



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0096350
(43) 공개일자 2017년08월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7048 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 31/192 (2006.01) A61K 31/215 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/7048 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0017625

(22) 출원일자 2016년02월16일

심사청구일자 2016년02월16일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

윤태영

서울특별시 중랑구 공릉로18길 59, 101동 804호
(목동, 브라운스톤태릉아파트)

이지윤

서울특별시 중랑구 공릉로18길 59, 103동 1204호
(목동, 브라운스톤태릉아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 하나

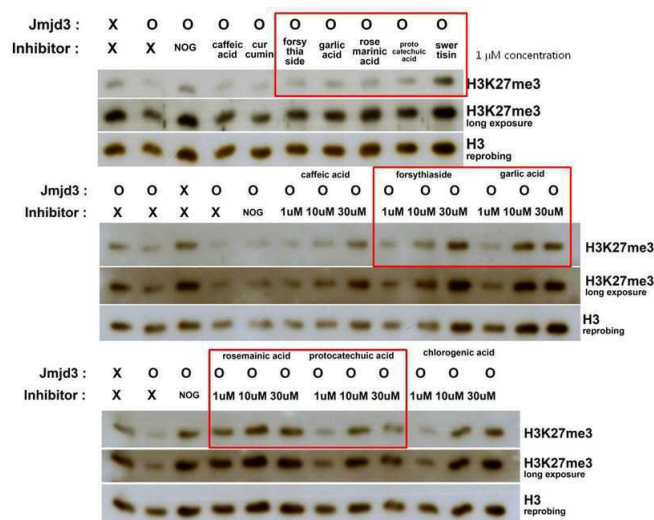
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 JMJD3 활성 억제제를 포함하는 신경병증성 통증의 완화용 조성물

(57) 요약

본 발명은 JMJD3 활성 억제제를 포함하는 신경병증성 통증의 완화용 조성물을 제공한다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 31/192 (2013.01)
A61K 31/215 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
G01N 33/5008 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
G01N 2500/04 (2013.01)

(72) 발명자

최혜영

서울특별시 중랑구 속선웅주로 91, 407동 703호 (목동, 신내아파트)

장대식

서울특별시 강남구 광평로10길 50, 106동 103호 (일원동, 청솔빌리지)

주봉건

경기도 고양시 일산동구 위시티4로 46, 202동 1201호 (식사동, 위시티2단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI13C1460
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	한국보건산업진흥원
연구사업명	질환극복기술개발사업
연구과제명	척수손상 후 그렐린/에스트로젠에 의한 척수혈관장벽 파괴 및 투과성 조절 연구
기 여 율	1/2
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2013.11.01 ~ 2016.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2015R1A2A2A01003795
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	중견핵심
연구과제명	JMJD3의 후성유전학적 MMP 발현조절을 통한 척수혈관장벽 파괴 및 신경변증성 통증 제어
연구	
기 여 율	1/2
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2015.05.01 ~ 2018.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

JMJD3 활성 억제제를 유효 성분으로 포함하는 신경병증성 통증의 완화용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

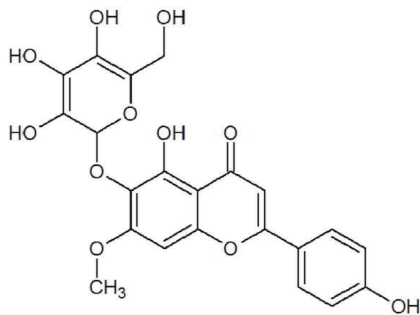
상기 JMJD3 활성 억제제는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 압타머, siRNA, shRNA, microRNA, 저해 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 저해 화합물은 하기 화학식 1의 화합물인 조성물.

[화학식 1]

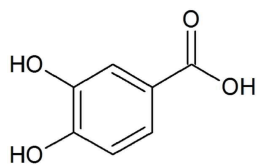


청구항 4

제2항에 있어서,

상기 저해 화합물은 하기 화학식 2의 화합물인 조성물.

[화학식 2]

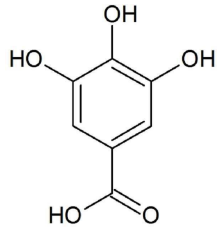


청구항 5

제2항에 있어서,

상기 저해 화합물은 하기 화학식 3의 화합물인 조성물.

[화학식 3]

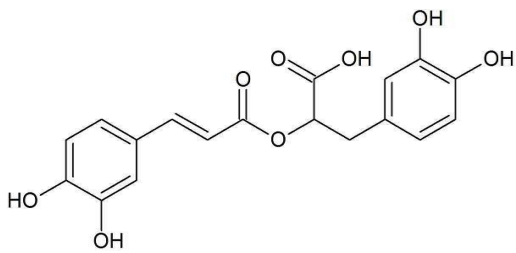


청구항 6

제2항에 있어서,

상기 저해 화합물은 하기 화학식 4의 화합물인 조성물.

[화학식 4]

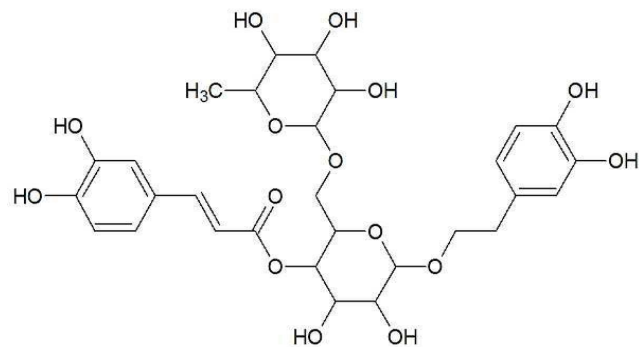


청구항 7

제2항에 있어서,

상기 저해 화합물은 하기 화학식 5의 화합물인 조성물.

[화학식 5]



청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 신경병증성 통증은 중추 신경의 손상에 의해 유도되는 조성물.

청구항 9

JMJD3 활성 억제제 또는 그의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는 신경병증성 통증의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 10

제9항에 있어서,

정제, 과립, 분말, 캡셀, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조된 건강기

능식품.

청구항 11

- (a) JMJD3을 발현하는 세포 및 시험 제제를 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 시험 제제의 JMJD3 발현에 대한 조절 효과를 결정하는 단계; 및
- (c) 상기 시험 제제와 접촉된 세포 및 상기 시험 제제와 접촉되지 않은 대조군에서 상기 JMJD3의 발현 수준을 비교하는 단계를 포함하는 신경병증성 통증의 치료제 스크리닝 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

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

청구항 13

JMJD3 활성 억제제를 비인간 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경병증성 통증의 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 JMJD3 활성 억제제를 포함하는 신경병증성 통증의 완화용 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 통증은 실질적인 또는 잠재적인 조직 손상이나 이와 관련하여 표현되는 감각적이고 정서적인 불유쾌한 경험을 의미하며, 삶을 위협하거나 강한 외부자극에 대한 방어기작으로 발생하는 생리적 반응 중 하나로서 위험에서 신체를 보호하는 중요한 역할을 수행한다.

[0003] 통증은 조직손상에 의한 침해성 통증(nociceptive pain)과 조직손상을 수반하지 않지만 신경계 이상반응으로 나타나는 신경병증성 통증(neuropathic pain)으로 구분된다. 침해성 통증은 조직손상에 의해 수반되는 염증반응과 밀접하게 관계가 있는 것으로 알려져 있으며 손상된 부위의 치유에 의해 자연적으로 소멸된다.

[0004] 신경병증성 통증은 외상(trauma)이나 염증, 허혈성 손상, 또는 대사산물 등 다양한 원인에 의해 신경계가 손상되었을 때 유발되는 만성적 신경질환이다(Gilron et al., 2006; Barn, 2006). 일반적으로 신경병증성 통증은 아무런 자극 없이 생기는 자발통(spontaneous pain) 및 외부자극에 의해 유발되는 통각과민(hyperalgesia) 또는 이질통(allodynia)등을 수반한다. 통각과민은 유해자극에 대한 비정상적인 통증반응으로 정의되며, 이질통은 무해한 자극에 의해 유발되는 통증반응으로 알려져 있다(Woolf and Mannion, 1999).

[0005] 특히 척수손상 환자는 완전한 혹은 부분적인 척수신경의 손상에 의해 약 70%가 몇 달 이내에 신경병증성 통증을 경험하며(Beric, 1997; Christensen and Hulsebosch, 1997; Yezierski. 1996 Yu et al., 2003), 신경병증성 통증은 궁극적으로 만성적인 신경병증성 통증으로 발전할 수 있다(Richards et al., 1980).

[0006] 척수손상에 의해 유발되는 통증은 크게 세 부위에서 나타나며, 손상 부위의 위쪽(rostral)에서 나타나는 통증인 above-level pain, 손상 부위와 가까운 부위 혹은 같은 분지(dermatome)에서 나타나는 통증인 at-level pain, 손상 부위의 아래쪽(caudal)에서 나타나는 통증인 below-level pain으로 구분된다(Siddall et al., 1997; Siddall and cousins, 1997). 척수손상에 의해 발생하는 통증은 경미한 저림에서 극심한 통증까지 그 양상이 다양하며, 대개 만성 통증으로 이어져 환자들에게 고통을 야기한다. 또한, 신경병증성 통증은 통증 자체뿐만 아니라 수면장애, 불안, 우울증과 같은 정신적 스트레스를 동반하기 때문에 환자의 삶의 질을 위협할 뿐만 아니라, 막대한 치료 비용(척수손상 환자 개인당 연간 2,500만원 소요)으로 인해 환자 및 가족을 넘어 심각한 사회, 경제적 문제로 대두되고 있다(Cairns et al., 1996; Segatore, 1994).

[0007] 신경병증성 통증은 기존의 진통제로는 통증을 완화시키기 어려운 것으로 알려져 있다. 신경병증성 통증 억제제는 칼슘채널에 작용하는 가바펜틴(Gabapentin), 프리가발린(Pregabalin)과 같은 항경련제, 나트륨 채널에 작용하는 카바마제핀(Carbamazepine)과 같은 항경련제; SNRI(Serotonin Norepinephrine Reuptake Inhibitor) 계열

항우울제; 응급 시에만 사용되는 아편류 등의 4가지 계열이 임상적으로 사용되고 있다.

- [0008] 신경병증성 통증에 사용되는 약물들은 임상에서 대부분 병용되지만 모두 유사한 부작용을 야기하므로 경우에 따라 부작용이 악화될 수 있는 반면 치료 효과는 저조한 문제가 있다. 현재까지 다양한 진통제 또는 진통방법의 발전에도 불구하고 신경병증성 통증 여전히 심각한 통증을 경험하고 있는 점에 비추어 볼 때 신경병증성 통증의 유발기전이 확실히 정립되지 않았을 뿐만 아니라, 기존의 진통제에 의해 신경병증성 통증이 적절하게 치료될 수 없음을 반증한다.
- [0009] 한편, 히스톤 메틸화는 히스톤 단백질의 라이신 및 아르기닌 잔기에서 나타나는 메틸화를 의미하며, 각각의 잔기는 3가지 다른 형태의 메틸화가 나타난다. 히스톤 메틸화의 형태에 따라 관련 유전자가 활성화 혹은 비활성화될 수 있다. 일반적으로 H3K9, H3K27 및 H4K20에 존재하는 라이신의 메틸화는 유전자를 불활성화 시키고, H3K4, H3K36 및 H3K79에 존재하는 라이신의 메틸화는 유전자 활성을 촉진시킨다.
- [0010] H3K27-메틸 마크(methyl mark)에 의한 전사 억제는 LC(lineage-committed) 전구세포(progenitor cells)에서 LS(lineage-specific) 유전자들을 전사의 발현을 조절한다(Mikkelsen et al., 2007). H3K27me3는 ES(embryonic stem) 세포의 다능성(pluripotency) 및 배발생 동안의 가소성(plasticity), 폴리콤-매개 유전자 사일런싱(Polycomb-mediated gene silencing), X 염색체 불활성에 중요한 역할을 한다(Schuettengruber et al., 2007; Boyer et al., 2006; Sparmann and van Lohuizen, 2006; Lee et al., 2006; Trojer et al., 2006).
- [0011] 폴리콤 복합체(Polycomb complex: PRC2) 단백질들에 의해 H3K27은 메틸화되며, H3K27me는 발달 단계에서 유전자의 발현을 억제할 수 있다. 단백질의 27번째 라이신에 3개의 메틸화가 이루어지면(H3K27me3), 크로마틴의 응집에 의해 유전자의 발현이 억제된다. H3K27me3은 발생 운명 결정 및 세포 성장 조절에 중요한 역할을 한다(Sparmann and van Lohuizen, 2006). 최근 H3K27me의 메틸 마크를 제거하는 H3K27-특이적 탈메틸효소인 JmjC-도메인 단백질인 UTX와 JMJD3가 보고된 바 있다(Agger et al., 2007; De Santa et al., 2007; Lan et al., 2007; Lee et al., 2007).
- [0012] JMJD3는 신경 세포의 성숙이나 면역 세포의 분화 등 다양한 생물학적 경로에 관여하는 것으로 알려진 바 있다. 그러나, JMJD3의 세포 유지 및 분화와의 밀접한 관련성에도 불구하고 신경병증성 통증, 중추 신경의 손상에 의해 유발되는 신경병증성 통증과의 관계는 규명된 바가 없으며, 이를 표적으로 하여 특정 질병을 치료하고자 하는 시도는 이루어지지 않았다.
- [0013] 본 발명자들은 신경병증성 통증 및 JMJD3 유전자 간의 상호 관련성을 규명하였으며, 상기 이해를 바탕으로 신경병증성 통증에 대한 근본적인 치료 방법을 제공하고자 하였다.

발명의 내용

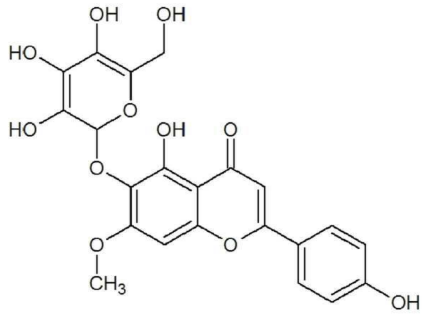
해결하려는 과제

- [0014] 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 JMJD3 단백질 및 신경병증성 통증 간의 상관관계를 명확하게 규명하고, 신경병증성 통증의 근본적인 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명의 일 측면에 따르면, JMJD3 활성 억제제를 유효 성분으로 포함하는 신경병증성 통증의 완화용 조성물이 제공된다.
- [0016] 일 실시예에 있어서, 상기 JMJD3 활성 억제제는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 압타머, siRNA, shRNA, microRNA, 저해 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.
- [0017] 일 실시예에 있어서, 상기 저해 화합물은 하기 화학식 1의 화합물일 수 있다.

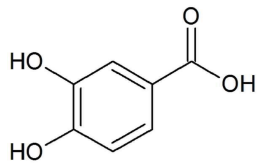
[0018] [화학식 1]



[0019]

[0020] 일 실시예에 있어서, 상기 저해 화합물은 하기 화학식 2의 화합물일 수 있다.

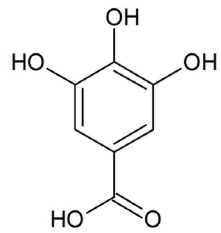
[0021] [화학식 2]



[0022]

[0023] 일 실시예에 있어서, 상기 저해 화합물은 하기 화학식 3의 화합물일 수 있다.

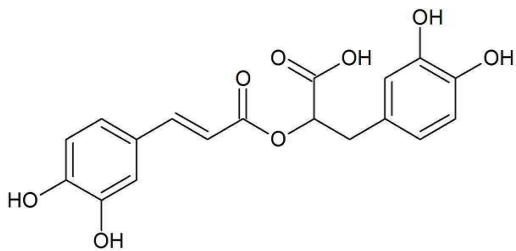
[0024] [화학식 3]



[0025]

[0026] 일 실시예에 있어서, 상기 저해 화합물은 하기 화학식 4의 화합물일 수 있다.

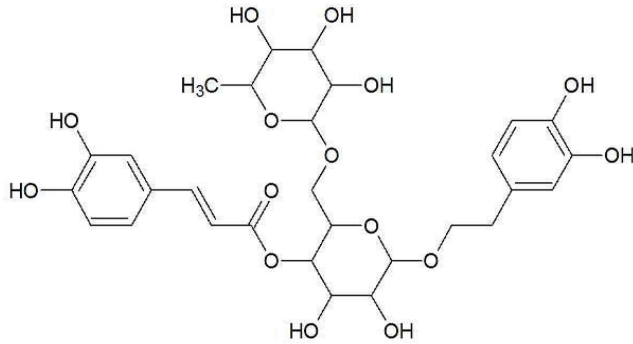
[0027] [화학식 4]



[0028]

[0029] 일 실시예에 있어서, 상기 저해 화합물은 하기 화학식 5의 화합물일 수 있다.

[0030] [화학식 5]



[0031]

[0032] 일 실시예에 있어서, 상기 신경병증성 통증은 중추 신경의 손상에 의해 유도될 수 있다.

[0033] 본 발명의 다른 측면에 따르면, JMJD3 활성 억제제 또는 그의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는 신경병증성 통증의 예방 또는 개선용 건강기능식품이 제공된다.

[0034] 일 실시예에 있어서, 상기 건강기능식품은 정제, 과립, 분말, 캡슐, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있다.

[0035] 본 발명의 다른 측면에 따르면, (a) JMJD3을 발현하는 세포 및 시험 제제를 접촉시키는 단계; (b) 상기 시험 제제의 JMJD3 발현에 대한 조절 효과를 결정하는 단계; 및 (c) 상기 시험 제제와 접촉된 세포 및 상기 시험 제제와 접촉되지 않은 대조군에서 상기 JMJD3의 발현 수준을 비교하는 단계를 포함하는 신경병증성 통증의 치료제 스크리닝 방법이 제공된다.

[0036] 일 실시예에 있어서, 상기 시험 제제는 폴리펩티드, 소 유기 물질(Small organic molecule), 다당류(Polysaccharide), 및 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0037] 본 발명의 다른 측면에 따르면, JMJD3 활성 억제제를 비인간 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경병증성 통증의 치료 방법이 제공된다.

발명의 효과

[0038] 본 발명은 JMJD3의 분자적 기작에 대한 명확한 이해를 바탕으로 효과적으로 신경병증성 통증을 완화하는 방법을 제공하며, 중추 신경의 손상에 의해 유발되는 신경병증성 통증에 대한 치료, 예방, 진단 또는 그 연구 등에 유용하게 활용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 JMJD3 억제제로 알려진 GSK-J4를 이용하여 JMJD3의 저해 및 중추 신경병증성 통증 간의 상관관계를 규명한 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물의 JMJD3 억제 효과를 확인한 것이다.

도 3은 스웰티신(Swertisin)의 중추 신경병증성 통증의 완화 효과를 확인한 것이다.

도 4는 프로토크테퀴산(Protocatechuic acid)의 중추 신경병증성 통증의 완화 효과를 확인한 것이다.

도 5는 갈산(Gallic acid)의 중추 신경병증성 통증의 완화 효과를 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

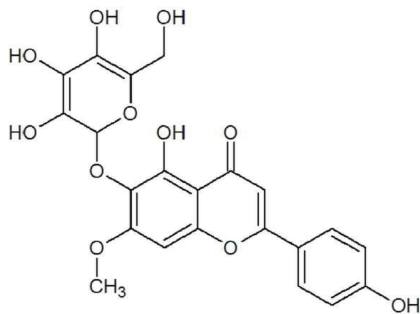
- [0042] 달리 정의되지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 단백질 정제, 단백질 공학, 및 DNA 서열 분석 및 당업자의 능력 범위 안에서 재조합 DNA 분야에서 흔히 사용되는 통상적인 기술에 의해 수행될 수 있다. 상기 기술들은 당업자에게 알려져 있고, 많은 표준화된 교재 및 참고저서에 기술되어 있다.
- [0043] 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용가능하다. 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실행 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 또한, 달리 지시된 바가 없으면, 핵산은 각각 왼쪽에서 오른쪽, 5'에서 3' 방향으로 썬여지고, 아미노산 서열은 왼쪽에서 오른쪽, 아미노에서 카복실 방향으로 썬여진다.
- [0045] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0047] 본 발명의 일 측면에 따르면, JMJD3 활성 억제제를 유효 성분으로 포함하는 신경병증성 통증의 완화용 조성물이 제공된다.
- [0048] 상기 "신경병증성 통증"은 IASP에 의해 신경계의 일차적인 손상 또는 기능장애에 의해 개시되거나 유발된 통증으로 규정될 수 있다(IASP, Classification of chronic pain, 2nd Edition, IASP Press(2002), 210).
- [0049] 상기 신경병증성 통증은 말초 신경 손상 또는 중추 신경 손상에 의해서 유도될 수 있으며, 말초신경계 이상 또는 손상, 및 척수신경 손상을 포함한 다발성경화증, 삼차 신경통(trigeminal neuralgia), 당뇨병성 신경장애(diabetes neuropathy), 환지통(phantom limb pain), HIV 감염, 암, 알코올 중독, 암 치료인 약물치료(chemotherapy)후에 오는 통증, 비정형 안면통증(atypical facial pain), 포진성 신경통(post herpetic neuralgia), 및 신경학적 장애로부터 야기되는 신경병증성 통증을 포함할 수 있으나, 바람직하게는 중추 신경의 손상에 의해 유도되는 신경병증성 통증일 수 있다.
- [0050] 상기 "중추 신경의 손상에 의해 유도되는 신경병증성 통증"은 중추신경계의 일차 손상, 기능장애 또는 일시적인 혼란에 의해 개시되거나 유발되는 신경병증성 통증을 의미하며, 상기 중추신경계는 뇌 및 척수가 없는 신경계로서 규정될 수 있다(Abbadie C., 2005). 말초 신경 및 중추 신경 손상에 의해 유도되는 신경병증성 통증과 관련된 증상 및 차이점은 선행문헌에 의해 상세히 보고된 바 있다(Jensen et al., 2003; Klein et al., 2005).
- [0051] 상기 "완화"는 상기 조성물의 투여로 신경병증성 통증이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0052] 상기 "활성 억제제"는 상기 JMJD3의 발현을 억제하거나 활성을 저하시켜 상기 JMJD3 단백질이 관여하는 생물학적 경로를 차단하거나 지연시키는 물질을 의미할 수 있다.
- [0053] 상기 JMJD3 활성 억제제는 상기 JMJD3과 상화 작용하여 활성을 억제할 수 있으면 족하고, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 압타머, siRNA, shRNA, microRNA, 저해 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0054] 상기 "항체"는 단일클론항체 및 이에 대한 키메라 항체, 인간화 항체 및 인간 항체를 모두 포함하는 것이고, 신규한 항체 외에 이미 당해 기술분야에서 공지된 항체들도 포함할 수 있다. 상기 항체는 JMJD3 단백질을 특이적으로 인식하는 결합의 특성을 갖는 한, 2개의 중쇄와 2개의 경쇄의 전체 길이를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 항체의 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 또는 Fv일 수 있다.
- [0055] 상기 "siRNA"는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성될 수 있다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법 또는 유전자 치료 방법으로 제공될 수 있다. 상기 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. siRNA 말단 구조는 표적 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의해 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 또는 점착(cohesive) 말단 모두 가

능하다. 접착 말단 구조는 3' 말단 돌출한 구조와 5' 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 또한 siRNA는 표적 유전자의 발현 억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 한쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예컨대, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA 분자 또는 인공의 RNA 분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단 구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중 사슬 RNA 일반의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스텝 루프형 구조일 수도 있다. 본 발명에 따른 siRNA는 그 자체로 폴리뉴클레오타이드 페어링을 갖는 완전한 형태, 즉 시험관 내에서 siRNA를 직접 합성한 두 형질전환 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태이거나, 생체 내에 투여된 후 이러한 형태를 갖도록 하나의 단일쇄 올리고뉴클레오타이드 단편과 이의 역방향(reverse) 상보물이 스페이서에 의해 분리된 단일쇄 폴리뉴클레오타이드로부터 유도될 수 있는 형태, 예를 들면 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-유도된 siRNA 발현 카세트를 형질전환 또는 감염(infection) 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태일 수 있다.

[0056] 상기 “shRNA”는 siRNA의 고가의 생합성 비용, 낮은 세포 형질감염 효율로 인한 RNA 간섭 효과의 단시간 유지 등의 단점을 극복하기 위한 것으로 RNA 중합효소 III의 프로모터로부터 아데노 바이러스, 렌티 바이러스 및 플라스미드 발현 벡터 시스템을 이용하여 이를 세포 내로 도입하여 발현시킬 수 있으며, 이러한 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소(Dicer or Rnase III)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 목적 유전자의 사일런싱을 유도함이 널리 알려져 있다.

[0057] 일 실시예에 있어서, 상기 저해 화합물은 하기 화학식 1의 화합물일 수 있다.

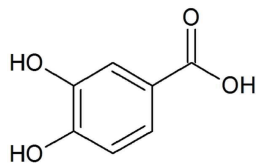
[0058] [화학식 1]



[0059] 상기 화학식 1의 화합물은 5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxy-6-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]chromen-4-one으로 명명될 수 있다. 상기 화합물은 통상적으로 스웰티신(Swertisin)으로 호칭되며, 자주쓴풀 등 식물류에 유효성분으로 함유되어 있다.

[0061] 일 실시예에 있어서, 상기 저해 화합물은 하기 화학식 2의 화합물일 수 있다.

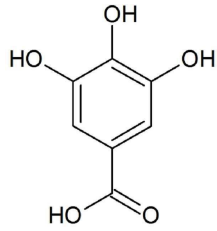
[0062] [화학식 2]



[0063] 상기 화학식 2의 화합물은 3,4-dihydroxybenzoic acid으로 명명될 수 있다. 상기 화합물은 통상적으로 프로토크테퀴산(Protocatechuic acid)으로 호칭되며, 녹차, 복분자 등 식물에서 유래할 수 있다.

[0065] 일 실시예에 있어서, 상기 저해 화합물은 하기 화학식 3의 화합물일 수 있다.

[0066] [화학식 3]

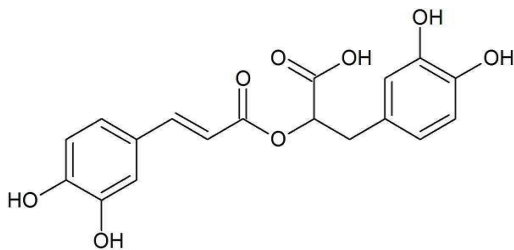


[0067]

[0068] 상기 화학식 3의 화합물은 3,4,5-trihydroxybenzoic acid으로 명명될 수 있다 상기 화합물은 통상적으로 갈산(Gallic acid)으로 호칭되며, 녹차, 단풍잎돼지풀 등 식물에서 유래할 수 있다.

[0069] 일 실시예에 있어서, 상기 저해 화합물은 하기 화학식 4의 화합물일 수 있다.

[0070] [화학식 4]

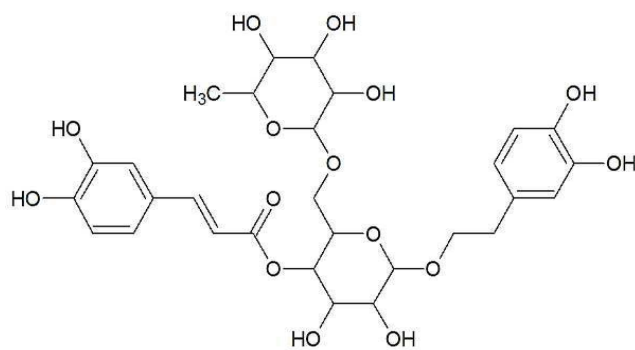


[0071]

[0072] 상기 화학식 4의 화합물은 (2R)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxypropanoic acid로 명명될 수 있다 상기 화합물은 통상적으로 로즈마리산(Rosmarinic acid)으로 호칭되며, 들깨잎, 보리지 등 식물에서 유래할 수 있다.

[0073] 일 실시예에 있어서, 상기 저해 화합물은 하기 화학식 5의 화합물일 수 있다.

[0074] [화학식 5]



[0075]

[0076] 상기 화학식 5의 화합물은 [(2R,3S,4R,5R,6R)-6-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy]-4,5-dihydroxy-2-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-3-yl] (E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoate으로 명명될 수 있다 상기 화합물은 통상적으로 포르시티아사이드(Forsythiaside)로 호칭되며, 의성개나리, 당개나리 등 식물의 과실에서 유래할 수 있다.

[0077] 본 발명의 다른 측면에 따르면, JMJD3 활성 억제제를 비인간 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경병증성 통증의 치료 방법이 제공된다.

[0078] 상기 JMJD3 활성 억제제는 경구적 전달, 비경구적 전달의 형태로 투여될 수 있다. 상기 조성물은 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 예컨대, 경구 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강 내 투여, 경막 내 투여가 이루어질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0079] 상기 JMJD3 활성 억제제는 적절한 투여 형태를 제공하도록 적합한 양의 약학적으로 허용되는 비히클 또는 담체와 함께 제형화 될 수 있으며, 약학 조성물의 제조에 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

- [0080] 상기 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0081] 또한, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화 하여 사용할 수 있다.
- [0082] 상기 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 들깨오일 유래의 알파-리놀렌산과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제, 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 혼합하여 조제할 수 있다. 상기 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.
- [0083] 상기 경구 투여를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0084] 상기 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 사용될 수 있다. 상기 비수성용제, 현탁제는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르가 사용될 수 있다. 상기 좌제의 기제는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴이 사용될 수 있다.
- [0085] 상기 JMJD3 활성 억제제를 유효 성분으로 포함하는 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양이 대상체에 투여될 수 있다. 상기 “약제학적으로 유효한 양”은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0086] 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 바람직하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0088] 본 발명의 다른 측면에 따르면, JMJD3 활성 억제제 또는 그의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는 신경병증성 통증의 예방 또는 개선용 건강기능식품이 제공된다.
- [0089] 상기 건강기능식품은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미할 수 있으며, 상기 기능성은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미할 수 있으나, 건강의 개선을 위한 목적으로 섭취하는 식품이라면 그 종류가 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0090] 일 실시예에 있어서, 상기 건강기능식품은 정제, 과립, 분말, 캡슐, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0091] 상기 건강기능식품은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, 상기 기능성은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미할 수 있다.
- [0092] 상기 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 식품 첨가물은 다른 규정이 없는 한 식품의약품 안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 적합성 여부를 판단할 수 있다. 상기 식품 첨가물 공전에 기재된 품목은 예컨대 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연 첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류를 들 수 있다.
- [0093] 상기 건강기능식품은 동맥 혈전증 및 정맥 혈전증을 포함하는 혈전증 관련 질환 예방 또는 개선을 위한 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있으며, 예컨대, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 보조

식품, 식품 첨가제 등에 사용될 수 있다.

- [0094] 상기 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 식품 첨가물은 다른 규정이 없는 한 식품의약품 안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 적합성 여부를 판단할 수 있다. 상기 식품 첨가물 공전에 기재된 품목은 예컨대 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류를 들 수 있다.
- [0095] 상기 건강기능식품은 신경병증성 통증 관련 질환의 예방 또는 개선을 위한 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있으며, 예컨대, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 보조 식품, 식품 첨가제 등에 사용될 수 있다.
- [0096] 상기 건강기능식품은 신경병증성 통증의 예방 또는 개선을 목적으로, 전체 중량 대비 1.0 내지 10.0 중량%의 JMJD3 활성 억제제를 포함할 수 있다. 상기 JMJD3 활성 억제제가 1.0 중량% 미만이면 신경병증성 통증의 개선 효과가 충분히 구현되지 않을 수 있고 10.0 중량% 초과이면 제품 본연의 품질이 구현되지 않거나 비용 효율이 저하되고 예측되지 아니한 부작용을 유발할 수 있다.
- [0097] 또한, 상기 건강기능식품은 신경병증성 통증의 예방 또는 개선을 목적으로 정제, 과립, 분말, 캡셀, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조 및 가공될 수 있다.
- [0098] 구체적으로 상기 정제 형태의 건강기능식품은 JMJD3 활성 억제제, 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와의 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 후, 활택제 등을 넣어 압축 성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.
- [0099] 상기 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질캡셀제는 통상의 경질캡셀에 JMJD3 활성 억제제 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질캡셀제는 JMJD3 활성 억제제 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 솔비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0100] 상기 환 형태의 건강기능식품은 JMJD3 활성 억제제, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.
- [0101] 상기 과립형태의 건강기능식품은 JMJD3 활성 억제제, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.
- [0102] 또한, 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함할 수 있다.
- [0104] 본 발명의 다른 측면에 따르면, (a) JMJD3을 발현하는 세포 및 시험 제제를 접촉시키는 단계; (b) 상기 시험 제제의 JMJD3 발현에 대한 조절 효과를 결정하는 단계; 및 (c) 상기 시험 제제와 접촉된 세포 및 상기 시험 제제와 접촉되지 않은 대조군에서 상기 JMJD3의 발현 수준을 비교하는 단계를 포함하는 신경병증성 통증의 치료제 스크리닝 방법이 제공된다.
- [0105] 상기 “접촉”은 통상적인 의미로서, 2개 이상의 제제(예: 2개의 폴리펩티드)를 결합(combine)시키거나, 제제와 세포(예; 단백질과 세포)를 결합시키는 것을 의미할 수 있다. 예컨대, 시험관(test tube) 또는 다른 컨테이너(container)에서 2개 이상의 제제를 결합시키거나 시험 제제와 세포 또는 세포 용해물과 시험 제제를 결합시킬 수 있으며, 2개의 폴리펩티드를 암호화하는 재조합 폴리뉴클레오티드를 세포 내에서 공동발현(coexpresion)시킴으로써 세포 또는 세포 용해물에서 2개의 폴리펩티드를 접촉시킬 수 있다.
- [0106] 상기 “제제(agent)” 또는 “시험 제제(test agent)”는 임의의 물질(substance), 분자(molecule), 원소(element), 화합물(compound), 실체물(entity) 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 예컨대, 단백질, 폴리펩티드, 소 유기 물질(small organic molecule), 다당류(polysaccharide), 폴리뉴클레오티드 등을 포함할 수 있으며, 자연 산물(natural product), 합성 화합물 또는 화학 화합물 또는 2개 이상의 물질의 조합일 수 있다. 달리

정의되지 않는 한, 상기 제제, 물질 및 화합물은 상호 교환적(interchangeably)으로 사용할 수 있다.

- [0107] 상기 스크리닝 방법은 당업계에 공지된 다양한 생화학적 및 분자생물학적 기술을 이용할 수 있으며[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y., Second(1998) and Third(2000) Editions; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York(1987-1999)], 예컨대, 시험관 내 단백질-단백질 결합 어세이(시험관 내 풀-다운 어세이), EMSA, 단백질 결합을 위한 면역 어세이, 기능적 어세이(인산화 어세이 등), 효모-2 하이브리드 어세이, 비면역 침전 어세이, 면역침전 웨스턴 블랏 어세이, 면역-공동-위치화 어세이 등 당업계에 공지된 다양한 방법으로 수행될 수 있다.
- [0108] 상기 스크리닝에 사용되는 화합물은 치료효과를 보유한 저분자량의 화합물일 수 있다. 예컨대, 상기 저분자량의 화합물은 중량이 400Da, 600Da 또는 800Da과 같이 약 1000Da 내외일 수 있다. 목적에 따라 상기 화합물은 화합물 라이브러리의 일부를 구성할 수 있으며, 라이브러리를 구성하는 화합물의 개수도 수십개부터 수백만개까지 상이할 수 있다. 상기 화합물 라이브러리는 펩타이드, 펩토이드 및 기타 환형 또는 선형의 올리고머성 화합물, 및 주형을 기본으로 하는 저분자 화합물, 예컨대 벤조디아제핀, 하이단토인, 바이아릴, 카보 사이클 및 폴리사이클 화합물(예컨대 나프탈렌, 페노티아진, 아크리딘, 스테로이드 등), 카보하이드레이트 및 아미노산 유도체, 디하이드로피리딘, 벤즈하이드릴 및 헤테로사이클(예컨대 트리아진, 인돌, 티아졸리딘 등)을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0109] 또한, 상기 스크리닝 방법에는 바이올로지스가 사용될 수 있다. 상기 바이올로지스는 세포 또는 바이오 분자를 일컫는 것으로, 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질 또는 생체 내 및 생체 외에서 세포 시스템 등을 이용하여 생산된 물질을 의미한다. 상기 바이오분자는 단독으로 또는 다른 바이오분자 또는 세포와 조합되어 사용될 수 있다. 상기 바이오분자는 예컨대, 폴리뉴클레오타이드, 펩타이드, 항체, 또는 기타 혈장에서 발견되는 단백질 또는 생물학적 유기물질을 포함할 수 있다.
- [0110] 상기 스크리닝 방법에 사용되는 세포의 종류 및 농도와 시험물질의 양 및 종류 등은 사용하는 구체적인 실험 방법 및 시험 제제의 종류에 따라 상이해질 수 있으며, 당업자라면 적절한 양을 선택할 수 있을 것이다. 실험결과 시험 제제와 접촉되지 않은 대조군과 비교하여 시험물질의 존재하에서 JMJD3의 활성을 증가 또는 억제시키는 물질을 후보 물질로 선별할 수 있다. 상기 대조군과 비교하여 약 99% 이하 감소, 약 95% 이하 감소, 약 90% 감소, 약 85% 감소, 약 80%감소, 약 75% 감소, 약 70% 감소, 약 65% 이하 감소, 약 60% 이하 감소, 약 55% 감소, 약 50% 이하 감소, 45% 이하 감소를 의미하나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.
- [0111] 일 실시예에 따르면, 1차적으로 상기 시험 제제가 JMJD3의 생물학적 활성을 조절하는 능력이 있는지 어세이할 수 있다. 구체적으로, 상기 1차 어세이는 시험 제제의 존재 하에서 분리된 JMJD3의 생물학적 활성을 분석하여 상기 폴리펩티드의 생물학적 활성을 조절하는 조절 제제(modulating agent)를 규명할 수 있다.
- [0112] 상기 1차 어세이는 JMJD3의 여러 생물학적 활성에 대한 조절이 어세이될 수 있다. 예컨대, 시험 제제는 JMJD3의 발현 수준, 예컨대, 전사 또는 번역을 조절하는 활성이 있는지 어세이될 수 있다. 또한 상기 시험 제제는 JMJD3의 세포 내 수준 또는 안정성, 예컨대 번역 후 수식(post-translational modification) 또는 가수분해를 조절하는 활성이 있는지 어세이될 수 있다.
- [0113] 상기 1차 어세이를 통해 JMJD3의 생물학적 활성과 관련된 조절 제제를 규명한 후, 상기 시험 제제가 신경병증성 통증을 완화할 수 있는지 2차적으로 시험할 수 있다 예컨대, 상기 시험 제제는 신경병증성 통증의 예방 또는 치료 활성이 있는지 더욱 시험될 수 있다.
- [0114] 상기 1차 및 2차 어세이는 변하지 않은(intact) JMJD3 및 이의 단편, 아날로그, 또는 기능적 동등물을 사용할 수 있다. 이들 어세이에 사용될 수 있는 단편은 일반적으로 JMJD3의 생물학적 활성을 하나 이상 보유할 수 있다. 또한, 상기 단편 또는 아날로그를 포함하는 융합 단백질이 시험 제제를 위한 스크리닝에 사용될 수 있다. 상기 JMJD3의 기능적 동등물은 아미노산 결실, 삽입, 또는 치환을 포함하나 JMJD3와 동일한 생체활성을 보유하는 것이므로 본 발명의 스크리닝 방법을 실시하는데 사용될 수 있다.
- [0115] 당업계에 통상적으로 실시되고 있는 다양한 어세이들이 JMJD3를 조절하는 제제를 확인하는데 사용될 수 있다. 바람직하게, 상기 제제는 세포 기반 어세이 시스템(cell based assay system)으로 스크리닝될 수 있다. 예컨대, 스크리닝하기 위한 전형적인 세포 기반 어세이(즉, 2차 어세이)에서, 시험 제제의 존재 하에서 리포터 유전자 활성(예: 효소 활성)을 측정하고, 이를 시험 제제의 부재 하에서의 리포터 유전자의 활성과 비교할 수 있다.
- [0116] 상기 리포터 유전자는 당업계에 공지된 임의의 검출 가능한 폴리펩티드(반응 또는 리포터 폴리펩티드), 예컨대,

형광 또는 인광(phosphorescence)에 의해 검출가능한 폴리펩티드나 그것이 보유하고 있는 효소 활성화에 의해 검출 가능한 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 검출 가능한 반응 폴리펩티드(detectable reponse polypeptide)는, 예컨대, 루시페라제, 알파-글루쿠로니다제(glucuronidase), 알파-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 전이효소, 녹색 형광 단백질, 강화된 녹색 형광 단백질 및 인간 분비된 알칼린 인산화 효소일 수 있다.

[0117] 상기 세포 기반 어세이에서, 시험 제제(예: 펩티드 또는 폴리펩티드)는 숙주세포 내에 존재하는 다른 벡터에 의해 발현될 수 있다. 어떤 방법에서는, 시험 제제의 라이브러리가 상기 벡터의 라이브러리(예: cDNA 라이브러리)에 의해 암호화될 수 있다. 상기 라이브러리는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제조할 수 있으며(Sambrook et al. and Ausubel et al., supra), 또는 다양한 상업적인 출처로부터 얻어질 수 있다.

[0118] 상기 세포-기반 어세이 이외에, 비-세포 기반 방법에 의해서도 스크리닝될 수 있다. 상기 방법은, 예컨대, 모빌리티 쉬프트 DNA 결합 어세이(mobility shift DNA-binding assays), 메틸화 및 우라실 간섭 어세이(methylation and uracil interference assays), DNase 및 히드록시 라디칼 풋프린팅 분석(DNase and hydroxyl radical footprinting analysis), 형광 편광(fluorescence polarization) 및 UV 교차결합(crosslinking) 또는 화학적 가교제(cross-linkers)를 포함할 수 있다. 일반적인 개요는 Ausubel 등의 문헌에 개시되어 있다(Ausubel et al., supra, chapter 12, DNA-Protein Interaction). 핵산 및 DNA/RNA 결합 단백질을 포함하는 공동-결합된 단백질(co-associating protein)을 분리하는 기술은 절단가능한 가교제 디티오비스(dithiobis; succinimidylpropionate) 및 3,3'-디티오비스(sulfosuccinimidyl-propionate)를 포함하는 UV 교차 결합 또는 화학적 가교제를 포함할 수 있다(McLaughlin, Am. J. Hum. Genet., 1996; Tang, 1996; Lingner, 1996; Chodosh, 1986).

[0119] 이하에서는 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 실시예는 발명의 이해를 돕기 위함이며 발명의 보호범위가 하기의 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0121] 실험예 1 : 중추 신경병증성 통증 동물모델의 제작

[0122] 동물모델로서 7주령의 성체 수컷 래트(체중 220 내지 250g)를 사용하였다. 래트는 12시간 주기의 명암 사이클실에서 사육되었으며 물과 먹이는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 동물 실험은 경희대학교(Kyung Hee University) 동물 실험 지침을 준수하여 실시하였다.

[0123] 동물모델에 중추 신경병증성 통증을 유도하기 위하여 클로랄 하이드레이트(chloral hydrate, 500 mg/kg)를 복강 주입하여 마취한 후에 척수 T8-T10 부분을 노출시켰다. 척수손상 동물모델로서 10g 무게의 추를 일정 높이에서 떨어뜨려 인간 척수손상과 유사한 외상을 주고, 외상 강도는 컴퓨터에서 수치화할 수 있게 고안된 NYU impactor를 사용하여 제어하였다.

[0124] NYU impactor의 클램프에 래트를 고정시킨 후, 25 mm 높이에서 10 g 무게의 추를 자유 낙하시켜 척수 T9 부위를 손상시켰다. 컴퓨터에서 산출된 손상 강도에 대한 데이터를 통해 오차 범위 내에 일정한 손상이 가해진 것을 확인한 후 손상 부위를 봉합하였다. 손상 부위를 포비돈 용액으로 소독한 후 2마리씩 케이지(cage)에 넣어 사육하였으며, 하루 3회 인위적으로 방광을 마사지하여 배뇨를 촉진하였다.

[0126] 실험예 2 : 기계적 이질통(mechanical allodynia)의 측정

[0127] 척수가 손상된 동물모델에 대한 기계 자극을 부여하고 통증 변화를 측정하여, 신경병증성 통증의 감소나 완화 효과를 측정하였다.

[0128] 척수가 손상된 동물은 철망(3 mm × 3 mm) 위의 투명한 플라스틱 박스(10 cm × 10 cm) 하단에 위치시켰다. 각각 테스트 시작 전 적어도 20분 동안 적응기를 거치도록 하였다.

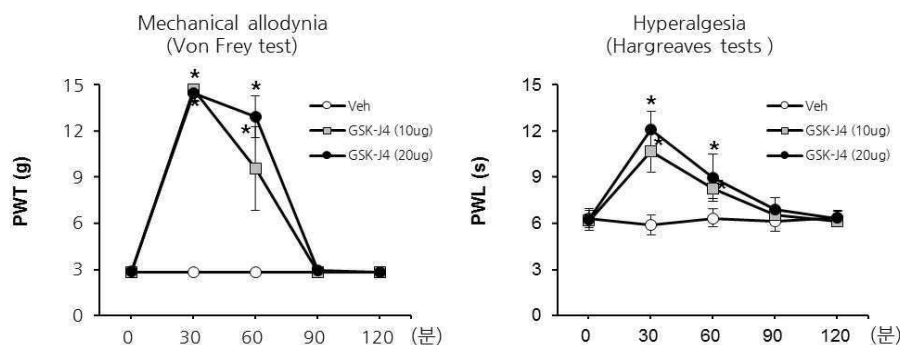
[0129] 본프레이 필라멘트(von-Frey filaments)는 양쪽 발바닥에 적용되었다. 촉각(기계적) 민감도는 로그로 증가되는 뿔뿔한 나일론 본프레이 단일 필라멘트 시리즈(3.61, 3.84, 4.08, 4.31, 4.56, 4.74, 4.93 and 5.18mN, Stoelting, WoodDale, IL, USA; equivalent in grams to 0.4, 0.6, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 and 15.0)를 사용하였다. 증가된 기계적 자극에 대한 발의 회피반응은 힘을 충분히 가함으로써 평가하였다. 본프레이 필라멘트는 완전히 구부러질 정도로 각 발에 3 내지 4초 동안 적용되었다. 50% 문턱값은 up-down 방법(Chaplan et al. 1994)을 사용하여 확인하였다.

- [0130] 0.4 내지 15 g의 8개 본프레이 필라멘트 가운데 중간인 2.0 g(4.31 mN)의 필라멘트를 처음으로 사용하였으며, 여러 부위에서 가장 민감한 부위를 확인하는 것으로 시작했다. 발의 회피반응이 나타나지 않는다면 그 다음 굵기의 필라멘트로 반복하였다. 회피반응이 나타나면 더 약한 필라멘트로 그 민감한 부위에 적용하였다. 자극은 2 초 간격으로 행하였다.
- [0131] 발바닥 자극에 의해 50% 회피반응을 보이는 von Frey hair의 그램(g)으로 나타내었으며, 양 발에서 모두 측정하여 평균값을 산출하였다. 척수손상 유발 전과 비교하여 통계적으로 유의하게 회피반응 역치가 감소한 것을 기계적 이질통이 발생한 것으로 판정하였다.
- [0133] 실험예 3 : 열 통각과민(heat hyperalgesia)의 측정
- [0134] 척수가 손상된 동물모델에 대한 열 자극을 부여하고 통증 변화를 측정하여, 신경병증성 통증의 감소나 완화 효과를 측정하였다.
- [0135] 통각과민에 대한 측정은 plantar test device(810 plantar test, IITC, USA)를 이용하여 Hargreaves 법으로 측정하였다(Hargreaves et al., 1988).
- [0136] 척수가 손상된 동물을 유리판 상단에 위치시키고 직사각형의 투명한 아크릴 박스로 밀폐시킨 후 20분간 적응기를 부여하였다. 유리판 하단에는 이동이 가능한 레이저 빔이 위치하며 실험동물의 발바닥 표면에 지속적으로 열을 가할 수 있다. 레이저 빔의 열 강도는 약 15초의 평균 발 회피 잠복기를 얻어서 조절되었으며 제한 시간은 조직 손상을 막기 위해 20초로 제한되었다. 3번의 열 자극이 5 내지 10분 간격으로 양쪽 발에 가해졌다. 세 번 시도한 각 발의 발 회피 잠복기의 평균 시간을 측정하였으며, 양쪽 발의 회피 시간을 측정하여 평균값을 산출하였다.
- [0138] 실험예 4 : JMJD3 및 중추 신경병증성 통증간의 상관관계 확인
- [0139] 실험예 1의 척수손상 동물모델을 이용하여 JMJD3 및 중추 신경병증성 통증 간의 상관관계를 확인하였다. JMJD3 및 중추 신경병증성 통증 간의 관련성을 확인하기 위하여 상기 JMJD3 억제제 투여에 따른 진통 효과를 관찰하였다.
- [0140] 척수손상 30일 경과 후 중추 신경병증성 통증이 유발된 동물모델에 JMJD3 억제제로 알려진 GSK-J4를 척수관 주사(intrathecal injection)하였으며, von frey test 및 Hargreaves test를 통하여 기계적 이질통(mechanical allodynia) 및 통각과민(hyperalgesia)을 측정하였다.
- [0141] 기계적 이질통 및 통각과민을 각각 측정한 결과 GSK-J4를 척수관 주사 30분 경과 후 진통 효과가 최대로 나타났으며, 90분 내지 120분 동안 진통 효과가 이어졌다(도 1).
- [0142] 상기 결과는 JMJD3의 활성 및 신경병증성 통증은 상호 밀접한 관련성이 있으며, JMJD3 활성을 하향 조절함으로써 신경병증성 통증이 완화되거나 개선될 수 있음을 시사한다.
- [0144] 실험예 5 : 특정 화합물의 JMJD3의 억제 효과 확인
- [0145] In vitro에서 히스톤(Histon)에 JMJD3를 첨가하면 H3K27을 탈메틸화되어 H3K27me의 수준이 감소하므로, H3K27me의 수준을 통해 간접적으로 JMJD3의 억제 효과를 확인하였다.
- [0146] 히스톤에 JMJD3과 스웰티신, 프로토카테큐산, 갈산, 로즈마리산, 포르시티아시드를 함께 개별적으로 첨가하고, H3K27me의 수준을 측정한 결과 H3K27me의 수준은 거의 감소하지 않았다(도 2). 즉, 상기 결과는 상기 화합물들이 JMJD3의 활성을 효과적으로 억제할 수 있음을 시사한다.
- [0148] 실험예 6 : 스웰티신(Swertisin)의 중추 신경병증성 통증 완화 효과 확인
- [0149] 척수손상 30일 경과 후 중추 신경병증성 통증이 유발된 동물모델에 스웰티신을 척수관 주사한 후 von frey test 및 Hargreaves test를 통하여 기계적 이질통(mechanical allodynia) 및 통각과민(hyperalgesia)을 측정하였다.

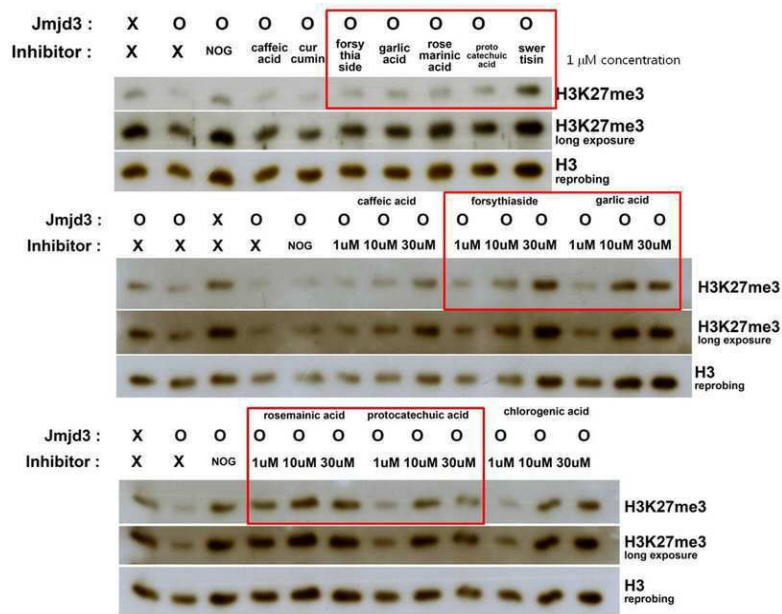
- [0150] 측정 결과, JMJD3 억제제로 알려진 GSK-J4과 유사하게 척수관 주사 30분 경과 후 진통 효과가 최대로 나타났으며, 약 90분 동안 진통 효과가 이어졌다(도 3).
- [0152] 실험예 7 : 프로토크테퀴산(Protocatechuic acid)의 중추 신경병증성 통증 완화 효과 확인
- [0153] 척수손상 30일 경과 후 중추 신경병증성 통증이 유발된 동물모델에 프로토크테퀴산을 복강 주사 (intraperitoneal injection) 한 후 von frey test 및 Hargreaves test를 통하여 기계적 이질통(mechanical allodynia) 및 통각과민(hyperalgesia)을 측정하였다.
- [0154] 측정 결과, JMJD3 억제제로 알려진 GSK-J4과 유사하게 복강 주사 30분 경과 후 진통 효과가 최대로 나타났으며, 약 90분 동안 진통 효과가 이어졌다(도 4).
- [0156] 실험예 8 : 갈산(Gallic acid)의 중추 신경병증성 통증 완화 효과 확인
- [0157] 척수손상 30일 경과 후 중추 신경병증성 통증이 유발된 동물모델에 갈산을 복강 주사한 후 von frey test 및 Hargreaves test를 통하여 기계적 이질통(mechanical allodynia) 및 통각과민(hyperalgesia)을 측정하였다.
- [0158] 측정 결과, JMJD3 억제제로 알려진 GSK-J4과 유사하게 복강 주사 30분 경과 후 진통 효과가 최대로 나타났으며, 약 120분 동안 진통 효과가 이어졌다(도 5).
- [0159] 상기 실험 결과는 스웰티신, 프로토크테퀴산, 갈산, 로즈마리산, 포르시티아시드가 JMJD3를 효과적으로 억제할 수 있으며, 중추 신경병증성 통증을 개선하기 위한 치료제로서 유용하게 활용될 수 있음을 시사한다.
- [0161] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [0162] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

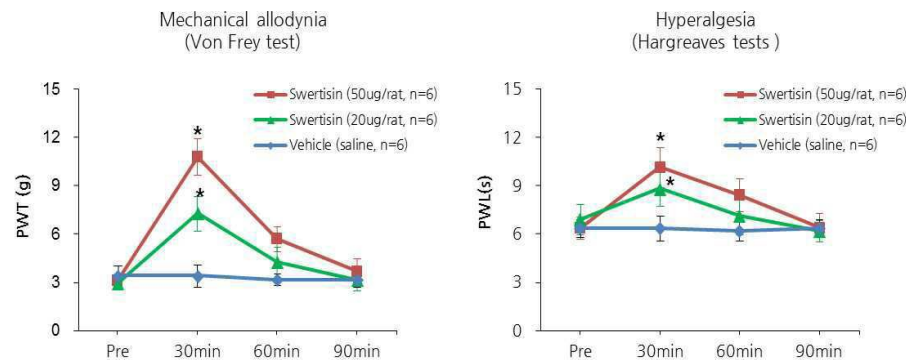
도면1



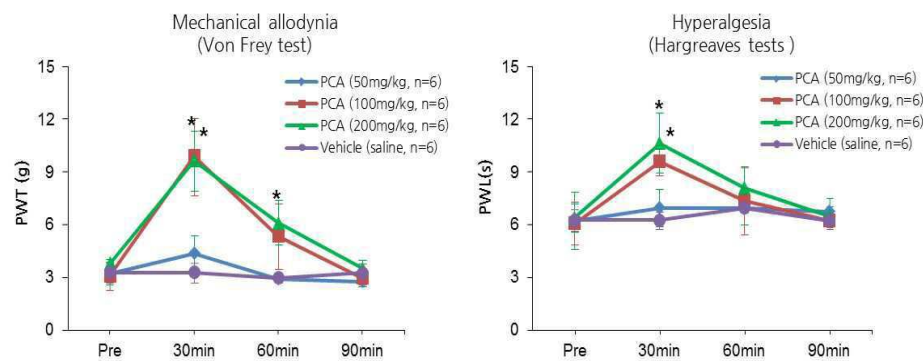
도면2



도면3



도면4



도면5

