

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2010년 5월 20일 (20.05.2010)



PCT



(10) 국제공개번호
WO 2010/055977 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 31/045 (2006.01) A61K 31/41 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2009/001796

(22) 국제출원일:

2009년 4월 7일 (07.04.2009)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2008-0113607 2008년 11월 14일 (14.11.2008) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 경상대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC CO-OPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 경상남도 진주시 가좌동 900, 660-701 Gyeongsangnam-do (KR).

(72) 발명자: 김

(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 김명옥 (KIM, Myeong Ok) [KR/KR]; 경상남도 진주시 호탄동 대동아파트 102 동 303 호, 660-788 Gyeongsangnam-do (KR). 박태주 (PARK, Tae Ju) [KR/US]; 위스콘신주 625 엠 드라 이브메디슨 위스콘신 메디슨대학교, 53706 WI (US).

임란나사르 (M.L. Naseer) [PK/KR]; 경상남도 진주시 가좌동 900, 660-701 Gyeongsangnam-do (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 서울 강남구 삼성동 159-9 도심공항타워 6 층, 135-973 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

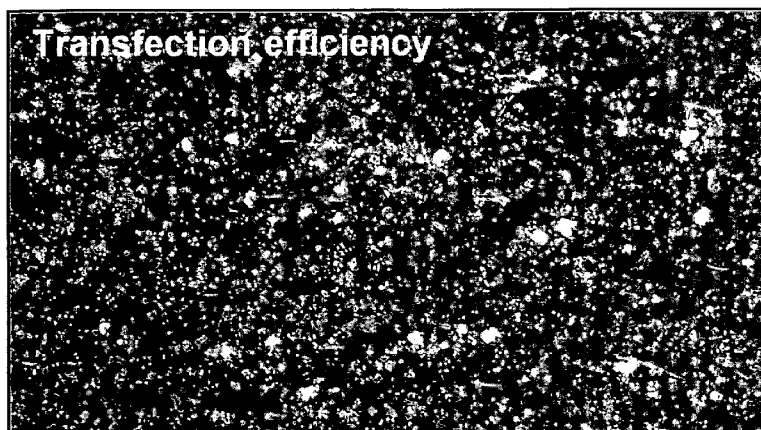
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR SCREENING THERAPEUTIC AGENT FOR NEURAL DISEASES USING GABA B RECEPTORS AND P-CREB

(54) 발명의 명칭 : G A B A B 수용체 및 p - C R E B를 이용한 신경 질환 치료제의 스크리닝 방법

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a method for suppressing the expression of GABA_{B1} receptors and p-CREB to treat neural diseases. More specifically, the present invention relates to an expression inhibitor of GABA_{B1} receptors and p-CREB that contains ethanol or PTZ (Pentylentetrazol). In addition, the present invention relates to a method for screening a therapeutic agent for neural diseases, a method for detecting GABA_{B1} receptors and p-CREB to diagnose neural diseases, and a method for suppressing the expression of GABA_{B1} receptors and p-CREB in an animal body using ethanol or PTZ. The method for screening the therapeutic agent comprises: a step of applying ethanol or PTZ to a sample; a step of suppressing the expression of the GABA_{B1} receptors and p-CREB; a step of confirming increase in the expression of GABA_{B1} receptors and p-CREB by treating a candidate material with the sample and a control group. The detection method is characterized by measuring the reduction in the expression of GABA_{B1} receptors and p-CREB in the sample.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2010/055977 A1



CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, **공개:**
TD, TG).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

규칙 4.17 에 의한 선언서:

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의
예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

본 발명은 신경 질환 치료를 위하여 $GABA_{B1}$ 수용체 및 p-CREB 의 발현을 억제시키는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 에탄올 또는 PTZ (Pentyleneetetrazol)를 포함하는 $GABA_{B1}$ 수용체 및 p-CREB 의 발현 저해제에 관한 것이다. 또한 본 발명은 검체에 에탄올 또는 PTZ 를 처리하는 단계; $GABA_{B1}$ 수용체 및 p-CREB 의 발현을 억제시키는 단계; 및 상기 검체 및 대조군에 후보 물질을 처리하여 $GABA_{B1}$ 수용체 및 p-CREB 의 발현 증가를 확인하는 단계를 포함하는 신경 질환 치료제의 스크리닝 방법, 검체 내의 $GABA_{B1}$ 수용체 및 p-CREB 의 발현 감소 정도를 측정하는 것을 특징으로 하는 신경 질환 진단을 위한 $GABA_{B1}$ 수용체 및 p-CREB 의 검출 방법 및 에탄올 또는 PTZ 를 이용하여 동물의 체내에서 $GABA_{B1}$ 수용체 및 p-CREB 의 발현을 저해시키는 방법에 관한 것이다.

명세서

G A B A B 수용체 및 p-C R E B를 이용한 신경 질환 치료제의 스크리닝 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 신경 질환에 관련된 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현을 억제시키는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 에탄올 또는 PTZ (Pentylentetrazol)를 포함하는 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현 저해제에 관한 것이다. 또한 본 발명은 검체에 에탄올 또는 PTZ를 처리하는 단계; GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현을 억제시키는 단계; 및 상기 검체 및 대조군에 후보 물질을 처리하여 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현 증가를 확인하는 단계를 포함하는 신경 질환 치료제의 스크리닝 방법, 검체 내의 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현 감소 정도를 측정하는 것을 특징으로 하는 신경 질환 진단을 위한 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 검출 방법 및 에탄올 또는 PTZ를 이용하여 동물의 체내에서 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현을 저해시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 신경전달물질 (neurotransmitter)이란 뇌를 비롯한 체내의 신경 세포에서 방출되어, 인접하고 있는 신경 세포 등에 정보를 전달하는 일련의 물질을 일컫는 용어이다. 이러한 신경전달 물질은 수십 종류가 발견되었는데, 크게 아미노산류 (아세틸콜린, 글리신, 아스파라긴산, 글루타메이트 (glutamate)), 아민류(도파민, 아드레날린(에피네프린), 노르아드레날린), 펩티드류 (바소프레신), 및 지방산류 (히스타민, 세로토닌) 등 4가지로 분류된다. 상기와 같은 여러가지 화학 물질들이 신경의 시냅스 (synapse)에서 분비되어 신경 세포 간 정보 전달에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 그 중, GABA (gamma-aminobutyric acid)는 아미노산 계열의 신경전달 물질로서, 억제성 (ingibitory) 시냅스 후 (post synaptic) 전위를 일으킨다. GABA는 이온성 효과를 내는 신경전달 물질 중 하나로서, 억제성 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 억제성 효과를 나타내는 GABA 수용체의 알려진 메카니즘은 GABA가 막에 있는 GABA 수용체에 결합하면, 염소 이온 통로 (Cl⁻ ion channel)가 열리면서 음전하를 띠는 염소 이온의 유입이 빨라져 세포 안쪽으로 들어오게 되며, 유입된 전하에 의한 세포내 이온 구배의 변화로, 흥분성을 유지하던 세포 내 작용을 억제성으로 이끌게 된다. 이러한 GABA는 GABA 또는 GABA 수용체의 이상 또는 결핍시 억제성 기작에 이상이 초래되어 다양한 신경 질환을 야기하는 것으로 알려져 있다. GABA계의 이상은 우울증, 및 간질 등과 같은 질환을 야기하는 것으로 보고되고 있다.

[3]

- [4] GABA 수용체와 작용하는 GABA는 글루타민산으로부터 GAD (glutamic acid

decarboxylase)에 의해 카르복실기가 제거되어 합성되고, 대뇌 피질과 소뇌 회백질에 고농도로 분포하며 그 외에 해마, 시상, 선조체, 후각망울, 및 연수 등 거의 뇌 전역에 분포하고 있다. GABA가 시냅스 (synapse) 연결 부위에 방출되면 다음 뉴런의 막 단백질과 결합하게 되는데, 이러한 작용은 GABA 수용체 (GABA receptor)에 의해 이루어진다. GABA 수용체는 크게 GABA_A와 GABA_B 수용체로 구분되며, 상기 서술된 바와 같이 GABA_A 수용체가 리간드 의존성 이온 채널을 개방함으로써 즉각적으로 Cl⁻가 유입됨으로서 신경세포를 과분극 (억제) 시키게 된다. GABA_B 수용체는 G-protein과 연결된 구조로 세포막의 이온채널인 K⁺ 채널을 활성화 시키며, 비간접적 억제성을 지닌 것으로 알려져 있다. 이처럼 세포 내 신호 전달에 사용되는 단백질의 생리활성을 조절하는 GABA_B 수용체의 기능을 규명하기 위하여 GABA_B 수용체를 제거한 실험용 쥐 모델을 사용하였으며, 이 수용체의 존재 여부가 쥐의 발달에 미치는 영향을 조사한 결과, 단지 GABA_{B1} 소단위체 (subunit)만 결핍된 쥐의 경우, GABA_B 수용체와 관련된 신호 전달이 전혀 일어나지 않는다는 사실을 확인하였다. 또한 이 과정에서 GABA_{B1} 소단위체가 결핍된 쥐가 태어난 후 수 주 안에 이 쥐로부터 심한 간질 증상이 발병한다는 사실이 보고된 바 있다(Molecular and Cellular Neuroscience 2001, www.academicpress.com/mcn).

[5]

[6] 간질 (epilepsy)은 신경계와 관련된 발작성 질환의 하나로서, 뇌세포의 활동 상황을 나타내는 뇌파의 연구가 활발해짐에 따라 간질의 진단, 분류 및 치료는 임상적 소견과 뇌파적 이상으로 나뉘어 수행된다. 간질의 일반적 정의로서 '발작적으로 뇌파에 이상파형이 생김과 동시에 무엇인가의 발작적 임상 소견을 나타내는것'으로 되어 있다. 간질의 종류는 유전적 소인으로 보이는 진정간질과 뇌의 병변에 수반하여 나타내는 증후성 간질로 구별되나, 이러한 구별은 엄밀한 것은 아니다. 간질에 대한 현재까지의 치료로서는 각종 항간질제에 의한 약물 요법이 가장 유효하게 수행되고 있으며, 임상적 발작형과 뇌파이상형의 정도 및 관계를 고려하여 사용 약제를 선택해야 한다. 또한 섭생에 의해 발작의 유인을 피하도록 환자 본인의 노력이 필요하다. 그러나 현재까지 개발된 간질 치료제의 종류는 매우 제한적이며, 증상 발병시 발작을 완화시키는 정도의 효과만 있는 실정인바, 본질적이고 효과적인 간질 치료제를 위하여 계속적으로 연구가 진행되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 이에 본 발명자들은 예의 노력한 결과, GABA 수용체의 소단위체인 GABA_B 수용체 및 p-CREB의 발현을 억제시킨 후, 후보 약물을 처리함에 따라 GABA_B 및 p-CREB의 발현 증가를 확인함으로써, 간질과 같은 GABA_B 수용체와 관련된 다양한 신경 질환의 후보 치료제를 스크리닝 할 수 있음을 확인하고 본 발명을

완성하였다.

기술적 해결방법

- [8] 본 발명의 목적은 에탄올 또는 PTZ (Pentylentetrazol)를 포함하는 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현 저해제를 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 검체에 에탄올 또는 PTZ를 처리하는 단계; GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현을 억제시키는 단계; 및 상기 검체 및 대조군에 후보 물질을 처리하여 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현 증가를 확인하는 단계를 포함하는 신경 질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 검체 내의 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현 감소 정도를 측정하는 것을 특징으로 하는 신경 질환 진단을 위한 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 검출 방법을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 에탄올 또는 PTZ를 이용하여 동물의 체내에서 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현을 저해시키는 방법을 제공하는 것이다.

유리한 효과

- [12] 본 발명의 신경 질환 치료용 스크리닝 방법을 이용하는 경우, 주로 GABA_{B1} 수용체 및 상기 수용체에 의해 매개되는 전사 조절에 의해 야기되는 간질 (epilepsy), 정신분열증 (schizophrenia), 공황장애 (panic disorder), 우울증 (depression), 정신지체 (mental retardation), 헌팅턴 무도병 (huntington's disease), 경직 (spasticity), 약물 중독 (drug addiction) 및 신경 퇴행성 질환 (mental degeneration)과 같은 다양한 신경 질환의 치료제를 스크리닝하는 데 매우 유용하다. 따라서 본 발명의 스크리닝 방법을 이용하는 경우, 빠른 시간에 상기 메카니즘에 관여하는 치료제를 선별하고, 이를 입증하는 실험을 통하여 간질 등의 신경 질환을 겪고 있는 환자에게 유용한 치료제를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [13] 도 1은 siRNA 감염 (transfection)에 대한 형광 올리고뉴클레오타이드 (fluorescent oligonucleotide (100mM))가 포함된 Blocki™ 감염 키트 (transfection kit)를 사용하여 감염 효과를 확인한 사진이다 (Scale bar=400 μm).
- [14] 도 2A는 피질에서 내재성 (endogenous) GABA_{B1} mRNA에 대해 상보적인 siRNA 감염 후, GABA_{B1} 수용체 mRNA가 현저하게 감소하는 것을 RT-PCR로 확인한 결과이다. C: 일반 배지 대조군 (normal media control), E: 에탄올 100 mM 처리군, PTZ: PTZ 10 mM 처리군, PTZ+E: 10mM PTZ 및 100 mM 에탄올 처리군, B: 50 μM 바클로펜 (baclofen), 및 P: 100 μM 파클로펜 (phaclofen)을 가리킨다. 도 2B는 도 2A에서의 GABA_{B1} 수용체 밴드의 밀도 값 (Densitometric evaluation)을 계산한 결과이다. * < 0.01 vs 일반군 (normal group).
- [15]
- [16] 도 3은 해마에서 GABA_{B1} 수용체 mRNA에 대해 상보적인 siRNA 감염 결과, D1R 및 GAPDH mRNA 수준은 변화를 보이지 않은 반면, GABA_{B1} 수용체

mRNA는 현저하게 감소하는 것을 RT-PCR로 확인한 결과이다. C: 일반 배지 대조군 (normal media control), E: 에탄올 100 mM 처리군, PTZ: PTZ 10 mM 처리군, PTZ+E: 10mM PTZ 및 100 mM 에탄올 처리군, B: 50 μ M 바클로펜 (baclofen) 처리군, 및 P: 100 μ M 파클로펜 (phaclofen) 처리군을 가리킨다. 도 3B는 도 3A에서의 GABA_{B1} 수용체 밴드의 밀도 값 (Densitometric evaluation)을 계산한 결과이다. * < 0.01 vs 일반군 (normal group).

[17]

[18] 도 4는 GABA_{B1} 수용체 siRNA 감염에 의하여 특이적으로 녹-다운된 GD 17.5로부터 1차 배양된 피질 신경 세포의 GABA_{B1} 수용체의 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다. 일반 배지, 100 mM 에탄올이 포함된 배지, 10 mM PTZ가 포함된 배지, 10 mM PTZ 및 100 mM 에탄올이 포함된 배지, 50 μ M 바클로펜이 포함된 배지, 100 μ M 파클로펜이 포함된 배지에 세포를 처리하였다.

[19]

도 4A는 서로 다른 조건 하에서 피질 신경 세포의 GABA_{B1} 수용체의 면역블롯팅 (immunoblots)을 나타낸 사진이다. 면역블롯팅은 항-GABA_{B1} 수용체 항체에 표지(labeled)함으로써 수행하였다. C: 일반 배지 대조군 (normal media control), E: 에탄올 100 mM 처리군, PTZ: PTZ 10 mM 처리군, PTZ+E: 10mM PTZ 및 100 mM 에탄올 처리군, B: 50 μ M 바클로펜 (baclofen) 처리군, 및 P: 100 μ M 파클로펜 (phaclofen) 처리군을 가리킨다. 도 4B는 도 4A에서의 GABA_{B1} 수용체 밴드의 밀도 값 (Densitometric evaluation)을 계산한 결과이다. * < 0.01 vs 일반군 (normal group). 모든 처리군은 시험관 내 (in vitro) 배양에서 20분 동안 처리되었다.

[20]

[21] 도 5는 GABA_{B1} 수용체 siRNA 감염에 의하여 특이적으로 녹-다운된 GD 17.5로부터 1차 배양된 피질 신경 세포의 p-CREB의 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다. 각각의 배지 조건은 도 4와 같다.

[22]

도 5A는 서로 다른 조건 하에서 피질 신경 세포의 p-CREB의 면역블롯팅 (immunoblots)을 나타낸 사진이다. 면역블롯팅은 항-p-CREB 항체에 표지(labeled)함으로써 수행하였다. 도 5에 사용된 약자는 도4에서와 같다. 도 5B는 도 5A에서의 GABA_{B1} 수용체 밴드의 밀도 값 (Densitometric evaluation)을 계산한 결과이다. * < 0.01 vs 일반군 (normal group). 모든 처리군은 시험관 내 (in vitro) 배양에서 20분 동안 처리되었다.

[23]

[24] 도 6은 GABA_{B1} 수용체 siRNA 감염에 의하여 특이적으로 녹-다운된 GD 17.5로부터 1차 배양된 피질 신경 세포의 PKA- α 의 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다. 각각의 배지 조건은 도 5와 같다.

[25]

도 6A는 서로 다른 조건 하에서 피질 신경 세포의 PKA- α 의 면역블롯팅 (immunoblots)을 나타낸 사진이다. 면역블롯팅은 항-PKA- α 항체에 표지(labeled)함으로써 수행하였다. 도 6에 사용된 약자는 도5에서와 같다. 도

6B는 도 6A에서의 GABA_{BI} 수용체 밴드의 밀도 값 (Densitometric evaluation)을 계산한 결과이다. * < 0.01 vs 일반군 (normal group). 모든 처리군은 시험관 내 (in vitro) 배양에서 20분 동안 처리되었다.

[26]

[27] 도 7은 GABA_{BI} 수용체 siRNA 감염에 의하여 특이적으로 녹-다운된 GD 17.5로부터 1차 배양된 해마 신경 세포의 GABA_{BI} 수용체의 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다. 일반 배지, 100 mM 에탄올이 포함된 배지, 10 mM PTZ가 포함된 배지, 10 mM PTZ 및 100 mM 에탄올이 포함된 배지, 50 μ M 바클로펜이 포함된 배지, 100 μ M 파클로펜이 포함된 배지에 세포를 처리하였다.

[28] 도 7A는 서로 다른 조건 하에서 해마 신경 세포의 GABA_{BI} 수용체의 면역블롯팅 (immunoblots)을 나타낸 사진이다. 면역블롯팅은 항-GABA_{BI} 수용체 항체에 표지(labeled)함으로써 수행하였다. C: 일반 배지 대조군 (normal media control), E: 에탄올 100 mM 처리군, PTZ: PTZ 10 mM 처리군, PTZ+E: 10mM PTZ 및 100 mM 에탄올 처리군, B: 50 μ M 바클로펜 (baclofen) 처리군, 및 P: 100 μ M 파클로펜 (phaclofen) 처리군을 가리킨다. 도 7B는 도 7A에서의 GABA_{BI} 수용체 밴드의 밀도 값 (Densitometric evaluation)을 계산한 결과이다. * < 0.01 vs 일반군 (normal group). 모든 처리군은 시험관 내 (in vitro) 배양에서 20분 동안 처리되었다.

[29]

[30] 도 8은 GABA_{BI} 수용체 siRNA 감염에 의하여 특이적으로 녹-다운된 GD 17.5로부터 1차 배양된 해마 신경 세포의 p-CREB의 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다. 각각의 배지 조건은 도 7과 같다.

[31] 도 8A는 서로 다른 조건 하에서 해마 신경 세포의 p-CREB의 면역블롯팅 (immunoblots)을 나타낸 사진이다. 면역블롯팅은 항-p-CREB 항체에 표지(labeled)함으로써 수행하였다. 도 8에 사용된 약자는 도7에서와 같다. 도 8B는 도 8A에서의 GABA_{BI} 수용체 밴드의 밀도 값 (Densitometric evaluation)을 계산한 결과이다. * < 0.01 vs 일반군 (normal group). 모든 처리군은 시험관 내 (in vitro) 배양에서 20분 동안 처리되었다.

[32]

[33] 도 9는 GABA_{BI} 수용체 siRNA 감염에 의하여 특이적으로 녹-다운된 GD 17.5로부터 1차 배양된 해마 신경 세포의 PKA- α 의 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다. 각각의 배지 조건은 도 8과 같다.

[34] 도 6A는 서로 다른 조건 하에서 해마 신경 세포의 PKA- α 의 면역블롯팅 (immunoblots)을 나타낸 사진이다. 면역블롯팅은 항-PKA- α 항체에 표지(labeled)함으로써 수행하였다. 도 9에 사용된 약자는 도8에서와 같다. 도 9B는 도 9A에서의 GABA_{BI} 수용체 밴드의 밀도 값 (Densitometric evaluation)을 계산한 결과이다. * < 0.01 vs 일반군 (normal group). 모든 처리군은 시험관 내 (in vitro) 배양에서 20분 동안 처리되었다.

[35]

[36] 도 10A는 450 파장길이 (wavelength)에서 대조군 및 감염된 대조군의 칼슘 농도를 나타낸 그래프이다. "E"로 나타낸 도 10B는, 에탄올 100 mM, 및 감염된 상기 에탄올 처리군에서의 세포 내 칼슘 농도를 나타낸 그래프이다. "PTZ"로 나타낸 도 10C는, PTZ 10 mM 및 감염된 상기 PTZ 처리군에서의 세포 내 칼슘 농도를 나타낸 그래프이다. "PTZ+E"로 나타낸 도 10D는, PTZ 10mM 및 에탄올 100 mM 처리군, 및 감염된 상기 처리군에서의 세포 내 칼슘 농도를 나타낸 그래프이다. 도 10E는 모든 그룹에서 세포 내 농도를 비교 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

[37]

[38] 도 11은 1차 배양된 GD 17.5 피질 신경 세포의 $GABA_{B1}$ 수용체 및 $PKA-\alpha$ 의 상호 위치 (co localization)에 대한 면역조직화학 결과를 나타낸 사진이다. (Scale bar=30 μ m, Magnification: 600X).

[39]

[40] 도 12는 1차 배양된 GD 17.5 해마 신경 세포에서의 $GABA_{B1}$, $PKA-\alpha$ 및 p-CREB의 발현, 세포 내 분포 및 상호 위치를 나타낸 사진이다. $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체 및 $PKA-\alpha$ 모두에 대한 면역형광 공초점 이미지는 같은 뉴런 내에 co-localized되어 있음을 확인할 수 있다.

[41] (A에 대한 Scale bar=30 μ m, B 및 C에 대해서는 20 μ m, Magnification: 600X)

[42]

[43] 도 13은 1차 배양된 GD 17.5 피질 신경 세포에서의 $GABA_{B2}$ 수용체 및 $PKA-\alpha$ 의 상호 위치를 나타낸 면역조직화학결과 사진이다. $GABA_{B2}$ 수용체 및 $PKA-\alpha$ 모두에 대한 면역형광 공초점 이미지는 같은 뉴런 내에 co-localized되어 있음을 확인할 수 있다.

[44] (A에 대한 Scale bar=30 μ m, B 및 C에 대해서는 20 μ m, Magnification: 600X)

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[45] 따라서 하나의 양태로서 본 발명은 에탄올 또는 PTZ (Pentyleneetetrazol)를 포함하는 $GABA_{B1}$ 수용체 및 p-CREB의 발현 저해제에 관한 것이다.

[46] 본 발명에서 사용되는 용어 "에탄올"이란 탄소 2개의 에탄(ethan)에서 수소 원자 하나가 하이드록시기 (-OH)로 치환된 알코올의 한 종류로서 에틸알코올 (ethyl alcohol)이라고도 한다. 무색의 가연성 화합물로서 용매, 소독제, 연료 등으로 많이 사용되며, 신경계와 관련하여서는 에탄올을 섭취할 경우 대뇌의 기능 억제로 인해 흥분 상태가 되고, 이후 중추신경 억제의 효과가 나타난다. 에탄올이 함유된 알코올성 음료를 지나치게 자주 마시면 습관성이 생기고 중독에 이르게 된다(화학대사전편집위원회, 성용길, 김창홍 역, 에틸알코올, 화학대사전 (Vol. 6), 서울, 세화, 2001, 347~348). 이러한 에탄올은 예방 가능한 선천성 장애 (preventable cause of birth defects), 정신 지체 (mental retardation) 및

신경 발달 장애 (neurodevelopmental disorders)를 일으키는 주요 요인 중 하나로서, 임신부의 에탄올 섭취는 장기 인지 (long-term cognitive), 신경 행동 장애 (neurobehavioral disruption), 성장 결핍 (growth deficits), 및 간질 (epilepsy) (Berman and Hannigan, 2000; Mattson, 2001, Kelly et al., 2000, Sampson et al., 2000; Autti-Ramo et al., 2000)을 나타내는 중추 신경 시스템 (central nervous system)의 발달 (Zhou et al. 2000; McGoey et al., 2003; Guerri, 2002)에 손상을 일으킨다. 본 발명에서는 이러한 에탄올을 뇌의 피질 세포 또는 해마 조직 세포에 처리함에 따른 GABA_{B1} 수용체의 발현 양상을 최초로 확인하였다.

[47]

[48] PTZ (pentylentetrazol)는 설치류에서 경련성 인지 결핍증 (convulsant cognitive deficits)을 발생시키는 물질로 알려져 있다(Corda and Biggio, 1986; Becker et al., 1994). PTZ는 펜테트라졸 (pentetrazol) 또는 펜타메틸렌테트라졸 (pentamethylenetetrazol)로도 알려져 있으며, 순환계 및 호흡기 촉진제로도 사용되는 약물이다. 과량 섭취시 경련을 일으키므로, 쇼크 요법으로 사용되어 왔다. 본 발명에서는 이러한 PTZ를 사용하여 신경 세포에 처리함으로써, 신경 세포에 존재하는 GABA 수용체 중 특히 GABA_{B1} 소단위체의 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하였다.

[49]

[50] 본 발명자는 에탄올 또는 PTZ를 처리하는 경우에 있어서, 대뇌 피질 또는 해마 세포에서의 GABA_{B1} 수용체, p-CREB, PKA- α 의 발현 양상을 확인하였다. 보다 상세하게 본 발명의 바람직한 실시예에서는 각 경우에 있어서 GABA_{B1} mRNA의 발현 양상을 확인하였다. 그 결과 피질에서는 PTZ, 및 PTZ와 에탄올을 함께 처리한 군에서 GABA_{B1} 수용체의 mRNA 수준이 감소한 반면, 에탄올 처리군에서는 발현이 증가하였음을 확인하였으며(도 2), 해마에서는 모든 경우에 있어서 GABA_{B1} 수용체의 mRNA 수준이 증가하는 것을 확인하였다(도 3). GABA_{B1} 수용체 siRNA를 처리한 경우에 있어서는 모든 조직, 모든 경우의 내재성(endogeneous) GABA_{B1} 수용체 mRNA를 억-다운시킬 수 있음을 실험을 통해 확인하였다(도 1, 도 2 및 도 3).

[51]

[52] 본 발명에서 사용되는 용어 "siRNA"란 19개 내지 27개 정도의 짧은 올리고머로 이루어진 억제성 RNA로서 short inhibitory RNA의 약자이다. mRNA 수준에서 억-다운시키는 방법으로 흔히 사용되며, siRNA를 사용하는 경우 단순한 방법으로 빠르고 효과적인 감염효과를 볼 수있다. 짧은 올리고머를 사용하므로 일반적인 세포주(cell line)에 감염시키는 것이 수월하며, RNAi(RNA interference)에 널리 사용되고 있다. siRNA를 이용한 RNAi는 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 포함하는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. 본 발명의 GABA_{B1} 수용체 mRNA를 억-다운시키는 방법으로는 상기와 같은 siRNA를 사용할 수 있으나,

턱-다운이 가능한 시스템이라면 siRNA 이외의 물질을 제한 없이 사용할 수 있다. 그 예로 shRNA와 같은 RNAi 시스템을 사용할 수 있으며, 상기 예들에 의해 본 발명의 턱-다운 방법이 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 siRNA를 이용하여 GABAB1 수용체의 mRNA를 턱-다운 시켜 GABAB1 수용체, PKA- α 및 p-CREB의 발현 증감 여부를 확인하였다.

[53]

[54] GABAB1 수용체란, GABA 수용체의 소단위체를 구성하는 하나의 구성 요소로서, GABA 수용체는 GABA_A 및 GABA_B 서브타입 (subtype)으로 나누어진다. 또한 GABA_B는 GABAB1 및 GABAB2의 두 소단위체 (subunit)로 구성되어 있다. 이전의 연구들은 시냅스 전 GABA_B 수용체 (presynaptic GABA_B Receptor)가 흥분성 (excitatory) 및 억제성 (inhibitory) 신경전달물질 모두의 분비를 조절하는 것으로 보고하고 있다. 본 발명에서는, 초기 발달 단계에서 GABAB1 수용체를 턱-다운 (knock-down) 시킴으로써, 피질 (cortex) 및 해마 (hippocampus)에서의 GABAB1 수용체의 민감성을 확인하였다. GABA_A 및 GABA_B 수용체는 모두 신경 흥분능 (neuronal excitability) 및 간질화 (epileptogenesis)와 관련되어 있으며, 전신 경련 발작 (generalized convulsive seizures)의 조절에서 GABA_A 수용체의 관여에 대해서는 상당한 부분이 알려져 있으나 (Mohler et al., 1996), 간질 과정 (epileptic processes)에서의 GABA_B 수용체의 역할에 대해서는 잘 알려져 있지 않다 (Libri et al., 1998). 이와 관련하여 바클로펜 (baclofen)과 같은 GABA_B 수용체 작용제 (agonist)가 항-경련성 소발작 (anti-convulsive absence seizures)을 억제하거나(Benedito and Leite 1981; ault and Nadler 1983) 비-경련성 소발작 (non-convulsive absence seizures)을 악화시킨다 (Marescaus et al., 1992)고 실험적 데이터로 보고되어 있으며, GABA_B 수용체 작용제가 경련성 간질 (convulsive epilepsy)의 몇몇 실험 모델에서 약제학적으로 유도된 ED (epileptiform discharges)를 모두 증가시킬수 있을 것이라는 보고 (Karlsson et al., 1992)가 있을 뿐이다. 따라서, 본 발명은 GABA 수용체의 서브 타입 중 특히 GABA_B 수용체에 있어서 에탄올 또는 PTZ의 영향을 확인하였다. 구체적으로 에탄올 또는 PTZ를 처리하는 경우, GABA_B 수용체의 발현 변화 양상을 확인하는 한편, GABA 수용체에서 이차 메신저 (second messenger)로 작용한다고 알려져 있는 PKA- α 및 p-CREB의 발현양상을 확인하였다. 아울러 GABA_B 수용체 mRNA에 대한 siRNA를 사용하여 GABAB1 수용체 mRNA를 턱-다운 시킴으로서 GABAB1 수용체, PKA- α 및 p-CREB의 발현양상을 siRNA를 사용하지 않은 경우와 비교하였다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 상기 발현 양상과 관련하여, 피질에 GABAB1 수용체 발현은 에탄올 및 PTZ를 처리한 그룹에서 감소하는 것을 확인하였다. 그러나 바클로펜 및 파클로펜에서는 이와 반대되는 결과를 나타내었다 (도 4). 또한, PKA- α 의 경우, 대조군과 비교하였을 때, 모든 약물 처리 그룹에서 대부분 일정한 발현 양상을 나타내었으나, p-CREB는 약물 처리 그룹에서 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. GABAB1 수용체에 대한 siRNA를

처리한 실험군에 있어서 역시, 피질에서의 PKA- α 의 경우에는 현저한 변화를 보이지 않은 반면, p-CREB의 발현은 siRNA가 감염되지 않은 그룹과 비교할 때 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 다만, GABA_{B1} 수용체를 siRNA에 의해 녹다운시킨 경우, 파클로펜 처리군에 있어서, p-CREB의 발현이 증가하였다(도 5 및 도 6).

[55]

[56] p-CREB란 CREB (cAMP Response Element Binding protein)의 인산화된 형태로서, CREB (cAMP response element-binding) proteins)는 DNA 내의 CRE (cAMP response element)라 불리는 특정 서열과 결합하는 전사 인자 (transcription factors)이다. CREB 단백질은 인간을 포함하는 많은 동물에서 활성을 나타낸다. 이전의 연구들은 전사 인자 CREB의 인산화가 몇몇 조기반응 유전자 (immediate-early genes)의 발현을 매개하는 데 중요하다는 사실을 보고하고 있다 (Yamamoto et al, 1988; Ginty et al., 1993; Konradi, et al., 1994). 일반적으로 신호가 세포 표면에 도착하면, 이에 대응하는 수용체가 활성화되고, cAMP 또는 Ca²⁺와 같은 이차 전달자 (second messenger)의 생산되어, 단백질 카이네이즈 (protein kinase)의 활성화를 유도한다. 이러한 단백질 카이네이즈는 세포 핵으로 이동하게 되는데, 여기에서 CREB 단백질이 활성화된다. 활성화된 CREB 분자는 그 후 CRE 요소 (CRE element)에 결합하고, 그 후 함께 작용하는 CBP (CREB binding protein)에 의해 결합되어, 특정 유전자의 작동 (on) 또는 비작동 (off)을 조절하게 된다. 본 발명에서는 이와 같이 유전자 발현을 조절하는 CREB의 활성화 형태인 p-CREB의 발현 양상을 확인함으로써, 특정 약물에 노출되는 경우 GABA 수용체의 다운스트림 (downstream)에 존재하는 p-CREB이 정상적으로 발현되는지 여부를 확인하였다.

[57]

[58] 에탄올 또는 PTZ (Pentylentetrazol)를 포함하는 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현 저해제란, 신경 세포의 표면에 존재하고 있는 GABA_{B1} 수용체 및 전사와 관련된 세포 내 단백질인 p-CREB의 발현을 억제하는 기능을 갖는 조성물을 의미한다. 상기 기능을 수행하는 본 발명의 조성물은 에탄올 또는 PTZ를 유효성분으로 포함하며, 이들 중 어느 하나 또는 이들의 조합을 신경세포에 처리함으로써 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현이 현저하게 감소되는 것을 확인하였다. 반면에 상기 메커니즘에 관여하는 것으로 알려진 PKA- α (protein kinase A alpha)의 경우에는 GABA_{B1}의 발현 또는 p-CREB의 발현 양상과는 독립적으로 일정한 발현을 유지하는 것을 확인하였다. GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현 저해제는 에탄올 또는 PTZ를 유효성분으로 포함하는 경우, 검체에 투여가능한 어떠한 형태로도 투여 가능하며, 부형제 또는 담체등의 다른 성분들을 제한없이 포함할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 에탄올 또는 PTZ의 본래의 성질에 기한 특징을 판단하기 위하여 이들 자체만을 쥐에게 투여하였으며, 에탄올 및 PTZ를 함께 투여하더라도 GABA_{B1} 수용체 및

p-CERB의 발현이 모두 저해되는 효과를 가져온다는 사실을 웨스턴 블롯팅 및 밀도값 (density of value)을 통하여 확인하였다.

[59]

[60] 다른 하나의 양태로서 본 발명은 검체에 에탄올 또는 PTZ를 처리하는 단계; GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현을 억제시키는 단계; 및 상기 검체 및 대조군에 시험 대상 물질을 처리하여 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현 증가를 확인하는 단계를 포함하는 신경 질환 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[61] 검체에 에탄올 또는 PTZ를 처리하면 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현의 현저한 감소를 야기하는데, 이렇게 두 종류의 단백질 발현이 감소된 검체에 후보물질을 처리하여, GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현이 회복(증가)되는 것을 확인함으로써, GABA_{B1} 수용체와 관련된 신경 질환의 후보 치료제를 선별할 수 있게된다. GABA 수용체는 흥분성 신경 작용이 활성화된 상태를 억제성으로 전환시키는데 필수적인 역할을 하는데, GABA가 GABA 수용체와 작용하여, 세포 내 이온 구배를 변화시키는 한편, 이차 전달자를 통하여 핵 내 억제성에 필요한 유전자를 작동시키는 기능을 수행한다. 이러한 이차 전달자에는 p-CREB, PKA- α 등이 존재하는데, 본 발명은 에탄올 또는 PTZ를 처리함으로써 GABA_{B1} 수용체 뿐만 아니라 이차 전달자 중 p-CREB의 발현을 감소하는 것을 유도할 수 있다. 바람직하게 본 발명은 에탄올 또는 PTZ를 처리하는 경우, GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현 감소를 가져오나, PKA- α 의 발현량에는 변화가 없는 것을 확인하는 한편, 후보물질을 처리하여 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현이 다시 증가하는 것을 확인하여 억제성 신경계 작용을 회복시킴으로써 간질과 같은 신경 질환에 대한 치료제를 스크리닝 할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 대뇌 피질 및 해마 조직에서 에탄올 또는 PTZ를 처리한 결과, GABA_{B1} 수용체의 발현 및 p-CREB의 발현에 현저한 증감 변동이 있는 경우에도, PKA- α 는 모든 경우에 있어서 그 발현 양상에 큰 차이가 없는 것을 확인하였다 (도 6, 도 9).

[62] 본 발명에서 사용되는 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현 증가를 확인하는 방법은 당업계에서 사용되는 방법을 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 물질들의 발현 확인은 mRNA 수준 또는 단백질 수준에서의 발현을 확인함으로써 수행될 수 있으며, mRNA 양을 측정하기 위한 예로써 RT-PCT, 경쟁적 RT-PCR (Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (real time RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅 (Northern blotting) 및 DNA 칩 등을 들 수 있으나, 상기 예에 의해서 확인 방법이 제한되는 것은 아니다. 단백질 양을 측정하는 방법으로서, GABAB1 또는 p-CREB 단백질 각각에 대한 특이적 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있으며, 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블롯팅 (Western blotting), ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선 면역 분석법 (RIA; Radioimmunoassay), 방사선 면역 확산법 (radioimmunodiffusion), 오우크테로니 (Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트 (rocket)

면역 전기 영동, 조직 면역 염색, 면역 침전 분석법 (Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법 (Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩 (protein chip)등이 있으나, 이들로 제한 되는 것은 아니다.

- [63] 단백질의 양을 확인하는 방법으로서 항체를 이용하는 경우에는, 표적 단백질에 특이적이고 검출 가능한 표지에 연결된 제2항체를 첨가할 수 있으며, 검출은 또한 제2항체를 첨가한 후, 제2항체에 대한 결합 친화도를 가지며, 검출 가능한 표지에 연결된 제3항체를 첨가할 수도 있다. 제 2항체 또는 제3항체에 검출될 수 있는 표지는 적절한 발색성 기질과 배양시 발색을 나타내는 효소가 사용될 수 있다. 검출 가능한 부분은 분광학적, 효소적, 광화학적, 생화학적, 생체전자공학적, 면역화학적, 전기적, 광학적 또는 화학적 수단으로 검출가능한 조성물을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 형광 마커 및 염료, 자성 표지, 연결된 효소, 질량 분광 태그, 스핀 표지, 전자 전달 공여자 및 수용자 등이 있으나 상기 예들에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 면역 형광 (immuno-fluorescence) 방법을 이용하여 $GABA_{B1}$, p-CREB 및 PKA- α 의 발현 수준을 확인 하였다.

[64]

- [65] 본 발명에서 사용되는 용어 '신경 질환'이란 개체에서 신경 세포 수용체 $GABA_{B1}$ 수용체와 관련하여 발생하는 모든 질환을 의미하며, 신경 질환의 예로 간질 (epilepsy), 정신분열증 (schizophrenia), 공황장애 (panic disorder), 우울증 (depression), 정신지체 (mental retardation), 헌팅턴 무도병 (huntington's disease), 경직 (spasticity), 약물 중독 (drug addiction) 또는 신경 퇴행성 질환 (mental degeneration)등이 있으나, 상기 예들에 의해 본원 발명의 $GABA_{B1}$ 수용체 관련 신경 질환이 한정되는 것은 아니다.

[66]

- [67] 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은 검체 내의 $GABA_{B1}$ 수용체 및 p-CREB의 발현 감소를 측정하는 것을 특징으로 하는 신경 질환 진단을 위한 $GABA_{B1}$ 수용체 및 p-CREB를 검출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 바람직한 실시예에서 확인하고 있는 바와 같이 $GABA_{B1}$ 수용체 및 p-CREB의 발현량 감소 정도 및 양상을 확인함으로써, 해당 개체가 상기에 열거된 간질과 같은 신경 질환의 발병 여부에 대해 진단할 수 있다.

[68]

- [69] 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은 에탄올 또는 PTZ를 이용하여 동물의 체내에서 $GABA_{B1}$ 수용체 및 p-CREB의 발현을 저해시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 에탄올 또는 PTZ를 동물의 체내에 투여함으로써 간질과 같은 신경 질환을 유도하여, 해당 질환의 연구 모델로 사용할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 쥐의 대뇌 피질 및 해마 조직에 에탄올 또는 PTZ를 투여하여 $GABA_{B1}$ 및 p-CREB의 발현이 저해됨을 확인하였다.

발명의 실시를 위한 형태

[70] 실시에 1. 동물군의 처리

[71] 암컷 스프라그-도레이 래트 (Sprague-Dawley rats) (n=30) (250g, Gyeongsang National University, Neurobiology Laboratory, Chinju, South Korea)를 사료를 공급하고 06:00-20:00까지 빛을 주어 온도-조절된 환경에서 임의적으로 사육시켰다. 실험군 쥐는 물로 처리하였다. GD 17.5 후에, 래트를 펜토바비탈 나트륨 (pentobarbital sodium) (3 mg/100 g b.w)의 i.v (intravenous) 투여 후 단두 방법으로 희생시켰다.

[72]

[73] 실시에 2. 초기 세포 배양 및 약물 처리

[74] 스프라그-도레이 래트 (Sprague-Dawley rats) GD 17.5인 피질 및 해마 조직으로부터 배양액을 준비하였다. 상기 해마 및 피질 조직을 20분 동안 0.25% 트립신-EDTA (trypsin-EDTA)로 처리하였고, 차가운 칼슘- 및 마그네슘-결여된 HBSS (Hank's balanced salt solution) (pH 7.4) 기계적으로 분쇄 (mechanical trituration)하여 용해시켰다.

[75] 원심분리에 의해 펠렛팅 (pelleting) 한 후, poly-lysine (0.02 g/l) 및 챔버 슬라이드 (cahmbler slides)로 사전-코팅된 세포 배양 플레이트에 세포를 플레이트팅 (1×10^6 cells/ml) 하였다. 배지의 구성성분을 10% 열-불활성화 된 우태혈청 (heat-inactivated fetal bovine serum), 1 mM 피루베이트(pyruvate), 4.2 mM 탄산수소나트륨(sodium bicarbonate), 20 mM HEPES, 0.3 g/l BSA (bovine serum albumin), 50 U/ml 페니실린 (penicillin), 및 50mg/l 스트렙토마이신 (streptomycin)이 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)로 하였다. 5% CO₂ 및 95% 공기 (air)의 습한 대기에서 37°C를 유지시켜 배양을 수행하였다. 12시간 동안 100 μ M 시토신 β -D-아라비노 푸라노사이드 (Cytosine β -D-Arabino Furanoside (Sigma)) 가 포함된 배지를 사용하여 신경교세포 (Neuroglia cells)를 억제하였다. 5일 후, 피질(cortical) 및 해마 신경 세포(hippocampal neuronal cells)를 일반 배지 (normal media) 및 에탄올 100mM, PTZ 10 mM, 바클로펜(baclofen) 50 μ M 및 파클로펜(phaclofen) 100 μ M 이 포함된 배지에 각기 다른 군 및 그들의 조합으로 처리하였다. 약물 처리된 모든 그룹을 시험관 내 (in vitro) 배양으로 20분 동안 배양시켰다.

[76]

[77] 실시에 3. RNA 간섭 (RNA interference, RNAi) 및 감염 (transfection)

[78] GABA_{B1} 수용체 (Novartis Pharma로부터 구입, Switzerland)의 cDNA를 XbaI 및 EcoRI 효소를 사용하여 PCI 벡터로부터 제거하였다. 그 후, 서열 번호 1 및 서열 번호 2로 구성된 T7 프로모터 영역을 포함하는 프라이머를 GABA_{B1} 수용체의 cDNA의 증폭을 위하여 사용하였다.

[79]

- [80] 정방향 프라이머 (forward primer):
5'-CGGTAATACGACTCACTATAGGGGAGACGCTACCATCCAACAGACCA-3'
(서열번호 1),
- [81] 역방향 프라이머 (reverse primer):
5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGGAGATCCTGTGAGCTCATGTTGGAA-3'
(서열번호 2)
- [82]
- [83] 2-4시간 동안 37°C 배양에 의해 dsRNA를 준비하기 위하여 MEGAscript® RNAi kit (Ambion) 방법을 사용하였다. RNAi (RNA interference)는 ShortCut™ RNAi Kit (New England Biolabs, UK)를 사용하여 수행하였다.
- [84]
- [85] 감염 하루 전, 배지를 항생제 및 혈청(serum)이 결여된 DMEM으로 교환하였다. 실온에서 5분간 배양된 리포솜 용액 (Liposome solution) (DMEM containing LipofectAMINE2000 TM, Invitrogen)을 dsRNA 용액 (shortcut dsRNA을 포함한 DMEM)를 동일 부피로 혼합하였고, 그 혼합물을 20분간 배양한 후, 배양 배지에 혼합물을 추가하기 전에 최종 농도가 30nM이 되도록 각 플레이트에 즉시 재혼합하였다. 감염 48시간 후, siRNA 감염된 세포와 그렇지 않은 세포 모두를 일반 배지, 100 mM 에탄올, 10 mM PTZ, 10 mM PTZ와 100 mM 에탄올, 50 µM 바클로펜 및 100µM 파클로펜으로 옮겼다. 이동 20분 후, 세포를 수거하였다.
- [86]
- [87] 실시예 4. 역전사-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR))
- [88] 감염 또는 비 감염된 세포로부터 cDNA를 사용하여 RT-PCR 분석을 수행하였다. 전체 RNA를 Trizol 시약 (Trizol Reagent)을 사용하여 분리하였다. 첫 번째 가닥 cDNA는 제조사에서 제공된 프로토콜에 따라 M-MLV RT (Promega)를 사용하여 RNA 2 µg으로부터 전사시켰다. PCR은 1분간 94 °C, 1분간 65 °C, 및 1분간 72°C 에서 전체 28 cycles로 수행되었다.
- [89]
- [90] 다음과 같은 프라이머를 사용하였다.
- [91] GABA_{B1} R 정방향 프라이머 (forward primer):
5'-AATTGAATTCCGCTACCATCCAACAGACCA-3' (서열번호 3);
- [92] GABA_{B1} R 역방향 프라이머 (reverse primer):
5'-AATTAAGCTTTCCTGTGACGTCATGTTGGAA-3' (서열번호 4)
- [93] 및 GAPDH 정방향 프라이머: 5'-GCCATCAATGACCCCTTCATT-3' (서열번호 5)
- [94] GAPDH 역방향 프라이머: 5'-CGCCTGCTTCACCACTTCTT-3' (서열번호 6)
- [95]
- [96]
- [97] 실시예 5. 웨스턴 블롯 (Western blotting)

- [98] 배양된 피질 및 해마 세포로부터 수득한 샘플을 PBS (phosphate buffered saline, 0.02 M)로 균질화시켰다. 초원심분리 (ultra centrifugation (12,000 rpm, 10 min ×2)) 후, 상청액은 Bio-Rad 단백질 분석을 사용하여 측정하였고, 각 라인 당 30 μ l 단백질을 적용하였다. 가용성 단편 (soluble fraction (30 μ g))을 동일한 (duplicate) 12% SDS-폴리아크릴아마이드 겔 (SDS-polyacrylamide gels) (30% Acrylamide/ 1% Bis/ 1 M Tris/ 20% SDS/ 10% APS/ TEMED)상에 나누었다. 하나의 겔은 쿠마시 블루(Coomassie Blue)로 염색하였고, 반면에 다른 하나의 겔에 있는 단백질은 니트로셀룰로오즈 막 (nitrocellulose membrane (90 V for 1 h in a 48 mM Tris, 39 mM glycine, 20% MeOH 및 0.037% SDS transfer buffer))상으로 이동시켰다. 비특이적 결합을 감소시키기 위하여 니트로셀룰로오즈 막을 차단 용액 (blocking solution (Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% (v/v) Tween 20 and 6% (w/v) non-fat dry milk))으로 처리하였다. 기니아피그(guinea pig)-유래 항-쥐 GABA_{BI}, p-CREB 및 PKA- α 항체 (1:1000, 24 h, 4 °C, Chemicon, USA) 또는 토끼-유래 항-쥐 GABA_{BI} 수용체 항체 (1:1000, Abcam Limited, UK)를 사용하여 면역반응 (Immunoreactions)을 수행하였다.
- [99] 세척 후, 염소 항-마우스 및 기니아 피그 IgG (1:10000, Bio-Rad)가 융합된 HRP (horseradish peroxidase)를 첨가하였고, 실온에서 40분간 배양하였다.
- [100]
- [101] 제조사의 프로토콜에 따라 ECL-detecting reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Western blotting detection reagents)을 사용하여 화학발광 (chemiluminescence)시킴으로서 단백질을 검출하였다. computer-based Sigma Gel (SPSS Inc. Chicago, USA) 시스템을 사용한 밀도계 (densitometry)에 의해 웨스턴 블롯을 분석하였다. 밀도 값은 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다.
- [102] 관련성있는 처리 그룹간의 현저한 차이점을 확인하기 위하여 Tukey-Kramer 다중 비교 테스트 (multiple-comparisons test)에 따른 단방향 (One-way) ANOVA 분석을 수행하였다. 모든 경우에서, 통계적 유의성을 위한 허용 범위는 $P < 0.01$ 였다.
- [103]
- [104] 실시에 6. 세포 내 칼슘의 형광 측정 (Fluorescence measurement of intracellular calcium)
- [105] 세포 내 칼슘의 변화를 확인하기 위하여 칼슘-민감성 표시제 Fura-2 (calcium-sensitive indicator Fura-2 (Molecular Probes))를 사용하였다.
- [106] 보정 용액 (control solution)으로 세포 배양을 세척한 후, Fura-2 아세톡시메틸 에스터 (acetoxymethyl ester)(Fura-2 AM; 10 μ mol/l)가 보충된 DMEM에 37°C, 60분 동안 세포를 배양하였다. 카메라로 자가 형광(Auto fluorescence)을 관찰할 수 없어, fura의 충분한 로딩을 위해 40분간 로딩(loading)을 수행하였다. 제논 램프 (Xenon lamp)로부터 여기 광(Excitation light)을 340 및 380nm 대역-통과 필터 (band-pass filter) 사이로 교류시켰다. 컴퓨터 및 유니버설 이미징 소프트웨어

(universal imaging software), 또는 MicroVax II 컴퓨터 및 소프트웨어 (D.F.D.)를 사용하여 형광 신호(Fluorescence signals)를 수집, 저장 및 분석하였다. 세포 내 칼슘(Intracellular calcium)은 비율 방법(ratio method)을 사용하여 결정하였다. 비율(ratio)은 세포가 없는 용액(bath)의 영역 내에서 측정된 배경 값을 제외한 후 계산하였다. Fura 비율은 0.38 ± 0.02 (mean $\pm$ S.E.)이었다. 기록은 30-s 간격으로 측정하였다. 세 실험을 하나의 세트로, 상기 아웃라인의 프로토콜을 사용하여 세포를 Fluo-3 AM에 로딩하였고, 공초점 현미경(confocal microscopy (Biorad))을 사용하여 세포 반응을 측정하였다. 이러한 실험은 피크 반응 (peak responses)이 Fura-2 실험에서 사용된 30-s 샘플링 진동수 (sampling frequency)가 잘못되지 않았다는 것을 증명하기 위해 수행되었다.

[107]

[108] 실시예 7. 면역-형광 (Immuno-fluorescence)

[109] 시험관 내 (in vitro) 폴리-D-라이신(poly-D-lysine)-코팅된 챔버 슬라이드(chamber slide)에서 자란 GD 17.5 초기 피질 및 해마 세포 배양상에서 면역형광 (immunofluorescence)을 수행하였다. PBS에 4% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde)로 5분 동안 고정시켰고, 5분 동안 PBS 내 0.3% Triton X-100 에 투과시킨 후, PBS로 2번 세척하였다. 세포를 37°C에서 1시간 동안 PBS 내에서 10% BSA로 사전 배양하였고, 4 °C에서 밤새 1차 항체를 노출시켰다. 기니아 피그 (guinea pig)-유래 항-쥐 GABA_{B1}, p-CREB (1:500, 24 h, 4, Chemicon, CA, USA), 토끼 항-쥐 PKA- α (1:500, Santa Cruz, USA)를 사용하여 면역 반응(Immunoreaction)을 수행하였고, 배양 후에, 세포를 씻어내고 2차 항체를 항-토끼 IgG-TRITC 및 FITC 용합체를 1:100의 농도로, 항-기니아 피그 IgG-FITC 용합체를 1:150 (DAKO Cytomation, Denmark) 농도로 접종하였다. 중복 염색 (double staining) 동안, 병행하여 배양을 수행하였다. 마운팅 배지(mounting medium)로 글래스 슬라이드(glass slides)에 글래스 커버 슬립(Glass cover slip)을 고정하였다. 이미지/Images)을 위하여 Zeiss 형광 현미경 (Zeiss fluorescent microscope) (Zeiss, Germany) 및 공초점 현미경(confocal microscope (Olympus, Japan))를 사용하였다. 소프트 이미징 시스템 비디오 카메라(soft imaging systems video camera)로 사진을 촬영하였다.

[110]

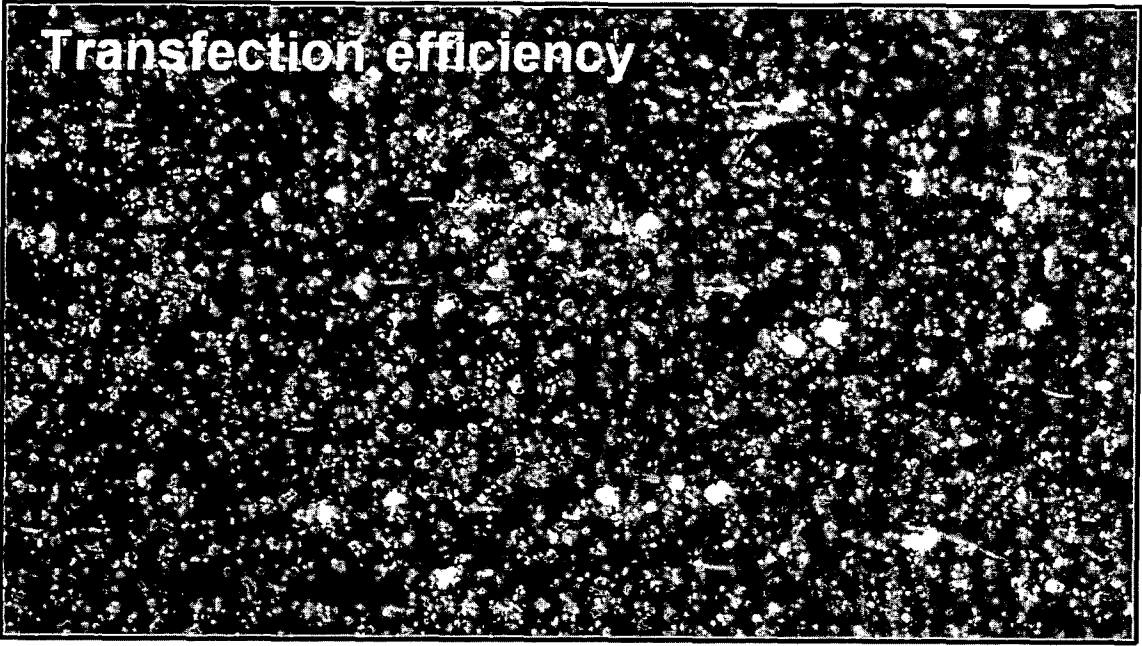
[111] 실시예 8. 데이터 분석 및 통계 (Data analysis and statistics)

[112] Sigma Gel System (SPSS Inc., Chicago, IL)에 기초한 컴퓨터를 사용한 밀도계에 의해 웨스턴 블롯으로부터의 목적 밴드가 스캔되었고 분석되었다. 밀도 값은 $\pm$ SEM으로 표현되었다. 관련성 있는 처리 그룹 간의 현저한 차이점을 측정하기 위하여 Tukey-Kramer 다중-비교 테스트 (Tukey-Kramer multiple-comparisons test)에 따른 단-방향 ANOVA 분석을 수행하였다. 모든 경우에서, 통계적 유의성을 위한 허용 범위는 $P < 0.01$ 였다.

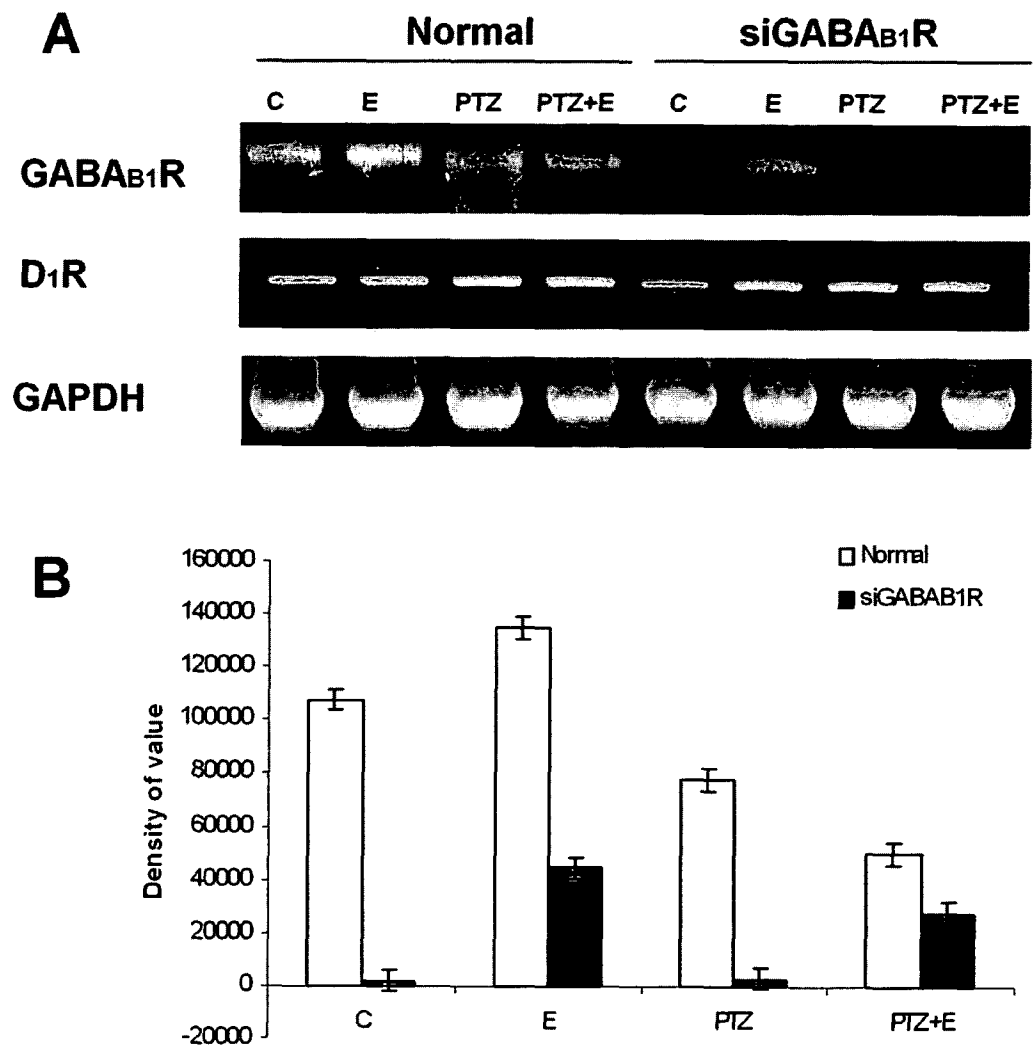
청구범위

- [1] 에탄올 또는 PTZ (Pentylenetetrazol)를 포함하는 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현 저해제.
- [2] 검체에 에탄올 또는 PTZ를 처리하는 단계;
GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현을 억제시키는 단계; 및
상기 검체 및 대조군에 후보 물질을 처리하여 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현 증가를 확인하는 단계를 포함하는 신경 질환 치료제의 스크리닝 방법.
- [3] 제2항에 있어서, 상기 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현을 억제시키는 단계에서, PKA- α 의 발현은 증감변동이 없는 것을 특징으로 하는 신경 질환 치료제의 스크리닝 방법.
- [4] 제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 신경 질환은 간질 (epilepsy), 정신분열증 (schizophrenia), 공황장애 (panic disorder), 우울증 (depression), 정신지체 (mental retardation), 헌팅턴 무도병 (huntington's disease), 경직 (spasticity), 약물 중독 (drug addiction) 및 신경 퇴행성 질환 (mental degeneration)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환을 치료하기 위한 신경 질환 치료제의 스크리닝 방법.
- [5] 검체 내의 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현 감소를 측정하는 것을 특징으로 하는, 신경 질환 진단을 위한 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 검출 방법.
- [6] 제5항에 있어서, 상기 신경 질환은 간질 (epilepsy), 정신분열증 (schizophrenia), 공황장애 (panic disorder), 우울증 (depression), 정신지체 (mental retardation), 헌팅턴 무도병 (huntington's disease), 경직 (spasticity), 약물 중독 (drug addiction) 및 신경 퇴행성 질환 (mental degeneration)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환을 진단하기 위한 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 검출 방법.
- [7] 에탄올 또는 PTZ를 이용하여 동물의 체내에서 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB의 발현을 저해시키는 방법.

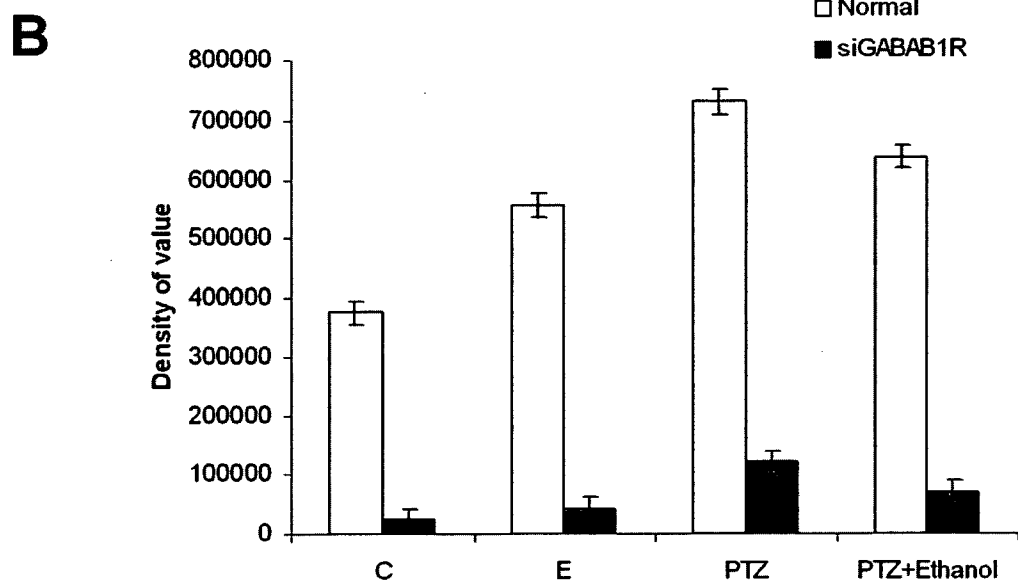
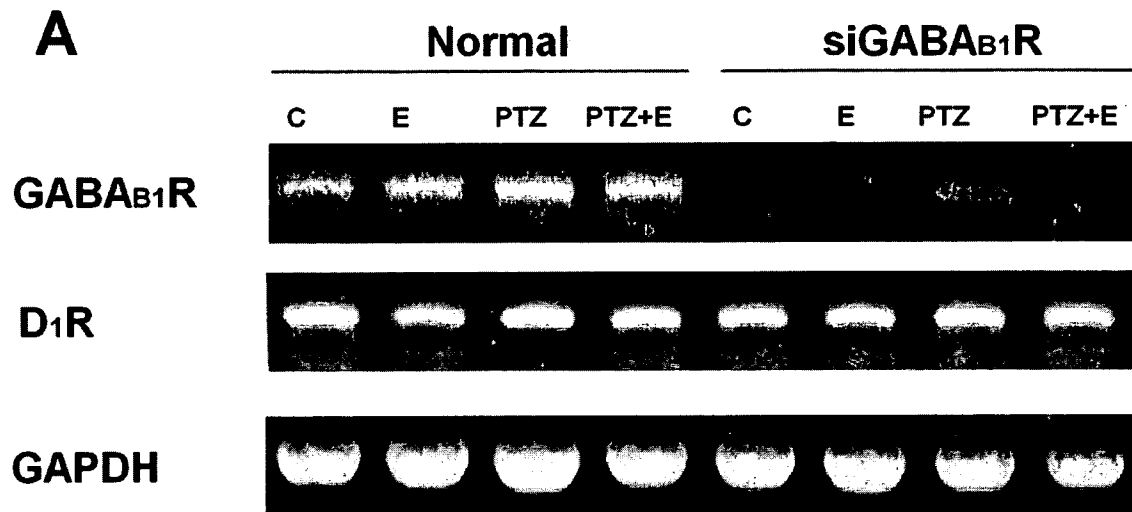
[Fig. 1]



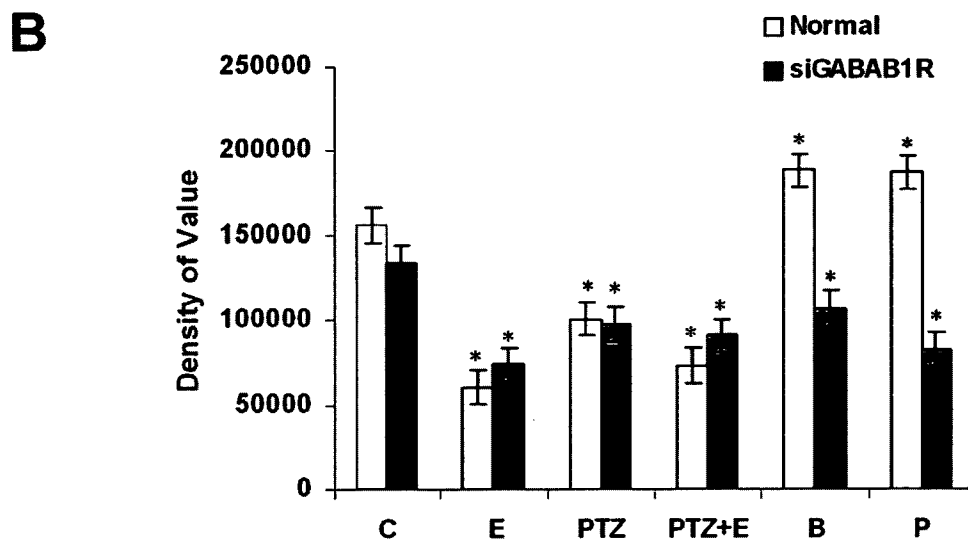
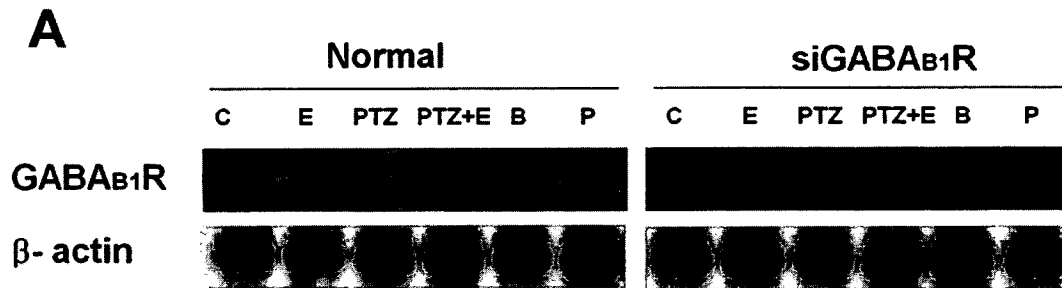
[Fig. 2]



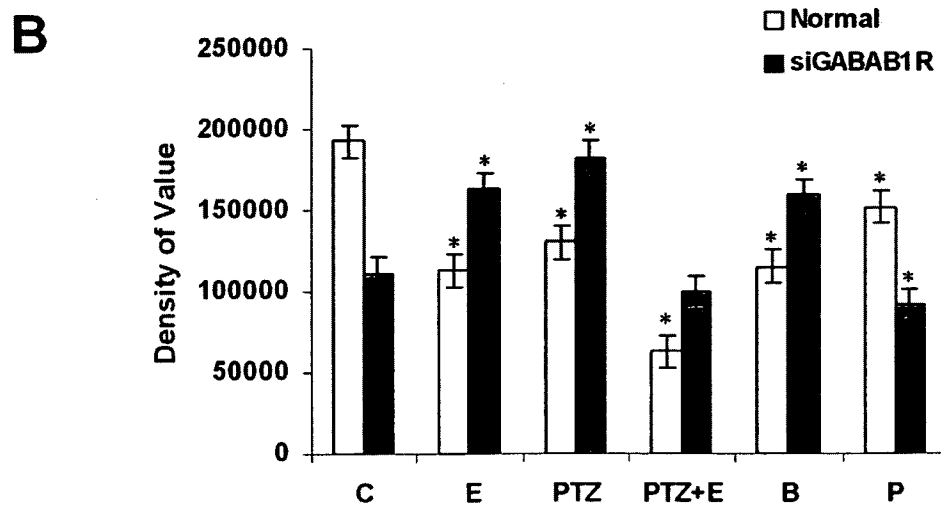
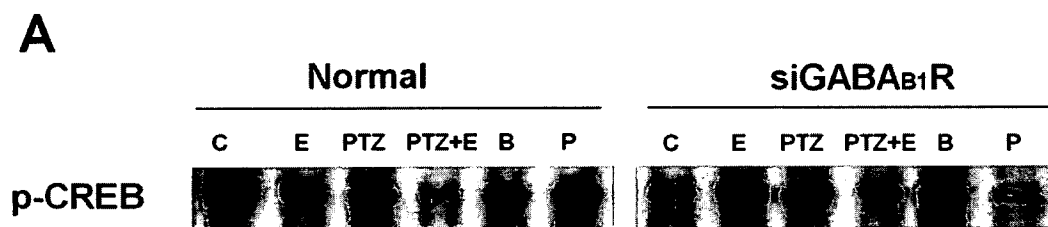
[Fig. 3]



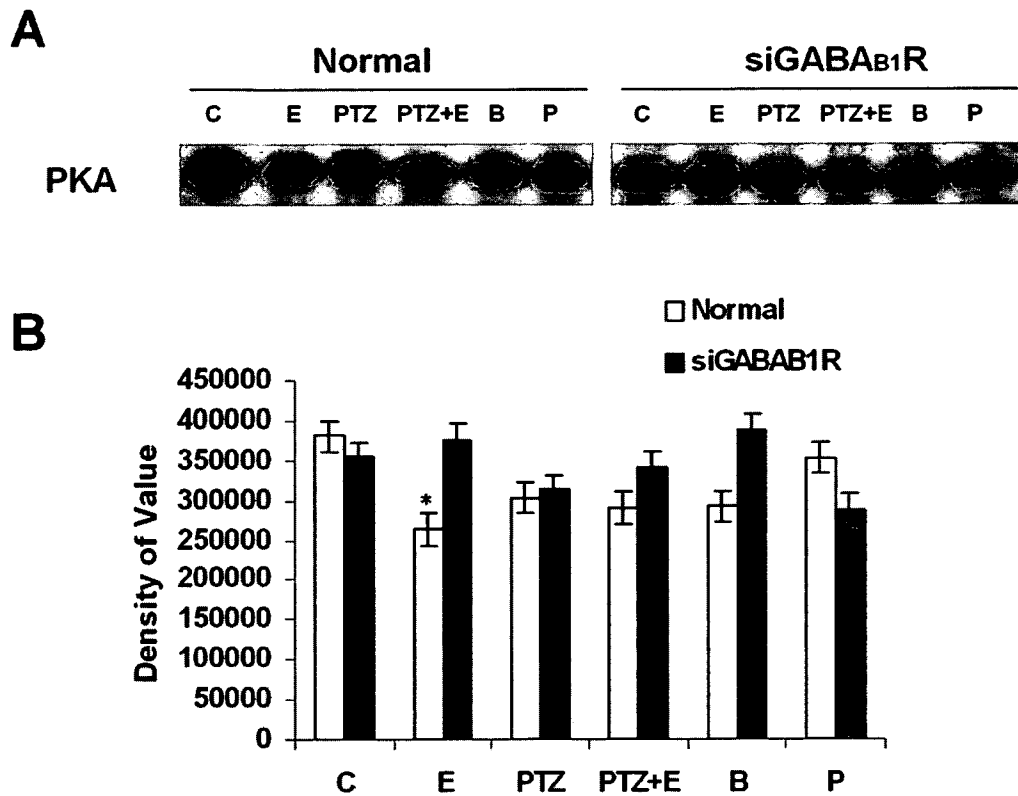
[Fig. 4]



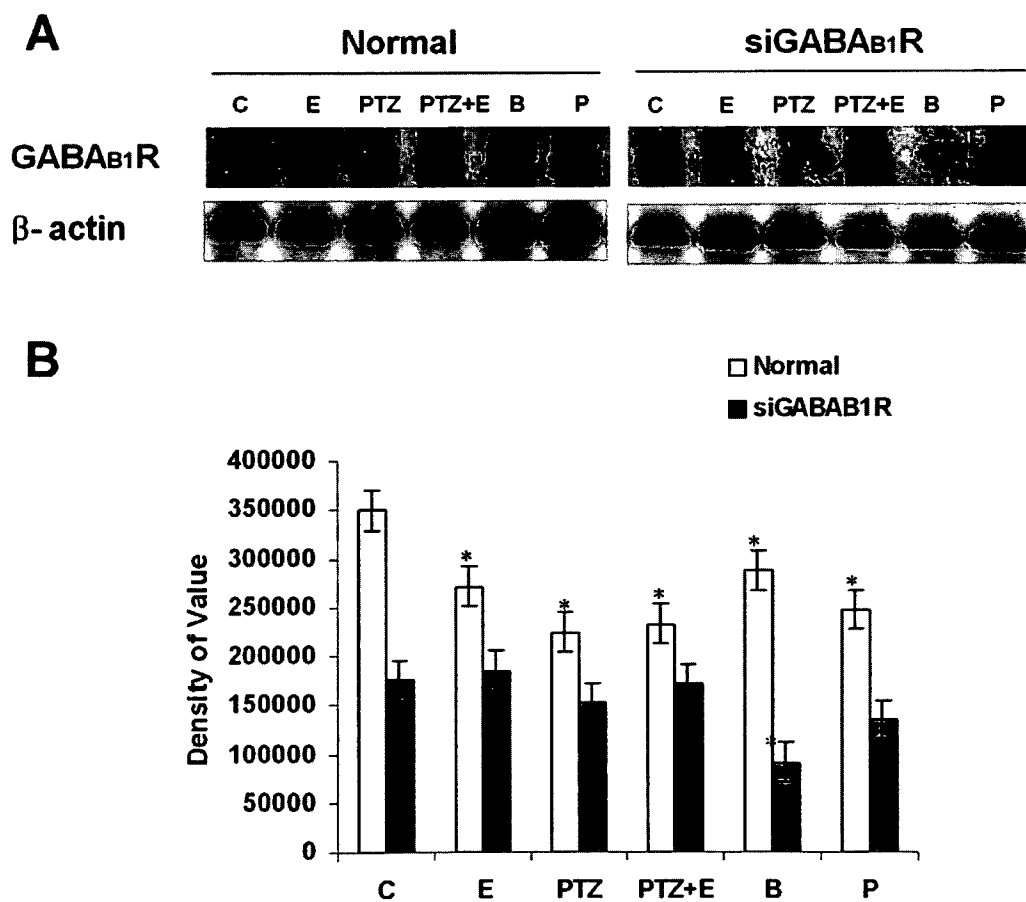
[Fig. 5]



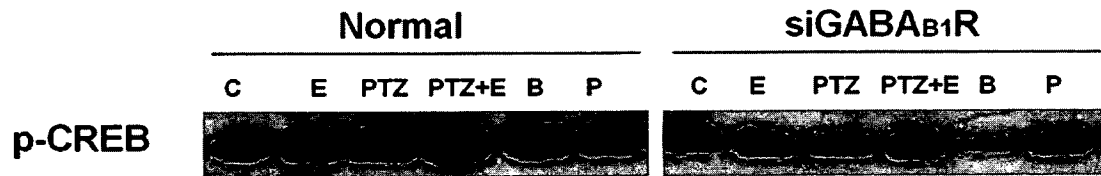
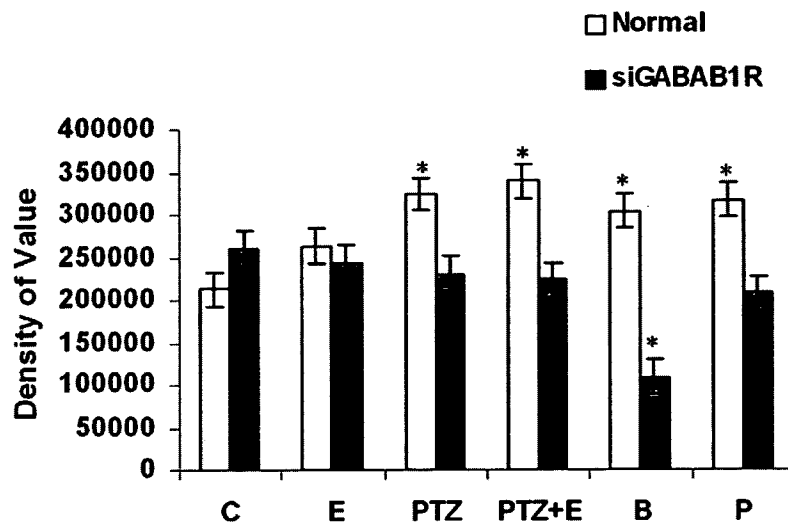
[Fig. 6]



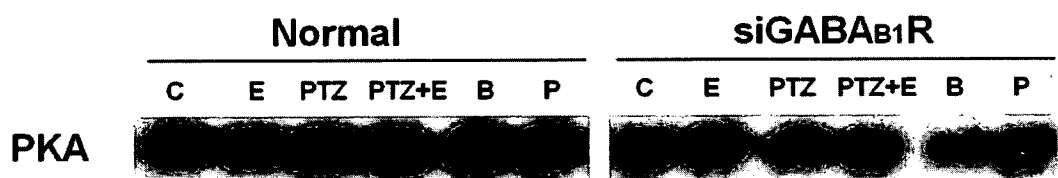
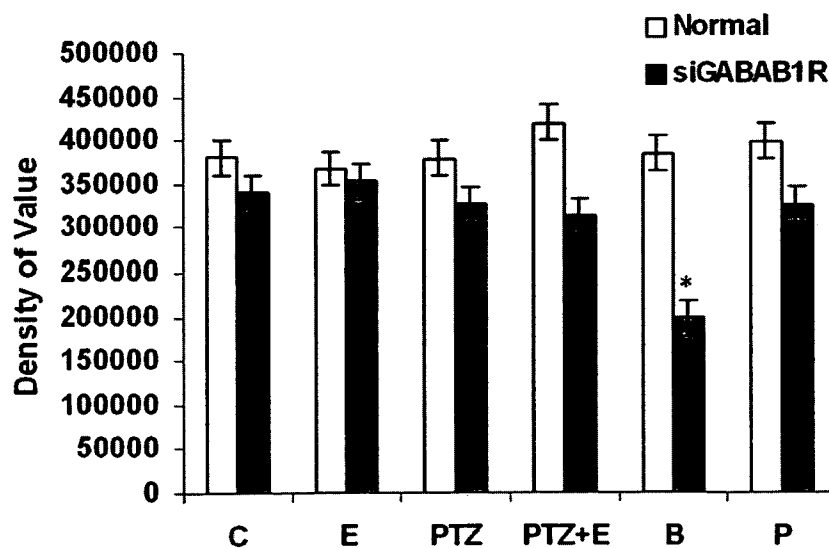
[Fig. 7]



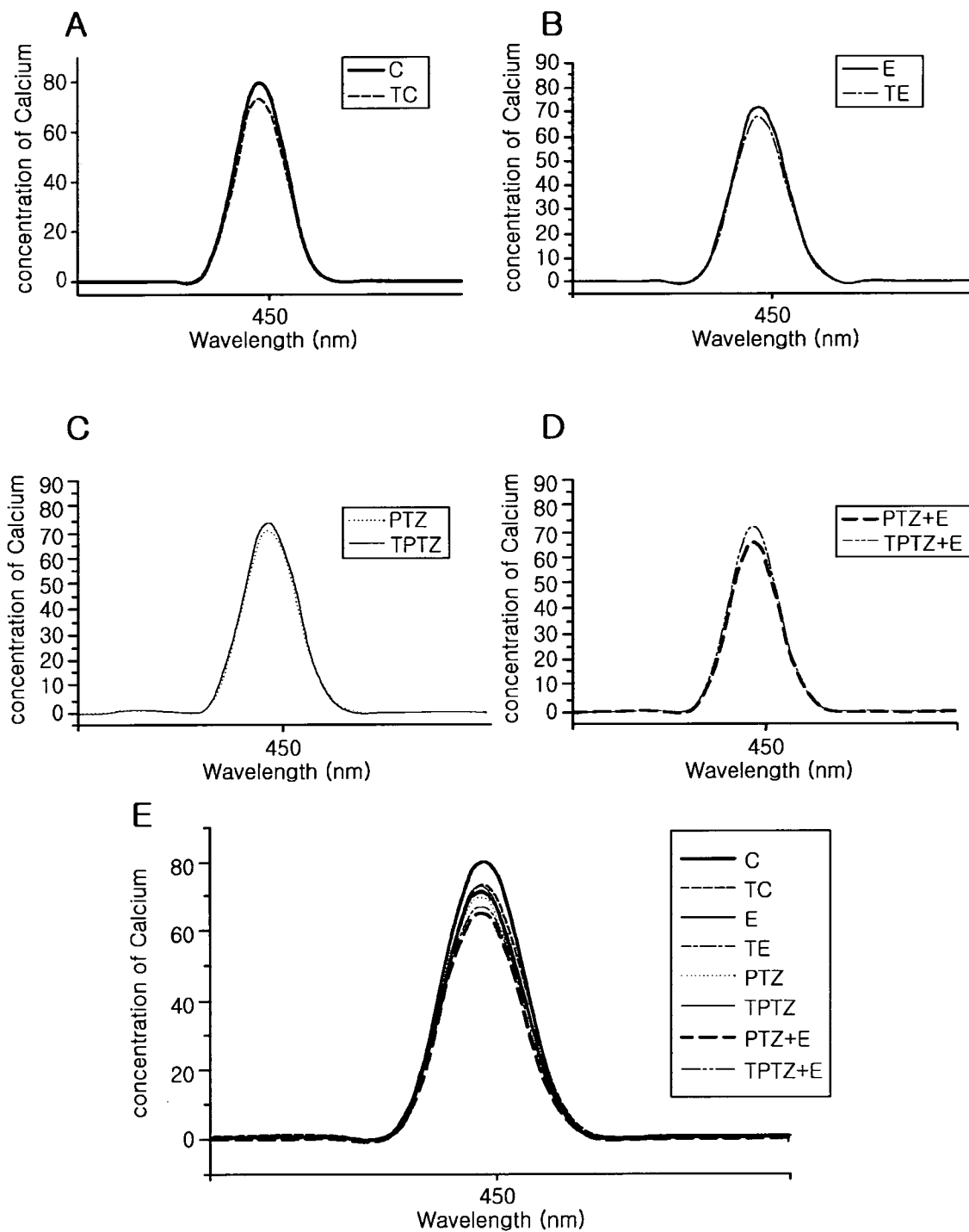
[Fig. 8]

A**B**

[Fig. 9]

A**B**

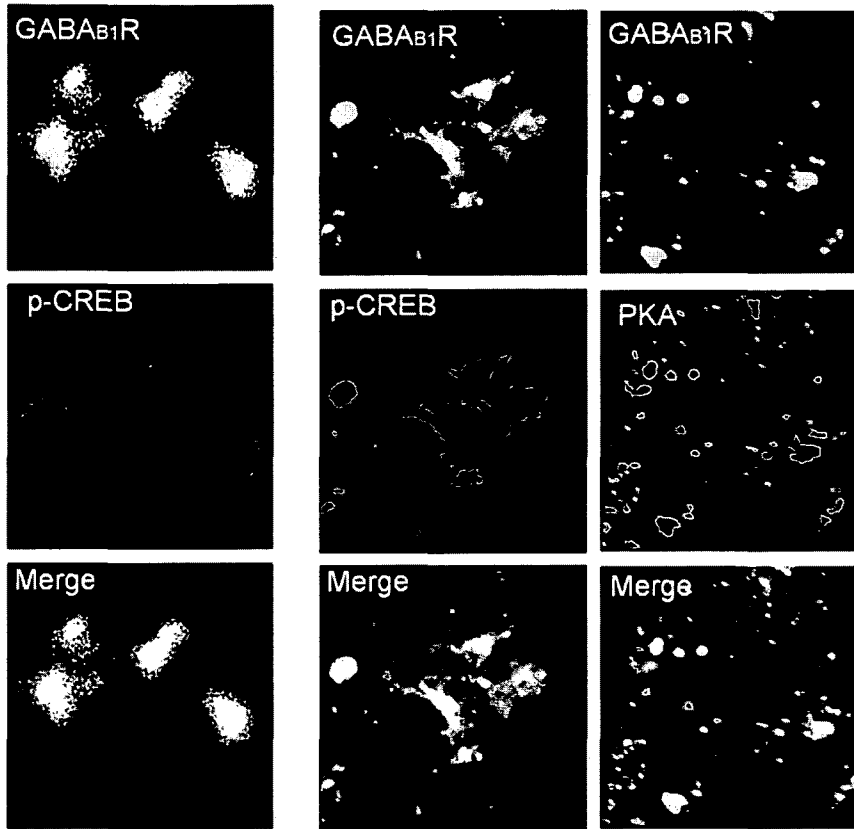
[Fig. 10]

Calcium concentration of siGABA_{B1}R in Cortex

[Fig. 11]

Control cortex

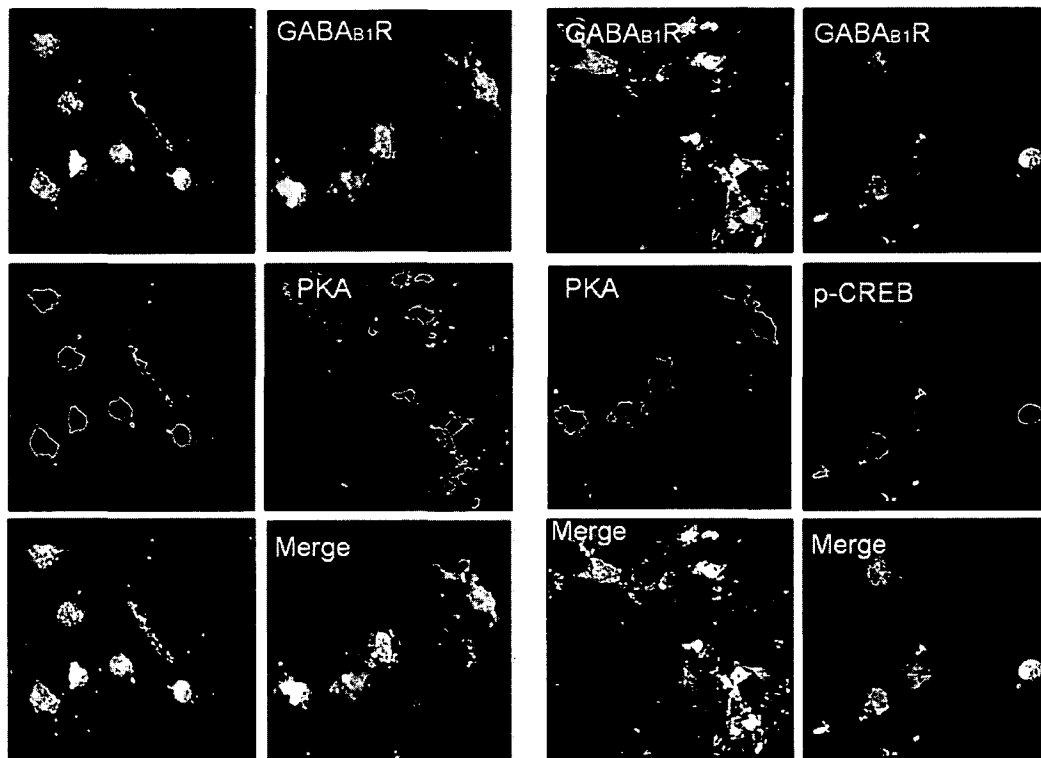
Transfected cortex



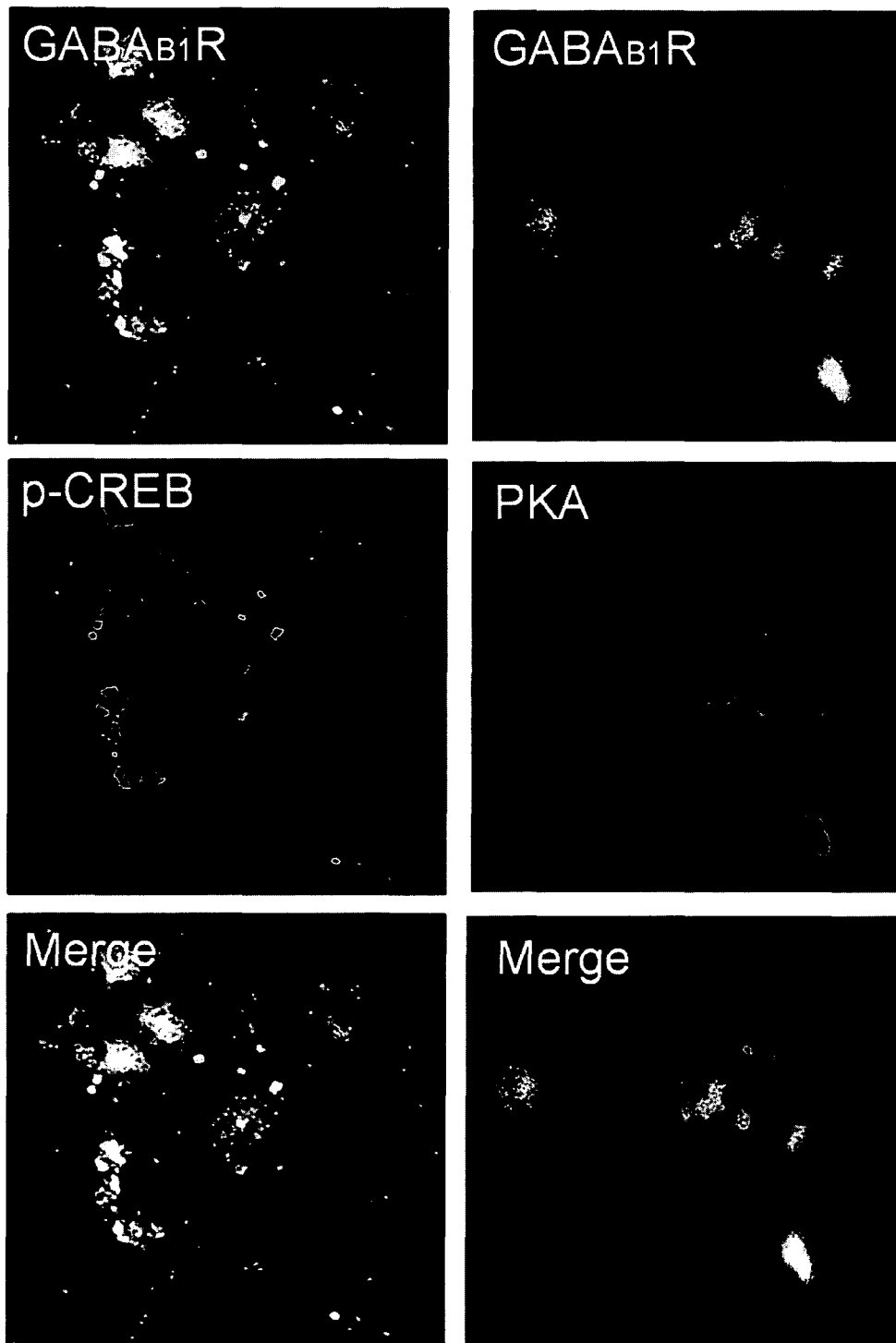
[Fig. 12]

Ethanol cortex

PTZ cortex



[Fig. 13]

Trans PTZ+E cortex

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2009/001796

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/045(2006.01)i, A61K 31/41(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS, Google scholar, Google, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEE, H.Y. et al. "Ethanol's Effect on Intracellular Signal Pathways in Prenatal Rat Cortical Neurons is GABAB1 Dependent" SYNAPSE. 2007, 61:622-628, ISSN: 0887-4476	1-6
Y	See abstract, the results and consideration	1-6
Y	BO, T. et al. "Effects of neonatal recurrent seizures on gamma-aminobutyric acid B1 receptor expression in the rat brain" Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi. 2006, 8(5):402-407, ISSN: 1008-8330	1-6
	See abstract	
A	BROWN, J.T. et al. "Mechanisms contributing to the exacerbated epileptiform activity in hippocampal slices of GABAB1 receptor subunit knockout mice" Epilepsy Research. 2003, 57:121-136, ISSN: 0920-1211	1-6
	See the entire document	
A	WEINER, J.L. et al. "Ethanol modulation of GABAergic transmission: The view from the slice" Pharmacology and Therapeutics. 2006, 111:533-554, ISSN: 0163-7258	1-6
	See the entire document	
A	NAKAMICHI, N. et al. "Transcription Factors and Drugs in the Brain" the Japanese Journal of Pharmacology. 2002, 89:337-348, ISSN: 0021-5198	1-6
	See the entire document	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 DECEMBER 2009 (04.12.2009)

Date of mailing of the international search report

04 DECEMBER 2009 (04.12.2009)

Name and mailing address of the ISA/


 Korean Intellectual Property Office
 Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
 Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2009/001796

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



on paper



in electronic form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in electronic form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2009/001796

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **7**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 7 relates to a method for suppressing the expression of receptors and proteins inside an animal body, which could include humans. Therefore, the claim relates to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method, which is a subject matter for which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/045(2006.01)i, A61K 31/41(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) IPC A61K		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS, Google scholar, Google, PubMed		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	LEE, H.Y. et al. "Ethanol's Effect on Intracellular Signal Pathways in Prenatal Rat Cortical Neurons is GABAB1 Dependent" SYNAPSE. 2007, 61:622-628, ISSN: 0887-4476	1-6
Y	초록, 결과 및 고찰 참조	1-6
Y	BO, T. et al. "Effects of neonatal recurrent seizures on gamma-aminobutyric acid B1 receptor expression in the rat brain" Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi. 2006, 8(5):402-407, ISSN: 1008-8330	1-6
	초록 참조	
A	BROWN, J.T. et al. "Mechanisms contributing to the exacerbated epileptiform activity in hippocampal slices of GABAB1 receptor subunit knockout mice" Epilepsy Research. 2003, 57:121-136, ISSN: 0920-1211	1-6
	문서 전체 참조	
A	WEINER, J.L. et al. "Ethanol modulation of GABAergic transmission: The view from the slice" Pharmacology and Therapeutics. 2006, 111:533-554, ISSN: 0163-7258	1-6
	문서 전체 참조	
A	NAKAMICHI, N. et al. "Transcription Factors and Drugs in the Brain" The Japanese Journal of Pharmacology. 2002, 89:337-348, ISSN: 0021-5198	1-6
	문서 전체 참조	
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☐ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2009년 12월 04일 (04.12.2009)		국제조사보고서 발송일 2009년 12월 04일 (04.12.2009)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 선사로 139, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 이민정 전화번호 82-42-481-5603 

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 대상의 유형

- ☒ 서열목록
☐ 서열목록 관련 테이블

b. 대상의 형태

- ☐ 서면
☒ 전자적 형태

c. 제출시기

- ☒ 출원시 국제출원에 포함
☐ 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출
☐ 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. ☐ 추가로 서열목록 및/또는 서열목록 관련 테이블에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 7
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제7항은 동물의 체내에서 수용체 및 단백질의 발현을 저해시키는 방법이므로 이는 사람을 포함할 수 있고, 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단 방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.