

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 12월 23일 (23.12.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/147273 A2

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/006721
- (22) 국제출원일: 2009년 11월 16일 (16.11.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0054096 2009년 6월 17일 (17.06.2009) 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). **김민정 (KIM, Min Jung) [KR/KR]**; 경상남도 진주시 가좌동 900, 660-701 Gyeongsangnam-do (KR). **이상열 (LEE, Sang Yeol) [KR/KR]**; 경상남도 진주시 망경동 한보아파트 106 동 1806 호, 660-762 Gyeongsangnam-do (KR). **양병철 (YANG, Byoung Chul) [KR/KR]**; 경기도 수원시 권선구 서둔동 농촌진흥청 축산연구소, 441-707 Gyeonggi-do (KR). **박문석 (PARK, Moon Seok) [KR/KR]**; 경상남도 진주시 가좌동 900, 660-701 Gyeongsangnam-do (KR). **이혜령 (LEE, Hae Young) [KR/KR]**; 경상남도 진주시 가좌동 900 경상대학교, 660-701 Gyeongsangnam-do (KR).

(74) 대리인: **손민 (SON, Min)**; 서울 강남구 삼성동 159-9 도심공향타워 6층 한일국제특허사무소, 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, CL, 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, PE, 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, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

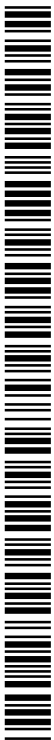
— 조약 제 17 조(2)(a)에 의한 선언서와 함께; 요약서 없이 공개함; 발명의 명칭에 대하여 국제조사기관의 검토가 없었음

(54) Title: METHOD FOR SCREENING AGENTS TO TREAT REPRODUCTIVE FUNCTION DISORDERS CAUSED BY ALCOHOL EXPOSURE

(54) 발명의 명칭: 알코올 노출에 의한 생식기능장애 질환 치료제의 스크리닝 방법

(57) Abstract:

(57) 요약서:



WO 2010/147273 A2

명세서

발명의 명칭: 알코올 노출에 의한 생식기능장애 질환 치료제의 스크리닝 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 알코올 노출에 의한 생식기능장애 관련 질환 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 상세하게는 알코올 노출에 의한 사춘기(puberty) 개체의 생식기관 내 세포의 GnRH 또는 GnRH-R(GnRH 수용체)의 발현 감소를 확인하고 개체에 후보 물질 처리를 처리한 후 상기 발현량의 변화를 확인함으로써 알코올 노출에 의한 생식기능장애 관련 질환 치료제를 스크리닝 하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 황체형성호르몬 분비 호르몬(LHRH)으로도 알려진 고나도트로핀 방출 호르몬(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)은 사람의 생식작용에 있어 중요한 역할을 수행하는 데카펩티드(pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂)이다. GnRH는 시상하부로부터 분비되고 뇌하수체에 도달하면 'GnRH 수용체'와 결합하여 상호작용을 한다. 이와 같은 작용으로 성선자극 호르몬 FSH(난포-자극 호르몬) 및 LH(황체화 호르몬)의 생합성 및 방출이 유도된다. 이러한 GnRH에 관한 연구는 생식기능의 이해는 물론 임상적 치료제 개발에 결정적인 정보를 제공하기 때문에 활발히 진행되어왔다. 일 예로 GnRH의 유전자 변형 혹은 GnRH 신경세포의 기능저하에 의해 생긴 내분비 혹은 신경내분비 질환은 GnRH를 외부에서 맥동적으로 처리함으로써 치료할 수 있음이 보고되어 있다.

[3]

- [4] 기존에는 생식기능장애와 관련하여 뇌하수체의 GnRH의 분비에 집중하여, 이와 관련된 경로에 따라 GnRH 길항제 및 효능제의 투여에 의해 전립선암, 유방암, 자궁내막증, 자궁근종 등과 같은 생식기능장애 치료에 집중되었다. 예를 들면, 상기 증상의 치료의 용도로 류프로렐린(pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt)과 같은 펩티드계 GnRH 효능제는 뇌하수체의 고나도트로핀의 GnRH 수용체에 결합하여, 고나도트로핀의 합성과 분비를 유도하는 역할을 한 반면, GnRH 효능제의 상습적 투여는 고나도트로핀을 고갈시키고, 계속하여 수용체를 하향조절(down regulation)함으로써, 얼마간의 시간(예를 들면, 상습적 투여의 개시 후 2-3주 정도)이 지난 후 스테로이드계 호르몬의 억제를 초래할 수 있다. 또한, 고나도트로핀을 억제하는 작용을 하는 GnRH 길항제는 오늘날, 이러한 길항제의 임상적 사용에 있어 이들의 비교적 낮은 생체이용률 및 히스타민 분비에 의하여 야기되는 지속적 투여(예를 들면, 피하 주사 또는 비내분무)가 이루어져야 하는 등의 부작용이 있었다.

[5]

[6] 한편, 흡연, 스트레스 또는 알코올 섭취 등 다양한 원인에 의해 GnRH의 생체내 생물학적 작용이 제 기능을 하지 못하게 되면 성선기능저하증, 칼만 증후군(Kallmann syndrome), 조기 사춘기증(precocious puberty) 등과 같은 생식기능장애 및 정자 형성 장애 등과 같은 내분비기능 장애 등을 유발할 수 있다고 알려져 있다. 이러한 질환 역시 시상하부로부터 분비되는 GnRH에 의한 조절작용에 의한 것으로 알려져 있으며, 이의 치료를 위하여 GnRH의 길항제 또는 효능제가 투여되고 있는데, 예를 들면 상기 조기 사춘기증의 경우, GnRH 길항제를 투여하고 있다.

[7]

[8] 알코올은 시상하부에서 GnRH 분비를 저해시키는 것으로 알려져 있으며, 감각이 있는 동물에 알코올을 투여하면 황체 형성 호르몬(luteinizing hormone, LH)이 억제되는 경미한 중독(mild intoxication) 현상을 일으킨다고 보고된 바 있다. 그러나, 알코올은 GnRH에 대한 뇌하수체의 반응성을 억제하지는 않으며, 이 같은 결과는 LH를 억제하는 데 있어 알코올의 영향이 시상하부 문맥관(hypophyseal portal vessels)으로 박동성 GnRH 분비를 억제하는 역할만을 하는 것을 의미한다(W. L. Dees, V. Rettori, G. P. Kozlowski, S. M. McCann, Alcohol 2 (1985)641-646). 뿐만 아니라 이와 같은 맥락으로 마취시켜 거세한 수컷 래트에서, 문맥 순환으로 GnRH의 분비가 알코올을 주입하면 감소한다고 개시하고 있다(M. Ching et al., Brain Res. 443 (1988) 325-328). 또한, 이와 유사하게 5주 동안 알코올이 포함된 식이 요법을 한 수컷 래트는 황체 형성 호르몬(Luteinizing Hormone, LH), 난포 자극 호르몬(follicle stimulating hormone, FSH), 및 테스토스테론 수준이 낮아짐을 보이는 등 시상하부가 알코올이 작용하는 초기 부위라고 개시하고 있다(P. J. Little, et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 263 (1992) 1056-1061). 그러나 알코올 노출에 의한 사춘기 생식기관에서 GnRH 또는 GnRH-R에 대한 발현을 직접적으로 억제함으로써 내분비 및 생식기능장애를 유발한다는 사실 또는 이를 이용한 치료제에 관한 연구는 전무한 상태이다.

[9]

[10] GnRH-R(GnRH 수용체) 중 특히 사람의 GnRH-R 유전자는 3개의 엑손(exon)과 2개의 인트론(intron)으로 구성되어 있어(Fan NC et al. Moll. Cell. Endocrinol. 107, R1-R8, 1995), 다양한 스플라이싱(splicing)이나 여러 가지 변종의 전이가 가능하다. GnRH와 GnRH-R은 모두 주요 림프기관이나 림프구를 포함한 면역세포에서 발견되었으며(Standaert FE et al., Biol. Reprod., 46, 997-1000, 1992), GnRH-R은 뇌하수체 이외에 고환이나 난소에서도 발견되었다(Botte MC et al., J. Endocrinol. 159, 179-189, 1998). 또한 성장호르몬, 황체호르몬 또는 갑상선자극호르몬을 분비하는 뇌하수체 선종(pituitary adenoma)에서도 발견되었다(Rosa SL et al., Virchows Arch., 437, 264-269, 2000). GnRH-R의 기능과 관련하여 중추신경계 뇌하수체에서의 생리학적인 기능에 관해서는 잘 알려져

있지만, 이 부위를 제외한 다른 부위에서 발견되는 GnRH-R에 대한 정보는 거의 연구되어 있지 않은 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명자들은 알코올 노출에 의한 사춘기 생식기관에서의 GnRH 또는 GnRH-R mRNA 발현 변화를 확인하고, 후보 물질에 대한 상기 발현 증감의 변화를 통해 생식기능장애 관련 질환 치료제의 스크리닝 방법을 개발하고자 하였다.

과제 해결 수단

- [12] 본 발명의 목적은 (a) 사춘기(puberty) 개체의 생식기관 내 세포의 GnRH 또는 GnRH-R(GnRH 수용체)의 발현을 확인하는 단계; (b) 상기 개체에 알코올을 투여하는 단계; (c) 알코올이 투여된 개체의 GnRH 또는 GnRH-R의 발현량이 (a) 단계에 비해 감소된 개체를 선별하는 단계; (d) 선별된 개체에 후보 물질을 투여하는 단계; 및 (e) 상기 GnRH 발현량 또는 GnRH-R 발현량의 증가를 확인하는 단계를 포함하는 사춘기 생식기능장애 관련 질환 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 효과

- [13] 본 발명은 생식기관에서 연령에 따른 알코올에 의한 생식기능장애 관련 질환 치료제 발굴을 위하여 GnRH 및 GnRH-R의 mRNA 발현량 및 비율 변화를 측정하는 한편, 이의 발현량의 감소를 확인함으로써 생식기능장애 관련 질환을 예상할 수 있고, 나아가 상기 발현량이 감소된 개체에 후보 물질을 처리하여 GnRH 또는 GnRH-R의 발현량의 증가를 확인함으로써 상기 질환에 대한 치료제를 개발할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [14] 도 1은 래트의 뇌에 있는 시상하부(hypothalamus)의 POA(preoptic area)에서 *in situ* 혼성화(hybridization)에 의한 GnRH mRNAs의 방사선 사진(→)을 나타낸 것이다. 성체 래트에서, 알코올을 처리한 그룹(도 1d)의 신호는 정상 그룹(도 1c)에 비하여 현저한 변화가 없었다. 사춘기 래트(Pubertal rat) 역시 알코올을 처리한 그룹(도 1f) 및 대조군(도 1e)이 차이가 나지 않았다. 도 1a는 밝은 영역 사진에서 크레질-마이올렛(cresyl-violet) 염색 처리한 POA를 나타낸 것이고 도 1b는 어두운 부분에서 신호를 나타낸다. 스케일 바(scale bars) = 200 μ m (도 1a) 및 50 μ m (도 1f).

[15]

- [16] 도 2는 RPA에 의한 GnRH mRNA양을 나타낸 것이다.

- [17] (POA: 시색전부(preoptic area); OC: 시신경 교차(optic chiasm); UP: 잘려지지 않은 GnRH 및 사이클로필린 cRNA; DP: 리보뉴클리에이즈 A로 잘려진 프로브 N: 정상 그룹 (n=5); E1: 2주간 알코올 처리한 그룹 ; E2: 4주간 알코올 처리한

그룹)

[18]

[19] 도 3은 사이클로필린(cyclophilin) mRNA로 보정한 GnRH mRNAs의 밀도값을 나타낸다. GnRH mRNA는 점진적으로 성체에서 감소되었으나, 사춘기 래트에서는 약간 증가하였다. $*P<0.05$, $***P<0.001$ (t-test)

[20]

[21] 도 4는 래트의 정소의 세르토리 세포(sertoli cells)에서 *in situ* 혼성화에 의한 GnRH mRNAs(→)의 방사선 사진을 나타낸 것이다. 도 4a는 사진의 어두운 영역에서 GnRH mRNA를 나타낸 것이고, 도 4b는 밝은 영역에서의 메틸-그린(methyl-green)으로 염색한 세정관(seminiferous tube)을 나타낸 것이다. 신호는 정상군(도 4c 및 도 4e)과 알코올 처리 군(도 4d 및 도 4f)을 비교하였으며 상기 신호는 성체(도 4c 및 도 4d) 및 사춘기 래트(도 4e 및 도 4f) 모두 알코올 처리에 의해 현저히 감소하였다. 스케일 바 = 200 μ m (도 4b) 50 μ m (도 4f).

[22]

[23] 도 5는 RPA에 의한 정소에서의 GnRH mRNA 양을 나타낸 것이다.

[24]

[25] 도 6은 사이클로필린 mRNA로 보정한 GnRH mRNAs의 밀도 값을 나타낸 것이다. 발현 수준은 사춘기 래트에서 2주(E1) 및 4주(E2) 동안 현저히 감소하였다. 그러나, 성체에서 상기 감소는 정상 값의 반으로 회복되었다. $***P<0.001$ (t-test).

[26]

[27] 도 7은 래트 정소의 레이디히 세포(Leydig cells)에서 *in situ* 혼성화에 의한 GnRH-R mRNAs(→)의 방사선 사진을 나타낸 것이다. 사춘기 래트에서, GnRH-R mRNA 발현은 정상군(도 7a)에 비하여 알코올 노출(도 7b)에 의해 감소되었다. 스케일 바= 50 μ m.

[28]

[29] 도 8은 RPA에 의한 GnRH-R mRNAs 신호를 나타낸 것이다.

[30]

[31] 도 9는 사이클로필린 mRNA로 보정한 GnRH-R mRNAs의 밀도값을 나타낸 것이다. GnRH-R mRNAs 양은 사춘기 래트에서 2주(E1)에서는 현저하게 감소하였고 4주(E2)에서는 유지된 반면, 성체에서는 점진적으로 감소하였다. $***P<0.001$ (t-test).

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[32]

하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 사춘기(puberty) 개체의 생식기관 내 세포의 GnRH 또는 GnRH-R(GnRH 수용체)의 발현을 확인하는 단계; (b) 상기 개체에 알코올을 투여하는 단계; (c) 알코올이 투여된 개체의 GnRH 또는 GnRH-R의 발현량이 (a) 단계에 비해 감소된 개체를 선별하는 단계; (d) 선별된 개체에 후보

물질을 투여하는 단계; 및 (e) 상기 GnRH 발현량 또는 GnRH-R 발현량의 증가를 확인하는 단계를 포함하는 사춘기 생식기능장애 관련 질환 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

[33]

[34] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 사춘기(puberty) 개체의 생식기관 내 세포의 GnRH 또는 GnRH-R(GnRH 수용체)의 발현을 확인할 수 있으며, 보다 상세하게는 알코올 투여 개체와 정상 개체(대조군)을 비교함으로써 알코올 노출에 따른 GnRH 및 GnRH-R의 발현 변화 및 그에 따른 효과를 관찰할 수 있다.

[35]

[36] 본 발명에서의 용어, '고나도트로핀 방출 호르몬 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH)'이란, 시상하부에서 합성되는 신경펩타이드로 시상하부-뇌하수체 축(hypothalmpituitary axis)과 관련되어 시상하부에서 배타적으로 분비되는 호르몬으로서, 생식내 분비 조절에서 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. GnRH는 주로 시상하부(hypothalamus)에서 분비되어 뇌하수체(pituitary)에 도달되면, 뇌하수체 세포막에 존재하고 있는 'GnRH 수용체'와 결합하여 상호작용을 나타낸다. GnRH는 시상하부에서 펄스 방식으로 분비되는데, 뇌하수체 세포에서 이루어지는 정상적인 생리화적인 합성 및 분비에 관련된 반응은 주로 수용체에 도달하는 이러한 펄스의 방식에 달려있다(Belchetz PE et al., Science 202, 631-633, 1978)고 알려져 있다. GnRH는 시상하부에서 분비되어 LH, FSH 분비를 조절하는 역할을 하며, 뇌하수체의 여포자극호르몬(follicle-stimulating hormone, FSH)과 황체형성호르몬(luteinizing hormone, LH) 분비를 자극하는데, FSH는 생식소의 발육을 촉진시키고, LH는 수컷의 경우 테스토스테론의 생산 및 분비에 관여하며, 특히 암컷의 경우 배란을 유도한다. GnRH에 의해 분비되는 FSH 및 LH는 생식소에서 스테로이드 호르몬 분비에 관여하여, 정자와 난자가 성숙하게 된다.

[37]

이러한 GnRH는 시상하부에서만 생산된다고 여겨져 왔으나, 최근에는 시상하부 외(extra hypothalamic)에서도 GnRH가 발견되고 있으며, 척수 신경절(spinal ganglia), 췌장 소도 세포(pancreatic islet cells), 난소 및 정소를 포함한 생식소에서의 GnRH가 그 예이다. 그럼에도 불구하고 이들 시상하부 외에서 발견되는 GnRH에 대한 정확한 기능은 현재까지 규명되지 못하고 있는 실정이다.

[38]

[39] 한편, GnRH와 알코올의 영향과 관련하여, 알코올이 시상하부의 GnRH 분비에 영향을 준다는 사실이 일부 보고되었으나, 본 발명의 알코올과 생식기관 GnRH의 발현 조절과 관련하여서는 알려진 바 없다. 나아가 알코올이 특히 사춘기 개체 생식기관의 GnRH 발현에 영향을 미치며, 알코올에의 노출이 중단된 후에도 성체에 비해 그 회복력이 현저히 저하되어 정상적인 생식기관의 발달에 영향을 미친다는 사실을 본 발명자들이 최초로 규명하였다.

[40] 특히, 본 발명은 알코올이 시상하부의 GnRH의 분비에 영향을 미침으로써 HPG (Hypothalamo-Pituitary-Gonad)축에 의한 호르몬 분비 경로를 파괴하여 정상적인 생식기관의 반응이 일어나지 못하게 하는 간접적인 경로에 의한 영향, 및 생식기관에서 분비되는 GnRH의 분비에도 직접적인 영향을 끼침으로써 생식기관의 반응 및 발달에 있어서 이중 효과를 나타냄을 처음으로 밝혔다. 바람직하게 본 발명은 GnRH가 시상하부 및 정소의 세정관 내 세르토리 세포에서 발현됨을 확인하는 한편(실시에 1 내지 3), 알코올 노출 기간(단기 ; 2주, 장기 ; 4주)에 따라 연령 의존적으로 GnRH의 발현량 변화를 측정한 결과, 알코올에 장기간 노출될 수록, 특히 성체에 비하여 사춘기 세정관의 세르토리 세포(sertoli cells)에서 GnRH의 발현량이 감소(도 1 내지 6)됨을 확인하였다. 뿐만 아니라 알코올에 노출된 경우에도 성체에서 GnRH의 발현량은 회복 양상을 나타내었으나, 사춘기에서는 알코올 노출에 의해 감소된 GnRH 발현이 회복되지 않아 알코올이 사춘기 생식기관의 정상적인 발달을 저해하는 것으로 나타났다(도 4 내지 6).

[41]

[42] 본 발명에서의 용어, '고나도트로핀 방출 호르몬 수용체(gonadotropin-releasing hormone-Receptor, GnRH-R)'란, 시상하부에서 분비되어 뇌하수체에 도달한 GnRH와 결합하는 특이성의 고 친화성 수용체로 알려져 있으며, 생쥐의 뇌하수체 세포에서 최초로 GnRH 수용체가 클로닝 된 이후 이 수용체의 cDNA 염기서열에 기초하여 사람, 양, 원숭이 등 포유동물에서 GnRH-R가 클로닝되었다.

[43]

[44] 바람직하게 본 발명의 GnRH-R은 생식기관에서 발현되는 GnRH-R을 의미하며, 기존에는 GnRH-R이 뇌하수체에서만 발현되는 수용체로 여겨져왔으나, 최근 시상하부 뿐만 아니라 시상하부 외 고환 및 전립선에서 발견되었고, 특히 여포세포(granulose cells)와 레이디히 세포(Leydig cells)에서 GnRH-R의 존재가 확인되었지만, 이들 기관에서 GnRH-R의 정확한 역할은 명확하게 밝혀지지 않았다.

[45]

[46] 한편, 알코올에 의한 생식기능장애와 관련하여, 만성 알코올 노출 후 시상하부에서 GnRH-R의 유지를 억제하지 않는다고 보고된 바 있다(IIRIA SALONEN et al., Biology of Reproduction 42, 55-62(1990)). 그러나 본 발명에서는 GnRH 뿐만 아니라, GnRH-R 또한 알코올 노출에 의한 생식기관의 기능 및 발달에 영향을 끼치는 것을 확인하였으며, 보다 상세하게는 알코올 노출에 의해 생식기관 내의 GnRH 및 GnRH-R 발현이 감소하였고, 특히 이러한 양상은 사춘기 개체에서 현저하였으며, 사춘기 개체에서는 알코올 노출 후 GnRH 및 GnRH-R 발현의 회복을 나타내지 않는 것을 확인하였다.

[47] 바람직한 본 발명의 실시예에서는 정소의 레이디히 세포에서 GnRH-R의

발현을 확인하는 한편, 알코올 노출 기간(단기; 2주, 장기; 4주)에 따라 GnRH-R의 발현이 감소되었음을 확인하였고(도 7 내지 9), 이러한 발현 감소는 성체 보다 사춘기 개체에서 현저하였다.

[48]

[49] 본 발명에서의 용어, '세정관'이란, 정세관이라고도 하며, 정소의 기능 단위인 정소 소엽의 90% 정도를 차지하고 직경은 약 0.2mm, 길이는 30~70cm 이다. 정자를 생산하는 장소인 곡세정관과 곡세정관을 정소망에 연결하는 직세정관으로 구분되며, 좁은 의미에서 곡세정관을 세정관이라고 한다. 한편, 본 발명에서의 용어, '세르토리 세포(Sertoli's cell)'란, 고환의 세정관에 있는 지주세포로서 정자 발생세포의 지주와 영양, 식작용에 관여하여 보호하는 역할을 한다. 또한, 본 발명에서의 '레이디히 세포(Leydig cell)'란, 세정관 사이에 위치하는 세포로서 간질세포라고도 하며 상기 세포는 뇌하수체전엽에서 분비되는 LH(luteinizing hormone)의 작용을 받아 남성호르몬인 테스토스테론(testosterone)의 생산 및 분비에 관여한다.

[50] 세르토리 세포(sertoli cells)에서 생산되는 GnRH는 레이디히 세포(Leydig cells)에서 발현되는 GnRH-R과 상호 작용하며, 이는 정자 발달에 있어서 구조적 및 대사적 지지를 제공하기 위한 테스토스테론 분비에 기여하는 국소적 신호 전달(local communication)로서 작용한다. 바람직한 본 발명의 실시예에서는 생식기관 정소의 세르토리 세포 및 레이디히 세포에서 각각 GnRH 및 GnRH-R의 발현을 확인하고, 알코올 노출 기간에 따라 발현량이 감소함을 확인하였다.

[51]

[52] 본 발명에서의 용어 '알코올'이란, 일반식이 ROH (R=알킬기)로 표현되는 탄화수소의 수소 원자가 하이드록시기 (-OH)로 치환된 화합물의 총칭을 의미하며, 바람직하게는 에탄올을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 신경계와 관련하여서 알코올을 섭취할 경우 대뇌의 기능 억제로 인해 흥분 상태가 되고, 이후 중추신경 억제의 효과가 나타나는 것으로 알려져 있다. 그 외에도 개체 내에서 알코올의 작용기전은 매우 다양한데, 구체적으로 세포막과 세포내 대사에 직접적으로 작용할 뿐만 아니라 급성 중독이나 금단, 구역, 구토 등을 유발할 수 있다. 알코올에 의한 손상과 관련된 질환에는 알코올 섭취에 의한 지방간과 알코올성 간염 및 간경화를 포함하는 알코올성 간질환과 중추 신경계 질환, 알코올성 심근병(심근세포의 비대 및 위축), 부정맥(심방, 심실 부정맥), 동맥경화증, 성욕감소, 통풍, 고혈압, 뇌졸중, 췌장염, 식도염, 위염, 십이지장염, 식도암, 직장암, 영양 태아알코올증후군(성장지체, 안면기형, 중추신경계 이상), 또는 영양 결핍 등이 있다.

[53]

[54] 특히, 생식기능과 관련하여 알코올은 고환에 직접적인 독성을 나타내며 테스토스테론의 수준을 낮추어 남자의 특징이 사라지고 가슴이 커지는 것 같은 여성화 현상을 일으킬 수 있고, 정자 발달에 필수적인 비타민 A 대사를 방해하여

정자의 정상적인 구조 및 운동을 저해하기도 한다. 뿐만 아니라 이러한 기능 부전은 알코올이 호르몬의 조절작용을 직접 저해할 수 있고, 시상하부 GnRH 감소를 포함하는 HPG 축 파괴를 통하여 신경 내분비계를 교란시키는 것으로 알려져 있다. 또한, 알코올의 섭취와 관련하여 시상하부의 GnRH를 감소시킨다는 사실이 보고되어 있다. 그러나 정소를 포함하는 생식기관에서 GnRH 및 GnRH-R의 발현 양상 및 그에 따른 생식기능장애에 대해서는 알려진 바 없다. 따라서 알코올 노출에 의한 생식기능 관련 질환을 진단하기 위한 방법, 상기 질환을 치료하기 위한 치료제의 스크리닝 방법, 및 치료제에 대해서는 현재까지 규명된 바 없으며, 나아가 알코올이 사춘기 개체의 생식기관에 미치는 구체적인 영향에 대해서는 명확히 규명되지 못하고 있다.

[55] 본 발명은 단기 및 장기 알코올을 투여의 경우, 대조군에 비해 GnRH-R mRNA 발현 수준의 감소를 유도하였으며, 이로부터 알코올이 생식기관의 활성을 저해함으로써 영향을 미치고, 특히 남성 생식기관에서의 GnRH/GnRH-R mRNA 감소는 정자 생산 장애를 일으킴을 확인하였다.

[56]

[57] 상기 알코올의 투여는 그 방법에 있어서, 경구, 정맥내, 피하, 피내, 비강내, 복강내, 근육내, 경피등 다양한 방법을 이용할 수 있고, 투여량은 개체의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며 당업자에게 용이하게 결정될 수 있다.

[58] 바람직하게 본 발명의 GnRH 또는 GnRH-R의 발현량 확인 방법은 당업계에서 사용되는 통상의 발현 확인 방법을 제한없이 사용할 수 있다. 또한 발현량의 확인은 당업자의 선택 또는 필요에 따라 mRNA 수준 또는 이들에 의해 코딩되는 단백질 수준으로부터 측정될 수 있으며, 그 예로 mRNA의 경우 해당 서열에 상보적인 프라이머 또는 프로브 서열을 통해 확인할 수 있고, 단백질의 경우, 단백질 또는 이의 단편에 결합하는 항체를 사용함으로써 확인할 수 있다. 바람직하게 본 발명은 mRNA 수준에서의 GnRH 또는 GnRH-R의 발현양상을 확인하기 위하여, in situ 혼성화 및 RNase 보호 분석법(RNase protection assay, RPA)을 사용할 수 있다.

[59]

[60] 본 발명에서의 용어, 'mRNA 발현수준 확인'이란 생식기능장애 관련 질환을 진단하기 위하여 개체에서 GnRH 또는 GnRH-R mRNA 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정한다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명에서 '단백질 발현수준 확인'이란, 생식기능장애 관련 질환을 진단하기 위하여 개체에서 GnRH 또는 GnRH-R mRNA로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 바람직하게는, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를

이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 또한, 상기 단백질의 발현 확인은 GnRH 또는 GnRH-R 단백질 각각에 대한 특이적 항체를 이용하여 면역 측정법에 의해 단백질의 양을 확인할 수 있으며, 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블롯, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선 면역 분석법 (radioimmunoassay, RIA), 방사선 면역 확산법 (radioimmunodiffusion), 오우크테로니 (ouchterlony) 면역 확산법, 로켓 (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 제한되는 것은 아니다. 또한 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. 제2항체 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.

[61] 바람직한 본 발명의 실시예에서는 생식기관에서 GnRH 또는 GnRH-R mRNA 발현을 확인하고 특히, 정소의 세르토리 세포와 레이디히 세포에서 각각 GnRH 및 GnRH-R의 발현 양상을 RNase 보호 분석법(RNase protection assay, RPA)을 통하여 측정한 결과(실시예 3), 알코올 노출에 의해 상기 발현량이 감소됨을 확인하였고 이러한 발현 양상이 사춘기 개체에서는 회복되지 않음을 확인하였다. 따라서 이로부터 알코올이 사춘기 개체에 있어서 생식기능 발달을 저해시키며, 생식기능장애 관련 질환을 유발하는 것을 확인하였다(도 4 내지 9).

[62]

[63] 바람직하게 본 발명의 생식기능장애 관련 질환은 알코올 노출에 의해 생식기관의 GnRH 또는 GnRH-R의 발현에 의해 유발되는 모든 생식기능 관련 질환을 의미하며, 그 예로 남성에게 있어 성선기능저하증 (고환 위축, 발기부전, 성욕 감퇴, 모발성장의 감소, 전립선 크기의 감소, 정자수의 감소)과 생식력 감소, 섬유종, 모발성장 감소, 남성의 양성 전립선 과다형성증, 전립선암 또는 성조숙증 등이 있으나, 이들 예에 의해 본 발명의 생식기능장애 관련 질환의 예가 제한되는 것은 아니다.

[64]

[65] 본 발명에서 사용되는 개체는 개, 소, 말, 토끼, 마우스, 래트, 닭 또는 인간을 포함한 포유류 전체를 의미하나, 상기 예에 의해 본 발명의 포유류가 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 마우스를 사용하여 사춘기 정소에서 알코올 노출에 의한 생식기능장애 여부를 측정하였다.

[66]

[67] 또한 본 발명은 바람직하게 GnRH 또는 GnRH-R의 발현이 감소된 개체를 선별하는 한편, 이들에 후보 물질을 투여하여 GnRH 또는 GnRH-R 발현량 증감을 확인함으로써 해당 후보 물질을 사춘기 생식기능장애 관련 질환의 치료제로 판정할 수 있고, 이를 통하여 상기 질환의 치료제를 스크리닝할 수 있다.

[68]

[69] 본 발명에서의 용어, '후보 물질'이란, 사춘기 생식기관 특히 정소에서 알코올 노출에 의한 생식기능장애 관련 질환의 예방 또는 치료가 가능할 것으로 여겨지는 모든 물질을 의미하며, 생식기관의 GnRH 및 GnRH-R 발현량의 변화를 직접 또는 간접적으로 변화시킴으로써 상기 질환을 치료할 수 있는 능력을 측정하는 대상을 말한다. 예컨대 단백질, 올리고펩티드, 소형 유기 분자, 다당류, 폴리뉴클레오타이드 및 광범위한 화합물 등의 임의 분자를 포함한다. 이러한 후보 물질은 또한 천연 물질 뿐 아니라 합성 물질을 모두 포함한다.

[70]

[71] 상기와 같은 방법으로 알코올이 투여되지 않은 사춘기 개체에 비해 투여된 개체에서 GnRH 또는 GnRH-R이 감소된 개체를 선별한 후, 해당 개체에 GnRH 또는 GnRH-R를 증가 또는 감소시킬 것으로 예상되는 후보 물질을 투여한 뒤, 이들의 발현 양상의 변화를 확인함으로써, 처리된 후보 물질이 GnRH 또는 GnRH-R의 발현을 알코올에 노출 되기 전의 상태로 회복시키는지 여부를 확인할 수 있다. 구체적으로 상기 선별된 개체로부터 GnRH 또는 GnRH-R의 발현을 증가시키는 경우, 해당 물질을 생식기능장애 관련 질환에 대한 치료제로 판정할 수 있고, 반대로 GnRH 또는 GnRH-R의 발현을 감소시키는 후보 물질은 생식기능장애 관련 질환의 치료에 대한 억제제로 판단할 수 있다.

[72]

[73] 본 발명에서 GnRH 또는 GnRH-R 발현 증감을 측정하는 방법은 상기 기재된 바와 같이 당업계에서 사용되는 방법을 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게 본 발명은 *in situ* 혼성화 및 RNase 보호 분석법(RNase protection assay, RPA)을 사용하였으며, 개체에 후보 물질의 투여 후 GnRH 또는 GnRH-R 발현량의 증가를 확인함으로써 상기 후보 물질을 생식기능장애 관련 질환의 치료제로 스크리닝 할 수 있다.

[74]

[75] 또한, 본 발명의 스크리닝 방법으로는 인 비보 (*in vivo*), 인 시츄 (*in situ*) 및 인 비트로 (*in vitro*)에서 실시할 수 있으며, 당업계에서 사용되는 방법을 제한 없이 사용할 수 있다. 또한 개체 중 유전자 발현 수준은 mRNA 또는 단백질의 양을 확인함으로써 확인할 수 있다.

[76]

[77] 본 발명은 알코올 노출 기간(2주/4주)에 따라 생식기관 중 정소의 세르토리

세포에서 GnRH mRNA 발현량이 사춘기에서는 감소된 상태로 유지되는 반면, 알코올의 장기(4주) 노출에서 성체 래트에서는 대조군 수준의 70% 까지 회복되는 것을 확인할 수 있었고, 이로부터 만성 알코올 노출의 영향이 연령에 따라 차이가 나며, 성체에서보다 사춘기에서 알코올 노출에 의한 생식기능 장애가 더욱 해롭다는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 성체 래트에서 재저장된 GnRH mRNA가 GnRH-R를 더욱 감소시키기 때문에, 장기 알코올 노출에 대해 국소적 음성 피드백(negative feedback) 조절 능력을 보유하고 있는 반면, 사춘기 개체에서는 이러한 음성 피드백 작용이 발달하지 못한 결과임을 반영하는 것으로 해석된다.

- [78] 본 발명의 실시예로부터 사춘기에서의 알코올-유도성 GnRH/GnRH-R mRNA 감소는 장기간에 걸쳐 지속되기 때문에 심각한 내분비계 시스템 혼란을 초래함을 알 수 있었다. 이는 시상하부의 GnRH 펄스 패턴이 연령에 따라 다르며, 특히 사춘기가 진행되는 때에는 밤낮으로 그 빈도 및 폭에 있어서 증가하는 리듬을 나타내는 반면, 성체에 있어서는 밤/낮 리듬이 사라지기 때문에 알코올은 사춘기에서 보다 해로운 영향을 야기한다. 또한, 사춘기는 정소의 성장 또는 성적 발생이 완성되기 전의 시기이므로, 이 기간은 성 호르몬 및 생식기능의 완성을 위한 정소 스테로이드를 활성화 시키는 것이 필요하며, GnRH는 정자 생성 및 남성화를 포함하여 완전한 발생을 유도하는 역할을 한다. 이 기간 동안 알코올은 쉽게 미성숙 생식소(gonad)에 영향을 미치며 사춘기에서 활성화되어 존재하는 유전자의 발현을 방해한다.

[79]

- [80] 이와 함께 본 발명의 바람직한 실시예에서는 in situ 혼성화를 통해 시상하부, 생식기관인 정소의 세르토리 세포에서 GnRH mRNA 발현 및 레이다히 세포에서 GnRH-R mRNA 발현이 알코올 투여에 의해 감소되었음을 확인하였으며(실시예 1, 도 1, 4 및 9), 이로부터 알코올이 정소의 기능을 저해하여 생식기능장애를 유발한다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, RNase 보호 분석법(RNase Protection Assay, RPA)을 통해 알코올에 의해 특히 사춘기 마우스 정소의 GnRH mRNA 발현량이 회복되지 않는다는 사실로부터, 만성 알코올이 사춘기 정소에서 더 나쁜 영향을 미침을 알 수 있었다.

발명의 실시를 위한 형태

- [81] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 실시예에 의해 본 발명의 내용이 제한되는 것은 아니다.

[82]

- [83] 실시예 1. 실험 동물 준비

- [84] 스프라그 도울리 성체(Sprague Dawley adult (3 개월령, n=15)) 및 사춘기 (1.5 개월령, n=15) 수컷 래트에 (경상 국립 대학교, 신경생물학 실험실, 진주,

대한민국)사료를 공급하여 임의로 사육하였다. 수컷 래트를 세 개 그룹으로 나누어서 10% 알코올을 경구로 2주 및 4주간 처리하고 대조군에는 물을 처리하였다. 처리 후, *in situ* 혼성화(hybridization) 또는 RNase 보호 분석법(RNase protection assay, RPA)을 위해 래트를 배분하였다.

[85]

[86] 실시예 2. cRNA 프로브의 합성

[87] EcoRI으로 잘라 선형화 시키고, Sp6 RNA 중합효소, *in situ* 혼성화를 위한 ³⁵S-표지 204bp cRNA 프로브, 및 RPA를 위한 ³²P-표지 cRNA 프로브로 중합시킨 pGEM-3Z 벡터에 서브클론된 cDNA로부터 GnRH cRNA를 제조하였다. GnRH-R cDNA를 pAMP10 벡터에 클론하였고, Sp6 중합효소에 의해 ³⁵S-표지 또는 ³²P-표지 cRNA 프로브 474bp를 생산하였다. 사이클로필린(Cyclophilin) cRNA 프로브(185bp)를 T7 RNA 중합효소로 전사시킨 pGEM-3Z 제조합 서브클론으로부터 합성하였다. ³⁵S-표지 cRNA 프로브를 세파덱스 G-50 DNA 그레이드 컬럼(Sephadex G-50 DNA grade column)으로 정제하였고, SET 완충액(0.1% SDS, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, 10 mM DTT)으로 용출하였으며, ³²P-표지 cRNA 프로브는 fulllength apparatus(Dwarf Science, Aloha, OR)를 사용하여 정제하였다. 활성도를 신틸레이션 계수기(scintillation counter)로 계산하였다.

[88]

[89] 실시예 3. *in situ* 혼성화

[90] *in situ* 혼성화를 위하여, 0.1 M 인산 나트륨(sodium phosphate (4% NBP))내 4% 파라포름알데히드를 래트의 우동맥을 통해 온몸으로 관류시켰다. 뇌와 정소를 제거하고, 48시간 동안 차가운 4% NBP에 고정시켰으며, 4 °C에서 48시간 동안 20% 수크로스 인산 완충액에 침지함으로써 동결방지시켰다. O.C.T. 화합물(compound (A.O., USA))에서 조직을 동결시키고, 프로브-양전하 슬라이드(Fisher) 위에서 관상면(coronal planes)(Leica cryostat CM 3050C, Germany)으로 10 μ m 섹션(sections)을 제조하였다. *in situ* 혼성화를 위하여, 슬라이드를 실온에서 자연건조시키고, 2 $\times$ SSC (sodium chloridesodium citrate ; 0.5 M 염화나트륨; 0.3 M 시트르산 나트륨, pH 7.0) 완충액으로 세척하였다. Kim et al 방법에 따라 프로테아제(Proteinase) K 처리 및 아세틸화(acetylation)를 수행하였다. 상기 슬라이드를 전혼성화 완충액 (prehybridization buffer) (50% 포름아마이드, 0.6 M 염화나트륨, 10 mM 트리스-염산 (pH 7.5), 0.02% 피콜(Ficoll), 0.02% 폴리비닐 피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone), 0.1% BSA, 1 mM EDTA (pH 8.0) 및 텍스트란 설페이트)으로 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 50 μ l/ml 효모 tRNA, 10 mM DTT(dithiothreitol) 및 용액의 μ l당 RNA 프로브 6 $\times$ 10⁵ cpm을 첨가 동일 용액내에서 60°C, 24시간 동안 안티센스 또는 센스 프로브와 혼성화를 수행하였다. 그 다음 상기 조직 슬라이드를 후혼성화 완충액(posthybridization buffer)에서 후혼성화하고, 30분 동안 2 $\times$ SSC에 세척; 20분 동안 RNase A (50 μ g/ml)로 처리, 따뜻한 (50 °C,

high-stringency) 2× SSC 완충액에서 두 번 세척, 65 °C에서 15분 동안 0.1× SSC를 사용하여 세척, 및 증가 농도의 알코올에서 탈수를 수행하였다. 상기 슬라이드를 70°C에서 1주일 동안 완전-차광 카세트(light-tight cassettes)에서 자가방사법 X-ray 필름 (Amersham)에 노출시켰다. X-ray 필름을 확대기(Kodak)로 촬영하였다. 양성 표지(positive labeling)를 확인한 후, 상기 슬라이드를 NTB2 에멀전(1:1 희석, Kodak)에 담그고, 4 °C에서 2주 동안 노출시킨 다음, 15 °C에서 D19 현상액(developer) (1:1 희석, Kodak)에서 현상하였고, 크레실 바이올렛(cresyl violet)으로 대비염색하였다. 슬라이드를 암실에서 명시야 현미경(bright field microscope)으로 관찰하고, 사진촬영하였다. *in situ* 혼성화를 이용하여 도 1 및 2에 나타낸 바와 같이 래트 뇌의 POA 영역에서 GnRH mRNA 가 발현되었다. 번호를 매기기 위해, 명시야 현미경(bright field microscope)하에서 상기 슬라이드를 확대하여 마이크로미터로 나누었다.

[91]

[92] 세포 신호 계산 결과를 표 1에 나타내었다.

[93]

[94] 표 1

세포 당 포함된 GnRH 및 GnRH-R mRNA 라디오-그레인(radio-grains) 수						
처리	성체 래트			사춘기(Puberty) 래트		
	해마 GnRH	정소 GnRH	정소 GnRH-R	해마 GnRH	정소 GnRH	정소 GnRH-R
N	49.8±1.9	30±3.4	5±2.8	32.5±3.1	19.6±3.2	4±2.6
E	47.3±1.9 ^{NS}	18.1±2.4 ^{***}	3.9±1.9	30.7±2.9 ^{NS}	9.5±2.8 ^{***}	2.1±1.1 ^{***}

[95]

[96] 상기 표에서의 값은 그레인(grain)을 포함하는 세포 수를 의미하며, $1 \times 10^4 \mu m^2$ 내 그레인 수(grains number)/세포 수(cells number)로 계산하였다. 본 발명자는 무작위 표본으로 10회 카운팅(counting) 하였다. 데이터는 평균±평균의 표준 오차(standard error)로 나타내었다. N; 정상 래트, E; 4주간 알코올(에탄올)을 처리한 래트를 나타낸다. **P<0.01, ***P<0.001, ^{NS}; 현저하지 않음(not significant)(t-test).

[97]

[98] 래트 정소의 세정관(seminiferous tube)에 세르토리 세포(sertoli cell)내에서 정소의 GnRH mRNA가 나타났고(도 4), 비록 상기 패턴은 연령에 따라 차이가 있었으나 발현 수준은 성체 및 사춘기 래트 모두에서 강력하게 감소되었음을 확인하였다. 또한, 정소 GnRH-R mRNA는 레이디히 세포(Leydig cells)에서 발견되었고(도 7), 상기 발현 역시 모든 그룹에서 현저하게 감소되었음을 확인하였다.

[99]

[100] **실시예 4. RNase 보호 분석법(RNase protection assay, RPA)**

[101] RPA를 위해, 래트를 단두한 후, 뇌의 시상하부 및 정소를 제거하였다. 전체 트리졸 시약(Trizol Reagent (Life Technologies, Gibco, USA))을 사용하여 RNA를 분리하였고, (DEPC-처리된)RNase-결여된 물에 용해시킨 다음, 상기 농도를 분광광도계로 측정하였다. 상기 RNA를 분배하여 다음 사용시까지 -80°C에서 저장하였다. RPA를 위해 RPA II kit (Ambion)를 사용하였고, 젤-정제 프로브를 500,000 cpm/ 20 μ l의 농도로 혼성화 버퍼에 재구성시켰으며, 전체 RNA 중 20 μ g (GnRH and GnRH receptors)으로 혼성화시켰다. 상기 RNA 샘플을 25,000 cpm³² P-rUTP 사이클로필린 프로브(cyclophilin probe)와 동시에 혼성화시켰다. 45 °C에서 하룻밤 동안 인큐베이션을 하였으며, 37 °C에서 1시간 동안 리보뉴클리에이즈(ribonuclease) T1 (700 U/ 200 μ l Life Technologies, NY, USA)으로 절단하였다. RNase 비활성 침전 용액 E(precipitation solution E) 300 μ l를 첨가함으로써 절단을 종료시켰고, 2시간 동안 250 V로 전기영동(7.1 M 우레아, 6% 폴리아크릴아마이드)을 수행하였다. 겔을 건조한 후, 증감지(intensifying screens)를 사용하여 80 °C에서 16시간 동안 자가방사능 필름(autoradiographic film) (Reflection; Dupont NEN Research Products, Boston, MA)에 노출시켰다. Sigma Gel (SPSS, Chicago, USA) 시스템에 기초한 컴퓨터를 사용하여 RPA 자가방사기록사진(autoradiogram)을 분석하였다.

[102]

[103] 만성 알코올 노출에 따른 GnRH mRNA의 변화를 알아보기 위하여, RPA를 수행하였으며, 계산된 농도를 도 2 및 3에 나타내었다. 그 결과, 알코올 노출은 성체 래트 그룹에서 시상하부 GnRH mRNA 발현을 약간 감소시키는 것으로 나타났다. 단기 알코올 처리 후, mRNA 농도는 5% 감소되었다 ($P<0.001$, 도 3). 장기 알코올 처리 후, 신호 수는 5.7% 감소된 반면(현저하지 않음, 표 1), 농도는 12% 감소되었다($P<0.001$, 도 3). 사춘기 뇌에서, GnRH mRNA 발현은 단기 처리 후 15% 로 약간 증가하였다($P<0.001$, 도 3). 장기 알코올 노출에 있어서, 상기 농도는 8% 증가($P<0.05$, 도 3) 하였으나, 신호를 포함하는 세포에서는(현저하지 않음, 표 1) 6% 감소하였다. 장기 노출에 있어서, 상기 신호의 수는 40% 감소되었고($P<0.001$, 표 1), 농도는 33% 감소되었으며, 이는 단기 노출에 비하여 적은 회복력이었다(도 6). 사춘기에 있어서, 단기 노출의 경우 상기 농도는 85% 감소하였다($P<0.001$, 도 6). 장기 처리의 경우, 신호 수는 52% 감소한 반면($P<0.001$, 표 1), 그 양은 81% 감소하였다. 성체에 있어서, 단기 처리의 경우 그 양이 54% 감소하였고($P<0.001$, 도 9), 이는 48% 감소한 신호의 수보다 더 감소된 것이었으며($P<0.05$, 표 1), 장기 노출 후에 그 양은 90% 로 급격히 감소하였다($P<0.001$, 도 9). 사춘기에서 단기 처리에, mRNA 발현 수준은 73%로 상당히 감소한 반면($P<0.001$, 도 9), 신호를 포함하는 세포 및 mRNA 측정은 각각 46.5% ($P<0.01$, 표 1) 및 79% ($P<0.001$, 도 9)로 각각 감소함을 확인하였다.

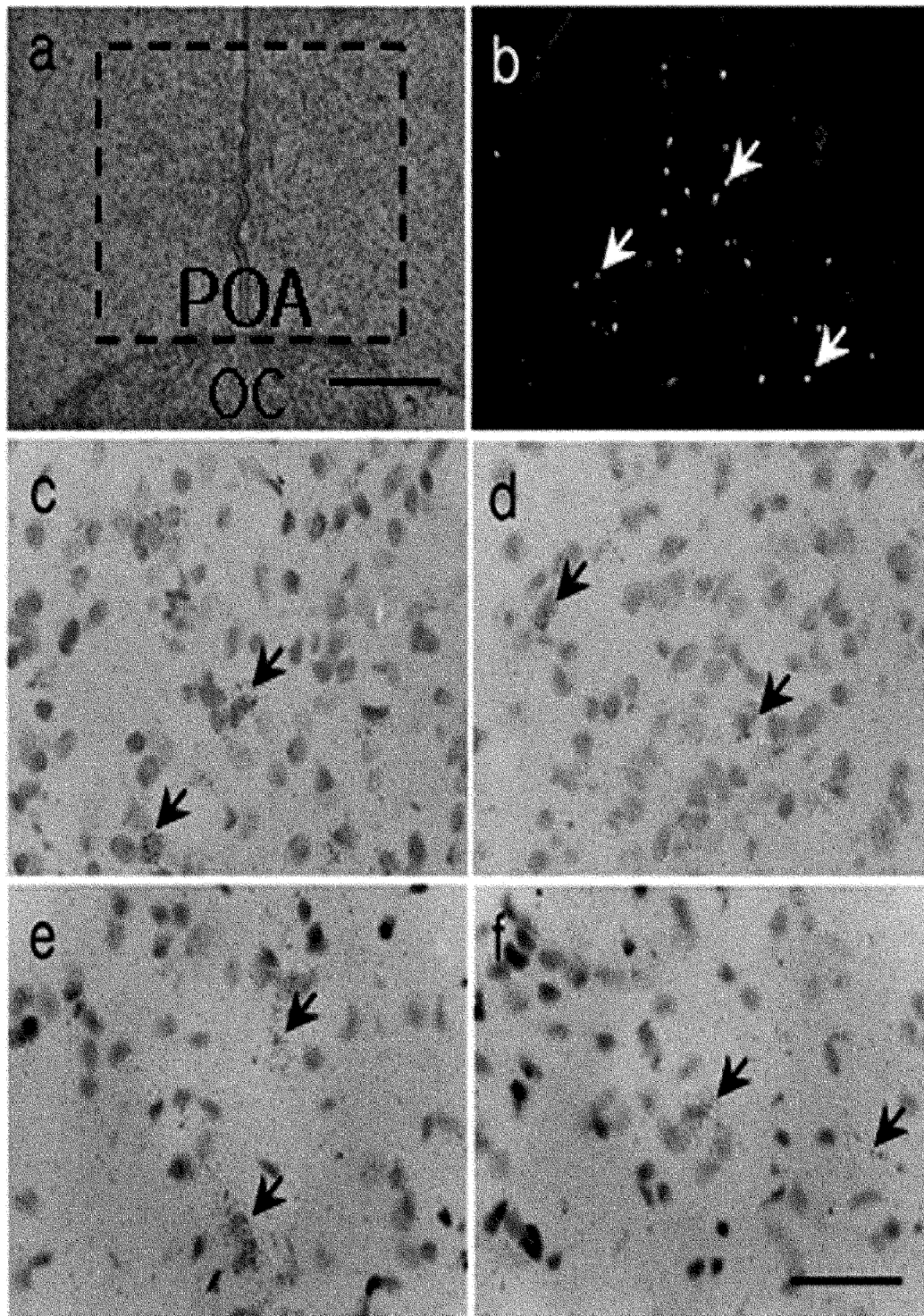
산업상 이용가능성

- [104] 본 발명은 생식기관에서 연령에 따른 알코올에 의한 생식기능장애 관련 질환 치료제 발굴에 사용할 수 있다. 구체적으로는 GnRH 및 GnRH-R의 mRNA 발현량 및 비율 변화를 측정하는 한편, 이의 발현량의 감소를 확인함으로써 생식기능장애 관련 질환을 예상할 수 있고, 상기 발현량이 감소된 개체에 후보 물질을 처리하여 GnRH 또는 GnRH-R의 발현량의 증가를 확인함으로써 상기 질환에 대한 치료제를 개발할 수 있어, 생명공학 분야 및 의학분야의 스크리닝 방법으로 유용하게 사용 가능할 것으로 예상된다.

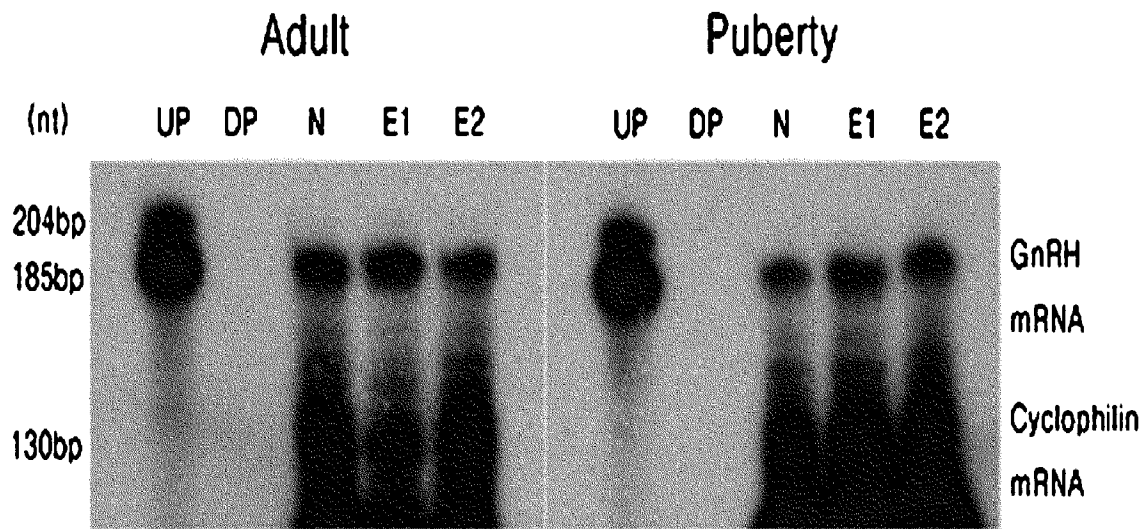
청구범위

- [청구항 1] (a) 사춘기(puberty) 개체의 생식기관 내 세포의 GnRH 또는 GnRH-R(GnRH 수용체)의 발현을 확인하는 단계;
 (b) 상기 개체에 알코올을 투여하는 단계;
 (c) 알코올이 투여된 개체의 GnRH의 또는 GnRH-R의 발현량이 (a) 단계에 비해 감소된 개체를 선별하는 단계;
 (d) 선별된 개체에 후보 물질을 투여하는 단계; 및
 (e) 상기 GnRH 발현량 또는 GnRH-R 발현량의 증가를 확인하는 단계
 를 포함하는 사춘기 생식기능장애 관련 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 생식기관 내 세포는 세정관 내 세포 또는 정소내 세포인 방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 세정관 내 세포는 세르토리 세포(Sertoli cell)인 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 정소 내 세포는 레이디히 세포(Leydig cell)인 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 생식기능장애 관련 질환은 불임, 고환 위축, 발기부전, 성욕 감퇴, 모발성장 감소, 생식력 감소 및 섬유종으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, GnRH 또는 GnRH-R의 발현은 mRNA 수준 또는 단백질 수준에서 확인하는 것인 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 개체는 래트인 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, GnRH 또는 GnRH-R의 발현량을 확인하는 방법은 인 시츄 혼성화(in situ hybridization) 또는 RPA(RNase Protection Assay)에 의한 것인 방법.

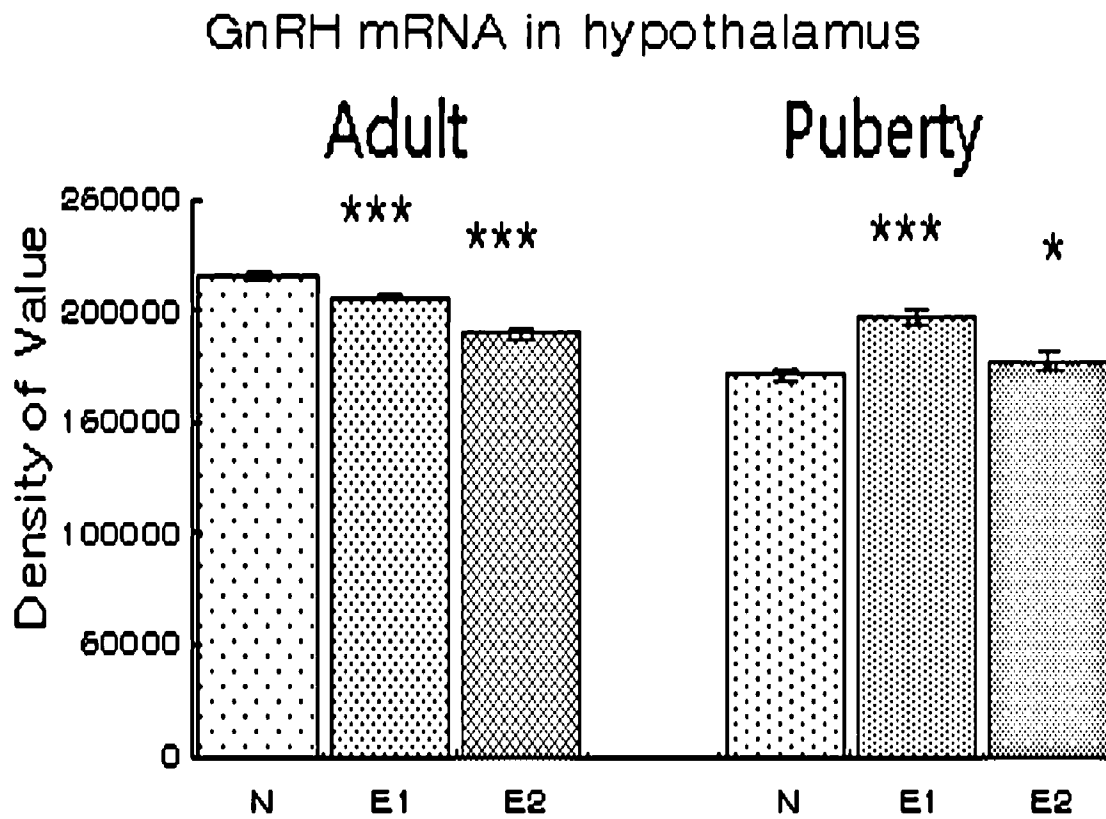
[Fig. 1]



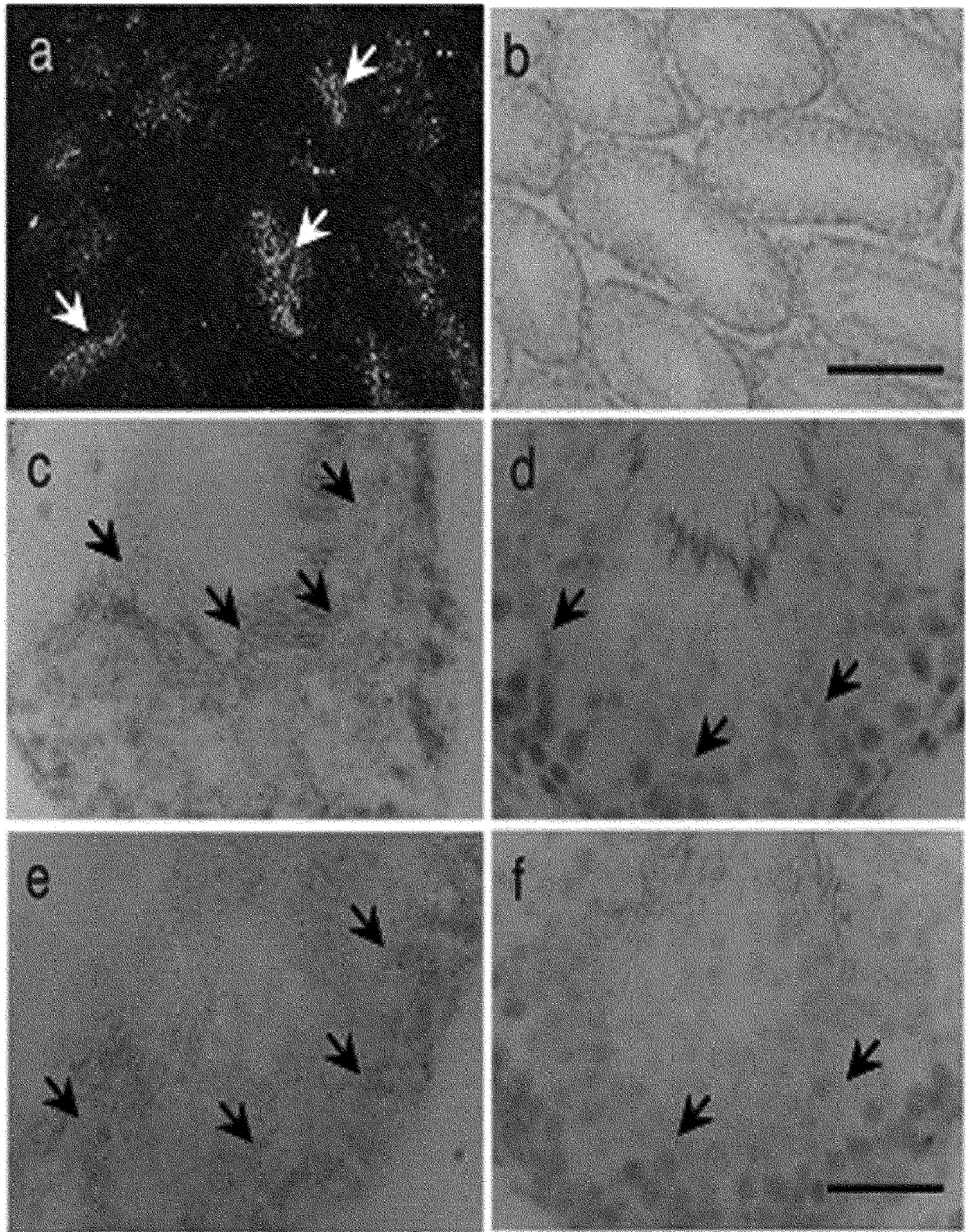
[Fig. 2]



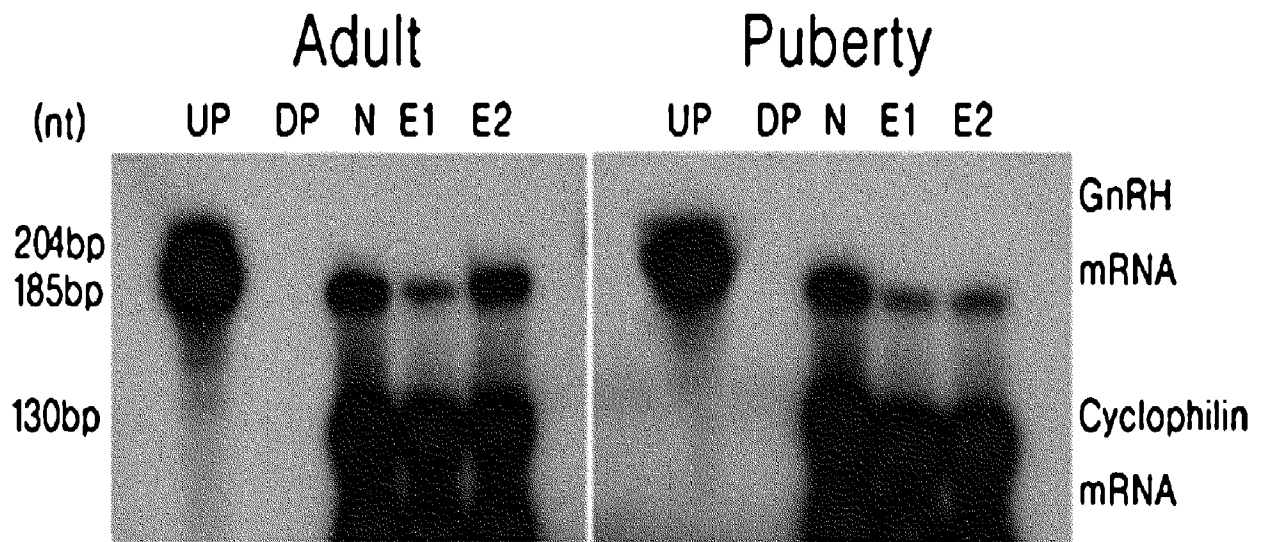
[Fig. 3]



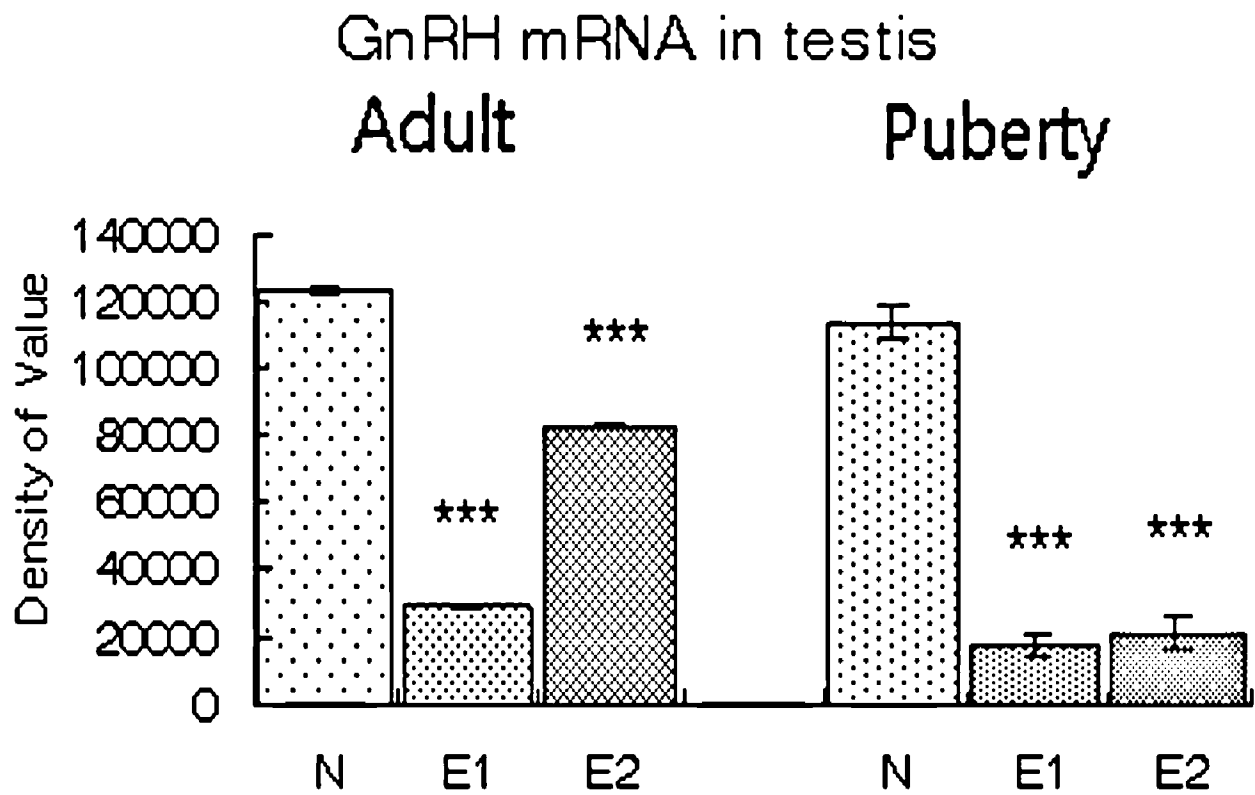
[Fig. 4]



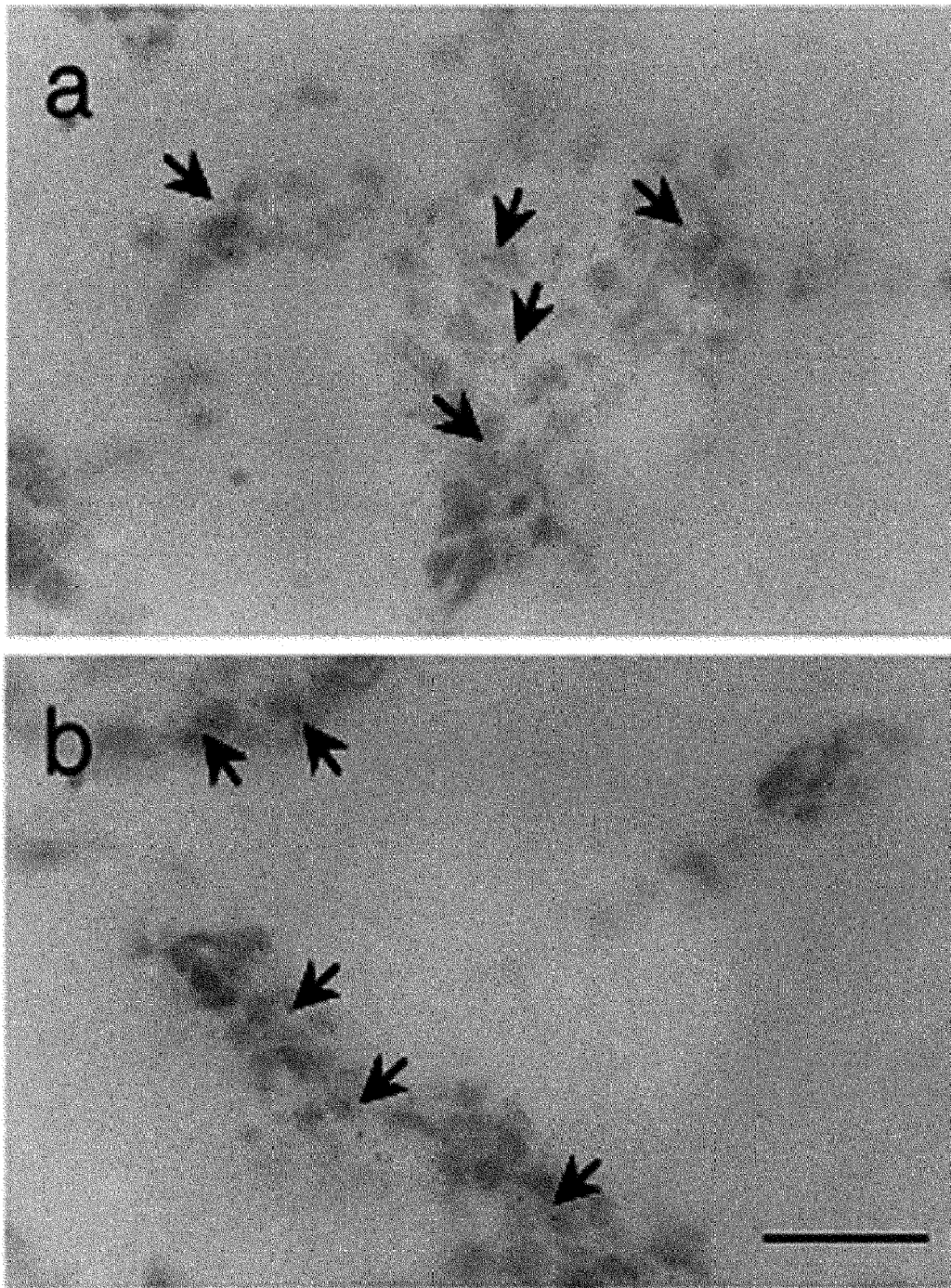
[Fig. 5]



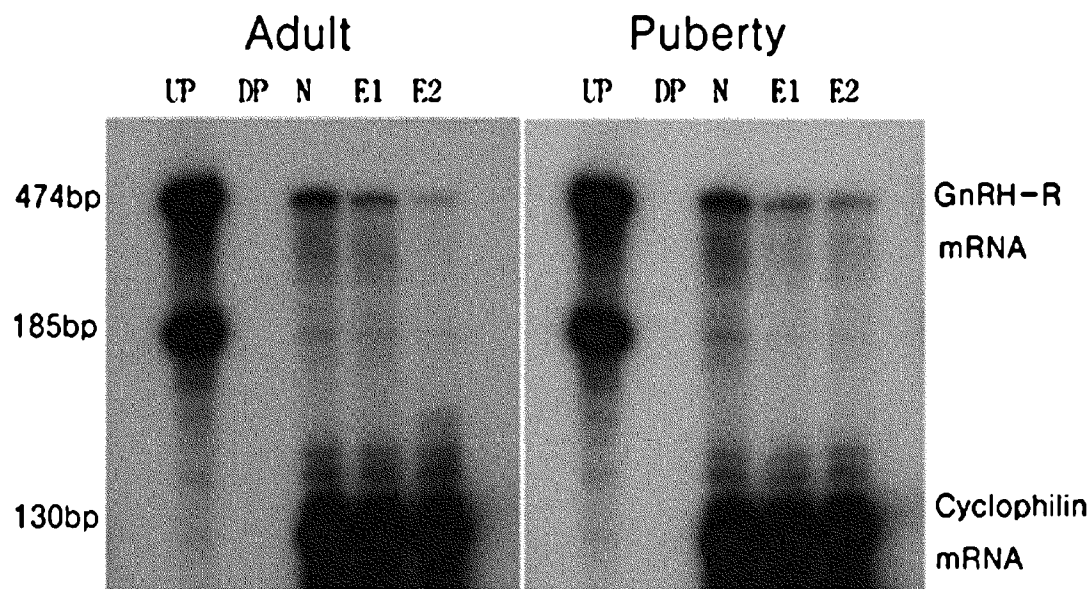
[Fig. 6]



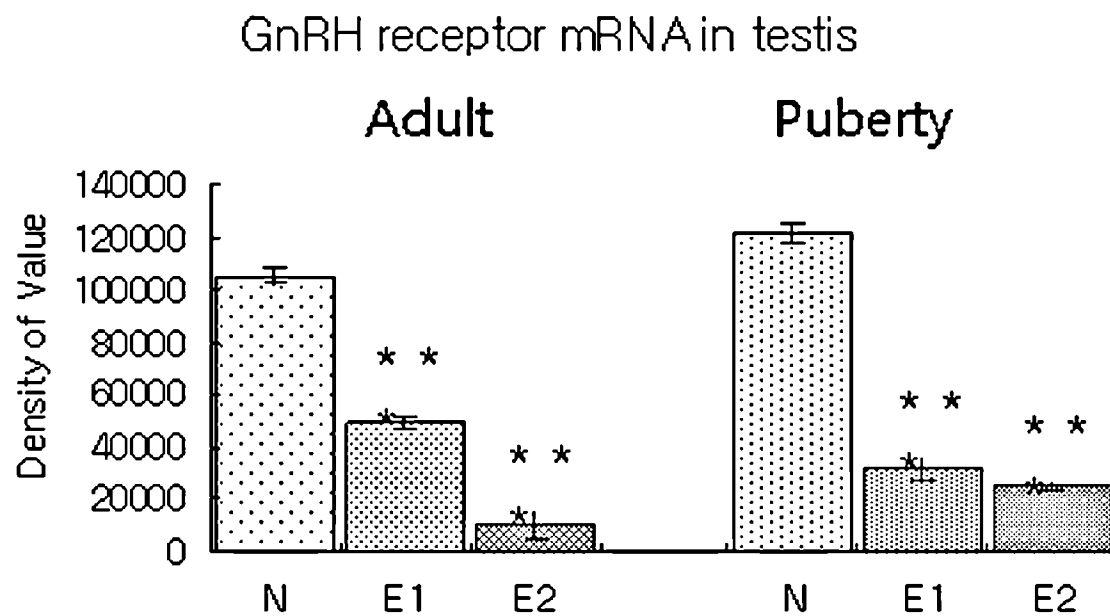
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

DECLARATION OF NON-ESTABLISHMENT OF INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 17(2)(a), Rules 13ter.1(c) and (d) and 39)

Applicant's or agent's file reference OPA09089PCT	IMPORTANT DECLARATION	Date of mailing (day/month/year) 13 AUGUST 2010 (13.08.2010)
International application No. PCT/KR2009/006721	International filing date (day/month/year) 16 NOVEMBER 2009 (16.11.2009)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 17 JUNE 2009 (17.06.2009)
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC <i>C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/15(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i</i>		
Applicant KYUNGSANG UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COLLABORATION FOUNDATION et al.		

This International Searching Authority hereby declares, according to Article 17(2)(a), that **no international search report will be established** on the international application for the reasons indicated below.

1. ☒ The subject matter of the international application relates to:
 - a. ☐ scientific theories
 - b. ☐ mathematical theories
 - c. ☐ plant varieties
 - d. ☐ animal varieties
 - e. ☐ essentially biological processes for the production of plants and animals, other than microbiological processes and the products of such processes
 - f. ☐ schemes, rules or methods of doing business
 - g. ☐ schemes, rules or methods of performing purely mental acts
 - h. ☐ schemes, rules or methods of playing games
 - i. ☒ methods for treatment of the human body by surgery or therapy
 - j. ☐ methods for treatment of the animal body by surgery or therapy
 - k. ☐ diagnostic methods practised on the human or animal body
 - l. ☐ mere presentations of information
 - m. ☐ computer programs for which this International Searching Authority is not equipped to search prior art
2. ☐ The failure of the following parts of the international application to comply with prescribed requirements prevents a meaningful search from being carried out:

☐ the description
 ☐ the claims
 ☐ the drawings
3. ☐ A meaningful search could not be carried out without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13ter.1(a) or (b).
4. ☐ A meaningful search could not be carried out without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
5. Further comments:

Name and mailing address of the ISA/KR  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.
---	---

특허협력조약

PCT

국제조사보고서 부작성 선언서

(PCT 제17조(2)(a), PCT규칙 13의3.1(c) 및 (d) 및 39)

출원인 또는 대리인의 서류참조기호 OPA09089PCT	중요 선언	발송일 (일/월/년) 2010년 08월 13일 (13.08.2010)
국제출원번호 PCT/KR2009/006721	국제출원일 (일/월/년) 2009년 11월 16일 (16.11.2009)	(최) 우선일 (일/월/년) 2009년 06월 17일 (17.06.2009)
국제특허분류(IPC) <i>C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/15(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i</i>		
출원인 경상대학교산학협력단 등		

본 국제조사기관은 PCT 제17조(2)(a)에 따라 아래와 같은 이유로 이 국제출원의 국제조사보고서가 작성되지 아니할 것을 선언합니다.

- ☒ 국제출원의 대상이 아래 해당 항목에 관련됩니다.
 - ☐ 과학 이론
 - ☐ 수학 이론
 - ☐ 식물 품종
 - ☐ 동물 품종
 - ☐ 동식물의 생산에 관한 생물학적인 방법. 단, 미생물학적 방법 및 미생물학적 방법에 의한 생산물은 제외
 - ☐ 사업활동에 관한 계획, 규칙 또는 방법
 - ☐ 순수한 정신적 행위에 관한 계획, 규칙 또는 방법
 - ☐ 게임에 관한 계획, 규칙 또는 방법
 - ☒ 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치 방법
 - ☐ 수술 또는 치료에 의한 동물의 처치 방법
 - ☐ 인체 또는 동물의 진단 방법
 - ☐ 정보의 단순한 제시
 - ☐ 국제조사기관이 선행기술을 조사할 수 없는 컴퓨터프로그램
- ☐ 국제출원의 다음 부분이 소정의 요건을 충족하지 아니하여 유효한 국제조사를 할 수 없습니다.

☐ 명세서
 ☐ 청구범위
 ☐ 도면
- ☐ 서열목록이 없이 유효한 국제조사를 할 수 없었습니다. 출원인은 소정의 기간내에

☐ PCT시행세칙 부록 C에서 규정하는 표준에 의하여 서면으로 작성된 서열목록을 제출하지 아니하였으며, 국제조사기관은 허용 가능한 형태 및 방법으로 그 서열목록을 이용할 수 없었습니다.

☐ PCT시행세칙 부록 C에서 규정하는 표준에 의하여 전자적 형태의 서열목록을 제출하지 아니하였으며, 국제조사기관은 허용 가능한 형태 및 방법으로 그 서열목록을 이용할 수 없었습니다.

☐ PCT규칙 13의3.1(a) 또는 (b)의 규정에 따른 서열목록 제출요구에 대응하여 서열목록 제출에 필요한 가산료를 납부하지 아니하였습니다.

4. 추가 의견:

ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 선사로 139, 정부대전청사 팩스번호 82-42-472-7140	심사관 이준혁 전화번호 82-42-481-8115	
---	-----------------------------------	---