(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0081281
(43) 공개일자 2012년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/12 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0002532
(22) 출원일자 2011년01월11일
심사청구일자 2012년04월30일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산 남구 무거2동 산29
(72) 발명자
이병주
울산광역시 울주군 범서읍 구영로 101-7, 구영2차 푸르지오 502동 502호
윤창호
울산광역시 남구 옥현로 34, 315동 606호 (무거동, 옥현으뜸마을주공3단지아파트)
이혜명
울산광역시 남구 대학로55번길 29, 409호 (무거동, 영남행복맨션)
(74) 대리인
특허법인 충정

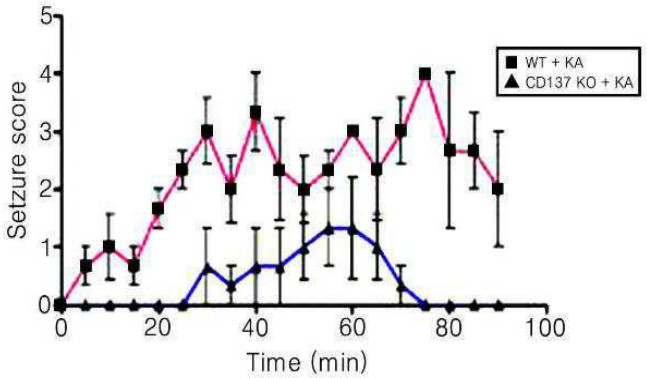
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **CD137 유전자의 신규한 용도**

(57) 요 약

본 발명은 CD137 유전자의 신규한 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 CD137 유전자의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 뇌질환의 진단용 조성물, 키트 및 마이크로어레이에 관한 것이며, 또한, 상기 유전자의 발현을 억제하거나 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 활성을 억제할 수 있는 억제제를 포함하는 뇌질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 상기 억제제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 CD137 유전자 발현의 억제는 간질 등에 의한 발작 증상을 감소시킬 수 있으며, 뇌에서 면역세포와 유사한 기능을 하는 성상교세포의 활성을 유도하지 않으며, 여러 가지 사이토카인의 분비를 증가시키는 COX-2의 발현을 억제하여 신경세포를 죽음으로부터 보호할 수 있으므로, 간질, 발작, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환 등의 뇌질환의 진단 또는 치료제의 표적 유전자로 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2009K001268
부처명	교육과학기술부
연구사업명	뇌기능활용 및 뇌질환치료기술개발연구사업
연구과제명	신기능 단백질에 의한 뇌기능 제어 연구
주관기관	울산대학교산학협력단
연구기간	2010.04.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

CD137 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 뇌질환의 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 CD137 유전자의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 나타내는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 뇌질환의 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 뇌질환은 간질, 발작, 알츠하이머 질환 및 파킨슨 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 뇌질환의 진단용 조성물.

청구항 4

CD137 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 뇌질환의 진단용 키트.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 CD137 유전자의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 나타내는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 뇌질환의 진단용 키트.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 뇌질환은 간질, 발작, 알츠하이머 질환 및 파킨슨 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 뇌질환의 진단용 키트.

청구항 7

CD137 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 뇌질환의 진단용 마이크로어레이.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 CD137 유전자의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 나타내는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 뇌질환의 진단용 마이크로어레이.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 뇌질환은 상기 뇌질환은 간질, 발작, 알츠하이머 질환 및 파킨슨 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 뇌질환의 진단용 마이크로어레이.

청구항 10

(a) CD137 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 CD137 유전자의 발현양, CD137 단백질의 양 또는 CD137 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계의 측정 결과, CD137 유전자의 발현양, CD137 단백질의 양 또는 CD137 단백질의 활성이 감소되는 경우에 상기 시료는 뇌질환의 치료 또는 예방용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 뇌질환의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 (b) 단계의 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블랏, 노던 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion) 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)으로 이루어진 군중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 뇌질환의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝 하는 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 뇌질환은 간질, 발작, 알츠하이머 질환 및 파킨슨 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 뇌질환의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 13

CD137 유전자의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열을 가지는 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 siRNA (small interference RNA) 올리고뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 뇌질환은 간질, 발작, 알츠하이머 질환 및 파킨슨 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CD137 유전자의 신규한 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는, 간질 또는 퇴행성 뇌질환과 관련된 CD137 유전자의 신규한 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인간 유전체 프로젝트 연구 결과, 인체의 질환을 분자 수준에서 이해하고 새로운 질환 관련 표적을 발굴하고 이를 이용한 신약을 개발하고자 하는 신개념의 바이오 생명공학 기술의 시대가 열리고 있다. 이에 따라, 유전적 환경이 다른 환자 개개인에 맞추어 각종 다양한 질병을 진단, 치료, 예측하는 맞춤의학 시대가 현실로 다가오고 있다. 맞춤의학에는 유전체 진단용 바이오마커의 발굴, 표적화 치료기술, 질병 특이적 약물작용점의 발굴, 표적 치료용 신약, 정확한 임상 정보, 환자의 유전체 정보, 유전체적 역학결과, 그리고 이들을 분석 통합할 수 있는 바이오인포매틱스 등이 상호보완적으로 구성된 약물 유전체기술 개발이 수반되어야 한다. 특히, 맞춤의학에서 경쟁력을 갖추기 위해서는 질환과 개인에 대한 약물 예측 시스템, 진단 바이오마커 발굴, 새로운 표적유전자 및 단백질을 발굴하는 기초연구 및 이를 이용한 치료제의 개발이 중요하다.

[0003] 간질이란 의식 상실과 함께 처음에는 강직성, 이어서 간대성(間代性)의 경련을 나타내는 발작성 질환으로 그 원인에는 내측두 경화증, 뇌종양, 외상, 뇌졸중, 선천적 장애, 뇌 감염이 있으며, 거의 유전되지 않는다고 알려져 있다.

[0004] 간질의 종류는 크게 전신 발작(generalized seizure), 부분 발작(partial seizure)이 있다. 전신 발작은 대뇌 전체에서 동시에 발작이 시작되며, 임상적으로는 신체 좌우 모두에서 일시에 시작되고, 의식 소실을 동반

하여 뇌파 검사 시 양쪽 대뇌에서 전반적으로 간질파가 나타난다. 전신 발작의 종류에는 강직 간대 발작, 소발작, 근간대성 발작, 실조성 발작 등이 있다. 강직 간대 발작은 대발작이라고도 불리우며, 가장 흔한 형태로서 전조 증상이 없는 상태에서 갑자기 의식 소실이 되며, 전신의 근육에 경련이 온다. 발작의 현상은 몸이 굳는 강직기, 몸을 떠는 간대기를 거친 후, 발작을 마치게 된다. 소발작은 주로 5~7세의 유아기에 자주 발생하며 사춘기가 되면 없어진다고 알려져 있다. 보통 수 초 동안의 의식 소실과, 눈이 깜박거림, 가벼운 근육 경련이 동반된다. 근간대성 발작은 의식 변화는 별로 없이 마치 깜짝 놀란 듯 전신의 근육이 순간적으로 수축하는 현상을 보인다. 실조성 발작은 경축과 정반대로 깜짝 놀라며 힘이 빠지는 듯한 발작을 말한다.

[0005] 부분 발작은 발작을 시작하면서 전조증상을 특징으로 한다. 부분 발작은 의식의 혼탁 여부에 따라 복합 부분 발작과 단순 부분 발작으로 구별하나, 초기에 부분 발작의 증상이 간질파가 양쪽 뇌로 퍼지면서 전신 발작으로 이행되는 경우도 발생한다고 알려져 있다. 전체 간질의 2/3를 차지하는 복합 부분 발작은 사람마다 양상이 매우 다르며, 경미한 경우에는 소발작과 심한 경우에는 대발작과 비슷한 형태를 보이기 때문에, 가장 진단하기 어렵다. 환청, 환취, 환시 등의 전조 증상으로 통해 발작된 후, 손, 발, 입 등에 자신도 모르는 반복적인 행동(자동증, automatism)을 보이거나, 몸을 한쪽으로 돌리거나, 소리를 지르거나 한쪽 팔, 다리에만 힘을 주는 듯한 행동을 보이나, 환자는 이러한 증상을 인식하지 못한다고 알려져 있다. 단순 부분 발작의 경우, 특정한 기능을 담당하는 뇌의 한 부분에서 국소적으로 일어나며, 일반적인 형태로 뇌의 운동 피질이나 감각 피질에서 발생된다고 알려져 있다.

[0006] 현재 간질 치료제에는 경구용으로 페니토인(Phenytoin), 카바마제핀(Carbamazepine), 발프로익에시드(Valproic acid), 페노바비탈(Phenobarbital), 에토숙시마이드(Ethosuximide), 클로나제팜(Clonazepam), 클로바잠(clobazam), 프리미돈(Primidone) 등을 사용하였다. 최근에는 비가바트린(vigabatrin), 조니사마이드(Zonisamide), 라모트리진(Lamotrigine), 토피라메이트(topiramate), 옥스카바제핀(Oxcarbazepine) 및 가바펜틴(Gabapentine) 등의 신약을 사용한 간질의 치료가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 간질 환자의 약물 치료의 결과를 살펴보면, 한 가지의 약물로 조절되는 경우가 전체의 60~70% 정도이며, 나머지 20~25% 정도는 여러 가지 약을 병용 투여해야 하며, 나머지 10% 남짓의 환자의 경우는 어떤 약을 써도 간질이 적절히 조절되지 않는 문제를 가지고 있다.

[0007] 더욱이 사용되는 이러한 약물은 부작용이 있으며, 클로나제팜의 경우, 짧은 시간에 효과가 나타나지만, 약에 대한 내성이 쉽게 생기고, 부작용이 빈번히 발생되는 것으로 알려져 있어서 권장되지 않고 있다. 이외에도 간손상을 일으킬 수 있다고 알려져 있다. 따라서, 이러한 약물들은 반드시 의사의 정확한 간질 진단을 받은 후 처방에 따라 복용하는 것이 바람직하다.

[0008] 퇴행성 신경질환은 점차적으로 신경세포가 소멸됨으로써 인지능력 상실, 운동기능 상실 등을 초래하여 사망에 이르게 하는 질환이다. 알츠하이머 질환(Alzheimers disease, AD), 파킨슨 질환(Parkinson's disease, PD), 뇌졸중(Stroke), 다발성 경화증 등이 대표적이며 노화의 과정에 따라 그 발병빈도가 증가하는 특징이 있다. 뇌의 노화와 퇴행성 신경질환과의 상관 관계에 대해서는 아직 완전하게 밝혀져 있지 않으나 두 가지 과정 간에는 뇌세포의 소멸과 뇌 용량감소 등 공통된 특성들이 많이 나타나고 있다.

[0009] 알츠하이머 질환(AD)은 서서히 진행되는 뇌 질환으로서 처음에는 기억력 감퇴, 성격의 변화 그리고 사고력이 감소하는 질병으로서 대부분의 환자는 8-10년 내에 폐렴 등으로 사망한다. 전 세계적으로 65세 이상의 노인 중 3.5-10% 가량이 이 질환을 앓고 있으며 미국에서만 400만 명의 환자가 있는 것으로 추정된다. 이 질환을 치료하기 위하여 소요되는 사회적 비용만도 미국에서만 연 1000억불이 지출되고 있는 노인의 대표적인 질병이다. 알츠하이머 질환의 특징적인 병변으로 뇌조직 중에 베타-아밀로이드가 포함된 아밀로이드 플라크(amyloid plaques), 신경섬유 농축체(neurofibrillary tangles) 등이 형성되어 면역세포에 염증반응을 일으키고, Ca^{2+} 채널을 파괴할 뿐 아니라, 신경전달물질인 아세틸콜린의 양을 감소시킴으로써 기억력, 인지기능의 감퇴증상이 서서히 나타나는 것으로 보고되고 있으나 아직 정확한 병인이나 치료법은 알려지지 않고 있는 실정이다. 또한, 최근의 역학 연구에 의하면 고혈압, 당뇨병, 고지혈증 및 심장질환 등 뇌혈관 질환의 위험인자들이 혈관성 치매뿐만 아니라 알츠하이머 질환의 발병율을 증가시킨다는 보고도 있다.

[0010] 알츠하이머 질환(AD)으로 인한 인지기능저하현상에 대한 현대 의학적 관점은 대부분 뇌 콜린성 신경세포의 광범위한 변성 및 소실을 인지기능감퇴의 가장 주요한 원인으로 간주하고 있으며, 이를 극복하기 위한 방편으로 손상되지 않고 남아있는 콜린성 신경계의 활성을 증가시켜 손상된 인지기능을 부분적으로 회복시킬 수 있는 약물들을 개발하고자 하는 연구가 주종을 이루고 있다. 현재 미국 식품의약국(FDA)으로부터 알츠하이머 질환의 치료제로 공인받은 네가지 약물(타크린, 리바스티그민, 도네페질, 갈란타민) 모두 아세틸콜린 분해 효소의

활성을 저해함으로써 인지기능을 항진시키고자하는 일명 아세틸콜린에스테라제 저해제(acetylcholinesterase inhibitors)들이다.

[0011] 실제로 지금까지 알려진 알츠하이머 질환의 치료제로 승인된 의약품은 아세틸콜린에스테라제 저해제가 유일한 실정이나, 이들 약제들은 일부 알츠하이머 질환 환자(40-50%)에서 일시적인 병증 완화 효과만을 보이고 그 약효 역시 오래 지속되지 못하는 단점이 있다. 또한 질환의 특성상 장기 복용을 요하는데, 지금까지 개발된 아세틸콜린에스테라제 저해제는 간독성을 비롯한 여러 가지 부작용을 수반하는 것 또한 문제점으로 드러나고 있다.

[0012] 파킨슨 질환 (Parkinson's disease)은 안정떨림, 경직, 운동완만 및 자세 불안정이 특징적으로 나타나는 신경계의 만성 진행성 퇴행성 질환으로 뇌의 흑질(Substantia Nigra pars compacta: SNc)에 분포하는 도파민의 신경세포가 점차 소실되는 신경병리학적인 특징을 나타낸다 (Calne *et al*., 1983, Heikkila 1984). 파킨슨 질환 환자는 대략 60세 이상에서 인구의 약 1% 정도로 추정된다.

[0013] 파킨슨 질환의 원인은 정확히 밝혀져 있지 않지만 유전적 인자와 환경적 인자가 서로 상호작용하여 일어난다는 '다인성 가설'이 가장 보편적으로 받아들여지고 있다. 대부분의 파킨슨 질환 환자들은 가족력 없이 발병하지만 약 10% 정도가 가족성 파킨슨 질환으로 나타나고 있다.

[0014] 파킨슨 질환의 감소된 도파민의 양을 증가시키기 위한 대증요법제로서 L-Dopa가 현재 일반적으로 사용되고 있다. L-Dopa는 사용 후, 파킨슨 질환의 진행을 더디게 하고 임상증상의 경감을 보이지만, 장기간 복용 시 불수의적인 운동, 구토 등의 부작용이 따른다(Clarke and Deane, 2001). 그 외에도, 파킨슨 질환을 치료하기 위하여 사용되고 있는 치료제로는 FDA 허가된 도파민 작용제(Dopamine Agonists), 카테콜-O-메틸트랜스퍼레이즈(catechol-O-methyltransferase inhibitor, COMT inhibitor), 모노아민 산화효소 B(monoamine oxidase B, MAO-B inhibitors), 항-콜린작용제(Anti-cholinergics) 등이 있다.

[0015] 지금까지, 파킨슨 질환의 대증요법제로 사용되고 있는 도파민 전구체인 L-Dopa는 도파민 신경의 손실을 막지는 못하며, 장기적인 사용으로 인한 부작용으로, 말기 파킨슨 질환의 대증요법제로서 그 효용에 한계가 있다. 이러한 부작용으로 인하여 L-Dopa의 대체 치료제인 프라미펙솔(Pramipexole)도 한동안 사용되었으나, 장기간의 사용 시에는 L-Dopa로 다시 치료를 해야한다는 연구보고를 통해, 아직 L-Dopa에 대한 확실한 대체제는 나오지 않은 실정이다. 최근 미국립 신경질환 및 뇌졸중 연구소(The National Institute of Neurological Disorders and Stroke. U.S.A : NINDS) 주도하에 신경보호 가능성이 큰 12가지의 후보물질을 선정하여 연구가 진행되고 있으나 여기서도 아직 뚜렷한 결과물은 없는 상태이다.

[0016] 따라서 간질, 발작, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환 등을 포함하는 뇌질환들은 앞서 기술한 바와 같이 세포 내에서 매우 복잡한 메카니즘에 의해 유발되는 것인 만큼, 상기 메카니즘을 보다 효율적으로 조절함으로써 뇌질환을 진단하고 예방 및 치료할 수 있는 기술들의 개발이 필요하다.

[0017] 한편, CD137 유전자는 면역세포인 T 임파구의 표면에 발현되어 T 임파구가 항원 제시세포(antigen presenting cell)와 결합할 때 수용기 역할을 하는 유전자로서, 종양괴사인자 수퍼패밀리 멤버 9(tumor necrosis factor receptor superfamily member 9; TNFRSF9) 또는 4-1BB로도 불린다. 상기 CD137은 T 세포의 활성에 의해 발현될 수 있으나, CD4 T 세포에 비해 CD8 T 세포에서 넓게 발현된다. 또한, CD137의 발현은 수상 세포, 여포성 수상 세포, 자연 살해 세포, 과립성 백혈구 및 염증 사이트에 있는 혈관 벽의 세포들에서도 발견된다. 상기 CD137의 가교는 T 세포 증식, IL-2 분비 및 세포 용해 활성을 증가시킨다. 나아가, 이는 마우스 내에서 종양을 제거하는 면역 활성을 증가시킬 수 있다.

[0018] 상기 CD137과 관련하여, 최근 오구택 교수 연구팀은 지금까지 주로 면역관련세포에서 발현되어 기능한다고 알려진 CD137 유전자가 동맥경화병변이 형성된 혈관의 내피 세포에서도 발현된다는 사실을 발견하였고, 면역세포와 혈관내피 세포가 CD137이라는 인자를 통해 상호 신호를 전달하여 동맥경화증을 촉진한다는 것도 처음으로 규명하였다 (Circulation. 2010;121:1124-1133.).

[0019] 그러나, 아직까지 상기 CD137의 간질, 발작, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환과 같은 뇌질환에 관하여는 보고된 바 없다.

[0020] 이에 본 발명자들은 간질, 발작, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환과 같은 뇌질환을 진단하고 예방하며 치료할 수 있는 새로운 방법을 연구하던 중, CD137 유전자가 결여된(knock out) 마우스를 대상으로 간질발작 유도 물질인 카인산 (kainic acid)을 처리한 결과, CD137 유전자가 정상적으로 발현되는 대조군 마우스에 비해 간질

의 발생정도가 감소하였고, 간질발작에 의한 신경사멸도 감소된다는 사실을 확인함으로써 뇌질환에 있어서 CD137 유전자의 신규한 용도를 규명하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0021] 따라서, 본 발명의 목적은 뇌질환의 진단용 조성물, 진단용 키트 및 진단용 마이크로어레이를 제공하는 것이다.

[0022] 또한, 본 발명의 목적은 뇌질환을 예방 또는 치료할 수 있는 물질을 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

[0023] 나아가, 본 발명의 목적은 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0024] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 CD137 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 뇌질환의 진단용 조성물을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 CD137 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 뇌질환의 진단용 키트를 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 CD137 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 뇌질환의 진단용 마이크로어레이를 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 (a) CD137 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 CD137 유전자의 발현양, CD137 단백질의 양 또는 CD137 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 측정 결과, CD137 유전자의 발현양, CD137 단백질의 양 또는 CD137 단백질의 활성이 감소되는 경우에 상기 시료는 뇌질환의 치료 또는 예방용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 뇌질환의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0028] 나아가 본 발명은 CD137 유전자의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열을 가지는 안티센스 또는 siRNA (small interference RNA) 올리고뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0029] 본 발명에 따르면, CD137 유전자 발현의 억제는 간질 등에 의한 발작 증상을 감소시킬 수 있으며, 뇌에서 면역세포와 유사한 기능을 하는 성상교세포의 활성을 유도하지 않으며, 여러 가지 사이토카인의 분비를 증가시키는 COX-2의 발현을 억제하여 신경세포를 죽음으로부터 보호할 수 있으므로, 간질, 발작, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환 등의 뇌질환의 진단 또는 치료제의 표적 유전자로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 본 발명의 일실시예에 의한 CD137의 유무에 따른 마우스의 카인산으로 유도된 발작 정도를 나타내는 그래프이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 의한 CD137의 유무에 따른 마우스의 카인산으로 유도된 발작에 의한 생존율을 나타내는 그래프이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 의한 CD137의 유무에 따른 마우스 내 카인산으로 유도된 성상교세포의 활성을 나타내는 도면이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 의한 CD137의 유무에 따른 마우스 내 카인산으로 유도된 사이클로옥시제나제-2 (COX-2)의 발현 변화를 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0032] 본 발명은 CD137 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하

는 뇌질환의 진단용 조성물을 제공한다.

[0033] 본 발명의 진단용 조성물에 포함되는 상기 프로브 또는 프라이머는 CD137 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 특징이 있으며, 본 발명에서 언급한 CD137 유전자의 서열은 서열번호 1 및 서열번호 2에 나타내었는데, 이는 CD137 유전자의 경우 splicing varient가 존재하기 때문에 2가지 형태, 즉 서열번호 1 또는 서열번호 2의 cDNA 서열을 갖는다.

[0034] 본 발명에서 상기 진단은 병리 상태를 확인하는 것을 나타내는 용어로서, 본 발명에서의 진단은 CD137 유전자의 발현 유무 및 발현 정도를 확인하여 뇌질환의 발병여부, 발전 및 경감 등을 판단하는 것도 포함하는 의미를 갖는다.

[0035] 본 발명의 진단용 조성물은 본 발명의 CD137 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머 이외에도 상기 프로브 또는 프라이머의 구조 또는 생리활성을 안정하게 유지시켜 주는 완충액 또는 반응액이 추가로 포함할 수 있으며, 안정성을 유지하기 위해, 분말 상태 또는 적절한 완충액에 용해된 상태로 제공될 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명의 진단용 조성물은 진단의 신속도 및 편리성을 높이기 위해, 적합한 담체 또는 지지체상에 공지된 다양한 방법을 이용하여 고정화된 상태로 제공될 수 있다(Antibodies: A Labotory Manual, Harlow & Lane; Cold SpringHarbor, 1988). 적합한 담체 또는 지지체의 예로는 아가로스, 셀룰로즈, 니트로셀룰로즈, 덱스트란, 세파덱스, 세파로즈, 리포솜, 카복시메틸 셀룰로즈, 폴리아크릴아미드, 폴리스테린, 반려암, 여과지, 이온교환 수지, 플라스틱 필름, 플라스틱 튜브, 유리, 폴리아민-메틸 비닐-에테르-말레산 공중합체, 아미노산 공중합체, 에틸렌-말레산 공중합체, 나일론, 컵, 플랫 팩(flat packs) 등이 포함될 수 있다. 그 외의 다른 고체 기질로는 세포 배양 플레이트, ELISA 플레이트, 튜브 및 폴리머성 막이 있다. 상기 지지체는 임의의 가능한 형태, 예를 들어 구형(비드), 원통형(시험관 또는 웰 내면), 평면형(시트, 시험 스트립)을 가질 수 있다.

[0037] 본 명세서에서, 상보적(complementary)이라는 용어는 어떤 특정한 혼성화 또는 어닐링 조건 하에서 본 발명의 CD137 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도의 상보성을 갖는 것을 의미한다. 따라서 상보적이라는 용어는 완전 상보적(perfectly complementary)과는 다른 의미를 가지며, 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 CD137 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도이면, 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있다.

[0038] 본 명세서에서, 프로브라는 용어는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타켓 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것을 말한다. 본 발명에 따른 프로브는 단일쇄일 수 있으며, 바람직하게는 올리고디옥시리보뉴클레오티드일 수 있다. 본 발명의 프로브는 자연 dNMP (즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 펩타이드 핵산 (PNA) (M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 헥소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로헥시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에티틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아졸릴-, 이미다졸릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아졸릴-, 이미다졸릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.

[0039] 본 명세서에서, 프라이머란 용어는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있을 수 있다. 또한, 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 CD137 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충

분한 상보성을 가지면 충분하다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머는 유전자 증폭 반응에 이용될 수 있는 것이 바람직하다. 상기 증폭 반응은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 말하며, 이러한 유전자 증폭 반응들에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있고, 예컨대, 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 리가아제 연쇄반응(LCR), 전자 중재 증폭(TMA), 핵산 염기서열 기판 증폭(NASBA) 등이 포함될 수 있다.

[0040] 본 명세서에서 뇌질환이란 특정 뇌 부분의 신호전달 과정의 이상 또는 신경세포의 사멸로 야기되는 질환을 말한다. 상기 뇌질환으로는 이에 제한되지는 않으나, 간질, 발작, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환 등이 포함될 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명은 CD137 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 뇌질환의 진단용 키트를 제공한다.

[0042] 상기 진단용 키트에 포함되는 프로브 또는 프라이머 용어에 대해서는 앞서 기술된 바와 같으며, CD137 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 본 발명의 뇌질환 진단용 키트가 만일 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, Thermus aquaticus (Taq), Thermus thermophilus (Tth), Thermus filiformis, Thermisflavus, Thermococcus literalis 또는 Pyrococcus furiosus(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있으며, 본 발명의 뇌질환 진단용 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징(packaging) 또는 컴파트먼트(compartment)로 제작될 수 있다.

[0043] 나아가, 본 발명은 CD137 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 뇌질환의 진단용 마이크로어레이를 제공한다.

[0044] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기 프로브 또는 프라이머는 혼성화 어레이 요소(hybridizable arrayelement)로서 이용되며, 기체(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기체는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함할 수 있다. 상기 혼성화 어레이 요소는 상기 기체 상에 배열되고 고정화되며, 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기체에 결합될 수 있다.

[0045] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA는 표지(labeling)되고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화 될 수 있다. 혼성화 조건은 다양할 수 있으며, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명은 (a) CD137 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 CD137 유전자의 발현양, CD137 단백질의 양 또는 CD137 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 측정 결과, CD137 유전자의 발현양, CD137 단백질의 양 또는 CD137 단백질의 활성이 감소되는 경우에 상기 시료는 뇌질환의 치료 또는 예방용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 뇌질환의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0047] 본 발명의 방법에 따르면, 먼저 CD137 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시킬 수 있다. 여기서 상기 시료는 CD137 유전자의 발현량, CD137 단백질의 양 또는 CD137 단백질의 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 뉴클레오티드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이후, 시료가 처리된 세포에서 CD137 유전자의 발현량, CD137 단백질의 양 또는 CD137 단백질의 활성을 측정할 수 있으며, 측정 결과, CD137 유전자의 발현량, CD137 단백질의 양 또는 CD137 단백질의 활성이 감소되는 것이 측정되면 상기 시료는 뇌질환의 치료 또는 예방용 물질로 판정될 수 있다.

[0048] 상기에서 CD137 유전자의 발현량, CD137 단백질의 양 또는 CD137 단백질의 활성을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 수행될 수 있는데, 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나, 역전사 중합효소 연쇄반

응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블랏, 노던 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA:radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion) 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay) 등을 이용하여 수행할 수 있다.

[0049] 나아가, 본 발명은 CD137 유전자의 발현을 억제하거나 또는 CD137 단백질의 발현 및 활성을 감소시키는 물질을 유효성분으로 포함하는 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0050] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 화학물질, 뉴클레오티드, 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA(small interference RNA) 올리고뉴클레오티드 또는 천연물 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 본 발명의 CD137 유전자의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열을 가지는 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 siRNA(small interference RNA) 올리고뉴클레오티드를 유효성분으로 포함할 수 있다.

[0051] 본 발명에서 "안티센스 올리고뉴클레오티드"란 용어는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 본 발명의 안티센스 서열은 CD137 mRNA에 상보적이고 CD137 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하며, CD137 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다.

[0052] 또한, 상기 안티센스 핵산은 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., Curr Opin Struct Biol., 5(3):343-55(1995)). 핵산 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 핵산은 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-메틸피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6(6-아미노헥실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다. 또한, 본 발명의 안티센스 핵산은 상기 안티센스 핵산의 활성 및 세포 흡착성을 향상시키는 하나 이상의 모이어티(moiety) 또는 컨쥬게이트(conjugate)와 화학적으로 결합될 수 있다. 콜레스테롤 모이어티, 콜레스테릴 모이어티, 콜릭산, 티오에테르, 티오콜레스테롤, 지방성 사슬, 인지질, 폴리아민, 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 아다맨탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 옥타데실아민, 헥실아미노-카르보닐-옥시콜에스테롤 모이어티 등의 지용성 모이어티 등이 있고 이에 제한되지는 않는다. 지용성 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오티드와 제조 방법은 본 발명의 기술 분야에서 이미 잘 알려져 있다(미국특허 제5,138,045호, 제5,218,105호 및 제5,459,255호). 상기 변형된 핵산은 뉴클레아제에 대한 안정성을 증가시키고 안티센스 핵산과 표적 mRNA와의 결합 친화력을 증가시킬 수 있다.

[0053] 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오티드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스 올리고뉴클레오티드를 합성하는 일예는 RNA 중합효소 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한 가지 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.

[0054] 본 발명에서 "siRNA" 용어는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다(국제공개 특허번호 00/44895, 01/36646, 99/32619, 01/29058, 99/07409 및 00/44914 참조). siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 넉다운(knock-down) 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다.

[0055] 본 발명의 siRNA 분자는, 센스 가닥(CD137 mRNA 서열에 상응하는 서열)과 안티센스 가닥(CD137 mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중쇄를 이루는 구조를 가질 수 있으며, 또한, 본 발명의 siRNA 분자는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다. 나아가 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. 또한, siRNA 말단 구조는 CD137 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하고, 점착 말단 구조는 3'-말단 돌출 구조와 5'-말단 돌출 구조 모두 가능하다.

[0056] 또한, 본 발명의 siRNA 분자는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오티드 서열이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-앤드-루프 구조를 형성하게 된다. 이 스템-앤드-루프 구조는 인 비트로 또는 인 비보에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다.

[0057] 상기 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등과 같은 경구 투여용 담체 및 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르 브산과 같은 항산화제가있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995). 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 적합한 형태로 제형화 될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학적 조성물은 공지의 방법에 따라 다양한 비경구 또는 경구 투여용 형태로 제조될 수 있으며, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것으로는 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화될 수 있다. 또한, 경구투여용 제형으로는, 이에 한정되지는 않으나, 분말, 과립, 정제, 환약 및 캡슐 등이 있다.

[0058] 상기와 같은 방법으로 제형화된 약학적 조성물은 유효량으로 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 상기에서 '유효량' 이란 환자에게 투여하였을 때, 예방 또는 치료 효과를 나타내는 양을 말한다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 투여 대상, 연령, 성별 체중, 개인차 및 질병 상태에 따라 적절히 선택할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으나, 바람직하게는 1~10000/체중kg/day, 더욱 바람직하게는 10~1000/체중kg /day의 유효용량으로 하루에 수회 반복 투여될 수 있다.

[0059] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0060] **<실시예 1>**

[0061] **CD137의 유무에 따른 마우스의 카인산으로 유도된 발작 정도 측정**

[0062] 본 발명에 따른 CD137이 발작 증상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0063] 1) 실험 동물

[0064] 6주령에서 8주령 수컷 C57BL6 마우스를 동물사육시설에서 22±3 ℃로 유지하고 12시간 주기로 조명을 켜고 끄는 조건에서 사육하였다. 사료와 수분은 제한을 두지 않고 자유롭게 섭취하도록 하였다.

[0065] 2) 발작 유발(Seizure induction model)

[0066] 일반 마우스(Wild type)와 CD137 결손(KO) 마우스에 카인산(sigma)을 체중(kg) 당 30 mg의 용량으로 실험 동물의 복강 내로 주사하여 발작을 유발시켰다. 발작 행동 점수(seizure score)의 산정은 해당 실험 동물에게 카인산을 투여한 후 2시간 동안 발작 행동을 관찰하였고 하기 5단계로 분류하여 점수로 환산하였다(최대 5점).

표 1

5단계 점수책정 기준

Seizure behavior	Seizure grade
No response	0
Front or hind limb pawing, staring	I
Rearing, staring, nodding, bilateral pawing	II
Rearing, staring, nodding, bilateral pawing, jumping, wobbling, falling	III
Status epilepticus or death	IV

[0067]

[0068] 측정 결과를 도 1에 나타내었다.

[0069] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 카인산을 마우스의 복강으로 30 mg/kg을 주사한 결과, 일반 마우스의 경우에는 카인산에 의하여 5분 후에 발작 증상이 나타났으며, 시간이 지날수록 발작 증상이 심해져서 75분 후에는 4단계의 발작 증상까지 나타났으나, CD137 결손(KO) 마우스는 카인산의 의한 발작 증상이 감소되어 1단계 이하로 경미하게 일어나는 것으로 나타났다.

[0070] 이로부터, CD137 유전자의 활성을 억제함으로써 발작 증상을 감소시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0071] **<실시예 2>**

[0072] **CD137의 유무에 따른 마우스의 카인산으로 유도된 마우스의 생존율 측정**

[0073] 본 발명에 따른 CD137이 발작에 의한 생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0074] 일반 마우스(Wild type)와 CD137 결손(KO) 마우스에 카인산(sigma)을 체중(kg) 당 40 mg의 고농도로 실험 동물의 복강 내로 주사하여 발작을 유발시켰다. 이후 발작에 의한 마우스의 생존율을 측정하여 도 2에 나타내었다.

[0075] 도 2에 나타낸 바와 같이, 고농도(40 mg/kg)의 카인산을 주사한 결과 일반 마우스 군에서는 2시간 이내에 급작스러운 발작 반응에 의해 모두 죽는 반면, CD137 결손 마우스는 모두 생존한 것을 확인하였다. 이는 CD137 유전자가 결손된 마우스에서는 카인산에 의해 유도되는 발작 반응이 감소된다는 핵심적인 증거이며, 이로부터 CD137 유전자의 활성을 억제함으로써 간질 등에 의한 발작 증상을 감소시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0076] **<실시예 3>**

[0077] **CD137의 유무에 따른 마우스의 카인산으로 유도된 마우스의 해마의 성상교세포의 활성 측정**

[0078] 본 발명에 따른 CD137이 성상교세포의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0079] 일반 마우스(Wild type)와 CD137 결손(KO) 마우스를 음성 대조군 또는 카인산 처리군으로 나누어 생리식염수 또는 카인산(sigma)을 체중(kg) 당 30 mg의 용량으로 실험 동물의 복강 내로 주사하였다. 3일 후, 실험동물을 마취하여 생리식염수로 관류한 후 3% 파라포름알데히드로 고정하였다. 뇌를 분리해서 30% 수크로스에 옮겨서 24시간 경과 후 OCT 화합물을 이용하여 급속 냉동하였다. 전체 해마 부위를 30 μm 두께로 잘라서 성상교세포 마커인 GFAP 항체로 면역염색을 수행하였다. 구체적으로, 뇌 조직을 0.1 M 인산완충액(PB)에 각 10분씩 3회 수세하고 내인성 퍼옥시다제(endogenous peroxidase)를 차단하기 위해 3% H_2O_2에 15분 처리했다. 인산완충생리식염수(PBS)에 각 10분씩 3회 수세하고 배경 염색을 줄이기 위해 블로킹 용액(blocking solution; 0.1 M 인산완충액(PB) 내 3% 비지방 우유 및 0.3% Triton X-100을 용해시킨 용액)에 30분 동안 반응시켰다. 1차 항체는 하룻밤 동안 4 ℃에 반응시켰으며 0.1 M 인산완충액(PB)에 각 10분씩 3회 수세하고 2차 항체로 상온에서

2시간 동안 반응시켰다. 이후, 인산완충생리식염수(PBS)로 각 10분씩 3회 수세하고, ABC 키트를 이용하여 TSA(tyramide signal amplication)로 형광염색하였다.

[0080] 측정 결과를 도 3에 나타내었다.

[0081] 도 3에 나타낸 바와 같이, 일반 마우스(Wild type)의 경우, 해마의 CA1 지역, CA3 지역의 성상교세포 활성은 생리식염수에 비해 카인산 처리시 활성이 증가하는 것으로 나타났으나, CD137 유전자 결손 마우스에서는 카인산 처리에 의한 성상교세포의 활성이 감소하는 것으로 나타났다.

[0082] 따라서, CD137 유전자의 활성을 억제함으로써 간질 등에 의한 발작 증상을 감소시킬 수 있으며, 뇌에서 면역세포와 유사한 기능을 하는 성상교세포의 활성을 유도하지 않아 신경세포를 죽음으로부터 보호할 수 있으므로, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환 등의 퇴행성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

[0083] **<실시예 4>**

[0084] **CD137의 유무에 따른 마우스의 카인산으로 유도된 마우스의 해마의 사이클로옥시제나제-2 (COX-2) 단백질의 발현 정도 측정**

[0085] 본 발명에 따른 CD137이 COX-2의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0086] 일반 마우스(Wild type)와 CD137 결손(KO) 마우스를 음성 대조군 또는 카인산 처리군으로 나누어 생리식염수 또는 카인산(sigma)을 체중(kg) 당 30 mg의 용량으로 실험 동물의 복강 내로 주사한 후, 1 및 3일 후에 해마(hippocampus) 부위를 30 μm 두께로 잘라서 GFAP 항체 대신 COX-2 항체를 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 수행하여 면역염색하여 상기 해마의 CA1, CA3 지역에서 COX-2 단백질의 발현을 관찰하였다.

[0087] 측정 결과를 도 4에 나타내었다.

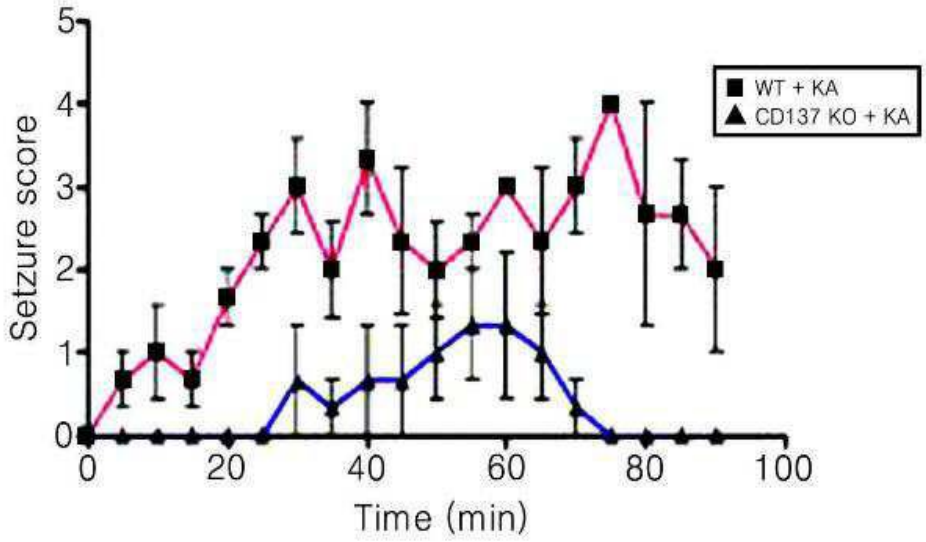
[0088] 도 4에 나타낸 바와 같이, 일반 마우스(Wild type)의 경우, 생리식염수 처리시에는 해마의 CA1 지역, CA3 지역에서 COX-2 단백질 발현이 일어나지 않았으나, 카인산 처리시 해마부위에서 COX-2 단백질의 발현이 증가되는 것으로 나타났고, CD137 유전자 결손 마우스에서는 카인산 처리에 의한 COX-2 단백질의 발현 변화가 나타나지 않았다. 이는 CD137 유전자가 여러 가지 사이토카인의 분비를 증가시키는 COX-2의 발현에 중요하게 관련되어 있다는 것을 의미하며, 발작에 의한 신경세포 사멸에 결정적인 역할을 한다는 증거임을 알 수 있다.

[0089] 따라서, CD137 유전자의 활성을 억제함으로써 여러 가지 사이토카인의 분비를 증가시키는 COX-2의 발현을 억제하여 신경세포를 죽음으로부터 보호할 수 있으므로, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환 등의 퇴행성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

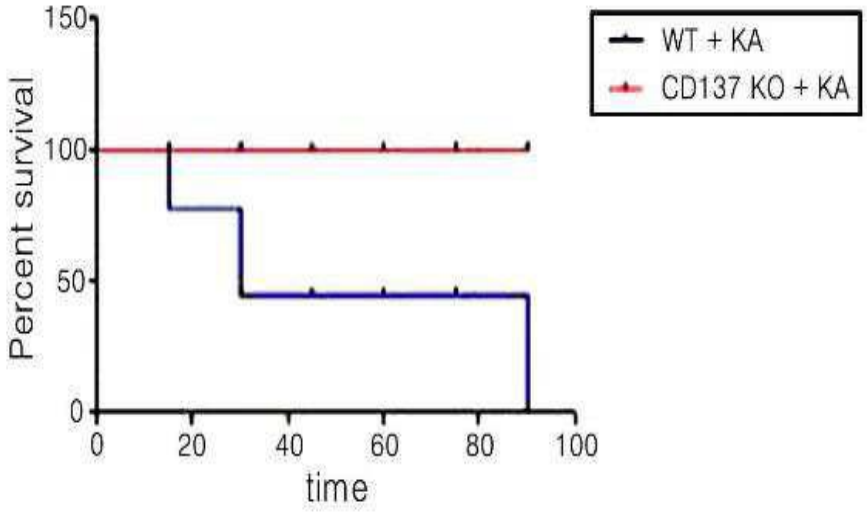
[0090] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

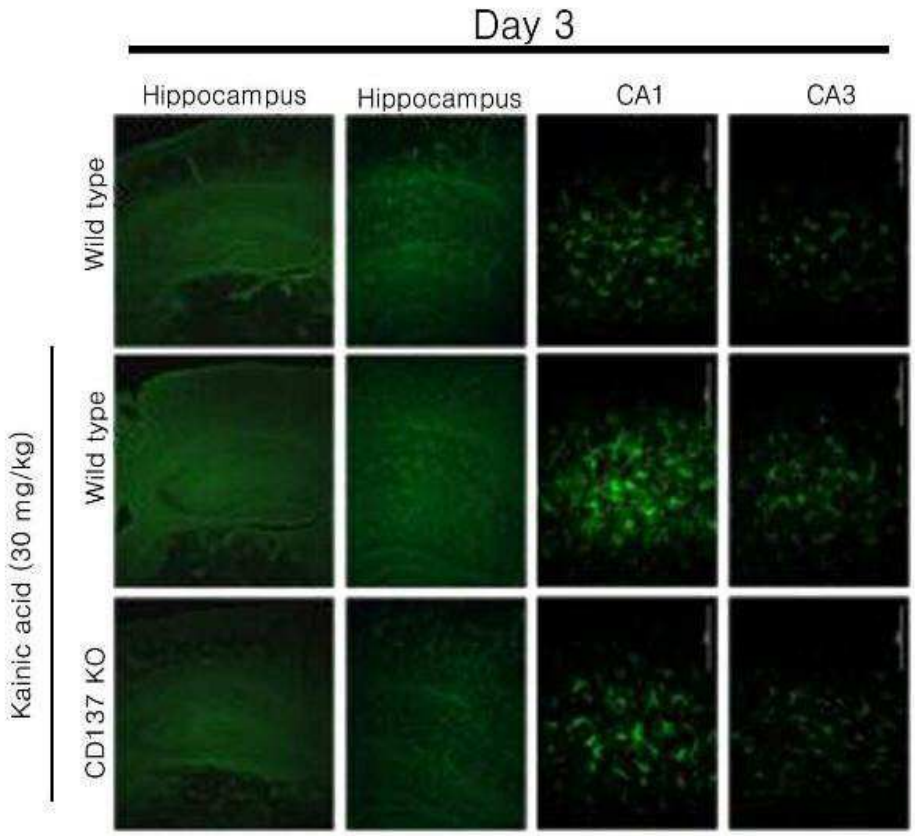
도면1


Setzure score
Time (min)
WT + KA
CD137 KO + KA
0
1
2
3
4
5
0
20
40
60
80
100

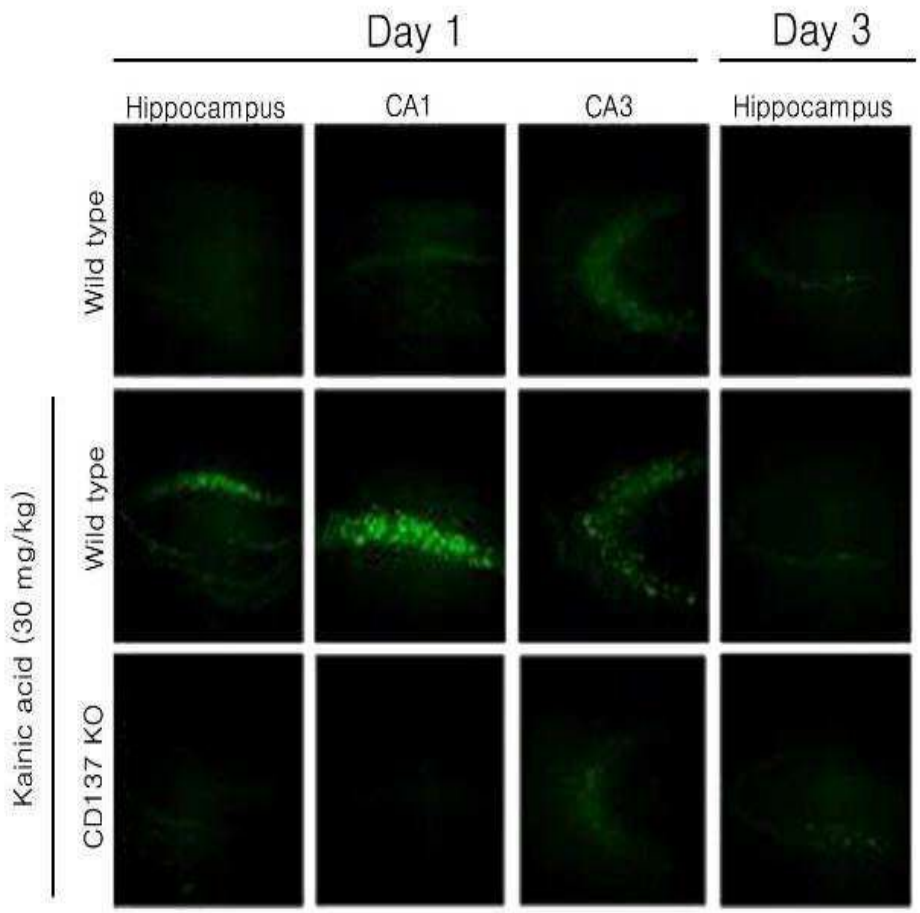
도면2


Percent survival
time
WT + KA
CD137 KO + KA
0
50
100
150
0
20
40
60
80
100

도면3


Day 3
Hippocampus
Hippocampus
CA1
CA3
Wild type
Wild type
CD137 KO
Kainic acid (30 mg/kg)

도면4



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation of Ulsan University

<120> Novel use of CD137 gene

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 771

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD137 cDNA sequence(variant 1)

<400> 1

atgggaaaca actgttacaa cgtggtggtc attgtgctgc tgctagtggg ctgtgagaag 60

gtgggagccg tgcagaactc ctgtgataac tgtcagcctg gtactttctg cagaaaatac 120

aatccagtct gcaagagctg ccctccaagt accttctcca gcataggtgg acagccgaac 180

tgtaacatct gcagagtgtg tgcaggctat ttcaggttca agaagttttg ctcctctacc 240

cacaacgcgg agtgtgagtg cattgaagga ttccattgct tggggccaca gtgcaccaga 300

tgtgaaaagg actgcaggcc tggccaggag ctaacgaagc agggttgcaa aacctgtagc 360

ttgggaacat ttaatgacca gaacggtact ggcgtctgtc gaccctggac gaactgctct 420

ctagacggaa ggtctgtgct taagaccggg accacggaga aggacgtggt gtgtggaccc 480

cctgtggtga gcttctctcc cagtaccacc atttctgtga ctccagaggg aggaccagga 540

gggcactcct tgcaggtcct taccttgttc ctggcgctga catcggcttt gctgctggcc 600

ctgatcttca ttactctcct gttctctgtg ctcaaatgga tcaggaaaaa attcccccac 660

atattcaagc aaccatttaa gaagaccact ggagcagctc aagaggaaga tgcttgtagc 720

tgccgatgtc cacaggaaga agaaggagga ggaggaggct atgagctgtg a 771

<210> 2

<211> 636

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD137 cDNA sequence(variant 2)

<400> 2

atgggaaaca actgttacaa cgtggtggtc attgtgctgc tgctagtggg ctgtgagaag 60

gtgggagccg tgcagaactc ctgtgataac tgtcagcctg gtactttctg cagaaaatac 120

aatccagtct gcaagagctg ccctccaagt accttctcca gcataggtgg acagccgaac 180

tgtaacatct gcagagtgtg tgcaggctat ttcaggttca agaagttttg ctcctctacc 240

cacaacgcgg agtgtgagtg cattgaagga ttccattgct tggggccaca gtgcaccaga 300

tgtgaaaagg actgcaggcc tggccaggag ctaacgaagc agggttgcaa aacctgtagc 360

ttgggaacat ttaatgacca gaacggtact ggcgtctgtc gaccctggac gaactgctct 420

ctagacggaa ggtctgtgct taagaccggg accacggaga aggacgtggt gtgtggaccc 480

cctgtggtga gcttctctcc cagtaccacc atttctgtga ctccagaggg aggaccagca 540

tttaagaaga ccactggagc agctcaagag gaagatgctt gtagctgccg atgtccacag 600

gaagaagaag gaggaggagg aggctatgag ctgtga 636