



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0029079
(43) 공개일자 2010년03월15일

(51) Int. Cl.

A61K 31/70 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7024747

(22) 출원일자 2008년05월15일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2009년11월27일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/063804

(87) 국제공개번호 WO 2008/144453
국제공개일자 2008년11월27일

(30) 우선권주장

60/938,163 2007년05월15일 미국(US)

(71) 출원인

헬리콘 테라퓨티스 인코퍼레이티드

미국, 캘리포니아 92121, 샌 디에고, 러스크 블레
바드 7473

(72) 발명자

페테르스, 마르코

미국, 캘리포니아 92037, 라 졸라, 플레이 멜 노
르테 340

스코트, 로데릭 이. 엠.

미국, 캘리포니아 02964, 포웨이, 카논 패스
15127

톨리, 티모시 피.

미국, 캘리포니아 92075, 솔라나 비치, 씨브라이
트 레인 819

(74) 대리인

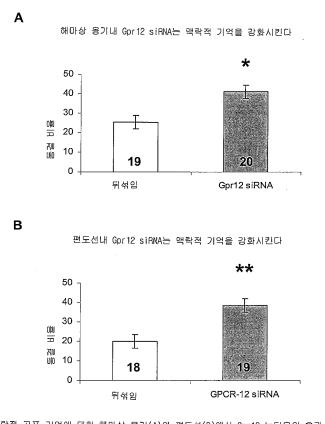
강명구

전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) G P R 12의 저해로 인지 질환을 치료하는 방법

(57) 요약

본 발명에서는 장기 기억 형성, 해마상 용기-의존성 인지 과제의 수행 또는 Gpr12 기능을 조절하는 능력에 대하여 약제를 스크리닝하는 방법을 제시한다. 본 발명에서는 또한, Gpr12-의존성 단백질 발현을 조절함으로써 장기 기억 형성 또는 해마상 용기-의존성 인지 과제의 수행을 조절하는 방법을 제시한다. 더 나아가, 본 발명에서는 Gpr12 기능을 저해함으로써 장기 기억 형성에서 결함을 치료하는 방법과 Gpr12 기능을 저해함으로써 해마상 용기-의존성 인지 과제의 수행에서 결함을 치료하는 방법을 제시한다.

대 표 도 - 도4

특허청구의 범위

청구항 1

포유동물에서 Gpr12 활성을 조절하는 효과량의 약제를 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 포유동물은 성체 포유동물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 포유동물은 인간인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 투여는 장기 기억 형성 조절을 결과하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 장기 기억 형성이 강화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 장기 기억 형성에서 조절을 검출하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 조절의 검출은 해마상 용기-의존성 인지 과제의 조절의 검출인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 조절의 검출은 편도선-의존성 인지 과제의 조절의 검출인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

청구항 6에 있어서, 조절의 검출은 해마상 용기-의존성 인지 과제와 편도선-의존성 인지 과제의 조절의 검출인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서, Gpr12 활성의 조절은 포유동물에서 Gpr12 단백질 발현의 조절을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 투여는 인식 기능의 강화를 결과하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 특정 인지 과제의 수행에서 향상을 산출하는데 충분한 조건 하에 포유동물을 훈련시키는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 수행 획득(performance gain)은 투여의 부재에서 단독으로 훈련시킴으로써 달성되는 인지 과제의 수행과 비교하여 달성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

청구항 12에 있어서, 훈련은 복수 훈련 기간을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

청구항 12에 있어서, 훈련은 구분된 훈련 기간을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

청구항 12에 있어서, 약제는 각 훈련 기간 이전에 또는 동안에, 또는 둘 모두에서 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

청구항 1에 있어서, 약제는 효과량의 Gpr12 siRNA 분자, 효과량의 생물학적 활성 Gpr12 안티센스 단편 또는 효과량의 Gpr12 단백질에 특이적인 항체 중에서 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

아래의 단계를 포함하는 방법:

- (a) Gpr12 단백질을 발현하는 숙주 세포 내로 관심 약제를 도입하는 단계;
- (b) Gpr12 기능을 결정하는 단계,

여기서 약제가 투여되지 않은 (a)의 숙주 세포의 Gpr12 기능과 비교하여 (b)에서 측정된 Gpr12 기능에서 차이는 상기 약제를 Gpr12 기능을 조절할 수 있는 약제로서 확인한다.

청구항 19

아래의 단계를 포함하는 방법:

- (a) Gpr12 기능을 조절하는 약제를 포유동물에 투여하는 단계;

(b) 포유동물에서 장기 기억 형성을 산출하는데 충분한 조건 하에 단계 (a)의 포유동물과 약제가 투여되지 않은 동일한 종류의 대조 포유동물을 훈련시키는 단계;

- (c) 단계 (b)에서 훈련된 포유동물에서 장기 기억 형성을 평가하는 단계;
- (d) 단계 (c)에서 평가된 포유동물에서 장기 기억 형성을 비교하는 단계,

여기서 대조 포유동물에서 평가된 장기 기억 형성과 비교하여 약제가 투여된 포유동물에서 평가된 장기 기억 형성에서 차이는 상기 약제를 장기 기억 형성을 조절할 수 있는 약제로서 확인한다.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 포유동물은 성체 포유동물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

청구항 19에 있어서, 포유동물은 인간인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

청구항 19에 있어서, 장기 기억 형성은 해마상 응기-의존성 장기 기억 형성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

청구항 19에 있어서, 장기 기억 형성은 편도선-의존성 장기 기억 형성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

청구항 19에 있어서, 장기 기억 형성은 해마상 응기-의존성과 편도선-의존성 장기 기억 형성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

청구항 19에 있어서, Gpr12 활성의 조절은 포유동물에서 Gpr12 단백질 발현의 조절을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

청구항 19에 있어서, 훈련은 복수 훈련 기간을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

청구항 19에 있어서, 훈련은 구분된 훈련 기간을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

청구항 19에 있어서, 약제는 각 훈련 기간 이전에 또는 동안에, 또는 둘 모두에서 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

청구항 19에 있어서, 약제는 효과량의 Gpr12 siRNA 분자, 효과량의 생물학적 활성 Gpr12 안티센스 단편 또는 효과량의 Gpr12 단백질에 특이적인 항체 중에서 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서**기술 분야****관련된 출원**

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119 하에, 2007년 5월 15일 제출된 U.S. 가출원 No. 60/938,163에 우선권을 주장하고, 이의 전체 내용은 본 명세서에 참조로서 편입된다.

본 발명의 기술 분야

[0004] 본 발명은 Gpr12 유전자 또는 유전자 산물의 저해로 인지 질환을 치료하는 방법에 관계한다.

배경 기술

[0005] 인간을 많은 생물체가 보유하는 속성(attribute)은 과거 사건의 기억이다. 이러한 속성은 수십 년간 연구되고 있고, 이의 분지(ramification) 중에서 다수를 설명하는 많은 정보가 현재 가용하다. 가령, 2가지 기본적 유형의 기억이 확인되었다: 단기 기억(short term memory)을 포함하는 전사 독립성 기억(transcription-independent memory), 그리고 장기 기억(long term memory)을 포함하는 전사-의존성 기억(transcription-dependent memory).

[0006] Gpr12는 고아 GPCR이다. *in situ* 혼성화(hybridization)에 의한 Gpr12 발현의 분석에서, Gpr12는 생쥐 CNS에서 폭넓게 발현되는데, 해마상 용기(hippocampus)와 시상(thalamus)에서 최대 수준으로 발현된다(Ignatov *et al.*, 2003, *J. Neurosci.* 23:907-914). Gpr12의 내인성 리간드(endogenous ligand)는 알려져 있지 않다. Gpr12의 계통발생 분석(phylogenetic analysis)에서, Gpr12의 가장 가까운 동족체(homologous)로서 고아 수용체(orphan receptor) Gpr3과 Gpr6이 확인되었다. 이들 3가지 고아 GPCR를 포함하는 하위군(subgroup)은 GPCR의 Mcr(멜라노코르틴-유사 웨티드, melanocortin-like peptide)와 Edg(내피세포 분화, endothelial differentiation) 집단에 가장 밀접하게 관련된다. 이는 Gpr12에 대한 가능 리간드로서 지질 또는 웨티드를 암시한다. 스피고실포스포릴콜린(sphingosylphosphorylcholine, SPC)은 이종성 발현 시스템(heterologous expression system)에서 Gpr12를 활성화시킨다. SPC는 배양된 태아 피질 뉴런(embryonic cortical neuron)의 분화(differentiation)와 성숙(maturation)을 촉진한다. 하지만, Gpr12의 내인성 리간드(engenous ligand)와 성체 CNS에서 이의 생체내 기능은 알려져 있지 않다.

[0007] 이전의 결과는 Gpr12가 G_{α_i} 의존성 기전을 통하여 신호한다는 것을 증명하였다. cAMP/PKA 경로는 포유동물 뇌에서 CREB 활성화와 장기 기억을 조절한다(Abel *et al.*, 1997, *Cell* 88:615-626; Bourtchouladze *et al.*, 1998, *Learn Mem.* 5:365-374; Barad *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95:15020-15025; Bourtchouladze *et al.*, 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 100:10518-10522).

본 발명의 요약

[0009] g-결합된 단백질 수용체 Gpr12는 포유동물에서 기억 형성의 기초가 되는 세포 현상(cellular event)을 매개하는

데 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, 해마상 용기 내에서 Gpr12-매개된 mRNA 트래피킹(trafficking)은 포유동물에서 맥락적 장기 기억 형성(contextual long-term memory formation)에 중요한 것으로 밝혀졌다. 해마상 용기 Gpr12 기능의 교란 또는 저해는 포유동물에서 전사 의존성 기억 형성(가령, 장기 기억 형성)을 강화시키는 밝혀졌다. 본 발명은 특히, Gpr12 유전자 또는 유전자 산물의 저해로 장기 기억 결함(long term memory defect) 또는 인지 질환(cognitive disorder)을 치료하는 방법에 관계한다.

[0010] 본 발명에서는 포유동물에서 인지 기능을 조절하는 방법을 제시한다.

[0011] 한 구체예에서, 본 발명은 포유동물에서 Gpr12 활성을 조절하는 약제(pharmaceutical agent)의 효과량을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관계한다.

[0012] 다른 구체예에서, 포유동물은 성체 포유동물이다. 다른 구체예에서, 포유동물은 인간이다.

[0013] 다른 구체예에서, 투여는 장기 기억 형성 조절을 결과한다. 다른 구체예에서, 장기 기억 형성이 강화된다.

[0014] 다른 구체예에서, 상기 방법은 장기 기억 형성에서 조절을 검출하는 단계를 더욱 포함한다. 다른 구체예에서, 조절의 검출은 해마상 용기-의존성 인지 과제(hippocampal-dependent cognitive task)의 조절의 검출이다. 다른 구체예에서, 조절의 검출은 편도선-의존성 인지 과제(amygdala-dependent cognitive task)의 조절의 검출이다. 다른 구체예에서, 조절의 검출은 해마상 용기-의존성 인지 과제와 편도선-의존성 인지 과제의 조절의 검출이다.

[0015] 특정 구체예에서, Gpr12 활성의 조절은 포유동물에서 Gpr12 단백질 발현의 조절을 포함한다. 다른 구체예에서, 투여는 인지 기능의 강화를 결과한다.

[0016] 다른 구체예에서, 상기 방법은 특정 인지 과제의 수행에서 향상을 산출하는데 충분한 조건 하에 포유동물을 훈련시키는 단계를 더욱 포함한다. 다른 구체예에서, 수행 획득(performance gain)은 이러한 투여의 부재에서 단독으로 훈련시킴으로써 달성되는 인지 과제의 수행과 비교하여 달성된다.

[0017] 다른 구체예에서, 훈련은 복수 훈련 기간(multiple training session)을 포함한다. 다른 구체예에서, 훈련은 구분된 훈련 기간(spaced training session)을 포함한다.

[0018] 다른 구체예에서, 약제는 각 훈련 기간 이전에 및/또는 동안에 투여된다.

[0019] 다른 구체예에서, 약제는 효과량의 Gpr12 siRNA 분자, 효과량의 생물학적 활성 Gpr12 안티센스 단편 및/또는 효과량의 Gpr12 단백질에 특이적인 항체 중에서 하나 이상을 포함한다.

[0020] 본 발명에 따른 다른 방법은 아래의 단계를 포함한다: (a) Gpr12 단백질을 발현하는 숙주 세포 내로 관심 약제를 도입하는 단계; (b) Gpr12 기능을 결정하는 단계, 여기서 약제가 투여되지 않은 (a)의 숙주 세포의 Gpr12 기능과 비교하여 (b)에서 측정된 Gpr12 기능에서 차이는 상기 약제를 Gpr12 기능을 조절할 수 있는 약제로서 확인한다.

[0021] 본 발명에 따른 다른 방법은 아래의 단계를 포함한다: (a) Gpr12 기능을 조절하는 약제를 포유동물에 투여하는 단계; (b) 포유동물에서 장기 기억 형성을 산출하는데 충분한 조건 하에 단계 (a)의 포유동물과 약제가 투여되지 않은 동일한 종류의 대조 포유동물을 훈련시키는 단계; (c) 단계 (b)에서 훈련된 포유동물에서 장기 기억 형성을 평가하는 단계; (d) 단계 (c)에서 평가된 포유동물에서 장기 기억 형성을 비교하는 단계, 여기서 대조 포유동물에서 평가된 장기 기억 형성과 비교하여 약제가 투여된 포유동물에서 평가된 장기 기억 형성에서 차이는 상기 약제를 장기 기억 형성을 조절할 수 있는 약제로서 확인한다.

[0022] 특정 구체예에서, 포유동물은 성체 포유동물이다. 다른 특정 구체예에서, 포유동물은 인간이다.

[0023] 다른 구체예에서, 장기 기억 형성은 해마상 용기-의존성 장기 기억 형성이다. 다른 구체예에서, 장기 기억 형성은 편도선-의존성 장기 기억 형성이다. 다른 구체예에서, 장기 기억 형성은 해마상 용기-의존성과 편도선-의존성 장기 기억 형성이다.

[0024] 다른 구체예에서, Gpr12 활성의 조절은 포유동물에서 Gpr12 단백질 발현의 조절을 포함한다.

[0025] 다른 구체예에서, 훈련은 복수 훈련 기간을 포함한다. 다른 구체예에서, 훈련은 구분된 훈련 기간을 포함한다.

[0026] 또 다른 구체예에서, 약제는 각 훈련 기간 이전에 및/또는 동안에 투여된다. 다른 구체예에서, 약제는 효과량의 Gpr12 siRNA 분자, 효과량의 생물학적 활성 Gpr12 안티센스 단편 및/또는 효과량의 Gpr12 단백질에 특이적인 항

체 중에서 하나 이상을 포함한다.

[0027] 본 발명의 이들 측면은 아래의 상세한 설명과 첨부된 도면을 참조하면 명백해질 것이다. 하지만, 본 명세서에 기술된 특정 구체예의 본질적인 기술적 사상과 범위를 벗어나지 않는, 이들 구체예에 대한 다양한 변화, 변형과 치환이 이루어질 수 있다. 이에 더하여, 이들 도면은 본 발명의 전형적인 구체예의 예시적이고 상징적인 대표인 것으로 의도되고, 다른 비-예시된 구체예 역시 본 발명의 범위 내에 속한다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 Gpr12의 저해가 장기 기억 형성을 촉진할 수 있다는 발견에 관련된다.

[0048] 전사-독립성 기억은 다양한 “기억 단계(memory phase)”, 예를 들면, 단기 기억, 중기(또는 중간) 기억과 마취-저항성(anesthesia-resistant) 기억((파리에서)을 포함한다. 이들 형태에서 공통점은 RNA 전사의 약리학적 저해물질이 이들 기억을 교란시키지 않는다는 것이다. 전사-의존성 기억은 일반적으로, 장기 기억으로 지칭되고, RNA 합성의 저해물질은 이의 출현을 차단한다.

[0049] 이러한 특정한 실험 경험의 기억 형성은 2가지 일반적 형태로 존재할 수 있다: 전사-독립성 형태와 전사-의존성 형태. 전자는 다양한 “기억 단계”, 예를 들면, 단기 기억, 그리고 중기(또는 중간) 기억을 포함한다. 이들 형태에서 공통점은 RNA 전사의 약리학적 저해물질이 이들 기억을 교란시키지 않는다는 것이다. 후자 형태는 일반적으로, 장기 기억으로 지칭되고, RNA 합성의 저해물질은 이의 출현을 차단한다.

[0050] g-결합된 단백질 수용체 Gpr12는 포유동물에서 기억 형성의 기초가 되는 세포 현상(cellular event)을 매개하는데 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, 해마상 용기 내에서 Gpr12-매개된 mRNA 트래피킹(trafficking)은 포유동물에서 맥락적 장기 기억 형성(contextual long-term memory formation)에 중요한 것으로 밝혀졌다. 해마상 용기 Gpr12 기능의 교란 또는 저해는 포유동물에서 전사 의존성 기억 형성(가령, 장기 기억 형성)을 강화시키는 밝혀졌다. 본 발명은 Gpr12 유전자 또는 유전자 산물의 저해로 장기 기억 결함(long term memory defect) 또는 인지 질환(cognitive disorder)을 치료하는 방법에 관계한다.

[0051] 달리 명시되지 않으면, 본 명세서에 이용된 기술 용어와 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야에 통상의 지식을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 갖는다.

[0052] 당업자는 본 발명의 실시에 이용될 수 있는, 본 명세서에 기술된 것들에 유사하거나 동등한 다수의 방법과 물질을 인식할 것이다. 실제로, 본 발명은 본 명세서에 기술된 방법과 물질에 결코 한정되지 않는다. 본 발명을 위하여, 아래의 용어가 정의된다.

정의

[0054] 본 명세서에서, “동물”에는 포유동물, 그리고 다른 동물, 척추동물(vertebrate)과 무척추동물(invertebrate)(가령, 조류(bird), 어류(fish), 파충류(reptile), 곤충(insect)(가령, 초파리(*Drosophila*) 종), 아프리시아(*Aplysia*))이 포함된다. 본 명세서에서, “포유동물”은 단공류(monotreme), 유대류(marsupial)와 태반동물(placental)을 비롯하여, 새끼에게 젖을 먹이고 새끼를 출산하거나(진수류(eutherian) 또는 유태반(placental) 포유동물), 또는 알을 낳는(후수류(metatherian) 또는 무태반(nonplacental) 포유동물) 임의의 척추동물을 지칭한다. 포유동물 종의 실례에는 인간과 다른 영장류(가령, 원숭이, 침팬지), 설치류(가령, 쥐, 생쥐, 기니피그(guinea pig))와 반추동물(ruminant)(가령, 소, 돼지, 말)이 포함된다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.

[0055] 본 명세서에서, “대조 동물” 또는 “정상 동물”은 전사-의존성 기억 형성을 유도하는데 충분한 조건 하에 훈련되는 동물과 동일한 종이고, 상기 동물에 달리 필적하는(가령, 유사한 연령, 성별)인 동물이다.

[0056] “Gpr12 기능”은 Gpr12의 생물학적 활성을 의미한다. 생물학적 활성은 생물학적 기능 또는 작용을 의미하는 것으로 해석된다.

[0057] “Gpr12 저해물질” 또는 “GRP12 저해물질 화합물 또는 작용제”는 Gpr12 폴리펩티드의 길항물질(antagonist)로서 기능할 수 있고, Gpr12 폴리펩티드의 기능을 직접적으로 또는 간접적으로 저해할 수 있는 화합물을 의미한다. 이런 화합물에는 Gpr12 유전자에 특이적인 간섭(interfering) RNA(siRNA), Gpr12 유전자에 특이적인 안티센스 뉴클레오티드, Gpr12 단백질에 특이적인 항체, 그리고 웨პ티드를 비롯한 작은 분자가 포함된다.

[0058] 생쥐와 인간의 Gpr12 유전자와 단백질 서열은 표 1에 열거된다.

丑 1

명칭	수탁 번호	SEQ ID NO:	서열
			gataggagct ttccatata accaaaaatag ttataata tacatttgg aaggcttgg ttttttctta ggaattcagt aataagtggc cagaacaga ggcgcgact ccttttttc cttcacag tagtactgc tctaagaat cacttgca gtttctcggt ttagtgg gtatgcagg ttccatgtgg tagtcatac actaattgca atattgcat gttaaaccca gaattaaaag agtcattttt tttcaatac agtttgg aatacccttcaatc caagtggat catgaaaaaa attttccaa ttacatata gtagactgtt gttttcaga attttttttttggat ttttaaact ctgactgtt gttttcaga aaaaaaaa gaaatatttta acggatcta ttgaaadaag attttatata tttaaatat taagaaat accaacatga cttttcaat attttttttttggat mnedpknls giprcdcidg apenisaavp sggsvaesp elvnpdiov lcsqglie enavvvvif hnsrlrapmf llisgslal llaglilitn fffayllqse atktvtigl mRNA vasfasvcs llaitvdryl slyalytyns ertrftfyvn lvnlgwtsic lgllpvgn clrdescsv vrpjtknna ilisiflm alnlqlqyiqi ckivnvhahq ialgihflat shyvttrzgv stialilgtf aacwmptly siladytyps lytyatilpa tynsinpvi yafringeik allcicgci psslsgars psdv
생쥐 Gpr12 단백질	NP_032177	4	atgaaatgggacttgggtgcctcgggatrrttt agatggcgct gctggggaga acatctcgcc tgctgtctcc tcgggggttc ctggcggtgaa gagctcgtag teaccctgt ggacatgtc tgggtacct cggaaacct ctgtcaatag gcaacggctggc ttctggatcc cacaacccca gcgtggggc gaaaargcca ttctggtoct ttatcacatcc cttggcggcg cgatggact tttggttttgg ccacactgtc tgtagtcaagaa ggccacggc tggctggct gtcgcccttt tcttgtgcctc tggctgtggc tggctggct tcactgtact acgtctgtac gtacattcg gagggaggc ctcgctctgc tcggggggc ctccatctgc ctgggggtgc tgcccctcat tgccctcgag acggatccac ctgcaggcg tgggggtgc tgcccctcat atccctcrag tgcccttcct cttagctttt gtcacggc tgtaatgttgg tggtagggca cggccatcg tcgactatg tgccacccgg gctgttgtgt gatgtccctt cacccctat tocttgatag cggatrac acttacacttccacccctt ctgcggccggc acttacaattt ccatcatcaa tatgttttca gaaaccaaga gatccggaaa gggctgtgt ccgttttgc tgccacagag agcgacatcg cocagttgtg tggat mnedknls giprdylida aenisaavs srpvapep elvnpdiov lctsqtllsc enavvvvif hnsrlrapmf llisgslal llaglilitn fffayllqse atktvtigl vasfasvcs llaitvdryl slyalytyns ertrftfyvn lvnlgwtsic lgllpvgn clrdescsv vrpjtknna ilisiflm alnlqlqyiqi ckivnvhahq ialgihflat shyvttrzgv stialilgtf aacwmptly siladytyps lytyatilpa tynsinpvi yafringeik allcicgci psslsgars psdv
인간 Gpr12	NM_005288	5	atgaaatgggacttgggtgcctcgggatrrttt agatggcgct gctggggaga acatctcgcc tgctgtctcc tcgggggttc ctggcggtgaa gagctcgtag teaccctgt ggacatgtc tgggtacct cggaaacct ctgtcaatag gcaacggctggc ttctggatcc cacaacccca gcgtggggc gaaaargcca ttctggtoct ttatcacatcc cttggcggcg cgatggact tttggttttgg ccacactgtc tgtagtcaagaa ggccacggc tggctggct gtcgcccttt tcttgtgcctc tggctgtggc tggctggct tcactgtact acgtctgtac gtacattcg gagggaggc ctcgctctgc tcggggggc ctccatctgc ctgggggtgc tgcccctcat tgccctcgag acggatccac ctgcaggcg tgggggtgc tgcccctcat atccctcrag tgcccttcct cttagctttt gtcacggc tgtaatgttgg tggtagggca cggccatcg tcgactatg tgccacccgg gctgttgtgt gatgtccctt cacccctat tocttgatag cggatrac acttacacttccacccctt ctgcggccggc acttacaattt ccatcatcaa tatgttttca gaaaccaaga gatccggaaa gggctgtgt ccgttttgc tgccacagag agcgacatcg cocagttgtg tggat mnedknls giprdylida aenisaavs srpvapep elvnpdiov lctsqtllsc enavvvvif hnsrlrapmf llisgslal llaglilitn fffayllqse atktvtigl vasfasvcs llaitvdryl slyalytyns ertrftfyvn lvnlgwtsic lgllpvgn clrdescsv vrpjtknna ilisiflm alnlqlqyiqi ckivnvhahq ialgihflat shyvttrzgv stialilgtf aacwmptly siladytyps lytyatilpa tynsinpvi yafringeik allcicgci psslsgars psdv
인간 Gpr12 단백질	NP_005279	6	atgaaatgggacttgggtgcctcgggatrrttt agatggcgct gctggggaga acatctcgcc tgctgtctcc tcgggggttc ctggcggtgaa gagctcgtag teaccctgt ggacatgtc tgggtacct cggaaacct ctgtcaatag gcaacggctggc ttctggatcc cacaacccca gcgtggggc gaaaargcca ttctggtoct ttatcacatcc cttggcggcg cgatggact tttggttttgg ccacactgtc tgtagtcaagaa ggccacggc tggctggct gtcgcccttt tcttgtgcctc tggctgtggc tggctggct tcactgtact acgtctgtac gtacattcg gagggaggc ctcgctctgc tcggggggc ctccatctgc ctgggggtgc tgcccctcat tgccctcgag acggatccac ctgcaggcg tgggggtgc tgcccctcat atccctcrag tgcccttcct cttagctttt gtcacggc tgtaatgttgg tggtagggca cggccatcg tcgactatg tgccacccgg gctgttgtgt gatgtccctt cacccctat tocttgatag cggatrac acttacacttccacccctt ctgcggccggc acttacaattt ccatcatcaa tatgttttca gaaaccaaga gatccggaaa gggctgtgt ccgttttgc tgccacagag agcgacatcg cocagttgtg tggat mnedknls giprdylida aenisaavs srpvapep elvnpdiov lctsqtllsc enavvvvif hnsrlrapmf llisgslal llaglilitn fffayllqse atktvtigl vasfasvcs llaitvdryl slyalytyns ertrftfyvn lvnlgwtsic lgllpvgn clrdescsv vrpjtknna ilisiflm alnlqlqyiqi ckivnvhahq ialgihflat shyvttrzgv stialilgtf aacwmptly siladytyps lytyatilpa tynsinpvi yafringeik allcicgci psslsgars psdv

[0061]

[0062]

다양한 종에서, 장기 기억(LTM)은 2가지 주요 생물학적 특성에 의해 정의된다. 첫째, 장기 기억의 형성은 새로운 단백질의 합성을 필요로 한다. 둘째, 이는 cAMP-반응성 전사를 수반하고, cAMP-반응 요소 결합 단백질(cAMP-response element binding protein, CREB) 집단 전사 인자를 통하여 매개된다.

[0063]

“인지 질환, 결함 또는 장애”에는 연령-연관된 기억 감손(age-associated memory impairment), 신경변성 질환(neurodegenerative disease)(가령, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease)(무도병(chorea))), 다른 노인성 치매(senile dementia)), 정신 질환(psychiatric disease)(가령, 우울증(depression), 정신분열증(schizophrenia), 자폐증(autism), 주의력 결핍 장애(attention deficit disorder)), 기능의 외상 의존성 상실(trauma dependent loss)(가령, 뇌혈관 질환(cerebrovascular disease)(가령, 뇌출중(stroke), 허혈(ischemia)), 뇌종양(brain tumor), 머리 또는 뇌 손상), 유전자 결함(genetic defect)(가령, 루빈스타인-테이비 증후군(Rubinstein-Taybi syndrome), 다운증후군(down syndrome), 안젤만 증후군(Angelman syndrome), 신경섬유종증(neurofibromatosis), 코핀-라우리 증후군(Coffin-Lowry syndrome), 레트 증후군(Rett syndrome), 근육긴장성 장애(myotonic dystrophy), X 결함 증후군(fragile X syndrome)(가령, 결함 X-1, 결함 X-2), 윌리엄스 증후군(William's syndrome)), 그리고 학습 무능력(learning disability)이 포함된다.

[0064]

정식 인지 훈련 프로토콜(cognitive training protocol)은 공지되어 있고 당분야에서 용이하게 적용하다(참조: Karni, A. and Sagi, D., "Where practice makes perfect in text discrimination: evidence for primary visual cortex plasticity", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:4966-4970 (1991); Karni, A. and Sagi, D., "The time course of learning a visual skill", Nature, 365:250-252 (1993); Kramer, A. F. et al., "Task coordination and aging: explorations of executive control processes in the task switching paradigm", Acta Psychol. (Amst), 101:339-378 (1999); Kramer, A. F. et al., "Training for executive control: Task coordination strategies and aging", In Aging and Skilled Performance: Advances In Theory and Applications, W. Rogers et al., eds. (Hillsdale, N.J.: Erlbaum) (1999); Rider, R. A. and Abdulahad, D. T., "Effects of massed versus distributed practice on gross and fine motor proficiency of educable mentally handicapped adolescents", Percept. Mot. Skills, 73:219-224 (1991); Willis, S. L. and Schaie, K. W., "Training the elderly on the ability factors of spatial orientation and inductive reasoning", Psychol. Aging, 1:239-247 (1986); Willis, S. L. and Nesselroade, C. S., "Long-term effects of fluid ability training in old-old age", Develop. Psychol., 26:905-910 (1990); Wek, S. R. and Husak, W. S., "Distributed and massed practice effects on motor performance and learning of autistic children", Percept. Mot. Skills, 68:107-113 (1989); Verhaegen, P. et al., "Improving memory performance in the aged through mnemonic training: a meta-analytic study", Psychol. Aging, 7:242-251 (1992); Verhaeghen, P. and Salthouse, T. A., "Meta-analyses of age-cognition relations in adulthood: estimates of linear and nonlinear age effects and structural models", Psychol. Bull., 122:231-249 (1997); Dean, C. M. et al., "Task-related circuit training improves performance of locomotor tasks in chronic stroke: a randomized, controlled pilot trial", Arch. Phys. Med. Rehabil., 81:409-417 (2000); Greener, J. et al., "Speech and language therapy for aphasia following stroke", Cochrane Database Syst. Rev., CD000425 (2000); Hummelsheim, H. and Eickhof, C., "Repetitive sensorimotor training for arm and hand in a patient with locked-in syndrome", Scand. J. Rehabil. Med., 31:250-256 (1999); Johansson, B. B., "Brain plasticity and stroke rehabilitation. The Willis lecture", Stroke, 31:223-230 (2000); Ko Ko, C., "Effectiveness of rehabilitation for multiple sclerosis", Clin. Rehabil., 13 (Suppl. 1):33-41 (1999); Lange, G. et al., "Organizational strategy influence on visual memory performance after stroke: cortical/subcortical and left/right hemisphere contrasts", Arch. Phys. Med. Rehabil., 81:89-94 (2000); Liepert, J. et al., "Treatment-induced cortical reorganization after stroke in humans", Stroke, 31:1210-1216 (2000); Lotery, A. J. et al., "Correctable visual impairment in stroke rehabilitation patients", Age Ageing, 29:221-222 (2000); Majid, M. J. et al., "Cognitive rehabilitation for memory deficits following stroke"(Cochrane review), Cochrane Database Syst. Rev., CD002293 (2000); Merzenich, M. et al., "Cortical plasticity underlying perceptual, motor, and Cognitive skill development: implications for neurorehabilitation", Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 61:1-8 (1996); Merzenich, M. M. et al., "Temporal processing deficits of language-learning impaired children ameliorated by training", Science, 271:77-81 (1996); Murphy, E., "Stroke rehabilitation", J. R. Coll. Physicians Lond., 33:466-468 (1999); Nagarajan, S. S. et al., "Speech modifications algorithms used for training language learning-impaired children", IEEE Trans. Rehabil. Eng., 6:257-268. (1998); Oddone, E. et al., "Quality Enhancement Research Initiative in stroke: prevention, treatment, and rehabilitation", Med. Care 38:192-1104 (2000); Rice-Oxley, M. and Turner-Stokes, L., "Effectiveness of brain injury rehabilitation", Clin. Rehabil., 13(Suppl 1):7-24 (1999); Tallal, P. et al., "Language learning impairments: integrating basic science, technology, and remediation", Exp. Brain Res., 123:210-219 (1998); Tallal, P. et al., "Language comprehension in language-learning impaired children improved with acoustically modified speech", Science, 271:81-84 (1996); Wingfield, A. et al., "Regaining lost time: adult aging and the effect of time restoration on recall of time-compressed speech", Psychol. Aging, 14:380-389 (1999), 이들 참고문헌은 본 명세서에 순전히 참조로서 편입된다)

[0065]

훈련은 1회 또는 복수 훈련 기간을 포함할 수 있고, 관심 있는 인지 과제의 수행에서 향상을 산출하는데 적합한 훈련이다. 가령, 언어 획득(language acquisition)에서 향상이 요구되면, 훈련은 언어 획득에 집중될 것이다. 악기를 연주하는 법을 학습하는 능력에서 향상이 요구되면, 훈련은 악기를 연주하는 법을 학습하는데 집중될 것이다. 특정 운동 기술에서 향상이 요구되면, 훈련은 특정 운동 기술의 획득에 집중될 것이다. 관심 있는 특정한 인지 과제는 적절한 훈련과 부합된다.

- [0066] “복수 훈련 기간”은 2회 이상의 훈련 기간을 의미한다. Gpr12 저해물질은 1회 이상의 훈련 기간 이전에, 동안에 또는 이후에 투여될 수 있다. 특정 구체예에서, Gpr12 저해물질은 각 훈련 기간 이전과 동안에 투여된다. “훈련(training)”은 인지 훈련(cognitive training)을 의미한다.
- [0067] “조절”은 유전자의 발현, 또는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 아단위(subunit)를 인코딩(encoding)하는 RNA 분자 또는 동등한 RNA 분자의 수준, 또는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 아단위의 활성이 조절물질(modulator)의 부재에서 관찰되는 것보다 높거나 낮도록, 이러한 발현, 수준, 또는 활성이 상향 조절 또는 하향 조절된다는 것을 의미한다. 가령, “조절”은 “저해”를 의미할 수 있긴 하지만, 용어 “조절”의 이용은 이러한 정의에 한정되지 않는다.
- [0068] “저해”, “하향-조절”, 또는 “감소”는 유전자의 발현, 또는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 아단위를 인코딩하는 RNA 분자 또는 동등한 RNA 분자의 수준, 또는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 아단위의 활성이 본 발명의 핵산 분자(가령, siNA)의 부재에서 관찰되는 것 미만으로 감소한다는 것을 의미한다. 한 구체예에서, siNA 분자로 저해, 하향-조절 또는 감소는 비활성(inactive) 또는 약화된(attenuated) siRNA 분자의 존재에서 관찰되는 수준보다 낮다. 다른 구체예에서, siNA 분자로 저해, 하향-조절 또는 감소는 예로써, 뒤섞인 서열(scrambled sequence) 또는 미스매치(mismatch)를 내포하는 siNA 분자의 존재에서 관찰되는 수준보다 낮다. 다른 구체예에서, siRNA 분자로 저해, 하향-조절 또는 감소는 표적 RNA 분자 또는 동등한 RNA 분자의 발현 수준이 이들 siRNA 분자의 부재에서 수준과 비교하여 최소한 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 또는 70% 감소한다는 것을 의미한다.
- [0069] “강화”는 정상과 비교하여, 생화학적(biochemical) 또는 생리학적(physiological) 작용 또는 효과를 강화시키거나, 증가시키거나, 개선하거나, 또는 더욱 크게 또는 더욱 좋게 만드는 능력을 의미한다. 가령, 장기 기억 형성의 강화는 동물에서 정상적인 장기 기억 형성과 비교하여, 장기 기억 형성을 강화 또는 증가시키는 능력을 지칭한다. 결과적으로, 장기 기억 획득이 더욱 신속하거나, 또는 더욱 좋게 유지된다. 인지 과제 수행의 강화는 동물에서 특정 인지 과제의 정상적인 수행과 비교하여, 상기 인지 과제의 수행을 강화 또는 개선하는 능력을 지칭한다.
- [0070] “해마상 용기-의존성 인지 과제(hippocampal-dependent cognitive task)”는 뇌의 해마상 용기 영역과 연관된 인지 과제를 지칭한다.
- [0071] “편도선-의존성 인지 과제(amygdala-dependent cognitive task)”는 뇌의 편도선 영역과 연관된 인지 과제를 지칭한다.
- [0072] “표적 유전자” 또는 “유전자”는 RNA를 인코딩하는 핵산, 예를 들면, 폴리펩티드를 인코딩하는 구조 유전자(structural gene)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 핵산 서열을 의미한다. 표적 유전자는 세포로부터 유래된 유전자 또는 내인성 유전자일 수 있다. “표적 핵산”은 발현 또는 활성이 조절되는 임의의 핵산 서열을 의미한다. 표적 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있다.
- [0073] “상동성 서열(homologous sequence)”은 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열, 예를 들면, 유전자, 유전자 전사체 및/또는 비-코딩 폴리뉴클레오티드에 의해 공유되는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 가령, 상동성 서열은 관련되지만 상이한 단백질, 예를 들면, 단백질 집단의 상이한 구성원, 상이한 단백질 에피토프(epitope), 상이한 단백질 동종체(isoform) 또는 완전하게 분기된 단백질, 예를 들면, 사이토킨(cytokine)과 이의 상응하는 수용체를 인코딩하는 2개 이상의 유전자에 의해 공유되는 뉴클레오티드 서열일 수 있다. 상동성 서열은 2개 이상의 비-코딩 폴리뉴클레오티드, 예를 들면, 비-코딩 DNA 또는 RNA, 조절 서열(regulatory sequence), 인트론(intron), 그리고 전사 제어 또는 조정 부위에 의해 공유되는 뉴클레오티드 서열일 수 있다. 상동성 서열은 또한, 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 공유되는 보존된 서열 영역을 포함할 수 있다. 상동성(homology)은 완벽한 상동성(가령, 100%)일 필요는 없는데, 그 이유는 본 발명에서 부분적으로 상동성 서열 역시 고려되기 때문이다(가령, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80% 등).
- [0074] “보존된 서열 영역”은 폴리뉴클레오티드 내에서 하나 이상의 영역의 뉴클레오티드 서열이 세대 간에, 또는 하나의 생물학적 체계, 개체 또는 생물체에서부터 다른 생물학적 체계, 개체 또는 생물체까지 별로 변하지 않는다는 것을 의미한다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 코딩과 비-코딩 DNA와 RNA를 모두 포함할 수 있다.
- [0075] “센스 영역(sense region)”은 siNA 분자의 안티센스 영역에 상보성(complementarity)을 갖는 siNA 분자의 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 이에 더하여, siNA 분자의 센스 영역은 표적 핵산 서열과 상동성을 갖는 핵산 서열을 포함할 수 있다.

- [0076] “안티센스 영역(antisense region)”은 표적 핵산 서열에 상보성을 갖는 siNA 분자의 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 이에 더하여, siNA 분자의 안티센스 영역은 siNA 분자의 센스 영역에 상보성을 갖는 핵산 서열을 선택적으로 포함할 수 있다.
- [0077] “상보성(complementarity)”은 핵산이 전통적인 왓슨-크릭(Watson-Crick) 또는 다른 비-전통적인 유형에 의해 다른 핵산 서열과 수소 결합(hydrogen bond)을 형성할 수 있다는 것을 의미한다. 본 발명의 핵산 분자와 관련하여, 핵산 분자와 이의 상보적 서열에 대한 결합 자유 에너지(binding free energy)는 핵산의 관련 기능이 예로써, RNAi 활성을 진행할 수 있도록 할 만큼 충분하다. 핵산 분자에 대한 결합 자유 에너지의 결정은 당분야에 널리 공지되어 있다(예로써, Turner et al., 1987, CSH Symp. Quant. Biol. LII pp. 123-133; Frier et al., 1986, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83:9373-9377; Turner et al., 1987, J. Am. Chem. Soc. 109:3783-3785 참조). 상보성 비율(percent complementarity)은 두 번째 핵산 서열과 수소 결합(가령, Watson-Crick 염기 쌍)을 형성할 수 있는 핵산 분자에서 인접 잔기의 비율을 지시한다(가령, 10개의 뉴클레오티드를 보유하는 두 번째 핵산 서열과 염기쌍을 형성하는 첫 번째 올리고뉴클레오티드 내에 총 10개의 뉴클레오티드 중에서 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개 뉴클레오티드는 각각, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%와 100% 상보적이다). “완전하게 상보적”은 핵산 서열의 모든 인접 잔기가 두 번째 핵산 서열 내에서 동일한 숫자의 인접 잔기와 수소 결합을 형성한다는 것을 의미한다.
- [0078] “RNA”는 최소한 하나의 리보뉴클레오티드(ribonucleotide) 잔기를 포함하는 분자를 의미한다. “리보뉴클레오티드”는 β -D-리보푸라노스 모이어티(ribofuranose moiety)의 2' 위치에서 하이드록실 기(hydroxyl group)를 보유하는 뉴클레오티드를 의미한다. 상기 용어에는 이중-가닥(double-stranded) RNA, 단일-가닥 RNA, 분리된 RNA, 예를 들면, 부분적으로 정제된 RNA, 본질적으로 순수한 RNA, 합성 RNA, 재조합 생산된 RNA, 그리고 하나 이상의 뉴클레오티드의 부가(addition), 결실(deletion), 치환(substitution) 및/또는 변경(alteration)에 의해 자연 발생 RNA와 상이한 변형된 RNA가 포함된다. 이런 변형에는 예로써, siNA의 말단에 또는 RNA의 내부에, 예를 들면, 하나 이상의 뉴클레오티드에서 비-뉴클레오티드 물질의 부가가 포함될 수 있다. 본 발명의 RNA 분자 내에서 뉴클레오티드는 비-가닥 뉴클레오티드, 예를 들면, 비-자연 발생 뉴클레오티드 또는 화학적으로 합성된 뉴클레오티드 또는 테옥시뉴클레오티드(deoxynucleotide) 역시 포함할 수 있다. 이를 변형된 RNA는 자연-발생 RNA의 유사체(analog)로 지칭될 수 있다.
- [0079] 본 명세서에서, “포스포로티오에이트(phosphorothioate)”는 2개의 뉴클레오티드 사이에 최소한 하나의 연쇄가 황 원자를 포함하는, RNA 분자 내에서 뉴클레오티드간 연쇄(internucleotide linkage)를 지칭한다. 따라서 포스포로티오에이트는 포스포로티오에이트와 포스포로디티오에이트(phosphorodithioate) 뉴클레오티드간 연쇄 둘 모두를 지칭한다.
- [0080] 본 명세서에서, “포스포노아세테이트 연쇄(phosphonoacetate linkage)”는 2개의 뉴클레오티드 사이에 최소한 하나의 연쇄가 아세틸 또는 보호된 아세틸 기를 포함하는, RNA 분자 내에서 뉴클레오티드간 연쇄를 지칭한다(참조: Sheehan et al., 2003 Nucleic Acids Research 31, 4109-4118 또는 U.S. Patent Publication No. 2006/0247194).
- [0081] 본 명세서에서, “티오프스포노아세테이트 연쇄”는 아세틸 또는 보호된 아세틸 기와 황 원자를 포함하는 최소한 하나의 뉴클레오티드간 연쇄를 포함하는 RNA 분자를 지칭한다(참조: Sheehan et al., 2003 Nucleic Acids Research 31, 4109-4118 또는 U.S. Patent Publication No. 2006/0247194).
- [0082] 본 명세서에서, “치료”는 불량한 장기 기억 형성을 암시하는 임상적 증상(clinical symptom)의 향상을 의미한다. 임상적 증상에는 예로써, 장기 기억에서 증가 또는 향상, 치료전 수준 또는 장기 기억 형성에서 결함이 없는 개체와 비교하여 인지 과제를 수행하는 증가된 능력 등이 포함된다.
- [0083] 본 명세서에서, “예방”은 불량한 장기 기억 형성을 암시하는 임상적 증상(clinical symptom)을 앞질러 예방하는 것을 의미한다.
- [0084] 본 명세서에서, “치료 효능(therapeutic efficacy)”은 장기 기억 형성에서 결함을 치료하고, 장기 기억 형성을 향상시키고, 인지 과제를 수행하는 능력을 향상시키는데 있어 약물 또는 후보 약물의 치료 효과를 지칭한다. 치료 효능은 인지 과제를 수행하는 환자의 능력을 모니터링(monitoring)함으로써 측정될 수 있다.
- [0085] RNA 분자
- [0086] 적절한 siRNA는 예로써, 합성에 의해, 또는 세포 내에서 발현에 의해 생산될 수 있다. 한 구체예에서, 이러한

siRNA 분자의 안티센스 가닥을 인코딩하는 DNA 서열이 PCR에 의해 산출될 수 있다. 다른 구체예에서, siRNA 인코딩 DNA는 포유동물 내로 운반을 용이하게 하기 위하여 벡터(vector), 예를 들면, 플라스미드(plasmid) 또는 바이러스 벡터(viral vector) 내로 클로닝(cloning)된다. 다른 구체예에서, siRNA 분자는 화학적 또는 효소적 수단을 이용하여 합성될 수도 있다.

[0087] 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명의 siNA 분자의 각 서열은 독립적으로, 대략 18개 내지 대략 30개 뉴클레오티드 길이, 특정 구체예에서, 대략 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개 뉴클레오티드 길이를 갖는다. 한 구체예에서, siRNA 분자는 대략 19-23개 염기쌍(base pair), 바람직하게는, 대략 21개 염기쌍을 내포한다. 다른 구체예에서, siRNA 분자는 대략 24-28개 염기쌍, 바람직하게는, 대략 26개 염기쌍을 내포한다. 개별 siNA 분자는 단일 가닥과 편성된 이중 가닥(“센스”와 “안티센스”)의 형태일 수 있고, 헤어핀 루프(hairpin loop)와 같은 이차 구조(secondary structure)를 포함할 수 있다. 개별 siRNA 분자는 또한, 전구체(precursor) 분자로서 전달될 수도 있는데, 이를 분자는 차후에 변형되어 활성 분자를 발생시킨다. 단일 가닥 형태의 siRNA 분자의 실례에는 DNA 서열의 비-전사된 영역(가령, 프로모터 영역)에 대한 단일 가닥 안티-센스 siRNA가 포함된다. 또 다른 구체예에서, 헤어핀(hairpin) 또는 환형 구조(circular structure)를 포함하는 본 발명의 siRNA 분자는 대략 35개 내지 대략 55개(가령, 대략 35개, 40개, 45개, 50개 또는 55개) 뉴클레오티드 길이, 또는 대략 38개 내지 대략 44개(가령, 대략 38개, 39개, 40개, 41개, 42개, 43개, 또는 44개) 뉴클레오티드 길이를 갖고 대략 16개 내지 대략 22개(가령, 대략 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개 또는 22개) 염기쌍을 포함한다.

[0088] 이들 siRNA 분자는 고유 생쥐 또는 인간 Gpr12 단백질 서열을 인코딩하는 DNA 서열의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥인 뉴클레오티드 단편을 포함할 수도 있다. 바람직하게는, 생쥐 또는 인간 Gpr12 단백질 서열은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO, 4와 SEQ ID NO:6로 구성된 군에서 선택되는, 표 1의 서열을 포함한다. 본 발명의 siRNA 분자는 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3과 SEQ ID NO:5로 구성된 군에서 선택되는, 표 1에 열거된 바와 같은 고유 생쥐 또는 인간 Gpr12 mRNA의 mRNA 서열의 센스 가닥의 뉴클레오티드 단편일 수 있다. 본 발명의 siRNA 분자는 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3과 SEQ ID NO:5로 구성된 군에서 선택되는, 표 1에 열거된 바와 같은 고유 생쥐 또는 인간 Gpr12 mRNA의 mRNA 서열에 안티센스 서열일 수 있다.

[0089] 여기에서는 현재 알려져 있는 바와 같은 짧은 간접 RNA에 의해 매개된 RNA 간접의 제안된 기전을 논의하는데, 본 발명은 이에 한정되지 않고 선행 기술의 인정으로서 간주되지 않는다. 화학적으로-변형된 짧은 간접 핵산은 siRNA 분자에서처럼, RNAi를 매개하는 유사한 또는 향상된 능력을 유지하고, 생체내에서 향상된 안정성과 활성을 유지할 것으로 기대된다. 이런 이유로, 본 논의는 siRNA에만 한정되지 않고 siNA 전체에 적용될 수 있다. “RNAi를 매개하는 향상된 능력” 또는 “향상된 RNAi 활성”은 시험관내에서 및/또는 생체내에서 측정된 RNAi 활성을 의미하는데, 여기서 RNAi 활성은 RNAi를 매개하는 본 발명의 siNA의 능력과 이들 siNA의 안정성의 반영이다.

[0090] RNA 간접은 짧은 간접 RNA(siRNA)에 의해 매개되는, 동물에서 서열 특이적 전사후 유전자 침묵(gene silencing)의 과정을 지칭한다(Fire et al., 1998, Nature, 391, 806). 식물에서 상응하는 과정은 통상적으로, 전사후 유전자 침묵 또는 RNA 침묵으로 지칭되고, 또한 진균에서 진압(quelling)으로 지칭된다. 전사후 유전자 침묵의 과정은 다양한 균종(flora)과 종족(phyla)에 의해 통상적으로 공유되는, 외래 유전자의 발현을 예방하는데 이용되는 진화적으로-보존된 세포 방어 기전(cellular defense mechanism)인 것으로 생각된다(Fire et al., 1999, Trends Genet., 15, 358). 외래 유전자 발현으로부터 이러한 보호는 상동성 단일-가닥 RNA 또는 바이러스 게놈 RNA를 특이적으로 파괴하는 세포 반응(cellular response)을 통하여, 바이러스 감염(viral infection) 또는 트랜스포손 요소(transposon element)의 숙주 게놈 내로의 무작위 통합으로부터 유래된 이중-가닥 RNA(dsRNA)의 생산에 대응하여 진화한 것으로 보인다. 세포 내에서 dsRNA의 존재는 아직 완전하게 특성화되지 않은 기전을 통하여 RNAi 반응을 유발한다. 이러한 기전은 리보뉴클레아제(ribonuclease) L에 의한 mRNA의 비-특이적 절단을 결과하는 단백질 키나아제 PKR과 2',5'-올리고아데닐레이트 신타아제(oligoadenylate synthetase)의 dsRNA-매개된 활성화에 기인하는 인터페론 반응(interferon response)과 상이한 것으로 보인다.

[0091] 세포 내에서 긴 dsRNA의 존재는 Dicer로 지칭되는 리보뉴클레아제 III 효소의 활성을 촉진한다. Dicer은 짧은 간접 RNA(siRNA)로 알려져 있는 dsRNA의 짧은 조각으로 dsRNA의 가공에 관여한다(Berstein et al., 2001, Nature, 409, 363). Dicer 활성으로부터 유래된 짧은 간접 RNA는 전형적으로, 대략 21개 내지 대략 23개 뉴클레오티드 길이를 갖고, 대략 19개 염기쌍 이중나선을 포함한다. Dicer은 또한, 번역 제어(translational control)에 관여하는, 보존된 구조의 전구체 RNA로부터 21개와 22개 뉴클레오티드 작은 일시적 RNA(small temporal RNA, stRNA)의 적출(excision)에 관여한다(Hutvagner et al., 2001, Science, 293, 834). 이러한 RNAi 반응은

또한, siRNA에 서열 상동성을 갖는 단일-가닥 RNA의 절단을 매개하고 RNA-유도된 침묵 복합체(RISC)로 통상적으로 지칭되는, siRNA를 내포하는 엔도뉴클레아제(endonuclease) 복합체를 특징으로 한다. 표적 RNA의 절단은 siRNA 이중나선의 안내 서열(guide sequence)에 상보적인 영역의 중간에서 발생한다(Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188). 이에 더하여, RNA 간섭은 아마도, 크로마틴 구조(chromatin structure)를 조절하여 표적 유전자 서열의 전사를 예방하는 세포 기전(cellular mechanism)을 통하여, 작은 RNA(가령, 마이크로-RNA 또는 mRNA) 매개된 유전자 침묵을 수반할 수도 있다(참조: Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218; Hall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237).

[0092] RNAi는 다양한 시스템에서 조사되었다. Fire et al., 1998, Nature, 391, 806에서는 최초로, 꼬마선충(*C. elegans*)에서 RNAi를 관찰하였다. Wianny and Goetz, 1999, Nature Cell Biol., 2, 70에서는 생쥐 태아에서 dsRNA에 의해 매개된 RNAi를 기술한다. Hammond et al., 2000, Nature, 404, 293에서는 dsRNA로 형질감염된 초파리(*Drosophila*) 세포에서 RNAi를 기술한다. Elbashir et al., 2001, Nature, 411, 494에서는 인간 태아 신장 세포와 HeLa 세포를 비롯한 배양된 포유동물 세포 내에서 합성 21개 뉴클레오티드 RNA의 이중나선의 도입에 의해 유도된 RNAi를 기술한다. 초파리(*Drosophila*) 유충 용해물에서 수행된 최근 연구에서, 효과적인 RNAi 활성을 매개하는데 필수적인 siRNA 길이, 구조, 화학적 조성과 서열에 대한 일정한 필요조건이 밝혀졌다. 이들 연구에서는 21개 뉴클레오티드 siRNA 이중나선이 2개의 2'-뉴클레오티드 3'-말단 뉴클레오티드 오버hang(overhang)을 내포할 때 가장 높은 활성을 나타낸다는 것을 증명한다. 더 나아가, 2'-데옥시 또는 2'-0-메틸 뉴클레오티드로 한쪽 또는 양쪽 siRNA 가닥의 치환은 RNAi 활성을 소멸시키는 반면, 데옥시뉴클레오티드로 3'-말단 siRNA 뉴클레오티드의 치환은 관용되는 것으로 밝혀졌다. siRNA 이중나선의 중심에서 미스매치 서열(mismatch sequence) 역시 RNAi 활성을 소멸시키는 것으로 밝혀졌다. 이에 더하여, 이들 연구에서는 표적 RNA 내에서 절단 부위(cleavage site)의 위치가 3'-말단 보다는 siRNA 안내 서열의 5'-말단에 의해 정의된다는 것을 시사한다(Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877). 다른 연구에서는 siRNA 이중나선의 표적-상보적 가닥 상에서 5'-포스페이트가 siRNA 활성을 요구되고 상기 siRNA 상에서 5'-포스페이트 모이어티를 유지하는데 ATP가 이용된다는 것을 시사하였다(Nykanen et al., 2001, Cell, 107, 309); 하지만, 5'-포스페이트가 부재하는 siRNA 분자가 외부에도 도입될 때 활성을 나타내는데, 이는 siRNA 구조체의 5'-인산화(phosphorylation)가 생체내에서 일어날 수 있음을 암시한다.

[0093] 한 구체예에서, 본 발명은 변형된 siNA 분자를 특징으로 한다. 포스페이트 골격(phosphate backbone)에서 고려되는 변형의 실례에는 하나 이상의 포스포로티오에이트, 포스포로디오에이트, 포스포네이트(phosphonate)(메틸포스포네이트(methylphosphonate) 포함), 포스포트리에스테르(phosphotriester)(알킬포스포트리에스테르(alkylphosphotriester) 포함), 모르폴리노(morpholino), 아미데이트 카바메이트(amidate carbamate), 카르복시메틸(carboxymethyl), 아세트아미레이트(acetamide), 폴리아마이드(polyamide), 설포네이트(sulfonate), 설�onium아마이드(sulfonamide), 설플라메이트(sulfamate), 포름아세탈(formacetal), 티오포름아세탈(thioformacetal) 및/또는 알킬실릴(alkylsilyl) 치환을 포함하는 포스페이트 골격 변형이 포함된다. 올리고뉴클레오티드 골격 변형의 개관을 위하여, Hunziker and Leumann, 1995, Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties, in Modern Synthetic Methods, VCH, 331-417과 Mesmaeker et al., 1994, Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides, in Carbohydrate Modifications in Antisense Research, ACS, 24-39를 참조한다.

[0094] 당 모이어티(sugar moiety)에서 고려되는 변형의 실례에는 2'-알킬 피리미딘, 예를 들면, 2'-0-메틸, 2'-플루오르, 아미노와 데옥시 변형 등이 포함된다(참조: Amarzguioui et al., 2003, Nucleic Acids Res. 31:589-595. U.S. Patent Publication No. 2007/0104688). 염기 기(base group)에서 고려되는 변형의 실례에는 무염기 당(abasic sugar), 2-0-알킬 변형된 피리미딘, 4-티오우라실(thiouracil), 5-브로모우라실(bromouracil), 5-요오드우라실(iodouracil), 5-(3-아미노알릴)-우라실 등이 포함된다. 잠금된 핵산(locked nucleic acid), 또는 LNA 역시 포함될 수 있다. 많은 다른 변형은 공지되어 있고, 상기 기준이 충족되면 이용될 수 있다. 변형의 실례는 또한, U.S. Pat. No. 5,684,143, 5,858,988과 6,291,438, 그리고 U.S. 공개된 특허 출원 No. 2004/0203145 A1에서 개시되는데, 이들 각각은 본 명세서에 참조로서 편입된다. 다른 변형은 Herdewijn (2000), Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10:297-310, Eckstein (2000) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10:117-21, Rusckowski et al. (2000) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10:333-345, Stein et al. (2001) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 11:317-25, Vorobjev et al. (2001) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 11:77-85에서 개시되는데, 이들 각각은 본 명세서에서 참조로서 편입된다.

- [0095] RNA는 효소에 의해 또는 부분적/전체 유기 합성에 의해 생산되고, 변형된 리보뉴클레오티드는 시험관내 효소 또는 유기 합성에 의해 도입될 수 있다. 한 구체예에서, 각 가닥은 화학적으로 제조된다. RNA 분자를 합성하는 방법은 당분야에 공지되어 있다.
- [0096] 항체
- [0097] 전형적인 항체에는 다클론 항체(polyclonal antibody), 단클론 항체(monoclonal antibody), 인간화된 항체(humanized antibody), 이중특이적 항체(bispecific antibody)와 혼합항체(heteroconjugate antibody)가 포함된다.
- [0098] “항체”는 가장 넓은 의미로 이용되고, 구체적으로 예로써, 단일 항-Gpr12 단클론 항체(길항물질과 중화 항체(neutralizing antibody) 포함), 다중에피토프 특이성(polyepitopic specificity)을 갖는 항-Gpr12 항체 조성물, 단일 사슬 항-Gpr12 항체, 그리고 항-Gpr12 항체의 단편을 포함한다. 본 명세서에서, “단클론 항체”는 실질적으로 상동한 항체의 개체군으로부터 획득된 항체를 지칭한다, 다시 말하면, 상기 개체군을 구성하는 개별 항체는 미량으로 존재하는 가능한 자연-발생 돌연변이를 제외하고 동일하다.
- [0099] “항체 단편”은 본래 항체의 일부분, 바람직하게는, 본래 항체의 항원 결합 영역(antigen binding region) 또는 가변 영역(variable region)을 포함한다. 항체 단편의 실례에는 Fab, Fab', F(ab')₂와 Fv 단편; 디아바디(diabody); 선형 항체(Zapata *et al.*, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); 단일 사슬 항체 분자; 그리고 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함된다.
- [0100] 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 상에서 에피토프(epitope)에 “특이적으로 결합하는” 또는 “특이적인” 항체는 임의의 다른 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프에 실질적으로 결합하지 않으면서 상기 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 상에서 에피토프에 결합하는 항체이다.
- [0101] 항-Gpr12 항체는 다클론 항체를 포함할 수 있다. 다클론 항체를 제조하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 다클론 항체는 포유동물 내에서, 예로써 면역원(immunizing agent)과 원하는 경우에, 어쥬번트(adjuvant)의 1회 이상의 주입에 의해 생성될 수 있다. 전형적으로, 면역원 및/또는 어쥬번트는 복수 피하(subcutaneous) 또는 복막내(intraperitoneal) 주입에 의해 포유동물에 주입될 것이다. 면역원은 Gpr12 폴리펩티드 또는 이의 융합 단백질(fusion protein)을 포함할 수 있다. 면역원은 면역되는 포유동물에서 면역원성(immunogenic)인 것으로 알려져 있는 단백질에 접합시키는 것이 유익할 수 있다. 이런 면역원성 단백질의 실례에는 키홀 림펫 혈모시아닌(keyhole limpet hemocyanin), 혈청 알부민(serum albumin), 소 티로글로불린(bovine thyroglobulin)과 콩 트립신 저해물질(soybean trypsin inhibitor)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 이용될 수 있는 어쥬번트의 실례에는 프레운드 완전 어쥬번트(Freund's complete adjuvant)와 MPL-TDM 어쥬번트(monophosphoryl Lipid A, synthetic trehalose dicorynomycolate)가 포함된다. 면역화 프로토콜(immunization protocol)은 과도한 실험 없이 당업자에 의해 선택될 수 있다.
- [0102] 대안으로, 항-Gpr12 항체는 단클론 항체일 수 있다. 단클론 항체는 Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975)에서 기술된 것들과 같은 하이브리도마(hybridoma) 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 하이브리도마(hybridoma) 방법에서, 생쥐, 햄스터, 또는 다른 적절한 숙주 동물을 전형적으로, 면역원에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구(lymphocyte)를 유도하기 위하여 면역원으로 면역화된다. 대안으로, 림프구는 시험관내에서 면역화될 수도 있다.
- [0103] 당업자가 인지하는 바와 같이, 다양한 다른 유전자 교란 기술이 본 발명과 함께 이용될 수 있다. 무제한적 실례로써, 상동성 재조합(homologous recombination), 우성 방식의 음성(dominant-negative) 유전자 구조체의 유전자도입 발현(transgenic expression), 정상적인 유전자 구조체의 유전자도입 발현, 그리고 표적 유전자 내에서 아미노산 서열의 임의의 다른 변형이 이용될 수 있다. 다양한 이들 유전자 구조체를 뇌 세포로 전달하기 위하여 바이러스 벡터가 이용될 수도 있는데, 이런 구조체에는 RNAi 경로를 통하여 작용하는 것들(짧은 헤어핀 RNA, 이중 가닥 RNA 등)이 포함된다.
- [0104] 제제(formulation)
- [0105] Gpr12 저해물질 화합물 시료는 적절하게 조제되고, 상기 시료의 충분한 분량이 세포로 들어가도록 하는 임의의 수단에 의해 포유동물 내로 도입될 수 있다. 가령, 상기 저해물질은 완충액 용액(buffer solution), 예를 들면, 포스페이트 완충된 염수 용액, 리포솜(liposome), 고질입자 구조(micellar structure)와 캡시드(capsid)에서 조제될 수 있다. 양이온성 지질(cationic lipid)을 포함하는 siRNA의 제제는 세포 내로 dsRNA의 형질감염을 촉

진하는데 이용될 수 있다. 가령, 양이온성 지질, 예를 들면, 리포펙틴(lipofectin)(U.S. Pat. No. 5,705,188), 양이온성 글리세롤 유도체(cationic glycerol derivative)와 다기양이온성 분자(polycationic molecule), 예를 들면, 폴리리신(polylysine)(공개된 PCT 국제 출원 WO 97/30731)이 이용될 수 있다. 적절한 지질에는 올리고펩타민(Oligofectamine), 리포펙타민(Lipofectamine)(Life Technologies), NC388(Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., Boulder, Colo.), 또는 FuGene 6(Roche)이 포함되는데, 이들 모두 제조업체의 사용설명서에 따라 이용될 수 있다.

[0106] 한 구체예에서, 본 발명의 Gpr12 특이적 siNA 분자는 예로써, 접합된(grafted) PEI, 예를 들면, 갈락토오스(galactose) PEI, 콜레스테롤(cholesterol) PEI, 항체 유도체화된 PEI, 그리고 이들의 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol) PEI(PEG-PEI) 유도체를 비롯하여, 폴리에틸렌이민(polyethylenimine)(가령, 선형 또는 가지형 PEI) 및/또는 폴리에틸렌이민(polyethylenimine) 유도체로 조제되거나, 또는 이를 유도체와 복합된다(참조: Ogris et al., 2001, AAPA PharmSci., 3, 1-11; Furgeson et al., 2003, Bioconjugate Chem., 14, 840-847; Kunath et al., 2002, Pharmaceutical Research, 19, 810-817; Choi et al., 2001, Bull. Korean Chem. Soc., 22, 46-52; Bettinger et al., 1999, Bioconjugate Chem., 10, 558-561; Peterson et al., 2002, Bioconjugate Chem., 13, 845-854; Erbacher et al., 1999, Journal of Gene Medicine Preprint, 1, 1-18; Godbey et al., 1999, PNAS USA, 96, 5177-5181; Godbey et al., 1999, Journal of Controlled Release, 60, 149-160; Diebold et al., 1999, Journal of Biological Chemistry, 274, 19087-19094; Thomas and Klibanov, 2002, PNAS USA, 99, 14640-14645; Sagara, U.S. Pat. No. 6,586,524).

[0107] Gpr12 저해물질 분자를 세포의 환경 내로 도입하는 방법은 세포의 유형과 주변 환경의 구성에 좌우될 것으로 인정될 수 있다. 가령, 세포가 액체 내에서 발견될 때, 한 가지 바람직한 제제는 리포펙타민에서처럼 지질 제제(lipid formulation)이고, 상기 저해물질이 이를 세포의 액상 환경(liquid environment)에 직접적으로 침가될 수 있다. 액상 제제는 또한, 예로써 정맥내(intravenous), 근육내(intramuscular) 또는 복막내(intraperitoneal) 주입에 의해, 경구에 의해, 또는 흡입 또는 당분야에 공지된 다른 방법에 의해 동물에 투여될 수 있다. 이러한 제제가 동물, 예를 들면, 포유동물, 더욱 구체적으로, 인간 내로 투여에 적합할 때, 상기 제제는 또한, 제약학적으로 허용가능하다. 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)를 투여하기 위한 제약학적으로 허용되는 제제는 공지되어 있고 이용될 수 있다. 일부 사례에서, 상기 저해물질을 완충액 또는 염수 용액에서 조제하고 조제된 저해물질을 세포 내로 직접적으로 주입하는 것이 바람직할 수 있다. dsRNA 이중나선의 직접적인 주입 역시 수행될 수 있다. siRNA를 도입하는데 적합한 방법과 관련하여, U.S. 공개된 특허 출원 No. 2004/0203145 A1을 참조하는데, 상기 문현은 본 명세서에 참조로서 편입된다.

[0108] Gpr12 저해물질은 약리 효과량을 포함한다. 약리 또는 치료 효과량은 의도된 약리학적 치료 또는 예방 결과를 산출하는데 효과적인 저해물질의 양을 지칭한다. “약리 효과량”과 “치료 효과량” 또는 간단하게, “효과량”은 의도된 약리학적 치료 또는 예방 결과를 산출하는데 효과적인 저해물질의 양을 지칭한다. 가령, 질환이나 질병과 연관된 측정가능 파라미터에서 최소한 20% 감소가 나타날 때 소정의 임상 치료(clinical treatment)가 효과적인 것으로 간주되면, 상기 질환이나 질병의 치료를 위한 약물의 치료 효과량은 상기 파라미터에서 최소한 20% 감소를 달성하는데 필요한 양이다.

[0109] 적절한 양의 저해물질이 도입되어야 하는데, 이들 양은 표준 방법을 이용하여 경험적으로 결정될 수 있다. 전형적으로, 세포 환경에서 개별 siRNA 종류의 효과적인 농도는 대략 50 나노몰(nanomolar) 이하 또는 10 나노몰 이하이거나, 또는 조성물에서 대략 1 나노몰 이하의 농도가 이용될 수 있다. 다른 구체예에서, 많은 상황에서 대략 200 피코몰(picomolar) 이하의 농도, 심지어 대략 50 피코몰 이하의 농도가 이용될 수 있다.

[0110] 일반적으로, siRNA의 적절한 투약 단위(dosage unit)는 수용자의 체중 kg당 대략 0.001 내지 대략 0.25 mg/day 범위, 또는 수용자의 체중 kg당 대략 0.01 내지 대략 20 µg/day 범위, 또는 수용자의 체중 kg당 대략 0.01 내지 대략 10 µg/day 범위, 또는 수용자의 체중 kg당 대략 0.10 내지 대략 5 µg/day 범위, 또는 수용자의 체중 kg당 대략 0.1 내지 대략 2.5 µg/day 범위일 것이다.

[0111] Gpr12 저해물질은 본 발명의 구체예에서, 일일 1회 투여될 수 있다. 하지만, 상기 제제는 하루 동안 적절한 간격으로 투여되는 2회, 3회, 4회, 5회, 6회 또는 그 이상의 하위 용량(sub-dose)을 내포하는 투약 형태(unit dosage form)로 투여될 수도 있다. 이러한 사례에서, 한 구체예에서, 각 하위 용량에 내포된 상기 저해물질은 총 일일 투약 단위를 달성하기 위하여 더욱 적은 양이어야 한다. 또한, 투약 단위는 예로써, 수일 기간 동안 siRNA의 지속되고 일관된 방출을 제공하는 전통적인 서방 제제(sustained release formulation)를 이용하여, 수일 동안 단일 용량을 위하여 조제될 수 있다. 서방 제제는 당분야에 널리 공지되어 있다. 이러한 구체예에서,

투약 단위는 일일 용량(daily dose)의 상응하는 배량을 내포한다. 조제 방법에 상관없이, 제약학적 조성물은 동물 내에서 Gpr12 유전자의 발현을 저해하는데 충분한 양으로 상기 저해물질을 내포해야 한다.

[0112] 적절한 투약 범위(dosage range)를 공식화하기 위한 데이터는 세포 배양 분석(cell culture assay)으로부터 획득될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물의 용량은 독성이 거의 또는 전혀 없이, ED₅₀(공지된 방법에 의해 결정됨)을 포함하는 순환 농도(circulating concentration)의 범위 내에 존재한다. 용량은 이용된 투약 형태와 이용된 투여 경로에 따라, 상기 범위 내에서 변할 수 있다. 본 발명의 방법에 이용되는 임의의 화합물에서, 치료 효과량은 초기에, 세포 배양 분석으로부터 산정될 수 있다. 혈장(plasma) 내에서 저해물질의 수준은 표준 방법, 예를 들면, 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography)에 의해 측정될 수 있다.

[0113] 상기 방법은 임의의 세포외 매트릭스(extracellular matrix)에 siRNA 조성물의 첨가에 의해 수행될 수 있는데, 세포는 충분한 양의 siRNA가 상기 세포에 들어가 효과를 발휘하도록 상기 siRNA 조성물이 조제된다면 상기 매트릭스 내에서 생존할 수 있다. 가령, 상기 방법은 액체, 예를 들면, 액상 배양액(liquid culture) 또는 세포 성장 배지(cell growth media) 내에, 조직 외식물(tissue explant) 내에, 또는 동물, 예를 들면, 포유동물, 특히, 인간을 비롯한 전체 생물체 내에 존재하는 세포에 이용하기 용이하다.

전달 방법

[0115] 유전자의 표적 서열에 특이적인 안티센스 가닥 또는 siRNA를 인코딩하는 DNA 서열은 발현을 위하여 포유동물 세포 내로 도입된다. 유전자 내에서 하나 이상의 서열(가령, 상이한 프로모터 영역 서열 및/또는 코딩 영역 서열)을 표적하기 위하여, 각 표적된 유전자 서열에 특이적인 별도의 siRNA-인코딩 DNA 서열이 세포 내로 동시에 도입될 수 있다. 다른 구체예에 따라서, 포유동물 세포는 유전자 내에서 복수 서열을 표적하는 복수 siRNA에 노출된다.

[0116] 본 발명의 Gpr12 저해물질은 당분야에 공지된 임의의 수단에 의해, 예를 들면, 정맥내(intravenous), 근육내(intramuscular), 복막내(intraperitoneal), 피하(subcutaneous), 경피(transdermal), 기도(airway)(에어로졸), 직장(rectal), 질(vaginal)과 국소(topical)(협축(buccal)과 설하(sublingual) 포함) 투여를 비롯한 비경구 경로(parenteral route)에 의해 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 정맥내 또는 복막내 주입 또는 주사에 의해 투여된다.

[0117] 한 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 분자를 중추신경계(central nervous system) 및/또는 말초 신경계(peripheral nervous system)로 전달하는 방법의 이용을 특징으로 한다. 실험을 통하여, 뉴런(neuron)에 의한 핵산의 효과적인 생체내 흡수(*in vivo* uptake)가 증명되었다. 신경 세포에 핵산의 국소 투여(local administration)의 한 가지 실례로써, Sommer et al., 1998, Antisense Nuc. Acid Drug Dev., 8, 75에서는 c-fos에 대한 15-mer 포스포로티오에이트 안티센스 핵산 분자가 뇌 내로 미세주입(microinjection)을 통하여 쥐에 투여되는 연구의 결과를 기술한다. 신경 세포에 핵산의 전신 투여(systemic administration)의 한 가지 실례로써, Epa et al., 2000, Antisense Nuc. Acid Drug Dev., 10, 469에서는 베타-사이클로텍스트린-아다만테인(beta-cyclodextrin-adamantane)-올리고뉴클레오티드 접합체(conjugate)가 뉴런 분화된 PC12 세포 내에서 p75 신경영양인자 수용체(neurotrophin receptor)를 표적하는데 이용되는 생체내 생쥐 연구의 결과를 기술한다. 2주 과정의 IP 투여 이후에, p75 신경영양인자 수용체 안티센스의 현저한 흡수가 배근신경절(dorsal root ganglion, DRG) 세포에서 관찰되었다. 이에 더하여, p75의 명료하고 일관된 하향-조절이 DRG 뉴런에서 관찰되었다. 뉴런에 핵산의 표적화를 위한 다른 접근법은 Broaddus et al., 1998, J. Neurosurg., 88(4), 734; Karle et al., 1997, Eur. J. Pharmacol., 340(2/3), 153; Bannai et al., 1998, Brain Research, 784(1,2), 304; Rajakumar et al., 1997, Synapse, 26(3), 199; Wu-pong et al., 1999, BioPharm, 12(1), 32; Bannai et al., 1998, Brain Res. Protoc., 3(1), 83; Simantov et al., 1996, Neuroscience, 74(1), 39에서 기술된다. 이런 이유로, 본 발명의 핵산 분자는 뉴런 세포로의 전달과 뉴런 세포에 의한 흡수가 용이하다.

[0118] 후보 유전자를 표적하는, 본 발명의 핵산 분자의 전달은 다수의 상이한 전략에 의해 제공된다. 이용될 수 있는, CNS 전달을 위한 전통적인 접근법에는 척수강내(intrathecal)와 뇌혈관내(intracerebroventricular) 투여, 카테터(catheter)와 펌프(pump)의 이식(implantation), 손상 또는 병소 부위에서 직접적인 주입 또는 관류(perfusion), 뇌동맥 체계(brain arterial system) 내로 주입, 또는 뇌-혈류 장벽(blood-brain barrier)의 화학적 또는 삼투압 개방이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 다른 접근법에는 예로써, 접합체(conjugate)와 생물분해성 중합체(biodegradable polymer)의 이용을 통한 다양한 운반과 담체 시스템의 이용이 포함될 수 있다. 더 나아가, 예로써 Kaplitt et al., U.S. Pat. No. 6,180,613과 Davidson, WO 04/013280에서 기술된 바

와 같은 유전자 요법(gene therapy) 접근법이 CNS에서 핵산 분자를 발현하는데 이용될 수 있다.

[0119] “도입”은 시험관내에서 또는 생체내에서, DNA를 세포 내로 도입하는 다양한 방법을 포함한다. 이런 방법에는 형질전환, 형질도입, 형질감염과 감염이 포함된다. 벡터는 siRNA 분자를 인코딩하는 DNA를 세포 내로 도입하는데 유용하고 바람직한 작용제이다. 이러한 도입은 최소한 하나의 벡터를 이용하여 달성될 수 있다. 가능한 벡터에는 플라스미드 벡터(plasmid vector)와 바이러스 벡터(viral vector)가 포함된다. 바이러스 벡터에는 레트로바이러스 벡터(retroviral vector), 렌티바이러스 벡터(lentiviral vector), 또는 아데노바이러스 벡터(adenoviral vector) 또는 아데노-연관된 벡터(adeno-associated vector)와 같은 다른 벡터가 포함된다.

[0120] 리포좀, 화학적 용제, 전기천공, 바이러스 벡터, 음세포작용(pinocytosis), 식세포작용(phagocytosis)과 외인성 물질의 다른 형태의 자발적 또는 유도된 세포 흡수, 그리고 당분야에 공지된 다른 전달 시스템(delivery system)을 비롯하여, siRNA 분자 또는 siRNA 분자를 인코딩하는 DNA의 세포 또는 조직으로의 대안적 전달 역시 본 발명에 이용될 수 있다.

[0121] 적절한 프로모터에는 간접 RNA 분자를 인코딩하는 서열과 작동가능하게 연합되거나 연결되면, 이들 RNA 분자의 발현을 촉진하는 프로모터가 포함된다. 이런 프로모터에는 당분야에 공지된 바와 같은 세포 프로모터와 바이러스 프로모터가 포함된다. 한 구체예에서, 프로모터는 RNA Pol III 프로모터인데, 이는 가급적, 간접 RNA 분자를 인코딩하는 DNA 서열의 직상류에 배치된다. 바이러스 LTR, 그리고 아데노바이러스, SV40과 CMV 프로모터가 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 당분야에 공지된 다양한 바이러스 프로모터가 이용될 수 있다.

[0122] 한 구체예에서, 본 발명에서는 포유동물 U6 RNA Pol III 프로모터, 더욱 바람직하게는, 인간 U6snRNA Pol III 프로모터를 이용하는데, 상기 프로모터는 인간 세포에서 짧고 정의된 리보자임(ribozyme) 전사체의 발현에 이용되고 있다(Bertrand et al., 1997; Good et al., 1997). U6 Pol III 프로모터와 이의 간단한 종결 서열(4개 내지 6개 우리딘(uridine))은 세포 내에서 siRNA를 발현하는 것으로 밝혀졌다. 적절하게 선택된 간접 RNA 또는 siRNA 인코딩 서열은 이들 RNA 분자의 내인성 발현과 기능을 조사하기 위한 최적 시스템을 제공하기 위하여 전사 카세트(transcriptional cassette) 내로 삽입될 수 있다.

발현 측정

[0124] Gpr12 유전자의 발현은 당분야에 현재 공지되거나 차후에 개발될 임의의 적절한 방법에 의해 결정될 수 있다. 표적 유전자의 발현을 측정하는데 이용되는 방법은 표적 유전자의 특성에 좌우될 것이다. 가령, 표적 유전자가 단백질을 인코딩할 때, “발현”은 상기 유전자로부터 유래된 단백질 또는 전사체를 지칭할 수 있다. 이런 경우에, 표적 유전자의 발현은 표적 유전자에 상응하는 mRNA의 양을 측정함으로써, 또는 단백질의 양을 측정함으로써 결정될 수 있다. 단백질은 단백질 분석에서, 예를 들면, 착색(staining) 또는 면역탁본(immunoblotting)에 의해, 또는, 상기 단백질이 측정될 수 있는 반응을 촉진하면, 반응 속도(reaction rate)를 측정함으로써 측정될 수 있다. 이와 같은 모든 방법은 당분야에 공지되어 있고 이용될 수 있다. 유전자 산물이 RNA 종류이면, 발현은 유전자 산물에 상응하는 RNA의 양을 측정함으로써 결정될 수 있다. 이러한 측정은 세포, 세포 추출물, 조직, 조직 추출물 또는 임의의 다른 적합한 공급원 물질에서 수행될 수 있다.

[0125] Gpr12 유전자의 발현이 감소되는 지의 결정은 유전자 발현에서 변화를 신뢰성 있게 검출할 수 있는 임의의 적절한 방법에 의해 달성될 수 있다.

실시예

실시예 1 맥락적 조건화와 혼적 조건화

[0127] 생쥐는 약한 기억을 유도하는 맥락적 조건화 패러다임으로 훈련시켰다(**도 1**; Tully, T., et al., Nat Rev Drug Discov 2, 267-77 (2003)). **도 1a**에서는 맥락적 기억 형성에 대한 시험 횟수의 효과를 도시한다. 생쥐는 증가하는 횟수의 CS-US 편성으로 훈련시키고, 4일후 맥락적 기억을 평가하였다. 1x 또는 2x CS-US 편성으로 훈련은 아극대(sub-maximal) 기억을 유도하였다.

[0128] 혼적 조건화는 CS와 US 사이에 시간 간격이 증가함에 따라서 점점 어려워졌다. 생쥐는 지연 조건화(delay conditioning)와 비교하여, 점점 길어지는 혼적 간격과 긴장 기억을 이용한 혼적 공포 조건화에서 훈련시켰다. **도 1b**에서는 시간적 기억 형성(temporal memory formation)에 대한 혼적 간격(trace interval)의 효과를 보여준다. 30초 이상의 혼적 간격은 긴장 CS에 대한 불량한 장기 기억을 유발하였다(5초, 15초, 30초, 60초, 100초와 120초의 혼적 간격과 지연 조건화의 경우에 각각, n=29, n=20, n=25, n=18, n=28, n=16과 n=12). 실제로, C57BL/6 생쥐는 CS와 US 사이에 혼적 간격(trace interval)이 60 초 또는 그 이상이면 불량을 기억을 보인다(**도**

1b).

[0129] 실시예 2 훈련후 생쥐의 해마상 응기에서 Gpr12 RNA의 수준

맥락적 기억을 평가하기 위하여, CREB 적중(knock-out) 생쥐에서 기억을 평가를 위하여 개발된 표준화된 맥락적 공포 조건화 과정을 이용하였다(Bourtchuladze et al., 1994 Cell 79, 59-68). 훈련 당일에, 생쥐는 무조건 자극(US), 2초간 0.5 mA 빨바닥 쇼크의 개시에 앞서 2분 동안 조건화 챔버(Med Associates, Inc., VA)에 위치시켰다. 약한 훈련(2회 훈련 시험)을 위하여, US는 쇼크 사이에 1분 시험간 간격으로 2회 반복하였다. 강한 훈련(5회 훈련 시험)을 위하여, 쇼크 사이에 1분 시험간 간격으로 5회 빨바닥 쇼크를 제공하였다(Bourtchouladze et al., 1998 Learn Mem 5, 365-374; Scott et al., 2002 J Mol Neurosci 19, 171-177; Tully et al., 2003 Nat Rev Drug Discov 2, 267-277). 훈련은 자동화 소프트웨어 패키지(Med Associates, Inc., VA)를 이용하여 수행하였다. 최종 훈련 시험후, 생쥐는 추가로 30초 동안 조건화 챔버에 방치하고, 이후 최초 우리로 복귀시켰다. 맥락적 기억은 훈련후 24시간 시점에 검사하였다. 생쥐는 동일한 훈련 챔버에 위치시키고, 동결 행동(freezing behavior)을 기록함으로써 조건화를 평가하였다. 동결은 5초 간격에서 움직임의 완전 부재로서 정의되었다(Fanselow and Bolles, 1979 J Comp Physiol Psychol 93, 736-744; Bourtchuladze et al., 1994 Cell 79, 59-68; Bourtchouladze et al., 1998 Learn Mem 5, 365-374). 총 검사 시간은 3분간 지속되었다. 각 실험 개체 이후에, 실험 기구는 75% 에탄올과 물로 완전하게 씻어내고, 건조시키고, 환기시켰다. 각 실험은 필름에 담았다. 모든 실험자는 약물과 훈련 조건에 대하여 맹검이었다.

[0131] 모든 행동 실험은 균형된 방식(balanced fashion)으로 설계되고 수행되었는데, 이는 (i) 각 실험 조건에서, 동등한 숫자의 실험 생쥐와 대조 생쥐가 이용되었고; (ii) 각 실험 조건이 수회 반복되고, 최종 숫자의 개체를 산출하는데 반복 일자(replicate day)가 추가되었음을 의미한다. 각 기간의 과정은 필름에 담았다. 각 실험에서, 실험자는 훈련과 검사 동안 개체의 처리에 대하여 알지 못하였다(맹검). 데이터는 소프트웨어 패키지(StatView 5.0.1; SAS Institute, Inc)를 이용하여 스튜던트 독립표본 t 검정(Student's unpaired t test)으로 분석하였다. 명시된 경우를 제외하고, 명세서와 도면에서 모든 수치는 평균 ± sem으로 표시된다.

[0132] 훈련 조건화 훈련을 위하여, 표준화된 생쥐 맥락적 공포 조건화 장비를 이용하였다(Med Associates, Inc., VA; Bourtchuladze et al., 1994 Cell 79, 59-68; Bourtchouladze et al., 1998 Learn Mem 5, 365-374). 훈련 당일에, 생쥐는 조건 자극(CS), 75에서 20초간 지속되는 2800긴장(tone)의 개시에 앞서 2분 동안 조건화 챔버 내에 위치시켰다. 긴장의 종결후 60초 시점에, 2초 동안 0.5 mA 쇼크 무조건 자극(US)을 동물에 전달하였다. 이전의 실험에서, 상기 훈련 패러다임이 C57BL/6 생쥐에서 불량한 훈련 공포 기억을 유도하고, 이러한 기억이 CREB 경로의 증진인자(enhancer)에 의해 촉진될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 챔버 내에서 추가로 30초후, 생쥐는 최초 우리로 복귀시켰다. 각 실험 개체 이후에, 실험 기구는 75% 에탄올과 물로 완전하게 씻어내고, 건조시키고, 수분동안 환기시켰다.

[0133] 검사는 맥락적 조건화의 혼동 효과(confounding effect)를 방지하기 위하여, 다른 수술실(procedural room) 내에 배치된 신규한 챔버에서 수행하였다. 내부 조건화 챔버는 떼어내고 생쥐 우리로 교체하였다. 우리를 서로 식별하기 위하여 각 우리의 뒷면에 다른 색상의 테이프를 붙였다. 각 개체 간에 냄새 오염(scent contamination)의 가능성을 줄이기 위하여, 3개의 상이한 우리를 차례로 이용하였다. 훈련과 검사 사이에 조명에서 차이를 담보하기 위하여 챔버 내부에 30-와트(watt) 램프를 배치하였다. 우리는 에탄올 대신에 비누 용액(soapy solution)을 이용하여 씻어냈다. 각 검사는 2분간 광 단독(pre-CS), 이후 20초간 긴장 표현(CS), 그 이후에 추가로 30초간 광 단독(post-CS)으로 시작하였다. 훈련 동안에서와 동일한 방식으로, 생쥐는 앞서 기술된 맥락적 조건화에서처럼, 5분 간격에서 “동결”에 대하여 차례로 기록하였다. 각 실험의 과정은 필름에 담았다. 청각 기억(auditory memory)에 특이적인 동결 반응의 비율은 CS 동결로부터 preCS 동결(비-특이적)을 뺄셈함으로써 결정하였다.

[0134] 훈련과 검사후, 생쥐의 해마상 응기 조직을 모았다. 개별 RNA 제조는 제조업체의 사용설명에서 따라 QIAgen RNeasy 키트(Qiagen)를 이용하여 수행하였다. cDNA는 TaqMan 역전사효소 키트(Applied Biosystems)를 이용하여 산출하였다. cDNA는 Affymetrix 유전자 칩 분석을 이용하여 분석하고 고유 생쥐에 대한 발현의 상대적 수준을 획득하였다. Affymetrix-칩 분석에 의해 확인된 훈련 공포 조건화후 1시간 시점에 발현 변화는 Nimble-칩 분석(NimbleGen Systems, Madison, WI, USA)으로 확인하였다. Affymetrix-칩 분석에 의해 확인된 맥락적 공포 조건화(5x 훈련 시험)후 1시간 시점에 발현 변화는 2차 Affy-칩 분석과 qPCR로 확인하였다.

표 2

[0135]	비교	시점	P 수치 (유의성 기준 p<0.05)	ES 수치	qPCR 상대적 양 (훈련된 vs 미경험)
	지연 조건화 vs. 미경험(우리에 감금됨)	6h	0.0008	-1.81	0.75
	흔적 조건화 vs. 미경험(우리에 감금됨)	6h	0.0383	NS(qPCR 확인으로부터 p 수치)	0.70

실시예 3 Neuro 2A 세포를 이용하여 Gpr12를 표적하는 siRNA에 대한 스크리닝

[0136] 실시간 PCR에 의한 발현 프로파일링(expression profiling)은 말초 조직 내에서 거의 발현 없이 생쥐와 인간 CNS 내에서 Gpr12 mRNA 발현을 확인시켰다(**도 2**).

[0137] Gpr12는 생쥐 CNS에서 폭넓게 존재하는데(**도 2a**), 최대 발현 수준은 감각 정보(sensory information)(시상(thalamus)), 운동 조절(motor control)(소뇌(cerebellum))과 자율 기능(autonomous function)(뇌간(brainstem))의 제공(feeding)과 통합(integration)에 관여하는 뇌 부위인 시상, 뇌간과 소뇌에서 관찰된다. 높은 수준의 Gpr12는 기억 형성에 매우 중요한 2가지 뇌 부위인 해마상 용기와 신피질(neocortex)에서도 관찰되었다(Fanselow 2005 J Comp Physiol Psychol 93, 736-744). 이들 결과는 생쥐 CNS에서 *in situ* 혼성화에 의해 관찰된 결과와 유사하다(Ignatov 2003 J Neurosci 23, 907-914). 생쥐에서, Gpr12 발현은 간을 제외하고, 대부분의 말초 조직에서 검출 수준(detection level) 미만이었다.

[0138] 인간 CNS 내에 해마상 용기, 신피질과 소뇌에서 Gpr12 발현이 최대이었다(**도 2b**).

[0139] Gpr12의 가장 가까운 동족체인 Gpr3과 Gpr6은 생쥐와 인간 CNS 둘 모두에서 존재하였다(**도 2a/b**). 하지만, Gpr12 mRNA 수준은 인간 CNS 내에서 Gpr3과 6의 수준보다 훨씬 높은 것으로 보인다. 이는 생쥐에서 상황과 대조적인데, 생쥐에서는 Gpr6 발현이 해마상 용기, 시상과 신피질에서 매우 두드러진다.

[0140] 생체내 등급 siSTABLE siRNA(Dharmacon Inc., Lafayette, USA)를 생쥐 CNS에서 Gpr12 기능의 평가에 이용하였다. siRNA는 안정성을 강화시키기 위하여 화학적으로 변형하였다. 21-mer siSTABLE 비-표적화 siRNA를 대조로서 이용하였다

[0141] siRNA 효능의 평가를 위하여, Neuro2A 세포는 siGENOME siRNA와 Dharmafect 3(Dharmacon, Lafayette, USA)을 이용하여 형질감염시켰다. RNA는 형질감염후 24시간 시점에 분리하고, cDNA는 해마상 용기 조직에서 기술된 바와 같이 합성하였다. 처리마다, 3가지 개별 RNA 제조와 cDNA 합성을 수행하였다. 표적 mRNA 수준은 cDNA 복제에 대해 중복 측정하고, ΔCT 수치는 각 실험 중복에 대하여 평균하였다(n=3 RNA/cDNA prep; 각각은 2회 qPCR 측정의 평균으로 표시된다).

[0142] 시험관내에서 Gpr12 mRNA를 효과적으로 감소시키는 3가지 siRNA가 확인되었다(**도 3**). siRNA2는 처리후 24시간 시점에 Gpr12 mRNA 수준을 운반체 대조의 31%로 감소시키고, Gpr12의 생체내 평가를 위하여 선택되었다. Gpr12-2 siRNA에 대한 생체내 등급 siSTABLE siRNA는 Dharmacon(Lafayette, USA)으로부터 구입하였다.

[0143] Gpr12에 대항하는 여러 비-변형된(siGENOME) siRNA는 Neuro 2a 세포를 이용하여 시험관내에서 bDNA 분석(Quantigene bDNA assay kit, Bayer)으로 시험하였다. siRNA는 복수 성분 합리적 설계 알고리즘(multi component rational design algorithm)(Reynolds, A. et al. Nat Biotechnol 22, 326-30 (2004))을 이용하여 설계하고 BLAST 검색으로 Gpr12에 대한 특이성을 제어하였다.

[0144] 아래의 siRNA가 추가적인 생체내 특성화를 위하여 선택되었다:

[0145] Gpr12 siRNA2 센스 가닥 GAGGCACGCCAUCAGAUUU; SEQ ID NO:7

[0146] Gpr12 siRNA2 안티센스 가닥 UAUCUGAUGGGCGUGCUCUU; SEQ ID NO:8

[0147] 비-표적화 siRNA 센스 가닥 UAGCGACUAAACACAUCAUU; SEQ ID NO:9

[0148] 비-표적화 siRNA 안티센스 가닥 UUGAUGUGUUUAGUCGCUAUU; SEQ ID NO:10

[0149] 실시예 4 생쥐 내에서 합성 Gpr12 siRNA의 생체내 전달

- [0151] 동물과 환경. 어린 성체(10~12 주령) C57BL/6 수컷 생쥐(Taconic, NY)를 이용하였다. 도착 이후에, 생쥐는 표준 실험실 우리(standard laboratory cage)에 집단-사육(5마리 생쥐)하고 12:12 시간 명암 주기(light-dark cycle)에 유지시켰다. 실험은 항상, 상기 주기의 밝음 단계(light phase) 동안 수행하였다. 캐뉼러삽입(cannulation)을 위한 수술 이후에, 생쥐는 개별 우리에서 단독 사육하고 실험의 종결 때까지 그렇게 유지시켰다. 훈련과 검사 시간을 제외하고, 생쥐는 사료와 물에 임의로 접근하였다. 생쥐는 National Institutes of Health(NIH) 가이드라인에 일치하고 Institutional Animal Care and Use Committee에 의해 승인된 표준 조건 하에 유지되고 사육되었다.
- [0152] 동물 수술과 siRNA 주입. siRNA의 주입을 위하여, 생쥐는 20 mg/kg Avertin으로 마취시키고 33-게이지(gauge) 가이드 캐뉼러(guide cannula)를 등면 해마상 용기(좌표: A = -1.8 mm, L = 1.2 mm의 깊이에 +/- 1.5 mm) 내로, 또는 편도선(좌표: A = -1.58 mm, L = 4.0 mm의 깊이에 +/- 2.8 mm) 내로 양측에 이식하였다(Franklin and Paxinos, 1997 *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*). 수술로부터 회복후 5일 내지 9일 시점에, 동물은 siRNA를 주입하였다. siRNA는 5% 글루코오스에서 0.5 µg/µl로 희석하고 6 당량의 22kDa 선형 폴리에틸렌 이민(PEI)(Fermentas)과 혼합하였다. 실온에서 10분간 배양후, 폴리에틸렌 튜브에 의해 마이크로-주사기(micro-syringe)에 연결된 주입 캐뉼러(infusion cannula)를 통하여 각 해마상 용기 내로 2 µl를 주입하였다. 전체 주입 절차는 ~2 분이 소요되었고, 동물은 스트레스를 최소화하기 위하여 부드럽게 다루었다. 3일 기간 동안 siRNA를 총 3회 주입하였다(해마상 용기마다 1 µg siRNA/day).
- [0153] Gpr12의 siRNA 매개된 녹다운은 해마상 용기 형성에 손상을 유발할 수 있다. siRNA 처리된 뇌의 해마상 용기 형태를 평가하였다.
- [0154] siRNA 주입된 동물은 행동 실험(behavioral experiment)후 익일에 희생시켰다. 냉동된 뇌는 15 µm 절편으로 절단하고 크레설 바이올렛(Cresyl violet)으로 착색하였다. 해마상 용기 형태는 연속적인 절편의 사진에서 평가하였다. 캐뉼러 검증을 위하여, 동물은 1 µl의 메틸 블루 염료(methyl blue dye)를 주입하고 직후에 희생시켰다. 냉동된 뇌는 15 µm 절편으로 절단하였다. 염료 착색(dye staining)의 위치는 현미경으로 결정하고 비교하였다(Franklin and Paxinos, 1997 *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*). 캐뉼러 검증은 개체의 처리에 맹점으로 수행되었다.
- [0155] 비-표적화 siRNA 처리된 생쥐(**도 6a**)와 Gpr12 siRNA 처리된 생쥐(**도 6b**) 사이에 해마상 용기 형태에서 명백한 차이는 관찰되지 않았다. 따라서 Gpr12 siRNA는 뇌 형태(brain morphology)에서 명백한 변화를 유발하지 않았다. 피라미드 세포층에 대한 손상은 캐뉼러삽입 부위에 국한되었다. 흥미롭게도, **도 6**(중간 패널)에서 관찰되는 손상은 해마상 용기 캐뉼러의 제거에 의해 촉진된다. 이는 해마상 용기 형태에서 실제 수술 유도된 변형을 대표하지 않고, 최소인 것으로 간주되고 실험 개체의 행동 수행에 영향을 주지 않는다.
- [0156] 생체내에서 siRNA에 의한 표적 녹다운을 확인하기 위하여, 3일 동안 해마상 용기내 siRNA로 생쥐를 처리하고 최종 siRNA 주입후 2일과 3일 시점에 Gpr12 mRNA 수준을 측정하였다(**도 7**).
- [0157] 생체내에서 gpr12 녹다운의 평가를 위하여, 군당 6마리 생쥐의 siRNA 주입된 해마상 용기 조직을 모았다. 제조업체의 사용설명서에 따라 QIAgen RNeasy 키트(Qiagen)를 이용하여 6가지 개별 RNA 제조를 수행하였다. cDNA는 TaqMan 역전사효소 키트(Applied Biosystems)를 이용하여 산출하였다. RNA/cDNA 복제마다 2회 실시간 PCR 반응은 ABI 프리즘과 SDS 2.1 소프트웨어를 이용하여 수행하였다. ABI Assays-on-Demand(Applied Biosystems)를 이용하여 Gpr12의 mRNA 수준을 조사하였다. 각 cDNA 시료에 대한 평균 CT 수치를 측정하였다. 데이터는 이후, TATA 결합 단백질(TBP)에 표준화시키고, ΔCT 수치를 측정하였다. mRNA 수준은 비-표적화 대조 siRNA 처리된 대조군에 표준화시켰다.
- [0158] 비-표적화 대조 siRNA(n=6)와 비교할 때, Gpr12 siRNA(n=6)는 처리후 2일 시점에 Gpr12의 해마상 용기 mRNA 수준을 유의하게 감소시켰다($p<0.01$). 처리후 3일 시점에 Gpr12 siRNA의 유의한 효과는 관찰되지 않았는데, 이는 Gpr12 mRNA 녹다운이 일시적이라는 것을 암시하였다($p=0.25$). 이를 결과는 siRNA가 생체내에서 해마상 용기에서 Gpr12 mRNA를 감소시킨다는 것을 증명한다. 하지만, 표적 mRNA와 단백질 수준은 Gpr12 siRNA에 의해 상이한 영향을 받을 수도 있다. Gpr12의 실제 단백질 수준은 siRNA 처리 이후에, 더욱 강하게, 그리고 더욱 오랜 기간 동안 감소될 수 있다.
- [0159] 실시예 5 - 맥락적 조건화와 혼적 조건화에 대한 Gpr12의 siRNA 매개된 녹다운의 효과
- [0160] 맥락적 기억을 평가하기 위하여, CREB 적중(knock-out) 생쥐에서 기억을 평가를 위하여 개발된 표준화된 맥락적 공포 조건화 과정을 이용하였다(Bourtchuladze et al., 1994 Cell 79, 59-68). 훈련 당일에, 생쥐는 무조건 자

극(US), 2초간 0.5 mA 빨바닥 쇼크의 개시에 앞서 2분 동안 조건화 챔버(Med Associates, Inc., VA)에 위치시켰다. 약한 훈련(2회 훈련 시험)을 위하여, US는 쇼크 사이에 1분 시험간 간격으로 2회 반복하였다. 강한 훈련(5회 훈련 시험)을 위하여, 쇼크 사이에 1분 시험간 간격으로 5회 빨바닥 쇼크를 제공하였다(Bourtchouladze et al., 1998 Learn Mem 5, 365-374; Scott et al., 2002 J Mol Neurosci 19, 171-177; Tully et al., 2003 Nat Rev Drug Discov 2, 267-277). 훈련은 자동화 소프트웨어 패키지(Med Associates, Inc., VA)를 이용하여 수행하였다. 최종 훈련 시험후, 생쥐는 추가로 30초 동안 조건화 챔버에 방치하고, 이후 최초 우리로 복귀시켰다. 맥락적 기억은 훈련후 24시간 시점에 검사하였다. 생쥐는 동일한 훈련 챔버에 위치시키고, 동결 행동을 기록함으로써 조건화를 평가하였다. 동결은 5초 간격에서 움직임의 완전 부재로서 정의되었다(Fanselow and Bolles, 1979 J Comp Physiol Psychol 93, 736-744; Bourtchouladze et al., 1994 Cell 79, 59-68; (Bourtchouladze et al., 1998 Learn Mem 5, 365-374). 총 검사 시간은 3분간 지속되었다. 각 실험 개체 이후에, 실험 기구는 75% 에탄올과 물로 완전하게 씻어내고, 건조시키고, 환기시켰다. 각 실험은 필름에 담았다. 모든 실험자는 약물과 훈련 조건에 대하여 맹검이었다.

[0161] 모든 행동 실험은 균형된 방식(balanced fashion)으로 설계되고 수행되었는데, 이는 (i) 각 실험 조건에서, 동등한 숫자의 실험 생쥐와 대조 생쥐가 이용되었고; (ii) 각 실험 조건이 수회 반복되고, 최종 숫자의 개체를 산출하는데 반복 일자(replicate day)가 추가되었음을 의미한다. 각 기간의 과정은 필름에 담았다. 각 실험에서, 실험자는 훈련과 검사 동안 개체의 처리에 대하여 알지 못하였다(맹검). 데이터는 소프트웨어 패키지(StatView 5.0.1; SAS Institute, Inc)를 이용하여 스튜던트 독립표본 t 검정(Student's unpaired t test)으로 분석하였다. 명시된 경우를 제외하고, 명세서와 도면에서 모든 수치는 평균 ± sem으로 표시된다.

[0162] 먼저, 맥락적 기억에서 해마상 용기 Gpr12의 기능을 조사하였다. 생쥐는 해마상 용기 내로 비-표적화(n=19) 또는 Gpr12 siRNA(n=20)를 주입하였다. 최종 siRNA 주입후 3일 시점에, 동물은 약한 맥락적 기억을 유도하도록 설계된 맥락적 조건화 패러다임으로 훈련시켰다(Scott et al., 2002 J Mol Neurosci 19, 171-177; Tully et al., 2003 Nat Rev Drug Discov 2, 267-277). Gpr12 DM-2 siRNA 처리된 동물은 훈련후 24시간 시점에 유의하게 강화된 맥락적 기억을 나타냈다(24시간 기억: p<0.05; **도 4a**).

[0163] 그 다음, 맥락적 기억 형성에 대한, 편도선 내에 Gpr12의 기능을 조사하였다. 생쥐는 편도선 내로 비-표적화(n=20) 또는 Gpr12 siRNA(n=21)를 주입하고 맥락적 기억에서 검사하였다. 해마상 용기에서 Gpr12 녹다운에서처럼, Gpr12 siRNA 처리된 동물은 훈련후 24시간 시점에서 유의하게 강화된 맥락적 기억을 나타냈다(24시간 기억: p<0.01; **도 4b**). 4마리 생쥐(2x 비-표적화 siRNA, 2x Gpr12-2 siRNA)는 부정확한 캐들러 배치로 인하여 분석에서 배제되었다.

[0164] 혼적 조건화 훈련을 위하여, 표준화된 생쥐 맥락적 공포 조건화 장비를 이용하였다(Med Associates, Inc., VA; Bourtchouladze et al., 1994 Cell 79, 59-68; Bourtchouladze et al., 1998 Learn Mem 5, 365-374). 훈련 당일에, 생쥐는 조건 자극(CS), 75에서 20초간 지속되는 2800긴장(tone)의 개시에 앞서 2분 동안 조건화 챔버 내에 위치시켰다. 긴장의 종결후 60초 시점에, 2초 동안 0.5 mA 쇼크 무조건 자극(US)을 동물에 전달하였다. 이전의 실험에서, 상기 훈련 패러다임이 C57BL/6 생쥐에서 불량한 혼적 공포 기억을 유도하고, 이러한 기억이 CREB 경로의 증진인자(enhancer)에 의해 촉진될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 챔버 내에서 추가로 30초후, 생쥐는 최초 우리로 복귀시켰다. 각 실험 개체 이후에, 실험 기구는 75% 에탄올과 물로 완전하게 씻어내고, 건조시키고, 수분동안 환기시켰다.

[0165] 검사는 맥락적 조건화의 혼동 효과(confounding effect)를 방지하기 위하여, 다른 수술실(procedural room) 내에 배치된 신규한 챔버에서 수행하였다. 내부 조건화 챔버는 떼어내고 생쥐 우리로 교체하였다. 우리를 서로 식별하기 위하여 각 우리의 뒷면에 다른 색상의 테이프를 붙였다. 각 개체 간에 냄새 오염(scent contamination)의 가능성을 줄이기 위하여, 3개의 상이한 우리를 차례로 이용하였다. 훈련과 검사 사이에 조명에서 차이를 담보하기 위하여 챔버 내부에 30-와트(watt) 램프를 배치하였다. 우리는 에탄올 대신에 비누 용액(soapy solution)을 이용하여 씻어냈다. 각 검사는 2분간 광 단독(pre-CS), 이후 20초간 긴장 표현(CS), 그 이후에 추가로 30초간 광 단독(post-CS)으로 시작하였다. 훈련 동안에서와 동일한 방식으로, 생쥐는 앞서 기술된 맥락적 조건화에서처럼, 5분 간격에서 “동결”에 대하여 차례로 기록하였다. 각 실험의 과정은 필름에 담았다. 청각 기억(auditory memory)에 특이적인 동결 반응의 비율은 CS 동결로부터 preCS 동결(비-특이적)을 뺀 셈으로써 측정하였다.

[0166] 혼적 공포 기억에서 해마상 용기 Gpr12의 기능을 조사하였다. 생쥐는 맥락적 조건화에서 기술된 바와 같이 해마상 용기 내로 비-표적화(n=20) 또는 Gpr12 siRNA(n=23)를 주입하였다. 1회 CS/US 편성과 60초 혼적 간격으로

훈련시켰을 때, Gpr12 DM-2 siRNA 처리된 동물은 유의하게 증가된 혼적 조건화를 나타냈다(CS-preCS: $p<0.01$; 도 5). 중요하게는, Gpr12 siRNA 처리된 동물은 긴장 CS 표현 이후에 동결 반응이 증가하지만 대조 siRNA 처리된 동물에서는 그렇지 않았다. 따라서 맥락적 조건화에서와 유사하게, 해마상 용기 Gpr12의 siRNA-매개된 높다운은 혼적 조건화를 촉진하였다. Gpr12 siRNA는 혼적 공포 조건화 동안 즉시 동결에 유의한 영향을 주지 않았다(비-표적화 siRNA: $3.3\pm1.5\%$; Gpr12 siRNA: $5.1\pm1.6\%$; $p=0.44$; 데이터 제시되지 않음).

[0167] 종합하면, 이를 결과는 Gpr12가 생쥐에서뿐만 아니라 인간에서 기억 형성에 매우 중요한 2가지 측두엽 구조(temporal lobe structure)인 해마상 용기와 편도선 둘 모두에서 기억 형성의 음성 조절인자이라는 것을 암시한다. 중요하게는, Gpr12 siRNA는 ‘기능의 획득’(즉, 기억 형성의 강화)을 유도하였다. 행동 적응성(behavioral plasticity)에 대한 이러한 효과가 Gpr12 siRNA의 부작용에 의해 유도될 가능성은 낮다. 따라서 Gpr12는 해마상 용기와 편도선에서 기억의 핵심적인 조절인자이다.

0168] 실시예 6 - Gpr12 적중 생쥐

[0169] Gpr12 적중 생쥐. Gpr12 적중 생쥐는 Deltagen(San Carlos, CA 94070, U.S.A)으로부터 허가를 받았다. 주로 C57BL/6 배경에서 이종접합성 Gpr12 KO 생쥐(Gpr12+/- 생쥐로 지칭됨)(C57BL/6으로 5회 역교배(backcross))와 WT 한배 새끼 대조는 수컷 Gpr12+/- 생쥐를 C57BL/6 암컷에 교배시킴으로써 산출하였다(Taconic Farms, USA). 이들 생쥐는 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction)으로 유전자형을 확인하였다. 성별로 균형된 수컷과 암컷 생쥐는 3-6 월령에, 행동 분석에 이용하였다.

[0170] Gpr12+/- 생쥐의 해마상 용기에서 Gpr12와 대조 mRNA 수준의 평가. Gpr12+/- 생쥐(n=3), Gpr12-/- 생쥐(n=2)와 WT 한배 새끼 대조(n=3)로부터 해마상 용기를 분리하였다. QIAgen RNeasy 키트(Qiagen)를 이용하여 RNA를 분리하였다. TagMan 역전사효소 키트(Applied Biosystems)를 이용하여 cDNA를 산출하였다. Gpr12, Creb1과 Grin1의 mRNA 수준은 ABI Assay on Demand(Applied Biosystems)를 이용하여 결정하고 TATA 결합 단백질(TBP)에 표준화시켰다.

[0171] 신규한 사물 인식 훈련과 검사. 동물은 3일 동안 3-5분간 길들였다. 훈련 전일에, 개별 동물은 불빛이 어둑한 방에 배치된 훈련 기구(L=48 cm, W=38 cm와 H=20 cm의 Plexiglas 상자) 내로 위치시키고 15분 동안 주변 환경에 익숙해지도록 하였다(Bourtchouladze, 2003 참조). 훈련은 습관화(habituation) 이후 24시간 시점에 시작하였다. 동물은 2개의 동일한 사물(가령, 작은 청자고등(conus)-형상 사물)이 담긴 훈련 상자 내로 다시 위치시키고, 이들 사물을 탐색하도록 하였다. 이들 사물을 상자의 중심부에 위치시키고, 사물의 공간적 위치(spatial position)(좌측-우측)를 개체 간에 평형시켰다. 동물은 10분, 15분 또는 20분 동안 훈련시켰다. 탐색 시간이 2초 이하인 생쥐는 분석에서 배제하였다.

[0172] 장기 기억 유지를 검사하기 위하여, 생쥐는 훈련후 24시간 시점에 10분 동안 관찰하였다. 단기(전사-독립성) 기억을 검사하기 위하여, 생쥐는 훈련후 3시간 시점에 10분 동안 관찰하였다(Bourtchouladze, 2003). 동물에 2가지 사물을 제공하였는데, 이들 중에서 하나는 훈련 동안 이용되어 “익숙하고”, 다른 하나는 신규하였다(가령, 작은 피라미드-형상 사물). 사물-기억 지수(object-memory index)는 ((신규한 탐색 - 익숙한 탐색)/ 총 탐색) * 100으로서 측정되었다. 탐색에 대한 비-특이적 효과를 제어하기 위하여, 검사 동안 총 탐색 시간 역시 계산하였다.

[0173] 구별 표적(discrimination target)이 냄새 차이가 되지 않도록 담보하기 위하여, 각 실험 개체 이후에, 기구와 사물은 90% 에탄올로 완전하게 씻어내고, 건조시키고, 수분동안 환기시켰다.

[0174] 개방 필드. 이는 동물의 운동 활동과 탐색을 측정하는데 통상적으로 이용되는 검사이다(Logue, 1997, Barad, 1998). 동물은 검사 시작전 1시간 시점에, 전체 동물 수용소에서 실험실로 이동시켰다. 실험은 앞서 기술된 것들과 유사하게 수행되었다(Barad, 1998). 생쥐는 표준 개방 필드에 위치시키고, 컴퓨터 추적 시스템(computerized tracking system)(EthoVision; Noldus, Inc., VA)을 이용하여 30분 동안 관찰하였다. 2개의 상자를 동시에 가동시키고, 동물은 이동된 거리(보행)와 뒷다리 서기를 기록하였다. 동물 사이에, 상기 기구는 75% 에탄올로 완전하게 씻어내고, 건조시키고, 수분동안 환기시켰다. 실험은 맹검 조사자가 수행하고, 각 실험의 과정은 비디오테이프에 녹화하였다. 아래의 척도를 정량하였다: 1) 개방 필드에서 수평 활동(보행), 2) 수직 활동(뒷다리 서기).

[0175] 표 3에서는 해마상 용기에서 기억 조절된 유전자로서 Gpr12의 실체를 증명하는 결과를 보여준다. Affymetrix 유전자-칩 분석에 대하여 P 수치와 델타(delta)(상대적인 발현의 log2)가 제시된다. 혼적 조건화 데이터는 Nimble-칩 분석으로 독립적으로 확인하였다. 맥락 조건화 데이터는 Affymetrix-칩의 반복과 qPCR로 확인하였다.

표 3

[0176]

비교	시점	P 수치 (유의성기준 p<0.05)	델타 (log2 수치)	확인
흔적 조건화 vs. 미경험(우리에 감금됨)	1h	0.033	-0.14	Nimble-칩
맥락 조건화 vs. 미경험(우리에 감금됨)	1h	0.0003	-0.28	Affy-칩, qPCR

[0177]

이종접합성 KO 생쥐(Gpr12+/- 생쥐)에서 만성 Gpr12의 저해, siRNA 데이터는 장기 기억이 본래의 성체 생쥐에서 급성 Gpr12의 저해에 의해 촉진된다는 것을 암시한다. 장기 기억에 대한 Gpr12의 만성적인 시스템 범위 저해의 효과를 검사하기 위하여, Gpr12+/- 생쥐를 분석하였다.

[0178]

동종접합성 Gpr12 적중 생쥐(Gpr12+/- 생쥐)는 앞서 기술된 바와 같이 분석되었다. 동종접합성 적중 생쥐는 감소된 운동력(locomotion), Rotarod에서 감속된 운동-수행, 모리스 수중 미로(Morris Water Maze)에서 감속된 운동 기능과 학습(수영), 동통과민증(hyperanalgesia)을 나타내고, 간과 신장 질환의 징후를 보인다(특히 출원 WO 2005/027628, Carlton, 2005). 추가의 연구에서, 동종접합성 Gpr12 적중 생쥐에서 이상지질혈증(dyslipidemia)과 비만(obesity)이 발병하는 것으로 밝혀졌다(Bjursell, 2006). 전제적으로, 이들 조사 결과는 동종접합성 Gpr12 적중 생쥐에서 다양한 일반적이고 발달 유도된 건강 문제가 발생한다는 것을 증명한다. 전반적으로 나쁜-건강 상태로 인하여, 이들 돌연변이체에서 인지 기능이 감속될 것으로 예상된다.

[0179]

이종접합성 Gpr12 KO 생쥐(Gpr12+/-)에 대한 데이터가 없긴 하지만, 이들 이전 연구(Carlton, 2005; Bjursell, 2006)로부터 이들 생쥐에서 장기 기억이 동종접합성 돌연변이체에서보다 정도가 덜하긴 하지만, 감속될 것으로 예상된다. 하지만, 장기 기억 공고화(consolidation)가 Gpr12+/- 생쥐에서 강화된다면, 이는 예상치 못한 결과가 될 것이다.

[0180]

Gpr12+/- 생쥐에서 양쪽 Gpr12 대립유전자(allele)가 비활성화되는데, 이들 생쥐는 Gpr12 mRNA를 검출가능 수준으로 발현하지 않고(WT 대조의 0%), Creb1의 발현이 약간 감소하지만 Grin1 수준이 정상이었다(각각, 대조의 81±1%와 102±2%; 도 8a). Gpr12+/- 생쥐에서 2개의 Gpr12 대립유전자 중에서 하나만 비활성화되는데, 이들 생쥐는 WT Gpr12 mRNA의 51±8%를 나타낸다. 따라서 Gpr12 mRNA 수준이 동종접합성 적중 생쥐에서와 상이하다. Gpr12+/- 생쥐에서 Creb1과 Grin1의 mRNA는 영향을 받지 않았다(각각, 102±8%와 101±4%; 도 8a). 크레실 바이올렛 착색에 의한 Gpr12+/- 해마상 용기의 그로스 조직학적 분석(gross histological analysis)에서, 이종접합성 돌연변이체와 WT 대조 사이에 명백한 차이가 확인되지 않았다(도 8b).

[0181]

이종접합성 Gpr12 적중 생쥐에서 전반적인 운동 활동과 개방 필드 탐색. 동종접합성 KO 생쥐에서 결과로부터 예상된 바와 같이, Gpr12+/- 생쥐에서 전반적인 운동 활동과 탐색이 감속되는지를 시험하는 개방 필드 검사를 수행하였다. 개방 필드에서 수평 활동(보행)을 측정하였는데, 이종접합성 돌연변이체와 WT 생쥐 사이에 이동 활동에서 차이가 관찰되지 않았다(모든 시점에서 p>0.05; 스튜던트 t 검정(student's t-test); 도 9a). Gpr12+/- 생쥐와 WT 대조 사이에 수직 활동(뒷다리 서기) 역시 차이가 관찰되지 않았다(모든 시점에서 p>0.05; 스튜던트 t 검정; 도 9b). 이들 결과는 이종접합성 Gpr12 돌연변이 생쥐에서 운동 활동과 탐색이 정상이라는 것을 암시한다.

[0182]

이종접합성 Gpr12 적중 생쥐에서 신규한 사물 인식 기억. 사물 인식(object recognition)은 생쥐와 쥐에게 행동학적으로 관련된 과제인데, 이는 부정적 강화(negative reinforcement)(벌바닥 쇼크)에 기인하지 않는다. 이러한 과제는 주변 환경에서 익숙한 사물을 신규한 사물을 더욱 탐색하려는 설치류의 선천적 호기심에 좌우된다. 명백하게, 사물이 “익숙하려면”, 동물은 이전에 상기 사물을 주목하고 이런 경험을 기억해야만 한다. 따라서 더욱 우수한 기억력을 갖는 동물은 익숙한 사물보다는 신규한 사물을 더욱 주목하고 탐색할 것이다. 인간에서 최근에 수행된 뇌영상(neuroimaging) 연구에서, 사물 인식에서 기억은 노화(aging)에 의해 강한 영향을 받는 구조인 전전두엽(prefrontal cortex)(Deibert, 1999)에 관련되는 것으로 밝혀졌다(Hedden, 2004). 원숭이와 설치류에서 수행된 다른 연구에서는 해마상 용기가 신규한 사물 인식에 중요하다는 것을 시사한다(Teng, 2000; Mumby, 2001). 따라서 신규한 사물 인식은 실험동물에서 해마상 용기와 괴질(cortex)의 기능과 연관된 인지 과제에 대한 약물-화합물 효과를 평가하기 위한 우수한 행동 모형(behavioral model)을 제공한다.

[0183]

맥락적 조건화와 흔적 조건화에서처럼, 사물 인식을 위한 장기 기억은 훈련 조건에 좌우된다(Bourtchouladze,

2003). 사물 인지 훈련에 대한 기억의 단기 유지를 가능하게 하지만 기억의 장기 유지가 불가능한 조건을 확립하기 위하여, Gpr12 돌연변이체와 동일한 유전자 배경의 WT 생쥐(n=19)를 10분, 15분, 또는 20분 동안 훈련시켰다(도 10). 24시간후 검사에서, 10분 동안 훈련된 생쥐(기억 스코어: 2.2 ± 8.0)는 신규한 산물에 대한 선호(preference)를 보이지 않는 반면, 15분과 20분 동안 훈련된 생쥐(기억 스코어: 15분과 20분 훈련의 경우에 각각, 21.0 ± 7.0 과 34.3 ± 4.9)는 신규한 사물에 대한 선호를 보였다. 따라서 10분간 훈련은 장기 사물 인식 기억을 유도하는데 충분하지 않았다.

[0184] 그 다음, 10분 훈련후 Gpr12+/- (n=15)와 WT 한배 새끼(n=16)에서 장기 사물 인식 기억을 검사하였다(도 11). 24시간후 검사에서, Gpr12+/- 생쥐는 장기 사물 인식 기억을 보였지만 WT 대조는 그렇지 않았다(기억 스코어: WT vs. Gpr12 +/- 생쥐에 대하여 6.0 ± 8.2 vs. 28.7 ± 4.9 ; p<0.05, 스튜던트 독립표본 t 검정(Student's unpaired t test); 도 11a). 훈련(p=0.34)과 검사(p=0.63) 동안 총 탐색에서 차이는 관찰되지 않았는데, 이는 Gpr12+/- 생쥐에서 장기 기억의 촉진이 탐색 활동(exploratory activity)에서 전반적인 증가에 기인하지 않았음을 암시한다(도 11b).

[0185] Gpr12+/- (n=6)와 WT 한배 새끼(n=8)에서 단기 사물 인식 기억 역시 검사하였다(도 12). 단기 사물 인식 기억은 훈련후 3시간 시점에서 검사될 때, 돌연변이체와 대조 사이에 유사하였다(기억 스코어: WT vs. Gpr12 +/- 생쥐에 대하여 25.6 ± 6.6 vs. 18.2 ± 4.8 ; p=0.41, 스튜던트 독립표본 t 검정; 도 12a). 검사 동안 총 탐색에서 군간 차이는 관찰되지 않았다(p=0.28; 도 12b). 중요하게는, 이전 연구(Bourtchouladze, 2003)와 일관되게, WT 생쥐는 10분 훈련후 사물 기억의 유의한 단기 유지를 보였다. 하지만, Gpr12+/- 생쥐만 장기 유지를 보였는데(도 11), 이는 Gpr12의 이종접합성 녹다운이 장기 기억을 특이적으로 강화시킨다는 것을 암시한다.

[0186] 따라서 이종접합성 Gpr12 돌연변이 생쥐(하나의 기능성 Gpr12 대립유전자 보유)는 운동 활동과 탐색에서 명백한 결함을 나타내지 않는다. 장기 사물 인식 기억의 분석에서, 장기 기억 공고화가 이종접합성 Gpr12 적중 생쥐에서 강화된다는 예상치 못한 결과가 확인되었다. 대조적으로, 단기 기억은 정상이었다. 이를 조사 결과는 해마상용기와 편도선 내에서 Gpr12의 siRNA 저해후 맥락적 기억과 시간적 기억의 촉진과 일치한다.

[0187] 본 발명의 배경을 설명하고, 특히, 실시와 관련하여 부가적인 상세를 제공하기 위하여 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특히와 특히 출원은 본 명세서에서 참조로서 편입된다.

[0188] 본 발명이 바람직한 구체예를 참조하여 상세하게 도시되고 기술되긴 했지만, 당업자는 첨부된 특허청구범위에 포함되는 본 발명의 범위를 벗어나지 않는, 형태와 상세에서 다양한 변화가 가능함을 이해할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1a는 맥락적 기억 형성에 대한 시험 횟수의 효과를 보여주는 막대그래프이다. 생쥐는 증가하는 횟수의 CS-US 편성(pairing)으로 훈련되고, 4일후 맥락적 기억이 평가되었다.

[0029] 도 1b는 시간적 기억 형성(temporal memory formation)에 대한 흔적 간격(trace interval)의 효과를 보여주는 막대그래프이다. 생쥐는 지연 조건화(delay conditioning)와 비교하여 점점 길어지는 흔적 간격과 긴장 기억(tone memory)을 이용한 흔적 공포 조건화에서 훈련되었다.

[0030] 도 2a는 실시간 PCR에 의해 측정된, 생쥐 CNS 내에서 Gpr12 mRNA 발현 수준의 표이다.

[0031] 도 2b는 실시간 PCR에 의해 측정된, 생쥐 CNS 내에서 Gpr12 mRNA 발현 수준의 표이다.

[0032] 도 3은 siRNA 처리후 24시간 시점에서 Neuro2A 세포 내에서 Gpr12의 mRNA 수준의 막대그래프이다.

[0033] 도 4a는 맥락적 기억(contextual memory)에 대한 생쥐 해마상 용기에서 Gpr12 siRNA 효과의 막대그래프이다.

[0034] 도 4b는 맥락적 기억에 대한 생쥐 편도선(amygdala)에서 Gpr12 siRNA 효과의 막대그래프이다.

[0035] 도 5는 흔적 공포 기억(trace fear memory)에 대한 생쥐 해마상 용기에서 Gpr12 siRNA 효과의 막대그래프이다.

[0036] 도 6은 주입된 해마상 용기에서 비-표적화(A)와 Gpr12 siRNA(B)의 니슬(Nissl) 착색의 사진이다. 캐뉼러삽입 부위의 등면과 배면의 해마상 용기 조각이 도시된다.

[0037] 도 7은 Gpr12 siRNA 처리후 2일과 3일 시점에 해마상 용기 Gpr12 mRNA 수준의 막대그래프이다.

[0038] 도 8a에서는 Gpr12-/-, Gpr12+/- 생쥐와 WT 대조 한배 새끼(littermate)에서 Gpr12, Creb1과 Grin1 mRNA 수준의 qPCR 분석 결과를 도시한다. Gpr12 mRNA는 Gpr12+/- 생쥐에서 대조의 51%로 감소하였고, 동종접합성

(homozygous) K0 생쥐에서 검출되지 않았다. 대조적으로, Creb1과 Grin1 mRNA는 영향을 받지 않았다.

[0039] 도 8b에서는 Gpr12+/-와 WT 해마상 용기 형태(크레실 바이올렛 착색(Cresyl violet stain))의 그로스 분석(gross analysis) 결과를 도시한다. Gpr+/- 생쥐에서 명백한 비정상은 관찰되지 않았다.

[0040] 도 9a에서는 Gpr12+/- 생쥐(n=9)와 WT 대조(n=8)에서, 개방 필드(open field)에서 전반적인 운동과 탐색 활동, 특히 수평 활동(horizontal activity)(보행)을 도시한다.

[0041] 도 9b에서는 Gpr12+/- 생쥐(n=9)와 WT 대조(n=8)에서, 개방 필드(open field)에서 전반적인 운동과 탐색 활동, 특히 수직 활동(vertical activity)(뒷다리 서기)을 도시한다.

[0042] 도 10에서는 WT 생쥐(n=19)에서, 사물 인식 기억(object recognition memory)의 장기 유지(retention)로서 NOR 기억이 훈련 시간에 좌우된다는 것을 보여준다.

[0043] 도 11a에서는 Gpr12+/- 생쥐(n=15)와 WT 대조(n=16)에서 NOR 기억의 24시간 유지를 도시한다.

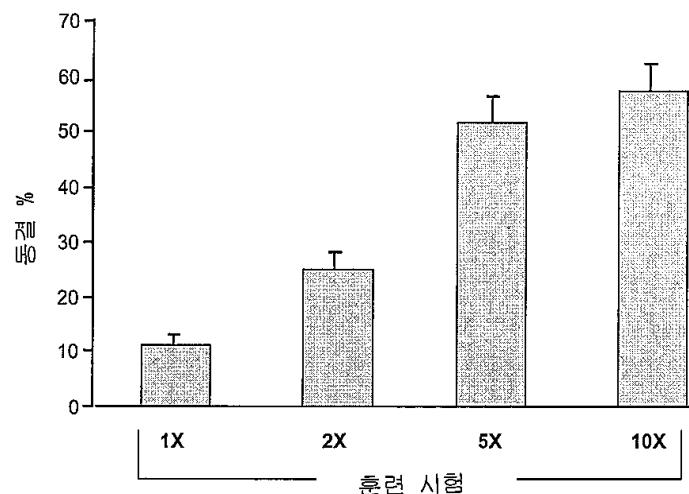
[0044] 도 11b에서는 검사 동안 Gpr12+/- 생쥐와 WT 대조에서 탐색 시간(exploration time)을 도시한다.

[0045] 도 12a에서는 Gpr12+/- 생쥐(n=6)와 WT 대조(n=8)에서 NOR 기억의 3시간 유지를 도시한다.

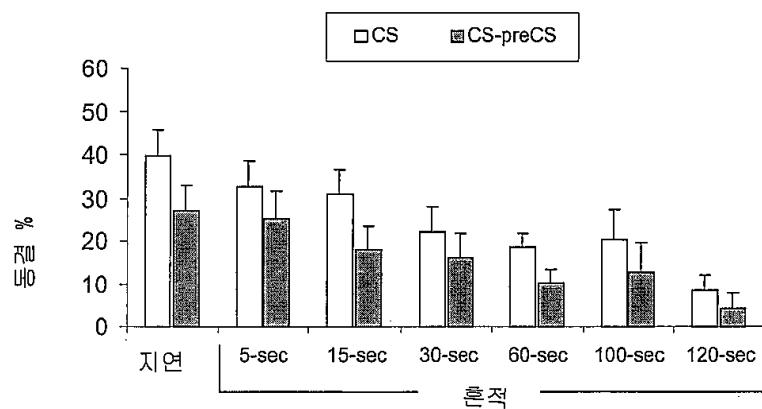
[0046] 도 12b에서는 검사 동안 탐색 시간을 도시한다.

도면**도면1****A**

맥락적 기억에 대한 시험 횟수의 효과

**B**

시간적 기억에 대한 흔적 간격의 효과



도면2

A

생쥐

Brain	GPR3	GPR6	GPR12
Whole Brain	222	1894	173
Hippocampus	123	2075	210
Frontal Cortex	124	844	245
Cerebral Cortex	109	811	172
Thalamus	75	1123	827
Cerebellum	97	13	414
Hypothalamus	49	544	157
Pons	98	38	263
Brainstem	106	610	725
Medulla	1	1	2

Non-Brain	GPR3	GPR6	GPR12
Testis	38	189	0
Ovary	19	7	1
Uterus	3	1	2
Small Intestine	1	8	0
Heart	11	23	0
Kidney	6	9	0
Lung	3	3	0
Liver	1	4	68
Spleen	3	33	1
Thymus	10	2	0

B

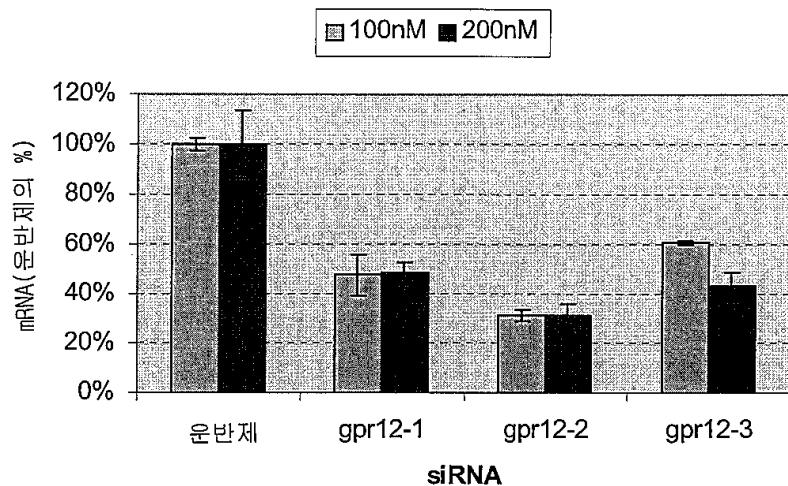
인간

Brain	GPR3	GPR6	GPR12
Whole Brain	82	51	255
Hippocampus	65	34	234
Frontal Cortex	99	73	203
Cerebral Cortex	108	54	182
Cerebellum	96	4	201
Pons	230	3	48
Medulla	86	2	55

Non-Brain	GPR3	GPR6	GPR12
Testis	7	15	15
Ovary	5	29	0
Uterus	2	2	1
Placenta	4	15	9
Small Intestine	6	0	31
Skeletal Muscles	1	0	4
Thymus	5	2	1
Blood	19	0	1
Pancreas	1	1	0

도면3

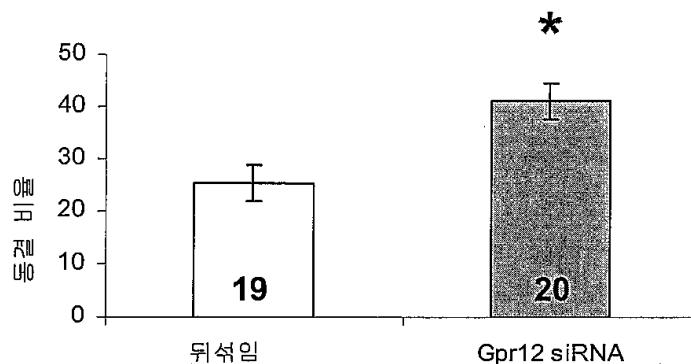
Neuro2A 세포 내에서 시험관내 Gpr 12 mRNA 늑다운



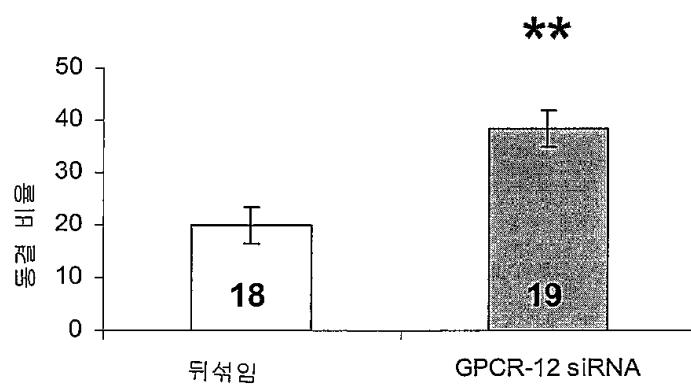
도면4

A

해마상 용기내 Gpr12 siRNA는 맥락적 기억을 강화시킨다

**B**

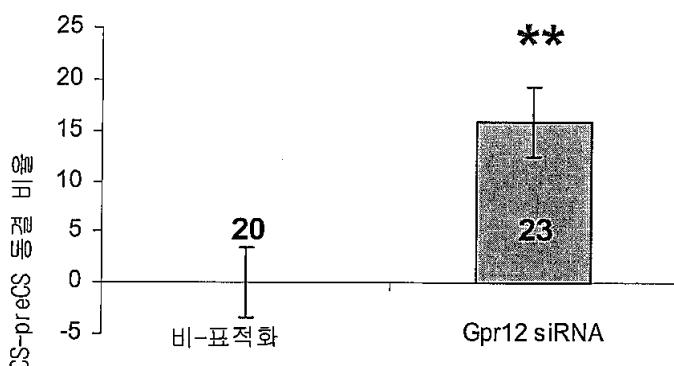
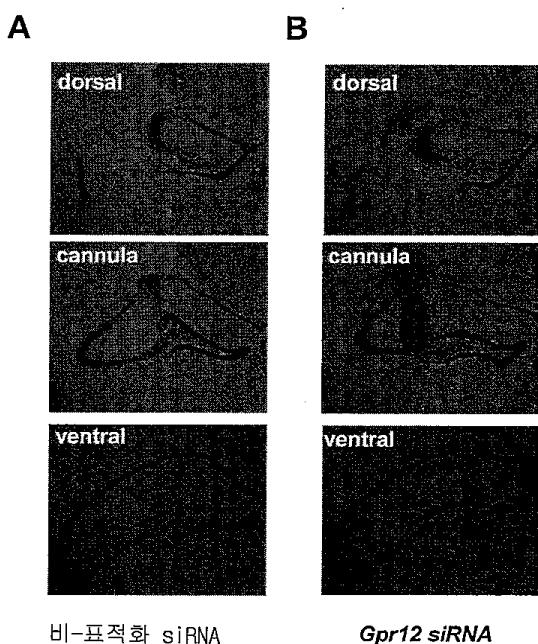
편도선내 Gpr12 siRNA는 맥락적 기억을 강화시킨다



맥락적 공포 기억에 대한 해마상 용기(A)와 편도선(B)에서 Gpr12 늑다운의 효과

도면5

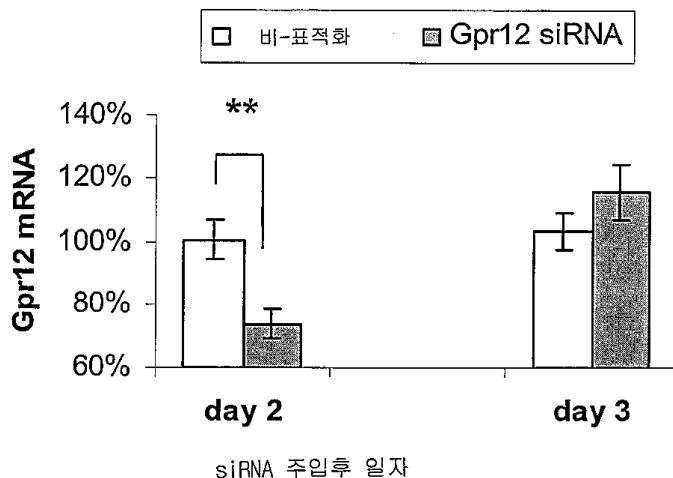
해마상 융기내 Gpr12 siRNA는 훈적 기억을 강화시킨다

**도면6**

주입된 해마상 융기에서 비-표적화와 Gpr12 siRNA의 니슬(Nissl) 칙색. 캐뉼러삽입 부위의 등면과 배면의 해마상 융기 조각이 도시된다.

도면7

생쥐 해마상 응기 내에서 Gpr12 mRNA의 siRNA 녹다운

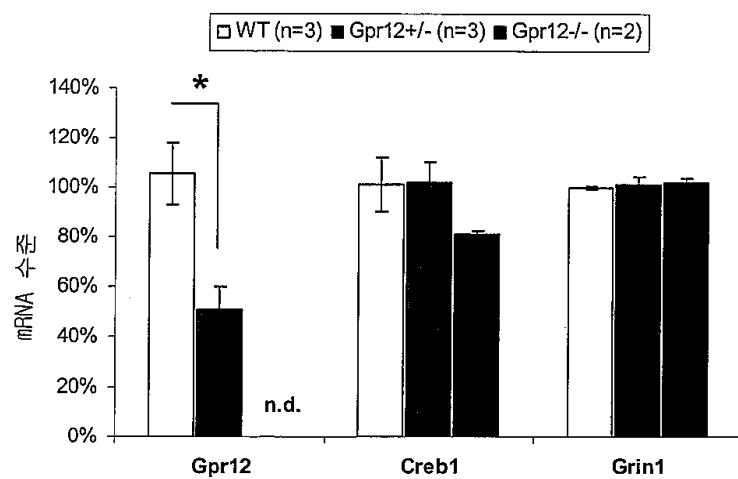
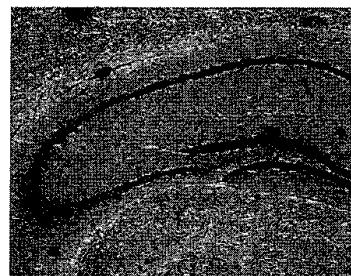


siRNA 주입후 일자

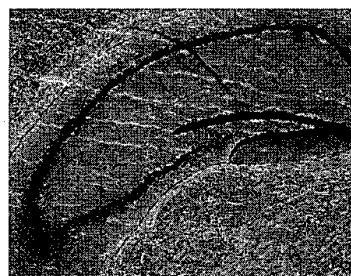
도면8

A

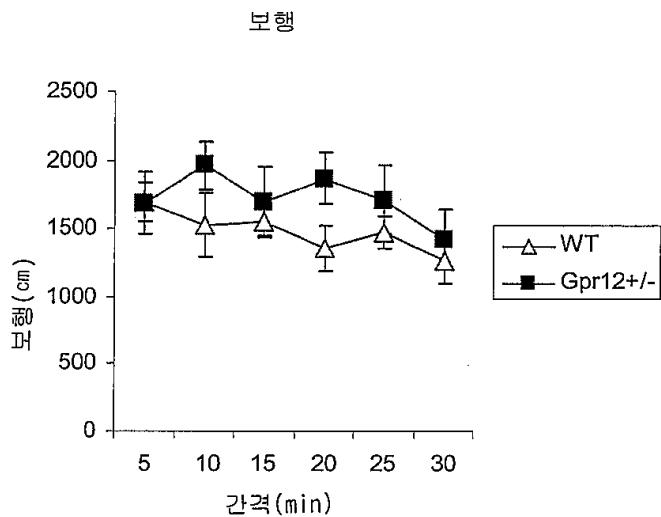
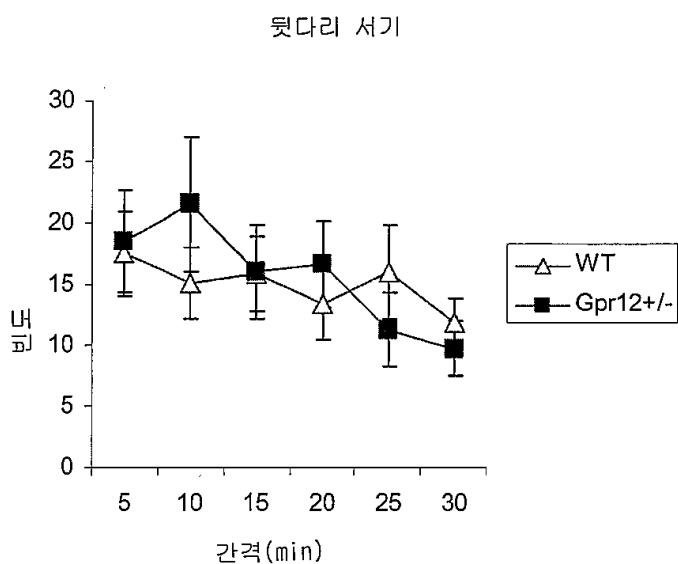
해마상 용기 내에서 Gpr12 K0 동물로부터 mRNA 수준

**B**

WT

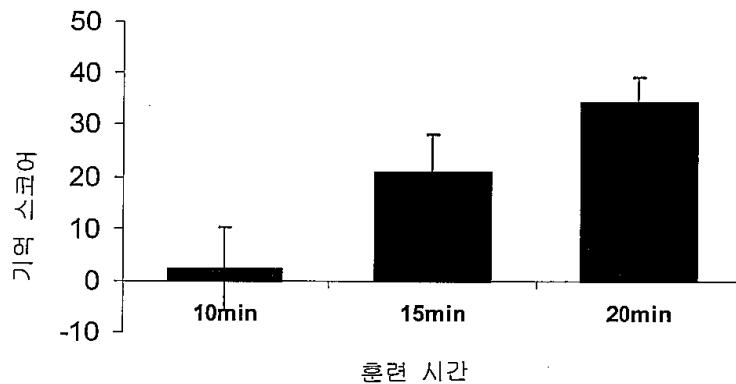
Gpr12^{+/-}

도면9

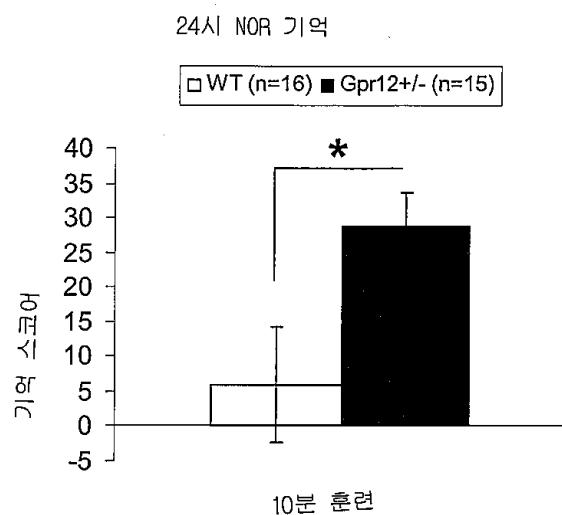
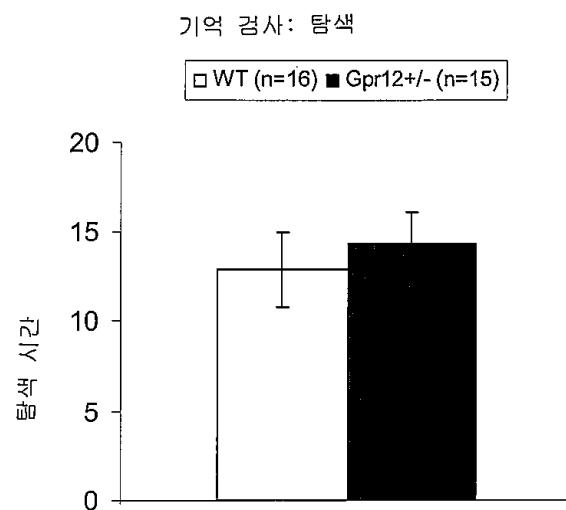
A**B**

도면10

24시 NOR 기억



도면11

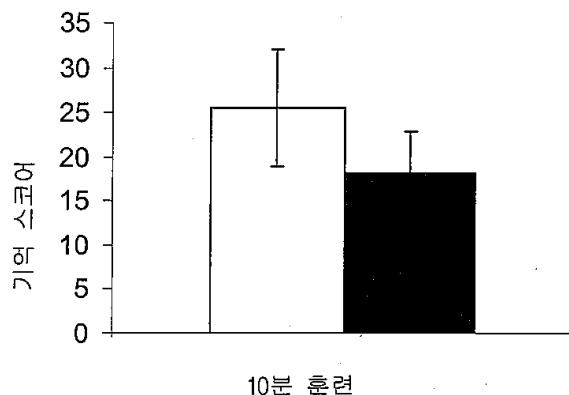
A**B**

도면12

A

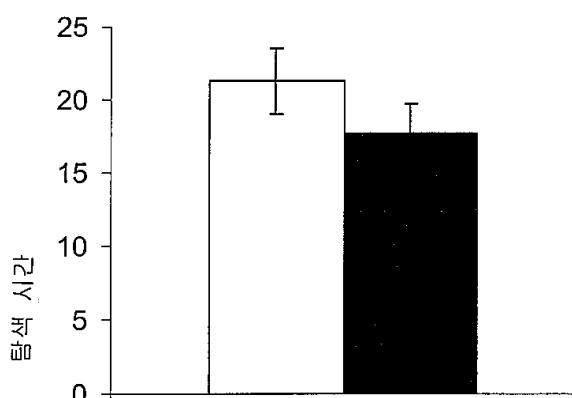
3시 NOR 기억

□ WT (n=8)	■ Gpr12 ^{+/−} (n=6)
------------	------------------------------

**B**

기억 검사: 탐색

□ WT (n=8)	■ Gpr12 ^{+/−} (n=6)
------------	------------------------------



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Helicon Therapeutics, Inc.

<120> Methods of Treating Cognitive Disorders by Inhibition of GPR12

<130> 17VV-137282

<140> PCT/US 08/063804

<141> 2008-05-15

<150> 60/938,163

<151> 2007-05-15

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 334
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 1

Met	Asn	Glu	Asp	Pro	Lys	Val	Asn	Leu	Ser	Gly	Leu	Pro	Arg	Asp	Cys
1															
														15	

Ile	Asp	Ala	Gly	Ala	Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Ala	Ala	Val	Pro	Ser	Gln
														30	

Gly	Ser	Val	Ala	Glu	Ser	Glu	Pro	Glu	Leu	Val	Val	Asn	Pro	Trp	Asp
														45	

Ile	Val	Leu	Cys	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Ile	Cys	Cys	Glu	Asn	Ala	Val
														50	

Val	Val	Leu	Ile	Ile	Phe	His	Ser	Pro	Ser	Leu	Arg	Ala	Pro	Met	Phe
														65	

Leu	Leu	Ile	Gly	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala	Asp	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Gly
														85	

Leu	Ile	Ile	Asn	Phe	Val	Phe	Ala	Tyr	Leu	Leu	Gln	Ser	Glu	Ala	Thr
														100	

Lys	Leu	Val	Thr	Ile	Gly	Leu	Ile	Val	Ala	Ser	Phe	Ser	Ala	Ser	Val
														115	

Cys Ser Leu Leu Ala Ile Thr Val Asp Arg Tyr Leu Ser Leu Tyr Tyr
 130 135 140

Ala Leu Thr Tyr His Ser Glu Arg Thr Val Thr Phe Thr Tyr Val Met
 145 150 155 160

Leu Val Met Leu Trp Gly Thr Ser Ile Cys Leu Gly Leu Leu Pro Val
 165 170 175

Met Gly Trp Asn Cys Leu Arg Asp Glu Ser Thr Cys Ser Val Val Arg
 180 185 190

Pro Leu Thr Lys Asn Asn Ala Ala Ile Leu Ser Ile Ser Phe Leu Phe
 195 200 205

Met Phe Ala Leu Met Leu Gln Leu Tyr Ile Gln Ile Cys Lys Ile Val
 210 215 220

Met Arg His Ala His Gln Ile Ala Leu Gln His His Phe Leu Ala Thr
 225 230 235 240

Ser His Tyr Val Thr Thr Arg Lys Gly Val Ser Thr Leu Ala Leu Ile
 245 250 255

Leu Gly Thr Phe Ala Ala Cys Trp Met Pro Phe Thr Leu Tyr Ser Leu
 260 265 270

Ile Ala Asp Tyr Thr Tyr Pro Ser Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Leu Leu
 275 280 285

Pro Ala Thr Tyr Asn Ser Ile Ile Asn Pro Val Ile Tyr Ala Phe Arg
 290 295 300

Asn Gln Glu Ile Gln Lys Ala Leu Cys Leu Ile Cys Cys Gly Cys Ile
 305 310 315 320

Pro Ser Ser Leu Ser Gln Arg Ala Arg Ser Pro Ser Asp Val

325

330

<210> 2
<211> 2485
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 2	
aaggaaaca taattgcag accggccaac tgcaatctaa gagagggagt cgcttgctgt	60
tgttaagtctc ctccgccagc cctaacctgc ttacccgca ttccctctgt tcatccgaa	120
aaccggccg ttacaattc tttagggaa agcataagaa gccgagcccc agggtaagg	180
gcccctcgga gaagccacag gatcaaagta ggtcgccaga ctctccggcc gttcgagtgg	240
gtcttcgcat gactgttgca ggccggcggtc cacgggtggcg ggctcccgcc cctcacgcag	300
ctgcgacctg cgggggcgcf cgcagcctcg tgggttccc gcggatgcgc gcccggcg	360
gagcgcggag ggcggagagc cggcgcgag caccgcagct caccgtccgc ggggccacc	420
acggacgtgc cacgcgggtg gcccgcgacta ttccgcagca ctgcggatgcgc caccgcgg	480
ccagggcgtg ccaaggacag gggtaaaaat gaacgaagac ccgaagggtca atttaagcgg	540
gctgcctcg gactgtatag atgcgggtgc tccagagaac atctcagccg ctgtccctc	600
ccagggctct gtgcggagt cagaacccga gctcggtgc aacccctggg acattgtctt	660
gtgcagctca ggaaccctca tctgctgtga aaatgcgtt gtggcctta tcatctcca	720
cagccccagc ctgcgagccc ccatgttct actgataggc agcctggctc ttgcagacct	780
gctggctggc ctggactca tcatcaattt tggtttgcg tacctgcttc agtcagaagc	840
caccaagctg gtcaccatcg gactcattgt cgccttttc tctgcctctg tctgcagtt	900
gctggctatt actgtggacc gctaccttc gctatattac gccctgacgt accactccga	960

gaggaccgtc accttacct atgtcatgt agtgatgctc tggggacct ccatctgcct	1020
ggggcgtctg cccgtcatgg gctggaactg ctggggac gagtcacacct gcagcggt	1080
cagacctctc actaagaaca acgctgccat cctctccatc tccttcctct tcgtttgc	1140
tctgatgctt cagctctaca tccagatttga tagattgtg atgaggcacg cccatcagat	1200
agccctgcag caccacttcc tggctacatc gcactatgtg actaccgga aagggtctc	1260
gaccctggct ctcatcctag ggaccttgc tgcctgctgg atgccttca ccctctattc	1320
cttgatcgcc gattacacct acccttcgtatcataccat gccaccctcc tgcccgcac	1380
ctacaattcc atcatcaacc ctgtcattta cgcttcaga aaccaagaga tccagaaagc	1440
cctctgcctc atttgctgtg ggtgcattcc ttccctcgctg tctcagagag ctggctcc	1500
cagcgatgtg tagcagcctt ctcctcatag gacgctgcct ctaccaagcg ctcccacctc	1560
ccagggcggc cagtgatttc ctccctaaa ttcttgac tggatctcac aagcagaagc	1620
aatgacatct tttagacacg tattgacagt ggaaatcatc ttaccagtgt ttttaaaaa	1680
aaaaacaaaa caaaactcga cttctcggt cagcattctg ttgtttgggt tggaggttag	1740
gatttgtttg ttgtttgct tgttgtttg tttggaggggt gtaatggac ctcatgtggc	1800
catgaaatta tacaaaagtc tcgggattt ttaacctagg ctgaaaata aatcaaagtt	1860
ttaaaggaaa ctggagaagg aaatacttt tctgaaggaa atacttttt ttttttaatc	1920
aaggtagatc ttccattctg tatgtatcta acaggatagg agcttgccataa	1980
atagttata taattacatt tgaaaggct tggatgttttatt tcttaggaatt cagtaataag	2040
tgaccagtaa cagaggcgcg aactccttc ttcccttca gcagtagtga ctgctttaa	2100

gaatcactt gcagttctc tgtgttag tttggtatgc atggttacct gtggtagtca	2160
gatcactaat tgaatatcc tttccaaagt gagtcatgaa aaaaatgtt ccaattacat	2220
atacagttt tgaatatcc tttccaaagt gagtcatgaa aaaaatgtt ccaattacat	2280
atgagatagc actggtaga ttgtcattg tgattttaa aactctagac tgggggttt	2340
cagaaaaca aagagaata attaacagca tctattgaaa gaagattta tttatTTTA	2400
atataattctg agagaataaa tgggtgata ctattaagaa atatacaaac atgactttc	2460
aaatctctaa aaaaaaaaaaaaaa	2485

<210> 3
<211> 2271
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 3 cggcatggga gatcaatta gccaatgtcg gtttcagcg tttggcaag tgtgcgagtg	60
tgcatgtgcc gcctcgggag tcctgatcg tggccctc agagacaac agcatttcgg	120
ttcagactt tagccccgtt ttttaattcc tgaagctcgt ggcattttga cactgatagc	180
tgcgtccagg gtgtctgtc ttctctgtg tggccatgt gatcttggat tggcaccccta	240
ctgtacccaa acattaaaaa gcctgtctt ccgttgaaga ggacaggggt taaaatgaac	300
gaagaccgcga aggtcaattt aagcgggtcg cctcggact gtatagatgc cggtgctcca	360
gagaacatct cagccgctgt cccctccag ggctctgtg cgagtcaga acccgagctc	420
gttgtcaacc cctggacat tgtctgtgc agctcaggaa ccctcatctg ctgtaaaaat	480
gccgttgtgg tccttatcat cttccacagc cccagectgc gagccccat gttctactg	540
ataggcagcc tggctttgc agacctgtcg gctggctgg gactcatcat caatTTTGT	600

tttgcgtacc tgcttcagtc agaagccacc aagctggta ccatcgact cattgtcgcc	660
tctttctctg ccctgtctg cagtttgctg gctattactg tggaccgcta cctctcgcta	720
tattacgccc tgacgtacca ctccgagagg accgtcacct ttacctatgt catgctagtg	780
atgctctggg gaacctccat ctgcctgggg ctgctgccc tcatggctg gaactgcttg	840
agggacgagt ccacctgcag cgtggtcaga cctctacta agaacaacgc tgccatcctc	900
tccatctctt tcctttcat gtttgctctg atgcttcagc tctacatcca gatttgaag	960
atttgtatga ggcacgcccc tcagatagcc ctgcagcacc acttcctggc tacatgcac	1020
tatgtgacta cccggaaagg ggtctcgacc ctggctctca tcctagggac ctttgctgcc	1080
tgctggatgc cttdcacct ctattccttg atcgccgatt acacctaccc ttgcgttat	1140
acctatgcca cccctctgcc cgccacctac aattccatca tcaaccctgt cattacgct	1200
ttcagaaacc aagagatcca gaaagccctc tgcctcattt gctgtgggtg catccctcc	1260
tcgctgtctc agagagctcg gtctcccagc gatgtgttagc agccttctcc tcataggacg	1320
ctgcctctac caagcgctcc cacctccag ggcggccagt gattccttc cttaaattct	1380
ttgcactgga tctcacaagc agaagcaatg acatttta gacacgtatt gacagtggaa	1440
atcatcttac cagtgtttt taaaaaaaaaa aaaaaacaaa actcgacttc tcggctcagc	1500
attctgttgt ttggtttggg agttaggatt tgtttggct tttgctgtt tgtttgtt	1560
gagggtgtaa tgggaccta tggccatg aaattataca aaagtctcg gatTTTAA	1620
ccttaggettg aaaataaatc aaagtttaa aggaaactgg agaaggaaat acttttctg	1680
aaggaaatac tttttttt ttaatcaagg tagatcttcc attctgtatg tatctaacag	1740

gataggagct ttgccatata accaaaatag tttatataat tacatttgga agggcttgt	1800
tttatttcta ggaattcagt aataagtgc cagtaacaga ggccgcaact cctttttc	1860
ctttcagcag tagtgactgc tcttaagaat cacttgtag tttctgtgt ttacagttt	1920
gtatgcattgg ttacctgtgg tagtcagatc actaattgca atattgccat gttaaaccca	1980
gaataaaaag agtcatttt tcttcaatac agttttgaa atatccttc caaagtggat	2040
catgaaaaaa atgttccaa ttacatatga gatagcactg gtttagattt tcattgttat	2100
ttttaaaact ctagactggt ggtttcaga aaacaaaaga gaaaatatta acagcatcta	2160
ttgaaagaag atttattta ttttaatat attctgagag aataaatggt gtgatactat	2220
taagaaatat acaaacatga ctttcaat ctctaaaaaa aaaaaaaaaa a	2271

<210> 4
<211> 334
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

Met Asn Glu Asp Pro Lys Val Asn Leu Ser Gly Leu Pro Arg Asp Cys			
1	5	10	15

Ile Asp Ala Gly Ala Pro Glu Asn Ile Ser Ala Ala Val Pro Ser Gln		
20	25	30

Gly Ser Val Ala Glu Ser Glu Pro Glu Leu Val Val Asn Pro Trp Asp		
35	40	45

Ile Val Leu Cys Ser Ser Gly Thr Leu Ile Cys Cys Glu Asn Ala Val		
50	55	60

Val Val Leu Ile Ile Phe His Ser Pro Ser Leu Arg Ala Pro Met Phe

65 70 75 80

Leu Leu Ile Gly Ser Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Ala Gly Leu Gly
85 90 95

Leu Ile Ile Asn Phe Val Phe Ala Tyr Leu Leu Gln Ser Glu Ala Thr
 100 105 110

Lys Leu Val Thr Ile Gly Leu Ile Val Ala Ser Phe Ser Ala Ser Val
 115 120 125

Cys Ser Leu Leu Ala Ile Thr Val Asp Arg Tyr Leu Ser Leu Tyr Tyr
 130 135 140

Ala Leu Thr Tyr His Ser Glu Arg Thr Val Thr Phe Thr Tyr Val Met
145 150 155 160

Leu Val Met Leu Trp Gly Thr Ser Ile Cys Leu Gly Leu Leu Pro Val
165 170 175

Met	Gly	Trp	Asn	Cys	Leu	Arg	Asp	Glu	Ser	Thr	Cys	Ser	Val	Val	Arg
							180			185				190	

Pro Leu Thr Lys Asn Asn Ala Ala Ile Leu Ser Ile Ser Phe Leu Phe
195 200 205

Met Phe Ala Leu Met Leu Gln Leu Tyr Ile Gln Ile Cys Lys Ile Val
210 215 220

Met Arg His Ala His Gln Ile Ala Leu Gln His His Phe Leu Ala Thr
225 230 235 240

Ser His Tyr Val Thr Thr Arg Lys Gly Val Ser Thr Leu Ala Leu Ile
245 250 255

Leu Gly Thr Phe Ala Ala Cys Trp Met Pro Phe Thr Leu Tyr Ser Leu

260	265	270
-----	-----	-----

Ile Ala Asp Tyr Thr Tyr Pro Ser Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Leu Leu	275	280	285
---	-----	-----	-----

Pro Ala Thr Tyr Asn Ser Ile Ile Asn Pro Val Ile Tyr Ala Phe Arg	290	295	300
---	-----	-----	-----

Asn Gln Glu Ile Gln Lys Ala Leu Cys Leu Ile Cys Cys Gly Cys Ile	305	310	315	320
---	-----	-----	-----	-----

Pro Ser Ser Leu Ser Gln Arg Ala Arg Ser Pro Ser Asp Val	325	330
---	-----	-----

<210> 5

<211> 1005

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atgaatgaag acctgaaggt caatttaagc gggctgcctc gggattattt agatgccgct 60

gctgcggaga acatctcgcc tgctgtctcc tcccggttc ctgcccgtaga gccagagcct 120

gagctcgtag tcaacccctg ggacattgtc ttgtgtacct cggaaaccct catctcctgt 180

gaaaatgcca ttgtggctt tatcatcttc cacaacccca gcctgcgagc acccatgttc 240

ctgctaatacg gcagcctggc tttgcagac ctgctggccg gcattggact catcaccaat 300

tttgttttg cctacctgct tcagtcaagaa gccaccaagc tggcacgat cggcctcatt 360

gtcgcccttt tctctgcctc tgtctgcagg ttgctggcta tcactgttga ccgctacctc 420

tcactgtact acgctctgac gtaccattcg gagaggacgg tcacgtttac ctatgtcatg 480

ctcgctatgc tctggggac ctccatctgc ctggggctgc tgcccgat gggctggaac 540

tgccctccgag acgagtccac ctgcagcgtg gtcagaccgc tcaccaagaa caacgcggcc	600
atcctctcggtgtccttcttttcatgttttgcgtcatgc ttcatgtctactatccagatc	660
tgttaagatttgatgaggca cgcccatcag atagccctgc agcaccactt cctggccacg	720
tcgcactatgtgaccacccg gaaagggtc tccaccctgg ctatcatcct gggacgttt	780
gctgcttgcttgcgttccacccttat tccttgatag cggttacac ctaccctcc	840
atctataacct acgccaccct cctgcccggcc acctacaattt ccatcatcaa ccctgtcata	900
tatgcttca gaaaccaaga gatccagaaa ggcgtctgtc tcatttgctg cggctgcata	960
ccgtccagtc tcgcccagag agcgcgctcg cccagtgtatgttag	1005

<210> 6
<211> 334
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Asn Glu Asp Leu Lys Val Asn Leu Ser Gly Leu Pro Arg Asp Tyr			
1	5	10	15

Leu Asp Ala Ala Ala Glu Asn Ile Ser Ala Ala Val Ser Ser Arg		
20	25	30

Val Pro Ala Val Glu Pro Glu Leu Val Val Asn Pro Trp Asp		
35	40	45

Ile Val Leu Cys Thr Ser Gly Thr Leu Ile Ser Cys Glu Asn Ala Ile		
50	55	60

Val Val Leu Ile Ile Phe His Asn Pro Ser Leu Arg Ala Pro Met Phe			
65	70	75	80

Leu Leu Ile Gly Ser Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Ala Gly Ile Gly
 85 90 95

Leu Ile Thr Asn Phe Val Phe Ala Tyr Leu Leu Gln Ser Glu Ala Thr
 100 105 110

Lys Leu Val Thr Ile Gly Leu Ile Val Ala Ser Phe Ser Ala Ser Val
 115 120 125

Cys Ser Leu Leu Ala Ile Thr Val Asp Arg Tyr Leu Ser Leu Tyr Tyr
 130 135 140

Ala Leu Thr Tyr His Ser Glu Arg Thr Val Thr Phe Thr Tyr Val Met
 145 150 155 160

Leu Val Met Leu Trp Gly Thr Ser Ile Cys Leu Gly Leu Leu Pro Val
 165 170 175

Met Gly Trp Asn Cys Leu Arg Asp Glu Ser Thr Cys Ser Val Val Arg
 180 185 190

Pro Leu Thr Lys Asn Asn Ala Ala Ile Leu Ser Val Ser Phe Leu Phe
 195 200 205

Met Phe Ala Leu Met Leu Gln Leu Tyr Ile Gln Ile Cys Lys Ile Val
 210 215 220

Met Arg His Ala His Gln Ile Ala Leu Gln His His Phe Leu Ala Thr
 225 230 235 240

Ser His Tyr Val Thr Arg Lys Gly Val Ser Thr Leu Ala Ile Ile
 245 250 255

Leu Gly Thr Phe Ala Ala Cys Trp Met Pro Phe Thr Leu Tyr Ser Leu
 260 265 270

Ile Ala Asp Tyr Thr Tyr Pro Ser Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Leu Leu

275

280

285

Pro Ala Thr Tyr Asn Ser Ile Ile Asn Pro Val Ile Tyr Ala Phe Arg
 290 295 300

Asn Gln Glu Ile Gln Lys Ala Leu Cys Leu Ile Cys Cys Gly Cys Ile
 305 310 315 320

Pro Ser Ser Leu Ala Gln Arg Ala Arg Ser Pro Ser Asp Val
 325 330

<210> 7
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Gpr12 siRNA2 sense strand

<400> 7
 gaggcacgcc caucagauau u 21

<210> 8
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Gpr12 siRNA2 anti-sense strand

<400> 8
 uaucugaugg gcgugccucu u 21

<210> 9
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> non-targeting siRNA sense strand

<400> 9
uagcgacuaa acacaucaau u

21

<210> 10
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> non-targeting siRNA antisense strand

<400> 10
uugauguguu uagucgcuau u

21