



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2009-0056938  
 (43) 공개일자 2009년06월03일

- (51) Int. Cl.  
*G01N 33/53* (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)  
*C12Q 1/68* (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2008-7032231  
 (22) 출원일자 2008년12월31일  
 심사청구일자 없음  
 번역문제출일자 2008년12월31일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2007/013948  
 국제출원일자 2007년06월13일  
 (87) 국제공개번호 WO 2007/146372  
 국제공개일자 2007년12월21일
- (30) 우선권주장  
 60/813,170 2006년06월13일 미국(US)  
 60/878,730 2007년01월05일 미국(US)

- (71) 출원인  
 더 락커펠러 유니버시티  
 미국 뉴욕 10021 뉴욕 요크 애비뉴 1230
- (72) 발명자  
 스펄닝슨 퍼  
 미국 뉴욕주 10021 뉴욕 파운더스 502 요크 애비뉴 1230 더 락커펠러 유니버시티  
 그린가드 폴  
 미국 뉴욕주 10021 뉴욕 파운더스 502 요크 애비뉴 1230 더 락커펠러 유니버시티
- (74) 대리인  
 김성기, 김진희

전체 청구항 수 : 총 39 항

**(54) 치료 및 진단용의 신규 생성물 및 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 p11의 약물 표적으로서의 용도 뿐만 아니라, p11/5-HT 수용체 관련 질환의 진단, 치료 및 개선을 위한 도구로서의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한, p11 녹-아웃 동물과 p11 유전자 이식 동물, 그리고 이 동물들의 신규 정신 치료제 개발을 위한 모델로서의 용도, 그리고 p11/5-HT 수용체 관련 질환의 진단, 예방 및 치료 방법에 관한 것이기도 하다.

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

개체로부터 유래하는 생물 시료 중 p11 수준을 측정하는 단계 및 상기 p11 수준을 참고 기준과 비교하는 단계를 포함하는, 개체 내 p11/5-HT 수용체 관련 질환을 진단하는 방법으로서, 참고 기준에 비하여 비정상적인 p11 수준은 p11/5-HT 수용체 관련 질환의 양성 진단을 구성하는 것인 방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 p11/5-HT 수용체 관련 질환은 비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련된 질환이며, 대조군 개체와 비교하여 개체 내 p11 수준 감소는 그러한 질환에 대한 양성 진단을 구성하는 것인 방법.

**청구항 3**

제2항에 있어서, 상기 비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련된 질환은 우울증, 강박증, 약물 중독, 섭식 장애, 알츠하이머병, 주의력 결핍 장애 및 주의력 결핍 과잉 행동 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 4**

제2항에 있어서, 상기 비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련된 질환은 우울증인 방법.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 p11/5-HT 수용체 관련 질환은 비정상적으로 높은 p11 수준과 관련된 질환이며, 대조군 개체에서와 비교하여 개체 내 p11 수준 상승은 그러한 질환에 대한 양성 진단을 구성하는 것인 방법.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 상기 비정상적으로 높은 p11 수준과 관련된 질환은 조증, 양극성 장애, 불안 장애, 공격성, 수면 장애, 성 기능 장애 및 위장 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 7**

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 p11 수준은 상기 개체로부터 유래하는 생물 시료 중 단핵구 및/또는 림프구 내 p11 단백질의 수준을 검정함으로써 측정되는 방법.

**청구항 8**

제1항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 p11 수준은 상기 개체로부터 유래하는 생물 시료 중 p11 mRNA 수준을 검정함으로써 측정되는 방법.

**청구항 9**

p11/5-HT 수용체 관련 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용한 조정 인자를 동정하는 방법으로서,

- a) p11 유전자 산물을 동량으로 함유하는 제1 시료와 제2 시료를 제공하는 단계;
- b) 제1 시료와 후보 p11 조정 인자를 접촉시키는 단계; 및
- c) 상기 제1 시료 중의 p11 유전자 산물의 양이 상기 후보 p11 조정 인자와 접촉하지 않은 제2 시료 중의 p11 유전자 산물의 양에 비하여 증가 또는 감소하였는지 여부를 측정하는 단계로서, 유전자 산물의 양 증가는 후보 조정 인자가 비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련된 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용할 수 있음을 나타내는 것인 반면에, 이 유전자 산물의 양 감소는 후보 조정 인자가 비정상적으로 높은 p11 수준과 관련된 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용할 수 있음을 나타내는 것인 단계를 포함하는 방법.

**청구항 10**

p11/5-HT 수용체 관련 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용한 조정 인자를 동정하는 방법으로서,

- a) 세포 표면에 5-HT<sub>1B</sub> 수용체를 동 수로 함유하는 제1 시료와 제2 시료를 제공하는 단계;
- b) 제1 시료와 후보 p11 조정 인자를 접촉시키는 단계; 및
- c) 상기 제1 시료의 세포 표면에서의 5-HT<sub>1B</sub> 수용체의 수가 제2 시료에 비하여 증가하였는지 여부를 측정하는 단계로서, 세포 표면에서의 5-HT<sub>1B</sub> 수용체의 수 증가는 후보 조정 인자가 비정상적으로 낮은 p11 활성 수준과 관련된 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용할 수 있음을 나타내는 것인 반면에, 세포 표면에서의 5-HT<sub>1B</sub> 수용체의 수 감소는 후보 조정 인자가 비정상적으로 높은 p11 활성 수준과 관련된 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용할 수 있음을 나타내는 것인 단계를 포함하는 방법.

**청구항 11**

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 조정 인자는 우울증, 강박증, 약물 중독, 섭식 장애, 알츠하이머병, 주의력 결핍 장애 또는 주의력 결핍 과잉 행동 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는 p11/5-HT 수용체 관련 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용하며, 상기 방법은 상기 후보 조정 인자가 p11 발현을 상향 조절하는 능력에 대해 검정하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 상기 p11/5-HT 수용체 관련 질환은 우울증인 방법.

**청구항 13**

제9항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 p11 조정 인자는 삼환성 항우울제, 세로토닌 재흡수 억제제 또는 모노아민 산화 효소 억제제인 방법.

**청구항 14**

5-HT<sub>1B</sub> 수용체를 뉴런 원형질 막에 모집하는 후보 p11 모의체의 능력에 대해 검정하는 단계를 포함하는, p11/5-HT 수용체 관련 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용한 p11 모의체를 동정하는 방법.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 p11 모의체는 비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련된 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용하며, 상기 후보 p11 모의체는 5-HT<sub>1B</sub> 수용체를 뉴런의 원형질 막에 모집하는 방법.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 질환은 우울증, 강박증, 약물 중독, 섭식 장애, 알츠하이머병, 주의력 결핍 장애 또는 주의력 결핍 과잉 행동 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 상기 질환은 우울증인 방법.

**청구항 18**

하나 이상의 p11/5-HT 수용체 관련 질환을 앓는 것으로 진단된 개체 내에서 p11의 기능 장애를 치료 또는 개선시키는 방법으로서, 상기 개체에 치료학적 유효량의 p11 조정 인자 또는 p11 모의체를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 상기 p11/5-HT 수용체 관련 질환은 우울증, 강박증, 약물 중독, 섭식 장애, 알츠하이머병, 주의력 결핍 장애 및 주의력 결핍 과잉 행동 장애로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 방법은 상기 개체에 치료학적 유효량의 p11 조정 인자 또는 모의체를 투여하는 단계를 포함하며, 상기 p11 조정 인자 또는 모의체는

p11의 발현을 상향 조절하거나, 5-HT<sub>1B</sub> 수용체를 뉴런의 원형질 막에 모집하는 방법.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 상기 p11/5-HT 수용체 관련 질환은 우울증인 방법.

**청구항 21**

제18항에 있어서, 상기 p11/5-HT 수용체 관련 질환은 조증, 양극성 장애, 불안 장애, 공격성, 수면 장애, 성 기능 장애 및 위장 장애로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 방법은 상기 개체에 치료학적 유효량의 p11 조정 인자 또는 모의체를 투여하는 단계를 포함하며, 상기 p11 조정 인자 또는 모의체는 p11의 발현을 억제하거나, 뉴런의 원형질 막에서의 5-HT<sub>1B</sub> 수용체를 하향 조절하는 방법.

**청구항 22**

동일한 종의 야생형 포유동물과 비교하여 p11 유전자에 결함, 돌연 변이 또는 결손을 가지는, 인간 이외의 p11 핵-아웃 포유동물.

**청구항 23**

마우스인 인간 이외의 p11 핵-아웃 포유동물.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 상기 마우스는 야생형 마우스에 비하여 p11 단백질을 저발현(under-express)하는 핵-아웃 마우스.

**청구항 25**

제23항에 있어서, 상기 마우스는 야생형 마우스에 비하여 뉴런 원형질 막에서의 5-HT<sub>1B</sub> 수용체가 더 적은 마우스.

**청구항 26**

제23항 내지 제25항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 마우스는 우울증-유사 표현형을 나타내는 마우스.

**청구항 27**

p11/5-HT 수용체 관련 질환을 연구하거나 또는 p11/5-HT 수용체 관련 질환을 치료하는데 유용한 신규의 정신 치료제를 개발하는 방법으로서,

- a) 항정신성 제제의 유효량을 p11 핵-아웃 마우스 및 대조군 마우스에 투여하는 단계;
- b) 상기 p11 핵-아웃 마우스 및 대조군 마우스에서의 상기 제제에 대한 p11 수준 및/또는 행동 반응을 평가하는 단계; 및
- c) 상기 p11 핵-아웃 마우스에서의 p11 수준 및/또는 행동 반응을 대조군 마우스와 비교하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 상기 p11/5-HT 수용체 관련 질환은 우울증, 불안 장애, 공격성, 조증, 양극성 장애, 수면 장애, 강박증, 약물 중독, 섭식 장애, 성 기능 장애, 알츠하이머병, 주의력 결핍 장애, 주의력 결핍 과잉 행동 장애 및 위장 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 29**

조절 가능한 프로모터의 제어 하에 p11을 코딩하는 트랜스 유전자를 포함하는, 인간 이외의 포유동물.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 마우스인 포유동물.

**청구항 31**

제29항 또는 제30항에 있어서, 상기 프로모터는 칼모듈린/칼모듈린-의존성 단백질 키나제 II(CamKII) 프로모터인 포유동물.

**청구항 32**

환자의 뇌 내 p11의 발현을 증강시키는 핵산을 투여하는 단계를 포함하는, p11/5-HT 수용체 관련 질환을 앓고 있는 환자에서 p11 발현을 증강시키는 방법.

**청구항 33**

제32항에 있어서, 상기 핵산은 p11을 코딩하는 방법.

**청구항 34**

제32항 또는 제33항에 있어서, 상기 p11/5-HT 수용체 관련 질환은 우울증, 강박증, 약물 중독, 섭식 장애, 주의력 결핍 장애 또는 주의력 결핍 과잉 행동 장애 및 알츠하이머병으로부터 선택되는, 비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련된 질환인 방법.

**청구항 35**

제32항 내지 제34항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 p11/5-HT 수용체 관련 질환은 우울증인 방법.

**청구항 36**

제32항 내지 제35항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 핵산은 p11을 코딩하는 DNA 구조물을 포함하는 재조합 복제력-결핍 아데노바이러스 벡터에 의해 전달되는 방법.

**청구항 37**

제36항에 있어서, 상기 DNA 구조물은 신경 조직-특이적 프로모터의 제어 하에 있는 방법.

**청구항 38**

제32항 내지 제35항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 핵산은 환자의 뇌 세포에 의해 발현되는 수준보다 높은 수준으로 p11을 발현하는 신경 줄기 세포에 의해 전달되는 방법.

**청구항 39**

제32항 내지 제38항 중 어느 하나의 항에 있어서, p11을 코딩하는 상기 핵산은 해마에 전달되는 방법.

**명세서**

**기술 분야**

<1> 본 출원은 미국 가 명세서 특허 출원인 제60/813,170호(2006년 6월 13일 출원)와 동 제 60/878,730호(2007년 1월 5일 출원)의 우선권의 이익을 주장하는 것으로서, 이들 출원의 내용은 본원에 참고용으로 인용되어 있다.

<2> **기술 분야**

<3> 본 발명은 p11 및 5-HT<sub>1B</sub> 수용체와 5-HT<sub>4</sub> 수용체 사이에 생물학적 결합을 도입하여, 상기 p11을, 상기 수용체들이 관련된 질병에 대한 약물 표적으로서 사용할 뿐만 아니라, 이 p11/5-HT 수용체 관련 질환을 앓고 있는 환자를 동정하기 위한 진단용 도구로서 사용하는 것에 관한 것이다.

**배경 기술**

<4> 현재 사용되고 있는 항우울제와 항-불안증 약물은 모노아민 신경 전달 물질 예를 들어, 노르에피네프린, 도파민, 구체적으로 세로토닌 (5-하이드록시-트립타민 또는 5-HT)의 생합성, 분해 및 작동 경로를 표적화한다.

1940년대 후반에 처음 발견된 세로토닌은 체내 다수의 기능들 예를 들어, 감정, 수면, 식욕 및 성 활동을 조절 하는데 있어서 중요한 역할을 한다. 이 물질은 중추 신경계 내에서 신경 전달 물질로서의 기능과, 말초 신호 조정 인자로서의 기능을 모두 갖는다. 결론적으로, 세로토닌의 생체 이용률과 활성화에 변동이 생기면, 우울증, 섭식 장애(예를 들어, 폭식증), 강박증(OCD), 약물 중독, 주의력 결핍 장애(ADD), 주의력 결핍 과잉 행동 장애(ADHD), 월경전 증후군, 불안 장애, 공격성, 수면 장애, 성기능 장애, 위장 장애(예를 들어, 과민성 대장 증후군), 조증, 편두통 및 양극성 장애가 발병하게 된다. 통상의 항우울제는 보통, (1) 모노아민 옥시게나제를 억제 하여 세로토닌이 분해되는 것을 방지하거나, 또는 (2) 전 시냅스 뉴런에 의해 세로토닌이 재흡수되는 것을 억제 하여, 뉴런을 통한 세로토닌의 이동량을 증가시킴으로써 신호 전달을 조절한다. 그러나, 반세기여 걸쳐 세로토닌 경로에 관한 집중적인 연구가 행하여졌음에도 불구하고, 이 경로에 대하여는 아직 완전히 파악되지는 않았으며, 세로토닌 경로의 작동 장애에 대한 생화학적 진단제나 생물 마커는 확립되어 있지 않다.

<5> 5-HT(세로토닌) 수용체는 이중의 것으로서, 다양한 세포의 표면에서 발견된다. 5-HT<sub>1B</sub> 수용체는 14개의 세로토닌 수용체 아형 중 하나로서, 중추 신경계 전체에 걸쳐 다량으로 존재한다. 5-HT<sub>1B</sub> 수용체의 구조, 분포 및 외관상 기능은 설치류와 인간 간에 매우 유사하다. 이 수용체는 광범위한 생리적 기능과 행동 예를 들어, 감정, 인지, 공격성, 중독성, 수면 및 섭식과 관련되어 있다. 5-HT<sub>1B</sub> 수용체는 세로토닌-함유 뉴런과 세로토닌-비 함유 뉴런 둘 다에서 발견된다. 5-HT<sub>1B</sub> 수용체는 이 수용체가 뉴런에 의한 세로토닌 방출 조절과 관련된 말단 자가 수용체 (autoreceptor)로서의 기능을 갖는 부분인 뉴런의 전 시냅스 부분에 더욱 많이 존재한다. 상기 수용체가 세로토닌과 결합함으로써 인하여 자극되는 경우, 이 수용체는 뉴런에 의하여 세로토닌이 추가로 방출되는 것을 억제하며; 상기 수용체가 자극되지 않는 경우, 세로토닌의 방출은 증가한다. 이와 같은 5-HT<sub>1B</sub> 수용체를 차단하면 세로토닌의 수준은 증가하는 경향이 있다. 이 5-HT<sub>1B</sub> 수용체가 기타 신경 전달 물질 예를 들어, 아세틸콜린, 글루타메이트, 도파민, 노르에피네프린과 감마-아미노부티르산 그리고 세로토닌의 방출을 제어하는데 관여하는 이중 수용체라는 것을 뒷받침해주는 증거도 몇 가지 존재한다. 일부 5-HT<sub>1B</sub> 수용체는 시냅스 후부에서도 발견된다. 5-HT<sub>4</sub> 수용체는, 그것이 소화기관의 운동성과 관련되는 경우이면 소화계에서 관찰되고, 또한 중추 신경계에서도 관찰된다. 반면에, 5-HT<sub>1B</sub>는 일반적으로 cAMP의 감소와 관련되어 있으며, 상기 5-HT<sub>4</sub> 수용체는 cAMP 활성화의 증가와 관련되어 있다. 뇌의 내부에 있는 5-HT<sub>4</sub> 수용체는 신경 전달 물질(아세틸콜린, 도파민, 세로토닌 및 GABA)의 방출을 조정하고, 시냅스 내 전달 과정을 촉진한다. 상기 5-HT<sub>4</sub> 수용체는 또한, 비-아밀로이드 형성 가용성 아밀로이드 전구체 단백질(sAPP알파)의 방출을 촉진함으로써 기억력을 강화시킬 수도 있다. 알츠하이머병은 베타-아밀로이드 플라크가 형성 및 축적되어, 5-HT<sub>4</sub> 수용체의 기능이 강화됨으로써 매개되는 질병인 것으로 일반적으로 여겨지고 있으므로, sAPP알파의 방출을 증가시키면 알츠하이머병의 치료 또는 예방에 효율적으로 접근할 수 있게 된다.

<6> 단백질 p11은 S100EF-핸드(S100EF-hand) 단백질 군의 일원이다. p11은 또한 어넥신-II 경쇄, 리포코르틴-II 경쇄, 칼렉틴 I 경쇄, 42C 또는 S-100 관련 단백질이라고도 알려져 있으며, 이와 같은 용어들은 본원에서 호환되어 사용될 수 있는 것들이다[R. Donato, Biochim. Biophys. Acta, 1450, 191 (1999)]. 이 단백질은 다양한 세포 내에 별개로서 존재하거나 또는 이중 4량체(heterotetramer)로서 존재한다. 이중 4량체는 p36(어넥신-II 또는 칼렉틴-I 중쇄라고도 알려짐) 2개와, p11 2개로 이루어져 있다. 세포 내에서 상기 이중 4량체는 막하 세포 골격 내 원형질 막의 세포질 표면에 위치하고 있으며, 이와 같은 복합체는 막 내 소통 과정 예를 들어, 세포 외 방출 작용(exocytosis), 세포 이물 흡수 작용(endocytosis) 및 세포-세포 부착 과정에서 일정한 역할을 담당할 수 있는 것으로 생각된다. p11은 중앙 세포 침투 과정, 중앙 성장 과정 그리고 전이 과정에서 일정한 역할을 담당하는 것으로 주장되고 있다. p11은 아직 5-HT 수용체 또는 정신 질환과 관련된 것으로 규명된 바 없었다.

<7> **발명의 개요**

<8> 본 출원인들은 놀랍게도, p11 단백질이 5-HT<sub>1B</sub> 수용체와 특이적으로 상호 작용하고, 뇌의 화학적 메신저인 세로토닌의 신호 전달 과정을 조절하는 것을 도와주며, 다수의 정신 치료제의 중요 표적이라는 사실을 발견하였다 [Svenningsson외 다수, Science (2006) 331:77-80; Svenningsson외 다수, Current Opinion in Pharmacology (2006), 6:1-6; 두 문헌 모두 본원에 참고용으로 인용되어 있음]. p11은 5-HT<sub>1B</sub> 수용체를 이 수용체의 기능이 더욱 활발한 뉴런 원형질 막에 모집하여 주는데 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 본 출원인들은 또한, p11이 5-HT<sub>4</sub> 수용체와도 상호 작용한다는 사실을 발견하였다. 본 출원인들은 p11 수준이 불완전한 세로토닌 수용체

가 관여하는 것으로 생각되는 우울증, 불안 장애, 그리고 이와 유사한 정신과적 질환과 직접적으로 관련될 수 있음도 파악하게 되었다. 우울증이 발병한 개체(우울증이 발병한 인간과 마우스 모델)의 뇌 내 p11 수준을, 우울증이 발병하지 않은 개체(우울증이 발병하지 않은 인간과 대조군 마우스)의 뇌 내 p11 수준과 비교해본 결과, 우울증이 발병한 개체의 p11 수준이 우울증이 발병하지 않은 개체의 p11 수준보다 훨씬 낮음을 파악하게 되었다. 뿐만 아니라, p11 수준은 다양한 유형의 항우울제 예를 들어, 삼환성 항우울제, 모노아민 산화 효소 억제제(MAOI)와, 전기 충격 요법으로 치료 받은 개체 내에서 더욱 높은 경향이 있다. p11은 항우울제 치료를 받은 동물의 경우에 과발현된다. 예를 들어, 선택적인 세로토닌 재흡수 억제제인 플루옥세틴을 투여받은 원숭이는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 내 p11 발현량이 상당히(2배 이상) 증가하였음을 알 수 있었으며, 플루옥세틴을 투여 받은 마우스의 뇌에서도 유사한 효과가 입증되었다. 이와 유사하게, p11 뇌-아웃 유전자로 말미암아 뉴런 원형질 막에 5-HT<sub>1B</sub> 수용체가 보다 적게 나타나는 동물 모델의 경우, 세로토닌의 신호 전달 현상이 감소하였으며, 우울증과 유사한 증상도 보였다. 흥미롭게도, p11의 발현량은 글루코코르티코이드 호르몬(즉, 스트레스를 받았을 때 종종 분비되는 호르몬)의 수준이 지나치게 높으면 감소하게 되는데, 본 출원인들의 연구 결과에 비추어 보았을 때, 이러한 현상은 우울증과 고도의 스트레스로 인한 현상간 연관성에 대한 생화학적 가설을 뒷받침해 주는 것이다. 본 출원인들에 의하여 관찰된 이와 같은 놀라운 사실들에 입각하였을 때, p11은 적당한 진단 표적일 뿐만 아니라, 약물 표적도 되며, 또한 5-HT<sub>1B</sub> 또는 5-HT<sub>4</sub> 수용체, 또는 세로토닌 기능과 관련된 전술한 질환(또는 세로토닌 기능과 관련되지 않는 질환)의 치료법을 개발하기 위한 스크리닝 도구인 것으로 보인다.

<9> 본원에 사용된 "p11/5-HT 수용체 관련 질환"이라는 용어는, p11 단백질에 의한 5-HT 수용체 예를 들어, 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 또는 5-HT<sub>4</sub> 수용체의 이동성(또는 이동성의 결핍)에 의해 매개되거나, 이와 관련되어 있거나, 이에 의해서 유발되거나, 이에 영향을 받거나, 이에 의해 촉진되거나 또는 이것이 관여하는 임의의 질환을 포함한다. p11/5-HT 수용체 관련 질환으로서 정신 질환(예를 들어, 우울증, 불안 장애, 공격성, 조증, 양극성 장애, 주의력 결핍 장애, 주의력 결핍 과잉 행동 장애, 약물 중독 및 강박증, 그리고 알츠하이머병), 수면 장애(예를 들어, 불면증), 섭식 장애(예를 들어, 폭식증), 성 기능 장애 및 소화기 장애(예를 들어, 과민성 대장 증후군)을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며; 특히, 우울증을 포함한다.

<10> 그러므로, 본 발명은 특히,

<11> 1. p11/5-HT 수용체 관련 질환의 진단 방법;

<12> 2. p11/5-HT 수용체 관련 질환의 치료에 유용한 화합물을 동정하는 방법;

<13> 3. p11을 과발현(over-express) 또는 저발현(under-express)하는 유전자 이식 동물; 그리고

<14> 4. p11/5-HT 수용체 관련 질환을 치료하는 방법

<15> 을 제공한다.

**발명의 상세한 설명**

<16> 하나의 구체예에서, 본 발명은 개체 내 p11/5-HT 수용체 관련 질환을 진단하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 (1) 상기 개체의 생물 시료 예를 들어, 혈액 또는 조직 시료 예를 들어, 단핵구 및/또는 백혈구 예를 들어, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 중 p11 단백질의 수준을 검정하는 단계 및 (2) 상기 p11 수준을 참고 기준 예를 들어, 대조군(p11/5-HT 수용체 관련 질환을 앓고 있지 않거나 또는 앓는 것으로 의심되지 않는 군집) 내 p11 수준과 비교하는 단계를 포함하는데, 여기서, 참고 기준과 비교되는 개체 중 p11의 비정상적 수준은 p11/5-HT 수용체 관련 질환의 양성 진단을 구성한다(제1 방법).

<17> 그러므로, 본 발명은 상기 제1 방법에 관한 다음과 같은 구체예들을 포함한다.

<18> 1.1. p11/5-HT 수용체 관련 질환은, 비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련된 질환인 것인 제1 방법의 방법으로서, 참고 기준에 비하여 개체 내 p11 수준이 감소하였음은 이와 같은 질환의 양성 진단을 구성하는 것인 방법.

<19> 1.2. 제1 방법 또는 제1.1 방법에 의한 방법으로서, 상기 질환은 비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련되며, 우울증, 강박증, 약물 중독, 섭식 장애, 주의력 결핍 장애 및 주의력 결핍 과잉 행동 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

<20> 1.3. 상기 방법들 중 임의의 방법에 의한 방법으로서, 상기 질환은 비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련된 우울증인 것인 방법.

- <21> 1.4. 제1 방법에 의한 방법으로서, 상기 p11/5-HT 수용체 관련 질환은 비정상적으로 높은 p11 수준과 관련되며, 참고 기준 내 p11 수준에 비하여 개체 내 p11 수준이 증가하였음은 이와 같은 질환의 양성 진단을 구성하는 것인 방법.
- <22> 1.5. 제1 방법 또는 제1.4 방법 중 어느 하나의 방법에 의한 방법으로서, 상기 질환은 비정상적으로 높은 p11 수준과 관련되며, 조증, 양극성 장애, 불안 장애, 공격성, 수면 장애, 성 기능 장애 및 위장 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.
- <23> 1.6. 상기 방법들 중 임의의 방법에 의한 방법으로서, 상기 p11 수준은 상기 개체로부터 유래하는 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC) 내 p11 단백질 수준을 측정함으로써 결정되는 것인 방법.
- <24> 1.7. 제1.6 방법에 의한 방법으로서, PBMC는 단핵구, NK 세포 및 CD8+ T-세포로부터 선택되는 것인 방법.
- <25> 1.8. 상기 방법들 중 임의의 방법에 의한 방법으로서, 상기 p11 수준은 상기 개체로부터 유래하는 생물 시료 중 p11 mRNA의 수준을 관찰함으로써 측정되는 것인 방법.
- <26> 1.9. 상기 방법들 중 임의의 방법에 의한 방법으로서, 상기 p11 수준은 p11에 특이적인 모노클로날 항체를 사용함으로써 측정되는 것인 방법.
- <27> 1.10. 상기 방법들 중 임의의 방법에 의한 방법으로서, 상기 p11/5-HT 수용체 관련 질환은 p11/5-HT<sub>1B</sub> 수용체 관련 질환인 것인 방법.
- <28> 1.11. 상기 방법들 중 임의의 방법에 의한 방법으로서, 상기 p11/5-HT 수용체 관련 질환은 p11/5-HT<sub>4</sub> 수용체 관련 질환인 것인 방법.
- <29> 1.12. 예를 들어, 상기 제1 방법 ~ 제1.11. 방법 중 임의의 방법에 의하여 p11 수준을 측정하는데 유용한 키트로서, p11 mRNA에 특이적인 올리고뉴클레오티드 프로브 또는 p11에 특이적인 모노클로날 항체, 그리고 사용 지침을 포함하는 것인 키트.
- <30> 1.13. 제1 방법 ~ 제1.11. 방법 중 임의의 방법에 있어서 p11 mRNA에 특이적인 올리고뉴클레오티드 프로브 또는 p11에 특이적인 모노클로날 항체의 용도.
- <31> 1.14. 제1 방법 ~ 제1.11. 방법 중 임의의 방법 또는 제1.12에 의한 키트에 사용되는 시약을 제조함에 있어서 p11 mRNA에 특이적인 올리고뉴클레오티드 프로브 또는 p11에 특이적인 모노클로날 항체의 용도.
- <32> 다른 구체예에서, 본 발명은 p11/5-HT 수용체 관련 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용한 p11 조정 인자를 동정하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은, 후보 조정 인자가 5-HT 수용체와 관련된 p11 발현 또는 p11 활성을 조절(상향 또는 하향)하는 능력에 대해 검정하는 단계를 포함한다(제2 방법).
- <33> 그러므로, 상기 제2 방법은 다음과 같은 구체예들을 포함한다.
- <34> 2.1. 동량의 p11 유전자 산물(예를 들어, 단백질 또는 mRNA)를 함유하는 제1 시료와 제2 시료 예를 들어, 세포 배양액 또는 세포나 조직 시료를 제공하는 단계; 제1 시료와 후보 p11 조정 인자를 접촉시키는 단계; 및 제1 시료 중 p11 유전자 산물의 양이 변화되었는지 여부를 측정하는 단계를 포함하는, p11/5-HT 수용체 관련 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용한 p11 조정 인자를 동정하는 방법으로서, 여기서, 유전자 산물의 양이 증가하였음은 곧 후보 조정 인자가, 비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련된 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용할 수 있음을 나타내는 것인 반면에, 이 유전자 산물의 양이 감소하였음은 곧 후보 조정 인자가, 비정상적으로 높은 p11 수준과 관련된 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용할 수 있음을 나타내는 것인 방법.
- <35> 2.2. 세포 표면에 동수의 5-HT<sub>1B</sub> 및/또는 5-HT<sub>4</sub> 수용체를 함유하는 제2 시료와 제1 시료를 제공하는 단계; 후보 p11 조정 인자와 제1 시료를 접촉시키는 단계; 및 제1 시료의 세포 표면에 존재하는 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 및/또는 5-HT<sub>4</sub> 수용체의 수가 제2 시료의 경우에 비하여 변화하였는지 여부를 측정하는 단계를 포함하는, p11/5-HT 수용체 관련 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용한 p11 조정 인자를 동정하는 방법으로서, 여기서, 세포 표면에 존재하는 5-HT<sub>1B</sub> 및/또는 5-HT<sub>4</sub> 수용체의 수가 증가하였음은 곧 후보 조정 인자가, 비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련된 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용할 수 있음을 나타내는 것인 반면에, 세포 표면에 존재하는 5-HT<sub>1B</sub> 및/또는 5-HT<sub>4</sub> 수용체의 수가 감소하였음은 곧 후보 조정 인자가, 비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련된 질환을 치

료 또는 개선시키는데 유용할 수 있음을 나타내는 것인 방법.

- <36> 2.3. p11 프로모터에 작동 가능하도록 결합된 리포터 유전자를 포함하는 세포와 후보 p11 조정 인자를 접촉시키는 단계와, 리포터 유전자 발현 수준을 p11 발현에 대한 대리 수단으로 이용하는 단계를 포함하는, p11 조정 인자를 동정하는 방법.
- <37> 2.4. 낮은 p11 수준과 관련된 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용한 p11 조정 인자를 동정하는 방법으로서, 후보 조정 인자가 5-HT<sub>1B</sub> 및/또는 5-HT<sub>4</sub>와 관련된 p11 발현을 상향 조절하거나 이 5-HT<sub>1B</sub> 및/또는 5-HT<sub>4</sub>와 관련된 p11 활성을 증가시키는 능력을 가지는지 여부에 대해 검정함으로써, 뉴런 원형질 막에 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 및/또는 5-HT<sub>4</sub> 수용체를 모집하는 단계를 포함하는 방법.
- <38> 2.5. 제2 방법 ~ 제2.4 방법 중 임의의 방법에 의한 방법으로서, 비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련된 질환은 우울증, 강박증, 약물 중독, 섭식 장애, 주의력 결핍 장애 또는 주의력 결핍 과잉 행동 장애 및 알츠하이머병으로부터 선택되는 것인 방법.
- <39> 2.6. 상기 제2 방법 ~ 제2.5 방법 중 임의의 방법에 의한 방법으로서, 상기 질환은 우울증인 것인 방법.
- <40> 2.7. 상기 제2 방법 ~ 제2.6 방법 중 임의의 방법에 의한 방법으로서, 상기 p11의 조정 인자는 양성 대조군으로서 사용되는 것인 방법.
- <41> 2.8. 제2.6 방법에 의한 방법으로서, 상기 p11의 조정 인자로서는 삼환성 항우울제, 선택적 세로토닌 재흡수 억제제, 트립탄 및 모노아민 산화 효소 억제제로부터 선택되는 것인 방법.
- <42> 2.9. 제2.8 방법에 의한 방법으로서, 상기 p11의 조정 인자는 아미트립틸린(상표명: 엘라빌(Elavil)), 데시프라민(상표명: 노르프라민(Norpramin)), 이미프라민(상표명: 토프라닐(Tofranil)), 및 노르트립틸린(상표명: 아벤틸(Aventyl), 파멜로(Pamelor))으로부터 선택되는 삼환성 항우울제인 것인 방법.
- <43> 2.10. 제2.8 방법에 의한 방법으로서, 상기 p11의 조정 인자는 이미프라민인 것인 방법.
- <44> 2.11. 제2.8 방법에 의한 방법으로서, 상기 p11의 조정 인자는 모노아민 산화 효소 억제제(MAOI) 예를 들어, 이소카복사지드(상표명: 마플란(Marplan)); 페넨진(상표명: 나르딜(Nardil)) 및 트래닐사이프로민(상표명: 파네이트(Parnate))인 것인 방법.
- <45> 2.12. 제2.11 방법에 의한 방법으로서, 상기 MAOI는 트래닐사이프로민인 것인 방법.
- <46> 2.13. 제2.8 방법에 의한 방법으로서, 상기 p11의 조정 인자는 예를 들어, 시탈로프람(상표명: 셀렉사(Celexa)); 에스시탈로프람(상표명: 렉사프로(Lexapro)); 플루옥세틴(상표명: 프로작(Prozac)); 파록세틴(상표명: 팍실(Paxil), 펙세바(Pexeva)); 세르트랄린(상표명: 졸로프트(Zoloft))으로부터 선택되는 선택적 세로토닌 재흡수 억제제인 것인 방법.
- <47> 2.14. 높은 p11 수준과 관련된 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용한 p11 조정 인자를 동정하는 방법으로서, 후보 조정 인자가 5-HT<sub>1B</sub> 및/또는 5-HT<sub>4</sub>와 관련된 p11 발현을 하향 조절하거나, 5-HT<sub>1B</sub> 및/또는 5-HT<sub>4</sub>와 관련된 p11 활성을 억제 또는 감소시키는 능력에 대해 검정함으로써, p11이 뉴런 원형질 막에 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 및/또는 5-HT<sub>4</sub> 수용체를 모집하는 능력을 감소 또는 억제하는 단계를 포함하는 방법.
- <48> 2.15. 제2.14 방법에 의한 방법으로서, 높은 p11 수준과 관련된 질환으로서는 조증, 양극성 장애, 불안 장애, 공격성, 수면 장애, 성 기능 장애 및 위장 장애를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아닌 것인 방법.
- <49> 2.16. 높은 p11 수준과 관련된 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용한 p11 조정 인자를 동정하기 위한 제2.15에 의한 방법으로서, 상기 조정 인자는 p11에 대한 siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 모노클로날 항체로부터 선택되는 것인 방법.
- <50> 2.17. 제2 방법 ~ 제2.16 방법 중 임의의 방법에 의한 방법으로서, p11에 대한 siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 모노클로날 항체로부터 선택되는 p11 억제 화합물을 대조군 또는 비교군으로 사용하는 것인 방법.
- <51> 2.18. 예를 들어, 비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련된 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용한 p11 모의체를 동정하기 위한 제2 방법 ~ 제2.17 방법 중 임의의 방법에 의한 방법으로서, 후보 p11 모의체가 5-HT<sub>1B</sub> 및/또는 5-HT<sub>4</sub> 수용체와 결합하거나 상호 작용하는 능력에 대해 검정함으로써, 이 5-HT<sub>1B</sub> 및/또는 5-HT<sub>4</sub> 수용체를 뉴런

원형질 막에 모집하는 단계를 포함하는 것인 방법.

- <52> 2.19. 우울증을 치료 또는 개선시키는데 유용한 p11 모의체를 동정하기 위한 제2.18 방법에 의한 방법으로서, 후보 p11 모의체가 5-HT<sub>1B</sub> 및/또는 5-HT<sub>4</sub> 수용체를 뉴런의 원형질 막에 모집하는 능력을 검정하는 단계를 포함하는 것인 방법.
- <53> 2.20. 상기 방법들 중 임의의 방법에 의한 방법으로서, p11/5-HT 수용체 관련 질환은 p11/5-HT<sub>1B</sub> 수용체 관련 질환인 것인 방법.
- <54> 2.21. 상기 방법들 중 임의의 방법에 의한 방법으로서, p11/5-HT 수용체 관련 질환은 p11/5-HT<sub>4</sub> 수용체 관련 질환인 것인 방법.
- <55> 2.22. p11 프로모터에 작동 가능하도록 결합되어 있는 리포터 유전자를 포함하는 세포.
- <56> 2.23. 제2 방법 ~ 제2.21 방법 중 임의의 방법에 의한 방법이 있어서 제2.22에 의한 세포의 용도.
- <57> 또 다른 구체예에서, 본 발명은 p11을 과발현 또는 저발현하는, 인간 이외의 유전자 이식 포유동물 또는 이의 자손과, 신약 개발을 위한 방법(제3 방법)에서 이 포유동물 또는 이의 자손의 용도에 관한 것이다. 그러므로, 본 발명은 다음의 구체예들을 포함한다.
- <58> 3.1. 인간 이외의 p11 녹아웃(knock-out) 포유동물로서, 상기 인간 이외의 포유동물은 p11 유전자에 결함이 있거나, 돌연 변이가 발생하였거나 또는 이 유전자가 결핍된 DNA 서열을 보유하므로, 뉴런 원형질 막에서 p11 단백질을 저발현하고/저발현하거나, 보다 적은 수의 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 및/또는 5-HT<sub>4</sub> 수용체를 보유하므로, 동일한 종에 속하는 인간 이외의 야생형 포유동물과는 달리, 우울증-유사 표현형을 나타내는 것인, 인간 이외의 p11 녹아웃 포유동물.
- <59> 3.2. 인간 이외의 p11 유전자 이식 포유동물로서, 상기 인간 이외의 포유동물은 p11 단백질을 과발현하고/과발현하거나, 뉴런 원형질 막에서 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 및/또는 5-HT<sub>4</sub> 수용체를 높은 수준으로 나타내므로, 동일한 종에 속하는 인간 이외의 야생형 포유동물과는 달리, 과잉 행동 표현형을 나타내는 것인, 인간 이외의 p11 녹아웃 포유동물.
- <60> 3.3. 제3.1 또는 제3.2에 의한 인간 이외의 포유동물은 마우스인 것인 동물.
- <61> 3.4. 예를 들어, 제3.2 또는 제3.3에 의한 인간 이외의 포유동물로서, 조절 가능한 프로모터 예를 들어, 독시사이클린-조절 가능 칼슘/칼모듈린-의존성 단백질 키나제 II(CamKII) 프로모터에 작동 가능하도록 결합되어 있는, p11을 코딩하는 코딩 부위를 포함하는 트랜스 유전자를 가지는, 인간 이외의 포유동물.
- <62> 3.5. p11/5-HT 수용체 관련 질환을 연구하거나, p11/5-HT 수용체 관련 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용한 신규의 정신 치료제를 개발하기 위한 방법으로서, (1) 상기 제제를 (a) 제3.1 또는 제3.3에 의한 p11 녹아웃 포유동물과 (b) p11/5-HT 수용체 관련 질환이 발병하지 않았거나 발병하였을 것으로 의심되지 않는, 동일한 종의 대조군 포유동물에 투여하는 단계; 및 (2) 상기 (a) 녹아웃 포유동물과 (b) 대조군 포유동물의 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 및/또는 5-HT<sub>4</sub> 수용체의 거동 및/또는 수준을 평가 및 비교하는 단계를 포함하는 것인 방법.
- <63> 3.6. 예를 들어, 제3.4에 의한 우울증 연구 방법으로서, (1) 항우울제를 (a) p11 녹아웃 포유동물과 (b) 우울증이 발병하지 않았거나 발병하였을 것으로 의심되지 않는 대조군 포유동물에 투여하는 단계; 및 (2) 상기 (a) 녹아웃 포유동물과 (b) 대조군 포유동물의 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 또는 5-HT<sub>4</sub> 수용체의 거동 및/또는 수준을 평가 및 비교하는 단계를 포함하는 것인 방법.
- <64> 3.7. 신규의 항정신성 질환 제제를 개발하는데 유용한 p11 마우스 모델로서, 이 제제의 개발 방법은 (1) p11 과발현 마우스 및 (b) p11/5-HT 수용체 관련 질환이 발병하지 않았거나 발병하였을 것으로 의심되지 않는 대조군 마우스에 상기 제제를 투여하는 단계; 및 (2) 상기 (a) 유전자 이식 마우스와 (b) 대조군 마우스의 p11 수준을 평가 및 비교하는 단계를 포함하는 것인 p11 마우스 모델.
- <65> 3.8. p11/5-HT 수용체 관련 질환을 연구하거나, p11/5-HT 수용체 관련 질환을 치료 또는 개선시키는데 유용한 신규의 정신 치료제를 개발하는 방법으로서, (1) 상기 제제를 (a) 제3.2 또는 제3.3에 의한 포유동물 및 (b) p11/5-HT 수용체 관련 질환이 발병하지 않았거나 발병하였을 것으로 의심되지 않는, 동일한 종에 속하는 대조군 포유동물에 투여하는 단계; 및 (2) 상기 (a) 제3.2 또는 제3.3에 의한 포유동물에서의 p11 수준과 (b) 대조군

포유동물에서의 p11 수준을 평가 및 비교하는 단계를 포함하는 것인 방법.

- <66> 3.9. 신규의 항정신성 질환 제제를 개발하는데 유용한 p11 마우스 모델로서, 이 제제의 개발 방법은 (1) 상기 제제를 (a) p11을 과발현하는 마우스 예를 들어, 제3.2에 의한 마우스와 (b) p11/5-HT 수용체 관련 질환이 발병하지 않았거나 발병하였을 것으로 의심되지 않는 대조군 마우스에 투여하는 단계; 및 (2) 상기 (a) 유전자 이식 마우스와 (b) 대조군 마우스의 p11 또는 5-HT 수용체의 거동 및/또는 수준을 평가 및 비교하는 단계를 포함하는 것인 p11 마우스 모델.
- <67> 3.10. 상기 방법들 또는 모델들 중 임의의 것에 의한 방법 또는 모델로서, 상기 측정 또는 과발현 또는 저발현되는 5-HT 수용체는 5-HT<sub>1B</sub> 수용체인 것인 방법 또는 모델.
- <68> 3.11. 상기 방법들 또는 모델들 중 임의의 것에 의한 방법 또는 모델로서, 상기 측정 또는 과발현 또는 저발현되는 5-HT 수용체는 5-HT<sub>4</sub> 수용체인 것인 방법 또는 모델.
- <69> 본 발명은 또한 p11/5-HT 수용체 관련 질환이 발병한 환자를 치료하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 치료학적으로 유효량만큼의 p11 조정 인자를 투여하는 것을 포함하는 것인 방법(제4 방법)에 관한 것이다.
- <70> 4.1. 환자가 제1 방법 ~ 제1.11. 방법 중 임의의 방법에 따라서 처음으로 동정될 때의 제4 방법.
- <71> 4.2. 제4 방법 또는 제4.1 방법에 의한 방법으로서, p11/5-HT 수용체 관련 질환은 비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련된 질환으로서, 예를 들어, 우울증, 강박증, 약물 중독, 섭식 장애, 주의력 결핍 장애 또는 주의력 결핍 과잉 행동 장애 및 알츠하이머병으로부터 선택되는 것인 방법.
- <72> 4.3. 제4.2 방법에 의한 방법으로서, 상기 질환은 우울증인 것인 방법.
- <73> 4.4. 상기 제4 방법 ~ 제4.3 방법 중 임의의 방법에 의한 방법으로서, 제3 방법에 따라서 동정된 p11 조정 인자를 예를 들어, 제3.1 ~ 제3.11의 임의의 구체예를 이용하여 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.
- <74> 4.5. 상기 방법들 중 임의의 방법에 의한 방법으로서, 상기 p11의 조정 인자는 삼환성 항우울제, 선택적 세로토닌 재흡수 억제제 및 모노아민 산화 효소 억제제로부터 선택되는 것인 방법.
- <75> 4.6. 제4.4 방법에 의한 방법으로서, p11의 조정 인자가 아미트립틸린(상표명: 엘라빌), 데시프라민(상표명: 노르프라민), 이미프라민(상표명: 토프라닐), 및 노르트립틸린(상표명: 아벤틸, 파멜로)로부터 선택되는 삼환성 항우울제인 것인 방법.
- <76> 4.7. 제4.5 방법에 의한 방법으로서, 상기 p11의 조정 인자는 이미프라민인 것인 방법.
- <77> 4.8. 제4.4의 방법에 의한 방법으로서, 상기 p11의 조정 인자는, 이소카복사지드(상표명: 마플란); 페넬진(상표명: 나르딜) 및 트레닐사이프로민(상표명: 파네이트)로부터 선택되는 모노아민 산화 효소 억제제(MAOI)인 것인 방법.
- <78> 4.9. 제4.8에 의한 방법으로서, 상기 MAOI는 트레닐사이프로민인 것인 방법.
- <79> 4.10. 제4.4의 방법에 의한 방법으로서, 상기 p11의 조정 인자는 시탈로프람(상표명: 셀렉사); 에스시탈로프람(상표명: 렉사프로); 플루옥세틴(상표명: 프로작); 파록세틴(상표명: 팍실, 펙세바); 세르트랄린(상표명: 졸로프트)으로부터 선택되는 선택적 세로토닌 재흡수 억제제인 것인 방법.
- <80> 4.11. p11/5-HT 수용체 관련 질환이 발병한 개체에 있어서 이 질병을 치료 또는 개선시키기 위한 제4 방법 ~ 제4.10 방법 중 임의의 방법에 의한 방법으로서, 상기 개체에 유효량의 p11 조정 인자 또는 모의체를 투여하여, 뉴런 원형질 막에서 p11 발현 및/또는 5-HT<sub>1B</sub> 또는 5-HT<sub>4</sub> 수용체를 조절(상향 또는 하향)하는 단계를 포함하는 것인 방법.
- <81> 4.12. 비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련된 질환을 앓고 있는 개체에서 이 질환을 치료 또는 개선시키기 위한 제4.11의 방법으로서, 상기 개체에 유효량만큼의 p11 조정 인자 또는 모의체를 투여하여, p11 발현을 상향 조절하거나, 5-HT<sub>1B</sub> 또는 5-HT<sub>4</sub> 수용체를 뉴런 원형질 막에 모집하는 단계를 포함하는 것인 방법.
- <82> 4.13. 제4.12에 의한 방법으로서, 상기 질환은 우울증, 강박증, 약물 중독, 섭식 장애, 주의력 결핍 장애 또는 주의력 결핍 과잉 행동 장애 및 알츠하이머병으로부터 선택되는 것인 방법.
- <83> 4.14. 상기 방법들 중 임의의 방법에 의한 방법으로서, 상기 p11/5-HT 수용체 관련 질환은 p11/5-HT<sub>1B</sub> 수용체

관련 질환인 것인 방법.

<84> 4.15. 상기 방법들 중 임의의 방법에 의한 방법으로서, 상기 p11/5-HT 수용체 관련 질환은 p11/5-HT<sub>4</sub> 수용체 관련 질환인 것인 방법.

<85> 4.16. 예를 들어, 본원에 개시된 바와 같이, p11/5-HT<sub>4</sub> 수용체 매개 질환을 치료하는 의약품을 제조하는 경우 예를 들어, 제4 방법 ~ 제4.15 방법 중 임의의 방법에 있어서, p11 조정 인자의 용도.

<86> 4.17. p11/5-HT<sub>4</sub> 수용체 매개 질환을 치료하는 경우 예를 들어, 제4 방법 ~ 제4.15 방법 중 임의의 방법에 있어서 사용되는 p11 조정 인자를 포함하는 약학 조성물.

<87> 다른 구체예에서, 본 발명은 p11/5-HT<sub>4</sub> 수용체 관련 질환이 발병한 환자 내에서 p11 발현을 증가시키거나 p11을 상향 조절하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 상기 환자의 뇌에서 p11을 발현하거나 또는 이 p11의 발현을 유도하는 핵산을 투여하는 과정을 포함하고, 상기 핵산은 상기 환자의 뇌에서 p11을 상향 조절하거나 이 p11의 발현을 증가시킨다(제5 방법). p11을 코딩하거나 또는 이 p11의 발현을 유도하는 핵산은, 이 핵산을 포함하는 벡터나 세포를 통하여 환자의 뇌에 투여되는 것이 바람직하다. 이와 같은 벡터는 적당한 전달 시스템 내에 포함된 DNA 또는 RNA의 형태 예를 들어, 리포솜-캡슐화 DNA 구조물의 형태를 가질 수 있거나, 또는 바이러스 벡터 예를 들어, 복제 결핍 아데노바이러스 벡터 또는 아데노-관련 바이러스 벡터의 형태를 가질 수도 있다. 바람직한 구체예에서, 상기 벡터는, 트랜스 유전자를 감염 세포에 통합하기 보다는 원하는 트랜스 유전자를 일시적으로 발현시키는 바이러스 벡터 예를 들어, 아데노바이러스 유래 벡터이다. 상기 벡터는 예를 들어, p11을 코딩하는 DNA의 발현을 제어하여, 표적 세포 내에서 p11을 발현시킬 수 있는 프로모터 예를 들어, 구성 프로모터(예를 들어, CMV 프로모터), 조직-특이적 프로모터(예를 들어, 뉴런-특이적 에놀라제(NSE) 프로모터) 또는 유도성 프로모터(예를 들어, 테트라사이클린 또는 독시사이클린 유도성 프로모터)에 작동 가능하도록 결합되어 있는, p11을 코딩하는 DNA를 포함할 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터는, 조직-특이적 프로모터의 제어 하에 있는 p11 DNA 구조물을 포함하고, 복제에 필수적인 하나 이상의 유전자(예를 들어, E1 유전자 및/또는 E3 유전자)의 기능성 복사체가 결여된, 재조합적으로 변형된 아데노바이러스일 수 있으므로, 이 바이러스는 조력 세포주(helper cell line) 또는 기타 환경(복제에 필수적인 유전자 또는 유전자들의 산물이 공급되는 환경) 하에서만 복제할 수 있다. 바이러스 벡터는 또한 원하는 세포에 대한 면역원성을 감소시키고/감소시키거나 이러한 세포에 벡터를 표적화하도록 만드는 표면의 변형을 포함할 수도 있다. CNS에 있어서 유전자 요법에 적당한 바이러스 벡터 예를 들어, CNS 세포에 표적화된 벡터 및, 트랜스 유전자의 발현에 있어서 조직 특이적이거나 유도성인 프로모터를 이용하는 벡터에 관하여는 당 업계에 공지되어 있다[예를 들어, Benitez, 외 다수, "Gene Therapy Targeting in Central Nervous System", Current Gene Therapy (2003) 3: 127-145; 본원에 참고용으로 인용됨]. 비-바이러스성 핵산 전달 시스템은 핵산이 세포막을 관통하는 것을 촉진하는 제제와 결합하거나 또는 이 제제와 복합체를 형성하는 핵산을 포함할 수 있다. 이러한 비-바이러스성 벡터 복합체의 예로서는, DNA의 응축을 촉진하는 다가 양이온 제제와 지질계 전달 시스템 예를 들어, 리포솜계 전달 시스템을 포함하는 제형을 포함한다. 다른 구체예에서, p11을 발현하거나 이 p11의 발현을 유도하는 핵산은 세포 예를 들어, 뉴런 줄기 세포에 의해 전달되며, 여기서, 환자의 뇌에 이식된 상기 뉴런 줄기 세포와 같은 세포는, p11 수준을 환자의 세포에 의해 발현되는 수준보다 높은 수준으로 발현한다. 세포의 공급원은 환자 또는 인간 공여자일 수 있다. p11은, p11 발현에 대하여 선택하고/선택하거나, 예를 들어, (i) p11 구조물, (ii) p11의 발현을 증가시키는 천연 p11 서열의 상류에 있는 프로모터, 또는 (iii) p11의 발현을 증가시키는 단백질을 코딩하는 구조물로 형질 전환 예를 들어, 세포 외 형질 전환시킴으로써, 이식된 세포 내에서 발현될 수 있다. 상기 세포는 예를 들어, 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터를 이용하여 안정적으로 형질 전환되고, 이 구조물은 세포의 계놈에 통합되는 것이 바람직하다. 세포성 벡터 또는 바이러스 벡터는 또한, 숙주 세포를 갠사이클로버에 감수성이 되도록 만들어주는 "안전성 유전자(safety gene)" 예를 들어, 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제 유전자(HSV-tk)를 포함할 수도 있으므로, 만일 세포가 암 세포로 되거나 바이러스가 환자에 침투하게 되면, 이 세포 또는 바이러스는 쉽게 파괴될 수 있거나, 또는 환자에게 유해할 위험도 따르게 된다. 바람직한 구체예에서, p11의 발현을 증가시키는 핵산(예를 들어, p11을 발현하는 구조물을 포함하는 세포 또는 바이러스 벡터)은 뇌 내 투여를 통해 표적화된 세포 예를 들어, 해마 부위에 도입된다. 핵산은 치료시 1회 투여될 수 있거나 또는 복수 회 투여될 수 있다.

<88> 그러므로, 본 발명은 다음과 같은 방법들을 제공하기도 한다:

<89> 5.1. p11의 발현을 증가시키는 제5 방법.

- <90> 5.2. 제5 또는 제5.1 방법에 있어서, 핵산 구조물이 뇌 세포 내에서 p11을 발현시킬 수 있는 것인 방법.
- <91> 5.3. 제5, 제5.1 및 제5.2 방법에 있어서, p11/5-HT 수용체 관련 질환은 비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련된 질환 예를 들어, 우울증, 강박증, 약물 중독, 섭식 장애, 주의력 결핍 장애 또는 주의력 결핍 과잉 행동 장애 및 알츠하이머병으로부터 선택되는 질환인 것인 방법.
- <92> 5.4. 제5, 제5.1 및 제5.2 방법에 있어서, p11/5-HT 수용체 관련 질환은 불안 장애 또는 우울증인 것인 방법.
- <93> 5.5. 제5, 제5.1 및 제5.2 방법에 있어서, p11/5-HT 수용체 관련 질환은 우울증인 것인 방법.
- <94> 5.6. 제5, 제5.1 또는 제5.5 방법에 있어서, 상기 p11 코딩 핵산은 p11 코딩 DNA를 포함하는 복제력-결핍 아데노바이러스 벡터에 의해 전달되는 것인 방법.
- <95> 5.7. 제5.6 방법에 있어서, p11을 코딩하는 DNA는 조직 특이적 프로모터 예를 들어, NSE 프로모터의 제어 하에 있는 것인 방법.
- <96> 5.8. 제5, 제5.1 또는 제5.5 방법에 있어서, 상기 p11을 코딩하는 핵산은 p11 구조물로 형성 전환된 줄기 세포에 의해 전달되는 것인 방법.
- <97> 5.9. 제5 또는 제5.1 ~ 제5.8 방법 중 임의의 방법에 있어서, 상기 p11의 핵산은 뇌 내 투여에 의해 도입되는 것인 방법.
- <98> 5.10. 제5 또는 제5.1 ~ 제5.8 방법 중 임의의 방법에 있어서, 상기 p11의 핵산은 해마에 도입되는 것인 방법.
- <99> 본원 및 청구의 범위에 사용된 바와 같이, 단수의 개념을 나타내는 "하나", "하나의" 및 "상기"와 같은 용어들은 본원의 내용 중 달리 언급이 없는 한 복수의 개념도 포함한다. 그러므로, 예를 들어, "항체"라는 용어는 하나 이상의 항체와 당 업자에게 공지된 이의 균등물 등을 의미하는 것이다. "하나의" p11/5-HT<sub>1B</sub> 수용체 매개 질환의 치료법으로서는 이와 같은 질환들 다수의 치료법을 포함할 수 있다.
- <100> 본원에 있어서 "p11"이란 용어는, 인간 또는 기타 임의의 종으로부터 유래하는 p11 폴리펩티드의 임의의 형태의 것들과 모든 형태의 것들 예를 들어, 일부 형태, 아형, 전구체형, 전장 폴리펩티드, p11 서열 또는 상기한 것들 중 임의의 것의 단편들을 함유하는 융합 단백질을 의미한다.
- <101> 본원에 있어서 "p11/5-HT 수용체 관련 질환"이라는 어구는, p11 단백질 및 5-HT 수용체 특히, 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 또는 5-HT<sub>4</sub> 수용체로의 상기 단백질의 이동에 의해 매개되거나, 이와 관련되었거나, 이에 의해 유발되거나, 이에 의해 영향을 받거나, 이에 의해 촉진되거나 또는 이것이 관여하는 임의의 질환을 의미한다. p11/5-HT 수용체 관련 질환으로서는 정신과 질환(예를 들어, 우울증, 불안 장애, 공격성, 조증, 양극성 장애, 주의력 결핍 장애, 주의력 결핍 과잉 행동 장애, 알츠하이머병, 약물 중독 및 강박증), 수면 장애(예를 들어, 불면증), 섭식 장애(예를 들어, 폭식증), 성 기능 장애 및 위장 장애(예를 들어, 과민성 대장 증후군)을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본원에 있어서 "비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련된 질환"이란, 질환 예를 들어, 우울증, 강박증, 약물 중독, 섭식 장애, 주의력 결핍 장애 또는 주의력 결핍 과잉 행동 장애 또는 알츠하이머병을 의미하며, 특히, 우울증을 의미한다. 이와 유사하게, "비정상적으로 높은 p11 수준과 관련된 질환"이란, 질환 예를 들어, 조증, 양극성 장애, 불안 장애, 공격성, 수면 장애, 성 기능 장애 및 위장 장애를 의미한다.
- <102> "p11 조정 인자(p11 modulator)"란 어구는, p11 단백질을 코딩하는 유전자의 발현, p11 유전자 또는 cDNA의 mRNA로의 전사, p11 mRNA의 단백질로의 번역, p11 단백질의 번역후 변형, p11 단백질의 세포 내 또는 세포 외 국소화, 또는 세포 막 내부 또는 위 또는 세포 내에 국소화된 p11의 양을, 유사한 세포 내 p11 활성과는 다르게, 변화(증가 또는 감소)시킬 수 있는 임의의 물질 또는 화합물(예를 들어, 본원에 개시된 바와 같은 소분자 또는 폴리펩티드) 또는 치료 방법(예를 들어, 전기 충격 요법)을 의미한다. "p11 조정 인자"라는 용어는 또한, p11 단백질이 5-HT<sub>1B</sub> 수용체를 뉴런 원형질 막에 모집하는 능력에 (양으로 또는 음으로) 영향을 미칠 수 있는 임의의 물질을 의미한다. 비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련된 질환 예를 들어, 우울증을 치료하는데 유용한 p11 조정 인자의 예로서는, 삼환성 항우울제(예를 들어, 이미프라민(토프라닐®), 아미트립틸린(엘라빌®), 엔넵(ENDEP)®, 트립타놀(TRYPTANOL)®, 클로미프라민(아나프라닐(ANAPRANIL)®), 데시프라민(노르프라민(NORPRAMIN)®, 페토프란(PERTOFRANE)®), 로페프라민(가마닐(GAMANIL)®, 로몬트(LOMONT)®), 노르트립틸린(파벨로®), 트리미프라민(서몬틸(SURMONTIL)®)을 포함한다. 낮은 p11 수준과 관련된 질환(예를 들어, 우울증)을 치료 또는 개선시키는데 유용한 기타 조정 인자로서는 모노아민 산화 효소 억제제(MAOI)(예를 들어, 트레닐사이프로민(파네이트), 이소카복사지드(마플란), 모클로베마이드(오로릭스(Aurorix), 마네릭스(Manerix), 모

클로두라(MOCLODURA®) 또는 페넬진(나르딜(Nardil)) 및 선택적 세로토닌 재흡수 억제제(예를 들어, 시탈로프람(상표명: 셀렉사); 에스시탈로프람(상표명: 렉사프로); 플루옥세틴(상표명: 프로작); 파록세틴(상표명: 팩실, 팩세바); 세르트랄린(상표명: 졸로프트))를 포함한다.

<103> 통상의 스크리닝 검정법(시험관 내 및 생체 내 스크리닝 검정법)은 p11 활성 및/또는 p11 유전자 발현을 억제 또는 유도하는 조정 인자를 동정하는데 사용될 수 있다. 이와 같은 검정법의 하나로서는 유전자 리포터 검정법이 있는데, 이 방법에서는, p11 결합 위치의 하류에 마커 유전자(예를 들어, 루시페라제 또는 녹색 형광 단백질(GFP))를 포함하는 리포터 구조물로 형질 감염된 세포를 후보 조정 인자 화합물과 접촉시키며, 마커 단백질의 발현량에 있어서의 변화를 측정하여, 그 결과를 어떠한 조정 인자와도 접촉하지 않은 형질 감염 세포 시료의 경우와 비교한다. 마커 단백질 발현을 억제 또는 유도하는 후보 조정 인자는 P11/5-HT 수용체 관련 질환의 치료에 유용한 약물인 것으로 동정된다. 마커 단백질 발현을 억제하는 후보 조정 인자는 비정상적으로 높은 p11 수준과 관련된 질환의 치료를 위한 약물 후보 물질로서 유용할 것인 반면에, 마커 단백질 발현을 유도하는 후보 조정 인자는 비정상적으로 낮은 p11 수준과 관련된 질환의 치료를 위한 약물 후보 물질로서 유용할 것이다.

<104> p11 조정 인자로서는 예를 들어, 유리된 형태 또는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태를 가지는 천연 또는 비천연 화학 화합물, 센스 또는 안티센스 p11 올리고뉴클레오타이드, p11에 대한 억제 항체, p11-수용체 차단 펩티드, p11 길항 물질, siRNA, 삼중 나선 DNA, 리보자임, RNA 앵타머 및/또는 이중 사슬 RNA를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 "안티센스"라는 용어는 특이적인 DNA 또는 RNA 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 그러므로, "p11 안티센스 폴리뉴클레오타이드"란 용어는, p11 DNA 또는 RNA 서열에 상보적인 임의의 뉴클레오타이드 서열을 의미하는 것이다. 기능상, p11 안티센스 폴리뉴클레오타이드는 세포 내 p11 단백질의 발현을 감소시킬 수 있다. "안티센스 사슬"이란 용어는, "센스" 사슬과 상보적인 핵산 사슬을 의미하는 것으로 사용된다. 안티센스 분자는 임의의 방법 예를 들어, 상보성 사슬의 합성을 허용하는 바이러스 프로모터에 대하여 역 배향으로 목적 유전자(들)를 결합시킴으로써 합성하는 방법에 의해 생산될 수 있다. 이 안티센스 분자가 일단 세포에 도입되면, 전사된 사슬은 세포에 의해 생산된 천연 서열과 합하여져 이중체를 형성하게 된다. 이후, 이와 같은 이중체는 추가의 전사 또는 번역을 차단하게 된다. "네거티브"라는 용어는 종종, 안티센스 사슬에 대하여 사용되며, "포지티브"라는 용어는 종종 센스 사슬에 대하여 사용된다. 이와 유사하게, 본원에 사용된 "센스"라는 용어는 번역되어 특이적인 폴리펩티드 또는 이의 단편을 생산할 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 그러므로, "p11 센스 폴리뉴클레오타이드"란, 번역되어 p11 폴리펩티드 또는 이의 단편을 생산할 수 있는 임의의 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 기능상, p11 센스 폴리뉴클레오타이드는 세포 내 p11 단백질의 발현을 증가시킬 수 있다.

<105> 구체적으로, p11의 발현을 핵산 수준에서 억제하는 물질로서는, p11 핵산의 적당한 뉴클레오타이드 서열에 대한 리보자임, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 삼중 나선형 DNA, RNA 앵타머 및/또는 이중 사슬형 RNA를 포함할 수 있다. 이와 같은 억제 분자는 과도한 부담 없이, 또는 부벽절한 실험을 수행하지 않고서도 당 업자에 의하여 통상의 기술로써 생산될 수 있다. 예를 들어, 유전자 발현에 대한 변화(예를 들어, 억제)는, 안티센스 분자, DNA 또는 RNA를, 본원에서 논의되는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 제어부 즉, 프로모터, 인핸서 및 인트론에 디자인함으로써 이루어질 수 있다. 예를 들어, 전사 개시 위치로부터 유래하는 올리고뉴클레오타이드 예를 들어, 개시 위치로부터 -10 ~ +10 위치 사이의 올리고뉴클레오타이드를 사용할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 유전자의 모든 부위는 mRNA와 가장 강력하게 혼성화되는 분자들을 만들기 위한 안티센스 분자를 디자인하는데 사용될 수 있으며, 이와 같이 적당한 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 당 업자에게 익숙한 표준 검정법에 의해 생산 및 동정될 수 있다.

<106> 이와 유사하게, 유전자 발현은 "삼중 나선" 염기-쌍 형성법을 이용하면 억제될 수 있다[Gee, J.E.외 다수(1994), Huber, B.E. and B. I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N. Y.]. 이와 같은 분자들은 또한 전사체가 리보솜에 결합하는 것을 막아줌으로써 mRNA의 번역을 차단하도록 디자인될 수도 있다. 리보자임 즉, 효소성 RNA 분자는 또한 RNA를 특이적으로 절단하는 것을 촉진함으로써 유전자 발현을 억제하는데 사용될 수도 있다. 리보자임의 작용 기작은, 리보자임 분자를 상보성 표적 RNA에 서열 특이적으로 혼성화한 다음, 핵 내 절단하는 과정을 포함한다. 사용될 수 있는 예로서는, 유전자 서열 예를 들어, p11에 대한 유전자의 핵 내 절단을 특이적이면서 효과적으로 촉진하도록 디자인될 수 있는, 조각형 "해머머리(hammerhead)" 또는 "헤어 핀(hair pin)" 모티프 리보자임 분자를 포함한다. 임의의 잠재 RNA 표적 내에 존재하는 특이적 리보자임 절단 위치는, 처음에, 다음과 같은 서열들을 포함하는 리보자임 절단 위치에 대한 표적 분자를 스캐닝함으로써 동정된다: GUA, GUU 및 GUC. 일단 동정되면, 15~20개의 리보뉴클레오타이드로 이루어진 짧은 RNA 서열(절단 위치를 함유하는 표적 유전자 부위에 상응하는 서열)은 올리고뉴클레오타이드가 작동을 하지

못하도록 만들 수 있는, 제2의 구조상의 특징에 대해 평가될 수 있다[Grassi and Marini, 1996, Annals of Medicine 28: 499-510; Gibson, 1996, Cancer and Metastasis Reviews 15: 287-299; Cotten외 다수, 1989 EMBO J. 8:3861-3866]. RNA 앵타머는 또한 세포에 도입되거나 세포 내에서 발현되어, RNA의 출현 빈도(abundance) 또는 활성을 변화시킬 수 있다. 예를 들어, RNA의 번역을 특이적으로 억제할 수 있는 Tat 및 Rev RNA(Good외 다수, 1997, Gene Therapy 4: 45-54)에 대한 RNA 앵타머는 단백질에 대한 특이적인 RNA 리간드이다. 통상의 이중 사슬 RNA 기술을 이용하면, 유전자 발현을 유전자 특이적으로 억제할 수도 있다. 이와 같은 기술에 대한 설명은 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용되어 있는 WO 99/32619에서 살펴볼 수 있다.

- <107> 본 발명의 안티센스 분자, 삼중 나선 DNA, RNA 앵타머 및 리보자임은 핵산 분자의 합성을 위한 방법으로서 당 업계에 공지된 임의의 방법에 의하여 제조될 수 있다. 이와 같은 기술로서는, 화학 합성된 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법 예를 들어, 고상 포스포라미다이트 화학 합성법을 포함한다. 대안적으로, RNA 분자는 본원에 논의된 폴리펩티드의 유전자를 코딩하는 DNA 서열의 시험관 내 및 생체 내 전사에 의해 생산될 수 있다. 이러한 DNA 서열은 적당한 RNA 중합 효소 프로모터 예를 들어, T7 또는 SP6와 함께 다양한 벡터에 통합될 수 있다. 대안적으로, 안티센스 RNA를 구성적으로 또는 유도적으로 합성하는 cDNA 구조물은 세포주, 세포 또는 조직에 도입될 수 있다.
- <108> 본 발명의 siRNA 분자는 2개의 상보성 단일 사슬 RNA 분자들을 함께 어닐링하거나(이 분자들 중 하나는 표적 mRNA의 일부와 매치됨)(Fire외 다수, 미국 특허 제 6,506,559호), 또는 그 자체가 뒤로 접힌 하나의 헤어핀 RNA 분자를 사용하여, 필요한 이중 사슬부를 생산하는 방법을 통하여(Yu외 다수 (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:6047-52) 생산될 수 있다. siRNA 분자는 화학 합성될 수 있거나(Elbashir외 다수 (2001) Nature 411:494-98), 또는 단일 사슬 DNA 주형을 이용하는 시험관 내 전사에 의해 생산될 수 있다(Yu외 다수, 상동). 대안적으로, 상기 siRNA 분자는, 센스 및 안티센스 siRNA 서열을 함유하는 발현 벡터(들)를 이용하여, 일시적으로 [Yu외 다수, 상동; Sui외 다수 (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:5515-20], 또는 안정적으로[Paddison외 다수 (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:1443-48], 생물학 방법에 의해 생산될 수 있다. 최근 들어, 추후 siRNA로 추가 가공되는 헤어핀 RNA를 발현하는 아데노바이러스 벡터를 이용하여, 1차 인간 세포 내 표적 mRNA의 수준이 효과적으로 그리고 서열-특이적 방식으로 감소된다는 사실이 입증되었다[Arts외 다수 (2003) Genome Res. 13:2325-32].
- <109> 본원에 사용된 바와 같이, "p11 활성화"이란 어구는, p11과 5-HT<sub>1B</sub> 수용체의 상호 작용에 (양으로 또는 음으로) 영향을 주는, p11의 직접적인 생화학적 활성화 또는 p11과 관련된 간접적인 활성을 의미한다. 5-HT<sub>1B</sub> 수용체와 함께 p11의 활성을 증가시키는 조정 인자는, 5-HT<sub>1B</sub> 수용체를 뉴런 원형질 막에 모집하는 p11 단백질의 능력을 증가시키기 위하여, p11과 5-HT<sub>1B</sub> 수용체의 결합 특성을 증가시켜주는 임의의 물질일 수 있다. 역으로, 5-HT<sub>1B</sub> 수용체와 함께 p11의 활성을 억제 또는 감소시키는 조정 인자는, 5-HT<sub>1B</sub> 수용체를 뉴런 원형질 막에 모집하는 p11 단백질의 능력을 감소시키기 위하여, p11과 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 사이의 상호 작용을 차단 또는 감소시켜주는 임의의 물질일 수 있다.
- <110> "p11 모의체"라는 용어는, p11 단백질의 구조, 기능, 특성 및/또는 활성을 모의하여, 뉴런 원형질 막에서의 5-HT<sub>1B</sub> 수용체의 생체 이용률을 조정, 조절 또는 증가시키는, 천연 또는 비 천연 물질 또는 폴리펩티드 또는 이의 임의의 단편을 의미한다. p11 모의체는 전체적으로나 부분적으로 p11을 모의할 수 있다.
- <111> "개체"란 용어는, 임의의 인간 또는 인간 이외의 유기체를 의미한다.
- <112> "대조군 개체"란 용어는, p11/5-HT 수용체 관련 질환, 증후군, 질병, 병상 및/또는 이 질환의 증상이 발생하지 않으며/않거나, 발생한 것으로 의심되지 않는 임의의 인간 또는 인간 이외의 유기체를 의미한다.
- <113> "생물 시료"란 용어는, 예를 들어, p11 단백질, 폴리펩티드, 올리고뉴클레오티드, mRNA 또는 폴리뉴클레오티드 또는 이것들 중 임의의 것의 임의의 단편을 함유하는, 유기체, 체액, 노폐물, 세포 또는 이 것들의 세포의 일부, 세포주, 생검편, 조직 배양액 또는 기타 공급원으로부터 얻어지는 생물학적 물질을 포함하는 임의의 시료를 포함할 수 있다.
- <114> p11/5-HT 수용체 관련 질환의 "양성 진단"이란, 관찰 대상인 개체의 p11 수준이, p11/5-HT 수용체 관련 질환을 앓고 있지 않으며/않거나 이 질환을 앓고 있는 것으로 의심되지 않는 대조군 개체의 p11 수준에 비하여 비정상적인 경우를 의미한다. 비정상적인 수준이란, 대조군 개체의 수준보다 높거나 낮은 수준을 의미한다. 예를 들어, 우울증에 대해 양성 진단을 받은 개체의 p11 수준은, 우울증 및/또는 이에 따른 증상이 발생하지 않으며/

않거나, 발생한 것으로 의심되지 않는 대조군 개체의 p11 수준에 비하여 낮다. 다시 말해서, 불안 장애 상태에 대해 양성 진단을 받은 개체의 p11 발현 수준은, 불안 장애 및/또는 이에 따른 증상이 발생하지 않으며/않거나, 발생한 것으로 의심되지 않는 대조군 개체의 p11 발현 수준에 비하여 높다.

- <115> p11의 수준은 p11을 발현하는 유형의 개체로부터 유래하는 조직 또는 세포의 시료 중 p11 단백질 수준을 검정함으로써 측정될 수 있다. 예를 들어, 단핵구 및/또는 림프구가 사용될 수 있다. 이와 유사하게, p11 수준은 또한, 시료 중 p11 mRNA 수준에 대해 검정함으로써 측정될 수도 있다. p11 유전자 발현 수준(예를 들어, mRNA 수준)은 당 업자에 익숙한 방법 예를 들어, 통상의 노던 분석법 또는 시판중인 마이크로 어레이를 사용하는 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 뿐만 아니라, 테스트 화합물의 p11 억제 효과 및/또는 관련 조절 단백질의 수준은, ELISA 항체계 검정법 또는 형광 표지화 반응 검정법으로 검출될 수 있다. 개체 내 p11 단백질 또는 mRNA의 수준이 참고 기준 예를 들어, 대조군 개체 또는 대조군 군집(또는 대조군 군집을 대상으로 선행된 측정 결과를 바탕으로 하는 참고 기준)에 비하여 비정상적이라는 사실은, p11/5-HT 수용체 관련 질환을 양성 진단하는 것에 대한 근거가 된다. 그러므로, 개체 내 p11 수준이, 참고 기준의 p11 수준에 비하여 높음은 곧, 높은 p11 수준과 관련된 질환 예를 들어, 조증, 양극성 장애, 불안 장애, 공격성 장애, 수면 장애, 성 기능 장애 및 위장 장애(예를 들어, IBD)에 대한 양성 진단의 근거가 된다. 다른 한편으로, 개체 내 p11 수준이, 대조군 개체의 p11 수준에 비하여 감소하였거나 낮음은 곧, 낮은 p11 수준과 관련된 질환 예를 들어, 우울증, 강박증, 약물 중독, 섭식 장애, 주의력 결핍 장애 또는 주의력 결핍 과잉 행동 장애에 대한 양성 진단의 근거가 된다. 바람직한 구체 예에서, 본 발명은 우울증을 앓고 있는 개체의 진단 방법을 포함하는데, 이 방법은, 상기 개체 내에서 p11 수준을 검정하고, 이 수준을 대조군 개체 내 p11 수준과 비교하는 단계를 포함하며, 여기서, 상기 개체 내 p11 수준이 대조군 개체 내 p11 수준에 비하여 낮음은 곧, 우울증에 대한 양성 진단의 근거가 된다.
- <116> 본원에 사용된 바와 같이, "항체"란 용어는, 에피토프 결정기와 결합할 수 있는 비 변형(intact) 분자 및 이의 단편 예를 들어, Fa, F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv를 의미한다. 비 변형 폴리펩티드 또는 이의 단편을 포함하는 목적 소형 펩티드를 면역화 항원으로 사용함으로써, p11 폴리펩티드와 결합하는 항체를 제조할 수 있다. 동물을 면역화하는데 사용되는 폴리펩티드 또는 펩티드는, RNA를 번역하여 얻을 수 있거나 화학적으로 합성할 수 있으며, 또한 원한다면, 담체 단백질에 접합될 수도 있다. 펩티드에 화학적으로 커플링된, 통상적으로 사용되는 담체로서는, 소혈청 알부민과 티로글로불린을 포함한다. 이후, 커플링된 펩티드는 동물(예를 들어, 마우스, 래트 또는 토끼)을 면역화하는데 사용된다.
- <117> 환자의 치료법을 최적으로 만들기 위한 고려 인자로서는, 치료될 특정 병상, 치료될 특정 포유동물, 개별 환자의 임상학적 병상, 활성 화합물의 전달 위치, 활성 화합물의 특정 유형, 투여 방법, 투여 스케줄, 그리고 의료업계 실무자들에게 알려진 기타 인자들을 포함한다. 투여될 활성 화합물의 치료학적 유효량은 이와 같은 고려 사항들에 의해 정해될 것이며, 그 양은 p11 매개 질환, 바람직하게는 우울증 치료에 필요한 최소량이다.
- <118> p11에 대한 적당한 항체 또는 관련 조절 단백질은 상업적 공급처로부터 구할 수 있거나, 아니면 통상의 방법에 따라서 생산될 수 있다. 예를 들어, 본원에는, 상이하게 발현된 하나 이상의 유전자 에피토프를 특이적으로 인지할 수 있는 항체를 생산하는 방법에 관하여 기술되어 있다. 이와 같은 항체로서는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체(mAb), 인간화된 항체 또는 키메라 항체, 단일 사슬 항체, Fab 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생산된 단편, 항-유전자형(항-Id) 항체, 그리고 상기한 것들 중 임의의 것의 에피토프-결합 단편을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <119> 본원에 기술된 p11 폴리펩티드에 대한 항체를 생산함에 있어서, 다양한 숙주 동물에 폴리펩티드 또는 이의 일부를 주사함으로써, 이 숙주 동물들을 면역화할 수 있다. 이와 같은 숙주 동물로서는 토끼, 마우스 및 래트를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 숙주의 종에 따라서, 다양한 애주반트 예를 들어, 프론트(완전 및 불완전) 애주반트, 무기 겔 예를 들어, 수산화알루미늄, 표면 활성화 물질 예를 들어, 리소레시틴, 플루론산 폴리올, 다가 음이온, 펩티드, 오일 에멀전, 키홀 림펫(keyhole limpet) 헤모시아닌, 디니트로페놀 및 잠재적으로 유용한 인간의 애주반트 예를 들어, BCG(바실레 칼메트-구에린; bacille Calmette-Guérin) 및 코린박테리움 파르븀(*Corynebacterium parvum*)을 사용함으로써 면역 반응을 증강시킬 수 있다.
- <120> 폴리클로날 항체는 항원 예를 들어, 표적 유전자 생산물, 또는 이의 항원 활성을 가지는 유도체로 면역화된 동물의 혈청으로부터 유래되는 항체 분자의 이종 군집이다. 폴리클로날 항체를 생산함에 있어서, 숙주 동물 예를 들어, 전술한 동물들에 폴리펩티드 또는 이의 일부를 주사함으로써, 이 동물들을 면역화할 수 있으며, 이때, 전술한 바와 같은 애주반트로 보강할 수 있다.
- <121> 특정 항원에 대한 항체의 동질 군집인 모노클로날 항체는, 배양액 중 연속 세포주에 의한 항체 분자를 생산하는

임의의 기술 예를 들어, 당 업계에 널리 공지된 기술을 통해 생산될 수 있다. 이와 같은 항체는 임의의 면역 글로불린 군 예를 들어, IgG, IgM, IgE, IgA 및 IgD와 이것들의 임의의 하위 군에 속하는 것, 바람직하게는 IgG일 수 있다. 본 발명의 mAb를 생산하는 하이브리도마 또는 형질 전환 세포주는 시험관 내 또는 생체 내에서 배양될 수 있다. 대안적으로, 단일 사슬 항체를 생산하는 것으로서 개시된 기술은 상이하게 발현되는 유전자-단일 사슬 항체를 생산하도록 적합하게 변형될 수 있다. 아미노산 가교를 통하여 Fv부의 중쇄 단편 및 경쇄 단편을 결합시킴으로써, 단일 사슬 폴리펩티드를 형성하면, 단일 사슬 항체가 생산된다.

<122> 본원에 개시된 항체는, 시험관 내 또는 생체 내에서 행하여지는 표준적인 ELISA, FACS 분석법, 그리고 표준 영상화 기술을 이용하여 검출될 수 있다. 항체를 검출 가능한 물질과 커플링(즉, 물리적으로 결합)함으로써 검출 과정이 촉진될 수 있다. 검출 가능한 물질의 예로서는 다양한 효소, 보결 분자단, 형광 물질, 발광 물질, 생물 발광 물질 및 방사성 물질을 포함한다. 적당한 효소의 예로서는 호오스 래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 3-갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스터라제를 포함하며; 적당한 보결 분자단 복합체의 예로서는, 스트렙타비딘/바이오틴 및 아비딘/바이오틴을 포함하고; 적당한 형광 물질의 예로서는, 옴벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오세인, 염화덴실 또는 피코에리트린을 포함하며; 발광 물질의 예로서는 루미놀을 포함하고; 생물 발광 물질의 예로서는, 루시페라제, 루시페린 및 애쿠오린을 포함하며; 적당한 방사성 물질의 예로서는, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>35</sup>S 또는 <sup>3</sup>H를 포함한다.

<123> 예를 들어, 통상의 전방향 검정법(forward assay)에 있어서, 표지화되지 않은 항체는 고체 기질상에 고정시키고, 테스트될 시료는 결합된 분자들과 접촉시킨다. 항은 처리에 적당한 만큼의 기간이 경과한 후에, 항체-항원의 2원성 복합체를 형성시키기에 충분한 시간 동안, 검출 가능한 신호를 유도할 수 있는 리포터 분자로 표지화된 제2의 항체를 첨가하여, 항체-항원-표지화된 항체로 구성된 3원성 복합체를 형성하기에 충분한 시간 동안 항은 처리한다. 이후 임의의 미반응 물질을 씻어내고, 항원의 존재는 신호를 관찰함으로써 확인되거나, 또는 공지의 양만큼의 항원을 함유하는 대조군 시료와 비교함으로써 정량될 수 있다. 전방향 검정법의 변형으로서, 결합된 항체에 시료와 항체 둘다를 동시에 부가하는 동시 검정법(simultaneous assay), 또는 표지된 항체와 테스트될 시료를 처음에 결합시킨 후 항은 처리하여, 비 표지화 표면 결합 항체에 부가하는 역 검정법(reverse assay)을 포함한다. 이와 같은 기술들은 당 업자에게 널리 공지되어 있으며, 최소한의 변형이 가하여질 가능성이 있음은 쉽게 알 수 있을 것이다. 본원에 사용된 "샌드위치 검정법(sandwich assay)"은, 기본적인 2-위치 기술을 바탕으로 하는 모든 변형들을 포함하는 것이다. 본 발명의 면역 검정법에 있어서, 유일한 제한 요인은, 표지화된 항체가 p11 폴리펩티드 또는 관련 조절 단백질 또는 이의 단편에 특이적인 항체라는 점이다.

<124> 가장 일반적으로 사용되는 리포터 분자로서는 효소, 형광단-함유 분자 또는 방사성 핵종-함유 분자가 있다. 효소 면역 검정법의 경우, 효소는 일반적으로 글루타르알데히드 또는 과요드산염을 통하여 제2의 항체에 접합된다. 그러나, 용이하게 파악할 수 있는 바와 같이, 당 업자에게 널리 공지된 다수의 상이한 결찰 기술이 존재한다. 일반적으로 사용되는 효소로서는 호오스 래디쉬 퍼옥시다제, 글루코스 산화 효소, 베타-갈락토시다제 및 알칼리성 포스파타제 등을 포함한다. 특이적 효소와 사용될 기질은 일반적으로, 해당 효소에 의해 가수 분해될 때, 색상 변화가 검출되는 것으로 선택된다. 예를 들어, 인산 p-니트로페닐은 알칼리성 포스파타제 접합체와 함께 사용되기 적당하고; 퍼옥시다제 접합체의 경우에는, 일반적으로 1,2-페닐렌디아민 또는 툴루이딘이 사용된다. 뿐만 아니라, 전술한 바와 같은 발색 기질보다는 형광 생성물을 생성하는 형광 발생 기질을 사용할 수도 있다. 이후, 적당한 기질을 함유하는 용액을 3원성 복합체에 첨가한다. 이 기질은 제2 항체와 결합된 효소와 반응하여, 추가로 정량시(일반적으로 분광 분석에 의한 정량시) 혈청 시료 중 존재하는 목적 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 단편의 양을 평가할 수 있는, 정성학적으로 관찰 가능한 신호를 발생시킨다.

<125> 대안적으로, 형광 화합물 예를 들어, 플루오레세인과 로다민은 이것들의 결합 능력을 변질시켜 항체와 화학적으로 커플링될 수 있다. 특정 파장의 빛으로 조사하여 활성화될 때, 형광 색소-표지화된 항체는 빛 에너지를 흡수하여 분자 내에서 여기 상태가 되고, 특징적으로 긴 파장의 빛을 발광하게 된다. 발광은 특징적인 색으로 나타나서, 광학 현미경으로 관찰할 수 있다. 면역 형광 기술 및 EIA 기술은 둘 다 당 업계에 널리 확립되어 있는 기술로서, 본 발명의 방법에 특히 바람직하다. 그러나, 기타 리포터 분자 예를 들어, 방사성 동위 원소, 화학 발광 분자 또는 생물 발광 분자도 사용할 수 있다. 필요한 용도에 맞추어서 어떻게 방법에 변형을 가할 수 있는지는 당업자가 쉽게 알 수 있을 것이다.

<126> 항체를 치료용으로 사용할 때, 이 항체는 이것의 면역원성을 최소화하기 위하여 인간의 불변부를 가지는 것이 바람직하다. 인간 항체 분자의 불변부를 코딩하는 DNA와 함께, 항원과의 특이성이 적당한 공여 항체 분자로부터 가변부를 코딩하는 DNA를 스플라이싱함으로써 키메라 항체를 제조할 수 있다. 항체는 인간화된 항체를 제공하도

록 추가로 변형될 수 있는데, 이때 항체는 추가로 변형되어, 인간 이외의 것의 잔기가 제거된다. 대부분의 경우, 인간화된 항체는, 수용 항체의 상보성 결정부(CDR)로부터 유래하는 잔기가 인간 이외의 종(공여 항체) 예를 들어, 마우스, 래트 또는 토끼의 CDR로부터 유래하는 잔기에 의해 치환된 것으로서, 원하는 특이성, 친화성 및 수용 능력을 가지는 인간의 면역 글로불린(수용 항체)이다. 몇몇 경우에 있어서, 인간 면역 글로불린의 Fv 틀 부위(FR) 잔기는 상응하는 인간 이외의 동물의 잔기에 의해 치환된다. 인간화된 항체는 수용 항체 또는 도입된 CDR 또는 틀 서열 중 어느 곳에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이와 같은 변형은 항체의 기능을 추가로 재정비 및 최적화하도록 가하여진다. 일반적으로, 인간화된 항체는 하나 이상, 통상적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 전부 포함할 것인데, 여기서, CDR 부위 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 이외의 동물의 면역 글로불린의 CDR 부위에 해당하며, FR 부위 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 면역 글로불린 공통 서열의 FR 부위에 해당한다. 인간화된 항체는 또한, 면역 글로불린 불변부 또는 불변 도메인(Fc)의 최소한의 일부, 통상적으로는 인간 면역 글로불린의 불변부 또는 불변 도메인(Fc)의 최소한의 일부를 포함할 수도 있을 것이다. 대안적으로, 인간 이외의 공급원으로부터 유래하되, 전체 유전자가 인간의 면역 글로불린 유전자인 항체는, 예를 들어, 파지 디스플레이 기술 또는 유전자 이식 동물 예를 들어, 인간의 IgV 및 IgC 유전자를 가지는 유전자 이식 마우스를 이용하여 제조될 수 있으며, 이와 같은 항체는 최소의 면역원성을 나타내야 할 것이다.

<127> 본원에 사용된 "치료학적 유효량"이란, p11/5-HT 수용체 관련 질환의 병리학적 증상을 치료 또는 개선시키는데 충분한 약물의 양을 의미한다. 예를 들어, p11/5-HT 수용체 관련 질환의 병리학적 증상을 치료 또는 개선시키는데 충분한 p11 조정 인자의 치료학적 유효량은, 뉴런 원형질 막에서 p11 발현을 유도 또는 억제하거나, 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 수준을 조절(상향 또는 하향 조절)하는데 충분한 양이다. 그러므로, 우울증의 병리학적 증상을 치료 또는 개선시키는데 충분한 p11 조정 인자의 치료학적 유효량은, p11의 발현을 유도하거나, 또는 5-HT<sub>1B</sub> 수용체를 뉴런 원형질 막에 모집하는 p11의 능력을 증가시키는데 충분한 양이다. 이와는 반대로, 불안 장애의 병리학적 증상을 치료 또는 개선시키는데 충분한 p11 조정 인자의 치료학적 유효량은, 뉴런 원형질 막에서의 p11의 발현을 억제하거나, 또는 이 뉴런 원형질 막에서의 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 수준을 하향 조절하는데 충분한 양이다. p11 조정 인자는 당 업계에 공지된 방법 예를 들어, 정맥 내, 피하, 근육 내, 경피 또는 뇌 내 투여 경로를 통하여 투여될 수 있다. 투여는 일정 기간에 걸쳐 주사하거나, 서방형 제형을 천천히 주입하거나 투여함으로써 신속하게 이루어질 수 있다.

<128> "p11 녹-아웃(p11 knock-out)"이란 어구는, 결함, 변형 또는 돌연 변이가 전체적으로 일어났거나 또는 부분적으로 일어난 DNA 서열 또는 p11 유전자가 없거나 이것이 결여된 DNA 서열을 의미한다. 그러므로, "p11 녹-아웃 마우스" 또는 "p11 녹-아웃 유전자 이식 마우스"란, 도입된 DNA에 p11 단백질을 발현하는 유전자에 결함이 일어났거나, 이 유전자가 결여, 돌연 변이 또는 변형된 마우스를 의미한다. p11 유전자에 결함이 일어났거나 또는 이 유전자가 결여됨에 따라서, p11 녹-아웃 마우스는 뉴런 원형질 막에 소수의 5-HT<sub>1B</sub> 수용체를 가지게 되며/되거나, 뉴런 원형질 막에 존재하던 5-HT<sub>1B</sub> 수용체의 수는 감소하거나 아예 없어지게 되어, 야생형 마우스에 비하여 우울증과 유사한 증상을 나타내게 된다. "녹-아웃"이란 용어는, 원래의 유전자에 비하여 전체 유전자에 결실이 일어난 하나의 뉴클레오티드 중 임의의 위치에 발생한 변이를 의미할 수 있다. 녹-아웃 마우스는 당 업계에 공지된 임의의 기술 예를 들어, 표적화된 상동성 재조합 기술을 이용하여 생산될 수 있다.

<129> "재조합체"라는 용어는, 천연 공급원 또는 내인성 공급원으로부터 분리되어, 화학적으로나 효소에 의해 변형됨으로써, 천연 생성 측점 뉴클레오티드가 결실되었거나, 또는 천연 생성되지 않는 측점 뉴클레오티드를 제공하는 DNA를 의미한다. 측점하는 뉴클레오티드는 뉴클레오티드의 개시된 서열 또는 부분 서열의 상류 또는 하류인 뉴클레오티드이다.

<130> 본원에 사용된 "백터"란, 재조합 핵산을 원하는 세포나 조직에 전달하는 수단으로서, 예를 들어, 세포를 감염, 형질 감염시킬 수 있거나, 또는 일시적으로나 영구적으로 세포에 형질 도입될 수 있는 바이러스가 있다. 백터는 나출 핵산 또는 단백질이나 지질과 복합체를 형성하는 핵산일 수 있다고 인식된다. 임의로, 백터는 바이러스 또는 박테리아 핵산 및/또는 단백질, 및/또는 막(예를 들어, 세포막, 바이러스 지질 외피 등)을 포함하기도 한다. 이와 같은 용도로 사용함에 있어서, 백터는 재조합 핵산을 포함하는 세포일 수도 있다. 백터는 통상적으로 목적 핵산을 프로모터의 제어 하에 두는 발현 카세트를 포함하거나, 또는 발현시킬 유전자의 상류에 서열을 표지화하여 삽입함으로써, 프로모터에 측점하게 될 수 있다. 백터로서는 DNA 단편이 부착되어 복제될 수 있는 레플리콘(예를 들어, 플라스미드, 박테리오파지)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 그러므로, 백터로서는 RNA, 자발적인 자기 복제성 환형 DNA(플라스미드)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 발현 플라스미드와 비 발현 플라스미드 둘 다를 포함한다. 재조합 미생물 또는 세포 배양액이 "발현 백터"를 수용한다고 기술된 경우,

이 벡터로서는 숙주의 염색체(들)에 통합된 DNA와 잉여 염색체인 환형 DNA 둘 다를 포함한다. 벡터가 숙주 세포에 의해 유지되는 경우, 이 벡터는 유사 분열 동안에 자체의 구조물로서 세포에 의해 안정적으로 복제될 수 있거나, 또는 숙주 계놈에 통합될 수 있다.

<131> "-를 코딩하는 핵산 서열"이란 어구는, 전사 및/또는 번역될 때, 특히 단백질 또는 펩티드를 발현하는 코돈을 함유하는 핵산을 의미한다. 핵산 서열은 또한 축적하는 서열, 인트론 및/또는 추후에 번역 후 절단되는 펩티드를 코딩하는 서열을 포함할 수도 있다. 핵산 서열로서는 RNA로 전사되는 DNA 사슬 서열과, 단백질로 번역되는 RNA 서열 둘 다를 포함한다. 핵산 서열은 전장 핵산 서열과, 전장 서열로부터 유래하는 비-전장 서열 둘 다를 포함한다. 서열은 예를 들어, 특정 숙주 세포 내 코돈 선호도(codon preference)에 서열을 맞추기 위해, 천연의 서열과 축적성 코돈을 이용하는 서열을 포함하는 것으로도 이해할 수도 있다.

<132> 본원에 사용된 "핵산"은, DNA 또는 RNA일 수 있다. 핵산은 또한, 중합 효소에 의해 올바르게 통독(read-through)될 수 있도록 만들어주며, 이 핵산에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 발현 수준을 변경시키지 않는, 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수도 있다.

**실시예**

<133> **실시예 1: 효모 2-하이브리드 스크리닝**

<134> 5-HT<sub>1B</sub> 수용체의 기능에 대한 이해를 돕기 위해, 효모 2-하이브리드 스크리닝에서 이 수용체의 세번째 세포 내 루프를 미끼(bait)로 사용한다. 래트의 5-HT<sub>1B</sub> 수용체의 세 번째 세포 내 루프(226~311번 아미노산)를 전장 cDNA 래트 뇌 라이브러리로부터 PCR 증폭하고, 이를 미끼인 pAS2-유래 벡터의 NcoI/SalI 위치에 서브클로닝하여, GAL4 DNA-결합 도메인 융합 단백질로서 발현시킨다. 아세트산리튬 방법을 이용하여, 5-HT<sub>1B</sub> 수용체-미끼 플라스미드를 효모 균주 CG1945에 형질 전환시킨다. 항-GAL4 DNA 결합 도메인 항체를 사용하는 면역 블롯팅에 의해 이 융합 단백질의 크기와 발현 수준을 체크한다. pACT2 래트 뇌 cDNA 라이브러리를 효모 균주 Y187에 형질 전환시킨다. 미끼와 먹이의 관계에 있는 형질 전환체들을 YPD 배지 상에서 메이팅(mating)시키고, 이를 히스티딘 리포터 유전자 발현에 대해 선택적인 배지(-LWH) 상에 도말한다. pACT2 래트 뇌 cDNA 라이브러리로부터 유래하는 244 × 106개의 이배체 클론을 스크리닝한다. 이 배지 상에서 생육시킨 다음, 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-D-갈락토시드 오버레이 검정법(overlay assay)을 수행한다. 300개 이상의 클론들을 선택적 배지상에서 생육시킨 결과, 이 클론들은 β-갈락토시다제 리포터 유전자에 대해 포지티브이다. 이 중 포지티브 클론으로부터 효모 추출물을 제조한다. 먹이인 삼입물을 PCR(5'-CGCGTTTGGAACTACTACAGGGATG-3' 및 5'-GAAATTGAGATGGTGCACGATGCAC-3')에 의해 증폭시키고, 이를 먹이인 벡터 올리고뉴클레오티드(5'-GGCTTACCCATACGATGTTC-3')를 사용하여 서열 결정한다. BLAST 검색에 의하면 p11은 주요 먹이인 것으로 확인된다. p11 먹이 플라스미드 클론은 효모로부터 선택적으로 구제되어, DNA 증폭을 위해 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*)를 형질 전환시키며, 상호 작용의 특이성을 테스트하기 위해, (i) 원래의 5-HT<sub>1B</sub> 수용체-미끼 벡터, (ii) 전이 활성화(transactivation)에 대해 테스트할 미끼 대조군 벡터, (iii) 관련성이 없는 2개의 기타 미끼 구조물인 pRP21 및 CΔ115, 또는 (iv) 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>5A</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, D<sub>1</sub> 또는 D<sub>2</sub> 수용체의 세 번째 세포 내 루프에 상응하는 미끼 구조물과 함께, 효모 균주 Y187을 다시 형질 전환시킨다. 5-HT<sub>1A</sub>(218~345번 아미노산), 5-HT<sub>2A</sub>(236~302번 아미노산), 5-HT<sub>5A</sub>(233~295번 아미노산), 5-HT<sub>6</sub>(209~265번 아미노산), D<sub>1</sub>(256~312번 아미노산) 및 D<sub>2</sub>(211~343번 아미노산) 수용체에 상응하는 미끼들은 각각, 래트 뇌 cDNA 라이브러리로부터 PCR-증폭되어, 이를 pAS2-유래 벡터에 서브클로닝함으로써 제조된다. 이와 같은 미끼들 각각은 p11 먹이 구조물과 함께 효모를 공동 형질 전환시키고, 이들의 상호 작용은 -LW 또는 -LWH 배지와 X-gal 오버레이 검정법에 의해 분석된다. 모든 공동-형질 전환체는 미-선택 배지(-LW) 대조군 평판상에서 생육되었다. 선택적 배지(-LWH)에 있어서, p11과 5-HT<sub>1B</sub> 수용체의 포지티브 상호 작용(p11과 기타 미끼 중 임의의 것과의 상호 작용은 제외)이 검출된다.

<135> 29개의 이중 포지티브 먹이 클론 중 26개의 클론은 p11에 대한 유전자를 코딩한다. 이 검정법에서 p11은 5-HT<sub>1B</sub> 수용체와 상호 작용하지만, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>5A</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 도파민 D<sub>1</sub> 또는 도파민 D<sub>2</sub> 수용체, 2개의 관련 없는 미끼들(C델타115 및 pRP21), 또는 비어있는(empty) 플라스미드와는 상호 작용을 하지 않는데, 이는 곧, p11과 5-HT<sub>1B</sub> 수용체의 결합 특이성을 보여주는 것이다.

<136> **실시예 2: 공동-면역 침전법**

<137> 제조자의 프로토콜에 따라서, 내인성 p11(SI)을 함유하는 HeLa 세포를 DMEM 배지 상에서 함유 상태가 60%에 이를 때까지 생육시키고, 이를 리포펙타민과 함께 *pcDNA3.1-5-HT<sub>1B</sub>R-V5* 또는 비어있는 플라스미드 구조물로 형질 감염시킨다. 형질 감염 후, 세포 추출물을 (50mM Tris, pH 7.4/150mM NaCl/2mM EDTA/2mM EGTA/0.1% 트리톤 및 단백질 분해 효소 억제제 중) 4°C에서 용해한다. 세포 추출물을 항-V5 모노클로날 항체로 면역 침전시키고, 이를 단백질 G와 항온 처리한 다음, 철저히 세척한다. 다른 실험에서, 야생형 마우스 및 p11 KO 마우스의 대뇌 피질로부터 유래하는 뇌 조직을 4°C의 용해 완충액 중에서 균질화시킨다. 뇌 추출물을 폴리클로날 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 항체로 면역 침전시키고, 이를 단백질 A와 항온 처리한 다음, 철저히 세척한다. 세포 및 뇌 조직으로부터 유래하는 면역 침전물을 SDS-PAGE 겔 상에서 전개시킨 다음, 이를 PVDF 막으로 옮긴다. p11에 대한 마우스 모노클로날 항체(1/100)를 이용하여 면역 블롯팅을 수행한다. 항체 결합 여부는, 마우스 IgG에 대해 유도된 2차 HRP-결합 항체와 함께 항온 처리하였을 때, 화학 발광도가 증가하였는지 여부에 의해 확인된다.

<138> p11은 HeLa 세포와 뇌 조직 내에서 5-HT<sub>1B</sub> 수용체와 함께 공동 면역 침전된다.

<139> **실시예 3 - 면역 형광도**

<140> HeLa 세포를 *pcDNA3.1-5-HT<sub>1B</sub>R* 또는 *pcDNA3.1-V5* 구조물로 형질 감염시킨다. 형질 감염후 36 시간 경과시, 10분 동안 4% 파라포름알데히드/0.01M PBS로 세포를 고정한다. PBS 중 10% BSA와 함께 항온 처리함으로써 비 특이적 염색을 차단한다. 5-HT<sub>1B</sub> 수용체와 p11을 항-V5-FITC 항체(1/500) 및 항-마우스 p11 항체(1/1000)와 함께 항온 처리한 다음, 알렉사 플루어(Alexa Fluor) 568-표지화된 염소 항-마우스 2차 항체(1/500)와 항온 처리하여, 이 5-HT<sub>1B</sub> 수용체와 p11을 가시화한다. PBS 중에서 세척한 다음, 겔/마운트(Gel/Mount)를 사용하여 커버 슬립을 슬라이드상에 놓는다. 레이저-주사 현미경을 이용하여 형광 단백질의 영상을 얻는다.

<141> 면역 형광도를 통해 세포 표면상에서 p11과 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 간에 현저한 공동 국소화(colocalization)가 일어났음을 알 수 있다.

<142> **실시예 4 - 현장 혼성화 실험**

<143> 모든 동물 실험은 록펠러 대학교(Rockefeller University), 캐롤린스카 연구소(Karolinska Institute) 및 미국 국립 보건원의 실험 동물 관리 위원회의 가이드라인에 따라서 수행된다. 성체 수컷 스프라그 돌리 래트 (Sprague Dawley rat)의 뇌를 사용하여, p11 유전자 발현의 부위별 분포와 이 p11 유전자와 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 유전자 발현의 공동 분포(co-distribution)를 측정한다. 몇몇 실험에서, p11 KO 마우스와 이의 야생형 마우스로부터 얻은 뇌를 사용한다. 정신 활성 약물 처리가 p11 mRNA의 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 연구하기 위하여, 야생형 성체 수컷 C57B16 마우스에 비이클, 이미프라민(10mg/kg, i.p.), 할로페리돌(1mg/kg, i.p.), 디아제팜(5mg/kg, i.p.), 트래닐사이프로민(10mg/kg, i.p.) 또는 리스페리돈(1mg/kg, i.p.)을 1회 주사하거나 또는 반복해서 주사한다(총 14일 동안, 하루에 한 번씩). 마지막 주사 후 1시간 경과시, 동물들을 죽인다. 전기 충격 처리(ECT)가 p11 발현에 미치는 효과를 연구하기 위하여, 상기 래트의 귀에 전극을 꽂아서 수컷 스프라그 돌리 래트(200 그램)를 매일 ECT에 노출시키고(45mA; 0.3초; 10일), 마지막 자극 후 18시간 경과시 상기 래트를 죽인다. 대조군 동물에는 sham 처리(sham treatment) 즉, 전극을 래트의 귀에 꽂기만 하고 전류는 통하게 하지 않는 처리를 해 준다.

<144> 이미프라민과 트래닐사이프로민으로 14일 동안 처리하고 나서, 반복적으로 전기 충격 요법을 수행하되, 할로페리돌, 리스페리돈 또는 디아제팜 처리는 하지 않은 결과, 전뇌에서의 p11 mRNA를 상향 조절한다.

<145> **실시예 5: 마우스 우울증 모델과 정상 및 우울증 발병 인간에서의 p11 단백질 수준**

<146> 하루에 한 번씩 14일 동안 야생형 성체 수컷 C57B16 마우스에 비이클 또는 이미프라민(10mg/kg, i.p.)을 처리하고, 마지막 투여 후 1시간 경과시 이 마우스를 죽인다. 수컷 스프라그 돌리 래트를 매일 ECT에 노출시키고(귀에 전극을 꽂아줌(45mA; 0.3 초), 10일), 마지막 자극을 준 이후 18시간 경과시 이 래트를 죽인다. 무기력한(helpless) 성체 암컷 H/로우엔(Rouen) 마우스와 무기력하지 않은(non-helpless) NH/로우엔 마우스를 죽인다. 이와 같은 3개의 상이한 처리군과 상응하는 대조군으로부터 전방 대뇌 피질을 절개해 낸 다음 이를 동결시킨다.

<147> 인간(정상적인 대조군과 주로 우울증을 앓고 있는 환자)의 대상 피질로부터 유래하는, 신선한 동결 조직을 스탠리 기금 신경 병리학 컨소시엄(Stanley Foundation Neuropathology Consortium)으로부터 얻었다. 동결된 대뇌 피질을 1% SDS 중에서 초음파 처리한 다음 10분 동안 끓였다. 비신코닌산 단백질 검정법(bicinchoninic acid

protein assay method)을 통한 단백질 정량을 위해 소량의 균질화물을 보관해 둔다.

- <148> 10~20% 구배의 아크릴아미드 겔을 이용하여 동량의 단백질을 처리한다. p11에 대한 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체(인간 시료의 경우에는 1/1000, 그리고 설치류 시료의 경우에는 1/200)와, 액틴에 대한 폴리클로날 항체(1/1000)를 이용하여 면역 블롯팅을 수행한다. 항체의 결합 여부에 관하여는 강화 화학 발광도로 검출하고, 밀도 측정계(국립 보건원의 이미지 1.63 소프트웨어(National Institutes of Health IMAGE 1.63 software) 사용)로 정량한다. p11 수준을 액틴의 수준에 대해 정규화한다. 모든 데이터를 정규화된 수준으로 제시한다.
- <149> 우울증에 관한 마우스 유전 모델 내에서 p11 mRNA의 조절 기작을 연구하기 위해, (성체 암컷 및 수컷) 무기력한 H/로우엔 마우스와, 무기력하지 않은 NH/로우젠 마우스로부터 유래하는 전뇌 조직을 비교한다. p11 mRNA와 단백질은 H/로우엔 마우스의 경우 그 수준이 상당히 낮음을 알 수 있었다. 양 성의 모델에서 유사한 결과가 얻어졌다.
- <150> 저온 유지 장치에서 절단한 인간(정상의 대조군과 주로 우울증을 앓고 있는 환자)의 피질 검편(두께 40 $\mu$ m)을 스탠리 기금 신경 병리학 컨소시엄으로부터 얻었다. 양 성(정상 군과 우울증 군; 6명의 여성 및 9명의 남성) 모델(연령 = 29~68세(정상) 및 30~35세(우울증))로부터 분석할 시료를 구한다. 우울증 환자 중 질병 지속 기간은 1~42년으로 다양하다. 우울증 환자 중 7명은 자살로 사망하였다. 사후 뇌 조직을 동결 시키기 전까지의 간격은 8~42시간(정상) 및 7~47시간(우울증)으로 하며, 이 조직의 pH는 5.8~6.6(정상) 및 5.9~6.5(우울증)으로 한다. 래트 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 유전자의 코딩 서열을 이루는 1159~1420개의 뉴클레오티드, 마우스 또는 인간 p11 유전자의 코딩 서열을 이루는 1~293개의 뉴클레오티드, 그리고 래트의 p11 유전자의 코딩 서열을 이루는 1~287개의 뉴클레오티드를 각각 PCR 증폭하여 현장 혼성화 프로브를 제조한다. 상이한 PCR 단편을 pCRII-TOPO 벡터에 서브클로닝한다. 인간 조직을 대상으로 하는 연구를 제외하고, 저온 유지 장치에서 절단한 검편(두께 12 $\mu$ m)을 모든 연구용으로서 준비한다. 전술한 바와 같이, 래트 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 유전자 또는 마우스, 래트 또는 인간의 p11 유전자에 상응하는 cDNA를 시험관 내 전사시켜 상기 검편을 [<sup>35</sup>S]UTP-표지화 리보프로브와 혼성화한다(S5). 혼성화 이후, 상기 검편을 7~24일 동안 바이오맥스(Biomax) MR 필름에 노출시키고, NIH 이미지 1.63 소프트웨어를 사용하여 분석한다. 달리 특정하지 않으면, 전지/전방 대상 피질을 대상으로 분석을 수행한다. 일부 검편을 일포드(Ilford) K5 에멀전에 침지하여 세포 분석을 실시한다. 8주 후, 상기 검편을 현상하고, Nissl-염색 및 적재한다.
- <151> H/로우엔 마우스의 경우와 유사하게, p11 mRNA 및 단백질은 심한 주요 양극성 장애를 앓고 있는 환자의 전방 대상 피질에서 하향 조절된다.
- <152> **실시예 6: p11/5-HT<sub>1B</sub> 수용체 공동 형질 감염 실험**
- <153> 천연 p11을 함유한다고 가정하면 소량 함유하는 COS 7 세포를 p11(pcDNA3.1-p11), 5-HT<sub>1B</sub>(pcDNA3.1-5-HT<sub>1B</sub>R-V5), 도파민 D<sub>1</sub> 수용체(pcDNA3.1-D<sub>1</sub>R-VS) 또는 비어있는 플라스미드로 형질 감염시킨다. 도말된 COS 7 세포를, 1mg/ml의 세포-NHS-LC-바이오틴을 함유하는 배지와 함께 항온 처리한다(30분, 열음상). 세포를 TBS 중에서 행구어 바이오틴 반응을 급랭시킨다. 세포를 300 $\mu$ l의 개질 RIPA 완충액(1% 트리톤 X-100, 0.1% SDS, 0.5% 데옥시콜린산, 50mM NaPO<sub>4</sub>, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 50mM NaF, 10mM 소듐 피로포스페이트, 1mM 소듐 오르토바나데이트, 1mM PMSF 및 1mg/ml 루페틴) 300 $\mu$ l 중에서 행군다. 균질화물을 14,000g에서 원심 분리한다(15분, 4 $^{\circ}$ C). 15 $\mu$ l의 상청액을 분리하여, 5-HT<sub>1B</sub> 수용체의 총 수준을 측정한다. 나머지 상청액은 100 $\mu$ l의 50% 뉴트라비딘 아가로스과 함께 항온 처리하여(3 시간, 4 $^{\circ}$ C), 간단히 원심 분리한다. 시토졸 5-HT<sub>1B</sub> 수용체를 함유하는 상청액을 수집한다. 이후, 아가로스 비드를 RIPA 완충액으로 3회 세척한 다음, 마지막으로 간간히 원심 분리한 후, 결합된 단백질을 40 $\mu$ l의 SDS 시료 완충액 중에 재현탁한 다음 끓인다. 항-V5(5-HT<sub>1B</sub> 수용체 검출용; 1:1000) 및 항-p11(1:1000) 항체를 사용하여, 전체 시토졸 및 바이오틴화(표면) 단백질 상에서 정량적 웨스턴 블롯법을 수행한다. 강화된 화학 발광법을 수행한 이후, 방사선 사진 촬영을 하여, 면역 반응성 밴드를 검출한다. NIH 이미지 1.63 소프트웨어를 이용하여 이 밴드의 진하기를 정량한다. 각각의 웰에 대한 표면/총 비율을 계산한다. 대조군 실험을 통하여, 세포 내 단백질 액틴은 이 검정법에서 바이오틴화되지 않음을 알 수 있었다.
- <154> 세포를 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 및 p11로 공동 형질 감염시키면, 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 단독으로 형질 감염된 세포의 경우보다 세포 표면에서 더욱 많은 5-HT<sub>1B</sub>를 발현한다. 이와는 반대로, 표면 대 총 도파민 D<sub>1</sub> 수용체의 비율은 p11이 존재하지 않을 때나 존재할 때가 같다.

<155> **실시예 7: COS 7 세포 내 cAMP 측정**

<156> DMEM 배지 중에서 성장한 COS 7 세포를 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 및/또는 p11로 형질 감염시킨다. 36시간 경과후, 세포를 테오필린(5mM)과 파르길린(10 μM)으로 15분 동안 전처리한다. 이후, 세로토닌(10 μM)과 함께 또는 세로토닌 없이, 비이클 또는 포스콜린(10 μM)을 15분 더 첨가한다. 처리의 마지막에, 약물-함유 배지를 분리하고, 이 웰을 PBS중에서 행군 다음 세포를 수집한다. 제조자의 지침에 따라서, 직접 cAMP 효소 면역 검정 키트를 사용하여 cAMP 형성 여부를 정량한다. 대조군 실험을 통하여, 세로토닌은 비 형질 감염 COS 7 세포 내 cAMP의 형성 상태를 변경시키지 않음을 알 수 있다.

<157> p11이 공동 형질 감염될 때, 5-HT<sub>1B</sub> 수용체로 형질 감염된 COS-7 세포 내에서 세로토닌(10mM)이 포스콜린-유도 cAMP 형성 능력을 증화시키는 능력은 증가한다. p11이 존재하든, 존재하지 않든 간에, 포스콜린에 대한 cAMP 반응성에는 별 차이가 없다. 데이터를, p11의 존재 또는 부재시 포스콜린-자극 조건에 대해 정규화하여, 평균 T SEM을 구한다.

<158> **실시예 8: p11을 과발현하는 유전자 이식 마우스의 제조 및 분석**

<159> p11의 과발현을 독시사이클린으로 조절 가능한 유전자 이식 마우스(갈습/갈모들린-의존성 단백질 키나제 II(CamKII) 프로모터의 제어 하에 있음)를 생산한다. PCR에 의해 마우스 p11을 Myc 에피토프 태그와 융합하고, 이를 pTet-스플라이스(S6)의 SalI/HindIII 위치에 서브클로닝한다. 이 플라스미드(pTetOp-p11-Myc)를 tTA-발현 CHO 세포(패트릭 앨런(Patrick Allen) 박사 기증)에 형질 감염시킨다. 이 세포의 추출물로부터 Myc가 발현되었는지 여부는, 항-Myc(1:1000) 항체를 사용하여 면역 블롯팅함으로써 확인한다. p11-Myc이 발현되었음을 확인한 후, DNA 단편(pTetOp-p11-Myc, SV40 인트론 및 폴리(A)+ 신호 함유)을 선형화하고, 이를 전기 용리법으로 정제한 다음, C57BL6 마우스의 난모 세포의 전핵에 미세 주입한 후, 가임신 C57BL6/CBA 마우스(록펠러 대학교 유전자 이식 연구소)에 이식한다. PCR[5'-TATAGTCGACATGATGCCATCCCAATGG-3' 및 5'-TATAAAGCTTCTACAAATCTTCTCAGAAATCAATTTTGTTCAGATTCTCCCTTCTG-3']을 통해, 미부 DNA(tail DNA)를 트랜스 유전자에 대해 분석한다. pTetOp-p11-Myc 구조물을 포함하는 원조 마우스(founder mouse)를 C57B16 마우스와 이종 교배하여, F1 마우스를 생산한다. F2 동형 접합 pTetOp-p11-Myc-유전자 이식 마우스를, F1 한 배 새끼들을 이종 교배시켜 생산한다[상기 동형 접합 유전자형은 상기 마우스를 야생형 마우스와 이종 교배함으로써 확인됨]. 이와 같은 마우스를 CamKII 프로모터(S7)의 제어 하에서 tTA를 발현하는 C57B16 마우스와 이종 교배한다. 상기 마우스의 유전자형을 전술한 프라이머(p11-Myc 검출용)와, 5'-GAGCTGCTTAATGAGGTCCGAATC-3' 및 5'-TCTAAAGGGCAAAGTGAGTATGG-3'(tTA 검출용)를 사용하는 PCR을 통하여 분석한다. 항-Myc 항체를 사용하는 면역 블롯팅과 마우스 p11 유전자에 대한 현장 혼성화법을 통하여, 2 마리의 유전자 이식 마우스 내 p11-Myc가 과발현됨을 확인할 수 있다(Fig. S2). CamKII-유도 tTA의 발현 여부는 tTA의 코딩 부위에 대한 리보프로브(콜럼비아 대학교의 알렉세이 모로조브(Alexei Morozov) 박사 기증)를 사용하여 현장 혼성화법을 통해 검출된다(Fig. S2). 거동 실험에 있어서, 2 마리의 유전자 이식 마우스를, 트랜스 유전자를 발현하지 않거나 하나만 발현하는 한 배 새끼들(대조군 마우스)과 비교한다. 몇몇 이종 유전자 이식 마우스에 독시사이클린 50mg/ℓ를 투여(18일 동안, 음수를 통한 투여)한 다음 실험을 실시한다.

<160> 독시사이클린이 존재하지 않을 경우, 유전자 이식 마우스의 뉴런(전뇌 내 세로토닌을 함유하지 않음) 내 p11 수준은 증가하였으나, 봉선핵 내 세로토닌 뉴런 내 p11 수준은 증가하지 않았다. 이와 같은 마우스의 흑색질 내 기능성 5-HT<sub>1B</sub> 수용체의 수준은 증가하였으며, 주축성(불안-관련 장애에 관한 지표)은 감소하였고, 과잉 행동 관찰 실험(open-field test)에서의 수평 행동성(horizontal activity)은 증가하였다. 상기 마우스는 또한 꼬리 현수법(tail suspension test)에서의 부동성(우울증-유사 상태에 관한 지표)이 감소하였다. 그러므로, p11을 과발현하는 마우스는 마치 이 마우스가 항우울제 처리를 받은 것처럼 행동하였으되, 다만, 교란 인자는 이 마우스들이 일반적으로 과잉 행동성을 나타낸다는 것이다. 독시사이클린 처리된 유전자 이식 마우스를 p11 발현에 대해 정규화하였으며(fig. S4), 이 경우, 주축성, 부동성 또는 수평 행동성에는 그다지 큰 변화가 없었다.

<161> **실시예 9: p11 넉-아웃 마우스의 생산 및 분석**

<162> **p11 KO 마우스의 생산 및 분석**

<163> 래트 p11의 코딩 서열로부터 유래하는 프로브를 사용하여, BAC 라이브러리 스크리닝을 통해 6개의 게놈 클론을 분리한다. 13.7-kb Bam HI 단편을 BAC 클론으로부터 서브 클로닝하고, 이를 제한 효소 분석법으로 맵핑한다. 마우스 p11 유전자는 ATG-함유 엑손, 3.5-kb 인트론을 함유하며, 또한 종결 코돈과 다른 엑손도 함유한다. p11 유

전자의 ATG-함유 엑손에 확장되어 있는 11.3kb 표적화 벡터(5' Hinc II-Bgl II + [Bam HI-loxPNeoloxP-KpnI] + Apa I\*-Eco RV 3')를 pBSK(-) 내에 만든다(Fig. S5). 전기 천공법을 통해 표적화 벡터를 129SvEv ES 세포에 도입한 후, G418로 재조합 클론을 선별한다. Spe I 및 Bam HI/Sal I으로 각각 분해된 ES 세포 DNA를 분석함에 있어서, ES 클론에서, 5' 및 3' 외부 프로브(각각 300-bp BamHI/Bsp M1 단편 및 285-bp BamHI/Sca I 단편)를 사용하는 서던 블롯팅에 의해 상동성 재조합이 일어난 것이 확인된다. 포지티브 클론을 C57BL/6 배반포에 주입하고, 키메라 수컷을 C57BL/6 암컷과 교배시켜, 생식 계열 전이가 발생하도록 한다. 이형 접합형 자손을 교배하여, 녹아웃 마우스 및 야생형 마우스를 생산한다. 미부 DNA를 사용하여 서던 블롯팅한 결과, p11 KO 마우스에서 양 대립 형질은 돌연 변이되었음을 알 수 있었다(Fig. S5). 마우스 p11 유전자에 대한 프로브를 사용하는 현장 혼성화법을 통하여, p11 녹아웃 마우스 내 p11 유전자가 존재하지 않음이 추가로 확인된다(Fig. S5). 다음과 같은 올리고뉴클레오티드 5'-CATTAGAGGTGAACCTGTGAGGG-3', 5'-CCTGTCAGCCACTCTATATGCTCCTAATC-3' 및 5'-GGCCAGCTCATTCTCCACTCATG-3'를 사용하는 PCR 과정을 진행시켜, 야생형 마우스, 이형 접합체 마우스 및 녹아웃 마우스를 구별한다(Fig. S5). 이와 같은 PCR계 방법을 통상의 유전자형 분석에 이용한다. 1차 대뇌 피질 배양액을 이용하는 연구를 제외하고, 이형 접합체 교배에 의해 생산된 p11 KO 및 야생형 한 배 새끼를 대상으로 모든 실험을 수행한다. 이형 접합체 × 이형 접합체간 교배를 통하여 야생형(29%), p11 이형 접합체(53%) 및 p11 KO 마우스(18%)가 생산되었다. KO 마우스가 소수의 개체수만큼 생산된 이유는 잘 모르겠지만, p11은 조기 배 이식에 관여한다는 것은 알 수 있었다(S8). 이형 접합체 p11 마우스를 C57B16 마우스와 역교배시켜 2 세대를 생산한다. 104개의 특이적 C57B16 마커(록펠러 대학교 유전자학 연구 센터)를 이용하여 미세 위성(microsatellite) 유전자형 분석을 실시한 결과, 실험 동물의 교배용으로 사용된 이형 접합체 p11 마우스는 74 ± 2.8 % C57B16 백그라운드임을 알 수 있다.

<164> **수용체에 대한 정량적 방사선 촬영술**

<165> p11 KO 마우스 및 야생형 마우스 조직을 저온 유지 장치에서 절단한 검편(두께 = 12 $\mu$ m)을 제조한다. 길항제 [<sup>125</sup>I]시아노핀돌롤(0.3, 1, 3, 10, 30, 100 pM; 2200 Ci/mmol), 100nM 8-OH-DPAT(5-HT<sub>1A</sub> 차단제) 및 30 $\mu$ M 이소프로테놀( $\beta$ -아드레날린 수용체 차단제)를 함유하는 170mM Tris/150mM NaCl(pH 7.4, 25 $^{\circ}$ C) 중에서 상기 검편을 2시간 동안 항온 처리하여, 5-HT<sub>1B</sub> 수용체를 검출한다(S9). 비 특이적 결합 여부는 100 $\mu$ M 세로토닌의 존재 하에 측정하여 확인한다. 대체 실험에 있어서, 세로토닌의 농도를 증가시키면서(0, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 10000 nM) 전술한 바와 같이 10pM [<sup>125</sup>I]시아노핀돌롤과 함께 항온 처리한다. 5-HT<sub>1B</sub> 수용체는 또한, 검편을 9 170mM Tris/4mM CaCl<sub>2</sub>/0.1% 아스코르브산(pH 7.4)(25 $^{\circ}$ C) 중에 길항제인 [<sup>3</sup>H]GR125743(0.3, 1, 3, 10, 30 nM; 80Ci/mmol; GE Healthcare)과 함께 2시간 동안 항온 처리함으로써 검출한다. 비 특이적 결합 여부는, 100 $\mu$ M의 세로토닌의 존재 하에서 측정함으로써 확인한다. 5-HT<sub>1A</sub> 수용체는, 검편을 50mM Tris pH 7.4, 4mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub> 및 0.1% 소 혈청 알부민(25 $^{\circ}$ C) 중에서 작동제인 [<sup>3</sup>H]8-하이드록시-2-(디-n-프로필아미노)-테트라핀([<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT; 10nM; 125Ci/mmol; GE Healthcare), 300nM SB-269970(5-HT<sub>7</sub> 수용체 차단제)와 함께 1 시간 동안 항온 처리함으로써 검출한다. 비 특이적 결합 여부는, 100 $\mu$ M의 세로토닌의 존재 하에서 측정함으로써 확인한다. D<sub>1</sub>-유사 수용체는 검편을, 길항제인 [<sup>3</sup>H]7-클로로-2,3,4,5-테트라하이드로-3-메틸-5-페닐-1H-3-벤자제핀-7-올([<sup>3</sup>H]SCH 23390; 2nM; 87.0Ci/mmol)을 함유하는, 25mM Tris/ 100mM NaCl/1mM MgCl<sub>2</sub>/1 $\mu$ M 파르길린/20nM 미안세린/0.001% 아스코르브산 중에서 2 시간 동안 항온 처리함으로써 확인한다. 비 특이적 결합 여부는 100 $\mu$ M의 SKF82958의 존재 하에서 측정함으로써 확인된다. D<sub>2</sub>-유사 수용체는, 검편을 170mM Tris/120mM NaCl/5mM KCl/2mM CaCl<sub>2</sub>/1mM MgCl<sub>2</sub>/10 $\mu$ M GTP/0.001% 아스코르브산 함유 길항제인 [<sup>3</sup>H]라클로프라이드(5nM; 72Ci/mmol)와 함께 1시간 동안 항온 처리함으로써 검출된다. 비 특이적 결합 여부는 100 $\mu$ M의 퀴피롤의 존재 하에서 측정함으로써 확인된다. 전 방사선 사진 촬영 실험 중 마지막 단계에서, 검편을 이와 상응하는 냉각 결합 완충액 중에서 5분씩 2회 행구고, 이를 증류수(4 $^{\circ}$ C)에 침지시킨 다음, 냉각 공기 하에 건조시킨다. 상기 검편을, 미량의 [<sup>125</sup>I] 또는 [<sup>3</sup>H]와 함께, 3~5일 동안([<sup>125</sup>I]시아노핀돌롤) 또는 4~10주 동안([<sup>3</sup>H]GR125743, [<sup>3</sup>H]8-OHDPAT, [<sup>3</sup>H]SCH23390, [<sup>3</sup>H]라클로프라이드), 바이오맥스(Biomax) MR 필름에 붙인다. 몇몇 뇌 부위를 대상으로 하여 NIH 이미지 1.63 영상 분석 시스템을 통해 광학 밀도를 측정한다. 특이 결합 수준은 전체 결합 수준으

로부터 비 특이적 표지화 수준을 디지털 차원에서 공제함으로써 계산한다. 미소 수준의 [<sup>3</sup>H] 또는 [<sup>125</sup>I]로부터 구하여진 표준 곡선을 사용하여 광학 밀도를 단백질 1mg당 펨토몰(femtomole) 수준으로 전환한다. 비 선형 회귀 등식을 이용하여 포화 실험 및 치환 실험으로부터 구하여진 데이터를 분석한다.

<166> 방사선 사진 촬영 리간드-결합 실험을 통하여, p11 KO 마우스의 담창구 내 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 길항제 방사성 리간드인 [<sup>125</sup>I]요도시아노핀돌롤 및 [<sup>3</sup>H]GR125743의 결합 위치가, 야생형 마우스의 경우보다 더욱 적음을 알 수 있었다. 이와 유사하게, [<sup>125</sup>I]요도시아노핀돌롤 결합 수준은 야생형 마우스의 경우보다 p11 KO 마우스의 흑색질 치밀부에서 더욱 낮다[77.3 ± 5.8 대 98.8 ± 6.2 fmol/mg 단백질; P < 0.05 스튜던트 t 테스트]. 결합된 [<sup>125</sup>I]요도시아노핀돌롤을 치환하는 세로토닌의 친화성은 야생형 마우스와 p11 KO 마우스 간에 차이가 없다[중양 유효농도(EC<sub>50</sub>) 수치: 57 대 52 nM]. 5-HT<sub>1A</sub>, D<sub>1</sub> 또는 D<sub>2</sub> 수용체의 양은 야생형 마우스와 p11 KO 마우스간에 차이가 없음을 확인할 수 있다. [<sup>125</sup>I]요도시아노핀돌롤 결합 수준은 또한, NH/로우엔 마우스에 대하여 H/로우엔 마우스의 경우 감소한다.

<167> 5-HT<sub>1A</sub> 또는 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 자극에 따른 [<sup>35</sup>S]GTPγS의 결합

<168> 야생형 마우스, p11 KO 마우스 및 p11 유전자 이식 마우스 조직을 저온 유지 장치에서 잘라낸 신선한 검편(12μm)을, 100mM NaCl, 10 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM EGTA, 2mM GDP 및 1U/ml 아데노신 데아미나제가 모집된 Tris-HCl 50mM(pH 7.4) 중에서 30분 동안 예비 항온 처리하여, 내인성 아데노신을 제거한다. 이후, 검편을 40pM [<sup>35</sup>S]GTP S를 함유하는 동일한 용액 중(25℃)에서 2시간 동안 항온 처리한다[50 μM의 5-HT<sub>1A</sub> 수용체 작동제, 8-OH-DPAT 또는 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 작동제인 안피르톨린 존재하(자극 조건) 또는 부재하(기본 조건)]. 비 특이적 표지화(백그라운드) 수준은 10 μM의 비 표지화 GTP S와 함께 항온 처리된 인접 검편을 대상으로 하여 방사선 사진 촬영하여 측정한다. 검편을 50mM Tris-HCl 완충액 중에서 2회 세척하고(각각 3분씩), 다시 증류수 중에서 1회 세척(30초)하여, 완충액 염을 제거한 다음, 공기 건조시킨다. 바이오맥스 MR 필름 상에 2~4일 동안 노출시켜 방사선 사진 촬영 결과를 얻는다. NIH 이미지 1.63 영상 분석 시스템을 사용하여 몇몇 뇌 부위에서 광학 밀도 측정 결과를 얻는다.

<169> p11 KO 마우스 내 세포 막에 존재하는 5-HT<sub>1B</sub> 수용체의 수가 감소하였음을 곧, 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 작동제인 안피르톨린이 상기 마우스의 담창구에서 [<sup>35</sup>S]구아노신 5'-0-(3'-티오텐리포스페이트(GTP-S))의 결합 수준을 증가시키는 능력이 감소하였음을 말해주는 것이다. 이와는 반대로, 야생형 마우스 및 p11 KO 마우스 간에, 8-OH-DPAT(+/-)-8-하이드록시-2-(디-n-프로필아미노)테트라린], 5-HT<sub>1A</sub> 수용체 작동제와 [35S]GTP-S의 결합능에는 차이가 없다(6.0 ± 2.1 대 5.0 ± 2.0 광학 밀도 단위). p11 KO 마우스의 세포 표면에 존재하는 기능성 5-HT<sub>1B</sub> 수용체의 수가 감소하였음을 또한, 세로토닌과 안피르톨린이 1차 대뇌 피질 배양액(p11 KO 마우스 유래) 중 포스포-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>-ERK1/2(세포 외 신호-조절 키나제) 수준을 하향 조절하는 능력과, 안피르톨린이 포스포-Ser<sup>9</sup>-시냅신 I의 수준을 감소시키는 능력이 상실되었으며, p11 KO 마우스로부터 유래하는 선조체 슬라이스 내 cAMP-의존성 단백질 키나제에 의하여 인산화된 위치도 상실되었음을 말해주는 것이다.

<170> 1차 대뇌 피질 배양액 내 인산화된 ERK1/2를 검출하기 위한 웨스턴 블롯팅

<171> WT × WT 또는 p11 KO × p11 KO 육종을 통하여 생산된 E18 마우스로부터 대뇌 피질을 분리하여, 이를 트립신(0.25%) 처리한 다음, 분쇄하여 분해시키고, 이를 폴리-L-리신(1mg/ml)으로 코팅된 6-웰 평판에 도말한다. 이 배양액(500,000 세포/ml)을 5% 소 태아 혈청, 4mM L-글루타민, B-27 영양 보충물, 페니실린(5U/ml) 및 스트렙토마이신(5μg/ml)과 함께 DMEM을 함유하는 배지 중에서 생육시킨다. 2주 후, 상기 배양액을 비이클, 세로토닌(10 μM) 또는 안피르톨린(10 μM)으로 15분 동안 처리한다. 처리 과정의 마지막 단계에서, 약물-함유 배지를 제거하고, 얼음-냉각시킨 PBS 중에서 상기 웰을 행구고, 세포 긁는 도구(cell scraper)로 뉴런을 분리한 다음, 액체 질소 중에서 동결시킨다. 동결된 세포 시료를 1% SDS 중에서 초음파 처리하고, 10분 동안 끓인다. 소량의 균질화물을 모아서 비신코닌산 단백질을 검정법으로 단백질 측정을 수행한다. 기술한 바와 같이, 10% 아크릴아미드 겔을 사용하여 동량의 단백질을 가공한다(S10). 포스포-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>-ERK1/2에 대한 인산화-상태-특이적 항체 또는 전체 ERK1/2에 대하여, 인산화-상태 특이적이 아닌 항체를 이용하여 면역 블롯팅을 수행한다. 항체의 결합에 관

하여는 강화 화학 발광법으로 검출하고, 밀도 측정계로 정량한다(국립 보건원의 이미지 1.63 소프트웨어 사용). ERK1/2의 인산화된 형태의 것의 수준은 그것의 총 수준에 대해 정규화한다. 모든 데이터는 정규화된 수준으로 제시한다.

<172> **뇌 슬라이스 내 인산화된 시냅신 I을 검출하기 위한 웨스턴 블롯팅**

<173> 전술한 바와 같이, 선조체 슬라이스(300 $\mu$ m)를 야생형 마우스와 p11 KO 마우스로부터 제조한다(S10). 상기 슬라이스를 크렙스(Krebs) 완충액(118mM NaCl/4.7mM KCl/1.5mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/1.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/25mM NaHCO<sub>3</sub>/11.7mM 글루코스 /1.3mM CaCl<sub>2</sub>) 중에서 예비 향온 처리한다[30 $^{\circ}$ C, 일정한 산소 공급(95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>), 60분 동안, 30분 경과후 완충액 교체]. 슬라이스를 비이클 또는 안피르톨린(50  $\mu$ M)으로 2분 동안 처리한다. 약물 처리 후, 완충액을 제거하고, 상기 슬라이스를 드라이 아이스 상에서 급속 냉동시킨 다음, 1% SDS 중에서 초음파 처리를 한 다음에, 10분 동안 끓여준다. 소량의 균질물을 모아서 단백질 측정을 수행한다(비신코닌산 단백질 검정법). 10% 아크릴아미드 겔을 사용하여 동량의 단백질을 처리한다. 포스포-Ser9-시냅신 I(PKA 및 CamKII에 의해 인산화된 위치)에 대한 인산화-상태 특이적 토끼 폴리클로날 항체, 또는 인산화-상태-특이적이 아닌 토끼 폴리클로날 시냅신 항체를 이용하여 면역 블롯팅을 실시한다. 항체의 결합 여부는 강화된 화학 발광법으로 검출하고, 밀도 측정계로 정량한다(국립 보건원의 이미지 1.63 소프트웨어 사용). 시냅신의 인산화된 형태의 것의 수준을 그것의 총 수준에 대해 정규화한다. 모든 데이터는 정규화된 수준으로 제시한다.

<174> **전기 생리학**

<175> 플루오로탄 마취 하에서 수컷 p11 KO 마우스 및 야생형 마우스(4~7주령)의목을 벤다. 이 마우스의 뇌를 신속하게 분리하고, 측좌핵을 포함하는 관상 뇌 슬라이스(두께 = 400 $\mu$ m)를 마이크로슬라이서로 준비한다. 이 슬라이스들을 1 시간 이상 동안, 32 $^{\circ}$ C에서 산소가 공급되는(95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) 인공 뇌 척수액(aCSF)[126 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, 10 글루코스 및 26 NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.4 함유(단위 = mM)] 중에서 향온 처리한다. 슬라이스를 직립 현미경에 적재된 기록 챔버로 옮긴 다음, 28 $^{\circ}$ C에서 산소 공급 aCSF로 계속 관류시킨다. 측좌핵의 슬라이스 표면에 위치하는 aCSF로 충전된 유리 마이크로피펫을 사용하여 세포 외 장 전위(Extracellular field potential)를 기록한다. 악소패치(Axopatch) 200B 증폭기(10kHz)를 사용하여 신호를 500배 증폭시키고, 이를 2kHz에서 필터링한 다음, 획득한 데이터와 pClamp9 데이터 분석 소프트웨어를 활용하는 컴퓨터에 기록한다. 슬라이스 표면에 꽂은 기록용 전극에 인접하여 장착된 동심 양극성 자극 전극을 이용하여 시냅스 반응을 유발시킨다. fEPSP 진폭으로 슬라이스에 가하여진 자극 강도의 독립성은 야생형 마우스와 p11 KO 마우스의 경우 모두 유사한데, 이는 곧, 글루타메이트 12 시냅스 전달 과정에 있어서 야생형 마우스와 p11 KO 마우스 간에 차이가 없음을 말해주는 것이다. 50~70%의 최대 반응[자극의 강도를 높임으로써 유발된 장 전위의 진폭을 측정함으로써 관찰된, 각 슬라이스에 대해 확립된 자극/반응 곡선에 의해 평가함]을 나타내는 강도에서, 15초 마다 한 번씩 신호 자극(지속 기간 = 0.1분)을 준다. 글루타메이트 시냅스 전달에 미치는 세로토닌 수용체 활성화의 효과를 평가하기 위하여, 세로토닌을 관류 용액에 첨가하였으며, 이때, fEPSP/PS 진폭을 측정하였다. 세로토닌(50  $\mu$ M; 10  $\mu$ M 플루옥세틴의 존재 하)은 야생형 마우스의 슬라이스 내 fEPSP/PS의 진폭을 감소시키며(72  $\square\square$ , 기준 수치의 2.7%), 상기와 같은 효과는 p11 KO 마우스로부터 유래하는 슬라이스 내에서는 나타나지 않았다(98  $\square\square$  기준 수치의 3.6%). 수치는 평균  $\square\square$ SEM으로 나타낸다. 3-웨이 탭을 스위칭하여(switching) 관류 용액 중에 약물을 첨가한다.

<176> 5-HT<sub>1B</sub> 수용체를 통하여, 세로토닌은 대뇌 피질로부터 기원하는 뉴런 말단부에서의 글루타메이트의 방출량을 감소시키고, 선조체 시냅스에서의 시냅스 전달을 억제한다. 글루타메이트 생성 섬유를 간단히 자극하여 발생되며, 측좌핵 내 세포 외에서 기록되는, 장 여기 시냅스 후 전위(fEPSPs)의 진폭을 관찰한다. fEPSP는 야생형 마우스와 p11 KO 마우스 둘 다의 슬라이스를 전기 자극함으로써 방출된 내인성 글루타메이트에 의해 활성화되는 AMPA 수용체에 의해 매개된다[AMPA 수용체 길항제인 6-시아노-7-니트로퀴놀리딘-2,3-디온(CNQX)으로 자극된 후 15분 경과시, 기준과 비교하였을 때, fEPSP/군집 스파이크(population spike)(PS) 감소율은 각각 77% 및 81%임]. 관류 용액을 통해 투여될 때, 세로토닌은 야생형 마우스 슬라이스 내 fEPSP/PS의 진폭을, p11 KO 마우스의 슬라이스 내 fEPSP/PS 진폭에 비하여 감소시킨다.

<177> **모노아민 및 대사 물질의 조직 내 함량**

<178> 수컷 p11 KO 마우스, p11 이종 접합체 및 야생형 마우스(n = 유전자형 당 8마리)를 집중 극초단파 자극으로 죽인 다음, 선조체, 대뇌 피질 및 해마를 잘라내어 드라이 아이스 상에서 동결시킨다. 이후, 상기 조직 시료들을 10 부피의 0.1N TCA 내에서 초음파 처리하고, 이를 와류시킨 다음, 12,000g에서 2분 동안 원심 분리시킨다. 상

청액을 수집하고, 이 상청액이 세로토닌과 세로토닌 대사 물질인 5-하이드록시인돌아세트산(5-HIAA)을 포함하는 지 여부에 대해 분석한다(HPLC와 전기 화학 검출법의 병행법(HPLC-EC) 이용). 1 염기 인산나트륨 75mM, 350mg/ℓ 1-옥탄설펜산 나트륨 염, 0.5mM EDTA, 0.8% 테트라하이드로푸란(HPLC급, 억제제 불포함) 및 8% 아세토니트릴 (pH 3)(인산으로 맞추)로 이루어진 이동 상(유속 = 1.2ml/분)을 포함하는, 염기 불활성화 실리카-하이퍼실 (Hypersil) 5 $\mu$ m C18 분석용 컬럼(4.6 × 150 mm)로 세로토닌과 5-HIAA를 분리한다. 유리로 된 탄소 전극 2개가 장착된 전기 화학적 검출기를 사용한다[전극 1 = 680mV, 범위, 0.5nA; 전극 2 = -100mV, 범위, 0.2nA]. 최고 높이와 시료의 농도를 계산하는 EZ크롬 소프트웨어를 사용하여 데이터를 수집한다. 세로토닌과 5-HIAA의 감도는 0.1pmol/ml이다.

<179> 5-HT<sub>1B</sub> 수용체는 자가 수용체(autoreceptor)의 역할을 하며, 세로토닌의 방출을 억제한다. p11은 봉선핵(raphe nuclei) 내에서 발견되므로, 세로토닌과 그것의 주요 대사 산물인 5-하이드록시인돌아세트산(5-HIAA)의 양을 야생형 마우스와 p11 KO 마우스의 대상부 즉, 대뇌 피질, 선조체 및 해마에서 측정한다. 5-HT 전좌 및/또는 5-HT<sub>1B</sub> 수용체에 의한 기작의 네거티브 조절, 그리고 5-HT<sub>1B</sub> 수용체 기능에 대한 p11의 주요 역할에 의하면, p11 KO 마우스는 세로토닌 전좌 및/또는 기작의 수준을 증가시키는 것을 알 수 있다.

<180> **행동 분석 - 과잉 행동 관찰 분석법(Open-field analysis)**

<181> 낮 동안에, 완전히 컴퓨터화되었으며, 적선 및 적외선-감수성 움직임 감지 시스템이 장착된 다수의 우리에서, 30분 동안 수평 운동성을 측정한다[그 결과는 5분마다 분석함]. 말초 활동성 수치(peripheral activity value)를 13(전체 수평 행동성 수치(total horizontal activity value))으로 나누어, 주축성을 측정한다. 안피르톨린 (5mg/kg, i.p.) 투여 실험에서, 상기 안피르톨린 투여 후 15분 경과시에 동물들을 테스트한다. 몇몇 안피르톨린 처리된 마우스에는 매일 이미프라민(10mg/kg, i.p.)을 투여한다(실험 전날까지, 4주 동안).

<182> **행동 분석 - 꼬리 현수 테스트(Tail Suspension Test)**

<183> 진술한 바와 같이, C57B16(S12) 및 NMRI 마우스(S13)에 대해 유효한 변형인 꼬리 현수 테스트(항우울제-유사 활동성 모델)를 실시한다(S11). 접착 테이프를 이용하여, 각각의 마우스를 꼬리로 수평 막대에 매달아 놓는다(꼬리 끝 부분으로부터의 길이 = 2cm). 통상적으로, 마우스는 움직일 수 없는 상태에서 일시적으로 발작 증세를 일으키면서 필사적으로 도망치려는 행동을 보였다. 테스트 기간(6분) 동안, 마우스의 행동을 비디오테이프에 녹화하고, 유전자형을 모르는 관찰자에 의해 스코어를 매기도록 한다. 기록된 매개 변수는, 움직일 수 없는 상태에서 경과된 초이다. 안피르톨린(5mg/kg) 및 이미프라민(10mg/kg)을 이용한 실험에 있어서는, 주사 후 15분 경과 시 동물들을 테스트한다.

<184> **행동 분석 - 수크로스 소모 테스트**

<185> p11 KO 마우스와 야생형 마우스를 각각 수용한 하나의 수용 기기 내에서 실시된 방법을 통해 수크로스 소모량을 테스트한다. 수중 2%의 수크로스 용액이 소모되는 것이 확인되었다(96시간 동안). 후속 실험에서, 수분 섭취량은 동일한 기간 동안에 측정한다.

<186> p11 결실시켰을 때 행동에 미치는 효과를 평가하기 위하여, 기본 조건 및 약물을 투여한 경험이 없는 마우스와 장기간 동안 이미프라민을 투여한 마우스 내에서의 안피르톨린 반응에 따라서, 야생형 마우스 및 p11 KO 마우스에서의 주축성을 비교한다. 이미프라민으로 처리한 동물에 있어서, 안피르톨린은 야생형 마우스의 경우 주축성을 상당한 수준으로 감소시켰지만, p11 KO 마우스의 경우에는 그렇지 않았다(Fig. 4G). 뿐만 아니라, p11 KO 마우스의 경우보다 염수 주사 야생형 마우스에서 주축성이 더 떨어졌다(Fig. 4G). 약물을 투여하지 않은 야생형 마우스와 p11 KO 마우스에서는 안피르톨린 부재 또는 존재 하에 유사한 주축성을 나타낸다. 기본 조건 하에서, 그리고 안피르톨린 또는 이미프라민 둘 중 어느 하나로 신속하게 처리한 경우 모두에서, 야생형 마우스에 비하여 p11 KO 마우스에서의 꼬리 현수 테스트에서 부동성이 증가하였다(Fig. 4H). 이와 같은 행동 관찰 결과를 통하여, p11 KO 마우스가 우울증-유사 표현형을 나타내며, p11은 5-HT<sub>1B</sub> 수용체를 통한 이미프라민에 대한 행동을 매개함을 알 수 있다. p11 KO 마우스의 우울증-유사 표현형을 추가로 뒷받침함에 있어서, p11 KO 마우스는 야생형 마우스의 한 배 새끼들보다, 입맛에 맞는 2% 수크로스 용액을 적게 섭취하였는데[1.74 ± 0.07 대 2.17 ± 0.11 ml/g 체중/일; P < 0.05 스튜던트 t 테스트], 이는 곧, 단맛에 대한 보상에 반응하는 특성이 감소함을 말해주는 것이다. 수분 섭취량은 p11 KO 마우스 한 배 새끼와 야생형 마우스 한 배 새끼 둘 다의 경우에 유사한데[1.51 ± 0.05 대 1.42 ± 0.05ml/g 체중/일], 이는, 상기와 같은 행동에 있어서 유체 밸런스를 변경시키는 역할을 제외한 경우에 그러하다.

<187> 실시예 10: 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 내 p11의 검출

<188> 전혈(10~15ml)을 헤파린 처리된 튜브에 수집한다. 혈액 1ml로부터는 약 1milj의 단핵 세포를 얻을 수 있는데, 그 수치는 개인마다 차이가 있다. 혈액을 인산염계 염수(PBS) 중에 1:1로 희석한다. 2.5ml의 림포프렙 (lymphoprep)(Medinor cat nr 1114547)을 15ml들이 튜브에 첨가하고, 10ml의 희석 혈액을 조심스럽게 위에 적층시킨다. 이 튜브를 1800rpm 및 실온에서 20분 동안 스핀(spin)시킨다. 파스퇴르 피펫을 사용하여, 2개의 튜브에서 PBMC를 수집하고, 이를 하나의 청결한 15ml들이 튜브에 넣는다. 이 튜브를 PBS로 채우고, 1500rpm에서 10분 동안 스핀 다운시킨다. 이후, 세포를 PBS중에서 2회 세척한다(혈소판과 림포프렙 제거). 계수를 위해, PBMC를 원래 10ml의 전혈 부피 당 1ml의 배지(90%의 소 태아 혈청/10% DMSO) 중에 희석시킨다[계수는, 트립판 블루중에서 1:10으로 희석시켜 수행함]. PBMC를 -80℃(드라이아이스 또는 냉각기)에서 동결시키고, 이를 -80℃로 옮겨 보관해 둔다. 웰 당 0.5milj PBMC를 96-웰 평판에 가한다. 상기 평판을 스핀한 다음, 상청액을 폐기한다. 세포를 BD 고정 완충액(BD Biosciences, 키트 카탈로그 번호 = 554715) 중에 고정시킨다. 여기에 동일한 키트로부터 유래하는 투과 처리 완충액(permeabilization buffer)을 첨가하고, 세포를 세척한다. 세포는 현재 세포 내 염색 준비가 되어 있는 상태이며, p11 항체(BD Biosciences; 2,5ug/ml)는 투과 처리 완충액 중에 희석시킨 다음, 웰에 가한다. 하나의 웰은 IgG1 대조군으로 사용한다. 세포를 피펫팅하여 현탁시킨다. 세포를 30분 동안 항온 처리하고, 투과 처리 완충액 중에서 세척한다. 2차 항체(예를 들어, 염소 항-마우스 PE 접합된 항체)를 투과 처리 완충액 중에 희석시키고, 이를 각 웰에 가한다. 세포를 30분 동안 현탁 및 항온 처리한다. 상기 세포를 투과 처리 완충액으로 2회 세척하고, PBS-1% FCS로 1회 세척한다. 이중 염색을 위하여, 100ul PBS-1% FCS-1% NMS(정상 마우스 혈청)으로 1회 세척함으로써 2차 항체를 차단시킨다. 차단 단계는 추후 항체가 임의의 잔류하는 2차 항체와 결합하는 것을 막아주는데 필요한 단계이다. 표면 마커를 염색하기 위하여, CD14-PerCP를 함유하는 PBS(단핵구 구별용) 또는 CD3-PerCP와 CD56-PE를 함유하는 PBS(T 세포와 NK 세포 구별용), 또는 CD19-FITC를 함유하는 PBS(B 세포 구별용)를 각 웰에 첨가한다. 이들 세포를 피펫팅하여 현탁시키고, 냉장고에서 10분 동안 항온 처리한다. 이후, 상기 세포를 200ul PBS-1% FCS로 세척한다. 표준 FACS 방법을 사용하여, 상이한 유형의 단핵 세포 내 p11의 염색 여부를 측정한다. 결과, p11은 몇몇 백혈구, 단핵구, NK 킬러 세포 및 CD-8 포지티브 T-세포에서 높은 수준으로 발현됨을 알 수 있다.

专利名称(译)	用于治疗 and 诊断的新产品和方法		
公开(公告)号	<a href="#">KR1020090056938A</a>	公开(公告)日	2009-06-03
申请号	KR1020087032231	申请日	2007-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	洛克菲勒大学 摇杆汉子大学		
申请(专利权)人(译)	摇杆汉子大学		
当前申请(专利权)人(译)	摇杆汉子大学		
[标]发明人	SVENNINGSSON PER 스벤닝슨퍼 GREENGARD PAUL 그린가드폴		
发明人	스벤닝슨퍼 그린가드폴		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 C12N15/09 G01N33/68		
CPC分类号	C12Q1/6883 G01N33/6896 G01N33/942 G01N33/53 A01K67/0275 A01K67/0276 C07K14/4721 C12N15/8509 C12N15/09 A01K2217/052 A01K2217/075 A01K2217/20 A01K2227/105 A01K2267 /0356 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/14 A61P15/00 A61P15/10 A61P25/00 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/30 C07K2319/41 C12N2830/003 C12Q2600/136 C12Q2600 /158 G01N2500/00 G01N2500/04 G01N2800/30 G01N2800/304 Y10T436/143333 C12Q1/6886 A61K49/0008 C12Q1/6876 C12Q2600/106 C12Q2600/178 G01N33/68 G01N2333/46 G01N2500/10		
代理人(译)	Gimseonggi Gimjinhoe		
优先权	60/813170 2006-06-13 US 60/878730 2007-01-05 US		
其他公开文献	KR101438841B1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

ÒKIPO0026 #WIPO 2009