



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0086818
(43) 공개일자 2016년07월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) A61K 31/4015 (2006.01)
A61K 31/4415 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
A61K 31/4015 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7009042
- (22) 출원일자(국제) 2014년09월09일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2016년04월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/054816
- (87) 국제공개번호 WO 2015/035402
국제공개일자 2015년03월12일
- (30) 우선권주장
61/875,384 2013년09월09일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
알코브라 리미티드
이스라엘 65785 텔 아비브 로스차일드 애비뉴 65
- (72) 발명자
다니엘리, 야론
이스라엘 65785 텔아비브 로스차일드 애비뉴 65
추만, 조안나
이스라엘 71707 모디인 나르 아야든 스트리트 60
루빈, 조나단
미국 19073 펜실베이니아주 뉴타운 스퀘어 부트 로
드 81
- (74) 대리인
양영준, 이상영

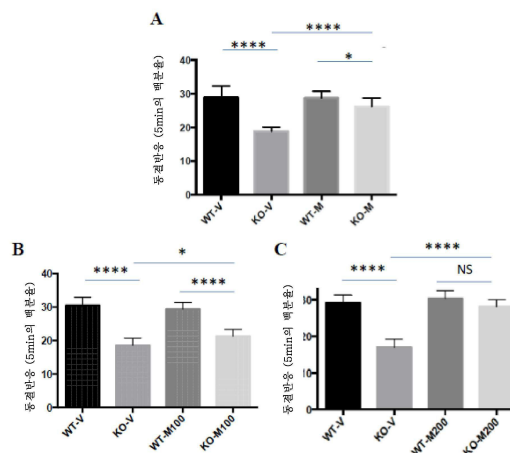
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 요법에 대한 반응의 결정 방법

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 취약 X 증후군 및 다른 인지 장애의 치료에서 메타독신 요법에 대한 반응의 결정 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 메타독신 요법에 대해 반응할 개체를 확인하는 것에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/4415 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

(30) 우선권주장

14/038,258 2013년09월26일 미국(US)

61/991,351 2014년05월09일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 메타독신 치료를 받은 취약 X 증후군 또는 다른 인지 장애가 있는 대상체로부터 유래된 샘플 내의 인산화된 ERK 및 Akt 단백질의 양을 측정하고;
- b) 샘플 내의 ERK 및 Akt 단백질의 총량을 측정하고;
- c) 단계 a)에서 결정된 인산화된 ERK 및 Akt 단백질의 양 대 단계 b)에서 결정된 ERK 및 Akt 단백질의 양의 비를 계산하고;
- d) 단계 c)의 계산된 비를 질환에 걸리지 않은 대상체로부터 측정된 계산된 비와 비교하는 것을 포함하고, 여기서 단계 c)의 계산된 비가 질환에 걸리지 않은 대상체의 계산된 비와 유사할 경우는 치료가 효과적임을 나타내는 것인, 메타독신 치료를 받은 취약 X 증후군 또는 다른 인지 장애가 있는 대상체에서 메타독신 치료 요법의 유효성을 평가하는 방법.

청구항 2

- a) 취약 X 증후군 또는 다른 인지 장애가 있는 대상체로부터 유래된 샘플 내의 인산화된 ERK 및 Akt 단백질의 양을 측정하고;
- b) 샘플 내의 ERK 및 Akt 단백질의 총량을 측정하고;
- c) 단계 a)에서 결정된 인산화된 ERK 및 Akt 단백질의 양 대 단계 b)에서 결정된 ERK 및 Akt 단백질의 양의 비를 계산하고;
- d) 단계 c)의 계산된 비를 질환에 걸리지 않은 대상체로부터 측정된 계산된 비와 비교하는 것을 포함하고, 단계 c)의 계산된 비가 질환에 걸리지 않은 대상체의 계산된 비보다 더 높은 경우는 대상체가 메타독신 치료 요법으로부터 이익을 얻게 될 것임을 나타내는 것인, 취약 X 증후군 또는 다른 인지 장애가 있는 대상체가 메타독신 치료 요법으로부터 이익이 얻어질 것인지 여부를 결정하는 방법.

청구항 3

- a) 제1 기간에서 대상체로부터의 제1 샘플에서 인산화된 ERK 및 Akt 단백질의 양을 측정하고;
- b) 제1 기간에서 제1 샘플에서 ERK 및 Akt 단백질의 총량을 측정하고;
- c) 단계 a)에서 결정된 인산화된 ERK 및 Akt 단백질의 양 대 단계 b)에서 결정된 ERK 및 Akt 단백질의 총량의 제1 비를 계산하고;
- d) 제2 기간에서 대상체로부터의 제2 샘플에서 인산화된 ERK 및 Akt 단백질의 양을 측정하고;
- e) 제2 기간에서 제2 샘플에서 ERK 및 Akt 단백질의 총량을 측정하고;
- f) 제2 비를 생성하기 위해 단계 d)에서 결정된 인산화된 ERK 및 Akt 단백질의 양 대 단계 e)에서 결정된 ERK 및 Akt 단백질의 총량의 제2 비를 계산하고,
- g) 제1 비 대 제2 비를 비교하는 것을 포함하는, 취약 X 증후군 또는 다른 인지 장애가 있는 대상체에서 메타독신 치료 요법을 모니터링하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 제2 비가 제1 비보다 낮은 경우는 치료가 효과적임을 나타내는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 측정 단계가 면역 검정을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플이 전체 혈액 또는 그의 분획인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플이 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, PMBC가 림프구 또는 단핵구인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본원은 그 내용 전체가 각각 본원에 참고로 포함된, 2013년 9월 9일 출원된 미국 특허 가출원 USSN 61/875,384, 2013년 9월 26일 출원된 미국 특허 가출원 USSN 14/038258, 및 2014년 5월 9일 출원된 미국 특허 가출원 USSN 61/991,351을 기초로 한 우선권 및 이익을 주장한다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 일반적으로 취약 X 증후군 및 다른 인지 장애의 치료를 위한 메타독신 요법(metadoxine therapy)에 대한 반응을 결정하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 메타독신 요법에 반응성일 개체의 확인에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 그 명칭이 암시하는 바와 같이 취약 X 증후군 (FXS)은 지도 위치 Xq 27.3에서 중기 염색체 내의 동위염색체 갭 (isochromatid gap)으로서 발현되는 취약 부위와 연관된다. 취약 X 증후군은 X 염색체 상에 위치하는 취약 X 정신 지체 1 (FMR1) 유전자의 5'-비번역 영역의 돌연변이에 의해 야기되는 유전 질환이다. FXS를 일으키는 돌연변이는 취약 X 정신 지체 유전자 FMR1 내의 CGG 반복체와 연관된다. 대부분의 건강한 개체에서, CGG 반복체의 총수는 10 내지 40 미만이고, 평균 약 29이다. 취약 X 증후군에서, CGG 서열은 200 내지 1,000회 초과까지 반복된다. 대상체가 약 200개 초과 CGG 반복체를 보유하면, 취약 X 유전자가 과메틸화되고, 이는 유전자를 침묵시킨다. 그 결과, 취약 X 정신 지체 단백질 (FMRP)은 생산되지 않거나 감소한 수준으로 생산되고, 대상체는 FXS의 소견을 보인다.

[0006] FMR1 유전자의 전돌연변이 팽창 (premutation expansion) (55-200개의 CGG 반복체)은 일반적인 인구집단에서 빈번하여, 추정 유병률은 259명의 여성 중 1명 및 812명의 남성 중 1명이다. 전돌연변이 보유자는 대개 정상 IQ를 갖지만, 불안증과 같은 정서 문제는 흔하다. 보다 고령의 남성 전돌연변이 보유자 (50세 이상)는 진행성 활동 떨림 (intention tremor) 및 운동실조를 발병한다. 이들 운동 장애는 종종, 기억 상실, 불안증, 및 실행 기능 결핍, 은둔 또는 과민한 행동, 및 치매를 비롯한 진행성 인지 및 행동 문제를 동반한다. 상기 장애는 취약 X-염색체 연관 떨림/운동실조 증후군 (FXTAS)으로 지정되었다. FXTAS이 있는 대상체에서 자기 공명 영상화는 중간 소뇌 다리 및 인접한 소뇌 백색질에서 T2-가중 신호 강도의 증가를 보인다.

[0007] FXS는 감소된 침투도를 갖는 X-연관 우성 장애로서 구분한다. 취약 X 돌연변이를 보유하는 경우 두 성별 모두 지적 장애를 보일 수 있고, 중증도는 가변적이다. FXS가 있는 아동 및 성인은 자폐-유사 특징 및 경향을 비롯한 다양한 정도의 지적 장애 또는 학습 장애와 행동 및 정서 문제를 갖는다. FXS가 있는 어린 아동은 종종 앉고 걷고 말하는 방법 학습과 같은 발달 이정표가 지연된다. 이환된 아동은 빈번한 짜증, 주의 집중 곤란, 빈번한 발작 (예를 들어, 측두엽 발작)을 일으킬 수 있고, 종종 매우 불안하고, 쉽게 당황하고, 감각 과다각성 장애, 위장 장애가 있을 수 있고, 언어 문제 및 이상한 행동, 예컨대 손 퍼덕이기 및 손 물어뜯기가 있을 수 있다.

- [0008] FXS는 대상체의 샘플 (예를 들어, 혈액 샘플, 구강 샘플)에 대해 수행한 확립된 유전자 시험에 의해 진단될 수 있다. 시험은 CGG 반복체의 수에 기반하여 대상체의 FMR1 유전자 내에 돌연변이 또는 전돌연변이가 존재하는지 여부를 결정한다.
- [0009] FXS가 있는 대상체는 또한 자폐증이 있을 수 있다. 자폐증으로 진단된 모든 아동의 약 5%에서는 FMR1 유전자 내에 돌연변이가 있고, 또한 취약 X 증후군 (FXS)이 있다. 자폐 범주성 장애 (ASD)는 FXS가 있는 남성의 약 30%와 여성의 약 20%에서 보이고, FXS 개체의 추가의 30%는 ASD 진단 없이 자폐 증상을 보인다. 지적 장애가 FXS의 전형적인 특징이지만, FXS가 있는 대상체는 종종 경증에서 수줍음, 눈 마주치기 어려움, 및 사회적 불안 증부터 중증에서 손 퍼덕이기, 손 물어뜯기 및 집착 언어에 이르는 자폐 특징을 보인다. FXS가 있는 대상체는 자폐증과 연관된 다른 증상, 예컨대 주의력 결핍 및 과잉행동, 발작, 감각 자극에 대한 과민성, 강박 행동 및 변경된 위장 기능을 보인다. FMR1 돌연변이는 단일 단백질 (FMRP)의 발현을 방지하거나 크게 감소시킨다. FMRP 부재 하에서의 뇌 발달이 FXS의 주요 증상을 일으키는 것으로 생각된다.
- [0010] 핵심 증상에 추가로, FXS가 있는 아동은 종종 심각한 행동 장애, 예컨대 자극과민성, 공격 및 자해 행동이 있다. FXS가 있는 남성 (연령 8-24)의 최근 연구에서, 2개월의 관찰 기간 동안 자해 행동은 대상체의 79%에서 및 공격적 행동은 75%에서 보고되었다.
- [0011] FXS가 있는 인간에 대한 현재 이용가능한 치료 요법은 예를 들어, 행동 수정, 및 항우울제와 항정신병 약물을 포함한 일정 범위의 의약 (FXS 치료에 대해 FDA에서 승인받지 않은)을 사용한 치료를 포함한다. FXS 및 자폐증이 있는 개체에서 언어 및 사회화를 개선하기 위해 인지 행동 요법이 사용되어 왔다. 최근에, 비전형적 항정신병약인 리스페리돈을 사용하는 약물학적 치료가 자폐증이 있는 개체의 치료에서 비-약물학적 방안을 증대시키기 위해 일반적으로 사용되고 있다. 자폐 아동에서 리스페리돈의 무작위 위약-대조 시험은 이상 행동 척도 (Aberrant Behavior Checklist) 및 임상 총괄 평가 척도-개선 (Clinical Global Impressions-Improvement)의 자극과민성 하위척도에 대한 유의한 개선을 입증하였다 (McCracken, J.T., et al., N. Engl. J. Med. 347:314-321 (2002)). 그러나, 유해 사례는 체중 증가, 식욕 증가, 피로, 졸림, 어지러움, 및 침흘림을 포함한다. 사회적 고립 및 의사소통은 리스페리돈의 투여에 의해 개선되지 않았고, 추체외로 증상 및 운동 장애와 같은 유해한 부작용이 자폐 아동에서 리스페리돈 사용과 연관된 바 있었다.
- 발명의 내용**
- [0012] **발명의 개요**
- [0013] 본 발명은 대상체로부터 유래된 샘플 내의 인산화된 ERK 및 Akt 단백질의 양을 측정하고; 샘플 내의 ERK 및 Akt 단백질의 총량을 측정하고; 인산화된 ERK 및 Akt 단백질의 양 대 ERK 및 Akt 단백질의 총량의 비를 계산하고; 계산된 비를 질환에 걸리지 않은 대상체로부터 측정된 계산된 비와 비교함으로써, 메타독신 치료를 받은 취약 X 증후군 또는 다른 인지 장애가 있는 대상체에서 메타독신 치료 요법의 유효성을 평가하는 방법을 제공한다. 대상체의 계산된 비가 공지의 질환에 걸리지 않은 대상체에 대한 계산된 비와 유사한 경우, 치료는 효과적이다.
- [0014] 본 발명에서 또한 대상체로부터 유래된 샘플 내의 인산화된 ERK 및 Akt 단백질의 양을 측정하고; 샘플 내의 ERK 및 Akt 단백질의 총량을 측정하고; 인산화된 ERK 및 Akt 단백질의 양 대 ERK 및 Akt 단백질의 총량의 비를 계산하고; 상기 대상체의 계산된 비를 질환에 걸리지 않은 대상체로부터 측정된 계산된 비와 비교함으로써, 취약 X 증후군 또는 다른 인지 장애가 있는 대상체가 메타독신 치료 요법으로부터 이익을 얻게 될지 결정하는 방법이 제공된다. 상기 대상체의 계산된 비가 공지의 질환에 걸리지 않은 대상체의 계산된 비보다 더 높은 경우, 대상체는 메타독신 치료 요법으로부터 이익을 얻게 될 것이다.
- [0015] 또한, 본 발명에서 제1 기간에서 대상체로부터의 제1 샘플에서 인산화된 ERK 및 Akt 단백질의 양을 측정하고; 제1 기간에서 제1 샘플에서 ERK 및 Akt 단백질의 총량을 측정하고; 인산화된 ERK 및 Akt 단백질의 양 대 ERK 및 Akt 단백질의 총량의 제1 비를 계산하고; 제2 기간에서 대상체로부터의 제2 샘플에서 인산화된 ERK 및 Akt 단백질의 양을 측정하고; 제2 기간에서 제2 샘플에서 ERK 및 Akt 단백질의 총량을 측정하고; 인산화된 ERK 및 Akt 단백질의 양 대 ERK 및 Akt 단백질의 총량의 제2 비를 계산하고, 제1 비 대 제2 비를 비교함으로써, 취약 X 증후군 또는 다른 인지 장애가 있는 대상체에서 메타독신 치료 요법을 모니터링하는 방법이 제공된다. 제2 비가 제1 비보다 낮은 경우, 치료는 효과적이다.
- [0016] 일부 측면에서, 측정 단계는 면역 검정을 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 전체 혈액 또는 그의 분획이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)이다. 일부 실시양태에서, PBMC는 림프구

또는 단핵구이다.

[0017] 달리 규정되지 않으면, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 학술 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 설명된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시예에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질을 아래에 설명한다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 및 다른 인용문은 명시적으로 그 전체가 참조로 포함된다. 충돌이 있는 경우에, 정의를 포함한 본 명세서가 우선할 것이다. 또한, 본원에 설명되는 물질, 방법 및 실시예는 단지 예시적이고, 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0018] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 다음 상세한 설명 및 청구항으로부터 명확해지고 그에 의해 포괄될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 환경적 공포 조건화 (contextual fear conditioning)에 대한 2개월령 Fmr1 녹아웃 (knockout) (KO) 또는 야생형 (WT) 마우스에서 비히클 (V) 또는 메타독신 (M) (100, 150, 또는 200 mg/kg)의 7일의 1일 1회 복강내 (ip) 투여의 효과를 보여준다. 구체적으로, 패널 A는 비히클 또는 150 mg/kg의 메타독신의 효과를 보여준다. 패널 B는 비히클 또는 100 mg/kg의 메타독신의 효과를 보여준다. 패널 C는 비히클 또는 200 mg/kg의 메타독신의 효과를 보여준다. 제시된 데이터는 평균 \pm 평균의 표준 오차 (sem)이고, N = 10마리 마우스/군이다. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, NS = 유의하지 않음.

도 2는 사회적 접근 행동에 대한 2개월령 Fmr1 녹아웃 (KO) 또는 야생형 (WT) 마우스에서 비히클 (V) 또는 150 mg/kg 메타독신 (M)의 7일의 1일 1회 복강내 투여의 효과를 보여준다. 제시된 데이터는 평균 \pm sem이고, N = 10마리 마우스/군이다. * $p < 0.05$ 및 **** $p < 0.0001$.

도 3은 2개월령 Fmr1 녹아웃 (KO) 또는 야생형 (WT) 마우스에서 Y형 미로 (Y-maze) 자발 변경 (패널 A), Y형 미로 보상된 변경 (패널 B) 또는 Y형 미로 수조 미로 공간 변별 (패널 C)에 대한 비히클 (V) 또는 150 mg/kg 메타독신 (M)의 7일의 1일 1회 복강내 투여의 효과를 보여준다. 제시된 데이터는 평균 \pm sem이고, N = 10마리 마우스/군이다. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, NS = 유의하지 않음.

도 4는 2개월령 Fmr1 녹아웃 (KO) 또는 야생형 (WT) 마우스에서 T형 미로 (T-maze) 보상된 변경에 대한 비히클 (V) 또는 150 mg/kg 메타독신 (M)의 7일의 1일 1회 복강내 투여의 효과를 보여준다. 제시된 데이터는 평균 \pm sem이고, N = 10마리 마우스/군이다. **** $p < 0.0001$.

도 5는 N = 10마리 야생형 (WT) 또는 Fmr1 녹아웃 (KO) 2개월령 마우스의 군에서 연속 주로 (successive alley) 과제에서 행동에 대한 비히클 (V) 또는 150 mg/kg 메타독신 (M)의 7일의 1일 1회 치료의 효과를 보여준다. 장치의 연속 주로는 마우스를 탐구하기 위해 진행적으로 보다 불안유발성 환경을 제공하였다. 따라서, 주로 아래로의 운동은 불안증을 평가하였다. 추가로, 전체 활동 수준을 또한 이 장치 내에서 정량할 수 있다.

도 6은 2개월령 Fmr1 녹아웃 (KO) 또는 야생형 (WT) 마우스에서 ERK (ERK 활성을 표시함) (패널 A) 및 Akt (Akt 활성을 표시함) (패널 B)의 인산화의 전체 뇌 수준에 대한 비히클 (V) 또는 150 mg/kg 메타독신 (M)의 7일의 1일 1회 복강내 투여의 효과를 보여준다. 제시된 데이터는 평균 \pm sem이고, N = 5마리 마우스/군이다. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, NS = 유의하지 않음.

도 7은 환경적 공포 조건화에 대한 6개월령 Fmr1 녹아웃 (KO) 또는 야생형 (WT) 마우스에서 7일 동안 비히클 (V) 또는 150 mg/kg 메타독신 (M)의 1일 1회 ip 투여의 효과를 보여준다. 제시된 데이터는 평균 \pm sem이고, N = 10마리 마우스/군이다. **** $p < 0.0001$ 및 ns = 유의하지 않음.

도 8은 한차례 냄새맡기 (sniffing bout)의 수 또는 냄새맡기의 지속시간에 의해 측정할 때, 6개월령 Fmr1 녹아웃 (KO) 또는 야생형 (WT) 마우스에서 사회적 접근 (패널 A 및 C) 및 사회적 기억 (패널 B 및 D) 행동에 대한 7일 동안 비히클 (V) 또는 150 mg/kg 메타독신 (M)의 1일 1회 ip 투여의 효과를 보여준다. 제시된 데이터는 평균 \pm sem이고, N = 10마리 마우스/군이다. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, 및 ns = 유의하지 않음.

도 9는 6개월령 Fmr1 녹아웃 (KO) 또는 야생형 (WT) 마우스에서 ERK (패널 A) 및 Akt (패널 B)의 인산화의 전체 뇌 수준에 대한 7일 동안 비히클 (V) 또는 150 mg/kg 메타독신 (M)의 1일 1회 ip 투여의 효과를 보여준다. 제

시된 데이터는 평균 \pm sem이고, N = 10마리 마우스/군이다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, 및 ns = 유의하지 않음.

도 10은 2개월령 Fmr1 녹아웃 (KO) 또는 야생형 (WT) 마우스에서 환경적 공포 조건화에 대한 7일 동안 1일 1회 150 mg/kg의 메타독신 (M) ip, 또는 비히클 (V) 또는 150 및 300 mg/kg의 메타독신의 경구 투여 (po)의 효과를 보여준다. 제시된 데이터는 평균 \pm sem이고, N = 10마리 마우스/군이다. 구체적으로, 패널 A는 Fmr1 녹아웃 및 야생형 마우스에서 비히클을 사용한 ip 및 경구 치료를 보여준다. 패널 B는 야생형 마우스에서 메타독신을 사용한 ip 및 경구 치료를 보여준다. 패널 C는 Fmr1 녹아웃 마우스에서 메타독신을 사용한 ip 및 경구 치료를 보여준다. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, 및 ns = 유의하지 않음.

도 11은 2개월령 Fmr1 녹아웃 (KO) 또는 야생형 (WT) 마우스에서 사회적 접근 (패널 A) 및 사회적 기억 (패널 B)에 대한 7일 동안 비히클 (V) 또는 150 또는 300 mg/kg의 메타독신 (M)의 1일 1회 ip 또는 경구 투여 (po)의 효과를 보여준다. 제시된 데이터는 평균 \pm sem이고, N = 10마리 마우스/군이다. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, 및 ns = 유의하지 않음.

도 12는 2개월령 Fmr1 녹아웃 (KO) 및 야생형 (WT) 마우스에서 유동 세포측정법을 사용하여 측정할 때 림프구 바이오마커 (biomarker)에 대한 7일 동안 비히클 (V) 또는 150 또는 300 mg/kg의 메타독신 (M)의 1일 1회 ip 또는 경구 투여 (po)의 효과를 보여준다. 제시된 바이오마커는 Fmr1 녹아웃 및 야생형 마우스에서 pAkt (패널 A) 및 pERK (패널 B)이다. 제시된 데이터는 평균 \pm sem이고, N = 10마리 마우스/군이다. **** $p < 0.0001$, 및 ns = 유의하지 않음.

도 13은 2개월령 야생형 (WT) 및 Fmr1 녹아웃 (KO) 마우스의 뇌 영역에서 pERK 수준에 대한 7일 동안 비히클 (V) 또는 150 mg/kg 메타독신 (M)의 1일 1회 ip의 효과를 보여준다. 분석된 영역은 Fmr1 녹아웃 또는 야생형 마우스에서 해마 (패널 A), 전전두 (pre-frontal) 피질 (패널 B), 및 선조체 (패널 C)이었다. 제시된 데이터는 평균 \pm sem이고, N = 10마리 마우스/군이다. **** $p < 0.0001$, 및 ns = 유의하지 않음.

도 14는 2개월령 야생형 (WT) 및 Fmr1 녹아웃 (KO) 마우스의 뇌 영역에서 pAkt 수준에 대한 7일 동안 비히클 (V) 또는 150 mg/kg 메타독신 (M)의 1일 1회 ip 투여의 효과를 보여준다. 분석된 영역은 Fmr1 녹아웃 또는 야생형 마우스에서 해마 (패널 A), 전전두 피질 (패널 B), 및 선조체 (패널 C)이었다. 제시된 데이터는 평균 \pm sem이고, N = 10마리 마우스/군이다. **** $p < 0.0001$, 및 ns = 유의하지 않음.

도 15는 Fmr1 녹아웃 (KO) 또는 야생형 (WT) 마우스로부터 뉴런 (neuron) 해마 배양액에서 사상위족 (filopodia) 밀도 (패널 A), 길이 (패널 B), 및 폭 (패널 C)에 대한 시험관 내 비히클 (V) 또는 300 μ M 메타독신 (M)을 사용한 5시간 치료의 효과를 보여준다. 제시된 데이터는 평균 \pm sem이다 (야생형, N = 20개의 뉴런, 및 Fmr1 녹아웃 마우스, N = 20개 뉴런). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, 및 ns = 유의하지 않음.

도 16은 Fmr1 녹아웃 (KO) 또는 야생형 (WT) 마우스로부터 400 μ M 해마 절편 (slice)에서 기초 드 노보 (de novo) 단백질 합성에 대한 비히클 (V) 또는 300 μ M 메타독신 (M)을 사용한 시험관 내 치료 효과를 보여준다. 제시된 데이터는 평균 \pm sem이고, N = 6개 절편/군이다. * $p < 0.001$ 및 **** $p < 0.0001$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020]

발명의 상세한 설명

[0021]

본 발명은 취약 X 증후군 (FXS) 및 다른 인지 장애가 있는 개체의 메타독신 요법에 대한 반응과 연관된 바이오마커의 확인에 관한 것이다. 구체적으로, 메타독신 치료는 대상체 샘플 내의 인산화된 ERK 및 Akt 단백질 대 총 ERK 및 Akt 단백질의 비를 정상 비에 보다 근접하게 되돌리는 것으로 밝혀졌다. 정상 비는 정상 (즉, 질환에 걸리지 않은) 대상체에서 발견된 인산화된 ERK 및 Akt 단백질 대 총 ERK 및 Akt 단백질의 비를 의미한다. 또한, 상기 인산화된 ERK 및 Akt 단백질 대 총 ERK 및 Akt 단백질 비의 변화가 혈액에서 검출될 수 있음이 예상치 않게 밝혀졌다.

[0022]

따라서, 본 발명은 대상체 샘플에서 인산화된 ERK 및 Akt 단백질 대 총 ERK 및 Akt 단백질의 비를 결정함으로써 FXS 또는 다른 인지 장애에 대한 메타독신 치료를 받고 있는 대상체를 모니터링하는 방법을 제공한다. 비는 대조군 비, 예컨대 인지 장애에 걸리지 않은 대상체로부터 얻은 비와 비교된다. 정상 대조군 비와 유사한 대상체

의 비는 치료가 효능이 있음을 나타낸다.

- [0023] 추가로, 본 발명은 대상체 샘플에서 인산화된 ERK 또는 Akt 단백질 대 총 ERK 및 Akt 단백질의 비를 결정함으로써 메타독신 치료로부터 이익을 얻게 될 인지 장애가 있는 대상체를 선택하는 방법을 제공한다. 비는 대조군 비, 예컨대 인지 장애에 걸리지 않은 대상체로부터 얻은 비와 비교된다. 정상 대조군 비보다 큰 대상체의 비는 대상체가 메타독신 치료로부터 이익을 얻을 수 있음을 나타낸다. 반면에, 정상 대조군 비보다 큰 비를 갖지 않는 대상체는 메타독신 치료로부터 이익이 얻어지지 않을 수 있다.
- [0024] 비의 계산은 본원에서 일방향으로 설명되지만, 통상의 기술자에게 자명한 바와 같이 그 역을 계산하는 것을 포함하는 것이 이해되어야 한다. 또한, 본원에서 설명되는 비의 계산은 유용한 상대적인 수를 제공할 때 유용한 반면, 인산화된 ERK 및 Akt 단백질과 총 ERK 및 Akt 단백질 수준 사이의, 및 시험 대상체와 대조군 대상체 사이의 절대적인 차이의 계산도 사용될 수 있고, 본 발명을 실시하는데 효과적으로 사용될 것이다.
- [0025] **정의**
- [0026] "정확도"는 측정된 또는 계산된 양 (시험 보고된 값)의 그의 실제 (또는 진정한) 값에 대한 일치도를 의미한다. 임상 정확도는 진정한 성과 (진정한 양성 (TP) 또는 진정한 음성 (TN)) 대 오분류된 성과 (거짓 양성 (FP) 또는 거짓 음성 (FN))의 비율에 관한 것이고, 양성 예측 값 (PPV) 또는 음성 예측 값 (NPV), 또는 다른 척도 중에서 가능성, 승산비 (odds ratio)로 언급될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 문맥에서 "바이오마커"는 비제한적으로, 단백질, 핵산, 및 대사산물, 이들의 다형성, 돌연변이, 변이체, 변형, 서브유닛, 단편, 단백질-리간드 복합체, 및 분해 생성물, 단백질-리간드 복합체, 요소, 관련 대사산물, 및 다른 분석물 또는 샘플-유래 척도를 포함한다. 바이오마커는 또한 돌연변이된 단백질 또는 돌연변이된 핵산을 포함할 수 있다. 바이오마커는 또한 건강 상태의 비-혈액 매개 인자 또는 비-분석물 생리학적 마커, 예컨대 본원에서 규정되는 "임상 파라미터", 및 또한 본원에서 규정되는 "전통적인 실험 위험 인자"를 포함한다. 바이오마커는 또한 수학적으로 생성된 임의의 계산된 지수 (index) 또는 일시적 경향 및 차이를 비롯한 임의의 하나 이상의 상기 측정의 조합을 포함한다. 이용가능한 경우에, 본원에서 달리 설명하지 않으면, 유전자 생성물인 바이오마커는 국제 인간 게놈 기구 명명 위원회 (Human Genome Organization Naming Committee) (HGNC)에 의해 할당되고 미국 국립 생물공학 정보센터 (US National Center for Biotechnology Information) (NCBI)의 웹 사이트에 본 출원의 출원일에 게시된 공식적인 문자 약어 또는 유전자 기호를 기초로 하여 확인된다.
- [0028] "임상 지표"는 세포 또는 유기체의 집단의 생리학적 상태를 평가할 때 단독으로 또는 다른 데이터와 함께 사용되는 임의의 생리학적 데이터이다. 이 용어는 전-임상 지표를 포함한다.
- [0029] "임상 파라미터"는 대상체 건강 상태에 대한 모든 비-샘플 또는 비-분석물 바이오마커 또는 다른 특징, 예컨대, 비제한적으로, 연령 (Age), 민족성 (RACE), 성별 (Sex), 또는 가족력 (FamHX)을 포함한다.
- [0030] "FN"은 거짓 음성이고, 질환 상태 시험에서 질환 대상체를 비-질환 또는 정상으로서 부정확하게 분류하는 것을 의미한다.
- [0031] "FP"는 거짓 양성이고, 질환 상태 시험에서 정상 대상체를 질환이 있는 것으로 부정확하게 분류하는 것을 의미한다.
- [0032] "공식", "알고리즘" 또는 "모델"은 하나 이상의 연속형 또는 범주형 입력 (이하 "파라미터"로 부름)을 통해, 때때로 "지수" 또는 "지수 값"으로 언급되는 출력 값을 계산하는 임의의 수학적, 알고리즘, 분석 또는 프로그램된 (programmed) 과정, 또는 통계학적 기술이다. "공식"의 비제한적인 예는 합계, 비, 및 회귀 연산자 (operator), 예컨대 계수 또는 지수 (exponent), 바이오마커 값 전환 및 표준화 (비제한적으로, 임상 파라미터, 예컨대 성별, 연령, 또는 민족성을 기초로 한 표준화 방식 포함), 규칙 및 지침, 통계학적 분류 모델, 및 선조 집단 (historical population)에 대해 훈련된 신경 네트워크를 포함한다. 패널 및 조합의 구축에서, 특히 관심을 끄는 것은 구조적 및 공동작용의 (synaptic) 통계학적 분류 알고리즘, 및 패턴 인지 특징을 이용하는 위험 지수 구축 방법, 예를 들어 확립된 기술, 예컨대 상호 상관관계 (cross-correlation), 주성분 분석 (PCA), 요인 변환 (factor rotation), 로지스틱 회귀 (LogReg), 선형 판별 분석 (LDA), 고유유전자 (Eigengene) 선형 판별 분석 (ELDA), 지지 벡터 머신 (Support Vector Machine) (SVM), 랜덤 포레스트 (Random Forest) (RF), 반복적 분할 트리 (Recursive Partitioning Tree) (RPART), 및 다른 관련 결정 트리 (decision tree) 분류 기술, 특히 수축 중심 (Shrunken Centroid) (SC), StepAIC, Kth-최근린법 (Kth-Nearest Neighbor), 부스팅 (Boosting), 결정 트리, 신경 네트워크 (Neural Network), 베이지 네트워크 (Bayesian Networks), 지지 벡터 머신, 및 히든 마르코프 (Hidden Markov) 모델이다. 통상의 기술자에게 잘 알려진 콕스 (Cox), 웨이블 (Weibull), 카플란-마

이어 (Kaplan-Meier) 및 그린우드 (Greenwood) 모델을 포함하는 다른 기술이 생존 및 time to 사건 위험 분석에 사용될 수 있다. 많은 이들 기술은 선택 기술, 예컨대 전진 (forward) 선택, 후진 (backwards) 선택, 또는 단계식 선택, 제시된 크기의 모든 잠재적인 패널의 완전한 목록, 유전적 알고리즘과 유용하게 조합되거나, 또는 이들은 그 자체의 기술 내에 바이오마커 선택 방법을 포함할 수 있다. 이들은 추가의 바이오마커와 모델 개선 사이의 균형 유지 (tradeoff)를 정량하기 위해, 및 과적응 (overfit)의 최소화를 돕기 위해 정보 기준, 예컨대 아카이케 정보 기준 (Akaike's Information Criterion) (AIC) 또는 베이즈 정보 기준 (Bayes Information Criterion) (BIC)과 연계될 수 있다. 생성되는 예측 모델은 다른 연구에서 검증되거나, 또는 부트스트랩 (Bootstrap), 리브-원-아웃 (Leave-One-Out) (LOO) 및 10-배 교차-검증 (10-배 CV)과 같은 기술을 사용하여 이들이 본래 훈련된 연구에서 교차-검증될 수 있다. 다양한 단계에서, 거짓 발견율은 관련 기술분야에 공지된 기술에 따른 값 순열 (value permutation)에 의해 추정할 수 있다. "보건 경제적 유용성 함수"는 진단적 또는 치료적 개입의 치료 기준 내로의 도입 전 및 후 둘 모두에 이상적인 적용가능한 환자 집단에서 다양한 임상 성과의 예상된 확률의 조합으로부터 유래되는 식이다. 이것은 상기 개입의 정확도, 타당성 및 성능 특징의 추정치, 및 실제 보건 시스템 비용 (서비스, 물품, 장비 및 약물 등)으로부터 및/또는 각각의 성과를 유도하는 질 보정 수명 (QALY) 당 추정된 허용되는 값으로부터 유도될 수 있는 각각의 성과와 연관된 비용 및/또는 값 측정 (유용성)을 포함한다. 모든 예측된 성과에 걸쳐, 각각의 성과의 예상된 유용성을 곱한 성과에 대해 예측된 집단 크기의 곱의 총합은 제시된 치료 기준의 총 보건 경제적 유용성이다. (i) 개입이 존재하는 상태의 치료 기준에 대해 계산된 총 보건 경제적 유용성 대 (ii) 개입이 없는 상태의 치료 기준에 대한 총 보건 경제적 유용성 사이의 차이는 개입의 보건 경제적 비용 또는 값에 대한 전체 척도를 제시한다. 이것은 단위 개입 당 비용에 도달하고 상기 결정을 시장 지위, 가격 책정, 및 보건 시스템 허용도의 추정으로서 유도하기 위해 분석되는 전체 환자군 사이에서 (또는 단지 개입군 사이에서) 나뉠 수 있다. 상기 보건 경제적 유용성 함수는 개입의 비용-유효성을 비교하기 위해 통상적으로 사용되지만, 또한 보건 시스템이 기꺼이 지불할 수 있는 QALY 당 허용되는 값, 또는 새로운 개입을 필요로 하는 허용되는 비용-효과적인 임상 성능 특징을 추정하기 위해 변환될 수 있다.

[0033] 각각의 성과 (질환 분류 진단 시험에서 TP, FP, TN, 또는 FN일 수 있음)는 상이한 비용이 소요되기 때문에, 본 발명의 진단적 (또는 예후) 개입을 위해, 보건 경제적 유용성 함수는 임상 상황 및 개별 성과 비용 및 값을 기초로 하여 특이성보다 민감성을, 또는 NPV보다 PPV를 우선적으로 선호할 수 있고, 따라서 보다 직접적인 임상적 또는 분석적 성능 척도와 상이할 수 있는 보건 경제적 성능 및 값의 또 다른 척도를 제공한다. 이러한 상이한 측정치 및 상대적인 균형 유지는 일반적으로 오류율 0 (0의 예측된 대상체 성과 착오분류 또는 FP 및 FN로 알려짐)의 완전한 시험의 경우에만 수렴될 것이고, 모든 성능 척도는 상이한 정도이지만 불완전한 상태보다 더 유리할 것이다.

[0034] "측정하는" 또는 "측정" 또는 별법으로 "검출하는" 또는 "검출"은 임상 또는 대상체-유래 샘플 내의 제시된 물질의 정성적 또는 정량적 농도 수준의 유도를 포함하는 상기 물질의 존재, 부재, 수량 또는 양 (유효량일 수 있음)의 평가 또는 대상체의 비-분석물 임상 파라미터의 값 또는 분류에 대한 평가를 의미한다.

[0035] "음성 예측 값" 또는 "NPV"는 $TN/(TN+FN)$ 또는 모든 음성 시험 결과의 진정한 음성 비율에 의해 계산한다. 이것은 또한 시험이 의도되는 집단의 질환 유병률 및 사전검사 확률에 의해 본질적으로 영향받는다. 예를 들어, 시험, 예를 들어, 임상 진단 시험의 특이성, 민감성, 및 양성 및 음성 예측 값을 논의하고 있는 문헌 [O'Marcaigh A S, Jacobson R M, "Estimating The Predictive Value Of A Diagnostic Test, How To Prevent Misleading Or Confusing Results," Clin. Ped. 1993, 32(8): 485-491]을 참고한다. 종종, 연속 진단 시험 측정을 이용하는 이진 (binary) 질환 상태 분류 방식에 대해, 민감성 및 특이성은 문헌 [Pepe et al., "Limitations of the Odds Ratio in Gauging the Performance of a Diagnostic, Prognostic, or Screening Marker," Am. J. Epidemiol 2004, 159 (9): 882-890]에 따른 수신기 작동 특성 (ROC) 곡선에 의해 요약되고, 곡선하 면적 (AUC) 또는 단지 단일 값으로 시험 (또는 검정) 차단점 (cut point)의 전체 범위에 걸친 시험, 검정, 또는 방법의 민감성 및 특이성의 제시를 허용하는 지표인 c-통계학에 의해 요약된다. 또한, 예를 들어, 문헌 [Shultz, "Clinical Interpretation Of Laboratory Procedures," chapter 14 in Teitz, Fundamentals of Clinical Chemistry, Burtis and Ashwood (eds.), 4th edition 1996, W.B. Saunders Company, pages 192-199]; 및 [Zweig et al., "ROC Curve Analysis: An Example Showing The Relationships Among Serum Lipid And Apolipoprotein Concentrations In Identifying Subjects With Coronary Artery Disease," Clin. Chem., 1992, 38(8): 1425-1428]을 참고한다. 가능성 함수, 승산비, 정보 이론, 예측 값, 교정 (calibration) (적합도 (goodness-of-fit) 포함), 및 재분류 측정을 이용하는 다른 방식은 문헌 [Cook, "Use and Misuse of the Receiver Operating Characteristic Curve in Risk Prediction," Circulation 2007, 115: 928-935]에 따라 요

약된다. 마지막으로, 시험에 의해 규정되는 대상체 코호트 (cohort) 내의 위험 비 및 절대적 및 상대적 위험 비는 임상 정확도 및 유용성의 추가의 척도이다. 참조 한계, 식별 한계, 및 위험 역치를 비롯하여 비정상 또는 질환 값을 규정하기 위해 다수의 방법이 빈번하게 사용된다.

- [0036] "분석 정확도"는 측정 과정 자체의 재현가능성 및 예측가능성을 의미하고, 변동 계수와 같은 측정치, 및 상이한 시간, 사용자, 장치 및/또는 시약을 사용한, 동일한 샘플 또는 대조군의 일치 및 교정의 시험에 의해 요약될 수 있다. 새로운 바이오마커의 평가시에 이들 및 다른 고려사항은 또한 문헌 [Vasan, 2006]에 요약되어 있다.
- [0037] "성능"은 특히 임상 및 분석 정확도, 다른 분석 및 공정 특징, 예컨대 사용 특징 (예를 들어, 안정성, 사용 용이성), 보건 경제적 가치, 및 시험 성분의 상대적인 비용을 포함하는, 진단 또는 예후 시험의 전체적인 유용성 및 질에 관련되는 용어이다. 임의의 이들 인자는 우수한 성능, 따라서 시험의 유용성의 원천일 수 있고, 적절한 "성능 계측", 예컨대 관련되는 AUC, 결과 획득 시간, 유효 기간 등에 의해 측정될 수 있다.
- [0038] "양성 예측 값" 또는 "PPV"는 $TP/(TP+FP)$ 또는 모든 양성 시험 결과의 진정한 양성 분율에 의해 계산된다. 이것은 시험이 의도되는 집단의 질환 유병률 및 사전검사 확률에 의해 본질적으로 영향받는다.
- [0039] 본 발명의 문맥에서 "위험"은 치료에 대한 반응처럼 사건이 특정 기간에 걸쳐 발생할 확률에 관한 것이고, 대상체의 "절대적" 위험 또는 "상대적" 위험을 의미할 수 있다. 절대적 위험은 관련 시간 코호트에 대해 측정 후 실제 관찰을 참고로 하여, 또는 관련 시간 동안 경과가 관찰된 통계학상 유효한 과거 (historical) 코호트로부터 발생한 지수 값을 참고로 하여 측정될 수 있다. 상대적인 위험은 저위험 코호트의 절대적 위험 또는 임상 위험 인자 평가 방법에 따라 상이할 수 있는 평균 집단 위험과 비교한 대상체의 절대적 위험의 비를 의미한다. 제시된 시험 결과에 대한 양성 사건 대 음성 사건의 비율인 승산비가 또한 전환하지 않은 상태로 통상적으로 사용된다 (승산비는 식 $p/(1-p)$ 에 따르고, 여기서 p 는 사건의 확률이고, $(1-p)$ 는 사건이 발생하지 않을 확률임).
- [0040] 본 발명의 문맥에서 "위험 평가" 또는 "위험의 평가"는 사건 또는 질환 상태가 발생할 수 있는 확률, 승산, 또는 가능성, 한 질환 상태에서부터 사건 또는 전환의 발생 비율을 예측하는 것을 포함한다. 위험 평가는 또한 이전에 측정된 집단에 대한 절대적인 또는 상대적인 측면에서 미래의 임상 파라미터, 전통적인 실험 위험 인자 값, 또는 FXS의 다른 지수의 예측을 포함할 수 있다. 본 발명의 방법은 치료에 대한 반응의 연속형 또는 범주형 측정을 수행하고, 이에 따라 반응자 또는 비-반응자로서 규정된 대상체 범주의 위험 스펙트럼의 진단 및 규정을 위해 사용될 수 있다. 범주형 시나리오에서, 본 발명은 반응에 대한 더 높은 위험에서 정상 및 다른 대상 코호트 사이를 식별하기 위해 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 문맥에서 "샘플"은 대상체로부터 단리된 생물학적 샘플이고, 예를 들어, 비제한적으로 전체 혈액, 혈청, 혈장, 뇌척수액 (CSF), 뇌 세포, 또는 임의의 다른 분비물, 배설물, 또는 다른 체액을 포함할 수 있다. "샘플"은 단일 세포 또는 다수 세포 또는 세포의 단편을 포함할 수 있다. 샘플은 또한 조직 샘플이다. 샘플은 뇌 세포 또는 림프구이거나 이를 함유한다. 바람직하게는, 샘플은 말초 혈액 단핵 세포, 예컨대 림프구 또는 단핵구이다.
- [0042] "민감성"은 $TP/(TP+FN)$ 또는 질환 대상체의 진정한 양성 분율에 의해 계산된다.
- [0043] "특이성"은 $TN/(TN+FP)$ 또는 비-질환 또는 정상 대상체의 진정한 음성 분율에 의해 계산된다.
- [0044] "통계학상 유의한"은 변이가 단지 우연히 발생할 것으로 예상될 수 있는 것 ("거짓 양성"일 수 있음)보다 더 큰 의미를 가진다. 통계학적 유의성은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 결정할 수 있다. 통상적으로 사용되는 유의성 척도는 데이터 점이 단지 우연의 결과임을 가정하면서, 적어도 제시된 데이터 점만큼 극단적인 결과를 얻을 확률을 나타내는 p -값을 포함한다. 결과는 0.05 이하의 p -값에서 매우 유의한 것으로 간주된다. 바람직하게는, p -값은 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001 또는 그 미만이다.
- [0045] 본 발명의 문맥에서 "대상체"는 바람직하게는 포유동물이다. 포유동물은 인간, 비-인간 영장류, 마우스, 래트, 개, 고양이, 말, 또는 소일 수 있고, 이들 예로 제한되지 않는다. 인간 이외의 다른 포유동물은 FXS의 동물 모델을 나타내는 대상체로서 유용하게 사용될 수 있다. 대상체는 남성 또는 여성일 수 있다. 대상체는 FXS 또는 다른 인지 장애가 존재하고 있거나 또는 존재할 것으로 의심된다.
- [0046] "TN"은 진정한 음성이고, 질환 상태 시험에서 비-질환 또는 정상 대상체를 정확하게 분류하는 것을 의미한다.
- [0047] "TP"는 진정한 양성이고, 질환 상태 시험에서 질환 대상체를 정확하게 분류하는 것을 의미한다.
- [0048] "전통적인 실험 위험 인자"는 대상체 샘플로부터 단리되거나 유래되고 현재 임상 실험실에서 평가되고 전통적인

전반적 위험 평가 알고리즘에서 사용되는 바이오마커에 대응한다. 취약 X에 대한 다른 전통적인 실험 위험 인자는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 알려져 있다.

[0049] **본 발명의 방법**

[0050] 본원에 개시된 방법은 FXS 및 다른 인지 장애에 대한 메타독신 치료 및/또는 요법을 받고 있는 대상체 및 FXS 및 다른 인지 장애를 진단받은 대상체에게 사용된다.

[0051] 본 발명의 방법은 대상체에서 FXS 및 다른 인지 장애의 치료를 모니터링하고 메타독신 치료로부터 이익을 얻게 될 대상체를 선택하기 위해 유용하다.

[0052] 일반적으로, FXS의 징후 및 증상은 다음과 같은 5개의 범주에 해당한다: 지능 및 학습; 신체적, 사회적 및 정서적, 말하기 및 언어 및 통상적으로 취약 X와 연관되거나 취약 X와 특징을 공유하는 지각 장애. 예를 들어, FXS가 존재하는 개체는 손상된 지적 기능, 사회적 불안증, 언어 장애 및 특성 감각에 대한 민감성을 갖는다.

[0053] 인지 장애는 정신 작용의 기능장애/손상이 중심 증상을 구성하는 일군의 장애를 포함한다. 인지 장애는 신경유전적 인지 장애 또는 행동 인지 장애를 포함한다.

[0054] 인지 장애는 발달 장애, 주의력 결핍 과잉행동 장애 (ADHD), 자폐 범주성 장애, 알츠하이머 (Alzheimer) 질환, 정신분열증 및 뇌혈관 질환을 포함한다.

[0055] 자폐 범주성 장애 및 자폐 증상은 취약 X 증후군이 있는 개체와 일반적으로 연관된다. 자폐증의 징후 또는 증상은 유의한 언어 지연, 사회적 및 의사소통 문제, 및 이상한 행동 및 관심을 포함한다. 자폐 장애가 있는 많은 사람은 또한 지적 장애를 갖고 있다.

[0056] 대상체 샘플 내의 인산화된 ERK 및 Akt 단백질 대 총 ERK 및 Akt 단백질의 비의 결정은 FXS 또는 다른 인지 장애의 치료 과정의 모니터링을 허용한다. 상기 방법에서, 생물학적 샘플은 치료를 받고 있는 대상체로부터 제공된다. 요구될 경우, 생물학적 샘플은 치료 전, 동안 또는 후의 다양한 시점에서 대상체로부터 얻는다. 이어서, 인산화된 ERK 및 Akt 단백질 대 총 ERK 및 Akt 단백질의 비를 계산한 후, 대조군 값과 비교한다. 대조군 값은 그의 인산화된 ERK 및 Akt 단백질 대 총 ERK 및 Akt 단백질의 비가 알려져 있거나 지수 값인 대조군 개체 또는 집단이다. 참조 샘플 또는 지수 값은 발병하지 않은 (예를 들어, FXS 또는 다른 인지 장애가 이환되지 않은) 하나 이상의 개체로부터 얻거나 유도될 수 있다. 별법으로, 참조 샘플 또는 지수 값은 치료 전에 대상체로부터 얻거나 유도될 수 있다. 예를 들어, 샘플은 치료의 진행을 모니터링하기 위해 초기 치료를 받지 않은 대상체로부터 후속 치료 후에 수집될 수 있다. 참조 샘플 또는 지수 값은 초기 치료 후에 대상체로부터 얻거나 유도될 수 있다. 예를 들어, 샘플은 치료의 진행을 모니터링하기 위해 초기 치료 및 FXS에 대한 후속 치료를 받은 대상체로부터 수집될 수 있다.

[0057] 또 다른 실시양태에서, 참조 값은 지수 값 또는 기준선 값이다. 지수 값 또는 기준선 값은 FXS 또는 다른 인지 장애를 앓고 있지 않은 개체로부터의 인산화된 ERK 및 Akt 단백질 대 총 ERK 및 Akt 단백질의 비의 복합 표본이다.

[0058] 치료의 유효성은 시간에 걸쳐 대상체로부터 얻은 샘플 내의 인산화된 ERK 및 Akt 단백질 대 총 ERK 및 Akt 단백질의 비를 결정하고 비들을 비교함으로써 모니터링될 수 있다. 예를 들어, 제1 샘플은 대상체가 치료 받기 전에 얻고, 하나 이상의 후속적인 샘플은 대상체의 치료 후 또는 치료 동안 채취할 수 있다.

[0059] "효능 있는"은 치료가 인산화된 ERK 및 Akt 단백질 대 총 ERK 및 Akt 단백질의 비를 FXS 또는 다른 인지 장애가 없는 대상체로부터의 대응하는 비와 유사하게 만드는 것을 의미한다. 효능은 FXS의 진단, 확인, 또는 치료를 위한 임의의 공지의 방법과 함께 결정될 수 있다.

[0060] 인산화된 ERK 및 Akt와 총 ERK 및 Akt 단백질은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법, 예컨대 면역 검정에 의해 결정할 수 있다.

[0061] **본 발명의 성능 및 정확도 척도**

[0062] 본 발명의 성능 및 따라서 절대적 및 상대적 임상 유용성은 상기한 많은 방법으로 평가할 수 있다. 진단, 예측, 또는 예후 시험, 검정, 또는 방법의 정확도는 인산화된 ERK 및 Akt 단백질 대 총 ERK 및 Akt 단백질의 비를 기초로 하여 메타독신 치료에 반응성인 대상체와 그렇지 않은 대상체를 구별하는 시험, 검정, 또는 방법의 능력에 관련된다. 정상과 비정상 사이의 비의 차이는 바람직하게는 통계학상 유의하다.

- [0063] 따라서, 대상체의 상태를 평가하기 위해 제시된 의료 시험, 검정, 또는 방법의 정확도 및 유용성을 평가할 때, 항상 민감성 및 특이성을 모두 고려하고, 민감성 및 특이성은 차단점의 범위에 걸쳐 유의하게 상이할 수 있기 때문에 민감성 및 특이성이 어떠한 차단점에서 보고되는지 유의하여야 한다. 모든 잠재적인 차단점 값을 포함하는 통계학, 예컨대 AUC의 사용은 본 발명을 사용하는 대부분의 범주성 위험 척도에 대해 바람직한 반면, 연속 위험 척도의 경우, 관찰된 결과 또는 다른 최적 표준 (gold standard)에 대한 적합도 및 교정의 통계학이 바람직하다.
- [0064] 상기 통계학을 사용하여, "진단 정확도의 허용되는 정도"는 본원에서 AUC (시험 또는 검정에 대한 ROC 곡선 하 면적)가 적어도 0.60, 바람직하게는 적어도 0.65, 보다 바람직하게는 적어도 0.70, 바람직하게는 적어도 0.75, 보다 바람직하게는 적어도 0.80, 가장 바람직하게는 적어도 0.85인 시험 또는 검정으로 규정된다.
- [0065] "매우 높은 정도의 진단 정확도"는 AUC (시험 또는 검정에 대한 ROC 곡선 하 면적)가 적어도 0.80, 바람직하게는 적어도 0.85, 보다 바람직하게는 적어도 0.875, 바람직하게는 적어도 0.90, 보다 바람직하게는 적어도 0.925, 가장 바람직하게는 적어도 0.95인 시험 또는 검정을 의미한다.
- [0066] 임의의 시험의 예측 값은 시험의 민감성 및 특이성, 및 시험되는 집단 내의 병태의 유병률에 따라 결정된다. 상기 개념은 베이즈 정리 (Bayes' theorem)를 기초로 하여, 스크리닝되는 병태가 개체 또는 집단에 존재할 가능성 (사전검사 확률)이 클수록, 양성 시험의 유효성이 크고 결과가 진정한 양성일 가능성이 더 큼을 제시한다. 따라서, 병태가 존재할 가능성이 낮은 임의의 집단에서 시험을 사용할 때의 문제는 양성 결과가 제한된 값을 갖는다 (즉, 거짓 양성일 가능성이 크다)는 것이다. 이와 유사하게, 위험이 매우 높은 집단에서, 음성 시험 결과는 거짓 음성일 가능성이 더 높다.
- [0067] 그 결과, ROC 및 AUC는 낮은 질환 유병률 (매년 1% 미만의 발생률 (발생 정도), 또는 특정 시간대에 걸쳐 10% 미만의 누적 유병률을 보이는 집단으로 규정되는)의 시험 집단에서 시험의 임상 유용성에 대해 오도할 수 있다. 별법으로, 본 개시내용의 다른 곳에서 규정되는 절대적 위험 및 상대적 위험 비는 임상 유용성 정도를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 시험되는 대상체의 집단은 또한 시험 측정값에 의해 사분위수 (quartile)로 분류되고, 여기서 상위 사분위수 (집단의 25%)는 치료 비반응성에 대해 가장 높은 상대적인 위험을 갖는 대상체의 군을 포함하고, 하위 사분위수는 치료 비반응성에 대해 가장 낮은 상대적인 위험을 갖는 대상체의 군을 포함한다. 일반적으로, 낮은 유병률 집단에서 상위 사분위수로부터 하위 사분위수까지 2.5배 초과와 상대적인 위험을 갖는 시험 또는 검정으로부터 유래된 값은 "높은 정도의 진단 정확도"로 간주되고, 각각의 사분위수에 대해 5 내지 7 배의 상대적인 위험을 갖는 것은 "매우 높은 정도의 진단 정확도"로 간주된다. 그럼에도 불구하고, 각각의 사분위수에 대해 단지 1.2 내지 2.5배의 상대적인 위험을 갖는 시험 또는 검정으로부터 유래된 값은 임상적으로 유용하고 질환에 대한 위험 인자로서 널리 사용되고; 이것은 총 콜레스테롤 및 미래 사건의 예측에 대한 많은 염증 바이오마커의 경우에도 그러하다. 종종 상기 더 낮은 진단 정확도 시험은 상기 언급된 전반적 위험 평가 지수를 사용하여 수행하는 바와 같이 치료적 개입을 위해 의미있는 임상 역치를 유도하기 위해 추가의 파라미터와 조합되어야 한다.
- [0068] 보건 경제적 유용성 함수는 각각의 임상 및 경제적 가치의 실제 척도를 기초로 하여 잠재적인 범주적 시험 성과에 가중치를 주는 것으로 이루어진, 제시된 시험의 성능 및 임상적 가치를 측정하는 또 다른 수단이다. 보건 경제적 유용성 함수는 정확한 분류의 이익 및 시험된 대상체의 오류 분류의 비용에 대해 경제적 가치를 특이적으로 할당하기 때문에, 보건 경제적 성능은 정확도에 밀접하게 관련된다. 성능 척도로서, 시험의 표적 가치를 초과하는 시험당 보건 경제적 가치 (시험 비용 차감 전)의 증가를 유도하는 성능 수준을 달성하기 위해 시험을 필요로 하는 것은 이상한 것이 아니다.
- [0069] **임상 알고리즘의 구축**
- [0070] 임의의 공식을 사용하여 결과를 본 발명의 실행에 유용한 지수로 조합할 수 있다. 상기 나타난 바와 같이, 비제한적으로, 상기 지수는 다양한 다른 지표 중에서 메타독신에 반응할 확률, 가능성, 절대적 또는 상대적 기회를 나타낼 수 있다. 이것은 특정 기간 또는 시간대, 또는 잔여 생애 위험에 대한 것이거나, 또는 간단히 또 다른 참조 대상체 집단에 상대적인 지수로서 제공될 수 있다.
- [0071] 다양한 바람직한 공식이 본원에서 설명되지만, 본원에서 및 상기 정의에서 언급된 것 이외의 여러 다른 모델 및 공식 종류가 통상의 기술자에게 잘 공지되어 있다. 사용되는 실제 모델 종류 또는 공식은 훈련 집단에서 그의 결과의 성능 및 정확도 특징을 기초로 하여 잠재적인 모델의 분야로부터 그 자체가 선택될 수 있다. 바람직한 공식은 광범한 클래스의 통계학상 분류 알고리즘, 및 특히 식별 분석의 사용을 포함한다. 식별 분석의 목표는

이전에 확인된 세트의 속성으로부터 클래스 구성원 수를 예측하는 것이다. 선형 식별 분석 (LDA)의 경우에, 일부 기준에 의해 군 중에서 분리를 최대화하는 속성의 선형 조합이 확인된다. 속성은 상이한 역치 (ELDA) 또는 다변량 분산 분석 (MANOVA)을 기초로 한 스텝핑 (stepping) 알고리즘을 사용하는 고유유전자 기반 방식을 통해 LDA에 대해 확인될 수 있다. 호텔링-몰리 (Hotelling-Lawley) 통계학을 기초로 하여 분리가 이루어지지 않는 확률을 최소화하는 전진, 후진, 및 단계적 알고리즘을 수행할 수 있다.

[0072] 고유유전자-기반 선형 식별 분석 (ELDA)은 문헌 [Shen et al. (2006)]에 의해 개발된 속성 선택 기술이다. 공식은 가장 중요한 고유벡터 (eigenvector)와 연관된 속성을 확인하기 위해 변형된 고유 분석을 이용하여 다변량 프레임워크에서 속성 (예를 들어 바이오마커)을 선택한다. "중요한"은 일부의 역치에 대해 분류가 시도되는 샘플 사이에서 차이의 대부분의 변화를 설명하는 고유벡터로서 규정된다.

[0073] 지지 벡터 머신 (SVM)은 2개의 클래스를 분리하는 초평면 (hyperplane)을 발견하기 위해 시도하는 분류 방식이다. 상기 초평면은 지지 벡터, 초평면으로부터 정확히 경계간 (margin) 거리인 데이터 점을 포함한다. 분리 초평면이 데이터의 현재 차원에 존재하지 않는 가능한 사건에서, 차원수 (dimensionality)는 원래의 변수의 비-선형 함수를 취하여 데이터를 보다 큰 차원으로 투사함으로써 크게 팽창된다 (Venables and Ripley, 2002). 요구되지는 않지만, SVM에 대한 속성의 여과는 종종 예측을 개선한다. 속성 (예를 들어, 바이오마커)은 최적의 단변량 속성을 선택하기 위해 비-파라미터 크루스칼-월리스 (Kruskal-Wallis) (KW) 시험을 사용하여 지지 벡터 머신에 대해 확인될 수 있다. 랜덤 포레스트 (RF, Breiman, 2001) 또는 반복적 분할 (RPART, Breiman et al. 1984)이 또한 별개로 또는 가장 중요한 바이오마커 조합을 확인하기 위해 조합하여 사용될 수 있다. KW 및 RF는 둘 모두 많은 속성이 전체로부터 선택될 것을 필요로 한다. RPART는 이용가능한 바이오마커의 하위세트를 사용하여 단일 분류 트리를 생성한다.

[0074] ERK 및/또는 Akt 측정의 개별 인산화의 결과를 예측 공식에 적용하기 전에 보다 가치있는 정보 형태로 미리 처리하기 위해 다른 공식이 사용될 수 있다. 특히, 통상적인 수학적 전환, 예컨대 대수 또는 로지스틱 함수를 사용하여 집단의 평균 값에 관하여 정규 분포 또는 다른 분포 위치 등으로서 바이오마커의 표준화 결과는 모두 통상의 기술자에게 잘 공지되어 있다. 임상 파라미터, 예컨대 연령, 성별, 인종, 또는 성을 기초로 한 표준화의 세트가 특히 관심을 끌고, 여기서 특정 공식이 클래스 내의 대상체에 대해서만 사용되거나 또는 입력으로서 임상 파라미터를 연속적으로 조합한다. 다른 경우에, 분석물-기반 바이오마커는 후에 공식에 제시되는 계산된 변수로 조합될 수 있다.

[0075] 잠재적으로 정규화되는 1명의 대상체의 개별 파라미터 값에 추가로, 모든 대상체, 또는 대상체의 임의의 알려진 클래스에 대한 전체 예측 공식은 문헌 [D'Agostino et al., (2001) JAMA 286:180-187]에 개관된 기술, 또는 다른 유사한 표준화 및 재교정 기술에 따라 집단의 예상된 유병률 및 평균 바이오마커 파라미터 값에 대한 조정을 기초로 하여 그 자체가 재교정되거나 다른 방식으로 조정될 수 있다. 상기 역학적 (epidemiological) 조정 통계학은 기기 판독가능하거나 다른 방식을 판독가능한, 모델에 제시된 과거 데이터의 등록을 통해, 또는 때때로 저장된 샘플 또는 언급 대상의 상기 파라미터의 이전 연구 및 통계학에 대한 후향 질의 (retrospective query)를 통해 연속적으로, 포착, 확인, 개선 및 업데이트될 수 있다. 공식 재교정 또는 다른 조정의 대상일 수 있는 추가의 예는 승산비의 제한에 대해 문헌 [Pepe, M. S. et al., 2004]; ROC 곡선에 관해 문헌 [Cook, N. R., 2007]에 의해 연구에서 사용된 통계학을 포함한다. 마지막으로, 분류기 (classifier) 공식의 수치 결과는 절대적 위험을 교정하고 분류기 또는 위험 공식의 다양한 수치 결과에 대한 신뢰 구간을 제공하기 위해 그 자체가 그 기준에 의해 실제 임상 집단 및 연구 결과 및 관찰된 중점으로 처리 후에 변환될 수 있다. 이것의 예는 실제 임상 연구를 사용하여 유도되고 제노믹 헬스, 인크. (Genomic Health, Inc., 미국 캘리포니아주 레드우드 시티)의 온코타입 (Oncotype) Dx 제품에서 재발 점수 공식의 출력에 대해 선택되는, 절대적 위험 및 이 위험에 대한 신뢰 구간의 제시이다. 추가의 변형은 분류기의 출력 또는 위험 공식을 기초로 하고 그의 임상 파라미터, 예컨대 연령 또는 성별에 의해 규정되고 선택되는 연구의 보다 작은 하위-집단을 조정하는 것이다.

[0076] 실시예

[0077] 실시예 1: 일반적인 방법

[0078] 본원에 기재된 실시예는 아래 일반적으로 설명하는 시약 및 방법을 사용하여 수행하였다.

[0079] 실험 동물

[0080] Fmr1 낙아웃 마우스 (KO2) 마우스 (The Dutch-Belgium Fragile X Consortium, 1994)를 초기에 잭슨 래브라토리 (Jackson Laboratory)로부터 입수하고, 야생형 (WT) 한배자손을 C57BL/6J 배경에서 생성하고, 8세대 초과 동안

C57BL/6J 배경에 대해 반복적으로 역교배하였다. Fmr1 낙아웃 마우스를 동일한 유전자형의 군으로, 12h 명암 사이클을 갖는 온도 및 습도 제어실 내에 수용하였다 (오전 7시부터 오후 7시까지 조명; 시험은 조명기 동안 수행하였다). 사료 및 물을 자유롭게 (ad libitum) 이용가능하도록 하면서 수용실 내에서 실내 온도 및 습도를 연속적으로 기록하였다. 행동 실험 동안 2 또는 6개월령의 건강한 Fmr1 낙아웃 마우스 및 그들의 야생형 한배자손 (N = 10마리 마우스/치료군)에 대해 시험을 수행하였다. 마우스를 시판 플라스틱 케이지 내에 수용하고, 영국 동물에 관한 과학적 실험 법안 (UK Animals (Scientific Procedures) Act, 1986)의 요건에 따라 실험을 수행하였다. 유전자형 및 약물 치료에 대해 모르는 실험자가 모든 실험을 수행하였다. 임의의 실험을 수행하기 전에 동물에게 1주의 최소 적응 기간을 허용하였다. 적응 기간 동안 예방 또는 치료적 처치를 투여하지 않았다.

[0081] **약물**

[0082] 연구 1 (실시에 2)을 위해, 메타독신을 염수에 용해시키고, 7일 동안 1일 1회 100, 150, 또는 200 mg/kg의 용량으로 복강내 투여하였다. 연구 2 (실시에 3, 생체내 시험)를 위해, 메타독신을 염수에 용해시키고, 7일 동안 1일 1회 150 mg/kg/일의 복강내 용량 또는 150 또는 300 mg/kg/일 (0.1 ml의 부피)의 경구 용량으로 투여하였다. 연구 2 (시험관 내 시험)를 위해, 메타독신을 5시간 동안 300 μ M의 농도로 투여하였다. 모든 경우에, 염수를 비히클 (대조군)로서 사용하였다.

[0083] **행동 시험**

[0084] *사회적 상호작용 및 사회적 인지 기억*: 마우스는 접근하기, 따라다니기, 냄새맡기, 몸단장하기, 공격적 만남, 성적 상호작용, 육아 행동, 보금자리 짓기 (nesting), 및 한 무리 (group huddle)로의 수면을 비롯한, 쉽게 점수 매겨지는 사회적 행동에 참여하는 사회적 종이다. 마우스에서 사회적 접근은 새로운 마우스를 향한 냄새맡기 지속시간에 의해 평가하였다.

[0085] 마우스를 바닥에 신선한 나뭇조각을 깔아놓은, 성체의 가정용 케이지와 동일한 크기의 시험 무대/케이지 (40x23x12 cm 케이지, 마우스를 쉽게 보도록 퍼스펙스 (Perspex) 덮개가 있는)에 넣었다. 배경 마우스 냄새는 시험에 앞서 일부 비-실험 마우스를 장치 내에 넣음으로써 생성하였다. 마우스를 시험 10-15 min 전에 실험실로 옮겼다. 시험 대상체 및 준성체 (juvenile)를 시험 케이지 내에 동시에 넣었다. 시험한 마우스에 의한 자극 준성체를 향한 냄새맡기 및 가까이 따라다니기 (꼬리로부터 <2 cm)로서 정의된 사회적 조사의 총 지속시간 및 한차례 조사의 수를 3 min 동안 평가하였다. 30 min 후에, 동일한 자극 준성체를 사용하여 시험을 반복하였다. 수집한 데이터 파라미터는 습득 및 인식을 위한 한차례 냄새맡기의 총 지속시간 및 총수였다. 시험 2/시험 1+2로서 정의한 사회적 기억 비를 유도하였다. 따라서, 기억 없음 (예를 들어 20/(20+20)) = 0.5이고, 기억 (예를 들어 10/(20+10)) = 0.5이다.

[0086] *Y형 미로 변경*: 2개의 과제를 실행하였다. 제1 과제는 아암 (arm) 입장 사이에 자발 변경의 비학습 평가이었다. 제2 과제는 공간 참조 기억 과제이고, 여기서 동물은 2개의 아암 중 어느 것에 사료 보상의 미끼가 있는지 학습하였다. 훈련 시작 전날에, 마우스가 5 min 동안 미로를 자유롭게 탐색하도록 하였다. 이어서, 이들을 2개의 시험으로 실험하였고, 하나는 사료가 좌측 아암에 놓이는 것이고, 다른 하나는 사료가 우측 아암에 배치되는 것이다. 상기 절차는 아암 중 하나에 대한 선호의 발생을 방지하였다.

[0087] *Y형 미로 수조 미로*: 투명한 퍼스펙스 Y형 미로를 20°C에서 2 cm 물로 채웠다. 이것은 마우스가 하나의 아암의 먼 단부에서 출구 튜브로 헤엄친 후 미로를 떠나도록 동기화하였다. 미로를 눈에 잘 띄는 시각적 단서로 둘러싸인 방의 중간에 놓았다.

[0088] *보상된 T형 미로 변경*: T형의 상승되거나 닫힌 장치 (수평으로 놓인)를 사용하였다. 마우스를 T자형의 기부에 놓고, 줄기의 다른 단부에 인접하는 목표 아암 중 하나를 선택하도록 허용하였다. 2회의 시험을 연달아 수행하였다: 제2 시험에서는 마우스가 이전에 방문하지 않은 아암을 선택하도록 요구하였고, 이것은 제1 선택의 기억을 반영한다 (자발 변경). 동물을 굶기고 변경한 경우에 원하는 사료로 보상함으로써 상기 경향을 강화시켰다. 구체적으로, T형 미로에서 4일의 적응 기간 후에, 보상으로서 달콤한 농축 우유를 받기 위해 마우스가 아암 선택을 변경하도록 훈련시켰다.

[0089] *연속 주로*: 장치는 도색한 목재로 제조한 4개의 연속적인, 직선으로 배열된, 점증적인 불안유발성 주로로 이루어졌다 (각각의 이어지는 주로는 선행 주로보다 더 밝은 색상으로 도색하고/하거나 벽이 더 낮고/낮거나 더 좁았다). 각각의 구역 또는 주로는 길이가 25 cm이었다. 주로 1은 25 cm 높이 벽을 갖고, 폭은 8.5 cm이고, 흑색으로 도색하였다. 0.5 cm 계단이 주로 2로 이어지고, 이것은 폭은 다시 8.5 cm이지만, 1.3 cm 높이 벽을 갖

고 회색이었다. 1.0 cm 계단이 주로 3으로 이루어지고, 이것은 폭이 3.5 cm이고 0.8 cm 높이 벽을 갖고 백색이었다. 0.4 cm 계단이 주로 4로 이어지고, 이것은 또한 백색이지만, 폭이 1.2 cm 이고 0.2 cm 높이 벽을 가졌다. 주로 1의 후면이 50 cm 높이로 서있도록 고정함으로써 장치를 상승시켰다. 마우스가 추락하는 경우를 위해 아암 3 및 4 아래에 패딩 (padding)을 제공하였다. 각각의 마우스를 벽을 대면하는 주로 1의 닫힌 단부에 놓았다. 1) 전체 시험 길이 (5 min) + 각각의 아암에 들어가는 대기시간 (latency), 및 2) 주로 1에서 보낸 시간 동안 타이머 (timer)를 시작하였다. 마우스가 4개의 모든 발을 다음 주로에 놓을 때, 주로에 들어간 것으로 간주하였다. 각각의 주로에서 보낸 총 시간 (4개의 모든 발)을 기록하였다.

[0090] **환경적 공포 조건화:** 공포 조건화 실험에서, 마우스를 새로운 환경 (어두운 방)에 넣고, 힌트와 전기 충격 (electric footshock) (0.2 mA, 1초 (연구 1) 또는 0.7 mA, 0.5 sec (연구 2))을 짝을 지어 인가하였다. 후속적으로, 원래 훈련 환경에서 시험할 때, 마우스는 동결반응 (freezing) (Blanchard, 1969) 또는 환경적 공포 조건화로 불리는 자연 방어 반응을 보였다. 동결반응 시간은 마우스가 호흡을 제외한 불가동 행동으로 보낸 시간으로서 정의하였다. 데이터를 시험 기간의 백분율로서 표현하였다. 훈련 기간의 24시간 후에, 마우스를 5 min 동안 훈련실에서 충격 제시 없이 시험하고, 동결반응 행동에 대해 관찰하였다.

[0091] **통계학:** 다변량 분산 분석을 이용하여 데이터를 가로질러 군 차이를 평가하였다. 반복 측정치 ANOVA를 행동 데이터에 대해 수행하였다. 각각의 ANOVA에서 통계학상 유의한 효과는 뉴먼-쿨스 (Newman-Keuls) 검정 (연구 1) 또는 터키 (Tukey) 검정 (연구 2)를 이용하여 사후 (post hoc) 비교에 따랐다. 0.05 미만의 p 값을 유의한 것으로 간주하였다.

[0092] **생화학적 시험**

[0093] **인산화된 ERK 및 Akt:** Ras-Mek-ERK 및 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로는 시냅스 가소성 (synaptic plasticity)의 변화의 근거가 되는 유전자 전사의 활동 의존적 변형을 매개하는데 관여한다 (Klann and Dever, 2004). 인산화된 ERK 및 Akt 단백질 발현은 이전에 문헌 (Lopez Verrilli et al., 2009)에 설명된 바와 같이 웨스턴 블롯 (western blot) 분석에 의해 측정하였다. 사용된 항체는 Akt (1/1000) 및 키나제 (ERK)1/2 (1/2000)에 대한 항-포스포타이킵 항체 (셀 시그널링 테크놀로지 (Cell Signaling Technology, 미국 매사추세츠주 댄버)이었다. 포스포-ERK에 대한 항체는 포스포-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)에서 인산화를 검출하는 반면, 포스포-Akt에 대한 항체는 포스포-Akt (Thr308)에서 인산화를 검출한다. 총 Akt 및 ERK1/2 단백질 함량과 인산화된 ERK 및 Akt는, 멤브레인을 항포스포-Akt (1/1000) 및 항포스포-ERK 항체 (1/2000) (셀 시그널링 테크놀로지, 미국 매사추세츠주 댄버)로 블로팅함으로써 평가하였다. Akt 또는 ERK 인산화를 동일한 샘플에서 단백질 함량으로 정규화하고, 기초 수준을 100%로서 간주하여 기초 조건에 관한 변화 %로서 표현하였다. 단백질 부하는 멤브레인을 벗겨내고 β-액틴 항체 (1/1000) (시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich), 미국 미주리주 세인트루이스)로 재-블로팅함으로써 평가하였다. 혈액 림프구 내에서 인산화된 ERK 및 Akt 단백질 발현을 유동 세포측정법에 의해 측정하였다. 림프구 바이오마커 결정을 위해, 488 nm로 조정된 여기 레이저를 갖는 FACStar 플러스 (벡톤 디킨슨 (Becton Dickinson))을 사용하였고, FITC (GST)로부터 초록 형광을 515-545 nm 대역 (bandpass) 필터를 통해 수집하였다. 평균 FITC 형광 강도를 참조 세포의 형광에 관하여 계산하였다. 평균 세포 형광 강도 (MFI)는 세포당 결합된 Ab 분자의 평균 수에 정비례한다.

[0094] **뉴런 형태학:** 재태 17.5의 배아일 (E17.5)의 야생형 및 Fmr1 KO 태아 마우스로부터 해마 세포 배양액을 제조하였다. 마우스를 경추 탈골로 치사시키고, 분리시킨 해마 세포를 15 mm 다중웰 용기 (팔콘 프리마리아 (Falcon Primaria)) 내에 플레이팅하였다. 시험관 내에서 5d 후에, 약물 치료 후 가지돌기 형태형성을 쉽게 모니터링하기 위해 초록 형광 단백질 (GFP)로 형질감염시켰다 ([Ethell and Yamaguchi, 1999]; [Ethell et al., 2001], [Henkemeyer et al., 2003]). 가지 돌기는 시험관 내에서 약 16일 (DIV)에 형성되었다. 배양액을 시험관 내 제17일에 메타독신으로 300 μM 농도에서 5 hr 동안 처리하였다.

[0095] GFP 형질감염된 뉴런의 사상위축 밀도는 스택형 (stacked) 자이스 (Zeiss) 공초점 생성된 영상 (40x 대물렌즈, 20x0.2 μm의 스택)의 솔 (Sholl) 분석을 수행함으로써 정량하였다. 메타몰프 (Metamorph) 소프트웨어를 사용하여, 동일한 간격의 동심원 (20 μm마다)을 각각의 뉴런의 세포 몸체의 둘레에 그리고, 후속적으로 원마다 사상위축의 양을 계수하였다. 계수의 평균을 짝이없는 양측 스튜던트 (unpaired two-tailed Student) T-검정을 이용하여 비교하였다.

[0096] GFP 형질감염된 뉴런의 가지 (spine) 성숙도는 메타몰프 소프트웨어 (몰레큘라 디바이시스 (Molecular Devices), 미국 캘리포니아주 서니베일)를 사용하여 분석하였다. 가지 형태측정 분석을 위해 뉴런마다 70-100 μm의 2개의 말단 가지돌기 절편을 선택하였다. 각각의 가지에 대해, 길이 및 폭을 측정하였다. 길이는 기부로

부터 돌출부의 끝까지 거리로서 정의한 반면; 폭은 가시의 장축에 수직인 최대 거리로서 정의하였다. 측정치를 짝이없는 양측 스튜던트 T-검정을 이용하여 비교하고, 다중 비교를 위해 ANOVA 교정하였다.

[0097] 드 노보 해마 단백질 합성: 횡단 해마 절편 (400 μ m)를 6주령 Fmr1 녹아웃 및 WT 마우스로부터 수득하였다. 단백질 합성 검정은 비-방사성 형광-활성화 세포 분류-기반 검정, 표면 감지 번역 (surface sensing of translation (SUnSET)) 방법을 사용하여 이전에 설명된 바와 같이 수행하였고, 상기 방법은 개별 포유동물 세포에서 및 불균질 세포 집단에서 전반적 단백질 합성의 모니터링 및 정량을 허용한다 (Hoeffler, 2011). 본 연구에 사용된 메타독신의 농도는 300 μ M이었다.

[0098] 실시예 2: 취약 X 증후군의 Fmr1 녹아웃 마우스 모델 (연구 1)에서 학습 및 기억 결핍 및 생화학적 이상에 대한 메타독신 (100 대 200 mg/kg) 치료의 효과

[0099] 행동 분석

[0100] 환경적 공포 조건화: 초기 실험은 N = 10마리 WT 및 Fmr1 녹아웃 마우스의 군에서 환경적 공포 조건화에 대한 7일 동안 1일 1회 비히클 또는 150 mg/kg 메타독신의 복강내 투여의 효과를 시험하였다. 비히클-치료 Fmr1 녹아웃 마우스는 시험 기간 동안 동결반응 감소로 반영되는 바와 같이 환경적 공포 조건화 패러다임에서 학습의 결핍을 보였다 (도 1의 패널 A ($p < 0.0001$)). 메타독신 투여는 Fmr1 녹아웃 마우스에서 학습 결핍 효과를 역전시켰고, 여기서 상기 역전은 부분적이고, 따라서 메타독신-치료 동물은 메타독신-치료 WT 동물과 상이하였다 ($p < 0.05$). 상기 실험의 반복은 N = 10마리 WT 및 Fmr1 녹아웃 마우스의 군에서 환경적 공포 조건화에 대한 7일 동안 1일 1회의 비히클, 100 또는 200 mg/kg 메타독신의 복강내 투여의 용량-의존 효과를 조사하였다 (도 1의 패널 B 및 C). 본 실험에서, 비히클-치료 Fmr1 녹아웃 마우스는 비히클-치료 WT 마우스에 비해 학습 결핍을 보였다 ($p < 0.0001$), 이것은 제1 실험을 반복한다. 100 mg/kg 메타독신은 Fmr1 녹아웃 마우스에서 결핍의 역전을 일으켰지만 ($P < 0.05$), 메타독신-치료 Fmr1 녹아웃 마우스가 메타독신-치료 야생형 마우스와 상이하기 때문에 ($p < 0.0001$) 이것은 부분적인 역전이었다. Fmr1 녹아웃 마우스에서 보이는 학습 결핍은 200 mg/kg i.p. 메타독신을 사용한 치료 후에 완전히 역전되었다 (치료된 Fmr1 마우스는 비히클-치료 Fmr1 녹아웃 마우스와 상이하였지만 ($P < 0.0001$), 메타독신-치료 WT 마우스와 상이하지 않았다). 메타독신 치료는 두 실험에서 WT 마우스에 대해 효과가 없었다 (도 1의 패널 A-C).

[0101] 사회적 접근: 비히클-치료 Fmr1 녹아웃 마우스는 한차례 냄새맡기에 의해 표시되는 바와 같이 더 적은 사회적 접근을 보여주었다 (도 2 ($p < 0.0001$)). 7일 동안 150 mg/kg 메타독신을 사용한 1일 1회 복강내 치료는 Fmr1 녹아웃 마우스에서 사회적 접근을 증가시켰다 (비히클 치료 Fmr1 녹아웃 마우스에 비해 $p < 0.0001$). 메타독신으로 치료한 Fmr1 녹아웃 마우스는 메타독신 치료 WT 마우스와 상이하였지만 ($p < 0.05$), WT 마우스의 효과에 접근하는 경향이 있었다. 메타독신 치료는 WT 마우스에 대해 효과가 없었다.

[0102] Y형 미로 자발 변경: N = 10마리 WT 또는 Fmr1 녹아웃 마우스의 군에서 자발 변경에 대한 비히클 또는 150 mg/kg 메타독신의 7일의 1일 1회 치료의 효과를 도 3의 패널 A에 제시한다. 비히클-치료 Fmr1 녹아웃 마우스는 비히클 치료 WT 마우스보다 더 적은 자발 변경을 보였다 ($p < 0.0001$). 메타독신 치료는 Fmr1 녹아웃 마우스에서 비히클 치료에 비해 자발 변경을 증가시켰지만 ($p < 0.0001$), 메타독신-치료 Fmr1 녹아웃 마우스는 메타독신-치료 WT 마우스에 비해 결핍을 보였다 ($p < 0.01$). 따라서, 메타독신은 Fmr1 녹아웃 마우스에서 보이는 결핍의 부분적 역전을 일으켰다.

[0103] Y형 미로 참조 기억 과제: N = 10마리 WT 또는 Fmr1 녹아웃 마우스의 군에서 보상된 참조 기억 학습에 대한 비히클 또는 150 mg/kg 메타독신을 사용한 7일의 1일 1회 치료의 효과를 도 3의 패널 B에 제시한다. 비히클-치료 Fmr1 녹아웃 마우스는 비히클-치료 WT 마우스보다 더 적은 적절한 아암 입장을 보였다 ($p < 0.0001$). 메타독신 치료는 비히클-치료 Fmr1 녹아웃 마우스에 비해 상기 결핍을 감소시켰고 ($p < 0.0001$), 따라서, 메타독신-치료 Fmr1 녹아웃 마우스는 메타독신-치료 WT 마우스와 상이하지 않았다. 메타독신 치료는 WT 마우스에 대해 효과가 없었다.

[0104] Y형 미로 수조 미로 좌측 우측 변별: N = 10마리 WT 또는 Fmr1 녹아웃 마우스의 군에서 혐오로 동기화된 공간 변별 학습에 대한 비히클 또는 150 mg/kg 메타독신을 사용하는 7일의 1일 1회 치료의 효과를 도 3의 패널 C에 제시한다. 비히클-치료 Fmr1 녹아웃 마우스는 비히클-치료 WT 마우스보다 더 많은 수의 부정확한 아암 입장을 보였다. 상기 결핍은 메타독신을 사용한 치료에 의해 감소하였다.

[0105] T형 미로 보상된 변경 과제: N = 10마리 WT 또는 Fmr1 녹아웃 마우스의 군에서 보상된 변경 작업 기억에 대한 비히클 또는 150 mg/kg 메타독신을 사용한 7일의 1일 1회 치료의 효과를 도 4에 제시한다. 비히클-치료 Fmr1

낙아웃 마우스는 비히클-치료 WT 마우스보다 정확한 아암에 도달하는데 더 긴 대기시간을 보였다 ($p<0.0001$). 메타독신 치료는 Fmr1 낙아웃 마우스에서 비히클 치료에 비해 상기 결핍을 감소시켰고 ($p<0.0001$), 여기서 메타독신-치료 Fmr1 낙아웃 마우스는 WT 마우스보다 더 느리게 반응하였으므로 ($p<0.0001$) 상기 역전은 부분적이었다.

[0106] 연속 주로: N = 10마리 WT 또는 Fmr1 낙아웃 마우스의 군에서 연속 주로 과제에서 행동에 대한 비히클 또는 150 mg/kg 메타독신을 사용한 7일의 1일 1회 치료의 효과를 도 5에 도시하고, 아래에 추가로 설명한다.

[0107] 연속 주로 시험은 불안증 (주로 1에 들어가는 대기시간) 및 과잉행동 (주로 2 내지 4)을 효과적으로 측정하였다. 주로 1에서부터 연속 주로 2, 3, 및 4를 통한 진행은 벽이 점증적으로 더 낮고 더 좁고 보다 노출된 열린 아암을 갖는 점증적으로 밝게 도색한 환경에의 노출과 연관되었다. 열린 아암 상에서 소모한 시간 및 열린 아암 내로의 입장 불안증을 지시하고; 이와 반대로, 보다 열린 아암 내에서 소모한 시간의 증가는 과잉행동을 반영하였다. 이들 요인은 과잉행동과 함께 불안증-유사 행동의 범위를 포괄하는 민감한 시험을 허용하였다.

[0108] 주로 1: Fmr1 낙아웃 마우스는 WT 마우스보다 더 많은 불안증을 보였다 ($p<0.001$). 메타독신으로 처리된 Fmr1 낙아웃 마우스는 비히클 치료 Fmr1 낙아웃 마우스에 비해 불안증의 완화를 보였고 ($p<0.001$), 따라서 완전한 정상화가 일어났다. 메타독신-치료 Fmr1 낙아웃 마우스 및 메타독신-치료 WT 마우스 사이에 차이가 존재하지 않았다. 또한, 메타독신 치료는 WT 마우스에 대해 효과가 없었다.

[0109] 주로 2: WT 마우스는 Fmr1 낙아웃 마우스에 비해 주로 2에서 더 적은 활동을 보였다 ($p<0.0001$). 메타독신을 사용한 치료는 Fmr1 낙아웃 마우스에서 과잉행동을 감소시켰지만 ($p<0.001$), 메타독신-치료 Fmr1 낙아웃 마우스 및 WT 마우스가 상이하였으므로 ($p<0.001$) 상기 과잉행동 역전은 부분적이었다. 메타독신 치료는 WT 마우스에 대해 효과가 없었다.

[0110] 주로 3: Fmr1 낙아웃 마우스는 WT 마우스에 비해 과잉행동을 보였다 ($p<0.0001$). 메타독신-치료 Fmr1 낙아웃 마우스가 비히클-치료 Fmr1 낙아웃 마우스와 상이하지 않았으므로, 상기 과잉행동은 메타독신에 의해 역전되지 않았다. 메타독신 치료는 WT 마우스에 대해 효과가 없었다.

[0111] 주로 4: Fmr1 낙아웃 마우스는 WT 마우스에 비해 과잉행동을 보였다 ($p<0.01$). 메타독신-치료 Fmr1 낙아웃 마우스가 비히클-치료 Fmr1 낙아웃 마우스보다 더 적은 활동을 보였으므로 ($p<0.01$), 메타독신 치료는 상기 과잉행동을 역전시켰다. 메타독신-치료 Fmr1 낙아웃 마우스가 메타독신-치료 WT 마우스와 상이하지 않았으므로, 상기 효과는 정상화를 반영하였다. 메타독신 치료는 WT 마우스에 대해 효과가 없었다.

[0112] 종합하면, 이론에 매이기를 바라지 않지만, 연속 주로 시험은 WT 마우스에 비해 Fmr1 낙아웃 마우스가 불안증 및 과잉행동이 증가하였음을 보여주었다. 메타독신 치료는 WT 마우스에 영향을 미치지 않으면서 Fmr1 낙아웃 마우스에서 상기 불안증 및 과잉행동을 감소시켰다.

[0113] 생화학적 분석

[0114] ERK 및 Akt의 인산화: 뇌 내의 ERK 또는 Akt의 전체 뇌 인산화에 대한, N = 5마리 Fmr1 낙아웃 또는 WT 마우스에서 비히클 또는 150 mg/kg 메타독신을 사용하는 7일의 1일 1회 복강내 치료의 효과를 도 6에 제시한다. 인산화 수준은 인산화된 ERK 대 총 ERK의 비로서 평가하였다. 상기 비의 증가는 ERK의 활성화를 지시하였다. ERK의 인산화는 비히클 대조군보다 비히클-치료 Fmr1 낙아웃 마우스에서 증가하였다 ($p<0.001$) - 상기 효과는 취약 X 증후군이 있는 인간 대상체에서 보이는 ERK의 이상 활성화를 복제하였다 (Wang et al., 2012). 상기 효과는 메타독신 치료에 의해 감소하였고 ($p<0.01$), 따라서, 메타독신-치료 WT 마우스에 비해 차이가 없었다. 메타독신은 WT 마우스에서 ERK의 인산화 또는 임의의 마우스에서 총 ERK 수준에 대해 효과가 없었다. 인산화된 Akt 대 총 AKT의 비는 비히클-치료 WT 마우스보다 비히클-치료 Fmr1 낙아웃 마우스에서 또한 증가하였다 ($p<0.0001$). 메타독신을 사용한 치료는 Fmr1 낙아웃 마우스에서 인산화된 Akt의 상대적인 수준을 감소시켰고 ($p<0.01$), 따라서, Fmr1 낙아웃 마우스는 대조군과 상이하지 않았다. 메타독신 치료는 WT 마우스에 대해, 또는 임의의 마우스의 총 Akt 수준에 대해 효과가 없었다.

[0115] 실시예 3: Fmr1 낙아웃 취약 X 마우스 모델에서 메타독신의 평가 (연구 2)

[0116] 6개월령 Fmr1 낙아웃 마우스에서 메타독신의 행동 효과

[0117] 환경적 공포 조건화: 초기 실험은 N = 10마리의 6개월령 WT 및 Fmr1 낙아웃 마우스의 군에서 환경적 공포 조건화에 대한 7일 동안 1일 1회 비히클 또는 150 mg/kg 메타독신의 복강내 투여의 효과를 시험하였다. 비히클-치

료 Fmr1 낙아웃 마우스 (KO-V)는 시험 기간 동안 동결반응의 감소 (도 7 ($p < 0.0001$))로 반영되는 바와 같이 비히클-치료 WT 마우스 (WT-V)에 비교할 때 환경적 공포 조건화 패러다임에서 학습의 결핍을 보였다. 메타독신 투여는 Fmr1 낙아웃 마우스에서 학습 결핍 효과를 역전시켰다 ($p < 0.0001$ KO-M-150 대 KO-V). 이것은 완전한 역전이었고, 따라서, 메타독신-치료 KO 마우스는 메타독신-치료 WT 마우스와 상이하지 않았다.

[0118] **사회적 접근 및 사회적 기억:** 사회적 접근 데이터 (초기 시험 1)을 도 8의 패널 A (한차례 냄새맡기의 수) 및 패널 C (냄새맡기의 지속 시간)에 제시한다. 사회적 기억 데이터 (시험 2, 시험 1의 24시간 후)를 도 8의 패널 B (한차례 냄새맡기의 수) 및 패널 D (냄새맡기의 지속 시간)에 제시한다. 이들 결과를 아래에서 추가로 논의한다.

[0119] 시험 1 동안, Fmr1 낙아웃 마우스는 WT 마우스에 비해 한차례 냄새맡기의 수의 증가 ($p < 0.0001$) (도 8의 패널 A 참조) 및 냄새맡기의 지속시간의 감소 ($p < 0.0001$) (도 8의 패널 C 참조)를 보여주었다. 이들 사회적 상호작용 결핍은 Fmr1 낙아웃 마우스에서 다른 연구자들이 보고한 것과 일치한다 (Thomas et al., 2011). 한차례 냄새맡기의 수 및 냄새맡기의 지속시간 둘 모두에 대해, 메타독신을 사용하는 치료는 Fmr1 낙아웃 마우스에서 이상의 역전을 일으켰고 (각각에 대해 $p < 0.0001$ KO-M-150 대 KO-V), 따라서, 메타독신-치료 Fmr1 낙아웃 마우스는 한차례 냄새맡기의 수 측정치에 대해 메타독신-치료 WT 마우스와 상이하지 않았다. 냄새맡기의 지속시간 측정치에 대해 구제가 보이지만, Fmr1 낙아웃 마우스는 메타독신 치료 후에 WT 마우스에 비해 상이하게 남았기 때문에 ($p < 0.05$) 상기 효과는 부분적이었다. 메타독신은 WT 마우스에 대해 효과가 없었다. 이들 데이터는 Fmr1 낙아웃 마우스에서 비정상 사회적 접근 행동이 메타독신에 의해 구제되었음을 보여준다.

[0120] 시험 2 동안, Fmr1 낙아웃 마우스는 야생형 마우스에 비해 한차례 냄새맡기의 수의 증가 및 냄새맡기의 지속시간의 증가를 보여주었다 (각각의 측정치에 대해 $p < 0.0001$, 각각 도 8의 패널 B 및 D). 이것은 적응의 실패, 및 따라서 사회적 기억 결핍을 반영하였다. 메타독신 치료는 이들 차이를 감소시켰다 (KO-M-150 대 KO-V에 대해 $p < 0.0001$). 메타독신-치료 Fmr1 낙아웃 마우스 및 메타독신-치료 WT 마우스 사이에 차이가 남았기 때문에 ($p < 0.05$), 한차례 냄새맡기의 수에 대한 역전은 부분적이었다. 메타독신-치료 Fmr1 낙아웃 마우스 및 메타독신-치료 WT 마우스 사이에서 차이가 관찰되지 않았으므로, 냄새맡기 지속시간에 대한 메타독신에 의한 역전은 완전하였다. 메타독신 치료는 WT 마우스에 대해 효과가 없었다. 이들 데이터는 메타독신이 Fmr1 낙아웃 마우스에서 사회적 기억 손상을 감소시켰음을 보여준다. 상기 사회적 기억 결핍의 감소는 사회적 기억 비의 계산 (실시예 1에 설명됨)에 의해 아래에 예시된다:

[0121] 사회적 기억 비는 한차례 냄새맡기의 지속시간으로서 정의하였다: 시험 2/시험 1+2. 따라서, 기억 없음의 예는 (예를 들어 $20/(20+20)$) = 0.5인 한편, 기억의 예는 (예를 들어 $10/(20+10)$) = 0.3이었다.

[0122] 계산된 사회적 기억 비는 다음과 같았다:

[0123] WT-V 시험 2/시험 1 + 시험 2: $12.4 / 12.4 + 26.8 = 0.3$, < 0.5 기억

[0124] KO-V 시험 2/시험 1 + 시험 2: $325 / 325 + 24.1 = 0.9$, 기억 없음

[0125] WT-M 시험 2/시험 1 + 시험 2: $12.5 / 38.5 + 12.5 = 0.2$, < 0.5 기억

[0126] KO-M 시험 2/시험 1 + 시험 2: $12.7 / 28.4 + 12.7 = 0.3$, < 0.5 기억

[0127] **6개월령 Fmr1 낙아웃 마우스에서 메타독신의 생화학적 효과**

[0128] 상기 설명된 행동 시험 이후 뇌 내의 전체 뇌 pERK (도 9의 패널 A) 및 pAkt (도 9의 패널 B)에 대한, N = 10마리 Fmr1 낙아웃 또는 WT 마우스에서 비히클 또는 150 mg/kg 메타독신을 사용한 7일의 1일 1회 ip 치료의 효과도 9에 제시한다. 구체적으로, 도 9의 패널 A는 pAkt의 뇌 수준을 보여주며, 이것은 선행 실험에서 보이는 바와 같이 WT 마우스보다 Fmr1 낙아웃 마우스에서 증가하였다 ($P < 0.0001$). 메타독신을 사용한 치료는 뇌 pAkt의 상기 증가를 역전시켰고 (KO-M-150 대 KO-V에 대해 $p < 0.0001$), 따라서, 메타독신-치료 Fmr1 낙아웃 마우스는 메타독신-치료 WT 마우스와 상이하지 않았다. 도 9의 패널 B는 pERK의 뇌 수준을 보여주며, 이것은 선행 실험에서 보이는 바와 같이 WT 마우스에 비해 Fmr1 낙아웃 마우스에서 증가하였다 (KO-M-150 대 KO-V에 대해 $p < 0.0001$). 상기 증가는 메타독신 치료에 의해 역전되었고 ($p < 0.0001$), 따라서, 메타독신-치료 Fmr1 낙아웃 마우스는 메타독신-치료 WT 마우스와 상이하지 않았다.

[0129] **2개월령 마우스의 행동에 대한 복강내 또는 경구 투여 후의 메타독신의 효과**

[0130] 도 10은 2개월령 Fmr1 낙아웃 및 WT 마우스에서 환경적 공포 조건화에 대한 7일 동안 150 mg/kg ip, 또는 150

및 300 mg/kg 경구의 용량으로 1일 1회 메타독신의 투여의 효과를 보여준다. 구체적으로, 도 10의 패널 A는 비히클을 사용한 ip 및 경구 치료 후에 Fmr1 낙아웃 및 WT 마우스로부터 환경적 공포 조건화 데이터를 보여준다. 비히클의 투여 경로에 관한 차이는 없었다. Fmr1 낙아웃 마우스는 ip 및 경구 경로를 통한 비히클 치료 후에 WT 마우스에 비해 동결반응 행동의 감소를 보여주었다 (각각의 경우에 $p < 0.0001$). 도 10의 패널 B는 WT 마우스에서 두 투여 경로를 통한 메타독신 치료의 효과를 보여준다. 효과는 보이지 않았다. 도 10의 패널 C는 Fmr1 낙아웃 마우스에서 ip 150 mg/kg 및 경구 150 및 300 mg/kg의 메타독신 치료가 Fmr1 낙아웃 마우스에서 보이는 동결반응 행동의 감소를 역전시켰음을 보여준다 (KO-M-ip, KO-M-po 150, 및 KO-M-po 300 대 KO-V-ip 및 KO-V po에 대해 각각 $p < 0.01$, $p < 0.0001$, 및 $p < 0.0001$). 150 mg po 메타독신을 사용한 투여의 효과는 300 mg/kg po 메타독신의 투여의 효과와 상이하지 않았다. Fmr1 낙아웃 마우스에서 150 및 300 mg/kg 경구 메타독신의 효과는 150 mg/kg ip 메타독신의 효과와 상이하지 않았다. 각각의 경우에, 메타독신-치료 Fmr1 낙아웃 마우스가 메타독신-치료 WT 마우스와 상이하지 않았으므로 역전은 완전하였다.

[0131] 도 11은 Fmr1 낙아웃 및 WT 마우스에서 사회적 접근 및 사회적 기억에 대한 7일 동안 150 mg/kg ip 또는 150 및 300 mg/kg 경구의 용량으로 1일 1회 메타독신의 투여의 효과를 보여준다. 구체적으로, 도 11의 패널 A는 Fmr1 낙아웃 또는 WT 마우스에서 사회적 접근 행동에 대한 비히클 또는 150 mg/kg ip 또는 150 및 300 mg/kg 경구의 메타독신의 효과를 보여준다. 비히클을 사용한 ip 또는 경구 치료 후에, Fmr1 낙아웃 마우스에서 냄새맡기 행동의 지속시간은 WT 마우스에 비해 감소하였다 (각각 $p < 0.0001$). 임의의 용량의 메타독신 치료는 WT 마우스에 대해 효과가 없었다. 그러나, 150 mg/kg ip, 150 mg/kg, 및 300 mg/kg 경구의 메타독신 치료는 Fmr1 낙아웃 마우스에서 보이는 사회적 접근 결핍을 역전시켰다 (KO-M-po 150 및 KO-M-po 300 대 KO-V po에 대해 각각 $p < 0.0001$). 경구 메타독신의 효과는 150 및 300 mg/kg 사이에서 용량 의존적이지 아니었다. 메타독신-치료 Fmr1 낙아웃 마우스는 메타독신-치료 WT 마우스와 상이하지 않았으므로, 상기 역전은 완전하였다. Fmr1 낙아웃 마우스에서 150 mg/kg ip 메타독신의 효과는 150 mg/kg 경구 또는 300 mg/kg 경구 메타독신의 효과와 상이하지 않았다. 도 11의 패널 B는 Fmr1 낙아웃 또는 WT 마우스에서 사회적 기억에 대한 비히클 또는 150 mg/kg ip 또는 150 및 300 mg/kg 경구의 메타독신의 효과를 보여준다. 비히클을 사용한 ip 또는 경구 치료 후에, Fmr1 낙아웃 마우스에서 냄새맡기 행동의 지속시간은 WT 마우스에 비해 증가하였다 (각각에 대해 $p < 0.0001$). 임의의 용량의 메타독신 치료는 WT 마우스에 대해 효과가 없었다. 그러나, 150 mg/kg ip, 150 mg/kg 경구, 및 300 mg/kg 경구의 메타독신 치료는 Fmr1 낙아웃 마우스에서 보이는 사회적 접근 결핍을 역전시켰다 (KO-M-ip 150, KO-M-po 150, 및 KO-M-po 300 대 KO-V-ip 및 KO-V po에 대해 각각 $p < 0.0001$, $p < 0.05$, 및 $p < 0.01$). 메타독신-치료 Fmr1 낙아웃 마우스는 메타독신-치료 WT 마우스와 상이하지 않았으므로, 상기 역전은 완전하였다. Fmr1 낙아웃 마우스에서 150 mg/kg ip 메타독신의 효과는 150 mg/kg 경구 또는 300 mg/kg 경구 메타독신의 효과와 상이하지 않았다. 또한, 150 mg/kg 및 300 mg/kg 사이에서 경구 메타독신 치료의 효과에 대한 용량 의존성은 없었다.

[0132] **2개월령 마우스에서 복강내 또는 경구 투여 이후 생화학적 마커에 대한 메타독신의 효과**

[0133] 말초 림프구: 도 12는 2개월령 Fmr1 낙아웃 및 WT 마우스에서 유동 세포측정법에 의해 결정할 때, 림프구 pAkt (도 12의 패널 A) 및 pERK (도 12의 패널 B)에 대한 7일 동안 150 mg/kg ip 또는 150 mg/kg 및 300 mg/kg 경구 용량의 1일 1회 메타독신의 투여의 효과를 보여준다. 구체적으로, 도 12의 패널 A는 비히클-치료 Fmr1 낙아웃 마우스가 동등한 비히클 치료를 받은 WT 마우스에 비해 림프구 Akt의 인산화 증가를 보였음을 보여준다 (ip 및 경구 투여 모두에 대해 $p < 0.0001$). 7일 동안 150 mg/kg ip 또는 150 mg/kg 또는 300 mg/kg의 경구 용량으로 1일 1회 메타독신을 사용한 치료는 과다활성화된 Akt를 정상화하였고, 따라서, pAkt 수준은 메타독신-치료 Fmr1 낙아웃 마우스 및 동일한 치료를 받은 WT 마우스 사이에서 상이하지 않았다. 도 12의 패널 B는 비히클-치료 Fmr1 낙아웃 마우스가 동등한 비히클 치료를 받은 WT 마우스에 비해 림프구 ERK의 인산화 증가를 보였음을 보여준다 (ip 및 경구 투여 모두에 대해 $p < 0.0001$). 7일 동안 150 mg/kg ip, 또는 150 mg/kg 또는 300 mg/kg의 경구 용량의 1일 1회 메타독신을 사용한 치료는 과다활성화된 ERK를 정상화시켰고, 따라서, pERK 수준은 메타독신-치료 Fmr1 낙아웃 마우스 및 동일한 치료를 받은 WT 마우스 사이에서 상이하지 않았다.

[0134] 뇌 영역: 도 13은 해마, 전전두 피질, 및 선조체에서 pERK 수준에 대한 7일 동안 150 mg/kg 메타독신의 투여의 효과를 보여준다. pERK 수준은 3개의 모든 뇌 영역에서 WT 마우스에 비해 Fmr1 낙아웃 마우스에서 증가하였다 (모든 경우에 $p < 0.0001$). pERK 수준은 비히클-치료 Fmr1 낙아웃 마우스에 비해 메타독신-치료 Fmr1 낙아웃 마우스에서 감소하였다 (모든 경우에 $p < 0.0001$). 해마 및 선조체에서 KO-M 및 WT-M 군 사이에서 차이는 없었고, 이것은 ERK의 활성화의 완전한 역전을 보여준다. 전전두 피질에서 효과는 부분적이고, KO-V 및 KO-M 군은 상이하게 남았다 ($p < 0.05$). 메타독신은 WT 마우스에 대해 효과가 없었다.

[0135] 도 14는 해마, 전전두 피질 및 선조체에서 pAkt 수준에 대한 7일 동안 150 mg/kg 메타독신의 투여의 효과를 보

여준다. pAkt 수준은 3개의 모든 뇌 영역에서 WT 마우스에 비해 Fmr1 녹아웃 마우스에서 증가하였다 (모든 경우에 $p < 0.0001$). pAkt 수준은 3개의 모든 뇌 영역에서 비히클-치료 Fmr1 녹아웃 마우스에 비해 메타독신-치료 Fmr1 녹아웃 마우스에서 감소하였다 (모든 경우에 $p < 0.0001$). 모든 경우에, KO-M 및 WT-M 군 사이에 차이는 없었고, 이것은 Akt의 활성화의 완전한 역전을 보여준다. 메타독신은 WT 마우스에 대해 효과가 없었다. 인산화된 ERK 및 Akt의 뇌 및 혈액 수준 상승의 감소는 Fmr1 녹아웃 마우스의 개선된 행동 성과와 상호관련되고, 이것은 인산화 수준이 메타독신 치료 반응의 바이오마커임을 제안한다.

[0136] **시험관 내에서 Fmr1 녹아웃 마우스로부터 일차 해마 뉴런 내의 가지돌기 사상위축 밀도 및 성숙화에 대한 메타독신의 효과**

[0137] 도 15 (패널 A-C)는 300 μ M 메타독신을 사용하는 5시간 동안 치료의 효과를 보여준다. 가지돌기를 각각 몸체로부터 거리에 기반하여 (근위부에서 원위부로, 좌측에서 우측으로) 10 μ m의 10개 절편으로 나누었다. 가지 밀도는 절편 3에서 WT 마우스로부터 뉴런에 비해 Fmr1 녹아웃 마우스로부터 뉴런에서 증가하였다. 구체적으로, 도 15의 패널 A는 뉴런 사상위축의 밀도를 보여준다. Fmr1 녹아웃 마우스로부터 일차 해마 뉴런은 사상위축 밀도의 증가를 보여주었다 ($p < 0.001$). 300 μ M 메타독신을 사용한 치료는 Fmr1 녹아웃 마우스에서 뉴런 사상위축 밀도의 이상 증가를 감소시켰다 ($p < 0.001$). Fmr1 녹아웃 마우스로부터 뉴런은 보다 길고 (도 15의 패널 B ($p < 0.01$)) 보다 짧은 (도 15의 패널 C ($p < 0.01$)) 미성숙의 특징을 갖는 사상위축을 보여주었다. 메타독신을 사용한 치료는 상기 사상위축 길이의 증가를 역전시키고 (도 15의 패널 B ($p < 0.01$)), 폭의 감소를 역전시켰다 (도 15의 패널 C ($p < 0.001$)).

[0138] **시험관 내에서 Fmr1 녹아웃 마우스에서 드 노보 해마 단백질 합성에 대한 메타독신의 효과**

[0139] 도 16은 Fmr1 녹아웃 또는 WT 마우스로부터 400 μ m 해마 절편에서 기초 드 노보 단백질 합성에 대한 비히클 또는 300 μ M 메타독신을 사용한 치료의 효과를 보여준다. 단백질 합성은 비히클-치료 WT 대조 해마보다 Fmr1 녹아웃 마우스로부터 비히클-치료 해마에서 더 높았다 ($p < 0.0001$). 메타독신 치료는 Fmr1 녹아웃 마우스 해마에서 단백질 합성 속도를 감소시켰다. Fmr1 녹아웃 마우스로부터 해마는 WT 마우스로부터 메타독신-치료 해마보다 더 높은 단백질 합성 속도를 보유하였으므로 ($p < 0.001$), 상기 효과는 부분적이었다.

표 1. 쥐의 X 중후군의 마우스 모델에서 페타독신 (150 mg/kg)의 효과의 개요

시험	경로 /용량	<i>fmr1</i> KO 마우스에서 이상 (Y/N)	결핍의 감소(Y/N)	실험 연구의 목적
6개월령 마우스에서 행동 효과				
환경적 공포 조건화	150 mg/kg i.p.		Y	Y
사회적 접근	150 mg/kg i.p.	Y	Y	Y
사회적 기역	150 mg/kg i.p.	Y	Y	시험안됨
6개월령 마우스에서 생화학적 효과				
뇌 Akt의 인산화	150 mg/kg i.p.	<i>fmr1</i> KO 마우스에서 증가함	Y	Y
뇌 ERK의 인산화	150 mg/kg i.p.	<i>fmr1</i> KO 마우스에서 증가함	Y	Y
뇌 GSK3β	150 mg/kg i.p.	<i>fmr1</i> KO 마우스에서 증가함	N	시험안됨
(Wt219/vr279)의 인산화				
뇌 GST 수준	150 mg/kg i.p.	<i>fmr1</i> KO 마우스에서 감소함	Y	Y
2개월령 마우스에서 복강내 또는 경구 투여 이후 페타독신의 행동 효과				
환경적 공포 조건화	150 mg/kg i.p.	Y	Y	Y
사회적 접근	150 mg/kg i.p.	Y	Y	Y
사회적 기역	150 mg/kg i.p.	Y	Y	시험안됨
환경적 공포 조건화	150 mg/kg po	Y	Y	시험안됨
사회적 접근	150 mg/kg po	Y	Y	시험안됨
사회적 기역	150 mg/kg po	Y	Y	시험안됨
환경적 공포 조건화	300 mg/kg po	Y	Y	시험안됨
사회적 접근	300 mg/kg po	Y	Y	시험안됨
사회적 기역	300 mg/kg po	Y	Y	시험안됨
2개월령 마우스에서 복강내 또는 경구 투여 이후 페타독신의 생화학적 효과				
람프구 PAK1 및 pERK	150 mg/kg i.p.	증가함	Y	시험안됨
람프구 pGSK3β (vr219/vr279)	150 mg/kg i.p.	감소함	N	시험안됨
람프구 GST	150 mg/kg i.p.	감소함	N	시험안됨
람프구 PAK1 및 pERK	150 mg/kg po	증가함	Y	시험안됨
람프구 pGSK3β (vr219/vr279)	150 mg/kg po	감소함	N	시험안됨
람프구 GST	150 mg/kg po	감소함	N	시험안됨
람프구 PAK1 및 pERK	300 mg/kg po	증가함	Y	시험안됨
람프구 pGSK3β (vr219/vr279)	300 mg/kg po	감소함	N	시험안됨
람프구 GST	300 mg/kg po	감소함	N	시험안됨
해마 pERK	150 mg/kg i.p.	증가함	Y	시험안됨

표 1 >

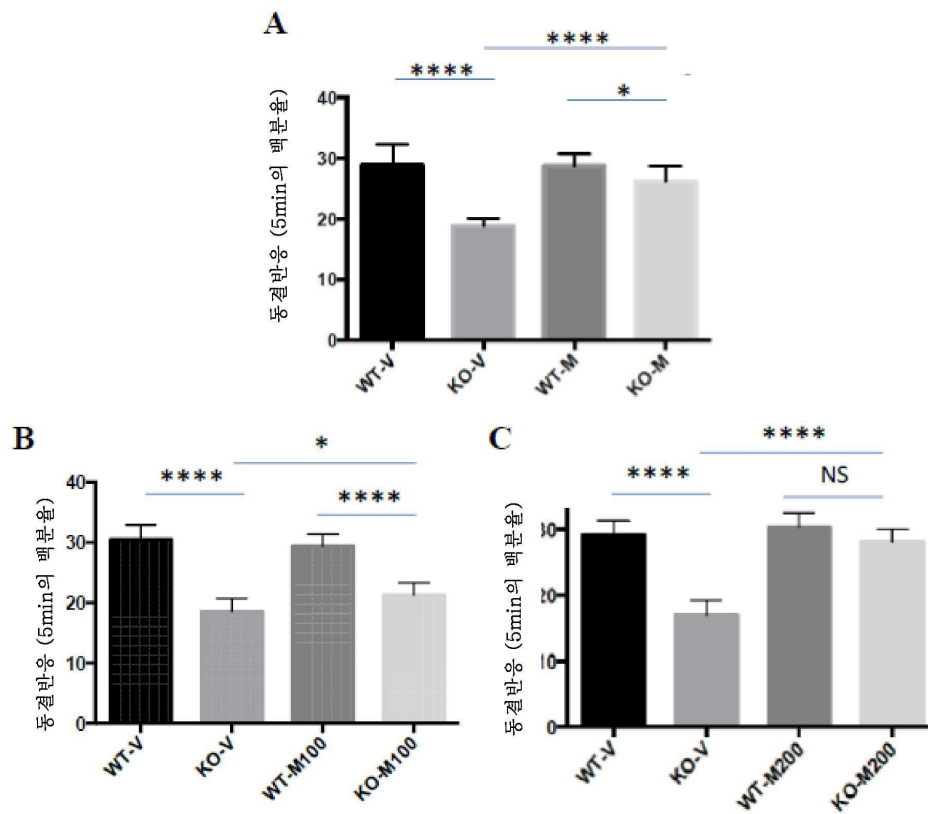
[0140]

[0141]

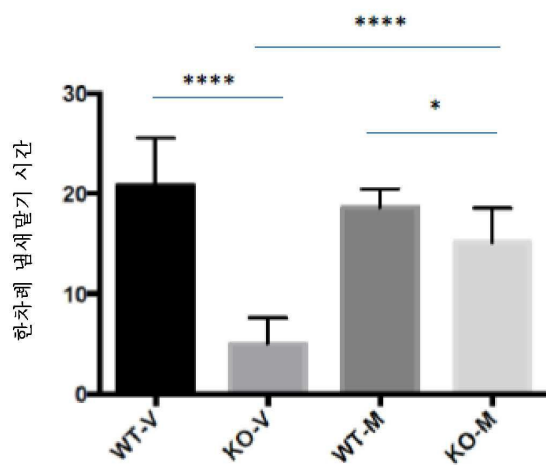
전전두엽 과질 PERK	150 mg/kg ip	증가함	Y	시험안됨
선조체 PERK	150 mg/kg ip	증가함	Y	시험안됨
해마 pAkt	150 mg/kg ip	증가함	Y	시험안됨
전전두엽 과질 pAkt	150 mg/kg ip	증가함	Y	시험안됨
선조체 pAkt	150 mg/kg ip	증가함	Y	시험안됨
시험	경로 /용량	<i>fmr1</i> KO 마우스에서 이상 (Y/N)	결핍의 감소(Y/N)	실험 연구의 목적
해마 pGSK3β(ser9)	150 mg/kg ip	정상 수준	N/A	시험안됨
전전두엽 과질 pGSK3β(ser9)	150 mg/kg ip	감소함	N	시험안됨
선조체 pGSK3β(ser9)	150 mg/kg ip	감소함	Y	시험안됨
해마 GST	150 mg/kg ip	감소함	N	시험안됨
전전두엽 과질 GST	150 mg/kg ip	감소함	N	시험안됨
선조체 GST	150 mg/kg ip	감소함	Y	시험안됨
해마 pS6K1(ser235/236)	150 mg/kg ip	증가함	N	시험안됨
전전두엽 과질 pS6K1(ser235/236)	150 mg/kg ip	증가함	N	시험안됨
선조체 pS6K1(ser235/236)	150 mg/kg ip	증가함	N	시험안됨
해마 pS6K1(ser240/244)	150 mg/kg ip	증가함	N	시험안됨
전전두엽 과질 pS6K1(ser240/244)	150 mg/kg ip	증가함	N	시험안됨
선조체 pS6K1(ser240/244)	150 mg/kg ip	증가함	N	시험안됨
시험관 내에서 <i>fmr1</i> 녹아웃 마우스로부터 뉴런 내의 사상위축 밀도 및 정숙화에 대한 메타독신의 효과	300 μM	증가함	Y	시험안됨
뉴런 사상위축 밀도	300 μM	증가함	Y	시험안됨
뉴런 사상위축 길이	300 μM	증가함	Y	시험안됨
뉴런 사상위축 폭	300 μM	감소함	Y	시험안됨
시험관 내에서 <i>fmr1</i> 녹아웃 마우스에서 드 노보 해마 단백질 합성에 대한 메타독신의 효과	300 μM	증가함	Y	시험안됨
드 노보 해마 단백질 합성 속도	300 μM	증가함	Y	시험안됨

도면

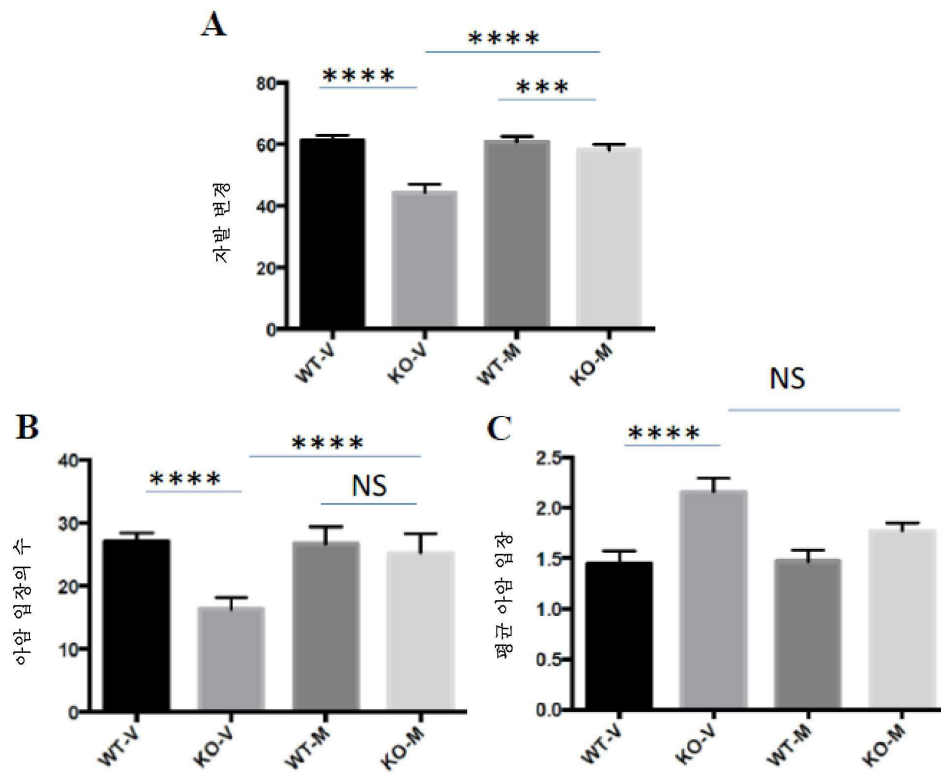
도면1



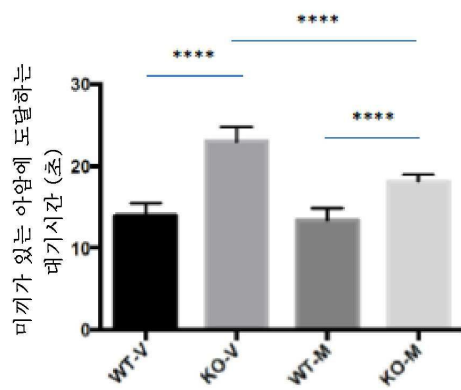
도면2



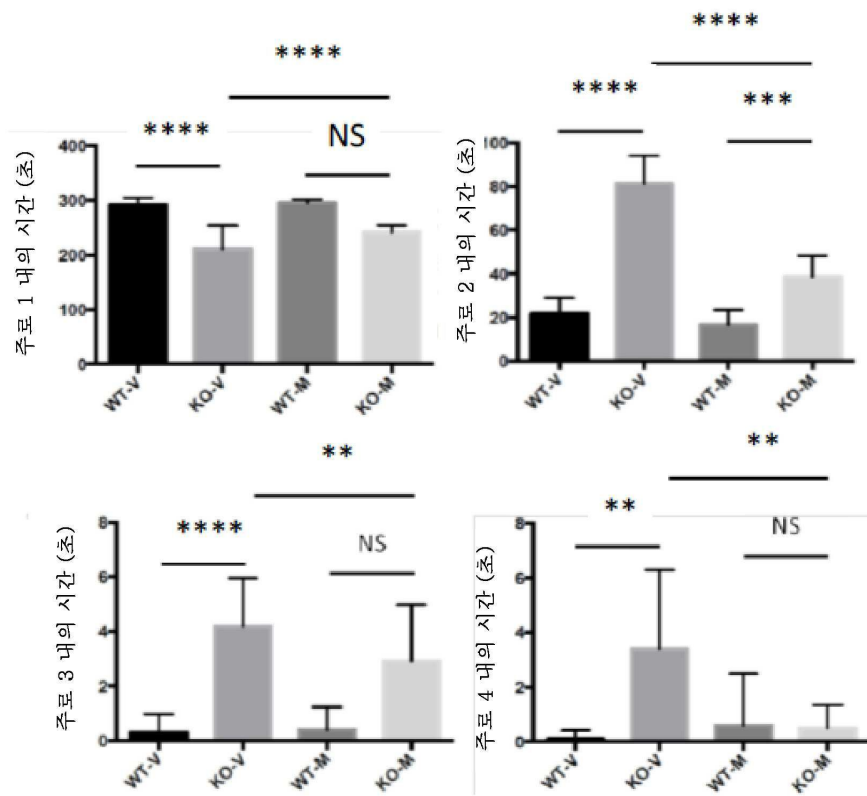
도면3



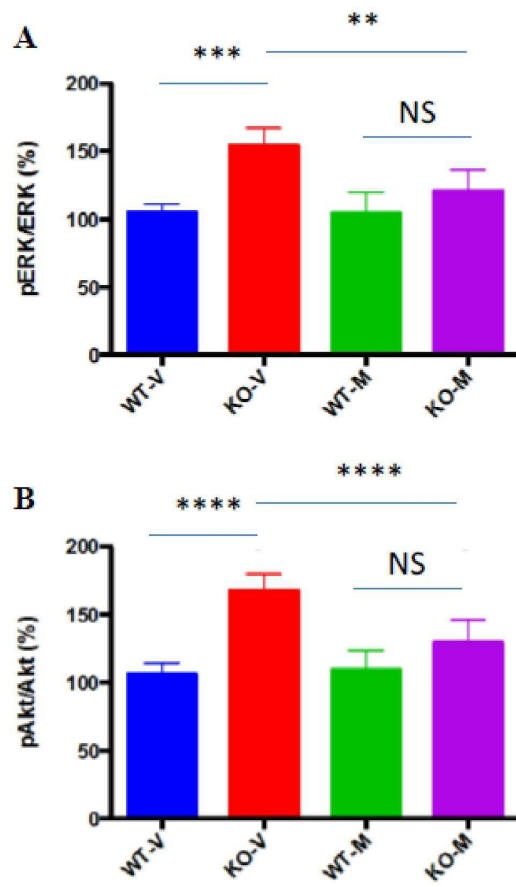
도면4



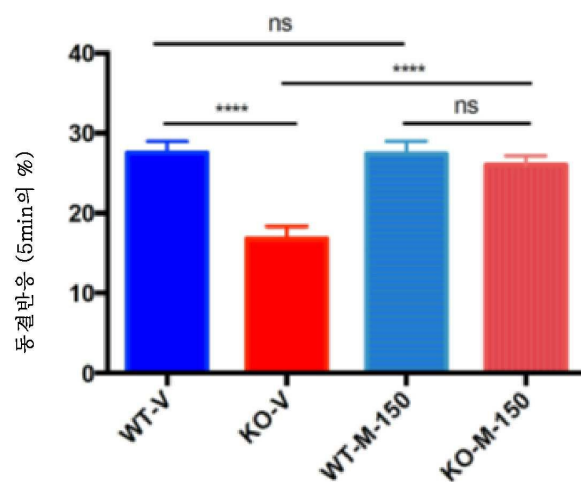
도면5



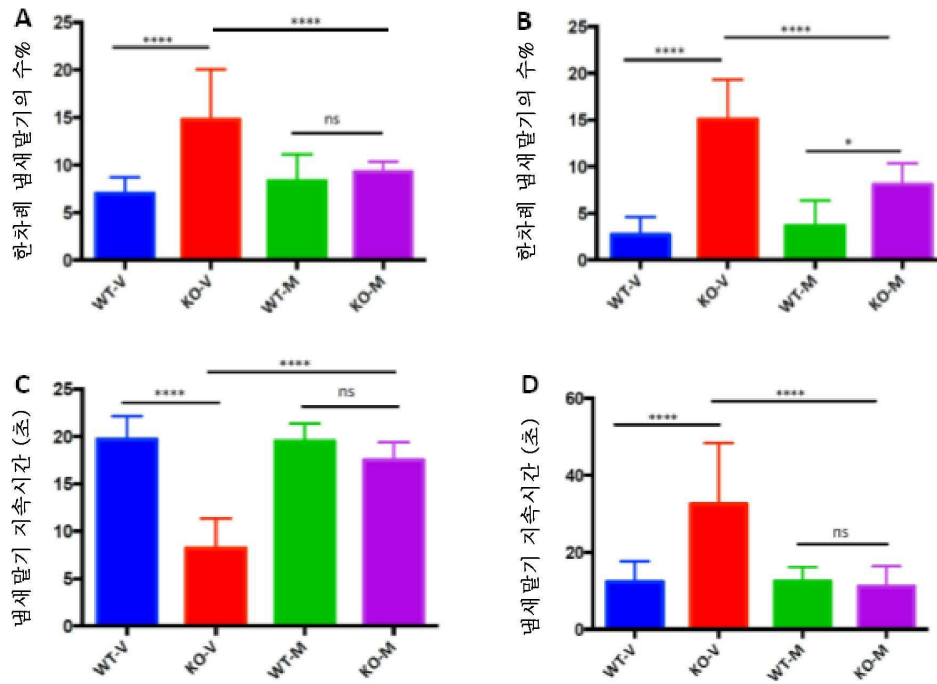
도면6



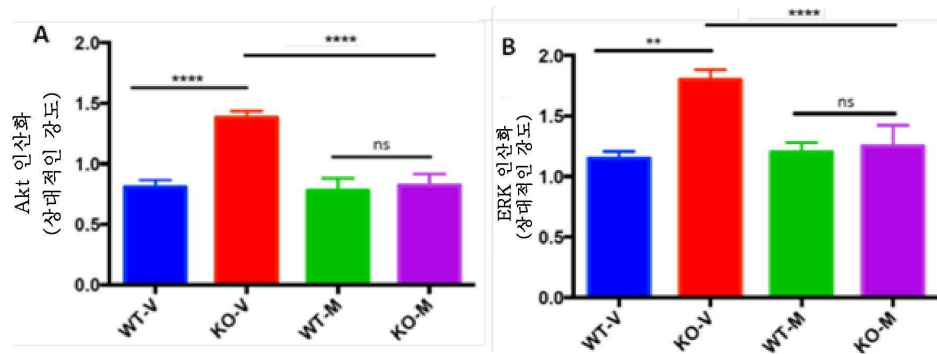
도면7



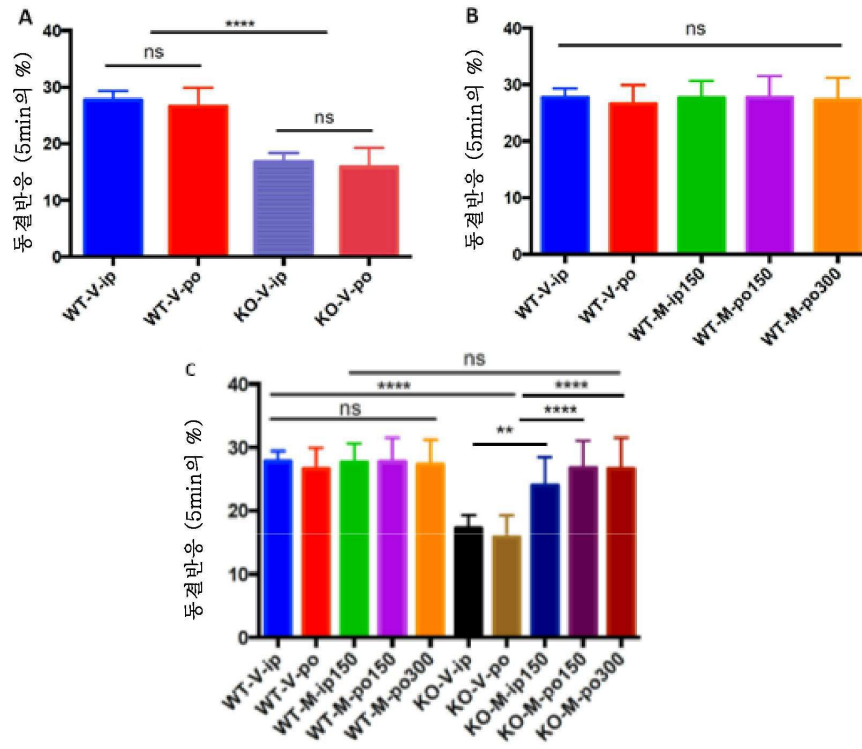
도면8



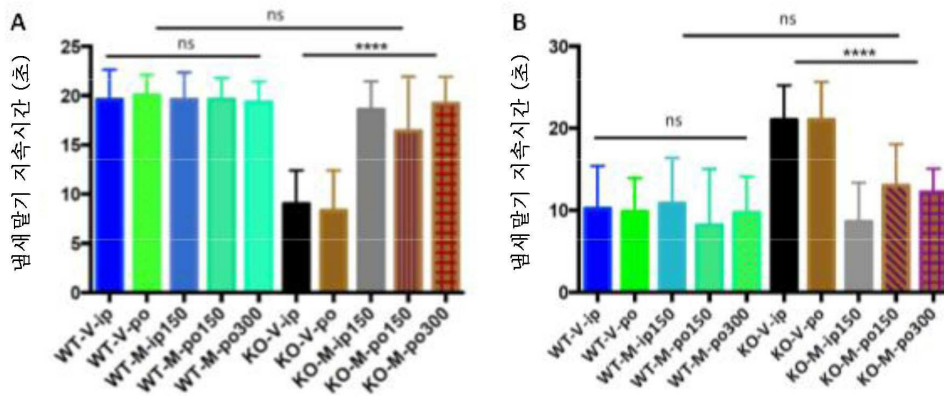
도면9



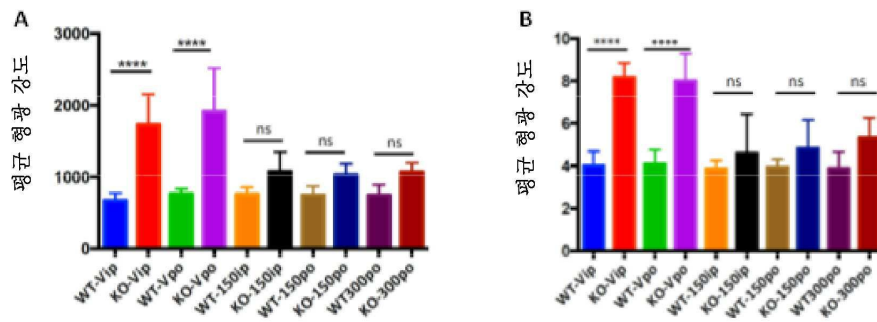
도면10



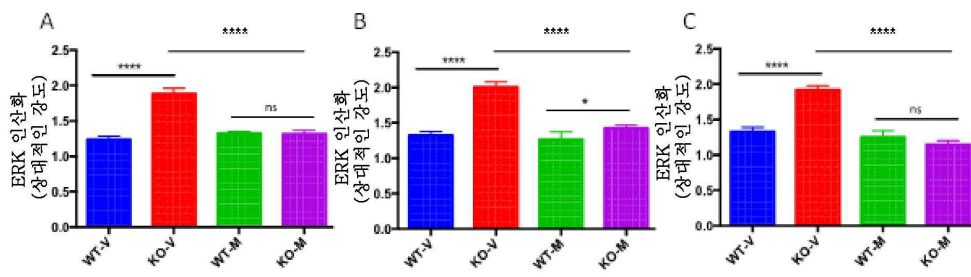
도면11



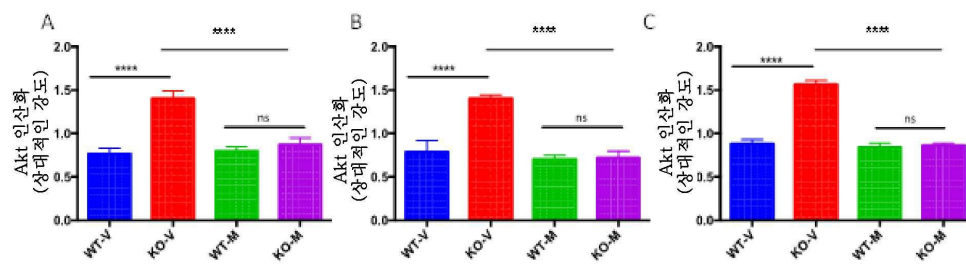
도면12



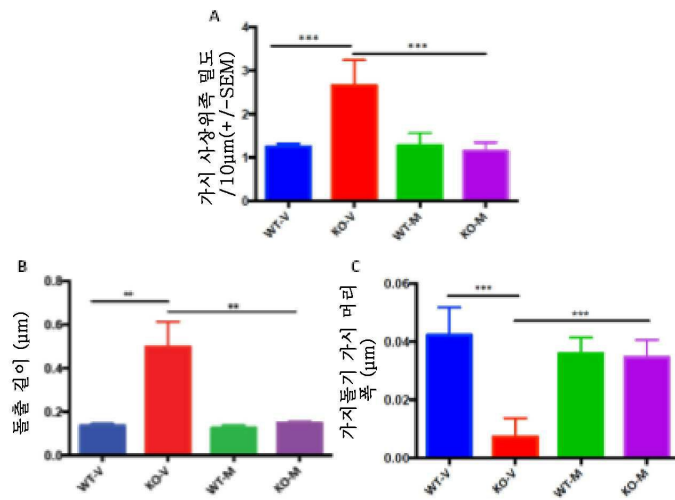
도면13



도면14



도면15



도면16

