(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
A61K 38/17

(11) 공개번호 특2001-0104401
(43) 공개일자 2001년11월26일

(21) 출원번호 10-2001-7012263
(22) 출원일자 2001년09월26일
번역문 제출일자 2001년09월26일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2000/01211
(86) 국제출원출원일자 2000년03월30일
(87) 국제공개번호 WO 2000/57900
(87) 국제공개일자 2000년10월05일

(81) 지정국 국내특허 : 아랍에미리트, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아-헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 코스타리카, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 도미니카연방, 에스토니아, 스페인, 핀랜드, 영국, 그레나다, 그루지야, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 유고슬라비아, 남아프리카, 짐바브웨, 모로코, 탄자니아, 안티구아바부다, 알제리,
AP ARIPO특허: 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 우간다, 짐바브웨, 탄자니아,
EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀랜드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 기네비쏘, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 9907461.9 1999년03월31일 영국(GB)

(71) 출원인 옥스포드 바이오메디카(유케이) 리미티드
찰스 굿맨
영국 오엑스4 4쥐에이 옥스포드 더 옥스포드 사이언스 파크 로버트 로빈슨 애비뉴 메다와 센터

(72) 발명자 마덴말콤
영국런던더블유씨2비5알엘드루리레인26/29킹스칼리지런던분화생물학연구실생물의과학부/랜달인스티튜트
콜코란조나단페트릭토마스
영국런던더블유씨2비5알엘드루리레인26/29킹스칼리지런던분화생물학연구실생물의과학부/랜달인스티튜트

(74) 대리인 김동완

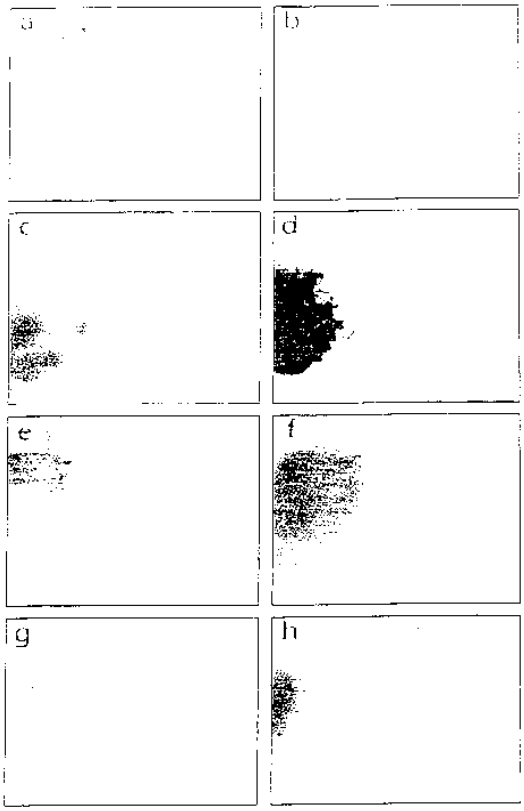
심사청구 : 없음

(54) 인자

요약

본 발명자들의 결과는 특정 부류의 뉴런으로부터의 신경돌기 생성에 있어서 RA의 역할이 RARβ2를 통하여 작용하는 것을 나타낸다. 따라서, 본 발명은 레틴산 수용체 RARβ2의 발현을 병에 걸린 세포 또는 조직에서 보장하는 신경퇴행성 질환의 치료 방법을 포함한다. 이는 RARβ2 수용체의 아고니스트를 사용한 치료에 의해, 또는 유전자 요법, 즉 상기 수용체를 코딩하는 핵산을 삽입함으로써 성취될 수 있다. 또한 본 발명은, 예를 들어 대마비의 경우에, 말초 신경계 손상의 치료 및 척수 재생을 위한 투약에 있어서의 상기 약제의 사용으로 구현될 수 있다.

대표도



색인어
신경돌기, 신경 성장 인자, 레틴산, 수용체, 신경퇴행성 질환, 아고니스트

명세서

기술분야

본 발명은 신경돌기 성장과 관련한 인자에 관한 것이다.

배경기술

예를 들어 척수 손상과 같은 신경 손상의 경우, 신경돌기 생성 및/또는 신경돌기 재생과 같은 신경돌기 발육을 야기하는 것이 바람직하다.

신경 성장 인자 (nerve growth factor, NGF)는 신경돌기 생성과 같은 특정 사건을 자극하는 것으로 알려져 있다. 그러나, NGF는 비교적 큰 분자로서, 상응하는 큰 분자량을 가진다. 또한, NGF는 프로테아제 매개 분해에 대하여 민감하다. 상기 및 기타 이유로 인하여, NGF는 투여가 어렵다. 또한 NGF는 제조하는 것이 비교적 비싸다. 상기는 종래 기술과 결부된 문제점이다.

발명의 요약

본 발명자들은 놀랍게도 레틴산 수용체 β2 (RARβ2) 및/또는 그의 아고니스트를 사용함으로써 신경돌기 발육, 예를 들어 신경돌기 생성 (outgrowth) 및/또는 신경돌기 재생을 야기할 수 있음을 알아내었다.

본 발명의 측면의 요약

본 발명은 RARβ2 및/또는 그의 아고니스트를 사용함으로써 신경돌기 발육, 예를 들어 신경돌기 생성 및/또는 재생을 야기할 수 있다는 놀라운 발견에 기초한 것이다.

본 발명의 측면은 이러한 발견을 이용한다. 예를 들어 본원에 설명된 바와 같이 RARβ2 및/또는 그의 아고니스트를 사용함으로써 신경돌기 발육, 예를 들어 신경돌기 생성 및/또는 신경돌기 재생의 조절을 야기하는 방법을 보유하는 것이 가능하다.

발명의 상세한 설명

하나의 측면에 있어서, 본 발명은 신경돌기 발육을 야기하는 의약의 제조에 있어서의 RARβ2 및/또는 그의 아고니스트의 용도에 관한 것이다.

본 발명에 있어서, RARβ2 및/또는 아고니스트는 약학적 활성제로 지칭될 수 있다.

신경돌기는 다양한 뉴런 세포형으로부터 발육하는 잘 알려진 구조체이다. 신경돌기는 그가 나오는 세포의 표면으로부터의 현미경적인 형태학적 돌출체 또는 분지상 또는 콤상 (comb-like) 구조체로 나타난다. 신경돌기 생성의 예는 첨부된 도면, 및 [Maden 1998-review article]에서 참고된 것과 같은 간행물에 예시되어 있으며, 당 업계에 잘 알려져 있다.

RARβ2 코딩 서열 (즉, RARβ2 유전자)는 하기하는 바와 같이 사용된다. RARβ2 유전자는 재조합 DNA 기술 및/또는 합성 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어 RARβ2 유전자는, 본원의 실시예 섹션에 상술되어 있는 프라이머 등을 사용하여 본원의 실시예 섹션에서와 같이 제조한 PCR 증폭 유전자 단편을 사용하여 제조하거나, 당 업계에 공지된 다른 적합한 방법에 따라 제조할 수 있다.

또다른 측면에 있어서, 본 발명은 신경돌기 발육을 야기하는 의약의 제조에 있어서의 RARβ2 및/또는 그의 아고니스트의 용도에 관한 것으로 여기서 상기 아고니스트는 레틴산 (retinoic acid, RA) 및/또는 CD2019이다.

레틴산은 구매가능하다. CD2019는 본원에서 논의되고 문헌 [Elmazar 등, (1996) Teratology vol. 53, pp 158-167]에 예시되어 있는 구조를 가지는 RARβ2 아고니스트로서, 폴리시클릭 헤테로카르빌 분자이다.

또다른 측면에 있어서, 본 발명은 신경계 장애 치료용 의약의 제조에 있어서의 RARβ2 및/또는 그의 아고니스트의 용도에 관한 것이다.

또다른 측면에 있어서, 본 발명은 신경계 손상을 포함하는 신경계 장애 치료용 의약의 제조에 있어서의 RARβ2 및/또는 그의 아고니스트의 용도에 관한 것이다.

또다른 측면에 있어서, 본 발명은 약리학적 활성량의 RARβ2 수용체, 및/또는 그의 아고니스트를 투여하는 것을 포함하는 신경계 장애의 치료 방법에 관한 것이다.

또다른 측면에 있어서, 본 발명은 약리학적 유효량의 RARβ2 수용체, 및/또는 RA 및/또는 CD2019인 그의 아고니스트를 투여하는 것을 포함하는 신경계 장애의 치료 방법에 관한 것이다.

또다른 측면에 있어서, 본 발명은 약리학적 활성량의 RARβ2 수용체, 및/또는 그의 아고니스트를 투여하는 것을 포함하는 신경계 장애의 치료 방법에 관한 것인데, 여기서, RARβ2 수용체는 RARβ2 발현 시스템을 포함하는 실체 (entity)에 의해 투여된다.

또다른 측면에 있어서, 본 발명은 대상자에 있어서 신경돌기 발육을 야기하는 방법에 관한 것인데, 상기 방법은 RARβ2 수용체의 적어도 일부의 발현을 지시할 수 있는 핵산 콘스트럭트를 제공하고, 상기 콘스트럭트를 상기 대상자의 하나 이상의 세포 내로 도입하고, 임의로 RARβ2 아고니스트, 예를 들어 RA 및/또는 CD2019를 상기 대상자에게 투여하는 것을 포함한다.

추가의 측면에 있어서, 본 발명은 약제가 RARβ2 시그널링을 조절할 수 있는지의 여부를 측정하기 위한 분석 방법에 관한 것인데, 상기 방법은 신경 세포를 제공하고, 상기 세포를 상기 약제와 접촉시키고, RARβ2 수용체의 활성을, 예를 들어 신경돌기의 생성을 모니터링함으로써 평가하는 것을 포함한다.

본 발명의 분석 방법에 사용하기 위한 신경 세포는, 배양 중에 안정하게 유지되거나, 동물로부터 직접 유래된 일차 세포일 수 있는 임의의 적합한 신경 세포주일 수 있다. 바람직하게는, 상기 세포는 하기하는 바와 같이 제조되는 마우스 배아 후근 신경절 (dorsal root ganglion, DRG) 세포이다.

추가의 측면에 있어서, 본 발명은 (i) 상기 RARβ2 시그널링 조절의 분석을 수행하는 단계, (ii) 상기 RARβ2 시그널링을 조절할 수 있는 하나 이상의 약제를 동정하는 단계, 및 (iii) 상기 하나 이상의 동정된 약제를 다량 제조하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

추가의 측면에 있어서, 본 발명은 (i) 상기 RARβ2 시그널링 조절의 분석을 수행하는 단계, (ii) 상기 RARβ2 시그널링을 조절할 수 있는 하나 이상의 약제를 동정하는 단계, (iii) 상기 하나 이상의 동정된 약제를 다량 제조하는 단계, 및 (iv) 상기 하나 이상의 동정된 약제를 함유하는 약학 조성물을 제조하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

추가의 측면에 있어서, 본 발명은 약제를 사용하여 RARβ2의 생체내 활성에 영향을 주는 방법에 관한 것인데, 여기서, 약제는 RARβ2 시그널링을 조절할 수 있다 (예를 들어 상기한 바와 같이 시험관내 분석 방법에서 RARβ2 시그널링을 조절할 수 있음).

추가의 측면에 있어서, 본 발명은 신경계 장애 또는 손상을 치료하기 위한 약학 조성물의 제조에 있어서의 약제의 용도에 관한 것인데, 여기서, 약제는 RARβ2 시그널링을 조절할 수 있다 (예를 들어 상기한 바와 같이 시험관내 분석 방법에서 RARβ2 시그널링을 조절할 수 있음).

추가의 측면에 있어서, 본 발명은 약제를 사용하여 대상자를 치료하는 방법에 관한 것인데, 여기서, 약제는 RARβ2 시그널링을 조절할 수 있다 (예를 들어 상기한 바와 같이 시험관내 분석 방법에서 RARβ2 시그널링을 조절할 수 있음).

추가의 측면에 있어서, 본 발명은 RARβ2 및/또는 그의 아고니스트를 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제와의 혼합물 형태로 함유하는 약학 조성물에 관한 것인데, 여기서, 약학 조성물은 신경돌기 발육을 야기하는 데 유용하다.

이제, 본 발명의 상기 및 추가의 측면은, 용이한 참조를 위하여 적합한 섹션 표제 하에 논의된다. 그러나, 각각의 섹션 하의 교시에 의해 각각의 특정 섹션이 제한될 필요는 없다.

바람직한 측면

바람직한 측면에 있어서, RARβ2의 발현을 지시할 수 있는 핵산 콘스트럭트의 투여는 RARβ2 아고니스트, 예를 들어 RA, 또는 바람직하게는 CD2019 (또는 그의 모방체)의 투여와 동반된다.

바람직하게는, 상기 아고니스트는 어느 정도 RARβ2 수용체에 대하여 선택성을 가진다. 바람직하게는, 상기 아고니스트는 RARα 수용체에 현저하게 영향을 주지는 않는다. 바람직하게는, 상기 아고니스트는 RARγ 수용체에 현저하게 영향을 주지는 않는다. 더 바람직하게는, 상기 아고니스트는 RARα 수용체 또는 RARγ 수용체에 현저하게 영향을 주지는 않는다. 훨씬 더 바람직하게는, 상기 아고니스트는 RARβ2 수용체에 대하여 고도로 선택성을 나타낸다.

바람직한 측면에 있어서, RARβ2의 발현을 지시할 수 있는 핵산 콘스트럭트의 투여는, 벡터, 바람직하게는 바이러스 벡터, 더 바람직하게는 레트로바이러스 벡터를 사용하여 성취된다. 고도로 바람직한 실시형태에 있어서, RARβ2의 발현을 지시할 수 있는 핵산 콘스트럭트의 투여는 신경 세포와 같은 비-분열 포유류 세포를 감염시킬 수 있는 레트로바이러스 벡터를 사용하여 성취된다.

장점

본 발명은, RARβ2 및/또는 그의 아고니스트가 신경 세포 발육의 조절을 야기할 수 있기 때문에 유리하다.

또한 본 발명의 잇점은 대상자에게 NGF를 투여하는 것을 회피한다는 것이다.

또한 본 발명의 잇점은 성체 (adult) 신경 조직에서 신경돌기 생성이 촉진되게 할 수 있다는 것이다.

레티노이드

레티노이드는 비타민 A로부터 유래되는 분자 패밀리로서, 생물학적 활성 대사산물인 레틴산 (RA)를 포함한다. RA의 세포적 효과는, 올-트랜스-RA (tRA) 및 9-시스-RA (9-cis-RA) 둘 모두에 의해 활성화되는 레틴산 수용체 (RAR), 및 단지 9-시스-RA에 의해서만 활성화되는 레티노이드 X 수용체 (RXR)의 2가지 부류의 수용체의 작용을 통하여 매개된다 (Kastner 등, 1994; Kleiwer 등, 1994). 상기 수용체로는, 대안적인 스플라이싱 (alternative splicing) 및 차별적 프로모터 사용으로 인하여 다수의 이소형이 존재하는 3가지 주요 아형 α, β 및 γ 수용체가 있다 (Leid 등). RAR은 RXR과 헤테로이량체를 형성함으로써 유전자 발현을 매개하며, 반면 RXR은 호모이량체로서, 또는 여러 고아 수용체와 헤테로이량체를 형성함으로써 유전자 발현을 매개할 수 있다 (Mangelsdorf & Evans, 1995). 여러 배아 뉴런형에 대한 다수의 연구에 의하면, RA는, 사실 뉴로트로핀이 그러할 수 있듯이 (Campenot, 1977; Lindsay, 1988; Turtle 및 Mathew, 1995), 신경돌기의 수 및 길이 모두를 자극할 수 있는 것으로 나타났다 (review, Maden, 1998). 뉴로트로핀은 발육 말초 신경계에 있어서 일차 감각 뉴런의 다양한 뉴런의 생존에 필요한 성장 인자 패밀리이다 (Snider, 1994). PC12 세포에 있어서, NGF에 의해 유도되는 가장 초기의 유전자 중 하나는 고아 수용체 NGFI-B (NURR1)이다 (Millbrandt, 1989). 이는, 발육 뉴런에 있어서 상기 성장 인자 및 레티노이드 매개 경로가 상호작용할 수 있음을 암시한다.

상기 측면에 대한 배경 교시는 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim 상에서 Victor A. McKusick 등에 의해 제시되었다. 하기 정보는 상기 출처로부터 추출하였다.

3가지 레틴산 수용체, 알파, 베타, 및 감마는 핵 수용체 수퍼패밀리의 구성원이다. 레틴산은 척추동물에 있어서 기술된 첫번째 모포겐 (morphogen)이었다. RARA 및 RARB 유전자는 각각 염색체 17 및 3에 위치하는 2가지의 밀접하게 관련된 티로이드 호르몬 수용체 THRA 및 THRB의 유전자에 대하여, 상기 핵 수용체 패밀리의 다른 구성원에 대한 것보다 더 상동성이다. 상기 관찰결과는, 티로이드 호르몬 및 레틴산 수용체가, 상기 패밀리의 스테로이드 수용체 군의 공통 조상으로부터 차라리 진화 초기에 그 자체 분기한 공통 조상으로부터 유전자, 가능하게는 염색체의 복제에 의해 진화되

었음을 암시한다. 이전에 HAP로 나타내어진 RARB 유전자는 체세포 혼성화에 의해, 그리고 원위치 혼성화에서 3p24에 지도화된다. Benbrook 등 (1988)은 상피 조직에서의 우세한 분포를 증명하였으며, 따라서 RAR (엡실론) 명칭을 사용하였다. 원위치 혼성화에 의해, Mattei 등 (1988)은 RARB 유전자를 3p24에 할당하였다. 결실 지도화를 사용하여, de The 등 (1990)은 전사 개시점의 59 bp 상류에 위치하는 27-bp 단편을 동정하였는데, 이는 헤르페스바이러스 티미딘 키나제 프로모터 상에 레틴산 응답성을 부여한다. 이들은 알파 및 베타 수용체 둘 모두가 동일한 DNA 서열을 통하여 작용한다는 증거를 발견하였다. Mattei 등 (1991)은 상응하는 유전자를 마우스에서는 염색체 14, 밴드 A에 할당하고, 래트에서는 염색체 15에 할당하였다.

Nadeau 등 (1992)은 염색체 14의 센트로머 부분에 대한 마우스 호몰로그의 할당을 확인하였다.

Dejean 등 (1986)은, 특정의 인간 간세포 암종 (HCC)에 존재하는 B형 간염 바이러스 (HBV) 통합 부위를, 동일 간의 비-종양성 조직 중 상응하는 미점유 부위와 비교한 결과, HBV 통합에 의해, 암유전자인 ERBA, 및 인간 글루코코르티코이드 수용체 및 에스트로겐 수용체 유전자의 추정 DNA 결합 도메인 모두와 매우 닮은 간세포 서열 다음에 바이러스 서열이 위치하게 됨을 알아내었다.

Dejean 등 (1986)은 일반적으로 정상 간세포에서 사일런트 (silent)하거나 매우 낮은 수준으로 전사되는 상기 유전자가 HBV 통합 결과로서 부적절하게 발현되어, 세포 형질전환에 기여하게 된다는 것을 제안하였다.

Dejean 등 (1986)은 설치류-인간 체세포 하이브리드 DNA 패널에 의해, 상기 유전자를 염색체 3에 위치화하였다. de The 등 (1987)에 의한 추가의 연구에 의하면, HAP 유전자 생성물이, 그의 간에서의 부적절한 발현이 간세포 발암 현상과 연관된 신규한 리간드-응답성 조절 단백질일 수 있음이 나타났다. Brand 등 (1988)은 HAP (HBV-활성화 단백질 (HBV-activated protein))로 지칭되는 신규한 단백질이 레틴산 수용체임을 입증하였다. 이들은 상기 수용체를 베타형 (RARB)으로서 나타내었으며, 이를 3p25-p21에 지도화하였다.

Lotan 등 (1995)은, RARB mRNA의 발현이 전암성 구강 병변에 있어서 선택적으로 손실되며, 이소트레티노인을 사용한 처리에 의해 회복될 수 있음을 알아내었다. RARB mRNA의 발현의 회복은 임상적 응답과 결부되었다.

RARB, RARG, RXRB, 및 RXRG는 선조체에서 발현된다. Kreczel 등 (1998)은, 상기 유전자의 이동 (locomotion)에 대한 영향을 연구하기 위하여, 단일 및 이중 녹아웃 (knockout) 마우스를 개발하였으며, 야외 및 로타로드 시험에 의해 그의 이동 기술을 분석하였다. RARB-RXRB, RARB-RXRG, 및 RXRB-RXRG 이중 눌 (null) 돌연변이 마우스는 야생형 리터메이트 (littermate)와 비교시 정방향 이동에서의 감소를 나타내었으나, 상응하는 단일 눌 돌연변이체는 그러하지 않았다. 40 퍼센트의 RARB-RXRB 눌 돌연변이체는 후방 이동을 나타내었다. 로타로드 시험 성능은 RARB, RARB-RXRB, RARB-RXRG, 및 RXRB-RXRG 마우스에 있어서 손상되었다. 반대로, RARA, RARG, RARA-RXRG, 및 RARG-RXRG 눌 마우스는, 심지어 RARA 및 RARG 모두가 선조체에서 또한 발현된다 해도, 이동에서의 결함을 전혀 나타내지 않았다. 골격근, 말초신경, 및 척수의 형태, 발육, 및 기능은 균형 반사와 마찬가지로, 모든 단일 및 이중 눌 돌연변이체에서 정상이었다. 이러한 결과는 Kreczel 등 (1998)에게, RARB, RXRB, 및 RXRG가 이동 거동의 제어에 특이적으로 연루되어 있으며, RARB와 RXRB 또는 RXRG와의 헤테로이량체는 기능성 수용체 단위이므로 RXRB 및 RXRG가 기능적으로 여분임을 암시하였다. Kreczel 등 (1998)은, 상기 돌연변이 마우스에 있어서, 선조체에서 가장 풍부한 도파민 수용체인 D1 및 D2 도파민 수용체 (D1R 및 D2R)의 발현을 연구하였다. RARB-RXRB, RARB-RXRG, 및 RXRB-RXRG 이중 눌 돌연변이체에서는, 야생형 대조와 비교시 전체 선조체 D1R 및 D2R 전사체가 각각 40% 및 30% 감소하였으나, RARB 또는 RXRG 단일 돌연변이체는 그러하지 않았다.

상기 감소는 측중격핵의 쉘 및 코어를 포함한 선조체의 복측중앙 (medioventral) 영역, 및 미상 피각의 배측중앙부 (mediodorsal part)에 주로 존재하였다. 상기 감소는 D2R-발현 뉴런의 손실에 의한 것이 아니었으며; 세포소멸 (apoptosis) 증가도 전혀 나타나지 않았다. 선조체의 조직학은 정상이었다.

Samad 등 (1997)에 의한 D2R 프로모터에서의 레틴산 응답 요소의 특성화는 Kreczel 등 (1998)으로 하여금 D2R 및 D2R 발현에서의 감소가 전사 수준에서 일어남을 제안하게 하였다. RARB-RXRB, RARB-RXRG, 및 RXRB-RXRG 이중 눌 돌연변이체는 코카인에 의해 유도되는 운동에서의 정상적인 증가를 나타내지 않았는데, 이는 D1R-눌 마우스의 표현형을 모방하는 것이다.

종합하면, 상기 결과는 Kreczel 등 (1998)에게 레티노이드가 도파민성 중변연계 경로의 기능을 제어하는 데 연루되어 있음을 암시하였으며, 레틴산 시그널링에서의 결함이 신경계 장애의 원인일 수 있음을 나타내는 것이었다.

아고니스트

본 발명의 아고니스트는 임의의 적합한 RARβ2 아고니스트일 수 있다. 바람직하게는 상기 RARβ2의 아고니스트는 트랜스활성화 분석에서 RARβ2를 활성화시킬 수 있다.

아고니스트는 유기 화합물 또는 기타 화학물질일 수 있다. 아고니스트는 아미노산 서열 또는 그의 화학적 유도체, 또는 이들의 조합일 수 있다. 약제는 심지어 센스 서열 또는 안티-센스 서열일 수 있는 뉴클레오티드 서열일 수 있다. 약제는 심지어 항체일 수도 있다.

일반적으로 아고니스트는 유기 화합물이다. 일반적으로 유기 화합물은 2개 이상의 히드로카르빌기를 포함한다. 본원에서, " 히드로카르빌기" 라는 용어는 적어도 C 및 H를 포함하는 기를 의미하며, 임의로 하나 이상의 다른 적합한 치환기를 포함할 수 있다. 이러한 치환기의 예는 할로-, 알콕시-, 니트로-, 알킬기, 시클릭기 등을 포함할 수 있다. 치환기가 시클릭기라는 가능성 외에도, 치환기의 조합이 시클릭 기를 형성할 수 있다. 히드로카르빌기가 하나 이상의 C를 포함할 경우, 상기 탄소는 서로 결합될 필요는 없다. 예를 들어, 탄소 중 2개 이상은 적합한 요소 또는 기를 통하여 결합될 수 있다. 이와 같이, 히드로카르빌기는 헤테로 원자를 포함할 수 있다. 적합한 헤테로 원자는 당 업계의 숙련자에게는 명확하며, 예를 들어 황, 질소 및 산소를 포함한다. 몇몇 용도에 있어서, 약제는 바람직하게는 하나 이상의 시클릭 기를 포함한다. 시클릭 기는 폴리시클릭 기, 예를 들어 비-융합 폴리시클릭 기일 수 있다. 몇몇 용도에 있어서, 아고니스트는 다른 히드로카르빌 기에 결합된 상기 시클릭 기 중 하나 이상을 포함한다.

특정 아고니스트

본 발명에 따른 특정 아고니스트의 예로는 레틴산 (RA)이 있다. 레틴산의 일반적인 두 형태 모두 (올-트랜스 레틴산 (tRA), 또는 9-시스-RA) RARβ2의 아고니스트이다.

CD2019는 본원에서 논의되고 문헌 [Elmazar 등, (1996) Teratology vol. 53, pp 158-167]에 예시되어 있는 구조를 가지는 RARβ2 아고니스트이다. 상기 및 기타 아고니스트가 문헌 [Beard 및 Chandraratna p.194; Johnson 등, 1996]에 또한 논의되어 있다. CD2019의 구조는 첨부된 도면에서 화학식 I로 나타내어져 있다.

대안적인 RARβ2 아고니스트가 첨부된 도면에서 화학식 II로 나타내어져 있다.

본 발명은 또한 화학식 I 및/또는 화학식 II의 유사체 또는 생동배체 (bioisostere)를 포함한다.

바람직하게는, 본 발명에 따른 유용한 약제는 RARβ2에 대하여 선택성을 가진다.

RARβ2 아고니즘 (agonism) 측정을 위한 분석

본 발명에 따른 아고니스트의 예는 RARβ2 아고니즘 측정을 위한 분석법을 사용하여 동정 및/또는 확인할 수 있다.

따라서, 본 발명은 (i) 후보 약제가 RARβ2 아고니스트로 작용할 수 있는지를 측정하는 단계; (ii) 상기 후보 약제가 RARβ2 아고니스트로 작용할 수 있을 경우, 신경돌기 발육을 야기하는 양으로 상기 약제를 대상자에게 전달하는 단계를 포함한다.

분석

다양한 임의의 약물 스크리닝 기술에 있어서, 임의의 하나 이상의 적당한 표적 - 예를 들어 아미노산 서열 및/또는 뉴클레오티드 서열 - 을, RARβ2를 조절할 수 있는 약제의 동정에 사용할 수 있다. 이러한 시험에서 사용되는 표적은 용액 중에서 자유롭거나, 고체 담체에 부착되거나, 세포 표면 상에서 보유되거나 세포내에 위치할 수 있다. 표적 활성의 박멸 또는 표적과 시험 약제 사이의 결합 복합물 형성을 측정할 수 있다.

본 발명의 분석은, 다수의 약제를 시험하는 스크리닝일 수 있다. 본 발명의 분석 방법은, 한 측면에 있어서, 고효율 스크리닝법이다.

약물 스크리닝 기술은 1984년 9월 13일에 발행된 Geysen의 유럽 특허 출원 제84/03564호에 기술되어 있는 방법을 기초로 할 수 있다. 요약하면, 다수의 상이한 작은 펩티드 시험 화합물을 고체 기재, 예를 들어 플라스틱 핀 또는 몇몇 다른 표면 상에서 합성한다. 펩티드 시험 화합물을 적합한 표적 또는 그의 단편과 반응시키고 세척한다. 이어서, 결합 실체를 예를 들어 당 업계에 잘 알려진 방법을 적당하게 채용함으로써 검출한다. 또한 정제된 표적은 약물 스크리닝 기술에서 사용하기 위한 플레이트 상에 직접 코팅할 수도 있다. 대안적으로는, 비-중화 항체를 사용하여 펩티드를 포획하거나, 그를 고체 지지체 상에 고정화할 수 있다.

또한, 본 발명은 약제에 결합하는 데 있어서, 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 중화 항체가 시험 화합물과 경쟁하는 경쟁성 약물 스크리닝 분석의 사용을 고려한다.

다른 스크리닝 기술은 표적에 대한 적합한 결합 친화성을 가지는 약제의 고효율 스크리닝법 (high throughput screening, HTS)을 제공하며, 이는 WO-A-84/03564에 상세하게 기술되어 있는 방법에 기초한 것이다.

본 발명의 분석 방법은, 시험 화합물의 소규모 및 대규모 스크리닝 모두, 그리고 정량적 분석에 적합할 것으로 기대된다.

하나의 바람직한 측면에 있어서, 본 발명은 RARβ2를 선택적으로 조절하는 약제를 동정하는 방법에 관한 것이다.

바람직한 측면에 있어서, 본 발명의 분석법은 표면 상에 RARβ2를 표시하는 세포를 이용한다. 상기 세포는 그러한 세포를 보유하는 대상자로부터 단리될 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 상기 세포는 트랜스펙션 시에 표면상에 RARβ2를 표시하도록 세포를 트랜스펙션시킴으로써 제조된다.

사용될 수 있는 분석법의 다른 예는 WO-A-9849271에 기술되어 있는데, 상기 문헌은 고수준의 신경 분화를 가진다고 하며 RARβ2에 결합하는 화합물의 검출에 유용한 불사화 (immortalised) 인간 기형암 CNS 신경 세포주에 관한 것이다.

리포터

매우 다양한 리포터가 본 발명의 분석 방법 (및 스크린)에서 사용될 수 있는데, 바람직한 리포터는 (예를 들어 분광기로) 편리하게 검출가능한 시그널을 제공한다. 그 예로, 리포터 유전자는 광 흡수성을 변경시키는 반응을 촉매하는 효소를 코딩할 수 있다.

다른 프로토콜은 효소-결합 면역흡수 분석법 (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)), 방사선 면역 분석법 (radioimmunoassay (RIA)) 및 형광 활성화 세포 분류법 (fluorescent activated cell sorting (FACS))를 포함한다. 심지어 2개의 비-간섭 에피토프에 반응성인 모노클로날 항체를 이용한 2-부위, 모노클로날-기초 면역분석법도 사용할 수 있다. 상기 및 기타 분석법은 다른 곳 중에서도, Hampton R 등 (1990, Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, 미국 미네소타주 세인트 폴 소재) 및 Maddox DE 등 (1983, J Exp Med 158; 1211)에 기술되어 있다.

리포터 분자의 예로는 갈락토시다제, 인버타제, 녹색 형광 단백질, 루시퍼라제, 클로람페니콜, 아세틸트랜스퍼라제, 글루쿠로니다제, 엑소-글루카나제 및 글루코아밀라제가 있으나, 그에 한정되는 것은 아니다. 대안적으로는, 방사성라벨링되거나 형광성 태그-라벨링된 뉴클레오티드를, 올리고뉴클레오티드 프로브에 결합시 동정되는 신생 전사체 내로 혼입시킬 수 있다.

추가의 예로, 다수의 회사, 예를 들어 Pharmacia Biotech (미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재) Promega (미국 위스콘신주 매디슨 소재), 및 US Biochemical Corp (미국 오하이오주 클레블랜드 소재)가 분석 과정을 위한 시판 키트 및 프로토콜을 공급하고 있다. 적합한 리포터 분자 또는 라벨은 방사성핵종, 효소, 형광체, 화학발광체, 또는 색원체성 약제, 및 기질, 보조인자, 저해제, 자성 입자 등을 포함한다. 이러한 라벨의 사용을 교시하는 특허는 US-A-3817337; US-A-3850752: US-A-3939350; US-A-3996345: US-A-4277437; US-A-4275149 및 US-A-4366241을 포함한다.

숙주 세포

본 발명에서 사용하기 위한 - 예를 들어 표적으로 사용하거나, 표적 발현에 사용하거나, 약학적 활성제로 사용하기 위한- 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입할 수 있다.

본 발명과 관련한 " 숙주 세포" 라는 용어는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있는 임의의 세포를 포함한다.

본원에서, 폴리뉴클레오티드는 원핵 세포 또는 진핵 세포, 예를 들어 효모, 곤충 또는 포유류 세포 내로 도입될 수 있다.

본 발명의 폴리뉴클레오티드는 당 업계에 공지된 다양한 기술, 예를 들어 트랜스펙션, 형질전환 및 전기천공법을 사용하여 적합한 숙주 세포 내로 도입할 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 동물에게 투여할 경우, 여러 기술, 예를 들어 레트로바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 및 아데노바이러스와 같은 재조합 바이러스 벡터를 사용한 감염, 핵산의 직접 주입 및 바이오리스틱 (biolistic) 형질전환이 당 업계에 공지되어 있다.

따라서, 본 발명의 추가의 실시 형태는, 본 발명의 표적이거나 본 발명의 표적을 발현하는 폴리뉴클레오티드로 형질전환되거나 트랜스펙션된 숙주 세포를 제공한다. 바람직하게는, 상기 폴리뉴클레오티드는 표적이 되거나 표적을 발현하는 폴리뉴클레오티드의 복제 및 발현을 위한 벡터 형태로 운반된다. 세포는 상기 벡터와 양립가능하도록 선택되며, 예를 들어 원핵 (예를 들어 박테리아), 진균류, 효모 또는 식물 세포일 수 있다.

이종성 유전자 발현을 위한 숙주로서 그램 음성균인 이. 콜라이 (E. coli)가 광범위하게 사용된다. 그러나, 다량의 이종성 단백질은 세포 내에 축적되는 경향이 있다. 이. 콜라이 세포내 단백질 벌크로부터의 목적 단백질의 후속 정제는 때로 어려울 수 있다.

E. coli와는 달리, 바실러스 (Bacillus) 속으로부터의 박테리아가, 배양 배지 내로 단백질을 분비하는 그의 능력 때문에 이종성 숙주로서 매우 적합하다. 숙주로서 적합한 다른 박테리아로는 스트렙토마이세스 (Streptomyces) 및 슈도모나스 (Pseudomonas) 속으로부터의 것이 있다.

본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 성질, 및/또는 발현 단백질의 추가의 프로세싱에 대한 요구성에 따라, 효모 또는 기타 진균류와 같은 진핵생물 숙주가 바람직할 수 있다. 일반적으로 효모 세포가 진균류 세포에 비하여 바람직한데, 이는 효모 세포의 조작이 더 용이하기 때문이다. 그러나, 몇몇 단백질은 효모 세포로부터 불충분하게 분비되거나, 몇몇 경우 적당하게 프로세싱되지 않는다 (예를 들어, 효모에 있어서 과다글리코실화). 상기의 경우, 다른 진균류 숙주 유기체가 선택되어야 한다.

본 발명의 범위 이내의 적합한 발현 숙주의 예로는 아스페르길루스 (Aspergillus)종 (예를 들어 EP-A-0184438 및 EP-A-0234603에 기술된 것) 및 트리코데르마 (Trichoderma)종과 같은 진균류; 바실러스 (Bacillus)종 (예를 들어 EP-A-0134048 및 EP-A-0253455에 기술된 것), 스트렙토마이세스 (Streptomyces)종, 및 슈도모나스 (Pseudomonas)종과 같은 박테리아; 및 클루이베로마이세스 (Kluyveromyces)종 (예를 들어 EP-A-0096430 및 EP-A-0301670에 기술된 것) 및 사카로마이세스 (Saccharomyces)종과 같은 효모가 있다. 그 예로, 일반적인 발현 숙주는 아스페르길루스 니게르 (Aspergillus niger), 아스페르길루스 니게르 변종 투비게니스 (Aspergillus niger var. tubigenis), 아스페르길루스 니게르 변종 아와모리 (Aspergillus niger var. awamori), 아스페르길루스 아쿨레아티스 (Aspergillus aculeatis), 아스페르길루스 니둘란스 (Aspergillus nidulans), 아스페르길루스 오리자에 (Aspergillus oryzae), 트리코데르마 레에세이 (Trichoderma reesei), 바실러스 서틸리스 (Bacillus subtilis), 바실러스 리케니포르미스 (Bacillus licheniformis), 바실러스 아밀로리쿠에파시엔스 (Bacillus amyloliq efaciens), 클루이베로마이세스 락티스 (Kluyveromyces lactis) 또는 사카로마이세스 세레비지애 (Saccharomyces cerevisiae)로부터 선택될 수 있다.

광범위하게 변형된 폴리펩티드는 그의 기능을 완전하게 하기 위하여 정확한 프로세싱을 필요로 할 수 있다. 상기와 같은 경우에 있어서, 포유류 세포 발현 시스템 (예를 들어 HEK-293, CHO, HeLA)가 필요하며, 폴리펩티드는 적당한 리더 서열이 선행할 경우 배양 배지 내로 분비되거나, 세포막 상에서, 세포내에서 발현된다.

적합한 숙주 세포 -예를 들어 효모, 진균류, 식물 및 포유류 숙주 세포- 의 사용은 본 발명의 재조합 발현 생성물에 대하여 최적의 생물학적 활성을 부여하는 데 필요할 수 있는 번역-후 변형 (예를 들어 미리스토일화, 글리코실화, 절단 (truncation), 지질화, 및 티로신, 세린 또는 트레오닌 인산화)을 제공할 수 있다.

유기체

본 발명과 관련한 " 유기체" 라는 용어는 본 발명에 따른 서열 및/또는 그로부터 얻어지는 생성물을 포함할 수 있는 임의의 유기체를 포함한다. 유기체의 예는 진균류, 효모 또는 식물을 포함할 수 있다.

본 발명과 관련한 " 트랜스제닉 유기체" 이라는 용어는 본 발명에 따른 표적 및/또는 그로부터 얻어지는 생성물을 포함하는 임의의 유기체를 포함한다.

숙주 세포/숙주 유기체의 형질전환

상기한 바와 같이, 숙주 유기체는 원핵 또는 진핵 유기체일 수 있다. 적합한 진핵생물 숙주의 예는 이. 콜라이 및 바실러스 서틸리스를 포함한다. 원핵 숙주의 형질전환에 대한 교시는 당 업계에서 면밀히 인용된다. 예를 들어 Sambrook 등의 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 제2판, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press] 및 Ausubel 등의 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, Inc.] 참조.

원핵생물 숙주를 사용할 경우, 뉴클레오티드 서열은 형질 전환 전에 -예를 들어 인트론의 제거에 의해- 적합하게 변형될 필요가 있을 수 있다.

다른 실시 형태에 있어서, 트랜스제닉 유기체는 효모일 수 있다. 이와 관련하여, 효모는 이종성 유전자 발현용 비히클로서도 광범위하게 사용되어 왔다. 사카로마이세스 세레비지애 종은 이종성 유전자 발현에 있어서의 그의 사용을 포함하여 오랜 공업적 사용 역사를 가지고 있다. 사카로마이세스 세레비지애에서의 이종성 유전자의 발현은 Goodey 등 (1987)의 문헌 [Yeast Biotechnology, D R Berry 등, ads, pp 401-429, Allen and Unwin, 영국 런던] 및 King 등 (1989)의 문헌 [Molecular and Cell Biology of Yeasts, E F Walton and G T Yarronton, eds, pp 107-133, Blackie, 글래스고우]에 개설되어 있다.

사카로마이세스 세레비지애는 여러 이유로 이종성 유전자 발현에 우수하게 적합화되어 있다. 첫째, 사카로마이세스 세레비지애는 인간에 대하여 비-병원성이며, 특정 내독소를 생성할 수 없다. 둘째, 사카로마이세스 세레비지애는 다양한 목적을 위한 수세기의 상업적 이용에 이은 안전한 사용의 오랜 역사를 가지고 있다. 그로 인해 대중에게 광범위하게 용인되었다. 셋째, 상기 유기체에 바쳐진 광범위한 상업적 사용 및 연구에 의해 사카로마이세스 세레비지애의 유전학 및 생리학과, 대규모 발효 특성에 관하여 풍부하게 알게 되었다.

사카로마이세스 세레비지애에서의 이종성 유전자 발현 및 유전자 생성물 분비의 원리에 대한 개설은 E Hinchcliffe E Kenny (1993)의 문헌 [" Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes" , Yeasts, Vol 5, Anthony H Rose and J Stuart Harrison, eds, 제2판, Academic Press Ltd.]에 주어져 있다.

통합성 벡터 (이는 그의 유지를 위하여 숙주 게놈과의 재조합을 필요로 함), 및 자가 복제 플라스미드 벡터를 포함하여 여러 형태의 효모 벡터가 이용가능하다.

트랜스제닉 사카로마이세스를 제조하기 위하여, 효모에서의 발현을 위하여 고안된 콘스트럭트 내로 본 발명의 뉴클레오티드 서열을 삽입함으로써 발현 콘스트럭트를 제조한다. 이종성 발현에 사용되는 여러 형태의 콘스트럭트가 개발되었다. 콘스트럭트는, 본 발명의 뉴클레오티드 서열에 융합된 효모에서 활성인 프로모터를 포함하며, 일반적으로 효모 기원의 프로모터, 예를 들어 GAL1 프로모터가 사용된다. 일반적으로 효모 기원의 시그널 서열, 예를 들어 SUC2 시그널 펩티드를 코딩하는 서열이 사용된다. 효모에서 활성을 갖는 터미네이터가 발현 시스템을 마감한다.

효모의 형질전환에 있어서, 여러 형질전환 프로토콜이 개발되었다. 예를 들어 본 발명에 따른 트랜스제닉 사카로마이세스는 Hinnen 등 (1978)의 문헌 [Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929]; Beggs, J D (1978)의 문헌 [Nature, London, 275, 104]; 및 Ito, H 등 (1983)의 문헌 [J Bacteriology 153, 163-168]의 교시에 따라 제조될 수 있다.

형질전환된 효모 세포는 다양한 선발성 마커를 사용하여 선발한다. 형질전환에 사용되는 마커로는 다수의 영양요구성 마커, 예를 들어 LEU2, HIS4 및 TRP1과, 우성 항생제 내성 마커, 예를 들어 아미노글리코시드 항생제 마커, 예를 들어 G418이 있다.

다른 숙주 유기체로는 식물이 있다. 유전적으로 변형된 식물의 콘스트럭션에 있어서의 기본적인 원리는 식물 게놈에 유전 정보를 삽입하여 삽입된 유전 물질의 안정한 유지를 수득하는 것이다. 유전 정보를 삽입하는 여러 기술이 존재하며, 두가지 주요 원리로는 유전 정보의 직접적인 도입, 및 벡터 시스템의 사용에 의한 유전 정보의 도입이 있다. 일반적인 기술에 대한 개설은 Potrykus (Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol [1991] 42:205-225) 및 Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech March/April 1994 17-27)의 논문에서 찾을 수 있다. 식물 형질전환에 대한 추가의 교시는 EP-A-0449375에서 찾을 수 있다.

본 발명의 뉴클레오티드 서열에 적합한 추가의 숙주는 더욱 고등한 진핵 세포, 예를 들어 곤충 세포 또는 척추동물 세포, 특히 인간 세포를 포함하여 포유류 세포, 또는 기타 다세포 유기체로부터의 핵화 세포를 포함한다. 근년에는, 배양 (조직 배양) 중 척추동물 세포의 증식이 일상적인 과정이 되었다. 유용한 포유류 숙주 세포주의 예로는 상피 또는 섬유아세포주, 예를 들어 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, NIH 3T3 세포, HeLa 세포 또는 293T 세포가 있다.

본 발명의 뉴클레오티드 서열은, 당 업계에 공지된 방법을 사용하여 숙주 세포 내로 안정하게 혼입하거나 일과성으로

발현시킬 수 있다. 그 예로, 안정하게 트랜스펙션된 포유류 세포는 선발성 마커 유전자를 가지는 발현 벡터로 세포를 트랜스펙션시키고, 마커 유전자를 발현하는 세포에 선택적인 조건 하에 트랜스펙션 세포를 생장시킴으로써 제조할 수 있다. 일과성 트랜스펙션체를 제조하기 위하여, 포유류 세포를 리포터 유전자로 트랜스펙션시켜 트랜스펙션 효율을 모니터링한다.

상기와 같은 안정하거나 일과성의 트랜스펙션 세포를 제조하기 위하여, 충분한 양의 본 발명의 뉴클레오티드 서열로 세포를 트랜스펙션시켜야 한다. 본 발명의 뉴클레오티드 서열의 정확한 양은 경험적으로 결정되거나 특정 세포 및 분석을 위하여 최적화될 수 있다.

따라서, 본 발명은 표적이거나 표적을 발현하는 뉴클레오티드 서열로 숙주 세포를 형질전환시키는 방법을 제공한다. 뉴클레오티드 서열로 형질전환시킨 숙주 세포는 코딩 단백질의 발현에 적합한 조건 하에 배양할 수 있다. 재조합 세포에 의해 생성되는 단백질은 세포의 표면 상에서 표시될 수 있다. 필요할 경우, 그리고, 당 업계의 숙련자가 알고 있듯이, 코딩 서열을 포함하는 발현 벡터는 특정 원핵 또는 진핵 세포 막을 통한 코딩 서열의 분비를 지시하는 시그널 서열을 가지도록 고안될 수 있다. 다른 재조합 콘스트럭션은 가용성 단백질의 정제를 돕는 폴리펩티드 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 코딩 서열을 결합시킬 수 있다 (Kroll DJ 등 (1993) DNA Cell Biol 12:441-53).

수용체

본원에서 논의되는 RARβ2 수용체는 온전한 유전자 생성물의 일부 또는 전체, 모방체, 호몰로그 및 단편을 포함한다. 바람직하게는, 본원에서 논의되는 RARβ2는 실질적으로 온전한 유전자 생성물을 나타낸다.

신경계 장애

본원에서 사용되는 신경계 장애라는 용어는 기계적으로 (예를 들어 외상), 또는 화학적으로 유도될 수 있는 (예를 들어, 고안에 의하거나, 부작용일 수 있는, 신경독소(들)에 의해, 또는 면역억제 효과를 가지는 치료 요법에 의해 유도될 수 있는) 임의의 손상, 바이러스 감염 또는 기타의 것에 의해 야기되는 것과 같은 임의의 신경병리, 임의의 퇴행성 장애, 또는 기타 신경 조직 관련 장애를 나타낼 수 있다.

신경계 장애의 예는 파킨슨병, 알쯔하이머병, 노화, 운동 신경원성 질환, 정신분열증, 및 기타 신경 및/또는 신경퇴행성 장애와 같은 병을 포함한다. 기타 신경 관련 장애는 녹내장 또는 기타 시신경 손상의 원인, 벨 마비 또는 기타 형태의 국부적 마비, 근차적 전립선 적출술에 이은 신경 외상에 의해 야기되는 것과 같은 신경 기재 발기부전, 또는 기타 질병을 포함한다. 본 발명이 유용할 수 있는 기타 장애는 당뇨병, AIDS, 신경병증, 나병 등의 신경병리학적 영향을 포함한다.

신경계 장애라는 용어는, 말초신경계 또는 중추신경계 (CNS)일 수 있거나, 교감신경계, 또는 부교감신경계일 수 있거나, 상이한 신경 형태의 서브세트 또는 수퍼세트에 영향을 줄 수 있는 임의의 신경계 장애를 나타낸다.

목적 뉴클레오티드 (nucleotide of interest (NOI))

본 발명에 따르면, NOI 서열은 약학적 활성제일 수 있는 펩티드 - 예를 들어 RA 수용체, 바람직하게는 RARβ2, 또는 그의 아고니스트를 코딩할 수 있다.

이러한 코딩 NOI 서열은 예를 들어 하나 이상의 특정 세포 형태에서 일반적으로 펩티드의 발현을 구동할 수 있는 적합한 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다.

전달 시스템은, 본원에서 기술된 NOI 또는 그의 일부 및 발현 조절 요소 외에도, 프로모터/인핸서, 번역 개시 시그널, 내부 리보좀 엔트리 부위 (internal ribosome entry site, IRES), 스플라이싱 및 폴리아데닐화 시그널을 포함하여 유전자 또는 유전자들의 효율적이거나 조절되는 발현을 위한 추가의 유전 요소를 포함할 수 있다.

NOI 또는 NOI들은 발현 조절 요소, 일반적으로 프로모터 또는 프로모터 및 인핸서의 발현 제어 하에 존재할 수 있다. 인핸서 및/또는 프로모터는 신경 세포에서 우선적으로 활성을 가질 수 있어, NOI는 신경 세포와 같은 특정의 목적 세포에서 우선적으로 발현된다. 따라서, 처리되는 개인에 대한 NOI의 현저한 생물학적 효과 또는 해로운 효과가 감소 또는 제거될 수 있다. 조절 발현을 부여하는 인핸서 요소 또는 기타 요소가 다중 카피로 존재할 수 있다. 마찬가지로, 또는 그 외에도, 인핸서 및/또는 프로모터는 하나 이상의 특정 세포 형태 - 예를 들어 신경 세포, 예를 들어 뉴런과 같은 유사분열-후 최종적으로 분화되는 비-복제 세포에 있어서 우선적으로 활성을 가질 수 있다.

" 프로모터" 라는 용어는 당 업계의 통상적인 의미, 예를 들어 자콥-모노드 (Jacob-Monod) 유전자 발현 이론에 있어서의 RNA 폴리머라제 결합 부위로 사용된다.

" 인핸서" 라는 용어는 전사 개시 복합체의 다른 단백질 성분에 결합하여 그의 결부된 프로모터에 의해 지시되는 전사의 개시를 돕는 DNA 서열을 포함한다.

발현 벡터

바람직하게는, 본 발명의 방법에 사용되는 NOI (예를 들어 RARβ2 또는 그의 일부를 코딩하는 것)는 숙주 세포에 의해 코딩 서열의 발현을 제공할 수 있는 제어 서열에 작동가능하게 연결된 벡터 (즉, 벡터는 발현 벡터임) 내로 삽입된다.

표적화 벡터

" 표적화 벡터" 라는 용어는 세포를 감염/트랜스펙션/형질도입시키거나, 숙주 및/또는 표적 세포에서 발현되는 능력이 숙주 유기체 내의 특정 세포 형태, 일반적으로 공통의, 또는 유사한 표현형을 가지는 세포에 한정되는 벡터를 나타낸다.

전달

본 발명에서 사용하기 위한 전달 시스템은 상기 NOI를 전달하기 위한 적합한 전달 시스템일 수 있으며, 상기의 제공 NOI는 생체내에서 발현되어 상기 결부 펩티드 (예를 들어 RARβ2)를 생성하고, 이는 다시 유익한 치료 효과를 제공한다.

전달 시스템은 바이러스 전달 시스템일 수 있다. 바이러스 전달 시스템은 아데노바이러스 벡터, 아데노-결부 바이러스 (AAV) 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 배큘로바이러스 벡터를 포함하지만, 그에 한정되는 것은 아니다. 대안적으로는, 전달 시스템은 비-바이러스 전달 시스템 - 예를 들어 플라스미드, 염색체 또는 인공 염색체의 DNA 트랜스펙션 방법일 수 있다. 본원에서, 트랜스펙션은 포유류 표적 세포로 유전자를 전달하는 비-바이러스 벡터를 사용하는 방법을 포함한다. 일반적인 트랜스펙션 방법은 전기천공법, DNA 바이오리스틱스, 지질-매개 트랜스펙션, 콤팩트 DNA-매개 트랜스펙션, 리포좀, 면역리포좀, 리포펙틴, 양이온성 약제-매개, 양이온성 페이셜 친양쪽성체 (CFA) (Nature Biotechnology 1996 14; 556), 및 그의 조합을 포함한다.

기타 벡터의 예는, -전기천공법, DNA 바이오리스틱스, 지질-매개 트랜스펙션, 콤팩트 DNA 매개 트랜스펙션과 같은 DNA 트랜스펙션 방법을 포함하지만, 그에 한정되는 것은 아닌 - 엑스 비보 (ex vivo) 전달 시스템을 포함한다.

바람직한 측면에 있어서, 전달 시스템은 벡터이다.

더 바람직한 측면에 있어서, 전달 시스템은 -때로 바이러스 벡터로 나타내어지는- 바이러스 전달 시스템이다.

벡터

당 업계에 잘 알려진 것과 마찬가지로, 벡터는 실체를 하나의 환경으로부터 다른 것으로 이전시키는 것을 가능하게 하거나 돕는 도구이다. 그 예로, 재조합 DNA 기술에 사용되는 몇몇 벡터는 실체, 예를 들어 DNA의 세그먼트 (예를 들어 이종성 cDNA 세그먼트와 같은 이종성 DNA 세그먼트)가 표적 세포 내로 이전되게 한다. 임의로, 벡터는 일단 표적 세포 내에서는 세포 내에서 이종성 DNA를 유지시키는 기능을 할 수 있거나 DNA 복제 단위로 작용할 수 있다. 재조합 DNA 기술에서 사용되는 벡터의 예는 플라스미드, 염색체, 인공 염색체 또는 바이러스를 포함한다.

"벡터"라는 용어는 발현 벡터 및/또는 형질전환 벡터를 포함한다.

"발현 벡터"라는 용어는 생체내 또는 시험관내/엑스 비보 발현이 가능한 콘스트럭트를 의미한다.

"형질전환 벡터"라는 용어는 하나의 종에서 다른 것으로 이전될 수 있는 콘스트럭트를 의미한다.

바이러스 벡터

본 발명에 있어서, NOI는 바이러스 전달 시스템 (바이러스 벡터)를 사용하여 적합한 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 다양한 바이러스 기술, 예를 들어 레트로바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 및 아데노바이러스와 같은 재조합 바이러스 벡터를 이용한 감염이 당 업계에 공지되어 있다.

레트로바이러스 벡터

레트로바이러스의 예로는 쥐 백혈병 바이러스 (MLV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 말 전염성 빈혈 바이러스 (EIAV), 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV), 라우스 (Rous) 육종 바이러스 (RSV), 후지나미 (Fujinami) 육종 바이러스 (FuSV), 몰로니 (Moloney) 쥐 백혈병 바이러스 (Mo-MLV), FBR 쥐 골육종 바이러스 (FBR-MSV), 몰로니 쥐 육종 바이러스 (Mo-MSV), 아벨슨 (Abelson) 쥐 백혈병 바이러스 (A-MLV), 조류 백혈증 바이러스-29 (MC29), 및 조류 적백혈병 바이러스 (AEV)가 있지만, 그에 한정되는 것은 아니다.

본 발명에 따라 사용하기에 바람직한 벡터는 재조합 바이러스 벡터, 특히 렌티바이러스 벡터와 같은 재조합 레트로바이러스 벡터 (RRV)이다.

"재조합 레트로바이러스 벡터" (RRV)라는 용어는 패키징 성분의 존재 하에, 표적 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자 내로 RNA 게놈을 패키징시키기에 충분한 레트로바이러스 유전 정보를 갖는 벡터를 나타낸다. 표적 세포의 감염은 역전사 및 표적 세포 게놈 내로의 통합을 포함한다. RRV는 표적 세포로 벡터에 의해 전달되는 비-바이러스 코딩 서열을 보유한다. RRV는 최종 표적 세포 내에서 감염성 레트로바이러스 입자를 생성하는 독립적인 복제를 할 수 없다. 일반적으로 RRV에는 기능성 gag-pol 및/또는 env 유전자 및/또는 기타 복제에 필수적인 유전자가 결여되어 있다.

레트로바이러스의 상세한 목록은 Coffin 등의 문헌 [Retroviruses, 1997년, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus, pp 758-763]에서 찾을 수 있다.

비-바이러스 전달

약학적 활성제 (예를 들어 RARβ2)는 비-바이러스 기술을 사용하여 투여될 수 있다.

그 예로, 약학적 활성제는 펩티드 전달을 사용하여 전달될 수 있다. 펩티드 전달은 플라스마 및/또는 핵막을 통하여 이행 (translocation)할 수 있는 단백질로부터의 도메인 또는 서열을 사용한다.

RARβ2와 같은 목적 폴리펩티드는 마이크로인젝션, 또는 세포막과 융합할 수 있는 리포좀과 같은 소포를 사용한 전달에 의해 세포로 직접 도입될 수 있다. 바이러스 푸소겐성 (fusogenic) 펩티드는 세포의 세포질로의 전달 및 막 융합을 촉진하는 데에도 사용될 수 있다.

바람직하게는 RARβ2 또는 그의 단편(들)은 플라스마 막 및/또는 핵막을 횡단할 수 있는 단백질과의 콘쥬게이트 또는 단백질 융합물로서 세포 내로 전달될 수 있다. 바람직하게는 RARβ2 또는 그의 단편(들)은 이행 활성에 책임이 있는 단백질로부터의 도메인 또는 서열에 융합되거나 콘쥬게이션된다. 바람직한 이행 도메인 및 서열은 HIV-1-트랜스 활성화 단백질 (Tat), 드로소필라 안테나페디아 (Drosophila Antennapedia) 유사도메인 (homeodomain) 단백질 및 헤르페스 심플렉스-1 바이러스 VP22 단백질로부터의 도메인 및 서열을 포함한다.

외인성 첨가되는 HIV-1-트랜스-활성화 단백질 (Tat)은 플라스마 막을 통하여 이행하여 핵에 도달하여 바이러스 게놈을 트랜스활성화시킬 수 있다. 이행 활성은 HIV-Tat의 아미노산 37-72 (Fawell 등, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 664-668), 37-62 (Anderson 등, 1993, Biochem, Biophys. Res. Commun. 194, 876-884) 및 49-58 (기본 서열 RKKRRQRRR을 가짐)에서 동정되었다. Vives 등(1997) [문헌 J Biol Chem 272, 16010-7 참조]은 아미노산 48-60 (CGRKKRRQRRRPPQC)으로 구성된 서열을 동정하였는데, 상기 서열은 세포 유전자의 이행, 핵 국소화 및 트랜스-활성화에 중요한 것으로 나타났다. 또한 드로소필라 안테나페디아 유사도메인 단백질의 제3 헬릭스가 유사한 특성을 보유하는 것으로 나타났다 (Prochiantz, A., 1999, Ann NY Acad Sci, 886, 172-9에 개설되어 있음).

안테나페디아에 있어서 이행에 책임이 있는 도메인은 서열 RQIKIWFQNRRMKWKK을 가지며 염기성 아미노산이 풍부한 16 아미노산의 긴 펩티드에 국소화되어 있다 (Derossi 등, 1994, J Biol Chem, 269, 10444-50). 상기 펩티드는 생물학적 활성 물질을 배양 중 세포의 세포질 및 핵으로 이끄는 데 사용되어 왔다 (Theodore 등, 1995, J. Neurosci 15, 7158-7167). 헤르페스 심플렉스 바이러스의 VP22 외피 (tegument) 단백질은 세포내 수송이 가능하며, 여기서, 세포의 서브집단에서 발현되는 VP22 단백질은 집단 중 다른 세포로 확산된다 (Elliot 및 O'Hare, 1997, Cell 88, 223-33). VP22를 보유하는 p53 (Phelan 등, 1998, Nat Biotechnol 16, 440-3), 티미딘 키나제 단백질 (Dilber 등, 1999, Gene Ther 6, 12-21) 또는 GFP (Elliott 및 O'Hare, 1999, Gene Ther 6, 149-51)로 구성된 융합 단백질이 이러한 방식으로 세포로 표적화되었다. 상기한 바와 같은 도메인 또는 서열 중 임의의 것을 사용하여 RARβ2 또는 그의 단편(들)을 세포 내로 이끌 수 있다. 상기한 임의의 도메인 또는 서열, 또는 이행 활성을 가지는 것으로 동정된 기타의 것을 사용하여 RARβ2 또는 그의 단편(들)을 세포(들) 내로 이끌 수 있다.

약학 조성물

또한 본 발명은 치료적 유효량의 본 발명의 약제 (예를 들어 본원에서 논의된 RARβ2 및/또는 그의 아고니스트) 및 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제 (그의 배합물을 포함하여)를 투여하는 것을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

약학 조성물은 2가지 성분 - 여기서, 제1 성분은 RARβ2 를 포함하며 제2 성분은 그의 아고니스트를 포함함 - 을 함유할 수 있다. 제1 및 제2 성분은 순차적으로, 동시에, 또는 함께, 심지어 상이한 투여 경로에 의해 전달될 수 있다.

약학 조성물은 인간 및 수의학적 의약에 있어서 인간 또는 동물에 사용하기 위한 것일 수 있으며, 일반적으로 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 희석제, 담체, 또는 부형제를 함유한다. 치료 용도를 위한 허용가능한 담체 또는 희석제는 약학 분야에서 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌 [Remington's Phamaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)]에 기술되어 있다. 약학적 담체, 부형제 또는 희석제의 선택은 의도하는 투여 경로 및 표준의

약학적 실무에 따라 선택될 수 있다.

약학 조성물은 담체, 부형제 또는 희석제로서 -또는 그에 더하여- 임의의 적합한 결합제(들), 윤활제(들), 현탁제(들), 코팅제(들), 가용화제(들)을 함유할 수 있다.

보존제, 안정제, 염료 및 심지어 풍미제가 약학 조성물에 제공될 수 있다. 보존제의 예는 소듐 벤조에이트, 소르브산 및 p-히드록시벤조산의 에스테르를 포함한다. 산화방지제 및 현탁제도 사용될 수 있다.

상이한 전달 시스템에 따라 상이한 조성/제형 요건이 존재할 수 있다. 그 예로, 본 발명의 약학 조성물은 미니-펌프를 사용하여, 또는 점막 경로에 의해, 예를 들어 비강 스프레이 또는 흡입용 에어로졸 또는 섭취가능한 용액으로서, 또는 전달을 위하여 조성물이 주사가능한 형태로 제형화된 비경구적 형태에 의해, 예를 들어 정맥내, 근육내, 또는 피하 경로에 의해 전달되도록 제형화될 수 있다.

약제가 위점막을 통하여 점막에 의해 전달될 경우, 상기 약제는 위장관을 통하여 통과하는 동안 안정하게 유지될 수 있어야 한다 (예를 들어, 약제는 단백질분해성 분해에 대하여 내성이어야 하며, 산 pH에서 안정해야 하며, 담즙의 세제 효과에 대하여 내성이어야 함).

적합할 경우, 약학 조성물은 흡입에 의해, 좌약제 또는 페서리의 형태로, 로션, 용액, 크림, 연고 또는 산포제의 형태로 국소적으로, 스킨 패치의 사용에 의해, 전분 또는 락토스와 같은 부형제를 포함하는 정제의 형태로 경구적으로, 또는 캡슐 또는 소란 (ovule)의 형태로 단독으로, 또는 부형제와의 혼합물로, 또는 풍미제 또는 착색제를 포함하는 엘릭시르, 용액 또는 현탁액의 형태로 투여될 수 있거나, 비경구적으로, 예를 들어 정맥내, 근육내 또는 피하내로 주사될 수 있다. 비경구적 투여에 있어서, 조성물은 다른 물질, 예를 들어 수성 용액이 혈액과 등장이 되게 하기에 충분한 염 또는 모노사카라이드를 포함할 수 있는 살균 수성 용액의 형태로 사용되는 것이 최상일 수 있다. 구강 또는 설하 투여에 있어서, 조성물은 통상의 방식으로 제형화될 수 있는 정제 또는 로젠지의 형태로 투여될 수 있다.

약학적 배합

본 발명의 약제는 하나 이상의 다른 약학적 활성 물질과 함께 투여될 수 있다. 그 예로, 본 발명은 본 발명에 따른 약제 및 하나 이상의 스테로이드, 진통제, 항바이러스제 또는 기타 약학적 활성 물질(들)을 사용한 동시 치료, 또는 순차적 치료를 포함한다.

상기 요법이 상기 물질의 순차적 투여, 동시 투여, 또는 함께인 것을 포함한다는 것을 알아야 한다.

도면의 간단한 설명

이제 본 발명을 단지 예시로서, 하기 도면을 참조로 하여 기술할 것이다.

도 1 (실시예 1에서 언급되는 도 1임)은 사진을 나타낸 것이다.

도 2 (실시예 1에서 언급되는 도 2임)은 막대그래프 (barchart) 및 사진을 나타낸 것이다.

도 3 (실시예 2에서 언급되는 도 1임)은 사진을 나타낸 것이다.

도 4 (실시예 2에서 언급되는 도 2임)은 사진을 나타낸 것이다.

도 5 (실시예 2에서 언급되는 도 3임)은 사진을 나타낸 것이다.

도 6 (실시예 2에서 언급되는 도 4임)은 사진을 나타낸 것이다.

도 7 (실시예 2에서 언급되는 도 5임)은 사진을 나타낸 것이다.

도 8 (실시예 2에서 언급되는 도 6임)은 막대 그래프를 나타낸 것이다.

도 9 (실시예 3에서 언급되는 도 1임)은 사진을 나타낸 것이다.

도 10 (실시예 3에서 언급되는 도 2임)은 사진을 나타낸 것이다.

도 11 (실시예 3에서 언급되는 도 3임)은 사진을 나타낸 것이다.

도 12 (실시예 3에서 언급되는 도 4임)은 사진을 나타낸 것이다.

도 13 (실시예 3에서 언급되는 도 5임)은 사진을 나타낸 것이다.

도 14 (실시예 3에서 언급되는 도 6임)은 사진을 나타낸 것이다.

도 15 (실시예 3에서 언급되는 도 7임)은 막대 그래프를 나타낸 것이다.

도 16 (실시예 3에서 언급되는 도 8임)은 사진을 나타낸 것이다.

도 17은 화학식을 나타낸 것이다.

도면은 하기 실시예 섹션에서 더욱 충분하게 기술된다.

실시예

(실시예 1) 신경돌기 생성의 자극

신경 성장 인자는 레틴산 합성을 통하여 신경돌기 생성을 자극하는 작용을 한다.

신경 성장 인자 (NGF)는 배양 성체 후근절 (DRG)으로부터의 신경돌기 생성을 자극한다 1. 또한 비타민 A 유도체 레틴산 (RA)는 DRG를 포함하여 여러 배아원으로부터의 신경돌기 생성도 유도한다 2,3. NGF 및 RA의 효과에 있어서의 상기와 같은 유사성은 이들 둘 모두가 신경돌기가 생성되게 하는 동일한 유전적 캐스케이드의 성분이기 때문일까? RA는 저- 및 고-친화성 NGF 수용체를 상향-조절하여 3,4 NGF 그 자체의 전사를 유도하는데 5, 이는 RA가 상기 캐스케이드에 있어서 NGF의 상류일 수 있음을 의미한다. 그러나, 본원에서, 본 발명자들은 그 정반대, 즉, NGF가 RA의 상류임을 입증하였다. 본 발명자들은, 성체 마우스 DRG를 RA 합성에 연루된 효소를 억제하는 화합물, 및 NGF의 존재하에 배양할 경우, 신경돌기 생성이 일어나지 않음을 입증하였다. 반대로, RA를 차단 항체와 함께 NGF에 첨가할 경우, 신경돌기 생성이 정상적으로 일어난다. 또한, 본 발명자들은, NGF가 레틴산-합성 효소 RALDH-2 및 레틴산 수용체-β 둘 모두의 전사, 및 검출가능한 합성 RA의 방출을 유도한다는 것을 입증하였다. 본 발명자들은 RA가 성체 DRG 신경돌기 재생에 필요하며, NGF가 RA의 상류에서 작용하여 RA의 합성을 유도한다는 것을 제안한다.

RA의 세포적 효과는 리간드 활성화 전사 인자인 핵 수용체에 결합함으로써 매개된다. 두 부류의 수용체, 레틴산 수용체 (RAR) 및 레티노이드 X 수용체 (RXR)이 존재하는데, 각각은 3가지의 서브타입 α, β 및 γ을 가진다 6,7. 또한, 대안적 스플라이싱 및 차별적 프로모터 사용으로 인하여 각각의 서브타임의 다수의 이소형이 존재한다. RAR 수용체는 RXR과 헤테로이량체를 형성함으로써 유전자 발현을 매개하며, 반면, RXR은 LXR8과 같은 고아 수용체와 헤테로이량체

를 형성하거나 호모이량체로서 유전자 발현을 매개할 수 있다. NGF와 RA 경로 사이의 추가의 기계학적 결부는, 핵 수용체 NGFIB가 RXR과 헤테로이량체화되며 8, NGFIB가 NGF의 투여에 의해 PC12 세포에서 신속하게 유도된다 6,7는 발견에 의해 제안된다.

비록 RA의 경우 배아 DRG으로부터의 신경돌기 생성의 자극에서 명확하게 역할을 가진다고 해도 2,3, 동일한 것이 성체 DRG에서 일어나는지는 아직 알려져 있지 않다. 이를 시험하기 위하여, 본 발명자들은 탈지질화 혈청 중 NGF (100 ng/ml), 또는 RA (100 nM)의 존재 하에 5일 동안 성체 마우스 DRG를 배양하였다. 둘 모두의 경우에서 신경돌기 생성이 일어났다 (도 1b). 단지 탈지질화한 혈청에서 배양한 성체 DRG에서는 신경돌기 생성이 거의 일어나지 않거나 전혀 일어나지 않았다 (도 1a). 신경돌기 수에서의 차이는 유의하였다 (도 2a; 1, 2 및 3). RA- 또는 NGF-처리 성체 DRG로부터 연장된 신경돌기의 수는, 비록 미처리 DRG로부터 연장된 신경돌기 수보다 현저하게 크다 해도, 배아 조직을 사용하여 얻어지는 수보다는 더 작음을 알게 된 것은 중요하다. RA를 NGF와 함께 첨가할 경우, 두 처리의 누적 효과는 전혀 없었으며 (도 1c), RA, NGF 또는 RA 플러스 NGF 군 사이에서는 유의차가 전혀 나타나지 않았다 (도 2a; 2, 3 및 4). NGF 및 RA 둘 모두가 개개의 포화 농도로 존재할 수 있다 해도, 상승작용이 결여된 것은 NGF 및 RA가 신경돌기 생성을 야기하기 위하여 동일한 경로를 통하여 작용한다는 것을 암시할 수도 있다. RA-합성 효소를 자극함으로써 NGF가 RA의 생성을 유도하거나, RA가 NGF의 생성을 유도한다고 생각할 수 있다 5.

상기 가설 중 어느 것이 가장 그럴듯한지를 시험하기 위하여, 본 발명자들은 효소 알데히드 데히드로게나제을 억제함으로써 레티날데히드가 RA로 전환되는 것을 차단하는 화합물인 디술피람 10 μM 및 NGF의 존재 하에 성체 DRG를 배양하였다 10. RA가 NGF 생성을 자극하는 작용을 할 경우, 디술피람은 NGF-자극 신경돌기 생성에 전혀 영향을 미치지 않아야 하며, 반면, NGF가 RA 합성을 유도할 경우에는 디술피람은 신경돌기 생성을 저해하여야 한다. 도 1d에서 알 수 있는 바와 같이, 10 μM의 디술피람을 NGF와 함께 첨가하면 NGF-유도 신경돌기 생성이 완전히 없어지며 (유의차; 도 2a, 2 및 5), 반면, DMSO (디술피람의 비히클) 및 NGF의 첨가는 신경돌기 생성에 아무런 영향을 주지 않았다 (도 2a, 2 및 6). 디술피람이 체외배양편 (explant) 내의 세포 생존에 전혀 영향을 주지 않는다는 것을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 2가지 형태의 레스큐 (rescue)를 수행하였다. 두가지 경우 모두에 있어서, 체외배양편은 디술피람을 보충한 배지에서 8일 동안 배양하였다. 제1 레스큐에 있어서, 100 nM의 RA를 실험 초기부터 체외배양편에 첨가하였으며; 제2 레스큐에 있어서, RA를 제4일에 첨가하였다. 두가지 경우 모두에 있어서, 단독의 디술피람을 보충한 배지에서 생장시킨 배양물과 비교하여 현저하게 큰 신경돌기 생성이 일어났다 (도 1e, f 및 2b). 상기 실험은 RA 합성 경로에 있어서의 디술피람의 특이성을 또한 확인해 주는 것이었는데, 이는 RA가 세포 응답을 레스큐할 수 있기 때문이다.

디술피람에 의한 NGF 유도 효과의 저해 (RA의 유도 효과는 저해하지 않음)는 NGF가 신경돌기를 생성시키는 캐스케이드에 있어서 RA에 선행할 수 있음을 나타낸다. 이를 시험하기 위하여, 본 발명자들은 NGF에 대한 차단 항체를 사용하였다. NGF 및 차단 항체의 존재 하에서는 실제 신경돌기 생성이 일어나지 않았다 (도 1g; 단독의 NGF 존재 하에 배양한 DRG와 비교하기 바람, 도 1b). 반면, NGF-차단 항체 및 100 nM의 RA의 존재 하에 배양한 DRG (도 1h)는 단독의 NGF를 사용하여 얻어지는 신경돌기 생성과 동일한 신경돌기 생성을 나타내었다 (도 1b 및 2c).

NGF가 RA의 상류라면, NGF는 DRG 배양물에 첨가한 후 RA의 합성을 유도하여야 한다. 이러한 예상을 시험하기 위하여, 본 발명자들은 lacZ 유전자에 결합된 레틴산 응답 요소 (RARE)를 포함하는 1.8 kb의 마우스 RARβ2 유전자 프로모터를 사용한 트랜스펙션으로 인하여 RA의 존재에 대하여 특이적으로 응답하는 F9 리포터 세포주를 사용하였다 (Sonneveld, E., van den Brink, C. E., van der Leede, B. J., Maden, M. & van der Saag, P. T. (1999) Embryonal carcinoma cell line stably transfected with mRARb2-lacz: sensitive system for measuring levels of active retinoids. Exp.Cell.Res. vol. 250 pp284-297). RA의 존재 하에, 활성화 세포는 β-갈락토시다제 조직화학

적 염색 후에 검출할 수 있다. 먼저, 본 발명자들은 NGF 그 자체가 F9 세포를 활성화하는 가능성을, F9 세포를 NGF (100 ng/ml)의 존재 하에 배양함으로써 배제하였는데, 이 때, 상기 배경의 F9 세포는 라벨링하지 않았다. 이어서, 본 발명자들은 3가지의 상이한 하기 조건: NGF의 부재 하에서, NGF의 존재 하에서, 또는 NGF 및 NGF-차단 항체 둘 모두의 존재 하에서 5일 동안 탈지질화 혈청 중에서 성체 DRG를 배양하였다. 이어서 배양 DRG를 초음파 처리하고 F9 리포터 세포 상에 두었다. NGF-처리 DRG 균질물은 미처리 DRG와 비교하여 명확한 RA 시그널을 생성하였다 (도 2d). 상기 활성화는 DRG를 NGF, 및 차단 항체와 함께 배양할 경우 방해받았다 (도 2d).

다음, 본 발명자들은 레틴산 합성 효소가 NGF에 의해 유도될 수 있다고 생각하였다. 레티놀은 2단계 산화 공정에 의해 알데히드인 레티날로 전환되며, 이어서 레티날은 레틴산으로 산화된다 (검토에 있어서, 참조 문헌 11 참조). 레티날데히드 데히드로게나제 제2형 (RALDH-2)는 DRG12를 포함하여 발육 신경계에서 발현됨이 밝혀졌다. 본 발명자들은 RT-PCR을 사용하여 배양 성체 DRG에서 NGF에 의한 RALDH-2의 강력한 유도도 또한 밝혀내었다 (도 2e). 마지막으로, 본 발명자들은 신경돌기 생성에 연루된 것으로 보이는 현상인 NGF-자극 배양에서의 RARβ2 수용체의 상향조절을 또한 밝혀내었다 13 (도 2e).

본 발명자들의 결과는, RA가 성체 신경 조직, DRG로부터의 신경돌기 생성을 자극할 수 있음을 나타낸다. 이와 유사하게, NGF가 상기 조직으로부터의 신경돌기 생성을 자극하며, 본 발명자들은 이것이 효소 RALDH-2를 통한 RA 합성의 유도에 의한 것임을 증명하였다. NGF-차단 항체 또는 RA 합성 저해제의 존재 하에서는 NGF는 작용하지 못한다. 따라서, NGF에 의한 신경돌기 생성의 유도에 있어서의 가장 가능성있는 귀결은 NGFRALDH-2RARARβ 신경돌기 생성이다. 본 발명자들은, NGF가 RALDH-2의 유도에 직접 책임이 있는지, 또는 상기 공정에 몇몇 중간 단백질이 필요한지를 아직 결정하지 못하였다. 그러나, NGFIB는 NGF에 의해 유도되는 가장 최초의 유전자 중 하나이고 9, 그의 생성물은 RXR과 헤테로이량체화할 수 있기 때문에 8, NGFIB/RXR 헤테로이량체는 RALDH-2 유전자의 활성화에 책임이 있을 수 있다. 전통적으로 뉴로트로핀은 신경 재생의 유도14 및 신경퇴행성 질환의 치료15를 위한 잠재적 약제로서 생각되었으나, 그의 사용에 있어서의 주요 문제점은 손상 부위로의 효과적인 전달 양식이 결여되어 있다는 것이다. RA는 재생 응답에 필요하며 NGF의 하류에 존재하기 때문에, 병변으로의 전달 문제점은 극복될 수 있는데, 이는 RA가 경구적으로 투여될 수 있는 저분자량의 친지성 화합물이기 때문이다. 따라서, RA는 신경병학에 있어서 임상적으로 사용할 수 있다.

실시예 1에 있어서의 도면

도 1. 탈지질화 혈청 플러스 하기: (a) 첨가 없음; (b) NGF, 100 ng/ml; (c) NGF 및 100 nM tRA; (d) NGF 및 1O M 디술피람; (e)디술피람 및 tRA를 제0일에 첨가; (f) 디술피람; (g) NGF 및 차단 항체; (h) NGF-차단 항체 및 tRA 의 존재 하에 5일 (a-d, g, h) 또는 8일 (e, f) 동안 배양한 성체 마우스 DRG에서의 신경돌기 생성.

도 2. (a-c) 셀로겐에서 배양한 성체 DRG에 의해 생성되는 신경돌기. (a) 5일째의 NGF. RA 및 디술피람의 영향 (1, 첨가제 없음; 2, NGF, 100 ng/ml. 3, RA, 100 nM; 4. NGF, 100 ng/ml 및 RA 100 nM; 5, 100 ng/ml NGF 및 10 M 디술피람; 6, NGF, 100 ng/ml 및 DMSO). 오차 막대, s.e.; 모든 군에 있어서 n = 6. NGF-처리군 (2)과 다른 군 사이의 유의차: *p < 0.01; **p < 0.0001; 스튜던트 t-검정 (Student's t-rest). (b) 10 M 디술피람으로 처리한 DRG의 RA 레스큐 (좌측에서 우측으로: RA 없음; 100 nM RA, 제 0일; 100 nM RA, 제 4일) 오차 막대, s.e.; 모든 군에 있어서 n = 6. RA 부재 배양물로부터의 유의차: *p < 0.01, **p < 0.0001; 스튜던트 t-검정. (c) 5-일 DRG 배양물에 대한 NGF-차단 항체의 영향. 좌측, NGF, 100 ng/ml; 중앙, NGF 플러스 차단 항체; 우측, 차단 항체 플러스 100 nM RA; n=4. NGF 플러스 차단 항체로부터의 유의차: *p < 0.01, **p < 0.0001, 스튜던트 t-검정. (d) NGF와 함께, 또는 NGF 없이 배양한 DRG에 대한 응답에 있어서, β-gal-양성 F9 세포의 퍼센트 증가. 좌측, 첨가제 없음; 중앙, NGF, 100 ng/ml; 우측, 차단 항체를 포함하는 NGF. NGF-처리 DRG에 의해 생성되는 것으로부터의 β-gal-양성 세포 퍼센트의 유의차; *p < 0.025, 스튜던트 t-검정; 각각의 군에 있어서, n = 9. (e) 5

일 동안 NGF (100 ng/ml)와 함께, 또는 NGF 없이 배양한 성체 DRG에 있어서의 RALDH-2 효소 및 RAR β 발현의 RT-PCR 분석. GAPDH를 사용하여 둘 모두의 시료에 있어서의 cDNA의 존재를 나타내었다. 병아리 배아에 있어서의 RA 분포 연구에서의 F9 리포터 세포의 사용은 기술되어 있다16.

(실시예 2) 성체 신경 조직에서의 신경돌기 발육의 유도

본원에서는 레틴산 수용체-β2가 성체 마우스 척수에 있어서 신경돌기 생성을 유도함이 놀랍게도 밝혀졌다.

레틴산은 신경돌기 생성에 필요한 것으로 나타났다. 본 발명자들은 최근에 말초 신경 재생에 있어서의 그의 작용 기전이 레틴산 수용체 β2의 활성화에 의한 것임을 증명하였다. 성체 중추 신경계는 재생될 수 없다. 따라서, 본 발명자들은 성체 척수에 있어서의 재생 불능이 레틴산 수용체β2와 관련되는지를 조사하였다.

결과: 본 발명자들은 본원에서 재생될 수 있는 마우스 배아 척수에 있어서 RARβ2가 신경돌기 생성을 최대한 자극하는 농도로 상향-조절된다는 것을 보고한다. 반대로, 성체 마우스 척수에서는, 시험관내에서 RARβ2RK 검출되지도 않고, RA에 의해 유도되지도 않으며, 신경돌기도 전혀 연장되지 않는다. 성체 척수를 RARβ2로 트랜스펙션시킬 경우 신경돌기 재생을 유도할 수 있다. 척수를 RARβ의 다른 이소형태인 RARβ4로 트랜스펙션시킬 경우 신경돌기 생성은 전혀 없다. 이는 신경돌기 재생에 있어서의 수용체 특이성의 중요성을 나타내는 것이다.

결론: 상기 데이터는 성체 CNS의 재생 잠재력에서의 손실이 일부는 RARβ 발현의 손실에 기인하는 것이며 뉴런 그 자체에 고유하다는 것을 나타낸다. 본 발명자들은 RARβ2를 사용한 유전자 요법에 의해 손상된 척수가 기능적으로 회복될 수 있음을 제안한다.

배경: 성체 중추 신경계 (CNS)에서의 축삭 재생의 유도는 신경생물학에 있어서의 주요 목표이다. 정상적인 환경 하에서 CNS 축삭이 재생될 수 없는 것은 하기 원인 중 하나 또는 그의 조합 때문이었다: 신경영양성 인자의 낮은 풍부함; 성장 촉진 분자의 부재; 생장 저해 분자의 존재. 따라서, CNS에 있어서 축삭 성장을 재자극하려는 시도는 상기 3가지 가능성에 중점을 두었다. 말초 신경 이식편을 사용하여 허용 환경을 제공할 경우, 척수 및 골수 뉴런은 성체 래트에 있어서 축삭을 30 mm까지 연장시켰다[1]. 섬유아세포 성장 인자와 조합된 유사한 방법의 적용에 의해 후방 사지 기능이 부분적으로 회복되었다[2]. 마이엘린에 존재하는 신경돌기 성장 저해제를 항체로 중화시키면 대조의 어린 래트에서와 비교하여 축삭이 더 길게 연장되었으며[3], 척수 손상 후 특정의 반사작용 및 이동 기능이 회복되었다[4]. 뉴로트로핀-3 및 상기 항체의 조합은 피질척수로 (corticospinal tract, CST) 축삭의 장거리 재생의 유도에 성공적이었다 [5]. 후각 엔쉬딩 (ensheathing) 세포의 현탁물도 래트의 상해 CST에 이동 기능을 되돌려 주는 데에 효과적이었다 [6]. 뉴로트로핀이 단순히 축삭 절단 (axotomised) 뉴런을 살아있도록 유지하는 작용만을 한다면, 상기 재생 유도 방법에 있어서, 주목할 초점은 뉴런 그 자체의 고유 능력이 아니라 축삭의 주변 환경이다. 그러나, CNS의 재생성 손실의 적어도 일부는 뉴런 그 자체에 고유한 것이다 (참고 문헌 4). 이는, 신경돌기를 재생시킬 수 있는 발육 CNS에서는 발현되지만 비재생 성체 CNS에서는 발현되지 않는 유전자의 동정이, 유전자 요법에 의한 척수 손상의 새로운 치료 전략으로 이어질 수 있음을 나타낸다.

본 발명자들은 본원에서, 상기 유전자 중 하나가 비타민 A의 생물학적 활성 대사산물인 레틴산 (RA)에 의해 활성화되는 RARβ2임을 입증하였다. RA는 발육 배아 및 성체 동물의 다양한 조직, 특히 신경계에 존재한다 [8-13] . 그의 부재에서는, CNS의 발육 뉴런은 신경돌기를 말초 신경계로 연장하지 못한다[14,15] . 반대로, 배양 뉴런에 적용할 경우, RA는 신경돌기의 수를 더 많아지게 하고 신경돌기를 더 길어지게 하며[16], 그의 성장 방향을 지시할 수 있다[17]. RA는 유전자 전사 수준에서 작용하는데, 이는 RA가 2가지 부류의 핵 전사 인자인 레틴산 수용체 (RAR) 및 레티노이드 X 수용체 (RXR)의 리간드이기 때문이다[18,19] . 레티노이드 수용체의 각각의 부류의 3가지 구성원 a, b 및 g와, 각각의 구성원의 여러 이소형이 존재하며, 상기 다양성은 세포에 대한 RA의 다면적 (pleitropic) 영향의 원인일 수 있다.

본 발명자들은 뉴런에 대한 RA의 분자적 작용 기전을 연구하여, 상기 레틴산 수용체 RARβ2가 뉴런에 있어서 RA 시그널의 중요한 트랜스듀서 (transducer)라는 결론을 얻었는데, 이는 RA가 신경돌기 생성을 자극하는 상황에서 RARβ2가 상향 조절되기 때문이다[20]. 따라서, 본 발명자들은 성체 척수에 있어서 상기 핵 수용체의 한계치 (threshold) 수준 이하, 또는 상기 수준의 부재가 상기 조직의 측삭 돌출 재생 불능의 원인이 될 수 있다고 가정하였다.

결과 및 토론

시험관내에서, 마우스 배아 척수에 대한 RA의 영향

본 발명자들은 다른 배아 CNS 지역이 그러하듯이, 마우스 배아 척수가 신경돌기 연장에 의해 RA에 응답하며[12, 17, 21-23], 상기 거동이 RARβ2의 상향-조절을 포함함을 확인함으로써 시작하였다. E13.5 척수를 셀로겐 매트릭스에 둔 마우스 배아로부터 절개하여 10% 탈지질화 혈청에서 배양하였다. 올-트랜스-RA를 3가지의 상이한 농도 (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M)로 첨가하고, 5일 후에 체외배양편을 뉴로필라멘트 항체로 염색하고 신경돌기의 존재에 대하여 조사하였다. RA의 농도가 증가함에 따라 배양 척수로부터 나오는 신경돌기의 수가 증가하였는데, 10^{-6} M에서 최대의 효과가 나타났다 (도 1 C, E, G). 심지어 RA의 부재 하에서도, 배아 척수는 신경돌기를 연장시켰는데 (도 1A), 이는 아마도 RA 및 그의 전구체 레티놀의 높은 내생 함량 때문인 것 같다[9, 13]. 실제, 내생 RA 합성을 디술피람으로 저해할 경우, 신경돌기는 연장되지 않는다[24]. 신경돌기의 유도는 RARβ2의 상향-조절을 포함한다는 것을 증명하기 위하여, 동일 범위의 RA 처리 5일 후 배양물에 대하여 RT-PCR을 수행하였다. 그에 의하면, 사용한 모든 RA 농도에서 배아 척수에서 RARβ2가 정상적으로 발현되며 (도 2A, 레인 1 - 5), RARβ2는 최대로 신경돌기가 생성되게 하는 것과 동일한 농도인 1 x 10^{-6} M의 RA의 처리 후 강력하게 상향-조절됨이 나타났다 (도 2A, 레인 5).

시험관 내에서의 성체 마우스 척수에 대한 RA의 영향의 결여

다음, 본 발명자들은 배아 척수 보다는 10개월의 성체 척수를 사용하여 동일 시리즈의 실험을 수행하였다. 배아 척수와는 반대로, RA는 임의의 시험 농도에서 신경돌기 생성에 대하여 아무런 영향을 미치지 못하였으며, 미처리 대조와 마찬가지로 상기 RA 처리 성체 척수는 신경돌기를 전혀 연장시키지 못하였다 (도 1B, D, F, H). RARβ2의 연루를 RT-PCR로 조사해 본 결과, 배아 척수와는 달리, 대조 성체 척수에서는 검출가능한 내생 수준의 상기 수용체가 조금 존재하거나 그를 전혀 검출할 수 없었으며 (도 2B, 레인 1), 그의 수준에 있어서 임의의 농도의 RA 처리에 응답하는 변화가 전혀 없었다 (도 2, 레인 2-5).

성체 척수에서의 신경돌기의 유도

따라서, 본 발명자들은 RARβ2 발현의 결여가 성체 척수의 완전히 불활성인 거동의 원인일 수 있다고 가정하였다. 신경돌기의 연장에 의해 RA에 응답하는 성체 DRG가 RARβ2를 또한 상향-조절한다는 본 발명자들의 이전의 관찰결과[24]는, 동일한 거동이 배아 및 적당한 성체 뉴런에 의해 유도되며 PNS와 CNS 뉴런들 사이의 조절성 거동에서의 차이를 강화시킴을 증명하는 것이다. 본 발명자들의 가설을 시험하기 위하여, 본 발명자들은 결함성 헤르페스 심플렉스 바이러스 제1형 (HSV-1) 벡터를 사용하여 성체 (10개월령) 마우스 척수 조각을 트랜스펙션시켰다.

3가지의 상이한 트랜스펙션을 수행하였는데, 이중 2가지는 대조로 기능하였다. 첫째는 lacZ 만을 포함하는 벡터 (pHSVlacZ); 둘째는, RARβ2를 포함하는 벡터 (pHSVRARβ2); 셋째는, RARb 유전자의 다른 이소형인 RARβ4를 포함하는 벡터 (pHSVRARβ4). 후자는 트랜스펙션에 있어서의 매우 정확한 대조로서 기능하는데, 이는 본 발명자들이 본 발명자들의 이전의 실험에서 뉴런의 RA 처리 후 RARβ4 이소형을 검출하지 못하였으며[20], 따라서, RARβ4는 신경돌기 생성에 연루되어 있지 않기 때문이다. 본 발명자들은 먼저 트랜스펙션이 성공적이며, 관련 수용체 이소형이 배양 척수에서 발현되는 것을 보증하였다. 척수 조각을 적당한 콘스트럭트로 밤새 트랜스펙션시키고 3일 또는 4일 후에 분석하였다.

성체 척수의 b-갈락토시다제 염색에 의해 판단되는 바와 같이, pHSVlacZ 처리 척수는 상당한 양의 트랜스펙션이 일어났음을 보여주었다 (도 3B). RT-PCR에 의하면, RARβ2 벡터를 사용한 트랜스펙션에 의해 RARβ2 는 발현되지만 (도 4, 레인 3), RARβ4 는 발현되지 않으며 (도 4, 레인 4), RARβ4 벡터를 사용한 트랜스펙션에 의해 RARβ4 는 발현되지만 (도 4, 레인 8), RARβ2 는 발현되지 않음 (도 4, 레인 7)이 증명되었다. 비-트랜스펙션 척수에서는 RARβ2 및 RARβ4 모두가 검출되지 않았다 (도 4, 레인 2 및 6).

신경돌기 생성에 대한 상기 트랜스펙션의 효과는 명확하였다. pHSVlacZ를 사용한 트랜스펙션은 신경돌기 생성에 있어서 완전히 미-응답성으로 남아있는 배양 성체 척수의 거동을 변화시키지 못하였다 (도 5A, 12/12 트랜스펙션). 이와 유사하게, pHSVRARβ4를 사용한 트랜스펙션은 불활성으로 남아있는 배양 척수에 있어서 응답을 전혀 생성하지 못하였다 (도 5C, 12/12 트랜스펙션). 그러나, pHSVRARβ2이소형을 사용한 트랜스펙션은 상이한 거동을 생성하였으며 다수의 신경돌기가 배양물 중에 나타났다 (도 5B, 8/12 트랜스펙션). pHSVRARβ2 척수에서 생성된 신경돌기의 수는 3 내지 23 사이에서 다양하였다. pHSVlacZ 트랜스펙션에 있어서, 체외배양편 당 lacZ 양성 세포의 수에 있어서의 다양성은 상당하였다. 이는, 신경돌기 수에서의 다양성이 트랜스펙션된 세포의 수에서의 다양성 때문일 수 있음을 암시한다.

상기 결과는, RARβ2 이소형이 RA에 응답하여 신경돌기 생성의 유도에 중요한 역할을 수행하며, 손상 성체 CNS에서 상향-조절되지 않는 주요 성분일 수 있다는 본 발명자들의 가설을 강력하게 지지하는 것이다. 본 발명자들의 가설은, 신경 조직의 재생 또는 비-재생 및 그의 RA에 대한 응답을 포함하는 여러 실험에 기초한 것이다. 따라서, 마우스 배아 척수, 마우스 배아 DRG 및 성체 마우스 DRG 모두는 RARβ2를 상향 조절하여 신경돌기를 연장시킴으로써 RA에 응답한다. 반대로, 성체 마우스 척수는 RARβ2를 상향 조절하지 못하여 신경돌기를 연장시키지 못한다. 또한, NGF는 신경돌기 생성을 자극하며, RARβ2의 상향조절에 의해 작용하고[24] 마우스 배아 DRG로부터의 신경돌기 생성은 RARβ 아고니스트에 의해 자극될 수 있다[20] .

상기 결과는, 뉴런 그 자체의 게놈을 조작할 경우, 재생을 다시 일깨울 수 있음을 나타낸다. 이는, 최근의 CNS 환경에 존재하는 저해 인자에 중점을 둔 생체내 신경돌기 생성의 유도와는 반대의 결과이다[1-5] . 발육 동안, 척수의 재생능의 손실은 마이엘린 결부 신경돌기 성장 저해 분자의 출연과 연관되어 있으며, 상기 중 몇몇은 올리고덴드로사이트에 의해 생성되는 것으로 생각된다[25] . 본 발명자들이 본 발명자들의 배양에서 관찰하거나 환경을 조작한 배양에서 관찰한 신경돌기의 재생은 2가지의 상이한 신경돌기 재생 기전이거나 이들은 관련된 공정이다. 후자의 관점에 대한 지지는 CNS 뉴런 그 자체가 마이엘린화에 연루된 것으로 나타난 사실에 의해 제공된다[26] . 따라서, 발육 동안 뉴런에서의 RARβ2의 존재는 마이엘린화에 연루된 유전자를 조절할 수 있으며, 상기 공정은 성체 CNS에서 RARβ2 유전자의 트랜스펙션에 의해 재복종된다고 생각하게 한다.

RARβ2 트랜스펙션 척수에서 본 발명자들이 관찰한 신경돌기의 어느 것도 상당한 거리 이상으로 신장되지 않았다. 이는, 신경돌기의 신장이 상이한 유전자 세트의 발현을 필요로 할 수 있음을 의미한다. 이것이 사실일 수 있다는 증거는 성체 PNS에서의 축색돌기의 재생으로부터 나타나는데, 여기서, 수지화 (arborizing)성장으로부터의 신장 성장으로의 전환은 전사 의존성 스위치에 의존적이다[27] . 대안적으로는, 본 발명자들의 배양물에서의 신경돌기 신장의 실패는 트랜스펙션의 일과성 성질로 인하여 RARβ2의 시간에 걸친 발현 손실이 존재하며, 이는 신장이 일어날 충분한 시간을 허용하지 않는다는 사실 때문일 수 있다.

그럼에도 불구하고, 본 발명자들은, 상기 예비 데이터가 성체 CNS에서의 신경돌기의 재생에 있어서의 RARβ2의 역할을 지지하며, 상기 전사체를 이용한 유전자 치료법을 다른 치료법과 병용하면 손상 척수를 기능적으로 회복시킬 수 있음을 제안한다.

방법

배양.척수를 E13.5 또는 10개월령의 마우스로부터 절단하여 약 5 mm의 횡단 조각으로 절단하였다. 상기를, 1 부피의 7.5 % 중탄산나트륨, 1 부피의 10 x MEM (Gibco제) 및 8 부의 셀로겐 (ICN flow제)를 혼합하여 제조한 셀로겐 매트릭스 (ICN flow제)에서 배양하였다. pH는 5 M NaOH를 적가함으로써 7.5로 조정하였다. 체외배양편을 매 2일마다 피딩 (feeding)하였다. 배지는 글루타민 (Gibco제), 6 % 글루코스, GMS-A (Gibco제) 10% 탈지질화 혈청 및 올-트랜스-RA (원액, 1 x 10^{-5} M, Sigma제)를 포함하는 DMEM-F12로 구성된다. 제5일에, 이들을 4% 파라포름알데히드에서 고정화하고 뉴로필라멘트 항체, NF200 (Sigma제)로 염색하였다.

RT-PCR 분석. RNA를 추출하고 (트리졸, Gibco제) 제조업자의 지시 사항에 기술된 바와 같이 Pharmacia 키트를 사용하여 cDNA를 제조하였다. 사용한 프라이머는 GAPDH, RARβ2 및 RARβ4로부터의 것이었다 (요청시 세부항목). PCR은 배아 척수의 경우 25 사이클, 그리고 성체 척수의 경우 40 사이클 실시하였다. 증폭은 하기와 같이 실시하였다: 변성: 95℃에서 30초; 어닐링: 55℃에서 30초; 및 연장: 72℃에서 1분. 이어서 생성된 생성물의 1/5을 겔 상에서 러닝시켰다.

트랜스펙션. 참고 문헌 28에 기술된 바와 같이 바이러스 원액을 제조하여 B 갈락토시다제 염색을 실시하였다. 사용한 타이터는 하기와 같았다: pHSV RARβ2, 5 x 10^{-4} ip/ul, pHSVRARβ4,, 4 x 10^{-4} ip/ ul, pHSVlacz 5 x 10^{-4} ip /ul.

실시예 2에 있어서의 도면:

도 1. 배양 E13.5 (A, C, E, G) 및 10개월령의 성체 척수 (B, D, F, H) 상에서의 신경돌기 생성에 대한 레틴산의 영향의 비교. 10%의 탈지질화 혈청 및 RA의 존재 하에서 5일 동안 척수 조각을 셀로겐에서 배양하였다. 배지는 매 2일마다 바꾸어주었다.A, B, RA 없음;C, D, 1 x 10^{-8}M RA;E, F, 1 x 10^{-7}M RA; G, H, 1 x 10^{-6}M RA.

도 2. E13.5 및 10개월령의 성체 척수에서의 RARβ2의 발현. 다양한 농도의 RA의 존재 하에 5일 동안 척수 조각을 배양하고, 그 후 RARβ2의 RT-PCR 분석을 수행하였다. A. E13.5 (레인 2-5) 및 B. 10개월령의 성체 척수 (레인 2-5). 레인: 1. 블루스크립트 (bluescript)/HPA II 크기 마커, 2. RA 없음, 3. 1 x 10^{-8}M RA, 4. 1 x 10^{-7}M RA, 5. 1 x 10^{-6}M RA. GAPDH의 존재를 이용하여 시료 중 cDNA의 동일 양을 나타내었다.

도 3. pHSVlacZ를 사용한 성체 척수의 트랜스펙션. 배양한 10개월령의 성체 척수를 5 x 10^{-4}ipu/ul의 pHSVlacZ로 밤새 트랜스펙션시키고 3일 후에 B 갈락토시다제 염색에 대하여 분석하였다. A. 비-트랜스펙션 성체 척수. B. pHSVlacZ로 트랜스펙션한 성체 척수.

도 4. pHSVRARβ2 또는 pHSVRARβ4를 사용한 성체 척수의 트랜스펙션. 성체 척수를 셀로겐에서 배양하고 5 x 10^{-4}ipu/ul의 pHSVRARβ2 또는 4 x 10^{-4}ipu/ul의 pHSVRARβ4로 밤새 트랜스펙션시켰다. 하기로 트랜스펙션한 성체 척수에서의 트랜스펙션 4일 후의 RARβ2 (레인 2-4) 및 RARβ4 (레인 6-8) 발현의 RT-PCR 분석: 레인 2, 6: 바이러스 없음, 3,7 pHSVRARβ2, 4, 8, pHSVRARβ4. GAPDH의 존재를 이용하여 시료 중 cDNA의 동일 양을 나타내었다. 레인 1,2 블루스크립트/HPA II 크기 마커.

도 5. 배양 성체 척수에 있어서의 pHSVlacZ, pHSVRARβ2 또는 pHSVRARβ4 트랜스펙션의 신경돌기 생성에 대한 영향. 10개월 척수를 셀로겐에서 배양하고, 5 x 10^{-4}ipu/ul의 pHSVlacZ, 5 x 10^{-4}ipu/ul의 pHSVRARβ2 또는 4 x 10^{-4}ipu/ul의 pHSVRARβ4로 밤새 트랜스펙션시키고, 트랜스펙션 4일 후 NF200으로 신경돌기 염색에 대하여 분석하였다. 배양 척수는 하기로 트랜스펙션시켰다: A. pHSVlacZ, B. pHSVRARβ2, C. pHSVRARβ4.

도 6은 척수 체외배양편 당 신경돌기의 평균 수의 막대그래프이다.

(실시예 3) 마우스 신경절 뉴런으로부터의 신경돌기 생성

마우스 배아 후근절의 상이한 집단으로부터의 신경돌기 생성에 있어서의 레틴산 수용체의 역할.

후근절 (DRG) 뉴런은 생존을 위한 그의 뉴로트로핀 요구성에 기초하여 3가지 이상의 유형으로 분류될 수 있다. 본 발명자들은 13.5일령의 마우스 배아 DRG로부터 단리한 NGF, NT-3 및 BDNF 의존성 뉴런에 있어서의 레틴산 수용체 (RAR) 및 레티노이드 X 수용체 (RXR)의 발현을 분석하였다. 본 발명자들은 각각의 뉴런 집단이 3가지의 RXR, α, β 및 γ를 발현한다는 것을 밝혀내었다. 그러나, NGF 및 NT-3 의존성 뉴런은 각각의 RAR α, β 및 γ를 발현하는 반면, BDNF 의존성 뉴런은 단지 RAR α 및 β만을 발현하였다. 레틴산을 각각의 뉴런 부류에 첨가할 경우, 단지 NGF 및 NT-3 의존성 뉴런만이 신경돌기 연장에 의해 응답하였으며, 상기 응답은 RARβ2의 상향-조절을 포함하였다. 상기 특이성은 단지 RARβ 선택성 화합물만이 신경돌기 생성을 자극하는 바와 같이 수용체 선택성 아고니스트의 사용에

의해 확인되었다. 상기 결과는 신경돌기 생성에 있어서 RA의 역할이 RARβ2를 통하여 작용함을 의미한다.

서론

뉴로트로핀은 발육 말초 신경계에서 다양한 일차 감각 뉴런의 생존에 필요한 성장 인자 패밀리이다(Snider, 1994). 상기 패밀리는 신경 성장 인자 (NGF) (Levi-Montalcini, 1987), 뉴로트로핀-3 (NT-3) (Maisonpierre 등, 1990), 및 뇌-유래 신경영양성 인자 (BDNF) (Barde 등, 1982)을 포함한다. 이들은 말초 뉴런이 분포하는 표적 분야에서 합성되며, 표적 분야로부터의 역행 기전에 의해 수송되어 발육 뉴런의 생존을 지지하는 것으로 생각된다. 뉴로트로핀은 Trk로 나타내어지는 수용체 티로신 키나제를 통하여 작용한다. NGF는 특이적으로 TrkA를 활성화시키며; BDNF는 TrkB를 활성화시키며, NT-3은 TrkC를 활성화시킨다 (Snider, 1994에 개설되어 있음). 뉴로트로핀 및 수용체 티로신 키나제의 기능 손실 실험으로부터 생성된 표현형의 분석에 의하면, 후근절 (DRG) 뉴런은 3가지 이상의 유형으로 분류될 수 있음이 나타났다. 생존에 있어서 NGF를 필요로 하는 뉴런은 노시오셉티드 (nocioceptive, 통증) 및 열 수용성 기능을 매개한다. 말초 신경계에 있어서, 축삭은 피부의 표면층에서 끝나며 척수의 표면 박층에 분포한다 (Crowley 등, 1994; Smeyne 등, 1994). 척수에 있어서, 고유감각성 뉴런 (proprioceptive neuron, 공간에 있어서 사지의 위치 감각)은, NGF형 뉴런보다 훨씬 더 크며, 척수에서 말초 신경으로부터 일차 근방추 말단으로 돌출하고, 측부 (collateral) 브랜치를 운동 풀로 연장시키고, 그의 생존에 있어서 NT-3에 의존적이다 (Ernfors 등, 1994; Farinas 등, 1994; Klein 등, 1994). BDNF 뉴런은 작은 크기에서 중간 크기를 가지며, 몇몇 메카노수용체 (mechanoreceptor)류를 포함할 수 있다 (Klein 등, 1993; Jones 등, 1994).

성장 인자가 뉴런의 생존에 연루된 것 외에도, 레티노이드도 동일한 역할을 수행할 수 있다. 레티노이드는 비타민 A로부터 유래되는 분자 패밀리로서, 생물학적 활성 대사산물인 레틴산 (RA)를 포함한다. RA의 세포적 효과는, 올-트랜스-RA (tRA) 및 9-시스-RA (9-cis-RA) 둘 모두에 의해 활성화되는 레틴산 수용체 (RAR), 및 단지 9-시스-RA에 의해서만 활성화되는 레티노이드 X 수용체 (RXR)의 2가지 부류의 수용체의 작용을 통하여 매개된다 (Kastner 등, 1994; Kleiwer 등, 1994). 상기 수용체는, 대안적인 스플라이싱 및 차별적 프로모터 사용으로 인하여 다수의 이소형이 존재하는 3가지 주요 아형 α, β 및 γ 수용체이다. RAR은 RXR과 헤테로이량체를 형성함으로써 유전자 발현을 매개하며, 반면 RXR은 호모이량체로서, 또는 여러 고아 수용체와 헤테로이량체를 형성함으로써 유전자 발현을 매개할 수 있다 (Mangelsdorf & Evans, 1995). 흥미롭게도, PC12 세포에 있어서 NGF에 의해 유도되는 가장 초기의 유전자 중 하나가 고아 수용체 NGFI-B (NURR1)이다 (Millbrandt, 1989). 이는, 발육 뉴런에 있어서 성장 인자 및 레티노이드 매개 경로가 상호작용할 수 있음을 나타내는 것이다. 상기 상호작용은 뉴런의 생존에 중요할 수 있는데, 이는 RA가 뉴런의 생존 및 분화에 연루된 것으로 밝혀졌기 때문이다 (Wuarin 및 Sidell, 1991; Quinn 및 De Boni, 1991). 또한, 여러 배아 뉴런형에 대한 다수의 연구에 의하면, RA는, 사실 뉴로트로핀이 그러할 수 있듯이 (Campenot, 1977; Lindsay, 1988; Turtle 및 Mathew, 1995), 신경돌기의 수 및 길이 모두를 자극할 수 있는 것으로 나타났다 (Maden (1998)의 문헌에 개설되어 있음). 최근에, 본 발명자들은 RA가 성체 DRG에 있어서의 신경돌기 재생에 중요하며, 그의 합성이 NGF에 의해 조절될 수 있음을 밝혀내었다 (Corcoran 및 Maden, 1999).

본원에 기술한 연구에 있어서, 본 발명자들은 E13.5 마우스 DRG를 사용하여, RAR 및 RXR 중 어느 것이 생존을 위하여 상이한 뉴로트로핀에 의존성인 뉴런에서 발현되는지를 물음으로써 레티노이드 매개 경로와 성장 인자 경로 사이의 상호작용의 성질을 추가로 조사하였다. 본 발명자들은, 실제 상이한 레티노이드 수용체 프로필이 NGF, NT-3 및 BDNF 뉴런에서 발현되며, 상기 프로필은 신경돌기 생성을 유도하는 RA 처리 후 변경된다는 것을 밝혀내었다. 구체적으로는, RARβ2는 NGF 및 NT-3 뉴런에서는 상향 조절되지만, BDNF형 뉴런에서는 상향 조절되지 않았다. 이러한 결과는 단지 RARβ 아고니스트만이 신경돌기 생성 유도에 있어서 RA를 치환하는 바와 같이 수용체 선택성 아고니스트의 사용으로 확인되었다. 상기 결과는 신경돌기 생성에 있어서 RARβ2를 통하여 작용하는 RA의 역할을 암시한다.

재료 및 방법

DRG 배양. DRG를 E13.5 마우스로부터 얻어, 비-신경절성 조직을 제거하고, 칼슘 마그네슘이 없는 빙냉 포스페이트 완충 염수에 수집하였다. 분리된 세포 현탁물을 제조하기 위하여, 신경절을 15℃에서 15분 동안 0.05 % 트립신으로 처리하였다. 반응을 1% 혈청의 첨가에 의해 중지시키고, 23 G 니들로 미분화하여 단일 세포를 얻었다. 이어서 세포를 1000 g에서 10분 동안 회전시키고 배지에 재현탁시켰다. 상기 세포를, 100 μg/ml의 폴리 D 라이신으로 2시간 동안 예비코팅한 웰에 대략 25000 개의 세포/cm^2의 밀도로 도말하였다. 배양물을 매 2일마다 피딩하였다.

배양 배지는 글루타민 (Gibco제), 6 % 글루코스, ITS (Gibco제)를 포함하는 DMEM-F12로 구성되었다. 사용한 성장 인자는 50ng/ml NGF (7s, Promega제), 50 ng/ml NT3 (Promega제) 또는 50 ng/ml BDNF (Promega제)이었다. 레티노이드는 1 x 10^{-7} M의 농도로 사용하였다. 올-트랜스-레틴산은 Sigma사로부터 수득하였으며, 수용체 아고니스트는 CIRD Galderma에 의해 합성하였는데: CD366은 RARα를 활성화시키며, CD2019는 RARβ를 활성화시키며, CD437은 RARγ를 활성화시키며, CD2809는 모든 RXR을 활성화시킨다.

RT-PCR 분석. RNA를 추출하고 (트리졸, Gibco제) 제조업자의 지시 사항에 기술된 바와 같이 Pharmacia 키트를 사용하여 cDNA를 제조하였다. 사용한 프라이머는 마우스 RAR, RXR 및 GAPDH로부터의 것이었다 (요청시 세부항목). 어느 RAR/RXR 수용체가 연루되었는지를 확인하기 위하여, 신경돌기 생성 반-정량적 PCR을 사용하였다. 증폭은 각각의 RAR 및 RXR의 선형 범위에서 실시하였으며, 그의 발현 수준을 GAPDH와 비교하였다. RXR의 경우 28 사이클을 수행하였으며, 반면, RARα 및 RARγ의 경우에는 25 사이클, 그리고 RARβ 및 GAPDH의 경우에는 22사이클을 사용하였다. 증폭은 하기와 같이 실시하였다: 변성: 95℃에서 30초; 어닐링: 55℃에서 30초; 및 연장: 72℃에서 30초. 이어서 생성된 생성물의 1/5을 겔 상에 러닝시켜 블로팅하였다. 이어서, 정상화를 위하여 적합한 RAR, RXR 또는 GAPDH로 이것을 프로빙하였다.

원위치 혼성화: 세포를 PBS로 1회 세척하고, 4% PFA에서 30분 동안 고정시켰다. 이어서, 세포를 PBS-0.05% 트윈 (PBT) 중에서 5분 동안 2회 세척하였다. 혼성화를 55℃에서 밤새 실시하였다. 완충제는 0.1M 트리스-Cl, pH9.5, 0.05M $MgCl_2$, 0.1M NaCl 및 0.1% 트윈-20으로 구성되었다. 이어서, 세포를 65℃에서 15분 동안, 50 % 혼성화 완충제, 50% 2 x SSC, 100% 2 x SSC 및 최종적으로 0.2% SSC에서 순차적으로 세척하였다. 이어서 세포를 실온에서 5분 동안, 각각 75% 0.2 x SSC, 25% PBT, 50% 0.2 x SSC, 50% PBT, 25% 0.2 x SSC, 75% PBT, 및 100% PBT에서 세척하였다. 세포를 PBT에서 1시간 동안 2% 양 혈청에서 블로킹시키고, 항 DIG 항체와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 PBT에서 2시간 동안 8회 세척하였다. 제조업자(Boehringer Mannheim)의 지시에 따라 NBT/BCIP를 사용하여 발색시켰다.

면역조직화학 및 신경돌기 길이의 측정: 세포를 PBS로 1회 세척하고, 4% PFA로 30분 동안 고정시켰다. 이어서 세포를 PBS-0.05% 트윈 (PBT)에서 5분 동안 2회 세척하였다. 이어서, 세포를 일차 항체 NF200 (Sigma제)에서 4 ℃에서 밤새 인큐베이션시키고 PBT에서 2시간 동안 8회 세척하였다. 이어서 실온에서 2시간 동안 이차 항체를 적용하고, 세포를 PBT에서 2시간 동안 다시 8회 세척하였다. 이어서 세포를 0.5 mg/ml DAB 및 6% H_2O_2를 포함하는 PBS에서 5분 동안 인큐베이션시켰다. NIH 이미지 소프트웨어를 사용하여 신경돌기 길이를 측정하였다. 실험을 3회 반복하였으며, 분석에 있어서 각각의 실험에 대하여 3회의 랜덤 필드를 취하였다. 평균 각각의 필드에 있어서 40개의 뉴런이 존재하였으며, 주어진 뉴런에 있어서 가장 긴 신경돌기 브랜치를 측정하였다.

결과

원위치 혼성화에 의한 수용체의 발현

먼저 본 발명자들은 원위치 혼성화에 의하여 E13.5 마우스 DRG의 일차 배양물에서의 RAR 및 RXR의 발현을 조사하였다. 분리 DRG 뉴런을 5일 동안 NGF, NT-3 또는 BDNF의 존재 하에 무혈청 배지에서 배양하였다. 뉴로트로핀의 부재 하에서는 세포는 사멸하였다. 본 발명자들은 3가지 유형의 모든 뉴런이 RXRα (도 1 D, J, P), RXRβ (도 1 E, K, Q) 및 RXRγ (도 1 F, L, R)을 발현한다는 것을 밝혀내었다. 반대로, RAR은 3가지 유형의 뉴런들 사이에서 차등적인 발현을 나타내었다. NGF 및 NT-3 의존성 뉴런은 RARα (도 1 A, G), RARβ (도 1 B, H), 및 RARγ (도 1

C, I)를 발현하는 반면, BDNF 의존성 뉴런은 단지 RARα (도 1 M) 및 RARβ(도 1 N)만을 발현하였다. RARγ는 BDNF 의존성 배양물에 있어서 원위치 혼성화에 의해 검출할 수 없었다 (도 1 0).

신경돌기 생성에 대한 RA의 영향

상이한 뉴런 집단에 대한 RA의 영양성 효과를 배제하기 위하여, 본 발명자들은 무혈청 배지 플러스 관련 뉴로트로핀 중에서 2일 동안 뉴런을 성장시킨 후 배양물에 3일 동안 1 x 10^{-7} M의 RA를 첨가하였다. 대조 배양물에는 RA를 전혀 첨가하지 않았으며, 대조 배양물은 단지 뉴로트로핀에서만 유지하였다. RA의 존재 또는 부재 하에 배양한 뉴런의 수에 있어서 유의차는 없었다. 이는, RA의 효과가 신경돌기 생성에 대하여 있는 것이며, 사용한 상이한 배양 조건 하에서 뉴런 서브세트의 선택적 생존으로 인한 것이 아니라는 것을 나타낸다. 신경돌기 생성을 분석하기 위하여, 배양물을 5일 후에 고정시키고, 모노클로날 항체 NF200으로 염색하였다. 신경돌기 길이는 NIH 이미지 소프트웨어로 측정하였다. 실험을 3회 반복하였다. 대략 전체 120개의 뉴런을 각각의 실험에서 카운팅하였으며, 각각의 뉴런으로부터 가장 긴 신경돌기를 측정하였는데, 그로부터 각각의 실험에 있어서 평균 신경돌기 길이를 취하였다. RA의 부재 하에서, BDNF 의존성 뉴런 (도 2 E 및 도 7 C 컬럼 1)은 신경돌기를 성장시켰으나, NGF (도 2 A) 및 NT-3 의존성 뉴런 (도 2 C)은 제한된 신경돌기 생성을 나타내었다 (도 7 A 및 B 컬럼 1). 반대로, RA를 배지에 첨가할 경우, NGF (도 2 B) 및 NT-3 의존성 뉴런 (도 2 D)에서의 신경돌기의 길이 및 수가 극적으로 증가하였으며, 상기 차이는 신경돌기의 길이의 비교시 유의한 것으로 밝혀졌다 (도 7 A 및 B, 컬럼 1 및 2). 반대로, RA는 BDNF 의존성 뉴런의 신경돌기 생성에 아무런 영향을 미치지 못하였다 (도 2 F 및 도 7 C 컬럼 1 and 2).

RT-PCR에 의한 수용체의 발현 및 RA에 대한 응답

수용체가 신경돌기 생성에 연루된 것을 확인하기 위하여, 재료 및 방법에 기술한 바와 같이 RXR 및 개개의 RAR 이소형에 대한 프라이머를 사용하여 반-정량적 PCR을 실시하였다. RA와 함께, 또는 RA 없이 배양한 3가지 유형의 뉴런 각각에 있어서 RXR의 발현에서의 차이는 없었다. 반대로, RAR 수용체 프로필에서는 편차가 있었다. 3가지 유형의 뉴런 각각은 NGF (도 3 A, 레인 8) 및 NT-3 (도 3 B, 레인 8) 의존성 뉴런에 있어서 RA에 응답하여 강력하게 상향 조절되며 BDNF 의존성 뉴런 (도 3 C, 레인 8)에서는 단지 약간 상향 조절되는 RARα1을 발현하였다 (도 3 A, B, C, 레인 1). 비록 블롯의 과다 노출 시에 NT-3 의존성 뉴런이 RARα5 및 RARα7 이소형을 발현하고, BDNF 의존성 뉴런이 RARα6 및 RARα7 이소형을 발현한다고 해도, 단지 RARα1 이소형만을 상기 DRG 뉴런에서 기꺼이 검출할 수 있음은 도 3으로부터 명확하다.

4가지의 가능한 RARβ 이소형 중, 단지 RARβ2 이소형만이 상기 3가지 유형의 뉴런 모두에서 검출되었다. 상기 이소형은 비-자극 배양물 (도 4 A, B, C, 레인 2)와 비교하여 NGF (도 4 A, 레인 6) 및 NT-3 의존성 뉴런 (도 4 B, 레인 6)에서 RA에 의해 강력하게 상향 조절되며, BDNF 의존성 뉴런 (도 4 C, 레인 6)에서는 상향 조절되지 않았다.

7가지의 RARγ 이소형 중 단지 RARγ1 이소형만이 뉴런 배양물 , 그리고 단지 NGF (도 5A, 레인 1 및 8) 및 NT-3 의존성 뉴런 (도 5 B, 레인 1 및 8)에서 검출되었다. BDNF 의존성 뉴런에서는 RT-PCR에 의해 RARγ1이 검출되지 않았다.

수용체 선택성 아날로그 및 신경돌기 생성

상기 데이터는, RARα1 또는 RARβ2의 상향 조절이 NGF 및 NT-3 의존성 뉴런에서 관찰되는 신경돌기 생성의 증가의 원인일 수 있음을 나타내는 것이다 (도 2B, D). 이는 RARβ2 이소형이 더욱 더 그러할 것 같은데, 이는 상기 수용체가 BDNF 의존성 뉴런에서 상향조절되지 않으며 상기 뉴런을 RA로 자극할 경우 신경돌기 생성의 증가가 없으며 (도 2 F) 반면, RARα1 이소형은 RA에 대한 신경돌기 응답의 결여에도 불구하고 상향 조절되기 때문이다. 상기 2가지 수용체를 구분하기 위하여, 본 발명자들은 개개의 수용체를 특이적으로 활성화하도록 개발한 수용체 선택성 합성 레티노이드를 사용하였다. CD366은 RARα를 활성화시키며, CD2019는 RARβ를 활성화시키며, CD437은 RARγ를 활성화

시키며, CD2809는 모든 RXR을 활성화시킨다. RARα 아고니스트의 존재 하에, 임의의 뉴런 집단에서는 신경돌기 생성의 증가가 현저하지 않았다 (도 6A, E, I 및 도 7 A, B 및 C 컬럼 1 및 3). 반대로, RARβ 아고니스트는 비-처리 뉴런과 비교하여 NGF 및 NT-3 의존성 뉴런에서 신경돌기 생성을 현저하게 증가시켰으나 (도 6B, F 및 도 7A B 컬럼 1 및 4), BDNF 의존성 뉴런에서는 신경돌기 생성을 초래하지 않았다 (도 6 J 및 도 7 C 컬럼 1 및 4). 상이한 뉴런 집단을 RARγ 아고니스트의 존재 하에 배양할 경우, NGF 및 NT-3 의존성 뉴런에서는 신경돌기 생성이 현저하게 감소하였으며 (도 6 C, G 및 도 7 A B 컬럼 1 및 5), 반면, 신경돌기 생성은 BDNF 의존성 뉴런에서 여전히 일어났다 (도 6 K 및 도 7 C 컬럼 1 및 5). 뉴런 집단을 RXR 아고니스트의 존재 하에 배양할 경우, 뉴런 집단에 있어서의 신경돌기 생성에 대해서는 현저한 효과가 없었다 (도 6 D, H, L 및 도 7 A B 및 C 컬럼 1 및 6).

따라서, 본 발명자들의 RT-PCR 데이터와 일치하여 RARβ2는 신경돌기 생성에 필요하다. 또한 RARγ는 신경돌기 생성을 저해할 수 있다.

RAR들 사이의 상호관계

마지막으로, 본 발명자들은 수용체 RARβ2 및 RARγ1 사이의 조절성 상호작용이 존재하는지의 여부를 연구하려고 하였는데, 이는, 상기 수용체가 신경돌기 생성에 대하여 반대의 효과를 가지기 때문이다. 이를 조사하기 위하여, 본 발명자들은 RARγ 아고니스트 또는 RARβ 아고니스트의 존재 하에 무혈청 배지에서 NGF 및 NT-3 의존성 뉴런을 배양하고, 24시간 후에 반정량적 RT-PCR에 의해 수용체 발현 수준을 측정하였다. RARβ 아고니스트는 비-자극 배양물과 비교하여 (도 8 레인 1 및 4) NGF 및 NT-3 의존성 뉴런 모두에서 RARβ2의 발현을 상향-조절하였으나 (도 8 B, 레인 3 및 6), RARγ1의 발현에는 영향을 미치지 않았다 (도 7 A, 레인 3 및 6). 그러나, RARγ 아고니스트의 존재 하에서는, RARβ2는 비-자극 배양물 (도 8 B, 레인 1 및 4)와 비교하여 NGF 및 NT-3 의존성 뉴런 모두에서 감소하였다 (도 8 B, 레인 2 및 5). RARγ 아고니스트는 RARγ $_1$의 수준에 대하여 아무런 영향을 미치지 않았다 (도 5 A, 레인 2 및 5). 이와 같이 RARγ $_1$은 RARβ2의 발현을 조절할 수 있다.

실시예 3의 토론

본 발명자들의 결과는, 본 발명자들이 단리한 3가지의 후근절 뉴런 집단 각각 (NGF, NT-3 및 BDNF 의존성)이 레티노이드 수용체의 공통 세트 및 유일무이한 세트 모두를 발현한다는 것을 나타낸다. RXR과 관련하여, 이들 각각은 RXRα, RXRβ 및 RXRγ를 발현하며, 이들 중 어느 것도 신경돌기 생성에 직접 연루되지는 않은 것으로 밝혀졌다. 반대로, 뉴런은 그를 선택하는 데 사용한 뉴로트로핀에 따라 상이한 RAR을 발현하였다. 각각의 집단에 공통적인 주요 RAR 이소형은 RARα1 및 RARβ2이었다. 또한, NGF 및 NT-3 집단은, 분석 시점에서 BDNF 집단에서는 발현되지 않는 RARγ1을 발현하였다.

NGF 및 NT-3 의존성 뉴런만이 신경돌기를 연장시킴으로써 RA에 응답하였으며, 반면, BDNF 의존성 뉴런은 RA의 존재 또는 부재에 상관없이 신경돌기를 생성하였다. 그에 부합하여, RA 첨가 후 RAR 프로필이 변화하였다. RARα1 및 RARβ2는 NGF 및 NT-3 의존성 뉴런에서 강력하게 상향-조절되었으며, 반면, BDNF 의존성 뉴런에서는 단지 RARα1만이 상향조절되었다. 이는 RARβ2가 신경돌기 생성의 유도에 필요하다는 것을 나타내며, 본 발명자들은 수용체 선택성 아고니스트를 사용하여 상기 관찰결과를 확인하였다.

수용체 선택성 아고니스트의 개발은 특정의 생물학적 공정에 있어서의 개개의 수용체의 역할을 조사하기 시작하기 위한 극히 유익한 도구를 제공하였다. 본 발명자들은 본원에서 단지 RARβ 아고니스트인 CD2019만이 NGF 및 NT-3 뉴런에 있어서 신경돌기 생성을 유도함으로써 RA의 효과를 모방한다는 것을 입증하였으며, 그에 따라 본 발명자들의 RT-PCR 결과를 확인하였다.

또한 본 발명자들은 RARγ 아고니스트가 NGF 및 NT-3 의존성 뉴런의 신경돌기 생성에서의 감소를 야기한다는 것을 관찰하였다. 이것이 RARβ2 발현과 결부된 것인지의 여부를 입증하기 위하여, 본 발명자들은 RAR 아고니스트가 수용체 발현에 영향을 미치는지의 여부를 조사하였다. RARβ 아고니스트는 RARβ2의 발현을 상향조절하였으나, RARγ1의 발현에는 아무런 영향을 미치지 않았다. 반대로, RARγ 아고니스트는 RARγ1의 발현에 아무런 영향을 미치지 않은 반면, RARβ2 의 발현 수준은 하향-조절하였는데, 이러한 현상도 신경돌기 생성의 전조가 될 수 있다. 이는, RARβ 전사체가 RARγ/RXR 헤테로이량체에 의해 조절될 수 있음을 나타낸다. 또한, BDNF 의존성 뉴런의 RA에 대한 응답에 있어서의 신경돌기 생성 증가의 결여는, 상기 유형의 뉴런에 있어서 RARβ가, 연구한 배아 단계에서 NGF 및 NT-3 의존성 뉴런에서 RARβ에 대하여 상이하게 조절될 수 있음을 나타낸다.

본 발명자들의 결과는, 신경돌기 생성의 원인이 되는 것이 RAR 경로의 활성화임을 나타내는데, 이는 RXR/고아 수용체를 활성화시키는 RXR 아고니스트가 신경돌기 생성에 아무런 영향을 미치지 않는 반면, RAR/RXR 헤테로이량체를 활성화시키는 RARβ 아고니스트는 신경돌기 생성량을 증가시켰기 때문이다. 이는, NGF가 예를 들어 NGFI-B를 이용함으로써 RXR/고아 수용체 경로를 통하여 작용할 경우, 이것은 상기 배아 단계에서 신경돌기 생성의 직접적인 원인이 아니며, 차라리 NGF가 뉴런 생존에 필요할 수 있음을 나타낸다. 흥미롭게도, 성체에 있어서는 그 반대가 사실인 것처럼 보인다. NGF는 뉴런 생존에는 필요하지 않지만, 신경돌기 생성에는 필요하다 (Lindsay, 1988). 따라서, 발육 및 성체 재생 신경돌기에 있어서의 신경돌기 생성 기전은 상이할 수 있다. 그러나, 발육 동안의 신경돌기 생성에는 RA가 절대적으로 필요하다. 비타민 A 결핍성 메추라기에 있어서, 신경관은 신경돌기를 말초신경계 내로 연장시키지 못한다 (Maden 등, 1996; Maden 등, 1998).

RA 및 상기 수용체 아고니스트에 대한 상기 뉴런의 차별적 응답은, 발육 및/또는 생존을 위하여 레티노이드를 필요로 하는 배아 및 성체 조직에 있어서 약간의 의의를 가질 수 있다. 상이한 RAR/RXR 및 RXR/고아 수용체 조합을 활성화시키기 위하여, 조직에 존재하는 상이한 레티노이드가 존재할 수 있다. 이러한 관점에 대한 몇몇 지지가, 발육 동안 국소화 발현을 나타내는 다수의 RA 생성 효소가 존재하며 (McCaffery 등, 1992; Drager & McCaffery, 1995; Godbout 등, 1996; Neiderreither 등, 1997; Ang & Duester, 1997) 상기 효소 각각은 상이한 레티노이드를 생성할 수 있다는 사실에 의해 제공된다. 지금까지 여러 신규한 레티노이드, 예를 들어 장에서 발견되는 5,6-에폭시레틴산 (McCormick 등, 1978), 쥐 배아 F9 세포의 분화에 책임있는 생물학적 활성 대사산물인 4-옥소-레티놀 (Achkar 등, 1996) 및 B 림프구에서 발견되는 14-히드록시-4,14-레트로레티놀 (Buck 등, 1991)가 발견되었다.

따라서, 배아는 상이한 레티노이드를 합성함으로써 신경돌기 생성량을 조절할 수 있다. 신경돌기 생성은, RARβ2/RXR 헤테로이량체를 활성화시킴으로써 일어날 수 있으며, 반면, RARγ/RXR 헤테로이량체를 활성화시킴으로써 중지될 수 있다. 또한, 신경돌기 생성량은 레틴산의 양에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어 마우스 발육 척수에 있어서, 상완 및 요부 확장에 있어서 고농도의 레티노이드가 존재하였다 (McCaffery & Drager, 1994). 이는, 신경돌기가 그의 최종 표적에 도달하기 위하여 넓은 거리를 여행하여야 하는 사지의 극점의 신경분포에 있어서의 고유 요건일 수 있으며, 반면, 레티노이드의 농도가 낮은 흉부 영역에 있어서는 상기와 같은 광범위한 신경돌기 생성은 필요하지 않다.

실시예 3에 있어서의 도면 설명

도 1. NGF, NT-3 또는 BDNF의 존재 하에 배양한 E13.5 마우스 배 DRG 뉴런에 의한 RAR 및 RXR의 발현. 하기의 원위치 혼성화:A-F, NGF 뉴런;G-L, NT-3 뉴런;M-R, BDNF 뉴런. 하기의 발현:A, G, M, RARα;B, H, N, RARβ;C, I, 0, RARγ;D, J, P, RXRα;E, K, RXRβ;F, L, R, RXRγ.

도 2. DRG 뉴런으로부터의 신경돌기 생성에 대한 RA의 영향. DRG 뉴런을 NGF, NT-3 또는 BDNT의 존재 하에 2일 동안 배양하고, 상기 지점에서 1 x ^{1}0-7M 올-트랜스-RA를 첨가하였다. 이어서, 상기 뉴런에 있어서 NF200 항체로 처리한지 총 5일 후 신경돌기 생성을 조사하였다.A, NGF;B, NGF + 1 X ^{1}0-7M RA;C, NT-3;D, NT-3 + 1 X ^{1}0-7;E, BDNF;F, BDNF + 1 X ^{1}0-7M RA.

도 3. RA의 부재 또는 존재 하에서 배양한 DRG 뉴런에서의 RARα의 발현. DRG 뉴런을 NGF, NT-3 또는 BDNF의 존재 하에 2일 동안 배양하고, 이어서, 1 X ^{1}0-7M RA를 첨가하고, 이어서 RARα 이소형의 존재를 RT-PCR로 분석하였다. 대조에는 RA를 첨가하지 않았다.A, 대조 NGF 뉴런 레인 1-7; NGF 뉴런 + 1 X ^{1}0-7M RA 레인 8-14.B, 대조 NT-3 뉴런 레인 1-7; NT-3 뉴런 + 1 X ^{1}0-7M RA 레인 8-14.C, 대조 BDNF 뉴런 레인 1-7; BDNF 뉴런 + 1I X ^{1}0-7M RA 레인 8-14. 레인: 1 & 8, RARα1; 2 & 9, RARα2; 3 & 1O, RARα3; 4 & 11, RARα4; 5 & 12, RARα5; 6 & 13, RARα6; 7 & 14, RARα7.

도 4. RA의 부재 또는 존재 하에 배양한 DRG 뉴런에서의 RARβ 이소형의 발현. DRG 뉴런을 NGF, NT-3 또는 BDNF의 존재 하에서 2일 동안 배양하고, 이어서 1 X ^{1}0-7M RA를 첨가하고, 이어서 RARβ이소형의 존재를 RT-PCR로 분석하였다. 대조에는 RA를 첨가하지 않았다.A, 대조 NGF 뉴런 레인 1-4; NGF 뉴런 + 1 X ^{1}0-7M RA 레인 5-8.B, 대조 NT-3 뉴런 레인 1-4; NT-3 뉴런 + 1 X ^{1}0-7M RA 레인 5-8.C, 대조 BDNF 뉴런 레인 1-4; BDNF 뉴런 + 1 x ^{1}0-7M RA 레인 5-8. 레인: 1 & 5, RARβ1; 2 & 6, RARβ2; 3 & 7, RARβ3; 4 & 8, RARβ4.

도 5. RA의 부재 또는 존재 하에 배양한 DRG 뉴런에서의 RARγ이소형의 발현. DRG 뉴런을 NGF, NT-3 또는 BDNF의 존재 하에서 2일 동안 배양하고, 이어서 1 X ^{1}0-7M RA를 첨가하고, 이어서 RARγ이소형의 존재를 RT-PCR로 분석하였다. 대조에는 RA를 첨가하지 않았다.A, 대조 NGF 뉴런 레인 1-7; NGF 뉴런 + 1 X ^{1}0-7M RA 레인 8-14.B, 대조 NT-3 뉴런 레인 1-7; NT-3 뉴런 + 1 X ^{1}0-7M RA 레인 8-14. 레인: 1 & 8, RARγ1; 2 & 9, RARγ2; 3 & 10, RARγ3; 4 & 11, RARγ4; 5 & 12, RARγ5; 6 & 13, RARγ6; 7 & 14, RARγ7.

도 6. DRG 뉴런으로부터의 신경돌기 생성에 대한 RAR 및 RXR 아고니스트의 영향. DRG 뉴런을 NGF, NT-3 또는 BDNF의 존재 하에서 2일 동안 배양하고, 이 지점에서 1 X ^{1}0-7M의 CD366 (RARα 아고니스트), CD2019 (RARβ 아고니스트), CD437 (RARγ 아고니스트) 또는 CD2809 (판 (pan)-RXR 아고니스트)를 배양물에 첨가하였다. 이어서, NF200 항체를 사용한 5일에 배양물을 신경돌기 생성에 대하여 염색하였다.A-D, NGF형 뉴런;E-H, NT-3형 뉴런;I-L, BDNF형 뉴런. 아고니스트: RARαA, E, I; RARβB, F, J; RARγC, G, K; RXRD, H, L.

도 7.A. NGF형 뉴런;B. NT-3형 뉴런;C. BDNF형 뉴런으로부터의 신경돌기의 길이에 대한 레티노이드 아고니스트의 영향. 컬럼 1. 아고니스트 없음, 2. RA, 3. RARα, 4. RARβ, 5. RAR, 6. RXR. 오차 막대 s.e.m., n = 50. *p < O.01.

도 8. NGF 또는 NT-3의 존재 하에 배양한 DRG 뉴런에 있어서의 RARβ2 발현 및 RARγ1의 발현에 대한 RARγ 또는 RARβ 아고니스트의 영향. DRG 뉴런을 무혈청 배지의 존재 하에 배양하였다. 이어서, 2일 후 1 x ^{1}0-7M RARγ 또는 RARβ 아고니스트를 24시간 동안 배양물에 첨가하였다.A. RARγ1;B, NGF (레인, 1-3) 및 NT-3 (레인, 4-6) 형 뉴런에서의 RARβ2의 발현 의 RT-PCR 분석. 레인: 1,4, 아고니스트 없음; 2,5, RARγ 아고니스트; 3, 6, RARβ 아고니스트

개요

실시예는 RARβ2 및/또는 그의 아고니스트가 신경돌기 발육을 야기하는 데 사용될 수 있음을 증명한다.

그 중에서도 특히, 본 발명자들은 레티노이드의 사용이 RARβ2의 활성화에 의해 말초 신경의 신경돌기 재생을 자극한다는 것을 입증하였다.

말초 신경이 손상될 경우, 재생을 나타내지 않는 중추 신경계의 신경과는 달리 약간의 재생이 일어날 수 있다. 그러나, 말초 신경의 재생은 신경 조직의 손실이 존재하여 재생 신경돌기가 가로질러 성장할 수 없는 갭이 형성되는 외상성 신경 손상이 존재할 경우 특히 제한된다. 신경 재생에 있어서의 상기와 같은 연기는 근 위축으로 이어져 영구적 신체장애로 이어질 수 있다.

말초 신경 손상에 응답하여 뉴로트로핀이 생성된다. 뉴로트로핀은 다양한 뉴런의 생존에 필요한 성장 인자 패밀리이다. 상기 패밀리는 신경 성장 인자 (NGF), 뉴로트로핀-3 (NT-3) 및 뇌-유래 신경영양성 인자 (BDNF)를 포함한다. PNS 손상 치료에 뉴로트로핀을 사용할 수 있기를 희망하여 왔다. 그러나, 결과는 희망적이지 못하였다. 2가지의 주요 문제점에 직면하게 되었는데, 첫째는 손상으로의 전달 문제점이고, 둘째는, 상이한 뉴런이 상이한 뉴로트로핀을 필요로 하기 때문에 모든 신경이 재생되게 하기 위해서는 이들의 칵테일을 투여하여야 하는 것이다. 본 발명자들은 뉴로트로핀이 신경돌기 재생을 어떻게 자극하는지를 조사하였다.

본 발명자들은 비타민 A 유도체 올-트랜스-레틴산 (tRA)가 NGF와 마찬가지로 PNS를 포함하여 다양한 배아원으로부터의 신경돌기 생성을 유도한다는 것을 밝혀내었다. tRA의 세포 효과는 리간드 활성화되는 전사 인자인 핵 수용체에 결합함으로써 매개된다. 2가지 부류의 수용체, 레틴산 수용체 (RAR) 및 레티노이드 X 수용체 (RXR)가 존재하며, 이들 각각은 3가지 아형 α, β, γ를 포함한다. RAR 수용체는 RXR과 헤테로이량체를 형성함으로써 유전자 발현을 매개하며, 반면, RXR은 호모이량체로서, 또는 고아 수용체와 헤테로이량체를 형성함으로써 유전자 발현을 매개할 수 있다.

본 발명자들은 본 발명자들이 배양한 모든 유형의 뉴런의 신경돌기 생성에 단지 RARβ2만이 필요하다는 것을 밝혀내었다. 또한, NGF 및 tRA 합성 저해제의 존재 하에 성체 마우스 DRG를 배양할 경우, 신경돌기 생성이 일어나지 않았다. 반대로, tRA를 NGF에 대한 차단 항체와 함께 첨가할 경우, 신경돌기 생성이 정상적으로 일어났다. 또한, 본 발명자들은, NGF가 tRA 합성 효소 RALDH-2 및 RARβ2 둘 모두의 전사, 및 검출가능한 합성 RA의 방출을 유도한다는 것을 입증하였다.

본 발명자들은 RARβ2의 자극이 말초 신경계에서의 신경돌기 재생에 있어서의 고유 요건이며, 매우 중요하게는, 상기가 뉴로트로핀의 하류라는 것을 제안한다. 따라서, 말초 신경계와 관련하여, 본 발명자들은 신경돌기 재생이 일어나게 하기 위하여 RARβ2 수용체를 활성화시킬 수 있는 레티노이드를 투여하기를 원한다.

본 발명자들은 본 발명자들의 관찰결과를 CNS로 연장하였다. 본 발명자들은 배아 척수가 RARβ2를 발현하며, 그의 발현량이 신경돌기 생성량과 상관관계가 있다는 것을 밝혀내었다. 반대로, 성체 척수는 RARβ2를 발현하지 않으며 신경돌기를 생성할 수도 없다. 본 발명자들은 결함성 헤르페스 심플렉스 바이러스 제1형 (HSV-1) 벡터를 사용하여 RARβ2를 배양 성체 척수 내로 트랜스펙션시킴으로써 정상적으로 불활성인 척수를 신경돌기를 연장시킬 수 있는 것으로 형질전환시키는 것을 입증하였다. 따라서, 본 발명자들은 RARβ2를 사용한 손상 척수의 유전자 요법이 기능적 회복으로 이어짐을 제안한다.

PNS 손상의 치료를 위한 레티노이드의 사용은 뉴로트로핀의 사용에 비하여 3가지 이상의 주요 잇점을 가진다. 첫째는, 뉴로트로핀과는 달리 레티노이드는 손상 부위에 용이하게 투여될 수 있는 작은 친지성 분자이기 때문에 재생이 뉴로트로핀으로 성취될 수 있는 것보다 훨씬 빠른 속도로 일어나며, 이는 근 위축 및 그로 인한 마비를 감소시킨다. 둘째는, RARβ2의 자극이 본 발명자들이 시험한 모든 뉴런의 재생에 중요하기 때문에, 뉴로트로핀의 칵테일을 투여할 필요를 우회하여 단지 하나의 유형의 레티노이드만이 취해질 필요가 있다. 셋째는, 레티노이드는 뉴로트로핀과는 달리 비교적 합성이 용이하다.

CNS 손상을 치료하기 위한 RARβ2를 사용한 유전자 요법은 기능적 회복으로 이어져 마비를 예방하여야 한다.

PNS 및 CNS 손상은 전세계적으로 일어나며, 이러한 손상의 발생은 불행하게도 감소할 것 같지 않다. 전 세계적으로 1년에 백만명의 집단 당 1000명의 사람이 척수 손상으로 고통받으며, 상기 수의 열배가 몇몇 종류의 PNS 손상으로 고통받는다.

또한, 레티노이드가 유용한 3가지의 다른 영역이 존재한다. 나병, 당뇨병 및 AIDS에 있어서, 신경병이 일어나며 (신경돌기가 사멸함), 이는 PNS 손상과 동일하다. 나병 및 당뇨병 둘 모두에 있어서, 두 유형의 환자의 피부에서 궤양 형성으로 이어질 수 있는 염증 및 통각의 손실로 이어지는 NGF의 손실이 존재한다는 것이 밝혀졌다. AIDS 환자에 있어서, 감각 신경병이 HIV 감염의 가장 일반적인 영향 중 하나이며, 이미 NGF가 상기 질병을 치료하는 데 사용되어 왔다.

따라서, 본 발명자들은 나병, 당뇨병 및 AIDS와 결부된 신경병을 포함하여 PNS를 치료하는 데에 RARβ2 아고니스트를 사용할 수 있음을 제안한다. RARβ2를 사용한 유전자 요법을 사용하여 CNS 손상을 치료할 수 있다.

요약하면, 본 발명자들의 결과는 특정 부류의 뉴런으로부터의 신경돌기 생성에 있어서 RA의 역할이 RARβ2를 통하여 작용하는 것을 나타낸다.

따라서, 본 발명은 레틴산 수용체 RARβ2의 발현을 병에 걸린 세포 또는 조직에서 보장하는 신경퇴행성 질환의 치료 방법을 포함한다. 이는 RARβ2 수용체의 아고니스트를 사용한 치료에 의해, 또는 유전자 요법, 즉 상기 수용체를 코딩하는 핵산을 삽입함으로써 성취될 수 있다. 또한 본 발명은, 예를 들어 대마비의 경우에, 말초 신경계 손상의 치료 및 척수 재생을 위한 투약에 있어서의 상기 약제의 사용으로 구현될 수 있다.

본 명세서에서 언급된 모든 간행물은 본원에 참고 문헌으로 채택되어 있다. 본 발명의 상기 방법 및 시스템의 다양한 변형 및 변경은 본 발명의 범위 및 정신을 벗어남이 없이 당 업계의 숙련자에게는 명확할 것이다. 본 발명을 특정의 바람직한 실시 형태와 관련하여 기술하였지만, 청구된 본 발명은 상기와 같은 특정 실시 형태에 부당하게 한정되는 것은 아님을 이해하여야 한다. 실제, 생화학, 생물공학, 화학 또는 관련 분야의 숙련자들에게는 명확한 본 발명을 실시하는 상기 양식의 다양한 변형은 하기 청구항의 범위 내에 존재한다. 예를 들어 본 발명의 RARβ2 중 일부 또는 모두, 및/또는 RARβ2 아고니스트의 일부 또는 모두를 RARβ2의 길항제의 저해제로 치환하는 것이 가능할 수 있다.

레틴산 섹션에 대한 참고 문헌

1. Benbrook, D.; Lernhardt, E.; Pfahl, M. : A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma. Nature 333: 669-672, 1988.

2. Brand, N.; Petkovich, M.; Krust, A.; Chambon, P.; de The, H.; Marchio, A.; Tiollais, P.; Dejean, A. : Identification of a second human retinoic acid receptor. Nature 332: 850-853, 1988.

3. Dejean, A.; Bougueleret, L.; Grzeschik, K.-H.; Tiollais, P. : Hepatitis B virus DNA integration in a sequence homologous to v-erb-A and steroid receptor genes in a hepatocellular carcinoma. Nature 322: 70-72, 1986.

4. de The, H.; del Mar Vivanco-Ruiz, M.; Tiollais, P.; Stunnenberg, H.; Dejean, A.:Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. Nature 343: 177-180, 1990.

5. de The, H.; Marchio, A.; Tiollais, P.; Dejean, A. : A novel steroid thyroid hormone receptor-related gene inappropriately expressed in human hepatocellular carcinoma. Nature 330: 667-670, 1987.

6. Kreczel, W.; Ghyselinck, N.; Samad, T. A.; Dupe, V.; Kastner, P.; Borrelli, E.; Chambon, P. : Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. Science 279: 863-867, 1998.

7. Lotan, R.; Xu, X.-C.; Lippman, S. M.; Ro, J. Y.; Lee, J. S.; Lee, J. J.; Hong, W. K. : Suppression of retinoic acid receptor-beta in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin. New Eng. J. Med. 332: 1405-1410, 1995.

8. Mattei, M.-G.; de The, H.; Mattei, J.-F.; Marchio, A.; Tiollais, P.; Dejean, A. : Assignment of the human hap retinoic acid receptor RAR-beta gene to the p24 band of chromosome 3. Hum. Genet. 80: 189-190, 1988.

9. Mattei, M.-G.; Riviere, M.; Krust, A.; Ingvarsson, S.; Vennstrom, B.; Islam, M. Q.; Levan, G.; Kautner, P.; Zelent, A.; Chambon, P.; Szpirer, J.; Szpirer, C. : Chromosomal assignment of retinoic acid receptor (RAR) genes in the human, mouse, and rat genomes. Genomics 10: 1061-1069, 1991.

10. Nadeau, J. H.; Compton, J. G.; Giguere, V.; Rossant, J.; Varmuza, S. : Close linkage of retinoic acid receptor genes with homeobox- and keratin-encoding genes on paralogous segments of mouse chromosomes 11 and 15. Mammalian Genome 3: 202-208, 1992.

11. Samad, A.; Kreczel, W.; Chambon, P.; Borrelli, E. : Regulation of dopaminergic pathways by retinoids: activation of the D2 receptor promoter by members of the retinoic acid receptor-retinoid X receptor family. Proc. Nat. Acad. Sci. 94: 14349-14354, 1997.

실시예 1에 대한 참고 문헌

1. Lindsay, R. *J. Neurosci.* **8**, 2394–2405 (1988).

2. Quinn, S. D. P. & De Boni, U. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **27A**, 55–62 (1991).

3. Haskell, B. E., Stach, R. W., Werrbach-Perez, K. & Perez-Polo, J. R. *Cell Tissue Res.* **247**, 67–73 (1987).

4. Rodriguez-Tebar, A. & Rohrer, H. *Development* **112**, 813–820 (1991).

5. Wion, D., Houlgatte, R., Barbot, N., Barrand, P., Dicou, E. & Brachet, P. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **149**, 510–514 (1987).

6. Kastner, P., Chambon, P. & Leid, M. in *Vitamin A in Health and Disease* (ed. Blomhoff, R.) 189–238 (Dekker, New York, 1994).

7. Kliewer, S. A., Umesono, K., Evans, R. M. & Mangelsdorf, D. J. in *Vitamin A in Health and Disease* (ed. Blomhoff, R.) 239–255. (Dekker, New York, 1994)

8. Mangelsdorf, D. J. & Evans, R. M. *Cell* **83**, 841–850 (1995).

9. Millbrandt, J. *Neuron* **1**, 183–188 (1988).

10. McCaffery, P., Lee, M.-O., Wagner, M. A., Sladek, N. E. & Drager, U. *Development* **115**, 371–382 (1992).

11. Duester, G. *Biochemistry* **35**, 12221–12227 (1996).

12. Drager, U. C. & McCaffery, P. in *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* Vol. 5 (eds. Weiner, H. *et al.*) 185–192 (Plenum, New York, 1995).

13. Plum, L. A. & Clagett-Dame, M. *Dev. Dynam.* **205**, 52–63 (1996).

14. Schnell, L., Schneider, R., Kolbeck, R., Barde, Y.-A. & Schwab, M. E. *Nature* **367**, 170–173 (1994).

15. Schatzl, H. M. *Trends Neurosci.* **18**, 463–464 (1995).

16. Maden, M., Sonneveld, E., van der Saag, P. T. & Gale, E. *Development* **125**, 4133–4144 (1998).

실시예 2에 대한 참고 문헌

1. David, S. & Agayo, A.J. Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* **214**, 931-933 (1981).
2. Cheng, H., Cao, Y. & Olsen, L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science* **273**, 510-513 (1996).
3. Schwab, M.E. Nerve fibre regeneration after traumatic lesions of the CNS; progress and problems. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **331**, 303-306 (1991).
4. Bregman, B.S. *et al.* Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* **378**, 498-501 (1995).
5. Schnell, L. *et al.* Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* **367**, 170-173 (1994).
6. Li, Y. *et al.* Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* **277**, 2000-2002 (1997).
7. Kobayashi, N.R. *et al.* BDNF and NT4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and Ta1-tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration. *J. Neurosci.* **17**, 9583-9595 (1997).
8. Wagner, M. *et al.* Regional differences in retinoid release from embryonic neural tissue detected by an in vitro reporter assay. *Development* **116**, 55-66 (1992).
9. Horton, C. & Maden, M. Endogenous distribution of retinoids during normal development and teratogenesis in the mouse embryo. *Dev. Dynam.* **202**, 312-323 (1995).
10. McCaffery, P. & Drager, U.C. Hot spots of retinoic acid synthesis in the developing spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 71947197 (1994).
11. McCaffery, P. & Drager, U.C. Retinoic acid synthesising enzymes in the embryopnic and adult vertebrate. In *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* **5** (H. Weiner et al. eds) pp173-183. Plenum Press, New York (1995).

실시예 3에 대한 참고 문헌

Achkar, C. C., Dergiuni, F., Blumberg, B., Langston, A., Levin, A.A., Speck, J., Evans, R.M., Bolado, J., Nakanishi, K., Buck, J. and Gudas, L.J. (1996). 4-oxoretinol, a new natural ligand and transactivator of the retinoic acid receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **93**, 4879-4884.

Ang, H.L. and Duester, G. (1997). Initiation of retinoid signalling in primitive streak mouse embryos: spatiotemporal expression patterns of receptors and metabolic enzymes for ligand synthesis. *Dev. Dynam.* **208**, 536-543.

Barde, Y. -A., Edgar, D. and Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* **1**, 549-553.

Buck, J., Derguini, F., Levi, E., Nakanishi, K. and Hammerling, U. (1991). Intracellular signalling by 14-hydroxy-4,14-retro-retinol.*Science* **254**, 1654-1656.

Campenot, R.B. (1977). Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **74**, 4516-4519.

Crowley, C., Spencer, S.D., Nishimura, M.C., Chen, K.S., Pitts-Meek, S., Armanini, M.P., Ling, L.H., McMahon, S.B., Shelton, D.L, Levinson, A.D. and Phillips, H.S. (1994). Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* **76**, 1001-1012.

Corcoran, J and Maden M. (1999). Nerve growth factor acts via retinoic acid synthesis to stimulate neurite outgrowth. *Nat. Neuroscience* **2**, 307-308.

Drager, U.C. and McCafery, P. (1995). Retinoic acid synthesis in the developing spinal cord. In *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism.* **5** (ed. H. Weiner et al.) 185-192 (Plenum Press, New York.

Ernfors, P, Lee, K, Kucera. J. and Jaenisch, R. (1994). Lack of Neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell* 77, 503-512.

Farinas, I., Jones, K.R., Backus, C., Wang, X-Y. and Reichardt, L.F. (1994). Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3. *Nature* **369**, 658-661.

Godbout, R., Packer, M., Poppema, S. & Dabbath, L. (1996). Localization of cytosolic aldehyde dehydrogenase in the developing chick retina: in situ hydridisation and immunohistochemical analyses.*Dev. Dynam.* **205**, 319-331.

Jones, K.R, Farlinas, I, Backus , C. and Reichardt, L.F. (1994). Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell* **76**, 989-999.

Klein, R., Silos-Santiago, I., Smeyne, R.J., Lira, S.A., Brambilla, R., Bryant, S., Zhang, L., Snider, W.D. and Barbacid. M. (1994). Disruption of the neurotrophin-3 receptor gene trkC eliminates la muscle afferents and results in abnormal movements. *Nature* **368**, 249-251.

Klein, R., Smeyne, R.J., Wurst, W., Long, L.K., Auerbach, B.A., Joyner, A.L. and Barbacid. M. (1993). Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell* **75**, 113-122.

Kastner, P., Chambon, P. and Leid, M. (1994). Role of nuclear retinoic acid receptors in the regulation of gene expression. In *Vitamin A in Health and Disease*. (R. Blomhoff ed.) pp 189-238. Marcel Dekker Inc., New York.

Kliewer, S.A., Umesono, K., Evans, R.M. and Mangelsdorf, D.J. (1994). The retinoid X receptors: modulators of multiple hormonal signalling pathways. In *Vitamin A in Health and Disease*. (R. Blomhoff ed.) pp 239-255. Marcel Dekker Inc., New York.

Leid, M., Kastner, P. and Chambon, P. (1992).Multiplicity generates diversity in the retinoic signalling pathways. Trends Biol. Sci. 17, 427-433

Levi-Montanlcini, R. The nerve growth factor: Thirty five years later. *Science* **237**, 1154-1164 (1987).

Lindsay, R. (1998). Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons. *J. Neurosci.* **8**, 2394-2405.

Maden, M., Gale, E., Kostetskii, I. and Zile, M.(1996). Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Current Biol.* **6**, 417-426.

Maden, M. Retinoids in neural development. In *Handbook of Experimental Pharmacology*. (H. Nau & W.S. Blaner eds.) Springer-Verlag, Heidelberg (1998) in press.

Maden, M., Gale, E. and Zile, E. (1998). The role of vitamin A in the development of the central nervous system. *J. Nutr.* **128**, 471S-475S.

Maden, M., Sonneveld, E., van der Saag, P.T. and Gale, E. (1998). The distribution of endogenous retinoic acid in the chick embryo: implications for developmental mechanisms. *Development* **125** in press.

Mangelsdorf, D.J. and Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**, 841-850.

Maisonpierre. P.C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N.Y., Furth, M.E., Lindsay, R.M. and Yancopoulos, G.D. (1990). Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* **247**, 1446-1451.

McCaffery, P. and Drager, U.C. (1994). Hot spots of retinoic acid synthesis in the developing spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7194-7197.

McCaffery, P., Lee, M.-O., Wagner, M.A., Sladek, N.E. & Drager, U. (1992). Asymmetrical retinoic acid synthesis in the dorsoventral axis of the retina. *Development* **115**, 371-382.

McCormick, A. M., Napoli, J. L., Schnoes, H. K. & Deluca, H. F. (1978). Isolation and identification of 5,6-epoxyretinoic acid: a biologically active metabolite of retinoic acid.

Biochemistry **17**, 4084-4090.

Millbrandt, J. (1989). Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* **1**, 183-188.

Niederreither, K., McCaffery, P., Drager, U.C., Chambon, P. and Dolle, P. (1997). Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech of dev* **62**, 67-68

Quinn, S.D.P and De Boni, U. (1991). Enhanced neuronal regeneration by retinoic acid of murine dorsal root ganglia and of fetal murine and human spinal cord in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **27A**, 55-62.

Smeyne, R.J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L.K., Bryant, S., Lewin, A, Lira, S.A. and Barbacid, M. (1994). Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted trk/NGF receptor gene. *Nature* **368**, 246-249.

Snider, W.D. (1994). Functions of the neurotrophins during nervous system development : what the knockouts are teaching us. *Cell* 77, 627-638.

Tuttle R.& Mathew, W.D (1995). Neurotrophins affect the pattern of DRG neurite growth in a bioassay that presents a choice of CNS and PNS substrates. *Development* **121**, 1301-1309.

Wuarin. L. & Sidell, N. (1991). Differential susceptibilities of spinal cord neurons to retinoic acid-induced survival and differentiation. *Dev. Biol.* **144**, 429-435.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

신경돌기 발육을 야기하는 의약의 제조에 있어서의 RARβ2 및/또는 그의 아고니스트의 용도

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 아고니스트가 레틴산 (RA) 및/또는 CD2019인 것을 특징으로 하는 RARβ2 및/또는 그의 아고니스트의 용도

청구항 3.

신경계 장애의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서의 RARβ2 및/또는 그의 아고니스트의 용도

청구항 4.

제3항에 있어서, 상기 신경계 장애가 신경계 손상을 포함하는 것을 특징으로 하는 RARβ2 및/또는 그의 아고니스트의 용도

청구항 5.

신경계 장애의 치료 방법으로서, 약리학적 활성량의 RARβ2 수용체, 및/또는 그의 아고니스트를 투여하는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 6.

제5항에 있어서, 상기 아고니스트가 RA 및/또는 CD2019인 것을 특징으로 하는 방법

청구항 7.

제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 RARβ2 수용체를 RARβ2 발현 시스템을 포함하는 실체 (entity)에 의해 투여하는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 8.

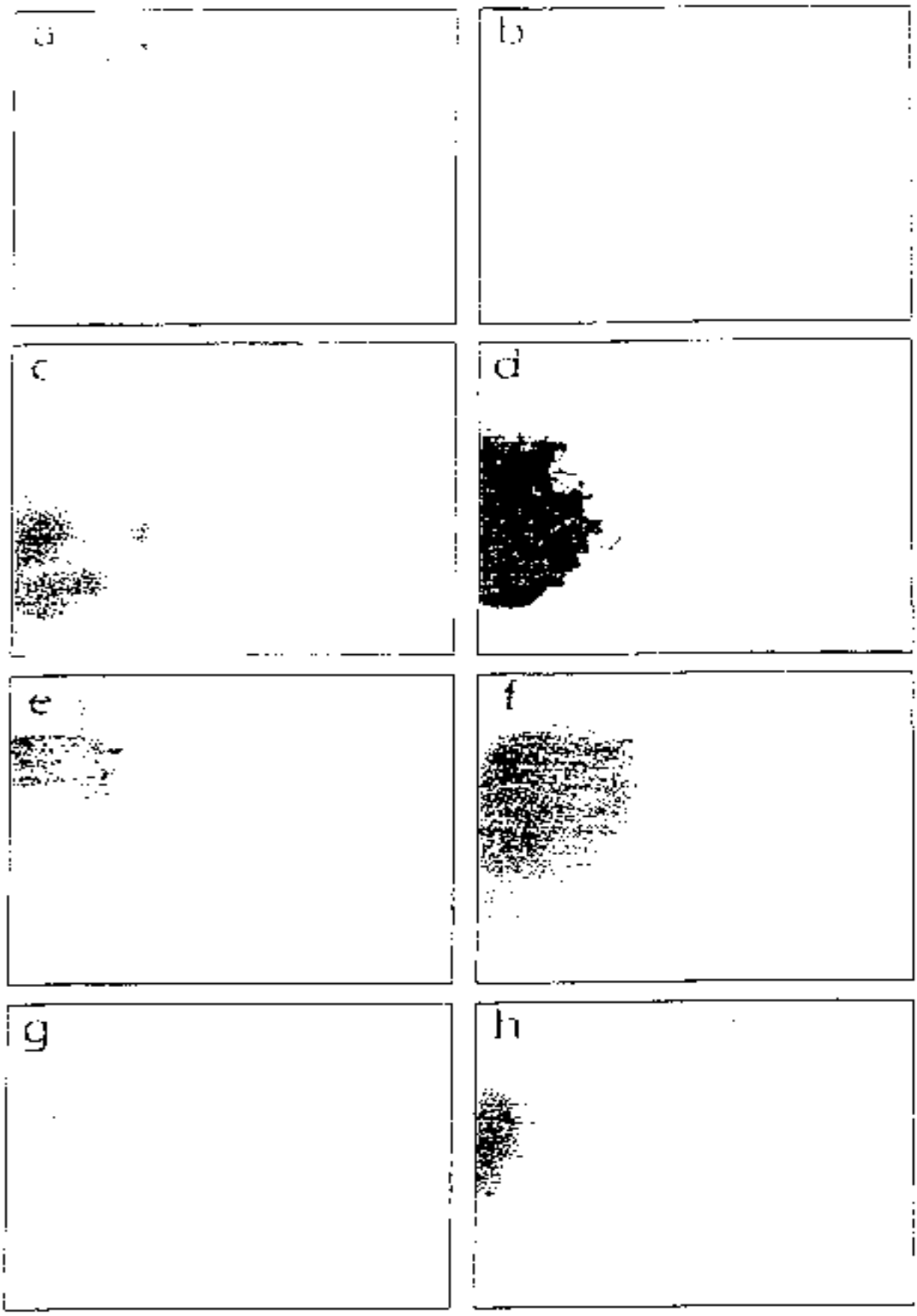
대상자에 있어서 신경돌기 발육을 야기하는 방법으로서, RARβ2 수용체의 적어도 일부의 발현을 지시할 수 있는 핵산 콘스트럭트를 제공하고, 상기 콘스트럭트를 상기 대상자의 하나 이상의 세포 내로 도입시키고, 임의로 RA 및/또는 CD2019와 같은 RARβ2 아고니스트를 상기 대상자에게 투여하는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 9.

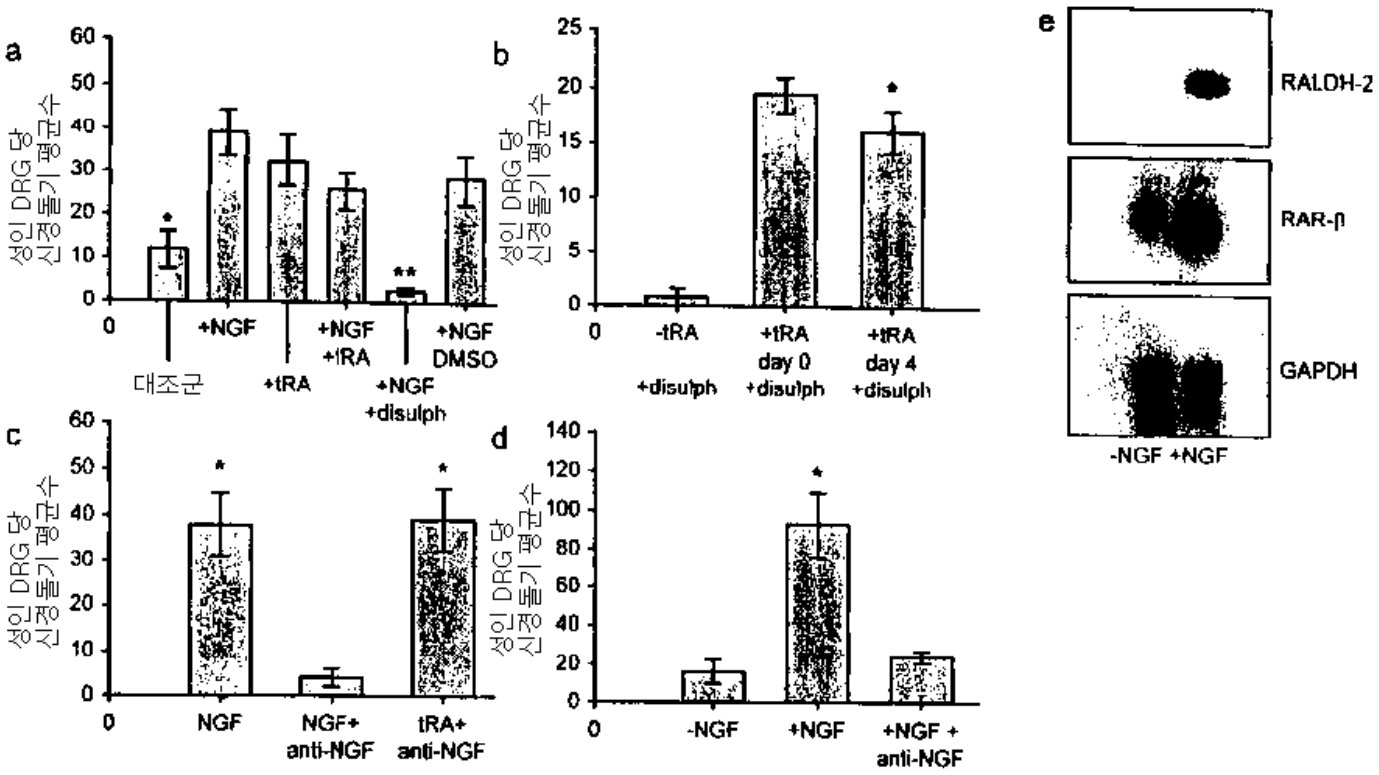
RARβ2 및/또는 그의 아고니스트를 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제와의 혼합물 형태로 함유하며, 신경돌기 발육을 야기하는 데 사용하기 위한 약학 조성물

도면

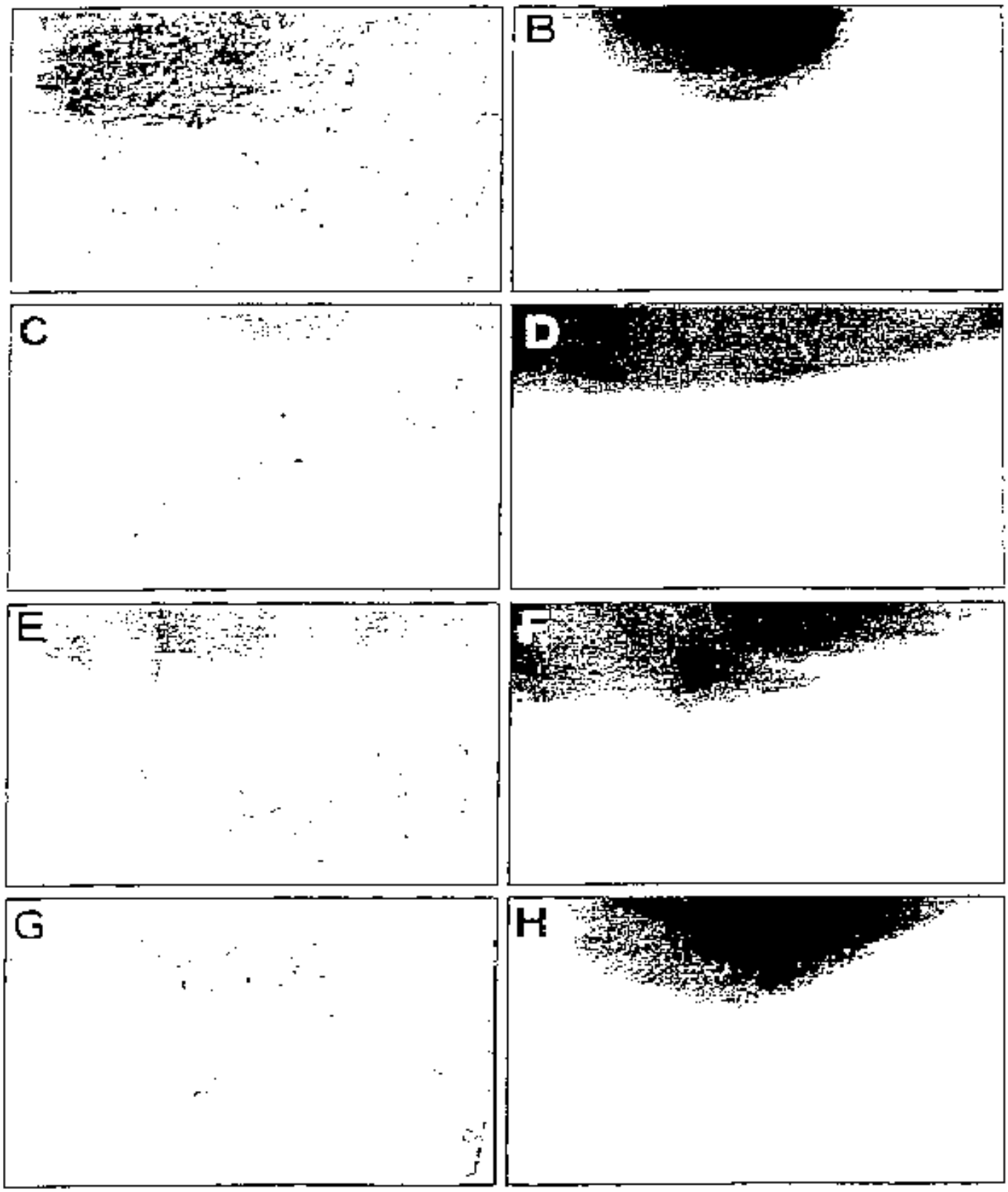
도면 1



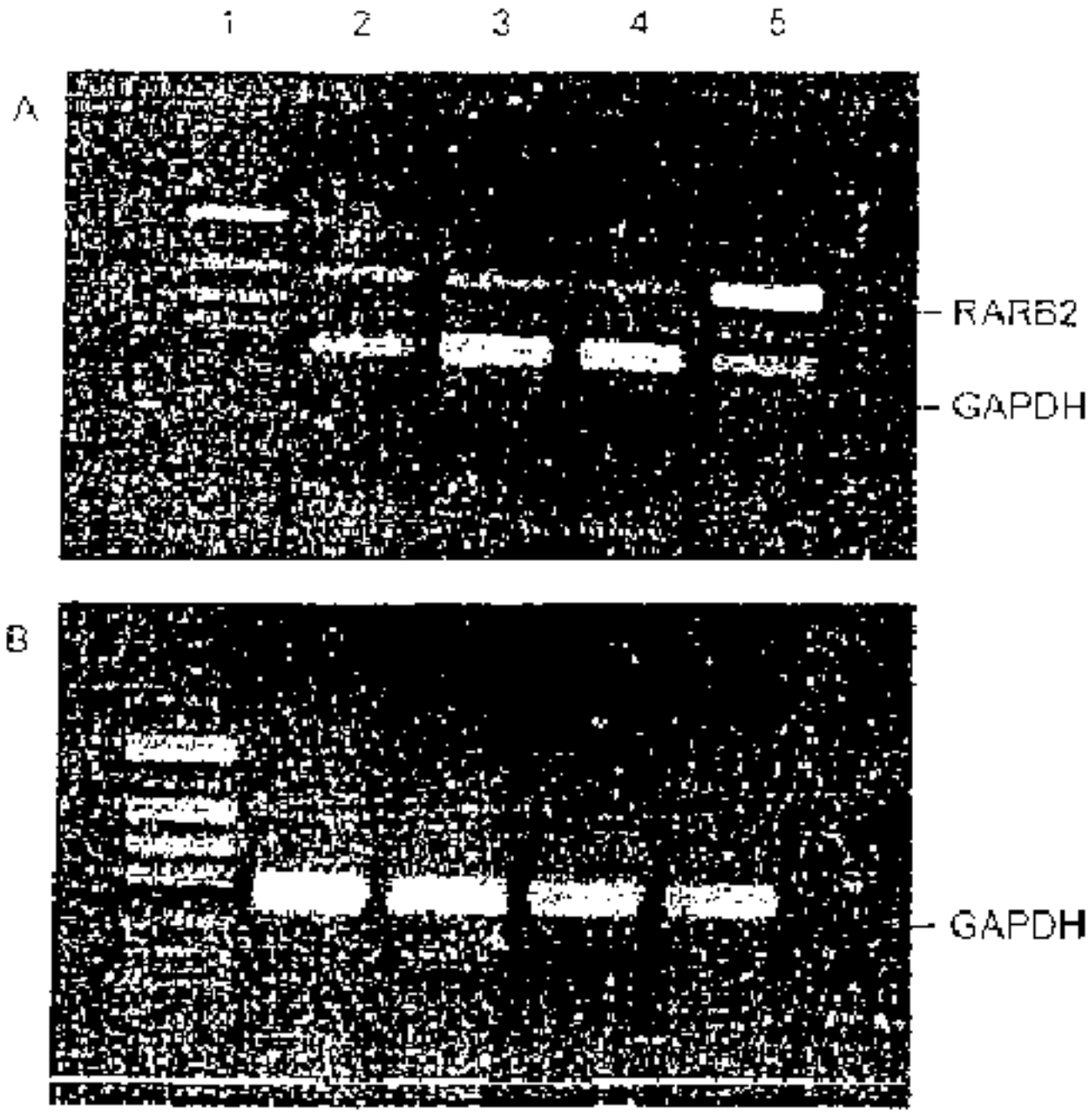
도면 2


a
성인 DRG 당 신경돌기 평균수
대조군
+NGF
+tRA
+NGF +tRA
+NGF +disulph
+NGF DMSO
b
-tRA +disulph
+tRA day 0 +disulph
+tRA day 4 +disulph
c
NGF
NGF+ anti-NGF
tRA+ anti-NGF
d
-NGF
+NGF
+NGF + anti-NGF
e
RALDH-2
RAR-β
GAPDH
-NGF +NGF

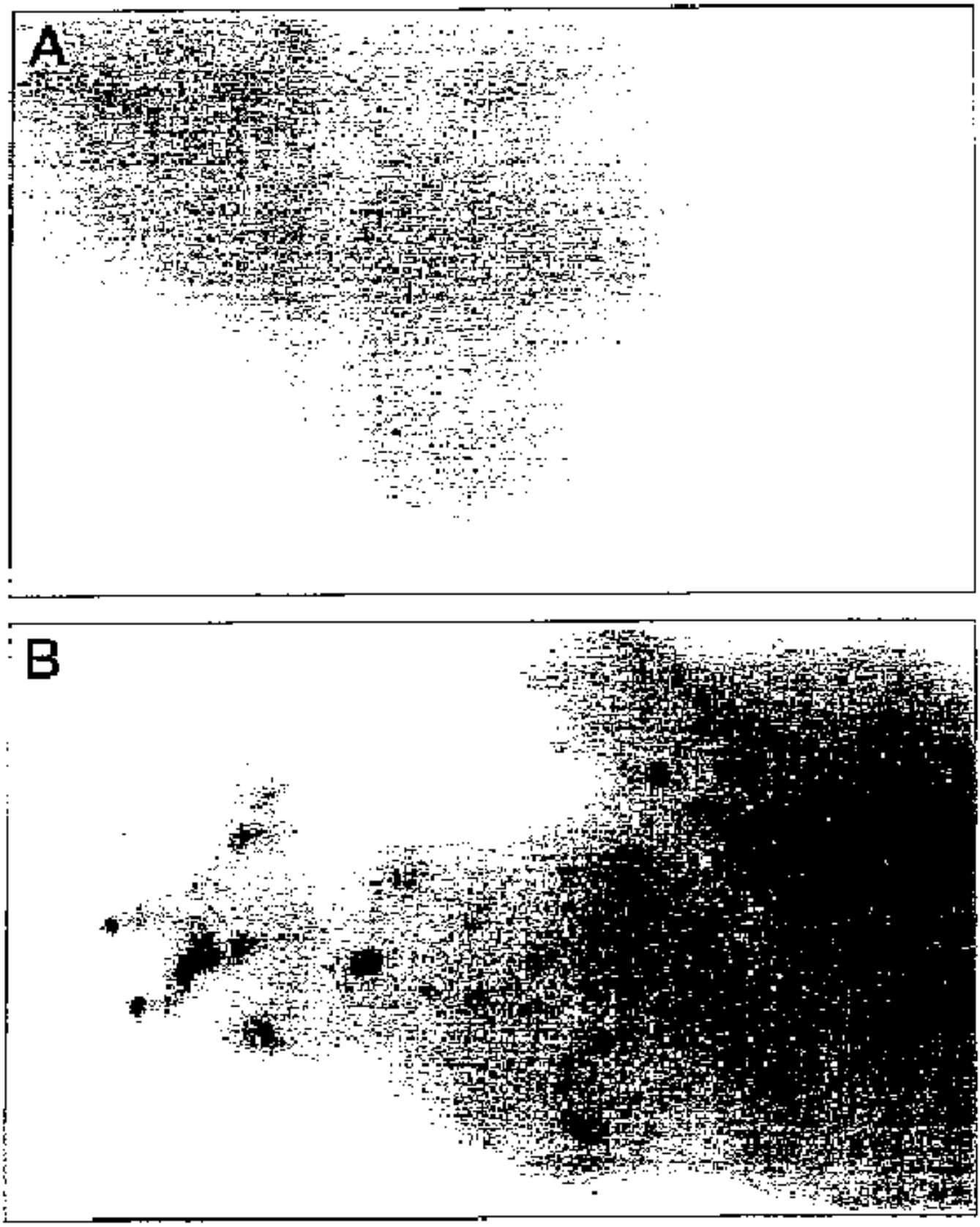
도면 3



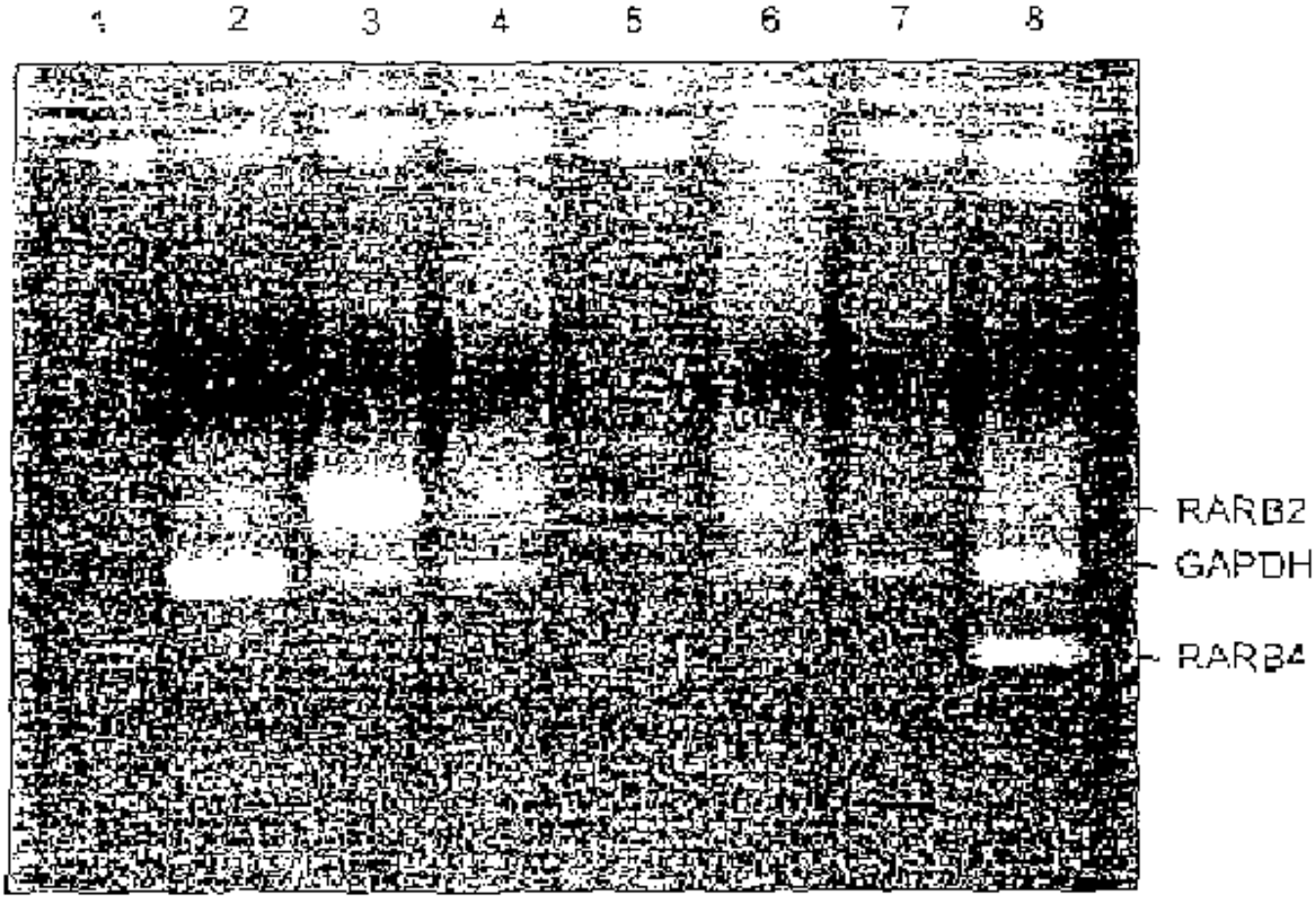
도면 4



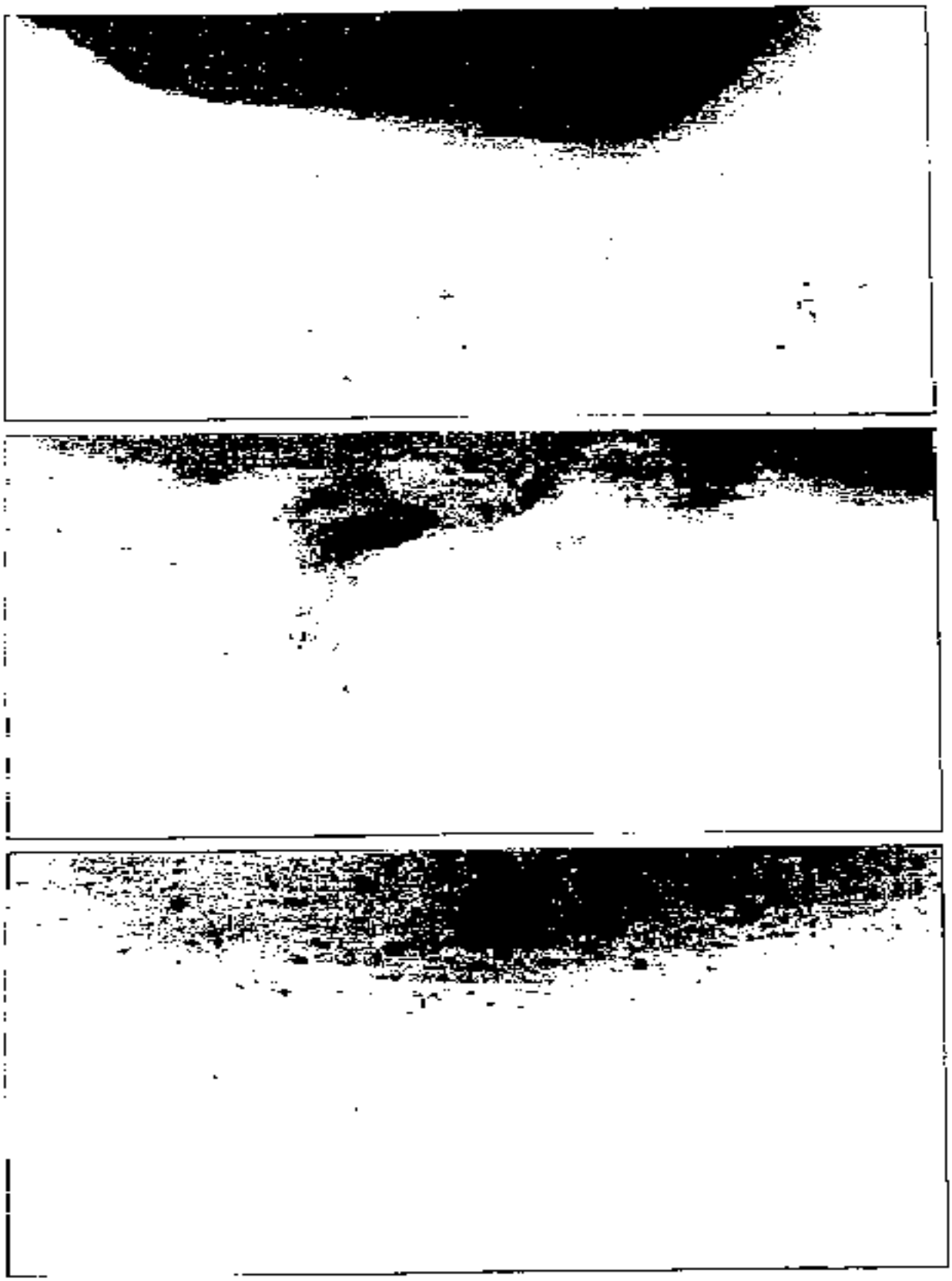
도면 5



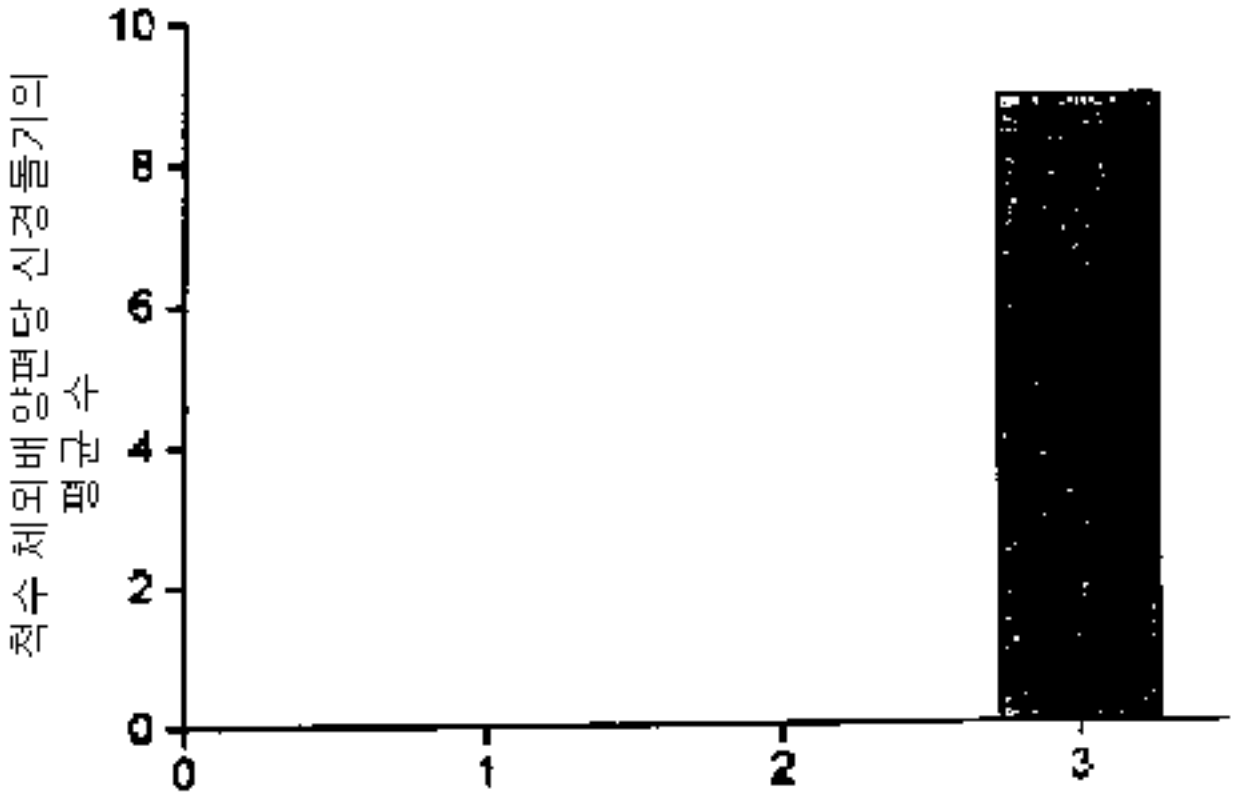
도면 6



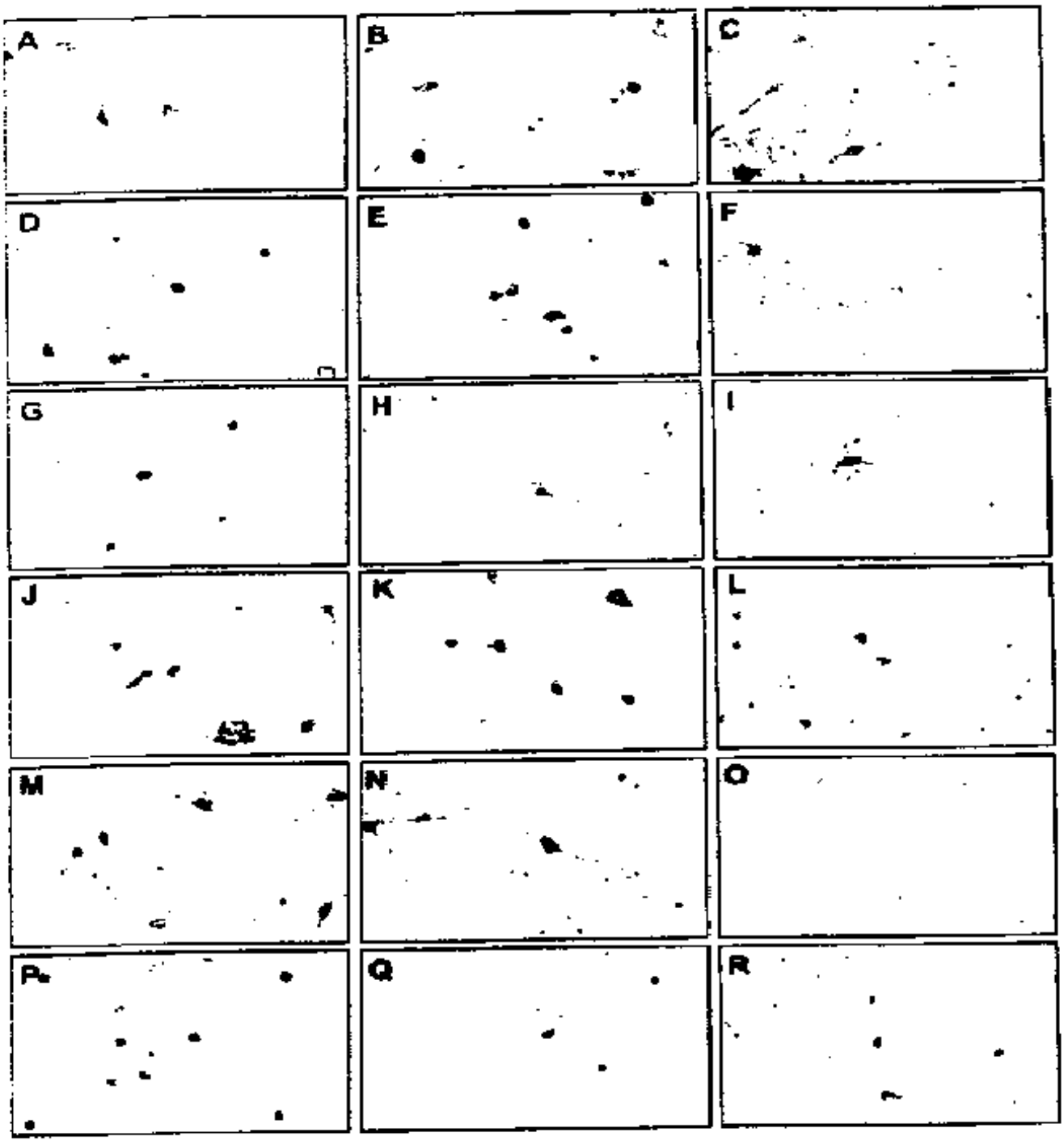
도면 7



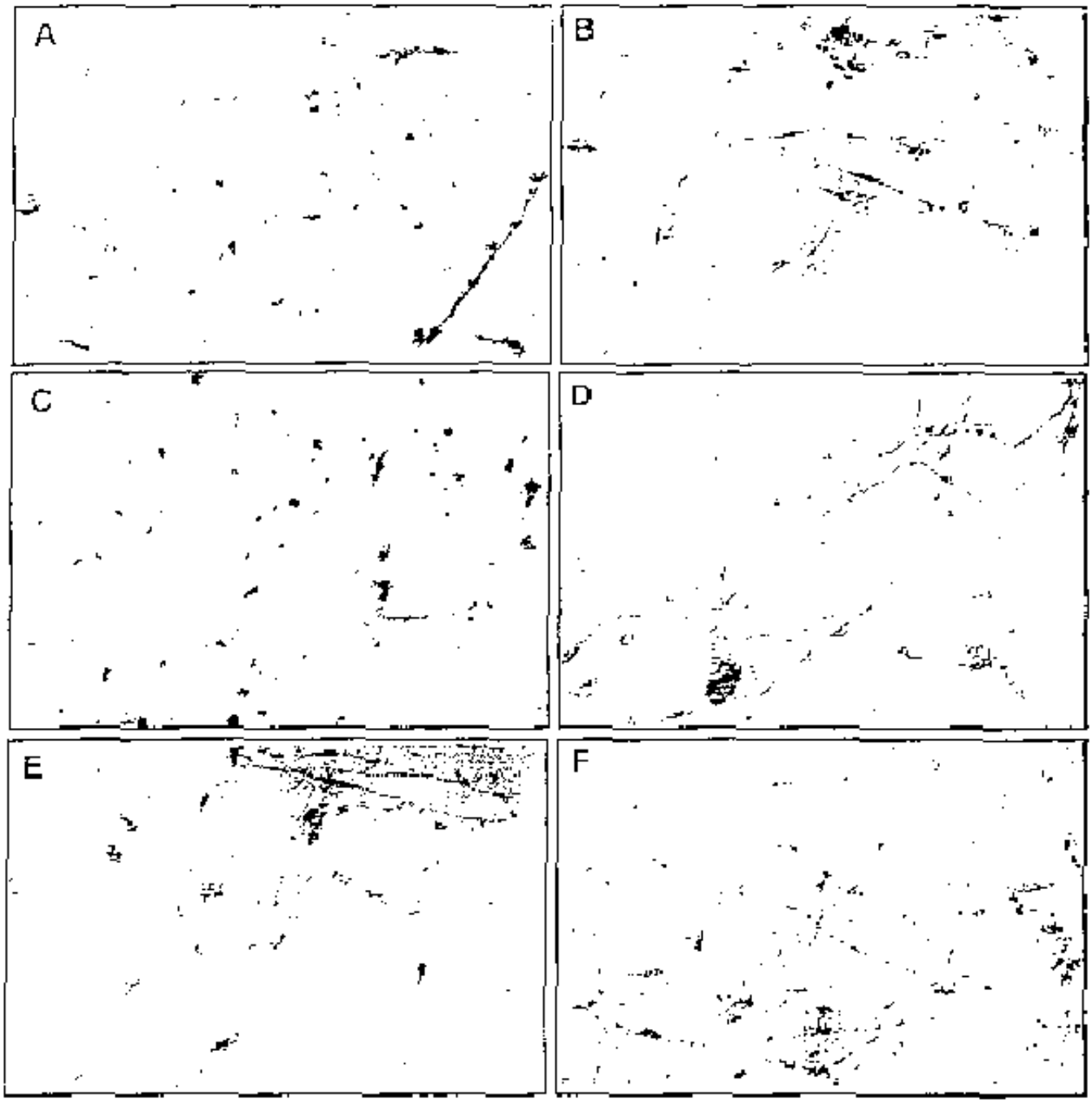
도면 8



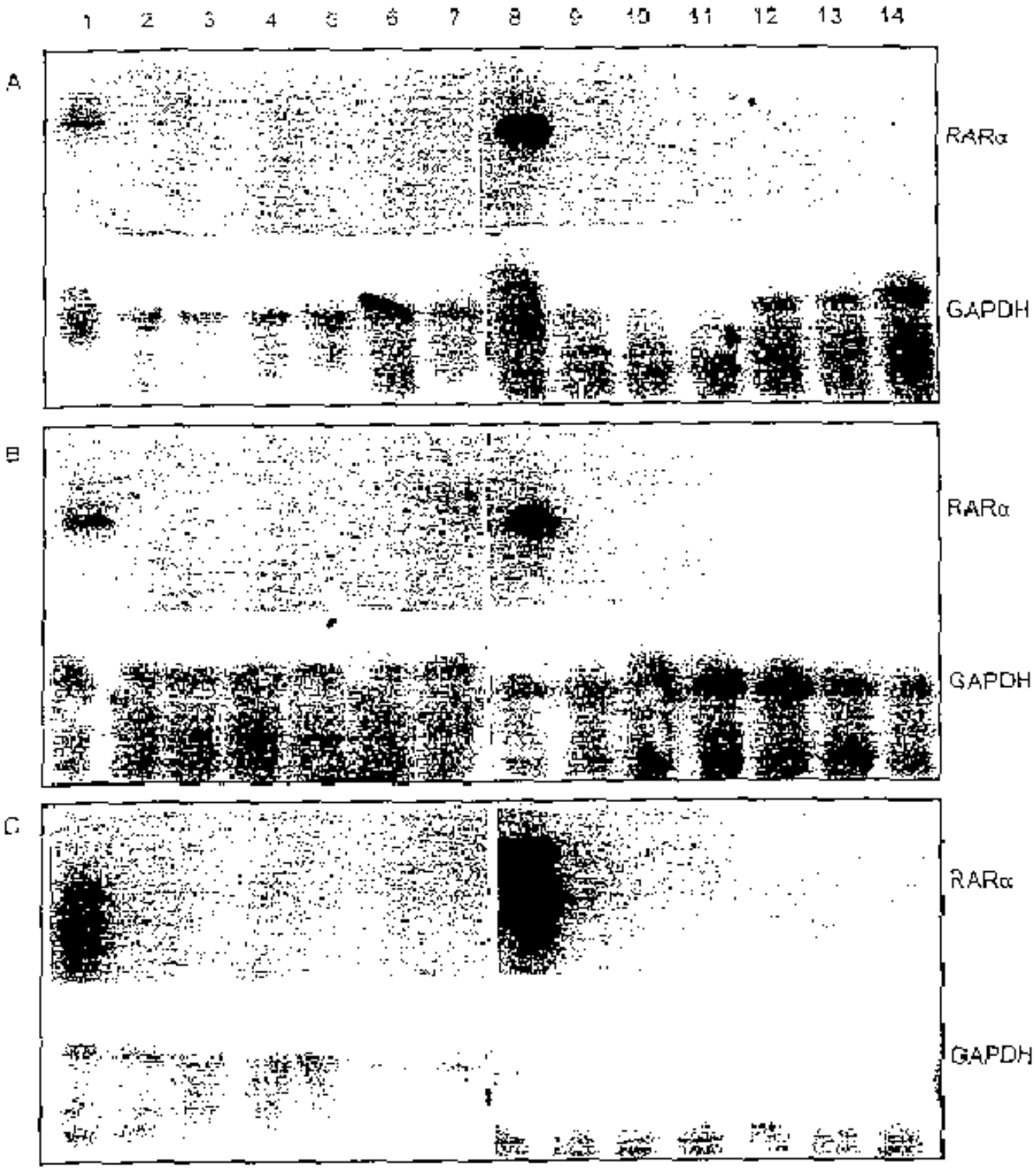
도면 9



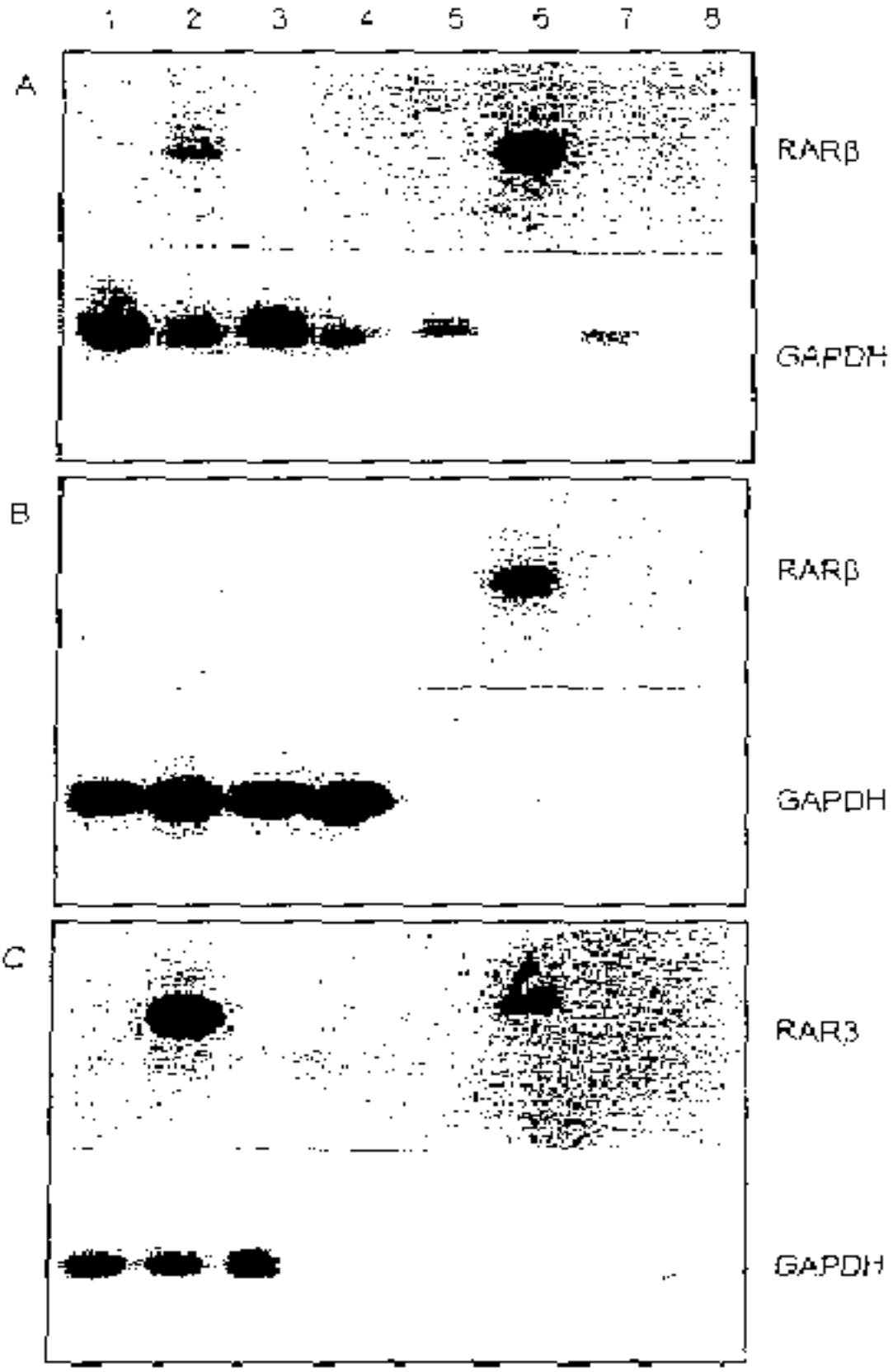
도면 10



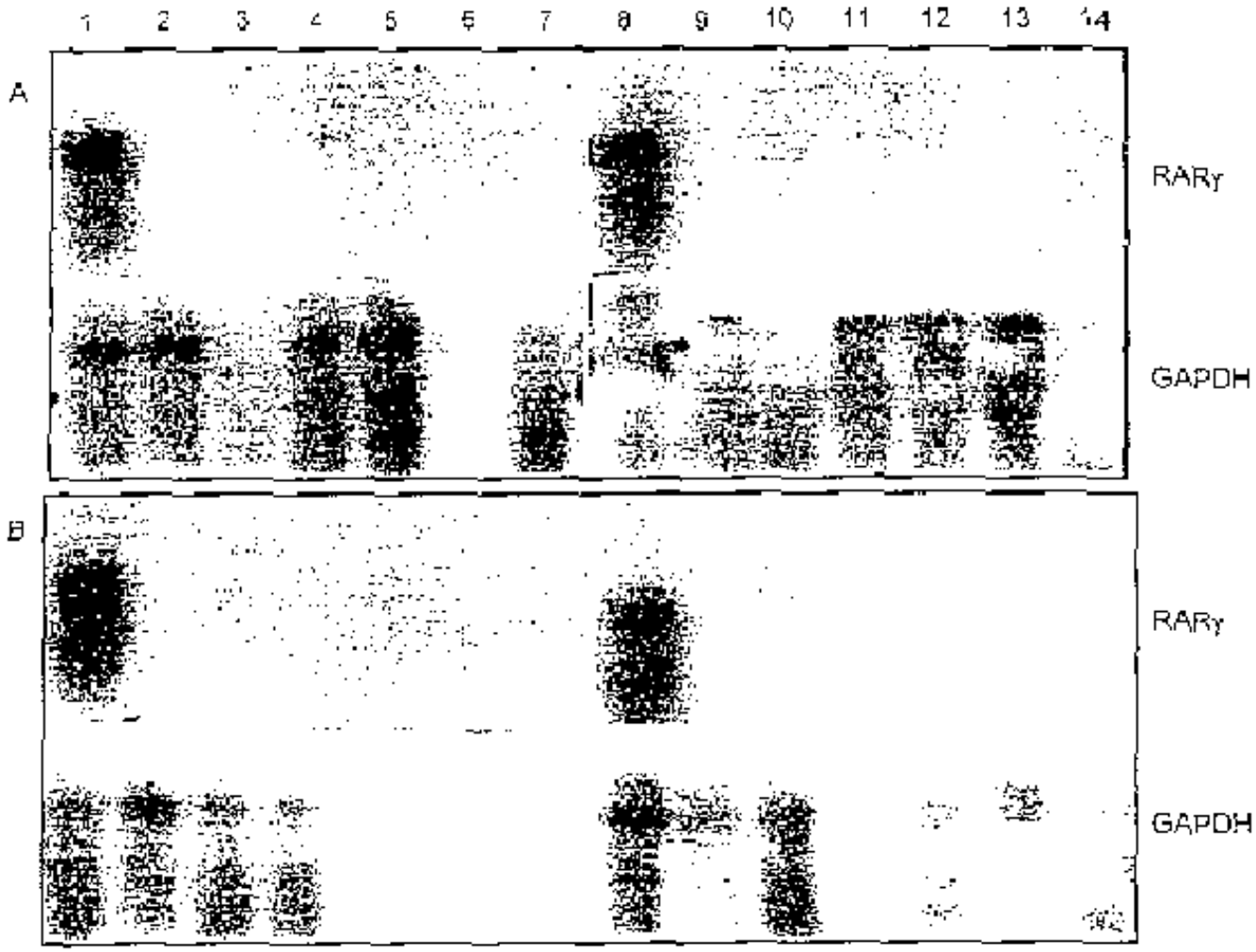
도면 11



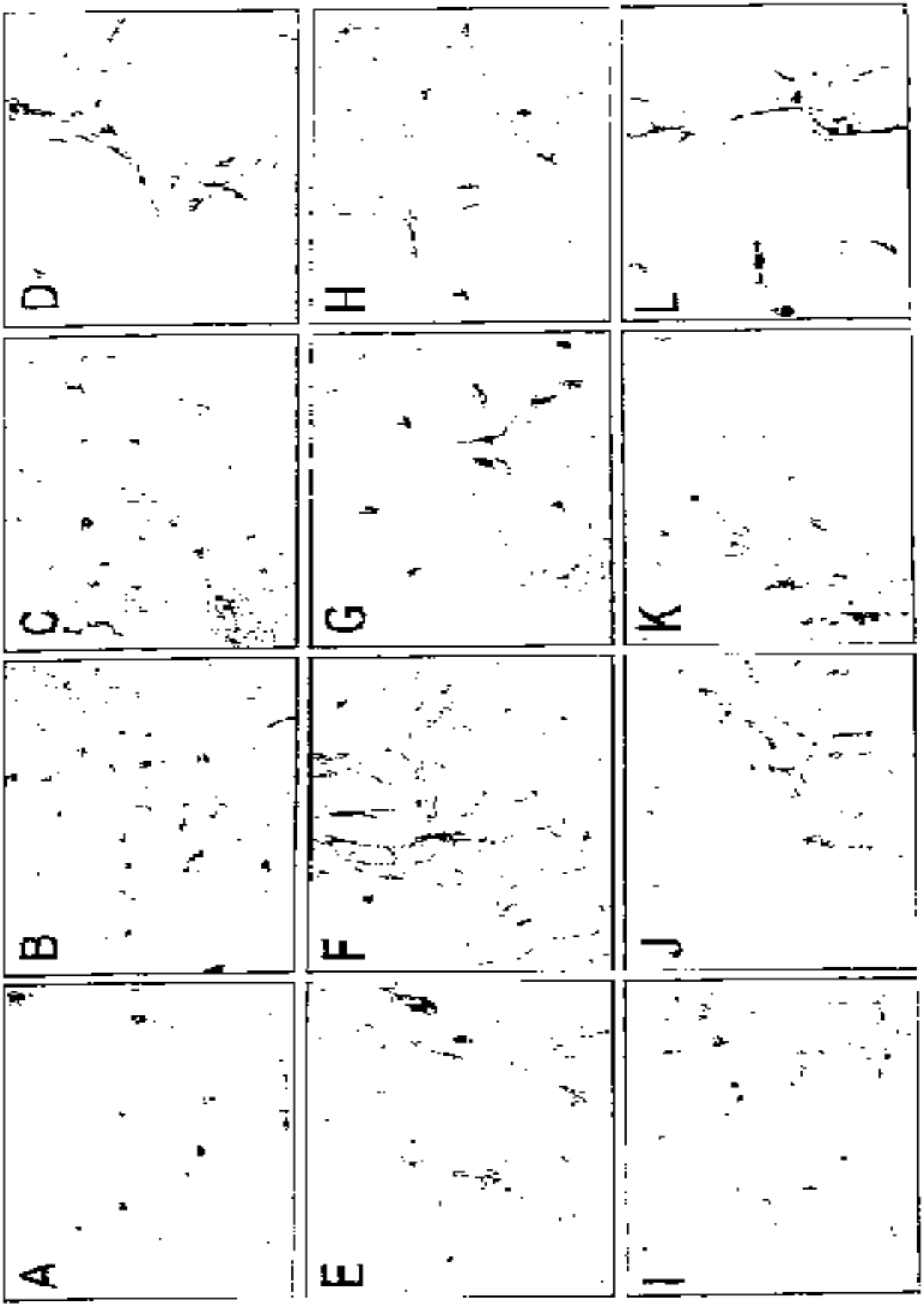
도면 12



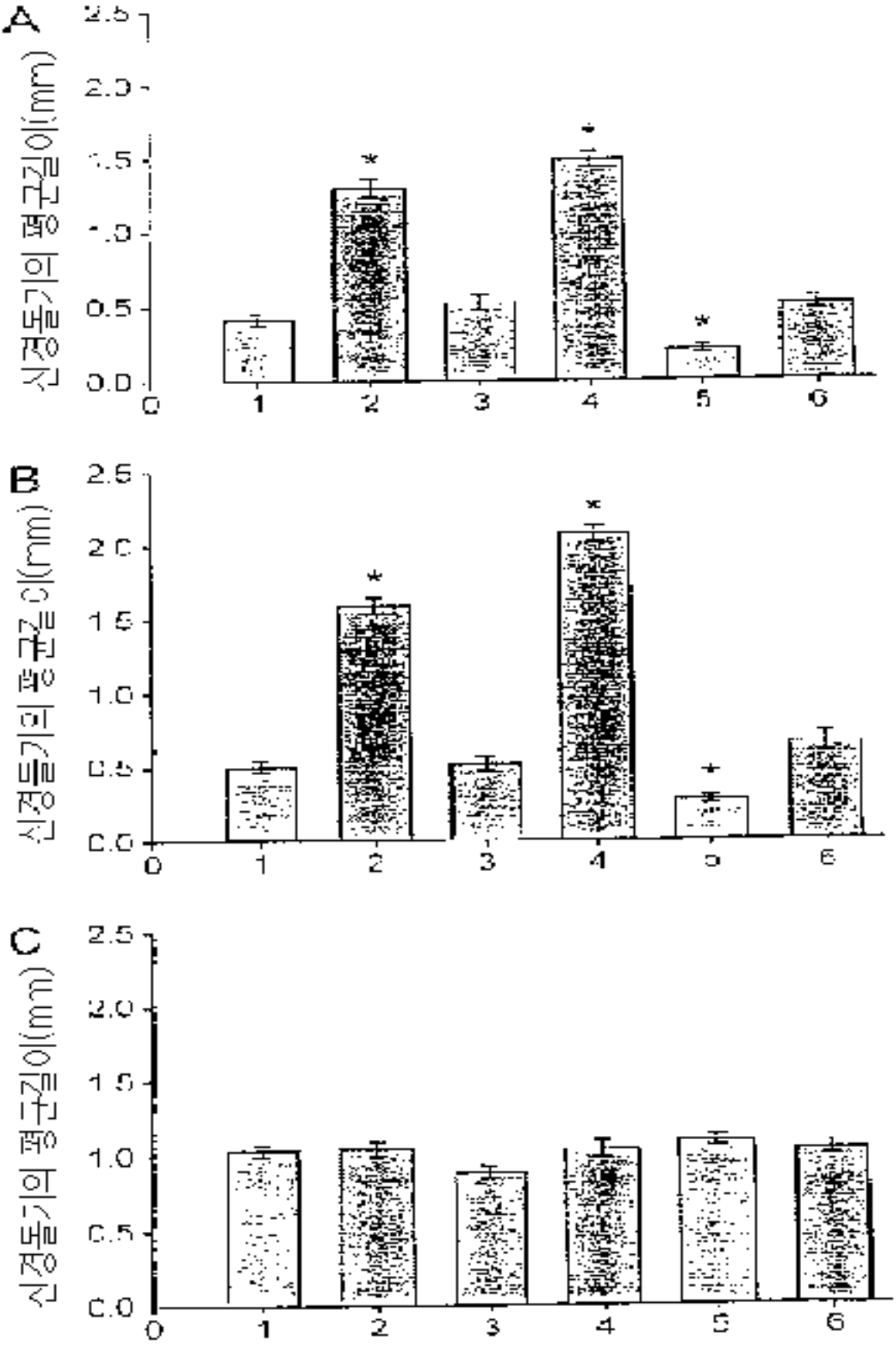
도면 13



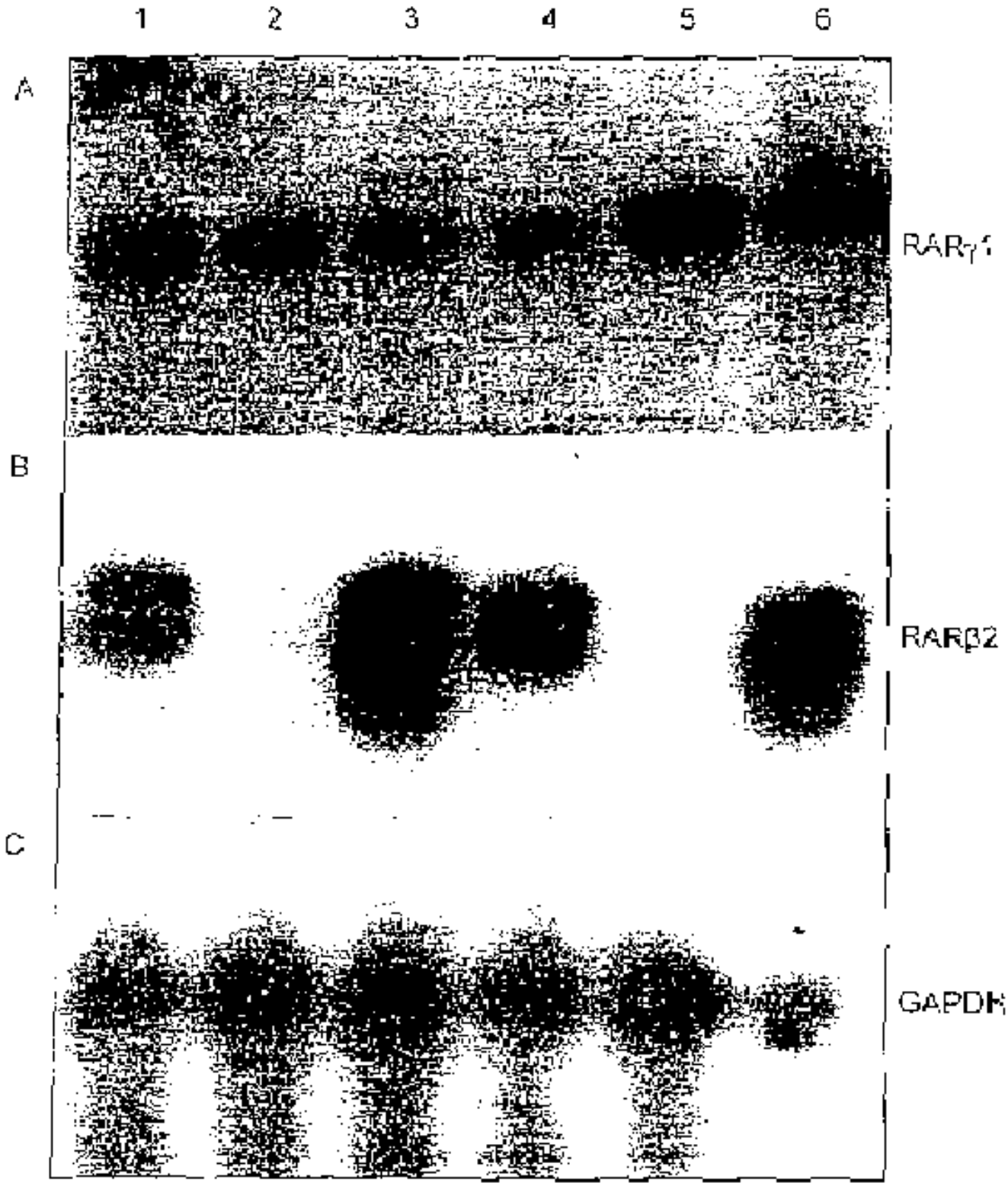
도면 14



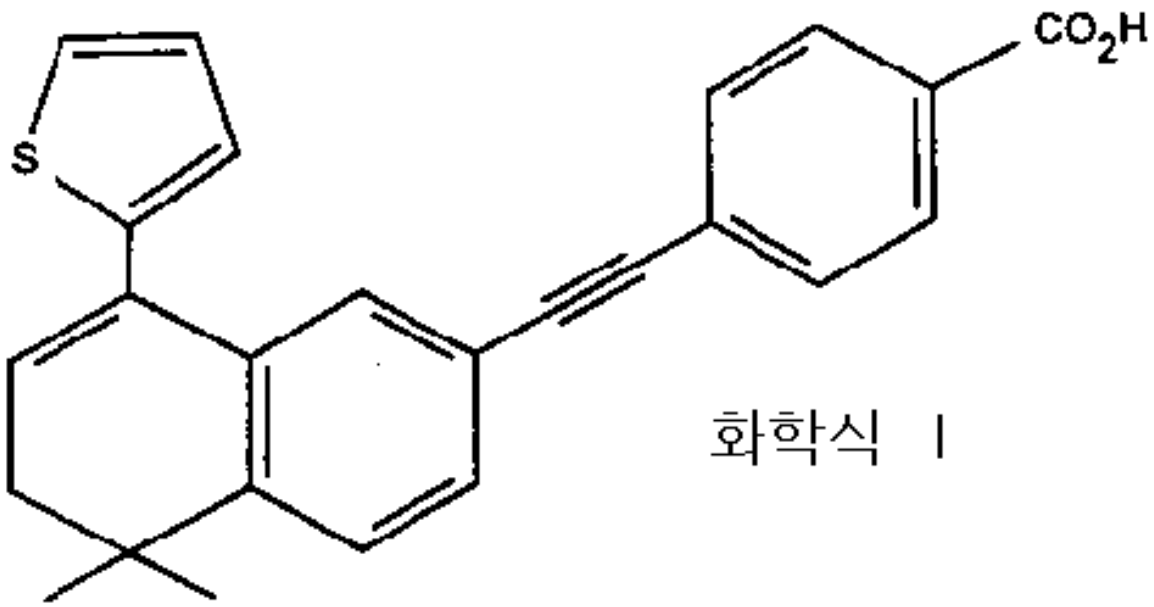
도면 15


A
신경돌기의 평균길이(mm)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
4
5
6
*
B
신경돌기의 평균길이(mm)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
4
5
6
*
C
신경돌기의 평균길이(mm)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
4
5
6

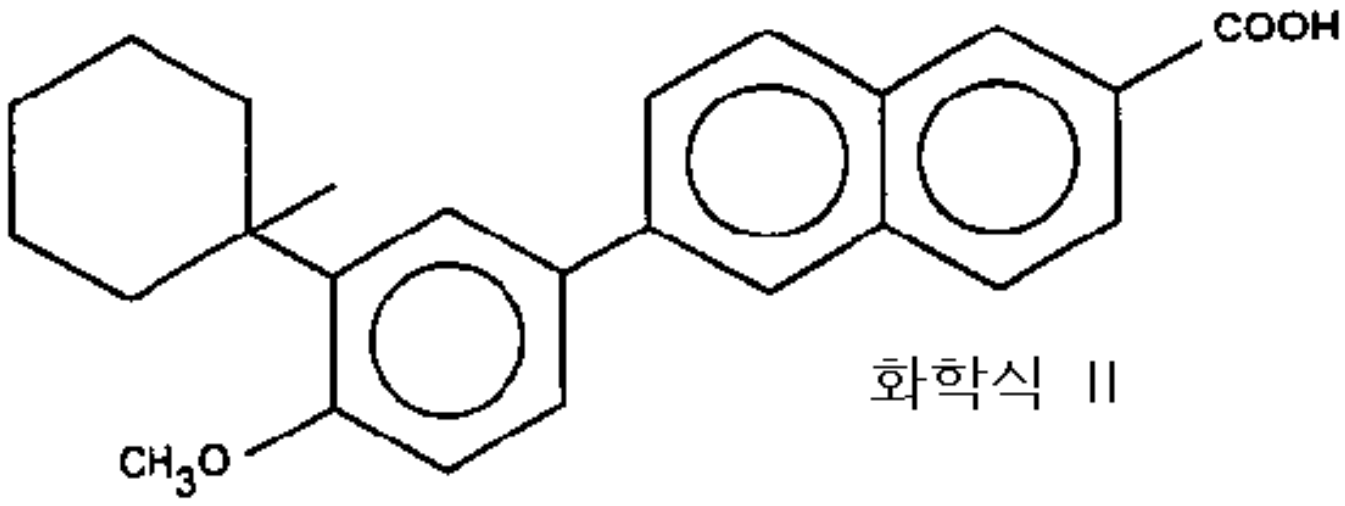
도면 16



도면 17



화학식 I



화학식 II

<110> King's College London
<120> Factor
<150> GB1999/9907461.9
<151> 1999-03-31
<160> 31
<170> KopatentIn 1.71
<210> 1
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 1
tgtagctctc tgagcactc 19
<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 2
tacgccttct tctttcccc 19
<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 3
cttttataac cagaaccggg c 21
<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 4
caagtagaag ccaggaaagt c 21
<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 5
ctaagaagac ccacacttct g 21
<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 6
aagtgaggtg aaaactggg 19
<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 7
ttcacagcct ggcataac 18
<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 8
gagaaggaag tgagccatc 19
<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 9
tctctgtgca ttcctgcttt g 21
<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 10
tggacacatg actcactacc 20
<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 11
atgttctgtc agtgagtccc 20
<210> 12
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer

<400> 12
gcatgtcaga ggacaactg 19
<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 13
agcctggaaa atgccatc 18
<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 14
ttacagcttc cttggacatg cc 22
<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 15
agatgctgag ccctagcttc 20
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 16
ttactacgca gagccactgg 20
<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 17
ggaagatgga agagggaac 19
<210> 18
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 18
caaatttact gggggttgg 19

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 19
ggctggattt tggattgaag 20
<210> 20
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 20
ttctgtcctc tcactacctt gg 22
<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 21
cattaccgcg agtcactaac 20
<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 22
cgtagacaaa atggtgaagg 20
<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 23
gactccacga catactcagc 20
<210> 24
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 24
gcttcttcat tgacccac 18
<210> 25
<211> 20

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 25
cttcaccgtc aggtctttac 20
<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 26
gcaaggaccg gaatgagaac 20
<210> 27
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 27
tctaggggca gctcagaaaa g 21
<210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 28
agaataaagg ggtagtgaag g 21
<210> 29
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 29
catcaatgtc cccacttg 18
<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 30
tgccagtagt agccacgaag 20
<210> 31
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide primer
<400> 31
tgagcagttc attccaccc 19