

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. ⁷
A61K 38/00

(11) 공개번호 특2001 - 0079503
(43) 공개일자 2001년08월22일

(21) 출원번호 10 - 2001 - 7000235
(22) 출원일자 2001년01월06일
 번역문 제출일자 2001년01월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US1999/15106
(86) 국제출원출원일자 1999년07월02일

(87) 국제공개번호 WO 2000/01440
(87) 국제공개일자 2000년01월13일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 - 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 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, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 유고슬라비아, 짐바브웨,
 AP ARIPO특허: 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 우간다, 짐바브웨,
 EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
 EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴,
 OA OAPI특허: 부르키나파소, 베냉, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기네, 기네비쑤, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 60/091,791 1998년07월06일 미국(US)

(71) 출원인 케임브리지 뉴로사이언스, 인코포레이티드
 추후제출
 미국 매사추세츠 02139 케임브리지 빌딩 700 완 켄달 스퀘어

(72) 발명자 마르치오니마크
 미국매사추세츠알링턴트윈서클24
 자르페마이클
 미국매사추세츠말보로타너스페이스25
 에벤달테드
 스웨덴에스 - 75229웁살라보에르예가탄45비

(74) 대리인 최규팔
 이은선

심사청구 : 없음

(54) 신경학적 손상 및 질환의 치료 방법

요약

본 발명은 신경 세포 사멸(변성) 및 신경변성 질환의 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 줄종 또는 최상성 뇌 손상 또는 신경변성 질환에 걸린 환자나 같은 하기 치료를 요하는 환자에게 유효량의 GDF - 1 단독 또는 뉴로트로핀 - 3 과 배합하여 투여함을 포함한다.

대표도

도 1

명세서

기술분야

본 출원은 1998년 7월 6일 출원된 미국 가출원(provisional application) 번호 제60/091,791호의 이익을 주장하며, 이는 전체가 본 명세서에서 참조로서 인용된다.

본 발명은 신경학적 손상 및 신경변성 질환의 치료 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 한 측면으로서 본 발명은 신경학적 손상 또는 신경변성 질환에 걸리거나 걸리기 쉬운 대상체(subject)를 치료하기 위한, 폴리펩타이드 GDF - 1 또는 GDF - 1 의 단편 또는 유도체 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산의 사용 방법을 포함한다. 본 발명은 또한 GDF - 1 및 뉴로트로핀(neurotrophin) - 3(NT - 3)의 배합물을 투여함을 포함하는, GDF - 1 의 배합물로 신경학적 손상 및 신경변성 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

배경기술

신경 세포 사멸(변성)은 잠재적으로 개체에 대하여 강력하고 비가역적인 효과를 야기할 수 있고, 예를 들어, 줄종(stroke), 심장 마비(heart attack) 또는 다른 뇌 또는 척수 허혈 또는 외상의 결과로서 나타날 수 있다. 또한, 신경변성 질환, 예를 들어, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병(Huntington's disease), 근위축성 측삭 경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis), 다운 증후군 및 코르사코프병(Korsakoff's disease)은 신경 세포 사멸(변성)을 포함한다.

예를 들어, 줄종 또는 다른 뉴런성 손상 후, 다른 조건에서는 개체에게 나타나는 신경 세포 사멸의 범위를 제한할 뿐만 아니라 회복을 촉진시키고, 리모델링하고(remodelling), 리프로그래밍하여(reprogramming), 신경 세포 변성 및 관련 질환을 치료하기 위한 치료법이 연구되어 왔다. 예를 들어 문헌[F. Seil, Curr Opin Neuro, 10:49 - 51(1997); N. L. Reddy et al., J Med Chem, 37:260 - 267(1994); 및 WO95/20950]을 참조하라.

어떤 성장 인자는 신경보호 성질을 나타내는 것으로 보고된 바 있다. 특히, 신경 성장 인자(NGF)는 신경 조직이 손상 또는 변성된 어떤 동물 모델에서 평가되었다. 예를 들어, 문헌[G. Sinson et al., J Neurosurg, 86(3):511 - 518(1997); 및 G. Sinson et al., J Neurochem, 65(5):2209 - 2216(1995)]을 참조하라. 골형성(Osteogenic) 단백질 - 1(OP - 1) 이 신경보호 활성에 대한 뇌 저산소증/허혈 래트 모델에서 평가되었다[G. Perides, Neurosci Lett, 1871): 21 - 24(1995)]. 글리아(glia) 세포주 - 유도 신경영양성(neurotrophic) 인자(GDNF)가 중추 뉴런의 어떤 집단에 영양(trophic) 활성을 나타내는 것으로 보고되었다[Y. Wang et al., J Neurosci, 17(11):4341 - 4348 (1997)]. 작은 분자, 예를 들어 MK - 801 또한 신경보호제로서 조사되었다. 문헌[B. Meldrum, Cereb Brain Metab Rev, 2:27 - 57

(1990); D. Choi, Cereb Brain Metab Rev, 2:27 - 57(1990)]을 참조하라.

그러나, 허혈 - 유도 뇌 손상 또는 다른 그러한 손상 및 질환에 대한 정규 임상에서 사용되는 효과적인 약물학적 치료법은 없다. 예를 들어, 문헌[Y. Wang et al., supra; G. Sinson et al., J Neurochem, 65(5):2209(1995)]을 참조하라.

따라서, 신규의 신경보호제, 특히 졸중, 심장 마비 또는 뇌 또는 척수 외상과 함께 나타나는 신경 세포 사멸(변성)의 범위를 제한하거나 그렇지 않으면 치료하거나 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 근위축성 측삭 경화증, 다운 증후군 및 코르사코프병을 치료하는 약제를 갖는 것이 매우 바람직할 것이다. 또한, 졸중 또는 다른 뉴런성 손상 후 회복을 촉진시키고, 리모델링하거나, 리프로그래밍하는 약제를 갖는 것이 바람직할 것이다.

[발명의 요약]

본 발명은 신경 세포 사멸(변성) 및 신경변성 질병의 치료 및 예방 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 중추 및 말초 신경계 양쪽에서의 증가된 뉴로트로핀 활성을 제공하고, 증가된 뉴런 생존 및 신경돌기(neurite) 성장을 촉진한다.

본 발명의 치료법은 특히 본 명세서에서 개시된 졸중, 뇌 또는 척수 손상 또는 허혈, 심장 마비, 시신경 및 망막 손상 및 허혈 및 다른 급성 - 형 상태 뿐만 아니라 만성 - 형 신경 변성 상태, 예를 들어, 간질, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 근위축성 측삭 경화증, 다운 증후군, 코르사코프병, 뇌성 마비(cerebral palsy) 및/또는 연령 - 의존 치매의 영향의 치료 또는 예방에 효과적이다.

또한, 본 발명의 방법은 졸중 또는 다른 뉴런성 손상, 신경변성 질병 또는 신경병증 후 회복을 촉진시키고, 리모델링하거나, 리프로그래밍하기 위한 치료법을 포함한다.

또한, 본 발명의 방법은 졸중 또는 다른 뉴런성 손상, 신경변성 질병 또는 신경병증에 걸린 포유동물의 기능적 능력(functional capability)을 개선하기 위하여, 예를 들어, 운동 기능 뿐만 아니라 인식 능력을 개선하기 위한 치료를 포함한다.

또한, 본 발명은 말초 신경 손상의 치료 방법을 제공한다.

본 발명의 치료 방법은 GDF - 1 또는 GDF - 1 의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 또는 GDF - 1 단편 또는 유도체를 코딩하는 핵산을 이를 필요로 하는 환자, 예를 들어, 신경 세포 사멸 또는 신경변성 질병 또는 신경병증에 걸리거나 걸렸거나 걸리기 쉬운 대상체에게 투여함을 포함한다. GDF - 1 은 도 1(서열번호 1 및 2)에 나타난 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 갖는다.

또한, 본 발명은 GDF - 1 또는 GDF - 1 의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 또는 GDF - 1 단편 또는 유도체를 코딩하는 핵산을 뉴로트로핀 - 3(NT - 3) 또는 NT - 3을 코딩하는 핵산과 배합하여 이를 필요로 하는 환자, 예를 들어, 신경 세포 사멸 또는 신경변성 질병에 걸리거나 걸렸거나 걸리기 쉬운 대상체에게 투여함을 포함하는 치료 방법을 제공한다.

놀랍게도, 본 발명에 따른 GDF - 1 및 NT - 3 의 배합 사용에 의하여 유의하게 증가된 신경보호 및 뉴런성 세포 성장 효과가 제공됨이 밝혀졌다. 예를 들어, 하기의 실시예 4 에 나타난 결과를 참조하라.

본 발명의 방법에 따라 치료될 수 있는 전형적인 환자는 신경병증, 예를 들어, 뇌 또는 척수 외상 또는 허혈, 졸중, 심장 마비, 저산소증, 저혈당증, 외과수술 - 후 신경학적 결손, 망막 조직 또는 시신경으로의 혈류 또는 영양 공급 감소, 망막 외상 또는 허혈, 시신경 손상 또는 녹내장에 걸리거나 걸리기 쉬운 사람이다.

본 발명의 방법은 졸중 또는 심장 마비 또는 심장 정지(cardiac arrest)와 관련된 신경학적 결손에 걸리기 쉽거나 걸린 사람, 뇌 또는 척수 손상에 걸리거나 걸리기 쉬운 사람, 망막 허혈 또는 변성의 영향에 걸린 사람, 또는 망막 조직 또는 시신경으로의 혈류 또는 영양 공급의 감소 또는 망막 외상 또는 시신경 손상에 걸린 사람의 치료에 특히 유용하다.

신경변성 질병에 걸린 환자는 또한, 본 발명의 방법에 따라 치료될 수 있고, 이는 간질, 파킨슨병, 헌팅턴병, 근위축성 측삭 경화증, 알츠하이머병, 다운 증후군, 코르사코프병, 뇌성 마비 및/또는 연령 - 의존 치매에 걸린 환자를 포함한다.

또한, 본 발명의 방법은 줄종 또는 다른 뉴런성 손상, 예를 들어, 외상성 뇌 또는 척수 손상에 걸린 대상체에게 회복을 촉진시키거나, 리모델링하거나, 리프로그래밍하는 치료를 포함한다. 그러한 경우, 치료제(들)를 대상체에게 손상에 따라 연장된 기간 동안, 예를 들어, 손상에 따라 적어도 약 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 또는 16주 동안 적합하게 투여할 수 있다.

본 발명의 또 다른 측면은 아래에 개시된다.

도면의 간단한 설명

도 1 은 GDF - 1을 코딩하는 DNA 의 뉴클레오타이드 서열(이 뉴클레오타이드 서열은 본 명세서에서 종종 서열번호 1 이라 칭한다) 및 GDF - 1 의 아미노산 서열(이 아미노산 서열은 본 명세서에서 종종 서열번호 2 라 칭한다)을 나타낸다. 폴리 A 테일(tail) 은 나타내지 않았다. 숫자는 클론의 5' 말단에 대한 뉴클레오타이드의 위치를 가리킨다.

발명의 상세한 설명

상기 진술한 바와 같이, 본 발명은 유효량의 GDF - 1 또는 GDF - 1 의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 또는 GDF - 1 의 단편 또는 유도체를 코딩하는 핵산을 투여함을 포함하는, 신경 세포 사멸(변성) 및 신경변성 질병의 치료 및/또는 예방 방법을 포함한다.

본 명세서에서 GDF - 1 의 " 단편" 또는 " 유도체" 는 1) 하나 이상의 아미노산 잔기가 보호(conserved) 또는 비보호된 아미노산 잔기(바람직하게는 보호된 아미노산 잔기)로 치환되고, 이렇게 치환된 아미노산 잔기가 유전자 코드에 의하여 코딩되거나 그렇지 않은 것일 수 있는 펩타이드, 또는 ii) 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환기를 포함하는 펩타이드, 또는 iii) 성숙한 단백질이 다른 화합물, 예를 들어, 폴리펩타이드의 반감기를 증가시키는 화합물(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜)과 융합된 펩타이드를 칭한다. 따라서, 본 발명의 방법에 따라 사용하기 위한 단편 또는 유도체는 전단백질(protein) 부분의 분열(cleavage)에 의하여 활성화되어 활성의 성숙한 폴리펩타이드를 생성할 수 있는 전단백질을 포함한다. 또한, GDF - 1 은 잠재적인 N - 링크된 글리코실화 부위를 갖는다. 그러한 글리코실화는 부분적으로 또는 전체적으로 제거되거나 또는 변형되어 GDF - 1 유도체 또는 단편을 생성할 수 있다.

본 발명의 GDF - 1 단편 및 유도체는 GDF - 1 의 부위를 유일하게 동정할 수 있는 충분한 길이이다. 따라서, GDF - 1 단편은 바람직하게는 적어도 8 개의 아미노산, 통상적으로 적어도 약 12 개의 아미노산, 더욱 통상적으로 적어도 약 15 개의 아미노산, 더욱 전형적으로 적어도 약 30 개의 아미노산, 더욱더 전형적으로 적어도 약 50 또는 70 개의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 바람직한 단편 또는 유도체는 서열번호 2(도면의 도 1에서 나타낸 아미노산 서열)와 적어도 약 70% 의 상동성(서열 동일성), 더욱 바람직하게는 서열번호 2와 약 80% 이상의 상동성, 가장 바람직하게는 서열번호 2 와 약 85 내지 90 % 이상의 상동성을 갖는 것을 포함한다. 본 명세서에서 GDF - 1 에 관한 서열 동일성 또는 상동성은 서열번호 2 와 동일한 GDF - 1 단백질 또는 그의 단편 또는 유도체의 아미노산 서열의 백분율로서 언급되고, 이후 최대 백분율의 상동성에 도달하기 위하여 필요한 어떤 차이를 도입한다.

본 발명의 방법에서 사용하기 위한 GDF - 1 단편 및 유도체는 바람직하게는 표준 신경보호 분석, 예를 들어, 하기의 실시예 1 의 생체내 뇌 허혈 분석에서 우수한 활성을 나타낸다. 상기 분석은 다음의 단계 a) 시험용 래트에게 우측 대뇌 피질에 병소의 허혈 경색을 유도하기 전 3일 동안 단백질 단편 또는 유도체 또는 담체만의 연속적 정맥내 주입; 및 b) 허혈 경색을 유도한 후 24 시간을 포함하며, 각각의 시험 동물의 경색 부피는 영상 분석에 의하여 측정한다. 상기 분석에서, 바람직하게는, 본 발명의 단백질 단편 또는 유도체는 담체 - 처리 동물에 대하여 적어도 약 10% 의 경색 부피 감소, 더욱 바람직하게는 담체 - 처리 동물에 대하여 약 20% 의 경색 부피 감소, 가장 바람직하게는 약 25% 의 경색 부피

감소를 제공한다. 생체내 뇌 허혈 분석에 대한 본 명세서의 참조는 상기 단계 a) 및 b) 의 분석을 참조하기 위한 것이고, 이는 하기의 실시예 1에서 더욱 충분히 기술된다.

상기 논의한 바와 같이, GDF - 1 핵산 단편 및 유도체가 또한 본 발명의 방법에서 사용하기 위하여 제공된다. 그러한 분획 및 유도체는 전형적으로 하기 적당하게 엄격한 조건(본 명세서에서 " 정상적으로 엄격한" 조건이라 칭한다) 하에서 서열번호 1 의 서열에 결합하기에 위한 충분한 길이이다: 0.8M 염수/0.08M 소듐 시트레이트(SSC) 완충액 중의 20% 포름아마이드를 포함하는 혼성화 완충액을 37°C에서 사용하고, 나머지가 37°C에서 상기 SSC 완충액으로 한번 세척하는 경우 결합한다.

본 발명의 바람직한 GDF - 1 핵산 단편 및 유도체는 하기 고도로 엄격한 조건(본 명세서에서 " 고도로 엄격한" 조건이라 칭한다) 하에서 서열번호 1 의 서열에 결합할 것이다: 0.9M 염수/0.09M 소듐 시트레이트(SSC) 완충액 중의 30% 포름아마이드를 포함하는 혼성화 완충액을 45°C에서 사용하고, 나머지가 45°C에서 상기 SSC 완충액으로 두번 세척하는 경우 결합한다.

GDF - 1 핵산 단편 및 유도체는 바람직하게는 적어도 20 개의 염기쌍, 더욱 바람직하게는 적어도 약 50 개의 염기쌍을 포함해야 하고, 가장 바람직하게는 본 발명의 핵산 단편 또는 유도체는 적어도 약 100, 200, 300 또는 400 개의 염기쌍을 포함한다. 일부 바람직한 구체예에서, 핵산 단편 또는 유도체는 즉시 동정할 수 있는 일부 부위, 예를 들어, 방사뉴클레오타이드, 형광 또는 다른 화학적 인식자(identifier)에 결합한다.

본 발명의 특히 바람직한 GDF - 1 단편 및 유도체는 서열번호 1 (도면의 도 1 에 나타난 핵산 서열)에 대하여 실질적인 상동성(서열 동일성), 바람직하게는 서열번호 1 에 대하여 적어도 약 70%의 상동성(서열 동일성), 더욱 바람직하게는 서열번호 1 에 대하여 약 80% 이상의 상동성, 가장 바람직하게는 서열번호 1 에 대하여 적어도 약 85, 90 또는 95%의 상동성을 갖는다. 도면의 도1 에 나타난 GDF - 1 의 핵산 서열에 대한 서열 동일성 또는 상동성은 본 명세서에서 서열번호 1 과 동일한 GDF - 1 핵산 단편 또는 그의 유도체의 염기 서열의 백분율로서 언급되고, 이후 최대 백분율의 상동성에 도달하기 위하여 필요한 어떤 차이를 도입한다.

본 발명의 단리된 GDF - 1 및 펩타이드 단편 또는 유도체는 바람직하게는 재조합 방법에 의하여 제조된다. 하기의 실시예 3 에 개시된 방법을 참조하라. GDF - 1 의 생성 및 발현을 위하여 매우 다양한 분자 및 생화학적 방법을 이용할 수 있다; 문헌[Molecular Cloning. A Laboratory Manual(2nd Ed., Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor), Current Protocols in Molecular Biology(Eds. Ausubel, Brent, Kingston, More, Feidman, Smith and Stuhl, Greene Publ, Assoc., Wiley - Interscience, NY, N.Y. 1992)]에 개시되어 있는 방법 또는 그렇지 않으면 당업계에 공지된 다른 방법을 참조하라. GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체의 크기, 성질 및 양에 따라, 예를 들면, GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체를 화학적 합성에 의하여, 또는 더욱 바람직하게는 박테리아, 예를 들어, E. coli 및 진핵생물(eukaryote), 예를 들어, 이스트, 배쿨로바이러스(baculovirus)에서의 발현에 의하여, 또는 포유동물 세포 - 기초 발현 시스템 등에 의하여 수득할 수 있고, 또는 대신에 트랜스젠(transgenic) 동물에 의하여 제조할 수 있다. 더욱 특히, GDF - 1을 코딩하는 DNA 세그먼트(segment) 및 벡터를 포함하는 재조합 DNA 분자, 또는 그의 단편 또는 유도체를 작제할 수 있다. 적합한 벡터는 예를 들어, 곤충 세포에서의 발현을 위한 배쿨로바이러스 - 유도 벡터[참조: Penock et al., Mol. Cell. Biol., 4:399 - 406(1984)], 박테리아에서의 발현을 위한 T7 - 기초 발현 벡터[참조: Rosenberg et al., Gene, 56:125 - 135(1987)] 및 포유동물 세포에서의 발현을 위한 pMSXND 발현 벡터[Lee and Nathans, J. Biol. Chem., 263:3521 - 3527(1988)]를 포함한다. DNA 세그먼트는 조절 요소(regulatory element), 예를 들어, 프로모터(예컨대, 폴리헤드린(polyhedrin), T7 또는 메탈로티오네인(metallothionein, Mt - I) 프로모터) 또는 폴리펩타이드의 분비성(secretory) 발현을 위한 리더(leader) 서열과 사용가능하게 링크된 벡터 중에 존재할 수 있다. GDF - 1을 코딩하는 DNA를 포함하는 재조합 DNA 분자 또는 그의 단편 또는 유도체는 공지된 방법에 의하여 적합한 숙주 세포에 도입할 수 있다. 적합한 숙주 세포는 예를 들어, 원핵생물(prokaryote), 예를 들어, E. coli, 바실러스 서

브틸루스 등, 및 원핵생물, 예를 들어, 동물 세포, 및 이스트 변종(strain), 예를 들어, S. 세레비시아에(cerevisiae)를 포함한다. 포유동물 세포는 예를 들어, J558, NSO, SP2 - 0 또는 CHO 가 바람직할 수 있다. 일반적으로 통상적인 배양 조건을 사용할 수 있다. 문헌[Sambrook, supra]을 참조하라. 이후, 안정하게 형질전환 또는 형질감염된 세포 주를 선택할 수 있다. 이후, 발현된 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체를 분리할 수 있고, 공지된 방법으로 정제할 수 있다. 통상적으로 배양기는 원심분리하고, 상등액을 결합(affinity) 또는 면역결합(immunoaffinity) 크로마토그래피, 예를 들어, 프로틴(Protein) - A 또는 프로틴 - G 결합 크로마토그래피 또는 GDF - 1 에 결합하는 모노클로날 항체의 사용을 포함하는 면역결합 프로토콜로 정제한다.

본 발명의 방법에서 사용하는 GDF - 1 핵산은 전형적으로 분리될 수 있고, 핵산이 천연 염색체 상에 결합하는 것 이외의 다른 뉴클레오타이드에 결합하는 서열을 포함하고, 통상적으로 주어진 분획에 존재하는 전체 핵산에 대하여 적어도 약 0.5중량%, 바람직하게는 적어도 약 2중량%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 5중량%로 구성됨을 의미한다. 부분적으로 순수한 핵산은 주어진 분획에 존재하는 전체 핵산에 대하여 적어도 약 10중량%, 바람직하게는 적어도 약 30중량%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 60중량%로 구성된다. 순수한 핵산은 주어진 분획에 존재하는 전체 핵산에 대하여 적어도 약 80중량%, 바람직하게는 적어도 약 90중량%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 95중량%로 구성된다.

상기 논의한 바와 같이, 유의하게 증가된 신경보호 및 뉴런성 세포 성장 효과가 GDF - 1 및 뉴로트로핀 - 3(NT - 3)의 배합 사용으로부터 야기될 수 있음이 밝혀졌다. NT - 3 은 상업적으로[예를 들어, Pepro Tech Inc.,; Rocky Hill, NH, 또는 다른 판매원] 얻을 수 있고, 뉴로트로핀 - 3(NT - 3)의 핵산 및 아미노산 서열은 공지되어 있다. 문헌[EP704219 2, EP0441947 및 WO91/03569]을 참조하라.

배합 치료에 있어서, GDF - 1 및 NT - 3 은 동일 또는 상이한 약제학적 제제로 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 그러나, 순차적으로 투여되는 경우, 목적하는 증가된 신경보호 및 뉴런성 세포 성장 효과의 약물학적 효과를 달성하기 위하여 바람직하게는 GDF - 1 및 NT - 3 이 충분한 시간 이내에 투여된다.

상기에서 논의한 바와 같이, NT - 3 단백질 또는 NT - 3을 코딩하는 핵산을 환자에게 투여할 수 있다. NT - 3 폴리펩타이드를 환자에게 투여하는 것이 일반적으로 더욱 바람직하다. NT - 3을 코딩하는 핵산은 바람직하게는 적어도 부분적으로 순수하다. 즉, NT - 3 핵산은 주어진 분획에 존재하는 핵산에 대하여 적어도 약 10중량%, 바람직하게는 적어도 약 30중량%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 60중량%로 구성된다. 더욱 전형적으로 NT - 3 핵산은 실질적으로 순수할 것이다. 즉, 핵산은 주어진 분획에 존재하는 전체 핵산에 대하여 적어도 약 80중량%, 바람직하게는 적어도 약 90중량%, 및 더욱 바람직하게는 적어도 약 95중량%로 구성된다.

상기 논의한 바와 같이, 본 발명의 방법은 포유동물, 특히 인간을 포함하는, 하기의 치료를 요하는 대상체에게 유효량의 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 그를 코딩하는 핵산을 투여하고 임의로 NT - 3 또는 NT - 3을 코딩하는 핵산을 공동 - 투여함을 포함하는, 졸중, 심장 마비, 외상성 두부 또는 뇌 손상, 척수 손상, 간질의 결과를 포함하는 신경학적 질환 또는 신경변성 질환의 치료 및 예방하는 방법을 포함한다.

특히, 본 발명은 예를 들어, 저산소증, 저혈당증, 뇌 또는 척수 허혈, 뇌 또는 척수 외상, 졸중, 심장 마비 또는 물에 빠짐(drowning)으로부터 야기되는 신경 세포 사멸(변성)의 치료 및/또는 예방 방법을 제공한다. 치료를 위한 전형적인 후보는 예를 들어, 심장 마비, 졸중 및/또는 심장 정지, 신경학적 결손에 걸린 사람, 뇌 또는 척수 손상 환자, 뇌 허혈이 잠재적인 합병증인 주요 외과 수술, 예를 들어, 심장 수술을 받은 환자 및 예를 들어, 혈류 중의 기체 색전으로 인한 잠함병(decompression sickness)에 걸린 잠수부와 같은 환자를 포함한다. 치료를 위한 후보자는 또한 체외 순환을 포함하는 수술 조치, 예를 들어 바이패스(bypass) 조치를 받은 환자를 포함할 수 있다.

본 발명은 또한, 뇌 또는 척수 빈혈 또는 상해가 잠재적으로 위험성이 있는 수술 또는 다른 과정을 겪는 환자에게 임의적으로 NT-3 또는 NT-3을 코딩하는 핵산과 함께 공동투여 GDF-1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 그를 코딩하는 핵산을 투여하는 것을 포함하는 치료 방법을 제공한다. 예를들면, 경동맥 내막절제는 경동맥의 아테롬 경화증을 치료하는데 사용되는 수술 과정이다. 그 과정과 관련된 주된 위험은 수술 중 전색 동맥류 또는 출혈을 초래할 수 있는 뇌 내의 혈류의 증가로 인한 고혈압의 위험을 포함한다. 따라서, 유효량의 치료제를 수술 전, 수술 중 또는 수술 후에 투여함으로써 경동맥 내막절제와 관련된 이러한 위험 또는 수술 후의 다른 신경병적 결함을 경감시킬 수 있다.

본 발명은 또한, 급성 뇌세포사 및 신경병적 증상으로부터의 회복을 증진시키고 촉진하거나 기능을 하게 하는데 효능적이다. 따라서, 발작 또는 다른 신경병성 상해를 앓는 환자에게, 적절하게는 상기 기술된 바와 같은 연장된 기간동안 GDF-1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 그를 코딩하는 핵산을, 임의적으로는 NT-3 또는 NT-3을 코딩하는 핵산과 함께 공동투여함으로써 치료, 리모델링(remodeling), 리프로그래밍(reprogramming)을 증진시킬 수 있다. 본 발명의 치료제는 또한 수술을 한 환자에게 일어날 수 있는 신경병적 결함으로부터의 회복을 증진시키기 위해 수술 후에 투여될 수 있다.

행동학적 결과 연구가 특정 GDF-1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 그를 코딩하는 핵산의 급성 신경세포사 및/또는 신경병성 이상으로부터 회복, 치료 및 리모델링을 증진시키는데 효능이 있는지 평가하는데 특히 유용할 수 있다. 적절한 행동 분석은 이어지는 실시예 2에 개시되어 있다. 또한 적절한 행동 분석을 위해, [J.Aronowski et al., J cereb Blood Flow Metab, 16:705 - 713(1996); G.Sinson et al., J Neurochem, 65(5):2209 - 2214(1995); T.K. McIntosh et al., Neuroscience, 28:233 - 244(1989); 및 T.K. McIntosh et al., J Neurotrauma, 10:373 - 384(1993)]을 참조한다.

본 발명은 또한 예를들면, 대동맥 관상동맥 바이패스 이식 수술 및 또는 대동맥변대체 수술로 발병되는 신경병적 결함을 예방하는 방법을 포함한다. 이 방법은 상기 수술 과정을 겪는 환자에게 임의적으로는 NT-3 또는 NT-3을 코딩하는 핵산과 함께 공동투여하여, GDF-1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 그를 코딩하는 핵산의 유효량을 투여하는 것을 포함할 것이다. 적절하게는 투여는 수술 전, 수술 중 또는 수술 후이다.

본 발명은 또한 심근 경색, 환자에게 빈혈 상해를 일으킬 수 있는 과정을 겪는 환자의 신경병적 상해를 치료하고 예방하는 방법을 제공한다. 이 방법은 상기 수술 방법으로 고생하는 환자에게 임의적으로는 NT-3 또는 NT-3을 코딩하는 핵산을 공동투여하여 GDF-1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 그를 코딩하는 핵산의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 전형적으로 투여는 수술 전 또는 수술 중이다.

본 발명은 또한, 말초 신경의 손상으로 고생하거나 이에 민감한 대상에게 임의적으로는 NT-3 또는 NT-3을 코딩하는 핵산과 함께 공동투여하여 GDF-1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 그를 코딩하는 핵산을 투여하는 것을 포함하는, 말초 신경 손상을 치료하고 예방하는 방법을 제공한다.

또한, 암 환자, 당뇨병이 있는 환자, 절단수술을 받은 환자 및 신경병성 통증을 겪을 수 있는 다른 사람이 겪을 수 있는 바와 같은 신경병성 통증을 치료 또는 예방하는 방법이 제공된다. 이들 치료 방법은 유효량의 GDF-1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 그를 코딩하는 핵산을 상기 치료가 필요한 환자에게 투여함을 포함한다.

본 발명은 또한, 망막 허혈 또는 변성 및 그로 인한 시력 상실에 대한 치료 및 예방 방법을 제공한다. 예를 들어, GDF-1 또는 그의 단편 또는 유도체를 임의로 NT-3 또는 NT-3을 코딩하는 핵산과 배합하여 비경구적으로 또는 본 명세서에 기술한 바와 같이 다른 방법으로, 망막 기능에 부작용을 일으킬 수 있는 허혈성 손상, 예를 들어, 유의하게 증가된 안압, 망막 동맥 또는 정맥 폐색과 같은 질병, 당뇨병 또는 다른 허혈성 안과-관련 질병에 걸리거나 걸리기 쉬운 대상체에게 투여할 수 있다. 허혈-후 투여는 또한 망막 손상을 제한할 수 있다. 본 발명은 또한, 망막 조직 또는 시신경으로의 혈류 또는 영양 공급의 감소에 대한 치료 및 예방 또는 망막 외상 또는 시신경 손상의 치료 또는 예방 방법을 포함한다.

본 발명의 상기 치료 방법에 따른 치료의 대상체는 죽상경화증(atherosclerosis), 모세 정맥 부전, 폐색성 동맥 또는 정맥 막막증, 노인성 반(macular) 변성, 포낭성 반 부종 또는 녹내장과 관련된 망막 허혈, 또는 포유동물의 종양 또는 손상과 관련될 수 있는 망막 허혈에 걸리거나 걸리기 쉬운 수 있다. 유리체내(intravitreal) 주사는 또한, 허혈성 망막에 대하여 더욱 직접적인 치료를 제공하기 위한 바람직한 투여 경로일 수 있다.

본 발명은 또한, 포유동물, 특히 인간을 포함하는 대상체에게 유효량의 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체를 질병 치료에 유효한 양으로 투여함을 포함하는 코르사코프병, 만성 알콜중독 - 유도 상태의 치료 방법을 제공한다. 본 발명의 화합물은 코르사코프병과 관련된 세포 손실, 출혈 및/또는 아미노산 변화를 약화시키는데 유용할 것으로 예상된다.

본 발명은 또한, 포유동물, 특히 인간을 포함하는 대상체에게 유효량의 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체를 상태 치료에 유효한 양으로 투여함을 포함하는, 간질, 구토, 마약중독 금단 증상 및 연령 - 의존 치매에 걸리거나 걸리기 쉬운 사람의 치료 방법을 포함한다.

어떤 경우에는, 특히 환자가 즉시 치료를 요하는 급성 신경학적 손상에 걸리거나 걸리기 쉬운 경우에는 핵산보다 폴리펩타이드(즉, GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체 또는 NT - 3)가 대상체에게 바람직하게 투여될 것으로 평가될 것이다. 예를 들어, 활성 치료제를 가능한 한 빨리 송달하는 것이 바람직한 졸중, 심장 마비, 외상성 뇌 손상 등에 걸린 환자에게는 폴리펩타이드의 투여가 바람직할 수 있다.

본 발명의 치료학적 방법에서, NT - 3 및 GDF - 1 펩타이드 및 핵산을 대상체, 예를 들어, 포유동물, 특히 인간에게 수많은 경로, 예를 들어, 비경구적(피하, 근육내, 정맥내 및 피내 포함), 경구적(흡입 포함), 직장내, 비내, 질내 및 국소적(구강 및 설하 포함) 투여 중 어느 것으로 적합하게 투여할 수 있다. NT - 3 및 GDF - 1 단백질 또는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 대상체에게 단독으로 또는 펩타이드 또는 핵산을 하나 이상의 허용가능한 담체 및 임의로 다른 치료학적 성분과 함께 포함하는 약제학적 조성물의 일부로서 투여할 수 있다. 담체는 제제 중의 다른 성분과 적합하고, 그의 대상체에게 유독하지 않다는 의미에서 "허용가능" 하여야 한다.

GDF - 1 단백질 또는 그의 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체, 및 임의적으로는 NT - 3 또는 핵산은 단독으로 활성 약제로서 대상체에게 투여될 수 있거나 그 제제는 OP - 1 또는 소분자 치료제와 같은 다른 치료제, 또는 다른 화합물과 함께 배합되어 사용될 수 있다.

GDF - 1 또는 GEF - 1 단편 또는 유도체 또는 NT - 3을 코딩하는 핵산이 일반적으로 공지된 방법으로 환자에게 투여될 수 있다. 예를들면, 핵산은, 표적세포에 의해서 핵산을 흡수하고 발현시킬 수 있게 하는 방법에 의해 표적세포내로 도입될 수 있다. 이 방법은 벡터, 리포솜, 네이키드 DNA, 어쥬번트 - 어시스티드(assisted) DNA, 카테터(catheters)등을 포함할 수 있다. 바람직하게는 투여되는 핵산은 투여시 발현을 증진시키는 적절한 분비성 서열을 코딩한다. 본 발명에 따른 핵산을 투여하기 위한 적절한 벡터로는 WO 93/04701호에 기재된 표적 부위(예로, 세포 표면 수용체에 대한 리간드), 및 핵산 결합 부위(예, 폴리라이신)를 갖는 화학 컨쥬게이트, 바이러스 벡터(예, DNA 또는 RNA 바이러스 벡터), PCT/US95/02140(WO 95/22618)호에 기재된 표적 부위(예, 표적 세포에 특이적인 항체) 및 핵산 결합 부위(예, 프로타민)을 함유하는 융합 단백질, 플라스미드, 파지등을 갖는다. 이 벡터는 염색체, 비 - 염색체이거나 합성물질일 수 있다.

바람직한 벡터로는 바이러스 벡터, 융합 단백질 및 화학 컨주게이트를 포함한다. 레트로바이러스 벡터는 몰로니(moloney) 뮤린 백혈병 바이러스를 포함한다. DNA 바이러스 벡터가 바람직하다. 이 벡터들은 오토폭스(orthopox) 또는 아비폭스(avipox) 벡터와 같은 폭스 벡터(pox vectors), 허피스 심플렉스(I) 바이러스(HSV) 벡터(herpes simple (I) virus vector)와 같은 허피스 바이러스 벡터[A.I.Geller et al., J. Neurochem, 64:487(1995); F.Lim et al., in DNA cloning: Mammalian Systems, D.Glover, Ed.(Oxford Univ. Press, Oxford England)(1995); A.I.Geller et al., Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A.: 90 7603(1993); A.I.Geller et al., Proc Natl. Acad. Sci.: USA: 87:1149(1990)], 아데노바이러스 벡터[LeGal LaSalle et al., Science, 259:988(1993); Davidson, et al., Nat. Genet., 3:219(1993); Yang et al., J. Virol., 69:2004(1995)] 및 아데노-결합된 바이러스 벡터[Kaplitt, M.G., et al., Nat. Genet., 8:148(1994)]를 포함한다.

폭스 바이러스 벡터는 유전자를 세포질내로 도입시킨다. 아비폭스 바이러스 벡터는 단기간동안에 핵산을 발현시킨다. 아데노바이러스, 아데노-결합된 바이러스 벡터 및 허피스 심플렉스 바이러스(HSV) 벡터가 핵산을 신경세포내로 도입시키는 데 바람직하다. 아데노바이러스 벡터(약 2달)가 아데노-결합된 바이러스 벡터(약 4달)보다 좀 더 단기간동안 발현시키고, 아데노-결합된 바이러스는 HSV보다도 좀 더 단기간이다. 선택되는 특정 벡터는 표적 세포 및 처리되는 특정 조건에 의존한다. 예를 들면, 감염, 트랜스펙션, 형질도입, 형질전환과 같은 표준 기술에 의해 도입될 수 있다. 유전자 도입 방식의 예로서, 네이키드 DNA, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 침전, DEAE 덱스트란, 일렉트로포레이션, 원형질체 융합, 리포펙션, 세포 미세주입법 및 바이러스 벡터를 포함한다.

벡터는 본질적으로 원하는 표적세포를 표적화하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 스테레오타식 주사는 벡터(예, 아데노바이러스, HSV)를 원하는 위치로 유도시키는데 사용될 수 있다. 또한, 입자는 싱크로메드 인퓨전 시스템(SynchroMed Infusion System)과 같은 미니펌프(minipump) 주입 시스템을 사용하여 뇌내실내 주입에 의해 전달될 수 있다. 대류(convection)를 의미하는 대량유동에 기초한 방법이 거대 분자를 뇌의 연장된 부위로 전달하는데 효능적임이 증명되었고 벡터를 표적세포에 전달하는데 유용하다는 것이 증명되었다(Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:2076-2080(1994); Morrison et al., Am. J. Physiol., 266:292-305(1994)). 사용가능한 다른 방법은 카테테르, 정맥내, 비경구, 복강내 및 피하 주사, 및 경구 또는 다른 공지된 투여 경로를 포함한다.

비경구용 제제는 액체 용액 또는 현탁액 형태일 수 있다; 경구 투여용 경우 제제는 정제 또는 캡슐 형태일 수 있다; 비강내 투여용 제제는 분제, 비강 드롭, 또는 에어로졸 형태일 수 있다.

당해 기술에서 제제를 제조하는 공지된 방법은 예를 들면 "Remington's Pharmaceutical Science."에 공개되어 있다. 비경구 투여용 제제는 예를 들면 부형제로서 멸균수 또는 염수, 폴리에틸렌 글라이콜과 같은 폴리알킬렌 글라이콜, 식물성 오일, 또는 수소화된 나프탈렌을 함유할 수 있고, 생화합성이고, 생분해성인 락티드 중합체, 또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체가 본 인자의 방출을 조정하는데 사용될 수 있다. 다른 잠재적으로 유용한 비경구 전달 시스템은 에틸렌-비닐 아세트 공중합체 입자, 삼투 펌프, 이식 가능한 주입 시스템, 및 리포솜을 포함한다. 흡입용 제제는 락토오스와 같은 부형제를 함유할 수 있거나, 예를 들면, 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르, 글라이코초콜릿 및 디옥시초콜릿을 함유하는 수용액이거나, 비강 드랍 형태의 투여용 유액이거나, 비강내로 투여되는 것은 겔일 수 있다. 비경구 투여용 제제는 또한 구강 투여용으로 글라이코초콜릿을, 직장 투여용으로는 메톡시살리실레이트를, 또는 질 투여용으로는 시트르산을 포함할 수 있다.

특정 대상에 투여되는, NT-3 또는 GDF-1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 이 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산의 농도는 치료받은 상태, 투여 방식 및 부위, 대상의 나이, 체중, 성별 및 건강을 포함하는 다수의 문제 및 당업자에 의해 인식되는 다른 인자에 따라 변환이다. 주어진 투여 프로토콜에 대한 최적의 투여 비율은 당업자에 쉽게 결정될 수 있다.

본 명세서에서 언급하는 모든 문서는 본 명세서에 참조 문헌으로 인용된다. 본 발명은 또한 하기 실시예에 의해 예시된다. 이들 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위해 제공되며 그의 범위로서 제한되는 것은 아니다.

실시예

실시에 1: 생체내에서의 신경보호성 분석.

하기 분석에 따라 GDF - 1 및 GDF - 1 단편 및 유도체의 신경보호적인 효능을 평가할 수 있었다.

성숙한 수컷 롱 - 이반(Long - Evans) 래트(Charles River, 250 - 350g)에 음식과 물을 임의로 제공하였다. 동물을 나트륨 펜토바르비탈(60mg/kg,i.p.)으로 마취시키고 정위고정성 뇌수술의 머리 홀더(David Kopf Instruments, Tujunga, CA)에 위치시켰다. 중앙을 절개하여 두개골의 배면을 노출시키고 브레그마(bregma)에 측부로 1.6mm 및 뒤로 0.9mm에 우뇌실에 작은 버(burr) 홀(직경 2 mm)을 뚫었다. 이어서, 스테인리스 스틸 캐놀라(cannula)(I.D. 0.020" , O.D.0.028" , 2 cm 길이)를 정위법적으로 두개골 표면 밑으로 4.4mm깊이까지 뇌실에 삽입하였다. 관끝 1 - 1.6cm정도를 적절하게 90 ° 정도 구부리고, 등쪽 피하에 이식되는 미니 - 삼투 펌프(Alzet 1007D, 100 μ l 전체 부피, 펌프 속도 = "0.5 μ l/시간;Alza" Corp., Palo Alto, CA)에 연결되는(폴 사용) 폴리에틸렌 관(I.D. 0.76mm, O.D. 1.22mm, 10 cm 길이)에 연결시켰다. 캐놀라를 두개골내 삽입된 두개의 작은 기계 나사(슬롯된(slotted) 1/8" 스테인리스 스틸)에 부착되어 있는 치아교정 합성수지(L.D. Culk Co., Milford, DE)로 적절히 두개골에 고정시킬 수 있었다. 펌프, 관 및 캐놀라는 삽입 전에 인퓨세이트(infusate) 용액으로 프라임(prime)시켰다; 이식 중에 3 - 0 나일론 봉합용실을 캐놀라 내에 삽입하여 뇌조직에 의한 폐색을 예방하였다. 환부를 3 - 0 실크 봉합실로 봉하고 세파졸린(cefazoline)(10mg,i.m.)을 투여하였다. 수술 후, 동물을 적절히 개인 우리내에서 사육하고 부드러운 음식을 주었다.

펌프를 담체(127mM NaCl, 2.6mM KCl, 1.2mM CaCl₂, 0.9mM MgCl₂, 4.14mM HEPES, 3mM 글리세린, 0.001% 소 혈청 알부민[BSA], 및 0.01% 패스트 그린(fast green))로만, 또는 그의 GEF - 1 또는 단편 또는 유도체와 함께 충전시켰다. 해파린은 상대적으로 적은양, 예를들어 표준 항 - 혈액응고량보다 대략 250 - 500배정도 적은 약 0.8유니트/kg/일로 적절히 사용될 수 있었다.

캐놀라를 이식한지 3일후, 동물을 2% 할로탄으로 재마취시키고 아트로핀(atropine)(0.15mg/kg,i.p.)을 동물에게 투여하였다. 이어서, 동물에 관을 삽입하고 산소중 1%할로탄/70%산화 질소를 전달하는 벤틸레이터(ventilator)(SAR - 380;CWE Inc., Ardmore,PA)에 연결시켰다. 오른쪽 대퇴부 동맥 및 정맥에 캐놀레이트하여 평균 혈압(MABP; Gould RS3200 Blood Pressure Monitor, Gould Inc., Valley View, OH)를 모니터하고 혈액 샘플링을 하였다. 이어서 동물을 판쿠로툼 브로마이드(0.5mg/kg,i.v.)로 마비시켰다. 동맥혈 가스(Corning 178 Blood Gas Analyzer, Ciba Corning Diagnostic Copr., Medford, MA), 혈당(Accu - Check Blood Glucose Analyzer, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 및 헤마토크릿(hematocrit)을 수술중 및 수술 후 즉시 적어도 두번 측정하였다. 벤틸레이터의 스트로크 부피및 속도를 조절하여 PaO₂의 압력을 100 - 200mmHg로, PaCO₂의 압력을 30 - 40mmHg로 유지시켰다. 중심 체온은 직장 써모커플(thermocouple)(예, Model 37ATA, Yellow Springs Instrument Co., Yellow Spings, OH)로 모니터할 수 있고 호메오터믹 블랭킷 컨트롤 유닛(Harvard Bioscience , South Natick, MA)을 이용하여 36 - 37°C로 유지시켰다.

병소의 빈혈 경색은 [Chen, et al., stoke, 17:738 - 743(1986)]에 기재된 방법으로 중뇌 동맥(MCA) 부위중 오른쪽 측두엽 피질에서 발병되었다. 경부 앞쪽 중앙을 절개하여 양 경동맥을 노출시켰다. 동물을 한쪽에 유치시키고 오른쪽 안각과 귓바퀴 앞쪽의 중앙의 피부를 1cm 정도 절개하였다. 측두골 근육을 수축시키고, 두개술(지름 3mm)을 염수로 냉각시킨 치과용 드릴을 사용하여 관골 및 측두린골(squamousal bone)의 접합부위에서 수행하였다. 해부 현미경을 사용하여, 미세한 핀셋으로 두라(dura)를 열고, 오른쪽 MCA를 비강 바로 위쪽에서 두개의 10 - 0 모노필라멘트 나일론 타이와 결찰시키고 타이사이를 절개하였다. 이어서 양 경동맥을 미소동맥류 클립을 이용하여 45분동안 폐색시켰다. 클립을 제거한 후, 동맥내 흐름을 볼 수 있었다. 마취를 15분동안 유지시키고, 수술후 동물을 우리에 재위치시키고 부드러운 음식을 주었다.

뇌경색 24시간 후, 동물의 체중을 다시 잰 후, 빠르게 목을 베었다. 뇌를 제거하고, 중뇌의 동맥의 해부 및 뇌출혈 또는 감염을 검사하고, 10분동안 냉각된 염수에 적신 후, 설치류 뇌 기질 슬라이서(Systems, Warren, MI)를 사용하여 6개

의 표준 관상의 슬라이스(각 2mm 두께)로 잘랐다. 뇌를 또한 뇌실 중의 염색(질은 녹색) 존재에 대하여 시각적으로 검사하였다. 슬라이스를 37°C 암실에서 30분동안, 중요한 염색 2,3,5 - 트리페닐 테트라졸리움 클로라이드(TTC, 2% ; Chemical Dynamics Co, NH)중에 방치한 후, 실온에서 밤새도록 10% 포르말린중에 방치하였다. 상 분석기(Bioquant IV Image Analysis System에 연결된 MTI 비디오카메라 및 Sony 비디오 모니터는 EVEREX 컴퓨터상에서 작동한다)를 사용하여 TTC 염색이 부족하여 명확하게 시각화되는(Chen et al., Stroke, 17:738 - 743(1986)), 좌우 뇌 반구 및 경색 조직의 아웃 라인(outline)을 각 슬라이스의 뒷면에 그렸다. 경색 부피는 슬라이스당 경색 면적의 합과 슬라이스 두께의 곱으로 계산되었다. 외과 의사 및 상 분석기 조작사는 주어진 각 동물의 치료에 대해서는 알지 못했다.

담체 대 GDF - 1 - 처리된 동물중 경색의 부피를 각 시험에 대한 언페어드(unpaired), 2 - 테일드 t(tailed t) - 시험으로 비교할 수 있었고 결합된 데이터에 대한 분산의 투웨이 분석(ANOVA; Exp. X. Treatment)으로 비교하였다. 이후, 모인 GDF - 1 - 대 담체 - 처리 동물사이의 경색 면적의 슬라이스별 분석을 투웨이 ANOVA(Treatment X Slice)를 사용하는 반복 측정으로 수행하였다. GDF - 1 - 대 담체 - 처리된 동물사이의 다른 해부학적, 생리학적 측정량을 다중적인 쌍 비교를 위한 본페로니 코렉션(Bonferroni correction)을 사용한 언페어드 2 - 테일드 t 시험으로 비교할 수 있었다.

실시예 2: 생체내에서의 행동 분석

GDF - 1, 그의 단편 또는 유도체, 또는 동일물을 코딩하는 핵산의 투여로 증진된 회복, 치료 및 리모델링과 같은 행동 결과 연구를 위해, [Aronowksi et al., J Cereb Blood Flow Metab;16:705 - 713(1996); G. Sinsin et al., J Neurochem, 65(5):2209 - 2214(1995); T.K. McIntosh et al., Neuroscience, 28:233 - 244(1989); and T.K. McIntosh et al., J Neurotrauma, 10:373 - 384(1993)]에 기술된 다수의 분석을 사용할 수 있었다.

간단히, 문헌 [G.Sinson et al., supra]에 기술된 적절한 행동 분석에서 시험 동물은(수컷 Sprague - Dawley 래트)를 18°C 물로 충전된 지름 1m의 원형 탱크, 모리스 워터 미로(Morris Water Maze)에서 상해전에 훈련시켰다. 물 표면을 스티로폼 조각으로 덮어 불투명하게 하였다. 동물을 훈련시키는 동안, 물에 잠긴 플랫폼이 미로(maze)so에 존재한다. 각 시험 동물은, 이들이 외부의 가시적 단서를 사용하여 플랫폼의 위치를 발견할 수 있도록 하는 이틀동안 20회의 훈련 시도를 하였다. 최종 훈련 시도후 즉시, 동물을 마취시키고 측면(화상 모양) 액 - 타격(FD) 뇌 손상을 일으켰다. 간단히, 좌측 두정부 피질의 람다(lamda) 및 브레그마(bregma) 사이 중앙에서 5 - mm 두개술을 수행하였다. 구멍 Leur - loc 피팅을 두개술 부위에 부착시켰다. FP 장치를 부착한 후, 상해시켰다. 상해는 적당하게 심각했다(2.1 - 2.3atm). 상해 후, Leur - loc을 제거하고 표피를 봉합하였다. 동물이 걸을 때까지 워밍 패드로 정상 온도를 유지시켰다.

상해 72시간, 1주 또는 2주후, 동물의 MWM내에서 플랫폼의 위치를 파악하는 습득한 임무 기억 능력을 평가하였다. 이 평가를 위해, 플랫폼을 미로에서 제거하고 동물의 수영하는 패턴을 컴퓨터화된 비디오 시스템으로 1분동안 적절히 기록하였다. 미로는 플랫폼의 근접도에 따라, 가중치를 두는 존(zone)으로 분리되었다. 메모리 점수는 가중치를 동물이 각 존에서 보낸 시간과 곱하고 이어서 곱을 더하여 산출하였다.

1주 또는 2 주동안 살아남은 동물에 대해 신경학적 모터 기능도 측정할 수 있다. 간략하게는, 하나의 적당한 분석은 동물을 하기하는 각각에 대해 0(심각한 손상) 내지 4(정상)로 채점하는 것을 제공한다: 꼬리로 매달려있는 동안 (1) 좌측 및 (2) 우측 앞다리; 앞다리를 바닥에 두고 뒷다리를 들어올려 꼬리뒤로 할때 (3) 좌측 및 (4) 우측 뒷다리 굴곡; (5) 좌측 및 (6) 우측에 대한 측면 압출을 견디는 능력; 및 (7) 좌측, (8) 우측, 및 (9) 수직 위치로 경사진 평면위에 서있는 능력. 점수를 단계 (1) 내지 (9) 각각에 대해 합산하였다. 시험을 위한 관찰자는 동물의 이전 처리를 보지않아야 한다.

실시예 3: GDF - 1의 클로닝

파트 1. 8.5 일된 배 cDNA 라이브러리의 제작 및 스크리닝

모든 배물질을 CD-1 마우스(찰스 리버)의 무작위 교배로 얻었다. 마우스를 실험동물의 간호 및 유지에 대한 NIH 가이드라인에 따라 유지시켰다. 질 막힘이 관측되는 날을 0.5 일로 지정하였다. 배를 자궁으로부터 적출하고 모든 외배막을 제거하여 신속하게 동결시켰다. 총 RNA를 구아니디늄 티오시아네이트 완충액에서 균질화시키고 용균물을 염화세슘 쿠션으로 원심분리하여 제조하였다(Chirgwin 등, *Biochemistry*, 18: 5294 - 5299(1979)). 폴리-A 함유 RNA를 올리고-dT 셀룰로스로 2회 선별하여 얻었다(H. Aviv, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 1408 - 1412(1972)). cDNA 라이브러리를 RNase H 방법(Okayama 등, *Mol. Cell Biol.*, 2: 161 - 170(1982); 및 Gubler 등, *Gene*, 25: 263 - 269(1983))을 사용하여 스트라타진이 제공하는 지시에 따라 람다 ZAPII 벡터에서 제작하였다. 재조합 플라크(3, 200,000 개)를 출발 RNA의 2 미생물로부터 얻었다. 라이브러리를 폴리뉴클레오타이드 키나제를 사용하여 말단-표지화된 올리고뉴클레오타이드 5'-GCAGCCACACTCCTCCACCACCATGTT-3'(서열번호 3)(아미노산 서열 NMVVEE CGC(서열번호 4)에 상응함)로 스크리닝하였다. 혼성화를 50 °C, 6×SSC, 1×덴하르트, 0.05% 소듐 피로포스페이트, 100 마이크로그램/ml 효모 tRNA중에서 수행하였다. 여과지를 60 °C, 6×SSC, 0.05% 소듐 피로포스페이트에서 세척하였다.

파트 2: DNA 서열분석 및 블랏 혼성화

양 가닥의 DNA 서열분석을 엑소뉴클레아제 III/S1 뉴클레아제 전략(Henikoff, *Gene*, 28:351 - 359(1984))를 이용하여 디데옥시쇄 종결 방법(Sanger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74:5463 - 5467(1977))으로 수행하였다.

노던 분석을 위하여, RNA를 포름알데히드 겔상에서 전기영동하고(Lehrach et al., *Biochemistry*, 16:4743 - 4751(1997); 및 Goldberg, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77:5794 - 5798(1980)), 니트로셀룰로스에 옮기고, 50% 포름아미드, 5X SSC, 4X 덴하르트, 0.1% SDS, 0.1% 소듐 피로포스페이트, 100 µg/ml 연어 DNA중에서 50°C에서 혼성화시켰다. 필터를 먼저 50°C에서 2X SSC, 0.1% SDS, 0.1% 소듐 피로포스페이트중에서 세척하고, 이어서 0.1X SSC, 0.1% SDS중에서 세척하였다.

서던 분석을 위하여, DNA를 1% 아가로스 겔상에서 전기영동하고, 니트로셀룰로스에 옮기고, 65°C에서 1M NaCl, 50 mM 소듐 포스페이트, pH 6.5, 2 mM EDTA, 0.5% SDS, 10X 덴하르트중에서 혼성화시켰다. 최종 세척을 68°C에서 2X SSC중에서 수행하였다.

파트 3: 시험관내 번역 실험

전장 1387 bp GDF-1 cDNA 또는 최초 251개 뉴클레오타이드가 결합된 결실 돌연변이체를 Bluescript 벡터(Stratagene(스트라타젠))에 서브클로닝하고, 센스 또는 안티센스 RNA를 스트라타젠에 의해 기술된 바와 같이 캡(cap) 유사체의 존재하에서 T3 또는 T7 프로모터로부터 시험관내 전사하였다(Golomb et al., *J. Virol.*, 21:743 - 752(1977)); 및 McAllister et al., *Nucl. Acids Res.*, 8:4821 - 4837(1980)). 시험관내 번역을 30°C에서 60분간 개체장 마이크로솜(Promega) 10 당량의 존재 또는 부재하에 0.5 µg RNA, 17.5 µl 토끼 망상적혈구 용균물(Promega), 및 20 µM 냉 아미노산 혼합물(Promega), 및 20 µCi [³⁵S]메티오닌(New England Nuclear)을 인큐베이팅하여 수행하였다. 엔도글리코시다제 분해를 번역 반응물을 100 mM 소듐 아세테이트 pH 5.5, 0.1% SDS, 17 mU/ml 엔도글리코시다제 H(Boehringer - Mannheim)로 1:30으로 희석하여 수행하였다. 프로테아제 분해를 0.1% 트리톤 X-100의 존재 또는 부재하에서 번역 반응물을 PBS, 1 mg/ml 트립신(Boehringer - Mannheim)으로 1:20으로 희석시켜 수행하였다. 모든 분해는 37°C에서 3시간 동안 수행하였다. 번역 생성물을 10% SDS 폴리아크릴아미드 겔상에서 전기영동(Laemmli, *Nature*, 227:680 - 685(1970)) 및 인헨스(New England Nuclear)를 이용한 플루오로그래피에 의해 분석하였다.

파트 4: GDF-1의 클로닝 및 뉴클레오타이드 서열분석

마우스 배형성(embryogenesis)에 중요할 수 있는 TGF-β 슈퍼패밀리의 새로운 멤버들을 동정하기 위하여, cDNA

라이브러리를 8.5일 p.c.에 단리된 완전 배로부터 폴리 A - 선별된 RNA를 사용하여 람다 Zap II에서 작제하였다. 이상에서 나타난 바와 같이, 라이브러리를 슈퍼패밀리의 멤버중에서 보존된 영역의 예견된 아미노산 서열을 기초로 하여 선택된 올리고뉴클레오타이드로 스크리닝하였다. 스크리닝된 600,000 재조합 파지중에서, 올리고뉴클레오타이드는 3개의 클론과 혼성화하였다. 서열분석 결과 3 cDNA 클론이 GDF - 1로 지칭되는, 동일한 유전자로부터 유래된 mRNA를 나타낼 수 있다는 것이 밝혀졌다.

GDF - 1 프로브를 사용한 8.5일된 배 RNA의 노던 분석 결과 대략 1.4 kb 길이의 단일의 우세한 mRNA 종이 검출되었다. 본래의 3개의 cDNA 단리물이 모두 1.5kb보다 작기 때문에, 가장 긴 클론의 일부분을 전장 클론을 단리하기 위하여 cDNA 라이브러리를 재스크리닝하는데 사용하였다. 혼성화 재조합 파지는 대략 200,000개중 1개의 빈도로 나타났다.

GDF - 1을 코딩하는 수득된 가장 긴 cDNA 클론의 전체 뉴클레오타이드 서열을 도 1에 나타내었다. 1387 bp 서열은 뉴클레오타이드 217의 개시 ATG에서 시작하고, 38,600의 분자량을 갖는 단백질 357개 아미노산을 잠재적으로 코딩하는 단일의 긴 오픈 리딩 프레임에 포함한다. 추정되는 개시 ATG 상류는 2개의 인 - 프레임(in - frame) 정지 코돈이고 추가의 ATG는 없다. 뉴클레오타이드 1259 내지 1285은 원래의 스크리닝으로부터 선택된 올리고뉴클레오타이드의 상보물(complement)과 25/27의 일치율을 보인다. 클론의 3'말단은 정규의 AAUAAA 폴리아데닐화 신호를 함유하지 않는다. 4개의 독립적인 cDNA 클론(모두 5' 말단에 있어서 다르다)의 3' 말단에서의 서열 분석 결과 2개의 클론이 동일한 뉴클레오타이드에서 종결하고, 다른 2개의 클론은 7개 뉴클레오타이드 추가 하류 위치에서 종결하였다(이들 클론은 3'말단에 추가의 AAAAATT 서열을 함유하였다).

이 스크리닝 과정동안 단리된 두 개의 cDNA 클론은 그들의 서열에서 도 1에 나타난 것으로부터 약간의 변화를 보였다. 뉴클레오타이드 서열이 결정된 제한된 세그먼트에서, 이들 2개의 클론은 각각 2개의 뉴클레오타이드 변화를 나타내며, 하나는 아미노산 145에서 시스테인으로부터 세린으로의 치환을 일으키고 두 번째는 아미노산 서열을 변화시키지 않는 제 3 위치 변화를 나타내었다. 이들 차이는 그들이 독립적으로 단리된 클론에서 발견되었기 때문에 클로닝 인공물인 것 같지는 않다. 이들 변화는 대립형질 차이를 나타낼 수 있거나 다중 GDF - 1유전자의 존재를 나타낼 수 있다.

실시예 4: GDF - 1과 NT - 3의 조합 사용

리폴딩된 E. coli 유래 rhGDF - 1(이하 기술된 바와 같이 수득됨)을 Ebendal et al., 1995, J. Neurosci, Res. 40:276 - 284에 기술된 바와 같이 병아리 교감신경절(Chick sympathetic ganglion)에서 섬유 성장(outgrowth) 분석에서의 활성에 대해 시험하였다. 간략하게는, 분석을 다음과 같이 수행하였다. 9일된 병아리 배로부터 체외이식된 교감신경 신경절을 콜라겐 겔로 체외이식하고, GDF - 1 또는 NT - 3을 적용하였다. 1일후 체외이식편을 섬유 성장을 기초로 하여 점수 0은 성장이 없는 것을 나타내고 점수 5는 최대 성장을 나타내도록 채점하였다. 점수는 두 사람에게 의해 기록된 두 개의 분리된 점수로 블라인드 형식으로 기록되었다.

rhGDF - 1을 다양한 희석농도로 첨가하였으나, 성장에서의 어떠한 변화도 NT - 3에 노출되지 않은 체외이식편에서 나타나지 않았다.

그러나, rhGDF - 1이 2 ng/ml의 NT - 3에 미리 노출된 체외이식편에 첨가되었을 때, NT - 3의 신경돌기 성장 촉진활성의 강력한 증강이 나타났다. 데이터를 하기 표 1에 요약한다. 하기 표 1에서, 수치는 두 명의 분리된 관찰자에 의해 매겨진 각 배양물에 대한 평균점수를 나타낸다. 평균 및 표준편차를 각각의 처리에 대해 표 1에 나타낸다.

E. coli유래된 rhGDF - 1을 다음과 같이 수득하였다. rhGDF - 1은E. coli에서 봉입체(inclusion bodies)로 생산되었다. 봉입체를 6M 구아니딘 및 100 mM 디티오프레이톨중에서 용해시키고 환원시켰다. 환원제 및 변성화제를 역상 HPLC에 의해 제거하였다. 단백질을 스피드 백(speed vac)으로 건조시키고, 8M 우레아에 5 mg/ml 단백질 농도로 재현탁시켰다. 이어서 단백질 용액을 리폴딩 완충액에서 1/100으로 희석시켜 최종농도가 50 µg/ml가 되게 하였다. 리폴딩 완충액은 10 mM 환원된 글루타티온, 1 mM 산화된 글루타티온 및 50 mM 트리스 완충액을 pH9에서 함유하였다. 단백질을 25°C에서 20 시간동안 리폴딩되도록 하였다. 이어서 리폴딩된 단백질을 샘플을 환원 및 비 - 환원 SDS - PAGE에 의해 분석하였다. 겔을 쿠마시(coomassie)로 염색하고, 이량체 비율을 농도측정에 의해 결정하였다. 이 이량체는 총 단백질의 대략 20%인 것으로 밝혀졌다. 이어서 리폴딩된 물질을 저장을 위해 - 80°C에서 동결시켰다.

표 1

	대조군	GDF - 1250ng/ml	NT - 32ng/ml	NT3 + GDF - 1250ng/ml	NT3 + GDF - 125.50ng/ml	NT - 3 + GDF - 15.10ng/ml
	000000	000	121.52.51.42.312.8	2.13.542.533.333	3.22.83.831.510.82	12.53.611
평균표준편차	00	00	1.690.74	3.050.58	2.261.10	1.821.19

실시에 5: 소뇌 과립세포에서의 GDF - 1 활성

래트로부터의 소뇌 과립세포에 rhGDF - 1를 투여하면 신경세포 수, BrdU 혼입, 신경돌기 성장 및 세포들의 세포 클러스터링(clustering)이 유의적으로 증가하였다.

본 발명을 그 바람직한 구체예를 참조로 하여 상세히 기술하였다. 그러나, 당업자가 이 개시내용을 고려하여, 본 발명의 취지 및 범위내에서 변형시키고 향상시킬 수 있음을 예상할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

신경 세포 사멸 또는 변성에 걸리거나 걸리기 쉬운 포유동물에게 치료학적 유효량의 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여함을 포함하는, 신경 세포 사멸 또는 변성의 치료 또는 예방 방법.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 신경 세포 사멸 또는 변성이 뇌 또는 척수 외상(trauma), 뇌 또는 척수 허혈, 망막 허혈, 저산소증 또는 저혈당증에 의해 야기된 것인 방법.

청구항 3.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 포유동물이 신경 세포 사멸 또는 변성에 걸린 후, GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여하는 방법.

청구항 4.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 포유동물이 신경 세포 사멸 또는 변성에 걸린 후, 적어도 약 2주일간 포유동물에게 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여하는 방법.

청구항 5.

포유동물에게 치료학적 유효량의 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여함을 포함하는, 졸중(stroke) 또는 심장 마비(heart attack)에 걸리거나 걸리기 쉬운 포유동물의 치료 방법.

청구항 6.

제 5 항에 있어서, 포유동물이 졸중 또는 심장 마비에 걸린 후, GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여하는 방법.

청구항 7.

제 5 항에 있어서, 포유동물이 졸중 또는 심장 마비에 걸린 후, 적어도 약 2주일간 포유동물에게 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여하는 방법.

청구항 8.

포유동물에게 치료학적 유효량의 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여함을 포함하는, 뇌 또는 척수 외상 또는 허혈에 걸리거나 걸리기 쉬운 포유동물의 치료 방법.

청구항 9.

제 8 항에 있어서, 포유동물이 뇌 또는 척수 외상 또는 허혈에 걸린 후, GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여하는 방법.

청구항 10.

제 8 항에 있어서, 포유동물이 뇌 또는 척수 외상 또는 허혈에 걸린 후, 적어도 약 2주일간 포유동물에게 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여하는 방법.

청구항 11.

포유동물에게 치료학적 유효량의 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여함을 포함하는, 망막 조직 또는 시신경으로의 혈류 또는 영양 공급 감소, 또는 망막 허혈 또는 외상, 또는 시신경 손상(injury), 또는 녹내장에 걸리거나 걸리기 쉬운 포유동물의 치료 방법.

청구항 12.

제 11 항에 있어서, 포유동물이 망막 조직 또는 시신경으로의 혈류 또는 영양 공급 감소, 또는 망막 허혈 또는 외상, 또는 시신경 손상, 또는 녹내장에 걸린 후, GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여하는 방법.

청구항 13.

제 11 항에 있어서, 포유동물이 망막 조직 또는 시신경으로의 혈류 또는 영양 공급 감소, 또는 망막 허혈 또는 외상, 또는 시신경 손상, 또는 녹내장에 걸린 후, 적어도 약 2주일간 포유동물에게 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여하는 방법.

청구항 14.

포유동물에게 치료학적 유효량의 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여함을 포함하는, 외과수술후 신경학적 결손 또는 심장 정지와 관련된 신경학적 결손에 걸리거나 걸리기 쉬운 포유동물의 치료 방법.

청구항 15.

제 14 항에 있어서, 포유동물이 외과수술후 신경학적 결손 또는 심장 정지와 관련된 신경학적 결손에 걸린 후, GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여하는 방법.

청구항 16.

제 14 항에 있어서, 포유동물이 외과수술후 신경학적 결손 또는 심장 정지와 관련된 신경학적 결손에 걸린 후, 적어도 약 2주일간 포유동물에게 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여하는 방법.

청구항 17.

포유동물에게 치료학적 유효량의 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여함을 포함하는, 말초 신경 손상에 걸리거나 걸리기 쉬운 포유동물의 치료 방법.

청구항 18.

제 17 항에 있어서, 포유동물이 말초 신경 손상에 걸린 후, GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여하는 방법.

청구항 19.

제 17 항에 있어서, 포유동물이 말초 신경 손상에 걸린 후, 적어도 약 2주일간 포유동물에게 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여하는 방법.

청구항 20.

신경변성 질병 또는 신경병증에 걸리거나 걸리기 쉬운 포유동물에게 치료학적 유효량의 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여함을 포함하는, 신경변성 질병 또는 신경병증의 치료 방법.

청구항 21.

알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 근위축성 측삭 경화증, 다운 증후군, 코르사코프병, 또는 간질에 걸리거나 걸리기 쉬운 포유동물에게 치료학적 유효량의 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여함을 포함하는, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 근위축성 측삭 경화증, 다운 증후군, 코르사코프병, 또는 간질의 치료 방법.

청구항 22.

포유동물에게 치료학적 유효량의 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여함을 포함하는, 신경 세포 사멸 또는 변성에 걸린 포유동물의 기능적 능력(functional capability)을 개선하는 방법.

청구항 23.

제 22 항에 있어서, 포유동물이 신경 세포 사멸 또는 변성에 걸린 후, 적어도 약 2주일간 포유동물에게 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여하는 방법.

청구항 24.

포유동물에게 치료학적 유효량의 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 투여함을 포함하는, 신경변성 질병 또는 신경병증에 걸린 포유동물의 기능적 능력을 개선하는 방법.

청구항 25.

제 24 항에 있어서, 포유동물이 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 근위축성 측삭 경화증, 다운 증후군, 코르사코프병, 또는 간질에 걸린 것인 방법.

청구항 26.

제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항에 있어서, GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체를 포유동물에게 투여하는 방법.

청구항 27.

제 26 항에 있어서, 투여된 GDF - 1 이 서열번호 1에 의하여 코딩되는 것인 방법.

청구항 28.

제 26 항에 있어서, 투여된 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체가 서열번호 1 과 적어도 약 70% 의 서열 상동성을 갖는 서열을 포함하는 핵산에 의하여 코딩되는 것인 방법.

청구항 29.

제 26 항에 있어서, 투여된 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체가 서열번호 1 과 적어도 약 80%, 90% 또는 95% 의 서열 상동성을 갖는 서열을 포함하는 핵산에 의하여 코딩되는 것인 방법.

청구항 30.

제 26 항에 있어서, 투여된 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체가 정상적으로 엄격한 조건 하에서 서열번호 1 과 혼성화되는(hybridize) 서열에 의하여 코딩되는 것인 방법.

청구항 31.

제 26 항에 있어서, 투여된 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체가 고도로 엄격한 조건 하에서 서열번호 1 과 혼성화되는 서열에 의하여 코딩되는 것인 방법.

청구항 32.

제 26 항에 있어서, 투여된 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체가 서열번호 2 와 적어도 약 70% 의 서열 상동성을 갖는 것인 방법.

청구항 33.

제 26 항에 있어서, 투여된 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체가 서열번호 2 와 적어도 약 80%, 90% 또는 95% 의 서열 상동성을 갖는 것인 방법.

청구항 34.

제 26 항에 있어서, 투여된 GDF - 1 이 서열번호 2 에 나타낸 서열을 갖는 것인 방법.

청구항 35.

제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항에 있어서, GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 포유동물에게 투여하는 방법.

청구항 36.

제 35 항에 있어서, 핵산이 서열번호 1 또는 그에 상보적인 것인 방법.

청구항 37.

제 35 항에 있어서, 핵산이 서열번호 1 과 적어도 약 70% 의 상동성을 갖는 것 또는 그에 상보적인 것인 방법.

청구항 38.

제 35 항에 있어서, 핵산이 서열번호 1 과 적어도 약 80%, 90% 또는 95% 의 상동성을 갖는 것 또는 그에 상보적인 것인 방법.

청구항 39.

제 35 항에 있어서, 핵산이 정상적으로 엄격한 조건 하에서 서열번호 1 과 혼성화되는 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 40.

제 35 항에 있어서, 핵산이 고도로 엄격한 조건 하에서 서열번호 1 과 혼성화되는 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 41.

제 1 항 내지 제 40 항 중 어느 한 항에 있어서, 투여된 GDF - 1 단편 또는 유도체, 또는 투여된 핵산이 생체내 뇌 허혈 분석에서 경색 부피가 적어도 약 10% 의 감소를 나타내는 GDF - 1 단편 또는 유도체를 코딩하는 것인 방법.

청구항 42.

신경 세포 사멸 또는 변성에 걸리거나 걸리기 쉬운 포유동물에게 치료학적 유효량의 1) GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체, 및 2) 뉴로트로핀 - 3 또는 뉴로트로핀 - 3을 코딩하는 핵산을 투여함을 포함하는, 신경 세포 사멸 또는 변성의 치료 또는 예방 방법.

청구항 43.

제 42 항에 있어서, 신경 세포 사멸 또는 변성이 뇌 또는 척수 외상, 뇌 또는 척수 허혈, 망막 허혈, 저산소증 또는 저혈당증에 의해 야기된 것인 방법.

청구항 44.

제 42 항 또는 제 43 항에 있어서, 포유동물이 신경 세포 사멸 또는 변성에 걸린 후, 유효량의 1) 및 2) 를 투여하는 방법.

청구항 45.

제 42 항 또는 제 43 항에 있어서, 포유동물이 신경 세포 사멸 또는 변성에 걸린 후, 적어도 약 2주일간 포유동물에게 유효량의 1) 및 2) 를 투여하는 방법.

청구항 46.

포유동물에게 치료학적 유효량의 1) GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체, 및 2) 뉴로트로핀 - 3 또는 뉴로트로핀 - 3을 코딩하는 핵산을 투여함을 포함하는, 졸중 또는 심장 마비에 걸리거나 걸리기 쉬운 포유동물의 치료 방법.

청구항 47.

제 46 항에 있어서, 포유동물이 졸중 또는 심장 마비에 걸린 후, 유효량의 1) 및 2) 를 투여하는 방법.

청구항 48.

제 46 항에 있어서, 포유동물이 졸중 또는 심장 마비에 걸린 후, 적어도 약 2주일간 포유동물에게 유효량의 1) 및 2) 를 투여하는 방법.

청구항 49.

포유동물에게 치료학적 유효량의 1) GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체, 및 2) 뉴로트로핀 - 3 또는 뉴로트로핀 - 3을 코딩하는 핵산을 투여함을 포함하는, 뇌 또는 척수 외상 또는 허혈에 걸리거나 걸리기 쉬운 포유동물의 치료 방법.

청구항 50.

제 49 항에 있어서, 포유동물이 뇌 또는 척수 외상 또는 허혈에 걸린 후, 유효량의 1) 및 2) 를 투여하는 방법.

청구항 51.

제 49 항에 있어서, 포유동물이 뇌 또는 척수 외상 또는 허혈에 걸린 후, 적어도 약 2주일간 포유동물에게 유효량의 1) 및 2) 를 투여하는 방법.

청구항 52.

포유동물에게 치료학적 유효량의 1) GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체, 및 2) 뉴로트로핀 - 3 또는 뉴로트로핀 - 3을 코딩하는 핵산을 투여함을 포함하는, 망막 조직 또는 시신경으로의 혈류 또는 영양 공급 감소, 또는 망막 허혈 또는 외상, 또는 시신경 손상, 또는 녹내장에 걸리거나 걸리기 쉬운 포유동물의 치료 방법.

청구항 53.

제 52 항에 있어서, 포유동물이 망막 조직 또는 시신경으로의 혈류 또는 영양 공급 감소, 또는 망막 허혈 또는 외상, 또는 시신경 손상, 또는 녹내장에 걸린 후, 유효량의 1) 및 2) 를 투여하는 방법.

청구항 54.

제 52 항에 있어서, 포유동물이 망막 조직 또는 시신경으로의 혈류 또는 영양 공급 감소, 또는 망막 허혈 또는 외상, 또는 시신경 손상, 또는 녹내장에 걸린 후, 적어도 약 2주일간 포유동물에게 유효량의 1) 및 2) 를 투여하는 방법.

청구항 55.

포유동물에게 치료학적 유효량의 1) GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체, 및 2) 뉴로트로핀 - 3 또는 뉴로트로핀 - 3을 코딩하는 핵산을 투여함을 포함하는, 외과수술후 신경학적 결손 또는 심장 정지와 관련된 신경학적 결손에 걸리거나 걸리기 쉬운 포유동물의 치료 방법.

청구항 56.

제 55 항에 있어서, 포유동물이 외과수술후 신경학적 결손 또는 심장 정지와 관련된 신경학적 결손에 걸린 후, 유효량의 1) 및 2) 를 투여하는 방법.

청구항 57.

제 55 항에 있어서, 포유동물이 외과수술후 신경학적 결손 또는 심장 정지와 관련된 신경학적 결손에 걸린 후, 적어도 약 2주일간 포유동물에게 유효량의 1) 및 2) 를 투여하는 방법.

청구항 58.

포유동물에게 치료학적 유효량의 1) GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체, 및 2) 뉴로트로핀 - 3 또는 뉴로트로핀 - 3을 코딩하는 핵산을 투여함을 포함하는, 말초 신경 손상에 걸리거나 걸리기 쉬운 포유동물의 치료 방법.

청구항 59.

제 58 항에 있어서, 포유동물이 말초 신경 손상에 걸린 후, 유효량의 1) 및 2) 를 투여하는 방법.

청구항 60.

제 58 항에 있어서, 포유동물이 말초 신경 손상에 걸린 후, 적어도 약 2주일간 포유동물에게 유효량의 1) 및 2) 를 투여하는 방법.

청구항 61.

신경변성 질병 또는 신경병증에 걸리거나 걸리기 쉬운 포유동물에게 치료학적 유효량의 1) GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체, 및 2) 뉴로트로핀 - 3 또는 뉴로트로핀 - 3을 코딩하는 핵산을 투여함을 포함하는, 신경변성 질병 또는 신경병증의 치료 방법.

청구항 62.

알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 근위축성 측삭 경화증, 다운 증후군, 코르사코프병, 또는 간질에 걸리거나 걸리기 쉬운 포유동물에게 치료학적 유효량의 1) GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체, 및 2) 뉴로트로핀 - 3 또는 뉴로트로핀 - 3을 코딩하는 핵산을 투여함을 포함하는, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 근위축성 측삭 경화증, 다운 증후군, 코르사코프병, 또는 간질의 치료 방법.

청구항 63.

포유동물에게 치료학적 유효량의 1) GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체, 및 2) 뉴로트로핀 - 3 또는 뉴로트로핀 - 3을 코딩하는 핵산을 투여함을 포함하는, 신경 세포 사멸 또는 변성에 걸린 포유동물의 기능적 능력을 개선하는 방법.

청구항 64.

제 63 항에 있어서, 포유동물이 신경 세포 사멸 또는 변성에 걸린 후, 적어도 약 2주일간 포유동물에게 1) 및 2) 를 투여하는 방법.

청구항 65.

제 63 항 또는 제 64 항에 있어서, 포유동물이 뇌 또는 척수 외상 또는 허혈, 졸중, 심장 마비, 저산소증, 저혈당증, 망막 허혈 또는 말초 신경 손상에 걸린 것인 방법.

청구항 66.

포유동물에게 치료학적 유효량의 1) GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는 GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체, 및 2) 뉴로트로핀 - 3 또는 뉴로트로핀 - 3을 코딩하는 핵산을 투여함을 포함하는, 신경변성 질병 또는 신경병증에 걸린 포유동물의 기능적 능력을 개선하는 방법.

청구항 67.

제 66 항에 있어서, 포유동물이 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 근위축성 측삭 경화증, 다운 증후군, 코르사코프병, 또는 간질에 걸린 것인 방법.

청구항 68.

제 42 항 내지 제 67 항 중 어느 한 항에 있어서, GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체를 포유동물에게 투여하는 방법.

청구항 69.

제 68 항에 있어서, 투여된 GDF - 1 이 서열번호 1에 의하여 코딩되는 것인 방법.

청구항 70.

제 68 항에 있어서, GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체가 서열번호 1 과 적어도 약 70% 의 서열 상동성을 갖는 서열을 포함하는 핵산에 의하여 코딩되는 것인 방법.

청구항 71.

제 68 항에 있어서, 투여된 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체가 서열번호 1 과 적어도 약 80%, 90% 또는 95% 의 서열 상동성을 갖는 서열을 포함하는 핵산에 의하여 코딩되는 것인 방법.

청구항 72.

제 68 항에 있어서, 투여된 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체가 정상적으로 엄격한 조건 하에서 서열번호 1 과 혼성화되는 서열에 의하여 코딩되는 것인 방법.

청구항 73.

제 68 항에 있어서, 투여된 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체가 고도로 엄격한 조건 하에서 서열번호 1 과 혼성화되는 서열에 의하여 코딩되는 것인 방법.

청구항 74.

제 68 항에 있어서, 투여된 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체가 서열번호 2 와 적어도 약 70% 의 서열 상동성을 갖는 것인 방법.

청구항 75.

제 68 항에 있어서, 투여된 GDF - 1 또는 그의 단편 또는 유도체가 서열번호 2 와 적어도 약 80%, 90% 또는 95% 의 서열 상동성을 갖는 것인 방법.

청구항 76.

제 68 항에 있어서, 투여된 GDF - 1 이 서열번호 2 에 나타낸 서열을 갖는 것인 방법.

청구항 77.

제 42 항 내지 제 67 항 중 어느 한 항에 있어서, GDF - 1 을 코딩하는 핵산 또는 그의 단편 또는 유도체를 포유동물에게 투여하는 방법.

청구항 78.

제 77 항에 있어서, 핵산이 서열번호 1 또는 그에 상보적인 것인 방법.

청구항 79.

제 77 항에 있어서, 핵산이 서열번호 1 과 적어도 약 70, 80 또는 90% 의 상동성을 갖는 것 또는 그에 상보적인 것인 방법.

청구항 80.

제 42 항 내지 제 67 항 중 어느 한 항에 있어서, NT - 3 을 투여하는 방법.

청구항 81.

제 42 항 내지 제 67 항 중 어느 한 항에 있어서, NT - 3을 코딩하는 핵산을 투여하는 방법.

청구항 82.

제 1 항 내지 제 81 항 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

도면

도면 1

1 CCTTTCTCCAGGGAAGTCTGCTGCTGCCAGGAGCTCCGGCTTTTCAGATCAATTCTCSACCACC 60

61 CACCTTGGGAAGTCCCGCCCACTGCTGCTGCTGCTGATCACTGGGCTCCAGACACGCCCCCT 120

121 CCAGGACCTCAAGACACCCCCGACCTAAGGTCACCAAGCCACTGGCCCCAGACCCAGTCC 180

181 GCTCCGGTGACTCTCTTGGACACCTGCTGCGAAGAAAAATGCTCCCTGTCTGCCATCGTTT
M L P V C H R F 240

241 TTGGGACCACCTCTCTCTCTCTGCTCTTGGTCCCTTCGACGACCTGGCCCCCGCCCCAGC 300
C D H L L L L L L L P S T T L A P A P A

301 ATCCATGGGCCCCCTGCCCCCTGCTCCAGGTTCTTGGGCTTCCCGAAGCCCCCCGAG 360
S M G P A A A L L Q V L G L P E A P R S

361 CCTCCCCACACACCCGACCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 420
V P T H R P V P P V H W R L F R R R D P

421 CCAGGAGCCGAGAGTCCGACCCCTCTGCGGCTATGCTACGTCGACGAACTAGGGCTCGC 480
Q E A R V G R P L R P C H V E E L C V A

481 CCGAAACATTGTGGCCACATCCCCSACAGCGCTCTGTCTCTCCAGGCTCGACAAACCCGC 540
G N I V R H I P D S G L S S R P A Q P A

541 CAGGACCTCCGGCTGTGCCCCGAGTCCGACAGTCTGCTTTGACCTGTGCAATGTGGAGTC 600
R T S G L C P E W T V V F D L S H V E P

601 CACAGAGCCCTCAACACGCGCGCGCTTAGAGTTGGGCTTGGAGGCTGAGTGTGAAGATAC 660
T E R P T R A R L E L R L E A E C E D T

661 AGGAGGCTCCGAGCTAAGCTTCCGACTGTGGGCGGACCCAGAGGATCCAGGGCTTGAGCT 720
G G W E L S V A L W A D A E H P G P E L

721 GCTGGGCTTGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 780
L R V P A P P G V L L R A D L L G T A V

781 AGCCCCCAACCGATCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG 840
A A N A S V P C T V R L A L S L H P G A

841 CACTCCAGGCTGTGGGCGCGCTGCTGAGGCTTCCCTGCTGCTGCTGAGGCTGGACCCAGC 900
T A A C G R L A E A S L L L V T L D P R

901 CCTGTGCTCCCTTGGCGGATTCGGGCGCGCACACCGAGCCGAGGCTAGAACTGCTCCAGT 960
L C P L P R L R R H T E P R V E V G P V

961 GGGCACTTGTGCTACCCGACGCTTGCATGTGAGGTTCCCTGAGCTGGGCTGGGACCGTTG 1020
C T C R T R R L H V S F R E V G W H R W

1021 GCTGATCGGCGCGCTGCTTCTAGCCAACTTCTGCCAGGCGACCTGGGCACTACCCCA 1080
V I A P R G F L A N F C G G T C A L P E

1081 AACGCTGAGCGGACCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 1140
T L R G P G G P P A L N H A V L R A L M

1141 GCAAGGAGCTGTTCCCAACCCCGGCTGCAAGCTTCCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1200
H A A A P T P G A G S P C C V P E R L S

1201 ACCCATCTCCCTGCTCTCTTCCAGCAATAGTGACAACTGCTGCTTCCGACACTACCAAGA 1260
P I S V L F F D N S D N V V L R H Y E D

1261 CATGCTGCTGATCACTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1320
M V V D E C C C R

1321 CCACCGAAAGGAGGAGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1380

1381 TTGACT 1387