



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0132807  
(43) 공개일자 2018년12월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**C07K 7/06** (2006.01) **A61K 38/00** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
**C07K 7/06** (2013.01)  
**A61K 38/00** (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7031919
- (22) 출원일자(국제) 2017년04월07일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2018년11월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/0266675
- (87) 국제공개번호 WO 2017/177178  
국제공개일자 2017년10월12일
- (30) 우선권주장  
 62/319,580 2016년04월07일 미국(US)  
 62/328,484 2016년04월27일 미국(US)
- (71) 출원인  
케이스 웨스턴 리저브 유니버시티  
미국 44106 오하이오주 클리블랜드 유클리드 애비뉴 10900
- (72) 발명자  
왕, 심룡  
미국 44106 오하이오 클리블랜드 유클리드 애비뉴 10900
- (74) 대리인  
특허법인에이아이피

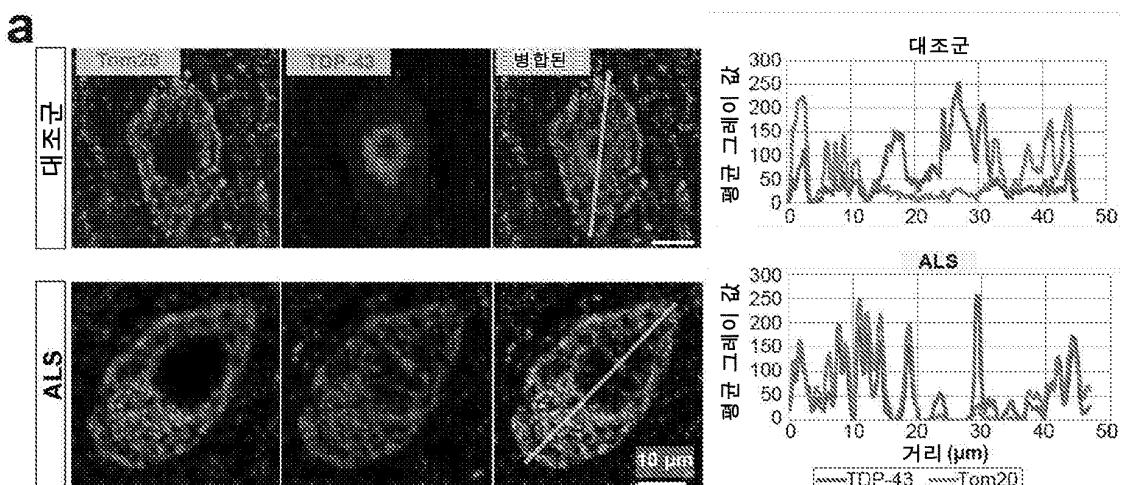
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 신경퇴행성 질환의 치료용 TDP-43 미토콘드리아 국소화 억제제

### (57) 요약

대상체에서 신경퇴행성 질환의 치료 방법은 대상체에게 TDP-43 미토콘드리아 국소화 억제제의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.

**대 표 도** - 도1a



(52) CPC특허분류

*A61P 25/28* (2018.01)

*C07K 14/4713* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기를 포함하는 약제학적 조성물: TDP-43의 적어도 하나의 미토콘드리아 내부 표적화 모티프의 약 5 내지 약 8 연속 아미노산에 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 약 5 내지 약 10 아미노산의 합성 치료 웹타이드, 그리고 상기 치료 웹타이드에 연결되고 세포에 의해 상기 치료 웹타이드의 흡수를 용이하게 하는 수송 모이어티를 포함하는 치료제.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 치료 웹타이드가 미토콘드리아 호흡 복합체 1의 TDP-43 매개된 디스어셈블리 (mediated disassembly)를 억제시키는, 조성물.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, TDP-43의 상기 적어도 하나의 미토콘드리아 내부 표적화 모티프가 서열 식별 번호: 1, 서열 식별 번호: 3, 및 서열 식별 번호: 5로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는, 조성물.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 치료 웹타이드가 서열 식별 번호: 1 또는 서열 식별 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는, 조성물.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 치료 웹타이드가 서열 식별 번호: 3 또는 서열 식별 번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는, 조성물.

#### 청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 치료 웹타이드가 서열 식별 번호: 5 또는 서열 식별 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는, 조성물.

#### 청구항 7

청구항 9에 있어서, 상기 수송 모이어티가 TAT 웹타이드를 포함하는, 조성물.

#### 청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 치료제가 서열 식별 번호: 12-17로 구성된 군으로부터 선택되는 산 서열을 갖는, 조성물.

#### 청구항 9

대상체에서 신경퇴행성 질환의 치료 방법으로서, 상기 대상체에게 TDP-43 미토콘드리아 국소화 억제제의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 TDP-43 국소화 억제제의 치료적 유효량이 TDP-43 유도된 미토콘드리아 기능이상 및 뉴런 손실을 억제시키기 위해 요구된 양인, 방법.

#### 청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 TDP-43 미토콘드리아 국소화 억제제가 TDP-43의 적어도 하나의 미토콘드리아 내부 표적화 모티프의 약 5 내지 약 8 연속 아미노산에 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%,

적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 약 5 내지 약 10 아미노산의 합성 치료 펫타이드를 포함하는, 방법.

#### **청구항 12**

청구항 11에 있어서, 상기 치료 펫타이드가 미토콘드리아 호흡 복합체 1의 TDP-43 매개된 디스어셈블리를 억제시키는, 방법.

#### **청구항 13**

청구항 11에 있어서, TDP-43의 상기 적어도 하나의 미토콘드리아 내부 표적화 모티프가 서열 식별 번호: 1, 서열 식별 번호: 3, 및 서열 식별 번호: 5로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는, 방법.

#### **청구항 14**

청구항 11에 있어서, 상기 치료 펫타이드가 서열 식별 번호: 1 또는 서열 식별 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

#### **청구항 15**

청구항 11에 있어서, 상기 치료 펫타이드가 서열 식별 번호: 3 또는 서열 식별 번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

#### **청구항 16**

청구항 11에 있어서, 상기 치료 펫타이드가 서열 식별 번호: 5 또는 서열 식별 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

#### **청구항 17**

청구항 14에 있어서, 상기 TDP-43 국소화 억제제가 상기 치료 펫타이드에 연결되고 세포에 의해 상기 치료 펫타이드의 흡수를 용이하게 하는 수송 모이어티를 추가로 포함하는, 방법.

#### **청구항 18**

청구항 17에 있어서, 상기 수송 모이어티가 TAT 펫타이드를 포함하는, 방법.

#### **청구항 19**

청구항 17에 있어서, 상기 TDP-43 국소화 억제제가 서열 식별 번호: 12-17로 구성된 군으로부터 선택되는 산 서열을 갖는, 방법.

#### **청구항 20**

청구항 9에 있어서, 상기 신경퇴행성 질환이 근위축성 측색 경화증 (ALS), 전두측두엽 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병, 및 헌팅턴병으로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법

#### **청구항 21**

청구항 9에 있어서, 상기 신경퇴행성 질환이 전두측두엽 치매인, 방법.

#### **청구항 22**

청구항 9에 있어서, 상기 신경퇴행성 질환이 근위축성 측색 경화증인, 방법.

#### **청구항 23**

청구항 9에 있어서, 상기 TDP-43 국소화 억제제가 상기 대상체에게 연속 피하 주입을 통해 투여되는, 방법.

#### **청구항 24**

대상체에서 근위축성 측색 경화증 (ALS)의 치료 방법으로서,

상기 대상체에게 TDP-43 미토콘드리아 국소화 억제제의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

### 청구항 25

청구항 24에 있어서, 상기 TDP-43 국소화 억제제의 치료적 유효량이 TDP-43 유도된 미토콘드리아 기능이상 및 뉴런 손실을 억제시키기 위해 요구된 양인, 방법.

### 청구항 26

청구항 24에 있어서, 상기 TDP-43 미토콘드리아 국소화 억제제가 TDP-43의 적어도 하나의 미토콘드리아 내부 표적화 모티프의 약 5 내지 약 8 연속 아미노산에 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 약 5 내지 약 10 아미노산의 합성 치료 웨타이드를 포함하는, 방법.

### 청구항 27

청구항 24에 있어서, 상기 치료 웨타이드가 미토콘드리아 호흡 복합체 1의 TDP-43 매개된 디스어셈블리를 억제시키는, 방법.

### 청구항 28

청구항 24에 있어서, TDP-43의 상기 적어도 하나의 미토콘드리아 내부 표적화 모티프가 서열 식별 번호: 1, 서열 식별 번호: 3, 및 서열 식별 번호: 5로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는, 방법.

### 청구항 29

청구항 24에 있어서, 상기 치료 웨타이드가 서열 식별 번호: 1 또는 서열 식별 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

### 청구항 30

청구항 24에 있어서, 상기 치료 웨타이드가 서열 식별 번호: 3 또는 서열 식별 번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

### 청구항 31

청구항 24에 있어서, 상기 치료 웨타이드가 서열 식별 번호: 5 또는 서열 식별 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

### 청구항 32

청구항 24에 있어서, 상기 TDP-43 국소화 억제제가 상기 치료 웨타이드에 연결되고 세포에 의해 상기 치료 웨타이드의 흡수를 용이하게 하는 수송 모이어티를 추가로 포함하는, 방법.

### 청구항 33

청구항 32에 있어서, 상기 수송 모이어티가 TAT 웨타이드를 포함하는, 방법.

### 청구항 34

청구항 24에 있어서, 상기 TDP-43 국소화 억제제가 서열 식별 번호: 12-17로 구성된 군으로부터 선택되는 산 서열을 갖는, 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

#### [0001] 관련 출원

본원은 2016년 4월 27일 출원된, 미국 출원 번호 62/328,484, 및 2016년 4월 7일 출원된, 62/319,580으로부터 우선권을 주장하고, 이의 주체는 본 명세서에서 참고로 그 전문이 편입된다.

[0003] **정부 지원**

[0004] 본 발명은 국립보건원에 의해 수여된 과제 번호 1R01NS089604 하에서 정부 지원으로 작성되었다. 미국 정부는 본 발명에서 특정 권리를 갖는다.

**배경 기술**

[0005] 근위축성 측색 경화증 (ALS)는 뇌 줄기 및 척수에서 진행성 운동 뉴런 퇴행을 특징으로 하는 가장 흔한 운동 질환이고, 반면에 전두측두엽 치매 (FTD)는 전두엽 및 측두엽에서 뉴런 손실에 의해 야기된 초기-발병 치매의 제2 가장 통상적인 형태이다. 돌발형 ALS 또는 FTD로서 지칭된, 대다수의 ALS 또는 FTD 사례는 유전자적으로 전염되지 않고 그것의 원인은 미공지된채 남아 있다. 현재, ALS 및 FTD 양쪽에 대하여 효과적인 치료는 없다.

[0006] TDP-43은 2 탠덤 RNA 인식 모티프 RRM1 및 RRM23을 함유하는 작은 도처에 발현된 RNA/DNA 결합 단백질이다. 이전의 연구는 TDP-43이 주로 mRNA를 결합시키고, RNA 스플라이싱, 수송 및 번역을 포함하는 전사후 RNA 처리를 조절한다는 것이 드러났다. TDP-43에서 상염색체 우세한 돌연변이는 돌발형 및 가족성 ALS와 관련되고, 핵부터 세포질까지 TDP-43의 재분포는 ALS의 대부분의 형태 그리고 FTD의 가장 빈번한 하위유형에 대하여 병리적 특질로서 인식되어 왔다. 사실상, TDP-43의 세포질로의 불-국소화는 또한 알츠하이머병, 파킨슨병 및 헌팅턴병을 포함하는 다른 주요 신경퇴행성 질환의 핵심 병리적 특질을 대표한다.

**발명의 내용**

**요약**

[0008] 본 명세서에서 기재된 구현예는 일반적으로 신경 세포에서 TAR DNA 결합 단백질 43 (TDP-43) 미토콘드리아 국소화를 억제시키는 조성물 및 방법에 관한 것이고, 특히 신경퇴행성 질환 또는 장애의 치료가 필요로 하는 대상체에서 신경퇴행성 질환 또는 장애의 치료 조성물 및 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 신경 세포 또는 이를 필요로 하는 대상체에게 TDP-43 미토콘드리아 국소화를 억제시키는 제제의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0009] 일부 구현예에서, 신경퇴행성 질환 또는 장애는 비정상적인 TDP-43 미토콘드리아 국소화, TDP-43 뉴런의 독성, 및/또는 TDP-43의 돌연변이와 관련된 및/또는 상기로 특성규명된 신경퇴행성 질환 또는 장애를 포함할 수 있다. 신경퇴행성 질환은, 예를 들어, 근위축성 측색 경화증 (ALS), 전두측두엽 치매 (FTD), 알츠하이머병, 알츠하이머병에 관련된 치매, 파킨슨병, 노인성 치매, 헌팅턴병, 질 드 라 뚜렛 증후군(Gilles de la Tourette's syndrome), 다발성 경화증, 또는 선천성 운동 및 감각 신경병증을 포함할 수 있다.

[0010] 다른 구현예는 돌연변이체 TDP-43 발현과 관련된 운동-조정 및 인지 기능이상의 치료 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 신경 세포 또는 이를 필요로 하는 대상체에게 TDP-43 미토콘드리아 국소화를 억제시키는 제제의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0011] 일부 구현예에서, 제제 또는 TDP-43 미토콘드리아 국소화 억제제는 TDP-43의 미토콘드리아 내부 표적화 신호의 약 5 내지 약 8 연속 아미노산에 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 약 5 내지 약 10 아미노산의 치료 웨타이드를 포함한다. 예를 들어, 치료 웨타이드는 M1 (서열 식별 번호: 1), M3 (서열 식별 번호: 3), 또는 M5 (서열 식별 번호: 5) 또는 TDP-43의 약 5 내지 약 7 연속 아미노산에 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 치료 웨타이드는 서열 식별 번호: 1 또는 서열 식별 번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 웨타이드를 포함할 수 있거나, 상기로 본질적으로 구성될 수 있거나, 상기로 구성될 수 있다.

[0012] 다른 구현예에서, 제제는 치료 웨타이드에 연결되는 그리고 세포에 의해 치료 웨타이드의 흡수를 용이하게 하는 수송 모이어티를 포함한다. 예를 들어, 수송 모이어티는 HIV Tat 수송 모이어티일 수 있다.

[0013] 추가의 다른 구현예에서, 세포는 치료받을 대상체에 있고, 치료제는 치료받을 대상체에게 국소적으로 또는 전신으로 투여된다.

[0014] 더욱 다른 구현예에서, 치료 웨타이드는 신경 세포에서 발현된다.

**도면의 간단한 설명**

[0015]

도 1(A-I)는 TDP-43이 ALS 및 FTD 환자에서 미토콘드리아내 공-국소화하고 축적하는 것을 설명한다. (A, B) 연령-매칭된 정상 개체 ( $n=5$ ) 및 산발적 ALS 사례 ( $n=6$ )의 요추 척수내 인간 운동 뉴런 (A)에서, 또는 연령-매칭된 정상 개체 ( $n=3$ ) 및 산발적 FTD 사례 ( $n=4$ )의 피질내 인간 피질 뉴런 (B)에서 Tom20 및 TDP-43의 대표적인 공초점 이미지 및 라인-스캔 분석. 뉴런은 Tom20 및 TDP-43 각각에 대해 특이적 항체를 사용하여 공-염색되었다. a, b에서 "2" 폭으로 백색 실선내 Tom20과 TDP-43 사이 공-국소화의 대표적인 라인-스캔 분석은 우측 패널에서 보여진다. 라인-스캔 분석은 방법에서 상세히 기재된 바와 같이 이미지 J RGB 프로파일 플롯 플러그인에 의해 수행되었다. (c, d) 이미지 J RGB 3D 뷔어 플러그인에 의해 시리즈 박형 공초점 이미지 (200 nm 광학 두께를 가진 약 30 연속 이미지)를 사용하여 a 및 b 각각에서 뉴런의 대표적인 재구성된 3차원 (3D) 이미지. (E, F) 연령 매칭된 대조군 ( $n=6$ ) 및 산발적 ALS ( $n=8$ ) 척수 (E), 또는 연령 매칭된 대조군 ( $n=6$ ) 및 산발적 FTD ( $n=7$ ) 피질 (F)로부터 단리된 정제된 미토콘드리아 ("미토콘드리아")에서 TDP-43 수준의 정량화 및 대표적인 면역블랏. 대조군과 비교하여, 총 조직 용해물 ("총 용해물")에서 TDP-43, 즉, "총 TDP-43"은 ALS 또는 FTD 조직에서 변함없이 남아 있다. 사이토졸 (GAPDH), 미토콘드리아 (COXIV 및 Tom20) 및 ER (칼네신)용 구획 특이적 마커는 포함된다. 미토콘드리아 및 총 TDP-43 수준은 모두 COXIV 및 GAPDH 각각에 의해 조정된다. (G, H) 연령 매칭된 대조군 및 ALS 척수 (G) 및 연령 매칭된 대조군 및 FTD 피질 (H)의 미토콘드리아로부터 제조된 상이한 하위-미토콘드리아 분획에서 TDP-43의 대표적인 면역블랏. 하위-미토콘드리아 구획 마커는 OMM용 Tom20, IMS용 사이토크롬 c (Cyto c), IMM용 Tim23 및 매트릭스용 Hsp60을 포함한다. (I) 연령 매칭된 대조군 및 산발적 ALS 척수, 또는 연령 매칭된 대조군 및 산발적 FTD 피질로부터 단리된 정제된 미토콘드리아에서 TDP-43의 대표적인 면역-전자 현미경적 (면역-EM) 현미경사진. 우측 패널에서 정량화는 박형 EM 부문 (50 nm 두께)에서 미토콘드리아의 제곱  $\mu\text{m}^2$ 당 TDP-43 황금 입자의 평균 수를 보여준다. 화살표는 면역황금 표지된 TDP-43을 나타낸다. 10  $\mu\text{g}$  단백질의 동일 양은 모든 면역블랏에서 장입되었다. 데이터는 삼중 독립 실험의 평균  $\pm$  s.e.m이다. 통계: 일원 분산 분석 (ANOVA) 이어서 터키 다중 비교 시험. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  및 \*\*\* $P < 0.01$ .

도 2(A-H)는 TDP-43에서 ALS-관련 유전적 돌연변이가 미토콘드리아 속에 그것의 도입을 증가시키는 것을 설명한다. (A-C) TDP-43 G298S 또는 A382T (G298S 또는 A382T 섬유아세포)를 보유하는 ALS 환자로부터 유래된 1차 인간 섬유아세포의 2 라인 그리고 연령 매칭된 1차 정상 인간 섬유아세포 (NHF1-4)의 4 라인으로부터 단리된 정제된 미토콘드리아 ("미토콘드리아" 분획) (A), 팬 TDP-43 항체를 사용하는 Flag 태깅된 인간 WT 및 돌연변이체 TDP-43 G298S, A315T 또는 A382T를 발현시키는 HEK293 세포 (B), 또는 인간 TDP-43 (hTDP-43)에 특이적인 항체를 사용하는 인간 WT ( $n=6$ ) 또는 돌연변이체 TDP-43 A315T ( $n=6$ )을 발현시키는 1-2 월령 유전자도입 암컷 마우스의 척수 및 뇌 (C)에서, TDP-43의 정량화 및 대표적인 면역블랏. HEK293 세포는 지시된 Flag 태깅된 TDP-43을 발현시키는 작제물로 일시적으로 형질감염되었다. 형질감염 2 일후, 세포는 미토콘드리아 단리 및 추가 생화학적 분석을 위하여 수집되었다. 별표는 내인성 TDP-43을 나타내고 반면에 화살표는 외인성 Flag 태깅된 TDP-43을 지시한다. 총 세포 용해물 ("총 용해물")에서 구획 특이적 마커 및 TDP43의 면역블랏은 또한 보여진다. 정량화를 위하여, 미토콘드리아 TDP-43은 양쪽 총 TDP-43 (즉, 총 세포 용해물에서 TDP-43의 발현) 및 COXIV (미토콘드리아 분획에서 COXIV의 발현)에 의해 조정된다. (D, E) 인간 섬유아세포의 정제된 미토콘드리아 (D) 또는 WT 또는 돌연변이체 인간 TDP-43을 발현시키는 유전자도입 마우스의 척수/뇌 조직 (E)로부터 제조된 하위-미토콘드리아 분획에서 TDP-43의 대표적인 면역블랏. (F) 미토콘드리아 도입 검정 후 0.25% 트립신 또는 1148 0.25% 트립신/디기토닌 (5mg/10mg 미토콘드리아) 유/무 처리된 마우스 뇌로부터 새롭게 단리된 미토콘드리아에서 Flag 태깅된 인간 rTDP-43 (좌측 패널) 또는 바이오토닐화된 F1 $\beta$  (우측 패널)의 대표적인 면역블랏. (G) 지시된 시간에 rTDP-43로 인큐베이션 이어서 0.25% 트립신/디기토닌 (5 mg/10mg 미토콘드리아) 사후도입 처리 후 마우스 뇌로부터 새롭게 단리된 미토콘드리아에서 Flag 태깅된 WT 및 돌연변이체 인간 rTDP-43의 정량화 및 대표적인 면역블랏. 주석: WT/돌연변이체 TDP-43의 N- 또는 C 말단 어느 한쪽에서 Flag는 그것의 도입에서 상당한 효과가 없다 (데이터 도시되지 않음). (H) 미토콘드리아 도입 검정 후 (사후도입 처리 없음) 정제된 마우스 뇌 미토콘드리아에서 Flag 태깅된 인간 rTDP-43 WT 또는 A315T의 대표적인 면역-EM 분석. 정량화는 박형 EM 부문 (50 nm 두께)에서 미토콘드리아의 제곱  $\mu\text{m}^2$ 당 TDP-43 황금 입자의 평균 수를 보여준다. 화살표는 면역황금 표지된 TDP-43을 나타낸다. 단백질의 동일 양(10  $\mu\text{g}$ )은 모든 면역블랏 분석에서 장입되었다. 데이터는 삼중 실험의 평균  $\pm$  s.e.m이다. 통계: 일원 분산 분석 (ANOVA) 이어서 터키 다중 비교 시험. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  및 \*\*\*\* $P < 0.0001$ . 패널 g에서, WT TDP-43과 비교된, \* $P < 0.05$ , \* $P < 0.05$ .

도 3(A-G)는 TDP-43 미토콘드리아 도입/국소화가 TOM/TIM23 복합체 및 내부 M1/3/5 모티프에 좌우되는 것을 설명한다. (A) 인간 TDP-43의 구조 (최상부 패널) 및 아미노산 서열 (최하부 패널) (서열 식별 번호: 10). RRM1/2는 RNA 인식 모티프이다. NLS: 핵 국소화 서열; NES: 핵 방출 서열. (B) 추정 내부 표적화 신호 ( $\Delta M1-6$ )의 결실과 지시된 재조합 Flag 태깅된 인간 야생형 (WT) TDP-43 또는 인공 TDP-43 돌연변이체로 인큐베이션 이어서

0.25% 트립신/디기토닌 (5 mg/10mg 미토콘드리아) 처리 (시험관내 미토콘드리아 도입 검정) 후 ("뇌 미토콘드리아"로 지시된) 마우스 뇌로부터 새롭게 단리된 미토콘드리아에서 rTDP-43의 정량화 및 대표적인 면역블랏. (C) Flag에 대해 특이적 항체를 사용하는 HEK293 과발현 Flag 태깅된 TDP-43 ( $\Delta M1-6$ )으로부터 단리된 순수한 미토콘드리아에서 TDP-43의 정량화 및 대표적인 면역블랏. 세포질 분획 ("사이토졸"), 핵 분획 ("핵") 및 총 용해물 ("총")에서 TDP-43의 발현은 또한 보여진다. HEK293 세포는 지시된 작제물로 또한 일시적으로 형질감염되었고 형질감염 2 일후 미토콘드리아 단리를 거쳤다. (D) 5  $\mu$ M 대조군 웹타이드 (cPM), PM1 또는 PM3으로 사전-/공-처리된 미토콘드리아에서 Flag 태깅된 rTDP-43 및 pF1 $\beta$ 의 정량화 및 대표적인 면역블랏, 이어서 rTDP-43 또는 pF1 $\beta$  인큐베이션을 사용하는 시험관내 미토콘드리아 도입 검정. (E, F) 24 시간 동안 1  $\mu$ M cPM, PM1 또는 PM3으로 처리된 렉트 1차 피질 뉴런 (12 일 시험관내: DIV 12, f) 또는 HEK293 세포 (E)로부터 단리된 순수한 미토콘드리아에서 TDP-43의 정량화 및 대표적인 면역블랏. 총 세포 용해물 ("총")에서 구획 특이적 마커 및 TDP43의 면역블랏은 또한 보여진다. (G) GFP 또는 M1/3/5-GFP (N-말단 태그)를 발현시키는 HEK293 세포로부터 단리된 순수한 미토콘드리아에서 GFP의 정량화 및 대표적인 면역블랏. HEK293 세포는 지시된 작제물로 일시적 형질감염 2 일후 수집되었다. 정량화는 트립신/디기토닌으로 공-처리된 샘플에 기반된다. 총 세포 용해물 ("총 용해물")에서 GFP 및 M1/3/5 태깅된 GFP의 면역블랏은 또한 보여진다. 10  $\mu$ g 단백질의 동일 양은 모든 면역블랏에서 장입되었다. 데이터는 삼중 실험의 평균  $\pm$  s.e.m이다. 통계: 일원 분산 분석 (ANOVA) 이어서 터키 다중 비교 시험. \*P< 0.05.

도 4(A-H)는 TDP-43이 복합체 I 하위단위 ND3/6을 인코딩하는 미토콘드리아-전사된 mRNAs를 우선적으로 결합시키고 그것의 번역을 억제시키는 것을 설명한다. (A) 인간 미토콘드리아 게놈의 맵. 경 (OL)/ 중 가닥 (OH) 복제의 기원, 경 및 중 가닥 프로모터 (LSP 및 HSP), 및 DNA 복제/전사의 방향은 화살표로 지시된다. 미토콘드리아 게놈은 코딩 유전자 사이 2 rRNAs 및 22 tRNAs, 그리고 4 산화적 인산화 (OXPHOS) 복합체, 즉, 복합체 I, III, IV 및 V에 필수적인 13 하위단위를 인코딩한다. 이들 13 미토콘드리아 인코딩된 단백질은 복합체 I의 7 하위단위 (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 및 6), 복합체 III의 1 하위단위 (Cyt b), 복합체 IV의 3 하위단위 (COXI, II 및 III) 및 복합체 V의 2 하위단위 (A6 및 A8)을 포함한다. (B-D) 3 월령 마우스로부터 새롭게 수집된 마우스 뇌 (B), 배양된 1차 인간 섬유아세포 (C) 또는 HEK293 세포 과발현 Flag 태깅된 WT 또는 돌연변이체 인간 TDP-43 (D)로부터 단리된 정제된 미토콘드리아에서 TDP-43 또는 Flag에 특이적인 항체에 의해 침전된 미토콘드리아 인코딩된 mRNAs의 대표적인 역전사효소-커플링된 정량적 실시간 폴리머라제 연쇄 반응 (qRT-PCR) 분석. HEK293 세포로부터 미토콘드리아는 지시된 작제물로 일시적 형질감염 2 일후 단리되었다. 모든 면역침강 (IP)는 자기 비드에 공유적으로 커플링된 항체로 수행되었고 이어서 RNA 추출 및 정제되었다. (E) HEK293 세포에서 미토콘드리아 인코딩된 단백질 번역의 정량화 및 대표적인 면역블랏. HEK293 세포는 TDP-43 WT 또는  $\Delta M1$ 을 인코딩하는 작제물로 형질감염되었다. 형질감염 2 일후, 세포는 에메틴 (0.1mg/ml)의 존재 하에서 AHA (50  $\mu$ M)으로 대사성으로 표지되었다. 미토콘드리아 정제 이후, AHA 표지된 단백질은 바이오틴-알kin으로 태깅되었고 스트렙타비딘 콘주케이트를 사용하여 면역블랏으로 마지막으로 분석되었다. 면역블랏에서 ND3 및 ND6 밴드는 특이적 항체에 의해 확인되었다 (도시되지 않음). (F-H) Flag 태깅된 (tagged) WT 또는 돌연변이체 인간 TDP-43을 발현시키는 HEK293 세포에서 미토콘드리아 인코딩된 단백질 (F), 48 시간 동안 1  $\mu$ M cPM (스크램블드 M1) 또는 PM1로 처리된 1차 인간 환자 섬유아세포 (G), 및 ALS (n=8) 및 연령-매칭된 정상 개체 (n=6)의 사례로부터 척수의 인간 조직 샘플 (h)의 발현의 정량화 및 대표적인 면역블랏. HEK293 세포는 또한 샘플 수집 2 일전 일시적으로 형질감염되었다. 10  $\mu$ g 단백질의 동일 양이 장입되었다. 데이터는 삼중 실험의 평균  $\pm$  s.e.m이다. 통계: 일원 분산 분석 (ANOVA) 이어서 터키 다중 비교 시험. \*P< 0.05, \*\*P< 0.01 및 \*\*\*P< 0.001. 패널 f에서, \*P< 0.05. 패널 a 및 b에서, \*P< 0.05, \*\*P< 0.01 및 \*\*\*P< 0.001.

도 5 (A-F)는 TDP-43이 구체적으로 복합체 I 어셈블리를 감소시키고 미토콘드리아 기능 및 형태학을 손상시키는 것을 설명한다. (A, C) M1 도메인 결실 유/무 HEK293 세포 과발현 Flag 태깅된 WT/돌연변이체 TDP-43에서 OXPHOS 복합체 I 또는 I-V 어셈블리 (A), 및 1  $\mu$ M cPM (스크램블드 M1) 또는 PM1 처리 48 시간후 배양된 1차 인간 섬유아세포 (C)의 정량화 및 대표적인 이미지. HEK293 세포는 일시적 형질감염 48 시간후 수집되었다 미토콘드리아는 세포로부터 단리되었고, 용해되었고 각각의 OXPHOS 복합체의 하위단위에 대해 특이적 항체를 사용하여 BN-PAGE/면역블랏에 의해 분석되었다. 화살표는 복합체 I을 나타낸다. (B, D, E) M1 도메인 결실 유/무 HEK293 세포 과발현 Flag 태깅된 WT/돌연변이체 TDP-43으로부터 단리된 미토콘드리아에서 OXPHOS 복합체 I 또는 II-V (B), 1  $\mu$ M cPM (스크램бл드 M1) 또는 PM1 처리 48 시간후 1차 인간 섬유아세포 (D), 또는 Flag 태깅된 WT TDP-43, ND3 및/또는 ND6을 공-과발현시키는 HEK293 세포 (E)의 활성의 측정. HEK293은 지시된 작제물로 일시적으로 형질감염되었고 미토콘드리아는 형질감염 48 시간후 효소 활성에 대하여 단리되었다. (F) 1  $\mu$ M cPM (스크램블드 M1) 또는 PM1 처리 48 시간후 1차 인간 섬유아세포에서  $m\triangle\psi$ , ATP 생산 및 산소 소비율 (OCR)을

포함하는 미토콘드리아 기능의 별크 측정.  $m\Delta\psi$ 를 위하여, 24 웨 플레이트에서 배양된 섬유아세포는 30 분 동안 20 nM TMRM으로 장입되었고 형광 마이크로플레이트 판독기에 의해 분석되었다. 섬유아세포의 ATP 수준은 ATP 비색계/형광 검정 키트 및 흡광도 마이크로플레이트 판독기에 의해 결정되었다. 최적의 씨딩 밀도 (100,000 세포/웰)로 살아있는 배양된 섬유아세포의 OCR은 씨호스 XF24 분석기를 사용하여 직접적으로 측정되었다. 각각의 샘플에서 모든 측정은 총 단백질에 의해 정규화되었다. (G) 1차 인간 섬유아세포에서 미토콘드리아 길이의 정량화 및 대표적인 공초점 이미지. 48 시간 동안 1  $\mu M$  cPM 또는 PM1로 처리 1 일전, 섬유아세포는 미토콘드리아를 표시하기 위해 mitoDsRed2 (미토콘드리아 구체적으로 국소화된 적색 형광 단백질)을 인코딩하는 자체물로 형질 감염되었다. 핵은 청색으로서 DAPI에 의해 염색되었다. 각각의 그룹에 대하여 n=50 세포. (F) 산화적 스트레스에 대한 1차 인간 섬유아세포의 감수성의 측정. 지시된 1차 인간 섬유아세포는 24 웨 플레이트에서 배양되었고 1  $\mu M$  cPM (스크램블드 M1) 또는 PM1 있거나 없이 전처리되었다. 전처리 48 시간후, 섬유아세포는 1 시간 동안 50  $\mu M$  H2O2로 처리되었고 ( $H_2O_2$  없이 신선한 배지 대체 후) 회수의 3 시간후 락테이트 탈수소효소 (LDH) 측정에 의해 검사되었다. 1% 트리톤 X-100의 존재 하에서 LDH 방출은 100% 세포 사망 ("100")으로 여겨졌다. 명백한 세포 탈착은 모든 조건 하에서 어느 한쪽 NHFs 또는 환자 섬유아세포에서 관측되지 않았고 각각의 샘플에서 LDH 방출은 총 단백질에 의해 정규화되었다. 데이터는 삼중 실험의 평균  $\pm$  s.e.m이었다. 통계: 일원 분산 분석 (ANOVA) 이어서 터키 다중 비교 시험. \*P< 0.05. 패널 A 및 B에서, 대조군 세포와 비교된, \*P<0.05 및 WT TDP-43을 발현시키는 세포와 비교된, #p<0.05.

도 6(A-J)는 생체내 TDP-43 미토콘드리아 국소화의 억제에 의해 미토콘드리아 및 운동 뉴런에서 TDP-43 독성으로부터 보호를 설명한다. (A) 생체내 mitoDsRed2에 의한 비시스템론성 렌티바이러스 형질도입 및 미토콘드리아 표시화를 보여주는 도식적 및 대표적인 큰 영역 이미지. 3 월령 마우스는 운동 피질 속에 TDP-43 및 mitoDsRed2 양쪽을 인코딩하는 2  $\mu l$   $1 \times 10^9$  TU/ml 비시스템론성 렌티바이러스로 주사되었고 7 일후 난자되었다. 화살표는 주사 부위를 나타낸다. AP/전측-후측: 1 mm; ML/내측-측면: 1mm 및 DV/등부-복부: 0.7mm. (B) 뉴런의 특정 마우스 시냅신1 유전자 프로모터 하에서 지시된 TDP-43 WT 및 A315T 그리고 mitoDsRed2를 인코딩하는 비시스템론성 렌티바이러스로 감염된 뉴런에서 미토콘드리아 길이의 정량화 및 대표적인 2D/3D (확장) 공초점 이미지. 상부 패널은 큰 영역 이미지이고 최하부 패널은 신경돌기에서 미토콘드리아의 확장이다. 6 3월령 마우스 / 그룹으로부터 뉴런 각각을 발현시키는 벡터, WT, WT/M1, A315T 및 A315T/M1에 대하여 n=45, 50, 40, 33 및 35. (C) 운동 피질에서 절단된 카스파제 3 양성 뉴런의 정량화 및 대표적인 면역염색. 핵은 DAPI로 염색되고 양성으로 감염된 뉴런은 mitoDsRed2에 의해 확인된다. 6 3월령 마우스 / 그룹으로부터 뉴런 각각을 발현시키는 벡터, WT, WT/ $\Delta$ M1, A315T 및 A315T/ $\Delta$ M1에 대하여 n=35, 37, 33, 33 및 32. (D) 지시된 웨타이드로 처리된 TDP-43 A315T (Tg)를 발현시키는 70 일령 비-유전자도입 (NTG) 및 유전자도입 마우스의 척수로부터 단리된 미토콘드리아에서 미토콘드리아 인코딩된 단백질의 발현의 정량화 및 대표적인 면역블랏 (n=6 마우스 / 그룹, 모두 암컷, cPM: 스크램블드 M1). (E, F) 지시된 웨타이드로 처리된 TDP-43 A315T를 발현시키는 70 일령 비-유전자도입 (NTG) 및 유전자도입 마우스에서 시냅스 미토콘드리아내 OCR/ $m\Delta\psi$  (E) 및 OXPHOS 복합체 어셈블리 (F)의 측정 (n=4 마우스 / 그룹, 모두 암컷). 시냅토솜은 마우스 뇌로부터 단리되었고 (척수 조직으로부터 시냅토솜은 OXPHOS 복합체 어셈블리의 추가 미토콘드리아 정제 및 측정에 충분하지 않았다) 씨호스 XF24 마이크로플레이트 또는 24 웨 세포 배양 플레이트에 부착되었다. 시냅토솜에서 시냅스 미토콘드리아의 OCR은 씨호스에 의해 직접적으로 결정되었고, 반면에  $m\Delta\psi$ 는 30 분 동안 20 nM TMRM 장입후 형광 마이크로플레이트 판독기에 의해 측정되었다. OXPHOS 복합체의 어셈블리는 각각의 OXPHOS 복합체의 하위단위에 대해 지시된 특이적 항체를 사용하는 BN-PAGE/면역블랏에 의해 시냅토솜으로부터 단리된 미토콘드리아를 사용하여 결정되었다. (G) 지시된 웨타이드로 처리된 70 일령 마우스의 요추 척수에서 운동 뉴런 (n=6 마우스/그룹, 모두 암컷). (H) 장딴지 근육 (송아지의 다리에서 가장 큰 근육)에서 신경근 접합부 (NMJs)의 정량화 및 대표적인 공초점 이미지. SV2 (시냅스 소포 단백질 2, 시냅스전 마커) 및 (2H3, 신경필라멘트에 대한 특이적 항체);  $\alpha$ -분자로토신 스테인 시냅스후 마커 니코틴산 아세틸 콜린 수용체 (AChR). n=6 마우스/그룹, 모두 암컷. (I) 지시된 웨타이드로 처리된 70 일령 마우스의 워킹 풋프린트 패턴의 정량화 및 대표적인 이미지 (n=6 마우스/그룹, 암컷). 화살표는 워킹 방향을 나타낸다. (J) 지시된 웨타이드로 처리된 가속 로타로드 (5 분 지나서 4-40 rpm)에서 70 일령 마우스의 운동 협응 및 벨런스 (n=6 마우스/그룹, 모두 암컷). D-J에 대하여, 모든 처리는 60 일령부터 시작하였다. 데이터는 삼중 실험의 평균  $\pm$  s.e.m이다. 통계: 일원 분산 분석 (ANOVA) 이어서 터키 다중 비교 시험. \*P< 0.05, \*\*P< 0.01 및 \*\*\*P < 0.001.

도 7(A-E)는 성체 반접합 TDP-43M337V 마우스의 감각운동 성능을 설명한다. (A) 마우스가 가속 회전 막대에서 남아있을 수 있는 최대 시간으로서 명시된, 로타로드에서 NTG 및 반접합 TDP-43M337V 마우스내 운동 협응(motor

coordination) 및 밸런스. (B) 각각의 빔을 방해하기 위한 잠복기에 의해 평가된 NTG 및 반접합 TDP-43M337V 마우스에서 마우스의 운동 협응 및 밸런스. (C) NTG 및 반접합 TDP-43M337V 마우스의 앞다리 및 뒷다리 강도. (D) 노지 시험에서 10 분 동안 계속해서 리코딩된 비-유전자도입 연령 매칭된 한배새끼 대조군 (NTG) 및 유전자도입 (TG) 반접합 TDP-43M337V 마우스의 이동된 거리 (m) 및 속도 (m/초). (E) 그것의 뒷발로부터 접착 테이프의 조각을 제거하기 위한 잠복기에 의해 측정된 NTG 및 반접합 TDP-43M337V 마우스의 감각운동 반응. 모든 마우스는 8-9 월령이다. NTG (8 암컷/3 수컷)에 대하여 n= 11 및 TG (10 암컷/8 수컷)에 대하여 n= 18이다. 빔 위킹 시험에서 데이터는 이원 ANOVA 분석 이어서 본페로니 다중 비교를 사용하여 분석하였고, 반면에 다른 시험에서 데이터는 스튜던트-t-시험을 사용하여 분석하였다. 모든 데이터는 점 및 평균 ± SEM으로서 나타났고; \*p<0.05, \*\*p<0.01; ns: 무의미.

도 8(A-D)는 성체 반접합 TDP-43M337V 마우스의 인지 성능을 설명한다. (A, B) Y 미로 (A)에서 NTG 및 반접합 TDP-43M337V 마우스 그리고 T 미로 (B) 시험에서 신규성 선호의 자발적인 교번. (C) 객체 인식 시험에서 3 상이한 기간에서 NTG 및 반접합 TDP-43M337V 마우스의 익숙하지 않은 객체에 대한 선호 비. T1: 제1 5-분 시험 기간; T2: 1.5 시간 지연된 5-분 비유사 자극 기간; T3: 24 시간 지연된 5-분 제3 기간. (D) 시험 기간에서 NTG 및 반접합 TDP-43M337V 마우스의 냉담한 행동 (자극 없이 그리고 자극-간-간격으로 4회 반복된 습관화), 상황적 공포 학습 및 공포 조건화 시험에서 단서-의존적 공포 학습. CS: 조건적 자극 (백색 소음, 30 초 동안 80 dB); US: 무조건적 자극 (1 초 동안 0.5 mA의 전기 쇼크). 모든 마우스는 8-9 월령이다. NTG (8 암컷/3 수컷)에 대하여 n= 11 및 TG (10 암컷/8 수컷)에 대하여 n= 18이다. 데이터는 스튜던트-t-시험 또는 이원(two-way) ANOVA 이어서 본페로니(Bonferroni) 다중 비교를 사용하여 분석하였다. 모든 데이터는 점 및 평균 ± SEM으로서 나타났고; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; ns: 무의미.

도 9(A-E)는 PM1에 의해 반접합 TDP-43<sup>M337V</sup> 마우스의 뇌에서 TDP-43 미토콘드리아 국소화, 미토콘드리아 기능이 상 및 신경 손실의 억제를 설명한다. 11 월령 NTG 및 반접합 TDP-43M337V 마우스는 피하 주입으로 6 주 동안 계속해서 1.5 mg/kg/일 cPM (PM1에 대한 대조군 웨타이드) 또는 PM1로 처리되었다. NTG+cPM: cPM으로 처리된 NTG 마우스; NTG+PM1: PM1로 처리된 NTG 마우스; TG+cPM: cPM으로 처리된 반접합 TDP-43M337V 마우스; TG+PM1: PM1로 처리된 반접합 TDP-43M337V 마우스. (A) cPM 또는 PM1 웨타이드로 처리된 NTG 및 TG 마우스의 뇌의 총 용해물 및 정제된 미토콘드리아 분획에서 외인성 인간 TDP-43 또는 총 TDP-43의 정량화 및 대표적인 면역블랏. 10 µg 단백질의 동일 양이 장입되었다. 데이터는 삼중 실험의 평균 ± SEM이다. (B) Tom20 및 TDP-43 각각에 대해 특이적 항체를 사용하여 공-염색된 괴질 뉴런에서 Tom20 및 TDP-43의 대표적인 공초점 이미지. 이미지 J RGB 프로파일 플롯 플러그인에 의해 백색 실선으로 Tom20과 TDP-43 사이 공-국소화의 라인-스캔 분석. (C) 지시된 웨타이드로 처리된 NTG 및 TG 마우스에서 시냅스 미토콘드리아내 OCR/m△ψ의 측정 (n=4 마우스 / 그룹). 시냅토솜은 씨호스 XF24 마이크로플레이트 또는 24 웰 세포 배양 플레이트에 부착된 마우스 뇌로부터 단리되었다. 시냅토솜내 시냅스 미토콘드리아는 씨호스에 의해 직접적으로 결정되었고, 반면에 m△ψ는 30 분 동안 20 nM TMRM 장입후 형광 마이크로플레이트 판독기로 측정되었다. (D, E) cPM을 가진 TG 마우스의 마우스 괴질 20 총 2&3에서 감소된 뉴런의 밀도를 보여주는 정량화 그리고 대표적인 해마복실린 및 에오신 (H&E) 염색된 부문 (유사한 패턴을 보여주는 cPM 처리 없이 Tg 마우스, 도시되지 않음). 그에 반해서, PM1로 처리된 TG 마우스는, cPM1 또는 PM1에 의해 처리된 NTG 마우스 또는 NTG 마우스와 유사한, 비교할만한 뉴런의 밀도 및 형태학을 보여준다. 12-13 월령에서 모든 마우스. NTG에 대하여 n= 5, TG+cPM에 대하여 n= 4 및 TG+PM1에 대하여 n= 3. 데이터는 이원 ANOVA 이어서 본페로니 다중 비교를 사용하여 분석하였다. \*p<0.05; ns: 무의미.

도 10(A-E)는 PM1에 의해 성체 반접합 TDP-43M337V 마우스의 개선된 운동 협응 성능을 설명한다. 11 월령 NTG 및 반접합 TDP-43M337V 마우스는 피하 주입으로 6 주 동안 계속해서 1.5 mg/kg/일 cPM (PM1용 대조군 웨타이드) 또는 PM1로 처리되었다. NTG+cPM: cPM으로 처리된 NTG 마우스; TG+cPM: cPM으로 처리된 반접합 TDP-43M337V 마우스; TG+PM1: PM1로 처리된 반접합 TDP-43M337V 마우스. (A-E) 로타로드 (A), 빔 위킹 (B), 앞다리/뒷다리 강도 (C), 노지 (open field)(D), 및 접착성 페이퍼 시험 (E)에서 NTG+cPM, TG+cPM 및 TG+PM1 마우스의 감각운동 성능. 모든 마우스는 12-13 월령이다. NTG+cPM (4 암컷/3 수컷)에 대하여 n= 7, TG+cPM (4 암컷/4 수컷)에 대하여 n= 8 및 TG+PM1 (5 암컷/4 수컷)에 대하여 n= 9. 데이터는 ANOVA 이어서 본페로니 다중 비교를 사용하여 분석하였다. 모든 데이터는 점 및 평균 ± SEM으로서 나타났고; \*p<0.05; ns: 무의미.

도 11(A-D)는 PM1에 의한 성체 반접합 TDP-43<sup>M337V</sup> 마우스의 개선된 인지 성능을 설명한다. 11 월령 NTG 및 반접합 TDP-43<sup>M337V</sup> 마우스는 피하 주입으로 6 주 동안 계속해서 1.5 mg/kg/일 cPM (PM1용 대조군 웨타이드) 또는 PM1로 처리되었다. NTG+cPM: cPM으로 처리된 NTG 마우스; TG+cPM: cPM으로 처리된 반접합 TDP-43M337V 마우스;

TG+PM1: PM1로 처리된 반접합 TDP-43M337V 마우스. (A-D) Y 미로 (A), T 미로 (B), 객체 인식 (C) 및 공포 조건화 시험 (D)에서 NTG+cPM, TG+cPM 및 TG+PM1 마우스의 인지 성능. 모든 마우스는 12-13 월령이다. NTG+cPM에 대하여 n= 7 (4 암컷/3 수컷), TG+cPM (4 암컷/4 수컷)에 대하여 n= 8 및 TG+PM1 (5 암컷/4 수컷)에 대하여 n= 9. 데이터는 ANOVA 이어서 본페로니 다중 비교를 사용하여 분석하였다. 모든 데이터는 점 및 평균 ± SEM으로서 나타났고; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; ns: 무의미.

도 12(A-D)는 5xFAD 유전자도입 마우스의 인지 성능 및 TDP-43 미토콘드리아 국소화 개선된 운동 협응의 억제를 설명한다. 10월령 NTg 및 Tg 수컷 마우스는 피하 주입으로 4 주 동안 계속해서 0.5 mg/kg/일 cPM (PM1용 대조군 웨타이드) 또는 PM1로 처리되었다. NTg+cPM, cPM으로 처리된 NTg 마우스; Tg+cPM, cPM으로 처리된 5xFAD 마우스; Tg+PM1, PM1로 처리된 5xFAD 마우스. (A, B) cPM 또는 PM1 웨타이드로 처리된 Tg 마우스의 뇌의 정제된 미토콘드리아 분획에서 내인성 TDP-43의 정량화 (B) 및 대표적인 면역블랏 (A). 10 µg의 단백질의 동등량은 장입되었다. (B). (C) 로타로드에서 NTg+cPM, Tg+cPM, 및 Tg+PM1 마우스의 성능. (D) 바네스 미로 과제에서 NTg+cPM, Tg+cPM, 및 Tg+PM1 마우스의 성능. 모든 수컷 마우스는 10 월령이었다. NTg+cPM에 대하여 n = 11, Tg+cPM에 대하여 n = 9, 및 Tg+PM1에 대하여 n = 9. 데이터는 평균±SEM으로서 보여진다. \*p < 0.05.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016]

본 명세서에서 기재된 구현예는 특정한 방법론, 프로토콜, 및 시약, 등에 제한되지 않고, 그 자체로 다양할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어는 특정 구현예만의 기재 목적으로, 청구항에 의해 단독으로 한정되는, 본 발명의 범위를 제한하도록 의도되지 않는다. 작동 예에서 예외로, 또는 달리 나타내는 경우에, 본 명세서에서 사용된 성분의 양 또는 반응 조건을 표현하는 모든 수자는 용어 "약"에 의해 모든 사례에 변형된 것으로 이해되어야 한다.

[0017]

확인된 모든 특허 및 다른 공보는, 예를 들어, 본 발명과 함께 사용될 수 있는 그와 같은 공보에서 기재된 방법론의 기재 및 개시의 목적으로 본 명세서에서 참고로 명확히 편입된다. 이를 공보는 본원의 출원일에 앞서 그것의 개시내용에 대하여 단독으로 제공된다. 이와 관련하여 어느 것도 본 발명자들이 선행 발명의 덕분에 또는 임의의 다른 이유로 그와 같은 개시내용을 선행하도록 권리가 주어지지 않는다는 인정으로서 해석되지 않아야 한다. 날짜에 관한 모든 서술 또는 이를 문서의 내용에 관한 표현은 출원인에 이용 가능한 정보에 기반되고 이를 문서의 날짜 또는 내용의 정확성에 관하여 임의의 인정을 구성하지 않는다.

[0018]

달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 과학 및 기술 용어는 당해 분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 가질 수 있다. 또한, 상황에 의해 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함할 수 있고 복수의 용어는 단수를 포함할 수 있다. 일반적으로, 본 명세서에서 기재된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 및 단백질 및 올리고- 또는 폴리뉴클레오타이드 화학 및 하이브리드화와 함께 이용된 명명법, 및 상기의 기술은 당해 분야에서 잘 알려진 및 통상적으로 사용된 것이다.

[0019]

부정관사 "한" 및 "하나"("a" and "an")는 부정관사의 문법적 대상의 1 또는 1 초과 (즉, 적어도 하나)를 지칭하는데 본 명세서에서 사용된다. 예로써, "한 요소"는 1 요소 또는 1 초과 요소를 의미한다.

[0020]

본 명세서에서 사용된 바와 같이, "a, b, 및 c의 하나 이상"은 a, b, c, ab, ac, bc, 또는 abc를 의미한다. 본 명세서에서 "또는"의 용도는 포괄적 또는 배타적일 수 있다.

[0021]

용어 "포함하다", "포함하는", "포괄하다", "포괄하는", "갖는다", 및 "갖는"은, 추가의 요소가 포함될 수 있다는 것을 의미하는, 포괄형, 개방형 의미로 사용된다. 용어 "예컨대", "예를 들면"은, 본 명세서에서 사용된 바와 같이 비-제한적이고 단지 설명하기 위한 것이다. "포함하는" 및 "비제한적으로 포함하는"은 상호교환적으로 사용된다.

[0022]

용어 "또는"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 상황상 달리 명확하게 나타내지 않는 한, "및/또는"을 의미하도록 이해되어야 한다.

[0023]

용어 "약" 또는 "대략"은 참조 양, 수준, 값, 수자, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 만큼 많이 다양하는 양, 수준, 값, 수자, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 지칭한다. 일 구현예에서, 용어 "약" 또는 "대략"은 참조 양, 수준, 값, 수자, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이 ± 15%, ± 10%, ± 9%, ± 8%, ± 7%, ± 6%, ± 5%, ± 4%, ± 3%, ± 2%, 또는 ± 1%의 범위를 참조한다.

- [0024] 환자에게 용어 "투여하는"은, 뇌척수액 속에 또는 혈액-뇌 장벽을 거쳐 투여, 어느 한쪽 비경구 또는 경구 경로에 의한 전달, 근육내 주사, 피하 또는 친피내 주사, 정맥내 주사, 볼 투여, 경피 전달 및 직장, 결장, 질, 비강내 또는 기도 경로에 의한 투여를 포함하는, 대상체에서 원하는 위치에 활성제의 전달을 위하여 (예를 들면, 그렇게 함으로써 원하는 세포, 예컨대 원하는 뉴런을 접촉시키기 위해) 임의의 적합한 경로로 대상체에게 약제학적 제형으로 활성제를 분배, 전달 또는 적용하는 것을 포함한다. 상기 제제는, 예를 들어, 정맥내 주사를 통해 혼수상태, 마취된 또는 마비된 대상체에게 투여될 수 있거나 태아에서 뉴런 기능이상을 억제시키기 위해 임신한 대상체에게 정맥내로 투여될 수 있다. 투여의 특이적 경로는 (예컨대 눈꺼풀 밑에 배치되도록 점안액, 크림 또는 침식가능 제형, 수양액 또는 유리액 속에 안구내 주사, 눈의 외부 층 속에 주사에 의해, 예컨대 결막하 주사 또는 태눈낭하 주사, 비경구 투여를 거쳐 또는 경구 경로를 거쳐 국소 도포를 포함할 수 있다.
- [0025] 용어 "뉴런 접촉" 또는 "뉴런 처리"는, 상기 제제가 뉴런에서 그것의 약리적 효과를 나타낼 수 있는, 어느 한쪽 세포에 또는 전체의 유기체에, 제제 전달 또는 "투여"의 임의의 방식을 지칭한다. "뉴런 접촉"은 본 발명의 제제를 뉴런에 가깝게하는 양쪽 생체내 및 시험관내 방법을 포함한다. 투여의 적합한 방식은 당해 분야의 숙련가에 의해 결정될 수 있고 투여의 그와 같은 방식은 제제 사이 다양할 수 있다.
- [0026] 용어 제제 또는 치료 웹타이드의 "유효량"은 원하는 치료 또는 약리적 효과를 달성하기에 충분한 양, 예컨대 뉴런의 생존력을 향상 및/또는 뉴런의 사망을 억제시킬 수 있는 양을 지칭한다. 본 명세서에서 정의된 바와 같이 제제의 유효량은 인자 예컨대 대상체의 질환 상태, 연령, 및 중량, 및 대상체에서 원하는 반응을 유도하기 위한 제제의 능력에 따라 다양할 수 있다. 투약 요법은 최적의 치료 반응을 제공하도록 조정될 수 있다. 유효량은 또한 활성제의 임의의 독성 또는 해로운 효과가 치료적으로 유익한 효과에 의해 우세되는 것이다.
- [0027] 용어 "치료적 유효량"은 원하는 치료 결과를 달성하기 위해, 필요한 투약량에서 그리고 기간 동안, 효과적인 양을 지칭한다. 치료 결과는, 예를 들면, 증상의 약화, 장기적인 생존, 개선된 이동도, 및 기타 동종일 수 있다. 치료 결과는 "치유"될 필요는 없다.
- [0028] 용어 "발현"은 핵산이, 예를 들어, 웹타이드, 폴리웹타이드 또는 단백질로 번역될 수 있는, 웹타이드로 번역되거나 RNA로 전사되는 공정을 지칭한다. 핵산이 게놈 DNA로부터 유래되면, 발현은, 적절한 진핵 숙주 세포 또는 유기체가 선택되면, mRNA의 스플라이싱을 포함한다. 이종성 핵산이 숙주 세포에서 발현되도록 하기 위해, 세포에 초기에 전달되어야 하고 그 다음, 세포에서, 궁극적으로 핵에 있어야 한다.
- [0029] 용어 "유전적 요법"은, 요법 또는 진단이 추가되는 장애 또는 병태를 가진, 포유동물, 특히 인간의 세포에 이종성 DNA의 전달을 포함한다. DNA는 이종성 DNA가 발현되고 그렇게 함으로써 인코딩된 치료 생성물이 생산되는 그와 같은 방식으로 선택된 표적 세포에 도입된다. 대안적으로, 이종성 DNA는 일부 방식으로 치료 생성물을 인코딩하는 DNA의 발현을 매개할 수 있고; 일부 방식으로, 치료 생성물의 발현을, 직접적으로 또는 간접적으로, 매개하는 생성물, 예컨대 웹타이드 또는 RNA를 인코딩할 수 있다. 유전적 요법은 또한 도입되는 세포 또는 포유동물에 의해 생산된 유전자 생성물을 보충 또는 불량성 유전자 보충물을 대체하기 위해 유전자 생성물을 인코딩하는 핵산을 전달하는데 사용될 수 있다. 도입된 핵산은 치료 화합물, 예컨대 이의 성장 인자 억제제, 또는 이의 종양 괴사 인자 또는 억제제, 예컨대 따라서, 포유동물 숙주에서 정상적으로 생산되지 않는 또는 치료적 유효량으로 또는 치료적으로 유용한 시간에 생산되지 않는 수용체를 인코딩할 수 있다. 치료 생성물을 인코딩하는 이종성 DNA는 생성물 또는 이의 발현을 향상 또는 달리 변경시키기 위해 시달리는 숙주의 세포에 도입에 앞서 변형될 수 있다.
- [0030] 용어 "유전자" 또는 "재조합 유전자"는, 양쪽 엑손 및 (임의로) 인트론 서열을 포함하는, 폴리웹타이드를 인코딩하는 열린 해독틀을 포함하는 핵산을 지칭한다.
- [0031] 용어 "이종성 핵산 서열"은 전사, 번역, 또는 다른 조절가능 생화학 공정에 영향미침으로써 내인성 DNA의 발현을 변경시키는 매개체를 매개하거나 인코딩하는 또는 발현되는 세포에 의해 생체내 정상적으로 생산되지 않는 RNA 및 단백질을 인코딩하는 전형적으로 DNA이다. 이종성 핵산 서열은 또한 외래 DNA로서 지칭될 수 있다. 당해 분야의 숙련가가 발현되는 세포에 이종성 또는 외래성으로서 인식 또는 간주할 임의의 DNA는 본 명세서에서 이종성 DNA에 의해 포함된다. 이종성 DNA의 예는, 비제한적으로, 추적가능한 마커 단백질, 예컨대 약물 내성을 부여하는 단백질을 인코딩하는 DNA, 치료적으로 효과적인 서브스턴스, 예컨대 항암제, 효소 및 호르몬을 인코딩하는 DNA, 및 다른 유형의 단백질, 예컨대 항체를 인코딩하는 DNA를 포함한다. 이종성 DNA에 의해 인코딩되는 항체는 이종성 DNA가 도입된 세포의 표면에서 분비 또는 발현될 수 있다.
- [0032] 용어 "상동성" 및 "동일성"은 내내 동의어로 사용되고 2 웹타이드 사이 또는 2 핵산 문자 사이 서열 유사성을

지칭한다. 상동성은, 비교의 목적으로 정렬될 수 있는, 각각의 서열에서 위치 비교에 의해 결정될 수 있다. 비교된 서열에서 위치가 동일한 염기 또는 아미노산에 의해 점유되는 경우, 분자는 그 위치에서 상동이거나 동일하다. 서열 사이 상동성 또는 동일성의 정도는 그 서열에 의해 공유된 매칭 또는 상동성 위치의 숫자의 합수이다.

[0033] 용어 "돌연변이체"는 유기체의 유전 물질에서 변화, 특히 야생형 폴리뉴클레오타이드 서열에서 변화 (즉, 결실, 치환, 부가, 또는 변경) 또는 야생형 단백질에서 변화를 지칭한다. 용어 "변이체"는 "돌연변이체"와 상호교환적으로 사용된다. 유전 물질에서 변화가 단백질의 기능의 변화를 초래한다고 종종 추정되어도, 용어 "돌연변이체" 및 "변이체"는 변화가 단백질의 기능을 변경 (예를 들면, 신규한 기능을 증가, 감소, 부여)하는지 여부, 또는 변화가 단백질의 기능에서 효과가 없는 (예를 들면, 돌연변이 또는 변화가 침묵인)지와 무관하게 야생형 단백질의 서열에서 변화를 지칭한다.

[0034] 용어 "비경구 투여" 및 "비경구로 투여된"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 일반적으로 주사로, 장관 이외 투여 및 국소 투여의 방식을 의미하고, 제한 없이, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 심실내, 관절내, 안와내, 심장내, 진피내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막밑, 지주막하, 척수내 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.

[0035] 용어 "전신 투여", "전신으로 투여된", "주변 투여" 및 "주변에 투여된"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 표적 조직 (예를 들면, 종추신경계)에 직접적으로 가 아닌 화합물, 약물 또는 다른 물질의 투여를 의미하고, 이로써 동물의 시스템에 진입하고, 따라서, 대사 및 다른 유사 공정, 예를 들어, 피하 투여를 거친다.

[0036] 용어 "환자" 또는 "대상체" 또는 "동물" 또는 "숙주"는 임의의 포유동물을 지칭한다. 대상체는 인간일 수 있지만, 또한 수의과 치료가 필요한 포유동물, 예를 들면, 가정용 동물 (예를 들면, 개, 고양이, 및 기타 동종), 농장 동물 (예를 들면, 소, 양, 가금, 돼지, 말, 및 기타 동종) 및 실험실 동물 (예를 들면, 랫트, 마우스, 기니아 피그, 및 기타 동종)일 수 있다.

[0037] 용어 "폴리뉴클레오타이드 서열" 및 "뉴클레오타이드 서열"은 본 명세서에서 상호교환적으로 또한 사용된다.

[0038] 용어 "펩타이드" 또는 "폴리펩타이드"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되고 포괄적으로 약 2 내지 약 90 아미노산 잔기로 구성되는 화합물을 지칭하고, 여기서 1 아미노산의 아미노 기는 웹타이드 결합에 의해 또 다른 아미노산의 카복실 기에 연결된다. 웹타이드는, 예를 들어, 효소적 또는 화학적 절단에 의해 원상태 단백질로부터 유래 또는 제거될 수 있거나, 종래의 웹타이드 합성 기술 (예를 들면, 고상 합성) 또는 분자 생물학 기술 (참조 Sambrook 등, MOLECULAR CLONING: LAB. MANUAL (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989))를 사용하여 제조될 수 있다. "펩타이드"는 임의의 적합한 L-및/또는 D-아미노산, 예를 들어, 공통 a-아미노산 (예를 들면, 알라닌, 글리신, 발린), 비-a-아미노산 (예를 들면, P-알라닌, 4-아미노부티르산, 아미노카프로산, 사르코신, 스타틴), 및 혼치않은 아미노산 (예를 들면, 시트룰린, 호모시트룰린, 호모세린, 노르류신, 노르발린, 오르니틴)을 포함할 수 있다. 웹타이드에서 아미노, 카복실 및/또는 다른 관능 기는 자유 (예를 들면, 비변형)될 수 있거나 적합한 보호 기로 보호될 수 있다. 아미노 및 카복실 기에 대하여 적합한 보호 기, 그리고 보호 기의 첨가 또는 제거용 수단은 당해 기술에 공지되어 있다. 참조, 예를 들면, Green & Wuts, PROTECTING GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (John Wiley & Sons, 1991). 웹타이드의 관능 기는 또한 종래기술-공지된 방법을 사용하여 유도 (예를 들면, 알킬화)될 수 있다.

[0039] 웹타이드는 좀 많은 별개의 문자 종을 포함하는 라이브러리로 합성 및 조립될 수 있다. 그와 같은 라이브러리는 조합 화학의 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있고, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 또는 CSPG-PTP σ 상호작용을 길항할 수 있는 웹타이드를 라이브러리가 포함하는지를 결정하는 다른 적합한 방법을 사용하여 선별될 수 있다. 그와 같은 웹타이드 길항제는 그 다음 적당한 수단에 의해 단리될 수 있다.

[0040] 용어 "펩타이드모사체"는 웹타이드를 모사하도록 설계된 단백질-유사 분자를 지칭한다. 웹타이드모사체는 전형적으로 어느 한쪽 현존하는 웹타이드의 변형으로부터, 또는 웹타이드, 예컨대 웹토이드 및 β-펩타이드를 모사하는 유사한 시스템 설계에 의해 발생한다. 접근법과 무관한, 변경된 화학 구조는 유익하게는 분자 특성 예컨대, 안정성 또는 생물학적 활성을 조정하도록 설계된다. 이들 변형은 자연적으로 발생하지 않는 웹타이드에 대한 변화 (예컨대 변경된 골격 및 비천연 아미노산의 편입)을 포함한다.

[0041] 폴리뉴클레오타이드 서열 (DNA, RNA)는 발현 제어 서열이 폴리뉴클레오타이드 서열의 전사 및 번역을 제어 및 조절하는 경우 발현 제어 서열에 "작동가능하게 연결된"다. 용어 "작동가능하게 연결된"은 발현되는 폴리뉴클레오타이드 서열 앞에 적절한 출발 신호 (예를 들면, ATG)의 가짐, 및 발현 제어 서열의 제어 하에서 폴리뉴클레

오타이드 서열의 발현을 허용하기 위해 정확한 해독틀의 유지, 및 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩된 원하는 폴리펩타이드의 생산을 포함한다.

[0042] 용어 "재조합"은, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단백질이 원핵 또는 진핵 발현 시스템으로부터 유래되는 것을 의미한다.

[0043] 용어 "조직-특이적 프로모터"는 프로모터로서 제공하는, 즉, 프로모터에 작동가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는, 그리고 조직의 특이적 세포, 예컨대 상피성 세포의 세포에서 선택된 핵산 서열의 발현에 영향을 주는 핵산 서열을 의미한다. 상기 용어는 또한, 주로 하나의 조직에서 선택된 핵산의 발현을 조절하지만, 다른 조직에서 또한 발현을 야기시키는, 소위 "누출성" 프로모터를 포함한다. 용어 "형질감염"은 세포에 의한 외래 DNA의 섭취를 지칭하는데 사용된다. 세포는 외인성 DNA가 세포 막 내부에서 도입된 경우 "형질감염되"었다. 수많은 형질감염 기술은 당해 분야에서 일반적으로 공지된다. 참조, 예를 들면, Graham 등, Virology 52:456 (1973); Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989); Davis 등, Basic Methods in Molecular Biology (1986); Chu 등, Gene 13:197 (1981). 그와 같은 기술은 하나 이상 외인성 DNA 모이어티, 예컨대 뉴클레오타이드 통합 벡터 및 다른 핵산 분자를 적합한 숙주 세포에 도입하는데 사용될 수 있다. 상기 용어는 화학, 전기, 및 바이러스-매개된 형질감염 절차를 포착한다.

[0044] 용어 "전사 조절 서열"은, 이들이 작동가능하게 연결되는 단백질 코딩 서열의 전사를 유도 또는 제어하는, 핵산 서열, 예컨대 개시 신호, 인핸서, 및 프로모터를 지칭하기 위해 명세서 전반에 걸쳐 사용된 일반 용어이다. 일부 예에서, 재조합 유전자의 전사는, 발현이 의도되는 세포-유형에서 재조합 유전자의 발현을 제어하는, 프로모터 서열 (또는 다른 전사 조절 서열)의 제어 하에 있다. 재조합 유전자가, 단백질의 자연 발생 형태의 전사를 제어하는, 그들 서열과 상이한 또는 동일한 전사 조절 서열의 제어 하에 있을 수 있다는 것이 또한 이해될 것이다.

[0045] 용어 "벡터"는 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 바람직한 벡터는 이들이 연결되는 핵산의 자율적 복제 및 발현의 하나 이상을 할 수 있는 것이다. 이들이 작동가능하게 연결되는 유전자의 발현을 유도할 수 있는 벡터는 본 명세서에서 "발현 벡터"로서 지칭된다.

[0046] 용어 "야생형"은, 정상적으로 생체내 실재하는 바와 같이, 단백질, 또는 이의 부분, 또는 단백질 서열, 또는 이의 부분, 각각을 인코딩하는 자연-발생 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "핵산"은 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 데옥시리보핵산 (DNA), 및, 적절한 경우, 리보핵산 (RNA)를 지칭한다. 상기 용어는 또한, 동가물로서, 뉴클레오타이드 유사체로부터 제조된 어느 한쪽 RNA 또는 DNA의 유사체, 및, 기재될 구현예에 적용가능한 경우, 단일 (센스 또는 안티센스) 및 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드를 포함하도록 이해되어야 한다.

[0047] 본 명세서에서 기재된 방법에서 사용된 제제, 화합물, 조성물, 항체, 등을 이의 사용에 앞서 정제 및/또는 단리되는 것으로 간주된다. 정제된 물질은, 핵산, 폴리펩타이드 또는 이의 단편, 또는 다른 분자가 그것을 자연적으로 동반하는 성분으로부터 분리된 것을 의미하는, 전형적으로 "실질적으로 순수"하다. 전형적으로, 상기 폴리펩타이드는, 자연적으로 관련되는 다른 유기 분자 및 단백질이 없는, 중량 기준으로, 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 심지어 99%인 경우 실질적으로 순수하다. 예를 들어, 실질적으로 순수한 폴리펩타이드는 천연 공급원으로부터 추출에 의해, 그 단백질을 정상적으로 발현시키지 않는 세포에서 재조합 핵산의 발현에 의해, 또는 화학 합성에 의해 수득될 수 있다. "단리된 물질"은 그것의 천연 위치 및 환경으로부터 제거되었다. 단리된 또는 정제된 도메인 또는 단백질 단편의 경우에서, 도메인 또는 단편은 실질적으로 자연-발생 서열에서 단백질을 측정하는 아미노산 서열이 없다. 용어 "단리된 DNA"는 DNA가 자연 발생 게놈에서 주어진 DNA를 측정하는 유전자가 실질적으로 없었다. 따라서, 용어 "단리된 DNA"는, 예를 들어, cDNA, 클로닝된 게놈 DNA, 및 합성 DNA를 포함한다.

[0048] 용어 "부분", "단편", "변이체", "유도체" 및 "유사체"는, 본 발명의 폴리펩타이드를 지칭하는 경우 본 명세서에서 지칭된 적어도 일부 생물학적 활성 (예를 들면, 상호작용 예컨대 결합의 억제)를 보유하는 임의의 폴리펩타이드를 포함한다. 본 명세서에서 기재된 바와 같이 폴리펩타이드는, 폴리펩타이드가 여전히 그것의 기능을 제공하는 한, 제한 없이 부분, 단편, 변이체, 또는 유도체 분자를 포함할 수 있다. 본 발명의 폴리펩타이드 또는 이의 부분은 단백분해 단편, 결실 단편 및 특히, 또는 동물에 전달된 경우 작용 부위에 더욱 쉽게 도달하는 단편을 포함할 수 있다.

[0049] 용어 "치료하는"은 기술적으로 인식되고 대상체에서 질환, 장애 또는 병태 억제, 예를 들면, 그것의 진행 방해;

및 질환, 장애 또는 병태의 경감, 예를 들면, 질환, 장애 및/또는 병태의 퇴행 야기를 포함한다. 질환 또는 병태의 치료는, 기저의 병리생리학이 영향받지 않을지라도, 특정한 질환 또는 병태의 적어도 하나의 증상 완화를 포함한다.

[0050] 조성물이 특정 성분을 갖는, 포괄하는, 또는 포함하는 것으로 기재되는, 설명 전반에 걸쳐, 조성물이 또한 인용된 성분으로 본질적으로 구성되거나, 상기로 구성되는 것이 고려된다. 유사하게, 방법 또는 공정이 특정 처리 단계를 갖는, 포괄하는, 또는 포함하는 것으로 기재되는 경우, 상기 공정은 또한 인용된 처리 단계로 본질적으로 구성되거나, 상기로 구성된다. 또한, 본 명세서에서 기재된 조성물 및 방법이 작동가능하게 남아있는 한 단계의 차례 또는 특정 행위 수행의 차례가 중요하지 않다는 것이 이해되어야 한다. 또한, 2 이상의 단계 또는 행위는 동시에 수행될 수 있다.

[0051] 본 명세서에서 사용된 모든 백분율 및 비는, 달리 나타내지 않는 한, 중량 기준이다.

[0052] 본 명세서에서 기재된 구현예는 일반적으로 신경 세포에서 TAR DNA 결합 단백질 43 (TDP-43) 미토콘드리아 국소화를 억제시키는 조성물 및 방법에 관한 것이고 특히 필요로 하는 대상체에서 신경퇴행성 질환 또는 장애 치료 용 조성물 및 방법에 관한 것이다. TDP-43이 신경퇴행성 질환, 예컨대 근위축성 측색 경화증 (ALS), 전두측두엽 치매 (FTD), 및 알츠하이머병을 가진 환자의 뉴런내 미토콘드리아에서 축적한다는 것이 밝혀졌다. TDP-43의 신경퇴행성 질환-관련 돌연변이가 뉴런에서 TDP-43 미토콘드리아 국소화를 추가로 증가시킨다는 것이 추가로 밝혀졌다. 미토콘드리아 내에, 야생형 및 돌연변이체 TDP-43은 OXPHOS 호흡 복합체 1 하위단위 ND3 및 ND6을 인코딩하는 미토콘드리아 전사된 메신저 RNAs (mRNAs)에 결합하고 그것의 발현을 손상시키고, 복합체 I 디스어셈블리, 및 뉴런의 세포 사망을 야기시킨다. 뉴런에서 TDP-43 미토콘드리아 국소화의 억제가 야생형 및 돌연변이체 TDP-43 유도된 미토콘드리아 기능이상 및 신경 손실 양쪽을 없앨 수 있다는 것이 밝혀졌다.

[0053] 따라서, 본 명세서에서 기재된 일부 구현예는 신경퇴행성 질환 또는 장애를 치료하기 위한 신경퇴행성 질환 또는 장애의 위험에 처한 또는 상기를 갖는 대상체의 세포, 예컨대 뉴런, 신경 세포, 신경 선조 세포, 또는 신경 줄기 세포, 및 특히 신경 세포에서 야생형 및/또는 돌연변이체 TDP-43 미토콘드리아 국소화의 억제, 감소, 축소, 또는 억제 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 TDP-43 미토콘드리아 국소화를 억제시키는 제제의 치료적 유효량을 대상체의 신경 세포에 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0054] 일부 구현예에서, 신경퇴행성 질환 또는 장애는 비정상적인 TDP-43 미토콘드리아 국소화, TDP-43 뉴런의 독성, 및/또는 TDP-43의 질환 관련된 돌연변이와 관련된 및/또는 상기로 특성규명된 신경퇴행성 질환 또는 장애를 포함할 수 있다. 신경퇴행성 질환은, 예를 들어, 근위축성 측색 경화증 (ALS), 전두측두엽 치매 (FTD), 알츠하이머병, 알츠하이머병에 관련된 치매, 파킨슨병, 노인성 치매, 헌팅턴병, 질 드 라 뚜렛 증후군, 다발성 경화증, 또는 선천성 운동 및 감각 신경병증을 포함할 수 있다.

[0055] 다른 구현예는 돌연변이체 TDP-43 발현과 관련된 운동-협응 및 인지 기능이상의 치료 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 TDP-43 미토콘드리아 국소화를 억제시키는 제제의 치료적 유효량을 필요로 하는 대상체 또는 신경 세포에 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0056] 일부 구현예에서, 세포 또는 대상체에 투여되는 제제 또는 치료제는 대상체의 뉴런에서 TDP-43 미토콘드리아 국소화를 감소, 억제, 축소, 및/또는 억압시키는 임의의 제제일 수 있다. TDP-43 미토콘드리아 국소화의 감소, 억제, 축소, 및/또는 억압은 하기에서 임의의 측정가능한, 재생가능한, 및/또는 실질적인 축소를 포함할 수 있다: TDP-43 미토콘드리아 국소화; 핵부터 세포질까지 TDP-43 재분포; 미토콘드리아 호흡 복합체 1 하위단위 ND3 및 ND6을 인코딩하는 mRNAs에 TDP-43 결합; 미토콘드리아 호흡 복합체 1의 TDP-43 매개된 디스어셈블리; TDP-43 유도된 미토콘드리아 기능이상 및 뉴런 손실; 및/또는 돌연변이체 및/또는 야생형 TDP-43 미토콘드리아 국소화에 의해 매개된 질환의 증상. 실질적인 축소는 "재생가능한", 즉, 일관되게 관측된 축소이다.

[0057] 뉴런에서 TDP-43 미토콘드리아 국소화는, 비제한적으로 하기를 포함하는, 몇 개의 식으로 감소, 억제, 축소, 및/또는 억압될 수 있다: (예를 들면, 웨타이드, 우세한 음성 폴리웨타이드; 중화하는 항체, 작은 분자 또는 웨타이드모사체의 간섭 또는 억제 사용에 의한) TDP-43의 미토콘드리아 국소화의 직접 억제, (예를 들면, 유전자 및/또는 단백질, 예컨대 Tim22 또는 TOM/Tim22 복합체의 발현 또는 활성 감소에 의한) TDP-43의 국소화, 활성, 신호전달, 및/또는 기능의 하나 이상을 용이하게 하는 유전자 및/또는 단백질의 억제; (예를 들면, 유전자 및/또는 단백질의 발현 또는 활성 억제에 의한) TDP-43의 국소화, 활성, 신호전달, 및/또는 기능의 하나 이상을 억제시키는 유전자 및/또는 단백질의 활성화; (예를 들면, 매개체 유전자 및/또는 단백질의 발현 및/또는 활성 차단에 의한) 다운스트림 TDP-43인 유전자 및/또는 단백질의 억제; (예를 들면, 재조합 유전자 발현 벡터, 재조합

바이러스 백터 또는 재조합 폴리펩타이드 사용에 의한) TDP-43의 활성, 신호전달, 및/또는 기능의 하나 이상을 부정적으로 조절하는 유전자 및/또는 단백질의 도입; 또는, 예를 들어, (예를 들면, 재조합 유전자 발현 또는 바이러스 백터, 또는 돌연변이유발을 사용하는 상동성 재조합, 과발현에 의한) TDP-43의 정상 하위 대립인자 돌연변이체로 유전자 대체.

[0058] 대상체의 뉴런에서 TDP-43 미토콘드리아 국소화를 감소, 억제, 축소, 또는 억압하는 치료제는 세포내에서 전달될 수 있고 일단 세포내에서 전달되면 TDP-43 유도된 뉴런의 독성, TDP-43의 질환 관련된 돌연변이, 및/또는 비정상적인 TDP-43 미토콘드리아 국소화를 억제시킬 수 있다.

[0059] 일부 구현예에서, 대상체의 뉴런에서 TDP-43 미토콘드리아 국소화를 감소, 억제, 축소, 또는 억압시키는 치료제는 TDP-43의 미토콘드리아 내부 표적화 신호의 약 5 내지 약 8 연속 아미노산에 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 약 5 내지 약 10 아미노산의 치료 웨პ타이드를 포함한다. 미토콘드리아 단백질은 어느 한쪽 절단가능 사전-서열 또는 절단불가능 내부 신호에 의해 미토콘드리아에 유도된다. TDP-43이 도입후 비절단된채 남아있고 절단가능 사전서열이 TDP-43에서 확인되었던 것이 밝혀졌고, TDP-43이 내부 신호를 사용한다는 것을 시사하였다. 미토콘드리아 내부 신호는 전형적으로 연속 소수성 아미노산의 스트레치로 구성되고, 6개의 그와 같은 스트레치는 TDP-43 (도 3A, M1-6 (서열 식별 번호: 1-6))에서 존재한다. M1/3/5 (M1/3/5) (서열 식별 번호: 1, 3, 및 5)의 결실은 시험관내 rTDP-43 도입을 상당히 억제시켰고, 외인성으로 발현된 TDP-43의 미토콘드리아 국소화를 감소시켰다 (도 3B, C). M1 (서열 식별 번호: 1) 및 M3 (서열 식별 번호: 3)을 포함하는 치료 웨პ타이드는 rTDP-43 도입을 실질적으로 억제시켰고, HEK293 세포 및 1차 뉴런에서 미토콘드리아 TDP-43을 감소시켰다 (도 3D-F). 유익하게는, TDP-43 미토콘드리아 국소화에 필수적인 확인된 모티프에 기반된 치료 웨პ타이드는 구체적으로 핵, 세포질 및 총 TDP-43의 발현에서 효과 없이 WT 또는 돌연변이체 TDP-43 미토콘드리아 도입을 억압시킬 수 있다.

[0060] 일부 구현예에서, 치료 웨პ타이드는 TDP-43의 M1 (서열 식별 번호: 1), M3 (서열 식별 번호: 3), 또는 M5 (서열 식별 번호: 5)의 약 5 내지 약 7 연속 아미노산에 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0061] 다른 구현예에서, 치료 웨პ타이드는 TDP-43의 M1 내부 모티프의 한 부분에 상응할 수 있다. TDP-43의 M1 내부 모티프의 한 부분에 상응하는 치료 웨პ타이드는 FPGACGL (서열 식별 번호: 1) 또는 AQFPGACGL (서열 식별 번호: 7)의 아미노산 서열을 갖는 웨პ타이드를 포함할 수 있거나, 상기로 본질적으로 구성될 수 있거나, 상기로 구성될 수 있다.

[0062] 추가의 다른 구현예에서, 치료 웨პ타이드는 TDP-43의 M3 내부 모티프의 한 부분에 상응할 수 있다. TDP-43의 M1 내부 모티프의 한 부분에 상응하는 치료 웨პ타이드는 GFGFV (서열 식별 번호: 3) 또는 SKGFGFVRF (서열 식별 번호: 8)의 아미노산 서열을 갖는 웨პ타이드를 포함할 수 있거나, 상기로 본질적으로 구성될 수 있거나, 상기로 구성될 수 있다.

[0063] 더욱 다른 구현예에서, 치료 웨პ타이드는 TDP-43의 M5 내부 모티프의 한 부분에 상응할 수 있다. TDP-43의 M1 내부 모티프의 한 부분에 상응하는 치료 웨პ타이드는 GGGAGLG (서열 식별 번호: 5) 또는 SRGGGAGLG (서열 식별 번호: 9)의 아미노산 서열을 갖는 웨პ타이드를 포함할 수 있거나, 상기로 본질적으로 구성될 수 있거나, 상기로 구성될 수 있다.

[0064] 본 명세서에서 기재된 치료 웨პ타이드는 그와 같은 변화가 그것의 사용에서 특정 이점을 제공하는 경우 다른 다양한 변화, 치환, 삽입, 및 결실에 적용될 수 있다. 이와 관련하여, TDP-43의 미토콘드리아 내부 표적화 신호에 상응하는 치료 웨პ타이드는 하나 이상의 변화가 실시되고 TDP-43 미토콘드리아 국소화를 억제 또는 감소시키는 능력을 보유하는 인용된 폴리웨პ타이드의 서열에 동일하기 보다는, 상기에 상응할 수 있거나 상기와 실질적으로 상동성일 수 있다.

[0065] 치료 웨პ타이드는, 아미드를 포함하는, 폴리웨პ타이드 유도체, 단백질을 가진 콜주게이트, 고리화된 폴리웨პ타이드, 중합된 폴리웨პ타이드, 유사체, 단편, 화학적으로 변형된 폴리웨პ타이드, 및 기타 동종 유도체의 임의의 여러가지의 형태일 수 있다.

[0066] 치료 웨პ타이드는 또한, 당해 기술에 공지되어 있는, 자연적 공정, 예컨대 후번역 가공에 의해, 및/또는 화학 변형 기술에 의해 변형될 수 있다. 변형은 웨პ타이드 골격, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카복시 말단을 포함하는 웨პ타이드에서 어디든지 발생할 수 있다. 동일한 유형의 변형이 주어진 웨პ타이드에서 몇 개의 부위에 동일한 또는 가변 정도로 존재할 수 있다는 것이 인정될 것이다. 변형은 예를 들어, 제한 없이, 하기를 포함한다: 아세틸

화, 아실화, 아세토미도메틸 (Acm) 기의 첨가, ADP-리보실화, 아미드화, 피아빈에 공유결합, 헵 모이어티에 공유결합, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체의 공유결합, 지질 또는 지질 유도체의 공유결합, 포스파티딜이노시톨의 공유결합, 가교결합, 고리화, 디설파이드 결합 형성, 탈메틸화, 공유 교차-결합의 형성, 시스틴의 형성, 파이로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마-카복실화, 당화, 하이드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 단백분해 가공, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황산화, 단백질에 아미노산의 전달-RNA 매개된 첨가 예컨대 아르기닐화 및 유비퀴틴화 (참조로 하기: Protein-structure and molecular properties, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New-York, 1993).

[0067] 다른 유형의 웨타이드 변형은, 그와 같은 변형이 웨타이드의 전반적인 억제제 능력을 실질적으로 변경시키지 않고 심지어 그것의 사용에서 특정 이점을 제공할 수 있는 폴리웨타이드 서열에서 보존적 또는 비-보존적 어느 한쪽으로, 예를 들어, 아미노산 삽입 (즉, 부가), 결실 및 치환 (즉, 대체)을 포함할 수 있다. 이와 관련하여, TDP-43 국소화의 억제제인 웨타이드는 하나 이상의 변화가 실시되고 TDP-43 국소화의 억제제로서 기능하는 능력을 보유하는 인용된 웨타이드의 서열에 동일하기 보다는, 상기에 상응한다.

[0068] 본 명세서에서 기재된 치료 웨타이드는 또한, 예를 들어, 생물학적 활성 돌연변이체, 변이체, 단편, 키메라, 및 유사체를 포함할 수 있고; 단편은 하나 이상 아미노산의 절단을 갖는 아미노산 서열을 포괄하고, 여기서 상기 절단은 단백질의 아미노 말단 (N-말단), 카복시 말단 (C-말단), 또는 내측으로부터 기원할 수 있다. 유사체는 하나 이상 아미노산의 삽입 또는 치환을 포함한다.

[0069] 본 명세서에서 기재된 치료 웨타이드는 당해 분야의 숙련가에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 웨타이드 및/또는 단백질은 재조합 DNA를 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 하나의 제제는, 세포 내에서 웨타이드 및/또는 단백질의 발현에 제공하는, 조건 하에서 숙주 세포 (박테리아 또는 진핵)의 배양을 포함할 수 있다.

[0070] 폴리웨타이드의 정제는 친화성 방법, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 또는 단백질 정제에 전형적으로 사용된 다른 정제 기술로 실시될 수 있다. 정제 단계는 비-변성 조건 하에서 수행될 수 있다. 다른 한편으로, 변성 단계가 요구되면, 단백질은 당해 분야에서 공지된 기술을 사용하여 재생될 수 있다.

[0071] 일부 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 치료 웨타이드는 폴리웨타이드가 다른 폴리웨타이드, 단백질, 검출 가능한 모이어티, 표지, 고체 매트릭스, 또는 캐리어에 편리하게 연결 및/또는 부착될 수 있는 "링커" 제공의 목적을 위하여 폴리웨타이드의 어느 한쪽 말단에서 부가될 수 있는 추가의 잔기를 포함할 수 있다.

[0072] 아미노산 잔기 링커는 일반적으로 적어도 하나의 잔기이고 40 이상 잔기, 더욱 종종 1 내지 10 잔기일 수 있다. 연결에 사용된 전형적인 아미노산 잔기는 글리신, 티로신, 시스테인, 라이신, 글루탐산 및 아스파르트산, 또는 기타 동종이다. 게다가, 대상체 폴리웨타이드는 말단-NH<sub>2</sub> 아실화, 예를 들면, 아세틸화, 또는 티오글리콜 산 아미드화에 의해, 예를 들면, 암모니아, 메틸아민, 및 기타 동종 말단 변형과 함께, 말단-카복실아미드화에 의해 변형될 서열에 의해 상이할 수 있다. 말단 변형은, 잘 알려진 바와 같이, 프로테이나제 소화에 의해 감수성을 감소시키는데 유용하고, 따라서 프로테아제가 존재할 수 있는 용액, 특히 생체액에서 폴리웨타이드의 반감기를 연장시키는 역할을 한다. 이와 관련하여, 폴리웨타이드 고리화는 또한 용한 말단 변형이고, 또한 고리화에 의해 형성된 안정한 구조 때문에 그리고 본 명세서에서 기재된 바와 같이 그와 같은 환형 웨타이드에 대하여 관측된 생물학적 활성의 면에서 특히 바람직하다.

[0073] 일부 구현예에서, 링커는 치료 웨타이드를 다른 폴리웨타이드, 단백질, 및/또는 분자, 예컨대 검출 가능한 모이어티, 표지, 고체 매트릭스, 또는 캐리어에 연결시키는 가요성 웨타이드 링커일 수 있다. 가요성 웨타이드 링커는 길이 약 20 이하 아미노산일 수 있다. 예를 들어, 웨타이드 링커는 약 12 이하 아미노산 잔기, 예를 들면, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 및 12를 함유할 수 있다. 일부 경우에, 웨타이드 링커는 2 이하의 하기 아미노산: 글리신, 세린, 알라닌, 및 트레오닌을 포함한다.

[0074] 일부 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 치료 웨타이드를 포함하는 치료제는, 치료 웨타이드에 연결되는, 적어도 세포 수송 서브도메인(들) 또는 모이어티(들) (즉, 수송 모이어티)를 포함하는 약물 전달 작제물 또는 콘주게이트 단백질의 형태로 제공될 수 있다. 수송 모이어티는 포유동물 (즉, 인간 또는 동물) 조직 또는 세포 (예를 들면, 신경 세포)에 치료 폴리웨타이드의 흡수를 용이하게 할 수 있다. 수송 모이어티는 치료 폴리웨타이드에 공유적으로 연결될 수 있다. 공유 연결은 웨타이드 결합 또는 불안정성 결합 (예를 들면, 내측 표적 세포 환경에서 화학 변화에 적용되거나 쉽게 절단 가능한 결합)을 포함할 수 있다. 추가적으로, 수송 모이어티는 치료 폴리웨타이드에 교차-연결 (예를 들면, 화학적으로 교차-연결, UV 교차-연결)될 수 있다. 수송 모이어티는 또한 본 명세서에서 기재된 폴리웨타이드를 연결하면서 치료 폴리웨타이드에 연결될 수 있다.

- [0075] 수송 모이어티는 치료제에서 1회 초과 반복될 수 있다. 수송 모이어티의 반복은 원하는 세포에 의한 웨타이드 및/또는 단백질의 흡수에 영향을 줄 수 있다 (예를 들면, 흡수를 증가시킬 수 있다). 수송 모이어티는 또한 어느 한쪽 치료 웨타이드의 아미노-말단 영역에서 또는 그것의 카복시-말단 영역에서 또는 양쪽 영역에서 위치할 수 있다.
- [0076] 일 구현예에서, 수송 모이어티는 수용체-독립 기전에 의해 세포 속으로 침투하기 위해 수송 모이어티에 연결되면 치료 웨타이드를 허용하는 적어도 하나의 수송 웨타이드 서열을 포함할 수 있다. 일 예에서, 수송 웨타이드는 Tat-매개된 단백질 전달 서열 (예를 들면, YGRKKRRQRRR (서열 식별 번호: 11))을 함유하는 합성 웨타이드이다. 수송 웨타이드는 서열 식별 번호: 1, 3, 5, 7, 8, 또는 9의 적어도 하나를 갖는 기재된 적어도 하나의 치료 웨타이드에 융합될 수 있다. 이를 웨타이드는, 각각, 서열 식별 번호: 12-17의 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0077] 공지된 수송 모이어티, 서브도메인 및 기타 동종의 다른 예는, 예를 들어, 캐나다 특허 문서 번호 2,301,157 (안네나페디아의 호메오도메인을 함유하는 콘주게이트)에서 뿐만 아니라 미국 특허 번호 5,652,122, 5,670,617, 5,674,980, 5,747,641, 및 5,804,604에서 기재되고, 이를 모두는 본 명세서에서 참고로 그 전문이 편입된다, (Tat HIV 단백질의 아미노산; 단순 포진 바이러스-1 DNA 결합 단백질 VP22, 길이 4 내지 30 히스티딘 반복부 범위의 히스티딘 태그, 또는 수용체 독립 공정에 의해 활성 전달대상물 모이어티의 흡수를 용이하게 할 수 있는 변화 유도체 또는 이의 동족체를 함유하는 콘주게이트).
- [0078] 안네나페디아 호메오도메인의 제3 알파-나선의 16 아미노산 영역은 또한 (융합 단백질로서 제조된) 단백질로 하여 세포 막을 교차할 수 있는 것으로 나타났다 (PCT 국제 공개 번호 WO 99/11809 및 캐나다 출원 번호 2,301,157. 유사하게, HIV Tat 단백질은 세포 막을 교차할 수 있는 것으로 나타났다.
- [0079] 게다가, 수송 모이어티(들)은 활성제 모이어티 (예를 들면, 세포내 도메인-함유 단편 억제제 웨타이드)에 공유적으로 연결된 염기성 아미노산 풍부 영역을 갖는 폴리웨타이드를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "염기성 아미노산 풍부 영역"은 염기성 아미노산 예컨대 아르기닌, 히스티딘, 아스파라긴, 글루타민, 라이신의 고 함량을 가진 단백질의 영역에 관한 것이다. "염기성 아미노산 풍부 영역"은, 예를 들어 15% 이상의 염기성 아미노산을 가질 수 있다. 일부 사례에서, "염기성 아미노산 풍부 영역"은 15% 미만의 염기성 아미노산을 가질 수 있고 여전히 수송 제제 영역으로서 기능한다. 다른 사례에서, 염기성 아미노산 영역은 30% 이상의 염기성 아미노산을 가질 것이다.
- [0080] 수송 모이어티(들)은 추가로 프롤린 풍부 영역을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 프롤린 풍부 영역은 그것의 서열에서 5% 이상 (최대 100%)의 프롤린을 가진 폴리웨타이드의 영역을 지칭한다. 일부 사례에서, 프롤린 풍부 영역은 5% 내지 15%의 프롤린을 가질 수 있다. 추가적으로, 프롤린 풍부 영역은 자연 발생 단백질 (예를 들면, 인간 게놈에 의해 인코딩된 단백질)에서 일반적으로 관측되는 것보다 더 많은 프롤린을 함유하는 폴리웨타이드의 영역을 지칭한다. 본원의 프롤린 풍부 영역은 수송 제제 영역으로서 기능할 수 있다.
- [0081] 일 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 치료 웨타이드는 형질도입 제제에 비-공유적으로 연결될 수 있다. 비-공유적으로 연결된 폴리웨타이드 형질도입 제제의 예는 단백질 전달 시스템 (참조 미국 특허 번호 6,841,535; *J Biol Chem* 274(35):24941-24946; 및 *Nature Biotec.* 19:1173-1176, 모두가 본 명세서에서 참고로 그 전문이 편입됨)이다.
- [0082] 다른 구현예에서, 치료 웨타이드는 TDP-43 미토콘드리아 국소화를 억제시키기 위해 유전자 요법을 사용하여 처리될 세포에서 발현될 수 있다. 유전자 요법은 치료 웨타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 사용할 수 있다. (때때로 유전자 전달 또는 유전자 전달 "비히클"로서 지칭된) "벡터"는 세포에 전달되는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 거대분자 또는 분자의 복합체를 지칭한다. 전달되는 폴리뉴클레오타이드는 유전자 요법에서 관심 코팅 서열을 포함할 수 있다. 벡터는, 예를 들어, 바이러스 벡터 (예컨대 아데노바이러스 (Ad), 아데노-관련 바이러스 (AAV), 및 레트로바이러스), 리포좀 및 다른 지질-함유 복합체, 및 표적 세포에 폴리뉴클레오타이드의 전달을 매개할 수 있는 다른 거대분자 복합체를 포함한다.
- [0083] 벡터는 또한 유전자 전달 및/또는 유전자 발현을 추가로 조절하는, 또는 달리 표적된 세포에 유익한 특성을 제공하는 다른 성분 또는 기능성을 포함할 수 있다. 그와 같은 다른 성분은, 예를 들어, (세포-유형 또는 조직-특이적 결합을 매개하는 성분을 포함하는) 세포에 결합 또는 표적화에 영향을 미치는 성분; 세포에 의해 벡터 핵산의 흡수에 영향을 미치는 성분; 흡수후 세포 이내에 폴리뉴클레오타이드의 국소화에 영향을 미치는 성분 (예컨대 핵 국소화를 매개하는 제제); 및 폴리뉴클레오타이드의 발현에 영향을 미치는 성분을 포함한다. 그와 같은 성분은 또한 마커, 예컨대 벡터에 의해 전달된 핵산을 발현시키는 그리고 섭취된 세포에 대하여 검출 또는 선택

하는데 사용될 수 있는 검출가능한 및/또는 선택가능한 마커를 포함할 수 있다. 그와 같은 성분은 벡터의 천연 특질 (예컨대 결합 및 흡수를 매개하는 성분 또는 기능성을 갖는 특정 바이러스 벡터의 용도)로서 제공될 수 있거나, 벡터는 그와 같은 기능성을 제공하도록 변형될 수 있다.

[0084] 선택가능한 마커는 양성, 음성 또는 이중작용성일 수 있다. 양성 선택가능한 마커는 마커를 운반하는 세포에 선택을 허용하고, 반면에 음성 선택가능한 마커는 선택적으로 제거되는 마커를 운반하는 세포를 허용한다. 이중작용성 (즉, 양성/음성) 마커를 포함하는, 여러가지의 그와 같은 마커 유전자는 기재되어 있다 (참조, 예를 들면, 1992년 5월 29일 공개된, Lupton, S., WO 92/08796; 및 1994년 12월 8일 공개된, Lupton, S., WO 94/28143). 그와 같은 마커 유전자는 유전자 요법 맥락에서 유리할 수 있는 대조군의 부가된 측정을 제공할 수 있다. 아주 다양한 그와 같은 벡터는 당해 기술에 공지되어 있고 일반적으로 이용가능하다.

[0085] 본 명세서에서 사용하기 위한 벡터는 표적 세포에 본 명세서에서 기재된 치료 웹타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 전달할 수 있는 바이러스 벡터, 지질 기반 벡터 및 다른 비-바이러스 벡터를 포함한다. 벡터는 표적된 벡터, 특히 뉴런에 우선적으로 결합하는 표적된 벡터일 수 있다. 본원에서 사용하기 위한 바이러스 벡터는 표적 세포에 저 독성을 나타내는 그리고 세포 특이적 방식으로 치료 웹타이드의 치료적으로 유용한 양의 생산을 유도하는 것을 포함할 수 있다.

[0086] 바이러스 벡터의 예는 아데노바이러스 (Ad) 또는 아데노-관련 바이러스 (AAV)로부터 유래된 것이다. 양쪽 인간 및 비-인간 바이러스 벡터는 사용될 수 있고 재조합 바이러스 벡터는 인간에서 복제-불량성일 수 있다. 벡터가 아데노바이러스인 경우, 벡터는 치료 웹타이드를 인코딩하는 유전자에 작동가능하게 연결된 프로모터를 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있고 인간에서 복제-불량성이다.

[0087] 본 명세서에서 사용될 수 있는 다른 바이러스 벡터는 단순 포진 바이러스 (HSV)-기반 벡터를 포함한다. 하나 이상 전초기 유전자 (IE)가 결실된 HSV 벡터는 이들이 일반적으로 비-세포독성이고, 표적 세포에서 잠복기에 유사한 상태로 지속하고, 효율적인 표적 세포 형질도입을 제공하기 때문에 유리하다. 재조합 HSV 벡터는 이종성 핵산의 대략 30 kb를 편입시킬 수 있다.

[0088] 레트로바이러스, 예컨대 C-유형 레트로바이러스 및 렌티바이러스는 또한 본원에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 레트로바이러스 벡터는 젖과 백혈병 바이러스 (MLV)에 기반될 수 있다. 참조, 예를 들면, Hu and Pathak, Pharmacol. Rev. 52:493-511, 2000 및 Fong 등, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 17:1-60, 2000. MLV-기반 벡터는 바이러스 유전자 대신에 최대 8 kb의 이종성 (치료) DNA를 함유할 수 있다. 이종성 DNA는 조직-특이적 프로모터 및 치료 웹타이드를 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 신경 세포에 전달의 방법에서, 또한 리간드를 조직 특이적 수용체에 인코딩시킬 수 있다.

[0089] 사용될 수 있는 추가의 레트로바이러스 벡터는, 인간 면역결핍 (HIV)-기반 벡터를 포함하는, 복제-불량성 렌티바이러스-기반 벡터이다. 참조, 예를 들면, Vigna and Naldini, J. Gene Med. 5:308-316, 2000 및 Miyoshi 등, J. Virol. 72:8150-8157, 1998. 렌티바이러스 벡터는 이들이 활동적으로 분할 및 비-분할 세포 양쪽을 감염시킬 수 있다는 점에서 유리하다.

[0090] 본원에서 사용하기 위한 렌티바이러스 벡터는 인간 및 비-인간 (SIV 포함) 렌티바이러스로부터 유래될 수 있다. 렌티바이러스 벡터의 예는 벡터 번식에 요구된 핵산 서열 뿐만 아니라 핵산을 인코딩하는 치료 웹타이드에 작동 가능하게 연결된 조직-특이적 프로모터를 포함한다. 이들 전자는 바이러스 LTRs, 프라이머 결합 부위, 폴리퓨린 도관, att 부위, 및 캡시드화 부위(encapsidation site)를 포함할 수 있다.

[0091] 일부 측면에서, 렌티바이러스 벡터는 이용될 수 있다. 렌티바이러스는 CNS 뉴런의 상이한 유형을 형질도입시킬 수 있다는 것이 증명되었고 (Azzouz 등, (2002) *J Neurosci.* 22: 10302-12) 그것의 큰 클로닝 수용력 때문에 일부 구현예에서 사용될 수 있다.

[0092] 렌티바이러스 벡터는 임의의 렌티바이러스 캡시드에 페키징될 수 있다. 하나의 입자 단백질의 상이한 바이러스로부터 또 다른 것으로의 치환은 "위형화"로서 지칭된다. 벡터 캡시드는, 젖과 백혈병 바이러스 (MLV) 또는 소포성 구내염 바이러스 (VSV)를 포함하는, 다른 바이러스로부터 바이러스 외피 단백질을 함유할 수 있다. VSV G-단백질의 용도는 고 벡터 역가를 산출하고 벡터 바이러스 입자의 더욱 큰 안정성을 초래한다.

[0093] 알파바이러스-기반 벡터, 예컨대 셈리키 포레스트 바이러스 (SFV) 및 신드비스 바이러스 (SIN)으로부터 제조된 것은 또한 본원에서 사용될 수 있다. 알파바이러스의 용도는 하기에서 기재된다: Lundstrom, K., Intervirology 43:247-257, 2000 및 Perri 등, Journal of Virology 74:9802-9807, 2000.

- [0094] 재조합, 복제-불량성 알파바이러스 벡터는 이들이 고-수준 이종성 (치료) 유전자 발현을 할 수 있고, 광범위 표적 세포를 감염시킬 수 있기 때문에 유리하다. 알파바이러스 레플리콘은 동족 결합 파트너를 발현시키는 표적 세포에 선택적 결합을 허용할 결합 도메인 또는 기능적 이종성 리간드를 그것의 비리온 표면에서 표시함으로써 특이적 세포 유형에 표적될 수 있다. 알파바이러스 레플리콘은 잠복기, 및 따라서 표적 세포에서 장기간 이종성 핵산 발현을 확립시킬 수 있다. 레플리콘은 또한 표적 세포에서 일시적 이종성 핵산 발현을 나타낼 수 있다.
- [0095] 본원의 방법과 양립가능한 많은 바이러스 벡터에서, 1 초과 프로모터는 1 초과 이종성 유전자를 벡터에 의해 발현되도록 하기 위해 벡터에서 포함될 수 있다. 또한, 벡터는, 표적 세포로부터 치료 웨بت아이드의 발현을 용이하게 하는, 신호 웨بت아이드 또는 다른 모이어티를 인코딩하는, 서열을 포함할 수 있다.
- [0096] 2 바이러스 벡터 시스템의 유리한 특성을 조합시키기 위해, 하이브리드 바이러스 벡터는 표적 뉴런, 세포, 또는 조직에 치료 웨بت아이드를 인코딩하는 핵산을 전달하는데 사용될 수 있다. 하이브리드 벡터의 작제용 표준 기술은 당해 분야의 숙련가에 공지된다. 그와 같은 기술은, 예를 들어, 하기에서 밝혀질 수 있다: Sambrook, 등, In Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y. 또는 재조합 DNA 기술을 논의하는 임의의 수의 실험실 매뉴얼. AAV 및 아데노바이러스 ITRs의 조합을 함유하는 아데노바이러스 캡시드내 이중-가닥 AAV 계놈은 세포를 형질도입시키는데 사용될 수 있다. 또 다른 변화에서, AAV 벡터는 "실질이 없는(gutless)", "헬퍼-의존적" 또는 "고-수용력" 아데노바이러스 벡터에 배치될 수 있다. 아데노바이러스/AAV 하이브리드 벡터는 Lieber 등, J. Virol. 73:9314-9324, 1999에서 논의된다. 레트로바이러스/아데노바이러스 하이브리드 벡터는 Zheng 등, Nature Biotechnol. 18:176-186, 2000에서 논의된다. 아데노바이러스 내에 함유된 레트로바이러스 계놈은 표적 세포 계놈 및 효과 안정한 유전자 발현 내에 통합할 수 있다.
- [0097] 치료 웨بت아이드의 발현 및 벡터의 클로닝을 용이하게 하는, 다른 뉴클레오타이드 서열 요소는 추가로 고려된다. 예를 들어, 프로모터의 인핸서 업스트림 또는 코딩 영역의 종결자 다운스트림의 존재는, 예를 들어, 발현을 용이하게 할 수 있다.
- [0098] 또 다른 구현예에 따르면, 조직-특이적 프로모터는 본 명세서에서 기재된 치료 웨بت아이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드에 융합될 수 있다. 아데노바이러스 작제물 내에 그와 같은 조직 특이적 프로모터 융합에 의해, 이식유전자 발현은 특정 조직에 제한된다. 유전자 발현의 효능 및 조직 특이적 프로모터에 의해 제공된 특이성의 정도는, 본원의 재조합 아데노바이러스 시스템을 사용하여, 결정될 수 있다. 뉴런 특이적 프로모터, 예컨대 혈소판-유래된 성장 인자  $\beta$ -사슬 (PDGF- $\beta$ ) 프로모터 및 벡터는 당해 기술에 공지되어 있다.
- [0099] 바이러스 벡터-기반 방법에 더하여, 비-바이러스 방법은 또한 치료 웨بت아이드를 표적 세포에 인코딩하는 핵산을 도입하는데 사용될 수 있다. 유전자 전달의 비-바이러스 방법의 검토는 Nishikawa and Huang, Human Gene Ther. 12:861-870, 2001에서 제공된다. 본원에 따른 비-바이러스 유전자 전달 방법의 예는 치료 웨بت아이드를 세포에 인코딩하는 핵산을 도입하기 위해 플라스미드 DNA를 사용한다. 플라스미드-기반 유전자 전달 방법은 당해 분야에서 일반적으로 공지된다.
- [0100] 합성 유전자 전달 분자는 플라스미드 DNA와 다분자 응집물을 형성하도록 설계될 수 있다. 이를 응집물은 표적 세포에 결합하도록 설계될 수 있다. 리포폴리아민 및 양이온성 지질을 포함하는, 양이온성 친양쪽성체는 표적 세포에 수용체-독립 핵산 전달을 제공하는데 사용될 수 있다.
- [0101] 게다가, 사전형성된 양이온성 리포좀 또는 양이온성 지질은 세포-형질감염 복합체를 생성하기 위해 플라스미드 DNA와 혼합될 수 있다. 양이온성 지질 제형을 포함하는 방법은 Felgner 등, Ann. N.Y. Acad. Sci. 772:126-139, 1995 및 Lasic and Templeton, Adv. Drug Delivery Rev. 20:221-266, 1996에서 검토된다. 유전자 전달을 위하여, DNA는 또한 양친매성 양이온성 웨بت아이드에 커플링될 수 있다 (Fominaya 등, J. Gene Med. 2:455-464, 2000).
- [0102] 양쪽 바이러스 및 비-바이러스 기반 성분을 포함하는 방법은 본원에 따라 사용될 수 있다. 예를 들어, 치료 유전자 전달용 앰뷸타인 바르 바이러스 (EBV)-기반 플라스미드는 Cui 등, Gene Therapy 8:1508-1513, 2001에서 기재된다. 추가적으로, 아데노바이러스에 커플링된 DNA/리간드/다중양이온성 보조물을 포함하는 방법은 Curiel, D. T., Nat. Immun. 13:141-164, 1994에서 기재된다.
- [0103] 추가적으로, 치료 웨بت아이드를 인코딩하는 핵산은 전기천공 기술을 사용하여 표적 세포를 형질감염에 의해 표적 세포에 도입될 수 있다. 전기천공 기술은 잘 알려지고 플라스미드 DNA를 사용하여 세포의 형질감염을 용이하게 하는데 사용될 수 있다.

- [0104] 치료 웨타이드의 발현을 인코딩하는 벡터는 필요에 따라 약제학적으로 허용가능한 캐리어, 예컨대 염수를 함유하는 주사가능 제제의 형태로 표적 세포에 생체내 전달될 수 있다. 다른 약제학적 캐리어, 제형 및 투약량은 또한 본원에 따라 사용될 수 있다.
- [0105] 표적 세포가 처리될 뉴런을 포함하는 경우 벡터는, 고도로 효과적인 요법을 허용하는, 정도로 치료 웨타이드가 발현되기에 충분한 양으로 직접 주사에 의해 전달될 수 있다. 뉴런 속에 직접적으로 또는 뉴런의 주변에 대하여 벡터를 주입시킴으로써, 다소 효과적으로 벡터 형질감염을 표적하는 것, 그리고 재조합 벡터의 손실을 최소화하는 것이 가능하다. 이러한 유형의 주사는 원하는 수의 세포의 국부 형질감염을, 특히 CNS 손상의 부위에서 가능하게 하고, 그렇게 함으로써 유전자 전달의 치료 효능을 최대화하고, 바이러스 단백질에 염증 반응의 가능성을 최소화한다. 표적 세포에 벡터의 다른 투여 방법은 사용될 수 있고 이용된 특이적 벡터에 의존할 것이다.
- [0106] 치료 웨타이드는, 일시적 발현 및 안정한, 장기간 발현을 포함하는, 표적 세포 내에 임의의 적합한 시기 동안 발현될 수 있다. 본원의 일 측면에서, 치료 웨타이드를 인코딩하는 핵산은 형질감염된 세포의 활성 및 성장을 유도하기 위해 효과적인 정의된 시기 동안 치료 양으로 발현될 것이다. 본원의 또 다른 측면에서, 치료 웨타이드를 인코딩하는 핵산은 신경퇴행성 질환 또는 장애를 치료하기 위해 효과적인 정의된 시기 동안 치료 양으로 발현될 것이다.
- [0107] 치료 양은, 치료된 동물 또는 인간에서 의료적으로 바람직한 결과를 생산할 수 있는, 양이다. 의술에서 잘 알려진 바와 같이, 임의의 하나의 동물 또는 인간에 대한 투약량은, 대상체의 크기, 체표면적, 연령, 투여되는 특정한 조성물, 성별, 투여의 시간 및 경로, 일반적인 건강, 및 동시에 투여될 다른 약물을 포함하는, 많은 인자에 좌우된다. 단백질 및 핵산의 특이적 투약량은 아래 기재된 실험적 방법을 사용하여 당해 분야의 숙련가에 의해 결정된 쉽게 결정될 수 있다.
- [0108] 본 명세서에서 기재된 치료제는 추가로 변형 (예를 들면, 화학적으로 변형)될 수 있다. 그와 같은 변형은, 분자의 용해도를 증가시키기 위해, 분자의 조작 또는 정제를 용이하게 하도록, 원하는 위치를 표적하는, 투여를 용이하게 하도록, 반감기를 증가 또는 감소시키도록 설계될 수 있다. 수많은 그와 같은 변형은 당해 기술에 공지되어 있고 당업자에 의해 적용될 수 있다.
- [0109] 또 다른 측면에서, 치료제는 약제학적 조성물에서 제공될 수 있다. 약제학적 조성물은 일반적으로, 약제학적으로 허용가능한 캐리어 또는 수성 매질에서 용해된 또는 분산된, 제제의 유효량을 포함할 것이다. 조합된 치료제는 또한 고려되고, 동일한 유형의 기저 약제학적 조성물은 양쪽 단일 및 조합된 약제에 이용될 수 있다.
- [0110] 일부 구현예에서, 치료제는 비경구 투여용으로 제형화, 예를 들면, 피하, 정맥내, 경피, 초자체내, 또는 표적된 부위에 직접 점적주입 및 연동 투여를 포함하는, 다른 그와 같은 경로를 통해 주사용으로 제형화될 수 있다. 활성 성분으로서 그와 같은 치료제를 함유하는 수성 조성물의 제제는 본 개시내용의 면에서 당해 분야의 숙련가에 공지될 것이다. 전형적으로, 그와 같은 조성물은 주사제로서, 어느 한쪽 액체 용액 또는 혼탁액으로서 제조될 수 있고; 주사에 앞서 액체의 첨가시 용액 또는 혼탁액을 제조하기 위해 사용에 적합한 고형 형태는 또한 제조될 수 있고; 제제는 또한 에멀젼화될 수 있다.
- [0111] 주사가능 용도로 사용될 수 있는 약제학적 형태는 멸균된 수용액 또는 분산물; 함께 오일, 땅콩 오일 또는 수성 프로필렌 글리콜을 포함하는 제형; 및 멸균된 주사가능 용액 또는 분산물의 즉석 제조용 멸균된 분말을 포함한다. 모든 경우에, 상기 형태는 멸균될 수 있고 주사기능성이 실재하는 정도로 유체일 수 있다. 제조 및 저장의 조건 하에서 안정할 수 있어야 하고 미생물, 예컨대 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대해 보존될 수 있어야 한다.
- [0112] 치료제의 조성물은 중성 또는 염 형태에서 멸균된 수성 조성물로 제형화될 수 있다. 유리 염기 또는 약리적으로 허용가능한 염으로서 용액은 계면활성제, 예컨대 하이드록시프로필셀룰로스와 적합하게 혼합된 물에서 제조될 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 염은 (단백질의 자유 아미노 기로 형성된) 산 부가 염, 및 무기 산 예컨대, 예를 들어, 염산 또는 인산, 또는 아세트산, 트리플루오로아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산, 및 기타 동종과 같은 유기 산으로 형성되는 것을 포함한다. 자유 카복실 기로 형성된 염은 또한 무기 염기 예컨대, 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 또는 수산화제이철, 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 및 기타 동종과 같은 유기 염기로부터 유래될 수 있다.
- [0113] 캐리어의 예는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜, 및 기타 동종), 이의 적합한 혼합물, 및 식물성 오일을 함유하는 용매 및 분산매를 포함한다. 많은 사례에서, 등장제, 예를 들어, 당류 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 적절한 유체성은, 예를

들어, 코팅물, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산물의 경우에서 요구된 입자 크기의 유지에 의해 및/또는 계면 활성제의 용도에 의해 유지될 수 있다.

[0114] 저장 및 사용의 통상적인 조건 하에서, 모든 그와 같은 제제는 미생물의 성장을 예방하기 위해 보존제를 함유시킬 수 있다. 미생물의 작용의 예방은 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살, 및 기타 동종에 의해 발생될 수 있다. 주사가능 조성물의 장기적인 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 조성물에서 사용에 의해 발생될 수 있다.

[0115] 제형에 앞서 또는 제형시, 치료제는 원하지 않는 작은 문자량 문자를 제거하기 위해 광범위하게 투석될 수 있고 /있거나, 적절한 경우, 원하는 비히클로 더욱 용이한 제형을 위하여 동결건조될 수 있다. 멸균된 주사가능 용액은, 원하는 대로, 상기 열거된 다양한 다른 성분과 적절한 용매에서 요구된 양으로 활성제를 편입 이어서 여과된 멸균에 의해 제조된다. 일반적으로, 분산물은 염기성 분산매를 함유하는 멸균된 비히클 속에 다양한 멸균된 활성 성분 그리고 상기 열거된 것으로부터 요구된 다른 성분을 편입시킴으로써 제조된다.

[0116] 멸균된 주사가능 용액의 제조용 멸균된 분말의 경우에서, 바람직한 제조 방법은 활성 성분, 플러스 이의 이전에 멸균된-여과된 용액으로부터 임의의 추가의 원하는 성분의 분말을 산출하는 진공-건조 및 냉동-건조 기술이다.

[0117] 약제학적 조성물의 예는 일반적으로, 의도한 용도에 의존하여, 최종 농도의 범위를 제공하기 위해, 허용가능한 약제학적 희석제 또는 부형제, 예컨대 멸균된 수용액과 혼합된 TDP-43 미토콘드리아 국소화 억제제 웨타이드의 양을 포함할 수 있다.

[0118] 상기 언급된 투여의 방식에서 사용하기 위한 약제학적 화합물의 제형 (및 기타)는 당해 기술에 공지되어 있고, 예를 들어, 하기에서 기재된다: Remington's Pharmaceutical Sciences (18th edition), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (또한 참조, 예를 들면, M. J. Rathbone, ed., Oral Mucosal Drug Delivery, Drug and the Pharmaceutical Sciences Series, Marcel Dekker, Inc., N.Y., U.S.A., 1996; M. J. Rathbone 등, eds., Modified-Release Drug Delivery Technology, Drugs and the Pharmaceutical Sciences Series, Marcel Dekker, Inc., N.Y., U.S.A., 2003; Ghosh 등, eds., Drug Delivery to the Oral Cavity, Drugs and the Pharmaceutical Sciences Series, Marcel Dekker, Inc., N.Y., U.S.A., 2005; 및 Mathiowitz 등, eds., Bioadhesive Drug Delivery Systems, Drugs and the Pharmaceutical Sciences Series, Marcel Dekker, Inc., N.Y., U.S.A., 1999. 본 발명의 화합물은 약제학적으로 허용가능한 비-독성 부형제 및 캐리어를 함유하는 약제학적 조성물로 제형화될 수 있다. 부형제는 모두 활성 성분 또는 성분들 이외 약제학적 제형에서 존재하는 성분이다. 본 발명에서 유용한 적합한 부형제 및 캐리어는 안전한 및 효과적인 것으로 간주되는 물질로 구성되고 바람직하지 않은 생물학적 부작용, 또는 다른 약물로 원치않는 상호작용 없이 개체에게 투여되 수 있다. 적합한 부형제 및 캐리어는, 제제의 성능 및 생체이용률에 영향을 주지 않을 물질로 구성되는 것이다. 본 명세서에서 일반적으로 사용된 바와 같이 "부형제"는, 비제한적으로 계면활성제, 유화제, 에멀젼 안정화제, 완화제, 완충액, 용매, 염료, 풍미제, 결합제, 충전제, 윤활제, 및 보존제를 포함한다. 적합한 부형제는 당해 분야에서 일반적으로 공지된 것 예컨대 "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 4th Ed., Pharmaceutical Press, 2003을 포함한다.

[0119] 치료제의 제형은 여러가지의 투약 형태, 예컨대 상기 기재된 주사가능 용액의 유형으로 쉽게 투여되지만, 다른 약제학적으로 허용가능한 형태, 예를 들면, 정제, 알약, 캡슐 또는 경구 투여용 다른 고체, 좌약, 페서리, 점비액 또는 스프레이, 에어로졸, 흡입제, 국소 제형, 리포좀 형태 및 기타 동종은 또한 고려된다. 투여용 형태의 유형은 치료되는 질환 또는 장애에 매칭될 것이다.

[0120] 약제학적 "서방형" 캡슐 또는 "지속 방출" 조성을 또는 제제는 사용될 수 있고 일반적으로 적용가능하다. 서방형 제형은 연장된 기간 동안 일정한 약물 수준을 제공하기 위해 일반적으로 설계되고 본 발명에 따라 TDP-43 미토콘드리아 국소화 억제제 웨타이드를 전달하기 위해 사용될 수 있다. 서방형 제형은 전형적으로 질환 부위의 부근에서 이식된다.

[0121] 지속-방출 제제의 예는, 매트릭스가 형상화된 물품, 예를 들면, 필름 또는 마이크로캡슐의 형태인, 폴리웹타이드 또는 면역접합체를 함유하는 고체 소수성 폴리머의 반투과성 매트릭스를 포함한다. 지속-방출 매트릭스의 예는 하기를 포함한다: 폴리에스테르; 하이드로겔, 예를 들어, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알코올); 폴리락타이드, 예를 들면, 미국 특허 번호 3,773,919; L-글루탐산 및 γ-에틸-L-글루타메이트의 코폴리머; 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트; 분해성 락트산-글라이콜산 코폴리머, 예컨대 루프론 데포 (락트산-글라이콜산 코폴리머 및 류프롤라이드 아세테이트로 구성된 주사가능 마이크로구형체); 및 폴리-D-(−)-3-하

이드록시부티르산.

- [0122] 폴리머 예컨대 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글라이콜산이 100 일 넘는 동안 분자의 방출을 가능하게 하는 반면, 특정 하이드로겔은 단기간 동안 단백질을 방출시킨다. 캡슐화된 폴리펩타이드가 장시간 바디에서 남아있는 경우, 이들은 37°C에서 수분에 노출의 결과로서 변성 또는 응집할 수 있고, 따라서 생물학적 활성을 감소 및 /또는 면역원성을 변화시킬 수 있다. 합리적인 전략은 관여된 기전에 의존하여 안정화에 이용가능하다. 예를 들어, 응집 기전이 티오-디설파이드 상호교환을 통해 분자간 S-S 결합 형성을 포함하면, 안정화는 설프하이드릴 잔기 변형, 산성 용액으로부터 동결건조, 수분 함량 제어, 적절한 첨가제 사용, 특이적 폴리머 매트릭스 조성물 개발, 및 기타 동종에 의해 달성된다.
- [0123] 일부 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 치료제를 포함하는 약제학적 조성물 및 치료제는 CNS 및/또는 PNS의 뉴런에 전달될 수 있다. 그와 같은 뉴런은 손상 또는 이환될 수 있다. 그와 같은 뉴런은 대안적으로 건강한, 손상되지 않은 뉴런일 수 있다. 그와 같은 뉴런은 손상의 부위에서, 또는 손상에 따른 부위에서 위치할 수 있다. 본 명세서에서 기재된 제제 및 조성물의 치료 투여, 전달/접촉용으로 표적되는 뉴런은 뉴런의 퇴행 또는 사망의 억제가 대상체에 유익한 것으로 증명된다고 생각되는 뉴런일 것이다. 그와 같은 결정은 단지 일상적인 실험과정일을 통해 당업자의 능력 내이다.
- [0124] 본 명세서에서 기재된 치료제 및 치료 약제학적 조성물은 또한 CNS 및/또는 PNS의 비-뉴런의 세포에, 예컨대 신경 세포에 지지를 제공하는 비-뉴런의 세포에 전달될 수 있다. 그와 같은 세포는, 제한 없이, CNS에서 신경교 세포 (예를 들면, 별아교세포, 회소돌기교세포, 뇌실막 세포, 방사 신경교; 및 PNS에서 슈반 세포, 위성 신경교 세포, 장용성 신경교 세포)를 포함한다.
- [0125] 일부 구현예에서, 하나 이상 치료제를 포함하는 약제학적 조성물은 TDP-43 미토콘드리아 국소화의 생체내 억제를 위하여 대상체에게 제공 및 투여될 수 있다. 약제학적 조성물은 치료제의 유익한 효과를 경험할 수 있는 임의의 대상체에게 투여될 수 있다. 본 발명이 그렇게 제한되도록 의도되지 않아도, 그와 같은 동물 중에서 가장 중요한 것은 인간이고, 신경퇴행성 질환을 가진 환자 및 동물을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0126] 본 명세서에서 기재된 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물은 .01 내지 1,000 mg/대상체의 체중의 kg의 범위에서, 및 더 바람직하게는 약 1 내지 100 mg/환자의 체중의 kg의 범위에서 투약량으로 제제의 치료적 유효량을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물은 약 1 내지 10 mg/대상체의 체중의 kg의 범위에서 투약량으로 제제의 치료적 유효량을 가질 수 있다.
- [0127] 전반적인 투약량은 사용된 특정한 제제, 대상체의 전반적인 건강, 대상체의 질환 상태, 병태의 중증도, 개선의 관찰, 그리고 선택된 제제(들)의 투여의 제형 및 경로를 포함하는 몇 개의 인자에 의존하는 치료적 유효량일 것이다. 치료적 유효량의 결정은 당해 분야의 숙련가의 능력 내이다. 정확한 제형, 투여의 경로 및 투약량은 대상체의 병태의 면에서 개별 의사에 의해 선택될 수 있다.
- [0128] 일부 구현예에서, 치료제는, 신경계의 중심, 체세포, 자율신경, 교감성 및 부교감신경 성분, 눈, 귀, 코, 입 또는 다른 기관 이내 신경감각 조직, 뿐만 아니라 뉴런의 세포 및 구조와 관련된 신경교 조직을 포함하는, 신경계의 요소와 관련된 질환, 장애, 또는 병태를 치료하는데 사용될 수 있다. 신경퇴행성 질환 또는 장애는 비정상적인 TDP-43 미토콘드리아 국소화, TDP-43 뉴런의 독성, 및/또는 TDP-43의 돌연변이와 관련될 수 있고/있거나 상기로 특성화될 수 있다. 신경퇴행성 질환은, 예를 들어, 근위축성 측색 경화증 (ALS), 전두측두엽 치매 (FTD), 알츠하이머병, 알츠하이머병에 관련된 치매, 파킨슨병, 노인성 치매, 헌팅턴병, 질 드 라 뚜렛 증후군, 다발성 경화증, 또는 선천성 운동 및 감각 신경병증을 포함할 수 있다.
- [0129] 하나의 특정 측면은 대상체에서 ALS의 치료를 고려한다. 상기 방법은 기재된 하나 이상 치료제의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. ALS는 표현형으로 진행성 약화를 그리고 신경병리적으로 운동 뉴런의 손실을 특징으로 한다. 본 발명의 방법이 야생형 및 돌연변이체 TDP-43 유도된 미토콘드리아 기능이상 및 신경 손실을 폐지시켜 그렇게 함으로써 ALS를 가진 대상체에서 질환 표현형을 개선할 수 있다는 것이 고려된다.
- [0130] 신경퇴행성 질환 또는 장애를 앓고 있는 대상체의 또 다른 치료 전략은 추가의 항-신경퇴행성 질환 제제의 치료적 유효량과 함께 본 명세서에서 기재된 TDP-43 미토콘드리아 국소화 억제제의 치료적 유효량을 투여하는 것이다. 항-신경퇴행성 질환 제제의 예는 L-dopa, 콜린에스테라아제 억제제, 항콜린제, 도파민 효능제, 스테로이드, 그리고 인터페론, 단클론성 항체, 및 갈라티라마 아세테이트를 포함하는 면역조절제를 포함한다.
- [0131] 따라서, 본 발명의 추가 측면에서, 본 명세서에서 기재된 치료제는 신경퇴행성 및 미엘린 관련된 장애 치료용

부속 요법과 조합 요법의 일부로서 투여될 수 있다.

[0132] 어구 "조합 요법"은 본 명세서에서 기재된 치료제 (예를 들면, TDP-43 미토콘드리아 국소화 억제제) 및 이들 치료제의 공동-작용으로부터 유익한 효과를 제공하도록 의도된 특정 치료 요법의 일부로서 추가의 치료제의 투여를 포용한다. 조합으로서 투여된 경우, TDP-43 미토콘드리아 국소화 억제제 및 치료제는 별개의 조성물로서 제형화될 수 있다. 전형적으로 조합으로 이들 치료제의 투여는 정의된 기간 (선택된 조합에 의존하여 일반적으로 분, 시간, 일 또는 주) 동안 수행된다.

[0133] "조합 요법"은 순차적인 방식으로 이들 치료제의 투여, 즉, 여기서 각각의 치료제는 상이한 시간에 투여됨, 뿐만 아니라 실질적으로 동시 방식으로, 이들 치료제, 또는 상기 치료제의 적어도 2개의 투여를 포용하도록 의도된다. 실질적으로 동시 투여는, 예를 들어, 각각의 치료제의 고정된 비를 갖는 단일 캡슐 또는 각각의 치료제용 다수의 단일 캡슐로 대상체에게 투여함으로써 달성될 수 있다. 각각의 치료제의 순차적인 또는 실질적으로 동시 투여는, 비제한적으로, 폐하 경로, 경구 경로, 정맥내 경로, 근육내 경로, 및 점액 막 조직을 통한 직접적인 흡수를 포함하는 임의의 적절한 경로에 의해 영향받을 수 있다. 치료제는 동일한 경로에 의해 또는 상이한 경로에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 선택된 조합의 제1 치료제는 정맥내 주사에 의해 투여될 수 있는 한편 조합의 다른 치료제는 경구로 투여될 수 있다. 대안적으로, 예를 들어, 모든 치료제는 경구로 투여될 수 있거나 모든 치료제는 정맥내 주사로 투여될 수 있다. 치료제가 투여되는 순서는 협소하게 중요하지 않다. "조합 요법"은 또한 다른 생물학적 활성 성분 (예컨대, 비제한적으로, 제2 및 상이한 치료제) 및 비-약물 요법 (예를 들면, 수술)과 추가 조합으로 상기 기재된 바와 같이 치료제의 투여를 포용할 수 있다.

[0134] 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 입증하기 위해 포함된다. 후술하는 실시예에서 개시된 기술이 본 발명의 실시에서 양호하게 기능하기 위해 본 발명자에 의해 발견된 기술을 나타내고, 따라서 그것의 실시를 위하여 바람직한 방식을 구성하도록 간주될 수 있다는 것이 당해 분야의 숙련가에 의해 인정되어야 한다. 그러나, 당해 분야의 숙련가는, 본 개시내용의 면에서, 많은 변화가 개시되는 특정 구현예에서 실시될 수 있다는 것 그리고 여전히 본 발명의 사상 및 범위로부터 이탈 없이 똑같은 또는 유사한 결과를 수득할 수 있다는 것을 인정해야 한다.

#### 실시예 1

##### TDP-43 미토콘드리아 국소화의 억제가 그것의 뉴런의 독성을 차단시킨다

[0137] 세포질 TDP-43의 역효과에 의한 기능의 이득 또는 해 고갈을 통한 TDP-43 기능의 손실이 ALS 및 FTD에서 신경 손실을 야기시키는지 여부는 아직 결정되지 않았다. 본 실시예는 TDP-43 세포질 TDP-43이 뉴런의 독성 및 신경 퇴행을 야기시키는데 충분하고 TDP-43 미토콘드리아 국소화의 억제가 뉴런의 그것의 뉴런의 독성을 차단시킨다는 것을 보여준다.

#### 물질 및 방법

[0139] 클리블랜드의 대학 병원으로부터 사후로 수득된 마우스 및 인간 척수 인간 척수 조직의 면역세포화학 및 면역형 광은 고정되었고 6  $\mu$ m-두께 연속 절편은 우리가 이전에 기재하였던 바와 같이 제조되었다 (표 1). 면역세포화학은 폐록시다아제 항-폐록시다아제 프로토콜에 의해 수행되었다. 면역형광 염색을 위하여, 탈파라핀화된 및 재-수화된 조직 절편은 증류된 H<sub>2</sub>O로 간단히 3회 세정되었고 1X 항원 데클로커 (Biocare, Concord, CA)에서 배치되었다. 절편은 그 다음 10 초 동안 125°C로 가열 및 30 초 동안 90°C로 냉각 이어서 128°C에서 22 psi로 가열, 및 94°C에서 0 psi로 냉각에 의해 바이오케어 데클로킹 챔버를 이용하여 가압 하에 항원 회수를 거쳤다. 온도가 30°C로 감소된 후, 절편은 5회 동안 증류된 H<sub>2</sub>O로 서서히 린스되었다. 절편은 그 다음 RT에서 30 분 동안 10% 정상 염소 혈청 (NGS)로 차단되었고, 4°C에서 밤새 1% NGS를 함유하는 PBS내 1차 항체로 인큐베이션되었다. PBS로 3 세정후, 절편은 10 분 동안 10% NGS에서, 그리고 그 다음 암실내 RT에서 2 시간 동안 Alexa Fluor 콘주게이션된 2차 항체 (Life Technologies, Grand Island, NY) (1:300)으로 인큐베이션되었다. 마지막으로, 절편은 PBS로 3회 린스되었고, DAPI로 염색되었고, 3회 동안 PBS로 재차 세정되었고, Fluoromount-G 중첩 배지 (Southern Biotech, Birmingham, AL)로 실장되었다.

#### 발현 벡터, 재조합 단백질, 팝타이드, 항체 및 화학물질

[0141] MitoDsRed2 (Clontech, Mountain View, CA) 및 렌티바이러스 팩킹 플라스미드 (Addgene, Cambridge, MA로부터 PCMV-dR8.2 및 PCMV-VSVG)는 수득되었다. Flag 태깅된 TDP-43 작제물은 PCMV-3Tag-1a (Agilent, Santa Clara, CA) 또는 pCMVTnT (Promega, Madison, WI) 속에 TDP-43 클로닝에 의해 생성되었다. M1/3/5 작제물과 융합된

GFP는 PCMV-3Tag-9a (Agilent, Santa Clara, CA)에 기반하여 생성되었다. TDP-43 돌연변이는 모두 QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Santa Clara, CA)를 사용하여 생성되었다. MitoDsRed2/TDP-43 비시스템론성 렌티바이러스 작제물은 pLVX-Puro (Clontech) 속에 TDP-43 및 mitoDsRed2 클로닝 및 마우스 시냅신 1 프로모터로 PCMV 프로모터 대체에 의해 생성되었다. 5'-말단에 인간 사이토크롬 c 산화효소의 하위단위 VIII로부터 미토콘드리아 표적화 서열의 부가 (및 3'-말단에 myc 태그의 부가)를 가진 핵 포맷에서 ND3 또는 ND6 유전자는 직접적으로 합성되었고 pcDNA3.1(+) (GenScript)로 아클론화되었다. RT-PCR/Realtime-PCR (Life Technologies, Grand Island, NY)에 사용된 프라이머 및 RNAi 올리고뉴클레오타이드 (Sigma St. Louis, MO; Tim22 esiRNAi: EH160361-20UG 및 Tim23 esiRNAi: EH106141-519 20UG)는 수득되었다. His 태깅된 재조합 인간 TDP-43은 ATGEN (한국, 경기도)로부터 수득되었고 Flag 태깅된 재조합 인간 TDP-43은 pCMVTnT 작제물 (Promega, Madison, WI)를 사용하는 바이오틴-라이실-tRNA와 커플링된 전사/번역에 의해 토끼 망상적혈구 시스템에서 합성되었다. M1 또는 M3 모티프 또는 스크램블드 M1 또는 M3 모티프가 기재된 바와 같이 웹타이드 전달/투과도를 향상시키기 위해 인간 면역결핍 바이러스 TAT 단백질의 단백질 형질도입 도메인 (YGRKKRRQRRR (서열 식별 번호: 11))의 524 C-말단에 융합하였던 (FITC 표지화 유/무) cPM, PM1 및 PM3 웹타이드 523은 NeoBiolab (Woburn, MA) 또는 Biomatik (Wilmington, DE)로부터 수득되었다. 모든 화학물질은 수득되었다 (Sigma St. Louis, MO).

#### [0142] 배아 1차 피질 뉴런, HEK293 세포 및 1차 인간 섬유아세포 배양물 530 및 형질감염

1차 피질 뉴런은 변형과 함께 이전에 기재된 바와 같이 E18 스프래그 다우리 랫트 (Harlan, Indianapolis, IN) 으로부터 단리되었다. 간단히, 랫트 뇌는 HBSS (Life Technologies, Grand Island, NY)에서 해부되었고 2% B27 (Life Technologies, Grand Island, NY)로 보충된 Hibernate E (BrainBits, Springfield, IL)에서 저장되었다. 해부 현미경 하에서, 수막은 가는 집게로 완전히 제거되었고 피질은 해부되었다. 피질은 그 다음 15 분 동안 실온 (RT)에서 0.25% 트립신으로 소화되었고 이어서 10% FBS 및 50 단위/ml DNase I (Worthington-biochem, Lakewood Township, NJ)로 보충된 Opti-MEM (Life Technologies, Grand Island, NY)에서 간단히 인큐베이션되었다. 소화된 피질은 세포 혼탁액이 균질해지고 큰 조각의 조직이 가시적으로 남아있지 않는 때까지 피펫으로 은화한 분쇄에 의해 추가로 해리되었다. 피질 뉴런은 마지막으로 수집되었고 폴리-L-라이신/라미닌 코팅된 커서 슬립/챔버 슬라이드 (BD, Franklin Lakes, NJ), 35mm 접시 또는 24 웰 플레이트에서 씨딩되었고 우리가 이전에 기재하였던 바와 같이 배양되었다. American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)로부터 HEK-293T 세포는, 37°C에 습한 인큐베이터에서 5% CO<sub>2</sub>내, 10% 우태 혈청 및 1% 폐니실린-스트렙토마이신으로 보충된, DMEM 배지 (Life Technologies, Grand Island, NY)에서 성장되었다. 4 연령-매칭된 정상 대상체 및 TDP-43 돌연변이를 보유하는 2 ALS 환자로부터 1차 인간 섬유아세포 (단지 2 라인이 이용가능함)는 Coriell Institute for Medical Research (NINDS 수집)으로부터 수득되었다. 1차 섬유아세포는 우리가 이전에 기재하였던 바와 같이 37°C에 습한 인큐베이터에서 5% CO<sub>2</sub>내, 10% 또는 15% (v/v) 우태 혈청으로 보충된, 비-필수 아미노산 및 2 mM 글루타민을 함유하는 최소 필수 배지 (Life Technologies)에서 성장되었다. HEK293 세포 및 1차 인간 섬유아세포는 마이코플라스마 오염 없이 시험되었다. 뉴런은 모두 NeuroMag (OZ Biosciences, San Diego, CA)에 의해 형질감염되었고, 한편 HEK293T 세포 및 1차 섬유아세포는 제조자의 프로토콜에 따라 리포펙타민 2000 (Life Technologies, Grand Island, NY)로 형질감염되었다. 공-형질감염을 위하여, 3:1 비 (mitoDsRed2/TDP-43:GFP)가 적용되었다.

#### [0144] 인간 섬유아세포를 사용하는 iPSCs의 생성 및 인간 뉴런에 iPSCs의 분화

리프로그래밍 및 분화를 위하여, NHFs 및 TDP-43 G298S 또는 A382T 인간 섬유아세포의 2 라인은 10% FBS (Life Technologies) 및 GlutaMAX (Life Technologies)로 보충된 DMEM에서 배양되었다. 섬유아세포는 공급기 세포로서 조사된 MEFs (iMEF)를 사용하는 제조자의 지침에 따라 CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Life Technologies)를 사용하여 리프로그래밍되었다. iPSCs는 hESC 배지 (GlutaMAX를 가진 DMEM/F12 (Life Technologies), 10% 녹아웃 혈청 대체물질 (Life Technologies), 0.1 mM 2-메르캅토에탄올 (Life Technologies), 1 × 비-필수 아미노산 (Life Technologies), 및 10 ng/ml bFGF (Sigma)내 iMEFs에서 일상적으로 배양되었다. 분화를 위하여, iPSCs는 적응되었고 TeSR1 E8 배지 (Stem Cell Technologies)내 매트리겔에서 공급기 자유 조건으로 배양되었고 지침에 따라 StemDiff Neural Induction 배지 및 AggreWell 800 (모두 Stem Cell Technologies 제)를 사용하여 유도된 뉴런의 선조 세포 (iNPCs)로 분화되었다. iNPCs는 Neural Rosette Selection 배지를 사용하여 선택되었고 신경 선조 배지 (모두 Stem Cell Technologies 제)를 사용하여 추가로 팽창되었다. iPSCs 및 iNPCs의 특성규명을 위하여, 면역형광 염색은 TRA-1-81, Nanog, SSEA3 및 SSEA4에 대해 항체를 사용하여 이전에 기재된 바와 같이 수행되었다. 알칼리성 포스파타제 (AP) 염색을 위하여, Alkaline

Phosphatase Staining Kit II (Stemgent)는 사용되었다. iNPCs는 제조자의 프로토콜에 따라 Axol iNPCs 분화 및 성숙 키트 (Axol, Cambridgeshire, United Kingdom)을 사용하여 인간 뉴런에 분화되었다. 간단히, iNPCs 세포는 24 또는 48 웰 플레이트 또는 Axol Plating-XF 배지내 Axol SureBondXF로 코팅된 24 웰 씨호스 플레이트에서 먼저 씨딩되었다. 플레이팅 24 시간 후, 세포는 뉴런의 분화 배지 (Axol Neuronal Differentiation-XF 배지)에 전달되었다. 72 시간 후, 뉴런의 분화 배지의 절반은 뉴런의 성숙 배지 (Axol Neuronal Maintenance-XF 배지)로 대체되었고 이어서 절반 뉴런의 성숙 배지는 매 4 일 변화하였다. 연구에서 사용된 iPSCs 및 iNPCs는 마이코플라스마 오염 없이 시험되었다. iPSCs 유래된 뉴런은 NeuroMag (OZ Biosciences, San Diego, CA)에 의해 또한 형질검증되었다.

#### [0146] 세포 및 미토콘드리아 분별화

미토콘드리아는 이전에 기재된 바와 같이 단리되었다. 간단히, 세포는 IB-1 용액 (IB-1: 225 mM 만니톨, 75 mM 수크로스, 0.1 mM EGTA, 20 mM HEPES; pH =7.4)에서 균질화되었고, 한편 조직은 0.5% BSA를 가진 IB-1에서 균질화되었다. 총 균질물 (H)는 5 분 동안 4에서 2회 동안 600g로 17 원심분리되었다. 후속적으로, 상청액 (S1)은 수집되었고 10 분 동안 4에서 7,000g로 원심분리되어 풍부한 미토콘드리아 분획을 수득하였고 상청액 (S2)는 수집되었다. 풍부한 미토콘드리아 분획은 세포 미토콘드리아용 IB-2 용액 (225 mM 만니톨, 75 mM 수크로스, 20 mM HEPES; pH =7.4) 그리고 조직 미토콘드리아용 0.5% BSA를 함유하는 IB-2에서 세정되었고 이어서 10 분 동안 9,000g로 원심분리되었다. 펠릿은 MRB 완충액 (250 mM 만니톨, 0.5 mM EGTA, 5 mM HEPES; pH 7.4)에 혼탁되어 미정제 미토콘드리아 분획 (cM)을 수득하였다. 미정제 미토콘드리아 분획은 8 ml Percoll 배지 (225 mM 만니톨, 25 mM HEPES, 1 mM EGTA 및 30% Percoll (vol/vol); pH = 7.4)의 최상부에서 추가로 중첩되었고 SW40 Ti 회전자에서 4에서 30 분 동안 95,000g로 원심분리를 거쳤다. 펠릿은 MRB 완충액에 재차 혼탁되었고 이어서 4에서 10 분 동안 6,300 g로 원심분리되어 정제된 미토콘드리아 (pM)를 수득하였다. 핵 분획은 핵 추출 시약 (Thermo scientific, Waltham, MA)에 의해 단리/정제되었다. 하위-미토콘드리아 구획 분별화를 위하여, 단리된 순수한 미토콘드리아는 0.12 mg 디기토닌/mg 미토콘드리아로 디기토닌을 가진 단리 배지 (225 mM 만니톨, 75 mM 수크로스, 0.1 mM EGTA, 20 mM HEPES; pH =7.4)에 혼탁되었고 15 분 동안 열음에서 약하게 교반되었다. 그 다음 디기토닌 처리된 샘플은 단리 배지의 3 용적으로 희석되었고 10 분 동안 9,000 g로 원심분리되어 상청액 A를 얻었고 이어서 단리 완충액에서 펠릿 재현탁되었고 30 초 동안 열음에서 초음파처리되었다. 그 다음 용액은 초음파 처리되었고 10 분 동안 6,500 g로 원심분리되었고 이어서 60 분 동안 144,000 g로 원심분리되어 내부 막 소포를 침전시켰고 상청액은 매트릭스 분획으로서 수집되었다. 상청액 A는 60 분 동안 144,000 g로 원심분리되어 외부 막 소포를 펠릿으로서 침전시켰고 상청액은 내부 막 공간 분획으로서 수집되었다.

#### [0148] 시냅토솜 단리 S

시냅토솜은 기재된 바와 같이 마우스 피질 또는 척수로부터 단리되었다. 간단히, 신선한 피질 조직은 빙랭된 '수크로스 배지' (320 mM 수크로스, 1 mM EDTA, 0.25 mM 디티오프레이톨, pH 7.4에서 균질화되었고 이어서 4에서 10 분 동안 1,000 g로 원심분리되었다. 상청액은 수집되었고 15 mL 원심관에서 불연속 Percoll 구배의 최상부 (수크로스 배지내 3, 10, 및 23% Percoll의 3 mL 층)에서 주의하여 적층되었고 이어서 SW-40Ti 회전자에서 4에서 10 분 동안 32,500 g로 원심분리되었다. 10%와 23% Percoll 사이 밴드는 수집되었고 이온성 배지 (20 mM HEPES, 10 mM D-글루코스, 1.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM KCl, 140 mM NaCl, pH. 7.4)로 희석 되었고 이어서 4에서 15 분 동안 15,000 g로 원심분리되어 Percoll을 제거하였다. 펠릿, 즉, 시냅토솜 분획은 수집되었고 재차 이온성 배지에서 재현탁되었고 30 분 동안 4에서 3,000g로 원심분리에 의해 폴리에틸렌이민 코팅된 플레이트에서 씨딩되었다. 시냅토솜의 순도는 시냅스 메이커 또는 EM의 면역블랏에 의해 확인되었다 (데이터 도시되지 않음).

#### [0150] 미토콘드리아 기능 및 세포 생존력 측정

HEK293 세포, 인간 섬유아세포, 1차 뉴런 또는 시냅스 미토콘드리아에서 m△ψ는 우리가 이전에 기재하였던 바와 같이 테트라메틸로다민 (TMRM) 및/또는 로다민 123 (rhod123)에 의해 결정되었다. 간단히, HEK293 세포, 인간 섬유아세포, 35mm 630 접시 또는 24 웰 플레이트에서 배양된 1차 뉴런, 또는 기재된 바와 같이 폴리에틸렌이민 (50% 용액으로부터 1:15000 희석, Sigma)로 사전-코팅된 24 웰 플레이트에 부착된 단리된 시냅토솜은 30 분 동안 PBS (포스페이트-완충 식염수 pH 7.4, Life Technologies, Grand Island, NY; HEK293 세포 및 인간 섬유아세포용), HEPES-완충된 타이로드 용액 (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 g/리터 D-글루코스, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 및 25 mM HEPES; pH 7.4; 1차 뉴런용) 또는 이온성 배지 (시냅스 미토콘드리아용)에서 20 nM TMRM 또는 2 μM rhod123으로 인큐베이션되었다. TMRM/rhod123 함유 용액은 제거되었다. PBS로 3회 세정 후, 타이로드 또

는 이온성 배지, 세포/뉴런/시냅토솜은 10 분 동안 실내 공기에서 37°C에 PBS 또는 타이로드 용액에서 인큐베이션되어 형광 현미경에 의한 이미지형성 전 TMRM/rhod123 신호의 대리를 허용하였다. ATP 수준은 이전에 기재된 바와 같이 세포 또는 뉴런의 용해물을 사용하여 ATP 18 비색계/형광 검정 키트 (Biovision, Milpitas, CA)에 의해 측정되었다. 지시된 바와 같이 최적의 씨딩 밀도를 가진 살아있는 배양된 HEK293 세포, 인간 섬유아세포 및 뉴런에서 또는 시냅토솜내 시냅스 미토콘드리아에서 산소 소비율 (OCR)의 실시간 측정은 제조 지침에 따라 씨호스 XF24 분석기 (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA)를 사용하여 수행되었다. 필요하면, ATP 합성효소 억제제 올리고마이신 ( $1 \mu\text{M}$ ), 언커플러 FCCP ( $4 \mu\text{M}$ ) 및 복합체 I 억제제 안티마이신 A ( $1 \mu\text{M}$ ) 및 로테논 ( $1 \mu\text{M}$ )은 순차적으로 주사되었다. 측정 후, 세포 및 시냅토솜은 용해되었고 OCR 데이터는 총 단백질에 의해 정규화되었다. 세포 사망 및 생존력은 세포독성 검출 키트 (LDH; Roche, Nutley, NJ), 절단된 카스파제 3 염색에 대한 특이적 항체를 사용하는 면역형광 염색 또는 SYTOX 그린 검정 (Life Technologies, Grand Island, NY)에 의해 측정되었다. SYTOX 그린 사망된 뉴런 염색을 위하여, 뉴런은 20 분 동안 실온에서 30 nM SYTOX 그린을 함유하는 PBS에서 인큐베이션되었고 이어서 PBS로 3회 세정되었다. SYTOX 그린-양성 핵 및/또는 명백한 단편화된 핵/신경돌기를 가진 뉴런은 비-생존가능한 뉴런으로서 카운트되었고, 반면에 SYTOX 그린-양성 핵 및 맑은 핵 윤곽/신경돌기 없는 뉴런은 생존가능한 뉴런으로서 카운트되었다.

#### [0152] 미토콘드리아 도입 검정(import assay)

미토콘드리아는 마우스 뇌로부터 단리되었고, 한편 미토플라스트는 15 분 동안 얼음에서 디기토닌 ( $1 \text{ mg}$ 의 미토콘드리아 단백질당  $0.1 \text{ mg}$ )으로 단리된 미토콘드리아 인큐베이팅 이어서 10 분 동안  $11,000\text{g}$ 로 원심분리에 의해 제조되었다. 사용된 도입 완충액은  $250 \text{ mM}$  수크로스,  $10 \text{ mM}$  MOPS-KOH, pH 7.2,  $80 \text{ mM}$  KCl,  $5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $2 \text{ mM}$  ATP,  $2 \text{ mM}$  NADH,  $3\%$  BSA로 구성되었다. 도입 검정은 45 분 동안 RT에서 지시된 재조합 단백질로 미토콘드리아 또는 미토플라스트 인큐베이팅에 의해 수행되었다. 도입 반응은 밸리노마이신 ( $1 \mu\text{M}$ ) 첨가에 의해 중단되었다. 도입 반응의 동등 용적은 필요에 따라 5 분 동안 RT에서 트립신 및/또는 디기토닌으로 처리되었고 이어서 10 분 동안  $11,000\text{g}$ 로 원심분리되었다. 마지막으로, 미토콘드리아 또는 미토플라스트 웰릿은 프로테아제 억제제 각테일 (Roche, Nutley, NJ) 및 폐닐메틸설포닐 플루오라이드 (PMSF, Sigma, St. Louis, MO)로 보충된 세포 용해 완충액 (Cell signaling, Danvers, MA)에서 재현탁되었다. 미토콘드리아 단백질은 도입 동안 언풀딩될 필요가 있어서, 시험관내 rTDP-43 도입을 용이하게 하는 망상적혈구 용해물에서 차폐론의 실재를 시사한다. rTDP-43 도입이 우레이-변성에 의해 증가될 수 있어도 (데이터 도시되지 않음), 망상적혈구 용해물에서 생성된 재조합 단백질은 또한 시험관내 효율적인 도입을 실증하였다. 따라서, 이 연구에서, 우리는 변성 없이 재조합 단백질을 사용하였다.

#### [0154] 호흡 사슬 복합체 I 내지 V의 활성의 측정

복합체 I-IV의 효소 활성은 기재된 바와 같이 측정되었다. 간단히, 냉동 및 해동의 3 사이클 후, 단리된 미토콘드리아는  $200 \mu\text{l}$  반응 완충액의 총 용적에서 재현탁되었다. 복합체 I (NADH:유비퀴논 산화환원효소) 활성은 로테논 ( $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ )의 첨가 전 및 후 5 분 동안  $340 \text{ nm}$ 에서  $25\text{mM}$  인산칼륨,  $5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $2.5 \text{ mg}/\text{ml}$ 의 BSA,  $0.13 \text{ mM}$  NADH,  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  안티마이신 A, 및  $65 \mu\text{M}$  유비퀴논1을 함유하는 반응 완충액에서 측정되었다. 복합체 II (석시네이트: 유비퀴논 산화환원효소) 활성은  $600 \text{ nm}$ 에서  $25 \text{ mM}$  인산칼륨,  $2.5 \text{ mg}/\text{ml}$ 의 BSA,  $20 \text{ mM}$  나트륨 석시네이트,  $0.05\text{mM}$  DCPIP,  $2\text{mM}$  KCN, 및  $65 \mu\text{M}$  유비퀴논1을 함유하는 반응 완충액에서 측정되었다. 반응은  $65 \mu\text{M}$  유비퀴논1의 첨가를 통해 개시되었다. 복합체 III (유비퀴놀2:사이토크롬 c 환원효소) 활성은  $550 \text{ nm}$ 에서  $25 \text{ mM}$  인산칼륨,  $2.5 \text{ mg}/\text{ml}$ 의 BSA,  $2 \text{ mM}$  KCN,  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  로테논,  $0.6 \text{ mM}$  n-도데실-b-D-말토사이드,  $15 \mu\text{M}$  사이토크롬 c 및  $35 \mu\text{M}$  유비퀴놀2를 함유하는 반응 완충액에서 측정되었다. 복합체 IV (사이토크롬 c 산화효소) 활성은  $25 \text{ mM}$  인산칼륨,  $0.45 \text{ mM}$  n-도데실-b-D-말토사이드 및  $15 \mu\text{M}$  사이토크롬 c를 함유하는 반응 완충액에서 측정되었다.  $550 \text{ nm}$ 에서 복합체 IV 활성. 복합체 V (F1-ATP 합성효소) 활성은  $40 \text{ mM}$  트리스-HCO<sub>3</sub>,  $10 \text{ mM}$  EGTA pH8.0,  $0.2\text{mM}$  NADH,  $2.5\text{mM}$  PEP,  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$  안티마이신 A,  $0.5\text{mg}/\text{ml}$  LDH,  $0.5\text{mg}/\text{ml}$  PK 및  $2.5\text{mM}$  ATP를 함유하는 검정 완충액에서 결정되었다. 복합체 V 활성은 NADH 산화로 인해  $340 \text{ nm}$ 에서 흡광도 변화 이후 측정되었다.

#### [0156] RNA 면역침강 및 RT-PCR/실시간 PCR

단리된 미토콘드리아는 1X 프로테아제 억제제 각테일 (Cell signaling, Danvers, MA) 및  $100\text{U}/\text{ml}$  리보뉴클레이제 억제제 (Life Technologies, Grand Island, NY)를 함유하는 면역침강 용해 완충액 ( $50 \text{ mM}$  Tris, pH 7.4,  $250 \text{ mM}$  NaCl,  $5 \text{ mM}$  EDTA,  $50 \text{ mM}$  NaF,  $1 \text{ mM}$  Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>,  $1\%$  Nonidet P40 (NP40) 및  $0.02\%$  NaN<sub>3</sub>)에 의해 먼저 용해되었다. 균질물을 그 다음 30 분 동안  $4^\circ\text{C}$ 에서  $18,000 \text{ g}$ 로 원심분리되었다. 상청액은 수집되었고  $4^\circ\text{C}$ 에서 밤새 TDP43 항체에 의해 결합된 자기 비드로 인큐베이션되었다. 자기 비드는 그 다음 용해 완충액으로 세정되었고

RNAs는 TRIzol 시약 (Life Technologies, Grand Island, NY)에 의해 추출되었다. HEK-293T 세포 및 인간 척수 조직으로부터 총 RNAs는 또한 TRIzol 시약 (Life Technologies, Grand Island, NY)에 의해 추출되었다. mtDNA는 DNase I 처리에 의해 제거되었고 PCR에 의해 확인되었다. 역전사는 랜덤 올리고머 프라이머를 가진 고 용량 cDNA 역전사 키트 (Life Technologies, Grand Island, NY)에 의해 수행되었다. 모든 미토콘드리아 전사체의 qRT-PCR 분석은 SYBR Green 마스터 믹스 (Life Technologies, Grand Island, NY)를 사용하여 적절한 프라이머 쌍을 가진 StepOnePlus 시스템에서 수행되었다. 사용된 프라이머에 대하여 표 1 참조 (A8/ND4L은 그것의 짧은 서열 때문에 구체적으로 측정 및 증폭되지 않았다).

#### [0158] HEK293 세포에서 미토콘드리아 발생기 단백질 합성

Flag 태깅된(tagged) TDP-43을 발현시키는 HEK293 세포는 1 시간 동안 메티오닌 없는 DMEM 배양 배지 (Life Technologies, Grand Island, NY)에서 배양되었고 이어서 10 분 동안 0.1mg/ml 에메틴으로 전처리되었고 4 시간 동안 1mg/ml 에메틴 및 L-Azidohomoalanine (AHA, Life Technologies, Grand Island, NY)으로 공-처리되었다. 필스 표지화 후, 세포는 수화되었고 이어서 미토콘드리아 분별화되었다. 단리된 미토콘드리아는 50mM 트리스-HCl, pH8.0에서 1% SDS로 용해되었고 이어서 10 분 동안 10,000g로 원심분리되었다. 상청액은 30 분 동안 RT에서 아비딘-다이나비드 (Life Technologies, Grand Island, NY)로 인큐베이션되었다. 비드의 제거 후, 상청액은 클러-잇 검정 (Life Technologies, Grand Island, NY)을 거쳤다. 간단히, 200 μg 미토콘드리아 단백질은 160 μL 용적 시스템에서 PEG4-카복사미드-6-아지도헥사닐-바이오텐으로 표지되었고, 총 단백질은 침전되었고 메탄올 및 클로로포름에 의해 추출되었다. 5 분 동안 18,000g으로 원심분리 후, 총 단백질 펠릿은 수집되었고 웨스턴 블랏용 50mM 트리스-HCl에서 1% SDS에 의해 용해되었다.

#### [0160] 미토콘드리아 리보솜용 분별화 및 RNAs에서 그것의 장입

단리된 미토콘드리아는 20 분 동안 얼음에서 용해 완충액 (260 mM 수크로스, 100 mM KC1, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM 트리스-C1 pH 7.5, 1% 트리톤 X-100, 5 mM β-메르캅토에탄올 및 프로테아제 억제제)에서 용해되었다. 용해물은 4°C에서 30 분 동안 9,400 g로 원심분리되었다. 그 다음 상청액은 11 ml 10%-30% 연속 선형 수크로스 구배 (50 mM 트리스-C1, 100 mM KC1, 10 mM MgCl<sub>2</sub>)에서 장입되었고 4°C에서 Beckman SW41-Ti 회전자에 15 시간 동안 20,400 rpm으로 원심분리되었다. 원심분리 후, 13 분획은 최상부로부터 수집되었고 추가 면역블랏 및 732 qRT-PCR 분석을 위하여 사용되었다.

#### [0162] 청색 원상태(blue native) PAGE 및 면역블랏 분석

청색 원상태 겔 전기영동은 NativePAGE 비스-트리스 겔 시스템 (Life Technologies, Grand Island, NY)로 수행되었다. 간단히, 10 μg의 미토콘드리아 단백질을 함유하는 단리된 미토콘드리아는 샘플 완충액에서 재현탁되었고 30 분 동안 얼음에서 2% 디기토닌 (Sigma)로 가용화되었다. 불용화된 펠릿은 30 분 동안 18,000g로 원심분리에 의해 제거되었다. 상청액은 수집되었고 5% G-250 샘플 첨가제는 첨가되었다. 샘플은 3-12% 프리케스트 비스-트리스 구배 겔 (Life Technologies, Grand Island, NY)에 장입되었고 이어서 4°C에서 밝은 청색 작동 완충액으로 40 V의 전압에서 전기영동되었다. 규칙적 면역블랏 분석을 위하여, 정제된 미토콘드리아, 세포 또는 조직은 세포 용해 완충액 (Cell signaling, Danvers, MA) 플러스 1 mM PMSF 및 프로테아제 억제제 카테일 (Roche, Nutley, NJ)로 용해되었다. 총 단백질 추출물의 동등량은 SDS-PAGE에 의해 분해되었고 Immobilon-P (Millipore, Billerica, MA)에 전달되었다. 건조 10% 탈지유로 차단 이후, 1차 및 2차 항체는 이전에 기재된 바와 같이 적용되었고 블랏은 Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Billerica, MA)로 현상되었다. 6 연령-매칭된 정상 및 sALS를 가진 8 환자로부터 냉동된 인간 흉부 척수 조직은 NICHD Brain and Tissue Bank로부터 수득되었다 (표 1).

#### [0164] RNA-단백질 시험관내 결합 검정

ND3 RNA 및 돌연변이체 ND3 RNA 탐침은 GenScript (Piscataway, NJ)로부터 구매되었다. RNA-단백질 결합은 1 μM RNA 탐침을 함유하는 20 μL 반응에서 수행되었다. 결합 조건은 pH 7.5에서 10mM 트리스, pH 7.5에서 10mM HEPES, 20 mM KC1, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM DTT, 5% 글리세롤이었다. 30 분 동안 RT에서 인큐ベ이션 후, 샘플은 빙수조에서 1 시간 동안 0.5×TBE를 함유하는 사전-전기영동된 6% 폴리아크릴아미드 겔에서 100V로 실시되었다. 겔은 RT에서 20 분 동안 SYBR Green 용액 (Life Technologies, Grand Island, NY)로 염색되었다. 그 다음 염색된 겔은 3회 동안 물로 린스되었고 EpiChemi II Darkroom (UVP, Upland, CA)에 의해 시각화되었다.

#### [0166] 렌티바이러스 생산, 정위방법의(stereotaxic) 주사 및 냉동저장화

[0167] Lent i-X 293T 세포 (Clontech, Mountain View, CA)는 PerFectin (Genlantis, San Diego, CA)를 사용하는 10cm 플레이트당 6  $\mu$ g, 4.5  $\mu$ g, 및 1.5  $\mu$ g의 DNA로 2 헬퍼 플라스미드: PCMV-dR8.2 및 PCMV-VSVG 그리고 비시스템론 성 렌티바이러스 작제물로 형질감염되었다. 형질감염 48 시간 후, 배양 배지는 30 분 동안 780g로 원심분리되었고 0.45  $\mu$ m 기공 크기로 여과되었다. 여과된 배지는 20% 수크로스의 최상부에 추가로 놓여졌고 이어서 2 시간 동안 90,000g로 Beckman SW-28 회전자에서 원심분리되었다. 펠릿은 수집되었고 PBS 또는 염수에서 재현탁되었다. 바이러스 주사를 위하여, 마우스는 아베르틴 (250mg/kg)을 사용하여 마취되었고 뇌정위적 프레임에서 배치되었다. 작은 절개는 실시되어 두개골 표면을 노출시켰다. 흘은 운동 피질 영역 (AP/전측-후측: 1 mm; ML/내측-측면: 1mm) 상부의 두개골에서 천공되었다. 바이러스로 채워진 바늘은 0.7 mm (DV/등부-복부) 낮아졌고 2  $\mu$ l 바이러스 (10<sup>9</sup> 바이러스 입자/ml)는 5 분 지나서 주사되었다. 바늘은 천천히 철수하기 전에 원위치에 5 분 방치되었다. 피부는 봉합되었고 마우스는 따뜻한 패드에서 회복을 위하여 허용되었다. 주사 1 주 후, 마우스는 아베르틴으로 깊게 마취되었고 차가운 PBS로 경심적으로 살포되었다. 뇌는 24 시간 동안 파라포름알데하이드 (4%)에서 그리고 그 다음 재차 24 시간 동안 30% 수크로스에서 고정되었다. 냉동보호 후, 뇌 관상 절편은 면역 염색을 위하여 20  $\mu$ m 두께로 절단되었다.

#### TAT-펩타이드의 생체내 투여

[0168] [0169] 마우스 수술/절차는 NIH 지침에 따라 수행되었고 케이스 웨스턴 리저브 대학교에서 실험 동물 운영 위원회 (IACUC)에 의해 승인되었다. C57BL/6 비-유전자도입 암생형 마우스 (NTG 마우스), Prnp-TARDBP 마우스 (TDP-43 WT Tg 마우스) 및 Prnp-TARDBP\*A315T 마우스 (TDP-43 A315T Tg 마우스)는 Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)로부터 구매되었다. 마우스는 미니-삼투 펌프 (Alzet Model 2004, Cupertino, CA; 0.25  $\mu$ l/시간의 유량)으로 피하로 주입되었다. 이식 1 일 전, 미니-삼투 펌프는 cPM 또는 PM1 펩타이드 (0.5 mg/kg/일)을 함유하는 200  $\mu$ l PBS로 채워졌고 이어서 제조자의 지침에 따라 밤새 37에서 PBS내 펌프 인큐베이션되었다. 수술을 위하여, 암컷 마우스는 아베르틴으로 마취되었다. 작은 절개는 마우스의 등에서 실시되었고 미니-삼투 펌프는 피하로 이식되었다. 처리 후, 마우스는 아베르틴으로 깊게 마취되었고 차가운 PBS로 경심적으로 살포되었고 척수 및 뇌 조직은 수집되었고 이어서 분별화, 웨스턴 블랏 또는 면역염색되었다.

#### 운동 행동 평가

[0170] [0171] 로타로드 시험은 Panlab RotaRods (Harvard Apparatus, Holliston, MA)를 사용하여 마우스의 운동 협응 및 밸런스를 검정하는데 사용되었다. 간단히, 마우스는 먼저 3 일 동안 하루에 3 시험 (시험 사이 적어도 10 분 간격으로 3 분 미만 동안 4-12 rpm)으로 트레이닝을 받았다. 이 연구에서 사용된 모든 마우스는 트레이닝 후 안정한 로타로드 성능을 달성하였다 (데이터 도시되지 않음). 트레이닝 3 일 후, 마우스는 매주 3회 동안 가속화 방식 (5 분 동안 4 - 40 rpm)으로 분석되었다. 모든 로타로드 시험은 상이한 유전자형을 위하여 적어도 5 분 간격으로 수행되었고 습관화를 피하기 위해 산재되었다. 풀프린트 분석은 50 cm 길이, 5 cm 넓이 및 양면 경계의 맞춤형 주로를 사용하여 수행되었다. 마우스의 앞발 및 뒷발은 적색 및 청색 비-독성 페인트에 먼저 침지되었다. 후속적으로, 마우스는 백색 종이로 포장된 주로에서 배치되었고 봉입된 어두운 박스 속으로 달려갔다. 위치한 마우스의 풀프린트는 정량화에서 포함되지 않았다. 걸음 거리는 각각의 걸음 사이 정방향 운동의 평균 거리이고, 한편 기본 길이는 좌측과 우측 앞발 또는 뒷발 사이 평균 거리이다.

#### 공초점 현미경검사, 형광 현미경검사 및 전자 현미경검사

[0172] [0173] 모든 공초점 이미지는 이전에 기재된 바와 같이 알파 Plan-Fluar 100x/1.45 오일 대물렌즈 \_ENREF\_3771 또는 C-Apochromat 40X/1.2W 물 대물렌즈가 구비된 Zeiss LSM 510 역전된 레이저-스캐닝 공초점 형광 현미경 (Zeiss LSM 510 공초점 소프트웨어를 통해 제어됨, Zeiss)로 RT에서 포착되었다. 근-적외 형광의 공초점 이미지는 HeNe 레이저로부터 633 nm 여기 광 및 650 nm 고주파통과 필터를 사용하여 수집되었고; 적색 형광의 이미지는 아르곤 레이저로부터 543 nm 여기 광 및 560 nm 고주파통과 필터를 사용하여 수집되었고; 녹색 형광 이미지는 아르곤 레이저로부터 488 nm 여기 광 및 500-550 nm 대역통과 장벽 필터를 사용하여 수집되었다.

[0174] TMRM, Rhod123 및 SYTOX 그린의 시간 경과 이미지형성 또는 규칙적 형광 이미지형성을 위하여, 세포 또는 뉴런은 35mm 접시 또는 24 웰 플레이트에서 씨딩되었고, mito-DsRed2 또는 지시된 플라스미드로 감염/형질감염되었다. 세포 또는 뉴런은 20X/0.7NA Plan Apochromat 건조 대물렌즈를 가진 그리고 제어된 CO<sub>2</sub> 함량, 습도 및 온도 (37°C)로 환경 챔버가 양호하게 구비된 (Leica LAS AF 3 소프트웨어를 통해 제어됨) 역전된 Leica DMI6000 형광 현미경 (Leica)에 의해 이미지화되었다. 이미지는 광표백 또는 신호 과포화를 피하기 위해 가장 낮은 강도로 포착되었다. 시간 경과 이미지형성 동안, 프레임은 광독성 또는 광표백 없이 적어도 1 시간 동안 매 10 초 포착되었다. 면역-EM을 위하여, 생체검사된 인간 뇌 조직, 세포 및 단리된 미토콘드리아는 45 분 동안 RT에서 0.1 M

HEPES 완충액 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA)내 0.1% w/v 글루타르알데하이드를 함유하는 4% w/v 포름알데하이드에서 고정되었고, 그 다음 에탄올에서 탈수되었고 LR 화이트 수지 (Polysciences, Inc., Warrington, PA)에 포매되었다. 면역-황금 표지화 절차는 Fujioka 등에 의해 기재된 방법에 따라 수행되었다. 박형 절편은 1% w/v 소 혈청 알부민 (BSA), 1% v/v 정상 염소 혈청 및 0.01% v/v Tween 20 (PBGT)를 함유하는 PBS로 차단되었다. 그리드는 그 다음 4°C에서 12 시간 동안 PBGT에서 1:10~1:30 희석에서 항체 (항-Flag 또는 아나트-TDP-43)으로 인큐베이션되었다. 음성 대조군은 1차 항체로서 대체된 정상 토끼 혈청, 정상 마우스 혈청, 및 PBT를 포함하였다. 세정 후, 그리드는 PBGT에서 1:20 희석된 10nm 황금-콘주게이션된 염소 항-토끼 IgG 또는 염소 항-마우스 IgG (British BioCell International, Ted Pella, Inc., Redding, CA)에서 1.5 시간 동안 인큐베이션되었고, PBS로 린스되었고, 글루타르알데하이드로 고정되어 황금 입자를 안정화시켰다. 황금-표지된 박형 절편은 30 분 동안 38°C에서 2% 산성화된 우라닐 아세테이트로 먼저, 그 다음 Hanaichi 등에 의해 변형된 바와 같이 Sato의 삼중 납 염색으로 염색되었고, 그 다음 Gatan US4000 4kx4k CCD를 가진 FEI Tecnai Spirit (T12)에서 검사되었다. 규칙적 EM을 위하여, 샘플은 새롭게 해부되었고 이전에 기재하는 바와 같이 투과 전자 현미경 검사를 위하여 가공되었다: 조직 또는 단리된 미토콘드리아의 작은 조각은 삼중 알데하이드-DMSO내 액침에 의해 고정되었다. 종류수에서 린스 후, 이들은 폐로시아나이드-화원된 오스뮴 테트록사이드에서 후위되었다. 또 다른 물 린스는 이어서 산성화된 우라닐 아세테이트에서 밤새 스며들게 되었다. 종류수에서 재차 린스 후, 조직 블록은 에탄올의 상승하는 농도에서 탈수되었고, 산화프로필렌을 통해 통과되었고, Poly/Bed 수지에 포매되었다. 박형 절편은 산성화된 우라닐 아세테이트로 순차적으로 염색되었고 이어서 Sato 삼중 납 염색의 변형이 실시되었고 Gatan US4000 4kx4k CCD를 가진 FEI Tecnai Spirit (T12)에서 검사되었다 검사되었다.

[0175]

#### 이미지 분석

[0176]

이미지 분석은 (W. Rasband에 의해 개발된) 개방-공급원 이미지 분석 프로그램 WCIF ImageJ로 또한 수행되었다. 3D 이미지는 "3D 뷰어" 플러그인을 사용하여 재구성되었다. 라인 스캔 분석은 "RGB 프로파일러 플롯" 플러그인을 사용하여 수행되었다. 간단히, 미가공 공초점 이미지는 배경 정정되었다. "2" 폭을 가진 직선은 관심 영역에서 작도되었다. 그 다음 라인은 "플러그인" 메뉴 하에서 ImageJ 플러그인 그래픽의 "RGB 프로파일러 플롯"을 선택함으로써 직접적으로 분석되었다. "RGB 프로파일러"의 출력에서, 데이터는 마이크로소프트 엑셀에 보내졌다. 라인의 길이는 x-축상에 플롯팅되었고, 한편 강도는 y-축상에 플롯팅되었다. 미토콘드리아 운동의 키모그래프 및 정량화는 기재된 바와 같이 "다중 키모그래프"를 사용하여 수행되었다 ([http://www.embl.de/eamnet/html/body\\_kymograph.html](http://www.embl.de/eamnet/html/body_kymograph.html)). 섬유아세포 및 HEK293 세포에서 미토콘드리아 형태학은 정량화되었다. 간단히, 미가공 이미지의 z-스택의 시리즈 또는 단일 평면은 배경 정정되었고, 선형으로 콘트라스트 최적화되었고, 7 × 7 '톱 햇' 필터로 적용되었고, 3 × 3 중앙 필터를 거쳤고 그 다음 역치되어 2원 이미지를 생성하였다. 대부분의 미토콘드리아는 2원 이미지에서 양호하게 분리되었고 미토콘드리아의 큰 클러스터는 자동으로 배제되었다. 모든 2원 이미지는 뉴런에서 이미지 J. 미토콘드리아 형태학에 의해 추가로 분석되었거나 EM 현미경사진은 모두 이미지 J에 의해 직접적으로 분석되었다.

[0177]

#### 통계적 분석

[0178]

통계적 분석은 일원 분산 분석 (ANOVA) 이어서 터키 870 다중 비교 시험 또는 스튜던트-t-시험으로 실시되었다. 데이터는 평균 ± s.e.m.이다. n은 실험당 871 뉴런, 세포 또는 마우스의 수를 나타낸다. p<0.05는 통계적으로 유의미한 것으로 간주되었다. ns, 무의미. 모든 통계적 분석은 블라인드 방식으로 수행되었다.

[0179]

#### 결과

[0180]

TDP-43은 ALS 및 FTD에 있어서 미토콘드리아에서 축적한다

[0181]

우리는 먼저 ALS 및 연령-매칭된 정상 개체의 사례로부터 척수 뿐만 아니라 FTD 및 연령-매칭된 정상 개체의 사례로부터 전두엽의 인간 조직 샘플내 뉴런에서 다양한 세포 소기관으로 TDP-43의 공-국소화를 조사하였다. 대조군 사례에서 척수 운동 뉴런 및 피질 뉴런 양쪽은 주로 핵 TDP-43 국소화를 실증하였고, 거기에 ALS 운동 뉴런 및 FTD 피질 뉴런 양쪽은 특징적인 4 증가된 세포질 TDP-43 축적을 보여주었다 (도 1A-D). 현저히, ALS 환자의 많은 척수 운동 뉴런 및/또는 FTD 환자의 피질 뉴런의 세포질 TDP-43은 유사한 분포 패턴에서 미토콘드리아 마커로 상당히 공-국소화하였지만 (도 1A-D), 골지, 내형질 망, 리소좀, 자가포식소체, 엔도솜 또는 폐록시솜의 마커로 최소로 중첩하였다. 낮은 존재도에도 불구하고, 대조군 인간 운동 뉴런 및 피질 뉴런에서 세포질 TDP-43은 미토콘드리아로 또한 상당히 공-국소화시켰다 (도 1A-D).

[0182]

우리는 인간 척수 및 피질 조직으로부터 보존된 막으로 고도로 경제된 미토콘드리아를 추가로 단리시켰고, 모든

샘플로부터 미토콘드리아에서 존재하는 TDP-43을 발견하였다 (도 1E, F). 기대된 대로, 연령-매칭된 대조군으로부터 보다 ALS 또는 FTD로부터 미토콘드리아에서 TDP-43의 현저하게 더 높은 발현이 있었다. 이를 정제된 미토콘드리아의 후속적인 하위-미토콘드리아 분별화 분석은 미토콘드리아 TDP-43이 외부 미토콘드리아 막 (OMM), 막간-공간 (IMS) 또는 매트릭스에서가 아닌 내부 미토콘드리아 막 (IMM) 분획에서 배타적으로 존재한다는 것을 드러냈다 (도 1G, H). 일관되게, 정제된 미토콘드리아 뿐만 아니라 생체검사된 인간 피질의 추가 면역-전자 현미경검사 (면역-EM) 분석은 IMM 크리스테에서 TDP-43의 주로 국소화를 확인하였다 (도 1I). ALS 척수 또는 FTD 피질로부터 단리된 미토콘드리아는, 예상되었던, 연령-매칭된 대조군으로부터의 것보다 더 많은 TDP-43 표지화를 나타냈다. 불가피한 사후 지연은 인간 조직의 완전성에 영향을 주어, IMM에서 TDP-43의 추가 생화학적 특성규명을 어렵게 만든다. 상보적 접근법으로서, 우리는 척수 및 피질의 새롭게 수집된 마우스 조직 샘플로부터 미토콘드리아를 수득하였고, 이들을 트립신 및 디기토닌으로 처리하여 IMM이 아닌 OMM을 투과가능하게 하였다. OMM-단백질 Mfn2/Mff는 트립신 단독에 의해 소화되었고, IMS 페이싱 IMM 단백질 Tim23/OPA1은 OMM 투과화후 트립신에 의해 소화되었고, 한편 TDP-43 또는 매트릭스 페이싱 IMM 단백질 COXIV/F1 $\beta$ 는 모든 이들 조건 하에서 변함없이 남아있었다. COXIV/F1 $\beta$ 처럼, TDP-43은 트리톤 X-100을 통한 완전한 막 투과화 후 트립신에 의해 소화될 수 있었다. TDP-43이 또한 배타적으로 마우스 미토콘드리아의 IMM 분획에서 거주함에 따라, 이를 결과는 TDP-43이 IMM의 매트릭스-직면 소편에서 위치한다는 것을 시사한다.

[0183] ALS-관련 돌연변이는 TDP-43 미토콘드리아 국소화를 증가시킨다

우리는 그 다음 TDP-43에서 질환-관련 돌연변이가 그것의 미토콘드리아 국소화에 영향을 주었는지를 결정하였다. 과발현에 관련된 잠재적 부작용을 배제하기 위해 그리고 또한 우리의 발견을 환자에 직접적으로 관련되도록 하기 위해, 우리는 먼저 TDP-43 돌연변이 G298S 또는 A382T (G298S 또는 A382T 섬유아세포)를 보유하는 ALS 환자 및 연령-매칭된 정상 인간 개체 (정상 인간 섬유아세포, NHFs)로부터 유래된 1차 인간 섬유아세포로부터 단리된 미토콘드리아에서 TDP-43 발현을 검사하였다. G298S 및 A382T 섬유아세포에서 TDP-43 돌연변이는 게놈 DNA 서열분석에 의해 확인되었다. TDP-43 오-국소화는 G298S 및 A382T 섬유아세포에서 관측되지 않았다. 반면에 TDP-43 돌연변이를 보유하는 모든 섬유아세포는 총 TDP-43의 비교할만한 발현을 표시하였고, G298S 및 A382T 섬유아세포는 NHFs보다 미토콘드리아 TDP-43의 상당히 더 높은 수준을 실증하여 (도 2A), 질환-관련 돌연변이에 의한 증가된 TDP-43 미토콘드리아 국소화를 시사하였다. 이를 발견을 구체화하기 위해, 우리는 반접합 유전자도입 마우스 과발현 WT 또는 돌연변이체 인간 TDP-43으로부터 뇌 및 척수의 배양된 HEK293 세포 또는 마우스 조직 샘플에서 WT 및 돌연변이체 TDP-43 미토콘드리아 국소화를 비교하였다. 일관되게, 총 용해물에서 유사한 발현 수준에도 불구하고, 외인성으로 발현된 인간 TDP-43 G298S, A315T 또는 A382T는 인간 WT TDP-43보다 미토콘드리아에서 일관되게 증가된 발현을 보여주었다 (도 2B, C, 미토콘드리아 TDP-43 발현은 총 TDP-43 및 미토콘드리아 마커 COXIV에 의해 조정되었다). 외인성으로 발현된 또는 내인성 인간 WT 및 돌연변이체 TDP-43은 IMM 분획에서 여전히 존재하였고 (도 2D, E) OMM 투과화가 아닌 IMM 후 트립신에 의해 소화가능하여 (데이터 도시되지 않음), 질환-관련 돌연변이가 TDP-43의 하위-미토콘드리아 국소화에서 효과가 없었다는 것을 나타냈다.

핵 TDP-43의 가능한 간섭을 배제하기 위해, 우리는 Flag-태깅된 재조합 WT/돌연변이체 인간 TDP-43 단백질 (rTDP-43)을 사용하여 무세포 미토콘드리아 도입 검정에서 이를 발견을 확인하기 위해 추가로 노력하였고 마우스 뇌로부터 미토콘드리아를 단리시켰다. 모든 인간 rTDP-43은 가용성이었고 절단되지 않았고 번역후에 변형되지 않았다 (데이터 도시되지 않음). 널리 사용된 바이오틴-표지된 재조합 F1 $\beta$  전구체 단백질 (pF1 $\beta$ )는 양성 대조군으로서 포함되었고, 한편 재조합 GFP는 음성 대조군으로서 이용되었다 (데이터 도시되지 않음). pF1 $\beta$ 는 더 짧은 mF1 $\beta$ 를 생성하기 위해 도입 후 절단 제거되었던 절단가능 신호 서열을 함유하여 (도 2F, 우측 패널), 단리된 미토콘드리아에서 온전한 도입 기계장치를 나타냈다. mF1 $\beta$ 와 유사하게, WT rTDP-43은 도입 후 디기토닌/트립신 공-처리에 생존하여 (도 2F, 좌측 패널), 시험관내 IMM의 내부에 성공적인 도입을 실증하였다. 기대된 대로, WT rTDP-43과 비교하여, G298S, A315T 또는 A382T를 보유하는 rTDP-43은 증가된 도입 효율을 실증하였다 (도 2G). 내부 도입된 WT/돌연변이체 rTDP-43은 트리톤 X-100 투과화 후 트립신에 의해 완전히 소화될 수 있었다 (데이터 도시되지 않음). 추가 면역-EM 분석은 도입된 WT/돌연변이체 rTDP-43의 주로 IMM 크리스테 국소화 그리고 질환-관련 돌연변이에 의한 증가된 rTDP-43 도입을 확인하였다 (도 2H). 함께, 이를 관찰은 ALS-돌연변이가 TDP-43 미토콘드리아 국소화를 증가시킨다는 것을 나타낸다.

[0186] TDP-43 미토콘드리아 국소화는 내부 모티프에 좌우된다

미토콘드리아 단백질은 절단가능 사전-서열 또는 비절단가능 내부 신호 어느 한쪽에 의해 미토콘드리아에 유도된다. TDP-43은 도입 후 비절단된채 남아있고 절단가능 사전서열은 TargetPor Mitoprot에 의해 TDP-43에서 확인되지 않아서, TDP-43이 내부 신호를 사용한다는 것을 시사한다. 미토콘드리아 내부 신호는 전형적으로 연속 소

수성 아미노산의 스트레치로 구성되고, 6개의 그와 같은 스트레치는 TDP-43에서 존재한다 (도 3A, M1-6). M1/3/5 (M1/3/5)의 결실은 시험관내 rTDP-43 도입을 상당히 억제시켰고, 외인성으로 발현된 TDP-43의 미토콘드리아 국소화를 감소시켰다 (도 3B, C). M1 및 M3 분절이 종을 거쳐 보존되었기 때문에, 우리는 그 다음 M1 또는 M3 모티프가 투과도를 향상시키기 위해 TAT 웨타이드 (YGRKKRRQRRR (서열 식별 번호: 11))에 융합되었던 2 웨타이드 PM1 (YGRKKRRQRRRAQFPAGCL (서열 식별 번호: 15)) 및 PM3 (YGRKKRRQRRRSKGFVRF (서열 식별 번호: 16))을 합성하였다. 대조군 웨타이드 cPMs (YGRKKRRQRRRAQGFGCPL (서열 식별 번호: 18) 및 YGRKKRRQRRGRFFKSFG (서열 식별 번호: 19))의 혼합물, TAT 각각에 융합된 스크램블드 M1 및 M3)이 아닌, PM1 및 PM3은 rTDP-43 도입을 실질적으로 억제시켰고, HEK293 세포 및 1차 뉴런에서 미토콘드리아 TDP-43을 감소시켰다 (도 3D-F). 관련없는 세포질 단백질 GFP (녹색 형광 단백질)과 M3 및 M5 특히 M1의 융합은 그것의 미토콘드리아 표적화를 용이하게 하는데 충분하였다 (도 3G). M1, M3 또는 M5 결실이 핵, 세포질 및 총 TDP-43의 발현에서 효과가 없다는 것 (도 3C), M1, M3 또는 M5 결실이 TDP-43 응집/오-국소화/절단을 야기시키지 않는다는 것 (데이터 도시되지 않음), 그리고 PM1 또는 PM3이 pF1 $\beta$  도입에서 효과가 없다는 것 (도 3D)의 추가 사실에 근거하여, 우리는 M1, M3 및 M5가 TDP-43 미토콘드리아 국소화에 대하여 208 중요한 내부 모티프인 것으로 결론낸다.

**[0188]** 미토콘드리아에서 WT/돌연변이체 TDP-43은 미토콘드리아-전사된 ND3/6 mRNAs를 우선적으로 결합시키고 그것의 번역을 억제시킨다

**[0189]** TDP-43은 주로 mRNA를 결합시킨다. TDP-43의 IMM 체류는 우리가 TDP-43이 미토콘드리아-전사된 mRNAs를 결합하였는지를 검사하도록 조장하였다 (도 4A). 마우스 뇌 미토콘드리아를 사용하는 선행 가교결합 있거나 없이 RNA 면역침강 (IP)는, 음성 대조군 COXIV (도시되지 않음)이 부족한 RNA-결합-도메인이 아닌 TDP-43이 ND3, ND5, ND6, COXI, COXIII, Cyt b 및 A6 mRNAs를 상당히 파괴하였고, 한편 다른 mRNAs가 12s 또는 16s rRNAs에 비교할 만한 수준에서 단지 약간 풍부하였다는 것을 알아내었다 (도 4B). ALS 돌연변이가 그것의 표적에 TDP-43 결합을 변경하였는지를 조사하기 위해, 우리는 인간 TDP-43 G298S, A315T 또는 A382T를 발현시키는 G298S/A382T 섬유아세포 또는 HEK293 세포로부터 미토콘드리아를 단리시켰다. 놀랍게도, 모든 돌연변이체 TDP-43은 WT TDP-43과 비교할 만한 존재도로 유사한 mRNAs를 침전시켰다 (도 4C, D).

**[0190]** 미토콘드리아-전사된 mRNA 수준은 TDP-43에 의해 영향받지 않아서, 미토콘드리아 전사에서 TDP-43의 가망이 없는 관여를 시사한다. 미토콘드리아 단리 및 다운스트림 생화학적 분석에 적합한 그것의 높은 형질감염 효율 및 단순 배양으로 인해, 우리는 그 다음 세포질 번역을 차단하기 위해 에메틴의 존재 하에서 아지도호모알라닌 (AHA) 편입 검정에 의해 HEK293 세포내 미토콘드리아 번역에서 TDP-43의 효과를 조사하였다. ND3 및 ND6의 합성은, 그것의 mRNAs에 TDP-43의 가장 우선적인 결합과 일치하는, WT TDP-43 과발현에 의해 가장 상당히 감소되었다 (도 4E). 산화적 인산화 (OXPHOS) 복합체의 대부분의 미토콘드리아-인코딩된 하위단위가 아닌 ND3 및 ND6의 정상 상태 수준은 WT TDP-43에 의해 사실상 감소되었고 (도 4F), ND3 및 ND6의 합성 또는 발현에서 WT TDP-43-유도된 감소는 M1 결실에 의해 차단될 수 있었다. 미토콘드리아 TDP-43이 ND3 및 ND6 번역을 조절시켰던 방법을 탐구하기 위한 시도에서, 우리는 TDP-43 WT 또는 M1을 발현시키는 HEK293 세포로부터 단리된 미토콘드리아의 수크로스 구배 원심분리에 의해 ND3 및 ND6 mRNAs상에 장입 및 미토콘드리아 리보솜 어셈블리를 조사하였다. TDP-43은 모든 미토콘드리아-인코딩된 단백질 번역에서 전반적인 효과를 갖지 않는다 (도 4E, F). 당연히, 수크로스 구배에서 MRPS18B 및 MRPL44 (미토콘드리아 리보솜 28S/39S 하위단위 마커)의 침강 패턴은 모든 샘플에서 유사하여, 변함없는 전반적인 미토콘드리아 리보솜 어셈블리를 시사하였다. 그러나, 추가 RNA 분포 분석은, 대조군 세포에서 55S 리보솜 복합체로 대부분 침강에 대조적으로, COXI mRNA가 아닌 ND3 및 ND6이 M1 과발현이 아닌 TDP-43 WT 후 28S와 55S 복합체 사이 추가의 피크를 실증하여, ND3 및 ND6 mRNAs상에 리보솜의 오장입을 나타낸다는 것을 알아내었다.

**[0191]** ND3 및 ND6 발현에서 돌연변이체 TDP-43의 효과를 조사하기 위해, 우리는 TDP-43 G298S, A315T 또는 A382T를 발현시키는 HEK293 세포 및 인간 G298S 또는 A382T 섬유아세포를 검사하였다. WT TDP-43과 비교하여, 모든 돌연변이체 TDP-43은 ND3 및 ND6의 추가 감소된 또는 감소된 발현을 야기시켰다 (도 4F, G). 현저히, M1의 결실 또는 PM1로 처리는 대조군 세포 또는 NHFs에 유사한 수준으로 ND3 및 ND6 발현을 증가시켰다. 이 연구에서, PM3은 TDP-43 RNA 결합 모티프에서 M3의 국소화 (도 3A) 및 세포에서 PM3의 온화한 독성 효과 (데이터 도시되지 않음) 때문에 시험되지 않았다. 일관되게, 에이징된 매칭된 정상 개체로부터 인간 조직 샘플과 비교하여, ALS의 사례로부터 척수 또는 FTD의 사례로부터 전두엽의 인간 조직 샘플은 ND3 및 ND6의 감소된 발현을 나타냈고 (도 4H), 따라서 질환에 우리의 발견을 연장시켰다.

[0192] 미토콘드리아에서 WT/돌연변이체 TDP-43은 OXPHOS 복합체 I 및 미토콘드리아 생물에너지학을 손상시킨다

[0193] 복합체 I 하위단위 ND3 및 ND6의 발현에서 TDP-43의 특정 억제성 효과와 일치하는, WT TDP-43을 과발현시키는 HEK293 세포는 OXPHOS 복합체 I의 가장 상당한 손실 및 기능이상 뿐만 아니라 복합체 I-포함된 OXPHOS 초복합체의 약간의 디스어셈블리의 대부분을 보여주었고, 이의 효과는 질환-관련 돌연변이 G298S, A315T 또는 A382T에 의해 상당히 악화되었지만 M1 결실에 의해 상당히 예방되었다 (도 5A, B). 기대된 대로, OXPHOS 복합체 I의 디스어셈블리 및 기능이상은 환자-유래된 G298S 또는 A382T 섬유아세포에서 굴복되었고, PM1 처리는 NHFs에 비교할만한 수준으로 OXPHOS 복합체 I 어셈블리 및 기능을 상당히 회복하였다 (도 5C, D). 흥미롭게도, TDP-43-유도된 복합체 I 디스어셈블리 및 기능이상은 또한 개별적으로 ND3 또는 ND6이 아닌 ND3 및 ND6 양쪽의 동시 과발현에 의해 크게 경감될 수 있어서 (도 5E), 미토콘드리아에서 TDP-43의 특정 표적으로서 ND3 및 ND6 양쪽을 추가로 지지한다.

[0194] 복합체 I은 OXPHOS27에 중요하다. 기대된 대로, 미토콘드리아 단편화에 의해 동반된 감소된 미토콘드리아 막 잠재력 ( $m\Delta \psi$ ), 산소 소비율 (OCR) 및 ATP 수준을 포함하는 상당한 미토콘드리아 기능이상은 모두 WT 또는 돌연변이체 TDP-43을 과발현하는 HEK293 세포, 및 환자 G298S 또는 A382T 섬유아세포에서 관측되었다 (도 5F, G). WT TDP-43에 비교하여, 돌연변이체 TDP-43은 HEK293 세포에서 더욱 단절된 미토콘드리아 비정상을 야기시켰다. 당연히, HEK293 세포 및 인간 섬유아세포에서 WT 및/또는 돌연변이체 TDP-43-유도된 미토콘드리아 기능이상 및 단편화는 M1 결실 또는 PM1 처리에 의해 완전히 예방될 수 있다. 현저히, 기저 세포 사망이 관측되지 않았어도, 환자 유래된 G298S 또는 A382T 섬유아세포는, PM1 처리에 의해 또한 폐지될 수 있는, NHFs와 비교된 산화적 스트레스에 상당히 증가된 취약성을 나타냈다 (도 5H). TDP-43 미토콘드리아 국소화의 억제는 시험관내 및 생체내 WT/돌연변이체 TDP-43 뉴런의 독성을 차단시킨다. 마지막으로, 우리는 TDP-43 미토콘드리아 국소화가 뉴런에서 그것의 독성에 기여하였는지를 결정하기 위해 애썼다. WT TDP-43의 과발현은 시험관내 배양된 랫트 1차 뉴런에서 뉴런의 사망에 선행하는 미토콘드리아 단편화 및 기능이상 (감소된  $m\Delta \psi$ /OCR/ATP)를 초래하였고, 이를 모두는 G298S, A315T 또는 A382T에 의해 악화되었지만 M1 결실 또는 PM1 처리에 의해 완전히 폐지되었다. 이를 발견을 구체화하기 위해, 우리는 유도된-만능 줄기 세포 (iPSCs)에 NHFs 및 인간 A382T 섬유아세포를 리프로그래밍하였고 이어서 유도된 뉴런의 선조 세포 (iNPCs) 및 인간 뉴런 (대조군 인간 뉴런 및 A382T 인간 뉴런 각각에 순차적으로 분화시켰다. 대조군 인간 뉴런 및 A382T 인간 뉴런은 TDP-43 해 국소화, 뉴런의 형태학 및 생존력에서 구별할 수 없었다. 그러나, 대조군 인간 뉴런에 비교하여, A382T 인간 뉴런은, PM1 처리에 의해 경감될 수 있는, 산화적 스트레스에 증가된 취약성 및 상당한 미토콘드리아 단편화/기능이상을 나타냈다. 기대된 대로, 랫트 1차 뉴런에서 관측되었던 것과 유사한, iPSCs-유래된 대조군 인간 뉴런에서 TDP-43 WT 또는 A315T의 과발현은 미토콘드리아 비정상 및 뉴런의 사망을 또한 야기시켰고, M1 결실의 결실은 TDP-43 유도된 미토콘드리아 및 뉴런의 독성을 폐지하는데 충분하였다.

[0195] 우리의 발견을 생체내에서 확인하기 위해, 우리는 마우스 피질 속에 TDP-43 및 mitoDsRed2 양쪽을 인코딩하는 뉴런-특이적 비시스템론성 렌티바이러스를 뇌정위적으로 주사하였다 (도 6A). WT TDP-43과 비교하여, TDP-43 A315T 과발현은, M1 결실에 의해 차단될 수 있는, 미토콘드리아의 추가 단편화 그리고 (뉴런의 사망을 반영하는) 절단된 카스파제-3 양성 뉴런의 증가된 수를 야기시켰다 (도 6B, C). TDP-43 A315T 유전자도입 마우스가 ALS-유사 표현형을 발생시키는지에 대한 논란에도 불구하고, 신경퇴행 및 신경병리학은, 이들이 인간 TDP-43의 유사한 발현을 나타냈을 지라도, TDP-43 WT 반접합 유전자도입 마우스에서가 아닌 TDP-43 A315T 반접합 유전자도입 마우스에서 일관되게 보고되어 왔다 (도 2C). 우리는 연속 피하 주입에 의해 PM1로 TDP-43 A315T 마우스를 처리하였고 PM1이 중추신경계에 도달하였고 미토콘드리아에서 돌연변이체 TDP-43을 실질적으로 감소시켰다는 것을 확인하였다. TAT가 웹타이드를 미토콘드리아 이중 막을 거쳐 방해할 수 있음에 따라, PM1은, 기대하였던 대로, 모든 미토콘드리아 구획에서 검출될 수 있다. TDP-43 A315T 마우스는 상당히 감소된 ND3 및 ND6 발현, 미토콘드리아 단편화 및 기능이상 (감소된  $m\Delta \psi$ /OCR 및 복합체 I 디스어셈블리), 운동 뉴런 손실 및 축색 퇴행, 신경병리학 (내포물 및 별아교세포 활성화), 탈신경 신경근육 접합 (NMJ), 보행 비정상 및 손상된 운동 협응/밸런스를 실증하였고, 이들 모두는 PM1에 의해 경감될 수 있고 비-유전자도입 (NTG) 마우스에 비교할만한 수준으로 회복될 수 있다 (도 6D-J). M1의 결실은 TDP-43 반감기, 이량체화 또는 비-미토콘드리아 mRNA 표적에 그것의 결합에서 효과가 없다. 또한, M1은 임의의 공지된 기능적 도메인에서 위치하지 않는다 (도 3A). 게다가, M1 결실 또는 PM1 처리는 세포질, 핵 또는 총 TDP-43에서 상당한 효과를 갖지 않는다 (도 3C-F). 함께, 모든 이들 데이터는 미토콘드리아 국소화가 뉴런에서 WT 및 돌연변이체 TDP-43 독성의 중요한 결정인자라는 것을 시사한다.

[0196] 실시예 2

- [0197] 이 실시예에서, 우리는 성체 반접합 TDP-43M337V Tg 마우스에서 수많은 운동협응 및 인지 시험을 수행하였다. TDP-43 유도된 신경독성용 직접 매개체로서 미토콘드리아를 확인하였던, 실시예 1에 기반하여, 우리는 돌연변이체 TDP-43 미토콘드리아 국소화의 억제가 질환 개시 후 에이징된 반접합 TDP-43M337V Tg 마우스에서 운동-협응 및 인지 결손을 반전시킬 수 있는지를 추가로 시험하였다.
- [0198] 물질 및 방법
- [0199] 동물 및 처리
- [0200] 마우스 수술/절차는 NIH 지침에 따라 수행되었고 케이스 웨스턴 리저브 대학교의 실험 동물 운영 위원회 (IACUC)에 의해 승인되었다. C57BL/6 비-유전자도입 야생형 C57BL/6 마우스 (NTG 마우스) 및 C57BL/6-Tg(Prnp-TARDBP\*M337V)4Ptcr/J (hTDP-43M337V 유전자도입 마우스, 스톡 번호 #017604)는 Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)로부터 구매되었고 케이스 웨스턴 리저브 대학교에서 유지되었다. 모든 마우스는 생후 30일째에서 이유되었고 천공된 귀로부터 추출된 DNA의 PCR 분석에 의해 유전자형화되었다. 각각의 실험에 대하여 상세한 마우스 연령 및 성별 정보는 특이적 도면 범례에서 제시된다. 펩타이드 주입을 위하여, 미니-삼투 펌프 (Alzet Model 2006, Cupertino, CA; 0.15  $\mu$ l/시간의 유량)은 SC 또는 PM1 펩타이드 (0.5mg/kg/일)을 함유하는 200  $\mu$ l PBS로 채워졌고 이어서 제조자의 지침에 따라 밤새 37°C에 PBS에서 펌프 인큐베이션되었다. 마우스가 아베르틴으로 완전하게 마취된 경우, 미니-삼투 펌프는 마우스의 등에 피하로 이식되었다. 처리 6 주 후, 마우스는 빙랭된 PBS로 경심적으로 살포되었고 뇌 및 척수 조직은 수집되었다.
- [0201] 행동 시험
- [0202] 감각운동 및 인지 성능을 조사하기 위한 일련의 행동 시험은 펩타이드 주입 유/무 처리된 마우스에서 수행되었다. 2 독립적인, 그러나 연령-매칭된 집단 그룹으로부터 결과는 조합되었다. 시험 배터리는 운동 과제 (노지 시험), 바디 협응 과제 (로타로드 및 빔 걷기 시험), 근육 강도 (악력 시험), 촉각의 감각 과제 (점착성 페이퍼 시험), 및 메모리 과제 (작업 기억에 대한 Y-미로, 단기 공간적 메모리에 대한 T-미로, 단기 및 장기간 비-공간적 메모리에 대한 객체 인식, 및 정서 메모리에 대한 공포 조건화)로 구성되었다. 개별 마우스는 이들 행동 임무에 대하여 각각의 시험 일자에 하기 순서로 시험되었다: 로타로드 및 악력 시험을 위한 일1; 노지 시험, 및 빔 걷기 시험을 위한 일2; Y-미로를 위한 일 3; 점착성 페이퍼 시험 및 객체 인식 시험을 위한 일 4-5; T-미로를 위한 일 6; 및 공포 조건화 시험을 위한 일 7-8. 모든 시험은, 양쪽 마우스 유전자형 및 처리 그룹에 블라인드된 조사자로, 사례 행동 코어에서 수행되었다.
- [0203] 로타로드 시험
- [0204] Rota-Rods (Panlab/Harvard Apparatus, Holliston, MA)는 운동 협응 및 밸런스를 측정하는데 사용되었다. 각각의 마우스는 먼저 3 일 동안 날마다 3 시험을 받았다. 트레이닝 주기 동안, 각각의 마우스는 로타로드에 배치되었고, 여기에서 실린더 속도는 각각의 시험에 대하여 4 rpm부터 12rpm까지 서서히 증가되었다. 시험 일에, 로타로드는 가속화 방식 (5 분 동안 4-40 rpm)으로 설정되었고 떨어지기까지 최대 잠복기는 통계적 분석을 위하여 수집되었다.
- [0205] 악력 시험
- [0206] 마우스의 근육 강도는 GRIP STRENGTH TEST 미터 (Bioseb, Vitrolles, France)에 의해 측정되었다. 앞다리 시험을 위하여, 마우스의 2 앞발은 바에 배치되었고 마우스 꼬리는 반대로 당겨졌다. 뒷다리를 위하여, 2 앞발은 심사관의 원손에 의해 유지된 그리드에서 배치되었고, 마우스의 2 뒷발은 연결된 기계이었던 바에서 배치되었다. 단일 최상의 기록된 값은 통계적 분석에 사용되었다.
- [0207] 노지 시험(open field test)
- [0208] 노지는, 50 cm 높이 벽으로 폐쇄된, 50 cm-길이 정사각형 플라스틱 장치로 구성되었고, 활성은 ANY-미로 비디오 추적 소프트웨어 (Stoelting Co. Wood Dale, IL)을 사용하여 기록되었다. 현장은 ANY미로 소프트웨어를 사용하여 내부 영역 (30 cm x 30 cm) 및 주변 (10 cm 폭 갤러리)로 디지털 방식으로 분할되었다. 데이터는 10 분 동안 계속해서 수집되었고 이동된 거리 (m), 속도 (m/초), 불가동 (2 초 초과 비-운동)에서 소비된 시간, 및 내부 영역에서 소비된 시간은 모두 기록되었고 자동으로 채점되었다.
- [0209] 빔 걷기 시험
- [0210] 마우스의 운동 협응 및 밸런스는 봉입된 안전성 플랫폼에 도달하기 위해 좁은 빔의 단계적인 시리즈를 방해하는

마우스의 능력을 측정함으로써 평가되었다. 빔은 16-mm 원형 직경, 또는 16- 또는 9-mm 정사각형 단면을 가진 목재의 긴 스트립 (50 cm)로 구성되었다. 트레이닝 동안, 마우스는 16-mm-원형 빔의 개시에 배치되었고 봉입된 박스에 빔을 방해하도록 트레이닝되었다. 마우스가 트레이닝되었다면 (< 20 초 미만에서 16-mm-원형 빔을 방해하게 되었다면) 이들은 각 경우에 16-mm-원형 빔, 16-mm-정사각형 빔, 내지 9-mm-정사각형 빔으로부터 진행하는 각각의 빔에서 2 연속 시험을 받았다. 마우스는 각각의 빔을 방해하기 위해 최대 60 초 허용되었다. 각각의 빔을 방해하기 위한 잠복기 그리고 각각의 빔에서 미끄러진 앞발 및 뒷발의 횟수는 각각의 시험에 대하여 기록되었다.

#### [0211] Y-미로 시험

그것의 단기 특별한 메모리를 조사하기 위해, 마우스는 (길이 60 cm 아암을 가진) 플렉시글라스 T-미로에서 배치되었고 아암 중 하나가 차단되면서 8 분 동안 미로를 자유롭게 탐구하도록 허용되었다. 차단된 아암은 임의의 아암 선호 바이어스 (카운터밸런스형)을 피하기 위해 동물 사이 스위칭되었다. 8-분 탐구 이후, 마우스는 2 시간 동안 그것의 집우리로 돌아왔고 그 다음, 이번에, 개방된 모두 3 아암으로, T-미로에서 5-분 동안 반대로 놓여졌다. T-미로에서 놓여졌다면, 마우스는 ANY-미로 추적 시스템을 사용하여 기록되었고, 이전에 차단된 아암에서 시간 및 빈도, 그리고 아암 등록의 총 수는 카운트되었다.

#### [0212] T-미로 시험

그것의 단기 특별한 메모리를 조사하기 위해, 마우스는 (길이 60 cm 아암을 가진) 플렉시글라스 T-미로에서 배치되었고 아암 중 하나가 차단되면서 10 분 동안 미로를 자유롭게 탐구하도록 허용되었다. 차단된 아암은 임의의 아암 선호 바이어스 (카운터밸런스형)을 피하기 위해 동물 사이 스위칭되었다. 10-분 탐구 이후, 마우스는 2 시간 동안 그것의 집우리로 돌아왔고 그 다음, 이번에, 개방된 모두 3 아암으로, T-미로에서 5-분 동안 반대로 놓여졌다. T-미로에서 놓여졌다면, 마우스는 ANY-미로 추적 시스템 (Stoelting, Wood Dale, IL)을 사용하여 기록되었고, 이전에 차단된 아암에서 시간 및 빈도, 그리고 아암 등록의 총 수는 비디오-평점 소프트웨어를 사용함으로써 카운트되었다.

#### [0213] 객체 인식 시험

인식 메모리의 이 과제는 동물이 익숙한 객체와 비교된 신규한 객체를 탐구하는 더 많은 시간을 동물이 소비할 것이라는 사실을 이용한다. 시험 장치는 침구 재료가 있는 규칙적 하우징 우리가었다. 각각의 마우스는 규칙적 하우징 우리에서 3 분 동안 배치되었다. 그 다음 2 동일한 객체는 하우징 우리의 코너에 배치되었다 (T1). 마우스는 5 분 동안 이들 목적을 조사하도록 허용되었다. 이 기간은 동물이 그것의 우리쪽과 그것의 집우리로 돌아왔던 동안 1.5 지연으로 이어졌다. 지연 후 동물은 5-분 비유사 자극 기간을 수행하였다 (T2, 단기 메모리). 이 기간에서, T1에서 나타났던 객체 그리고 익숙하지 않았던 또 다른 객체는 시험 우리에서 배치되었다. 객체는 분명하게 상이한 형상을 가진 하드 플라스틱 및/또는 금속으로 만들어졌다. 각각의 객체를 찾고 접촉하는데 소비된 시간의 총 양은 기록되었고 완전하게 자동화 ANY-미로 비디오 추적 소프트웨어를 사용하여 채점되었다. 5 분 동안 총 이동 거리 그리고 우리의 면쪽에서 머물기 (불가동)의 지속기간은 또한 측정되었다.

#### [0214] 공포 조건화 시험

모든 동물은 컨디셔닝 박스 (Med Associates, Burlington, VT)에 배치되었고 전기 쇼크 (1 초 동안 0.5 mA, 무 조건 자극 (US))와 톤 (백색 소음, 30 초 동안 80 dB, 조건 자극 (CS))를 회합하도록 트레이닝되었다. 이 절차는 120 초 축적 및 60 초 자극간-간격으로 4회 반복되었다. 톤 및 쇼크는 공-종결되었다. 시험의 마지막에, 동물은 밖으로 빼내졌고 박스에서 24 시간 후 반대로 배치되어 쇼크 (상황-의존적 공포)와 관련된 환경에 대하여 그것의 학습된 혐오를 평가하였다. 이를 위해, 모든 동물은 이들이 6 분의 지속기간 동안 트레이닝된 동일한 박스에서 배치되었고, 톤 또는 혐오 자극의 부재 하에서 냉담한 행동은 측정되었다. 동물은 그 다음 제거되었고, 상황은 동물이 트레이닝되어 왔던 챔버를 더 이상 인식할 수 없도록 변화되었다. 2 시간 후 동물은 상황적 공포 조건화에 대하여 시험되었고, 이들은 현재 상황적으로 변경된 박스 (형상, 조명, 및 악취 (바닐라 에센스))에 재도입되었고, 냉담한 행동은 동물이 상황을 인식하지 않았다는 것을 입증하기 위해 최초 2 분 동안 측정되었다. 2 분 (무단서 기간) 후, 톤 (30초, 5kHz, 80dB)는 60 초 ISI에서 US 노출 없이 10 회 전달되었고, 냉담한 행동은 단서-의존적 공포 조건화를 결정하기 위해 측정되었다.

#### [0215] 미토콘드리아 단리

[0220] 조직은 IB-1 용액 (225 mM 만니톨, 75 mM 수크로스, 0.1 mM EGTA, 20 mM HEPES, pH 7.4)에서 균질화되었다. 그 다음 균질물은 5 분 동안 600g로 원심분리되어 혼 오염물질 및 미파손된 세포를 제거하였다. 상청액은 다시 한번 5 분 동안 600g로 원심분리되었고, 이어서 10 분 동안 7,000g로 원심분리되었다. 상청액은 세포질 분획으로서 수집되었다. 펠릿은 IB-2 용액 (225 mM 만니톨, 75 mM 수크로스, 20 mM HEPES, pH 7.4)에서 세정되었고, 10 분 동안 7,000g로 원심분리되었고, IB-2 용액에서 재현탁되었고, 10 분 동안 10,000g로 원심분리되었고 마지막으로 MRB 완충액 (250 mM 만니톨, 5 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, pH 7.4)에서 재현탁되었다. 재현탁된 분획은 8 mL Percoll 배지 (225 mM 만니톨, 25 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EGTA 및 30% Percoll (v/v))의 최상부에서 중첩되었고, 이어서 4°C에서 30 분 동안 SW40 회전자에서 95,000g로 원심분리되었다. 정제된 미토콘드리아 분획은 수집되었고 MRB 완충액의 10 배 용적에서 재현탁되었고 6,300g로 10 분 원심분리되어 미토콘드리아 분획으로서 펠릿을 수집하였다.

#### 시냅토솜 단리 및 미토콘드리아 호흡 검정

[0221] 시냅토솜은 이전에 보고된 바와 같이 마우스 피질로부터 단리되었다. 간단히, 피질 조직은 빠르게 제거되었고 빙랭된 '수크로스 배지' (320 mM 수크로스, 1 mM EDTA, 0.25 mM 디티오토레이톨, pH 7.4)에서 균질화되었다. 균질물은 그 다음 4°C에서 10 분 동안 1000 g로 원심분리되었다. 상청액은 원심관내 불연속 Percoll 구배 (수크로스 배지내 3, 10, 및 23% Percoll의 3 mL 층)의 최상부에서 주의하여 적층되었고 4°C에서 10 분 동안 32,500 g로 원심분리되었다. 시냅토솜은 10%와 23% Percoll 사이 밴드로서 수집되었다. 수집된 용액은 '이온성 배지' (20 mM HEPES, 10 mM D-글루코스, 1.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM KC1, 140 mM NaCl, pH 7.4)로 희석되었다. Percoll을 제거하기 위해 4°C에서 15 분 동안 15,000 g로 원심분리된 후, 펠릿은 이온성 배지에서 재현탁되었다. 세포 배양 플레이트는 밤새 폴리에틸렌이민 (50% 용액으로부터 1:15000 희석, Sigma-Aldrich)로 코팅되었고 중류수로 세정되었다. 시냅토솜은 30 분 동안 4°C에서 3,000g로 원심분리에 의해 플레이트에 부착되었고 추가 측정을 위하여 얼음에 배치되었다. 미토콘드리아 호흡 검정 프로토콜은 3 분 혼합, 2 분 대기 및 3 분 측정 기간의 반복된 사이클로 구성되었다. 기저 산소 소비율 (OCR)은 씨호스 XF-24 (Seahorse Bioscience, Billerica, USA)에 의해 3회 측정되었다. 각각의 웰에 대하여 단백질 농도는 시냅토솜의 유사한 양을 확인하기 위해 측정되었다.

#### 면역블랏, 면역세포화학 및 면역형광 분석

[0223] 조직 또는 세포 분획은 1X 프로테아제 억제제 칵테일 (Cell signaling, Danvers, MA)를 가진 RIPA 완충액 (Abcam, Cambridge, MA)에서 균질화 또는 용해되었다. 단백질은 10% SDS PAGE에 의해 분리되었고 PVDF 막에 전달되었다. 밤새 냉장실에서 1차 항체 및 실온에서 1 시간 동안 2차 항체로 인큐베이션 이후, 면역반응성은 ECL (Millipore Immobilon)에 의해 검출되었다. 토키 TDP-43 항체 (Proteintech, Rosemont, IL), 마우스 인간 TDP-43 항체 (Abnova, Walnut, CA), COX VI (Abcam, Cambridge, MA), 및 GAPDH/칼넥신 (Cell signaling, Danvers, MA). 면역세포화학은 폐록시다아제 항-폐록시다아제 프로토콜에 의해 수행되었다. 면역형광 염색을 위하여, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 없이 탈파라핀화된 및 재-수화된 조직 절편은 중류된 H<sub>2</sub>O로 3회 간단히 세정되었고 1X 항원 데클로커 (Biocare, Concord, CA)에서 배치되었다. 절편은 그 다음 10 초 동안 125°C로 가열 및 30 초 동안 90°C로 냉각 이어서 128°C에서 22 psi로 가열, 및 94°C에서 0 psi로 냉각에 의해 Biocare's Decloaking Chamber를 사용하여 가압 하에서 항원 회수를 거쳤다. 온도가 30°C로 감소된 후, 절편은 5 회 동안 중류된 H<sub>2</sub>O로 서서히 린스되었다. 절편은 그 다음 RT에서 30 분 동안 10% 정상 염소 혈청 (NGS)로 차단되었고, 4°C에서 밤새 1% NGS를 함유하는 PBS내 1차 항체로 인큐ベ이션되었다. PBS로 3 세정 후, 절편은 10분 동안 10% NGS에서, 그 다음 암 실내 RT에서 2 시간 동안 Alexa Fluor 콘주케이션된 2차 항체 (Life Technologies, Grand Island, NY) (1:300)으로 인큐베이션되었다. 마지막으로, 절편은 PBS로 3회 린스되었고, DAPI로 염색되었고, PBS로 3회 재차 세정되었고, Fluoromount-G 중첩 배지 (Southern Biotech, Birmingham, AL)로 실장되었다.

#### 결과

[0225] 성체 반접합 TDP-43M337V 마우스에 있어서 보행성 활성, 근육 강도 또는 감각운동 기능에서가 아닌 운동 협응에서 변경

[0226] 우리는 운동 및 협응 기능: 로타로드 및 빔-걷기 테스트에 관련된 통상적으로 사용된 행동 시험 그리고 체중에 의해 반접합 TDP-43M337V 마우스를 먼저 모니터링하였다. 반접합 TDP-43M337V 마우스는 생존가능하였고 출생시 표현형으로 정상이었고, 16 월령 (현재 가장 늙은 이용가능한 마우스, 테이터 도시되지 않음)까지 식이, 체중, 생존 및 뒷다리 클라스핑에서 야생형 (WT) 한배새끼로부터 차이 없음을 실증하였다. 그러나, 8 월령에서, 이들

은 뼈에서 더 긴 방해 잠복기 및 로타로드에서 머물기 위한 감소된 능력에 의해 명시된 뼈-걷기 시험 및 로타로드에서 성능에서 상당한 손상을 나타냈다 (로타로드에 대하여  $F_{1,27}=8.12$ ,  $P<0.01$ ; 12 mm 정사각형 뼈에 대하여  $F_{1,27}=11.86$ ,  $P<0.01$ ; 12 mm 원형 뼈에 대하여  $F_{1,27}=1.21$ , 무의미; 9 mm 정사각형 뼈에 대하여  $F_{1,27}=5.48$ ,  $P<0.05$ ; 도 7A, B). 로타로드 및 뼈-걷기 테스트에서 차이 없음은 암컷과 숫컷 마우스 사이 보여졌다. 손상된 로타로드 및 뼈-걷기 성능은 양쪽 앞다리 및 뒷다리에 대하여 악력 시험에서 유사하게 수행된 모든 마우스로서 근육 약화에 의해 야기될 것 같지 않았다 (앞다리에 대하여  $F_{1,27}=0.69$  및 뒷다리에 대하여 0.38, 무의미; 도 7C).

[0228] 이동 활성이 변경되었는지를 추가로 조사하기 위해, 우리는 유전자도입 마우스의 노지 활성을 평가하였다. WT 마우스와 비교하여, 8-9 월령 반접합 TDP-43M337V 마우스는 노지 시험에서 더 큰 이동 거리 및 더 빠른 움직임 속도에 대하여 무의미한 추세를 보여주었다 (거리에 대하여  $F_{1,27}=3.55$ ,  $P<0.10$ ; 속도에 대하여  $F_{1,27}=3.50$ ,  $P<0.10$ ; 도 7D). 내부 영역에서 소비된 시간에서 차이 없음은 언급되었고 ( $F_{1,27}=0.05$ , 무의미; 데이터 도시되지 않음), 변함없는 불안-관련된 행동을 나타냈다. 우리는 또한 점착성 페이퍼 시험에 의해 반접합 TDP-43M337V 마우스에서 촉각의 감각 반응을 측정하였다. TDP-43M337V의 발현은 마우스가 접촉하고 접착 테이프를 제거하기 위한 시간에 상당히 영향을 주지 않아서 ( $F_{1,27}=0.02$ , 무의미; 도 7E), 발 감각운동 기능이 변경되지 않았음을 시사하였다.

#### [0229] 성체 TDP-43M337V Tg 마우스에서 인지 결손

[0230] 운동 협응을 평가하는데 사용된 양쪽 뼈-걷기 및 특히 로타로드 시험은 또한 뇌 기능이상에 특히 감수성일 수 있다. 따라서, 보행성 활성, 근육 강도 또는 감각운동 기능에서 결손 없이, 반접합 TDP-43M337V 마우스에서 손상된 로타로드 및 뼈걷기 성능의 발견은 뇌에서 인지 결손에서 기인하는 행동 변화를 반영시킬 수 있다. 이 가설을 시험하기 위해, 우리는 8-9 월령 반접합 TDP-43<sup>M337V</sup> 마우스에서 인지 성능을 조사하기 위해 일련의 행동 시험을 수행하였다. 시험 배터리는 공간적 작업 기억에 대하여 Y-미로 시험, 단기 공간적 메모리에 대하여 T-미로 시험, 단기간 및 장기간 비-공간적 메모리에 대하여 객체 인식 시험, 및 정서 메모리에 대하여 공포 조건화 시험으로 구성되었다. 신규한 환경을 탐구하는 경우 아암을 변경하기 위한 마우스의 천연 경향에 기반된 Y미로 시험에서, 모든 마우스는 유사한 탐구 속도로 양호한 변경가능한 활성을 나타냈다 (데이터 도시되지 않음). 그러나, 유전자도입 마우스는 WT 마우스보다 자발적인 교번의 상당히 더 낮은 비를 보여주어 ( $F_{1,27}=8.92$ ,  $p<0.01$ , 도 8A), 손상된 공간적 작업 기억을 시사하였다. 반접합 TDP-43<sup>M337V</sup> 마우스에서 공간적 메모리 결손을 추가로 평가하기 위해, 우리는 방문된 아암에 관련된 익숙하지 않은 환경을 탐구하기 위한 마우스의 선천적인 선호에 또한 기반하여 T-미로 시험을 수행하였다. 순응 기간 후, Y-미로 시험과 일치하는, 유전자도입 마우스는 연령매칭된 WT 마우스 보다 상당히 더 나쁘게 수행하였다 ( $F_{1,27}=4.47$ ,  $p<0.05$ ; 도 8B).

[0231] 동물이 익숙한 객체와 비교하여 신규한 객체를 탐구하는 더 많은 시간을 소비할 것이라는 사실을 이용하는 객체 인식 시험에서, 각각의 객체를 찾고 접촉하는데 소비된 시간의 총 양에서 유의차 없음은 마우스의 어느 한쪽 그룹에 대하여 제1 탐침 시험 (T1, 50% 기회 수준) 동안 분명하였다 ( $F_{1,27}=0.97$ , 무의미 도 8C). 그러나, 제2 비 유사 자극 기간 (T2, 단기 메모리) 및 T2 후 24 시간에 제3 기간 (T3, 장기 메모리) 동안, 반접합 TDP-43<sup>M337V</sup> 마우스는 WT 마우스보다 상당히 덜 객체를 조사하여 (T2에 대하여  $F_{1,27}=22.73$ ,  $p<0.01$ ; T3에 대하여  $F_{1,27}=10.98$ ,  $p<0.01$ ; 도 8C), 양쪽 단기간 및 장기간 비-공간적 메모리가 손상되었음을 나타냈다.

[0232] 온화한 전기 빌 무조건적 자극 (US)와 중성 톤 조건적 자극 (CS)를 회합하기 위한 그리고 냉담한 반응을 보여주기 위한 마우스 학습에 기반된 공포 조건화 시험에서, 우리는 습관화 동안 냉담하는 소비된 시간의 비율 그리고 트레이닝 기간에서 최초 3 US 노출에서 WT와 유전자도입 마우스 사이 임의의 유의차를 검출시키지 않았다 (습관화 기간에 대하여  $F_{1,27}=0.09$ ; 제1 US에 대하여  $F_{1,27}=0.003$ ; 제2 US에 대하여  $F_{1,27}=2.85$ ; 및 제3 US에 대하여  $F_{1,27}=1.83$ ; 모두 무의미; 도 8D). 흥미롭게도, 제4 US 노출에서, 반접합 TDP-43M337V 마우스는 WT 마우스와 비교된 상당히 더 낮은 냉담한 시간을 보여주었다 ( $F_{1,27}=6.99$ ,  $p<0.05$ ). 감소된 공포 반응은 쇼크 (상황-의존적 공포;  $F_{1,27}=4.94$ ,  $p<0.05$ )와 관련된 환경에 대하여 그것의 학습된 혐오를 평가하기 위해 시험 기간에서 24 시간 후 6 사실상 유지되었다. 마우스의 접단은 또한 단서의존적 공포 조건화 시험을 위하여 상황적으로 변경된 박스 (형상, 조명, 및 악취 (바닐라 에센스))에 재도입되었다. WT도 유전자도입 마우스도 CS 침가전 상황을 인식할 수 없었다 ( $F_{1,27}=2.44$ , 무의미). 기대된 대로, CS 유발된 냉담한 반응은 WT 마우스보다 반접합 TDP-43M337V 마우스에서 상당히 더 낮았다 ( $F_{1,27}=7.59$ ,  $p<0.05$ ). 10 회 CS 노출로 소광 트레이닝 동안, 양쪽 WT 및 유전자도입 마우스는 유사한 약한 소광을 표시하였다 (데이터 도시되지 않음). 이 연구에서, 암컷과 숫컷 마우스 사이 인지 성능에서 유의성 차이는 언급되지 않았다. 결국, 우리의 결과는, 손상된 운동 및 협응 기능에

더하여, 성체 반접합 TDP-43M337V 마우스가 또한 메모리에서 결손을 발생시킨다는 것을 보여준다.

[0233] PM1에 의한 TDP-43 미토콘드리아 국소화의 억제가 TDP-43M337V Tg 마우스의 뇌에서 세포질 TDP-43 축적, 미토콘드리아 기능이상 및 신경 손실을 경감시킨다

[0234] 우리는 TDP43 미토콘드리아 국소화를 부여하는 특이적 아미노산 모티프를 이전에 특성규명하였다. 그것의 미토콘드리아 국소화에 필수적인 모티프 M1 (AQFPAGCGL) (서열 식별 번호: 4)의 결실, 또는 M1 모티프 기반 억제성 웹타이드 PM1으로 처리 어느 한쪽에 의한 TDP-43 미토콘드리아 국소화의 억제는 시험관내 및 마우스에서 WT 또는 돌연변이체 TDP-43 유도된 미토콘드리아 기능이상 및 뉴런의 사망을 차단시킬 수 있다. 여기에서, 11-12 월령 WT 및 유전자도입 마우스는 6 주 동안 PM1 또는 대조군 웹타이드 (cPM)로 계속해서 주입되었다 (1.5 mg/kg/일; 피하로 이식된 ALZET 펌프). 우리의 이전의 연구와 일치하는, 젖과 TDP-43 (<sup>m</sup>TDP-43, WT 마우스에서 팬-TDP-43 항체에 의해 인식됨) 및 인간 돌연변이체 TDP-43 (hTDP-43, TDP-43M337V 마우스에서 인간 TDP-43에 특이적인 항체에 의해 인식됨)은 마우스 뇌 조직으로부터 단리된 고도로 정제된 미토콘드리아에서 존재하였다 (도 9A). 우리는 PM1이 중추신경계에 도달하였고 WT 마우스의 뇌에서 미토콘드리아내 내인성 <sup>m</sup>TDP-43의 수준을 실질적으로 감소시켰다는 것을 확인하였다 (데이터 도시되지 않음). 총 용해물에서 유사한 수준에도 불구하고, 양쪽 총 TDP-43 (<sup>m</sup>TDP-43 플러스 hTDP-43) 및 hTDP-43은 PM1 처리 후 반접합 TDP-43M337V 마우스의 미토콘드리아 분획에서 상당히 감소된 발현을 표시하였다 (도 9A). 팬-TDP-43 항체를 사용하는 TDP-43의 면역조직화학 분석은 반접합 TDP-43M337V 마우스내 총 2 및 3에서 선택적으로 피질 뉴런의 세포질내 TDP-43 축적을 찾아내었다. 미토콘드리아 단백질 TOM20에 특이적 항체로 추가 이중 표지화는 오국소화된 TDP-43이 미토콘드리아로 고도로 공-국소화하였다는 것을 드러냈다 (도 9B). 흥미롭게도, TDP-43M337V 마우스에서 TDP-43 세포질 축적은 PM1 웹타이드 주입 후 사라져서, PM1에 의한 TDP-43 오국재화의 예방을 시사하였다 (도 9B).

[0235] 미토콘드리아에서 TDP-43은 미토콘드리아 생물에너지학을 손상시키고, TDP-43 미토콘드리아 국소화의 억제는 미토콘드리아 기능에서 그것의 독성을 억압시킨다. 당연히, 반접합 TDP-43M337V 마우스의 뇌로부터 단리된 시냅스 미토콘드리아에서 언급된 미토콘드리아 막 잠재력 ( $m\Delta\psi$ ) 또는 산소 소비율 (OCR)의 상당한 감소는 또한 PM1에 의해 크게 경감되었다 (도 9C). PM1 단독은, 우리의 이전의 발견과 일치하였던,  $m\Delta\psi$  또는 OCR의 기저 수준을 변화시키지 않았다. 흥미롭게도, 8 월령이 아닌, 12 월령 반접합 TDP-43M337V 마우스는 또한 피질 층 2 및 3에서 가장 상당히 피질 뉴런의 손실을 보여주어 (도 9D, E 및 보충의 도 3, 8 월령 마우스 도시되지 않음), 이들 제한된 피질 영역에서 관측된 TDP-43 오국재화와 상관관계가 있었다. PM1 처리 후, 반접합 TDP-43<sup>M337V</sup> 마우스의 피질 층 2 및 3에서 뉴런의 밀도는 WT 마우스 또는 cPM으로 처리된 WT 마우스에 비교할만 하여, PM1에 의한 돌연변이체 TDP-43<sup>M337V</sup>-유도된 신경 손실의 완전한 예방을 나타냈다. 분명한 신경 손실은 해마, 소뇌, 또는 척수에서 보여지지 않았다 (데이터 도시되지 않음).

[0236] PM1은 TDP-43M337V Tg 마우스에서 운동 협응 및 인지 결손을 방해한다

[0237] 미토콘드리아 및 뉴런에서 PM1 웹타이드 처리의 보호성 효과와 관련하여, 우리는 PM1에 의한 TDP-43 미토콘드리아 국소화의 억제가 중상 개시 후 반접합 TDP-43M337V 마우스에서 행동 결손을 방해할 수 있었는지를 마지막으로 다루었다. 11-12 월령 WT 또는 유전자도입 마우스는 6 주 동안 연속 피하 주입을 통해 PM1 또는 cPM에 의해 처리되었다. 우리는 처리 전 PM1 및 cPM 주입에 대하여 유전자도입 마우스의 집단 사이 로타로드 및 빔-걷기 시험에서 유의차가 없었음을 확인하였다 (로타로드에 대하여  $p>0.1$ , 데이터 도시되지 않음; 12 mm 정사각형/12 mm 원형/9 mm 정사각형 빔-걷기에 대하여  $F_{1,16}=1.51/0.18/0.01$ , 무의미; 보충의 도 10). cPM으로 처리된 WT 마우스 (NTG/cPM 그룹)과 비교하여, PM1 주입을 가진 유전자도입 마우스 (Tg/PM1 그룹)이 아닌 cPM 주입을 가진 유전자도입 마우스 (Tg/cPM 그룹)은 상당히 손상된 로타로드 및 빔-걷기 성능을 나타내어 (로타로드에 대하여  $F_{2,21}=11.93$ ,  $p<0.001$ ; 12 mm 정사각형 빔에 대하여  $F_{2,21}=3.3$ ,  $p<0.1$ ; 12 mm 원형 빔에 대하여  $F_{2,21}=8.8$ ,  $p<0.01$ ; 12 mm 정사각형 빔에 대하여  $F_{2,21}=9.61$ ,  $p<0.01$ ; 도 10A, B), PM1 주입 후 개선된 운동 협응 및 밸런스를 나타내었다. 악력, 보행성 활성, 또는 촉각의 감각에서 차이 없음을 모두 3 그룹 중에서 언급되었다 (노지 시험에 대하여  $F_{2,21}=1.803$ , 무의미; 앞다리/뒷다리 악력에 대하여  $F_{2,21}=0.53$  및  $F_{2,21}=0.37$ , 무의미; 점착성 페이퍼 시험에 대하여  $F_{2,21}=1.368$ , 무의미; 도 10C-E). 일관되게, 운동-협응 기능에서 결손에 더하여, 상당히 손상된 메모리는 또한 Tg/cPM 마우스에서 보여졌다 (Y-미로에 대하여  $F_{2,21}=3.92$ ,  $p<0.05$ ; T-미로에 대하여  $F_{2,21}=4.97$ ,  $p<0.05$ ; 신규한 객체 인식 시험에서 T1-3 기간 각각에 대하여  $F_{2,21}=1.43/7.22/5.16$ ,  $p>0.1/<0.01/<0.05$ ; 공포 조건화 시험에서 트레이닝 기간 각각 동안 제1-제4 US 8 노출 및 습관화에 대하여  $F_{2,21}=1.31/4.35/8.55/3.08/4.19$ ,  $p>0.1/<0.05/<0.01/<0.05$ ; 상황-의존적 학습에 대하여  $F_{2,21}=7.93$ ,  $p<0.01$ ; 단서-의존적 학습에서 무단서 기간에 대하여  $F_{2,21}=0.68$ , 무의미; 단서-의존적 학습에서 단서 기간에

대하여  $F_{2,21}=7.84$ ,  $p<0.01$ , 도 11A-D). 그에 반해서, Tg/PM1은 NTG/cPM 마우스의 수준까지 크게 회복된 인지 를 보여주어, PM1이 반접합 TDP-43<sup>M337V</sup> 마우스에서 인지 기능을 개선하였다. 소광은 아마 CS 자극 (백색 소음)이 마우스에서 냉담함을 유지하였기 때문에 모든 그룹에서 공포 조건화 시험에서 관측되지 않았다 ( $F_{8,84}=1.065$ ,  $p>0.1$ , 데이터 도시되지 않음). 종합하면, 이들 결과는 PM1에 의한 TDP-43 미토콘드리아 국소화의 억제가 증상 개시 후 반접합 TDP-43M337V 마우스에서 운동 협응 기능이상 및 인지 결손을 방해하는데 충분하다는 것을 나타낸다.

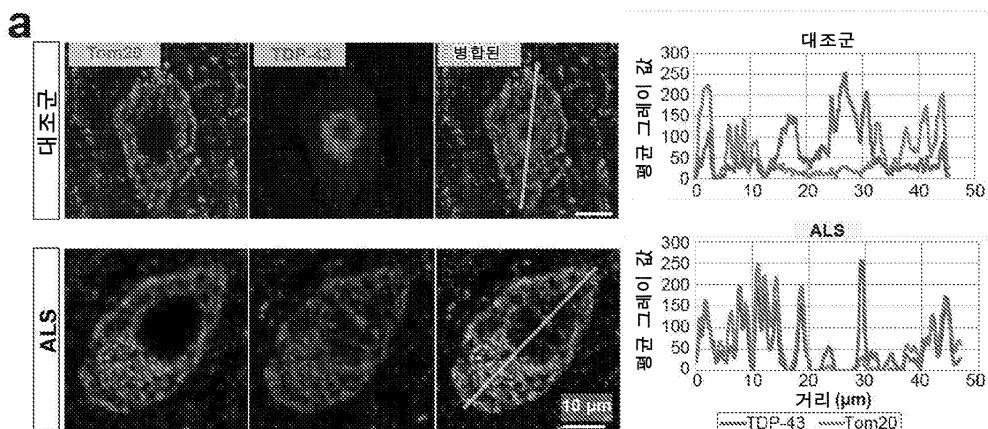
#### [0238] 실시예 3

우리의 이전의 결과는 PM1 웨타이드에 의한 TDP-43 미토콘드리아 국소화의 억제가 ALS 및 FTD 동물 모델에서 운동 및 인지 결손을 완전히 폐지시키는데 충분하였다는 것을 보여주었다. 이 실시예에서, 우리는 5xFAD 유전자도입 마우스, 많은 알츠하이머병 (AD)-관련된 특질을 재구복시키는 널리-사용된 마우스에서 운동 및 인지 기능에 관한 PM1 웨타이드의 보호성 효과를 시험하였다. 10-월령에서, 비-유전자도입 (NTg) 또는 5xFAD 유전자도입 마우스 (Tg)는 PM1 또는 대조군 cPM 웨타이드로 피하로 주입되었다. 우리는 용합 4 주 후, 미토콘드리아에서 TDP-43의 수준이 PM1로 처리된 Tg 마우스의 뇌에서 사실상 감소되었다는 것을 확인하였다 (도 12A, B). 11-월령에서, cPM으로 처리된 Tg 마우스는 로타로드 (도 12C)에서 머물기 위한 감소된 능력 및 표적 홀 (도 12D) 각각에 대한 오랜 잠복기에 의해 명시된 로타로드 (운동 기능 시험) 및 바네스 미로 (공간적 학습 및 메모리 시험)에 관한 성능에서 상당한 손상을 실증하였다. 놀랍게도, cPM1로 처리된 Tg 마우스와 비교하여, PM1로 처리된 Tg 마우스는 상당히 개선된 로타로드 성능을 입증하고 (도 12C) 표적 홀에 대한 잠복기를 크게 감소시킨다 (도 12D). 5XFAD 마우스에서 행동 결손이 6-월령에서 만큼 일찍 언급될 수 있음에 따라, 이들 결과는 PM1이 증상 개시 후 5xFAD 유전자도입 마우스에서 운동 및 인지 기능을 또한 개선할 수 있다는 것을 나타낸다.

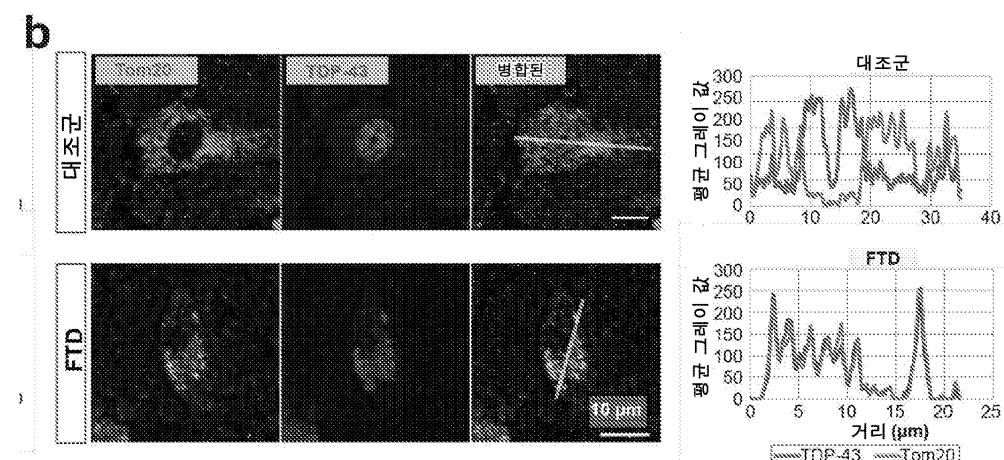
[0240] 본 발명의 상기 설명으로부터, 당해 분야의 숙련가는 개선, 변화 및 변형을 인지할 것이다. 종래 분야의 기술 내에서 그와 같은 개선, 변화 및 변형은 첨부된 청구항에 의해 포함되도록 의도된다. 본원에서 인용된 모든 참조문헌, 공보, 및 특허는 참고로 그 전문이 본 명세서에서 편입된다.

## 도면

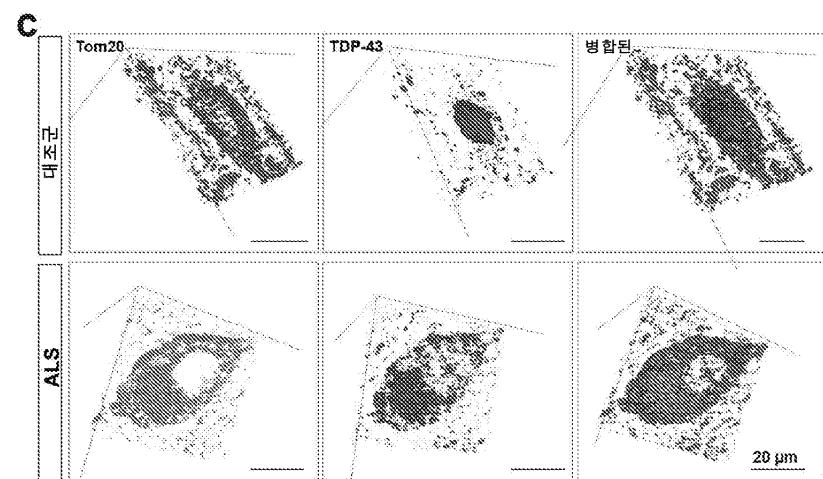
### 도면1a



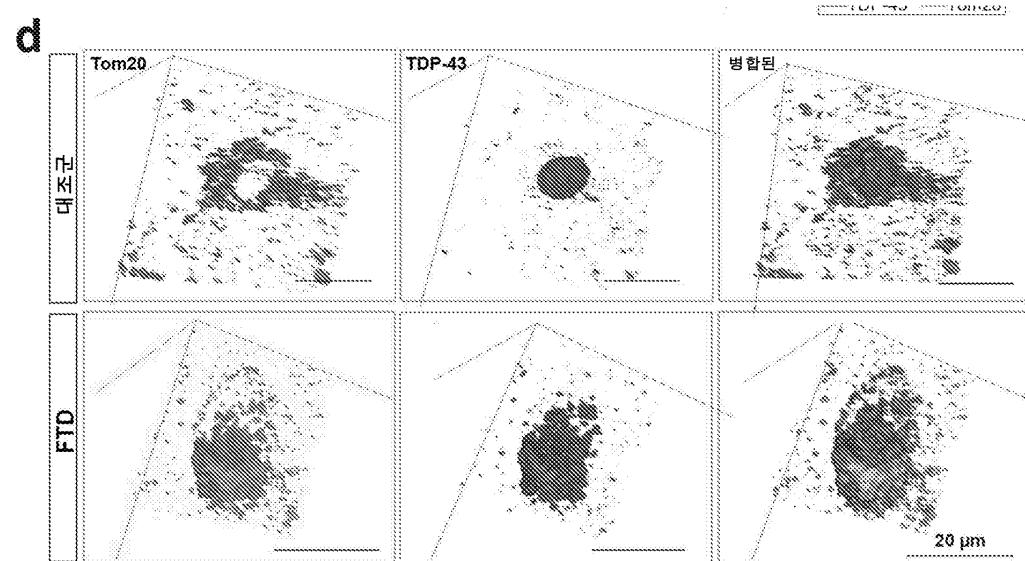
도면 1b



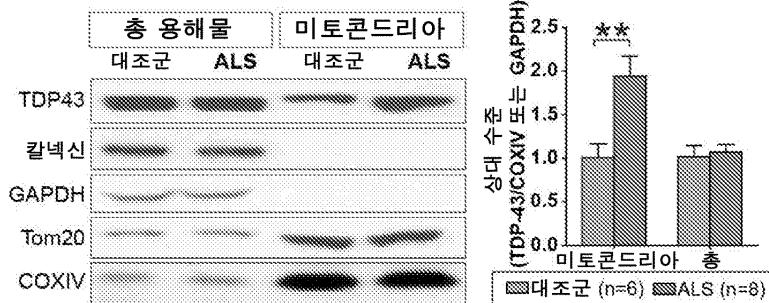
도면 1c



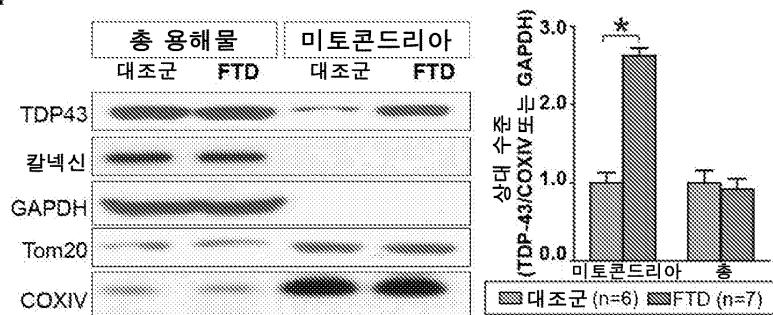
도면 1d



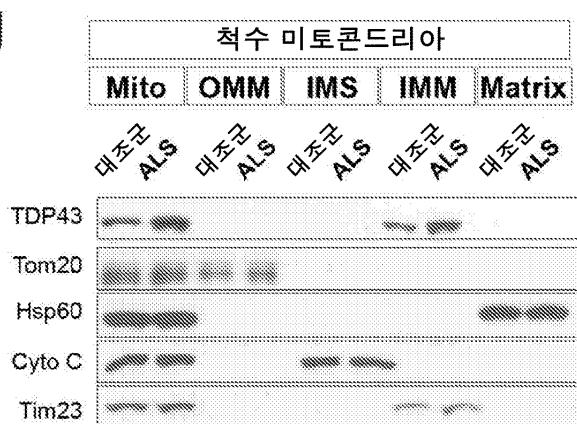
## 도면1e

**e**

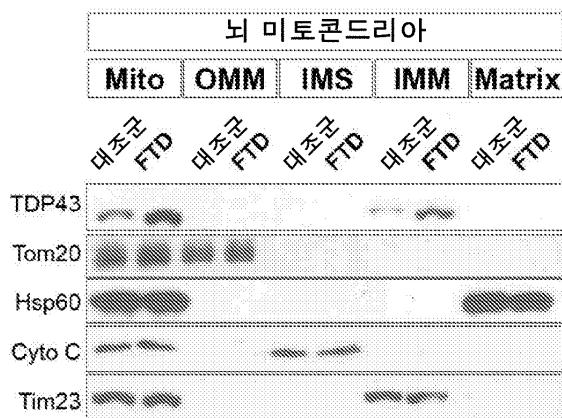
## 도면1f

**f**

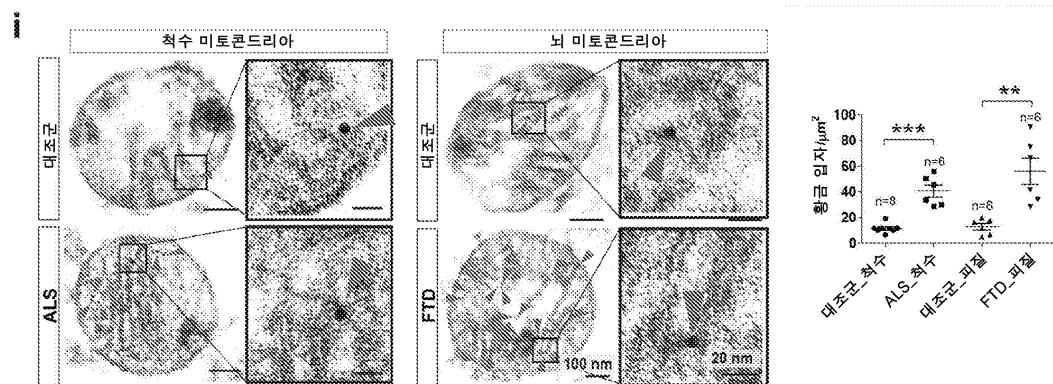
## 도면1g

**g**

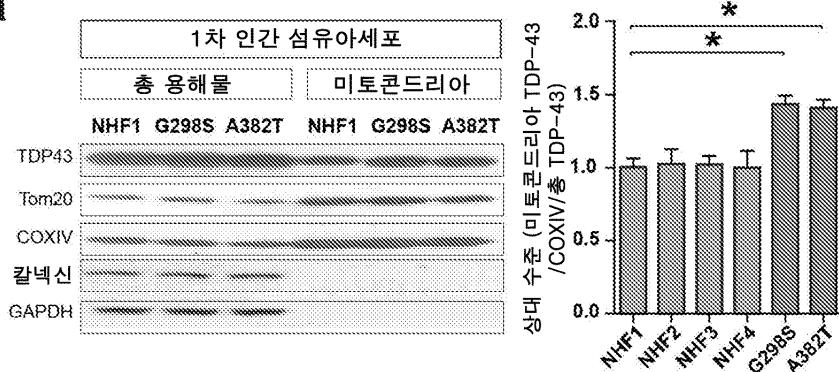
## 도면1h

**h**

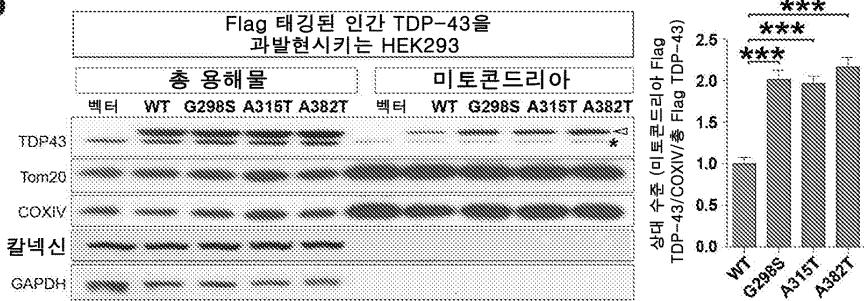
## 도면1i



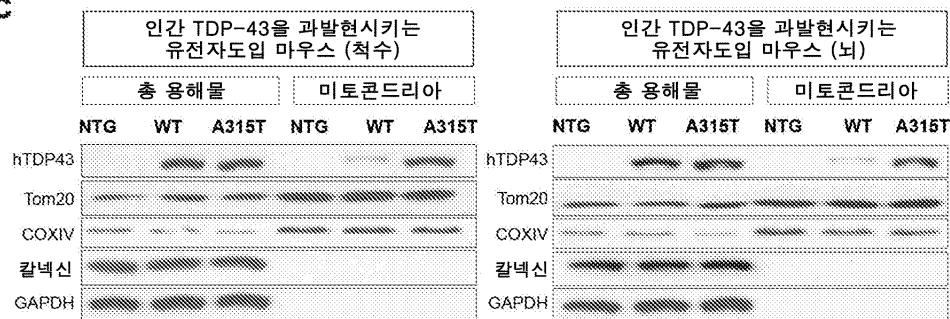
## 도면2a

**a**

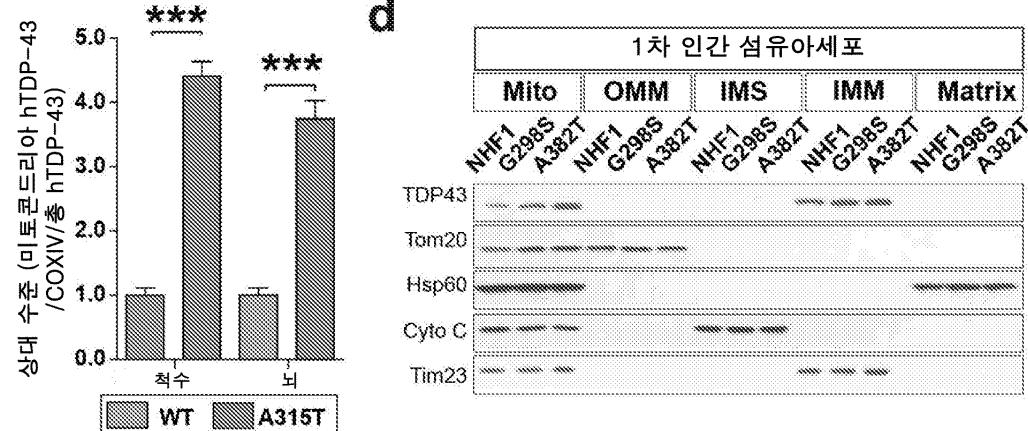
## 도면2b

**b**

## 도면2c

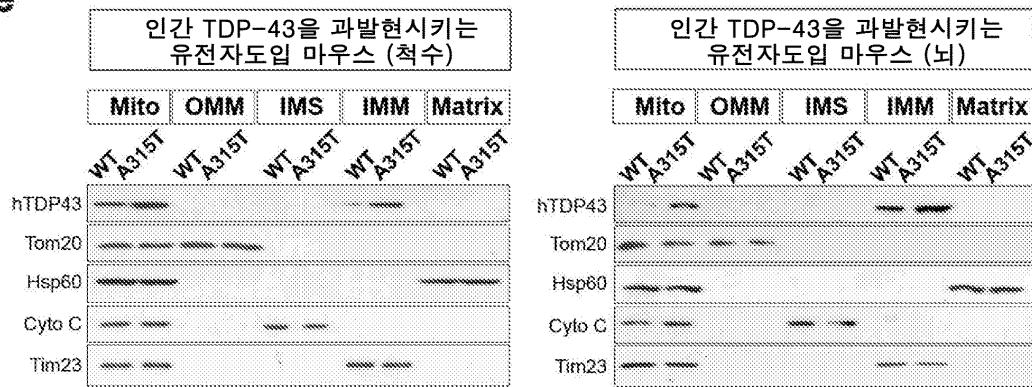
**c**

## 도면2d

**d**

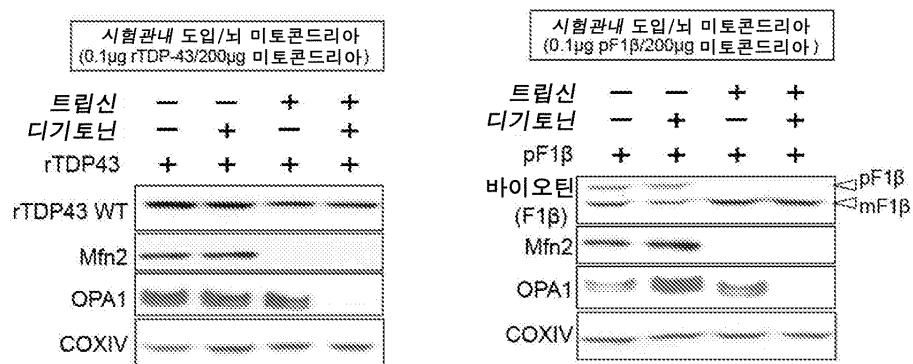
## 도면2e

e



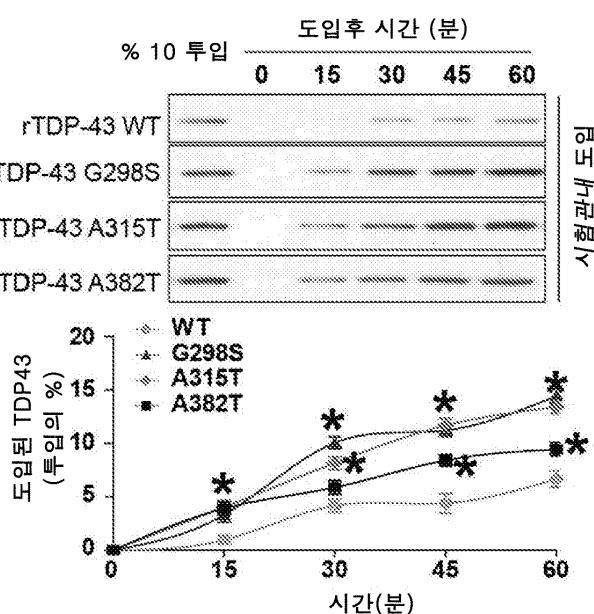
## 도면2f

f

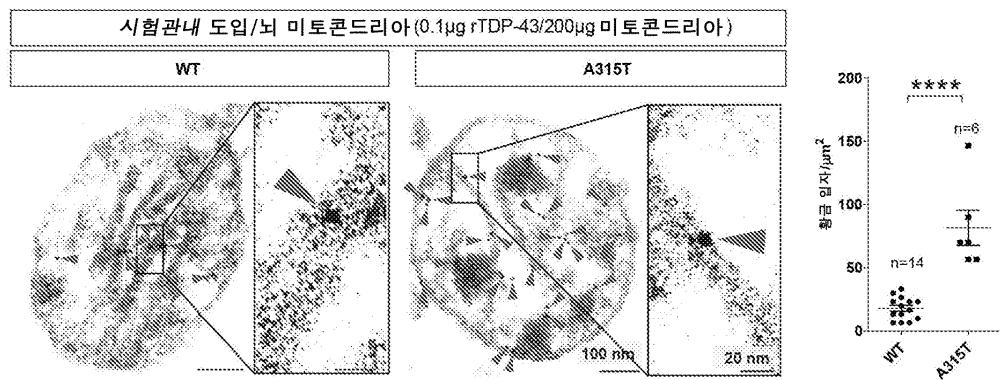


## 도면2g

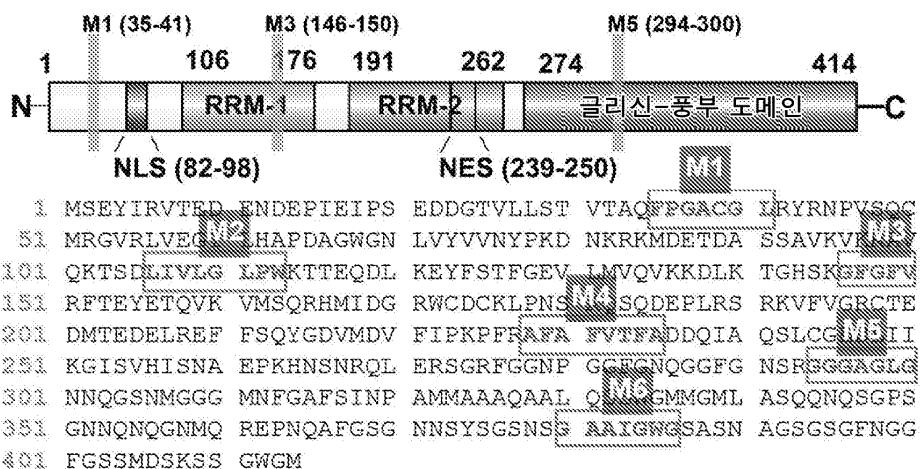
g



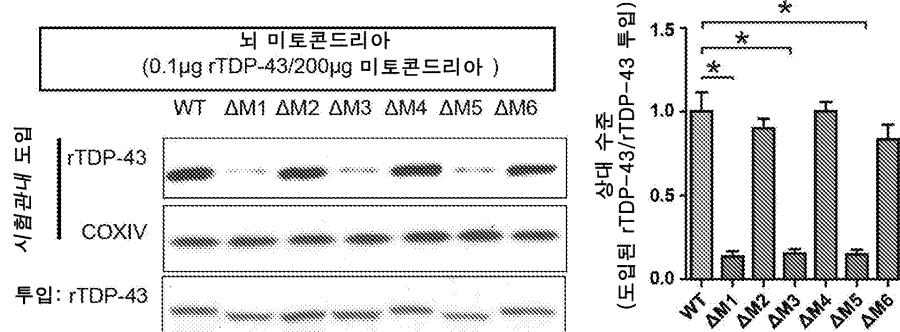
## 도면2h

**h**

## 도면3a

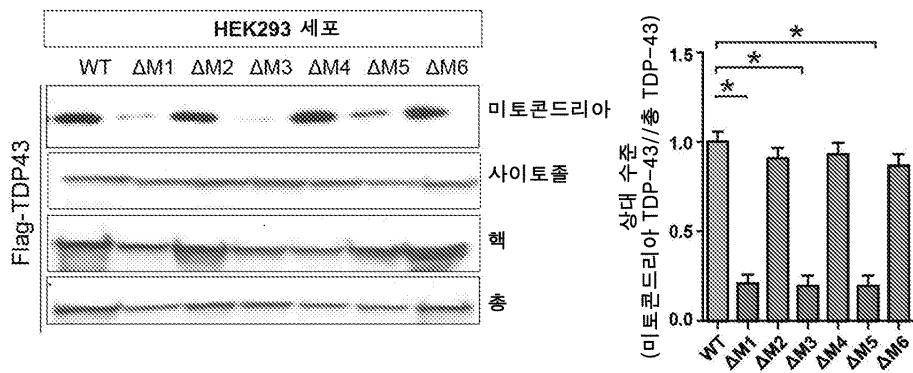
**a**

## 도면3b

**b**

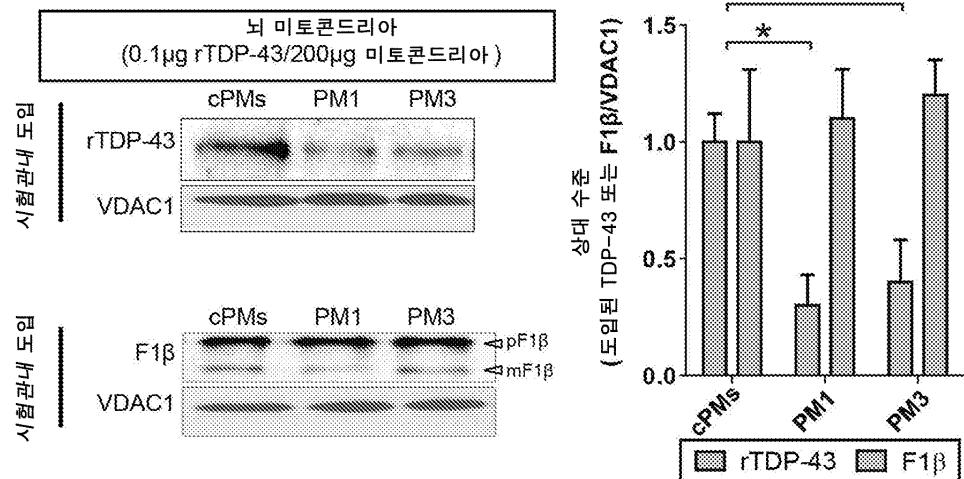
## 도면3c

C



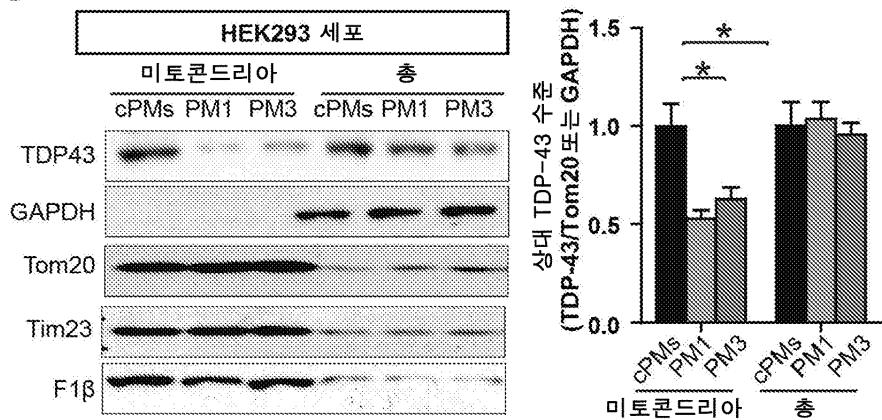
## 도면3d

d



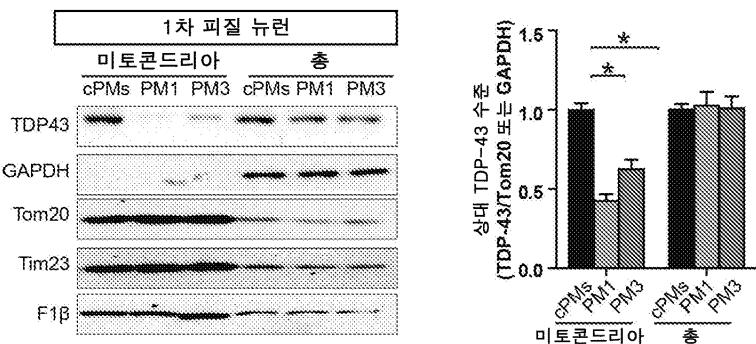
## 도면3e

e



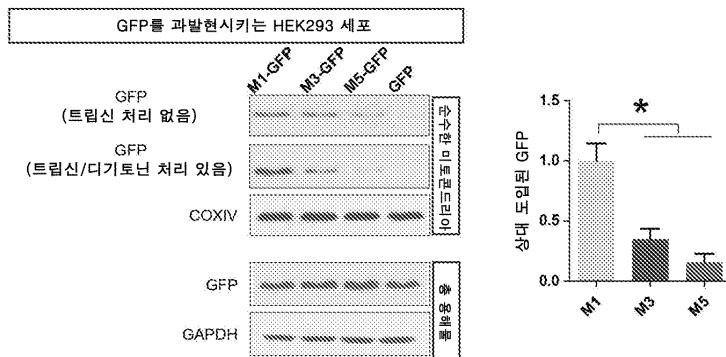
## 도면3f

f



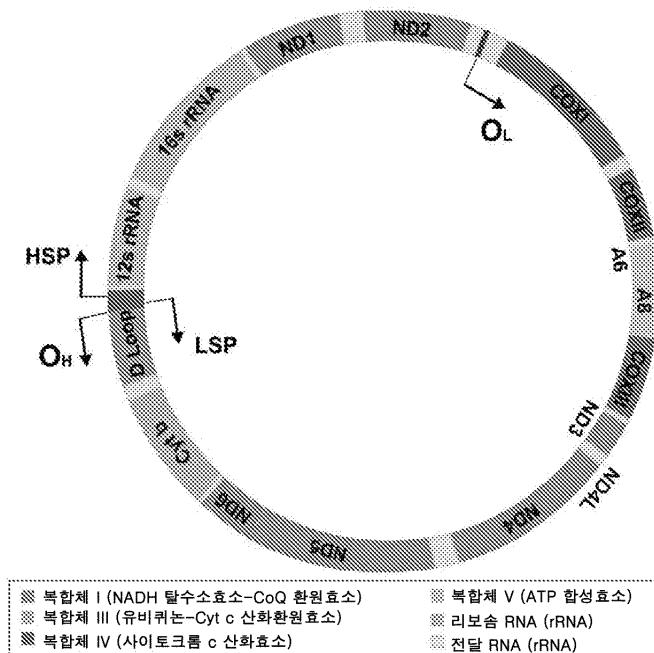
## 도면3g

g

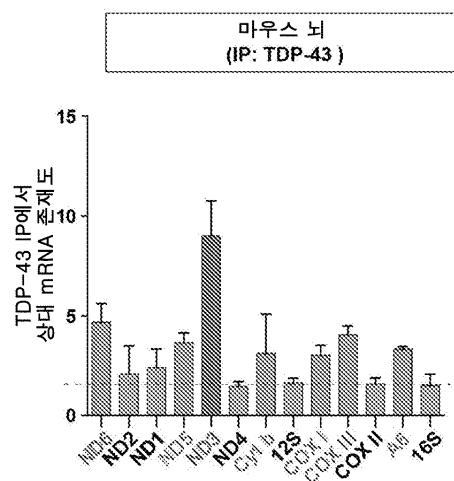


## 도면4a

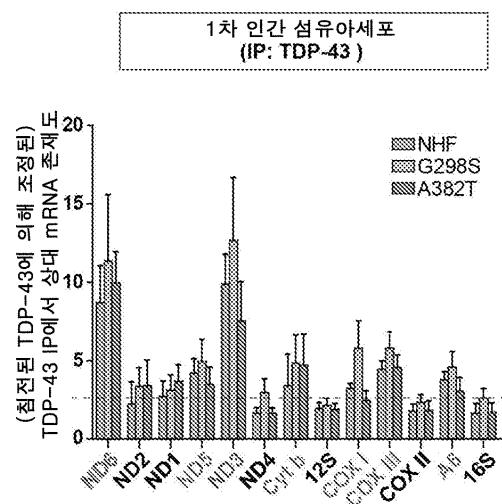
a



## 도면4b

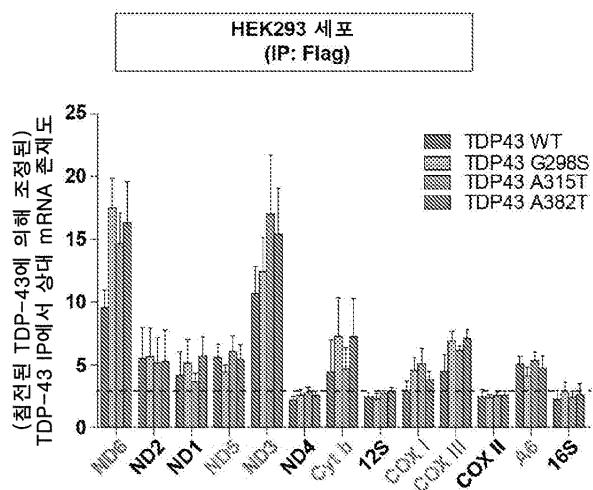
**b**

## 도면4c

**c**

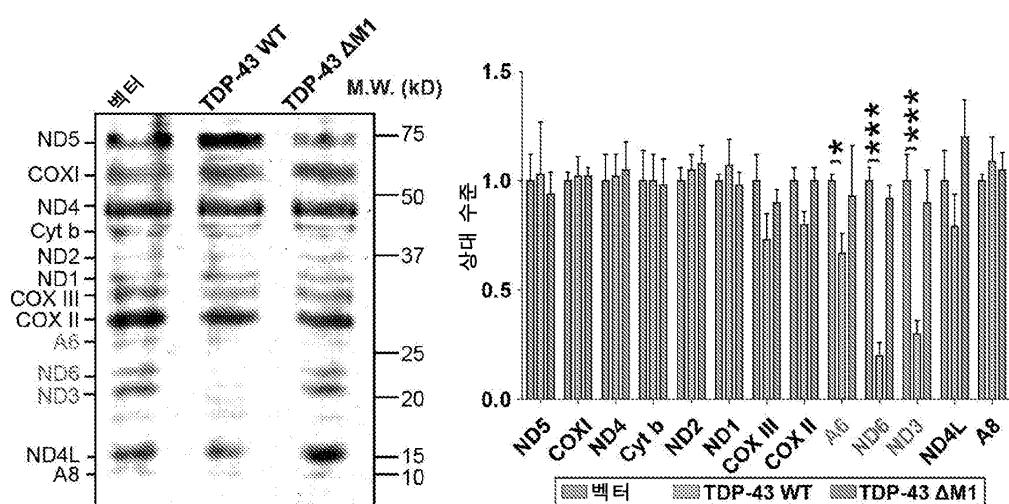
## 도면4d

d

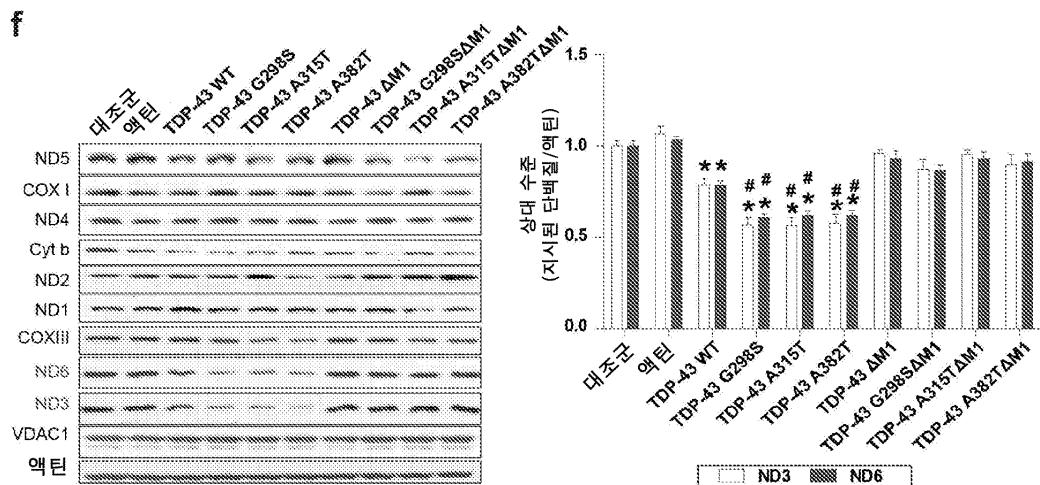


## 도면4e

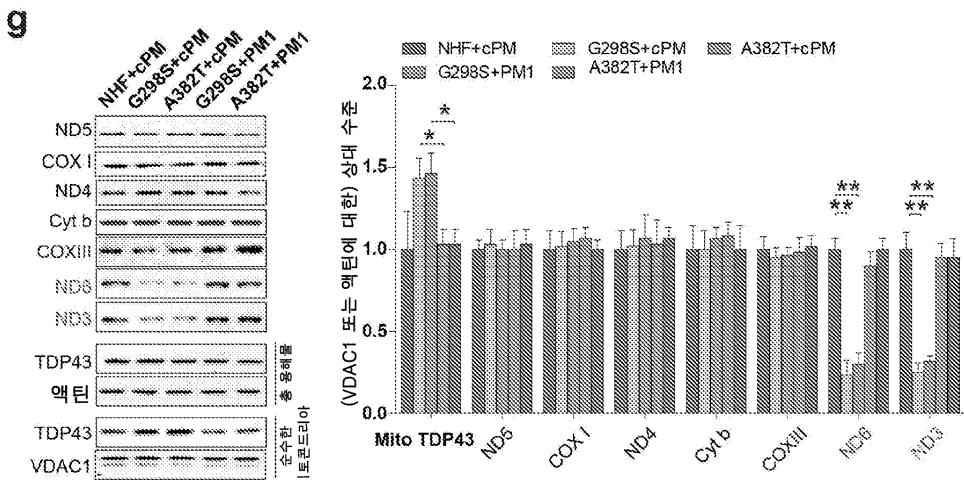
e



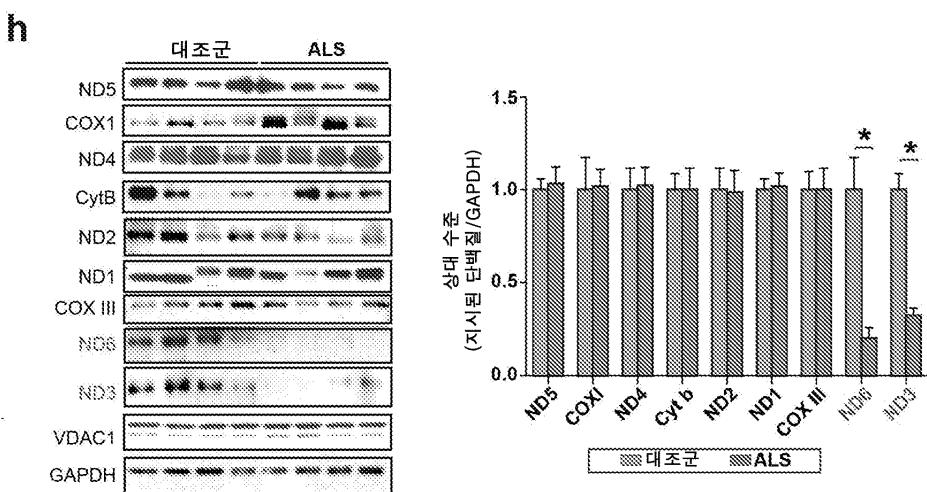
## 도면4f



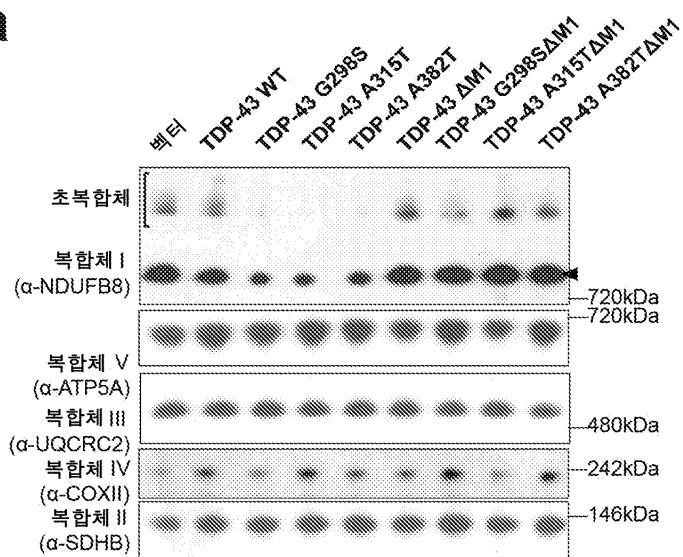
## 도면4g



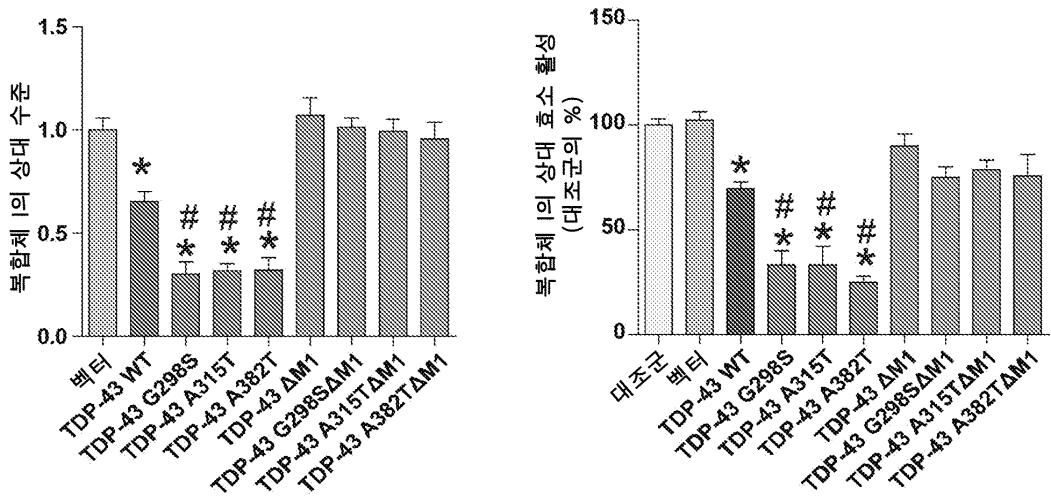
## 도면4h



## 도면5a

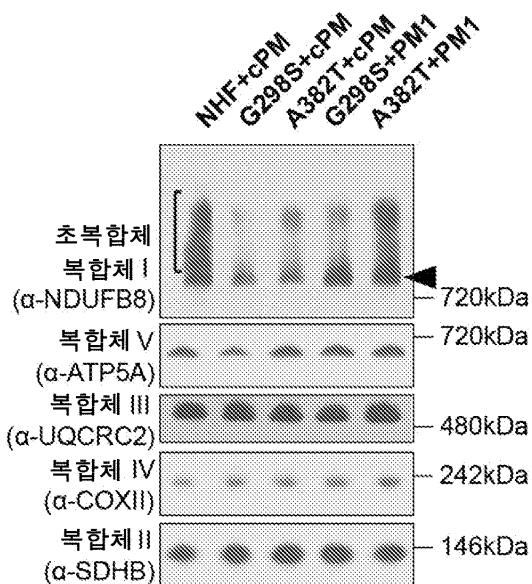
**a**

## 도면5b

**b**

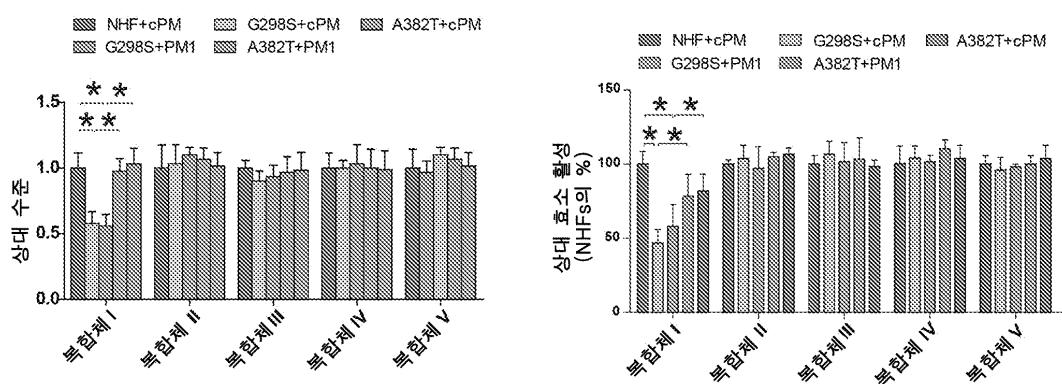
## 도면5c

C



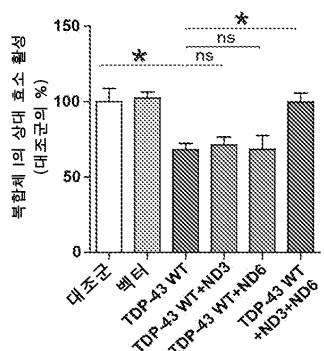
## 도면5d

d

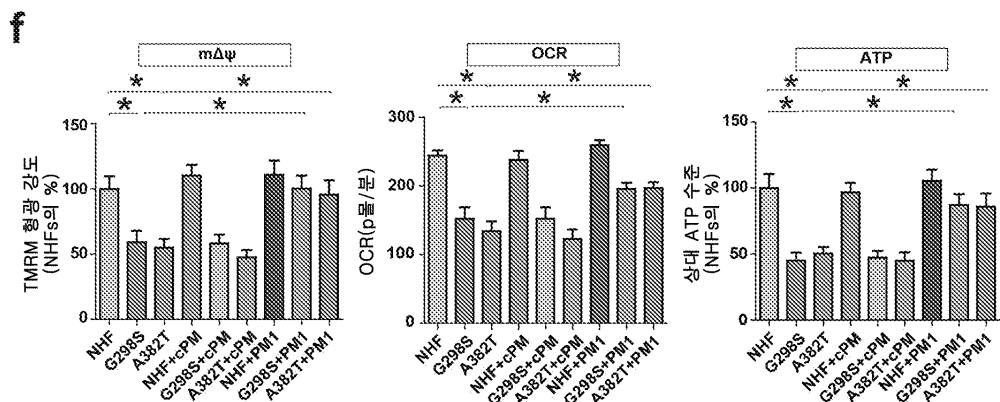


## 도면5e

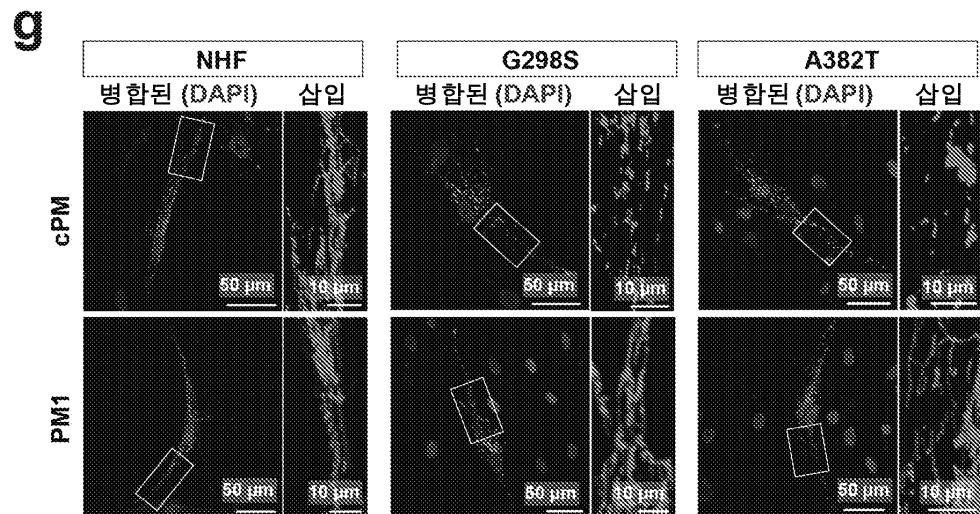
e



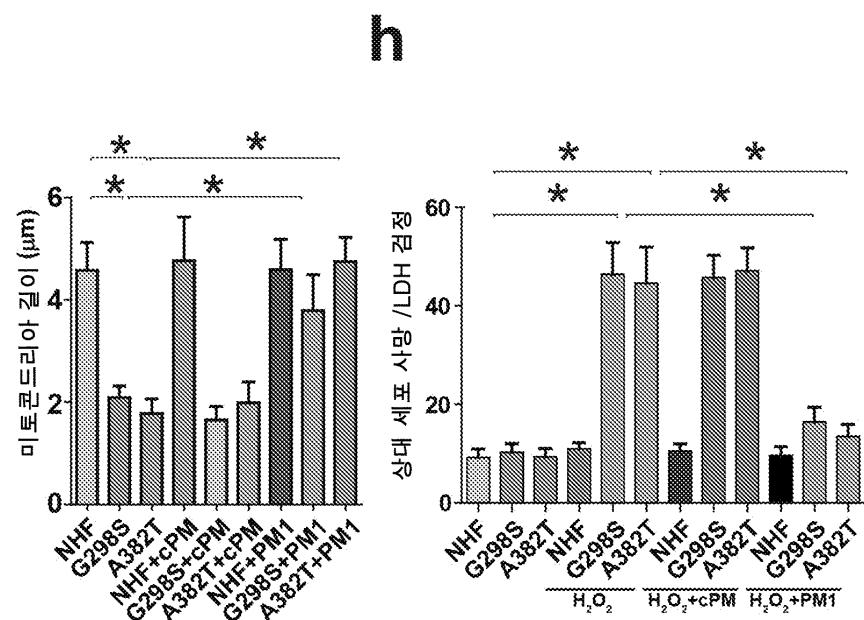
도면5f



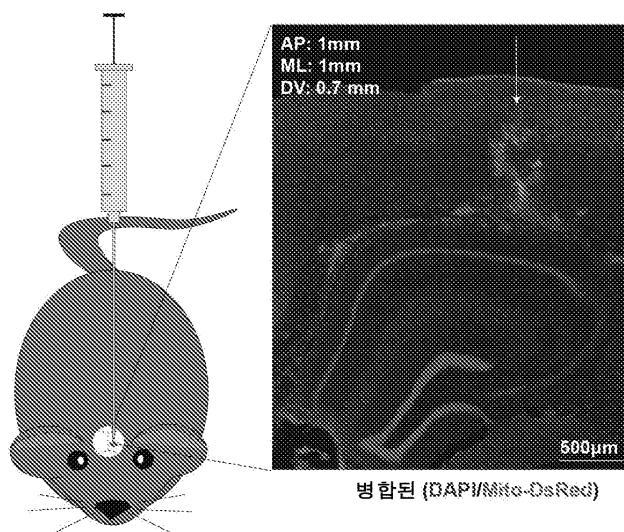
도면5g



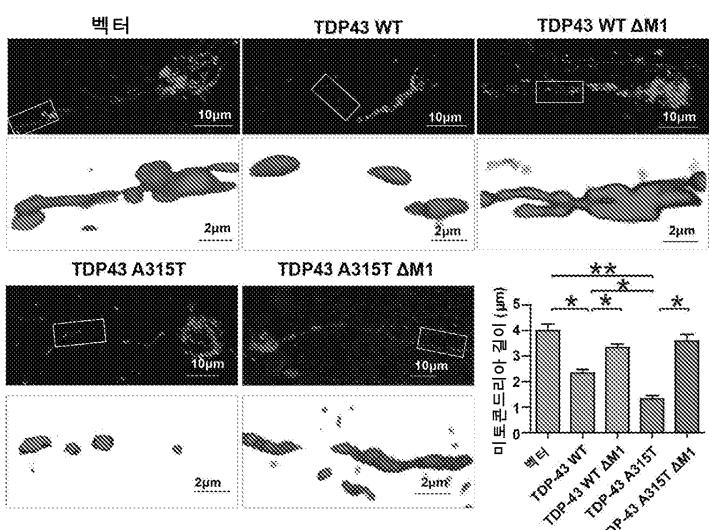
도면5h



## 도면6a

**a**

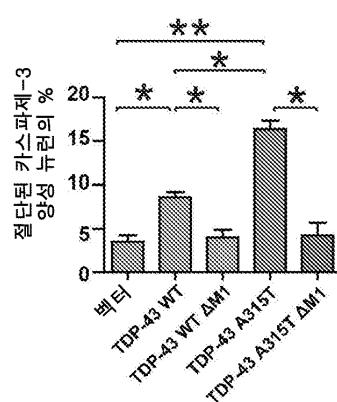
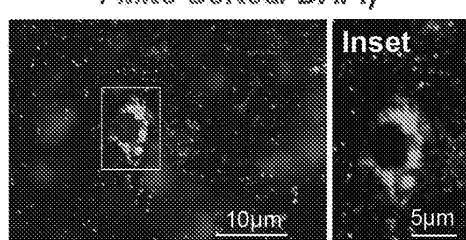
## 도면6b

**b**

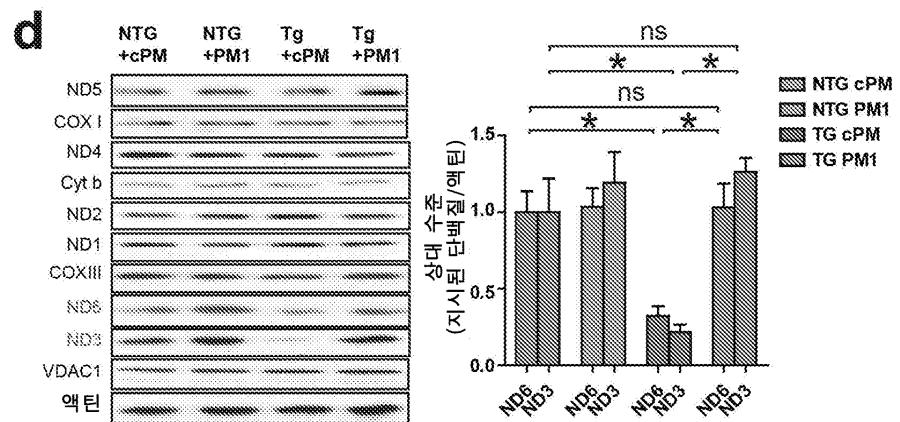
## 도면6c

**c**

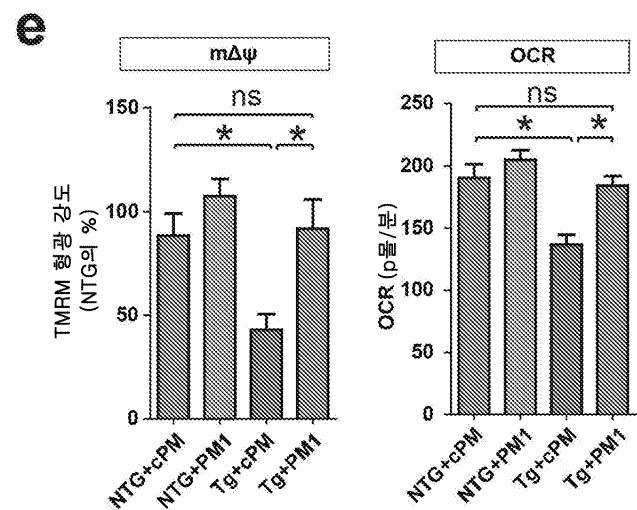
병합된 (절단된 카스파제-3 / Mito-DsRed/ DAPI)



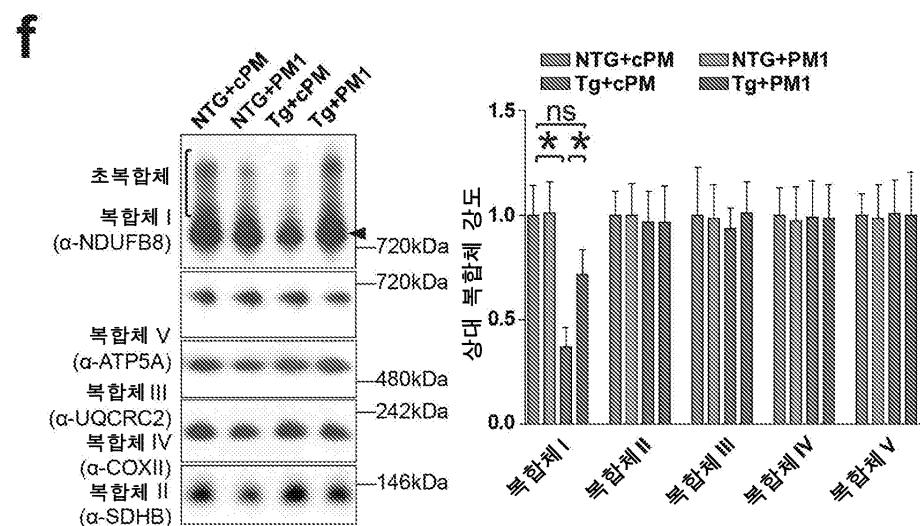
## 도면6d



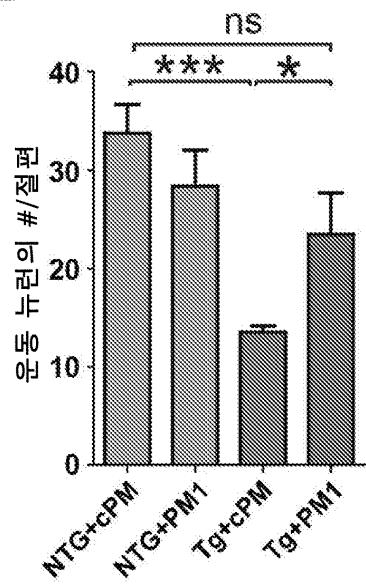
## 도면6e



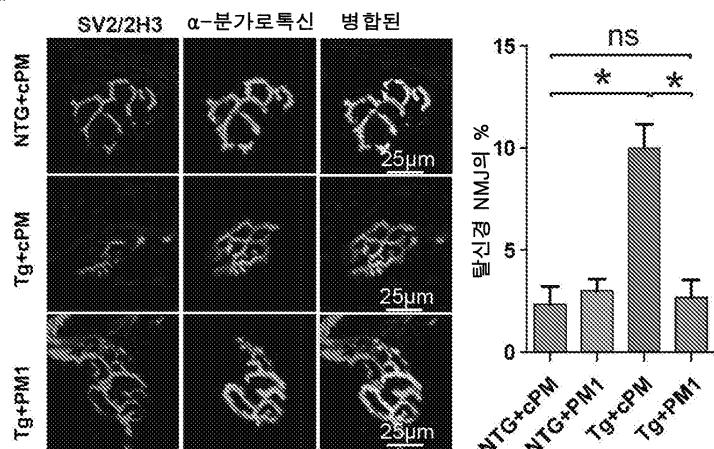
## 도면6f



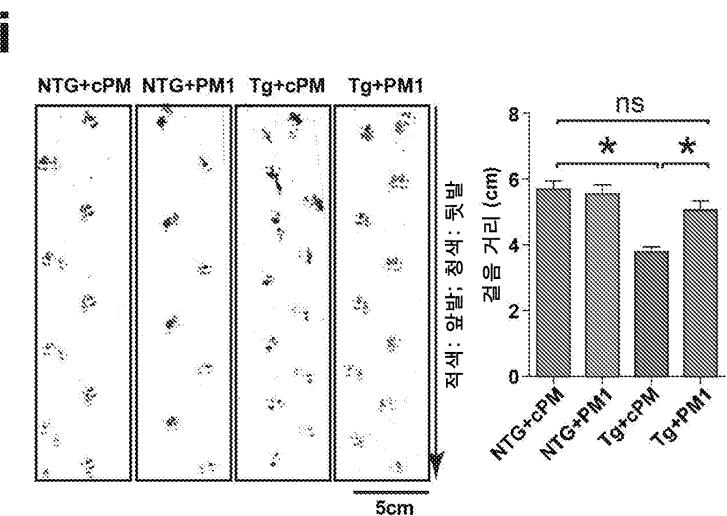
도면6g

**g**

도면6h

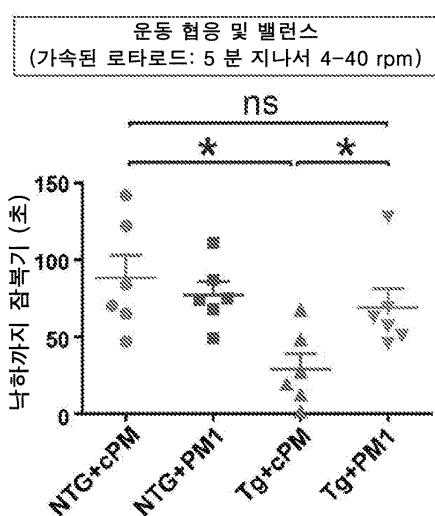
**h**

도면6i



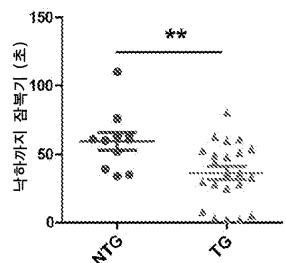
도면6j

j

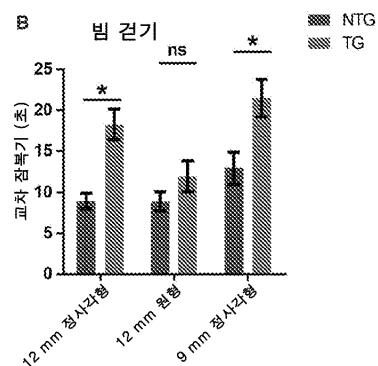


도면7a

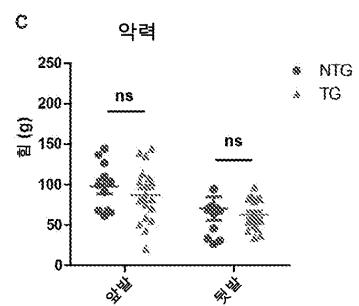
A      로타로드



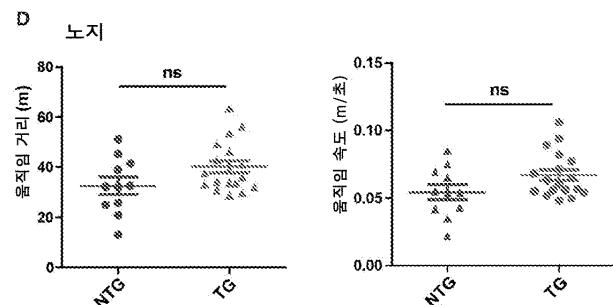
## 도면7b



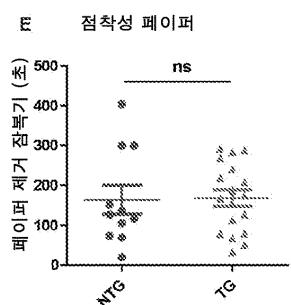
## 도면7c



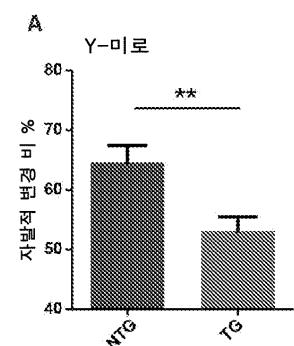
## 도면7d



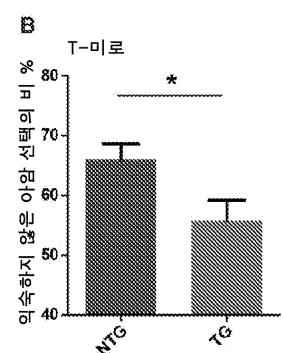
## 도면7e



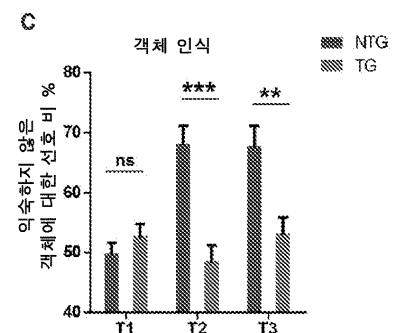
도면8a



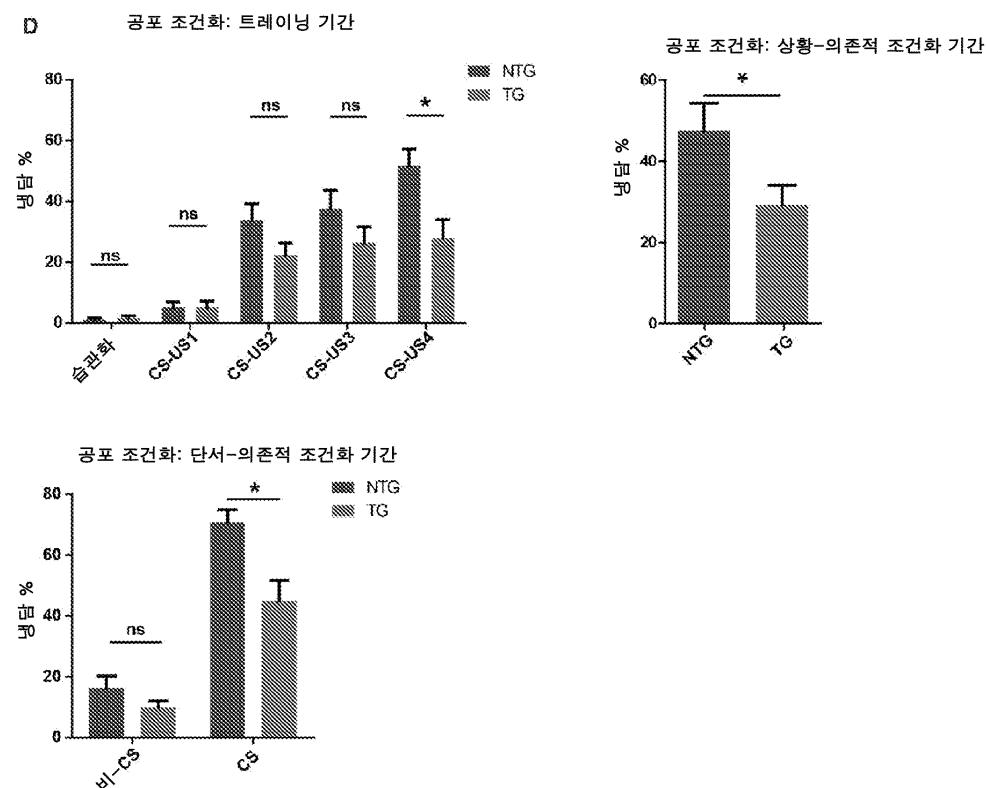
도면8b



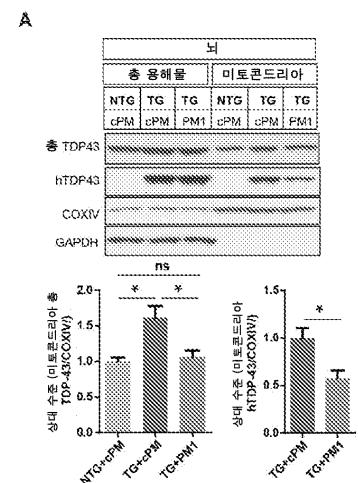
도면8c



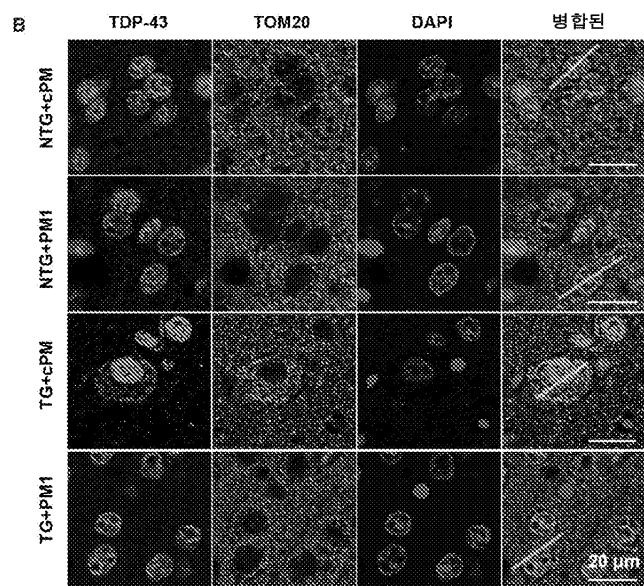
## 도면8d



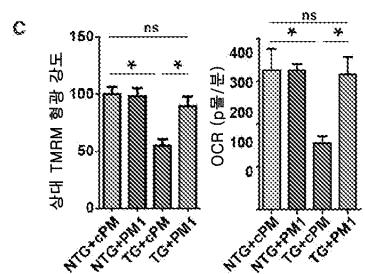
## 도면9a



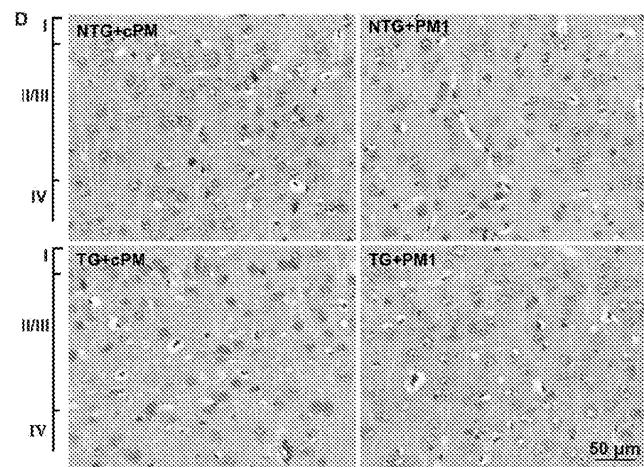
## 도면9b



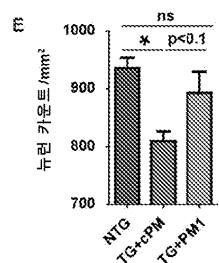
## 도면9c



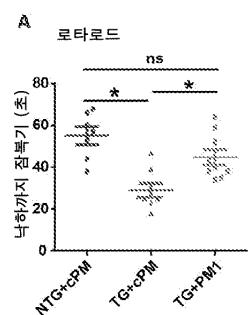
## 도면9d



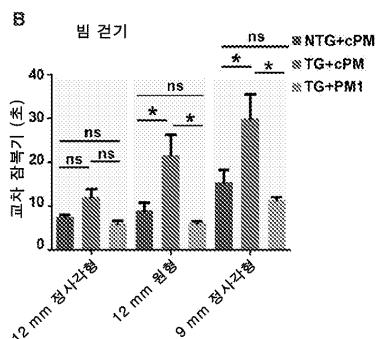
도면9e



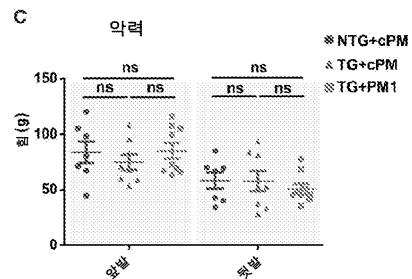
도면10a



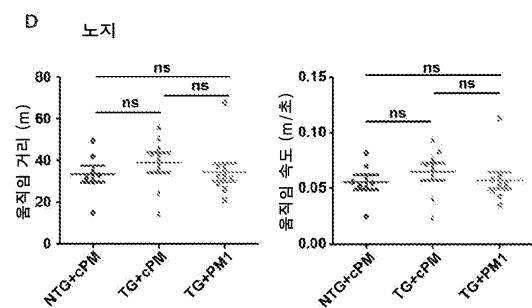
도면10b



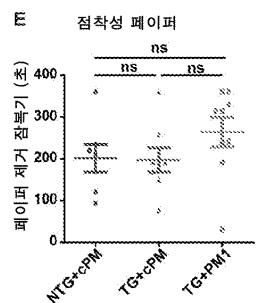
도면10c



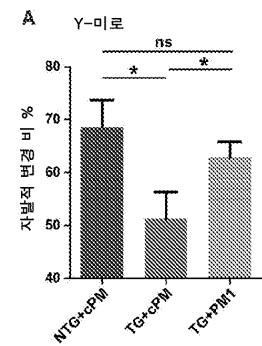
## 도면10d



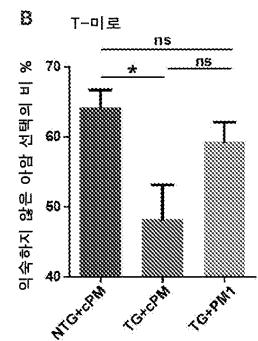
## 도면10e



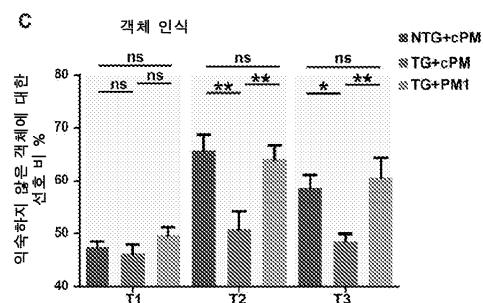
## 도면11a



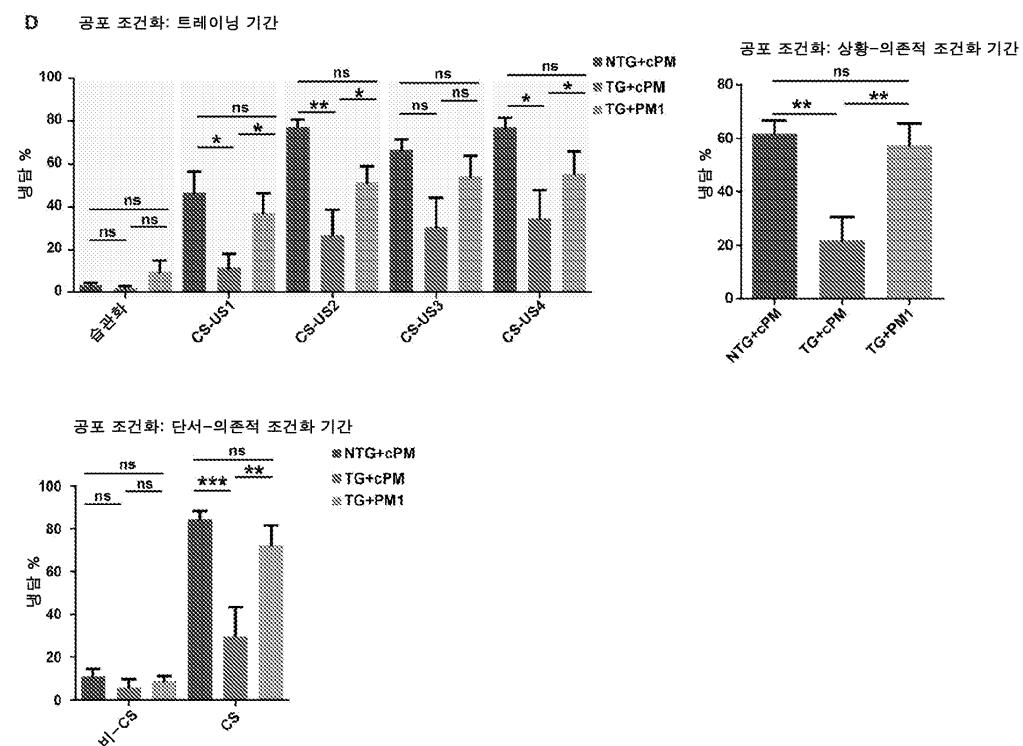
## 도면11b



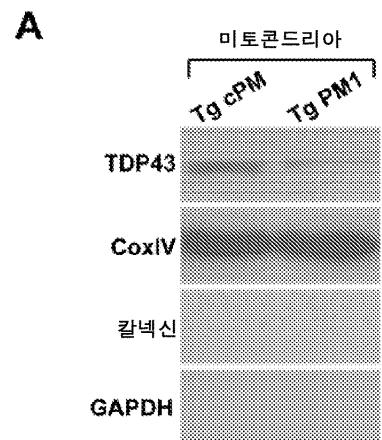
## 도면11c



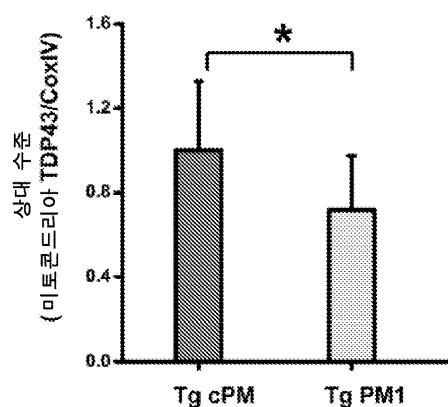
## 도면11d



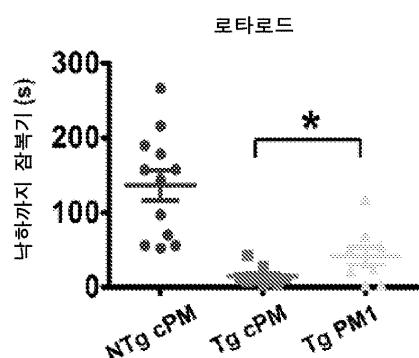
## 도면12a



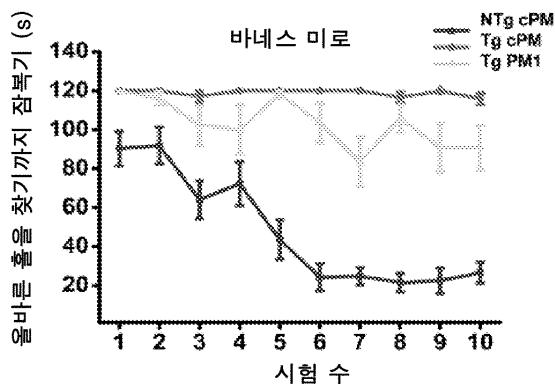
## 도면12b

**B**

## 도면12c

**C**

## 도면12d

**D**

## 서 열 목 록

- <110> Case Western Reserve University  
<120> TDP-43 MITOCHONDRIAL LOCALIZATION INHIBITOR FOR THE TREATMENT OF NEURODEGENERATIVE DISEASE  
<130> CWR-025431WO ORD  
<150> 62/328,484

<151> 2016-04-27

<150> 62/139,580

<151> 2016-04-07

<160> 19

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Phe Pro Gly Ala Cys Gly Leu

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Leu Ile Val Leu Gly Leu Pro Trp

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gly Phe Gly Phe Val

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Phe Ala Phe Val Thr Phe Ala

1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gly Gly Gly Ala Gly Leu Gly

1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gly Ala Ala Ile Gly Trp Gly

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Gln Phe Pro Gly Ala Cys Gly Leu

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ser Lys Gly Phe Gly Phe Val Arg Phe

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ser Arg Gly Gly Gly Ala Gly Leu Gly

1 5

<210> 10  
<211> 414  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 10

Met Ser Glu Tyr Ile Arg Val Thr Glu Asp Glu Asn Asp Glu Pro Ile

1 5 10 15

Glu Ile Pro Ser Glu Asp Asp Gly Thr Val Leu Leu Ser Thr Val Thr

20 25 30

Ala Gln Phe Pro Gly Ala Cys Gly Leu Arg Tyr Arg Asn Pro Val Ser

35 40 45

Gln Cys Met Arg Gly Val Arg Leu Val Glu Gly Ile Leu His Ala Pro

50 55 60

Asp Ala Gly Trp Gly Asn Leu Val Tyr Val Val Asn Tyr Pro Lys Asp

65 70 75 80

Asn Lys Arg Lys Met Asp Glu Thr Asp Ala Ser Ser Ala Val Lys Val

85 90 95

Lys Lys Ala Val Gln Lys Thr Ser Asp Leu Ile Val Leu Gly Leu Pro

100 105 110

Trp Lys Thr Thr Glu Gln Asp Leu Lys Glu Tyr Phe Ser Thr Phe Gly

115 120 125

Glu Val Leu Met Val Gln Val Lys Lys Asp Leu Lys Thr Gly His Ser

130 135 140

Lys Gly Phe Gly Phe Val Arg Phe Thr Glu Tyr Glu Thr Gln Val Lys

145 150 155 160

Val Met Ser Gln Arg His Met Ile Asp Gly Arg Trp Cys Asp Cys Lys

165 170 175

Leu Pro Asn Ser Lys Gln Ser Gln Asp Glu Pro Leu Arg Ser Arg Lys

180 185 190

Val Phe Val Gly Asx Cys Thr Glu Asp Met Thr Glu Asp Glu Leu Arg

195 200 205

Glu Phe Phe Ser Gln Tyr Gly Asp Val Met Asp Val Phe Ile Pro Lys

210	215	220
Pro Phe Arg Ala Phe Ala Phe Val Thr Phe Ala Asp Asp Gln Ile Ala		
225	230	235
Gln Ser Leu Cys Gly Glu Asp Glu Ile Ile Lys Gly Ile Ser Val His		
245	250	255
Ile Ser Asn Ala Glu Pro Lys His Asn Ser Asn Arg Gln Leu Glu Arg		
260	265	270
Ser Gly Arg Phe Gly Gly Asn Pro Gly Phe Cys Asn Gln Gly Gly		
275	280	285
Phe Gly Asn Ser Arg Gly Gly Ala Gly Leu Gly Asn Asn Gln Gly		
290	295	300
Ser Asn Met Gly Gly Met Asn Phe Gly Ala Phe Ser Ile Asn Pro		
305	310	315
Ala Met Met Ala Ala Ala Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ser Trp Gly Met		
325	330	335
Met Gly Met Leu Ala Ser Gln Gln Asn Gln Ser Gly Pro Ser Gly Asn		
340	345	350
Asn Gln Asn Gln Gly Asn Met Gln Arg Glu Pro Asn Gln Ala Phe Gly		
355	360	365
Ser Gly Asn Asn Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Ser Gly Ala Ala Ile Gly		
370	375	380
Trp Gly Ser Ala Ser Asn Ala Gly Ser Gly Ser Gly Phe Asn Gly Gly		
385	390	395
Phe Gly Ser Ser Met Asp Ser Lys Ser Ser Gly Trp Gly Met		
405	410	

<210>	11
<211>	11
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<400>	11

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1	5	10
---	---	----

<210> 12  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 12

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Ser Lys Gly Phe Gly

1	5	10	15
Phe	Val	Arg	Phe

20

<210> 13  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 13

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Gly Phe Gly Val

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 14  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 14

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Gly Gly Ala Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Gly

<210> 15  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 15

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Ala Gln Phe Pro Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala Cys Gly Leu

20

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 16

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Lys Gly Phe Gly

1

5

10

15

Phe Val Arg Phe

20

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 17

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Arg Gly Gly Gly

1

5

10

15

Ala Gly Leu Gly

20

&lt;210&gt;

18

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 18

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Ala Gln Gly Phe

1

5

10

15

Gly Cys Pro Leu

20

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 19

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Gly Arg Phe Phe Lys

1

5

10

15

Ser Phe Gly