



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0028982
(43) 공개일자 2020년03월17일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 38/16</i> (2006.01) <i>A61K 31/7105</i> (2006.01)
 <i>A61K 31/713</i> (2006.01) <i>A61K 39/00</i> (2006.01)
 <i>A61K 45/06</i> (2006.01) <i>A61P 25/00</i> (2006.01)
 <i>C07K 16/18</i> (2006.01) <i>C07K 16/40</i> (2006.01)
 <i>C12N 15/113</i> (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 38/16</i> (2013.01)
 <i>A61K 31/7105</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-7003844
 (22) 출원일자(국제) 2018년07월12일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2020년02월10일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2018/041764
 (87) 국제공개번호 WO 2019/014418
 국제공개일자 2019년01월17일</p> <p>(30) 우선권주장
 62/532,026 2017년07월13일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지
 미국 02139 메사추세츠 캠프리지 메사추세츠 애브뉴 77</p> <p>(72) 발명자
 차이, 리-후에이
 미국 02138 메사추세츠주 캠프릿지 프레쉬 폰드 파크웨이 26
 야마카와, 히데쿠니
 미국 02139 메사추세츠주 캠프릿지 메사추세츠 애비뉴 77
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 양영준, 김영</p> |
|--|---|

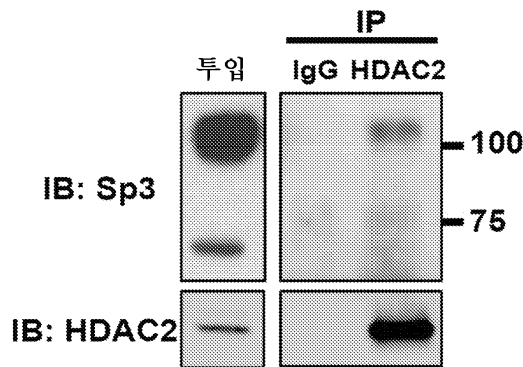
전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 **시냅스 기능을 증진시키기 위한 HDAC2-SP3 복합체 표적화**

(57) 요약

본 개시내용은, 일부 실시양태에서, HDAC2의 카르복실-말단을 포함하는 펩티드 억제제일 수 있는 히스톤 데아세틸라제 2 (HDAC2)/Sp3 억제제 및 관련 조성물을 사용하여 대상체에서 신경변성 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 25/00 (2018.01)
C07K 16/18 (2013.01)
C07K 16/40 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/1137 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

첵, 제미

미국 10523 뉴욕주 엘름스포트 타운 그린 드라이브
32108

가오, 팬

미국 02139 메사추세츠주 캄브릿지 메사추세츠 애
비뉴 77

페니, 제이

미국 02148 메사추세츠주 물든 메이플 스트리트
158

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에게 히스톤 데아세틸라제 2 (HDAC2)/전사 인자 Sp3 (Sp3) 억제제의 유효량을 투여하여 신경변성 질환을 치료하는 것을 포함하는 대상체에서 신경변성 질환을 치료하는 방법이며, 여기서 HDAC2 억제제는 HDAC2가 전사 인자 Sp3 (Sp3)에 결합하는 것을 감소시키는 것인, 대상체에서 신경변성 질환을 치료하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, HDAC2/Sp3 억제제가 펩티드인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 펩티드 HDAC2/Sp3 억제제가 항-HDAC2 항체인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, HDAC2/Sp3 억제제가 소분자 억제제인 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 펩티드가 약 25-110개 아미노산 길이인 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 펩티드가 서열식별번호: 1과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 신경변성 질환이 MCI (경도 인지 장애), 외상후 스트레스 장애 (PTSD), 알츠하이머병, 기억 상실, 알츠하이머병과 연관된 주의력 결핍 증후군, 알츠하이머병과 연관된 신경변성, 혼합형 혈관성 기원의 치매, 퇴행성 기원의 치매, 초로기 치매, 노인성 치매, 파킨슨병과 연관된 치매, 혈관성 치매, 진행성 핵상 마비 또는 피질 기저 변성으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, HDAC2/Sp3 억제제의 양이 시냅스 기능장애를 감소시키는데 유효한 것인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, HDAC2/Sp3 억제제의 양이 히스톤 탈아세틸화를 감소시키는데 유효한 것인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, HDAC2/Sp3 억제제가 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함하는 제약 조성물 중에 제제화된 것인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 대상체에게 또 다른 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 대상체가 인간 환자인 방법.

청구항 13

대상체에서 Sp3 발현 수준을 감소시키기 위한 전사 인자 Sp3 (Sp3) 발현 억제제의 유효량을 대상체에게 투여하여 신경변성 질환을 치료하는 것을 포함하는, 대상체에서 신경변성 질환을 치료하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, Sp3 발현 억제제가 안티센스 올리고뉴클레오티드인 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, Sp3 발현 억제제가 siRNA인 방법.

청구항 16

대상체에게 히스톤 데아세틸라제 2 (HDAC2) 국제화 억제제의 유효량을 투여하여 신경변성 질환을 치료하는 것을 포함하는 대상체에서 신경변성 질환을 치료하는 방법이며, 여기서 HDAC2 국제화 억제제는 염색질의 HDAC2 국제화를 감소시키는 것인, 대상체에서 신경변성 질환을 치료하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, HDAC2 국제화 억제제가 HDAC2/Sp3 억제제인 방법.

청구항 18

서열식별번호: 1과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 20-110개 아미노산 길이의 펩티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 펩티드가 약 80-100개 아미노산 길이인 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 펩티드가 서열식별번호: 1과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 21

제18항에 있어서, 펩티드가 서열식별번호: 1과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 22

제18항에 있어서, 펩티드가 서열식별번호: 1과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 23

제18항에 있어서, 펩티드가 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 24

제18항에 있어서, 펩티드가 서열식별번호: 1의 아미노산 서열로 이루어진 것인 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 제약상 허용되는 담체가 나노입자, 정맥내 유체, 완충 제약 용액, 크림, 에멀전, 겔, 리포솜 또는 연고인 조성물.

청구항 26

서열식별번호: 1과 적어도 80% 서열 동일성을 갖고 서열식별번호: 1의 HDAC2 펩티드에서 비-자연 발생하는 적어도 1개의 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 20-110개 아미노산 길이의 펩티드.

청구항 27

제18항에 있어서, 서열식별번호: 1과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드.

청구항 28

제18항에 있어서, 서열식별번호: 1과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드.

청구항 29

제18항에 있어서, 서열식별번호: 1과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드.

청구항 30

(i) 히스톤 데아세틸라제 2 (HDAC2)/전사 인자 Sp3 (Sp3) 억제제의 유효량; 및 (ii) 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 대상체에서 신경변성 질환을 치료하기 위한 제약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. 119(e) 하에 2017년 7월 13일에 출원된 미국 특허 가출원 U.S.S.N. 62/532,026에 대한 우선권을 주장하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] 중추 신경계의 신경변성 질환은 종종 학습 및 기억 장애와 연관되고, 결국 치매로 이어진다. 뉴런 가소성 및 시냅스 유전자 발현을 음성적으로 조절하는 히스톤 데아세틸라제 HDAC2는 알츠하이머병 (AD) 환자 및 마우스 모델 둘 다에서 상향-조절된다.

발명의 내용

[0004] 본 개시내용은, 적어도 부분적으로, 신경변성의 마우스 모델에서 전사 인자 Sp3 (Sp3)이 시냅스 가소성-연관 유전자의 프로모터로의 HDAC2의 동원을 매개하고, 그러한 상호작용을 파괴하는 HDAC2 억제제, 예컨대 펩티드 억제제가 시냅스 및 인지 기능장애를 성공적으로 감소시킨다는 예상외의 발견을 기초로 한다.

[0005] 따라서, 본 개시내용의 한 측면은 대상체에게 히스톤 데아세틸라제 2 (HDAC2) 억제제의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 신경변성 질환을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 HDAC2 억제제는 HDAC2가 전사 인자 Sp3 (Sp3)에 결합하는 것을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, HDAC2 억제제는 항-HDAC2 항체, 소분자 억제제, 또는 펩티드 억제제일 수 있다.

[0006] 본원에 기재된 방법에서 치료될 대상체는 신경변성 질환을 갖는 환자 (예를 들어, 인간 환자)일 수 있다. 일부 예에서, 신경변성 질환은 MCI (경도 인지 장애), 외상후 스트레스 장애 (PTSD), 알츠하이머병, 기억 상실, 알츠하이머병과 연관된 주의력 결핍 증후군, 알츠하이머병과 연관된 신경변성, 혼합형 혈관성 기원의 치매, 퇴행성 기원의 치매, 초로기 치매, 노인성 치매, 파킨슨병과 연관된 치매, 혈관성 치매, 진행성 핵상 마비 또는 피질 기저 변성으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0007] 일부 실시양태에서, HDAC2 억제제의 양은 시냅스 기능장애를 감소시키는데 유효하다. 대안적으로 또는 추가로, HDAC2 억제제의 양은 히스톤 탈아세틸화를 감소시키는데 유효하다. HDAC2 억제제 중 임의의 것은 전신적으로, 예를 들어, 경장 경로를 통해 또는 비경구 경로를 통해 투여될 수 있다. 본원에 기재된 방법에 의해 치료될 임의의 대상체는 또 다른 치료제를 투여받을 수 있다.

[0008] 다른 측면에서, 본 발명은 (i) 히스톤 데아세틸라제 2 (HDAC2) 억제제의 유효량; 및 (ii) 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 대상체에서 신경변성 질환을 치료하기 위한 제약 조성물이다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 HDAC2가 전사 인자 Sp3 (Sp3)에 결합하는 것을 감소시키는데 유효한 HDAC2 억제제의 양을 포함한다.

[0009] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열식별번호(SEQ ID NO): 1과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 억제제이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 억제제는 약 25-110개 아미노산 길이이다. 다른 실시양태에서, 펩

티드 억제제는 서열식별번호: 1과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드 억제제는 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드 억제제는 서열식별번호: 1의 아미노산 서열로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 펩티드 억제제는 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함하는 제약 조성물 중에 제제화된다.

[0010] 본 발명의 하나 이상의 실시양태의 세부사항이 이하의 상세한 설명에 제시된다. 본 발명의 다른 특색 또는 이점은 하기 도면 및 여러 실시양태의 상세한 설명으로부터, 및 또한 첨부된 청구범위로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0011] 하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고, 본 개시내용의 특정 측면을 추가로 입증하기 위해 포함되며, 이는 이들 도면 중 하나 이상을 본원에 제시된 구체적 실시양태의 상세한 설명과 조합하여 참조함으로써 보다 잘 이해될 수 있다.

도 1a-1e는 Sp3이 시냅스 기능 및 시냅스 유전자 발현을 조절한다는 것을 보여준다. 도 1a는 마우스 피질 조직으로부터의 항-HDAC2 항체에 의한 Sp3의 공동-면역침전의 대표적인 웨스턴 블롯을 보여준다. 도 1b는 대조군 shRNA, HDAC2 shRNA 또는 Sp3 shRNA (n=6-12)로 형질도입된 뉴런으로부터의 대표적인 mEPSC 트레이스 (상부) 및 mEPSC 진폭 및 빈도의 정량화 (하부)를 보여준다. ** P < 0.01, *** P < 0.001 (f-검정의 결과에 따른 양측 웰치(Welch) 또는 스튜던트(Student) t-검정). 도 1c는 대조군 shRNA, Sp3 shRNA 또는 Sp3 shRNA와 조합된 shRNA-저항성 Sp3 (n=6-8)으로 형질도입된 뉴런에서의 mEPSC 진폭 및 빈도의 대표적인 트레이스를 보여준다. * P < 0.05, ** P < 0.01 (던넛 검정). 값은 평균 ± s.e.m.이다. 도 1d는 1차 피질 뉴런에서 HDAC2 shRNA 또는 Sp3 shRNA 발현 후 차등 발현된 유전자의 비교 행렬을 보여준다. P-값은 피셔(Fisher) 정확 검정을 이용하여 계산하였다. 흑색칸 유전자는 HDAC2 또는 Sp3 shRNA로의 처리 후 발현에서 변화를 나타내지 않고, 암회색은 발현의 감소를 나타내고, 담회색은 발현의 증가를 나타낸다. HDAC2 및 Sp3 shRNA는 둘 다 군 1 유전자의 감소된 발현 및 군 2 유전자의 증가된 발현을 매개한다. 도 1e는 DAVID를 사용한 HDAC2 shRNA 및 Sp3 shRNA에 의해 상향-조절된 유전자의 유전자 온톨로지 분석을 보여준다.

도 2a-2c는 Sp3 녹다운이 표적 유전자로의 HDAC2 동원을 감소시킨다는 것을 보여준다. 도 2a는 ChIP 실험을 위한 뉴런 분류의 개략적 도시를 보여준다. 도 2b는 마우스 피질 (n=3)로부터 분류된 뉴런에서 RNA-seq에 의해 확인된 잠재적 표적 유전자 및 대조군 유전자의 프로모터에서의 HDAC2 (상부 패널) 및 Sp3 (하부 패널)의 ChIP-qPCR 결과를 보여준다. 각각의 유전자 전사 개시 부위에 관하여 증폭된 영역의 위치가 표시된다. 도 2c는 Sp3 shRNA 또는 대조군 바이러스 (n=3)로 형질도입된 1차 뉴런의 표적 유전자의 프로모터에서의 HDAC2 (상부 패널) 및 아세틸화된 히스톤 H4 (하부 패널)의 ChIP-qPCR 결과를 보여준다. * P < 0.05, ** P < 0.01 (던넛 검정). 값은 평균 ± s.e.m.이다.

도 3a-3e는 HDAC2 및 Sp3 발현이 AD 환자에서 상승되고, 시냅스 유전자 발현과 역-상관된다는 것을 보여준다. 도 3a는 13명의 건강한 대조군 및 10명의 AD 환자로부터의 사후 해마 CA1 조직에서의 HDAC2의 mRNA 수준을 보여준다. ** P < 0.01 (양측 스튜던트 t-검정). 도 3b는 13명의 건강한 대조군 및 10명의 AD 환자로부터의 사후 해마 CA1 조직에서의 Sp3의 mRNA 수준을 보여준다. ** P < 0.01 (양측 스튜던트 t-검정). 도 3c는 13명의 대조군 및 10명의 AD 환자의 데이터셋으로부터 생성된 유전자 계통도 및 공동-발현 모듈을 보여준다. 도 3d는 모듈 사이의 관계 비교를 위한 확인된 모듈로부터의 고유유전자의 발현의 상관관계 행렬을 보여준다. 각각의 고유유전자는 주어진 모듈에 대한 표준화된 발현 데이터를 가장 잘 나타내는 유전자이다. 시냅스 유전자가 가장 유의하게 풍부화된 모듈은 "시냅스 모듈"로 간주되고, "HDAC2&Sp3 모듈"은 HDAC2 및 Sp3 둘 다를 함유한다. 시냅스 유전자는 SynSysNet에 의해 규정되었다. 시냅스 모듈을 나타내는 고유유전자의 발현은 HDAC2/Sp3 모듈을 나타내는 고유유전자의 발현과 역-상관된다 (흑색 점선으로 강조된 바와 같음). 좌측의 흑백 척도는 시냅스 유전자의 풍부화에 대한 통계적 $-\log_{10}P$ 값을 나타내고, 이는 R에서 피셔 정확 검정에 의해 생성되었다. 우측 흑백 척도는 2개의 고유유전자 사이의 상관 계수인 r 값을 나타낸다. 도 3e는 HDAC2&Sp3 모듈 (좌측) 및 시냅스 모듈 (우측)에서의 유전자의 발현 수준의 열 지도를 보여준다. 각각의 열 지도의 좌측 13개의 칼럼은 대조군 사례로부터의 것이고; 우측 10개의 칼럼은 AD 환자로부터의 것이다.

도 4a-4d는 Sp3 및 HDAC2의 상승된 수준이 CK-p25 마우스에서 시냅스 가소성을 손상시킨다는 것을 보여준다. 도 4a는 대조군 및 CK-p25 마우스 (n=3)의 피질로부터의 대표적인 웨스턴 블롯 영상 및 Sp3의 정량화를 보여준다. 정량화는 β -튜블린에 대해 정규화한 후에 수행하였다. * P < 0.05 (양측 스튜던트 t-검정). 도 4b는 대조군 및 CK-p25 마우스 (n=6)로부터의 피질 조직으로부터 HDAC2에 의해 공동-IP된 Sp3의 대표적인 이뮤노블롯

및 정량화를 보여준다. IP는 항-HDAC2 항체 (ab12169) 또는 마우스 IgG (음성 대조군)를 사용하여 수행하였다. * $P < 0.05$ (단측 스튜던트 t-검정). 값은 평균 \pm s.e.m.이다. 도 4c는 대조군 및 CK-p25 마우스 (n=3)의 피질로부터 분류된 뉴런에서의 그의 표적 유전자 및 대조군 유전자의 프로모터에서의 HDAC2 (상부 패널) 및 Sp3 (하부 패널)에 대한 ChIP-qPCR 결과를 보여준다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (던넛 검정). 도 4d는 대조군 마우스 및 대조군 또는 Sp3 shRNA를 주사한 CK-p25 마우스의 해마 구역 CA1에서의 필드 흥분성 시냅스 후 전위 (fEPSP) 기울기를 보여준다. 기울기는 2X 세타-돌발 자극 (TBS) 전의 기울기의 평균에 의해 정규화되었다 (n=5-9개 슬라이스). * $P < 0.05$ (반복 측정 이원 ANOVA). 값은 평균 \pm s.e.m.이다.

도 5a-5e는 HDAC2의 C-말단 영역이 시냅스 기능의 조절에 중요함을 보여준다. 도 5a는 다양한 HDAC2 및 1 키메라 구축물의 다이어그램을 보여준다. #으로 라벨링된 영역은 HDAC1 및 2 사이와 동일하다. 회색으로 채워진 영역은 HDAC2로부터의 것이고, 회색선으로 음영처리된 것은 HDAC1로부터의 것이다. 2방향 화살표는 각각 HDAC1 및 HDAC2에 대해 도 5b-5c에 사용된 qPCR 프라이머 세트에 의한 앰플리콘을 나타낸다. 도 5b는 표시된 구축물로 형질도입된 1차 뉴런으로부터 HDAC1을 검출하는 프라이머를 사용한 정량적 RT-qPCR을 보여준다. 값은 평균 \pm s.e.m.이다. 도 5c는 표시된 구축물로 형질도입된 1차 뉴런으로부터 HDAC2를 검출하는 프라이머를 사용한 정량적 RT-qPCR을 보여준다. 값은 평균 \pm s.e.m.이다. 도 5d는 도 5e에 제시된 조건에 상응하는 대표적인 mEPSC 트레이스를 보여준다. 도 5e는 표시된 구축물 (n=5-12)에 의한 HDAC2-녹다운 뉴런의 구제 후의 mEPSC의 진폭을 보여준다. 채워진 칼럼 및 줄무늬 칼럼은 각각 구제 없음 및 유의한 구제를 나타낸다. ** $P < 0.01$ (던넛 검정).

도 6a-6e는 HDAC2 C-말단 도메인의 외인성 발현이 CK-p25 마우스에서 시냅스 및 인지 기능장애를 개선시킨다는 것을 보여준다. 도 6a는 Neuro2A 세포에서의 HDAC2, 플래그-태그부착된 mCherry, 1C 및 2C에 의한 Sp3 또는 Sin3A의 공동-면역침전의 대표적인 웨스턴 블롯 영상을 보여준다. 화살표는 각각 mCherry-1C, mCherry-2C 및 mCherry의 밴드를 나타낸다. 도 6b는 대조군 (mCherry) 또는 2C 발현 바이러스 (n=5-8)로 형질도입된 1차 뉴런으로부터의 대표적인 트레이스 및 mEPSC의 진폭 및 빈도의 정량화를 보여준다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (양측 웰치 t-검정). 도 6c (상부 패널)는 대조군 (mCherry) 또는 2C 발현 바이러스 (n=3)로 형질도입된 1차 뉴런에서 표적 유전자 및 대조군 유전자의 프로모터에서의 HDAC2의 ChIP-qPCR 결과를 보여준다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (단측 스튜던트 t-검정). 도 6c (하부 패널)는 2C (n=4)로 형질도입된 1차 뉴런에서 표적 유전자 및 대조군 유전자의 정량적 RT-qPCR 결과를 보여준다. 값은 평균 \pm s.e.m.이다. * $P < 0.05$ (홀름-시달법에 의해 교정된 독립표본 t-검정). 도 6d는 대조군 또는 2C 발현 렌티바이러스를 주사한 CK-p25 마우스의 해마 구역 CA1로부터의 fEPSP 기울기를 보여준다. 2xTBS 전에 각각의 슬라이스에 대해 기울기를 기준선에 대해 정규화하였다 (n=5-6개 슬라이스). ** $P < 0.01$ (반복 측정 이원 ANOVA). 도 6e는 맥락적 공포 조건화 24시간 후 (n=10마리의 CK-p25 마우스 각각, n=8 CK 마우스), CK (대조군 마우스) 및 대조군 또는 2C 발현 바이러스를 주사한 CK-p25 마우스의 동결 반응을 보여준다. * $P < 0.05$ (터키 검정). 값은 평균 \pm s.e.m.이다.

도 7a-7d는 가중 유전자 공동-발현 네트워크 분석을 사용한 HDAC2-상호작용 파트너에 대한 스크리닝의 개략도를 보여준다. 도 7a는 전반적인 유전자 발현 패턴에 기초한 높은- 및 낮은-HDAC2 발현 개체의 비편향 클러스터링이 2개의 군을 신뢰성 있게 분리한다는 것을 보여준다. 암회색 및 담회색은 각각 높은 HDAC2 발현 및 낮은 HDAC2 발현을 갖는 개체를 나타낸다. 도 7b는 유전자 계통도 및 공동-발현 모듈을 보여준다. 각각의 색상은 고도로 상관된 발현을 갖는 유전자를 함유하는 별개의 모듈을 나타낸다 (HDAC2-함유 모듈은 회색으로 표시됨). 도 7c는 HDAC2 모듈에서 "리프레서" (x-축) 및 모든 유전자 (y-축)의 발현 사이의 피어슨 상관 계수의 열 지도를 보여준다. 분류는 "리프레서"에 대한 유전자 온톨로지 분석을 기초로 하였다. 도 7d는 HDAC2 및, HDAC2와 상호작용하는 것으로 이전에 보고된 단백질인 TDP2 사이의 결합을 시험하기 위해 수행된, HDAC2 항체를 사용한 마우스 피질로부터의 공동-면역침전의 대표적인 웨스턴 블롯 영상을 보여준다.

도 8a-8d는 HDAC2 및 후보 공동-리프레서의 녹다운 후 녹다운 효율 및 mEPSC 기록을 보여준다. 도 8a는 Hdac2 및 Sp3 shRNA (n=4)의 녹다운 효율을 보여준다. 도 8b는 Sap30 및 Ttrap shRNA (n=2)의 녹다운 효율을 보여준다. 도 8c는 Sap30 또는 Ttrap (TDP2) shRNA (n=6-10)로 형질도입된 뉴런으로부터의 대표적인 트레이스, mEPSC 진폭 및 빈도를 보여준다. n.s.는 유의하지 않음을 의미한다 (양측 스튜던트 t-검정). 도 8d는 대조군 shRNA, Sp3 shRNA 또는 Sp3 shRNA와 조합된 shRNA-저항성 Sp3 (n=3)으로 형질도입된 뉴런에서의 Sp3의 발현 수준을 보여준다. 값은 평균 \pm s.e.m.이다.

도 9a-9h는 HDAC2 또는 Sp3 shRNA로 처리된 뉴런의 RNA-seq 분석을 보여준다. 도 9a-9b는 관련 전사체의 감소를 보여주는, HDAC2에서 대조군, HDAC2 또는 Sp3 shRNA로 처리된 뉴런으로부터의 RNA-seq 트레이스 파일의 스냅샷이다. 데이터는 각각의 조건에 대한 생물학적 중복으로부터의 것이다. 도 9c-9d는 표시된 shRNA로 형질도입

된 뉴런으로부터의 HDAC2, Sp3 및 액틴의 이뮤노블롯을 보여준다. 도 9e는 ChIP 분석을 위해 선택된 "시냅스" 유전자의 목록을 보여준다. 각각의 유전자의 발현은 HDAC2 및 Sp3 녹다운 둘 다에 의해 증가되었고, 뿐만 아니라 CK-p25 마우스에서는 감소되었다. 볼드체인 유전자는 또한 AD 환자에서 감소하였다. 도 9f-9g는 Sp3 또는 HDAC2 shRNA (n=3-7)로 형질도입된 1차 뉴런에서의 표적 유전자의 RT-qPCR 결과를 보여준다. * P < 0.05, ** P < 0.01 (단측 스튜던트 또는 웰치 t-검정). 값은 평균 ± s.e.m.이다. 도 9h는 HDAC2 및 Sp3에 의해 공동-조절되는 유전자와 CK-p25 마우스에서 차등 발현된 유전자를 비교한 행렬을 보여준다. P-값은 피셔 정확 검정에 의해 계산된다. 흑색칸 유전자는 발현에서 변화를 나타내지 않고, 암회색은 발현의 감소를 나타내고, 담회색은 발현의 증가를 나타낸다.

도 10a-c는 해마 및 피질 사이의 Sp3 및 HDAC2의 ChIP 신호의 상관관계를 보여준다. 도 10a는 NeuN+ 핵의 단리에 대한 FACS 플롯을 보여준다. 도 10b-10c는 마우스 해마 (n=3)로부터 분류된 뉴런에서의 그의 표적 유전자 및 대조군 유전자의 프로모터 또는 하류 영역에서의 HDAC2 (도 10b) 및 Sp3 (도 10c)의 ChIP-qPCR 결과를 보여준다. 값은 평균 ± s.e.m.이다. 도 10c는 HDAC2 (좌측 패널), Sp3 (중간 패널) 및 IgG (우측 패널)에 대한 해마 및 피질 사이의 ChIP 신호의 상관관계를 보여준다.

도 11a-11d는 CK-p25 마우스에서의 HDAC2 및 Sp3의 상승된 수준을 보여준다. 도 11a-11b는 대조군 (CK) 및 CK-p25 마우스 (n=3)의 피질 (도 11a)에서의 HDAC2 뿐만 아니라 해마 (도 11b)에서의 HDAC2 및 Sp3 수준의 대표적인 이뮤노블롯 및 정량화를 보여준다. 정량화는 β-튜블린에 대해 정규화한 후에 수행하였다. * P < 0.05, ** P < 0.01 (양측 스튜던트 t-검정). 도 11c는 대조군 및 CK-p25 마우스 (n=3)로부터의 해마 조직으로부터 HDAC2에 의해 공동-IP된 Sp3의 대표적인 이뮤노블롯 및 정량화를 보여준다. IP는 항-HDAC2 항체 (ab12169) 또는 마우스 IgG (음성 대조군)를 사용하여 수행하였다. ** P < 0.01 (단측 스튜던트 t-검정). 값은 평균 ± s.e.m.이다. 도 11d는 CK 및 CK-p25 마우스로부터의 NeuN+ 핵의 단리에 대한 FACS 플롯을 보여준다.

도 12a-12c는 Sp3의 생체내 녹다운을 보여준다. 도 12a는 대조군 shRNA 및 Sp3 shRNA를 주사한 마우스의 해마 CA1에서의 Sp3 및 copGFP (shRNA와 동일한 벡터 내의 독립적인 프로모터에 의해 유도되는 형질도입 마커)의 대표적인 면역조직화학 영상을 보여준다. 도 12b는 해마 CA1의 copGFP-양성 영역에서의 HDAC2, Sp3 및 내부 대조군의 웨스턴 블롯을 보여준다. 도 12c는 대조군 (CK) 마우스 및 대조군 또는 Sp3 shRNA를 주사한 CK-p25 마우스로부터의 해마 슬라이스에서의 웨퍼 측부 경로의 자극 후의 입력-출력 곡선을 보여준다. 값은 평균 ± s.e.m.이다.

도 13a-13c는 HDAC2 C-말단 단편 (2C)의 외인성 발현의 효과를 보여준다. 도 13a는 대조군 shRNA, HDAC2 shRNA, HDAC2+HDAC1 shRNA, mCherry (2C에 대한 대조군) 또는 2C로 형질도입된 MEF의 증식 비를 보여준다. ** P < 0.01 (던넛 검정), n.s.; 유의하지 않음 (단측 스튜던트 t-검정). 도 13b는 대조군 또는 2C로 형질도입된 CK-p25로부터의 해마 슬라이스에서의 웨퍼 측부 경로의 자극 후의 입력-출력 곡선을 보여준다. 도 13c는 단서적 공포 조건화 48시간 후에 측정된 (n=8 또는 10), 대조군 마우스 및 대조군 또는 2C로 형질도입된 CK-p25 마우스에 의한 청각 단서에 대한 동결 반응을 보여준다. * P < 0.05 (터키 검정). 값은 평균 ± s.e.m.이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 히스톤 아세틸화와 같은 후성적 메카니즘은 다양한 생물학적 프로세스를 조절하는 전사 활성의 중요한 조절자이다. 히스톤-변형 효소 중에서, HDAC2는 포유동물 신경계에서 구조적 및 기능적 가소성의 중요한 음성 조절자이다. HDAC2는 수많은 시냅스 가소성 연관 유전자의 프로모터에 국재화하고, 여기서 이는 히스톤 기질의 국한된 탈아세틸화를 촉진한다 (Graff et al., 2012, Nature 483, p.222-226). 이와 일관되게, HDAC2의 상실 또는 HDAC 억제제 처리는 시냅스 유전자 발현, 장기간 시냅스 가소성 및 기억 프로세스를 촉진하는 반면, HDAC2 과다 발현은 반대 효과를 갖는다 (Fischer et al., 2007, Nature 447, p. 178-182; Graff et al., 2014 Cell 156, p. 261-276; Graff et al., 2012, Nature 483, p.222-226; Guan et al., Nature, 2009).

[0013] 그러나, HDAC2를 표적화함으로써 신경변성 질환을 치료하는 것에 대한 주요 장애는 현재 HDAC 억제제 화합물의 특이성이 결여되어 있다는 것이다. 이들 화합물은 데아세틸라제 촉매 도메인을 표적화하고, 이들 중 많은 것은 부류 II, III 및 IV 효소에 비해 부류 I HDAC (HDAC 1, 2, 3 및 8)에 대한 선택성을 나타내지만, 기능적인 HDAC2 특이적 억제제는 아직 보고되어 있지 않다. 이러한 특이성의 결여는 상이한 HDAC 효소의 구별되고 때때로 반대되는 기능을 고려하면 특히 문제가 된다 (Dobbin et al., 2013 Nature Neuroscience, 16, p. 1008-1015; Wang et al., 2013, Cell, 138 p. 1019-1031). 추가의 복잡한 문제는 HDAC 효소가 다수의 상이한 염색질 결합 복합체에 참여할 수 있다는 것이다. 실제로, HDAC2 및 다른 HDAC는 종종 상이한 결합 파트너와 상호작용

용하고, 세포-유형, 발생 단계, 및 임의의 수의 다른 내인성 또는 외인성 신호에 따라 유전자의 별개의 하위세트를 조절한다.

- [0014] HDAC2 복합체를 억제하여 인지 기능을 증진시킬 뿐만 아니라 이용가능한 범-HDAC 억제제의 유해 부작용을 피할 수 있는 HDAC2 억제제의 부류가 본 발명에 따라 발견되었다. 이러한 군의 화합물은 시냅스 가소성-연관 유전자의 프로모터로의 HDAC2의 동원을 담당하는 DNA 결합 단백질(들)과 HDAC2의 상호작용을 특이적으로 파괴할 수 있다. 본원에서는 전사 인자 Sp3의 녹다운이 시냅스 전달을 용이하게 하는 그의 능력에 있어서 HDAC2 녹다운과 유사하다는 것이 입증되었다. 표적 유전자로의 HDAC2의 동원에서의 역할과 일관되게, Sp3의 녹다운은 HDAC2 점유를 감소시킬 수 있고, 시냅스 유전자 프로모터에서 히스톤 아세틸화를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라, 시냅스 유전자 발현을 길항작용할 수 있었다. 또한 HDAC2와 마찬가지로, AD-유사 신경변성의 마우스 모델의 뇌에서, 뿐만 아니라 알츠하이머병을 갖는 환자에서 Sp3 발현이 상승된 것으로 밝혀졌다. 중요한 것으로, HDAC2-Sp3 상호작용을 파괴하는 본 발명의 HDAC2 억제제의 외인성 발현은 알츠하이머-유사 신경변성의 마우스 모델에서 발견되는 시냅스 가소성 및 기억 결함을 상쇄시킬 수 있었다.
- [0015] 따라서, 일부 측면에서, 본 발명은 HDAC2-Sp3 상호작용을 파괴하기 위한 방법 및 조성물이다. HDAC2는 전사 인자 Sp3에 의해 시냅스 가소성 유전자의 프로모터로 동원되는 히스톤 데아세틸라제이다. 본원에 사용된 용어 "HDAC2"는 다양한 종으로부터의 HDAC2, 예를 들어 인간 HDAC2를 포괄한다. 예로서, 인간 HDAC2의 아미노산 서열은 진뱅크(GenBank) 수탁 번호 NP_001518.3 및 유니프록트KB(UniProtKB) 번호 Q92769에 제공된다.
- [0016] HDAC2-특이적 억제제는 포유동물 HDAC 이소형 사이의 활성 부위의 높은 보존으로 인해 문제가 된다. 따라서, 현재 HDAC 억제제는 HDAC2에 대한 특이성이 결여되어 있고 다중 HDAC를 억제하며, 이는 신체 전반의 HDAC 효소의 다양한 기능을 고려하면 유해할 수 있다. 예를 들어, 뉴런 기능의 맥락에서, HDAC2의 상실은 시냅스 유전자 발현 및 기억 프로세스를 촉진하지만, 조혈 동안 HDAC1 및 HDAC2의 상실은 분화 및 혈소판감소증에서의 결함을 유발한다. 현재 이용가능한 범-HDAC 억제제는 세포 증식을 방해하고, 따라서 항암제로서 사용되어 왔다.
- [0017] 본원에 기재된 바와 같이, 시냅스 유전자 발현을 제어하는 HDAC2 복합체 내의 특이적 단백질이 확인되었고, 이에 의해 다른 프로세스에서의 HDAC2 기능은 유지하면서 신경변성 동안 뉴런 유전자의 HDAC2 매개된 억제를 완화시키기 위한 표적이 제공되었다.
- [0018] 따라서, 본 개시내용은 Sp3과의 HDAC2 상호작용을 억제할 수 있는 HDAC2/Sp3 억제제, HDAC2의 염색질에의 국제화를 감소시키거나 억제할 수 있는 HDAC2 국제화 억제제, 또는 HDAC2 결합에 이용가능한 Sp3의 수준을 감소시키는 Sp3 발현 억제제를 포함한 억제 화합물의 유효량을 사용하여, 대상체에서 신경변성 질환을 치료하는 (예를 들어, 신경변성을 완화시키는, 변성의 개시를 지연시키는, 및/또는 변성을 저해하는) 방법을 제공한다.
- [0019] HDAC2 억제제 및 제약 조성물
- [0020] 본 발명에 따라 유용한 화합물은 HDAC2 활성의 특이적 억제제이다. HDAC2 활성의 특이적 억제제는 세포 증식 또는 HDAC1 활성에는 영향을 미치지 않으면서 HDAC2 활성을 간섭하거나 방해하는 화합물이다. HDAC2 활성의 특이적 억제제는 HDAC2/Sp3 억제제, HDAC2 국제화 억제제 및 Sp3 발현 억제제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0021] 본원에 사용된 HDAC2/Sp3 억제제는 HDAC2 및 Sp3 사이의 결합 상호작용을 차단하거나, 저해하거나, 감소시키는 화합물을 지칭한다. HDAC2/Sp3 억제제는 HDAC2에 결합하여 HDAC2가 Sp3과 상호작용하는 것을 방지하고/거나 Sp3에 결합하여 Sp3이 HDAC2에 결합하는 것을 방지하는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 메커니즘을 통해 HDAC2-Sp3 상호작용을 감소시키거나 방해할 수 있다.
- [0022] 본원에 사용된 HDAC2 국제화 억제제는 HDAC2의 염색질로의 동원을 차단하거나, 저해하거나, 감소시키는 화합물을 지칭하며, 이에 따라 시냅스 가소성 유전자의 프로모터로의 HDAC2 동원을 방해한다. HDAC2 국제화 억제제는 HDAC2 및 염색질 동원 인자, 예컨대 Sp3 사이의 결합 상호작용을 차단하거나, 저해하거나, 감소시키는 화합물을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서 HDAC2 국제화 억제제는 HDAC2/Sp3 억제제를 포함한다.
- [0023] 용어 감소, 방해, 억제, 및 저해는 억제제의 부재 하의 전형적인 활성 수준에 비해 활성 수준의 부분적인 또는 완전한 감소를 지칭한다. 예를 들어, 감소는 적어도 20%, 50%, 70%, 85%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 또는 500%, 또는 10-배, 20-배, 50-배, 100-배, 1000-배, 또는 10⁴-배일 수 있다.
- [0024] 일부 경우에, 본원에 기재된 HDAC2/Sp3 억제제는 HDAC2에 결합하여 HDAC2가 Sp3에 결합하는 것을 억제하는 작용제일 수 있다. 다른 경우에, HDAC2/Sp3 억제제는 Sp3에 결합하여 HDAC2 및 Sp3 사이의 상호작용을 방해하는 작

용제일 수 있다. 다른 예에서, HDAC2 억제제는 Sp3과의 HDAC2 상호작용 또는 HDAC2의 발현은 억제하지만, 다른 HDAC 효소가 Sp3과 상호작용하는 것 또는 임의의 다른 HDAC 효소 예컨대 HDAC1, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, HDAC12, HDAC13, HDAC14, HDAC15, HDAC16, HDAC17, 또는 HDAC18의 발현은 유의하게 억제하지 않는 작용제일 수 있다.

- [0025] 예시적인 HDAC2/Sp3 억제제 및 HDAC2 국제화 억제제는 펩티드, 예컨대 항체 소분자 화합물, 및 HDAC2/SP3 상호작용을 파괴할 수 있는 다른 화합물을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0026] 일부 실시양태에서, HDAC2/Sp3 억제제 및/또는 HDAC2 국제화 억제제는 HDAC2 또는 그의 결합 파트너, 예를 들어 SP3에 결합하고 그들 사이의 상호작용을 파괴하는 펩티드 억제제일 수 있다. 특히, HDAC2의 C-말단 부분이 Sp3과의 결합 상호작용을 담당한다는 것이 본원에서 입증된다. 펩티드인 억제제는 Sp3 결합에 수반되는 HDAC2 분자의 부분, HDAC2 결합에 수반되는 Sp3 분자의 부분인 펩티드, 또는 HDAC2 또는 Sp3의 그러한 영역에 결합하여 천연 결합 상호작용을 경쟁적으로 억제 또는 차단할 수 있는 임의의 다른 펩티드, 예컨대 항체 또는 그의 단편 또는 HDAC2 및 Sp3 사이의 결합을 파괴할 또 다른 인자에 결합할 수 있는 임의의 다른 펩티드일 수 있다.
- [0027] 따라서, 일부 실시양태에서, 펩티드는 HDAC2 단백질의 부분을 포함하고, 여기서 펩티드는 Sp3에 특이적으로 결합하고, 전장 HDAC2 단백질과 그의 상호작용을 차단한다. 일부 실시양태에서, HDAC2의 C-말단 단편을 포함하는 펩티드 억제제가 본원에 제공된다. 본원에 언급된 펩티드 억제제는 임의의 공급원으로부터의 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 펩티드 억제제는 영양류 또는 설치류로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 억제제는 마우스 또는 래트로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 억제제는 인간으로부터의 것이다.
- [0028] 일부 실시양태에서, 펩티드 억제제는 서열식별번호: 1과 적어도 80% 동일한 아미노산을 갖는 HDAC2의 C-말단 단편을 포함한다. 서열식별번호: 1에서 아미노산 1 내지 98은 인간 HDAC2 서열의 위치 390-488에 상응한다.
- [0029] 일부 실시양태에서, 펩티드는 서열식별번호: 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드는 서열식별번호: 1의 아미노산 서열에 대해 약 50% 내지 약 99%, 약 60% 내지 약 99%, 약 70% 내지 약 99%, 약 75% 내지 약 99%, 약 80% 내지 약 99%, 약 85% 내지 약 99%, 약 90% 내지 약 99%, 약 95% 내지 약 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 펩티드는 서열식별번호: 1 또는 그의 단편으로부터 1개 이상의 아미노산 치환을 갖고, 따라서 펩티드는 자연 발생 펩티드의 단편이 아니다.
- [0030] 일부 실시양태에서, 펩티드는 약 25-110개 아미노산 길이이다. 일부 실시양태에서, 펩티드는 약 35-110, 약 45-110, 약 55-110, 약 65-110, 약 75-110, 약 85-110, 약 95-110, 또는 약 100-110개 아미노산 길이이다. 일부 실시양태에서, 펩티드는 약 25-100, 약 25-90, 약 25-80, 약 25-70, 약 25-60, 약 25-50, 약 25-40, 또는 약 25-30개 아미노산 길이이다.
- [0031] 일부 실시양태에서, 펩티드는 적어도 1개의 비천연 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드는 1 또는 2개의 비천연 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드는 적어도 1개의 D-아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드는 1 또는 2개의 D-아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드는 1-5개의 D-아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드는 1-10개의 D-아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드는 모든 D-아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드는 적어도 2000 Da의 분자량을 포함한다.
- [0032] 본원에 기재된 펩티드는 L-아미노산, D-아미노산, 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 펩티드 내의 모든 잔기는 L-아미노산이다. 특정 실시양태에서, 펩티드 내의 모든 잔기는 D-아미노산이다. 특정 실시양태에서, 펩티드 내의 잔기는 L-아미노산 및 D-아미노산의 조합이다. 특정 실시양태에서, 펩티드는 D-아미노산인 1 내지 5개의 잔기를 함유한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 서열의 적어도 5%는 D-아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 서열의 적어도 10%는 D-아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 서열의 적어도 20%는 D-아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 서열의 최대 15%는 D-아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 서열의 최대 20%는 D-아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 서열의 최대 50%는 D-아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 서열의 최대 60%는 D-아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 서열의 최대 80%는 D-아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 서열의 최대 90%는 D-아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 서열의 약 5-15%는 D-아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 서열의 약 5-20%는 D-아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 서열의 약 5-50%는 D-아미노산을 포함한다.
- [0033] 일부 실시양태에서, 펩티드는 1, 5, 10, 15, 20, 또는 25개의 아미노산 변화 (예를 들어, 아미노산 치환, 결실,

및/또는 부가)를 갖는 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 아미노산 변화는 1, 5, 10, 15, 20, 또는 25개의 아미노산이 또 다른 아미노산으로 돌연변이된 아미노산 치환이다. 일부 실시양태에서, 아미노산 변화는 부가 또는 결실이고, 여기서 부가 또는 결실은 야생형 서열의 돌연변이 지점에 최대 1, 5, 10, 15, 20, 또는 25개의 잔기를 부가 또는 결실시키는 것을 포함한다. 부가되거나 결실되는 잔기는 연속적 또는 비-연속적 잔기일 수 있다.

- [0034] 특정 실시양태에서, 펩티드는 수용액 중에서 최대 약 30 mg/mL, 약 40 mg/mL, 약 50 mg/mL, 약 60 mg/mL, 약 100 mg/mL, 또는 약 120 mg/mL의 용해도를 갖는다.
- [0035] 특정 실시양태에서, 펩티드는 Sp3에 대한 HDAC2 결합의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 억제를 나타낸다. 특정 실시양태에서, 펩티드는 Sp3에 대한 HDAC2 결합의 적어도 70% 억제를 나타낸다. 특정 실시양태에서, 펩티드는 Sp3에 대한 HDAC2 결합의 적어도 80% 억제를 나타낸다. 억제 활성을 측정하기 위한 다양한 방법이 공지되어 있다. 예를 들어, 억제제 활성은 펩티드 억제제를 발현하는 배양된 세포를 사용하는 염색질 면역침전 실험, 예를 들어, 본원에 기재된 실시예 5를 사용하여 측정할 수 있다. 유전자의 프로모터에서의 HDAC2 풍부화의 감소는 억제제 활성을 나타낸다.
- [0036] HDAC2/Sp3 억제제는 항체 및 그의 단편을 포함하며, 예컨대 항-HDAC2 및/또는 항-Sp3 항체는 본원에 기재된 방법에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-HDAC2 항체는 HDAC2에 특이적으로 결합하고, HDAC2 및 Sp3 사이의 상호작용을 방지한다. 일부 실시양태에서, 항-Sp3 항체는 Sp3에 특이적으로 결합하고, HDAC2 및 Sp3 사이의 상호작용을 방지한다. 다른 실시양태에서, 항체는 HDAC2 및 Sp3 둘 다에 결합할 수 있는 이중기능성 항체이다.
- [0037] 항체 (복수형으로 상호교환가능하게 사용됨)는 이뮤노글로불린 분자의 가변 영역에 위치한 적어도 1개의 항원 인식 부위를 통해 표적, 예컨대 탄수화물, 폴리뉴클레오티드, 지질, 폴리펩티드 등에 특이적 결합을 할 수 있는 이뮤노글로불린 분자이다.
- [0038] 본원에 사용된 용어 "항체"는 무손상 (즉, 전장) 폴리클로날 또는 모노클로날 항체 뿐만 아니라, 그의 항원-결합 단편 (예컨대, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단일 쇠 (scFv), 그의 돌연변이체, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 인간화 항체, 키메라 항체, 디아바디, 선형 항체, 단일 쇠 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체) 및 요구되는 특이성의 항원 인식 부위를 포함하는 이뮤노글로불린 분자의 임의의 다른 변형된 형상, 예컨대 항체의 글리코실화 변이체, 항체의 아미노산 서열 변이체, 및 공유 변형된 항체를 포괄한다. 항체는 임의의 부류, 예컨대 IgD, IgE, IgG, IgA, 또는 IgM (또는 그의 하위부류)의 항체를 포함하며, 항체는 임의의 특정한 부류의 것일 필요는 없다. 그의 중쇄의 불변 도메인의 항체 아미노산 서열에 따라, 이뮤노글로불린은 상이한 부류로 배정될 수 있다. 이뮤노글로불린의 5가지 주요 부류: 즉 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 하위부류 (이소형), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 추가로 분류될 수 있다. 이뮤노글로불린의 상이한 부류에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마, 및 뮤로 불린다. 이뮤노글로불린의 상이한 부류의 서브유닛 구조 및 3차원 형상이 널리 공지되어 있다.
- [0039] 항-HDAC2 항체는 HDAC2에 결합할 수 있는 항체이며, 이는 HDAC2가 Sp3에 결합하는 것을 감소시킬 수 있고/거나 HDAC2 생물학적 활성을 억제할 수 있다. 일부 예에서, 본원에 기재된 방법에 사용되는 항-HDAC2 항체는 HDAC2가 Sp3에 결합하는 것을 적어도 20%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 90%, 적어도 100%, 또는 적어도 2-배, 적어도 5-배, 적어도 10-배, 적어도 20-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배, 또는 적어도 1000-배 감소시킨다.
- [0040] 항-Sp3 항체는 Sp3에 결합할 수 있는 항체이며, 이는 HDAC2가 Sp3에 결합하는 것을 감소시킬 수 있고/거나 Sp3 생물학적 활성을 억제할 수 있다. 일부 예에서, 본원에 기재된 방법에 사용되는 항-Sp3 항체는 HDAC2가 Sp3에 결합하는 것을 적어도 20%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 90%, 적어도 100%, 또는 적어도 2-배, 적어도 5-배, 적어도 10-배, 적어도 20-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배, 또는 적어도 1000-배 감소시킨다.
- [0041] 항-HDAC2 또는 Sp3 항체의 HDAC2 또는 Sp3 (예컨대 인간 HDAC2 또는 Sp3)에 대한 결합 친화도는 임의의 약 100 nM, 약 50 nM, 약 10 nM, 약 1 nM, 약 500 pM, 약 100 pM, 또는 약 50 pM 내지 임의의 약 2 pM 미만일 수 있다. 결합 친화도는 K_d 또는 해리 상수로 표현될 수 있고, 증가된 결합 친화도는 감소된 K_d에 상응한다. HDAC2 또는 Sp3에 대한 항체의 결합 친화도를 결정하는 하나의 방법은 항체의 단일기능성 Fab 단편의 결합 친화도를 측정하는 것에 의한다. 단일기능성 Fab 단편을 수득하기 위해, 항체 (예를 들어, IgG)는 파파인으로 절단되거나 또는 재조합적으로 발현될 수 있다. 항체의 항-HDAC2 또는 Sp3 Fab 단편의 친화도는 표면 플라즈몬 공명 (비아코어3000(BIAcore3000)TM 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 시스템, 비아코어, 인크 (BIAcore, INC), 뉴저지

주 피스카웨이))에 의해 결정할 수 있다. 동역학적 회합률 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off}) (일반적으로 25°C에서 측정됨)을 측정하고; k_{off}/k_{on} 으로서 평형 해리 상수 (K_D) 값을 계산한다.

[0042] 일부 실시양태에서, 항체는 인간 HDAC2 또는 Sp3에 결합하고, 또 다른 포유동물 종으로부터의 HDAC2 또는 Sp3에는 유의하게 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 HDAC2 또는 Sp3 뿐만 아니라 또 다른 포유동물 종으로부터의 1종 이상의 HDAC2 또는 Sp3에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 HDAC2에 결합하고, 다른 단백질, 예컨대 다른 HDAC와는 유의하게 교차반응하지 않는다. 항체에 의해 결합된 에피토프(들)는 연속적 또는 불연속적일 수 있다.

[0043] 본원에 기재된 방법에서 사용되는 항-HDAC2 또는 Sp3 항체는 무린, 래트, 인간, 또는 임의의 다른 기원 (키메라 또는 인간화 항체 포함)일 수 있다. 일부 예에서, 항체는 변형된 불변 영역, 예컨대 면역학적으로 불활성인, 예를 들어, 보체 매개 용해를 촉발하지 않거나, 항체-의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC)을 자극하지 않는 불변 영역을 포함한다. ADCC 활성은 미국 특허 번호 5,500,362에 개시된 방법을 사용하여 평가될 수 있다. 다른 실시양태에서, 불변 영역은 문헌 [Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624]; PCT 출원 번호 PCT/GB99/01441; 및/또는 UK 특허 출원 번호 9809951.8에 기재된 바와 같이 변형된다.

[0044] 본원에 기재된 임의의 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있다. "모노클로날 항체"는 균질 항체 집단을 지칭하고, "폴리클로날 항체"는 불균질 항체 집단을 지칭한다. 이들 두 용어는 항체의 공급원 또는 그것이 제조되는 방식을 제한하지 않는다.

[0045] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 사용되는 항체는 인간화 항체이다. 인간화 항체는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 특이적 키메라 이뮤노글로불린, 이뮤노글로불린 쇄, 또는 그의 항원-결합 단편인 비-인간 (예를 들어, 무린) 항체의 형태를 지칭한다. 대개의 경우, 인간화 항체는 수용자의 상보성 결정 영역 (CDR)으로부터의 잔기가 목적하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 마우스, 래트, 또는 토끼와 같은 비-인간 종 (공여자 항체)의 CDR로부터의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에서, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 유입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서 발견되지 않지만 항체 성능을 추가로 정밀화하고 최적화하기 위해 포함된 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개 및 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-인간 이뮤노글로불린의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 이뮤노글로불린 컨센서스 서열의 것이다. 인간화 항체는 최적으로는 또한, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 것인 이뮤노글로불린 불변 영역 또는 도메인 (Fc)의 적어도 일부를 포함할 것이다. 항체는 W099/58572에 기재된 바와 같이 변형된 Fc 영역을 가질 수 있다. 다른 형태의 인간화 항체는 원래 항체와 관련하여 변경된 1개 이상의 CDR (1, 2, 3, 4, 5, 6개)을 갖고, 이는 또한 원래 항체로부터의 1개 이상의 CDR"로부터 유래된" 1개 이상의 CDR로 언급된다. 인간화 항체는 또한 친화도 성숙을 수반할 수 있다.

[0046] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 항체로부터의 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 포함할 수 있는 키메라 항체이다. 키메라 항체는 제1 종으로부터의 가변 영역 또는 그의 일부 및 제2 종으로부터의 불변 영역을 갖는 항체를 지칭한다. 전형적으로, 이들 키메라 항체에서, 경쇄 및 중쇄 둘 다의 가변 영역은 포유동물의 하나의 종 (예를 들어, 비-인간 포유동물, 예컨대 마우스, 토끼, 및 래트)으로부터 유래된 항체의 가변 영역을 모방하고, 한편 불변 부분은 또 다른 포유동물, 예컨대 인간으로부터 유래된 항체에서의 서열과 상동성이다. 일부 실시양태에서, 가변 영역 및/또는 불변 영역에서 아미노산 변형이 이루어질 수 있다.

[0047] 일부 예에서, 본원에 개시된 항체는 표적 항원, 예컨대 인간 HDAC2 또는 Sp3에 특이적으로 결합한다. (본원에서 상호교환가능하게 사용되는) 표적 또는 에피토프에 "특이적으로 결합하는" 항체는 관련 기술분야에서 널리 이해되는 용어이고, 이러한 특이적 결합을 결정하는 방법도 또한 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 분자는 그것이 대안적인 표적에 비해 특정한 표적 항원과 보다 빈번하게, 보다 신속하게, 보다 긴 지속시간으로 및/또는 보다 큰 친화도로 반응하거나 회합한다면 "특이적 결합"을 나타내는 것으로 언급된다. 항체는 그것이 다른 물질에 결합하는 것에 비해 보다 큰 친화도, 결합력으로, 보다 용이하게, 및/또는 보다 긴 지속시간으로 결합한다면 표적 항원에 "특이적으로 결합한다". 예를 들어, HDAC2 또는 Sp3 에피토프에 특이적으로 (또는 우선적으로) 결합하는 항체는 다른 HDAC2 또는 Sp3 에피토프 또는 비-HDAC2 또는 Sp3 에피토프에 결합하는 것보다 더 큰 친화도, 결합력으로, 보다 용이하게, 및/또는 보다 긴 지속시간으로 이러한 HDAC2 또는 Sp3 에피토프에 결합하는 항체이다. 이러한 정의를 읽음으로써, 예를 들어 제1 표적 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 제2 표적 항원에 특이적으로 또는 우선적으로 결합할 수 있거나 또는 결합하지 않을 수 있다는 것이 또한 이해된다. 따라

서, "특이적 결합" 또는 "우선적 결합"은 배타적 결합을 (포함할 수 있지만) 반드시 요구하지는 않는다. 일반적으로, 반드시 그러한 것은 아니지만, 결합에 대한 언급은 우선적 결합을 의미한다.

- [0048] HDAC2가 Sp3에 결합하는 것을 감소시킬 수 있는 항체는 HDAC2 또는 Sp3 (예를 들어, 인간 HDAC2 또는 Sp3)에 결합하고, HDAC2 생물학적 활성 및/또는 유전자의 프로모터로의 HDAC2의 Sp3 매개된 동원을 억제하는 항체일 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 HDAC2 내지 Sp3의 결합을 감소시킬 수 있는 항체 (예를 들어, 항-HDAC2 또는 Sp3 항체)는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 방법에 따라 HDAC2 또는 Sp3에 결합하는 항체 또는 그의 단편의 능력 및 기능은 공지된 결합 또는 활성 검정, 예컨대 본원에 기재된 것을 사용하여 검정될 수 있다. 대안적으로, 경쟁 검정은 항체가 다른 항체와 동일한 에피토프에 결합하는지 결정하기 위해 동일한 항원에 결합하는 것으로 공지된 다른 항체를 사용하여 수행될 수 있다. 경쟁 검정은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다.
- [0050] HDAC2/Sp3 억제제는 또한 HDAC2가 Sp3에 결합하는 것을 직접 억제하는 소분자 억제제, 또는 결합 상호작용을 억제하는 다른 작용제를 포함한다.
- [0051] 본 발명의 HDAC2/Sp3 억제 화합물은 하기 특징 중 어느 하나 이상을 나타낼 수 있다: (a) HDAC2가 Sp3에 결합하는 것을 감소시킴; (b) 신경변성 질환의 임의의 측면을 예방, 개선 또는 치료함; (c) 시냅스 기능장애를 감소시킴; (d) 인지 기능장애를 감소시킴; (e) 히스톤 탈아세틸화를 감소시킴; (f) 유전자의 프로모터로의 HDAC2의 동원을 감소시킴. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 제공된 지침을 사용하여 이러한 억제 화합물을 제조할 수 있다.
- [0052] 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 HDAC2 억제 화합물은 약 100 내지 20,000 달톤, 500 내지 15,000 달톤, 또는 1000 내지 10,000 달톤 중 임의의 분자량을 가질 수 있는 소분자이다. 소분자 라이브러리는 상업적으로 입수 가능하다. 소분자는 흡입, 복강내, 정맥내, 근육내, 피하, 척수강내, 뇌실내, 경구, 경장, 비경구, 비강내, 또는 피부를 포함한 관련 기술분야에 공지된 임의의 수단을 사용하여 투여될 수 있다. 일반적으로, 본 발명에 따른 HDAC2 억제제가 소분자인 경우, 이는 환자의 체중의 0.1 내지 300 mg/kg의 비율로 1 내지 3회 또는 그 초과로 용량으로 나누어져서 투여될 것이다. 정상 체중의 성인 환자의 경우, 용량당 1 mg 내지 5 g 범위의 용량이 투여될 수 있다.
- [0053] 상기 언급된 소분자는 화합물 라이브러리로부터 수득될 수 있다. 라이브러리는 공간상 위치지정이 가능한 병렬 고체 상 또는 용액 상 라이브러리일 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Zuckermann et al. J. Med. Chem. 37, 2678-2685, 1994; 및 Lam Anticancer Drug Des. 12:145, 1997]을 참조한다. 화합물 라이브러리의 합성 방법은 관련 기술분야, 예를 들어, 문헌 [DeWitt et al. PNAS USA 90:6909, 1993; Erb et al. PNAS USA 91:11422, 1994; Zuckermann et al. J. Med. Chem. 37:2678, 1994; Cho et al. Science 261:1303, 1993; Carrell et al. Angew Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059, 1994; Carell et al. Angew Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061, 1994; 및 Gallop et al. J. Med. Chem. 37:1233, 1994]에 널리 공지되어 있다. 화합물 라이브러리는 용액 중에 (예를 들어, Houghten Biotechniques 13:412-421, 1992), 또는 비드 (Lam Nature 354:82-84, 1991), 칩 (Fodor Nature 364:555-556, 1993), 박테리아 (미국 특허 번호 5,223,409), 포자 (미국 특허 번호 5,223,409), 플라스미드 (Cull et al. PNAS USA 89:1865-1869, 1992), 또는 파지 (Scott and Smith Science 249:386-390, 1990; Devlin Science 249:404-406, 1990; Cwirla et al. PNAS USA 87:6378-6382, 1990; Felici J. Mol. Biol. 222:301-310, 1991; 및 미국 특허 번호 5,223,409) 상에 존재할 수 있다.
- [0054] 대안적으로, 본원에 기재된 억제제는 Sp3 발현을 감소시키는 Sp3 발현 억제제, 예를 들어 모르폴리노 올리고뉴클레오티드, 소형 간섭 RNA (siRNA 또는 RNAi), 안티센스 핵산, 또는 리보자임일 수 있다. RNA 간섭 (RNAi)은 dsRNA가 메신저 RNA의 상동성 서열-특이적 분해를 지시하는 프로세스이다. 포유동물 세포에서, RNAi는 숙주 인터페론 반응을 활성화시키지 않으면서 소형 간섭 RNA (siRNA)의 21-뉴클레오티드 듀플렉스에 의해 촉발될 수 있다. 본원에 개시된 방법에 사용되는 dsRNA는 siRNA (2개의 개별 및 상보적 RNA 쇄를 함유함) 또는 짧은 헤어핀 RNA (즉, 촘촘한 헤어핀 구조를 형성하는 RNA 쇄)일 수 있고, 이들 둘 다는 표적 유전자의 서열에 기초하여 설계될 수 있다.
- [0055] 임의로, 상기 기재된 바와 같이 본원에 기재된 방법에 사용되는 핵산 분자 (예를 들어, 안티센스 핵산, 소형 간섭 RNA, 또는 마이크로RNA)는 비-자연 발생 핵염기, 당, 또는 공유 뉴클레오타이드간 연결 (백본)을 함유한다. 이러한 변형된 올리고뉴클레오티드는 바람직한 특성, 예컨대 증진된 세포 흡수, 표적 핵산에 대한 개선된 친화도, 및 증가된 생체내 안정성을 부여한다.

- [0056] 한 예에서, 핵산은 인 원자를 보유하는 것 (예를 들어, 미국 특허 3,687,808; 4,469,863; 5,321,131; 5,399,676; 및 5,625,050 참조) 및 인 원자를 갖지 않는 것 (예를 들어, 미국 특허 5,034,506; 5,166,315; 및 5,792,608 참조)을 포함하여 변형된 백본을 갖는다. 인-함유 변형된 백본의 예는 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포도티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬-포스포트리에스테르, 3'-알킬렌 포스포네이트, 5'-알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 포함한 메틸 및 다른 알킬 포스포네이트, 포스피네이트, 3'-아미노 포스포르아미데이트 및 아미노알킬포스포르아미데이트를 포함한 포스포르아미데이트, 티오노포스포르아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 셀레노포스페이트 및 3'-5' 연결 또는 2'-5' 연결을 갖는 보라노포스페이트를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 백본은 또한 역극성을 갖는 것, 즉, 3'에서 3', 5'에서 5' 또는 2'에서 2' 연결을 포함한다. 인 원자를 포함하지 않는 변형된 백본은, 단쇄 알킬 또는 시클로알킬 뉴클레오시드간 연결, 혼합된 헤테로원자 및 알킬 또는 시클로알킬 뉴클레오시드간 연결, 또는 1개 이상의 단쇄 헤테로원자 또는 헤테로시클릭 뉴클레오시드간 연결에 의해 형성된다. 이러한 백본은 모르폴리노 연결 (부분적으로 뉴클레오시드의 당 부분으로부터 형성됨)을 갖는 것; 실록산 백본; 술폰, 술폰사이드 및 술폰 백본; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 리보아세틸 백본; 알켄 함유 백본; 술폰사이드 백본; 메틸렌이미노 및 메틸렌히드라지노 백본; 술폰네이트 및 술폰아미드 백본; 아미드 백본; 및 혼합된 N, O, S 및 CH₂ 성분 부분을 갖는 다른 것을 포함한다.
- [0057] 또 다른 예에서, 개시된 방법에 사용되는 핵산은 1개 이상의 치환된 당 모이어티를 포함한다. 이러한 치환된 당 모이어티는 그의 2' 위치에 하기 기 중 1개를 포함할 수 있다: OH; F; O-알킬, S-알킬, N-알킬, O-알케닐, S-알케닐, N-알케닐; O-알키닐, S-알키닐, N-알키닐, 및 O-알킬-O-알킬. 이들 기에서, 알킬, 알케닐 및 알키닐은 치환되거나 비치환된 C₁ 내지 C₁₀ 알킬 또는 C₂ 내지 C₁₀ 알케닐 및 알키닐일 수 있다. 이들은 또한 그의 2' 위치에 헤테로시클로알킬, 헤테로시클로알킬아릴, 아미노알킬아미노, 폴리알킬아미노, 치환된 실릴, RNA 절단기, 리포터 기, 삽입제, 올리고뉴클레오티드의 약동학적 특성을 개선시키기 위한 기, 또는 올리고뉴클레오티드의 약역학적 특성을 개선시키기 위한 기를 포함할 수 있다. 바람직한 치환된 당 모이어티는 2'-메톡시에톡시, 2'-디메틸아미노옥시에톡시, 및 2'-디메틸아미노옥시에탄올을 갖는 것을 포함한다. 문헌 [Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504]을 참조한다.
- [0058] 또 다른 예에서, 핵산은 1개 이상의 변형된 천연 핵염기 (즉, 아데닌, 구아닌, 티민, 시토신 및 우라실)를 포함한다. 변형된 핵염기는 미국 특허 3,687,808, 문헌 [The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, Englisch et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613, 및 Sanghvi, Y. S., Chapter 15, *Antisense Research and Applications*, pages 289-302, CRC Press, 1993]에 기재된 것을 포함한다. 특정의 이들 핵염기는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 그의 표적 핵산에 대한 결합 친화도를 증가시키는데 특히 유용하다. 이들은 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린 (예를 들어, 2-아미노프로필-아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신)을 포함한다. 문헌 [Sanghvi, et al., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278]을 참조한다.
- [0059] 임의의 핵산은 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 합성될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Caruthers et al., 1992, *Methods in Enzymology* 211, 3-19, Wincott et al., 1995, *Nucleic Acids Res.* 23, 2677-2684, Wincott et al., 1997, *Methods Mol. Bio.* 74, 59, Brennan et al., 1998, *Biotechnol Bioeng.*, 61, 33-45], 및 Brennan, 미국 특허 번호 6,001,311을 참조한다. 이는 또한 발현 벡터로부터 전사될 수 있고, 표준 기술을 사용하여 단리될 수 있다.
- [0060] 본원에 기재된 억제제는 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 확인되거나 특징화될 수 있고, 이에 의해 Sp3에 대한 HDAC2 결합의 감소, 개선 또는 중화가 검출되고/거나 측정된다. 예를 들어, ELISA-유형 검정은 Sp3에 대한 HDAC2 결합의 정성적 또는 정량적 측정에 적합할 수 있다.
- [0061] HDAC2/Sp3 억제제는 또한 후보 작용제를 HDAC2와 함께 인큐베이션하고, 하기 특징 중 임의의 하나 이상을 모니터링함으로써 확인할 수 있다: (a) HDAC2에 결합함; (b) HDAC2가 Sp3에 결합하는 것을 감소시킴; (c) 신경변성 질환의 임의의 측면을 예방, 개선 또는 치료함; (d) 인지 기능을 보존함; (e) 히스톤 아세틸화를 보존함; (f) 유전자의 프로모터로의 HDAC2 동원을 감소시킴; (g) HDAC2 합성, 생산 또는 방출을 억제함 (감소시킴).
- [0062] 일부 실시양태에서, HDAC2/Sp3 억제제는 후보 작용제를 HDAC2와 함께 인큐베이션하고, 결합 및 동반되는 Sp3에 대한 결합의 감소 또는 중화를 모니터링하는 것에 의해 확인된다. 결합 검정은 정제된 HDAC2 폴리펩티드(들), 또는 HDAC2 폴리펩티드(들)를 자연 발현하거나 발현하도록 형질감염된 세포를 사용하여 수행할 수 있다. 한 실

시양태에서, 결합 검정은 HDAC2 결합에 대해 공지된 HDAC2 억제제와 경쟁하는 후보 항체의 능력을 평가하는 경쟁적 결합 검정이다. 검정은 ELISA 포맷을 포함한 다양한 포맷으로 수행될 수 있다. 다른 실시양태에서, HDAC2 억제제는 후보 작용제를 HDAC2와 함께 인큐베이션하고, 동반되는 HDAC2/Sp3 복합체 형성의 억제력을 모니터링함으로써 확인된다. 초기 확인에 이어, 후보 HDAC2 억제제의 활성은 표적화된 생물학적 활성을 시험하는 것으로 공지된 생물검정에 의해 추가로 확정되고 정밀화될 수 있다. 대안적으로, 생물검정은 후보를 직접적으로 스크리닝하는데 사용될 수 있다.

- [0063] 하기 제공된 실시예는 후보 HDAC2/Sp3 억제제를 스크리닝하는데 사용될 수 있는 다수의 검정을 제공한다. 생물검정은, HDAC2 억제제의 존재 하에, 인지 기능 및/또는 유전자 프로모터에서의 히스톤 아세틸화의 보존을 검정하는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 또한, Sp3 발현을 직접 측정하기 위해 실시간 PCR (RT-PCR)이 사용될 수 있다.
- [0064] 추가로, 적합한 HDAC2 억제제는 조합 화합물 라이브러리로부터 관련 기술분야에 공지되고/거나 본원에 기재된 임의의 검정 방법을 이용하여 스크리닝될 수 있다.
- [0065] 제약 조성물
- [0066] 본원에 기재된 HDAC2 억제제 중 1종 이상은 완충제를 포함한 제약상 허용되는 담체 (부형제)와 혼합되어, HDAC2가 Sp3에 결합하는 것을 감소시키는데 사용하기 위한 제약 조성물을 형성할 수 있다. "허용되는"은 담체가 조성물의 활성 성분과 상용성이고 (및 바람직하게는, 활성 성분을 안정화시킬 수 있고) 치료될 대상체에게 유해하지 않아야 한다는 것을 의미한다. 본원에 사용된 제약상 허용되는 담체는 물을 포함하지 않고, 물과 같은 자연 발생 담체를 초과하는 것이다. 일부 실시양태에서, 제약상 허용되는 담체는 제제화된 완충제, 나노담체, IV 용액 등이다.
- [0067] 완충제를 포함한 제약상 허용되는 부형제 (담체)는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover]을 참조한다. 예를 들어, 본원에 기재된 제약 조성물은 1종 이상의 HDAC2/Sp3 억제제, 예컨대 표적 항원의 상이한 에피토프를 인식하는 펩티드 억제제를 함유한다.
- [0068] 본 발명의 방법에 사용되는 제약 조성물은 동결건조 제제 또는 수용액 형태의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함할 수 있다 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover). 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기 산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 항산화제; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트란을 포함한 다른 탄수화물; 킬레이트화제 예컨대 EDTA; 당 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비-이온성 계면활성제 예컨대 트윈(TWEEN)TM (폴리소르베이트), 플루로닉스(PLURONICS)TM (폴록사머) 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함할 수 있다. 제약상 허용되는 부형제는 본원에 추가로 기재되어 있다.
- [0069] 일부 예에서, 본원에 기재된 제약 조성물은 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해, 예컨대 문헌 [Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980)]; 및 미국 특허 번호 4,485,045 및 4,544,545에 기재된 바와 같이 제조될 수 있는 HDAC2 Sp3 억제제를 함유하는 리포솜을 포함한다. 증진된 순환 시간을 갖는 리포솜은 미국 특허 번호 5,013,556에 개시되어 있다. 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화된 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 사용하여 역상 증발 방법에 의해 생성될 수 있다. 리포솜은 목적하는 직경을 갖는 리포솜을 수득하기 위해 규정된 세공 크기의 필터를 통해 압출된다.
- [0070] 활성 성분 (예를 들어, HDAC2 억제제)은 또한 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로구체, 마이크로에멀전, 나

노-입자 및 나노캡슐) 내에 또는 마이크로에멀전 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌 [Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)]을 참조한다.

[0071] 다른 예에서, 본원에 기재된 제약 조성물은 지속-방출 포맷으로 제제화될 수 있다. 지속-방출 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하며, 매트릭스는 성형품, 예를 들어, 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 지속-방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산 및 7 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 루프로논 데포(LUPRON DEPOT)TM (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능한 마이크로구체), 수크로스 아세테이트 이소부티레이트, 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다.

[0072] 생체내 투여에 사용되는 제약 조성물은 멸균되어야 한다. 이는, 예를 들어 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다. 치료 항체 조성물은 일반적으로 멸균 접근 포트를 갖는 용기, 예를 들어, 피하 주사 바늘에 의해 관통될 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알 내에 놓인다.

[0073] 본원에 기재된 제약 조성물은 경구, 비경구 또는 직장 투여, 또는 흡입 또는 취입에 의한 투여를 위한 단위 투여 형태 예컨대 정제, 환제, 캡슐, 분말, 과립, 용액 또는 현탁액, 또는 좌제로 존재할 수 있다.

[0074] 정제와 같은 고체 조성물을 제조하기 위해, 주요 활성 성분을 제약 담체, 예를 들어 통상적인 정제화 성분, 예컨대 옥수수 전분, 락토스, 수크로스, 소르비톨, 활석, 스테아르산, 스테아르산마그네슘, 인산이칼슘 또는 검, 및 다른 제약 희석제, 예를 들어 물과 혼합하여 본 발명의 화합물 또는 그의 비-독성 제약상 허용되는 염의 균질 혼합물을 함유하는 고체 예비제제 조성물을 형성할 수 있다. 이들 예비제제 조성물을 균질이라고 지칭하는 경우, 이는 활성 성분이 조성물 전체에서 균등하게 분산되어 조성물이 동등하게 효과적인 단위 투여 형태, 예컨대 정제, 환제 및 캡슐로 용이하게 세분될 수 있음을 의미한다. 이러한 고체 예비제제 조성물은 이어서, 본 발명의 활성 성분 0.1 내지 약 500 mg을 함유하는 상기 기재된 유형의 단위 투여 형태로 세분된다. 신규 조성물의 정제 또는 환제는 코팅되거나, 또는 달리 지속 작용 이점을 제공하는 투여 형태를 제공하도록 배합될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 환제는 내부 투여 성분 및 외부 투여 성분을 포함할 수 있고, 후자는 전자의 외피 형태이다. 2개의 성분은 위에서의 분해에 저항하는 역할을 하고 내부 성분이 무손상 상태로 십이지장을 통과하게 하거나 방출이 지연되게 하는 장용 층에 의해 분리될 수 있다. 다양한 물질이 이러한 장용 층 또는 코팅에 사용될 수 있고, 이러한 물질은 수많은 중합체 산 및 중합체 산과 셀락, 세틸 알콜 및 셀룰로스 아세테이트와 같은 이러한 물질의 혼합물을 포함한다.

[0075] 적합한 표면-활성제는 특히 비-이온성 작용제, 예컨대 폴리옥시에틸렌소르비탄 (예를 들어, 트윈TM 20, 40, 60, 80 또는 85) 및 다른 소르비탄 (예를 들어, 스펠(SPAN)TM 20, 40, 60, 80 또는 85)을 포함한다. 표면-활성제를 함유하는 조성물은 편리하게는 0.05 내지 5% 표면-활성제를 포함할 것이고, 이는 0.1 내지 2.5%일 수 있다. 필요한 경우에 다른 성분, 예를 들어 만니톨 또는 다른 제약상 허용되는 비히클이 첨가될 수 있다는 것이 인지될 것이다.

[0076] 적합한 에멀전은 상업적으로 입수가 가능한 지방 에멀전, 예컨대 인트라립이드(INTRALIPID)TM, 리포신(LIPOSYN)TM, 인포뉴트롤(INFONUTROL)TM, 리포펀딘(LIPOFUNDIN)TM 및 리피피산(LIPIPHYSAN)TM을 사용하여 제조될 수 있다. 활성 성분은 사전-혼합된 에멀전 조성물 중에 용해될 수 있거나, 또는 대안적으로 이는 오일 (예를 들어, 대두 오일, 홍화 오일, 목화씨 오일, 참깨 오일, 옥수수 오일 또는 아몬드 오일) 및 인지질 (예를 들어, 난 인지질, 대두 인지질 또는 대두 레시틴) 및 물과 혼합 시 형성되는 에멀전 중에 용해될 수 있다. 에멀전의 장성을 조정하기 위해 다른 성분, 예를 들어 글리세롤 또는 글루코스가 첨가될 수 있음이 인지될 것이다. 적합한 에멀전은 전형적으로 최대 20%의 오일, 예를 들어 5 내지 20%의 오일을 함유할 것이다. 지방 에멀전은 0.1 내지 1.0 μm, 특히 0.1 내지 0.5 μm의 지방 액적을 포함할 수 있고, 5.5 내지 8.0 범위의 pH를 갖는다.

[0077] 에멀전 조성물은 HDAC2 억제제를 인트라립이드TM (지질 에멀전) 또는 그의 성분 (대두 오일, 난 인지질, 글리세롤 및 물)과 혼합한 것에 의해 제조된 것일 수 있다.

[0078] 흡입 또는 취입을 위한 제약 조성물은 제약상 허용되는 수성 또는 유기 용매, 또는 그의 혼합물 중의 용액 및 현탁액, 및 분말을 포함한다. 액체 또는 고체 조성물은 상기 제시된 바와 같은 적합한 제약상 허용되는 부형제를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 국부 또는 전신 효과를 위해 구강 또는 비강 호흡 경로로 투여된다.

- [0079] 바람직하게 멸균된 제약상 허용되는 용매 중의 조성물은 기체의 사용에 의해 분무될 수 있다. 분무된 용액은 분무 장치로부터 직접 호흡될 수 있거나, 또는 분무 장치는 페이스 마스크, 텐트 또는 간헐적 양압 호흡 기계에 부착될 수 있다. 용액, 현탁액 또는 분말 조성물은 제제를 적절한 방식으로 전달하는 장치로부터, 바람직하게는 경구로 또는 비강으로 투여될 수 있다.
- [0080] 신경변성 질환의 치료를 위한 HDAC2 억제제의 용도
- [0081] 본원에 개시된 방법을 실시하기 위해, 상기 기재된 제약 조성물의 유효량을 적합한 경로 (예를 들어, 정맥내 투여)를 통해 치료를 필요로 하는 대상체 (예를 들어, 인간)에게 투여할 수 있다.
- [0082] 본원에 기재된 방법에 의해 치료될 대상체는 신경변성 질환을 갖거나, 갖는 것으로 의심되거나, 또는 위험이 있는 인간 환자일 수 있다. 신경변성 질환의 예는 MCI (경도 인지 장애), 외상후 스트레스 장애 (PTSD), 알츠하이머병, 기억 상실, 알츠하이머병과 연관된 주의력 결핍 증후군, 알츠하이머병과 연관된 신경변성, 혼합형 혈관성 기원의 치매, 퇴행성 기원의 치매, 초로기 치매, 노인성 치매, 파킨슨병과 연관된 치매, 혈관성 치매, 진행성 핵상 마비 또는 피질 기저 변성을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0083] 본원에 기재된 방법에 의해 치료될 대상체는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간일 수 있다. 포유동물은 가축, 스포츠 동물, 애완동물, 영장류, 말, 개, 고양이, 마우스 및 래트를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 치료를 필요로 하는 인간 대상체는 신경변성 질환 (예를 들어, MCI)을 갖거나, 그의 위험이 있거나, 또는 이를 갖는 것으로 의심되는 인간 환자일 수 있다. 신경변성 질환을 갖는 대상체는 상용 의학 검사, 예를 들어, 임상 검사, 의료 병력, 실험실 시험, MRI 스캔, CT 스캔, 또는 인지 평가에 의해 확인될 수 있다. 신경변성 질환을 갖는 것으로 의심되는 대상체는 장애의 1종 이상의 증상, 예를 들어, 기억 상실, 혼란, 우울증, 단기 기억 변화, 및/또는 언어, 소통, 집중 및 추론의 장애를 나타낼 수 있다. 신경변성 질환의 위험이 있는 대상체는 그러한 장애에 대한 위험 인자 중 1개 이상을 갖는 대상체일 수 있다. 예를 들어, 신경변성 질환과 연관된 위험 인자는 (a) 연령, (b) 가족력, (c) 유전, (d) 두부 손상, 및 (e) 심장 질환을 포함한다.
- [0084] 본원에 사용된 "유효량"은 단독으로 또는 1종 이상의 다른 활성 작용제와 조합되어 대상체에 대한 치료 효과를 부여하는데 요구되는 각각의 활성제의 양을 지칭한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 인식되는 바와 같이, 유효량은 치료되는 특정한 상태, 상태의 중증도, 연령, 신체 상태, 크기, 성별 및 체중을 포함한 개별 환자 파라미터, 치료 지속기간, 공동 요법 (존재하는 경우)의 성질, 구체적 투여 경로, 및 건강 진료의 지식 및 경험 내의 기타 인자에 따라 달라진다. 이들 인자는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있고, 상용 실험을 사용하여 다루어질 수 있다. 개별 성분 또는 그의 조합의 최대 용량, 즉 타당한 의학적 판단에 따른 가장 높은 안전한 용량이 사용되는 것이 일반적으로 바람직하다. 그러나, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 환자가 의학적 이유, 심리적 이유 또는 실질적으로 임의의 다른 이유로 보다 낮은 용량 또는 허용되는 용량을 요구할 수 있음을 이해할 것이다.
- [0085] 실험적 고려사항, 예컨대 반감기는 일반적으로 투여량의 결정에 기여할 것이다. 예를 들어, 항체의 반감기를 연장시키고 항체가 숙주의 면역계에 의해 공격받는 것을 방지하기 위해 인간 면역계에 상용성인 항체, 예컨대 인간화 항체 또는 완전 인간 항체가 사용될 수 있다. 투여 빈도는 요법의 과정에 걸쳐 결정되고 조정될 수 있으며, 반드시 그렇지는 않지만 일반적으로, 신경변성 질환의 치료 및/또는 저해 및/또는 개선 및/또는 지연에 기초한다. 대안적으로, HDAC2 억제제의 지속적인 연속 방출 제제가 적절할 수 있다. 지속 방출을 달성하기 위한 다양한 제제 및 장치는 관련 기술분야에 공지되어 있다.
- [0086] 한 예에서, 본원에 기재된 바와 같은 HDAC2 억제제에 대한 투여량은 HDAC2 억제제의 1회 이상의 투여(들)가 주어진 개체에서 실험적으로 결정될 수 있다. 개체에게 억제제의 증분 투여량이 주어진다. 억제제의 효능을 평가하기 위해, 신경변성 질환의 지표 (예컨대 인지 기능)를 따를 수 있다.
- [0087] 일반적으로, 본원에 기재된 펩티드 억제제 중 임의의 것의 투여의 경우, 초기 후보 투여량은 약 2 mg/kg일 수 있다. 본 개시내용의 목적상, 전형적인 1일 투여량은 상기 언급된 인자에 따라, 약 0.1 µg/kg 내지 3 µg/kg 내지 30 µg/kg 내지 300 µg/kg 내지 3 mg/kg, 내지 30 mg/kg 내지 100 mg/kg 또는 그 초과 중 임의의 것의 범위일 수 있다. 수일 또는 그 초과에 걸친 반복 투여의 경우에, 상태에 따라, 치료는 증상의 목적하는 저해가 발생할 때까지 또는 충분한 치료 수준이 달성되어 신경변성 질환 또는 그의 증상이 완화될 때까지 지속된다. 예시적인 투여 요법은 항체를 초기 용량 약 2 mg/kg으로 투여한 후에, 매주 유지 용량 약 1 mg/kg으로 투여하거나, 또는 격주로 유지 용량 약 1 mg/kg으로 투여하는 것을 포함한다. 그러나, 진료의가 달성하기 원하는 약동학적 감쇠의 패턴에 따라, 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 예를 들어, 1주 1-4회 투여가 고려된다. 일부

실시양태에서, 약 3 µg/mg 내지 약 2 mg/kg (예컨대 약 3 µg/mg, 약 10 µg/mg, 약 30 µg/mg, 약 100 µg/mg, 약 300 µg/mg, 약 1 mg/kg, 및 약 2 mg/kg) 범위의 투여가 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여 빈도는 1주마다, 2주마다, 4주마다, 5주마다, 6주마다, 7주마다, 8주마다, 9주마다, 또는 10주마다 1회; 또는 1개월마다, 2개월마다, 또는 3개월마다, 또는 그 초과마다 1회이다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링된다. 투여 요법 (사용된 펩티드 억제제 포함)은 시간 경과에 따라 달라질 수 있다.

[0088] HDAC2 억제제가 펩티드 억제제가 아닌 경우, 이는 환자의 체중의 약 0.1 내지 300 mg/kg의 비율로 1 내지 3회 용량으로 나누어, 또는 본원에 개시된 바와 같이 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 정상 체중의 성인 환자의 경우, 약 0.3 내지 5.00 mg/kg 범위의 용량이 투여될 수 있다. 특정한 투여 요법, 즉, 용량, 타이밍 및 반복은 특정한 개체 및 그러한 개체의 의료 병력, 뿐만 아니라 개별 작용제의 특성 (예컨대 작용제의 반감기, 및 관련 기술분야에 널리 공지된 다른 고려사항)에 좌우될 것이다.

[0089] 본 개시내용의 목적상, HDAC2 억제제의 적절한 투여량은 사용되는 구체적 HDAC2 억제제(들) (또는 그의 조성물), 신경변성 질환의 유형 및 중증도, 억제제가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 억제제에 대한 반응, 및 담당 의사의 판단에 좌우될 것이다. 전형적으로 임상적 목적하는 결과를 달성하는 투여량에 도달할 때까지 HDAC2 억제제, 예컨대 HDAC2의 C-말단을 포함하는 펩티드 억제제를 투여할 것이다. HDAC2 억제제의 투여는 예를 들어, 수용자의 생리학적 상태, 투여의 목적이 치료적인지 예방적인지 여부, 및 숙련된 진료의에게 공지된 다른 인자에 따라 연속적 또는 간헐적일 수 있다. HDAC2 억제제 (예를 들어, HDAC2 억제제가 펩티드 억제제인 경우)의 투여는 미리 선택된 기간에 걸쳐 본질적으로 연속적일 수 있거나, 또는 예를 들어 신경변성 질환의 발생 전, 그 동안 또는 그 후에 일련의 이격 용량으로 이루어질 수 있다.

[0090] 본원에 사용된 용어 "치료하는"은 1종 이상의 활성제를 포함하는 조성물을 신경변성 질환, 신경변성 질환의 증상, 또는 신경변성 질환에 대한 소인을 갖는 대상체에게 장애, 질환의 증상, 또는 신경변성 질환에 대한 소인을 치유하거나, 낮게 하거나, 완화시키거나, 경감시키거나, 변경하거나, 해소하거나, 호전시키거나, 개선시키거나, 또는 이에 영향을 미칠 목적으로 적용 또는 투여하는 것을 지칭한다.

[0091] 신경변성 질환을 완화시키는 것은 질환의 발생 또는 진행을 지연시키거나, 또는 질환 중증도를 감소시키는 것을 포함한다. 질환을 완화시키는 것은 치유적 결과를 반드시 필요로 하지 않는다. 본원에 사용된 바와 같은, 질환 (예컨대 MCI)의 발생을 "지연시키는 것"은 질환의 진행을 연기시키는 것, 방해하는 것, 느리게 하는 것, 늦추는 것, 안정화시키는 것, 및/또는 미루는 것을 의미한다. 이러한 지연은 질환의 병력 및/또는 치료될 개체에 따라서, 시간의 길이가 달라질 수 있다. 질환의 발생을 "지연" 또는 완화시키거나, 또는 질환의 발병을 지연시키는 방법은, 방법을 사용하지 않은 경우와 비교하여, 주어진 시간 프레임에서 질환의 1종 이상의 증상이 발생할 가능성을 감소시키고/거나 주어진 시간 프레임에서 증상의 정도를 감소시키는 방법이다. 이러한 비교는, 통계적으로 유의한 결과를 제공하는데 충분한 다수의 대상체를 사용하여, 전형적으로 임상 연구에 기초한다.

[0092] 질환의 "발생" 또는 "진행"은 질환의 초기 징후 및/또는 뒤이은 진행을 의미한다. 질환의 발생은 관련 기술분야에 널리 공지된 바와 같은 표준 임상 기술을 사용하여 검출가능할 수 있고 평가될 수 있다. 그러나, 발생은 또한 검출될 수 없는 진행도 지칭한다. 본 개시내용의 목적상, 발생 또는 진행은 증상의 생물학적 과정을 지칭한다. "발생"은 출현, 재발 및 발병을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 신경변성 질환의 "발병" 또는 "출현"은 초기 발병 및/또는 재발을 포함한다.

[0093] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 HDAC2 억제제 (예를 들어, HDAC2 펩티드 억제제)는 HDAC2가 Sp3에 결합하는 것을 적어도 20% (예를 들어, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 초과)만큼 감소시키기에 충분한 양으로 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 다른 실시양태에서, HDAC2 억제제는 유전자 프로모터에서 히스톤 아세틸화를 보존하는데 유효한 양으로 투여된다. 대안적으로, HDAC2 억제제는 HDAC2의 유전자 프로모터로의 동원을 감소시키는데 유효한 양으로 투여된다.

[0094] 일부 실시양태에서, HDAC2 억제제는 시냅스 기억 기능을 적어도 20% (예를 들어, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 초과)만큼 증진시키기에 충분한 양으로 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 시냅스 기능은 전기적 또는 화학적 신호를 또 다른 세포 (예를 들어, 뉴런)에 통과시키는 세포 (예를 들어, 뉴런)의 시냅스의 능력을 지칭한다. 시냅스 기능은 통상적인 검정 또는 본원에 기재된 검정에 의해 결정할 수 있다 (실시예 참조).

[0095] 치료될 질환의 유형 또는 질환 부위에 따라, 의학 분야의 통상의 기술자에게 공지된 통상적인 방법을 사용하여

제약 조성물을 대상체에게 투여할 수 있다. 이러한 조성물은 또한 다른 통상적인 경로를 통해 투여될 수 있고, 예를 들어, 경구로, 비경구로, 흡입 스프레이에 의해, 국소로, 직장으로, 비강으로, 혈측으로, 질로 또는 이식된 저장소를 통해 투여될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 동맥내, 활막내, 흉골내, 척수강내, 병변내, 및 두개내 주사 또는 주입 기술을 포함한다. 또한, 주사가 가능한 데포 투여 경로를 통해, 예컨대 1-, 3-, 또는 6-개월 데포 주사가 가능한 또는 생분해성 물질 및 방법을 사용하여 이를 대상체에게 투여할 수 있다.

[0096] 주사가 가능한 조성물은 다양한 담체, 예컨대 식물성 오일, 디메틸아세트아미드, 디메틸포름아미드, 에틸 락테이트, 에틸 카르보네이트, 이소프로필 미리스테이트, 에탄올, 및 폴리올 (글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등)을 함유할 수 있다. 정맥내 주사의 경우, 수용성 항체는 점적법에 의하여 투여될 수 있으며, 그에 의해 항체 및 생리학상 허용되는 부형제를 함유하는 제약 제제가 주입된다. 생리학상 허용되는 부형제는 예를 들어 5% 텍스트로스, 0.9% 염수, 링거 용액 또는 다른 적합한 부형제를 포함할 수 있다. 근육내 제제, 예를 들어, 항체의 적합한 가용성 염 형태의 멸균 제제는 제약 부형제, 예컨대 주사용수, 0.9% 염수, 또는 5% 글루코스 용액 중에 용해되고 투여될 수 있다.

[0097] 한 실시양태에서, HDAC2 억제제는 부위-특이적 또는 표적화된 국부 전달 기술을 통해 투여된다. 부위-특이적 또는 표적화된 국부 전달 기술의 예는 HDAC2 억제제의 다양한 이식형 데포 공급원 또는 국부 전달 카테터, 예컨대 주입 카테터, 유치 카테터, 또는 바늘 카테터, 합성 이식편, 혈관외막 랩, 선트 및 스텐트 또는 다른 이식형 장치, 부위 특이적 담체, 직접 주사, 또는 직접 적용을 포함한다. 예를 들어, PCT 공개 번호 WO00/53211 및 미국 특허 번호 5,981,568을 참조한다.

[0098] 안티센스 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터, 또는 서브게놈 폴리뉴클레오티드를 함유하는 치료 조성물의 표적화 전달이 또한 사용될 수 있다. 수용체-매개된 DNA 전달 기술은 예를 들어, 문헌 [Findeis et al., Trends Biotechnol. (1993) 11:202; Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J. A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al., J. Biol. Chem. (1988) 263:621; Wu et al., J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:3655; Wu et al., J. Biol. Chem. (1991) 266:338]에 기재되어 있다. 폴리뉴클레오티드를 함유하는 치료 조성물은 유전자 요법 프로토콜에서 국부 투여의 경우 약 100 ng 내지 약 200 mg의 DNA 범위로 투여된다. 일부 실시양태에서, 약 500 ng 내지 약 50 mg, 약 1 µg 내지 약 2 mg, 약 5 µg 내지 약 500 µg, 및 약 20 µg 내지 약 100 µg DNA 또는 그 초과 농도 범위가 또한 유전자 요법 프로토콜 동안 사용될 수 있다.

[0099] 본원에 기재된 치료적 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 유전자 전달 비히클을 사용하여 전달될 수 있다. 유전자 전달 비히클은 바이러스 또는 비-바이러스 기원일 수 있다 (일반적으로, 문헌 [Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185; 및 Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6:148] 참조). 내인성 포유동물 또는 이종 프로모터 및/또는 인핸서를 사용하여 이러한 코딩 서열의 발현이 유도될 수 있다. 코딩 서열의 발현은 구성적일 수 있거나, 또는 조절될 수 있다.

[0100] 목적하는 폴리뉴클레오티드의 전달 및 목적하는 세포에서의 발현을 위한 바이러스-기반 벡터는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예시적인 바이러스-기반 비히클은 재조합 레트로바이러스 (예를 들어, PCT 공개 번호 WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; 미국 특허 번호 5,219,740 및 4,777,127; GB 특허 번호 2,200,651; 및 EP 특허 번호 0 345 242 참조), 알파바이러스-기반 벡터 (예를 들어, 신드비스(Sindbis) 바이러스 벡터, 셈리키 포레스트(Semliki forest) 바이러스 (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), 로스강(Ross River) 바이러스 (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) 및 베네수엘라 말 뇌염(Venezuelan equine encephalitis) 바이러스 (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532), 및 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터 (예를 들어, PCT 공개 번호 WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 및 WO 95/00655 참조)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 문헌 [Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147]에 기재된 바와 같은 사멸된 아데노바이러스에 연결된 DNA의 투여가 또한 사용될 수 있다.

[0101] 사멸된 아데노바이러스 단독에 연결되거나 연결되지 않은 다가양이온성 축합 DNA (예를 들어, 문헌 [Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147] 참조); 리간드-연결된 DNA (예를 들어, 문헌 [Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985] 참조); 진핵 세포 전달 비히클 세포 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,814,482; PCT 공개 번호 WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; 및 WO 97/42338 참조); 및 핵 전하 중화 또는 세포막과의 융합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 비-바이러스 전달 비히클 및 방법이 또한 사용될 수 있다. 네이키드 DNA가 또한 사용

될 수 있다. 예시적인 나이키드 DNA 도입 방법은 PCT 공개 번호 WO90/11092 및 미국 특허 번호 5,580,859에 기재되어 있다. 유전자 전달 비히클로서 작용할 수 있는 리포솜은 미국 특허 번호 5,422,120; PCT 공보 번호 WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; 및 EP 특허 번호 0524968에 기재되어 있다. 추가의 접근법은 문헌 [Philip, Mol. Cell. Biol. (1994) 14:2411, 및 Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581]에 기재되어 있다.

- [0102] 또한, 발현 벡터가 본원에 기재된 임의의 단백질-기반 HDAC2 억제제 (예를 들어, 펩티드 억제제)의 발현을 지시 하는데 사용될 수 있다는 것이 명백하다. 예를 들어, HDAC2 및/또는 HDAC2 생물학적 활성을 차단 (부분적 내지 완전 차단)할 수 있는 다른 HDAC2 억제제가 관련 기술분야에 공지되어 있다.
- [0103] 본원에 기재된 방법에 사용되는 특정한 투여 요법, 즉, 용량, 타이밍 및 반복은 특정한 대상체 및 그러한 대상체의 의료 병력에 좌우될 것이다.
- [0104] 일부 실시양태에서, 1종 초과 HDAC2 억제제, 예컨대 항체 및 소분자 HDAC2 억제 화합물이 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여될 수 있다. 억제제는 서로 동일하거나 또는 상이한 유형일 수 있다. 적어도 1종, 적어도 2종, 적어도 3종, 적어도 4종, 적어도 5종의 상이한 HDAC2 억제제가 공-투여될 수 있다. 일반적으로, HDAC2 억제제는 서로 불리한 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는다. HDAC2 억제제는 또한 작용제의 유효성을 증진시키고/거나 보완하는 작용을 하는 다른 작용제와 함께 사용될 수 있다.
- [0105] 치료 효능은 관련 기술분야에 널리 공지된 방법, 예를 들어 치료에 적용된 환자에서 시냅스 기능 또는 기억 상실을 모니터링하는 것에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 실시예 5를 참조한다.
- [0106] 조합 요법
- [0107] 또한, 본원에 기재된 HDAC2 억제제 중 임의의 것 및 본원에 기재된 것과 같은 또 다른 항신경변성 질환 치료제를 사용하는 조합 요법이 본원에 제공된다. 본원에 사용된 용어 조합 요법은 이들 작용제 (예를 들어, HDAC2 억제제 및 항신경변성 질환 치료제)의 순차적 방식으로의 투여, 즉 각각의 치료제가 상이한 시간에 투여되는 것, 뿐만 아니라 이들 치료제, 또는 작용제 중 적어도 2종의 실질적으로 동시 방식으로의 투여를 포괄한다.
- [0108] 각각의 작용제의 순차적 또는 실질적 동시 투여는 경구 경로, 정맥내 경로, 근육내, 피하 경로, 및 점막 조직을 통한 직접 흡수를 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 적절한 경로에 의해 이루어질 수 있다. 작용제는 동일한 경로에 의해 또는 상이한 경로에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 제1 작용제 (예를 들어, HDAC2 억제제)는 경구로 투여될 수 있고, 제2 작용제 (예를 들어, 항신경변성 질환 작용제)는 정맥내로 투여될 수 있다.
- [0109] 본원에 사용된 용어 "순차적"은, 달리 명시되지 않는 한, 규칙적 순서 또는 차례를 특징으로 하는 것을 의미하며, 예를 들어 투여 요법이 HDAC2 억제제 및 항신경변성 질환 작용제의 투여를 포함하는 경우, 순차적 투여 요법은 항신경변성 질환 작용제의 투여 전에, 동시에, 실질적으로 동시에, 또는 그 후에 HDAC2 억제제를 투여하는 것을 포함할 수 있지만, 둘 다의 작용제는 규칙적 순서 또는 차례로 투여될 것이다. 용어 "개별"은, 달리 명시되지 않는 한, 하나가 다른 것으로부터 떨어져 있는 것을 의미한다. 용어 "동시에"는, 달리 명시되지 않는 한, 동일한 시간에 일어나거나 이루어지는 것을 의미하고, 즉, 본 발명의 작용제가 동일한 시간에 투여되는 것을 의미한다. 용어 "실질적으로 동시에"는 작용제가 서로 수분 내에 (예를 들어, 서로 10분 내에) 투여되는 것을 의미하고, 연합 투여뿐만 아니라 연속 투여를 포괄하는 것으로 의도되지만, 투여가 연속적이면 이는 시간상 오직 단기간 (예를 들어, 의료 진료의가 2종의 작용제를 개별적으로 투여하는 데 걸리는 시간) 동안만 분리된다. 본원에 사용된 공동 투여 및 실질적으로 동시 투여는 상호교환가능하게 사용된다. 순차적 투여는 본원에 기재된 작용제의 시간상 분리된 투여를 지칭한다.
- [0110] 조합 요법은 또한 본원에 기재된 작용제 (예를 들어, HDAC2 억제제 및 항신경변성 질환 작용제)를 다른 생물학적 활성 성분 (예를 들어, 상이한 항신경변성 질환 작용제) 및 비-약물 요법 (예를 들어, 작업 요법)과 추가로 조합하여 투여하는 것을 포괄할 수 있다.
- [0111] HDAC2 억제제 및 또 다른 항신경변성 질환 작용제 (예를 들어, 항신경변성 질환 항체)의 임의의 조합이 신경변성 질환을 치료하기 위해 임의의 순서로 사용될 수 있음이 인지될 것이다. 본원에 기재된 조합물은 HDAC2를 억제하는 것, 인지 기능을 보존하는 것, 기억 상실을 감소시키는 것, 시냅스 기능을 감소시키는 것, 및/또는 신경변성 질환과 연관된 적어도 하나의 증상을 완화시키는 것에 대한 유효성, 또는 조합물의 또 다른 작용제의 부작용을 완화시키는 것에 대한 유효성을 포함하나 이에 제한되지 않는 수많은 인자에 기초하여 선택될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 조합 요법은 조합물의 각각의 개별 구성원과 연관된 부작용 중 임의의 것, 예를

들어, 항신경변성 질환 작용제와 연관된 부작용을 감소시킬 수 있다.

- [0112] 일부 실시양태에서, 또 다른 항신경변성 질환 작용제는 의약 요법, 외과적 요법, 및/또는 대체 요법이다. 의약 요법의 예는 콜린에스테라제 억제제 (예를 들어, 벤트트로핀 및 트리헥시페니딜), 레보도파, 메만틴, 도파민 길항제 (예를 들어, 프라미펙솔, 로피니롤, 로티고틴 및 아포모르핀), 및 MAO-B 억제제 (예를 들어, 셀레길린 및 라사길린)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 외과적 요법의 예는 심부 뇌 자극, 시상절개술, 담창구절개술, 및 시상하부절개술을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 대체 요법의 예는 음악 요법, 애완동물 요법, 예술 요법, 작업 요법, 운동, 및 작업 요법을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0113] 신경변성 질환의 치료에 사용하기 위한 키트
- [0114] 본 개시내용은 또한 신경변성 질환을 완화시키는데 사용하기 위한 키트를 제공한다. 이러한 키트는 HDAC2 억제제 (예를 들어, 펩티드 억제제)를 포함하는 1개 이상의 용기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, HDAC2 억제제는 본원에 기재된 바와 같은 HDAC2가 Sp3에 결합하는 것을 감소시킬 수 있는 임의의 작용제이다. 다른 실시양태에서, 키트는 소분자 억제제인 HDAC2 억제제, 항-HDAC2 항체, 또는 HDAC2의 발현을 억제하는 작용제를 포함한다.
- [0115] 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 방법 중 임의의 것에 따른 사용에 대한 지침서를 포함할 수 있다. 포함된 지침서는 본원에 기재된 방법 중 임의의 것에 따라, 신경변성 질환을 치료하거나, 발병을 지연시키거나, 또는 그를 완화시키기 위해 HDAC2 억제제를 투여하는 것에 대한 설명을 포함할 수 있다. 키트는 개체가 신경변성 질환을 갖는지 확인하는 것에 기초하여 치료에 적합한 개체를 선택하는 것에 대한 설명을 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 지침서는 신경변성 질환을 갖거나, 갖는 것으로 의심되거나, 또는 위험이 있는 개체에게 HDAC2 억제제를 투여하는 것에 대한 설명을 포함한다.
- [0116] HDAC2 억제제의 사용에 관한 지침서는 일반적으로 의도된 치료를 위한 투여량, 투여 스케줄, 및 투여 경로에 대한 정보를 포함한다. 용기는 단위 용량, 벌크 패키지 (예를 들어, 다중-용량 패키지) 또는 하위-단위 용량일 수 있다. 본 발명의 키트에 제공되는 지침서는 전형적으로 라벨 또는 패키지 삽입물 (예를 들어, 키트에 포함된 종이 시트) 상의 서면 지침서이지만, 기계-판독가능한 지침서 (예를 들어, 자기 또는 광학 저장 디스크 상에 운반되는 지침서)가 또한 허용된다.
- [0117] 라벨 또는 패키지 삽입물은 조성물이 신경변성 질환의 치료, 발병의 지연 및/또는 완화를 위해 사용된다는 것을 표시한다. 지침서는 본원에 기재된 방법 중 임의의 것을 실시하기 위해 제공될 수 있다.
- [0118] 본 발명의 키트는 적합한 포장 내에 있다. 적합한 포장은 바이알, 병, 단지, 가요성 포장 (예를 들어, 밀봉된 마일라 또는 플라스틱 백) 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 장치, 예컨대 흡입기, 비강 투여 장치 (예를 들어, 아토마이저) 또는 주입 장치, 예컨대 미니펌프와 조합하여 사용하기 위한 포장이 또한 고려된다. 키트는 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘이 관통할 수 있는 마개를 갖는 정맥 내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 용기도 또한 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘이 관통할 수 있는 마개를 갖는 정맥 내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 조성물 내의 적어도 1종의 활성제는 HDAC2 억제제, 예컨대 펩티드 억제제이다.
- [0119] 키트는 임의로 추가의 성분, 예컨대 완충제 및 설명적 정보를 제공할 수 있다. 통상적으로, 키트는 용기, 및 용기 상에 있거나 용기와 회합된 라벨 또는 패키지 삽입물(들)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 상기 기재된 키트의 내용물을 포함하는 제조 물품을 제공한다.
- [0120] 추가적인 부연설명 없이, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상기 설명에 기초하여 본 발명을 그의 최대 범위까지 활용할 수 있는 것으로 여겨진다. 따라서, 하기 구체적 실시양태는 단지 예시적이며 어떠한 방식으로든 나머지 개시내용을 제한하지 않는 것으로 해석되어야 한다. 본원에 인용된 모든 간행물은 본원에 언급된 목적 또는 주제를 위해 참조로 포함된다.
- [0121] 일반적 기술
- [0122] 본 발명의 실시는 달리 나타내지 않는 한 분자 생물학 (재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상적인 기술을 이용할 것이며, 이는 관련 기술분야의 기술 내에 있다. 이러한 기술은 문헌, 예컨대 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell

Culture (R. I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)]에 충분히 설명되어 있다.

[0123] 실시예

[0124] 본원에 기재된 본 발명이 보다 완전하게 이해될 수 있도록, 하기 실시예가 제시된다. 본 출원에 기재된 실시예는 본원에 제공된 방법, 조성물, 및 시스템을 예시하기 위해 제공되고, 어떠한 방식으로든지 그의 범주를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0125] 물질 및 방법

[0126] 동물 모델

[0127] 모든 마우스 작업은 매사추세츠주 기술 연구소 비교 의약부의 동물 관리 위원회에 의해 승인받았다. 수컷 CK-p25 마우스를 암컷 CK 또는 p25 마우스와 교배시켜 WT, CK, p25 및 이중 트랜스제닉 CK-p25 마우스를 수득하였다. CK 또는 p25 마우스를 음성 대조군으로서 사용하였다. 2.5-3.5개월령의 이중 트랜스제닉 CK-p25 마우스 (및 그의 한배새끼)를 사용하여, 독시시클린을 함유하는 사료 펠릿을 독시시클린이 결여된 것으로 바꿈으로써 p25 발현을 유도하였다. 모든 행동 실험 및 생체외 LTP 기록을 인지 결핍이 강하게 관찰된 때인 p25 유도의 6 내지 8주 사이에 수행하였다.

[0128] 행동 시험

[0129] 행동 실험을 맹검으로 수행하였다. 공포 조건화 시험: 공포 조건화를 위해, 마우스를 조건화 챔버 (TSE 시스템) 안에 3분 동안 넣고, 이어서 30 s 청각 단서 (3 kHz, 80 dB)에 이어서 일정한 2 s 발 쇼크 (0.8 mA)를 적용하였다. 24시간 후, 마우스를 훈련 상황에 3분 동안 재-노출시키고, 기억 획득에 대해 그의 동결 행동을 스코어링하였다. 48시간 후, 마우스를 신규 상황에 2분 동안 적응시킨 후, 훈련에 사용된 청각 단서 (3 kHz, 80 dB)에 2분 노출시키고, 기억 획득에 대해 그의 동결 행동을 스코어링하였다.

[0130] 플라스미드 구축

[0131] shRNA 플라스미드를 위해, U6 프로모터 및 shRNA 서열을 CMV 프로모터가 결실된 pCDH 벡터 (시스템 바이오사이언시스(System Biosciences), CD511B-1) 내로 도입하였다. shRNA 서열 및 루프 서열을 표 1에 열거한다. HDAC2 및 Sp3 cDNA 클론은 트랜스오믹(TransOMIC)으로부터 구입하였고, 깃슨 어셈블리 마스터 믹스(Gibson Assembly Master Mix) (NEB, E2611S)를 사용하여 이를 pCDH 벡터 내로 서브클로닝하여 태그부착된 단백질 또는 키메라 단백질을 발현시켰다. 퀵체인지(QuikChange) II 부위-지정 돌연변이유발 키트 (애질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies))를 사용하여 shRNA-저항성 돌연변이체를 생성하였다. 돌연변이유발을 위해 사용된 프라이머를 표 2에 열거한다. 이들 pCDH 플라스미드를, 공동-면역침전뿐만 아니라 렌티바이러스 체제를 위해 Neuro2A 세포에서 발현시키는데 사용하였다.

[0132] 표 1. shRNA 서열 목록.

	서열 5' → 3'	SEQ ID NO
루프 서열	TTCAAGAGA	2
대조군 shRNA	AATTCTCCGAACGTGTCACG	3
HDAC2 shRNA	GGTCGTAGGAATGTTGCTGAT	4
Sp3 shRNA	GCACCTGTCCCAACTGTAAAG	5
Sap30 shRNA	GGAACAGAAGGAAGAGGAA	6
Ttrap shRNA	GCCATCAGGATTTCAAGTAAT	7

[0133]

[0134] 표 2. 돌연변이유발을 위한 프라이머 목록.

프라이머 서열 5' → 3'		
HDAC2 shRNA- 저항성 돌연변이체	정방향 역방향	GATGAAGGTGAAGGAGGCCGCAGAAACGTGGCAGACCATAAGAAAGGAG (SEQ ID NO: 8) CTCCTTTCTTATGGTCTGCCACGTTTCTGCGGCCTCCTTACCTTCATC (SEQ ID NO: 9)
Sp3 shRNA-저항성 돌연변이체	정방향 역방향	GTACCTCTCCACCACCTTCTTCAATTCGGGCACGTACAAGCTACCTCCGAAGTCT (SEQ ID NO: 10) AGACTTCGGAGGGTAGCTTGTACGTGCCCGAATTGCAAGGAAGTGGTGGGAGAGGTAC (SEQ ID NO: 11)

[0135]

[0136] 렌티바이러스 구축

[0137] HEK-293T 세포를 제조업체의 프로토콜에 따라 리포펙타민 2000 (라이프 테크놀로지스(Life Technologies))을 사용하여 7.5 µg 렌티바이러스 플라스미드, 2.5 µg VSV-G, 1.9 µg pRSV-Rev 및 5.0 µg pMDLg/pRRE로 형질감염시켰다. 다음날, 배지를 20% FBS를 함유하는 신선한 배지로 교환하였다. 상청액을 48시간 후에 수집하고, 300g에서 5분 동안 원심분리하고, 0.45 µm 필터를 통해 멸균-여과한 후, 19,500 rpm에서 4°C에서 2시간 동안 원심분리하고 (옵티마 I-90K 초원심분리기, SW41 Ti 로터), 폐기하였다. 펠릿을 저온 돌베코 포스페이스트 완충염수 (DPBS, 라이프 테크놀로지스) 중에 4°C에서 밤새 재현탁시킨 후, 분취하고, -80°C에서 저장하였다. 바이러스 역가를 렌티바이러스 qPCR 역가 키트 (ABM 인크.(ABM Inc.))로 추정하였다.

[0138] 1차 배양된 뉴런

[0139] 1차 피질 뉴런을 E15-16 스위스-웹스터 배아로부터 해리시켰다. 뉴런을 둥근 커버슬립 (mEPSC 기록을 위함)을 함유하는 24-웰 플레이트 (RT-PCR을 위함), 6cm 디쉬 (RNA-seq를 위함), 또는 10cm 디쉬 (ChIP을 위함)에 플레이트팅하였고, 이들은 모두 PDL (30 µg/mL, 시그마; P6407) 및 마우스 라미닌 (2 µg/mL, 코닝(Corning); 354232)으로 코팅되었다. 세포의 밀도는 24-웰 플레이트의 경우 1x10⁵개 세포/mL/웰이었고, 6cm 디쉬의 경우 1.5x10⁶개 세포/8mL/디쉬였고, 10cm 디쉬의 경우 4x10⁶개 세포/15mL/디쉬였다. 뉴런을 B27, 페니실린/스트렙토마이신 및 글루타맥스 (라이프 테크놀로지스)가 보충된 뉴로베이슬 배지로 유지시키고, 신경교 세포를 최소화하기 위해 DIV5에서 1 µM AraC로 처리하였다. 배지의 절반을 2-3일마다 신선한 배지로 바꾸었다. 모든 실험은 DIV17-22의 뉴런을 사용하여 수행하였다.

[0140] 염색질 면역침전 (ChIP)

[0141] Sp3 및 아세틸화된 히스톤에 대해 실온에서 1% 포름알데히드를 사용하여 가교를 수행하였다. HDAC2 ChIP를 위해, 2mM 디숙신이미딜 글루타레이트 (DSG)를 사용한 추가의 가교를 35분 동안 수행한 후, 포름알데히드 (최종 1%)를 첨가하고 또 다른 10분 인큐베이션을 수행하였다. 반응을 125mM 글리신으로 정지시켰다. 1차 배양된 뉴런에 대해, 세포 펠릿을 50mM HEPES-KOH (pH 7.4), 140mM NaCl, 1mM EDTA, 10% 글리세롤, 0.5% NP-40, 0.25% 트리톤X-100, 프로테아제 억제제 칵테일로 10분 동안 용해시켰다. 1000rpm에서 5분 동안 4°C에서 회전시켜 핵을 펠릿화하였다. 펠릿을 10mM 트리스-HCl (pH8.0), 0.5mM EGTA, 1mM EDTA, 200mM NaCl로 재현탁시키고, 실온에서 10분 동안 요동시킨 후, 1000rpm에서 5분 동안 4°C에서 원심분리하였다. 생성된 펠릿은 ChIP 실험을 위한 핵 분획이었다. 뇌 조직의 경우, 뉴런 핵의 단리는 가교 후에 수행하였다. 단리된 핵을 알렉사488-접합된 항-NeuN 항체 (밀리포어(Millipore), MAB 477X)로 염색한 후 형광-활성화 세포 분류 (FACS)에 적용하였다. 정제된 NeuN-양성 핵 또는 1차 뉴런의 핵 분획을 10mM 트리스-HCl (pH8.0), 0.5mM EGTA, 1mM EDTA, 0.5%(w/v) N-라

우로일사르코신 나트륨 염 중에서 바이오루프터(Bioruptor) (높음으로 셋팅, 30 s 온 및 30 s 오프의 40 사이클)를 사용하여 초음파처리하였다. 전단된 염색질을 HDAC2 (압캠(Abcam); ab12169), Sp3 (산타 크루즈 (Santa cruz); sc-644 X), 또는 아세틸화된 히스톤 H4 (액티브 모티프(Active motif); 39925)에 대한 항체로 면역침전시켰다. 면역침전된 DNA를 페놀/클로로포름/이소아밀 알콜에 의해 추출하고, 에탄올 침전에 의해 정제하고, 검정되는 유전자의 프로모터 영역에 특이적인 프라이머를 사용하여 정량적 PCR에 적용하였다 (프라이머 서열에 대해서는 표 3 참조). 증폭된 DNA의 형광 신호 (SYBR 그린, 바이오라드(BioRad))를 투입에 대해 정규화 하였다.

[0142]

표 3. ChIP 실험에 사용된 프라이머 목록. 유전자 명칭 다음의 숫자는 TSS로부터의 각각의 프라이머의 3' 말단의 위치를 나타낸다.

유전자 명칭	프라이머 (5'-3')	SEQ ID NO
Kcna2 -237	CTACCCTCTCCCCTGTCTCC	12
Kcna2 -133	GCAAAGAAAACACCCCATTC	13
Kcna2 +200	AGTGTCCGGCATTCTGCT	14
Kcna2 +292	CTCGCCACCCAGACTAC	15
Grik2 -251	TCAATCCTTGTCCTTTTGC	16
Grik2 -339	CAAGCAAGCACATCCACATC	17
Grik2 +317	CAGGAAAGGAAGAGGGGAAC	18
Grik2 +228	AGTGAGACAAAGCCCTCCAA	19
Dlgap1 -367	GCTGAGATGTGGTTGGCTTT	20
Dlgap1 -270	CCCCAAGCCTATTCTGTTT	21
Dlgap1 +338	GTGAATCAGGTGGGGACATC	22
Dlgap1 +419	CAACAAGACCACAGGAAGCA	23
Lin7a -114	TCTCCATCTGGCTACCAACC	24
Lin7a -22	AGAGGGAAGACGGAAGGAG	25
Lin7a +449	AAGAGGGGCAGAGAAAGCTC	26
Lin7a +553	GGGACAAACTTCCTCCCTTC	27
Kcnc3 -298	TCGCTGTGCTGCTGAGTTAG	28
Kcnc3 -214	CAGAAAGCTCAGGGATTGGA	29
Kcnc3 +435	TTCGCCTACGTGCTCAACTA	30
Kcnc3 +541	GTCTCGTCTATGCCCCAGAA	31
Gabbr2 -330	AGCAGTACCCAACCACCTTG	32
Gabbr2 -433	CTCCAGAGCCCCACGTTC	33
Gabbr2 +608	GAGCTAGCCATCGAGCAGAT	34
Gabbr2 +529	ACCTCGGTGTCGTAGAGTCG	35
Gabbr2 +4223	CGCCCATAATCTACCTTTGC	36
Gabbr2 +4109	GTGGGGGAAATTCCATGATA	37
Ogfr11 -363	AGACCGCAGGGATTCTAGGT	38
Ogfr11 -465	AGCCACAGCAGAAGACAAAAG	39
Ogfr11 +203	CCTTTCAATGGGCAACCT	40
Ogfr11 +116	GAATCGGTCTGCCAGGTG	41
Nlgn1 -197	AGTGGGCTTCAGCTCCTGTA	42
Nlgn1 -299	GCCGCTAGGTCTTCTTATG	43
Nlgn1 +413	AAGCCGAGAGGAGTGAGACA	44
Nlgn1 +326	CCGCTCGGAAGACTAGGAG	45
Scn3b -489	TGTGCCACACCCTACCCTAT	46

[0143]

Scn3b -410	TGCCTTGATTAATGGGTTCC	47
Scn3b +260	CACATTCTGTAGCCCAGACG	48
Scn3b +343	CAGAATCTCGGGCTTCTACG	49
Scn3b +3906	CAGTGTGCTTTCTCCCCTTC	50
Scn3b +4000	AGAGGTTTGGGGCCTGTATT	51
Syng3 -201	TGGGCCTCAGTTTCCTCTTA	52
Syng3 -296	CATAGCCAAGAGCATCGACA	53
Syng3 +190	AACGGACAGAAGGCAAAGTG	54
Syng3 +104	CAAAGCTCACGGGATCAAAG	55
Magi2 -263	GAAGGGATGCAGCCTTGTTA	56
Magi2 -149	TTGAGCCTTTTTGGTTTTCC	57
Magi2 +220	AGAGAGAGAGCGAGCTGCAT	58
Magi2 +309	TTGAAGCCAGACACAGCAAC	59
Synpr -294	CCCTGACATTGGTGCTCTTT	60
Synpr -207	TGGTTGGCAACAGTGGACTA	61
Synpr +162	CTGAAGGGAAGTGGTTCGAG	62
Synpr +246	CCTGCCTGTCTGTTCAATTT	63
Cd81 +303	ATTCGTCTTCTGGGTGAGC	64
Cd81 +390	CCTTCTCAGCAGGGCCTA	65
Mkm1 -298	CACTTCCATCAGCAGGGATT	66
Mkm1 -400	GGGGCTGTGTCTGCTCTTTA	67
Fam171b -358	CCTCGGTGTCTAGTGGAAGG	68
Fam171b -250	GCGTTTAGCTAGGCGGAGAT	69
Tanc2 +418	CTGCCTCCGAATGAATGTG	70
Tanc2 +498	AGACCAACCTCGGTGACAAC	71
Engase +343	ATCTCGTTCTGGCAGTCTGG	72
Engase +436	ACACGAACAGAAAGCCATCC	73

[0144]

[0145]

유전자 발현 분석

[0146]

RN이지 플러스 미니 키트 (퀴아젠(QIAGEN))를 사용하여 RNA를 추출하였다. 역전사 (RT) 및 PCR 반응의 정량성을 보장하기 위해, RNA 투 cDNA 에코드라이(RNA to cDNA ECODRY)TM 프리믹스 (이중 프라이밍) (클론테크 (Clontech))와의 각각의 RT 반응에 8-16 ng의 RNA를 사용하였고, RT 생성물 중 1/40을 각각의 PCR 반응에 사용하되, 단 28s rRNA의 경우 PCR은 PCR 주형으로서 RT 반응의 1/240을 사용하여 행하였다. 희석된 대조군 샘플의 표준 곡선에 기초하여 RNA의 상대량을 계산하고, 28s rRNA 또는 HPRT의 것에 대해 정규화하였다. 프라이머의 포괄적 목록을 표 3에 제시한다. RNA-서열분석 (RNA-seq)을 위해, 300-500 ng의 총 RNA를 사용하여, TrueSeq 총 RNA 샘플 제조 키트 (일루미나(Illumina))를 사용하여 라이브러리를 제조하였다. 일루미나 Hi-Seq 2000을 사용하여 바코드 라이브러리의 서열분석을 수행하였다. 유전자 온톨로지 분석은 DAVID 기능 주석화 도구를 사용하여 수행하였다.

[0147] 표 4. RT-qPCR 실험에 사용된 프라이머 목록.

유전자	정방향 (5'-3')	SEQ ID NO	역방향 (5'-3')	SEQ ID NO
Hdac1	GACGGCATTGACGACGAATC	74	TGAAGCAACCTAACCGGTCC	90
Hdac2	TATGGGGAATACTTTCCTGG	75	TGACAGCATAGTATTTTCCC	91
Kcna2	GCACCCACAAGACACCTATGA	76	GTCTCTGGGAACTGGGCTAAG	92
Grik2	CAGTTGTGTATGACGACAGC	77	AGATTGTACCTTGATGGAGC	93
Dlgap1	CCGAAGCTTGTCAACAAGAG	78	GTGTACCCTGACCATTTCATC	94
Lin7a	GCTGCTATCAGTGAACGGAG	79	GCAGCCTTGAGAAGTTCCAC	95
Kcnc3	TTTGAGGACCCCTACTCGTC	80	ATGAAGCCCTCGTGTGTCTC	96
Gabbr2	TCAACGACACCATAAGGTTT	81	GGATGCTATACAGTGAAGC	97
Ogfr1	AAGACTGGAATGTTGCTCGG	82	GCTCGCCAAGGCTTTTAAGAA	98
Nlgn1	TTTGCTAAAAGTGGTACCC	83	AAGCGGTTGGGTTTGGTATG	99
Scn3b	GATTGCTTCCCCTAGCTTCTCT	84	AGGAAATCTTTACCGCCCTCA	100
Syng3	ATGGAGGGAGCATCCTTTGG	85	CACCGCAATAGAAAACACCCA	101
Magi2	CCCCAGGTTTCCGAGAAAAG	86	CCACCAATGATGGTAAACCC	102
Synpr	ACAGCCCTGTCATGTCCAGC	87	CAAATGTTTCCAGCCCAGAG	103
Hprt1	TACCTAATCATTATGCCGAGGA	88	GAGCAAGTCTTTCAGTCCTG	104
28s rRNA	TCATCAGACCCAGAAAAGG	89	GATTGCGCAGGTGAGTTGTT	105

[0148]

[0149] 이뮤노블롯팅

[0150] 뇌 조직 또는 세포 펠릿을 50mM 트리스-HCl (pH8.0), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 및 완전 프로테아제 억제제 콕테일 (로슈(Roche)) 중에서 다운스 타이트(Dounce tight) 균질화기를 사용하여 20 스트로크로 용해시켰다. 10분 동안 10000 x g에서 2회 원심분리한 후, 상청액을 공동-면역침전 또는 웨스턴 블롯 분석 (바이오-라드)에 적용하였다. 2 마이크로그램의 항-HDAC2 항체 (ab12169) 또는 15 µL의 항-플래그 M2 친화도 겔 (시그마 (Sigma))을 면역침전을 위해 사용하였다. 이뮤노블롯팅에 사용된 항체는 항-HDAC2 (1 µg/mL, ab12169), 항-Sp3 (1 µg/mL, sc-644 X), 항-Sin3A (1 µg/mL, 암캠; ab3479), 및 항-λ-튜불린 (1:500, 시그마; F2043)이었다.

[0151] 면역조직화학

[0152] 마우스를 이소플루란으로 마취시키고, 4% 파라포름알데히드로 경심 관류시켰다. 뇌를 바이브라툼 (레이카 (Leica))을 사용하여 40 µm로 관상 절편화하였다. 절편을 항-Sp3 (1:1000, sc-644 X) 항체로 염색하였다. copGFP 신호는 염색 없이 검출되었다.

[0153] 정위 주사

[0154] shRNA 또는 mCherry-융합 단백질 구축물을 발현하는 1 마이크로리터의 렌티-바이러스를 양측 반구의 배측 해마 구역 CA1에 0.1 µL/분으로 정위 주사하였다. 바이러스의 균일한 분포를 보장하기 위해 주사 바늘을 주사 2분 전 및 5분 후에 그대로 두었다. 주사는 LTP 기록 또는 행동 시험 4주 전에 수행하였다. LTP 기록을 위한 주사 부위의 좌표는 전방-후방 위치 (AP) -2.3 mm, 내측-외측 위치 (ML) 브레그마로부터 ±1.35 mm, 복배측 (DV) 피질 표면으로부터 -1.35 mm였다. 행동 시험을 위해, 전체 배측 해마 CA1 구역을 커버하기 위해 상기 기재된 부위에 더하여 바이러스를 2개 더 많은 부위, AP: -1.70 mm, ML: ±1.66 mm, DV: -1.27 mm 내로 주사하였다. 모든 주입 수술은 무균 조건 및 마취 (케타민/크실라진) 하에 매사추세츠주 기술 연구소의 비교 의약부 가이드라인에 따라 수행하였다.

[0155] 전기생리학

[0156] 렌티-바이러스를 주사한 마우스로부터 바이러스 주사 4주 후에 급성 해마 슬라이스를 제조하였다. 마우스를 이소플루란으로 마취시키고, 단두하였다. 실험자는 바이러스가 주사된 것에 대해 맹검이었다. 레이카 VT1000S 바이브라툼 (레이카)을 사용하여 빙냉 해부 완충제 (211 mM 수크로스, 3.3 mM KCl, 1.3 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 26 mM NaHCO₃ 및 11 mM 글루코스) 중에 횡방향 해마 슬라이스 (400 µm 두께)를 제조하였다. 슬라이스를 124 mM NaCl, 3.3 mM KCl, 1.3 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, 26 mM NaHCO₃ 및 11

mM 글루코스로 이루어진 95% O₂/5% CO₂-포화 인공 뇌척수액 (ACSF)이 담긴 액침 챔버 내에서 28-30°C에서 1시간 동안 회복시켰다. 각각의 슬라이스에 등가의 수의 바이러스-형질도입된 세포가 존재하도록 보장하기 위해, GFP/mCherry 발현 세포의 수를 정량화하였다. 세포의 기록을 위해, 양극성 전극을 사용한 웨퍼 측부 자극에 의해 유발된 CA1 필드 전위를 30s마다 측정하였다. 기준선을 15분 동안 기록한 후, 반복된 (2회) 세타-돌발 자극 (TBS, 100 Hz의 4개의 펄스로 이루어진 10개의 단기 돌발파를 함유함)에 의해 LTP를 유도하였다. fEPSP의 기울기를 측정하여 시냅스 전달의 강도를 정량화하였다. HEKA 기기 (EPC10)를 사용하여 데이터를 획득하고, 데이터를 pClamp10 (액손 인스트루먼트(Axon Instruments))으로 분석하였다. 자극 강도 (mA)에 대해 fEPSP의 기울기를 플로팅하여 입력-출력 곡선을 획득하였다. 1차 피질 뉴런 (DIV17-22)의 mEPSC 기록을 위해, 외부 용액은 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES 및 10 mM 글루코스 (NaOH에 의해 pH 7.3), 315 mOsm으로 이루어졌다. 내부 용액은 145 mM CsCl, 5 mM NaCl, 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, 4 mM Mg-ATP, 및 0.3 mM Na₂-GTP (CsOH에 의해 pH 7.3), 305 mOsm을 함유하였다. 외부 용액은 또한 1 μM TTX, 10 μM 비큐클린을 함유하였다. 직렬 저항이 보상되었다. 기록 동안 각각의 세포의 막 전위는 -70mV에서 패치되었다. 기록은 실온에서 획득하였다. 악소패치(Axopatch) 200B 증폭기를 사용하여 데이터를 획득하고, pClamp10 소프트웨어 (몰레큘라 디바이시스(Molecular Devices))로 분석하였다.

[0157] 생물정보학

[0158] 이용가능한 R-패키지 (labs.genetics.ucla.edu/horvath/CoexpressionNetwork/, labs.genetics.ucla.edu/horvath/CoexpressionNetwork/Rpackages//#technicalReports)를 사용하여 가중 유전자 공동-발현 네트워크 분석을 수행하였다. 유전자 발현 옴니버스 (GEO; ncbi.nlm.nih.gov/geo/)에서 GSE15222로부터 187명의 건강한 개체의 뇌 피질로부터의 유전자 발현에 대한 데이터셋을 도출하였다. AD 환자 및 대조군에서의 해마 유전자 발현의 데이터셋은 GSE5281로부터의 것이었다. RNA-Seq 데이터에 대해, 단일-말단 서열분석 관독물을 토포트2(Tophat2)를 사용하여 마우스 게놈 어셈블리 (mm9)에 맵핑하였다. 커프링크스(Cufflinks)의 커프디프(Cuffdiff) 모듈을 사용하여 차등 발현 분석을 수행하였다. 유의하게 변경된 유전자는 2개의 군 사이에서 0.05 미만의 조정된 P-값을 갖는 유전자였다. HDAC2 및 Sp3 유전자좌에서의 RNA-Seq 신호를 IGV 브라우저를 사용하여 가시화하였다. 시냅스 유전자를 SynSysNet (bioinformatics.charite.de/synsysnet/)으로부터 획득하였다. DAVID 웹 서버를 사용하여 유전자 온톨로지를 평가하였다. 알츠하이머 마우스 모델, CK-p25의 RNA-Seq 데이터셋을 또한 중첩 분석을 위해 사용하였다. 명시되지 않는 한, 소프트웨어 R을 플롯을 생성하는데 사용하였다. 각각의 유전자 교란 (HDAC2 또는 Sp3 KD) 후에, 유전자를 3개의 군: 상향-조정됨, 하향-조정됨, 및 변화-없음으로 분류하였다. 주어진 2개의 군 (HDAC2 KD로부터 1개, Sp3 KD로부터 1개)에 대해 중첩 카운트를 계산하고, R에서 피셔 정확 검정에 의해 통계적 P-값을 생성하였다.

[0159] 통계

[0160] f-검정 후 2개의 군의 통계적 비교를 위해 스튜던트 또는 웰치 t-검정을 사용하였다. 다중 비교는 달리 나타나지 않는 한 던넛 검정으로 수행하였다. RNA-seq 데이터에서 중첩의 유의성을 검사하기 위해, 피셔 정확 검정을 사용하였다.

[0161] 실시예 1: WGCNA를 통한 잠재적인 HDAC2 공동-조절자의 확인

[0162] HDAC2를 포함한 HDAC는 다수의 상이한 염색질-변형 복합체와 회합하고, 이들 각각은 세포 내에서 다중 프로세스를 조절한다. 어떠한 결합 파트너가 특정한 프로세스에 수반되는 유전자로의 HDAC2 동원에 필수적인지 결정하기 위해, 전통적인 면역-침전 (IP)에 이은 질량 분광측정법 (mass spec) 이외의 기술을 고려하였다. IP-mass spec은 HDAC2에 결합된 모든 단백질을 구별 없이 확인하고, 시냅스 가소성에 수반되는 유전자로의 HDAC2의 동원을 매개하는 특이적 단백질을 정확하게 나타내는데 있어서 제한된 값을 가질 것이다. 이들 우려로 인해, 가중 유전자 공동-발현 네트워크 분석 (WGCNA)을 이용하였다. 유사한 발현 패턴을 갖는 유전자는 종종 유사한 세포 프로세스에 수반되는 상호작용 단백질 또는 단백질의 군을 코딩한다는 가설 하에, WGCNA를 187개의 건강한 인간 사후 뇌로부터의 공동 이용가능한 유전자 발현 데이터에 적용하였다.

[0163] 파일럿 연구로서, "높은" HDAC2 발현 (평균보다 1 초과의 표준 편차만큼 높음)을 갖는 28명의 개체 및 "낮은" HDAC2 발현 (평균보다 1 초과의 표준 편차만큼 낮음)을 갖는 35명의 개체의 하위셋을 추출하였고, 이어서 전반적인 유전자 발현의 비편향 클러스터링을 수행하였다 (도 7a). 소수의 예외가 있지만, 이러한 분석은 "높은" HDAC2 발현 개체를 "낮은" 것으로부터 신뢰성 있게 구별하였고, 이는 유전자 발현 서명이 HDAC2 수준과 연관될

수 있다는 것을 나타낸다.

[0164] 이어서, HDAC2 유전자 발현에서의 이러한 천연 변이가 시냅스 가소성에 수반되는 HDAC2 결합 파트너를 확인하는데 사용될 수 있는지 여부를 시험하였다. 따라서, 전체 데이터 세트에 대해 (HDAC2 수준에 관계없이) WGCNA를 수행하였고, 유전자 발현에 기초하여 HDAC2와 가장 밀접하게 상관되거나 역-상관되는 유전자를 확인하였다 (도 7b). 이러한 분석은 공지된 HDAC2 결합 단백질을 코딩하는 많은 유전자를 포함한, 2,282개의 유전자의 HDAC2-함유 모듈을 밝혀내었다. 유전자 온톨로지 (GO) 분석에 기초하여, 잠재적인 HDAC2 공동-조절자의 목록을 전사 리프레서 (GO 용어 "히스톤 데아세틸라제 결합", "전사 코리프레서 활성화", "히스톤 데아세틸라제 활성화" 및 "전사 리프레서 활성화"에 의해 정의된 바와 같음)로 추가로 좁혔다. 마지막으로, 전사 리프레서 (HDAC2 포함) 및 HDAC2-모듈 내의 유전자 사이의 쌍별 상관관계를 계산하여 HDAC2와 동일한 방향의 상관관계를 나타내는 추정 HDAC2 공동-조절자를 발견하였다 (도 7c). 생성된 22개의 후보의 목록은 이전에 보고된 바와 같은 HDAC2 결합 단백질을 코딩하는 여러 유전자, 예컨대 DNA-결합 단백질, Sp3, Tdp2 및 Sap30을 포함하였다. HDAC2에 대한 Sp3 및 Tdp2의 물리적 상호작용은 HDAC2의 면역침전에 이어 항-Sp3 및 항-Tdp2 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅을 통해 확인되었다 (도 1a 및 7d).

[0165] 실시예 2: Sp3은 시냅스 기능을 음성적으로 조절한다

[0166] HDAC2를 포함한 HDAC는 DNA에 직접 결합할 수 없으므로, 이후의 노력은 DNA에 결합할 수 있는 HDAC2 상호작용 단백질 (Sp3, Sap30 및 Ttrap/Tdp2)을 확인하는데 초점을 맞추었다. 이들 3종의 단백질이 HDAC2를 시냅스 유전자로 동원하는데 필요할 수 있는지 여부를 확인하는데 도움이 되도록, 시냅스 기능을 조절하는데 있어서의 각각의 단백질의 역할을 평가하였다. HDAC2, Sp3, Sap30 또는 Ttrap를 표적화하는 shRNA를 형질도입한 배양된 마우스 1차 뉴런으로부터 소형 흥분성 시냅스-후 전류 (mEPSC)를 측정하였다 (각각의 shRNA에 의한 형질도입은 mRNA의 50% 초과 감소를 발생시킴; 도 8a-8b). 예상된 바와 같이, HDAC2 녹다운은 증가된 mEPSC 진폭 및 빈도를 발생시켰다 (도 1b). 흥미롭게도, Sp3의 녹다운은 평균 mEPSC 진폭 및 빈도를 증가시켰지만 (도 1b), Sap30 또는 Ttrap의 녹다운은 어떠한 파라미터도 유의하게 변경시키지 않았다 (도 8c). Sp3 녹다운에 의한 이러한 mEPSC의 축진은 Sp3의 shRNA-저항성 형태의 발현에 의해 완전히 역전되었고, 이는 효과의 특이성을 확인시켜 주었다 (도 1c 및 8d).

[0167] 실시예 3: Sp3은 HDAC2의 동원을 통해 시냅스 유전자의 발현을 억제한다

[0168] Sp3이 HDAC2에 결합하고, 마우스 1차 뉴런으로부터의 Sp3의 고갈은 mEPSC에 대한 HDAC2 녹다운의 효과를 재현하였기 때문에, Sp3 및 HDAC2가 뉴런에서 시냅스 유전자 발현을 공동-조절하는지 여부를 결정하였다. 이를 위해, 대조군, HDAC2 또는 Sp3 shRNA를 형질도입한 1차 뉴런으로부터 RNA-서열분석 (RNA-seq)을 통한 트랜스크립톰 분석 (각각의 단백질의 >50% 감소가 있음; 도 9a-9d)을 수행하였다. HDAC2 또는 Sp3의 녹다운에 의해 변경된 유전자의 통계적으로 유의한 중첩은 HDAC2 및 Sp3이 기능적으로 유사하다는 것을 지지하는 것으로 밝혀졌다 (도 1d). 흥미롭게도, 시냅스 전달 및 뉴런 활성화에 수반되는 유전자는 HDAC2 또는 Sp3의 녹다운 후에 상향-조절된 유전자들 중에서 유의하게 풍부화되었다 (도 1e). 칼륨 채널, 나트륨 채널, 및 시냅스 막 단백질 및 수용체의 서브유닛의 발현에서의 변화를 포함한 유전자 발현에서의 다수의 이들 변화는 역전사에 이은 정량적 PCR (RT-qPCR)에 의해 확인되었다 (도 9e-9g).

[0169] HDAC2 및 Sp3에 의해 공동-조절되는 유전자가 병리학적 조건 하에 변화되는지 검사하기 위해, HDAC2 또는 Sp3 녹다운에 의해 변경된 유전자와, 해마에서 상승된 수준의 HDAC2를 디스플레이하는 CK-p25 신경변성 마우스 모델에서 조절이상된 유전자의 중첩을 비교하였다. 또한, 이들 마우스는 독시시클린을 회수하는 것에 의한 p25의 6-주 유도 후에, 기억 결핍 및 여러 AD-관련 병리상태, 예컨대 뉴런 상실, 타우 과인산화, 타우 응집, 증가된 아밀로이드 부하, 및 감소된 시냅스 밀도를 나타내었다. p35의 말단절단된 버전인 p25는 시클린-의존성 키나제 5 (CDK5)의 활성화제이고, AD에 연루된다. p25 생성의 억제제는 AD 모델 마우스에서 AD 표현형의 발현을 방지하고, 이는 p25 축적이 AD 촉발자일 수 있다는 개념을 지지한다. 따라서, p25 유도 후 CK-p25 마우스의 유전자 발현 및 에피게놈 서명은 인간 AD 환자의 것과 상관된다.

[0170] 흥미롭게도, HDAC2 또는 Sp3 녹다운에 의해 상향-조절된 유전자는 CK-p25 마우스에서 하향-조절된 유전자 (도 9h), 뿐만 아니라 AD 환자의 뇌에서 하향-조절된 유전자 (표 5)와 유의한 중첩을 보여주었다. 구체적으로, 시냅스 유전자, 예컨대 Dlgap1, Gabbr2, Scn3b, 및 Syng3은 CK-p25 마우스 및 AD 환자 둘 다에서 하향-조절되었고, HDAC2 및 Sp3에 의해 음성적으로 공동-조절되었다. 전체적으로, 게놈-전반 발현 분석은 Sp3 및 HDAC2가 시냅스 기능과 관련된 유전자의 중첩 세트의 발현을 음성적으로 조절한다는 증거를 제공하였다.

[0171] 표 5. CGP 데이터베이스 (broadinstitute.org/gsea/msigdb/annotate.jsp.)에서의 용어에 관한, HDAC2/Sp3 녹다운에 의해 상향-조절되는 유전자의 풍부화

유전자 세트 명칭	설명	FDR
BLALOCK_ALZHEIMERS_DISEASE_DN	알츠하이머병을 갖는 환자로부터의 뇌에서 하향-조절되는 유전자.	8.39E-30
GRAESSMANN_APOPTOSIS_BY_DOXORUBICIN_DN	독소루비신 [PubChem=31703]에 반응하여 아포토시스를 거치는 ME-A 세포 (유방암)에서 하향-조절되는 유전자.	8.87E-28
GOBERT_OLIGODENDROCYTE_DIFFERENTIATION_DN	PD174265 [PubChemID=4709]에 반응하여 Oli-Neu 세포 (펠지교세포 전구체)의 분화 동안 하향-조절되는 유전자.	4.83E-26
NUYTEN_EZH2_TARGETS_UP	RNAi에 의한 EZH2 [유전자ID=2146]의 녹다운 후 PC3 세포 (전립선암)에서 상향-조절되는 유전자.	1.64E-24
WONG_ADULT_TISSUE_STEM_MODULE	'성인 조직 줄기' 모듈: 성인 조직 줄기 세포 일람에서 혈용적으로 상향-조절되는 유전자.	1.97E-21
SCHAEFFER_PROSTATE_DEVELOPMENT_48HR_DN	48시간 동안 안드로겐 디히드로테스토스테론 [PubChem=10635]에 노출된 제E16일 여성의 비뇨생식동 (UGS)에서 하향-조절되는 유전자.	6.76E-21
GEORGES_TARGETS_OF_MIR192_AND_MIR215	24시간에 MIR192 또는 MIR215 [유전자ID=406967;406997]의 발현에 의해 HCT116 세포 (결장암)에서 하향-조절되는 유전자.	3.06E-20
BENPORATH_SUZ12_TARGETS	세트 'Suz12 targets': 인간 배아 줄기 세포에서 폴리콤 단백질 SUZ12 [유전자ID=23512]의 표적으로서 칩 상에서 ChIP에 의해 확인되는 유전자.	9.83E-19
PEREZ_TP53_TARGETS	TP53의 발현 시 HMEC 세포 (1차 유선 상피)에서 상향-조절되는 유전자	2.60E-18

[0172]

[0173]

종합하면, 이들 발견은 DNA-결합 단백질인 Sp3이 HDAC2를 시냅스 기능에 수반되는 유전자의 프로모터로 동원하는 역할을 할 수 있다는 개념을 지지한다. 이러한 가설을 다루기 위해, 염색질 면역침전 (ChIP)에 이은 qPCR (ChIP-qPCR)을 이용하여 HDAC2 및 Sp3이 HDAC2 또는 Sp3 녹다운 후에 상향-조절된 시냅스 유전자의 프로모터에 직접 결합하는지 여부를 결정하였다 (도 9e). 전사 개시 부위 (TSS)의 상류 및 하류 둘 다의 프로모터의 영역을 증폭시키기 위해 프라이머 쌍을 설계하였다. 추가의 프라이머는 TSS의 대략 4kb 하류의 영역을 증폭시켰고, 이들 단백질은 이전에 프로모터 영역에 국재화되는 것으로 밝혀졌기 때문에, 이는 HDAC2 및 Sp3 풍부화에 대한 음성 대조군으로서의 역할을 하였다. 시냅스 유전자의 프로모터에서의, 및 뉴런 기능에서의 HDAC2 및 Sp3의 역할에 대한 관심으로 인해, 마우스 뇌로부터 뉴런을 단리하고 직접 프로빙하였다. 뉴런 핵의 단리는 뉴런 마커인 NeuN에 대한 염색에 이어, NeuN+ 뉴런으로부터 NeuN-신경교세포 집단을 분리하기 위한 형광-활성화 세포 분류 (FACS)를 통해 달성되었다 (도 2a 및 10a). 항-HDAC2 및 항-Sp3 항체와 함께 야생형 마우스의 피질 뉴런 (NeuN+) 핵으로부터 유래된 염색질을 사용한 ChIP-qPCR은 HDAC2 및 Sp3이 시냅스 유전자의 프로모터에 공동국재화되고, IgG 대조군에 비해 분명하게 풍부화된다는 것을 입증하였다 (도 2b-2c). 해마 조직으로부터 유래된 NeuN+ 핵을 사용한 ChIP-qPCR 실험에서, 시냅스 유전자 프로모터에서의 HDAC2 및 Sp3의 풍부화 및 분포는 피질 뉴런에서 관찰된 것과 유사하였고, 이는 이러한 현상이 뇌 영역에 걸쳐 보존된다는 것을 시사한다 (도 10b-10c).

[0174]

다음으로, Sp3이 Sp3 및 HDAC2에 의해 공동-조절되는 시냅스 유전자의 프로모터로의 HDAC2 동원을 매개하는지 여부를 시험하였다. 이러한 의문을 다루기 위해, 1차 뉴런의 시냅스 유전자 프로모터에서의 HDAC2 풍부화에 대한 Sp3 녹다운의 효과를 검사하였다. 흥미롭게도, ChIP 실험은 Sp3 단독의 녹다운이 이들 유전자의 프로모터로의 HDAC2 동원을 유의하게 감소시키기에 충분하다는 것을 밝혀내었다 (도 2d). 중요한 것으로, HDAC2 또는 Sp3의 녹다운 후 발현에서의 변화의 결여에 의해 규정되는 대조군 유전자 (Cd81, Mkrn1, Fam171b, Tanc2, Engase)에서의 HDAC2 풍부화는 Sp3의 상실에 의해 영향을 받지 않았다 (도 2d). 공동-조절되는 시냅스 유전자 프로모터로의 HDAC2 동원이 감소된 경우에 예상되는 바와 같이, 이들 부위에서 히스톤 H4 아세틸화가 Sp3 녹다운에 의해 변경되는지 여부를 시험하였다. 실제로, Sp3의 녹다운으로 인한 HDAC2 결합의 감소는 Grik2, Lin7a, Nlgn1, Syngr3 및 Synpr을 포함한 여러 유전자의 프로모터에서 증가된 히스톤 H4 아세틸화를 동반하였다 (도 2e). 이들 발견은 Sp3이 HDAC2를 시냅스 유전자의 프로모터로 동원한다는 생각과 일치하며, 여기서 HDAC2는 이어서 히스톤의 탈아세틸화를 매개하여 유전자 발현을 조절한다.

[0175]

실시예 4: HDAC2 및 Sp3의 발현은 AD에서 탈조절된다

[0176] 유전자 발현 프로파일링은, 다수가 AD 병리학의 맥락에서 또한 탈조절되는, 시냅스 유전자의 하위세트를 HDAC2 및 Sp3이 공동-조절한다는 것을 나타내었다. 이들 관찰은, HDAC2 단백질 수준이 AD 환자 및 신경변성의 마우스 모델에서 증가된다는 이전의 발견과 함께, Sp3 발현이 AD에서 또한 상향조절될 수 있는지 여부를 시험할 것을 촉진하였다. 먼저, 13명의 건강한 대조군 및 10명의 AD 환자로부터의 해마 CA1 피라미드 뉴런으로부터 수집된 공개된 유전자 발현 데이터를 검사하였고, AD 환자에서 HDAC2 및 Sp3 둘 다의 발현의 유의한 증가가 발견되었다 (도 3a-3b 및 표 6). 또한, WGCNA를 데이터셋에 적용하여 AD 환자에서 유전자 발현 네트워크의 변경을 조사하였다. 심지어 건강한 대조군 및 AD 환자를 조합한 이러한 데이터셋에서도, HDAC2 및 Sp3은 동일한 유전자 발현 모듈로 분리되었음이 관찰되었다 (도 3c). 또한, HDAC2/Sp3 모듈의 유전자의 발현은 대조군과 비교하여 AD 환자에서 더 높았고, 시냅스 기능을 위해 가장 풍부화된 모듈의 유전자의 발현과 음으로 상관되었다 (도 3d-3e).

[0177] 표 6. 대조군 대상체 및 AD 환자에 대한 인간 조직 정보.

GEO 수탁:	샘플 명칭:	질환 상태:	성별:	연령:
GSM119628	HIP 대조군 1	정상	남성	85일
GSM119629	HIP 대조군 2	정상	남성	80세
GSM119630	HIP 대조군 3	정상	남성	80세
GSM119631	HIP 대조군 4	정상	여성	102세
GSM119632	HIP 대조군 5	정상	남성	63세
GSM119633	HIP 대조군 6	정상	남성	79세
GSM119634	HIP 대조군 7	정상	남성	76세
GSM119635	HIP 대조군 8	정상	남성	83세
GSM119636	HIP 대조군 9	정상	남성	79세
GSM119637	HIP 대조군 10	정상	여성	88세
GSM119638	HIP 대조군 11	정상	여성	73세
GSM119639	HIP 대조군 12	정상	남성	69세
GSM119640	HIP 대조군 13	정상	남성	78세
GSM238799	HIP_이환됨_1	알츠하이머병	여성	73세
GSM238800	HIP_이환됨_2	알츠하이머병	남성	81세
GSM238801	HIP_이환됨_3	알츠하이머병	남성	78세
GSM238802	HIP_이환됨_4	알츠하이머병	남성	75세
GSM238803	HIP_이환됨_5	알츠하이머병	여성	70.8세
GSM238804	HIP_이환됨_6	알츠하이머병	여성	85세
GSM238805	HIP_이환됨_7	알츠하이머병	여성	77세
GSM238806	HIP_이환됨_8	알츠하이머병	남성	79세
GSM238807	HIP_이환됨_9	알츠하이머병	남성	88세
GSM238808	HIP_이환됨_10	알츠하이머병	남성	72세

[0178]

[0179] 이어서, CK-p25 마우스에서의 Sp3 수준을 검사하였다. HDAC2의 발현은 6-주 유도된 CK-p25 마우스의 피질 및 해마에서 상승하였다 (도 11a-11b). 흥미롭게도, Sp3 단백질 수준도 또한 6주 유도된 CK-p25 마우스의 피질 (도 4a) 및 해마 (도 11b)에서 상승하였다. 유사하게, 항-HDAC2 항체에 의한 공동-면역침전에 의해 평가된 바와 같이, HDAC2 및 Sp3의 복합체는 CK-p25 마우스에서 증가하였다 (도 4b 및 11c). 중요한 것으로, 6-주 유도된 CK-p25 마우스에서 하향조절된 시냅스 유전자의 프로모터에 결합된 HDAC2 및 Sp3의 수준을 평가하였다. HDAC2-Sp3 복합체가 이들 마우스에서 시냅스 유전자 발현과 길항작용한다는 개념과 일치하게, CK 대조군과 비교하여 CK-p25 NeuN+ 뉴런 핵 내 많은 이들 유전자좌에서 증가된 HDAC2 및 Sp3 결합이 발견되었다 (도 4c 및 4d 및 11d).

[0180] AD-관련 병리상태에 대한 상승된 Sp3 수준의 중요성을 시험하기 위해, CK-p25 마우스의 해마에서 Sp3을 표적화하는 shRNA를 발현시켰다 (도 12a-12b). 이전의 실험은 CK-p25 마우스에서 HDAC2 수준을 정규화하기 위한 HDAC2 shRNA의 발현이 장기 시냅스 가소성에서의 결핍을 역전시키는데 충분하다는 것을 보여주었다. CA3-CA1 웨퍼 측부 경로에서의 장기 강화 (LTP)는 대조군 shRNA를 주사한 CK-p25 마우스에서 심각하게 손상되었지만, Sp3 shRNA를 주사한 CK-p25 마우스는 대조군 마우스와 대등한 강건한 LTP를 나타내었다 (도 4e). Sp3 녹다운은 CK-p25 마우스에서 기저 시냅스 전달에 유의하게 영향을 미치지 않았다 (도 12c).

[0181] 종합하면, 이들 결과는 HDAC2 및 Sp3 둘 다가 CK-p25 모델 마우스 및 사후 AD 해마 조직에서 상향-조절된다는 것을 보여준다. 또한, 이들 결과는 HDAC2와 마찬가지로, Sp3 발현의 하향-조절이 CK-p25 마우스에서 시냅스 가소성의 결핍을 개선시킨다는 것을 입증한다.

[0182] 실시예 5: HDAC2-Sp3 복합체의 억제제는 시냅스 기능을 증진시킨다

- [0183] 본원에 제공된 실험 데이터는 Sp3이 시냅스 유전자의 프로모터로의 HDAC2 동원에서 주요 역할을 하고, 이러한 메카니즘은 알츠하이머병에서 탈조절된다는 것을 입증한다. HDAC2와 달리, HDAC1은 시냅스 유전자 발현 및 인지 기능을 억제하지 않지만, 2종의 단백질은 80% 아미노산 상동성을 공유하며, 카르복실 말단 (C-말단)에서 최대 분기를 갖는다. 대신, HDAC1의 상실은 이중 가닥 DNA 파괴, 세포 주기로의 이상 재진입, 및 뉴런 사멸을 초래한다. HDAC1 기능-획득은 신경보호성이다.
- [0184] HDAC2-Sp3 상호작용을 추가로 특징화하기 위해, 시냅스 기능을 조절하고 Sp3에 결합하는데 수반되는 HDAC2의 영역을 맵핑하였다. 각각 고도로 보존된 HDAC2 촉매 도메인 및 핵 국제화 신호를 함유하는 HDAC2 및 밀접하게 관련된 HDAC1의 3개의 키메라를 생성하였다 (도 5a). 키메라 A의 경우, HDAC2의 아미노 말단 (아미노산 1-121)을 HDAC1의 것 (아미노산 1-120)으로 대체하였다. 키메라 B에서는, HDAC2의 중간 도메인 (아미노산 227-357)을 HDAC1의 것 (아미노산 226-356)으로 대체하였다. 키메라 C에서는, HDAC2의 분기형 C-말단 (아미노산 391-488)을 HDAC1의 것 (아미노산 390-482)으로 대체하였다. 각각의 이들 키메라를 배양된 1차 뉴런에서 발현시키고, HDAC1 및 HDAC2에 상보적인 프라이머 (프라이머 결합 영역은 도 5a에서 화살표로 표시됨)를 사용하여 발현 수준을 결정하였다. 배양된 뉴런에서 HDAC2의 녹다운 후에, 키메라 B만이 HDAC1의 중간 부분을 전장 HDAC1과 동일한 수준으로 발현하였다 (도 5b). 또한, 키메라 A, B, 및 C는 전장 HDAC1과는 달리, 아미노산 120-226 사이의 HDAC2의 영역을 유사한 수준으로 발현하였고, 이는 후속 실험에서 관찰된 임의의 차등 효과가 구축물의 가변적인 발현으로 인한 것은 아님을 시사한다 (도 5b-5c).
- [0185] 이어서, 각각의 구축물을, 배양된 1차 뉴런에서 HDAC2 녹다운에 의해 유발된 증가된 mEPSC 진폭을 약화시키는 그의 능력에 대해 시험하였다. 명백하게, 전장 HDAC1 또는 키메라 C (HDAC1의 C-말단을 갖는 HDAC2)의 발현은 mEPSC에 대한 HDAC2 녹다운의 효과를 상쇄시키지 않았다 (도 5d-5e). 대조적으로, 키메라 A 및 키메라 B, 뿐만 아니라 전장 HDAC2는 HDAC2 녹다운을 유의하게 구제하였다 (도 5d-5e). 이들 데이터는 HDAC2의 분기형 C-말단이 시냅스 기능의 조절에 중요하다는 것을 시사한다.
- [0186] HDAC2의 분기형 C-말단만이 Sp3에 결합할 수 있다면, HDAC2-Sp3 상호작용은 이러한 도메인의 과다발현을 통해 잠재적으로 억제될 수 있다. 이를 시험하기 위해, mCherry와 융합된 HDAC2 (2C로 명명됨) 또는 HDAC1 (1C로 명명됨)의 C-말단 도메인, 또는 mCherry 단독으로 뉴런 N2A 세포를 형질감염시켰다. 공동-IP 실험을 사용하여, 2C는 내인성 Sp3에 강건하게 결합하지만, 1C 또는 mCherry 단독은 그렇지 않은 것으로 나타났다 (도 6a). 중요한 것으로, 세포 주기 진행을 제어하는 HDAC1/2 복합체의 널리 특징규명된 파트너인 Sin3A에 대한 2C의 결합은 검출되지 않았다. 이러한 결과는 Sin3A가 HDAC2의 상이한 영역에 결합한다는 것을 시사한다.
- [0187] 다음으로, 시냅스 기능이 2C의 발현에 의해 영향을 받는지 여부를 검사하였다. 결과는 배양된 1차 뉴런에서 2C의 발현이 HDAC2 또는 Sp3 녹다운을 연상시키는 mEPSC 진폭 및 빈도를 촉진하였음을 보여주었다 (도 6b). Sp3의 녹다운에 의한 것과 같이 2C의 발현에 의해 HDAC2의 시냅스 유전자로의 동원이 교란되었는지 여부를 또한 시험하였다 (도 2d). 일관되게, 시냅스 전달에 수반되는 유전자의 프로모터에서의 HDAC2 풍부화는 2C의 발현 후에 유의하게 감소되었다 (도 6c). 추가로, 2C의 발현 후에 시험된 대다수의 시냅스 유전자의 증가된 발현이 관찰되었다 (도 6d). 종합하면, 이들 데이터는 HDAC2의 C-말단 도메인의 과다발현이, 아마도 관련 계층 유전자로부터의 HDAC2의 퇴거를 통해, 시냅스 기능, 유전자 발현, 및 DNA에 걸친 HDAC2 국제화에 대한 HDAC2 및 Sp3 녹다운의 효과를 모방한다는 것을 나타낸다.
- [0188] 다음으로, 2C의 과다발현을 통한 시냅스 유전자의 프로모터로의 HDAC2 동원의 억제가 세포 증식에 영향을 미치는지 여부를 검사하였다. 현재 이용가능한 범-HDAC 억제제는 세포 주기 진행을 차단하며, 이는 바람직하지 않은 효과를 도출할 수 있다. 따라서, 마우스 배아 섬유모세포 (MEF)의 증식이 2C의 과다발현에 의해 영향을 받는지 여부를 시험하였다. MEF의 증식 속도는 HDAC1 및 HDAC2의 동시 녹다운에 의해 유의하게 감소되었지만, mCherry 대조군과 비교하여 증식에 대한 2C 발현의 효과는 관찰되지 않았다 (도 13a). 이들 결과는 HDAC2의 C-말단 도메인을 표적화하는 것이 세포 증식에 대한 유해 효과를 피하면서 시냅스 기능의 선택적인 조작을 가능하게 한다는 것을 시사한다.
- [0189] 2C의 발현을 통해 HDAC2-Sp3 복합체를 표적화하는 치료 잠재력의 확인으로서, CK-p25 신경변성 모델을 사용하여 CA3-CA1 웨퍼 측부 LTP 및 기억 기능에 대한 2C 발현의 효과를 시험하였다. CK-p25 마우스의 해마에서 2C의 렌티바이러스 발현은 기저 시냅스 전달에 대해 어떠한 효과도 없었지만, 이들 마우스에서 LTP를 증진시켰고, 대조군 바이러스는 그렇지 않았다 (도 6e 및 13b). 맥락적 및 단서적 공포 조건화 검정에 의해 평가된 바와 같이, 해마-의존성 기억 형성이 또한 6-주 유도된 CK-p25 마우스에서 현저하게 손상되었다. 중요한 것으로, 해마에서의 2C의 과다발현은 맥락-의존성 및 단서적 공포 학습 결핍 둘 다를 개선시킬 수 있었다 (도 6f 및 13c). 따라

서, 2C의 과다발현은 신경변성 마우스 모델에서 시냅스 및 인지 결핍을 상쇄시킬 수 있다. 종합하면, 본 발명자들의 발견은 HDAC2의 C-말단을 표적화하는 것이 HDAC2-Sp3 복합체를 억제하고 기억 장애와 연관된 신경계 장애를 치료하기 위한 타당하고 특이적인 전략을 구성한다는 것을 보여준다.

[0190]

서열

[0191]

서열식별번호: 1 - HDAC2 펩티드 억제제 (인간 HDAC2, 유니프룻 ID No.: Q92769, 아미노산 390-488)

[0192]

VHEDSGDEDGEDPDKRISIRASDKRIACDEEFSDSEDEGEGGRRNVADHKKGAKKARIEED
KKKETEDKKTVDVKEEDKSKDNSGEKTDTKGKTSEQLSNP

[0193]

다른 실시양태

[0194]

본 명세서에 개시된 모든 특색은 임의의 조합으로 조합될 수 있다. 본 명세서에 개시된 각각의 특색은 동일한, 등가의, 또는 유사한 목적을 제공하는 대안적 특색에 의해 대체될 수 있다. 따라서, 달리 명백하게 언급되지 않는 한, 개시된 각각의 특색은 단지 일련의 포괄적인 등가의 또는 유사한 특색의 예이다. 상기 설명으로부터, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 개시내용의 본질적인 특징을 용이하게 확인할 수 있으며, 그의 취지 및 범주를 벗어나지 않고 다양한 용도 및 조건에 적용시키기 위해 본 개시내용의 다양한 변화 및 변형을 행할 수 있다. 따라서, 다른 실시양태도 또한 청구범위 내에 포함된다.

[0195]

등가물 및 범주

[0196]

관련 기술분야의 통상의 기술자는 상용 실험만을 사용하여 본원에 기재된 본 개시내용의 구체적 실시양태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 본 개시내용의 범주는 상기 설명으로 제한되는 것으로 의도되지 않으며, 오히려 첨부된 청구범위에 제시된 바와 같다. 청구범위에서 단수표현은, 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 문맥으로부터 명백하지 않는 한, 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 군의 하나 이상의 구성원 사이에 "또는"을 포함하는 청구범위 또는 설명은, 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 문맥으로부터 명백하지 않는 한, 군의 구성원 중 하나, 하나 초과, 또는 모두가 주어진 생성물 또는 프로세스에 존재하거나, 그에 사용되거나, 또는 달리 관련된다면 충족되는 것으로 간주된다. 본 개시내용은 군의 정확히 하나의 구성원이 주어진 생성물 또는 프로세스에 존재하거나, 그에 사용되거나, 또는 달리 관련된 실시양태를 포함한다. 본 개시내용은 군의 구성원 중 하나 초과 또는 모두가 주어진 생성물 또는 프로세스에 존재하거나, 그에 사용되거나, 또는 달리 관련된 실시양태를 포함한다.

[0197]

또한, 본 개시내용은 열거된 청구항 중 하나 이상으로부터 1개 이상의 제한, 요소, 절 및 설명 용어가 또 다른 청구항에 도입된 모든 변형, 조합 및 순열을 포괄한다. 예를 들어, 또 다른 청구항에 대해 종속항인 임의의 청구항은 동일 기반 청구항에 대해 종속항인 임의의 다른 청구항에서 발견되는 1개 이상의 제한을 포함하도록 변형될 수 있다. 요소가, 예를 들어 마쿠쉬 군 포맷의 목록으로서 제시되는 경우에, 요소의 각각의 하위군이 또한 개시되고, 임의의 요소(들)가 군으로부터 제거될 수 있다. 일반적으로, 본 개시내용 또는 본 개시내용의 측면이 특정한 요소 및/또는 특색을 포함하는 것으로 언급되는 경우, 본 개시내용 또는 본 개시내용의 측면의 특정 실시양태는 이러한 요소 및/또는 특색으로 이루어지거나, 또는 본질적으로 이루어진다는 것을 이해해야 한다. 단순성의 목적을 위해, 그러한 실시양태는 본원에 구체적으로 제시되지 않았다. 또한, 용어 "포괄하는" 및 "함유하는"은 개방적이고, 추가의 요소 또는 단계의 포함을 허용하는 것으로 의도된다는 것에 주목한다. 범위가 주어진 경우, 종점들이 포함된다. 또한, 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 문맥 및 관련 기술분야의 통상의 기술자의 이해로부터 명백하지 않는 한, 범위로 표현된 값은 본 개시내용의 상이한 실시양태에 언급된 범위 내의 임의의 특정 값 또는 하위-범위를, 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한, 범위의 하한치의 10분의 1 단위까지 가정할 수 있다.

[0198]

본 출원은 다양한 허여된 특허, 공개 특허 출원, 학술지 논문, 및 다른 공개물을 언급하며, 이는 모두 본원에 참조로 포함된다. 포함된 참고문헌 중 임의의 것과 본 명세서 사이에 충돌이 존재하는 경우에, 본 명세서가 우선할 것이다. 또한, 선행 기술 내에 속하는 본 개시내용의 임의의 특정한 실시양태는 청구항 중 어느 한 항 이상으로부터 명시적으로 제외될 수 있다. 이러한 실시양태는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 것으로 여겨지기 때문에, 이들은 제외가 본원에 명시적으로 제시되지 않더라도 제외될 수 있다. 본 개시내용의 임의의 특정한 실시양태는 선행 기술의 존재에 관계 없이, 임의의 사유로, 임의의 청구항으로부터 배제될 수 있다.

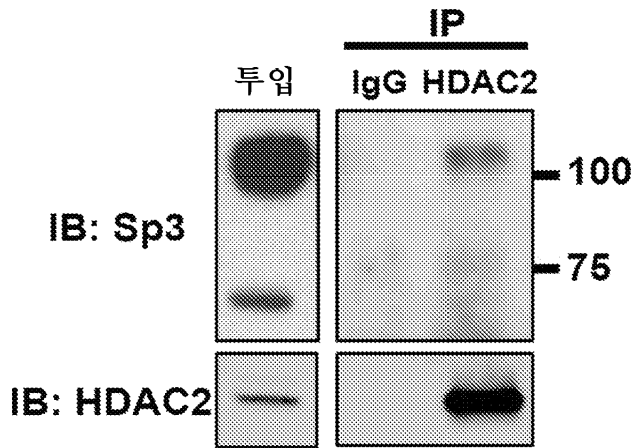
[0199]

관련 기술분야의 통상의 기술자는 상용 실험만을 사용하여 본원에 기재된 구체적 실시양태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 본원에 기재된 본 실시양태의 범주는 상기 설명으로 제한되는 것으로

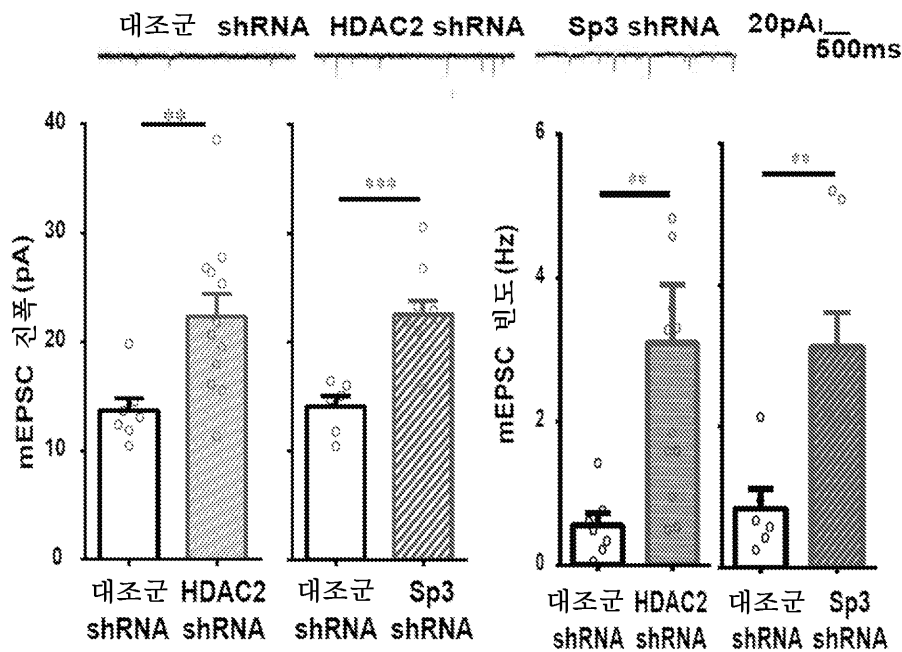
의도되지 않으며, 오히려 첨부된 청구범위에 제시된 바와 같다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이러한 설명에 대한 다양한 변화 및 변형이 하기 청구범위에 정의된 바와 같은 본 개시내용의 취지 또는 범주로부터 벗어나지 않고 이루어질 수 있음을 인지할 것이다.

도면

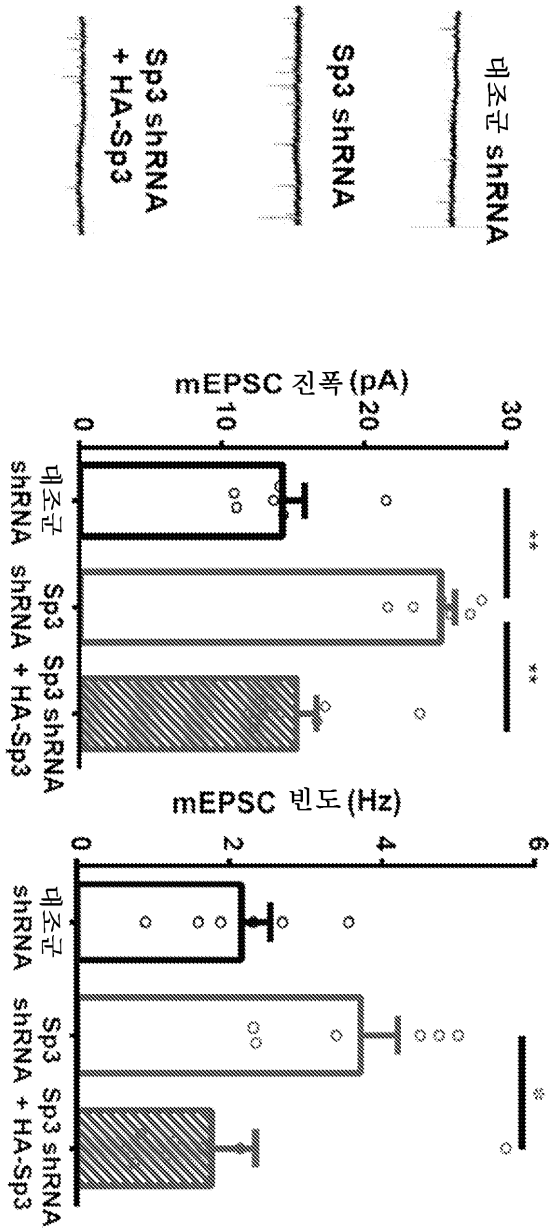
도면1a



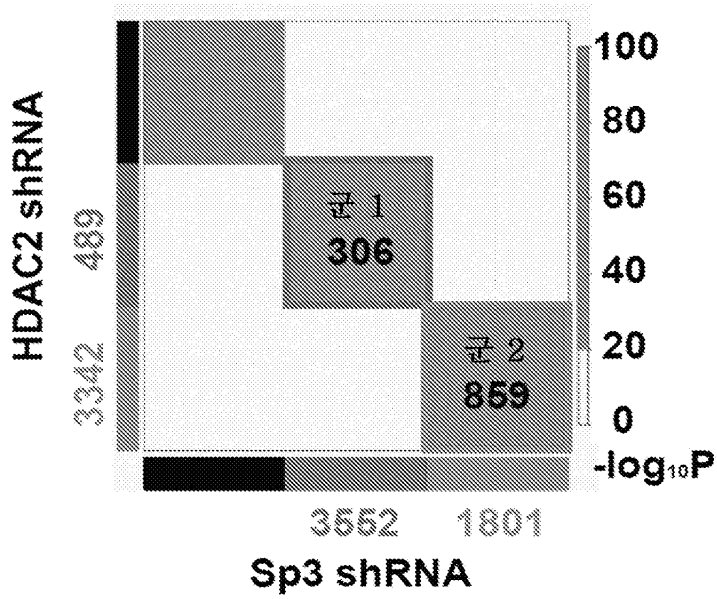
도면1b



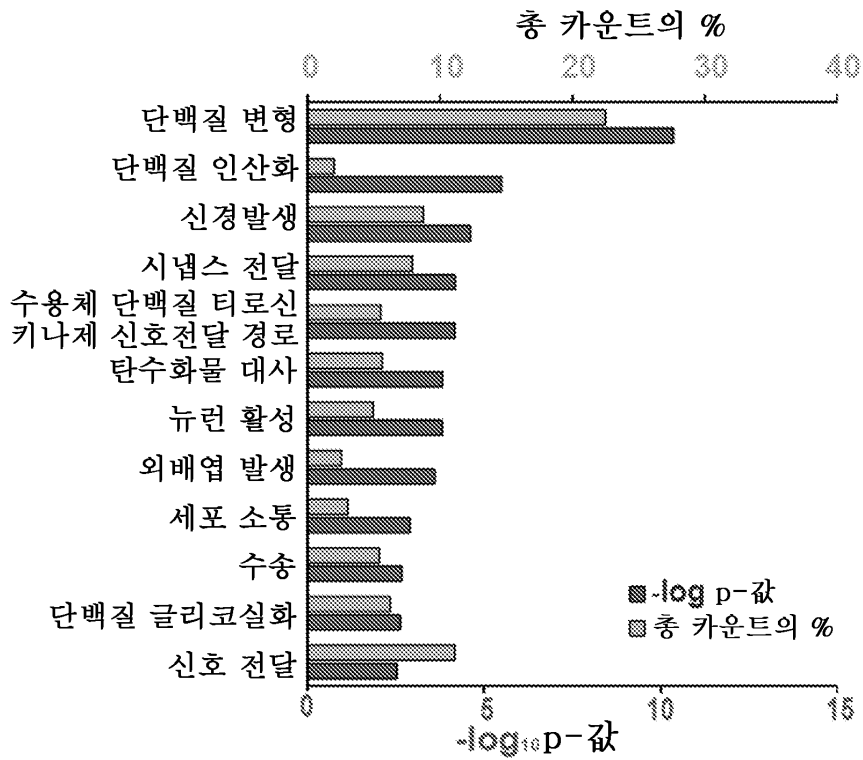
도면1c



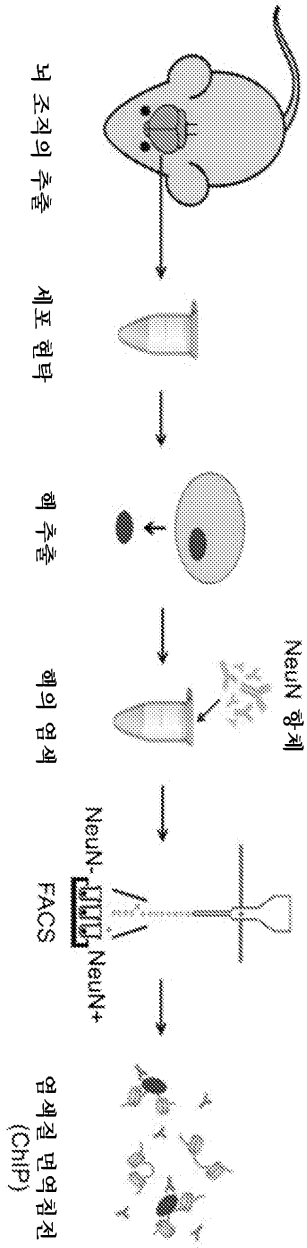
도면1d



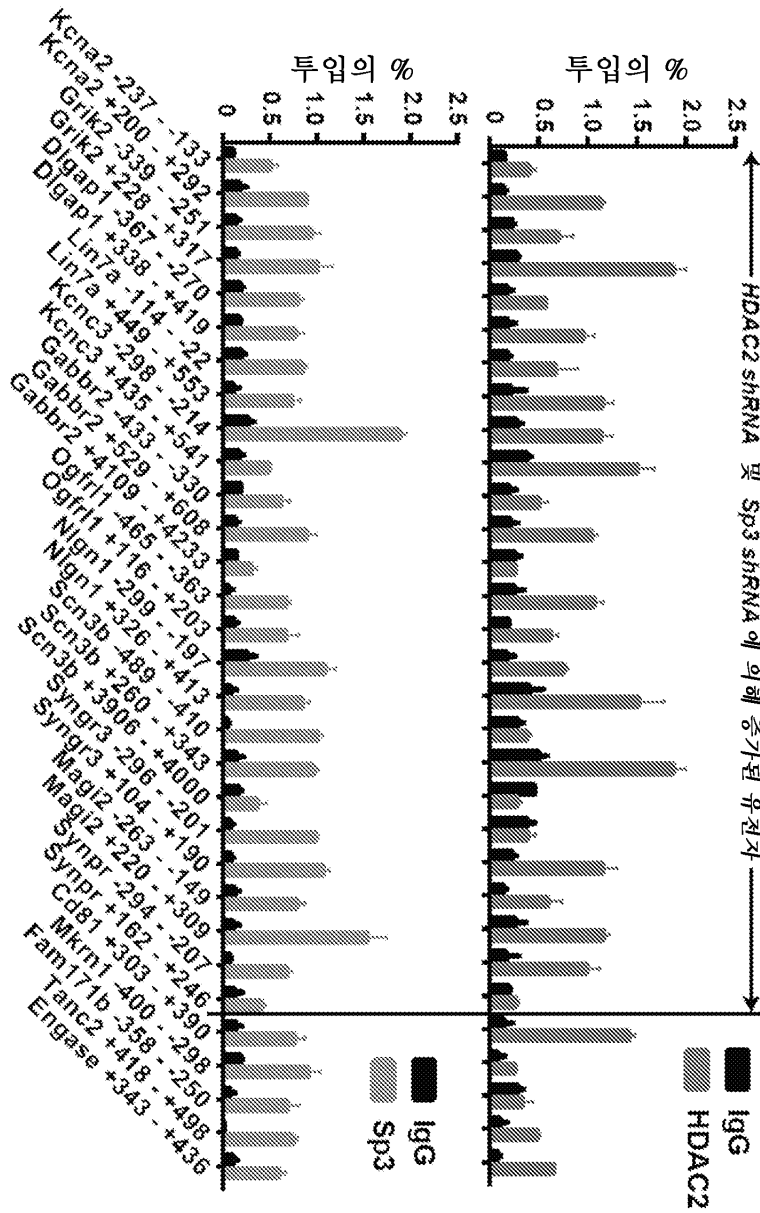
도면1e



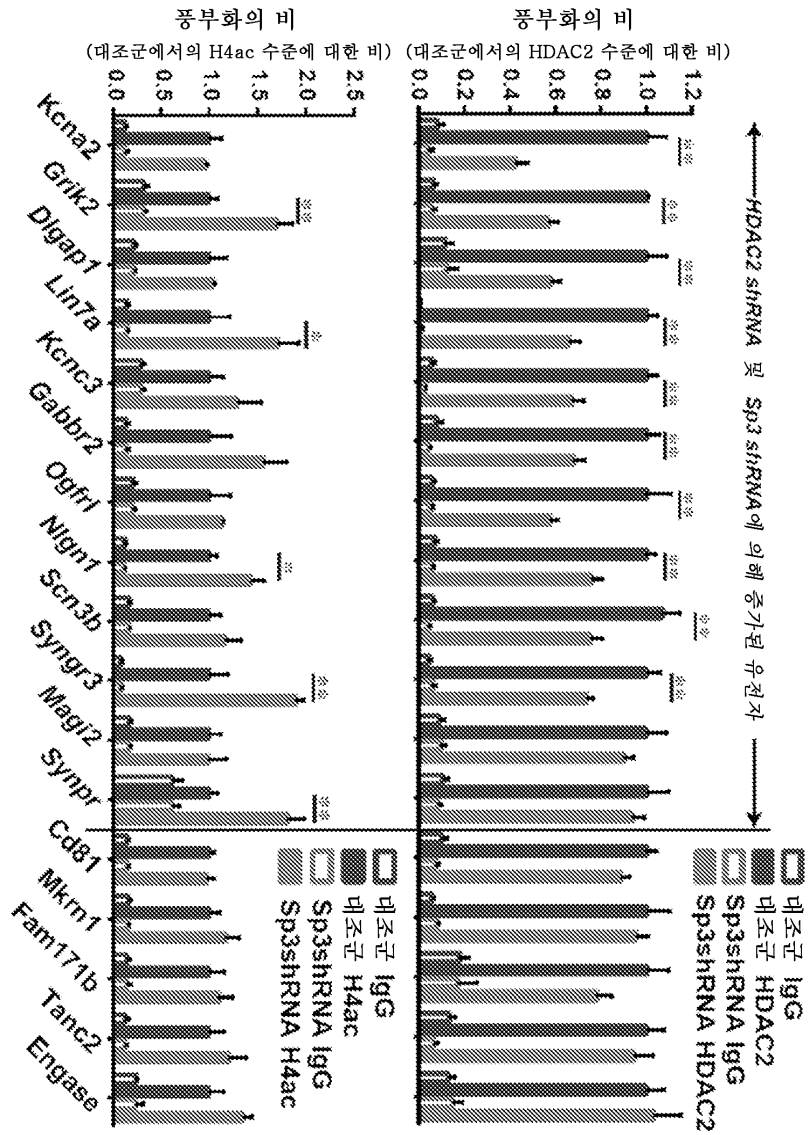
도면2a



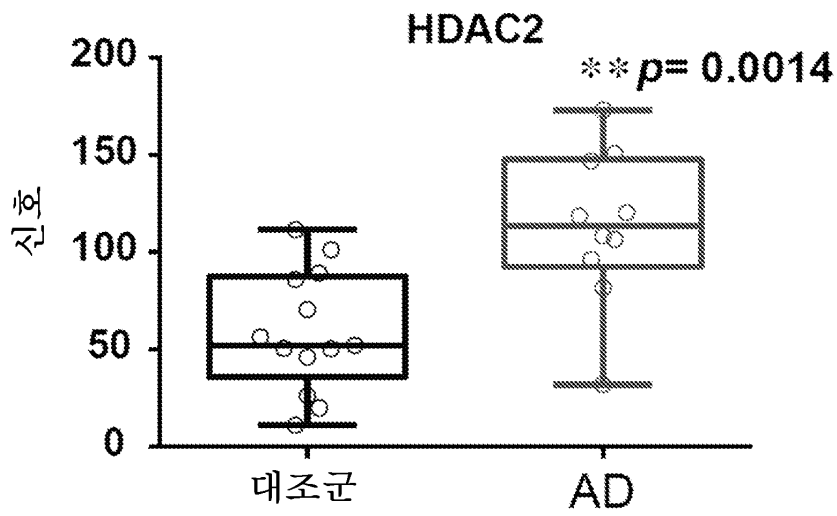
도면2b



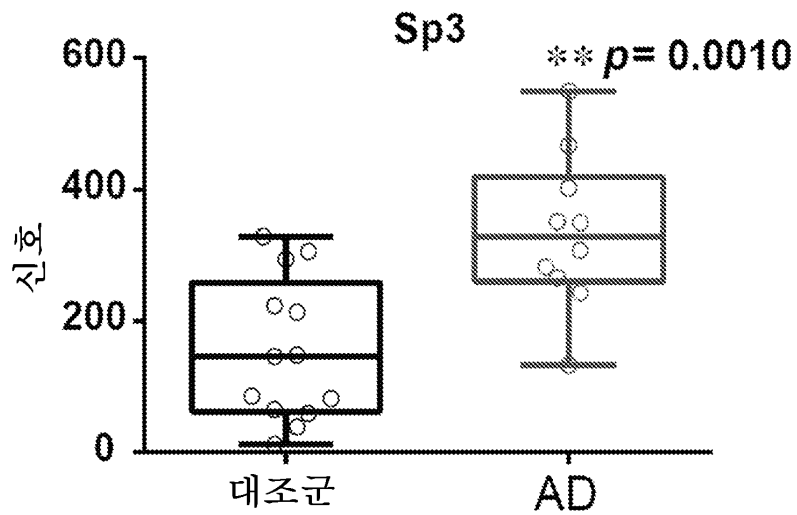
도면2c



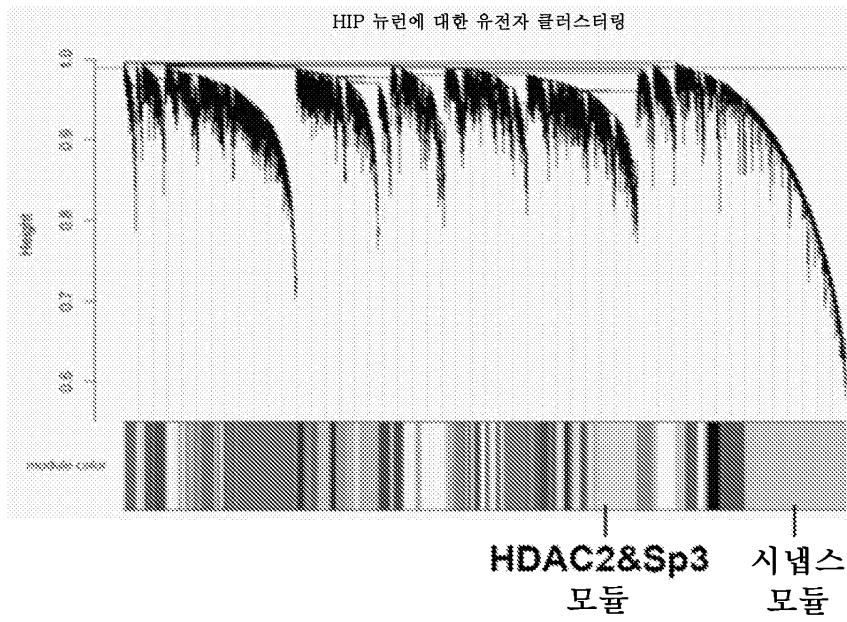
도면3a



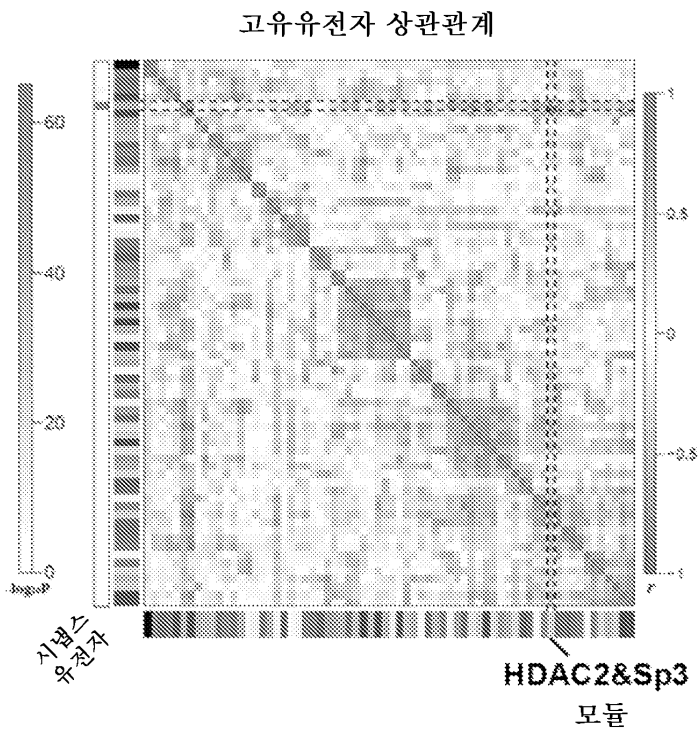
도면3b



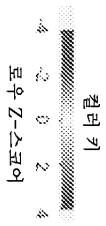
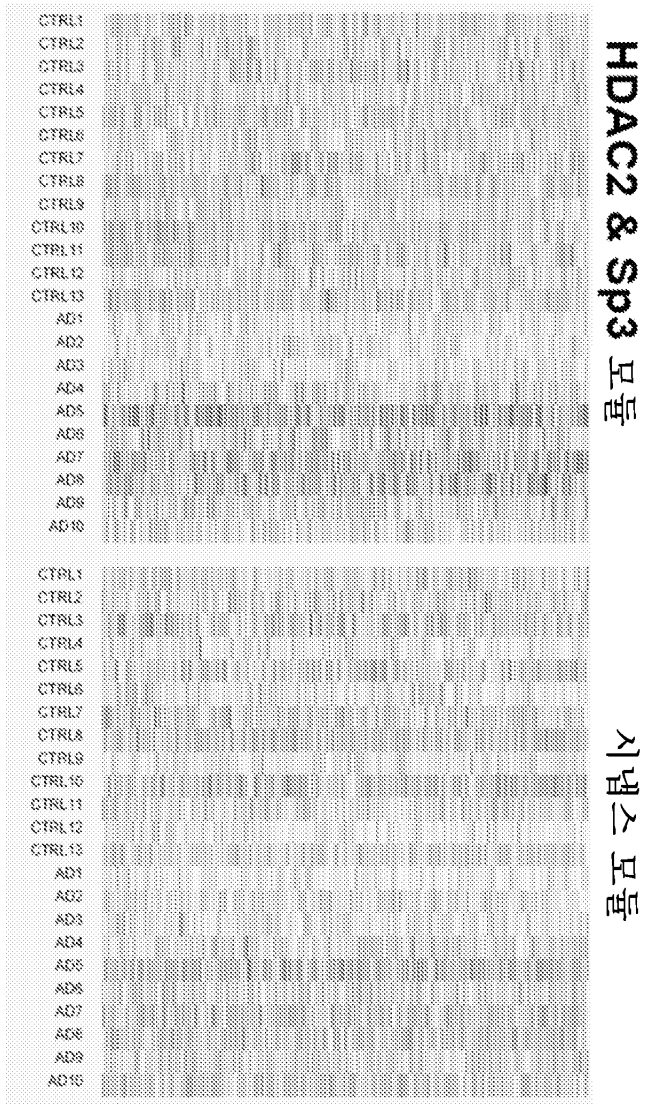
도면3c



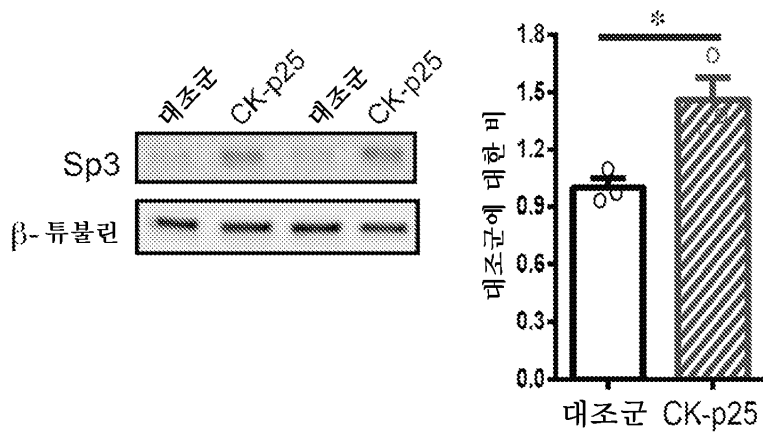
도면3d



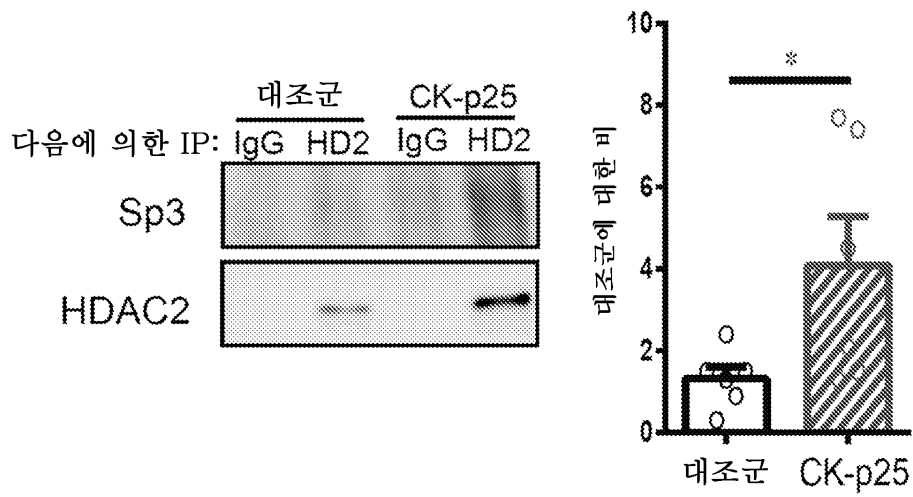
도면3e



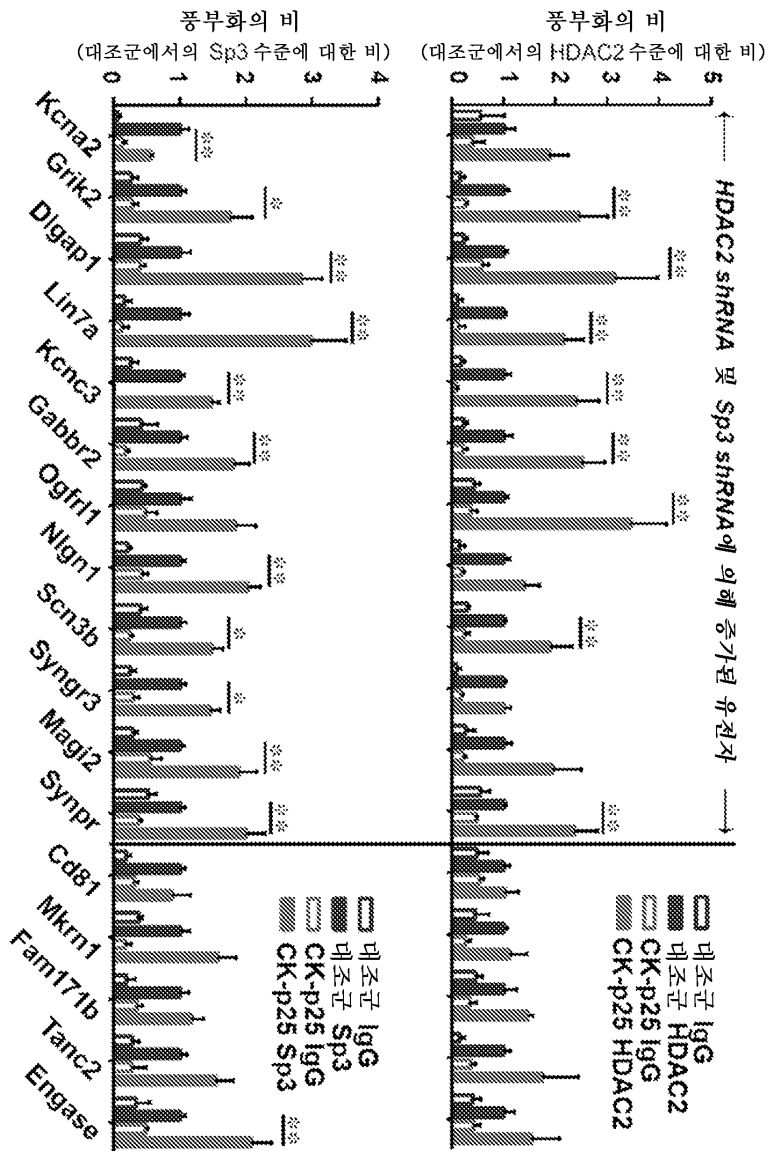
도면4a



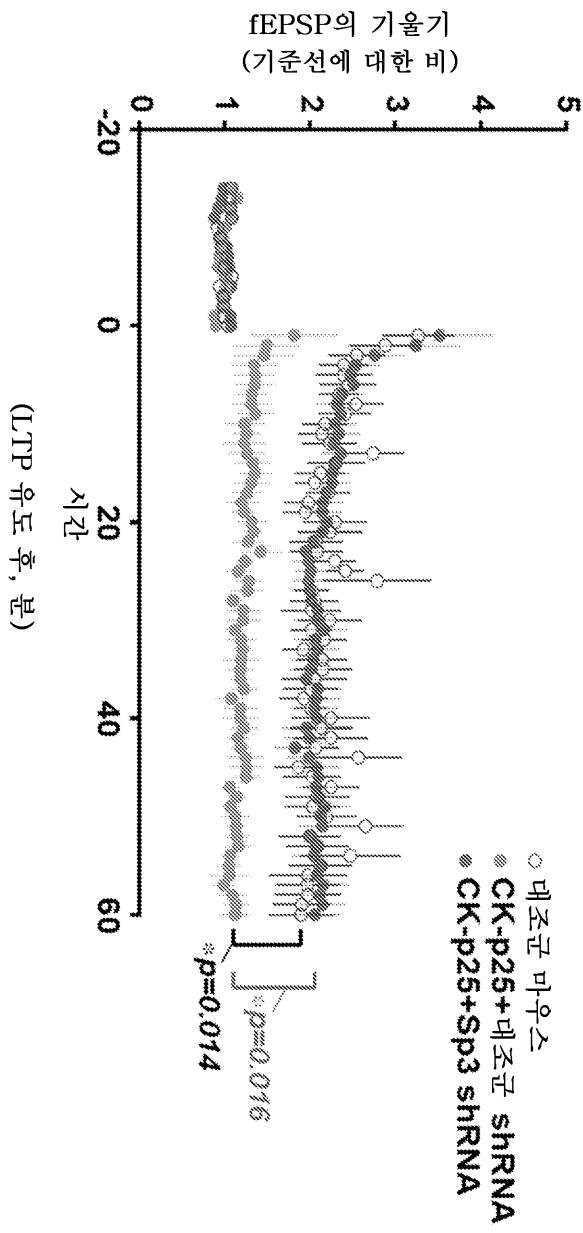
도면4b



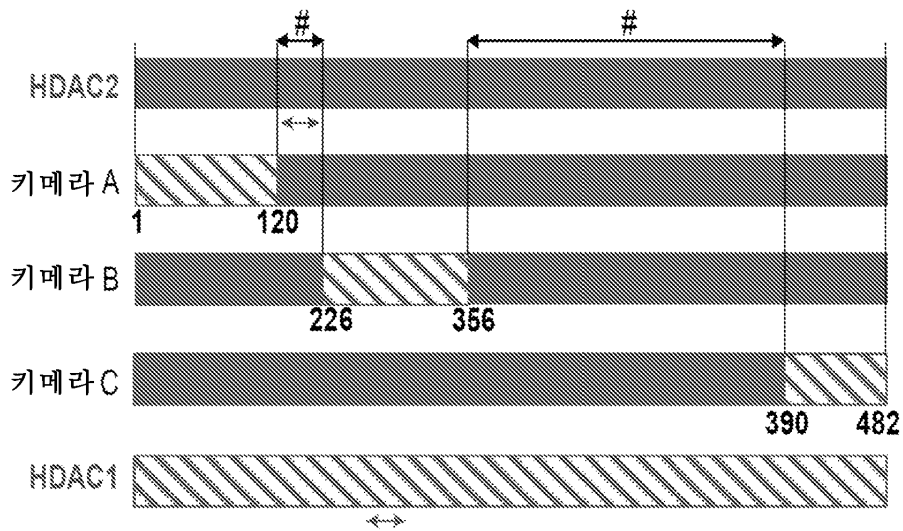
도면4c



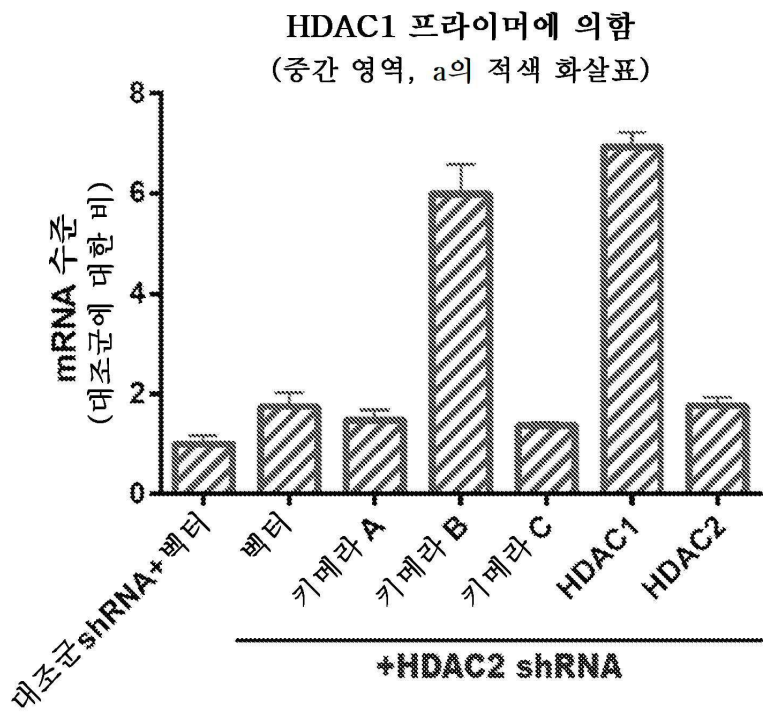
도면4d



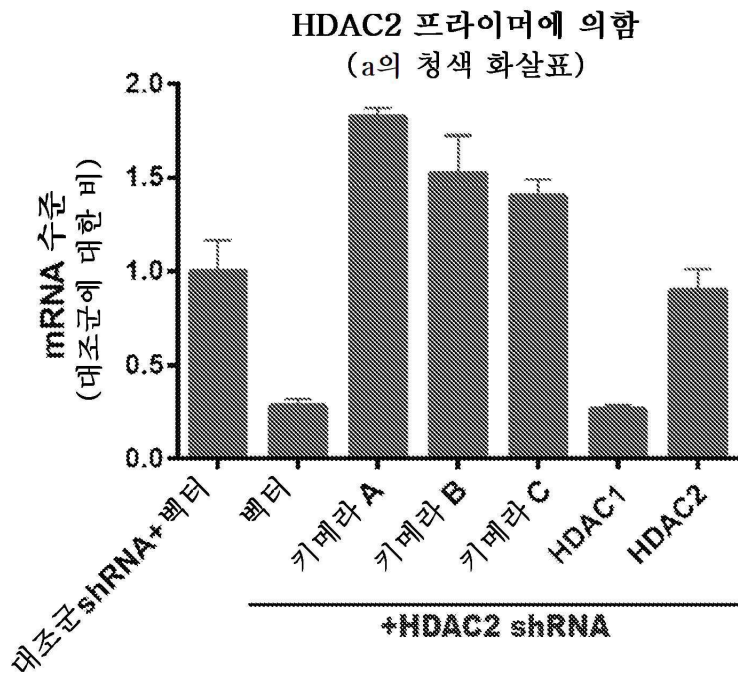
도면5a



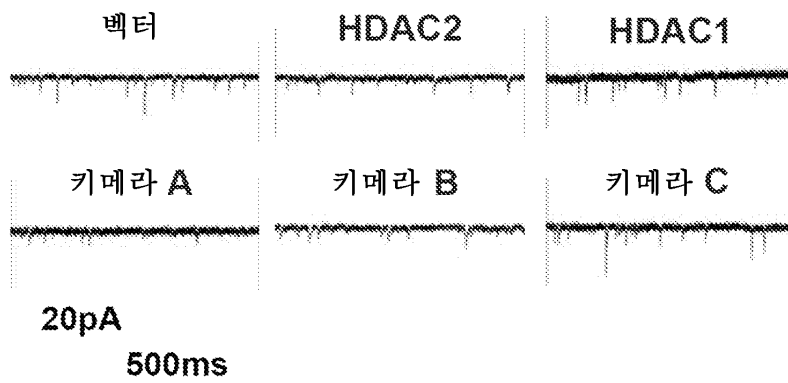
도면5b



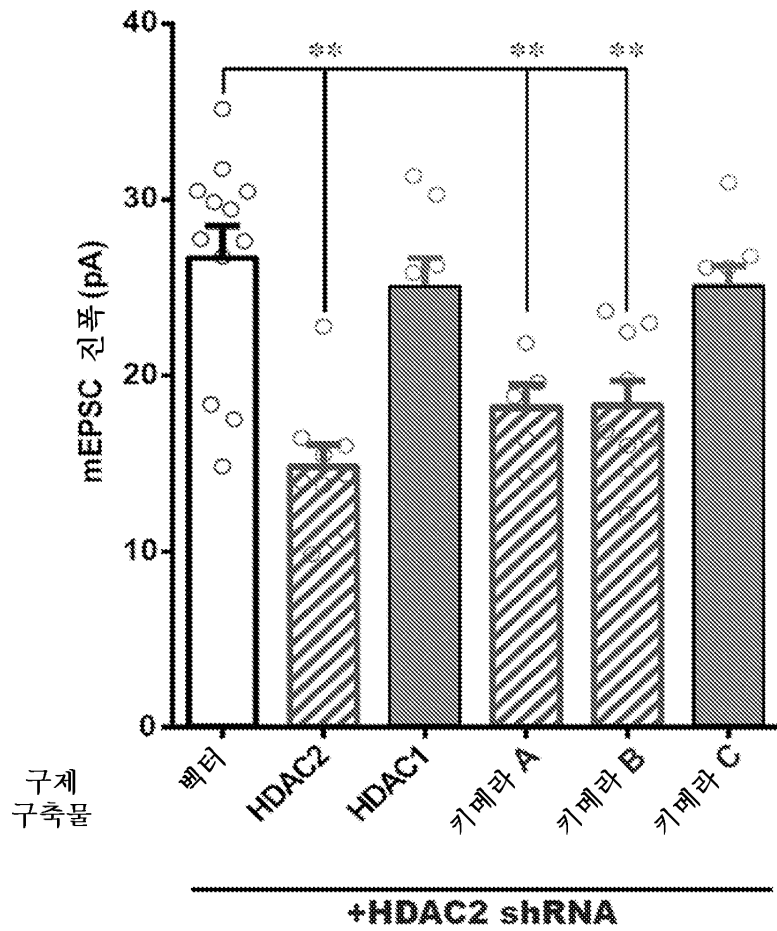
도면5c



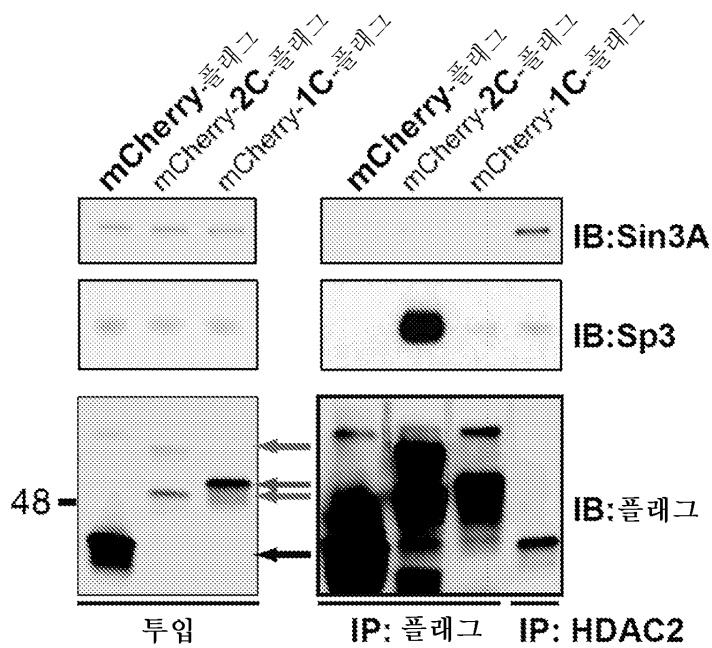
도면5d



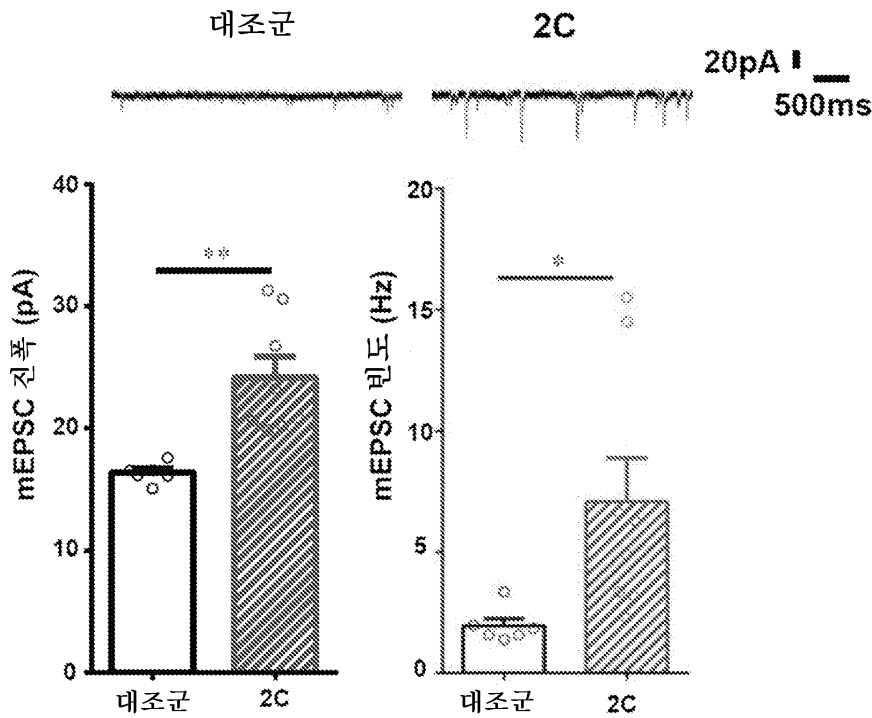
도면5e



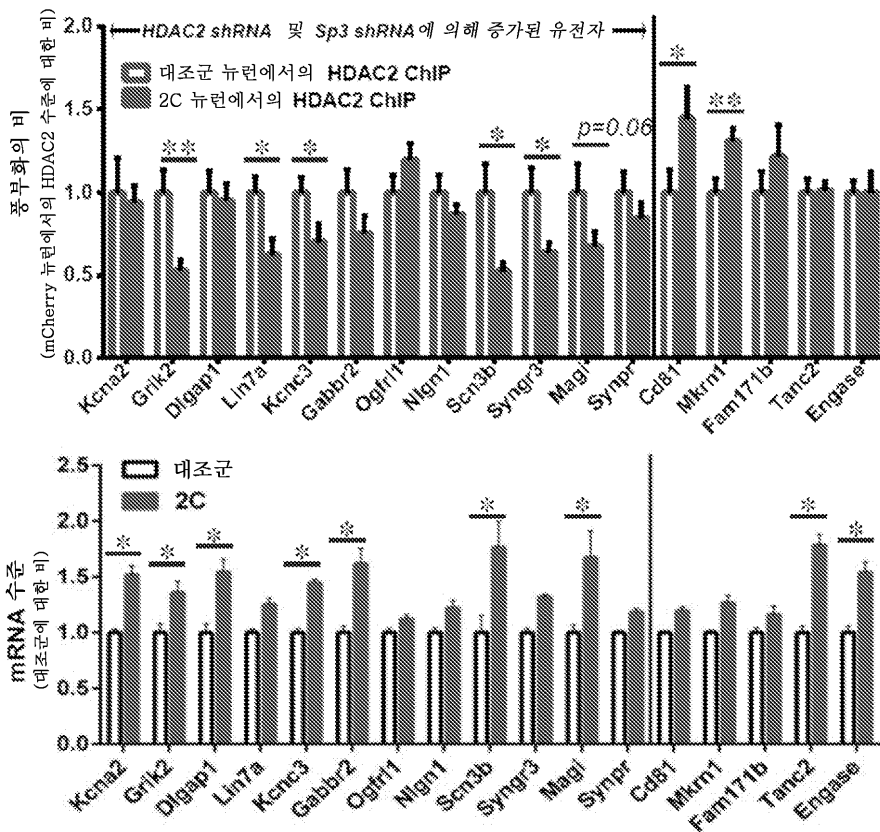
도면6a



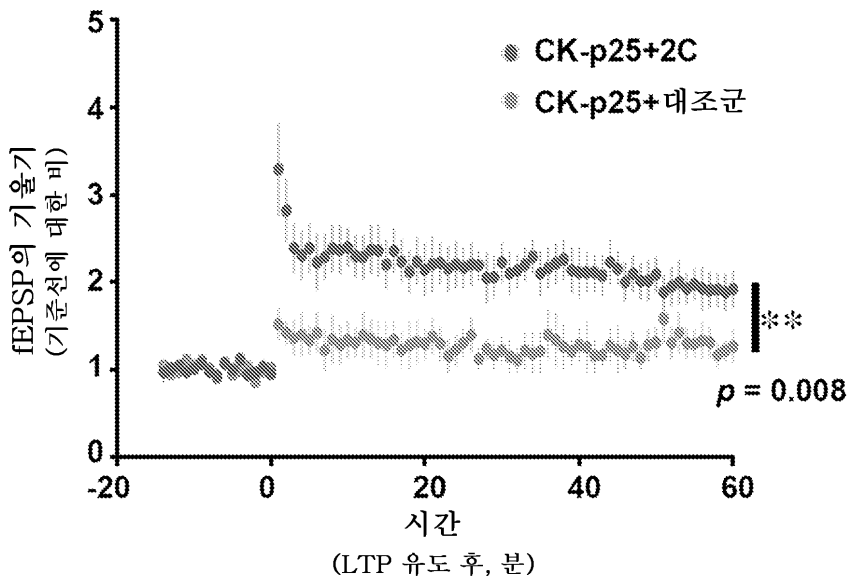
도면6b



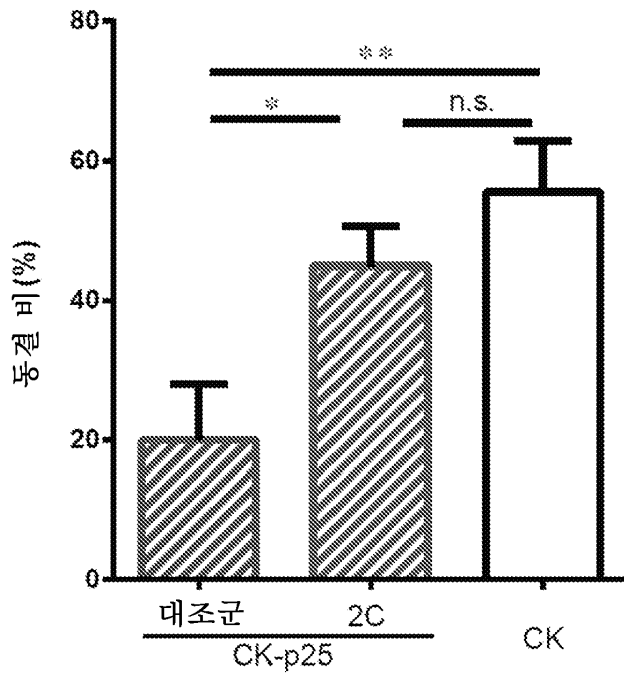
도면6c



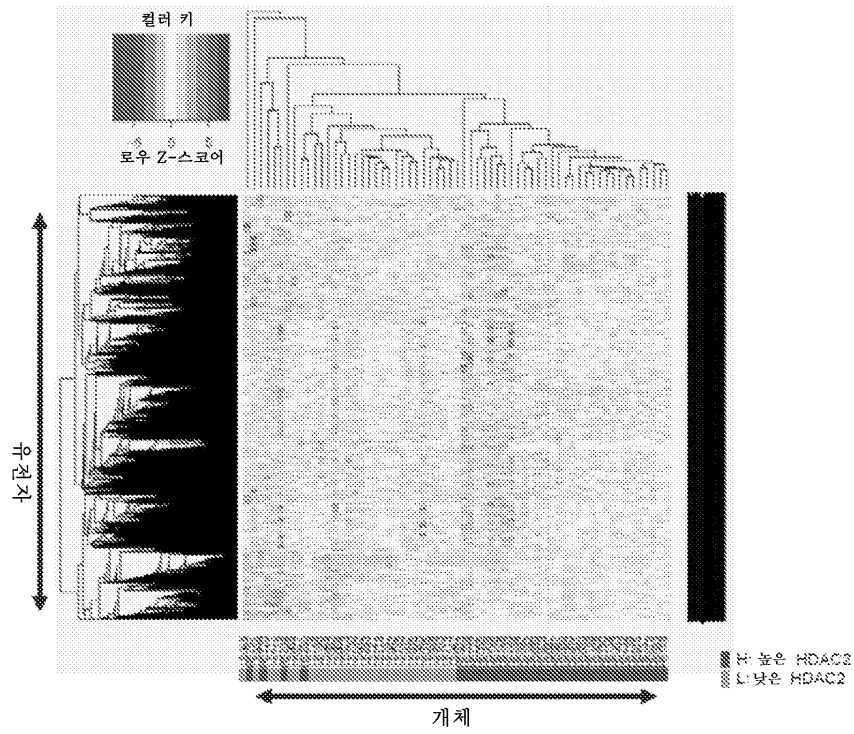
도면6d



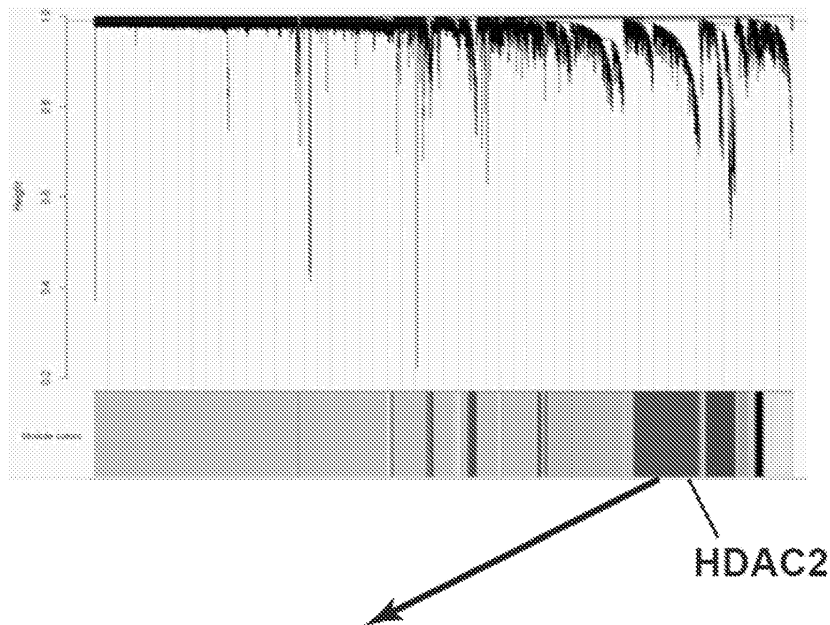
도면6e



도면7a

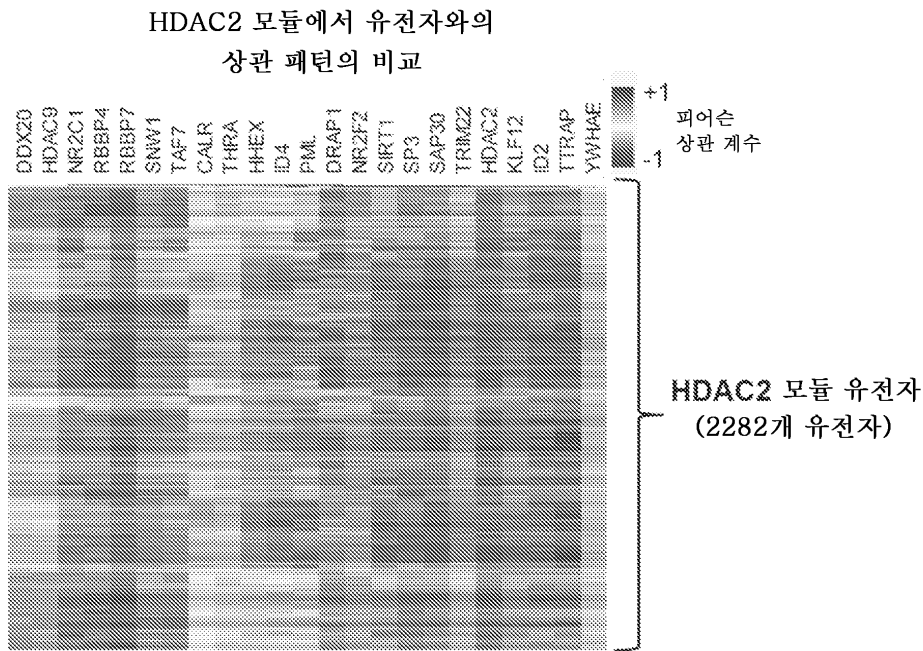


도면7b

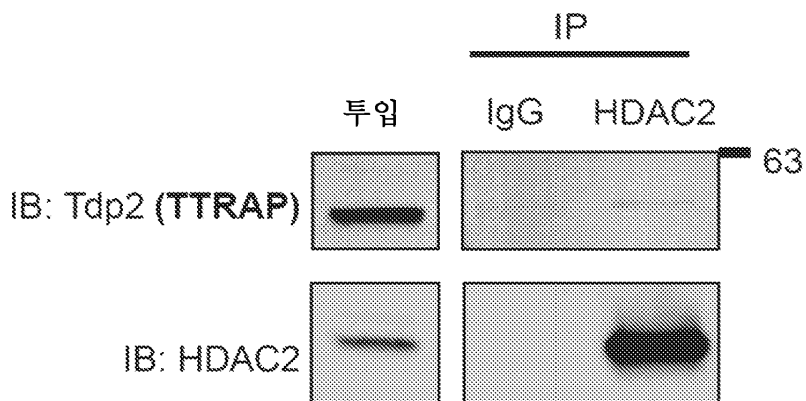


"HDAC 복합체 성분"을 골라내기 위한
유전자 온돌로지 분석

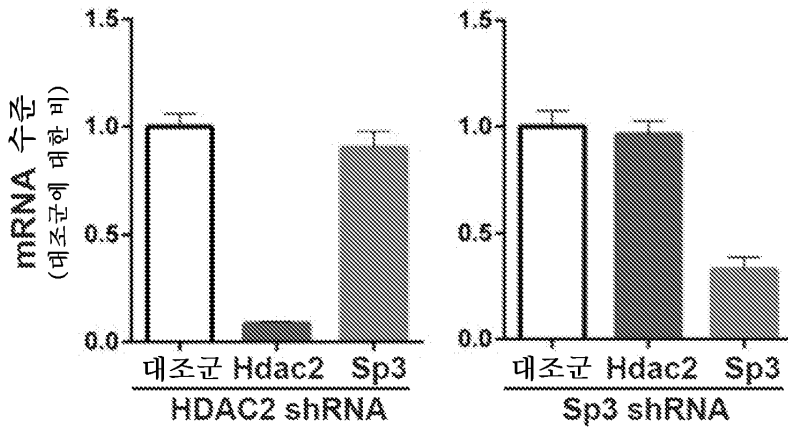
도면7c



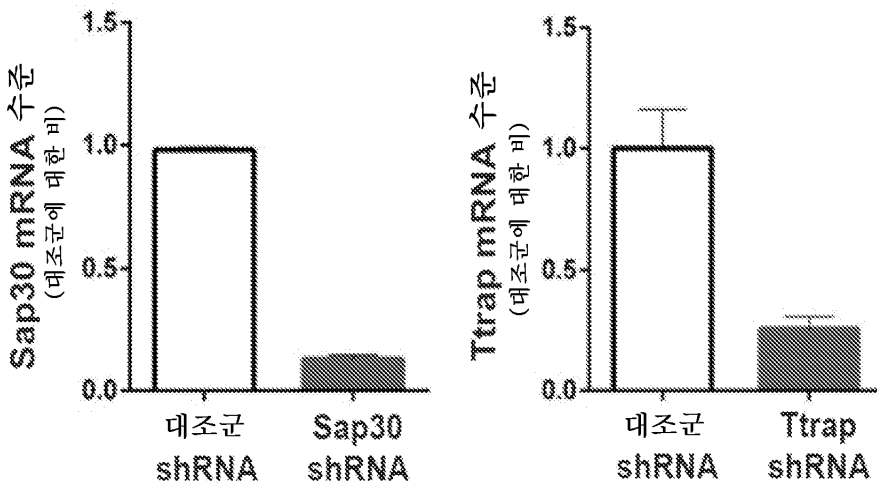
도면7d



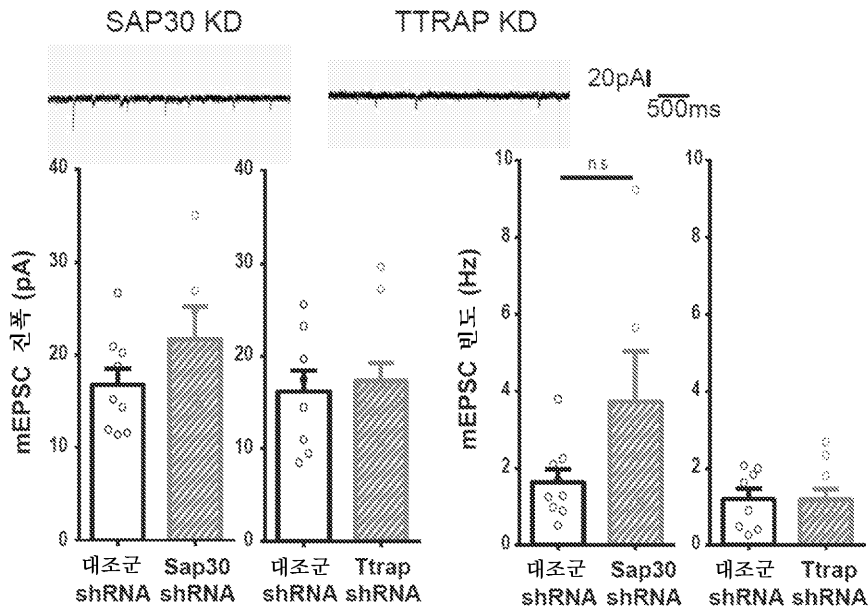
도면8a



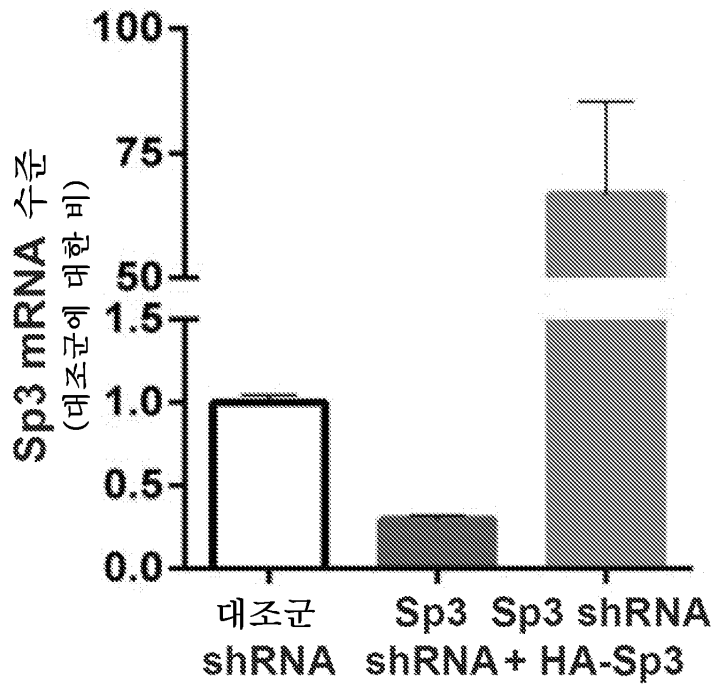
도면8b



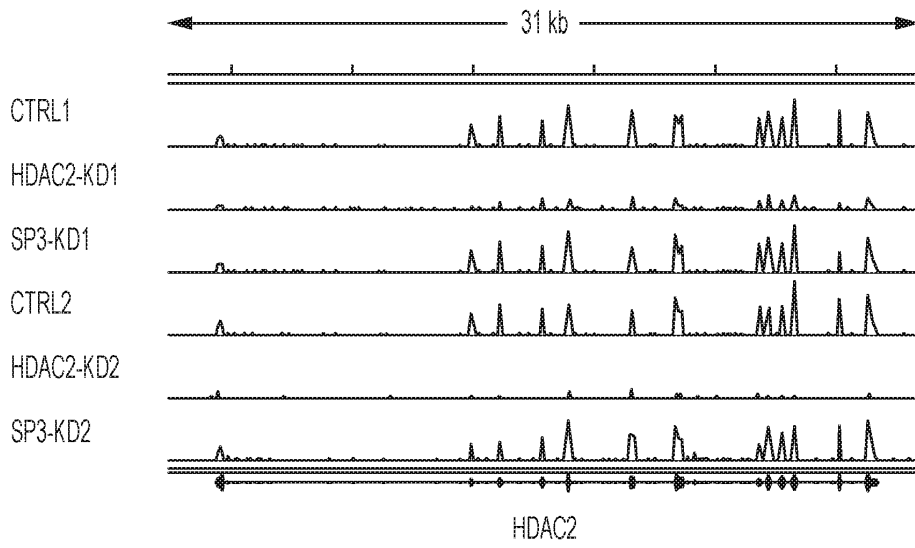
도면8c



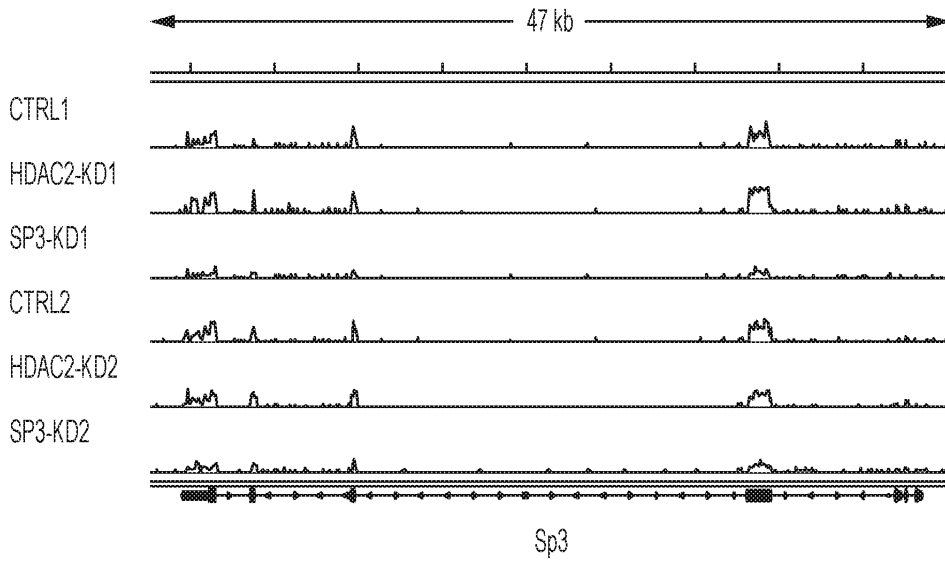
도면8d



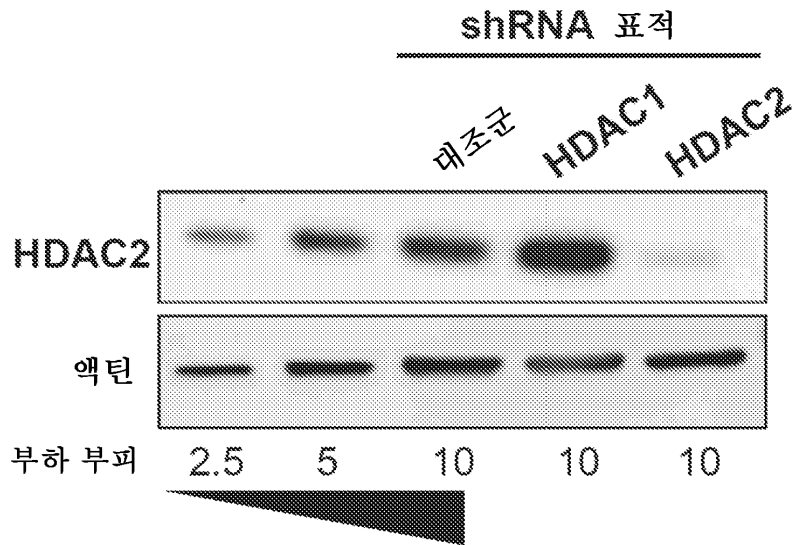
도면9a



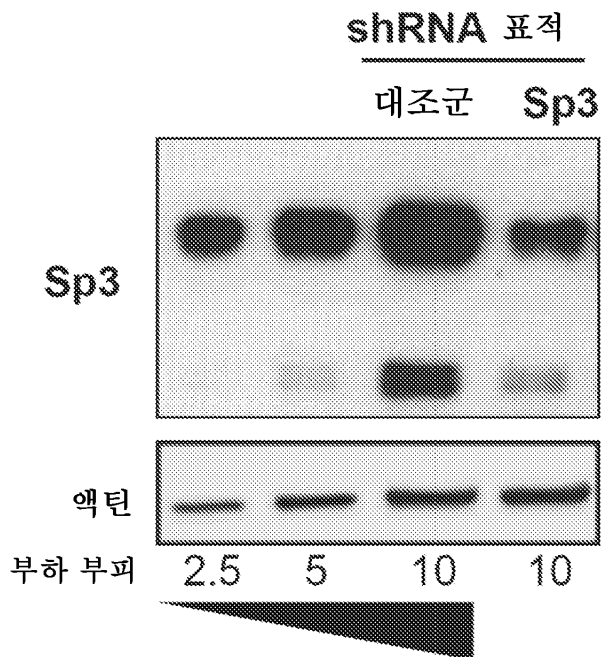
도면9b



도면9c



도면9d

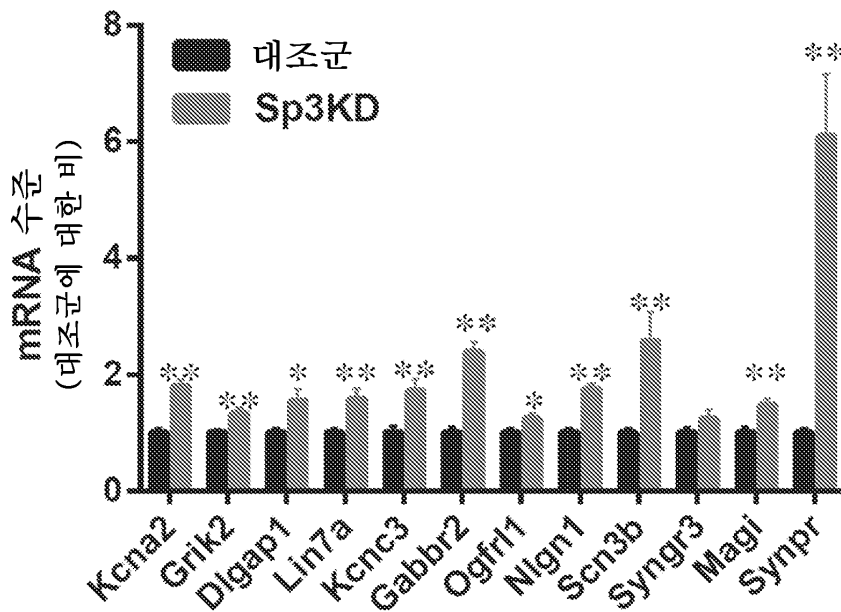


도면9e

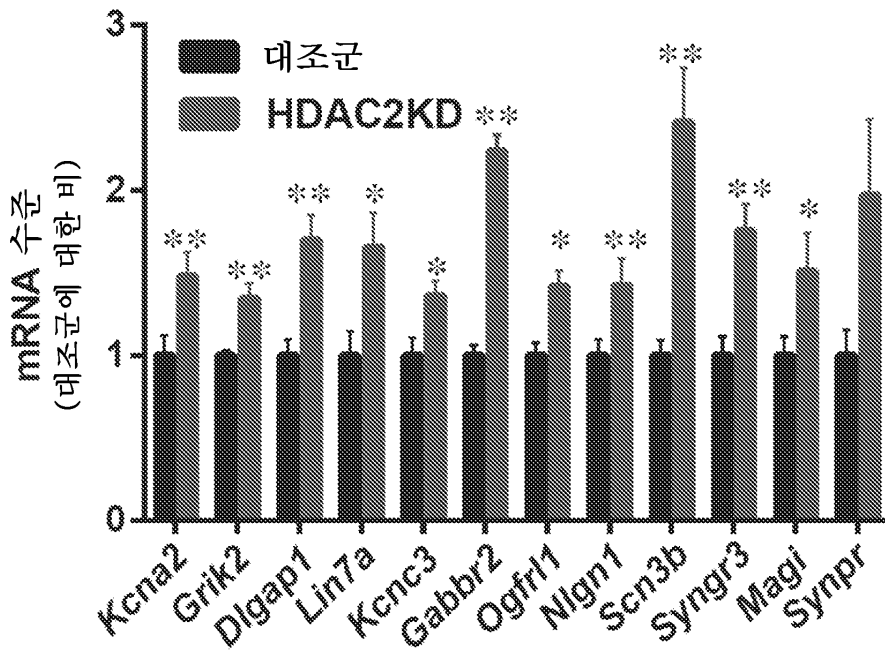
유전자 명칭	GO 용어
DLGAP1	뉴런 활성화
GABBR2	시냅스 전달
GRIK2	시냅스 전달
KCNA2	뉴런 활성화
KCNC3	시냅스 전달
LIN7A	뉴런 활성화
MAGI2	시냅스 전달
NLGN1	뉴런 활성화
OGFRL1	뉴런 활성화
SCN3B	시냅스 전달
SYNGR3	뉴런 활성화
SYNPR	시냅스 전달

볼드체: AD 환자에서 하향-조절됨

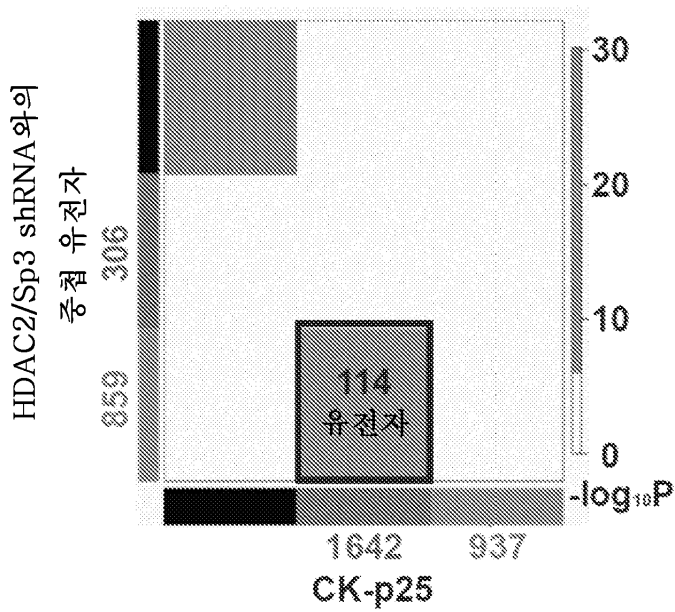
도면9f



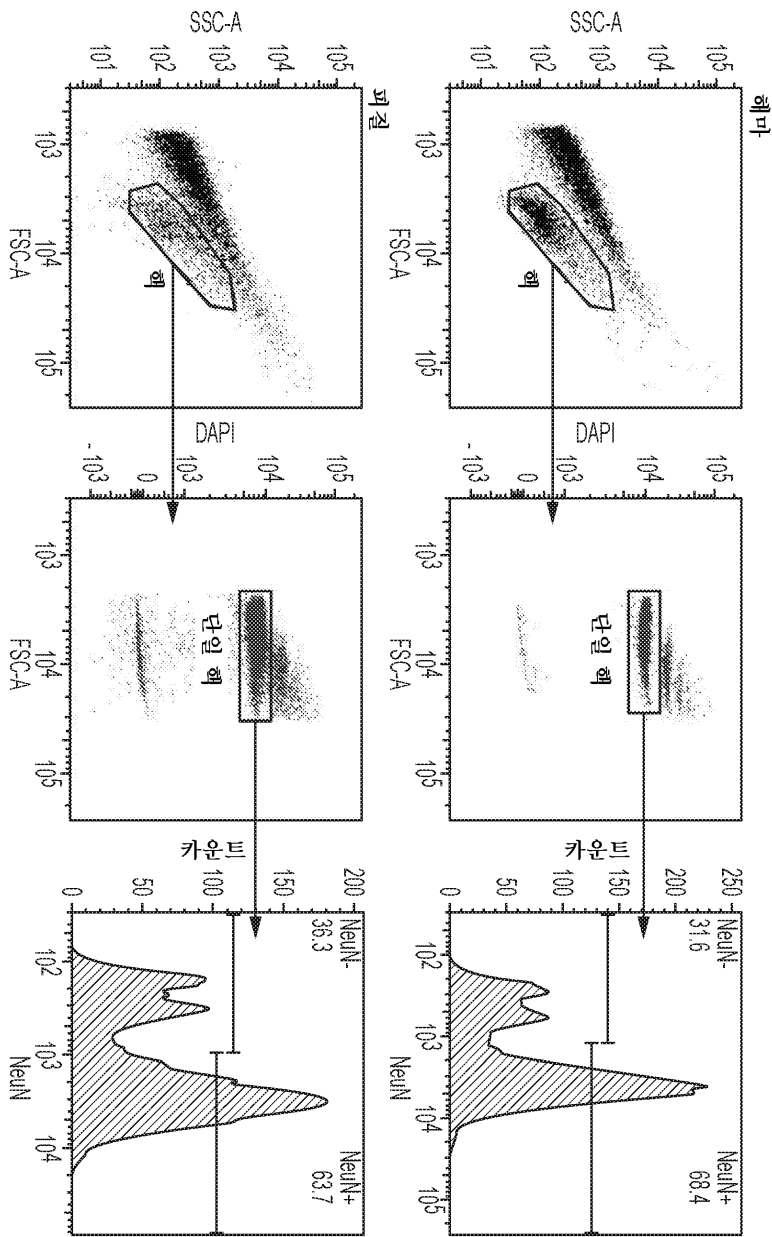
도면9g



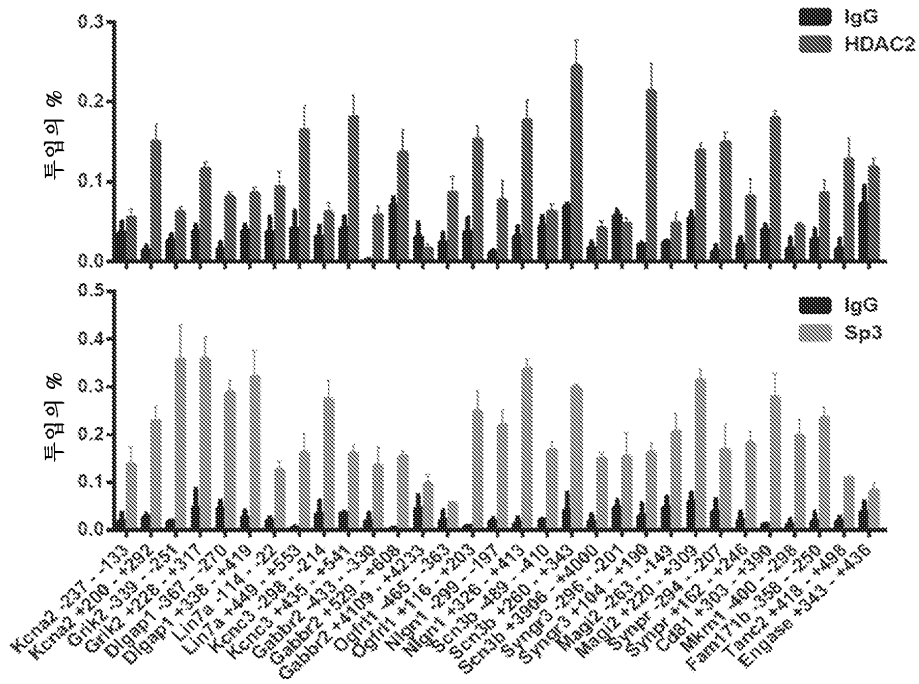
도면9h



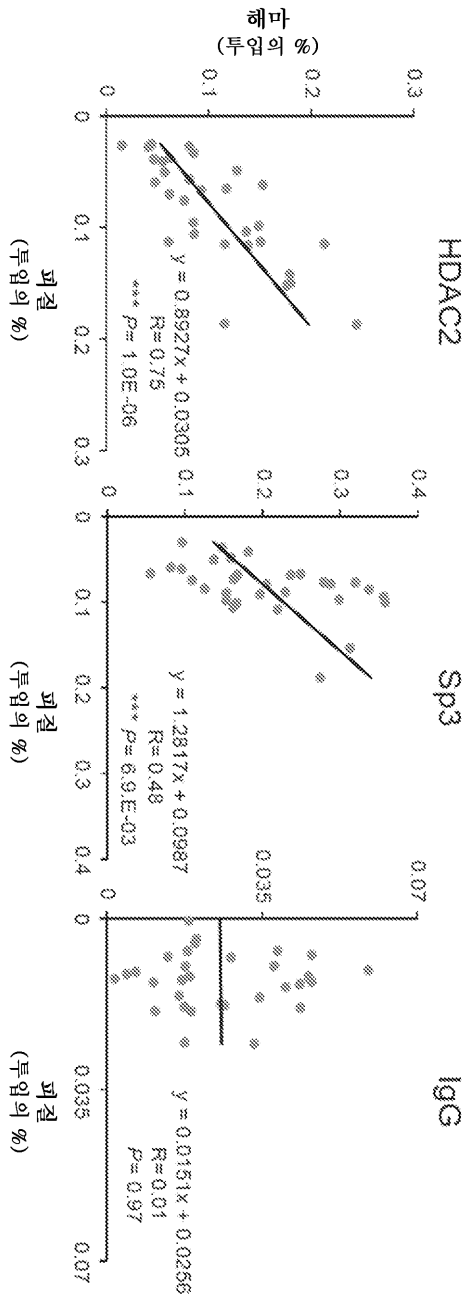
도면10a



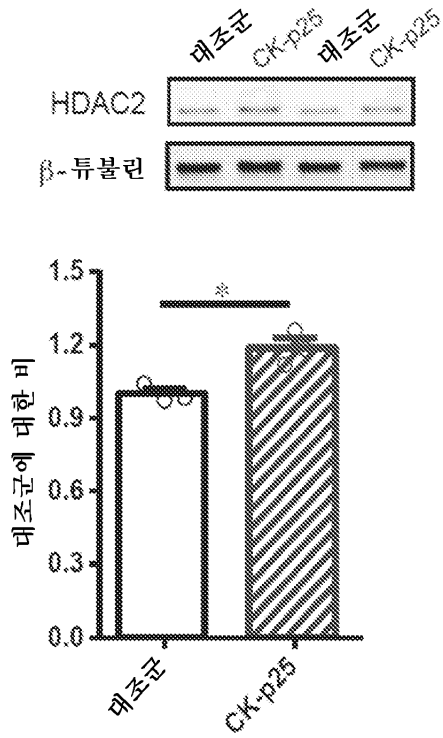
도면10b



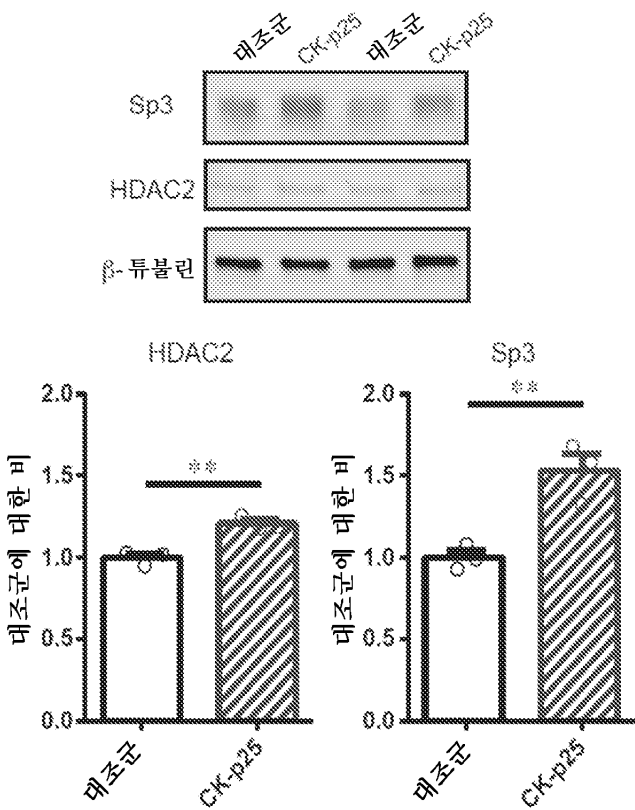
도면10c



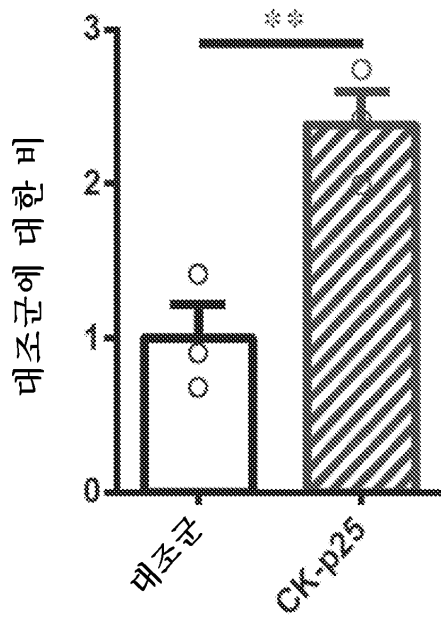
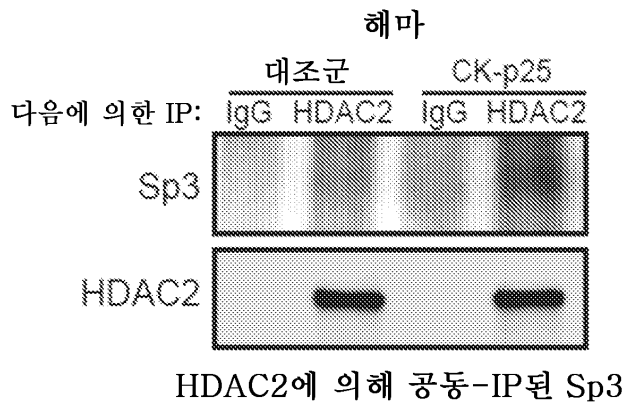
도면11a



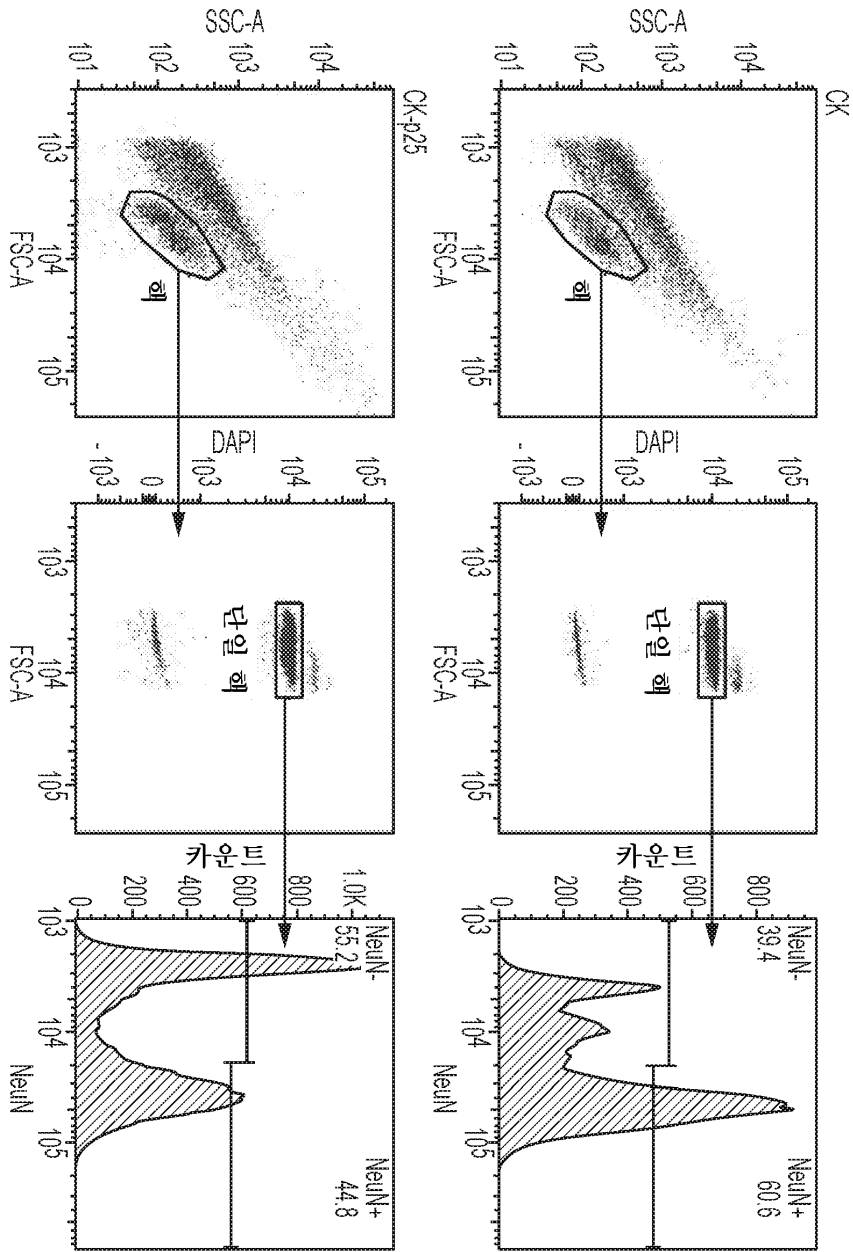
도면11b



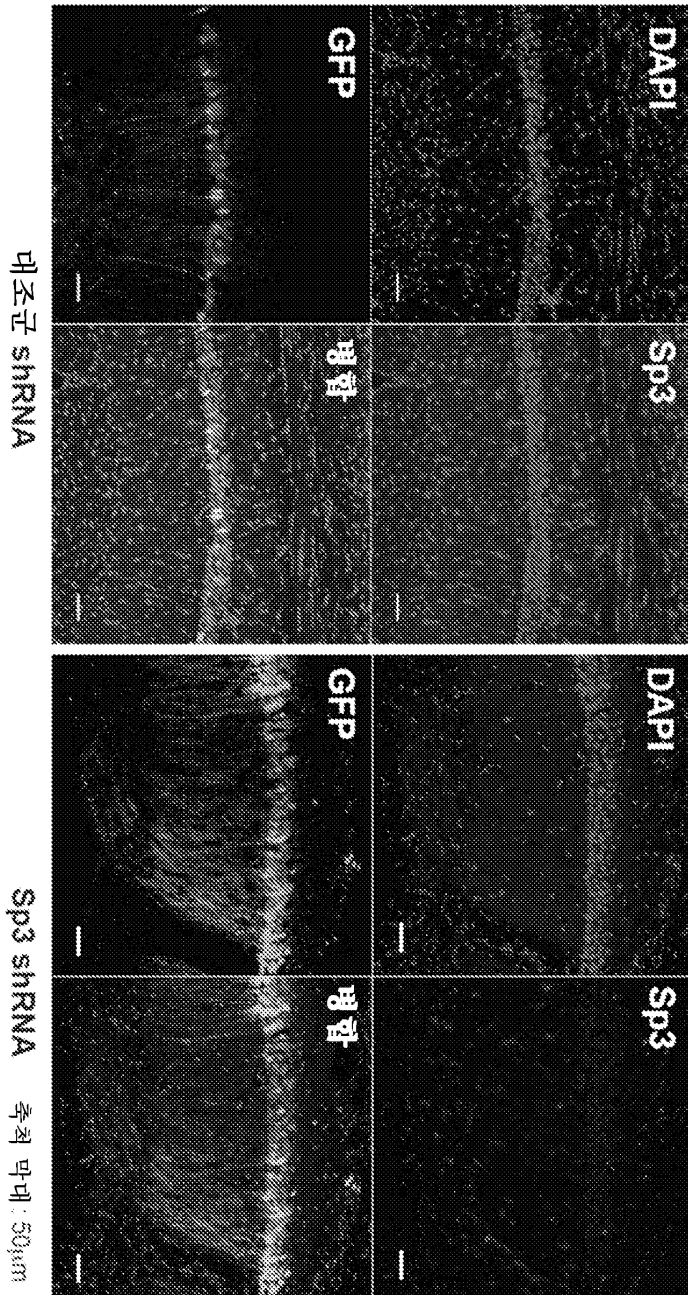
도면11c



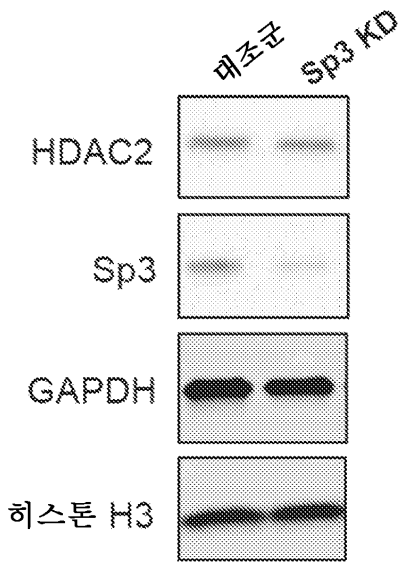
도면11d



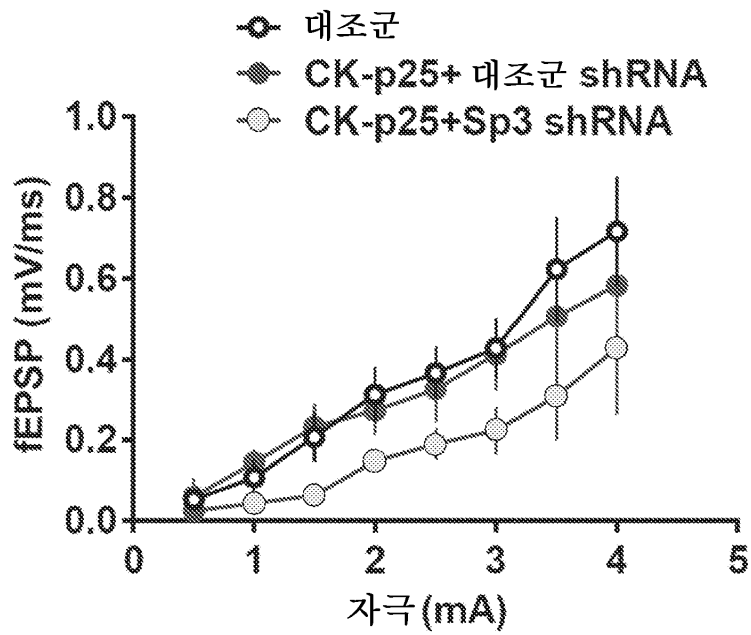
도면12a



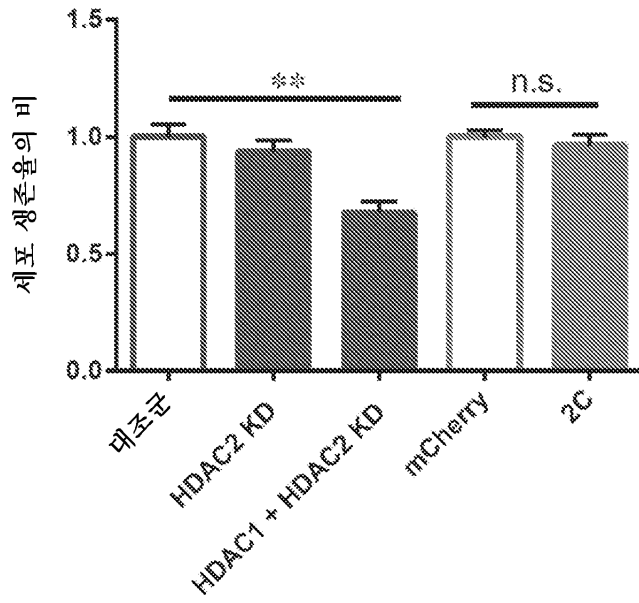
도면12b



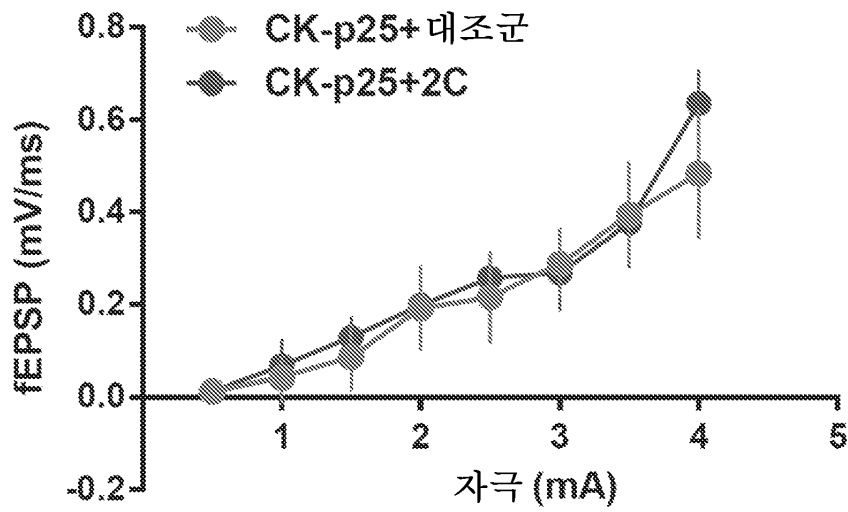
도면12c



도면13a

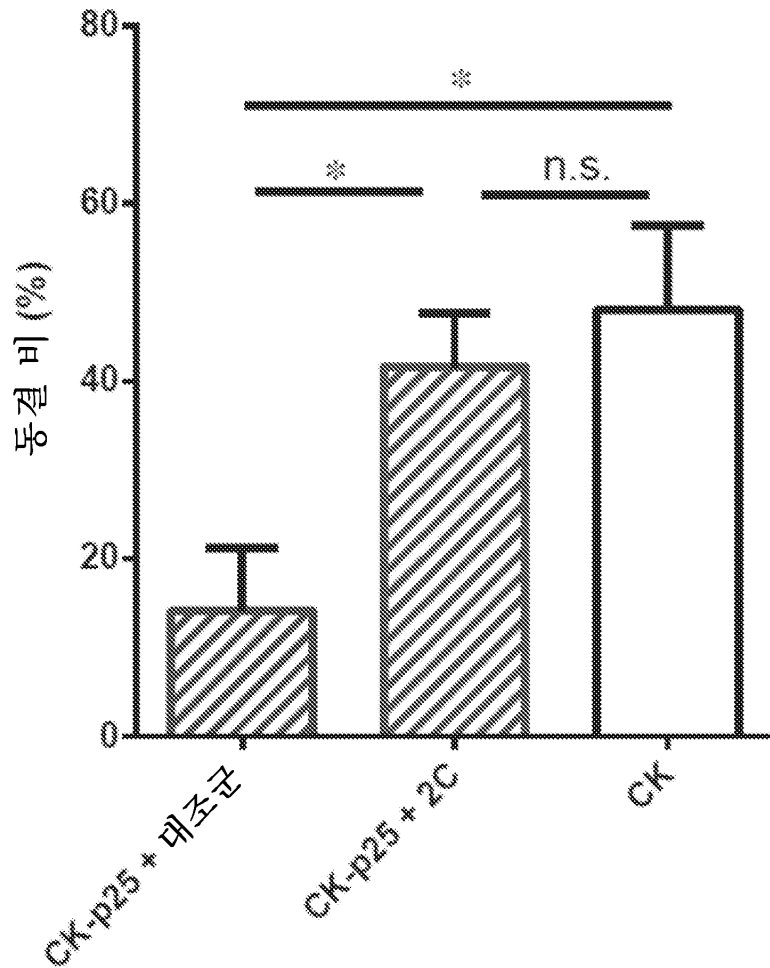


도면13b



도면13c

단서적 공포 조건화



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Massachusetts Institute of Technology
- <120> TARGETING THE HDAC2-SP3 COMPLEX TO ENHANCE SYNAPTIC FUNCTION
- <130> M0656.70417W000
- <140> Not Yet Assigned
- <141> Concurrently Herewith
- <150> US 62/532,026
- <151> 2017-07-13
- <160> 105
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1

<211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Val His Glu Asp Ser Gly Asp Glu Asp Gly Glu Asp Pro Asp Lys Arg

1 5 10 15

Ile Ser Ile Arg Ala Ser Asp Lys Arg Ile Ala Cys Asp Glu Glu Phe

 20 25 30

Ser Asp Ser Glu Asp Glu Gly Glu Gly Gly Arg Arg Asn Val Ala Asp

 35 40 45

His Lys Lys Gly Ala Lys Lys Ala Arg Ile Glu Glu Asp Lys Lys Glu

 50 55 60

Thr Glu Asp Lys Lys Thr Asp Val Lys Glu Glu Asp Lys Ser Lys Asp

65 70 75 80

Asn Ser Gly Glu Lys Thr Asp Thr Lys Gly Thr Lys Ser Glu Gln Leu

 85 90 95

Ser Asn Pro

<210> 2

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 2

ttcaagaga

9

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 3

aattctccga acgtgtcagc

20

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 4
 ggtcgtagga atgttgctga t 21
 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 5
 gcacctgtcc caactgtaaa g 21
 <210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 6
 ggaacagaag gaagaggaa 19

 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 7
 gccatcagga tttcaagtaa t 21
 <210> 8
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 8

gatgaaggtg aaggaggccg cagaaacgtg gcagaccata agaaaggag 49

<210> 9

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 9

ctcctttctt atggtctgcc acgtttctgc ggctccttc accttcac 49

<210> 10

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 10

gtacctctcc caccaccttc cttgcaattc gggcacgtac aagctaccct cgaagtct 59

<210> 11

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 11

agacttcgga gggtagcttg tacgtgccg aattgcaagg aagtggtgg gagaggtac 59

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 12

ctacctctc ccctgtctcc 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 13
 gcaaagaaaa cacccattc 20
 <210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 14
 agtgtccggc attctgct 18
 <210> 15
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 15
 ctgccccacc cagactac 18
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 16
 tcaatccttg tccttttgc 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 17
 caagcaagca catccacatc 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 18
 caggaaagga agaggggaac 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 19
 agtgagaca agccctcaa 20

<210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 20
 gctgagatgt ggttgcttt 20

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 21
 cccccaagcc tattctgttt 20

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 22
 gtgaatcagg tggggacatc 20

<210> 23

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 23
 caacaagacc acaggaagca 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 24
 tctccatctg gttaccaacc 20

 <210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 25
 agaggaaga cggaaaggag 20
 <210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 26
 aagagggca gagaaagctc 20
 <210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 27

gggacaaact tcctcccttc 20

<210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 28

tcgctgtgct gctgagttag 20

<210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 29

cagaaagctc agggattgga 20

<210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 30

ttcgcctacg tgctcaacta 20

<210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 31

gtctgtcta tgccccagaa 20

<210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 32
 agcagtaccc aaccaccttg 20
 <210> 33
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 33
 ctccagagcc ccacgttc 18

 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 34
 gagctagcca tcgacgat 20
 <210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 35
 acctcgtgt cgtagagtcg 20
 <210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 36
 cgcccataat ctacctttgc 20

 <210> 37
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 37
 gtgggggaaa ttccatgata 20
 <210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 38
 agaccgcagg gattctaggt 20
 <210> 39
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 39
 agccacagca gaagacaaaa g 21

 <210> 40
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 40
 cctcttcaat gggcaacct 19
 <210> 41
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 41
 gaatcgtct gccaggtg 18
 <210> 42

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 42
 agtgggcttc agctcctgta 20

<210> 43
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 43
 gccgcgtagg tcttcttatg 20

<210> 44
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 44
 aagccgagag gagtgagaca 20

<210> 45
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 45
 ccgctcggaa gactaggag 19

<210> 46
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 46

tgtgccacac cctaccctat 20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 47

tgcccttgatt aatgggttcc 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 48

cacattctgt agcccagacg 20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 49

cagaatctcg ggcttctacg 20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 50

cagtgtgctt tctccccttc 20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 51	
agaggtttgg gcctgtatt	20
<210> 52	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic polynucleotide	
<400> 52	
tgggcctcag tttccttta	20
<210> 53	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic polynucleotide	
<400> 53	
catagccaag agcatcgaca	20
<210> 54	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic polynucleotide	
<400> 54	
aacggacaga aggcaaagtg	20
<210> 55	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic polynucleotide	
<400> 55	
caaagctcac gggatcaaag	20
<210> 56	
<211> 20	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 56
 gaagggatgc agccttgta 20
 <210> 57
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 57
 ttgagccttt ttggtttcc 20

 <210> 58
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 58
 agagagagag cgagctgcat 20
 <210> 59
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 59
 ttgaagccag acacagcaac 20
 <210> 60
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 60
 ccctgacatt ggtgctcttt 20

 <210> 61

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 61
 tggttggcaa cagtggacta 20
 <210> 62
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 62
 ctgaagggaa ctggttcgag 20
 <210> 63
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 63
 cctgcctgtc ctgttcattt 20

 <210> 64
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 64
 atttcgtcct ctgggtgagc 20
 <210> 65
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 65
 ccttctcagc agggccta 18

<210> 66
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 66
 cacttccatc agcagggatt 20

<210> 67
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 67
 ggggctgtgt ctgctcttta 20

<210> 68
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 68
 cctcgggtgc tagtggaagg 20

<210> 69
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 69
 gcgtttagct aggccggagat 20

<210> 70
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 70	
ctgcctccga atgaatgtg	19
<210> 71	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic polynucleotide	
<400> 71	
agaccaacct cggtgacaac	20
<210> 72	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic polynucleotide	
<400> 72	
atctcgttct ggcagtctgg	20
<210> 73	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic polynucleotide	
<400> 73	
acacgaacag aaagccatcc	20
<210> 74	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic polynucleotide	
<400> 74	
gacggcattg acgacgaatc	20
<210> 75	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 75
 tatggggaat actttcctgg 20

<210> 76
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 76
 gcaccacaa gacacctatg a 21

<210> 77
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 77
 cagttgtgta tgacgacagc 20

<210> 78
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 78
 ccgaagcttg tcaacaagag 20

<210> 79
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 79
 gctgctatca gtgaacggag 20

<210> 80
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 80
 ttgaggacc cctactcgtc 20
 <210> 81
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 81
 tcaacgacac cataaggttc 20

 <210> 82
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 82
 aagactggaa atgttgctcg g 21
 <210> 83
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 83
 ttgctaaaa ctggtgaccc 20
 <210> 84
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 84
 gattgcttcc cctagcttct ct 22

<210> 85
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 85
 atggaggag catccttgg 20
 <210> 86
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 86
 ccccagttt ccgagaaaag 20
 <210> 87
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 87
 acagccctgt catgtccagc 20

 <210> 88
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 88
 tacctaatca ttatgccgag ga 22
 <210> 89
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 89

tcatcagacc ccagaaaagg 20

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 90

tgaagcaacc taaccgtcc 20

<210> 91

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 91

tgacagcata gtattttccc 20

<210> 92

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 92

gtctctggga actgggctaa g 21

<210> 93

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 93

agattgtacc ttgatggagc 20

<210> 94

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 94
 gtgtaccctg accattcatc 20
 <210> 95
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 95
 gcagccttga gaagttccac 20
 <210> 96
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 96
 atgaagccct cgtgtgtctc 20

 <210> 97
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 97
 ggatgctata cagtggaagc 20
 <210> 98
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 98
 gctcgccaag gcttttaaga a 21
 <210> 99
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 99
 aagcggttgg gtttggatg 20

<210> 100
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 100
 aggaaatctt taccgcctc a 21

<210> 101
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 101
 caccgcaata gaaaacacc a 21

<210> 102
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 102
 ccaccaatga tggtaaacc 20

<210> 103
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 103
 caaatgtttc cagcccagag 20

<210> 104

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 104

gagcaagtct ttcagtcctg 20

<210> 105

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 105

gattcggcag gtgagttggt 20