



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0089528  
(43) 공개일자 2016년07월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
G01N 33/564 (2006.01) A61K 31/445 (2006.01)  
A61K 31/5375 (2006.01) A61K 31/716 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
G01N 33/564 (2013.01)  
A61K 31/445 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7018593  
(22) 출원일자(국제) 2014년12월12일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2015년07월11일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/070099  
(87) 국제공개번호 WO 2015/089443  
국제공개일자 2015년06월18일
- (30) 우선권주장  
61/963,738 2013년12월12일 미국(US)  
62/049,813 2014년09월12일 미국(US)
- (71) 출원인  
더 브리검 앤드 우먼즈 হাসপিট, 인크.  
미국 02115 메사추세츠주 보스턴 프란시스 스트리트 75
- (72) 발명자  
퀸타나, 프란시스코 제이.  
미국 02130 메사추세츠주 차메이카 플레인 사우스 스트리트 72 아파트먼트 2  
마요, 리오르  
이스라엘 53421 피바타임, 하잔하님 5  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
양영준, 김영

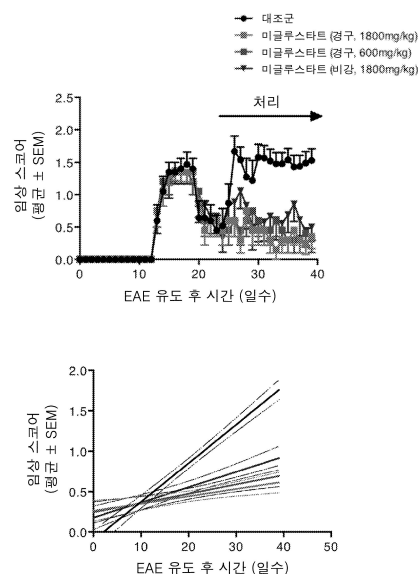
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 신경퇴행성 질환의 치료

(57) 요약

대상체에서 MS, 예를 들어 2차 진행성 다발성 경화증(SPMS)을 진단하거나 이의 발병 위험을 결정하는, 락토실세라미드(LacCer)의 수준을 검출하는 것을 기반으로 하는, 방법이 개시된다. 또한, 예를 들어 LacCer 합성 억제제의 투여를 포함하는, SPMS를 치료하는 방법이 개시된다.

대표도 - 도16



(52) CPC특허분류

**A61K 31/5375** (2013.01)

**A61K 31/716** (2013.01)

*G01N 2400/00* (2013.01)

*G01N 2800/285* (2013.01)

*G01N 2800/50* (2013.01)

*G01N 2800/52* (2013.01)

(72) 발명자

**웨이너, 하워드**

미국 02445 매사추세츠주 브록클린 콜번 크레슨트  
72

---

**할스, 레자**

미국 02116 매사추세츠주 보스턴 뉴베리 스트리트  
280 아파트먼트 5

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

대상체에서 2차 진행성 다발성 경화증(SPMS)을 진단하거나 이의 발병 위험을 결정하는 시험관내 방법이며,  
대상체 기원의 샘플 중 락토실세라미드(LacCer)의 수준을 검출하는 단계;

상기 샘플 중 LacCer의 수준을, SPMS를 앓거나 이의 발병 위험이 있는 대조군 대상체에서의 LacCer의 수준을 나타내는 LacCer의 표준 수준과 비교하는 단계; 및

상기 샘플 중 LacCer의 수준이 상기 표준 수준 초과인 경우에는 대상체를 SPMS 발병 위험이 있는 것으로서 확인하거나 대상체에서 SPMS를 진단하는 단계

를 포함하는, 대상체에서 SPMS을 진단하거나 이의 발병 위험을 결정하는 시험관내 방법.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 대상체가 재발 완화형(relapsing remitting) 다발성 경화증을 앓는 것인 방법.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 대상체가 1개월, 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 2년, 3년, 4년, 또는 5년 이내에 SPMS를 발병할 증가된 위험을 갖는 것인 방법.

#### 청구항 4

대상체에서 진행성 다발성 경화증(MS), 예를 들어 1차 진행성 다발성 경화증(PPMS) 또는 2차 진행성 다발성 경화증(SPMS)을 치료하는 방법이며, 상기 대상체에게 치료학적 유효량의 LacCer 합성 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 5

대상체에서 진행성 다발성 경화증(MS), 예를 들어 1차 진행성 다발성 경화증(PPMS) 또는 2차 진행성 다발성 경화증(SPMS)의 치료에 있어서 LacCer 합성 억제제의 용도.

#### 청구항 6

대상체에서 진행성 다발성 경화증(MS)을 치료하는 방법이며,

진행성 MS를 앓거나 이를 앓을 것으로 의심되는 대상체 기원의 샘플 중 락토실세라미드(LacCer)의 수준을 검출하는 단계;

상기 샘플 중 LacCer의 수준을, LacCer의 표준 수준, 예를 들어 진행성 MS를 앓거나 이의 발병 위험이 있는 대조군 대상체에서의 LacCer의 수준을 나타내는 표준 수준과 비교하는 단계, 및

상기 표준 수준 초과인 LacCer의 수준을 갖는 대상체에게 치료학적 유효량의 LacCer 합성 억제제를 투여하는 것을 포함하는 치료(treatment)를 실시하는 단계

를 포함하는, 대상체에서 진행성 MS를 치료하는 방법.

#### 청구항 7

MS, 예를 들어 진행성 MS를 앓거나 이를 앓을 것으로 의심되는 대상체에 대한 치료를 선택하는 방법이며,

진행성 MS를 앓거나 이를 앓을 것으로 의심되는 대상체 기원의 샘플 중 락토실세라미드(LacCer)의 수준을 검출하는 단계;

상기 샘플 중 LacCer의 수준을, LacCer의 표준 수준, 예를 들어 진행성 MS를 앓거나 이의 발병 위험이 있는 대

조군 대상체에서의 LacCer의 수준을 나타내는 표준 수준과 비교하는 단계, 및

표준 수준 초과 LacCer의 수준을 갖는 대상체에게 치료학적 유효량의 LacCer 합성 억제제를 투여하는 것을 포함하는 치료를 선택하는 단계

를 포함하는, MS, 예를 들어 진행성 MS를 앓거나 이를 앓을 것으로 의심되는 대상체에 대한 치료를 선택하는 방법.

#### 청구항 8

청구항 4 내지 6 또는 청구항 7 중 어느 한 청구항에 있어서, 상기 LacCer 합성 억제제가 글루코실레라미드(GlcCer) 합성 억제제인 방법 또는 용도.

#### 청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 GlcCer 합성 억제제가 1-(3',4'-에틸렌디옥시)페닐-2-노나노일아미노-3-피롤리디노-1-프로판올; 1-(3',4'-에틸렌디옥시)페닐-2-옥타노일아미노-3-피롤리디노-1-프로판올; D-트레오-(1R,2R)-페닐-2-데카노일아미노-3-모르폴리노-1-프로판올 (PDMP), 및 D-PDMP를 포함하는 이의 유사체; PPMP (DL-트레오-1-페닐-2-팔미토일아미노-3-모르폴리노-1-프로판올), D-트레오-EtDO-P4; ((1R,2R)-노나노산 [2-(2',3'-디하이드로-벤조[1,4]디옥신-6'-일)-2-하이드록시-1-피롤리딘-1-일메틸-에틸]-아미드-L-타르타르산 염; CCG0203586 (1-하이드록시-3-(피롤리딘-1-일)아세트아미드); Genz-112638 (에를리글루스타트(eliglustat)); Genz-529468; 테옥시노지로마이신-기반 GlcCer 억제제; GZ-161; Genz-682452; EXEL-0346; OGT2378; 및 Genz-123346로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 테옥시노지로마이신-기반 GlcCer 억제제가 N-(5'-아다만탄-1'-일-메톡시)-펜틸-1-테옥시노지리마이신(AMP-DNM), N-부틸-테옥시노지리마이신(미글루스타트(miglustat)) 또는 알킬 쇠에 9 내지 약 20 개 탄소 원자를 갖는 1,5-디테옥시-1,5-이미노-D-글루시톨의 장쇄 N-알킬 유도체인 방법.

#### 청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 N-알킬 치환체가 노닐, 데실, 운테실, 도데실, 테트라데실, 헥사데실, 시스-11-헥사데세닐, 옥타데실, 시스-13-옥타데세닐, 및 에이코실로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 12

청구항 4 내지 6 또는 청구항 7 중 어느 한 청구항에 있어서, 상기 LacCer 합성 억제제가 소분자, B4GALT6 표적화 억제 핵산 또는 B4GALT6에 특이적으로 결합하고 LacCer 합성을 억제하는 억제 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 B4GALT6 억제제인 방법 또는 용도.

#### 청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 B4GALT6 표적화 억제 핵산이 안티센스, siRNA, shRNA, 및 miRNA로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 14

청구항 4 내지 6 중 어느 한 청구항에 있어서, B4GALT6 억제제 및 GlcCer 합성 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 15

청구항 4 내지 6 중 어느 한 청구항에 있어서, 상기 대상체가 진행성 MS, 예를 들어 PPMS 또는 SPMS를 갖는지를 기반으로 상기 대상체를 선택하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 16

청구항 4 내지 6 중 어느 한 청구항에 있어서, 글루코세레브로시다제의 활성화제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

## 청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 글루코세레브로시다제의 활성화제가 사포신 C 또는 이의 활성 단편; NCGC00182186 (5-사이클로프로필리덴-7-(디플루오로메틸)-N-(2-페닐설파닐페닐)-1H-피라졸로[1,5-a]피리미딘-3-카복스아미드); NCGC00182510 ([2-(3급-부틸아미노)-2-옥소에틸] 2-[2-(4-브로모아닐리노)-2-옥소에톡시]벤조에이트) 또는 포스파티딜세린인 방법.

## 청구항 18

청구항 4 내지 17 중 어느 한 청구항에 있어서, 상기 화합물이 경구로, 비강으로, 정맥내로 또는 척추강내로 투여되는 방법 또는 용도.

## 청구항 19

청구항 4 내지 18 중 어느 한 청구항에 있어서, 상기 대상체가 SPMS를 앓고/앓거나 이들이 SPMS를 앓는 것을 기반으로 선택되는 것인 방법 또는 용도.

## 발명의 설명

### 기술 분야

- [0001] 우선권 주장
- [0002] 본 출원은 2013년 12월 12일자로 출원된 미국 가특허 출원 제61/963,738호 및 2014년 9월 12일자로 출원된 미국 가특허 출원 제62/049,813호의 우선권을 주장한다. 상기 출원의 전문이 본원에 참조로 인용된다.
- [0003] 연방 정부 지원 연구 또는 개발
- [0004] 본 발명은 국립보건원에 의해 부여된 승인 번호 AI075285 및 AI093903 하의 정부 지원으로 수행되었다. 상기 정부는 본 발명에 대해 특정 권리를 갖는다.
- [0005] 기술분야
- [0006] 본 발명은 락토실세라미드(LacCer)의 수준을 검출하는 것을 기반으로 하는 대상체에서 진행성 다발성 경화증(MS), 예를 들어, 1차 진행성 다발성 경화증(PPMS) 또는 2차 진행성 다발성 경화증(SPMS)을 진단하거나 이의 발병 위험을 결정하는 방법 및 LacCer 합성 억제제의 투여를 기반으로 하는 진행성 MS를 치료하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

- [0007] 성상교세포는 중추신경계(CNS)에서 가장 풍부한 세포이다. 정상 조건하에서, 성상교세포는 시냅스 활성을 조절하고 뉴런 생존을 위해 필요한 영양물 및 지지체를 제공한다<sup>1-4</sup>. 신경염증과 관련하여, 성상교세포는 말초 염증 촉진성 백혈구에 의해 CNS 침윤을 제어하고<sup>5-8</sup> 미세아교세포, 희소돌기신경교 및 적응성 면역계 세포의 활성을 조절한다<sup>9</sup>. 따라서, 성상교세포 활성의 치료학적 조절을 위한 잠재적 표적 뿐만 아니라, CNS 염증 동안에 성상교세포 활성화를 조절하는 메커니즘을 특징 분석하는 것이 중요하다.
- [0008] 다발성경화증(MS)은 CNS의 만성 탈수초 자가면역 질환이다. 대부분의 환자에서, MS는 처음에 재발 완화형 만성 과정(재발 완화형 MS, RRMS)에 이어서 가용한 치료가 제한된 효능을 보여주는, 연속되고 비가역적 신체적 정신적 장애의 누적을 특징으로 하는 진행성 단계(2차 진행성 MS, SPMS)를 나타낸다<sup>10</sup>. 최근의 발견은 국소 CNS 선천성 면역 반응이 SPMS에서 질환 진행을 구동함을 시사한다<sup>9,11,12</sup>.

### 발명의 내용

- [0009] 요약
- [0010] 본원에 기재된 바와 같이, 락토실세라미드(LacCer) 수준은 다발성 경화증(MS)의 실험 모델인 만성 실험적 자가

면역 뇌척수염(EAE) 동안에 CNS에서 상향 조절된다. 성상교세포에서  $\beta$ -1,4-갈락토실트랜스퍼라제 6 (B4GALT6)에 의해 합성된 LacCer은 자가분비 방식으로 작용하여 CNS-침윤 단핵구 및 미세아교세포의 징집(recruitment) 및 활성화 및 신경 퇴행을 촉진하는 전사적 프로그램을 유발한다. 추가로, 증가된 B4GALT6 발현 및 LacCer 수준은 인간 환자의 CNS MS 병변에서 검출되었다. 최종적으로, LacCer 합성의 억제제 EAE에서 국소 CNS 선천성 면역 및 신경퇴행을 억제하고 시험관내 인간 성상교세포의 활성화를 차단하였다. 따라서, B4GALT6은 MS 및 다른 신경염증 장애에 대한 치료학적 표적이다.

[0011] 따라서, 제1 측면에서, 본 발명은 대상체에서 2차 진행성 다발성 경화증(SPMS)을 진단하거나 이의 발병 위험을 결정하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 대상체 기원의 샘플 중의 락토실세라미드(LacCer)의 수준을 검출하고; 상기 샘플 중 상기 LacCer의 수준을, SPMS를 앓거나 이의 발병 위험이 있는 대조군 대상체에서의 LacCer의 수준을 나타내는 LacCer의 표준 수준과 비교하고; 대상체에서 SPMS를 진단하거나, 상기 샘플 중의 LacCer의 수준이 상기 표준 수준 초과인 경우 대상체를 SPMS를 발병할 위험이 있는 것으로서 확인함을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 예를 들어, 당업계에 공지되어 있거나 본원에 기재된 바와 같은 MS에 대한 치료제를, SPMS를 앓거나 이의 발병 위험이 있는 것으로서 확인된 대상체에게 투여함을 포함한다.

[0012] 일부 양태에서, 상기 대상체는 재발 완화형 다발성 경화증을 앓고 상기 수준은 상기 대상체가 SPMS 발병 위험이 있음을 지적한다. 일부 양태에서, 대상체는 1, 3, 6, 9, 12개월, 2년, 3년, 4년, 또는 5년 내에 SPMS를 발병할 증가된 위험을 갖는다.

[0013] 또 다른 측면에서, 본 발명은 치료학적 유효량의 LacCer 합성 억제제를 대상체에게 투여함에 의해, 대상체에서 진행성 MS, 예를 들어, 1차 진행성 다발성 경화증(PPMS) 또는 2차 진행성 다발성 경화증(SPMS)을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 또한, 이를 필요로 하는 대상체에서 진행성 MS, 예를 들어, 1차 진행성 다발성 경화증(PPMS) 또는 2차 진행성 다발성 경화증(SPMS)을 치료하는데 있어서, 또는 진행성 MS, 예를 들어, 1차 진행성 다발성 경화증(PPMS) 또는 2차 진행성 다발성 경화증(SPMS)을 치료하기 위한 약물의 제조에 있어서 억제제 또는 LacCer 합성의 용도가 제공된다.

[0014] 추가의 측면에서, 본 발명은 대상체에서 진행성 다발성 경화증(MS)을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 진행성 MS를 앓거나 이를 앓는 것으로 의심되는 대상체 기원의 샘플 중의 락토실세라미드(LacCer)의 수준을 검출하고; 상기 샘플 중의 LacCer의 수준을, LacCer의 표준 수준, 예를 들어, 진행성 MS를 앓거나 이의 발병 위험이 있는 대조군 대상체에서의 LacCer의 수준을 나타내는 표준 수준과 비교하고, 상기 표준 수준 초과인 LacCer의 수준을 갖는 대상체에게 치료학적 유효량의 LacCer 합성 억제제를 투여함을 포함하여 치료제를 투여함을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 예를 들어, 당업계에 공지되어 있거나 본원에 기재된 바와 같은 MS에 대한 또 다른 치료제, 예를 들어, MS에 대한 표준 치료제를 투여함을 포함한다.

[0015] 추가의 측면에서, 본 발명은 MS, 예를 들어, 진행성 MS를 앓거나 이를 앓는 것으로 의심되는 대상체에 대한 치료제를 선택하기 위한 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 진행성 MS를 앓거나 이를 앓는 것으로 의심되는 대상체 기원의 샘플 중의 락토실세라미드(LacCer)의 수준을 검출하고; 상기 샘플 중의 LacCer의 수준을 LacCer의 표준 수준, 예를 들어, 진행성 MS를 앓거나 이의 발병 위험이 있는 대조군 대상체에서의 LacCer의 수준을 나타내는 표준 수준과 비교하고, 표준 수준 초과인 LacCer의 수준을 갖는 대상체에게 치료학적 유효량의 LacCer 합성 억제제를 투여함을 포함하여 치료제를 선택함을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 SPMS를 앓거나 이의 발병 위험이 있는 것으로서 확인된 대상체에게 MS에 대한 치료제를 투여하고 임의로 예를 들어, 당업계에 공지되어 있거나 본원에 기재된 바와 같은 MS에 대한 또 다른 치료제를 투여함을 포함한다.

[0016] 일부 양태에서, LacCer 합성 억제제는 글루코실세라미드 (GlcCer) 합성 억제제이다. 일부 양태에서, GlcCer 합성의 억제제는 1-(3',4'-에틸렌디옥시)페닐-2-노나노일아미노-3-피롤리디노-1-프로판올; 1-(3',4'-에틸렌디옥시)페닐-2-옥타노일아미노-3-피롤리디노-1-프로판올; D-트레오-(1R,2R)-페닐-2-데카노일아미노-3-모르폴리노-1-프로판올(PDMP) 및 D-PDMP를 포함하는 이의 유사체; PPMP(DL-트레오-1-페닐-2-팔미토일아미노-3-모르폴리노-1-프로판올), D-트레오-EtDO-P4; ((1R,2R)-노나노산[2-(2',3' 디하이드로-벤조[1,4]디옥신-6'-일)-2-하이드록시-1-피롤리딘-1-일메틸-에틸]-아미드-L-타르타르산 염; CCG0203586 (1-하이드록시-3-(피롤리딘-1-일)아세트아미드); Genz-112638 (엘리글루스타트); Genz-529468; 테옥시노지리마인-기반 GlcCer 억제제; GZ-161; Genz-682452; EXEL-0346; OGT2378; 및 Genz-123346으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 테옥시노지리마인-기반 GlcCer 억제제는 N-(5'-아다만탄-1'-일-메톡시)-펜틸-1-테옥시노지리마인(AMP-DNM), N-부틸-테옥시노지리마인(미글루스타트) 또는 알킬쇄에 9 내지 약 20개 탄소 원자를 갖는 1,5-디테옥시-1,5-이미노-D-글루시톨의 장쇄 N-알킬 유도체이다. 일부 양태에서, N-알킬 치환체는 노닐, 데실,

운데실, 도데실, 테트라데실, 헥사데실, 시스-11-헥사데세닐, 옥타데실, 시스-13-옥타데세닐 및 에이코실로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

- [0017] 일부 양태에서, LacCer 합성의 억제제는 소분자, 억제 핵산 표적화 B4GALT6, 또는 B4GALT6에 특이적으로 결합하고 LacCer 합성을 억제하는 억제 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 B4GALT6의 억제제이다.
- [0018] 일부 양태에서, 억제 핵산 표적화 B4GALT6은 안티센스, siRNA, shRNA 및 miRNA로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0019] 일부 양태에서, 상기 방법은 B4GALT6의 억제제 및 GlcCer 합성의 억제제를 투여함을 포함한다.
- [0020] 일부 양태에서, 상기 방법은 대상체가 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SPMS를 앓는지에 대한 기준으로 대상체를 선택함을 포함한다.
- [0021] 일부 양태에서, 상기 방법은 글루코세레브로시다제의 활성화제를 투여함을 포함한다. 일부 양태에서, 글루코세레브로시다제의 활성화제는 사포신 C 또는 이의 활성 단편; NCGC00182186 (5-사이클로프로필렌-7-(디플루오로메틸)-N-(2-페닐설파닐페닐)-1H-피라졸로[1,5-a]피리미딘-3-카복사미드); NCGC00182510 ([2-(3급-부틸아미노)-2-옥소에틸] 2-[2-(4-브로모아닐리노)-2-옥소에톡시]벤조에이트) 또는 포스파티딜세린이다.
- [0022] 일부 양태에서, 상기 방법은 치료제, 예를 들어, 화합물을 경구로, 비강으로, 정맥내로 또는 척추강내로 투여함을 포함한다.
- [0023] 일부 양태에서, 상기 대상체는 SPMS를 앓고/앓거나 이들이 SPMS를 앓는지를 기반으로 선택된다.
- [0024] 달리 정의되지 않는 경우, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에게 통상적으로 이해되는 바와 같은 동일한 의미를 갖는다. 방법 및 재료는 본 발명에 사용하기 위해 본원에 기재되어 있고; 그 밖의 당업계에 공지된 적합한 방법 및 재료가 또한 사용될 수 있다. 상기 재료, 방법 및 예는 단지 예시적인 것이고 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 모든 공보, 특허 출원, 특허, 서열, 데이터베이스 엔트리 및 본원에 언급된 다른 참조문헌은 이들의 전문이 참조로 인용된다. 상충될 경우에, 정의를 포함하는 본원의 명세서가 조정할 것이다.
- [0025] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 도면으로부터 및 청구항으로부터 자명할 것이다.

## 도면의 간단한 설명

- [0026] 특허 또는 출원 파일은 칼라로 나타낸 하나 이상의 도면을 함유한다. 칼라 도면(들)과 함께 상기 특허 또는 특허 출원 공보의 카피물은 요구시 및 필요한 비용의 납부시 청에 의해 제공될 것이다.

**도 1 (A-L). B4GALT6 활성은 CNS 염증 및 신경퇴행을 제어한다.** (A, b) 야생형 (WT) 및 GFAP-TK 유전자전이 (GFAP<sup>TK</sup>) F1 하이브리드 마우스 (평균 및 s.e.m.)에서 EAE 스코어. 우측 패널, 선형-회귀 곡선; 점선은 회귀 선의 95% 신뢰 간격을 지적한다. 마우스는 지적된 바와 같이(검정 막대) 간시클로비르 (GCV, 25mg/kg) 또는 비히클(PBS)로 매일 처리하였다.  $n \geq 7$  마우스/그룹인 3개의 독립적 실험의 대표적인 데이터. (A) 마우스는 EAE 유도 7일 전 및 15일 때까지 연속적으로 전처리하거나, (B) 단지 진행성 단계(30일 내지 50일) 동안에 처리한다. (C) 나노스트링 n카운터분석에 의한 검출시 비처리 NOD 마우스의 CNS로부터 분리되거나 NOD EAE의 급성 또는 진행성 단계 동안에 성상교세포에서 차등적 mRNA 발현 프로필을 도시하는 히트맵; 3개의 독립적 실험의 대표적인 데이터. (D) EAE의 진행성 단계 동안에 특이적으로 상향 조절된 독특한 유전자 클러스터를 도시하는 히트맵. 본래에, 최우측 3개의 칼럼 대부분은 고발현이고 중간 및 최좌측은 낮은 발현이었다. (E) 비처리 또는 EAE NOD 마우스로부터 미세아교세포 또는 성상교세포에서 b4galt6 발현의 qPCR 분석; *gapdh*로 표준화되고 비처리 마우스 기원의 세포의 발현에 상대적으로 제공된 발현. 3개의 독립적 실험의 대표적인 데이터, 스튜던트 t-시험 (Student's t-test)에 의한 통계학적 분석. (F) 네트 조직 중량에 상대적인 비처리 또는 EAE NOD 마우스의 CNS에서 락토실세라미드(LacCer)의 정량. 조건당  $n \geq 15$  샘플과 함께 3개의 독립적 실험의 대표적인 데이터, 스튜던트 t-시험에 의한 통계학적 분석. (G, H) C57BL/6에서 EAE 임상적 스코어 (G) 및 NOD (H) 화살표 또는 막대로 나타낸 바와 같은 LacCer(마우스 당 10 $\mu$ g) 또는 비히클의 투여 후 마우스.  $n \geq 8$  마우스/그룹과 함께 2개의 독립적 실험의 대표적인 데이터. (A)에서와 같은 통계학적 분석. (G) EAE 유도 동안에 LacCer 또는 비히클의 MOG<sub>(35-55)</sub> 펩타이드와 함께 C57BL/6 마우스로 투여 후 및 또한 이후 3일 마다 복강내(i.p.) 투여 후 EAE 스코어 (평균 및 s.e.m.). (H) EAE 유도 후 35일째에(진행성 단계) 개시된 LacCer 또는 비히클 투여 후 EAE 스코어. (I) PDMP는 B4GALT6에 의해 LacCer 합성을 억제한다. (J) (K)에 나타낸 바와 같은 PDMP 또는 비히클로 처리된

비치리 또는 EAE NOD 마우스의 CNS에서 LacCer 수준의 정량. (K)  $n \geq 8$  마우스/그룹과 함께 3개의 독립적 실험의 대표적인 데이터의 지속기간 동안 EAE 유도 후 40일(진행성 단계)로부터 매일 투여된 (1일 2회 i.p.로 투여된 20mg/kg) PDMP 또는 비히클로 처리된 NOD 마우스에서 EAE의 임상적 스코어. (L) 각각 탈수초화 또는 신경돌기 손실의 분석을 위한 (K)에서와 같이 PDMP 또는 비히클로 처리되고 Luxol 신속 블루 또는 비엘쇼브스키 은 염색으로 염색된 EAE NOD 마우스로부터 요추 척수의 조직병리학적 분석.  $n \geq 6$  마우스 /그룹과 함께 2개의 독립적 실험의 대표적인 데이터 (평균 및 s.e.m.). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , n.s. 유의적이지 않음.

**도 2 (A-E). B4GALT6 억제제는 EAE 동안에 성상교세포 활성화를 억제한다.** (A) PDMP 또는 비히클(비히클)로 처리된 비치리 또는 EAE NOD 마우스로부터 분리된 성상교세포에서 나노스트링 n 카운터 분석에 의한 검출된 바와 같이 mRNA 발현을 도시하는 히트맵. 상부 패널, 각각의 유전자 클러스터에서 표준화된 유전자 발현의 히스토그램 제공. 3개의 독립적 실험의 대표적인 데이터, 스튜던트 t-시험에 의한 통계학적 분석. 본래의 좌측 그래프에서 좌측 칼럼은 대부분 고발현이고, 중앙 칼럼은 낮은 발현이고 우측 칼럼은 혼합되었고; 본래의 우측 그래프에서, 좌측 칼럼은 대부분 낮은 발현이고, 중앙 칼럼은 대부분 고발현이고, 우측 칼럼은 혼합되었다. (B) 비히클 또는 PDMP로 처리된 비치리 및 EAE NOD 마우스로부터 분리된 성상교세포에서 *ccl2*, *ccl5*, *cxc110*, *il1b*, *nos2*, *opn*, *H2-Aa*, *vim* 및 *tlr2* 발현의 qPCR 분석; 발현은 *gapdh*에 상대적으로 나타낸다. 3개의 독립적 실험의 대표적 데이터, 스튜던트 t-시험에 의한 통계학적 분석. (C) 비히클 또는 PDMP로 처리된 EAE NOD 마우스로부터 분리된 성상교세포에서 탈수초화의 제어(표 2)와 관련된 유전자들의 (NOD 비치리 그룹에) 상대적 발현. 3개의 독립적 실험의 대표적인 데이터. 스튜던트 t-시험에 의한 통계학적 분석. (D, E) (B)에서 수행된 *Irf1* (D) 및 *Relb* (E) 발현의 qPCR 분석. 평균 및 s.e.m.으로서 제공된 모든 데이터. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  및 n.s. 통계학적으로 유의적이지 않음.

**도 3 (A-M). B4GALT6에 의해 생성된 LacCer은 성상교세포 활성화를 촉진시키기 위해 자가분비 방식으로 작용한다.** 배양된 성상교세포는 PDMP(25  $\mu$ M), LacCer (10  $\mu$ M), 둘 다(LacCer+PDMP), 또는 비히클(비히클)로 1시간 동안 전처리하고 이어서 리포폴리사카라이드 (100 ng/ml) 및 인터페론- $\gamma$  (100 Units/ml) (LPS/IFN $\gamma$ )로 활성화시키거나 처리되지 않은 상태로 유지시킨다(대조군). (A) LPS/IFN $\gamma$ 로 자극된 성상교세포에서 나노스트링 n카운터 분석에 의한 검출시 mRNA 발현을 도시하는 히트맵. 3개의 독립적 실험의 대표적인 데이터. (B) (A)에서 제공된 표준화된 유전자 발현의 히스토그램 제공, 원-웨이 ANOVA에 이어서 터키 포스트-훅 분석에 의한 통계학적 분석. (C-F) C8-D30 성상교세포에서 *B4galt5* (sh*B4galt5*), *B4galt6* (sh*B4galt6*) 또는 비-표적화 shRNA (Sh대조군)의 발현은 입증된 shRNA를 사용하여 녹-다운시켰다 ( $n \geq 4$ ). (C) *B4galt5* 및 *B4galt6* mRNA 발현의 qRT 분석. (D-F) 성상교세포는 (A)에서와 같이 활성화시키고 (D) *H2-Aa*, (E) *Ccl5* 및 (F) *Cxc110*에 대한 mRNA 발현을 측정하였고; 발현은 하우스 키핑 유전자 (*Gapdh*)에 상대적으로 제공된다 ( $n \geq 4$ ). (G) 성상교세포-특이적 shRNA 렌티 바이러스 벡터의 도식적 맵. (H-J) 성상교세포-특이적 sh*B4galt6* 렌티바이러스의 i.c.v. 주사는 질환 중증도를 완화시킨다. EAE 유도 후 35일째에(진행성 단계) NOD 마우스에 i.c.v.로  $1 \times 10^7$  IU의 sh대조군, sh*B4galt5* 또는 sh*B4galt6* 렌티바이러스를 주사하였다. 그룹 당  $n = 10$ 마리 마우스 (H, I) i.c.v. 주사 실험 후 10주에 종료하고 (H) *b4galt5* 및 *b4galt6* 발현 수준은 비치리 또는 EAE NOD 마우스로부터 분리된 성상교세포에서 qPCR에 의해 측정하고; *gapdh*로 표준화되고 비치리 마우스 기원의 세포의 발현에 상대적으로 제공된 발현. 2개의 독립적 실험의 대표적인 데이터, 원-웨이 ANOVA에 이어서 터키 포스트-훅 분석에 의한 통계학적 분석. (I) LacCer 수준은 (J)에서 보여지는 바와 같이 처리된 비치리 또는 EAE NOD 마우스의 CNS에서 정량하였다. 원-웨이 ANOVA에 이어서 터키 포스트-훅 분석에 의한 통계학적 분석. (J) EAE 임상적 스코어. 2개의 독립적 실험의 대표적인 데이터. (도 1의 A)에서와 같은 통계학적 분석. (K) 배양된 1차 성상교세포는 1시간 동안 PDMP (25  $\mu$ M), LacCer (10  $\mu$ M), 둘 다 (LacCer+PDMP), 또는 비히클 대조군 (비히클)로 1시간 동안 전처리함에 이어서 45분 동안, LPS/IFN $\gamma$ 로 활성화시키거나, 처리되지 않은 상태로 유지시켰다(대조군, Con). 웨스턴 블롯에 의해 분석된 핵 분획에서 IRF-1 및 라민 B 발현 및 IRF-1의 핵으로의 전좌 정도는 4개의 독립적 실험상에서 밀도측정 정량 후 핵 분획에서 IRF-1 및 라민-B의 발현 간의 비율에 의해 평가하였다(우측 패널). 원-웨이 ANOVA에 이어서 터키 포스트-훅 분석에 의한 통계학적 분석. (L) 1차 배양된 성상교세포에서 NF- $\kappa$ B 및 IRF-1과 *nos2* 프로모터의 상호작용의 ChIP 분석. (도 4의 C)에서와 같은 실험 디자인 및 데이터 분석. 2개의 독립적 실험으로부터 데이터 (M) LacCer 또는 비히클로 전처리되고 LPS/IFN $\gamma$ 로 활성화된 WT 또는 IRF-1 결핍(IRF-1 KO) 마우스로부터 확립된 성상교세포 배양에서 *nos2*, *csf2*, *ccl2*, *ccl5*, *il6*, 및 *tlr2*의 발현의 qPCR 분석. 5개의 독립적 실험으로부터 LPS/IFN $\gamma$ -활성화된 세포에서 LacCer 치료에 응답하는 평균 유전자 유도. 스튜던트 t-시험에 의한 통계학적 분석. 모든 데이터는 평균 및 s.e.m.으로 나타낸다. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.01$  및 n.s.는 유의적이지 않음.

**도 4 (A-M). B4GALT6은 성상교세포에서 *ccl2* 전사 활성을 조절한다.** (A) 뮤린 *ccl2* 프로모터. (B) *ccl2* 루시퍼

라제 리포터 및 IRF-1, p65 또는 공(empty) 대조군 벡터(Empty)를 암호화하는 하기의 작제물 중 하나로 형질감염된 293T 세포에서 루시퍼라제 활성. 결과는 공 벡터로부터 배수 유도로서 제공된, 분비된 알칼린 포스파타제 활성에 상대적이다. 3개의 독립적 실험으로부터 데이터, 스튜던트 t-시험에 의한 통계학적 분석. (C) LPS/IFN $\gamma$  유도 2시간 후에 PDMP 및 LacCer로 전처리되고 LPS/IFN $\gamma$ 로 활성화된 (도 3에서와 같이) 1차 배양된 성상교세포에서 NF- $\kappa$ B, 및 IRF-1과 *cc12* 프로모터의 상호작용의 ChIP 분석. (D-H) 유동 세포측정에 의해 분석되고 세포 빈도(E, G) 및 총 세포 수(F, H)로서 제공되는, (도 1의 K)에서와 같이 PDMP 또는 비히클로 처리된 EAE NOD 마우스의 CNS로의 염증성 단핵구(CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup> 또는 CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup> 세포에 대해서 정의된 바와 같은)의 징집. 3개의 독립적 실험의 대표적인 데이터. 스튜던트 t-시험에 의한 통계학적 분석. (I) (도 3의 J)에서와 같이 성상교세포-특이적 shRNA 렌티바이러스의 i.c.v. 주사 10일 후 CNS에서 측정된 바와 같은 CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup> 단핵구의 빈도 및 수. 2개의 독립적 실험의 대표적인 데이터. 원-웨이 ANOVA에 이어서 터키 포스트-후 분석에 의한 통계학적 분석. (J) 단핵구는 1시간 동안 PDMP, LacCer, 둘 다 (LacCer+PDMP) 또는 비히클로 전처리하고 단핵구 화학주성은 트랜스웰 챔버 시스템을 사용하여 측정하였다. CCL2 또는 PBS는 하부 격실(compartment)에 첨가하고 3시간 후 세포 생존능 (J,K) 및 이동 단핵구의 수(L) 및 세포 생존능을 측정하였다. 이동 데이터는 대조군으로부터 배수로서 나타내고 세포 생존능은 대조군으로부터 %로서 나타낸다. 작동 농도는 적색으로 표시한다. 4개의 독립적 실험의 대표적인 데이터. (M) CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup> 단핵구는 PDMP, LacCer 또는 비히클로 처리하고 이어서 6시간 동안 LPS/IFN $\gamma$ 로 활성화시키거나 (도 3의 A)에서와 같이 비처리된 상태로 유지시켰다(대조군). mRNA 발현은 n카운터 나노스트링 분석에 의해 측정하였다. 2개의 ANOVA에 의한 통계학적 분석은 단핵구 이동에 대해서 LacCer 또는 PDMP 처리 효과를 나타내지 않았다. 모든 데이터에 대해, 평균 및 s.e.m으로서 제공된 데이터. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 및 n.s. 유의적이지 않음.

**도 5 (A-M). 성상교세포에서 B4GALT6는 미세아교세포 및 CNS-침윤 단핵구의 활성화를 조절한다.** (A) PDMP 또는 비히클로 처리된 비처리 또는 EAE NOD 마우스 기원의 미세아교세포에서 n카운터 나노스트링 분석에 의해 결정된 바와 같은 mRNA 발현을 도시하는 히트맵. 3개의 독립적 실험의 대표적인 데이터. 스튜던트 t-시험에 의한 통계학적 분석. (B) *Gapdh*에 상대적인 *cc15*, *i11b*, *opn*, *nos2*, *cd40*, 및 *H2-Aa* 유전자 발현의 qPCR 분석. (C, D) 미세아교세포(표 3) (C) 및 Ly6C<sup>low</sup> 단핵구 (D)에서 M1- 또는 M2-표현형과 관련된 유전자의 평균 표준화된 발현. 스튜던트 t-시험에 의한 통계학적 분석. (E-H) 1차 미세아교세포는 PDMP, LacCer, 또는 비히클로 전처리 함에 이어서 (도 3의 A)에서와 같이 6시간 동안 LPS/IFN $\gamma$ 로 활성화시키거나 비처리된(대조군) 상태로 유지하였다. mRNA 발현은 n카운터 나노스트링 분석 (E, G)에 의해 결정하고, 미세아교세포 생존능을 결정하였다. (F, H) 5개의 독립적 실험의 대표적인 데이터. (I) 혼합된 신경교 배양물은 약한 트립신/EDTA (T/E)으로 처리하여 성상교세포 단층을 제거하여 단지 플레이트에 미세아교세포만이 부착되어 있게 하거나 비처리된 상태로 유지하였다. 배양물은 PDMP, LacCer 또는 비히클로 전처리하고 6시간 동안 LPS/IFN $\gamma$ 로 활성화시켰다. 활성화 후, 2개의 배양물을 세척하고 약한 T/E와 항온처리하여 성상교세포를 제거하고; 따라서 미세아교세포(MG)만이 플레이트에 부착되어 있게 한다. RNA는 성상교세포의 부재[MG(비처리한)] 또는 존재[MG(혼합된)]하에 처리된 미세아교세포로부터 수거하고 유전자 발현은 *gapdh*에 상대적인 발현 *cc12*, *cc15* 및 *nos2*에 대해 qPCR로 분석하였다. 데이터는 5개의 독립적 실험으로부터 LPS/IFN $\gamma$ -유발된 유전자 유도에 대한 PDMP(좌측 패널) 또는 LacCer(우측 패널) 전처리의 상대적 효과를 제공한다. 스튜던트 t-시험에 의한 통계학적 분석. (J) 혼합된 아교세포는 지정된 차단 항체 또는 적당한 이소형 대조군 (25 $\mu$ g/ml) 및 LacCer (10  $\mu$ M) 또는 비히클 대조군으로 전처리하고 이어서 6시간 동안 LPS/IFN $\gamma$ 로 활성화시켰다. 미세아교세포는 (I)에서와 같이 분리하고, 미세아교-*nos2* 발현은 *gapdh*에 상대적으로 qRT에 의해 결정하고 (I)에서와 같이 제공되었다. 3개의 독립적 실험의 대표적인 데이터. (K) 1차 배양된 성상교세포에서 *csf2*프로모터와 NF- $\kappa$ B, 및 IRF-1의 상호작용의 ChIP 분석. (L,M) (도 3의 J)에서와 같이 성상교세포 특이적 shRNA 렌티바이러스의 i.c.v. 주사 10일 후, 만성 EAE NOD 마우스의 CNS로부터 분리된 성상교세포에서 발현 *csf2* (L) 및 성상교세포에서 발현 *nos2* (M). 2개의 독립적 실험으로부터의 데이터. 모든 데이터에 대해, 평균 및 s.e.m을 나타낸다. \*P<0.05, \*\*P< 0.01, \*\*\*P<0.001 및 n.s. 유의적이지 않음.

**도 6 (A-D). B4GALT5 및 B4GALT6 및 LacCer 수준은 MS 병변에서 상향 조절된다.** 부검 샘플은 MS, 비-MS CNS 염증 질환 (NMOSD, 바이러스 뇌염, 라스무센 뇌염 및 ADEM을 포함하는, n=5) 환자 및 건강한 대조군(n=6)의 병변 (n=10) 또는 NAWM(n=5)으로부터 수득하였다. (A) *ACTB*에 상대적인 CNS 샘플에서 B4GALT5 및 B4GALT6 mRNA 발현의 qPCR 분석. (B) MS 환자의 NAWM 및 병변에서의 GFAP+ 성상교세포에서 B4GALT6, CCL2 및 iNOS의 IF 분석. (C) 단백질 함량에 상대적인 CNS 샘플에서 결정된 LacCer 수준. 원-웨이 ANOVA에 이어서 터키 포스트-후 분석에 의한 통계학적 분석. (D) 1차 인간 성상교세포는 PDMP (25  $\mu$ M) 또는 비히클로 전처리하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) 또는 폴리 (I:C) (10 $\mu$ g/ml)으로 활성화시키거나 비처리된 (대조군) 상태로 유지하였다. RNA는 6시간 후 수거하

고 *CCL2*, *CCL5*, *COX2*, *IL6*, *NOS2*, 및 *TLR2*의 발현은 3개의 독립적 실험에서 *ACTB*에 상대적으로 qPCR에 의해 분석하였다. 스튜던트 t-시험에 의한 통계학적 분석. 제공된 데이터는 평균 및 s.e.m이다. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  및 \*\*\* $P < 0.001$ .

**도 7 (A-B).** SPMS에서 미글루스타트(Miglustat)의 치료학적 잠재력. A. CNS 염증에서 B4GALT6/LacCer의 역할. B. LPS 및 IFN $\gamma$  (LPS/IFN $\gamma$ )로 활성화된 1차 마우스 성상교세포에 대한, 미글루스타트와 함께 PDMP 또는 GlcCer 억제에 의한 B4GALT6 억제의 효과.

**도 8 (A-C).** F1 하이브리드 마우스는 만성 진행성 EAE를 발병한다. (A) NOD C57BL/6 F1 하이브리드 마우스 EAE의 임상적 스코어는 평균 및 s.e.m으로 나타낸다. 우측 패널, 선형-회귀 곡선; 점선은 회귀선의 95% 신뢰 구간을 지칭한다. 데이터는 7개의 독립적 실험(평균 및 s.e.m) ( $n \geq 15$  마우스/그룹)을 나타낸다. (B, C) 조직 병리학 분석. EAE 유도된 F1 마우스의 요추 척수 부분을 실험 중점에서 취하고 (B) 축삭돌기 밀도에 대해 비엘쇼브스키 은 염색(Bielschowsky's silver stain) 또는 (C) 미엘린 함량에 대해 룩솔(Luxol) 패스트(fast) 블루로 염색시켰다. 데이터는 3개의 독립적 실험을 나타낸다.

**도 9 (A-D).** 반응성 성상교세포의 고갈은 말초 백혈구의 CNS로의 징집을 감소시킨다. (A-D). EAE는 WT 또는 GFAP<sup>TK</sup> F1 하이브리드 마우스에서 유도하고 강시클로비르 (GCV) 또는 비히클 대조군 (PBS)은 도 1의 B에서와 같이 투여하였다. 데이터는  $n \geq 7$  마우스/그룹(평균 및 s.e.m.)과 함께 3개의 독립적 실험을 나타낸다. (A) GFAP 염색에 의해 검출된 반응성 성상교세포에 대한 GCV 투여의 효과. (B) FACS에 의해 평가된 CNS로의 단핵구(적색 게이트) 및 림프구(녹색 게이트)의 징집. 데이터는 3개의 독립적 실험을 나타낸다. 스튜던트 t-시험에 의한 통계학적 분석. (C, D) MOG<sub>(35-55)</sub> 또는 항-CD3에 대한 리콜 증식성 반응에 대한 EAE의 만성 단계 동안에 반응성 성상교세포 고갈의 효과 (C) 및 비장 CD4<sup>+</sup> T 세포에서 IFN- $\gamma$ , IL-17A, Foxp3 및 IL-10의 발현 (D). \* $P < 0.05$ , 및 (n.s) 유의적이지 않음.

**도 10 (A-G).** CNS로부터 성인 성상교세포의 분리. (A-C) 성인 마우스로부터 성상교세포의 분리. (A) 죽은 세포의 배제. (B) CD11b<sup>+</sup> 염색 (미세아교세포 및 단핵구, 블루 게이트) 또는 CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>neg</sup> (림프구, 녹색 게이트)를 기반으로 하는 면역 세포의 배제. (C) 오염 면역 세포 및 회소돌기신경교는 덤프 채널(재료 및 방법에서 상세히 기재된 바와 같이)을 사용하여 "비-면역" 세포 분획으로부터 제거하였다(B, 적색 게이트). 음성 분획물 (C, 적색 게이트)은 성상교세포-풍부 분획으로 지정하였고 세포내 염색 (D) 또는 mRNA 분석 (E-F)에 대해 사용되었다. GFAP-GFP FVB 마우스로부터의 GFP<sup>+</sup> 성상교세포 뿐만 아니라 전체 세포, 미세아교세포/단핵구 분획물은 또한 mRNA 분석을 위해 채취하였다. (D) 성상교세포-풍부 분획물에서 GFAP 발현 (검정-GFAP 염색, 회색-이소형 대조군). (E-F) 풍부한 성상교세포, 미세아교세포/단핵구, 림프구 및 뇌 분획물에서 순도의 qPCR 분석. (E) 성상교세포 마커 *gfap*, *aldh1l1* 및 *aqp4*의 발현. (F) 면역 세포 마커의 발현: 미세아교세포/단핵구 세포 (*Cd11b*, *F4/80*), 수지상 세포 (*Cd11c*), NK 세포 (*Klrb1c*), T-세포 (*Cd3*), B-세포 (*Cd19*). (G) 회소돌기신경교 (*mog*, *mbp*), 및 뉴런 (*Syt1*, *Snap25*) 마커의 발현. 데이터는 3개의 독립적 실험을 나타낸다 (평균 및 s.e.m.), ( $n \geq 5$ 마우스/그룹).

**도 11 (A-D).** LacCer 신타제 발현은 만성 NOD EAE 동안에 성상교세포에서 상향조절된다. (A) 백색질, 회색질 및 혈관주위 신경교 경계의 GFAP<sup>+</sup> 성상교세포에서 B4GALT6 발현의 면역 염색 (CD31은 내피 세포에 대한 마커로서 사용하였다). (B) NESTIN<sup>+</sup> 신경 전조체에서 B4GALT6 발현의 면역 염색. 비처리 NOD 마우스의 CNS로부터 또는 EAE의 만성 단계 동안에 분리된 (C) 성상교세포 또는 (D) 미세아교세포에서 *B4galt5* mRNA 발현의 qRT 분석; 발현은 하우스키핑 유전자 (*Gapdh*)에 상대적으로 제공된다. 데이터는 4개의 실험을 나타낸다. 제공된 데이터는 평균 및 s.e.m이다. 통계학적 분석은 스튜던트 t-시험에 의해 수행된다. \* $P < 0.05$ , 및 (n.s) 유의적이지 않음.

**도 12 (A-I).** B4GALT6 및 LacCer은 EAE 동안에 말초 T-세포 반응에 영향을 주지 않는다. (A) 비처리 C57BL/6 (좌측 패널) 및 NOD (우측 패널) 마우스는 적색 화살표에 의해 지칭된 바와 같은 LacCer (마우스 당 10 $\mu$ g) 또는 비히클로 처리하고, EAE 임상 스코어를 기록하였다. 실험 중점(25일)에서, 성상교세포를 분리하고 이들의 전사 프로파일은 n카운터 나노스트링 분석에 의해 결정하였다. (B-E) EAE는 C57BL/6 (B, C) 또는 NOD 마우스 (D, E)에서 유도하였고 LacCer 또는 비히클은 각각 도 1의 G 및 H에서와 같이 입증하였다. MOG<sub>(35-55)</sub> (20 $\mu$ g/ml)에 대한 비장 T-세포 리콜 반응; 증식 (B, D) 및 IL-17A, IFN- $\gamma$  및 IL-10 사이토킨 (C, E)의 분비. 데이터는 " $\geq 8$ 마리 마우스/그룹"과 함께 2개의 독립적 실험을 나타낸다(평균 및 s.e.m.). (F-I) EAE NOD 마우스는 도 1의 K에서와 같이 만성 단계 동안에 PDMP 또는 비히클로 처리하였다. 데이터는  $n \geq 8$ 마리 마우스/그룹과 함께 3개의 독립적

실험을 나타낸다 (평균 및 s.e.m.). (F) CNS로부터 분리된  $CD3^+CD4^+$  T-세포의 *tbx21*, *ifng*, *rorc*, *il17a*, *csf2*, *il10*, *foxp3*, 및 *tgfb1* mRNA의 발현의 qPCR 분석; 발현은 *gapdh*에 상대적으로 제공된다. (G, H) MOG<sub>(35-55)</sub> (20 $\mu$ g/ml); 증식 (G) 및 IL-17A, IFN- $\gamma$  및 IL-10 사이토킨의 분비 (H)에 대한 리콜 반응. (I) 비장  $CD3^+CD4^+$  T 세포에 의한 IFN- $\gamma$ , IL-17A, Foxp3 및 IL-10의 발현 (평균 및 s.e.m.).

**도 13. CCL-2 및 iNOS는 B4GALT6<sup>+</sup> GFAP<sup>+</sup> 성상교세포에 의해 동시 발현된다.**

면역 염색 연구는 만성 EAE 동안에 B4GALT6<sup>+</sup> GFAP<sup>+</sup> 성상교세포에서 CCL-2 또는 iNOS의 발현을 확인했지만 비처리 척수 절편에서는 확인하지 못했다. 2개의 독립적 실험의 대표적인 데이터, 6마리 동물/그룹을 사용하였다.

**도 14 (A-G). B4GALT6은 직접적으로 성상교세포 활성화를 제어한다.** (A) 배양된 성상교세포는 1시간 동안 PDMP (25  $\mu$ M), LacCer (10  $\mu$ M), 둘 다 (LacCer+PDMP), 또는 비히클 대조군(비히클)으로 처리하고 이어서, 6시간 동안 LPS/IFN $\gamma$ 로 활성화시키거나 처리되지 않은 상태(대조군, Con)로 유지시켰다. mRNA 발현은 활성화 6시간 후 분석하였다. *gapdh*에 상대적으로 제공된 *ccl15*, *csf2*, *nos2*, *il6*, *H2-Aa*, 및 *tlr2*의 발현의 qPCR 분석. 원-웨이 ANOVA에 이어서 터키-포스트-후 분석에 의한 통계학적 분석. (B,C) 배양된 성상교세포는 지정된 농도에서 1시간 동안 LacCer (B) 또는 PDMP (C)로 전처리하고, 이어서 LPS/IFN $\gamma$ 로 활성화시키거나 처리되지 않은 상태로(대조군, Con) 유지시켰다. 세포 생존능은 활성화 6시간 후 결정하였다. 원-웨이 ANOVA에 의한 통계적 분석은 어떠한 유의적 세포사를 밝히지 못했다. 작동 농도 (A에서와 같이)는 적색으로 표시한다. (D) 1차 성상교세포에서 *B4galt6* (sh*B4galt6*) 또는 비-표적화 shRNA (Sh대조군)의 발현은 입증된 shRNA를 사용하여 녹다운시켰다. 성상교세포는 이어서 1시간 동안 PDMP 또는 비히클 대조군(비히클)로 전처리하고 이어서 6시간 동안 LPS/IFN $\gamma$ 로 활성화시키거나 처리되지 않은 상태(대조군, Con)로 유지시켰다. *H2-Aa*, *Ccl15* 및 *Cxcl10*에 대한 mRNA 발현을 측정하고; 발현은 하우스키핑 유전자 (*Gapdh*)에 상대적인 배수 유도로서 제공한다. 원-웨이 ANOVA에 이어서 터키 포스트-후 분석에 의한 통계학적 분석 ( $n \geq 3$ ). (E) 모사체(Mock)- 또는 렌티바이러스-감염된 마우스로부터의 척수 슬라이스의 면역염색 분석은 GFAP<sup>+</sup> 성상교세포에서만 GFP+ 발현을 확인한다. 2개의 독립적 실험의 대표적인 데이터, 적어도 6마리 동물/그룹을 사용하였다. (F) 웨스턴 블롯에 의해 분석된 세포질 및 핵 분획물에서 NF- $\kappa$ B (P65), GAPDH, 및 라민 B 발현. NF- $\kappa$ B의 핵으로의 전위 정도는 4개의 독립적 실험에 대한 밀도측정 정량 후 핵 및 세포질 분획물에서 P65의 발현 간의 비율에 의해 평가하였다(우측 패널). 원-웨이 ANOVA에 이어서 터키-후 분석에 의한 통계학적 분석. 데이터는 5개의 독립적 실험(평균 및 s.e.m)으로부터 비롯된다 \* $P < 0.05$ , 및 \*\* $P < 0.01$ . (G) 만성 EAE 동안에 IF에 의해 결정된 IRF-1<sup>+</sup> GFAP<sup>+</sup> 성상교세포에서 CCL-2 또는 iNOS의 발현. 2개의 독립적 실험의 대표적인 데이터, 6마리 동물/그룹을 사용하였다.

**도 15 (A-B). LacCer은 1차 연수막 식세포 및 맥락총 세포의 전사 반응에 영향을 미치지 않는다.** 연수막 식세포 (A) 및 맥락총 세포 (B)는 1시간 동안 LacCer (10  $\mu$ M), 또는 비히클 대조군 (비히클)으로 전처리하고 이어서 6시간 동안 LPS/IFN $\gamma$ 로 활성화시키거나 처리되지 않은 상태(대조군, Con)로 유지시켰다. mRNA 발현은 n카운터나노스트링 분석에 의해 결정하였다. 2개의 독립적 실험의 대표적인 데이터.

**도 16. 미글루스타트 처리는 만성 EAE 진행을 중단시킨다.** NOD 마우스는 MOG 35-55로 면역화시켰다. 마우스는 NOD EAE의 만성/진행성 단계의 초기 및 이후에 미글루스타트 또는 비히클 대조군으로 매일 처리하였다.

**도 17. 미글루스타트 처리는 CNS로의 단핵구 징집을 감소시킨다.**

**도 18. 미글루스타트 처리는 T-세포 분극에 영향을 미치지 않는다.**

**도 19. 미글루스타트 처리는 체중에 영향을 미치지 않는다.**

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 성상교세포는 CNS 발육 및 기능에서 다수의 역할을 수행한다<sup>1-4</sup>. 이롭고 해로운 역할 둘 다는 연구 중에 있는 성상교세포의 활성 상태, 유형 및 위치, 관여된 활성화 자극 및 면역 반응의 지속성과 같은 인자들에 의존하는 CNS 염증 동안에 성상교세포에 할당되었다<sup>3,32-36</sup>. 실제로, 성상교세포 이중성은 최근에서야 활성화에 대한 성상교세포에 영향을 미치는 중요한 인자로서 인지되었다<sup>37,38</sup>. GFAP<sup>높음</sup> 반응성 성상교세포는 백혈구 침윤을 조정하고<sup>7,8</sup> CNS 외상 및 급성 EAE에 반응하는 염증 반응을 조절하지만<sup>5-9</sup> 만성 CNS 염증 동안에 이들의 조절 및 기능을

이해하기에는 역부족이다.

[0028] 본원에 기재된 바와 같이, NOD EAE의 만성 단계 동안에 성상교세포에서 B4GALT6 상향 조절은 CNS 염증을 부스팅하고 신경퇴행을 촉진시키기 위해 자가분비 방식으로 작용하는 생활성 지질 LacCer의 CNS 수준을 증가시킨다. B4GALT5 및 B4GALT6은 LacCer 합성을 촉매하는  $\beta$ 4-갈락토실트랜스퍼라제 계열의 구성원이다<sup>17</sup>. 효소 둘 다 만성 EAE 및 MS 동안에 성상교세포에 의해 특이적으로 상향 조절되지만, B4GALT5가 아닌 B4GALT6이 CNS LacCer 수준 증가 및 결국 성상교세포 활성화 및 질환 진행에 관여한다. 이전의 연구는 B4GALT5 및 B4GALT6의 상이한 생물학적 역할을 기재하였다. 예를 들어, B4GALT6가 아닌 B4GALT5는 배아 발육을 위해 필수적이다<sup>23,24</sup>. 토쿠다 및 그의 공동연구자들은 최근에 B4GALT6 결핍이 비처리 마우스의 CNS에서 LacCer 신타제 활성화에서 상당한 감소를 유도하지만; 신장에서 LacCer 합성은 B4GALT5에 의해 제어됨을 입증하였다<sup>24</sup>. 이를 종합해보면, 이들 데이터는 B4GALT5 및 B4GALT6 LacCer 신타제 활성화의 공간적 및 기능적 구획화를 시사한다.

[0029] 미세아교세포 및  $Ly6C^{high}$   $CCR2^{+}$  염증 단핵구는 CNS에서 면역 반응의 주요 성분들이고 신경 퇴행에 큰 효과를 갖는다<sup>9,14,19,21,31</sup>. 성상교세포는 신경교 상처의 형성<sup>39</sup>에서 염증 단핵구를 CNS로 징집시키는 케모킨, 예를 들어, CCL-2의 분비에 이르는 여러 기작들을 통해 CNS로의 백혈구 침윤을 조절한다<sup>20,21</sup>. 본원에서 입증된 바와 같이, B4GALT6/LacCer 축은 NF- $\kappa$ B 및 IRF-1에 의한 *cc12* 프로모터의 트랜스활성화를 제어하고 궁극적으로 성상교세포에 의한 CCL-2 생산을 제어한다. 따라서, LacCer 합성의 억제는 또한 성상교세포에 의한 CCL-2 생산의 감소 및 염증 단핵구의 CNS로의 징집에 있어서 상당한 감소 둘 다를 유도한다. B4GALT6은 또한 CCL-5 및 CXCL-10의 생산을 제어하는 것으로 밝혀졌고; 따라서, 이들 데이터는 염증 세포의 CNS로의 징집에 있어서 중요한 조절체로서 B4GALT6/LacCer 경로를 확인한다.

[0030] CNS-침윤 단핵구 및 미세아교세포는 염증 촉진 및 소염 활성화와 관련된 상이한 표현형을 나타내고; M1 염증 촉진 미세아교세포 및 단핵구는 MS 및 다른 CNS 장애의 발병에 기여하는 것으로 사료된다<sup>29,30,40</sup>. 여러 인자들은 미세아교세포 및 단핵구 활성화에 영향을 미친다<sup>29,30,40</sup>. GM-CSF는 예를 들어, M1 대식세포의 분극화를 촉진시키고 EAE 동안에 미세아교세포를 활성화시킨다<sup>41</sup>. 본원에서 보여지는 바와 같이, B4GALT6/LacCer 축은 성상교세포에 의한 GM-CSF의 생산을 제어하고 궁극적으로 미세아교세포 활성화를 제어한다. 따라서, 상기 데이터는 Th17 세포<sup>42,43</sup>뿐만 아니라, 성상교세포가 또한 만성 CNS 염증 동안에 GM-CSF의 상당한 공급원을 구성함을 시사한다. 총체적으로, 상기 데이터는 성상교세포에 의해 생성된 LacCer이 만성 CNS 염증 동안에 염증 단핵구 및 미세아교세포의 징집 및 활성화를 제어함을 입증한다.

[0031] 지질은 미생물 감염 및 자가면역 동안에 면역 반응에 대해 상당한 효과를 발휘하여 면역 반응의 표적 또는 조절체로서 작용한다<sup>44-46</sup>. 지질 특이적 항체 및 T 세포가 MS에서 확인되었지만<sup>47,48</sup>, CNS 자가면역에서 생활성 지질의 역할은 대부분 공지되어 있지 않다. 슈타인만(Steinman) 및 공동연구자들은 최근에 수초(myelin sheath) 지질이 자가반응성 T 세포에서 어팍토시스를 유도하고 EAE를 완화시킴을 보고하였다<sup>44</sup>. 이들 지질의 감소된 수준은 MS 뇌 샘플에서 검출되었고, 이는 이들이 CNS-특이적 T 세포를 조절하는 역할을 수행함을 시사한다. 본원에 보여지는 LacCer의 염증 촉진 효과를 고려하여, CNS에서 소염 및 염증 촉진 지질의 균형에서의 교란이 MS 병리에 상당한 역할을 수행하는 것으로 나타난다. 따라서, CNS 지질의 프로파일링은 MS 및 다른 신경퇴행성 질환을 갖고 본원에 기재된 바와 같은 치료학적 중재를 위한 후보물인 대상체를 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0032] 중요하게, 도 1의 A-B에 나타난 바와 같이, 급성 단계 동안에 반응성 성상교세포의 고갈은 EAE의 상당한 악화를 유도하였지만 (도 1의 A), 진행성 단계 동안에 성상교세포 고갈은 EAE의 상당한 완화를 유도하였다 (도 1의 B). 더욱이, 급성 EAE에서 반응성 성상교세포 고갈이 본원에 기재된 바와 같이 CNS로의 증가된 단핵구 및 T-세포 징집을 유도하지만 EAE의 진행성 단계 동안의 고갈은 CNS에서 백혈구 침윤을 감소시켰지만(도 9의 B) 말초 T-세포 반응에 영향을 주지 않았다(도 9의 C,D).

[0033] 종합해 보면, 이들 결과는 B4GALT6에 의해 생성된 LacCer이 CNS 염증 및 신경퇴행을 구동시키고 진행성 MS에서 중요한 역할을 하는 것으로 사료되는 광범위한 과정들을 제어함을 입증한다. 따라서, LacCer 합성의 조절은 진행성 MS를 위한 그리고 또한 성상교세포 활성화가 질환 병리에 기여하는 다른 신경학적 장애를 위한 치료학적 방법이다.

[0034] **진행성 MS의 발병을 진단하고 예측하는 방법**

[0035] 신경퇴행성 질환, 특히 진행성 다발성 경화증(예를 들어, PPMS 또는 SPMS)을 진단하고 이들의 발병을 예측하기 위한 방법이 본원에 포함된다. 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 획득하고 상기 샘플 중에 LacCer의 존재 및/또는 수준을 평가하고, 상기 존재 및/또는 수준을 하나 이상의 참조물, 예를 들어, LacCer의 정상 수준, 예를 들어, 영향받지 않은 대상체에서의 수준을 나타내는 대조군 표준물 및/또는 진행성 다발성 경화증(예를 들어, PPMS 또는 SPMS)과 관련된 LacCer의 수준, 예를 들어, 진행성 다발성 경화증(예를 들어, PPMS 또는 SPMS)을 갖는 대상체에서 수준을 나타내는 질환 참조물과 비교함을 포함한다. 표준 수준 이상의 LacCer 수준의 존재는 대상체가 진행성 다발성 경화증(예를 들어, PPMS 또는 SPMS)을 가짐을 지적한다.

[0036] 일부 양태에서, LacCer의 수준은 질환 참조물에서 LacCer의 수준과 유사하고, 상기 대상체는 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS와 관련된 하나 이상의 증상을 갖고 있어서 상기 대상체는 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS를 갖는다. 일부 양태에서, 대상체는 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS의 명백한 징후 또는 증상을 갖지 않지만(예를 들어, 재발 완화형 MS를 갖지만 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS를 발병할 징후를 갖지 않는다) LacCer의 수준은 질환 참조물에서 LacCer의 수준과 유사하고 있어서, 상기 대상체는 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS를 발병하거나 증가된 발병 위험을 가질 가능성이 높다. 일부 양태에서, 상기 샘플은 생물학적 유체, 예를 들어, 혈액, 혈장, 혈청, 눈물, 침샘, 정액, 뇨 및/또는 뇌척수액, 또는 예를 들어, 생물학적 조직, 예를 들어, CNS 병변으로부터 생검 샘플을 포함한다.

[0037] 일부 양태에서, 개인이 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS를 갖거나 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS를 발병할 증가된 위험을 갖는 것으로 결정되면, 당업계에 공지되어 있거나 본원에 기재된 바와 같은 치료제가 투여될 수 있다.

[0038] LacCer의 존재 및/또는 수준은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어, 화학치료요법(예를 들어, 액체 또는 박층 크로마토그래피) 및/또는 질량 분광측정기를 사용하여, 예를 들어, LC-MS/MS 분석을 사용하여, 예를 들어, 삼중-사극자 LC/MS/MS 시스템상에서 수행되는 방법, MRI-분광측정기(문헌참조: 예를 들어, Taki et al., J Biochem. 1992 May;111(5):614-9), 생검 (예를 들어, LacCer의 존재하에 증식하는 종양 세포주의 증식을 측정함에 의해; 문헌참조: 예를 들어, Jiang et al., Glycobiology 16:1045-1051 (2006); Hamamura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 (31):11041-11046 (2005)); B4GALT6 활성의 검출을 위한 효소적 검정; 및 면역 검정, 예를 들어, 항-LacCer 항체를 사용하는 정량적 면역검정 방법 (예를 들어, ELISA 또는 면역형광)을 사용하여 평가될 수 있다. 항-LacCer 항체는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 마우스 항-락토실 세라미드 항체 (클론 TrA7; IgM) (Symington et al., J Biol Chem 259:6008-6012 (1984) 및 Dohi et al., Cancer Res. 48:5680-5685 (1988))가 있고; 다른 항체는 예를 들어, 제조원(Funakoshi Corp)으로부터 시판된다.

[0039] 적합한 참조물 값은 당업계에 공지된 방법을 사용하여, 예를 들어, 표준 임상적 시험 방법 및 통계학적 분석을 사용하여 결정될 수 있다. 상기 참조값은 임의의 관련 형태를 가질 수 있다. 일부 경우에, 상기 참조물은 LacCer의 의미있는 수준, 예를 들어, LacCer의 정상 수준을 나타내는 대조군 참조 수준, 예를 들어, 영향받지 않은 대상체 또는 RRMS를 갖지만 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS를 현재 발병할 위험이 없는 대상체에서의 수준, 및/또는 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS와 관련된 LacCer의 수준, 예를 들어, 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS, 또는 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS(예를 들어, 1, 3, 6, 9, 12개월, 2년, 3년, 4년, 또는 5년의 시기내)를 이후 발병하는 대상체에서의 수준에 대한 소정의 값을 포함한다.

[0040] 상기 소정의 수준은 중앙 또는 평균과 같은 단일 컷-오프(역치) 값일 수 있거나 다른 분절과 통계학적으로 상이한 것으로 결정된 임상 시험 집단의 상부 또는 하부 사분위도, 삼분위도 또는 다른 분절의 경계선을 한정하는 수준일 수 있다. 신뢰 구간과 같은 컷-오프(또는 역치) 값의 범위일 수 있다. 하나의 한정된 그룹에서 질환을 발병할 위험 또는 질환의 존재와의 관련성이 또 다른 한정된 그룹에서 질환의 위험 또는 존재 보다 배수로 보다 높거나 낮은 (예를 들어, 대략적으로 2-배, 4-배, 8-배, 16-배 이상) 경우와 같은 비교 그룹을 기준으로 확립될 수 있다. 예를 들어, 대상체의 집단(예를 들어, 대조군 대상체)가 균등하게(또는 비균등하게) 저위험 그룹, 중간 위험 그룹 및 고위험 그룹과 같은 그룹으로 또는 n-사분위도(즉, 정규적으로 이격된 간격)으로 나누어지는 경우의 범위일 수 있고, 최저 n-사분위도는 최저 위험을 갖는 대상체이고 최고 n-사분위도는 최고 위험을 갖는 대상체이다.

[0041] 일부 양태에서, 소정의 수준은 예를 들어, 상이한 시점, 예를 들어, 초기 시점에서 동일한 대상체에서의 수준 또는 존재이다.

- [0042] 소정의 값과 관련된 대상체는 전형적으로 참조 대상체로서 언급된다. 예를 들어, 일부 양태에서, 대조군 참조 대상체는 본원에 기재된 장애(예를 들어, 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS)를 갖지 않고 1, 3, 6, 9, 12 개월, 2년, 3년, 4년, 또는 5년 이내에 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS를 발병하지 않는다. 일부 경우에, 대조군 대상체가 RRMS를 갖는 것이 바람직할 수 있고 다른 경우에, 대조군 대상체가 건강한 대조군인 것이 바람직할 수 있다.
- [0043] 질환 참조 대상체는 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS를 갖는 (또는 발병할 증가된 위험, 예를 들어, 특정 기간 이내, 예를 들어, 1, 3, 6, 9, 12개월, 2년, 3년, 4년, 또는 5년의 특정 기간 이내에 발병할 증가된 위험을 갖는) 대상체이다. 증가된 위험은 일반 집단에서 대상체의 위험 이상의 위험으로서 정의된다.
- [0044] 따라서, 일부 경우에, LacCer의 표준 수준 이상의 대상체에서 LacCer의 수준은 임상적 상태를 지적한다(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 장애, 예를 들어, SPMS를 지적한다). 다른 경우에, LacCer의 참조 수준 이하의 대상체에서의 LacCer의 수준은 예를 들어, 1, 3, 6, 9, 12개월, 2년, 3년, 4년, 또는 5년 이내에 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS의 부재 또는 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS를 발병할 정상적 위험을 지적한다. 일부 양태에서, 대상체에서의 수준이 표준 수준 초과가 되게하는 양은 대상체를 대조군 대상체와 구분하기에 충분하고 임의로 대조군 대상체에서의 수준 보다 통계학적으로 유의적으로 높다. 대상체에서 LacCer의 수준이 LacCer의 참조 수준과 동등한 경우에, "동등함"은 대략적으로 동등함(예를 들어, 통계학적으로 상이하지 않은)을 언급한다.
- [0045] 소정의 참조 값은 선택된 특정 집단의 대상체(예를 들어, 인간 대상체)에 의존할 수 있다. 예를 들어, 걸보기 건강한 집단 또는 RRMS를 갖지만 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS를 갖지 않는 (및 예를 들어, 소정의 기간 내에, 예를 들어, 1, 3, 6, 9, 12개월, 2년, 3년, 4년, 또는 5년 내에 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS를 발병하지 않는) 대상체 집단은 본원에 기재된 장애를 갖거나 발병할 가능성이 높은 (예를 들어, 소정의 기간, 예를 들어, 1, 3, 6, 9, 12개월, 2년, 3년, 4년, 또는 5년 내에) 대상체 집단 보다 상이한 "정상" 범위를 갖는다. 따라서, 선택된 소정의 값은 대상체(예를 들어, 인간 대상체)가 속하는 카테고리(예를 들어, 성별, 연령, 건강, 위험, RRMS의 존재 또는 다른 질환)를 고려할 수 있다. 적당한 범위 및 카테고리는 통상의 기술자에 의해 통상적인 실험만으로 선택될 수 있다.
- [0046] 가능성 또는 위험을 특징화하는데 있어서, 다수의 소정의 값이 확립될 수 있다.
- [0047] LacCer 수준에 대한 대안으로서, AHR, CCL2, CCL5, CCL7, CXCL10, CXCL3, CXCL9, Marco, NRF2, Timp1, TLR2, TLR8, TNF $\alpha$ , 또는 VEGF mRNA 또는 단백질의 수준은 대상체 기원의 샘플에서 평가할 수 있다. 표준 수준 초과인 수준은 대상체가 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SPMS를 갖거나 이의 발병 위험이 있음을 지적한다. mRNA 또는 단백질 수준을 결정하기 위한 다수의 방법이 당업계에 공지되어 있다. 단백질의 존재 및/또는 수준은 예를 들어, 정량 면역검정 방법을 사용하여 당업계에 공지된 방법을 사용하여 평가할 수 있다. 일부 양태에서, 고속 처리 방법, 예를 들어, 단백질 또는 유전자 칩은 당업계에 공지되어 있고(문헌참조: 예를 들어, Ch. 12, Genomics, in Griffiths et al., Eds. Modern genetic Analysis, 1999, W. H. Freeman and Company; Ekins and Chu, Trends in Biotechnology, 1999, 17:217-218; MacBeath and Schreiber, Science 2000, 289(5485):1760-1763; Simpson, Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2002; Hardiman, Microarrays Methods and Applications: Nuts & Bolts, DNA Press, 2003) 단백질 또는 mRNA의 존재 및/또는 수준을 검출하기 위해 사용될 수 있다.
- [0048] **치료 방법**
- [0049] 본원에 기재된 방법은 예를 들어, B4GALT6 및/또는 글루코실세라미드 (GlcCer) 신타제의 억제제인 LacCer 합성의 억제제인 활성제를 사용하여 신경학적 장애, 즉, 성상교세포의 기능부전과 관련된 신경학적 장애의 치료를 위한 방법을 포함한다. 도 1의 A-B에서 보여지는 바와 같이, 급성 단계 동안에 반응성 성상교세포의 고갈은 EAE를 상당히 악화시켰지만 (도 1의 A), 진행성 단계 동안에 성상교세포 고갈은 EAE의 상당한 완화를 유도하였다 (도 1의 B). 따라서, 일부 양태에서, 상기 장애는 진행성 MS, 예를 들어, SPMS 또는 PPMS이고, RRMS가 아니다. 대안적으로, 상기 질환은 또 다른 신경퇴행성 질환, 예를 들어, 파킨슨 질환, 알츠하이머 질환, 근위축성 측삭 경화증, 알렉산더 질환, 헌팅턴 질환, 또는 래트 질환 (문헌참조: 예를 들어, Maragakis and Rothstein, Nature Clinical Practice Neurology (2006) 2, 679-689); 또는 뇌 및 척수 외상일 수 있다. 성상교세포의 기능부전은 예를 들어, 문헌(참조: Maragakis and Rothstein, Nature Clinical Practice Neurology (2006) 2, 679-689)에 기재된 바와 같다.

- [0050] 일부 양태에서, 개인이 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS를 갖거나 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS를 발병할 증가된 위험을 갖거나 LacCer 합성의 상승된 수준을 갖는 것으로 결정되면, 이어서 치료학적 유효량의 LacCer 합성의 억제제의 투여를 포함하는 치료가 적용될 수 있다. 따라서, 이들 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하고 상기 샘플에서 LacCer의 존재 및/또는 수준을 평가하고 상기 존재 및/또는 수준을 하나 이상의 참조물, 예를 들어, LacCer의 정상 수준, 예를 들어, 영향받지 않은 대상체에서의 수준을 나타내는 대조군 참조물 및/또는 진행성 다발성 경화증(예를 들어, PPMS 또는 SPMS)와 관련된 LacCer의 수준, 예를 들어, 진행성 다발성 경화증(예를 들어, PPMS 또는 SPMS)을 갖는 대상체에서 수준을 나타내는 질환 참조물과 비교함을 포함할 수 있다. 표준 수준 초과 LacCer의 수준의 존재는 대상체가 진행성 다발성 경화증(예를 들어, PPMS 또는 SPMS)을 갖고 LacCer 합성의 억제제로 치료되어야 함을 지적한다. 이들 방법은 또한 누가 GlcCer 신타제의 억제제를 사용한 치료로부터 이득을 얻을 것인지를 예측하기 위해 사용될 수 있고; 표준 수준 초과 LacCer의 수준을 갖는 대상체는 표준 수준 미만의 LacCer 수준을 갖는 대상체보다 LacCer 합성 억제제를 사용한 치료로부터 이득을 얻을 가능성이 더 높다. 추가로, 상기 방법은 대상체를 위한 치료를 선택하기 위해 사용될 수 있고; LacCer 합성 억제제를 사용한 치료는 참조 수준 초과 LacCer 수준을 갖는 대상체를 위해 선택된다. 일부 양태에서, 상기 대상체는 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS와 관련된 하나 이상의 증상을 갖고/가거나 대상체는 MS, 예를 들어, 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS를 갖는 것으로 진단되거나 이전에 RRMS를 앓았던 것으로 진단되거나 진행성 MS로 전환된 것으로 의심된다.
- [0051] 일반적으로, 상기 방법은 본원에 기재된 바와 같은 치료학적 유효량의 GlcCer 신타제의 억제제를 이를 필요로 하거나 상기 치료를 필요로 하는 것으로 결정된 대상체에게 투여함을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "치료하는" 것은 정상교세포의 활성화와 관련된 장애의 적어도 하나의 증상을 완화시킴을 의미한다. 치료는 MS의 하나 이상의 증상, 예를 들어, 우울증 및 피로, 방광 기능부전, 경직, 통증, 운동실조 및 기도진전을 감소시킬 수 있다. 치료학적 유효량은 급성 에피소드의 개시를 예방하거나 급성 에피소드의 지속성을 단축시키거나 하나 이상의 증상, 예를 들어, 열 민감성, 핵간성안근마비, 시신경염, 및 레르미트 증상의 중증도를 감소시키기에 충분한 양일 수 있다. 일부 양태에서, 치료학적 유효량은 예를 들어, MRI에서 입증된 바와 같이 대상체의 뇌, 시신경 및 척수 중 하나 이상에서 탈수초 병변의 출현을 예방하거나, 성장을 지연시키거나 성장(즉, 크기의 증가)을 예방하거나 치유를 촉진시키기에 충분한 양이다.
- [0052] 일부 양태에서, 예를 들어, GlcCer 신타제의 억제제가 투여되는 양태에서, 상기 장애는 MS, 예를 들어, 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPS이고; 일부 양태에서, 상기 장애는 알츠하이머 질환(AD), 니만-픽 질환(Niemann-Pick Disease), 파킨슨 질환, 롬드리-길리안-바레-스트롤 증후군, RRMS, 바이러스 뇌염, 후천성 면역결핍 질환(AIDS)-관련 치매, 근위축성측색경화증, 뇌 외상 또는 척수 장애가 아니다. 일부 양태에서, 예를 들어, GlcCer 신타제의 억제제가 투여되는 양태에서, 상기 방법은 활성제로서 S-니트로글루타티온(GSNO), L-2-옥소-티아졸리딘 4-카복실레이트(프로시스테인), N-아세틸 시스테인(NAC), 또는 N-아세틸 글루타티온과 같은 글루타티온 공여체를 투여함을 포함하지 않는다.
- [0053] *재발 완화형 및 진행성 MS*
- [0054] 다발성 경화증(MS)은 중추신경계(CNS)의 염증 탈수초 질환이다. MS는 전형적으로 CNS에서 병변에 의해 유발되는 재발 또는 만성적 진행성 신경학적 기능부전을 특징으로 한다. 병리학적으로, 상기 병변은 뇌, 시신경 및 척수에 영향을 미치는 탈수초의 다발성 영역을 포함한다. 기반이 되는 병인은 불확실하지만 MS는 광범위하게 적어도 부분적으로 자가면역 또는 면역 매개 질환인 것으로 사료된다.
- [0055] 환자의 85%에서, MS는 초기에 중추신경계(CNS)에 대한 급성 자가면역 공격에 이어서 완전히 회복되는 재발 완화형 과정(RRMS)에 따른다(문헌참조: Compston and Coles, Lancet 372, 1502-1517 (2008)). 대다수의 RRMS 환자들은 2차 진행성 MS(SPMS)를 발병하게 되고 이는 신경학적 불능의 비가역적 진행성 누적을 특징으로 한다(문헌참조: Rovaris et al., Lancet Neurol 5, 343-354 (2006)). SPMS를 특징으로 하는 진행성이고 비가역적 불능은 새로운 염증 병변의 부재하에 일어나고 이는 다른 메커니즘이 상기 MS 단계에서 역할을 수행함을 시사한다(문헌참조: Rovaris et al., Lancet Neurol 5, 343-354 (2006)). 여러 치료요법이 RRMS에 대해 양성 효과를 보여주지만 이들은 일반적으로 SPMS에서 비효과적이고 어떠한 마커도 SPMS로의 전이를 모니터링하기 위해 가용하지 않다. 실제로, 적응성 염증 반응을 중단하는 치료는 RRMS의 관리에 양성 효과를 보여주지만 일반적으로 SPMS에서 비효과적이다(문헌참조: Lopez-Diego and Weiner, Nat Rev Drug Discov 7, 909-925 (2008)). 따라서, SPMS로의 전이에 관여하는 과정을 특징 분석하고 진행성 MS에 대한 새로운 치료요법 및 RRMS의 SPMS로의 전이를 모니터링하기 위한 바이오마커를 확인하는 것이 중요하다.

- [0056] 2차 진행성 다발성 경화증 (SPMS)은 4개의 국제적으로 인지된 형태의 다발성 경화증 중 하나(다른 것들은 재발/완화 다발성 경화증, 1차 진행성 다발성 경화증 및 진행성 재발 다중 경화증)이고 표생적 재발 및 최소 감퇴 및 정체기를 갖거나 갖지 않는 임상적 신경학적 손상의 안정적 진행을 특징으로 한다. SPMS를 발병할 사람들은 일반적으로 2년 내지 40년 이상 지속할 수 있는 재발/완화 다발성 경화증(RRMS)을 이전에 앓은 적이 있다. 때로는 상기 대상체는 SPMS의 발병 후 일부 재발 및 완화를 갖지만 이들은 시간 경과에 따라 적은 빈도가 되는 경향이 있다.
- [0057] 1차 진행성 MS (PPMS)는 상대적으로 드물고(MS 환자 집단의 약 15%), 질환 개시로부터 느리게 진행되는 능력 상실을 특징으로 한다. 대부분의 PPMS 환자들은 진행성 척수병증 또는 진행성 소뇌 기능부전을 갖는다.
- [0058] MS의 진단 및 아유형의 결정은 예를 들어, 공간 및 시간적으로 파종된 CNS 병변의 존재 및 대안적 진단의 제거를 기반으로 하는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다(다발성 경화증에서 치료요법의 실험적 시험의 문제점: 다발성 경화증에서 치료요법의 실험적 시험의 평가에 대한 패널에 의한 보고. Ann N Y Acad Sci. 122: 1965; 552-568). 대안적으로, 진단은 열 민감성, 핵간성안근마비, 시시경염 및 레르미트(Lhermitte) 증상을 포함하는 임상적 징후 및 증상의 존재를 기반으로 수행될 수 있다(문헌참조: 예를 들어, McDonald et al., Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines From the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. Ann. Neurol. 2001; 50:121; 및 Polman et al., Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2005 Revisions to the "Donald Criteria." Ann Neurol 2005;58:840-846).
- [0059] MS에서 장애(disability)를 정량하는 방법은 쿠르츠 확장 장애 상태 스케일(Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS)); MRI 스캐닝; 스크립스 신경학적 등급화 스케일(Scripps Neurologic Rating Scale (SNRS)); 크루프 피로 중증도 스케일(Krupp Fatigue Severity Scale (FSS)); 무능 상태 스케일(Incapacity Status Scale (ISS)); 기능 독립적 측정(Functional Independence Measure (FIM)); 보행 지수(Ambulation Index (AI)); 캠브릿지 다발성 경화증 기본 스코어(Cambridge Multiple Sclerosis Basic Score (CAMBS)); 다발성 경화증의 기능성 평가 (FAMS); 분위기 상태의 프로파일 (POMS); 및 질병 영향 프로파일(SIP)을 포함한다.
- [0060] MS, 및 진행성 MS, 예를 들어, PPMS 또는 SMPMS를 진단하고 치료하는 것에 대한 추가의 정보는 문헌[참조: 예를 들어, Hurwitz et al., Ann Indian Acad Neurol. 2009 Oct-Dec; 12(4): 226-230; 및 Spinal Cord Medicine, Principles and Practice, Lin et al., Eds., (Demos Medical Publishing, Inc., 2003), e.g., Section V, Chapter 32, "Multiple Sclerosis"]에서 찾을 수 있다.
- [0061] 표적화 LacCer 합성: B4GALT6 및 GlcCer 합성
- [0062] 본원에 기재된 방법은 LacCer 합성의 억제제, 예를 들어, B4GALT6 및/또는 글루코실세라미드 (GlcCer) 신타제의 억제제, 또는 글루코세레브로시다제의 활성화제를 사용하여 진행성 다발성 경화증(예를 들어, PPMS 또는 SPMS)의 치료를 위한 방법을 포함한다. 상기 방법은 진행성 다발성 경화증(예를 들어, PPMS 또는 SPMS)을 갖는 대상체를 확인하고, 치료학적 유효량의 LacCer 합성의 특이적 억제제, 예를 들어, B4GALT6 및/또는 GlcCer 합성의 특이적 억제제를 포함하는 치료학적 조성물을 진행성 다발성 경화증(예를 들어, PPMS 또는 SPMS)을 갖는 대상체에게 투여함을 포함한다.
- [0063] GlcCer 신타제의 소분자 억제제
- [0064] GlcCer 신타제의 억제제는 소분자를 포함하고, 이의 대부분은 효소 활성 부위에 결합하여 기질 결합을 차단하는 효소 기질 유사체이다. 이들 억제제는 세라미드 유사체 (문헌참조: 예를 들어, 미국 특허 제6,569,889호; 제6,255,336호; 제5,916,911호; 제5,302,609호; Lee et al., J. Biol. Chem. 274(21):14662 (1999); Abe et al., J. Biochem. 111:191 (1992); Inokuchi et al., J. Lipid Res. 28:565 (1987); Shayman et al., J. Biol. Chem. 266:22968 (1991); and Bell et al. Ed., 1993, Advances in Lipid Research: Sphingolipids in Signaling (Academic Press, San Diego)) 및 당 유사체 (문헌참조: 예를 들어, 미국 특허 제6,660,749호; 제6,610,703호; 제5,472,969호; 제5,525,616호; Overkleeef et al., J. Biol. Chem. 273(41):26522 (1998))를 포함하고; 또한 문헌[참조: US20120022126, US20130040953, US20130225573, US20070135487, 5,700,826 및 5,840,721; 및 Koltun et al., Bioorg Med Chem Lett. 2011 Nov 15;21(22):6773-7]을 참조한다. 예는 1-(3',4'-에틸렌디옥시)페닐-2-노나노일아미노-3-피롤리디노-1-프로판올; 1-(3',4'-에틸렌디옥시)페닐-2-옥타노일아미노-3-피롤리디노-1-프로판올; D-트레오-(1R,2R)-페닐-2-데카노일아미노-3-모르폴리노-1-프로판올(PDMP), 및 D-PDMP를 포함하는 이의 유사체[예를 들어, 문헌(Hillaert et al., Bioorg Med Chem. 2006 Aug 1;14(15):5273-84)을 참조한다]; D-트레오-EtDO-P4; ((1R, 2R)-노나노산 [2-(2',3' -디하이드로-벤조 [1,4] 디옥신-6'-일)-2-

하이드록시-1-피롤리딘-1-일메틸-에틸]-아미드-L-타르타르산 염; AMP-DNM; CCG0203586 (1-하이드록시-3-(피롤리딘-1-일)아세트아미드); Genz-112638 (에글리글루스타트(eliglustat)); Genz-529468; GZ-161; Genz-682452; EXEL-0346 (Richards et al., J Med Chem. 2012 May 10;55(9):4322-35); OGT2378; Genz-123346; 데옥시노지리마이신-기반 GCS 억제제 (예를 들어, N-부틸-데옥시노지리마이신 (NB-DNJ, 또한 미글루스타트로서 공지됨), N-(5'-아다만탄-1'-일-메톡시)-펜틸-1-데옥시노지리마이신(AMP-DNM), 또는 긴 알킬 측쇄, 예를 들어, 알킬 측쇄에 9 내지 약 20개 탄소 원자를 갖는 1,5-디데옥시-1,5-아미노-D-글루시톨의 장쇄 N-알킬 유도체를 갖는 a1-데옥시노지리마이신을 포함한다. 따라서, N-알킬 치환체는 예를 들어, 노일, 데실, 운데실, 도데실, 테트라데실, 헥사데실, 시스-11-헥사테세닐, 옥타데실, 시스-13-옥타테세닐 및 에이코실 (문헌참조: US 6,610,703)); 및 PPMP (DL-트레오-1-페닐-2-팔미토일아미노-3-모르폴리노-1-프로판)(문헌참조: US20130217691 및 US 20050101674)일 수 있다.

[0065] 본 발명의 방법에 유용한 추가의 억제제는 문헌[참조: 8,389,517; 20110166134; 20070203223; 20050222244; 20130095089; 7,335,681; 7,253,185; 7,148,251; 6,916,802; 6,890,949; 6,051,598; 6,040,332; 6,030,995; 5,952,370; 5,945,442; 20090247559; 20060111400; 20060058349; 20060074107; 8,557,844; 20100204162; 8,252,789; 20130012539; 및 20090163500]에 기재된 것들을 포함한다.

[0066] B4GALT6을 표적화하는 억제 핵산

[0067] B4GALT6의 특이적 억제제는 B4GALT6 유전자 또는 mRNA를 표적화하는 억제 핵산을 포함하고; 인간 B4GALT6 mRNA의 서열은 Acc. No. NM\_004775.3으로 GenBank에 있고; 게놈 서열은 NC\_000018.10으로 있다. 본 발명의 방법 및 조성물에 유용한 억제 핵산은 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임, 외부 가이드 서열(EGS) 올리고뉴클레오타이드, siRNA 화합물, 단일- 또는 이중-가닥 RNA 간섭(RNAi) 화합물, 예를 들어, siRNA 화합물, 변형된 염기/잠겨진 핵산(LNA), 안타고미르(antagomir), 펩타이드 핵산 (PNA), 및 다른 올리고머성 화합물 또는 표적 B4GALT6 핵산의 적어도 일부에 하이브리드화하여 이의 기능을 조절하는 올리고뉴클레오타이드 모사체를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 억제 핵산 분자는 안티센스 RNA, 안티센스 DNA, 키메라 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 변형된 연결체를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 간섭 RNA (RNAi), 짧은 간섭 RNA (siRNA); 마이크로, 잡섭 RNA (miRNA); 작은 일시적 RNA (stRNA); 또는 짧은 헤어핀 RNA (shRNA); 작은 RNA-유도된 유전자 활성화 (RNAa); 작은 활성화 RNA (saRNAs), 또는 이의 배합물을 포함한다. 상기 억제 핵산은 예를 들어, 변형된 뉴클레오타이드(예를 들어, 잠겨진 핵산) 또는 골격(예를 들어, 여기에 인 원자를 포함하지 않는 골격)을 포함하도록 변형될 수 있거나, 믹스머(mixmer) 또는 갭머(gapmer)일 수 있다(문헌참조: 예를 들어, WO2013/006619). B4GALT6에 대해 지시된 다수의 siRNA는 예를 들어, 오리젠(origene), 라봄(labome), 아브노바(abnova), 및 퀴아젠(qiagen)로 시판되고 있다.

[0068] 본원에 기재된 방법을 수행하기 위해 사용되는 억제 핵산은 RNA, cDNA, 게놈 DNA, 벡터, 바이러스 또는 이의 하이브리드인 상관 없고 다양한 공급원으로부터 분리되거나 유전학적으로 가공되거나, 증폭되고/되거나 발현되거나 재조합적으로 또는 합성적으로 생성될 수 있다. 재조합 핵산 서열은 개별적으로 분리되거나 클로닝될 수 있고 목적하는 활성에 대해 시험될 수 있다. 임의의 재조합 발현 시스템이 사용될 수 있고, 예를 들어, 시험관 내, 세균, 진균류, 포유동물, 효모, 곤충 또는 식물 세포 발현 시스템을 포함한다.

[0069] 핵산 서열은 전달 벡터로 삽입되고 상기 벡터내 전사 단위로부터 발현될 수 있다. 상기 재조합 벡터는 DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터일 수 있다. 벡터 작제물의 생성은 당업계에 널리 공지된 임의의 적합한 유전자 가공 기술을 사용하여 성취될 수 있고 PCR의 표준 기술, 올리고뉴클레오타이드 합성, 반응 엔도뉴클레아제 분해, 연결, 형질전환, 플라스미드 정제, 및 예를 들어, 문헌(참조: Sambrook et al. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (1989)), Coffin et al. (Retroviruses. (1997)) and "RNA Viruses: A Practical Approach"(Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000))에 기재된 바와 같은 DNA 서열분석을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 당업자에게 자명한바와 같이, 다양한 적합한 벡터는 본 발명의 핵산을 세포로 전달하기 위해 가용하다. 핵산을 전달하기 위해 적당한 벡터의 선택 및 상기 선택된 발현 벡터의 상기 세포의 삽입을 위한 조건의 최적화는 과도한 실험을 필요로 하지 않고 당업계의 기술 범위내에 있다. 바이러스 벡터는 팩킹 세포에서 재조합 바이러스의 제조를 위한 서열을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 본 발명의 핵산을 발현하는 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 폭스 바이러스 또는 알파 바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않는 바이러스 골격을 기초로하여 작제될 수 있다. 본 발명의 핵산을 발현할 수 있는 재조합 벡터는 본원에 기재된 바와 같이 전달될 수 있고 표적 세포(예를 들어, 안정한 형질전환체)에서 지속적으로 존재한다.

- [0070] 억제 핵산은 문헌[참조: 예를 들어, Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; U.S. Patent No. 4,458,066]에 기재된 바와 같이 널리 공지된 화학적 합성 기술에 의해 시험관내에서 합성될 수 있다.
- [0071] 본원에 기재된 방법에 사용하기 위한 억제 핵산은 하나 이상의 변형을 포함할 수 있고, 예를 들어, 변형, 예를 들어, 뉴클레오타이드 변형을 혼입함에 의해 핵산용해 분해로부터 안정화될 수 있다. 예를 들어, 억제 핵산은 뉴클레오타이드 서열의 5' 또는 3' 말단에서 포스포로티오에이트, 적어도 제1, 제2 또는 제3 상호뉴클레오타이드 연결체를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 억제 핵산은 2'-변형된 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2'-데옥시, 2'-데옥시-2'-플루오로, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸 (2'-O-MOE), 2'-O-아미노프로필 (2'-O-AP), 2'-O-디메틸아미노에틸 (2'-O-DMAOE), 2'-O-디메틸아미노프로필 (2'-O-DMAP), 2'-O-디메틸아미노에틸옥시에틸 (2'-O-DMAEOE), 또는 2'-O-N-메틸아세트아미도 (2'-O-NMA)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 억제 핵산은 적어도 하나의 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있고 일부 양태에서 모든 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 변형을 포함한다. 일부 양태에서, 억제 핵산은 "잠겨져 있고", 즉, 리보스 환이 2'-O 원자와 4'-C 원자를 연결하는 메틸렌 브릿지에 의해 "잠겨져" 있다(문헌참조: 예를 들어, Kaupinnen et al., Drug Disc. Today 2(3):287-290 (2005); Koshkin et al., J. Am. Chem. Soc., 120(50):13252-13253 (1998)). 추가의 변형을 위해서는 문헌[US 20100004320, US 20090298916, 및 US 20090143326]을 참조한다.
- [0072] 예를 들어, 서브클로닝, 표지화 프로브(예를 들어, 클레노우(Klenow) 폴리머라제, Nick 해독, 증폭을 사용한 무작위-프라이머 표지화), 서열분석, 하이브리드화 등과 같은 억제 핵산의 조작을 위한 기술은 과학 문헌 및 특허 문헌에 널리 기재되어 있다[문헌참조: 예를 들어, Sambrook et al., Molecular Cloning; A Laboratory Manual 3d ed. (2001); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds. (John Wiley & Sons, Inc., New York 2010); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993)].
- [0073] B4GALT6에 결합하고 이를 억제하는 항체
- [0074] B4GALT6에 결합하여 이의 활성을 억제하는(즉, LacCer 합성을 억제하기 위해) 항체가 또한 사용될 수 있고; 인간 B4GALT6 단백질의 서열은 Acc. No. NP\_004766.2로 GenBank에 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항체"는 면역글로불린 분자 또는 이의 항원 결합부를 언급한다. 면역글로불린 분자의 항원 결합부의 예는 항원에 결합하는 능력을 보유한 F(ab) 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 포함한다. 상기 항체는 폴리클로날, 모노클로날, 재조합, 키메라, 탈면역화되거나 인간화된, 완전히 인간, 비-인간(예를 들어, 쥐) 또는 단일쇄 항체일 수 있다. 일부 양태에서, 상기 항체는 이펙터 기능을 갖고 보체를 고정할 수 있다. 일부 양태에서, 상기 항체는 Fc 수용체에 결합하는 능력이 감소되었거나 결합능이 없다. 예를 들어, 상기 항체는 Fc 수용체로의 결합을 지지하지 않는 이소형 또는 아유형, 단편 또는 다른 돌연변이체일 수 있고, 예를 들어, 이것은 돌연변이되거나 결실된 Fc 수용체 결합 영역을 갖는다. 이의 항체 및 단편을 제조하기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌[Harlow et al., editors, Antibodies: A Laboratory Manual (1988); Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, (N.Y. Academic Press 1983); Howard and Kaser, Making and Using Antibodies: A Practical Handbook (CRC Press; 1st edition, Dec 13, 2006); Kontermann and **Dübel**, Antibody Engineering Volume 1 (Springer Protocols)(Springer; 2nd ed., May 21, 2010); Lo, Antibody Engineering: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Humana Press; Nov 10, 2010); 및 **Dübel**, Handbook of Therapeutic Antibodies: Technologies, Emerging Developments and Approved Therapeutics, (Wiley-VCH; 1 edition September 7, 2010)]을 참조한다. B4GALT6에 결합하는 항체는 제조원(EMD Millipore, R&D Systems, Cell Signaling Technology, OriGene, Novus Biologicals, Thermo Fisher Scientific, LSBio, Abcam, and/or Cloud-Clone Corp.)으로부터 시판되고 있고 당업자는 B4GALT6을 발현하는 세포에서 LacCer 합성을 억제하는 항체를 용이하게 제조하거나 수득하고 이의 능력을 시험할 수 있다.
- [0075] 글루코세레브로시다제의 활성화제
- [0076] 글루코세레브로시다제의 활성화제는 또한 본원에 기재된 다른 화합물에 추가로 또는 대안으로서 사용될 수 있다. 활성화제는 당업계에 공지되어 있고, NCGC00182186 (5-사이클로프로필리덴-7-(디플루오로메틸)-N-(2-페닐

설과닐페닐)-1H-피라졸로 [1,5-a]피리미딘-3-카복시아미드) 및 NCGC00182510 ([2-(3급-부틸아미노)-2-옥소에틸] 2-[2-(4-브로모아닐리노)-2-옥소에톡시]벤조에이트) (문헌참조: 예를 들어, Goldin et al., PLoS ONE 7(1):e29861); 또는 사포신 C 또는 포스파티딜세린 (문헌참조: 예를 들어, Salvioli et al., Biochem. J. (2005) 390 (95-103))을 포함한다. 사포신 C는 리소좀 글루코세레브로시다제를 활성화시키는 8.5 kDa의 스펅고 지질 활성화제 단백질이다. 각각 활성화 부위에 인접하거나 부분적으로 중첩되는 결합 부위를 포함하는 2개의 기능성 도메인이 확인되었다. 도메인 1은 아미노산 위치 6번 내지 34번내에 위치하고 도메인 2는 아미노산 41번 내지 60번이다. 상기 활성화 부위는 잔기 27번 내지 34번 및 41번 내지 49번에 걸쳐있고 결합 부위는 잔기 6번 내지 27번 및 45번 내지 60번을 포함한다. 펩타이드는 도메인 1 또는 전장 합성 사포신 C 활성화의 90%를 나타내는 서열을 함유한다 (문헌참조: Yoneshige et al., J Neurosci Res. 2010 Aug 1;88(10):2118-34; Weiler et al., Protein Sci. 1995 Apr;4(4):756-64; Weiler et al., J Mol Neurosci. 1993 Fall;4(3):161-72; Fujibayashi and Wenger, Clin Chim Acta. 1985 Mar 15;146(2-3):147-56; Zschoche et al., Eur J Biochem. 1994 May 15;222(1):83-90). 따라서, 사포신 C 또는 이의 단편(예를 들어, 도메인 1 또는 2를 함유하는)이 사용될 수 있다. 인간 사포신 C의 서열은 다음과 같다(도메인 1 및 2는 굵게 표시되고 이중선으로 나타낸다):

[0077] SDVYCEVCEFLVKEVTKLIDNNKTEKEILDADFDMCSKLP

[0078] KSLSEECQEVVDYTGSSILSILLEEVSP'ELVCSMLHLCSG

[0079] (서열번호 1)

[0080] 진행성 다발성 경화증(예를 들어, PPMS 또는 SPMS)을 앓는 대상체의 확인

[0081] 일부 양태에서, 상기 방법은 예를 들어, 진행성 다발성 경화증(예를 들어, PPMS 또는 SPMS)의 하나 이상의 지표를 스크리닝함에 의해 SPMS에 대한 대상체를 스크리닝함을 포함할 수 있다. 진행성 다발성 경화증(예를 들어, PPMS 또는 SPMS)을 앓는 대상체를 확인하기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있고 또한 본원에 기재된 바와 같이 상승된 수준의 LacCer을 검출함에 의해 대상체를 확인함을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, SPMS는 통상적으로 운동기관/소뇌 기능에서 대상체에서 MS의 3.5 이상의 EDSS로의 장애 진행에 의해 확인된다. SPMS는 또한 초기 재발 완화형 과정 후 6개월 이상의 재발과는 무관하게 증상에서의 악화의 존재로 진단될 수 있다. PPMS는 예를 들어, 질환의 개시로부터 장애의 진행(예를 들어, 개선 기간 없이), 예를 들어, 최소 1년의 양성 뇌 MRI, 양성 척수 MRI 및 양성 CSF 발견 중 적어도 2개를 갖는 최소 1년의 질환 진행을 기준으로 진단될 수 있다.

[0082] 상기 방법은 대상체에서 진행성 다발성 경화증(예를 들어, PPMS 또는 SPMS)의 존재 또는 대상체에서 진행성 다발성 경화증(예를 들어, PPMS 또는 SPMS)의 발병 가능성(예를 들어, 본원에 기재된 방법을 사용한 특정 시기 이내, 예를 들어, 1, 3, 6, 9, 12개월, 2년, 3년, 4년, 또는 5년)을 검출하고, 대상체가 진행성 다발성 경화증(예를 들어, PPMS 또는 SPMS)을 앓거나 발병할 가능성이 있는지를 기반으로 대상체를 선택함을 포함할 수 있다.

[0083] 일반적으로, 본원에 기재된 방법은 임의의 포유동물, 바람직하게는 인간에 대해 수행될 수 있다.

[0084] 표준 치료제

[0085] 일부 양태에서, 본원에 기재된 치료는 MS에 대한 표준 치료와 병용하여 투여되고, 예를 들어, 코르티코스테로이드 치료요법, 인터페론  $\beta$ -1b, 글라티라머 아세테이트, 미톡산트론, 핀골리모드, 테리플루노미드, 디메틸 푸마레이트, 나탈리주맙, 카나비스 또는 이의 배합물이 투여된다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 치료는 MS의 하나 이상의 증상, 예를 들어, 우울증 및 피로, 방광 기능부전, 경직, 통증, 운동실조 및 기도진전에 대한 치료와 병용하여 투여되고; 상기 치료는 약리학적 제제, 운동 및 적당한 운동회복을 포함한다. MS의 진단 및 치료에 대한 추가의 정보는 웹사이트(National MS Society website, on the world wide web at nationalmssociety.org)에서 찾을 수 있다.

[0086] 대상체가 특정 시기내에 SPMS를 앓거나 발병할 가능성이 있는 것으로서, 예를 들어, 표준 수준 초과인 GlcCer의 수준을 갖는 것으로 확인된 일부 양태에서, 예를 들어, 미톡산트론 또는 나탈리주맙을 포함하는 진행성 MS에 대한 치료제가 투여된다.

[0087] 약제학적 조성물

[0088] 본원에 기재된 방법은 활성 성분으로서 LacCer 합성의 억제제를 함유하는 약제학적 조성물의 제조 및 용도를 포함한다. 또한, 약제학적 조성물 자체가 포함된다.

[0089] 약제학적 조성물은 전형적으로 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "약제학

적으로 허용되는 담체"는 약제학적 투여와 상용성인 식염수, 용매, 분산 매질, 코팅, 항세균제 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제들을 포함한다. 보충 활성 화합물은 또한 상기 조성물에 혼입될 수 있다.

[0090] 약제학적 조성물은 전형적으로 의도된 투여 경로와 상용성하도록 제형화된다. 본 발명의 방법에 특히 유용한 투여 경로의 예는 비경구 (예를 들어, 정맥내), 척추강내, 경구, 및 비강 또는 비강내 (예를 들어, 적하제로서의 투여 또는 흡입에 의한) 투여이다. 혈뇌 장벽을 통과하지 못하는 화합물에 대해, CNS 또는 CSF로의 직접적인 전달이 사용될 수 있고, 예를 들어, 이식된 청구강내 펌프 (문헌참조: 예를 들어, Borrini et al., Archives of Physical Medicine and Rehabilitation 2014;95:1032-8; Penn et al., N. Eng. J. Med. 320:1517-21 (1989); and Rezai et al., Pain Physician 2013; 16:415-417) 또는 나노입자, 예를 들어, 골드 나노입자 (예를 들어, 글루코스 코팅된 골드 나노입자, 예를 들어, 문헌참조: Gromnicova et al. (2013) PLoS ONE 8(12): e81043)가 사용될 수 있다. 적합한 약제학적 조성물을 제형화하고 전달하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[the books in the series Drugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs (Dekker, NY); and Allen et al., Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Lippincott Williams & Wilkins; 8th edition (2004)]을 참조한다.

[0091] 주사용으로 적합한 약제학적 조성물은 멸균 수용액(수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함할 수 있다. 정맥내 투여를 위해, 적합한 담체는 생리학적 식염수, 세균 억제 수, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) 또는 포스페이트 완충 식염수(PBS)를 포함한다. 모든 경우에, 상기 조성물은 멸균성이어야 하고 용이한 주사능이 존재할 정도로 유동적이어야 한다. 이는 제조 및 저장 조건 하에서 안정해야만 하고 세균 및 진균류와 같은 미생물의 오염 작용으로부터 보존되어야 한다. 상기 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적당한 유동성은 예를 들어, 렉시틴과 같은 코팅을 사용하고, 분산의 경우에 요구되는 입자 크기를 유지하고 계면활성제를 사용함에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 예방은 다양한 항세균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 성취될 수 있다. 많은 경우에, 상기 조성물 중에 등장성 제제, 예를 들어, 당, 폴리알콜, 예를 들어, 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 주사용 조성물의 지연 흡착은 상기 조성물내에 흡수를 지연시키는 제제 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 겔라틴을 포함시킴에 의해 유발될 수 있다.

[0092] 멸균 주사 용액은 요구되는 양의 활성 화합물을 요구되는 바와 같은 상기 열거된 성분들 중 하나 또는 배합물과 함께 적당한 용매 중에 혼입함에 있어서 여과 멸균함에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산제는 활성 화합물을, 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터 요구되는 다른 성분들을 함유하는 멸균 비히클로 혼합함에 의해 제조된다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조이고 이는 활성 성분 + 이전에 멸균 여과된 용액으로부터의 임의의 추가의 목적하는 성분의 분말을 생성시킨다.

[0093] 경구 투여를 위해, 상기 조성물은 불활성 희석제 또는 식용 담체와 제형화될 수 있다. 경구 치료학적 투여 목적을 위해, 활성 화합물은 부형제와 함께 혼입될 수 있고 정제, 트로키제 또는 캡슐제, 예를 들어, 겔라틴 캡슐제 형태로 사용될 수 있다. 경구 조성물은 또한 구강세척제로서 사용하기 위한 유체 담체를 사용하여 제조될 수 있다. 약제학적 상용성 결합제 및/또는 보조 물질은 조성물의 일부로서 포함될 수 있다. 상기 정제, 환제, 캡슐제, 트로키제 등은 임의의 하기의 성분들 또는 유사한 성질의 화합물을 함유할 수 있다: 결합제, 예를 들어, 미세결정 셀룰로스, 트라가칸트 겜 또는 겔라틴; 부형제, 예를 들어, 전분 또는 락토스, 붕해제, 예를 들어, 알긴산, 프리모겔 또는 옥수수 전분; 윤활제, 예를 들어, 마그네슘 스테아레이트 또는 스테로테스; 활주제, 예를 들어, 콜로이드성 이산화규소; 감미제, 예를 들어, 슈크로스 또는 사카린; 또는 향제, 예를 들어, 페퍼민트, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지 향제.

[0094] 흡입에 의한 투여를 위해, 상기 조성물은 적합한 추진제, 예를 들어, 이산화탄소와 같은 가스, 또는 네불라이저를 함유하는 가압된 컨테이너 또는 분배기로부터 에어로졸 분무 형태로 전달될 수 있다. 상기 방법은 미국 특허 제 6,468,798호에 기재된 것들을 포함한다.

[0095] 핵산이거나 이를 포함하는 치료학적 조성물은 핵산 제제, 예를 들어, DNA 백신의 투여용으로 적합한 임의의 방법에 의해 투여될 수 있다. 이들 방법은 유전자 총, 바이오 주사기 및 피부 패치제, 및 바늘 없는 방법, 예를 들어, 미국 특허 제 6,194,389호에 기재된 미세-입자 DNA 백신 기술 및 미국 특허 제6,168,587호에 기재된 분말 형태 백신과 함께 포유동물 경피 바늘 없는 백신 접종을 포함한다. 추가로, 비강내 전달은 문헌[참조: 특히,

Hamajima et al., Clin. Immunol. Immunopathol., 88(2), 205-10 (1998)]에 기재된 바와 같이 가능하다.

- [0096] 리포솜 (예를 들어, 미국 특허 제 6,472,375호에 기재된 바와 같이) 및 미세캡슐화가 또한 본원에 기재된 화합물을 전달하기 위해 사용될 수 있다. 생분해가능한 미세입자 전달 시스템이 또한 사용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제6,471,996호에 기재된 바와 같이).
- [0097] 하나의 양태에서, 치료학적 화합물은 신체로부터 신속한 제거에 대한 치료학적 화합물을 보호하는 담체, 예를 들어, 이식체 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 제어 방출 제형과 같은 담체와 함께 제조된다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리언하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 생분해가능한 생물적합성 중합체가 사용될 수 있다. 상기 제형은 표준 기술을 사용하여 제조되거나 제조원[예를 들어, Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc]으로부터 구입할 수 있다. 리포솜 현탁제(세포 항원에 대한 모노클로날 항체와 함께 선택된 세포에 표적화된 리포솜을 포함하는)가 또한 약제학적으로 허용되는 담체로서 사용될 수 있다. 이들은 당업자에게 공지된 방법, 예를 들어, 미국 특허 제4,522,811호에 기재된 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0098] 약제학적 조성물은 컨테이너, 팩 또는 분배기, 예를 들어, 투여 지침서와 함께 단일 용량 분배기에 포함될 수 있다. 컨테이너, 팩 또는 분배기는 또한 예를 들어, 치료 1일, 1주 또는 1개월을 위해 충분한 단일 용량 분배기를 포함할 수 있는 키트의 일부로서 포함될 수 있다.
- [0099] **투여용량**
- [0100] 화합물의 투여용량, 독성 및 치료학적 효능은 예를 들어, LD50(집단의 50%에 대한 치사 용량) 및 ED50(집단 50%에서 치료학적으로 효과적인 용량)을 결정하기 위해 세포 배양물 또는 실험 동물에서 표준 약제학적 과정에 의해 결정될 수 있다. 독성과 치료학적 효과 간의 용량 비율은 치료학적 지수이고 비율 LD50/ED50으로서 표현될 수 있다. 높은 치료학적 지수를 나타내는 화합물이 바람직하다. 독성 부작용을 나타내는 화합물이 사용될 수 있지만 비감염된 세포에 대해 가능한 손상을 최소화함에 의해 부작용을 감소시키기 위해서는 환부 조직 부위로 상기 화합물을 표적화하는 전달 시스템을 디자인하는데 주의해야 한다.
- [0101] 상기 세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 수득된 데이터는 인간에 사용하기 위한 투여용량 범위를 제형화하는데 사용될 수 있다. 상기 화합물의 투여 용량은 바람직하게 거의 독성을 갖지 않는 ED50을 포함하는 순환 농도 범위 내에 있다. 상기 투여용량은 사용되는 투여 형태 및 투여 경로에 의존하여 상기 범위 내에서 다양할 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 임의의 화합물에 대해, 치료학적 유효량은 처음에 세포 배양 검정으로부터 평가될 수 있다. 용량은 세포 배양에 결정된 바와 같이 IC50(즉, 증상의 최대 절반 억제를 성취하는 시험 화합물의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도를 성취하기 위해 동물 모델에서 제형화될 수 있다. 상기 정보를 사용하여 인간에서 유용한 용량을 보다 정확하게 결정할 수 있다. 혈장 수준은 예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다.
- [0102] "유효량"은 이롭거나 요구되는 결과를 실행하기에 충분한 양이다. 예를 들어, 치료학적 양은 목적하는 치료학적 효과를 성취하는 양이다. 상기 양은 질환 또는 질환 증상의 발병을 예방하기 위해 필요한 양인 예방학적 유효량과 동일하거나 상이할 수 있다. 유효량은 하나 이상의 투여, 적용 또는 투여용량으로 투여될 수 있다. 치료학적 유효량의 조성물은 선택된 조성물에 의존한다. 상기 조성물은 하루에 1회 이상 내지 격일을 포함하는 주당 1회 이상으로 투여될 수 있다. 당업자는 질환 또는 장애의 중증도, 이전 치료, 대상체의 일반 건강 및/또는 연령, 및 존재하는 다른 질환을 포함하지만 이에 제한되지 않는 특정 인자들이 대상체를 효과적으로 치료하기 위해 요구되는 투여 용량 및 시기에 영향을 줄 수 있음을 인지할 것이다. 더욱이, 본원에 기재된 치료학적 유효량의 조성물을 사용한 대상체의 치료는 단일 치료 또는 일련의 치료를 포함할 수 있다.
- [0103] **실시예**
- [0104] 본 발명은 추가로 하기의 실시예에서 추가로 기재되고 이는 청구항에 기재된 발명의 범위를 제한하지 않는다.
- [0105] **재료 및 방법**
- [0106] 하기의 재료 및 방법이 하기에 제시된 실시예에서 사용된다.
- [0107] **동물.** C57BL/6J, NOD/ShiLtJ (NOD), IRF-1 결핍 마우스 및 GFAP-HSV-TK 마우스는 연구소(The Jackson Laboratory)로부터 수득하였다. 이중접합체 GFAP-HSV-TK 함유 C57B1/6 마우스는 GFAP<sup>TK</sup> 또는 WT F1인 F1 한배 새끼를 생성하기 위해 사용하였다. Tg(GFP-hGFAP) FVB 유전자전이 마우스가 기재되었다<sup>49</sup>. 모든 동물은 연구소

(Harvard Institutes of Medicine)에서 병원체가 없는 시설에서 유지하였다. 모든 실험은 기관(Institutional Animal Care and Use Committee of Harvard Medical School)에 의해 정해진 지침에 따라 수행하였다.

[0108] **EAE 유도 및 치료.** EAE는 암컷 마우스를 마우스 당 100 $\mu$ g (C57BL/6 및 F1 마우스) 또는 150 $\mu$ g (NOD 마우스) 용량에서 CFA(Difco Laboratories) 중에 유화된 MOG<sub>35-55</sub> 펩타이드를 사용하여 면역화시킴에 이어서 기재된 바와 같이 0일 및 2일째에 백일해 독소(마우스 당 150ng; List biological laboratories, Inc.)를 투여하여 유도하였다<sup>14</sup>. EAE의 임상적 징후는 하기의 스코어에 따라 평가하였다: 0, 질환 징후 없음; 1, 꼬리 색의 상실; 2, 뒷다리 부전마비; 3, 뒷다리 마비; 4, 사지마비; 5, 빈사상태. GCV (APP Pharmaceuticals), 또는 비히클 대조군(PBS)이 EAE 유도 7일 전에 하루 (25mg/kg, 피하내)로 투여하고 급성 단계의 지속기간(15일) 동안 계속하거나 진행성/만성 단계 동안에만(30일 내지 50일) 계속하였다. LacCer (Matreya LLC) 또는 비히클 (10% DMSO)은 EAE 유도 동안에 MOG<sub>35-55</sub> 펩타이드와 함께 마우스 당 10 $\mu$ g의 용량으로 C57BL/6J 마우스에 투여하고 또한 이후 3일마다 복강내(i.p)로 투여하였다. NOD 마우스로의 LacCer 또는 비히클 투여는 3일마다 i.p.로 투여된 마우스 당 10 $\mu$ g의 용량으로 질환 유도 후 35일째에 개시하였다. PDMP(Matreya LLC) 또는 비히클 대조군 (5% tween-80)은 실험 지속기간 동안 i.p.로 투여되는 20mg/kg으로 하루 2회 EAE 유도 후 40일째에 투여하였다.

[0109] **면역형광 (IF).** 동물에게 0.1M PBS 중에서 4% 파라포름알데하이드로 관류시켰다. 조직은 0.1 M PBS + 30% 슈크로스에서 냉동보호하고, 10- $\mu$ m 두께 절편으로 크래오스테트로 절단하였다. 절편은 5% 염소 혈청, 0.3% Triton<sup>TM</sup> X-100 (Sigma-Aldrich)을 함유하는 M.O.M.<sup>TM</sup> 마우스 Ig 블록킹 시약 (Vector laboratories) 중에서 블록킹하고 하기의 항체를 사용하여 4℃에서 밤새 항온처리하였다: GFAP (닭, 1:500, Abcam), GFP (닭, 1:500, Abcam), IBA-1 (토끼, 1:200, Dako), B4GALT6 (토끼, 1:100, proteintech), iNOS [마우스 (4E5), 1:100, iNOS], CCL2 [마우스 (2D8), 1:100, Fisher scientific], Nestin [마우스 (래트-401), Millipore], CD31 [마우스 (RM0032-1D12), 1:100, Abcam], 및 IRF-1 (토끼, 1:250, Santa cruz). 다음 날 절편을 3회 세척하고 실온에서 1시간 동안 적당한 형광단-접합된 염소 2차 Ab (1:1000; Abcam)로 항온처리하였다. 6마리의 동물/그룹을 사용하였다. LSM 710 공초점 현미경 (Carl Zeiss)을 사용하여 이미지를 촬영하였다.

[0110] **성인 마우스 CNS로부터 세포의 분리.** 단핵 세포는 최소 변형과 함께 이전에 기재된 바와 같이 CNS로부터 분리하였다<sup>50</sup>. 비처리 및 EAE 마우스는 안락사시키고 이어서 빙냉 멸균 PBS로 좌심실을 통해 관류시켰다. 이어서 뇌 및 척수를 제거하고, 분쇄하고 효소적으로 0.05% (w/v) 콜라게나제 유형 III (Worthington Biochemical), 0.5% 디스파제 II (Roche Applied Science), HBSS 중 40 $\mu$ g/ml DNase I, 20 mM HEPES로 37℃에서 30분 동안 분해시켜 단일 세포의 현탁액을 제조한다. 효소는 2 mM EDTA 및 20 mM HEPES를 함유하는 20 ml의 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-유리된 HBSS로 불활성화시켰다. 상기 분해된 조직은 삼중수소로 처리하고 100- $\mu$ m 세포 스트레이너에 통과시켰다. 세포는 원심 분리하고 30% 등장성 Percoll (GE Healthcare) 및 40 $\mu$ g/ml DNase I에서 재현탁시키고, 70% 등장성 퍼콜(isotonic Percoll)로 강화하고, 25분 동안 4℃에서 1000 x g에서 원심분리하였다. 세포는 70%-30% 간기로부터 수거하고, FACS Aria에 의해 분류하였다.

[0111] **성상교세포, 미세아교세포 및 단핵구의 FACS 분류.** 이들 정제 과정은 이전에 기재된 분해 및 정제 프로토콜을 기반으로 한다<sup>50,51</sup>. 분리된 CNS 세포는 빙상에서 15분 동안 항-마우스 CD16/CD32로 항온처리하여 Fc 수용체를 블록킹하고 CD11b (M1/70), CD45(90), CD3 (145-2C11), CD4 (GK1.5), 및 Ly6C (HK1.4)에 대한 형광색소-접합된 항체, 및 비오틴-접합된 GSL I-이소렉틴 B4 (Vector labs), CD105 (N418), CD140a (APA5), CD11c (N418), F4/80 (BM8), O4 (O4, Miltenyi Biotec), 및 CD19 (eBio1D3), 및 마우스 MOG(8-18C5, Millipore)를 인지하는 비-접합된 항체, O1 (O1), 및 갈락토세레브로시드 (mGlaC, Millipore)로 염색시켰다. 모든 항체들은 달리 언급되지 않는 경우(클론 번호, 적절한 경우 괄호로) 제조원(Ebioscience)으로부터 기원한다. 세포는 세척하고 암실에서 4℃에 20분 동안 PE-접합된 스트렙타비딘 및 염소 항-마우스 IgG +IgM (H+L) (Jackson ImmunoResearch laboratories)의 PE-접합된 스트렙타비딘 및 R-피코에리트린 AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> 단편으로 항온처리하였다. 세포를 세척하고, 죽은 세포를 배제하기 위해 7-AAD 또는 고정할 수 있는 생존능 안료 eFluor® 450 (세포가 세포 내 염색을 위해 사용되어야만 하는 경우)로 항온처리하고 (**도 S3A**), 하기와 같이 분류하였다. 미세아교세포는 낮은 CD45 발현 및 낮은 Ly6C (CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>낮음</sup>/Ly6C<sup>낮음</sup>)를 갖는 CD11b<sup>+</sup> 세포로 분류되었고 염증 단핵구는 CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>높음</sup>으로 고려된다. T-세포는 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 세포로서 분류하였다. 성상교세포는 림프구, 미세아교세포, 단핵구 (**도 S3B**), 및 회소돌기신경교 및 림프구 (T-세포, B-세포 및 NK 세포) (**도 S3C**)의 고갈 후 분리하였다.

분류된 세포는 FACS 분석에 의해  $>85\%$  GFAP<sup>+</sup> 인 것으로 밝혀졌다 (도 S3D). 본 발명자는 발명자가 성상교세포 마커<sup>44,51</sup> *gfap*, *aldh1l1* 및 *aqp4*에 대한 qPCR에 의해 성상교세포의 상대적 비처리 집단을 분리하였음을 확인하였고 이들이 전적으로 성상교세포 분획물에서 발현되는 것으로 밝혀졌다(유사한 발현 패턴으로 Tg(GFP-hGFAP) FVB 유전자전이 마우스로부터 분류된 GFP<sup>+</sup> 성상교세포의 발현과 유사한 발현 패턴이다<sup>49</sup>)(도 S3E). 본원 발명자는 마커의 추가의 코호트를 사용하여 면역 세포 [미세아교세포/단핵구 세포-*itgam* (CD11b), 및 *emr1* (F4/80), 수지상 세포-*itgax* (CD11c), NK 세포-*Klrb1c* (Nk1.1), T-세포- *cd3*, 및 B-세포 - *cd19*], 희소돌기신경교 (*mog*, *mbp*), 및 뉴런 (*sytl*, *snap25*) (도 S3F, G)의 존재를 탐색하였다.

[0112] **LacCer 측정.** LacCer (d18:1/16:0) 및 LacCer (d18:1/18:0)의 화학적 표준물은 아반티 (Avanti) 극성 지질로부터 수득하였다. LacCer (d18:1/16:0) 및 LacCer (d18:1/18:0)의 정량은 Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 6460 삼중-사중 LC/MS/MS 시스템상에서 수행된 LC-MS/MS 분석에 의해 성취하였다. LacCer에 대한  $[M+H]^+$  이온으로부터의 단편 및 내부 표준물은 충돌 유도된 분해에 적용되고 2개의 주요 유형의 단편 이온은 각각의 이온에 대한 다중 반응 모니터링(MRM) 모드의 2개 주요 유형의 양성 이온 모드로 전기분무 이온화를 통해 모니터링하였다. 이들 2개의 MRM 전이는 중성 락토실 잔기의 상실에 상응하고 락토스 이온의 형성에 상응한다. 구체적으로, LacCer (d18:1/16:0) 및 LacCer(d18:1/18:0)에 대한 정량을 위해 사용되는 MRM 전이는 각각 862.5>464.5 및 890.6>548.5이다. 862.5>264.3 및 890.6>264.3의 LacCer(d18:1/16:0) 및 LacCer(d18:1/18:0)에 대한 MRM 전이를 또한 모니터링하였다. 질량 분광측정기 파라미터 세팅은 가스 온도(325℃), 가스 기류(12L/분), 네블라이저(25psi), 쉬쓰 가스 온도 (400℃), 쉬쓰 가스 기류 (12 L/분), 모세관 전압 (4000v), 및 노즐 전압 (500v)이었다. Phenomenex Gemini C18 칼럼 4.6 x 50mm 5 $\mu$ m 입자 크기를 갖는 액체 크로마토그래피 조건은 분리를 위해 사용되었다. 크로마토그래피 방법, 하기의 유속 = 0.4 mLs/분; 용매 A = 5% MeOH 및 0.1% 포름산 v/v/v 중 5mM 암모늄 포르메이트; 용매 B = 80% 2-프로판올, 15% 메탄올, 5% 물 및 0.1% 포름산 (v/v/v/v). 농도구배는 20% A에서 개시하여 10분 후 100% A로 전개하고 다음 10분 동안 유지하였다. 상기 칼럼은 다음 주사 전에 5분 동안 개시 조건으로 재평형화시켰다. 안정한 이소형 버전이 가용하지 않기 때문에 비-천연 LacCer의 내부 표준물 (18:1/12:0)을 사용하였다. 표준 곡선 혼합물은 LacCer(d18:1/16:0) 중 0.10nM 내지 3.3 $\mu$ M과 1 $\mu$ M의 내부 표준 농도 사이의 다양한 농도에서 분석하였다. 정량의 하한치는 1 nM에서 평가하고 0.9969의 R<sup>2</sup>는 선형 회귀 분석을 사용하여 수득하였다. 도핑된 내부 표준물과의 표준 곡선은 1nM 내지 3.3 $\mu$ M 사이에서 전개하였다. 표준물은 LacCer(18:1/16:0)에 대해서만 가용하기 때문에, LacCer (18:1/18:0)에 대한 값은 2개의 밀접하게 관련된 지질에 대한 상대적 이온화 효능이 동일함을 추정한다.

[0113] **지질의 추출.** 뇌 조직을 칭량하고 블리 및 다이어 타입(Bligh and Dyer type) 액체-액체 추출을 사용하여 추출 용매 중에서 다운스 파쇄기(VWR)를 사용하여 파쇄시켰다. 모든 용매는 매우 높은 순도로 제조원(Sigma-Aldrich)로부터 구입하였다. 내부 표준물 LacCer (18:1/12:0)은 2:1 클로로포름-메탄올 v/v, 6 ml의 2:1 클로로포름-메탄올 및 2 ml의 PBS 중에서 용해시켰다. 대략 파쇄 2분 후, 액체는 8ml의 유리 바이엘에 전달하였다. 상기 혼합물을 20분 동안 1000g로 고속 원심분리기로 회전시켰다. 이로써 중앙에 단백질 디스크 및 불용성 물질을 형성시켰다. 바닥 층은 유리 파스퇴르 피펫을 사용하여 제거하고 약간 질소 증기하에 증발을 위해 투명한 바이엘로 이전시켰다. 건조된 샘플은 100 $\mu$ l의 2:1 클로로포름-메탄올 중에 재구성하고 HPLC-MS를 사용하여 분석하였다.

[0114] **n카운터 유전자 발현.** 100 내지 200ng의 총 RNA를 리포터, 및 제조업자 (NanoString Technologies)의 지침에 따른 n카운터 유전자 발현 코드 세트 (마우스 염증 키트, 또는 제작 주문 성상교세포-배향된 프로브 세트 (표 S1))에 대한 포획 프로브와 하이브리드화하였다. 데이터는 스파이크된 양성 대조군 및 하우스키핑 유전자 (nSolver Analysis system)로 표준화시켰다. 음성 각 샘플에 대한 음성 대조군 전사체 + 2개 표준 편차의 평균 미만의 전사체 카운트는 백그라운드로서 고려하였다.

[0115] **유전자 발현 데이터의 분석.** 나노스트링 생성된 유전자 발현 데이터는 확장기 6.06 플랫폼을 사용하여 분석하였다<sup>53</sup>. 유전자는 비편중 CLICK 알고리즘을 사용하여 클러스터링하고 각각의 클러스터는 전사 인자 결합 부위에서의 집적에 대해 추가로 분석하였다(프로모터 분석).

[0116] **q PCR.** RNA는 RNAeasy 칼럼 (Qiagen), 또는 TRIzol®(Invitrogen)을 사용하여 추출하였고, cDNA를 제조하고 qPCR을 위해 사용하고 결과는 *gapdh* (마우스) 또는 *ACTIN* (인간)으로 표준화하였다. 모든 프라이머는 제조원 (Applied Biosystems)으로부터 구입하였다. *Aldh1l1* (Mm03048957\_m1), *aqp4* (Mm00802131\_m1), *b4galt5* (Mm00480147\_m1), *b4galt6* (Mm00480045\_m1), *ccl5* (Mm01302427\_m1), *cd19* (Mm00515420\_m1), *cd3e*

(Mm00599684\_g1), *cd40* (Mm00441891\_m1), *csf2* (Mm01290062\_m1), *cxc110* (Mm00445235\_m1), *emr1* (Mm00802529\_m1), *foxp3* (Mm00475162\_m1), *gapdh* (Mm00484668\_m1), *gfap* (Mm01253033\_m1), *h2-Aa* (Mm00439211\_m1), *Ifng* (Mm01168134\_m1), *Il10* (Mm00439614\_m1), *il17a* (Mm00439618\_m1), *il1b* (Mm00434228\_m1), *il6* (Mm00446190\_m1), *irf1* (Mm01288580\_m1), *itgam* (Mm00434455\_m1), *itgax* (Mm00498698\_m1), *klrb1c* (Mm00824341\_m1), *mbp* (Mm01266402\_m1), *mog* (Mm00447824\_m1), *nos2* (Mm00440502\_m1), *relb* (Mm00485664\_m1), *snap25* (Mm00456921\_m1), *spp1* (Mm00436767\_m1), *syt1* (Mm00436858\_m1), *tbx21* (Mm00450960\_m1), *tgfb1* (Mm01178820\_m1), *tlr2* (Mm00442346\_m1), *tnf* (Mm00443260\_g1), *vim* (Mm01333430\_m1), *ACTB* (Hs01872448\_s1), *B4GALT5* (Hs00941041\_m1), *B4GALT6* (Hs00153133\_m1), *CCL2* (Hs01060665\_g1), *CCL5* (Hs00941041\_m1), *IL6* (Hs00234140\_m1), *NOS2* (Hs00174575\_m1), *PTGST2* (Hs00191135\_m1), 및 *TLR2* (Hs00985639\_m1).

[0117] **T-세포 증식 및 사이토킨 측정.** 비장세포 및 림프절은 X-VIVO 배지에서 배양하고 MOG<sub>35-55</sub> 펩타이드의 존재하에 웰당  $5 \times 10^5$  세포의 밀도로 72시간 동안 플레이팅하였다. 최종 16시간 동안에, 세포는 1 Ci [3H]티미딘 (PerkinElmer)으로 펄싱시키고, 이어서 유리 섬유 필터상에 수거하고 a-카운터 (1450 MicroBeta TriLux; PerkinElmer)에서 혼입된 [3H]티미딘을 분석하였다. 상등액은 효소 결합된 면역흡착 검정에 의한 사이토킨 측정을 위해 배양 48시간 후 수거하였다<sup>14</sup>. 세포내 사이토킨 염색을 위해, 세포는 6시간 동안 PMA (포르볼 12-미리 스테이트 13-아세테이트; 50 ng/ml; Sigma), 이노마이신 (1 µg/ml; Sigma) 및 모넨신 (GolgiStop; 1 ml/ml; BD Biosciences)으로 자극하였다. 표면 마커의 염색 후, 세포를 고정화하고 제조업자의 지침 BD Cytotfix/Cytoperm<sup>TM</sup> 키트 (BD Biosciences), 또는 Foxp3 고정화 /투과 (Ebioscience)에 따라 투과가능하게 하였다.

[0118] **마우스 1차 미세아교세포.** 마우스 1차 미세아교세포는 기재된 바와 같이 최소 변형과 함께 제조하였다<sup>54</sup>. 1 내지 3일령 신생태아 마우스 기원의 뇌 피질을 절개하고 주의깊게 뇌척수막을 박리하고, 0.25% 트립신으로 분해하고, 단일-세포 수준으로 분산시켰다. 세포 현탁액("혼합된 아교세포")을 이어서 습화된 5% CO<sub>2</sub>-95% 공기에서 37 °C에서 배양하였다. 배지는 4 내지 5일마다 대체하였다. 혼합된 아교세포 배양물은 7 내지 10일 후 컨플루언스에 도달하였고 이를 사용하여 증식 후 15 내지 20일 사이에 미세아교세포를 수거하였다. 미세아교세포는 이전에 기재된 바와 같이 약간의 트립신처리 과정(Mild T/E)에 의해 분리하였다<sup>54</sup>. 간략하게, 컨플루언트 혼합 아교세포 배양물을 0.06% 트립신 (mild T/E)으로 처리하여 거의 모든 성상교세포를 함유하는 온전한 세포층을 탈착시키고 고도로 집적된 미세아교 세포 집단 (플루레세인-접합된 그리포니아 심플리시폴리아 이소렉틴 B4 (IB4) (Vector Laboratories) 또는 PE-접합된 CD11b Ab (데이터는 나타나지 않음)로 염색함에 의해 결정되는 바와 같이 98% 초과)을 잔류시켰다. 부착된 미세아교세포는 24 내지 48시간 동안 회복되도록 하였다.

[0119] **마우스 1차 성상교세포.** 혼합 아교세포를 상기와 같이 제조하고 RT에서 20분 동안 20 µg/ml 비오틴 항-IB4 (Vector Labs)로 항온처리하고, 세척하고 4°C에서 15분 동안 스트렙타비딘-접합된 자기 비드 (Miltenyi Biotec)로 항온처리하였다. 세포를 세척하고, 세포 분리 칼럼(MiltenyiBiotec)을 사용하여 IB4<sup>+</sup> 세포 (미세아교세포 및 내피 세포)를 제거하였다<sup>51</sup>. 이어서 세포는 컨플루언트(7 내지 10일)때까지 배양하고, 성상교세포 단층은 약한 트립신 처리 과정을 사용하여 분리하고, 아쿠타제(Invitrogen)을 사용하여 단일 세포 현탁액으로 분리하고 플레이팅하였다. 세포는 GFAP 또는 GLAST로 염색에 의한 측정시 98% 초과가 성상교세포였고, 2% 미만이 CD11b<sup>+</sup> 미세아교 세포로 오염되었다(데이터는 나타나지 않음)).

[0120] **마우스 1차 연수막 식세포.** 뇌척수막은 1 내지 3일령 신생태아 마우스의 뇌로부터 주의깊게 박리시키고 20 분 동안 37°C에서 1% 콜라게나제로 분해시키고, 이어서 단일 세포 수준으로 분산시켰다. 분리된 세포는 병상에서 15분 동안 항-마우스 CD16/CD32로 항온처리하여 Fc 수용체를 차단시키고 4°C에서 30분 동안 CD11b (M1/70)에 대한 APC-접합된 항체로 염색시켰다. 세포를 세척하고 죽은 세포를 배제하기 위해 7-AAD로 항온처리하고 분류하였다.

[0121] **마우스 1차 맥락층 세포.** 마우스 1차 맥락층 세포는 기재된 바와 같이 최소 변형으로 제조하였다<sup>55,56</sup>. 간략하게, 맥락층은 1 내지 3일령 신생태아 마우스로부터 제거하고 37°C에서 20분 동안 1% 콜라게나제로 분해시키고 이어서 단일 세포 수준으로 분산시켰다. 세포 현탁액을 맥락층 세포에 대한 배양 배지(10% 태아 소 혈청 (Sigma-Aldrich), 1mM 1-글루타민, 1mM 나트륨 피루베이트, 100U/ml 페니실린, 100mg/ml 스트렙토마이신,

5mg/ml 인슐린, 20mM Ara-C가 보충된 돌베코 변형 이글 배지/헵스 F12(Invitrogen))에서 세척하고, 폴리-D-라 이신 코팅된 24-웰 플레이트에서 37℃, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양( $2.5 \times 10^5$  세포/웰)하였다. 24시간 후, 상기 배지를 교체 하고 세포는 비처리된 상태로 유지시키거나 기재된 바와 같이 처리하였다.

[0122] **플라스미드.** 쥐 *Ccl2* 프로모터하에 가우시아(Gaussia) 루시퍼라제 및 CMV 프로모터(형질감염 표준화를 위해 사 용되는) 하에 분비된 알칼린 포스파타제(SEAP)를 발현하는 이원 리포터 작제물은 제조원(GeneCopoeia, Inc.)로 부터 구입하였다. IRF1을 암호화하는 작제물은 제조원(Addgene)으로부터 구입하였다. pLenti-GFAP-EGFP-mir30-shAct1 벡터<sup>25</sup>는 구양 시양 창 박사( Dr. Guang-Xian Zhang) (Thomas Jefferson University, PA, USA)로부터 친절히도 기부받았다.

[0123] **shRNA를 사용한 시험관내 녹 다운.** LacCer 신타제의 발현은 *b4galt5* (TRCN0000018782), *b4galt6* (TRCN0000334278), 또는 대조군으로서 비-표적화 서열 (TRCN0000018782) (Sigma)에 대한 shRNA 렌티바이러스 입자를 사용하여, C8-D30 정상교세포에서 녹다운시켰다. 정상교세포는 12시간 동안 렌티바이러스 및 8μg/ml의 폴리브렌(둘 다 제조원(Sigma-Aldrich)로부터 구입함)으로 항온처리하고 24시간 동안 회복되도록 하였고 푸로마 이신 (2μg/ml)으로 선택하였다. 푸로마이신-내성 세포에서 유전자 녹다운은 qPCR에 의해 입증하였다.

[0124] **shRNA 렌티바이러스를 사용한 생체내 정상교세포-특이적 녹다운.** *b4galt5*, *b4galt6*에 대한 shRNA 서열을 함유하 는 pLenti-GFAP-EGFP-mir30-shRNA, 및 비-표적화 shRNA를 Act1에 대한 shRNA를 상기 언급된 시험관내 입증된 shRNA 서열 (*b4galt5* : 5'-GCAGCCTGAATGACTCAGATTctcgagAATCTGAGTCATTAGGCTGC-3'(서열번호 2), *b4galt6* : 5'-CGATGGACTGAACAATTTATTctcgagAATAAATTGTTAGTCCACG-3'(서열번호 3), 및 비-표적화 shRNA: 5'-GCGCGATAGCGCTAATAATTTctcgagAAATTATTAGCGCTA-TCGCGC-3'(서열번호 4))로 대체함에 의해 골격으로서 pLenti-GFAP-EGFP-mir30-shAct1 벡터를 사용하여 클로닝하였다<sup>25</sup>. 이어서 렌티바이러스 입자는 293FT 세포 (Invitrogen)를 3μg의 새롭게 생성된 pLenti-GFAP-EGFP-mir30-shRNA 벡터 및 9μg의 ViraPower<sup>TM</sup> 팩키징 믹스 (헬퍼 플라스미드 pLP1, pLP2, pLP/VSV-G, Invitrogen)로 형질감염시킴에 의해 제조하였다. 48시간 후, 상등액 을 수거하고, 0.45 μ M PVDF 필터를 통해 여과하고 제조업자의 지침에 따라 Lenti-X<sup>TM</sup> 농축기 키트 (Clontech) 를 사용하여 밤새 농축시켰다. 상기 바이러스 적정물은 제조업자의 지침에 따라 Lenti-X<sup>TM</sup> qRT-PCR 적정 키트 (Clontech)를 사용하여 결정하고 -70℃에서 분류하였다.

[0125] 생체내 주사를 위해, 면역화 35일 후 (진행성 단계) NOD EAE 마우스를 케타민 (100 mg/kg) 및 크실라진 (20 mg/kg)을 i.p로 주사하여 마취시키고 Kopf Stereotaxic 정렬 시스템에 위치시켰다. 해밀톤 시린지를 사용하여, shB4galt5, shBrgalt5, sh대조군 (비-표적화) 바이러스 1 x 10<sup>7</sup> IU/마우스를 브레그마 뒤쪽 0.44mm, 이의 측면 1.0mm, 두개골 표면 아래 2.2mm에 주사하였다. 주사 속도는 누출을 막기 위해 1μl/분으로 유지하였다.

[0126] **생존능 검증.** 정상교세포, 미세아교세포 또는 Ly6Chigh 단핵구는 PDMP 또는 LaCcer의 지정된 농도로 전처리하고, 추가로 LPS/IFN γ (미세아교세포 및 정상교세포), CCL-2 (단핵구)로 활성화시키고 비처리된 상태로 유지시켰다. 생존능은 CellTiter-Fluor<sup>TM</sup> 세포 생존능 검정 (Promega)을 사용하는 활성화 후 평가하였다.

[0127] **준세포 분획화 및 면역블롯 분석.** 정상교세포는 지적된 바와 같이 처리하고 총 추출물(30μg의 단백질) 또는 세 포의 핵 및 세포질 준세포 분획물을 NuPAGE 10% Bis-Tris 겔 (Invitrogen)로 분리하고, 지지된 니트로셀룰로스 막상 으로 전기 블롯팅하였다. 준세포 분획물은 제조업자의 지침에 따라 NE-PER<sup>®</sup> 핵 및 세포질 추출 키트 (Pierce Biotechnology)를 사용하여 제조하였다. 블롯은 토끼 항-IRF-1 (D5E4) XP<sup>®</sup> 토끼 mAb, GAPDH (D16H11) XP<sup>®</sup>토끼 mAb, 라민 B1 폴리클로날 토끼 Ab, NF-κB p65 (D14E12) XP<sup>®</sup> 토끼 mAb로 프로빙하고 이어서 염소 항 -토끼 IgG 퍼옥시다제 접합체 Ab (세포 시그널 전달로부터 모든 항체)로 프로빙하였다. 블롯은 슈퍼시그널 웨스 트 피코 화학발광 키트(SuperSignal West Pico chemiluminescence kit (Pierce Biotechnology))를 사용하여 전 개하였다. 각각의 블롯은 GAPDH (총 추출물, 또는 세포질 분획물) 또는 라민 B1 (핵 분획물)로 재프로빙하여 단 백질 균일성을 확인하였다. 데이터 정량은 이미지 스튜디오 소프트웨어 (버전 3.1.4) (LI-COR, Inc.)를 사용하 여 수행하였다.

[0128] **형질감염 및 루시퍼라제 검정.** 293T 세포는 10% FBS가 보충된 DMEM에서 성장시키고, CCL2 이원-리포터 및 IRF1, NF-κB p65, 또는 적당한 속빈 대조군을 암호화하는 작제물과 함께 푸헨(Fugene)-HD 형질감염 시약 (Roche)으 로 형질감염시켰다. 루시퍼라제 및 SEAP 활성은 분비-쌍 이원 발광 검정 키트(Secrete-Pair Dual Luminescence Assay Kit) (GeneCopoeia, Inc)로 형질감염시킨지 24시간 후 분석하였다.

- [0129] **ChIP.** 세포는 15분 동안 1% 포르말데하이드로 가교결합시켰다. 가교결합은 글라이신을 첨가하여 중단시키고 세포는 1 x 프로테아제 억제제 카테일을 함유하는 0.35 ml의 용해 완충액 (1% SDS, 10 mM EDTA 및 50 mM Tris-HCl, pH 8.1) (Roche Molecular Biochemicals)으로 용해시켰다. 염색질은 초음파로 전단시키고 상등액을 원심 분리 후 수거하고 완충액 (1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl and 20 mM Tris-HCl, pH 8.1) 중에서 희석시켰다. 항체 (5 $\mu$ g)는 6시간 동안 단백질 A 및 단백질 G 다이날(Dynal) 자기 비드(Invitrogen)에 미리 결합시키고 PBS 중에서 빙냉 5% BSA로 3회 세척하고 이어서 희석된 염색질에 첨가하고 밤새 면역침전(하기된 항체)시켰다. 이어서 자기 비드-염색질 복합체는 RIPA 완충액 (50 mM HEPES, pH 7.6, 1 mM EDTA, 0.7% 나트륨 데옥시콜레이트, 1% Nonidet-P40 및 0.5 M LiCl) 중에서 3회 세척하고 이어서 Tris-EDTA 완충액으로 3회 세척하였다. 이어서 면역침전된 염색질은 1% SDS, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>으로 추출하고 포르말데하이드 가교결합의 역전을 위해 65 $^{\circ}$ C에서 적어도 8시간 동안 가열하였다. DNA 단편은 QIAquick DNA 정제 키트 (Qiagen)를 사용하여 정제하고 SYBR 그린 실시간 PCR (하기된 프라이머)에 의해 분석하였다. 하기의 항체는 ChIP: 항-IRF1 (SC-640x; Santa Cruz Biotechnology), 항-NF- $\kappa$ B p65 (ab7970; Abcam), 및 토끼 IgG (ab27478; Abcam)에 대해 사용하였다. 하기의 프라이머 쌍을 사용하였다: *cc12*:NF- $\kappa$ B 정배향, 5'-CAGCTAAATATCTCTCCGAAGG-3' (서열번호 5), 및 역배향, 5'-CATAGATGCCACAGCTCAT-3' (서열번호 6); *cc12*:ISRE 정배향, 5'-CTGCCAATTCTTCCCTTTTC-3' (서열번호 7), 및 역배향, 5'-GTGGGTGGA-ATTTGGTATTT-3' (서열번호 8); *csf2*:NF- $\kappa$ B 정배향, 5'-GACCAGATGGGTGGAGTGACC-3' (서열번호 9), 및 역배향, 5'-AGCCACACGCTTCTGGTTCC-3' (서열번호10); *csf2*:ISRE 정배향, 5'-GCTTCGAGGGTGCA-GATAACA-3' (서열번호 11), 및 역배향, 5'-CACACGCTTGGGCTAAGA-3' (서열번호 12); *nos2*:NF- $\kappa$ B(1) 정배향, 5'-CACAGACTAGGAGTGTCCATCA-3' (서열번호 13), 및 역배향, 5'-GCAGCAGCCATCAGGTATTT-3' (서열번호 14); *nos2*:ISRE/NF- $\kappa$ B(2) 정배향, 5'-ACCATGCGAAGATGAGTGGA-3' (서열번호 15), 및 역배향, 5'-AGCC-AGGAACACTACAGAA-3' (서열번호 16).
- [0130] **단핵구 이동 검정.** 비장 Ly6C<sup>높음</sup> 단핵구를 분류하고 (CD11b<sup>+</sup>/F4-80<sup>+</sup>, SSC<sup>낮음</sup>/Ly6C<sup>높음</sup>), 3- $\mu$ m 공극 크기를 갖는 24-웰 세포 배양물 삽입체 (Corning)의 상부 챔버에 씨딩하였다. 세포는 1시간 동안 PDMP, LacCer, PDMP+LacCer 또는 비히클로 전처리하였다. 이어서, 삽입체는 CLL-2 (50 ng/ml, peprotech) 또는 비히클 (PBS)을 함유하는 미리 가온된 배지와 함께 상이한 웰에 전달하였다. 이동하는 단핵구는 3시간 후 하부 챔버에서 정량하였다.
- [0131] **인간 1차 성상교세포.** 인간 태아 성상교세포는 건강 연구 승인된 지침서에 대한 캐나다 연구소에 따라 인간 태아 조직 저장소 (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY)로부터 수득된 17 내지 23주 임신기간에서 태아의 인간 CNS 조직으로부터 이전에 기재된 바와 같이 분리하였다<sup>57</sup>. 배양물은 90% 초과로 비처리하였다.
- [0132] **MS 조직.** 뇌 조직은 임상적으로 진단되고 신경병리학적으로 확인된 MS, 비-MS CNS 염증 질환(바이러스 뇌염, 라스무센 뇌염 및 ADEM 및 건강한 대조군을 포함하는, NMSCID)을 앓는 MS 환자로부터 수득하였다. 부검 샘플은 즉시 액체 질소에 동결시켰다. 백색질 MS 조직 샘플은 이전에 기재된 바와 같이 선택하였다<sup>58</sup>. 모든 환자 및 대조군 또는 이들의 후속 친족에게 부검 및 연구 목적을 위한 이들의 뇌 조직의 사용에 대한 사전 동의서를 받았다. 부검 전에 윤리적 승인을 받았다 (CHUM 윤리적 승인: SL05.022 및 SL05.023 및 BH07.001).
- [0133] **통계학적 분석.** 프리즘 소프트웨어 버전 6.0e (GraphPad Software)는 통계적 분석을 위해 사용하였다. 0.05 미만의 P 값은 유의적인 것으로 고려되었다.
- [0134] **실시예 1. LacCer신타제는 CNS 염증 및 신경퇴행을 제어한다**
- [0135] 민감한 마우스 종에서 유도된 실험적 자가면역 뇌척수염 (EAE)은 MS의 유용한 실험적 모델을 구성한다. 그러나, 상이한 측면의 MS는 각각의 마우스 종에서 나타나는 EAE에 의해 모델링된다. 미엘렌 펩타이드 MOG<sub>35-55</sub>로 면역화된 C57BL/6 마우스는 예를 들어, RRMS동안에 단일 공격과 유사한 단일상 형태의 EAE를 나타낸다. 그러나, 동일한 항원을 사용한 비-비만 당뇨병(NOD) 마우스의 면역화는 SPMS와 유사한 신경학적 손상의 진행성 및 비가역적 누적 단계(진행성 단계)로 이어지는 급성 공격(급성 단계)의 발병을 유도한다<sup>13,14</sup>.
- [0136] 본 발명자는 최근에 육종 NOD 및 C57BL/6 마우스로부터 유래된 F1 하이브리드 마우스가 또한 만성 진행성 형태의 EAE를 발병함을 밝혔다 (도 8의 A-C). 따라서, CNS 염증 동안에 성상교세포의 역할을 연구하기 위해, 본원 발명자는 F1 NOD C57BL/6 GFAP-HSV-TK 하이브리드 마우스에서 EAE의 과정을 분석하였고, 여기서, 반응성 세포는 강시클로비르 (GCV) 투여에 의해 고갈될 수 있다 (도 9의 A). C57BL/6 마우스에서 이전의 발견에 따라<sup>7,8</sup>, 본원 발명자는 급성 단계 동안에 반응성 성상교세포의 고갈이 EAE를 유의적으로 악화시킴을 밝혔다 (도 1의 A). 그러

나, 진행성 단계 동안에 성상교세포 고갈은 EAE의 유의적 완화를 유도하였다 (도 1의 B). 더욱이, 급성 EAE에서 반응성 성상교세포 고갈이 증가된 단핵구 T 세포의 CNS로의 징집을 유도하였지만<sup>5,8</sup>, 본원 발명자는 EAE의 진행성 단계 동안에 고갈이 CNS에서 백혈구 침윤을 감소시키지만 (도 9의 B) 말초 T 세포 반응에 영향을 주지 않음을 밝혔다(도 9의 C,D). 주지할만한 것은, GCV 투여가 잠재적으로 NOD C57BL/6 GFAP-HSV-TK 하이브리드 마우스에서 신경 선조체 세포(NPC)를 고갈시킬 수 있지만, NPC는 EAE에서 보호 효과를 보여준다<sup>15,16</sup>. 따라서, 이들 데이터는 반응성 성상교세포의 고갈이 EAE의 완화에 관여함을 시사한다.

[0137] 만성 자가면역 CNS 염증 동안에 성상교세포 활성을 제어하는 분자 메커니즘을 연구하기 위해, 본원 발명자는 비처리 NOD 마우스로부터 또는 EAE의 급성 및 진행성 단계 동안에 성상교세포를 분리하고 (도 10의 A-G), 주문 제작된 나노스트링 n카운터 정렬을 사용하여 이들의 전사체를 분석하였다 (표 1). 본원 발명자는 NOD EAE의 상이한 단계 동안에 성상교세포의 mRNA 발현 프로파일에서의 유의적인 차이를 발견하였고 (도 1의 C) 진행성 단계 동안에 상향조절된 특유의 유전자 클러스터를 확인하였다 (도 1의 D). 이의 발현이 진행성 NOD EAE와 관련된 유전자들 중 하나는 *b4galt6*, LacCer 신타제였다<sup>17</sup>. 검증 qPCR 연구는 미세아교 세포에서가 아닌 NOD EAE의 진행성 단계 동안에 성상교세포에서의 *B4galt6* 발현의 상향 조절을 확인하였다 (도 1의 E). 면역형광(IF)에 의한 추가의 검증은 회색질, 혈관주변 아교세포경계 또는 네스틴+ 신경 선조체에서가 아닌 회색질 GFAP<sup>+</sup> 성상교세포에서 B4GALT6 발현을 검출하였다(도 11의 A,B). 추가로, 본원 발명자는 또한 B4GALT6와 함께 LacCer 신타제 활성을 갖는 B4GALT 계열의 유일한 구성원인  $\beta$ -1,4-갈락토실트랜스퍼라제 5(B4GALT5)의 유의적 상향조절을 검출하였다<sup>17</sup> (도 11의 C). 실제로, B4GALT5 및 B4GALT6 (B4GALT5/6)의 LacCer 신타제 활성과 일치하여, 본원 발명자는 EAE의 진행성 단계 동안에 NOD 마우스의 CNS에서 증가된 LacCer 수준을 검출하였다 (도 1의 F).

[0138] 이어서, 본원 발명자는 CNS 염증에 대한 LacCer의 효과를 조사하였다. MOG 면역화의 부재에서 LacCer 투여는 EAE형 질환을 유도하거나 생체내 성상교세포 활성화를 유도하지 않았다(도 12의 A). 그러나, LacCer 투여는 C57BL/6 마우스에서 EAE의 유의적 악화를 유도하였다 (도 1의 G). 유사하게, NOD 마우스에서 EAE 유도 후 35일째에 진행성 단계 동안에 개시된 LacCer 투여는 또한 질환 임상적 증상의 유의적 악화를 유도하였다 (도 1의 H). 주지 사항 중에서, LacCer 투여 후 C57BL/6 및 NOD EAE의 악화는 T-세포 반응에서의 변화에 연계되지 않았다 (도 12의 B-E).

[0139] NOD EAE의 진행성 단계에서 LacCer의 역할을 추가로 조사하기 위해, 본원 발명자는 B4GALT5/6-특이적 억제제 D-트레오-1-페닐-2-데카노일아미노-3-모르폴리노 -1-프로판올 (PDMP)을 사용하여 합성을 억제하였다<sup>17</sup> (도 1의 I). EAE 유도 후 40일째에 개시된 하루 PDMP 투여 (20mg/kg, 하루 2회)는 CNS LacCer 수준에서의 유의적 감소를 유도하였고 (도 1의 J) 임상적 스코어, 탈수초 및 축색돌기 상실의 측면에서 질환 진행의 억제를 유도하였다 (도 1의 K,L). 그러나, 어떠한 유의적 변화가 PDMP-처리된 마우스의 T 세포 반응에서 검출되지 않았다 (도 12의 F-I). 종합해 보면, 이들 데이터는 B4GALT5/6에 의해 제조된 LacCer이 CNS 염증에서 치명적 역할을 수행함을 시사한다.

표 1 별아교세포 맞춤화 설계된 나노스트링 n계수기 코드 세트.		
그룹	기호	유전자 명칭
표적 유전자	<i>Ahr</i>	아릴 탄화수소 수용체
	<i>Akr1b10</i>	알도-케토 환원효소 패밀리 1, 멤버 B10 (알도오스 환원효소)
	<i>Aldh1l1</i>	알데하이드 탈수소효소 1 패밀리, 멤버 L1
	<i>Aqp4</i>	아쿠아포린 4
	<i>Arg1</i>	아르기나아제, 간
	<i>B4galt6</i>	UDP-Gal:베타GlcNAc 베타 1,4-갈락토실전달효소, 폴리펩타이드 6
	<i>Bcan</i>	브레비칸
	<i>Bdnf</i>	뇌 유도된 신경친화성 인자
	<i>Bruno14</i>	브루노(Bruno)-유사 4, RNA 결합 단백질 (드로소필라)
	<i>Ccl2</i>	케모카인 (C-C 모티프) 리간드 2
	<i>Ccl3</i>	케모카인 (C-C 모티프) 리간드 3
	<i>Ccl4</i>	케모카인 (C-C 모티프) 리간드 4
	<i>Ccl5</i>	케모카인 (C-C 모티프) 리간드 5
	<i>Ccl7</i>	케모카인 (C-C 모티프) 리간드 7
	<i>Ccl20</i>	케모카인 (C-C 모티프) 리간드 20
	<i>Cd3e</i>	CD3 항원, 엡실론 폴리펩타이드
	<i>Cd19</i>	CD19 항원
	<i>Cd24a</i>	CD24a 항원
	<i>Cd274</i>	CD274 항원
	<i>Cd36</i>	CD36 항원
	<i>Cd38</i>	CD38 항원
	<i>Cd40</i>	CD40 항원
	<i>Cd80</i>	CD80 항원
	<i>Cd86</i>	CD86 항원
	<i>Cd163</i>	CD163 항원
	<i>Chi3l3</i>	키티나제 3-유사 3 (ym1)
	<i>Ciita</i>	클래스 II 교차활성인자
	<i>Csf1</i>	집락 자극 인자 1 (대식세포)
	<i>Csf2</i>	집락 자극 인자 2 (과립구-대식세포)
	<i>Csf3</i>	집락 자극 인자 3 (과립구)
	<i>Cspg4</i>	콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸 4
	<i>Cxcl3</i>	케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 3
	<i>Cxcl9</i>	케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 9
	<i>Cxcl10</i>	케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 10
	<i>Cxcl11</i>	케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 11
	<i>Cxcl12</i>	케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 12

[0140]

표 1 별아교세포 맞춤화 설계된 나노스트링 n계수기 코드 세트.		
그룹	기호	유전자 명칭
	<i>Cxcl15</i>	케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 15
	<i>Cyp1a1</i>	사이토크롬 P450, 패밀리 1, 서브패밀리 a, 폴리펩타이드 1
	<i>Ddx58</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 박스 폴리펩타이드 58 (RIG-I)
	<i>Dhx58</i>	DEXH (Asp-Glu-X-His) 박스 폴리펩타이드 58 (LPG2)
	<i>Ebi3</i>	엡슈타인-바르 바이러스 유도된 유전자 3
	<i>Emr1</i>	EGF-유사 모듈 함유, 뮤신-유사, 호르몬 수용체-유사 서열 1
	<i>Entpd1</i>	엑토뉴클레오사이드 삼인산 디포스포가수분해효소 1 (CD39)
	<i>Fasl</i>	Fas 리간드 (TNF 슈퍼패밀리, 멤버 6)
	<i>Fgf2</i>	섬유아세포 성장 인자 2
	<i>Gfap</i>	신경교 원섬유성 산성 단백질
	<i>Glul</i>	글루탐메이트-암모니아 리가제 (글루타민 신데타제)
	<i>H2-Aa</i>	조직적합성 2, 클래스 II 항원 A, 알파
	<i>H2-Ab1</i>	조직적합성 2, 클래스 II 항원 A, 베타 1
	<i>H2-Ea</i>	조직적합성 2, 클래스 II 항원 E 알파
	<i>Icam1</i>	세포간 접합 부착 1
	<i>Ifih1</i>	헬리카제 C 도메인 1 (MDA5)로 유도된 인터페론
	<i>Ifnb1</i>	인터페론 베타 1, 섬유아세포
	<i>Ifng</i>	인터페론 감마
	<i>Ifnga</i>	인터페론 알파
	<i>Igf1</i>	인슐린-유사 성장 인자 1
	<i>Il1b</i>	인터루킨 1 베타
	<i>Il2</i>	인터루킨 2
	<i>Il4ra</i>	인터루킨 4 수용체, 알파
	<i>Il6</i>	인터루킨 6
	<i>Il10</i>	인터루킨 10
	<i>Il10ra</i>	인터루킨 10 수용체, 알파
	<i>Il11</i>	인터루킨 11
	<i>Il12a</i>	인터루킨 12a
	<i>Il12b</i>	인터루킨 12b
	<i>Il13</i>	인터루킨 13
	<i>Il15</i>	인터루킨 15
	<i>Il17ra</i>	인터루킨 17 수용체 A
	<i>Il17rc</i>	인터루킨 17 수용체 C
	<i>Il21</i>	인터루킨 21
	<i>Il23a</i>	인터루킨 23, 알파 서브유닛 p19
	<i>Il27</i>	인터루킨 27

[0141]

표 1 별아교세포 맞춤형 설계된 나노스트링 n계수기 코드 세트.		
그룹	기호	유전자 명칭
표적 유전자	<i>Il27ra</i>	인터루킨 27 수용체, 알파
	<i>Il33</i>	인터루킨 33
	<i>Irf1</i>	인터페론 조절 인자 1
	<i>Irf2</i>	인터페론 조절 인자 2
	<i>Irf3</i>	인터페론 조절 인자 3
	<i>Irf4</i>	인터페론 조절 인자 4
	<i>Irf5</i>	인터페론 조절 인자 5
	<i>Irf6</i>	인터페론 조절 인자 6
	<i>Irf7</i>	인터페론 조절 인자 7
	<i>Irf8</i>	인터페론 조절 인자 8
	<i>Irf9</i>	인터페론 조절 인자 9
	<i>Itgam</i>	인테그린 알파 M (CD11b)
	<i>Itgax</i>	인테그린 알파 X (CD11c)
	<i>Ly6c1</i>	림프구 항원 6 복합체, 좌위 C1
	<i>Ly6g</i>	림프구 항원 6 복합체, 좌위 G
	<i>Maf</i>	조류 근널힘줄 섬유육종 (v-maf)을 as42 종양유전자 동족체
	<i>Marco</i>	교원성 구조를 갖는 대식세포 수용체
	<i>Mbp</i>	수초 염기성 단백질
	<i>Mmp2</i>	매트릭스 메탈로펩티다아제 2
	<i>Mmp9</i>	매트릭스 메탈로펩티다아제 9
	<i>Mmp12</i>	매트릭스 메탈로펩티다아제 12
	<i>Mog</i>	수초 희소돌기교세포 당단백질
	<i>Mrc1</i>	만노스 수용체, C 1형
	<i>Ncan</i>	뉴로칸
	<i>Ncr1</i>	천연 세포독성 유발성 수용체 1
	<i>Nfe2l2</i>	핵 인자, 적혈구 유도된 2, 유사 2
	<i>Ngf</i>	신경 성장 인자
	<i>Nod1</i>	1 함유 뉴클레오타이드-결합 올리고머화 도메인
	<i>Nod2</i>	2 함유 뉴클레오타이드-결합 올리고머화 도메인
	<i>Nos2</i>	산화질소 신타제 2, 유도성
	<i>Nqo1</i>	NAD(P)H 탈수소효소, 퀴논 1
	<i>Ntf3</i>	뉴로트로핀 3
	<i>Prom1</i>	프로미닌 1 (CD133)
	<i>Relb</i>	조류 세망내피증 바이러스 (v-rel) 종양유전자 관련된 B
	<i>Retnla</i>	레지스틴 유사 알파
	<i>Rnf146</i>	링 핑거 단백질 146

[0142]

표 1 별아교세포 맞춤화 설계된 나노스트링 n계수기 코드 세트.		
그룹	기호	유전자 명칭
표적 유전자	<i>Slc1a2</i>	용질 담체 패밀리 1 (신경교 높은 친화성 글루타메이트 수송체), 멤버 2
	<i>Spp1</i>	분비된 인단백질 1, 오스테오폰틴 (OPN)
	<i>Stat1</i>	신호 변환체 및 활성제 of 전사 1
	<i>Stat2</i>	신호 변환체 및 활성제 of 전사 2
	<i>Stat3</i>	신호 변환체 및 활성제 of 전사 3
	<i>Stat4</i>	신호 변환체 및 활성제 of 전사 4
	<i>Stat5a</i>	신호 변환체 및 활성제 of 전사 5A
	<i>Tdo2</i>	트립토판 2,3-디옥시게나제
	<i>Tgfb1</i>	형질전환 성장 인자, 베타 1
	<i>Tgfb2</i>	형질전환 성장 인자, 베타 2
	<i>Tgfb3</i>	형질전환 성장 인자, 베타 3
	<i>Timp1</i>	조직 저해제 of 메탈로프로테이나제 1
	<i>Tiparp</i>	TCDD-유도성 폴리(ADP-리보오스) 폴리머라제
	<i>Tlr1</i>	톨(toll)-유사 수용체 1
	<i>Tlr2</i>	톨(toll)-유사 수용체 2
	<i>Tlr3</i>	톨(toll)-유사 수용체 3
	<i>Tlr4</i>	톨(toll)-유사 수용체 4
	<i>Tlr5</i>	톨(toll)-유사 수용체 5
	<i>Tlr6</i>	톨(toll)-유사 수용체 6
	<i>Tlr7</i>	톨(toll)-유사 수용체 7
	<i>Tlr8</i>	톨(toll)-유사 수용체 8
	<i>Tlr9</i>	톨(toll)-유사 수용체 9
	<i>Tlr11</i>	톨(toll)-유사 수용체 11
	<i>Tlr12</i>	톨(toll)-유사 수용체 12
	<i>Tlr13</i>	톨(toll)-유사 수용체 13
	<i>Tnf</i>	중양 과사 인자
	<i>Traf3ip2</i>	TRAF3 상호 단백질 2 (ACT1)
	<i>Vcam1</i>	혈관 세포 접합 부착 1
	<i>Vegfa</i>	혈관 내피 성장 인자 A
	<i>Vim</i>	비멘틴
	<i>Vwfr</i>	폰빌레브란트 인자 동족체
하우스-키핑 유전자	<i>Gapdh</i>	글리세르알데하이드-3-포스페이트 탈수소효소
	<i>B2m</i>	베타-2 마이크로글로불린
	<i>Cltc</i>	클라트린, 무거운 폴리펩타이드 (Hc)

표 1 별아교세포 맞춤화 설계된 나노스트링 n계수기 코드 세트.		
그룹	기호	유전자 명칭
	<i>Gusb</i>	글루쿠로니다제, 베타
	<i>Hprt1</i>	하이포잔틴 구아닌 포스포리보실 전달효소 1
	<i>Pgk1</i>	포스포글리세레이트 키나제 1
	<i>Tubb5</i>	튜불린, 베타 5

실시예 2. B4GALT5/6억제는 EAE 동안에 성상교세포 활성화를 억제한다

LacCer은 실험적 척수 손상 동안에 병리를 촉진시키는 것으로 제안되었다<sup>18</sup>. 따라서, 본원 발명자는 EAE의 진행 단계 (100일) 동안에 비히클 또는 PDMP 처리된 NOD 마우스로부터 분리된 성상교세포의 전사 프로그램에 대한 B4GALT5/6 억제의 효과를 연구하였다. 본 발명의 비편중 분석은 2개 세트의 유전자를 확인하였다: EAE 동안에 하향조절되고 PDMP에 의해 상향 조절되는 유전자, 및 EAE 동안에 상향조절되고 PDMP에 의해 하향 조절되는 유전자 (도 2의 A)에서 각각 클러스터 1 및 2). 클러스터 2는 EAE 및 MS 병리와 관련된 여러 유전자를 포함했다: *cc12* (염증 단핵구의 CNS로의 징집)<sup>19-21</sup>, *cc15* 및 *cxc110* (말초 면역 세포의 CNS로의 징집), IL-1 (*il1b*), 오스테오폰틴 (*opn*), 산화질소 신타제 (*nos2*), MHC-II (*H2-Aa*) 및 비멘틴 (성상교세포 활성화와 관련된 *vim*). 독립적인 샘플에 대한 qPCR에 의한 검증 실험은 클러스터 2에 포함된 대표적인 유전자들의 발현에 대한 PDMP의 억제 효과를 확인했다(도 2의 B). EAE와 MS 병리와 관련된 유전자들의 발현을 조절하는데 있어서 B4GALT6의 역할

에 대한 추가의 지지는 IF 연구에 의해 제공되었고, 여기서, 본원 발명자는 GFAP<sup>+</sup> 성상교세포에서 CCL2 및 iNOS와 함께 B4GALT6의 동시 발현을 검출하였다 (도 13).

[0147] 더욱이, 성상교세포는 재수초화 및 뉴런의 생존증을 조절하는 것으로 보고되었기 때문에<sup>9,22</sup>, 본원 발명자는 성상교세포에 의한 수초화의 제어와 관련된 유전자들의 발현을 분석하였다 (표 2 및 도 2의 C). 도 1의 L에 보여지는 탈수초화 및 축색돌기 손상에 일치하여, 본원 발명자는 NOD EAE의 진행성 단계에서 탈수초화와 관련된 유전자들의 유의적 상향조절 및 재수초화와 관련된 유전자들의 하향 조절을 검출하였다. 그러나, PDMP에 의한 B4galT5/6 억제제는 동시에 탈수초화 관련된 유전자들의 발현에서 유의적 감소 및 재수초화 관련된 유전자들의 증가된 발현을 유도하였다(도 2의 C). 총체적으로, 이들 데이터는 B4galT5/6이 EAE 동안에 성상교세포 활성화를 제어함을 입증한다.

[0148] EAE 동안에 성상교세포의 전사 반응에 대한 B4GALT5/6 차단 효과의 메커니즘을 확인하기 위해, 본원 발명자는 특이적 전사 인자 결합 부위의 집적을 위해 클러스터 1 및 2에 포함된 유전자들의 프로모터 서열을 연구하였다. 본원 발명자는 이의 발현이 B4GALT5/6 억제에 의해 억제되는 클러스터 2에 포함된 유전자들이 인터페론-민감성 반응 요소들 (ISRE) ( $P=4.83 \times 10^{-6}$ ) 및 NF- $\kappa$ B 반응 요소들 ( $P=9.99 \times 10^{-6}$ )에 대해 집적됨을 밝혔다. B4GALT5/6에 의한 EAE의 조절 동안에 이들 경로의 관여에 대한 추가의 지지는 EAE 동안에 검출된 *irf1* 및 *relB* 발현의 상향 조절 및 LacCer 합성이 PDMP로 억제되는 경우 후속적 억제에 의해 제공되었다 (도 2의 D,E). 종합해 보면, 이들 결과는 B4GALT5/6이 CNS 염증 동안에 NF- $\kappa$ B 및 IRF-1 활성화를 제어함을 시사한다.

표 2 이전에 기재된 바와 같은, 수초화 및 뉴런의 생존력/축색돌기 성장의 대조군과 연관된 별아교세포 유전자 <sup>9,59</sup> .			
탈수초화		재수초화	
<i>Bcan</i>	<i>Il12</i>	<i>Bdnf</i>	<i>Il4</i>
<i>Ccl2</i>	<i>Icam</i>	<i>Cd274</i>	<i>Il5</i>
<i>Ccl5</i>	<i>Il1b</i>	<i>Cntf</i>	<i>Lif</i>
<i>Cd24</i>	<i>Il23</i>	<i>Csf1</i>	<i>Mmp12</i>
<i>Cd40</i>	<i>Il33</i>	<i>Ctla4</i>	<i>Mmp9</i>
<i>Cd80</i>	<i>Il6</i>	<i>Cxcl1</i>	<i>Ngf</i>
<i>Cd86</i>	<i>Mmp2</i>	<i>Cxcl12</i>	<i>Nos2</i>
<i>Csf2</i>	<i>Ncan</i>	<i>Cd95l</i>	<i>Nrf2</i>
<i>Cx3cl1</i>	<i>Nos2</i>	<i>Fgf2</i>	<i>Nt3</i>
<i>Cxcl10</i>	<i>Opn</i>	<i>Gs</i>	<i>Ntf4</i>
<i>Cxcl8</i>	<i>TNFa</i>	<i>Igf1</i>	<i>Pdgf</i>
<i>Gfap</i>	<i>Traf3ip2</i>	<i>Il10</i>	<i>Slc1a2</i>
<i>H2-Aa</i>	<i>Vcam</i>	<i>Il11</i>	<i>Tgfb1</i>
<i>H2-Ab</i>	<i>Vim</i>	<i>Il27</i>	<i>Timp1</i>

[0149]

[0150] 실시예 3. B4GALT6에 의해 생성되는 LacCer은 성상교세포 활성화를 부스팅하기 위한 자가분비 방식으로 작용한다

[0151] B4GALT5/6에 의해 생성되는 LacCer가 성상교세포의 활성을 조절하기 위해 쥐의 성상교세포에 직접 작용하는지를 조사하기 위해, 본원 발명자는 활성화에 대한 1차 성상교세포의 전사적 반응에 대한 B4GALT5/6 억제 및 LacCer 보충 효과를 연구하였다. 본원 발명자는 B4GALT5/6 억제제가 리포폴리사카라이드 및 인터페론- $\gamma$  (LPS/IFN $\gamma$ )의 자극에 대한 성상교세포의 전사적 반응을 억제함을 밝혔다 (도 3의 A, B 및 도 14의 A). 역으로, 외인성 LacCer의 보충은 LPS/IFN $\gamma$ 에 대한 성상교세포의 반응을 부스팅하였고, 이는 B4GALT5/6에 의해 합성된 LacCer이 이들 실험적 조건하에 성상교세포 활성화를 촉진시키기 위해 자가분비 방식으로 작용함을 시사한다 (도 3의 A,B 및 도 14의 A). 상기 해석과 일치하여, 외인성 LacCer은 성상교세포 활성화에 대한 PDMP의 억제 효과를 극복하였다(도 3의 A,B 및 도 14의 A). 주지할 사항 중에, PDMP 또는 LacCer 처리는 성상교세포 생존능에 영향을 주지 않았고 (도 14의 B,C) PDMP 및 LacCer의 유사 효과는 본원 발명자가 뇌염 유발성 T 세포에 의해 생성되는 IL-1b, 폴리(I:C) 또는 IFN $\gamma$  및 IL-17의 조합으로 활성화된 성상교세포에 대한 이들의 효과를 분석했을 때, 검출되었다.

[0152] 성상교세포 활성화에 대한 B4GALT5 및 B4GALT6의 상대적 기여를 분석하기 위해<sup>17,23,24</sup>, 본원 발명자는 검증된 렌티바이러스-전달된 shRNA를 사용하여 *b4galT5* 및 *b4galT6* 발현을 녹다운시켰다 (도 3의 C). 본원 발명자는 *b4galT6*의 녹다운이 PDMP 처리와 유사한 정도로 LPS/IFN $\gamma$  활성화에 의해 유발된 *h2-Aa*, *cc15* 및 *cxcl10* 발현의 상향조절을 유의적으로 억제함을 밝혔다. 그러나, *b4galT5*의 녹다운은 상기 유전자들의 발현에 영향을 주지

않았고 (도 3의 D-F), 이는 B4GALT6이 LacCer에 의한 성상교세포 활성화의 조절에서 주요 역할을 수행함을 시사한다. 주지 사항 중에, B4GALT6이 shRNA와 함께 녹다운된 성상교세포의 PDMP 처리는 *h2-Aa*, *cc15* 및 *cxcl10* 발현을 추가로 억제하지 않았고, 이는 PDMP의 효과가 B4GALT6-의존성 LacCer 합성의 특이적 억제로부터 비롯됨을 시사한다 (도 14의 D).

[0153] 생체내 성상교세포 활성화 및 EAE 진행의 제어에 대한 B4GALT5 및 B4GALT6의 상대적 기여를 결정하기 위해, 본원 발명자는 생체내 성상교세포 특이적 녹다운을 위해 최적화된 렌티바이러스계 시스템을 사용하여 shRNA를 NOD 마우스로 전달하였다<sup>25</sup> (도 3의 G). 상기 시스템에서, 마우스 *gfap* 프로모터는 선택된 shRNA 및 GFP 리포터의 발현을 구동시킨다. NOD 마우스에서 EAE 유도 후 35일째에 진행성 단계 동안에 shRNA-암호화 렌티바이러스의 뇌 실내 (i.c.v.) 주사 후, 본원 발명자는 Iba1<sup>+</sup> 미세아교 세포 및 염증성 대식세포가 아닌 GFAP<sup>+</sup> 성상교세포에 제한된 GFP 리포터의 발현을 검출하였다 (도 3의 H 및 도 14의 E). 결론적으로, 본원 발명자는 *b4galt6* 및 *b4galt5* 발현의 성상교세포 특이적 녹다운을 검출하였다 (도 3H). *b4galt5*가 아닌 *b4galt6*의 녹다운은 NOD EAE의 진행성 단계 동안에 CNS LacCer 수준의 유의적 감소를 유도하였다 (도 3의 I). 더욱이, *b4galt5*의 녹다운이 아닌 *b4galt6*의 녹다운이 NOD 마우스에서 질환 진행을 억제하였다 (도 3의 J). 종합해 보면, 이들 데이터는 B4GALT6에 의해 생성된 LacCer이 성상교세포 활성화 및 EAE 진행을 촉진시키기 위해 자가분비 방식으로 작용함을 보여준다.

[0154] 성상교세포 활성화에 대한 LacCer의 효과를 매개하는 분자적 메커니즘을 조사하기 위해, 본원 발명자는 특이적 TF 결합 부위에서 집적을 위한 배양 중 1차 성상교세포에서 LacCer에 의해 조절된 유전자의 프로모터를 연구하였다 (도 3의 A). PDMP로 처리된 NOD 마우스로부터 분리된 성상교세포에서의 본원 발명자의 발견과 유사하게, 본원 발명자는 NF- $\kappa$ -B 및 ISRE 반응성 요소들에서 유의적 집적 ( $P < 10^{-5}$ )을 검출하였다.

[0155] LacCer이 성상교세포에서 NF- $\kappa$ B를 활성화시킨다는 것은 이전에 보고되었다<sup>18,26</sup>. 따라서, 본원 발명자는 B4GALT6 억제 후 NF- $\kappa$ B의 핵으로의 감소된 전위를 발견하였고; 역으로, 외인성 LacCer은 NF- $\kappa$ B 활성화를 유발하였고 심지어 PDMP에 의해 유도된 억제를 차단시켰다 (도 14의 F). 그러나, LacCer에 의한 성상교세포 활성화의 조절에서 IRF1/ISRE의 역할은 공지되어 있지 않다. 본원 발명자는 LacCer 처리가 IRF-1의 핵으로의 전위를 증진시키는 반면, B4GALT6 억제는 상기 과정을 방해함을 밝혔다 (도 3의 K). 더욱이, 염색질 면역침전 (ChIP) 실험에서, 본원 발명자는 LPS/IFN $\gamma$ 로 활성화된 성상교세포에서 NF- $\kappa$ B 및 IRF-1의 *nos2* 프로모터의 유의적 징집을 검출하였다 (도 3의 L). LacCer에 대한 성상교세포의 반응에 대한 IRF-1의 기능적 관련성을 연구하기 위해, 본원 발명자는 LPS/IFN $\gamma$ 에 의한 활성화에 대한 WT 및 IRF-1 결핍 성상교세포의 반응을 비교하였다. 본원 발명자는 IRF-1 결핍이 *nos2*, 및 이들의 프로모터 (*csf2*, *cc12*, *cc15*, *il6* 및 *tlr2*)에 ISRE 결합 부위를 함유하는 다른 유전자의 LacCer에 의해 유발된 상향조절을 중단시켰음을 밝혔다 (도 3의 M). 진행성 NOD EAE 동안에 *cc12* 및 *nos2* 발현의 조절에서 IRF-1의 역할에 대한 추가의 지지는 GFAP<sup>+</sup> 성상교세포에서 IF에 의해 검출되는 CCL-2 및 iNOS와 함께 IRF-1의 동시 발현에 의해 제공되었다 (도 14의 G). 종합해 보면, 이들 결과는 B4GALT6에 의해 생성된 LacCer이 NF- $\kappa$ B 및 IRF-1 의존성 경로를 통해 성상교세포를 활성화시키기 위해 자가분비 방식으로 작용함을 입증한다.

[0156] 실시예 4. *B4galt6*은 성상교세포에서 *cc12* 전사 활성을 조절한다

[0157] CCL-2에 의해 구동되는 염증 단백질의 CNS로의 징집은 MS 및 EAE에서 신경퇴행 및 질환 진행을 촉진시키는 것으로 사료된다<sup>19-21,27</sup>. 본원 발명자는 B4GALT6 및 LacCer가 성상교세포에 의한 *cc12* 발현을 제어함을 밝혔다 (도 2의 A,B 및 3의 A). 성상교세포에서 NF- $\kappa$ -B 및 IRF-1의 활성화에 미치는 LacCer의 효과에 대한 본원 발명자의 발견을 토대로, 본원 발명자는 이들 전사 인자에 대한 반응성 요소들에 대해 *cc12* 프로모터를 연구하였다. 본원 발명자의 생물정보학 연구는 NF- $\kappa$ B 및 IRF-1에 대한 잠재적인 결합 부위를 확인하였다 (도 4의 A). 이들의 기능적 관련성을 평가하기 위해, 본원 발명자는 *cc12* 프로모터의 제어하게 루시페라제 유전자를 함유하는 리포터 작제물을 사용하였다. 본원 발명자는 IRF-1 및 NF- $\kappa$ B (p65)가 *cc12* 프로모터를 상당히 트랜스활성화시킴을 발견하였다 (도 4의 B). 더욱이, ChIP 연구에서, 본원 발명자는 LPS/IFN $\gamma$ 로 활성화된 성상교세포에서 NF- $\kappa$ B 및 IRF-1의 *cc12* 프로모터로의 상당한 징집을 검출하였다 (도 4의 C). 이러한 징집은 PDMP로 LacCer 합성의 억제에 의해 중지되고 PDMP의 효과는 외인성 LacCer의 첨가에 의해 중단될 수 있다 (도 4의 C). 따라서, B4GALT6에 의해 생성된 LacCer은 *cc12* 발현을 제어한다.

[0158] B4GALT6-LacCer에 의한 *cc12* 발현 조절의 생체내 관련성을 조사하기 위해, 본원 발명자는 비히클로 처리되거나

B4GALT6 억제제 PDMP로 처리된 NOD EAE 마우스의 CNS로의 염증 단핵구의 징집을 분석하였다. 본원 발명자는 B4GALT6 억제가 EAE 동안에 CNS로 징집되는 염증 단핵구의 빈도 및 총 수 ( $CD11b^{+}Ly6C^{high}$  또는  $CD11b^{+}CD45^{high}$  세포의 것으로서 정의되는) (도 4의 D-H)를 상당히 감소시킴을 밝혔다. 유사한 결과는 또한 B4GALT6이 NOD EAE의 만성 단계 동안에 렌티바이러스-전달된 shRNA를 사용하여 성상교세포에서 녹다운되는 경우 수득되었다 (도 4의 I). 따라서, B4GALT6은 CCL-2의 생산 및 염증 단핵구의 CNS로의 징집을 제어한다. 주지 사항 중에서, B4GALT6의 억제 또는 LacCer를 사용한 치료는 정제된  $Ly6C^{high}$  단핵구의 생존능, CCL-2 농도구배에서 이들의 이동 또는 LPS/IFN $\gamma$  자극에 대한 이들의 반응 (도 4의 J-M)에 영향을 미치지 않았고, 이는 B4GALT6/LacCer이 CNS로의 이들의 징집을 제어하기 위해 단핵구에서 직접적으로 작용하지 않음을 시사한다.

[0159] 실시예 5. 성상교세포에서 B4GALT6은 미세아교세포 및 CNS-침윤 단핵구의 활성화를 조절한다

[0160] 미세아교세포는 CNS 염증의 제어에 중추 역할을 수행한다<sup>28</sup>. 미세아교세포에 대한 B4GALT5/6의 효과를 연구하기 위해, 본원 발명자는 비처리 마우스로부터 또는 비히클 또는 PDMP 처리된 마우스에서 NOD EAE의 진행성 단계 동안에 분리하고 나노스트링카운터에 의해 이들의 전사 프로필을 분석하였다. 본원 발명자는 B4GALT5/6 억제가 EAE 동안에 미세아교세포 활성화와 관련된 유전자들의 발현을 감소시킴을 밝혔다 (도 5의 A,B). 미세아교세포 및 CNS-침윤 단핵구에 대한 B4GALT5/6 억제의 효과를 추가로 분석하기 위해, 본원 발명자는 MS 및 EAE<sup>29-31</sup>에서의 질환 병리에 영향을 미치는 것으로 사료되는 대식세포/단핵구 계통에서 염증 촉진 또는 소염 표현형(각각 M1 또는 M2)과 관련된 유전자들의 발현을 연구하였다. 본 발명자는 B4GALT5/6 억제가 미세아교세포 및 CNS-침윤 단핵구에서 M2-관련된 유전자의 상향조절과 동시에 M1 관련된 유전자들을 상당히 하향 조절함을 밝혔다 (도 5의 C,D 및 표 3). 따라서, B4GALT5/6이 EAE 동안에 미세아교세포에 의해 상향 조절되지 않지만, LacCer은 미세아교세포 및 CNS-침윤 단핵구의 활성화를 조절한다.

[0161] 생체내 B4GALT5/6 억제가 미세아교 세포 및 CNS-침윤 단핵구에서 M1/M2 균형을 변화시키는 경우 (도 5의 C,D), 본원 발명자는 미세아교세포 및 단핵구에서 B4GALT5/6 및 LacCer의 효과가 세포 자율적인지를 연구하였다. 본원 발명자는 LPS/IFN $\gamma$ 에 대한 배양된 1차 마우스 미세아교 세포의 생존능 또는 반응이 성상교세포의 부재하에 B4GALT5/6의 억제 또는 LacCer의 첨가에 의해 영향받지 않았음을 밝혔다 (도 5의 E-H). 추가로, LacCer은 연수막 식세포 또는 맥락층 세포의 활성화에 대한 전사 반응에 영향을 주지 않았다 (도 15의 A,B).

[0162] 그러나, 본원 발명자는 미세아교 세포 및 성상교세포 둘 다를 함유하는 혼합 아교세포 배양물에서 미세아교 세포 활성화에 대한 PDMP 및 LacCer의 상당한 효과를 검출하였다 (도 5의 I). 성상교세포에 의한 미세아교 활성화의 조절에 관여하는 B4GALT6/LacCer-의존성 메커니즘을 확인하기 위해, 본원 발명자는 블록킹 항체를 사용하였다. 본원 발명자는 혼합 아교 세포 배양물을 GM-CSF, IL-12, TNF $\alpha$ , 또는 IL-6 시그널 전달을 중화시키기 위해 블록킹 항체로 처리하고 LPS/IFN $\gamma$  및 LacCer의 존재하에 미세아교 세포 활성화(nos2 상향 조절에 의해 지적된 바와 같이)를 분석하였다. 본원 발명자는 GM-CSF의 차단이 미세아교 세포 nos2의 상향 조절에서 LacCer-의존성 부스트를 억제함을 밝혔다 (도 5의 J). 실제로, 본원 발명자는 또한 B4GALT6/LacCer 경로가 성상교세포 활성화 동안에 NF- $\kappa$ B 및 IRF-1의 csf2 (GM-CSF) 프로모터로의 징집을 제어함을 밝혔다 (도 5의 K).

[0163] 이들 시험관내 발견의 생리학적 관련성을 평가하기 위해, 본원 발명자는 NOD EAE의 만성 단계 동안에 shRNA를 사용한 b4galt6 녹다운 후 성상교세포에서 csf2 발현을 분석하였다. 본원 발명자의 시험관내 결과에 일치하여, b4galt6의 녹다운은 성상교세포에서 csf2 발현을 상당히 감소시켰다 (도 5의 L). 더욱이, 성상교세포에서 b4galt6의 특이적 녹다운은 미세아교 세포에서 nos2 발현을 감소시켰다(도 5의 M). 함께 종합해 보면, 이들 데이터는 B4GALT6/LacCer-의존성 방식에서 성상교세포에 의해 생성된 GM-CSF가 미세아교 세포 활성화를 조절함을 시사한다.

표 3 이전에 기재된 바와 같은, M1/M2 관련된 유전자 <sup>29,30,60-62</sup> .			
M1 관련된 유전자		M2 관련된 유전자	
<i>Ccl4</i>	<i>Icam</i>	<i>Arg1</i>	<i>Il8</i>
<i>Ccl5</i>	<i>Il1b</i>	<i>Ccl1</i>	<i>Il21</i>
<i>Ccl8</i>	<i>Il6</i>	<i>Ccl2</i>	<i>Il21r</i>
<i>Ccl15</i>	<i>Il7r</i>	<i>Ccl17</i>	<i>Irf4</i>
<i>Ccl19</i>	<i>Il15</i>	<i>Ccl20</i>	<i>Maf</i>
<i>Ccl20</i>	<i>Il15ra</i>	<i>Cd14</i>	<i>Pparg</i>
<i>Ccl23</i>	<i>Il12a</i>	<i>Cd163</i>	<i>Ptgst1</i>
<i>Cd40</i>	<i>Il12b</i>	<i>Cd206</i>	<i>Sra1</i>
<i>Cd80</i>	<i>Il12ra</i>	<i>Cd209</i>	<i>Stat6</i>
<i>Cd83</i>	<i>Il18</i>	<i>Cd36</i>	<i>Tgfb</i>
<i>Cd86</i>	<i>Il18r</i>	<i>Cd39</i>	<i>Tlr1</i>
<i>Cxcl9</i>	<i>Il23a</i>	<i>Cd73</i>	<i>Tlr8</i>
<i>Cxcl10</i>	<i>Irf5</i>	<i>Cxcl1</i>	<i>Ym1</i>
<i>Cxcl11</i>	<i>Nos2</i>	<i>Cxcl2</i>	
<i>Cxcl13</i>	<i>Ptgs2</i>	<i>Cxcl3</i>	
<i>H2-Aa</i>	<i>Socs3</i>	<i>Fizz1</i>	
<i>H2-ab</i>	<i>Stat1</i>	<i>Igf1</i>	
<i>H2-Ea</i>	<i>Tnf</i>	<i>Il10</i>	
<i>Marco</i>			

[0164]

[0165]

[0166]

실시예 6. B4GALT6 및 LacCer 수준은 MS 병변에서 상향조절된다

MS에 대한 본원 발명자의 발견의 관련성을 조사하기 위해, 본원 발명자는 MS 환자 및 대조군으로부터의 뇌 샘플에서 B4GALT6 및 B4GALT5 발현을 분석하였다. 본원 발명자는 정상인 것으로 보이는 백색질(NAWM) 또는 대조군에서는 아닌 MS 병변에서 B4GALT5 ( $2.15 \pm 0.28$  배) 및 B4GALT6 ( $8.26.15 \pm 2.11$ 배)의 상당한 상향 조절을 발견하였다. 추가로, 비-MS CNS 염증 질환(NMCID)으로부터의 뇌 샘플에서, 본원 발명자는 B4GALT5 ( $1.95 \pm 0.34$ )의 상향 조절을 검출하였지만 B4GALT6 발현 ( $0.82 \pm 0.37$ )은 상향 조절되지 않았다 (도 6의 A).

[0167]

MS에서 B4GALT6 상향 조절의 역할을 추가로 조사하기 위해, 본원 발명자는 IF에 의해 환자 뇌 샘플을 분석하고 GFAP<sup>+</sup> 성상교세포에서 B4GALT6의 발현을 검출하였다(도 6의 B). 더욱이, 본원 발명자는 GFAP<sup>+</sup> 성상교세포에서 CCL2 및 iNOS와 함께 B4GALT6의 동시 발현을 검출하였다 (도 6의 B).

[0168]

B4GALT5/6 발현의 상향 조절의 생물학적 관련성을 조사하기 위해, 본원 발명자는 샘플의 동일한 수거물에서 LacCer 수준을 정량하였다. B4GALT5/6 발현에 대한 본원 발명자의 데이터와 일치하여, 본원 발명자는 대조군, NMCID 및 MS NAWM 샘플에서 유사한 LacCer 수준을 검출하였다(도 6의 C). 그러나, LacCer 수준은 MS 병변에서 상당히 상향 조절되었고, 이것은 증가된 B4GALT6 활성 및 LacCer 수준이 또한 MS 병리와 관련됨을 시사한다.

[0169]

본원 발명자는 B4GALT6이 또한 인간 성상교세포의 활성을 조절하는지를 연구하였다. 이러한 목적을 위해, 인간 1차 성상교세포는 PDMP 또는 비히클 대조군의 존재하에 TLR-3 효능제 폴리 (I:C) (외인성 자극) 또는 IL-1 $\beta$  (내인성 자극)에 의해 활성화시켰다. 본원 발명자는 B4GALT6 억제제 CCL2, CCL5, COX2, IL6, NOS2 및 TLR2 발현을 상당히 감소시킴을 발견하였다 (도 6의 D). 따라서, 이들 결과는 B4GALT6이 인간 신경염증 장애에서 성상교세포 활성의 조절을 위한 잠재적 치료학적 표적임을 시사한다.

[0170]

실시예 7. 미글루스타트는 성상교세포 활성화를 억제한다

[0171]

본원에서 입증된 바와 같이, LacCer은 성상교세포 활성화 및 신경퇴행을 촉진시킨다. 인간용으로 승인된 약물인 미글루스타트 (문헌참조: Venier, R.E. & Igdoura, S.A. Miglustat as a therapeutic agent: prospects and caveats. J Med Genet 49, 591-597 (2012))는 혈뇌 장벽을 통과하고 LacCer를 합성하기 위해 B4GALT6에 의해 사용되는 글루코세라미드 (GlcCer)의 합성을 억제한다(도 1a) (문헌참조: Venier & Igdoura, J Med Genet 49, 591-597 (2012); Jeyakumar et al., Nature reviews. Neuroscience 6, 713-725 (2005); Platt et al. Science (New York, N.Y.) 276, 428-431 (1997)). 성상교세포 활성의 조절을 위한 이의 리퍼포징을 지지하는 것으로서 PDMP를 사용한 관찰과 유사하게, 미글루스타트가 성상교세포 활성화를 억제하는 것으로 밝혀졌다 (도 7의 B). 따라서, 미글루스타트는 MS 및 다른 신경퇴행 질환에서 병리학적 성상교세포 활성화를 억제하기 위해 사용될 수 있다.

[0172] 실시예 8. 미글루스타트 처리는 만성 EAE 진행을 중지시킨다

[0173] 실험적 자가면역 뇌척수염 (EAE)은 MS 연구에 기여하는 입증된 기록과 함께MS의 유용한 실험 모델을 구성하고 실제로, EAE는 직접적으로 다발성 경화증(MS)에 사용하기 위해 승인된 3개의 치료제의 개발을 유도하였다: 글라티라머 아세테이트, 미톡산트론, 및 나탈리주맙. MOG<sub>35-55</sub>를 사용한 비-비만 당뇨병(NOD) 마우스의 면역화는 급성 공격(급성 단계)에 이어서 2차 진행성 MS와 유사한 신경학적 손상의 진행성 및 비가역적 누적 단계(진행성 단계)를 유도한다.

[0174] NOD EAE의 진행성 단계에서 미글루스타트의 치료학적 잠재력을 조사하기 위해, 본원 발명자는 진행성 단계의 개시점에서 미글루스타트 투여를 개시하였다 (도 16). 미글루스타트는 경구 또는 비강 경로를 통해 매일 투여하였다. 경구 처리된 마우스에는 단일 용량의 1800mg/kg 또는 600mg/kg의 미글루스타트를 투여하고, 900 mg/kg의 용량 (하루 1800mg/kg에 달하는)으로 하루 2회 처리되는 경우 마우스는 비강으로 처리하였다. 본원 발명자는 미글루스타트의 하루 투여가 질환 진행의 임상적 과정을 억제함을 밝혔다 (도 16). 더욱이, 이것은 또한 MS 및 다른 신경퇴행성 장애의 발병에 주요 기여자로서 사료되는 염증 단핵구의 CNS로의 징집(도 17)을 감소시켰다 (문헌참조: 예를 들어, David and Kroner, *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(7):388-99; Lawrence and Natoli, *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):750-61; Murray and Wynn, *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):723-37). 주지 사항 중에, 미글루스타트는 T-세포 반응 또는 체중 감량에 영향을 미치지 않았다 (각각, 도 18 및 19). 종합해 보면, 이들 데이터는 미글루스타트 투여가 만성 EAE 진행을 중지시키고 진행성 MS에 대한 치료학적 방법을 제공함을 시사한다.

[0175] 참조문헌

1. Clarke, L.E. & Barres, B.A. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci* **14**, 311-321 (2013).
2. Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K. & Giaume, C. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* **322**, 1551-1555 (2008).
3. Seifert, G., Schilling, K. & Steinhauser, C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* **7**, 194-206 (2006).
4. Tsai, H.H., *et al.* Regional astrocyte allocation regulates CNS synaptogenesis and repair. *Science* **337**, 358-362 (2012).
5. Bush, T.G., *et al.* Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* **23**, 297-308 (1999).
6. Myer, D.J., Gurkoff, G.G., Lee, S.M., Hovda, D.A. & Sofroniew, M.V. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain* **129**, 2761-2772 (2006).
7. Toft-Hansen, H., Fuchtbauer, L. & Owens, T. Inhibition of reactive astrocytosis in established experimental autoimmune encephalomyelitis favors

[0176]

- infiltration by myeloid cells over T cells and enhances severity of disease. *Glia* **59**, 166-176 (2011).
8. Voskuhl, R.R., *et al.* Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J Neurosci* **29**, 11511-11522 (2009).
9. Mayo, L., Quintana, F.J. & Weiner, H.L. The innate immune system in demyelinating disease. *Immunol Rev* **248**, 170-187 (2012).
10. Nylander, A. & Hafler, D.A. Multiple sclerosis. *J Clin Invest* **122**, 1180-1188 (2012).
11. Weiner, H.L. The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease? *Ann Neurol* **65**, 239-248 (2009).
12. Joseph, J., Bittner, S., Kaiser, F.M., Wiendl, H. & Kissler, S. IL-17 silencing does not protect nonobese diabetic mice from autoimmune diabetes. *J Immunol* **188**, 216-221 (2012).
13. Basso, A.S., *et al.* Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. *J Clin Invest* **118**, 1532-1543 (2008).
14. Farez, M.F., *et al.* Toll-like receptor 2 and poly(ADP-ribose) polymerase 1 promote central nervous system neuroinflammation in progressive EAE. *Nat Immunol* **10**, 958-964 (2009).
15. Cao, W., *et al.* Leukemia inhibitory factor inhibits T helper 17 cell differentiation and confers treatment effects of neural progenitor cell therapy in autoimmune disease. *Immunity* **35**, 273-284 (2011).
16. Pluchino, S., *et al.* Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* **422**, 688-694 (2003).
17. Chatterjee, S. & Alsaccedi, N. Lactosylceramide synthase as a therapeutic target to mitigate multiple human diseases in animal models. *Adv Exp Med Biol* **749**, 153-169 (2012).
18. Pannu, R., Won, J.S., Khan, M., Singh, A.K. & Singh, I. A novel role of lactosylceramide in the regulation of lipopolysaccharide/interferon-gamma-mediated inducible nitric oxide synthase gene expression: implications for neuroinflammatory diseases. *J Neurosci* **24**, 5942-5954 (2004).
19. Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., McNagny, K.M. & Rossi, F.M. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci* **14**, 1142-1149 (2011).

[0177]

20. Izikson, L., Klein, R.S., Charo, I.F., Weiner, H.L. & Luster, A.D. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *J Exp Med* **192**, 1075-1080 (2000).
21. Mildner, A., *et al.* CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain* **132**, 2487-2500 (2009).
22. Watkins, T.A., Emery, B., Mulinyawe, S. & Barres, B.A. Distinct stages of myelination regulated by gamma-secretase and astrocytes in a rapidly myelinating CNS coculture system. *Neuron* **60**, 555-569 (2008).
23. Nishie, T., *et al.* Beta4-galactosyltransferase-5 is a lactosylceramide synthase essential for mouse extra-embryonic development. *Glycobiology* **20**, 1311-1322 (2010).
24. Tokuda, N., *et al.* beta4GalT6 is involved in the synthesis of lactosylceramide with less intensity than beta4GalT5. *Glycobiology* **23**, 1175-1183 (2013).
25. Yan, Y., *et al.* CNS-specific therapy for ongoing EAE by silencing IL-17 pathway in astrocytes. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **20**, 1338-1348 (2012).
26. Lee, J.K., *et al.* Lactosylceramide Mediates the Expression of Adhesion Molecules in TNF-alpha and IFNgamma-stimulated Primary Cultured Astrocytes. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* **15**, 251-258 (2011).
27. Huang, D.R., Wang, J., Kivisakk, P., Rollins, B.J. & Ransohoff, R.M. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* **193**, 713-726 (2001).
28. Heppner, F.L., *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med* **11**, 146-152 (2005).
29. Lawrence, T. & Natoli, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* **11**, 750-761 (2011).
30. Murray, P.J. & Wynn, T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* **11**, 723-737 (2011).

[0178]

31. Miron, V.E., *et al.* M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci* **16**, 1211-1218 (2013).
32. Bi, F., *et al.* Reactive astrocytes secrete lcn2 to promote neuron death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 4069-4074 (2013).
33. Colombo, E., *et al.* Stimulation of the neurotrophin receptor TrkB on astrocytes drives nitric oxide production and neurodegeneration. *J Exp Med* **209**, 521-535 (2012).
34. Freeman, M.R. Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science* **330**, 774-778 (2010).
35. Hochstim, C., Deneen, B., Lukaszewicz, A., Zhou, Q. & Anderson, D.J. Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain code. *Cell* **133**, 510-522 (2008).
36. Matyash, V. & Kettenmann, H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev* **63**, 2-10 (2010).
37. Zhang, Y. & Barres, B.A. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr Opin Neurobiol* **20**, 588-594 (2010).
38. Molofsky, A.V., *et al.* Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes & development* **26**, 891-907 (2012).
39. Sofroniew, M.V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences* **32**, 638-647 (2009).
40. David, S. & Kroner, A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* **12**, 388-399 (2011).
41. Ponomarev, E.D., *et al.* GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **178**, 39-48 (2007).
42. Codarri, L., *et al.* RORgammat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* **12**, 560-567 (2011).
43. El-Behi, M., *et al.* The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* **12**, 568-575 (2011).
44. Zamanian, J.L., *et al.* Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci* **32**, 6391-6410 (2012).

[0179]

45. Jahng, A., *et al.* Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. *J Exp Med* **199**, 947-957 (2004).
46. Schwab, J.M., Chiang, N., Arita, M. & Serhan, C.N. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* **447**, 869-874 (2007).
47. Kanter, J.L., *et al.* Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nat Med* **12**, 138-143 (2006).
48. Quintana, F.J., Yeste, A., Weiner, H.L. & Covacu, R. Lipids and lipid-reactive antibodies as biomarkers for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **248**, 53-57 (2012).
49. Nolte, C., *et al.* GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* **33**, 72-86 (2001).
50. Cardona, A.E., Huang, D., Sasse, M.E. & Ransohoff, R.M. Isolation of murine microglial cells for RNA analysis or flow cytometry. *Nat Protoc* **1**, 1947-1951 (2006).
51. Cahoy, J.D., *et al.* A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* **28**, 264-278 (2008).
52. Prinz, M., Priller, J., Sisodia, S.S. & Ransohoff, R.M. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci* **14**, 1227-1235 (2011).
53. Ulitsky, I., *et al.* Expander: from expression microarrays to networks and functions. *Nat Protoc* **5**, 303-322 (2010).
54. Saura, J., Tusell, J.M. & Serratosa, J. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* **44**, 183-189 (2003).
55. Kunis, G., *et al.* IFN-gamma-dependent activation of the brain's choroid plexus for CNS immune surveillance and repair. *Brain* **136**, 3427-3440 (2013).
56. Menhenniott, T.R., Charalambous, M. & Ward, A. Derivation of primary choroid plexus epithelial cells from the mouse. *Methods in molecular biology* **633**, 207-220 (2010).
57. Jack, C.S., *et al.* TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol* **175**, 4320-4330 (2005).
58. Alvarez, J.I., *et al.* The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science* **334**, 1727-1731 (2011).
59. Nair, A., Frederick, T.J. & Miller, S.D. Astrocytes in multiple sclerosis: a product of their environment. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **65**, 2702-2720 (2008).
60. Krausgruber, T., *et al.* IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* **12**, 231-238 (2011).
61. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* **122**, 787-795 (2012).
62. Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A. & Locati, M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **13**, 453-461 (2008).

[0180]

[0181]

[0182]

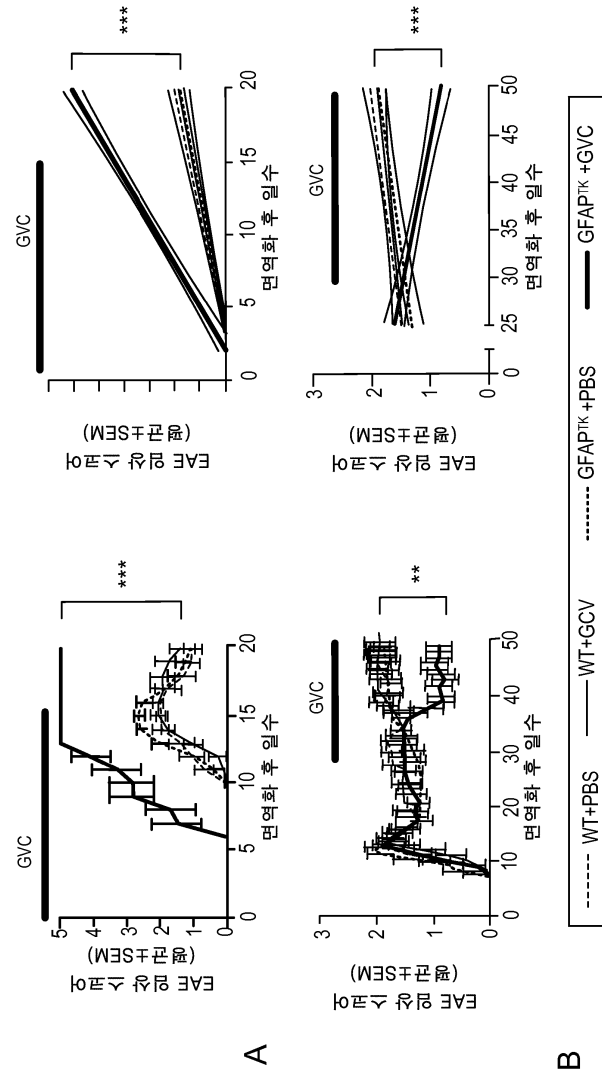
다른 양태

[0183]

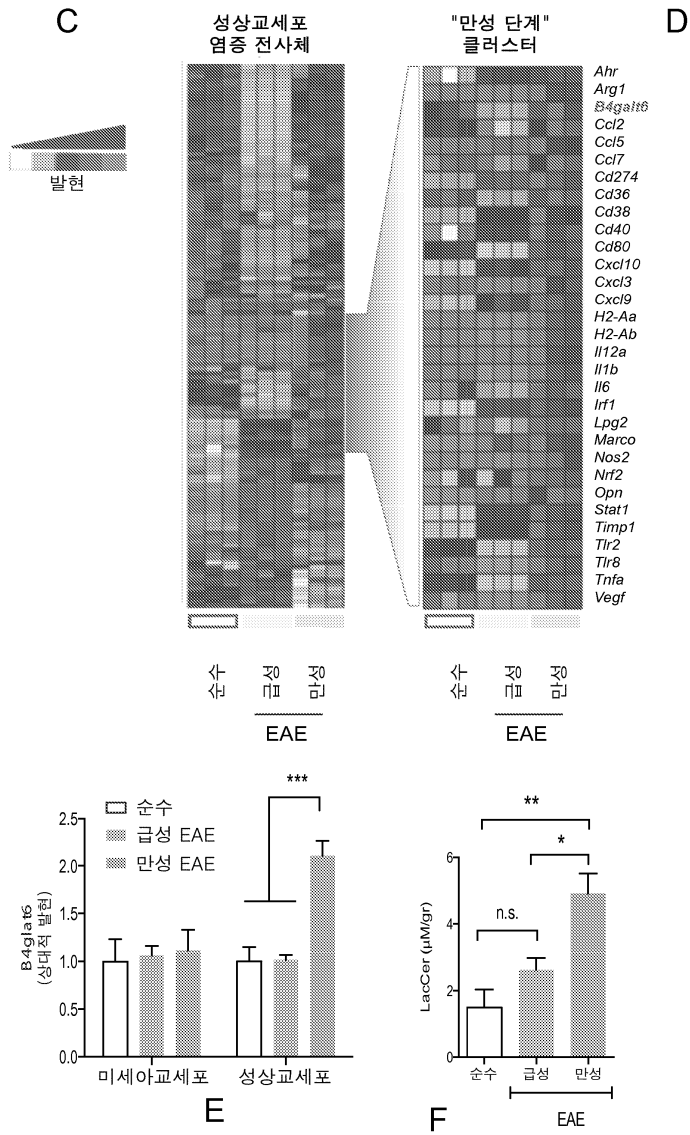
본 발명은 이의 상세한 설명과 연계하여 기재되었고 이전의 기재는 설명을 위한 것이고 첨부된 특허청구범위에 의해 한정되는 본 발명의 범위를 제한하지 않는 것으로 이해되어야만 한다. 다른 측면, 이점 및 변형은 하기의 특허청구 범위내에 있다.

도면

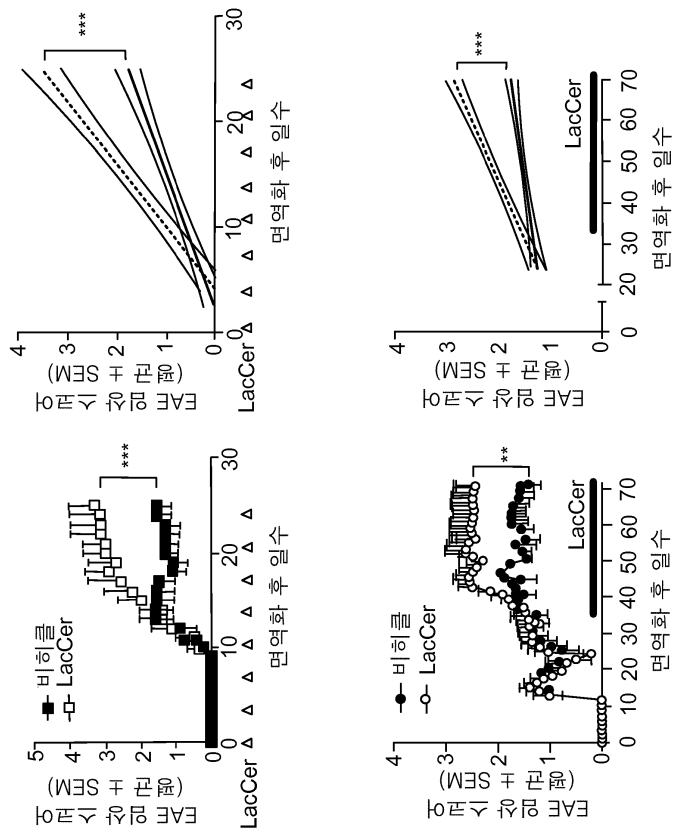
도면1a



도면1b



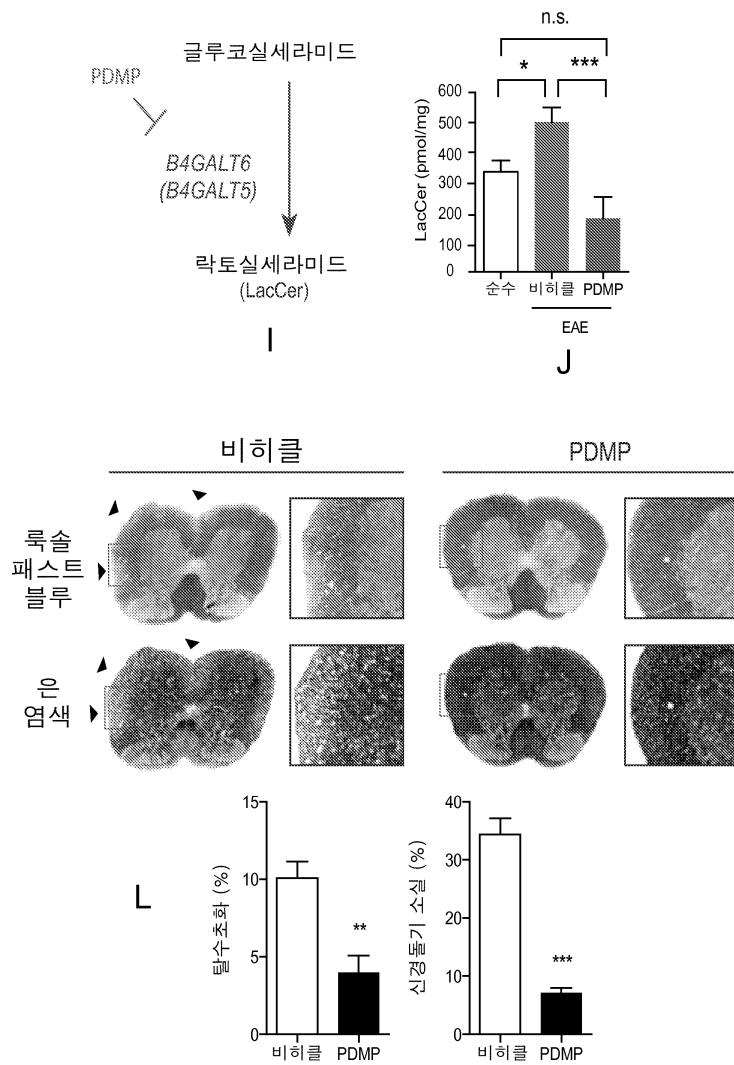
도면1c



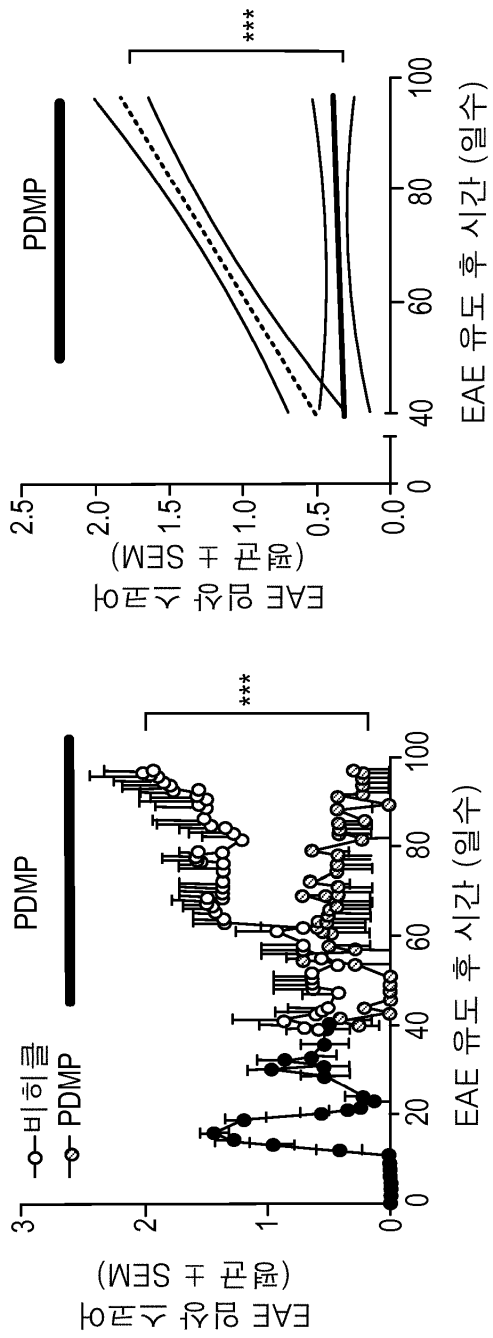
G

H

도면1d

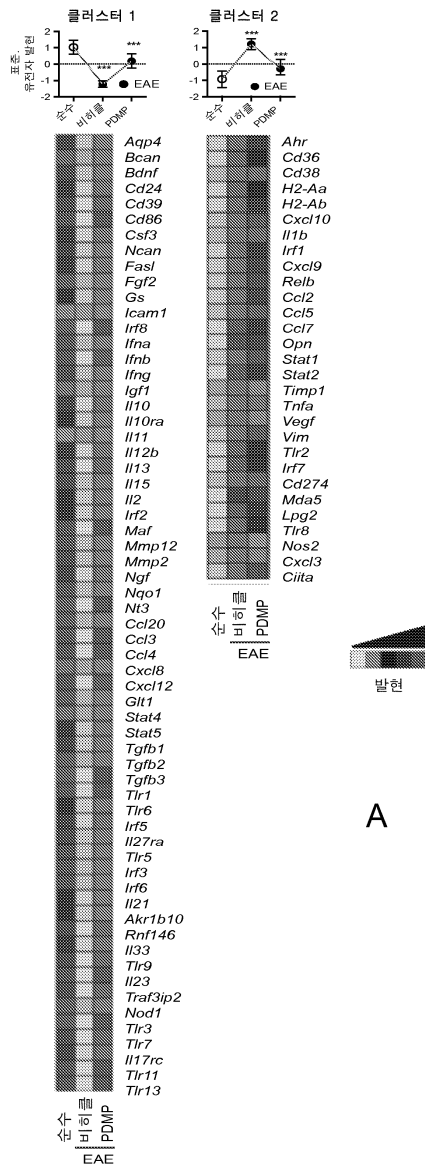


도면1e

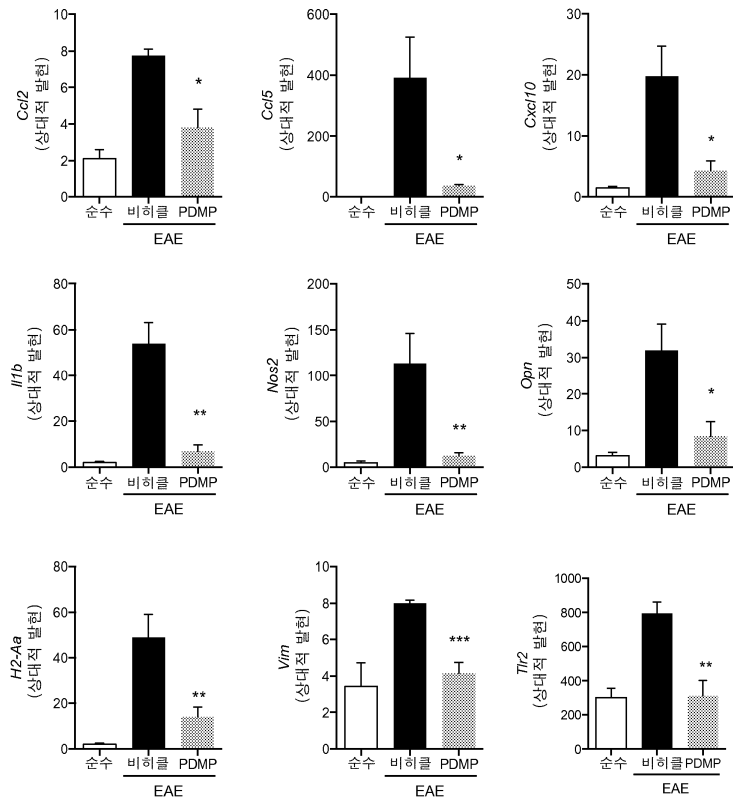


K

## 도면2a

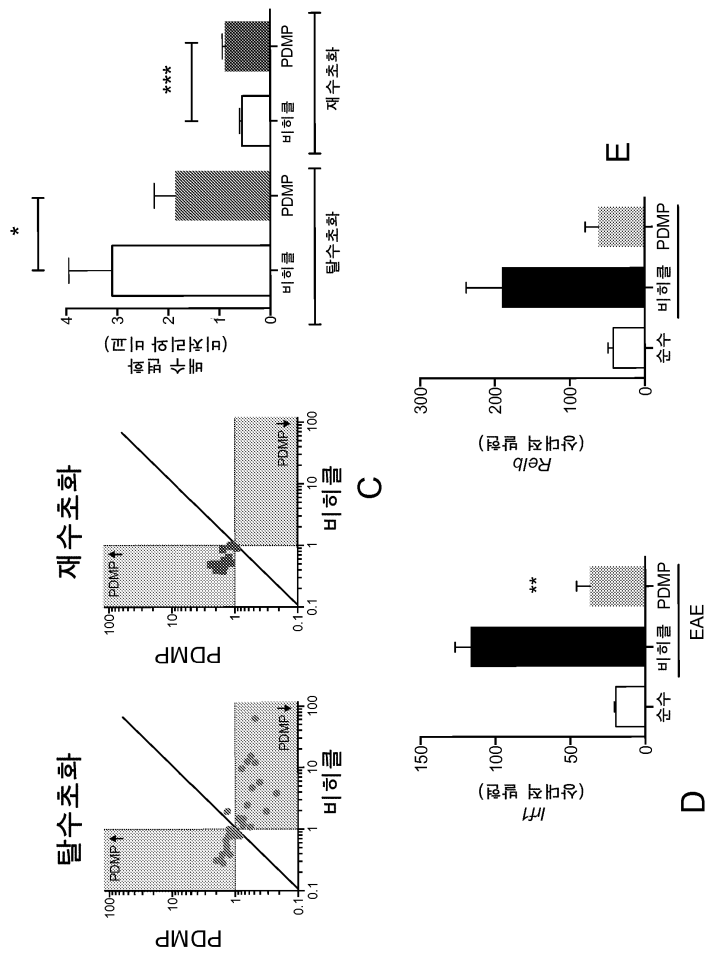


도면2b

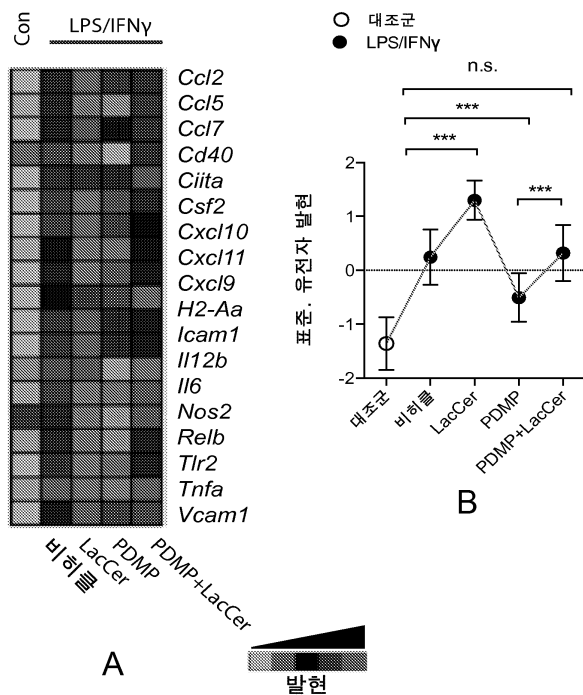


B

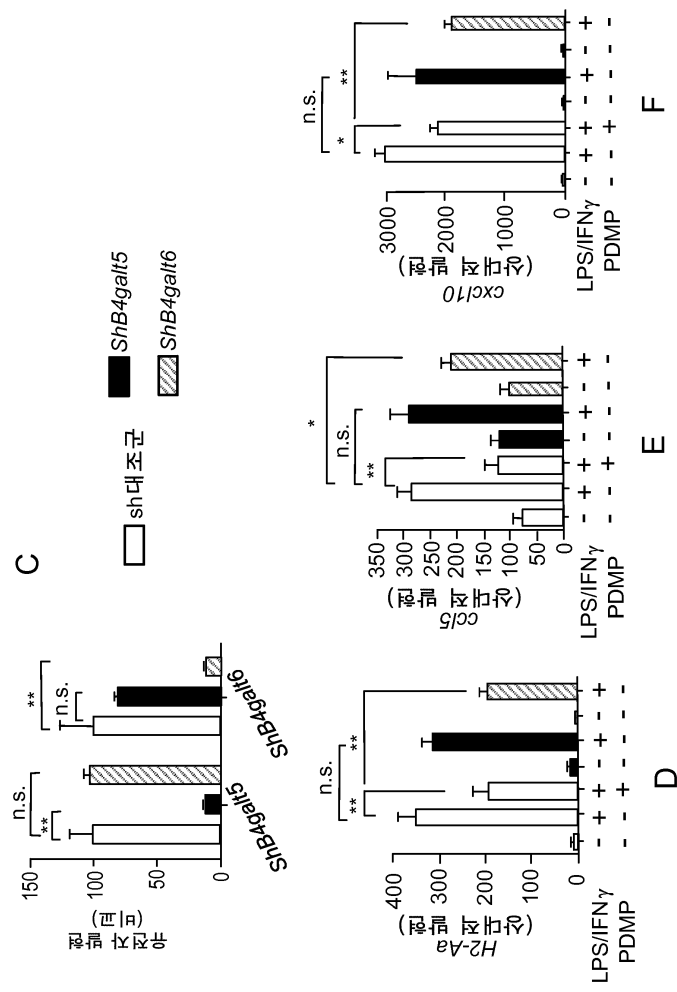
도면2c



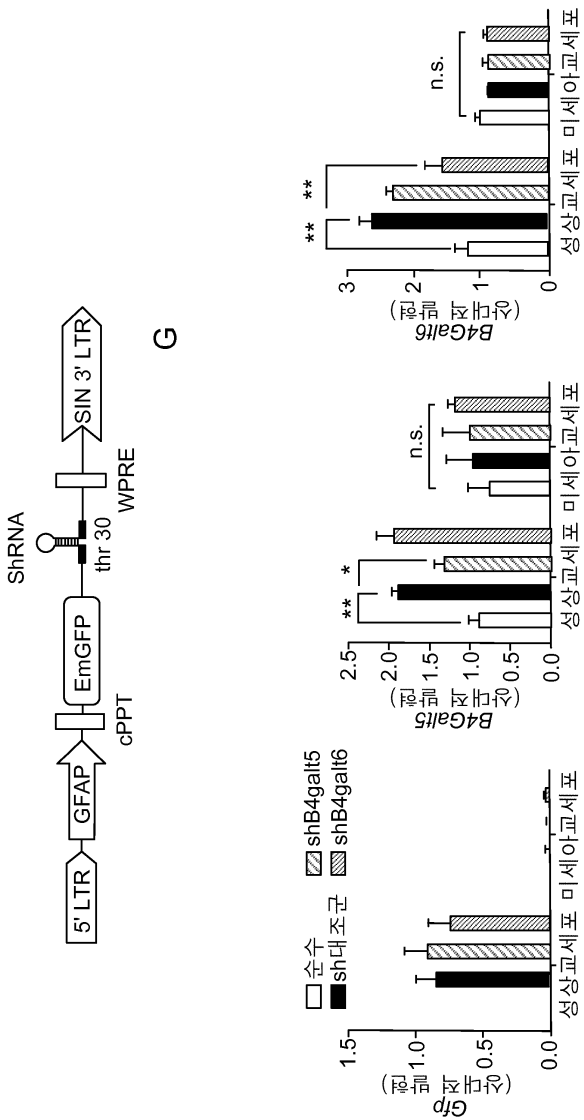
도면3a



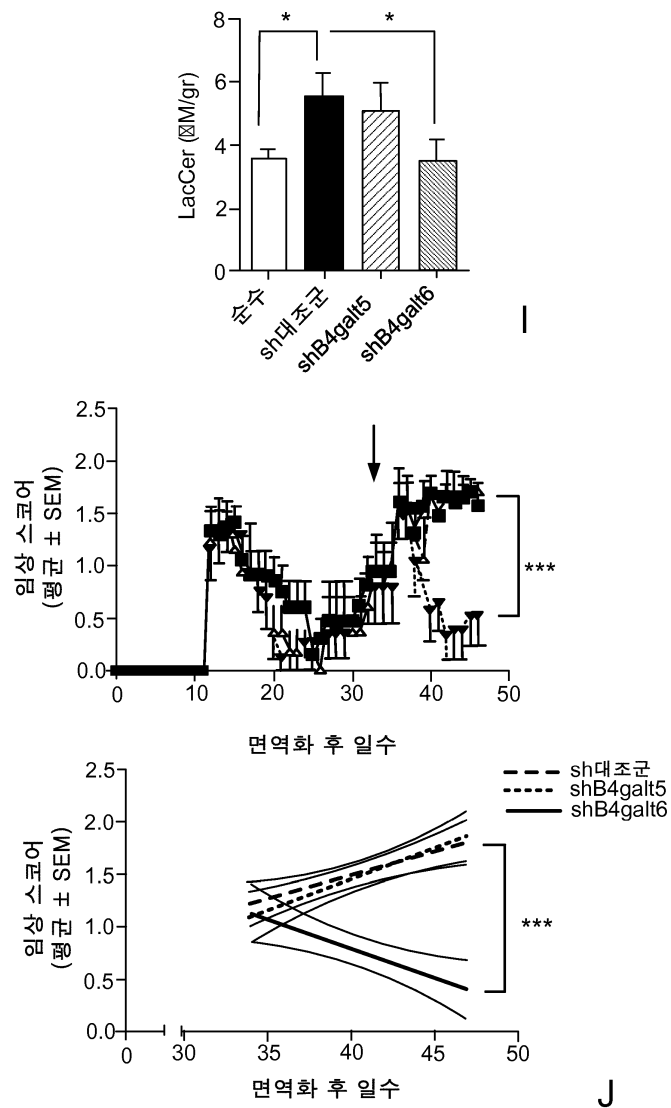
도면3b



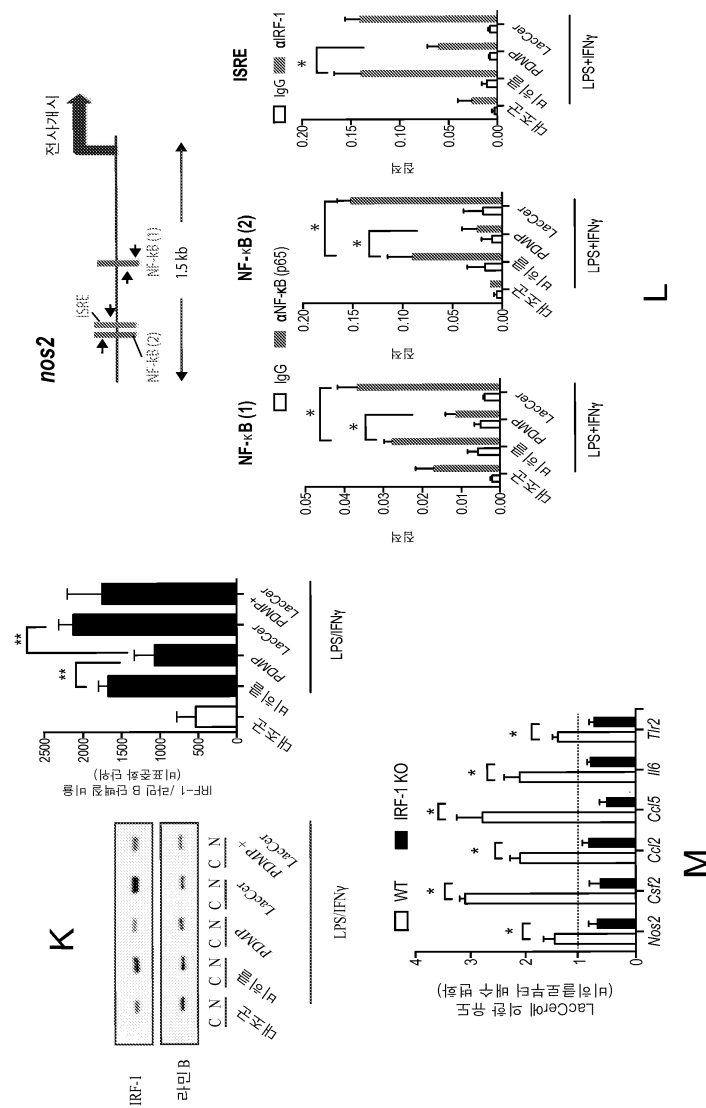
도면3c



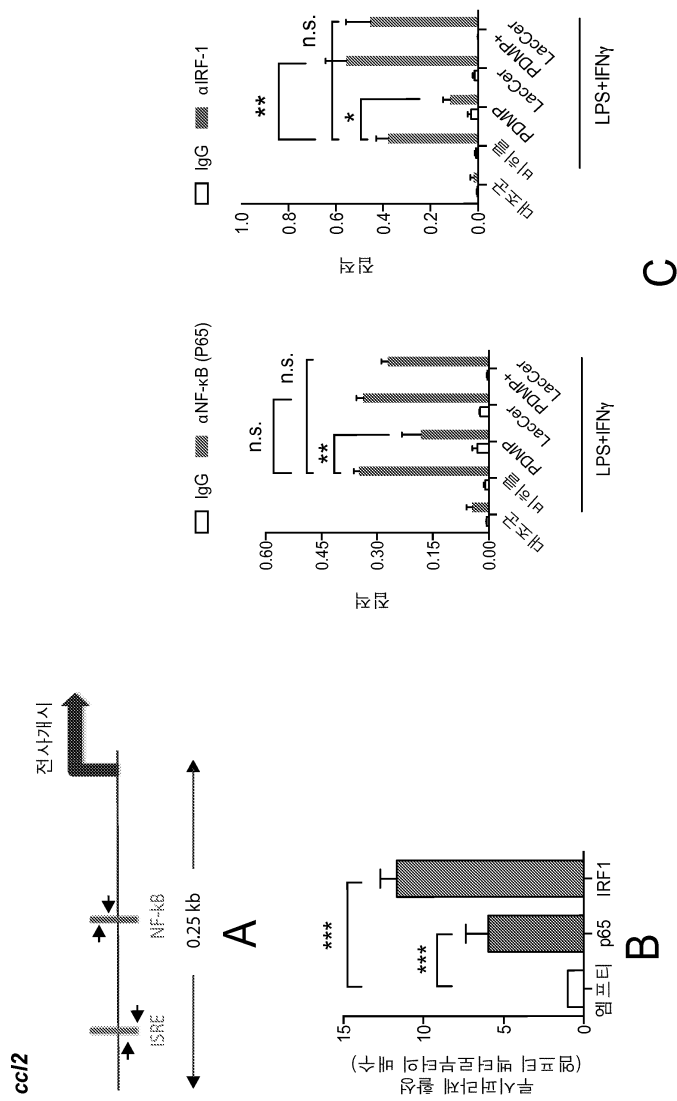
도면3d



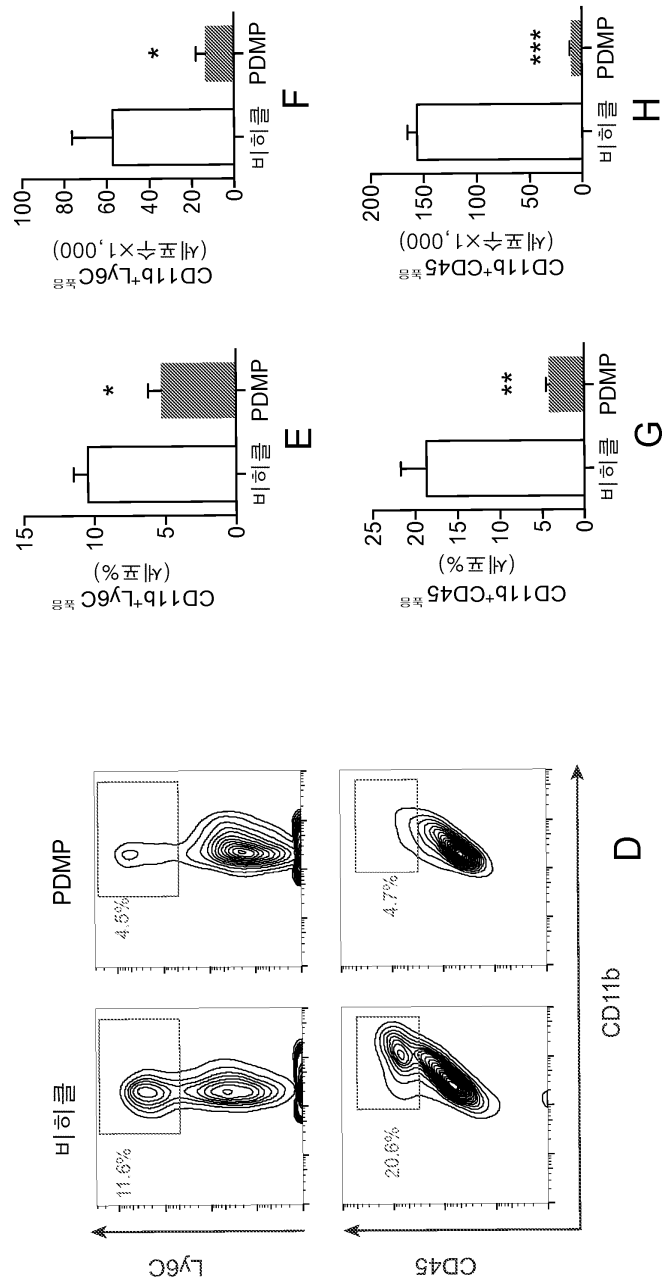
도면3e



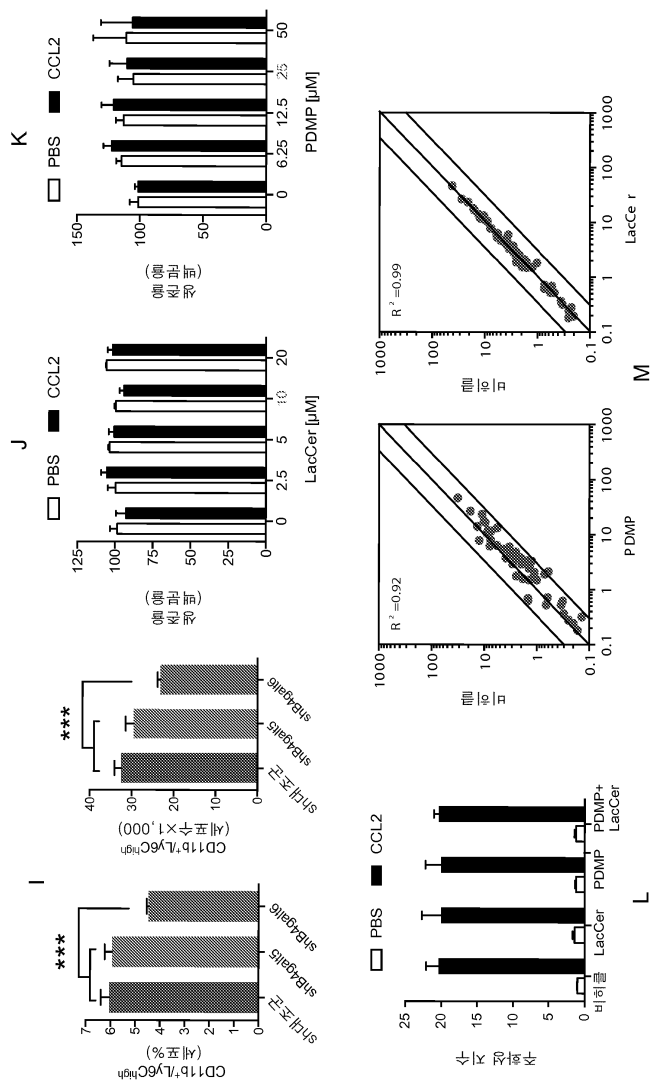
도면4a



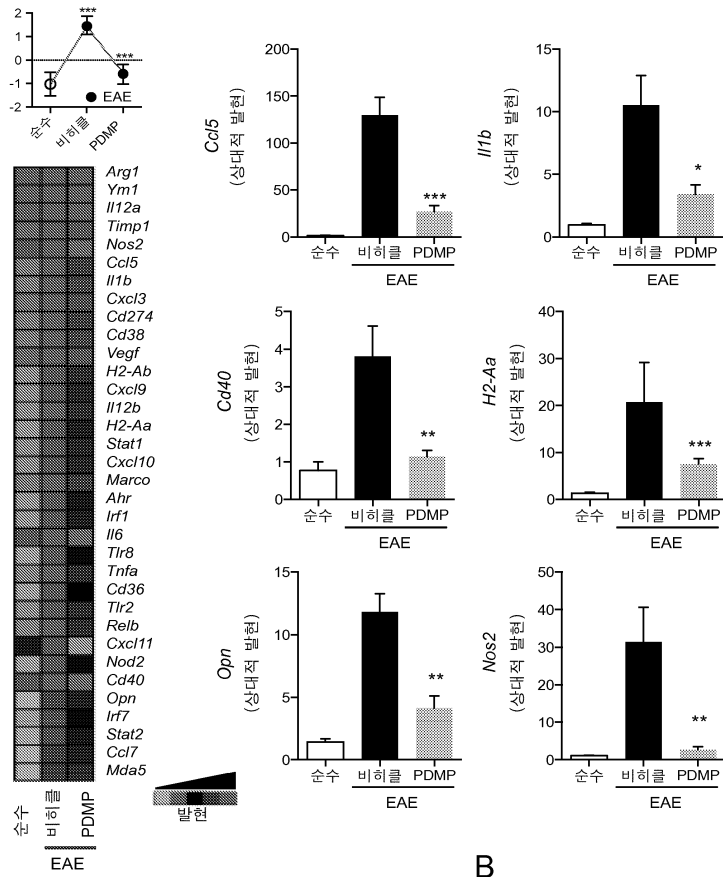
도면4b



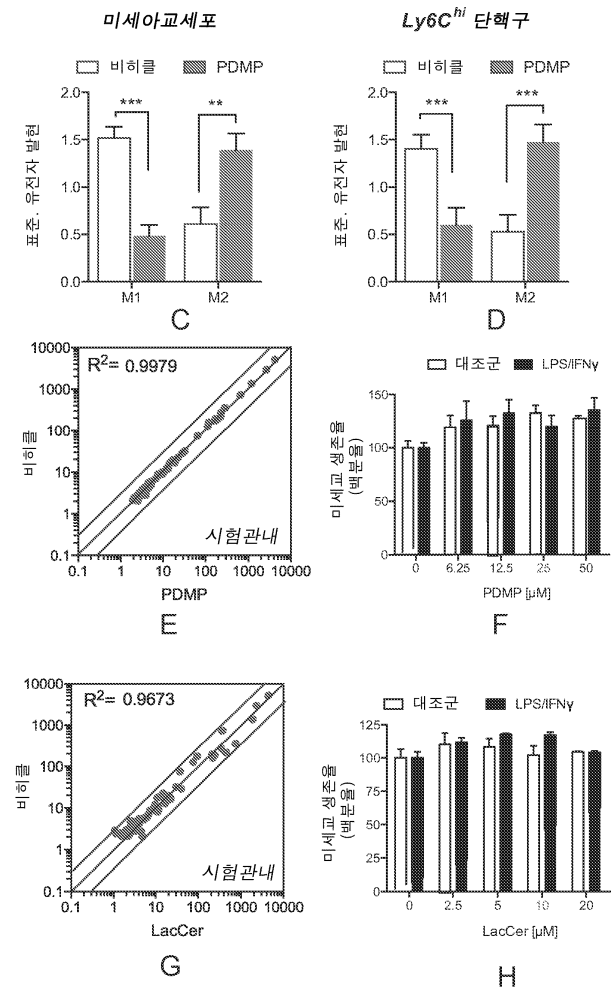
도면4c



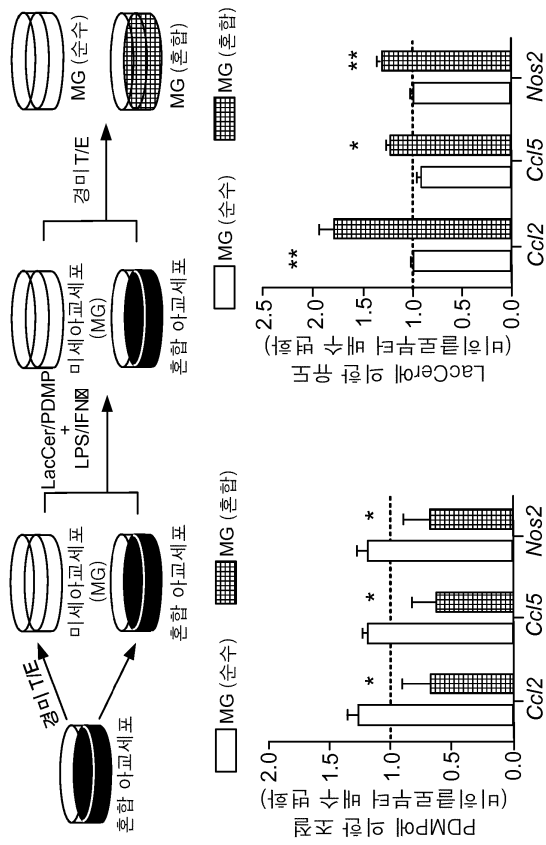
도면5a



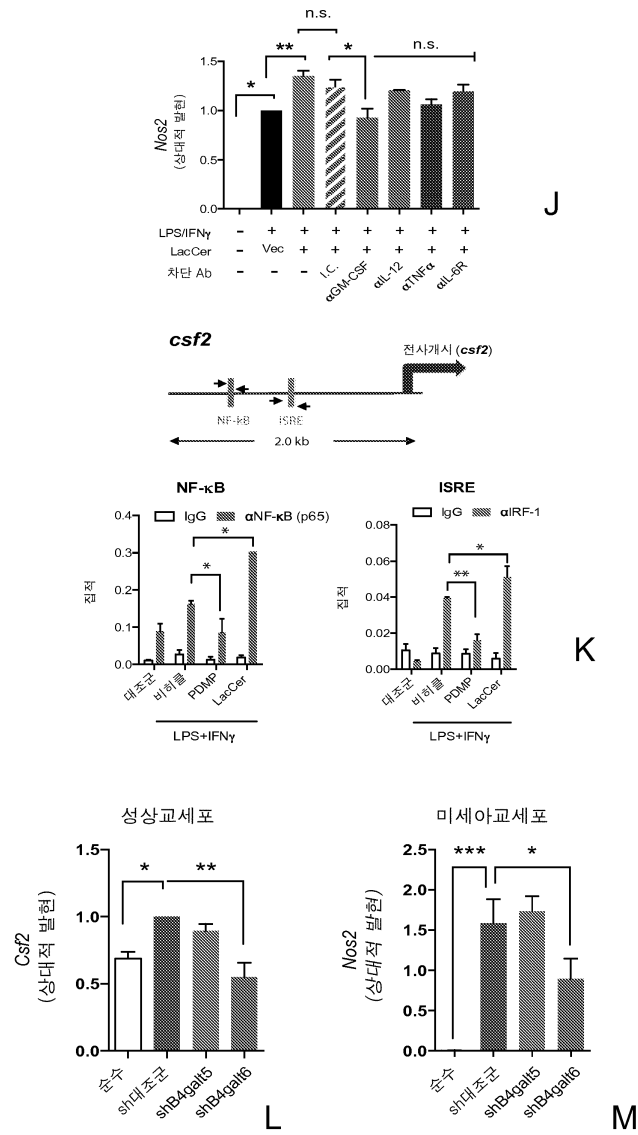
도면5b



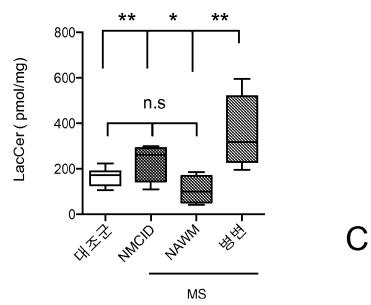
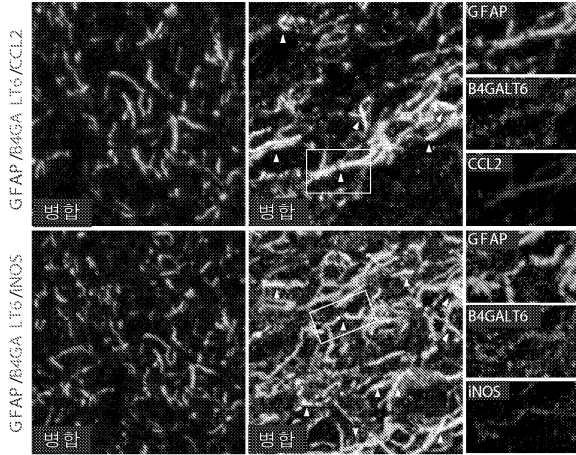
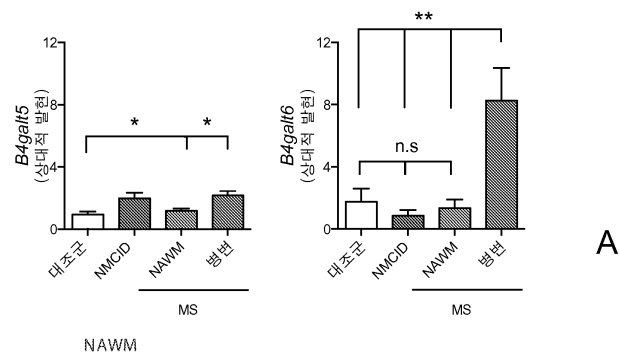
도면5c



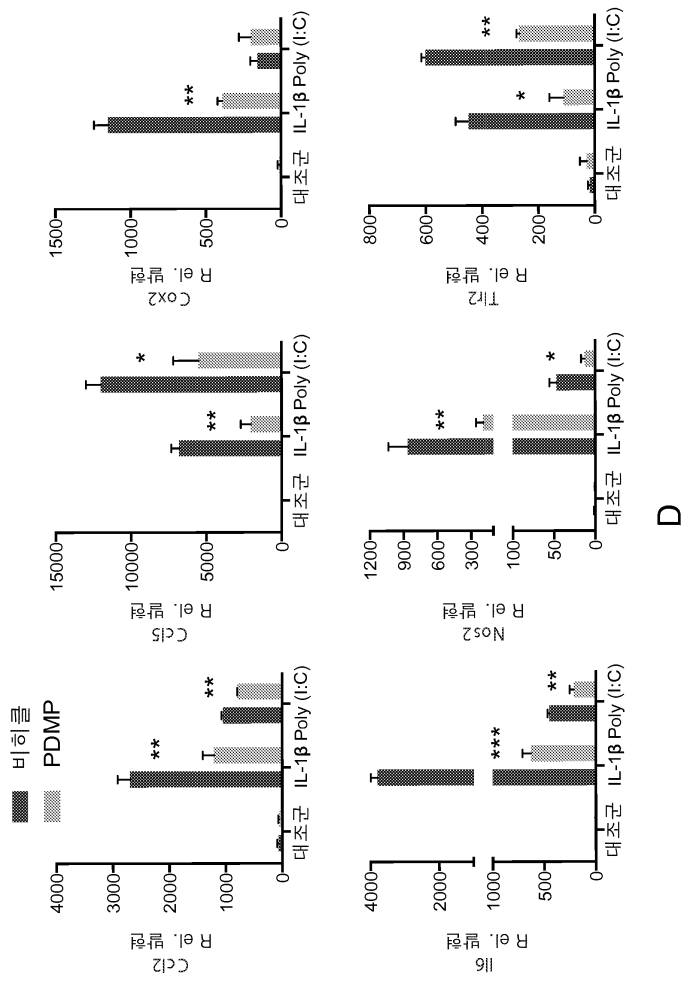
도면5d



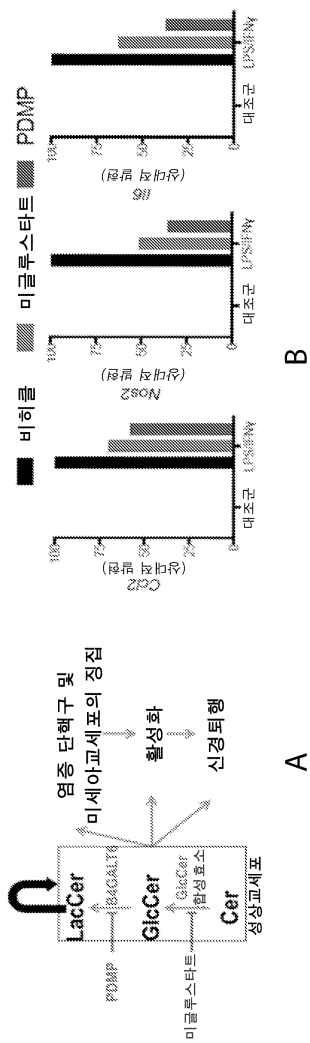
도면6a



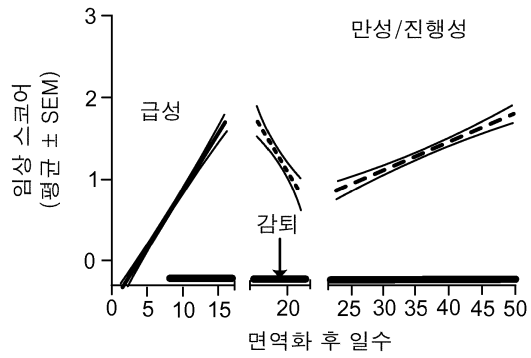
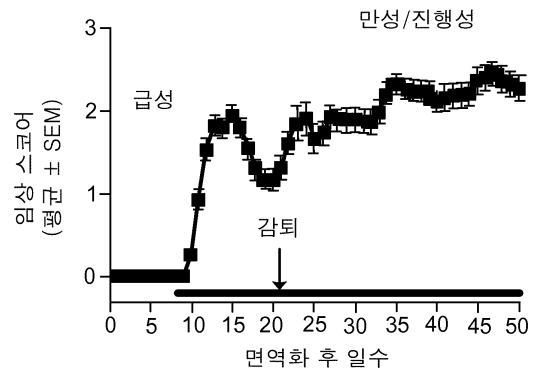
도면6b



도면7



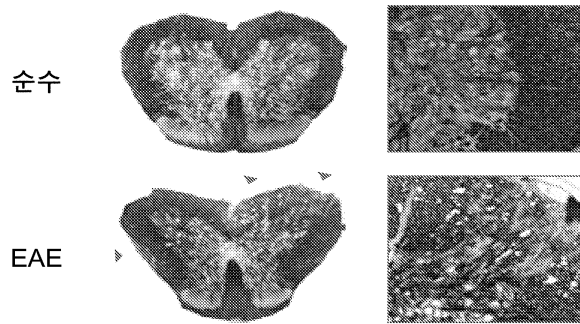
도면8a



A

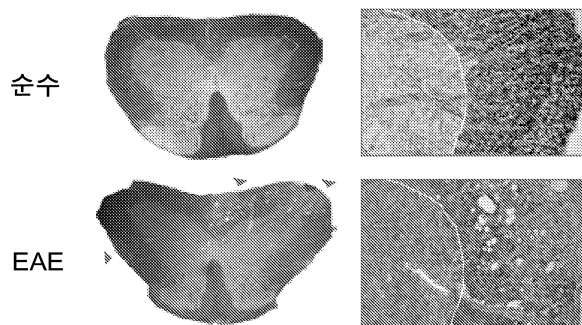
도면8b

신경돌기 밀도  
(빌쇼브스키 은 염색)



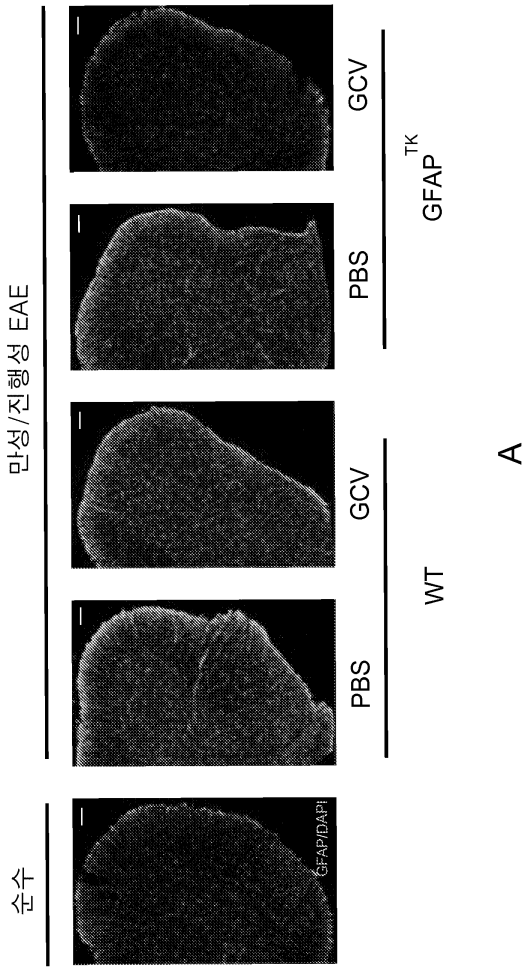
B

미엘린 함량  
(룩솔 패스트 블루 염색)

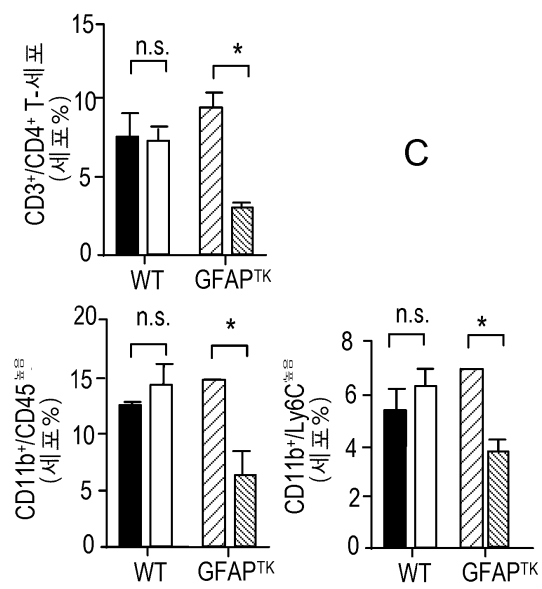
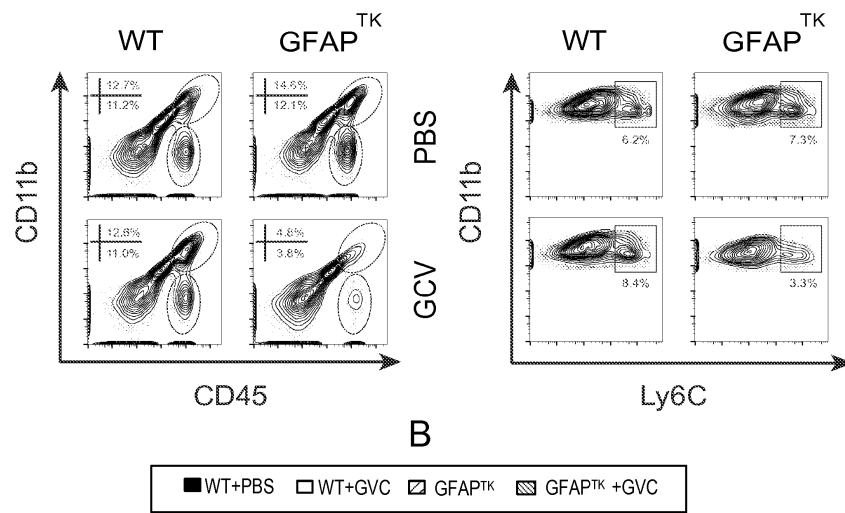


C

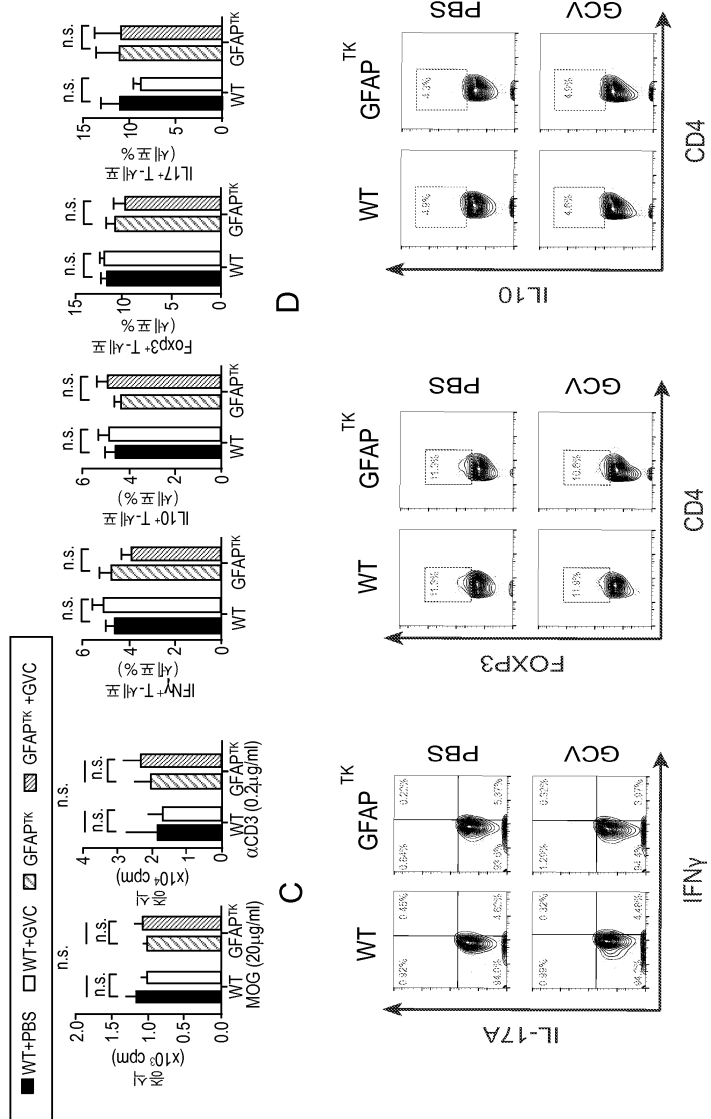
도면9a



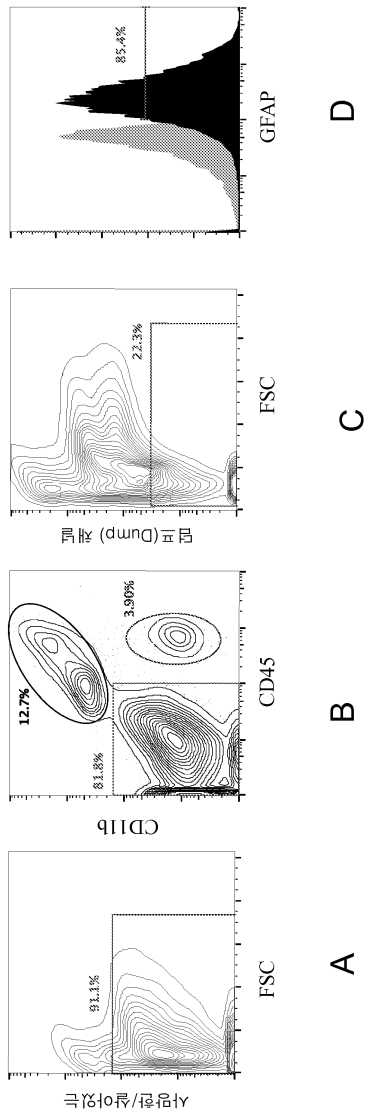
도면9b



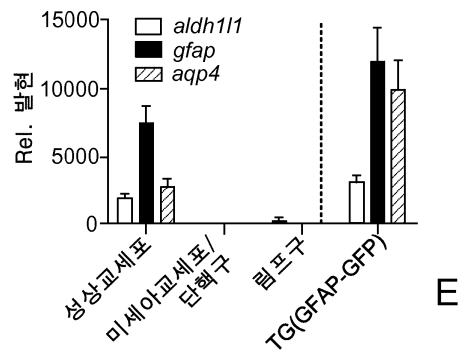
도면9c



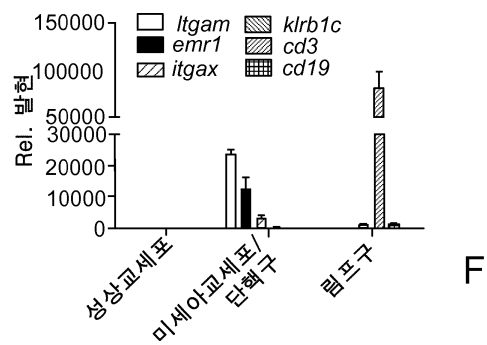
도면10a



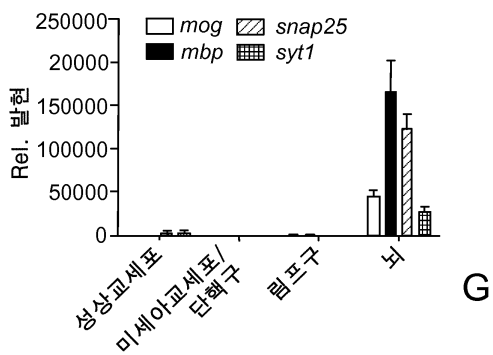
도면10b



E

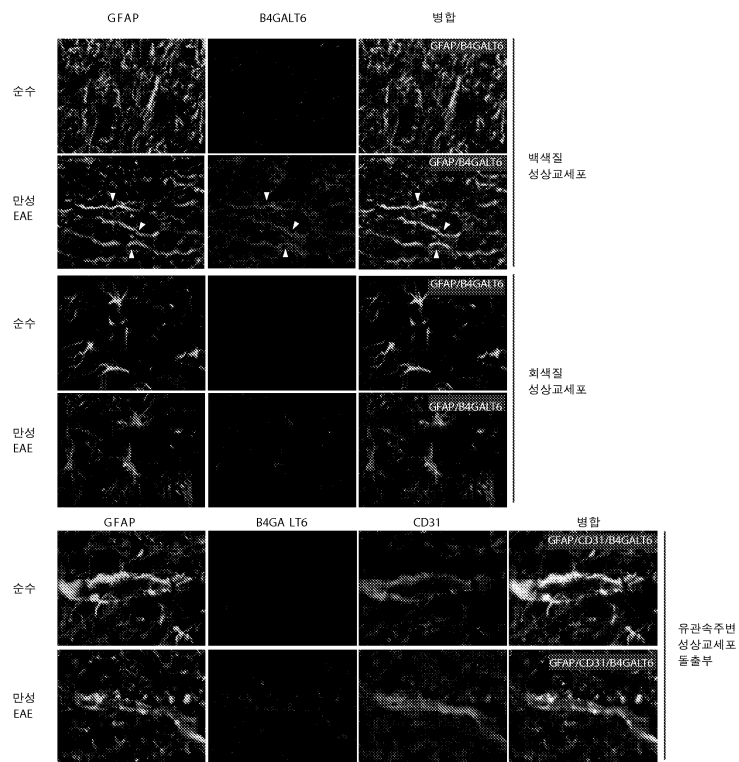


F



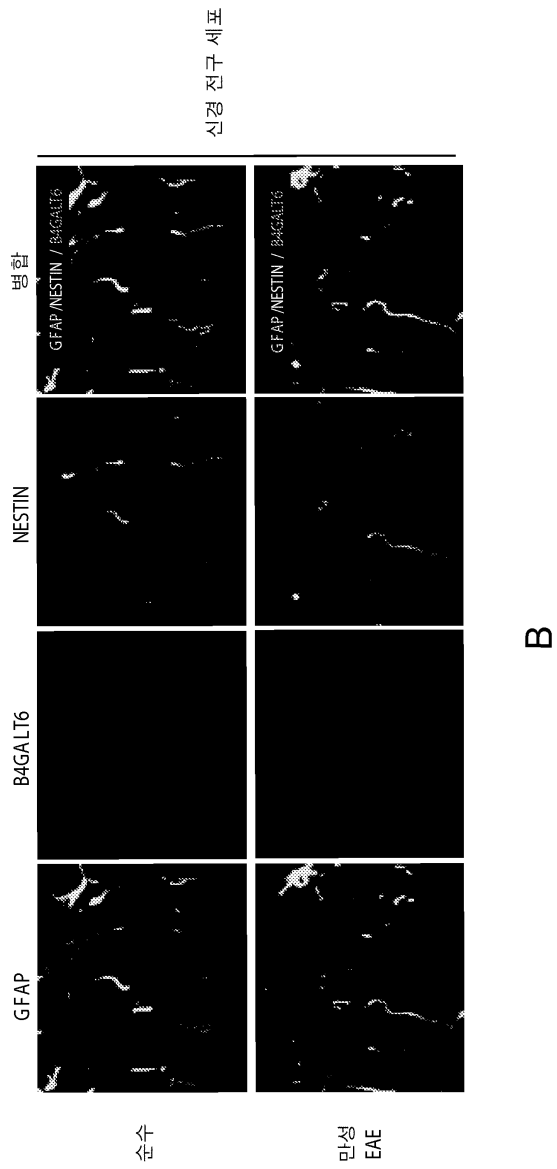
G

도면11a



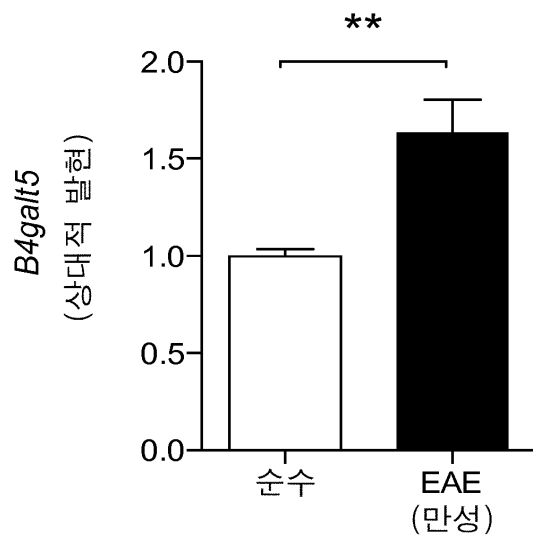
A

도면11b



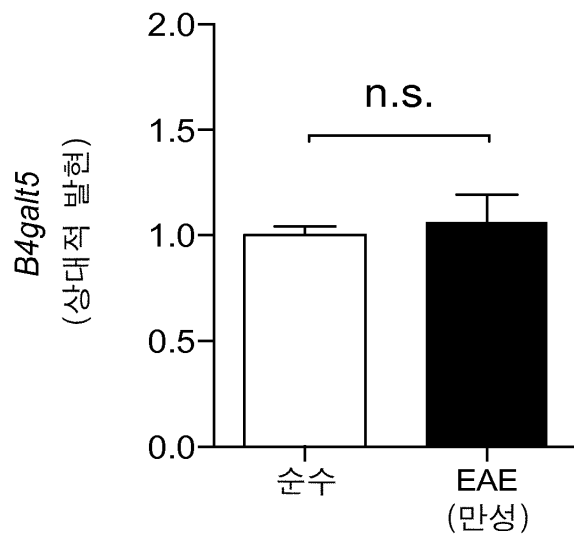
도면11c

### 성상교세포



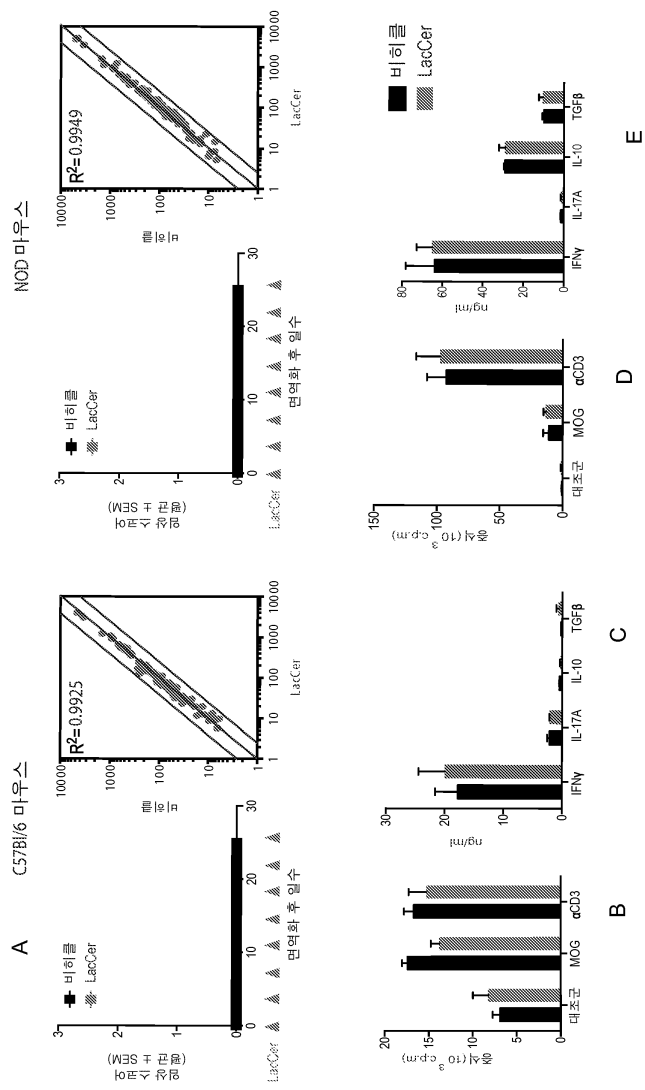
C

### 미세아교세포

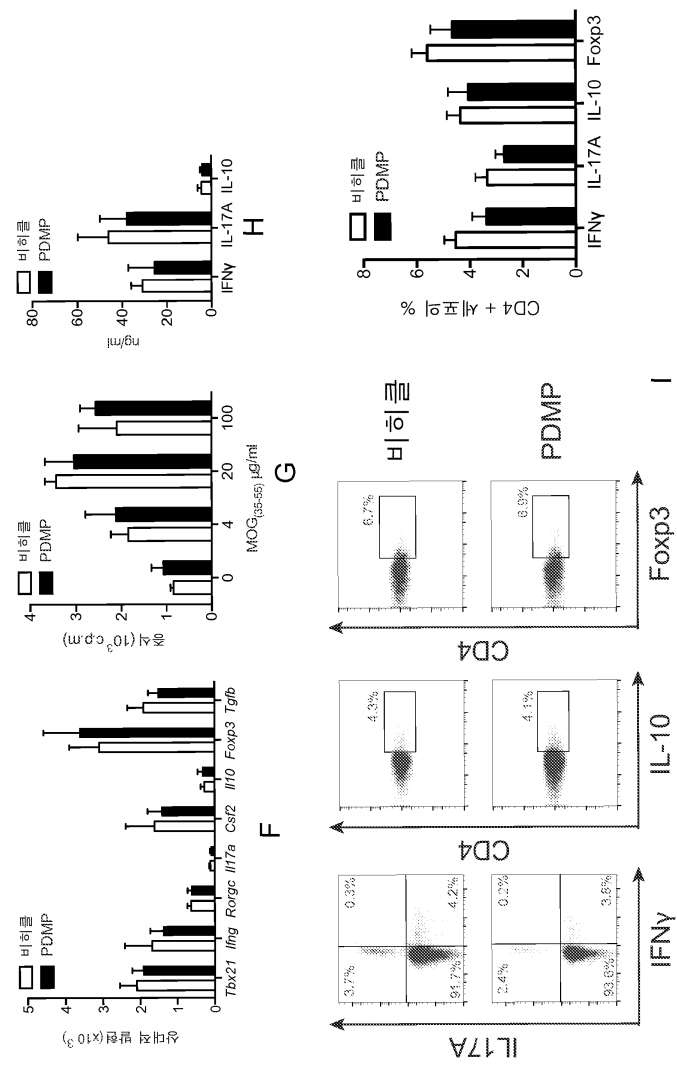


D

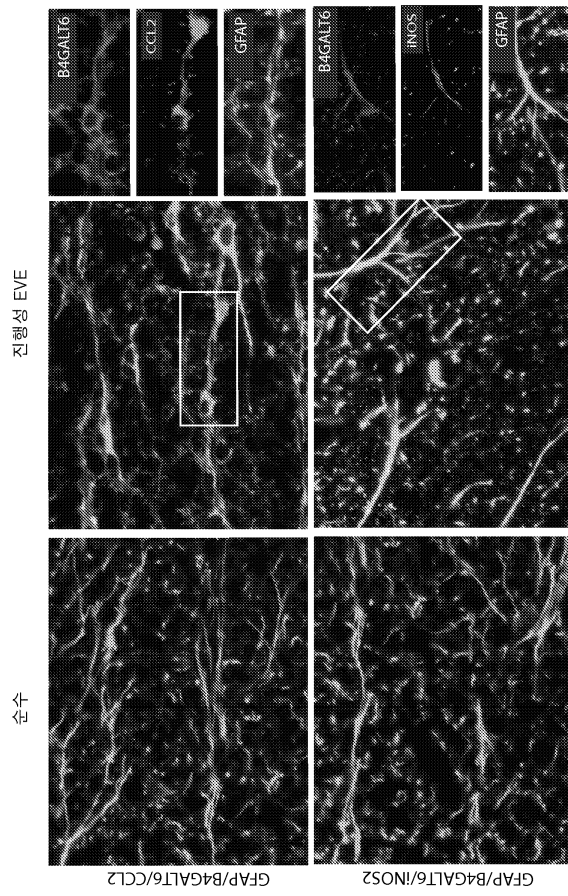
도면12a



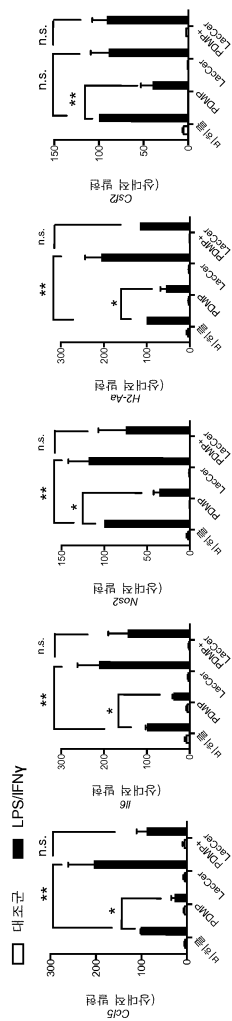
도면12b



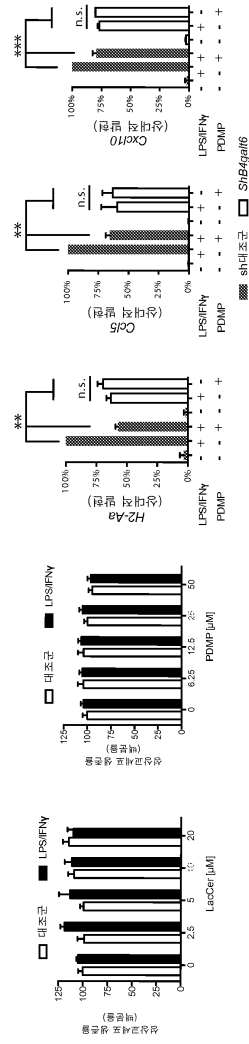
도면13



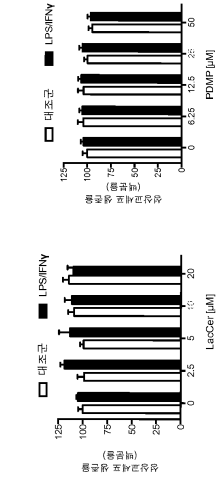
도면14a



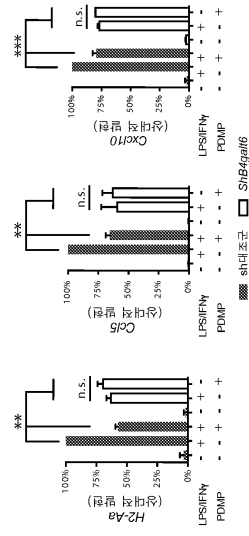
A



B

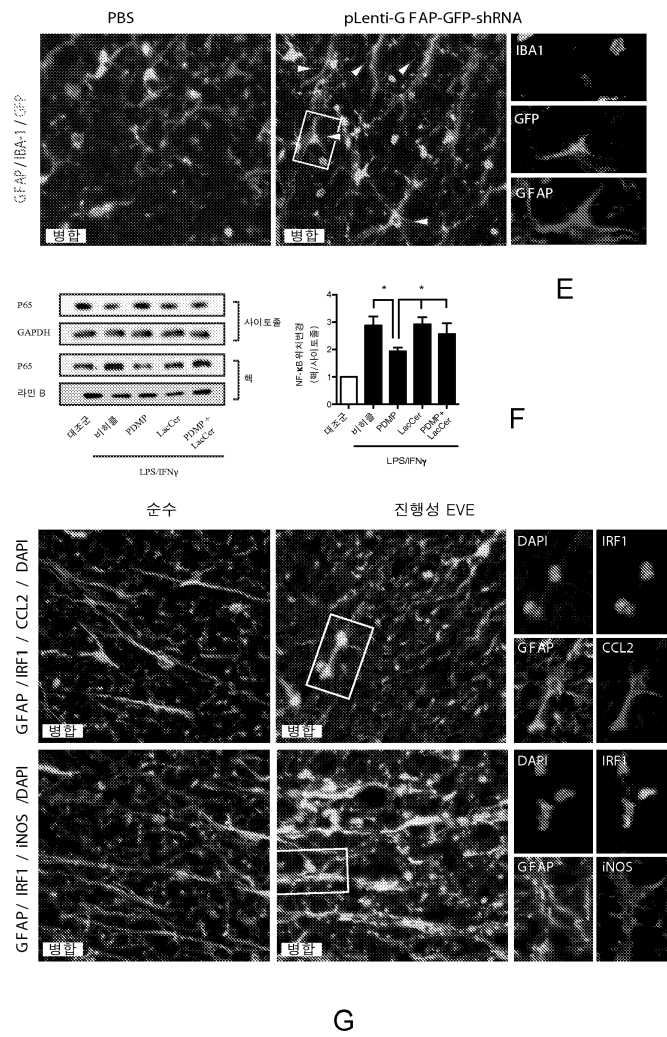


C

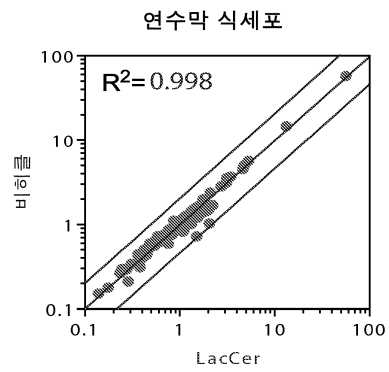


D

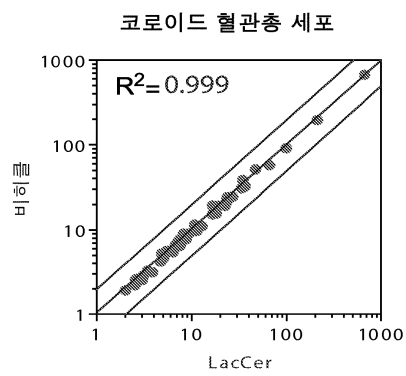
도면14b



도면15

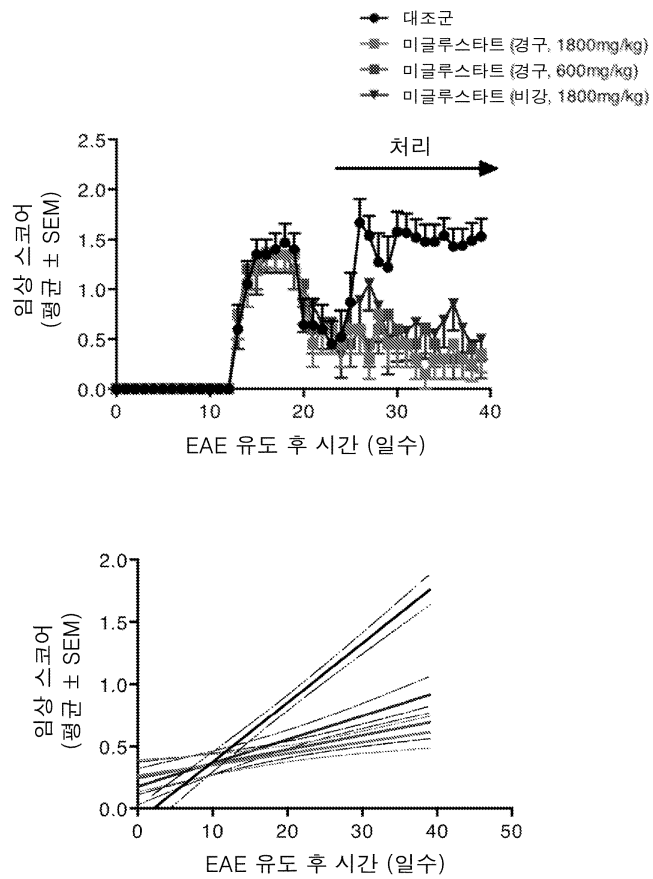


A

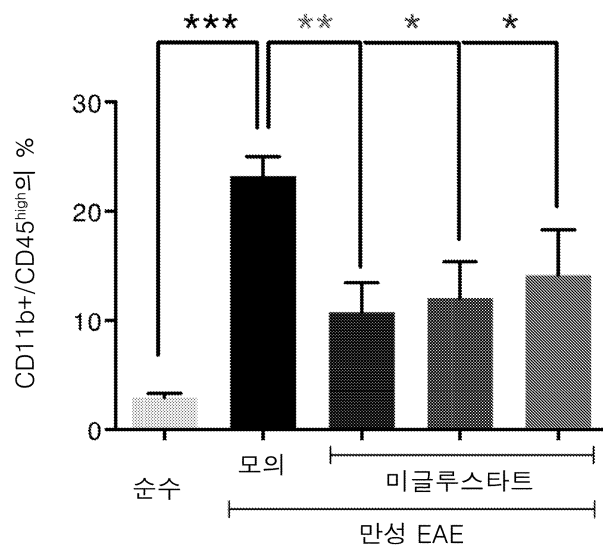


B

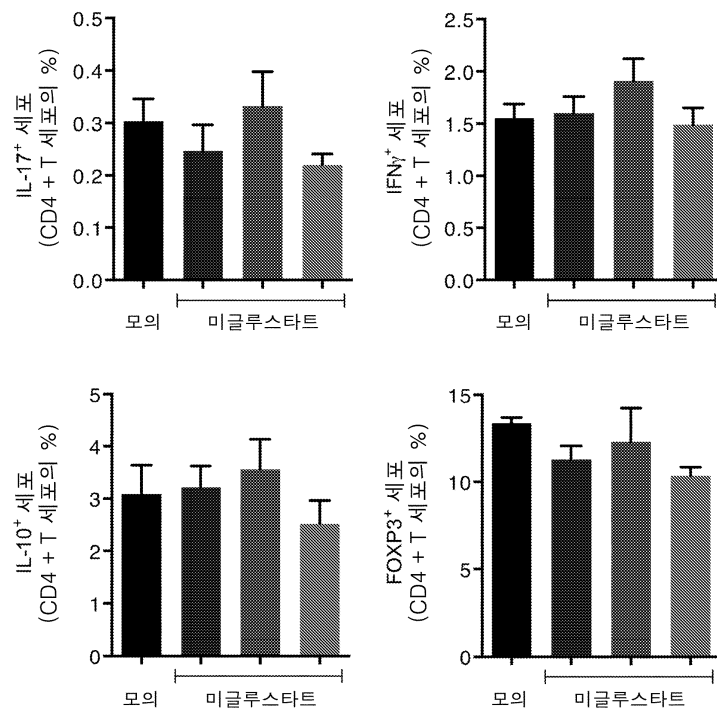
도면16



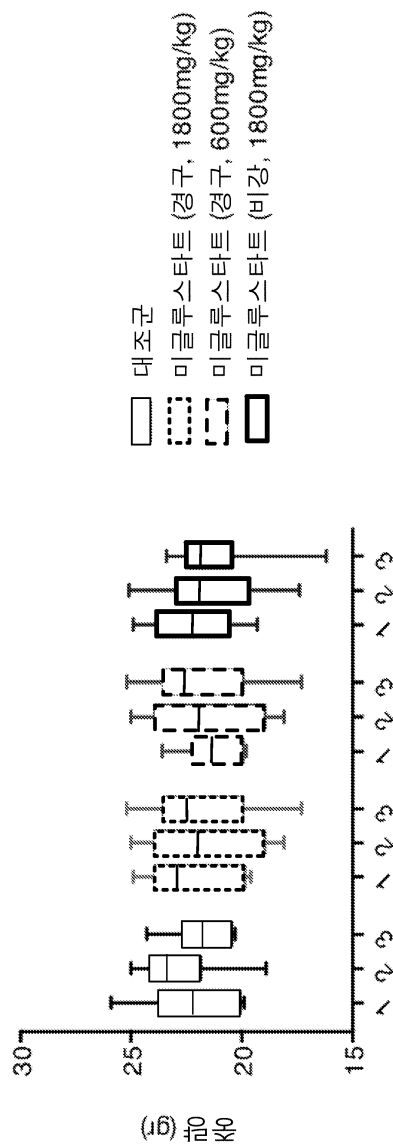
도면17



도면18



도면19



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> The Brigham and Women's Hospital, Inc.

<120> Treating Neurodegenerative Disease

<130> 40175-0004W01

<140> PCT/US2014/070099

<141> 2014-12-12

<150> US 61/963,738

<151> 2013-12-12

<150> US 62/049,813

<151> 2014-09-12

<160> 16

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 1

Ser Asp Val Tyr Cys Glu Val Cys Glu Phe Leu Val Lys Glu Val Thr

1 5 10 15

Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys Thr Glu Lys Glu Ile Leu Asp Ala Phe

20 25 30

Asp Lys Met Cys Ser Lys Leu Pro Lys Ser Leu Ser Glu Glu Cys Gln

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Pro Glu Leu Val Cys Ser Met Leu His Leu Cys Ser Gly

65 70 75 80

<210> 2

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically generated shRNA

<400> 2

gcagcctgaa tgactcagat tctcgagaat ctgagtcatt caggctgc 48

<210> 3

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically generated shRNA

<400> 3

cgatggactg aacaatttat tctcgagaat aaattgttca gtccacg 47

<210> 4  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetically generated shRNA  
 <400> 4  
 gcgcgatagc gctaataatt tctcgagaaa ttattagcgc tatcgcg 48

<210> 5  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetically generated primer  
 <400> 5  
 cagctaaata tctctcccga agg 23

<210> 6  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetically generated primer  
 <400> 6  
 catagatgcc cacagtcac 20

<210> 7  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetically generated primer  
 <400> 7  
 ctgccaattc ttccctcttt c 21

<210> 8

<211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetically generated primer  
 <400> 8  
 gtgggttgga atttggattt t 21  
 <210> 9  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetically generated primer  
 <400> 9  
 gaccagatgg gtggagtgc c 21  
 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetically generated primer  
 <400> 10  
 agccacacgc ttctggttc 20  
  
 <210> 11  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetically generated primer  
 <400> 11  
 gctttcgagg gtcagataac a 21  
 <210> 12  
 <211> 18  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically generated primer

<400> 12

cacacgcttg ggctaaga 18

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically generated primer

<400> 13

cacagactag gagtgtccat ca 22

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically generated primer

<400> 14

gcagcagcca tcaggtatatt 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically generated primer

<400> 15

accatgcgaa gatgagtgga 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically generated primer

<400> 16

accatgcgaa gatgagtgga

20