



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0053971
(43) 공개일자 2014년05월08일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 38/17</i> (2006.01) <i>A61K 38/49</i> (2006.01)
 <i>A61P 9/10</i> (2006.01) <i>A61P 25/00</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2014-7001639</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2012년06월23일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2014년01월21일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/IB2012/053178</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2012/176172
 국제공개일자 2012년12월27일</p> <p>(30) 우선권주장
 61/501,117 2011년06월24일 미국(US)
 61/617,001 2012년03월28일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 노노 인코포레이티드
 캐나다 온타리오 토론토 스트라쓰 애브뉴 88 (우:
 엠8엑스 1알5)</p> <p>(72) 발명자
 타이미안스키, 마이클
 캐나다 엠8엑스 1알5 온타리오 토론토 스트라쓰
 애브뉴 88</p> <p>(74) 대리인
 특허법인 남앤드남</p> |
|---|--|

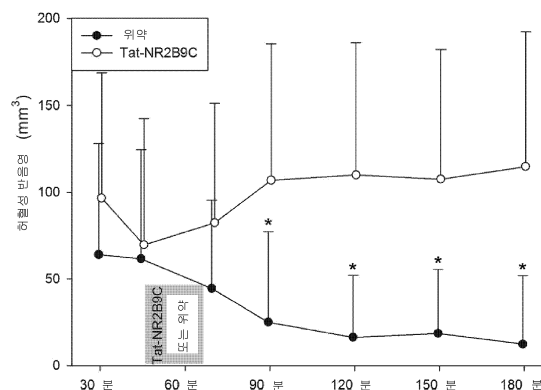
전체 청구항 수 : 총 35 항

(54) 발명의 명칭 허혈에 대한 PSD-95 억제제와의 조합 요법

(57) 요약

본 발명은 CNS에 영향을 미치거나 달리 영향을 미치는 허혈 질환, 예를 들어, 뇌졸중에 대한 조합 치료를 제공한다. 상기 치료는 PSD-95 억제제의 투여 및 재관류 요법을 수행(예를 들어, tPA의 투여에 의함)하는 것을 포함한다. 재관류 요법과 조합된 PSD-95 억제제의 투여는 재관류 요법의 효능을 증가시키고/시키거나 허혈의 발생 후의 시간이 지남에 따른 재관류 요법의 효능에서의 감소를 늦춰, 재관류 요법이 제공될 수 있는 윈도우를 연장시킨다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

허혈을 갖거나 허혈의 위험이 있는 피검체에 PSD-95 억제제를 투여하는 단계, 및 피검체에 대해 재관류 요법을 수행하는 단계를 포함하는, 중추신경계에 대한 허혈의 손상 효과를 치료하는 방법으로서, 상기 PSD-95 억제제 및 재관류 요법이 피검체의 중추신경계에 대한 허혈의 손상 효과를 치료하는, 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, PSD-95 억제제가 재관류 요법이 수행되기 전에 투여되는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, PSD-95-억제제가 허혈의 발생 전에 허혈의 위험이 있는 피검체에 투여되고, 재관류 요법이 허혈의 발생 후에 수행되는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 허혈의 발생 후에 PSD-95-억제제가 투여되고, 재관류 요법이 수행되는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 허혈이 대뇌 허혈인 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 피검체가 뇌졸중을 갖는 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 허혈이 CNS로의 혈류 또는 CNS로부터의 혈류를 억제함으로써 중추신경계에 영향을 미치는 심장, 폐 또는 주요 사지(major limb) 허혈인 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 피검체가 PSD-95 억제제의 투여와 재관류 요법의 수행 사이에 대뇌 허혈의 존재 및/또는 대뇌 출혈의 부재에 대해 시험되는 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 피검체가 PSD-95 억제제의 투여와 재관류 요법의 수행 사이에 출혈의 존재 또는 출혈의 위험에 대해 평가되는 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 평가가 PET 스캔, CAT 스캔 또는 MRI의 수행, 또는 피검체의 병력의 재조사 또는 허혈의 지표를 제공하는 하나 이상의 바이오마커의 사용을 포함하는 방법.

청구항 11

제 1항에 있어서, PSD-95-억제제가 펩티드인 방법.

청구항 12

제 1항에 있어서, PSD-95-억제제가 tat-NR2B9c인 방법.

청구항 13

제 1항에 있어서, 재관류가 혈전용해제를 투여함으로써 수행되는 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 혈전용해제가 플라스미노겐 활성화제인 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 혈전용해제가 tPA인 방법.

청구항 16

제 13항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 있어서, PSD-95 투여와 재관류 요법 사이의 간격이 30분 내지 6시간인 방법.

청구항 17

제 13항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서, 혈전용해제가 손상된 혈류 부위로의 국소 투여에 의해 투여되는 방법.

청구항 18

제 1항에 있어서, 재관류 요법이 기계적 재관류인 방법.

청구항 19

제 1항에 있어서, 재관류 요법이 허혈의 발생 3시간 초과 후에 수행되는 방법.

청구항 20

제 1항에 있어서, 재관류 요법이 허혈의 발생 4.5시간 초과 후에 수행되는 방법.

청구항 21

제 1항에 있어서, 재관류 요법이 허혈의 발생 4.5시간 초과 후 및 24시간 미만 후에 수행되는 방법.

청구항 22

제 1항에 있어서, 재관류 요법이 CT, MRI 또는 PET 분석에 의해 나타나는 마와 같은 완전 경색의 결손, 허혈성 반음영(ischemic penumbra) 및 출혈의 결손을 기초로 하여 재관류에 적절한 피검체를 결정한 후에 수행되는 방법.

청구항 23

제 22항에 있어서, 재관류 요법이 허혈의 발생 적어도 12시간 후 또는 적어도 24시간 후에 수행되는 방법.

청구항 24

제 1항에 있어서, 재관류 요법이 허혈의 발생 275-690분 후에 수행되는 방법.

청구항 25

제 11항에 있어서, 펩티드가 내재화 펩티드에 연결되거나, 지질화됨으로써 세포막 또는 혈액뇌장벽을 가로지르는 펩티드의 통과가 촉진되는 방법.

청구항 26

제 25항에 있어서, 펩티드가 미리스토일화된 펩티드인 방법.

청구항 27

제 26항에 있어서, 펩티드가 KLSSIESDV(SEQ ID NO:5) 또는 KLSSIETDV(SEQ ID NO:43)로 구성되거나, 이들을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 방법.

청구항 28

제 26항 또는 제 27항에 있어서, 미리스토일화가 펩티드의 N-말단에서 이루어지는 방법.

청구항 29

피검체에 PSD-95 억제제를 투여하는 단계로서, 이러한 피검체가 재관류 요법의 허용되지 않는 부작용 위험에 대해 분석되는 단계, 및 허용되지 않는 부작용 위험이 없는 피검체에서 재관류 요법이 수행되고, 허용되지 않는 부작용 위험을 갖는 피검체에서 재관류 요법이 수행되지 않는 단계를 포함하는, 허혈의 징후(들) 및/또는 증상(들)을 나타내는 피검체 집단을 치료하는 방법.

청구항 30

제 29항에 있어서, 허용되지 않는 부작용 위험의 분석이 출혈의 존재 또는 출혈의 위험에 대한 분석을 포함하는 방법.

청구항 31

제 29항에 있어서, 피검체가 뇌졸중의 징후(들) 및/또는 증상(들)을 나타내고, 분석이 허혈성 뇌졸중과 출혈성 뇌졸중을 구별하는 뇌 스캔을 수행하는 것을 포함하고, 허혈성 뇌졸중을 갖는 피검체에서 재관류 요법이 수행되고, 출혈성 뇌졸중을 갖는 피검체에서 재관류 요법이 수행되지 않는 방법.

청구항 32

재관류 요법이 또한 수행되는 피검체의 중추신경계에 대한 허혈의 손상 효과를 치료하는데 사용하기 위한 NMDAR 2B에 결합하는 PSD-95를 억제하는 작용제로서, 상기 재관류 요법 및 작용제가 중추신경계에 대한 허혈의 손상 효과를 치료하는, 작용제.

청구항 33

NMDAR 2B, 2A 또는 nNOS에 결합하는 PSD-95를 억제하는 작용제가 또한 투여되는 피검체에서의 재관류 요법에 사용하기 위한 작용제 또는 장치로서, 상기 재관류 요법 및 작용제가 중추신경계에 대한 허혈의 손상 효과를 치료하는, 작용제 또는 장치.

청구항 34

제 33항에 있어서, 코일, 스텐트(stent), 풍선(예를 들어, 대동맥내 풍선, 펌프), 카테터(catheter)인 작용제 또는 장치.

청구항 35

제 33항에 있어서, 혈전용해제, 혈관확장제 또는 고혈압제인 작용제 또는 장치.

명세서

기술 분야

[0001] 관련 출원의 전후-참조

[0002] 본 출원은 정규출원이고, 2011년 6월 24일에 출원된 US 61/501,117호, 및 2012년 3월 28일에 출원된 US 61/617,001호의 이익을 주장하며, 상기 둘 모두의 출원은 모든 목적상 이들의 전체내용이 참조로서 본원에 포함된다.

배경 기술

[0003] 배경

[0004] 허혈성 뇌졸중은 사망 및 심각한 장애의 흔한 원인이며, 이는 보통 두개내 공동 및/또는 뇌 내의 혈관의 봉쇄 또는 두개내 공동 및/또는 뇌에서의 혈관의 봉쇄를 발생시키는 혈관의 봉쇄에 의해 야기된다. 소수의 효과적인 치료가 이용가능하다. 한 치료는 당해 혈관 내의 봉쇄를 제거하는 것으로 구성된다. 다른 치료는 뇌에 대한

혈압을 증가시킴으로써 뇌 내의 관류 압력을 변경시키는 것으로 구성된다. 혈관의 봉쇄는 일정 범위의 기계적 장치, 또는 정맥내 또는 동맥내로 전달되는 "응괴 용해 제제(clot busting agent)"를 이용하여 제거될 수 있다. 상기 응괴 용해 제제에는 허혈을 야기시키는 색전을 용해시켜, 이에 따라 뇌로의 혈류를 회복시키기 위해 일부 뇌졸중 피검체에 투여되는 혈전용해제인 조직 플라스미노겐 인자(tPA), 및 재조합 tPA, 예를 들어, 알테플라제(Alteplase), 레테플라제(reteplase) 및 테넥테플라제(tenecteplase)가 있다. 응괴를 파괴하는 다른 혈전용해 약물은 스트렙토키나제(streptokinase), 유로키나제(urokinase) 및 데스모타플라제(desmotaplastase)를 포함한다. 기계적 재관류 장치로는, 동맥내 카테터(catheter), 풍선, 스텐트(stent), 및 다양한 응괴 복구 장치, 예를 들어, Penumbra System Reperfusion Catheter가 있다. 뇌에서 관류 압력을 변경시키는 치료에는 뇌 내의 동맥압을 증가시키는 장치, 예를 들어, 대뇌의 동맥, 예를 들어, 대동맥에서 팽창됨으로써 다른 신체 영역으로부터의 혈류를 전환시키고 뇌 동맥 관류를 증가시킬 수 있는 풍선, 예를 들어, CoAxia NeuroFlo™ 카테터 장치가 있다. 집합적으로, 상기 방법들은 대뇌 허혈의 발생시 또는 대뇌 허혈의 발생 후에 뇌 관류를 향상시키는 의학적 및 기계적 작용제(이하, 집합적으로 "재관류 요법")로서 고려될 수 있다.

[0005] 허혈의 발생 직후에 제공된 tPA 및 다른 재관류 요법은 허혈성 뇌졸중으로부터의 사망 또는 장애를 감소시키는 데 효과적이거나, 뇌졸중을 나타내는 피검체의 약 3% 미만이 tPA 또는 다른 재관류 요법으로 치료된다. tPA 및 다른 재관류 요법의 낮은 사용빈도는 부분적으로는 뇌 출혈을 갖거나 뇌 출혈이 발생할 상승된 위험이 있는 환자에게 투여되는 경우 사망의 위험으로 인한 것이다. 뇌졸중은 허혈 또는 출혈의 결과일 수 있다. 항상, 병원에 피검체를 데려가고, 최초 진단에 이르고, 허혈성 뇌졸중과 출혈성 뇌졸중을 구별하기 위해 뇌 스캔을 수행하는데 필요한 시간은 피검체를 tPA 또는 재관류 요법이 효과적일 수 있는 윈도우 밖에 두게 한다. 따라서, tPA 또는 다른 재관류 요법이 이로울 수 있는 많은 허혈성 뇌졸중 피검체가 상기 치료를 받지 못한다.

[0006] 뇌졸중 및 관련 질환에 대한 치료의 다양한 형태가 현재 임상 시험중이다(WO 2010144721호 및 문헌[Aarts et al., Science 298, 846-850 (2002)] 참조). 이러한 치료는 PSD-95를 억제하고, 이에 따라 N-메틸-D-아스파테이트 수용체(NMDAR) 및 신경 산화질소 신다제(nNOS)로의 결합을 붕괴시키고, 대뇌 허혈에 의해 유도되는 흥분독성을 감소시키는 작용제인 Tat-NR2B9c(NA-1)를 이용한다. 치료는 경색 크기 및 기능 결손을 감소시킨다.

발명의 내용

[0007] 도면의 간단한 설명

[0008] 도 1A, B, C, 및 D: 비-인간 영장류(NHP; A) 투여를 위한 프로토콜의 설명, 및 손상의 MRI 표시 영역에 대한 결과로서 발생된 확산 부피의 그래프. B. 4.5시간의 뇌졸중의 발생 48시간 후의 DWI MRI. C. 4.5시간의 뇌졸중의 발생 48시간 후의 T2 부피. D. 4.5시간의 뇌졸중의 발생 7일 후의 T2 부피.

[0009] 도 2A, B. A. 동물을 4.5시간의 MCAO에 적용시키고, Tat-NR2B9c 또는 위약으로 5분 이내에 처리하였다. 처리된 동물 및 대조군 동물에서의 MCAO 후의 DWI 고강도에서의 증가의 시간 경과. B. 다양한 시점에서의 뇌의 관류 및 MRI 이미지.

[0010] 도 3. 위약 또는 Tat-NR2B9c 동물에서의 반음영(penumbra) 미스매치의 일시적 발달.

[0011] 도 4A, B. Tat-NR2B9c는 세포내 ATP 고갈을 감소시키고, 산소-글루코스 결핍(OGD)에 의해 유도된 세포독성에 대한 마우스 피질 뉴런을 보호한다. (A) 프로피듐 아이오다이드 라벨링 방법에 의한 OGD 20시간 후에 측정된 세포 사멸의 분획. (B) 노르모식(normoxic) 대조군 샘플에 비한 %ATP 농도로서 표현되는, 화학발광 ATP 검출 검정에 의해 결정된 피질 뉴런으로부터의 세포내 ATP 농도.

[0012] 도 5: 뇌졸중 후 단일 용량으로 투여되는 경우, 자기공명영상(MRI)에 의해 평가되는 바와 같이, NA-1(Tat-NR2B9c)이 뇌에서 병변의 발달을 정지시킬 수 있음의 입증. 이러한 효능은 대뇌 혈류의 변형을 통해 작용하지 않는다.

[0013] 도 6: A: 기준선에서의 관류 결손의 부피. B: 30일에 걸친 DWI 및 T2 영상화에 의해 측정된 바와 같은 뇌졸중 부피의 분석. C: MCAO 24시간 후 위약 및 약물 처리된 동물에서 초래된 뇌졸중의 대표적 T2-강조 이미지. D: 헤마톡실린 및 에오신으로 염색된 30일에서의 NA-1(Tat-NR2B9c) 및 위약 처리된 동물로부터의 대표적 연속 조직학적 절편. E: 24시간의 DWI 부피 및 30일의 T2-강조 부피를 이용하여 계산된 뇌졸중 부피. F: 30일의 관찰 기간에 걸친 NHPSS.

[0014] 도 7A-F: A: 관류 결손의 부피. B: 7일에 걸친 DWI 및 T2 MRI에 의해 측정된 바와 같은 뇌졸중 부피. C: 각각의 동물의 최초 관류 결손에 대해 표준화된 48시간의 DWI 및 T2-강조 및 7일의 T2-강조 MRI 스캔으로부터의 뇌졸중

부피. D: 대표적 7일 MRI. E: 대표적 7일 조직학. F: 7일의 관찰 기간에 걸친 NHPSS 스코어.

[0015] **도 8A-F:** A: 관류 결손의 부피. B: 14일에 걸친 DWI 및 T2 MRI에 의해 측정된 바와 같은 뇌졸중 부피. C: 각각의 동물의 최초 관류 결손에 대해 표준화된 48시간의 DWI 및 T2-강조 및 14일의 T2-강조 MRI 스캔으로부터의 뇌졸중 부피. D: 대표적 14일 MRI. E: 대표적 14일 조직학. F: 14일의 관찰 기간에 걸친 NHPSS 스코어.

[0016] **도 9A, B:** A: 뇌졸중 및 NA-1(Tat-NR2B9c)을 이용한 처리 후의 래트의 동측 반구와 대측 반구 사이의 PSD-95:NMDAR 공동-면역침전의 비를 나타내는 그래프. B: 다양한 농도의 NA-1 또는 대조군의 존재하에서의 항-PSD-95 항체로 면역침전된 NMDAR의 양을 나타내는 예시적 면역블롯.

[0017] **도 10:** 뇌졸중 및 NA-1(Tat-NR2B9c)을 이용한 처리 후의 다양한 시점에서의 래트의 동측 반구와 대측 반구 사이의 PSD-95:NMDAR 공동-면역침전의 비를 나타내는 그래프.

[0018] **도 11:** 뇌졸중에 적용되고, tPA 및 NA-1(Tat-NR2B9c) 투여의 다양한 조합 및 시간으로 처리된지 24시간 후의 래트 뇌에서의 경색 영역.

[0019] 청구된 발명의 개요

[0020] 본 발명은 허혈을 갖거나 허혈의 위험이 있는 피검체에 PSD-95 억제제를 투여하는 단계, 및 피검체에 대해 재판류 요법을 수행하는 단계를 포함하는, 중추신경계에 대한 허혈의 손상 효과를 치료하는 방법을 제공하며, 상기 PSD-95-억제제 및 재판류 요법은 피검체의 중추신경계에 대한 허혈의 손상 효과를 치료한다. 임의로, PSD-95-억제제는 재판류 요법이 수행되기 전에 투여된다. 임의로, PSD-95-억제제는 허혈의 발생 전에 허혈의 위험이 있는 피검체에 투여되고, 재판류 요법은 허혈의 발생 후에 수행된다. 임의로, 허혈의 발생 후에 PSD-95-억제제가 투여되고, 재판류 요법이 수행된다. 일부 방법에서, 허혈은 대뇌 허혈이다. 일부 방법에서, 피검체는 뇌졸중을 갖는다. 일부 방법에서, 허혈은 CNS로의 혈류 또는 CNS로부터의 혈류를 억제함으로써 중추신경계에 영향을 미치는 심장, 폐 또는 주요 사지(major limb) 허혈이다. 일부 방법에서, 피검체는 작용제의 투여와 재판류 요법의 수행 사이에 대뇌 허혈의 존재 및/또는 대뇌 출혈의 부재에 대해 시험된다. 일부 방법에서, 피검체는 작용제의 투여와 재판류 요법의 수행 사이에 출혈의 존재 또는 출혈의 위험에 대해 평가된다. 일부 방법에서, 평가는 PET 스캔, CAT 스캔 또는 MRI의 수행, 또는 피검체의 병력의 재조사 또는 허혈의 지표를 제공하는 하나 이상의 바이오마커의 사용을 포함한다. 일부 방법에서, PSD-95-억제제는 펩티드이다. 일부 방법에서, 작용제는 NA-1(Tat-NR2B9c)이다. 일부 방법에서, 재판류는 혈전용해제를 투여함으로써 수행된다. 일부 방법에서, 혈전용해제는 플라스미노겐 활성화제이다. 일부 방법에서, 혈전용해제는 tPA이다. 일부 방법에서, 재판류 요법은 기계적 재판류이다. 일부 방법에서, 재판류 요법은 허혈의 발생 3시간 초과 후에 수행된다. 일부 방법에서, 재판류 요법은 허혈의 발생 4.5시간 초과 후에 수행된다. 일부 방법에서, 재판류 요법은 허혈의 발생 4.5시간 초과 후 및 24시간 미만 후에 수행된다. 일부 방법에서, 재판류 요법은 CT, MRI 또는 PET 분석에 의해 나타나는 바와 같은 완전 경색의 결손, 허혈성 반음영(ischemic penumbra) 및 출혈의 결손을 기초로 하여 재판류에 적절한 피검체를 결정한 후에 수행된다. 일부 방법에서, 재판류 요법은 허혈의 발생 적어도 12시간 후 또는 적어도 24시간 후에 수행된다. 일부 방법에서, 재판류 요법은 허혈의 발생 275-690분 후에 수행된다. 일부 방법에서, PSD-95의 투여와 재판류 요법 사이의 간격은 30분 내지 6시간일 수 있다. 일부 방법에서, 혈전용해제는 손상된 혈류 부위로의 국소화된 투여에 의해 투여된다. 상기 방법 중 임의의 방법에서, 펩티드 또는 다른 작용제는 내재화 펩티드에 연결되거나, 지질화됨으로써 세포막 또는 혈액뇌장벽을 가로지르는 펩티드의 통과가 촉진될 수 있다. 일부 펩티드 또는 다른 작용제는 미리스토일화된다. 펩티드는 바람직하게는 N-말단에서 미리스토일화된다.

[0021] 본 발명은 피검체에 PSD-95 억제제를 투여하는 단계로서, 이러한 피검체가 재판류 요법의 허용되지 않는 부작용 위험에 대해 분석되는 단계, 및 허용되지 않는 부작용 위험이 없는 피검체에서 재판류 요법이 수행되고, 허용되지 않는 부작용 위험을 갖는 피검체에서 재판류 요법이 수행되지 않는 단계를 포함하는, 허혈의 징후(들) 및/또는 증상(들)을 나타내는 피검체 집단을 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 일부 방법에서, 허용되지 않는 부작용 위험의 분석은 출혈의 존재 또는 출혈의 위험에 대한 분석을 포함한다. 일부 방법에서, 피검체는 뇌졸중의 징후(들) 및/또는 증상(들)을 나타내고, 분석은 허혈성 뇌졸중과 출혈성 뇌졸중을 구별하는 뇌 스캔을 수행하는 것을 포함하고, 허혈성 뇌졸중을 갖는 피검체는 재판류 요법이 수행되고, 출혈성 뇌졸중을 갖는 피검체는 재판류 요법이 수행되지 않는다.

[0022] 본 발명은 재판류 요법이 또한 수행되는 피검체의 중추신경계에 대한 허혈의 손상 효과를 치료하는데 사용하기 위한 NMDAR 2B 또는 다른 NMDAR 2 서브유닛(들)에 결합하는 PSD-95를 억제하는 작용제를 제공하며, 상기 재판류

요법 및 작용제는 중추신경계에 대한 허혈의 손상 효과를 치료한다.

- [0023] 본 발명은 NMDAR 2B, 2A 또는 nNOS에 결합하는 PSD-95를 억제하는 작용제가 또한 투여되는 피검체에서의 재관류 요법에 사용하기 위한 작용제 또는 장치를 추가로 제공하며, 상기 재관류 요법 및 작용제는 중추신경계에 대한 허혈의 손상 효과를 치료한다. 임의로, 장치는 코일, 스텐트(stent), 풍선(예를 들어, 대동맥내 풍선, 펌프), 카테터(catheter)이다. 임의로, 작용제는 혈전용해제, 혈관확장제 또는 고혈압제이다.
- [0024] 정의
- [0025] "키메라 펩티드"는 융합 단백질로서 또는 화학적 결합에 의해 또 다른 하나의 펩티드에 연결된, 하나의 다른 펩티드와 자연적으로 결합되지 않은 2개의 성분 펩티드를 갖는 펩티드를 의미한다.
- [0026] "융합" 단백질 또는 폴리펩티드는 복합 폴리펩티드, 즉, 단일한 폴리펩티드 서열 내에서 일반적으로 함께 융합되지 않는 2개(또는 그 초과)의 별개의 이중성 폴리펩티드로부터의 서열로 구성된 단일한 연속 아미노산 서열을 나타낸다.
- [0027] 용어 "PDZ 도메인"은 뇌 시냅스 단백질 PSD-95, 드로소필라(Drosophila) 중격 이음부 단백질 Discs-Large(DLG), 및 상피 치밀 이음부 단백질 ZO1(ZO1)과 유의한 서열 동일성(예를 들어, 적어도 60%)을 특징으로 하는, 약 90개의 아미노산의 모듈 단백질(modular protein) 도메인을 나타낸다. PDZ 도메인은 또한 Discs-Large 상동성 반복부("DHR") 및 GLGF(SEQ ID NO:68) 반복부로 공지되어 있다. PDZ 도메인은 일반적으로 코어 컨센서스 서열을 유지시키는 것으로 보인다(Doyle, D. A., 1996, Cell 85: 1067-76). 예시적 PDZ 도메인-함유 단백질 및 PDZ 도메인 서열이 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 출원 번호 10/714,537호에 개시되어 있다.
- [0028] 용어 "PL 단백질" 또는 "PDZ 리간드 단백질"은 PDZ-도메인과 분자 복합체를 형성하는 자연 발생 단백질, 또는 전장 단백질로부터 단독으로(예를 들어, 3-25개의 잔기, 예를 들어, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 14 또는 16개의 잔기의 펩티드 단편으로서) 발현되는 경우 카르복시-말단이 상기 분자 복합체를 형성하는 단백질을 나타낸다. 분자 복합체는, 예를 들어, US 20060148711호에 기재된 "A 검정" 또는 "G 검정"을 이용하여 시험관내에서, 또는 생체내에서 관찰될 수 있다.
- [0029] 용어 "NMDA 수용체" 또는 "NMDAR"은 하기에 기재되는 다양한 서브유닛 형태를 포함하는 NMDA와 상호작용하는 것으로 공지된 막 결합 단백질을 나타낸다. 이러한 수용체는 인간 또는 비-인간(예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이) 수용체일 수 있다.
- [0030] "PL 모티프"는 PL 단백질의 C-말단의 아미노산 서열(예를 들어, C-말단의 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 20 또는 25개의 연속적 잔기)("C-말단 PL 서열") 또는 PDZ 도메인에 결합하는 것으로 공지된 내부 서열("내부 PL 서열")을 나타낸다.
- [0031] "PL 펩티드"는 PDZ 도메인에 특이적으로 결합하는 PL 모티프를 포함하거나 이로 구성되거나, 이를 다른 방식으로 기초로 한 펩티드이다.
- [0032] 용어 "분리된" 또는 "정제된"은 목표 종(예를 들어, 펩티드)이 샘플, 예를 들어, 목표 종을 함유하는 자연 공급원으로부터 획득된 샘플에 존재하는 오염물질로부터 정제된 것을 의미한다. 목표 종이 분리되거나 정제되는 경우, 이는 샘플에 존재하는 우세한 거대분자(예를 들어, 폴리펩티드) 종(즉, 물을 기초로 하여, 이는 조성물의 임의의 다른 개별적 종보다 더 풍부함)이며, 바람직하게는 목표 종은 존재하는 모든 거대분자 종의 적어도 약 50 퍼센트(물을 기초로 함)를 포함한다. 일반적으로, 분리되거나, 정제되거나, 실질적으로 순수한 조성물은 조성물에 존재하는 모든 거대분자 종의 80 내지 90 퍼센트 초과를 포함한다. 가장 바람직하게는, 목표 종은 본질적으로 동질성(즉, 통상적인 검출 방법에 의해 조성물 내에서 오염물질 종이 검출될 수 없음)으로 정제되고, 상기 조성물은 단일 거대분자 종을 필수적으로 포함한다. 용어 '분리된' 또는 '정제된'은 분리된 종과 조합하여 작용하는 것이 의도되는 다른 성분의 존재를 반드시 배제하지는 않는다. 예를 들어, 내재화 펩티드는, 활성 펩티드에 연결됨에도 불구하고 분리된 것으로 기재될 수 있다.
- [0033] "펩티도미메틱(peptidomimetic)"은 자연 아미노산으로 구성된 펩티드와 실질적으로 동일한 구조적 및/또는 기능적 특징을 갖는 합성 화학 화합물을 나타낸다. 펩티도미메틱은 완전히 합성인 아미노산의 비-자연 유사체를 함유할 수 있거나, 부분적으로 자연 펩티드 아미노산 및 부분적으로 아미노산의 비-자연 유사체의 키메라 분자일 수 있다. 또한, 펩티도미메틱은 치환이 또한 모방체의 구조 및/또는 억제 또는 결합 활성을 실질적으로 변경시키지 않는 한 임의의 양의 자연 아미노산 보존성 치환을 포함할 수 있다. 폴리펩티드 모방체 조성물은 통상적

으로 a) 자연 아미드 결합("펩티드 결합") 연결이 아닌 잔기 결합 그룹; b) 자연 발생 아미노산 잔기를 대신하는 비-자연 잔기; 또는 c) 이차 구조 모방을 유도, 즉, 이차 구조, 예를 들어, 베타 턴, 감마 턴, 베타 시트, 알파 헬릭스 형태 등을 유도하거나 안정화시키는 잔기의 3개의 구조적 그룹으로부터 유래되는 비자연 구조 성분의 임의의 조합을 함유할 수 있다. 활성 펩티드 및 내재화 펩티드를 포함하는 키메라 펩티드의 펩티도미메틱에서, 활성 모이어티(moiety) 또는 내재화 모이어티 또는 활성 모이어티 및 내재화 모이어티 둘 모두는 펩티도미메틱일 수 있다.

[0034] 용어 "특정 결합"은 많은 다른 다양한 분자의 존재하에서도 또 다른 특정 분자(수용체)와 결합하는, 즉, 분자의 이중성 혼합물에서 또 다른 분자에 대한 한 분자의 우선적 결합을 나타내는 분자(리간드)의 능력을 특징으로 하는, 2개의 분자, 예를 들어, 리간드 및 수용체 사이의 결합을 나타낸다. 수용체에 대한 리간드의 특이적 결합은 또한 과량의 라벨링되지 않은 리간드의 존재(즉, 결합 경쟁 검정)하에서의 수용체에 대한 검출가능하게 라벨링된 리간드의 감소된 결합으로 나타난다.

[0035] 흥분독성은 뉴런이 흥분 신경전달물질 글루타메이트에 대한 수용체, 예를 들어, NMDA 수용체, 예를 들어, NMDAR 2B 서브유닛을 갖는 NMDA 수용체의 과다활성에 의해 손상되고 사멸되는 병리학적 과정이다.

[0036] 용어 "피검체"는 인간 및 수의 동물, 예를 들어, 포유동물 뿐만 아니라 실험실 동물 모델, 예를 들어, 전임상 연구에서 사용되는 마우스 또는 래트를 포함한다.

[0037] 용어 "작용제"는 약학적 활성을 갖거나 갖지 않는 화합물, 자연 화합물, 합성 화합물, 소분자, 펩티드 및 펩티도미메틱을 포함하는 임의의 화합물을 포함한다. PSD-95 억제제는 하기에 추가로 기재되는 바와 같은 PSD-95를 억제하는 작용제이다.

[0038] 용어 "약리 작용제"는 약리학적 활성을 갖는 작용제를 의미한다. 약리학적 작용제는 공지된 약물인 화합물, 약리학적 활성이 확인되었으나, 동물 모델 또는 임상 시험에서 추가의 치료적 평가가 진행중인 화합물을 포함한다. 키메라 작용제는 내재화 펩티드에 연결된 약리학적 작용제를 포함한다. 작용제는 활성제가 질병의 예방 또는 치료에서 유용하거나 유용할 수 있는 것을 나타내는 스크리닝 시스템에서 활성을 나타내는 경우 약리학적 활성을 갖는 것으로 기재될 수 있다. 스크리닝 시스템은 시험관내, 세포, 동물 또는 인간일 수 있다. 작용제는 질병의 치료에서 실제의 예방적 또는 치료적 유용성을 확립하기 위해 추가 시험이 요구될 수 있음에도 불구하고 약리학적 활성을 갖는 것으로 기재될 수 있다.

[0039] tat 펩티드는 5개 이하의 잔기가 서열 내에서 결실되거나, 치환되거나, 삽입되고, 세포로의 결합된 펩티드 또는 다른 작용제의 흡수를 촉진하는 능력을 보유하는 GRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1)을 포함하거나 이로 구성된 펩티드를 의미한다. 바람직하게는, 임의의 아미노산 변화는 보존성 치환이다. 바람직하게는, 집합체 내의 임의의 치환, 결실 또는 내부 삽입은, 바람직하게는 상기 서열의 것과 유사한 순수 양이온 전하를 갖는 펩티드를 남긴다. 이는 유의한 수의 R 및 K 잔기를 치환시키거나 결실시킴이 없이 달성될 수 있다. tat 펩티드의 아미노산은 염증 반응을 감소시키기 위해 비오틴 또는 유사한 분자로 유도체화될 수 있다.

[0040] 약리학적 작용제의 공동-투여는 상기 작용제가 혈장에 동시에 존재하는 작용제의 검출가능한 양에 대해 시간적으로 충분히 가깝게 투여되고/되거나, 상기 작용제가 동일한 질병의 에피소드에 대해 치료 효과를 발휘하거나, 상기 작용제가 동일한 질병의 에피소드를 치료하는데 있어서 협력적으로 또는 상승작용적으로 작용하는 것을 의미한다. 예를 들어, 항-염증 작용제는 2개의 작용제가 항-염증 작용제가 내재화 펩티드에 의해 유도가능한 항-염증 반응을 억제할 수 있도록 시간적으로 충분히 가깝게 투여되는 경우에 tat 펩티드를 포함하는 작용제와 협력적으로 작용한다.

[0041] 통계적으로 유의함은 <0.05, 바람직하게는 <0.01, 가장 바람직하게는 <0.001인 p-값을 나타낸다.

[0042] 질병의 에피소드는 질병의 징후 및/또는 증상이 존재하는 기간이 상기 징후 및/또는 증상이 부재하거나 덜한 정도로 존재하는 더 긴 기간에 접하여 산재된 것을 의미한다.

[0043] 상세한 설명

[0044] I. 총론

[0045] 본 발명은 CNS에서의 허혈 또는 CNS에 다른 방식으로 영향을 미치는 허혈, 예를 들어, 허혈성 뇌졸중에 대한 조합 치료를 제공한다. 상기 치료는 PSD95 억제제의 투여 및 재관류 요법의 수행(예를 들어, tPA 또는 또 다른 혈전용해제의 투여에 의하거나, 영향을 받은 CNS 영역으로의 혈류를 증가시키는 기계적 장치의 이용에 의함)을 포함한다. tPA 및 다른 재관류 요법의 통상적인 이용에서, 허혈의 발생으로부터 시간이 증가함에 따라 효능이

감소되고, 출혈성 부작용에 대한 잠재성이 증가한다. 따라서, tPA의 경우에서, 이러한 혈전용해 방법은 허혈의 발생으로부터 약 3-4.5시간 후에는 효과가 없는 것으로 간주된다. 본 발명은 재관류 요법과 조합된 PSD95 억제제의 투여가 재관류 요법의 효능을 증가시키고/시키거나 허혈의 발생 후의 시간에 따른 tPA 또는 다른 재관류 요법의 효능에서의 감소를 늦추고, 이에 따라 tPA 또는 다른 재관류 요법이 제공될 수 있는 윈도우를 연장시킨다는 통찰을 일부 기초로 한다.

[0046] tPA 및 다른 재관류 요법은 허혈성 뇌졸중을 갖는 것으로 공지된 뇌졸중 피검에만 안전하게 투여될 수 있는 반면, PSD-95 억제제는 피검체가 허혈성 또는 출혈성 뇌졸중을 갖는지의 여부 및 피검체가 어쨌든 뇌졸중으로 고통받는지의 여부와 상관 없이 임의의 뇌졸중 또는 가능한 뇌졸중 피검체에 안전하게 투여될 수 있다. PSD-95 억제제를 투여함으로써, 허혈성 뇌졸중의 존재를 결정한 후, 적절한 경우 tPA 또는 또 다른 재관류 요법을 제공하기 위해 뇌 스캔 또는 임의의 다른 진단 시험을 수행하기 위해 더 많은 시간이 이용가능하다. 따라서, 허혈성 뇌졸중을 갖는 더 많은 피검체가 tPA 또는 다른 재관류 요법으로부터 이득을 얻을 수 있고, 동시에 PSD-95 억제제를 이용한 치료로부터 이득을 얻을 수 있다.

[0047] II. PSD-95를 억제하는 작용제

[0048] PSD-95 억제제는 PSD-95와 하나 이상의 NMDAR(예를 들어, 2A, 2B, 2C 또는 2D) 또는 nNOS(예를 들어, Swiss-Prot P29475) 사이의 상호작용을 억제한다. 억제는, 예를 들어, PSD-95에 대한 억제제의 특이적 결합의 결과일 수 있다. 이러한 작용제는 뇌졸중의 하나 이상의 손상 효과 및 NMDAR 흥분독성에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 다른 신경학적 질환을 감소시키는데 유용하다. 상기 작용제는 NMDA 수용체의 PL 모티프 또는 PSD-95의 PDZ 도메인을 포함하거나 이들을 기초로 한 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 포함한다. 상기 펩티드는 또한 PSD-95 및 nNOS 및 다른 글루타메이트 수용체(예를 들어, kainite 수용체 또는 AMPA 수용체), 예를 들어, KV1-4 및 GluR6 사이의 상호작용을 억제할 수 있다. 바람직한 펩티드는 시냅스후 치밀질(postsynaptic density)-95 단백질(PSD-95)의 PDZ 도메인 1 및 2(문헌[Stathakism, Genomics 44(1):71-82 (1997)]에 의해 제공된 인간 아미노산 서열)와 신경 N-메틸-D-아스파테이트 수용체의 NR2B 서브유닛을 포함하는 하나 이상의 NMDA 수용체 2 서브유닛의 C-말단 PL 서열(Mandich et al., Genomics 22, 216-8 (1994)) 사이의 상호작용을 억제한다. NMDAR2B는 GenBank ID 4099612, C-말단의 20개의 아미노산 FNGSSNGHVYEKLSSIESDV(SEQ ID NO:11) 및 PL 모티프 ESDV(SEQ ID NO:12)를 갖는다. 바람직한 펩티드는 PSD-95의 인간 형태 및 인간 NMDAR 수용체를 억제한다. 그러나, 억제는 또한 단백질의 중 변이체로부터 나타날 수 있다. 사용될 수 있는 NMDA 및 글루타메이트 수용체의 목록이 하기에 제시된다:

[0049] 표 1: PL 서열을 갖는 NMDA 수용체

명칭	GI 또는 Acc#	C-말단 20mer 서열	C-말단 4mer 서열	PL?	내부 PL ID
NMDAR1	307302	HPTDITGPLNLS DPSVST VV (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO:27)	X	AA216
NMDAR1-1	292282	HPTDITGPLNLS DPSVST VV (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO:27)	X	AA216
NMDAR1-4	472845	HPTDITGPLNLS DPSVST VV (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO:27)	X	AA216
NMDAR1-3b	2343286	HPTDITGPLNLS DPSVST VV (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO:27)	X	AA216
NMDAR1-4b	2343288	HPTDITGPLNLS DPSVST VV (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO:27)	X	AA216
NMDAR1-2	11038634	RRAIEREEGQLQLCSRH RES (SEQ ID NO:14)	HRES (SEQ ID NO:28)		
NMDAR1-3	11038636	RRAIEREEGQLQLCSRH RES (SEQ ID NO:14)	HRES (SEQ ID NO:28)		
NMDAR2C	6006004	TQGFPGPCTWRRISLES EV (SEQ ID NO:15)	ESEV (SEQ ID NO:29)	X	AA180
NMDAR3	560546	FNGSSNGHVYEKLSSIES DV (SEQ ID NO:11)	ESDV (SEQ ID NO:12)	X	AA34.1
NMDAR3A	17530176	AVSRKTELEEYQRTSRT CES (SEQ ID NO:16)	TCES (SEQ ID NO:30)		
NMDAR2B	4099612	FNGSSNGHVYEKLSSIES DV (SEQ ID NO:11)	ESDV (SEQ ID NO:12)	X	

[0050]

명칭	GI 또는 Acc#	C-말단 20mer 서열	C-말단 4mer 서열	PL?	내부 PL ID
NMDAR2A	558748	LNCSNRRVYKKMPSIE SDV (SEQ ID NO:17)	ESDV (SEQ ID NO:12)	X	AA34.2
NMDAR2D	4504130	GGDLGTRRGS AHFSSLE SEV (SEQ ID NO:18)	ESEV (SEQ ID NO:29)	X	
글루타메이트 수용체 델타 2	AF009014	QPTPTLGLNLGNDPDRG TSI (SEQ ID NO:19)	GTSI (SEQ ID NO:31)	X	
글루타메이트 수용체 1	I28953	MQSIPCMSSHSGMPLGA TGL (SEQ ID NO:20)	ATGL (SEQ ID NO:32)	X	
글루타메이트 수용체 2	L20814	QNFATYKEGYNVYGIES VKI (SEQ ID NO:21)	SVKI (SEQ ID NO:33)	X	
글루타메이트 수용체 3	AF167332	QNYATYREGYNVYGTE SVKI (SEQ ID NO:22)	SVKI (SEQ ID NO:33)	X	
글루타메이트 수용체 4	U16129	HTGTAIRQSSGLAVIASD LP (SEQ ID NO:23)	SDLP (SEQ ID NO:34)		
글루타메이트 수용체 5	U16125	SFTSILTCHQRRTQRKET VA (SEQ ID NO:24)	ETVA (SEQ ID NO:35)	X	
글루타메이트 수용체 6	U16126	EVINMHTFNDRLPGKE TMA (SEQ ID NO:25)	ETMA (SEQ ID NO:36)	X	

[0051]

[0052] 일부 펩티드는 PSD-95와 다수의 NMDAR 서브유닛 사이의 상호작용을 억제한다. 상기 예에서, 펩티드의 사용은 흥분 신경전달물질에 대한 다양한 NMDAR의 각각의 기여의 이해를 반드시 필요로 하지는 않는다. 다른 펩티드는 단일 NMDAR에 대해 특이적이다.

[0053] 펩티드는 상기 서브유닛 중 임의의 서브유닛의 C-말단으로부터의 PL 모티프를 포함하거나 이를 기초로 할 수 있

고, 이는 [S/T]-X-[V/L]을 포함하는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 이러한 서열은 바람직하게는 본 발명의 펩티드의 C-말단에서 발생한다. 바람직한 펩티드는 이들의 C-말단에 [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L](SEQ ID NO:38)을 포함하는 아미노산 서열을 갖는다. 예시적 펩티드는 C-말단 아미노산으로서 ESDV(SEQ ID NO:12), ESEV(SEQ ID NO:29), ETDV(SEQ ID NO:39), ETEV(SEQ ID NO:40), DTDV(SEQ ID NO:41), 및 DTEV(SEQ ID NO:42)를 포함한다. 2개의 특히 바람직한 펩티드는 KLSSIESDV(SEQ ID NO:5), 및 KLSSIETDV(SEQ ID NO:43)이다. 상기 펩티드는 일반적으로 3-25개의 아미노산(내재화 펩티드가 없음)을 가지며, 5-10개 아미노산, 특히 9개 아미노산(또한 내재화 펩티드가 없음)의 펩티드 길이가 바람직하다. 일부 상기 펩티드에서, 모든 아미노산은 NMDA 수용체의 C-말단으로부터 유래된다(내재화 펩티드로부터의 아미노산을 포함하지 않음).

[0054] PSD95와 NMDAR 사이의 상호작용을 억제하는 다른 펩티드는 PSD-95의 PDZ 도메인 1 및/또는 2로부터의 펩티드 또는 PSD-95와 NMDA 수용체, 예를 들어, NR2B 사이의 상호작용을 억제하는 상기 펩티드 중 임의의 펩티드의 하위 단편을 포함한다. 상기 활성 펩티드는 문헌[Stathakism, Genomics 44(1):71-82 (1997)]에 의해 제공되는 PSD-95의 대략 아미노산 65-248(인간 서열) 또는 NP_031890.1, GI:6681195(마우스 서열) 또는 다른 종 변이체의 상응하는 영역 내에 존재하는 PSD-95의 PDZ 도메인 1 및/또는 PDZ 도메인 2로부터의 적어도 50, 60, 70, 80 또는 90개의 아미노산을 포함한다.

[0055] 본 발명의 펩티드 및 펩티도미메틱은 변형된 아미노산 잔기, 예를 들어, N-알킬화된 잔기를 함유할 수 있다. N-말단 알킬 변형은, 예를 들어, N-메틸, N-에틸, N-프로필, N-부틸, N-사이클로헥실메틸, N-사이클리헥실에틸, N-벤질, N-페닐에틸, N-페닐프로필, N-(3,4-디클로로페닐)프로필, N-(3,4-디플루오로페닐)프로필, 및 N-(나프탈렌-2-일)에틸)을 포함할 수 있다.

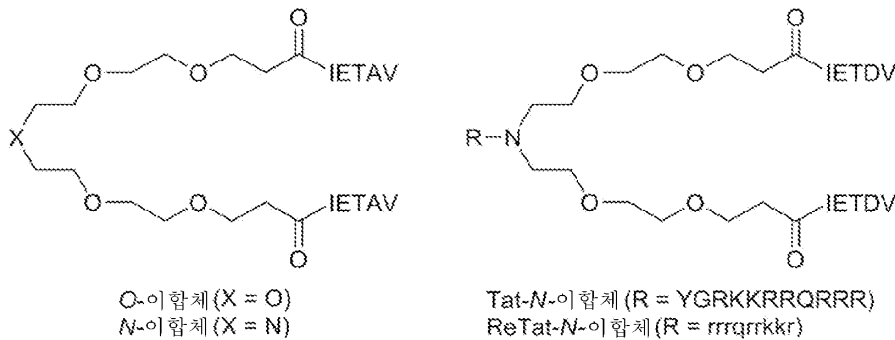
[0056] 문헌[Bach, J. Med. Chem. 51, 6450-6459 (2008)] 및 WO 2010/004003호에는 NR2B9c(SEQ ID NO:6)의 일련의 유사체가 기재되어 있다. PDZ-결합 활성은 단지 3개의 C-말단 아미노산(SDV)을 갖는 펩티드에 의해 나타난다. 상기 Bach의 문헌에는 또한 X_1tSX_2V (SEQ ID NO:68)를 포함하거나 이로 구성된 아미노산 서열을 갖는 유사체가 보고되어 있고, 여기서 t 및 S는 대안적 아미노산이고, X_1 은 E, Q, 및 A, 또는 이들의 유사체로부터 선택되고, X_2 는 A, Q, D, N, N-Me-A, N-Me-Q, N-Me-D, 및 N-Me-N 또는 이들의 유사체로부터 선택된다. 임의로, 펩티드는 P3 위치(C-말단으로부터 세번째 아미노산, 즉, tS에 의해 점유되는 위치)에서 N-알킬화된다. 펩티드는 사이클로헥산 또는 방향족 치환기와 함께 N-알킬화될 수 있고, 이는 치환기와 펩티드 또는 펩티드 유사체의 말단 아미노기 사이에 스페이서 기를 추가로 포함하며, 상기 스페이서는, 바람직하게는 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌 및 부틸렌으로부터 선택되는 알킬기이다. 방향족 치환기는 1개 또는 2개의 할로겐 및/또는 알킬기로 치환된 나프탈렌-2-일 모이어티 또는 방향족 고리일 수 있다.

[0057] 다른 변형이 또한 활성에 불리하게 영향을 미치지 않고 포함될 수 있으며, 이들은 자연 L-아미노산 형태의 아미노산 중 하나 이상의 D-아미노산 형태의 아미노산으로의 치환을 포함한다. 따라서, L-형태(화합물의 구조에 따라 R 또는 S로도 언급될 수 있음)에서 자연 존재하는 임의의 아미노산이 일반적으로 D-아미노산으로 언급되나, R-형태 또는 S-형태로 추가로 언급될 수 있는, 동일한 화학 구조 유형 또는 펩티도미메틱이나 반대 키랄성인 화학 구조 유형 또는 펩티도미메틱의 아미노산으로 대체될 수 있다. 따라서, 펩티도미메틱은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 적어도 50%, 또는 모든 D-아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 일부 또는 모든 D 잔기를 함유하는 펩티도미메틱은 때때로 "인버소(inverso)" 펩티드로 언급된다.

[0058] 펩티도미메틱은 또한 레트로 펩티드를 포함한다. 레트로 펩티드는 역 아미노산 서열을 갖는다. 펩티도미메틱은 또한 원래 C-말단 아미노산이 N-말단에서 보이고, D-아미노산이 L-아미노산 대신 사용되도록 아미노산의 순서가 역전된 레트로 인버소 펩티드를 포함한다. WO 2008/014917호에는 아미노산 서열 vdseisslk-rrrrrkrkrgvin(SEQ ID NO:69)(소문자 글자는 D 아미노산을 나타냄)을 갖는 Tat-NR2B9c의 레트로-인버소 유사체가 기재되어 있으며, 상기 유사체는 대뇌 허혈을 억제하는데 효과적인 것으로 보고되어 있다. 여기에 기재된 또 다른 효과적인 펩티드는 Rv-Tat-NR2B9c(RRRQRKKRGYKLSSIESDV; SEQ ID NO:70)이다.

[0059] 링커, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 링커는 탠덤(tandem) PDZ 도메인을 함유하는 단백질에 대한 친화성 및 선택성을 향상시키기 위해 펩티드 또는 펩티도미메틱의 활성 모이어티를 이합체화시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Bach et al., (2009) Angew. Chem. Int. Ed. 48:9685-9689] 및 WO 2010/004003호를 참조하라. PL 모터프-함유 펩티드는 바람직하게는 2개의 상기 분자의 N-말단을 연결시킴으로써 이합체화되어, C-말단이 자유롭게 된다. 상기 Bach의 문헌에는 NMDAR 2B의 C-말단으로부터의 펜타머 펩티드 IESDV(SEQ ID NO:71)가 PSD-95에 대한 NMDAR 2B의 결합을 억제하는데 있어서 효과적인 것이 추가로 보고되어 있다. IETDV(SEQ ID NO:73)가

또한 IESDV 대신 사용될 수 있다. 임의로, 약 2-10 카피의 PEG가 링커로서 세로로 1열로 연결될 수 있다. 임의로, 링커는 또한 세포 흡수를 향상시키기 위해 내재화 펩티드에 부착되거나 지질화될 수 있다. 예시적 이합체 억제제의 예가 하기에 제시된다(Bach et al., PNAS 109 (2012) 3317-3322 참조). 본원에 개시된 PSD-95 억제제 중 임의의 PSD-95 억제제가 IETDV 대신 사용될 수 있고, 임의의 내재화 펩티드 또는 지질화 모이어티가 tat 대신 사용될 수 있다. 제시된 것과 다른 링커가 또한 사용될 수 있다.

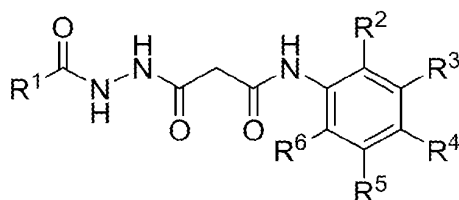


IETAV는 SEQ ID NO:74로 지정되고, YGRKKRRQRRR은 SEQ ID NO:2로 지정되고, rrrqrrkkr은 SEQ ID NO:75로 지정되며, 소문자 글자는 D-아미노산을 나타낸다.

펩티드, 펩티도미메틱 또는 다른 작용제의 적절한 약리학적 활성은 요망시 영장류에서의 시험 전에 뇌졸중의 이전에 기재된 래트 모델 및 본 출원에 기재된 임상 시험을 이용하여 입증될 수 있다. 펩티드 또는 펩티도미메틱은 또한, 예를 들어, 참조로서 포함되는 US 20050059597호에 기재된 검정을 이용하여 PSD-95와 NMDAR 2B 사이의 상호작용을 억제하는 능력에 대해 스크리닝될 수 있다. 유용한 펩티드는 통상적으로 상기 검정에서 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 0.1 μ M 또는 0.01 μ M 미만의 IC₅₀ 값을 갖는다. 바람직한 펩티드는 통상적으로 0.001 내지 1 μ M, 및 더욱 바람직하게는 0.001 내지 0.05, 0.05 내지 0.5 또는 0.05 내지 0.1 μ M의 IC₅₀ 값을 갖는다. 펩티드 또는 다른 작용제가 하나의 상호작용, 예를 들어, NMDAR2B에 대한 PSD-95 상호작용의 결합을 억제하는 것을 특징으로 하는 경우, 상기 기재는 펩티드 또는 작용제가 또한, 예를 들어, nNOS에 대한 PSD-95 결합의 억제와 같은 또 다른 상호작용을 억제하는 것을 배제하지 않는다.

상기 기재된 것과 같은 펩티드는 임의로 억제제의 결합 친화성을 개선시키거나, 세포막을 가로질러 운반되는 억제제의 능력을 개선시키거나, 안정성을 개선시키기 위해 유도체화(예를 들어, 아세틸화, 인산화, 미리스토일화, 제라닐화(geranylation) 및/또는 당화)될 수 있다. 특정 예로서, C-말단으로부터의 세번째 잔기가 S 또는 T인 억제제에 대해, 상기 잔기는 펩티드의 사용 전에 인산화될 수 있다.

약리학적 작용제는 또한 PSD-95와 NMDAR 2B 사이의 상호작용, 및/또는 상기 기재된 다른 상호작용을 억제하는 소분자를 포함한다. 적합한 소분자 억제제는, 예를 들어, WO/2009/006611호에 기재되어 있다. 적합한 화합물의 한 예시적 부류는 하기 화학식의 화합물이다:



상기 식에서, R¹은 0-4개의 R⁷로 치환된 사이클로헥실, 0-4개의 R⁷로 치환된 페닐, $\cdots(\text{CH}_2)_u-(\text{CHR}^8\text{R}^9)$, 분지된 C₁₋₆ 알킬(이소프로필, 이소부틸, 1-이소프로필-2-메틸-부틸, 1 에틸-프로필), 및 $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CR}^{10}\text{R}^{11})_v\text{H}$ 로 구성된 군으로부터 선택된 일원이고;

각각의 R⁷은 독립적으로 C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{12}$, OH, COOH, $-\text{NO}$, N-치환된 인돌린 및 세포막 전위 펩티드로 구성된 군으로부터 선택된 일원이고;

각각의 R⁸ 및 R⁹는 독립적으로 H, OH, 사이클로헥산, 사이클로펜탄, 페닐, 치환된 페닐 및 사이클로펜타디엔으로

람직한 tat 펩티드는 RRRQRKKRG 또는 RRRQRKKRGY(SEQ ID NO:70의 아미노산 1-10 또는 1-11)를 포함하거나 이로 구성된다. N-타입 칼슘 채널을 억제함이 없이 약리학적 작용제의 흡수를 촉진하는 다른 tat 유래 펩티드는 하기 표 2에 제시되는 것들을 포함한다.

표 2:

X-FGRKKRRQRRR (F-Tat) (SEQ ID NO:69)
X-GKKKKKQKKK (SEQ ID NO:50)
X-RKKRRQRRR (SEQ ID NO:51)
X-GAKKRRQRRR (SEQ ID NO:52)
X-AKKRRQRRR (SEQ ID NO:53)
X-GRKARRQRRR (SEQ ID NO:54)
X-RKARRQRRR (SEQ ID NO:55)
X-GRKKARQRRR (SEQ ID NO:56)
X-RKKARQRRR (SEQ ID NO:57)
X-GRKKRRQARR (SEQ ID NO:58)
X-RKKRRQARR (SEQ ID NO:59)
X-GRKKRRQARR (SEQ ID NO:60)
X-RKKRRQARR (SEQ ID NO:61)
X-RRPRRRPRRR (SEQ ID NO:62)
X-RRARRARRARR (SEQ ID NO:63)
X-RRRARRARR (SEQ ID NO:64)
X-RRRPRRRPRR (SEQ ID NO:65)
X-RRPRRRPRR (SEQ ID NO:66)
X-RRARRARR (SEQ ID NO:67)

X는 자유 아미노 말단, 하나 이상의 아미노산, 또는 컨주게이션된 모이어티를 나타낼 수 있다. 내재화 펩티드는 인버소 또는 레트로 또는 인버소 레트로 형태에 존재하는 연결된 펩티드 또는 펩티도미메틱이 존재하거나 존재하지 않는 인버소 또는 레트로 또는 인버소 레트로 형태로 사용될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 키메라 펩티드는 RRRQRKKRGY-KLSSIESDV(SEQ ID NO:70, NA-1 또는 Tat-NR2B9c로도 공지됨)를 포함하거나 이로 구성된 아미노산 서열을 갖거나, RRRQRKKRGY-KLSSIEDTV(SEQ ID NO:37)를 포함하거나 이로 구성된 아미노산 서열을 갖는다.

내재화 펩티드는 통상적인 방법에 의해 약리학적 작용제에 부착될 수 있다. 예를 들어, 작용제는 화학적 결합, 예를 들어, 커플링 또는 컨주게이션 작용제에 의해 내재화 펩티드에 연결될 수 있다. 다수의 상기 작용제는 시판되며, 문헌[S. S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991)]에 의해 개관되어 있다. 가교 시약의 일부 예는 J-석신이미딜 3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트(SPDP) 또는 N,N'-(1,3-페닐렌) 비스말레이미드; N,N'-에틸렌-비스-(아이오도아세트아미드) 또는 6 내지 11개의 탄소 메틸렌 브릿지(비교적 선택적 연결에 특이적임)를 갖는 다른 상기 시약; 및 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠(아미노 및 티로신기와 비가역적 결합을 형성함)을 포함한다. 다른 가교 시약은 p,p'-디플루오로-m,m'-디니트로디페닐설펜(아미노 및 페놀기와 비가역적 가교를 형성함); 디메틸 아디프이미데이트(아미노기에 특이적임); 페놀-1,4-디설펜포닐클로라이드(주로 아미노기와 반응함); 헥사메틸렌다이소시아네이트 또는 디이소티오시아네이트, 또는 아조페닐-p-다이소시아네이트(주로 아미노기와 반응함); 글루타르알데하이드(여러 상이한 측쇄와 반응함) 및 디스디아조벤지딘(주로 티로신 및 히스티딘과 반응함)을 포함한다.

펩티드인 약리학적 작용제에 대해, 내재화 펩티드에 대한 부착은 바람직하게는 N-말단에서 내재화 펩티드에 융합된 펩티드 서열을 포함하는 융합 단백질을 생성시킴으로써 달성될 수 있다.

내재화 펩티드에 PSD-95를 억제하는 펩티드(또는 다른 작용제)를 연결시키는 것 대신 또는 연결시키는 것에 더하여, 상기 펩티드는 펩티드 단독에 비해 컨주게이트의 소수성을 증가시킴으로써, 세포막 및/또는 뇌장벽을 가로지르는 연결된 펩티드의 통과를 촉진시키기 위해 지질에 연결(지질화)될 수 있다. 지질화는 바람직하게는 N-말단 아미노산에서 수행되나, PSD-95와 NMDAR 2B 사이의 상호작용을 억제하는 펩티드의 능력이 50% 초과까지 감소되지 않는 한 내부 아미노산에서 수행될 수 있다. 바람직하게는, 지질화는 4개의 가장 C-말단의 아미노산 중 하나가 아닌 아미노산에 대해 수행된다. 지질은 물에서보다 에테르에서 더욱 가용성인 유기 분자이며, 이는 지방산, 글리세라이드 및 스테롤을 포함한다. 지질화의 적합한 형태는 미리스토일화, 팔미토일화 또는 바람직하게는 10-20개의 탄소의 사슬 길이를 갖는 다른 지방산, 예를 들어, 라우르산 및 스테아르산의 부착, 뿐만 아니라 제라닐화, 제라닐제라닐화(geranylgeranylation), 및 이소프레닐화를 포함한다. 자연 단백질의 번역후 변형을 발생시키는 타입의 지질화가 바람직하다. 펩티드의 N-말단 아미노산의 알파-아미노기에 대한 아미드 결합의 형성을 통해 지방산을 갖는 지질화가 또한 바람직하다. 지질화는 미리 지질화된 아미노산을 포함하는 펩티드

합성에 의해 수행될 수 있거나, 시험관내에서 효소적으로 수행될 수 있거나, 재조합 발현에 의해 수행될 수 있거나, 펩티드의 화학적 가교 또는 화학적 유도체화에 의해 수행될 수 있다. 미리스토일화 및 다른 지질 변형에 의해 변형된 아미노산이 시판된다.

[0083] 지질화는 바람직하게는 표준 tat 펩티드가 높은 투여량(예를 들어, 3 mg/kg 또는 그 초과)으로 투여되는 경우에 발견되는 바와 같은 혈압의 일시적 감소를 야기시키지 않거나, 적어도 표준 tat 펩티드에 연결된 동일한 펩티드보다 적은 감소를 야기시키면서, 세포막 및/또는 혈액뇌장벽을 가로지르는 연결된 펩티드(예를 들어, KLSSIESDV(SEQ ID NO:5) 또는 KLSSIETDV(SEQ ID NO:43))의 통과를 촉진시킨다.

[0084] 임의로 tat 펩티드에 융합된 약리학적 펩티드는 고상 합성 또는 재조합 방법에 의해 합성될 수 있다. 과학 및 특허 문헌, 예를 들어, 문헌[Organic Syntheses Collective Volumes, Gilman et al. (Eds) John Wiley & Sons, Inc., NY, al-Obeidi (1998) Mol. Biotechnol. 9:205-223; Hruby (1997) Curr. Opin. Chem. Biol. 1:114-119; Ostergaard (1997) Mol. Divers. 3:17-27; Ostresh (1996) Methods Enzymol. 267:220-234]에 기재된 다양한 절차 및 방법을 이용하여 펩티도미메틱이 합성될 수 있다.

[0085] III. 재관류를 위한 작용제 및 방법

[0086] 허혈을 야기시키는 플라크 및 혈병(색전으로도 공지됨)은 약리학적 및 물리적 수단 둘 모두에 의해 용해되거나, 제거되거나, 회피될 수 있다. 플라크 및 혈병의 용해, 제거 및 결과로서 발생하는 혈류의 회복은 재관류로 언급된다. 한 부류의 작용제는 혈전용해에 의해 작용한다. 이들 작용제는 조직 플라스미노겐 활성제(tPA)의 주입을 통해 플라스민에 의한 섬유소용해를 자극함으로써 작용한다. 플라스민은 가교된 섬유소 망(혈병의 백분)을 청소하여 혈병을 가용성이 되도록 만들고, 다른 효소에 의한 추가 단백질분해에 적용되도록 하며, 폐색된 혈관에서 혈류를 회복시킨다. 혈전용해제의 예는 조직 플라스미노겐 활성제 t-PA, 알테플라제(alteplase)(액티바제(Activase)), 레테플라제(reteplase)(레타바제(Retavase)), 테넵테플라제(tenecteplase)(TNKase), 아니스트레플라제(anistreplase)(에미나제(Eminase)), 스트렙토키나제(streptokinase)(카비키나제(Kabikinase), 스트렙타제(Streptase)), 및 유로키나제(urokinase)(압보키나제(Abbokinase))를 포함한다.

[0087] 재관류에 사용될 수 있는 또 다른 부류의 약물은 혈관확장제이다. 이들 약물은 혈관을 이완시키고 개방시켜, 이에 따라 폐색 주위로 혈액이 유동하는 것을 가능케 함으로써 작용한다. 혈관확장제 유형의 일부 예는 알파-아드레날린수용체 길항제(알파-차단제), 안지오텐신 수용체 차단제(ARB), 베타₂-아드레날린수용체 효능제(β_2 -효능제), 칼슘-채널 차단제(CCB), 중추적으로 작용하는 교감신경차단제, 직접 작용하는 혈관확장제, 엔도텔린 수용체 길항제, 신경절 차단제, 니트로딜레이터(nitrodilator), 포스포디에스테라제 억제제, 포타슘-채널 개방제, 및 레닌 억제제가 있다.

[0088] 재관류에 사용될 수 있는 또 다른 부류의 약물은 고혈압 약물(즉, 혈압을 상승시키는 약물), 예를 들어, 에피네프린(epinephrine), 페닐에프린(phenylephrine), 슈도에페드린(pseudoephedrine), 노르에피네프린(norepinephrine); 노르에페드린(norephedrine); 터부탈린(terbutaline); 살부타몰(salbutamol); 및 메틸에페드린(methylephedrine)이다. 증가된 관류 압력은 폐색 주위의 혈액의 흐름을 증가시킬 수 있다.

[0089] 재관류의 기계적 방법은 혈관성형술, 카테터삽입, 및 동맥 우회 이식 수술, 스텐팅(stenting), 색전제거술, 또는 동맥내막절제술을 포함한다. 이러한 절차는 플라크의 기계적 제거에 의해 플라크 유동을 복원시키고, 혈관을 개방된 채로 유지시켜, 혈액이 플라크 주위로 유동할 수 있거나 플라크를 우회할 수 있다.

[0090] 재관류의 다른 기계적 방법은 신체의 다른 영역으로부터 뇌로 혈류를 전환시키는 장치의 사용을 포함한다. 한 예는 대동맥을 부분적으로 폐색시키는 카테터, 예를 들어, 최근에 무작위화 시험에 적용되었고, 뇌졸중 치료에 대해 FDA 승인을 얻게될 수도 있는 CoAxia NeuroFlo™ 카테터 장치이다. 이러한 장치는 허혈의 발생 14시간 후까지 뇌졸중을 나타내는 피검체에 사용되어왔다.

[0091] 비-혈전용해제 또는 재관류의 기계적 방법의 사용은 단백질분해성 분해에 펩티드 PSD-95 억제제를 적용시키지 않으며, 따라서, PSD-95 억제제 및 재관류가 동시에 제공되거나 시간적으로 근접하여 제공되는 경우 유리할 수 있다.

[0092] IV. 뇌졸중

[0093] 뇌졸중은 원인에 상관 없이 CNS 내의 손상된 혈류로부터 발생하는 질환이다. 잠재적 원인은 색전증, 출혈 및 혈전증을 포함한다. 일부 신경 세포는 손상된 혈류의 결과로서 즉시 사멸한다. 이들 세포는 글루타메이트를 포함하는 이들의 성분 분자를 방출하고, 이는 차례로 NMDA 수용체를 활성화시키고, 세포내 칼슘 수준, 및 세포

내 효소 수준을 상승시켜, 추가의 신경 세포 사멸을 발생시킨다(홍분독성 캐스케이드). CNS 조직의 사멸은 경색증으로 언급된다. 경색 부피(즉, 뇌 내의 뇌졸중으로부터 발생하는 사멸한 신경 세포의 부피)는 뇌졸중으로부터 발생하는 병리학적 손상의 정도의 지표로 사용될 수 있다. 대증 결과는 경색의 부피 및 뇌 내에서의 경색의 위치 둘 모두에 좌우된다. 장애 지수, 예를 들어, 랭킨 뇌졸중 결과 척도(Rankin Stroke Outcome Scale)(Rankin, Scott Med J;2:200-15(1957)) 및 바텔 지수(Barthel Index)가 대증 손상의 척도로 사용될 수 있다. 랭킨 척도는 하기와 같이 피검체의 전체적인 상태를 직접 평가하는 것을 기초로 한다.

표 3

0	증상이 전혀 없음.
1	증상에도 불구하고 유의한 장애가 없음; 모든 일상적인 직무 및 활동을 수행할 수 있음.
2	약간의 장애; 모든 이전의 활동을 수행할 수 없으나, 도움 없이 자신의 업무를 감독할 수 있음.
3	약간의 도움을 필요로 하는 중간장애, 그러나 도움 없이 보행할 수 있음.
4	중간 내지 중증의 장애; 도움 없이 보행할 수 없고, 도움 없이 자신의 신체적 용무를 수행할 수 없음.
5	중증 장애; 누워 있음, 실금, 및 항시적인 간호 및 주의를 필요로 함.

바텔 지수는 피검체의 일상의 10개의 기본적인 활동을 수행하는 능력에 관한 일련의 질문을 기초로 하고, 0 내지 100의 스코어를 발생시키며, 낮은 스코어는 더욱 심한 장애를 나타낸다(Mahoney et al., Maryland State Medical Journal 14:56-61 (1965)).

대안적으로, 뇌졸중 중증도/결과는 월드 와이드 웹 ninds.nih.gov/doctors/NIH_Stroke_Scale_Booklet.pdf에서 이용가능한 NIH 뇌졸중 척도를 이용하여 측정될 수 있다.

상기 척도는 피검체의 의식, 운동, 감각 및 언어 기능의 수준의 평가를 포함하는 11개 그룹의 기능을 수행하는 피검체의 능력을 기초로 한다.

허혈성 뇌졸중은 더욱 특히 뇌로의 혈류의 봉쇄에 의해 야기되는 뇌졸중의 한 유형을 나타낸다. 상기 유형의 봉쇄에 대한 기초적 질환은 가장 일반적으로는 혈관벽 내층의 지방 침착의 발생이다. 이러한 질환은 죽상경화증으로 언급된다. 이들 지방 침착은 2개 유형의 폐색을 야기시킬 수 있다. 뇌혈전증은 혈관의 막힌 부분에서 발생하는 혈전(혈병)을 나타낸다. "뇌색전증"은 일반적으로 순환계, 일반적으로 심장 및 상부 흉부 및 목의 대동맥 내의 또 다른 위치에서 형성되는 혈병 또는 죽종을 나타낸다. 이후, 혈병 및/또는 죽종의 일부가 방출되고, 혈류로 진입하고, 통과하기에 너무 작은 혈관에 도달할 때까지 뇌의 혈관을 통해 이동한다. 색전증의 두번째의 중요한 원인은 동맥 세동으로 공지된 불규칙한 심박이다. 이는 혈병이 심장에서 형성되고, 이동하고, 뇌로 전해질 수 있는 질환을 발생시킨다. 허혈성 뇌졸중의 추가의 잠재적 원인은 출혈, 혈전증, 동맥 또는 정맥의 박리, 심장 정지, 출혈을 포함하는 임의의 원인의 쇼크, 및 의인성 원인, 예를 들어, 뇌 또는 심장 수술을 초래하는 뇌혈관 또는 혈관들에 대한 직접적인 외과적 손상이다. 허혈성 뇌졸중은 모든 뇌졸중 환자의 약 83 퍼센트에 해당한다.

일과성 허혈 발작(TIA)은 작은 또는 경계 뇌졸중이다. TIA에서, 허혈성 뇌졸중을 나타내는 질환이 존재하고, 통상적인 뇌졸중 경계 징후가 발생한다. 그러나, 폐색(혈병)이 단기간 동안 발생하고, 일반적인 메커니즘을 통해 자연히 해소되는 경향이 있다. 심장 수술을 겪는 피검체는 일과성 뇌 허혈 발작의 위험이 특히 존재한다.

출혈성 뇌졸중은 뇌졸중 환자의 약 17 퍼센트에 해당한다. 이는 파열되고, 주위 뇌로 출혈되는 약해진 혈관으로부터 발생한다. 혈액은 축적되고, 주위 뇌 조직을 압박한다. 출혈성 뇌졸중의 2개의 일반적 유형은 뇌내 출혈 및 거미막밑 출혈이다. 출혈성 뇌졸중은 약해진 혈관의 파열로부터 발생한다. 약해진 혈관으로부터의 파열의 잠재적 원인은 높은 혈압이 혈관의 파열을 야기시키는 고혈압성 출혈, 또는 뇌 동맥류, 동정맥 기형(AVM) 또는 해면 기형을 포함하는 파열된 뇌 혈관 기형과 같은 약해진 혈관의 또 다른 기초적 원인을 포함한다. 출혈성 뇌졸중은 또한 경색 내의 혈관을 약화시키는 허혈성 뇌졸중의 출혈성 전환, 또는 비정상적으로 약한 혈관을 함유하는 CNS에서의 원발성 또는 전이성 종양으로부터의 출혈로부터 발생할 수 있다. 출혈성 뇌졸중은 또한 의인

성 원인, 예를 들어, 뇌혈관에 대한 직접적인 외과적 손상으로부터 발생할 수 있다. 동맥류는 혈관의 약해진 영역의 풍선확장이다. 치료되지 않고 방치되는 경우, 동맥류는 파열되고, 뇌로 출혈될 때까지 지속적으로 약해질 수 있다. 동정맥 기형(AVM)은 비정상적으로 형성된 혈관의 집단이다. 해면 기형은 약해진 정맥 구조로부터 출혈을 야기시킬 수 있는 정맥 이상이다. 상기 혈관 중 어느 하나가 파열되고, 또한 뇌로의 출혈을 야기시킬 수 있다. 출혈성 뇌졸중은 또한 신체적 외상으로부터 발생할 수 있다. 뇌의 한 부분에서의 출혈성 뇌졸중은 출혈성 뇌졸중에서 손실된 혈액의 부족을 통해 또 다른 부분에서 허혈성 뇌졸중을 초래할 수 있다.

[0102] V. 치료에 적용가능한 피검체

[0103] 치료에 적용가능한 피검체는 CNS 또는 신체의 다른 곳에서 허혈의 징후(들) 및/또는 증상(들)을 나타내지만, 폐색이 뇌를 통한 혈류를 방해할 수 있는 혈관이 영향을 받은 피검체를 포함한다. 이들 피검체는 뇌졸중, 심근 허혈, 폐 색전증, 사지 허혈, 신장 또는 망막 허혈의 징후(들) 및/또는 증상을 나타내는 피검체를 포함한다. 이러한 피검체는 상기 질환의 의심되거나 다른 질환이 배제될 수 없는 피검체, 뿐만 아니라 일반적으로 승인된 기준, 예를 들어, DSM IV TR에 따라 진단된 피검체를 포함한다.

[0104] 치료에 적용가능한 피검체는 또한 허혈의 위험이 있으나, 허혈의 발생이 아직 발생되지 않은 피검체를 포함한다. 피검체가 대조 집단보다 허혈이 발생할 위험이 더 높은 경우 상기 피검체는 위험이 있는 피검체이다. 대조 집단은 장애가 진단된 적이 없거나, 장애의 가족력을 갖는 일반 집단(예를 들어, 연령, 성별, 인종 및/또는 민족에 의해 매치됨)으로부터 무작위로 선택된 하나 이상의 개체를 포함할 수 있다. 피검체는 상기 장애와 관련된 "위험 인자"가 상기 피검체와 관련된 것으로 밝혀지는 경우 장애에 대해 위험이 있는 것으로 간주될 수 있다. 위험 인자는, 예를 들어, 피검체 집단에 대한 통계적 또는 역학적 연구를 통해 제공된 장애와 관련된 임의의 활성, 소질, 사건 또는 특성을 포함할 수 있다. 따라서, 피검체는 기초적 위험 인자를 확인하는 연구가 특별히 상기 피검체를 포함하지 않은 경우에도 장애의 위험이 있는 것으로 분류될 수 있다. 예를 들어, 심장 수술을 받은 피검체는 일과성 뇌 허혈 발작의 위험이 있는데, 이는 심장 수술을 받지 않은 피검체의 집단에 비해 심장 수술을 받은 피검체의 집단에서 일과성 뇌 허혈 발작의 빈도가 증가되기 때문이다.

[0105] 뇌에 영향을 미치는 허혈의 위험이 있는 피검체는 뇌 또는 CNS에 대한 외과적 시술, 예를 들어, 혈관내 수술, 클리핑(clipping), 스텐팅 또는 미세카테터삽입(microcatheterization)을 받은 피검체를 포함한다. 상기 피검체는 또한 뇌로 공급하는 혈관(심장과 뇌를 연결시키는 혈관, 예를 들어, 경동맥 및 경정맥) 또는 망막, 신장, 척수 또는 사지에 혈액을 공급하는 동맥에 영향을 미치는 신체 내의 다른 곳에서의 수술을 받은 피검체를 포함한다. 바람직한 부류의 피검체는 뇌 동맥류를 치료하기 위한 혈관내 수술을 받은 피검체이다. 상기 유형의 수술을 받은 피검체는 CNS에 영향을 미치는 허혈의 향상된 위험을 갖는다. 뇌졸중의 위험이 있는 피검체는 또한 흡연자, 고혈압, 당뇨, 고콜레스테롤 환자를 포함한다. 특히 위험이 높은 피검체는 이전의 뇌졸중, 약한 뇌졸중, 또는 일과성 허혈 발작을 겪은 피검체이다.

[0106] VI. 조합 치료 방법

[0107] 조합 방법은 치료에 적용가능한 피검체로의 PSD-95 억제제 및 재관류 요법 형태의 제공을 포함하였다. PSD-95 억제제 및 재관류는 임의의 순서로 또는 동시에 제공될 수 있다. 보통, PSD-95 억제제 및 재관류는 동시에 제공되거나, 중첩되어 제공되거나, 인접한 시간(즉, 15분의 간격 이내)에 제공되거나, PSD-95 억제제가 먼저 투여된다.

[0108] 미리 예측될 수 없는 허혈의 치료를 위해, PSD-95 억제제가 허혈의 발생 이후 가능한 신속히 또는 실용적으로 신속히 투여될 수 있다. 예를 들어, PSD-95 억제제는 허혈의 발생 이후 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12 또는 24시간의 기간 이내에 투여될 수 있다. 미리 예측될 수 있는 허혈에 대해, PSD-95 억제제는 허혈의 발생 전, 발생과 동시에, 또는 발생 후에 투여될 수 있다. 예를 들어, 수술로부터 발생하는 허혈에 대해, PSD-95 억제제는 때때로 허혈이 발생하거나 발생할 지의 여부와 상관 없이 수술 시작 전 30분으로부터 시작하여 수술 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12 또는 24시간에 이르는 기간 동안 통상적으로 투여된다. PSD-95 억제제는 심각한 부작용이 없으므로, 이는 미리 정해진 당 분야에서 승인된 기준에 따라 진단 없이 뇌졸중 또는 다른 허혈성 질환이 의심되는 경우에 투여될 수 있다. 예를 들어, PSD-95 억제제는 뇌졸중이 발생한 위치(예를 들어, 환자의 집) 또는 피검체를 병원에 이송중인 앰블런스에서 투여될 수 있다. PSD-95 억제제는 또한 상기 질환이 실제 발생하거나 발생하지 않을 수 있는, 발생 전의 뇌졸중 또는 다른 허혈성 질환의 위험이 있는 피검체에 안전하게 투여될 수 있다.

[0109] PSD-95 억제제의 투여 후, 또는 때때로 투여 전, 허혈의 징후(들) 및/또는 증상(들)을 나타내는 피검체는 피검

체가 CNS 내에서 허혈을 갖거나 다른 방식으로 CNS에 영향을 미치는 지의 여부를 결정하고, 피검체가 출혈을 갖거나 출혈에 민감한지의 여부를 결정하기 위한 추가 진단 평가에 적용될 수 있다. 가장 특히, 뇌졸중의 증상을 나타내는 피검체에서, 뇌졸중이 출혈 또는 허혈의 결과인지의 여부를 구별하기 위한 시험이 시도되며, 출혈은 뇌졸중의 약 17%에 해당한다. 진단 시험은 하나 이상의 기관의 스캔, 예를 들어, CAT 스캔, MRI 또는 PET 영상화 스캔 또는 뇌졸중이 발생한 것을 암시하는 바이오마커에 대한 혈액 시험을 포함할 수 있다. B-타입 신경영양 성장인자, 폰 빌레브란트 인자, 기질 금속단백분해효소-9, 및 단백질 화학주성 단백질-1을 포함하는 뇌졸중과 관련된 여러 바이오마커가 공지되어 있다(Reynolds et al., *Clinical Chemistry* 49: 1733-1739 (2003) 참조). 스캐닝된 기관(들)은 허혈 부위(예를 들어, 뇌, 심장, 사지, 척추, 폐, 신장, 망막)인 것으로 다소 여겨질 뿐만 아니라 출혈의 근원인 것으로 다소 달리 여겨지는 것을 포함한다. 뇌의 스캔은 허혈성 뇌졸중과 출혈성 뇌졸중 사이를 구별하기 위한 일반적 절차이다. 진단 평가는 또한 피검체의 의학적 병력을 수득하거나 재검토하고, 다른 시험을 수행하는 것을 포함할 수 있다. 단독이거나 조합된 하기 요인 중 임의의 요인의 존재는 재관류 요법이 허용되지 않는 위험을 제공하는지의 여부: 피검체의 증상이 작거나 신속히 개선되는지의 여부, 피검체가 뇌졸중의 발생시 발작을 갖는지의 여부, 피검체가 과거 3개월 이내에 또 다른 뇌졸중 또는 심각한 두부 외상을 갖는지의 여부, 피검체가 마지막 14일 이내에 주요 수술을 받은지의 여부, 피검체가 두개내 출혈의 공지된 병력을 갖는지의 여부, 피검체가 >185 mmHg의 지속 수축기 혈압을 갖는지의 여부, 피검체가 >110 mmHg의 지속 확장기 혈압을 갖는지의 여부, 피검체의 혈압을 낮추기 위해 공격적 치료가 필요한지의 여부, 피검체가 거미막밑 출혈을 암시하는 증상을 갖는지의 여부, 피검체가 마지막 21일 이내에 위장관 또는 요로 출혈을 가졌는지의 여부, 피검체가 마지막 7일 이내에 비압박성 부위에서 동맥 천자를 가졌는지의 여부, 피검체가 마지막 48시간 내에 해파린을 투여받고, 상승된 PTT를 가졌는지의 여부, 피검체의 프로트롬빈 시간(PT)이 >15초인지의 여부, 피검체의 혈소판 수가 <100,000 μ L인지의 여부, 피검체의 혈청 글루코스가 <50 mg/dL 또는 >400 mg/dL인지의 여부, 피검체가 혈우병환자이거나, 다른 응고 결손을 갖는지의 여부를 평가하는데 사용될 수 있다.

[0110] 추가 진단 연구는, 연구 전, 피검체가 허혈성 질환을 갖는지의 여부, 및 피검체가 출혈을 갖거나, 허용되지 않는 출혈의 위험을 갖거나, 허용되지 않는 부작용 위험으로 인해 재관류 요법의 제공으로부터 달리 배제되는지의 여부를 승인된 기준에 따라 혹은 적어도 상기 여부들이 발생할 더 큰 가능성을 기준으로 해서 결정한다. 허용되지 않는 부작용의 위험이 없는, CNS 내 또는 다른 방식으로 CNS에 영향을 미칠 수 있는 허혈성 질환의 진단이 확인된 피검체는 이후 재관류 요법에 적용될 수 있다. 바람직하게는, 재관류 요법은 임의의 진단 절차의 완료 후 실용적으로 가능한 빨리 수행된다. 일부 피검체에서, 재관류 요법은 허혈의 발생 후 0, 1, 2, 3, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 15, 18 또는 24시간 초과 후에 시작된다. 의학적 환경(예를 들어, 혈관내 절차 동안)에서 발생하는 뇌졸중에서, 치료는 발생 1시간 미만 후에 시작될 수 있다. 일부 피검체에서, 재관류 요법은 허혈의 발생 0.5-6, 0.5-12, 0.5-18 또는 0.5-24시간 후에 시작된다. 일부 피검체에서, 재관류 요법은 재관류 요법이 지금까지 효과적인 것으로 간주되어온 보통 3-4.5시간의 윈도우 외부에서 시작된다. 예를 들어, 일부 피검체에서, 재관류 요법은 허혈의 발생 3시간 초과 후 또는 4.5시간 초과 후, 및 허혈의 발생 24 또는 48시간 이하 후에 시작된다. 일부 피검체에서, 재관류 요법은 허혈의 발생 5, 6, 7, 8, 9 또는 10시간 후 및 24 또는 48시간 이하 후에 시작된다. 일부 피검체에서, 재관류 요법은 허혈의 발생 275-390분 후로부터 시작된다. 일부 피검체에서, 재관류 요법은 허혈의 발생 시간에 관계없이 시작되나, 단, 이들은 특정 진단 기준, 예를 들어, CT 스캔 상에서의 완전 경색의 부재, 컴퓨터단층촬영술(CT), 자기공명영상(MRI) 또는 양전자방출단층촬영술(PET) 영상화 기준에 의한 허혈성 반응성의 증거, 및 뇌 출혈의 부재를 기초로 하여 재관류에 적격검사된다.

[0111] 재관류 시간이 또한 PSD-95 억제제의 투여로부터 측정될 수 있다. 상기 간격은, 예를 들어, 5분 내지 24 또는 48시간(본 출원의 다른 곳에서와 같은 여기서의 PSD-95 투여와 재관류 사이의 간격은 재관류 제공을 개시시키기 위한 PSD-95 억제제 투여 개시로부터 측정됨)일 수 있다. 상기 간격은, 예를 들어, 15분 내지 6시간, 15분 내지 4.5시간, 15분 내지 3시간, 15분 내지 1시간, 30분 내지 6시간, 또는 30분 내지 3시간, 또는 30분 내지 4.5시간, 또는 1-3시간, 또는 1-4.5시간일 수 있다. 단백질분해를 통해 작용하는 재관류를 위한 작용제(예를 들어, tPA)와 함께 사용되는 Tat-NR2B9c와 같은 펩티드 PSD-95 억제제에 대해서는 보다 긴 간격이 유리할 수 있는데, 이는 상기 긴 간격이 플라스민 발생에 의한 단백질분해성 분해에 적용되기 전 상기 작용제의 효과를 발휘하기 위해 보다 긴 기간을 억제제에 제공하기 때문이다.

[0112] 허혈성 질환이 확인되지 않거나 허혈성 질환이 있을 것 같지 않은 피검체는 보통 재관류 요법이 제공되지 않는다. 이러한 피검체는 PSD-95 억제제로부터 어떠한 이익도 제공받지 않을 수 있으나, 또한 치료된 적이 없는 것 보다는 더 악화되지 않는다. 허혈성 질환인 확인되거나, 허혈성 질환이 있을 것으로 간주되지만 재관류 요법으로부터 허용되지 않는 부작용의 위험이 있는 것으로 간주되는 피검체는 재관류 요법이 제공되지 않는다. 상기 피검체는 PSD-95 억제제로부터 획득된 이익을 가질 수 있으나, 재관류 요법으로부터의 허용되지 않는 부작용의

위험이 존재한다.

- [0113] PSD-95 억제제를 이용한 치료 및 재판류 요법 둘 모두는 독립적으로 경색 크기 및 허혈로 인한 기능 결손을 감소시키는 능력을 갖는다. 본 발명의 방법에 따라 조합하여 사용되는 경우, 경색 크기 및/또는 기능 결손에서의 감소는 바람직하게는 조합(즉, 협력)보다 동등한 요법하에서 단독으로 투여되는 상기 중 어느 한 작용제의 사용으로부터의 감소보다 더 크다. 더 바람직하게는, 경색 크기 및/또는 기능 결손에서의 감소는 조합을 제외하면 동등한 요법하에서 작용제 단독에 의해 달성되는 감소에 적어도 추가적이거나 바람직하게는 더욱 추가적(즉, 상승작용적)이다. 일부 요법에서, 재판류 요법은 허혈의 발생 후 시간(예를 들어, 4.5시간 초과)에서 경색 크기 및/또는 기능적 시간을 감소시키는데 효과적이거나, PSD-95 억제제의 동시 투여 또는 투여 전에 대해서는 효과가 없을 것이다. 달리 말하면, 피검체에 PSD-95 억제제 및 재판류 요법이 제공되는 경우, 재판류 요법은 바람직하게는 적어도 PSD-95 억제제 없이 이른 시간 제공되는 경우만큼 효과적이다. 따라서, PSD-95 억제제는 재판류 요법이 효과를 발생시키기 전 또는 효과를 발생시킴에 따라 허혈의 하나 이상의 손상 효과를 감소시킴으로써 재판류 요법의 효능을 효과적으로 증가시킨다. 따라서, PSD-95 억제제는 지연이 피검체의 최초 증상의 위험을 인지하는데 있어서의 피검체에서의 지연, 병원 또는 다른 의료 시설로 피검체를 수송하는데 있어서의 지연, 또는 허혈의 존재 및/또는 출혈 또는 이의 허용되지 않는 위험의 부재를 확립하는 진단 절차를 수행하는데 있어서의 지연으로부터의 지연인지 아닌지 간에 재판류 요법을 제공하는데 있어서의 지연을 벌충시킬 수 있다. 추가적 또는 상승작용적 효과를 포함하는 PSD-95 억제제 및 재판류 요법의 통계적으로 유의한 조합된 효과가 임상 시험에서의 집단 사이 또는 전임상 연구에서 동물 모델의 집단 사이에서 입증될 수 있다.

[0114] VI. 효과적인 투여 요법

- [0115] PSD-95 억제제는 CNS에 대한 허혈의 하나 이상의 손상 효과를 감소시키거나, 억제하거나, 지연시키는데 효과적인 투여량, 투여 빈도 및 투여 경로로 투여된다. 달리 지정하지 않는 한, 내재화 펩티드에 연결된 약리학적 작용제를 포함하는 키메라 작용제인 억제제에 대한 투여량은 키메라 작용제의 단지 약리학적 작용제 성분이 아닌 전체 작용제를 나타낸다. 유효량은 본 발명의 작용제로 처리되지 않은 질병 또는 질환으로부터 고통받는 피검체(또는 동물 모델)의 대조 집단에서의 손상에 비해 본 발명의 작용제로 처리된 질병으로부터 고통받는 피검체(또는 동물 모델)의 집단에서 허혈의 하나 이상의 손상 효과를 유의하게 감소시키거나, 억제하거나, 지연시키기에 충분한 작용제의 양을 의미한다. 상기 양은 또한 개별 처리된 피검체가 본 발명의 방법에 의해 처리되지 않은 동등한 피검체의 대조 집단에서의 평균 결과보다 더 유리한 결과를 달성하는 경우 효과적인 것으로 간주된다. 효과적인 요법은 의도된 목적을 달성하는데 필요한 투여 빈도 및 경로의 유효량의 투여를 포함한다.

- [0116] 치료를 필요로 하는 질환이 뇌졸중인 경우, 결과는 경색 부피 또는 장애 지수에 의해 결정될 수 있고, 개별 처리된 피검체가 랜킨 척도에서 2 또는 그 미만 및 바텔 척도에서 75 또는 그 초과를 나타내거나(Lees et al., N Engl J Med 2006;354:588-600 참조), 처리된 피검체의 집단이 동등한 미처리된 집단보다 임의의 장애 척도(예를 들어, 바텔, 랜킨, NIH 뇌졸중 척도)에서 유의하게 개선된(즉, 보다 덜한 장애) 분포의 스코어를 나타내거나, 처리된 피검체의 집단이 동등한 미처리된 집단에 비해 유의하게 감소된 경색 크기 또는 수를 나타내는 경우 투여량은 효과적인 것으로 인지될 수 있다. 작용제의 단일 용량은 일반적으로 뇌졸중의 치료에 충분하다. 그러나, 완전 경색의 존재가 CT 스캔에서 검출되거나, 추가 이익이 관찰되지 않을 때까지 다수의 투여량이, 예를 들어, 1, 2, 3, 6, 12, 18, 또는 24시간의 간격으로 투여될 수 있다.

- [0117] 작용제에 따라, 투여는 비경구, 정맥내, 비, 경구, 피하, 동맥내, 두개내, 수막강내, 복막내, 국소, 비내 또는 근내 투여일 수 있다. 펩티드 작용제에 대해 정맥내 투여가 바람직하다.

- [0118] 내재화 펩티드, 특히 아미노산 서열 YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:2)을 포함하는 HIV tat 펩티드를 포함하는 키메라 작용제에 대해, 작용제의 투여는 높은 수준의 내재화 펩티드와 관련된 히스타민의 방출 및 이의 다운스트림 효과를 감소시키기 위해 항염증제와 조합되거나 조합되지 않을 수 있다. 공동-투여에 바람직한 작용제는 비만세포 탈과립의 억제제, 예를 들어, 크로몰린(cromolyn) 또는 로독사미드(lodoxamide) 또는 본원에 나열된 임의의 다른 작용제이다. 항-히스타민 또는 코르티코스테로이드가 특히 조합되거나 보다 많은 투여량으로 또한 사용될 수 있다(WO2009/076105호 및 WO2010/144742호 참조).

- [0119] 인간으로의 투여를 위해, 키메라 작용제 Tat-NR2B9c의 바람직한 용량은 2-3mg/kg, 더욱 바람직하게는 2.6mg/kg이다. 지정된 투여량은 상기 투여량이 통상적인 병원 환경에서 측정될 수 있는 정확도에서 고유한 오차 한계(margin of error)를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 상기 용량이 바람직한데, 이는 상기 용량이 상기 작용제가 대부분의 피검체에서 유의한 양의 히스타민의 방출 및 계속해서 발생하는 후유증 없이 투여될 수 있는 최대 용량이기 때문이다. 보다 많은 투여량의 히스타민의 방출은 상기 논의된 바와 같은 항-염증제의 공동 투여

에 조절될 수 있고, 임의의 경우에 일반적으로 유해한 사례 없이 자연적으로 해소될 수 있으나, 이는 용량을 3 mg/kg 미만, 바람직하게는 2-3 mg/kg, 더욱 바람직하게는 2.6 mg/kg으로 유지시킴으로써 최적으로 회피될 수 있다. 상기 양은 단일 용량 투여를 위한 양, 즉, 질병 에피소드 당 하나의 용량이다. 상기 용량은 또한 매일, 또는 더욱 빈번히 투여될 수 있다. 보다 적은 용량, 임의로 1-2 mg/kg, 또는 0.5-1 mg/kg, 0.1-0.5 mg/kg 또는 0.1 mg/kg 미만이 이용될 수 있다. 반복된 용량 요법을 위해, 심지어 더 적은 투여량이 사용될 수 있다.

[0120] 상기 지정된 투여량은 키메라 작용제 Tat-NR2B9c(YGRKKRRQRRRLSSIESDV; SEQ ID NO:6)에 대한 것이다. 동일 효과를 달성하기 위한 다른 작용제에 대한 동등한 투여량은 여러 방법에 의해 결정될 수 있다. 하나 또는 소수의 아미노산이 치환되거나, 삽입되거나, 결실되고, 분자량이 약 +/- 25% 내에서 동일하게 유지되는 상기 작용제의 가까운 변이체에 대해, 상기 투여량은 여전히 우수한 지침이다. 그러나, 일반적으로, 다른 작용제에 대해, 동등한 투여량은 내재화 펩티드를 갖거나 갖지 않는 상기 작용제의 분자량, 내재화 펩티드가 존재시, 이의 표적에 대한 Kd, 및 이의 약동학 및 약역학 파라미터에 따라 다양할 수 있다. 일부 작용제에 대해, 동등한 투여량은 등몰량의 약리학적 작용제를 전달하도록 계산될 수 있다. 다른 작용제에 대해, Kd 또는 약동학 및 약역학 파라미터에서의 차이를 고려하기 위해 추가 조정이 이루어질 수 있다. 일부 작용제에 대해, 동등한 투여량은 동물 모델 또는 임상 시험에서 동일 종점에 도달하도록 달성된 용량으로부터 경험적으로 결정된다.

[0121] 펩티드 작용제, 예를 들어, Tat-NR2B9c는 바람직하게는 혈관으로의 주입, 더욱 바람직하게는 정맥내 주입에 의해 전달된다. 키메라 작용제 Tat-NR2B9c에 대해, 상기 고려사항들 사이의 균형을 제공하는 바람직한 주입 시간은 5-15분, 더욱 바람직하게는 10분이다. 지정된 시간은 +/- 10%의 오차점(marking of error)을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 주입 시간은 다른 방식으로 진행되어 완료되는 최초 확산으로부터의 임의의 잔여 비밀을 세척하기 위한 세척 확산을 위한 임의의 여분의 시간을 포함하지 않는다. Tat-NR2B9c에 대한 주입 시간은 또한, 임의로 내재화 펩티드에 연결된 다른 약리학적 작용제, 특히 상기 논의된 바와 같은 Tat-NR2B9c의 가까운 변이체에 대한 지침으로 작용할 수 있다.

[0122] PSD-95 억제제는 약학적 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 약학적 조성물은 통상적으로 GMP 조건하에서 제조된다. 비경구 투여를 위한 약학적 조성물은 선택적으로 살균(예를 들어, 펩티드의 필터 살균)되고, 발열원을 함유하지 않는다. 약학적 조성물은 단위 투여량 형태(즉, 단일 투여를 위한 투여량)로 제공될 수 있다. 약학적 조성물은 약학적으로 사용될 수 있는 제제물로의 키메라 작용제의 가공을 촉진하는 하나 이상의 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 이용하여 통상적인 방식으로 제형화될 수 있다. 적절한 제형화는 선택된 투여 경로에 좌우된다.

[0123] 키메라 작용제 Tat-NR2B9c의 한 예시적 제형은 10-30 mg/ml, 예를 들어, 16-20 또는 18 mg/ml 또는 20 mg/ml의 농도로 일반적인 염수(0.8-1.0%, 바람직하게는 0.9% 염수) 또는 인산염 완충 염수 중에 펩티드를 함유한다. 동결 저장되는 경우, 상기 조성물은 4년 또는 그 초과 기간 동안 안정적(사소한 펩티드의 분해 또는 응집)이다. 추가 부형제가 첨가될 수 있으나, 상기 부형제가 없는 일반적인 염수 또는 인산염 완충 염수가 상기 안정성을 획득하기에 충분하다. 사용을 위해, 상기 조성물은 해동되고, 혈관으로의 주입을 위해 보다 많은 부피의 일반적인 염수로 희석된다.

[0124] 재관류를 위한 약리학적 작용제의 많은 예가 임상적으로 사용중이다. 상기 작용제는 이들의 통상적인 제형화, 용량, 투여 경로, 및 투여 빈도에 따라 본 발명의 조합 방법에서 사용될 수 있다(미국 의사 처방 참고서(Physician's Desk Reference) 및 적용가능한 패키지 삽입물 참조). 예를 들어, tPA 또는 다른 혈전용해제는 인간에서, 예를 들어, 0.5-1.5 mg/kg, 바람직하게는 0.9 mg/kg의 용량으로 정맥내 투여될 수 있다. tPA 및 다른 혈전용해제가 또한 36시간 이하 동안 인간 환자에서 바람직하게는 0.02-0.1 mg/kg/시간의 용량으로 동맥내로 제공될 수 있다. tPA 및 다른 혈전용해제는 또한 손상된 혈류 부위, 예를 들어, 뇌 내의 색전에 직접 투여될 수 있으며, 이에 대해 바람직한 용량은 인간 환자에서 2 mg(30 kg 미만의 체중을 갖는 환자에서 그 미만)이다. 국소화된 투여는 바람직하게는 카테터를 통한 투여이다. 경색 부위로의 직접적 투여는 단백질분해성 분해에 대한 펩티드 PSD-95 억제제의 잠재적 노출을 감소시킨다. 마찬가지로, 기계적 재관류 방법이 통상적인 실시예 따라 이용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0125] 실시예

[0126] 실시예 1:

- [0127] 추너류 구세계 영장류(Gyrencephalic Old World Primate)에서의 뇌졸중 후의 신경보호
- [0128] 서문
- [0129] 본 발명자는 인간에 대한 유전적, 해부학적 및 행동 유사성을 갖는 보다 고등한 목(order)의 추너류 비인간 영장류(NHP)를 이용하였으며, 신경독성 신호전달 경로로부터 시냅스후 치밀질 단백질 PSD-95를 분리시키는 화합물인 PSD95 억제제에 의한 신경보호를 시험하였다. 여기서, 본 발명자는 뇌졸중 손상이 PSD95 억제제가 뇌졸중 발생 후에 투여된 NHP에서 예방될 수 있음을 제시한다. 상기 처리는 자기공명영상(MRI) 및 조직학에 의해 측정되는 바에 따라 경색 부피를 감소시켰고, 허혈 뇌 조직의 전체-유전체(genome-wide) 스크린에서 유전자 전사를 유지시키는 허혈 세포의 능력을 보존시켰고, 신경행동 검정에서 신경학적 기능을 유의하게 보존시켰다. MRI에 의한 조직 신경보호의 정도는 신경학적 기능의 보존과 강하게 부합하였고, 이는 뇌 조직 온전성이 기능적 결과를 반영할 수 있다는 증명되지 않은 견해를 뒷받침한다. 본 발명자의 발견은 뇌졸중 후의 조직 신경보호 및 개선된 기능적 결과가 PSD95 억제제를 이용하여 추너류 NHP에서 명료하게 달성가능한 것을 확립시킨다.
- [0130] 진반적 실험 흐름 및 평가
- [0131] 본 발명자는 모든 결과의 배경 은폐 및 맹검 평가로 모든 실험을 수행하였다. 일차 결과 척도는 T2-강조 MRI 연구로부터 측정된 30일에서의 경색 부피였다. 해부학적 이차 결과는 확산-강조 영상화(DWI) MRI에 의한 4시간 및 24시간, T2 MRI에 의한 24시간, 및 T2 MRI 및 조직학에 의한 30일에서의 경색 부피였다. 신경행동 결과를 비-인간 영장류 뇌졸중 척도(NHPSS) 및 언덕 및 골짜기 임무(hill and valley task), 2-튜브 임무 및 6 웰 임무를 포함하는 임무들의 감각운동 배터리(sensorimotor battery)를 이용하여 30일의 관찰 기간 전체에 걸쳐 측정하였다. 처리 및 평가를 위한 계획은 도 1A, 및 후속되는 설명에 제공된다. 중간대뇌동맥 폐색의 시간은 하기에 기재되는 실험 사이에서 다양하였다.
- [0132] 90분 MCAO의 발생 1시간 후 또는 3시간 후에 시작하여 Tat-NR2B9c(2.6mg/kg) 또는 위약(0.9% 염수)의 10분의 정맥내 주입을 제공하기 위해 마카크(Macaque)를 무작위화시켰다. NHP에 대해 선택된 용량을 래트 연구에서 사용된 이전의 용량으로부터 외삽된 "영장류 등가 용량"의 계산으로부터 어렵잡았고, 이는 신체 표면적에서의 중간 차이에 대한 표준화를 기초로 하였다.
- [0133] 동물을 MCAO의 15분 이내에 MRI 스캐너로 옮기고, MCAO 동안 혈류가 박탈된 뇌 부피(위험이 존재하는 조직)를 정량하기 위해 관류 영상화를 모두 수행하였다. 추가로, MCAO를 확인하기 위해 MR 혈관조영술(MRA)을 수행하였다. 90분 후 이차 MRA를 수행하였고, MCAO를 종결시켜 MCA의 재관류를 확인한 후, 4시간에서 확산 영상화를 수행하였다. 이후, 동물을 깨우고, 회복시켰다. 이들을 다시 마취시키고, 24시간 및 30일에서 다시 영상화를 수행하였다. NHPSS 스코어를 MCAO의 8시간 이내 및 30일까지 할당하였고, 나머지 신경학적 시험을 7일 및 14일 또는 30일에 수행하였다.
- [0134] 실험 그룹 사이의 생리학적인 파라미터, 또는 MCAO의 15분 이내의 관류 영상화에 의해 결정된 바와 같은 약물 그룹과 위약 그룹 사이의 위험이 있는 조직의 부피에서 차이가 없었다.
- [0135] 본 발명자는 비-인간 영장류 뇌졸중 척도(NHPSS), 및, 일부 경우에, 언덕 및 골짜기 임무, 2-튜브 선택 임무 및 6 웰 임무를 포함하는 임무들의 감각운동 배터리를 이용하여 14 내지 30일의 관찰 기간 전체에 걸쳐 신경학적 평가를 수행하였다. NHPSS는 인간 뇌졸중 실험에서 사용되는 NIH 뇌졸중 척도와 유사한 복합 등급화이다. 41 포인트의 스코어는 중증의 양쪽성 신경학적 장애를 나타내고, 0은 정상이다. 나머지 시험은 사지의 전체 강도, 미세 운동 기능 및 편측-무시(hemi-neglect) 또는 시야 결손의 영향을 측정한다.
- [0136] *Tat-NR2B9c* 처리는 뇌 허혈을 감소시키고, *tPA*의 사용을 위한 현재의 유용한 4.5 시간 윈도우를 넘어 재관류 요법을 위한 시간 윈도우를 연장시킬 수 있다.
- [0137] 현재, 급성 허혈 뇌졸중에 대해 유일한 널리 승인된 치료는 섬유소용해 작용제 rt-PA(재조합 조직 플라스미노겐 활성화제)의 정맥내 주입을 이용한 폐색된 뇌 동맥의 재관류이다. 정맥내 rt-PA를 이용한 통상적인 재관류는 뇌졸중 발생 후 90분 이내에 제공되는 경우에 임상 결과를 개선시키는데 가장 유리하며, 그 후 4.5시간에서 최저가 되거나 0이 될 때까지 이익이 감소한다. 재관류의 유용성에 대한 상기 협소한 윈도우는 유리할 수 있는 환자의 수를 제한한다. 따라서, 신경보호제를 이용한 초기 치료의 한 잠재적 적용은 재관류 요법으로부터 임상적 이익이 수득될 수 있는 동안 간격을 연장시키는 것이다. 신경외과 의사 및 신경중재시술자(neurointerventionalists)는 뇌의 상태가 여전히 뇌를 구제하기에 유용하고, 출혈의 위험이 없이 뇌를 구제하기에 안전한 것을 나타내는 경우 표준 윈도우 외부에서 재관류 요법을 이용할 수 있다. 이를 시험하기 위해,

본 발명자는 MCAO 발생 60분 후의 Tat-NR2B9c의 투여가 정맥내 rt-PA가 인간에서 더 이상 유의하게 이롭지 않은 4.5시간 시점까지 재관류가 지연되는 경우에 뇌졸중 결과를 개선시킬 수 있는지의 여부를 NHP에서 평가하였다 (또한, Cook et al., Nature. 483, 213-7 2012 참조).

[0138] 6 마리의 마카크를 영구적 MCAO에 적용시켰고, 허혈 발생 5분 후에 시작하여 Tat-NR2B9c 또는 위약을 처리하였다. 동물을 MRI 스캐너에 두었고, DWI MRI 스캔을 15분마다 획득하였다(도 2A). DWI 고강도가 검출가능한 뇌의 부피는 둘 모두의 그룹에서 시간이 지남에 따라 증가하였다. 그러나, Tat-NR2B9c를 이용한 처리는 상기 증가의 속도를 약 2배까지 약화시켰다(도 2A; 시간 상수 = 대조군 및 Tat-NR2B9c에 대해 각각 2.20 ± 0.28 시간 및 4.50 ± 0.54 ; $p = 0.019$). 심지어 MCAO 4.5시간 후에도, Tat-NR2B9c 처리된 동물은 48시간 및 7일에서의 MRI 및 T2 스캔에 의해 경색 크기에서 유의한 감소를 나타내었다(도 1B-D). 또한, 허혈 부피 내에서, Tat-NR2B9c 처리된 동물의 뇌에서의 DWI 강도는 미처리된 대조군의 DWI 강도보다 낮게 유지되었고, 이는 경색 부피 내의 조직이 보다 나은 온전성으로 유지된 것을 암시한다(도 2B). 이들 데이터는 구제될 수 있는 뇌가 남아있으며, 재관류 약물 또는 요법의 제공이 효과적인 시간 윈도우의 외부인 것으로 인해 일반적으로 고려되지 않는 시간에서 뇌 조직의 재관류 및 생존을 개선시킬 수 있는 증거를 제공한다. 이들은 또한 Tat-NR2B9c가 나머지 조직을 구제하기 위해 뇌의 재관류를 위한 유용한 시간을 연장시킬 수 있는 증거를 제공한다.

[0139] Tat-NR2B9c는 90분 뇌졸중에 적용된 비-인간 영장류에서 경색 부피 및 신경학적 결손을 유의하게 감소시킨다.

[0140] 허혈성 뇌졸중 1시간 후에 제공되는 경우 Tat-NR2B9c의 효과를 관찰하는 이후의 연구를 상기 모델에서 시험하였다. 90분 MCAO의 발생 1시간 후에 시작하여 Tat-NR2B9c(2.6mg/kg) 또는 위약(0.9% 염수)의 10분 정맥내 주입을 제공하기 위해 20마리의 마카크를 무작위화시켰다. NHP에 대해 선택된 용량을 래트 연구에서 사용된 이전의 용량으로부터 외삽된 "영장류 등가 용량"의 계산으로부터 어렵잡았고, 신체 표면적에서의 중간 차이에 대한 표준화를 기초로 하였다.

[0141] 동물을 MCAO의 15분 이내에 MRI 스캐너로 옮기고, MCAO 동안 혈류가 박탈된 뇌 부피(위험이 존재하는 조직)를 정량하기 위해 관류 영상화를 모두 수행하였다. 추가로, MCAO를 확인하기 위해 MR 혈관조영술(MRA)을 수행하였다. 90분의 MCAO 후 재관류를 확인하기 위해 이차 MRA를 수행한 후, 4시간에서 확산 영상화를 수행하였다. 이후, 동물을 깨우고, 회복시켰다. 이들을 다시 마취시키고, 24시간 및 30일에서 다시 영상화를 수행하였다. NHPSS 스코어를 MCAO의 8시간 이내 및 30일까지 할당하였고, 나머지 신경학적 시험을 7일 및 30일에 수행하였다.

[0142] 위약이 투여된 10마리의 동물 중 4마리는 뇌 종창 및 갈고리이랑탈출(uncal herniation)로 인해 뇌졸중 48시간 이내에 사망하였다. Tat-NR2B9c로 처리된 3마리의 동물은 뇌졸중 또는 약물과 관련되지 않은 수술/마취 합병증의 결과로 사망하였다. 어떠한 동물도 "치료 의향"(ITT) 분석으로부터 배제시키지 않았다. 가장 큰 가능한 경색 부피 및 최악의 신경학적 스코어를 반영시키기 위해 초기 사망으로 인해 분실된 데이터 모두를 귀속시켰다. 상기 방법은 유의한 처리 효과를 검출하는 것에 대해 편향됨에도 불구하고, 이는 인간 임상 시험에서 사용되는 가장 보존적이고 가장 반영적인 방법이다.

[0143] 생리학적 파라미터 또는 MCAO의 15분 이내의 관류 영상화에 의해 결정된 바와 같은 위험이 있는 조직의 부피에서 약물 그룹과 위약 그룹 사이에 차이가 없었다(도 6A). 그러나, 24시간까지, Tat-NR2B9c로 처리된 동물은 DWI 영상화(44.0% 감소; $p = 0.039$; 도 6B) 및 T2-강조 영상화(37.4% 감소, $p = 0.010$; 도 6B, C)에 의해 위약과 비교하여 경색 부피에서 유의한 감소를 나타내었다. 경색 부피에서의 상기 감소는 30일의 T2-강조 MRI 스캔(38.7% 감소, $p = 0.013$; 도 6C) 및 30일에서의 조직학적 평가(도 6D; ITT에 의해 평가하고, 초기 사망을 배제시키는 경우 경색 부피에서 각각 59.3% 및 73.6% 감소; $p < 0.001$)에 의해 반영되는 바와 같이 지속되었다. 인간과 같이 NHP는 MCAO 후에 가변적인 경색을 가질 수 있으므로, 각각의 동물의 경색 부피를 MCAO의 15분 이내에 측정된 이의 MRI 관류 결손으로 표준화시켰다. 이러한 표준화는 Tat-NR2B9c를 이용한 처리가 DWI 영상화에 의해 평가시 24시간까지 위험이 있는 부피의 55% 및 T2-강조 MRI로 측정시 30일에서 70%까지 경색을 감소시킨 것을 나타내었다(도 6E). 24시간 DWI MRI로부터 계산된 경색 부피는 30일의 조직학적 분석으로부터 획득된 경색 부피와 충분히 상관 관계가 있었다($R = 0.691$, $p < 0.01$).

[0144] 본 발명자는 비-인간 영장류 뇌졸중 척도(NHPSS) 및 언덕 및 골짜기 임무, 2-튜브 선택 임무 및 6 웰 임무를 포함하는 임무들의 감각운동 배터리를 이용하여 30일의 관찰 기간 전체에 걸쳐 신경학적 평가를 수행하였다. NHPSS는 인간 뇌졸중 실험에서 사용되는 NIH 뇌졸중 척도와 유사한 복합 등급화이다. 41 포인트의 스코어는 중증의 양측성 신경학적 장애를 나타내고, 0은 정상이다. 나머지 시험은 사지의 전체 강도, 미세 운동 기능 및 편측-무시 또는 시야 결손의 영향의 조합을 측정한다.

- [0145] Tat-NR2B9c로 처리된 동물은 허혈 발생 8시간 후에서의 가장 이른 평가 및 30일의 관찰 기간 전체에 걸쳐 개선된 NHPSS 스코어를 나타내었다($P=0.018$, 2원 반복 측정 ANOVA; 도 6F). 2 튜브 선택 임무에서의 수행은 Tat-NR2B9c로 처리된 동물에서 뇌졸중 전 수준으로 복귀되었으나, 위약 그룹에서는 완전히 손상된 채로 유지되었고, 이는 뇌 구제가 대비병변 반구에서의 항목들에 대한 주의를 가리는 동측병변 반구에서의 항목들에 대한 주의의 경향인 "소거(extinction)"를 방지한 것을 암시한다. Tat-NR2B9c를 이용한 처리는 또한 좌측 상지에서의 6-웰 및 언덕 및 골짜기 계단 임무에서 동물의 수행을 유의하게 개선시켰다. 우측 상지 수행이 또한 개선을 나타내었고, 이는 전체적으로 개선된 주위 및 지각 능력을 암시한다.
- [0146] *Tat-NR2B9c는 중증-뇌졸중에서 경색 크기 및 신경학적 결손을 감소시키는데 효과적이다.*
- [0147] 본 발명자는 다음으로 정맥내 tPA를 이용한 재관류의 효과의 한계인 4.5시간보다 길게 지속된 뇌졸중에서의 Tat-NR2B9c의 효능을 입증하였다. 4.5h 분의 MCAO의 발생 1시간 후에 시작하여 Tat-NR2B9c(2.6mg/kg) 또는 위약(0.9% 염수)의 10분의 정맥내 주입을 제공하기 위해 12마리의 마카크를 무작위화시켰다. 다른 점에서는, 상기 방법은 MRI 스캔의 타이밍 및 최종 영상화 및 신경학적 평가가 7일에서 수행된 것을 제외하고는 본 발명자의 첫번째 연구와 유사하였다.
- [0148] 사망이 없었고, MCAO 후 생리학적 파라미터 또는 위험이 있는 조직의 부피에서 약물 그룹과 위약 그룹 사이에 차이가 없었다(도 7A). 그러나, 연장된 허혈 간격에도 불구하고, Tat-NR2B9c로 처리된 동물은 48시간에서의 T2 및 DWI 영상화 및 7일에서의 T2-강조 영상화에 의해 평가시 위약과 비교하여 경색 부피에서 유의한 감소를 나타내었다(도 7B-E). 또한, Tat-NR2B9c로 처리된 동물은 허혈 발생 12시간 후에서의 가장 이른 평가 및 7일의 관찰 기간 전체에 걸쳐 개선된 NHPSS 스코어를 나타내었고($P<0.001$; 2원 반복 측정 ANOVA; 도 7F), 6-웰 및 골짜기 계단 임무에서 보다 나은 수행의 경향을 나타내었다. 상기 결과는 Tat-NR2B9c를 이용한 초기 처리가 결손환이 제한되고 반응성이 작은 중증 MCAO의 모델에서도 재관류가 기능적 이익을 가질 수 있는 기간 동안의 윈도우를 증가시킬 수 있는 것을 암시한다. MRI 및 신경학적 평가에 의해 평가된 바와 같은 뇌졸중 4.5시간 후에서의 처리의 이익의 크기는 심지어 4.5시간의 윈도우를 넘어서는 재관류 요법의 이익을 연장시키기 위한 초기 신경보호의 유용성에 대한 잠재성을 암시한다.
- [0149] *Tat-NR2B9c는 뇌졸중의 발생 3시간 후에 제공되는 경우 뇌졸중 후 허혈 및 신경학적 결손을 감소시키는데 효과적이다.*
- [0150] 뇌졸중 발생 60분 이내에 신경보호제를 이용한 처리가 환자의 작은 서브셋에서 실행가능하나, 투여의 치료 윈도우를 연장시키는 것은 뇌졸중 피해자의 훨씬 더 큰 비율에게 이로울 것이다. 따라서, 본 발명자는 뇌졸중 발생 3시간 후에 Tat-NR2B9c를 투여하는 것이 연장된 MCAO의 환경에서 이로울 수 있는지의 여부를 결정하였다. 인간에서, 뇌졸중 발생 3시간 후에 투여된 정맥내 rtPA를 이용한 재관류는 신경보호의 부재하에서도 이롭다. 이는 많은 환자에서 상기 시간에서 구제가능한 반응성의 존재를 증명한다. 본 발명자는 NHP가 3시간에서 유의한 PWI/DWI 미스매치(반응성)을 나타내는 MCAO 모델을 이용함으로써 상기 임상 시나리오를 실험적으로 재현시켰다. 인간에서와 마찬가지로, 상기 미스매치는 처리의 부재하에서 경색으로 진행된다.
- [0151] 3.5시간의 MCAO의 발생 3시간 후에 시작하여 Tat-NR2B9c(2.6mg/kg) 또는 위약(0.9% 염수)의 10분의 정맥내 주입을 제공하기 위해 24마리의 마카크를 무작위화시켰다. 최종 영상화 및 신경학적 평가를 14일에 수행한 것을 제외하고는 다른 방법은 변경되지 않았다. 사망이 없었고, 그룹 사이에서 MCAO 후 생리학적 파라미터 또는 위험이 있는 조직의 부피에서 차이가 없었다(도 8A). 그러나, 연장된 허혈 간격 및 Tat-NR2B9c를 이용한 지연된 처리 둘 모두에도 불구하고, 약물 처리된 동물은 48시간 및 14일에서의 해부학적(MRI) 기준에 의해 평가시 위약과 비교하여 경색 부피에서 유의한 감소를 나타내었다(도 8B-E). Tat-NR2B9c로 처리된 NHP는 또한 14일의 관찰 기간 전체에 걸쳐 개선된 NHPSS 스코어를 나타내었고($P=0.004$ 2원 반복 측정 ANOVA; 도 8F), 6-웰 및 골짜기 계단 임무에서 보다 나은 수행의 경향을 나타내었다. 따라서, 뇌졸중 발생 3시간 후의 Tat-NR2B9c를 이용한 처리는 NHP에서 뇌졸중 손상을 감소시키는데 효과적이다. 상기 치료 윈도우가 뇌졸중 피해자에서 실용적임에 따라, PSD95 억제제를 이용한 처리는 임상적으로 사용할 수 있는 치료 방법을 구성할 수 있고, 재관류 단독의 이용보다 효과적일 수 있다.
- [0152] *결론*
- [0153] Tat-NR2B9c는 원숭이 및 인간과 같은 보다 고등한 목(order)의 뇌에서 뇌졸중 후의 손상의 중증도를 효과적으로 감소시킬 수 있다. 뇌졸중 후의 시점에서 MRI DWI 및 T2 이미지를 시험하는 것은 허혈의 영역이 미처리된 동물에서의 허혈의 영역보다 유의하게 덜 손상되는 것을 입증한다. 병변의 부피에서의 감소에 더하여, 이는 DWI-

MRI에 의한 덜 강한 이미지 및 T2 이미지에서의 감소된 신호 강도에 의해 암시된다. 상기 데이터는 뇌가 여전히 구제될 여지가 있고, 재관류 요법이 여전히 다른 방식으로는 Tat-NR2B9c 처리가 없을 수 있는 뇌로 혈액이 투과하여 상기 뇌의 많은 부분에서 작용하도록 할 수 있는 증거를 제공한다. 따라서, 특히 tPA와 같은 약물과의 재관류 요법은 뇌의 영향을 받은 영역으로 보다 낮게 투과될 수 있고, 뇌의 영향을 받은 영역으로의 혈류를 추가로 증가시키는데 효과적일 수 있다.

[0154] 비-인간 영장류 방법

[0155] 뇌졸중 모델: 동물을 마취시키고(이소플루란 1.0-2.5%), 관삽입하고, 환기시켰다. 비-침습성 모니터링은 레그 커프(leg cuff)에 의한 BP, 호흡중기 CO₂, O₂ 포화, ECG 및 직장 프로브에 의한 온도를 포함하였다. 가열 담요에 의해 온도를 유지시켰다(37 ± 0.5°C). BP 및 혈액 가스를 모니터링하기 위해 대퇴 동맥 라인을 이용하였다. 시노몰구스(cynomolgus) 마카크(3.0-4.0 kg)에서의 MCAO를 우측 관자놀이 개두술을 이용하고, 안와전두분지(orbitofrontal branch) 및 렌즈핵선조체 동맥(lenticulo-striate artery)의 기원에 원위에 5mm 티타늄 동맥류 클립으로 실비안 열구(Sylvian fissure) 내에서 우측 MCA를 폐색시켜 수행하였다.

[0156] 허혈성 반응영 조직 규정: 반응영 조직을 조직 수거시에 아직 경색되지 않았으나, 이후의 경색으로 지속적으로 진행되는 조직으로 작업적으로 정의하였다. 반응영은 마카크에서 가변적일 수 있으므로, 허혈 피질로부터 수득된 것을 반영하는 부위로부터의 뇌졸중에 대한 동측 및 또한 뇌졸중에 대한 대측의 전체 MCA 혈관 분포를 가로지르는 피질로부터 MCAO 1시간 후 또는 6시간 후에 8개의 2x2mm 생검을 수득하였다. 생검된 위치의 사진을 찍었다. 8개의 생검이 반응영 조직을 나타내는지 결정하기 위해, 동물을 7T MRI 스캐너로 옮기고, 생검 후 15분 이내 및 5.75시간에서 확산 강조(DWI), T2 및 관류 영상화를 수행하였다. 1시간에서의 반응영 조직을 DWI에 의해 5.75시간에서 경색으로 진행되는 경색이 결여된 조직으로 규정하였다. 6시간에서의 반응영 조직을 MR 관류 결손의 경계 내이지만, DWI 또는 T2 고강도를 나타내지 않은 조직으로 규정하였다. NHP의 반응영을 규정하기 위한 MRI의 이용은 구제가능한 조직의 양이 6시간까지 줄어들에 따라 필수적이다.

[0157] 전반적 MRI 절차: 영상화를 B-GA20S 구매 코일을 이용하여 7-Tesla Bruker BioSpec 시스템 구동 Paravision 4.0 소프트웨어에서 수행하였다. NHP 스캔을 위해 15.5cm 내부 직경의 구적 전송/수신 부피 코일(quadrature transmit/receive volume coil)을 사용하였다. NHP에 관 삽입하고, 환기시키고, 엎드린 상태로 영상화시켰다. 전체에 걸쳐 생리학적인 모니터링을 유지시켰다. 상기 프로토콜은 측면에서의 2D T2-강조, 관류 및 확산-강조 이미지의 스택을 제공한다. T2-강조 영상화는 고속-스핀 에코(fast-spin echo)(TE/TR = 84/5000ms, 레어(rare) 인자 = 14, 400x400x1500 마이크론 해상도에 대해 9cm 시계 상에서 225x225 매트릭스)로도 언급되는 RARE 방법을 이용한다. 확산-강조 영상화는 스핀-에코 멀티-샷 에코-평면 영상화 기술(TE/TR = 32/10000ms, 9 EPI 샷(shot), 250 kHz 주파수폭, b=1000 s/mm²에서 3 직각 확산 방향, 500x500x1500 마이크론 해상도에 대해 9cm 시계 상에서 180x180 매트릭스를 갖는 10개 평균)을 이용한다. 관류 영상화를 동적, 대조 증강, 민감성-강조 관류 방법(T2-EPI, TE=18ms, 2 EPI 샷, 2-초 시간 해상도, 및 90 반복, 5 연속 슬라이스 상에서 700x700x1500-마이크론 해상도에 대해 9cm 시계 상에서 180x180 매트릭스)을 이용하여 수행하였다. 관류 스캔을 위해, 말초 정맥내를 통해 7-초의 전체 주사 시간을 이용하여 세번째 반복시에 시작하여 가돌리늄(0.1mmol/kg) 볼투스를 정맥내 주사하였다. 확산 이미지를 MATLAB(Natick, MA, USA)에서 후-처리하여, 3개의 b=1000 s/mm² 이미지로부터 평균 이미지를 생성시키고, 겹보기 확산 계수(Apparent Diffusion Coefficient, ADC) 맵을 계산하였다. 3차원으로 재구성된 평균 확산 이미지의 스택과 함께 ITK-Snap 윤곽형성 소프트웨어(Pittsburgh, PA, USA)를 이용하여 뇌졸중 부피를 계산하였다. PerfTool 소프트웨어를 이용하여 관류 영상화를 처리하여 뇌 혈류 맵을 생성시켰다.

[0158] 실험 설계 및 통계 분석: 미국 뇌졸중 치료 학술 산업 원탁회의(Stroke Therapy Academic Industry Roundtable, STAIR) 위원회의 "우수한 과학적 문진을 보장하기 위한 권고(recommendations for ensuring good scientific enquiry)"에 준하여 뇌졸중 실험을 수행하였다. 10 마리의 동물/그룹의 샘플 크기는 0.8의 파워(power), 알파 = 0.05 및 그룹 평균의 30%의 추정 표준 편차로 30일의 T2 강조 MRI를 기초로 하여 약물과 위약 사이의 경색 부피에서의 40% 차이를 검출하기 위한 바램을 기초로 하였다. 일차 분석은 치료 의향 방법을 기초로 하였으며, 등록된 어떠한 동물도 배제되지 않았다. 20마리의 시노몰구스 마카크를 약물 또는 위약(비히클 단독)을 이용한 처리에 블록-무작위화시켰다. 실험 동물의 관리(실험 동물의 초기 회생을 포함함), 및 모든 결과의 평가와 관련된 결정을 위해 허혈의 유도, 유지, 및 역전을 담당하는 연구자들은 동물이 속하는 실험 그룹에 대해 맹검이었다. 그룹 사이의 차이를 스튜던츠 t-검정(Student's t-test), 또는 필요시 반복-측정 ANOVA를 이용하여 측정하였다. 조속한 사망 또는 임무를 완수할 수 없음으로 인한 손실 값을 임무에 대해 달성가능한 최악의 스코어, 또는 모든 동물에 걸쳐 달성된 가장 큰 경색 부피로 정의되는 최대 가능 뇌졸중 부피를 반영시

키기 위해 귀속시켰다.

- [0159] 신경학적 평가: 이들을 이전에 확인된 비-인간 영장류 뇌졸중 척도(NHPSS) 및 언덕 및 골짜기 임무, 2-튜브 임무 및 6 웰 임무를 포함하는 임무들의 감각운동 배터리를 이용하여 수행하였다. NHPSS 스코어는 의식, 방어 반응, 움켜잡기 반사, 사지 운동, 보행, 서클링(circling), 운동완만(bradykinesia), 균형, 무시, 시야 절단(visual field cut)/반맹(hemianopsia) 및 안면 약화(facial weakness)의 상태의 복합 등급화이며, 이중 다수는 또한 인간에서의 NIH 뇌졸중 스코어링 시스템에 포함된다. 전체 41 포인트로부터, 0은 정상 행동에 해당하며, 41은 중증의 양측성 신경학적 장애를 나타낸다. 다른 곳에 기재된 바와 같은 통상적인 마모셋(marmoset) (비단마모셋(*Callithrix jacchus*))에 대해 개발된 검정으로부터 나머지 시험을 변형시켰다. 보다 정교한 감각운동 기능을 평가하는 것에 더하여, 이들은 또한 소거(extinction) 및 지각 공간 장애/무시를 시험한다. 90분의 MCAO에 적용된 5 마리의 마카크에서의 파일럿 실험에서, NHPSS 결과는 처음 36시간 동안 지속된 후, 14일 내지 30일(평균=14.36, SEM=3.2) 사이의 안정기(plateau)로 점진적으로 하락한 스코어에서의 최초 피크(평균 36.3, SEM=5.7)를 나타내었다. 감각운동 시험은 동물이 뇌졸중 7일 후 및 30일 후에 시간 경과에 따라 약간의 회복을 나타낸 심각한 좌측 시공간 무시 및 좌측 반신불완전마비를 가진 것을 나타내었다. 이들 결과는 6 웰(7.8x 및 5.33x 기준선의 평균 지연) 및 좌측 팔에 대한 언덕 및 골짜기 임무(골짜기 세그먼트에서 8.2x 및 6.4x 기준선의 평균 지연 및 언덕 세그먼트에서 7.6x 및 5.8x 기준선의 평균 지연)의 완료에서 유의한 지연으로 나타났다.
- [0160] 실시예 2: PSD-95 억제제는 관류/확산 강조 MRI에서 허혈성 반응성 변화를 고정시킨다
- [0161] 본 실시예의 목적은 PSD-95 억제제를 이용한 신경보호가 실험적 영구 MCAO에서 뇌혈류 증가(재관류) 없이 실행 가능한 것을 입증하는 것이었다.
- [0162] 방법: 래트를 pMCAO에 적용시키고, 1시간 후에 PSD-95 억제제 Tat-NR2B9c(7.5 mg/kg) 또는 염수의 5분의 정맥 내 주입으로 처리하였다. 관류 MRI(PWI) 및 확산 MRI(DWI)를 pMCAO 30, 45, 70, 70, 120, 150 및 180분 후에 4.7T Bruker 시스템으로 획득하여, 뇌혈류(CBF) 및 겔보기 확산 계수(ADC) 맵을 결정하였다. 24시간에서, 동물을 신경학적으로 스코어링하고, 희생시키고, 뇌를 절편화시키고, TTC로 염색시켜, 부종에 대해 정확한 경색 부피를 확인하였다. ATP 수준에 대한 Tat-NR2B9c의 효과를 기재(Aarts et al. (2002), 상기)된 바와 같이 OGD에 적용된 뉴런에서 시험관내로 측정하고, ATP 수준을 제조업체의 설명서(Promega, Madison, WI)에 따라 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay를 이용하여 평가하였다.
- [0163] 결과: 혈액 가스, 전해질, 및 혈중 글루코스는 2개 그룹 사이에서 상이하지 않았다. 24시간에서의 뉴로스코어(Neuroscore)는 Tat-NR2B9c 그룹이 위약에 비해 유의하게 개선된 뉴로스코어를 갖는 것을 나타내었다. 도 3은 CBF와 ADC-유래 병변 부피 사이의 절대 미스매치를 나타낸다. 위약 동물에 비하여, ADC/CBF 미스매치 병변 부피는 Tat-NR2B9c 그룹에서 폐색 90분 후에 시작하여 유의하게 더 컸다. 코어 및 피질 반응성 영역에서의 상대 CBF 값의 관심 영역 분석은 어느 한 처리 그룹에서의 시점 사이에 상대 CBF에서 유의한 변화를 나타내지 않았고, 이는 CBF에 대해 Tat-NR2B9c 처리의 효과가 없는 것을 나타낸다.
- [0164] 역치-유래 ADC 및 CBF 병변 부피에 의해 기재된 허혈성 뇌졸중의 시공간적 발달은 위약 처리된 동물에서의 TTC-유래 병변 부피와 충분히 관련되었다. Tat-NR2B9c 처리 동물에서, ADC 병변 부피는 위약 그룹에서와 같이 MCAO 후 25분으로부터 45분으로 증가하였다. 그러나, 70분 시점에서, Tat-NR2B9c 약물의 개시 직후, 증가가 약화되었다. 120분 및 이를 지나서, Tat-NR2B9c-처리된 동물에서의 ADC 병변은 위약-처리된 래트보다 유의하게 적게 유지되었다. CBF-유래 부피 및 TTC 경색 부피는 Tat-NR2B9c 동물에서 유의하게 더 작았다. 도 5는 CBF 및 ADC 유래 병변 부피 사이의 절대 매스매치를 나타낸다. 위약 동물에 비해, ADC/CBF 미스매치 병변 부피는 Tat-NR2B9c 그룹 내의 포함 후 90분에서 시작하여 유의하게 더 컸다. 이들 결과는 Tat-NR2B9c가, 경색주위 혈류가 상기 처리에 의해 증가된 경우에 발생하는 바와 같이, 허혈성 반응성의 크기를 수축시킴으로써 경색 크기를 감소시키거나 결과를 개선시키지 않는 것을 암시한다. 오히려, 이는 Tat-NR2B9c가 존재하는 허혈에 대한 허혈 조직의 회복력(resilience)을 향상시키는 신경보호제로 작용하는 것을 암시한다.
- [0165] 100nM Tat-NR2B9c로 처리된 일차 신경 배양물은 노르모식 상태에서 염수 대조군에 비해 세포 사멸 또는 ATP 수준에서 유의함이 없음을 나타내었다. 그러나, 100nM Tat-NR2B9c를 이용한 전처리는 OGD 20시간 후의 염수 대조군에 비해 세포 사멸에서 26% 감소를 발생시켰다(도 4A). ATP 수준은 염수 처리된 배양물에 비해 OGD 1시간 후에 Tat-NR2B9c 처리된 배양물에서 34% 더 높았다(도 4B).
- [0166] 논의: 래트 또는 마우스에서 MCAO 60분 후 Tat-NR2B9c의 투여는 ADC 저장도 부피에서 유의한 감소를

발생시켰고, 이는 TTC에 의한 경색 부피에서의 감소와 서로 관련되었다. 뇌졸중 부피에서의 감소는 MCAO 24시간 후 신경학적 스코어에서의 유의한 개선과 관련되었다. pMCAO 후 뇌졸중 결과에서의 상기 해부학적 및 신경학적 개선은 뇌 혈류에 영향을 미치지 않고 달성되었고, 이는 뇌졸중 요법이 혈류 증가 없이도 신경보호에 의해 달성가능한 것을 확립시킨다. 따라서, 물리적이거나 치료적인 재관류 방법에 대한 PSD-95 억제제를 이용한 커플링 치료는 뇌졸중 후의 신경 조직 또는 뇌의 구조를 추가로 향상시킬 수 있는 것으로 예상된다.

[0167] 허혈의 발생 후, 뉴런 및 아교세포에서 세포내 ATP 수준에서 신속한 하락이 존재하며, 이는 항상성 메커니즘의 붕괴, 세포 기능의 상실 및 세포 사멸과 관련된다. PSD-95 억제제 처리는 ATP 고갈을 감소시켰다. 이들 결과는 PSD-95 억제제 처리가 허혈성 반응성을 보존시켜, 재관류 요법의 치료적 또는 시간적 윈도우를 연장시키는 실용적인 방법을 제공하는 것을 성립시킨다.

[0168] 실시예 3: Tat-NR2B9c의 단일한 4-5분 주입이 뇌졸중에 적용된 설치류 뇌에서 NMDAR:PSD95 복합체를 붕괴시키는 데 충분하다

[0169] **방법 요약:**

[0170] **시냅스후 치밀질-95 억제제:** Tat-NR2B9c는 HIV-1-Tat 단백질의 세포막 단백질 형질도입 도메인(YGRKKRRQRRR; Tat)에 융합된 NR2B 서브유닛의 9개의 c-말단 아미노산(KLSSIESDV)으로 구성된 합성 펩티드이다. PSD95에 결합할 수 없는 대조군은 NR2B C-말단 서열의 3개의 말단 아미노산이 SDV로부터 ADA로 전환된 유사한 펩티드이며, 이러한 대조군은 "ADA" 펩티드로 명명된다. 펩티드를 화합물의 정제 및 이의 용량에 대해 맹검된 개체에 의해 4 내지 5분에 걸쳐 염수 중에서 정맥내로 투여하였다.

[0171] **동물:** 성체 수컷 스프라그-돌리(Sprague-Dawley) 래트(250 내지 300 g; Charles River Laboratories, Sherbrooke, Quebec, Canada)를 실험 동물 운영 위원회(institutional animal care committee)에 의해 승인된 절차에 따라 이용하였다. 모든 실험을 단식시키지 않은 동물에 대해 수행하였다.

[0172] **외과적 제조물:** 영구적 연결막 혈관 폐색(3PVO)을 위해, 래트를 100 mg/kg의 케타민, 2 mg/kg의 아세프로마진, 및 50 mg/kg의 크실라진으로 마취시켰다. 래트에 관 삽입하고, 환기(60 스트로크/분, 30 내지 35 mL의 일회호흡량)시켰다. 평균 동맥 혈압, 혈액 가스, pH, 및 글루코스를 좌측 대퇴 동맥 카테터를 이용하여 모니터링하였다. 꼬리 정맥을 통해 약물을 전달하였다.

[0173] **실험 절차.** 동물을 3PVO 허혈에 적용시켰다. 1시간 후, 이들에게 염수, 3nmol/g의 Tat-KLSSIEADA(SEQ ID NO:76), 또는 0.3nmol/g, 3nmol/g 및 10nmol/g의 Tat-NR2B9c(Tat-KLSSIESDV)를 주사하였다. 추가 1시간 후, 뇌 피질을 동측(뇌졸중) 면, 및 뇌졸중에 대해 대측면 면으로부터 신속히 수거하였다. 모의(Sham) 처리된 동물은 개두술만 받았고, 뇌졸중 또는 약물 주입은 없었다. 이후, Co-IP 실험을 통상적인 방법을 이용하여 수거된 조직에 대해 수행하였다. 항-NR2B 또는 항-PSD95 항체를 이용한 CoIP 후, 지정된 항체(항 NR2B, PSD95 및 Src)를 이용하여 블롯을 프로빙(probing)하였다. 밴드의 농도계측 분석을 Image J 소프트웨어를 이용하여 수행하였다. 결합된 단백질의 CoIP에 대한 처리의 효과를 측정하기 위해, 블롯 상의 각각의 단백질의 수준을 먼저 면역침전된 단백질(PSD95 또는 NR2B)의 수준으로 표준화시킨 후, 동측(뇌졸중) 면으로부터의 수준을 대측 면의 수준으로 표준화시켰다.

[0174] **결과:** 실험을 5개의 복제물로 수행하였다. 각각의 복제물에 대한 조직을 6마리의 별개의 래트(조건 당 1마리)로부터 획득하였다. 각각의 복제물에서, 조직을 뇌졸중 면(동측) 및 대측 반구 둘 모두로부터 획득하였다. 어느 한 단백질에 대한 항체를 이용하여 수행된 IP에 의해 평가된 바와 같은 PSD95 및 NR2B의 공동-면역침전에 대한 모의 처리(뇌졸중 및 약물 주입 없음)의 효과가 없었다(예로서 제시된 도 9A-B). 유사하게, 대조군 펩티드 Tat-KLSSIEADA를 이용한 처리는 PSD95 및 NR2B의 co-IP에 대해 효과가 없었다. 그러나, Tat-KLSSIESDV를 이용한 처리는 용량-의존 방식으로 PSD95와 NR2B의 co-IP를 억제하였다(도 9A-B). PSD95와 NR2B의 co-IP의 억제 정도는 뇌졸중을 억제하는데 있어서 Tat-NR2B9c의 역가와 동등하였고, 여기서 0.3 nmol/g은 뇌졸중의 상기 모델에서 경색의 크기를 감소시키는데 있어서 효과가 없고, 3 또는 10 nmol/g의 용량은 효과적이었다. 특히, 뇌졸중 크기를 감소시키는데 있어서 효과가 없었던 0nm/g 또는 0.3nm/g의 Tat-NR2B9c 용량을 이용한 처리는 PSD95와 NR2B의 결합을 유의하게 억제하지 않았다. 대조적으로, 뇌졸중 손상을 억제하는데 있어서 효과적인 3nm/g 또는 10nm/g의 용량의 Tat-NR2B9c를 이용한 처리는 또한 NR2B와 PSD95의 결합을 유의하게 억제하였다. 한 추가 대조군으로서, PSD95 또는 NR2B와 함께 면역침전된 조직을 NMDAR 신호전달 복합체25에서 주요 조절 단백질인 NMDAR-결합 단백질 키나제 Src에 대한 항체로 프로빙시켰다. PSD95로부터 NR2B를 해리시키는 10nm/g의 Tat-NR2B9c를 이용한 처리(도 9A-B)는 PSD95 또는 NR2B와 Src의 결합에 대해 효과가 없었다(제시되지 않음). 이는

NR2B/PSD95 상호작용을 억제하는데 있어서 Tat-NR2B9c의 작용이 특이적이며, 이는 Tat-NR2B9c가 상기 중 어느 한 단백질과 Src의 유사한 상호작용에 대해 효과가 없기 때문인 것을 나타낸다.

[0175] **결론:** 첫째로, Tat-NR2B9c는 뇌졸중의 면에서 뇌로 들어가며, 뇌졸중 후에 투여되는 경우 허혈성 뇌에서 미리 형성된 NR2B/PSD95 복합체를 해리시킬 수 있다. 둘째로, Tat-NR2B9c는 용량-의존적 방식으로 상기를 달성할 수 있다. 셋째로, Tat-NR2B9c가 뇌에서 미리 형성된 NR2B/PSD95 복합체의 유의한 해리를 달성하는 용량은 Tat-NR2B9c가 동일한 동물 뇌졸중 모델에서 면역보호성인 용량에 상응한다. 넷째로, Tat-NR2B9c가 뇌에서 미리 형성된 NR2B/PSD95 복합체의 유의한 해리를 달성할 수 없는 용량은 또한 Tat-NR2B9c가 동일한 동물 뇌졸중 모델에서 면역보호성이 아닌 용량이다. 다섯째로, Tat-NR2B9c는 NR2B/PSD95 복합체에 대해 이의 효과를 선택적으로 달성한다(즉, 이는 NMDAR 신호전달 복합체 분자에 대해 비-특이적으로 효과적이지 않다).

[0176] 뇌졸중에 적용된 뇌의 영역에 위치한 뉴런 내의 PSD95-NMDAR 복합체의 붕괴의 시간 경과를 조사하기 위해 동일 모델 및 처리 조건을 이용하여 두번째 연구를 수행하였다. 이전 연구에서와 같이, 래트 뇌를 뇌졸중을 유도하기 위해 PIAL 혈관 폐색 2, 4, 8, 24 또는 48시간 후에 수거하였다. 도 10은 NMDAR:PSD-95 복합체가 Tat-NR2B9c의 단일 정맥내 주입 후에 적어도 8시간, 잠재적으로는 24-48시간 동안 붕괴되는 것을 나타낸다. 따라서, 치료적이거나 기계적이건 간에 Tat-NR2B9c가 환자에 투여될 수 있는 경우와 환자가 재관류 요법으로부터 이로우 수 있는 경우 사이의 시간의 넓은 윈도우가 존재한다.

[0177] 상세한 재료 및 방법

[0178] **재료.** NA1(GMP lot 165I1107) 및 TAT-ADA(YGRKKRRQRRRLSSIEADA)를 각각 Bachem 및 GeneScript에 의해 화학적으로 합성하였다. 모든 펩티드는 >95%로 고-성능 액체 크로마토그래피 정제되었다. 펩티드 스톡(3mM 또는 10mM)을 살균 염수 중에서 제조하고, 4°C에서 저장하였다.

[0179] **항체.** 면역침전 및 웨스턴: 마우스 항-NMDA2B(ab28373; Abcam), 토끼 항-PSD95(2507; Cell Signaling), 토끼 항-NMDA2B(4212, Cell Signaling), 마우스 모노클로날 항-PSD95(MA1-046, Thermo), 마우스 모노클로날 항-Src(ab16885-100)(Abcam). Dynabeads 단백질 G 면역침전 키트를 면역침전에 사용하였다(100.07D, Invitrogen). 웨스턴 블롯을 위한 이차 항체는 Jackson ImmunoResearch Lab Inc.로부터의 퍼옥시다제 컨쥬게이션된 AffiniPure F(ab')₂ 단편 염소 항 토끼 IgG 항체(111-036-047) 및 퍼옥시다제 컨쥬게이션된 AffiniPure F(ab')₂ 단편 염소 항 마우스 IgG(115-036-006)였다.

[0180] **허혈의 3개의 연결막 혈관 폐색 모델.** 250 내지 300 g 사이로 칭량된 수컷 스프라그 돌리 래트(co-IP 실험 당 n=6)를 본 연구에 사용하였다. 영구성을 위해, 3개의 연결막 혈관 폐색(3PVO)을 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다(4,26). 요컨대, 래트를 필요에 따라 최초 용량의 1/3이 보충된 케타민(100 mg/kg), 아세프로마진(2 mg/kg), 및 크실라진(5 mg/kg)의 0.5 ml/kg 근내 주사로 마취시켰다. 항문 온도 프로브를 삽입하고, 동물을 37 °C로 유지되는 가열 패드에 배치하였다. 두개골을 중간선 절개를 통해 노출시키고, 조직을 벗겨내었다(scrape off). 절개 현미경 및 공압 치과 드릴을 이용하여, 두개골 전체에 걸쳐 직사각형으로 천공시키고, 경질막을 온전하게 유지시키면서 두개골 조각을 들어올림으로써 우측 몸감각피질(브레그마(bregma)에 대해 2 mm 미부 및 5 mm 측면) 전체에 걸쳐 6-mm 내지 8-mm의 두개 윈도우를 만들었다. 3개의 연결막 세동맥 중 뇌동맥은 배럴 피질(barrel cortex) 주위로 분지된다(이는 경질막을 통해 동맥 당 2개 스폿에서 전기적으로 소작되었다). 소작술 후, 두피를 봉합하였다. 3PVO 허혈 1시간 후, 래트에 대퇴 정맥을 통해 3분에 걸쳐 전체 약 300 μ l의 염수 중 처리 약물을 투여하였다(동물로의 목표 mg/kg 용량을 달성하기 위한 정확한 부피는 동물의 체중에 의해 결정되었다). 처리 약물의 투여 1시간 후(뇌졸중 2시간 후), 래트를 산소와 혼합된 3% 이소플루란을 이용하여 마취시켰다.

[0181] **뇌 용해질의 제조.** 뇌를 두개골로부터 분리시키고, 피질의 허혈 영역 및 대측면 상의 동등한 샘플을 신속히 수거하였다. 각각의 뇌 샘플을 350 μ l RIPA 용해 완충액(Tris-HCL 50mM, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, SDS 0.1%, 데옥시콜산 0.5%, NP-40 1% 플러스 완전 프로테아제 억제제 콕테일(PhosSTOP 포스파타제 억제제 콕테일, Roche))에 배치시키고, 균질화시키고, 얼음 상에 두었다.

[0182] **래트 피질로부터의 NMDAR 및 이의 결합 단백질의 공동-면역침전.** 래트 피질 용해질을 1시간 동안 얼음 상에서 인큐베이션시킨 후, 4°C에서 20분 동안 원심분리(12,000 rpm)시켰다. 상층액을 새로운 튜브로 옮기고, 5 μ g의 항-PSD95 또는 항-NMDAR 항체가 미리 로딩된 30 μ l Dynabeads 단백질 G(Invitrogen)와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션시켰다(제공된 세척 완충액을 이용하여 제조업체의 프로토콜에 따름). Dynabead-항체-항원 복합체를 4회 세척하고, 30 μ l RIPA 완충액 + 10 μ l SDS-PAGE 로딩 완충액(2.4 ml 1M Tris pH 6.8, 0.8g SDS, 4 ml 100% 글

리세롤, 0.1% Bromophenol Blue, 1ml 베타-머캅토에탄올, dH₂O를 이용하여 10 mL까지 q.c.)에 재현탁시켰다. 샘플을 75℃에서 10분 동안 가열하고, 비드를 유지시키기 위해 자석에 배치한 후, 상층액을 분석을 위해 SDS-PAGE 겔 상에 로딩하였다.

[0183] SDS-PAGE 및 웨스턴 블로팅. 분리된 면역침전물을 10% SDS-PAGE를 이용하여 용해시키고, 이후 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 막을 1:1000으로 항-PSD95로 프로빙시킨 후, 세척하고, ECL 화학발광 키트(Amersham/GE Healthcare)를 이용하여 발달시켰다. 30초 내지 2분의 노출과 함께 Luminescent Image Analyzer LAS-3000(Fujifilm)을 이용하여 이미지를 포착하였다. 막을 이후 실온에서 10분 동안 스트립핑(striping)시키고 (1.5% 글리신, 0.1% SDS, 1% Tween 20 pH 2.2), 다시 블로킹시켰다. 이후, 막을 항-NMDAR2B(1:1000) 및 항-Src 항체(1:500)로 다시 프로빙시키고, 세척하고, 발달시키고, 상기와 같이 이미지를 포착하였다.

[0184] 이미지 분석. 이미지 상의 밴드 강도를 Image J(NIH)를 이용하여 분석하였다. 동일 동물로부터의 동측 및 대측 면역침전물 사이의 밴드 밀도의 비를 발생시키기 전에 동측 및 대측 밴드를 먼저 면역침전된 PSD95 또는 NR2B 수준에 대해 표준화시켰다.

[0185] 실시예 4: Tat-NR2B9c 및 tPA는 뇌졸중으로부터의 결과를 개선시키기 위해 동시에 제공되거나 별개의 시간에 제공될 수 있다.

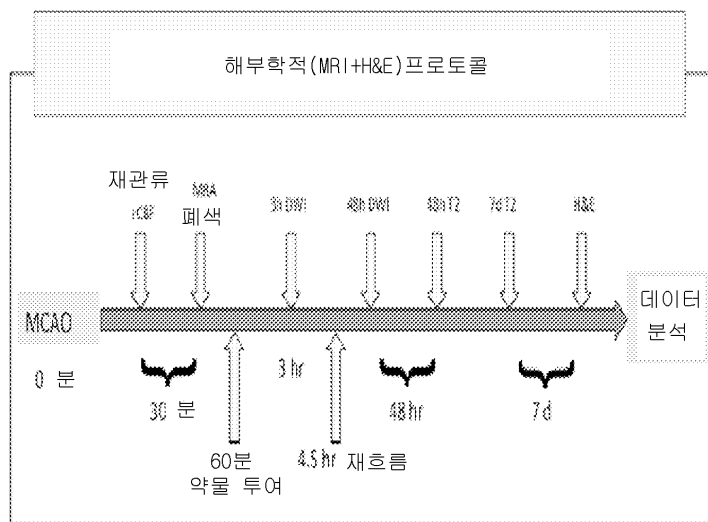
[0186] 먼저, Tat-NR2B9c가 혈병 용해에 대해 효과가 없고, Tat-NR2B9c가 혈병으로부터 섬유소를 방출시키는 tPA의 능력 또는 속도에 영향을 미치지 않는 것을 입증하기 위해 시험관내 연구를 수행하였다. 간단히, ¹²⁵I 표지된 피브리노젠을 함유하는 인간 혈장을 37℃에서 2시간 동안 100 nM NaCl, 30nM Na₂HPO₄, 3mM 30nM NaH₂PO₄, pH 7.4를 함유하는 완충액 중의 다양한 농도의 Tat-NR2B9c, Tat-NR2B9c + 1500 ng/ml tPA, 또는 tPA 단독과 함께 인큐베이션시켰다. 혈병으로부터의 섬유소 방출의 정량을 가용성 물질의 신틸레이션 계산에 의해 측정하였다. Tat-NR2B9c는 혈병을 용해시키지 않았으며, 이는 또한 혈병으로부터 피브리노젠을 방출시키는 tPA의 능력에 영향을 미치지 않았다.

[0187] Tat-NR2B9c 및 tPA가 뇌졸중의 동물 모델에서 동시에 제공될 수 있는 것을 입증하기 위해, 본 발명자는 상기 기재된 바와 같은 래트에서의 뇌졸중의 PIAL 패색 모델을 다시 이용하였다. Tat-NR2B9c가 뇌졸중 1시간 후에 4-5분의 정맥내 주입으로 제공되었고, tPA가 인간에서 처방된 바와 같으나(볼루스로서 중량을 기준으로 용량의 10% 후, 용량의 나머지 90%가 1시간에 걸친 주입으로 제공됨), 설치류 연구에 적절한 용량 수준(중량을 기준으로 인간 용량의 10배)으로 제공되었다. 그룹(n=10)은 또한 상기 용량 방법에 의해 동시에, 또는 Tat-NR2B9c의 주입 15분 후에 개시되는 tPA에 의해 Tat-NR2B9c 및 tPA 둘 모두가 제공된 동물을 포함하였다. 도 11은 동시에 제공되거나, Tat-NR2B9c 용량이 tPA 용량에 선행하는 경우 tPA 단독보다 Tat-NR2B9c + tPA가 더 효과적인 것을 나타낸다. 래트에서의 조합된 치료의 효능은 Tat-NR2B9c 단독의 효능과 유사하나, 조합된 치료의 효능은 대개 tPA 및 Tat-NR2B9c 둘 모두의 기여를 반영하는데, 이는 Tat-NR2B9c의 일부가 플라스미노젠을 혈장에서 Tat-NR2B9c를 분해시킬 수 있는 프로테아제 플라스민으로 전환시키는 tPA의 결과로서 분해에 적용되기 때문이다. 즉, 상기 데이터는 tPA-매개 재관류에 의해 벌충되는 플라스민에 의해 분해되는 Tat-NR2B9c의 결과로서 상실된 활성과 일치한다. 플라스민에 의한 Tat-NR2B9c의 분해는 래트에서보다 인간에서 덜한 정도로 발생할 것으로 예상되는데, 이는 플라스미노젠의 활성화를 위한 tPA의 용량(중량 기준)이 래트에서보다 인간에서 10배 덜하기 때문이다. 따라서, 상기 데이터는 인간에서, tPA의 기여가 작용제 단독보다 더 큰 효과로 CNS에 대한 뇌졸중 또는 다른 허혈의 손상 효과를 감소시키는데 있어서 Tat-NR2B9c의 기여와 조합될 수 있는 증거를 제공한다.

[0188] 본 발명은 이해의 명료함의 목적으로 상세하게 기재되었으나, 첨부된 청구항의 범위 내에서 특정 변형이 실시될 수 있음이 명백할 것이다. 본 출원에 인용된 모든 간행물, 등록 번호, 및 특허 문헌은, 이들 각각이 개별적으로 표시되는 것과 동일한 정도로 모든 목적상 이들의 전체내용이 참조로서 본원에 포함된다. 상기 범위에서, 하나 이상의 서열이 다양한 시점에서 등록 번호와 관련되는 경우, 이는 본 출원의 유효 출원일일부부터의 등록 번호와 관련된 서열을 의미한다. 유효 출원일은 당해 등록 번호를 개시하는 가장 이른 우선권 출원일의 날짜이다. 문맥으로부터 달리 명백하지 않은 한, 본 발명의 임의의 구성요소, 구체예, 단계, 특징 또는 양태는 임의의 다른 구성요소, 구체예, 단계, 특징 또는 양태와 조합하여 수행될 수 있다.

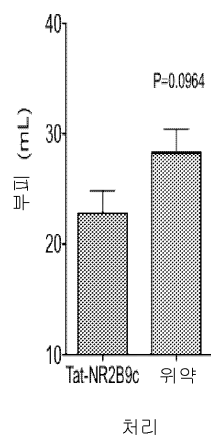
도면

도면1a

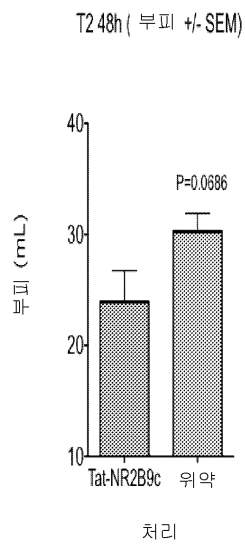


도면1b

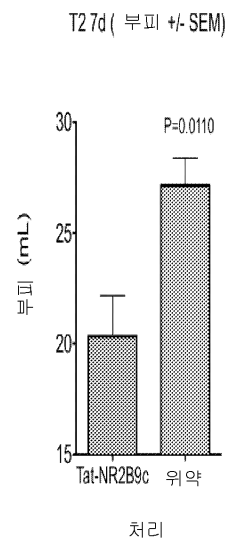
DWI 48h (부피 +/- SEM)



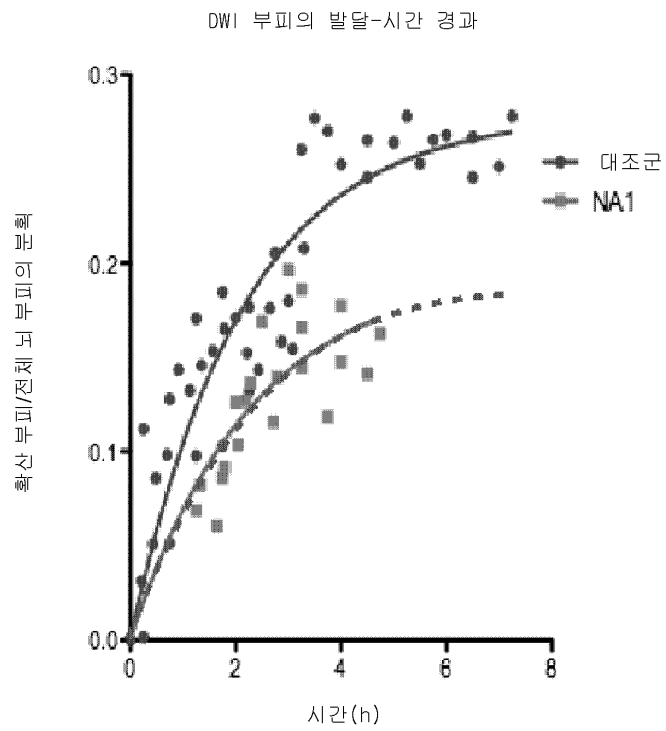
도면1c



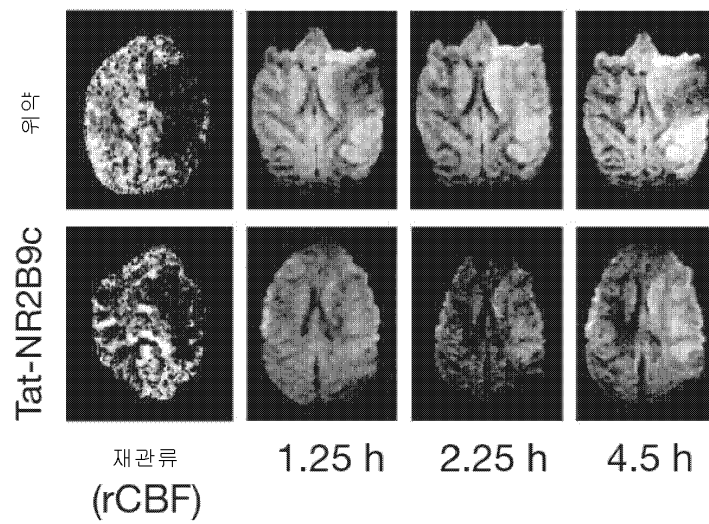
도면1d



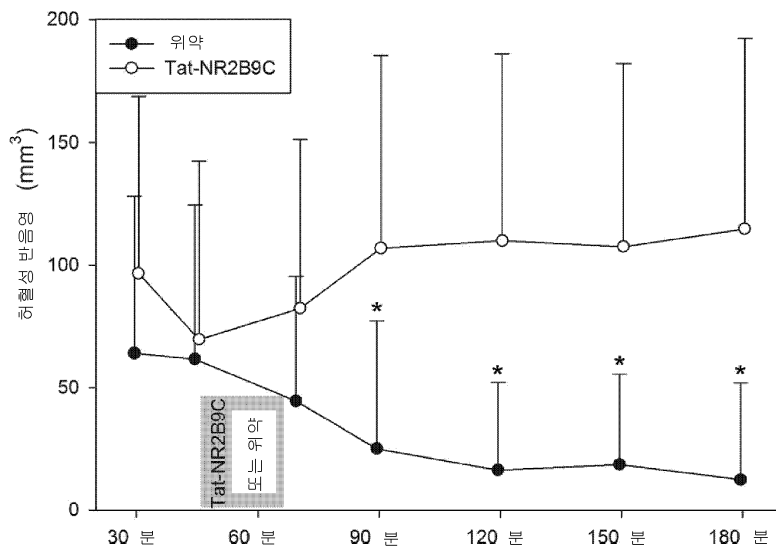
도면2a



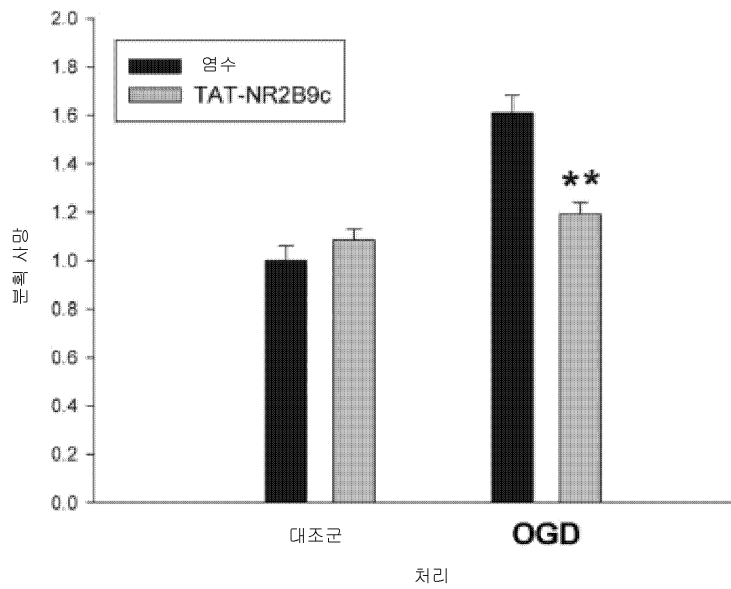
도면2b



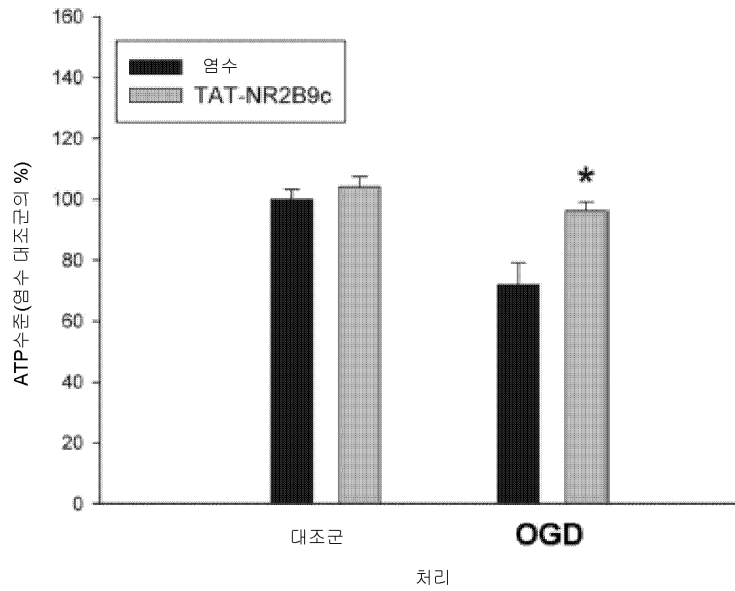
도면3



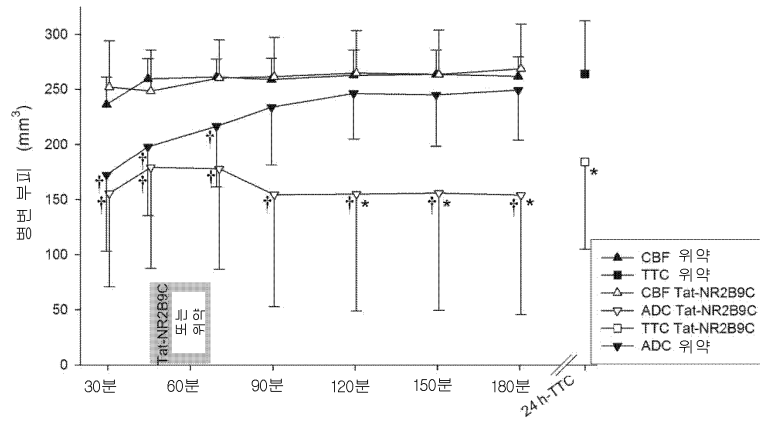
도면4a



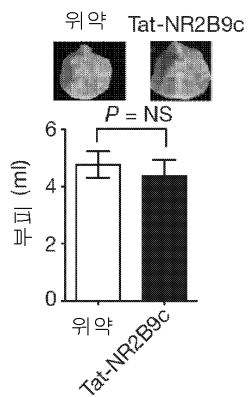
도면4b



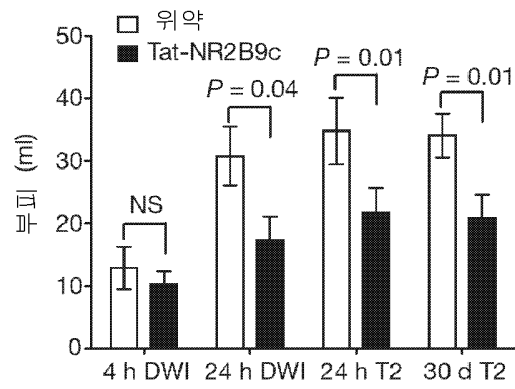
도면5



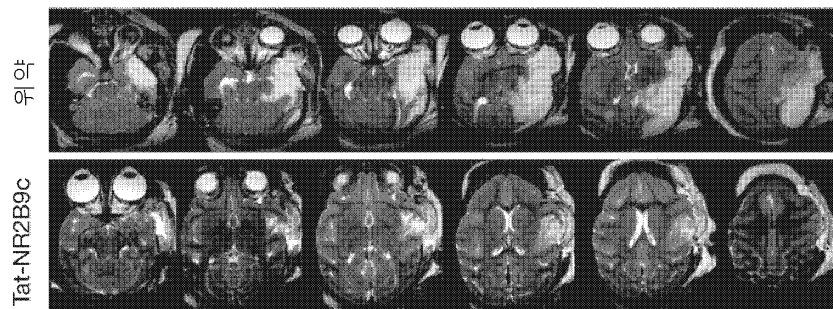
도면6a



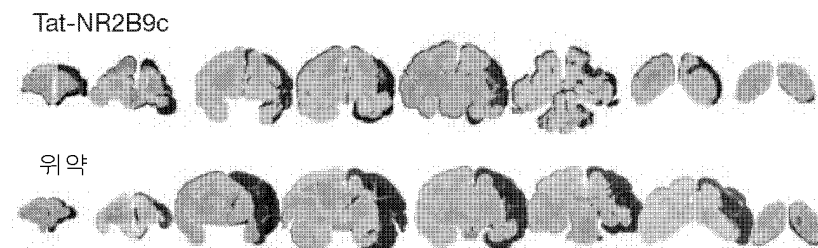
도면6b



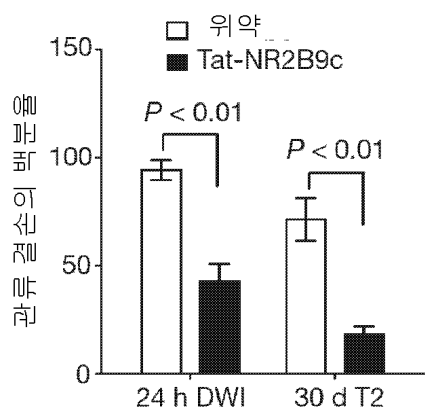
도면6c



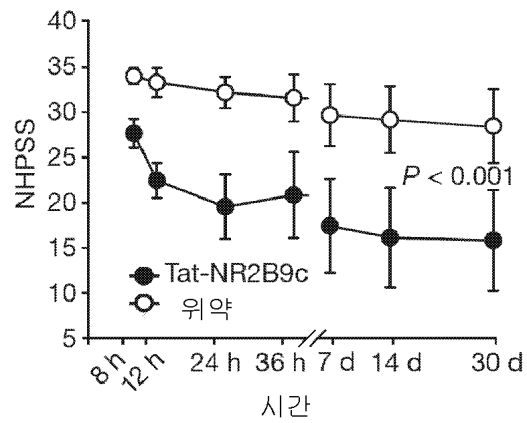
도면6d



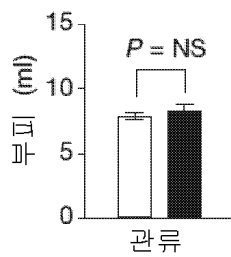
도면6e



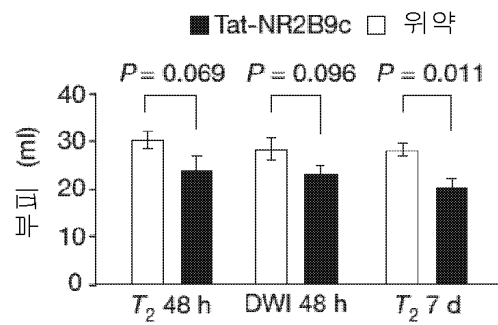
도면6f



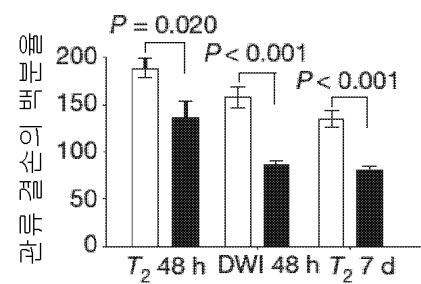
도면7a



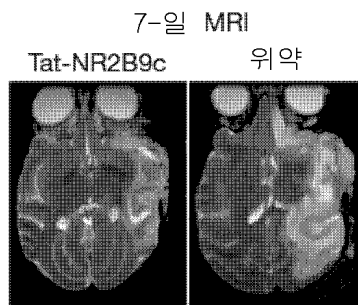
도면7b



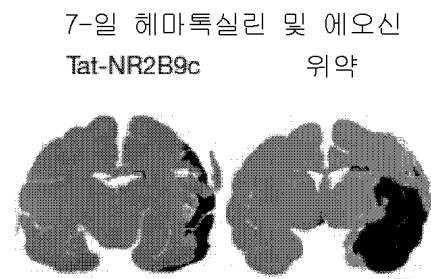
도면7c



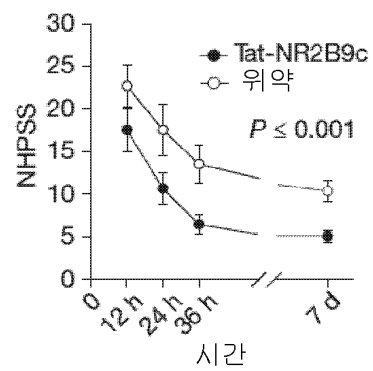
도면7d



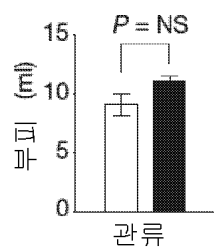
도면7e



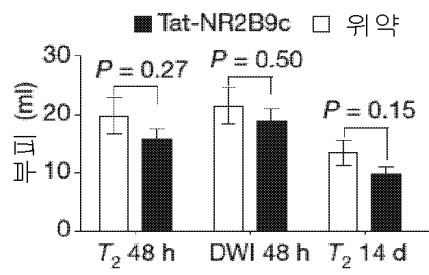
도면7f



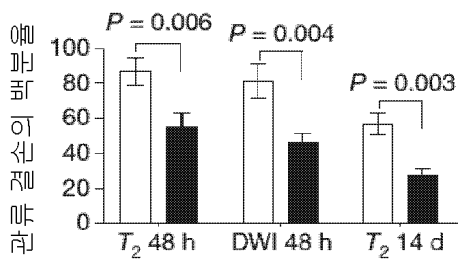
도면8a



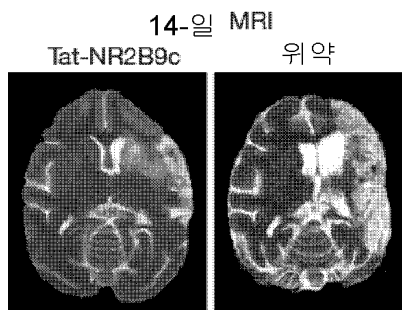
도면8b



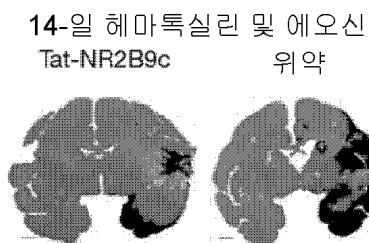
도면8c



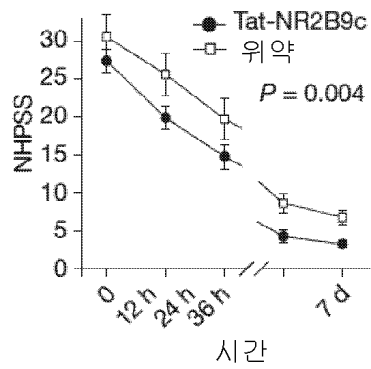
도면8d



도면8e

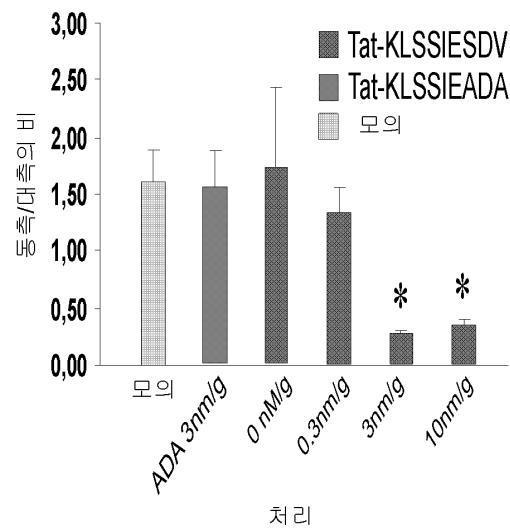


도면8f



도면9a

IP: PSD95, NR2B로 블롯



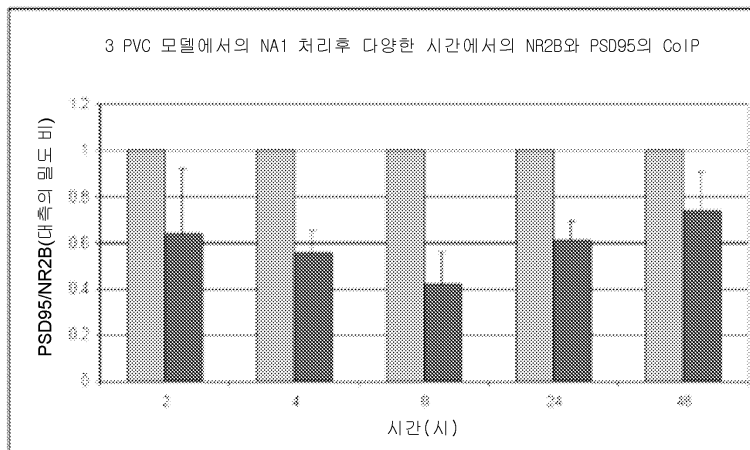
도면9b

IP: PSD95

3PVO



도면10



도면11

