



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월25일

(11) 등록번호 10-2772298

(24) 등록일자 2025년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/10 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

A61K 47/64 (2017.01) A61P 25/00 (2006.01)

C07K 14/46 (2006.01) C07K 14/465 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/10 (2013.01)

A61K 38/1703 (2020.05)

(21) 출원번호 10-2019-7037688

(22) 출원일자(국제) 2018년07월11일

심사청구일자 2021년07월12일

(85) 번역문제출일자 2019년12월19일

(65) 공개번호 10-2020-0039621

(43) 공개일자 2020년04월16일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/041636

(87) 국제공개번호 WO 2019/014342

국제공개일자 2019년01월17일

(30) 우선권주장

62/531,251 2017년07월11일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20150366949 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

케이스 웨스턴 리저브 유니버시티

미국 44106 오하이오주 클리블랜드 유클리드 애비뉴 10900

(72) 발명자

실버 제리

미국 44106 오하이오주 클리블랜드 유클리드 애비뉴 10900

루오 푸첵

미국 44106 오하이오주 클리블랜드 유클리드 애비뉴 10900

양 안

미국 44106 오하이오주 클리블랜드 유클리드 애비뉴 10900

(74) 대리인

특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 8 항

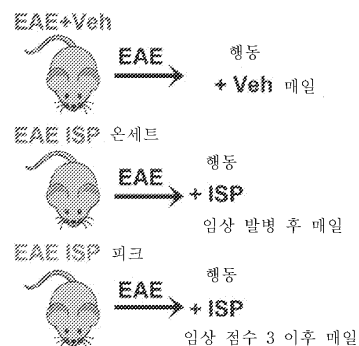
심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 미엘린 장애의 치료를 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

올리고덴드로사이트 전구 세포(OPC) 이동, 분화, 증식 및/또는 성숙화의 증진을 필요로 하는 대상체에게 PTP σ 의 촉매 활성, 신호전달, 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 치료제를 투여하는 단계를 포함하는, OPC 이동, 분화, 증식 및/또는 성숙화의 증진을 필요로 하는 대상체에서 OPC 이동, 분화, 증식 및/또는 성숙화를 증진시키는 방법.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 38/1706 (2013.01)

A61K 47/645 (2017.08)

A61P 25/00 (2018.01)

C07K 14/461 (2013.01)

C07K 14/465 (2013.01)

C07K 7/08 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

치료제를 포함하는, 수초화(myelination) 또는 재수초화(remyelination)가 필요한 인간 대상체에서 수초화 또는 재수초화를 촉진하기 위한 조성물로서,

상기 치료제가 서열 번호: 58의 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 포함하고,

상기 인간 대상체가 다발성 경화증을 제외한 미엘린 관련 장애를 앓거나, 또는 상기 미엘린 관련 장애의 위험이 있으며, 상기 미엘린 관련 장애가 수초 탈락성 장애, 백질위축성 장애 또는 말초 신경계의 탈수초성 질환 중 적어도 하나를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 치료제가 치료되는 인간 대상체에게 전신으로 투여되는 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 치료제가 인간 대상체에서 인식을 증진시키는 데 효과적인 양으로 투여되는 것인, 조성물.

청구항 4

치료제를 포함하는, 미엘린 관련 질환 또는 장애의 치료가 필요한 인간 대상체에서 미엘린 관련 질환 또는 장애를 치료하기 위한 조성물로서,

상기 치료제가 서열 번호: 58의 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 포함하고, 인간 대상체에서 수초화 또는 재수초화를 촉진하며,

상기 인간 대상체가 다발성 경화증을 제외한 미엘린 관련 장애를 앓거나, 또는 상기 미엘린 관련 장애의 위험이 있고, 상기 미엘린 관련 장애가 수초 탈락성 장애, 백질위축성 장애 또는 말초 신경계의 탈수초성 질환 중 적어도 하나를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 치료제가 치료되는 인간 대상체에게 전신으로 투여되는 것인, 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 치료제가 올리고덴드로사이트 전구 세포 이동, 분화, 증식 또는 성숙화를 유도, 촉진 또는 조정하는 것인, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 미엘린 관련 장애가 횡단성 척수염, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병, 길랭-바레 증후군(Guillain-Barre Syndrome), 데빅병(Devic's disease), 백질위축성 장애, 백질뇌병증, 백질위축증, 부신척수신경병증(adrenomyeloneuropathy), 뇌힘줄황색종증(cerebrotendinous xanthomatosis), 크라베병(Krabbe disease), 알렉산더병(Alexander's disease), 펠리체우스-메르츠바허병(Pelizaeus Merzbacher disease: PMD), 말초 신경계의 탈수초성 질환, 또는 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease) 중 적어도 하나를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 미엘린 관련 장애가 성인 발병 상염색체 우성 백질위축증 (ADLD), 아이카디-구티에레스 증후군(Aicardi-Goutieres syndrome), 알렉산더병, CADASIL, 카나반병(Canavan disease), CARASIL, 뇌힘줄황색종증,

아동기 운동실조 및 뇌 저수초형성(CACH)/소멸 백질 질환 (VWMD), 파브리병(Fabry disease), 푸코시드축적증(fucosidosis), GM1 강글리오시드증, 크라베병, L-2-히드록시글루타르산뇨증, 피질 낭종을 동반한 거대뇌성 백질뇌병증(megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts), 이염색성 백질위축증, 다중 숄파타제 결손증, 펠리체우스-메르츠바허병(PMD), Pol III-관련 백질위축증, 레프섬병(Refsum disease), 살라병(salla disease), 쇼그렌-라손 증후군(Sjogren-Larsson syndrome), X-연관 부신백질위축증, 또는 젤베거 증후군(Zellweger syndrome) 스펙트럼 장애 중 적어도 하나를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2017년 6월 11일 출원된 미국 가출원 번호 62/531,251을 우선권 주장하며, 상기 출원의 주제는 그 전 문이 본원에서 참조로 포함된다.

[0003] 정부의 재정 지원

[0004] 본 발명은 미국 국립 보건원(National Institutes of Health)에 의해 수여된 보조금(들) NS077942 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에서 특정 권리를 갖는다.

배경 기술

[0005] 배경

[0006] 다발성 경화증 (MS)은, 올리고덴드로사이트 (OL) 클러스터의 극적 손실을 유도하는 강력한 염증, 탈수초화, 및 비가역적 신경학적 장애를 특징으로 하는, 중추 신경계 (CNS)의 만성 자가면역-매개 탈수초성 질환이다. 비록 MS 초기 단계 동안 재수초화가 자발적으로 발생할 수는 있지만, 궁극적으로는 반흔 유사, 프로테오글리칸 함유 플라크가 발생한 영역에서는 발생하지 못한다. 그러나, 실패한 올리고덴드로사이트 분화, 성숙화(maturation), 및 재수초화의 기본적인 기전에 대해서는 여전히 잘 이해되고 있지 않다. 최근 연구를 통해 OPC 성숙화 및 기 능에서 콘드로이틴 술페이트 프로테오글리칸 (CSPG)의 조절 효과가 확인되었다.

[0007] CSPG는 코어 단백질에 부착된 황산화된 글리코사미노글리칸 (GAG)의 쇄로 구성된 구조적 세포외 기질 (ECM) 분 자이다. CSPG의 극적인 상향조절은 예컨대, 척수 손상 (SCI), 간질, 알츠하이머병, 뇌졸중 및 MS와 같은, CNS 손상의 특징이 된다. CSPG의 축삭 재생 및 척수 손상(SCI) 이후 재생 축삭 말단부를 포획함으로써 이영양성 엔 드볼(endball)을 형성하는 데에서의 그의 역할에 미치는 억제적 영향은 문서상으로 잘 입증되어 있다.

[0008] MS에서, 반응성 성상신경교 생산 CSPG, 예컨대, 아그레칸 및 베르시칸은 활동성 탈수초성 병변 내에서 풍부하게 검출되었다. 허용성 라미닌은 OL의 확산, 생존, 및 성숙화를 촉진시키지만, 최근 연구에서는 억제성 CSPG가 상 기 성장 지원 ECM 단백질을 능가할 수 있고, 이동 감소, 형태학적 돌기 연장, 및 성숙화 능력의 감소를 유발함 으로써 마우스 또는 인간 OPC/OL을 강력히 억제시키는 것으로 밝혀졌다. 그러나, OL 성숙화를 증진시키기 위해 서는 콘드로이티나제 ABC를 통한 효소적 분해에 의해 CSPG 억제를 완화시킬 수 있다. 생체내에서, CSPG는 리솔 레시틴 (LPC)-유도성 병변에서 일시적으로 증가하고, 개선된 재수초화도 마찬가지로 예컨대, 프로테오글리칸 합 성 억제제, 베타-d-크실로시드 또는 플루로사민과 같은, CSPG 표적화 치료 이후에 발생할 수 있다.

발명의 내용

[0009] 요약

[0010] 본원에 기술된 실시양태는 일반적으로 올리고덴드로사이트 전구 세포(oligodendrocyte progenitor cell) (OPC) 이동, 분화, 증식 및/또는 성숙화를 조정하는 작용제(agent), 화합물, 및 방법, 수초화를 촉진시키는 방법 뿐만 아니라, 수초화 또는 재수초화가 도움이 되는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다.

- [0011] 본 방법은 미엘린 관련 장애, 예컨대, 수초 탈락성 장애, 백질위축성 장애 또는 말초 신경계의 탈수초성 질환을 앓거나, 또는 그러한 위험이 있는 대상체에게 PTP σ 의 촉매 활성, 신호전달, 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 치료제를 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0012] 일부 실시양태에서, 치료제는 치료 펩티드를 포함할 수 있다. 치료 펩티드는 PTP σ 의 웨지 도메인(wedge domain)의 약 10 내지 약 20개의 연속된 아미노산과 적어도 약 65%, 적어도 약 75%, 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 95% 상동성인 아미노산 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, 치료제는 서열 번호: 1-25, 32, 및 33으로 구성된 군으로부터 선택되는 치료 펩티드를 포함할 수 있다.
- [0013] 추가의 다른 실시양태에서, 치료제는 서열 번호: 32의 아미노산 서열과 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 상동성인 서열 동일성을 갖는 치료 펩티드를 포함할 수 있다. 치료 펩티드는 예를 들어, 서열 번호: 32의 잔기 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 또는 13 중 적어도 1, 2, 3, 또는 4개의 아미노산의 보존적 치환을 포함할 수 있다.
- [0014] 다른 실시양태에서, 치료제는 서열 번호: 33의 아미노산 서열과 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 상동성인 서열 동일성을 갖는 치료 펩티드를 포함할 수 있다. 치료 펩티드는 예를 들어, 서열 번호: 33의 잔기 7, 8, 9, 10, 12, 또는 13 중 적어도 1, 2, 3, 또는 4개의 아미노산의 보존적 치환을 포함할 수 있다.
- [0015] 다른 실시양태에서, 치료제는, 치료 펩티드에 연결되어 있고, 올리고텐드로사이트 (OL) 또는 OPC에 의한 치료 펩티드의 흡수를 촉진시키는 수송 모이어티(transport moiety)를 포함한다. 예를 들어, 수송 모이어티는 HIV Tat 수송 모이어티 또는 (PRR5) 수송 모이어티일 수 있다.
- [0016] 추가의 다른 실시양태에서, 치료제는 올리고텐드로사이트 전구 세포 (OPC) 이동, 분화, 증식 및/또는 성숙화를 유도 또는 촉진시키는 데 효과적인 양으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료 유효량은 대상체에서 인식을 증진시키는 데 효과적인 양이다. 일부 실시양태에서, 치료제는 전식으로 투여될 수 있다.
- [0017] 일부 실시양태에서, 대상체는 미엘린 관련 장애, 예컨대, 수초 탈락성 장애, 백질위축성 장애, 또는 말초 신경계의 탈수초성 질환을 앓거나, 또는 그의 위험이 있는 대상체이다. 일부 실시양태에서, 미엘린 관련 장애는 다발성 경화증이다.
- [0018] 본 개시내용은 또한 생체내에서의 콘드로이틴 술페이트 프로테오글리칸 기반의 단백질 티로신 포스파타제 σ (PTP σ)와의 상호작용 및/또는 그의 억제를 예방 또는 감소시키는 방법, 및 생체내에서의 MMP2 활성 및/또는 발현을 증가시키는 방법을 제공한다. 본 방법의 실시양태는 본원에 개시된 임의의 치료제를 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1a-1j는 EAE 마우스 모델에서 ISP가 기능적 및 조직학적 회복을 촉진시킨다는 것을 도시한 것이다. 도 1a: 임상 점수에 의해 측정된 질병의 발병시 또는 최고 시점에서의 EAE 마우스에게 수행된 ISP 투여의 다이어그램. 도 1b: 질병의 발병시 또는 최고 시점에 시작하여 매일 ISP 또는 비히클로 처리된 MOG35-55-유도성 EAE 마우스에서의 질환 중증도의 임상 점수. 도 1c: b에서의 EAE 코호트 동물당 질환 점수의 평균 향상. (n=9 (EAE 비히클 군), 15 (EAE ISP 온세트 군) 및 12 (EAE ISP 피크 군), ANOVA F(2,33)=20.96; 터키(Tukey's) 다중 비교 검정, $P_{\text{EAE+Veh 대 EAE ISP 온세트}} < 0.0001$, $P_{\text{EAE+Veh 대 EAE ISP 피크}} = 0.0004$). 도 1d 및 1e: 비히클 처리된 대조군의 척수에 존재하는 뚜렷한 미엘린 손실과 대조를 이루는, 유도 후 48일째 ISP 처리된 EAE 마우스에서의 정상적인 미엘린 무결성을 입증하는, 각각 미엘린의 특수 패스트 블루(Luxol Fast Blue: LFB)를 보여주는 면역염색 및 그래프. 파선은 병변 부위의 경계를 표시하는 것이다. 스케일 바 = 100 μm . (n=5 마우스/군, $P=0.0002$, $t=6.647$, $df=8$; 양측 독립 스튜던트 t 검정). 도 1f: 유도 후 48일째 비히클- 및 ISP 처리된 EAE 마우스의 흉부 척수에서의 MBP 및 신경필라멘트-200 (NF200)에 대한 이중 면역염색. 파선은 병변 부위의 경계를 표시하는 것이다. 스케일 바=100 μm . 도 1g: 유도 후 48일째 비히클 또는 ISP 처리된 대조군 마우스 및 EAE 마우스의 척수 조직에서의 MBP 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석. 데이터는 β -액틴 단백질 발현으로 정규화된 것이다. (n=4 마우스/군, ANOVA F(3,12)=26.68; 터키 다중 비교 검정, $P_{\text{con 대 EAE+Veh}} = 0.0001$, $P_{\text{EAE+Veh 대 EAE+ISP}} = 0.0037$). 도 1h: 유도 후 48일째 비히클 및 ISP 1070 처리된 EAE 마우스의 배쪽 허리 척수로부터의 전자 현미경 사진. 스케일 바=2 μm . 도 1i: 비히클 및 ISP1072 처리된 EAE 마우스의 척수 병변 중의 수초화된 축삭의 개수. (n=3마리 마우스/군, $P=0.0014$, $t=7.815$, $df=4$; 양측 독립 스튜던트 t 검정). 도 1j: 비히클 및 ISP 처리된 EAE 마우스의 배쪽 허

리 척수 중 수초화된 섬유의 g-비 (축삭 직경/섬유 직경)의 정량화. (EAE+Veh 군, $g\text{-비} = 0.8874 \pm 0.001901$; EAE+ISP 군, $g_{1077} \text{ 비} = 0.8423$ ISP 군; 3마리 마우스/군으로부터의 재수초화된 축삭 $n=134$; $P < 0.0001$, $t=14.31$, $df=266$; 양측 독립 스튜던트 t 검정). 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.으로 제시된 것이다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $p < 0.001$.

도 2a-2g는 ISP가 리솔레시틴 (LPC)-탈수초화된 마우스의 척수에서 재수초화를 촉진시킨다는 것을 도시한 것이다. 도 2a: 비히클 또는 ISP 처리된 마우스의 척수로부터의 LPC 병변의 대표적인 LFB 염색된 절편. 파선은 병변 부위의 경계를 표시하는 것이다. 스케일 바=100 μm . 도 2b: 3, 7, 14 및 21 dpi에 비히클 또는 ISP 처리된 마우스에서 병변이 있는 척수의 부피의 정량적 분석. ($n=4$ 마우스/군, ANOVA $F(3,12)=16.41$; 시닥(Sidak's) 다중 비교 검정, 14dpi: $R_{LPC+Veh}$ 대 $LPC+ISP = 0.0003$; 21dpi: $R_{LPC+Veh}$ 대 $LPC+ISP < 0.0001$). 도 2c: 14 및 21dpi에 비히클- 및 ISP 처리된 마우스의 척수에서 MBP 및 DAPI에 대한 이중 면역염색. 파선은 병변 부위의 경계를 표시하는 것이다. 스케일 바 = 100 μm . 도 2d: 14dpi에 비히클 또는 ISP 처리된 마우스의 척수 조직에서의 MBP 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석. 데이터는 β -액틴 단백질 발현으로 정규화된 것이다. ($n=4$ 마우스/군, ANOVA $F(3,12)=24.21$; 터키 다중 비교 검정, P_{con} 대 $LPC+Veh < 0.0001$, $R_{LPC+Veh}$ 대 $LPC+ISP = 0.0276$). 도 2e: 14dpi에 비히클 또는 ISP 처리된 마우스의 척수로부터의 LPC 병변의 대표적인 전자 현미경 영상. 스케일 바=5 μm . 도 2e: 14dpi에 비히클 또는 ISP1100 처리된 마우스로부터의 LPC-유도성 병변 중 수초화된 축삭의 개수. ($n=3$ 마리 마우스/군, $P=0.0001$, $t=14.26$, $df=4$; 양측 독립 스튜던트 t 검정). 도 2g: 14dpi에 비히클 또는 ISP 처리된 마우스의 LPC-병변 중 미엘린 g-비 ($LPC+veh$ 군, $g\text{-비} = 0.9103 \pm 0.003583$; $LPC+ISP$ 군, $g\text{-비} = 0.8741 \pm 0.003599$; 3마리 마우스/군으로부터의 재수초화된 축삭 $n=139$, $P < 0.0001$, $t=7.142$, $df=276$; 양측 독립 스튜던트 t 검정). 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.으로 제시된 것이다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $p < 0.001$.

도 3a-3c는 ISP가 LPC 처리된 기관형 소뇌 배양물에서 재수초화를 가속화시킨다는 것을 도시한 것이다. 도 3a: MBP 및 신경필라멘트-200 (NF200)의 대표적인 면역조직화학 영상은 나이브 (Con) 절편에서의 정상적인 수초화, 시험관내 1일째 (div: day *in vitro*)의 LPC-유도성 탈수초화, 및 8div 및 14div에 LPC-탈수초화된 소뇌 슬라이스에서의 ISP 처리 후 증가된 재수초화를 보여주는 것이다. 스케일 바=100 μm . 도 3b: 비처리 (대조군으로서 100%) 대비 소뇌 슬라이스에서의 상대적인 MBP 면역반응성 (즉, MBP 및 NF200의 공동국체화). (군당 3회의 독립 반복 실험으로부터의 슬라이스 $n=9$, ANOVA $F(5,48)=230.4$, 터키 다중 비교 검정, 8dpi: $R_{LPC+Veh}$ 대 $LPC+ISP < 0.0001$, 14dpi: $R_{LPC+Veh}$ 대 $LPC+ISP < 0.0001$). 도 3c: 8div 및 14div에 비히클 또는 ISP 처리된 소뇌 슬라이스에서의 MBP 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석. 데이터는 β -액틴 단백질 발현으로 정규화된 것이다. ($n=3$ 독립 반복 실험/군. 8div: ANOVA $F(3,8)=58.89$, 터키 다중 비교 검정, P_{Veh} 대 $LPC+Veh < 0.0001$, $R_{LPC+Veh}$ 대 $LPC+ISP = 0.0187$; 14div: ANOVA $F(3,8)=6.281$, 터키 다중 비교 검정, P_{Veh} 대 $LPC+Veh < 0.048$, $R_{LPC+Veh}$ 대 $LPC+ISP = 0.025$). 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.으로 제시된 것이다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $p < 0.001$.

도 4a-4d는 ISP가 두 EAE 및 LPC 모델에서 모두 콘드로이틴 술페이트 프로테오글리칸 (CSPG) 로드를 감소시킨다는 것을 도시한 것이다. 도 4a: Iba1 및 Cat301 (아그레간 특이적 항체)의 대표적인 면역조직화학 영상은 유도 후 41일째 비히클 처리된 마우스 EAE 마우스와 비교하여 ISP 처리된 마우스의 흉부 척수에서 CSPG 및 소교세포/대식세포의 축적이 감소되었음을 보여주는 것이다. 스케일 바=100 μm . 도 4b: LPC 탈수초화 마우스에서 14dpi에 ISP 처리 후 CSPG의 축적이 감소되었음을 보여주는, MBP, Cat301 및 CS56 (글리코사미노글리칸 특이적 항체)의 대표적인 면역조직화학 영상. 스케일 바=100 μm . 도 4c: LPC 탈수초화 마우스에서 7dpi에 ISP 처리 후 CSPG의 축적이 감소되었음을 보여주는, Iba1, GFAP, MBP, Cat301 및 CS56의 대표적인 면역조직화학 영상. 스케일 바=100 μm . 도 4d: 7dpi에 비히클 또는 ISP 처리된 LPC 마우스의 척수에서 Iba1, GFAP, MBP, Cat301 및 CS56의 면역형광 강도의 상대적 정량화. ($n=3$ 마리 마우스/군, Iba1: $P=0.1848$, $t=1.6$, $df=4$; Cat301: $P=0.0092$, $t=4.719$, $df=4$; GFAP: $P=0.1111$, $t=2.039$, $df=4$; CS56: $P=0.0028$, $t=6.55$, $df=4$; MBP: $P > 0.9999$, $t=0$, $df=4$; 베르시칸: $P=0.0095$, $t=4.669$, $df=4$; 양측 독립 스튜던트 t 검정). 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.으로 제시된 것이다. ** $P < 0.01$.

도 5a-5i는 ISP가 CSPG-분해 프로테아제 활성을 증가시킨다는 것을 도시한 것이다. 도 5a 및 5b: CSPG 구배 통과 검정법은 ISP 처리가 CSPG 구배를 통한 PDGFR α 또는 O4+ OPC의 통과를 촉진시킨다는 것을 보여주는 것이다. 스케일 바=100 μm . 도 5c: 비히클 또는 ISP 처리 후, CSPG 장벽을 통과하는 PDGFR α 또는 O4+ OPC의 양에 대한 면역염색 정량화. (3회의 독립 반복 실험으로부터의 스폿 $n=9$. PDGFR α : $P < 0.0001$, $t=7.99$, $df=16$; O4: $P < 0.0001$, $t=9.419$, $df=16$, 양측 독립 스튜던트 t 검정). 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.으로 제시된 것이다. 도 5d: CS56 및 PDGFR α + OPC가 CSPG 장벽을 통과하여 CS56 "음영부" (삽도 및 화살표 표시)를 남김에 따

은, ISP 처리 이후의 CSPG 분해를 도시킨 CSPG 장벽 상의 CS56 및 PDGFR α + OPC의 대표적인 면역염색 영상. 도 5e: 프로테아제 활성을 조사하기 위해, OPC 조정 배지 (CM)를 비히클 대조군 또는 2.5 μ M ISP 또는 스크램블된-ISP (SISP)로 처리하고, 아그레칸 (20 μ g/mL) 또는 라미닌 (10 μ g/mL)과 함께 인큐베이션시킨 후, 웨스턴 블롯을 통해 분석하였다. 도 5f: CS56 면역블롯팅을 통해 글리코사미노글리칸 모이어터를 정량화한 결과, ISP 처리 후 CS56이 유의적으로 분해된 것으로 나타났다 (일원 ANOVA, 던넛(Dunnett's) 사후 검정, $P=0.0432$, $F(2,12)=4.131$, $N=5$ 웨스턴 블롯). 도 5g: 라미닌 면역블롯팅의 정량화는 유의적인 변화가 없음을 보여준다 (일원 ANOVA, 터키 사후 검정, $P=0.9024$, $F(2,15)=0.1034$, $N=6$ 웨스턴 블롯). 도 5h: EnzChek 프로테아제 활성 검정법에서 소광된 카세인은 일단 절단되고 나면, 형광을 낸다. 도 5i: 대조군과 비교하여 2.5 μ M ISP로 처리된 OPC CM에서의 EnzChek 프로테아제 활성 검정법의 정량화는 유의적인 프로테아제 활성을 나타낸다 (일원 ANOVA 던넛 사후 검정, $P=0.0015$, $F(2,18)=9.534$, 7회의 반복 실험으로부터 $N=26$). 그래프는 웨스턴 블롯의 산점도 대표도 또는 표준 오차 평균과 함께 각 반복 실험의 평균을 나타낸다. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $p < 0.001$. n.s., 비유의적.

도 6a-6i는 프로테아제 활성을 추가로 특징화하기 위해, ISP가 MMP-2 분비 및 활성을 증가시킨다는 것을 도시킨 것이며, 도 6a에서, 배양된 OPC를 비히클 대조군 또는 2.5 μ M ISP 또는 SISP로 처리하고, 농축시킨 후, 자이모그래피 분석을 위해 젤라틴 SDS/PAGE 겔 상에 로딩하였다. 25 ng의 재조합 MMP-9 또는 MMP-2는 양성 대조군으로서 작용하였다. 도 6b: 젤라틴 자이모그래피의 활성 MMP-2 레인의 정량화는 대조군과 비교하여, ISP 처리 후의 유의적인 MMP-2 활성을 나타낸다 (일원 ANOVA, 던넛 사후 검정, $P=0.0161$, $F(2,12)=5.937$, $N=5$ 자이모그래프). 도 6c: ISP 처리 후 증진된 MMP-2 발현이 농축된 OPC 조정 배지 (CM)의 웨스턴 블롯에서 확인되었다. 도 6d: MMP-2 면역블롯팅의 정량화는 대조군과 비교하여, ISP 처리 후 유의적으로 증진되었다 (일원 ANOVA, 던넛 사후 검정, $P=0.0150$, $F(2,15)=5.63$, $N=6$ 웨스턴 블롯). 그에 반해, 도 6e에서, MMP-10 면역블롯팅은 처리군 사이에서 비유의적이었다 (일원 ANOVA, 터키 사후 검정, $P=0.9619$, $F(2,15)=0.03899$, $N=6$ 웨스턴 블롯). 도 6i: ISP가 CSPG를 분해하는 프로테아제의 분비를 유도하는지 여부를 조사하기 위해, 배양된 OPC를 2.5 μ M ISP와 함께, 또는 사용하지 않고, 하기 약물로 처리하였다: 엑소사이토시스 억제제 Exo1 10 μ g/mL, 일반 메탈로프로테아제 억제제 GM6001 (25 μ M), 또는 특이적 MMP-2 억제제 (OA-Hy, 칼바이오펜(Calbiochem)), 100 nM. 수집된 CM을 아그레칸 (20 μ g/mL)과 함께 인큐베이션시키고, CS56으로 면역블롯팅하였다. 도 6j: CS56의 정량화는 대조군, Exo1+ISP, GM6001+ISP, 및 OA-Hy + ISP와 비교하여 유의적인 ISP 유도성 CSPG 분해를 나타낸다 (일원 ANOVA, 터키 사후 검정, $P=0.0010$, $F(7,32)=4.749$ $N=5$ 웨스턴 블롯). 도 6h: OPC 체세포 및 돌기에 농축되어 있는 MMP-2를 보여주는 O4+ (적색) OPC의 면역염색. 그래프는 웨스턴 블롯의 산점도 대표도 또는 표준 오차 평균과 함께 각 반복 실험의 평균을 나타낸다. * $P<0.05$. n.s., 비유의적.

도 7a-7f는 ISP-유도성 MMP-2 활성이 OPC 이동 및 CSPG 탈착제를 통한 재수초화를 증가시킨다는 것을 도시킨 것이다. ISP-유도성 프로테아제 활성이 OPC 이동 및 재수초화에 관여하는지 여부를 묻기 위해, 도 7a에서, 배양된 OPC를 CSPG 스폿 구배로 커버슬립에 플레이팅하고, 비히클 대조군, 2.5 μ M ISP 또는 SISP, 25 μ M GM6001 +/- ISP 또는 SISP, 또는 100 nM MMP-2 억제제 (OA-Hy) +/- ISP 또는 SISP로 처리하였다. CSPG 장벽을 통과하는 O4+ OPC의 양을 계수하였고, 도 7b에서, 정량화하고, 그래프로 나타내었다. ISP 처리 ($N=37$ 스폿, 5회 반복 실험)는 대조군 (일원 ANOVA, 터키 사후 검정, $P=0.0002$, $F(11,48)=5.013$), GM6001+ISP ($N=20$ 스폿), 또는 OA-Hy + ISP ($N=20$ 스폿) 처리와 비교하여 CSPG 장벽을 통과하는 O4+ OPC 이동이 더 크게 진행되도록 유의적으로 유도하였다. $N(\text{스폿})=31$ 대조군, 26 SISP, 18 GM6001, 20 GM6001+SISP, 18 OA-Hy, 19 OA-Hy+SISP). 도 7c: 재수초화가 프로테아제 억제에 의해 영향을 받았는지 여부를 시험하기 위해, P7-9 소뇌 슬라이스를 모두 18시간 동안 LPC로 처리한 후, 대조군 비히클, 2.5 μ M ISP 또는 SISP, 25 μ M GM6001 +/- ISP, 또는 100 nM OA-Hy +/- ISP로 9일 동안 처리한 후, 신경필라멘트 (NF200) 또는 MBP로 염색하였다. 도 7d: MBP 및 신경필라멘트 공동국재화를 통해 재수초화를 정량화하였다. ISP 처리 (최대 총 13개의 절편을 이용한 4회 반복 실험으로부터의 영상 $N=35$)는 대조군 (일원 ANOVA, 터키 사후 검정, $P=0.0001$, $F(8, 88) = 13.61$), GM6001 + ISP ($N=28$), 및 OA-Hy + ISP ($N=23$) 군과 비교하여 MBP-신경필라멘트 공동국재화를 유의적으로 증가시켰다. $N(\text{영상})=17$ 대조군, 22 SISP, 48 GM6001, 20 GM6001+SISP, 22 OA-Hy, 22 OA-Hy +SISP. 그래프는 웨스턴 블롯의 산점도 대표도 또는 표준 오차 평균과 함께 각 반복 실험의 평균을 나타낸다. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $p < 0.001$. 도 7e 및 7f: 소뇌 슬라이스 배양물을 LPC 처리 전 48시간 동안 렌티바이러스 구축물로 처리하였다. 비히클 또는 ISP (2.5 μ M)로 6일 동안 처리하였다. 이어서, MBP 면역형광 (녹색)을 NF200 (적색)을 이용하여 정량화하였다. 일원 ANOVA, 터키 사후 검정. $P=0.0005$. $F(3, 116)=6.395$. 10개의 슬라이스로부터의 영상 $N\approx 30$). 그래프는 웨스턴 블롯의 산점도 대표도 또는 표준 오차 평균과 함께 각 반복 실험의 평균을 나타낸다.

도 8a-8f는 ISP가 LPC-유도성 탈수초화 마우스 모델에서 MMP-2 발현 증가를 통해 미엘린 수복을 촉진시킨다는

것을 도시한 것이다. 도 8a: MMP-2 및 DAPI의 면역조직화학법으로부터의 대표적인 영상은 나이브 또는 LPC 비히클 대조군 척수와 비교하여 LPC 주사 후 7일째 (dpi: day post LPC injection) ISP 처리된 마우스의 척수에서 MMP-2의 수준이 증가되었음을 보여주는 것이다. 파선은 병변 부위의 경계를 표시하는 것이다. 스케일 바=100 μ m. 도 8b: 7dpi에 ISP 처리된 마우스의 척수에서 MMP-2의 면역형광 강도의 상대적 정량화 (n=3마리 마우스/군, ANOVA F(2,6)=48.12, 터키 다중 비교 검정, P_{con} 대 LPC = 0.0075, P_{LPC} 대 LPC+ISP = 0.0056). 도 8c: 7dpi에 나이브, 비히클, 또는 ISP 처리된 마우스의 척수 조직에서의 MBP 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석. 데이터는 β -액틴 단백질 발현으로 정규화된 것이다. (n=3마리 마우스/군, ANOVA F(2,6)=33.14; 터키 다중 비교 검정, P_{con} 대 LPC = 0.0168, P_{LPC} 대 LPC+ISP = 0.0143). 도 8d: 대표적인 면역조직화학 영상은 14dpi에 ISP 처리된 마우스의 척수에서 Olig2+ OPC가 MMP-2를 발현한다는 것을 보여주는 것이다. 흰색 화살표 표시는 MMP-2 및 Olig2의 공동국재화를 나타낸 것이다. 도 8e: 대표적인 면역조직화학 영상은 14dpi에 ISP 처리된 마우스의 척수에서 Iba1+ 세포 (소교세포/대식세포)가 MMP-2를 발현한다는 것을 보여주는 것이다. 흰색 화살표 표시는 MMP-2 및 Iba1의 공동국재화를 나타낸 것이다. 스케일 바=100 μ m. 도 8f: 나이브, 비히클, ISP, MMP-2 억제제 (OA-Hy), 또는 MMP-2 shRNA 처리된 마우스의 척수로부터의 LPC 병변의 대표적인 에리오크롬 시아닌 (미엘린) 염색. 파선은 병변 부위의 경계를 표시하는 것이다. 스케일 바=100 μ m. 도 8g: 18dpi에 비히클, ISP, MMP-2 억제제 (OA-Hy), 또는 MMP-2 shRNA 처리된 마우스에서 병변이 있는 척수의 부피의 정량적 분석. (n=4 마우스/군, ANOVA F(5,18)=169.7; 터키 다중 비교 검정, P_{LPC} 대 LPC+ISP < 0.0001; $P_{LPC+ISP}$ 대 LPC+ISP+OA-Hy < 0.0001; $P_{LPC+ISP}$ 대 LPC+ISP+MMP-2 shRNA < 0.0001; P_{LPC} 대 LPC+OA-Hy = 0.0279). 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.으로 제시된 것이다. *P<0.05, *** p < 0.001.

도 9a-9d는 MS 마우스 모델에서의 CSPG 로드 증가를 도시한 것이다. 도 9a 및 9b: 대표적인 LFB 염색된 절편 및 Cat301 및 CS56의 면역조직화학 영상은 유도 후 28 및 48일째 EAE 마우스의 흉부 척수에서의 CSPG 축적을 보여주는 것이다. 스케일 바=100 μ m. 도시된 Cat301 (아그레칸 CSPG) 및 CS56 (CSPG의 글리코사미노글리칸 모이어티)의 픽셀 강도 정량화. (Cat301: n=3마리 마우스/군, ANOVA F(2,6)=163.9, 터키 다중 비교 검정, P_{con} 대 EAE D28 = 0.0007, $P_{EAE D28}$ 대 EAE D41 = 0.0001; CS56: n=3마리 마우스/군, ANOVA F(2,6)=168.7, 터키 다중 비교 검정, P_{con} 대 EAE D28 = 0.0052, $P_{EAE D28}$ 대 EAE D41 < 0.0001). 도 9c 및 9d: 대표적인 LFB 염색된 절편 및 Cat301 및 CS56의 면역조직화학 영상은 유도 후 7dpi 및 14dpi에 LPC 탈수초화 이후 병변 부위에서의 CSPG 축적을 보여주는 것이다. 스케일 바=100 μ m. 도시된 Cat301 및 CS56의 픽셀 강도 정량화. (Cat301: n=3마리 마우스/군, ANOVA F(2,6)=269.7, 터키 다중 비교 검정, P_{con} 대 7 dpi < 0.0001, P_{7dpi} 대 14 dpi < 0.0001; CS56: n=3마리 마우스/군, ANOVA F(2,6)=105, 터키 다중 비교 검정, P_{con} 대 7 dpi < 0.0001, P_{7dpi} 대 14 dpi = 0.0011).

도 10a-10e는 PTP σ 발현이 EAE 및 LPC 후에 증진된다는 것을 도시한 것이다. 도 10a: PTP σ 및 Olig2의 대표적인 면역세포화학 영상은 시험관내에서 성장된 올리고덴드로사이트 전구 세포 상에서의 PTP σ 발현을 보여주는 것이다. 도 10b: 공개적으로 이용가능한 RNA-서열분석 트랜스크립토 데이터베이스 (web.stanford.edu/group/barres_lab/)로부터 수득된 세포 특이적 PTPRD (PTP δ), PTPRS (PTP σ), PTPRF (LAR) 및 RTN4R (Nogo) mRNA 수준을 그래프로 나타낸 대표도. FPKM은 단편/전사체 서열의 킬로베이스/100만 개의 지도화된 단편을 나타낸다. 도 10c: PTP σ , CC1, 및 MBP의 대표적인 면역조직화학 영상은 시험관내 OPC 배양물 중 CC1+ 또는 MBP+ 세포에서의 PTP σ 발현을 보여주는 것이다. 도 10d: EAE 또는 LPC-유도성 탈수초화 마우스의 흉부 척수에서의 PTP σ 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석. 데이터는 β -액틴 단백질 발현으로 정규화된 것이다 (n=4마리 마우스/군. P_{con} 대 EAE = 0.012, t=3.558, df=6; P_{con} 대 LPC=0.0012, t=5.775, df=6; 양측 독립 스튜던트 t 검정). 도 10e: PTP σ 및 Olig2의 대표적인 면역조직화학 영상은 유도 후 28일째 EAE 마우스의 척수 중 Olig2+ 세포에서 PTP σ 발현이 증가되었음을 보여주는 것이다. 스케일 바=50 μ m. 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.으로 제시된 것이다. *P<0.05, **P<0.01.

도 11a 및 11b는 ISP는 재수초화가 발생됨에 따라, CSPG 제거를 증가시킨다는 것을 보여주는 것이다. 도 11a: MBP 및 Cat301의 대표적인 면역조직화학 영상은 8dpi 및 14dpi에 LPC-탈수초화된 소뇌 슬라이스에서 ISP 처리 후 CSPG의 존재량이 감소되었다는 것을 보여주는 것이다. 스케일 바=100 μ m. 도 11b: 4dpi, 8dpi 및 14dpi에 LPC 탈수초화된 소뇌 슬라이스에서 비히클 또는 ISP 처리 후 Cat301의 면역형광 강도의 상대적 정량화 (군당 3 회의 독립 반복 실험으로부터의 슬라이스 n=9, 이원 ANOVA F(2,6)=30.78, 시탁 다중 비교 검정, 8dpi: $P_{LPC+Veh}$ 대 LPC+ISP < 0.0001, 14dpi: $P_{LPC+Veh}$ 대 LPC+ISP = 0.0325).). *P<0.05, *** p < 0.001, n.s: 비유의적.

도 12a-12f는 ISP가 EAE 마우스 모델에서 염증을 조정한다는 것을 시사하는 것이다. 도 12a: Iba1 및 GFAP의

대표적인 면역조직화학 영상은 EAE 유도 후 41일째 ISP 처리된 마우스의 척수에서 소교세포 및 성상세포의 활성화가 각각 감소되었음을 보여주는 것이다. 스케일 바= 100 μm . 도 12b: 41일째 ISP 처리된 마우스의 척수에서 Iba1 및 GFAP의 면역형광 강도의 상대적 정량화 ($n=3$ 마리 마우스/군, Iba1: $P=0.0016$, $t=7.608$, $df=4$; GFAP: $P=0.0113$, $t=4.448$, $df=4$. 양측 독립 스튜던트 t 검정). 도 12c: iNOS (M1 소교세포 마커) 및 아르기나제-1 (M2 소교세포 마커)의 대표적인 면역조직화학 영상은 28일째 ISP 처리된 마우스의 척수에서 M2 소교세포가 증가 및 M1 소교세포가 감소되었음을 보여주는 것이다. 스케일 바= 100 μm . 도 12d: 41일째 ISP 처리된 마우스의 척수에서 iNOS 및 아르기나제-1의 상대적 면역형광의 정량화 ($n=3$ 마리 마우스/군, NOS: $P=0.0008$, $t=9.114$, $df=4$; 아르기나제-1: $P=0.0014$, $t=7.824$, $df=4$. 양측 독립 스튜던트 t 검정). 도 12e: 대표적인 록슬 패스트 블루 염색 영상은 18일째 비히클 또는 ISP 처리된 마우스의 탈수초화 부위에는 차이가 없음을 보여주는 것이다. 도 12f: 18일째 비히클 또는 ISP 처리된 마우스의 척수에서 탈수초화 부위의 정량화는 EAE 모델에서의 탈수초화 수준과 유사하다는 것을 나타낸다 ($n=3$ 마리 마우스/군, $P=0.8559$, $t=0.1936$, $df=4$, 양측 독립 스튜던트 t 검정). * $P<0.05$, *** $p < 0.001$, n.s.: 비유의적.

도 13a-13f는 ISP가 CSPG 상에서의 OPC 동원 및 생존을 촉진시킨다는 것을 도시한 것이다. 도 13a: 7dpi에 비히클- 및 ISP 처리된 마우스의 척수에서 증식하는 OPC (Olig2+)를 보여주는 Ki67 면역염색의 대표적인 영상. 흰색 화살표 표시는 Olig2+/Ki67+ 세포를 나타낸다. 스케일 바=100 μm . 도 13b: 7dpi에 비히클- 및 ISP 처리된 마우스의 척수 중 Olig2+ 세포/ mm^2 , Ki67+ 세포/ mm^2 및 Olig2+/Ki67+ 세포/ mm^2 를 보여주는 면역염색의 정량화. ($n=3$ 마리 마우스/군, Olig2: $P=0.0012$, $t=1.6$, $df=4$; Ki67: $P=0.0449$, $t=2.883$, $df=4$; Olig2+/Ki67+: $P=0.056$, $t=2.666$, $df=4$. 양측 독립 스튜던트 t 검정). 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.으로 제시된 것이다. 도 13c: 척수 LPC 주사 후 7div 동안 비히클 또는 ISP로 처리된 동물. 절편을 Olig2, Ki67, 및 DAPI로 염색하였다. b) LPC 절편에서 Olig2, Ki67, 및 공동국재화된 Olig2 및 Ki67의 정량화. c) OPC를 아그레칸/라미닌-미리 코팅된 커버슬립 상에서 배양하고, 비히클 대조군, 2.5 μM ISP 또는 SISP로 처리하고, O4 및 Ki67로 염색하였다. 도 13d: Ki67을 군 사이에서 비유의적으로 변화하였다 (일원 ANOVA, 터키 사후 검정, $P=0.8998$, $F(2,9)=0.1068$, $N=12$ 영상, 각각 4회 반복 실험 및 각각 3회 반복). 도 13e: OPC를 아그레칸/라미닌 상에서 배양하고, 2div 동안 대조군 또는 2.5 μM ISP로 처리한 후, 2시간 동안 비히클 또는 LPC (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 인큐베이션시킨 후, DAPI 및 TUNEL 염색을 수행하였다. 도 13f: DAPI+ 세포 대비 TUNEL+ 정량화는 대조군과 비교하여 ISP 처리된 ($N=40$ 영상, 4회 반복 실험) OPC의 유의적인 생존을 나타낸다 (일원 ANOVA, 터키 사후 검정, $P=0.0021$, $F(3,36)=5.96$). ISP-처리된 LPC 처리된 세포의 생존을 증진시켰다 ($N(\text{영상})=36$ 대조군, 28 각각 LPC 처리된 군). 그래프는 웨스턴 블롯의 산점도 대표도 또는 표준 오차 평균과 함께 각 반복 실험의 평균을 나타낸다. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $p < 0.001$.

도 14a-14g는 ISP가 OPC 돌기 성장 및 성숙화를 증진시킨다는 것을 도시한 것이다. 도 14a: 유도 후 41일째 비히클 또는 ISP 처리된 EAE 마우스의 흉부 척수에서 Olig2 및 CC1의 대표적인 면역조직화학 영상. 스케일 바=50 μm . 도 14b: 유도 후 41일째 비히클 또는 ISP 처리된 EAE 마우스의 흉부 척수에서 Olig2+ 세포/ mm^2 및 CC1+ 세포/ mm^2 에 대한 면역염색의 정량화. ($n=3$ 마리 마우스/군, Olig2: $P=0.0189$, $t=3.811$, $df=4$; CC1: $P=0.0019$, $t=7.259$, $df=4$. 양측 독립 스튜던트 t 검정). 도 14c: 14dpi에 비히클 또는 ISP 처리된 LPC 마우스의 척수에서 DAPI 및 CC1의 대표적인 면역조직화학적 영상. 파선은 병변 부위의 경계를 표시하는 것이다. 스케일 바=100 μm . 도 14d: 14dpi에 정규화된 CC1+ 올리고덴드로사이트 밀도에 대한 면역염색의 정량화. ($n=3$ 마리 마우스/군, $P=0.0044$, $t=5.789$, $df=4$. 양측 독립 스튜던트 t 검정). 도 14e: ISP 또는 비히클의 존재하에서 폴리-1-리신 또는 CSPG 상에 플레이팅한 후의 OPC의 성숙화의 대표적인 면역조직화학적 영상. 스케일 바=100 μm . 도 14f: ISP 또는 비히클의 존재하에서 폴리-1-리신 (대조군) 또는 CSPG 상에의 OPC 플레이팅 후, 성숙한 OL의 상대적인 비율의 정량화. ($n=3$ 회의 독립 반복 실험, O4: ANOVA $F(2,6)=1.321$, $P=0.3347$; MBP: ANOVA $F(2,6)=30.99$, 터키 다중 비교 검정, $P_{\text{Con}} \text{ 대 } \text{CSPG+Veh} = 0.0005$, $P_{\text{CSPG+Veh}} \text{ 대 } \text{CSPG+ISP} = 0.0175$). 도 14g: 6일째 ISP 또는 비히클의 존재하에서 폴리-1-리신 (대조군) 또는 CSPG 상에의 OPC 플레이팅 후, MBP+ 포트프린트의 크기 비교. ($n=3$ 회의 독립 반복 실험, ANOVA $F(2,6)=40.96$, 터키 다중 비교 검정, $P_{\text{Con}} \text{ 대 } \text{CSPG+Veh} = 0.0003$, $P_{\text{CSPG+Veh}} \text{ 대 } \text{CSPG+ISP} = 0.0052$). 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.으로 제시된 것이다. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $p < 0.001$. n.s., 비유의적.

도 15는 프로테아제 검정법의 결과를 그래프로 도시한 것이다. 어느 프로테아제가 ISP 처리에 의해 상향조절될 수 있는지를 스크리닝하는 것을 시작으로, 배양된 OPC를 시험관내에서 4일 동안 비히클 대조군 또는 2.5 μM ISP로 처리하였다. 이어서, 조정 배지를 정질적 프로테아제 어레이 (R & D 시스템즈(R & D Systems))와 인큐베이션시키고, 현상시켰다. 이어서, 대조군 OPC CM 대비 ISP 처리된 OPC CM의 픽셀 강도의 변화율(%)을 계산하였다.

도 16a-16h는 ISP가 용량에 의존하는 방식으로 CS56 분해를 증진시킨다는 것을 도시한 것이다. ISP 처리된 OPC CM은 CS56 스폿을 분해할 수 있다. 도 16a: 비히클 대조군, 2.5 μ M ISP 또는 SISP로 처리된 OPC를 시험관내에서 2일 동안 인큐베이션시킨 후, CM을 수집하고, 아그레칸/라미닌 스폿과 함께 인큐베이션시켰다. 인큐베이션시켰다의 추가의 서브세트를 오직 배지하고만 동일 기간 동안 인큐베이션시켰다. 스폿을 CS56 또는 라미닌으로 면역염색하고, 스폿 태두리의 픽셀 강도를 기록하였다. 도 16b: 관심의 대상이 되는 황색 영역은 스폿의 측정 부분을 나타내는 것인, CS56 염색된 스폿의 대표적인 영상. 도 16c: CS56 면역염색된 스폿의 정량화는 ISP 처리된 OPC CM이 대조군과 비교하여 CSPG를 유의적으로 분해시킨다는 것을 나타낸다 (일원 ANOVA, 던넛 사후 검정, $P=0.0001$, $F(5,72)=45.19$). N (영상, 5회 반복 실험)=69 대조군, 104 ISP, 95 SISP, 31 오직 배지만). 도 16d: 라미닌 염색된 스폿의 대표적인 영상. 도 16e: 라미닌 염색된 스폿의 정량화는 군들 사이에 유의적인 변화는 없음을 나타낸다 (일원 ANOVA, 터키 사후 검정, $P=0.0818$, $F(3,85)=2.312$), N (영상, 5회 반복 실험)=133 대조군, 134 ISP, 114 SISP, 34 오직 배지만). 도 16f: CS56 분해를 확인하기 위해, OPC를 다양한 양의 ISP 또는 비히클 대조군으로 처리하고, 고정된 농도의 아그레칸 (20 μ g/mL)와 함께 2시간 동안 인큐베이션시킨 후, 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 도 16g: CS56의 웨스턴 블롯 분석 및 후속하여 CS56 밴드의 정량화 (도 16h)는 2.5 및 5 μ M 용량의 대조군과 비교하여 유의적인 ISP 처리된 CS56 분해를 나타낸다 (일원 ANOVA, 터키 사후 검정, $P=0.0049$, $F(5,12)=6.112$, $N=3$ 웨스턴 블롯). 그래프는 웨스턴 블롯의 산점도 대표도 또는 표준 오차 평균과 함께 각 반복 실험의 평균을 나타낸다

도 17a-17g는 프로테아제 억제제가 ISP-유도성 CSPG 분해, 및 후속하여 CSPG-OPC 탈억제를 약화시킨다는 것을 도시한 것이다. 프로테아제 억제제가 OPC에 미치는 기능적 효과를 사정하기 위한 것으로, 도 17a 및 17b는 CS56-면역염색된 스폿을 비히클 대조군, 2.5 μ M ISP, 또는 25 μ M GM6001 +/- ISP 처리된 OPC CM과 함께 인큐베이션시킨 검정법의 결과를 도시한 것이다. 정량화된 CS56 면역반응성은 대조군 및 GM6001+ISP와 비교하여 유의적인 ISP-유도성 CS56 분해를 나타낸다 (일원 ANOVA, 터키 사후 검정, $P=0.0001$, $F(3, 37) = 21.43$), N (영상, 3회 반복 실험)=24 대조군, 17 ISP, 19 GM6001, 20 GM6001+ISP). 유사하게, 도 17c 및 17d는 비히클 대조군, 2.5 μ M ISP, 또는 100 nM MMP-2 억제제 (OA-Hy) +/- ISP로 처리된 아그레칸 스폿이 비히클 대조군 및 MMP-2 억제제 (OA-Hy) + ISP와 비교하여 ISP-유도성 분해를 나타내었다는 것을 도시한 것이다 (일원 ANOVA, 터키 사후 검정, $P=0.001$, $F(3, 44)=31.50$). $N=24$ 영상 각각). 도 17e: MMP-2 억제제가 아포토시스에 영향을 주었는지 여부를 사정하기 위해, 아그레칸/라미닌 미리 코팅된 커버슬립 상에서 배양된 OPC를 시험관내에서 2일 동안 ISP, 100 nM MMP-2 억제제 (OA-Hy) +/- ISP로 처리하였다. 처리된 OPC 서브세트를 추가로 LPC (1 μ g/mL)로 챌리지하고, 2시간 동안 인큐베이션시키고, TUNEL/DAPI 염색을 수행한다. MMP-2 억제제 (OA-Hy)는 TUNEL+ 세포/총 세포를 유의적으로 증가시키지 않았다. 그러나, LPC-ISP 처리와 비교하여 MMP-2 억제제 (OA-Hy)는 심지어 ISP로 처리한 경우에도, LPC 처리 후 아포토시스를 증가시켰다 (일원 ANOVA, 터키 사후 검정, $P=0.0001$, $F(7,21)=29.66$), $N=2$ 반복 실험, 각각 2 웰). 도 17f: 아그레칸/라미닌 상에서 배양된 OPC의 100 nM MMP-2 억제제 (OA-Hy) 처리는 ISP 처리 단독과 비교하여 MBP 풋프린트를 유의적으로 추가로 감소시켰다 (일원 ANOVA, $P=0.0001$, $F(3,112)=228.3$), N (세포, 총 5회 반복 실험)=128 대조군, 126 ISP, 191 OA-Hy, 222 OA-Hy+ISP). 그래프는 표준 오차 평균과 함께 각 반복 실험의 평균의 산점도 대표도를 나타낸다.

도 18a-17e는 MMP-2의 shRNA 넉 다운이 CSPG 상의 OPC 성숙화 및 이동을 감소시켜 소뇌 슬라이스에서 채수초화를 제한한다는 것을 도시한 것이다. 도 18a: 대조군 렌티바이러스 스크램블된 shRNA, 또는 MMP-2를 표적화하는 렌티바이러스 입자 발현 shRNA 구축물로 48시간 동안 감염된 OPC 배양물, 이어서, 웨스턴 블롯을 수행하여 GAPDH와 비교하여 MMP-2 넉 다운 사정. 도 18b 및 18c: 라미닌 및 저농도의 아그레칸 (1 μ g/mL) 상에서 배양된, 스크램블된 shRNA 또는 MMP-2를 표적화하는 shRNA의 렌티바이러스 감염된 OPC를 MBP로 면역염색한 후, 48시간 동안 비히클 또는 ISP (2.5 μ M)로 처리하였다. MBP 부위를 정량화하였다 (일원 ANOVA, 터키 사후 검정, $P=0.013$, $F(3, 158)=6.677$, 2회 반복으로부터의 세포 $N=100$). 도 18d 및 18e: OPC (O4, 적색)를 48시간 렌티바이러스 구축물로 감염시킨 후, 스폿 검정 상에 플레이팅하여 ISP (2.5 μ M) 존재 또는 부재하의 아그레칸 (녹색)을 통과하는 이중을 사정하였다. 아그레칸 스폿을 통과하는 OPC 개수를 계수하였다 (일원 ANOVA, 터키 사후 검정, $P=0.0015$, $F(3, 44)=6.056$, 2회 반복으로부터의 스폿 $N=40$).

도 19a-19d는 MMP-2는 LPC-탈수초화된 마우스 모델에서 ISP-유도성 채수초화를 매개한다는 것을 도시한 것이다. 도 19a: 비히클, ISP 또는 MMP-2 억제제 (OA-Hy) 처리된 마우스의 척수로부터의 CS56 및 DAPI의 면역조직화학법으로부터의 대표적인 영상은 LPC 주사 후 14일째의 MMP-2-매개 CS56 분해를 보여주는 것이다. 파선은 척수의 등쪽 백질의 경계를 표시하는 것이다. 스케일 바= 100 μ m. 도 19b: 14dpi에 비히클, ISP 또는 MMP-2 억제제 (OA-Hy) 처리된 마우스의 척수에서 CS56의 면역형광 강도의 상대적 정량화 ($n=3$ 마리 마우스/군, ANOVA

$F(3,8)=76.08$, 터키 다중 비교 검정, P_{LPC} 대 $LPC+ISP < 0.0001$, $P_{LPC+ISP}$ 대 $LPC+ISP+OA-Hy = 0.0079$, P_{LPC} 대 $LPC+OA-Hy = 0.0026$). 도 19c: 비히클, ISP 또는 MMP-2 억제제 (OA-Hy) 처리된 마우스의 척수로부터의 Olig2 및 DAPI의 면역조직화화학으로부터의 대표적인 영상은 LPC 주사 후 14일째의 MMP-2-매개 OPC 이동을 보여주는 것이다. 파선은 병변 부위의 경계를 표시하는 것이다. 스케일 바= 100 μm . 도 19d: 14dpi에 비히클, ISP 또는 MMP-2 억제제 (OA-Hy) 처리된 마우스의 척수에서 Olig2+ 세포 개수의 정량화 ($n=3$ 마리 마우스/군, ANOVA $F(3,8)=21.58$, 터키 다중 비교 검정, P_{LPC} 대 $LPC+ISP = 0.0074$, $P_{LPC+ISP}$ 대 $LPC+ISP+OA-Hy = 0.0088$, P_{LPC} 대 $LPC+OA-Hy = 0.0385$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

상세한 설명

달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 과학 및 기술 용어는 당업계의 숙련가가 보편적으로 이해하는 의미를 가져야 한다. 추가로, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함하고, 복수 용어는 단수를 포함하여야 한다. 일반적으로, 본원에 기술된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 및 단백질 및 올리고 또는 폴리뉴클레오티드 화학 및 하이브리드화와 관련하여 사용된 명명법, 및 그의 기술은 널리 공지되고, 당업계에서 보편적으로 사용되는 것이다.

편의상, 본 명세서, 실시예 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 특정 용어는 여기 수집되어 있다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 기술 및 과학 용어는 모두 본 출원이 속하는 분야의 당업계의 숙련가가 보편적으로 이해하는 의미를 갖는다.

본원에서 사용되는 바, "하나"("a" 및 "an")라는 관사는 상기 관사의 문법상의 객체가 하나 또는 1개 이상 (즉, 적어도 하나)인 것을 지칭한다. 예로서, "한 요소"란, 하나의 요소 또는 1개 이상의 요소를 의미한다.

"포함하다(comprise)," "포함하는(comprising)," "포함하다(include)," "포함하는(including)," "갖다," 및 "갖는"이라는 용어는 포괄하는 개방적 의미로 사용되며, 이는 추가 요소를 포함할 수 있다는 것을 의미한다. 본원에서 사용되는 바, "예컨대(such)," "예컨대(e.g.)"라는 용어는 비제한적인 것으로, 단지 예시 목적으로 사용되는 것이다. "포함하는" 및 "포함하지만, 이에 제한되지 않는"은 상호교환적으로 사용된다.

본원에서 사용되는 바, "또는"이라는 용어는 문맥상 달리 명확하게 명시되지 않는 한, "및/또는"을 의미하는 것으로 이해하여야 한다.

본원에서 사용되는 바, "약" 또는 "대략"이라는 용어는 양, 수준, 값, 개수, 빈도, 비율, 치수, 크기, 양, 체중 또는 길이가 참조 양, 수준, 값, 개수, 빈도, 비율, 치수, 크기, 양, 체중 또는 길이 대비 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 정도로 달라질 수 있다는 것을 의미한다. 한 실시양태에서, "약" 또는 "대략"이라는 용어는 참조 양, 수준, 값, 개수, 빈도, 비율, 치수, 크기, 양, 체중 또는 길이에 대해 참조 양, 수준, 값, 개수, 빈도, 비율, 치수, 크기, 양, 체중 또는 길이 $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 6\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, 또는 $\pm 1\%$ 인 범위를 지칭한다.

본원에서 사용되는 바, "a, b, 및 c 중 하나 이상"이란, a, b, c, ab, ac, bc, 또는 abc를 의미한다. 본원에서 "또는"의 사용은 포함적 또는이다.

환자에게 "투여하는"이라는 용어는 대상체에게 제약 제제 중의 활성 화합물을 상기 활성 화합물을 대상체 내의 원하는 위치에 전달하는 데 적합한 임의의 경로에 의해 분배, 전달 또는 적용시키는 것 (예컨대, 이로써, 원하는 세포, 예컨대, 원하는 뉴런과 접촉하도록 하는 것)을 포함하며, 뇌척수액 내로, 또는 혈액-뇌 장벽을 통해 투여, 비경구적 또는 경구 경로, 근육내 주사, 피하 또는 진피내 주사, 정맥내 주사에 의한 전달, 협측 투여, 경피적 전달 및 직장, 결장, 질, 비내 또는 기도 경로에 의한 투여를 포함한다. 작용제는 예를 들어, 정맥내 주사를 통해 혼수 상태인, 마취된 또는 마비된 대상체에게 투여될 수 있거나, 또는 태아의 축상 성장을 자극시키기 위해 임신한 대상체에게 정맥내로 투여될 수 있다. 특정 투여 경로는 국부 적용 (예컨대, 점안제, 크림제 또는 눈꺼풀 아래 제공되는 부식가능한 제제에 의한 것), 수양액 또는 유리체액 내로의 안내 주사, 예컨대, 결막하 주사 또는 태눈하 주사, 비경구적 투여를 통한 또는 경구적 경로를 통한 안구의 외층 내로의 주사를 포함할 수 있다.

"항체"라는 용어는 인간 및 동물 mAb, 및 폴리클로날 항체, 합성 항체 (제조항 항체(항혈청) 포함), 키메라 항체 (인간화 항체 포함), 항이디오타입 항체 및 그의 유도체의 제제를 포함한다. 항체의 일부분 또는 단편이란, 특정 에피토프에 결합할 수 있는 그의 능력 (결합 특이성 및 친화성)을 적어도 일부를 유지하는 항체의 영역을

지칭한다. "에피토프" 또는 "항원성 결정기"라는 용어는 항체 파라토프가 결합하는 항원 상의 부위를 지칭한다. 연속된 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매에의 노출시에도 유지되는 반면, 3차원 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매 처리시에 손실된다. 에피토프는 전형적으로 고유한 공간 구조로 적어도 3, 적어도 5, 또는 8 내지 10, 또는 약 13 내지 15개의 아미노산을 포함한다. 에피토프의 공간 구조를 측정하는 방법으로는 예를 들어, x선 결정학법 및 2차원 핵 자기 공명을 포함한다.

[0030] "키메라 단백질" 또는 "융합 단백질"은 폴리펩티드를 코딩하는 제1 아미노산 서열과, 제1 폴리펩티드의 도메인에 대해서는 외래의 것이고, 그와 실질적으로 상동성은 아닌 도메인 (예컨대, 폴리펩티드 부분)을 정의하는 제2 아미노산 서열과의 융합체를 지칭한다. 키메라 단백질은 제1 단백질 또한 발현하는 유기체에서 (비록 상이한 단백질에서 발견되는 것이지만) 발견되는 외래 단백질을 제공할 수 있거나, 또는 상이한 종류의 유기체에 의해 발현되는 단백질 구조체의 "중간," "유전자간" 융합체 동일 수 있다.

[0031] 작용제 또는 치료 펩티드의 "유효량"은 원하는 치료적 또는 약리적 효과를 달성하는 데 충분한 양, 예컨대, 뉴런의 성장을 활성화시킬 수 있는 양이다. 본원에서 정의된 바와 같은 작용제의 유효량은 대상체의 질환 상태, 연령, 및 체중, 및 대상체에서 원하는 반응을 유도할 수 있는 작용제의 능력에 따라 달라질 수 있다. 최적의 치료 반응을 제공하기 위해 투여량 요법은 조정될 수 있다. 유효량은 또한 치료학상 유의한 효과가 활성 화합물의 임의의 독성 또는 유해한 효과를 능가하는 것이다.

[0032] "발현"이라는 용어는 핵산이 펩티드로 번역되거나, 또는 예를 들어, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질로 번역될 수 있는 RNA로 전사되는 프로세스를 지칭한다. 핵산이 게놈 DNA로부터 유도된 경우, 적절한 진행 숙주 세포 또는 유기체가 선택되었다면, 발현은 mRNA의 스플라이싱을 포함할 수 있다. 숙주 세포에서 발현시키고자 하는 것이 이중성 핵산의 경우, 이는 먼저 세포 내로 전달되어야 하고, 이어서, 일단은 세포내에, 최종적으로는 핵에 상주하여야 한다.

[0033] "유전적 요법"이라는 용어 및 그의 문법상 파생어 (예컨대, "유전자 요법")는 요법 또는 진단이 필요한 장애 또는 병태를 앓는 포유동물, 특히, 인간의 세포로 이중성 DNA를 전달하는 것을 포함한다. DNA는 이중성 DNA가 발현되고, 그에 코딩되는 치료 생성물이 생산되는 방식으로 선택된 표적 세포 내로 도입된다. 대안적으로, 이중성 DNA는 일부 방식으로 치료 생성물을 코딩하는 DNA의 발현을 매개할 수 있고; 일부 방식으로 치료 생성물의 발현을 직접 또는 간접적으로 매개하는 생성물, 예컨대, 펩티드 또는 RNA를 코딩할 수 있다. 유전적 요법은 또한 유전자 생성물을 코딩하는 핵산을 전달하여 결합 유전자를 대체하거나, 또는 상기 핵산이 도입된 포유동물 또는 세포에 의해 생산되는 유전자 생성물을 보충하기 위해 사용될 수 있다. 치료 생성물을 코딩하는 이중성 DNA는 생성물 또는 그의 발현을 증진시키거나, 또는 다르게는 변경시키기 위해 질병을 앓는 숙주의 세포 내로 도입되기 이전에 변형될 수 있다.

[0034] "유전자" 또는 "제조합 유전자"라는 용어는 엑손 및 (임의적으로) 인트론을 포함하는, 폴리펩티드를 코딩하는 오픈 리딩 프레임에 포함하는 핵산을 지칭한다.

[0035] "이중성 핵산 서열"이라는 용어는 전형적으로는 보통은 그의 발현이 이루어지는 세포에서 생체내에서는 생산되지 않거나, 또는 전사, 번역, 또는 다른 조절가능한 생화학적 프로세스에 영향을 줌으로써 내인성 DNA의 발현의 변경을 매개하거나, 또는 그 발현을 변경시키는 매개인자를 코딩하는 RNA 및 단백질을 코딩하는 DNA이다. 이중성 핵산 서열은 또한 외래 DNA로 지칭될 수 있다. 당업자에 의해 그의 발현이 이루어지는 세포에 대해 이중성 또는 외래인 것으로 이해되거나, 또는 간주되는 임의의 DNA는 본원에서 이중성 DNA에 포함된다. 이중성 DNA의 예로는 추적가능한 마커 단백질, 예컨대, 약물 내성을 부여하는 단백질을 코딩하는 DNA, 치료학상 효과적인 물질, 예컨대, 항암제, 효소 및 호르몬을 코딩하는 DNA, 및 다른 유형의 단백질, 예컨대, 항체를 코딩하는 DNA를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 이중성 DNA에 의해 코딩되는 항체는 이중성 DNA가 도입된 세포의 표면 상에서 분비 또는 발현될 수 있다.

[0036] "상동성" 및 "동일성"이라는 용어는 전역에 걸쳐 동의어로 사용되며, 이는 두 펩티드 사이의 또는 두 핵산 분자 사이의 서열 유사성을 지칭한다. 상동성은 비교 목적으로 정렬될 수 있는 각 서열 중의 위치를 비교함으로써 측정될 수 있다. 비교되는 서열 중의 위치가 동일한 염기 또는 아미노산으로 점유되었다면, 이때 분자는 상기 위치에서 상동성 또는 동일한 것이다. 서열 사이의 상동성 또는 동일성 정도는 서열을 공유하는 매칭 또는 상동성 위치의 개수의 함수이다.

[0037] 본원에서 사용되는 바, "올리고네토사이트 전구 세포" 또는 "OPC"라는 용어는 새로운 올리고네토사이트 세포를 생성할 수 있는 신경 전구 세포를 지칭한다. OPC는 다수의 표면 항원의 발현에 의해 확인될 수 있다. 예

를 들어, 혈소판-유래 성장 인자-알파 수용체 서브유닛 (PDGFR α), NG2 콘드로이틴 술페이트 프로테오글리칸, 강글리오시드 GD3으로 공지된 표면 항원이 OPC를 확인하는 데 보편적으로 사용된다.

- [0038] 미성숙한 OPC는 공통 신경교 전구체로부터 발생 중이 뇌의 배쪽 부위에서 생성된다. 미성숙한 세포는 활발하게 이동하고, 증식하고, 중추 신경계 (CNS)에 거주하여 최종적으로는 사전수초화 올리고덴드로사이트 (O4+)로 분화된다. OPC 분화 및 성숙화는 다중 돌기의 연장, 세포체 크기 증가 및 미엘린 형성을 특징으로 한다.
- [0039] "비경구적 투여" 및 "비경구적으로 투여된"이라는 어구는 일반적으로 주사에 의해 이루어지는 장관 및 국부 투여 이외의 투여 모드를 의미하며, 제한 없이, 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 뇌실내, 피막내, 안와내, 심장내, 진피내, 복강내, 기관경유, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.
- [0040] 본원에서 사용되는 바, "전신 투여," "전신으로 투여된," "말초 투여" 및 "말초적으로 투여된"이라는 어구는 예를 들어, 피하 투여와 같이, 표적 조직 내로 직접 투여하는 것 이외의 방식으로 화합물, 약물 또는 다른 물질을 투여함으로써, 상기 화합물, 약물 또는 다른 물질은 동물의 시스템으로 유입되고, 이로써, 대사 및 다른 유사 프로세스를 거치게 되는 방식을 의미한다.
- [0041] "환자" 또는 "대상체" 또는 "동물" 또는 "숙주"라는 용어는 임의의 포유동물을 지칭한다. 대상체는 인간일 수 있고, 그 뿐만 아니라, 수의학적 처치를 필요로 하는 포유동물, 예컨대, 가축 (예컨대, 개, 고양이 등), 농장 동물 (예컨대, 소, 양, 가금류, 돼지, 말 등) 및 실험실 동물 (예컨대, 래트, 마우스, 기니아 피그 등)일 수 있다.
- [0042] "말초 신경계 (PNS) 뉴런"이라는 용어는 CNS 밖에 상주하거나, 밖으로 돌출되어 있는 뉴런을 포함한다. PNS는 감각 뉴런 및 운동 뉴런을 비롯한, 말초 신경계로 분류된 것으로 통상 이해되는 뉴런을 포함하는 것으로 의도된다.
- [0043] "폴리뉴클레오티드 서열" 및 "뉴클레오티드 서열"이라는 용어는 또한 본원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0044] "펩티드" 또는 "폴리펩티드"라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 약 2 내지 약 90개의 아미노산 잔기(2개 및 90개 포함)로 구성된 화합물로서, 여기서, 한 아미노산의 아미노기는 펩티드 결합에 의해 또 다른 아미노산의 카르복실기에 연결되어 있는 것인 화합물을 지칭한다. 펩티드는 예를 들어, 효소적 또는 화학적 절단에 의해 천연 단백질로부터 유래 또는 제거될 수 있거나, 또는 종래 펩티드 합성 기술 (예컨대, 고체상 합성) 또는 분자 생물학 기술 (문헌 [Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: LAB. MANUAL (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) 참조]을 사용하여 제조될 수 있다. "펩티드"는 임의의 적합한 L- 및/또는 D-아미노산, 예를 들어, 일반 α -아미노산 (예컨대, 알라닌, 글리신, 발린), 비- α -아미노산 (예컨대, P-알라닌, 4-아미노부티르산, 6-아미노카프로산, 사르코신, 스타틴), 및 특이 아미노산 (예컨대, 시트룰린, 호모시트룰린, 호모세린, 노르류신, 노르발린, 오르니틴)을 포함할 수 있다. 펩티드 상의 아미노, 카르복실 및/또는 다른 작용기는 유리 상태 (예컨대, 비변형된 상태)이거나, 또는 적합한 보호기로 보호될 수 있다. 아미노기 및 카르복실기를 위한 적합한 보호기, 및 보호기를 부가 또는 제거하기 위한 수단은 당업계에 공지되어 있다. 예컨대, 문헌 [Green & Wuts, PROTECTING GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (John Wiley & Sons, 1991)]을 참조한다. 펩티드의 작용기는 또한 당업계에 공지된 방법을 이용하여 유도체화 (예컨대, 알킬화)될 수 있다.
- [0045] 펩티드는 매우 많은 별개의 분자 종을 포함하는 라이브러리로 합성되고, 어셈블리될 수 있다. 상기 라이브러리는 널리 공지된 조합 화학 방법을 이용하여 제조될 수 있고, 본원에 기술된 바와 같이, 또는 라이브러리가 CSPG-PTP σ 상호작용을 길항시킬 수 있는 펩티드를 포함하는지 여부를 측정하는 다른 적합한 방법을 이용하여 스크리닝될 수 있다. 이어서, 상기 펩티드 길항제는 적합한 수단에 의해 단리될 수 있다.
- [0046] "펩티드모방체"라는 용어는 펩티드를 모방하도록 디자인된 단백질-유사 분자를 지칭한다. 펩티드모방체는 전형적으로 기존 펩티드의 변형으로부터, 또는 예컨대, 펩토이드 및 β -펩티드와 같이, 펩티드를 모방하는 유사 시스템을 디자인함으로써 생성된다. 접근법과는 상관없이, 변경되는 화학 구조는 예컨대, 안정성, 또는 생물학적 활성과 같은 분자 특성을 유리하게 조정하도록 디자인된다. 이러한 변형은 자연적으로 발생하지 않는, 펩티드로의 변이 (예컨대, 백본 변경 및 비천연 아미노산의 도입)를 포함한다.
- [0047] "예방하다" 또는 "예방하는"이라는 용어는 질환 또는 병태의 빈도 또는 중증도를 감소시키는 것을 지칭한다. 본 용어는 질환 또는 병태의 절대적 방지를 필요로 하는 것은 아니다. 오히려, 상기 용어는 질환 발생 기회를 감소시키는 것을 포함한다. 예를 들어, 대상체의 신경근결출 손상부에 치료 유효량의 치료제를 포함하는 조성

물을 투여하는 단계를 포함하는, 신경근결출 손상 발생 및/또는 그의 중증도를 감소시키는 방법을 개시한다.

- [0048] 폴리뉴클레오티드 서열 (DNA, RNA)은, 발현 제어 서열이 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 전사 및 번역을 제어 및 조절할 때, 발현 제어 서열에 "작동적으로 연결"되어 있는 것이다. "작동적으로 연결"이라는 용어는 발현시키고자 하는 폴리뉴클레오티드 서열 앞에 적절한 출발 신호 (예컨대, ATG)를 갖고, 발현 제어 서열의 제어하에서 폴리뉴클레오티드 서열이 발현될 수 있도록 및 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 원하는 폴리펩티드를 생산하도록 정확한 리딩 프레임을 유지하는 것을 포함한다.
- [0049] 본원에서 사용되는 "재조합"이라는 용어는 단백질이 원핵성 또는 진핵성 발현 시스템으로부터 유도된 것임을 의미한다.
- [0050] "치료학적 효과적"이라는 용어는 사용되는 조성물의 양이 질환 또는 장애의 하나 이상의 원인, 증상 또는 후유증을 호전시키는 데 충분한 양이라는 것을 의미한다. 상기 호전은 단지 질환 또는 장애의 원인, 증상 또는 후유증의 감소 또는 변경을 필요로 하지만, 그의 제거를 반드시 필요로 하는 것은 아니다.
- [0051] "조직 특이적 프로모터"라는 용어는, 프로모터로서 작용하고, 즉, 프로모터에 작동가능하게 연결된 선택된 핵산 서열의 발현을 조절하고, 조직의 특정 세포, 예컨대, 상피 세포인 세포에서 선택된 핵산 서열에 발현에 영향을 주는 핵산 서열을 의미한다. 상기 용어는 또한, 주로 한 조직에서 선택된 핵산의 발현을 조절하지만, 다른 조직에서도 발현을 일으키는, 소위 "누설" 프로모터라 불리는 것도 포함한다. "형질감염"이라는 용어는 세포에 의한 외래 DNA의 흡수를 지칭하는 데 사용된다. 외인성 DNA가 세포 막 내부로 도입되었을 때, 세포는 "형질감염된" 것이다. 다수의 형질감염 기술이 당업계에 공지되어 있다. 예컨대, 문헌 [Graham et al., Virology 52:456 (1973)]; [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989)]; [Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986)]; [Chu et al., Gene 13:197 (1981)]을 참조한다. 상기 기술은 하나 이상의 외인성 DNA 모이어티, 예컨대, 뉴클레오티드 통합 벡터 및 다른 핵산 분자를 적합한 숙주 세포 내로 도입하는 데 사용될 수 있다. 상기 용어는 화학적, 전기적 및 바이러스 매개 형질감염 방법을 표현한다.
- [0052] "전사 조절 서열"이라는 용어는 본 명세서에서 걸쳐 사용되는 일반 용어로서, 그와 작동가능하게 연결되어 있는 단백질 코딩 서열의 전사를 유도 또는 제어하는 핵산 서열, 예컨대, 개시 신호, 인핸서, 및 프로모터를 지칭한다. 일부 예에서, 재조합 유전자의 전사는 발현이 의도되는 세포 유형에서 재조합 유전자의 발현을 제어하는 프로모터 서열 (또는 다른 전사 조절 서열)의 제어하에 있다. 재조합 유전자는 자연적으로 발생된 형태의 단백질의 전사를 제어하는 것으로, 상기 서열과 동일한 또는 상이한 전사 조절 서열의 제어하에 있을 수 있다는 것 또한 이해할 것이다.
- [0053] "치료"라는 용어는 질환, 병적 병태, 또는 장애를 치유, 호전, 안정화, 또는 예방하기 위한 의도로 환자를 의학적으로 관리하는 것을 지칭한다. 본 용어는 능동적 처치, 즉, 구체적으로 질환, 병적 병태, 또는 장애의 개선 쪽으로 진행되는 처치를 포함하고, 이는 또한 원인적 처치, 즉, 연관된 질환, 병적 병태, 또는 장애의 원인을 제거하는 쪽으로 진행되는 처치를 포함한다. 추가로, 상기 용어는 완화 처치, 즉, 질환, 병적 병태, 또는 장애의 치유보다는 증상을 경감시키기 위해 디자인된 처치; 예방적 처치, 즉, 연관된 질환, 병적 병태, 또는 장애의 발생을 최소화 또는 부분적으로 또는 완전히 억제시키는 쪽으로 진행되는 처치; 및 지원적 처치, 즉, 연관된 질환, 병적 병태, 또는 장애를 개선하는 쪽으로 진행되는 또 다른 특정 요법을 보충하는 데 사용되는 처치를 포함한다.
- [0054] "벡터"라는 용어는 그에 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 바람직한 벡터는 그에 연결된 핵산의 자율적 복제 및 발현 중 하나 이상을 수행할 수 있는 것이다. 그에 작동적으로 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있는 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 지칭된다.
- [0055] "야생형" (또는 "WT")이라는 용어는 각각, 생체내에 보통 존재하는 것과 같은, 단백질을 코딩하는 자연적으로 발생된 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 그의 일부, 또는 단백질 서열, 또는 그의 일부를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바, "핵산"이라는 용어는 폴리뉴클레오티드, 예컨대, 데옥시리보핵산 (DNA), 및 적절한 경우, 리보핵산 (RNA)을 지칭한다. 상기 용어는 또한 등가물로서 뉴클레오티드 유사체로부터 제조된 RNA 또는 DNA의 유사체, 및 기술된 본 실시양태에 적용가능한 것으로서, 단일 (센스 또는 안티센스) 및 이중 가닥 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0056] 본원에 기술된 방법에서 사용되는 작용제, 화합물, 조성물, 항체 등은 그의 사용 전에 정제 및/또는 단리된 것으로 간주된다. 정제된 물질은 전형적으로 "실질적으로 순수한" 것으로서, 이는 핵산, 폴리펩티드 또는 그의 단편, 또는 다른 분자가 천연적으로 그를 동반하는 성분으로부터 분리되었다는 것을 의미한다. 전형적으로, 폴

리펩티드는, 천연적으로 그와 회합되어 있는 단백질 및 다른 유기 분자가 적어도 60중량%, 70중량%, 80중량%, 90중량%, 95중량%, 또는 심지어 99중량% 없을 때, 실질적으로 순수한 것이다. 예를 들어, 실질적으로 순수한 폴리펩티드는 천연 공급원으로부터의 추출에 의해, 보통은 상기 단백질을 발현하지 않는 세포에서의 재조합 핵산의 발현에 의해, 또는 화학적 합성에 의해 획득될 수 있다. "단리된 물질"은 그의 천연 위치 및 환경으로부터 제거된 것이다. 단리 또는 정제된 도메인 또는 단백질 단편의 경우, 자연적으로 발생된 서열에서 단백질 측면에 위치하는 아미노산 서열이 도메인 또는 단편에는 실질적으로 없다. "단리된 DNA"라는 용어는 자연적으로 발생된 게놈에서 주어진 DNA 측면에 위치하는 유전자가 실질적으로 없는 DNA를 의미한다. 따라서, "단리된 DNA"라는 용어는 예를 들어, cDNA, 클로닝된 게놈 DNA, 및 합성 DNA를 포함한다.

[0057] 폴리펩티드를 언급할 때, "부분," "단편," "변이체," "유도체" 및 "유사체"라는 용어는 본원에서 언급된 생물학적 활성 (예컨대, 상호작용, 예컨대, 결합 억제)을 적어도 일부 보유하는 임의의 폴리펩티드를 포함한다. 본원에 기술된 폴리펩티드는, 폴리펩티드가 여전히 그의 기능을 수행하는 한, 제한없이, 일부, 단편, 변이체, 또는 유도체 분자를 포함할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 일부는 단백질분해 단편, 결실 단편, 및 특히, 또는 동물에게 전달될 때, 작용 부위에 더욱 쉽게 도달하는 단편을 포함할 수 있다.

[0058] 본원에 기술된 실시양태는 일반적으로 올리고덴드로사이트 전구 세포 (OPC) 이동, 분화, 증식 및/또는 성숙화를 유도, 촉진 및/또는 조정하기 위한 작용제, 화합물, 및 방법, 수초화를 촉진시키는 방법 뿐만 아니라, 수초화 또는 재수초화가 도움이 되는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0059] 본 발명자들은 중추 신경계 (CNS) 손상의 반응으로 신경교 반흔형성이 형성되는 동안 세포외 기질 내로 방출된 특정 유형의 콘드로이틴 술페이트 프로테오글리칸 (CSPG)이 OPC 상에서 동족 수용체 단백질 티로신 포스파타제 σ (PTP σ)와의 결합을 통해 미엘린 생성을 억제시킬 수 있다는 것을 발견하게 되었다. 다양한 시험관내, 계내 및 생체내 다발성 경화증 (MS) 모델에서, 병변 연관 반흔 형성 동안의 프로테오글리칸 침착은 OPC 이동, 분화 및 미엘린 재형성을 강력하게 억제시켰다. 본 발명자들은 PTP σ 촉매 활성, 신호전달, 및 기능을 억제시킨 전신 펩티드 처리가 LPS 유도성 병변에서의 재수초화 속도를 현저히 증진시켰고, 강력한 미엘린 재생 및 만성 탈수초화 후 기능 회복을 자극시켰다는 것을 발견하였다. 또한, PTP σ 촉매 활성, 신호전달, 및 기능 억제는 OPC에 의해 분비되는 프로테아제 MMP-2의 상향조절을 증진시킬 수 있고, 결국에는 CSPG의 강력한 분해를 허용하며, 이로써, MS 진행을 정지 또는 저속화시킬 수 있다.

[0060] 따라서, 본원에 기술된 일부 실시양태에서, PTP σ 의 촉매 활성, 신호전달, 및 기능 중 하나 이상을 억제, 저해, 및/또는 차단하는 치료제는 대상체에 투여되어 OPC 이동, 분화, 증식 및/또는 성숙화를 유도, 촉진 및/또는 조정할 수 있을 뿐만 아니라, 수초화 또는 재수초화가 대상체에게 도움이 되는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료할 수 있다.

[0061] PTP σ 의 활성, 신호전달, 및/또는 기능은, (예컨대, 소형 분자, 펩티드모방체, 항체, 인트라바디, 또는 우세한 음성 폴리펩티드를 사용함으로써 수행되는) PTP σ 의 세포내 도메인의 활성의 직접적인 억제; (예컨대, 하기 유전자 및/또는 단백질의 발현 또는 활성을 증가시킴으로써 수행되는) PTP σ 의 세포내 도메인의 활성, 신호전달, 및/또는 기능 중 하나 이상을 억제하는 유전자 및/또는 단백질의 활성화; (예컨대, 하기 매개인자 유전자 및/또는 단백질의 발현 및/또는 활성을 차단함으로써 수행되는) PTP σ 의 하류 매개인자인 유전자 및/또는 단백질의 억제; (예컨대, 재조합 유전자 발현 벡터, 재조합 바이러스 벡터 또는 재조합 폴리펩티드를 사용함으로써 수행되는) PTP σ 의 활성, 신호전달, 및/또는 기능 중 하나 이상을 음성적으로 조절하는 유전자 및/또는 단백질의 도입; 또는 (예컨대, 상동성 재조합, 재조합 유전자 발현 또는 바이러스 벡터를 사용하는 과다발현, 또는 돌연변이 유발법을 사용하여 수행되는) 예를 들어, PTP σ 의 정상하위 대립인자 돌연변이체(hypomorphic mutant)와의 유전자 대체를 비롯한 수개의 방식으로 억제, 저해 및/또는 차단될 수 있다.

[0062] PTP σ 의 활성, 신호전달, 및/또는 기능 중 하나 이상을 억제 또는 감소시키는 치료제로는 PTP σ 의 활성, 신호전달, 및/또는 기능을 감소 및/또는 억제시키는 작용제를 포함할 수 있다. 상기 작용제는 세포내로 전달될 수 있고, 일단 세포내로 전달되고 나면, OPC 이동, 분화, 증식 및/또는 성숙화를 촉진시키고, 수초화 또는 재수초화를 증진시킨다.

[0063] 일부 실시양태에서, PTP σ 의 활성, 신호전달, 및/또는 기능 중 하나 이상을 억제 또는 감소시키는 치료제는 PTP σ 의 세포내 도메인, 특히, 세포내 웨지 형상의 도메인에 결합 및/또는 그와 복합체를 형성하여 PTP σ 의 활성, 신호전달, 및/또는 기능을 억제하는 치료 펩티드 또는 소형 분자를 포함할 수 있다. 따라서, OL 및/또는 OPC (OL/OPC)의 PTP σ 의 세포내 도메인에 결합 및/또는 그와 복합체를 형성하는 치료 펩티드 또는 소형 분자는 상기 세포의 세포 성장, 이동, 생존 및 가소성을 촉진시키는 데 사용될 수 있다.

- [0064] 치료제는 예컨대, WO 2013/155103A1(이는 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 기술되어 있는 바와 같이, PTP σ 의 세포내 촉매 도메인의 웨지 형상의 도메인 (즉, 웨지 도메인)의 펩티드 모방체일 수 있다. PTP σ 의 웨지 도메인의 펩티드 모방체는 세포 (예컨대, OL/OPC)에서 발현되었을 때, 또는 세포내 수송 모이어티에 접합되었을 때, 웨지 도메인에 결합할 수 있고, CSPG로 활성화된 OL/OPC에서 PTP σ 신호전달을 폐기하여 세포 성장, 이동 및 생존을 촉진시키는 데 사용될 수 있다. 상기 치료 펩티드의 PTP σ 무손상 웨지 도메인과의 결합은 잠재적으로는 (i) PTP σ 가 표적 단백질, 예컨대, 포스파타제 표적과 상호작용할 수 있는 능력을 방해할 수 있고/거나; (ii) PTP σ 와, PTP σ 내 함유되어 있는 또 다른 도메인, 예컨대, 촉매적으로 불활성인 제2 포스파타제 도메인 D2의 분자내 상호작용을 촉진시키는 활성을 방해할 수 있고/거나; (iii) 단백질의 활성 포스파타제 부위의 접근을 방해할 수 있고/거나; (iv) 웨지도메인의 정상적인 상호작용인자를 증가할 수 있고/거나; (iv) 포스파타제 활성을 입체적으로 억제시킬 수 있다.
- [0065] 일부 실시양태에서, 펩티드 모방체 (즉, 치료 펩티드)는 약 10 내지 약 20개의 아미노산을 포함하고/거나, 본질적으로 그로 구성되고/거나, 그로 구성될 수 있고, PTP σ 의 웨지 도메인의 아미노산 서열의 약 10 내지 약 20개의 연속된 아미노산 부분과 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100% 상동성이거나, 또는 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 약 10 내지 약 20개의 연속된 아미노산 부분은 N-말단 알파 헬릭스의 연속된 아미노산 및 웨지 도메인의 4개의 아미노산 선회부를 포함한다.
- [0066] 시토줄릭 캐리어를 포함하는 PTP σ 의 웨지 도메인에 상응하거나, 또는 실질적으로 상동성인 펩티드 (예컨대, 치료 펩티드)는 CSPG-매개 억제를 완화시키고, LPS 유도성 병변에서 재수초화 속도를 증진시키고, 만성 탈수초화 후, 강력한 미엘린 재생 및 기능 회복을 자극시키고, OPC에 의해 분비되는 프로테아제 MMP-2의 상향조절을 증진시켜 결국에는 CSPG를 강력하게 분해시킬 수 있다. 상기 펩티드는 대상체에 전신으로 제공되어 수초화 또는 재수초화를 촉진시킬 수 있다.
- [0067] 하기 표 1에 제시된 바와 같이, PTP σ 의 웨지 도메인 서열은 고등 포유동물 사이에서 고도로 보존되고, 인간 내지 마우스 및 래트에서 단 하나의 아미노산만이 변이되며 (6번 위치의 트레오닌 또는 메티티온), 이로써 100% 상동성을 막는다.

표 1

웨이 도메인 정렬																										
0									1										2							
1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4			
D	L	A	E	H	T	E	H	L	K	A	N	D	N	L	K		S	Q	E	Y	E	S		제노푸스	서열 번호 : 1	
D	H	T	E	H					L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	녹색 아놀도마뱀	서열 번호 : 2
E	L	A	E	H	T	E	L	L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	제브라피시	서열 번호 : 3	
E	L	A	E	H	T	E	L	L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	탈라피아	서열 번호 : 4	
E	L	A	E	H	T	E	H	L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	닭	서열 번호 : 5	
E	L	A	E	H	T	E	H	L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	되새류	서열 번호 : 6	
E	L	A	E	H	T	D	H	L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	오리너구리	서열 번호 : 7	
E	M	A	E	H	T	E	H	L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	태즈메니언 데빌 (Tazmanina Devil)	서열 번호 : 8	
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	원담비	서열 번호 : 9	
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	갈라고 원숭이	서열 번호 : 10	
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	마모셋	서열 번호 : 11	
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	레트	서열 번호 : 12	
D	M	A	E	H	M	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	마우스	서열 번호 : 13	
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	개	서열 번호 : 14	
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	돼지	서열 번호 : 15	
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	소	서열 번호 : 16	
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	양	서열 번호 : 17	
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	범고래	서열 번호 : 18	
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	다람쥐 원숭이	서열 번호 : 19	
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	개코원숭이	서열 번호 : 20	
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	고릴라	서열 번호 : 21	

[0068]

D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	긴팔원숭이	서열 번호 : 22
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	마카크	서열 번호 : 23
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	침팬지	서열 번호 : 24
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	인간	서열 번호 : 25
D	L	A	D	N	I	E	R	L	K	A	N	D	G	L	K	F	S	Q	E	Y	E	S	I	LAR (Lar 패밀리)	서열 번호 : 26
E	L	A	D	H	I	E	R	L	K	A	N	D	N	L	K	F	S	Q	E	Y	E	S	I	델타 (Lar 패밀리)	서열 번호 : 27
K	L	E	E	E	I	N	R	R	M	A	D	D	N	K	I	F	R	E	E	F	N	A	L	ptp 알파	서열 번호 : 28

[0069]

[0070]

표 1에 제시된 바와 같이, PTP σ 의 웨지 도메인의 제1 알파 헬릭스는 아미노산 1-10을 포함하고, 선회부는 아미

노산 11-14를 포함하고, 제2 알파 헬릭스는 아미노산 15-24를 포함한다. 예를 들어, 인간 PTP σ 의 웨지 도메인의 제1 알파 헬릭스는 DMAEHTERLK (서열 번호: 29)의 아미노산 서열을 갖고, 선회부는 ANDS (서열 번호: 30)의 아미노산 서열을 갖고, 제2 알파 헬릭스는 LKLSQEYESI (서열 번호: 31)의 아미노산 서열을 갖는다.

[0071] 웨지 도메인은 또한 LAR 패밀리의 다른 구성원, LAR 및 PTP σ 와 서열 상동성을 공유한다. 상기 아미노산은 웨지 도메인의 전체 구조에 필요할 수 있다. 보존적 아미노산은 제1 알파 헬릭스의 단부 및 선회부의 출발점을 마킹하는 13번 위치의 알라닌을 포함하며, 이는 가능하게는 일반적인 웨지 크기 및 구조에 필요하게 만들 수 있다.

[0072] 웨지 도메인은 일반적인 2차 및 3차 구조를 대부분의 수용체 PTP를 통해 일관되게 유지하기 때문에, PTP σ 웨지 도메인을 표적화하는 치료 펩티드에 대해 수개의 보존적 치환이 이루어질 수 있고, 이로써 유사한 결과를 수득할 수 있다. 보존적 치환의 예로는 또 다른 잔기 대신으로 하나의 비-극성 (소수성) 잔기, 예컨대, 이소류신, 발린, 류신, 또는 메티오닌의 치환, 또 다른 잔기 대신으로 하나의 극성 (친수성) 잔기의 치환, 예컨대, 아르기닌과 리신 사이, 글루타민과 아스파라긴 사이, 글리신과 세린 사이의 치환, 또 다른 잔기 대신으로 하나의 염기성 잔기, 예컨대, 리신, 아르기닌 또는 히스티딘의 치환, 및/또는 또 다른 잔기 대신으로 하나의 산성 잔기, 예컨대, 아스파르트산, 또는 글루탐산의 치환을 포함한다.

[0073] 이러한 보존적 치환은 알파 헬릭스 또는 선회부 중 비-고유 도메인에서, 구체적으로, 제1 알파 헬릭스 중 1-3 및 7-10번 위치에서; 선회부 중 12 및 13번 위치에서; 및 제2 알파 헬릭스 중 15, 16, 18-24번 위치에서 발생할 수 있다. 상기 아미노산은 웨지 도메인의 전체 구조에 필요할 수 있지만, 웨지의 PTP σ 에의 결합 특이성에는 필요하지 않을 수 있다.

[0074] PTP σ 에 공유한 아미노산, 특히, LAR과 비교하여 PTP σ 에서 차별적으로 발현되는 아미노산은 웨지 도메인 결합의 특이성에 필요한 것으로 나타났다. 이는 제1 알파 헬릭스 4 및 5번 위치 중 EH 도메인, 이어서, 6번 위치의 트레오닌 또는 메타티온 (레트 및 마우스 치환)을 포함한다. 모든 고등 포유동물의 선회부에는 14번 위치에 공유한 세린이 존재한다. 마지막으로, 제2 알파 헬릭스 17번 위치에는 공유한 류신이 존재한다. 상기 공유 아미노산의 잠재적 역할을 하기에서 논의된다.

[0075] 선회부 중의 14번 위치의 세린 잔기는 웨지 도메인 내의 그의 위치에 기인하여 특히 관심의 대상이 된다. 알파 헬릭스 사이의 선회부 사이에 위치하는 상기 아미노산은 PTP σ 의 일반 2차 및 3차 구조로부터 약간 연장되어 있고, 이를 통해 결합 상호작용에 이용될 수 있다. 추가로, 세린은 그의 히드록실 기 및 그를 함유하는 극성에 기인하여 수개의 동중친화성 및 이종친화성 결합 이벤트, 예컨대, 인접한 세린 사이의 수소 결합을 촉진시키는 것으로 공지되어 있다. 세린은 또한 예컨대, 인산화와 같은 다양한 변형을 거쳐 특이성에 대한 그의 필요 가능성을 더 높게 증가시킬 수 있다. 웨지 도메인 중 선회부에 집중되고, 보존적 세린을 포함하는 더 작은 소형 펩티드가 유사한 기능을 가지며, 더욱 큰 안정성을 제공할 수 있다. 상기 펩티드는 양단에 시스테인을 갖는 루프로서 합성될 수 있으며, 이로써, 이황화 결합을 형성할 수 있다.

[0076] 제1 알파 헬릭스 중의 공유한 아미노산으로는 4번 위치의 글루탐산, 5번 위치의 히스티딘 및 6번 위치의 트레오닌 또는 메타티온을 포함한다. 비록 히스티딘이 컨센서스 웨지 도메인에 연루되어 있지만, LAR, PTP σ , PTP μ 또는 CD45에서는 발견되지 않는다. 상기 아미노산 중 3개 모두 하전된 아미노산 또는 극성 아미노산이기 때문에, 상기 서열 또는 그의 성분 중 하나는 PTP σ 웨지 특이성에 필요한 것일 수 있다.

[0077] 추가로, 제2 알파 헬릭스는 17번 위치에 공유한 류신을 함유한다. 류신은 류신 지퍼의 3차원 구조를 위해 중요한 부착 분자로서 연루되어 있다. 웨지 도메인과 구조적으로 유사한 상기 분자에서, 대략 7개 간격으로 위치하는, 반대측 알파 헬릭스의 류신은 반대측 알파 헬릭스의 소수성 영역과 상호작용한다. 류신은 제1 알파 헬릭스 중 9번 위치에도 존재하는 바, 상기 공유한 류신은 PTP σ 웨지의 전체 3차원 구조의 무결성을 위해 필요한 것으로 간주된다.

[0078] 따라서, 다른 실시양태에서, 치료 펩티드는 약 14 내지 약 20개의 아미노산을 포함하고/거나, 본질적으로 그로 구성되고/거나, 그로 구성될 수 있고, 아미노산 서열 EHX₁ERLKANDSLKL (서열 번호: 32)을 포함하고, 여기서, X₁은 T 또는 M이다. 서열 번호: 32을 포함하는 치료 펩티드는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 또는 적어도 5개의 보존적 치환을 포함할 수 있고, 이로서, 치료 펩티드는 서열 번호: 32과 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 상동성인 아미노산 서열을 갖는다.

[0079] 일부 실시양태에서, 보존적 치환은 서열 번호: 32의 아미노산 잔기 4E, 5R, 6L, 7K, 9N, 10D, 12L, 또는 13K의

것일 수 있다. 예로서, 아미노산 잔기 4E는 D 또는 Q로 치환될 수 있고/거나, 아미노산 잔기 5R은 H, L, 또는 K로 치환될 수 있고/거나, 아미노산 잔기 6L은 I, V, 또는 M으로 치환될 수 있고/거나, 아미노산 잔기 7K는 R 또는 H로 치환될 수 있고/거나, 아미노산 잔기 9N은 E 또는 D로 치환될 수 있고/거나, 아미노산 잔기 10D는 E 또는 N으로 치환될 수 있고/거나, 아미노산 잔기 12L은 I, V, 또는 M으로 치환될 수 있고/거나, 아미노산 잔기 13K는 R 또는 H로 치환될 수 있다.

[0080] 다른 실시양태에서, 치료 펩티드는 약 14 내지 약 20개의 아미노산을 포함하고/거나, 본질적으로 그로 구성되고/거나, 그로 구성될 수 있고, 아미노산 서열 DMAEHX₁ERLKANDS (서열 번호: 33)을 포함하고, 여기서, X₁은 T 또는 M이다. 서열 번호: 33을 포함하는 치료 펩티드는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 또는 적어도 5개의 보존적 치환을 포함할 수 있고, 이로서, 치료 펩티드는 서열 번호: 33과 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 상동성인 아미노산 서열을 갖는다.

[0081] 일부 실시양태에서, 보존적 치환은 서열 번호: 33의 아미노산 잔기 7E, 8R, 9L, 10K, 12N, 또는 13D의 것일 수 있다. 예로서, 아미노산 잔기 7E는 D 또는 Q로 치환될 수 있고/거나, 아미노산 잔기 8R은 H, L, 또는 K로 치환될 수 있고/거나, 아미노산 잔기 9L은 I, V, 또는 M으로 치환될 수 있고/거나, 아미노산 잔기 10K는 R 또는 H로 치환될 수 있고/거나, 아미노산 잔기 12N은 E 또는 D로 치환될 수 있고/거나, 아미노산 잔기 13D는 E 또는 N으로 치환될 수 있다.

[0082] 본원에 기술된 치료 펩티드에서는 다른 각종의 변이, 치환, 삽입, 및 결실이 이루어질 수 있고, 여기서, 상기 변이는 그의 사용에 특정 이점을 제공한다. 이와 관련하여, PTP σ 의 웨지 도메인에 결합하고/거나, 그와 복합체를 형성하는 치료 펩티드는 언급된 폴리펩티드의 서열과 동일하기보다는, 그에 상응하거나, 또는 그와 실질적으로 상동성일 수 있고, 여기서, 하나 이상의 변이가 이루어지고, 이는 PTP σ 기능의 활성화, 신호전달, 및/또는 기능 중 하나 이상을 억제 또는 감소시킬 수 있는 능력을 유지한다.

[0083] 치료 폴리펩티드는 아미드, 단백질과의 접합체, 폐환화된 폴리펩티드, 중합화된 폴리펩티드, 유사체, 단편, 화학적으로 변형된 폴리펩티드, 및 유사한 유도체를 포함하는, 다양한 형태의 폴리펩티드 유도체 중 임의의 것일 수 있다.

[0084] 보존적 치환은, 펩티드가 필수적인 결합 활성을 보인다면, 비-유도체화된 잔기 대신 화학적으로 유도체화된 잔기를 사용하는 것을 포함할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0085] "화학적 유도체"란, 기능성 측쇄 기의 반응에 의해 하나 이상의 잔기가 화학적으로 유도체화된 것인 대상 폴리펩티드를 지칭한다. 상기 유도체화된 분자는 예를 들어, 유리 아미노 기가 유도체화되어 아민 히드록로라이드, p-톨루엔 술폰닐 기, 카르보벤족시 기, t-부틸옥시카르보닐 기, 클로로아세틸 기 또는 포르밀 기를 형성한 것인 분자를 포함한다. 유리 카르복실 기는 유도체화되어 염, 메틸 및 에틸 에스테르 또는 다른 유형의 에스테르 또는 히드라지드를 형성할 수 있다. 유리 히드록실 기는 유도체화되어 O-아실 또는 O-알킬 유도체를 형성할 수 있다. 히스티딘의 이미다졸 니트로젠은 유도체화되어 N-im-벤질히스티딘을 형성할 수 있다. 20종의 표준 아미노산의 하나 이상의 자연적으로 발생된 아미노산 유도체를 포함하는 폴리펩티드 또한 화학적 유도체로서 포함된다. 예를 들어: 4-히드록시프롤린은 프롤린 대신으로 치환될 수 있고; 5-히드록시리신은 리신 대신으로 치환될 수 있고; 3-메틸히스티딘은 히스티딘 대신으로 치환될 수 있고; 호모세린은 세린 대신으로 치환될 수 있고; 오르니틴은 리신 대신으로 치환될 수 있다. 본원에 기술된 폴리펩티드는 또한, 필수적인 활성이 유지되는 바, 본원에 서열이 제시되어 있는 폴리펩티드의 서열과 비교하여 하나 이상의 부가 및/또는 결실 또는 잔기를 갖는 임의의 폴리펩티드를 포함할 수 있다.

[0086] 본원에 기술된 폴리펩티드 중 하나 이상은 또한 자연적 프로세스, 예컨대, 번역 후 프로세싱에 의해, 및/또는 당업계에 공지되어 있는 화학적 변형에 의해 변형될 수 있다. 변형은 펩티드 백본, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카르복시 말단을 비롯한 펩티드에서 일어날 수 있다. 동일한 유형의 변형이 주어진 펩티드 중 여러 부위에서 동일하거나, 또는 상이한 정도로 존재할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 변형은 예를 들어, 제한없이, 아세틸화, 아실화, 아세트아미도메틸 (Acm) 기 부가, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈에의 공유 부착, 헴 모이어티에의 공유 부착, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체에의 공유 부착, 지질 또는 지질 유도체에의 공유 부착, 포스파티딜이노시톨에의 공유 부착, 가교 결합, 폐환화, 이황화 결합 형성, 탈메틸화, 공유 가교 형성, 시스틴 형성, 피로글루타메이트 형성, 포르밀화, 감마-카르복실화, 글리코실화, 히드록실화, 아이오딘화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 단백질분해 프로세싱, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황화, 아미노산의 단백질로의 전령 RNA 매개 부가, 예컨대, 아르기닐화 및 유비퀴틴화를 포함한다 (참고로 문헌 [Protein-structure and

molecular properties, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New-York, 1993] 참조)

- [0087] 본원에 기술된 펩티드 및/또는 단백질은 또한 예를 들어, 생물학적으로 활성인 돌연변이체, 변이체, 단편, 키메라 및 유사체를 포함할 수 있고; 단편은 하나 이상의 아미노산의 말단절단부를 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 여기서, 말단절단부는 아미노 말단 (N-말단), 카르복시 말단 (C-말단)로부터, 또는 단백질의 내부로부터 기원하는 것일 수 있다. 본 발명의 유사체는 하나 이상의 아미노산은 삽입 또는 치환을 포함한다. 변이체, 돌연변이체, 단편, 키메라 및 유사체는 (본 예로 제한되지 않고) LAR 패밀리 포스파타제의 억제제로서 작용할 수 있다.
- [0088] 본원에 기술된 치료 폴리펩티드는 당업자에게 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 펩티드 및/또는 단백질은 재조합 DNA를 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 한 제조법은 세포 내에서 펩티드 및/또는 단백질을 발현시킬 수 있는 조건하에서 숙주 세포 (박테리아 또는 진핵 세포)를 배양하는 것을 포함할 수 있다.
- [0089] 폴리펩티드 정제는 친화성 방법, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 또는 단백질 정제를 위해 전형적으로 사용되는 다른 정제 기술에 의해 수행될 수 있다. 정제 단계는 비-변성 조건하에서 수행될 수 있다. 한편, 변성 단계가 필요한 경우, 단백질은 당업계에 공지된 기술을 사용하여 변성될 수 있다.
- [0090] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 치료 펩티드는, 폴리펩티드가 편리하게 다른 폴리펩티드, 단백질, 검출가능한 모이어티, 표지, 고체 매트릭스, 또는 캐리어에 연결 및/또는 부착시킬 수 있는 수단인 "링커"를 제공하기 위한 목적으로 폴리펩티드의 양 말단에 부가될 수 있는 추가 잔기를 포함할 수 있다.
- [0091] 아미노산 잔기 링커는 보통 적어도 하나의 잔기이고, 40개 이상의 잔기, 더욱 빈번하게는 1 내지 10개의 잔기일 수 있다. 연결을 위해 사용되는 전형적인 아미노산 잔기는 글리신, 티로신, 시스테인, 리신, 글루탐산 및 아스파르트산 등이다. 추가로, 대상 폴리펩티드는 말단-NH₂ 아실화, 에컨대, 아세틸화, 또는 티오글리콜산 아미드화에 의해, 말단-카르복실 아미드화에 의해, 에컨대, 암모니아, 메틸아민에 의한 것, 및 유사 말단 변형에 의해 변형된 서열과 상이할 수 있다. 널리 공지되어 있는 바와 같이, 말단 변형은 프로테아제 분해에 의한 감수성을 감소시키는 데 유용하고, 그러므로, 용액, 특히, 프로테아제가 존재할 수 있는 생물학적 체액 중에서의 폴리펩티드의 반감기를 연장시키는 작용을 한다. 이와 관련하여, 폴리펩티드 폐환화 또한 유용한 변형이고, 이는 또한 폐환화에 의해 형성된 안정적인 구조 때문에, 및 본원에 기술된 바와 같은 시클릭 펩티드에 대하여 관찰되는 생물학적 활성에서 볼 때 특히 바람직하다.
- [0092] 일부 실시양태에서, 링커는 다른 폴리펩티드, 단백질, 및/또는 분자, 에컨대, 검출가능한 모이어티, 표지, 고체 매트릭스, 또는 캐리어에 치료 펩티드를 연결하는 가요성 펩티드 링커일 수 있다. 가요성 펩티드 링커의 길이는 약 20개 이하의 아미노산 길이일 수 있다. 예를 들어, 펩티드 링커는 약 12 이하의 아미노산 잔기, 에컨대, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 및 12개를 함유할 수 있다. 일부 경우에, 펩티드 링커는 하기 아미노산: 글리신, 세린, 알라닌, 및 트레오닌 중 2개 이상을 포함한다.
- [0093] 일부 실시양태에서, 접합체 단백질 형태 또는 약물 전달 구축물 형태로 제공될 수 있는, 본원에 기술된 치료 펩티드를 포함하는 치료제는 치료 펩티드에 연결된 적어도 수송 서브도메인(들) 또는 모이어티(들) (즉, 수송 모이어티)를 포함한다. 수송 모이어티는 치료 폴리펩티드의 포유동물 (즉, 인간 또는 동물) 조직 또는 세포 (예컨대, 신경 세포) 내로의 흡수를 촉진시킬 수 있다. 수송 모이어티는 치료 폴리펩티드에 공유적으로 연결될 수 있다. 공유 연결은 펩티드 결합 또는 불안정 결합 (에컨대, 내부 표적 세포 환경에서 쉽게 절단가능하거나, 또는 화학적 변화가 쉽게 일어나는 결합)을 포함할 수 있다. 추가로, 수송 모이어티는 치료 폴리펩티드에 가교 결합될 수 있다 (에컨대, 화학적으로 가교 결합, UV 가교 결합될 수 있다). 수송 모이어티는 또한 본원에 기술된 연결 폴리펩티드를 이용하여 치료 폴리펩티드에 연결될 수 있다.
- [0094] 수송 모이어티는 치료제에서 1회 초과로 반복될 수 있다. 수송 모이어티의 반복은 원하는 세포에 의한 펩티드 및/또는 단백질의 흡수에 영향을 줄 수 있다 (에컨대, 증가시킬 수 있다). 수송 모이어티는 또한 치료 펩티드의 아미노-말단 영역에, 그의 카르복시-말단 영역, 또는 두 영역 모두에 위치할 수 있다.
- [0095] 한 실시양태에서, 수송 모이어티는, 일단 수송 모이어티에 연결되고 나면, 치료 폴리펩티드가 수용체-비의존 기전에 의해 세포 내로 투과될 수 있도록 허용하는 적어도 하나의 수송 펩티드 서열을 포함할 수 있다. 한 예에서, 수송 펩티드는 Tat-매개 단백질 전달 서열 및 서열 번호: 1-25, 32, 및 33 중 적어도 하나를 함유하는 합성 펩티드이다. 상기 펩티드는 각각 서열 번호: 34-60의 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0096] 공지된 수송 모이어티, 서브도메인 등의 다른 예는 예를 들어, 캐나다 특허 문서 번호 2,301,157 (안테나페디아의 호메오도메인을 함유하는 접합체) 뿐만 아니라, 미국 특허 번호 5,652,122, 5,670,617, 5,674,980, 5,747,641, 및 5,804,604 (상기 특허는 모두 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다) (Tat HIV 단백질의

아미노산; 단순 포진 바이러스-1 DNA 결합 단백질 VP22, 길이 범위가 4 내지 30개의 히스티딘 반복부 길이인 히스티딘 태그를 함유하는 접합체, 또는 수용체 비의존적 프로세스에 의해 활성 카르고 모이어티의 흡수를 촉진시킬 수 있는 그의 변이 유도체 또는 동족체)에 기술되어 있다.

[0097] 안테나페디아 호메오도메인의 제3 알파-헬릭스의 16개의 아미노산 영역 또한 (융합 단백질로서 제조된) 단백질이 세포막을 통과할 수 있게 하는 것으로 나타났다 (PCT 국제 공개 번호 WO 99/11809 및 캐나다 출원 번호: 2,301,157). 유사하게, HIV Tat 단백질도 세포막을 통과할 수 있는 것으로 나타났다.

[0098] 추가로, 수송 모이어티(들)는 염기성 아미노산이 풍부한 영역이 활성제 모이어티에 공유적으로 연결된 폴리펩티드 (예컨대, 세포내 도메인 함유 단편 억제제 펩티드)를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "염기성 아미노산이 풍부한 영역"은 염기성 아미노산, 예컨대, 아르기닌, 히스티딘, 아스파라긴, 글루타민, 리신의 함량이 높은 단백질 영역에 관한 것이다. "염기성 아미노산이 풍부한 영역"은 예를 들어 15% 이상의 염기성 아미노산을 가질 수 있다. 일부 경우에, "염기성 아미노산이 풍부한 영역"은 15% 미만으로 염기성 아미노산을 갖고, 수송 작용제 영역으로서의 역할을 그대로 수행할 수 있다. 다른 경우에, 염기성 아미노산 영역은 30% 이상의 염기성 아미노산을 가질 것이다.

[0099] 수송 모이어티(들)는 프롤린이 풍부한 영역을 추가로 포함할 수 있다. 프롤린이 풍부한 영역이라는 용어는 그의 서열 내에 5% 이상 (최대 100%)의 프롤린을 포함하는 폴리펩티드 영역을 지칭한다. 일부 경우에, 프롤린이 풍부한 영역은 5% 내지 15%의 프롤린을 가질 수 있다. 추가로, 프롤린이 풍부한 영역이란, 자연적으로 발생된 단백질 (예컨대, 인간 계놈에 의해 코딩된 단백질)에서 일반적으로 관찰되는 것보다 더 많은 프롤린을 함유하는 폴리펩티드 영역을 지칭한다. 본 출원의 프롤린이 풍부한 영역은 수송제 영역으로서의 기능을 수행할 수 있다.

[0100] 한 실시양태에서, 본원에 기술된 치료 펩티드는 형질도입체에 비-공유적으로 연결될 수 있다. 비-공유적으로 연결된 폴리펩티드 형질도입체의 예로는 캐리오토(Chariot) 단백질 전달 시스템이 있다 (미국 특허 번호 6,841,535; 문헌 [*J Biol Chem* 274(35):24941-24946]; 및 [*Nature Biotech.* 19:1173-1176]) (상기 문헌은 모두 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다).

[0101] 다른 실시양태에서, 치료 펩티드는 LAR 패밀리 신호전달 또는 PTP σ 신호전달을 억제시키는 유전자 요법을 사용하여 치료되는 세포에서 발현될 수 있다. 유전자 요법은 치료 펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 사용할 수 있다. (종종 유전자 전달(gene delivery) 또는 유전자 전달(gene transfer) "비히클"로서 지칭되는) "벡터"는 세포에 전달하고자 하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 거대분자 또는 분자의 복합체를 지칭한다. 전달하고자 하는 폴리뉴클레오티드는 유전자 요법에서 관심의 대상이 되는 코딩 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 예를 들어, 바이러스 벡터 (예컨대, 아데노바이러스 (Ad), 아데노-연관 바이러스 (AAV), 및 레트로바이러스), 리포솜 및 다른 지질 함유 복합체, 및 표적 세포로 폴리뉴클레오티드의 전달을 매개할 수 있는 다른 거대분자 복합체를 포함한다.

[0102] 벡터는 또한 유전자 전달 및/또는 유전자 발현을 추가로 조정하거나, 다르게는 표적화된 세포에 특이한 특성을 제공하는 다른 성분, 또는 기능도 포함할 수 있다. 상기 다른 성분으로는 예를 들어, 세포에의 결합 또는 표적화에 영향을 주는 성분 (세포 유형 또는 조직 특이적 결합을 매개하는 성분 포함); 세포에 의한 벡터 핵산의 흡수에 영향을 주는 성분; 흡수 후 세포 내에서의 폴리뉴클레오티드의 국재화에 영향을 주는 성분 (예컨대, 핵 국재화를 매개하는 작용제); 및 폴리뉴클레오티드의 발현에 영향을 주는 성분 (예컨대, 하나 이상의 전사 조절 서열)을 포함한다. 상기 성분은 또한 마커, 예컨대, 벡터에 의해 전달된 핵산을 흡수하고, 그를 발현하는 세포를 검출 또는 선별하는 데 사용될 수 있는 검출가능한 및/또는 선별가능한 마커도 포함할 수 있다. 상기 성분은 벡터의 자연적 특징부로서 제공될 수 있거나 (예컨대, 결합 및 흡수를 매개하는 성분 또는 기능을 갖는 특정 바이러스 벡터 사용), 또는 벡터는 그러한 기능을 제공하도록 변형될 수 있다.

[0103] 선별가능한 마커는 양성, 음성, 또는 이작용성일 수 있다. 양성 선별가능한 마커를 통해서는 마커를 보유하는 세포를 선별할 수 있는 반면, 음성 선별가능한 마커를 통해서는 마커를 보유하는 세포를 선택적으로 제거할 수 있다. 이작용성 (즉, 양성/음성) 마커를 비롯한, 각종의 상기와 같은 마커 유전자가 기술되어 있다 (예컨대, WO 92/08796 (Lupton, S., 1992년 5월 29일 공개); WO 94/28143 (Lupton, S., 1994년 12월 8일 공개)). 상기 마커 유전자는 유전자 요법 맥락에서 유익할 수 있는 부가된 제어 수단을 제공할 수 있다. 매우 다양한 상기 벡터가 당업계에 공지되어 있고, 일반적으로 이용될 수 있다.

[0104] 본원에서 사용하기 위한 벡터는 본원에 기술된 치료 펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드를 표적 세포에 전달할 수 있는 바이러스 벡터, 지질 기반 벡터 및 다른 비-바이러스 벡터를 포함한다. 벡터는 표적화된 벡터, 특히, 우

선적으로 뉴런에 결합하는 표적화된 벡터일 수 있다. 본 출원에서 사용하기 위한 바이러스 벡터는 표적 세포에 대해 낮은 독성을 보이고, 세포 특이적 방식으로 치료 펩티드를 치료학상 유용한 양으로 생산하도록 유도하는 것을 포함할 수 있다.

- [0105] 바이러스 벡터의 예로는 아데노바이러스 (Ad) 또는 아데노-연관 바이러스 (AAV)로부터 유래된 것이다. 인간 및 비-인간 바이러스 벡터, 둘 모두 사용될 수 있고, 재조합 바이러스 벡터는 인간에서 복제 결합성일 수 있다. 벡터가 아데노바이러스로부터의 것인 경우, 벡터는 치료 펩티드를 코딩하는 유전자에 작동가능하게 연결된 프로모터를 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 인간에서 복제-결합성을 띤다.
- [0106] 본원에서 사용될 수 있는 다른 바이러스 벡터로는 단순 포진 바이러스 (HSV)-기반 벡터를 포함한다. 하나 이상의 극초기 유전자 (IE)가 결실된 HSV 벡터는 일반적으로 비독성이고, 표적 세포에서 잠복기와 유사한 상태로 지속되고, 효율적인 표적 세포 형질도입을 가능하게 하는 바, 이롭다. 재조합 HSV 벡터는 대략 30 kb인 이중성 핵산을 도입할 수 있다.
- [0107] 레트로바이러스, 예컨대, C형 레트로바이러스 및 렌티바이러스 또한 본 출원에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 레트로바이러스 벡터는 뮤린 백혈병 바이러스 (MLV)에 기반할 수 있다. 예컨대, 문헌 [Hu and Pathak, Pharmacol. Rev. 52:493-511, 2000] 및 [Fong et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 17:1-60, 2000]을 참조한다. MLV 기반 벡터는 바이러스 유전자 대신으로 최대 8 kb의 이중성 (치료) DNA를 함유할 수 있다. 이중성 DNA는 조직 특이적 프로모터 및 치료 펩티드를 코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 신경 세포로의 전달 방법에서, 이는 조직 특이적 수용체에 대한 리간드를 코딩할 수 있다.
- [0108] 사용될 수 있는 추가의 레트로바이러스 벡터로는 인간 면역결핍 (HIV)-기반 벡터를 비롯한, 복제-결합 렌티바이러스-기반 벡터가 있다. 예컨대, 문헌 [Vigna and Naldini, J. Gene Med. 5:308-316, 2000] 및 [Miyoshi et al., J. Virol. 72:8150-8157, 1998]을 참조한다. 렌티바이러스 벡터는 활발하게 분열하는 세포 및 비-분열 세포, 둘 모두를 감염시킬 수 있다는 점에서 이롭다.
- [0109] 본 출원에서 사용하기 위한 렌티바이러스 벡터는 인간 및 비-인간 (SIV 포함) 렌티바이러스로부터 유래된 것일 수 있다. 렌티바이러스 벡터의 예는 벡터 증식에 필요한 핵산 서열 뿐만 아니라, 핵산을 코딩하는 치료 펩티드에 작동가능하게 연결된 조직 특이적 프로모터를 포함한다. 상기 전자의 핵산 서열은 바이러스 LTR, 프라이머 결합 부위, 폴리퓨린 트랙, att 부위, 및 캡시드화 부위를 포함할 수 있다.
- [0110] 일부 측면에서, 렌티바이러스 벡터가 사용될 수 있다. 렌티바이러스는 상이한 유형의 CNS 뉴런을 형질도입시킬 수 있는 것으로 입증되었고 (문헌 [Azzouz et al., (2002) *J Neurosci.* 22: 10302-12]), 일부 실시양태에서, 그의 클로닝 능력이 크기 때문에 사용될 수 있다.
- [0111] 렌티바이러스 벡터는 임의의 렌티바이러스 캡시드 내로 패키징될 수 있다. 한 입자 단백질을 상이한 바이러스로부터의 또 다른 것으로 치환하는 것이 "슈도타이핑"으로 지칭된다. 벡터 캡시드는 뮤린 백혈병 바이러스 (MLV) 또는 수포성 구내염 바이러스 (VSV)를 비롯한, 다른 바이러스로부터의 바이러스 외피 단백질을 함유할 수 있다. VSV G-단백질 사용으로 높은 벡터 역가를 얻을 수 있고, 벡터 바이러스 입자의 안정성은 더 크게 증가된다.
- [0112] 알파바이러스-기반 벡터, 예컨대, 샘리키 삼립열 바이러스 (SFV) 및 신드비스 바이러스 (SIN)로부터 제조된 벡터 또한 본 출원에서 사용될 수 있다. 알파바이러스 사용은 문헌 [Lundstrom, K., Intervirology 43:247-257, 2000] 및 [Perri et al., Journal of Virology 74:9802-9807, 2000]에 기술되어 있다.
- [0113] 재조합, 복제-결합 알파바이러스 벡터는 고수준의 이중성 (치료) 유전자 발현이 가능하고, 광범위한 표적 세포를 감염시킬 수 있기 때문에 이롭다. 알파바이러스 레플리콘은 그의 비리온 표면 상에, 동족 결합 파트너를 발현하는 표적 세포에 선택적으로 결합할 수 있도록 허용하는 기능성 이중성 리간드 또는 결합 도메인을 제시함으로써 특이적 세포 유형으로 표적화될 수 있다. 알파바이러스 레플리콘은 표적 세포에서 잠복기, 및 따라서, 장기간의 이중성 핵산 발현을 확립할 수 있다. 알파바이러스 레플리콘은 또한 표적 세포에서 일시적인 이중성 핵산 발현을 나타낼 수 있다.
- [0114] 본 출원의 방법과 화합성을 띠는 다수의 바이러스 벡터에서, 1개 초과인 이중성 유전자가 본 벡터에 의해 발현될 수 있도록 1개 초과인 프로모터가 벡터에 포함될 수 있다. 추가로, 벡터는 신호 펩티드, 또는 표적 세포로부터 치료 펩티드의 발현을 촉진시키는 다른 모이어티를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0115] 두 바이러스 벡터 시스템의 유익한 특성을 조합하기 위해, 하이브리드 바이러스 벡터를 사용하여 치료 펩티드를

코딩하는 핵산을 표적 뉴런, 세포, 또는 조직으로 전달할 수 있다. 하이브리드 벡터의 구축을 위한 표준 기술은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 그러한 기술은 예를 들어, 문헌 [Sambrook, et al., In Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.] 또는 재조합 DNA 기술을 논의하는 임의의 다수의 실험실용 매뉴얼에서 살펴볼 수 있다. AAV 및 아데노바이러스 ITR의 조합을 함유하는, 아데노바이러스 캡시드 중의 이중 가닥 AAV 게놈을 사용하여 세포를 형질도입시킬 수 있다. 또 다른 변형법에서, AAV 벡터는 "거트리스(gutless)," "헬퍼-의존성" 또는 "고용량" 아데노바이러스 벡터로 대체될 수 있다. 아데노바이러스/AAV 하이브리드 벡터는 문헌 [Lieber et al., J. Virol. 73:9314-9324, 1999]에서 논의된다. 레트로바이러스/아데노바이러스 하이브리드 벡터는 문헌 [Zheng et al., Nature Biotechnol. 18:176-186, 2000]에서 논의된다. 아데노바이러스 내에 함유되어 있는 레트로바이러스 게놈은 표적 세포 내에 통합될 수 있고, 안정적인 유전자 발현에 영향을 줄 수 있다.

- [0116] 치료 펩티드의 발현 및 벡터의 클로닝을 촉진시키는 다른 뉴클레오티드 서열 요소도 추가로 고려된다. 예를 들어, 프로모터 상류의 인헨서, 또는 코딩 영역 하류의 종결인자의 존재가 발현을 촉진시킬 수 있다.
- [0117] 또 다른 실시양태에 따라, 조직 특이적 프로모터는 본원에 기술된 치료 펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드에 융합될 수 있다. 아데노바이러스 구축물 내에서 상기 조직 특이적 프로모터의 융합에 의해, 트랜스진 발현은 특정 조직으로 제한된다. 조직 특이적 프로모터에 의해 제공되는 유전자 발현의 효능 및 특이성 정도는 본 출원의 재조합 아데노바이러스 시스템을 사용하여 측정될 수 있다. 뉴런 특이적 프로모터, 예컨대, 혈소판-유래 성장인자 β -쇄 (PDGF- β) 프로모터 및 벡터가 당업계에 널리 공지되어 있다.
- [0118] 바이러스 벡터-기반 방법 이외에도, 치료 펩티드를 코딩하는 핵산을 표적 세포 내로 도입시키는 데 비-바이러스 방법 또한 사용될 수 있다. 비-바이러스 유전자 전달 방법에 관한 리뷰는 문헌 [Nishikawa and Huang, Human Gene Ther. 12:861-870, 2001]에 제시되어 있다. 본 출원에 따른 비-바이러스 유전자 전달 방법의 예는 치료 펩티드를 코딩하는 핵산을 표적 세포 내로 도입시키는 데 플라스미드 DNA를 사용한다. 플라스미드-기반 유전자 전달 방법은 일반적으로 당업계에 공지되어 있다.
- [0119] 합성 유전자 전달 분자는 플라스미드 DNA와 다분자 응집체를 형성하도록 디자인될 수 있다. 상기 응집체는 표적 세포에 결합하도록 디자인될 수 있다. 수용체에 비의존하는 방식으로 표적 세포로 핵산을 전달하는 데, 리포폴리아민 및 양이온성 지질을 포함하는, 양이온성 양친매성 물질이 사용될 수 있다.
- [0120] 추가로, 미리형성된 양이온성 리포솜 또는 양이온성 지질을 플라스미드 DNA와 혼합하여 세포 형질감염 복합체를 생성할 수 있다. 양이온성 지질 제제를 포함하는 방법은 문헌 [Felgner et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 772:126-139, 1995] 및 [Lasic and Templeton, Adv. Drug Delivery Rev. 20:221-266, 1996]에 리뷰되어 있다. 유전자 전달을 위해, DNA는 또한 양쪽성 양이온성 펩티드에 커플링될 수 있다 (문헌 [Fominaya et al., J. Gene Med. 2:455-464, 2000]).
- [0121] 바이러스 및 비-바이러스 기반 성분, 둘 모두를 포함하는 방법은 본 출원에 따라 사용될 수 있다. 예를 들어, 치료 유전자 전달을 위한 엡스타인 바(Epstein Barr virus)(EBV)-기반 플라스미드는 문헌 [Cui et al., Gene Therapy 8:1508-1513, 2001]에 기술되어 있다. 추가로, 아데노바이러스에 커플링된 DNA/리간드/다가양이온성 부가물을 포함하는 방법은 문헌 [Curiel, D. T., Nat. Immun. 13:141-164, 1994]에 기술되어 있다.
- [0122] 추가로, 치료 펩티드를 코딩하는 핵산은 전기천공 기술을 이용하여 표적 세포를 형질감염시킴으로써 표적 세포 내로 도입될 수 있다. 전기천공 기술은 널리 공지되어 있고, 플라스미드 DNA를 사용하는 세포 형질감염을 촉진시키는 데 사용될 수 있다.
- [0123] 치료 펩티드의 발현을 코딩하는 벡터는 필요에 따라, 제약상 허용되는 담체, 예컨대, 염수를 함유하는 주사용 제제 형태로 생체내에서 표적 세포로 전달될 수 있다. 다른 제약 담체, 제제 및 투여량 또한 본 출원에 따라 사용될 수 있다.
- [0124] 표적 세포가 치료되는 OL/OPC를 포함하는 경우, 벡터는 치료 펩티드가 고도로 효과적인 요법을 허용하는 정도로 발현되는 데 충분한 양으로 OL/OPC 내로 또는 그의 주변 부위에 직접 주사에 의해 전달될 수 있다. 벡터를 OL/OPC 내로 또는 그의 주변 부위에 주사함으로써, 벡터 형질감염을 더욱 효과적으로 표적화할 수 있고, 재조합 벡터의 손실을 최소화할 수 있다. 이러한 유형의 주사를 통해 원하는 개수의 세포를 특히, 손상 부위에 국소적으로 형질감염시킬 수 있고, 이로써, 유전자 전달의 치료 효능은 최대화시키고, 바이러스 단백질에 대한 염증 반응의 가능성은 최소화시킬 수 있다. 벡터를 표적 세포에 투여하는 다른 방법도 사용될 수 있고, 이는 사용되는 특정 벡터에 의존하게 될 것이다.

- [0125] 치료 펩티드는 일시적 발현, 및 안정적인 장기간의 발현을 비롯한 것으로, 표적 세포 내에서 임의의 적합한 시간 동안 발현될 수 있다. 본 출원의 한 측면에서, 치료 펩티드를 코딩하는 핵산은 형질감염된 세포의 활성 및 성장을 유도하는 데 효과적인 치료량으로 정의된 시간 동안 발현될 것이다. 본 출원의 또 다른 측면에서, 치료 펩티드를 코딩하는 핵산은 OL/OPC 생존율을 증가시키고/거나, OPC 이동, 분화, 증식 및/또는 성숙화를 증진시키고/거나, 수초화 또는 재수초화를 증진시키는 데 효과적인 치료량으로 정의된 시간 동안 발현될 것이다.
- [0126] 본원에 기술된 치료제는 변형 (예컨대, 화학적으로 변형)될 수 있다. 그러한 변형은 분자의 조작 또는 정제를 촉진시키도록, 분자의 가용성을 증가시키도록, 원하는 위치로 표적화하면서 투여를 촉진시키도록, 반감기를 증가 또는 감소시키도록 디자인될 수 있다. 상기와 같은 변형이 다수 당업계에 공지되어 있고, 이는 당업자에 의해 적용될 수 있다.
- [0127] 본원에 개시된 치료 방법에서, 치료 유효량의 치료제가 미엘린 관련 또는 탈수초화 관련 질환 또는 장애 (예컨대, MS)를 치료하기 위해 대상체에게 투여된다. 한 실시양태에서, 치료제를 포함하는 제제는 대상체에게 예를 들어, 미엘린 관련 또는 탈수초화 관련 질환 또는 장애 (예컨대, MS) 검출 또는 발병 시점부터 미엘린 관련 또는 탈수초화 관련 질환 또는 장애 (예컨대, MS) 검출 또는 발병 이후 수일 수주, 수개월 및/또는 수년까지의 기간 동안 투여될 수 있다.
- [0128] 치료제는 예를 들어, 국소 및/또는 전신 투여를 비롯한, 임의의 적합한 경로에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 전신 투여는 예를 들어, 비경구적 투여, 예컨대, 근육내, 정맥내, 관절내, 동맥내, 경맥내, 피하 또는 복강내 투여를 포함할 수 있다. 작용제는 또한 경구적으로, 경피적으로, 국부적으로, 흡입에 의해 (예컨대, 기관지내, 비내, 경구 흡입 또는 비내 점적제에 의해) 또는 직장으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료제는 대상체에게 매일, 매주, 또는 용량의 치료제를 전달하는 주입 펌프를 이용하는 정맥내 투여를 통해 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0129] 국소 투여의 바람직한 특징으로는 치료제의 효과적인 국소 농축을 달성하는 것 뿐만 아니라, 치료제의 전신 투여로부터의 유해한 부작용을 막는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 치료제는 대상체의 뇌 내로 직접 도입될 수 있다.
- [0130] 제약상 허용되는 제제는 수성 비히클 중에 현탁될 수 있고, 종래의 피하 니들을 통해, 또는 주입 펌프를 사용하여 도입될 수 있다.
- [0131] 주사를 위해, 치료제는 액체 용액으로, 전형적으로, 생리적으로 화합성인 완충제, 예컨대, 행크스 용액 또는 링커액 중에서 제제화될 수 있다. 추가로, 치료제는 고체 형태로 제제화될 수 있고, 사용 직전에 재용해 또는 현탁화될 수 있다. 동결건조된 형태 또한 포함된다. 주사는 예를 들어, 치료제의 볼루스 주사 또는 연속 주입 (예컨대, 주입 펌프 사용) 형태일 수 있다.
- [0132] 어느 한 동물 또는 인간에게 투여되는 치료제의 양, 부피, 농도, 및/또는 투여량은 대상체의 크기, 체표면적, 연령, 투여되는 특정 조성물, 성별, 투여 시간 및 경로, 일반적인 건강 상태, 및 공동으로 투여되는 다른 약물을 비롯한, 다수의 인자에 의존한다. 상기 언급된 치료제의 양, 부피, 농도, 및/또는 투여량에 대한 구체적인 변동은 하기 기술되는 실험 방법을 사용하여 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있다.
- [0133] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 치료제, 예컨대, 치료 펩티드는 그를 필요로 하는 대상체에게 국소적으로 및/또는 전신으로 치료되는 대상의 약 0.1 μmol , 약 1 μmol , 약 5 μmol , 약 10 μmol 이상; 또는 약 0.0001 mg/kg, 약 0.001 mg/kg, 약 0.01 mg/kg, 약 0.1 mg/kg, 또는 약 1 mg/kg 내지 약 5 mg/kg 또는 10 mg/kg의 용량 또는 양으로 투여될 수 있다. 치료제는 CSPG 영역의 재수초화가 최대가 될 때까지 매일, 매주, 2주마다, 매월 또는 그보다 덜 빈번하게 투여될 수 있다.
- [0134] 또 다른 실시양태에서, 치료제는 손상이 발생하였을 때, 일반적으로 약 24시간, 약 48시간, 약 100시간, 또는 약 200시간 이상의 기간 이내에 (예컨대, 손상 시점부터 약 6시간, 약 12시간, 또는 24시간 이내에 (약 6시간, 약 12시간, 또는 24시간 포함) 정맥내 주사에 의해 전신으로, 또는 주사 부위에 국소적으로 투여될 수 있다.
- [0135] 다른 실시양태에서, 치료제(들)를 투여하는 사용되는 제약상 허용되는 제제는 또한 대상체에게 활성 화합물을 지속적으로 전달하기 위해 제제화될 수 있다. 예를 들어, 제제는 대상체에게로의 초기 투여 후, 적어도 1, 2, 3, 또는 4주 동안 (1, 2, 3, 또는 4주 포함) 활성 화합물을 전달할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따라 치료되는 대상체는 (반복 투여에 의해, 또는 지속적인 전달 시스템의 사용에 의해, 또는 그 둘 모두에 의해) 적어도 30일 동안 치료제로 치료를 받을 수 있다.

- [0136] 지속적인 전달을 위한 접근법은 중합체 캡슐, 제제를 전달하는 미니펌프, 생분해성 임플란트, 또는 이식된 트랜스제닉 자가 세포 (미국 특허 번호 6,214,622 참조)의 사용을 포함한다. 이식형 주입 펌프 시스템 (예컨대, INFUSAID 펌프 (미국 펜실베이니아주 토완다)); 문헌 [Zierski et al., 1988]; [Kanoff, 1994] 참조) 및 삼투성 펌프 (알자 코퍼레이션(Alza Corporation)에 의해 판매)는 상업적으로 이용가능하고, 다르게는 당업계에 공지되어 있다. 또 다른 투여 모드는 이식형의, 외부에서 프로그램가능한 주입 펌프를 통한 것이다. 주입 펌프 시스템 및 저장 시스템 또한 예컨대, 미국 특허 번호 5,368,562 및 4,731,058에 기술되어 있다.
- [0137] 치료 펩티드를 코딩하는 벡터는 대개 다른 유형의 치료제보다 덜 빈번하게 투여될 수 있다. 예를 들어, 상기 벡터의 유효량은 약 0.01 mg/kg 내지 약 5 또는 10 mg/kg (0.01 mg/kg, 약 5 또는 10 mg/kg 포함) 범위일 수 있고; 매일, 매주, 2주마다, 매월 또는 덜 빈번하게 투여될 수 있다.
- [0138] 치료 펩티드를 전달 또는 발현할 수 있는 능력을 통해 다수의 상이한 세포 유형에서 세포 활성을 조정할 수 있다. 치료 펩티드는 예를 들어, 특이적 프로모터를 통해 OL/OPC에서 발현될 수 있다.
- [0139] 제약 조성물은 OPC 이동, 분화, 증식 및/또는 성숙화의 유익한 효과를 경험할 수 있는 대상체에게 투여될 수 있다. 본 발명이 하기와 같이 인간으로 제한되는 것으로 의도하는 것은 아니지만, 상기 동물 중에서 인간이 가장 중요하다.
- [0140] 일부 실시양태에서, 치료제는 대상체에서 OPC 이동, 분화, 증식 및/또는 성숙화에 의해 대상체를 치료하는 방법에서 사용될 수 있다. 본 방법은 그를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 본원에 기술된 치료제를 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 치료 유효량은 예를 들어, 신경퇴행성 질환 (예컨대, 다발성 경화증)을 앓는 대상체에서 치료하는 데 효과적인 양 (용량)을 포함할 수 있다.
- [0141] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 치료제는 비처리된 OL/OPC 또는 대상체에서의 생존 OL/OPC의 개수와 비교하여, 생존 OL/OPC의 개수를 적어도 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 950%, 또는 1000%만큼 증가시킴으로써 대상체에서 OL/OPC의 생존을 촉진시키는 데 효과적인 양으로 투여될 수 있다.
- [0142] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 치료제는 비처리된 OPC 또는 대상체에서의 OL 재생량과 비교하여, OL 재생량을 적어도 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 950%, 또는 1000%만큼 증가시킴으로써 대상체의 중추 신경계에서 OL의 재생을 증진시키는 데 효과적인 양으로 투여될 수 있다.
- [0143] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 치료제는 비처리된 OPC 또는 대상체에서의 OPC 분화량과 비교하여, OPC 분화량을 적어도 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 950%, 또는 1000%만큼 증가시킴으로써 대상체의 중추 신경계에서 OPC 분화를 유도하는 데 효과적인 양으로 투여될 수 있다.
- [0144] 일부 실시양태에서, 치료제는 신경퇴행성 질환 및 장애를 치료하기 위해 대상체에게 투여될 수 있다. 본원에 기술된 방법에 의해 치료하는 데 고려되는 신경퇴행성 질환으로 미엘린 관련 장애를 포함할 수 있다. 미엘린 관련 장애는 대상체에서의 탈수초화, 불충분한 수초화 및 재수초화 또는 수초형성장애와 관련된 임의의 질환, 병태, 또는 장애를 포함할 수 있다. 미엘린 관련 장애는 다양한 신경독성 손상으로부터 초래되는 수초화 관련 장애 또는 탈수초화로부터 발생할 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "탈수초화"는 탈수초화, 또는 신경을 절연시키는 미엘린 초의 손실을 지칭하고, 이는 다발성 경화증, 횡단성 척수염, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병, 백질위축증, 및 길랭-바레 증후군(Guillain-Barre Syndrome)을 비롯한, 일부 신경퇴행성 자가면역 질환의 특징이 된다. 백질위축증은 유전성 효소 결핍에 의해 유발되며, 이는 CNS 백질 내에서의 미엘린 초의 비정상적인 형성, 파괴 및/또는 비정상적인 교체를 유발한다. 후천성 및 유전성 미엘린 장애, 둘 모두 불량한 예후를 공유하며, 이는 주요 장애로 이어진다. 따라서, 일부 실시양태는 대상체에서 신경퇴행성 자가면역 질환을 치료하는 방법을 포함할 수 있다.
- [0145] 본원에 기술된 방법에 의해 치료 또는 호전될 수 있는 미엘린 관련 질환 또는 장애로는 대상체의 CNS 또는 말초 신경계에서 수초형성장애 또는 탈수초화와 관련된 질환, 장애 또는 손상을 포함할 수 있다. 상기 질환으로는 뉴런을 둘러싸는 미엘린이 없거나, 불완전하거나, 또는 적절하게 형성되지 않았거나, 또는 황폐화된 것인 질환

및 장애를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 질환으로는 수초 탈락성 장애, 예컨대, 다발성 경화증 (MS), 데빅병(Devic's disease), 및 염증성 탈수초성 질환, 백질위축성 장애, 예컨대, 백질뇌병증, 백질위축증, 예컨대, 부신척수신경병증(adrenomyeloneuropathy), 뇌힘줄황색종증(cerebrotendinous xanthomatosis), 크라베병(Krabbe disease), 알렉산더병(Alexander's disease), 및 펠리체우스-메르츠바허병(Pelizaeus Merzbacher disease: PMD), 및 말초 신경계의 탈수초성 질환, 예컨대, 길랭-마레 증후군 및 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0146] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 방법에 의해 치료 또는 호전될 수 있는 미엘린 관련 질환 또는 장애로는 백질위축증을 포함한다. 백질위축증은 뇌, 척수 및 흔히 말초 신경계를 이환시키는 진행성, 대사성, 유전적 질환군이다. 각 유형의 백질위축증은 뇌의 미엘린 초의 비정상적인 발생 또는 파괴를 유도하는 특이적인 유전자 이상에 의해 유발된다. 각 유형의 백질위축증은 미엘린 초의 상이한 부분을 이환시켜 다양한 신경학적 문제를 일으킨다. 본원에 기술된 방법에 의해 치료 또는 호전될 수 있는 백질위축증의 예로는 성인 발병 상염색체 우성 백질위축증 (ADLD), 아이카디-구티에레스 증후군(Aicardi-Goutieres syndrome), 알렉산더병, CADASIL, 카나반병(Canavan disease), CARASIL, 뇌힘줄황색종증, 아동기 운동실조 및 뇌 저수초형성 (CACH)/소멸 백질 질환 (VWMD), 파브리병(Fabry disease), 푸코시드축적증(fucosidosis), GM1 강글리오시드증, 크라베병, L-2-히드록시글루타르산뇨증, 피질 낭종을 동반한 거대뇌성 백질뇌병증(megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts), 이염색성 백질위축증, 다중 술과파체 결손증, 펠리체우스-메르츠바허병 (PMD), Pol III-관련 백질위축증, 레프섬병(Refsum disease), 살라병(salla disease) (유리 시알산 저장병), 쇼그렌-라손 증후군 (Sjogren-Larsson syndrome), X-연관 부신백질위축증, 및 젤베거 증후군(Zellweger syndrome) 스펙트럼 장애를 포함한다.

[0147] 본원에 기술된 방법에 의해 치료 또는 호전될 수 있는 미엘린 관련 질환 또는 장애로는 미엘린 결핍증을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 포함할 수 있다. 중추 신경계에서 불충분한 수초화는 다양한 신경학적 장애에 연루되어 있다. 이 중에는 심실 주위 백색연화증을 앓는 아동에서의 전뇌 수초화에서 선천적 결손이 신경학적 질병의 원인이 되는 뇌성 마비 형태가 있다 (문헌 [(Goldman et al., 2008) Goldman, S. A., Schanz, S., and Windrem, M. S. (2008). Stem cell-based strategies for treating pediatric disorders of myelin. Hum Mol Genet. 17, R76-83]. 연령 스펙트럼의 반대쪽 끝에서, 미엘린 손실 및 비효과적인 수복이 노화와 연관된 인지 기능 감퇴의 원인이 될 수 있다 (문헌 [(Kohama et al., 2011) Kohama, S. G., Rosene, D. L., and Sherman, L. S. (2011) Age (Dordr). Age-related changes in human and non-human primate white matter: from myelination disturbances to cognitive decline])). 그러므로, 수초화 및/또는 재수초화를 증진시키는 데 효과적인 작용제 및 그러한 방법이 MS 및 다양한 신경학적 장애에서 질환 진행을 정지시키고, 기능을 회복시키는 데 상당한 치료적 이익을 가질 수 있는 것으로 고려된다.

[0148] 한 특정 측면은 대상체에서의 다발성 경화증 치료를 고려한다. 본 방법은 대상체에게 치료 유효량의 본원에 기술된 치료제를 투여하는 단계를 포함한다. 다발성 경화증 (MS)은 가장 일반적인 탈수초성 질환이다. 다발성 경화증에서, 신체의 미엘린을 수복하지 못하는 장애는 신경 손상으로 이어지고, 다발성 경화증과 연관된 증상을 유발하고, 장애를 증가시키는 것으로 간주된다. MS에서 관찰되는 탈수초화는 항상 영구적인 것은 아니고, 질환의 초기 단계에서는 재수초화가 일어난다고 문서상으로 잘 입증되어 있다. 본원에 기술된 방법은 대상체에서 OPC 분화를 촉진시킬 수 있고, 이로써, 내인성 재수초화를 유도할 수 있는 것으로 고려된다.

[0149] 또 다른 특정 측면은 대상체에서의 미엘린 손실 (탈수초화)로부터 초래된 유전적 미엘린 장애의 치료를 고려한다. 본 방법은 대상체에게 치료 유효량의 본원에 기술된 치료제를 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시양태에서, 유전적 미엘린 장애는 백질위축증, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 펠리체우스-메르츠바허병 (PMD)이다.

[0150] 신경퇴행성 질환 또는 장애를 앓는 대상체를 치료하는 또 다른 전략법은 치료 유효량의, 추가의 올리고덴드로사이트 분화 및/또는 증식 유도화제(들) 및/또는 항-신경퇴행성 질환제와 함께 치료 유효량의 본원에 기술된 치료제를 투여하는 것이다. 항-신경퇴행성 질환제의 예로는 L-도파, 콜린에스테라제 억제제, 항콜린제, 도파민 효능제, 스테로이드제, 및 면역조절제 (인터페론, 단일클론 항체, 및 글라티라머 아세테이트 포함)를 포함한다.

[0151] 그러므로, 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 치료제는 신경퇴행성 및 미엘린 관련 장애의 치료를 위한 보조 요법과의 조합 요법의 일부로서 투여될 수 있다.

[0152] "조합 요법"이라는 어구는 PTP σ 의 활성화, 신호전달, 및 기능 중 하나 이상을 억제 또는 감소시키는 치료제, 및 추가의 치료제를, 상기 치료제들의 공동 작용으로부터 유의한 효과를 제공하도록 의도된 특정 치료 요법의 일부

로서 투여하는 것을 포함한다. 조합으로 투여될 때, PTP σ 의 활성, 신호전달, 및 기능 중 하나 이상을 억제 또는 감소시키는 치료제, 및 추가의 치료제는 별개의 조성물로서 제제화될 수 있다. 조합으로 진행되는 상기 치료제들의 투여는 전형적으로 정의된 기간 동안에 걸쳐 (일반적으로 선택된 조합에 의존하여 수분, 수시간, 수일, 수주) 수행된다.

[0153] "조합 요법"은 순차적 방식으로, 즉, 각 치료제를 상이한 시점에 투여하는 방식으로 상기 치료제들을 투여하는 것 뿐만 아니라, 상기 치료제들 또는 치료제 중 적어도 2개를 실질적으로 동시에 투여하는 것을 포함하도록 의도된다. 실질적으로 동시에 투여하는 것은 예를 들어, 대상체에게 각 치료제를 고정비로 포함하는 단일 캡슐제를 투여하거나, 또는 각 치료제에 대한 단일 캡슐제를 다회에 걸쳐 투여함으로써 달성될 수 있다. 각 치료제의 순차적 투여 또는 실질적으로 동시 투여는 경구적 경로, 정맥내 경로, 근육내 경로, 및 점막 조직을 통한 직접적인 흡수를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 임의의 적절한 경로에 의해 수행될 수 있다. 치료제는 동일한 경로에 의해 또는 상이한 경로에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 선택된 조합의 제1 치료제는 정맥내 주사에 의해 투여될 수 있는 반면, 조합의 다른 치료제는 경구적으로 투여될 수 있다. 대안적으로, 예를 들어, 모든 치료제가 경구적으로 투여될 수 있거나, 또는 모든 치료제가 정맥내 주사에 의해 투여될 수 있다. 치료제 투여 순서는 엄밀하게는 중요하지 않다. "조합 요법"은 또한 생물학적으로 활성인 다른 성분 (예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 제2 및 상이한 치료제) 및 비-약물 요법 (예컨대, 수술)과의 추가 조합으로 상기 기술된 바와 같은 치료제 투여를 포함할 수 있다.

[0154] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기술된 PTP σ 의 활성, 신호전달, 및 기능 중 하나 이상을 억제 또는 감소시키는 치료제와의 조합 요법으로 투여되는 추가 치료제로는 적어도 하나의 항-신경퇴행성 제제, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 면역치료제를 포함할 수 있다.

[0155] 본 방법에서 사용하기 위한 면역치료제로는 완화-재발형 다발성 경화증에서 급작스런 발병 동안 입증된 질환 및/또는 급성 염증성 반응의 면역 성분을 표적화하는 요법을 포함할 수 있다. 예로 면역조절제, 예컨대, 인터페론 베타-1a 및 베타-1b (각각 아보넥스(Avonex) 및 베타세론(Betaseron)), 나탈리주맙 (코팍손(Copaxone)) 나탈리주맙 (Tysabri), 글라티라머 아세테이트 (코팍손) 또는 미토크산트론을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 다른 실시양태에서, 치료제는 미엘린 의존성 프로세스를 증진 또는 촉진시키기 위해, 미엘린 관련 장애를 앓지 않고/거나, 그를 앓는 것으로 의심되지 않는 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 치료제는 인지 건강한 대상체에서, 미엘린 의존성 프로세스인 것으로 공지된 인식을 증진시키기 위해 CNS 뉴런의 수초화를 촉진시키도록 대상체에게 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 치료제는 인지 증진제 (항정신제)와 함께 조합하여 투여될 수 있다. 상기 작용제의 예로는 건강한 개체에서 인지 기능, 특히, 실행 기능, 기억, 창의력, 또는 동기 부여를 개선시키는 임의의 약물, 보충제, 또는 다른 물질을 포함한다. 비제한적인 예로는 라세탐 (예컨대, 피라세탐, 옥시라세탐, 및 아니라세탐), 약효식품 (예컨대, 바코파 몬니에르(bacopa monnieri), 인삼(파낙스 진생(*panax ginseng*)), 은행(징코 빌로바(*ginko biloba*), 및 GABA), 자극제 (예컨대, 암페타민 제약, 메틸페니데이트, 각성제, 크산틴, 및 니코틴), L-테아닌(L-Theanine), 톨카폰(Tolcapone), 레보도파(Levodopa), 아토목세틴(Atomoxetine), 및 데시프라민(Desipramine)을 포함한다.

[0156] 하기는 본 개시내용의 구체적이고, 예시적인 실시양태에 관한 논의이다. 본 논의에서, 본 발명자들은 세포내 시그마 펩티드 (ISP) 처리가 다양한 탈수초성 모델에서 기능 회복을 촉진시킨다는 것을 보여준다. ISP 처리는 CSPG 장벽을 극복함으로써 재수초화 및 기능 회복을 촉진시키며, 다발성 경화증 (MS)의 병리생물학에서의 수용체 단백질 티로신 포스파타제 (RPTP)의 중요한 역할을 밝힌다. 본 발명자들은 또한 PTP σ 의 ISP 조절이 OPC 그 자체에서 프로테아제 활성을 현저히 증가시키는 신규한 기전을 보여준다. 결국, 증진된 효소 방출은 CSPG를 선택적으로 분해시키고, 이는 이전에 반흔형성된 영역 내로의 그의 이동 및 그 영역에서의 분화를 증강시키는 데 도움을 준다.

[0157] 실시예

[0158] 물질 및 방법

[0159] 동물

[0160] 모든 동물 관리 및 동물 절차는 케이스 웨스턴 리저브 대학교 의과 대학의 동물 실험 윤리 위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee of Case Western Reserve University School of Medicine)의 승인을 받았다. 야생형 C57BL/6 마우스를 잭슨 라보라토리(Jackson Laboratory)로부터 입수하였고 (스톡 번호 000664), 케이스 웨스턴 리저브 대학교 동물 연구소(Animal Research Center)에서 하우징하였고, 마우스를 12

h 명/암주기로 유지시켰다. 수컷 및 암컷 마우스, 둘 모두 본 연구에 포함시켰다.

[0161] 실험적 자가면역 뇌척수염 (EAE) 모델

[0162] EAE를 유도하기 위해, 연령이 10주령인 C57BL/6/J 암컷 마우스를 제조사의 설명서에 따라 완전 프로인트 애주버트 에멀전 (후케 라보라토리즈(Hooke Laboratories), MOG₃₅₋₅₅ EAE 유도 키트, EK-2110)과 함께 MOG₃₅₋₅₅로 면역화시켰다. EAE 유도 키트 사용으로 98% 성공적으로 질환이 유도된다. 모든 EAE 동물을 매일 모니터링하고, 0 내지 5인 임상 척도를 사용하여 점수화하였다 (0: 이상은 발견되지 않음; 1: 축 늘어진 꼬리; 2: 축 늘어진 꼬리 및 뒷다리 힘이 없음; 3: 축 늘어진 꼬리 및 뒷다리 완전 마비; 4, 뒷다리 마비 및 앞다리의 부분적인 마비; 5: 빈사 상태). 일단 EAE 마우스가 점수 1 또는 3을 부여받았다면, 상기 마우스를 무작위로 처리군 및 비히클 군으로 동원시켰다. 처리군의 경우, 5-7마리의 마우스에 ISP (20 μ g/일)를 매일 복강내 주사하여 제공하거나, 비히클 군의 경우, 염수 중 5% DMSO, 100 μ l를 매일 복강내 주사하여 제공하였다. 실험은 맹검 방식으로 수행하였고, 동물을 매일 점수화하였다. ISP 온세트의 경우: 임상 척도에 의해 점수화된 질병의 발병시에 ISP 처리를 제공하였다. ISP 피크의 경우: 임상 척도에 의해 점수화된 질병이 최고 시점일 때 ISP 처리를 제공하였다.

[0163] 마우스에서의 리솔레시틴 (LPC) 유도성 국소 탈수초화

[0164] 이소플루란을 이용하여 12주령된 C57BL/6 수컷 마우스를 마취시키고, 척추후궁절제술을 수행하였다. 1.5 μ l의 1% LPC를 0.25 μ l/min 속도로 T11과 T12 척수 사이의 후주 내로 주입하였다. 역류를 최소화하기 위해 5 min 지체한 후, 니들을 제거하고, 병변을 봉합하였다. 수술 후 24 h째를 시작으로, 마우스를 ISP (20 μ g/일) 또는 비히클 (염수 중 5% DMSO, 100 μ l)을 이용하여 손상 부위에 가까운 위치에 피하 주사에 의해 매일 처리하였다. 마우스를 별개로 척추후궁절제술 후 7, 14 및 21일째에 안락사시켰다. 추가의 웨스턴 블롯, 조직화학 및 초미세구조 분석을 위해 척수를 절개하였다. 대조군 동물은 등가의 염수 주사를 받았고, 조직을 같은 패러다임에 따라 수집하였다. MMP-2 억제제 OA-Hy (10 μ g/1.5 μ l, 444244, 칼바이오킵), shRNA 표적화하는마우스 MMP-2를 표적화하는 shRNA를 발현하는 렌티바이러스 입자 (1 μ l, LPP-MSH027657-LVRU6GP, 진코포에이아(GeneCopoeia)) 또는 0.9% 염수의 2차 주사를 위해, LPC 병변 후 1 d (렌티바이러스 입자의 경우) 또는 4 d (OA-Hy의 경우)째에 동물을 마취시키고, OA-Hy 또는 렌티바이러스 입자를 상기 패러다임을 사용하여 동일 부위에 전달하였다. 동물을 회복시키고, 병변 후 14일 (dpl: days post lesion) 또는 18 dpl 시점에 희생시켰다. 에리오크롬 시아닌 염색으로 연속 절편을 염색함으로써 병변 크기를 측정하였다.

[0165] 마우스 소뇌 슬라이스 배양물에서의 LPC-유도성 탈수초화

[0166] 본 발명자들은 앞서 기술된 바와 같이 소뇌 슬라이스 배양 방법을 수행하였다 (문헌 [Zhang, H., et al. Central nervous system remyelination in culture - A tool for multiple sclerosis research. Experimental Neurology 230, 138-148 (2011)]). 간략하면, 레이카(Leica) 진동 마이크로톰 (레이카, VT1000S)을 사용하여 P10-12 마우스 소뇌로부터 300 μ m 두께의 소뇌 슬라이스를 절단하고, 50% 기초 배지 이글 배지, 25% 열 불활성화된 말 혈청, 25% 헥스 용액, 2.5% 글루코스, 1% 글루타민 및 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 배지 중에서 배양하였다. 시험관내에서 4일 (DIV: days in vitro) 후, 0.5 mg/ml LPC를 17-18h 동안 첨가하여 탈수초화를 유도하였다. 이어서, 슬라이스를 2.5 μ M ISP와 함께 8일 동안 인큐베이션시켰다. GM6001 실험을 위해, 25 μ M GM6001 (토크리스(Tocris)) 및/또는 2.5 μ M ISP 또는 SISP를 9일 동안 인큐베이션시켰다. MBP의 반정량적 웨스턴 블롯 및 MBP 및 NeuF200의 면역형광 염색에 의해 재수초화를 조사하였다.

[0167] 배양된 슬라이스의 면역염색

[0168] 슬라이스를 4% PFA로 고정시키고, 지질을 제거하고, PBS 중에서 3회 세척하고, 0.1% 트리톤 X-100 및 5% 정상적인 염소 혈청을 함유하는 PBS 중에서 차단시키고, 항-MBP (SMI-99P, 코반스(Covance), 1:300), 및 항-NeuF200 (N4142, 시그마(Sigma), 1:250) 항체와 함께 4°C에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 이어서, 슬라이스를 PBS 중에서 세척하고, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor)-접합된 2차 항체 (1:500, 인비트로젠(invitrogen)) 중에서 2 h 동안 인큐베이션시켰다. DAPI를 포함하는 벡타실드(Vectashield) 마운팅 배지 (벡터 라보라토리즈(Vector Laboratories)) 중에 슬라이스를 마운팅하고, 레이카 DFC500 형광 현미경을 사용하여 분석하였다.

[0169] 정제된 마우스 올리고덴드로사이트 전구 세포 세포 (OPC) 배양

[0170] 앞서 기술된 바와 같이 새로 태어난 C57BL/6 마우스로부터 OPC를 제조하였다 (문헌 [Luo, F., et al. The Activators of Cyclin-Dependent Kinase 5 p35 and p39 Are Essential for Oligodendrocyte Maturation, Process Formation, and Myelination. J. Neurosci. 36, 3024-3037 (2016)]). 세포 배양 플레이트를 50 mM

트리스-HCl 중 IgM (10 $\mu\text{g/ml}$, 밀리포어(Millipore))으로, 이어서, 1차 마우스 항체 A2B5로 미리 코팅하였다. 해리된 세포를 미리 코팅된 배양 디쉬 중에서 37°C에서 30 min 동안 인큐베이션시킨 후, 비-부착 세포를 부드럽게 제거하였다. A2B5+ OPC를 ~96% 순도로 DMEM 중 0.05% 트립신에 의해 유리시켰다. 정제된 OPC 세포를 N2, 20 ng/ml PDGF, 20 ng/ml FGF, 5 ng/ml NT-3, 10 ng/ml CNTF, 글루타민 (200 mM)으로 보충된 DMEM/F12 배지에서 확장시켰다.

[0171] 조정 배지 (CM) 프로테아제 활성 검정법

[0172] 약 1×10^6 개의 OPC를 PLL, 1 $\mu\text{g/ml}$ 라미닌, 및 2 $\mu\text{g/ml}$ 아그레칸 코팅 6 웰 플레이트 상에 각 웰에 플레이팅하고, 37°C에서 2일 동안 비히클, 2.5 μM ISP 또는 SISP로 처리하였다. CM을 수집하고, 세포 염색하고, 검정시까지 얼음 상에 놓았다. 서모피서(ThermoFisher) 프로테아제 검정 키트 (E66383, EnzChek, 서모피서)를 사용하여 프로테아제 활성을 검정하였다. 1x의 EnzChek 혼합물을 각 군으로부터의 CM과 1:1로 혼합하고, 부드럽게 진탕시키면서 RT 0/N에서 인큐베이션시켰다. 각 샘플당 3회 반복 수행하였다. 분광광도계를 사용하여 502/528 nm 여기 및 방출로 샘플을 분석하여 절단된 형광성 카세인을 사정하였다. 기록된 형광 단위는 EnzChek 및 세포 배양 배지 혼합물로 블랭킹된 것이다.

[0173] CSPG 구매 통과 검정법 및 구매 정량화

[0174] 앞서 기술된 바와 같이 CSPG 구매를 제조하였다 (문헌 [Tom, V. J., et al. Studies on the Development and Behavior of the Dystrophic Growth Cone, the Hallmark of Regeneration Failure, in an *In vitro* Model of the Glial Scar and after Spinal Cord Injury]). 24 웰 유리 커버슬립을 폴리-L-리신 및 니트로셀룰로스로 코팅하고, 700 $\mu\text{g/ml}$ 아그레칸 (A1960 시그마) 및 10 $\mu\text{g/ml}$ 라미닌 (11243217001 시그마)의 혼합물을 코팅된 커버슬립 상에 스폿팅하였다. 건조 후, 코팅된 커버슬립을 라미닌과 함께 37°C에서 3h 동안 인큐베이션시켰다. 정제된 OPC를 10,000/커버슬립의 밀도로 플레이팅하고, N2, PDGF (20 ng/ml), FGF (20 ng/ml), NT-3 (5 ng/ml), CNTF (10 ng/ml), 글루타민 (200 mM)를 함께 함유하는 DMEM/F12 배지에서 배양하였다. 커버슬립을 CS-56 (C8035, 시그마, 1:500) 및 O4 항체 (하이브리도마 코어 클리블랜드 클리닉(Hybridoma Core Cleveland Clinic), 1:10)로 염색하였다. 각 스폿에 대해 아그레칸 경계를 통과되는 O4-양성 세포를 계수하였다. CSPG 구매 정량화를 위해, 1×10^6 개의 OPC를 약 1×10^6 개의 OPC를 PLL, 1 $\mu\text{g/ml}$ 라미닌, 및 2 $\mu\text{g/ml}$ 아그레칸 코팅 6 웰 플레이트 상에 각 웰에 플레이팅하였다. OPC를 37°C에서 2일 동안 비히클, 2.5 μM ISP, 또는 2.5 μM SISP로 처리하였다. CM을 수확하고, 새로 제조된 스폿과 함께 인큐베이션시켰다. 스폿을 37°C에서 2일 동안 CM과 함께 인큐베이션시킨 후, CS-56 및 라미닌 (L9393, 시그마, 1:1000) 항체로 염색하고, 일관되게 영상화시켰다. 이미지J(ImageJ) 소프트웨어 (NIH)를 사용하여, 동일한 ROI를 사용하여 CS-56 또는 라미닌 스폿 테두리의 픽셀 강도를 정량화하였다. 배양된 척수 이식편을 위해, P1 마우스 새끼의 경부 및 흉부의 척수를 1-2 mm 조직 조각을 초평하고(chopped), 커버슬립으로 옮겨 놓았다. 외식편을 15% FBS (하이클론(Hyclone)), 10 ng/ml PDGF (시그마) 및 N2 보충물 (인비트로젠)을 포함하는 DMEM/F12 배지에서 배양하였다. ISP 처리를 위해, 2.5 μM ISP를 플레이팅 시점에 배지에 첨가하였다. 25 μM GM6001 (2983, 토크리스), 100 nM MMP-2 억제제 (444244, 칼바이오크), 및/또는 2.5 μM ISP 또는 SISP를 사용하였다.

[0175] 펩티드 서열

[0176] 펩티드를 1 mg의 동결건조된 양으로 진스크립트(GenScript) 또는 CS-바이오(CS-Bio)로부터 구입하였고, 이를 사용할 준비가 되었을 때, 앞서 기술된 바와 같이 dH₂O 중에 2.5 mM로 희석하고, -20°C에서 분취하였다 (문헌 [Lang, B. T. et al. 조정 of the proteoglycan 수용체 PTPsigma promotes recovery after spinal cord injury. Nature 518, 404-408 (2015)]).

[0177] 세포내 시그마 펩티드 (ISP): GRKKRRQRRRCMAEHMERLKANDSLKLSQEYESI (서열 번호: 61)

[0178] 스크램블된 ISP (SISP):

[0179] GRKKRRQRRRCIREDDSLMLYALAEKKESNMHES (서열 번호: 62)

[0180] 아그레칸 및 라미닌의 웨스턴 블롯 분석

[0181] PLL, 1 $\mu\text{g/ml}$ 라미닌, 및 2 $\mu\text{g/ml}$ 아그레칸 코팅 6 웰 플레이트 상에서 인큐베이션된 1×10^6 개의 OPC로부터 CM을 수확하였다. OPC를 37°C에서 2일 동안 10 $\mu\text{g/ml}$ Exo1 (ab120292, 압캠(Abcam)), 또는 25 μM GM6001 (364205, 칼바이오크)과 함께 비히클, 2.5 μM ISP, 또는 2.5 μM SISP로 처리하였다. 세포가 제거된 각 군의 100 μl CM

을 1 mL 에펜도르프 튜브에서 37℃에서 2일 동안 20 $\mu\text{g/mL}$ 아그레칸 및/또는 10 $\mu\text{g/mL}$ 라미닌과 함께 인큐베이션시켰다. 양성 대조군으로서, OPC 배지를 아그레칸과 함께 인큐베이션시키고, 동일한 방식으로 인큐베이션시켰다. 이어서, 하기 기술되는 바와 같이 CS-56 및/또는 라미닌 항체에 대한 인큐베이션과 함께 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0182] OPC 용해물 또는 CM의 웨스턴 블롯 분석

[0183] OPC CM 또는 용해물 중 MMP-2 또는 10을 사정하기 위해, OPC를 상기 기술된 바와 같이 미리 코팅된 PLL, 아그레칸, 및 라미닌 상에서 인큐베이션시켰다. OPC를 37℃에서 2일 동안 비히클, 2.5 μM ISP 또는 SISP로 처리하였다. 이어서, CM을 수확하고, 밀리포어 울트라셀(Milipore Ultracel) YM-C 원심분리 필터 유닛 (에펜도르프 센추리퓨지(Eppendorf Centrifuge) 5415D)을 사용하여 최대 속도로 4℃에서 30분 동안 농축시켰다. 50 μg 의 농축된 CM을 각 레인에 로딩하였다. 각 군으로부터 20 μg 단백질을 로딩하면서, 하기 기술되는 바와 같은 웨스턴 블롯 기술을 이용하여 OPC 용해물을 사정하였다.

[0184] 웨스턴 블롯 분석

[0185] 조직 샘플 또는 소뇌 슬라이스 또는 정제된 OPC 세포를 RIPA 용해 완충제로 균질화시키고, 제조사의 설명서 (써모 피셔(Thermo Fisher))에 따라 피어스(Pierce) BCA 단백질 검정 키트에 의해 단백질 농도를 측정하였다. 이어서, 동일한 양의 단백질을 15% SDS-PAGE 겔에 로딩하고, 전기영동에 의해 PVDF 막 (밀리포어)으로 옮겼다. 막을 5% 무지방 밀크를 함유하는 0.1% TPBS 완충제 중에서 실온에서 1 h 동안 차단시키고, 4℃에서 밤새도록 명시된 1차 항체로, 이어서, 호스라디쉬 퍼옥시다제 (HRP)에 접합된 2차 항체로 프로빙하였다. 하기 1차 항체를 사용하였다: MBP (SMI-99P, 코반스, 1:1000), CS-56 (C8035, 시그마, 1:1000), 라미닌 (L9393, 시그마, 1:1000), GAPDH (AF5718, R 앤드 D 시스템즈(R and D Systems), 1:1000), MMP-2 (AF1488, R 앤드 D 시스템즈, 1:1000), MMP-10 (MAB910, R 앤드 D 시스템즈, 1:1000), 및 β -액틴 (sc-47778, 산타 크루즈(Santa Cruz), 1:1000). 웨스트 피코 키트(West Pico Kit) (써모 피셔)를 사용하여 증강 화학발광을 수행하고, 플루오르켄(FluorChem) E 시스템 (프로테인심플(ProteinSimple: 미국))에 의해 검출하였다. 이미지J 소프트웨어 (NIH)를 이용하여 밴드의 밀도를 정량화하였다.

[0186] 젤라틴 자이모그래피

[0187] PLL, 1 $\mu\text{g/mL}$ 라미닌, 및 2 $\mu\text{g/mL}$ 아그레칸 코팅 6 웰 플레이트 상에서 인큐베이션된 1×10^6 개의 OPC로부터 CM을 수집하였다. OPC를 37℃에서 2일 동안 비히클, 2.5 μM ISP 또는 SISP로 처리하였다. CM을 상기 기술된 바와 같이 밀리포어 울트라셀 YM-3 원심분리 필터 유닛을 이용하여 농축시켰다. 농축된 CM 또는 25 ng의 재조합 MMP-2 (PF023, 밀리포어) 및 MMP-9 (PF140, 밀리포어)로부터의 40 μg 비변성된 단백질을 1x 램리 완충제 (1610747, 바이오-래드(Bio-Rad))를 이용하여 10% 젤라틴 자이모그램 (1611167, 바이오-래드) 상에 로딩하고, 얼음 상에서 1.5시간 동안 100 mV로 전개시켰다. 이어서, 자이모그램을 RT에서 30분 동안 1x 재생 완충제 (1610765, 바이오-래드)와 함께 부드럽게 진탕시킨 후, 1x 현상 완충제 (1610766, 바이오-래드) 37℃에서 O/N으로 1x 현상 완충제 (1610766, 바이오-래드)와 함께 인큐베이션시켰다. 이어서, 현상된 자이모그램을 dH_2O 로 세척하고, 0.1% 쿠마시 블루(Coomassie Blue) 염료 (27816, 시그마)와 함께 O/N으로 인큐베이션시켰다. 탈염색 완충제 (40% MeOH, 10% 아세트산)로 세척한 후, 자이모그램을 영상화하고, 웨스턴 블롯 섹션에서 기술된 방법으로 이미지J를 이용하여 젤라틴 분해량을 사정하였다.

[0188] 프로테아제 어레이 스크린

[0189] OPC를 4 div 동안 6 웰 플레이트 상에서 비히클 대조군 또는 2.5 μM ISP 처리와 함께 배양하였다. 각 군으로부터 조정 배지를 수집하고, 세포를 제거한 후, R & D 시스템즈 프로테아제 어레이 키트(R & D Systems Protease Array Kit)에서 제공받은 블롯 어레이 (ARY025)와 함께 인큐베이션시켰다. 키트로부터의 설명서에 따라 4℃에서 밤새도록 수집된 배지를 인큐베이션시켰다. 대조군 및 ISP 블롯을 동일한 노출 시간을 이용하여 함께 현상시키고, 이미지J (NIH)를 이용하여 어레이의 픽셀 강도를 사정하였다.

[0190] 룩솔 패스트 블루(LFB) 미엘린 염색 및 정량화

[0191] 제조사의 설명서에 따라 (#26681, 일렉트론 마이크로스코피 사이언시스(Electron Microscopy Sciences)) LFB 염색을 수행하였다. 척수 절편의 경우, 20 mm 관상 절편을 56℃에서 밤새도록 LFB 용액 중에서 인큐베이션시킨 후, 95% 알콜 및 증류수로 순차적으로 세정하였다. 이어서, 절편을 0.1% 탄산리튬 용액 중에 놓고, 이어서, 연속 구배화된 에탄올로 탈수시키고, 히스토클리어(Histoclear)로 세정하고, 탑재시켰다. 연속 매칭된 절편 세트

를 영상화하고, 분석하였다. 광학 현미경하에서 영상 (5 내지 6개의 절편/동물)을 포착하였다. 이미지J 소프트웨어를 사용하여 탈수초화된 부위 (LFB 염색 부재)를 정량화하였다. EAE 절편의 경우, 탈수초화된 부위를 측정하고, 척수 전체 면적에 대한 상대적인 비율(%)로 나타내었다. LPC 모델의 절편의 경우, 원기둥의 부피 방정식 ($V = \text{병변 면적} \times \text{병변 길이}$)에 기초하여 전체 병변 전역에 걸쳐 연속 절편으로부터의 병변 면적에 의해 병변 부피를 계산하였다.

[0192] 면역세포화학법

[0193] MMP-2/04 염색을 위해, OPC를, PLL, 1 $\mu\text{g/mL}$ 라미닌, 및 2 $\mu\text{g/mL}$ 아그레칸으로 미리 코팅된 24 웰 커버슬립 상에 플레이팅하고, 37°C에서 2일 동안 비히클 또는 2.5 μM ISP와 함께 인큐베이션시켰다. 배양된 OPC 또는 OL 세포를 4% PFA 중에서 고정시킨 후, PBST 용액 (PBS 중 10% 정상적인 염소 혈청 및 0.2% 트리톤-X100)중에서 차단시켰다. 희석된 1차 항체를 4°C에서 밤새도록 샘플과 함께 인큐베이션시킨 후, 이어서, 알렉사 플루오르 488 또는 594 (1:500, 인비트로젠)와 접합된 적절한 2차 항체 염소 항-마우스 또는 항-토끼 IgM 또는 IgG와 함께 인큐베이션시켰다. 하기 1차 항체를 사용하였다: PDGFR α (XX), 04 (하이브리도마 코어, 클리블랜드 클리닉), MBP (SMI-99P, 코반스, 1:300), MMP-2 (R 앤드 D 시스템즈, 1:500), 및 CS-56 (C8035, 시그마, 1:250). DAPI를 포함하는 벡타실드 마운팅 배지 (벡터 라보라토리즈) 중에 세포를 마운팅하였다.

[0194] TUNEL, Ki-67 면역세포화학법 및 정량화

[0195] 증식을 사정하기 위해, OPC를, PLL, 1 $\mu\text{g/mL}$ 라미닌, 및 2 $\mu\text{g/mL}$ 아그레칸으로 미리 코팅된 24 웰 커버슬립 상에 플레이팅하였다. OPC를 플레이팅 즉시 37°C에서 2일 동안 비히클, 2.5 μM ISP 또는 SISIP로 처리하였다. 커버슬립을 고정시키고, 면역세포화학법 섹션에서 기술된 것과 동일한 방법으로 Ki-67 (550609, BD 파미젠(BD Pharmingen), 1:500) 및 04 (1:10)로 염색하였다. 커버슬립을 영상화하고, 계수하였다. 아포토시스를 사정하기 위해, OPC를 동일한 방식으로 배양하고, 비히클, 2.5 μM ISP 또는 SISIP 인큐베이션 2일째, 비히클 또는 1 $\mu\text{g/mL}$ LPC와 함께 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 커버슬립을 PFA 및 메탄올로 고정시킨 후, APO-BrdU TUNEL 검정 키트 (A23210, 서모피셔) 및 가이드라인을 이용하여 염색하고, RT에서 O/N으로 1차 항체의 인큐베이션을 수행하였다. 커버슬립을 추가로 DAPI (D9542, 시그마, 1:10,000)와 함께 공동 염색한 후, 영상화하고, 계수하였다.

[0196] 면역조직화학법

[0197] 마우스를 아베르틴으로 마취시키고, PBS 및 4% 파라포름알데히드 (PFA)를 관류시켰다. 뇌 또는 척수를 절개하고, 4% PFA 중에서 4°C에서 밤새도록 포스트-고정시키고, 20% 수크로스 중에서 평형화시켰다. 20 μm 두께의 절편을 항원 검색용 리빌 데클로커 솔루션(Reveal Decloaker Solution) (RV1000M, 바이오케어 메디컬(Biocare Medical))을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 전처리하였다. 차단 후, 절편을 4°C에서 밤새도록 1차 항체와, 이어서, 알렉사 플루오레센스 488 또는 594와 접합된 적절한 2차 항체와 함께 인큐베이션시켰다. 하기 1차 항체를 사용하였다: MBP (SMI-99P, 코반스, 1:300), NeuF200 (N4142, 시그마, 1:250), CS-56 (C8035, 시그마, 1:250), CAT301 (MAB5284, 밀리포어, 1:250), 베르시칸 (AB1032, 밀리포어, 1:250), Iba1 (019-19741, WAKO, 1:250), GFAP (MAB360, 밀리포어, 1:250), Olig2 (AB9610, 밀리포어, 1:250), CC1 (OP80, 밀리포어, 1:250). 각 염색을 위해, 적어도 3마리의 동물 개체/군을 조사하였고, 레이카 DFC500 형광 현미경을 이용하여 영상을 포착하였다. 이미지J 소프트웨어 (미국 국립 보건원: 미국)를 이용하여 염색을 정량화하였다. 나이브 대조군의 평균 값에 대한 상대적인 비율(%)로서 형광 강도를 계산하였다.

[0198] 전자 현미경법 (EM) 분석을 위한 조직 제조

[0199] 수초화의 초미세구조 분석을 위해, 0.1 M 소듐 카르보딜레이트 완충제, PH 7.4 (일렉트론 마이크로스코피 사이언시스) 중 2% 글루타르알데히드/4% 파라포름알데히드를 마취된 동물에 관류시켰다. ISP 처리된 동물 또는 대조군 동물로부터 LPC 또는 EAE 유도된 척수의 병변 부위를 절개하고, 1% OsO₄ 중에서 2 hr 동안 포스트-고정시켰다. 척수 또는 뇌량 함유 뇌의 관상 절편 (500 μm)을 제조하고 레이카, 바이브레이토(Vibratome)), 탈수시키고, 포화된 우라닐 아세테이트로 염색하고, Poly/Bed812 수지 (폴리사이언시스 인크.(Polysciences Inc.)) 중에 포매시켰다. 1 μm 두께의 절편을 절단하고, 톨루이딘 블루로 염색하고, EM 분석을 위해 매칭되는 부위를 선택하였다. 초미세구조 분석을 위해, 초박 절편 (0.1 μm)을 절단하고, 전자 현미경 (JEOL100CX)을 사용하여 80 kV로 시각화하였다. 미엘린 초의 내경 및 외경의 미엘린 두께를 측정함으로써 적어도 50-100개의 무작위로 선택된 수초화된 축삭으로부터 G-비를 계산하였다.

[0200] MMP-2의 shRNA 녀 다운

- [0201] MMP-2 억제 다운은 U6 프로모터 (LPP-MSH027657-LVRU6GP, 진코포에이아)에 의해 구동되는, 마우스 MMP2를 표적화하는 shRNA를 발현하는 렌티바이러스 입자를 통해 매개되었다. shRNA 스크램블된 구축물 (LPP-CSHCTR001-LVRU6GP-100-C, 진코포에이아)을 위한 렌티바이러스 입자를 상응하는 대조군으로서 사용하였다. OPC 배양물을 실험 전 적어도 48시간 동안 1인 감염 다중도 (MOI)로 감염시켰다. 감염된 OPC 배양물의 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 구축물을 MMP-2 (AB191677, 시그마, 1:500)에 대해 입증하였다.
- [0202] 통계학적 분석
- [0203] 모든 데이터 분석은 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 6.00을 이용하여 수행하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 제시되어 있다. $p < 0.05$ 인 경우, 통계학상 유의적인 것으로 간주된다. 터키 다중 비교 검정, 던넛 다중 비교 검정, 또는 시달 다중 비교 검정에 의한 사후 분석과 함께 양측 독립 스튜던트 t 검정, 일원 또는 이원 ANOVA에 의해 통계학적 분석을 수행하였다. 맹검 방식으로 정량화를 수행하였다. 샘플 크기를 미리 측정하는데 통계학적 검정은 사용하지 않았지만, 본 발명자들의 샘플 크기는 당업계에서 일반적으로 사용되는 것과 유사하다. 데이터 분포는 정규 분포인 것으로 가정하였지만, 이는 공식적으로 검정되지는 않았다. 모든 실험은 독립적으로 적어도 3회 수행되었다.
- [0204] 결과
- [0205] EAE 및 LPC 탈수초성 MS 마우스 모델에서의 병변에서 증가된 CSPG 및 수용체 PTP σ 발현
- [0206] 본 발명자들은 MOG₃₅₋₅₅-유도성 만성 진행성 EAE 및 LPC-유도성 급성 국소 탈수초화의 탈수초성 병변에서 CSPG 발현을 특징화하였다. 탈수초화된 EAE 및 LPC 병변을 록슬 패스트 블루 (LFB) 미엘린 염색으로 시각화하였다 (도 9a-9d). 예상대로, LFB 염색은 두 모델 모두의 병변에서 감소되어 있었다. 척수 조직 절편의 면역염색 결과, 비히클 대조군과 비교하였을 때, EAE- 및 LPC-이환된 동물의 탈수초성 병변에서 CSPG 발현이 상향조절되어 있는 것으로 나타났다 (도 9a-9d). 추가로, CSPG 상향조절은 면역화 후 28 내지 41일째에 EAE-병변이 있는 척수에서 점진적으로 증가하였다 (도 9a). 등쪽 척수에서 LPC 주사 후 7 및 14일째 동물로부터 수집된 조직 절편 (도 9c 및 9d)은 유사하게 탈수초성 병변에서 증가된 CSPG 생산을 나타내었다. 국소적으로 탈수초화된 부위에서의 증가된 CSPG를 통해, 본 발명자들은 CSPG는 PTP σ 신호전달을 통해 병변 부위에서 OPC에 부정적인 영향을 미치고, 궁극적으로는 척수를 재생초화하는 그의 능력에 영향을 줄 수 있다는 가설을 세우게 되었다.
- [0207] CSPG는 수용체 PTP σ , LAR, 및 Nogo 수용체 1 및 3을 통해 신호전달하는 것으로 알려져 있다. 본 발명자들은 OPC 발생 동안 PTPRS (PTP σ), PTPRF (LAR), PTPRD (PTP δ), 및 RTN4R (Nogo 수용체)의 유전자 발현을 검색하기 위해, 앞서 공개된, 마우스 대뇌 피질의 RNA-서열분석 트랜스크립토 데이터베이스를 이용하였다. PTPRS 유전자 전사체 (FPKM)는 발생 중인 OPC에서 가장 풍부한 유형의 CSPG 수용체였다 (도 10b). 야생형 마우스 새끼 뇌 (생후 1-2일째)로부터 유래된 OPC/OL 세포의 면역염색 결과, PTP σ 는 체세포 및 미성숙한 Olig2⁺ 및 성숙한 CC1⁺ 또는 미엘린 기본 단백질 (MBP)⁺ 세포의 돌기에서 발현된 것으로 나타났다 (도 10a 및 10c). 웨스턴 블롯 분석을 통해서도 또한 주사 후 28일째 (EAE) 및 7일째 (LPC) EAE- 또는 LPC-유도성 탈수초성 모델의 병변이 있는 척수에서 PTP σ 가 상향조절되어 있는 것으로 나타났다 (도 10d). EAE-유도성 동물에서, PTP σ 에 대한 항체 및 OPC 마커, Olig2를 이용하여 이중-면역염색 또한 수행한 결과, 탈수초성 병변에서 Olig2⁺ OPC로 공동 표지된 PTP σ 가 증가되어 있는 것으로 나타났다 (도 10e). 이러한 관찰결과는 PTP σ 가 EAE 또는 LPC 유도성 질환 이후 올리고덴드로사이트 계통의 세포에서 발현되고, 상향조절된다는 것, 및 상기 수용체는 MS 모델에서 CSPG 및/또는 수용체 조작의 효과를 연구하기 위한 추적가능한 표적을 제공한다는 것을 제안한다.
- [0208] ISP를 이용한 PTP σ 조절이 EAE 동물 모델에서 기능 회복 및 재생초화를 촉진시킨다.
- [0209] 이어서, 본 발명자들은 만성 진행성 탈수초화 질환 프로세스를 반복하는 EAE 마우스 모델에서 세포내 시그마 펩티드 (ISP)를 시험하였다. MOG₃₅₋₅₅ 면역화 후, 동물은 임상 점수화에 의해 측정된 질병의 발병시 (EAE ISP 온세트) 또는 최고 시점 (EAE ISP 피크)에 41일 동안 복강내 ISP 주사 (20 μ g/마우스, 매일)를 받았다 (도 1a). 대조군은 평행으로 5% DMSO 비히클 주사를 맞았다. 기능 회복은 ISP 투여 ~10-12일 후에 (즉, 면역화 후 23일째) 온세트 군에서 최초로 관찰되었다. ISP는 임상 점수를 3.5-4 (중증 마비)에서 2-1.5 (축 늘어진 꼬리 및 뒷다리 힘이 없음)로 개선시켰다. ISP 처리 20-22일 후 (면역화 후 ~33일째), 온세트 군 중 몇몇 동물은 회복되어, 0.5-1 (축 늘어진 꼬리)로 개선된 임상 점수를 받았다 (도 1b 및 1c). 그에 반해, 대조군 동물은 심각하게 마비된 상태로 유지되었고, 점수는 약 3.5-4 그대로 유지되었다. EAE ISP 피크 동물은 또한 ISP 처리로 유의적으로 개선되었지만; 그러나, 질환 발병시에 제공된 ISP는 뒷다리가 더 잘 회복시켰다 (도 1b 및 1c). 이러한

개선은 또한 조직학적 개선과 밀접한 상관관계를 가졌다. 병변 크기는 LFB 미엘린 염색으로 나타난 바와 같이, 특히 온세트 처리 동물에서 감소되었다 (도 1d 및 1e). 반대로, MBP 면역염색은 대조군 EAE 동물과 비교하였을 때, 41일 동안 ISP로 처리된 동물에서 더 진하게 나타났다 (도 1f). MBP 단백질 이소폼의 웨스턴 블롯팅 결과, 이 역시 ISP 처리된 마우스에서 MBP 발현이 회복된 것으로 나타났다 (도 1g). 초미세구조 분석 결과, 대조군과 비교하였을 때, ISP 처리된 마우스의 EAE-병변이 있는 척수에서 수초화된/재수초화된 축삭이 증가된 것으로 나타났다 (도 1h). 정량적 분석 결과, ISP 처리군에서 수초화된/재수초화된 축삭이 증가되었고 (도 1i), 축삭 직경에 의해 수초화의 직경을 정규화함으로써 수초화 두께를 나타내는 G-비는 비히클 처리군과 비교하였을 때, ISP 처리군에서 더 낮은 것으로 확인되었다 (도 1j). 중요하게는, 본 발명자들의 결과는, 특히, EAE 유도 후 18일째 탈수초화 기준선 (LFB)이 질환 진행의 상기 초기 단계 시점에 두 군 사이에는 유의적으로 상이하지 않았기 때문에, ISP는 탈수초화를 예방한다기보다는 미엘린 재생을 증진시키는 작용을 하였다는 것을 제안한다 (도 12e 및 12f).

[0210] ISP 처리는 시간 경과에 따른 탈수초화된 병변에서의 CSPG 발현 감소 뿐만 아니라, EAE에서 염증성 반응의 변경과 연관이 있다

[0211] EAE-유도성 동물의 ISP 처리 후, CSPG가 현저히 감소되었다는 관찰결과 이외에도 (도 4a, Cat301), 본 발명자들은 또한 같은 동물에서 대식세포 동력학적 성질이 변경된 것도 발견하게 되었다. 먼저, 대식세포 (Iba1)는 특히 백질에서 아그레칸 (Cat301)과 함께 공동국재화되는 것으로 보였는데 (도 4a), 이는 생산하는 것은 알려져 있지 않은 아그레칸을 침착시키거나, 또는 더욱 가능하게는 그를 포식하는 활성화된 대식세포에 기인할 수 있다. 본 발명자들은 추가로 대조군과 비교하여 ISP 처리된 EAE 동물에서 감소된 Iba1 면역염색 뿐만 아니라, Iba1⁺ 대식세포 내 감소된 양의 아그레칸을 관찰하게 되었다 (도 4a). 본 발명자들은 EAE 유도 후 41일째 Iba1 및 GFAP의 추가 정량화를 수행하였고, ISP 철치 후 각각 소교세포/대식세포 및 반응성 성상세포, 둘 모두의 유의적인 감소를 관찰하게 되었다 (도 4a 및 4b). ISP를 비롯한, 합성 펩티드를 이용한 LAR 패밀리 수용체 포스포타제 조절이 척수 손상 후 소교세포/대식세포를 M2 분극화 쪽으로 편향시켰다고 최근 보고되었다. 실제로, M1 (iNOS) 및 M2 (아르기나제-1) 대식세포 분극화를 확인하는 마커에 대한 면역염색으로 ISP 처리가 EAE 동물에서 염증성 환경을 조정한다는 것을 뒷받침하는 증거가 밝혀졌다 (도 4c 및 4d). 특히, 소교세포/대식세포는 손상 후 PTP σ 를 생산하는 것으로 보였지만, 반응성 성상세포는 그렇지 않았다.

[0212] ISP는 LPC-유도성 탈수초화에서 미엘린 수복 속도를 증진시킨다.

[0213] 이어서, 본 발명자들은 PTP σ -CSPG 상호작용의 ISP 조절이 LPC 주사 후 1일째 시작된 ISP (20 μ g/일, 피하) 또는 대조군 비히클로 처리된 어린 성체 C57BL6/J 마우스의 후주 백질 내로 LPC에 의해 유도된 급성 국소 탈수초화에서 유사한 효과를 갖는지 여부에 관해 의문을 갖게 되었다. ISP 처리 후, LPC-유도성 병변 부피는 LFB 미엘린 염색에 의해 제시된 바와 같이, 비히클 처리된 동물과 비교하였을 때, 병변 후 14일 및 21일째 (dp1) 유의적으로 감소되었다 (도 2a 및 2b). 도 2a-2g에 제시된 바와 같이, 비히클 처리된 동물의 평균 병변 부피는 7, 14 또는 21 dp1 후 각각 $1.508 \pm 0.069 \text{ mm}^3$, $1.035 \pm 0.06 \text{ mm}^3$ 및 $0.738 \pm 0.027 \text{ mm}^3$ 이었다. 그에 반해, ISP 처리된 동물은 7 dp1에 평균 $1.535 \pm 0.058 \text{ mm}^3$ 에서 14 dp1에 $0.613 \pm 0.043 \text{ mm}^3$ 로 감소된 병변 부피를 보였다 (도 2b). 21 dp1까지, 본 발명자들은 ISP 처리된 마우스에서 광범위한 병변 수복 및 감소된 병변 부피를 관찰하게 되었다 ($1.535 \pm 0.058 \text{ mm}^3$ 에서 $0.2 \pm 0.041 \text{ mm}^3$ 로 감소) (도 2b). 면역염색은 일관되게 14 및 21 dp1 후 비히클 처리된 마우스와 비교하였을 때, ISP 처리된 마우스의 LPC-병변에서 증가된 MBP 발현을 나타내었다 (도 2c). 정량적 웨스턴 블롯 분석 결과, 14 dp1에 ISP 처리 후 LPC-병변이 있는 동물에서 MBP의 발현이 증가된 것이 확인되었다 (도 2d). 마지막으로, 초미세구조 분석을 통해 대조군과 비교하였을 때, 14 dp1에 ISP 처리된 마우스에서 재수초화된 축삭의 개수를 확인하였다 (도 2e 및 2f). 상기 결과와 일관되게, ISP 처리된 마우스 및 비히클 처리된 마우스 사이의 G-비의 정량적 분석 결과, 14 dp1에 ISP 처리된 마우스에서 미엘린 초의 두께가 증가된 것으로 나타났다 (도 2g). 본 실험에서는 ISP 처리가 생체내에서 미엘린 수복 속도를 가속화시킨 것으로 나타났다.

[0214] ISP가 OPC, 및 후속하여 재수초화에 영향을 주는 능력을 더 잘 시각화하기 위해, 본 발명자들은 탈수초화를 유도하기 위해 17-18시간 동안 0.1% LPC로 처리된 생후 8-10일된 새끼로부터 유래된 수초화 마우스 소뇌 슬라이스 배양물의 잘 확립된 생체외 모델을 사용하였다. 본 발명자들은 MBP 및 신경필라멘트 (NF200) 공동국재화 (도 3a, Con)로 나타난 바와 같이, 나이브 슬라이스 배양물은 풍부한 수초화된 축삭을 발생시켰다는 것을 발견하게 되었다. 그러나, LPC 처리는 점상 모양 및 비조직화된 미엘린 생산과 함께 다량의 탈수초화를 유발하였다 (도 3a, 시험관내 1일 (div)). 8 div 후, 비히클과 비교하여 처리된 LPC 슬라이스에서 탈수초화된 표현형은 여전히

두드러지게 나타났고, 재수초화는 지연되었다 (도 3a, LPC+Veh, 8 div). 그에 반해, 8 div 동안 ISP로 처리된 LPC-탈수초화된 슬라이스는 비히클 처리와 비교하였을 때, 증가된 재수초화를 보였다 (도 3a, LPC+ISP, 8 div). 비록 LPC 처리 후 14 div까지 비히클 처리된 슬라이스에서는 MBP 발현 증가가 관찰되기는 하였지만, MBP 발현은 여전히 비조직화된 상태였고, 축삭과 잘 공동국재화되지 못했다 (도 3a, LPC+Veh, 14 div). 그러나, 14 div 동안의 ISP 처리 결과, 풍부한 재수초화된 축삭을 얻었고 (도 3a 및 3b, LPC+ISP, 14 div), 이는 웨스턴 블롯 분석 및 정량화로 확인할 수 있었다 (도 3c). 상기 슬라이스 배양물 실험을 통해 LPC 처리 후, ISP가 아마도 OPC에 직접, 또는 가능하게는 소교세포/대식세포에도 영향을 줌으로써 재수초화 속도를 증진시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

[0215] 흥미롭게도, 비록 아그레칸 발현이 4 div에는 ISP 군과 비히클 군 사이에 유사하였지만 (도 11a 및 11b), 상기 ISP에 의한 재수초화 속도 증진은 본 발명자들의 소뇌 슬라이스 배양물 중 8 div까지 아그레칸 존재 (Cat301) 감소와 상관관계를 보였다 (도 11a 및 11b). 14 div까지, 본 발명자들은 비록 ISP 처리된 슬라이스가 증진된 MBP 발현 및 더욱 큰 CSPG 감소를 보였지만, 상기 2개 군 모두에서 MBP 염색을 통한 동시 재수초화 및 감소된 CSPG 발현을 관찰하게 되었다.

[0216] CSPG가 ISP 처리에 의해 영향을 받는지 추가 조사하기 위해, 본 발명자들은 LPC-주사맞은 동물에서 MBP 및 CSPG에 대해 이중으로 면역염색하였다. 대조군 LPC-병변이 있는 동물은 14 dpI에 감소된 MBP 발현과 역의 상관관계를 보인, 상향조절된 수준의 GAG-CSPG (CS56) 및 아그레칸 (Cat301)을 보였다 (도 4b). 그에 반해, ISP 처리된 동물은 대조군과 비교하여 더욱 빠른 CSPG (CS56 및 Cat301) 감소 및 증진된 미엘린 발현을 보였다 (도 4b 및 4d). 미엘린 수복은 보통 LPC-병변이 있는 동물에서는 발생하지 않지만, CSPG 분해는 펩티드 처리 후 발생하는 것보다 훨씬 더 느리게 진행된다는 것을 아는 것이 중요하다 (도 3a 및 3b 보충). 따라서, 본 발명자들은 ISP 처리는 미엘린 수복을 증진시켰을 뿐만 아니라, 이는 시간 경과에 따라 더욱 빠르게 감소된 CSPG 발현과도 연관이 있다는 것을 발견하게 되었다.

[0217] LPC-주사맞은 동물에서, 베르시칸 면역염색은 반응성 성상세포 (GFAP⁺)가 관찰된 병변의 반응영부에서 가장 강력하게 나타났다 (도 4c). 이러한 CSPG 침착 패턴을 통해, 반응성 성상세포에 의한 증가된 베르시칸 분비라는 최근 보고된 관찰결과를 확인할 수 있었다. 본 발명자들은 또한 국소적으로 탈수초화된 LPC 병변에서 염증성 세포 및 성상세포를 조사하였고, ISP 처리 후 감소된 CSPG 발현의 기저가 되는 기전(들)에 관한 본 발명자들의 연구를 시작하기 위해 ISP 처리 시간을 변경하였다. LPC 주사 후 (1일 지연보다는) 즉시, 마우스는 7일 동안 ISP (20 μ g 일/마우스, 피하)를 받았다. 병변 중심점 염색 결과, 상기 초기 단계에서는 ISP 처리된 동물과 대조군 사이에 활성화된 소교세포 (Iba1), 반응성 성상세포 (GFAP), 또는 MBP 미엘린 단백질 발현 양에 있어서 변화는 없는 것으로 밝혀졌다 (도 4c 및 4d). 이는 LPC-유도성 손상 정도는 초기에는 ISP 및 대조군 사이에 유사하였다는 것을 제안한다. 또한, 아그레칸 염색은 Iba1⁺ 대식세포와 함께 공동국재화되었다 (도 4c). 그러나, CSPG 발현 (CS56, Cat301)은 ISP 처리 후 유의적으로 감소되었으며, 이는 ISP가 탈수초성 병변에서 증진된 CSPG 분해에 관여할 수 있다는 것을 제안한다.

[0218] ISP에 의한 CSPG 감소가 OPC 생존, 분화, 및 이동을 증진시킨다

[0219] ISP-유도성 CSPG 탈억제는 OPC 증식, 생존, 분화, 또는 이동을 조절함으로써 재수초화를 증진시킬 수 있다. 이러한 가능성을 구별하기 위해, 본 발명자들은 7 dpI에 LPC 병변에서 Olig2 및 Ki67 항체로 면역염색함으로써 증식성 OPC의 정량화를 시작하였다. 본 발명자들은 비히클 처리된 마우스와 비교하였을 때, ISP 처리된 마우스의 병변에서 Olig2⁺ OPC의 비율이 유의적으로 증가되었다는 것을 발견하였지만 (도 13a 및 13b), 두 군 사이에 Olig2⁺/Ki67⁺ 세포에서는 어떤 차이도 발견되지 않았다 (도 13b). ISP가 OPC 증식에 미치는 효과를 추가로 조사하기 위해, 본 발명자들은 저농도의 라미닌 (1 μ g/mL) 및 아그레칸 (2 μ g/mL)에 대해 2 div 동안 배양된 OPC를 펩티드 처리하였고, 처리군과 대조군 사이에 증식 속도에 있어서 어떤 유의적인 차이도 발견하지 못했다 (도 13c 및 13d). OPC의 아포토시스가 CSPG에 의해 영향을 받았는지 여부를 조사하기 위해, 본 발명자들은 저농도의 라미닌 및 아그레칸에서도 또한 배양된 OPC의 TUNEL 염색을 수행하였고, ISP 처리가 아포토시스성 세포의 비율을 감소시켰다는 것을 발견하게 되었다 (도 13e 및 13f). 유사하게 배양된 OPC를 LPC (1 μ g/mL, 2시간)로 챌린지하였을 때, ISP는 또한 OPC 사멸을 감소시켰다 (도 13e 및 13f).

[0220] ISP 처리가 OPC 분화에 미치는 효과를 조사하기 위해, 본 발명자들은 ISP로 처리된 두 EAE 동물 모두에서 (41 dpI) 및 LPC-주사맞은 동물에서 (14 dpI) 분화된 CC1⁺ 올리고덴드로사이트의 개수를 정량화하였다. 대조군과

비교하여 ISP 처리된 마우스의 병변에서 $CC1^{+}$ 올리고덴드로사이트의 비율은 유의적으로 증진되어 있었다 (도 14a-14d). ISP-증진된 OPC 성숙화는 또한 아그레칸 및 라미닌 미리 코팅된 커버슬립 상에서 배양된 면역정제된 OPC (P1-2 WT 마우스)를 이용함으로써 시험관내에서 확인할 수 있었다. 조기의 OPC ($O4^{+}$) 및 성숙한 OL (MBP $^{+}$) 면역염색 결과, 비-CSPG 대조군 기관 상에서 배양된 OPC와 비교하였을 때, CSPG 상에서 성장된 $O4^{-}$ 및 MBP-발현 세포의 돌기 길이의 감소를 통해 관찰된 바와 같이, CSPG가 OPC의 진행성 성숙화를 감소시킨 것으로 나타났다 (도 14e 및 14f). (ISP 처리하에 또는 ISP 처리하지 않고, CSPG 상에서 성장된 세포의 MBP $^{+}$ 포트프린트를 분석함으로써 정량화된 바) CSPG 상에서 성장된 OPC의 돌기 성장은 ISP 처리로 크게 구조되었다 (도 14e 및 14g). 상기 관찰결과는 ISP가 탈수초화된 병변에서 OPC의 증식 대신, 생존 및 분화를 증진시킬 수 있다는 것으로 나타났다.

[0221] ISP는 또한 OPC의 병변 부위로의 이동을 촉진시킬 수 있고, 상기 병변 부위에서 OPC는 생존할 수 있고, 이어서, 그의 수초화된 형태로 분화될 수 있다. OPC 이동에 미치는 CSPG/수용체 효과를 조사하기 위해, 본 발명자들은 신경교 반흔에서 발견된 CSPG의 억제성 구매 분포의 잠재적 시험관내 모델로서 앞서 사용되었던 본 발명자들의 CSPG 구매 스폿 검정법 상에서 배양된 P2 WT 새끼로부터 유래된 척수 이식편을 사용하였다. 이식편으로부터 유래된 ISP 처리된 조기 (PDGFR α^{+}) 및 조숙한 ($O4^{+}$) OPC는 구매 스폿의 CSPG가 강화된 외측 테두리를 통과할 수 있다. 대조군 이식편에서, 상기 억제성 영역을 통과하여 이동할 수 있는 세포는 거의 없었다 (도 5a-5c). 따라서, CSPG 관련 아포토시스 및 성숙화 결함을 완화시키는 것 이외에도, ISP는 또한 OPC의 병변 부위로의 이동을 촉진시킬 수 있고, 상기 병변 부위에서 OPC는 생존할 수 있고, 이어서, 그의 성숙한 수초화된 형태로 분화될 수 있다. 슬라이스 배양물 (도 11a 및 11b) 및 MS의 생체내 모델 (도 4a-4d), 둘 모두에서, ISP 처리 후 CSPG가 감소되었다는 것과 함께 종합하여 본 관찰결과를 통해 본 발명자들은 ISP를 통해 PTP σ 를 표적화하는 것이 내인성 프로테아제의 분비 또는 활성화 증가를 유도할 수 있다는 가설을 세우게 되었다.

[0222] ISP 처리는 CSPG의 프로테아제-의존성 효소적 분해를 증진시킨다.

[0223] ISP 처리된 생체의 및 생체내 탈수초화 모델에서 CSPG 발현이 감소되었다는 관찰결과 이외에도, 본 발명자들은 ISP 처리된 PDGFR α^{+} OPC가 가능하게는 분해된 GAG-CSPG 부위로서, 본 발명자들의 스폿 검정법의 아그레칸 테두리로 침윤된 부위의 "음영부"를 벗어났다는 것을 알게 되었다 (도 5d, 화살표 표시). 전체 외측 프로테오글리칸 테두리 또한 ISP 존재하에서 직경이 감소되었다 (도 5d, 테두리 폭과 비교). 우선 프로테아제 활성이 발생하였는지 여부의 조사를 시작으로, 본 발명자들은 추정 아그레칸 분해를 더욱 잘 특징화하기 위해 본 발명자들의 스폿 검정법으로 다시 돌아갔다. 비히클, ISP, 또는 SISP (스크램블된 ISP)로 처리된 면역정제된 OPC로부터 조정 배지 (CM)를 수집하고, 새로 제조된 스폿 상에 플레이팅하였다. ISP 처리된 OPC CM은 비히클 또는 스크램블된 펩티드 대조군 뿐만 아니라, 세포 부재 대조군과 비교하였을 때, CS56 발현을 유의적으로 감소시켰다 (도 16a-16c). 흥미롭게도, 면역염색에 의해 시각화된 바와 같이, 스폿의 라미닌 부분은 완전히 보존되었다 (도 16d 및 16e). 본 발명자들은 또한 비히클, ISP, 또는 SISP 존재로 처리된 OPC로부터 수집된, 아그레칸 (20 μ g/mL) 및 라미닌 (10 μ g/mL)과 함께 인큐베이션된 OPC CM의 웨스턴 블롯 분석 결과를 사용하여 상기 결과를 확인할 수 있었다 (도 5e-5g).

[0224] OPC 프로테아제 활성의 ISP 유도를 독립적으로 특징화하기 위해, 본 발명자들은 소광된 카세인 형광계 기반한 일반 효소 활성 검정법 (EnzChek 키트)을 수행하였고, 실제로, OPC의 ISP 처리가 비히클 및 SISP 대조군과 비교하였을 때, 프로테아제 활성 (형광 A.U.)을 증가시켰다는 것을 발견하게 되었다 (도 5h 및 5i). 추가로, ISP는 아그레칸과 함께 인큐베이션된 OPC CM의 ISP 처리의 웨스턴 블롯 분석을 통해 시각화된 바와 같이, 용량에 의존하는 방식으로 아그레칸 분해를 증가시켰다 (도 16g 및 16h).

[0225] ISP는 프로테아제 활성, 및 특히, MMP-2 분비를 증가시켜 OPC 이동 및 재수초화를 증진시킨다

[0226] 우선 ISP가 어떤 중요한 프로테아제를 조절할 수 있는지를 확인하기 위해, 본 발명자들은 비히클 또는 ISP 처리된 OPC CM을 프로테아제 어레이 블롯과 함께 인큐베이션시켰다. 본 발명자들은 ISP 처리군에서 (만약 충분한 양으로 생산되었다면) 잠재적으로 CSPG를 분해할 수 있는, 여러 부류의 프로테아제에 속하는 각종 효소 (예컨대, ADAMTS, 칼리크레인, 카텝신, MMP)에 대한 신호가 증가되었다는 것을 발견하게 되었다 (도 15). 흥미롭게도, 3개의 라미닌 분해 프로테아제, 예컨대, 카텝신 L 및 V 및 MMP-10이 감소되었고, 이는 PTP σ 조정과 연관된 효소 캐스케이드 조절에서 어느 정도의 특이성을 제안하는 것이다. 이러한 결과는 본 발명자들이 본 발명자들의 ISP 처리된 시험관내 검정법에서 변함없는 라미닌 발현을 관찰하게 된 이유를 설명하는 데 도움을 줄 수

있다 (도 5e, 5g, 16d, 및 16e). 본 발명자들의 프로테아제 어레이로부터의 결과를 확인하기 위해, 본 발명자들은 ISP 처리된 OPC CM 또는 대조군 처리된 OPC CM 중에서 MMP-2, 9, 및 카텝신 B를 비롯한 다종의 상향조절된 프로테아제의 웨스턴 블롯 분석을 수행하였고, MMP-2가 쉽게 검출될 수 있었고, ISP 처리 후 뚜렷이 증진된 것을 발견하게 되었다 (도 6c 및 6D). 배양된 OPC 염색 결과, MMP-2는 그의 돌기 내 $O4^+$ OPC에서 발현되고, 펩티드 처리 후 강화된 것으로 보이는 것으로 나타났다 (도 6h).

[0227] OPC CM-유래 MMP-2 활성이 ISP 처리에 의해 증진되는지 확인하기 위해, 본 발명자들은 젤라틴 자이모그래피를 수행하였고, MMP-2 젤라틴-분해 활성이 ISP 처리시 대조군과 비교하여 유의적으로 증가되었다는 것을 발견하게 되었다 (도 6a 및 6b). MMP-9 활성은 젤라틴 자이모그래피에 의해서는 거의 관찰되지 않았고 (도 6a), 웨스턴 블롯 분석에 의해서는 검출되지 않았다 (데이터는 제시되지 않음). 본 발명자들은 또한 피브로넥틴, 라미닌, 및 엘라스틴을 분해하는 프로테아제인 MMP-10에 대해 블롯팅하였고, 이는 MMP-2보다 훨씬 더 낮은 양으로 분비된다는 것을 발견하게 되었다 (도 6c). 비히클, ISP, 및 SISP 처리된 OPC 배양물은 동일한 낮은 양으로 MMP-10을 분비하는 것으로 보였으며 (도 6c 및 6e), 이는 ISP에 의해 증진된 MMP-2 분비는 PTP σ 조절에 특이적인 것일 수 있음을 제안하는 것이다. ISP 처리된 OPC CM 이외에도, OPC 용해물 또한 웨스턴 블롯으로 분석하였고, GAPDH 로딩 대조군에 대해 정규화된 MMP-2 발현은 감소된 것으로 나타났으며, 이는 MMP-2 분비가 ISP에 의해 증진될 수 있다는 것을 제안한다 (도 6f). 이를 시험하기 위해, 본 발명자들은 ISP와 함께, 엑소사이토시스 억제제, Exo1 (10 $\mu\text{g/mL}$)로 처리된 OPC CM과 아그레칸을 인큐베이션시켰다. 충분한 농도일 때, Exo1은 Arf GTPase의 그의 억제제를 통해 엑소사이토시스를 가역적으로 억제시키는 것으로 관찰되었다. 본 발명자들은 Exo1이 아그레칸 GAG 분해를 부분적으로는 구조하였다는 것을 발견하게 되었다 (도 6i 및 도 6j). 본 발명자들은 또한 ISP와 함께 광범위한 MMP 억제제, GM6001 (25 μM), 및 특이적 MMP-2 억제제 (OA-Hy, 칼바이오킴, 100 nM)을 이용하여 동일한 실험을 수행하였고, GAG 분해가 두 경우 모두에서 부분적으로 구조되었다는 것을 발견하게 되었고, 이는 ISP-유도성 CSPG 분해가 메탈로프로테아제 패밀리 및 MMP-2에 의해 주로 매우 잘 자행될 수 있다는 것을 시사하는 것이다 (도 6i 및 6j). GM6001 및 MMP-2 억제제는 추가로 CS56 스폿 분해를 구조하였다 (도 17a-17d).

[0228] 본 발명자들은 MMP 억제제가 CSPG 테두리를 가로지르는 OPC 이동을 감소시키는지 여부를 시험하기 위해 스폿 검정법으로 다시 돌아왔다. OPC를 GM6001 (25 μM) 및 특이적 MMP-2 억제제 (OA-Hy, 100 nM)로 처리하였을 때, 심지어 ISP의 존재하에서 OPC의 CSPG가 풍부한 부위의 진입은 효과적으로 정지되었다 (도 7a 및 7b). 이는 ISP-유도된 OPC 이동 증진은 MMP에 의존할 수 있다는 것을 제안한다. 마지막으로, 재수초화에 대한 MMP의 기능적 필요성을 시험하기 위해, 본 발명자들은 ISP와 함께 GM6001 또는 특이적 MMP-2 억제제로 LPC-탈수초화된 소뇌 슬라이스를 처리하였다. 실제로, MBP 및 신경필라멘트⁺ 축삭의 공동국재화는 ISP의 존재에도 불구하고, GM6001 및 MMP-2 억제제 처리에 따라 감소되었다 (도 7c 및 7d). 추가로, TUNEL 염색을 통해 사정된 바, 저농도의 아그레칸 및 라미닌 상에서 배양된 LPC-젤라틴화된 (1 $\mu\text{g/mL}$, 2시간) OPC에서 MMP-2의 2 div 억제는 ISP의 생존 촉진 효과를 제거하였다 (도 17e). 그러나, MMP-2 억제제는 아그레칸/라미닌 단독일 때, 비히클 대조군과 비교하여 아포토시스를 증가시키는 것으로 보이지 않았다 (도 17e). MMP-2의 특이적인 억제제는 저농도의 아그레칸/라미닌 상에서 성장된 성숙한 올리고덴드로사이트의 MBP 풋프린트의 획득을 무효화시켰다 (도 17f 및 17g).

[0229] 재수초화를 증진시키는 데 있어서 ISP 처리 후 MMP-2 활성의 필요성을 추가로 설명하기 위해, 본 발명자들은 렌티바이러스 입자-전달된 shRNA 구축물을 사용하였다. 본 발명자들은 먼저 렌티바이러스 전달 뿐만 아니라, 48 시간 감염된 OPC 배양물 중 넉 다운 MMP-2에 대한 웨스턴 분석을 사용하여 상기 shRNA 접근법을 입증하였다 (도 18a). MMP-2의 shRNA 넉 다운은 ISP 처리에도 불구하고, 시험관내에서 아그레칸 상에서 배양된 OL의 연장된 MBP⁺ 돌기의 부위를 감소시킬 수 있고 (도 18b 및 18c), 높은 아그레칸 장벽을 통과하여 이동할 수 있는 OPC의 능력을 감소시킬 수 있다 (도 18d 및 18e). 예상대로, MMP-2의 shRNA 넉 다운은 또한 소뇌 슬라이스 배양물에서 ISP-유도성 재수초화를 약화시켰다 (도 7e 및 7f).

[0230] 이어서, 본 발명자들은 면역조직화화법을 이용하여 생체내 MMP-2 발현을 특징화하였고, 나이브 척수의 후주는 일부 MMP-2 단백질질을 기준선으로 발현한 반면, 동일한 부위로 LPC를 주사하였을 때, 14 dp1 MMP-2 발현이 다수 증가된 것으로 나타났다 (도 8a 및 8b). 그러나, ISP 처리는 LPC-주사받은 부위에서 MMP-2 발현을 현저히 증진시켰고, 이는 또한 이환된 척수 부위의 웨스턴 블롯 분석으로 확인되었다 (도 8c). ISP 처리된 LPC 탈수초화된 척수의 면역염색 결과, MMP-2가 Olig2-확인된 OPC (도 8d) 뿐만 아니라, Iba1-표지된 면역 세포 (도 8e)와 공동국재화된 것으로 나타났다. ISP-증진된 재수초화에서 MMP-2 활성의 필요성을 추가로 조사하기 위해, 본 발명자들은 LPC 모델로 다시 돌아갔고, MMP-2 억제제 (OA-Hy), 또는 렌티바이러스 입자로 전달된 MMP-2를 표적화하는

shRNA 구축물을 이용하여 18 dpI에 미엘린 염색 후 병변 부피를 분석하였다 (도 8f 및 8g). 흥미롭게도, MMP-2의 약리학적 억제제는 비히클 비하여 병변 부피를 증가시켰고, 이는 MMP-2의 기준선 수준이 상기 모델에서 저속 재수초화를 촉진시킬 수 있다는 것을 제안한다. MMP-2 약리학적 억제 또는 MMP-2 shRNA-매개 턴 다운 부가는, 동반된 CS56 면역 반응성 증가 (도 19a 및 19b), 및 병변 중심점에서의 Olig2⁺ OPC의 축적 감소 (도 19c 및 19d)와 상관관계가 있는 ISP의 증진된 재수초화 효과를 약화시켰다. 종합해 보면, 상기 결과는 OPC 뿐만 아니라, 가능하게는 소교세포에 의한 PTP σ -조절된 MMP-2 분비는 국소 탈수초성 손상 후, 높은 CSPG 침착에도 불구하고, 그가 이동할 수 있도록 지원하는 데, 및 재수초화할 수 있는 능력을 지원하는 데 있어 중요하다는 것을 시사한다.

[0231] 논의

[0232] 본 발명자들은 병변 연관 반흔 형성 동안 프로테오글리칸 침착이 OPC 이동, 분화, 및 재수초화를 강력하게 억제시킨 다양한 MS 모델에서의 OPC 항상성 회복에서 CSPG 수용체 PTP σ 의 조정 후, 그에 대한 중요한 역할을 입증하였다. 본원에서 기술된 바와 같이, 전신으로 전달된 펩티드를 이용하는 PTP σ 표적화는 LPC-유도성 병변에서, 미엘린 수복 속도를 증진시키고, 만성 탈수초성 EAE 이후, 강건한 미엘린 재생 및 기능 회복을 자극시킨다. 상기 데이터는 PTP σ 조정과 변경된 면역 분극화 및 증진된 프로테아제 활성 사이의 새로운 연관성을 제시한다. 이는 CNS 탈수초성 질환 이후의 CSPG가 중요한 역할을 강조하며, CSPG 매개 억제를 완화시키기 위해 신경축 전역에 걸쳐 광범위하게 MS 병변을 표적화할 수 있는 전략법을 확인시켜 준다.

[0233] 세포가 CSPG 억제를 극복할 수 있도록 하는 수용체 PTP σ 의 펩티드 조정 이후의 하류 기전은 크게 알려진 바 없다. 프로테아제 활성은 전사, 번역, 분비, 국제화, 활성화, 및 제한받지 않는, 잠재적으로는 손상시키는 활성을 막는 억제를 비롯한 여러 수준으로 아주 많이 조절된다. 제한되지 않는 상태 그대로 유지되면, 프로테아제는 다양하게 단백질을 분해시킬 수 있고, 잠재적으로는 다양한 CNS 손상 이후의 "프로테아제 급발증"에서 관찰되는 것과 같은 치참한 결과가 초래될 수 있다. MS의 재발 단계에서, 광범성 염증 및 미엘린 퇴행과 연관된 비특이적인 프로테아제 상향 조절은 특징이 잘 규명되어 있다. 그러나, 손상 후 조직 수복을 촉진시키는 미세 조절된 프로테아제 분비의 유익한 효과는 더욱 인정받고 있다. 여기서, 본 발명자들은 PTP σ 조정과, MS 유사 병변을 둘러싼 CSPG 함유 탈수초화된 플라크를 통해 그의 분해에서 도움이 되는, OPC에 의한 MMP-2 프로테아제 활성 증진을 연관시키는 새로운 관찰결과를 제시한다. 시험관내, 생체외, 및 생체내 검정법을 통해, 본 발명자들은 OPC 이동 뿐만 아니라, 개선된 OPC 생존, 성숙화, 및 재수초화를 위해서는 PTP σ 조정을 통한 MMP-2 활성이 필요하다는 것을 (부분적으로) 확인하게 되었다. MMP-2 상향조절은 줄기 세포가 신경교 반흔의 CSPG-함유 영역을 침범하고, 배양물 중 슈반 세포에 의한 말초 축삭의 재수초화를 개선시킬 수 있게 한다고 앞서 확인되었다. 본 발명자들은 ISP 처리시 라미닌 보존 및 동반하여 CSPG 분해가 일어난 것을 관찰하게 되었고, 이는 OPC가 CSPG-조밀한 탈수초화된 병변 내로 침윤될 수 있고, 그 부위에서 생존할 수 있게 하는 한 기전일 수 있다. 이는 조절된 CSPG 분해를 촉진시키기 위하여 PTP σ 를 통해 OPC, 및 가능하게는 면역 세포에 의한 프로테아제의 정확한 조절을 강조한다.

[0234] 추가로, 본 발명자들은 CSPG 로드 뿐만 아니라, 파괴적 M1 대식세포 표현형 마커 iNOS의 감소 및 M2 연관 아르기나제-1의 증가를 관찰한, 본 발명자들의 연구를 통해 펩티드 처리된 MS의 EAE 모델에서 대식세포의 상기 조절을 확인할 수 있었다.

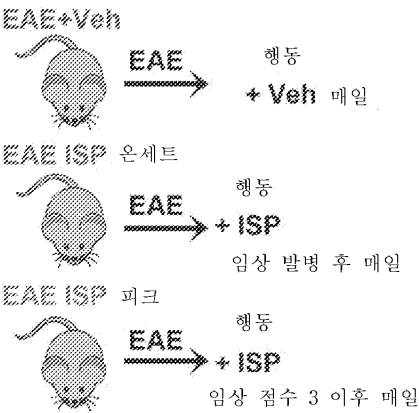
[0235] 본 발명자들의 연구는 ISP가 소교세포 포식작용 능력을 현저히 증진시킬 수 있다는 것을 제안한다. CSPG의 동족 수용체를 조정함으로써, OPC 및 소교세포는 억제성 CSPG 및 다른 세포 잔류물을 더욱 신속하게 제거하기 위해 함께 작용할 수 있다. 따라서, M2 상태로 염증유발성 환경을 변경하고, 선택성 세포에 의해 국소 프로테아제 활성을 유도하는 데 있어서, ISP는 추가의 CSPG 탈억제를 제공하고, 결국에는 미엘린 재생으로 이어질 수 있다.

[0236] 본 개시내용은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되지만, 실시예가 청구범위의 범주를 제한하고자 하는 것은 아니다.

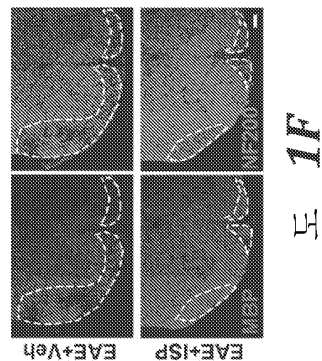
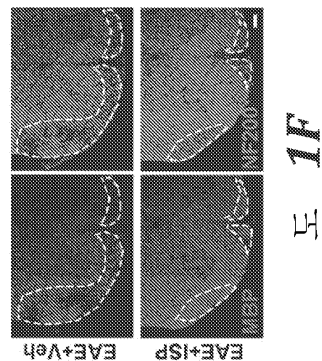
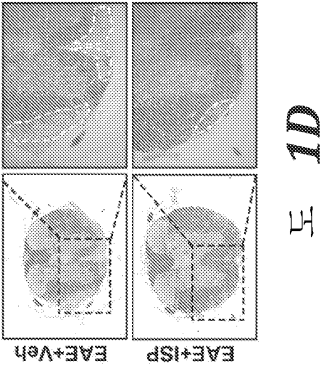
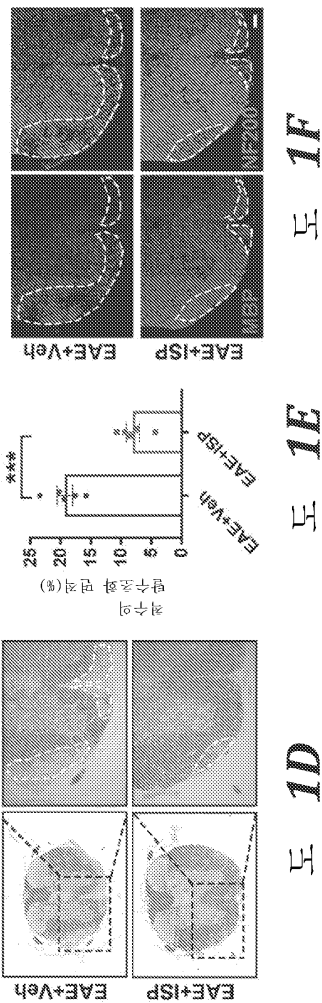
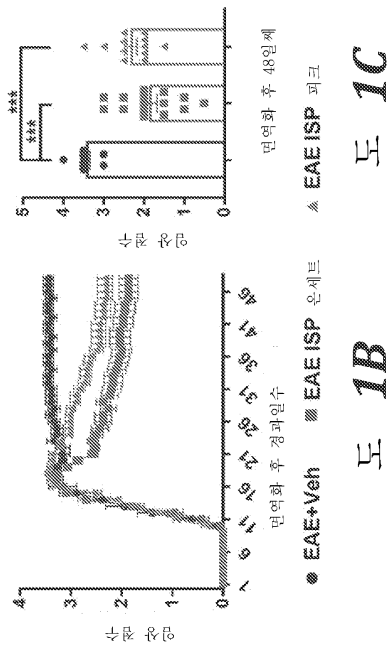
[0237] 본 발명은 그의 바람직한 실시양태를 참조로 하여 특별히 제시되고 기술되었지만, 첨부된 청구범위에 의해 포함되는 본 발명의 범주로부터 벗어남 없이 그 안에서 다양한 형태로 및 세부적으로 변형될 수 있음을 당업자는 이해할 것이다. 상기 명세서에서 인용된 모든 특허, 공개문헌 및 참고문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

도면

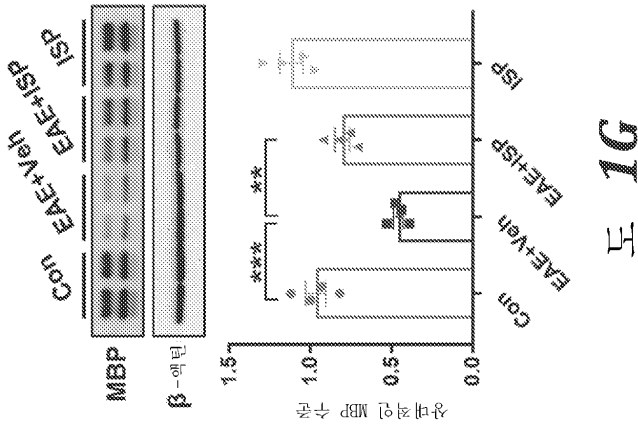
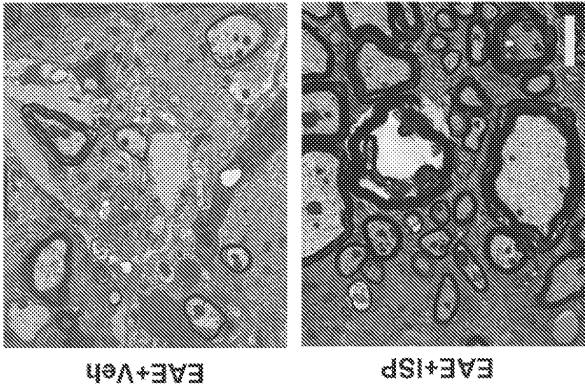
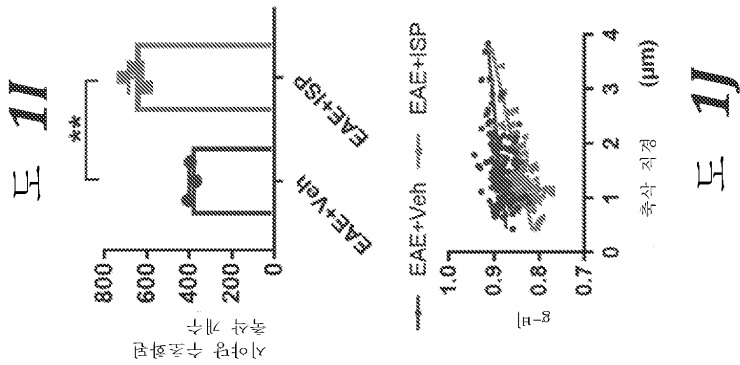
도면1a



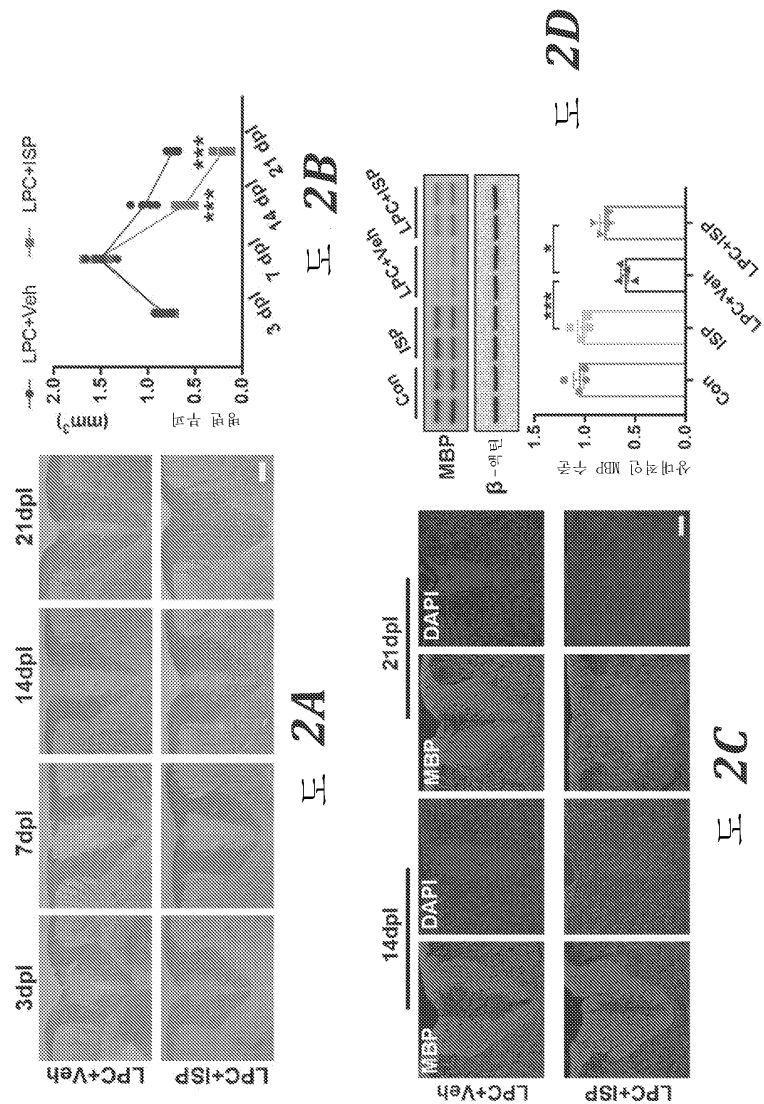
도면1bf



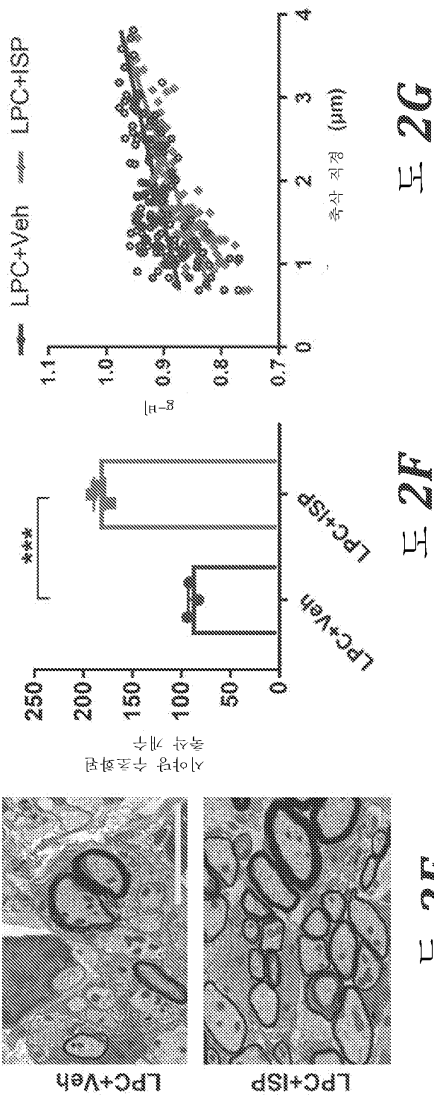
도면1gj



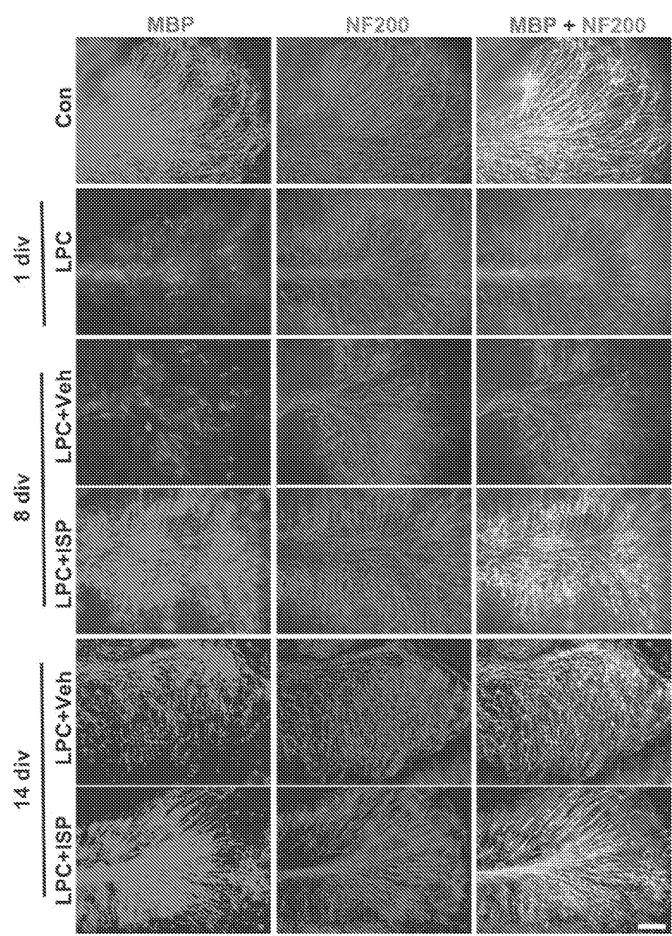
도면2ad



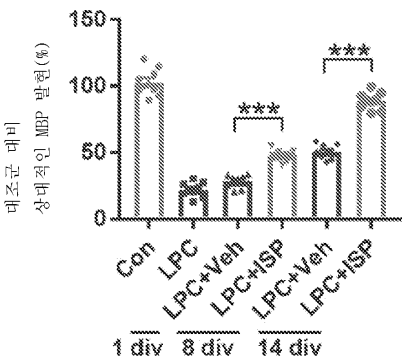
도면2eg



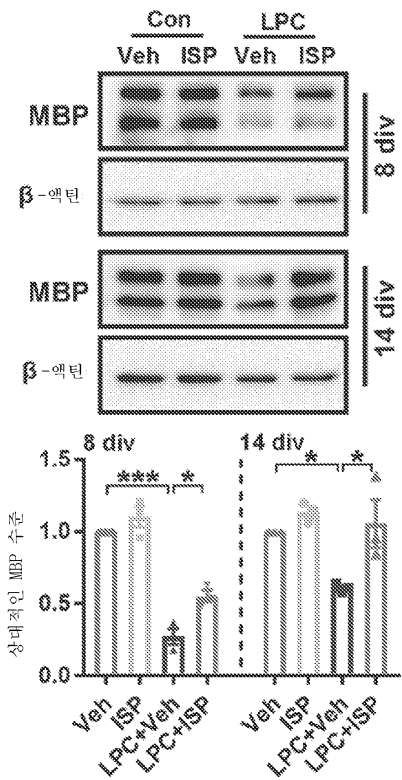
도면3a



도면3bc

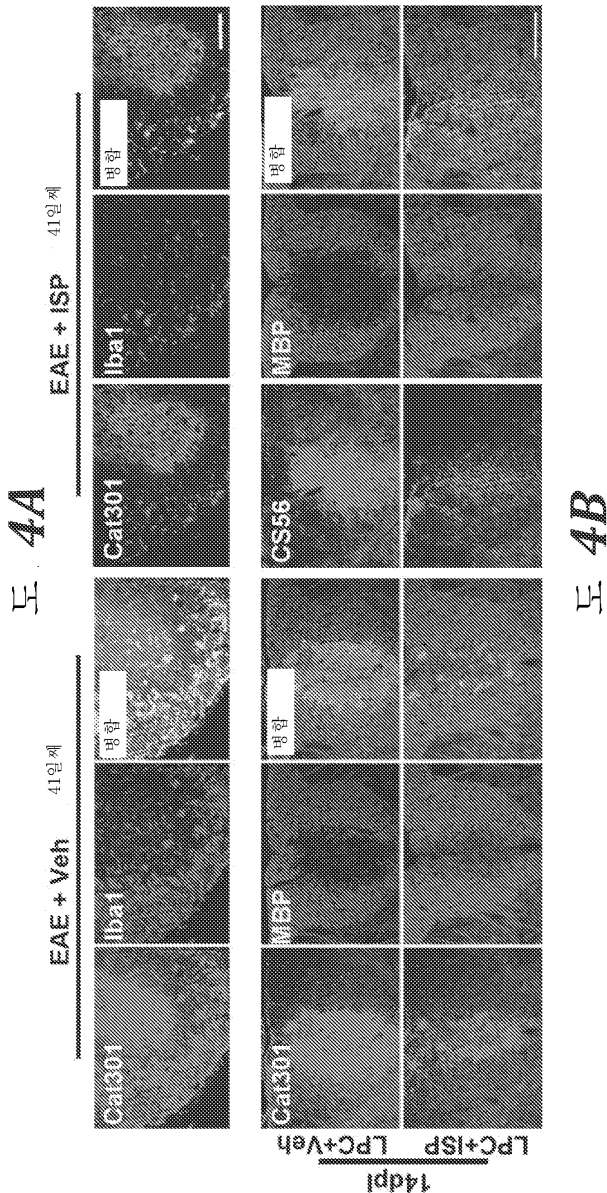


도 3B

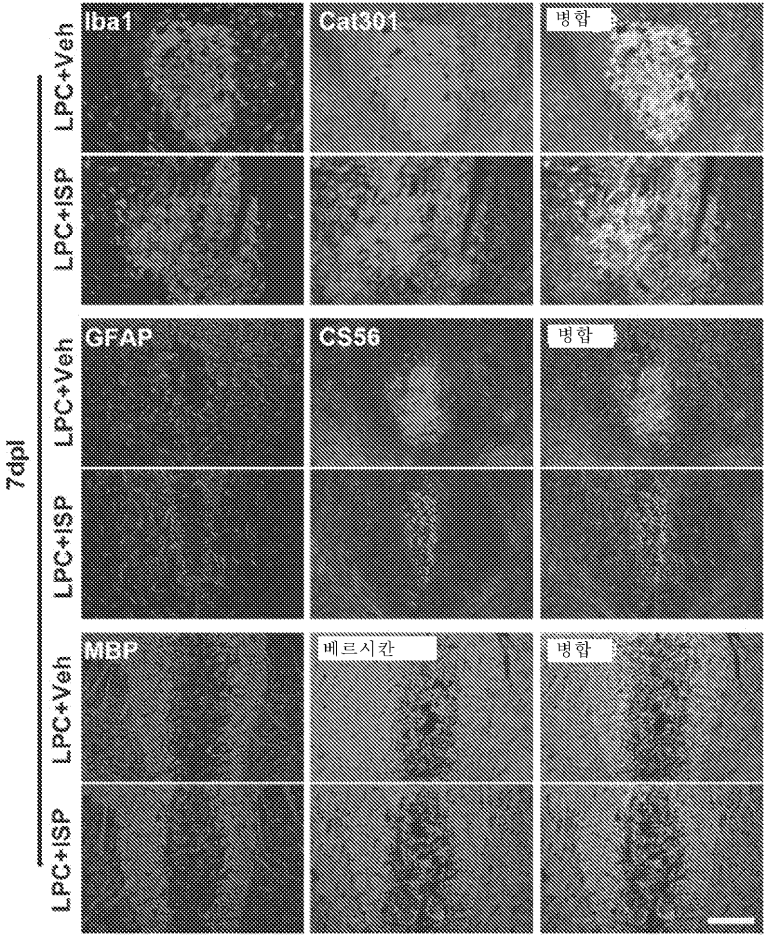


도 3C

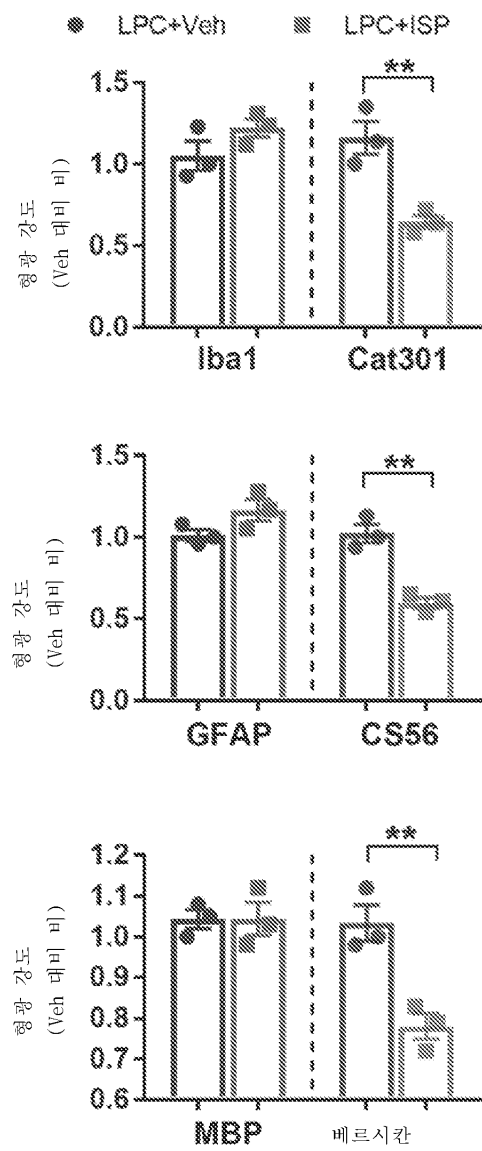
도면4ab



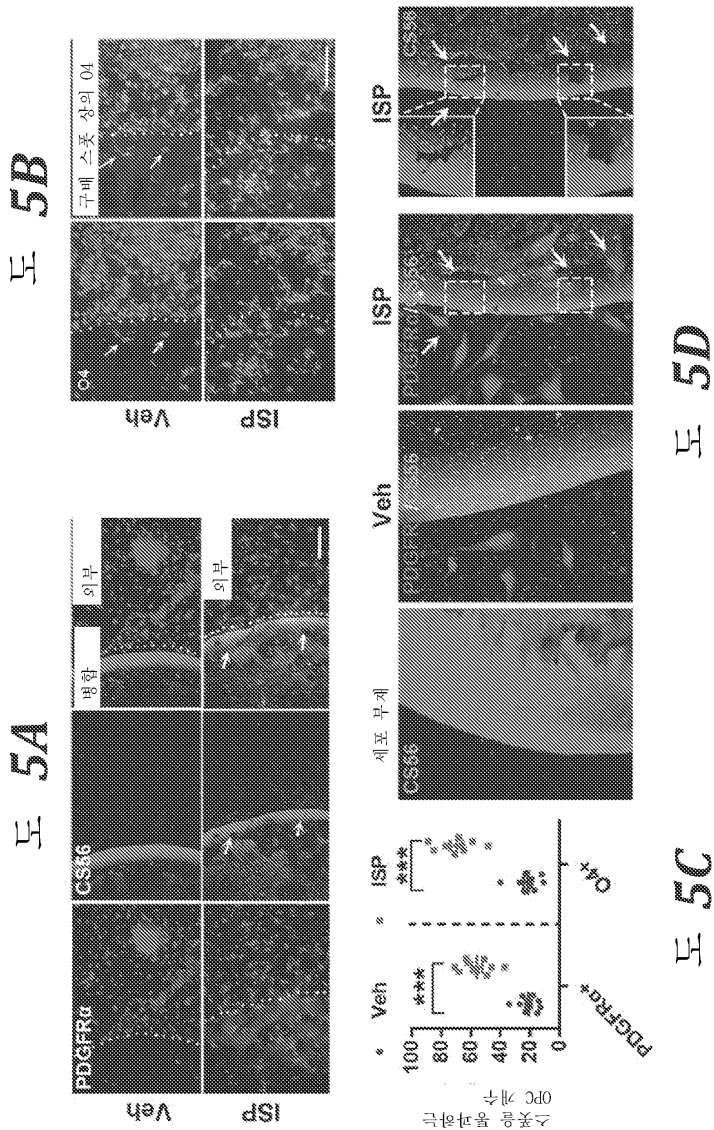
도면4c



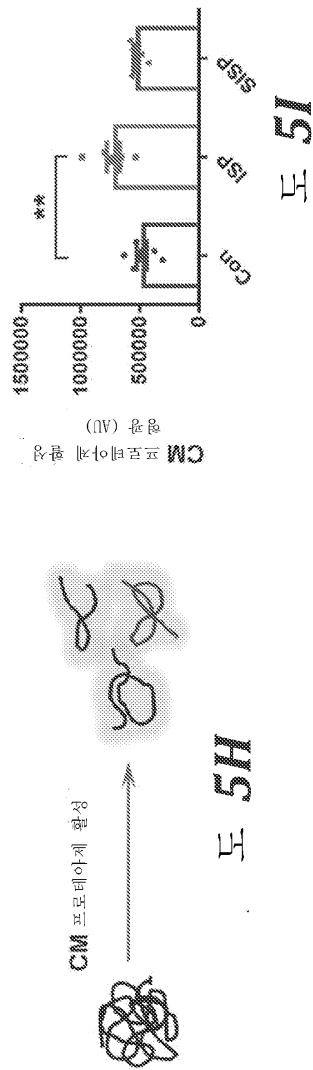
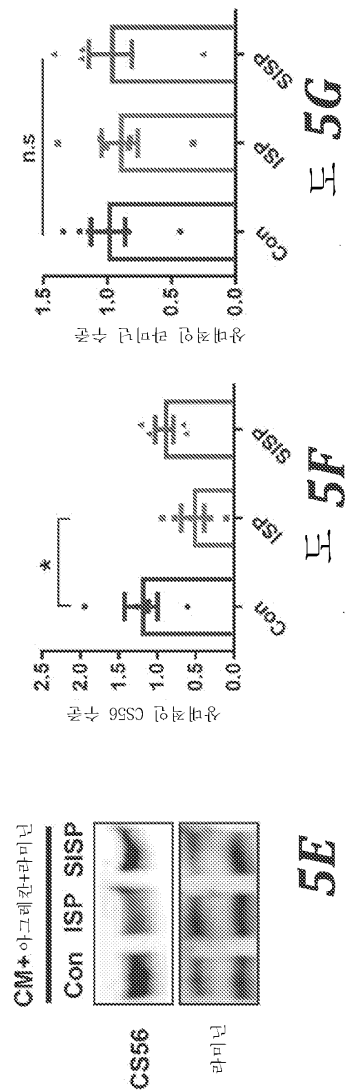
도면4d



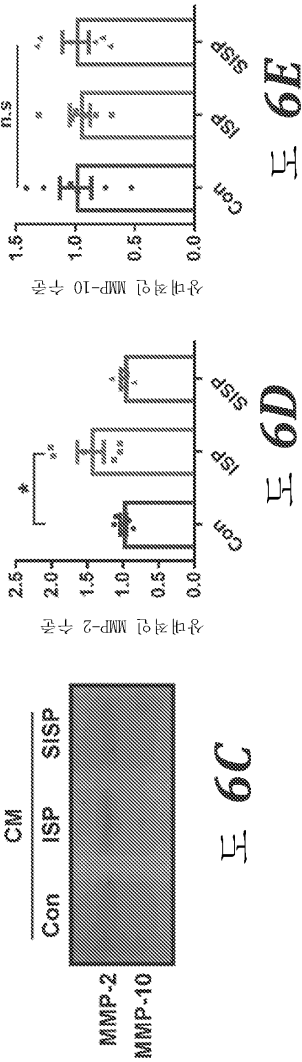
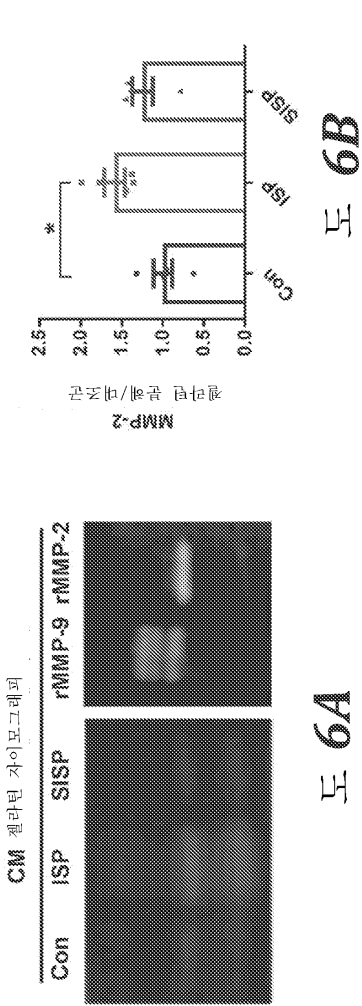
도면5ad



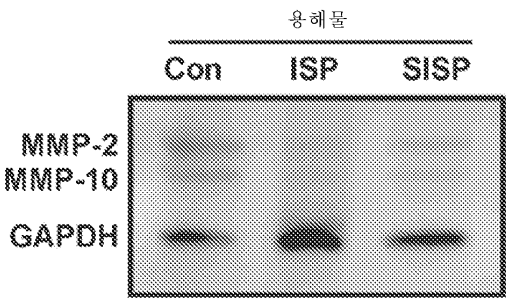
도면5e



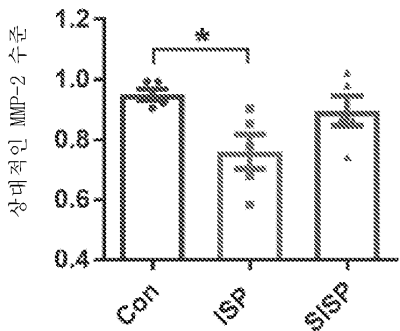
도면6ae



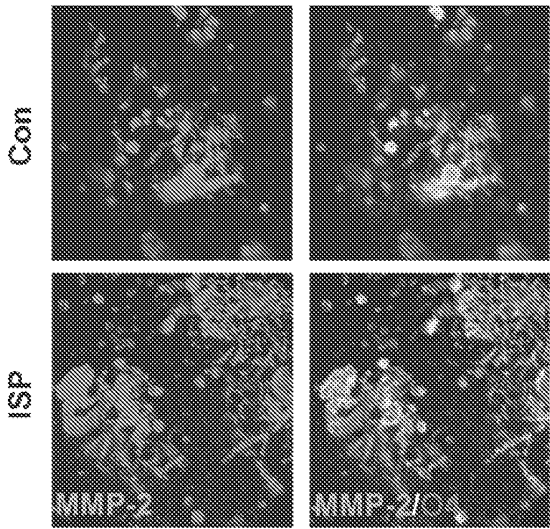
도면6f



도 6F

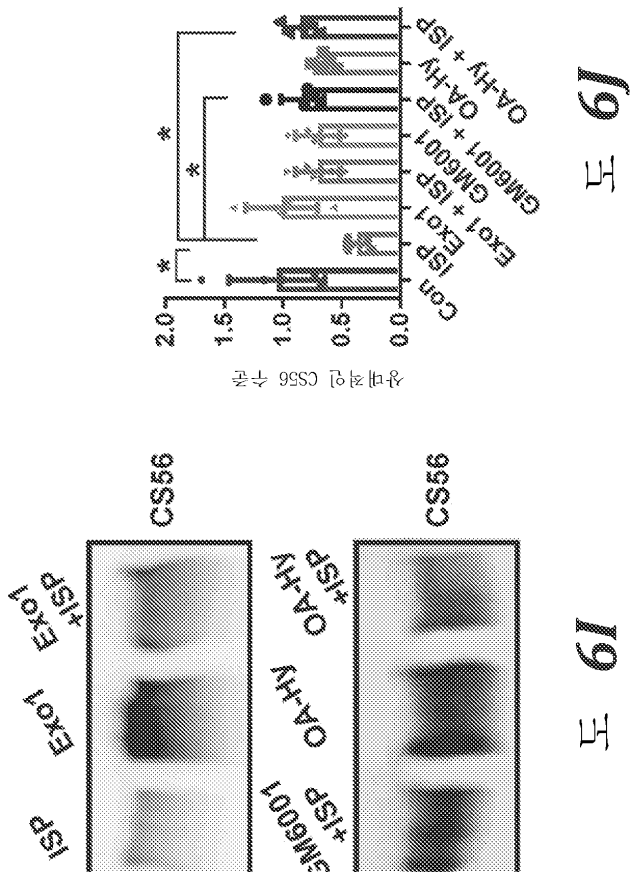


도 6G

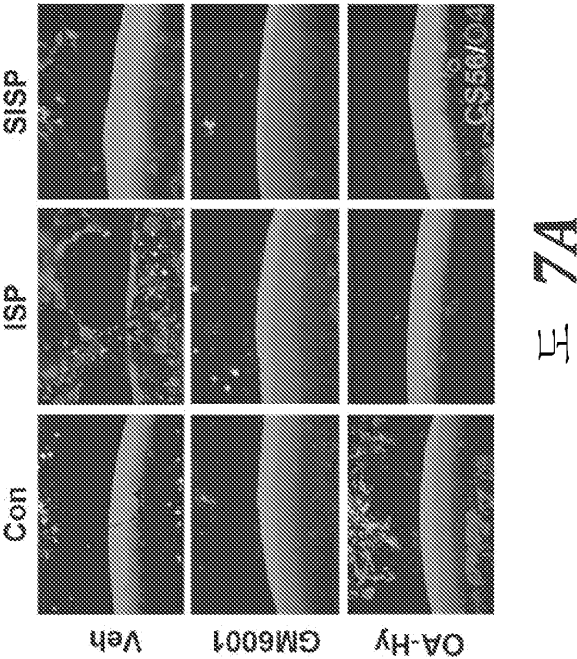
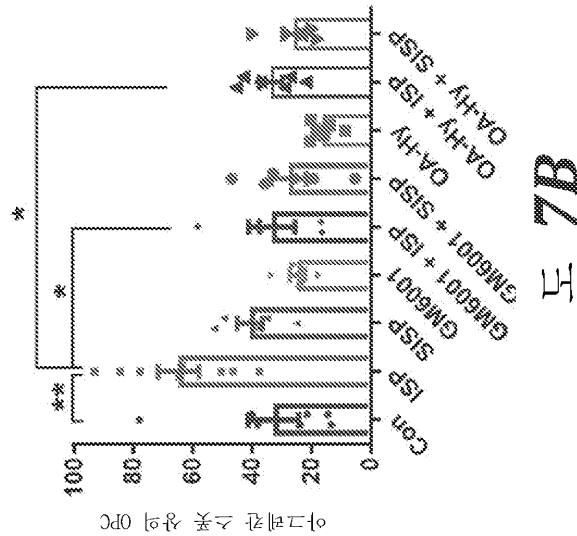


도 6H

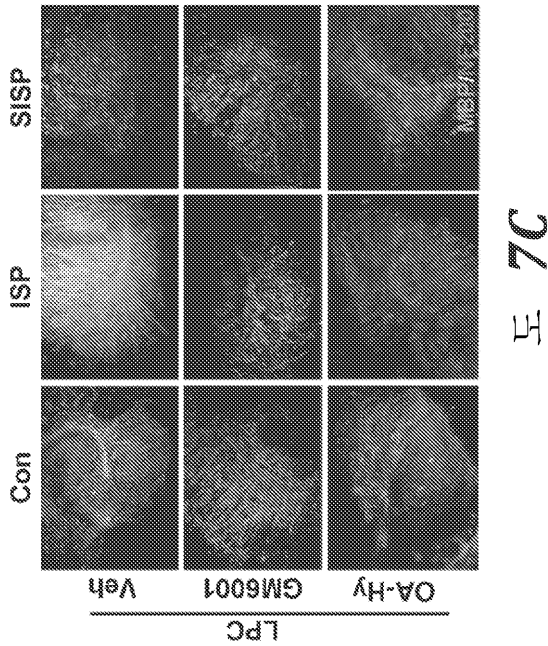
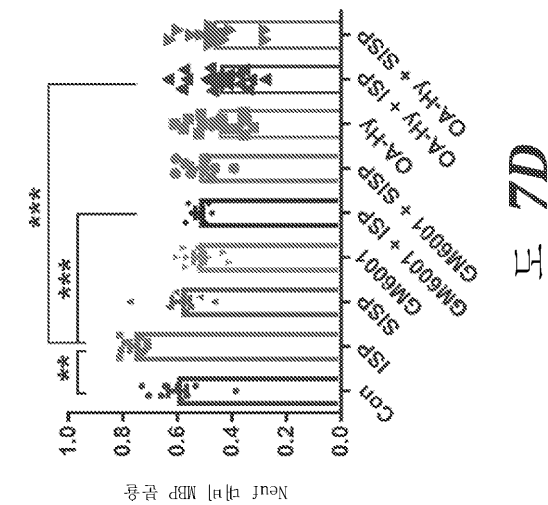
도면6ij



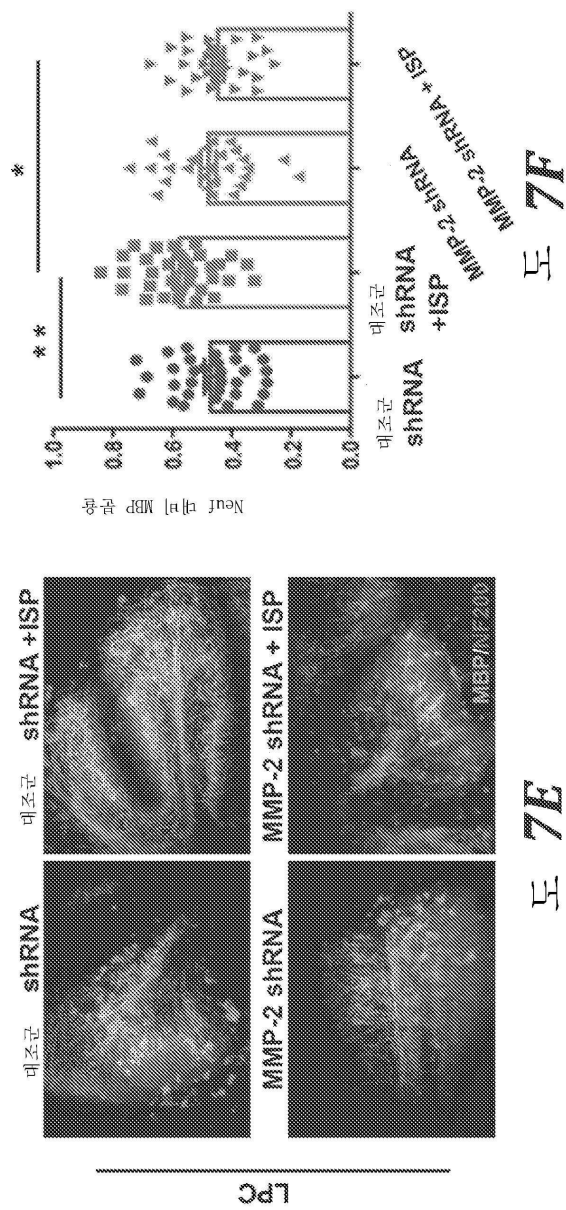
도면7ab



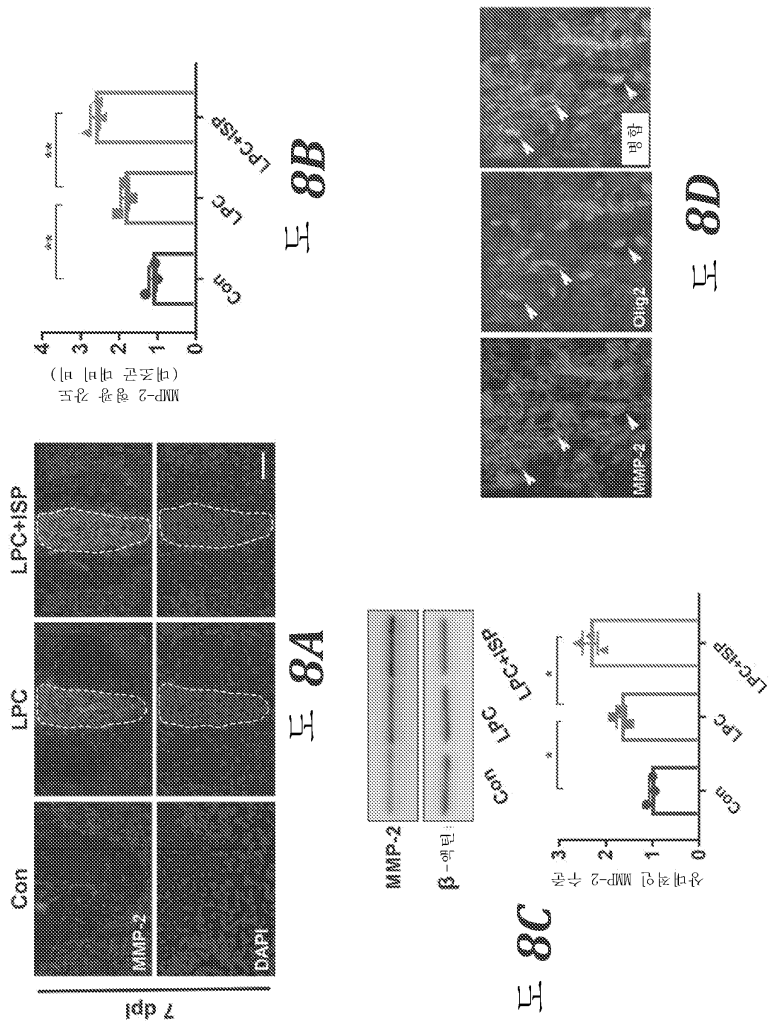
도면7cd



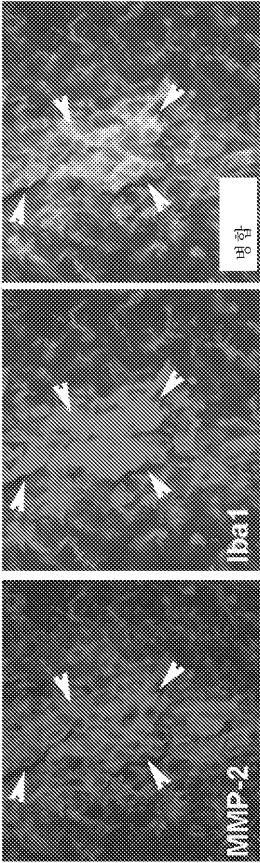
도면7ef



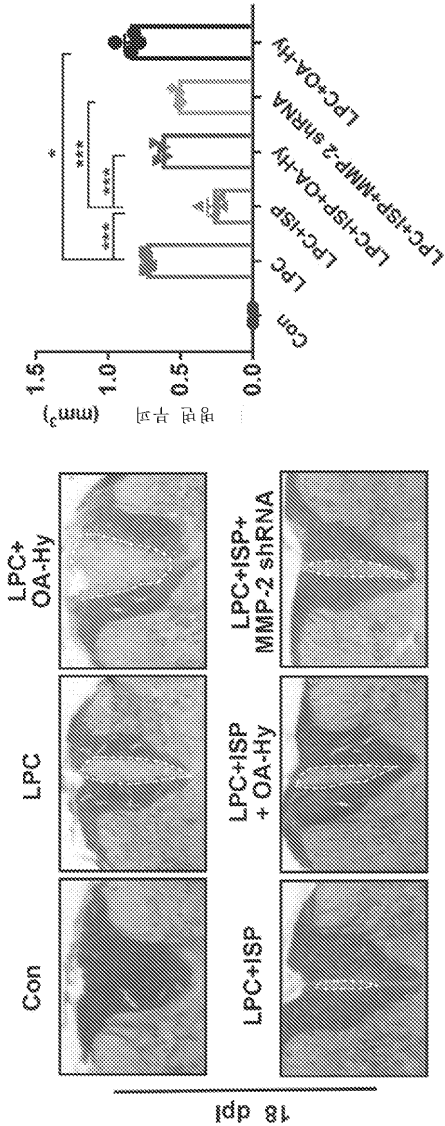
도면8ad



도면8eg



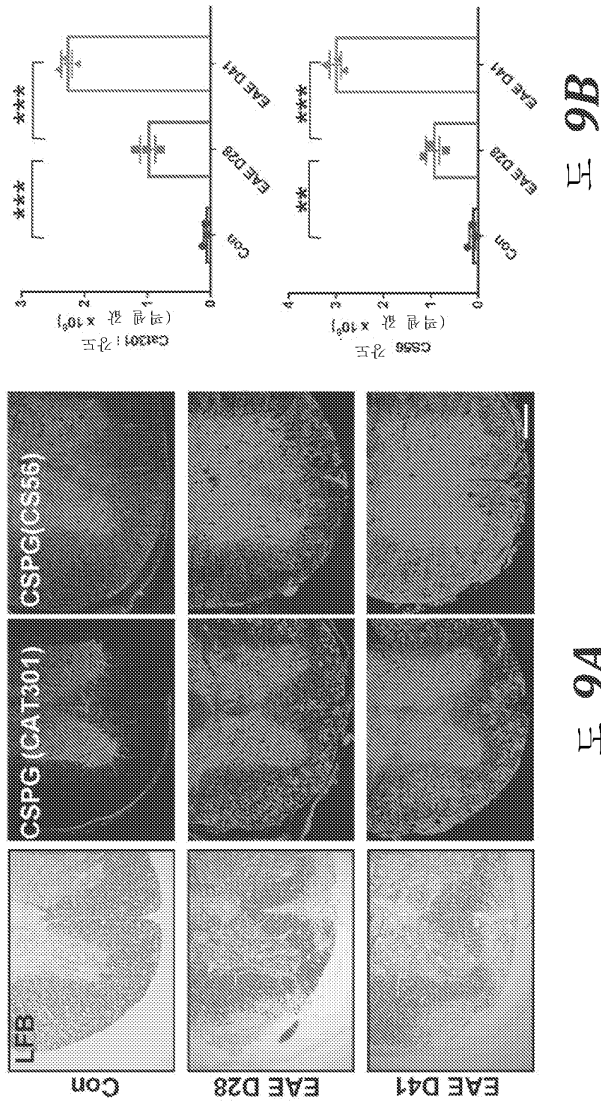
도 8E



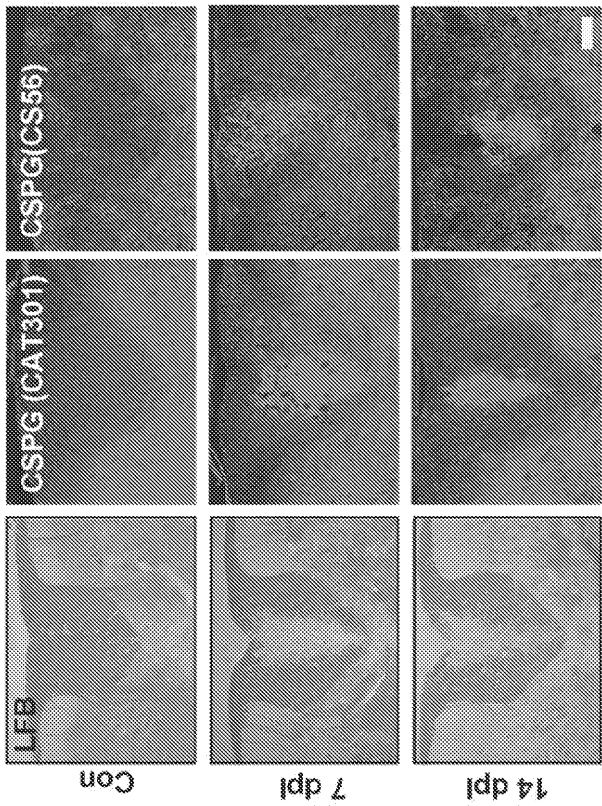
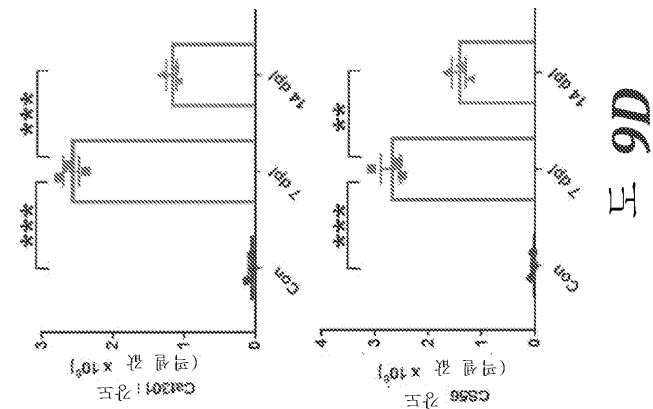
도 8G

도 8F

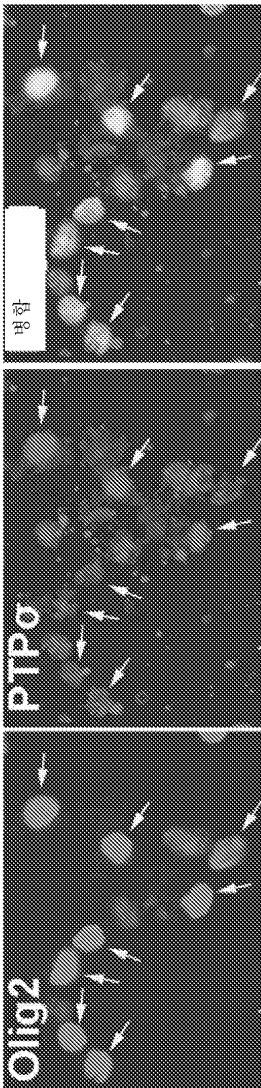
도면9ab



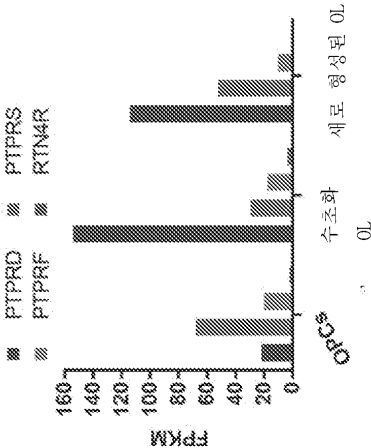
도면9cd



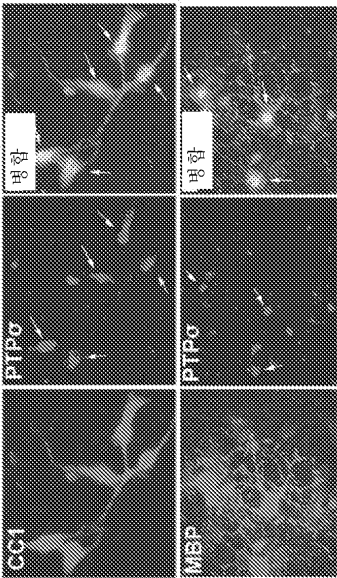
도면10ac



도 10A

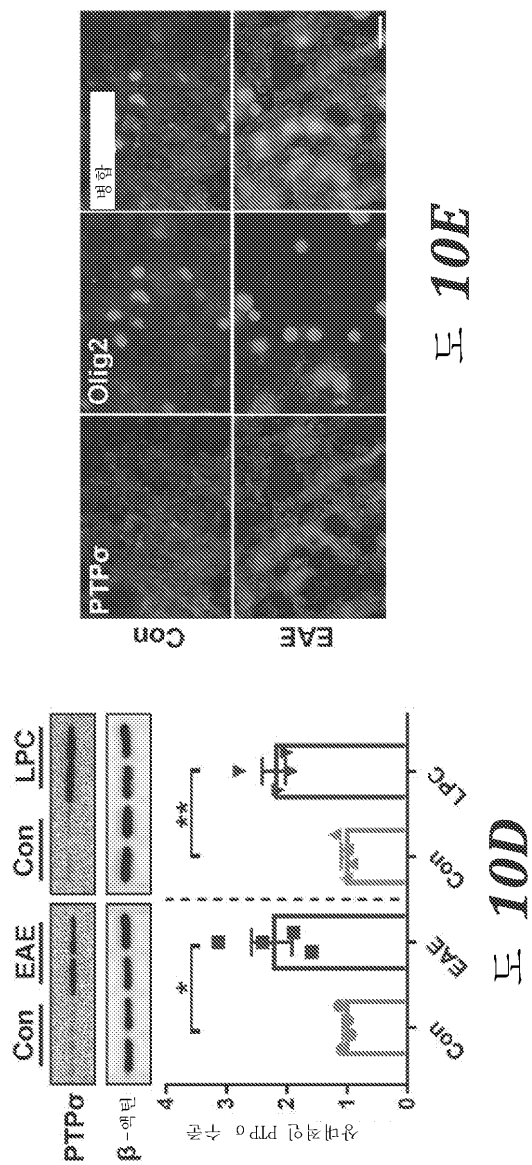


도 10B

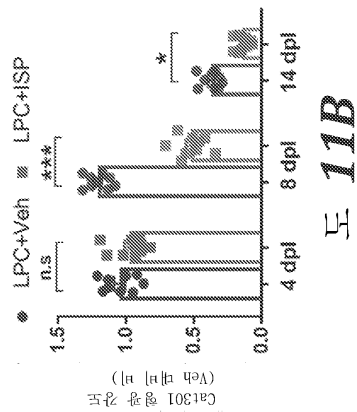
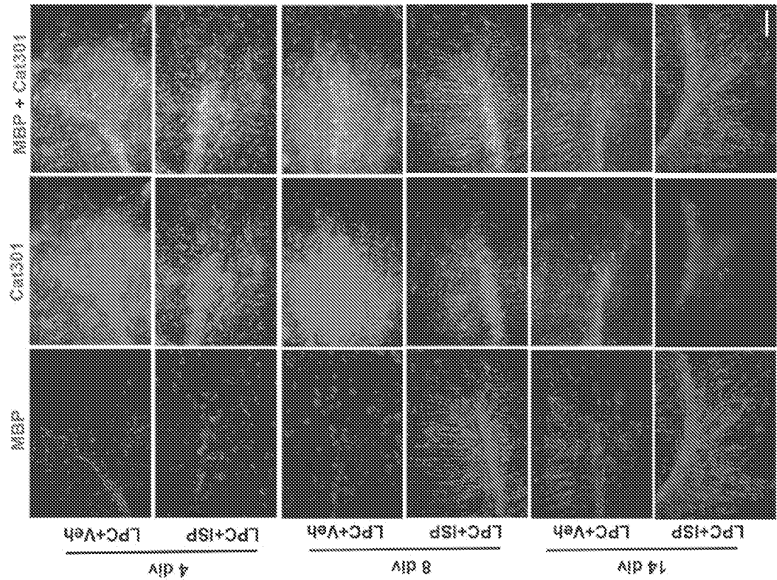


도 10C

도면10de



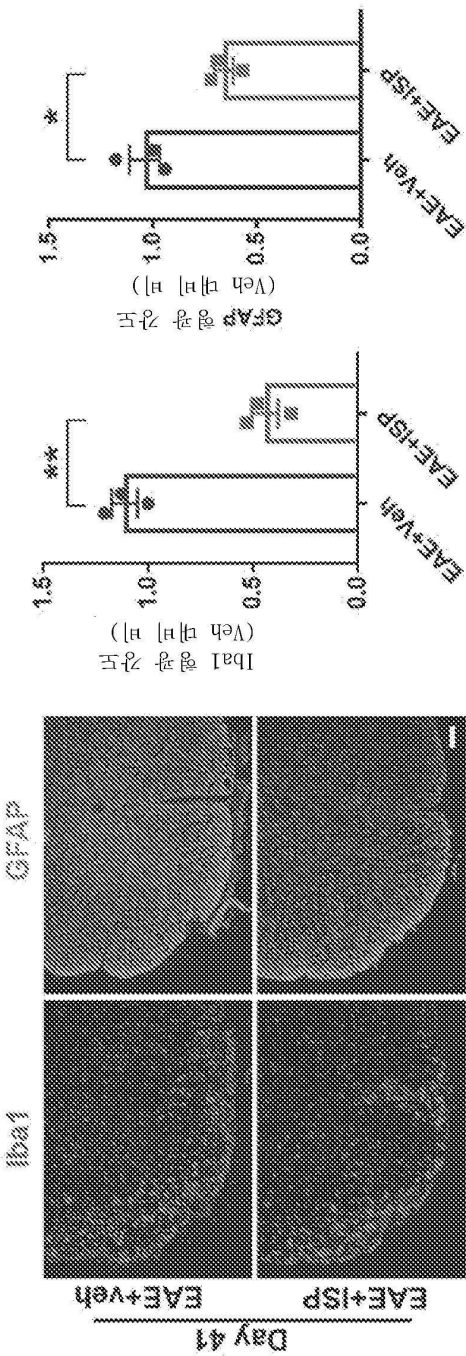
도면11



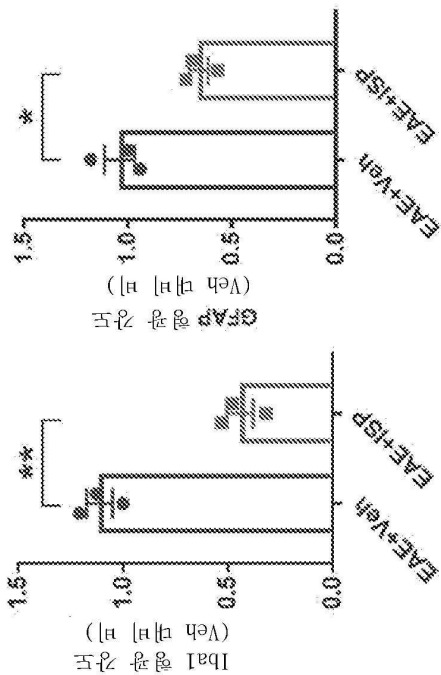
도 11A

도 11B

도면12ab

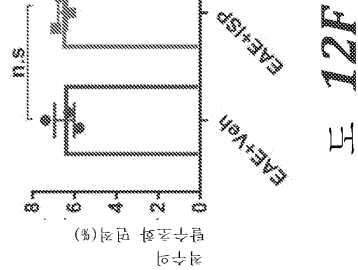
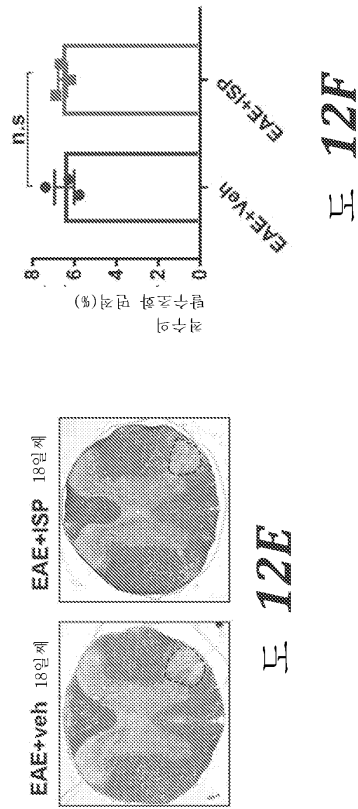
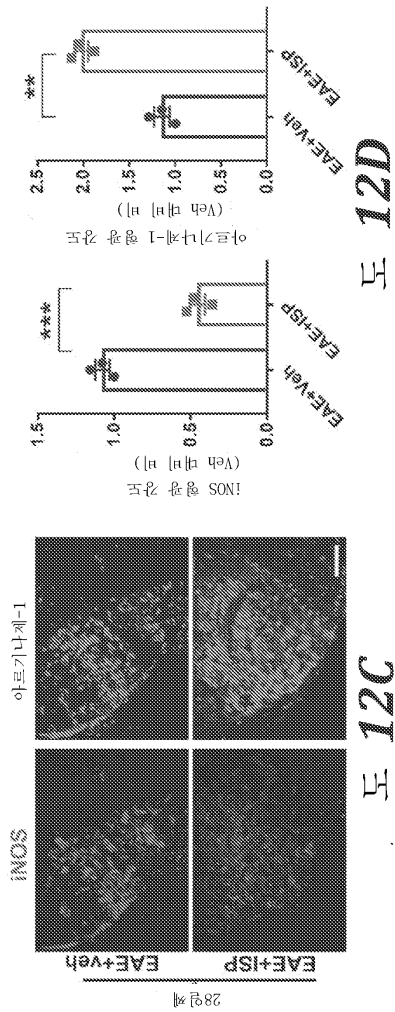


도 12A

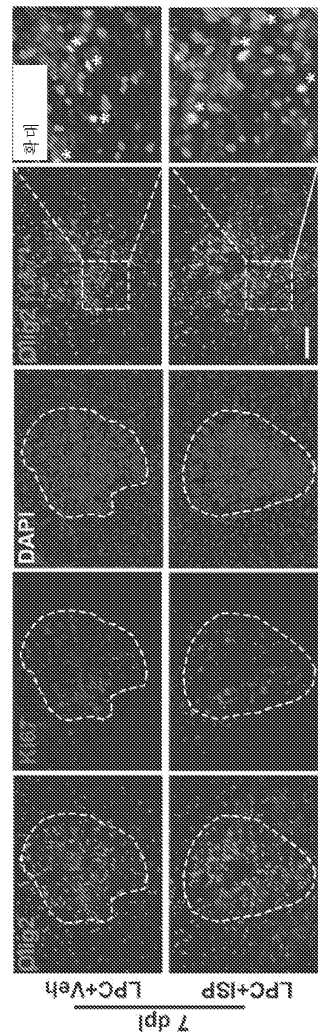


도 12B

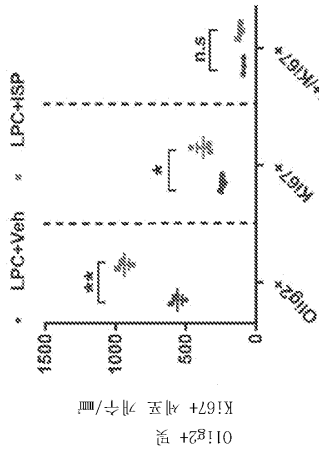
도면12cf



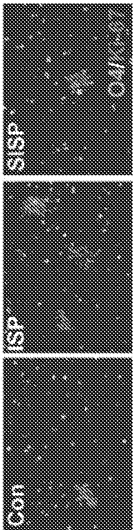
도면13ac



도 13A

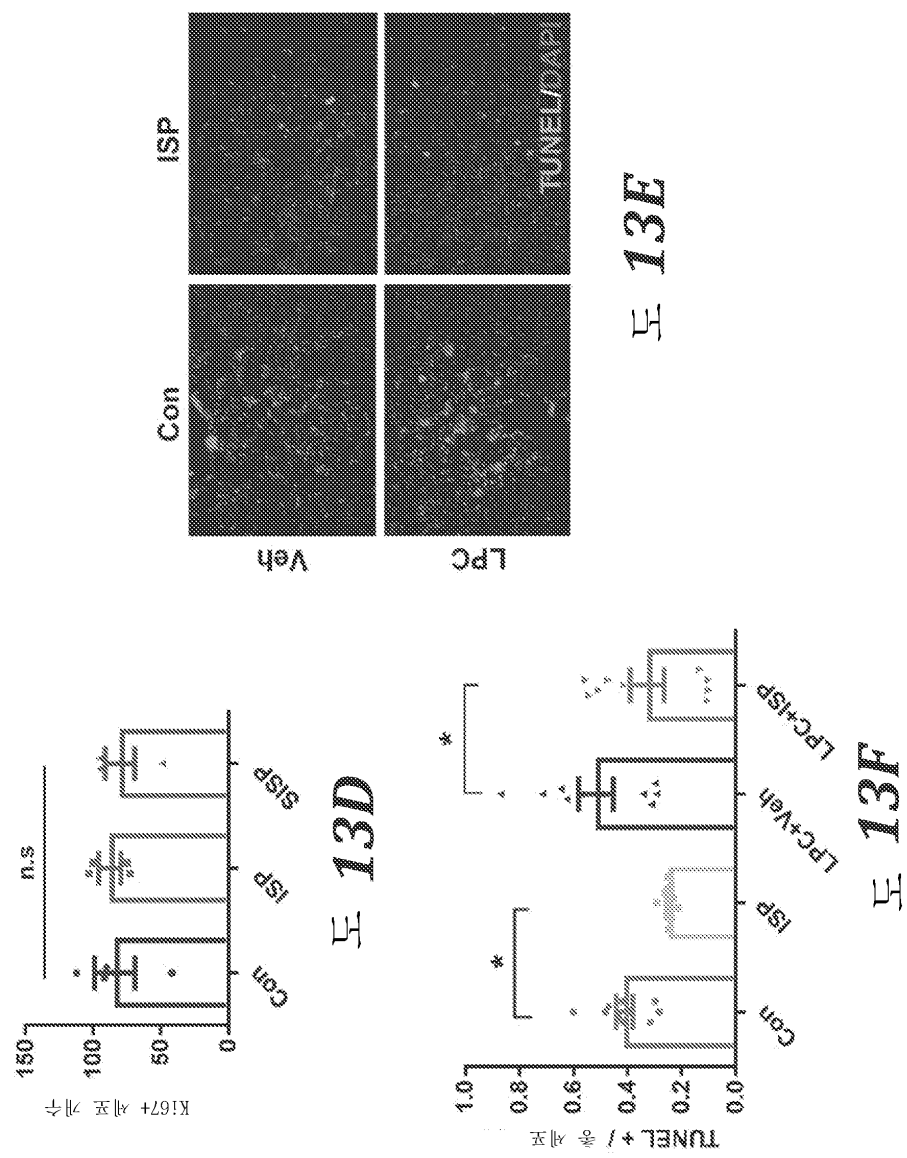


도 13B

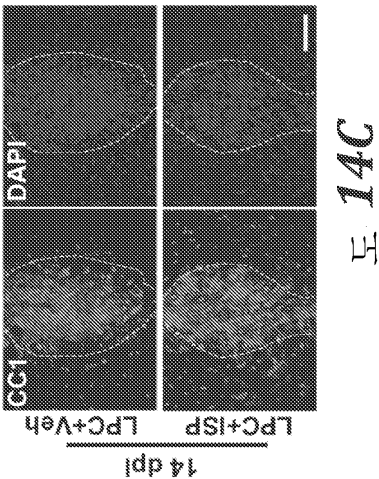
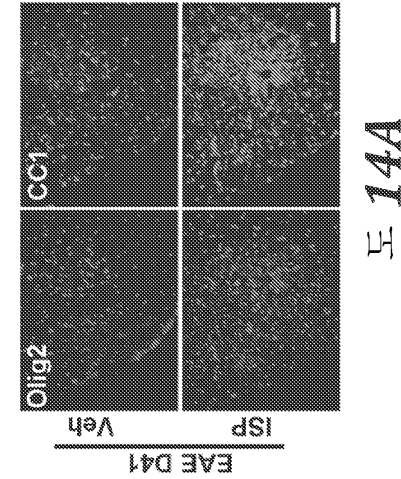
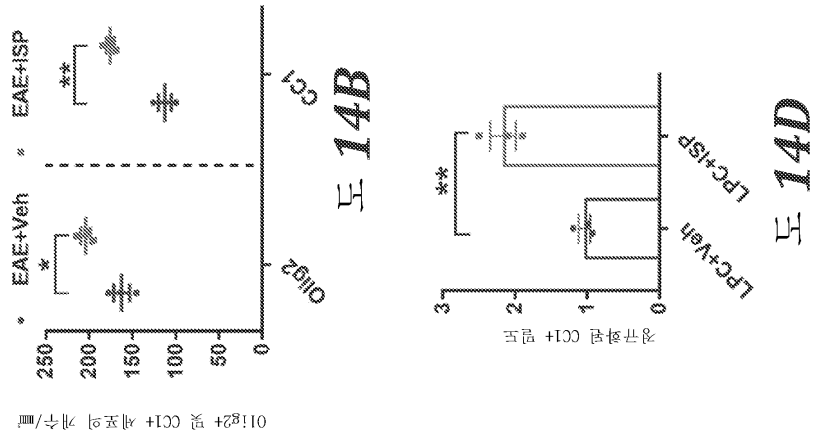


도 13C

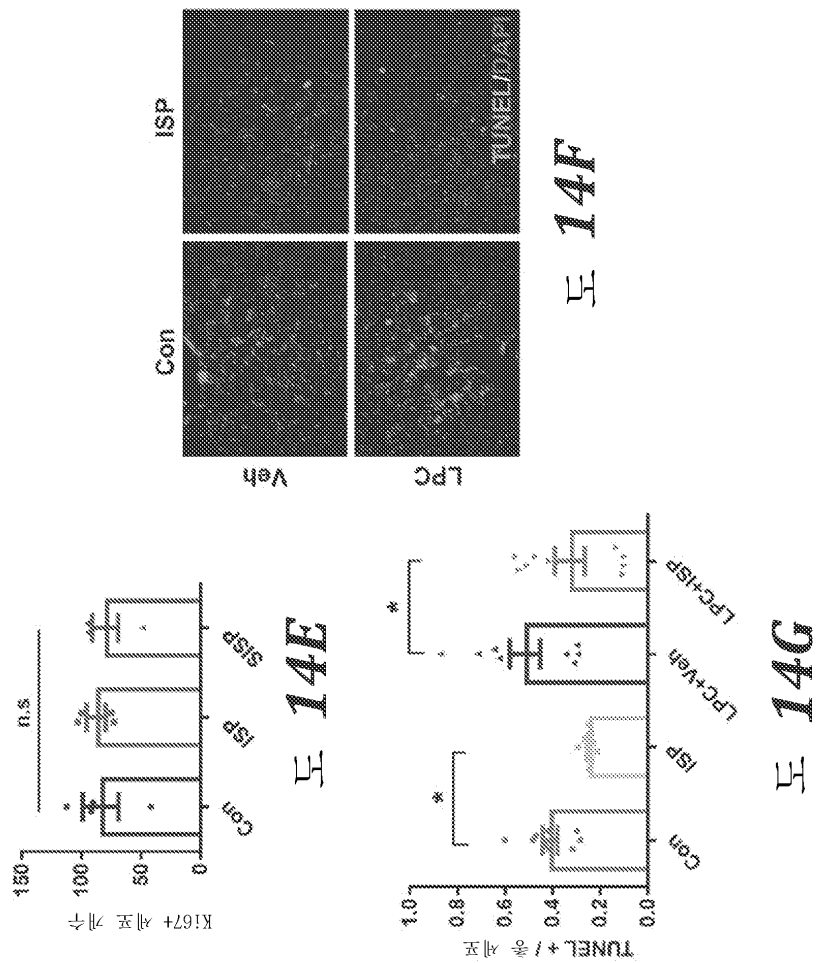
도면13df



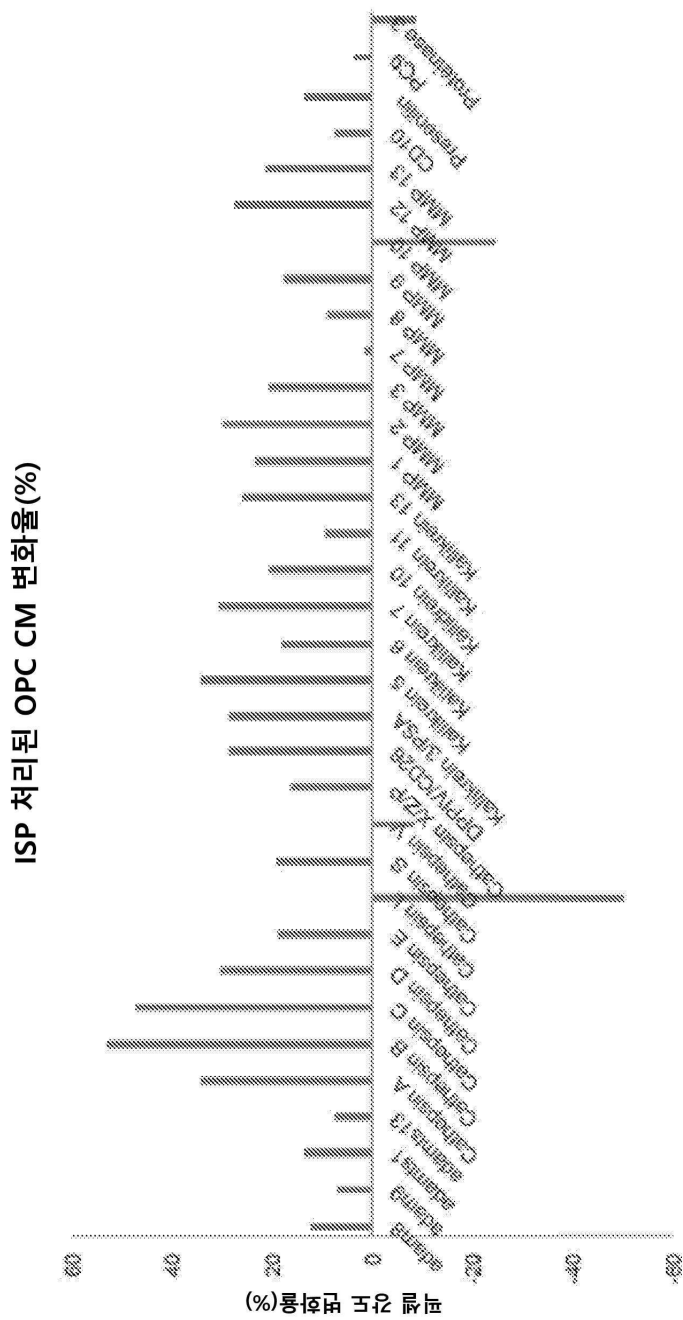
도면14ad



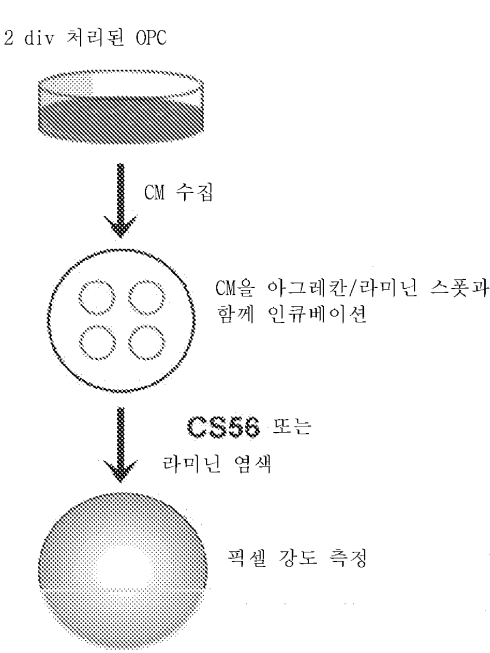
도면14eg



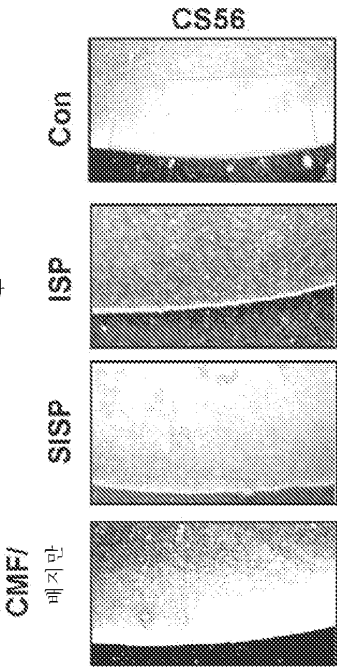
도면 15



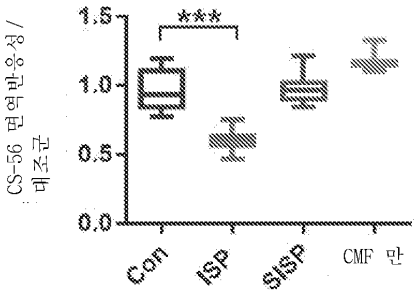
도면16ac



도 16A

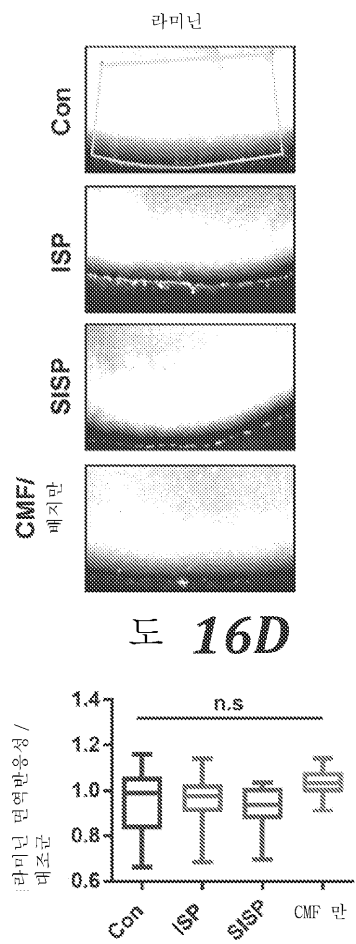


도 16B

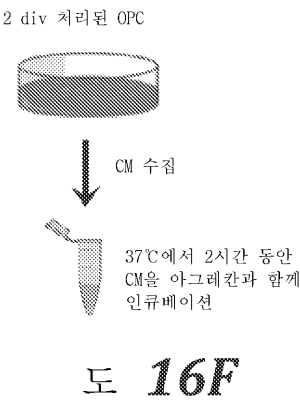


도 16C

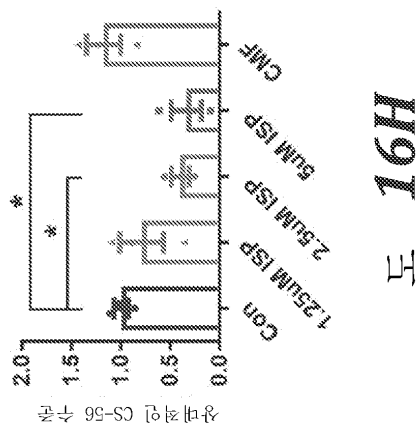
도면16df



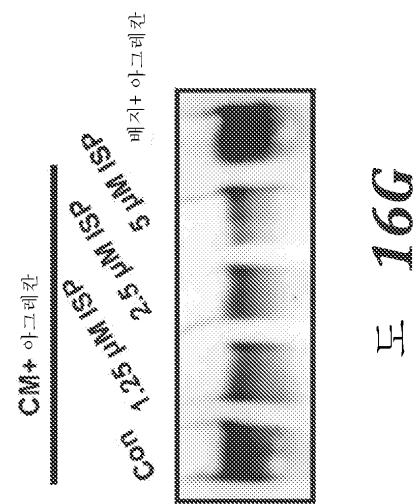
도 16E



도면16gh

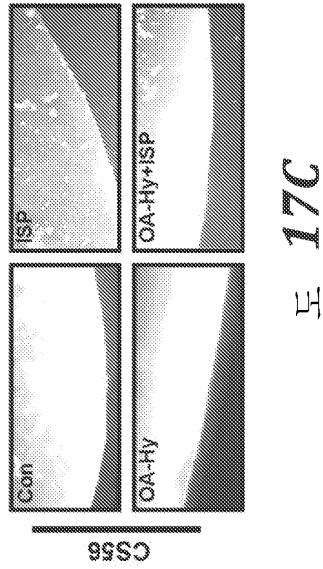
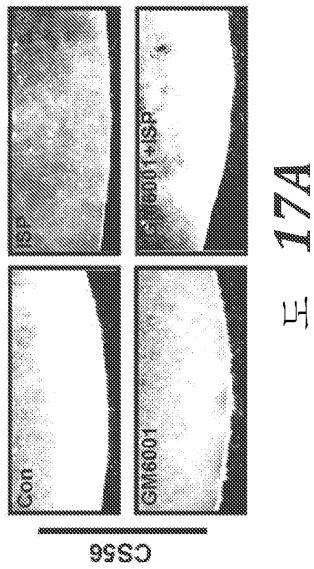
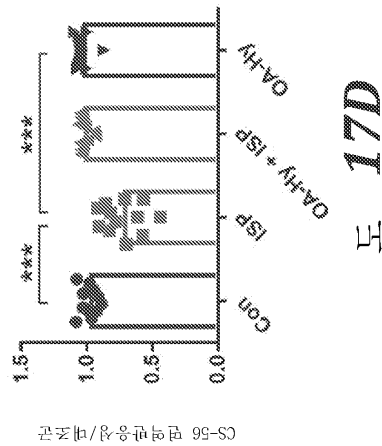
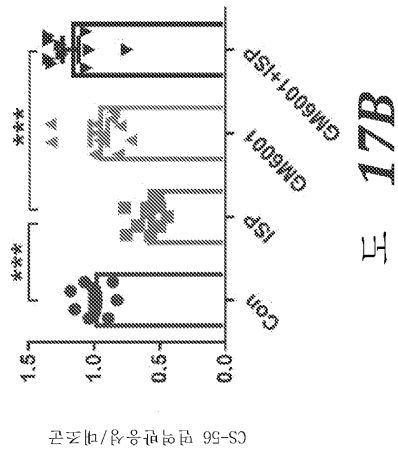


도 16H

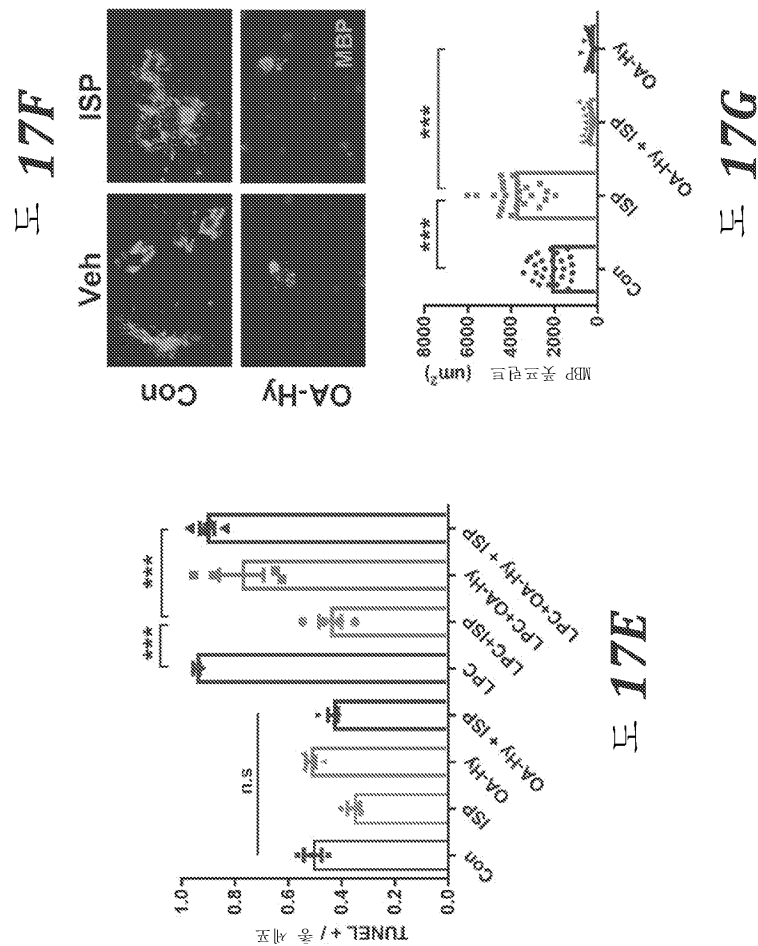


도 16G

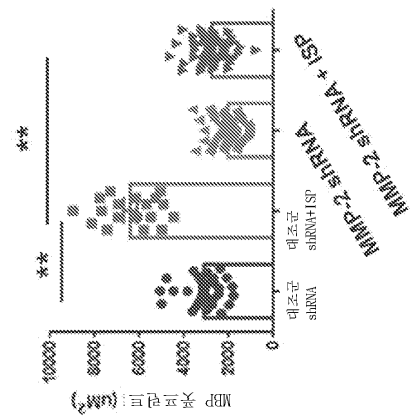
도면17ad



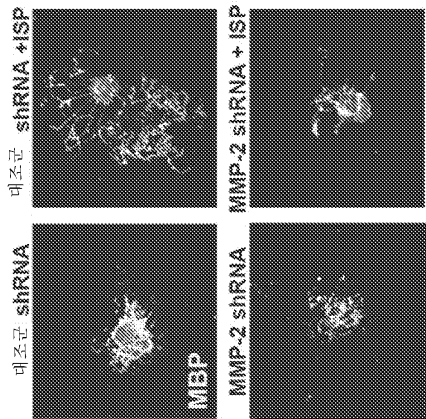
도면17eg



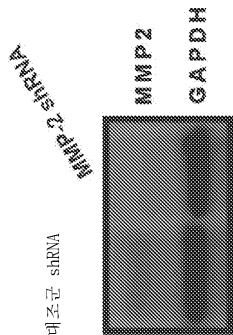
도면18ac



도 18C

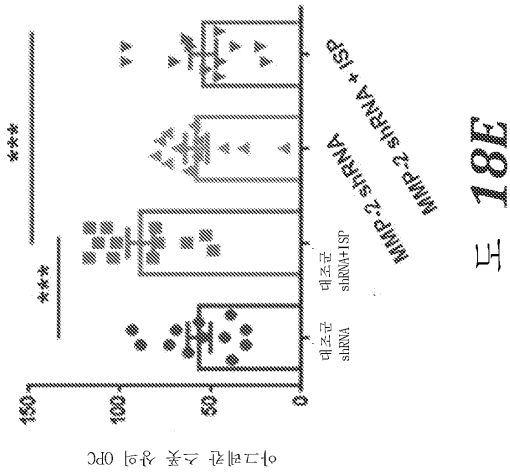


도 18B

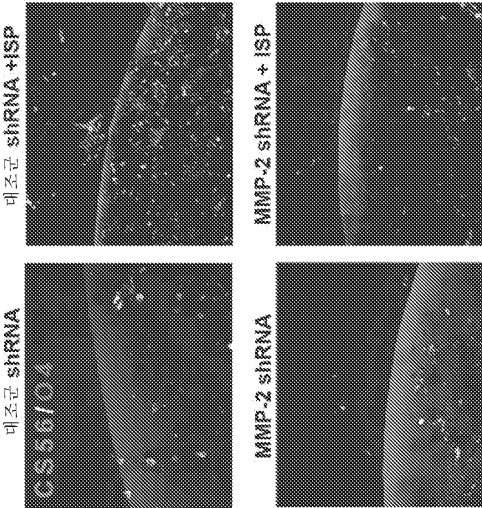


도 18A

도면18de

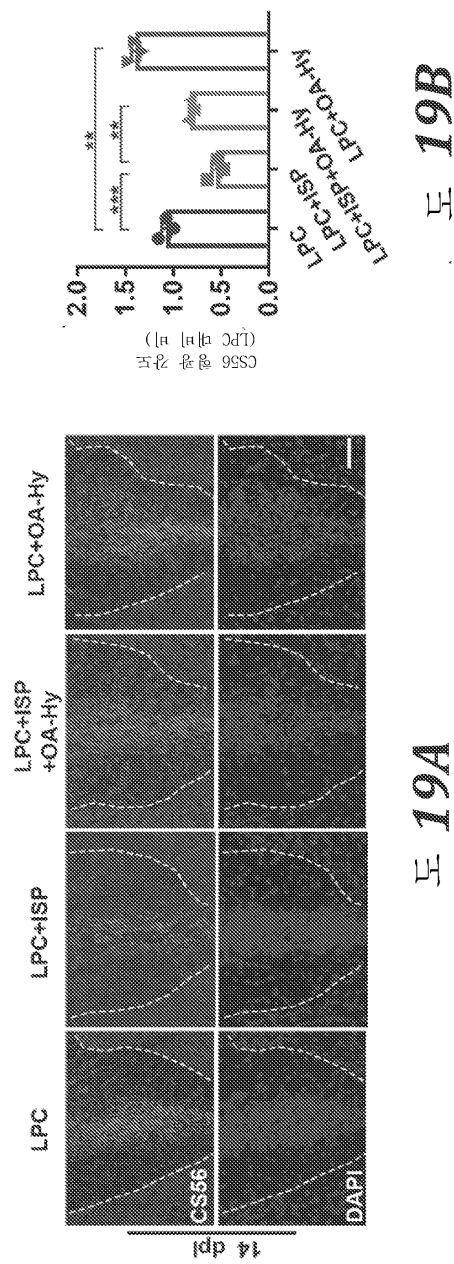


도 18E

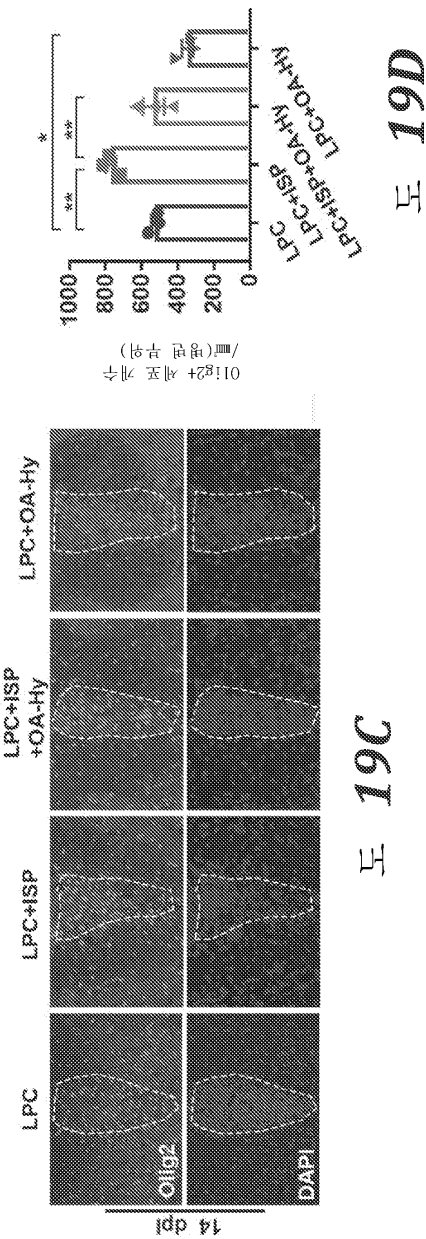


도 18D

도면 19ab



도면19cd



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY
- <120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING MYELIN DISORDERS
- <130> IPA191575-US
- <150> US 62/531,251
- <151> 2017-07-11
- <160> 62
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> *Xenopus borealis*

<400> 1

Asp Leu Ala Glu His Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys

1 5 10 15

Ser Gln Glu Tyr Glu Ser

20

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> *Anolis carolinensis*

<400> 2

Asp His Thr Glu His Glu Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser

1 5 10 15

Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 3

<211> 24

<212> PRT

<213> *Danio rerio*

<400> 3

Glu Leu Ala Glu His Thr Glu Leu Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210

> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> *Oreochromis aureus*

<400> 4

Glu Leu Ala Glu His Thr Glu Leu Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 5

<211> 24

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 5

Glu Leu Ala Glu His Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> Fringilla coelebs

<400> 6

Glu Leu Ala Glu His Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> Ornithorhynchus anatinus

<400> 7

Glu Leu Ala Glu His Thr Asp His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 8

<211> 24

<212> PRT

<213> Sarcophilus harrisii

<400> 8

Glu Met Ala Glu His Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 9

<211> 24

<212> PRT

<213> Mustela putorius

<400> 9

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 10

<211> 24

<212> PRT

<213> Galago alleni

<400> 10

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 11

<211> 24

<212> PRT

<213> Callithrix aurita

<400> 11

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 12

<211> 24

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 12

Asp Met Ala Glu His Met Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 13

<211> 24

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Asp Met Ala Glu His Met Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 14

<211> 24

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 14

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 15

<211> 24

<212> PRT

<213> Sus barbatus

<400> 15

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 16

<211> 24

<212> PRT

<213> Bos primigenius

<400> 16

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 17

<211> 24

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 17

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 18

<211> 24

<212> PRT

<213> Orcinus orca

<400> 18

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 19

<211> 24

<212> PRT

<213> Saimiri sciureus

<400> 19

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
20

<210> 20

<211> 24

<212> PRT

<213> Papio hamadryas

<400> 20

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
20

<210> 21

<211> 24

<212> PRT

<213> Primate calicivirus

<400> 21

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
20

<210> 22

<211> 24

<212> PRT

<213> Primate calicivirus

<400> 22

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
20

<210> 23

<211> 24

<212> PRT

<213> *Macaca radiata*

<400> 23

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 24

<211> 24

<212> PRT

<213> *Pan troglodytes*

<400> 24

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 25

<211> 24

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 25

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 26

<211> 24

<212> PRT

<213> *Rattus rattus*

<400> 26

Asp Leu Ala Asp Asn Ile Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Gly Leu Lys

1 5 10 15

Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 27

<211> 24

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 27

Glu Leu Ala Asp His Ile Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys

1 5 10 15

Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 28

<211> 24

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 28

Lys Leu Glu Glu Glu Ile Asn Arg Arg Met Ala Asp Asp Asn Lys Ile

1 5 10 15

Phe Arg Glu Glu Phe Asn Ala Leu

20

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys

1 5 10

<210> 30

<211

> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Ala Asn Asp Ser

1

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

1 5 10

<210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Thr or Met

<400> 32

Glu His Xaa Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu

1 5 10

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 33

Asp Met Ala Glu His Xaa Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser

1 5 10

<210> 34

<211> 33

<212> PRT

<213> Xenopus borealis

<400> 34

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Leu Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Ser Gln Glu Tyr Glu
20 25 30

Ser

<210> 35

<211> 32

<212> PRT

<213> Anolis carolinensis

<400> 35

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp His Thr Glu His
1 5 10 15

Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
20 25 30

<210> 36

<211> 35

<212> PRT

<213> Danio rerio

<400> 36

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Glu Leu Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu Leu Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile

35

<210> 37

<211> 35

<212> PRT

<213> Tilapia nilotica

<400> 37

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Glu Leu Ala Glu His

1 5 10 15

Thr Glu Leu Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

20 25 30

Glu Ser Ile

35

<210> 38

<211> 35

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 38

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Glu Leu Ala Glu His

1 5 10 15

Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

20 25 30

Glu Ser Ile

35

<210> 39

<211> 35

<212> PRT

<213> Fringilla coelebs

<400> 39

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Glu Leu Ala Glu His

1 5 10 15

Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

20 25 30

Glu Ser Ile

35

<210> 40

<211> 35

<212> PRT

<213> Ornithorhynchus anatinus

<400> 40

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Glu Leu Ala Glu His

1 5 10 15
Thr Asp His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

 20 25 30
Glu Ser Ile

 35

<210> 41

<211> 35

<212> PRT

<213> *Sarcophilus harrisi*

<400> 41

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Glu Met Ala Glu His

1 5 10 15
Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

 20 25 30
Glu Ser Ile

 35

<210> 42

<211> 35

<212> PRT

<213> *Mustela putorius*

<400> 42

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15
Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

 20 25 30
Glu Ser Ile

 35

<210> 43

<211> 35

<212> PRT

<213> *Galago alleni*

<400> 43

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15
Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

 20 25 30
Glu Ser Ile

 35

<210> 44

<211> 35

<212> PRT

<213> *Callithrix argentata*

<400> 44

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15
Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

 20 25 30
Glu Ser Ile

 35

<210> 45

<211> 35

<212> PRT

<213> *Rattus rattus*

<400> 45

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15
Met Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

 20 25 30
Glu Ser Ile

 35

<210> 46

<211> 35

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 46

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15
Met Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

20 25 30
Glu Ser Ile

35

<210> 47

<211> 35

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 47

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15
Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

20 25 30

Glu Ser Ile

35

<210> 48

<211> 35

<212> PRT

<213> Sus barbatus

<400> 48

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15
Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

20 25 30

Glu Ser Ile

35

<210> 49

<211> 35

<212> PRT

<213> Bos primigenius

<400> 49

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15
Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

20 25 30
Glu Ser Ile

35

<210> 50

<211> 35

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 50

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15
Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

20 25 30

Glu Ser Ile

35

<210> 51

<211> 35

<212> PRT

<213> Orcinus orca

<400> 51

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15
Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

20 25 30

Glu Ser Ile

35

<210> 52

<211> 35

<212> PRT

<213> Saimiri boliviensis

<400> 52

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15
Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

20 25 30
Glu Ser Ile

35

<210> 53

<211> 35

<212> PRT

<213> Papio hamadryas

<400> 53

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15
Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

20 25 30

Glu Ser Ile

35

<210> 54

<211> 35

<212> PRT

<213> Primate calicivirus

<400> 54

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15
Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

20 25 30

Glu Ser Ile

35

<210> 55

<211> 35

<212> PRT

<213> Primate calicivirus

<400> 55

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15
Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

 20 25 30
Glu Ser Ile

 35

<210> 56

<211> 35

<212> PRT

<213> Macaca arctoides

<400> 56

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15
Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

 20 25 30
Glu Ser Ile

 35

<210> 57

<211> 35

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 57

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15
Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

 20 25 30
Glu Ser Ile

 35

<210> 58

<211> 35

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15

Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

20 25 30

Glu Ser Ile

35

<210> 59

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is Thr or Met

<400> 59

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Glu His Xaa Glu Arg

1 5 10 15

Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu

20 25

<210> 60

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> X1 is T or M

<400> 60

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15

Xaa Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser

20 25

<210> 61

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> MISC_FEATURE

<223> X1 is T or M

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> X1 is T or M

<400> 61

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15

Met Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

20 25 30

Glu Ser Ile

35

<210> 62

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 62

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Ile Arg Glu Asp Asp

1 5 10 15

Ser Leu Met Leu Tyr Ala Leu Ala Gln Glu Lys Lys Glu Ser Asn Met

20 25 30

His Glu Ser

35