



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0043401  
(43) 공개일자 2020년04월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/13 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)  
A61P 25/08 (2006.01) A61P 25/18 (2006.01)  
C12Q 1/6883 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 31/13 (2013.01)  
A61P 25/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7006028
- (22) 출원일자(국제) 2018년07월31일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년02월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/044608
- (87) 국제공개번호 WO 2019/028025  
국제공개일자 2019년02월07일
- (30) 우선권주장  
62/539,549 2017년08월01일 미국(US)

- (71) 출원인  
립튼 스투어트 에이.  
미국 92067 캘리포니아주 랜초 산타페이 피.오.  
박스 8095
- (72) 발명자  
립튼 스투어트 에이.  
미국 92067 캘리포니아주 랜초 산타페이 피.오.  
박스 8095
- (74) 대리인  
장훈

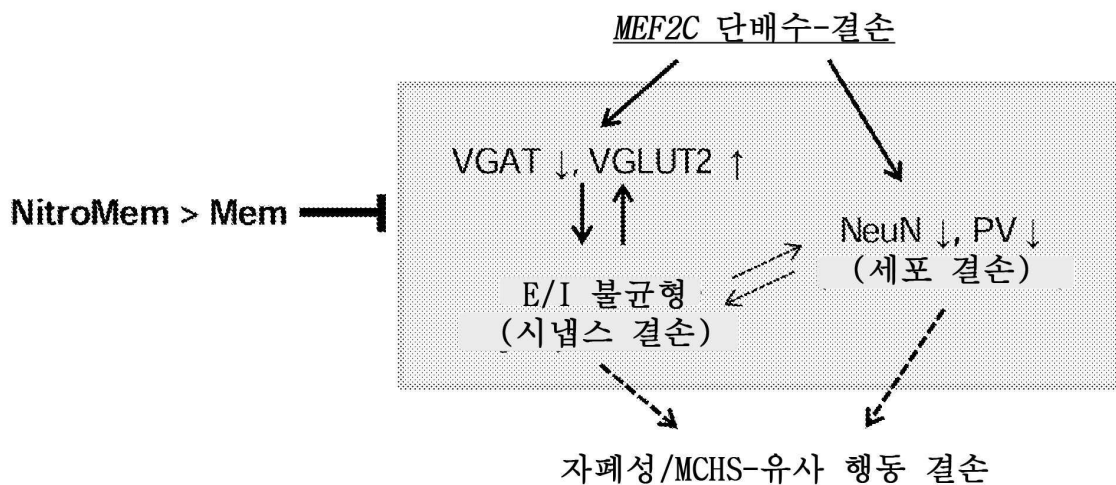
전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 **신경 질환을 치료하기 위한 방법 및 조성물**

(57) 요약

N-메틸-D-아스파르테이트 수용체(NMDAR)의 억제제로 유년 발병형 신경 질환, 예컨대 자폐증 (ASD), 지적 장애, 또는 간질을 치료하는 방법이 본 명세서에 개시된다. 상기 억제제는 니트로시넵신 또는 이의 유도체일 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61P 25/08* (2018.01)

*A61P 25/18* (2018.01)

*C12Q 1/6883* (2018.05)

*G01N 33/6896* (2013.01)

*C12Q 2600/106* (2013.01)

*C12Q 2600/158* (2013.01)

*G01N 2800/285* (2013.01)

*G01N 2800/2857* (2013.01)

*G01N 2800/52* (2013.01)

---

명세서

청구범위

청구항 1

유년-발병 신경 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 *N*-메틸-D-아스파르테이트 유형의 글루타메이트 수용체 (NMDAR)의 억제제로 유년-발병 신경 질환을 치료하는 방법.

청구항 2

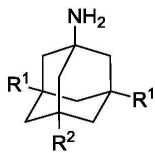
제1항에 있어서, 상기 NMDAR의 억제제는 니트로시넵신을 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 NMDAR의 억제제는 니트로시넵신인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 NMDAR의 억제제는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염이며,



화학식 I

여기서,

각각의 R<sup>1</sup>은 -CH<sub>3</sub> 및 -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>로부터 독립적으로 선택되고;

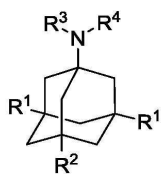
R<sup>2</sup>는 수소 및 -ONO<sub>2</sub>로부터 선택되는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 각각의 R<sup>1</sup>은 -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>이고 R<sup>2</sup>는 -ONO<sub>2</sub>인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 NMDAR의 억제제는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염이며,



화학식 II

여기서,

각각의 R<sup>1</sup>은 수소, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 및 헤테로아릴로부터 독립적으로 선택되고;

R<sup>2</sup>는 수소, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 및 -ONO<sub>2</sub>로부터 선택되고;

$R^3$  및  $R^4$  각각은 수소 및  $C_1-C_6$  알킬로부터 독립적으로 선택되고;

또는  $R^3$  및  $R^4$ 는 이들이 부착된 질소 원자와 함께 합쳐져서 헤테로사이클로알킬을 형성하는, 방법.

**청구항 7**

제6항에 있어서,  $R^3$  및  $R^4$  각각은 수소인, 방법.

**청구항 8**

제6항에 있어서,  $R^2$ 는 수소 및  $-ONO_2$ 로부터 선택되는, 방법.

**청구항 9**

제8항에 있어서,  $R^2$ 는  $-ONO_2$ 인, 방법.

**청구항 10**

제6항에 있어서, 각각의  $R^1$ 은 독립적으로  $C_1-C_6$  알킬인, 방법.

**청구항 11**

제6항에 있어서, 각각의  $R^1$ 은 메틸 및 에틸로부터 독립적으로 선택되는, 방법.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 각각의  $R^1$ 은 에틸인, 방법.

**청구항 13**

제1항에 있어서, 상기 유년-발병 신경 질환은 지적 및 발달 장애인, 방법.

**청구항 14**

제1항에 있어서, 상기 유년-발병 신경 질환은 자폐 스펙트럼 장애(ASD)인, 방법.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 상기 유년-발병 신경 질환은 간질을 포함하는, 방법.

**청구항 16**

제1항에 있어서, 상기 유년-발병 신경 질환은 결절성 경화증인, 방법.

**청구항 17**

제1항에 있어서, 상기 유년-발병 신경 질환은 자폐증인, 방법.

**청구항 18**

제1항에 있어서, 상기 유년-발병 신경 질환은 레트 증후군인, 방법.

**청구항 19**

제1항에 있어서, 상기 대상체는 아동인, 방법.

**청구항 20**

제1항에 있어서, 상기 대상체는 *MEF2C* 단배수-결손이고, *MEF2C* 단배수-결손 증후군(MCHS)을 갖는, 방법.

**청구항 21**

제1항에 있어서, *MEF2C*, *SLC32A1*, *SLC17A6*, *SYP*, 및 *GAD65*로부터 선택된 적어도 하나의 유전자의 발현 수준에 기초하여 치료를 위한 대상체를 선택하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 상기 발현 수준은 대상체의 세포의 것인, 방법.

**청구항 23**

제21항에 있어서, 상기 발현 수준은 대상체의 뇌에서의 세포의 것인, 방법.

**청구항 24**

제21항에 있어서, 상기 발현 수준은 대상체의 순환 세포의 것인, 방법.

**청구항 25**

제21항에 있어서, 상기 발현 수준은 mRNA 발현 수준인, 방법.

**청구항 26**

제21항에 있어서, 상기 발현 수준은 단백질 발현 수준인, 방법.

**청구항 27**

제21항에 있어서, 상기 대상체는 *MEF2C* 단배수-결손을 갖는, 방법.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 상기 유전자는 *SLC32A1*이고 발현 수준은 *MEF2C* 유전자의 2개의 사본을 포함하는 평균 대상체의 것에 비하여 상당히 감소된 것인, 방법.

**청구항 29**

제27항에 있어서, 상기 유전자는 *SLC17A6*이고 발현 수준은 *MEF2C* 유전자의 2개의 사본을 포함하는 평균 대상체의 것에 비하여 상당히 증가된 것인, 방법.

**청구항 30**

제27항에 있어서, 상기 유전자는 *SYP*이고 발현 수준은 *MEF2C* 유전자의 2개의 사본을 포함하는 평균 대상체의 것에 비하여 상당히 감소된 것인, 방법.

**청구항 31**

제27항에 있어서, 상기 유전자는 *GAD65*이고 발현 수준은 *MEF2C* 유전자의 2개의 사본을 포함하는 평균 대상체의 것에 비하여 상당히 감소된 것인, 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 교차-참조

[0002] 본원은 2017년 8월 1일 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/539,549의 이점을 주장하고, 이것은 본 명세서에 전체적으로 참고로 편입된다.

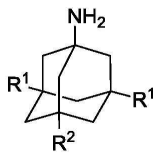
**배경 기술**

[0003] 뇌에서, 근세포 향상제 인자 2 (MEF2) 전사는 뉴런 분화, 시냅스 형성, 및 뉴런 생존에 대해 중요하다. 네스틴-발현 신경 선조 세포에서 *Mef2c*의 조건적 녹아웃은 손상된 전기생리적 네트워크 특성 및 ASD에 관련된 신경 장

에인 레트 증후군을 연상시키는 행동 결핍을 갖는 마우스를 생산하는 것으로 나타났다. 염색체 5q14.3q15 미세 결실의 영역은 *MEF2C* 단배수-결손으로 확인된 소아에서 신경 결손 표현형을 야기한다. 이들 환자는 ASD, 지적 및 발달 장애(IDD), 불량한 상호 행동, 언어 결핍, 정형 및 반복적인 행동, 및 간질을 포함한 징후 및 증상을 나타낸다. *MEF2C* 단배수-결손에 의해 야기된 장애는 집합적으로 *MEF2C* 단배수-결손 증후군(MCHS)으로 불린다. 추가로, 다수의 MEF2 표적 유전자는 공유된 조상을 갖는 인간 가계도에서 자폐증-관련된 유전자로 확인되었다.

**발명의 내용**

[0004] 일부 양태에서, 유년-발병 신경 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 글루타메이트 수용체의 *N*-메틸-D-아스파르테이트 유형 (NMDAR)의 억제제로 유년-발병 신경 질환을 치료하는 방법이 본 명세서에 개시된다. 일부 사례에서, NMDAR의 억제제는 니트로시넵신을 포함한다. 일부 사례에서, NMDAR의 억제제는 니트로시넵신이다. 일부 사례에서, NMDAR의 억제제는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염이다:



화학식 I

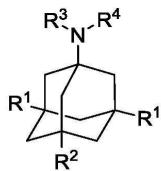
[0005]

[0006] 여기서,

[0007] 각각의 R<sup>1</sup>은 -CH<sub>3</sub> 및 -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>로부터 독립적으로 선택되고; 그리고

[0008] R<sup>2</sup>는 수소 및 -ONO<sub>2</sub>로부터 선택된다.

[0009] 일부 사례에서, 각각의 R<sup>1</sup>은 -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>이고 R<sup>2</sup>는 -ONO<sub>2</sub>이다. 일부 사례에서, NMDAR의 억제제는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염이다:



화학식 II

[0010]

[0011] 여기서,

[0012] 각각의 R<sup>1</sup>은 수소, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 및 헤테로아릴로부터 독립적으로 선택되고;

[0013] R<sup>2</sup>는 수소, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 및 -ONO<sub>2</sub>로부터 선택되고;

[0014] R<sup>3</sup> 및 R<sup>4</sup> 각각은 수소 및 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬로부터 독립적으로 선택되거나;

[0015] 또는 R<sup>3</sup> 및 R<sup>4</sup>는 이들이 부착된 질소 원자와 함께 합쳐져서 헤테로사이클로알킬을 형성한다.

[0016] 일부 사례에서, R<sup>3</sup> 및 R<sup>4</sup> 각각은 수소이다. 일부 사례에서, R<sup>2</sup>는 수소 및 -ONO<sub>2</sub>로부터 선택된다. 일부 사례에서, R<sup>2</sup>는 -ONO<sub>2</sub>이다. 일부 사례에서, 각각의 R<sup>1</sup>은 독립적으로 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬이다. 일부 사례에서, 각각의 R<sup>1</sup>은 메틸 및 에틸로부터 독립적으로 선택된다. 일부 사례에서, 각각의 R<sup>1</sup>은 에틸이다. 일부 사례에서, 상기 유년-발병 신경 질환은 지적 및 발달 장애이다. 일부 사례에서, 상기 유년-발병 신경 질환은 자폐 스펙트럼 장애(ASD)이다. 일부 사례에서, 상기 유년-발병 신경 질환은 간질을 포함한다. 일부 사례에서, 상기 유년-발병 신경 질환은 결절

성 경화증이다. 일부 사례에서, 상기 유년-발병 신경 질환은 자폐증이다. 일부 사례에서, 상기 유년-발병 신경 질환은 레트 증후군이다. 일부 사례에서, 상기 대상체는 아동이다. 일부 사례에서, 상기 대상체는 *MEF2C* 단배수 결손이고, *MEF2C* 단배수-결손 증후군(MCHS)을 갖는다. 일부 사례에서, 치료를 위한 대상체를 선택하는 것은 *MEF2C*, *SLC32A1*, *SLC17A6*, *SYP*, 및 *GAD65*로부터 선택된 적어도 하나의 유전자의 발현 수준에 기초했다. 일부 사례에서, 발현 수준은 대상체의 세포의 것이다. 일부 사례에서, 발현 수준은 대상체의 뇌에서의 세포의 것이다. 일부 사례에서, 발현 수준은 대상체의 순환 세포의 것이다. 일부 사례에서, 발현 수준은 mRNA 발현 수준이다. 일부 사례에서, 발현 수준은 단백질 발현 수준이다. 일부 사례에서, 상기 대상체는 *MEF2C* 단배수-결손을 갖는다. 일부 사례에서, 유전자는 *SLC32A1*이고 발현 수준은 *MEF2C* 유전자의 2개 사본을 포함하는 평균 대상체의 것에 비하여 상당히 감소된다. 일부 사례에서, 유전자는 *SLC17A6*이고 발현 수준은 *MEF2C* 유전자의 2개 사본을 포함하는 평균 대상체의 것에 비하여 상당히 증가된다. 일부 사례에서, 유전자는 *SYP*이고 발현 수준은 *MEF2C* 유전자의 2개 사본을 포함하는 평균 대상체의 것에 비하여 상당히 감소된다. 일부 사례에서, 유전자는 *GAD65*이고 발현 수준은 *MEF2C* 유전자의 2개 사본을 포함하는 평균 대상체의 것에 비하여 상당히 감소된다.

**도면의 간단한 설명**

[0017]

**도 1**은 니트로시넵신(니트로메만틴 YQW-036 또는 NMI-6979로도 알려져 있음)에 의해 구제된 E/I 불균형 및 MCHS-유사 표현형으로 이어지는 *Mef2c* 단배수-결손의 요약 다이어그램을 도시한다.

**도 2**는 *Mef2c*-het 뇌에서 *MEF2C* 단백질 수준이 감소되었다는 것을 도시한다. 전뇌 조직 용해물의 면역블로팅은 WT에 비교하여 *Mef2c*-het 마우스에서 줄어든 *MEF2C*를 나타냈다. 단백질 수준은 β-액틴(대조군 %)으로 정규화되었다. 대표적인 블랏은 하단에 예시했다. 값은 평균 ± s.e.m., n = 5; 스튜던트 t-시험에 의한 \*\*P < 0.01이다.

**도 3**은 MCHS-유사 표현형을 나타낸 *Mef2c*-het 마우스를 도시한다. **도 3a**는 *Mef2c*-het 마우스가 조기에 사망한 것을 도시한다. WT 마우스에 비교하여 *Mef2c*-het의 수는 E18에서는 거의 동등하였지만, 성인기에서는(~3개월) WT의 것의 ~45%였다(카이-제곱에 의한 \*P < 0.05). **도 3b** 및 **도 3c**는 훈련 동안(**도 3b**) 및 후속적인 프로브 테스트(**도 3c**)에서 *Mef2c*-het 마우스의 반즈 미로에서 손상된 공간적 학습 및 기억을 도시한다. **도 3d** 및 **도 3e**는 홀-보드 탐색에서 *Mef2c*-het 마우스의 증가된 발 클라스핑(**도 3d**) 및 반복적인 머리 침지(**도 3e**)를 도시한다. 데이터는 평균 ± s.e.m.; **도 3b, c** 및 **e**에서 유전자형당 n = 9-11 마우스; d에서 n = 30 (WT) 및 21 (het); n.s. 유의하지 않음, 스튜던트 t-시험 (**도 3c-e**) 또는 ANOVA (**도 3b**)에 의한 \*P < 0.05, \*\*P < 0.01이다.

**도 4**는 마이크로어레이 분석에 의한 *Mef2c*-het 마우스에서 신경인성 및 시냅스 유전자의 하향조절을 도시한다. **도 4a**는 볼캐노 플롯이 출생 후 일(P) 30 *Mef2c*-het 및 WT 해마에서의 RNA 발현 프로파일링을 나타내는 것을 도시한다(적색 = 위, 청색 = 아래, P < 0.05는 녹색 선으로 표시됨). [비교: 색상을 언급하는 **도 4** 및 후속적인 **도 5-19**에서, 색상 이미지는 본 발명자의 하기 공보에 나타나 있다: Tu S, Lipton SA, Nakanishi N, et al. NitroSynapsin therapy for the mouse *MEF2C* haploinsufficiency model of human autism. *Nature Commun* 8, 1488 (2017)]. **도 4b**는 NextBio 및 유전자-온톨로지 (GO-용어) 필터링을 사용하여 WT에 비하여 *Mef2c*-het에서 상당히 변경된 발현을 갖는 모든 유전자의 경로-강화 분석을 나타낸다. **도 4c**는 WT 대조군의 백분율(% Ctrl; n = 군당 4마리)로 *Mef2c*-het 마우스에서 (18S에 대비한) mRNA의 발현 수준을 보여주는 qPCR 실험의 그래프를 도시한다. 데이터는 평균 ± s.e.m.; 스튜던트 t-시험에 의한 \*P < 0.05, \*\*P < 0.01이다.

**도 5**는 *Mef2c*-het 마우스가 비정상적인 뉴런 특성을 나타냈음을 도시한다. **도 5a**는 WT 및 *Mef2c*-het 마우스의 덴테이트 뉴어량 (DG)에서 NeuN+ 세포를 나타내는 면역조직화학을 도시한다. **도 5b**는 WT에 비하여 *Mef2c*-het 마우스에서 해마 (hipp) 및 피질 (Ctx)에서의 줄어든 NeuN+ 세포수를 나타내는 정량화를 제시한다. 해마 측정은 DG의 분자 층에서 과립 세포에 대해, 그리고 피질 측정은 전두엽 층 IV 및 V에 대해 수행되었다. **도 5c** 및 **도 5d**는 *Mef2c*-het 마우스에서 별아교세포종과 일치하는 GFAP+ 세포의 증가된 수를 도시한다. **도 5e**는 WT 및 *Mef2c*-het 마우스의 시각령의 V1(일차 시각령), M2ML(이차 시각령 중간면 영역), 및 LPTA(측면 두정 연합 피질)에서 골지 염색에 의해 시각화된 대표적인 수직상조직을 도시하는 뉴로루시다를 나타낸다. **도 5f** 및 **도 5g**는 *Mef2c*-het 뉴런에서 수직상 교차의 누적 수(**도 5f**) 및 수직상 길이(**도 5g**)에서 감소를 보여주는 Sho11 분석의 요약 그래프를 나타낸다. 기준자: 50 μm. 데이터는 평균 ± s.e.m.; n = 군당 4마리이다. **도 5a-d**에서 스튜던트 t-시험 및 **도 5f** 및 **도 5g**에서 ANOVA에 의한 \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

**도 6**은 *Mef2c*-het 마우스가 비정상적인 신경발생을 나타냈음을 도시한다. **도 6a**는 8-주령 WT 및 *Mef2c*-het 마우스에서 DG의 아과립 구역 (SGZ)에서 PCNA (녹색) 및 DCX (red) 이중 염색을 보여주는 공초점 이미지이다. **도 6b** 및 **도 6c**는 *Mef2c*-het DG에서 증식 세포(**도 6b**) 및 발달 뉴런(**도 6c**)의 수에서 감소를 드러내는 PCNA+ 및 DCX+ 세포의 정량화를 도시한다. **도 6d**는 8-주령 WT 및 *Mef2c*-het 마우스에서 BrdU 주사 4주 후 BrdU (녹색) 및

NeuN (적색) 이중 염색이 새로-태어난 DG 뉴런(화살표: BrdU+/NeuN+)을 밝혀낸 것을 도시한다. **도 6e**는 *Mef2c-het* DG에서 BrdU+/NeuN+ 세포에서의 감소를 도시한다;  $n =$  패널 A-E에서 유전자형당 4마리 마우스. **도 6f**는 성인 *Mef2c-het* 및 WT 마우스에서 태어난 뉴런의 형태적 발달의 예를 도시한다. 덴테이트 뇌이랑 (DG)에서 분열 세포는 레트로바이러스-매개된 유전자 형질도입을 통해 mCherry로 라벨링된다. 마우스는 4주 후에 희생되었다. **도 6g**는 4-주령 뉴런의 총 수지상 길이의 정량화가 WT 마우스( $n = 12$ )에 비교하여 *Mef2c-het* 마우스( $n = 17$ )에서 감소된 수지상 길이를 밝혔다는 것을 도시한다. **도 6h**는 정량화가 WT 마우스( $n = 28$ )에 비교하여 *Mef2c-het* 마우스( $n = 71$ )에서 감소된 체세포의 크기를 나타냈다는 것을 도시한다. **도 6i**는 신경돌기 수의 정량화가 WT 뇌에 비교하여 *Mef2c-het*에서의 4-주령 뉴런의 일차 신경돌기의 정상적인 수( $n_{WT} = 25$ ,  $n_{het} = 55$ )를 나타냈지만, 감소된 수의 이차( $n_{WT} = 25$ ,  $n_{het} = 55$ ), 삼차( $n_{WT} = 25$ ,  $n_{het} = 55$ ), 사차( $n_{WT} = 12$ ,  $n_{het} = 17$ ), 및 오차( $n_{WT} = 12$ ,  $n_{het} = 17$ ) 신경돌기를 나타냈다는 것을 도시한다. 색션 두께: 40  $\mu\text{m}$ . 기준자: 50  $\mu\text{m}$ . 값은 평균  $\pm$  s.e.m., 스튜던트  $t$ -시험에 의한  $*P < 0.05$ ;  $***P < 0.001$ 이다.

**도 7**은 *Mef2c-het* 마우스가 시냅스 신경전달에서 변경된 시냅스 특성 및 흥분성/억제성 (E/I) 불균형을 나타냈음을 도시한다. **도 7a**는 WT 및 *Mef2c-het* 해마에서 스냅토파이신(SYP), VGLUT1, 및 VGAT의 면역조직화학을 도시한다. 기준자: 500  $\mu\text{m}$ (*좌상부 패널*), 50  $\mu\text{m}$ (*중간 및 좌하부 패널*). **도 7b**는 *Mef2c-het* 해마의 덴테이트 뇌이랑 (DG) 및 CA1 영역에서 SYP의 면역반응성이 감소했지만 피질 (Ctx) 또는 선조체(str, *좌측*)에서는 그렇지 않음을 도시한다. DG 측정은 분자 층에서 수행되었고, CA1은 피라미드 세포 층에서, Ctx는 전두 피질 층 IV 및 VI에서, 그리고 str은 중격의지핵의 수준에서 조가비핵에서 수행되었다. *Mef2c-het* 해마에서 VGLUT1이 아닌 VGAT의 발현이 감소되었다(우측). 데이터는 평균  $\pm$  s.e.m.,  $n =$  군당 4마리; 스튜던트  $t$ -시험에 의한  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ 이다. **도 7c** 및 **도 7d**는 WT 및 *Mef2c-het* 마우스의 DG 뉴런의 슬라이스 기록으로부터 mIPSC(**도 7c**) 및 미니어처 흥분성 시냅스후 전류 (mEPSC)(**도 7d**)의 대표적인 트레이스를 도시한다. **도 7e-h**는 미니어처 억제성 시냅스후 전류 (mIPSC) 및 mEPSC 진폭 및 사건간 간격의 누적 플롯을 도시한다.  $n =$  유전자형 당 7-9마리; 2-샘플 Kolmogorov-Smirnov 테스트에 의한  $**P < 0.01$ .

**도 8**은 *Mef2c-het* 마우스가 해마에서 시냅스 단백질의 변경된 수준을 발현했음을 도시한다. **도 8a**는 시냅소솜-농축된 해마 용해물의 면역블랏이 *Mef2c-het* 마우스에서 스냅토파이신 (SYP) 및 GAD65는 감소했지만 VGLUT1은 감소하지 않았다는 것을 도시한다. 단백질 수준은  $\alpha$ -튜불린(대조군 %)으로 정규화했다. 대표적인 블랏은 *하단*에 예시했다. **도 8b**는 VGLUT1 대 GAD65의 비를 도시한다. **도 8c**는 시냅소솜-농축된 해마 용해물의 면역블랏이 *Mef2c-het* 마우스에서  $\alpha$ -튜불린에 대해 정규화된 VGLUT2를 증가시켰다는 것을 도시한다. 대표적인 블랏은 *하단*에 있다. 데이터는 평균  $\pm$  s.e.m.,  $n =$  유전자형 당 4마리;  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ 이다. 통계적 유의도는 스튜던트  $t$ -시험에 의해 결정되었다.

**도 9**는 *Mef2c-het* 마우스가 뇌 슬라이스 기록에서 해마 장기간 강화작용 (LTP)의 손상 및 쌍으로 된-펄스 촉진 (PPF)을 도시한다. **도 9a** 및 **도 9b**는 *Mef2c-het* 마우스가 손상된 LTP(**도 9a**) 및 줄어든 PPF(**도 9b**)를 나타냈음을 도시한다. 대표적인 트레이스는 그래프 아래에 도시되어 있다. 데이터는 평균  $\pm$  s.e.m.,  $n =$  유전자형 당 5-9마리이다. 통계적 유의도는 ANOVA(**도 9a**,  $*P < 0.01$ ) 또는 징후 테스트(**도 9b**,  $*P < 0.05$ )에 의해 결정되었다.

**도 10**은 니트로시넵신이 *Mef2c-het* 마우스에서 MCHS-유사 표현형을 구조했음을 보여준다. **도 10a**는 모리스 수중 미로에서 훈련 기간 동안 숨겨진 플랫폼을 발견하는 대기시간을 도시한다. **도 10b**는 프로브 테스트의 결과인, 비히클-처리된 *Mef2c-het* 마우스 (Het/V)가 목표와 반대편 사분면 사이의 선호를 나타내지 않았음을 도시하며, 이는 손상된 기억을 시사한다. 니트로시넵신(N)으로 처리는 이 효과(Het/N)를 구제했다. 대표적인 수영 패턴은 하부에 도시했다. **도 10c** 및 **도 10d**는 오픈 필드 테스트; Het/V 마우스가 N으로 처리(**도 10c**)에 의해 구제된 증가된 중심 시간을 나타냈음을 도시한다. 그에 반해서, Het/V 마우스는 정상 총 활성을 나타냈다(**도 10d**). **도 10e**는 반복적인 행동을 시사하는, 홀당 증가된 헤드-침지를 Het/V 마우스가 나타냈음을 도시한다. 각각의 약물이 구제했다. **도 10f-i**는 N 처리가 *Mef2c-het* 마우스에서 비정상적인 사회적 능력을 구제했음을 도시한다. **도 10e**는 3-챔버 사회적 능력 테스트에서 마우스 운동의 대표적인 트레이스를 도시한다. **도 10g-i**는 *Mef2c-het* 마우스(Het/V)가 각각의 챔버에서 소비한 시간(**도 10g**); 및 E(비어있음) 또는 S1(낮선 마우스 1) 챔버에 방문 수(**도 10h**) 및 방문 기간(**도 10i**)에 의해 측정된 사회적 상호작용에서 비정상을 나타냄을 도시한다. N 처리는 이 결손(Het/N)을 개선시켰다. M: 중간 챔버. 데이터는 평균  $\pm$  s.e.m.  $n =$  군 당 7-9마리이다. ANOVA에 의한  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ .

**도 11**은 *Mef2c* 이형접합성 또는 니트로시넵신 처리 어느 것도 모리스 수중 미로에서 마우스의 수영 속도를 변경

시키지 않았음을 나타낸다. 모리스 수중 미로의 훈련 단계 동안 숨겨진 플랫폼을 탈출하는 마우스의 속도는 거리를 대기시간으로 나눔으로써 계산되었다. 플랫폼에 대한 대기시간(도 10 참고)과 달리, 세 군의 마우스(WT/V, Het/V, 및 Het/N)의 속도는 유의하게 상이하지 않았다. 데이터는 평균 ± s.e.m., n = 군당 7-9마리이다.

도 12는 *Mef2c*-het 마우스의 신경 결핍을 구제함에 있어 니트로시넵신이 메만틴보다 더 효과적인을 도시한다. 도 12a는 니트로시넵신(N)으로 처리된 *Mef2c*-het 마우스에 의한 사회적 방문의 수는 3-챔버 사회적 상호작용 테스트에서 메만틴(M)-처리된 마우스의 것보다 유의하게 크다는 것을 도시하는 요약 그래프를 제시한다. 사회적 방문은 낯선 마우스(S1)가 있는 챔버로 방문의 수에서 비어있는 챔버(E)로 방문의 수를 뺀 값으로 구성된다. 데이터는 평균 + s.e.m., n = 군당 7-9마리; 스튜던트 t-시험에 의한 \*P < 0.05이다. 도 12b는 메만틴(M)이 아닌 니트로시넵신(N)으로 처리된 *Mef2c*-het 마우스에서 해마 NeuN+ 세포의 수가 비히클(V)-처리된 마우스에서보다 상당히 크다는 것을 도시하는 요약 그래프를 제시한다. 데이터는 평균 + s.e.m., n = 군당 4-5마리; ANOVA에 의한 \*\*P < 0.01이다.

도 13은 니트로시넵신(N) 처리가 3-챔버 검정에서 WT 마우스의 사회적 행동을 변경시키지 않았다는 것을 나타낸다. 비히클(V) 또는 니트로시넵신(N)으로 3개월간 처리 후 WT 마우스에 의한 3개 챔버에서의 시간(도 13a), 방문의 수(도 13b), 및 방문의 기간(도 13c)을 나타내는 요약 그래프. 니트로시넵신 처리는 WT 마우스의 사회적 행동을 유의하게 변화시키지 않았다. 데이터는 평균 + s.e.m., n = WT/V 및 WT/N 군에 대해 각각 10마리이다. E: 비어있는 챔버; S1: 낯선 마우스 1 챔버. ANOVA 또는 t-시험에 의한 E에 비교한, \*P < 0.05 및 \*\*P < 0.01.

도 14는 *Mef2c*-het 마우스가, 니트로시넵신에 의해 구제되지 않은 발 클라스핑을 제외하고 비정상 운동 행동을 나타내지 않았다는 것을 도시한다. 비히클(V) 또는 니트로시넵신(N)으로 3개월간 처리 후 WT 및 *Mef2c*-het 마우스의 운동 행동을 도시하는 요약 그래프. *Mef2c*-het 마우스는 평균대(도 14a), 원통형 막대(도 14b), 견인 수용력(도 14c), 매달리기 테스트(도 14d), 또는 수직 장대 테스트(도 14e) 상에서 상당히 변경된 행동을 나타내지 않았다. 이들 실험에서, 니트로시넵신으로 처리는 WT 또는 *Mef2c*-het 마우스의 행동에 유의한 영향을 미치지 않았다. *Mef2c*-het 마우스에서 관측된 비정상 발 클라스핑 활성화는 니트로시넵신 처리에 의해 구제되지 않았다(도 14f). 데이터는 평균 + s.e.m., n = WT/V, WT/N, Het/V, 및 Het/N 군 각각에 대해 12, 5, 11, 및 13마리이다. ANOVA에 의한 WT/V에 비교한 \*P < 0.05.

도 15는 니트로시넵신이 *Mef2c*-het 마우스에서 비정상 뉴런 및 시냅스 특성을 구제했다는 것을 도시한다. 도 15a는 비히클(V) 또는 니트로시넵신(N)으로 처리된 WT 및 *Mef2c*-het 마우스의 해마 덴테이트 뇌이랑(DG)의 분자층(ML)에서 NeuN, VGLUT1, VGAT, 및 VGLUT2의 면역조직화학 이미지를 도시한다. 기준자: 500 μm(최상부 패널), 25 μm(중간 패널), 40 μm(최하부 패널). 도 15b-f는 *Mef2c*-het 마우스의 해마에서 니트로시넵신에 의한 총 NeuN+ 세포수의 줄어든 수의 구제(도 15b), VGAT(도 15d) 및 VGLUT2(도 15f)의 감소된 면역반응성, 및 VGLUT1/VGAT(e) 또는 VGLUT2/VGAT(도 15g)의 증가된 비를 도시하는 요약 그래프를 제시한다. 도 15h는 *Mef2c*-het 마우스에서 손상된 LTP가 니트로시넵신에 의해 또한 구제되었음을 도시한다. 데이터는 평균 ± s.e.m., n = 도 15a-g에서 군당 4-5마리 및 도 15h에서 7-9마리이다. ANOVA에 의한, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

도 16은 *Mef2c*-het 마우스가 해마에서 증가된 카스파제-3 활성화 및 세포자멸사를 나타냈음을 도시한다. 도 16a는 비히클(WT/V) 또는 니트로시넵신(WT/N)으로 처리된 WT 마우스의 해마 CA3 영역, 및 비히클(Het/V) 또는 니트로시넵신(Het/N)으로 처리된 *Mef2c*-het 마우스에서 활성화된 카스파제-3(Act Casp 3, 최상부 패널) 및 TUNEL 염색(최하부 패널)의 면역조직화학을 도시한다. 기준자, 25 μm. 도 16b 및 도 16c는 카스파제-3+(도 16b) 및 TUNEL+ 뉴런(도 16c)이 대조군 WT/V 마우스에 비교하여 Het/V 마우스에서 상당히 증가되었다는 것을 나타내는 히스토그램을 제시한다. 게다가, 이들 표현형의 둘 모두는 Het/N 마우스에서 개선되었다. 데이터는 평균 + s.e.m., n = 군당 4-5마리; ANOVA에 의한 \*P < 0.05이다.

도 17은 니트로시넵신이 *Mef2c*-het 해마에서 정상세포의 수를 정규화했음을 도시한다. 도 17a-c는 *Mef2c*-het 마우스 대 WT(도 17b 대 도 17a)에서 정상세포의 형태를 갖는 증가된 GFAP+ 세포를 도시하는 대표적인 이미지를 도시한다. GFAP+ 세포의 수는 니트로시넵신으로 만성 처리에 의해 WT 수준으로 회복되었다(도 17c). ML, 덴테이트 뇌이랑(DG)의 분자층. 기준자, 25 μm. (도 17d) 비히클(V) 또는 니트로시넵신(N)으로 처리된 WT 및 *Mef2c*-het 마우스의 해마에서 GFAP+ 세포의 정량화. 데이터는 평균 + s.e.m., n = 군당 4 또는 5마리; ANOVA에 의한 WT/V에 비교한 \*\*P < 0.01 및 Het/V에 비교한 #P < 0.05이다.

도 18은 *Mef2c*-het 마우스가 파브알부민+ (PV+) 억제성 시냅스 및 세포에서 감소를 나타냈음을 도시한다. 도 18a는 비히클(WT/V)로 처리된 WT 마우스 및 비히클(Het/V) 또는 니트로시넵신(Het/N)으로 처리된 *Mef2c*-het 마우스의 해마에서 PV+ 면역반응성을 나타내는 대표적인 이미지를 제시한다. 더 높은 배율의 PV+ 뉴런(각각의 패

널의 최하부 좌측) 또는 시냅스 (각각의 패널의 최하부 우측). 기준자, 25  $\mu$ m. **도 18b**는 WT/V 마우스에 비교된 Het/V 마우스에서 PV-면역반응성 시냅스에서의 감소를 나타내는 히스토그램을 제시한다. 이 감소는 니트로시넵신 처리 후 상당히 개선되었다. **도 18c**는 WT/V 마우스에 비교하여 Het/N 마우스에서가 아닌 Het/V 마우스에서 PV-면역반응성 세포의 수에서 감소를 나타내는 히스토그램을 제시한다. 데이터는 평균 + s.e.m.,  $n$  = 군당 4-5마리; ANOVA에 의한  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ 이다.

**도 19**는 니트로시넵신 처리가 *Mef2c*-het 마우스 내 LTP에서의 결핍을 구제했음을 도시한다. WT/V-, Het/V-, 및 Het/N-처리된 마우스로부터 제조된 슬라이스에서 해마 LTP의 유도 전(좌측) 및 후(우측) 유발된 전류의 대표적인 트레이스. 각각의 동물 군에 대한 fEPSP 기울기는 본문 내 **도 15h**에 제시되어 있다.

**도 20a**는 시냅스의부에 존재하는 *N*-메틸-D-아스파르테이트 수용체(eNMDAR) 활성이 결절성 경화증 2(TSC2)를 불활성화시킨 신호전달을 유발하였고 메만틴보다 큰 정도로 NMDAR 길항제 니트로메만틴(일명 니트로시넵신, YQW-036, NMI-6979)에 의해 약화되었다는 것을 도시한다. 개략도는 NMDA 수용체 길항제가 p38 MAPK 캐스케이드의 활성화를 차단했음을 나타낸다. 니트로메만틴 YQW-036(니트로시넵신으로도 알려져 있음)은 메만틴보다 더 효과적인 길항제이고, 따라서 더욱더 큰 유의한 효과 (그러므로, 더 큰 억제제 기호)를 발휘했다. **도 20b**는 eNMDAR 자극이 p38 MAPK/ MAPKAPK2/TSC2/mTORC1/S6K1 캐스케이드의 인산화/활성화를 증가시켰다는 웨스턴 블랏 증거를 도시한다. eNMDAR 길항제 메만틴(10  $\mu$ M)으로 eNMDAR의 차단은 이 신호전달을 감소시켰다. 이 실험은 유사한 결과로 4회 반복되었고, **도 20c**에 정량화되었다. **도 20c**는 짝을 이루지 않은 t-시험에 의한 면역블랏의 정량화를 도시한다; 평균  $\pm$  s.e.m.,  $n$  = 4,  $*P < 0.05$  (Mem, 메만틴).

**도 21**은 *Tsc2*<sup>+/-</sup> (het) 마우스의 시냅스 완전성에 대한 메만틴(M) 및 니트로시넵신(N, 도면에서 니트로메만틴으로 표지됨) 처리의 효과를 도시한다. **도 21a**는 비히클, M 또는 N으로 처리된 3-월령 WT 및 *Tsc2*<sup>+/-</sup> 형질전환 마우스로부터의 뇌 슬라이스의 대표적인 조직학적 이미지를 나타낸다. SY38 (스냅토파이신)-양성 시냅스 말단 (적색)에 대한 염색은 해마에 도시되어 있다. **도 21b**는 비히클, M 또는 N 처리를 한 WT 및 *Tsc2*<sup>+/-</sup> 형질전환 마우스에서 스냅토파이신의 면역반응성의 정량화를 도시한다. 시냅스 완전성은 면역반응성 SY38에 의해 점유된 면적 퍼센트로 측정된다. N으로 처리된 *Tsc2*<sup>+/-</sup> 마우스는 시냅스 신호를 WT 수준으로 상승시켰고 비히클 처리된 것보다 상당히 더 컸다. % 면적 + s.e.m.으로 제시된 값, t 테스트에 의한  $*P < 0.5$ ,  $n$  = 처리 군당 3마리 마우스.

**도 22**는 *Tsc2*<sup>+/-</sup> (het) 마우스에서 비정상 CA1-LTP 및 니트로시넵신으로 개선을 도시한다. **도 22a**는 다중전극 어레이(MEA)에 의해 해마 슬라이스로부터 기록된 LTP(장기간 강화작용)를 도시한다. fEPSP 기울기는 30초마다 플롯팅되고 *Tsc2*<sup>+/+</sup> 및 *Tsc2*<sup>+/-</sup> (7마리 마우스로부터  $n$  = 7개 슬라이스)에 대해 평균  $\pm$  s.e.m.을 나타낸다. **도 22b**는 *Tsc2*<sup>+/-</sup> 마우스에 대한 비히클 대조군 대 1-2  $\mu$ M 메만틴 또는 니트로시넵신 처리의 효과를 도시한다(13마리 마우스로부터  $n$  = 13개 슬라이스, 유도 55-65분 후에 모니터링된 (메만틴이 아닌) 니트로시넵신에 의한 LTP의 개선에 대한  $P < 0.001$ ).

**도 23**은 공포 조건화 테스트에 의해 평가된 *Tsc2*<sup>+/-</sup> (het) 마우스에서 맥락 식별에 대해서 메만틴이 아닌 니트로시넵신 처리의 유의한 효과를 도시한다. 공포-조건화 시험에서 비히클, 메만틴 또는 니트로시넵신으로 처리된 3-개월령 WT 및 *Tsc2*<sup>+/-</sup> 형질전환 마우스의 동결 시간. 시험된 마우스의 모든 4개의 군(WT-비히클, Het-비히클, Het-메만틴, 및 Het-니트로시넵신)은 "훈련 맥락" 및 "신규한 맥락 + 큐"에서 동결을 보였으며, 이는 그것의 조건화된 공포 반응이 유전자형 또는 약물에 의해 영향을 받지 않았음을 나타낸다. 추가로, WT 마우스는 훈련과 신규한 맥락 사이에 맥락 식별을 나타냈다( $*P = 0.032$ ). 그에 반해서, 비히클- 또는 메만틴-처리된 *Tsc2*<sup>+/-</sup> 마우스는 이 행동에서 결핍을 보여, 훈련과 신규한 맥락 사이에 식별의 결여를 초래한다( $n.s.$  = 유의차 없음). 니트로시넵신(메만틴은 아님) 처리는 이 표현형을 개선하여, *Tsc2*<sup>+/-</sup> 마우스에서 맥락 식별을 정상화했다( $**P = 0.023$ ). 값은 평균 + s.e.m.이다 ( $n$  = 군당 7-12마리 마우스).

**도 24**는 니트로시넵신 처리에 의해 레트 중후군의 *MeCP2* 녹아웃 (KO) 마우스 모델의 개선된 로타로드 성능을 도시한다. 마우스를 고정된 실린더 상에 놓고 그 다음 실린더를 천천히 10회전/분으로 가속시켰다. 실린더로부터 떨어지기 전 10rpm에서의 총 시간이 기록되었다. V = 비히클 처리(WT에 대해  $n$  = 12마리 및 *MeCP2* KO 마우스에 대해  $n$  = 7마리; M = 메만틴 처리(WT에 대해  $n$  = 16마리 및 *MeCP2* KO에 대해  $n$  = 13마리; N = 니트로시넵신 처리(WT에 대해  $n$  = 5마리 및 *MeCP2* KO에 대해  $n$  = 14마리). 값은 +s.e.m.;  $*P < 0.05$ 이다. M이 아닌 N의 처리는

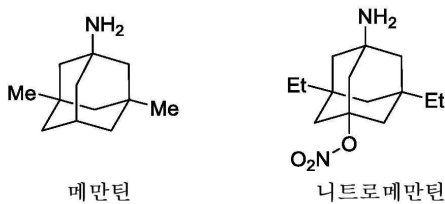
이 로타로드 시험에서 상당히 개선된 운동 성능을 발휘했다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0018] 뇌에서, 전사 인자인, 근세포 향상제 인자 2 (MEF2)는 뉴런 분화, 시냅스 형성, 및 뉴런 생존에 대해 중요하다. 네스틴-발현 신경 선조 세포에서 *Mef2c*의 조건적 녹아웃은 손상된 전기생리적 네트워크 특성 및 자폐 스펙트럼 장애(ASD)에 관련된 신경 장애인 레트 증후군을 연상시키는 행동 결핍을 갖는 마우스를 생산하는 것으로 나타났다. 염색체 5q14.3q15 미세결실의 영역은 *MEF2C* 단배수-결손으로 확인된 소아에서 신경 결손 표현형을 야기한다. 이들 환자는 ASD, 지적 및 발달 장애(IDD), 불량한 상호 행동, 언어 결핍, 정형 및 반복적인 행동, 및 간질을 포함한 징후 및 증상을 나타낸다. *MEF2C* 단배수-결손에 의해 야기된 장애는 집합적으로 *MEF2C* 단배수-결손 증후군(MCHS)으로 불린다. 추가로, 다수의 MEF2 표적 유전자는 공유된 조상을 갖는 인간 가계도에서 자폐 증-관련된 유전자로 확인되었다. 따라서, MCHS에 대한 청구된 치료 방법은 다른 형태의 ASD/IDD 및 간질도 효과적으로 치료하는 데 유용성을 발견한다.

[0019] ASD, IDD, 간질 및 관련된 증상의 치료에 대한 개선된 요법이 필요하다. 이런 점을 따라, 개선된 일련의 약물이 최근에 이중 메만틴-유사 작용 및 시냅스외부에 존재하는 NMDA 수용체(eNMDAR)의 우수한 산화환원(S-니트로실화)-기반 억제에 기초하여 합성되었다. 초기에 이들 화합물은 '니트로메만틴'으로 지칭되었지만 최근에 대표 화합물인, YQW-036 (또는 NMI-6979)이 시냅스 수 및 다중 공격의 면에서 기능을 회복하는 그것의 능력 때문에 니트로시넵신으로 지정되었다. 식 1은 메만틴 및 니트로메만틴(일명 니트로시넵신)의 구조를 나타낸다.

[0020] 식 1.



[0021] 본 명세서에서 실시예에서 구체화된 바와 같이, 신경행동 결핍, 흥분성/억제성(E/I) 불균형, 및 조직학적 손상은 *Mef2c*<sup>+/-</sup> (*Mef2c*-het) 마우스에서 니트로시넵신(니트로메만틴 YQW-036/NMI-6979로도 알려져 있음 - 구조 1 참고)으로 치료에 의해 모두 개선되었다. *Mef2c*-het 마우스는 ASD의 인간 MEF2C 단배수-결손의 모델로 개발되었다. *Mef2c*-het 마우스는 뉴런 및 시냅스 비정상, 해마에서 줄어든 억제성 및 증가된 흥분성 시냅스 전달, 억제된 장기강화작용(LTP), 및 MCHS-유사 행동 표현형을 표시했다. 니트로시넵신으로 처리 전, 이들 마우스는 줄어든 신경발생, 향상된 뉴런 세포자멸사, E/I 신경전달의 변경된 비, 및 자폐 스펙트럼 장애(ASD), 지적 및 발달 장애(IDD) 및 간질이 있는 인간 환자의 것과 유사한 행동 결핍의 표현형을 나타냈다. 중요하게는, 이들 표현형의 거의 모두는 니트로시넵신으로 만성 치료에 의해 구체되거나 완화되었다. 또한, 레트 증후군 및 결정성 경화증의 인간 질환의 추가의 마우스 모델은 E/I 불균형과 연관된 이들 다른 형태의 ASD/IDD 및 간질과 연관된 표현형을 교정하는 데 니트로시넵신이 유사하게 효과적이었다는 것을 나타냈다. 기전에도 불구하고, 니트로시넵신은 ASD/IDD 및 간질의 다중 마우스 모델에서 효과적인 치료로 나타났고, 따라서 인간 ASD/IDD 및 간질의 치료에 대해서 효과적이어야 한다.

[0023] 메만틴 같은 다른 NMDAR 길항제는 이러한 목적을 위한 인간 임상시험에서 실패했기 때문에, 니트로시넵신이 MCHS 및 다른 형태의 ASD/IDD 및 간질 증후군에 대해 효능이 있었다는 것은 본 발명자들에게 놀라운 것이었다 (Fung LK, Hardan AY. Developing medications targeting glutamatergic dysfunction in autism: Progress to date. *CNS Drugs* **29**, 453-463 (2015); Tu S, Lipton SA, Nakanishi N, et al. NitroSynapsin therapy for the mouse MEF2C haploinsufficiency model of human autism. *Nature Commun* **8**, 1488 (2017)). 니트로시넵신은 시냅스 전달 및 장기강화작용(LTP)의 차단을 피하는 임상적으로 허용되는 특성을 가지면서 우수한 효능을 나타내기 때문에 이와 관련하여 작동한다.

[0024] 도 1은 니트로시넵신에 의해 구제된 E/I 불균형 및 MCHS-유사 표현형으로 이어지는 *Mef2c* 단배수-결손의 요약 다이어그램을 도시한다. *Mef2c* 단배수-결손은 줄어든 VGAT 및 증가된 VGLUT2 단백질 수준을 유발시켜, E/I 불균형(과흥분성) 및 시냅스 기능이상을 초래한다. *Mef2c* 단배수-결손은 또한 신경 손실, 현저히 감소된 수의 PV+

뉴런간 억제성을 야기한다. 이들 시냅스 및 세포 비정상성은 *Mef2c-het* 마우스에서 관측된 MCHS-유사 행동 표현형의 근본적인 원인일 수 있다. 조직학적 및 행동 표현형은 니트로시냅신(NitroMem)으로의 만성 치료에 의해 FDA-승인된 의약품 메만틴(Mem)보다 상당히 더 큰 정도로 개선된다.

[0025] 신경 질환

[0026] 일부 양태에서, 대상체에서 적어도 하나의 신경 질환을 치료하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 본 방법은 본 명세서에 개시된 화합물을 상기 대상체에게 전달하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 화합물의 조합을 상기 대상체에게 전달하는 단계를 포함할 수 있다. 본 신경 질환은 당해 분야의 숙련가가 평가하는 방법을 알고 있는 바와 같은 E/I 불균형과 관련될 수 있다. 간단히 말해서, E/I는 수많은 방법, 예를 들어, 과도흥분성 또는 억제성 전달에서의 결핍을 보여주는 패치-클램프 전기 기록에 의해 평가될 수 있다(Tu et al., 2017 *앞에서 언급한 것*). Tu et al., 2017(*앞에서 언급한 것*)에서 기재된 바와 같은 흥분성 및 억제성 시냅스의 조직학적 평가는 또한 E/I 불균형을 평가하기 위해 부분적으로 사용될 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법에 따라 치료될 수 있는 인간 또는 다른 동물에서의 신경 질환은, 비제한적으로 임의의 형태의 자폐증 (ASD), *MEF2C* 단배수-결손 증후군(MCHS), 지적 및 발달 장애(IDD), 간질, 레트 증후군, 및 결절성 경화증을 포함한다.

[0027] 본 명세서에 개시된 치료 방법은 유년-발병 신경 질환을 치료하는 것을 포함한다. 유년-발병 신경 질환은 하나 이상의 신경적 또는 행동 비정상성이 소아기에 나타나는 것이다. 일부 사례에서, 소아기는 0세에서 18세 사이로 간주된다. 일부 사례에서, 아동은 0세에서 12세 사이이다. 신경적 및 행동 비정상의 비-제한적인 예는 손 클라스핑, 눈 마주침의 결핍, 느린 머리 성장, 발작, 반복적인 동작, 언어의 감소 또는 상실, 손잡기, 박수, 두드리기, 무작위적인 파지 및 해제, 호흡 불규칙, 사회적 상호작용의 감소 또는 상실, 의사소통 기술의 사회적 상호작용의 감소 또는 상실, 불안정적인 보행, 행위상실증, 운동 어려움, 근육 약화, 강성/경직성, 경직, 전신운동 지연, 일반화된 긴장저하, 불량한 눈 마주침, 손-입 고경관념, 사시, 및 안면 이형성을 포함한다. 유년-발병 신경 질환의 비-제한적인 예는 자폐 스펙트럼 장애(ASD), 지적 및 발달 장애(IDD), 간질, *MEF2C* 단배수-결손 증후군(MCHS), 및 결절성 경화증을 포함한다. 일부 사례에서 IDD는 자폐증 자체를 포함한다, ASD에 해당하는 질환을 포함한다. 자폐 스펙트럼 장애는, 비제한적으로 자폐증, 아스퍼거의 증후군, 및 레트 증후군을 포함한다. 유년-발병 신경 질환으로 간주될 수 있는 추가의 질환은 주의력 결핍 장애, 주의력 결핍 과반응 장애, 전반적 발달 장애, 및 강박 장애를 포함한다. 일부 사례에서, 유년-발병 신경 질환은 질환/감염, 두부 외상, 또는 독성에 의해 야기된 뇌 손상에 기인한다.

[0028] 본 명세서에 개시된 치료 방법은 시냅스 가소성을 복원하는 것을 초래하여 E/I 불균형을 개선할 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 신경 손실을 예방할 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 시냅스 마커의 증가를 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 장기간 강화작용(LTP)을 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 뉴런 수의 증가를 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 E/I 불균형 정정을 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 개선된 자폐성/MCHS-유사 행동 결핍을 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 증가된 억제성 뉴런간/파브알부민 (PV)+ 시냅스를 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 정상화한 VGAT 및/또는 VGLUT2 수준을 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 정상화한 VGLUT1 대 VGAT의 비, VGLUT2 대 VGAT의 비, 또는 이들의 조합을 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 세포자멸적 뉴런을 구제할 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 대상체의 뇌에서 관측된 세포자멸적 뉴런의 수를 감소시킬 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 인지 결손 감소 또는 예방을 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 반복적인 행동 감소 또는 예방을 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 손상된 사회적 상호작용 감소 또는 예방을 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 불안 감소 또는 예방을 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 비정상적인 운동 행동 감소 또는 예방을 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 손 클라스핑 감소 또는 예방을 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 비정상 사회적 행동 감소 또는 예방을 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 기억을 개선할 수 있다. 본 명세서에 개시된 치료 방법은 학습을 개선할 수 있다.

[0029] 일부 사례에서, 본 명세서에 개시된 방법은 자폐 스펙트럼 장애(ASD)가 있는 대상체를 치료하는 것을 포함한다. ASD에 해당하는 대상체는 자폐증, 아스퍼거 증후군, 및 상세분명의 전반적 발달 장애(PDD-NOS), 및 소아기 붕괴성 장애로 진단된 대상체를 포함한다. 이들 대상체는 사회적 의사소통 및 상호작용에 어려움을 나타낸다. 이들은 또한 반복적인 행동을 나타낼 수 있다. ASD의 진단은 가장 최신의 정신적 장애의 진단 및 통계적 지침서 및/또는 질환 및 관련된 건강 문제의 국제 통계적 분류(ICD)에 공개된 기준에 기초하여 수행될 수 있다. 의사는 자폐 진단 인터뷰-수정 및 자폐증 진단 관찰 일정과 같은 평가를 관리할 수 있다. 다른 질환, 예컨대 간질, 결절성 경화증(비-악성 종양), 불안, 우울증, 정신분열증, 주의력 결핍 과잉행동 장애(ADHD), 및 감각 처리 장애가

중증 ASD와 동반이환된다. 본 명세서에 개시된 방법은 ASD 또는 ASD와 동반이환된 질환의 중증도를 평가하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 화합물을 대상체에게 투여하기 전에 ASD 또는 ASD와 동반이환된 질환의 하나 이상의 증상의 존재 및/또는 중증도를 평가하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 화합물을 대상체에게 투여한 후에 ASD 또는 ASD와 동반이환된 질환의 하나 이상의 증상의 존재 및/또는 중증도를 평가하는 것을 포함할 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법은 ASD 또는 ASD와 동반이환된 질환의 하나 이상의 증상의 중증도를 감소시키는 것을 초래할 수 있다. 일부 사례에서, 방법은 ASD가 있는 대상체에게 본 명세서에 개시된 화합물을 전달하는 단계 및 말하기 및 언어 요법 및 직업적 요법과 같은 행동 요법을 대상체에게 제공하는 단계를 포함한다.

[0030] 일부 사례에서, 본 명세서에 개시된 방법은 지적 및 발달 장애(IDD)가 있는 대상체를 치료하는 것을 포함한다. IDD는 대상체의 신체적, 인지, 및/또는 정서 발달에 영향을 주는 질환이다. IDD가 있는 대상체는 학습, 추리, 문제 해결, 및/또는 사회화에 어려움이 있을 수 있다. IDD가 있는 대상체는 하나 이상의 행동 장애, 말하기 장애, 언어 문제, 발작, 및 물리적 장애를 나타낼 수 있다. IDD가 있는 대상체는 손상된 시력을 가질 수 있다. IDD가 있는 대상체는 손상된 청력을 가질 수 있다. IDD가 있는 대상체는 대사 장애를 가질 수 있다. 일부 사례에서, 이들 문제는 나이가 들면서 악화된다. IDD, 또는 IDD와 연관된 질환의 예는, 비제한적으로, 뇌성 마비, 다운 증후군, 취약 X 증후군, 자폐 스펙트럼 장애(ASD), 페닐케톤뇨증(PKU) 및 선천성 갑상선기능저하증을 포함한다. 본 명세서에 개시된 방법은 IDD 또는 IDD 와 동반이환된 질환의 중증도를 평가하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 화합물을 대상체에게 투여하기 전에 IDD의 하나 이상의 증상의 존재 및/또는 중증도를 평가하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 화합물을 대상체에게 투여한 후에 IDD의 하나 이상의 증상의 존재 및/또는 중증도를 평가하는 것을 포함할 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법은 IDD의 하나 이상의 증상의 중증도를 감소시키는 것을 초래할 수 있다. 일부 사례에서, 방법은 대상체에게 본 명세서에 개시된 화합물을 전달하는 단계 및 말하기 및 언어 요법 및 직업적 요법과 같은 행동 요법을 IDD 가 있는 대상체에게 제공하는 단계를 포함한다.

[0031] 일부 사례에서, 본 명세서에 개시된 방법은 간질이 있는 대상체를 치료하는 것을 포함한다. 간질은 간질 발작을 특징으로 하는 다양한 신경 장애를 기술하는 용어이다. 이들 발작은 뇌에서 과도한 및/또는 비정상 활성화에 의해 야기되는 것으로 여겨진다. 많은 사례에서, 발작은 약물, 수술, 신경자극, 식이 제한, 또는 이들의 조합으로 제어될 수 있다. 방법은 약물, 수술, 신경자극, 식이 제한, 또는 이들의 조합과 조합하여 간질이 있는 대상체에게 본 명세서에 개시된 하나 이상의 화합물을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 화합물 대상체에게 투여하기 전에 대상체의 발작의 존재 및/또는 중증도를 평가하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 화합물 대상체에게 투여한 후에 대상체의 발작의 존재 및/또는 중증도를 평가하는 것을 포함할 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법은 대상체의 발작의 중증도를 감소시키는 것을 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법은 대상체의 발작의 빈도를 감소시키는 것을 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법은 대상체의 발작의 기간을 감소시키는 것을 초래할 수 있다.

[0032] 일부 사례에서, 본 명세서에 개시된 방법은 레트 증후군이 있는 대상체를 치료하는 것을 포함한다. 레트 증후군은 언어 및 협응, 및 반복적인 운동에 어려움을 특징으로 하는 신경 장애이다. 일부 사례에서 레트 증후군이 있는 대상체는 발작, 척추측만증, 및 수면 문제를 갖는다. 다른 증상은 줄어든 머리 성장(4세 이전), 손 제어의 감소 또는 상실, 언어의 감소 또는 상실, 손잡기, 박수, 두드리기, 무작위적인 파지 및 해제, 호흡 불규칙, 사회적 상호작용의 감소 또는 상실, 의사소통 기술의 사회적 상호작용의 감소 또는 상실, 불안정적인 보행, 행위 상실증, 운동 어려움, 근육 약화, 강성/경직성, 경직을 포함한다. 방법은 비제한적으로 수면 보조제, 선택적 세로토닌 재흡수 억제제, 항정신병약물, 및 베타-차단제, 또는 이들의 조합을 포함한, 레트 증후군을 치료하기 위해 사용된 약물과 조합하여 본 명세서에 개시된 하나 이상의 화합물을 레트 증후군이 있는 대상체에게 전달하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 레트 증후군이 있는 대상체에게 본 명세서에 개시된 화합물을 전달하기 전에 대상체의 증상의 존재 및/또는 중증도를 평가하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 레트 증후군이 있는 대상체에게 본 명세서에 개시된 화합물을 전달한 후에 대상체의 증상의 존재 및/또는 중증도를 평가하는 것을 포함할 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법은 레트 증후군이 있는 대상체의 증상 중 하나 이상의 중증도를 감소시키는 것을 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법은 레트 증후군이 있는 대상체의 증상 중 하나 이상을 경감시키는 것을 초래할 수 있다.

[0033] 일부 사례에서, 본 명세서에 개시된 방법은 결절성 경화증이 있는 대상체를 치료하는 것을 포함한다. 결절성 경화증(TSC)은 *TSC1* 또는 *TSC2* 유전자에서 이종접합성 돌연변이에 의해 야기된 상염색체 우세한 장애이다. TSC는

중증 신경적, 인지, 및 행동 결핍과 연관된다. TSC 환자는 불안 및 기분 장애와의 동반이환을 나타낼 수 있다. TSC-관련된 신경 증상에는 과도한 글루타메이트성 활성 및 변경된 시냅스 가시 구조가 동반될 수 있다. 결정성 경화증은 양성 종양을 전형적으로 특징으로 하는 증상이다. 이들 종양은 기관, 예컨대 뇌, 심장, 신장, 간, 눈, 폐 및 피부에 나타날 수 있다. 증상은, 비제한적으로 ASD의 징후, 발작, 인지 장애, 행동 비정상(예를 들어, 공격, 주의력 결핍 과잉행동 장애, 강박 장애, 자해), 피부 병태, 폐 질환 및 신장 질환을 포함한다. 이 증상들에 대한 소수의 치료 선택이 있지만, 에버롤리무스는 뇌 및 신장에서 종양의 치료를 위해 승인되었다. 방법은 에버롤리무스, 신경수술 개입, 또는 이들의 조합과 조합하여, 본 명세서에 개시된 하나 이상의 화합물을 결정성 경화증이 있는 대상체에게 전달하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 결정성 경화증이 있는 대상체에게 본 명세서에 개시된 화합물을 전달하기 전에 대상체의 증상의 존재 및/또는 중증도를 평가하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 결정성 경화증이 있는 대상체에게 본 명세서에 개시된 화합물을 전달한 후에 대상체의 증상의 존재 및/또는 중증도를 평가하는 것을 포함할 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법은 결정성 경화증이 있는 대상체의 증상 중 하나 이상의 중증도를 감소시키는 것을 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법은 결정성 경화증이 있는 대상체의 증상 중 하나 이상을 경감시키는 것을 초래할 수 있다.

[0034] 일부 사례에서, 본 명세서에 개시된 방법은 *MEF2C* 단배수-결손이 대상체를 치료하는 것을 포함한다. *MEF2C* 단배수-결손 증후군(MCHS)은 지적 장애, 자폐성 특징, 간질, 및 비정상 운동과 관련된 신경발달 장애이다. 증상은, 비제한적으로 전신운동 지연, 일반화된 긴장저하, 불량한 눈 마주침, 손-입 고정관념, 사시, 및 거울 안면 이형성을 포함한다. 일부 증상은 뇌에서 정상 전기 활성의 변경된 흥분성 대 억제성 비(E/I 비)에 기인할 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법은 E/I 비를 정상 범위(예를 들어, *MEF2C* 단배수-결손이 없는 사람의 것)로 복원하고 ASD의 징후를 개선하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 *MEF2C* 단배수-결손이 있는 대상체에게 본 명세서에 개시된 화합물을 전달하기 전에 대상체의 증상의 존재 및/또는 중증도를 평가하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 *MEF2C* 단배수-결손이 있는 대상체에게 본 명세서에 개시된 화합물을 전달한 후에 대상체의 증상의 존재 및/또는 중증도를 평가하는 것을 포함할 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법은 *MEF2C* 단배수-결손이 있는 대상체의 증상 중 하나 이상의 중증도를 감소시키는 것을 초래할 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법은 *MEF2C* 단배수-결손이 있는 대상체의 증상 중 하나 이상을 경감시키는 것을 초래할 수 있다.

[0035] 일부 사례에서, 본 명세서에 개시된 방법은 대상체를 치료하는 것을 포함하며, 여기서 상기 대상체는 아동이다. 아동은 약 14세 미만, 약 13세 미만, 약 12세 미만 또는 미만 약 10세 미만일 수 있다. 일부 사례에서, 상기 대상체는 1세 초과, 2세 초과, 3세 초과, 4세 초과, 또는 5세 초과이다.

[0036] 본 명세서에 개시된 방법은 치료를 위한 대상체를 선택하는 것을 포함할 수 있다. 일부 사례에서, 상기 대상체는 대상체에서 유전자의 발현에 기초하여 선택된다. 일부 사례에서, 상기 대상체는 대상체에서 유전자의 서열에 기초하여 선택된다. 일부 사례에서, 상기 대상체는 대상체에서 유전자에서의 돌연변이에 기초하여 선택된다. 돌연변이는 결실 돌연변이일 수 있다. 결실 돌연변이는 단배수-결손(예를 들어, *MEF2C* 단배수-결손)일 수 있다. 돌연변이는 틀이동 돌연변이일 수 있다. 돌연변이는 단일 뉴클레오타이드 다형성일 수 있다. 일부 사례에서, 상기 대상체는 유전자에 의해 인코딩된 단백질 대상체의 발현에 기초하여 선택된다. 일부 사례에서, 상기 대상체는 유전자에 의해 인코딩된 단백질의 활성에 기초하여 선택된다. 본 유전자는 근세포 향상제 인자 2C(*MEF2C*)를 인코딩하는 *MEF2C*일 수 있다. 본 유전자는 소포성  $\gamma$ -아미노부티르산(GABA) 수송체(VGAT)를 인코딩하는 *SLC32A1*일 수 있다. 본 유전자는 소포성 글루타메이트 수송체 2(*VGLUT2*)를 인코딩하는 *SLC17A6*일 수 있다. 본 유전자는 주요 시냅스 소포 단백질 p38로도 알려져 있는, 단백질 스냅토포아신을 인코딩하는 *SYP*일 수 있다. 본 유전자는 글루탐산 탈탄산효소를 인코딩하는 *GAD65*일 수 있다.

[0037] 방법은 본 명세서에 개시된 유전자의 발현 수준을 획득하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 단백질의 발현 수준을 획득하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 단백질의 활성에 대한 정보를 획득하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 유전자의 발현 수준을 분석하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 단백질의 발현 수준을 분석하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 단백질의 발현 수준을 정량하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 유전자의 발현 수준을 정량하고 분석하는 것은 당해 기술에 공지되어 있다. 유전자 발현을 정량하고 분석하는 비-제한적인 예는 q-PCR, 마이크로어레이, 서열분석, 및 노던 블랏이다. 방법은 대립유전자-특이적 발현을 분석하는 단계를 포함할 수 있다. 단백질 발현 및 활성을 정량하고 분석하는 비-제한적인 예는 면역조직화학, 웨스턴 블랏, 면역침강, 유세포측정, 면역형광, 및 이들의 조합이다. 방법은 본 명세서에 개시된

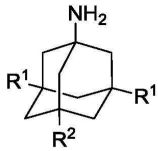
유전자를 서열분석하는 단계를 포함할 수 있다.

- [0038] 방법은 본 명세서에 개시된 유전자의 발현 수준을 획득하는 단계를 포함할 수 있으며, 여기서 상기 발현 수준은 대상체의 세포의 것이다. 방법은 대상체로부터 세포를 획득하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 대상체로부터 세포를 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 본 세포는 뇌 세포일 수 있다. 본 세포는 순환 세포일 수 있다. 본 세포는 뇌척수액에서 순환하는 세포일 수 있다. 본 세포는 혈구일 수 있다. 본 세포는 피부 세포일 수 있다. 본 세포는 상피 세포일 수 있다. 본 세포는 환자 피부 생검으로부터 유래되고 뉴런 또는 다른 뇌 세포(예를 들어, 성상세포, 희돌기교세포, 및 미세아교세포)로 분화되고, 2-차원(2D) 배양 시스템 또는 작은 뇌 유사 구조가 시험관내 생산되어 따라서 "접시-내-질환"을 모델링할 수 있는 3D 뇌 오가노이드에서 분석된 인간 유도 만능 줄기 세포일 수 있다.
- [0039] 유전자의 발현 수준을 획득하는 것은 대상체로부터 무세포 핵산을 분리하는 것을 포함할 수 있다. 본 무세포 핵산은 RNA를 포함할 수 있다. 본 무세포 핵산은 메신저 RNA를 포함할 수 있다. 본 무세포 핵산은 본질적으로 메신저 RNA로 구성될 수 있다. 본 무세포 핵산은 DNA를 포함할 수 있다. DNA는 메틸화된 DNA일 수 있다. 유전자의 발현 수준을 획득하는 것은 대상체로부터 무세포 핵산을 분리하는 것을 포함할 수 있다. 본 무세포 핵산은 순환하는 무세포 핵산일 수 있다. 방법은 대상체로부터 샘플을 획득하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 상기 샘플은 무세포 핵산을 함유한다. 이러한 샘플의 비-제한적인 예는 전혈, 혈장, 혈청, 소변, 뇌척수액, 및 타액이다.
- [0040] 본 명세서에 개시된 방법은 대상체, 또는 이들의 세포, 또는 이들의 생체액에서 *SLC32A1*의 발현 수준을 정량하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 대상체는 *MEF2C* 단배수-결손을 가질 수 있다. 상기 대상체는 *MEF2C* 단배수-결손을 가지지 않을 수 있다. 상기 대상체는 *MEF2C* 유전자의 2개의 사본을 갖는 복수의 대조군 대상체의 평균의 것에 비하여 상당히 감소된 *SLC32A1* 발현 수준을 가질 수 있다. 상기 대상체는 신경 장애의 징후 또는 증상을 나타내지 않는 복수의 대조군 대상체의 평균의 것에 비하여 상당히 감소된 *SLC32A1* 발현 수준을 가질 수 있다. 상기 대상체는 본 명세서에 개시된 신경 장애의 징후 또는 증상을 나타내지 않는 복수의 대조군 대상체의 평균의 것에 비하여 상당히 감소된 *SLC32A1* 발현 수준을 가질 수 있다. 상당히 감소된 것은 적어도 약 10% 감소, 적어도 약 20% 감소, 적어도 약 30% 감소, 적어도 약 40% 감소, 적어도 약 50% 감소, 적어도 약 75% 감소, 또는 약 100% 감소된 것일 수 있다.
- [0041] 본 명세서에 개시된 방법은 대상체, 또는 이들의 세포, 또는 이들의 생체액에서 *SLC17A6*의 발현 수준을 정량하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 대상체는 *MEF2C* 단배수-결손을 가질 수 있다. 상기 대상체는 *MEF2C* 단배수-결손을 가지지 않을 수 있다. 상기 대상체는 *MEF2C* 유전자의 2개의 사본을 갖는 복수의 대조군 대상체의 평균의 것에 비하여 상당히 증가된 *SLC17A6* 발현 수준을 가질 수 있다. 상기 대상체는 신경 장애의 징후 또는 증상을 나타내지 않는 복수의 대조군 대상체의 평균의 것에 비하여 상당히 증가된 *SLC17A6* 발현 수준을 가질 수 있다. 상기 대상체는 본 명세서에 개시된 신경 장애의 징후 또는 증상을 나타내지 않는 복수의 대조군 대상체의 평균의 것에 비하여 상당히 증가된 *SLC17A6* 발현 수준을 가질 수 있다. 상당히 증가된 것은 적어도 약 10% 증가, 적어도 약 20% 증가, 적어도 약 30% 증가, 적어도 약 40% 증가, 적어도 약 50% 증가, 적어도 약 75% 증가, 또는 약 100% 증가된 것일 수 있다.
- [0042] 본 명세서에 개시된 방법은 대상체, 또는 이들의 세포, 또는 이들의 생체액에서 시냅스전 단백질인 스냅토파이신(*SYP*)의 발현 수준을 정량하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 대상체는 *MEF2C* 단배수-결손을 가질 수 있다. 상기 대상체는 *MEF2C* 단배수-결손을 가지지 않을 수 있다. 상기 대상체는 *MEF2C* 유전자의 2개의 사본을 갖는 복수의 대조군 대상체의 평균의 것에 비하여 상당히 감소된 *SYP* 발현 수준을 가질 수 있다. 상기 대상체는 신경 장애의 징후 또는 증상을 나타내지 않는 복수의 대조군 대상체의 평균의 것에 비하여 상당히 감소된 *SYP* 발현 수준을 가질 수 있다. 상기 대상체는 본 명세서에 개시된 신경 장애의 징후 또는 증상을 나타내지 않는 복수의 대조군 대상체의 평균의 것에 비하여 상당히 감소된 *SYP* 발현 수준을 가질 수 있다. 상당히 감소된 것은 적어도 약 10% 감소, 적어도 약 20% 감소, 적어도 약 30% 감소, 적어도 약 40% 감소, 적어도 약 50% 감소, 적어도 약 75% 감소, 또는 약 100% 감소된 것일 수 있다.
- [0043] 본 명세서에 개시된 방법은 대상체, 또는 이들의 세포, 또는 이들의 생체액에서 *GAD65*의 발현 수준을 정량하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 대상체는 *MEF2C* 단배수-결손을 가질 수 있다. 상기 대상체는 *MEF2C* 단배수-결손을 가지지 않을 수 있다. 상기 대상체는 *MEF2C* 유전자의 2개의 사본을 갖는 복수의 대조군 대상체의 평균의 것에 비하여 상당히 감소된 *GAD65* 발현 수준을 가질 수 있다. 상기 대상체는 신경 장애의 징후 또는 증상을 나타내지 않는 복수의 대조군 대상체의 평균의 것에 비하여 상당히 감소된 *GAD65* 발현 수준을 가질 수 있다. 상기 대상체는 본 명세서에 개시된 신경 장애의 징후 또는 증상을 나타내지 않는 복수의 대조군 대상체의 평균의 것에 비하

여 상당히 감소된 *GAD65* 발현 수준을 가질 수 있다. 상당히 감소된 것은 적어도 약 10% 감소, 적어도 약 20% 감소, 적어도 약 30% 감소, 적어도 약 40% 감소, 적어도 약 50% 감소, 적어도 약 75% 감소, 또는 약 100% 감소된 것일 수 있다.

[0044] 화합물

[0045] 자폐 스펙트럼 장애(ASD), 지적 및 발달 장애(IDD), 간질, 레트 증후군, 및/또는 결절성 경화증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 화학식 I의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로 자폐 스펙트럼 장애(ASD), 지적 및 발달 장애(IDD), 간질, 레트 증후군, 및/또는 결절성 경화증을 치료하는 방법이 본 명세서에 개시된다:



화학식 I

[0046]

[0047] 여기서,

[0048] 각각의 R<sup>1</sup>은 -CH<sub>3</sub> 및 -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>로부터 독립적으로 선택되고; 그리고

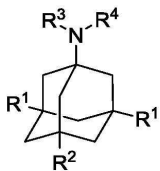
[0049] R<sup>2</sup>는 수소 및 -ONO<sub>2</sub>로부터 선택된다.

[0050] 화학식 I의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 일부 구현예에서, R<sup>2</sup>는 수소이다. 일부 구현예에서, R<sup>2</sup>는 -ONO<sub>2</sub>이다.

[0051] 화학식 I의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 일부 구현예에서, 각각의 R<sup>1</sup>은 상이하다. 일부 구현예에서, 각각의 R<sup>1</sup>은 동일하다. 일부 구현예에서, 각각의 R<sup>1</sup>은 -CH<sub>3</sub>이다. 일부 구현예에서, 각각의 R<sup>1</sup>은 -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>이다.

[0052] 화학식 I의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 일부 구현예에서, 각각의 R<sup>1</sup>은 -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>이고 R<sup>2</sup>는 -ONO<sub>2</sub>이다.

[0053] 다른 형태의 자폐 스펙트럼 장애(ASD), 지적 및 발달 장애(IDD), 간질, 레트 증후군, 및/또는 결절성 경화증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 화학식 II의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로 다른 형태의 자폐 스펙트럼 장애(ASD), 지적 및 발달 장애(IDD), 간질, 레트 증후군, 및/또는 결절성 경화증을 치료하는 방법이 또한 본 명세서에 개시된다:



화학식 II

[0054]

[0055] 여기서,

[0056] 각각의 R<sup>1</sup>은 수소, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 및 헤테로아릴로부터 독립적으로 선택되고;

[0057] R<sup>2</sup>는 수소, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 및 -ONO<sub>2</sub>로부터 선택되고;

[0058]  $R^3$  및  $R^4$  각각은 수소 및  $C_1-C_6$  알킬로부터 독립적으로 선택되거나;

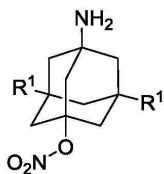
[0059] 또는  $R^3$  및  $R^4$ 는 이들이 부착된 질소 원자와 함께 합쳐져서 헤테로사이클로알킬을 형성한다.

[0060] 화학식 II의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 일부 구현예에서,  $R^3$  및  $R^4$ 는 수소, 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, i-부틸, s-부틸, 및 t-부틸로부터 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서,  $R^3$  및  $R^4$ 는 수소 및 메틸로부터 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서,  $R^3$  및  $R^4$ 는 동일하다. 일부 구현예에서,  $R^3$  및  $R^4$ 는 상이하다. 일부 구현예에서,  $R^3$  및  $R^4$ 는 수소이다.

[0061] 화학식 II의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 일부 구현예에서,  $R^3$  및  $R^4$ 는 이들이 부착된 질소 원자와 함께 합쳐져서 헤테로사이클로알킬을 형성한다. 일부 구현예에서,  $R^3$  및  $R^4$ 는 이들이 부착된 질소 원자와 함께 합쳐져서 단환형 헤테로사이클로알킬을 형성한다.

[0062] 화학식 II의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 일부 구현예에서,  $R^2$ 는 수소이다. 일부 구현예에서,  $R^2$ 는  $C_1-C_6$  알킬이다. 일부 구현예에서,  $R^2$ 는  $-ONO_2$ 이다. 일부 구현예에서,  $R^2$ 는 수소 또는  $-ONO_2$ 이다.

[0063] 일부 구현예에서, 화학식 II의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 화학식 III의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염이다:



화학식 III

[0064]

[0065] 화학식 II 또는 화학식 III의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 일부 구현예에서, 각각의  $R^1$ 은 수소,  $C_1-C_6$  알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 및 아릴로부터 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서, 각각의  $R^1$ 은 수소 및  $C_1-C_6$  알킬로부터 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서, 각각의  $R^1$ 은  $C_1-C_6$  알킬로부터 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서, 각각의  $R^1$ 은 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, i-부틸, s-부틸, 및 t-부틸로부터 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서, 각각의  $R^1$ 은 메틸, 에틸, 및 n-프로필로부터 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서, 각각의  $R^1$ 은 메틸 및 에틸로부터 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서, 각각의  $R^1$ 은 동일하다. 일부 구현예에서, 각각의  $R^1$ 은 상이하다. 일부 구현예에서, 각각의  $R^1$ 은 메틸이다. 일부 구현예에서, 각각의  $R^1$ 은 에틸이다. 일부 구현예에서, 각각의  $R^1$ 은 n-프로필이다.

[0066] 제형

[0067] 방법은 본 명세서에 개시된 화합물의 약 1 mg 내지 약 25 mg의 용량을 대상체에게 전달하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 화합물의 약 1 mg 내지 약 20 mg의 용량을 대상체에게 전달하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 화합물의 약 1 mg 내지 약 5 mg의 용량을 대상체에게 전달하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 화합물의 약 5 mg 내지 약 10 mg의 용량을 대상체에게 전달하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 화합물의 약 10 mg 내지 약 15 mg의 용량을 대상체에게 전달하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 화합물의 약 15 mg 내지 약 20 mg의 용량을 대상체에게 전달하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 화합물의 약 1 mg 내지 약 10 mg의 용량을 대상체에게 전달하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 본 명세서에 개시된 화합물의 약 10 mg 내지 약 20 mg의 용량을 대상체에게 전달하는 것을 포함할 수 있다. 아동(소아 환자)에 대한 1일당 1 내지 5 mg의 화합물의 용량이 충분할 수 있다. 용량은 분할 투약량에서 1일당 최대 약 20 mg까지 용인된 것으로 느리게 증가될 수 있다. 용량은 하나 이상의 주에 걸쳐 느리게 증가될 수 있다.

- [0068] 방법은 1일 1회 본 명세서에 개시된 화합물의 용량을 전달하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 1일 1회 본 명세서에 개시된 용량을 전달하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 1일 2회 본 명세서에 개시된 용량을 전달하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 1일 동안 제1 시점에서 첫 번째 용량 및 1일 동안 두 번째 시점에서 두 번째 용량을 전달하는 것을 포함할 수 있다. 상기 첫 번째 용량과 상기 두 번째 용량은 동일할 수 있다. 상기 첫 번째 용량과 상기 두 번째 용량은 상이할 수 있다.
- [0069] 본 명세서에 개시된 방법은 경시적으로 본 명세서에 개시된 화합물의 일일 용량을 증가시키는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 방법은 제1 주 동안 첫 번째 용량으로 본 명세서에 개시된 적어도 하나의 화합물을 전달하는 것과 제2 주 동안 두 번째 용량으로 적어도 하나의 화합물을 전달하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 상기 첫 번째 용량과 상기 두 번째 용량은 상이하다. 일부 사례에서, 상기 두 번째 용량은 상기 첫 번째 용량보다 많다. 일부 사례에서, 상기 두 번째 용량은 상기 첫 번째 용량보다 적다.
- [0070] 본 명세서에 개시된 방법은 본 명세서에 개시된 적어도 하나의 화합물을 대상체에게 경구로 전달하는 것을 포함할 수 있다. 본 화합물은 정제 또는 캡슐을 통해 경구로 전달될 수 있다. 본 화합물은 액체 용액으로 경구로 전달될 수 있다. 본 액체 용액은 삼킬 수 있다. 본 액체 용액은 점적기 또는 피펫을 통해 전달될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 전달하는 것은 화합물을 주사하는 것(비경구 투여), 국소적으로 화합물을 도포하는 것, 화합물을 흡입하는 것, 화합물을 비강을 통해 뇌에 투여하는 것, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.
- [0071] 본 명세서에 개시된 방법은 본 명세서에 개시된 적어도 하나의 화합물을 포함하는 약제학적 조성물을 전달하는 것을 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 희석제, 부형제, 담체, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "약제학적으로 허용가능한"은 본 명세서에 기재된 화합물의 생물학적 활성 또는 특성을 없애지 않고 상대적으로 비독성(즉, 물질의 독성이 물질의 이점보다 상당히 더 큼)인 물질을 지칭한다. 일부 사례에서, 약제학적으로 허용가능한 물질은 상당한 바람직하지 않은 생물학적 효과를 야기함이 없이 또는 이것이 함유된 조성물의 임의의 성분과 유해한 방식으로 상당히 상호작용함이 없이 개체에 투여될 수 있다.
- [0072] 본 명세서에서 약제학적 조성물은 약제학적으로 사용되는 제제로 활성제의 가공을 촉진하는 부형제 및 보조물을 포함한 하나 이상의 생리적으로 허용가능한 캐리어를 사용하여 제형화될 수 있다. 적절한 제형은 선택된 투여 경로에 의존적이다. 약제학적 조성물의 요약은, 예를 들어, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980; 및 Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins, 1999)에서 발견된다.
- [0073] 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 희석제(들), 부형제(들), 또는 담체(들)를 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 다른 약효 또는 약제학적 제제, 캐리어, 아췌반트, 예컨대 보존제, 안정제, 습윤제 또는 유화제, 용액 증진제, 삼투압 조절용 염, 및/또는 완충액을 포함할 수 있다. 또한, 약제학적 조성물은 또한 다른 치료적으로 가치있는 물질을 함유한다.
- [0074] 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 비제한적으로, 비경구(정맥내, 피하, 복강내, 근육내, 혈관내, 척추강내, 유리체내, 주입, 또는 국소), 국소, 경구, 또는 비강 투여를 포함한 임의의 적합한 투여 경로에 의해 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0075] 근육내, 피하, 종양주위, 또는 정맥내 주사에 적합한 제형은 생리적으로 허용가능한 멸균 수성 또는 비-수성 용액, 분산물, 현탁액 또는 에멀션, 및 멸균 주입가능 용액 또는 분산물로 재구성을 위한 멸균 분말을 포함할 수 있다. 적합한 수성 및 비-수성 캐리어, 희석제, 용매, 또는 비히클의 예는 물, 에탄올, 폴리올(프로필렌글리콜, 폴리에틸렌-글리콜, 글리세롤, 크레모포어 및 기타 동종의 것), 이들의 적합한 혼합물, 식물성 오일(예컨대 올리브 오일) 및 주입가능 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트를 포함한다. 적절한 유체성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산물의 경우에 요구된 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지된다. 피하 주사에 적합한 제형은 또한 선택적인 첨가제, 예컨대 보존제, 습윤제, 에멀션화제, 및 분산제를 함유한다.
- [0076] 정맥내 주사를 위해, 활성제는 선택적으로 수용액, 바람직하게는 생리적으로 양립가능한 완충액, 예컨대 한스 용액, 링거액, 또는 생리적 염수 완충액에 제형화될 수 있다.
- [0077] 비경구 주사는 선택적으로 볼러스 주사 또는 연속적 주입을 포함한다. 주사를 위한 제형은 선택적으로, 첨가된

보존제와 함께, 단위 투약 형태로, 예를 들어, 앰플 또는 다중 용량 용기로 제시된다. 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물은 유성 또는 수성 비히클에서 멸균 현탁액, 용액 또는 에멀션으로 비경구 주사에 적합한 형태로 될 수 있고, 제형제, 예컨대 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제를 함유할 수 있다. 비경구 투여를 위한 약제학적 제형은 수용성 형태로 활성제의 수용액을 포함한다. 추가로, 현탁액은 선택적으로 적절한 유성 주사 현탁액으로 제조된다.

[0078] **실시예**

[0079] 하기 예시적인 실시예는 본 명세서에서 기재된 소프트웨어 적용, 시스템, 및 방법의 구현예를 나타내고, 어떤 식으로든 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0080] **실시예 1 *Mef2c*-het 마우스는 MCHS-유사 행동 및 감소된 생존력을 나타낸다**

[0081] MEF2C 단백질 발현은 야생형(WT) 한배새끼에서보다 *Mef2c*-het 마우스에서 유의미하게 낮았고( $P < 0.01$ ) 도 2), 그리고 *Mef2c*-het 마우스에서 유의미한 수의 조기 사망이 관측되었다(도 3a). WT와 *Mef2c*-het 부모 사이의 크로스로부터 생존가능한 동물의 수가 계수되었다. WT 및 *Mef2c*-het 자손의 수는 배아 일(E) 18에서 대략 동등한 반면(각각, 28 대 23), 생존한 *Mef2c*-het 대 WT 마우스의 비는 출생후 일(P) 21 및 90에서 각각 44% 및 40%였다. E18에서 생존과 성체 사이의 차이는 상당하였다(카이-제곱에 의한  $P < 0.05$ ). 감소된 생존력에 더해, 3개월령까지 생존한 *Mef2c*-het 마우스는 그것의 WT 대응물에 비교하여 체중에서 감소(~14%)를 나타냈다(WT 경우  $31.9 \pm 1.0$  gm 대 *Mef2c*-het 경우  $27.4 \pm 0.8$  gm; 스튜던트 *t*-시험에 의한  $P < 0.001$ ).

[0082] 성인 *Mef2c*-het 마우스가 MCHS-유사 표현형을 나타내는 지를 결정하기 위해, 수컷 *Mef2c*-het 마우스 및 그것의 WT 한배새끼( $\geq 3$ 개월령)에 대해 행동 테스트를 수행하였다. 인지 손상을 나타내는 인간 환자에 유사하게, *Mef2c*-het 마우스는 공간적 학습 및 기억 기능을 측정하는 시험인 반스 미로에서 저조하게 수행하였다. *Mef2c*-het 마우스는 훈련 기간 동안 탈출 터널을 찾는 데 상당히 오랜 시간이 걸렸다(도 3b). 후속적인 프로브 테스트에서, *Mef2c*-het 마우스가 아닌 WT 마우스는 반대편 사분면에 비교하여 표적 사분면에 대한 선호도를 나타내었고(도 3c), 이는 *Mef2c*-het 마우스의 손상된 공간적 기억을 시사한다. *Mef2c*-het 마우스는 비정상 발-클라스핑 행동(도 3d) 및 홀-보드 탐사 테스트에서 반복적인 머리 침치(도 2e)를 포함하여 고정관념을 나타내었다. 함께 할 때, 이들 결과 *Mef2c*-het 마우스가 MCHS를 모델링하는 광범위한 MCHS-유사 표현형을 나타낸다는 것을 시사한다.

[0083] **실시예 2 신경발생 및 시냅스 기능을 조절하는 유전자는 *Mef2c*-het 마우스에서 하향조절된다**

[0084] MCHS의 발병을 기본으로 하는 분자 경로를 확인하기 위해, *Mef2c*-het 마우스 대 WT 한배새끼의 유전자 발현을 마이크로어레이에 의해 검사하였다. *Mef2c*-het 마우스에서 하향조절된 394개 및 상향조절된 389를 포함하여, 해마에서 그 발현 수준이 유의하게 변경된 총 783개의 유전자가 확인되었다(도 4a, 녹색 선 위). 이들 데이터와 함께, NextBio 경로 분석을 사용하여, 신경발생, 뉴런 분화, 및 시냅스 기능에 대한 바이오그룹을 포함한, 마우스에서 *Mef2c* 단배수-결손에 의해 하향조절된 최상부 뉴런 바이오그룹을 확인하였다(도 4b). 동반하여, 뉴런 세포사의 조절을 위한 바이오그룹이 상향조절되었다(도 4b). 마이크로어레이 결과는 3개월령 마우스로부터 추출된 RNA를 사용하여 qPCR에 의해 확인되었다(도 4c). NextBio 분석과 일치하게, 억제성 시냅스전 마커를 나타내는 소포성  $\gamma$ -아미노부티르산(GABA) 수송체 VGAT(*Slc32a1*에 의해 인코딩됨)의 mRNA 수준이 *Mef2c*-het 마우스에서 현저히 감소하였다. 흥분성 시냅스 마커를 나타내는 소포성 글루타메이트 수송체 1/2(VGLUT1/2)의 mRNA 수준도 또한 검사되었으며, VGLUT1이 아닌 VGLUT2의 수준이 *Mef2c*-het 마우스에서 유의하게 증가하여, 이들 마우스에서 흥분성 및 억제성 신경전달 둘 모두의 기능이상을 나타낸다는 것이 밝혀졌다.

[0085] **실시예 3. *Mef2c*-het 마우스에서 뉴런 감소 및 손상된 흥분성/억제성 (E/I) 시냅스 전달**

[0086] 비편향된 입체적 계수 방법으로서 광학 분리기를 사용하는 조직학적 실험에서, NeuN+ 세포(즉, 뉴런)의 총 수는 해마(WT 대조군 값의  $69.5 \pm 1.6\%$ , 스튜던트 *t* 시험에 의한  $P < 0.01$ ) 및 정면 피질(WT 대조군의  $79.8 \pm 5.1\%$ ,  $P < 0.05$ )에서의 WT와 비교하여 *Mef2c*-het 마우스에서 유의하게 감소하였다(도 5a, 도 5b). NeuN+ 세포에 대조적으로, 신경교 원섬유성 산 단백질 (GFAP)+ 세포의 수는 해마(WT 대조군의  $123.0 \pm 6.8\%$ ,  $P < 0.01$ ) 및 정면 피질(WT 대조군의  $135.16 \pm 11.70\%$ ,  $P < 0.05$ ) 둘 모두에서 WT와 비교하여 *Mef2c*-het 마우스에서 상당히 증가되었다(도 5c, 도 5d).

[0087] 골지 염색을 *Mef2c*-het 및 WT 뇌 둘 모두에서 수행하여 3D 몽타주 이미지상의 뉴로루시다 소프트웨어를 사용해 뇌 피질의 V 층에서 피라미드 세포의 수지상 가지화 패턴을 결정하였다(도 5e). Sho11 분석은 *Mef2c*-het 뉴런의 수지상 복잡성이, 줄어든 수지상 상호작용(도 5f) 및 줄어든 총 수지상 길이(도 5g)에 의해 입증된 바와 같이,

상당히 감소되었다는 것을 나타냈다.

[0088] MEF2C 결핍에 의해 매개된 배아 신경발생에서의 공지된 감소에 부가하여, 뉴런 수의 감소를 추가로 설명하기 위해, 성인 신경발생이 2-3개월령 *Mef2c-het* 마우스의 텐테이트 뇌이랑(DG)의 아과립 구역(SGZ)에서 특성구명되었고, 증식하는 세포(PCNA+, 도 6a, 도 6b) 및 발전하는 뉴런의 수 둘 모두에서의 감소가 관측되었다(DCX+, 도 6a, 도 6c). BrdU-라벨링된 NeuN+ 세포의 수 또한 DG에서 감소되었다(도 6d, 도 6e). 이들 결과는 *Mef2c-het* 마우스에서 감소된 성인 신경발생이 뉴런에서의 감소에 기여함을 시사한다. 추가로, mCherry의 레트로바이러스-매개된 유전자 형질도입을 통해 가시화된, 새로 형성된 뉴런의 발달 및 복잡성은 또한 감소된 체세포의 크기 및 수지상 길이에 의해 지시된 바와 같이 *Mef2c-het* DG에서 감소되었다(도 6f-i). 따라서, *Mef2c* 단배수-결손은 마우스에서 줄어든 뉴런 수, 손상된 성인 신경발생, 및 줄어든 수지상 복잡성을 초래한다.

[0089] *Mef2c-het* 마우스에서의 시냅스를 후속으로 검사하였다. 시냅스 단백질의 변화를 예측하는 마이크로어레이 분석과 일치하여, 정량적 공초점 면역조직화학은 시냅스전 마커인, 스냅토파이신(SYP)의 발현이 *Mef2c-het* 마우스의 해마에서 상당히 감소되었음을 보여주었다(도 7a, 도 7b). 시냅스 결손을 보다 잘 정의하기 위해, 우세한 흥분성 시냅스 단백질 VGLUT1의 발현 수준을 검사하고 해마에서의 정량적 공초점 면역조직화학에 의해 억제성 시냅스 단백질 VGAT를 검사하였다(도 7a). VGLUT1이 아닌 VGAT의 발현은 *Mef2c-het* 마우스에서 상당히 감소되었다(도 7b). 추가로, 면역블랏 실험이 해마 시냅톰-농축된 용해물에 대해 수행되었고, VGLUT1이 아닌 SYP 및 GAD65(또 다른 억제성 뉴런 마커)의 수준이 *Mef2c-het* 마우스에서 하향조절되었음이 밝혀졌다(도 8a). VGLUT1(흥분성 뉴런) 대 GAD65(억제성 뉴런)의 비는 E/I 불균형의 징후로, *Mef2c-het* 마우스에서 상당히 증가되었다(도 8b). 또한, VGLUT1에 대조적이고 mRNA 발견과 병행하여, 성인 해마에서 극히 낮은 수준에서만 정상적으로 발현된 VGLUT2 단백질은 WT 대비 *Mef2c-het*에서 상당히 상향조절되었다(도 8c). 이를 함께 취하면, 이들 발견은 *Mef2c-het* 해마에서 비정상적인 흥분성 및 억제성 시냅스 단백질 발현을 나타낸다.

[0090] E/I 마커 발현에서 이들 변경에 기능성 시냅스 전달에서의 비정상이 동반되는지 여부를 결정하기 위해, *Mef2c-het* 및 WT 마우스의 해마 슬라이스로부터 자발적인 미니어처 흥분성 및 억제성 시냅스후 전류(mEPSCs/mIPSCs)를 기록하였다. 양자 방출 이론으로부터, 미니어처 빈도에서의 변화는 시냅스전 신경전달물질 방출 또는 시냅스의 수에서의 변화를 반영하는 반면, 미니어처 진폭에서의 변화는 시냅스후 기능, 예를 들어, 시냅스후 수용체의 수에서의 변화를 나타내는 것으로 생각된다. *Mef2c-het* 마우스는 시냅스전 VGAT, 수지상조직 및 시냅스에서 전체적인 감소와 병행하여, 줄어든 mIPSC 빈도(도 7c, 도 7g에서 증가된 사건간 간격으로 명시됨)를 나타냈다. 감소된 mIPSC 진폭이 또한 관측되었으며(도 7c, 도 7e), 이는 MEF2 수준이 특이적 GABA 수용체 서브유닛의 발현과 상관관계가 있는 것으로 알려진 사실을 반영할 수 있다. 흥미롭게도, 이들 마우스는 또한 뇌 특이적 *Mef2c-KO* 마우스에서 증가된 mEPSC 빈도의 이전의 보고서에 유사하게 mEPSC 빈도에서의 증가를 나타낸다(줄어든 사건간 간격으로 나타남, 도 7d, 도 7f). 이 결과는 또한 *Mef2c-het* 해마에서 시냅스전 VGLUT2의 증가된 발현의 발견과 일치한다. mEPSC 진폭에서의 약간의 감소(도 7d, 도 7h)는 MEF2가 전사적으로 글루타메이트 수용체 발현을 정상적으로 상향조절한다는 사실과 연관이 있다. mIPSC 및 mEPSC에서의 전반적인 변화는 *Mef2c-het* 마우스에서 상승된 E/I 비를 초래할 것으로 기대된다. 사실상, 평균 mEPSC 대 mIPSC 값의 몫에 의해 결정된 바와 같이, *Mef2c-het* 마우스는 WT 마우스에 비교하여 E/I 빈도 비에서 116.2% 증가율 및 E/I 진폭 비에서 25.7% 증가율을 나타내어, 기능성 E/I 불균형의 존재를 확인한다.

[0091] 이들 뉴런 및 시냅스 결함이 시냅스 가소성 및 신경 회로에 유해한 효과가 있는지 여부를 결정하기 위해, 해마 LTP를 기록하였다. *Mef2c-het* 마우스는 해마의 CA1 영역에서 감소된 LTP를 나타냈다(도 9a). 쌍으로 된 펄스 자극(PPF)은 제1 자극 후 시냅스전 말단에서 잔존  $Ca^{2+}$ 에 의해 야기된 제2의 2개 쌍으로 된 자극에 반응으로 시냅스전 기능의 단기 향상을 나타낸다. 예를 들어, 줄어든 PPF는 신경전달물질 방출의 증가된 개연성과 연관된다. *Mef2c-het*에서 PPF에서의 통계적인 감소가 WT 마우스에 비교하여 관측되었으며(도 9b), mEPSC 빈도에서 관측된 작은 증가와 일치한다(도 7d, 도 7f). 종합적으로, 이들 결과는 *Mef2c-het* 마우스가 줄어든 억제성 및 증가된 흥분성 시냅스 신경전달과 함께 시냅스 결핍을 동반한 감소된 뉴런의 수를 나타내고, 따라서 E/I 불균형으로 이어진다는 것을 보여준다.

[0092] **실시예 4 니트로시넵신은 *Mef2c-het* 마우스에서 자폐성-유사 행동을 구제한다.**

[0093] 수컷 *Mef2c-het* 또는 WT 마우스를 3개월 동안 니트로시넵신 또는 PBS 비히클로 처리하였다. 행동, 전기생리적 및 조직학적 분석을 그 다음 수행하여 이 약물의 효과를 확인했다. 중요하게는, WT-마우스의 니트로시넵신 처리는 모리스 수중 미로, EPSC 또는 LTP에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

[0094] 신경행동 테스트를 사용하여 *Mef2c-het* 마우스의 니트로시넵신 처리가 자폐성/MCHS-유사 행동 표현형을 구제할

수 있는지 여부를 결정하였다. 모리스 수중 미로를 먼저 수행하여 공간적 학습 및 메모리에 대한 효과를 테스트 하였다(도 10a, 도 10b). 숨겨진 플랫폼 훈련 기간 동안, 비히클-처리된 *Mef2c*-het (Het/V) 마우스는 비히클-처리된 WT (WT/V) 마우스보다 숨겨진 플랫폼을 찾기 위해 처음 2일 동안 더 오래 걸려 손상된 공간적 학습을 나타 냈다(도 10a). 그러나, 니트로시넵신으로 처리된 *Mef2c*-het 마우스(Het/N)는 이들 테스트 동안 비히클에 비하여 개선된 성능을 나타냈다. 이 개선은 *Mef2c* 이형접합성 또는 니트로시넵신 처리가 수영 속도에 영향을 미치지 않았기 때문에 수영 속도 자체의 증가에 기인할 수 없었다(도 11). 모든 마우스의 군이 기준(숨겨진 플랫폼을 발견하는 데 20초)에 도달한 24시간 후, 기억 보유를 검사하기 위해 프로브 테스트를 수행하였다. 도 10b에서 나타낸 바와 같이, WT/V 마우스는 숨겨진 플랫폼이 이전에 위치했던 표적 사분면에서 상당히 더 긴 시간을 소비함에 의해 정상 기억 보유를 표시했다. 그에 반해서, Het/V 마우스는 반대편 사분면보다 표적 사분면에 대한 선호를 나타내지 않음으로 손상된 기억을 표시했다. 흥미롭게도, Het/N 마우스는 반대편 사분면에서보다 표적 사분면에서 상당히 많은 시간을 소비하며, 이는 니트로시넵신 처리가 기억 기능을 정상화했다는 징후이다(도 10a, 도 10b). 일반적인 운동 활동을 검정하기 위한 30-분 시험인 오픈 필드 테스트를 그 다음에 수행했다. Het/V 마우스는 향상된 중심 활성을 보였지만(도 10c), 총 활성은 아니었다(도 10d). 이 이상 행동은 니트로시넵신으로 의 만성 치료에 의해 구제되었다. 본 약물은 또한 홀-보드 탐구 테스트에서 *Mef2c*-het 마우스의 증가된 머리 침지의 비정상적인 반복적인 행동을 교정하였다(도 10e). 추가로, 사회적 상호작용 행동 테스트를 수행했다. WT/V 마우스는 유사하지만 비어있는 우리를 갖는 챔버에서보다 낯선 마우스 1(S1)이 있는 챔버에서 훨씬 더 많은 시간을 소비했다(도 10e). 그러나, Het/V 마우스는 어느 하나의 챔버에서 소비된 시간에 대한 선호를 나타내지 않았으며(도 10f, 도 10g), 이것은 손상된 사회적 능력의 징후이다. 추가로, Het/V 마우스는 WT/V 마우스보다 S1에 대한 방문이 상당히 적었고 방문당 시간이 더 짧았다(도 10h, 도 10i). 니트로시넵신으로의 처리는 이 비정상 사회적 행동을 개선시켰다. 중요하게는, *Mef2c* het 마우스를 헤드-대-헤드 비교에서 등물의 메만틴 또는 니트로시넵신으로 처리한 초기 실행성 실험은 이들 행동 패러다임에서 니트로시넵신의 우월성을 실증했다(도 12a). 또한, 니트로시넵신 처리는 WT 마우스의 사회적 행동을 유의하게 변화시키지 않았다(도 13).

[0095] 이를 함께 취하면, 이들 결과는 니트로시넵신으로 *Mef2c*-het 마우스의 만성 치료는 인지 결손, 반복적인 행동, 손상된 사회적 상호작용, 및 가능하게는 변경된 불안을 상당히 개선시켰다는 것을 나타낸다. 주목할 점은, *Mef2c*-het 마우스는 발 클라스핑을 제외하고 비정상적인 운동 행동을 나타내지 않았다(도 14a-e). 그러나, 니트로시넵신 처리는 발 클라스핑 표현형을 개선시키지 않았다(도 14f).

[0096] **실시예 5 *Mef2c*-het 마우스에서 신경 세포 손실, 변경된 E/I 마커, 및 손상된 LTP에 대한 니트로시넵신의 유의한 효과**

[0097] 면역조직화학을 수행하여 *Mef2c*-het 마우스의 해마에서 신경 손실 및 VGAT 또는 VGLUT2의 변경된 발현에 대한 약물 치료의 효과를 결정하였다(도 15a-g). 구체적으로, 광학 분리기 방법을 사용한 입체학으로 모니터링할 때, Het/N 마우스의 해마에서 NeuN+ 세포의 총수는 Het/V 마우스에서보다 상당히 더 많았으며(도 15b), 이는 이전 행동 실험에서 니트로시넵신의 효능과 일치한다. 추가로, 초기 실행성 실험에서, NeuN+ 세포수에 대해 메만틴에 비해 니트로시넵신의 상당히 더 큰 효과가 관찰되었다(도 12b).

[0098] *Mef2c*-het 마우스에서 NeuN+ 세포의 감소는 세포자멸적 세포 손실에 의해 적어도 부분적으로 설명될 수 있는데, 이는 해마의 CA3 영역에서 활성 카스파제-3 및 말단 데옥시뉴클레오티딜 전달효소 dUTP Nick End 라벨링(TUNEL)에 대한 뉴런 염색의 수가 WT에 비교하여 *Mef2c*-het 마우스에서 상당히 증가되었기 때문이다( $P < 0.012$ , 도 16). 또한, 활성화된 카스파제 3-양성 및 TUNEL-양성 세포의 수가 Het/V에서 증가된 반면, Het/N 마우스에서는 다시 정상으로 감소되었다(도 16). 이 결과는 *Mef2c*-het 마우스에서 관측된 세포자멸적 뉴런이 니트로시넵신에 의해 유의하게 구제되었다는 개념과 일치하였다. 또한, 니트로시넵신으로 처리는 *Mef2c*-het 마우스에서 정상세포 형태를 갖는 GFAP+ 세포의 수를 또한 정규화했다(도 17).

[0099] *Mef2c*-het 마우스에서 E/I 마커의 변경된 발현에 대한 니트로시넵신의 효과가 정량적 공초점 면역조직화학에 의해 결정되었다. VGLUT1 면역반응성의 수준은 니트로시넵신 처리에 의해 변경되지 않았지만, VGAT 및 VGLUT2 수준뿐만 아니라 VGLUT1/VGAT 또는 VGLUT2/VGAT의 비는 *Mef2c*-het 마우스에서 니트로시넵신 처리에 의해 정규화되었다(도 15c-g). 파브알부민 (PV)-발현 뉴런간-바스켓 및 PV-양성 시냅스 둘 모두의 수는 *Mef2c*-het 마우스에서 상당히 감소되었고(도 18), 반면 니트로시넵신은 PV+ 시냅스를 상당히 증가시켰다(영역 %)(도 18). 이들 결과는 니트로시넵신이 *Mef2c*-het 마우스에서 E/I 밸런스를 회복시킨다는 것을 시사한다. 마지막으로, 니트로시넵신을 이용한 만성적인 처리는 또한 *Mef2c*-het 마우스에서 손상된 해마 LTP를 상당히 구제하였다(도 15h, 도 19).

[0100] 도 1에 요약된 바와 같이, *Mef2c*-het 마우스는 MCHS-유사 행동 결핍을 나타냈고 따라서 질환 병리생리학을 연구

하는 모델을 제시했다. *Mef2c-het* 마우스는 감소된 생존력을 보였으며, 그 원인은 현재 알려져 있지 않다. 성인 기까지 생존한 *Mef2c-het* 마우스는 감소된 수의 뉴런 및 시냅스 손상, 구체적으로 감소된 억제성 및 향상된 흥분성 신경전달에 의해 야기되는 E/I 불균형을 나타낸다. 놀랍게도, 신규한 개선된 NMDAR 길항제 니트로시넵신을 이용한 *Mef2c-het* 마우스의 치료는 E/I 불균형을 교정할뿐만 아니라 자폐성/MCHS-유사 행동 결핍을 개선하였고, 따라서 표적 검증 및 잠재적 질환 치료를 제공한다.

[0101] 본 명세서에 제공된 결과는 VGAT는 *Mef2c-het* 마우스 해마에서 상당히 감소되었다는 것을 나타냈다. 이 발견에 따라, 기능성 억제성 시냅스 전달이 자발적인 mIPSC의 기록에서 입증된 바와 같이 감소되었다. 추가로, VGLUT2는 비정상적으로 상향조절되었으며, 이는 증가된 mEPSC 빈도에 의해 문서로 기록된 바와 같이, 흥분성 신경전달에서의 증가와 일치한다. 결과적으로, 기능이상 억제성 및 흥분성 신경전달은 *Mef2c-het* 마우스의 해마에서 E/I 불균형에 기여한다. 놀랍게도, 니트로시넵신은 시냅스 마커, LTP, 및 뉴런 수에서의 증가로 *Mef2c-het* 마우스에서 3개의 파라미터 모두를 상당히 개선했다. 가장 중요하게는, 니트로시넵신은 *Mef2c-het* 마우스에서 자폐성/MCHS-유사 행동을 상당히 개선시켰다.

[0102] **실시예 6 결절성 경화증의 TSC+/- 마우스 모델에서 니트로시넵신의 유의한 효과**

[0103] 결절성 경화증 (TSC)은 지적 장애, 간질/전기생리적 결핍, 및 신경행동 비정상에 의해 나타난 상염색체 우성 장애로, 종종 자폐 스펙트럼 장애(ASD)의 특징을 생성한다. 본 장애는 *Tsc1* 또는 *Tsc2* 두 유전자 중 하나를 불활성화시키는 이형접합성 돌연변이에 의해 야기된다. TSC 단백질은 라파마이신 복합체 1(mTORC1)의 포유동물 표적을 활성화시키는 GTPase인 Rheb를 억제하는 TSC1/2 복합체를 형성한다. mTORC1은 mRNA 번역 및 세포 성장을 자극하고; 불활성 TSC1/2 복합체로 인한 이 경로의 과도한 활성화는 시냅스에서의 비정상 신호전달 및 다양한 뉴런 유형에서의 AMPA 수용체의 비정상적인 서브유닛 조성과 같은 TSC 병리학적 특징으로 이어질 수 있다. 하나의 중요한 병인적 경로는 mTOR의 과자극을 포함한다. TSC에서 mTOR의 과활성화는 시냅스 가시의 결과적인 손실 및 행동 비정상과 함께, 거대자가포식의 억제를 초래하고; 라파마이신으로 mTOR의 억제는 이들 표현형을 구제할 수 있다.

[0104] 이 실시예에서, eNMDAR에서 강장 활성을 우선적으로 차단하는 길항제, 특히 신규한 약물 니트로시넵신은 *Tsc2*<sup>+/-</sup> (*het*) 마우스 표현형에서 생물학적 및 통계적으로 상당한 개선을 제공한다는 것이 밝혀졌다. 이들 연구에서, 결절성 경화증의 *Tsc2*<sup>+/-</sup> 마우스 모델이 사용되었다. 이 개선은 p38 MAPK-TSC-Rheb-mTORC1-S6K1 경로에서 활성의 교정을 수반하였다(도 20). *Tsc2*<sup>+/-</sup> 마우스에서 해마 장기간 강화작용 (LTP)에서의 결핍, 시냅스의 조직학적 손실, 및 행동적 공포 조건화는 모두 니트로시넵신 처리 후 개선되었다. 이를 함께 취하면, 이들 결과는 과도한 eNMDAR 활성을 제한함에 의해, 흥분성/억제성(E/I) 불균형의 개선은 TSC에 대한 새로운 치료 접근법을 나타낼 수 있다는 것을 시사한다.

[0105] 니트로시넵신은 *Tsc2* 이중접합성 마우스에서 장기간 해마 가소성에서의 결핍을 역전시킨다

[0106] 흥분성 입력에 반응하여 유발되고 해마에서 학습 및 기억의 전기적 상관관계를 나타내는 것으로 생각되는 시냅스 가소성의 형태인 장기간 강화작용 (LTP)을 검사하였다. 해마 슬라이스의 CA1 영역에서 필드 기록을 사용하여 이 형태의 시냅스 가소성에 대한 *Tsc2* 돌연변이의 영향을 조사하였다. 이러한 목적을 위해, 1개월령 마우스로부터의 급성 해마 슬라이스를 제조하고 인공 뇌척수액(ACSF)이 살포된 미세전극 어레이(MEA) 챔버에서 필드 기록을 수행하였다. fEPSP(필드 흥분성 시냅스후 전위)는 Schaffer 부수(각각 1초 동안 100 Hz 펄스의 4회 반복)의 자극을 통해 LTP를 유발한 후 CA1 영역에서 기록되었다. fEPSP의 초기 기울기를 분석하여 LTP를 평가하였다. 그러나, 여기에 사용된 바와 같은 보다 강력한 유도 프로토콜로, 본 발명자들은 유도 후 60분에 모니터링된 LTP에서의 감소를 관찰하였다. 놀랍게도, 본 발명자들은 메만틴이 아닌 1-2 μM의 보다 효과적인 eNMDAR 길항제 니트로시넵신의 4-시간 처리가 비히클 대조군 처리와 비교하여 *Tsc2*<sup>+/-</sup> 마우스에서 LTP를 개선하였음을 발견하였다 (55-65분에서 P < 0.001). 도 21-23에 도시된 바와 같이, 니트로시넵신(일명 니트로메만틴)은 ADD/IDD의 결절성 경화증 (TSC) *het* 모델에서 시냅스, 장기간 강화작용 (LTP), 및 신경행동을 메만틴보다 유의하게 더 나은 정도로 보호했다.

[0107] *Tsc2* 이중접합성 마우스의 니트로시넵신 처리는 시냅스 손실을 감소시킨다

[0108] *Tsc2*<sup>+/-</sup> 마우스의 뇌 조직학에 대한 eNMDAR 길항제의 효과를 결정하기 위해, 정량적 공초점 면역조직화학을 사용하여 비히클, 메만틴 또는 니트로시넵신으로 2.5일 동안 처리된 3-개월령 야생형 (WT) 및 *Tsc2*<sup>+/-</sup> 마우스로부터의 관상동맥 뇌 슬라이스를 분석하였다. C57B1/6J 배경의 *Tsc2*<sup>+/-</sup> 마우스에 비히클 또는 92 μmol/kg의 메만틴

또는 니트로시넵신의 장입 용량을 복강내 경로를 통해 투여하고, 이어서 4.6  $\mu\text{mol/kg}$ 의 약물을 2.5일 동안 매일 2회로, 마지막 용량은 행동 훈련 기간 이전 3시간에 투여하였다(총 5회 약물 주사). 이 투약 요법은 1-10  $\mu\text{M}$ 의 뇌 내의 NMDAR로 약물의 효과적인 농도를 산출한다.

[0109] TSC의 주요 특징은 시넵스의 손실을 포함하는 것으로 생각된다. 중요하게는, 니트로시넵신(니트로메판틴)으로 처리된  $Tsc2^{+/-}$  마우스는 처리되지 않은 이중접합성 한배새끼보다 해마에서 시넵스전 마커 스냅토파이신 (SY38)에 대해 훨씬 더 많은 염색을 나타내고, 반면에 메판틴의 효과는 통계적으로 유의하지 않았다(도 21a 및 21b 참고).

[0110] 추가의 마커 분석은 신경교 원섬유성 산성 단백질(GFAP, 이들 조건 하에서 정상세포 마커), NeuN(신경핵 및 세포체 마커), 및 미세소관-연관된 단백질 2(MAP2, 뉴런 수지 가지 라벨링)를 포함했다. 해마의 공초점 면역조직화학 이미지는 WT 대  $Tsc2^{+/-}$  마우스에서 NeuN, MAP2, 또는 GFAP 사이에 발현에서의 차이가 없음을 나타내었다. 종합적으로, 이들 조직학적 결과는 시넵스의 손실과 대조적으로 해마에서 이 질환의 단계에서 뉴런/뉴로필의 현저한 손실 또는 반응성 별아교세포증의 증가가 없음을 나타낸다.

[0111] 니트로시넵신은  $Tsc2$  이중접합성 마우스에서 신경행동 표현형을 개선한다

[0112] 공포 조건화 테스트를 3-개월령  $Tsc2^{+/+}$  및  $Tsc2^{+/-}$  마우스에 대해 수행하여  $Tsc2^{+/-}$  마우스에서 불안, 및 학습 및 기억 결핍에 대한 eNMDAR 길항제의 효과를 탐색하였다. 비히클, 메판틴 또는 니트로시넵신을 2.5일 동안 투여하였고, 마지막 용량은 제1 훈련 기간 이전 3-시간에 발생하였다. 공포 조건화 테스트(도 23 참고)에서, WT 한배새끼 마우스는 신규한 맥락에 대한 훈련 맥락에서 상당히 증가된 동결 시간의 양을 나타내어( $P = 0.032$ ), 이는 이들 동물이 두 조건을 구별할 수 있었음을 나타냈다. 도 23은 공포 조건화 테스트에 의해 평가된  $Tsc2^{+/-}$ -마우스에서 맥락 식별에 대한 메판틴 또는 니트로시넵신 처리의 효과를 나타낸다. 공포-조건화 시험에서 비히클, 메판틴 또는 니트로시넵신으로 처리된 3-개월령 WT 및  $Tsc2^{+/-}$  형질전환 마우스의 동결 시간. 시험된 마우스의 모든 4개의 군(WT-비히클, Het-비히클, Het-메판틴, 및 Het-니트로시넵신)은 "훈련 맥락" 및 "신규한 맥락 + 큐"에서 동결을 보였으며, 이는 그것의 조건화 공포 반응이 유전자형 또는 약물에 의해 영향을 받지 않았음을 나타낸다. 추가로, WT 마우스는 훈련과 신규한 맥락 사이에 맥락 식별을 나타냈다( $*P = 0.032$ ). 그에 반해서, 비히클- 또는 메판틴-처리된  $Tsc2^{+/-}$  마우스는 이 행동에서 결핍을 보여, 훈련과 신규한 맥락 사이에 식별의 결여를 초래한다(n.s. = 유의차 없음). 니트로시넵신 처리는 이 표현형을 개선하여,  $Tsc2^{+/-}$  마우스에서 맥락 식별을 정상화했다( $**P = 0.023$ ). 값은 평균 + s.e.m.이다 ( $n =$  군당 7-12마리 마우스). 약어: 훈련 맥락 = 마우스가 이전에 소리 신호에 의해 선행된 충격을 받아 훈련된 훈련 환경. 신규한 맥락 = 테스트 챔버에서 신규한 바닥재 및 벽. 신규한 맥락 + 큐 = 소리 신호가 있는 신규한 맥락.

[0113] 그에 반해서,  $Tsc2^{+/-}$  (het) 마우스는 이 형태의 맥락 식별이 결핍되었다. 놀랍게도, 메판틴은 이 결손을 완화시키지 못했지만, 니트로시넵신은 정상 WT 수준으로  $Tsc2^{+/-}$  마우스에서 맥락을 구별하는 능력을 개선시켰다( $P = 0.023$ ). 대조군으로, 시험된 마우스의 모든 4개의 군(WT-비히클, Het-비히클, Het-메판틴, 및 Het-니트로시넵신)은 신규한 맥락에서 조건화된 신호에 동결을 나타내었고, 이는 해마-독립적 공포 반응이 유전자형 또는 약물에 의해 영향을 받지 않음을 나타낸다.

[0114] 요약하면, 메판틴이 아닌 신규한 개선된 약물 니트로시넵신의 단기(4 시간) 적용은 CA1 해마에서 LTP의 유도 후 대략 1시간에 모니터링될 때 시넵스 가소성의 결핍을 역전시킬 수 있었다. 중요하게는, 니트로시넵신의 2.5일간 처리는 스냅토파이신 염색에 의해 모니터링될 때  $Tsc2^{+/-}$  마우스의 해마에서 관찰된 시넵스 손실을 역전시켰다. 메판틴이 아닌 니트로시넵신의 2.5일 정도의 처리는,  $Tsc2^{+/-}$  마우스에서 맥락 식별을 정규화했다. 니트로시넵신은 시넵스 가소성의 전기생리적 관측, 시넵스의 신경조직학적 분석 및 불안과 기억의 신경행동 평가에서 메판틴에 비해 상당한 이점을 제공했다. 이들 결과는 니트로시넵신이 삶의 질을 향상시키기 위한 노력으로 TSC의 신경학적 측면에 대한 잠재적 치료법으로 시험되어야 함을 시사한다.

[0115] **실시예 7 레트 증후군의 MeCP2 널 마우스 모델에서 니트로시넵신의 유의한 효과**

[0116] 도 24에서 나타낸 바와 같이, 니트로시넵신은 ADD/IDD의 또 다른 유형인 레트 증후군의 MeCP2 녹아웃(KO) 마우스 모델에서 운동 행동(당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진, 로타로드 테스트)을 개선했다.

- [0117] 본원은 *Mef2c*-het 마우스가 인간 MCHS에 대한 유용한 모델이고; E/I 불균형은 MCHS의 발병에서 역할을 수행할 수 있다는 것을 입증한다. 적절한 NMDAR 길항제로 시냅스 가소성을 복원하고 신경 손실을 예방하는 것은 *Mef2c*-het 마우스에서 자폐성/MCHS-유사 표현형을 구제 또는 개선시켰다. 본 명세서에서의 결과는 니트로시넵신(니트로메탄틴 YQW-036 또는 NMI-6979로도 알려져 있음, 구조 1 참조)의 투여에 의한 인간 MCHS 및 다른 형태의 ASD, IDD, 및 간질(예를 들어, 여기서 나타난 바와 같은 TSC 및 레트 증후군)의 치료를 설명한다.
- [0118] **실시예 8. 방법**
- [0119] 실시예 1-7은 하기 기재된 바와 같은 방법을 이용했다. 당해 분야의 숙련가는 하기 설명이 예시적이고 실시예 1-7에서 동일하거나 유사한 결과를 얻는 동안 이루어질 수 있는 사소한 변동이 있음을 이해한다.
- [0120] *마우스, 약물 치료, 및 행동 테스트*
- [0121] *Mef2c* 이중접합성 녹아웃 (*Mef2c*-het) 마우스는 *Mef2c*의 통상적인 엑손 2-삭제된 대립유전자를 담지하는 마우스 (*Mef2c*<sup>Δ2</sup>)를 그것의 WT 한배새끼와 교차시킴에 의해 생성되었다. 이들 마우스를 유지하고 사용하기 위한 모든 절차는 Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute의 동물실험윤리위원회(IACUC)에 의해 승인되었다. 이 연구에서, (약물 처리 유무에 관계없이) 균일성을 보장하기 위하여, 행동 검정에 대해 단지 수컷 마우스만을 사용하였다. 메탄틴, 니트로시넵신(둘 모두 4.6 μmol/kg 체중) 또는 비히클(PBS)로 만성 치료는 ~ 2.5주령에서 시작하여 적어도 3개월 동안 하루에 두 번 i.p. 주사를 통해 투여하였다. 마우스가 아직 유년이기 때문에 이 나이가 선택되었고 따라서 치료는 동등한 단계에서 인간에서 시작할 수 있다. 약물 치료의 이 용량 및 기간은 니트로시넵신이 뉴런 및 시냅스에 상당한 보호 효과를 나타내는 이전의 연구에 기초하여 선택되었다.
- [0122] 마우스는 유전자형이 정해지기 전에 메탄틴, 니트로시넵신, 또는 비히클 군에 무작위로 분포되었다. i.p. 주사 및 행동 테스트를 수행하는 실험실 작업자는 유전자형에 대해 블라인드되었다. 행동 테스트 후, 마우스를 아래에 기재된 바와 같이 면역조직화학 또는 전기생리학에 사용하고, 맹검 방식으로 연구하였다.
- [0123] *운동 활동*
- [0124] 운동 활동은 우리의 바닥 위로 2 및 7 cm에서 2 레벨의 광전지 빔이 장착된 프레임(25.5 x 47 cm)에 배치된 폴리카보네이트 우리(42 x 22 x 20 cm)에서 측정되었다(San Diego Instruments, 캘리포니아주 샌디에이고 소재). 이들 두 세트의 빔은 수평(운동) 및 수직(사육) 행동 둘 모두를 기록할 수 있었다. 얇은 층의 베딩을 우리의 바닥에 적용하였다. 정확한 검정에 따라 마우스를 30분 또는 120분 동안 시험하였다.
- [0125] *발 클라스핑*
- [0126] 발 클라스핑 테스트를 위해, 마우스를 그것의 꼬리의 원위 1/3에 의해 집어 들고 10초 동안 관찰하였다. 앞발 및/또는 뒷발의 클라스핑을 기준으로 유전자형과 관련하여 맹검 방식으로 평가되었다: 0 - 발 클라스핑 없음, 1 - 가끔 앞발의 클라스핑 및 3 - 앞발의 일정한 클라스핑 및 가끔 뒷발의 클라스핑.
- [0127] *반즈 미로*
- [0128] 반즈 미로는 직경 75 cm인 불투명한 Plexiglas 디스크로 구성되었고, 삼각대에 의해 바닥위 58 cm로 상승하였다. 직경이 5cm인 20개의 홀이 주변에서 5 cm 떨어져 위치하였고 검은 Plexiglas 탈출 상자(19 x 8 x 7 cm)가 홀 중 하나 아래에 배치되었다. 뚜렷한 공간적 신호가 미로 주변에 전부에 위치하고 연구 내내 일정하게 유지되었다. 테스트 첫날에, 훈련 기간이 수행되었으며, 이 기간은 마우스를 탈출 상자에 놓고 1분 동안 그대로 남겨두는 것으로 구성되었다. 1분 후 제1 세션이 개시되었다. 각각의 세션의 개시 시에, 마우스를 미로의 중간에 10 cm 높이 원통형 블랙 시작 챔버에 넣었다. 10초 후, 시작 챔버를 제거하고, 버저(80 dB) 및 조명(400 lux)을 켜고 마우스를 자유롭게 미로를 탐험하도록 설정하였다. 마우스가 탈출 터널에 들어가거나 3분이 경과되면 세션이 종료되었다. 마우스가 탈출 터널에 들어왔을 때, 버저가 꺼지고 마우스가 1분 동안 어둠 속에 남겨지도록 하였다. 마우스가 터널에 스스로 들어가지 않았을 때, 탈출 상자에 1분 동안 부드럽게 넣었다. 터널은 항상 동일한 홀(공간적 환경 내에서 안정적인) 아래에 위치하고 있으며 각각의 마우스에 대해 무작위로 결정되었다. 연구의 취득 부분을 위해 12일 동안 하루에 1회 마우스를 시험하였다. 일반적으로 반즈 미로는 이것이 스트레스가 적기 때문에 모리스 수중 미로보다 마우스에서 종종 선호된다는 것에 주의한다. 그러나, 설치류는 니트로시넵신으로 모리스 수중 미로를 사용하는 다른 징후에 대해 시험되었으므로, 이것은 여기에서 약물 테스트를 위한 비교를 제공하기 위해 또한 사용되었다.

[0129] *모리스 수중 미로*

[0130] 본 발명자들은 종래의 모리스 수중 미로의 일 버전을 사용하여 공간적 참조 학습 및 기억을 시험하였다. 마우스는 직경 14 cm의 플랫폼으로 수영하도록 훈련되었고 물의 표면 아래로 1.5 cm 침수되었다. 수영하는 동안 플랫폼은 마우스에게 보이지 않았다. 마우스가 60초 이내에 플랫폼을 찾지 못하면, 수작업으로 플랫폼으로 유도되어 10초 동안 그곳에 유지되었다. 마우스는 기준(<20초 평균 탈출 지연 시간)에 도달하기 위해 필요한 만큼 며칠 동안 하루에 4번의 시험을 받았다. 공간적 훈련의 유지는 마지막 훈련 시험 후 24 시간에 평가되었다. 프로브 시험 둘 모두는 플랫폼이 없는 수영장에서 60-초의 자유 수영으로 구성되었다. ANY-미로 비디오 추적 시스템(Stoelting Co.)을 사용하여 자동화 분석을 위한 모든 시험을 비디오테이프 녹화했다.

[0131] *3-챔버 사회적 상호작용*

[0132] 이 테스트는 자폐증의 동물 모델을 위해 Crawley 그룹에 의해 원래 개발되었다. 자폐성 개체는 낮은 수준의 사회적 접근법 및 흔치않은 상호작용의 방식을 포함하여 비정상적인 상호 사회적 상호작용을 보여준다. 각각의 챔버가 20 cm(길이) x 40.5 cm(폭) x 22 cm(높이)로 측정되는 직사각형, 3개의 챔버형 Plexiglas 상자로 구성되는 사회적 상호작용 장치를 사용하였다. 챔버를 분할하는 벽은 투명했으며, 작은 반원형 개구부(3.5 cm 반경)를 통해 각각의 챔버 안으로 접근할 수 있었다. 중간 챔버는 비어 있고 2개의 외부 챔버는 작고 둥근 와이어 우리를 포함했다(Galaxy Cup, Spectrum Diversified Designs, Inc., 오하이오주 스트리트스보로 소재). 마우스를 5분 동안 전체 장치에 습관화시켰다. 사회적 상호작용을 평가하기 위해, 이번에는 낯선 마우스(와이어 우리에 결박된 같은 성별의 C57BL/6J)를 사용하여 마우스를 중간 챔버로 되돌렸다. 낯선 마우스와 함께 챔버에서 소비된 시간 및 비어있는 와이어 우리-함유 챔버에서 소비된 시간은 각각의 챔버로의 유입 횟수와 마찬가지로 5분 동안 각각 기록되었다. 실험 마우스는 한 번 시험되었고, 낯선 C57BL/6J 마우스는 최대 6회 테스트에 사용되었다.

[0133] *홀 보드 탐구*

[0134] 장치는 상승된 마루 상에 등간격으로 이격된 4 x 4(직경 각각 3 cm)의 형식으로 16개 홀이 있는 Plexiglas 우리(32 x 32 x 30 cm)로 구성되었다. 머리-침지의 수 및 머리-침지에 소비된 시간을 포함하는 탐사적 활성을 5분 동안 측정하였다.

[0135] *해마 슬라이스 준비 및 전기생리학*

[0136] 1 내지 6-개월령 마우스를 이소플루란 과선량으로 마취시키고 참수시켰다. 뇌를 빠르게 해부하고, 해마 슬라이스(두께 350  $\mu\text{m}$ )를 하기를 함유하는 빙랭 절개 완충액(mM 단위)에 수집하였다: 212 수크로스, 3 KCl, 5 MgCl<sub>2</sub>, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 및 10 글루코스 (pH 7.4). CA3 영역을 간질 활성을 피하기 위해 절단하였다. 슬라이스는 30°C에서 하기를 함유하는 인공 뇌척수액(ACSF)(mM 단위)에 배치하였다: 124 NaCl, 5 KCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 및 10 글루코스 (pH 7.4). ACSF 및 절개 완충액을 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>로 버블링시켰다. 기록하기 전에, 슬라이스를 담금-기록 챔버에 배치하고, 30°C에서 유지시키고,  $\geq 1$ 시간 동안 ACSF로 관류시켰다.

[0137] 세포외 필드 기록의 경우, 동심성 양극성 텅스텐 전극을 사용하여 해마 CA1 영역에서 Schaffer 부수/교합(SC) 섬유를 활성화시켰다. ACSF로 충전된 세포외 유리 미세전극(저항  $\sim 1-3 \text{ M}\Omega$ )을 방사층에 배치하고 필드 흥분성 시냅스후 전위(fEPSP)를 측정하였다. 기준선 기록을 위해, 슬라이스는 최대 측정된 fEPSP 진폭을 유도하는데 사용된 것의 30-40%의 자극 강도에서 20분 동안 0.033 Hz에서 자극되었다. 3개의 100 Hz 펄스(기간: 1초, 간격: 20초)로 구성된 고주파 자극(HFS)을 적용하여 장기간 강화작용(LTP)을 유도했다. 쌍으로 된-펄스 촉진(PPF)은 20 내지 200 ms 범위의 자극간 간격(ISI)을 갖는 2개의 펄스를 적용함에 의해 시험되었다. 멀티클램프 700B 증폭기(Molecular Devices)를 실험에 사용하였다. 데이터를 5 kHz에서 샘플링하고 Clampfit 10 프로그램(Molecular Devices)을 사용하여 분석했다.

[0138] 시냅스 활성화는 전체-전지 전압-클램프 기술을 사용하여 텐테이트 뇌이랑 (DG) 과립 뉴런으로부터 기록되었다. 데이터는 Multiclamp 700B 증폭기 및 Clampex 10.2 소프트웨어(Molecular Devices)를 사용하여 획득되었다. 기록은 200  $\mu\text{s}$ 에서 샘플링되었고 2 kHz에서 필터링되었다. ACSF는 50  $\mu\text{M}$  피크로톡신 및 1  $\mu\text{M}$  테트로도톡신(TTX)과 함께 외부 배스 용액으로 사용되어 자발적인 미니어처 흥분성 시냅스후 전류(mEPSC)를 분리하거나, 또는 10  $\mu\text{M}$  6-시아노-7-니트로퀴놀살린-2,3-디온(CNQX), 50  $\mu\text{M}$  (2R)-아미노-5-포스포노펜타노에이트(AP5), 및 1  $\mu\text{M}$  TTX는 자발적인 미니어처 억제성 시냅스후 전류(mIPSC)를 분리한다. 모든 용액은 기록을 시작하기 이전 적어도 20분 동안 평형화되도록 하였다. 전압-클램프 실험을 위한 피펫 내부 용액은 하기를 함유했다(mM 단위):

120 K-글루코네이트, 15 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, 5 EGTA, 2 Mg-ATP, pH 7.4(300 mOsm). mEPSC 및 mIPSC는 전형적으로 적어도 3-5분 동안 기록되었고 미니 분석 프로그램 버전 6.0.3(Synaptosoft)을 사용하여 분석되었다.

[0139] *면역조직화학 및 비편향된 입체적 세포 계수*

[0140] 마우스에 PBS 완충액으로 그 다음 PBS(PFA) 내 2% 파라포름알데하이드로 관류시켰다. 관류 후, 뇌를 제거하고 후-고착을 위해 밤새 2% PFA에 넣고 동결 전에 PBS에서 30% 수크로스에 가라앉혔다. 극저온 섹션을 15 μm의 두께로 절단하였다. 섹션은 항원 마스킹하지 않은 용액(백터)에 담그고 30초 동안 마이크로파 처리한 후, 이어서 15분 동안 PBS 중 0.25% 트리톤 X-100으로 투과화하였다. 일차 항체를 4°C에서 16시간 동안 인큐베이션하고 25°C에서 2시간 동안 이차 항체를 형광-공액 배양하였다. 각각의 필드에서 수많은 염색되지 않은 세포는 염색 특이성을 위한 내부 대조군으로 작용되었다. 일차 항체는 하기를 포함했다: NeuN(마우스, EMD Millipore), 활성화된 카스파제-3(토끼, Cell Signaling), VGLUT1(기니피그, SYSY), VGLUT2(토끼, SYSY), VGAT(마우스, SYSY), 스냅토파이신(마우스, Sigma), GFAP(마우스, Sigma), PCNA(마우스, Santa Cruz), DCX(염소, Santa Cruz). TUNEL 검정은 공급자의 지침에 따라 Roche 원위치 세포사 검출 키트를 사용하여 세포자멸사를 평가하기 위해 수행되었다. NeuN, 활성화된 카스파제-3, TUNEL, GFAP, PCNA, 또는 DCX에 의해 점유된 양성 세포의 수 또는 영역 퍼센트는 광학 분리를 사용하여 특이적 뇌 영역에서 계수되거나, 또는 이전에 기재된 바와 같이 정량적 공초점 면역조직화학 또는 광학 밀도에 의해 추정되었다.

[0141] *뇌 용해물의 제조 및 웨스턴 블랏팅*

[0142] 뇌 조직을 10 부피의 차가운 수크로스 완충액(0.32 M 수크로스, 25 mM Hepes, pH 7.4)에서 균질화시켰다. 4°C에서 5분 동안 3,000g에서 짧은 원심분리 후, 상청액을 수집하고 4°C에서 12분 동안 10,000g에서 원심분리하였다. 조심스러운 피펫팅에 의해 동일한 수크로스 완충액을 사용하여 펠릿의 외부 3/4를 수집하고 재현탁시키고, 반면에 미토콘드리아를 함유하는 어두운 중심은 피했다. 4°C에서 12분 동안 10,000g에서 제2의 원심분리 후, 어두운 중심이 없는 펠릿을 시냅소솜-농축된 뇌 용해물로서 차가운 HBS(25 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl)에 수집하고 웨스턴 블랏 실험에 사용하였다. 면역블로팅을 위한 일차 항체는 하기를 포함했다: VGLUT1(기니피그, SYSY), VGLUT2(토끼, SYSY), GAD65(토끼, Millipore), 스냅토파이신(마우스, Millipore), MEF2C(토끼, Proteintech), α-튜불린(마우스, Sigma), β-액틴(마우스, Sigma) 및 이어서 적절한 이차 항체<sup>52</sup>. 이전의 항체가 웨스턴 블랏보다 우월함이 입증되었기 때문에 면역블로팅을 위해 VGAT 대신 GAD65를 사용하였다는 것을 주지한다. 면역신호를 Kodak x-선 필름 상에 포착하고 이미지 J 버전 1.45s를 사용하여 정량화했다.

[0143] *골지 염색 및 Shol1 분석*

[0144] 표준 골지-Cox 침투는 제조자의 지침에 따라 FD Rapid GolgiStain 키트(FD NeuroTechnologies, Inc.)를 사용하여 WT 및 *Mef2c-het* 뇌로 수행되었다. 전체 세포의 3D 몽타주를 디킨블루선 현미경검사에 의해 40x로 찍은 후 SlideBook 5.0 소프트웨어(Intelligent Imaging Innovations)로 재구성하고, 뉴로루시다 뉴런 추적 소프트웨어(MBF Bioscience)를 사용하여 전체 세포 프로파일을 묘사하고 Shol1 분석을 다른 곳에서 자세히 설명된 바와 같이 수행했다. 누적 수지상 교차 및 수지상 길이를 분석하였다.

[0145] *성인 신경발생*

[0146] 성인 신경발생을 연구하기 위해, 8-주령 마우스에 BrdU(50 mg/kg 체중)로 연속 5일 동안 매일 2회 i.p. 주입하고, 마지막 주사 4주 후 4% PFA로 관류하였다. 그 다음 뇌를 해부하고 4% PFA에서 밤새 고정시키고, 행구고, 동결보호하고, 액체 N<sub>2</sub>에서 냉동시켰다. 동결절편(두께 30 또는 40 μm)을 극저온 상에서 슬라이스했다. 적절한 접합된 이차 항체를 갖는 일차 항체에 대해 표준 면역염색 절차를 사용하였다. BrdU 면역염색을 위해, 섹션을 2N HCL에서 30분 동안 전처리하였다. PCNA, DCX, BrdU, NeuN, 또는 mCherry에 양성인 세포를 *Mef2c-het* 및 WT 마우스의 해마 DG를 통해 일련의 섹션으로 분석하였다. SlideBook 소프트웨어를 사용하여 63x 대물렌즈 하에서 양성 세포를 계수하였다. 총 세포 수는 광학 분리기 기술을 사용하여 계수되었다. 동일한 노출 시간과 대비/휘도 매개변수로 사진을 촬영했다. 특정 마커에 대한 평균 강도는 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 결정되었고 DG 과립 뉴런의 평균 강도로 정규화되었다. 각각의 마커에 대해 적어도 40개 세포를 함유하는 최소 6개의 사진을 분석하였다.

[0147] *운동 행동 테스트*

[0148] 4회의 20초 시험에서 상승된(40 cm) 수평 막대(길이 50 cm)로부터 떨어지는 대기시간에 의해 균형을 측정하였다. 시험 1-2에서는 평평한 목재 막대(폭 9mm)를 사용하였고 시험 3-4에서는 원통형 알루미늄 막대(1cm

직경)를 사용했다. 각각의 시험에서, 동물을 상승된 막대의 표시된 중심 구역(10 cm)에 배치하였다. 동물이 20 초 이내에 떨어졌을 경우 0점을 얻었고, 20초 동안 중심 구역에 머물렀다면 1점, 중심 구역을 떠났을 경우 2점, 바의 단부 중 하나에 도달한 경우 3점이 주어졌다. 견인 능력은 3개의 5초 시험에 걸쳐 상승된 수평 막대(2mm 직경) 주위를 움켜쥐고 있는 앞발로 매달린 채로 남아 있으면서 뒷다리를 올리는 동물의 능력으로 측정되었다. 동물이 사지를 올리지 않으면 0점의 점수, 하나의 사지를 올리는 경우 1점, 2개의 사지를 올리는 경우 2점이 주어졌다. 근육 강도는 마우스가 수평 막대의 중간에 거꾸로 된 위치로 놓인 60초의 한 번의 시험에 의해 결정되었고, 떨어질 때까지의 대기시간이 측정되었다. 수직 장대 시험의 경우, 마우스는 천 테이프(1 cm 직경; 높이: 시험 1에서 75 cm, 시험 2-3에서 55 cm)로 덮은 수직 목재 장대에 머리를 위로 향하게 배치되었다. 3번의 시험에 걸쳐 하향으로 전환하는 대기시간과 마루로 내려가는 총 시간이 기록되었다. 마우스가 하향으로 전환하지 않거나 아래로 떨어지거나 미끄러지지 않으면 60초의 디폴트 값이 기록되었다.

[0149] 마이크로어레이 및 NextBio 유전자 네트워크 분석

[0150] Qiagen miRNA 키트를 사용하여 출생후 30일에서 WT 및 *Mef2c*-het 마우스의 해마로부터 제조된 냉동된 조직으로부터 총 RNA를 추출하였다. RNA 농도는 Nanodrop 분광측정기(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 측정하였고, RNA 품질은 Agilent 생체분석기를 사용하여 평가하였다. 발현 분석에 포함된 모든 RNA 샘플은 RNA 완전성 수치(RIN) > 8을 가졌다. 유전자-발현 마이크로어레이를 위해 MouseRef-8 v2 발현 비드칩(Illumina)을 사용하였다. R 소프트웨어 및 생체전도체 패키지를 사용하여 마이크로어레이 데이터 분석을 수행하였다. 미가공 발현 데이터를 log2 전환하고 변위치 정규화에 의해 정규화하였다. 데이터 품질관리 기준은 높은 어레이-간 상관관계(피어슨 상관 계수 > 0.85)와 평균 어레이-간 상관관계 및 계층적 군집이 기반한 특이점 어레이의 검출을 포함했다.

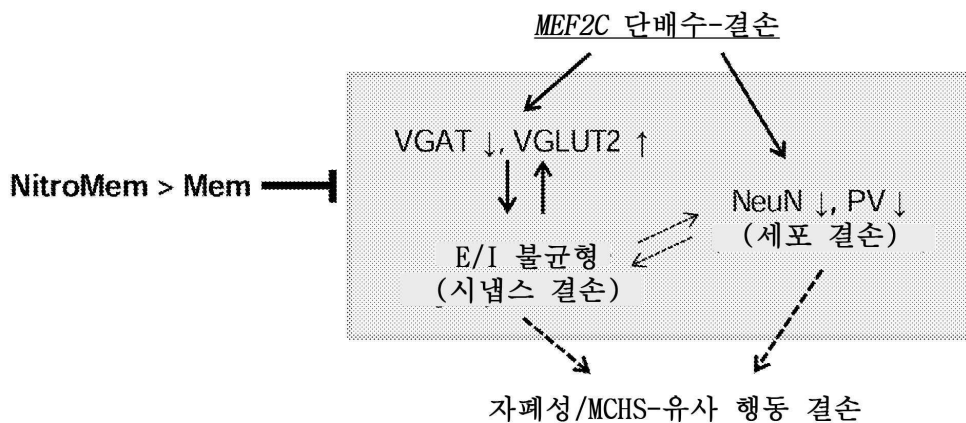
[0151] 경로 강화 분석을 위해, WT 마우스에 비해 *Mef2c*-het 마우스에서 발현이 통계적으로 변경된( $P < 0.05$ ) 모든 유전자를 NextBio(Illumina, Inc.)의 경로 강화 적용을 사용하여 GO-말단에 대해 군집화하였다. 사용된 유전자의 배경 세트는 전체 인간 게놈이었다. 순위 점수는 앞에서 설명한 방법에 기초한 NextBio에 의해 배정되었다. 뉴런 발달과 관련된 GO-말단에 군집된 유전자를 유전자 발현에서의 변화의 검증을 위해 우선 순위화하였다.

[0152] 통계적인 분석

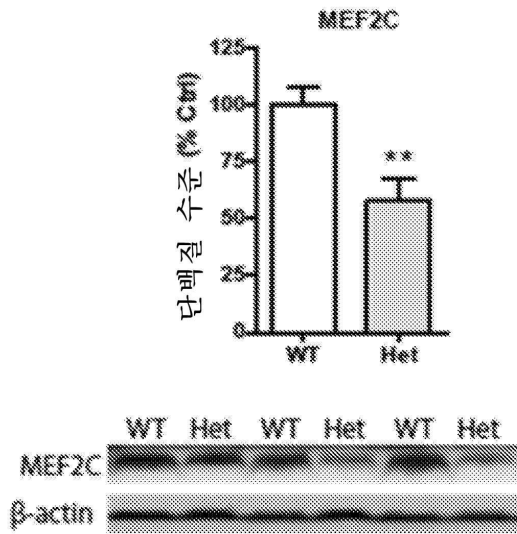
[0153] 데이터는 평균  $\pm$  s.e.m으로 보고된다. 각각의 실험에서 통계적인 테스트는 본 명세서, 도면 범례 또는 텍스트에 열거되어 있다. 모든 데이터는 Prism 6 프로그램(GraphPad Software, Inc.)을 사용하여 분석되었다. 정규 분포를 가진 데이터의 경우, 통계적 유의도는 쌍별 비교를 위해 스튜던트의 *t* 테스트로 결정되었다. Tukey, Dunnett 또는 Newman-Keul 사후 분석과 함께 ANOVA를 다중 비교에 사용했다. 범주형 데이터의 경우, 2x2 우연성 표에 대한 카이-제곱 테스트 또는 피셔의 정확 검정이 사용되었다. 정규 분포에 맞지 않는 데이터의 경우, 비-모수적 시험이 사용되었다.  $P < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

**도면**

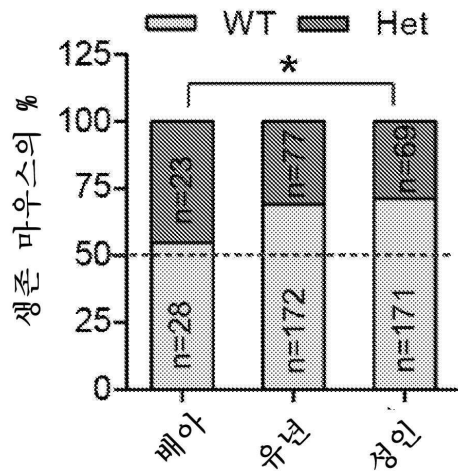
**도면1**



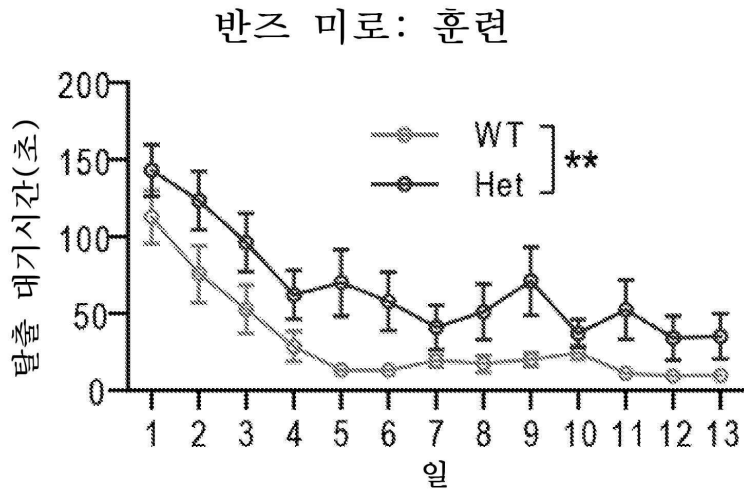
도면2



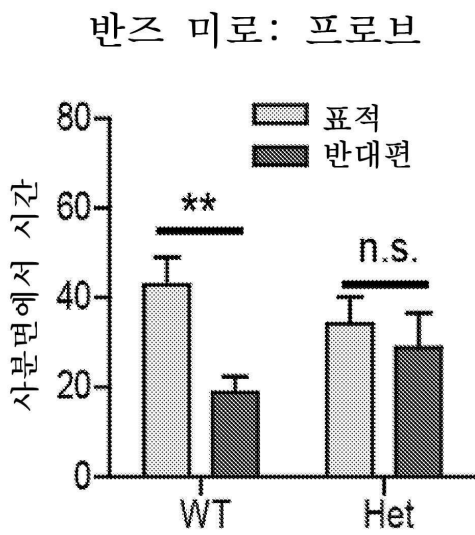
도면3a



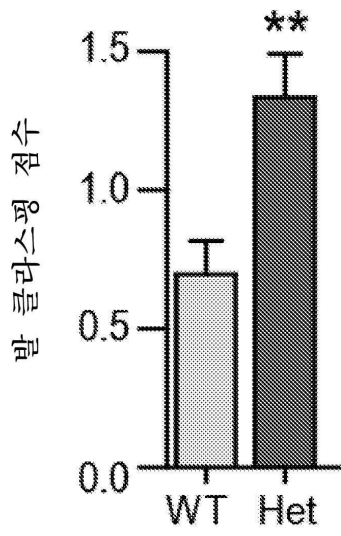
도면3b



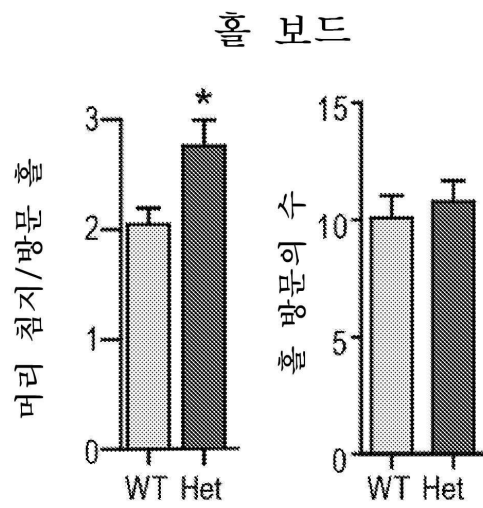
도면3c



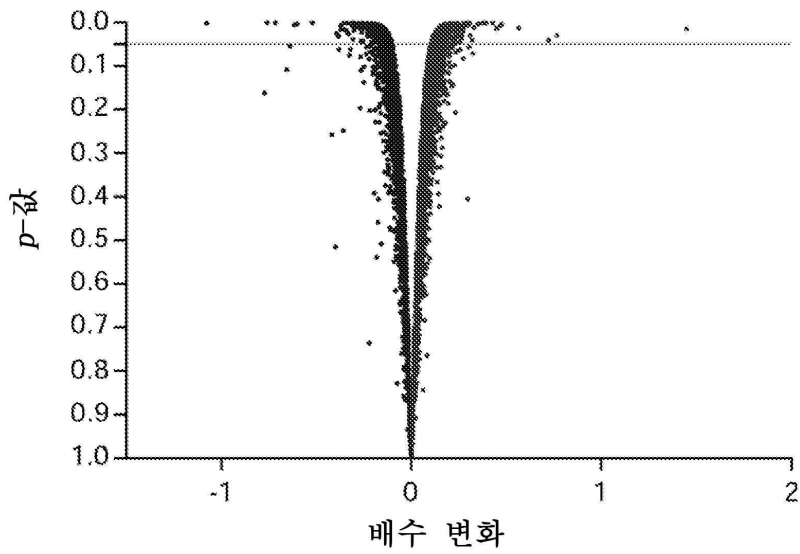
도면3d



도면3e



도면4a

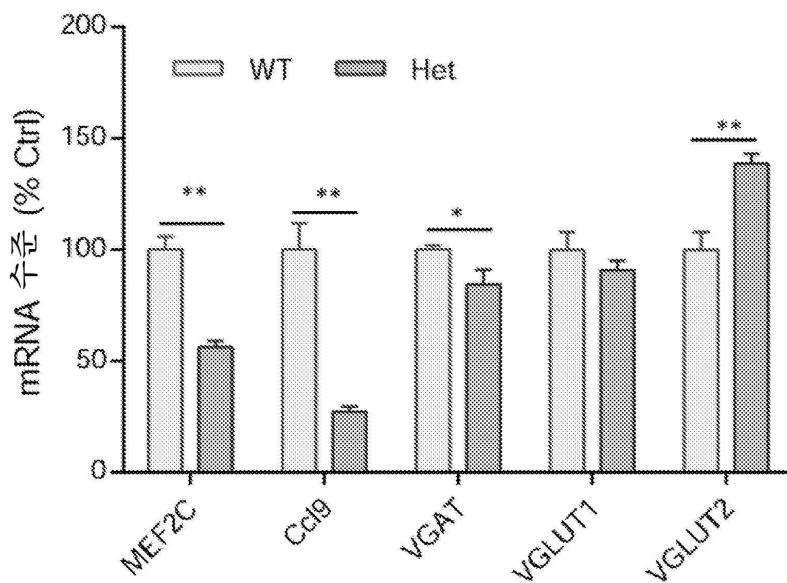


도면4b

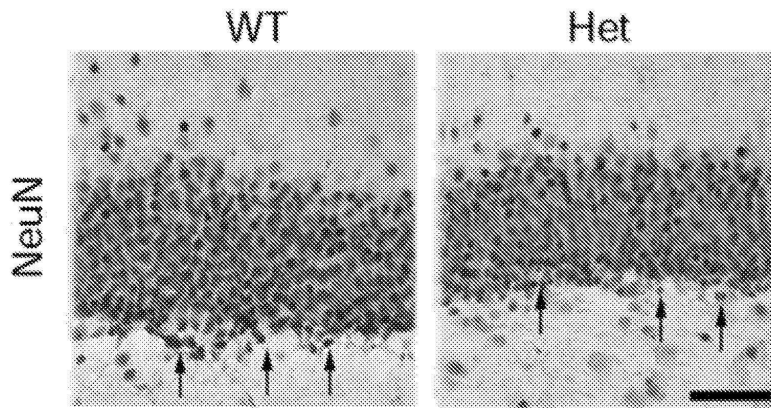
Mef2c-het 마우스에서 조절되지 않은 생체군	조절되지 않은 유전자의 수	방향	점수	P-값	소스
신경발생	33	하방	34.31	1.3E-15	GO
신경 분화	23	하방	27.51	1.1E-12	GO
시냅스	18	하방	24.04	3.6E-11	GO
신경사의 조절	5	상방	9.29	9.3E-05	GO

도면4c

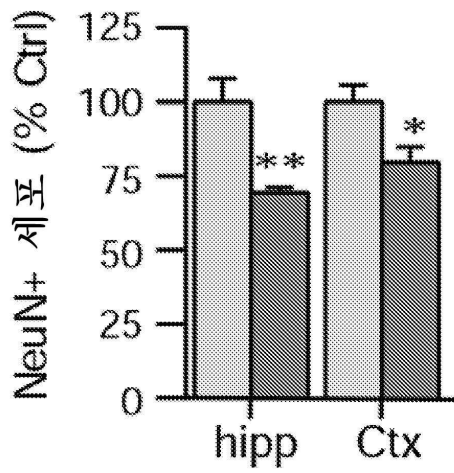
qPCR 결과



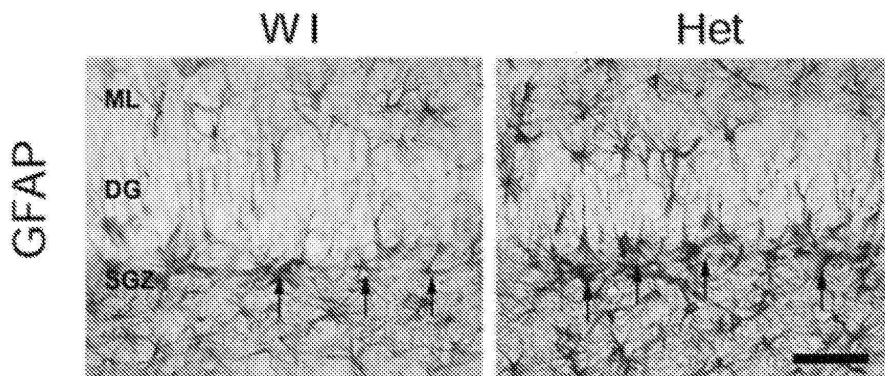
도면5a



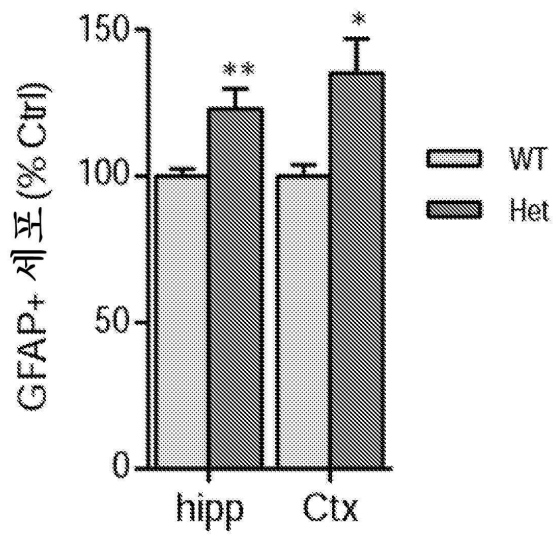
도면5b



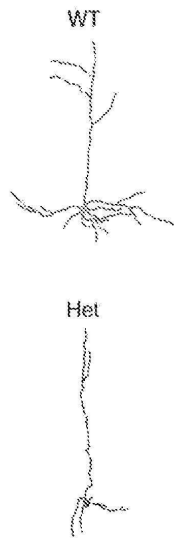
도면5c



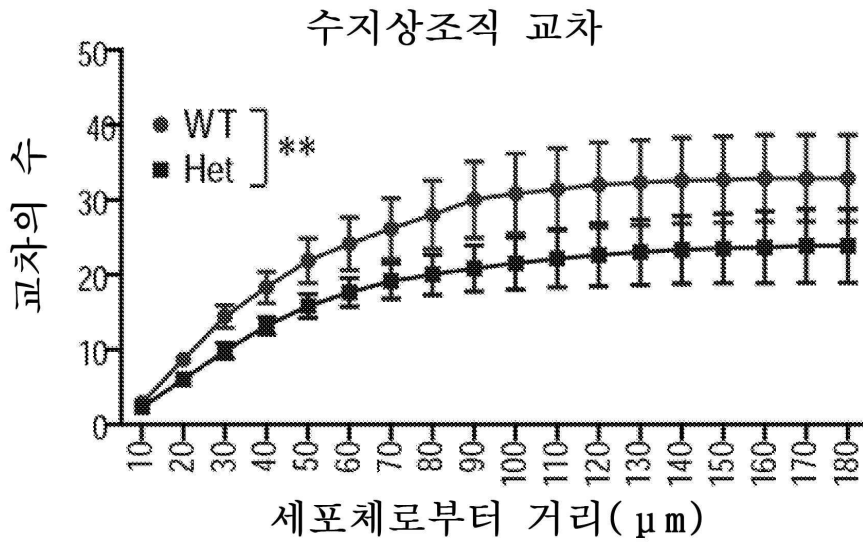
도면5d



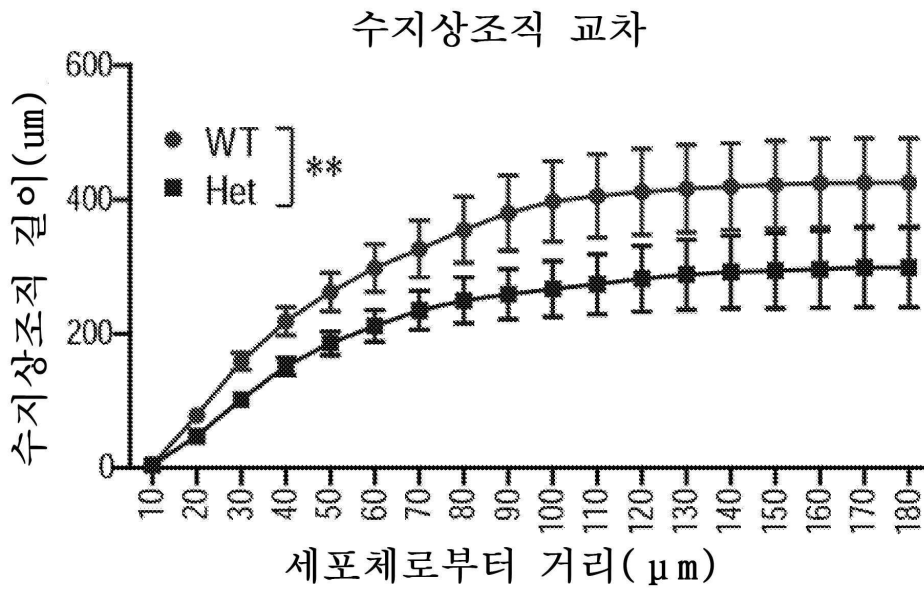
도면5e



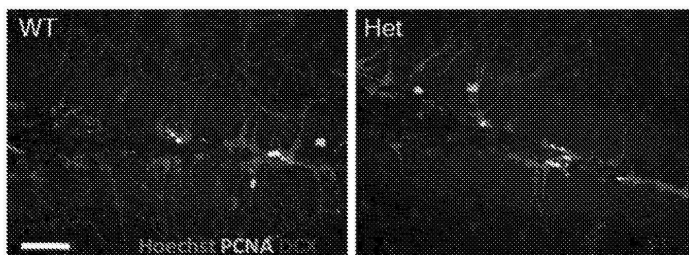
도면5f



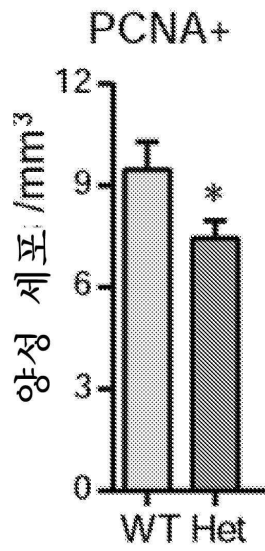
도면5g



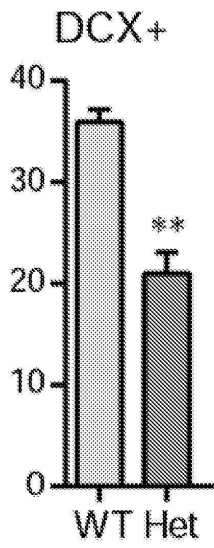
도면6a



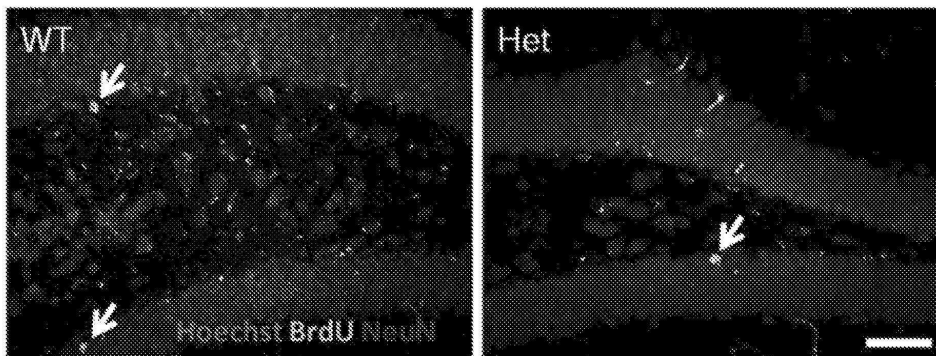
도면6b



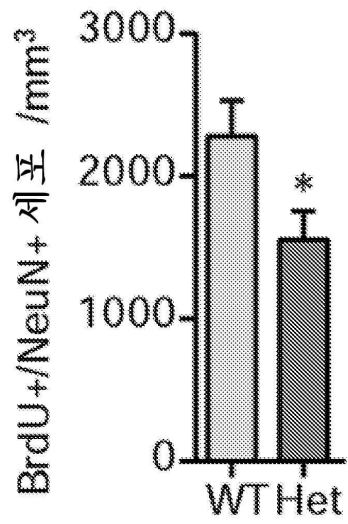
도면6c



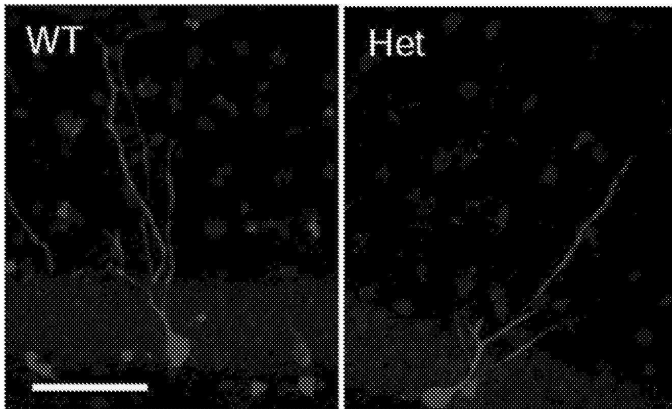
도면6d



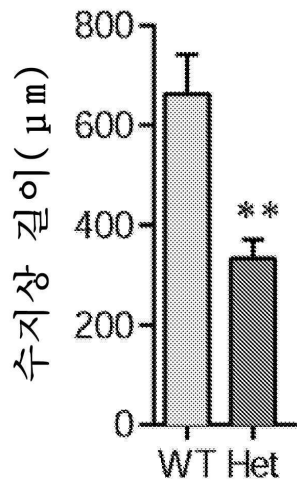
도면6e



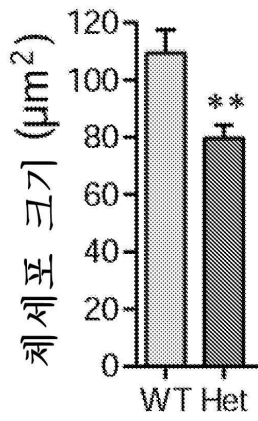
도면6f



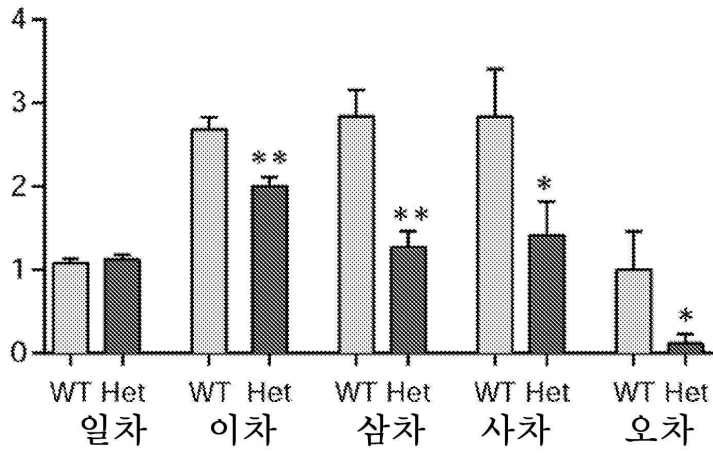
도면6g



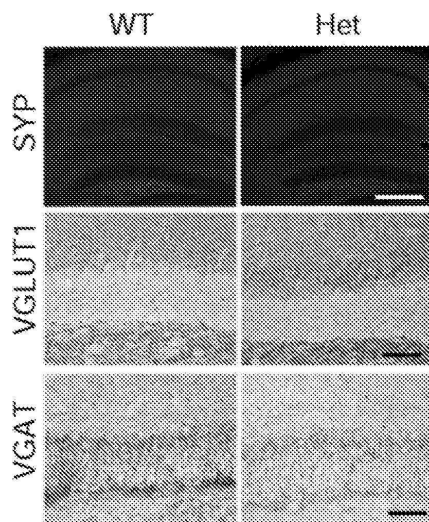
도면6h



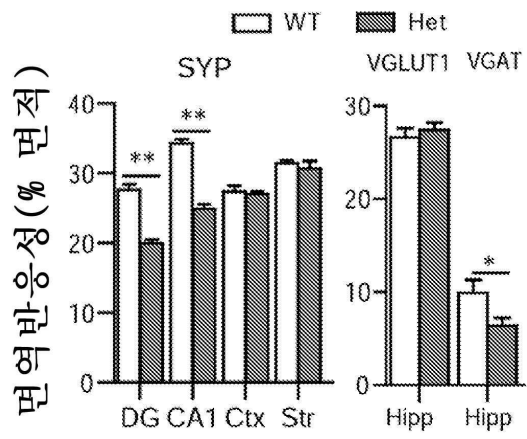
도면6i



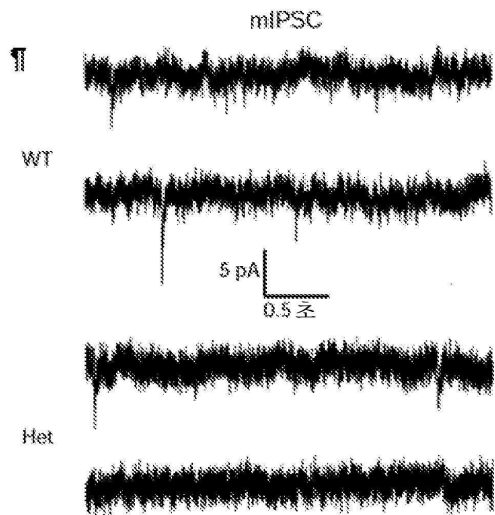
도면7a



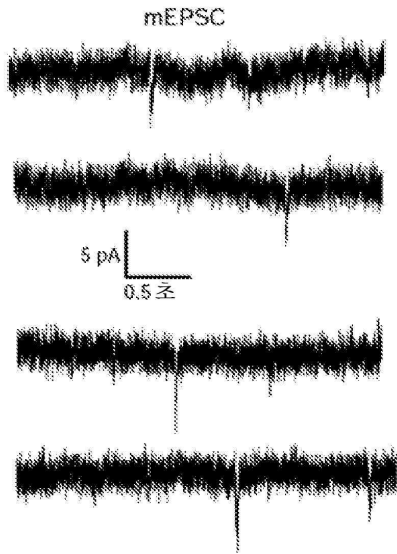
도면7b



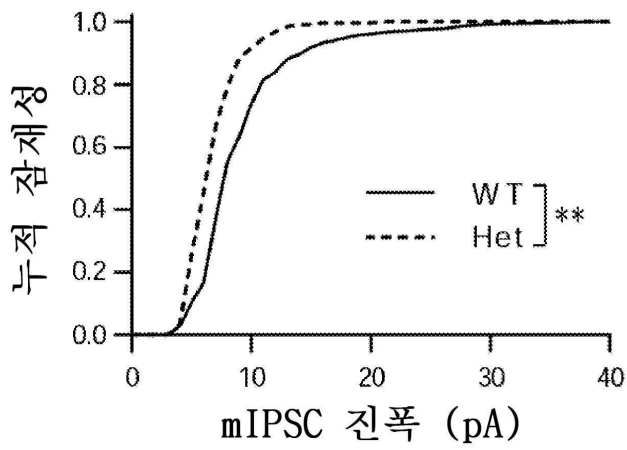
도면7c



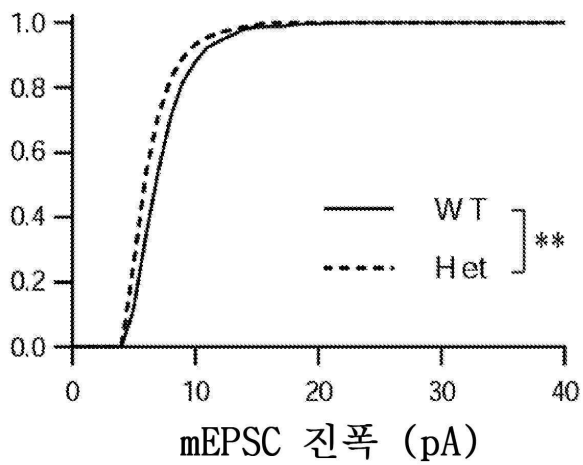
도면7d



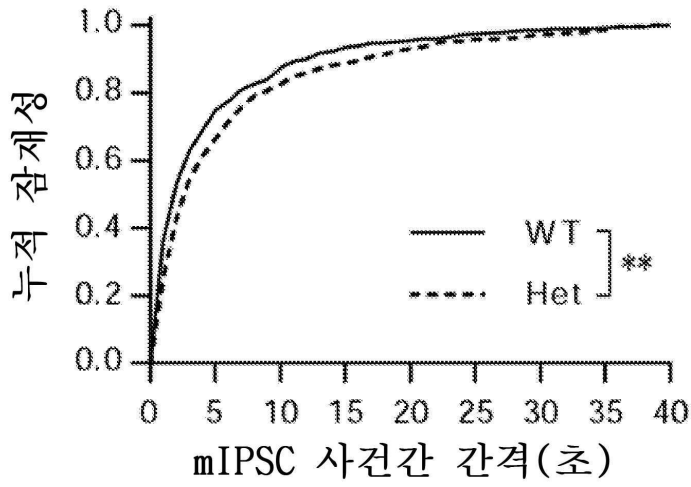
도면7e



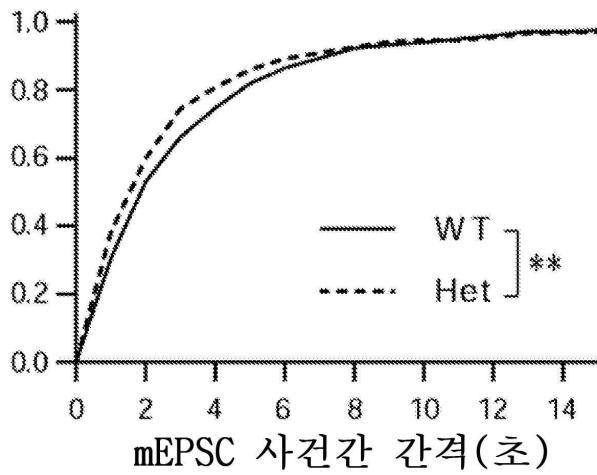
도면7f



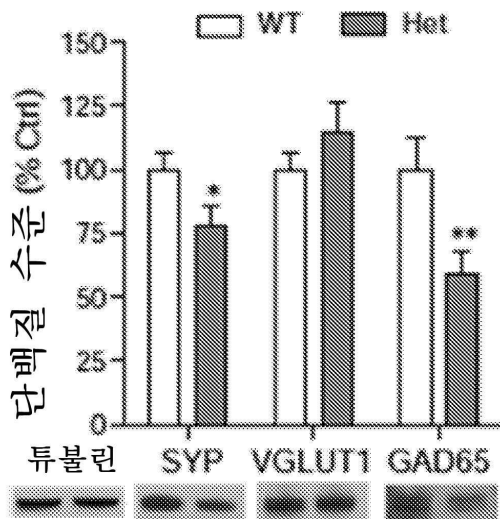
도면7g



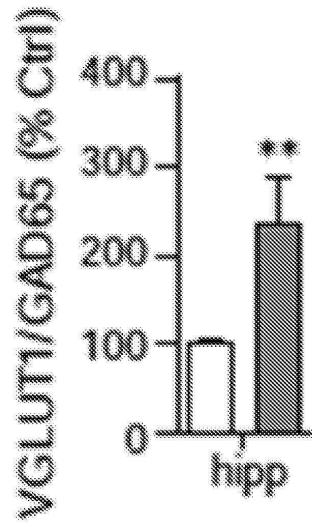
도면7h



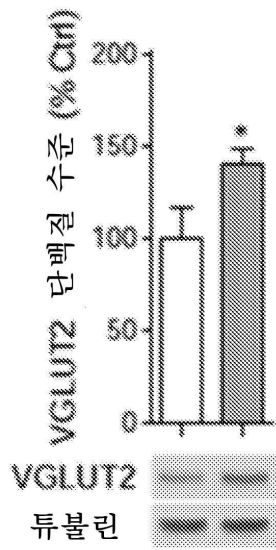
도면8a



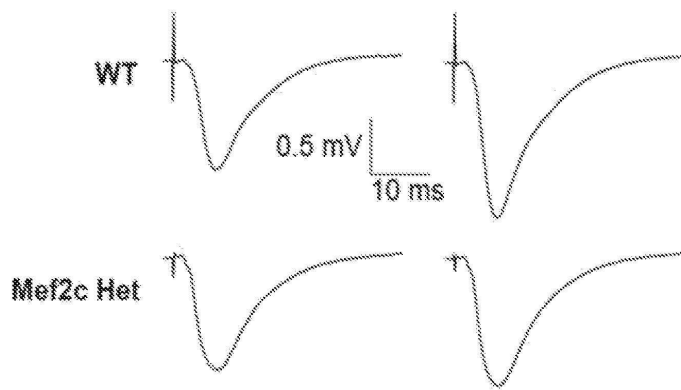
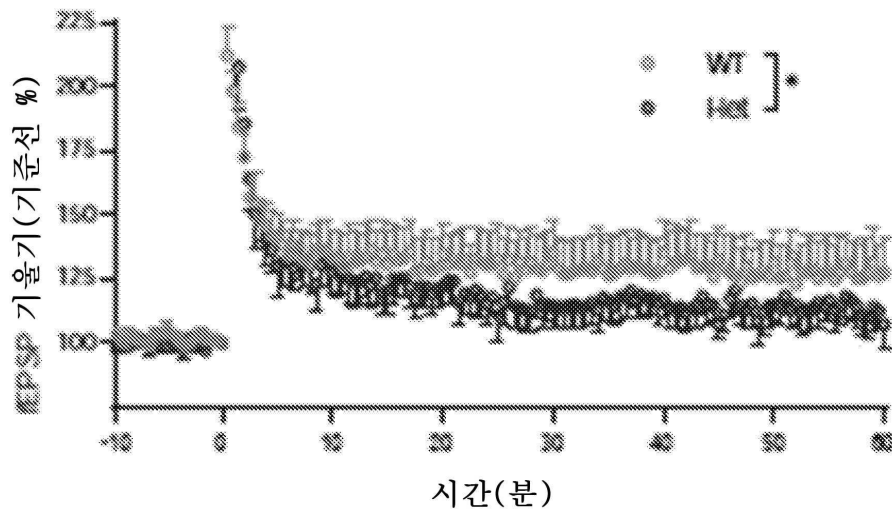
도면8b



도면8c

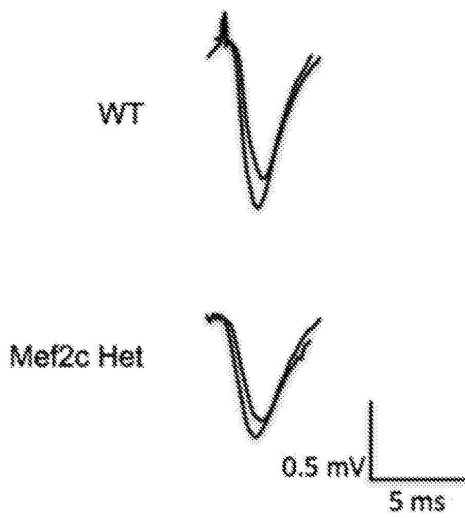
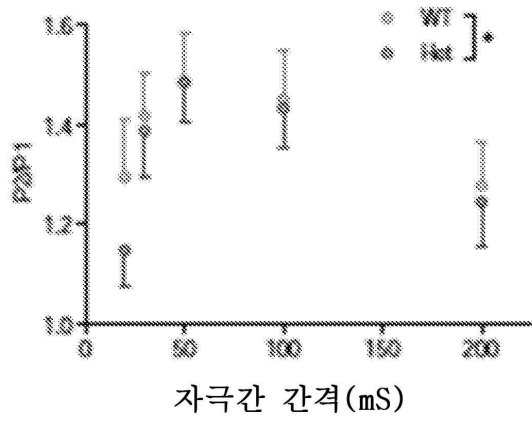


도면9a



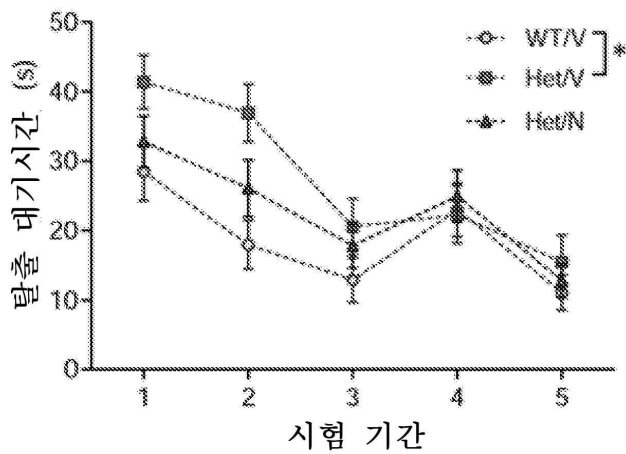
도면9b

쌍으로 된-펄스 촉진



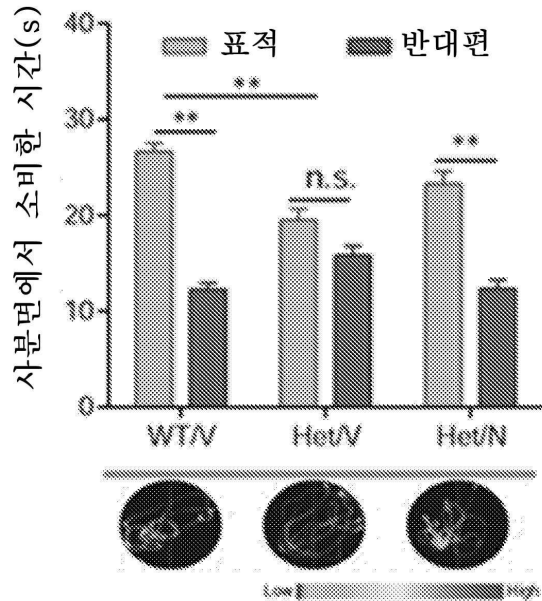
도면10a

모리스 수중 미로: 숨겨진 플랫폼



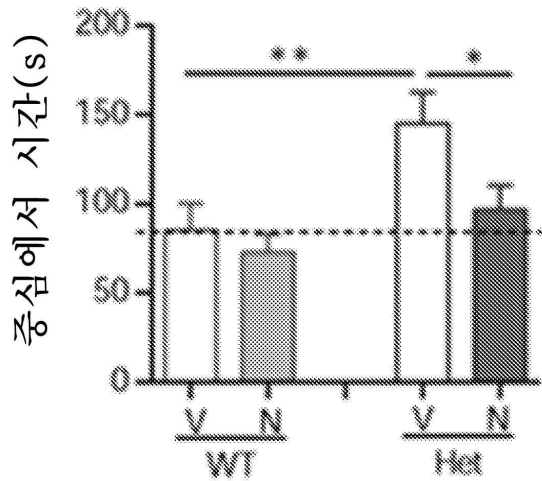
도면10b

모리스 수중 미로: 프로브 테스트

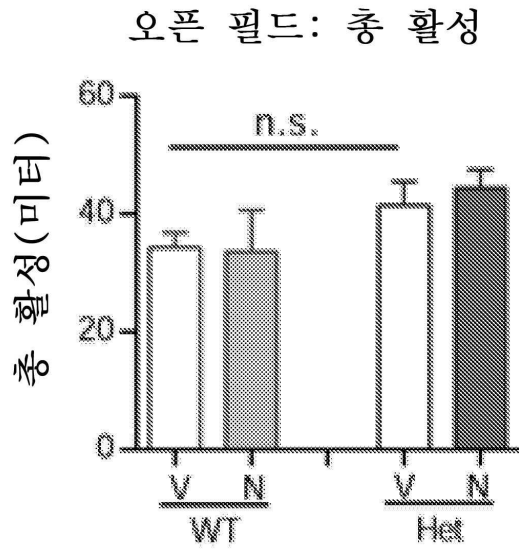


도면10c

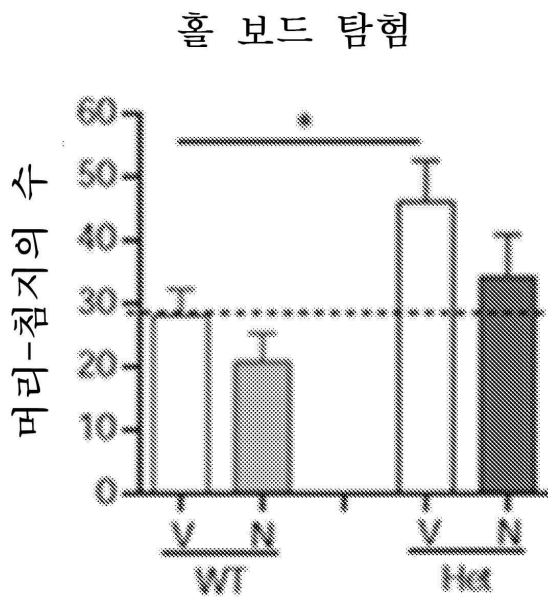
오픈 필드: 중심 시간



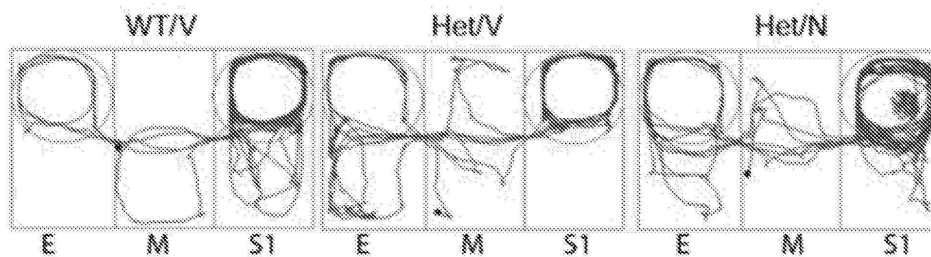
도면10d



도면10e

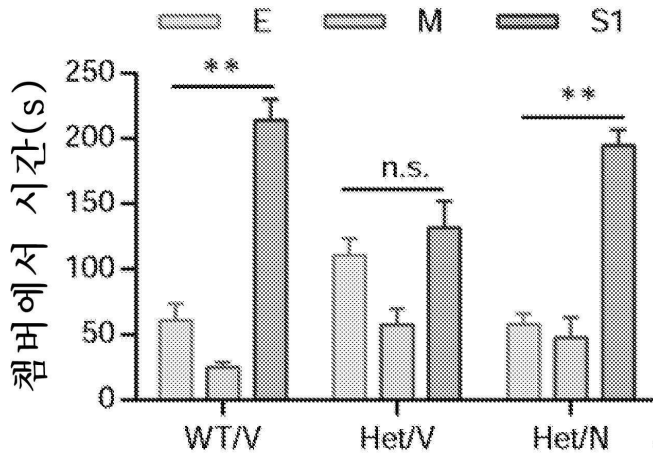


도면10f



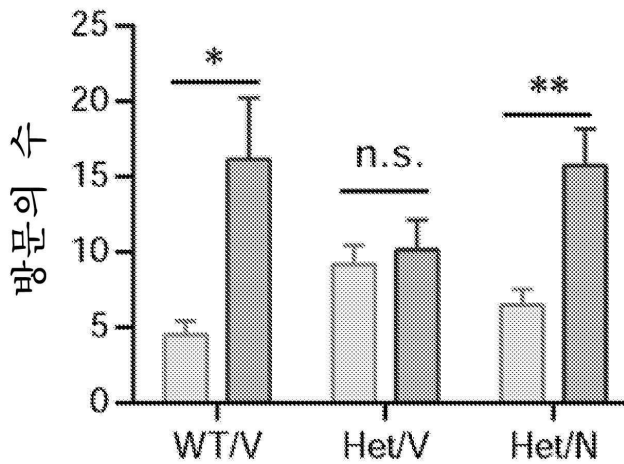
도면10g

사회적 상호작용: 챔버에서 시간



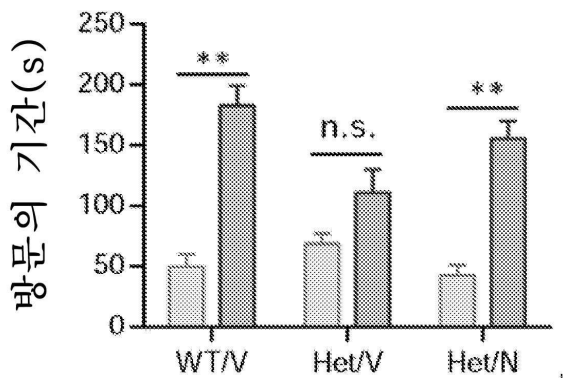
도면10h

사회적 상호작용: 방문의 수



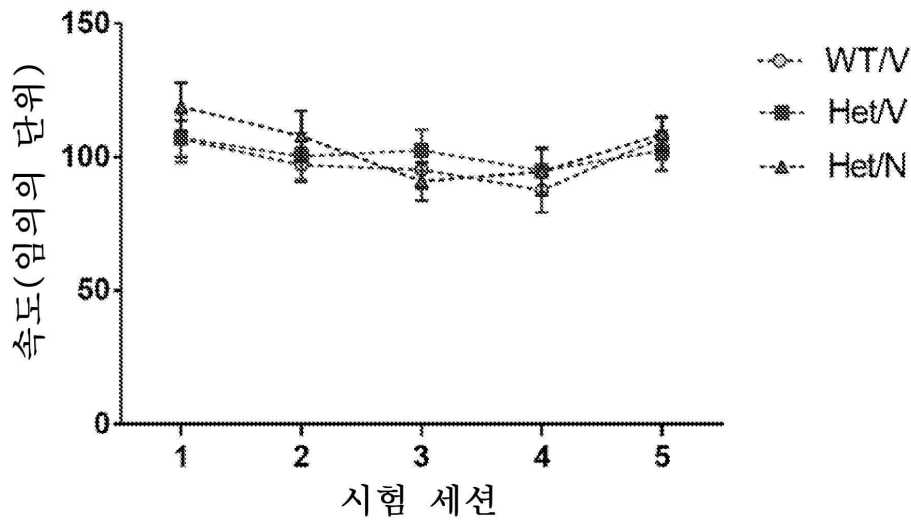
도면10i

사회적 능력: 방문의 기간



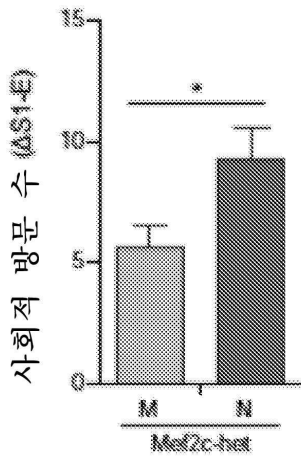
도면11

모리스 수중 미로: 숨겨진 플랫폼

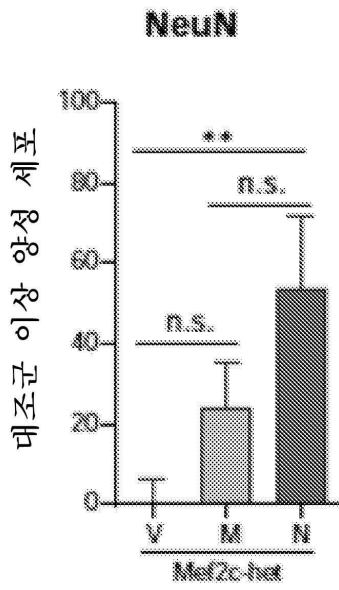


도면12a

사회적 상호작용

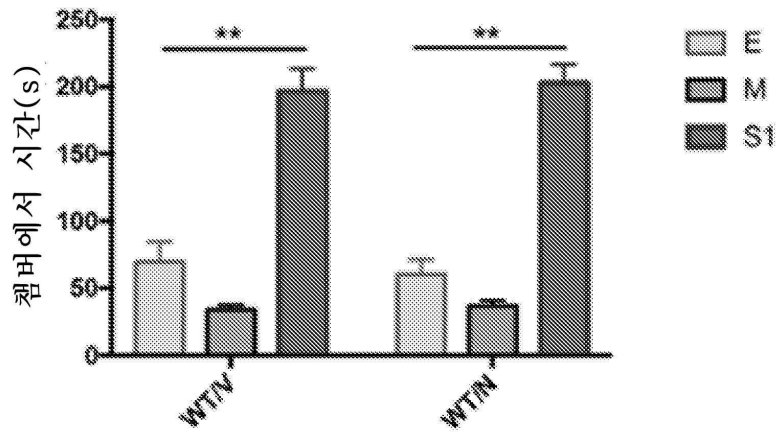


도면12b

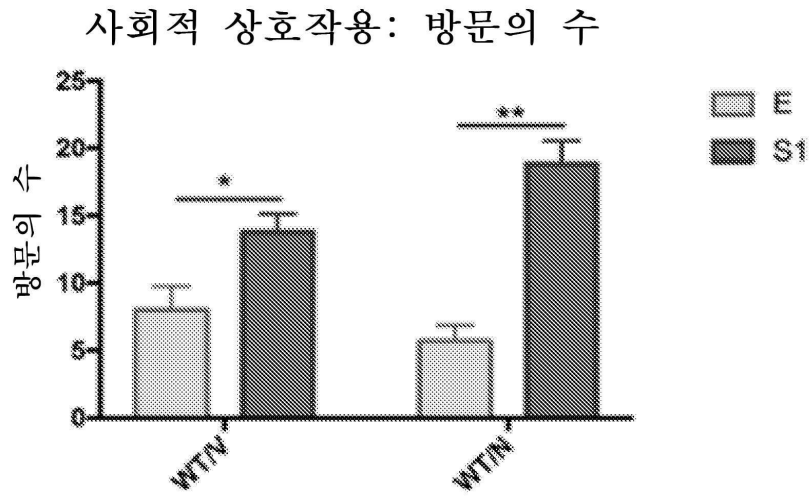


도면13a

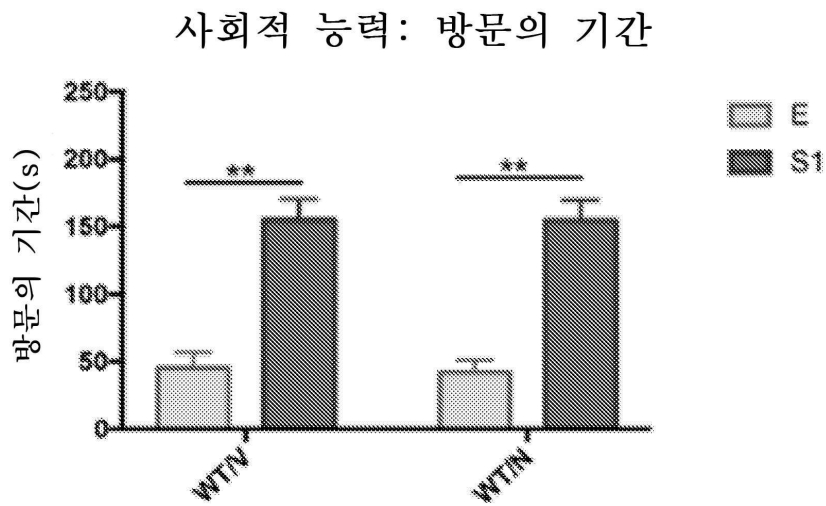
사회적 상호작용: 챔버에서 시간



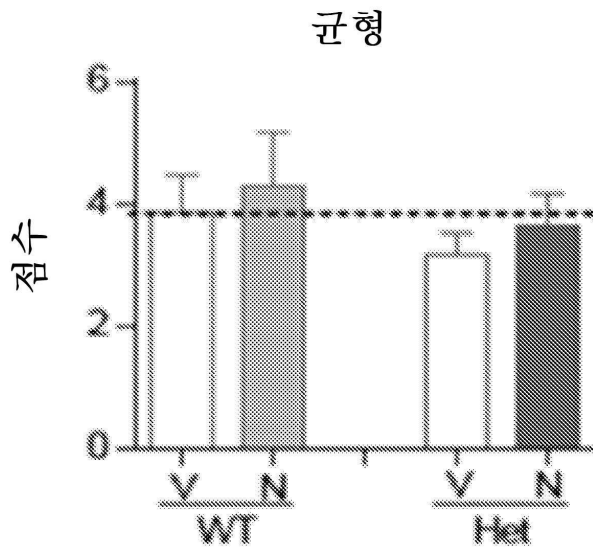
도면13b



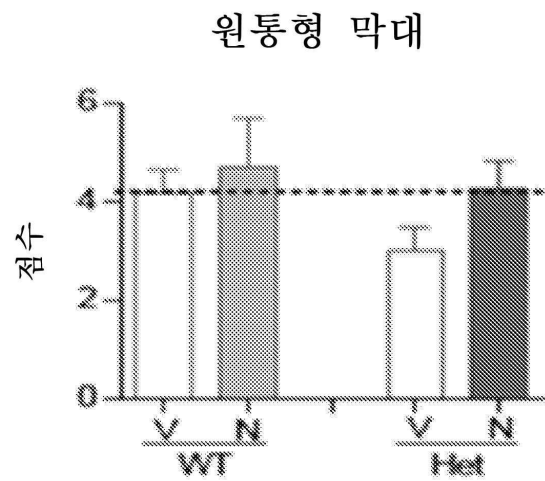
도면13c



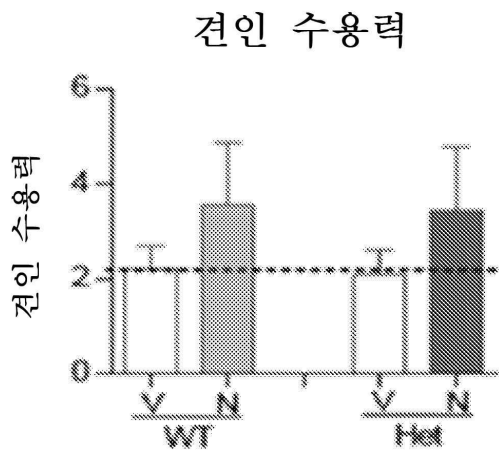
도면14a



도면14b

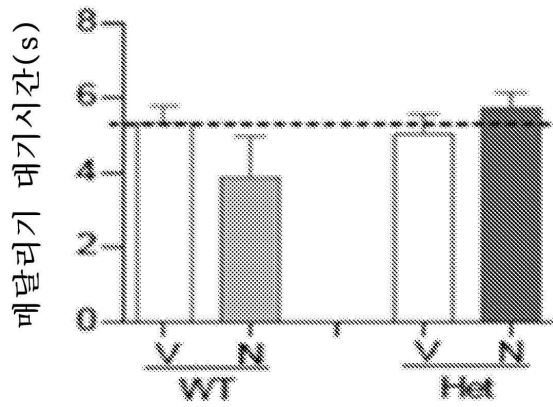


도면14c



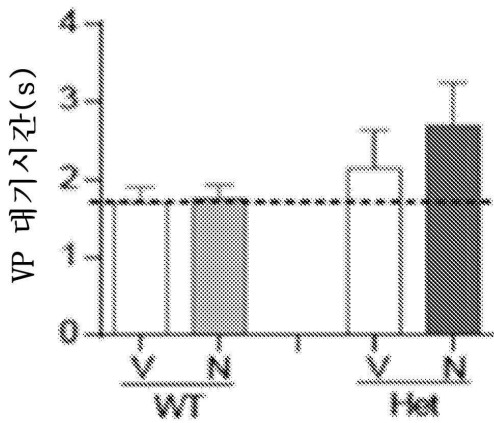
도면14d

매달리기 테스트



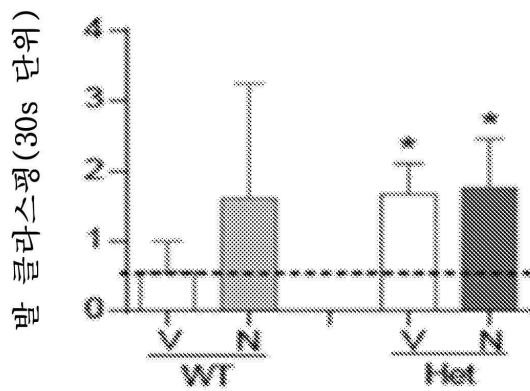
도면14e

수직 장대

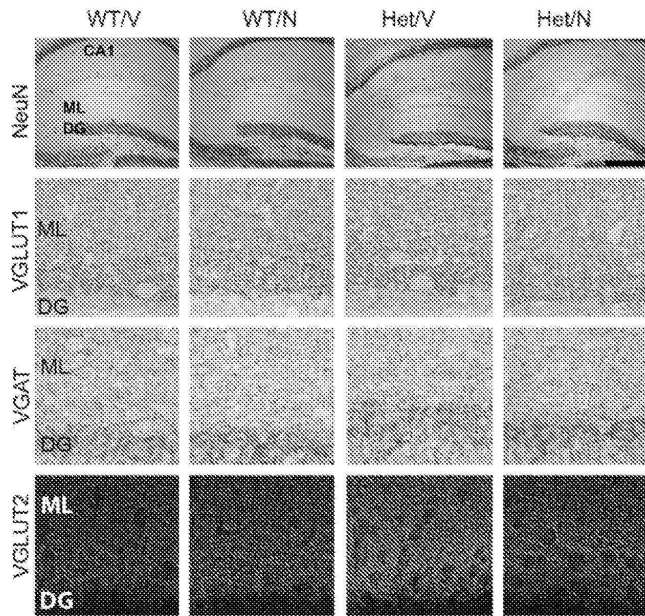


도면14f

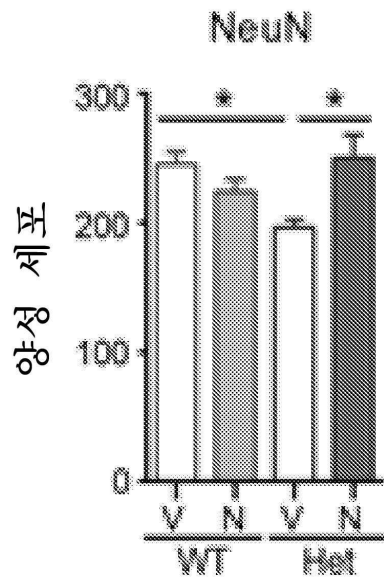
발 클라스핑



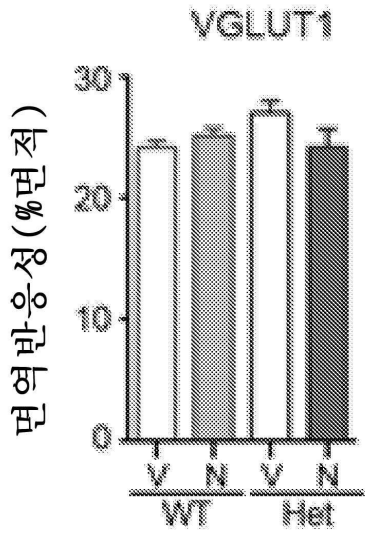
도면15a



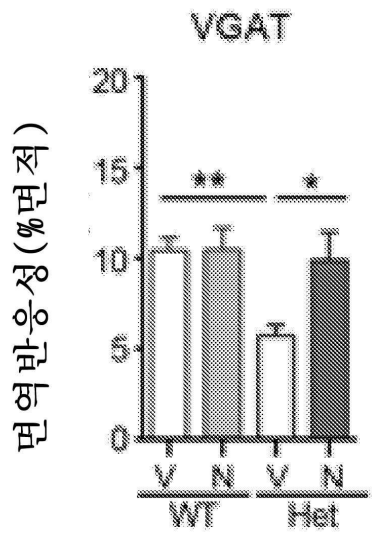
도면15b



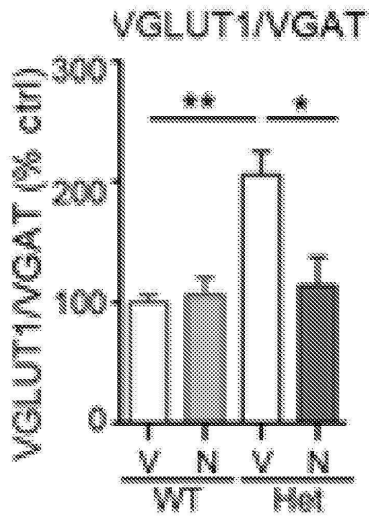
도면15c



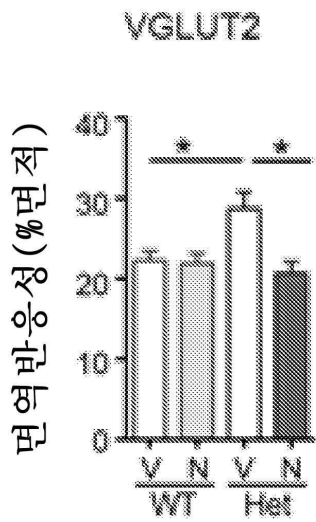
도면15d



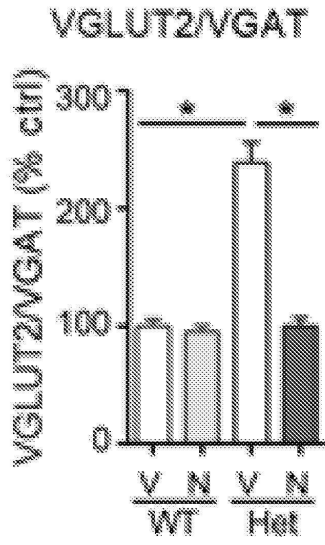
도면15e



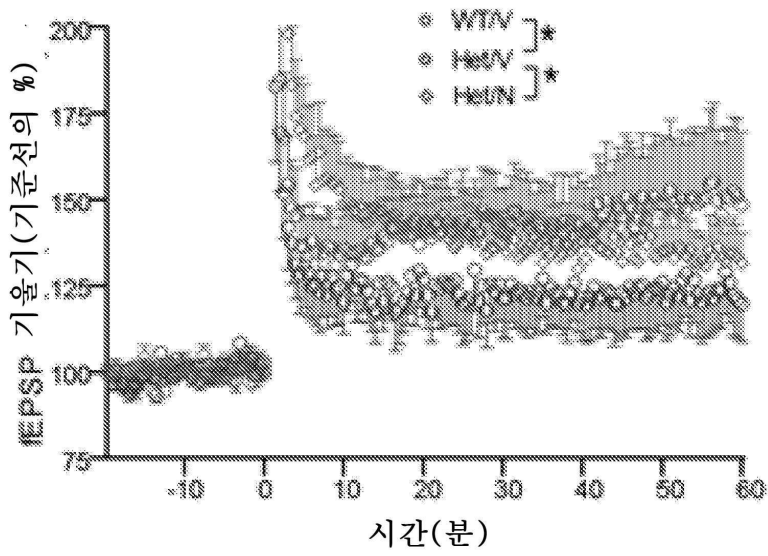
도면15f



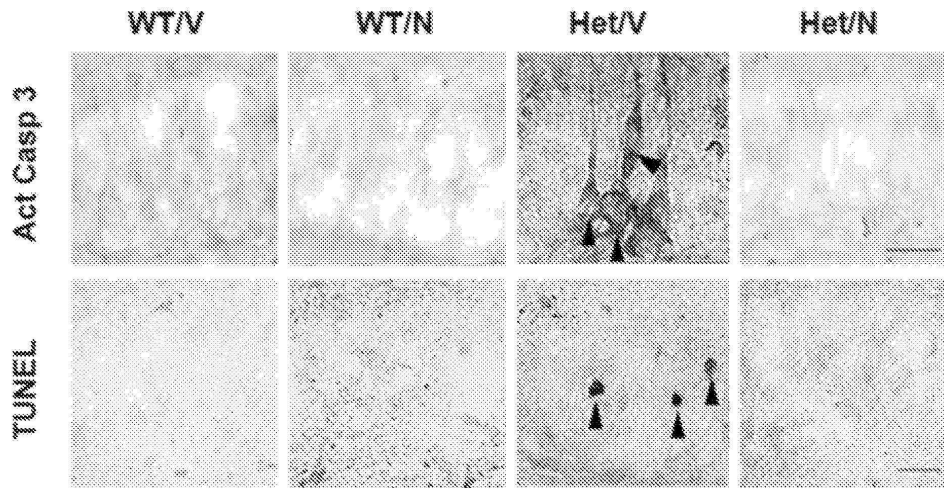
도면15g



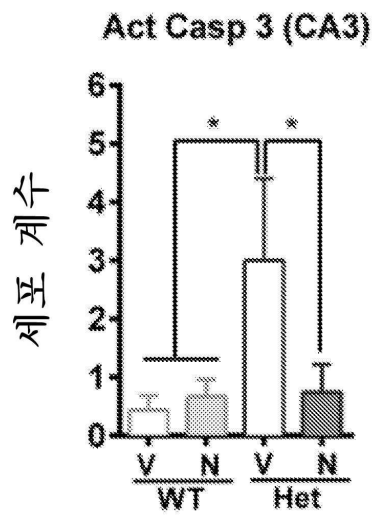
도면15h



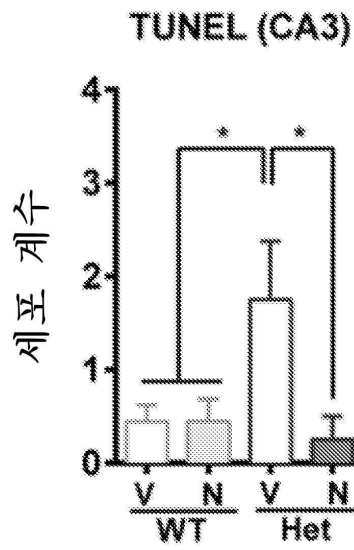
도면16a



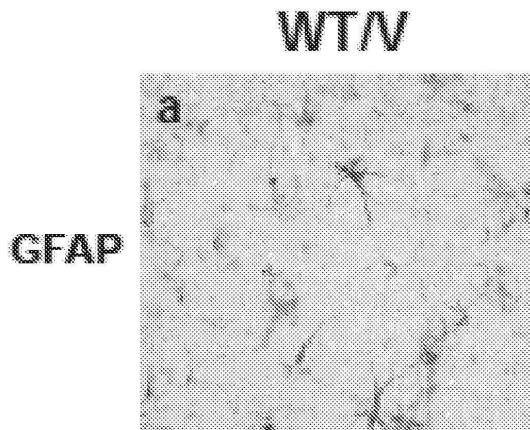
도면16b



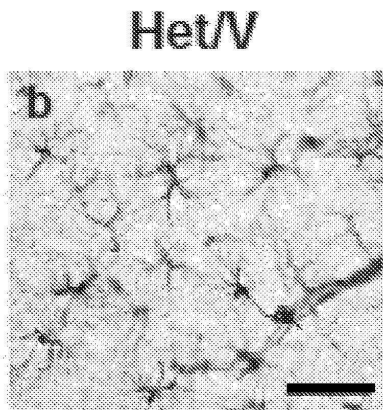
도면16c



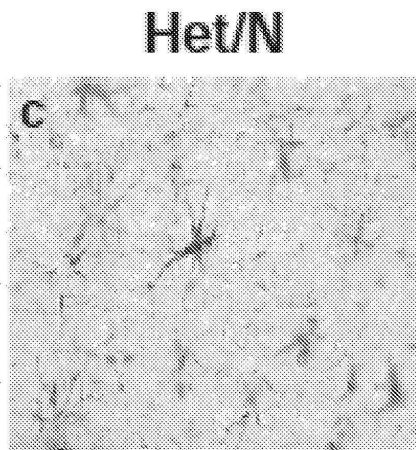
도면17a



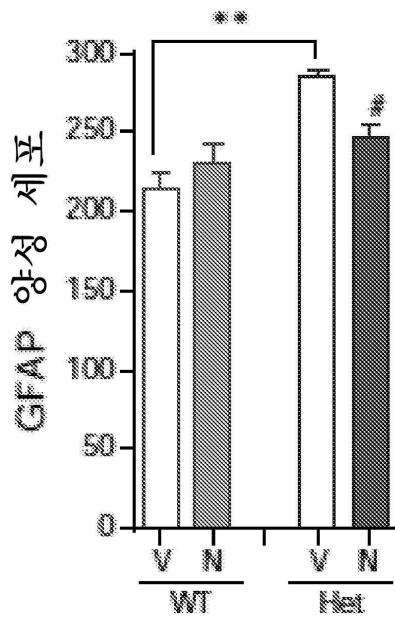
도면17b



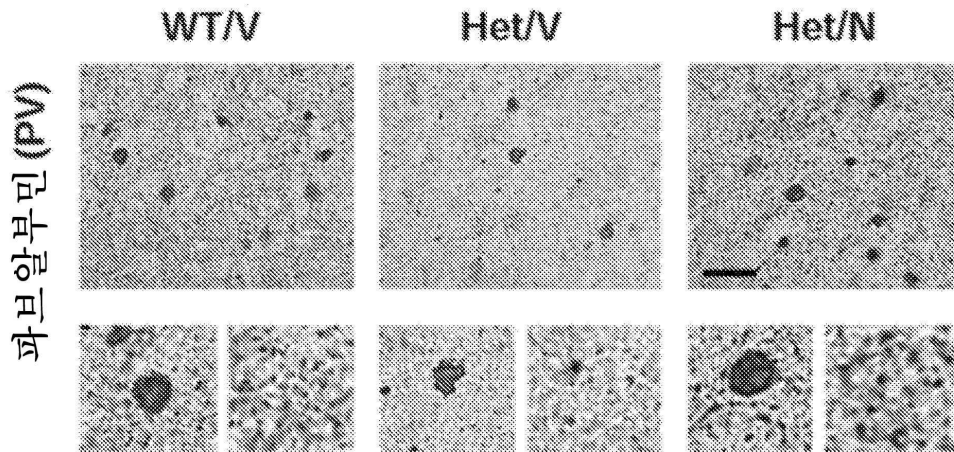
도면17c



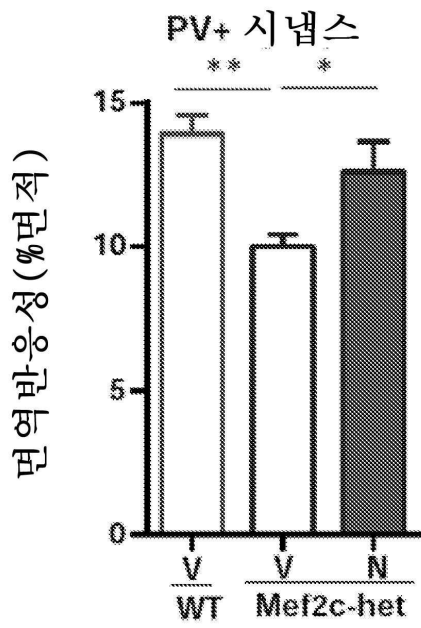
도면17d



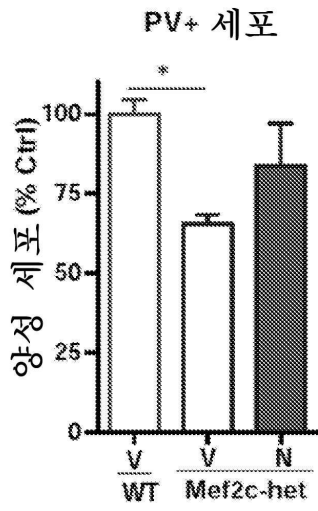
도면18a



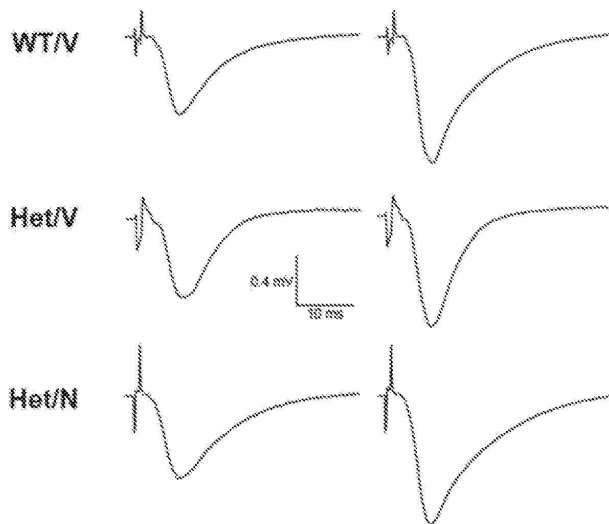
도면18b



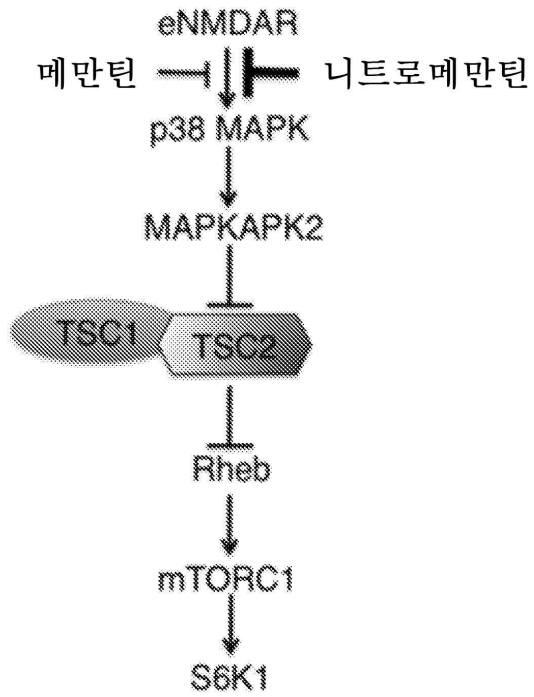
도면18c



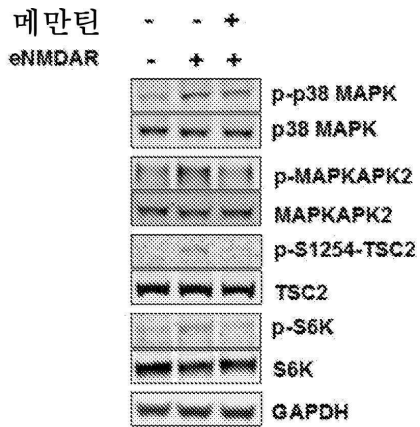
도면19



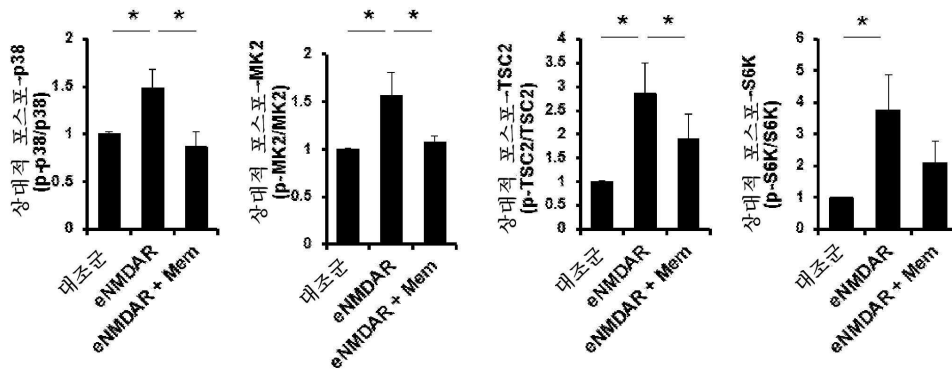
도면20a



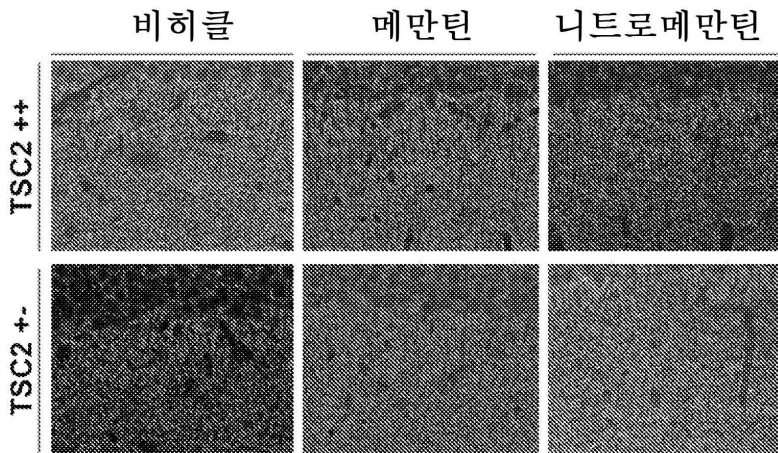
도면20b



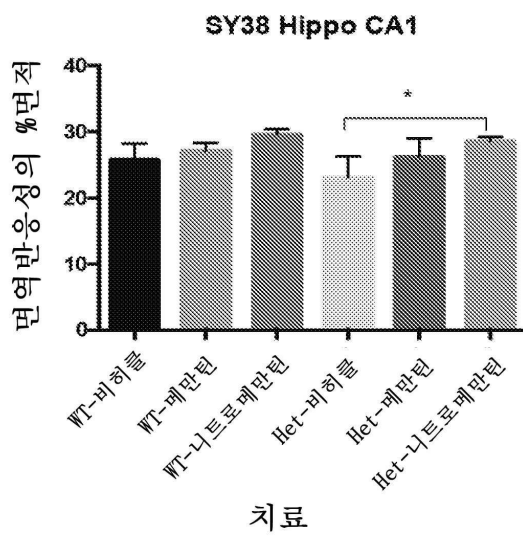
도면20c



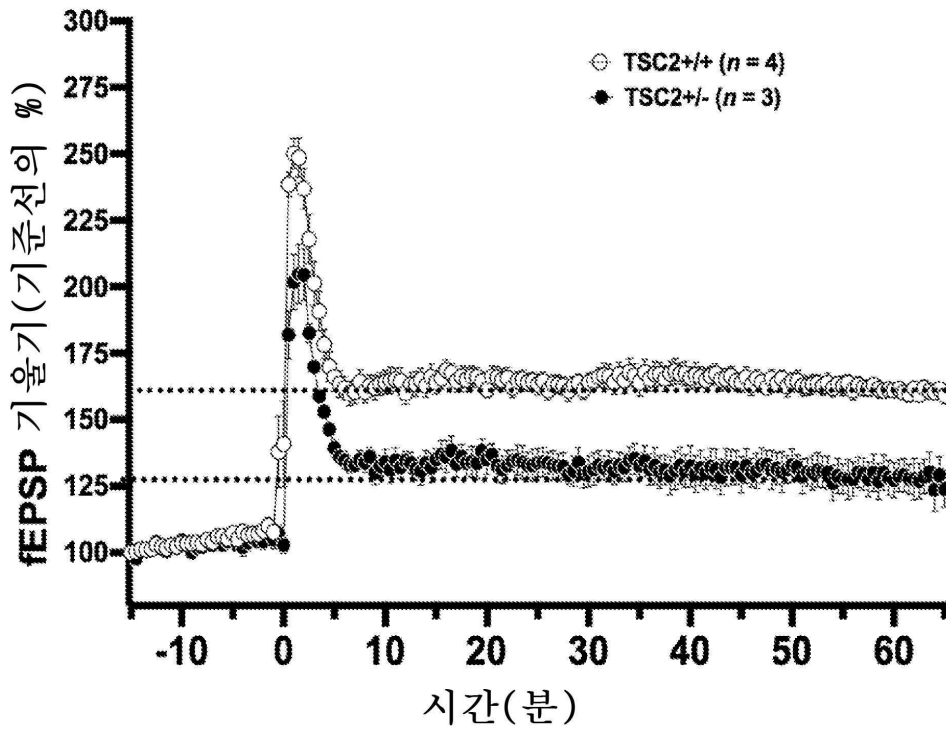
도면21a



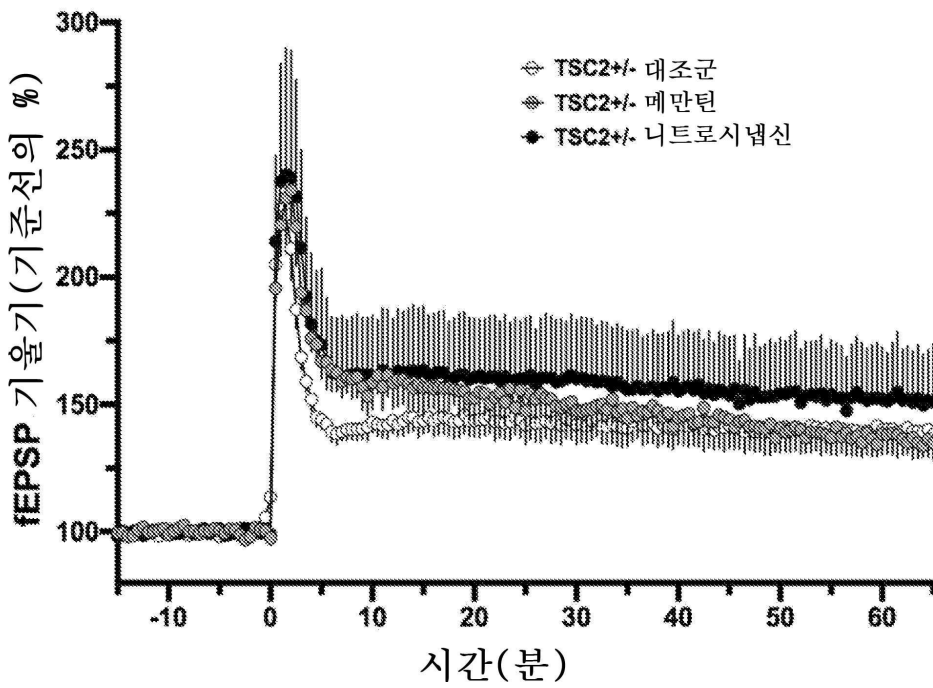
도면21b



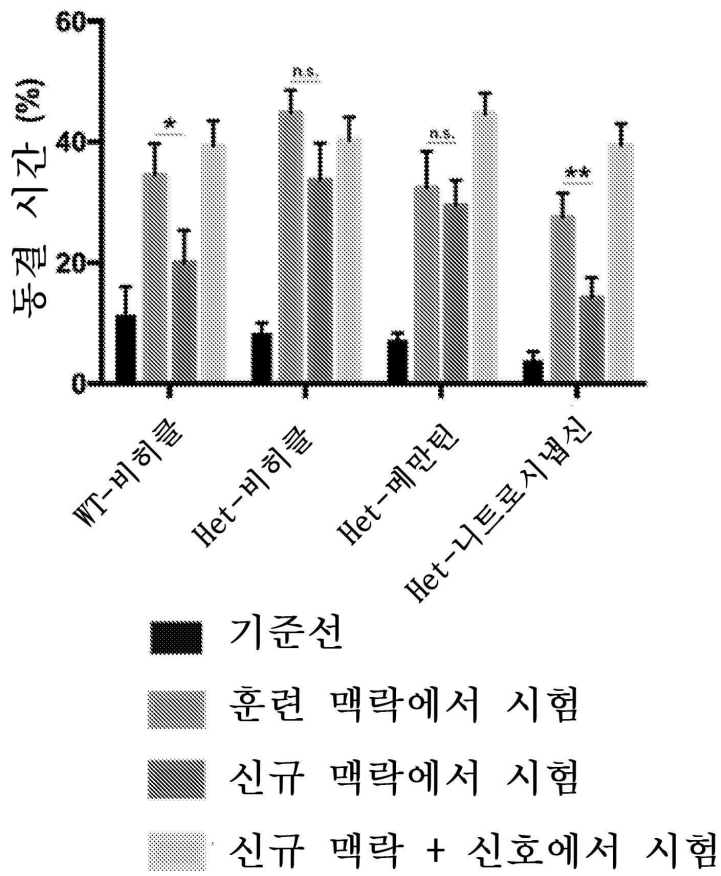
도면22a



도면22b



도면23



도면24

