



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0072713
(43) 공개일자 2018년06월29일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-7012245</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2016년09월28일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2018년04월30일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2016/054199</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2017/058926
국제공개일자 2017년04월06일</p> <p>(30) 우선권주장
62/235,914 2015년10월01일 미국(US)
(뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
고레이니 인크.
미국 19901 텔라웨어주 도버 사우스 듀폰트 하이웨이 3500</p> <p>(72) 발명자
토마스, 그리피스 로저
미국 94010 캘리포니아주 벨링게임 파크 애비뉴 812
프레이저, 샤날리 지미
미국 94061 캘리포니아주 레드우드 시티 홀 애비뉴 1733</p> <p>(74) 대리인
양영준, 이상남</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 80 항

(54) 발명의 명칭 클로라이드 채널의 표적된 발현 및 이의 사용 방법

(57) 요약

본 발명의 특정 구현에는, 상기 발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터의 유효량을 상기 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, 필요로 하는 포유동물에서 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태의 치료 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류

C07K 14/70571 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/235,920 2015년10월01일 미국(US)

62/303,907 2016년03월04일 미국(US)

62/378,509 2016년08월23일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

홍분성 세포-관련된 질병 또는 병태의 상기 예방 또는 치료 처치를 위한, 상기 발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터.

청구항 2

발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터의 유효량을 상기 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, 필요로 하는 포유동물에서 홍분성 세포-관련된 질병 또는 병태의 치료 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 서브유닛이 1종 이상의 추가의 서브유닛과 다량체화에 의해 다량체성 이온 채널을 형성할 수 있는, 벡터 또는 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 치료가 효능제 또는 알로스테릭 조절제의 상기 투여의 부재하이거나; 상기 다량체성 이온 채널의 효능제 또는 알로스테릭 조절제가 상기 포유동물에 투여되지 않는, 벡터 또는 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 효능제가 글리신인, 벡터 또는 방법.

청구항 6

청구항 3에 있어서, 상기 다량체성 이온 채널이 내인성 효능제에 의해 활성화되는, 벡터 또는 방법.

청구항 7

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 핵산 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 핵산이 글리신 수용체 (GlyR), γ -아미노부티르산 수용체 (GABA_AR) 또는 글루타메이트-게이팅된 클로라이드 채널 (GluCl)의 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 핵산이 GlyR의 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 인코딩된 GlyR 서브유닛이 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는, 벡터 또는 방법: 알파-1 서브유닛, 알파-2 서브유닛, 알파-3 서브유닛, 알파-4 서브유닛 및 베타-서브유닛.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 인코딩된 GlyR 서브유닛이 GlyR (GlyRa1)의 알파-1-서브유닛인, 벡터 또는 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 인코딩된 GlyR 서브유닛이 인간 GlyRa1 (hGlyRa1)인, 벡터 또는 방법.

청구항 13

청구항 8에 있어서, 상기 핵산이 GABA_AR의 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 핵산이 GABA_{A-ρ} 수용체의 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.

청구항 15

청구항 13에 있어서, 상기 인코딩된 GABA_AR 서브유닛이 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는, 벡터 또는 방법: GABRA1 (α_1), GABRA2 (α_2), GABRA3 (α_3), GABRA4 (α_4), GABRA5 (α_5), GABRA6 (α_6), GABRB1 (β_1), GABRB1 (β_2), GABRB1 (β_3), GABRG1 (γ_1), GABRG2 (γ_2), GABRG3 (γ_3), GABRD (δ), GABRE (ϵ), GABRP (π), GABRQ (θ), GABRR1 (ρ_1), GABRR2 (ρ_2) 및 GABRR3 (ρ_3).

청구항 16

청구항 8에 있어서, 상기 핵산이 GluCl의 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 인코딩된 GluCl 서브유닛이 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는, 벡터 또는 방법: α_1 , α_{2A} , α_{2B} , GBR2A (α_{3A}), GBR2B (α_{3B}) 및 β .

청구항 18

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 인코딩된 서브유닛이 대응하는 야생형 서브유닛에 비교된 경우 적어도 1종의 돌연변이를 포함하는, 벡터 또는 방법.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 돌연변이체 서브유닛을 포함하는 다량체성 이온 채널이 항상적 활성인, 벡터 또는 방법.

청구항 20

청구항 18에 있어서, 상기 돌연변이체 서브유닛을 포함하는 다량체성 이온 채널이 대응하는 야생형 다량체성 이온 채널에 비교된 경우 향상된 효능제 감수성을 갖는, 벡터 또는 방법.

청구항 21

청구항 18-20 중 어느 한 항에 있어서, 대응하는 야생형 서브유닛에 비교된 경우, 상기 인코딩된 서브유닛이 M2 막관통 도메인을 포함하고 상기 적어도 1종의 돌연변이가 상기 M2 막관통 도메인에 있는, 벡터 또는 방법.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 상기 적어도 1종의 돌연변이가 대응하는 야생형 서브유닛에 비교된 경우, 상기 류신 9' 잔기에 있는, 벡터 또는 방법.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 적어도 1종의 돌연변이가 대응하는 야생형 서브유닛에 비교된 경우 L9' A 또는 L9' G 인, 벡터 또는 방법.

청구항 24

청구항 18 또는 19에 있어서, 대응하는 야생형 서브유닛에 비교된 경우, 상기 인코딩된 서브유닛이, 상기 적어도 1종의 돌연변이가 L263인, GABA_A α -서브유닛; 상기 적어도 1종의 돌연변이가 L259인, GABA_A β -서브유닛; 상기 적어도 1종의 돌연변이가 L274인, GABA_A γ -서브유닛; 또는 상기 적어도 1종의 돌연변이가 T314, L317 또는

L301인, GABA_C ρ -서브유닛인, 벡터 또는 방법.

청구항 25

청구항 18에 있어서, 상기 인코딩된 서브유닛이 대응하는 야생형 서브유닛에 약 80% 서열 동일성 내지 약 99% 서열 동일성을 갖는, 벡터 또는 방법.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 상기 인코딩된 서브유닛이 대응하는 야생형 서브유닛에 약 90% 서열 동일성 내지 약 99% 서열 동일성을 갖는, 벡터 또는 방법.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 상기 인코딩된 서브유닛이 대응하는 야생형 서브유닛에 약 95% 서열 동일성 내지 약 99% 서열 동일성을 갖는, 벡터 또는 방법.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 상기 인코딩된 서브유닛이 대응하는 야생형 서브유닛에 약 99% 서열 동일성을 갖는, 벡터 또는 방법.

청구항 29

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 프로모터가 조절가능 프로모터인, 벡터 또는 방법.

청구항 30

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 프로모터 항상적 프로모터인, 벡터 또는 방법.

청구항 31

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 프로모터가 조직 특이적 프로모터인, 벡터 또는 방법.

청구항 32

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 프로모터가 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는, 벡터 또는 방법: 인간 시냅신-1 프로모터 (Syn1, 또는 hSyn), 인간 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터, 닭 베타-액틴 (CBA) 프로모터, 근육-특이적 데스민 프로모터, 매트릭스 Gla 단백질 (MGP) 프로모터 또는 이의 단편 및 키티나제 3-유사 1 (Ch3L1) 유전자의 5' 프로모터 영역.

청구항 33

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 벡터가 바이러스 벡터인, 벡터 또는 방법.

청구항 34

청구항 33에 있어서, 상기 바이러스 벡터가 아데노바이러스, 렌티바이러스, 아데노-관련 바이러스 (AAV), 자기-상보적 AAV (scAAV), 폴리오바이러스, HSV, 또는 췌장과 말로니-기반 바이러스 벡터인, 벡터 또는 방법.

청구항 35

청구항 34에 있어서, 상기 바이러스 벡터가 AAV 벡터인, 벡터 또는 방법.

청구항 36

청구항 35에 있어서, 상기 AAV 벡터가 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는, 벡터 또는 방법: AAV1, AAV2, AAV3, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 및 rAAV2/6.

청구항 37

청구항 36에 있어서, 상기 벡터가 AAV6 벡터인, 벡터 또는 방법.

청구항 38

청구항 34에 있어서, 상기 벡터가 scAAV 벡터인, 벡터 또는 방법.

청구항 39

청구항 38에 있어서, 상기 scAAV 벡터가 scAAV2 벡터인, 벡터 또는 방법.

청구항 40

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태가 통증, 염증, 안구 고혈압 또는 경직성 긴장항진인, 벡터 또는 방법.

청구항 41

청구항 40에 있어서, 상기 흥분성 세포-관련된 질환이 통증인, 벡터 또는 방법.

청구항 42

청구항 41에 있어서, 상기 통증이 만성 통증인, 벡터 또는 방법.

청구항 43

청구항 41에 있어서, 상기 통증이 관절 통증 또는 신경병성 통증인, 벡터 또는 방법.

청구항 44

청구항 40에 있어서, 상기 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태가 염증인, 벡터 또는 방법.

청구항 45

청구항 44에 있어서, 상기 염증이 관절 염증인, 벡터 또는 방법.

청구항 46

청구항 41 내지 45 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터가 AAV6 벡터이고, 상기 프로모터가 인간 시냅신 (hSyn) 프로모터이고, 상기 핵산이 GlyR 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.

청구항 47

청구항 46에 있어서, 상기 GlyR 서브유닛이 상기 서브유닛의 다량체화시 항상적 활성 GlyR을 초래하는 적어도 1 종의 돌연변이를 포함하는, 벡터 또는 방법.

청구항 48

청구항 40에 있어서, 상기 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태가 안구 고혈압인, 벡터 또는 방법.

청구항 49

청구항 48에 있어서, 상기 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태가 녹내장인, 벡터 또는 방법.

청구항 50

청구항 48 또는 49에 있어서, 상기 벡터가 scAAV2 벡터이고, 상기 프로모터가 매트릭스 Gla 단백질 (MGP) 프로모터이고, 상기 핵산이 GlyR 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.

청구항 51

청구항 50에 있어서, 상기 GlyR 서브유닛이 상기 서브유닛의 다량체화시 항상적 활성 GlyR을 초래하는 적어도 1 종의 돌연변이를 포함하는, 벡터 또는 방법.

청구항 52

청구항 40에 있어서, 상기 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태가 경직성 긴장항진인, 벡터 또는 방법.

청구항 53

청구항 52에 있어서, 상기 벡터가 AAV2 또는 AAV6 벡터이고, 상기 프로모터가 인간 시냅신 (hSyn) 프로모터이고, 상기 핵산이 GlyR 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.

청구항 54

벡터 또는 방법 of 청구항 53에 있어서, 상기 GlyR 서브유닛이 상기 서브유닛의 다량체화시 항상적 활성 GlyR을 초래하는 적어도 1종의 돌연변이를 포함하는, 벡터 또는 방법.

청구항 55

청구항 52에 있어서, 상기 벡터가 AAV8 또는 AAV9 벡터이고, 상기 프로모터가 인간 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터, 닭 베타-액틴 (CBA) 프로모터 또는 CAG 또는 근육-특이적 데스민 프로모터이고, 상기 핵산이 GlyR 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.

청구항 56

청구항 55에 있어서, 상기 GlyR 서브유닛이 상기 서브유닛의 다량체화시 항상적 활성 GlyR을 초래하는 적어도 1종의 돌연변이를 포함하는, 벡터 또는 방법.

청구항 57

청구항 55 또는 56에 있어서, 상기 벡터가 AAV8이고 상기 프로모터가 근육-특이적 데스민 프로모터인, 벡터 또는 방법.

청구항 58

청구항 2에 있어서, 추가로 상기 포유동물에 1종 이상의 다른 치료제를 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 59

청구항 58에 있어서, 상기 1종 이상의 다른 치료제가 통증, 염증, 안구 고혈압 및/또는 경직성 긴장항진 치료에 유용한 제제인, 방법.

청구항 60

청구항 58에 있어서, 상기 1종 이상의 다른 치료제가 상기 다량체성 이온 채널의 효능제 또는 알로스테릭 조절제가 아닌, 방법.

청구항 61

청구항 60에 있어서, 상기 1종 이상의 다른 치료제가 글리신이 아닌, 방법.

청구항 62

발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터, 및 약제학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는, 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태의 상기 예방 또는 치료 처치용 약제학적 조성물.

청구항 63

흥분성 세포-관련된 질환 또는 장애의 상기 예방 또는 치료 처치를 위한; a) 상기 발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터; 및 b) 1종 이상의 다른 치료제의 조합.

청구항 64

청구항 63에 있어서 상기 1종 이상의 다른 치료제가 통증, 염증, 안구 고혈압 및/또는 경직성 긴장항진 치료에

유용한 제제인, 조합.

청구항 65

청구항 63에 있어서, 상기 1종 이상의 추가의 치료제가 상기 다량체성 이온 채널의 효능제 또는 알로스테릭 조절제가 아닌, 조합.

청구항 66

청구항 65에 있어서, 상기 1종 이상의 추가의 치료제가 글리신이 아닌, 조합.

청구항 67

발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터; 포장재, 및 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태를 치료하기 위해 필요로 하는 포유동물에 상기 벡터 투여용 지침을 포함하는, 키트.

청구항 68

청구항 67에 있어서, 추가로 1종 이상의 다른 치료제를 포함하는, 키트.

청구항 69

필요로 하는 포유동물에서 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태의 상기 치료용 약제를 제조하기 위해, 상기 발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터의 용도.

청구항 70

의료 요법에서 사용을 위하여 상기 발현 카세트가 다량체성 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터.

청구항 71

포유류 세포의 전기생리학적 활성의 상기 생체내 조절을 위하여, 상기 발현 카세트가 다량체성 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터.

청구항 72

다량체성 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 벡터와 상기 세포의 접촉을 포함하는 포유류 세포의 전기생리학적 활성의, 상기 생체내 조절 방법.

청구항 73

청구항 71 또는 72에 있어서, 상기 서브유닛이 1종 이상의 추가의 서브유닛과 다량체화하고 다량체성 이온 채널을 형성하는, 벡터 또는 방법.

청구항 74

청구항 73에 있어서, 상기 다량체성 이온 채널의 효능제 또는 알로스테릭 조절제가 상기 포유동물에 투여되지 않는, 방법.

청구항 75

청구항 74에 있어서, 상기 효능제가 글리신인, 방법.

청구항 76

청구항 71 또는 72에 있어서, 상기 다량체성 이온 채널이 내인성 효능제에 의해 활성화되는, 벡터 또는 방법.

청구항 77

청구항 71 또는 72에 있어서, 상기 핵산이 글리신 수용체 (GlyR), γ -아미노부티르산 수용체 (GABA_AR) 또는 글루타메이트-게이팅된 클로라이드 채널 (GluCl)의 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.

청구항 78

청구항 77에 있어서, 상기 핵산이 GlyR의 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.

청구항 79

청구항 71 또는 72에 있어서, 상기 인코딩된 서브유닛이 대응하는 야생형 서브유닛에 비교된 경우 적어도 1종의 돌연변이를 포함하는, 벡터 또는 방법.

청구항 80

청구항 79에 있어서, 상기 다량체성 이온 채널이 항상적 활성인, 벡터 또는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본원은 하기의 우선권의 이점을 청구한다: 미국 가출원 일련 번호 62/235,914 (2015년 10월 1일 출원), 미국 가출원 일련 번호 62/235,920 (2015년 10월 1일 출원), 미국 가출원 일련 번호 62/303,907 (2016년 3월 4일 출원) 및 미국 가출원 일련 번호 62/378,509 (2016년 8월 23일 출원), (이들 출원은 참고로 본 명세서에서 편입된다).

배경 기술

[0003] 흥분성 세포 (예를 들면, 뉴런 및 근육 세포)의 전기생리학적 반응을 조절하는 전위는 잠재적으로 상기 세포의 활성화와 관련된 신경근육 병태, 통증, 및 다른 장애의 치료로 이어질 수 있다. 하지만, 내인성 이온 채널에서 작용하는 리간드의 투여는 전신 전달로 인한 널리 퍼진 부작용에 대하여 전위 때문에 상당한 장애를 안고 있다. 또한, 국소적으로 작용하는 제제 (예컨대 은 또는 캡사이신)은 원치않는 부작용을 갖고 잠재적으로 영구적 손상을 일으킬 수 있다.

[0004] 리간드 게이팅된 음이온성 채널의 발현에 의한 뉴런의 활성화의 조절은 이전에 나타났고, 여기서 무척추동물에서 발견된 니코티코이드 계열 수용체인, 글루타메이트-게이팅된 클로라이드 채널 (GluCl)의 발현은 뉴런을 침묵화하는데 사용되었다 (Slimko E. 등 (2002) J NeuroSci. 22(17): 7373-9). GluCl은 내인성 포유류 이온 채널에서 저 농도로 거의 효과가 없는 고-효력 리간드인, 이버멕틴의 첨가에 의해 선택적으로 활성화될 수 있다. 척추동물, 및 특히 인간 환자에서 사용을 위하여, 하지만, 상기 접근법은, 잠재적인 자가면역 장애로 이어지는, 그와 같은 외래 단백질에 대한 면역 반응 생성의 위험을 안고 있다. 면역 위험을 극복하기 위해 인간 글리신-게이팅된 클로라이드 채널 (GlyR)은 유사한 방식으로 사용되었다 (Goss JR. 등 (2010) Molecular Therapy 19(3): 500-506; 미국 특허 번호 8,957,036). 하지만, 이버멕틴의 투여가 채널을 활성화시키는데 필요하였던, GluCl의 경우에서와 같이, GlyR 채널 및 차후의 생리적 효과의 활성화는 국소적으로 또는 전신으로 효능제 (글리신)의 투여에 의해 달성되었다. 글리신은 26-245 min의 범위로 바다에서 짧은 반감기를 갖고 (Hahn R. (1993) Urol Res. 21: 289-91) 그래서 하기에 의해 기재된 시약 및 방법에 의한 지속적 또는 만성적 병태, 예컨대 만성 통증, 안구 고혈압 또는 경직성 긴장항진의 치료에 대하여 생리적 효과의 유지: 미국 특허 번호 8,957,036 글리신의 대 용량의 반복된 주사 또는 섭취; 또는 GlyR 채널의 선택적 오랜 반감기 합성 효능제의 개발 및 차후의 반복된 투여가 필요할 것이다. 따라서, 흥분성 세포의 전기생리학적 활성화의 장기간 조절을 위하여 추가의 방법 및 시약은 필요하다. 추가적으로, 신규한 조성물 및 방법은 흥분성 세포-관련된 질환 및 병태를 치료하는데 필요하다.

[0005] 발명의 요약

- [0006] 따라서, 본 발명의 특정 구현에는 흥분성 세포의 전기생리학적 활성 조절 방법 및 시약을 제공한다.
- [0007] 본 발명의 특정 구현에는, 포유류 세포의 전기생리학적 활성의 조절 (예를 들면, *생체내* 조절)을 위하여, 발현 카세트가 다량체성 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0008] 본 발명의 특정 구현에는 다량체성 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 벡터와 세포의 (예를 들면, *생체내*) 접촉을 포함하는 포유류 세포의 전기생리학적 활성의 조절 (예를 들면, *생체내* 조절) 방법을 제공한다.
- [0009] 본 발명의 특정 구현에는, 포유류 세포의 전기생리학적 활성의 조절 (예를 들면, *생체내* 조절)용 약제를 제조하기 위한, 발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터의 용도를 제공한다.
- [0010] 그와 같은 방법은 포유동물 (예를 들면, 인간)의 흥분성 세포에서 GlyR 단백질의 외인성 발현 유발을 포함할 수 있다. 그 후에, 흥분성 세포는 GlyR 단백질의 효능제로서 작용하는 내인성 글리신에 노출된다. 내인성 글리신에 반응하여 외인성 GlyR 단백질 (이온 채널)의 조절은 수용체의 외인성 효능제 또는 알로스테릭 조절제의 투여 없이 흥분성 세포의 전기생리학적 활성을 조절한다.
- [0011] 본 발명의 특정 구현예에서, 이온 채널의 서브유닛은 항상적으로 활성 채널을 형성하기 위해 변형될 수 있고, 이 경우에 효능제에 노출은 더 이상 필요 없다. 상기 방법은 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태, 예컨대 통증, 안구 고혈압 및 경직을 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0012] 따라서, 본 발명의 특정 구현에는, 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태의 예방 또는 치료 처치를 위하여, 발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0013] 본 발명의 특정 구현에는, 발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터의 유효량을 포유동물 (예를 들면, 인간)에 투여하는 것을 포함하는, 필요로 하는 포유동물에서 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태의 치료 방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 특정 구현에는, 필요로 하는 포유동물에서 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태의 치료용 약제를 제조하기 위한, 발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터의 용도를 제공한다.
- [0015] 본 발명의 특정 구현에는 의료 요법에서 사용을 위하여 발현 카세트가 다량체성 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0016] 본 발명의 특정 구현에는, 발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터, 및 약제학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는, 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태의 예방 또는 치료 처치용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 특정 구현에는 a) 발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터; 및 b) 1종 이상의 다른 치료제의 조합을; 흥분성 세포-관련된 질환 또는 장애의 예방 또는 치료 처치를 위하여 제공한다.
- [0018] 본 발명의 특정 구현에는, 발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터; 포장재, 및 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태를 치료하기 위해 필요로 하는 포유동물에 벡터 투여용 지침을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0019] 도면의 간단한 설명
- [0020] **도 1A-B**는 리간드의 부재 하에 GluCl 수용체의 배경 전도도를 실증한다. 도 1A. GluCl WT로부터 전류 응답의 예. 용량성 보상이 없는, 전-세포 전압-고정된 세포는 50 ms에 걸쳐 60 mV에서 +60 mV로 급등되었다. 막 Im에 거쳐 총 전류는 용량성 전류 I_c , 및 저항성 전류, I_R 의 합계이다. 도 1B. (괄호로 나타난) 기록된 세포의 수에 대하여 각각의 수용체의 평균 커패시턴스로 정규화된 배경 전도도. 가용성 GFP는 모의-형질감염 대조군으로서 사용되었다.
- [0021] **도 2A-F**는 GluCl 채널을 예시한다. 도 1A. 결합된 IVM 분자 (3RIF.pdb) 및 글루타메이트를 가진 변형된 GluCl

α -동중체성 채널의 결정 구조 (측면도). 효능제는 서브유닛 계면에 결합하고; 글루타메이트는 세포의 도메인에서 결합하고, IVM은 막관통 도메인의 최상부 절반에 결합한다. 도 1B. GluCl은 글루타메이트 및 IVM에 의해 차별적으로 활성화된다. 전기생리학적 미량은 제노푸스 난모세포에서 발현된 헤테로머 GluCl $\alpha\beta$ 채널로부터 수득되었다. 도 1C. 기공을 형성하는 서브유닛의 대칭 배열을 나타내는 GluCl 채널의 상면도. 도 1D, E, 및 F. 나선 기공-라이닝 M2 도메인의 잔기. 류신 9'는 고도로 보존된 기공-라이닝 잔기이다.

[0022] 도 3은 인간 눈의 해부학의 특정 측면을 실증한다.

[0023] 도 4는 더욱 강직성이 됨에 따라 하나의 마이크로 홀을 가진 가요성 막의 수학적 모델을 실증한다. 홀을 거쳐 푸아죄유 유동에 대한 관계를 이용하여, 수용액의 유동 저항은 막이 더욱 강직해짐에 따라 마킹 변경된다. 3개의 곡선은 2 내지 3 마이크로리터 / 분의 유동으로 플롯팅된다. 상기 간소화한 예는 TM이 더욱 강직해짐에 따라 설비가 밀착되는 것을 나타낸다.

[0024] 도 5A-5B는 GlyR α -서브유닛 (hGlyRa1)을 발현시키는 HEK-293 세포의 막 전위에서 글리신의 효과를 보여준다. 도 5A) 글리신은 GlyR α -서브유닛 (hGlyRa1)을 발현시키는 HEK-293 세포의 막 전위에서 용량-의존적 효과를 나타낸다. 도 5B) 글리신에 대한 반응은 타우린 (100 μ M)의 존재에 의해 영향받지 않는다.

[0025] 도 6은 GlyR α -서브유닛 (hGlyRa1)을 발현시키는 HEK-293 세포의 막 전위에서 글리신의 용량-반응 곡선을 나타낸다. 글리신 \pm 타우린의 첨가 후 4.5 분에서 수집된 데이터는 글리신이 GlyR α -서브유닛 (hGlyRa1) HEK-293 세포의 막 전위에서 용량-의존적 효과를 가졌다는 것을 나타낸다. 타우린은 이들 세포의 막 전위에서 효과 없었다. 적합화된 곡선은 글리신에 대한 반응이 100 μ M 타우린의 존재에 의해 상당히 영향받지 않았던 92 μ M의 EC_{50} 농도 ($EC_{50} = 43 \mu$ M)를 가졌다는 것을 나타낸다.

[0026] 도 7은 GlyR α -서브유닛 (hGlyRa1)을 발현시키는 HEK-293의 막 전위에서 글리신 \pm 타우린의 효과를 나타낸다. GlyR α -서브유닛 (hGlyRa1)을 발현시키는 HEK-293 세포에서, 기준선 막 전위 (참고, 도 5A-5B에서 글리신의 첨가에 앞서 최초 20 초) (기준선)은 타우린 (300 μ M)의 첨가에 의해 상당히 변경되지 않았지만 치료 후 4.5 min에서 측정된 경우 글리신 (300 μ M)의 첨가에 의해 변경되었다. 글리신 (300 μ M)에 대한 치료 후 4.5 min 반응은 타우린 (100 μ M)의 존재에 의해 영향받지 않았다.

[0027] 도 8은 랫트의 신경병성 통증의 SNI 모델에서 GTX-01의 진통 효과의 시간경과를 나타낸다. 기준선 평가는 일-1에서 측정되었고 비골 및 경골 신경을 절단하는 수술은 0일째에서 실시되었다. 모든 랫트는 수술 후 10일째에서 기계적 자극 (이질통증)에 과민성이다. GTX-01 또는 대조군 벡터는 10일째에서 투여되었다. 말초 신경에서 유전자 요법의 바이러스 전달과 일치하는 이질통증의 시간-의존적 역전은 관측되지 않았다. 데이터 포인트는 4 동물 "GTX-01"의 평균 및 5 동물 "대조군" \pm SEM을 나타낸다. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

[0028] 도 9는 GTX-01 또는 대조군 벡터로 처리된 SNI 랫트의 체중을 나타낸다. 체중은 측정되었고 연구 내내 기록되었다. 하기로 치료된 동물의 체중에서 차이는 보이지 않았다: GTX-01 대 대조군 벡터.

[0029] 도 10은 이버멕틴이 GluCl 글루타메이트 수용체 단독의 야생형 α -서브유닛을 발현시키는 HEK-293 세포의 막 전위에서 용량-의존적 효과를 나타내는 것을 보여준다. 이것은 단량체성 클로라이드-선택적 채널이 GluCl 글루타메이트 수용체의 α -서브유닛에 의해 형성될 수 있다는 것을 입증한다.

[0030] 도 11은 (도 10에서 나타낸 바와 같이) 이버멕틴의 첨가 후 4.5 분에서 수집된 데이터가 GluCl 글루타메이트 수용체의 단량체성 야생형 α -서브유닛을 발현시키는 HEK-293 세포의 막 전위에서 이버멕틴이 용량-의존적 효과를 가졌음을 보여주는 것을 실증한다. 데이터에 곡선 적합화는 이버멕틴에 대한 반응이 147 nM의 EC_{50} 농도를 가졌다는 것을 보여준다.

[0031] 도 12는 GluCl 글루타메이트 수용체 α -서브유닛 단독의 L9' A 돌연변이를 발현시키는 HEK-293 세포에서 (이버멕틴의 첨가에 앞서 최초 20 초) 기준선 막 전위가 최대로 변화되었고 이버멕틴의 최대로 효과적인 농도에 의해 자극된 경우 GluCl 글루타메이트 수용체의 야생형 α -서브유닛을 발현시키는 세포에서 보여진 것과 동일하였음을 보여준다. GluCl 글루타메이트 수용체 α -서브유닛의 L9' A 돌연변이를 발현시키는 세포에서, 이버멕틴은 기준선에서 측정된 이상으로 막 전위에서 변화를 확대하지 않았다.

[0032] 도 13은 랫트의 신경병성 통증의 SNI 모델에서 GTX-01*의 진통 효과의 시간경과를 보여준다. 기준선 평가는 일-1에서 측정되었고 비골 및 경골 신경을 절단하는 수술은 0일째에서 실시되었다. 모든 랫트는 수술 후 10일째에서 기계적 자극 (이질통증)에 과민성이다. GTX-01* 또는 대조군 벡터는 10일째에서 투여되었다. 말초 신경에서 유전자 요법의 바이러스 전달과 일치하는 이질통증의 시간-의존적 역전은 치료 후 13 일까지 이질통증의 33% 역

전 및 치료후 일 22 및 일 35 모두에서 77% 역전으로 관측되었다. 데이터 포인트는 6 동물 (최종 데이터 포인트로 5 동물)의 평균 \pm SD를 나타낸다. *** $P < 0.001$.

[0033] 도 14는 하기인 경우 반응을 실증한다: 가바펜틴 (100 mg/kg: IP)가 수술후 일 46에서 투여된 경우. 이전에 대조군 벡터 (대조군)로 처리된 그리고 기계적 자극에 과민성있게 된 동물에서 가바펜틴은 투약후 1 시간에서 25%만큼 그리고 2 시간에서 44%만큼 이질통 반응을 감소시켰다. 가바펜틴은 이전에 GTX-01*로 처리된 동물에서 기계적 자극에 거의 정상 반응에서 효과가 없었다. 점선은 수술에 앞서 이들 동물에서 측정된 평균 기준선 회수 역치를 나타낸다 (참고 도 13). 데이터 포인트는 5 동물의 평균 \pm SD를 나타낸다. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

[0034] 도 15는 치료후 일 22에서 수확된 GTX-01*-치료된 동물로부터 DRG의 면역조직화학 평가를 보여준다. 우측 패널에서, EYFP에 대하여 양성으로 염색한 개별 세포 바다 (GTX-01*에 의해 전달된 pFB-hSyn-GluCloptalpha-mEYFP-L9' A 유전자의 생성물). 유사하게, 좌측 패널에서, EYFP에 대하여 양성으로 염색된 동일한 동물로부터 발의 진피 층 바로 밑에 위치한 신경 말단.

[0035] 도 16은, 형질감염되지 않은, 모의-형질감염된 (모의) 또는 글리신에 의해 활성화되는 활성 Cl^- 채널을 형성하는 GlyR 수용체 채널 (hGlyRa1)의 알파-1 서브유닛으로 형질감염된 HEK-293 세포의 생존력을 보여준다. 형질감염후 세포는 무글리신 배지 또는 글리신 (400 μ M)를 함유하는 DMEM에서 배양되었다. 세포 생존력은 형질감염후 72 시간에서 트립판 블루 염료 제외를 이용하여 측정되었다.

[0036] 도 17은, 형질감염되지 않은, 모의-형질감염된 (모의) 또는 항상적 활성 Cl^- 채널 (GluCl*)를 형성하는 GluCl 알파 서브유닛의 야생형 GluCl 알파 서브유닛 (GluCl) 또는 L9' A 돌연변이로 형질감염된 HEK-293 세포의 세포 생존력을 보여준다. 세포 생존력은 형질감염후 48 시간에서 트립판 블루 염료 제외를 이용하여 측정되었다.

[0037] 도 18A-B는 정상 건강한 공여체의 폐로부터 배양된 평활근 세포에서 포르모테롤 (1 μ M)에 의한 세포내 Ca^{++} 및 그의 길항작용의 카르바콜 (Cch)-유도된 증가를 보여준다. Cch에 대한 반응은, 양쪽 공여체로부터, GluCl 알파 서브유닛 L9' A 돌연변이 (pFB-CMV-GluCloptalpha-mEYFP-L9' A)로 형질감염된 세포에서 감소된다.

[0038] 도 19A-B는 정상 건강한 공여체의 폐로부터 배양된 평활근 세포에서 세포내 Ca^{++} 의 히스타민-유도된 증가를 보여준다. 히스타민 반응은 pFB-CMV-hGlyRa1-P2A-mEYFP-WT (야생형 GlyR 알파-1 서브유닛)으로 형질감염된 세포에서 약화되었고 글리신 (100 μ M 또는 1mM)에 노출되었다. 히스타민 반응은 글리신의 첨가 없이 pFB-CMV-hGlyRa1-P2A-mEYFP-L9' A (GlyR 알파-1 서브유닛 L9' A)로 형질감염된 세포에서 또한 약화되었다.

[0039] 도 20은 배양액에서 인간 DRG 세포의 이미지를 보여준다. AAV6-hSyn-GFP에 노출후 4 일에서 뉴런의 세포 (화살표)는 GFP의 발현을 보여준다. GFP 발현은 뉴런의 대 신경교 세포로 제한된다.

[0040] 발명의 상세한 설명

[0041] 본 발명의 방법

[0042] 본 발명의 특정 구현에는 흥분성 세포의 전기생리학적 활성의 조절 방법을 제공한다.

[0043] 본 발명의 특정 구현에는 또한 본 명세서에서 기재된 바와 같이 벡터와 생체내 세포 접촉을 포함하는 포유류 세포의 전기생리학적 활성의 생체내 조절 방법을 제공한다.

[0044] 본 발명의 특정 구현에는 본 명세서에서 기재된 바와 같이 포유류 세포의 전기생리학적 활성의 생체내 조절용 벡터를 제공한다.

[0045] 본 발명의 특정 구현에는 본 명세서에서 기재된 바와 같이 포유류 세포의 전기생리학적 활성의 생체내 조절용 약제를 제조하기 위한 벡터의 용도를 제공한다.

[0046] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 “포유류 세포의 전기생리학적 활성의 조절”은, 생물학적 세포의 내부와 외부 사이 전위에서 차이가 있는, 세포의 막 전위에서 변화를 지칭한다. 세포의 외부에 대해, 막 전위의 전형적인 값은 -40 mV 내지 -80 mV이다. 예를 들어 클로라이드 이온 (Cl^-)의 도입을 통해, 세포의 내부를 더욱 음성 (초분극화)으로 만듦으로써 상기 막 전위 증가는 세포의 전기 활성화의 가능성 감소 (탈분극)에 의해 흥분성 세포의 활성을 감소시킨다. 세포의 전기생리학은 당해 분야에서 공지된 기법을 이용하여, 예를 들어, 세포 막을 거쳐 전압 변화를 검출하는데 사용된 FLIPR 막 전위 검정을 사용하여 본 명세서에서 기재된 형광-기반 검정 또는 패치 클램프 절차를 이용하여 측정될 수 있다.

- [0047] 상기 방법은 포유동물 (예를 들면, 인간)의 흥분성 세포에서 다량체성 이온 채널의 서브유닛 (예를 들면, 글리신 수용체 (GlyR)의 서브유닛)의 외인성 발현 유발을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 흥분성 세포는 이온 채널의 내인성 효능제 (예를 들면, 글리신)에 노출될 수 있다. 내인성 효능제에 반응으로 (외인성 서브유닛을 포함하는) 이온 채널의 조절은 이온 채널의 외인성 효능제 또는 알로스테릭 조절제의 투여 없이 흥분성 세포의 전기생리학적 활성을 조절한다. 특정 구현예에서, 서브유닛 (예를 들면, GlyR 또는 GluCl 서브유닛)은 서브유닛의 다량체화시 항상적 활성 이온 채널을 초래하는 적어도 1종의 돌연변이를 포함할 수 있다. 항상적 활성 이온 채널의 경우에서, 효능제에 대한 노출은 더 이상 필요 없고 흥분성 세포의 전기생리학적 활성은 채널의 외인성 효능제 또는 알로스테릭 조절제의 투여 없이 조절될 것이다.
- [0048] 본 명세서에서 기재된 바와 같이, 흥분성 세포는 이온 채널 활성화의 결과로서 그것의 막 전위내 변동을 경험하는 임의의 세포일 수 있다. 상기 세포는 근세포, 뉴런, 및 기타 동종을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 흥분성 세포는 주변 뉴런, 골격 근육 세포 또는 눈의 섬유 주대 세포이다.
- [0049] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 “외인성”은 세포 (예를 들면, 흥분성 세포)에서 천연적으로 발현되지 않는 단백질을 지칭한다. 예를 들어, GlyRs는 주로 척수 및 뇌 하부 이내 세포에서 일반적으로 발현된다. 따라서, (즉, 뮤테인이 아닌) 심지어 야생형 GlyR 단백질이, 예를 들어, 주변 뉴런에서 발현되는 경우, 상기 세포내 그것의 발현은 외인성이다. 또한, 외인성 발현은 야생형 발현보다 상당히 더 높은 수준에서 단백질의 발현일 수 있다. 따라서, 낮은 수준으로 단백질을 발현시키는 세포에서 단백질의 발현의 동기는 세포가 유도의 결과로서 측정가능하게 더 많은 단백질을 생산하도록 유도되면 “외인성”으로서 간주된다. GluCl 단백질이 포유동물에서 발현되지 않는 것이 또한 언급되고, 따라서 그들의 발현은 외인성인 것으로 고려된다.
- [0050] 본 발명의 특정 구현예는 본 명세서에서 기재된 바와 같이 의료 요법에서 사용하기 위한 벡터를 제공한다.
- [0051] 본 발명의 특정 구현예는, 포유동물에 본 명세서에서 기재된 바와 같이 벡터의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 필요로 하는 포유동물에서 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태의 치료 방법을 제공한다.
- [0052] 본 발명의 특정 구현예는 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태의 예방 또는 치료 처치를 위하여 본 명세서에서 기재된 벡터를 제공한다.
- [0053] 본 발명의 특정 구현예는 필요로 하는 포유동물에서 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태의 치료용 약제를 제조하기 위한 본 명세서에서 기재된 벡터의 용도를 제공한다.
- [0054] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 “흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태”는 음이온 (예를 들면, 클로라이드) 채널 및 양이온 (예를 들면, 나트륨) 채널 활성화의 순수 효과에 기반된 흥분성 세포의 전기생리학적 활성화에서 비롯한, 이와 연관되는, 또는 이와 관련된 임의의 질병 또는 병태를 지칭한다. 특정 구현예에서, 질병 또는 병태는 흥분성 세포에서 (즉, 그와 같은 질병 또는 병태를 앓고 있지 않는 포유동물에서 흥분성 세포에 존재하는 전기생리학적 활성화에 비교된 경우) 비정상적인 전기생리학적 활성화의 결과일 수 있다. 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태는 당해 기술에 공지되어 있고, 예를 들어, 하기를 포함한다: 통증 (예를 들면, 만성 통증, 예를 들면, 관절 통증 또는 신경병성 통증), 염증 (예를 들면, 관절 염증), 안구 고혈압 (예를 들면, 녹내장) 및 경직성 긴장항진 (경직). 따라서, 특정 구현예에서, 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태는 하기이다: 통증 (예를 들면, 만성 통증, 예를 들면, 관절 통증 또는 신경병성 통증), 염증 (예를 들면, 관절 염증), 안구 고혈압 (예를 들면, 녹내장) 또는 경직성 긴장항진 (경직).
- [0055] 특정 구현예에서, 상기 방법은 추가로 포유동물에 1종 이상의 다른 치료제 (예를 들면, 약제학적 제제)를 투여하는 것을 포함한다. 따라서, 특정 구현예에서, 상기 방법은 추가로 하기 치료에 유용한 1종 이상의 다른 치료제 (예를 들면, 약제학적 제제)를 포유동물에 투여하는 것을 포함한다: 안구 고혈압 (예를 들면, 녹내장). 특정 구현예에서, 1종 이상의 다른 치료제는 하기이다: 베타 차단제 (예를 들면, 티몰롤) 또는 동공축소제 (예를 들면, 필로카르핀) 또는 탄산탈수효소 억제제 (예를 들면, 아세타졸라미드) 또는 교감신경모방 (예를 들면, 디피페프린) 또는 프로스타글란딘 유사체 (예를 들면, 라타노프로스트) 또는 Rho 키나제 억제제. 특정 구현예에서, 상기 방법은 추가로 통증 (예를 들면, 만성 통증, 예를 들면, 관절 통증 또는 신경병성 통증) 치료에 유용한 1종 이상의 다른 치료제 (예를 들면, 약제학적 제제)를 포유동물에 투여하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 추가로 염증 (예를 들면, 관절 염증) 치료에 유용한 1종 이상의 다른 치료제 (예를 들면, 약제학적 제제)를 포유동물에 투여하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 1종 이상의 다른 치료제는 비스테로이드 항-염증성 약물 (NSAID) (예를 들면, 이부프로펜) 또는 스테로이드이다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 추가로 경직성 긴장항진 치료에 유용한 1종 이상의 다른 치료제 (예를 들면, 약제학적 제제 예컨대 바클로펜,

벤조디아제핀, 단트롤렌 나트륨, 이미다졸린 또는 가바펜틴)을 포유동물에 투여하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 1종 이상의 다른 치료제는 면역계 억제제, 인헨서, 항생제 (예를 들면, 살균제 또는 살진균제), 및 아드레날린으로부터 선택될 수 있다.

[0056] 본 명세서에서 기재된 바와 같이, 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 벡터는, 발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산을 포함하는, 발현 카세트를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 다량체성 이온 채널은 내인성 화합물에 의해 활성화된다. 다른 구현예에서, 다량체성 이온 채널은 항상적 활성화이다. 따라서, 특정 구현예에서, 이온 채널의 효능제 (예를 들면, 글리신) 또는 알로스테릭 조절제는 포유동물에 투여되지 않는다. 따라서, 상기 구현예에서 상기 기재된 1종 이상의 다른 치료제는 이온 채널의 효능제 (예를 들면, 글리신) 또는 알로스테릭 조절제가 아닐 것이다.

[0057] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 “효능제”는 수용체/이온 채널에 결합할 수 있는 그리고 생물학적 반응을 생산하기 위해 수용체/이온 채널을 활성화시킬 수 있는 화합물질을 지칭한다. 예를 들어, 글리신은 GlyR 효능제이다.

[0058] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 “알로스테릭 조절제”는 이온 채널을 효능화 또는 길항화 (개방 또는 폐쇄)할 수 있는 화합물질을 지칭한다. 따라서, 상기 용어는 효능제 및 길항제 둘 모두를 포함한다. 예를 들어, GlyR의 효능제는 글리신, 타우린 및 베타-알라닌을 포함하고, 반면에 GlyR의 길항제는 스트리크닌을 포함한다. 또한 상기 용어는 표적 단백질, 예를 들어 수용체에서 효능제 또는 역효능제의 효과를 간접적으로 영향을 주는 (조절하는) 서브스텐스 를 포함한다. 알로스테릭 조절제는 오쏘스테릭 효능제 결합 부위의 것과 구별되는 부위에 결합할 수 있다. 일반적으로 이들은 단백질 구조 이내 형태적 변화를 유도한다. 양성 알로스테릭 조절제 (PAM) 또는 알로스테릭 인헨서는, 결합 친화성 또는 상기 표적 단백질용 오쏘스테릭 효능제의 기능성 효능 향상에 의해, 오쏘스테릭 효능제의 효과의 증폭을 유도한다. 음성 조절제 (NAM)은 오쏘스테릭 리간드의 효과를 감소시키지만, 오쏘스테릭 리간드의 부재 하에 불활성이다. 알로스테릭 결합 부위를 차지하고 기능적으로 중성인 서브스텐스는 침묵의 알로스테릭 조절제 (SAMs)로 불린다. 고전적 벤조디아제핀은 GABAA 수용체의 공지된 PAMs이다.

[0059] 특정 구현예에서, 본 발명의 방법은 추가로 포유동물의 다이어트를 변형시키는 것을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 다이어트는 포유동물에서 내인성 글리신의 수준을 증가 또는 감소시키기 위해 변형될 수 있다.

[0060] **통증 및 염증의 치료 방법**

[0061] 본 발명의 특정 구현예는, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 벡터의 유효량을 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, 필요로 하는 포유동물 (예를 들면, 인간 환자)에서 통증 (예를 들면, 만성 통증, 예를 들면, 관절 통증 또는 신경병성 통증)의 치료 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 통증의 감각을 약화시키기 위해 사용될 수 있다.

[0062] 본 발명의 특정 구현예는 또한, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 벡터의 유효량을 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, 필요로 하는 포유동물 (예를 들면, 인간 환자)에서 염증 (예를 들면, 관절 염증)의 치료 방법을 제공한다.

[0063] 본 발명의 특정 구현예는 포유동물에서 통증 또는 염증 치료용 약제를 제조하기 위한 본 명세서에서 기재된 바와 같이 벡터의 용도를 제공한다.

[0064] 본 발명의 특정 구현예는 통증 또는 염증의 치료 처치를 위하여 본 명세서에서 기재된 바와 같이 벡터를 제공한다.

[0065] 최대 1억명의 미국인이 만성 통증을 앓고 있는 것으로 추정된다. 만성 통증에서 환자의 상당한 백분율은, 상기 병태를 위한 약리적 및 비-약리적 개입에서 큰 고통을 강조하는, 현행 치료에 만족하지 못한다. 통증은 단리된 통증일 수 있거나, 통증은 특정한 질환과 관련될 수 있다. 통증은 하기와 관련될 수 있다: 특정 병태 예컨대, 비제한적으로, 만성 수술후 통증, 신경중 예컨대 다단 신경중 및 지간 신경중, 영치영덩 통증을 포함하는 관절 통증, 요통 및, 비제한적으로, 하기를 포함하는, 임의의 공지된 인간 질환과 관련된 통증: 당뇨병, 관절염, 심혈관 질환, 자가면역 질환, 호흡 질환 (예를 들면, 폐경기증), 감염성 질환 (예를 들면, 바이러스 또는 박테리아 감염), 신경적 질환 (예를 들면, 알츠하이머병), 위장 질환, 간 질환, 혈액 장애, 알러지, 내분비 질환, 및 암. 통증은 하기의 암과 관련될 수 있다: 구강 (예를 들면, 설암 및 입 암), 인두, 소화계 (예를 들면, 식도, 위, 소장, 결장, 직장, 항문, 간, 담낭, 및 췌장), 호흡 계통 (예를 들면, 폐 암), 뼈 및 관절 (예를 들면, 뼈 전이, 골육종), 연조직, 피부 (예를 들면, 흑색종), 유방, 생식기 시스템 (예를 들면, 난소암), 비뇨기계 (예를

들면, 방광암, 신장암), 눈 및 눈확, 뇌 및 신경계 (예를 들면, 신경아교종), 또는 내분비계 (예를 들면, 갑상선). 암은 또한 하기일 수 있다: 림프종 (예를 들면, 호지킨 질환 및 비-호지킨 림프종), 다발성 골수종, 또는 백혈병 (예를 들면, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병, 및 기타 동종). 또한 만성 통증 예컨대, 비제한적으로, 뇌졸중후 통증 또는 다발성 경화증과 관련된 것, 척수 손상, 편두통, HIV-관련된 신경병성 통증, 대상포진후 신경통, 당뇨병성 신경병증, 체장염, 염증성 장 증후군, 하부 요통, 섬유근육통, 또는 신경 손상 또는 장애에서 비롯하는 통증 예컨대 개흉술후 통증에서 또는 탈장 수복 이후 수술후 통증 또는 절단후 “다단 통증”, 또는 신경 장애 예컨대 측면 대퇴부 피부 신경 포착 (지각이상성 대퇴신경통)에서 비롯한 통증 또는 다른 상황 이로써 통증은 예를 들어 포착, 허혈 또는 염증으로 인한 신경 손상에서 비롯한다.

[0066] 통증 (예를 들면, 만성 통증)의 치료를 위하여, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 백터는 국부 마취제의 전달에 사용된 것과 유사한 종래의 주사 기법을 이용하여 통증의 부위에 전달될 수 있다. 비제한 예로써, 진피내 또는 피하 주사는 만성 수술후 통증 (CPSP) 또는 대상포진후 신경통 (PHN) 같은 병태에서 피부에서 생기는 통증을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 주사는 신경 조직 예컨대, 비제한 예로써, 절단 이후 발생하는 병태 예컨대 지간 신경종 또는 “다단 신경종”을 치료하기 위해 신경종에 직접적으로 실시될 수 있다. 또한 비제한 예로써 직접적인 주사는 부위 통증 예컨대 당뇨병성 신경병증 또는 내장 압과 관련된 통증의 치료를 위하여 신경 섬유 및 신경 트렁크 또는 신경절에 실시될 수 있다. 요법은 또한, 비제한 예로써, 골관절염, 트라우마, 에이징 또는 염증과 관련된 통증을 경감시키기 위해 관절에 직접적으로 전달될 수 있다. 이들 관절은 비제한적으로 후 관절, 엉치엉덩 관절, 무릎, 엉덩이, 어깨, 발목, 손목, 팔꿈치 등을 포함할 수 있다.

[0067] 본 명세서에서 기재된 바와 같이 백터를 이용하여 통증을 치료하는 능력은 하기의 범위를 이용하여 시험될 수 있다: 동물 모델 예컨대 모노나트륨 아이오도아세테이트 - 유도된 골관절염 (MIA-OA) 모델 (Bove SE. 등 (2003) Osteoarthritis and Cartilage 11(11): 821-30; Schuelert N. 및 McDougall JJ. (2009) Neuroscience Letters 465(2): 184-188; Combe R. 등 (2004) Neuroscience Letters 370(2-3): 236-240) 또는 염증성 통증 모델 예컨대 CFA - 완전한 프로인트 아췌반트 염증성 통증 모델 (Fehrenbacher JC. 등 (2012) CurrentProtocols in Pharmacology 5.4.1-5.4.7, March 2012). 신경병성 통증 모델 예컨대 하기는 또한 사용될 수 있다: 신경 손상에서 비롯한 것, 예를 들어 청(Chung) 척추 신경 결찰 모델 (Chung JM. 등 (2004) Methods Mol Med. 99: 35-45), 신경 부분 손상 모델 (Richner M. 등 (2011) Journal of Visualized Experiments 18(54): pii 3092) 베넷 만성 수축 신경 손상 모델 (Austin PJ. 등 (2012) Journal of Visualized Experiments 13(61): pii 3393) 또는 라이소포스파티드산 모델 (Inoue M. 등 (2004) Nat Med. 10(7): 712-718; Ogawa K. 등 (2012) EurJ Pain 16(7): 994-1004).

[0068] 본 명세서에서 기재된 바와 같이, 본 발명의 특정 구현예는, 포유동물에 본 명세서에서 기재된 바와 같이 백터의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 필요로 하는 포유동물에서 통증의 치료 방법을 제공한다. 상기 구현예에서, 백터는, 발현 카세트가 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산 및 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 바이러스 백터 (예를 들면, AAV 백터)일 수 있다. 특정 구현예에서, 바이러스 백터는 AAV6 백터이다. 특정 구현예에서, 프로모터는 인간 시냅신 (hSyn) 프로모터이다. 특정 구현예에서, 핵산은 GlyR의 서브유닛을 인코딩한다. 특정 구현예에서, 핵산은, 서브유닛이 서브유닛의 다량체화시 항상적 활성 이온 채널을 초래하는 적어도 1종의 돌연변이를 포함하는, 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩한다. 특정 구현예에서, 서브유닛은 서브유닛의 다량체화시 항상적 활성 GlyR 채널을 초래하는 적어도 1종의 돌연변이를 포함하는 GlyR 서브유닛이다.

[0069] 글리신 및 타우린의 상당한 수준은 활막 유체 (SF), 특히 염증성 관절의 것에서 또한 존재한다. 이전의 연구는 활성 관절염 병태를 가진 환자로부터 추출된 SF에서 흥분성 아미노산 (EAA) 및 다른 신경전달물질의 상승된 수준을 실증하였다 (Appelgren A. 등 (1991) Scand J Dent Res. 99: 519-521; Larsson J. 등 (1991) Scand J Rheumatol. 20: 326-335; McNearney T. 등 (2000) J Rheumatol. 27: 739-745). 추가의 연구는 정상 대조군과 비교된 류마티스성 관절염을 가진 환자에서 상승된 혈장 아미노산 (AA) 수준을 보고하였다 (Trang LE. 등 (1985) Scand J Rheumatol. 14: 393-402). 증가된 SF EAA 수준의 공급원(들)은 공지되지 않지만 가능성은 활막을 거쳐 혈액 또는 혈장에서 국부 세포 생산, 신경인성 삼출, 또는 수동 확산을 포함한다. 증상 관절병증 및 SF RANTES와 그들의 보고된 회합에서 SF EAA의 농도 상승, 및 MIPI-알파 농도는 혈장에서 수동 확산 보다는 국부 염증성 관절 과정이 SF EAA 농도를 결정한다는 것을 시사한다 (McNearney T. 등 (2004) Clin Exp Immunol. 137: 621-627). 이를 평가하기 위해, McNearney 및 Westlund는 활성 관절염을 가진 14 최근에 사망된 사체 및 9 환자의 무릎에서 혈장 및 활막 유체를 동시에 뽑았고 구획 SF를 평가하는 EAA 및 다른 AA의 수준을 측정하였

다: 혈장 농도 비. (McNearney T. 및 Westlund K. (2013) *Int J Clin Exp Pathol.* 6(3): 492-497). 그들의 데이터는 하기를 보여주었다: 비-관절염 샘플에서 평균 SF: 혈장 농도 비의 글리신 및 타우린이 -2.11 및 -1.57, 각각이었음. 하지만, 라이터 증후군을 앓고 있는 환자에서 평균 SF: 혈장 농도 비는 글리신에 대하여 혈장에서 보다 SF에서 대략 2-배 더 높았다. 글리신에서 상승에 대하여, SF 글루타메이트의 수준은 상기 환자에서 7.5-배만큼 또한 상당히 상승되었다.

[0070] 활성 관절염에서 상승된 SF Glu 및 Asp 농도의 공급원은 미궁지되지만, 아마 후보는 신경 섬유로부터 관절 캡슐 또는 국부 분비에서 활막세포 또는 골세포로부터 혈장, 국부 생산을 포함한다. 작은 생리적 분자가 일반적으로 혈장과 활막 유체 사이 전체 평형압에 따라, SF Glu 및 Asp가 크기에 기반하여 혈장으로 전체 평형이 될 것임을 예상할 수 있다 (McCarty D. *Arthritis and Allied Conditions*. Edited by Koopman WJ. Baltimore: Williams 및 Wilkins, 1997; pp: 81-102). 하지만, 사망전 관절염을 갖지 않은 사체로부터 샘플은 하기를 가졌다: 상당히 감소된 EAA SF: 혈장 농도 비 (9개의 다른 AA와 비교된). SF Glu 및 Asp의 상당히 더 큰 구획 비 차이는 혈장이 SF EAA의 유일한 또는 심지어 주요 공급원이 아님을 나타낸다. 더 높은 SF: 사망전 관절염을 가진 하나의 사체 및 활성 염증성 관절염 과정을 가진 몇몇의 환자에서 혈장 농도 비는 또한 SF EAA 농도가 관절에서 국소 생리적 과정을 반영한다는 가설을 뒷받침한다. 아마 이들 흥분성 아미노산의 공급원은, 관절에 서브스텐스 P 방출 대하여 생각됨에 따라, 관절을 공급하는 1차 구심성 신경 말단에서 자극된 방출일 수 있다 (Yaksh TL. 등 (1988) *Peripheral release of substance P from primary afferents*. *Proceedings from the Vth World Congress on Pain*. Edited by Dubner R, Gebhart GF, Bond MR. Amsterdam: Elsevier, pp: 51-54). 정상 랫트에서 유래된 SF EAA 값은 낮은 값이 활성 관절염의 부재 하에 생리적일 수 있고 염증성 관절에서 상승된다는 것을 시사한다 (Lawand NB. 등 (2000) *Pain* 86: 69-74; Lawand NB. 등 (1997) *Eur J Pharmacol.* 324: 169-177). 이전의 연구는 원숭이의 염증성 관절을 공급하는 중앙 관절 신경에서 증가된 Glu 면역반응성을 실증하였다 (Westlund KN. 등 (1992) *Brain Res Rev.* 17: 15-27). 따라서, 글루타메이트가 또한 신경 섬유에 의해 관절에 방출될 수 있음을 추정하는 것이 합리적이다. 랫트의 카울린/카라기난 유도된 관절염 모델에서, SF Glu에서 기대된 증가는, 말초 신경으로부터 신경전달물질 방출을 감소시키는, 관절내 리도카인을 이용한 사전치료로 폐지되었다 (Lawand NB. 등 (2000)). 국부 글루타메이트 및 아스파르테이트는 국부 염증 및 병리학을 향상 또는 영속시키기 위해 국부 골세포, 연골세포 및 활막세포에서 주변 수용체를 결합 및 활성화시킬 수 있다 (Skerry TM. 및 Genever PG. (2001) *Trends Pharmacol Sci.* 22: 174-181; Lawand NB. 등 (1997) *Eur J Pharmacol.* 324: 169-177; Flood S. 등 (2007) *Arthritis Rheum.* 56: 2523-2534; GuY. 등 (2002) *Calcif Tissue Intl.* 70: 194-203; Laketic-Ljubojevic I. 등 (1999) *Bone* 25: 631-637; McNearney TA. 등 (2010) *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 298: R584-598; Ramage L. 등 (2008) *Osteoarthritis Cartilage* 16: 1576-1584). 따라서 염증성 관절을 자극하는 국부 구심성 신경의 초분극화가 통증을 감소시킬 뿐만 아니라 관절에 전-염증성 매개체의 방출 감소에 의해 염증을 감소시킬 수 있다는 것이 합리적이다.

[0071] 안구 고혈압의 치료 방법

[0072] 본 발명의 특정 구현에는 하기의 치료 방법을 제공한다: 안구 고혈압 (예를 들면, 녹내장) 필요로 하는 포유동물 (예를 들면, 인간 환자)에서, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 벡터의 유효량을 포유동물에 투여하는 것을 포함함. 특정 구현예에서, 상기 투여는 포유동물에서 낮아진 안구내 압력을 초래한다.

[0073] 본 발명의 특정 구현에는 포유동물에서 안구 고혈압 치료용 약제를 제조하기 위한 본 명세서에서 기재된 바와 같이 벡터의 용도를 제공한다.

[0074] 본 발명의 특정 구현에는 안구 고혈압의 치료 처치를 위하여 본 명세서에서 기재된 바와 같이 벡터를 제공한다.

[0075] 녹내장은 세계에서 시각상실의 제2-주된 원인이고, 2020년까지, 유병률은 전세계적으로 58.6 백만 및 미국에서 3.4 백만으로 증가하는 것이 예상된다. 녹내장은 2개의 주요 카테고리, 개방-각 및 폐쇄된-각 (또는 각 폐쇄) 녹내장으로 거의 분할될 수 있다. 도 3을 참조로, 인간 눈의 특징을 도시하는 해부상의 다이어그램은 보여진다. 녹내장과 관련하여, “각”은 홍채와 각막 사이 공간을 지칭하고, 이를 통해 유체 (안방수 (AH))는 섬유 주대 (TM)를 통해 눈에서 배수하도록 유동해야 한다. 폐쇄된-각 녹내장은 갑작스럽게 나타날 수 있고 종종 동통성이고; 시각 손실은 빠르게 진행할 수 있지만, 영구적 손상이 발생하기 전에 불편은 종종 환자가 진찰하도록 이끈다. 개방-각, 만성 녹내장은 더 느린 속도로 진행되는 경향이 있고 질환이 상당히 진행되었을 때까지 환자는 본인들이 시력을 잃었다는 것을 알아차리지 못할 수 있다. 개방-각 녹내장의 정확한 병인은 미궁지된 채로 남아있다. 하지만, 대부분의 녹내장 환자에 대한 주요 위험 인자, 및 치료의 주안점은 증가된 안구내 압력 (IOP), 즉 안구 고혈압 (OHT)이다. 망막 신경 섬유 층에서 세포 손실로 인한 시야의 진행성 손실은 OHT의 직접적인 결과이

다. 시력 손실은 환자의 삶의 질 및 이동성, 예컨대, 심각한 부정적 거시경제적 충격을 갖는, 운전하는 능력에 부정적으로 영향을 줄 수 있다. 본 발명은 우세하게 개방-각 녹내장에서 OHT의 치료에 관한 것이다.

- [0076] IOP는, 눈의 모양체에 의해 생산되는, 안방수에 의해 주로 유지된다. 모양체가 안방수를 생산하는 경우, (렌즈 및 홍체에 의해 한정된) 후방으로 먼저 유동한다. 그 다음 (홍체 및 각막에 의해 한정된) 전방으로 홍체의 동공을 통해 유동한다. 여기서부터, TM을 거쳐 유동하여 슐렘관 (SC)를 통해 정상 바디 순환에 진입한다. 인간 눈에서, SC는 대략 $3 \mu\text{l}$ 의 안방수 / 분의 평균을 전이시킨다. 따라서, 안구내 압력은 AH의 합성과 배출 사이 정교한 균형에 의해 유지된다. OHT의 주요 기전은 섬유 주대 또는 포도막공막 경로를 통한 유출의 감소이다. 1차 유출 경로는 또한 안방수의 유출 저항에 가장 큰 기여를 하는 TM을 통한 것이고, 본 발명의 치료 주안점이다.
- [0077] 녹내장 관리의 최신 목표는 녹내장 손상 및 신경 손상을 피하는 것이고, 최소 부작용으로, 환자에 대하여 시야 및 총 삶의 질을 보존하는 것이다. 녹내장용 선별은, 안압측정을 통한 IOP의 측정을 포함해야 하는, 표준 눈 시험의 일부로서 일반적으로 수행된다.
- [0078] IOP는 약물, 일반적으로 점안액으로 낮춰질 수 있다. 몇 개의 상이한 부류의 약물은, 각각의 부류에서 몇 개의 상이한 약물로 사용되어 왔다. 종종 각각의 이들 의약의 치료 효과는 국부 및 전신 부작용에 의해 제한될 수 있다. 부작용이 발생하면, 환자는 일반적으로 이것을 기꺼이 견뎌야 하거나, 약물 요법을 개선하기 위해 치료 의사와 소통해야 한다. 약물 및 후속조치 방문으로 좋지 못한 순응도는 녹내장 환자의 시력 손실에 대하여 주요 이유로서 인용되어 왔다 (Nordstrom BL. 등. (2005) Am J Ophthalmol. 140: 598).
- [0079] 양쪽 레이저 및 종래의 수술은 OHT를 치료하기 위해, 특히 선천성 녹내장을 가진 이들을 위하여 수행되었다. 이들이 높은 성공률을 가져도, 이들 수술은 일반적으로 일시적 해결책을 나타내고, 주기적으로, 예컨대 격년으로 재치료가 요구된다. 대개의 경우, 약물은 후-op IOP를 제어 및 유지하기 위해 여전히 필요하다. 하지만, 수술은 필요한 약물의 양을 줄일 수 있다.
- [0080] 따라서, OHT의 치료를 위하여 강력한 및 신뢰할 수 있는 요법에 대한 요구가 남아 있다. 예를 들어, AH의 유출에 대해 그들의 유압 임피던스 감소에 의해, IOP를 낮추기 위한 TM의 세포 완화용 치료 방법.
- [0081] 전통적 개념에서, 섬유 주대는, 그 자체의 조절 특성이 없는, 불활성 조직이다. 상기 개념에서, 유출 저항의 조절은 모양체근에 의해 결정된다. 하지만, 지난 20여년 동안 실시된 과업은, 모양체근에 의해 수동적으로 팽창됨에 더하여, 섬유 주대가 그 자체의 수축성 특성을 갖는다는 것, 그리고 완화가 안구내 압력을 감소시킨다는 점에서 상기 구조의 수축 및 완화가 안구 유출에 영향을 미칠 수 있다는 것을 확립하였다. 풍부한 증거는 섬유 주대가 평활근-유사 특성을 보유한다는 이론을 뒷받침한다. 또한, 섬유 주대 세포는, 이들 다수가 평활근 수축성을 조절하는 것으로 공지되는, 다수의 수축체, 채널 및 수용체를 발현시킨다. 섬유 주대가 약리적 제제 예컨대 아세틸콜린 및 엔도텔린에 반응하여 수축 및 이완하기 위해 유도될 수 있는 것으로 나타났다 (Lepple-Wienhues A. 등 (1991) Exp Eye Res. 53(1): 33-38; Stumpff F. 및 Wiederholt M. (2000) Ophthalmologica. 214(1): 33-53). 세포 수준에서, 이것은 혈장 막의 탈분극 및 세포내 칼슘의 상승과 커플링된다. 세포내 Ca^{2+} 의 상기 증가는 소포체로부터 Ca^{2+} 의 방출에 의해 매개되지만 또한 세포의 Ca^{2+} 의 유입은 L-유형 전압-게이팅된 Ca^{2+} 채널의 개방을 통해 매개된다. 상기 효과는 L-유형 전압-게이팅된 채널 차단제 니페디핀에 의해 차단될 수 있다 (Stumpff F. 및 Wiederholt M. (2000) Ophthalmologica. 214(1): 33-53). 다른 쪽에서, 섬유 주대의 완화는 maxi-K 채널의 자극, 초분극화 유도 및 L-유형 칼슘 채널의 폐쇄에 커플링되는 것처럼 보인다 (Stumpff F. 등 (1999) Invest Ophthalmol Vis Sci. 40(7): 1404-1417; Stumpff F. 및 Wiederholt M. (2000) Ophthalmologica. 214(1): 33-53).
- [0082] TM의 완화는, 예를 들어 원자력 현미경검사 (AFM)을 이용하여, 측정된 경우 주대의 더 큰 순응도를 초래할 것이다. 이런 식으로 측정된 영률 (순응도의 측정)은 섬유 주대의 유동 저항과 상관하는 것으로 나타났다. 정상 눈에서 섬유 주대의 근방소관내 영역 (JCT) 영역의 영률은 1.1 내지 6.5 kPa이고 반면에 녹내장 눈의 JCT에서는, 도 4에서 나타낸 바와 같이, 100 내지 250 kPa의 영역이다 (미국 특허 출원 공개 US 2013/0184318 A1).
- [0083] 본 명세서에서 기재된 것은 TM 세포 완화를 초래하는 기전이다. 이들 기전은 세포 내에서 수축성 요소를 활성화시키기 위해 필요한 세포내 칼슘을 이용하는 세포의 능력 약화에 의해 또는 세포내 칼슘의 이용가능성 감소에 의해 TM 세포의 수축성을 감소시킨다.
- [0084] TM과 평활근 세포 사이 유사성, 특히 수축을 지속시키기 위해 필요한 세포내 Ca^{2+} 를 제공하는 L-유형 전압-게이팅된 Ca^{2+} 채널의 역할이 제공되면, 일부 사례에서 평활근 세포가 TM 세포의 약리적 특성의 모델로서 사용될 수

있는 것 같다. 그러므로, 하기가 기대된다: 세포의 초분극화가 하기에 의해: Cl^- 의 유입 및 기도 평활근의 차후의 완화 (Yim PD. 등 (2011) The FASEB Journal 25(5): 1706-1717) 그리고 실시예 8 (도 18 및 19)에서 나타낸 바와 같이 TM 세포의 유사한 초분극화가 TM의 완화를 초래할 것을 예상함.

[0085] 상기 기재된 기법을 이용하여 섬유 주대 세포의 표면에서 발현된 항상적으로 활성 채널의 이용은 리간드- 또는 광-활성화된 채널에 대해 상당한 이점을 갖는다 (미국 특허 #US20150217133A1). 리간드- 및 광-활성화된 채널의 활성은 리간드의 이용가능성 및 농도 또는 광의 방사 수준에 의존적이다. 리간드-활성화된 채널은 리간드의 효력 및 약동학적 (PK) 특성에 의존적이다. 상기 표적 조직 (특히 눈에서 사안)에 리간드의 접근성, 리간드의 국부 자유 농도, 및 조직 이내 리간드의 체류 시간은 모두 리간드-게이팅된 채널에 대하여 활성의 패턴의 핵심 결정인자이다. 흡수는 광의 광자에 의해 활성화된 경우만 활성이고, 따라서 적은 광의 기간 동안 (예를 들면, 밤에) 채널은 활성이 아니다. 화학적 또는 물리적 활성제에 의존성은 항상적으로 활성 채널에 대한 사안이 아니고, 생리적 효과는 모든 병태 하에 그리고 환자가 임의의 약물을 섭취할 필요 없이 지속할 것이다. OHT 및 POAG의 경우에서 이들 환자 중에서 순응도가 30 내지 70%인 것으로 추정됨에 따라 이것은 결정적으로 중요한 이점이다. 흡수의 경우에서, 광은 낮 동안 대부분의 환자에 풍부하지만, 밤에는 이들이 21mmHg 미만의 IOP를 유지하기 위해 종래의 약물요법을 이용해야 한다는 것이 가능하다. 리간드-게이팅된 채널의 경우에서, 이들은 전달, 대사 및 청소능의 동일한 PK 사안 뿐만 아니라 종래의 약리적-기반 요법의 사용을 복잡하게 하고 제한하는 부작용의 경향이 있다.

[0086] 본 명세서에서 제시된 것은, 비제한 예로써, 화학적 또는 물리적 자극의 사용 없이 TM 세포 이내 수축성 요소의 완화를 초래하기 위해 외인성 유전 물질 (즉, 이온 채널의 서브유닛), 예컨대 항상적으로 활성 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩하는 유전자의 조직-특이적 전달 및 세포 선택적 발현을 이용하는 접근법이다. TM의 완화는 유압 임피던스의 감소를 초래하는 TM 조직 구조의 증가된 투과도를 초래할 것이고 이로써 높은 IOP를 감소시켜 OHT를 제어한다.

[0087] 포유동물 (예를 들면, 인간 환자)의 눈에 선택된 외인성 물질의 전달은, 다른 시스템 및/또는 구조에 비하여 인간 눈의 특유의 해부상의 위치결정/접근을 이용할 수 있는, 1종 이상의 패러다임, 예컨대 아래 기재된 것을 따를 수 있다. 하기에서 기재된 바와 같이: Buie LK. 등 (2010) (Invest Ophthalmol Vis Sci., 51; 1: 236-48), 눈의 유출 경로의 세포의 위치, 형태학, 및 생리학은 효율적인 유전자 전달에 힘을 쏟는다. 안방수의 자연스러운 유동때문에, 전방에 전달된 유전자는 우선적으로 섬유 주대에 도달할 수 있다. 일단 백터가 섬유 주대에 도달하면, 섬유 주대 세포 층 사이 및 주위에서 유체의 생리적 유동 패턴은 전이 분자에 더 긴 접촉 시간을 제공할 수 있고 세포에 그들의 진입을 용이하게 할 수 있다.

[0088] 표적화된 해부학의 세포에서 발현되는 외인성 수용체 유전 물질을 포함하는, 본 명세서에서 기재된 백터의 전달은, 비제한적으로 내부 국소 주사 또는 적용 (즉, 일반적으로, 예컨대 내시경 기법을 통한, 외과적 접근 이후, 해부학의 표적화된 부분과 관련된 조직 구조의 표면에서, 또는 해부학 자체에서 주사)를 포함하는, 1종 이상의 배치구성에서, 주사기 또는 다른 디바이스로 주사를 포함할 수 있다. 각각의 이들 주사 배치구성은 아래 추가로 상세히 탐구된다.

[0089] 조직 구조 표면에 전방내 투여 또는 적용은 유전 물질 (즉, 본 명세서에서 기재된 백터)를 전달하기 위해 이용될 수 있다. 제조한 백터는 상기 국소 적용 또는 노출 이후 세포를 감염 및 조직을 통해 확산시킬 수 있다. 바이러스 백터의 국소 적용의 효능은 겔에 현탁된 백터를 이용하여 증가되어 왔다. 일 구현예에서, 백터는 겔에 현탁될 수 있거나, 조직의 표면에 적용될 수 있거나, 상기 표적 조직과 동일한 해부상의 공간에서 배치될 수 있다. 내부 국소 적용은 복강경검사 기법을 이용하여 달성될 수 있고, 여기서 1종 이상의 작은 절개는 외과적 장치 (카메라, 바늘, 도구, 등)를 삽입시키기 위해 눈의 외층(들) 및 다른 적절한 조직 구조를 통해 실시될 수 있다. 바늘은 (카메라 또는 다른 이미징형성 디바이스, 예컨대 슬릿 램프 생체현미경, 또는 수술 현미경을 통해 시각화된 경우) 전방내로 삽입될 수 있다. 모든 경우에, 백터는 겔 (예를 들면 Abbott에 의해 상표명 “Healon”, 또는 Alcon에 의해 “Viscoat” 하에 판매된 제품)과 혼합될 수 있고 그 다음 적절한 조직의 표면에 분무, 도장, 또는 주사될 수 있다. 예를 들어, AAV의 1×10^{11} vg를 함유하는 대략 0.1 mL 염수의 용량은 각각의 1 cm^2 면적을 포함하기 위해 사용될 수 있다. 이들 범위는 설명적이고, 용량은 표적화된 TM 세포와 이들을 짝짓기하는 각각의 백터에 대하여 시험된다.

[0090] 국소 적용의 하나의 특정한 예에서, 안구 고혈압은 적절한 세포에 광유전 물질의 전이를 달성하기 위해 현미경적 가시화 하에 바늘을 이용하여 눈의 전방 내에 백터 용액 또는 겔의 국소 적용에 의해 다뤄질 수 있다. 백터는 가능한 많은 이용가능한 TM 표면을 포함하기 위해 TM 근처 다중 부위에서 또는 전방의 안방수에 볼러스로서

직접적으로 및 국소적으로 적용될 수 있고, 목표는 TM의 세포를 감염시키는 것이다. 대안적으로, 바이러스-부담된 겔의 플러그는 전방에서 배치될 수 있고 몇 시간의 과정에 걸쳐 바이러스를 용출시키게 될 수 있다. 플러그는, 하지만, TM을 실질적으로 차단하지 않는 방식으로 배치되어야 한다. 추가 대안적 구현예에서, 바이러스-용출 섬유주 플러그는 유사한 효과를 위하여 삽입될 수 있다. 안과 평형 염류액, 예컨대 Alcon에 의한 BSS는 백터 주사를 제조하기 위해 사용될 수 있다.

[0091] 전방에 대한 접근은 국소 마취제, 예컨대 (Alcon에 의해, Alcaine으로서 판매된) 프로파라카인의 점적주입후 실시될 수 있고, 바늘 주사가 전방에서 실시되도록 하기 위해, 개검기, 예컨대 Storz에 의해 Seibel 3-D Lid Speculum은 삽입될 수 있다. 대안적으로, 바늘 주사 대신에, 천자술은 예리한 찌르기 칼날, 예컨대 ASICO에 의해, MIP Diamond Knife 이용에 의해 우월한 일시적 측두 경계에서 수행될 수 있다. 다량의 안방수는 방출될 수 있고, 백터 주사는, 예를 들어, 25 내지 30-게이지 전방 캐놀라, 예컨대 천자술을 통해 AC에 도입되는, Storz에 의해, 뭉툭한 끝의 Knolle Anterior Irrigating Cannula를 이용하여 수행될 수 있다. 대안적으로, 대체된 안방수는 천자술을 통해 내부 작동가능하게 통기될 수 있다.

[0092] 본 명세서에서 기재된 (예를 들면, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 야생형 또는 변형된 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩하는) 백터 및 섬유 주대에 그것의 전달의 능력은 다양한 동물 모델을 이용하여 예컨대 정상 실험실 동물 예컨대 랫트, 마우스 또는 토끼에서 안구내 압력에 관한 치료의 효과를 측정하여 시험될 수 있다. 상기 측정은 안압계를 이용하여 의식있는 또는 진정된 동물에서 실시될 수 있다. 대안적으로 안구 고혈압의 모델은 요법의 효과를 측정하기 위해 사용될 수 있다. 하나의 상기 모델은 3 또는 4 주 동안 매일 3회 눈에 0.5% 프레드니솔론 아세테이트의 투여에 의해 생성된다 (Gerometta R. 등 (2008) Investigative Ophthalmology & Visual Science 50(2): 669-73).

[0093] 본 명세서에서 기재된 바와 같이, 본 발명의 특정 구현예는, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 백터의 유효량을 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, 필요로 하는 포유동물에서 안구 고혈압의 치료 방법을 제공한다. 상기 구현예에서, 백터는, 발현 카세트가 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산 및 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 바이러스 백터 (예를 들면, AAV)일 수 있다. 특정 구현예에서, 바이러스 백터는 scAAV2 바이러스 백터이다. 특정 구현예에서, 프로모터는 매트릭스 Gla 단백질 (MGP) 프로모터이다. 특정 구현예에서, 핵산은, 서브유닛이 서브유닛의 다량체화시 항상적 활성 이온 채널을 초래하는 적어도 1종의 돌연변이를 포함하는, 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩한다. 특정 구현예에서, 서브유닛은 서브유닛의 다량체화시 항상적 활성 GlyR 채널을 초래하는 적어도 1종의 돌연변이를 포함하는 GlyR 서브유닛이다.

[0094] 경직성 긴장항진 치료 방법

[0095] 본 발명의 특정 구현예는, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 백터의 유효량을 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, 필요로 하는 포유동물 (예를 들면, 인간 환자)에서 경직성 긴장항진 (경직)의 치료 방법을 제공한다.

[0096] 본 발명의 특정 구현예는 포유동물에서 경직성 긴장항진 (경직) 치료용 약제를 제조하기 위한 본 명세서에서 기재된 바와 같이 백터의 용도를 제공한다.

[0097] 본 발명의 특정 구현예는 경직성 긴장항진 (경직)의 치료 처치를 위하여 본 명세서에서 기재된 바와 같이 백터를 제공한다.

[0098] 경직은 특정 근육이 계속해서 수축되는 병태이다. 상기 수축은 근육의 강성도 또는 강도를 유발시키고 정상 운동, 말하기, 및 보행을 방해할 수 있다. 경직은 자발적인 운동을 제어하는 뇌 또는 척수의 부분에 대한 손상에 의해 일반적으로 야기된다. 상기 손상은 신경계와 근육 사이 신호의 밸런스에서 변화를 유발시킨다. 상기 불균형은 근육에서 증가된 활성으로 이어진다. 경직은 사지의 근육 및 관절에 부정적으로 영향을 주고, 성장하는 소아에 특히 유해하다.

[0099] 경직은 전세계적으로 추정된 12 백만 명 초과에 영향을 준다. 뇌성 마비 (CP)를 가진 사람의 약 80 퍼센트는 가변 정도의 경직을 갖는다. CP의 일부 형태를 가진 미국내 추정된 500,000명으로, 이것은 일부 정도의 CP-관련된 경직을 가진 약 400,000명과 동일시한다. 다발성 경화증 (MS)을 가진 사람의 약 80 퍼센트는 가변 정도의 경직을 갖는다. MS를 가진 미국내 추정된 400,000명으로, 이것은 일부 정도 MS-관련된 경직을 가진 약 320,000명과 동일시한다. 경직을 유발시킬 수 있는 다른 병태는 하기를 포함할 수 있다: 외상성 뇌 손상 (TBI), 척수 손상 (SCI), 산소 부족으로 인한 뇌 손상, 뇌졸중, 뇌염, 수막염, 부신백질이상증, 근위축 측삭 경화증 (루게릭 질환) 및 페닐케톤뇨증.

[0100] 경직은 근육에서 강도의 느낌으로써 가벼울 수 있거나 사지; 가장 통상적으로 다리 및 팔의 동통성, 통제불가능

경직을 생산하는데 충분한 중증일 수 있다. 경직은 또한 통증의 느낌 또는 관절에서 및 주변에서 강도를 창출할 수 있고, 하부 요통을 유발시킬 수 있다. 경직의 역효과는 하기를 포함한다: 운동을 덜 정확하게 하고 특정 과제를 수행하기 어렵게 하는, 근육 강성도; 통제불가능한 및 종종 동통성 근육 수축을 유발시키는, 근육 경직; 다리의 비자발적인 교차; 근육 및 관절 기형; 근육 피로; 중방향 근육 성장의 억제; 근육 세포내 단백질 합성의 억제. 이들은 하기로 이어질 수 있다: 추가의 합병증 예컨대: 요로 감염, 만성 변비, 열병 또는 다른 전신 병 및 욕창.

[0101] 하기의 공통 목표를 공유하는 이용가능한 몇 개의 치료 유형이 있다: 경직의 징후 및 증상 완화; 근육 수축의 통증 및 빈도 감소; 보행, 위생, 일상 생활 활동, 및 돌봄 용이성 개선; 돌보는 사람 과제 예컨대 드레싱, 급식, 이송, 및 수영 감소; 자발적인 운동 기능 포함 목적 예컨대 잡기, 움직이기, 놓아주기 달성 개선; 소아에서 정상 근육 성장의 더욱 가능화. 이들 치료 옵션은 하기를 포함한다: 물리적 및 직업적 요법; 경구 약물 예컨대: 바클로펜, 벤조디아제핀, 단트롤렌 나트륨, 이미다졸린 및 가바펜틴. 척추강내 바클로펜 (ITB) 펌프 및 선택적 후근 절제술 (SDR)을 포함하는 외과적 옵션은 또한 이용가능하다.

[0102] 보톡스 주사로서 또한 공지된 보툴리눔 독소 (BTA) 는, 경직성 근육을 마비시킴으로써, 소량으로 사용될 때 효과적임을 입증하였다. 주사 부위는 경직의 패턴에 기반하여 주의하여 결정된다. 보톡스가 근육(들)에 주사된 경우, 아세틸콜린의 방출은 차단되어, 과민성 근육의 완화를 초래한다. 신규한 신경 말단이 역으로 성장하고 감염된 근육(들)이 회복하는 때까지, 주사(들)은 일반적으로 몇 일 이내 효과를 갖지만 단지 약 12-16 주 지속한다. 투여될 수 있는 주사의 수에서 제한이 있다.

[0103] 경직의 치료용 옵션은 따라서 제한되고, 그러므로 덜 침습성, 더욱 유효한 및 환자 친화적인 요법이 필요하다.

[0104] 경직의 치료를 위하여, 본 명세서에서 기재된 벡터의 유효량은 포유동물 (예를 들면, 인간 환자)에 투여될 수 있다. 예를 들어, 벡터는 다중 바늘 주사를 이용하여 침범된 근육 그룹에 직접적으로 전달될 수 있다. 상기 절차 동안, 작은 전극은 침범된 근육 면적에 걸쳐 환자의 피부에 테이프로 부착된다. 전극은 근전도 검사 기계 (EMG)에 부착된다. EMG는 주사 이전 바늘 위치를 확인하기 위해 사용되어, 정확한 근육을 확실히 하는 것이 확인된다. 의사는 그 다음 환자에게 근육 그룹을 움직이게 요청할 것이다. 환자가 이것을 할 수 없다면, 의사는 환자용 관절 가동범위 운동을 수행할 것이다. 이것은 주사로부터 사람들이 최상의 이점을 얻도록 돕는다. 벡터는, EMG 기계에 부착되는, 작은 바늘을 이용하여 근육에 주사된다. 의사는 근육 그룹을 따라 몇 개의 위치에 또는 많은 근육 그룹 이내 벡터의 소량을 주사할 수 있다. 이것은 치료의 이점 최대화를 돕는다. 특정 구현예에서, 전달되는 벡터는 하기의 초분극화를 유발시키기 위해 Childers 등에 의해 기재된 바와 같이 맞추어질 수 있다: 표적화된 골격근 그룹의 전부 또는 일부(들) (Childers M. 등 (2014) Sci Transl Med. 6(220): 220ra210) 또는 하기에 의해 기재된 바와 같이 표적화된 근육 그룹을 자극시키는 운동 신경의 모두 또는 일부: Towne 등 (Towne C. 등 (2010) Gene Therapy 17(1): 141-6). 어느 한쪽 근육 또는 뉴런의 세포의 표적화는 사용된 벡터의 유형 (예를 들면, AAV 벡터 하위유형의 유형), 뿐만 아니라 발현 카세트에서 포함된 프로모터의 유형에 기반하여 결정될 것이다.

[0105] 경직을 치료하기 위해 본 명세서에서 기재된 벡터의 능력은 다양한 동물 모델에서 시험될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터는 선택된 근육 그룹에 주사될 수 있고 4-6 주의 기간후 신경 자극에 반응하여 근육의 기능은 하기 어느 한쪽으로 측정될 수 있다: 전체의 동물에서 (Fertuck HC. 등 (1775) J Cell Biol. 66, 209-13) 또는 표적화된 근육 및 그것의 관련된 운동 신경을 제거 및 시험관내 전기 신경 자극에 대한 반응 측정에 의해 (Franco JA. (2014) J. Vis. Exp. (91), e51948, doi: 10.3791/51948).

[0106] 특정 구현예에서, 벡터는 경직을 치료하기 위한 운동 신경을 표적화하도록 설계된다. 그와 같은 상황에서, 벡터는 하기일 수 있다: AAV 벡터 (예를 들면, AAV6 또는 AAV2). 특정 구현예에서, 벡터는 AAV6 벡터이다. 특정 구현예에서, 벡터는, 발현 카세트가 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산 및 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함한다. 특정 구현예에서, 프로모터는 인간 시냅신 (hSyn) 프로모터이다. 특정 구현예에서, 핵산은 GlyR 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩한다. 특정 구현예에서, 서브유닛은 서브유닛의 다량체화시 항상적 활성 GlyR 채널을 초래하는 적어도 1종의 돌연변이를 포함하는 GlyR 서브유닛이다.

[0107] 특정 구현예에서, 벡터는 경직을 치료하기 위해 골격 근육 세포를 표적화하도록 설계된다. 그와 같은 상황에서, 벡터는 AAV 벡터일 수 있다. 특정 구현예에서, 벡터는 AAV8 벡터이다. 특정 구현예에서, 벡터는 AAV9 벡터이다. 특정 구현예에서, 벡터는, 발현 카세트가 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산 및 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함한다. 특정 구현예에서, 프로모터는 인간 사이토메갈로바이러스 ("CMV") 프로모터이다. 특정 구현예에서, 프로모터는 닭 베타-액틴 ("CBA") 프로모터이다. 특정 구현예에서, 프로모터

는 CAG 또는 근육-특이적 데스민 프로모터이다. 특정 구현예에서, 핵산은 GlyR 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩한다. 특정 구현예에서, 서브유닛은 서브유닛의 다량체화시 항상적 활성 GlyR 채널을 초래하는 적어도 1종의 돌연변이를 포함하는 GlyR 서브유닛이다. 특정 구현예에서, 벡터는, 발현 카셋트를 포함하는, AAV8 벡터이고, 여기서 상기 발현 카셋트는 GlyR의 서브유닛을 인코딩하는 핵산 및 근육-특이적 데스민 프로모터를 포함하고, 여기서 상기 GlyR 서브유닛은 서브유닛의 다량체화시 항상적 활성 GlyR 채널을 초래하는 적어도 1종의 돌연변이를 포함한다.

[0108] 발현 카셋트

[0109] 본 명세서에서 기재된 바와 같이 벡터는 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 상기 벡터는, 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는, 발현 카셋트를 포함할 수 있다.

[0110] 특정 구현예에서, 발현 카셋트는 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 상기 서브유닛은 활성 이온 채널을 (예를 들면, 다량체화에 의해) 형성할 수 있다. 특정 구현예에서, 서브유닛은 1종 이상의 추가의 서브유닛으로 다량체화에 의해 활성 이온 채널을 형성한다. 특정 구현예에서, 1종 이상의 추가의 서브유닛은 내인성으로 발현된다. 특정 구현예에서, 1종 이상의 추가의 서브유닛은 재조합으로 발현된다. 특정 구현예에서, 다량체성 이온 채널은 호모머성이다. 특정 구현예에서, 다량체성 이온 채널은 헤테로머성이다.

[0111] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 “다량체성”은, 동일 (호모머성) 또는 상이 (헤테로머성)할 수 있는, 다중 서브유닛을 포함하는 이온 채널을 지칭한다. 다량체성 이온 채널의 특이적 유형, 뿐만 아니라 그들의 다양한 서브유닛 및 형태는 아래 논의된다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 “다량체화”는, 기능성 이온 채널을 형성하기 위해 회합하는, 동일 또는 상이할 수 있고 내인성 또는 재조합으로 발현될 수 있는, 서브유닛을 지칭한다.

[0112] 특정 구현예에서, 이온 채널은 클로라이드 채널이고/클로라이드 채널 (예를 들면, 선택적 클로라이드 채널)로서 기능한다. 따라서, 특정 구현예에서, 핵산은 다량체성 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩한다.

[0113] 특정 구현예에서, 이온 채널은 칼륨 채널이고/칼륨 채널 (예를 들면, 선택적 칼륨 채널)로서 기능한다. 따라서, 특정 구현예에서, 핵산은 다량체성 칼륨 채널의 서브유닛을 인코딩한다.

[0114] 이온 채널 및 이의 서브유닛

[0115] 본 발명의 방법은 본 명세서에서 기재된 바와 같이 벡터를 이용할 수 있다. 상기 벡터는, 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는, 발현 카셋트를 포함할 수 있다. 예를 들어, 이들 벡터는 포유동물에서 특정한 세포 (들)에 다량체성 이온 채널 발현을 표적하기 위해 사용될 수 있고, 이로써 세포(들) (예를 들면, 흥분성 세포 (들))의 전기생리학적 활성을 조절한다. 예를 들어, 상기 조절은 생리적 효과 (예를 들면, 통증을 경감시키는 위한 감각 뉴런의 전도도 변화)를 초래할 수 있다.

[0116] 아래 표 1은 Cys-루프 수용체 (즉, 다량체성 이온 채널), 그들의 서브유닛 및 그들의 리간드의 비제한 목록을 포함한다. 이들 이온 채널/서브유닛은 본 명세서에서 기재된 방법에서 사용될 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 이온 채널은 아래 표 1에서 기재된 적어도 1종의 서브유닛을 포함한다. 따라서, 특정 구현예에서, 발현 카셋트는 표 1에서 기재된 서브유닛으로부터 선택된 서브유닛을 인코딩하는 핵산을 포함한다.

[0117] 특정 구현예에서, 다량체성 이온 채널은 글리신 수용체 (GlyR)이다. 특정 구현예에서, 인코딩된 서브유닛은 GlyR의 알파-1 서브유닛, 알파-2 서브유닛, 및 알파-3 서브유닛, 알파-4 서브유닛 및 베타-서브유닛으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, GlyR 서브유닛은, 동일 또는 상이할 수 있고 내인성으로 또는 재조합으로 발현될 수 있는, 1종 이상의 추가의 서브유닛으로 다량체할 수 있다. 특정 구현예에서, 인코딩된 서브유닛은 GlyR (GlyRa1)의 알파-1-서브유닛이다. 특정 구현예에서, GlyRa1은 인간 GlyRa1 (hGlyRa1)이다. GlyR 서브유닛은 당해 기술에 공지되어 있고; 다양한 GlyR 서브유닛 서열, 뿐만 아니라 특이적 GlyR 서브유닛 서열용 수탁 번호는 아래 포함된다.

[0118] 특정 구현예에서, 다량체성 이온 채널은 γ -아미노부티르산 수용체 (GABA_AR)이다. 특정 구현예에서, 다량체성 이온 채널은 GABA_{A-p} 수용체 (GABA_C)이다. 특정 구현예에서, 인코딩된 서브유닛은 하기로 구성되는 군으로부터 선택된다: GABRA1 (α_1), GABRA2 (α_2), GABRA3 (α_3), GABRA4 (α_4), GABRA5 (α_5), GABRA6 (α_6), GABRB1 (β_1), GABRB1 (β_2), GABRB1 (β_3), GABRG1 (γ_1), GABRG2 (γ_2), GABRG3 (γ_3), GABRD (δ), GABRE (ϵ), GABRP (π), GABRQ (θ), GABRR1 (ρ_1), GABRR2 (ρ_2) 및 GABRR3 (ρ_3).). GABA_AR 서브유닛은 당해 기술에 공지되어 있

고; 다양한 인간 GABA_AR 서브유닛 서열용 수탁 번호 는 하기를 포함한다: GABRA1 (NM_000806), GABRA2 (NM_000807), GABRA3 (NM_000808), GABRA4 (NM_000809), GABRA5 (NM_000810), GABRA6 (NM_000811), GABRB1 (NM_000812), GABRB2 (NM_021911), GABRB3 (NM_000814), GABRG1 (NM_173536), GABRG2 (NM_198904), GABRG3 (NM_033223), GABRD (NM_000815), GABRE (NM_004961), GABRP (NM_014211), GABRQ (NM_018558), GABRR1 (NM_002042), GABRR2 (NM_002043) 및 GABRR3 (NM_001105580).

[0119] 특정 구현예에서, 다량체성 이온 채널은 글루타메이트-게이팅된 클로라이드 채널 (GluCl)이다. 특정 구현예에서, 인코딩된 서브유닛은 하기로 구성되는 군으로부터 선택된다: α_1 , α_{2A} , α_{2B} , GBR2A (α_{3A}), GBR2B (α_{3B}) 및 β . 상기 논의된 바와 같이, GluCl 단백질은 포유동물에서 발현되지 않고 면역-특권화되지 않은 조직에서 면역 반응을 유발시킬 수 있다. 그러므로, 본 발명의 특정 방법에서, 발현 카세트가 GluCl의 서브유닛을 인코딩하는 핵산을 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터는, 비제한적으로, (뇌 및 척수를 포함하는) 중추신경계 및 눈을 포함하는, 면역 특권화된 세포에 표적화될 수 있다. GluCl 서브유닛은 당해 기술에 공지되어 있고; 다양한 GluCl 서브유닛 서열용 수탁 번호 는 하기를 포함한다: GluCl 알파 (AY195802.1) 및 GluCl 베타 (AY195803.1).

[0120] 특정 구현예에서, 서브유닛은 적어도 1종의 돌연변이 (즉, 뮤테인 서브유닛; 예를 들면, 대응하는 야생형 서브유닛에 비교된 경우)를 포함한다. 특정 구현예에서, 인코딩된 서브유닛은 대응하는 야생형 서브유닛에 약 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.

[0121] “야생형” 또는 “자연 발생” 또는 “원상태”는 임의의 공지된 돌연변이 없이 자연에서 발견된 정상 유전자, 단백질 또는 유기체를 지칭한다. 따라서, “야생형 서브유닛”은 임의의 공지된 돌연변이 없이 자연에서 발견된 정상 서브유닛을 지칭한다. 대응하는 서브유닛은 동일한 유형 및 종의 서브유닛을 지칭할 것이고, 예를 들면, 돌연변이체 hGlyRa1은 야생형 hGlyRa1에 비교된다.

[0122] 특정 구현예에서, 서브유닛은 (예를 들면, 대응하는 야생형 이온 채널에 비교된 경우) 이온 채널의 향상된 효능제 감수성을 초래하는 적어도 1종의 돌연변이를 포함한다.

[0123] 특정 구현예에서, 이온 채널은 내인성 효능제/리간드에 의해 활성화될 수 있다.

[0124] 특정 구현예에서, 인코딩된 서브유닛은 서브유닛의 다량체화시 항상적 활성 이온 채널을 초래하는 적어도 1종의 돌연변이를 포함한다. 상기 항상적 활성 이온 채널은 추가로 상세히 아래 논의된다.

표 1.

수용체/채널	서브유닛	리간드
글리신 수용체 (GlyR)	α_{1-4} , β <ul style="list-style-type: none"> GLRA1 (α_1) GLRA2 (α_2) GLRA3 (α_3) GLRA4 (α_4) β 	β -알라닌 D-알라닌 D-세린 글리신 하이포타우린 L-알라닌 L-프롤린 L-세린 밀라세미드 퀴이스쿠알라민 사르코신 타우린
γ -아미노부티르산 수용체 (GABA _A R) GABA _{A-p} 수용체 (GABA _C)	α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , π , θ , ρ_{1-3} <ul style="list-style-type: none"> GABRA1 (α_1) GABRA2 (α_2) GABRA3 (α_3) GABRA4 (α_4) GABRA5 (α_5) GABRA6 (α_6) GABRB1 (β_1) GABRB1 (β_2) GABRB1 (β_3) GABRG1 (γ_1) GABRG2 (γ_2) GABRG3 (γ_3) GABRD (δ) GABRE (ϵ) GABRP (π) GABRQ (θ) GABRR1 (ρ_1) GABRR2 (ρ_2) GABRR3 (ρ_3) 	γ -아미노부티르산
글루타메이트-게이팅된 클로라이드 채널 (GluCl)	α_{1-3} , β <ul style="list-style-type: none"> α_1 α_{2A} α_{2B} GBR2A (α_{3A}) GBR2B (α_{3B}) β 	글루탐산

표 1. Cys-루프의 구성원은 이온 채널 및 그들의 각각의 서브유닛 및 그들의 아미노산 리간드를 리간드-게이팅하였다. 열거된 채널은 Cys-루프 리간드-게이팅된 이온 채널의 클로라이드-선택적 구성원이다. GlyR의 성체 형태는, 3 α_1 서브유닛 및 2 β -서브유닛 또는 4

α_1 -서브유닛 및 1 β -서브유닛의 화학양론을 갖는다고 여겨지는, 헤테로머 $\alpha_1\beta$ 수용체이다. 5 서브유닛은 GABA_A 채널을 형성하기 위해 상이한 방식으로 조합할 수 있다. GABA-게이팅된 이온 채널을 생산하기 위한 최소 요건은 양쪽 α - 및 β -서브유닛의 포함이지만, 뇌에서 가장 흔한 유형은 2 α , 2 β , 및 1 γ ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$)를 포함하는 오량체이다. GluCl 채널은 α - 및 β -서브유닛으로 구성된 오량체 구조이다. α - 및 β -서브유닛의 비는 고정되지 않지만 일반적으로 상보적 3 또는 2 β -서브유닛과 2 또는 3 α -서브유닛으로, 각각 구성된다. GlyR 및 GluCl의 경우에서 α -서브유닛은 포유류 세포주에서 기능성 호모-오량체 수용체를 형성할 수 있다.

글리신 수용체 (GlyR)

GlyR은 중추신경계 (CNS)에서 빠른 신경전달을 매개하는 리간드-게이팅된 이온요구성 수용체의 니코티니노이드 상과의 구성원이다. GlyR의 경우에서, 글리신 (약 100 μ M의 EC₅₀) 또는 다른 효능제의 결합은 상기 음이온-선택적 채널의 일시적 게이팅을 유발시킨다. 성체에서, GlyR은 2 α 서브유닛 및 3 β 서브유닛의 화학양론을 전형

적으로 갖는 것으로 여겨진다 (Rajendra S. 등 (1997). *Pharmacol Ther.* 73(2): 121-46). 단지 인간 $\alpha 1$ 서브유닛의 이중성 발현은, 하지만, 원상태 채널의 것과 본질적으로 동일한 약리적 특성을 가진 활성 글리신-게이팅된 채널을 재구성하기에 충분하다 (Sontheimer H. 등 (1989) *Neuron* 2(5): 1491-1497; Jensen AA. 및 Kristiansen U. (2004) *Biochemical Pharmacology* 67(9): 1789-1799). 따라서, 본 발명의 방법에서 사용을 위하여, GlyR 단백질은 GlyR의 야생형 서브유닛 (예를 들면, 알파1, 알파2, 알파3, 알파4, 또는 베타)일 수 있다. 특정 구현예에서, GlyR 서브유닛은 포유류 GlyR 서브유닛일 수 있다. 특정 구현예에서, GlyR 서브유닛은 대응하는 야생형 GlyR 서브유닛에 비교된 경우 1종 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다 (즉, 핵산은 GlyR 서브유닛의 뮤테인을 인코딩할 수 있다). GlyR 단백질은 양호하게 특성규명되고 (Rajendra S. 등 (1997). *Pharmacol Ther.* 73(2): 121-46) 그리고 포유류 종으로부터 많은 서브유닛을 인코딩하는 서열은 유전적 데이터베이스에서 색인화되거나 달리 이용가능하다. 예를 들어, GlyR의 알파1 서브유닛에 관한 서열은 하기에서 발견될 수 있다: NCBI 수탁 번호 NM-000171 (인간), NM-020492 (마우스) 및 NM-013133 (랫트). GlyR의 알파2 서브유닛에 관한 서열은 하기에서 발견될 수 있다: NCBI 수탁 번호 NM-002063 (인간), CR450343 (cDNA) (인간), NM-183427 (마우스), 및 NM-012568 (랫트). GlyR의 알파3 서브유닛에 관한 서열은 하기에서 발견될 수 있다: NCBI 수탁 번호 NM-006529 (인간), NM-001042543 (인간), BC036086 (인간), NM-080438 (마우스), AY230204 (마우스), AF362764 (마우스), 및 NM-053724 (랫트). GlyR의 알파4 서브유닛에 관한 서열은 하기에서 발견될 수 있다: NCBI 수탁 번호 NM-010297 (마우스), 및 BC110630 (마우스). GlyR의 베타 서브유닛에 관한 서열은 하기에서 발견될 수 있다: NCBI 수탁 번호 NM-000824 (인간), NM-010298 (마우스), 및 NM-053296 (랫트).

[0129] 야생형 GlyR 서브유닛에 더하여, 변경된 활성을 가진 GlyR 서브유닛의 돌연변이체 (뮤테인)은 또한 공지되고, 본 발명의 문맥에서 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 핵산은 대응하는 야생형 GlyR 서브유닛 (즉, 뮤테인 GlyR 서브유닛)에 비교된 경우 1종 이상의 돌연변이를 포함하는 GlyR 서브유닛을 인코딩할 수 있다. 예를 들어, GlyR 단백질의 특정 뮤테인은 변경된 이온-채널 특성을 초래, 예컨대 하기를 초래한다: 양이온성 이온 채널 (예를 들면, $\Delta 250$ A251E: Keramidas A. 등 (2002) *J.Gen.Physiol.* 119, 393-410). 하기가 부족한 다른 뮤테인은 공지된다: 아연 강화작용 또는 아연 억제용 부위 (Hirzel K. 등 (2006) *Neuron* 52: 679-690) 알로스테릭 조절제에 대한 친화성 (예를 들면, 마취제 강화작용 (Hemmings HC. 등 (2005) *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 503-10), 또는 리간드에 대한 친화성 (Rajendra S. 등, (1995) *Neuron* 14, 169-175; Schnrieden V. 등 (1993) *Science* 262, 256-258). GlyR 서브유닛의 돌연변이는 또한 이온 침투 (예를 들면, 음이온성- 또는 양이온성-선택적 채널)을 선택적으로 변경시킬 수 있고, 특유의 약리학적 체제를 인식하기 위해 수용체 서브유닛의 리간드 결합 포켓을 재설계할 수 있다. 예를 들어, 특정한 리간드에 대하여 GlyR 단백질의 감수성 및 선택성을 변경하기 위해, 점 돌연변이는 용량 반응 곡선을 좌측 또는 우측 (즉, 글리신에 덜 또는 더 특이적)으로 이동하도록 기대되는 GlyR $\alpha 1$ 서브유닛에서 실시될 수 있다.

[0130] 하기의 돌연변이체 형태는: 서브유닛 (예를 들면, GlyR) 당해 분야에 공지된 임의의 적당한 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 상기 방법은, 예를 들어, 하기를 포함한다: 부위 지향적 돌연변이유발, PCR에 의한 랜덤 돌연변이유발, DNA의 링커-스캐닝 돌연변이유발, 및 화학적 돌연변이유발 (참고, 예를 들면, Ausubel 등, eds., *Short Protocols in Molecular Biology*, 5th Ed., John Wiley & Sons, Inc. (2002)).

[0131] 본 명세서에서 기재된 벡터로부터 표적 세포에서 일단 발현되면, GlyR 서브유닛은 세포 (예를 들면, 흥분성 세포)의 표면에서 채널을 형성하기 위해 다량체화할 수 있다. 이들 채널은 글리신 (내인성 글리신)을 주변에 순환 시킴으로써 활성화될 수 있다. 글리신의 혈액 농도는 대략 230 - 330 μM 인 것으로 보고되었다. 구체적으로, 정상 성체 숫컷에서 242.0 \pm 44.0 μM 및 정상 성체 암컷에서 258.0 \pm 64.0 μM (Geigy Scientific Tables, 8th Rev edition, pp.93. Edited by C. Lentner, West Cadwell, N.J.: Medical education Div., Ciba-Geigy Corp. Basel, Switzerland c1981-1992); 양쪽 성별의 정상 성체에서 329.9 \pm 105.6 μM (Psychogios N. 등 (2011) *PLoS One* 6(2): e16957); 정상 성체 숫컷에서 212.4 \pm 57.4 μM (Grant SL. 등 (2006) *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 844(2): 278-82); 양쪽 성별의 정상 성체에서 230.0 μM (178.0 - 282.0 μM) (Cynober LA. (2002) *Nutrition* 18(9): 761-6); 양쪽 성별의 정상 성체에서 325.4 \pm 126.8 μM (Psychogios N. 등 (2011) *PLoS One* 6(2): e16957).

[0132] 뉴런의 구심성이 글리신 수용체의 알파-서브유닛으로 형질감염되었다면, 뉴런의 세포의 생리학이, 하기에 기반된, 내인성 글리신에 의해 활성화된 글리신 수용체를 통해 Cl^- 의 유입으로 인해 막 전위에서 변화의 덕으로 변경될 수 있다는 것이 상상될 수 있다: 1) 인간 혈액에서 보고된 글리신의 초과 수준; 2) 관절염 관절에서 글리신

의 수준이 혈액의 것에 대략 2-배인 관찰 (McNearney T. 및 Westlund K. (2013) Int J Clin Exp Pathol. 6(3): 492-497); 및 3) GlyR의 글리신-감수성이 α -서브유닛 ($ED_{50} = 85$ 내지 $100 \mu M$)만의 발현에 의해 형성하였던 관찰 (Sontheimer H. 등 (1989) Neuron 2(5): 1491-1497; Jensen AA. 및 Kristiansen U. (2004) Biochemical Pharmacology 67(9): 1789-1799).

[0133] 항상적 활성 이온 채널

[0134] 상기 논의된 바와 같이, 특정 구현예에서, 다량체성 이온 채널은 항상적 활성 이온 채널 (예를 들면, 항상적 활성 GlyR 또는 GluCl)일 수 있다. 따라서, 항상적 활성 이온 채널은 (예를 들면, 흥분성 세포의 활성을 조절하기 위해 그리고 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태, 예컨대 만성 통증, 안구 고혈압 또는 경직을 치료하기 위해) 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다.

[0135] 따라서, 본 발명의 특정 구현예에서, 발현 카세트는 다량체성 이온 채널 (예를 들면, 단량체성 또는 헤테로머 이온 채널)의 서브유닛을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 상기 서브유닛은 서브유닛의 다량체화시 항상적 활성 이온 채널을 초래하는 적어도 1종의 돌연변이 (즉, 뮤테인 서브유닛)을 포함한다. 특정 구현예에서, 항상적으로 활성 이온 채널은 클로라이드 채널로서 기능한다. 특정 구현예에서, 항상적으로 활성 이온 채널은 칼륨 채널로서 기능한다.

[0136] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 “항상적 활성 이온 채널”은 계속해서 활성화되는 그리고 (예를 들면, 화학적 또는 생물학적) 효능제 또는 물리적 활성제 (예를 들면, 압력, 열 또는 광) 또는 활성화되도록 세포의 전기생리학적(electrophysiological) 상태에 노출될 필요가 없는 이온 채널을 지칭한다. 이온 채널의 활성을 측정하기 위한 검정은 당해 기술에 공지되어 있다. 특정 구현예에서, 실시예에서 기재된 검정은 이온 채널이 항상적으로 활성화되는지를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 항상적 활성 이온 채널을 이용하는 상기 구현예에서, 효능제 또는 알로스테릭 조절제는 포유동물에 투여되지 않을 것이다.

[0137] 비제한 예로써 *카에노르하브디티스 엘레강스* 글루타메이트-게이팅된 클로라이드 채널 (GluCl)의 특정 돌연변이는 항상적 활성 또는 누출성인 것으로 밝혀졌다. 이의 일부가 표 2에 열거되는, 이들 돌연변이 그리고 도 1에 기재된 그들의 활성은 세포 막에서 발현된 경우 클로라이드 이온에 의해 운반된 기저 전도도로 이어진다.

표 2

GluCl 채널에서 α 서브유닛의 M2 도메인에서 류신 9' 잔기의 돌연변이	류신으로 치환된 아미노산	자발적인 활성
없음 (WT)	없음	0
L9'I	이소류신	+ 무의미한
L9'F	페닐알라닌	0
L9'V	발린	+ 무의미한
L9'A	알라닌	++ 유의미한
L9'G	글리신	++ 유의미한
L9'S	세린	0
L9'T	트레오닌	+ 무의미한

표 2. GluCl 채널에서 α -서브유닛의 M2 도메인에서 류신 9'잔기의, 최소 측쇄를 가진 아미노산 (알라닌 또는 글리신)으로의 치환은 WT 수용체로부터 상당히 상이하였던 최대 배경 전도도를 갖는 항상적으로 개방 채널을 생성하였다. β -분지형 측쇄를 가진 3 L9' 돌연변이체 (이소류신, 발린 또는 트레오닌)은 평균적으로 WT 수용체보다 더 큰 배경 전도도를 갖지만, 증가는 샘플링된 세포의 수에 대하여 통계적으로 유의미하지 않았다.

[0138]

[0139] 항상적 활성 클로라이드 채널이 흥분성 세포의 전기 활성을 조절하기 위해 본 발명의 방법에서 이용되는 구현예에서, 비제한 예로써, 변형된 글루타메이트-게이팅된 클로라이드 (GluCl) 채널은 사용될 수 있다. GluCl 클로라이드 전류는 전통적 신경전달물질 글루타메이트 및 세미-합성 항-구충 약물 이버멕틴 (IVM)에 의해 게이팅된다. 변형된 호모머성 GluCl 채널의 3.3 Å-해상도 결정 구조는 각각의 이들 효능제에 대하여 결합 부위 위치를 드러낸다 (도 2A, 2B). 글루타메이트는 2 서브유닛의 계면에 세포외 도메인에서 위치한 고전적 신경전달물질 결합

부위에 결합한다. 이버택틴은, 막관통 나선의 상부 주변에서 삽입하는, 분리된, 비전통 부위에 또한 2 인접한 서브유닛의 계면에 삽입한다. 채널의 구조적 배위는 명확히 정의된 기공-라이닝 잔기의 측쇄를 가진 개방-기공 형태를 나타낸다 (도 2C, 2D). 하나의 기공-라이닝 잔기, 류신 9' (L9')는 M2 막관통 도메인의 중간에서 거주한다. L9'는 Cys-루프 수용체 계열의 서브유닛 중에서 고도로 보존되고 소수성 채널 게이트로서 작용하도록 제한되어 왔다 (도 2E, 2F) (Unwin N. (1993) J Mol Biol.229: 1101-1124; Miyazawa A. 등 (2003) Nature 423: 949-955; Beckstein O. 및 Sansom MS. (2006) Phys Biol.3: 147-159).

[0140] GluCl 채널에서 α -서브유닛의 M2 도메인에서 고도로 보존된 류신 9' 잔기는 각각의 7 다른 잔기, L9' I, F, V, A, G, S, T로 돌연변이되었다 (이로써 L9' 류신 잔기는 이소류신, 페닐알라닌, 발린, 알라닌, 글리신, 세린 또는 트레오닌, 각각으로 치환되었다) (참고 표 2). 형질감염된 HEK293 세포는 용량성 보상 없이 전체의-세포 배치구성에서 전압 고정되었다. 전압은 리간드의 부재 하에 50 ms에 걸쳐 60 mV에서 +60 mV로 계속해서 급등되었다. WT 전류 반응의 예는 도 1A에서 보여진다. 배경 전도는 저항성 전류 램프의 기울기로부터 측정되었고, 용량성 전류 상쇄로부터 계산될 수 있는, 각각의 수용체의 평균 막 커패시턴스에 의해 정규화되었다. GluCl WT 및 WT-XFP 수용체는 모의-형질감염된 대조군과 상이하지 않았던 최소 배경 전도를 보여주었다 (도 1B). 최소 측쇄를 가진 2 L9' 돌연변이, L9' A 및 L9' G는 WT 수용체와 상당히 상이하였던 최대 배경 전도를 가졌다. (Frazier SJ. (2012) Optimization of the GluCl/IVM Neuronal Silencing Tool via Protein Engineering.PhD Thesis, California Institute of Technology).

[0141] 상기에 기재된 바와 같이 L9'에서 아미노산 치환에 의해 자발적인 채널 활성 또는 항상적으로 개방 채널 또는 Cl^- 기공을 가진 채널로 야생형 GluCl 채널의 전환의 예는 예시적인 구현예로서 의미된다. 유사한 변형은 Cys-루프 수용체 계열에서 임의의 채널, 및 특히 글리신 수용체 (GlyR) 클로라이드 채널, GABA_A 및 GABA_C 수용체, 그러나 더욱 일반적으로 임의의 생물학적 유기체로부터 임의의 이온 채널을 전환시키도록 설계 및 시험될 수 있다. 항상적으로 활성 채널을 초래하는, 클로라이드 채널의 자발적인 개방을 초래하는 것으로 나타난 GABA_A 및 GABA_C 수용체의 α , β , γ 및 ρ -서브유닛의 보존된 아미노산의 일부로 돌연변이의 특이적 예는 표 3에 기재된다.

표 3

수용체	서브유닛	돌연변이	참고
GABA _A	β	L259S	Thompson 등, 1999
GABA _C	ρ	T314A	Pan 등, 1997
GABA _C	ρ	L317A	Pan 등, 1997
GABA _C	ρ	L301A	Chang 및 Weiss.1998
GABA _C	ρ	L301G	Chang 및 Weiss, 1998
GABA _C	ρ	L301S	Chang 및 Weiss, 1998
GABA _C	ρ	L301T	Chang 및 Weiss, 1998
GABA _C	ρ	L301V	Chang 및 Weiss, 1998
GABA _C	ρ	L301Y	Chang 및 Weiss, 1998
GABA _A	α	L263S	Chang 및 Weiss, 1999
GABA _A	β	L259S	Chang 및 Weiss, 1999
GABA _A	γ	L274S	Chang 및 Weiss, 1999

표 3. 항상적 활성 클로라이드 채널을 초래하는 GABA_A 및 GABA_C 수용체의 증가된 자발적인 활성을 초래하는 것으로 문서화된 채널 기공 내에 류신 및 티로신 잔기로 돌연변이. (Chang Y. 및 Weiss DS. (1999) Biophys J.77:2542-2551; Thompson SA. 등(1999) Br J Pharmacol.127:1349-1358; Chang Y. 및 Weiss DS. (1998) Mol Pharmacol.53:511-523; Pan ZH. 등(1997) Proc Natl Acad Sci USA 94:6490-6495).

[0142]

[0143] 따라서, 특정 구현예에서, 항상적 활성 이온 채널은 항상적 활성 GluCl 이온 채널이다. 특정 구현예에서, 서브유닛은 α -서브유닛이고, 여기서 상기 α -서브유닛은 항상적 활성 GluCl 이온 채널을 형성하기 위해 다량체화할

수 있다. 특정 구현예에서, 서브유닛은 표 2에 기재된 바와 같이 서브유닛의 M2 도메인에서 적어도 1종의 돌연변이를 포함한다. 특정 구현예에서, 적어도 1종의 돌연변이는 표 2에 기재된 바와 같이 L9' A 또는 L9' G이다.

[0144] 특정 구현예에서, 항상적 활성 이온 채널은 항상적 활성 GlyR이다. 특정 구현예에서, 서브유닛은 α -서브유닛 (예를 들면, 알파-1)이고, 여기서 상기 α -서브유닛은 항상적 활성 GlyR 이온 채널을 형성하기 위해 다량체화할 수 있다. 특정 구현예에서, 서브유닛은 표 2에 기재된 바와 같이 서브유닛의 M2 도메인에서 적어도 1종의 돌연변이를 포함한다. 특정 구현예에서, 적어도 1종의 돌연변이는 표 2에 기재된 바와 같이 L9' A 또는 L9' G이다.

[0145] 특정 구현예에서, 항상적 활성 이온 채널은 항상적 활성 GABA_A 수용체이다. 특정 구현예에서, 항상적 활성 이온 채널은 항상적 활성 GABA_C 수용체이다. 특정 구현예에서 서브유닛은 α -, β - 또는 γ -서브유닛이고, 여기서 상기 α -, β - 또는 γ -서브유닛은 항상적 활성 GABA_A 수용체를 형성하기 위해 다량체화할 수 있다. 특정 구현예에서, 서브유닛은 ρ -서브유닛이고, 여기서 상기 ρ -서브유닛은 항상적 활성 GABA_C 수용체를 형성하기 위해 다량체화할 수 있다. 특정 구현예에서, 서브유닛은 표 3에 기재된 바와 같이 적어도 1종의 돌연변이를 포함한다. 따라서, 특정 구현예에서, 인코딩된 서브유닛은 하기이다: 하기에서 적어도 1종의 돌연변이를 가진 GABA_A α -서브유닛: L263 (예를 들면, L263S), 하기에서 적어도 1종의 돌연변이를 가진 GABA_A β -서브유닛: L259 (예를 들면, L259S), 하기에서 적어도 1종의 돌연변이를 가진 GABA_A γ -서브유닛: L274 (예를 들면, L274S) 또는 하기에서 적어도 1종의 돌연변이를 가진 GABA_C ρ -서브유닛: T314 (예를 들면, T314A), L317 (예를 들면, L317A) 또는 L301 (예를 들면, L301A, L301G, L301S, L301T, L301V, L301Y). 추가적으로, 대응하는 돌연변이는 또한 이온 채널의 다른 유형으로부터 서브유닛으로 제조될 수 있고; 상기 대응하는 아미노산은 서열 정렬 프로그램을 이용하여 당해 분야의 숙련가에 의해 확인될 수 있다.

[0146] 프로모터

[0147] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 발현 카세트는 추가로 프로모터를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 프로모터는 핵산에 작동가능하게 연결된다. 프로모터는 세포의 표적화된 세트 이내 이온 채널 서브유닛의 발현을 구동시키기 위해 선택될 수 있다. 이것은 표적화된 조직에 특이성을 부여할 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 프로모터는 조직 특이적 프로모터이다.

[0148] 예를 들어, 표적화된 세포 유형이 뉴런성이면, 통증 (감각 뉴런) 또는 경직 (운동 뉴런)의 치료용 사례에서와 같이, 선택된 프로모터는 팬-뉴런의 인간 시냅신-1 프로모터 (Syn1, 또는 hSyn)일 수 있다 (Iyer SM. 등 (2014) Nature Biotechnology 32(3): 274-278). 대안적으로, 도처에 존재하는 프로모터, 예컨대 인간 사이토메갈로바이러스 ("CMV") 프로모터 또는 닭 베타-액틴 ("CBA") 프로모터는 이용될 수 있고, 이들 각각은 신경 특이적이지 않고, 각각의 이들은 신경퇴행성 질환용 유전자 요법 시험에서 안전하게 이용되었다.

[0149] 경직의 치료를 위하여 골격근 세포 표적화 경우, 인간 사이토메갈로바이러스 ("CMV") 프로모터, 닭 베타-액틴 ("CBA") 프로모터 또는 근육-특이적 데스민 프로모터는, 예를 들어, 사용될 수 있다 (Childers M. 등 (2014) Sci Transl Med. 6(220): 220ra210; Falk DJ. 등 (2015) Molecular Therapy — Methods & Clinical Development 2: 15007).

[0150] 안구 고혈압의 치료를 위하여 섬유 주대 (TM) 표적화 경우, 유출 경로의 TM 세포에 AAV-매개된 유전자를 통한 표적화된 유전자 발현은 매트릭스 Gla 단백질 (MGP) 유전자로부터 프로모터 단편을 이용하여 이전에 실증되었다 (Gonzalez P. 등 (2004) Invest Ophthalmol Vis Sci. 45: 1389-1395). 선택적 표적화는, TM의 최외부 전측 및 후측 영역에 구체적으로 지향된 발현으로, 키티나제 3-유사 1 (Ch3L1) 유전자의 5' 프로모터 영역을 이용하여 또한 달성되었다 (Liton PB. 등 (2005) Invest Ophthalmol Vis Sci. 46: 183-190). 추가로, 섬유 주대 세포-선택적 프로모터에 추가의 대안적인 배치구성을 제공하는, 섬유 주대의 수많은 유전자 프로파일링 연구는 공개되었다 (Gonzalez P. 등, (2000) Invest Ophthalmol Vis Sci. 41: 3678-3693; Wirtz, 등 (2002) Invest Ophthalmol Vis Sci. 43: 3698-3704; Tomarev, 등 (2003) Invest Ophthalmol Vis Sci. 44: 2588-2596; Liton, 등 (2006) Mol Vis. 12: 774-790; Fan, 등 (2008) Invest Ophthalmol Vis Sci. 49: 1886-1897; Fuchshofer, 등 (2009) Exp Eye Res. 88: 1020-1032; Paylakhi, 등 (2012) Mol Vis. 18: 241-254; Liu, 등 (2013) Invest Ophthalmol Vis Sci. 54: 6382-6389).

[0151] 따라서, 특정 구현예에서, 프로모터는 본 명세서에서 기재된 바와 같이 임의의 프로모터일 수 있다. 특정 구현예에서, 프로모터는 조절가능 프로모터이다. 특정 구현예에서, 프로모터는 항상적 프로모터이다.

- [0152] 특정 구현예에서, 프로모터는 하기로 구성되는 군으로부터 선택된다: 인간 시냅신-1 프로모터 (Syn1, 또는 hSyn), 인간 사이토메갈로바이러스 (“CMV”) 프로모터, 닭 베타-액틴 (“CBA”) 프로모터, 근육-특이적 테스민 프로모터, 매트릭스 Gla 단백질 (MGP) 프로모터 또는 이의 단편 그리고 키티나제 3-유사 1 (Ch3L1) 유전자의 5' 프로모터 영역.
- [0153] 특정 구현예에서, 프로모터는 이온 채널/서브유닛의 발현을 특정한 세포 유형으로 제한하도록 설계된 선택적 프로모터이다. 따라서, 특정 구현예에서, 프로모터는 이온 채널/서브유닛 (예를 들면, 항상적 활성 이온 채널)의 발현을 안방수의 배출과 관련된 섬유 주대의 세포 및/또는 다른 세포로 제한하도록 설계된 선택적 프로모터이다. 특정 구현예에서, 프로모터는 이온 채널/서브유닛 (예를 들면, 항상적 활성 이온 채널)의 발현을 뉴런의 세포 (예를 들면, 인간 시냅신 프로모터 (hSyn))로 제한하도록 설계된 선택적 프로모터이다. 특정 구현예에서, 프로모터는 이온 채널/서브유닛 (예를 들면, 항상적 활성 이온 채널)의 발현을 근육 세포 (예를 들면, 테스민 프로모터)로 제한하도록 설계된 선택적 프로모터이다.
- [0154] 특정 구현예에서, 발현 카세트는 추가로 마커 유전자 (예를 들면, 형광 단백질, 예컨대 GFP 또는 YFP를 인코딩하는 유전자)를 포함한다.
- [0155] 특정 구현예에서, 발현 카세트는 추가로 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 발현 대조군 서열 (예를 들면, 인헨서)를 포함한다. 발현 대조군 서열 및 함께 서열을 작동가능하게 연결하는 기법은 당해 기술에 공지되어 있다.
- [0156] **세포**
- [0157] 본 발명의 특정 구현예는 본 명세서에서 기재된 발현 카세트를 포함하는 세포를 제공한다. 특정 구현예에서, 세포는 포유류 세포, 예컨대 눈에서 위치한 세포 (예를 들면, 섬유 주대 세포), 말초 신경계에서 위치한 세포 (예를 들면, 통각성 구심성 뉴런의 세포) 또는 근육 세포이다. 특정 구현예에서, 발현 카세트는 박테리아에서 함유된다. 특정 구현예에서, 박테리아는 아데노바이러스, 렌티바이러스, 아데노-관련 바이러스 (AAV), 폴리오바이러스, HSV, 또는 젓과 말로니-기반 바이러스 박테리아이다. 특정 구현예에서, 박테리아는 AAV6 바이러스 박테리아이다.
- [0158] **박터**
- [0159] 임의의 적당한 방법은 포유동물 (예를 들면, 포유류 세포, 예컨대 흥분성 세포)에서 이온 채널 서브유닛 (예를 들면, 클로라이드 채널, 예컨대 GlyR 또는 GluCl의 서브유닛)의 외인성 발현을 야기 또는 유도하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 제제는 흥분성 세포의 계층으로부터 서브유닛을 인코딩하는 유전자의 전사를 활성화하는 포유동물에 투여될 수 있다. 하지만, 전형적으로, 이온 채널 서브유닛의 외인성 발현은 유전자 전이 기술에 의해 야기 또는 유도된다.
- [0160] 따라서, 본 발명의 특정 구현예는 본 명세서에서 기재된 발현 카세트를 포함하는 박터를 제공한다. 추가적으로, 특정 구현예는 흥분성 세포 (예를 들면, 포유류 흥분성 세포)에 본 명세서에서 기재된 박터의 접촉/도입을 제공한다. 특정 구현예는 또한 (예를 들면, 흥분성 세포의 발현을 위하여) 포유동물에 본 명세서에서 기재된 박터 투여를 포함한다.
- [0161] 임의의 적당한 박터는 포유류 세포 (예를 들면, 흥분성 세포)에 본 명세서에서 기재된 발현 카세트 도입을 위하여 사용될 수 있다. 적당한 박터의 예는 플라스미드, 리포솜, 분자 콘주게이트 (예를 들면, 트랜스페린), 및 바이러스를 포함한다.
- [0162] 특정 구현예에서, 박터는 바이러스 박터이다. 바이러스 발현 시스템은 표적화된 해부학에서 강력한 발현 수준을 위하여 높은 감염수/카피수와 조합된 빠른 및 다용도 실행의 이중 이점을 갖는다. 바이러스 발현 기법, 예컨대 재조합 바이러스 박터 내에 패키징된 요망된 프로모터-단백질 서열을 인코딩하는 DNA의 전달을 포함하는 것은 효과적으로 표적화된 해부학을 도입하기 위해 포유동물에서 성공리에 이용되어 왔다. 이들은 표적화된 세포의 핵에 유전 물질을 전달하여, 이로써 상기 세포를 유도하여 요망된 단백질, 예를 들어 이온 채널, 예컨대 GluCl, GlyR 또는 다른 클로라이드 채널 단백질의 서브유닛을 생산한다. 이온 채널의 경우에서, 이들 단백질은 그 다음 세포 막에 수송된다.
- [0163] 적당한 바이러스 박터는, 예를 들어, 레트로바이러스 박터, 헤르페스 바이러스 기반 박터 및 파코바이러스 기반 박터 (예를 들면, 아데노-관련 바이러스 (AAV) 기반 박터, AAV-아데노바이러스 키메라성 박터, 및 아데노바이러스-기반 박터)를 포함한다. 특정 구현예에서, 박터는 아데노바이러스, 렌티바이러스, 아데노-관련 바이러스 (AAV), 자기-상보적 AAV (scAAV), 폴리오바이러스, HSV, 또는 젓과 말로니-기반 바이러스 박터이다. 특정 구현예에서, 박터는 AAV 박터이다. 특정 구현예에서, 박터는 표적화된 흥분성 세포의 특이적 유형에 대하여 공지된

굴성을 가진 AAV 벡터이다. 특정 구현예에서, AAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 및 rAAV2/6으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 벡터는 AAV6 바이러스 벡터이다.

[0164] 본 명세서에서 기재된 바와 같이, 본 발명의 벡터는, 발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛 (예를 들면, GlyR 또는 GluCl의 서브유닛)을 인코딩하는 핵산을 포함하는, 발현 카세트를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 발현 카세트는, 요망된 세포 집단에서만 단백질의 발현을 구동시키는, 선택적 프로모터를 추가로 포함할 수 있다. 피부, 근육, 관절, 눈에서 부위, 또는 다른 주변 부위의 접종 이후, 바이러스 벡터 (예를 들면, AAV)는, 감염된 세포 이내 인코딩된 단백질 (예를 들면, GlyR 또는 GluCl의 서브유닛)의 발현을 용이하게 하는, 1종 이상의 세포 (예를 들면, 흥분성 세포)를 감염시킨다. 하지만, 상기 벡터가 전형적으로 복제-불량성이기 때문에, 이들은 다른 구역까지 확산시키기 위해 세포 내에 복제하지 않는다. 따라서, 선택적 굴성을 가진 AAV 벡터가 서브유닛을 인코딩하는 핵산을 전달하기 위해 이용되었다면, 접종의 부위는 포유동물의 사전-선택된 구역까지 치료를 표적화하기 위해 선택될 수 있다.

[0165] 비제한 예로써, GlyR 클로라이드 채널 배치구성의 경우에서, GlyR 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩하는 DNA 그리고 GlyR 클로라이드 채널 단백질의 발현을 구동시키기 위해 선택될 프로모터를 함유할, “GlyR 클로라이드 채널 발현 카세트”로서 지칭될 수 있는, 전형적으로 바이러스 벡터는 패키징할 것이다. 아데노-관련 바이러스 (AAV)의 경우에서, 관심 유전자 (상기 예에서 GlyR 클로라이드 채널 서브유닛)은 단 하나의 활성 클로라이드 채널 발현 카세트를 가진 단일가닥 배치구성일 수 있다.

[0166] AAV 벡터 이내 발현 카세트 패키징 및 GluCl 또는 GlyR 클로라이드 채널 배치구성의 경우에서, 몇 개의 배치구성은 사용될 수 있다. AAVs는 역전된 말단 반복에 의해 측정된 4.7 kb 단일가닥 (ss) DNA를 함유하는 불량성 과보바이러스이다. 이들은 감염을 위하여 헬퍼 아데노바이러스가 필요하고, 그들의 계통은 복제 및 패키징에 필요한 AAV 단백질을 인코딩한다. 세포에 진입시, 바이러스 ss DNA는 숙주 효소에 의해 전사적으로 활성 이중-가닥 DNA로 전환된다. 재조합 AAV 벡터는 이식유전자 발현 카세트에 의해 그의 바이러스 단백질의 양쪽을 인코딩하는 DNA를 대체하고 그러므로 임의의 개방 바이러스 해독틀을 함유하지 않는다. 상기 대체는 대략 4.5 kb (4500 염기쌍 (bp))의 이식유전자 삽입 크기를 허용한다 (Buie LK. 등 (2010) Invest Ophthalmol Vis Sci. 51; 1: 236-48). 하기 유전자 코딩 서열 크기에 기반하여, AAV 바이러스 벡터에 패키징될 수 있는 GluCl 및 GlyR 서브유닛을 인코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트의 예는 아래 보여진다: GluCl (아래 기재된 채널)의 알파 및 베타 서브유닛은 대략 1400 bp이고; GlyR 알파 서브유닛은 ~1200 bp이고; 인간 시냅신 (hSyn)) 프로모터의 유전자 코딩 서열 크기는 대략 500 bp이고; 통상적으로 사용된 발현 리포터의 것, 다량체성 황색 형광 단백질 (mYFP)는 720bp이다.

[0167] 하기를 포함하는 발현 카세트의 예: GluCl

[0168] 1. hSyn 프로모터 + GluCl- α 서브유닛 (~2Kb)

[0169] 2. hSyn 프로모터 + GluCl- β 서브유닛 (~2Kb)

[0170] 3. hSyn 프로모터 + GluCl- α 서브유닛 + mYFP (~2.7Kb)

[0171] 4. hSyn 프로모터 + GluCl- β 서브유닛 + mYFP (~2.7Kb)

[0172] 5. hSyn 프로모터 + GluCl- α 서브유닛 + hSyn 프로모터 + GluCl- β 서브유닛 (~4Kb)

[0173] 및 가능하게는:

[0174] 6. hSyn 프로모터 + GluCl- α 서브유닛 + hSyn 프로모터 + GluCl- β 서브유닛 + mYFP (~4.7Kb)

[0175] 하기를 포함하는 발현 카세트의 예: GlyR

[0176] 1. hSyn 프로모터 + GlyR- α 서브유닛 (~1.7Kb)

[0177] 2. hSyn 프로모터 + GlyR- α 서브유닛 + mYFP (~2.4Kb)

[0178] 자기-상보적 AAV (scAAV) 구조에서, 서로 서열로 상보적(complimentary)이고 헤어핀 루프에 의해 연결된 발현 카세트의 2 카피는 바이러스 엔빌로프 이내 캡슐화된다. scAAVs는 더욱 안정적인 것으로 생각되고 특히 일부 세포, 예를 들어 섬유 주대 세포에서 더 높은 발현 수준을 보여준다. scAAV 발현 카세트의 크기는 최초 4.5에서 2.2 kb까지 감소된다 (Buie LK. 등 (2010) Invest Ophthalmol Vis Sci. 51; 1: 236-48). scAAV의 크기 제한이 제공되면, GluCl 발현 카세트 배치구성 1 또는 2 (상기) 및 가능하게는 3 또는 4 (상기)는 scAAV 바이러스 벡터

에 패키징될 수 있다. 하지만, GlyR 발현 카세트 배치구성 1 또는 2 (상기)의 어느 한쪽은 scAAV 바이러스 벡터에 패키징될 수 있다.

- [0179] 상기 발현 카세트의 상기 설명에서, GluCl 및 GlyR 수용체는 비제한 예로서 사용되었다. 유사한 발현 카세트는 GABA_A 및 GABA_C 수용체의 형질감염을 위하여 설계 및 이용될 수 있다. 추가적으로, 유전자 생성물의 발현은 (바이러스 캡시드 또는 코트 단백질에 의해 부여된) 바이러스의 상이한 혈청형에 의해 표적화될 수 있고; 상이한 혈청형은 상이한 조직 굴성을 보여준다. 예를 들어 바이러스 (예를 들면, AAV) 바이러스는 특이적 세포 유형 (예를 들면, 감각 뉴런, 예컨대 통각성 뉴런)을 표적화하기 위해 설계될 수 있다.
- [0180] 바이러스는 양쪽 중추신경계에서 및 주변에서 많은 조직 구조 및 시스템을 표적화하기 위해 이용되었다. 예를 들어, 침해수용체로의 유전자 전이는 만성 통증의 유망한 관리 전략으로, 신경계에서 제한된 부위에 이식유전자의 발현을 허용하고, 이로써 부정확한 효과의 유발 없이 통증-관련된 경로를 선택적으로 표적화한다.
- [0181] 통각성 뉴런으로의 유전자 전이는 양쪽 바이러스 및 비-바이러스 방법을 통해 달성되었다. 단백질의 플라스미드 DNA 구동 발현은 하기를 통해 감각 뉴런에 전달되었다: 리포좀 (Meuli-Simmen C. 등 (1999) HumGene Ther. 10: 2689-700), 전기천공 (Lin CR. 등 (2002) Neurosci Lett. 317: 1-4) 및 고장성 회색체를 통한 전달 (Milligan ED. 등 (2006) Pain 126: 294-308) 중추신경계에 주변 또는 직접적인 주사를 통해. 이들 방법의 주요 단점은 이들이 2 주 이하 지속하는 일시적 단백질 발현을 초래한다는 점이다. 대안적으로, 바이러스는 더 긴 이식유전자 발현을 구동시키기 위해 사용될 수 있다. 바이러스-매개된 유전자 전달의 효능은 전달 방법의 유형 및 사용된 바이러스의 유형에 주로 좌우된다. 아데노바이러스, 헤르페스-단순 바이러스 (HSV), 렌티바이러스 및 아데노-관련 바이러스 (AAV)는 하기를 포함하는 수많은 전달 경로를 통해 통각성 경로로 이식유전자를 전달하는 것으로 보고되었다: 피하 (Wilson SP. 등 (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96: 3211-6; Goss, JR. 등 (2010) Molecular Therapy 19(3): 500-506; 미국 특허 번호: US 8,957,036), 근육내 (Ghadge GD. 등 (1995) Gene Ther. 2: 132-7), 신경내 (Palmer JA. 등 (2000) J Virol. 74: 5604-18), 척추강내 (Storek B. 등 (2006) Mol Pain 2: 4; Storek B. 등, (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105: 1055-60, 척수내 (Pezet S. 등 (2006) Mol Ther. 13: 1101-9; Meunier A. 등 (2008) J Neurosci Methods 167: 148-59, 직접적인 배근 신경절 주사 (Xu Y. 등 (2003) HumGene Ther. 14: 897-906) 및 또한 HSV의 경우에서 바이러스의 국소 적용 (Antunes Bras JM. 등 (1998) J Neurochem. 70: 1299-303; Zhang G. 등 (2008) Anesthesiology 108: 305-13. 이들 연구가 양호한 부위에서 그리고 통증-관련된 행동내 수반되는 감소로 이식유전자 발현을 초래하였던 반면, 형질도입 프로파일은 종종 특성규명되지 않았다. 이것은 세포외 환경에서 작용하는 분비된 이식유전자, 예컨대 엔케팔린, 엔도모르핀 및 인터튜킨을 이용하는 연구에서 공통적이고, 여기에서 단지 몇 개의 형질도입된 세포는 침범된 세포 이웃에 이식유전자를 전달 및 통증 지각을 조절하도록 요구된다 (Mata M. 등 (2008). Curr Gene Ther. 8: 42-8).
- [0182] 2009년에, Towne 등은 마우스에서 만성 통증의 생성 및 발달에 관련된 세포 기전을 표적화하기 위한 유전자 전이 도구로서 재조합 AAV (rAAV) 혈청형 6을 평가하였다. rAAVs는 그들의 넓은 조직 굴성, 효율적인 및 안정적인 형질도입 (> 년), 낮은 면역원성 그리고 생체내 유사분열후 세포를 감염시키는 능력으로 인해 강력한 유전자 전이 벡터이다 (Mandel RJ. 등 (2006) Mol Ther. 13: 463-83). 혈청형 6 벡터 (rAAV2/6)은 하기로부터 선택되었다: 이전의 실험에서 마우스내 정맥내 전달 이후 감각 섬유 형질도입의 관찰 (Towne C. 등 (2008) Mol Ther. 16: 1018-25) 및 중추신경계에 직접적인 주사 이후 뉴런에 대하여 높은 굴성 (Azeredo da Silveira S. 등 (2009) HumMol Genet. 18: 872-87). Towne 등은 다양한 투여 경로를 통해 rAAV2/6을 전달하였고 정확하게 맵핑하였고 배근 신경절 (DRG) 및 척수 이내 수득된 형질도입 프로파일을 비교하였다 (Towne C. 등 (2009) Molecular Pain 5(1): 52). DRG 뉴런에 유전자를 전달하기 위한 재조합 AAV 혈청형 6 (rAAV2/6)의 수용력은 평가되었다. 또한 5 상이한 투여 경로를 통한 침해수용체의 형질도입은 마우스에서 특성규명되었다. 좌골 신경에 녹색 형광 단백질 (eGFP)를 발현시키는 rAAV2/6의 직접적인 주사는 용량-의존적 방식으로 L4 DRG 뉴런의 최대 30% eGFP-양성 세포의 형질도입을 초래하였다. 형질도입된 세포의 90% 초과는 작은 및 중간 크기 뉴런 (< 700 μm^2)이었고, 통각성 뉴런의 마커로 우세하게 공국재화되었고, 척수 배면각의 표면 층판에서 eGFP-양성 중심 말단 섬유를 가졌다. 형질도입의 효율 및 프로파일은 마우스 유전적 배경에 독립적이었다. rAAV2/6의 척추강내 투여는 형질도입의 최고 수준 (대략 60%)를 제공하였고 유사한 크기 프로파일 및 통각성 뉴런으로 공국재화를 가졌다. 척추강내 투여는 또한 자궁경부 및 흉부 수준에 DRG 뉴런을 형질도입하였고 신경병성 통증용 마우스 모델에서 형질도입의 비교할만한 수준을 초래하였다. 피하 및 근육내 전달은 L4 DRG에서 형질도입의 낮은 수준을 초래하였다. 마찬가지로, 꼬리 정맥 주사를 통한 전달은 DRG 이내 상대적으로 소수의 eGFP-양성 세포를 초래하였고, 하지만, 상기 형질도입은 모든 척추 수준에서 관측되었고 큰 비-통각성 세포 유형에 대응하였다. 이들 데이터로부터 이들은 rAAV2/6이 마우스에서 통각성 뉴런에 이식유전자를 전달하기 위한 효율적인 벡터인 것으로 결

론내었다. 더욱이, 형질도입 프로파일의 특성규명은 신경병성 통증 뒤에 기전을 해부하기 위한 유전자 전이 연구를 용이하게 할 수 있다.

[0183] 이들 연구는 광에 대한 반응으로 통증 감각을 생성 또는 억제시키기 위한 흥분성 또는 억제성 옵션, 각각으로 마우스에서 구심성 침해수용체 신경을 선택적으로 형질감염시키기 위해 전달 벡터로서 AAV6을 다시 사용하였던, 2014년 Iyer 등에 의해 나중에 지지되었다 (Iyer SM. 등 (2014) *Nature Biotechnology* 32(3): 274-278). 이들 연구는 특이적 뉴런의 집단이 특이적 AAV 혈청형을 이용하여 선택적으로 표적화될 수 있다는 것을 보여준다. 이 경우에 통증 감지 뉴런은 AAV6을 이용하여 선택적으로 표적화되었다. 이들 연구는 또한 AAV6이 피하 및 근육내 전달 이후 통각성 구심성 신경에 의해 차지될 수 있다는 것을 입증한다. 이것은 만성 관절 통증용 진피내 또는 관절내 주사의 경우에서와 같이 통증의 부위에 국부 주사가 그 팔다리에서 운동 활동 또는 동일한 팔다리로부터 다른 뉴런의-매개된 감각 (예컨대 터치) 침범 없이 동통성 구역 또는 관절을 국소적으로 자극하는 통각성 신경을 구체적으로 및 선택적으로 형질주입하기 위한 AAV-벡터화된 유전자 요법의 생존가능한 전달 경로인 것을 강하게 시사한다.

[0184] 상기 접근법의 전반적인 결과는 진피내, 피하 또는 관절내 경로를 통해 전달된 국부 마취제의 마취 효과를 매우-오래 지속되는 것과 마찬가지로 일 것이다 (여러 해의 지속기간을 가질 수 있다). 오늘날 영치영덩 관절 블록으로서도 공지된 - 영치영덩 관절에서 예를 들어 피부에 또는 관절내로 국부 마취제를 주사하는 것이 흔한 실시이다 (Rupert M. 등 (2009) *Pain Physician* 12(2): 399-418).

[0185] 또 다른 구현예에서, 유전자 생성물 (예를 들면, 이온 채널 서브유닛)은 눈 안에 구조에 표적화될 수 있다. 렌티- 및 아데노-관련 (AAV) 바이러스 벡터는 마우스, 랫트 및 영장류 눈에 유전자를 형질도입하기 위해 성공적으로 이용되었다 (Borrás T. 등 (2002) *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43(8): 2513-2518). 추가적으로, 이들은 양호하게 용인되었고 보고된 역효과 없이 상대적으로 긴 기간에 걸쳐 고도로 발현되어, 장기간 치료 패러다임에 기회를 제공한다.

[0186] 바이러스는, 비제한적으로 섬모 상피, 섬모 근육 망막 신경절 세포 뿐만 아니라 섬유 주대 세포를 포함하여, 많은 조직 구조 및 시스템을 표적화하는데 이용되었다. 현재까지, 적어도 6 전달 시스템은 관련된 조직 또는 세포에 유전자를 전달하기 위한 능력에 대하여 시험되었다. 이들은 아데노바이러스 (Ads), 아데노-관련 바이러스 (AAVs), 단순 포진 바이러스 (HSVs), 렌티바이러스 (LVs; 고양이 면역부전 바이러스 [FIV] 및 인간 면역부전 바이러스 [HIV]), 리포좀 (LPs), 및 네이키드 DNA를 포함한다. 이들 중, AAV는 그것의 안전성 프로파일로 인해 바람직한 벡터일 수 있다. 하지만, 문헌 보고는 자기-상보적 AAV가 AAV를 함유하는 전통적 단일가닥 DNA보다 TM 세포 감염에서 더 효과적일 수 있다는 것을 시사한다. 따라서, 유전 물질이 안구 고혈압의 치료를 위하여 섬유 주대에서 발현되는, 특정 구현예에서, 바이러스 벡터는 자기-상보적 AAV2 (scAAV2)일 수 있다. 상기 벡터는 마우스 및 영장류의 눈에서 섬유 주대 세포내 녹색 형광 단백질 (GFP)의 장기간 발현 표적화 및 유효화에 효과적인 것으로 밝혀졌다 (Buie LK. 등 (2010) *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51: 1: 236-48).

[0187] 본 명세서에서 논의된 바와 같이, (예를 들면, GlyR 또는 GluCl 서브유닛을 인코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트)를 포함하는 본 발명의 벡터는 경직의 치료를 위하여 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 서브유닛의 발현은 요망된 효과를 초래하기 위해 요구되는 바와 같이 어느 한쪽 근육 또는 운동 뉴런 혹은 양쪽에 표적화될 수 있다. 유전 물질이 예를 들어 경직성 긴장항진 (경직)의 치료를 위하여 운동 뉴런에서 발현되는 경우에서, 벡터는 근육에 또는 이완되는 근육의 신경근육 접합에서 주사된 AAV6 벡터일 수 있다. 상기 벡터는 비-인간 영장류의 운동 뉴런 세포에서 녹색 형광 단백질 (GFP)의 장기간 발현 표적화 및 유효화에 효과적인 것으로 밝혀졌다 (Towne C. 등 (2010) *Gene Therapy* 17(1): 141-6). 서브유닛이 예를 들어 경직성 긴장항진 (경직)의 치료를 위하여 골격 근육에서 발현되는 경우에서, 벡터는 하기 중 하나일 수 있다: AAV 유형 1, 3, 또는 5 (Chao H. (2000) *Molecular Therapy* 2(6): 619-23) 또는 AAV8 (Childers M. 등 (2014). *Sci Transl Med.* 6(220): 220ra210) 또는 AAV9 (Falk DJ. 등 (2015) *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 2: 15007). 이들 벡터는 NOD/SCID 마우스의 골격근 세포에서 갯과 인자 IX의 장기간 발현 표적화 및 유효화에 효과적인 것으로 밝혀졌다. 벡터는 치료받는 근육에 직접적으로 주사될 것이다.

[0188] **벡터 제조 및 투여**

[0189] 본 명세서에서 기재된 벡터가 창출된 후, 벡터는 정제될 수 있다. 조성물에서 벡터의 농도를 향상시키기 위한 벡터 정제는 임의의 적당한 방법, 예컨대 밀도 구배 정제, 크로마토그래피 기법, 또는 제한 희석 정제에 의해 달성될 수 있다. 특이적 정제 기법은 당해 분야의 숙련가에 공지되고 벡터 유형 (예를 들면, 바이러스의 유형,

예컨대 AAV의 유형)에 의존하여 다양할 것이다.

[0190] 본 발명의 특정 구현예에서, 벡터는 바이러스 벡터, 예컨대 AAV 벡터이다. 일반적으로, 세포가 사전규정된 수의 바이러스와 대면되는 것을 확보하기 위해 충분한 바이러스가 세포 집단에 전달될 수 있는 경우 바이러스 벡터는 가장 유용하다. 따라서, 본 발명은, 하기를 포함하는, 스톡, 바람직하게는 균질한 스톡을 제공한다: 바이러스 벡터 (예를 들면, AAV 벡터). 하기의 제조 및 분석: 바이러스 스톡 (예를 들면, AAV 스톡)은 당해 분야에 공지되어 있다. 바이러스 스톡은, 주로 바이러스 유전자형 및 이들을 제조하기 위해 사용된 프로토콜 및 세포주에 의존하여, 역가가 상당히 가변적이다. 특정 구현예에서, 그와 같은 스톡은 적어도 약 10^5 플라크-형성 단위 (pfu), 예컨대 적어도 약 10^6 pfu 또는 더욱더 구체적으로 적어도 약 10^7 pfu의 바이러스 역가를 갖는다. 더욱더 특이적 구현예에서, 역가는 적어도 약 10^8 pfu, 또는 적어도 약 10^9 pfu일 수 있다. 특정 구현예에서, 스톡은 적어도 약 10^{10} pfu 또는 적어도 약 10^{11} pfu의 고역가 스톡이다.

[0191] 본 발명은 본 명세서에서 기재된 벡터 (예를 들면, AAV 벡터) 및 캐리어를 포함하는 조성물을 추가적으로 제공한다. 조성물의 캐리어는 임의의 적당한 벡터용 캐리어일 수 있다. 캐리어는 전형적으로 액체일 것이지만, 또한 고체, 또는 액체 및 고체 성분의 조합일 수 있다. 캐리어는 바람직하게는 약제학적으로 허용가능한 (예를 들면, 생리적으로 또는 약리적으로 허용가능한) 캐리어 (예를 들면, 부형제 또는 희석제)이다. 약제학적으로 허용가능한 캐리어는 잘 알려지고 쉽게 이용가능하다. 캐리어의 선택은, 적어도 부분적으로, 조성물을 투여하기 위해 사용된 특정한 벡터 및 특정한 방법에 의해 결정될 것이다. 조성물은, 특히 조성물의 안정성 및/또는 그의 최종 용도 향상을 위하여, 임의의 다른 적당한 성분을 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물의 다양한 적당한 제형이 있다. 하기 제형 및 방법은 단지 예시적이고 결코 제한이 아니다.

[0192] 상기 논의된 바와 같이, 본 명세서에서 기재된 벡터는 약제학적 조성물로서 제형화될 수 있고, 정맥내, 근육내, 국소 또는 피하 경로에 의해, 선택된 투여 경로에 적응된 다양한 형태로, 즉, 경구로 또는 비경구로 포유류 숙주, 예컨대 인간 환자에 투여될 수 있다.

[0193] 벡터는 진피내, 피하, 신경내, 근육내 또는 전방내 주입 또는 주사를 통해 투여될 수 있다. 국부 (영역) 주사 또는 비경구 투여에 적당한 제형은, 산화방지제, 완충제, 정균제, 및 의도된 수령체의 혈액으로 제형을 등장으로 만드는 용질을 함유할 수 있는, 수성 및 비-수성, 등장의 멸균된 주사 용액, 그리고 현탁화제, 가용화제, 증점제, 안정화제, 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균된 현탁액을 포함한다. 벡터의 용액은, 비독성 계면활성제와 선택적으로 혼합된, 물에서 제조될 수 있다. 분산물은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 트리아세틴, 및 이들의 혼합물에서 그리고 오일에서 제조될 수 있다. 저장 및 이용의 통상적인 조건 하에, 이들 제제는 미생물의 성장을 예방하기 위해 보존제를 함유한다. 제형은 단위-용량 또는 다중-용량 밀봉된 컨테이너, 예컨대 앰플 및 바이알에서 제시될 수 있고, 이용 직전에, 주사용, 멸균된 액체 부형제, 예를 들어, 물의 첨가만을 요구하는 냉동건조된 (동결건조된) 조건에서 저장될 수 있다. 즉석 주사 용액 및 현탁액은 이전에 기재된 종류의 멸균된 분말, 과립, 및 정제로부터 제조될 수 있다.

[0194] 주사 또는 주입에 적당한 약제학적 복용 형태는, 리포솜내 선택적으로 캡슐화된, 멸균된 주사가능 또는 불용성 용액 또는 분산물의 즉석 제조에 적합한 벡터를 포함하는 멸균된 수용액 또는 분산물 또는 멸균된 분말을 포함할 수 있다. 모든 경우에, 최종적인 복용 형태는 제조 및 저장의 조건 하에 멸균, 유체 및 안정적이어야 한다. 액체 캐리어 또는 비히클은, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 및 기타 동종), 식물성 오일, 비독성 글리세릴 에스테르, 및 적당한 이들의 혼합물을 포함하는 용매 또는 액체 분산매일 수 있다. 적절한 유체성은, 예를 들어, 리포솜의 형성, 분산물의 경우에서 요구된 입자 크기의 유지 또는 계면활성제의 이용에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 예방은 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살, 및 기타 동종에 의해 초래될 수 있다. 많은 사례에서, 등장제, 예를 들어, 당, 완충제 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사가능 조성물의 장기적인 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 조성물에서 사용에 의해 초래될 수 있다.

[0195] 멸균된 주사가능 용액은, 요구되는 바와 같이, 상기 열거된 다양한 다른 성분과 적절한 용매에서 요구된 양으로 벡터 편입, 그 다음 멸균에 의해 제조된다. 멸균된 주사가능 용액의 제조를 위하여 멸균된 분말의 경우에서, 바람직한 제조 방법은, 이전에 멸균된-여과된 용액에서 존재하는 임의의 추가의 요망된 성분 플러스 활성 성분의 분말을 수득하는, 진공 건조 및 냉동 건조 기법이다.

- [0196] 본 박터는 또한 약제학적으로 허용가능한 비히클 예컨대 불활성 희석제와 조합으로 국소적으로 투여될 수 있다. 국소 투여를 위하여, 본 박터는, 즉, 이들이 액체인 경우, 순수한 형태로 적용될 수 있다. 하지만, 액체일 수 있는, 피부과로 허용가능한 캐리어와 조합으로, 조성물 또는 제형으로서 피부에 이들을 투여하는 것이 일반적으로 바람직할 것이다.
- [0197] 유용한 액체 캐리어는, 본 박터가 선택적으로 무독성 계면활성제의 도움으로 효과적인 수준에서 용해 또는 분산될 수 있는, 물, 알코올 또는 글리콜 또는 물-알코올/글리콜 블렌드를 포함한다. 아쥘반트 예컨대 방향제 및 추가의 향미생물제는 제공된 용도를 위한 특성을 최적화하기 위해 첨가될 수 있다. 수득한 액체 조성물은 흡수제 패드로부터 적용될 수 있거나, 붕대 및 다른 드레싱을 함침시키기 위해 사용될 수 있거나, 펌프-유형 또는 에어로졸 분무기를 이용하여 환부에 분무될 수 있다.
- [0198] 증점제 예컨대 합성 폴리머, 지방산, 지방산 염 및 에스테르, 지방 알코올, 변형된 셀룰로오스 또는 변형된 미네랄 물질은 또한, 사용자의 피부에 직접적으로 바르기 위하여, 확산가능한 페이스트, 젤, 연고, 비누, 및 기타 동종을 형성하기 위해 액체 캐리어와 함께 이용될 수 있다.
- [0199] 피부에 본 박터를 전달하기 위해 사용될 수 있는 유용한 피부과 조성물의 예는 종래 기술에 공지된다; 예를 들어, 참고 Jacquet 등 (미국특허번호 4,608,392), Geria (미국특허번호 4,992,478), Smith 등 (미국특허번호 4,559,157) 및 Wortzman (미국특허번호 4,820,508).
- [0200] 본 명세서에서 기재된 박터의 유용한 복용량은 동물 모델에서 그들의 시험관내 활성, 및 생체내 활성 비교에 의해 결정될 수 있다. 인간에게 마우스, 및 다른 동물내 효과적인 복용량의 외삽 방법은 종래 기술에 공지된다; 예를 들어, 참고 Nathwani AC. 등 (2011) Mol Ther. 19: 876-885; Nathwani AC. 등 (2014) N Engl J Med. 371(21): 1994-2004.
- [0201] 치료에서 사용을 위하여 요구된, 박터의 양은 투여의 경로, 치료받을 병태의 본성 그리고 환자의 연령 및 상태에 가변적일 것이고 궁극적으로 주치의 또는 임상사의 재량일 것이다.
- [0202] 요망된 용량은 편리하게 적절한 간격, 예를 들어, 2, 3, 4 또는 초과 하위-용량 / 일로 투여된 분할 용량으로서 또는 단일 용량으로 제시될 수 있다. 하위-용량 자체는, 예를 들면, 수많은 별개의 느슨하게 이격된 투여; 예컨대 눈에 복수의 드롭스의 적용으로 추가로 분할될 수 있다.
- [0203] 본 명세서에서 논의된 바와 같이, 박터는 다른 치료제 또는 생물학적으로-활성제, 예를 들어, 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태, 예컨대 통증, 염증, 안구 고혈압 또는 경직성 긴장항진 치료에 유용한 다른 제제와 조합으로 투여될 수 있다. 추가적으로, 면역계 억제제, 인핸서, 항생제, 또는 아드레날린은 본 명세서에서 기재된 박터와 조합으로 투여될 수 있다. 따라서, 일 구현예에서 본 발명은 또한 본 명세서에서 기재된 바와 같이 박터, 적어도 1종의 다른 치료제 또는 생물학적 활성 제제, 및 약제학적으로 허용가능한 희석제 또는 캐리어를 포함하는 조성물을 제공한다. 예를 들어, 특정한 징후의 치료에서 유용한 치료 인자는 존재할 수 있다. 염증, 예컨대 이부프로펜 또는 스테로이드를 제어하는 인자는 박터의 생체내 투여와 관련된 팽윤 및 염증 그리고 생리적 고통을 감소시키기 위해 조성물의 일부일 수 있다. 면역계 억제제는 장애와 관련된 또는 박터 자체에 임의의 면역 반응을 감소시키기 위해 조성물 방법으로 투여될 수 있다. 대안적으로, 면역 인핸서는 질환에 대해 바디의 자연 방어를 상향조절하기 위해 조성물에서 포함될 수 있다. 항생제, 즉, 살균제 및 살진균제는 유전자 전이 절차 및 다른 장애와 관련된 감염의 위험을 감소시키기 위해 존재할 수 있다. 추가적으로 약리적으로 활성제 예컨대 아드레날린은 국부 마취제로서 사용된 경우 주사 부위로부터 AAV의 청소능을 감소시키기 위해 그리고 혈관수축을 유도하기 위해 제형에 첨가될 수 있다. 본 발명은 또한 본 명세서에서 기재된 바와 같이 박터, 적어도 1종의 다른 치료제 또는 생물학적 활성 제제, 포장제, 그리고 본 명세서에서 기재된 바와 같이 박터 및 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태를 치료하기 위해 동물에 다른 치료/생물학적 활성 제제 또는 제제들 투여용 지침을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0204] **본 발명의 특정 구현예**
- [0205] 구현예 1. 포유류 세포의 전기생리학적 활성의 생체내 조절을 위한, 상기 발현 카세트가 다량체성 이온 채널 (예를 들면, 클로라이드 채널)의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 박터.
- [0206] 구현예 2. 다량체성 이온 채널 (예를 들면, 클로라이드 채널)의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 박터와 세포의 접촉을 포함하는 포유류 세포의 전기생리학적

활성의 생체내 조절 방법.

- [0207] 구현예 3. 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태의 상기 예방 또는 치료 처치를 위한, 상기 발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터.
- [0208] 구현예 4. 상기 발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터의 유효량을 상기 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, 필요로 하는 포유동물에서 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태의 치료 방법.
- [0209] 구현예 5. 구현예 1-4 중 어느 하나에 있어서, 상기 서브유닛이 1종 이상의 추가의 서브유닛과 다량체화에 의해 다량체성 이온 채널을 형성할 수 있는, 벡터 또는 방법.
- [0210] 구현예 6. 구현예 1-5 중 어느 하나에 있어서, 치료가 효능제 또는 알로스테릭 조절제의 투여의 부재 하이고; 다량체성 이온 채널의 효능제 또는 알로스테릭 조절제가 포유동물에 투여되지 않고; 및/또는 상기 포유류 세포가 외인성 효능제 또는 외인성 알로스테릭 조절제와 접촉되지 않는, 벡터 또는 방법.
- [0211] 구현예 7. 구현예 6에 있어서, 상기 효능제가 글리신인, 벡터 또는 방법.
- [0212] 구현예 8. 구현예 1-7 중 어느 하나에 있어서, 상기 다량체성 이온 채널이 내인성 효능제에 의해 활성화되는, 벡터 또는 방법.
- [0213] 구현예 9. 구현예 1-8 중 어느 하나에 있어서, 상기 핵산이 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.
- [0214] 구현예 10. 구현예 9에 있어서, 상기 핵산이 글리신 수용체 (GlyR), γ -아미노부티르산 수용체 (GABA_AR) 또는 글루타메이트-게이팅된 클로라이드 채널 (GluCl)의 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.
- [0215] 구현예 11. 구현예 10에 있어서, 상기 핵산이 GlyR의 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.
- [0216] 구현예 12. 구현예 11에 있어서, 상기 인코딩된 GlyR 서브유닛이 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는, 벡터 또는 방법: 알파-1 서브유닛, 알파-2 서브유닛, 및 알파-3 서브유닛, 알파-4 서브유닛 및 베타-서브유닛.
- [0217] 구현예 13. 구현예 12에 있어서, 상기 인코딩된 GlyR 서브유닛이 GlyR의 알파-1-서브유닛 (GlyRa1)인, 벡터 또는 방법.
- [0218] 구현예 14. 구현예 13에 있어서, 상기 인코딩된 GlyR 서브유닛이 인간 GlyRa1 (hGlyRa1)인, 벡터 또는 방법.
- [0219] 구현예 15. 구현예 10에 있어서, 상기 핵산이 GABA_AR의 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.
- [0220] 구현예 16. 구현예 15에 있어서, 상기 핵산이 GABA_{A-p} 수용체의 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.
- [0221] 구현예 17. 구현예 15에 있어서, 상기 인코딩된 GABA_AR 서브유닛이 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는, 벡터 또는 방법: GABRA1 (α_1), GABRA2 (α_2), GABRA3 (α_3), GABRA4 (α_4), GABRA5 (α_5), GABRA6 (α_6), GABRB1 (β_1), GABRB1 (β_2), GABRB1 (β_3), GABRG1 (γ_1), GABRG2 (γ_2), GABRG3 (γ_3), GABRD (δ), GABRE (ϵ), GABRP (π), GABRQ (θ), GABRR1 (ρ_1), GABRR2 (ρ_2) 및 GABRR3 (ρ_3).
- [0222] 구현예 18. 구현예 10에 있어서, 상기 핵산이 GluCl의 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.
- [0223] 구현예 19. 구현예 18에 있어서, 상기 인코딩된 GluCl 서브유닛이 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는, 벡터 또는 방법: α_1 , α_{2A} , α_{2B} , GBR2A (α_{3A}), GBR2B (α_{3B}) 및 β .
- [0224] 구현예 20. 구현예 1-19 중 어느 하나에 있어서, 상기 인코딩된 서브유닛이 대응하는 야생형 서브유닛에 비교된 경우 적어도 1종의 돌연변이를 포함하는, 벡터 또는 방법.
- [0225] 구현예 21. 구현예 20에 있어서, 돌연변이체 서브유닛을 포함하는 다량체성 이온 채널이 항상적 활성인, 벡터 또는 방법.
- [0226] 구현예 22. 구현예 20에 있어서, 돌연변이체 서브유닛을 포함하는 다량체성 이온 채널이 대응하는 야생형 다량체성 이온 채널에 비교된 경우 향상된 효능제 감수성을 갖는, 벡터 또는 방법.

- [0227] 구현예 23. 구현예 20-22 중 어느 하나에 있어서, 대응하는 야생형 서브유닛에 비교된 경우, 상기 인코딩된 서브유닛이 M2 막관통 도메인을 포함하고 적어도 1종의 돌연변이가 M2 막관통 도메인에 있는, 벡터 또는 방법.
- [0228] 구현예 24. 구현예 23에 있어서, 상기 적어도 1종의 돌연변이가 대응하는 야생형 서브유닛에 비교된 경우, 류신 9' 잔기에 있는, 벡터 또는 방법.
- [0229] 구현예 25. 구현예 24에 있어서, 상기 적어도 1종의 돌연변이가 야생형 서브유닛에 비교된 경우 L9' A 또는 L9' G인, 벡터 또는 방법.
- [0230] 구현예 26. 구현예 20-22 중 어느 하나에 있어서, 대응하는 야생형 서브유닛에 비교된 경우, 상기 인코딩된 서브유닛이, 상기 적어도 1종의 돌연변이가 L263인, GABA_A α-서브유닛; 상기 적어도 1종의 돌연변이가 L259인, GABA_A β-서브유닛; 상기 적어도 1종의 돌연변이가 L274인, GABA_A γ-서브유닛; 또는 상기 적어도 1종의 돌연변이가 T314, L317 또는 L301인, GABA_C ρ-서브유닛인, 벡터 또는 방법.
- [0231] 구현예 27. 구현예 20-26 중 어느 하나에 있어서, 상기 인코딩된 서브유닛이 대응하는 야생형 서브유닛에 약 80% 서열 동일성 내지 약 99% 서열 동일성을 갖는, 벡터 또는 방법.
- [0232] 구현예 28. 구현예 27에 있어서, 상기 인코딩된 서브유닛이 대응하는 야생형 서브유닛에 적어도 90% 서열 동일성을 갖는, 벡터 또는 방법.
- [0233] 구현예 29. 구현예 28에 있어서, 상기 인코딩된 서브유닛이 대응하는 야생형 서브유닛에 적어도 95% 서열 동일성을 갖는, 벡터 또는 방법.
- [0234] 구현예 30. 구현예 29에 있어서, 상기 인코딩된 서브유닛이 대응하는 야생형 서브유닛에 약 99% 서열 동일성을 갖는, 벡터 또는 방법.
- [0235] 구현예 31. 구현예 1-30 중 어느 하나에 있어서, 상기 프로모터가 조절가능 프로모터인, 벡터 또는 방법.
- [0236] 구현예 32. 구현예 1-30 중 어느 하나에 있어서, 상기 프로모터가 항상적 프로모터인, 벡터 또는 방법.
- [0237] 구현예 33. 구현예 1-30 중 어느 하나에 있어서, 상기 프로모터가 조직 특이적 프로모터인, 벡터 또는 방법.
- [0238] 구현예 34. 구현예 1-30 중 어느 하나에 있어서, 상기 프로모터가 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는, 벡터 또는 방법: 인간 시냅신-1 프로모터 (Syn1, 또는 hSyn), 인간 사이토메갈로바이러스 ("CMV") 프로모터, 닭 베타-액틴 ("CBA") 프로모터, 근육-특이적 데스민 프로모터, 매트릭스 Gla 단백질 (MGP) 프로모터 또는 이의 단편 및 키티나제 3-유사 1 (Ch3L1) 유전자의 5' 프로모터 영역.
- [0239] 구현예 35. 구현예 1-34 중 어느 하나에 있어서, 상기 벡터가 바이러스 벡터인, 벡터 또는 방법.
- [0240] 구현예 36. 구현예 35에 있어서, 상기 바이러스 벡터가 아데노바이러스, 렌티바이러스, 아데노-관련 바이러스 (AAV), 자기-상보적 AAV (scAAV), 폴리오바이러스, HSV, 또는 췌장과 말로니-기반 바이러스 벡터인, 벡터 또는 방법.
- [0241] 구현예 37. 구현예 36에 있어서, 상기 바이러스 벡터가 AAV 벡터인, 벡터 또는 방법.
- [0242] 구현예 38. 구현예 37에 있어서, 상기 AAV 벡터가 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는, 벡터 또는 방법: AAV1, AAV2, AAV3, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 및 rAAV2/6.
- [0243] 구현예 39. 구현예 38에 있어서, 상기 벡터가 AAV6 벡터인, 벡터 또는 방법.
- [0244] 구현예 40. 구현예 36에 있어서, 상기 벡터가 scAAV 벡터인, 벡터 또는 방법.
- [0245] 구현예 41. 구현예 40에 있어서, 상기 scAAV 벡터가 scAAV2 벡터인, 벡터 또는 방법.
- [0246] 구현예 42. 구현예 3-41 중 어느 하나에 있어서, 상기 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태가 통증, 염증, 안구 고혈압 또는 경직성 긴장항진인, 벡터 또는 방법.
- [0247] 구현예 43. 구현예 42에 있어서, 상기 흥분성 세포-관련된 질환이 통증인, 벡터 또는 방법.
- [0248] 구현예 44. 구현예 43에 있어서, 상기 통증이 만성 통증인, 벡터 또는 방법.
- [0249] 구현예 45. 구현예 43 또는 44에 있어서, 상기 통증이 관절 통증 또는 신경병성 통증인, 벡터 또는 방법.

- [0250] 구현예 46. 구현예 42에 있어서, 상기 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태가 염증인, 벡터 또는 방법.
- [0251] 구현예 47. 구현예 46에 있어서, 상기 염증이 관절 염증인, 벡터 또는 방법.
- [0252] 구현예 48. 구현예 42-47 중 어느 하나에 있어서, 상기 벡터가 AAV6 벡터이고, 상기 프로모터가 인간 시냅신 (hSyn) 프로모터이고, 상기 핵산이 GlyR 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.
- [0253] 구현예 49. 구현예 48에 있어서, 상기 GlyR 서브유닛이 서브유닛의 다량체화시 항상적 활성 GlyR을 초래하는 적어도 1종의 돌연변이를 포함하는, 벡터 또는 방법.
- [0254] 구현예 50. 구현예 42에 있어서, 상기 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태가 안구 고혈압인, 벡터 또는 방법.
- [0255] 구현예 51. 구현예 50에 있어서, 상기 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태가 녹내장인, 벡터 또는 방법.
- [0256] 구현예 52. 구현예 50 또는 51에 있어서, 상기 벡터가 scAAV2 벡터이고, 상기 프로모터가 매트릭스 Gla 단백질 (MGP) 프로모터이고, 상기 핵산이 GlyR 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.
- [0257] 구현예 53. 구현예 52에 있어서, 상기 GlyR 서브유닛이 서브유닛의 다량체화시 항상적 활성 GlyR을 초래하는 적어도 1종의 돌연변이를 포함하는, 벡터 또는 방법.
- [0258] 구현예 54. 구현예 42에 있어서, 상기 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태가 경직성 긴장항진인, 벡터 또는 방법.
- [0259] 구현예 55. 구현예 54에 있어서, 상기 벡터가 AAV2 또는 AAV6 벡터이고, 상기 프로모터가 인간 시냅신 (hSyn) 프로모터이고, 상기 핵산이 GlyR 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.
- [0260] 구현예 56. 구현예 55에 있어서, 상기 GlyR 서브유닛이 서브유닛의 다량체화시 항상적 활성 GlyR을 초래하는 적어도 1종의 돌연변이를 포함하는, 벡터 또는 방법.
- [0261] 구현예 57. 구현예 54에 있어서, 상기 벡터가 AAV8 또는 AAV9 벡터이고, 상기 프로모터가 인간 사이토메갈로바이러스 ("CMV") 프로모터, 닭 베타-액틴 ("CBA") 프로모터 또는 CAG 또는 근육-특이적 테스민 프로모터이고, 상기 핵산이 GlyR 서브유닛을 인코딩하는, 벡터 또는 방법.
- [0262] 구현예 58. 구현예 57에 있어서, 상기 GlyR 서브유닛이 서브유닛의 다량체화시 항상적 활성 GlyR을 초래하는 적어도 1종의 돌연변이를 포함하는, 벡터 또는 방법.
- [0263] 구현예 59. 구현예 57 또는 58에 있어서, 상기 벡터가 AAV8이고 상기 프로모터가 근육-특이적 테스민 프로모터인, 벡터 또는 방법.
- [0264] 구현예 60. 구현예 4-59 중 어느 하나에 있어서, 추가로 포유동물에 1종 이상의 다른 치료제를 투여하는 것을 포함하는, 방법.
- [0265] 구현예 61. 구현예 60에 있어서, 상기 1종 이상의 다른 치료제가 통증, 염증, 안구 고혈압 및/또는 경직성 긴장항진 치료에 유용한 제제인, 방법.
- [0266] 구현예 62. 구현예 60에 있어서, 상기 1종 이상의 다른 치료제가 다량체성 이온 채널의 효능제 또는 알로스테릭 조절제가 아닌, 방법.
- [0267] 구현예 63. 구현예 62에 있어서, 상기 1종 이상의 다른 치료제가 글리신이 아닌, 방법.
- [0268] 구현예 64. 상기 발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터, 및 약제학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는, 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태의 상기 예방 또는 치료 처치용 약제학적 조성물.
- [0269] 구현예 65. 흥분성 세포-관련된 질환 또는 장애의 상기 예방 또는 치료 처치를 위한; a) 상기 발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터; 및 b) 1종 이상의 다른 치료제의 조합.
- [0270] 구현예 66. 구현예 65에 있어서, 상기 1종 이상의 다른 치료제가 통증, 염증, 안구 고혈압 및/또는 경직성 긴장항진 치료에 유용한 제제인, 조합.
- [0271] 구현예 67. 구현예 65에 있어서, 상기 1종 이상의 추가의 치료제가 다량체성 이온 채널의 효능제 또는 알로스테릭 조절제가 아닌, 조합.

- [0272] 구현예 68. 구현예 67에 있어서, 상기 1종 이상의 추가의 치료제가 글리신이 아닌, 조합.
- [0273] 구현예 69. 상기 발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터; 포장제, 및 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태를 치료하기 위해 필요로 하는 포유동물에 상기 벡터 투여용 지침을 포함하는, 키트.
- [0274] 구현예 70. 구현예 69에 있어서, 추가로 1종 이상의 다른 치료제를 포함하는, 키트.
- [0275] 구현예 71. 필요로 하는 포유동물에서 흥분성 세포-관련된 질병 또는 병태의 상기 치료용 약제를 제조하기 위해, 상기 발현 카세트가 다량체성 이온 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터의 용도.
- [0276] 구현예 72. 의료 요법에서 사용을 위하여 상기 발현 카세트가 다량체성 클로라이드 채널의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터.
- [0277] 구현예 73. 상기 발현 카세트가 하기의 서브유닛을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터의 유효량을 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, 필요로 하는 포유동물에서 통증, 염증, 안구 고혈압 또는 경직성 긴장항진의 치료 방법: GlyR (예를 들면, GlyRa1, 예를 들면, hGlyRa1)).
- [0278] 구현예 74. 상기 발현 카세트가 GluCl의 서브유닛 (예를 들면, GluCl의 알파 서브유닛)을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트를 포함하는 벡터의 유효량을 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, 필요로 하는 포유동물에서 통증, 염증, 안구 고혈압 또는 경직성 긴장항진의 치료 방법.
- [0279] 구현예 75. 구현예 73 또는 74에 있어서, 효능제 또는 알로스테릭 조절제가 포유동물에 투여되지 않는, 방법.
- [0280] 구현예 76. 구현예 73-75 중 어느 하나에 있어서, 상기 인코딩된 서브유닛이 적어도 1종의 돌연변이를 포함하는, 방법.
- [0281] 구현예 77. 상기 α -서브유닛이 서브유닛의 다량체화시 항상적 활성 GlyR을 초래하는 적어도 1종의 돌연변이를 포함하는, 글리신 수용체 (GlyR)의 α -서브유닛을 인코딩하는 서열을 포함하는, 핵산.
- [0282] 구현예 78. 구현예 77에 있어서, GlyR의 상기 인코딩된 α -서브유닛이 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는, 핵산: 알파-1 서브유닛, 알파-2 서브유닛, 및 알파-3 서브유닛 및 알파-4 서브유닛.
- [0283] 구현예 79. 구현예 77에 있어서, GlyR의 상기 인코딩된 α -서브유닛이 GlyR의 인간 α -서브유닛인, 핵산.
- [0284] 구현예 80. 구현예 79에 있어서, GlyR의 상기 인코딩된 α -서브유닛이 GlyR의 알파-1-서브유닛 (GlyRa1)인, 핵산.
- [0285] 구현예 81. 구현예 79에 있어서, GlyR의 상기 인코딩된 α -서브유닛이 인간 GlyRa1 (hGlyRa1)인, 핵산.
- [0286] 구현예 82. 구현예 77-81 중 어느 하나에 있어서, GlyR의 상기 인코딩된 α -서브유닛이 M2 막관통 도메인을 포함하고 적어도 1종의 돌연변이가 (GlyR의 대응하는 야생형 α -서브유닛에 비교된 경우) M2 막관통 도메인인, 핵산.
- [0287] 구현예 83. 구현예 82에 있어서, 상기 적어도 1종의 돌연변이가 (GlyR의 대응하는 야생형 α -서브유닛에 비교된 경우) 류신 9' 잔기인, 핵산.
- [0288] 구현예 84. 구현예 82에 있어서, 적어도 1종의 돌연변이가 표 2에 기재되는, 핵산.
- [0289] 구현예 85. 구현예 82에 있어서, 상기 적어도 1종의 돌연변이가 (GlyR의 대응하는 야생형 α -서브유닛에 비교된 경우) L9' A 또는 L9' G인, 핵산.
- [0290] 구현예 86. 구현예 82에 있어서, 상기 적어도 1종의 돌연변이가 L9' A인, 핵산.
- [0291] 구현예 87. 구현예 82에 있어서, 상기 핵산이 서열식별번호: 2에 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 핵산.
- [0292] 구현예 88. 구현예 87에 있어서, 상기 핵산이 서열식별번호: 2에 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 핵산.
- [0293] 구현예 89. 구현예 87에 있어서, 상기 핵산이 서열식별번호: 2를 포함하는, 핵산.

- [0294] 구현예 90. 구현예 87에 있어서, 상기 핵산이 서열식별번호: 2로 구성되는, 핵산.
- [0295] 구현예 91. 본 명세서에서 기재된 핵산에 의해 인코딩된, 폴리펩타이드.
- [0296] 구현예 92. 본 명세서에서 기재된 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 카세트.
- [0297] 구현예 93. 구현예 92에 있어서, 상기 프로모터가 조절가능 프로모터인, 발현 카세트.
- [0298] 구현예 94. 구현예 92에 있어서, 상기 프로모터가 항상적 프로모터인, 발현 카세트.
- [0299] 구현예 95. 구현예 92에 있어서, 상기 프로모터가 조직 특이적 프로모터인, 발현 카세트.
- [0300] 구현예 96. 구현예 92에 있어서, 상기 프로모터가 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는, 발현 카세트: 인간 시냅신-1 프로모터 (Syn1, 또는 hSyn), 인간 사이토메갈로바이러스 ("CMV") 프로모터, 닭 베타-액틴 ("CBA") 프로모터, 근육-특이적 테스민 프로모터, 매트릭스 Gla 단백질 (MGP) 프로모터 또는 이의 단편 및 키티나제 3-유사 1 (Ch3L1) 유전자의 5' 프로모터 영역.
- [0301] 구현예 97. 구현예 92에 있어서, 상기 프로모터가 인간 시냅신-1 프로모터 (hSyn)인, 발현 카세트.
- [0302] 구현예 98. 본 명세서에서 기재된 (예를 들면, 구현예 92-97 중 어느 하나에 기재된 바와 같이) 발현 카세트를 포함하는, 벡터.
- [0303] 구현예 99. 구현예 98에 있어서, 상기 벡터가 바이러스 벡터인, 벡터.
- [0304] 구현예 100. 구현예 99에 있어서, 상기 바이러스 벡터가 아데노바이러스, 렌티바이러스, 아데노-관련 바이러스 (AAV), 자기-상보적 AAV (scAAV), 폴리오바이러스, HSV, 또는 췌장과 말로니-기반 바이러스 벡터인, 벡터.
- [0305] 구현예 101. 구현예 100에 있어서, 바이러스 벡터가 AAV 벡터인, 벡터.
- [0306] 구현예 102. 구현예 101에 있어서, 상기 AAV 벡터가 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는, 벡터: AAV1, AAV2, AAV3, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 및 rAAV2/6.
- [0307] 구현예 103. 구현예 102에 있어서, 상기 벡터가 AAV6 벡터인, 벡터.
- [0308] 구현예 104. 본 명세서에서 기재된 (예를 들면, 구현예 98-103 중 어느 하나에 기재된 바와 같이) 벡터 및 약제학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0309] 구현예 105. 본 명세서에서 기재된 바와 같이 벡터를 포함하는, 바이러스 스톱.
- [0310] 본 발명의 (예를 들면, 구현예 98-103 중 어느 하나에 기재된 바와 같이) 벡터는 본 명세서에서 기재된 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다.
- [0311] DNA 및 단백질 서열은 인간 GlyRa1 서브유닛에 대하여 아래 보여진다. 양쪽 야생형 및 L9' A 돌연변이체 서열은 각각에 대하여 보여진다. 추가적으로, M2 도메인용 서열은 또한 포함된다.
- [0312] **핵산 서열**
- [0313] **인간** *GlyRa1* **야생형**

ATGTACAGCTTCAATACTCTTCGACTCTACCTTTGGGAGACCATTGTATTCTTCAGCCTTGCTGCTTCTAAGGAGGCTGAAGCTGCTCGCTCCGCACCCAAG
CCTATGTGACCCCTCGGATTTCCTGGATAAGCTAATGGGGAGAACCTCCGGATATGATGCCAGGATCAGGCCAATTTTAAAGGTCCCCAGTGAACGTGAGC
TGCAACATTTTCATCAACAGCTTTGGTTCCATTGCTGAGACAACCATGGACTATAGGGTCAACATCTTCTGCGGCAGCAATGGAACGACCCCCGCTGGCC
TATAATGAATACCCTGACGACTCTCTGGACCTGGACCCATCCATGCTGGACTCCATCTGGAACCTGACCTGTCTTTGCCAACGAGAAGGGGGCCACTTC
CATGAGATCACCACAGACAACAATTGCTAAGGATCTCCCGAATGGGAATGTCCTCTACAGCATCAGAATCACCTGACACTGGCCTGCCCCATGGACTTG
AAGAATTTCCCCATGGATGTCCAGACATGTATCATGCAACTGGAAGCTTTGGATATACGATGAATGACCTCATCTTTGAGTGGCAGGAACAGGGAGCCGTG
CAGGTAGCAGATGGACTAACTCTGCCCCAGTTTATCTTGAAGGAAGAGAAGGACTTGAGATACTGCACCAAGCACTACAACACAGGTAAATTCACCTGCATT
GAGGCCCGGTTCCACCTGGAGCGGCAGATGGGTTACTACCTGATTGATGATATATCCAGCCTGCTCATTGTCATCTCTCATGGATCTCTCTGATC
AACATGGATGCTGCACCTGCTCGTGTGGGCTAGGCATCACCCTGTGCTCACCATGACCACCCAGAGCTCCGGCTCTCGAGCATCTCTGCCCCAAGGTGTCC
TATGTGAAAGCCATTGACATTTGGATGGCAGTTTGCTGCTCTTTGTGTTCTCAGCCCTATTAGAATATGCTGCCGTTAACTTTGTGTCTCGGCAACATAAG
GAGCTGCTCCGATTCAGGAGGAAGCGGAGACATACAAGAGCCCATGTTGAATCTATTCCAGGAGGATGAAGCTGGAGAAGGCCGCTTTAACTTCTCTGCC
TATGGGATGGGCCAGCCTGTCTACAGGCCAAGGATGGCATCTCAGTCAAGGCGCCAACAACAGTAACACCACCAACCCCCCTCTGACCATCTAAGTCC
CCAGAGGAGATGCGAAAATCTTTCATCCAGAGGGCCAAGAAGATCGACAAAATATCCCGATTGGCTTCCCCATGGCCTTCTCATTTTCAACATGTTCTAC

TGGATCATCTACAAGATTGTCCGTAGAGAGGACGTCCACAACCAGTGA (서열식별번호: 1)

*L9' 잔기용 코돈은 볼드체로 보여진다.

인간 GlyRa1 L9' A 류테인

ATGTACAGCTTCAATACTCTTCGACTCTACCTTTGGGAGACCATTGTATTCTTCAGCCTTGCTGCTTCTAAGGAGGCTGAAGCTGCTCGCTCCGCACCCAAG
CCTATGTCACCCCTCGGATTTCCTGGATAAGCTAATGGGGAGAACCTCCGGATATGATGCCAGGATCAGGCCCAATTTTAAAGGTCCCCAGTGAACGTGAGC
TGCAACATTTTCATCAACAGCTTTGGTTCCATTGCTGAGACAACCATGGACTATAGGGTCAACATCTTCTGCGGCAGCAATGGAACGACCCCCGCTGGCC
TATAATGAATACCCGTGACGACTCTCTGGACCTGGACCCATCCATGCTGGACTCCATCTGGAACCTGACCTGTTCTTTGCCAACGAGAAGGGGGCCACTTC
CATGAGATCACCACAGACAACAAATTGCTAAGGATCTCCCGAATGGGAATGTCTCTACAGCATCAGAATCACCCCTGACACTGGCCTGCCCATGGACTTG
AAGAATTTCCCCATGGATGTCCAGACATGTATCATGCAACTGGAAGCTTTGGATATACGATGAATGACCTCATCTTTGAGTGGCAGGAACAGGGAGCCGTG
CAGGTAGCAGATGGACTAACTCTGCCCCAGTTTATCTTGAAGGAAGAGAAGGACTTGAGATACTGCACCAAGCACTACAACACAGGTAAATTCACCTGCATT
GAGGCCCGGTTCCACCTGGAGCGGCAGATGGGTTACTACCTGATTGATGATATATTTCCAGCCTGCTCATTGTCATCTCTCATGGATCTCTCTGATC
AACATGGATGCTGCACCTGCTCGTGTGGCCCTAGGCATCACCCTGTGGCCACCATGACACCCAGAGCTCCGGCTCTCGAGCATCTCTGCCCAAGGTGTCC
TATGTGAAAGCCATTGACATTTGGATGGCAGTTTGCTGCTCTTTGTGTTCTCAGCCCTATTAGAATATGCTGCCGTTAACTTTGTGTCTCGGCAACATAAG
GAGCTGCTCCGATTCAGGAGGAAGCGGAGACATCACAAGAGCCCATGTTGAATCTATTCCAGGAGGATGAAGCTGGAGAAGGCCGCTTTAACTTCTCTGCC
TATGGGATGGGCCAGCCTGTCTACAGGCCAAGGATGGCATCTCAGTCAAGGGGCCAACAACAGTAACACCACCAACCCCTCTGACCATCTAAGTCC
CCAGAGGAGATGCGAAAACCTTTCATCCAGAGGGCCAAGAAGATCGACAAAATATCCCGATTGGCTTCCCATGGCCTTCTCATTTTCAACATGTTCTAC
TGGATCATCTACAAGATTGTCCGTAGAGAGGACGTCCACAACCAGTGA (서열식별번호: 2)

*L9' A 잔기용 코돈은 볼드체로 보여진다.

단백질 번역

인간	GlyRa1	야생형
MYSFNTLRRLYLWETIVFFSLAASKEAEARSAPKPMSPSDFLDKLMGRITSGYDARIRPNFKGPPVNVSCNIFINSFGSIAETMDYRVNIFLRQQWNPRLA YNEYPDDSLDLDPMSLDLWKPDLFFANEKGAHFHEITTDNKLRLSRNGNVLYSIRITLTLACPMDLKNFPMQVQTCIMQLESFGYTMNDLIFEWQEQGAV QVADGLTLPQFILKEEKDLRYCTKHYNTGKFTCIERFHLERQMGYYLIQMYIPSLILVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTVLTMTTQSSGSRASLPKVS YVKAIDIMAVCLLFVFSALLEYAANFVSRQHKELLRFRKRHHKSPMLNLFQDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSTNTNPPAPSKS PEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ (서열식별번호: 3)		

*M2 영역은 밑줄치고 L' 9 잔기는 볼드체로 보여진다.

야생형 인간 GlyRa1의 M2 영역

P A R V G L G I T T V L T M T T Q S S G S (서열식별번호: 4)

-2' 02' 6' 9' 13' 16'

*L' 9 잔기는 볼드체로 보여지고 밑줄 친다.

인간 GlyRa1 L9' A 류테인

MYSFNTLRRLYLWETIVFFSLAASKEAEARSAPKPMSPSDFLDKLMGRITSGYDARIRPNFKGPPVNVSCNIFINSFGSIAETMDYRVNIFLRQQWNPRLA
YNEYPDDSLDLDPMSLDLWKPDLFFANEKGAHFHEITTDNKLRLSRNGNVLYSIRITLTLACPMDLKNFPMQVQTCIMQLESFGYTMNDLIFEWQEQGAV
QVADGLTLPQFILKEEKDLRYCTKHYNTGKFTCIERFHLERQMGYYLIQMYIPSLILVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTVATMTTQSSGSRASLPKVS
YVKAIDIMAVCLLFVFSALLEYAANFVSRQHKELLRFRKRHHKSPMLNLFQDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSTNTNPPAPSKS
PEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ (서열식별번호: 5)

*M2 영역은 밑줄치고 L' 9A 잔기는 볼드체로 보여진다.

L9' A 돌연변이체 인간 GlyRa1의 M2 영역

P A R V G L G I T T V A T M T T Q S S G S (서열식별번호: 6)

-2' 02' 6' 9' 13' 16'

*L' 9A 잔기는 볼드체로 보여지고 밑줄 친다.

특정 정의

- [0333] 용어 "핵산"은, 당, 포스페이트 및 퓨린 또는 피리미딘인 염기를 함유하는 모노머 (뉴클레오타이드)로 구성된, 단일- 또는 이중-가닥 형태로 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 및 이들의 폴리머를 지칭한다. 구체적으로 제한되지 않는 한, 상기 용어는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 갖는 그리고 자연 발생 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사작용되는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포함한다. 달리 나타내지 않는 한, 특정한 핵산 서열은 또한 전적으로 보존적으로 변형된 이의 변이체 (예를 들면, 축퇴 코돈 치환) 및 상보적 서열 뿐만 아니라 명백하게 지시된 서열을 포함한다. 구체적으로, 축퇴 코돈 치환은 1종 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합된 염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환되는 서열 생성에 의해 달성될 수 있다 (Batzer 등 (1991) Nucl. Acids Res., 19: 508; Ohtsuka 등 (1985) JBC, 260: 2605; Rossolini 등 (1994) Mol.Cell.Probes, 8: 91."핵산 단편"은 제공된 핵산 분자의 분획이다. 다수의 유기체에서 데옥시리보핵산 (DNA)는 유전 물질이고 반면 리보핵산 (RNA)는 DNA 안에 함유된 정보의 단백질로의 전이에 관여된다. 용어 "뉴클레오타이드 서열"은, DNA 또는 RNA 폴리머에 편집할 수 있는 합성, 비-천연 또는 변경된 뉴클레오타이드 염기를 선택적으로 함유하는, 단일- 또는 이중-가닥일 수 있는 DNA 또는 RNA의 폴리머를 지칭한다. 용어 "핵산", "핵산 분자", "핵산 단편", "핵산 서열 또는 분절", 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 또한 유전자, 유전자에 의해 인코딩된 cDNA, DNA 및 RNA와 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0334] 핵산 분자에 관련함에 따라, "부분" 또는 "단편"으로써, 본 발명의 서열 또는 분절은, 발현용 다른 서열에 연결되는 경우, 적어도 80 뉴클레오타이드, 더 바람직하게는 적어도 150 뉴클레오타이드, 및 더욱 더 바람직하게는 적어도 400 뉴클레오타이드를 갖는 서열을 의미한다. 발현을 위하여 이용되지 않았다면, "부분" 또는 "단편"은, 본 발명의 핵산 분자의 뉴클레오타이드 서열에 대응하는, 적어도 9, 바람직하게는 12, 더 바람직하게는 15, 더욱더 바람직하게는 적어도 20, 연속적인 뉴클레오타이드, 예를 들면, 프로브 및 프라이머 (올리고뉴클레오타이드)를 의미한다.
- [0335] 용어 "단백질", "펩타이드" 및 "폴리펩타이드"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0336] 본 발명은 단리된 또는 실질적으로 정제된 핵산 또는 단백질 조성물을 포함한다. 본 발명의 문맥에서, "단리된" 또는 "정제된" DNA 분자 또는 "단리된" 또는 "정제된" 폴리펩타이드는 그것의 원상태 환경에서 떨어져서 존재하고 그러므로 자연 생성물이 아닌 DNA 분자 또는 폴리펩타이드이다. 단리된 DNA 분자 또는 폴리펩타이드는 정제된 형태로 존재할 수 있거나 비-원상태 환경 예컨대, 예를 들어, 유전자도입 숙주 세포로 존재할 수 있다. 예를 들어, "단리된" 또는 "정제된" 핵산 분자 또는 단백질, 또는 이의 생물학적 활성 부분은 다른 세포 물질, 또는 재조합 기법에 의해 생산된 경우 배양 배지가 실질적으로 없거나, 화학적으로 합성된 경우 화학적 전구체 또는 다른 화합물이 실질적으로 없다. 일 구현예에서, "단리된" 핵산은 핵산이 유래되는 유기체의 게놈 DNA에서 핵산을 자연적으로 추출하는 서열 (즉, 핵산의 5' 및 3' 단부에 위치한 서열)이 없다. 예를 들어, 다양한 구현예에서, 단리된 핵산 분자는 핵산이 유래되는 세포의 게놈 DNA에서 핵산 분자를 자연적으로 추출하는 뉴클레오타이드 서열의 약 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb, 또는 0.1 kb 미만을 함유할 수 있다. 세포 물질이 실질적으로 없는 단백질은 오염 단백질의 (건조 중량으로), 약 30%, 20%, 10%, 5% 미만을 갖는 단백질 또는 폴리펩타이드의 제제를 포함한다. 본 발명의 단백질, 또는 이의 생물학적 활성 부분이 재조합으로 생산되는 경우, 바람직하게는 배양 배지는 화학적 전구체 또는 비-단백질-관심 화합물의 (건조 중량으로) 약 30%, 20%, 10%, 또는 5% 미만을 나타낸다. 개시된 뉴클레오타이드 서열의 단편 및 변이체 그리고 이로써 인코딩된 단백질 또는 부분-길이 단백질은 또한 본 발명에 의해 포함된다. "단편" 또는 "부분"은, 폴리펩타이드 또는 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 또는 상기의 아미노산 서열의 전장 또는 전장 미만을 의미한다.
- [0337] "자연 발생" 또는 "야생형"은 인공적으로 생산된 것과 구별되는 바와 같이 자연에서 발견될 수 있는 객체를 기재하기 위해 사용된다. 예를 들어, 자연에서 공급원로부터 단리될 수 있는 그리고 실험실에서 사람에 의해 의도적으로 변형되지 않았던, (바이러스를 포함하는) 유기체에서 존재하는 단백질 또는 뉴클레오타이드 서열은 자연 발생이다.
- [0338] 분자의 "변이체"는 원상태 분자의 서열에 실질적으로 유사한 서열이다. 뉴클레오타이드 서열에 대하여, 변이체는, 유전자 암호의 축퇴 때문에, 원상태 단백질의 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는 서열을 포함한다. 자연 발생 대립유전자 변이체 예컨대 이들은, 예를 들어, 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 및 하이브리드화 기법으로와 같이 공지된 분자 생물학 기법의 이용으로 확인될 수 있다. 변이체 뉴클레오타이드 서열은 또한 합성으로 유래된 뉴클레오타이드 서열, 예컨대, 예를 들어, 원상태 단백질을 인코딩하는 부위 지향적 돌연변이유발 이용에 의해 생성된 것, 뿐만 아니라 아미노산 치환을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 것을 포함한다. 일반적으로, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열 변이체는 하기를 가질 것이다: 적어도 40, 50, 60, 내지 70%, 예를 들면, 바람직하게는 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 내지 79%, 일반적으로 적어도 80%, 예를 들면, 81%-84%, 적어

도 85%, 예를 들면, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 내지 98%, 원상태 (내인성) 뉴클레오타이드 서열에 대한 서열 동일성.

- [0339] 특정한 핵산 서열의 “보존적으로 변형된 변동”은 동일한 또는 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열, 또는 핵산 서열이 아미노산 서열을 인코딩하지 않는 경우, 본질적으로 동일한 서열을 지칭한다. 유전자 암호의 축퇴 때문에, 다수의 기능적으로 동일한 핵산은 임의의 제공된 폴리펩타이드를 인코딩한다. 예를 들면 코돈 CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, 및 AGG는 모두 아미노산 아르기닌을 인코딩한다. 따라서, 아르기닌이 코돈에 의해 지정되는 모든 위치에서, 코돈은 인코딩된 단백질의 변경 없이 기재된 임의의 대응하는 코돈으로 변경될 수 있다. 상기 핵산 변동은 “보존적으로 변형된 변동”의 1종인 “침묵의 변동”이다. 폴리펩타이드를 인코딩하는 본 명세서에서 기재된 모든 핵산 서열은 또한, 달리 언급되는 경우를 제외하고, 모든 가능한 침묵의 변동을 기재한다. 기술 중 하나는 (통상적으로 메티오닌용 코돈뿐만, ATG 제외) 핵산에서 각각의 코돈이 표준 기법에 의해 기능적으로 동일한 분자를 수득하기 위해 변형될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 따라서, 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산의 각각의 “침묵의 변동”은 각각의 기재된 서열에서 암시된다.
- [0340] “재조합 DNA 분자”는, 예를 들어, 하기에 기재된 바와 같이 함께 DNA 서열을 결합하기 위해 사용된 재조합 DNA 기술 및 절차를 이용하여 함께 연결되는 DNA 서열의 조합이다: Sambrook 및 Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press (3rd edition, 2001).
- [0341] 용어 “이종성 DNA 서열”, “외인성 DNA 분절” 또는 “이종성 핵산”, 각각은 특정한 숙주 세포에 외래인 공급원으로부터 기원하거나, 동일한 공급원으로부터이면, 그의 최초 형태로부터 변형되는 서열을 지칭한다. 따라서, 숙주 세포에서 이종성 유전자는 특정한 숙주 세포에 내인성이지만 변형된 유전자를 포함한다. 상기 용어는 또한 자연 발생 DNA 서열의 비-자연 발생 다중 카피를 포함한다. 따라서, 상기 용어는 세포에 외래 또는 이종성이거나, 세포에 상동성인 DNA 분절 그러나 숙주 세포 안의 위치에서 요소가 통상적으로 발견되지 않는 핵산을 지칭한다. 외인성 DNA 분절은 발현되어 외인성 폴리펩타이드를 수득한다.
- [0342] “상동성” DNA 서열은 도입되는 숙주 세포와 자연적으로 관련되는 DNA 서열이다.
- [0343] “야생형”은 정상 유전자, 또는 임의의 공지된 돌연변이 없이 자연에서 발견된 유기체를 지칭한다.
- [0344] “게놈”은 유기체의 완전한 유전 물질을 지칭한다.
- [0345] “벡터”는, 특히, 자체 전달가능 또는 이동가능할 수 있거나 아닐 수 있는, 그리고 세포 게놈에 통합에 의해 원핵 또는 진핵생물 숙주 어느 한쪽을 형질전환시킬 수 있거나 염색체외로 존재할 수 있는 이중 또는 단일가닥 선형 또는 원형 형태로 임의의 바이러스 벡터, 플라스미드, 코스미드, 파아지 또는 2원 벡터 (예를 들면, 복제의 기원을 가진 자율적 복제 플라스미드)를 포함하도록 정의된다.
- [0346] “클로닝 벡터”는 외래 DNA 서열이 벡터, 뿐만 아니라 클로닝 벡터로 전환된 세포의 확인 및 선택에서 사용에 적당한 마커 유전자의 필수적인 생물학적 기능의 손실 없이 결정가능한 방식으로 삽입될 수 있는 하나 또는 소수의 제한 엔도뉴클레아제 인식 부위를 전형적으로 함유한다. 마커 유전자는 테트라사이클린 저항, 하이그로마이신 저항 또는 암피실린 저항을 제공하는 유전자를 전형적으로 포함한다.
- [0347] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 “발현 카세트”는, 종료 신호에 작동가능하게 연결되는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 적절한 숙주 세포에서 특정한 뉴클레오타이드 서열의 발현을 유도할 수 있는 DNA 서열을 의미한다. 또한 전형적으로 뉴클레오타이드 서열의 적절한 번역에 요구된 서열을 포함한다. 코딩 영역은 일반적으로 관심 단백질에 대하여 코딩하지만 또한 관심 기능성 RNA, 예를 들어 안티센스 RNA 또는 비번역된 RNA에 대하여 센스 또는 안티센스 방향으로 코딩할 수 있다. 관심 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트는, 적어도 1종의 그의 성분이 적어도 1종의 그의 다른 성분에 대해 이종성인 것을 의미하는, 키메라성일 수 있다. 발현 카세트는 또한 자연 발생이지만 이종성 발현에 유용한 재조합 형태로 수득된 것일 수 있다. 발현 카세트에서 뉴클레오타이드 서열의 발현은 숙주 세포가 일부 특정 외부 자극에 노출되는 경우에만 전사를 개시하는 항상성 프로모터 또는 유도성 프로모터의 제어 하일 수 있다. 다중세포 유기체의 경우에서, 프로모터는 또한 특정한 조직 또는 장기 혹은 발달 시기에 특이적일 수 있다.
- [0348] 상기 발현 카세트는 관심 뉴클레오타이드 서열에 연결된 본 발명의 전사 개시 영역을 포함할 것이다. 그와 같은 발현 카세트는 조절 영역의 전사 조절 하에 있기 위해 관심 유전자의 삽입용 복수의 제한 부위로 제공된다. 발현 카세트는 추가적으로 선별 마커 유전자를 함유할 수 있다.
- [0349] 용어 “RNA 전사체”는 DNA 서열의 RNA 폴리머라제 촉매화된 전사에서 비롯하는 생성물을 지칭한다. RNA 전사체가

DNA 서열의 완벽한 상보적 카피인 경우, 1차 전사체로서 지칭되거나 1차 전사체의 전사후 가공에서 유래된 RNA 서열일 수 있고 성숙한 RNA로서 지칭된다. "메신저 RNA" (mRNA)는 인트론이 없는 그리고 세포에 의해 단백질에 번역될 수 있는 RNA를 지칭한다. "cDNA"는 mRNA에 상보적이고 상기로부터 유래되는 단일- 또는 이중-가닥 DNA를 지칭한다.

- [0350] "조절 서열" 및 "적당한 조절 서열" 각각은 코딩 서열의 업스트림 (5' 비-코딩 서열), 내부, 또는 다운스트림 (3' 비-코딩 서열) 위치한 뉴클레오타이드 서열을 지칭하고, 이는 관련된 코딩 서열의 전사, RNA 가공 또는 안정성, 또는 번역에 영향을 미친다. 조절 서열은 인핸서, 프로모터, 번역 리더 서열, 인트론, 및 폴리아데닐화 신호 서열을 포함한다. 이들은 천연 및 합성 서열 뿐만 아니라 합성 및 천연 서열의 조합일 수 있는 서열을 포함한다. 상기 언급된 바와 같이, 용어 "적당한 조절 서열"은 비제한적으로 프로모터이다. 하지만, 본 발명에서 유용한 일부 적당한 조절 서열은, 비제한적으로 항상적 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 발달-특이적 프로모터, 유도성 프로모터 및 바이러스 프로모터를 포함할 것이다.
- [0351] "5' 비-코딩 서열"은 코딩 서열에 5' (업스트림) 위치한 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 개시 코돈의 완전히 가공된 mRNA 업스트림에서 존재하고 mRNA에 일차 전사체의 가공, mRNA 안정성 또는 번역 효율에 영향을 줄 수 있다 (Turner 등 (1995) Mol.Biotech.3: 225).
- [0352] "3' 비-코딩 서열"은 코딩 서열에 3' (다운스트림) 위치한 뉴클레오타이드 서열을 지칭하고 폴리아데닐화 신호 서열 및 mRNA 가공 또는 유전자 발현을 침범할 수 있는 조절 신호를 인코딩하는 다른 서열을 포함한다. 폴리아데닐화 신호는 일반적으로 mRNA 전구체의 3' 단부에 폴리아데닐산 미량의 첨가 영향을 특징으로 한다.
- [0353] 용어 "번역 리더 서열"은 RNA에 전사되는 코딩 서열과 프로모터 사이 유전자의 DNA 서열 부분을 지칭하고 번역 시작 코돈의 완전히 가공된 mRNA 업스트림 (5')에서 존재한다. 번역 리더 서열은 mRNA에 1차 전사체의 가공, mRNA 안정성 또는 번역 효율에 영향을 줄 수 있다.
- [0354] 용어 "성숙한" 단백질은 그의 신호 펩타이드 없이 번역후 가공된 폴리펩타이드를 지칭한다. "전구체" 단백질은 mRNA의 번역의 1차 생성물을 지칭한다. "신호 펩타이드"는, 전구체 펩타이드를 형성하는 폴리펩타이드와 함께 번역되고 분비성 경로에 그의 입장이 요구되는, 폴리펩타이드의 아미노 말단 연장을 지칭한다. 용어 "신호 서열"은 신호 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다.
- [0355] "프로모터"는, 적절한 전사를 위하여 요구된 RNA 폴리머라제 및 다른 인자에 대한 인식을 제공함으로써 코딩 서열의 발현을 제어하는, 그의 코딩 서열에 일반적으로 업스트림 (5')인, 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. "프로모터"는, 조절 인자가 발현의 제어를 위하여 첨가되는 것에, 전사 개시의 부위를 특징하는 역할을 하는 다른 서열 및 TATA- 박스로 구성된 짧은 DNA 서열인 최소 프로모터를 포함한다. "프로모터"는 또한 코딩 서열 또는 기능성 RNA의 발현을 제어할 수 있는 최소 프로모터 플러스 조절 인자를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 상기 유형의 프로모터 서열은 근위 및 더욱 원위 업스트림 요소로 구성되고, 후자 요소는 종종 인핸서로서 지칭된다. 따라서, "인핸서"는 프로모터 활성을 자극시킬 수 있는 그리고 프로모터의 타고난 요소 또는 프로모터의 수준 또는 조직 특이성을 향상시키기 위해 삽입된 이중성 요소일 수 있는 DNA 서열이다. 프로모터는 원상태 유전자로부터 그들의 전체로 유래될 수 있거나, 자연에서 발견된 상이한 프로모터로부터 유래된 상이한 요소로 구성될 수 있거나, 심지어 합성 DNA 분절로 구성될 수 있다. 프로모터는 또한 생리적 또는 발달성 병태에 반응하여 전사 개시의 유효성을 제어하는 단백질 인자의 결합에 관여되는 DNA 서열을 함유할 수 있다.
- [0356] "개시 부위"는, 위치 +1로서 또한 정의되는, 전사된 서열의 일부인 제1 뉴클레오타이드를 둘러싸는 위치이다. 상기 부위에 대해 유전자의 모든 다른 서열 및 그의 제어 영역은 넘버링된다. 다운스트림 서열 (즉 3' 방향에서 추가 단백질 인코딩 서열)은 양성으로 명명되고, 반면 (5' 방향에서 주로 제어 영역의) 업스트림 서열은 음성으로 명명된다.
- [0357] 불활성이거나 업스트림 활성화의 부재 하에 프로모터 활성을 크게 감소시킨 프로모터 요소, 특히 TATA 요소는 "최소 또는 코어 프로모터"로서 지칭된다. 적당한 전사 인자의 존재 하에, 최소 프로모터는 전사를 허용하도록 기능한다. "최소 또는 코어 프로모터"는 따라서 전사 개시에 필요한 모든 기저 요소, 예를 들면, TATA 박스 및/또는 개시제로만 구성된다.
- [0358] "항상적 발현"은 항상적 또는 조절된 프로모터를 이용하는 발현을 지칭한다. "조건적" 및 "조절된 발현"은 조절된 프로모터에 의해 제어된 발현을 지칭한다.
- [0359] "작동가능하게-연결된"은 하나의 기능이 다른 것에 영향을 받도록 단일 핵산 단편에서 핵산 서열의 회합을 지칭한다. 예를 들어, 조절 DNA 서열은 조절 DNA 서열이 코딩 DNA 서열의 발현에 영향을 주도록 (즉, 코딩 서열 또

는 기능성 RNA가 프로모터의 전사 제어 하에 있도록) 2 서열이 위치하면 폴리펩타이드 또는 RNA에 대하여 코딩하는 DNA 서열"에 작동가능하게 연결되는" 또는 "상기와 관련되는" 것으로 언급된다. 코딩 서열은 센스 또는 안티센스 배향으로 조절 서열에 작동가능하게-연결될 수 있다.

- [0360] "발현"은 내인성 유전자, 이식유전자의 세포에서 전사 및/또는 번역, 뿐만 아니라 센스 (mRNA) 또는 기능성 RNA의 전사 및 안정적인 축적을 지칭한다. 안티센스 작제물의 경우에서, 발현은 안티센스 DNA만의 전사를 지칭할 수 있다. 발현은 또한 단백질의 생산을 지칭할 수 있다.
- [0361] "전사 중단 단편"은, 전사를 종료시킬 수 있는, 1종 이상의 조절 신호를 함유하는 뉴클레오타이드 서열, 예컨대 폴리아데닐화 신호 서열을 지칭한다. 전사 중단 단편의 예는 종래 기술에 공지된다.
- [0362] "번역 중단 단편"은, 번역을 종료시킬 수 있는, 1종 이상의 조절 신호, 예컨대 1종 이상의 종료 코돈을 모든 3 프레임에서 함유하는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 코딩 서열의 5' 단부에서 개시 코돈에 인접한 또는 근처에 번역 중단 단편의 삽입은 무 번역 또는 부적절한 번역을 초래할 것이다. 부위-특이적 재조합에 의한 번역 중단 단편의 절개는 개시 코돈을 이용하여 적절한 번역을 방해하지 않는 코딩 서열에서 부위-특이적 서열을 남길 것이다.
- [0363] 용어 "시스-작용 서열" 및 "시스-작용 요소"는 기능이 동일한 분자에서 이들을 요구하는 DNA 또는 RNA 서열을 지칭한다.
- [0364] 용어 "트랜스-작용 서열" 및 "트랜스-작용 요소"는 기능이 동일한 분자에서 이들을 요구하지 않는 DNA 또는 RNA 서열을 지칭한다.
- [0365] 하기 용어들은 2 이상의 서열 (예를 들면, 핵산, 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드) 사이 서열 관계를 기재하기 위해 사용된다: (a) "참조 서열", (b) "비교 윈도우", (c) "서열 동일성", (d) "서열 동일성의 백분율", 및 (e) "실질적인 동일성".
- [0366] (a) 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "참조 서열"은 서열 비교용 기준으로서 사용된 정의된 서열이다. 참조 서열은 지정된 서열의 서브셋 또는 전체; 예를 들어, 전장 cDNA, 유전자 서열 또는 펩타이드 서열의 분절, 또는 완전한 cDNA, 유전자 서열 또는 펩타이드 서열로서일 수 있다.
- [0367] (b) 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "비교 윈도우"는 서열의 인접 및 지정된 분절을 참조하고, 여기서 비교 윈도우에서 상기 서열은 2 서열의 최적의 정렬을 위하여 (부가 또는 결실을 포함하지 않는) 참조 서열에 비교된 부가 또는 결실 (즉, 갭)을 포함할 수 있다. 일반적으로, 비교 윈도우는 적어도 20 인접 뉴클레오타이드 길이이고, 선택적으로 30, 40, 50, 100, 또는 초과일 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 서열에서 갭의 포함으로 인한 참조 서열에 높은 유사성을 피하기 위해 갭 페널티가 전형적으로 도입되고 매치의 수로부터 공제되는 것이 이해한다.
- [0368] 비교용 서열의 정렬 방법은 당해 기술에 공지되어 있다. 따라서, 임의의 2 서열 사이 퍼센트 동일성의 결정은 수학적 알고리즘을 이용하여 달성될 수 있다. 상기 수학적 알고리즘의 비제한 예는 하기의이다: 하기의 알고리즘: Myers 및 Miller (1988) CABIOS, 4: 11; 하기의 국부 상동성 알고리즘: Smith 등 (1981) Adv.Appl.Math.2: 482; 하기의 상동성 정렬 알고리즘: Needleman 및 Wunsch,(1970) JMB, 48: 443; 하기의 유사성 검색 방법: Pearson 및 Lipman, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444; 하기의 알고리즘: Karlin 및 Altschul, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2264, 하기에서와 같이 변형된: Karlin 및 Altschul, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873.
- [0369] 이들 수학적 알고리즘의 컴퓨터 실행은 서열 동일성을 결정하기 위한 서열의 비교에 이용될 수 있다. 상기 실행은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: (Intelligenetics, Mountain View, California로부터 이용가능한) PC/유전자 프로그램에서 CLUSTAL; ALIGN 프로그램 (버전 2.0) 및 GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, 그리고 (Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA로부터 이용가능한) Wisconsin Genetics Software Package, Version 8에서 TFASTA. 이들 프로그램을 이용하는 정렬은 디폴트 파라미터를 이용하여 수행될 수 있다. CLUSTAL 프로그램은 하기에 의해 양호하게 기재된다: Higgins 등 (1988) Gene 73: 237; Higgins 등 (1989) CABIOS 5: 151; Corpet 등 (1988) Nucl.Acids Res. 16: 10881; Huang등 (1992) CABIOS 8: 155; 및 Pearson 등 (1994) Meth. Mol. Biol. 24: 307.ALIGN 프로그램은 하기의 알고리즘에 기반된다: Myers 및 Miller, 상동. 하기의 BLAST 프로그램: Altschul 등 (1990) JMB, 215: 403; Nucl.Acids Res., 25: 3389 (1990) 은 하기의 알고리즘에 기반된다: Karlin 및 Altschul 상동.

- [0370] BLAST 분석 수행용 소프트웨어는 (월드 와이드 웹 ncbi.nlm.nih.gov/에서 이용가능한) National Center for Biotechnology Information을 통해 공공연하게 이용가능하다. 상기 알고리즘은, 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 단어로 정렬된 경우 일부 양성-평가된 역치 스코어 T 를 매치 또는 만족시키는, 쿼리 서열에서 길이 W 의 짧은 단어 확인에 의한 높은 평점 서열 쌍 (HSPs)의 최초 확인을 포함한다. T 는 이웃 단어 스코어 역치로서 지칭된다. 이들 초기 이웃 단어 히트는 이들을 함유하는 더 긴 HSPs를 찾기 위한 검사 개시용 씨드로서 작용한다. 단어 히트는 그 다음 누적 정렬 스코어가 증가될 수 있는 한 멀리 각각의 서열을 따라 양쪽 방향으로 연장된다. 누적 스코어는, 뉴클레오타이드 서열에 대하여, 파라미터 M (한 쌍의 매칭 잔기용 보상 스코어; 항상 > 0) 및 N (미스매칭 잔기용 패널치 스코어; 항상 < 0)을 이용하여 계산된다. 아미노산 서열에 대하여, 스코어링 매트릭스는 누적 스코어를 계산하기 위해 사용된다. 각각의 방향에서 단어 히트의 연장은 누적 정렬 스코어가 그의 최대 달성된 값에서 양 X 만큼 떨어지는 경우 중단되고, 누적 스코어는 1종 이상의 음성-스코어링 잔기 정렬의 축적으로 인해 0 또는 밑으로 가거나, 어느 한쪽 서열의 단부가 도달된다.
- [0371] 퍼센트 서열 동일성 계산에 더하여, BLAST 알고리즘은 또한 2 서열 사이 유사성의 통계적인 분석을 수행한다. BLAST 알고리즘에 의해 제공된 유사성의 하나의 측정은, 2 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 사이 매치가 우연히 발생할 개연성의 징후를 제공하는, 최소 합계 확률 ($P(N)$)이다. 예를 들어, 시험 핵산 서열은 참조 핵산 서열에 시험 핵산 서열의 비교에서 최소 합계 확률이 약 0.1 미만, 더 바람직하게는 약 0.01 미만, 및 가장 바람직하게는 약 0.001 미만이면 참조 서열에 유사한 것으로 간주된다.
- [0372] 비교 목적으로 갱땀된 정렬을 수득하기 위해, 갱땀된 BLAST (BLAST 2.0)은 하기에 기재된 바와 같이 이용될 수 있다: Altschul 등 (1997) NucleicAcids Res. 25: 3389. 대안적으로, PSI-BLAST (BLAST 2.0)은 분자 사이 원연 관계를 검출하는 반복된 검사를 수행하기 위해 사용될 수 있다. 참고 Altschul 등, 상동. BLAST, 갱땀된 BLAST, PSI-BLAST를 이용하는 경우, 하기의 디폴트 파라미터: 각각의 프로그램 (예를 들면, 뉴클레오타이드 서열용 BLASTN, 단백질용 BLASTX)는 사용될 수 있다. (뉴클레오타이드 서열용) BLASTN 프로그램은 디폴트로서 단어길이 (W) 11, 기대 (E) 10, 컷오프 100, $M=5$, $N=-4$, 및 양쪽 가닥의 비교를 이용한다. 아미노산 서열에 대하여, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 단어길이 (W) 3, 기대 (E) 10, 및 BLOSUM62 스코어링 매트릭스를 이용한다. 참고 월드 와이드 웹 ncbi.nlm.nih.gov. 정렬은 또한 육안 검사에 의해 수작업으로 수행될 수 있다.
- [0373] 본 발명의 목적을 위하여, 또 다른 서열에 퍼센트 서열 동일성의 결정을 위한 서열의 비교는 그의 디폴트 파라미터 또는 임의의 등가 프로그램과 BlastN 프로그램 (버전 1.4.7 또는 이후)를 이용하여 실시될 수 있다. "등가 프로그램"은, 문제의 임의의 2 서열에 대하여, 바람직한 프로그램에 의해 생성된 대응하는 정렬에 비교된 경우 동일한 퍼센트 서열 동일성 및 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기 매치를 갖는 정렬을 생성하는 의도된 임의의 서열 비교 프로그램이다.
- [0374] (c) 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 2 핵산 또는 폴리펩타이드 서열의 문맥에서 "서열 동일성" 또는 "동일성"은, 서열 비교 알고리즘 또는 육안 검사에 의해 측정된 바와 같이, 지정된 비교 윈도우에 걸쳐 최대 관련성으로 정렬된 경우 동일한 2 서열에서 잔기의 지정된 백분율을 참조한다. 서열 동일성의 백분율이 단백질에 관련하여 사용되는 경우 동일하지 않은 잔기 위치가 종종 보존적 아미노산 치환에 의해 상이한 것이 인식되고, 여기에서 아미노산 잔기가 유사한 화학적 특성 (예를 들면, 전하 또는 소수성)을 가진 다른 아미노산 잔기로 치환되고 그러므로 분자의 기능성 특성을 변화시키지 않는다. 서열이 보존적 치환에서 상이한 경우, 퍼센트 서열 동일성은 치환의 보존적 성질 수정하기 위해 상향으로 조정될 수 있다. 상기 보존적 치환에 의해 상이한 서열은 "서열 유사성" 또는 "유사성"을 갖는 것으로 언급된다. 상기 조정을 하기 위한 수단은 당해 분야의 숙련가에 잘 알려져 있다. 전형적으로 이것은 전체 미스매치보다는 부분으로서 보존적 치환 스코어링을 포함하여, 이로써 백분율 서열 동일성을 증가시킨다. 따라서, 예를 들어, 동일한 아미노산이 1의 스코어 그리고 비-보존적 치환이 0의 스코어로 제공되는 경우, 보존적 치환은 0과 1 사이 스코어로 제공된다. 보존적 치환의 스코어링은, 예를 들면, 프로그램 PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California)에서 시행된 바와 같이, 계산된다.
- [0375] (d) 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "서열 동일성의 백분율"은 비교 윈도우에 걸쳐 2 최적으로 정렬된 서열 비교에 의해 결정된 값을 의미하고, 여기서 비교 윈도우에서 서열의 부분은 2 서열의 최적의 정렬을 위하여 (부가 또는 결실을 포함하지 않는) 참조 서열에 비교된 경우 부가 또는 결실 (즉, 갱)을 포함할 수 있다. 백분율은 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 매칭된 위치의 수를 산출하기 위해 양쪽 서열에서 발생하는 위치의 수 결정, 비교의 윈도우에서 위치의 총 수로 매칭된 위치의 수 나눗셈, 및 그 결과의 100 곱셈에 의해 계산되어 서열 동일성의 백분율을 산출한다.
- [0376] (e) (i) 서열의 용어 "실질적인 동일성"은 폴리뉴클레오타이드가, 표준 파라미터를 이용하여 기재된 정렬 프로

그램 중 하나를 이용하여 참조 서열에 비교된, 적어도 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 또는 79%, 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 또는 89%, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 또는 94%, 및 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다는 것을 의미한다. 당해 분야의 숙련가는 이들 값이 코돈 축퇴, 아미노산 유사성, 해독틀 위치결정, 및 기타 등등을 고려함으로써 2 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩된 단백질의 대응하는 동일성을 결정하기 위해 적절하게 조정될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 이들 목적을 위하여 아미노산 서열의 실질적인 동일성은 정상적으로 적어도 70%, 적어도 80%, 90%, 적어도 95%의 서열 동일성을 의미한다.

[0377] 뉴클레오타이드 서열이 실질적으로 동일하다는 또 다른 징후는 2 분자가 엄격한 조건 하에 서로 하이브리드화하는 경우이다 (참고 아래). 일반적으로, 엄격한 조건은 정의된 이온 강도 및 pH에서 특이적 서열에 대하여 열적 용융점 (T_m)보다 낮은 약 5 °C이도록 선택된다. 하지만, 엄격한 조건은, 본 명세서에서 달리 적격화되는 바와 같이 엄격성의 요망된 정도에 따라, 약 1 °C 내지 약 20 °C의 범위에서 온도를 포함한다. 엄격한 조건 하에 서로 하이브리드화하지 않는 핵산은 이들이 인코딩하는 폴리펩타이드가 실질적으로 동일하면 여전히 실질적으로 동일하다. 이것은, 예를 들면, 핵산의 카피가 유전자 암호에 의해 허용된 최대 코돈 축퇴를 이용하여 창출되는 경우, 발생할 수 있다. 2 핵산 서열이 실질적으로 동일하다는 하나의 징후는 제1 핵산에 의해 인코딩된 폴리펩타이드가 제2 핵산에 의해 인코딩된 폴리펩타이드와 면역학적으로 교차 반응성인 경우이다.

[0378] (e) (ii) 펩타이드의 문맥에서 용어 "실질적인 동일성"은 펩타이드가, 지정된 비교 원도우에 걸쳐 참조 서열에 서열 동일성, 적어도 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 또는 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 또는 89%, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 또는 94%, 또는 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%를 가진 서열을 포함하는 것을 표시한다. 최적의 정렬은 하기의 상동성 정렬 알고리즘을 이용하여 수행된다: Needleman 및 Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970). 2 펩타이드 서열이 실질적으로 동일하다는 징후는 하나의 펩타이드가 제2 펩타이드에 대해 상승된 항체와 면역학적으로 반응성인 것이다. 따라서, 예를 들어, 2 펩타이드가 보존적 치환에 의해서만 상이한 경우, 펩타이드는 제2 펩타이드에 실질적으로 동일하다.

[0379] 서열 비교를 위하여, 전형적으로 하나의 서열은 시험 서열이 비교되는 참조 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 이용하는 경우, 시험 및 참조 서열은 컴퓨터에 입력되고, 하위서열 배위는 필요하면 지정되고, 서열 알고리즘 프로그램 파라미터는 지정된다. 서열 비교 알고리즘은 그 다음, 지정된 프로그램 파라미터에 기반하여, 참조 서열에 비해 시험 서열(들)용 퍼센트 서열 동일성을 계산한다.

[0380] 전술한 바와 같이, 2 핵산 서열이 실질적으로 동일하다는 또 다른 징후는 2 분자가 엄격한 조건 하에 서로 하이브리드화한다는 것이다. 어구 "구체적으로 하이브리드화하는"은 그 서열이 복합 혼합물 (예를 들면, 총 세포성) DNA 또는 RNA에서 존재하는 경우 엄격한 조건 하에 특정한 뉴클레오타이드 서열에만 분자의 결합, 중복화, 또는 하이브리드화를 지칭한다. "실질적으로 결합한다"는 탐침 핵산과 표적 핵산 사이 상보적 하이브리드화를 지칭하고 상기 표적 핵산 서열의 요망된 검출을 달성하기 위해 하이브리드화 배지의 엄격성 감소에 의해 수용될 수 있는 소수의 미스매치를 포함한다.

[0381] "엄격한 하이브리드화 조건" 및 "엄격한 하이브리드화 세정 조건"은 핵산 하이브리드화 실험 예컨대 서던 및 노던 하이브리드화의 문맥에서 서열 의존적이고, 상이한 환경 파라미터 하에 상이하다. 더 긴 서열은 구체적으로 더 높은 온도에서 하이브리드화한다. 열적 용융점 (T_m)은 상기 표적 서열의 50%가 완벽하게 매칭된 탐침에 하이브리드화하는 (정의된 이온 강도 및 pH 하의) 온도이다. 특이성은 전형적으로 후-하이브리드화 세정의 기능이고, 핵심 인자는 최종 세정 용액의 이온 강도 및 온도이다. DNA-DNA 하이브리드를 위하여, T_m 은 하기의 방정식으로부터 근사치로 계산될 수 있다: Meinkoth 및 Wahl (1984) Anal. Biochem. 138: 267; T_m 81.5 °C + 16.6 (log M) + 0.41 (%GC) - 0.61 (% form) - 500/L; 여기에서 M은 1가 양이온의 몰농도이고, %GC는 DNA에서 구아노신 및 시토신 뉴클레오타이드의 백분율이고, % 형태는 하이브리드화 용액에서 포름아미드의 백분율이고, L은 염기쌍내 하이브리드의 길이이다. T_m 은 미스매치의 각 1%에 대하여 약 1 °C만큼 감소되고; 따라서, T_m , 하이브리드화, 및/또는 세정 조건은 요망된 동일성의 서열에 하이브리드화하기 위해 조정될 수 있다. 예를 들어, >90% 동일성을 가진 서열이 구해지면, T_m 은 10 °C 감소될 수 있다. 일반적으로, 엄격한 조건은 정의된 이온 강도 및 pH에서 특이적 서열 및 그의 보체에 대하여 T_m 보다 낮은 약 5 °C이도록 선택된다. 하지만, 심하게 엄격한 조건은 T_m 보다 낮은 1, 2, 3, 또는 4 °C에서 하이브리드화 및/또는 세정을 사용할 수 있고; 중간 정도로 엄격한 조건은 T_m 보다 낮은 6, 7, 8, 9, 또는 10 °C에서 하이브리드화 및/또는 세정을 사용할 수 있고; 낮은 엄격성 조

건은 T_m 보다 낮은 11, 12, 13, 14, 15, 또는 20°C에서 하이브리드화 및/또는 세정을 사용할 수 있다. 상기 방정식, 하이브리드화 및 세정 조성물, 및 요망된 온도를 이용하여, 통상적인 기술의 것은 하이브리드화 및/또는 세정 용액의 엄격성에서 변동이 본질적으로 기재되는 것을 이해할 것이다. 미스매칭의 요망된 정도가 45 °C (수용액) 또는 32 °C (포름아미드 용액) 미만의 온도를 초래하면, 더 높은 온도가 사용될 수 있도록 SSC 농도를 증가시키는 것이 바람직하다. 핵산의 하이브리드화에 대한 광범위한 가이드는 하기에 발견된다: Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Hybridization with Nucleic Acid Probes, part I chapter 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" Elsevier, New York (1993). 일반적으로, 고도로 엄격한 하이브리드화 및 세정 조건은 정의된 이온 강도 및 pH에서 특이적 서열에 대하여 T_m 보다 낮은 약 5 °C이도록 선택된다.

[0382] 고도로 엄격한 세정 조건의 예는 약 15 분 동안 72 °C에서 0.15 M NaCl이다. 엄격한 세정 조건의 예는 15 분 동안 65 °C에서 0.2X SSC 세정이다 (참고, Sambrook, *아래*, SSC 완충액의 설명에 대하여). 종종, 고 엄격성 세정은 낮은 엄격성 세정에 의해 선행되어 배경 탐침 신호를 제거한다. 예를 들면, 100 뉴클레오타이드 초과인 듀플렉스에 대한 예 중간 엄격성 세정은 15 분 동안 45 °C에서 1X SSC이다. 예를 들면, 100 뉴클레오타이드 초과인 듀플렉스에 대한 예 낮은 엄격성 세정은 15 분 동안 40 °C에서 4-6X SSC이다. 짧은 탐침 (예를 들면, 약 10 내지 50 뉴클레오타이드)에 대하여, 엄격한 조건은 전형적으로 pH 7.0 내지 8.3에서 약 1.5 M 미만, 더 바람직하게는 약 0.01 내지 1.0 M, Na 이온 농축물 (또는 다른 염)의 염 농도를 포함하고, 온도는 하기에 대하여 전형적으로 적어도 약 30 °C 및 적어도 약 60 °C다: 긴 탐침 (예를 들면, >50 뉴클레오타이드). 엄격한 조건은 또한 불안정화제 예컨대 포름아미드의 첨가로 달성될 수 있다. 일반적으로, 특정한 하이브리드화 검정에서 관련없는 탐침에 대하여 관측한 것보다 2X (또는 더 높은 것)의 신호 대 잡음비는 특이적 하이브리드화의 검출을 표시한다. 엄격한 조건 하에 서로 하이브리드화하지 않는 핵산은 이들이 인코딩하는 단백질이 실질적으로 동일하면 여전히 실질적으로 동일하다. 이것은, 예를 들면, 핵산의 카피가 유전자 암호에 의해 허용된 최대 코돈 축퇴를 이용하여 창출되는 경우, 발생한다.

[0383] 매우 엄격한 조건은 특정한 탐침에 대하여 T_m 과 같도록 선택된다. 서던 또는 노던 블랏에서 필터상에 100 상보적 잔기 초과를 갖는 상보적 핵산의 하이브리드화용 엄격한 조건의 예는 50% 포름아미드, 예를 들면, 37 °C에서 50% 포름아미드, 1 M NaCl, 1% SDS내 하이브리드화, 및 60 내지 65 °C에서 0.1X SSC내 세정이다. 예시적인 낮은 엄격성 조건은 37 °C에서 30 내지 35% 포름아미드, 1M NaCl, 1% SDS (나트륨 도데실 설페이트)의 완충 용액으로 하이브리드화, 및 50 내지 55 °C에서 1X 내지 2X SSC (20X SSC = 3.0 M NaCl/0.3 M 트리나트륨 시트레이트)내 세정을 포함한다. 예시적인 중간 정도 엄격성 조건은 37 °C에서 40 내지 45% 포름아미드, 1.0 M NaCl, 1% SDS내 하이브리드화, 및 55 내지 60 °C에서 0.5X 내지 1X SSC내 세정을 포함한다.

[0384] "변이체" 폴리펩타이드는 원상태 단백질의 N-말단 및/또는 C-말단에 1종 이상의 아미노산의 결실 (소위 절단) 또는 부가; 원상태 단백질에서 1종 이상의 부위에 1종 이상의 아미노산의 결실 또는 부가; 또는 원상태 단백질에서 1종 이상의 부위에 1종 이상의 아미노산의 치환에 의해 원상태 단백질로부터 유래된 폴리펩타이드가 의도된다. 상기 변이체는, 예를 들어, 유전적 다형성 또는 인간 조작에서 비롯할 수 있다. 상기 조작 방법은 당해 분야에 일반적으로 공지된다.

[0385] 따라서, 본 발명의 폴리펩타이드는 아미노산 치환, 결실, 절단, 및 삽입을 포함하는 다양한 방식으로 변경될 수 있다. 상기 조작 방법은 당해 분야에 일반적으로 공지된다. 예를 들어, 폴리펩타이드의 아미노산 서열 변이체는 DNA에서 돌연변이에 의해 제조될 수 있다. 돌연변이유발 및 뉴클레오타이드 서열 변경 방법은 당해 기술에 공지되어 있다. 참고, 예를 들어, Kunkel(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488; Kunkel 등 (1987) Meth. Enzymol. 154: 367; U.S.특허 번호 4,873,192; Walker 및 Gastra (1983) Techniques in Mol. Biol. (MacMillan PublishingCo., 및 본 명세서에서 인용된 참조문헌. 관심 단백질의 생물학적 활성에 영향을 주지 않는 적절한 아미노산 치환에 관한 지도는 하기의 모델에서 발견될 수 있다: Dayhoff 등, Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. BioMed. Res. Found.1978). 보존적 치환, 예컨대 하나의 아미노산을 유사한 특성을 가진 또 다른 것으로 교환이 바람직하다.

[0386] 따라서, 본 발명의 유전자 및 뉴클레오타이드 서열은 양쪽 자연 발생 서열 뿐만 아니라 돌연변이체 형태를 포함한다. 마찬가지로, 본 발명의 폴리펩타이드는 자연 발생 단백질 뿐만 아니라 이들의 변동 및 변형된 형태를 포함한다. 상기 변이체는 요망된 활성을 계속 보유할 것이다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 포함된 폴리펩타이드 서열의 결실, 삽입, 및 치환은 폴리펩타이드의 특징에서 라디칼 변화를 생산할 수 없다. 하지만, 그렇게 하기에 앞서 치환, 결실, 또는 삽입의 정확한 효과를 예측하기 어려운 경우, 당해 분야의 숙련가는 효과가 일상적

인 선별 검정에 의해 평가될 것을 인식할 것이다.

- [0387] 인코딩된 서열에서 단일 아미노산 또는 아미노산의 작은 백분율 (전형적으로 5% 미만, 더욱 전형적으로 1% 미만)을 변경, 부가 또는 결실하는 개별 치환 결실 또는 부가는, 변경이 화학적으로 유사한 아미노산으로 아미노산을 치환시키는 것을 초래하는, “보존적으로 변형된 변동”이다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당해 기술에 공지되어 있다. 하기 5 그룹 각각은 서로에 대하여 보존적 치환인 아미노산을 함유한다: 지방족: 글리신 (G), 알라닌 (A), 발린 (V), 류신 (L), 이소류신 (I); 방향족: 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W); 황-함유: 메티오닌 (M), 시스테인 (C); 염기성: 아르기닌 (R), 라이신 (K), 히스티딘 (H); 산성: 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E), 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q). 또한, 인코딩된 서열에서 단일 아미노산 또는 아미노산의 작은 백분율을 변경, 부가 또는 결실하는 개별 치환, 결실 또는 부가는 또한 “보존적으로 변형된 변동”이다.
- [0388] 용어 “형질전환”은, 유전적으로 안정적인 상숙을 초래하는, 숙주 세포의 게놈에 핵산 단편의 전이를 지칭한다. 형질전환된 핵산 단편을 함유하는 숙주 세포는 “유전자도입” 세포로서 지칭되고, 유전자도입 세포를 포함하는 유기체는 “유전자도입 유기체”로서 지칭된다.
- [0389] “형질전환된”, “유전자도입”, “형질도입된” 및 “재조합”은 이중성 핵산 분자가 도입된 숙주 세포 또는 유기체를 지칭한다. 핵산 분자는 당해 분야에 일반적으로 공지된 게놈에 안정적으로 통합될 수 있고 하기에 개시된다: Sambrook 및 Russell, *상동*. 참고 또한 Innis 등, *PCR Protocols*, Academic Press (1995); 및 Gelfand, *PCR Strategies*, Academic Press (1995); 및 Innis 및 Gelfand, *PCR Methods Manual*, Academic Press (1999). PCR의 공지된 방법은, 비제한적으로, 쌍으로 된 프라이머, 내포된 프라이머, 단일 특이적 프라이머, 축퇴 프라이머, 유전자-특이적 프라이머, 벡터-특이적 프라이머, 부분적으로 미스매칭된 프라이머, 및 기타 동종을 이용하는 방법을 포함한다. 예를 들어, “형질전환된”, “형질전환성”, 및 “유전자도입” 세포는 형질전환 공정을 통해서일 수 있고 그들의 염색체에 통합된 외래 유전자를 함유한다. 용어 “미형질전환된”은 형질전환 공정을 통하지 않은 정상 세포를 지칭한다.
- [0390] 질환 상태/병태 치료와 관련하여, 용어 “치료적 유효량”은 단일 용량으로서 또는 다중 용량으로 투여된 경우 질환 상태/병태의 임의의 증상, 측면, 또는 특징에 관한 임의의 검출가능한, 긍정적인 효과를 가질 수 있는 약제학적 조성물에 함유된 경우 또는 단독으로 벡터의 양을 지칭한다. 상기 효과는 유익하도록 절대적일 필요가 없다.
- [0391] 용어 “치료한다” 및 “치료”는 양쪽 처치 치료 및 예방 또는 예방적 조치를 지칭하고, 여기서 본 목적은 요망되지 않는 생리 변화 또는 장애를 예방 또는 감소시키는 것이다. 본 발명을 위해, 유익한 또는 요망된 임상 결과는, 비제한적으로, 증상의 경감, 질환 정도의 약화, 질환의 안정화된 (즉, 악화되지 않은) 상태, 질환 진행의 지연 또는 저속화, 질환 상태의 완화 또는 일시적 처방, 및 검출가능한 또는 검출불가능한 차도 (부분적 또는 전체적)을 포함한다. “치료”는 또한 치료를 받지 않으면 기대된 생존에 비교된 지속적 생존을 의미할 수 있다. 치료가 필요한 것은 이미 병태 또는 장애를 가진 것 뿐만 아니라 병태 또는 장애를 갖는 경향이 있는 것 혹은 병태 또는 장애가 예방되는 것을 포함한다.
- [0392] 본 발명의 방법은, 인간, 통상 실험실 포유동물 (예를 들면, 마우스, 랫트, 기니아 피그, 개, 돼지, 원숭이, 유인원, 등) 및 수의과 동물 예컨대 고양이, 개, 돼지, 말, 소, 양, 및 기타 동종을 포함하는, 포유동물 (예를 들면, 포유동물의 흥분성 세포), 뿐만 아니라 다른 척색동물문 (예를 들면, 조류, 파충류, 양서류, 경골 및 연골어류, 등)에 적용될 수 있다.
- [0393] 실시예
- [0394] 본 발명의 특정 구현에는 하기 비제한 실시예에 의해 이제 설명될 것이다.
- [0395] 실시예 1
- [0396] **목적**
- [0397] 본 연구의 목적은 HEK-293 세포내 β -서브유닛 (단량체성 발현)의 부재 하에 hGlyRa1 단독의 발현이 천연 효능제 글리신 및/또는 타우린에 반응성이었던 기능성 채널을 형성할 수 있는지를 결정하는 것이었다.
- [0398] **물질**
- [0399] 형광 태그된 인간 글리신 수용체 서브유닛 알파 1, 및 단량체성 향상된 황색 형광 단백질 (mEYFP) 동형체 a에

대하여 완전한 코딩 서열을 함유하는 플라스미드 벡터 pFB-CMV-hGlyRa1-P2A-mEYFP (GenScript)는 이 연구에서 사용되었다. 합성 유전자 pFB-CMV-hGlyRa1-P2A-mEYFP는 합성 올리고뉴클레오타이드 및/또는 PCR 생성물로부터 조립되었다. 단편은 pcDNA3.1(+)에 삽입되었다. 플라스미드 DNA는 전환된 박테리아로부터 정제되었고 농도는 UV 분광법에 의해 결정되었다. 최종 작제물은 서열분석에 의해 확인되었다.

[0400] 유전자 명칭: *pFB-CMV-hGlyRa1-P2A-mEYFP*

[0401] 유전자 크기: 1374 bp

[0402] 벡터 골격: *pcDNA3.1(+)*

[0403] 클로닝 부위: *BamHI* / *AscI*

[0404] 세포

[0405] 인간 배아 신장 (HEK) 293 세포는 ATCC (#CRL-1573)으로부터 구매되었다. 세포는 10% FBS (Gibco #26140), 100 유닛/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신 (Gibco #15140), 및 1 mM 나트륨 피루베이트 (Gibco #11360)으로 보충된 돌베코 변형된 이글 배지 (DMEM; Gibco #11965)에서 배양되었고, 가습된 인큐베이터에서 37 °C 및 5% CO₂에 유지되었다. 세포는 매 3 내지 4 일 1: 5 또는 1: 10의 계대배양 비에서 융합성인 경우 통과되었다.

[0406] 방법의 설명

[0407] 세포 배양

[0408] FlexStation 검정을 위하여, HEK-293 세포는 20,000 세포/웰에, 100 µl/웰의 플레이팅 용적으로, 흑색-측면/투명-저면 96-웰 이미지형성 플레이트 (BD Falcon #353219)에서 플레이팅되었다. 형질감염을 위하여, 750 µl Opti-MEM (Gibco 31985-070)내 16 µg 총 DNA는 750 µl Opti-MEM내 30 µl ExpressFect와 혼합되었고, 20 분 동안 사전-인큐베이션되었고, 그 다음 100 µl 신선한 배양 배지를 함유하는 세포에 15 µl/웰로 첨가되었다. 세포는 플레이팅 이후 24 시간에 형질감염되었고 형질감염 이후 48 시간에 분석되었다. 형질감염 혼합물은 37 °C/5% CO₂에서 4-6 시간 인큐베이션 기간 이후 배양액으로부터 제거되었고 L-글루타민 (Gibco 25030-081)로 보충된, 신선한 무 글리신, 배양 배지 (Gibco 12360-038)로 대체되었다

[0409] 막 전위 측정

[0410] FLIPR 막 전위 검정 키트, BLUE 제형, (Molecular Devices, #R8042)를 사용하는 형광-기반 검정은 세포 막을 거쳐 전압 변화를 검출하기 위해 사용되었다. 염료 장입 완충액은 패키지 문헌에 따라 제조되었다. 구체적으로, BLUE 시약의 하나의 바이알의 내용물은 5 mL의 1x 검정 완충액으로 용해되었고, 그 다음 또 다른 5 mL의 1x 검정 완충액으로 바이알을 세정하여, 10 mL의 염료 장입 완충액의 총 용적을 수득하였다. 염료 장입 완충액의 미 사용된 부분은 -20 °C에서 저장되었고 5 일 이내 사용되었다. 기능성 검정을 위하여, 배양 배지는 세포로부터 제거되었고 50 µl 무 글리신 MEM으로 대체되었다. 세포는 그 다음 50 µl의 청색 염료 장입 완충액으로 장입되었고 40 min 동안 37 °C/5% CO₂에서 인큐베이션되었다. 신호는 SoftMax Pro Data Acquisition & Analysis Software (Molecular Devices)에 의해 작동된 FlexStation 3 다중방식 벤치톱 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 검출되었다. 여기 및 방출 파장은, 550 nm의 방출 컷오프로, 530 nm 및 565 nm, 각각에서 설정되었다. 플레이트 판독은 '저 PMT' 셋팅으로 30 °C에서 수행되었다. 기저 형광을 최초 20 s 측정하였던, 실행 시간은 글리신-유도된 신호에 대하여 300 s이었다. 다른 FlexStation 파라미터는 피펫 높이 130 µl, 초기 웰 용적 100 µl, 전이 용적 50 µl (그러므로, 약물 농축물은 3x 제조되었다), 및 ~31 µl/sec에 대응하는, 전이 속도 셋팅 2를 포함하였다.

[0411] 글리신 및 타우린에 대한 농도/반응 곡선은 hGlyRa1-형질감염된 세포에서 생성되었다. 사용된 글리신 및 타우린 농도는 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 µM이었다. 글리신에 대한 용량 반응 곡선은 100 µM 타우린의 존재 하에 또한 생성되었다. 글리신 및 타우린은 10 mM 스톱으로서 DMSO에 용해되었고 -20 °C에서 0.3 mM 분취액으로서 저장되었다. FlexStation 검정용 글리신 및 타우린 농축물은, 0.1% DMSO를 함유하는, pH 7.4에서 20 mM HEPES와 1x HBSS를 이용하여 제조되었다.

[0412] 실험적 치료

[0413] 세포는 하기 플라스미드로 형질감염되었다: 인간 글리신 수용체 서브유닛 알파 1, 동형체 a (hGlyRa1) (pFB-CMV-hGlyRa1-P2A-mEYFP). 하기 효능제는 GlyR 알파 서브유닛을 자극시키기 위해 사용되었다: 글리신 (Sigma #

G2879) 또는 타우린 (Sigma # T0625).

[0414] 데이터에서 수행된 계산 또는 작동의 설명

[0415] 미가공 FlexStation 신호는 SoftMax Pro 5로부터 '.txt' 파일로서 수출되었고 Microsoft Excel 2008 및 Origin 7.0을 이용하여 오프라인 분석되었다.

[0416] 통계

[0417] 플롯된 데이터는 평균 \pm SEM으로 나타난다.

[0418] 결과

[0419] GlyR α -서브유닛 (hGlyRa1)을 발현시키는 세포에서 막 전위내 미 자극된 변화는 없었고 (도 5A-5B, 도 7), 이들 이 타우린의 증가하는 농도 (1 μ M 내지 1 mM)에 막 전위내 임의의 변화로 반응하지 않았다 (도 6, 도 7). 이들 세포에서, 글리신의 증가하는 농도 (1 μ M 내지 1 mM)의 첨가는 92 μ M의 EC₅₀ 및 대략 300 μ M의 EC₁₀₀ (도 6)을 가진 막 전위 (도 5A-5B)내 용량-의존적 변화를 초래하였다. 글리신에 대한 반응은 타우린 (100 μ M)의 존재에 의해 상당히 영향받지 않았다 (EC₅₀ = 43 μ M). 이들 데이터는 하기에 의해 이전에 보고된 것과 양호하게 일치한다: Sontheimer H. 등 ((1989) Neuron 2(5): 1491-1497) (EC₅₀ = 100 μ M) 및 Jensen AA. 및 Kristiansen U. ((2004) Biochemical Pharmacology 67(9): 1789-1799) (EC₅₀ = 82 μ M) 유사한 검정 이용.

[0420] 이들 데이터는 또한 이들 단량체성 채널이 인간 혈장 (242 - 258 μ M)에서 존재하는 글리신의 정상 내인성 수준에 의해 활성화될 수 있다는 것을 보여준다 (Geigy Scientific Tables, 8th Rev edition, pp.93. Edited by C. Lentner, West Cadwell NJ.: Medical Education Div., Ciba-Geigy Corp. Basel, Switzerland c1981-1992).

[0421] 뉴런의 세포에서 발현된 경우, HEK-293 세포에서 측정된 막 전위내 이들 변화는 GlyR α -서브유닛의 단량체성 발현 및 내인성 효능제 글리신에 수용체의 차후의 노출에 의해 형성된 Cl⁻-선택적 채널을 통해 Cl⁻ 이온의 유입으로 인한 초분극화를 초래하는 것으로 기대된다. 타우린은 $\alpha\beta$ -다량체성 GlyR의 부분적인 효능제인 것으로 보고되어 왔지만 직접적인 효과가 없거나, 이들 연구에서 단량체성 채널상에 글리신 반응에 영향을 미쳤다. 타우린은 141 - 162 μ M의 농도로 인간 혈장에 존재한다 (Geigy Scientific Tables, 8th Rev edition, pp.93. Edited by C. Lentner, West Cadwell, NJ.: Medical Education Div., Ciba-Geigy Corp. Basel, Switzerland c1981-1992).

[0422] 결론

[0423] HEK-293 세포에서 글리신 수용체 α -서브유닛 (hGlyRa1)의 단량체성 발현은 정상 인간 혈장에서 존재하는 농도로 글리신에 반응성인 기능성 클로라이드 채널을 형성한다.

[0424] 실시예 2

[0425] 목적

[0426] 정상 수컷 랫트 혈장에서 존재하는 글리신 수준을 측정하기 위해 그리고 통각성 뉴런에 바이러스 벡터를 통해 전달된 및 그 뒤에 내인성 글리신에 의해 활성화된 경우 랫트가 GlyRa1의 진통제 효능을 평가하는 적당한 종인지를 확인하기 위해.

[0427] 방법

[0428] 혈액은 K2EDTA에서 6 성체 숫컷 스프래그 다우리 랫트로부터 수집되었다. 샘플은 원심분리되었고 혈장은 저장 및 수송을 위하여 분리 및 냉동되었다.

[0429] 일단 해동되고 혈장 단백질이 침전되면, 랫트 혈장 샘플내 글리신의 농도는 하기로 측정되었다: LC/MS/MS 시스템 (AB Sciex API-4000Qtrap 질량 분광분석기 및 Thermo Silica 100 x 2.1mm HPLC 칼럼을 동반한 Shimazu 20A HPLC). MRM 스캔 (m/z, 76/48)과 함께 양성 ESI 이온화는 사용되었다. 이 방법의 보정 범위는 10 내지 5000ng/mL이었다.

[0430] 결과

[0431] 수컷 랫트 혈장에서 혈장 글리신 수준은 $240.9 \pm 45.2 \mu$ M (평균 \pm SD)의 평균을 가진 13.8 내지 23.0 μ g/mL (184 - 307 μ M) 범위이었다.

- [0432] **결론**
- [0433] 랫트 혈장에서 존재하는 글리신의 수준은 정상 성인 인간 남성에서 보고된 $242.0 \pm 44.0 \mu\text{M}$ 및 정상 성인 인간 여성에서 $258.0 \pm 64.0 \mu\text{M}$ 에 유사하다 (Geigy Scientific Tables, 8th Rev edition, pp.93. Edited by C. Lentner, West Cadwell, NJ.: Medical Education Div., Ciba-Geigy Corp. Basel, Switzerland c1981-1992). 랫트 혈장에서 글리신 수준은 주변 조직에서 발현된 경우 $92 \mu\text{M}$ 의 EC_{50} 및 대략 $300 \mu\text{M}$ 의 EC_{100} (도 6)을 갖는 단량체성 GlyRa1 채널을 활성화시키기 위해 적당한 범위 이내이다.
- [0434] 랫트 및 인간 혈장에서 글리신 수준의 유사성에 기반하여 랫트는 통각성 뉴런에 바이러스 벡터를 통해 전달된 및 그 뒤에 내인성 글리신에 의해 활성화된 경우 GlyRa1의 진통제 효능을 평가하는 적당한 종이다.
- [0435] 실시예 3
- [0436] **목적**
- [0437] 만성 신경병성 통증의 랫트 모델에서 통각과민(hyperalgesia) /이질통증 반응을 약화시키는 GTX-01의 유효성을 평가하기 위해.
- [0438] **물질**
- [0439] *바이러스 벡터*
- [0440] 치료는, AAV를 이용하여 전달된, 유전자 요법 DNA 서열을 포함하였다. 유전자 요법은 하기 성분을 포함하였다:
- [0441] ● 아데노-관련 바이러스 (혈청형 6) - AAV6
- [0442] ● 인간 시냅신 프로모터 - hSyn
- [0443] ● GlyR 수용체 - GlyRa1의 알파-1-서브유닛을 인코딩하는 DNA
- [0444] ● 녹색 형광 단백질 - GFP
- [0445] 벡터는 설계되었고, 클로닝되었고 Goleini, Inc.에 의해 합성되었고 하기에 의해 AAV6에 패키징되었다: Virovec, Inc. (Hayward, CA) 무혈청 조건 하에 곤충 세포내 AAV 벡터를 생산하기 위해 배컬로바이러스 발현 시스템을 사용하는 BAC-to-AAV 기술을 이용함.
- [0446] 활성 치료: (GTX-01) AAV6-hSyn-GlyRa1. 바이러스는 9.41×10^{13} 바이러스 입자/mL를 함유하는 수용액으로서 공급 및 투여되었다.
- [0447] 대조군 치료: (대조군) AAV6-hSyn-GFP. 바이러스는 2.22×10^{13} 바이러스 입자/mL를 함유하는 수용액으로서 공급 및 투여되었다
- [0448] 동물
- [0449] 182g 내지 227g 칭량한 9마리 숫컷 스포래그-다우리 랫트 (Envigo, Hayward, CA)는 아래 기재된 바와 같이 수술을 경험하여 신경병성 통증의 SNI 모델을 확립하였다. 모든 동물은 규칙적 간격에서 재마킹된 꼬리 마킹에 의해 개별적으로 확인되었다. 연구 내내 동물은 음식 및 물에 대한 접근이 선택적으로 허용되었다.
- [0450] **방법**
- [0451] *Spared Nerve Injury (SNI) Model - Surgery*
- [0452] 이소플루란 마취 하에 허벅지의 측면 표면상의 피부는 절제되었고 하기를 노출시키는 대퇴이두근을 통해 직접적으로 절단면이 만들어졌다: 좌골 신경 및 그의 3 말단 분지: 비복, 총비골 및 경골 신경. SNI 절차는 비복 신경을 온전하게 남겨두는 경골 및 총비골 신경의 축색 절단 및 결찰을 포함하였다. 총비골 및 경골 신경은 5.0 실크로 밀착-결찰되고 결찰에 원위로 절단되어, 원위 신경 부분의 $2 \pm 4 \text{ mm}$ 를 제거하였다. 매우 주의하여 온전한 비복 신경의 스트레칭 또는 상기와 임의의 접촉을 피하였다. 근육 및 피부는 2 층으로 밀폐되었다 (Decosterd I. and Woolf C. (2000) Pain 87(2): 149-158). 현행 연구에서 이것은 0일째로서 간주되었다.
- [0453] *기계적 과민증에 대한 시험*
- [0454] 시험은 생물학적 주기 뿐인 낮 부분 (06: 00-18: 00 h) 동안 수행되었다. 랫트는 발에 전체 접근을 허용하였던 상승된 철망 플랫폼에서 역전된 플라스틱 케이지에 배치되었다. 케이지 탐구 및 주요 훈련 활성이 중지되는 때

까지 행동 순응은 대략 15 min 동안 허용되었다. 시험된 구역은, 털 감수성 원절 (발바닥)을 피하는, 비복 신경 분포에서, 발바닥의 좌측 뒷발의 측면 영역이었다. 발은 대수적으로 증분적 강성도 (0.41, 0.70, 1.20, 2.00, 3.63, 5.50, 8.50, 및 15.10 g) (Stoelting)을 가진 일련의 8 본 프레이 필라멘트 중 1개와 터치되었다. 본 프레이 필라멘트는 충분한 힘으로 발바닥 표면에 수직으로 표시되어 발에 대해 약간의 좌굴을 유발시켰고, 대략 6-8 s 동안 유지되었다. 자극은 몇 초의 간격에서 표시되어, 이전의 자극에 대한 임의의 행동 반응의 분명한 해상도를 허용하였다. 양성 반응은 발이 빈틈없이 철수되면 주목되었다. 모발의 즉시 제거시 플린칭은 또한 양성 반응으로 간주되었다. 보행은 애매한 반응으로 간주되었고, 그와 같은 경우에 자극은 반복되었다. 정상, 비-수술된 랫트에 관한 관찰에 기반하여, 15.10 g 필라멘트 (더 작은 랫트의 체중의 ~ 10%)의 컷오프가 시험에 대하여 상한으로서 선택되었던 것은, 더 강직한 필라멘트가 조이기 보다 전체 팔다리를 들어올리는 경향이 있어서, 실질적으로 자극의 성질을 변화시켰기 때문이다 (Chaplan S. 등 (1994) J Neurosci Methods 53(1): 55-63).

[0455] 수술 (일 -1) 하루 앞서 동물은 기계적 자극에 대한 그들의 기준선 반응 (기계적 감수성)에 대하여 시험되었다. 수술후 10 일에 모든 동물은 그들의 기계적 감수성에 대하여 재시험되었다.

[0456] 수술후 10일째에서 동물은 어느 한쪽 대조군 벡터 또는 GTX-01로 치료되었다. 일반적인 마취 (이소플루란) 하에 어느 한쪽 GTX-01 또는 대조군 벡터는 좌측 뒷발 패드의 측면 구역에 피하 주사된 20 μ L (2 x 10 μ L 주사)의 용적으로, 1.88e12 및 4.44e11 벡터 계놈, 각각의 용량에서 투여되었다.

[0457] 치료후 일 14, 21, 29, 36, 44 및 51 (수술후 일 24, 31, 39, 46, 54 및 61)에서 동물은 그들의 기계적 감수성에 대하여 재평가되었다. 이들 측정 모두에 대하여 오퍼레이터는 동물의 동일성에 대해 맹검되었다.

[0458] 실험적 치료 (2)

[0459] 동물의 그룹은 하기 치료 중 하나로 복용되었다:

[0460] ● GTX-01: 4 동물은 추정된 농도 9.41e13 바이러스 입자/mL에서 AAV6 바이러스 제제의 2 x 10 μ L/발을 받았다. 바이러스는 pFB-hSyn-GlyRa1에 대하여 인코딩하였던 DNA를 운반하였다

[0461] ● 대조군: 5 동물은 추정된 농도 2.22e13 바이러스 입자/mL에서 AAV6 바이러스 제제의 2 x 10 μ L/발을 받았다. 바이러스는 hSyn-GFP에 대하여 인코딩하였던 DNA를 운반하였다.

[0462] 데이터에서 수행된 계산 또는 작동의 설명

[0463] 50% 회수 역치는 하기의 위-아래 방법을 이용하여 결정되었다: Dixon (Dixon, WJ. (1980) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.20: 441-462; Chaplan S. 등 (1994) J Neurosci Methods 53(1): 55-63). 상기 패러다임에서, 시험은 시리즈의 중간에서 2.0 g 필라멘트로 개시되었다. 자극은, 상승 또는 하강하든, 연속적인 방식으로 항상 표시된다. 초기에 선택된 필라멘트에 발 회수 반응의 부재 하에, 더 강력한 자극은 표시되었고, 발 회수의 경우에서, 다음 더 약한 자극은 선택되었다. Dixon에 따르면, 상기 방법에 의한 최적의 역치 계산은 50% 역치의 즉각적인 부근에서 6 반응을 요구한다. 역치가 공지되지 않기 때문에, 일련의 유사한 반응은 역치가 어느 한쪽 방향에서 접근됨에 따라 생성될 수 있다. 따라서, 모든 반응이 언급되었어도, 핵심 6 데이터 포인트의 카운팅은 반응 역치가 최초 교차되는 때까지 시작하지 않았고, 어느 시점에 역치를 올라선 2 반응은 6의 시리즈의 최초 2 반응으로서 소급해서 지정되었다. 랫트의 반응에 기반된, 순차적으로 위 또는 아래로 다양하였던 자극의 계속된 제시에 대한 4 추가의 반응은 시리즈의 나머지를 구성하였다. 따라서, 상기 패러다임을 이용하여 수집된 실제의 반응의 수는 하기에서 다양할 수 있다: 최소의 4 (하강하는 범위 2.0 - 0.4 g에서 4 필라멘트에 순차적으로 발 회수의 경우에서: 역치는 실제의 자극의 범위 아래 놓인다) 내지 최대 9 (회수가 15.1 g에서 또는 아래에서 계속해서 발생하는 것으로 추정하는, 15.1 g에서 제5 상승 자극 제시시 발생하는 제1 회수, 그 다음 4 추가의 반응의 유발의 경우에서). 연속 양성 또는 음성 반응이 자극 세트의 소진까지 관측되었던 사례에서, 15.00 g 및 0.25 g의 값은 각각 배정되었다. 양성 및 음성 반응의 수득한 패턴은 관례, X= 회수; 0 = 무 회수를 이용하여 표로 작성되었고, 50% 반응 역치는 하기에 기반된 알고리즘을 이용하여 보간되었다: Dixon의 위-아래 방법의 Chaplan의 버전 (Chaplan S. 등 (1994) J Neurosci Methods 53(1): 55-63; Dixon WJ. (1980) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.20: 441-462).

[0464] 치료후 일 14, 21, 29, 36, 44 및 51에서 대조군과 GTX-01-치료된 그룹 사이 기계적 자극에 대한 반응에서 차이는 짚기되지 않은 스튜던트 t-시험을 이용하여 통계적 유의도로 분석되었다.

[0465] 결과

[0466] GTX-01 그룹은 치료후 일 29 (P<0.001), 일 36 (P<0.001), 일 44 (P<0.001) 및 일 51 (P<0.01)에서 증가된 회

수 역치에 의해 측정된 바와 같이 상당한 통각상실증을 보여주었다. 양쪽 그룹, 대조군 (n=5) 및 GTX-01 (n=4)에 대한 데이터는 표 4 및 도 8에서 나타난다.

표 4.

일 (치료후)	대조군	GTX-01
0 (-10)	11.9 ± 4.6	14.6 ± 6.4
10 (0)	2.2 ± 0.8	2.7 ± 1.8
24 (14)	2.2 ± 1.8	4.4 ± 3.6
31 (21)	4.4 ± 2.0	6.3 ± 2.8
39 (29)	3.3 ± 0.5	9.0 ± 1.9***
46 (36)	2.7 ± 1.5	11.0 ± 0.9***
54 (44)	2.7 ± 0.8	9.7 ± 2.2***
61 (51)	2.7 ± 1.8	9.6 ± 1.4**

표 4. 0 일째에서 비복 신경을 온전하게 남겨둔 경골 및 총 비골 신경의 축삭 절단 및 결찰 (신경 부분 손상)을 경험하고 10 일째에서 어느 한쪽 대조군 바이러스 (대조군) 또는 GTX-01 으로 치료된 랫트의 기계적 역치 (g). 기계적 역치 (g) 데이터는 5 동물 (대조군) 및 4 동물 GTX-01 의 평균 ± 표준 편차 (SD)로서 표시된다. 대조군 및 GTX-01 그룹은 짝짓기되지 않은 스튜던트 t-시험을 이용하여 통계적 유의도로 분석되었다. 유의차는 **P<0.01 또는 ***P<0.001 로 표시된다.

정상 또는 100% 통각상실증을 나타내기 위해 일 -1에서 기준선 데이터 및 10일째에서 그것을 택하는 것은 0% 통각상실증을 나타내는 것으로 제공되고 그 다음 GTX-01의 투여후 일 29, 36, 44 및 51에서 GTX-01의 평균 진통 효과는 52%, 70%, 59% 및 58%, 각각이었다.

체중은 측정되었고 연구 내내 기록되었다. 하기로 치료된 동물의 체중에서 차이는 보이지 않았다: GTX-01 대 대조군 벡터 (도 9).

결론

임의의 다른 제제의 투여 없이 GTX-01의 단일 투여는 랫트에서 만성 신경병성 통증의 SNI 모델에서 상당한 및 오래 지속되는 진통 효과를 생산하였다. 이것은 차별화되고, 하기에 의해 보고된 데이터와 대조적이다: Goss JR. 등 (2010) Molecular Therapy 19(3): 500-506 및 미국 특허 번호: US 8,957,036 여기에서 이들은 사이질 방광염의 모델을 치료하기 위해 경정맥을 통해 전신으로 또는 통증의 부위 예컨대 “포르말린 주사된 발의 발바닥 표면”에 주사의 형태로 동물에 수용체 효능제 (글리신)이 투여되는 경우에만 GlyRa1의 바이러스 전달 및 그의 차후의 발현 이후 통각상실증을 기재한다.

실시예 4.

목적

연구의 목적은 HEK-293 세포내 β-서브유닛 (단량체성 발현)의 부재 하에 L9' A 돌연변이된 GluCl α-서브유닛 단독의 발현이 항상적 활성 클로라이드 채널 (지정된 GluCl*)를 형성할 수 있는지를 결정하는 것이었다.

물질

형광 태그된 카에노르하브디티스 엘레간스 GluCl α-서브유닛에 대하여 완전한 최적화된 코딩 서열을 함유하는 플라스미드 벡터 GluClOptbetmFYYPY182F (Life Technologies)는 이 연구에서 사용되었다. 항상된 황색 형광 단백질 (YFP) 삽입물은 세포내 M3-M4 루프 안에 위치한다. 합성 유전자 GluClOptbetmFYYPY182F는 합성 올리고뉴클레오타이드 및/또는 PCR 생성물로부터 조립되었다. 단편은 pcDNA3.1(+)에 삽입되었다. 플라스미드 DNA는 전환된 박테리아로부터 정제되었고 농도는 UV 분광법에 의해 결정되었다. 최종 작제물은 서열분석에 의해 확인되었다.

지정: *E. 콜리 K12 (dam+ dcm+ tonA rec-)* 유전자 명칭: *GluClOptbetmFYYPY182F*

- [0478] 유전자 크기: 2043 bp
- [0479] 벡터 골격: pcDNA3.1(+)
- [0480] 클로닝 부위: HindIII / XhoI
- [0481] 부위 지향적 돌연변이유발
- [0482] 류신 9' 돌연변이는 하기 순방향 및 역방향 프라이머를 이용하여 PfuTurbo DNA 폴리머라제 (Agilent Technologies #600250)을 가진 QuikChange II XL 부위 지향적 돌연변이유발 키트 (Agilent Technologies #200522)를 이용하여 실시되었다: 5' - CC CTG GGC GTG ACC ACC CTG xxx AC - 3' 및 5' - GC GGA CTG AGC GGT CAT GGT xxx CA - 3' , 여기에서 'xxx' 는 돌연변이된 Leu9' 코돈을 기술하다. GluCl*에 대하여, Leu9' 는 Ala로 돌연변이되었다. 모든 돌연변이는 DNA 서열분석에 의해 확인되었다.
- [0483] 세포
- [0484] 인간 배아 신장 (HEK) 293 세포는 ATCC (#CRL-1573)으로부터 구매되었다. 세포는 10% FBS (Gibco #26140), 100 유닛/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신 (Gibco #15140), 및 1 mM 나트륨 피루베이트 (Gibco #11360)으로 보충된 돌베코 변형된 이글 배지 (DMEM; Gibco #11965)에서 배양되었고, 가습된 인큐베이터에서 37 °C 및 5% CO₂에 유지되었다. 세포는 매 3 내지 4 일 1: 5 또는 1: 10의 계대배양 비에서 융합성인 경우 통과되었다.
- [0485] 방법의 설명
- [0486] 세포 배양
- [0487] FlexStation 검정을 위하여, HEK-293 세포는 20,000 세포/웰에, 100 µl/웰의 플레이트 용적으로, 흑색-측면/투명-저면 96-웰 이미지형성 플레이트 (BD Falcon #353219)에서 플레이트되었다. 형질감염을 위하여, 750 µl DMEM내 16 µg 총 DNA는 750 µl DMEM내 30 µl ExpressFect와 혼합되었고, 20 분 동안 사전-인큐베이션되었고, 그 다음 100 µl 신선한 배양 배지를 함유하는 세포에 15 µl/웰로 첨가되었다. 세포는 플레이트 이후 24 시간에 형질감염되었고 형질감염 이후 48 시간에 분석되었다. 형질감염 혼합물은 37 °C/5% CO₂에서 4-6 시간 인큐베이션 기간 이후 배양액으로부터 제거되었고 신선한 배양 배지로 대체되었다.
- [0488] 막 전위 측정
- [0489] FLIPR 막 전위 검정 키트, BLUE 제형, (Molecular Devices, #R8042)를 사용하는 형광-기반 검정은 세포 막을 거쳐 전압 변화를 검출하기 위해 사용되었다. 염료 장입 완충액은 패키지 문헌에 따라 제조되었다. 구체적으로, BLUE 시약의 하나의 바이알의 내용물은 5 mL의 1x 검정 완충액으로 용해되었고, 그 다음 또 다른 5 mL의 1x 검정 완충액으로 바이알을 세정하여, 10 mL의 염료 장입 완충액의 총 용적을 수득하였다. 염료 장입 완충액의 미사용된 부분은 -20 °C에서 저장되었고 5 일 이내 사용되었다. 기능성 검정을 위하여, 배양 배지는 세포로부터 제거되었고 50 µl DMEM으로 대체되었다. 세포는 그 다음 50 µl의 청색 염료 장입 완충액으로 장입되었고 40 min 동안 37 °C/5% CO₂에서 인큐베이션되었다. 신호는 SoftMax Pro Data Acquisition & Analysis Software (Molecular Devices)에 의해 작동된 FlexStation 3 다중방식 벤치톱 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 검출되었다. 여기 및 방출 파장은, 550 nm의 방출 컷오프로, 530 nm 및 565 nm, 각각에서 설정되었다. 플레이트 판독은 '저 PMT' 셋팅으로 30 °C에서 수행되었다. 기저 형광을 최초 20 s 측정하였던, 실행 시간은 이버맥틴-유도된 신호에 대하여 300 s이었다. 다른 FlexStation 파라미터는 피펫 높이 230 µl, 초기 웰 용적 100 µl, 전이 용적 50 µl (그러므로, 약물 농축물은 3x 제조되었다), 및 ~31 µl/sec에 대응하는, 전이 속도 셋팅 2를 포함하였다.
- [0490] 이버맥틴에 대한 농도/반응 곡선은 양쪽 GluCl* 및 야생형-형질감염된 세포에서 생성되었다. 사용된 이버맥틴 농도는 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 nM이었다. 이버맥틴은 10 mM 스톱으로서 DMSO에 용해되었고 0.3 mM 분취액으로서 -20 °C에서 저장되었다. FlexStation 검정용 이버맥틴 농축물은, 0.1% DMSO를 함유하는, pH 7.4에서 20 mM HEPES와 1x HBSS를 이용하여 제조되었다.
- [0491] 실험적 치료
- [0492] 세포는 하기 플라스미드 중 하나로 형질감염되었다:
- [0493] ● pFB-CMV-GluCloptalpha-mEYFP-L9' L (야생형) (*GluCloptbetmFYYPY182F*)

- [0494] ● pFB-CMV-GluCloptalpha-mEYFP-L9' A (GluCl*)
- [0495] 하기 효능제는 형질감염된 세포를 자극시키기 위해 사용되었다
- [0496] ● 이버멕틴 (Sigma #18898)
- [0497] 데이터에서 수행된 계산 또는 작동의 설명
- [0498] 미가공 FlexStation 신호는 SoftMax Pro 5로부터 '.txt' 파일로서 수출되었고 Microsoft Excel 2008 및 Origin 7.0을 이용하여 오프라인 분석되었다.
- [0499] 통계
- [0500] 플롯된 데이터는 평균 \pm SEM으로 나타난다.
- [0501] **결과**
- [0502] 야생형 GluCl α -서브유닛을 발현시키는 세포에서 막 전위내 미자극된 변화는 없었다 (도 10). 이버멕틴의 증가 농도의 첨가는 147 nM의 EC₅₀ (도 11)으로 막 전위내 용량-의존적 변화 (도 10)를 초래하였다.
- [0503] L9' A 돌연변이된 GluCl α -서브유닛 (GluCl*)를 발현시키는 세포에서 기준선 막 전위는 최대로 변경되었다 (도 12). 반응은 1 μ M 이버멕틴에 반응하여 야생형 GluCl α -서브유닛에 보여진 것과 규모에서 유사하였다 (도 10). GluCl*를 발현시키는 세포에 이버멕틴의 증가 용량의 첨가는 막 전위내 변화를 확대시키지 않았다 (도 12).
- [0504] 뉴런의 세포에서 발현된 경우, HEK-293 세포에서 측정된 막 전위내 이들 변화는 GluCl α -서브유닛의 단량체성 발현 및 수용체 효능제 이버멕틴의 차후의 적용에 의해 형성된 Cl⁻-선택적 채널을 통해 Cl⁻ 이온의 유입 때문에 초분극화를 초래하는 것으로 기대된다. 뉴런의 세포에서 GluCl α -서브유닛의 L9' A 돌연변이의 단량체성 발현은 효능제의 첨가 없이 뉴런의 조직의 영구적 초분극화를 초래하는 것으로 기대되는 항상적 활성 Cl⁻를 형성하는 것으로 기대된다.
- [0505] **결론**
- [0506] HEK-293 세포에서 카에노르하브디티스 엘레간스 GluCl 글루타메이트 수용체 α -서브유닛의 L9' A 돌연변이의 단량체성 발현은 기능성 및 항상적 활성 클로라이드 채널을 형성한다.
- [0507] 실시예 5
- [0508] **목적**
- [0509] 이 연구의 목적은 만성 신경병성 통증의 랫트 모델에서 통각과민(heperalgesia)/이질통증 반응을 약화시키는 GTX-01*의 유효성을 평가하는 것이었다.
- [0510] **물질**
- [0511] 치료는, AAV를 이용하여 전달된, 유전자 요법 DNA 서열을 포함하였다. 유전자 요법은 하기 성분을 포함하였다:
- [0512] ● 아테노-관련 바이러스 (형질형 6) - AAV6
- [0513] ● 인간 시냅신 프로모터 - hSyn
- [0514] ● DNA 인코딩 GluCl* - 항상적으로 개방 채널을 생성하기 위해 L9' A 돌연변이를 가진 GluCl 수용체의 알파-서브유닛. pFB-hSyn-GluCloptalpha-mEYFP-L9' A
- [0515] ● 향상된 황색 형광 단백질 - EYFP
- [0516] 벡터는 설계되었고, 클로닝되었고 Goleini, Inc.에 의해 합성되었고 하기에 의해 AAV6에 패키징되었다: Virovec, Inc. (Hayward, CA) 무혈청 조건 하에 곤충 세포에서 AAV 벡터를 생산하기 위해 배칼로바이러스 발현 시스템을 사용하는 전매 BAC-to-AAV 기술을 이용함.
- [0517] **활성 치료: GTX-01***
- [0518] AAV6-hSyn-GluCloptalpha-mEYFP-L9' A. 바이러스는 9.79e13 바이러스 입자/mL를 함유하는 수용액으로서 공급 및 투여되었다.

- [0519] 대조군 치료: 대조군
- [0520] AAV6-hSyn-EYFP 바이러스는 2.22×10^{13} 바이러스 입자/mL를 함유하는 수용액으로서 공급 및 투여되었다.
- [0521] 연구의 마지막에 동물은 하기를 받았다: 가바펜틴 (100mg/kg: IP) (Sigma Aldrich, G154).
- [0522] 동물
- [0523] 200 내지 250 g (6 - 7 주령) 칭량한 6 숫컷 스프래그-다우리 랫트 (Envigo, Hayward, CA)의 2 그룹은 신경병성 통증의 SNI 모델을 확립하기 위해 아래 기재된 바와 같이 수술을 경험한 21 동물의 초기 집단으로부터 선택되었다. 동물은 수술후 10 일에서 그들의 기계적 감수성에 기반하여 선택되었다. 선택된 12 동물은 기계적 자극에 유사한 과민증을 가졌다. 12 선택된 동물은 그들의 기계적 감수성에 따라 등급화되었고 기계적 자극에 유사한 과민증을 가진 동물의 2 “균형있는” 그룹을 창출하기 위해 대안적으로 “치료” 및 “대조군” 그룹으로 배분되었다. 모든 동물은 규칙적 간격에서 재마킹된 꼬리 마킹에 의해 개별적으로 확인되었다. 연구 내내 동물은 음식 및 물에 대한 접근이 선택적으로 허용되었다.
- [0524] **방법론**
- [0525] 연구는 AfaSci’s Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)에 의해 승인된 프로토콜에 따라 수행되었다.
- [0526] **방법의 설명**
- [0527] **신경 부분 손상 (SNI) 모델 - 수술:**
- [0528] 이소플루란 마취 하에 허벅지의 측면 표면상의 피부는 절제되었고 하기를 노출시키는 대퇴이두근을 통해 직접적으로 절단면이 만들어졌다: 좌골 신경 및 그의 3 말단 분지: 비복, 총비골 및 경골 신경. SNI 절차는 비복 신경을 온전하게 남겨두는 경골 및 총비골 신경의 축색 절단 및 결찰을 포함하였다. 총비골 및 경골 신경은 5.0 실크로 밀착-결찰되고 결찰에 원위로 절단되어, 원위 신경 부분의 2 ± 4 mm를 제거하였다. 매우 주의하여 온전한 비복 신경의 스트레칭 또는 상기와 임의의 접촉을 피하였다. 근육 및 피부는 2 층으로 밀폐되었다 (Decosterd I. 및 Woolf C. (2000) Pain 87(2): 149-158). 현행 연구에서 이것은 0일째로서 간주되었다.
- [0529] **기계적 과민증에 대한 시험:**
- [0530] 시험은 생물학적 주기 뿐이 낮 부분 (06: 00-18: 00 h) 동안 수행되었다. 랫트는 발에 전체 접근을 허용하였던 상승된 철망 플랫폼에서 역전된 플라스틱 케이지에 배치되었다. 케이지 탐구 및 주요 훈련 활성이 중지되는 때까지 행동 순응은 대략 15 min 동안 허용되었다. 시험된 구역은, 털 감수성 원절 (발바닥)을 피하는, 비복 신경 분포에서, 발바닥의 좌측 뒷발의 측면 영역이었다. 발은 대수적으로 증분적 강성도 (0.41, 0.70, 1.20, 2.00, 3.63, 5.50, 8.50, 및 15.10 g) (Stoelting)을 가진 일련의 8 본 프레이 필라멘트 중 1개와 터치되었다. 본 프레이 필라멘트는 충분한 힘으로 발바닥 표면에 수직으로 표시되어 발에 대해 약간의 좌굴을 유발시켰고, 대략 6-8 s 동안 유지되었다. 자극은 몇 초의 간격에서 표시되어, 이전의 자극에 대한 임의의 행동 반응의 분명한 해상도를 허용하였다. 양성 반응은 발이 빈틈없이 철수되면 주목되었다. 모발의 즉시 제거시 플린칭은 또한 양성 반응으로 간주되었다. 보행은 애매한 반응으로 간주되었고, 그와 같은 경우에 자극은 반복되었다. 정상, 비-수술된 랫트에 관한 관찰에 기반하여, 15.10 g 필라멘트 (더 작은 랫트의 체중의 ~ 10%)의 컷오프가 시험에 대하여 상한으로서 선택되었던 것은, 더 강직한 필라멘트가 조이기 보다 전체 팔다리를 들어올리는 경향이 있어서, 실질적으로 자극의 성질을 변화시켰기 때문이다 (Chaplan S. 등 (1994) J Neurosci Methods 53(1): 55-63).
- [0531] 수술 (일 -1) 하루 앞서 동물은 기계적 자극에 대한 그들의 기준선 반응 (기계적 감수성)에 대하여 시험되었다. 수술후 10 일에 모든 동물은 그들의 기계적 감수성에 대하여 재시험되었다.
- [0532] 수술후 10일째에서 가장 큰 기계적 과민증을 가진 12 동물은 어느 한쪽 대조군 벡터 또는 GTX-01*로 치료를 위하여 선택되었다. 일반적인 마취 (이소플루란) 하에 어느 한쪽 GTX-01* 또는 대조군 벡터는 좌측 뒷발 패드의 측면 구역에 피하 주사된 20 μ L (2×10 μ L 주사)의 용적으로, 1.96×10^{12} 및 4.44×10^{11} 벡터 게놈, 각각의 용량에서 투여되었다.
- [0533] 치료후 일 13, 22 및 35 (수술후 일 23, 32 및 45)에서 동물은 그들의 기계적 감수성에 대하여 재평가되었다. 이들 측정 모두에 대하여 오퍼레이터는 동물의 동일성에 대해 맹검되었다.
- [0534] 치료후 일 22 (수술후 일 32)에서 각각의 대조군 및 GTX-01*-치료된 그룹에서 1 동물은 안락사되었고 조직은 아

래 기재된 바와 같이 수확 및 가공되었다.

[0535] 치료후 일 36 (수술후 일 46)에서 동물은 하기로 복용되었다: 가바펜틴 (100 mg/kg: IP). 가바펜틴 투여후 1 시간 및 2 시간에 동물은 기계적 자극에 대한 그들의 감수성에 대하여 평가되었다.

[0536] 조직 수확:

[0537] 치료후 일 22에서 그리고 치료후 일 36에서 실험의 마지막에 동물은 이소플루란의 투여에 의해 안락사되었고 그 다음 개흉술되었다. 좌측 배근 신경절 (L4, L5 및 L6), 좌측 비복 신경 및 좌측 뒷발은 수확되었고 14 일 동안 4°C에 4% 파라포름알데하이드에서 고정되었고, 그 다음 적어도 24 시간 동안 20% 수크로오스에 전달되었다. 조직은 그 뒤에 동결-절단되었고 공초점 현미경검사를 이용하여 조직학적 평가를 위하여 염색되었다. YFP에 대한 1차 항체는 *pFB-hSyn-GluC1optalpha-mEYFP-L9' A* 유전자의 발현을 확인하기 위해 사용되었다.

[0538] 실험적 치료

[0539] 동물의 그룹은 하기 치료 중 하나로 복용되었다:

[0540] GTX01* - 6 동물은 추정된 농도 9.79e13 바이러스 입자/mL로 AAV6 바이러스 제제의 2 x 10⁶ μL/발을 받았다. 바이러스는 pFB-hSyn-GluC1optalpha-mEYFP-L9' A에 대하여 인코딩하였던 DNA를 운반하였다.

[0541] 대조군 - 6 동물은 추정된 농도 2.22e13 바이러스 입자/mL로 AAV6 바이러스 제제의 2 x 10⁶ μL/발을 받았다. 바이러스는 hSyn-EYFP에 대하여 인코딩하였던 DNA를 운반하였다.

[0542] 제외 파라미터:

[0543] 연구로부터 제외된 동물은 없었다. 연구 동안 죽은 동물은 없었다.

[0544] 데이터에서 수행된 계산 또는 작동의 설명

[0545] 50% 회수 역치는 하기의 위-아래 방법을 이용하여 결정되었다: Dixon (Chaplan S. 등 (1994) J NeurosciMethods 53(1): 55-63; Dixon WJ. (1980) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.20: 441-462). 상기 패러다임에서, 시험은 시리즈의 중간에서 2.0 g 필라멘트로 개시되었다. 자극은, 상승 또는 하강하든, 연속적인 방식으로 항상 표시된다. 초기에 선택된 필라멘트에 발 회수 반응의 부재 하에, 더 강력한 자극은 표시되었고, 발 회수의 경우에서, 다음 더 약한 자극은 선택되었다. Dixon에 따르면, 상기 방법에 의한 최적의 역치 계산은 50% 역치의 즉각적인 부근에서 6 반응을 요구한다. 역치가 공지되지 않기 때문에, 일련의 유사한 반응은 역치가 어느 한쪽 방향에서 접근됨에 따라 생성될 수 있다. 따라서, 모든 반응이 언급되었어도, 핵심 6 데이터 포인트의 카운팅은 반응 역치가 최초 교차되는 때까지 시작하지 않았고, 어느 시점에 역치를 올라선 2 반응은 6의 시리즈의 최초 2 반응으로서 소급해서 지정되었다. 랫트의 반응에 기반된, 순차적으로 위 또는 아래로 다양하였던 자극의 계속된 제시에 대한 4 추가의 반응은 시리즈의 나머지를 구성하였다. 따라서, 상기 패러다임을 이용하여 수집된 실제의 반응의 수는 하기에서 다양할 수 있다: 최소의 4 (하강하는 범위 2.0 - 0.4 g에서 4 필라멘트에 순차적으로 발 회수의 경우에서: 역치는 실제의 자극의 범위 아래 놓인다) 내지 최대 9 (회수가 15.1 g에서 또는 아래에서 계속해서 발생하는 것으로 추정하는, 15.1 g에서 제5 상승 자극 제시시 발생하는 제1 회수, 그 다음 4 추가의 반응의 유발의 경우에서). 연속 양성 또는 음성 반응이 자극 세트의 소진까지 관측되었던 사례에서, 15.00 g 및 0.25 g의 값은 각각 배정되었다. 양성 및 음성 반응의 수득한 패턴은 관례, X= 회수; 0 = 무 회수를 이용하여 표로 작성되었고, 50% 반응 역치는 하기에 기반된 알고리즘을 이용하여 보간되었다: Dixon의 위-아래 방법의 Chaplan의 버전 (Chaplan S. 등 (1994) J Neurosci Methods 53(1): 55-63; Dixon WJ. (1980) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.20: 441-462).

[0546] 치료후 일 13, 22 및 35에서 대조군과 GTX-01*-치료된 그룹 사이 기계적 자극에 대한 반응에서 차이는 찢기되지 않은 스튜던트 t-시험을 이용하여 통계적 유의도로 분석되었다. 가바펜틴에 반응은 찢기되지 않은 스튜던트 t-시험을 이용하여 사전-치료 값과 가바펜틴 투약후 1 시간 및 2 시간을 비교함으로써 통계적 유의도로 분석되었다.

[0547] 결과

[0548] 일 -1에서 연구용으로 선택된 동물에 대하여 기준선 회수 역치는 6.24 ± 0.09 g (대조군 그룹) 및 6.27 ± 0.09 g (GTX-01* 그룹)의 평균 값을 가졌다. 수술후 10일째에서 대조군 백터 및 GTX-01* 치료용으로 선택된 동물에서 회수 역치는 1.40 ± 0.18 g 및 1.51 ± 0.14 g, 각각이었다. 어느 한쪽 대조군 백터 또는 GTX-01*의 투여후 일 13에서 회수 역치는 1.58 ± 0.28 g 및 3.07 ± 0.68 g (P<0.001)이었다. 치료후 일 22까지 대조군

그룹에 대한 회수 역치는 1.69 ± 0.17 g에서 크게 변함없었고 반면에 GTX-01* 그룹에 대한 GTX-01* 회수 역치는 5.18 ± 0.74 g ($P<0.001$)까지 추가로 증가하였다. 시험된 최종 시점 (치료후 35 일)에서 대조군 그룹에서 기계적 자극에 대한 과민증에서 작은 손실 (2.53 ± 0.40 g)이 있었고 반면에 GTX-01* 그룹은 정상 수준 (5.21 ± 0.43 g) ($P<0.001$)에 가깝게 기계적 자극에 대한 감수성의 수준을 유지하였다 (도 13).

[0549] 일 -1에서 기준선 데이터가 정상 또는 100% 통각상실증을 나타내고 10일째에서 그것이 0% 통각상실증을 나타내면 치료후 일 13, 22 및 35에서 GTX-01*의 진통 효과는 정상의 33%, 77% 및 77%를, 각각 나타낸다.

[0550] 수술후 일 46에서, 가바펜틴 (100 mg/kg: IP)는 이전에 “대조군 백터”에 투여된 동물에서 기계적 과민증을 감소시켰다. 투여전, 투여후 1 시간 및 2 시간에서 그들 동물내 회수 역치는 2.46 ± 0.49 g, 3.44 ± 0.36 g ($P<0.01$) 및 4.15 ± 0.19 g ($P<0.001$), 각각이었다 (도 14). 가바펜틴은 GTX-01*로 이전에 치료된 그들 동물에서 기계적 자극에 대한 거의-정상 반응으로 효과가 없었다 (도 14).

[0551] 치료후 일 22에서 수확된 GTX-01*-치료된 동물로부터 DRG의 면역조직화학 평가는 EYFP에 대하여 양성 염색하였던 개별 세포 바다 (GTX-01*에 의해 전달된 *pFB-hSyn-GluC1optalpha-mEYFP-L9' A* 유전자의 생성물)을 보여주었다 (도 15). 유사하게, 신경 말단은 EYFP에 대하여 양성 염색된 동일한 동물로부터 발의 진피 층 바로 밑에 위치되었다 (도 15). 이들 데이터는 바이러스가, DRG에서 세포 바다에 수송된, 주사된 부위에서 신경 말단에 의해 차지되었다는 것 그리고 유전자 생성물이 신경 말단에서 성공적으로 발현되었다는 것을 보여준다.

[0552] **결론**

[0553] GTX-01*의 단일 투여가 랫트에서 만성 신경병성 통증의 SNI 모델에서 상당한 및 오래 지속되는 진통 효과를 생산하였다.

[0554] 실시예 6

[0555] **목적**

[0556] 이 연구의 목적은 HEK-293 세포내 인간 글리신 수용체 서브유닛 알파 1, 동형체 a (hGlyRa1)의 단량체성 발현이 세포 생존력에서 효과를 가졌는지를 결정하는 것이었다.

[0557] **방법**

[0558] 인간 배아 신장 (HEK) 293 세포는 ATCC (#CRL-1573)으로부터 구매되었다. 세포는 10% FBS (Gibco #26140), 100 유닛/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신 (Gibco #15140), 및 1 mM 나트륨 피루베이트 (Gibco #11360)으로 보충된 돌베코 변형된 이글 배지 (DMEM; Gibco #11965)에서 배양되었고, 가습된 인큐베이터에서 37 °C 및 5% CO₂에 유지되었다. 세포는 매 3 내지 4 일 1: 5 또는 1: 10의 계대배양 비에서 융합성인 경우 통과되었다. 세포는 그 다음 20,000 세포/웰에, 100 μ l/웰의 플레이트 용적으로, 투명 96-웰 배양 플레이트에서 플레이트되었다. 배양액에서 24 시간 후 세포는 모의-형질감염되었거나 hGlyRa1 (pFB-CMV-hGlyRa1-P2A-mEYFP-WT)로 형질감염되었다. 형질감염을 위하여, 750 μ l Opti-MEM (Gibco 31985-070)내 16 μ g 총 DNA는 750 μ l Opti-MEM내 30 μ l ExpressFect와 혼합되었고, 20 분 동안 사전-인큐베이션되었고, 그 다음 100 μ l 신선한 배양 배지를 함유하는 세포에 15 μ l/웰로 첨가되었다. 형질감염 혼합물은 37 °C/5% CO₂에서 4-6 시간 인큐베이션 기간 이후 배양액으로부터 제거되었고 L-글루타민 (Gibco 25030-081)로 보충된, 신선한 무 글리신, 배양 배지 (Gibco 12360-038) 또는 (400 μ M 글리신을 함유하는) 신선한 DMEM으로 대체되었다. 미형질감염된, 모의 형질감염된 및 형질감염된 세포의 절반은 (400 μ M 글리신을 함유하는) DMEM에서 배양되었고 반면 다른 절반은 무 글리신 배지에서 배양되었다. 72 시간 후, 세포 생존력은 세포 생존력의 마커로서 트립판 블루 염료 제외를 이용하여 측정되었다. 쌍안 현미경 하에, 미염색된 (생존가능한) 및 염색된 (비-생존가능한) 세포는 개별적으로 카운트되었다. 5 별도의 웰들은 각각의 조건으로 평가되었다.

[0559] **결과**

[0560] 글리신의 부재 및 존재 하에 미형질감염된 세포는 94.6% 및 95.6% 각각의 평균 세포 생존력을 가졌다. 모의-형질감염된 세포는 글리신의 부재 하에 93.8% 및 글리신의 존재 하에 92.8%의 평균 세포 생존력을 가졌다. hGlyRa1의 단량체성 발현은 알파 서브유닛에 의해 형성된 단량체성 클로라이드 채널을 활성화시키는 글리신의 존재 하에 (세포의 94.0%가 생존가능하였다) 또는 글리신의 부재 하에 (세포의 92.0%가 생존가능하였다) 세포 생존력에 영향을 주지 않았다 (도 16).

[0561] **결론**

- [0562] 글리신 수용체 채널 (hGlyRa1)의 알파 서브유닛의 단량체성 발현 및 HEK-293 세포에서 72시간 동안 글리신에 차후의 노출은 세포 생존력에서 효과가 없었다.
- [0563] 실시예 7
- [0564] **목적**
- [0565] 이 연구의 목적은 HEK-293 세포에서 GluCl α -서브유닛의 L9' A 돌연변이의 단량체성 발현이 세포 생존력에서 임의의 효과를 가졌는지를 결정하는 것이었다.
- [0566] **방법**
- [0567] 인간 배아 신장 (HEK) 293 세포는 ATCC (#CRL-1573)으로부터 구매되었다. 세포는 10% FBS (Gibco #26140), 100 유닛/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신 (Gibco #15140), 및 1 mM 나트륨 피루베이트 (Gibco #11360)으로 보충된 둘베코 변형된 이글 배지 (DMEM; Gibco #11965)에서 배양되었고, 가습된 인큐베이터에서 37 °C 및 5% CO₂에 유지되었다. 세포는 매 3 내지 4 일 1: 5 또는 1: 10의 계대배양 비에서 융합성인 경우 통과되었다. 세포는 그 다음 20,000 세포/웰에, 100 μ l/웰의 플레이트 용적으로, 투명 96-웰 배양 플레이트에서 플레이트되었다. 배양액에서 24 시간후 세포는 어느 한쪽 GluCl (pFB-CMV-GluCloptalpha-mEYFP-WT) 또는 GluCl* (pFB-CMV-GluCloptalpha-mEYFP-L9' A)의 α -서브유닛으로 모의-형질감염 또는 형질감염되었다. 형질감염을 위하여, 750 μ l Opti-MEM (Gibco 31985-070)내 16 μ g 총 DNA는 750 μ l Opti-MEM내 30 μ l ExpressFect와 혼합되었고, 20 분 동안 사전-인큐베이션되었고, 그 다음 100 μ l 신선한 배양 배지를 함유하는 세포에 15 μ l/웰로 첨가되었다. 형질감염 혼합물은 37 °C/5% CO₂에서 4-6 시간 인큐베이션 기간 이후 배양액으로부터 제거되었고 신선한 배양 배지로 대체되었다. 48 시간 후, 세포 생존력은 세포 생존력의 마커로서 트립판 블루 염료 배제를 이용하여 측정되었다. 쌍안 현미경 하에, 미염색된 (생존가능한) 및 염색된 (비-생존가능한) 세포는 개별적으로 카운트되었다. 5 별도의 웰들은 각각의 조건 (비-형질감염된, 모의-형질감염된, GluCl 및 GluCl*)에 대하여 평가되었다.
- [0568] **결과**
- [0569] 미형질감염된 및 모의-형질감염된 세포는 94.8% 및 92.8%, 각각의 평균 세포 생존력을 가졌다. GluCl 야생형 α -서브유닛의 단량체성 발현은 세포 생존력에 영향을 주지 않았다 (세포의 91.8%는 생존가능하였다). 항상적 활성 Cl⁻ 채널 (GluCl*)을 형성하는 GluCl 알파 서브유닛의 L9' A 돌연변이의 단량체성 발현은 세포 생존력에서 상당한 효과가 없었다 (세포의 94.0%는 생존가능하였다) (도 17).
- [0570] **결론**
- [0571] HEK-293 세포에서 GluCl α -서브유닛의 L9' A 돌연변이의 단량체성 발현은 세포 생존력에서 효과가 없었다.
- [0572] 실시예 8
- [0573] **목적**
- [0574] 인간 평활근 세포내 무스카린성 수용체 효능제 카르바콜의 첨가시 자유 세포내 Ca⁺⁺에서 GluCl 수용체 알파 서브유닛 L9' A 돌연변이체 및 글리신 수용체 알파-1 서브유닛 돌연변이체 (L9' A)의 효과를 평가하기 위해.
- [0575] **방법**
- [0576] 인간 기도 평활근 (HASM) 세포는 National Disease Research Interchange (Philadelphia, PA, USA) 및 International Institute for the Advancement of Medicine (Edison, NJ, USA)로부터 수득된 기관에서 유래되었다. 세포는 10% FBS, 100 U mL⁻¹ 페니실린, 0.1 mg mL⁻¹ 스트렙토마이신 및 2.5 mg mL⁻¹ 암포테리신 B로 보충된 Ham의 F-12 배지에서 배양되었고, 상기 배지는 매 72 h 대체되었다. 통로 1-5 동안 계대배양액내 HASM 세포가 사용된 것은, 이들 세포가 원상태 수축성 단백질의 발현을 보유하기 때문이다. HASM 세포는 건강한 정상 공여체에서 유래되었다.
- [0577] *GluCl* 수용체
- [0578] 세포는 2 개별 공여체 (HSAM-N030116K/1 및 N082715/3)의 기관에서 유래되었다. 이들은 ~80% 합류점까지 성장되었고 그 다음 pFB-CMV-GluCloptalpha-mEYFP-L9' A (GluCl 수용체 알파 L9' A 돌연변이체)로 형질감염되었거나

72시간 동안 무 형질감염되었다. 세포는 24시간 동안 혈청 결핍되었고 카르바콜 (10 μ M)로 자극에 앞서 1시간 동안 Fluo 8 칼슘 감지 염료로 장입되었다. 별도의 웰들은 카르바콜 (10 μ M)로 자극에 앞서 포르모테롤 (1 μ M, 10 min)으로 자극되었다. 이 연구에서 모든 인큐베이션 및 자극은 글리신을 함유하는 조직 배양 배지에서 실시되었다.

[0579] Gly 수용체

[0580] 세포는 2 개별 공여체 (HASM-N070112/3 및 N082112/3)의 기관에서 유래되었고 ~80% 합류점까지 성장되었고 pFB-CMV-hGlyRa1-P2A-mEYFP-WT (야생형 GlyR 알파-1 서브유닛), pFB-CMV-hGlyRa1-P2A-mEYFP-L9'A (GlyR 알파-1 서브유닛 L9' A)로 형질감염되었거나, 72시간 동안 무 형질감염되었다. 세포는 24시간 동안 혈청 결핍되었고 히스타민으로 자극에 앞서 1시간 동안 Fluo 8 칼슘 감지 염료로 장입되었다. pFB-CMV-hGlyRa1-P2A-mEYFP-WT로 형질감염된 세포는 히스타민 (1 μ M)으로 자극에 앞서 글리신 (100 μ M 또는 1 mM)으로 1시간 동안 사전-인큐베이션되었다. 글리신은 pFB-CMV-hGlyRa1-P2A-mEYFP-L9'A로 형질감염된 세포에 첨가되지 않았다. 이 연구에서 모든 인큐베이션 및 자극은 무 글리신 크랩 완충액에서 실시되었다. 양쪽 연구로부터 모든 데이터는 상대 형광 단위로서 표현된다.

[0581] 결과

[0582] GluCl 수용체에 대한 결과는 도 18A-B에서 나타난다. 구체적으로, 무스카린성 수용체 효능제 카르바콜의 첨가시 자유 세포내 Ca^{++} 에서 증가가 있었다. 세포 N030116K/1에서 반응은 매우 급속이었고 제2 공여체 N082715/3으로부터 세포에서 더욱 점진적이었다. 포르모테롤 (베타-아드레노CEPT 효능제 및 공지된 평활근 이완제)는 세포내 Ca^{++} 에서 카르바콜-유도된 증가를 길항하였다. 항상적 활성 GluCl 알파 서브유닛 L9' A 돌연변이 (pFB-CMV-GluCloptalpha-mEYFP-L9' A)로 형질감염된 세포는 또한 카르바콜에 의해 유도된 세포내 Ca^{++} 에서 감소를 보여주었다. 이것은 양쪽 공여체로부터 세포에서 관측되었다. 상기 관찰은 상기 돌연변이가 세포의 초분극화를 유발시키는 항상적 활성 클로라이드 채널을 생성하는 Frazier (2012)의 관찰과 일치하고, 이는 차례로 전압-의존적 Ca^{++} (L-유형) 채널의 개방을 약화 따라서 세포내 Ca^{++} 의 수준을 감소시킬 것이다.

[0583] GlyR에 대한 결과는 도 19A-B에서 나타난다. 구체적으로, 히스타민의 첨가시 자유 세포내 Ca^{++} 에서 증가가 있었다. 세포 N082112/3에서 반응은 매우 급속이었고 공여체 N070112/3으로부터 더욱 점진적이었다. 글리신 (100 μ M 또는 1 mM)의 존재 하에 pFB-CMV-hGlyRa1-P2A-mEYFP-WT (야생형 GlyR 알파-1 서브유닛)으로 형질감염된 세포에서 세포내 Ca^{++} 에서 히스타민-유도된 증가는 길항되었다. pFB-CMV-hGlyRa1-P2A-mEYFP-L9'A (GlyR 알파-1 서브유닛 L9' A)로 형질감염된 양쪽 공여체로부터 세포에서 히스타민 반응의 증가 길항작용은 글리신의 부재 하에 보여졌다.

[0584] 결론

[0585] GluCl 알파 서브유닛 L9' A 돌연변이체에 대한 관찰은 상기 돌연변이가 세포의 초분극화를 유발시키는 항상적 활성 클로라이드 채널을 생성하는 Frazier (2012)의 관찰과 일치하고, 이는 차례로 전압-의존적 Ca^{++} (L-유형) 채널의 개방을 약화 따라서 세포내 Ca^{++} 의 수준을 감소시킬 것이다.

[0586] GlyR에 관한 이들 데이터는 GlyR 알파-1 서브유닛 L9' A가 세포의 초분극화를 유발시키는 항상적 활성 클로라이드 채널을 형성한다는 가설과 일치하고, 이는 차례로 전압-의존적 Ca^{++} (L-유형) 채널의 개방을 약화 따라서 세포내 Ca^{++} 의 수준을 감소시킬 것이다.

[0587] 실시예 9

[0588] 목적

[0589] 배양액에서 인간 뉴런의 세포를 형질도입하는 AAV6의 능력을 평가하기 위해.

[0590] 방법

[0591] 절개 현미경 하에, 공여체로부터 사후 수집된 인간 배근 신경절 (hDRG)는 과잉의 지방, 연결하는 조직, 및 신경근으로부터 청소되었다. 신경절은 그 다음 작은 조각으로 잘려졌다. 상기 조각은 0.25% 콜라겐분해효소 P 및 0.1% 디스파제 I의 효소 콕테일에서 소화되었고 37 °C에서 18시간 동안 인큐베이션되었다. 소화 이후, 세포는

행크 평형 염류액으로 효소 용액 없이 세정되었다.

[0592] 정제 이후, 해리된 세포는 조직 배양 접시에 플레이팅되었다. 플레이팅에 앞서 접시는 10 μ g/ml 폴리-L-라이신 및 유형 1 랫트-꼬리 콜라겐으로 치료되었다. 세포는 B-27 보충물 (Invitrogen), 1% 페니실린/스트렙토마이신, 0.4 mM L-글루타민, 2.5 g/L 글루코스 및 1% 우태 혈청으로 보충된 Neurobasal-A 배지 (Invitrogen)에서 유지되었다.

[0593] 일단 배양된 세포가 안정화하면 (4-5 일) 이들은 2.2e11 vg/mL의 농도로 세포에 첨가된 AAV6-hSyn-GFP로 형질도입되었고 최소의 6 시간 동안 세포와 접촉하게 되었다. 세포는 형광 현미경 하에 매 2-3 일 검사되어 GFP 발현에 대하여 체크되었다. 관찰은 디지털 이미지로 기록되었다.

[0594] **결과**

[0595] AAV6에 노출후 4 일에서 뉴런의 세포는 GFP 단백질의 강한 발현을 보여주었다 (도 20). GFP의 발현은 AAV6이 작은 통각성 뉴런에 대하여 선택성을 나타내는 것을 보여주는 마우스에서 이전의 연구와 일치하는 모든 뉴런의 세포에서 가시적이지 않았다 (Towne C. 등 (2009) Molecular Pain 5(1): 52). 신경교 세포는 GFP를 어느 한쪽으로 발현시키지 않았다. 선택성의 상기 수준은 부분적으로 AAV6 굴성에 기인될 수 있고 틀림없이 GFP의 뉴런-선택적 발현을 허용하는 hSyn 프로모터의 이용에 의해 영향받는다.

[0596] **결론**

[0597] 이들 데이터는 AAV6이 배양액에서 인간 뉴런의 세포를 형질도입할 수 있다는 것을 보여준다. 상기 관찰은, 설치류에서 실증된 바와 같이, 주변에 주사된 경우 AAV6이 주사의 영역에서 통각성 뉴런을 형질도입할 것 그리고 그들 뉴런의 생리학에 영향을 줄 수 있는 유전자를 전달할 수 있다는 것을 시사한다. 이들 관찰은, 인간내 주변부터 척수까지 통증 신호의 이송을 예방하기 위해, 주변 통각성 뉴런에 내인성으로-활성화된 또는 항상적 활성 클로라이드 채널을 전달하는 AAV6 이용의 개념과 일치한다.

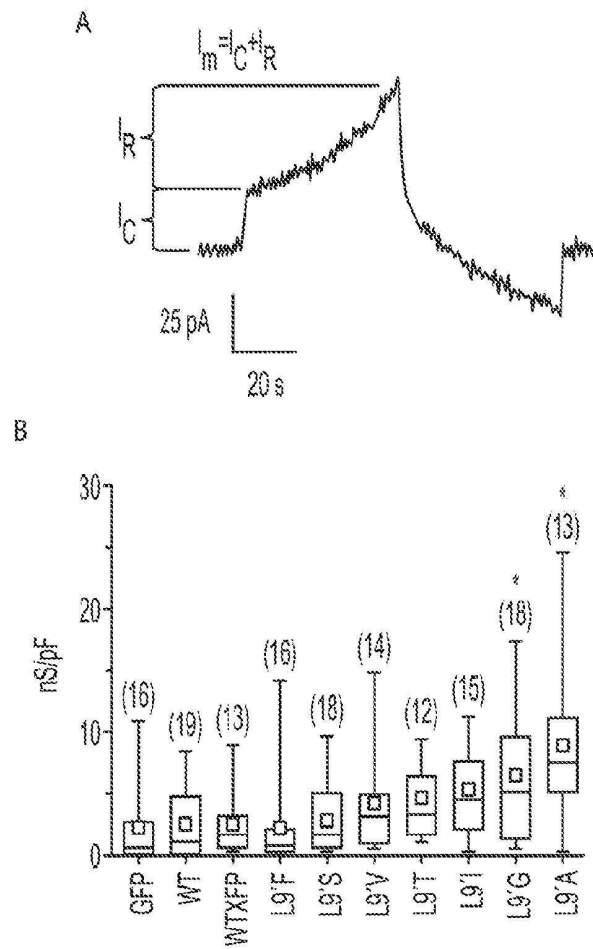
[0598] 각각의 참조문헌이 참고로 편입되도록 개별적으로 및 구체적으로 지시되고 그 전문이 본 명세서에서 제시된 것처럼 동일한 정도로 본 명세서에서 인용된, 공개, 특허 출원, 및 특허를 포함하는, 모든 참조문헌은 참고로 편입된다.

[0599] 본 발명 기재의 문맥에서 (특히 하기 청구항의 문맥에서) 용어 “한” 및 “하나” 및 “그” 및 유사한 지시대상의 사용은, 본 명세서에서 달리 나타내지 않는 한 또는 맥락에 의해 명확히 반박되지 않는 한, 양쪽 단수 및 복수를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 용어 “포함하는”, “갖는”, “포괄하는”, 및 “함유하는”은 달리 지적되지 않는 한 (즉, “비제한적으로, 포함하는”을 의미하는) 개방형 용어들로서 해석되어야 한다. 본 명세서에서 값의 범위의 설명은, 본 명세서에서 달리 나타내지 않는 한, 그 범위 내에 해당하는 각각의 별도의 값을 개별적으로 지칭하는 속기 방법으로서 작용하도록 단지 의도되고, 각각의 별도의 값은 본 명세서에서 개별적으로 인용된 것처럼 명세서에 편입된다. 본 명세서에서 기재된 모든 방법은 본 명세서에서 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 맥락에 의해 명확히 반박되지 않는 한 임의의 적당한 순서로 수행될 수 있다. 하기의 이용은: 임의의 및 모든 예, 또는 예시적인 언어 (예를 들면, “예컨대”) 본 명세서에서 제공된, 본 발명을 더 양호하게 예시하도록 단지 의도되고 달리 청구되지 않는 한 본 발명의 범위에서 제한을 두지 않는다. 명세서에서 언어는 본 발명의 실시예에 필수적인 만큼 임의의 비-청구된 요소를 지시하는 것으로서 해석되지 않아야 한다.

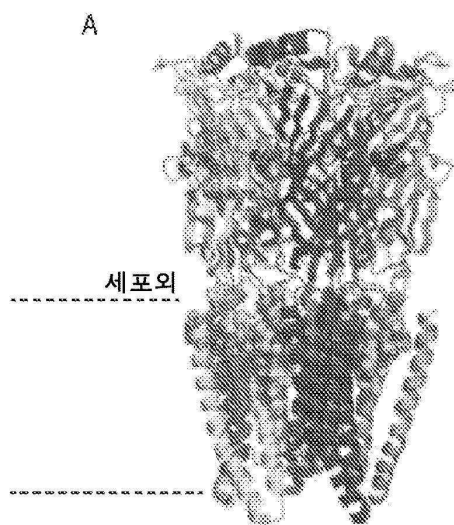
[0600] 본 발명 실시를 위하여 발명자들에 공지된 최상의 방식을 포함하는, 본 발명의 바람직한 구현에는 본 명세서에서 기재된다. 그들 바람직한 구현예의 변동은 전술한 설명 관독시 당해 분야의 숙련가에 분명해질 수 있다. 본 발명자들은 숙련가가 상기 변동을 적절하게 사용할 것을 기대하고, 본 발명자들은 구체적으로 본 명세서에서 기재된 것 이외 본 발명이 실시되는 것을 의도한다. 따라서, 본 발명은 적용가능한 법에 의해 허용된 바와 같이 여기에 첨부된 청구항들에서 인용된 요지의 모든 변형 및 등가물을 포함한다. 또한, 이의 모든 가능한 변동에서 상기-기재된 요소의 임의의 조합은 본 명세서에서 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 맥락에 의해 명확히 반박되지 않는 한 본 발명에 의해 포함된다.

도면

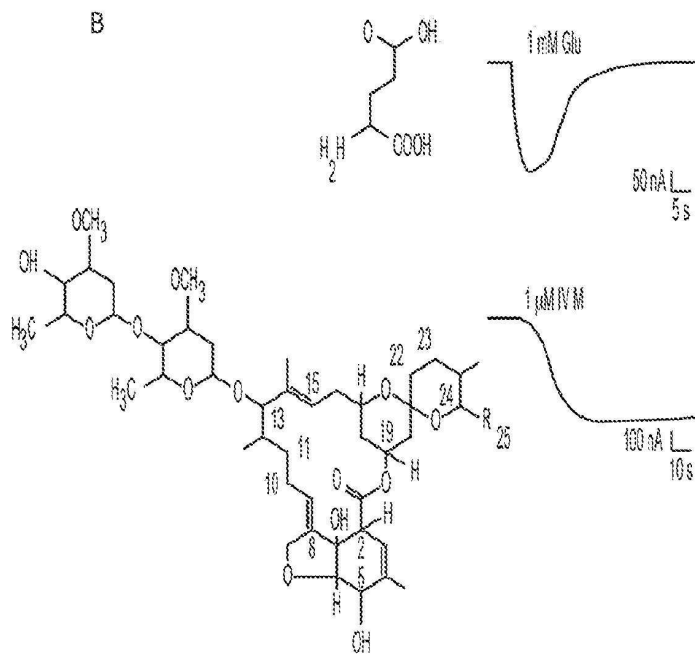
도면1



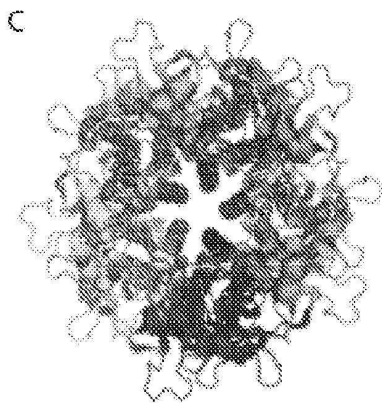
도면2a



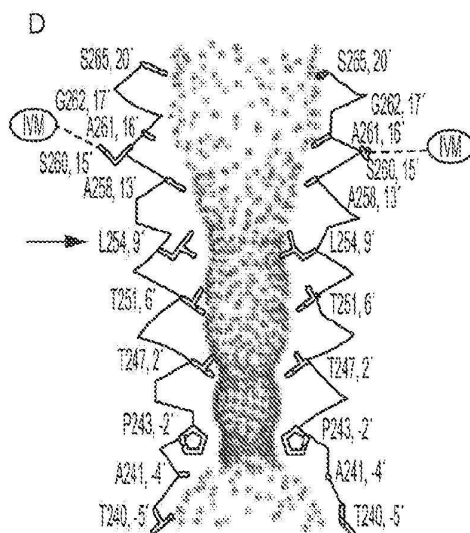
도면2b



도면2c

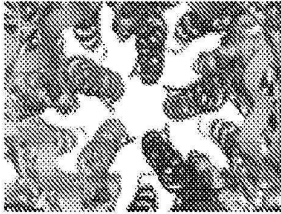


도면2d



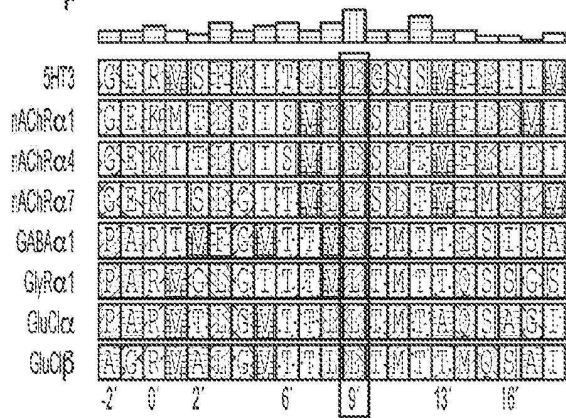
도면2e

E

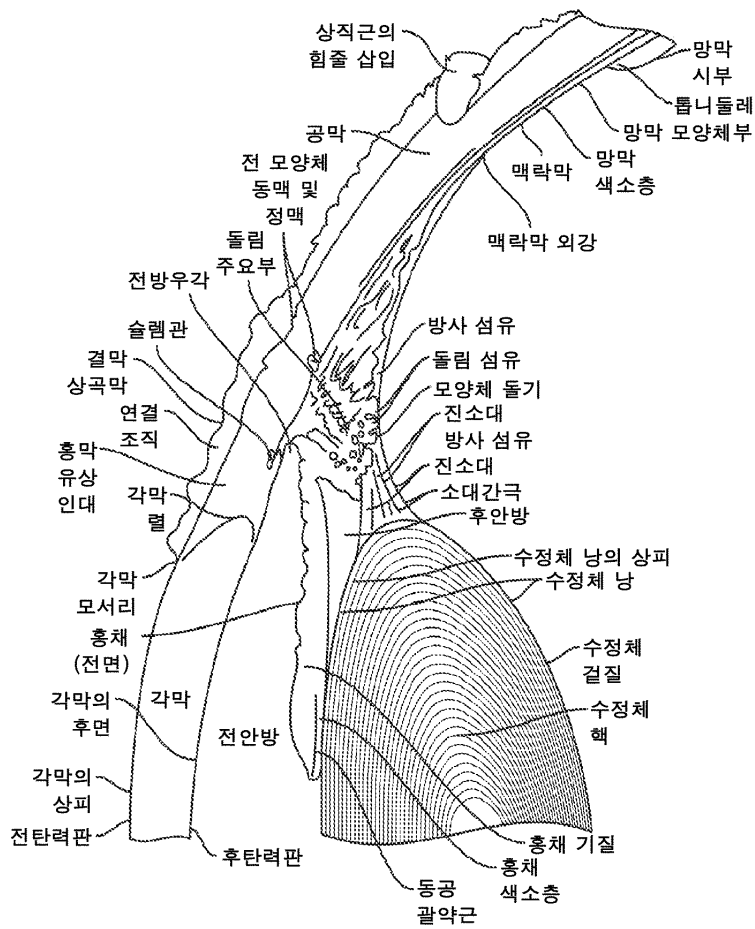


도면2f

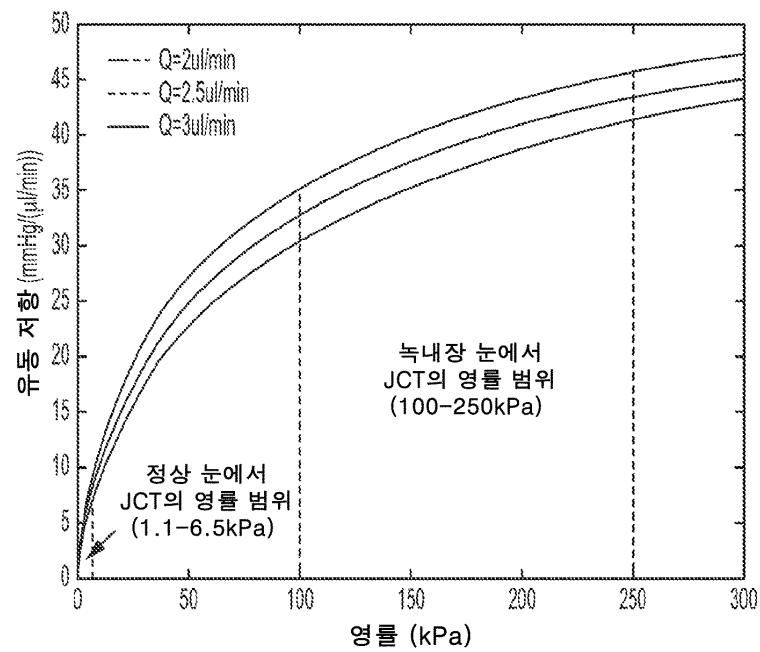
F



도면3

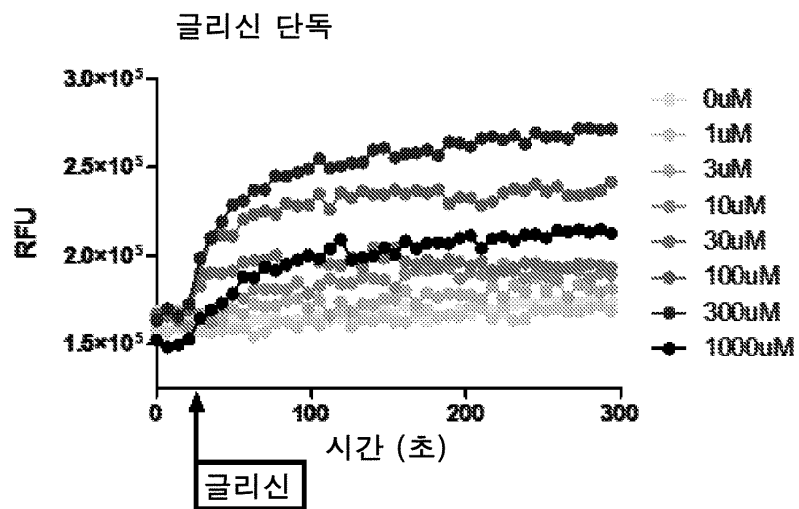


도면4



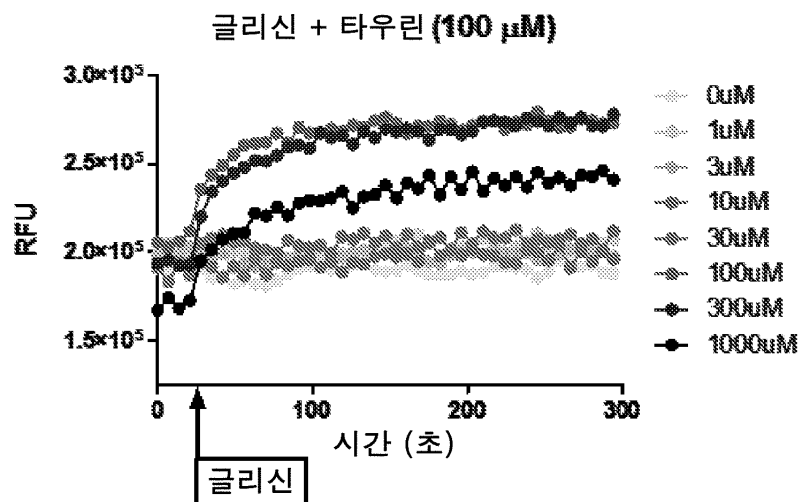
도면5a

A

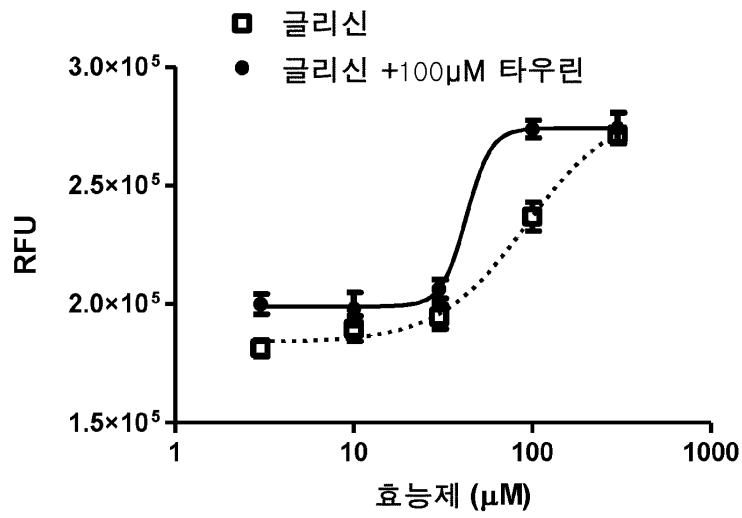


도면5b

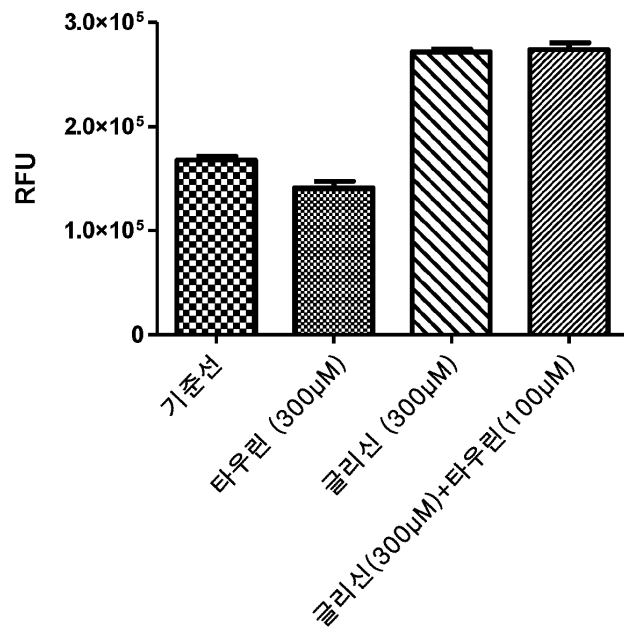
B



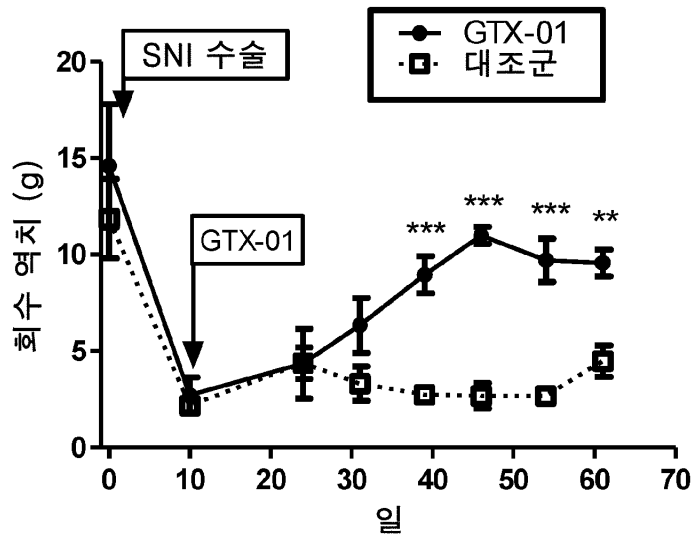
도면6



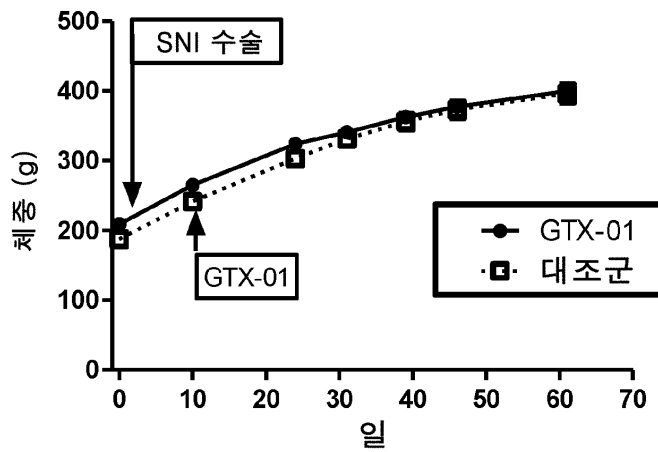
도면7



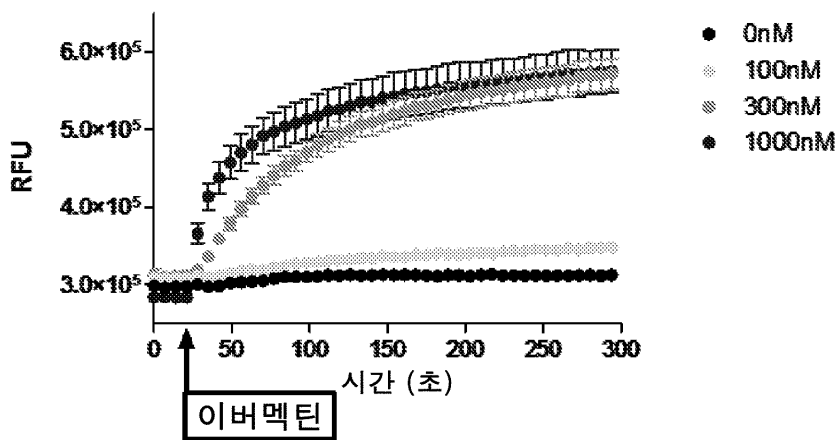
도면8



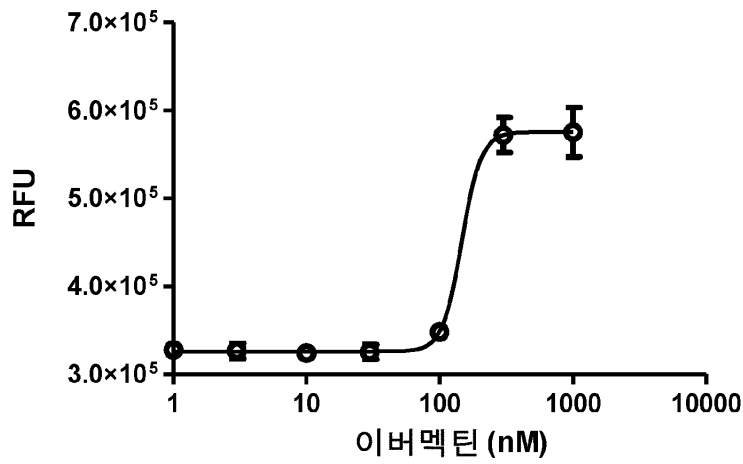
도면9



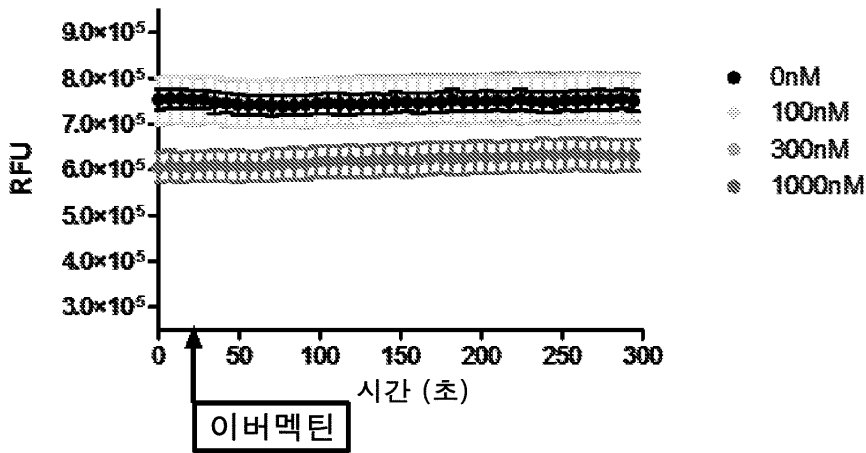
도면10



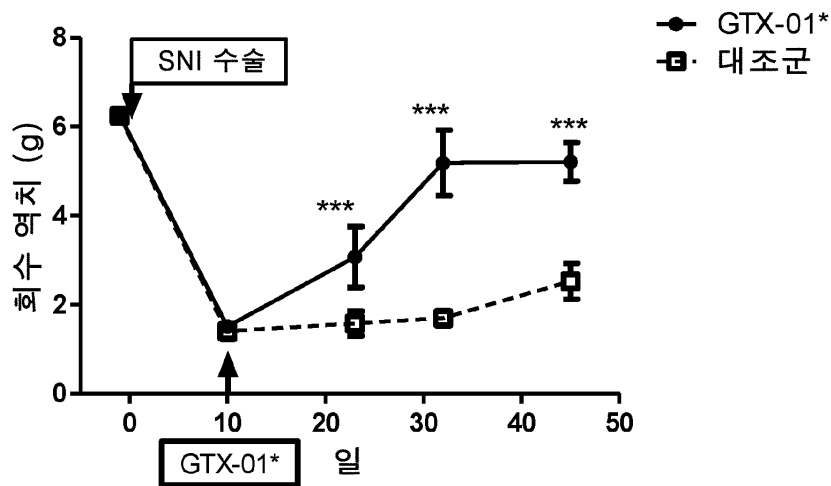
도면11



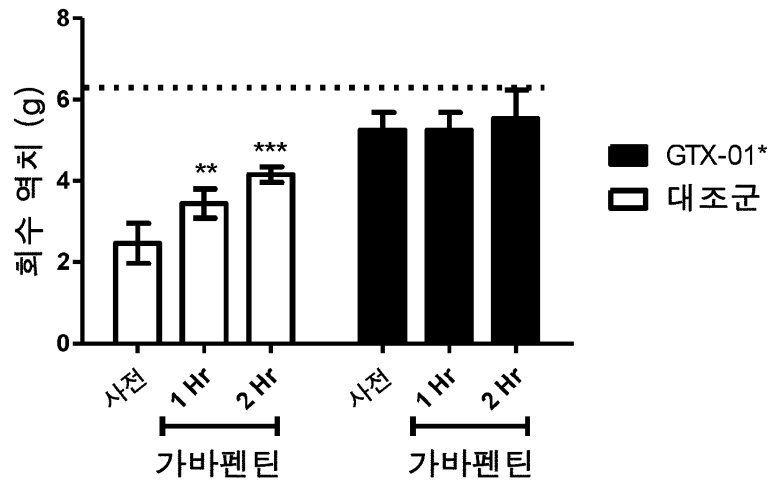
도면12



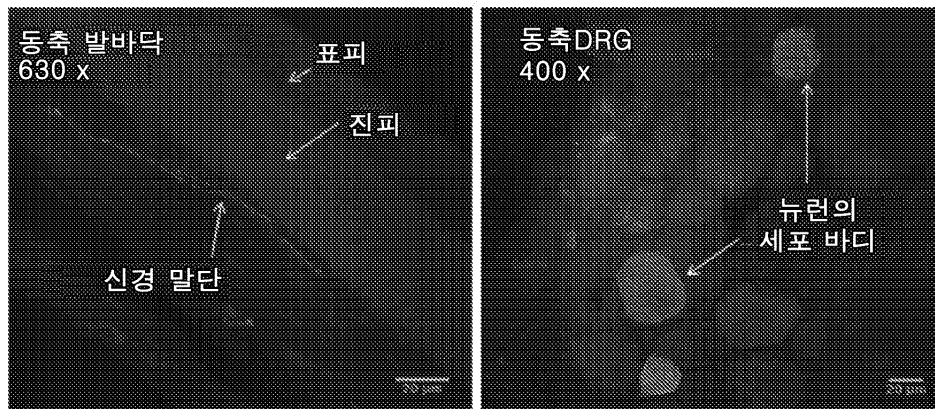
도면13



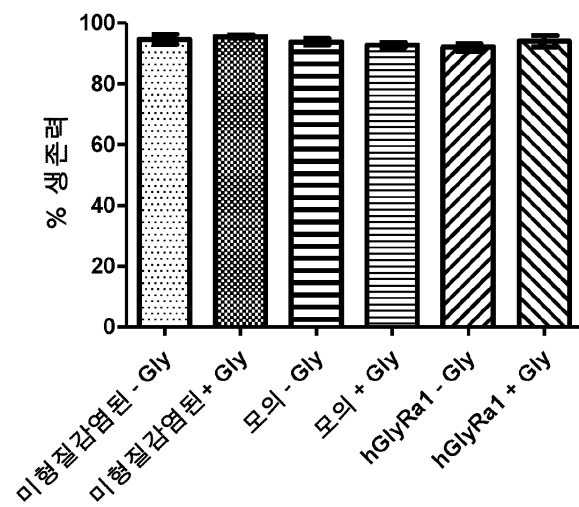
도면14



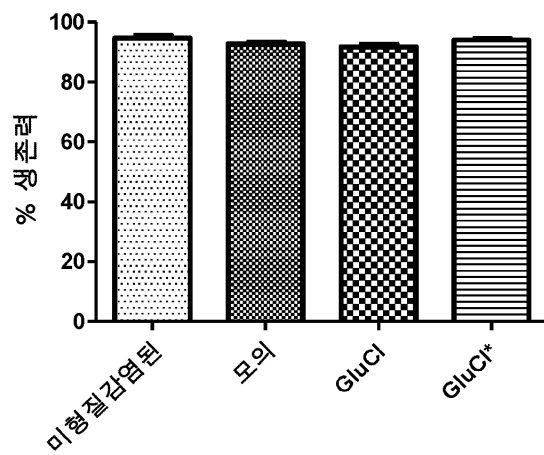
도면15



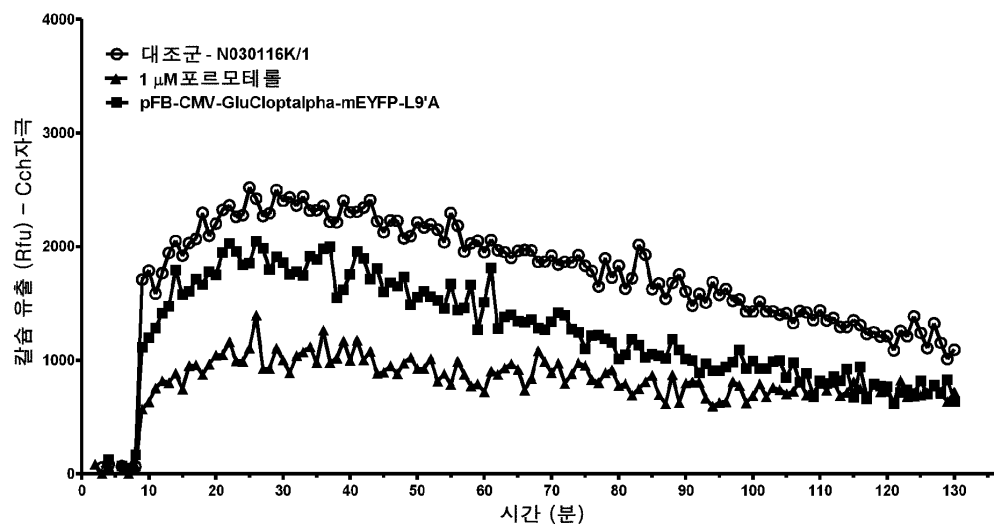
도면16



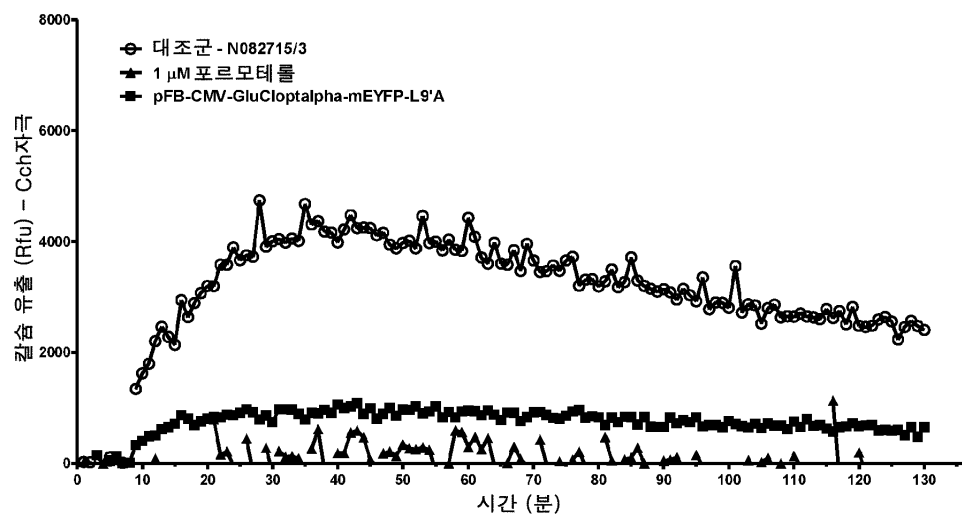
도면17



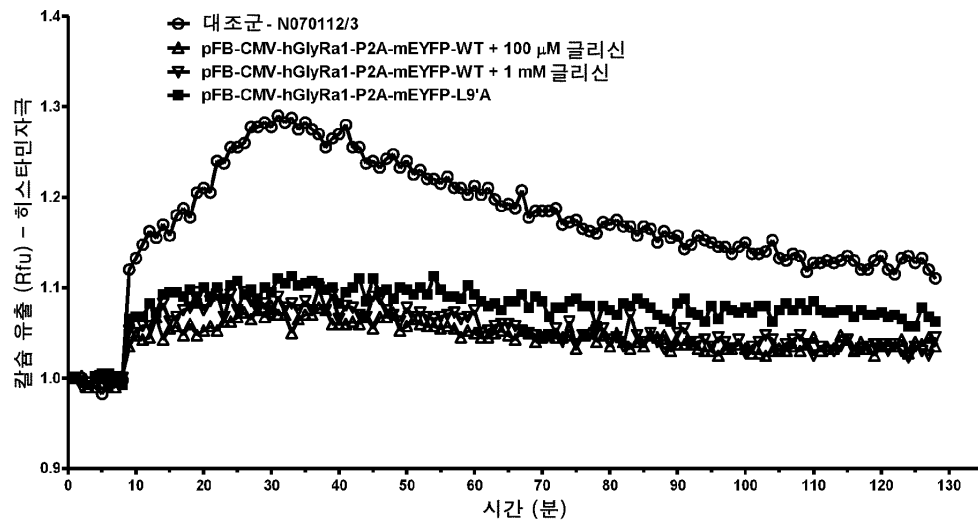
도면18a



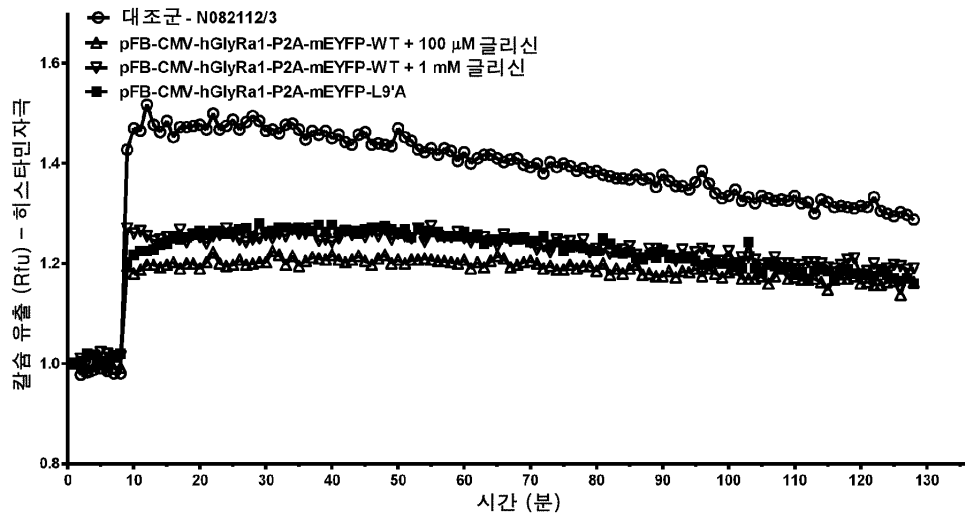
도면18b



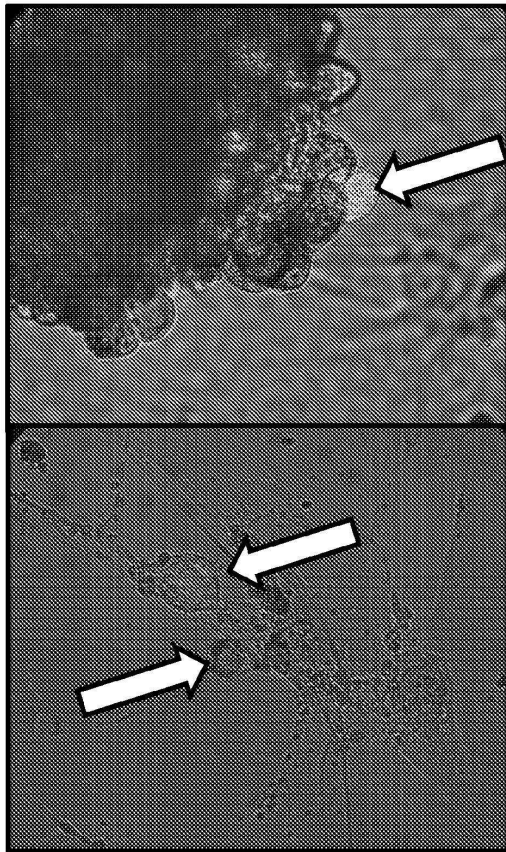
도면19a



도면19b



도면20



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GOLEINI INC.

<120> TARGETED EXPRESSION OF CHLORIDE CHANNELS AND METHODS OF USE
THEREOF

<130> 01989-007W01

<140> PCT/US2016/054199

<141> 2016-09-28

<150> 62/378,509

<151> 2016-08-23

<150> 62/303,907

<151> 2016-03-04

<150> 62/235,920

<151> 2015-10-01

<150> 62/235,914

<151> 2015-10-01

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1374

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgtacagct tcaatactct tcgactctac ctttgggaga ccattgtatt cttcagcctt 60

gctgcttcta aggaggctga agctgctcgc tccgcaccca agcctatgtc accctcggat 120

ttcctggata agctaattggg gagaacctcc ggatatgatg ccaggatcag gcccaatttt 180

aaaggcccc cagtgaacgt gagctgcaac attttcatca acagctttgg ttccattgct 240

gagacaacca tggactatag ggtcaacatc ttctgcggc agcaatggaa cgacccccgc 300

ctggcctata atgaataccc tgacgactct ctggacctgg acccatccat gctggactcc 360

atctggaaac ctgacctgtt ctttgccaac gagaaggggg cccacttcca tgagatcacc 420

acagacaaca aattgctaag gatctcccgg aatgggaatg tcctctacag catcagaatc 480

accctgacac tggcctgccc catggacttg aagaatttcc ccatggatgt ccagacatgt 540

atcatgcaac tggaaagctt tggatatacg atgaatgacc tcacttttga gtggcaggaa 600

caggagccg tgcaggtagc agatggacta actctgcccc agtttatctt gaaggaagag 660

aaggacttga gatactgcac caagcactac aacacaggta aattcacctg cattgaggcc 720

cggttccacc tggagcggca gatgggttac tacctgattc agatgtatat tcccagcctg 780

ctcattgtca tcctctcatg gatctccttc tggatcaaca tggatgctgc acctgctcgt 840

gtgggcctag gcatcaccac tgtgtctacc atgaccacce agagctccgg ctctcgagca 900

tctctgcca aggtgtccta tgtgaaagcc attgacattt ggatggcagt ttgcctgctc 960

tttgtgttct cagccctatt agaatatgct gccgttaact ttgtgtctcg gcaacataag 1020

gagctgctcc gattcaggag gaagcggaga catcacaaga gcccattgtt gaatctattc 1080

caggaggatg aagctggaga aggccgcttt aacttctctg cctatgggat gggcccagcc 1140

tgtctacagg ccaaggatgg catctcagtc aaggcgcca acaacagtaa caccaccaac 1200

ccccctctg caccatctaa gtccccagag gagatgcgaa aactcttcat ccagagggcc 1260

aagaagatcg acaaaatata ccgcattggc ttcccatgg ccttctcat tttcaacatg 1320

ttctactgga tcactacaa gattgtccgt agagaggacg tccacaacca gtga 1374

<210> 2

<211> 1374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 2

atgtacagct tcaatactct tcgactctac ctttgggaga ccattgtatt cttcagcctt	60
gctgcttcta aggaggctga agctgctcgc tccgcacca agcctatgtc accctcggat	120
ttcctggata agctaattggg gagaacctcc ggatatgatg ccaggatcag gcccaatttt	180
aaaggtcccc cagtgaacgt gagctgcaac attttcatca acagctttgg ttccattgct	240
gagacaacca tggactatag ggtcaacatc ttctgcggc agcaatggaa cgacccccgc	300
ctggcctata atgaataccc tgacgactct ctggacctgg acccatccat gctggactcc	360
atctggaaac ctgacctgtt ctttgccaac gagaaggggg ccacttcca tgagatcacc	420
acagacaaca aattgctaag gatctcccgg aatgggaatg ttctctacag catcagaatc	480
accctgacac tggcctgccc catggacttg aagaatttcc ccatggatgt ccagacatgt	540
atcatgcaac tggaaagctt tggatatacg atgaatgacc tcacttttga gtggcaggaa	600
cagggagccg tgcaggtagc agatggacta actctgcccc agtttatctt gaaggaagag	660
aaggacttga gatactgcac caagcactac aacacaggta aattcacctg cattgaggcc	720
cggttccacc tggagcgcca gatgggttac tacctgattc agatgtatat tcccagcctg	780
ctcattgtca ttctctcatg gatctccttc tggatcaaca tggatgctgc acctgctcgt	840
gtgggcctag gcatcaccac tgtggccacc atgaccaccc agagctccgg ctctcgagca	900
tctctgcccc aggtgtccta tgtgaaagcc attgacattt ggatggcagt ttgcctgctc	960
tttgtgttct cagccctatt agaatatgct gccgttaact ttgtgtctcg gcaacataag	1020
gagctgctcc gattcaggag gaagcggaga catcacaaga gccccatgtt gaatctattc	1080
caggaggatg aagctggaga aggccgcttt aacttctctg cctatgggat gggcccagcc	1140
tgtctacagg ccaaggatgg catctcagtc aaggcgcca acaacagtaa caccaccaac	1200
ccccctctg caccatctaa gtccccagag gagatgcgaa aactcttcat ccagagggcc	1260
aagaagatcg acaaaatata ccgcattggc ttccccatgg ccttctcat tttcaacatg	1320
ttctactgga tcactacaa gattgtccgt agagaggacg tccacaacca gtga	1374

<210> 3

<211> 457

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Tyr Ser Phe Asn Thr Leu Arg Leu Tyr Leu Trp Glu Thr Ile Val

1 5 10 15
Phe Phe Ser Leu Ala Ala Ser Lys Glu Ala Glu Ala Ala Arg Ser Ala
20 25 30
Pro Lys Pro Met Ser Pro Ser Asp Phe Leu Asp Lys Leu Met Gly Arg
35 40 45
Thr Ser Gly Tyr Asp Ala Arg Ile Arg Pro Asn Phe Lys Gly Pro Pro
50 55 60
Val Asn Val Ser Cys Asn Ile Phe Ile Asn Ser Phe Gly Ser Ile Ala

65 70 75 80
Glu Thr Thr Met Asp Tyr Arg Val Asn Ile Phe Leu Arg Gln Gln Trp
85 90 95
Asn Asp Pro Arg Leu Ala Tyr Asn Glu Tyr Pro Asp Asp Ser Leu Asp
100 105 110
Leu Asp Pro Ser Met Leu Asp Ser Ile Trp Lys Pro Asp Leu Phe Phe
115 120 125
Ala Asn Glu Lys Gly Ala His Phe His Glu Ile Thr Thr Asp Asn Lys

130 135 140
Leu Leu Arg Ile Ser Arg Asn Gly Asn Val Leu Tyr Ser Ile Arg Ile
145 150 155 160
Thr Leu Thr Leu Ala Cys Pro Met Asp Leu Lys Asn Phe Pro Met Asp
165 170 175
Val Gln Thr Cys Ile Met Gln Leu Glu Ser Phe Gly Tyr Thr Met Asn
180 185 190
Asp Leu Ile Phe Glu Trp Gln Glu Gln Gly Ala Val Gln Val Ala Asp

195 200 205
Gly Leu Thr Leu Pro Gln Phe Ile Leu Lys Glu Glu Lys Asp Leu Arg
210 215 220
Tyr Cys Thr Lys His Tyr Asn Thr Gly Lys Phe Thr Cys Ile Glu Ala

225 230 235 240
 Arg Phe His Leu Glu Arg Gln Met Gly Tyr Tyr Leu Ile Gln Met Tyr
 245 250 255
 Ile Pro Ser Leu Leu Ile Val Ile Leu Ser Trp Ile Ser Phe Trp Ile

 260 265 270
 Asn Met Asp Ala Ala Pro Ala Arg Val Gly Leu Gly Ile Thr Thr Val
 275 280 285
 Leu Thr Met Thr Thr Gln Ser Ser Gly Ser Arg Ala Ser Leu Pro Lys
 290 295 300
 Val Ser Tyr Val Lys Ala Ile Asp Ile Trp Met Ala Val Cys Leu Leu
 305 310 315 320
 Phe Val Phe Ser Ala Leu Leu Glu Tyr Ala Ala Val Asn Phe Val Ser

 325 330 335
 Arg Gln His Lys Glu Leu Leu Arg Phe Arg Arg Lys Arg Arg His His
 340 345 350
 Lys Ser Pro Met Leu Asn Leu Phe Gln Glu Asp Glu Ala Gly Glu Gly
 355 360 365
 Arg Phe Asn Phe Ser Ala Tyr Gly Met Gly Pro Ala Cys Leu Gln Ala
 370 375 380
 Lys Asp Gly Ile Ser Val Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr Thr Asn

 385 390 395 400
 Pro Pro Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys Leu Phe
 405 410 415
 Ile Gln Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly Phe Pro
 420 425 430
 Met Ala Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr Lys Ile
 435 440 445
 Val Arg Arg Glu Asp Val His Asn Gln
 450 455

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Pro Ala Arg Val Gly Leu Gly Ile Thr Thr Val Leu Thr Met Thr Thr

1 5 10 15

Gln Ser Ser Gly Ser

20

<210> 5

<211> 457

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 5

Met Tyr Ser Phe Asn Thr Leu Arg Leu Tyr Leu Trp Glu Thr Ile Val

1 5 10 15

Phe Phe Ser Leu Ala Ala Ser Lys Glu Ala Glu Ala Ala Arg Ser Ala

20 25 30

Pro Lys Pro Met Ser Pro Ser Asp Phe Leu Asp Lys Leu Met Gly Arg

35 40 45

Thr Ser Gly Tyr Asp Ala Arg Ile Arg Pro Asn Phe Lys Gly Pro Pro

50 55 60

Val Asn Val Ser Cys Asn Ile Phe Ile Asn Ser Phe Gly Ser Ile Ala

65 70 75 80

Glu Thr Thr Met Asp Tyr Arg Val Asn Ile Phe Leu Arg Gln Gln Trp

85 90 95

Asn Asp Pro Arg Leu Ala Tyr Asn Glu Tyr Pro Asp Asp Ser Leu Asp

100 105 110

Leu Asp Pro Ser Met Leu Asp Ser Ile Trp Lys Pro Asp Leu Phe Phe

115 120 125

Ala Asn Glu Lys Gly Ala His Phe His Glu Ile Thr Thr Asp Asn Lys

130 135 140

Leu Leu Arg Ile Ser Arg Asn Gly Asn Val Leu Tyr Ser Ile Arg Ile
 145 150 155 160
 Thr Leu Thr Leu Ala Cys Pro Met Asp Leu Lys Asn Phe Pro Met Asp
 165 170 175
 Val Gln Thr Cys Ile Met Gln Leu Glu Ser Phe Gly Tyr Thr Met Asn
 180 185 190
 Asp Leu Ile Phe Glu Trp Gln Glu Gln Gly Ala Val Gln Val Ala Asp
 195 200 205

 Gly Leu Thr Leu Pro Gln Phe Ile Leu Lys Glu Glu Lys Asp Leu Arg
 210 215 220
 Tyr Cys Thr Lys His Tyr Asn Thr Gly Lys Phe Thr Cys Ile Glu Ala
 225 230 235 240
 Arg Phe His Leu Glu Arg Gln Met Gly Tyr Tyr Leu Ile Gln Met Tyr
 245 250 255
 Ile Pro Ser Leu Leu Ile Val Ile Leu Ser Trp Ile Ser Phe Trp Ile
 260 265 270

 Asn Met Asp Ala Ala Pro Ala Arg Val Gly Leu Gly Ile Thr Thr Val
 275 280 285
 Ala Thr Met Thr Thr Gln Ser Ser Gly Ser Arg Ala Ser Leu Pro Lys
 290 295 300
 Val Ser Tyr Val Lys Ala Ile Asp Ile Trp Met Ala Val Cys Leu Leu
 305 310 315 320
 Phe Val Phe Ser Ala Leu Leu Glu Tyr Ala Ala Val Asn Phe Val Ser
 325 330 335

 Arg Gln His Lys Glu Leu Leu Arg Phe Arg Arg Lys Arg Arg His His
 340 345 350
 Lys Ser Pro Met Leu Asn Leu Phe Gln Glu Asp Glu Ala Gly Glu Gly
 355 360 365
 Arg Phe Asn Phe Ser Ala Tyr Gly Met Gly Pro Ala Cys Leu Gln Ala
 370 375 380
 Lys Asp Gly Ile Ser Val Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr Thr Asn

385 390 395 400

Pro Pro Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys Leu Phe

405 410 415

Ile Gln Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly Phe Pro

420 425 430

Met Ala Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr Lys Ile

435 440 445

Val Arg Arg Glu Asp Val His Asn Gln

450

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

pept i de

<400> 6

Pro Ala Arg Val Gly Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Thr Met Thr Thr

1 5 10 15

Gln Ser Ser Gly Ser

20

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

 $\langle 220 \rangle \langle 221 \rangle$ modified_base

<222> (21)..(23)

<223> a, c, t, g, unknown or other

 $\langle 220 \rangle$

<223> See specification as filed for detailed description of
substitutions and preferred embodiments

<400> 7

ccctgggcgt gaccaccctg nnnac

25

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<220><221> modified_base

<222> (21)..(23)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<220>

<223> See specification as filed for detailed description of
substitutions and preferred embodiments

<400> 8

gcggactgag cggcatggt nnnca

25

<210> 9

<211> 21

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

helical pore-lining M2 domain peptide

<400> 9

Gly Glu Arg Val Ser Phe Lys Ile Thr Leu Leu Leu Gly Tyr Ser Val

1 5 10 15

Phe Leu Ile Ile Val

20

<210> 10

<211> 21

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

helical pore-lining M2 domain peptide

<400> 10

Gly Glu Lys Met Thr Leu Ser Ile Ser Val Leu Leu Ser Leu Thr Val

1 5 10 15

Phe Leu Leu Val Ile

20

<210> 11

<211> 21

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

helical pore-lining M2 domain peptide

<400> 11

Gly Glu Lys Ile Thr Leu Cys Ile Ser Val Leu Leu Ser Leu Thr Val

1 5 10 15

Phe Leu Leu Leu Ile

20

<210>

> 12

<211> 21

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

helical pore-lining M2 domain peptide

<400> 12

Gly Glu Lys Ile Ser Leu Gly Ile Thr Val Leu Leu Ser Leu Thr Val

1 5 10 15

Phe Met Leu Leu Val

20

<210> 13

<211> 21

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

helical pore-lining M2 domain peptide

<400> 13

Pro Ala Arg Thr Val Phe Gly Val Thr Thr Val Leu Thr Met Thr Thr

1 5 10 15

Leu Ser Ile Ser Ala

20

<210> 14

<211> 21

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

helical pore-lining M2 domain peptide

<400> 14

Pro Ala Arg Val Thr Leu Gly Val Thr Thr Leu Leu Thr Met Thr Ala

1 5 10 15

Gln Ser Ala Gly Ile

20

<210> 15

<211> 21

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

helical pore-lining M2 domain peptide

<400> 15

Ala Gly Arg Val Ala Leu Gly Val Thr Thr Leu Leu Thr Met Thr Thr

1 5 10 15

Met Gln Ser Ala Ile

20