



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년02월23일

(11) 등록번호 10-2640462

(24) 등록일자 2024년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61P 25/02 (2006.01)

A61P 25/04 (2006.01) A61P 29/00 (2023.01)

C07K 14/705 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/0058 (2013.01)

A61P 25/02 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2020-7009380

(22) 출원일자(국제) 2018년09월07일

심사청구일자 2021년08월19일

(85) 번역문제출일자 2020년03월31일

(65) 공개번호 10-2020-0051679

(43) 공개일자 2020년05월13일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/049914

(87) 국제공개번호 WO 2019/051202

국제공개일자 2019년03월14일

(30) 우선권주장

62/556,088 2017년09월08일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20030069398 A1

US20140256801 A1

KR102489437 B1

WO2008010637 A1

(73) 특허권자

더 리첸즈 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아  
미합중국, 94607-5200 캘리포니아, 오클랜드, 프  
랭클린 스트리트 1111, 5th 플로어

(72) 발명자

마르살라 마틴

미국 92075 캘리포니아주 솔라나 비치 산타 마르  
타 코트 1440

미야노하라 아츠시

미국 92122 캘리포니아주 샌디에고 레이크우드 스  
트리트 6276

다도코로 다카히로

미국 92122 캘리포니아주 샌디에고 레본 드라이브  
3391 넘버203

(74) 대리인

특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 16 항

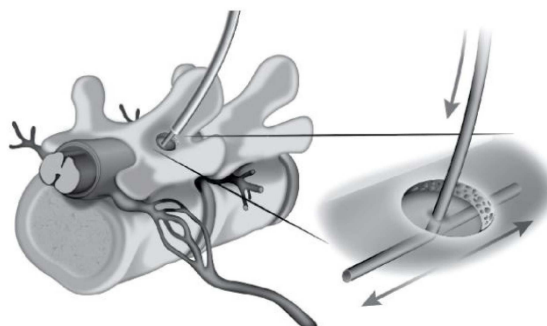
심사관 : 윤재욱

(54) 발명의 명칭 신경병증성 통증의 치료를 위한 방법 및 조성물

### (57) 요약

본 발명은 감염된 배각 뉴런으로부터 시냅스 간극으로 소포 GABA의 방출을 강력화시킴으로써 통각수용 효과의 유도에 효과적인, GAD65 (글루타메이트디카르복실라제) 유전자 및 VGAT (소포 GABA 수송체) 유전자의 척추 분절-특이적 상향조절을 위한 조성물의 소량의 연막하 투여를 통해서 신경병증성 통증을 치료하기 위한 요법을 제공한다.

대표도 - 도1a



도 1A

(52) CPC특허분류

*A61P 25/04* (2018.01)

*A61P 29/00* (2023.02)

*C07K 14/705* (2013.01)

*C12N 9/88* (2013.01)

*C12Y 401/01015* (2013.01)

*C12N 2750/14143* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

연막하 투여에 의해 대상체에서 신경병증성 통증을 치료하는데 사용하기 위한, (i) 조직-특이적 또는 조직-비특이적 프로모터 제어 하의 바이러스 벡터, GAD65 유전자 및 VGAT 유전자를 포함하는 핵산 구성체; 및 (ii) 약학적으로 허용가능한 바이러스 담체를 포함하는 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

(i) 핵산 구성체는 AAV 혈청형 9 또는 Anc80 캡시드로 캡슐화되고;

(ii) 조성물 중 핵산 구성체의 농도는  $0.1$  내지  $2.0 \times 10^{13}$  gc/mL이고/이거나;

(iii) 약학적으로 허용가능한 바이러스 담체는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 (AV), 또는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 바이러스 담체는 AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh33, AAVrh34, 및 AAV Anc80으로 이루어진 군으로부터 선택되는 AAV를 포함하는 것인, 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, GAD65 유전자는 SEQ ID NO: 2 또는 5의 유전자이고/이거나 VGAT 유전자는 SEQ ID NO: 4 또는 6의 유전자인 조성물.

#### 청구항 5

조성물의 연막하 투여를 포함하는 유전자 요법에 의해 대상체에서 신경병증성 통증을 치료하는데 사용하기 위한, 조직-특이적 또는 조직-비특이적 프로모터 제어 하의 (i) 바이러스 벡터; (ii) GAD65 유전자; 및 (iii) VGAT 유전자를 포함하는 유전자 요법 구성체의 치료적 유효량 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 (AV), 또는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터로 이루어진 군으로부터 선택되고; AAV는 AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh33, AAVrh34, 및 AAV Anc80으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.

#### 청구항 7

제5항에 있어서, 유전자 요법 구성체는 SEQ ID NO: 2의 유전자 및 SEQ ID NO: 4의 유전자를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 8

제1항 또는 제5항에 있어서, 조직-특이적 프로모터는 인간 유비퀴틴 프로모터 및 인간 시냅신 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

#### 청구항 9

제5항에 있어서, 조성물은  $0.1$  내지  $2.0 \times 10^{13}$  gc/mL의 농도로 유전자 요법 구성체를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 10

연막하 투여에 의해 대상체에서 신경병증성 통증 및/또는 근육 경직을 치료하는데 사용하기 위한, GAD65를 코딩하는 제1 벡터 및 VGAT를 코딩하는 제2 벡터를 포함하는 조성물.

#### 청구항 11

제1항 또는 제5항에 있어서, 대상체는 포유동물인 조성물.

#### 청구항 12

제10항에 있어서, 대상체는 포유동물인 조성물.

#### 청구항 13

제10항에 있어서, 제1 및 제2 벡터 각각은 독립적으로 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 (AV), 또는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터로 이루어진 군으로부터 선택되고; AAV는 AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh33, AAVrh34, 및 AAV Anc80으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

#### 청구항 14

제10항에 있어서, 제1 벡터는 SEQ ID NO: 2의 유전자를 포함하고 제2 벡터는 SEQ ID NO: 4의 유전자를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 15

조직-특이적 또는 조직-비특이적 프로모터 제어 하의, 바이러스 벡터, GAD65 유전자 및 VGAT 유전자를 포함하는 핵산 구성체로서, 조직-특이적 프로모터는 인간 유비퀴틴 프로모터 및 인간 시냅신 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 핵산 구성체.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터를 포함하고; AAV는 AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh33, AAVrh34, 및 AAV Anc80으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 핵산 구성체.

#### 청구항 17

삭제

#### 청구항 18

삭제

#### 청구항 19

삭제

#### 청구항 20

삭제

#### 청구항 21

삭제

#### 청구항 22

삭제



청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 관련 출원(들)에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2017년 9월 8일 출원된 미국 출원 번호 제62/556,088호의 우선권 이득을 주장하며, 이의 전문을 참조로 본 명세서에 편입시킨다.

[0003] 서열목록

[0004] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자 제출된 서열 목록을 함유하고 이의 전문을 참조로 본 명세서에 편입시킨다. 2018년 9월 6일 생성된 ASCII 사본은 명칭이 20378-201844\_SL.txt이며 크기는 22KB이다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 발명은 일반적으로 신경병증성 통증의 치료에 관한 것이고, 보다 특별히 만성 신경병증성 통증의 치료를 위한 하나 이상의 유전자의 척주 연막하 전달을 포함하는 병용 치료 용법에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0007] 신경병증성 통증은 다양한 유형의 신경 손상으로 초래되는 통증이다. 신경병증성 통증 병태의 일부 예는 제한없이 당뇨병성 말초 신경병증, 대상 포진, 대상 포진 후 신경통, 3차 신경통, 복합 부위 통증 증후군, 반사 교감신경 이영양증, 편두통, 환상지통, 만성 질환 (다발성 경화증, HIV 등)에 의한 신경병증성 통증, 외상 (작열통)에 의한 신경병증성 통증, 충돌에 의한 신경병증성 통증 (즉, 좌골신경통, 손목 터널 등), 약물 노출 또는 독성 화학물 노출로 인한 신경병증성 통증, 감염 또는 감염 후로 인한 신경병증성 통증, 손상된 장기 기능으로 인한 신경병증성 통증, 혈관 질환으로 인한 신경병증성 통증, 대사 질환으로 인한 신경병증성 통증, 암 또는 암 치료로 인한 신경병증성 통증, 자가면역 질환으로 인한 신경병증성 통증, 신경병증성 요통, 섬유근육통으로 인한 신경병증성 통증, 및 원인 미상 (특발성) 신경병증성 통증을 포함한다. 사실, 신경병증성 통증은 가장 빈번하게는 증상을 기반으로 진단되므로, 전형적으로 작열감 및/또는 전격통 및/또는 무감각 및/또는 저림 및/또는 이질통으로 특징되는 임의 통증은 신경병증성으로 간주된다. 신경병증성 통증의 다른 특징은 통각과민 (자극에 대한 상당히 과도한 통증 감각), 지각과민 (정상 자극에 대해 증가된 민감도), 이상감각 (손상이 일어나지 않은 경우에 마치 일어난듯 불쾌한 비정상적 감각), 및 손발저림 (자발적이건 또는 유발된 것이건, "저린 느낌"과 같은 비정상적 감각)을 포함한다.

[0008] 통각수용성 통증 및 신경병증성 통증은 상이한 기전에 의해 야기되므로, 상이한 치료 방식에 반응한다는 것은 충분히 알려져 있다. 통각수용성 통증은 피부, 뼈, 결합 조직, 근육 및 내장에 위치하는 수용체에 의해 매

개된다. 전형적으로, 이들 수용체는 전형적으로 날카롭거나, 찌시거나, 욕신거리거나, 또는 쪼는 느낌으로서 설명되는 통증을 일으키는 유해한 화학적, 열적 및 기계적 자극에 반응한다. 대조적으로, 신경병증성 통증은 본질적으로 "화끈거림", "찌릿함", "따끔거림", 및 "쿵쿵췌췌"으로 설명되는 통증이 일어나는, 말초 또는 중추 신경계에 대한 손상, 또는 그에서의 병리학적 변화로 인해 일어난다. 마지막으로, 통각수용성 통증은 일반적으로 오피오이드 및 비스테로이드 항염증제 (NSAIDS)에 반응하지만, 이들 접근법에 의한 신경병증성 통증의 성공적 치료는 제한적이었다.

[0009] 현재는, 척추강내-주입 항-통각수용성 화합물 (예컨대 가바펜틴 및 오피오이드)을 사용하여 척추-제한적 항-통각수용성 효과를 달성한다. 그러나, 만성 신경병증성 통증을 치료하기 위해 이용가능한 유전자-요법-기반 기법은 없다. 유사하게, 말초 신경 손상 부위와 동측으로, 특별한 척추 분절에서 통각수용 전달을 억제하는데 효과적으로 사용될 수 있는 유전자 요법-기반 기법은 현재 이용가능한 것이 없다. 또한, 현재 이용가능한 척추 약물 전달 시스템 (예컨대 경막외 또는 척추강내 전달)은 척추 분절-제한적 치료 효과를 허용하지 않는다. 따라서, 신경병증성 통증을 위한 이러한 개선된 치료에 대한 필요성이 존재한다.

### 발명의 내용

[0010] 본 발명은 GAD65 (글루타메이트 디카르복실라제) 및 VGAT (소포 GABA 수송체)의 척추 분절-특이적 상향조절로 구성된 병용 치료가 감염된 배각 뉴런으로부터 시냅스 간극으로 소포 GABA의 방출을 강력화시킴으로써 통각수용 효과의 유도에 효과적이라는 관찰을 기반으로 한다.

[0011] 따라서, 본 발명은 대상체에서 신경병증성 통증을 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 (i) 조직-특이적 프로모터 제어 하의, 바이러스 벡터 서열, GAD65 유전자 서열 (예를 들어, SEQ ID NO: 2 또는 5) 및 VGAT 유전자 서열 (예를 들어, SEQ ID NO: 4 또는 6); 및 (ii) 약학적으로 허용가능한 바이러스 담체를 포함하는 조성물의 연막하 투여에 의해 대상체에서 신경병증성 통증을 치료하는 단계를 포함한다. 다양한 실시형태에서, 대상체는 포유동물일 수 있다. 다양한 실시형태에서, 핵산 구성체는 9형 AAV 혈청형 캡시드로 캡슐화된다.

다양한 실시형태에서, 조성물 중 핵산 구성체의 농도는 약 0.1 내지  $2.0 \times 10^{13}$  gc/mL이다. 다양한 실시형태에서, 약학적으로 허용가능한 바이러스 담체는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 (AV), 또는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다양한 실시형태에서, AAV는 AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh33, AAVrh34 및 AAV Anc80으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다양한 실시형태에서, 조직-특이적 프로모터는 인간 유비퀴틴 프로모터 및 인간 시냅신 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0012] 다른 양상에서, 본 발명은 대상체에서 신경병증성 통증을 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 조직-특이적 프로모터 제어 하의, (i) 바이러스 벡터 서열; (ii) GAD65 유전자 서열; 및 (iii) VGAT 유전자 서열을 포함하는 유전자 요법 구성체의 치료적 유효량, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 연막하 투여하는 단계, 그리하여 대상체에서 신경병증성 통증을 치료하는 단계를 포함한다. 다양한 실시형태에서, 핵산 구성체는 9형 AAV 혈청형 캡시드로 캡슐화된다. 다양한 실시형태에서, 조성물 중 핵산 구성체의 농도는 약 0.1 내지  $2.0 \times 10^{13}$  gc/mL이다. 다양한 실시형태에서, 약학적으로 허용가능한 바이러스 담체는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 (AV) 또는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된다.

다양한 실시형태에서, AAV는 AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh33, AAVrh34 및 AAV Anc80으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다양한 실시형태에서, 조직-특이적 프로모터는 인간 유비퀴틴 프로모터 및 인간 시냅신 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0013] 다른 양상에서, 본 발명은 대상체에서 신경병증성 통증을 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 GAD65 (글루타메이트 디카르복실라제) 유전자를 코딩하는 제1 벡터 및 VGAT (소포 GABA 수송체) 유전자를 코딩하는 제2 벡터의 연막하 투여 단계, 및 그리하여 대상체에서 신경병증성 통증을 치료하는 단계를 포함한다. 제1 및 제2 벡터의 투여 단계는 그 결과로 대상체에서 GAD65 유전자 및 VGAT 유전자의 척추-특이적 상향조절을 일으킨다. 다양한 실시형태에서, 제1 바이러스 벡터는 GAD65를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고 제2 바이러스 벡터는 VGAT를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하며, GAD65 및 VGAT는 대상체에서 발현되어, 대상체에서 신경병증성 통증을 치료한다. 제1 및 제2 벡터는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터일 수 있다. AAV는 9형 AAV (AAV9) 또는 AAV Anc80일 수 있다. 다양한 실시형태에서, 제1 벡터는 AAV9-UBI-GAD65이고 제2 벡터는 AAV9-UBI-VGAT이다.

[0014] 다른 양상에서, 본 발명은 대상체에서 신경병증성 통증을 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 치료를 필

으로 하는 대상체에게 GAD65를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터의 치료 유효량을 연막하로 투여하는 단계 및 대상체에게 GABA 효현제를 전신으로 투여하는 단계, 그리하여 대상체에서 경직을 치료하는 단계를 포함한다. 벡터는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 또는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터일 수 있고, 대상체의 척추에 직접적으로 투여될 수 있다. AAV는 9형 AAV (AAV9) 또는 AAV Anc80일 수 있다. 다양한 실시형태에서, 벡터는 AAV9-UBI-GAD65이다.

[0015] 다른 양상에서, 본 발명은 조직-특이적 프로모터의 제어 하에, 바이러스 벡터 서열, GAD65 유전자 서열 및 VGAT 유전자 서열을 포함하는 핵산 구성체를 제공한다. 다양한 실시형태에서, 조직-특이적 프로모터는 인간 유비퀴틴 프로모터 및 인간 시냅신 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다양한 실시형태에서, 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터, 예컨대, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh33, AAVrh34 또는 AAV Anc80이다.

### 도면의 간단한 설명

[0016] 도 1A-1C는 편측 척추 연막하 벡터 전달을 도시하는 그림 도표이다. 도 1A는 동물 모델에서 카테터가 연막하에 배치된 척수의 그림 도표를 도시한다. 도 1B는 벡터 조성물의 전달을 위한 연막하 공간으로의 주사 바늘의 편측 연막하 전진술 (3 mm)을 도시한다. 도 1C는 성체 마우스에서 AAV9-UBI-GFP ( $0.5 \mu\text{L}$ ;  $1.2 \times 10^{13}$  gc/mL)의 편측 연막하 전달 후 2주에 편측 배각 mRNA-GFP 신호 (형광 동소 혼성화법 (fluorescence in situ hybridization); FISH)를 도시한다.

도 2A-2F는 신경병증성 통증이 발생된 마우스에서 AAV9-UBI-GAD65/VGAT 또는 Anc80-UBI-GAD65/VGAT의 연막하 전달 후 항-통각수용 결과를 도시한 그림 및 그래프 도표이다. 도 2A 및 2B는 AAV9-UBI-GAD65/VGAT 벡터의 편측 연막하 주사를 받은 동물의 뒷발에서 측각 및 브러쉬-유발된 통각수용 반응의 유의한 억제에 도시한다. 도 2C 및 2D는 AAV9-UBI-GAD65/VGAT 벡터의 편측 연막하 주사를 받은 신경병증 동물에서 개방 시야 운동 수행능 (달린 거리) 및 동측 뒷발 배치 패턴 (캣워크 어세이)의 유의한 개선을 도시한다. 도 2E 및 2F는 Anc80-UBI-GAD65/VGAT 벡터로 처리된 신경병증 동물에서 비슷한 항-통각수용 효과를 확인하였음을 도시한다.

도 3A-3E는 성체 마우스에서 편측 (동측) (L2-L4) 연막하 AAV9-UBI-GAD65/VGAT 전달 이후 동측 배각 흥분성 개재뉴런에서 혼합 억제성-흥분성 신경전달물질 표현형의 유도를 도시하는 그림 및 그래프 도표이다. 도 3A-3D는 VGLUT2 (도 3A), GAD65 (도 3B), VGAT (도 3C)에 의한 동측 배각 뉴런의 염색 및 VGLUT2, GAD65 및 VGAT-염색된 반점 국재화 (도 3D)의 이미지를 도시한다. VGLUT2와 VGAT 및 VGLUT2와 GAD65의 명확한 공발현 (흰색 화살표)이 검출되었다. 도 3E는 처치군 (손상+GAD65+VGAT) 및 대조군 (손상+PBS) 동물의 배각 (추간판 I-III)에서 VGLUT, GAD65 및 VGAT의 발현의 정량적 밀도측정계 결과를 도시한다. 마우스는 AAV9-UBI-GAD65/VGAT 벡터 또는 PBS 단독이 동측 (L2-L4)으로 주사되었다. 대측 배각에서 어떠한 증가된 발현이 확인/측정되지 않았다.

도 4A-4D는 PBS-주사된 동물 (PNI-PBS)과 비교하여 AAV9-UBI-GAD65/VGAT-주사된 동물 (PNI+GAD65+VGAT)의 VGLUT2+ 말단부에서 GAD65 및 VGAT 면역금-태그화된 입자의 분명한 증가를 보여주는 전자 현미경과 결합된 VGLUT2 및 GAD65 및 VGAT 항체에 의한 사전-내포 면역금 염색의 결과를 도시하는 그림 도표이다.

도 4E-4J는 AAV9-UBI-GAD65/VGAT-주사된 동물의 동측 배각 뉴런에서 VGLUT2, GAD65 및 VGAT mRNA로 이중 및 삼중-태그화된 뉴런 (흰색 화살표)의 분명한 출현을 보여주는 형광 동소 혼성화법에 의한 결과를 도시하는 그림 도표이다.

도 5A-5D는 성체 돼지 모델에서 편측 Anc80-UBI-Rp122 (3xHA) 전달을 보여주는 그림 도표이다. 도시된 바와 같이, 동측 배각 뉴런-특이적 Rp122 단백질 발현은 성체 돼지 모델 (DH-배각; VH-전각)에서 편측 연막하 (L2-L3) Anc80-UBI-Rp122-3xHA 벡터 전달 ( $100 \mu\text{L}$ ;  $1.2 \times 10^{13}$  gc/mL) 이후에 관찰되었다.

도 6A-6D는 성체 돼지에서 편측 Anc80-UBI-GAD65/VGAT 전달이 배각 뉴런에서 혼합 흥분성-억제성 뉴런 표현형을 유도시킨다는 것을 보여주는 그림 도표이다. Anc80-UBI-GAD65/VGAT 벡터 ( $100 \mu\text{L}$ ;  $1.2 \times 10^{13}$  gc/mL)가 동측으로 주사된 동물 모델 (성체 돼지; 35 kg)에서 VGLUT2 (도 6A), VGAT (도 6B), 및 GAD65 (도 6C) 항체로 동측 배각 뉴런의 염색. 도시된 바와 같이, VGAT 및 GAD65과 VGLUT2의 분명한 공발현 (흰색 반점)을 검출할 수 있다 (도 6D).

도 7은 만성 척추 손상-유도 근육 경직이 존재하는 래트 모델에서 GAD65 및 VGAT 유전자의 척추 연막하 전달의

치료적 항-경직 효과를 연구하기 위한 실험 설계의 예시적인 단계를 보여주는 그림 도표이다. 단계 A 및 B는 뒷다리의 근육 경직이 Th9 척추 분절 횡절단에 의해 유도되어 발바닥 촉각 자극에 대한 비복근 근육 EMG 반응의 정량적 변화를 통해 식별/확인한다는 것을 보여준다. 단계 C 및 D는 근육 경직의 유도 후 2-3개월에, 동물은 AAV9 (또는 Anc80)-UBI-GAD65/VGAT 벡터의 요추 연막하 주사를 받았고 경직 반응의 존재는 추가 2개월 동안 측정하였다는 것을 보여준다. 단계 E는 희생 후에 GAD65 및 VGAT 상향조절의 존재를 면역형광 염색으로 측정하였다는 것을 보여준다.

도 8A-8D는 척추 횡절단-유도된 근육 경직의 만성 래트 모델에서 AAV9-UBI-GAD65/VGAT의 연막하 전달 이후 항-경직 효과를 보여주는 그림 및 그래프 도표이다. 도 8A 및 8B는 (척추 횡절단 후 2-3개월에 측정된 기준점과 비교하여) 바이러스 전달 후 8주 동안 근육 경직의 점진적인 증가를 보여주는, 대조군 벡터 (AAV9-GFP)를 받은 동물에서 근육 경직의 측정 결과를 보여준다. 대조적으로, AAV9-UBI-GAD65/VGAT 벡터를 받은 동물에서 경직 반응의 거의 완전한 차단이 측정되었다. 도 8C 및 8D는 AAV9-UBI-GAD65/VGAT 벡터로 처리된 동물에서 RDD의 유의한 회복을 보여주는, H-반사의 속도-의존적 억압 (rate-dependent depression)(RDD)의 측정 결과를 보여준다.

도 9A-9D는 AAV9-UBI-GFP (대조군 벡터) 또는 AAV9-UBI-GAD65/VGAT 벡터가 주사된 동물 (래트)의 배각 뉴런에서 VGLUT2, GAD65 및 VGAT의 발현을 보여주는 그림 도표이다. 도 9A 및 9B는 대조군 AAV9-UBI-GFP 벡터를 받은 동물의 VGLUT2 말단부에서 GAD65 및 VGAT의 공발현이 없음을 보여준다. 도 9C 및 9D는 만성 근육 경직의 성체 래트 모델에서 양측 (L2-L4) 연막하 AAV9-UBI-GAD65/VGAT 전달 이후 요추 흥분성 개재뉴런에서 혼합 억제성-흥분성 신경전달물질 표현형의 유도를 보여준다. VGLUT2 말단부에서 GAD65 및 VGAT의 공발현으로 증명된 바와 같은 척추 개재뉴런에서 혼합 신경전달물질 표현형의 출현을 확인할 수 있다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명은 GAD65 (글루타메이트디카르복실라제) 유전자 및 VGAT (소포 GABA 수송체) 유전자의 척추 분절-특이적 상향조절로 구성된 조합 치료의 소량의 연막하 투여가 감염된 배각 뉴런으로부터 시냅스 간극으로 소포 GABA의 방출을 강력화시킴으로써 통각수용 효과의 유도에 효과적이라는 관찰을 기반으로 한다.
- [0018] 본 발명의 조성물 및 방법을 설명하기에 앞서, 본 발명이 기술된 특정한 조성물, 방법 및 실험 조건에 제한적이지 않음에, 이러한 조성물, 방법 및 조건이 다양할 수 있기 때문이라는 것을 이해해야 한다. 또한, 본 발명의 범주는 오직 첨부된 청구항으로만 제한될 것이므로, 본 명세서에서 사용되는 전문용어는 오직 특정한 실시형태를 설명하려는 목적이고, 본 발명을 제한하려는 의도가 아님을 이해해야 한다.
- [0019] 본 명세서 및 첨부된 청구항에서 사용되는 단일형, "한", "하나" 및 "그"는 달리 명확하게 명시하지 않으면 다수 참조를 포함한다. 따라서, 예를 들어, "그 방법"에 대한 언급은 본 개시 내용 등을 읽었을 때 당업자에게 자명해질 것인 본 명세서에 기술된 유형의 하나 이상의 방법들, 및/또는 단계들을 포함한다.
- [0020] "포괄하는", "함유하는", 또는 "~로 특징지어지는"과 상호교환적으로 사용되는 용어 "포함하는"은 포함적이거나 또는 확장가능한 언어이고 추가적이거나, 미열거된 구성요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다. 어구 "~로 이루어지는"은 청구항에 명시되지 않은 임의의 구성요소, 단계 또는 성분을 배제하지 않는다. 어구 "본질적으로 이루어지는"은 명시된 재료 또는 단계 및 청구된 발명의 기본적인 특징에 물질적으로 영향을 미치지 않는 것들로 청구항의 범주를 제한한다. 본 개시 내용은 각각의 이들 어구의 범주에 상응하는 본 발명의 조성물 및 방법의 실시형태를 고려한다. 따라서, 언급된 구성요소 또는 단계들을 포함하는 조성물 또는 방법은 그 조성물 또는 방법이 그들 구성요소 또는 단계들로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어진 특정한 실시형태를 고려한다.
- [0021] 본 명세서에 제공되는 범위는 그 범위 내 모든 값에 대한 약칭으로 이해한다. 예를 들어, 1 내지 50의 범위는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 및 50으로 이루어진 군으로부터의 임의의 수치, 수치들의 조합, 또는 부분 범위를 포함하는 것으로 이해한다.
- [0022] 용어 "약" 및 "대략"은 일반적으로 측정법의 정확도 또는 성질을 고려하여 측정된 분량에 대해 허용가능한 정도의 오차를 의미하는 것이다. 전형적으로, 예시적인 오차 정도는 소정 값 또는 값의 범위의 20% 이내, 바람직하게는 10% 이내, 보다 바람직하게는 5% 이내이다. 대안적으로, 그리고 특히 생물학적 체계에서, 용어 "약" 및 "대략"은 소정 값의 한 자릿수 이내, 바람직하게는 10배 또는 5배 이내, 보다 바람직하게는 2배 이내인 값을 의미할 수 있다. 본 명세서에서 제공되는 수치 분량은 달리 명시하지 않으면 근사치이고, 명확하게 명



시되지 않은 경우에 용어 "약" 또는 "대약"이 추론될 수 있다는 것을 의미한다.

- [0023] 달리 정의하지 않으면, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 공통으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기술된 것과 유사하거나 또는 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료를 이제 설명한다.
- [0024] 본 명세서에서 사용되는 용어 "대상체"는 대상 방법이 수행되는 임의의 개체 또는 환자를 의미한다. 일반적으로, 대상체는 인간이지만, 당분야에서 이해하게 되는 바와 같이, 대상체는 동물일 수도 있다. 따라서 포유동물, 예컨대 설치류 (마우스, 래트, 햄스터 및 기니피그 포함), 고양이, 개, 토끼, 소, 말, 양, 돼지 등을 포함한 가축, 및 영장류 (원숭이, 침팬지, 오랑우탄 및 고릴라 포함)를 포함하는 다른 동물들도 대상체의 정의 내에 포함된다.
- [0025] 본 명세서에서 사용되는 "치료적 효과"는 본 명세서에 기술된 바와 같은 치료적 이득 및/또는 예방적 이득을 포괄한다.
- [0026] 본 명세서에서 사용되는 용어 "감소하다" 및 "억제하다"는 일부 경우에서, 하락이 특정 어세이의 검출 수준 이하로 감소될 수 있다는 것이 인지되므로 함께 사용된다. 이와 같이, 발현도 또는 활성이 어세이의 검출 수준 이하로 "감소"되거나, 또는 완전히 "억제"되는지 여부가 항상 명확하지 않을 수 있다. 그럼에도, 본 발명의 방법에 따른 치료 이후에 분명하게 결정가능할 것이다.
- [0027] 본 명세서에서 사용되는 "치료" 또는 "치료하는"은 바람직하지 않은 병태가 존재하는 시스템 또는 대상체에게 조성물을 투여하는 것을 의미한다. 병태는 질환 또는 장애를 포함할 수 있다. "예방" 또는 "예방하는"은 병태의 위험성이 있는 시스템 또는 대상체에게 조성물을 투여하는 것을 의미한다. 병태는 질환 또는 장애에 대한 소인을 포함할 수 있다. 대상체에 대한 조성물 투여의 (치료 및/또는 예방) 효과는 제한없이, 병태의 하나 이상의 증상의 중지, 병태의 하나 이상의 증상의 감소 또는 예방, 병태의 중증도 감소, 병태의 완전한 제거, 특정한 사건 또는 특징의 발생 또는 진행의 안정화 또는 지연, 또는 특정 사건 또는 특징이 발생할 기회의 최소화일 수 있다.
- [0028] 용어 "폴리펩티드," "펩티드," 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 의미하고자 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 이 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 천연 발생 아미노산의 인공 화학적 모방체인 아미노산 중합체를 비롯하여, 천연 발생 아미노산 중합체 및 비천연 발생 아미노산 중합체에 적용된다.
- [0029] 용어 "아미노산"은 천연 발생 및 합성 아미노산을 비롯하여, 천연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 의미한다. 천연 발생 아미노산은 유전자 코드에 의해 코딩된 것을 비롯하여, 이후에 변형되는 아미노산, 예를 들어, 히드록시프롤린,  $\alpha$ -카복시글루타메이트, 및 O-포스포세린이다. 아미노산 유사체는 천연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학적 구조, 즉, 수소, 카르복실 기, 아미노 기, 및 R 기에 결합된  $\alpha$  탄소를 갖는 화합물, 예를 들어, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 술폰사이드, 메티오닌 메틸 술폰을 의미한다. 이러한 유사체는 변형된 R 기 (예를 들어, 노르류신) 또는 변형된 펩티드 골격을 갖지만, 천연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학적 구조는 유지한다. 아미노산 모방체는 일반적인 아미노산의 화학적 구조와 상이한 구조를 갖지만, 천연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 화학적 화합물을 의미한다.
- [0030] 아미노산은 IUPAC-IUB 생화학 명명법 위원회가 추천하는 3글자 기호 또는 1글자 기호로 본 명세서에서 언급될 수 있다. 유사하게, 뉴클레오티드는 그들의 통상적으로 용인되는 1글자 코드로 언급될 수 있다.
- [0031] 본 명세서에서 사용되는 "조절 유전자" 또는 "조절 서열"은 다른 유전자의 발현을 제어하는 생체물 (예를 들어, 전사 인자)을 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0032] 본 명세서에서 사용되는 특정한 단백질 또는 폴리펩티드를 코딩하는 서열 또는 "단백질 코딩 서열"은 적절한 조절 서열의 제어 하에 배치될 때 시험관 내 또는 생체 내에서 (DNA 경우) mRNA로 전사되어 (mRNA 경우) 폴리펩티드로 번역되는 핵산 서열이다. 코딩 서열의 경계는 5' 말단 (N-말단)의 출발 코돈 및 3' 말단 (C-말단)의 번역 중지 넌센스 코돈에 의해 결정된다. 코딩 서열은 제한없이, 진핵생물 mRNA 유래 cDNA, 진핵생물 DNA 유래 게놈 DNA 서열, 및 합성 핵산을 포함할 수 있다. 전사 종결 서열은 일반적으로 코딩 서열의 3'에 위치될 것이다.
- [0033] 본 명세서에서 사용되는 "프로모터"는 일반적으로 RNA 중합효소가 DNA에 결합하게 유도하여 RNA 합성을 개시시킴으로써 전사의 개시를 매개하는 유전자의 상류에 위치되는 조절성 DNA 서열로서 정의된다. 프로모터는 항

상적으로 활성인 프로모터 (즉, 항상적으로 활성/"온" 상태인 프로모터)일 수 있거나, 유도성 프로모터 (즉, 활성/"온" 또는 불활성/"오프"의 그들 상태가 외부 자극, 예를 들어 특정한 화합물 또는 단백질의 존재에 의해 제어되는 프로모터)일 수 있고, 공간적으로 제한된 프로모터 (즉, 전사 제어 엘리먼트, 인핸서 등) (예를 들어, 조직 특이적 프로모터, 세포 유형 특이적 프로모터 등)일 수 있고, 시간적으로 제한된 프로모터 (즉, 프로모터가 배아 발생의 특별한 단계 동안 또는 생물학적 과정의 특별한 단계 동안 "온" 상태 또는 "오프" 상태임)일 수 있다.

[0034] 본 명세서에서 사용되는 용어 "유전자"는 구조적 유전자의 코딩 영역을 포함하는 데옥시리보뉴클레오타이드 서열을 의미한다. "유전자"는 또한 유전자가 전체 길이 mRNA의 길이에 상응하도록 5' 및 3' 말단 둘 모두 상에서 코딩 영역에 인접하여 위치한 비번역 서열을 포함할 수도 있다. 코딩 영역의 5'에 위치하고 mRNA 상에 존재하는 서열은 5' 비번역 서열을 의미한다. 코딩 영역의 3' 또는 하류에 위치하고 mRNA 상에 존재하는 서열은 3' 비번역 서열을 의미한다. 용어 "유전자"는 유전자의 게놈 형태 및 cDNA 둘 모두를 포괄한다. 유전자의 클론 또는 게놈 형태는 "인트론" 또는 "개재 영역" 또는 "개재 서열"이라고 하는 넌코딩 서열이 개재된 코딩 영역을 함유한다. 인트론은 이중성 핵 RNA (hnRNA)로 전사되는 유전자의 절편이고, 인트론은 조절 엘리먼트 예컨대 인핸서를 함유할 수 있다. 인핸서는 핵 또는 1차 전사물로부터 제거되거나 또는 "스플라이싱 아웃"되므로, 인트론은 메신저 RNA (mRNA) 전사물에 부재한다. mRNA는 번역 동안 초기 폴리펩티드에서 아미노산의 서열 또는 순서를 지정하도록 기능한다.

[0035] 본 명세서에서 사용되는 용어 "기능적으로 연결된" 및 "작동적으로 연결된"은 상호교환적으로 사용되고 발현시키려는 둘 이상의 DNA 절편, 특히 유전자 서열 및 그들 발현을 제어하는 서열 간 기능적 상관성을 의미한다. 예를 들어, 시스-작용성 전사 제어 엘리먼트의 임의 조합을 포함하는, 프로모터/인핸서 서열은 적절한 숙주 세포 또는 다른 발현 시스템에서 코딩 서열의 전사를 자극시키거나 또는 조절시키면 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 전사된 유전자 서열에 작동적으로 연결된 프로모터 조절 서열은 전사된 서열에 물리적으로 인접한다.

[0036] "보존적으로 변형된 변이체"는 아미노산 및 핵산 서열 둘 모두에 적용된다. 특정한 핵산 서열과 관련하여, 보존적으로 변형된 변이체는 동일하거나 또는 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산, 또는 핵산이 아미노산 서열을 코딩하지 않는 경우에, 본질적으로 동일한 서열을 의미한다. 유전자 코드의 축퇴성때문에, 대량의 기능적으로 동일한 핵산은 임의의 소정 단백질을 코딩한다. 예를 들어, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 코딩한다. 따라서, 알라닌이 코돈에 의해 지정되는 모든 위치에서, 그 코돈은 코딩되는 폴리펩티드를 변경시키지 않고 기술된 임의의 상응하는 코돈으로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이는 보존적으로 변형된 변이의 한 종인 "침묵 변이"이다. 폴리펩티드를 코딩하는 본 명세서의 모든 핵산 서열은 또한 핵산의 모든 가능한 침묵 변이를 기술한다. 당업자는 핵산의 각 코돈 (보통 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG, 및 보통 트립토판의 유일한 코돈인 TGG 제외)은 기능적으로 동일한 분자를 생산하도록 변형될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 따라서, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 각 침묵 변이는 각각의 기술된 서열에 내포된다.

[0037] 아미노산 서열과 관련하여, 당업자는 코딩된 서열 중 단일 아미노산 또는 적은 비율의 아미노산을 변경, 첨가 또는 결실시키는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질 서열에 대한 개별 치환, 결실 또는 첨가는 그 변경이 화학적으로 유사한 아미노산으로 아미노산의 치환을 일으키는 "보존적으로 변형된 변이체"라는 것을 인식하게 될 것이다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존성 치환은 당분야에 충분히 공지되어 있다. 이러한 보존적으로 변형된 변이체는 또한 본 발명의 다형성 변이체, 중간 상동체 및 대립유전자를 배제하지 않는다.

[0038] 하기 8개 그룹 각각은 서로에 대한 보존성 치환인 아미노산을 함유한다:

[0039] 1) 알라닌 (A), 글리신 (G);

[0040] 2) 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E);

[0041] 3) 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q);

[0042] 4) 아르기닌 (R), 리신 (K);

[0043] 5) 이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V);

[0044] 6) 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W);

[0045] 7) 세린 (S), 트레오닌 (T); 및

[0046] 8) 시스테인 (C), 메티오닌 (M) (예를 들어, [Creighton, Prteins (1984)] 참조).

[0047] 보존성 치환은 예컨대 염기에서 염기, 산성에서 산성, 극성에서 극성으로의 치환 등을 포함할 수 있다. 이렇게 유래된 아미노산의 세트는 아마도 구조적 이유로 보존되는 듯 하다. 이들 세트는 벤 다이어그램의 형태로 기술될 수 있다 (Livingstone C. D. and Barton G. J. (1993) "Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation" Comput. Appl Biosci. 9: 745-756; Taylor W. R. (1986) "The classification of amino acid conservation" J. Theor. Biol. 119: 205-218). 보존성 치환은 예를 들어, 일반적으로 허용되는 아미노산의 벤 다이어그램을 기술하는 하기 표에 따라서 만들어질 수 있다.

[0048] 표 1: 아미노산의 분류

특징	세트	특징	서브세트
소수성	FWYHKMILVAGC	방향족 지방족	FWYHILV
극성	WYHKREDCSTNQ	양으로 하전	HKREDHKKR
		음으로 하전	ED
소형	VCAGSPTND	초소형	AGS

[0049]

[0050] "서열 동일성 백분율"은 비교창 상에서 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하여 결정되고, 여기서 비교창 내 폴리뉴클레오티드 서열의 일부분은 2개 서열의 최적 정렬을 위해, 첨가 또는 결실을 포함하지 않는 기준 서열 (예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드)과 비교하여 첨가 또는 결실 (즉, 갭)을 포함할 수 있다. 이러한 백분율은 동일한 핵산 염기 또는 아미노산이 일치하는 위치의 개수를 비교창의 모든 위치 개수로 나누어서 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성 백분율을 산출하여 계산된다.

[0051]

둘 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열에서 용어 "동일한" 또는 "동일성" 백분율은 동일한 서열인 둘 이상의 서열 또는 하위서열을 의미한다. 2개 서열은 하기 서열 비교 알고리즘 중 하나를 사용하거나 또는 수동 정렬 및 육안 검사를 통해서 측정시 지정된 영역, 또는 비교창 상의 최대 상응도를 위해 비교 및 정렬시켰을 때, 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 명시된 백분율 (즉, 전체 서열 상에서 특정하지 않은 경우, 또는 특정한 영역 상에서 60% 동일성, 임의로는 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 동일성)을 가지면 2개 서열은 "실질적으로 동일"하다. 본 발명은 본 명세서에서 예시된, 각각 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 폴리펩티드를 비롯하여, 제한없이 신경학적 질환 또는 장애, 예를 들어 신경퇴행성 질환 또는 장애의 치료 또는 예방, 및/또는 SCI의 치료를 위한 용도를 포함한 이의 용도를 제공한다. 임의로는, 동일성은 적어도 약 50개 뉴클레오티드 길이인 영역, 또는 보다 바람직하게는 100 내지 500개 또는 1000개 이상의 뉴클레오티드 길이인 영역, 또는 기준 서열의 전체 영역 상에 존재한다.

[0052]

서열 비교를 위해서, 전형적으로 하나의 서열은 시험 서열이 비교되는 기준 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용할 때, 시험 및 기준 서열을 컴퓨터에 입력하고, 부분서열 좌표를 필요하다면 지정하고, 서열 알고리즘 프로그램 매개변수를 지정한다. 디폴트 프로그램 매개변수가 사용될 수 있거나, 또는 대안적인 매개변수가 지정될 수 있다. 그 다음으로 서열 비교 알고리즘은 프로그램 매개변수를 기반으로, 기준 서열에 대한 시험 서열의 서열 동일성 백분율을 계산한다.

[0053]

본 명세서에서 사용되는 "비교창"은 2개 서열을 최적으로 정렬시킨 이후에 동일한 개수의 인접한 위치의 기준 서열과 서열을 비교할 수 있는, 20개 내지 600개, 일반적으로 약 50개 내지 약 200개, 보다 일반적으로 약 100개 내지 약 150개로 이통러진 군으로부터 선택되는 인접한 위치의 개수의 어느 하나의 절편에 대한 기준을 포함한다. 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 당분야에서 충분히 공지되어 있다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은 예를 들어, [Smith and Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c]의 국소 상동성 알고리즘을 통해서, [Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443]의 상동성 정렬 알고리즘을 통해서, [Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444]의 유사성 방법에 대한 검색을 통해서, 이들 알고리즘의 컴퓨터 실행 (Wisconsin Genetics Software Package의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.)에 의해서, 또는 수동 정렬 및 육안 검사(예를 들어, [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995 supplement)] 참조)를 통해 수행될 수 있다.

[0054]

서열 동일성 및 서열 유사성 백분율을 결정하는데 적합한 알고리즘의 2가지 예는 [Altschul et al. (1977) Nuc.

Acids Res. 25:3389-3402], 및 [Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410]에 각각 기술된 BLAST 및 BLAST 2.0이다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 미국 국립 생물공학 정보 센터를 통해 공공으로 입수가 가능하다. 이러한 알고리즘은 데이터베이스 서열 중 동일 길이의 단어와 정렬했을 때 일부 양성값 역치 점수 T에 부응하거나 또는 이를 만족하는 문의 서열 중 짧은 단어 길이 W를 식별하여 고득점 서열 쌍 (HSP)을 먼저 식별하는 단계를 포함한다. T는 이웃 단어 점수 역치라고 한다 (Altschul et al., 상동). 이들 초기 이웃 단어 히트는 그들을 함유하는 보다 긴 HSP를 찾기 위한 초기 검색용 씨드로서 작용한다. 단어 히트는 누적 정렬 점수가 증가될 수 있는 한 각 서열을 따라서 양쪽 방향으로 연장된다. 누적 점수는 예를 들어, 뉴클레오타이드 서열의 경우, 매개변수 M (일치하는 잔기 쌍에 대한 보상 점수; 항상 >0) 및 N (불일치 잔기에 대한 패널티 점수; 항상 <0)을 사용하여 계산된다. 아미노산 서열의 경우, 채점 매트릭스를 사용하여 누적 점수를 계산한다. 각 방향으로 단어 히트의 연장은 누적 정렬 점수가 이의 최대 획득값으로부터 X 분량만큼 떨어진 경우, 또는 누적 점수가 하나 이상의 음성-채점 잔기 정렬의 축적으로 인해 누적 점수가 0 또는 그 이하가 되는 경우; 또는 양쪽 서열의 끝에 도달하는 경우에 중단된다. BLAST 알고리즘 매개변수 W, T, 및 X는 정렬의 감도 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램 (뉴클레오타이드 서열의 경우)은 디폴트로서 11의 단어길이 (W), 10의 기대치 (E), M=5, N=-4 및 양쪽 가닥의 비교를 사용한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 3의 단어길이, 및 10의 기대치 (E), 및 50의 BLOSUM62 채점 매트릭스 ([Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915] 참조) 정렬 (B), 10의 기대치 (E), M=5, N=-4, 및 양쪽 가닥의 비교를 사용한다.

[0055] BLAST 알고리즘은 또한 2개 서열 간 유사성의 통계적 분석을 수행한다 (예를 들어, [Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787] 참조). BLAST 알고리즘으로 제공되는 유사성의 한 척도는 2개 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 간 일치가 우연하게 일어날 확률의 징후를 제공하는, 최소 총합 확률 (P(N))이다. 예를 들어, 핵산은 기준 핵산과 시험 핵산의 비교에서 최소 총합 확률이 약 0.2 미만, 보다 바람직하게 약 0.01 미만, 가장 바람직하게 약 0.001 미만이면 기준 서열과 유사한 것으로 간주된다.

[0056] "핵산"은 단일 가닥 형태 또는 이중 가닥 형태인 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 및 이의 중합체, 및 이의 상보체를 의미한다. 이 용어는 기준 핵산 서열과 유사한 결합 성질을 갖고, 기준 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사하는, 합성, 천연 발생, 및 비천연 발생인, 기지 뉴클레오타이드 유사체 또는 변형된 골격 잔기 또는 연결부를 함유하는 핵산을 포괄한다. 이러한 유사체의 예는 제한없이 포스포로티오에이트, 포스포라미데이트, 메틸 포스포네이트, 키랄-메틸 포스포네이트, 2-O-메틸 리보뉴클레오타이드, 펩티드-핵산 (PNA)을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 핵산은 알칼리/SDS 처리, CsCl 밴딩, 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기영동 및 당분야에 충분히 공지된 다른 방법을 포함하는 표준 기술을 통해서 다른 세포 성분 또는 다른 오염물 (예를 들어, 세포에 존재하는 다른 핵산 또는 단백질)로부터 정제될 때 분리된다. 예를 들어, [F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York]를 참조한다. 다양한 실시형태에서, 핵산은 예를 들어, DNA 또는 RNA이고, 인트론 서열을 함유하거나 또는 함유하지 않을 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 핵산은 cDNA 분자이다.

[0057] 본 명세서에서 사용되는 "벡터"는 숙주 세포에 도입시 형질전환된 숙주 세포를 생산하는 핵산 분자이다. 벡터는 숙주 세포 내에서 복제를 허용하는 핵산 서열, 예컨대 복제 기원을 포함할 수 있다. 벡터는 또한 당업자에게 공지된 하나 이상의 선별 마커 유전자 및 다른 유전자 엘리먼트를 포함할 수 있다. 벡터는 바람직한 유전자를 투여하도록 유전자 전달을 수행하기에 적합한 특별한 벡터 구성체라고 하는, "유전자 전달 벡터", "유전자 요법 벡터", 또는 "유전자 요법 구성체", 또는 유사한 용어를 포함할 수 있다.

[0058] 그러므로 용어 "벡터", "클로닝 벡터" 및 "발현 벡터"는 DNA 또는 RNA 서열 (예를 들어, 외래 유전자)은 숙주를 형질전환시키고 도입된 서열의 발현 (예를 들어, 전사 및 번역)을 촉진하도록 숙주 세포에 도입될 수 있는 비히클을 의미한다. 벡터는 적절한 제어 엘리먼트와 회합시 복제할 수 있고 세포 간에 유전자 서열을 전달할 수 있는 임의의 유전자 엘리먼트, 예컨대 플라스미드, 파지, 트랜스포존, 코스미드, 염색체, 바이러스 등을 포함한다. 따라서, 이 용어는 클로닝 및 발현 비히클을 비롯한 바이러스 벡터를 포함한다.

[0059] 본 명세서에서 사용되는 "약학적으로 허용가능한 담체"는 임의의 표준 약학 담체, 예컨대 포스페이트 완충 염수 용액, 물 및 에멀션 예컨대 오일/물 또는 물/오일 에멀션, 및 다양한 유형의 습윤제를 포함한다. 약학적으로 허용가능한 담체로서 작용할 수 있는 재료의 일부 예는 당류, 예컨대 락토스, 포도당 및 수크로스; 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스, 및 이의 유도체, 예컨대 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 분말 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 탈크; 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌제용 왁스; 오일, 예컨대 땅콩유, 면실유, 홍화유, 참깨유, 올리브유, 옥수수유, 및 대두유; 글리콜, 예컨대 프로필렌



글리콜; 폴리올, 예컨대 글리세린, 솔비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; 에스테르, 예컨대 에틸 올레레이트 및 에틸 라우레이트; 한천; 완충제, 예컨대 마그네슘 히드록시드 및 알루미늄 히드록시드; 알긴산; 발열원 무함 유 물; 등장성 염수; 링거액; 에틸 알콜; 포스페이트 완충 용액; 및 약학 제제에 적용되는 무독성 상용성 물질을 포함한다. 적합한 약학 담체는 본 분야의 표준 참고서인 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company]에 기술되어 있다.

[0060] 본 명세서에서 사용되는 용어 "유전자 요법"은 유전자, 즉 GAD65 및/또는 VGAT 유전자의 외생성 투여를 통해서 내생성 유전자의 발현을 변화시키는 방법에 관한 것이다. 본 명세서에서 사용되는 유전자 요법은 또한 결합성 또는 결손 GAD65 및/또는 VGAT 유전자에 상응하는 유전자의 일부분 또는 기능성 유전자의 이를 필요로 하는 개체의 척추 연막하 공간으로의 도입에 의한, 결합성 GAD65 및/또는 VGAT 유전자의 치환, 또는 결손 GAD65 및/또는 VGAT 유전자의 치환을 의미한다. 본 개시 내용의 목적을 위해서, 유전자 요법은 치료적 결과를 획득하기 위해서 광범위한 바이러스 벡터 (예를 들어, AAV), 리포솜, 나노입자, 단백질:DNA 복합체, 변형된 핵산 또는 나형 DNA를 사용하는 "생체내" 방법을 통해서 수행될 수 있다.

[0061] 용어 "이식유전자"는 대상체의 세포로 도입되어서 적절한 조건 하에서 발현될 수 있고 그것이 도입된 세포에 바람직한 성질을 부여하거나, 또는 아니면 바람직한 치료적 결과를 야기시키는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.

[0062] 바이러스 역가에 대하여 사용된 용어 "게놈 입자 (gp)", "게놈 균등물" 또는 "게놈 복제수 (gc)"는 감염성 또는 기능성과 무관하게, 재조합 AAV DNA 게놈을 함유하는 비리온의 개수를 의미한다. 특정 벡터 조제물 중 게놈 입자의 개수는 본 명세서의 다른 곳, 또는 예를 들어 [Clark et al. (1999) Hum. Gene Ther., 10:1031-1039] 및 [Veldwijk et al. (2002) Mol. Ther., 6:272-278]에 기술된 바와 같은 절차를 통해서 측정할 수 있다.

[0063] 본 명세서에서 사용되는 용어 "뉴런"은 뉴런 및 이의 일부 또는 일부들 (예를 들어, 뉴런 세포체, 축삭돌기, 또는 수상돌기)을 포함한다. 따라서, 본 명세서에서 사용되는 용어 "뉴런"은 중추 세포체 또는 세포체, 및 2 가지 연장부 또는 돌출부: 일반적으로 대부분의 뉴런 신호를 세포체로 운반하는 수상돌기, 및 일반적으로 대부분의 뉴런 신호를 세포체로부터 이펙터 세포, 예컨대 표적 뉴런 또는 근육으로 운반하는 축삭돌기를 포함하는 신경계 세포를 의미한다. 뉴런은 조직 및 장기로부터 중추 신경계 (구심성 또는 감각 뉴런)로 정보를 운반할 수 있고 중추 신경계 유래 신호를 이펙터 세포 (원심성 또는 운동 뉴런)로 전달할 수 있다. 개체뉴런이라고 하는 다른 뉴런은 중추 신경계 (뇌 및 척추) 내 뉴런을 연결시킨다. 본 발명에 따른 치료 또는 방법에 수행될 수 있는 뉴런 유형의 특별한 일례는 소뇌 과립 뉴런, 후근 신경절 뉴런, 및 대뇌피질 뉴런을 포함한다.

[0064] 용어 "뉴런 퇴행"은 광범위하게 사용되며, 제한없이, 뉴런 세포의 사멸 또는 상실, 세포 사멸에 선행되는 임의의 변화, 및 뉴런 세포의 활성 또는 기능의 임의의 감소 또는 상실을 포함하는, 뉴런 세포에서의 임의의 병리학 적 변화를 의미한다. 병리학 적 변화는 자발적일 수 있거나 또는 임의의 사건에 의해 유도될 수 있고, 예를 들어 아홉토시스와 연관된 병리학 적 변화를 포함할 수 있다. 뉴런은 제한없이 감각, 교감, 부교감, 또는 장관, 예를 들어, 배근 신경절 뉴런, 운동 뉴런, 및 중추 뉴런, 예를 들어, 척수 유래 뉴런을 포함하여, 임의의 뉴런일 수 있다. 뉴런 퇴행 또는 세포 상실은 다양한 신경학적 질환 또는 장애, 예를 들어 신경퇴행성 질환 또는 장애의 특징이다. 일부 실시형태에서, 뉴런은 감각 뉴런이다. 일부 실시형태에서, 뉴런은 운동 뉴런이다. 일부 실시형태에서, 뉴런은 손상된 척수 뉴런이다.

[0065] 본 명세서에서 사용되는, "신경퇴행성 장애" 또는 "신경학적 장애"는 신경 세포 또는 신경 세포 개체군의 형태학적 및/또는 기능적 이상성을 야기하는 장애를 의미한다. 신경퇴행성 장애는 대상체에서 정상적인 신경학적 기능의 손상 또는 부재 또는 비정상적인 신경학적 기능의 존재를 초래할 수 있다. 예를 들어, 신경퇴행성 장애는 질환, 상해, 및/또는 노화의 결과일 수 있다. 형태학적 및 기능적 이상성의 비제한적인 예는 신체 악화 및/또는 신경 세포의 사멸, 신경 세포의 비정상적인 성장 패턴, 신경 세포 간 물리적 연결성의 이상성, 신경 세포에 의한 물질 또는 물질들, 예를 들어 신경전달물질의 저생산 또는 과생산, 신경 세포의 정상적으로 물질, 예를 들어 신경전달물질의 생산을 일으키는 물질 또는 물질들의 생산 실패, 및/또는 비정상적 패턴 또는 비정상적 시기에 전기 임펄스의 전달을 포함한다. 신경퇴행은 대상체 뇌의 임의의 영역에서 발생할 수 있고, 예를 들어 두부 외상, 졸중, ALS, 다발성 경화증, 헌팅톤 질환, 파킨슨 질환, 및 알츠하이머 질환을 포함하는 많은 장애에서 확인된다.

[0066] 본 명세서에서 사용되는 용어 "통각"은 유해하거나 또는 잠재적으로 유해한 어떠한 자극에 대한 감각 신경계의 반응을 의미한다. 통각에서, 통각수용체라고 하는 감각 신경 세포의 강렬한 화학적 (예를 들어, 안구에 찰리 분말), 기계적 (예를 들어, 절단, 압쇄), 또는 열적 (더위 및 추위) 자극은 신경 섬유 사슬을 따라서 척수를 통해 뇌로 이동하는 신호를 생성시킨다. 통각은 다양한 생리적 반응 및 행동 반응을 촉발시켜서 일반적으로

시각있는 존재에서 통증의 주관적 경험을 야기시킨다.

[0067]

감마-아미노부티르산 (GABA) 및 글루타메이트는 포유동물에서의 주요한 억제성 및 흥분성 신경전달물질이다. GABA 및 글루타메이트 간 균형성은 신경발생, 운동, 생체 시계, 조직 발생 및 혈당 조절과 같은 다양한 과정을 제어한다. GABA는 피리독살 포스페이트 (PLP) 의존적 효소 글루탐산 디카르복실라제의 65 kDa 및 67 kDa 이소폼 (각각 GAD65 및 GAD67)에 의해서 글루타메이트로부터 합성된다.

[0068]

래트 GAD2/GAD65에 대한 핵산 서열은 당분야에서 공지되어 있다. 예를 들어, 하기 핵산 서열 (SEQ ID NO: 5)로 제공되는, 라투스 노르베지쿠스 (*Rattus norvegicus*) 글루타메이트 디카르복실라제 2 (Gad2)의 mRNA의 GenBank 수탁번호: NM\_012563을 참조한다:

```

1  gggcgctgcgg ggtcgcagccg aagcagcttg cccgcagcca ctccgaggcg accagcgcca
61  gactagcaga acccatggca tctccgggct ctggcttttg gtccttcgga tctgaagatg
121 gctctgggga tcctcgagaac ccgggaacag cgagagccctg gtgccagggtg gcccaaaagt
181 tcacggggcgg catcggaaac aagctatgct ctctgctcta cggagactctt gagaagccag
241 cagagagcgg cgggagcgtg acctcgccgg ccgccactcg gaaggtcgcc tgcacctgtg
301 accaaaaacc ctgcagctgc cccaaaggag atgtcaatta tgcacttctc cagcaacag
361 acctgctgcc agcctgtgaa ggagaaaggg ccactctcgc atttctgcaa gatgtaata
421 acatttttct tcagtaacgtg gtgaaaagtt ttgatagatc aactaaagtg attgatttcc
481 attaccccaa tgagcttctt caagagtata attgggaatt ggagagccaa ccgcaaaatc
541 tggagggaat tttgacgcac tgccaaacaa ctctaaaata tgcgattaaa acagggcatc
601 cccgatattt taatcagctg tctaccggat tggatatggt tggattagca gcagattggt
661 tgacatcaac agcaaacacg aacatgttta cctatgagat cgcccctgta tttgtactac
721 tgggaatatgt gacactaaag aaaatgaggg aaatcattgg ctggccaggga ggtctctggcg
781 atggaatctt ttctctctgt ggtgccatct ccaacatgta cgccatgctc attgcccgct
841 ataagatggt tccagaagtc aaggaaaagg ggatggcggc ggtgcccagg ctcatcgcat
901 tcacgtcaga gcatagtcat tttctctctc agaagggagc tgcagccttg gggatcggaa
961 cagacagcgt gattctgatt aaatgtgatg agagagggaa aatgatccca tctgaccttg
1021 aaagaagaat ccttgagtc aaacagaaa gatttgttcc ttctctggtg agtgccacag
1081 ctggaaccac tgtgtacggg gcttttgatc ctctcttgcc tgtagctgac atctgcaaaa
1141 aatataagat ctggatgcat gtggatgctg cttgggggtg agggttactg atgtctcgga
1201 aacacaagtg gaagctgaac ggtgtggaga gggccaactc tgtgacatgg aatccccaca
1261 agatgatggg tgtccctctt caatgttctg ctctcctggt cagagaggag ggactgatgc
1321 agagctgcaa ccagatgcat gcttctacc tctttcagca agataagcac tatgacctgt
1381 cctatgacac gggagacaag gccttgacgt gtggacgcca cgctcgatgtc tttaaattat
1441 ggctcatgtg gagagcaaac gggactactg gatttgaagc tcacattgat aagtgttttg
1501 agctggcaga gtattttatc aatatcatta aaaaaccaga aggatatgaa atggtgttctg
1561 atgggaagcc tcagcacaca aatgtctgct tctgggttgt acctcctagt ttgcgagttc
1621 tggaaagaca tgaagagaga atgagccgcc tctcaaaagt ggcgccagtg attaaagcca
1681 gaatgatgga gtatgggacc acaatggtca gctaccaacc cttaggagat aaggtcaact
1741 tcttccgcat ggtcatctca aacctgcag caactcacca agacattgac ttcctcattg
1801 aagaaatcga acgcctggga caagatttgt aatcactttg ctcaccaaac tttcagttct
1861 ctaggtagac agctaagttg tcacaaactg tgtaaatgta tttgtagttt gttccagagt
1921 aattctattt ctatatcgtg gtgtcacagt agagtccagt ttaaaa.

```

[0069]

인간 GAD65 및 GAD67은 [Bu et al. (1992) Proc Natl Acad Sci 89:2115-2119]에 의해 단리 및 클로닝되었다. 인간 GAD65 cDNA는 585개 아미노산 잔기를 갖는 Mr 65,000 폴리펩티드 (Genbank 수탁번호 NM000818; M81882)를 코딩하고, 인간 GAD67은 594개 아미노산 잔기를 갖는 Mr 67,000 폴리펩티드 (Genbank 수탁번호 NM013445; M81883)를 코딩하고, 이들 각각은 참조로 본 명세서에 편입된다. 또한, 참조로 본 명세서에 편입되는 미국 공개 특허 출원 제2016/0081956호를 참조한다.

[0071]

인간 GAD65에 대한 추가의 핵산 및 아미노산 서열은 당분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 하기 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 1)로 제공되는, 인간 글루타메이트 디카르복실라제 2 (GAD2/GAD65)의 GenBank 수탁번호: Q05329를 참조한다:

```

MASPGSGFWSFGSEDGSGDSENPGTARAWCQVAQKFTGGIGNKLCALLYGDAEKP
AESGGSQPPRAAARKAACACDQKPCSCSKVDVNYAFLHATDLLPACDGERPTLAFL
QDVMINILLQYVVKSFDRSTKVIDFHYPNELLQEYNWELADQPQNLEEILMHCQTTL
KYAIKTGHPRYFNQLSTGLDMVGLAADWLTSTANTNMFTYEIAPVFLLEYVTLKK
MREIIGWPGSGDGFISPGGAISNMYAMMIARFKMFPEVKEKGMAALPRLIAFTSEH
SHFSLKKGAAALGIGTDSVILIKCDERGMIPSDLERRILEAKQKGFVPFLVSATAGTT
VYGAFDPLLAVADICKKYKIWMHVDAAWGGGLMSRKHKWKLSGVERANSVTW
NPHKMMGVPLQCSALLVREEGLMQNCNQMHASYLFQQDKHYDLSYDTGDKALQC
GRHVDVFKLWLMWRAGTTGFEAHVDKCLELAELYNIKNREGYEMVFDGKPDH
TNVCFWYIPPSLRITLEDNERMSRLSKVAPVIKARMMEYGTMTMSYQPLGDKVNFF
RMVISNPAATHQDIDFLIEIERLGQDL.

```

[0072]

또한, 예를 들어, 하기 핵산 서열 (SEQ ID NO: 2)로 제공되는, 글루타메이트 디카르복실라제 (GAD2/GAD65)에 대한 호모 사피엔스 mRNA의 GenBank 수탁번호: X69936을 참조한다:

```

1 atgtccccta tacatcacca tcaccatcac ctggttcgcg gtggatccga agcttcgaat
61 tctggctttt ggctcttcgg gtccgaagat ggctctgggg attccgagaa tcccggcaca
121 gcgcgagcct ggtgccaaagt ggctcagaag ttccacgggcg gcacccgaaa caaactgtgc
181 gccctgctct acggagacgc cgagaagccg gcggagagcg gcgggagcca accccgcg
241 gccgcccggc ggaagggccg ctgcgcctgc gaccagaagc cctgcagctg ctccaaagt
301 gatgtcaact acgcgtttct ccatgcaaca gacctgtgc cggcggtgtga tggagaaagg
361 cccactttgg cgtttctgca agatgttatg aacattttac ttcagtatgt ggtgaaaagt
421 ttcgatagat caaccaaagt gattgatttc cattatccta atgagcttct ccaagaatat
481 aattgggaat tggcagacca accacaaaat ttggaggaaa tttttagtga ttgccaaca
541 actctaaaat atgcaattaa aacagggcac cctagatact tcaatcaact ttctactggt
601 ttggatatgg ttggattagc agcagactgg ctgacatcaa cagcaaatac taacatgttc
661 acctatgaaa ttgctccagt atttgtgctt ttggaatatg tcacactaaa gaaaatgaga
721 gaaatcattg gctggccagg gggctctggc gatgggatat tttctcccgg tggcgccata
781 tctaacatgt atgccatgt gatcgacgc tttaagatgt tcccagaagt caaggagaaa
841 ggaatggcgt ctctcccag gctcattgac ttcacgtctg aacatagtca ttttctctc
901 aagaaggagg ctgcagcctt agggattgga acagacagcg tgattctgat taaatgtgat
961 gagagaggga aatgatttc atctgatctt gaaagaagga ttcttgaagc caaacagaaa
1021 ggggtttgtt ctttctctgt gattgccaca gctggaacca ccgtgtacgg agcatttgac
1081 cccctcttag ctgtcgtgta catttgcaaa aagtataaga tctggatgca tgtggatgca
1141 gcttgggggt ggggattact gatgtcccga aaacacaaat ggaactgag tggcggtgag
1201 agggccaaat ctgtgacgtg gaatccacac aagatgatgg gaggctctt cagtgctct
1261 gctctcctgg ttagagaaga gggattgatg cagaattgca accaaatgca tgcctcctac
1321 ctctttcagc aagataaaca ttatgacctg tcctatgaca ctggagacaa ggccttacag
1381 tgccgacgcc acgttgatgt ttttaacta tggctgatgt ggagggcaaa ggggactacc
1441 ggggtttgaa cgcattgtga taaatgtttg gaggttggcag agtatttata caacatcata
1501 aaaaaccgag aaggatatga gatgggtgtt gatgggaagc ctcagcacac aaatgtctgc
1561 ttctggtaca ttcctccaag cttgcgtact ctggaagaca atgaagagag aatgagtgc
1621 ctctcgaagg tggctccagt gattaaagcc agaatgatgg agtatggaac cacaatgggtc
1681 agctaccaac ccttgggaga caaggccaat ttcttccgca tggctatctc aaaccagcg
1741 gcaactcacc aagacattga cttcctgatt gaagaaatag aacgccttgg acaagattta
1801 taa.

```

[0074]

[0075]

GABA는 시냅스 전 및 시냅스 후 뉴런 과정 둘 모두의 원형질막 중 특이적 경막 수용체에 결합하여 뇌에서 억제성 시냅스에서 작용한다. 이러한 결합은 음으로 하전된 클로라이드 이온의 세포 안으로의 흐름 또는 양으로 하전된 포타슘 이온의 세포 밖으로의 흐름을 허용하도록 이온 채널의 개방을 야기시킨다. 이러한 작용은 일반적으로 과분극을 야기하는 경막 전위의 음성적 변화를 야기시킨다. GABA 수용체의 2개의 일반적인 부류: 수용체가 리간드-게이팅된 이온 채널 복합체의 일부인 GABA<sub>A</sub>, 및 중개체 (G 단백질)를 통해서 이온 채널을 열거나 또는 닫는 G 단백질-커플링된 수용체인 GABA<sub>B</sub> 대사성 수용체가 공지되어 있다.

[0076]

당분야에서 충분히 공지된 GABA 효현제는 무시물, 프로가비드, 릴루졸, 바클로펜, 가바펜틴 (NEURONTIN®), 비가바트린, 발프로산, 티아가빈 (GABITRIL®), 라모트리진 (LAMICTAL®), 프레가발린, 페니토인 (DILANTIN®), 카바마제핀 (TEGRETOL®), 토피라메이트 (TOPAMAX®) 및 이들 GABA 효현제의 유사체, 유도체, 프로드러그 및 약학적으로 허용가능한 염을 포함한다. 다른 GABA 효현제는 또한 본 발명의 병용물, 약학 조성물, 방법 및 키트에서 유용하다는 것을 당업자가 인식하게 될 것이다. GABA 효현제는 중추 신경계 장애 예컨대 뇌전증, 헌팅턴 무도병, 뇌경색, 파킨슨 질환, 지연성 이상운동증 및 경직을 위한 항-발작 요법에 유용하다고 개시되었다. GABA 효현제는 또한 항우울제, 항불안제, 항정신병제로서 유용하고, 통증 치료에서 유용성을 갖는다고 개시되었다.

[0077]

VGAT (소포 GABA 수송체) (소포 억제성 아미노산 수송체 (VIAAT)로서도 알려짐)는 인간에서 SLC32A1 유전자 (VGAT 유전자로도 알려짐)에 의해 코딩되는 단백질이다. VGAT는 뇌 및 척수 내 GABA성 뉴런의 신경 말단부 뿐만 아니라 또한 글리신성 신경 말단부에서 고도로 농축된다. 본 명세서에 참조로 편입되는, [Caudhry, et al., J. Neurosci., 18(23):9733-9750 (1998)]를 참조한다. 인간 VGAT에 대한 핵산 및 아미노산 서열은 당 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 하기 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 3)로 제공되는, 인간 소포 억제성 아미노산 수송체 (VIAAT/VGAT)에 대한 GenBank 수탁번호: Q9H598을 참조한다:

```

MATLLRSKLSNVATSVSNKSQAKMSGMFARMGFAATDEEAVGFAHCDDLDFEHR
QGLQMDILKAEGEPCGDEGAEPVEGDIHYQRGSGAPLPPSGSKDQVGGGGEGFGH
DKPKITAWAEAGWNVTNAIQGMFVLGLPYAILHGGYLGFLHFAAVVCCYTGKILIA
LYEENEDGEVVRDYSYVAIANACCAPRFPPTLGGRVVNVAQIIELVMTCILYVVVSG
NLMYNSFPGLPVSQKSWSIIATAVLLPCAFLKLNKAVSKFSLLCTLAHFVINILVIAYC
LSRARDWAWEKVKFYIDVKKFPISIGIHFVSYSQIFLPSLEGNMQQPSEFHCMMNWT
HIAACVLKGLFALVAYLTWADETKEVITDNLPGSIRAVVNIFLVAKALLSYPLPFAA
VEVLEKSLFQEGSRAFFPACYSGDGRLKSWGLTLRCALVVFTLLMAIYVPHFALLMG
LTGSLTGAGLCFLPLSLFHLRLLRKLLWHQVFFDVAIFVIGGICSVSGFVHSLEGLIE
AYRTNAED.

```

[0078]

[0079]

또한, 예를 들어, 하기 핵산 서열 (SEQ ID NO: 4)로 제공되는, 호모 사피엔스 용질 캐리어 패밀리 32 구성원 1



(SLC32A1), mRNA에 대한 GenBank 수탁번호: NM\_080552를 참조한다:

```

1  gctcgcgccc  cgcggcagct  ccgcagtgca  ctagccacca  ccgcgcgcgc  cgcgcgtccg
61  ccagacctgc  tgccagcttg  cccggtccag  ccctgagaga  gcctcgaaacg  ccagctgcga
121  ggggtcatgag  ccagagagcc  ccggggcgcc  gcgcggagag  caagcggaga  tagcgacttt
181  gcgcccccca  gccctcgcc  tcttgcatcg  cgttccccgc  atcctcgggt  ccttctgtcc
241  tttccgctgt  cccacccgct  gccatggcca  ccttgcctcg  cagcaagctg  tccaacgtgg
301  ccacgtccgt  gtccaacaag  tcccaggcca  agatgagcgg  catgttcgcc  aggatgggtt
361  ttccagcgcc  caccgatgag  gaggcggtgg  gcttcgcgca  ttgcgacgac  ctgcactttg
421  agcaccgcca  gggcctgcag  atggacatcc  tgaaagccga  gggagagccc  tgcggggacg
481  agggcgctga  agcgcccgct  gaggagagaca  tccattatca  gcgaggcagc  ggagctcctc
541  tgccgccttc  cggctccaag  gaccaggtgg  gagggtgtgg  cgaattcggg  ggccacgaca
601  agcccaaaat  caccggctgg  gaggcaggt  ggaacgtgac  caacgccatc  cagggcattg
661  tcgtgctggg  cctaccctac  gccatcctgc  acggcgggta  cctgggggtg  tttctcatca
721  tcttcgcgcg  cgttgtgtgc  tgctacaccg  gcaagatcct  catcgcgtgc  ctgtacgagg
781  agaatgaaga  cggcgaggtg  gtgcgcgtgc  gggactcgta  cgtggccata  gccaacgcct
841  gctgcgcccc  gcgcttccca  acgctgggcg  gccgagtgtg  gaacgtagcg  cagatcatcg
901  agctggtgat  caggtgcatc  ctgtacgtgg  tgggtgagtg  caacctcatg  tacaacagct
961  tccccgggct  gccgctgtcg  cagaagtcc  ggtccattat  cgccacggcc  gtgctgctgc
1021  cttgcgcctt  ccttaagaac  ctcaaggccg  tgtccaagt  cagtcctgtg  tgcactctgg
1081  cccacttcgt  catcaatata  ctggtcatag  cctactgtct  atcgcgggcg  cgcgactggg
1141  cctgggagaa  ggtaagttc  tacatcgacg  tcaagaagt  ccccatctcc  attggcatca
1201  tcgtgttcag  ctacacgtct  cagatcttcc  tgcttctcgt  ggagggcaat  atgcagcagc
1261  ccagcgagtt  ccttaccgat  atgaactgga  cgacatcgc  agcctgcgtg  ctcaaggggc
1321  tcttcgcgct  cgtgcctac  ctcacctggg  ccgacgagac  caaggaggtc  atcacggata
1381  acctgcccgg  ctccatccgc  gccgtggta  acatctttct  ggtggccaag  gcgctgtgtg
1441  cctatcctct  gccattcttt  gccgtgtcgc  aggtgctgga  gaagtgcgtc  ttccaggaa
1501  gcagccgcgc  ctttttccgg  gcctgctaca  gcggcgacgg  gcgcctgaag  tcctgggggc
1561  tgacgctgcg  ctgcgcgtc  gtcgtcttca  cgctgctcat  ggccatttat  gtgccgaact
1621  tcgcgctgct  catgggcctc  accggcagcc  tcacgggccc  cggcctctgt  ttcttgcgtc
1681  ccagcctctt  tcacctgcgc  ctgctctggc  gcaagctgct  gtggcaccaa  gtcttcttgc
1741  acgtcgccat  cttcgtcatc  ggcggcatct  gcagcgtgtc  cggcttcgtg  cactccctcg
1801  agggcctcat  cgaagcctac  cgaaccaacg  cggaggacta  gggcgcaagg  gcgagcccc
1861  gccgcgcttc  tgctctctct  ccttctctcc  ctacccccgc  cccaccagc  ccagtgcgcc
1921  ctgccgccc  gcttgggagg  ccaagcttta  aacatctctg  gttcctagtt  tctgattatt
1981  cggggatggg  ggggatggga  ggggacaggg  attcacgac  catcgcgtct  gcgttctgtg
2041  tgtcctttct  tttccacaac  accctgggtt  tggggggagg  cggggtgcat  ttgcgggcag
2101  ggttctctgt  ccttccaagt  ggggccccga  cactttggtt  ccagtcacgc  aggggggtgg
2161  gaagggaggg  agagggggcg  cagctcgacg  gcgtggcaac  ttgaccttgg  gggaatatct
2221  cacatccatc  cagagctcgg  aatctacagc  gtccagccat  ttccagcaag  agcgttctcc
2281  attccggaga  cgtttcaacc  ctgcagcggg  aaaggctgac  tgggaaatcc  attttgggtg
2341  ggcaatttcc  ttcaacgaag  ccggaaggcg  agaagccgcg  gcggggccag  cttgcctgcc
2401  ggttttcagg  aatctaaact  ctcatcttgt  gcaatttatc  aggtgtggaa  ctgttctact
2461  gtgcgtgtgg  tgtgctcgtg  gtgaataaga  tgaaatgtat  atcagaaaaa  aatctatctc
2521  taatttagag  tgcggtacat  aattatatcc  gcaaataaag  aagagacaaa  ggctaaaaaa
2581  a.

```

[0080]

[0081]

또한, 래트 VGAT에 대한 핵산 서열이 당분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 하기 핵산 서열 (SEQ ID NO: 6)로 제공되는, 라투스 노르베지쿠스 (*Rattus norvegicus*) 소포 GABA 수송체 (VGAT) mRNA에 대한 GenBank 수탁번호: AF030253.1을 참조한다:

```

1  agcggagata  gcggcccttg  ctgccttgac  gcgcgcccg  cgcgtcccca  gacccttctg
61  tccttttctc  ccgccccgcc  gccgccatgg  ccaccctgct  ccgcagcaag  ctgaccaacg
121  tggccacctc  tgtgtccaac  aagtccacgg  ccaagggtgag  cggcatgttc  gccaggatgg
181  gggtttcagg  ggccacggat  gaggaggcgg  tgggcttcgc  gcactgcgac  gatctcgact
241  ttgagcaccc  ccagggcctg  cagatggaca  tcctgaaatc  ggaaggcgag  ccctgcgggg
301  acgagggcgc  agaacctccc  gtcgagggag  acattcatta  tcagcgcggc  ggcgtcccc
361  tgccaccctc  gggctccaag  gaccaggccg  tgggagctgg  tggggagttc  gggggtcacg
421  acaaacccaa  gatcacggcg  tgggaagcgg  gctggaacgt  gacaaacgcc  attcagggca
481  tgttctgtgt  gggctctacc  tacgccatcc  tcacggcgcg  ctacctgggg  ttgttctcct
541  tcattcttcg  cgcgggtggt  tgctgctaca  ccggcaagat  cctcatcgcg  tgctgtacg
601  aggagaacga  agatggtgag  gtggtgcgcg  tgagggaact  gtatgtggcc  atagctaacg
661  cgtgtcgcgc  tcctcgattc  cccacgctgg  gcggccgctg  ggtcaatgtg  gccagatca
721  tcgagctggt  gatgacgtgt  atcttgtacg  tagtggtgag  cggcaacctc  atgtacaaca
781  gtttccgggg  gctgcggctg  tcgcagaagt  cctggtccat  catagccacg  gcggtgctgc
841  tgccctgcgc  ctctctgaag  aatctcaagg  ccgtgtccaa  gttcagtctg  ctgtgcacgc
901  tggcccaact  cgtcatcaac  atcctggtea  tcgcctactg  tctctcgcgc  gcgcgtgact
961  gggcctggga  gaagggtgag  ttctacatcg  acgtcaagaa  gtttctctat  tccatcgggc
1021  tcattctgtt  cagctacacg  tcgcagatct  tcctgccctc  gctcgaaggc  aacatgcagc
1081  agccccagca  attccactgc  atgatgaact  ggacacacat  cgcgcctgct  gtgctcaagg
1141  gtctcttcgc  gctcgtgcgc  tacctcacct  gggccgacga  gaccaaggaa  gtcacacg
1201  ataacctgcc  cggtttcctc  cgcgcctggt  tcaacatctt  cctggtggcc  aaggcgctgc
1261  tgctctaccc  gttgccttcc  ttccgcccgc  tcgaagtgtc  ggagaagtct  ctcttccagg
1321  aaggcagtcg  tgctcttctc  cccgcctgct  acggtggcga  cggtcgcctt  aagtcctggg
1381  ggctgacgct  gcgctgcgcg  ctggtgtctt  tcacgctgct  catggccatc  tacgtgccac
1441  acttcgcgct  gctcatgggc  ctccacggca  gcctcacggg  agccgcctc  tgcttctgct
1501  tgcccagcct  ctccacttgc  cgtcttctct  ggcgcgaagt  gctgtggcac  caggctctct
1561  tcgatgtggc  catcttctgc  atcggcgcca  tctgcagcgt  gtcggcttc  gtgcattcac
1621  tcgagggcct  catcgaggcc  taccgaacca  acgcagagga  ctagggggag  gggaccctgc
1681  cccagctccc  ctcccgcccc  accccactc  ccccttatcc  ccgcccccaa  cccccacccc
1741  cagccccctg  cgcaaccacg  ctggggaggc  cgagctttaa  acacctccgg  ttctagtgtg
1801  ctgattattc  ggggacccgg  cgggggaggg  agggggatag  acatccaagg  tccactgcgt
1861  ctgcgtttct  tgcgttcttt  ctattccaca  tcgtcctgat  ttggggggag  ggagcagagc
1921  gtataagtga  agggattttt  ctgtccttcc  tagaacaccc  accaccacca  ccaccaaaact
1981  ttggctccag  tcaatgttag  ggggtgggaa  ggagggggaa  agggaaacac  cagtttcgag
2041  gctcggaacc  ttgaccttgg  ggggtggggt  ggggacattt  cacagccatt  cagtgcttgg
2101  aatctactgc  gtccagccat  ttccagcaag  agcgcctccc  atgccctaga  catttcaacc
2161  ttgagggcct  aaaggctgac  cgggaaatcc  atttcgggca  ggcgacttcc  ctctggagaa
2221  gcgcggcag  gggcccccg  ttgcctgcgc  gttttcagga  acccaactc  atcttctgca
2281  atgtatccgg  ttgtggaact  gtatactgtg  cgtgtggtgt  gctcgtggtg  aataagatga
2341  aatgtatatc  agaaaaaatc  tatctctaata  ttagagtgcg  gtcgctcgtg  cc.

```

[0082]

[0083]

인간 환자뿐만 아니라 만성 신경병증성 통증의 동물 모델에서, 신경병증성 통증 상태를 초래하는 기전을 비롯한 연관된 신경병리학적 변화는 비교적 상당히 정의된다. 이들은 말초 신경 손상-유도된 신경종 또는 부분 척추 분절 외상성 또는 허혈성 손상의 존재에 의해 나타날 수 있다. 이와 같이, 분절 수준뿐만 아니라 통증-유도 자극의 기원 부위를 확인할 수 있다. 따라서, 본 발명은 관련 척추 분절에서 통각수용 자극의 전달을 담당하는 척추 뉴런의 핵심 개체군을 선택적으로 표적화하지만, 다른 뉴런 개체군 (예컨대 비표적적인 이웃 분절의  $\alpha$ -운동뉴런 또는 개재뉴런)에 영향을 미치지 않는 치료 전략을 제공한다. 본 명세서에서 제공하는 데이터는 신경병증성 통증의 마우스 모델의 L3-L5 척추 분절로 GAD65 및 VGAT 유전자의 연막하 전달이 강력하고 장기간 지속적인 항-통각수용성 효과를 제공한다는 것을 입증한다.

[0084]

(뉴런과 반대로) 감염된 정상세포에서 GAD65 유전자의 우선적인 발현은 기대되는 GABA 매개된 항-경직 효과에 대한 특별한 장점을 제공하는 것으로 보인다 (예를 들어, 각각 참조로 본 명세서에 편입되는, WO2014/116652 및 PCT/US2017/024285 참조). 시험관 내에서 확인된 바와 같이, 초대 정상세포의 감염은 세포의 GABA 농도의  $Ca^{2+}$  독립적 증가를 초래하였다. 따라서, 척추 실질에서 정상세포-매개 GABA 방출이 국소 뉴런 억제 회로의 기능성 및 연결성과 독립적일 것이고 Ia 구심성 및/또는  $\alpha$ -운동뉴런 상에 발현된 GABA<sub>B</sub> 수용체에 대해 이의 부분적 효과를 특이적으로 발휘하게 될 것으로 기대된다. 정상세포-생성된 GABA의 생물학적 활성은 우선적으로 GABA<sub>A</sub> 수용체-발현의 배양된 hNT 뉴런에 대한 이의 탈분극-유도 효과에 의해 확증되었다.

[0085]

이중 GAD65 및 VGAT 유전자 요법의 사용은 국지적 뉴런 억제를 증가시키려는 목적으로 척추 또는 뇌 전달 상황에서 이전에 시험되지 않은 신규한 접근법을 제시한다. 첫번째로, 이 접근법은 말초 신경 손상 부위에 대해 편측으로 벡터-주사된 분절의 배각에서 뉴런의 국제화된 감염만을 야기시키는, 소량으로 전달되는 벡터의 연막하 투여를 사용한다. 이것은 벡터가 주사된 영역 전반 (좌우 및 다수 분절)에서 전각 뉴런 및 후근 신경절 세포를 감염시키는데 효과적인 척추강내 전달 기법과 대조적이다. (통각수용 자극의 뇌로의 척추 전달을 담당하는 주요한 뉴런 개체군인) 배각 뉴런은 벡터의 척추강내 전달 이후에 감염되지 않는다. 두번째로, GAD65 및 VGAT 유전자의 조합은 감염된 배각 뉴런으로부터 시냅스 간극으로 소포 GABA의 방출을 강력화시킴으로써 통각수용 효과의 효과적인 유도에 필요하다.

[0086]

따라서, 일 양상에서, 본 발명은 GAD65 유전자 및 VGAT 유전자의 척추-특이적 상향조절에 의한 대상체에서 신경

병증성 통증을 치료하는 방법을 제공한다. 다양한 실시형태에서, 이 방법은 GAD65 및 VGAT를 코딩하는 바이러스 벡터의 연막화 투여 단계, 및 대상체의 치료적 수준으로 투여 부위에 대해 원위, 대측 및/또는 동측으로 GAD65 및 VGAT를 발현시키는 단계, 그리하여 대상체에서 신경병증성 통증을 감소시키는 단계를 포함한다. 다양한 실시형태에서, 벡터는 GAD65 및 VGAT를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 또한 GAD65 또는 이의 기능성 단편에 대해 적어도 60%의 상동성을 갖는 뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 폴리펩티드 (즉, GAD65 또는 이의 단편과 약 70% 상동성, 약 75% 상동성, 약 80% 상동성, 약 85% 상동성, 약 90% 상동성, 약 95% 상동성, 약 99% 상동성을 갖는 뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 폴리펩티드)가 본 발명의 범주 내에 속한다. 또한 VGAT 또는 이의 단편과 적어도 60%의 상동성을 갖는 뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 폴리펩티드 (즉, VGAT 또는 이의 단편과 약 70% 상동성, 약 75% 상동성, 약 80% 상동성, 약 85% 상동성, 약 90% 상동성, 약 95% 상동성, 약 99% 상동성을 갖는 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드)가 본 발명의 범주 내에 속한다.

[0087] 바이러스 벡터는 본 발명의 방법을 수행하는데 유용한 폴리뉴클레오타이드를 표적 세포로 도입시키는데 특히 유용할 수 있다. 바이러스 벡터는 특정한 숙주 시스템, 특히 포유동물 시스템에서 사용을 위해 개발되었고 예를 들어, 레트로바이러스 벡터, 다른 렌티바이러스 벡터 예컨대 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 아데노바이러스 벡터 (AV), 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터 등을 기반으로 하는 것들을 포함한다 (각각 참조로 본 명세서에 편입되는, [Miller and Rosman, *BioTechniques* 7:980-990, 1992], [Anderson et al., *Nature* 392:25-30 *Suppl.*, 1998], [Verma and Somia, *Nature* 389:239-242, 1997], [Wilson, *New Engl. J. Med.* 334:1185-1187 (1996)]를 참조함). 본 발명의 일 양상에서, 렌티바이러스, AV, 또는 AAV가 이용된다.

[0088] 아데노바이러스는 이들이 엔도솜을 통해서 수송될 수 있는 최대 크기이기 때문에, 가장 큰 비외피형 바이러스를 대표한다 (즉, 외피 용해 불필요). 비리온은 또한 숙주 세포와의 부착을 보조하는 캡시드의 각 펜톤 베이스와 회합된 독특한 "스파이크" 또는 섬유를 갖는다. AAV는 정의상 생산적인 감염 주기를 개시하고 지속시키기 위해서 다른 바이러스 (전형적으로 아데노바이러스 또는 헤르페스바이러스)와의 동시 감염을 필요로 하는 의존적 파코바이러스이다. 이러한 헬퍼 바이러스의 부재 하에서, 여전히 AAV는 수용체-매개 결합 및 내재화를 통해 표적 세포를 감염 또는 형질도입시켜서, 비분열 및 분열 세포 둘 모두의 핵으로 침투하는 능력을 갖는다.

[0089] 핵에 존재하면, 바이러스는 탈피하고 이식유전자가 다양한 상이한 형태로부터 발현되는데, 가장 영속적인 형태는 원형 단량체이다. AAV는 안정하게 형질도입된 1% 내지 5%의 세포의 계놈으로 통합될 것이다 (Nakai et al., *J. Virol.* 76: 11343-349, 2002). 이식유전자의 발현이 유난히 안정적일 수 있다. 헬퍼 바이러스의 부재 하에서 AAV 감염에 의해 자손 바이러스는 생산되지 않으므로, 형질도입 정도는 바이러스로 감염된 초기 세포에만 제한된다. 이러한 특징으로 AAV가 본 발명에 적합한 유전자 요법 벡터이다.

[0090] 본 발명의 방법에서 사용할 수 있는 아데노바이러스 벡터 및 다른 바이러스 벡터를 설명하는 추가의 참조는 다음을 포함한다: Horwitz, M. S., *Adenoviridae and Their Replication*, in Fields, B., et al. (eds.) *Virology*, Vol. 2, Raven Press New York, pp. 1679-1721, 1990; Graham, F., et al., pp. 109-128 in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7: Gene Transfer and Expression Protocols, Murray, E. (ed.), Humana Press, Clifton, N.J. (1991); Miller, N., et al., *FASEB Journal* 9: 190-199, 1995; Schreier, H., *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 68: 145-159, 1994; Schneider and French, *Circulation* 88:1937-1942, 1993; Curiel D. T., et al., *Human Gene Therapy* 3: 147-154, 1992; Graham, F. L., et al., WO 95/00655 (5 Jan. 1995); Falck-Pedersen, E. S., WO 95/16772 (22 Jun. 1995); Deneffe, P. et al., WO 95/23867 (8 Sep. 1995); Haddada, H. et al., WO 94/26914 (24 Nov. 1994); Perricaudet, M. et al., WO 95/02697 (26 Jan. 1995); Zhang, W., et al., WO 95/25071 (12 Oct. 1995). 다양한 아데노바이러스 플라스미드는 또한 예를 들어, Microbix Biosystems (캐나다, 온타리오주, 토론토 소재)을 포함한, 상업적 공급처로부터 입수가능하다 (예를 들어, [Microbix Product Information Sheet: Plasmids for Adenovirus Vector Construction, 1996] 참조).

[0091] 본 발명의 방법에서 사용할 수 있는 AAV 벡터를 설명하는 추가의 참조는 다음을 포함한다: Carter, B., *Handbook of Parvoviruses*, vol. I, pp. 169-228, 1990; Berns, *Virology*, pp. 1743-1764 (Raven Press 1990); Carter, B., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 3: 533-539, 1992; Muzyczka, N., *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 92-129, 1992; Flotte, T. R., et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7:349-356, 1992; Chatterjee et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, 770: 79-90, 1995; Flotte, T. R., et al., WO 95/13365 (18 May 1995); Trempe, J. P., et al., WO 95/13392 (18 May 1995); Kotin, R., *Human Gene Therapy*, 5: 793-801, 1994; Flotte, T. R., et al., *Gene Therapy* 2:357-362, 1995; Allen, J. M., WO



96/17947 (13 Jun. 1996); Du et al., *Gene Therapy* 3: 254-261, 1996.

[0092] 본 명세서에서 사용되는 용어 "아데노-연관 바이러스" (AAV)는 제한없이 1형 AAV, 2형 AAV, 3형 AAV (3A형 및 3B형 포함), 4형 AAV, 5형 AAV, 6형 AAV, 7형 AAV, 8형 AAV, 9형 AAV, 10형 AAV, 11형 AAV, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 양 AAV, 및 현재 공지된 임의의 다른 AAV를 포함한다. AAV 벡터는 포유동물에 비병원성인 단일-가닥 (ss) DNA 파코바이러스로부터 유래된다 (참조로 본 명세서에 편입되는, [Muzyscka (1992) *Curr. Top. Microb. Immunol.*, 158:97-129] 참조). 간략하게, AAV-기반 벡터는 바이러스 게놈의 96%를 차지하는 rep 및 cap 바이러스 유전자가 제거되어, 바이러스 DNA 복제, 패키징 및 통합을 개시시키는데 사용되는 2개의 축적한 145-염기쌍 (bp)의 ITR (inverted terminal repeat)이 남겨진다. 헬퍼 바이러스의 부재 하에서, 야생형 AAV는 염색체 19q 13.3에서 우선적인 부위-특이성으로 인간 숙주 세포 게놈에 통합되거나 또는 예외적으로 발현되게 남아있을 수도 있다. 단일 AAV 입자는 최대 5 kb의 ssDNA를 수용할 수 있어서, 이식유전자 및 조절 엘리먼트를 위해 약 4.5 kb가 남으며, 이것은 대체로 충분하다. 그러나, 예를 들어, 미국 특허 제 6,544,785호에 기술된 바와 같은 트랜스-스플라이싱 시스템은 이러한 한계치의 거의 두배일 수 있다. 많은 혈청형의 아데노-연관 바이러스가 광범위하게 연구되어왔고 유전자 요법 벡터로서 특징규명되었다. 당업자는 기능성 AAV-기반 유전자 요법 벡터의 제조에 친숙할 것이다. 인간 대상체에 투여를 위한 AAV의 다양한 생산, 정제 및 조제 방법에 대한 많은 참조는 광범위한 공개 문헌에서 확인할 수 있다 (예를 들어, 참조로 본 명세서에 편입되는 [Virus Vector for Gene Therapy: Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003] 참조). 추가적으로, CNS의 세포를 표적화하는 AAV-기반 유전자 요법은 미국 특허 제 6,180,613호 및 제 6,503,888호 (이들 각각은 참조로 본 명세서에 편입됨)에 기술되어 있다.

[0093] 임의로는, AAV 바이러스 캡시드는 AAV2/9, AAV9, AAVrh8, AAVrh10, AAV Anc80, 또는 AAV PHP.B이지만, 본 발명의 일정 실시형태에서 사용되는 바이러스 캡시드의 혈청형은 다른 기지 혈청형의 AAV 바이러스 캡시드를 포함하여, 공지된 바이러스 캡시드 중에서 선택될 수 있다.

[0094] 임의로는, 유전자 요법 벡터, 예를 들어, AAV 또는 AAV-기반 벡터는 관심 표적 조직으로 바이러스 흡수, 바이러스 안정성 및 항성을 개선시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, AAV 벡터의 캡시드는 관심 조직 내 또는 관심 조직의 수용체에 결합하는 리간드 (예를 들어, 합성 또는 천연 발생 소형 분자, 펩티드, 또는 폴리펩티드, 또는 다른 생분자)로 변형될 수 있다. 관심 조직을 표적화하고 구성체가 표적 세포에 진입하여 효율적으로 형질도입시킬 수 있도록 사용되는 벡터의 기능적 성질을 개선 및/또는 향상시키기 위한 다른 변형이 가능하다. 이러한 변형은 당업자의 기술 범위 내일 것이다.

[0095] 이용되는 숙주 세포/벡터 시스템에 따라서, 항상성 및 유도성 프로모터, 전사 인핸서 엘리먼트, 전사 종결인자 등을 포함하여, 임의의 많은 적합한 전사 및 번역 엘리먼트가 발현 벡터에 사용될 수 있다 (Bitter et al., *Meth. Enzymol.* 153:516-544, 1987). 상기에 정의된 바와 같이, "프로모터" 또는 "프로모터 서열"에 대한 언급은 이의 가장 넓은 맥락으로 이해해야 하며 세포에서 RNA 중합효소에 결합할 수 있고 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 코딩 서열 예컨대 메신저 RNA, 리보솜 RNA, 소형 핵의 핵소체 RNA 또는 임의 유형의 임의의 RNA 중합효소에 의해 전사되는 임의 종류의 RNA의 전사를 개시할 수 있는 DNA 조절 영역을 포함한다. 본 명세서에서 고려되는 "프로모터"는 또한 CAT 박스 서열 및 추가의 조절 엘리먼트 (즉, 상류 활성화 서열, 인핸서 및 사일렌서)가 있거나 또는 없이, 진핵생물 세포에서 정확한 전사 개시에 필요한 골드버그-호그네스 (Goldberg-Hogness) 박스를 포함한, 고전적인 게놈 유전자의 전사 조절 서열을 포함할 수 있다.

[0096] 프로모터 서열의 조절 제어 하에 서열의 배치는 발현이 프로모터 서열에 의해 제어되도록 상기 분자가 위치되는 것을 의미한다. 프로모터는 일반적으로 그들이 제어하는 유전자의 5' (상류)에 위치된다. 이중성 프로모터/구조 유전자 조합의 구축에서, 일반적으로 프로모터 위치는 프로모터와 이의 천연 상황에서 이것이 제어하는 유전자, 즉, 프로모터가 유래된 유전자 사이의 거리와 대략 동일한 유전자 전사 출발 부위로부터의 거리일 수 있다. 당분야에 공지된 바와 같이, 이러한 거리의 일부 변동은 프로모터 기능의 상실없이 수용될 수 있다. 유사하게, 이의 제어 하에 위치시키려는 이중성 유전자에 대한 조절 서열 엘리먼트의 배치는 이의 천연 상황에서 엘리먼트의 배치, 즉 이것이 유래된 유전자에 의해 정의된다. 다시, 당분야에 공지된 바와 같이, 이러한 거리에서 일부 변동이 또한 발생될 수 있다.

[0097] 상이한 특징 및 발현 프로파일을 갖는 프로모터 서열은 조직-특이적, 조직-비특이적, 항상성 및 유도성인 것을 포함하여, 당분야에서 충분히 공지되어 있다. 예를 들어, [Papadakis et al., "Promoters and Control Elements: Designing Expression Cassettes for Gene Therapy." *Current Gene Therapy*, 2004, 4, 89-113]을 더욱 참조할 수 있고, 이의 내용을 참조로 본 명세서에 편입시킨다. 본 발명에서 고려되는 프로모터는 제한

없이 Apo A-I, ApoE, 서피나 (TBG), 알파-1-항트립신 (hAAT) (간 특이적); MCK (근육 특이적); GFAP, NSE, 시냅신 I, 프리프로엔케팔린, 도파민 b-히드록실라제 (dbH), 프로락틴, 미엘린 염기성 단백질 (뉴런-특이적), GUSB, CBA, CAG, 엔키린 (적혈구 특이적), 인간 유비퀴틴 프로모터 (UBI) 및 인간 시냅신 프로모터를 포함한다. 그러나, 다른 기지의 조직-특이적 또는 세포-특이적 프로모터도 사용될 수 있다.

[0098] 재조합 AAV 입자를 생산하는데 적합한 숙주 세포는 제한없이, 외생성 핵산 분자의 수령체로서 사용될 수 있거나, 또는 사용된 적이 있는, 미생물, 효모 세포, 곤충 세포 및 포유동물 세포를 포함한다. 따라서, 본 명세서에서 사용되는 "숙주 세포"는 일반적으로 외생성 핵산 분자로 형질감염된 세포를 의미한다. 숙주 세포는 세포 또는 세포주가 발현시키려는 단백질, 선택된 선택 시스템 또는 적용되는 발효 시스템과 상용성이라면 임의의 진핵생물 세포 또는 세포주를 포함한다.

[0099] AAV 벡터는 그들을 적절한, 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제에 용해, 현탁 또는 유화시켜 주사 또는 투여용 조제물로 제제화될 수 있다. 이러한 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제의 예는 수성 또는 비수성 용매, 예컨대 오일, 합성 지방족 산 글리세리드, 고급 지방족 산의 에스테르 또는 프로필렌 글리콜; 및 바람직하다면, 통상의 첨가제 예컨대 가용화제, 등장화제, 현탁제, 유화제, 안정화제 및 보존제와 함께 포함한다.

[0100] 세포 유형에 특이적인 바이러스 벡터가 이용불가하면, 벡터는 표적 세포 상에서 발현되는 리간드 (또는 수용체)에 특이적인 수용체 (또는 리간드)를 발현하도록 변형될 수 있거나, 또는 이러한 리간드 (또는 수용체)를 포함하도록 역시 변형될 수 있는 리포솜 내에 캡슐화될 수 있다. 펩티드제는 예를 들어, 세포 내로 펩티드의 전좌를 촉진시킬 수 있는, 단백질 전달 도메인 예컨대 인간 면역결핍 바이러스 TAT 단백질 전달 도메인을 함유하도록 펩티드를 조작하는 것을 포함하여, 다양한 방법으로 세포에 도입될 수 있다. 또한, 다양한 생물재료-기반 기법 예컨대 이러한 기법을 수용하도록 역시 변형될 수 있는 나노-케이지 및 약학적 전달 웨이퍼 (뇌암 화학요법제에서 사용되는 것과 같음)가 존재한다.

[0101] 따라서, 다른 양상에서, 본 발명은 적어도 중추 신경계의 조직에서 발현될 수 있는 프로모터 엘리먼트에 작동적으로 연결된, GAD65 및/또는 VGAT 유전자, 또는 이의 유도체 및/또는 돌연변이체를 포함하는 유전자 요법 벡터 또는 구성체를 제공한다. 용인되는 마우스, 래트 및 돼지 모델을 사용해 본 명세서에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 유전자 요법 벡터는 신경병증성 통증 및/또는 근육 경직을 치료하는데 효과적이었다.

[0102] 따라서, 다양한 실시형태에서, 본 발명에서 사용되는 바이러스 벡터의 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh33, AAVrh34, AAV Anc80 (Anc80), AAV PHP.B 등으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다 (예를 들어, 본 명세서에서 참조로 편입시킨 [Cao et al. (2002) PNAS, 99:11854-11859]; 및 [Virus vectors for gene therapy: Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003] 참조). 본 명세서에 열거된 것들 이외의 다른 혈청형도 또한 고려된다. 일정한 예시적인 실시형태에서, AAV9 또는 Anc80이 사용된다. 개시된 조성물 및 방법이 AAV 키메라 벡터를 사용할 수도 있어서, AAV의 일부분이 다른 유사한 벡터, 예컨대 아데노바이러스와 융합된다는 것을 또한 고려한다.

[0103] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 유전자 요법 구성체는 또한 관심 유전자(들) (예를 들어, GAD65 및/또는 VGAT)가 클로닝되거나 또는 아니면 벡터의 뉴클레오티드 서열이 관심 유전자(들)의 발현 (항상성 또는 달리 일부 방식으로 조절)을 허용하게 되는 방식으로 관심 유전자(들)를 포함하는 벡터 (또는 유전자 요법 발현 벡터)를 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 벡터 구성체는 관심 조직 (예를 들어, CNS)으로 전달될 수 있고 선택된 관심 조직 (예를 들어, CNS)에서 관심 유전의 발현을 제공하게 되는 임의의 적합한 유전자 발현 벡터를 포함한다.

[0104] 따라서, 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 GAD65 및/또는 VGAT-제공 벡터(들)를 포함하는 유전자 요법 조성물을 제공한다. 그러므로 본 발명의 유전자 요법 조성물은 신경병증성 통증 또는 근육 경직을 치료하기 위해, 본 명세서에 기술된 바와 같은 벡터(들) 및 세포 또는 조직, 예를 들어 CNS 세포 또는 조직으로의 진입 달성을 위한 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 유리하게, 본 발명의 유전자 요법 조성물은 최적의 속도 및 치료 용량으로 작용 부위에 활성 유전자, 특히 치료 유전자의 제어된 전달을 제공한다. 유전자 요법 벡터 및/또는 이러한 유전자 요법 벡터를 함유하는 바이러스 벡터와 전달 시스템의 조합은, 특히, 작용 부위로 이의 특이적 전달 또는 작용 부위의 표적화 이후 유전자의 제어된 발현을 가능하게 한다.

[0105] 렌티바이러스 벡터의 사용 이후에 유전자 전달이 통합된 세포 이외에도, 시상하부 핵으로 AAV-GAD65 주사 이후에 성공적인 GAD65 유전자 과발현에 관한 보고가 있다. 이들 연구에서, 영속적인 GAD65 발현은 AAV-GAD65



주사 이후 최대 4-5개월까지 확인되었다. 보다 중요하게, 최근의 체계적인 데이터는 제한된 횟수의 AAV 주사 (1-2회 주사) 이후임에도 래트 또는 미니피그 선조체로의 AAV-기반 유전자 전달의 높은 효율성을 입증한다.

따라서, 다른 실시형태에서, 본 발명은 분절-특이적 GAD65 및 VGAT 발현을 획득하기 위해서 AAV-기반, 게놈-비통합 GAD65-코딩 및 VGAT-코딩 벡터를 적용한다.

[0106] 본 명세서에서 입증된 바와 같이, GAD65 및 VGAT의 척추 전달 (즉, 연막하 투여)을 (양쪽 유전자를 코딩하는 단일 벡터를 사용하거나, 또는 각 개별 유전자를 코딩하는 별개 벡터를 사용하여) 조합하여, 신경병증성 통증에서 유의하고 기능적으로 관련된 감소를 달성하였다. 척추 억제제의 역할은 만성 신경병증성 통증의 충분히 특징 규명된 마우스 모델에서 시험하였다 (예를 들어, 참조로 본 명세서에 편입시킨, [Pain 76(1-2): 215-222, 1998] 참조).

[0107] 본 발명의 병용 요법의 투여는 당업자에게 공지된 임의의 다양한 방법 및 전달 시스템을 사용해 실시 또는 수행될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "투여" 또는 "투여하는"은 본 발명의 방법이 본 발명의 방법을 수행시에 대상체에게 본 발명의 화합물 또는 약학 조성물을 제공하는 행위를 포함하는 것으로 정의된다. 투여의 예시적인 경로는 제한없이, 정맥내, 관절내, 수조내, 안구내, 뇌실내, 척추강내, 연막하, 근육내, 복강내, 피내, 체강내 등을 비롯하여 이의 임의의 둘 이상의 조합을 포함한다. 일정 실시형태에서, 벡터 조성물은 GAD65 유전자 및 VGAT 유전자의 척추 상향조절을 달성하기 위해서, 척추 실질, 척추의 척추강내 공간, 대상체의 척추 연막하 공간, 및/또는 말초 경직 근육으로 직접적으로 전달될 수 있다. 예를 들어, 참조로 본 명세서에 편입되는 W02016/122791을 참조한다.

[0108] 따라서, 본 명세서에 제공되는 방법은 대형 동물 또는 인간에서, AAV의 사용과 같은 척추 연막하 유전자 요법을 허용한다. 연막하 공간으로 벡터의 전달을 위한 예시적인 전달 시스템은 90° 로 휘는 유도관 및 카테터 (예를 들어, PE-5 또는 PE-10)를 포함하여, 표적화된 척수 분절의 배측 연막하 공간으로 연막하 카테터의 정확한 유도 및 배치를 허용한다. 카테터의 배치 후에, 벡터는 제거되기 전에 일정 시간량 동안 주입된다.

[0109] 본 명세서에서 사용시 용어 "PE-10"은 대략 0.010 인치의 내경을 갖는 폴리에틸렌 배관을 의미한다. 일정 실시형태에서, PE-10 배관의 내경은 약 0.011 인치일 것이다. 유사하게, 용어 "PE-5"는 대략 0.005 인치의 내경을 갖는 폴리에틸렌 배관을 의미한다. 일정 실시형태에서, PE-5 배관의 내경은 약 0.008 인치일 것이다.

[0110] 따라서, 청구되는 방법은 치료하는 대상체의 백질 및 회색질 둘 모두에서 거의 완전한 척추 실질 벡터-매개 유전자 발현을 제공하는, 연막하 전달 (즉, 연막 우회)을 제공한다. 현재 이용가능한 비침습성 기법은 비슷한 수준의 척추 실질 이식유전자 발현 또는 충분히 제어된 분절-특이적 유전자 침묵화를 허용하지 않는다.

[0111] 포유동물 대상체에서 연막하 카테터를 배치시키기 위한 예시적인 방법은 도 7에 도시되어 있는데, 여기서는 노출된 "무경막" 척수 근방에서 장비/카테터 조작과 연관된 잠재적인 척추 손상을 최소화하기 위해서 몇몇 순차적인 절차 단계를 따를 수 있다. 도 7의 단계 A 및 B에 도시된 바와 같이, 뒷다리의 근육 경직이 Th9 척추 분절 횡절단에 의해 유도되고 경직은 발바닥 촉각 자극에 대한 비복근 근육 EMG 반응의 정량적 변화를 통해 식별/측정된다. 근육 경직 유도 후 2-3개월에, 동물들은 AAV9 (또는 Anc80)-UBI-GAD65/VGAT 벡터의 요추 연막하 주사를 받았고 경직 반응의 존재는 추가 2개월 동안 측정되었다 (도 7; 단계 C 및 D). 희생 후 GAD65 및 VGAT 상향조절의 존재는 면역형광 염색으로 측정된다 (도 7; 단계 E).

[0112] 중추 신경계의 특정 영역, 특히 척추 연막하 공간으로 특이적으로 본 명세서에 기술된 유전자 요법 벡터를 전달하기 위해서, 정위 미세주사법으로 투여될 수 있다. 따라서, 다양한 실시형태에서, (추궁절제술 바로 위 및 아래에 배치된) 미골 및 두개 척추 클램프의 사용을 이용하여 카테터 배치 동안 척수 박동을 최소화시킬 수 있다. 또한 다양한 실시형태에서, XYZ 조작기 상에 고정된 "L"형 카테터 스테인레스강 유도관 (예를 들어, 90° 굴곡형 16-26 G 스테인레스강 튜브) (예를 들어, 참조로 본 명세서에 편입되는, 미국 공개 특허 출원 번호 2015/0224331에 기술된 바와 같음)을 사용하여 연막하 카테터 배치를 용이하게 할 수 있다.

[0113] 일정 실시형태에서, 연막하 투여는 먼저 굴곡형 30G 바늘을 사용해 천자한다. 침투한 바늘 (예를 들어, 30G 바늘)의 침단이 약 1 내지 1.5 mm로 연막하 공간에 존재하면, 연막하를 1-2 mm 만큼 약간 들어올릴 수 있다. 그러면 연막하 카테터는 유도관으로부터 카테터를 진행시켜 연막하 공간에 배치된다. 카테터가 표적화된 길이로 진행된 후에, 유도관의 침투 바늘 침단을 연막하 공간으로부터 제거시킨다. 그 다음으로 약학적으로 허용가능한 담체 중 벡터가 주사될 수 있다. 벡터 주사가 완료되면 (전형적으로 2분 내지 5분, 일부 실시형태에서는 약 3분), 카테터를 연막하 공간으로부터 빼내고 연막하를 닫히게 된다. 이러한 기술적 접근법을 사용함으

로써, 연막하 카테터의 배치는 연막 개방 순간부터 약 3분 내지 5분 이내에 수행될 수 있다. 그 이후에, 이식유전자는 투여 부위에 대해 원위, 대측 및/또는 동측에서 치료 수준으로 발현된다.

[0114] 용어 "치료적 유효량" 또는 "유효량"은 연구자, 의사, 의사 또는 다른 임상가가 추구하는 조직, 체계, 동물 또는 인간의 생물학적 또는 의학적 반응, 예를 들어 GAD65 유전자 및 VGAT 유전자의 척추 상향조절을 유발시키게 되는 화합물 또는 조성물의 양을 의미한다. 따라서, 용어 "치료적 유효량"은 본 발명에서 발명된 영역에 일정 기간 동안 반복적으로 적용했을 때 질환 병태에 실질적인 개선을 야기시키는 제제의 임의량을 의미하기 위해 사용된다. 그러한 양은 치료하려는 병태, 병태의 진행 병기, 및 적용하려는 제제의 유형 및 농도에 따라 다양하게 될 것이다. 임의의 소정 예에서 적절한 양은 당업자에게 쉽게 분명해질 것이거나 또는 통상의 실험으로 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 대상 치료 방법에 대한, GAD65 유전자를 단독으로 또는 VGAT 유전자와 조합하여 코딩하는 벡터 또는 GAD65 유전자 및 VGAT 유전자를 코딩하는 벡터를 포함하는 조성물의 "치료적 유효량"은 바람직한 치료 용법의 일부로서 적용했을 때, GAD65 유전자 및 VGAT 유전자의 상향조절을 일으키는 조성물 중 벡터의 양을 의미한다. 일부 경우에서, 다수 용량의 벡터가 투여된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 제1 투여 부위 이외에도, 이식유전자를 보유하는 본 명세서에 기술된 유전자 요법 벡터를 포함하는 조성물은 제1 투여 부위에 대해 대측 또는 동측일 수 있는 다른 부위에 투여된다.

[0115] 유효량은 또한 사용되는 특정 벡터에 따라 좌우될 수 있다. 예를 들어, CNS 조직을 표적화하기 위한 용량은 AAV의 혈청형 (예를 들어, 캡시드 단백질)에 의존적일 수 있다. 예를 들어, AAV는 AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, rh.10, rh.39, rh.43 및 CSP3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 AAV 혈청형의 캡시드 단백질을 가질 수 있다. 일정 실시형태에서, AAV의 유효량은 kg 당  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$ , 또는  $10^{14}$  게놈 카피수이다. 일정 실시형태에서, AAV의 유효량은 대상체 당  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$ ,  $10^{14}$ , 또는  $10^{15}$  게놈 카피수이다. 실험 마우스에서, 주사되는 벡터, 예를 들어 AAV 벡터 용액의 총 부피는 0.25  $\mu$ l 내지 1.0  $\mu$ l인데 반해서, 실험 돼지에서 주사되는 벡터 용액의 총 부피는 50  $\mu$ l 내지 150  $\mu$ l이다.

[0116] 전달 벡터의 치료적 또는 예방적 유효량의 결정은 통상의 계산 방법을 사용해 동물 데이터를 기반으로 수행할 수 있다. 적절한 용량은 특히 선택된 전달 벡터의 특이도, 투여 경로, 치료되는 포유동물 (예를 들어, 인간 또는 인간이외의 영장류 또는 다른 포유동물), 치료하려는 대상체의 연령, 체중 및 전신 상태, 치료되는 장애의 중증도, 치료되는 심장 내 역역 위치 및 투여 방식에 따라 좌우될 것이다. 따라서, 적절한 용량은 환자에 따라 가변적일 수 있다. 적절한 유효량은 당업자가 쉽게 결정할 수 있다.

[0117] 인간 용량은 동물 모델과 비교하여 인간을 위한 용량으로 변형시키기 위해 당분야에서 당업자가 통상적으로 인식하는 바와 같이, 마우스, 래트 및/또는 돼지에서 사용되는 화합물의 양으로부터 외삽하여 초기에 결정할 수 있다. 일정 실시형태에서 용량은 약 1 mg 화합물/Kg 체중 내지 약 5000 mg 화합물/Kg 체중; 또는 약 5 mg/Kg 체중 내지 약 4000 mg/Kg 체중 또는 약 10 mg/Kg 체중 내지 약 3000 mg/Kg 체중; 또는 약 50 mg/Kg 체중 내지 약 2000 mg/Kg 체중; 또는 약 100 mg/Kg 체중 내지 약 1000 mg/Kg 체중; 또는 약 150 mg/Kg 체중 내지 약 500 mg/Kg 체중으로 가변적일 수 있다는 것을 고려한다. 다른 실시형태에서 이러한 용량은 약 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 mg/Kg 체중일 수 있다. 다른 실시형태에서, 더 높은 용량을 사용할 수 있다는 것을 고려하며, 이러한 용량은 약 5 mg 화합물/Kg 체중 내지 약 20 mg 화합물/Kg 체중 범위일 수 있다. 다른 실시형태에서 용량은 약 8, 10, 12, 14, 16 또는 18 mg/Kg 체중일 수 있다. 물론, 이러한 용량은 초기 임상 시험 결과 및 특정 환자의 요구에 따라서, 이러한 치료 프로토콜에서 통상적으로 수행되는 바와 같이, 위로 또는 아래로 조정될 수 있다. 일정 실시형태에서, 용량은 벡터 농도에 대한 것일 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기술된 유전자 요법 벡터의 농도는 적어도 0.5, 0.75, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 또는  $2.0 \times 10^{13}$  gc/mL일 수 있다.

[0118] 용량 치료는 단일 용량 일정일 수 있거나 또는 다수 용량 일정일 수 있다. 게다가, 대상체는 적절하면 많은 용량으로 투여될 수 있다. 당업자는 적절한 수의 용량을 쉽게 결정할 수 있다. 그러나, 용량은 임의의 부작용에 대해 치료 이득을 균형 맞추거나, 또는 대안적인 투여 경로를 고려하여 조정될 필요가 있을 수 있다. 이러한 용량은 재조합 벡터가 적용되는 치료 용도에 따라 가변적일 수 있다.

[0119] 임의로는, 본 발명에 따른 AAV-매개 전달은 다른 바이러스 및 비바이러스 벡터에 의한 전달과 조합될 수 있다. 제한없이 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스(HSV)

백터, 배클로바이러스 백터, 및 합성 백터를 포함한 이러한 다른 바이러스 백터는 당분야에 공지된 방법에 따라 쉽게 선택 및 생성시킬 수 있다. 유사하게, 제한없이, 리포솜, 지질-기반 백터, 폴리플렉스 백터, 분자 접합체, 폴리아민 및 다양이온 백터를 포함한 비바이러스 백터는 당분야에 공지된 방법에 따라서 쉽게 선택 및 생성시킬 수 있다. 이들 대안적인 경로를 통해 투여시, 용량은 상기 기술된 범위 내인 것이 바람직하다.

[0120] 본 발명의 유전자 요법 조성물은 투여를 위한 설명서와 함께 키트 및/또는 약학 패키지, 용기, 팩, 또는 분배기에 포함될 수 있다. 따라서, 본 개시 내용은 신경병증성 통증 및/또는 근육 경직의 치료를 위한 키트를 제공한다. 일 실시형태에서, 키트는 단위 제형으로 유전자 요법 백터의 유효량을 함유하는 치료 조성물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 치료 조성물을 함유하는 멸균 용기를 포함하고, 이러한 용기는 박스, 앰플, 병, 바이알, 튜브, 백, 파우치, 블리스터-팩, 또는 당분야에 공지된 다른 적합한 용기일 수 있다. 이러한 용기는 플라스틱, 유리, 합판지, 금속 호일, 또는 약물 수용에 적합한 다른 재료로 만들어질 수 있다. 설명서는 일반적으로 신경병증성 통증 및/또는 근육 경직의 치료를 위한 조성물의 사용에 관한 정보를 포함할 것이다. 다른 실시형태에서, 설명서는 다음 중 적어도 하나를 포함한다: 조성물의 설명; 신경병증성 통증 및/또는 근육 경직 또는 이와 연관된 증상의 치료를 위한 용량 일정 및 투여; 주의; 경고; 적응증; 금기증; 과다복용 정보; 이상 반응; 동물 약리학; 임상 연구; 및/또는 참조. 설명서는 용기 (존재시) 상에 직접 인쇄될 수 있거나, 또는 용기에 적용되는 표지로서, 또는 용기 내에 또는 그와 함께 제공되는 개별 시트, 팜플렛, 카드 또는 폴더로서 인쇄될 수 있다.

[0121] 다른 양상에서, 신경병증성 통증을 치료하는 방법은 본 명세서에 기술된 하나 이상의 유전자의 국소 분절 상향 조절이 GABA 흡수 억제제, 예컨대 티아가빈을 사용한 전신 치료와 병용하여 수행되어서, GAD65/VGAT-과발현 척추 분절 및 연관 피부 분절에만 존재하도록 항-통과 효과를 강력화시키는 것인 병용 요법을 포함할 수 있다. 따라서, 치료 용법은 GABA 흡수 억제제의 전신 투여와 병용하여 GAD65 유전자 및 VGAT 유전자를 코딩하는 바이러스 백터를 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0122] 또한, 본 발명의 방법은 중금속 (예를 들어, 납, 비소 및 수은), 및 산업 용매를 포함한 독성 화합물을 비롯하여, 화학요법제 (예를 들어, 빈크리스틴 및 시스플라틴), 답손, HIV 약물 (예를 들어, 지도부딘, 디다노신, 스타부딘, 잘시타빈, 리토나비어, 및 암프레나비어), 콜레스테롤 저하제 (예를 들어, 로바스타틴, 인다파미드, 및 젬피브로질), 심장 또는 혈압 약물 (예를 들어, 아미오다론, 히드랄라진, 피렉실린), 및 메트로니다졸을 포함하는 약물에 노출로 인해 초래된 신경 손상, 예컨대 말초 신경병증의 치료에서 사용될 수 있다.

[0123] 본 발명의 방법은 또한 물리적, 기계적, 또는 화학적 외상으로 인해 초래된 신경계에 대한 손상을 치료하는데 사용될 수 있다. 따라서, 방법은 물리적 손상 (예를 들어, 화상, 창상, 수술, 및 사고와 연관), 허혈, 저온에 장기간 노출 (예를 들어, 동상)로 인해 초래된 말초 신경 손상을 비롯하여, 예를 들어, 졸충 또는 두개내 출혈 (예컨대 뇌출혈)로 인한 중추 신경계에 대한 손상을 치료하는데 사용될 수 있다. 유사하게, 본 발명의 방법은 이러한 외상으로 초래된 만성 통증/통각의 치료에서 사용될 수 있다.

[0124] 하기 실시예는 본 발명을 제한하려는 것이 아니라 예시하려는 것이다.

# [0125] 실시예 1

## [0126] 마우스 모델에서 백터 전달

[0127] 도 1A 및 1B는 표적화된 분절로 GAD65 (글루타메이트-디카르복실라제 65) 및 VGAT (소포 GABA 수송체)를 코딩하는 AAV9 (또는 Anc80) 백터의 예시적인 연막하 전달을 도시한다. 미경험 C57BL6 마우스는 기계적 이질통을 유도시키도록 좌골 신경 직경의 대략 1/3 내지 1/2에 단단한 봉합사를 배치시켰다 (편측 결찰). 신경 손상 후에 동물은 10일 동안 브러쉬-유발된 이질통 및 폰 프레이 (von Frey) 필라멘트를 사용한 촉각 통각수용 역치의 변화에 대해 시험되었다.

[0128] 좌골 신경 손상 유도 후 10일에 동물은 유비퀴틴 프로모터 (UBI) 하의 GAD65 및 VGAT 유전자를 코딩하는 AAV9의 편측 연막하 주사를 받았다. 2개 대조군을 실험하였다. 제1 대조군에서는 오직 PBS만이 좌골 신경 손상 동물의 L2-L3에서 연막하로 주사되었다. 다른 대조군 (미경험 미손상 동물)에서는 처치를 수행하지 않았다.

GFP를 코딩하는 AAV9를 사용한 미손상 동물의 개별군 (n=6)에서, 0.5  $\mu$ l의 AAV9의 연막하 편측 주사 ( $1.2 \times 10^{13}$  gc/mL; L2-L3 연막하 공간으로 주사)가 성체 마우스에서 편측 배각 뉴런을 선택적으로 감염시킨다는 것을 입증하였다 (도 1C). 따라서, 본 명세서에서 제공되는 데이터는 연막하 백터 전달 기법의 사용이 배각 뉴런에 제한적이고 백터 전달과 동측에서 표적화된 이식유전자 발현을 달성한다는 것을 입증한다.

- [0129] 좌골 신경 결찰 부위와 동측에서 일관적으로 높은 정도의 축삭 과민증은 축삭 철수 역치가 대략 1 g (손상전 기준점)에서 약 0.2 g으로 감소되었을 때 좌골 신경 결찰 이후 2일부터 좌골 신경-손상 동물에서 측정되었다. 대조군 PBS-주사된 좌골 신경-손상 동물에서는 축삭 과민증 변화가 보이지 않았고 모든 동물은 연막하 PBS 전달 후 최대 10주 동안 신경병증성 통증의 지속적인 징후 (즉, 축삭 및 브러쉬-유발 과민증)를 보였다 (도 2A 및 2B). 대조적으로, AAV9-UBI-GAD65/VGAT 또는 Anc80-UBI-GAD65/VGAT의 연막하 전달을 받은 동물에서, 축삭 및 브러쉬-유발 과민증의 점진적이고 완전한 ( $P < 0.05$ ) 역전이 확인되었고 10주 (즉, 실험 지속기간) 동안 지속되었다 (도 2A, 2B, 2E 및 2F). 이들 데이터는 AAV9-UBI-GAD65/VGAT의 편측 척추 전달이 장기간 지속되는 항-통각수용성 효과를 제공하는데 매우 강력하다는 것을 입증한다. 중요한 것은, 검출가능한 부작용, 예컨대 운동 약화 (전시 또는 척추강내 전달된 항-통각수용성 약물의 사용 후 주요 문제점)가 보이지 않았다는 것이다.
- [0130] 개방 시야 운동 수행능 (달린 거리) 및 동측 뒷발 배치 패턴 (캣워크 어세이)의 분석은 AAV9-UBI-GAD65/VGAT를 연막하로 처치한 동물에서 동측 발바닥 배치의 정상화 및 달린 거리의 유의한 증가가 확인되었다 (도 2C 및 2D).
- [0131] 도 3A-3E에 도시된 바와 같이, 성체 마우스에서 편측 (동측) (L2-L4) 연막하 AAV9-UBI-GAD65/VGAT 전달은 동측 배각 흥분성 개재뉴런에서 혼합 억제성-흥분성 신경전달물질 표현형의 유도를 야기시킨다. 그러나, VGLUT2, GAD65 및 VGAT 항체를 사용한 대측 배각 뉴런의 염색 결과 GAD65 또는 VGAT와 VGLUT2의 공동국재가 검출되지 않았다. 반면에 동일 항체에 의한 동측 배각 뉴런의 염색은 VGLUT2와 VGAT 및 VGLUT와 양쪽 GAD65의 분명한 공발현을 입증하였다 (도 3A-3D; 흰색 화살표). 유사하게, 정량적 밀도계 분석은 AAV9-UBI-GAD65/VGAT 벡터가 주사된 동측 배각에서 GAD65 및 VGAT 발현의 유의한 증가를 보여주었다 (도 3E). 대측 배각에서 증가된 발현이 측정되지 않았다.
- [0132] 전자 현미경과 결합된 VGLUT2, GAD65 및 VGAT 항체에 의한 사전-내포된 면역금 염색법은 AAV9-UBI-GAD65/VGAT-주사된 동물의 VGLUT2+ 말단부에서 GAD65 및 VGAT 면역금-태그화된 입자의 분명한 증가를 보여주었다 (도 4C 및 4D; PNI+GAD65+VGAT: Ipsi 이미지). VGLUT2와 GAD65 및 VGAT 입자의 공발현은 대조군 PBS-주사된 동물에서는 최소이거나 또는 전혀 보이지 않았다 (도 4A 및 4B; PNI+PBS: Ipsi 이미지). 형광 동소 혼성화법은 AAV9-UBI-GAD65/VGAT-주사된 동물에서 VGLUT2, GAD65 및 VGAT mRNA에 의한 이중 및 삼중-태그화된 뉴런의 분명한 출현을 보여주었다 (PNI: GAD65+VGAT; Ipsi 이미지) (도 4E-4J).
- [0133] 따라서, 흥분성 (VGLUT2) 뉴런/말단부에서 억제성 신경전달물질 기구 (즉, GAD65 및 VGAT)의 공발현은 동물 모델에서 개선된 운동 수행능과 측정된 항-통각수용 효과를 야기시킨다. 더 나아가서, 이중 흥분성-억제성 신경전달물질 표현형의 유도는 말초 통각수용성 구심 신경의 활성화 이후에 우선적인 억제 효과를 야기시킨다.
- [0134] **실시예 2**
- [0135] **돼지 모델에서 벡터 전달**
- [0136] 이 실시예에서, 성체 돼지 모델을 사용하여 벡터의 연막하 전달이 성체 인간의 것과 유사한 척수 치수를 갖는 동물종에서 충분히 표적화된 이식유전자 발현을 달성한다는 것을 입증하였다. 성체 돼지 (유카탄 돼지, 15-25 kg;  $n=3$ )는 편측 연막하 (L2-L3) Anc80-UBI-Rp122-3xHA 벡터 전달 ( $100 \mu\text{L}$ ;  $1.2 \times 10^{13}$  gc/mL)을 받았다. 벡터 주사 이후에, 동물은 48시간 동안 생존하였고, 그 다음에 4% 파라포름알데히드로 관류-고정시켰다. 그 다음으로, 횡절단 척수 절편을 준비하였고, 항-HA 항체로 염색하였다. 염색된 절편은 공초점 현미경으로 분석하였다. 도 5A-5D에 도시된 바와 같이, 벡터 주사 측면과 동측으로 배각 뉴런-특이적 Rp122 단백질 발현이 관찰되었다.
- [0137] 상이한 군의 성체 돼지 (괴팅겐 - 미네소타; 35-45 kg;  $n=3$ )는 마우스 모델에서 관찰된 것과 유사하게, 감염된 뉴런에서 혼합 흥분성-억제성 뉴런 표현형의 유도를 입증하기 위해 편측 연막하 (L2-L3) Anc80-UBI-GAD65/VGAT ( $100 \mu\text{L}$ ;  $1.2 \times 10^{13}$  gc/mL)를 받았다. 벡터 주사 이후에, 동물은 8주 동안 생존하였고 정기적으로 개방 시야 운동 수행능에 대해 평가되었다. 어떠한 동물에서도 검출가능한 운동 약화가 관찰되지 않았다. 8주 후에, 동물은 4% 파라포름알데히드로 관류-고정시켰고 횡절단 척수 절편을 L1-L4 분절로부터 준비하였다. 절편은 항-VGLUT2, GAD65 및 VGAT 항체로 염색하고 공초점 현미경으로 분석하였다.
- [0138] 도 6A-6D에 도시된 바와 같이, VGLUT2, GAD65 및 VGAT 항체에 의한 동측 배각 뉴런의 염색은 VGLUT2와 VGAT 및 GAD65의 분명한 공발현을 보여주었다. 따라서, 연막하 공간으로 전달되는 벡터의 부피를 조작성으로써, 성



인 인간 척수와 유사한 척수를 갖는 척수에서 표적화된 이식유전자의 비슷한 다분절 발현이 달성되었다.

### [0139] 실시예 3

#### [0140] 만성 근육 경직의 래트 모델에서 벡터 전달

[0141] 만성 근육 경직의 래트 모델 (즉, 척추 횡절단-유도된 근육 경직이 존재하는 래트)에서, 벡터 요법이 AAV9-UBI-GAD65/VGAT의 연막하 전달 이후에 항-경직 효과를 입증하기 위해 제공되었다. 도 8A 및 8B에 도시된 바와 같이, 대조군 벡터 (AAV9-GFP)를 받은 동물에서 근육 경직의 측정은 (척추 횡절단 이후 2-3개월에 측정된 기준 점과 비교하여) 바이러스 전달 이후 8주 동안 근육 경직의 점진적인 증가를 보여주었다. 대조적으로 AAV9-UBI-GAD65/VGAT 벡터를 받은 동물에서는 경직 반응의 거의 완전한 차단이 측정되었다. H-반사의 속도-의존적 억압 (RDD)의 측정은 AAV9-UBI-GAD65/VGAT 벡터로 처리된 동물에서 RDD의 유의한 회복을 보여주었다 (도 8C 및 8D).

[0142] 만성 근육 경직의 성체 래트 모델에서 양측 (L2-L4) 연막하 AAV9-UBI-GAD65/VGAT 전달은 요추 흥분성 개재뉴런에서 혼합 억제성-흥분성 신경전달물질 표현형을 유도하였다. 도 9C 및 9D에 도시된 바와 같이, VGLUT2 말단부에서 GAD65 및 VGAT의 공발현으로 입증되듯이, 척추 개재뉴런에서 혼합 신경전달물질 표현형이 관찰되었다. 그러나, 대조군 AAV9-UBI-GFP 벡터를 받은 동물에서는 VGLUT2 말단부에서 GAD65 및 VGAT의 공발현이 보이지 않았다 (도 9A 및 9B).

[0143] 대조군 벡터-주사된 동물과 비교하여 회백질에서 GAD65 및 VGAT를 공발현하는 VGLUT1 및 VGLUT2 말단부의 수 및 GAD65, VGAT 발현의 매우 유의한 ( $p<0.01$ ) 증가가 AAV9-UBI-GAD65/VGAT 벡터의 요추 연막하 주사를 받은 경직 래트에서 측정되었다 (표 2). 따라서, AAV9-UBI-GAD65/VGAT 벡터의 척추 연막하 전달은 충분히 확립된 척추 횡절단-유도 뒷다리 경직의 래트 모델에서 만성 근육 경직의 억제에 매우 효과적이다. 따라서, 측정된 항-경직 효과의 기전은 척추 흥분성 개재뉴런에서 혼합 흥분성-억제성 신경전달물질 표현형의 유도 및 달리 악화된 경직 EMG 반응의 결과적인 억제를 기반으로 한다.

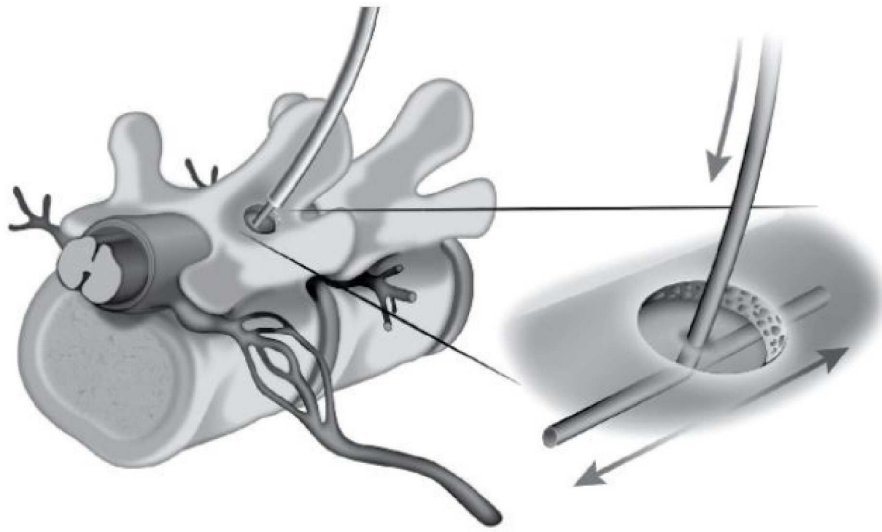
[0144] 표 2: GAD65 및 VGAT 발현의 정량 분석

요추 연막하 AAV9 전달	GAD65	VGAT	VGLUT1 + GAD65	VGLUT1 + VGAT	VGLUT2+ GAD65	VGLUT2+ VGAT
실험군	정규화된 신호% (통합 밀도)		공발현 반점 (* $P<0.01$ )			
AAV9-GAD65/VGAT (n=4; 6개 절편/동물)	208±19*	166±25*	14±8*	9±3.4*	245±97*	331±67*
AAV9-GFP (n=4; 6개 절편/동물)	100±7	100±15	2±1	2±0.9	1±0.7	5±1

[0145] 본 발명을 상기 실시예를 참조하여 설명하였지만, 본 발명의 사조 및 범주 내에 변형 및 변이가 포괄된다는 것을 이해해야 한다. 따라서, 본 발명은 하기 청구항에 의해서만 제한된다.

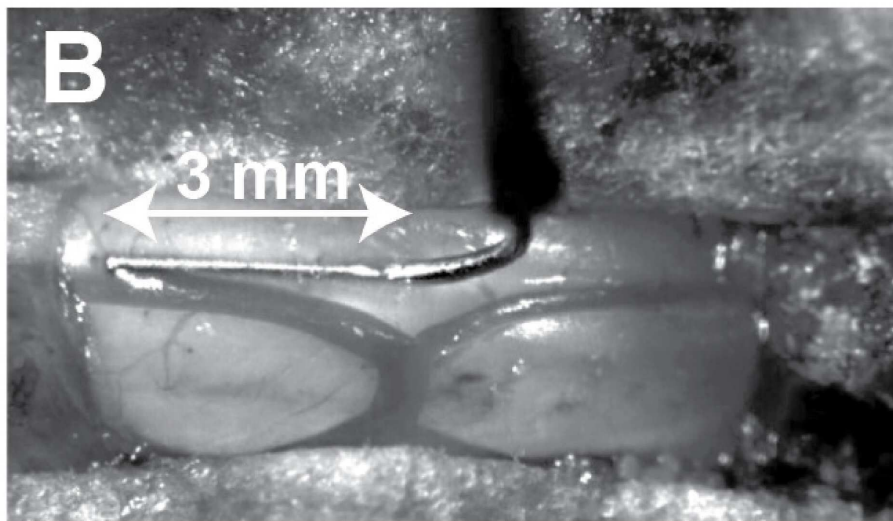
도면

도면1a



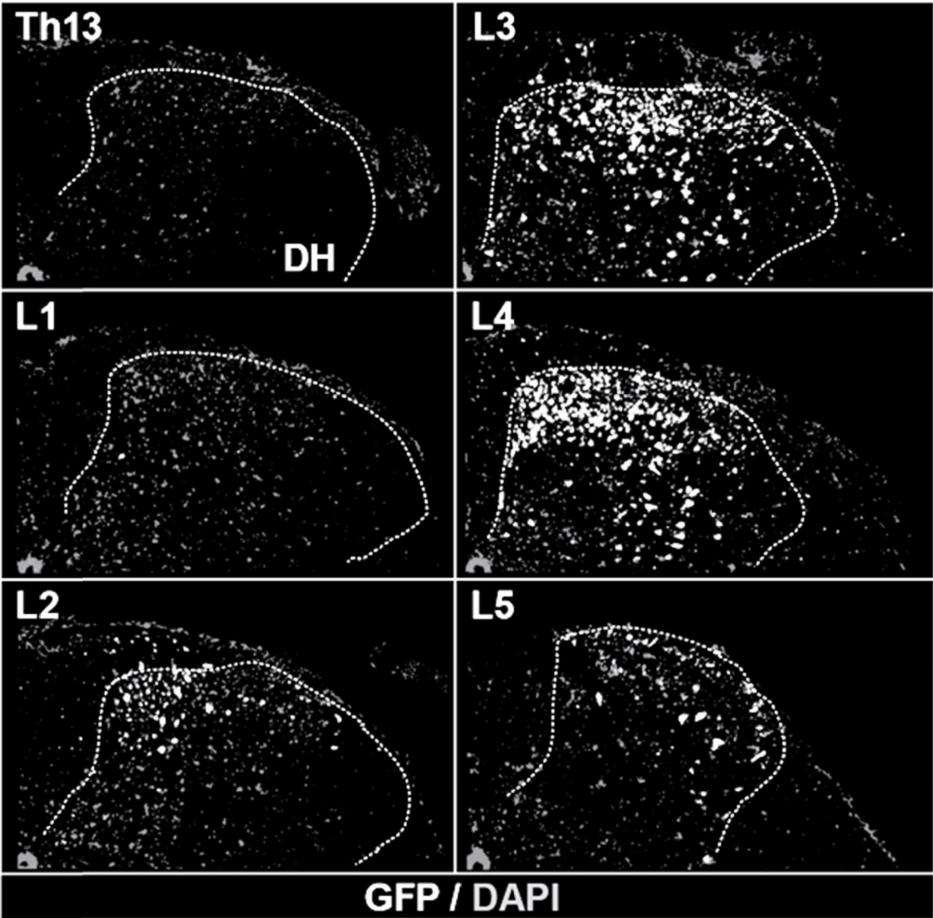
도 1A

도면1b



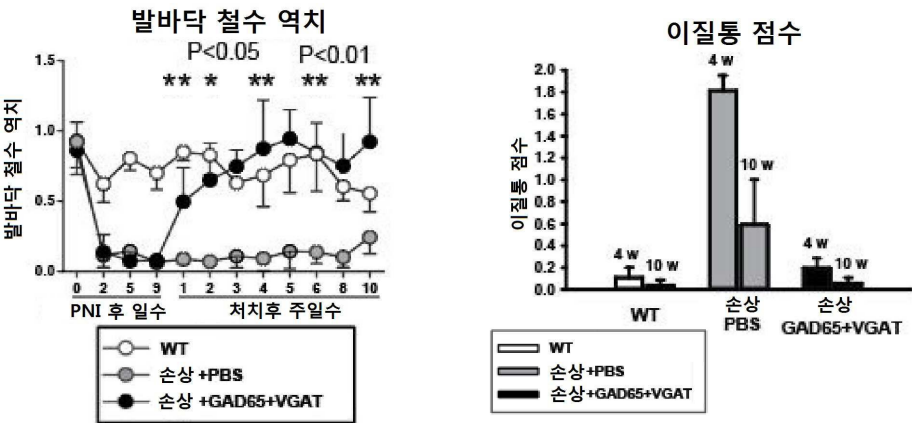
도 1B

도면1c



도 1C

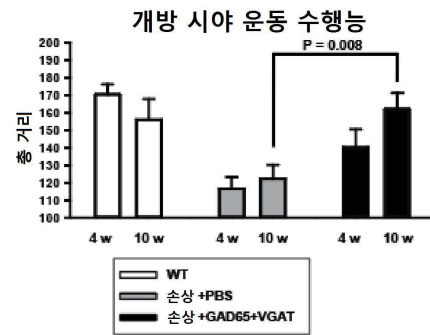
도면2i



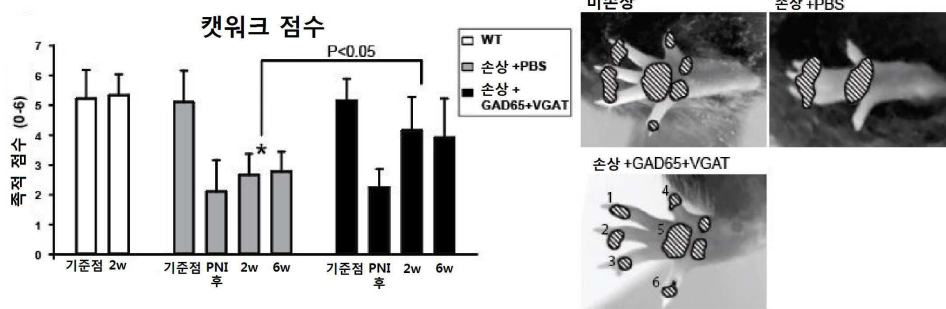
도 2A

도 2B

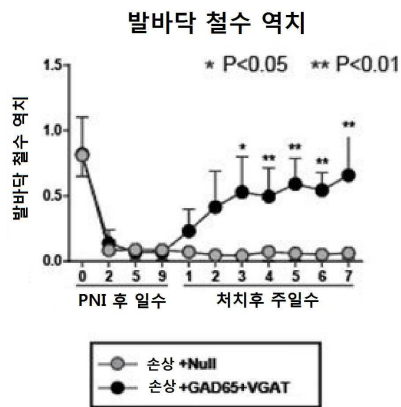
도면2ii



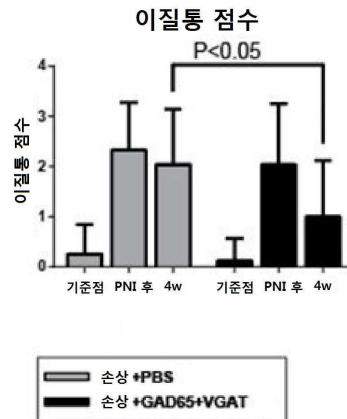
도 2C



도 2D



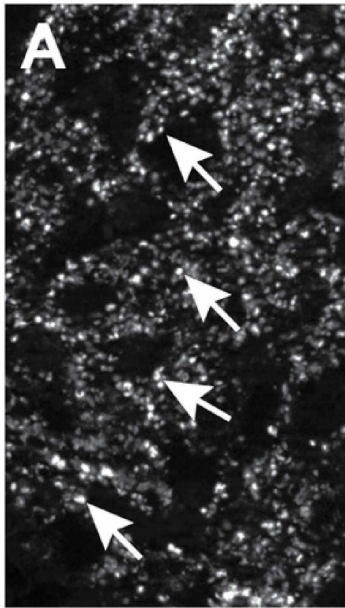
도 2E



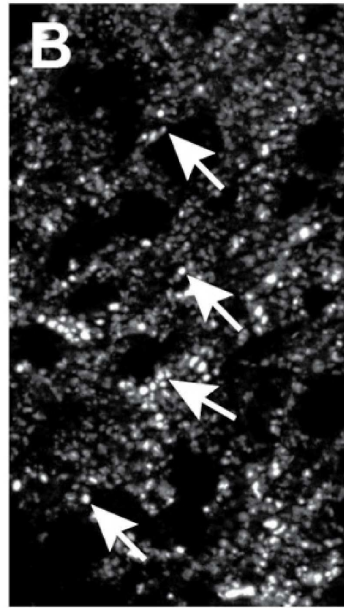
도 2F



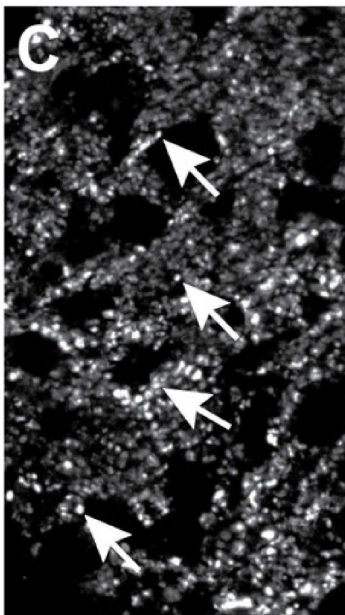
도면3i



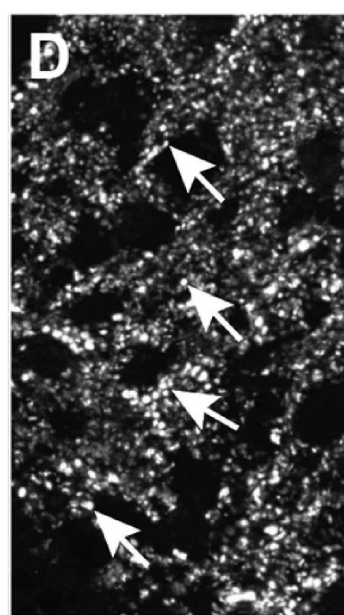
도 3A



도 3B

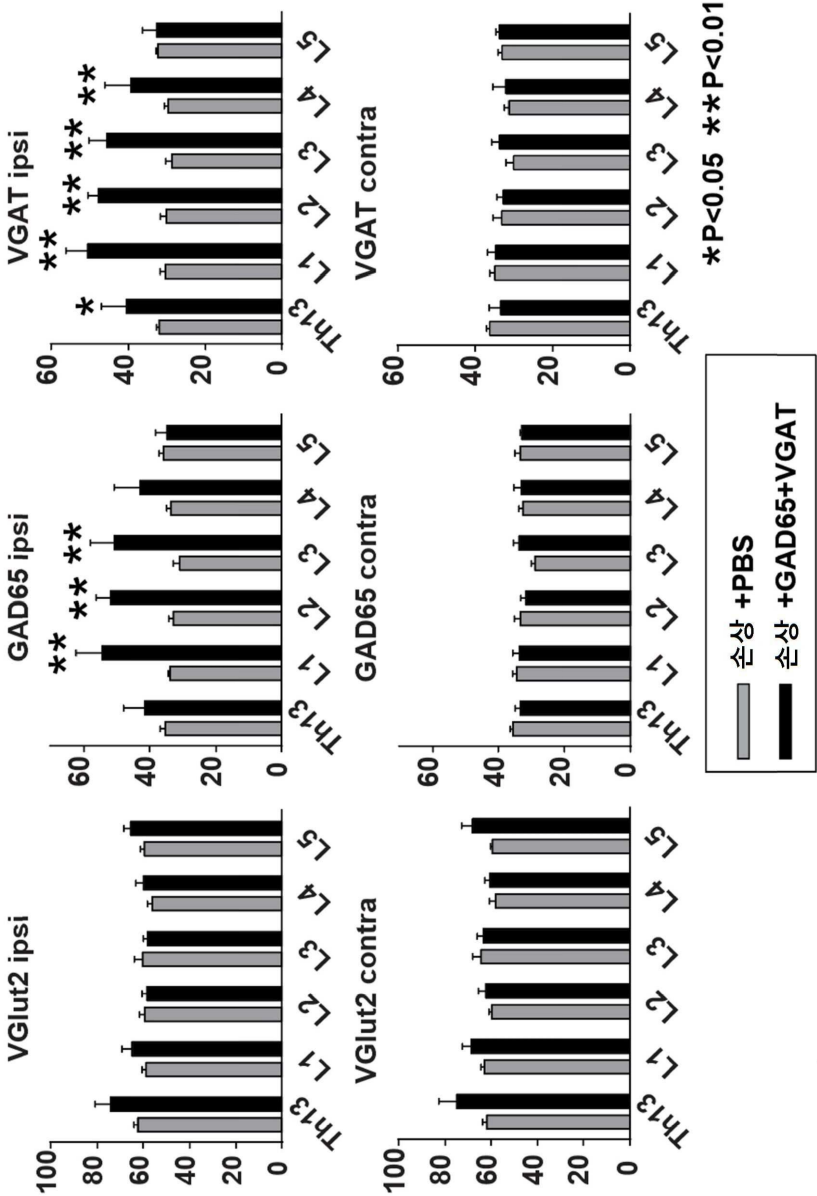


도 3C



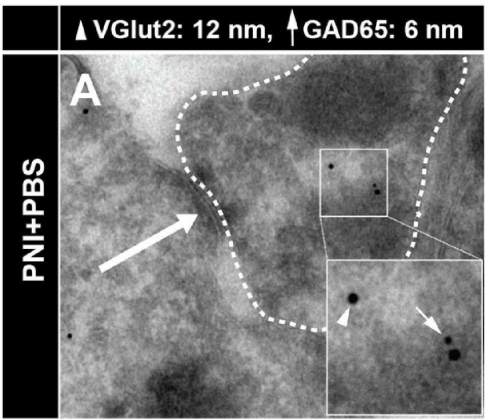
도 3D

도면3ii

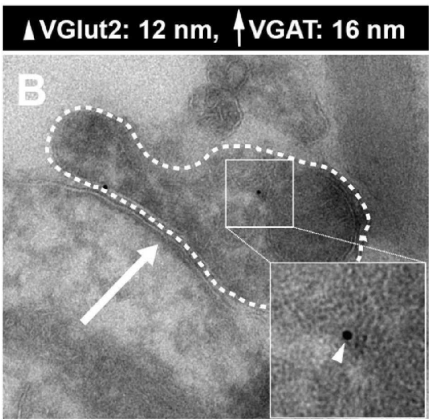


도 3E

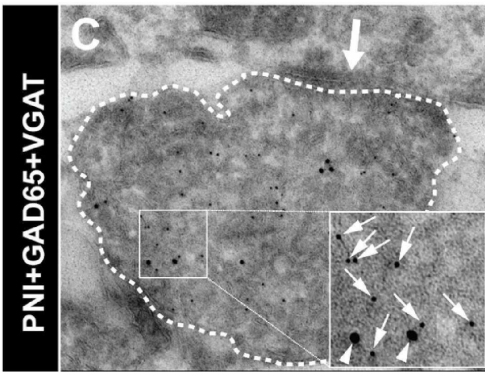
도면4i



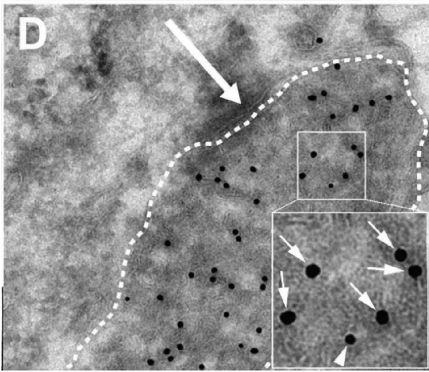
도 4A



도 4B



도 4C



도 4D

도면4ii

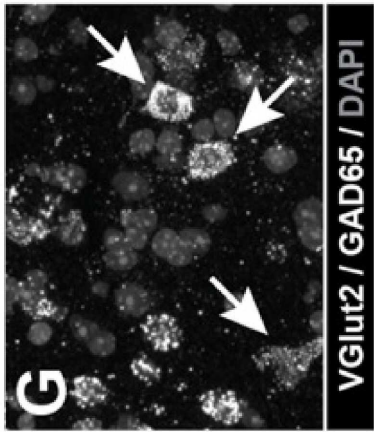


FIG. 4G

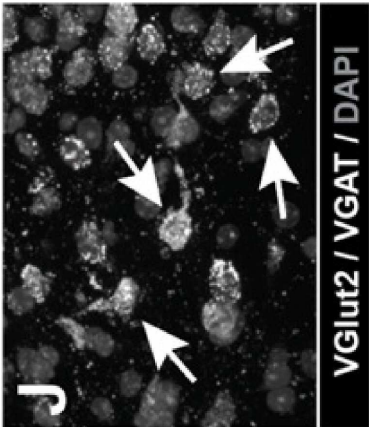


FIG. 4J

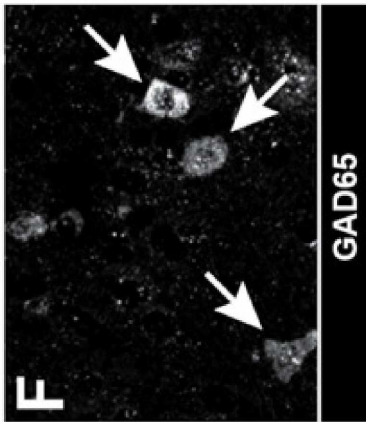


FIG. 4F

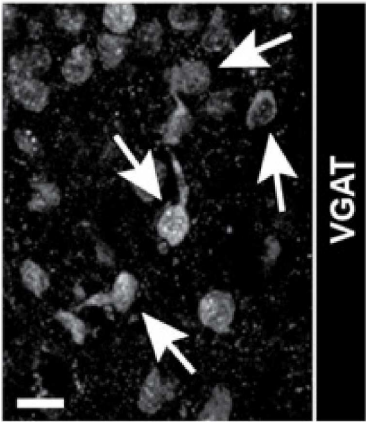


FIG. 4I

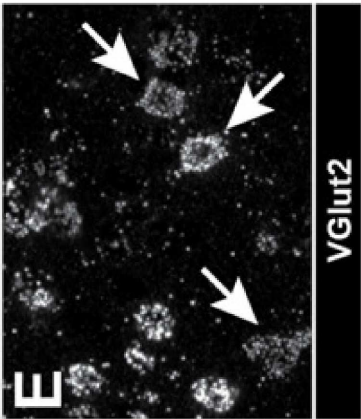


FIG. 4E

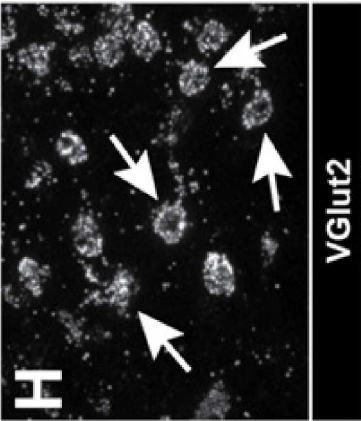
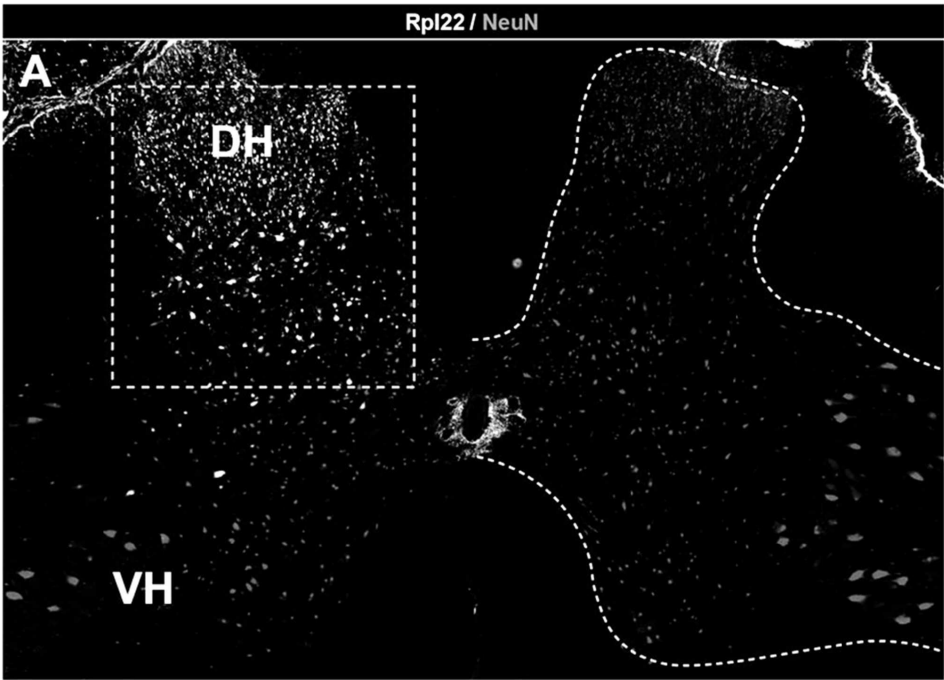
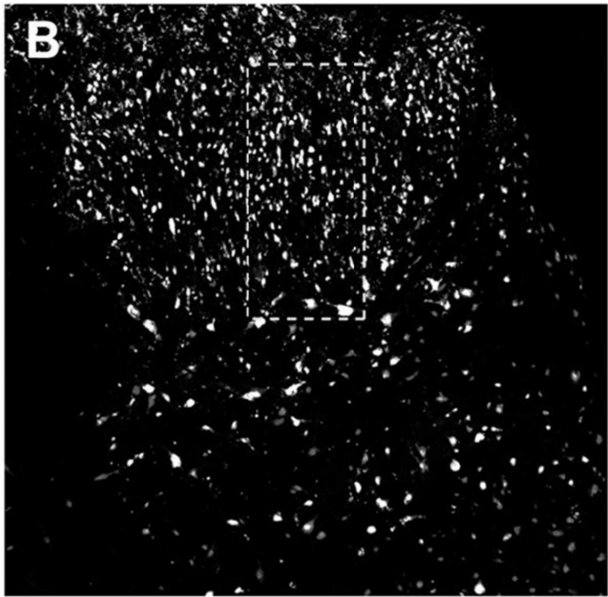


FIG. 4H

도면5i



도 5A



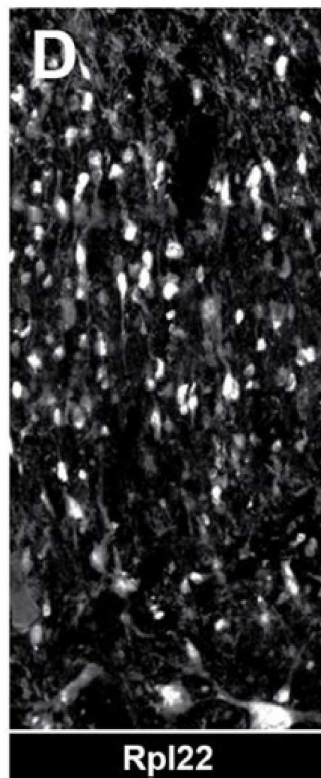
도 5B



도면5ii

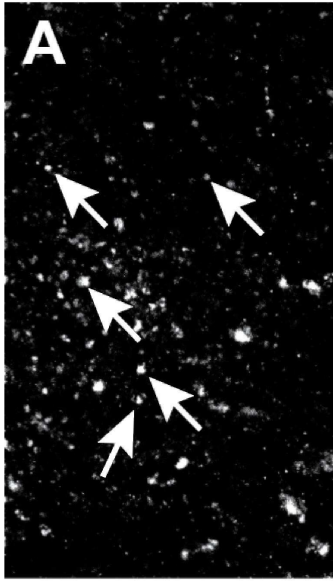


도 5C

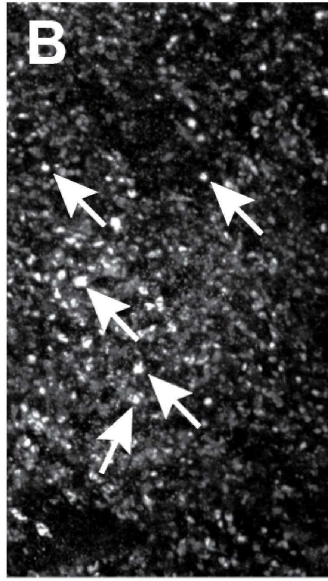


도 5D

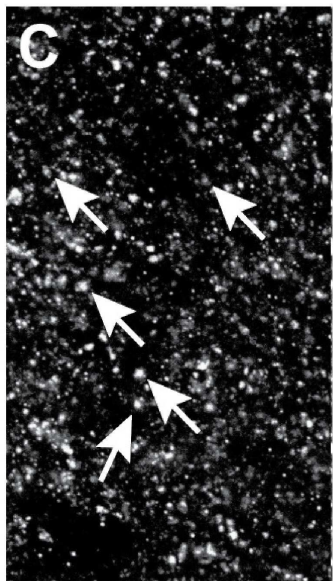
도면6



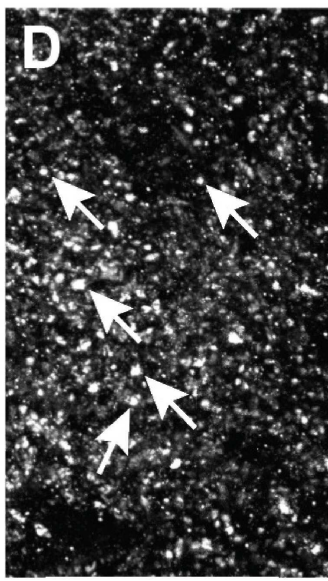
도 6A



도 6B

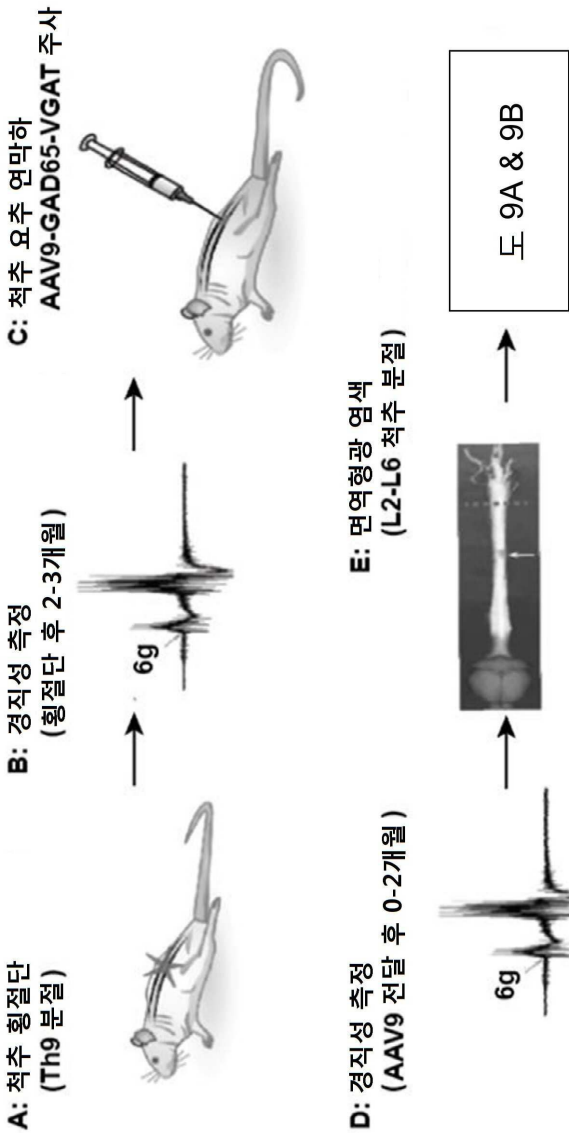


도 6C



도 6D

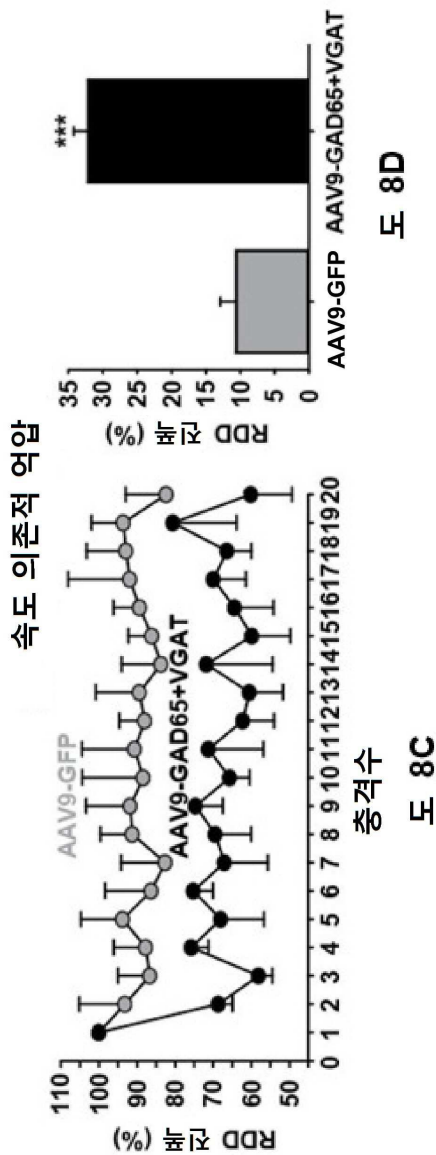
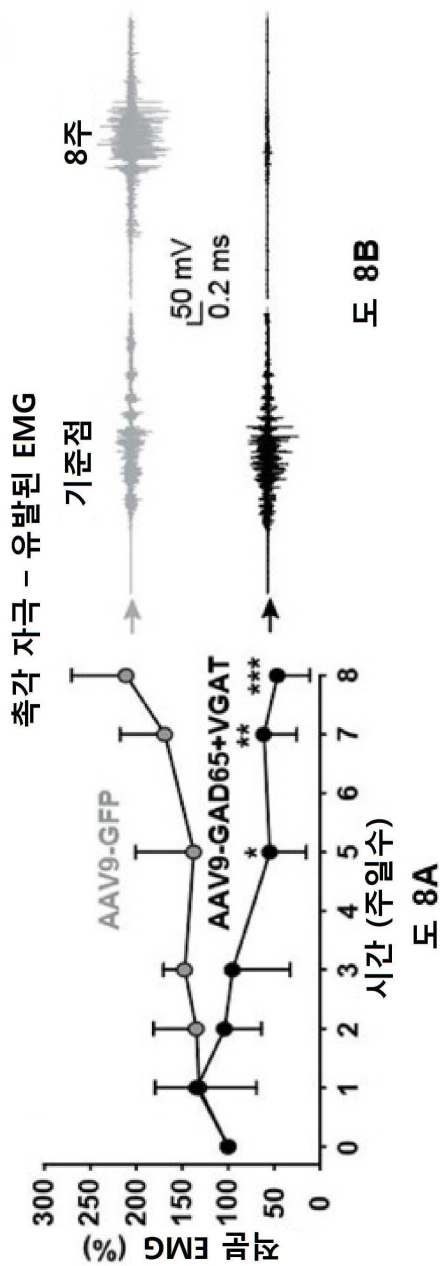
도면7



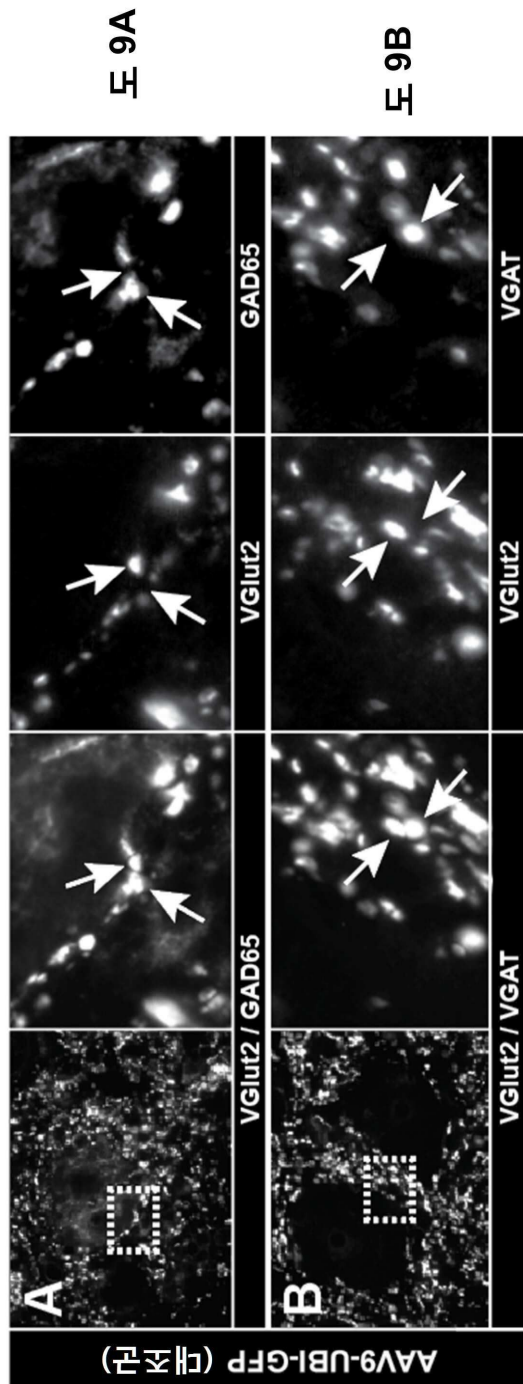
도 7



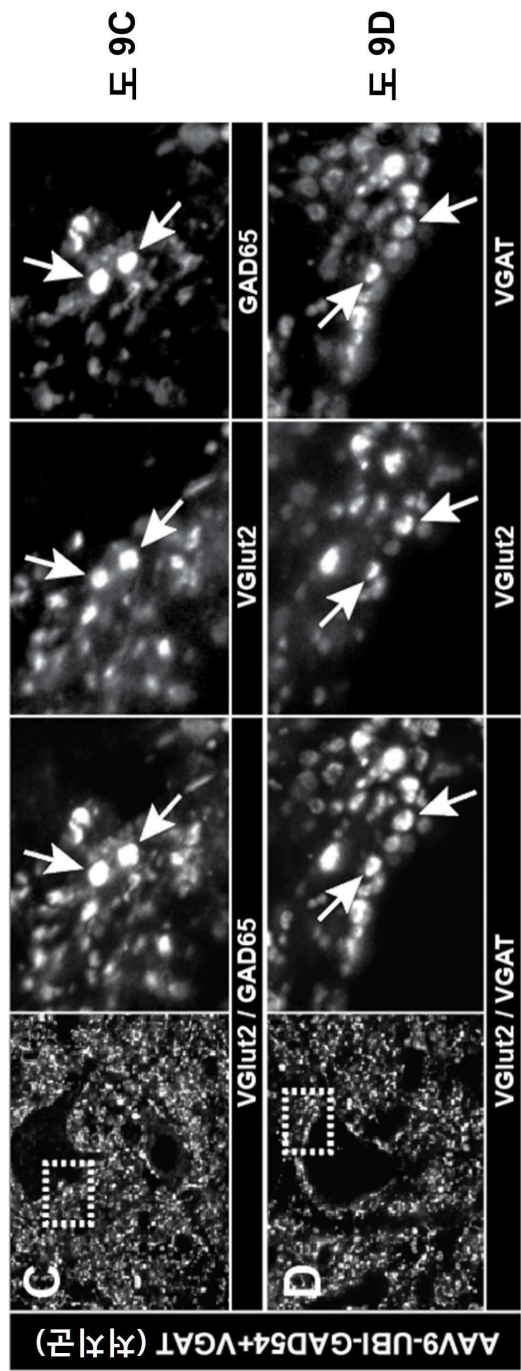
도면8



도면9i



도면9ii



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> The Regents of the University of California
- <120> METHOD AND COMPOSITION FOR TREATING NEUROPATHIC PAIN
- <130> 20378-201844
- <150> 62/556,088
- <151> 2017-09-08

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ser Pro Gly Ser Gly Phe Trp Ser Phe Gly Ser Glu Asp Gly

1 5 10 15

Ser Gly Asp Ser Glu Asn Pro Gly Thr Ala Arg Ala Trp Cys Gln Val

20 25 30

Ala Gln Lys Phe Thr Gly Gly Ile Gly Asn Lys Leu Cys Ala Leu Leu

35 40 45

Tyr Gly Asp Ala Glu Lys Pro Ala Glu Ser Gly Gly Ser Gln Pro Pro

50 55 60

Arg Ala Ala Ala Arg Lys Ala Ala Cys Ala Cys Asp Gln Lys Pro Cys

65 70 75 80

Ser Cys Ser Lys Val Asp Val Asn Tyr Ala Phe Leu His Ala Thr Asp

85 90 95

Leu Leu Pro Ala Cys Asp Gly Glu Arg Pro Thr Leu Ala Phe Leu Gln

100 105 110

Asp Val Met Asn Ile Leu Leu Gln Tyr Val Val Lys Ser Phe Asp Arg

115 120 125

Ser Thr Lys Val Ile Asp Phe His Tyr Pro Asn Glu Leu Leu Gln Glu

130 135 140

Tyr Asn Trp Glu Leu Ala Asp Gln Pro Gln Asn Leu Glu Glu Ile Leu

145 150 155 160

Met His Cys Gln Thr Thr Leu Lys Tyr Ala Ile Lys Thr Gly His Pro

165 170 175

Arg Tyr Phe Asn Gln Leu Ser Thr Gly Leu Asp Met Val Gly Leu Ala

180 185 190

Ala Asp Trp Leu Thr Ser Thr Ala Asn Thr Asn Met Phe Thr Tyr Glu



195 200 205  
Ile Ala Pro Val Phe Val Leu Leu Glu Tyr Val Thr Leu Lys Lys Met

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

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

340 345 350  
Ile Cys Lys Lys Tyr Lys Ile Trp Met His Val Asp Ala Ala Trp Gly  
355 360 365  
Gly Gly Leu Leu Met Ser Arg Lys His Lys Trp Lys Leu Ser Gly Val  
370 375 380  
Glu Arg Ala Asn Ser Val Thr Trp Asn Pro His Lys Met Met Gly Val  
385 390 395 400  
Pro Leu Gln Cys Ser Ala Leu Leu Val Arg Glu Glu Gly Leu Met Gln

405 410 415  
Asn Cys Asn Gln Met His Ala Ser Tyr Leu Phe Gln Gln Asp Lys His  
420 425 430  
Tyr Asp Leu Ser Tyr Asp Thr Gly Asp Lys Ala Leu Gln Cys Gly Arg  
435 440 445

His Val Asp Val Phe Lys Leu Trp Leu Met Trp Arg Ala Lys Gly Thr

450 455 460

Thr Gly Phe Glu Ala His Val Asp Lys Cys Leu Glu Leu Ala Glu Tyr

465 470 475 480

Leu Tyr Asn Ile Ile Lys Asn Arg Glu Gly Tyr Glu Met Val Phe Asp

485 490 495

Gly Lys Pro Gln His Thr Asn Val Cys Phe Trp Tyr Ile Pro Pro Ser

500 505 510

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

515 520 525

Val Ala Pro Val Ile Lys Ala Arg Met Met Glu Tyr Gly Thr Thr Met

530 535 540

Val Ser Tyr Gln Pro Leu Gly Asp Lys Val Asn Phe Phe Arg Met Val

545 550 555 560

Ile Ser Asn Pro Ala Ala Thr His Gln Asp Ile Asp Phe Leu Ile Glu

565 570 575

Glu Ile Glu Arg Leu Gly Gln Asp Leu

580 585

<210> 2

<211> 1803

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgtccccta tacatcacca tcaccatcac ctggttccgc gtggatccga agcttcgaat 60

tctggctttt ggtctttcgg gtcggaagat ggctctgggg attccgagaa tcccggcaca 120

gcgcgagcct ggtgccaaagt ggctcagaag ttcacgggcg gcatcggaaa caaactgtgc 180

gccctgctct acggagacgc cgagaagccg gcggagagcg gcgggagcca acccccgcgg 240

gccgcgcgcc ggaaggccgc ctgcgcctgc gaccagaagc cctgcagctg ctccaaagtg 300

gatgtcaact acgcgtttct ccatgcaaca gacctgtgc cggcgtgtga tggagaaagg 360

cccactttgg cgtttttgcga agatgttatg aacattttac ttcagtatgt ggtgaaaagt 420

ttcgaatagat caaccaaagt gattgatttc cattatccta atgagcttct ccaagaatat 480

aattgggaat tggcagacca accacaaaat ttggaggaaa ttttgatgca ttgccaacaa 540  
 actctaaaat atgcaattaa aacagggcat cctagatact tcaatcaact ttctactggt 600  
 ttggatatgg ttggattagc agcagactgg ctgacatcaa cagcaaatac taacatgttc 660  
 acctatgaaa ttgtccagat atttgtgctt ttggaatatg tcacactaaa gaaaatgaga 720  
 gaaatcattg gctggccagg gggctctggc gatgggatat tttctcccgg tggcgccata 780  
 tctaacatgt atgcatgat gatcgacgc ttaaatgt tcccagaagt caaggagaaa 840  
 ggaatggctg ctcttcccag gctcattgcc ttacgtctg aacatagtca tttttctctc 900

aagaaggag ctgcagcctt agggattgga acagacagcg tgattctgat taaatgtgat 960  
 gagagaggga aaatgattcc atctgatctt gaaagaagga ttcttgaagc caaacagaaa 1020  
 gggtttggtc ctctcctgt gaggccaca gctggaacca ccgtgtacgg agcatttgac 1080  
 cccctcttag ctgtcgtga catttgcaaa aagtataaga tctggatgca tgtggatgca 1140  
 gcttggggtg ggggattact gatgtcccga aacacaaagt ggaaactgag tggcgtggag 1200  
 agggccaact ctgtgacgtg gaatccacac aagatgatgg gaggccctt gcagtgtctt 1260  
 gctctcctgg ttagagaaga gggattgatg cagaattgca accaaatgca tgcctcctac 1320

ctctttcagc aagataaaca ttatgacctg tcctatgaca ctggagacaa ggccttacag 1380  
 tgcggacgcc acgttgatgt ttttaacta tggtgatgt ggagggcaaa ggggactacc 1440  
 gggtttgaag cgcatgttga taaatgtttg gatttggcag agtatattata caacatcata 1500  
 aaaaaccgag aaggatatga gatggtgttt gatggaagc ctgagcacac aatgtctgc 1560  
 ttctgttaca ttctccaag ctgctgact ctggaagaca atgaagagag aatgagtcgc 1620  
 ctctcgaagg tggctccagt gattaaagcc agaattgatg agtatggaac cacaatggtc 1680  
 agctaccaac cttgggaga caaggtcaat ttcttccgca tggatcatctc aaaccagcg 1740

gcaactcacc aagacattga ctctctgatt gaagaaatag aacgccttgg acaagattta 1800  
 taa 1803

<210> 3

<211> 525

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Thr Leu Leu Arg Ser Lys Leu Ser Asn Val Ala Thr Ser Val

1 5 10 15

Ser Asn Lys Ser Gln Ala Lys Met Ser Gly Met Phe Ala Arg Met Gly

20 25 30

Phe Gln Ala Ala Thr Asp Glu Glu Ala Val Gly Phe Ala His Cys Asp

35

40

45

Asp Leu Asp Phe Glu His Arg Gln Gly Leu Gln Met Asp Ile Leu Lys

50

55

60

Ala Glu Gly Glu Pro Cys Gly Asp Glu Gly Ala Glu Ala Pro Val Glu

65

70

75

80

Gly Asp Ile His Tyr Gln Arg Gly Ser Gly Ala Pro Leu Pro Pro Ser

85

90

95

Gly Ser Lys Asp Gln Val Gly Gly Gly Gly Glu Phe Gly Gly His Asp

100

105

110

Lys Pro Lys Ile Thr Ala Trp Glu Ala Gly Trp Asn Val Thr Asn Ala

115

120

125

Ile Gln Gly Met Phe Val Leu Gly Leu Pro Tyr Ala Ile Leu His Gly

130

135

140

Gly Tyr Leu Gly Leu Phe Leu Ile Ile Phe Ala Ala Val Val Cys Cys

145

150

155

160

Tyr Thr Gly Lys Ile Leu Ile Ala Cys Leu Tyr Glu Glu Asn Glu Asp

165

170

175

Gly Glu Val Val Arg Val Arg Asp Ser Tyr Val Ala Ile Ala Asn Ala

180

185

190

Cys Cys Ala Pro Arg Phe Pro Thr Leu Gly Gly Arg Val Val Asn Val

195

200

205

Ala Gln Ile Ile Glu Leu Val Met Thr Cys Ile Leu Tyr Val Val Val

210

215

220

Ser Gly Asn Leu Met Tyr Asn Ser Phe Pro Gly Leu Pro Val Ser Gln

225

230

235

240

Lys Ser Trp Ser Ile Ile Ala Thr Ala Val Leu Leu Pro Cys Ala Phe

245

250

255

Leu Lys Asn Leu Lys Ala Val Ser Lys Phe Ser Leu Leu Cys Thr Leu

260

265

270

Ala His Phe Val Ile Asn Ile Leu Val Ile Ala Tyr Cys Leu Ser Arg



275                      280                      285  
Ala Arg Asp Trp Ala Trp Glu Lys Val Lys Phe Tyr Ile Asp Val Lys

290                      295                      300  
Lys Phe Pro Ile Ser Ile Gly Ile Ile Val Phe Ser Tyr Thr Ser Gln  
305                      310                      315                      320  
Ile Phe Leu Pro Ser Leu Glu Gly Asn Met Gln Gln Pro Ser Glu Phe  
325                      330                      335  
His Cys Met Met Asn Trp Thr His Ile Ala Ala Cys Val Leu Lys Gly  
340                      345                      350  
Leu Phe Ala Leu Val Ala Tyr Leu Thr Trp Ala Asp Glu Thr Lys Glu

355                      360                      365  
Val Ile Thr Asp Asn Leu Pro Gly Ser Ile Arg Ala Val Val Asn Ile  
370                      375                      380  
Phe Leu Val Ala Lys Ala Leu Leu Ser Tyr Pro Leu Pro Phe Phe Ala  
385                      390                      395                      400  
Ala Val Glu Val Leu Glu Lys Ser Leu Phe Gln Glu Gly Ser Arg Ala  
405                      410                      415  
Phe Phe Pro Ala Cys Tyr Ser Gly Asp Gly Arg Leu Lys Ser Trp Gly

420                      425                      430  
Leu Thr Leu Arg Cys Ala Leu Val Val Phe Thr Leu Leu Met Ala Ile  
435                      440                      445  
Tyr Val Pro His Phe Ala Leu Leu Met Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr  
450                      455                      460  
Gly Ala Gly Leu Cys Phe Leu Leu Pro Ser Leu Phe His Leu Arg Leu  
465                      470                      475                      480  
Leu Trp Arg Lys Leu Leu Trp His Gln Val Phe Phe Asp Val Ala Ile

485                      490                      495  
Phe Val Ile Gly Gly Ile Cys Ser Val Ser Gly Phe Val His Ser Leu  
500                      505                      510  
Glu Gly Leu Ile Glu Ala Tyr Arg Thr Asn Ala Glu Asp  
515                      520                      525

<210> 4

<211> 2581

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

gctcgcgcc cgcggcagct ccgcagtga ctagccacca ccgccgccgc gcccgctccg      60
ccagacctgc tgccagcttg cccggtccag ccctgagaga gcctcgaacg ccagctgcga      120

gggtcatgag ccagagagcc ccggggcgcc gcgcggagag caagcggaga tagcgacttt      180
gcgcccccca gccctcgctt tcttgcctcg cgttccccgc atcctcgggt ccttctgtcc      240
tttccgtgtt cccaccgcc gccatggcca ccttgctccg cagcaagctg tccaactggg      300
ccacgtccgt gtccaacaag tcccaggcca agatgagcgg catgttcgcc aggatgggtt      360
ttcaggcggc cacgcatgag gaggcggtgg gcttcgcgca ttgcgacgac ctcgactttg      420
agcaccgcca gggcctgcag atggacatcc tgaaagccga gggagagccc tgcggggacg      480
agggcgctga agcgcctgcg gagggagaca tccattatca gcgaggcagc ggagctcttc      540

tgccgccctc cggtccaag gaccaggtgg gaggtggtgg cgaattcggg ggccacgaca      600
agcccaaaat cacggcgtgg gaggcaggct ggaacgtgac caacgccatc caggcatgt      660
tcgtgctggg cctaccctac gccatcctgc acggcggtta cctggggttg tttctcatca      720
tcttcgccgc cgttgtgtgc tgctacaccg gcaagatcct catcgcgtgc ctgtacgagg      780
agaatgaaga cggcgaggtg gtgcgcgtgc gggactcgta cgtggccata gccaacgcct      840
gtcgcgcccc gcgcttccca acgctgggcg gccgagtggg gaacgtagcg cagatcatcg      900
agctggtgat gacgtgcatc ctgtacgtgg tggtagtgg caacctcatg tacaacagct      960

tccccgggct gccctgtcgc cagaagtcc tggccattat cgccacggcc gtgctgctgc      1020
cttgccctt ccttaagaac ctcaaggccg tgtccaagtt cagtctgctg tgcactctgg      1080
cccacttcgt catcaatata ctggcatag cctactgtct atcgcgggcg cgcgactggg      1140
cctgggagaa ggtcaagttc tacatcgacg tcaagaagtt ccccatctcc attggcatca      1200
tcgtgttcag ctacacgtct cagatcttcc tgccttcgct ggagggcaat atgcagcagc      1260
ccagcgagtt ccaactgcat atgaactgga cgcacatcgc agcctgcgtg ctcaagggcc      1320
tcttcgcgtc cgtcgcttac ctacactggg ccgacgagac caaggaggtc atcacggata      1380

acctgcccgg ctccatccgc gccgtggtca acatctttct ggtggccaag gcgctgttgt      1440
cctatcctct gccattcttt gccgtgtcgc aggtgctgga gaagtcgctc ttccaggaag      1500
gcagccgcgc ctttttcccg gcctgctaca gcggcgacgg gcgcctgaag tcctgggggc      1560

```

tgacgtgctg ctgcgcgtc gtcgtcttca cgtgctcat ggccatttat gtgccgcact	1620
tcgcgtgct catgggcctc accggcagcc tcacgggcgc cggcctctgt ttcttgctgc	1680
ccagcctctt tcacctgcgc ctgctctggc gcaagctgct gtggcaccaa gtcttcttcg	1740
acgtcgccat ctctgtcatc ggcgcatct gcagcgtgtc cggcttcgtg cactccctcg	1800
aggcctcat cgaagcctac cgaaccaacg cggaggacta gggcgcaagg gcgagcccc	1860
gccgcgttc tgcgtctct ccttctccc ctcacccgc cccaccagc ccagtgcgc	1920
ctgccccgc gcttgggagg ccaagcttta aacatctctg gttcctagt tctgattatt	1980
cgggatggg ggggatgga ggggacagg attcacgac catcgctct gcgtttctgt	2040
tgctcttct tttccacaac accctgggtt tggggggagg cgggtgcat ttgcgggcag	2100
ggttctctgt cctccaagt ggggccccga cactttggt ccagtcacg agggggttg	2160
gaaggaggg agagggggcg cagctgcag gcgtggcaac ttgaccttg gggaatattt	2220
cacatccatc cagagctcgg aatctacag gtccagccat ttccagcaag agcgcttccc	2280
attccggaga cgtttcaacc ctgcagcggg aaaggctgac tgggaaatcc attttgggtg	2340
ggcaatttcc ttcaacgaag ccggaaggcg agaagccgc gcggggccag ctgcctgcc	2400
ggttttcagg aatctaaact ctcatctgt gcaatttacc aggtgtgga ctgttctact	2460
gtgcgtgtg tgtgctctg gtgaataaga tgaatgtat atcagaaaa aatctatctc	2520
taatttagag tgcggtacat aattatatcc gcaataaag aagagacaaa ggctaaaaaa	2580
a	2581

<210> 5

<211> 1966

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 5

gggcgtgcgg ggtcagaccg aagcagcttg cccgcagcca ctcggaggcg accagcgcca	60
gactagcaga acccatggca tctcgggct ctggcttttg gtccttcgga tctgaagatg	120
gctctgggga tctgagaac ccgggaacag cgagagcctg gtgccagggtg gcccaaaagt	180
tcacggcgcg catcggaac aagctatcg ctctgctcta cggagactct gagaagccag	240
cagagagcgg cgggagcgtg acctcgcggg ccgccaactc gaaggtcgcc tgcacctgtg	300
accaaaaacc ctgcagctgc ccaaaggag atgtcaatta tgcacttctc cagcaacag	360
acctgtgcc agcctgtgaa ggagaaaggc ccactctcgc atttctgcaa gatgtaatga	420
acattttgct tcagtacgtg gtgaaaagt ttgatagatc aactaaagt attgatttcc	480

attaccccaa tgagcttctt caagagtata attgggaatt ggcagaccaa cgcacaaatc 540  
 tggaggaaat tttagcgac tgccaaacaa ctctaaaata tgcgattaaa acagggcatc 600  
 cccgatattt taatcagctg tctaccgat tggatatggt tggattagca gcagattggt 660  
 tgacatcaac agcaaacacg aacatgttta cctatgagat cgccctgta ttgtactac 720  
 tggaatatgt gacactaaag aaaatgaggg aatcattgg ctggccagga ggctctggcg 780

atggaatctt ttctcctggt ggtgccatct ccaacatgta cgccatgctc attgcccgct 840  
 ataagatgtt tccagaagtc aaggaaaagg ggtggcggc ggtgccagg ctcacgcat 900  
 tcacgtcaga gcatagtcac tttctctca agaaggagc tgcagccttg gggatcgaa 960  
 cagacagcgt gattctgatt aaatgtgatg agagaggaa aatgatcca tctgacctg 1020  
 aaagaagaat cctgaagtc aaacagaaag gatttgttcc ttctctggtg agtgccacag 1080  
 ctggaaccac tgtgtacggg gcttttgatc ctctctggc tgtagctgac atctgcaaaa 1140  
 aatataagat ctggatgcat gtggatgctg cttggggtgg agggttactg atgtctcgga 1200

aacacaagtg gaagctgaac ggtgtggaga gggccaactc tgtgacatgg aatccccaca 1260  
 agatgatggg tgcaccttg caatgttcgg ctctcctggt cagagaggag ggactgatgc 1320  
 agagctgcaa ccagatgcat gcttctacc tctttcagca agataagcac tatgacctgt 1380  
 cctatgacac gggagacaag gccttgcatg gtggacgcca cgtcgatgct tttaaattat 1440  
 ggctcatgtg gagagcaaag gggactactg gatttgaagc tcacattgat aagtgtttgg 1500  
 agctggcaga gtatttatac aatatcatta aaaaccgaga aggatatgaa atggtgttcg 1560  
 atgggaagcc tcagcacaca aatgtctgct tctggtttgt acctcctagt ttgcgagttc 1620

tggaagacaa tgaagagaga atgagccgcc tctcaaaggt ggcgccagt attaaagcca 1680  
 gaatgatgga gtatgggacc acaatggtca gctaccaacc cttaggagat aaggtaact 1740  
 tcttcgcat ggtcatctca aacctgcag caactacca agacattgac ttcctcattg 1800  
 aagaaatcga acgcctggga caagatttgi aatcacttg ctaccaaac tttagttct 1860  
 ctaggtagac agctaagttg tcacaaactg tgtaaatgta ttgtagttt gttccagagt 1920  
 aattctattt ctatctgtg gtgtcacagt agagtccagt ttaaaa 1966

<210> 6  
 <211> 2392  
 <212> DNA  
 <213> Rattus norvegicus

<400> 6  
 agcggagata gcggccttg ctgccttgac gcgcgcccgc cgcgtcccca gaccttctg 60



tccttttctc ccgccccgcc gccgccatgg ccaccctgct ccgcagcaag ctgaccaacg	120
tggccacctc tgtgtccaac aagtcccagg ccaaggtgag cggcatgttc gccaggatgg	180
ggtttcaggc ggccacggat gaggaggcgg tgggtctcgc gcactgcgac gatctcgact	240
ttgagcaccg ccagggcctg cagatggaca tctgaaatc ggaaggcgag ccctgcgggg	300
acgagggcgc agaacctccc gtcgaggag acattcatta tcagcgcggc ggcgctcccc	360
tgccaccctc gggctccaag gaccaggccg tgggagctgg tggggagttc gggggtcacg	420
acaaacccaa gatcacggcg tgggaagcgg gctggaacgt gacaaacgcc attcagggca	480
tgttcgtgct gggctctacc tacgccatcc tccacggcgg ctacctgggg ttgttcctca	540
tcattctcgc cgcggtgggtg tgctgctaca ccggcaagat cctcatcgcg tgcctgtacg	600
aggagaacga agatggtgag gtggtgcgcg tgagggactc gtatgtggcc atagctaacg	660
cgtgctgcgc tctcgtatc cccacgtcgg gcggcccgct ggtcaatgtg gccagatca	720
tcgagctggt gatgacgtgt atcttgtacg tagtggtgag cggcaacctc atgtacaaca	780
gtttcccggg gctgcccgtg tcgcagaagt cctggtccat catagccacg gcggtgctgc	840
tgccctgcgc ctctctgaag aatctcaagg ccgtgtccaa gttcagtcctg ctgtgcacgc	900
tggcccaactt cgtcatcaac atcctgggtca tcgcctactg tctctcgcgc gcgcgtgact	960
gggcctggga gaaggtgaag ttctacatcg acgtcaagaa gtttcctatc tccatcgga	1020
tcacgtgtgt cagctacacg tcgcagatct tctgcctc gctcgaaggc aacatgcagc	1080
agcccagcga attccactgc atgatgaact ggacacacat cgcccgctgc gtgctcaagg	1140
gtctcttcgc gctcgtcgcc tacctcacct gggccgacga gaccaaggaa gtcacacgg	1200
ataacctgcc cggttcctac cgcgccgtgg tcaacatctt cctggtggcc aaggcgtgc	1260
tgctctacce gttgcccttc ttgcggccg tcgaagtgt ggagaagtct ctcttcagg	1320
aaggcagtcg tgccttcttc cccgcctgct acggtggcga cggtcgcctt aagtctggg	1380
ggctgacgct gcgctgcgcg ctggtgggtct tcacgtgct catggccatc tacgtgccac	1440
acttcgcgt gtcacatggc ctcacgggca gcctcacggg agccggcctc tgcctctgc	1500
tgcccagcct ctccacttg cgtcttctct ggcgcaagct gctgtggcac caggcttct	1560
tcgatgtggc catcttcgtc atcgccggca tctgcagcgt gtccggcttc gtgattcac	1620
tcgagggcct catcgaggcc taccgaacca acgcagagga ctaggggcg gggaccctgc	1680
ccccagctcc ctccccgcc accccacac ccccttatcc ccgccccaa cccccaccc	1740
cagccccctg cgcaaccacg ctggggaggc cgagctttaa acacctccgg ttcctagtgtg	1800
ctgattatcc ggggaccggg cgggggaggg agggggatag acatccaagg tccactgcgt	1860
ctgcgtttct gtcgtttctt ctattccaca tcgtcctgat ttggggggag ggagcagagc	1920

gtataagtga agggatatttt ctgtccttcc tagaacaccc accaccacca ccaccaaact	1980
ttggctccag tcaatgttag gggtaggaag ggagggggaa aggggaacacg cagttcgag	2040
gctcggaac ttgaccttg gggtaggggtg ggggacattt cacagccatt cagtgttgg	2100
aatctactgc gtccagccat ttccagcaag agcgctcccc atgcctaga catttcaacc	2160
ttgaggcctg aaaggctgac cgggaaatcc atttcgggca ggcgacttcc ctctggagaa	2220
gccgcggcag gggccccgt ttgctgccg gttttcagga acccaaacac atcttgtgca	2280
atgtatccgg ttgtggaact gtatactgtg cgtgtggtgt gctcgtggtg aataagatga	2340
aatgtatatc agaaaaaac tatctctaatt ttagagtgcg gtgcctcgtg cc	2392