(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0132307
(43) 공개일자 2011년12월07일

(51) Int. Cl.
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 15/861* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0123632(분할)
(22) 출원일자 2011년11월24일
심사청구일자 2011년11월24일
(62) 원출원 특허 10-2008-0096465
원출원일자 2008년10월01일
심사청구일자 2008년10월01일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산 남구 무거2동 산29
(72) 발명자
이희란
경기도 성남시 분당구 정자동 상록라이프아파트 106동 201호
김동호
서울특별시 서초구 양재동 우성아파트 112동 101호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 4 항

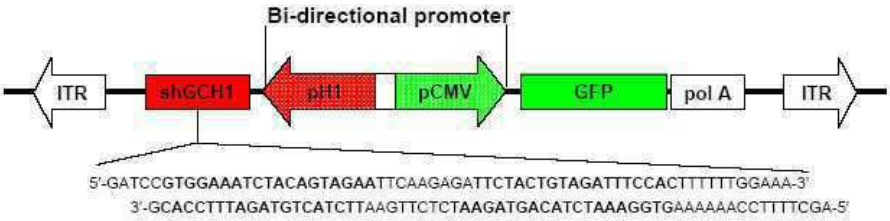
(54) GCH1을 표적으로 하는 siRNA를 포함하는 재조합 벡터 및 이를 함유하는 신경병증성 통증 완화용 약제학적 조성물

(57) 요 약

본 발명은 GCH1(GTP cyclohydrolase 1)을 표적으로 하는 siRNA를 포함하는 재조합 벡터 및 이 재조합 벡터를 포함하는 신경병증성 통증 완화용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 GCH1을 표적으로 하는 siRNA를 포함하는 재조합 벡터는 상기 siRNA를 후근절(Dorsal Root Ganglia, DRG)까지 전달할 수 있고, GCH1의 발현을 하향 조절함으로써 신경 손상으로 인한 신경병증성 통증을 억제함과 동시에 신경 손상으로 인한 척추에서의 염증 반응도 억제할 수 있다.

대 표 도 - 도3a



(72) 발명자

김승후

서울특별시 송파구 방이동 코오롱아파트 103동 1312호

김성진

서울특별시 강동구 성내2동 288-43

이원일

경기도 수원시 영통구 망포동 동양하이츠 A-102

이윤선

대구광역시 동구 신서동 동화해오름타운 106동 402호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	KRF-2007-412-J00304
부처명	학술진흥재단
연구관리전문기관	울산대학교
연구사업명	중점연구소지원사업
연구과제명	암관련 단백질의 구조 규명과 제어 방법의 개발
기여율	1/1
주관기관	울산대학교
연구기간	2007.12.01 ~ 2009.11.30

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호: 5에 나타낸 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어진 siRNA인 GCH1(GTP cyclohydrolase 1)을 표적으로 하는 siRNA를 포함하는 재조합 아데노 부속 바이러스 벡터를 포함하며,

상기 재조합 아데노 부속 바이러스 벡터는 사람 H1 폴리머라제-III 프로모터를 포함하고, siRNA는 상기 사람 H1 폴리머라제-III 프로모터에 작동 가능하게 연결되며, CMV 프로모터를 포함하고, 리포터 유전자는 상기 CMV 프로모터에 작동가능하게 연결되며, 상기 사람 H1 폴리머라제-III 프로모터와 상기 CMV 프로모터는 양방향 프로모터인 것을 특징으로 하는 것인 신경병증성 통증 완화용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

서열번호: 1에 나타낸 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어진 siRNA;

서열번호: 3에 나타낸 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어진 siRNA;

서열번호: 4에 나타낸 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어진 siRNA; 및

서열번호: 7에 나타낸 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어진 siRNA으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 GCH1(GTP cyclohydrolase 1)을 표적으로 하는 siRNA를 포함하는 재조합 아데노 부속 바이러스 벡터 중 어느 하나 이상의 벡터를 추가로 포함하는 신경병증성 통증 완화용 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 아데노 부속 바이러스는 혈청형 2이며, rAAV-GFP-shGCH1인 것을 특징으로 하는 신경병증성 통증 완화용 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 신경병증성 통증은 말초 신경병증성 통증인 것을 특징으로 하는 신경병증성 통증 완화용 약제학적 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신경병증성 통증 치료제에 관한 것으로, 보다 자세하게는 GCH1을 표적으로 하는 siRNA를 포함하는 재조합 벡터 및 이 재조합 벡터를 포함하는 신경병증성 통증 완화용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 신경병증성 통증(Neuropathic pain)은 말초 신경계(peripheral nervous system, PNS) 또는 중추 신경계(central nervous system, CNS)의 질환에 의해 일어나며, 특히 뇌 손상에 의해 유발된다(Baron R. Mechanisms of disease: neuropathic pain: a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol* 2006; 2: 95-106). 특히 말초 신경병증성 통증은 말초 구심의 비정상적인 활성에 의해 기인된 통증으로 정의된다(Bridges D, Thompson SWN, Rice ASC. Mechanisms of neuropathic pain. *British Journal of Anaesthesia* 2001; 87: 12-26). PNS에서의 비정상은 말초와 CNS 모두에 다양한 변화를 유도하고 통증을 유발한다. 이는 척추 신경의 활성과 흥분성에서의 변화로 이어지는 증폭된 감각 전달(중추 민감화)을 일으킨다(Woolf CJ, Salter MW. Neuronal Plasticity: Increasing the Gain in Pain. *Science* 2000; 288: 1765-1768). 신경병증성 통증은 다양한 신경-생리학적 과정에 의해 유발된다(Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology* 2001; 429: 23-37). 이 통증은 피부, 뼈, 연결 조직 및 근육에 존재하는 A-델타 및 C-신경섬유상 수용체에 의해 매개된다. 이 수용체는 유해 화합물, 열 및 기계적 자극과 같은 상이한 정보를 감지하고 그 다음 뇌로 전달한다. 이러한 감지에 의한 연장되고 일관된 고통은 심각한 어려움이 될 수 있다. 이러한 비정

상적인 감각은 일반적으로 이질통(allodynia) 및 통각과민(hyperalgesia)에 의해 나타난다(Baron R. Mechanisms of disease: neuropathic pain: a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol* 2006; 2: 95-106; Woolf CJ, Salter MW. Neuronal Plasticity: Increasing the Gain in Pain. *Science* 2000; 288: 1765-1768). 이질통은 일반적으로 통증을 일으키지 않는 자극 (예, 가벼운 접촉)에 대하여 통증 반응을 보인다. 통각과민은 보통의 통증을 일으키는 자극에 대하여 민감성이 증가된다.

[0003] 현재 신경병증성 통증의 약물 요법은 크게 두 가지 유형의 약물에 기초한다: 비스테로이드 염증제 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 및 아편양제제 (opioid)이다(Kenneth C. Pharmacotherapy for neuropathic pain. *Pain Practice* 2006; 6: 27-33). 이 약물들은 오랫동안 확립되어 왔음에도 불구하고 종종 부분적이고 일시적인 고통 경감 효과를 보인다는 결함이 있다. 또한, 상기 약물의 반복적인 이용은 우울증과 조직 독성과 같은 부작용을 유발할 수 있다. 따라서 통증 경감을 위한 다른 전략이 요구된다(Kenneth C. Pharmacotherapy for neuropathic pain. *Pain Practice* 2006; 6: 27-33; Pohl M, Braz J. Gene therapy of pain: emerging strategies and future directions. *European Journal of Pharmacology* 2001; 429: 39-48).

[0004] 만성적 통증의 경감을 위한 또 다른 전략으로서, 유전자 기반 치료는 단일 치료만으로도 효과적이고 덜 침습성이라는 점 등에서 다양한 이점을 가지고 있다(Pohl M, Braz J. Gene therapy of pain: emerging strategies and future directions. *European Journal of Pharmacology* 2001; 429: 39-48). 또한, 효과는 장기간 지속되고 상대적으로 부작용이 적다. 이를 위해서는 적절한 치료 유전자를 선택하고 유전자 전달 비히클을 포함하여 더욱 효과적인 유전자 발현 시스템을 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자는 GCH1을 표적으로 하는 siRNA를 포함하는 재조합 아데노 부속 바이러스 벡터를 좌골 신경에 투여한 결과, siRNA가 후근절까지 전달되고, GCH1의 발현을 하향 조절함으로써 신경 손상으로 인한 신경병증성 통증을 억제하며, 또한 신경 손상으로 인한 척추에서의 염증 반응도 억제할 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0006] 따라서, 본 발명은 상기 siRNA를 포함하는 재조합 벡터를 제공하고자 한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 포함하는 신경병증성 통증 완화용 약제학적 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] GCH1(GTP cyclohydrolase I)은 신경병증성 통증과 관련된 인자 중 하나이다. GCH1은 260kDa의 동종 서브유니트 십합체로서, GTP의 디히드로네오프테린 트리포스페이트(dihydroneopterin triphophate 또는 neopterin)로의 전환을 촉매한다. GCH1은 BH4 생합성에서 초기 속도 제한 효소로서 알려져 있다. BH4는 티로신 합성에 관여하는 페닐알라닌 하이드록실라제, 카테콜아민 생산에 관여하는 티로신 하이드록실라제, 세로토닌 합성에 관여하는 트립토판 하이드록실라제 및 질산 합성에서 질산 합성효소의 필수적인 보조인자이다. 신경병증성 통증 동물 모델을 이용한 연구를 통하여 BH4 합성 효소가 손상된 감각 신경에서 활성화됨이 규명되었다. BH4 또는 이와 유사한 분자의 직접 주입은 통증을 유발하는 자극에 대한 동물의 반응을 증가시킬 수 있다. 따라서, 신경병증성 통증을 완화하기 위해서는 BH4의 생산을 효과적으로 억제하여야 한다.

[0009] 한편, RNA 간섭(RNA interference, RNAi)은 표적 유전자의 발현을 선택적으로 억제하는 천연의 매커니즘이다. 서열 특이적 mRNA 분해의 매개자는 보다 긴 ds RNA로부터 리보뉴클레아제 III의 절단에 의해 생산된 19~23 뉴클레오타이드의 작은 간섭 RNA이다. 세포질의 RISC(RNA-induced silencing complex)는 siRNA에 결합하고 그 siRNA 중 한 가닥에 상보적인 서열을 포함하는 mRNA의 분해를 지시한다. 포유동물에서 RNA 간섭의 적용은 치료 유전자 침묵(silencing)의 효능을 가지고 있다. siRNA의 장점에도 불구하고 siRNA는 시험관내에서 제조되어야 하고 녹다운 유전자를 통상적으로 6 내지 10일 동안 일시적 형질감염에 의해 전달되어야 한다는 점에서 임상에 적용하는데 제한을 가지고 있다. 본 발명의 shRNA(small-hairpin RNA) 발현 시스템이 전술된 단점을 해결할 수 있다.

[0010] 한 관점으로서, 본 발명은 하기 GCH1을 표적으로 하는 siRNA를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다.

[0011] 본 발명에서 GCH1(GTP cyclohydrolase I)을 표적으로 하는 siRNA는 (1) GCH1의 275 내지 293 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 siRNA; (2) GCH1의 293 내지 311 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 siRNA; (3) GCH1의 318 내지 336 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 siRNA; (4) GCH1의 427 내지 445 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 siRNA; (5) GCH1의 487 내지 505 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 siRNA; (6) GCH1의 515 내지 533 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 siRNA; (7) GCH1의 516 내지 534 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 siRNA; (8) GCH1의 656 내지 674 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 siRNA; 및 (9) GCH1의 658 내지 676 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 siRNA로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.

[0012] 본 발명에서 GCH1을 표적으로 하는 siRNA는 GCH1 유전자의 일부에 상보적인 서열을 가지고, GCH1 유전자의 mRNA를 분해하거나, 번역을 억제할 수 있다. 상보성이 80-90%인 경우에는 mRNA의 번역을 억제할 수 있고, 100%인 경우에는 mRNA를 분해시킬 수 있다.

[0013] 따라서, 본 발명에서 GCH1을 표적으로 하는 siRNA는 GCH1의 275 내지 293 뉴클레오타이드에, GCH1의 293 내지 311 뉴클레오타이드에, GCH1의 318 내지 336 뉴클레오타이드에, GCH1의 427 내지 445 뉴클레오타이드에, GCH1의 487 내지 505 뉴클레오타이드에, GCH1의 515 내지 533 뉴클레오타이드에, CH1의 516 내지 534 뉴클레오타이드에, GCH1의 656 내지 674 뉴클레오타이드에 또는 GCH1의 658 내지 676 뉴클레오타이드에 대한 상보적인 서열에 대하여 80%, 바람직하게는 90%, 특히 바람직하게는 100% 상동성을 갖는 염기서열을 포함하는 것이 바람직하다.

[0014] 한 양태로서, (1)의 siRNA는 서열번호: 1에 나타낸 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어지고, (2)의 siRNA는 서열번호: 2에 나타낸 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어지며, (3)의 siRNA는 서열번호: 3에 나타낸 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어지고, (4)의 siRNA는 서열번호: 4에 나타낸 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어지며, (5)의 siRNA는 서열번호: 5에 나타낸 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어지고, (6)의 siRNA는 서열번호: 6에 나타낸 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어지며, (7)의 siRNA는 서열번호: 7에 나타낸 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어지고, (8)의 siRNA는 서열번호: 8에 나타낸 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어지며, (9)의 siRNA는 서열번호: 9에 나타낸 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어질 수 있다. 상기 각각의 염기서열과 그의 상보적인 염기서열은 5 내지 15bp의 루프 영역에 의해 회문적으로(palindrom)연결되어 헤어핀 구조를 형성하는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 siRNA는 당업계에 공지된 RNA 분자의 제조방법에 따라 제조할 수 있다. RNA 분자의 제조방법으로는 화학적 합성 방법 및 효소적 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, RNA 분자의 화학적 합성은 문헌에 개시되어 있는 방법을 사용할 수 있으며(Verma and Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.* 67, 99-134, 1999), RNA 분자의 효소적 합성은 T7, T3 및 SP6 RNA 폴리머라제와 같은 파아지 RNA 폴리머라제를 이용하는 방법이 문헌에 개시되어 있다(Milligan and Uhlenbeck, *Methods Enzymol*. 180:51-62, 1989).

[0016] 본 발명의 재조합 벡터는 당해 분야에 공지된 재조합 DNA 방법에 의해 구성될 수 있다.

[0017] 본 발명에서 GCH1에 대한 siRNA를 전달하기에 유용한 바이러스 (또는 바이러스 벡터)로는 바큘로비리디애(baculoviridiae), 파르보비리디애(parvoviridiae), 피코르노비리디애(picornoviridiae), 헤레페스비리디애(herepesviridiae), 폭스비리디애(poxviridiae), 아데노비리디애(adenoviridiae) 등이 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명에서는 아데노 부속 바이러스(Adeno Associated Virus, AAV)를 이용하는 것이 가장 바람직하다. 아데노 부속 바이러스는 면역반응과 세포독성을 거의 유발하지 않는다. 특히, 아데노 부속 바이러스 혈청형 2(serotype 2)는 CNS 의 신경세포로 효율적인 유전자 전달을 할 수 있으며, 또한 신경계에서 트랜스유전자(transgene)를 효과적으로 장기간 발현할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명에서 GCH1에 대한 siRNA를 전달하기에 유용한 비바이러스 벡터로는 전술한 바이러스 벡터를 제외한 통상적으로 유전자 요법에 사용되는 모든 벡터를 의미하며, 그러한 예로는 진핵세포에서 발현 가능한 다양한 플라스미드 및 리포좀 등이 있다.

[0020] 한편, 본 발명에서는 GCH1을 표적으로 하는 siRNA는 전달된 세포에서 적절히 전사되기 위하여 적어도 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것이 바람직하다. 상기 프로모터는 진핵세포에서 기능할 수 있는 프로모터라면 어떤 것이든지 무방하나, 사람 H1 폴리머라제-III 프로모터가 특히 바람직하다. GCH1을 표적으로 하는 siRNA의 효율

적인 전사를 위하여 필요에 따라 리더 서열, 폴리아데닐화 서열, 프로모터, 인핸서(enhancer), 업스트림(upstream) 활성화 서열, 시그날 펩타이드 서열 및 전사 종결인자를 비롯한 조절서열을 추가로 포함할 수도 있다.

[0021] 여기서, 이용된 용어 "작동가능하게 연결된"이란 핵산 서열간의 결합이 기능적으로 연관되어 있는 것을 의미한다. 임의의 핵산서열이 작동가능하게 연결된 경우는 임의의 핵산서열이 다른 핵산서열과 기능적으로 관련성을 가지도록 위치해 있는 경우이다. 본 발명에 있어서, 임의의 전사 조절서열이 GCH1을 표적으로 하는 siRNA의 전사에 영향을 미치는 경우, 상기 전사 조절서열이 상기 siRNA와 작동가능하게 연결되어 있다고 말한다.

[0022] 다른 관점으로서, 본 발명의 재조합 벡터와 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 신경병증성 통증 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0023] 본 발명에 따른 재조합 벡터는 좌골신경에 투여하여도 상기 siRNA를 후근절(Dorsal Root Ganglia, DRG)까지 전달할 수 있고, 신경 손상으로 인한 신경병증성 통증을 억제함과 동시에 신경 손상으로 인한 척추에서의 염증 반응을 억제할 수 있다. 즉, 신경 손상으로 인해 유도된 GCH1의 발현을 억제하여 신경병증성 통증을 억제하고, GCH1의 하향조절은 척추에서의 염증반응도 감소시킨다.

[0024] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토오스, 덱스트로스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 약제학적 조성물은 유전자 요법에서 통상적으로 이용되는 경로를 통해 투여될 수 있으며, 비경구 투여가 바람직하고, 예컨대 정맥내 투여, 복강내 투여, 근육내 투여, 피하 투여 또는 국부 투여를 이용하여 투여할 수 있다. 특히, 좌골신경에 투여하는 것이 가장 바람직하다.

[0026] 본 발명에서 약제학적 조성물은 재조합 벡터가 사람을 포함한 포유동물에 대해 하루에 체중 1kg 당 1ng 내지 100㎍, 바람직하게는 10ng 내지 10㎍의 양으로 투여되도록 할 수 있다. 그러나, 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 결정되어야 하는 것이므로 상기 투여량을 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 약제학적 조성물은 실온에서 안정성을 증가시키고, 값비싼 저온 저장의 필요성을 줄이며, 저장 수명(self-life)을 연장하기 위해 동결건조시킬 수 있다. 동결건조 공정은 동결, 일차 건조 및 이차 건조의 연속 단계로 이루어질 수 있다. 조성물을 동결시킨 후의 이차 건조 공정은 압력을 강하고 수증기의 승화를 위해 가열하는 것이다. 이차 건조 단계를 건조물로부터 흡수된 잔여 수분을 증발시키는 것이다.

[0029] 동결건조된 제제에는 부형제(excipient) 및 동결건조보호제(lyoprotectant)가 포함될 수 있다. 부형제로는 이들로 한정되는 것은 아니지만, 0.9% NaCl과 10mM 인산나트륨 (pH 7.0) 또는 10mM 나트륨 시트레이트 (pH 7.0)의 완충액이 포함된다. 동결건조보호제는 동결 및 건조 공정 동안에 생물학적 분자를 보호하고 최종 산물에 기계성(mechnical support)을 부여하는 역할을 하며 이들의 예로는 PBS(pH 7.0), PBS/4%, 12% 또는 15% 트레할로스 등을 들 수 있다.

발명의 효과

[0030] 신경병증성 통증의 치료를 위한 본 발명에 따른 유전자 치료는 약물 요법에 비하여 다음과 같은 효과가 있다: (1) 유전자가 장기간 발현되므로 단일 치료만으로도 신경병증성 통증 완화 효과를 달성할 수 있다; (2) 치료 유

전자를 타겟 부위로 전달할 수 있다. 본 발명에 의하면 좌골신경으로 투여된 재조합 벡터가 효과적으로 후근절로 치료 유전자를 전달할 수 있었다; (3) NSAID와 아편양제제가 보이는 즉, 우울증과 세포독성과 같은 부작용으로부터 자유로울 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 래트의 GCH1의 엑손(A)과 서열(B) 및 각 엑손에 대한 siRNA 위치(밑줄)를 나타낸 것이다.

도 2는 래트의 GCH1과 본 발명의 GCH1에 대한 siRNA로 공형질전환된 293T 세포의 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 3a는 본 발명에 따른 rAAV-GFP-shGCH1의 모식도를 나타낸 것이다.

도 3b는 rAAV-GFP 또는 rAAV-GFP-shGCH1로 형질전환된 293T 세포로부터 생산된 rAAV의 총 역가를 나타낸 것이다.

도 3c는 rAAV-GFP 또는 rAAV-GFP-shGCH1로 처리된 HeLa 세포에서 GFP가 발현됨을 형광 현미경으로 확인한 결과이다.

도 3d는 rAAV-GFP 또는 rAAV-GFP-shGCH1로 처리된 HeLa 세포에서 GCH1의 발현이 하향 조절됨을 나타낸 것이다.

도 4a는 본 발명에서 이용된 SNI 모델을 비롯한 다양한 신경병증성 통증의 모델을 확립하는 과정을 간략하게 나타낸 것이다.

도 4b는 정상 또는 SNI 모델에서 기계적 이질통에 대한 본 프레이(Von Fray) 행동 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 생체내에서 rAAV-GFP-shGCH1의 치료 효과를 검증하기 위한 실험 전략을 간략하게 나타낸 것이다.

도 6a는 정상, SNI 모델, rAAV-GFP 또는 rAAV-GFP-shGCH1이 좌골신경으로 투여된 SNI 모델로부터 각각 분리된 DRG에서 GFP의 발현 정도를 RT-PCR로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6b는 SNI 모델, rAAV-GFP 또는 rAAV-GFP-shGCH1이 좌골신경으로 투여된 SNI 모델로부터 각각 분리된 DRG에서 GFP의 발현 정도를 공초점 현미경으로 확인한 결과이다.

도 7a는 정상, SNI 모델, rAAV-GFP 또는 rAAV-GFP-shGCH1이 투여된 SNI 모델 각각에 대한 기계적 이질통 패턴을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7b는 정상, SNI 모델, rAAV-GFP 또는 rAAV-GFP-shGCH1이 투여된 SNI 모델 각각에 대한 앞발 역치값의 평균을 나타낸 것이다.

도 8a는 정상, SNI 모델, rAAV-GFP 또는 rAAV-GFP-shGCH1이 투여된 SNI 모델로부터 각각 분리된 DRG에 대한 GCH1과 GFP mRNA의 RT-PCR 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 8b는 정상, SNI 모델, rAAV-GFP 또는 rAAV-GFP-shGCH1이 투여된 SNI 모델로부터 각각 분리된 DRG에 대한 GCH1의 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 8c는 정상, SNI 모델, rAAV-GFP 또는 rAAV-GFP-shGCH1이 투여된 SNI 모델로부터 각각 분리된 DRG에 대한 GCH1 단백질 특이적 면역조직화학분석 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 정상, SNI 모델, rAAV-GFP 또는 rAAV-GFP-shGCH1이 투여된 SNI 모델로부터 각각 분리된 척추에 대한 소교세포 활성 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0033] **물질과 방법**

[0034] 실시예 1: 세포 배양 및 형질감염

[0035] 293T 세포는 Dr J. Jung(하버드 의과대학, USA)으로부터 제공받았다. 293T 세포는 5% CO_2 배양기에서 37℃에서 10% FBS(fetal bovine serum), L-글루타민(2mM), 페니실린(100 IU/ml) 및 스트렙토마이신(50㎍/ml)으로 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)(Gibco BRL, Carlsbad, CA) 배지에서 보관하였다.

[0036] 세포는 형질전환 24시간 전에 6-구판에 접종하였다. 다음날 세포를 혈청 없는 리포펙타민 시약(Invitrogen, Carlsad, CA)을 포함하는 OPTI-MEM 배지 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 siRNA(100mM)와 GCH1 유전자를 포함하는 플라스미드 DNA (0.5㎍)로 형질전환시켰다. 3시간 후 10% 혈청을 함유한 성장 배지를 형질 감염 혼합물을 제거하지 않고 추가하였다. 다음 날 세포를 회수하고 용균용 완충용액(Intron, Seoul, Korea)을 이용하여 15분 동안 용균하였다. 원심분리 후 상층액으로부터 총 단백질을 분석하였고 일전에 개시된 바와 같이 항체로 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0037] 실시예 2: siRNA의 설계와 서열

[0038] 먼저 rGCH1 유전자의 엑손을 확인하기 위하여 CCDS (conserved cDNA sequence) 소프트웨어 프로그램을 이용하였다. 이 소프트에어는 사람과 마우스로부터 수득한 정보를 고려하여 유전자의 엑손을 추정한다. 이 소프트웨어를 통해서 사람과 마우스에서 유사한, 6개의 엑손으로 이루어진 GCH1 엑손을 확인하였다(도 1).

[0039] 효과적인 siRNA의 설계를 위하여 MWG Biotech AG 소프트웨어 (www.mwg-biotech.acom) 또는 CAPSID(Convenient Application Program for siRNA Design)라고 하는 교내에서 개발된 siRNA 설계 소프트웨어를 이용하였다. siRNA의 서열을 결정한 후, 비특이적인 대조군 siRNA를 포함하는 dTdT 3'-오버행을 갖는 21 뉴클레오타이드의 이중가닥 siRNA 분자를 Bioneer (Seoul, Korea)에 의해 "ready-to-use"옵션으로 합성하였다. siRNA 이중가닥 올리고뉴클레오타이드는 제조업자에 의해 지시된 바에 따라 뉴클레아제가 없는 물에 재현탁하였다. 세포로 형질감염 효율을 조사하기 위하여 Cy3-형광 염료로 표지된 비특이적인 siRNA가 대조군으로서 이용되었다. 본 실시예에서 이용된 모든 siRNA의 서열은 표 1과 도 1에 나타내었다.

[0040] ***표 1***

본 발명의 siRNA 서열

siRNA	표적으로 하는 서열 (5'-3')	시작	GC(%)	서열번호
rGCH1-ex1	CCAUGCAGUUCUUCACCAA	275	47.4	1
rGCH1-ex 1-2	AGGGAUACCAGGAGACCAU	293	49.2	2
rGCH1-ex 2	UGUCCUGAACGAUGCUAUA	318	42.1	3
rGCH1-ex 3	GUCCAUAUUGGUUAUCUUC	427	36.8	4
rGCH1-ex 4	GUGGAAAUCUACAGUAGAA	487	36.8	5
rGCH1-ex 5-1	UUCAAGAACGCCUUACCAA	515	42.1	6
rGCH1-ex 5-2	UCAAGAACGCCUUACCAAA	516	42.1	7
rGCH1-ex 6-1	UGCAGAAAAUGAACAGCAA	656	36.8	8
rGCH1-ex 6-2	CAGAAAAUGAACAGCAAGA	658	36.8	9
비특이적	AUUCUAUCACUAGCGUGAC	-	42.1	10

[0041] *상기 siRNA 명칭은 각 siRNA가 표적으로 하는 엑손을 인용하여 명명된 것이다.

[0042] 실시예 3: pH1에 의해 유도되는 스몰 헤어핀 GCH1(shlGCH1)을 발현하는 재조합 아데노-부속 바이러스(rAAV)의 구축

[0043] 3-1: pSP72-pH1의 작제

[0044] shRNA 발현을 위한 프로모터로서 사람 H1 폴리머라제 -III 프로모터 (pH1)는 PCR을 기반으로 한 방법에 의해 증폭되었다. 즉, pH1의 서열은 HeLa 세포로부터 분리된 사람의 지노믹 DNA로부터 프라이머 5'-CCA TGG AAT TCG AAC GCT GA-3' (서열번호: 11) 및 5'-GGG AAA GAG TGG TCT CAT AC-3'(서열번호: 12)를 이용하여 PCR에

의해 증폭되었다. 이렇게 증폭된 PCR 산물을 주형으로 센스 프라이머 (*Eco*RI 링커)5'-ATC GAA TTC ATA TTT GCA TGT CGC TAT GTG-3'(서열번호: 13) 및 안티센스 프라이머(*Bam*HI 링커)5'-ATC GGA TCC GAG TGG TCT CAT ACA GAAC-3'(서열번호: 14)를 이용하여 이차 PCR을 실시하였다. PCR 산물은 *Eco*RI/*Bam*HI으로 소화시킨 후 아가로스 겔로부터 분리하였다. 그 다음 클로닝 벡터 pSP72 (Promega, Madison, WI)의 *EcoRI*/*BamHI* 위치로 클로닝하여 pSP72-pH1을 제조하였다.

[0045] 3-2: pSP72-pH1-shGCH1의 작제

[0046] 엑손 4를 표적으로 하는 siRNA 'rGCH1-ex 4'가 *Bam*HI 및 *Hind*III 5'- 또는 3'- 오버행을 포함하도록 작제한 후 pSP72-pH1 벡터에 라이게이션하여 pSP72-pH1-shGCH1를 제조하였다. 이를 위한 *Bam*HI 링커를 갖는 센스 프라이머 서열은 5'-GAT CCC GTG GAA ATC TAC AGT AGA A**TT CAA GAG A**TT CTA CTG TAG ATT TCC ACT TTT TTG GAA A-3'(서열번호: 15)이며, *Hind*III 링커를 갖는 안티센스 프라이머 서열은 5'-AGC TTT TCC AAA AAA GTG GAA ATC TAC AGT AGA **ATC TCT TGA A**TT CTA CTG TAG ATT TCC ACG-3'(서열번호: 16)이다. 상기 서열에 있어서 래트의 GCH1에 특이적인 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시하였고 루프 구조는 굵은체로 나타내었다.

[0047] 3-3: pSP72-XP-rAAV-MCS의 작제

[0048] 자가-상보적인 AAV의 본래 백본인 pHpa-Trs-SK는 McCarty (오하이오주립대)에 의해 제공받았다. 다중 클로닝 위치(multi-cloning site)를 갖는 새로운 벡터로 변형하였다. 먼저 pSP72-XP-rAAV 벡터를 작제하였다. 이는 pHpa-Trs-SK로부터 ITR(internal repeat), CMV 프로모터, 리포터 유전자 GFP 및 SV40 폴리 A 시그날을 포함하는 AAV의 필수 영역을 X*ho*I 및 *Pvu*II를 이용하여 절단한 후, pSP72 벡터로 라이게이션함으로써 작제되었다. 다음으로는 다중 클로닝 위치를 갖는 링커를 제작하였다. 이 링커는 Kpn I 제한효소 자리를 갖는 센스 올리고뉴클레오타이드 서열인 5'- CGG GAG ATC TTC CTG CAG GAT ATC TGG ATC CAC GAA GCT TCC CAC CGG TTC TAG AGC G-3'(서열번호: 17)과, Sal I 제한효소 자리를 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열인 5'-TCG ACG CTC TAG AAC CGG TGG GAA GCT TCG TGG ATC CAG ATA TCC TGC AGG AAG ATC TCC CGG TAC-3'(서열번호: 18)으로 구성하였다. 이 링커를 앞서 작제한 pSP72-XP-rAAV로부터 절단한 부분이 KpnI 및 SalI을 갖도록 작제한 후 링커를 라이게이션하여 pSP72-XP-rAAV-MCS를 제조하였다.

[0049] 3-4: rAAV-shGCH1의 작제

[0050] pSP72-XP-rAAV-MCS로부터 CMV 프로모터를 *Kpn*I and *Xba*I 소화에 의해 제거하고, 이어서 DNA 폴리머라제 (New England BioLabs, Beverly, MA)로 둔단(blunt end)을 만들었다. pH1-shGCH1는 (pSP72-XP-rAAV-MCS에 존재하는) BGH 폴리 A 위치 다음에 인접하게 놓이도록 하였다. 그 다음 pSP72-XP-rAAV-MCS 벡터는 폴리 A 테일을 *Sal* I으로 절단하였다. shGCH1 발현을 위한 삽입물, 즉 pH1-shGCH1은 pSP72-pH1-shGCH1 벡터로부터 *Eco*RV 및 *Xho*I로 소화하여 얻었다. 이어서 상기 벡터와 삽입물은 DNA 폴리머라제 (New England BioLabs, Beverly, MA)로 둔단을 만들었다. 이렇게 제조된 벡터와 삽입물은 둔단 라이게이션하였다. 이는 GFP는 발현하지 않으며, 단지 shGCH1만을 발현할 수 있도록 고안되었다. 이를 플라스미드의 경우에는 pSP72-XP-rAAV-pH1-shGCH1이라고 명명하고, 바이러스의 경우에는 rAAV-shGCH1라고 명명하였다.

[0051] 3-5: rAAV-GFP-shGCH1의 작제

[0052] 벡터가 도입된 세포를 검출하기 위하여 최종적으로 shGCH1의 발현을 위한 pH1과 독립적으로 GFP 발현 카세트의 발현을 위한 CMV 프로모터를 포함하는 GFP와 shGCH1의 이중 유전자 발현 rAAV 벡터를 작제하였다. 클로닝 전략은 다음과 같다: pSP72-XP-rAAV-MCS 벡터(또는 pSP72-XP-rAAV-GFP 벡터라고도 명명함)를 *Eco*RI로 절단하고 삽입물인 pH1-shGCH1은 pSP72-pH1-shGCH1 벡터로부터 *Eco*RV and *Xho*I로 소화하여 얻었다. 그 다음 벡터와 삽입물을 DNA 폴리머라제 (New England BioLabs, Beverly, MA)로 둔단을 만들었다. 이 벡터는 shGCH1 및 GFP를 발현할 수 있다. 이 벡터는 플라스미드의 경우에 pSP72-XP-rAAV-GFP-pH1-shGCH1라고 명명하고, 바이러스의 경우에 rAAV-GFP-shGCH1라고 명명하였다(도 3a). 또한, 상기 pSP72-XP-rAAV-GFP 벡터는 바이러스의 경우에 rAAV-GFP라고 명명하였다.

[0053] 실시예 4: 재조합 자체-상보적인 아데노 부속 바이러스 벡터 혈청형 2의 제조 및 역가 측정

[0054] rAAV2를 제조하기 위한 pHpa-trs-SK는 Dr J. Samulski(노스캐롤라이나 대학)으로부터 자체-상보적인 AAV 플라스미드 벡터로서 제공받았다. 혈청형 2의 캡시드 유전자를 포함하는 pRepCap 플라스미드는 Dr. C. High(렌실베니아 대학교)에 의해 제공받았다. rAAV는 양방향 프로모터 하에 있는 GFP 또는 GFP-shGCH1, pRepCaps 및 아데노바이러스의 헬퍼 유전자를 코딩하는 pXX6(Stratagene, La Jolla, CA)을 보유한 pHpa-trs-SK를 사용하여 3중 형질감염 과정과 칼슘 포스페이트 방법에 의해 생산하였다.

[0055] rAAV의 더 많은 생산을 위하여 20×10cm 디쉬에서 293T 세포를 형질감염시켰다. 세포내 rAAV를 CsCl 기울기 단계에 의해 분리 정제하였다. rAAV의 순수한 군은 두 차례 연속적 CsCl 기울기 단계에 의하여 상층액을 포함한 세포 용균물로부터 준비하였다. 2 mM $MgCl_2$ 및 2 % 소르비톨을 포함하는 10mM 트리스 완충용액(pH 7.9)에서 투석한 후 rAAV는 할수하여 -80℃에서 저장하였다. 총 바이러스 입자의 수는 ELISA 키트(Progen Inc., Heidelberg, Germany) 및 실시간 qPCR 분석을 통해 확인하였다.

[0056] 실시예 5: 총 RNA 추출 및 RT-PCR

[0057] 총 RNA는 신경이 손상된 L4-L5 후근절로부터 트리졸 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA)으로 추출하였다. 추출된 RNA는 탈이온수에 용해하였다. 총 RNA 시료(250ng/㎕)는 슈퍼스크립트 III 효소 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 및 프라이머로서 최종 부피의 20㎕의 100 pmole Oligo d(T)20 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 RT(reverse transcription) 반응을 수행하였다. RT 반응은 50℃에서 50분간 진행되었고 70℃에서 15분간 불활성화시켰다. 이어서, 반응 산물의 10분의 1을 20㎕의 PCR 증폭반응(Invitrogen, Carlsbad, CA)에 투입하였다. 반응 프로필은 94℃에서 3분간 1회에 이어 94℃에서 30초간, 56℃에서 30초간, 72℃에서 45초간을 35회 진행하였다. 래트의 GCH1 특이적 프라이머의 서열은 센스는 5'-GGA TAC CAG GAG ACC ATC TCA-3'(서열번호: 19)이고, 안티센스는 5'-GTC CTC CTT GAA GTC GAT GC-3'(서열번호: 20)이다. GFP 특이적 프라이머 서열은 센스는 5'-CCT TCA TTG ACC TCA ACT AC-3'(서열번호: 21)이고, 안티센스는 5'-GGA AGG CCA TGC CAG TGA GC-3'(서열번호: 22)이다. PCR 산물은 1% 아가로오스 겔에서 전기영동하여 분리하였고 에티듐 브로마이드 염색으로 관찰하였다.

[0058] 실시예 6: 웨스턴 블로팅 분석

[0059] 세포를 회수하여 100㎕의 용균 완충용액(Intron, Seoul, Korea)으로 용균하였다. 용균물은 5X 시료 완충용액과 함께 100℃에서 5분간 끓여주고 변성 단백질은 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 분리한 후 semi-drier (Bio-Rad)를 이용하여 20V에서 30분간 PVDF 멤브레인으로 전달시켰다. 실온에서 1시간 동안 블록 용액(0.4 % Tween 20 및 5 % dry milk in PBS)으로 처리한 후 멤브레인을 일차 항체: GCH1 (1:1000, Abnova Abnova, Taipei, Twawan), β-actin (1:5000, Sigma, St. Louis, MI) 및 GFP (1:1000, Santa Cruz)와 하룻밤 동안 정치하였다. PBST 또는 TBST로 세척한 후 호스 라디쉬 퍼옥시다제가 접합된 이차 항체(Jackson laboratory)는 적용되었고 블롯은 개선된 화학발광 시약(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)으로 발현시켰다.

[0060] 조직의 경우 동측 L4, 5 DRG 및 척추 배각 (SCDH, T13-L2)이 준비되었다. 각 시료는 용균 완충용액(20 mM Tris, pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 % Triton, 및 protease inhibitors)으로 균질화하고 원심분리에 의해 데브리스를 제거하였다. 상층액을 할수하고 -80℃에서 저장하였다. 시료는 BCA(Bio-ad, Richmond, CA) 에세이를 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 단백질 시료(각각 30㎍씩)는 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 분리되었고 전술된 바와 같이 분석되었다.

[0061] 실시예 7: 동물 관리, 바이러스 투여 및 행동 검사

[0062] 7-1: 동물의 관리

[0063] 180-200g 중량의 성체 수컷 Sprague Dawley 래트를 케이지당 3마리씩 수용하고 음식과 물에 자유롭게

섭취하도록 하였다. 동물의 이용과 관리는 대학 위원회의 승인 하에 이루어졌으며, 래트는 최적의 온도와 습도가 조절되는 방에서 12시간 낮/밤 주기로 관리하였다.

[0064] 7-2: 바이러스 투여

[0065] 좌골신경으로 rAAV를 주입하기 위하여 래트는 Zoletil (50 mg/kg)과 Rompun(25 mg/kg)로 마취시켰다. 그 다음 좌측 좌골신경의 절편을 노출시켰다. 수술 현미경(Olympus, Japan)하에서 주변 조직을 조심스럽게 제거하고 좌골 신경을 노출하였다. 3㎕의 rAAV를 해밀턴 시린지와 연결된 유리 마이크로피펫을 통해서 좌골신경으로 5분 동안 천천히 전달하였다. 5분 후 피펫은 제거하였다.

[0066] 7-3: SNI 모델의 구축

[0067] 도 4a에 나타낸 바와 같은 SNI(spared nerve injury) 모델을 생산하기 위하여, 래트를 Zoletil (50 mg / kg) 및 Rompun(25 mg/kg)로 마취시켰다. 그 다음 좌측 좌골신경을 노출하였다. 3 가닥의 좌골 신경 중에서 총 비골 및 경골 신경을 단단하게 결찰하고 완전히 횡절단하는 한편, 비복 신경은 온전하게 유지하였다. 상처는 식염수로 관주하고 두 층의 외과적 피부 봉합기로 봉합하였다.

[0068] 7-3: 행동 검사

[0069] 래트의 기계적 이질통은 앞발(범위 0.01-1.66g) 뒤쪽의 발바닥 표면에 일련의 본 프레이 필라멘트(von Frey filaments)를 상승 및 하강 순(업-앤-다운 방법)으로 적용함으로써 확인하였다. 다리 뒤쪽의 빠른 움직임 양성 반응으로 간주된다. 4.0g 이하의 움직임 역치값이 이질통으로 분류되었다.

[0070]

[0071] 실시예 8: 조직면역학적 분석

[0072] 적절한 절차를 완료한 후 래트를 마취시키고 125ml의 보통의 식염수와 얼음으로 차갑게 한 250ml의 4% 파라포름알데히드를 경심으로(transcardinally) 주입하였다. 주입 후 DRG (L4, L5) 및 척추 (T13-L2)를 제거하고 인산 완충용액에 용해된 30% 수크로오스 용액에 5일 동안 4℃에서 동결보존(cryprotect)한 다음 OCT 포매 배지에서 포매하였다. DRG 및 척추 절편은 10㎛의 두께로 절단하고 사용할 때까지 동결 보관하였다.

[0073] 형광 검출을 위하여 조직 절편은 일차항체: GCH1 (1:500, Abnova, Taipei, Twawan), Iba-1 (1:500, Wako, Japan)로 24시간 동안 4℃에서 정치하였다. Alexa 488이 접합된 이차 항체(1:1000, Invitrogen) 및 Alexa 555가 접합된 이차 항체 (1:1000, Invitrogen)가 각 절편에 1시간 동안 실온에서 적용되었다. 각 절편은 TBS로 세척하고 DAPI (Vector laboratories, Burlingame, CA)를 갖는 Vectashield으로 표본을 제작하였다.

[0074] **결과**

[0075] **1. 래트의 GCH1에 특이적인 GCH1을 약화시키는 siRNA의 생산**

[0076] 실시예 2를 통해 통해 확보된 siRNA 후보자의 침묵 효능을 조사하기 위하여 siRNA 및 플라스미드 pcDNA3.1/rGCH1를 293T 세포로 공형질전환시켰다. 이 세포를 공형질전환 후 24시에 회수하였다. 세포 용균물에서 GCH1 발현은 GCH1 특이적 항체를 이용하는 웨스턴 블로팅 분석에 의해 평가되었다. 도 2에 나타낸 바와 같이 본 실시예에서 테스트된 모든 siRNA는 비특이적인 비특이적 siRNA 또는 가상 처리된 대조군과 비교하였을 때 유전자 침묵 효과를 나타내었다. rGCH1의 엑손 1-1, 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5-1을 표적으로 하는 siRNA가 다른 경우보다 효과적이었다. 따라서, 이 데이터에 의해 rGCH1의 발현은 rGCH1의 1 내지 5 엑손을 표적으로 하는 siRNA에 의해 효과적으로 하향 조절될 수 있다는 것이 확인하였다.

[0077] **2. GFP와 함께 shGCH1을 발현하는 rAAV의 작제와 GCH1의 하향 조절 효과**

[0078] rAAV에 의한 shGCH1을 검사하기 위하여 실시예 3으로부터 rAAV-GFP-shGCH1를 작제하였다. rAAV-GFP-

shGCH1은 도 3a에 나타낸 바와 같이 양방향 프로모터를 이용하여 shGCH1과 GFP를 모두 생산할 수 있다. 여기서, 대조군으로 rAAV, rAAV-GFP가 이용되었다. 도 3b에서 총 입자 생산 수율로 나타낸 바와 같이 rAAV-GFP-shGCH1은 효과적으로 생산되었다: rAAV-shGCH1 (3.3×10^{11} TP/ml) 및 rAAV-GFP-shGCH1 (3.0×10^{11} TP/ml). 또한, 시험관내에서 HeLa 세포에 rAAV-GFP-shGCH1 처리는 GFP의 발현을 유도하는 한편 GCH1 발현을 하향 조절하였다(도 3c 및 3d). 따라서 rAAV-GFP-shGCH1은 rGCH1 유전자의 발현을 억제할 뿐 리포터 유전자의 발현을 억제하지 않았다. 따라서, 상기 데이터는 본 발명에서 이용된 rAAV에 의해 유전자 전달이 제대로 이루어진다는 것을 의미한다.

[0079] **3. 신경병증성 통증의 동물 모델 확립과 좌골신경으로 rAAV의 투여 후 DRG로**의 성공적인 유전자 전달

[0080] 본 실시예 7에서 생산된 SNI 모델은 수술 후 3일 내에 기계적 이질통을 보이는 것으로 확인되었다(도 4b).

[0081] 한편, rAAV-GFP-shGCH1의 치료 효능을 조사하기 위하여 도 5에 나타낸 바와 같은 동물 실험을 시도하였다. 유전자 전달의 효과는 리포터 유전자 GFP의 생산을 조사함으로써 측정되었다. DRG 시료로부터 GFP에 대한 RT-PCR을 실시하였고 15개의 시료 중에서 11개가 GFP 양성이었으며, 이는 유전자 전달 성공률이 70%에 달하는 것을 보여준다(도 6a 및 데이터 미도시). 바이러스 주입 후 기간에 따라 성공률에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. GFP 단백질은 rAAV-GFP 및 rAAV-GFP-shGCH1 처리 그룹으로부터 검출되었다(도 6b). DRG와는 이격된 좌골신경으로 rAAV를 주사함으로써 DRG로의 효과적인 유전자 전달이 가능하였다.

[0082] **4. 양방향성 프로모터를 포함하는 rAAV-GFP-shGCH1에 의한 신경병증성 통증** 증상의 완화

[0083] DRG에서 rAAV-GFP-shGCH1에 의한 rGCH1의 하향 조절로부터 나온 이로운 효과는 von Frey test (up-and-down method, 실시예 7)를 수행함으로써 확인되었다. 도 7a와 7b에 나타낸 바와 같이 rAAV-GFP-shGCH1이 주입된 그룹에서 통증 증상의 유의적인 감소가 관찰되었다($3\mu\ell$에서 9.9×10^{7}TP). 이 데이터는 rAAV-GFP-shGCH1의 이격된 주사가 기계적 이질통을 유의적으로 억제할 수 있다는 것을 보여준다(3일째, $P<0.01$; 7일째, $P<0.05$; 10일째, $P<0.01$; 14일째, $P<0.01$ vs. SNI 모델, 각각). 이 효과는 rAAV-GFP-shGCH1 이 주사된 그룹에서 전체 실험 기간 동안 지속되었다. 반대로 rAAV-GFP 주사 그룹에서는 통증 감소가 나타나지 않았다. 각 그룹의 기계적 이질통 패턴은 도 7a에 나타내었다. 이 결과는 SNI 모델과 rAAV-GFP 주사 그룹은 대부분 민감하여 4g 이하의 앞발 움직임 역치값을 보여주었다. shGCH1 주입 그룹은 4g 이상의 앞발 움직임 역치값을 보여주어 GCH1에 의해 유도된 신경병증 통증의 발달을 억제함을 확인시켜 주었다.

[0084] **5. rAAV-GFP-shGCH1 처리 후 DRG에서 GCH1의 발현 감소**

[0085] RT-PCR 분석은 rAAV-GFP-shGCH1 처리 그룹이 GCH1의 양에 있어서 정상 그룹과 유사하다는 것을 보여준다(도 8a). 반면에 GCH1 mRNA의 상당한 유도가 SNI 모델과 rAAV-GFP 처리 그룹에서 관찰되었다. RT-PCR 결과와 일치하게 GCH1 단백질 양은 rAAV-GFP-shGCH1 처리 그룹에서 정상 그룹과 유사하였다. 도 8b에 나타낸 바와 같이 GCH1 단백질 양은 손상 후 2일째에 증가되었고 증가된 양은 14일까지 유지되었다. GCH1에 대한 조직면역분석은 rAAV-GFP-shGCH1 처리 그룹에서 GCH1 양이 수술에 의해 증가되지 않는다는 것을 보여주었다(도 8c). 행동 검사와 GCH1 발현 패턴을 고려하면, 이 데이터는 GCH1 유도가 신경병증성 통증의 발생과 밀접하게 연관되어 있다는 것을 재확인시켜준다.

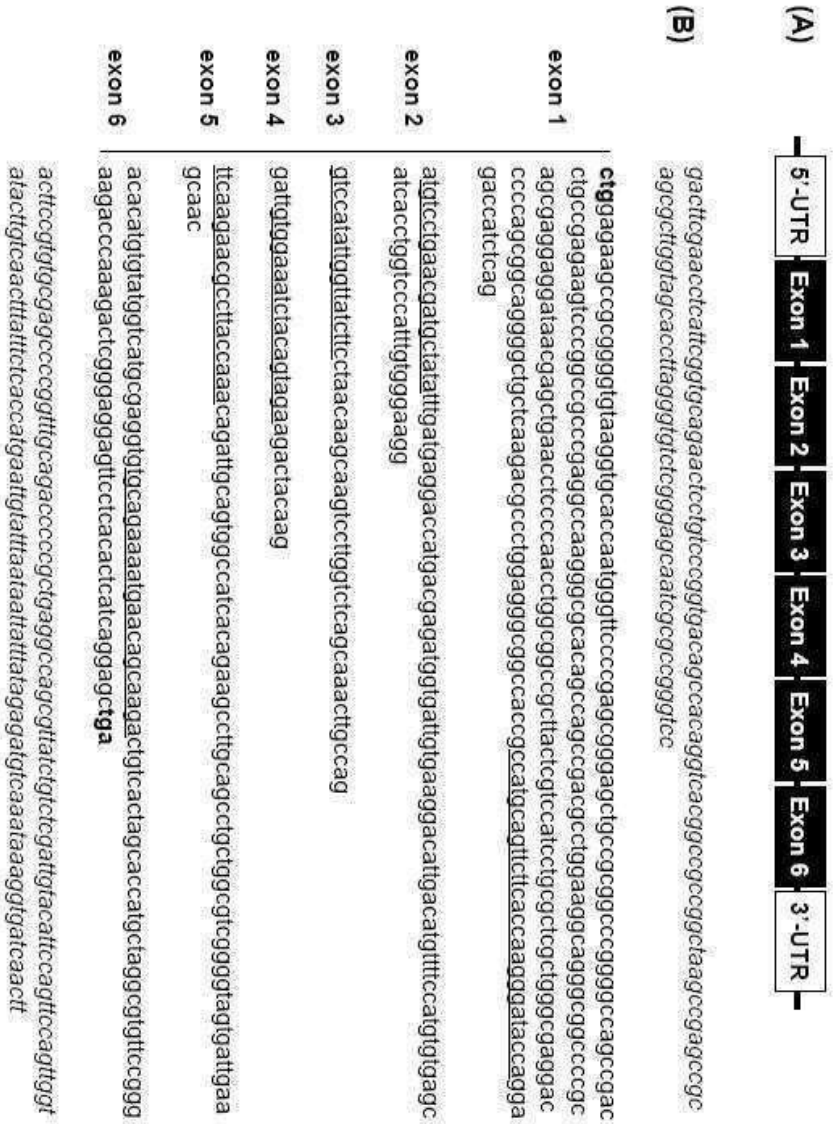
[0086] **6.척추에서 rAAV-GFP-shGCH1에 의한 소교세포 활성화의 억제**

[0087] 신경 손상에 의한 염증이 신경병증성 통증을 유발한다는 것이 알려져 있으므로 GCH1 하향 조절이 척추에서 염증의 활성화와 관련이 있는지 조사하기 위하여 대식세포 및 소교세포를 검출할 수 있는 Iba-1 항체를 이용하여 조직면역분석을 실시하였다. DRG로부터 나온 결과와 서로 일치하여 SNI 모델과 rAAV-GFP 주사 그룹은 특히 척수의 동측 배각에서 증가된 소교세포의 활성화를 보여주었다(도 9). Iba-1 양성 세포의 개수는 현저하게 증가되었고, 소교세포의 형태학적 변화가 또한 관찰되었다. 이 데이터는 GCH1의 선택적인 녹다운이 척추에서 소교세

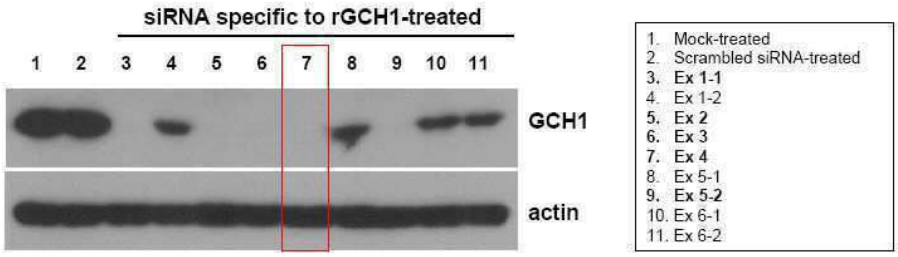
포의 활성을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여준다.

도면

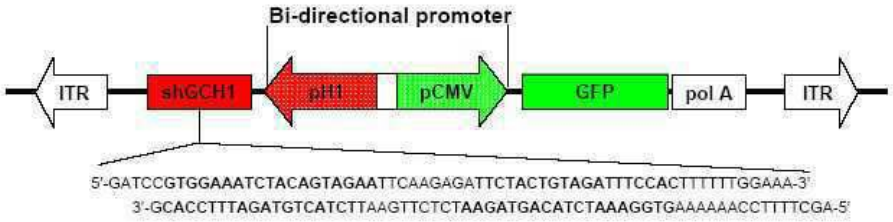
도면1



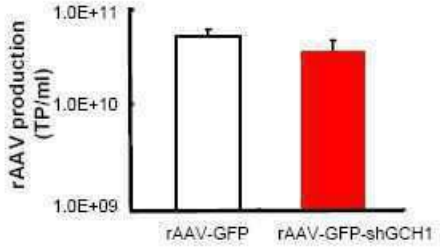
도면2



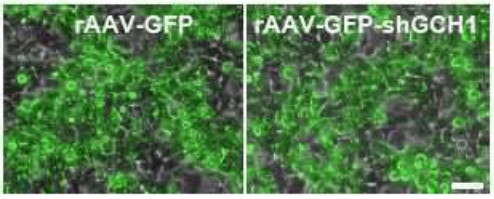
도면3a



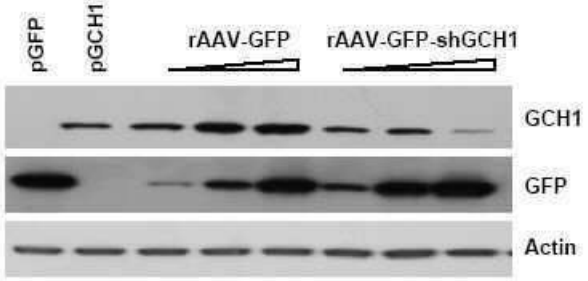
도면3b



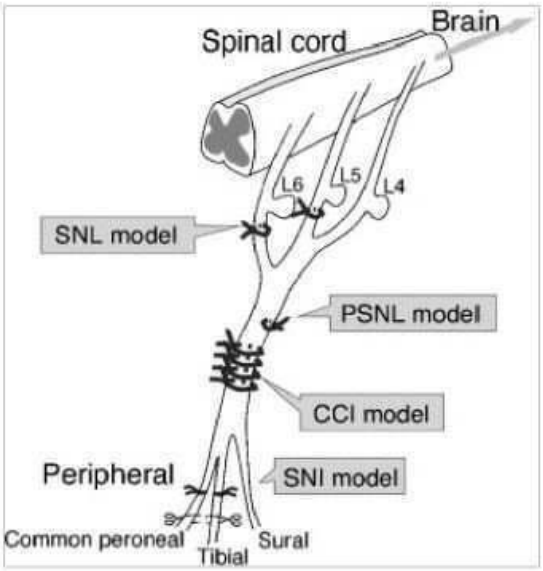
도면3c



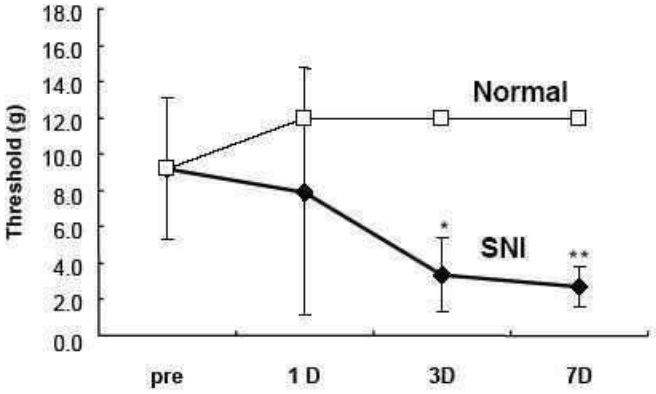
도면3d



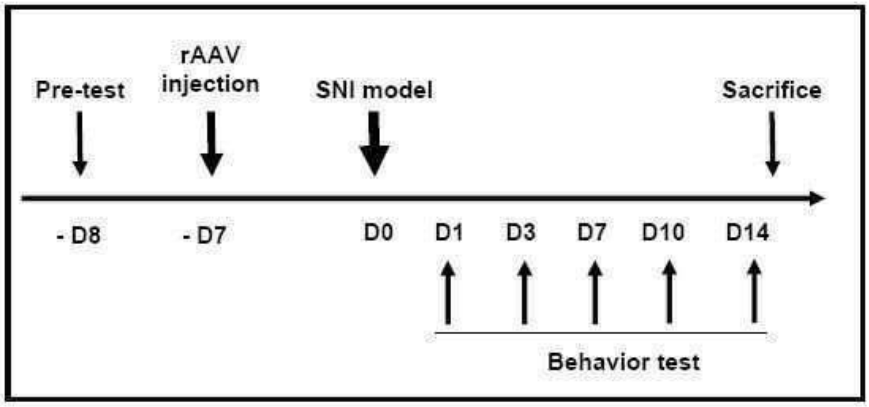
도면4a


Spinal cord
Brain
L6
L5
L4
SNL model
PSNL model
CCI model
Peripheral
SNI model
Common peroneal
Tibial
Sural

도면4b

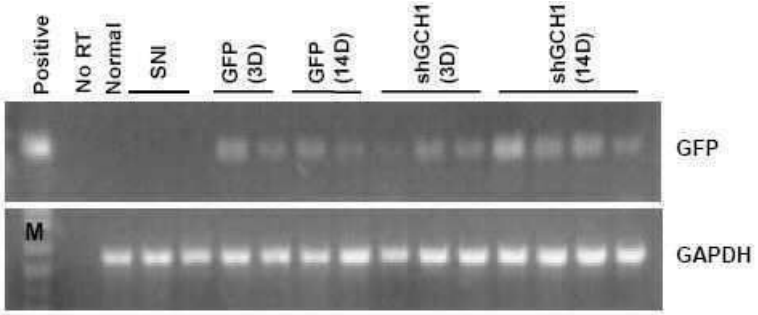

18.0
16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
Threshold (g)
Normal
SNI
*
**
pre
1 D
3D
7D

도면5

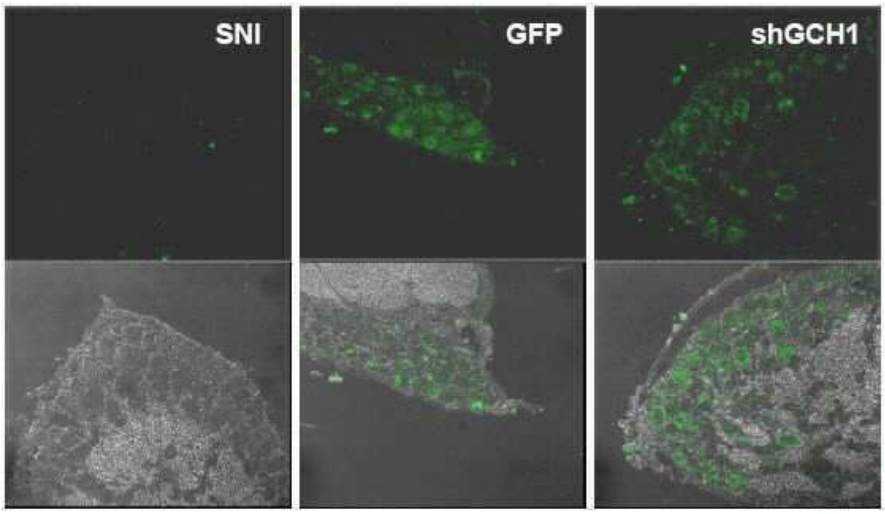


- Animals : Sprague-Dawley rats (8 weeks)
- Injection of rAAV into sciatic nerve.
  (1) Normal (n=8)
  (2) SNI model (n=10)
  (3) rAAV-GFP (6.0 x 10^7 TP in 3 ul, n=20)
  (2) rAAV-GFP-shGCH1 (9.9 x 10^7 TP in 3 ul, n=22)
- Behavior test : von Frey test

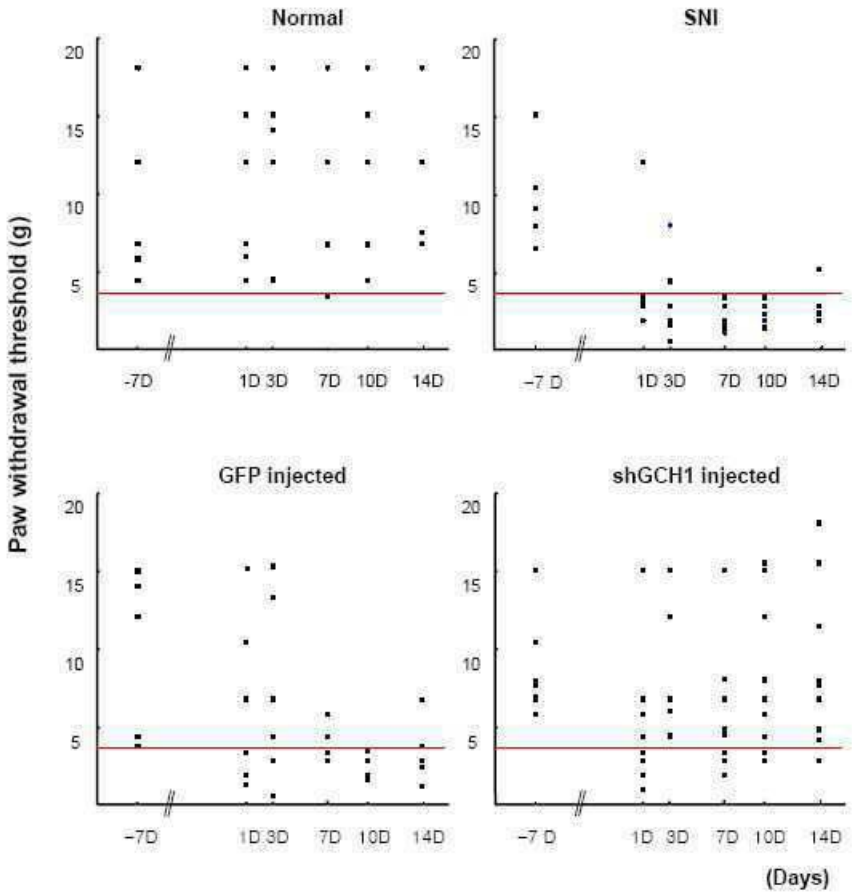
도면6a



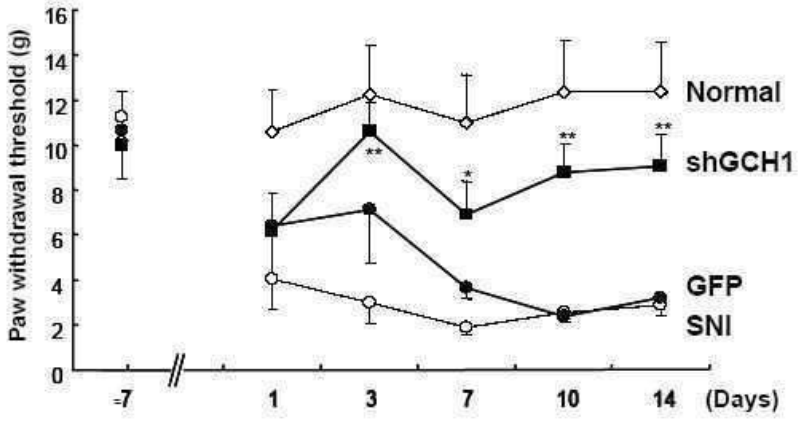
도면6b



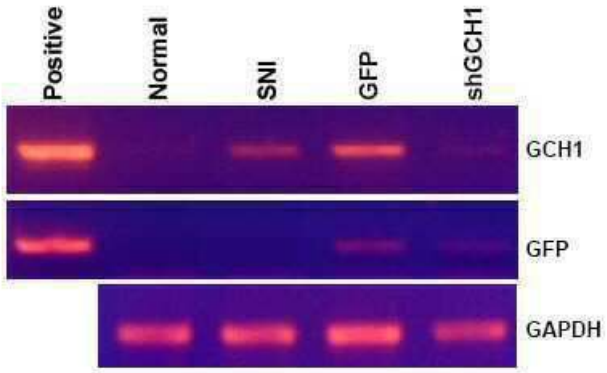
도면7a


Normal
SNI
GFP injected
shGCH1 injected
Paw withdrawal threshold (g)
20
15
10
5
-7D
1D 3D
7D
10D
14D
(Days)

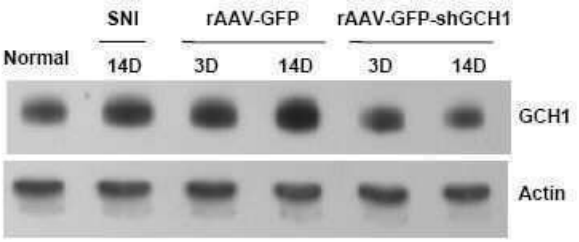
도면7b


Paw withdrawal threshold (g)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-7
1
3
7
10
14
(Days)
Normal
shGCH1
GFP
SNI
**
*

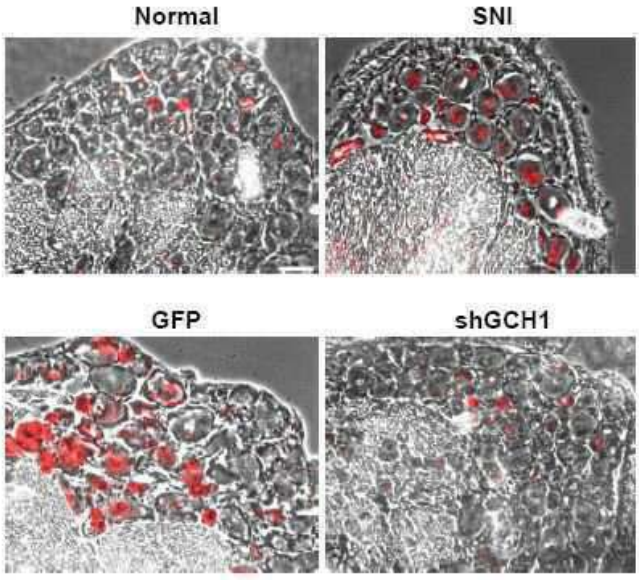
도면8a



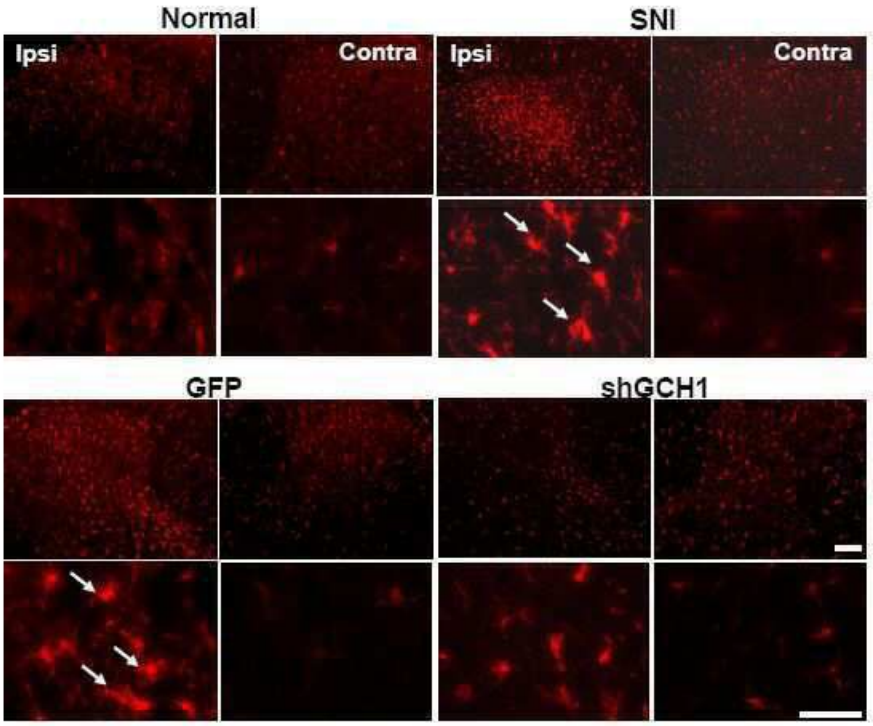
도면8b



도면8c



도면9



서 열 목 록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Recombinant Vector Containing siRNA Targeting GCH1 and Pharmaceutical Composition for Attenuating Neuropathic Pain Comprising The Same

<160> 22

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 1

ccaugcaguu cuucaccaa 19

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 2

agggauacca ggagaccau 19

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 3

uguccugaac gaugcuaua 19

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 4

guccauauug guuaucuuc 19

<210> 5

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 5

guggaaaucu acaguagaa 19

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 6

uucaagaacg ccuuaccaa 19

<210> 7

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 7

ucaagaacgc cuuaccaaa 19

<210> 8

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 8

ugcagaaaau gaacagcaa 19

<210> 9

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 9

cagaaaauga acagcaaga 19

<210> 10

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 10

auucuaucac uagcgugac 19

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

ccatggaatt cgaacgctga 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

gggaaagagt ggtctcatac 20

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

atcgaattca tatttgcatg tcgctatgtg 30

<210> 14

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

atcggatccg agtggtctca tacagaac 28

<210> 15

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

gatcccgtgg aaatctacag tagaattcaa gagattctac tgtagatttc cacttttttg 60

gaaa 64

<210> 16

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

agcttttcca aaaaagtgga aatctacagt agaatctctt gaattctact gtagatttcc 60

acg 63

<210> 17

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MCS

<400> 17

cgggagatct tcctgcagga tatctggatc cacgaagctt cccaccggtt ctagagcg 58

<210> 18

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MCS

<400> 18

tcgacgctct agaaccggtg ggaagcttcg tggatccaga tatcctgcag gaagatctcc 60

cggtac 66

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

ggataccagg agaccatctc a 21

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 20

gtcctccttg aagtcgatgc 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

ccttcattga cctcaactac 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

ggaaggccat gccagtgagc 20