



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0099360
(43) 공개일자 2024년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61P 25/08 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7017747
(22) 출원일자(국제) 2022년10월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년05월27일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/080020
(87) 국제공개번호 WO 2023/073071
국제공개일자 2023년05월04일
(30) 우선권주장
63/263,175 2021년10월28일 미국(US)

(71) 출원인
유씨비 바이오파마 에스알엘
벨기에 브뤼셀 1070 알레 더 라 러쉴르쉐 60
(72) 발명자
로드리게스 알바레즈 나탈리아
영국 에스엘1 3더블유이 버크셔 슬라우 배스 로드
208 유씨비 아이피디 내
시페키 실라
영국 에스엘1 3더블유이 버크셔 슬라우 배스 로드
208 유씨비 아이피디 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

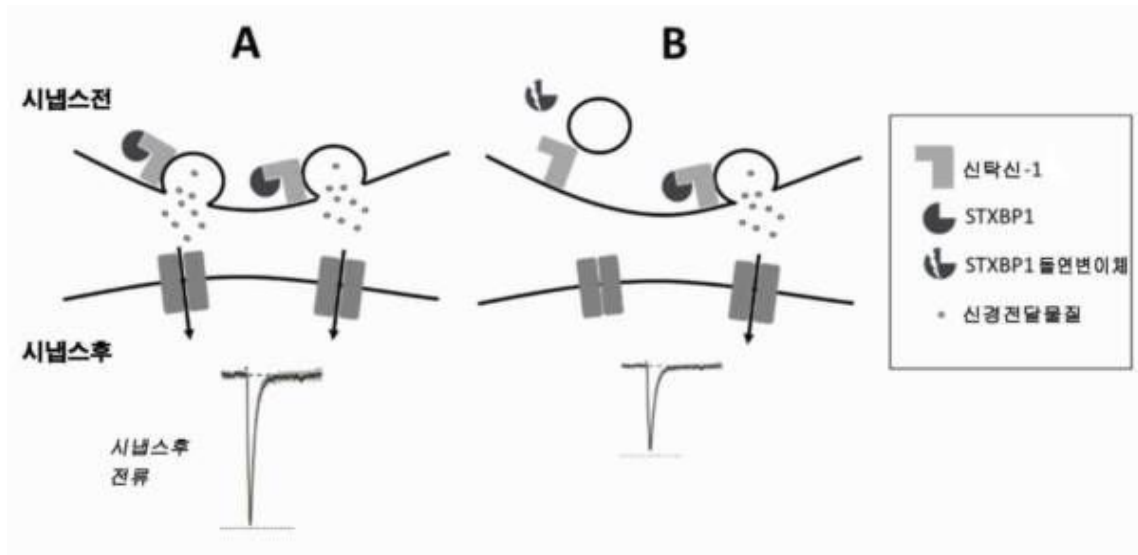
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 핵산 구축물, 바이러스 벡터 및 바이러스 입자

(57) 요약

본 발명은 신타신(syntaxin) 결합 단백질 1(STXBP1, Munc-18)을 코딩하는 형질전이유전자를 포함하는 핵산 구축물, 상기 핵산을 바이러스 입자에 패키징하기 위한 바이러스 벡터; 및 STXBP1 기능적 활성의 상실과 관련된 질환을 치료하기 위한 이러한 바이러스 입자의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 25/08 (2018.01)

C07K 14/47 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

C12N 2750/14152 (2013.01)

C12N 2830/50 (2013.01)

(72) 발명자

발레트 브리트니 니콜

영국 에스엘1 3더블유이 버크셔 슬라우 배스 로드
208 유씨비 아이피디 내

볼프 크리스티안 길버트 조셉

영국 에스엘1 3더블유이 버크셔 슬라우 배스 로드
208 유씨비 아이피디 내

수 메이유

영국 에스엘1 3더블유이 버크셔 슬라우 배스 로드
208 유씨비 아이피디 내

명세서

청구범위

청구항 1

형질전이유전자(transgene)를 포함하는 핵산 구축물로서,

- i. 각각 서열번호 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16으로 제공된 서열을 가진 이소형(isoform) a, b, c, d, e, f, g 또는 h를 포함하는 신탭신 결합 단백질 1(STXBP1); 또는
- ii. 서열번호 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16과 적어도 95% 서열 동일성을 갖고 STXBP1로서의 기능성을 보여주는 서열; 또는
- iii. 서열번호 9에 대해 표 7에 제시된 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 천연 생성 변이체를 코딩하는 형질전이유전자를 포함하는 핵산 구축물.

청구항 2

제1항에 있어서, 형질전이유전자는

- i. 각각 서열번호 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 또는 33으로 제공된 서열을 가진 STXBP1 전사체 변이체 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12; 또는
 - ii. 서열번호 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 또는 33과 적어도 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 또는 99.5% 서열 동일성을 가진 서열
- 을 코딩하는 것인 핵산 구축물.

청구항 3

제1항에 있어서, 형질전이유전자는 STXBP1 이소형 a를 코딩하고 서열번호 7의 cDNA 서열; 또는 서열번호 7과 적어도 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 또는 99.5% 서열 동일성을 가진 서열을 포함하는 것인 핵산 구축물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 형질전이유전자에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함하고, 상기 프로모터는

- i. 서열번호 1의 CAG 1.6 kb 프로모터; 또는
- ii. 서열번호 2의 hSYN 프로모터; 또는
- iii. 서열번호 3의 MECP2 프로모터; 또는
- iv. 서열번호 4의 hNSE 프로모터; 또는
- v. 서열번호 5의 CamKII 프로모터; 또는
- vi. 서열번호 6의 내인성 hSTXBP1 프로모터; 또는
- vii. 서열번호 37의 MECP2 인트론에 5'에서 3' 방향으로 작동 가능하게 연결된 서열번호 3의 MECP2 프로모터를 포함하는 것인 핵산 구축물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 구축물은 서열번호 8의 SV40 폴리아데닐화 신호 서열을 포함하는 것인 핵산 구축물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 핵산 구축물을 포함하는 바이러스 벡터로서, 상기 핵산 구축물의 5' 및/또는 3' 플랭크(f flank)에서 역위 말단 반복부(ITR)를 추가로 포함하는 바이러스 벡터.

청구항 7

제6항에 있어서, 5' ITR 및/또는 3' ITR이 천연 아데노 관련 바이러스(AAV)의 ITR을 포함하는 것인 바이러스 벡터.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 3' ITR이 서열번호 18을 포함하고/하거나 5' ITR이 서열번호 19를 포함하는 것인 바이러스 벡터.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 핵산 구축물 또는 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 바이러스 벡터를 포함하는 바이러스 입자.

청구항 10

제9항에 있어서, AAV2, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9, AAV10, AAVtt 또는 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 AAV로부터의 VP1 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 입자.

청구항 11

제10항에 있어서, 캡시드 단백질은 AAVtt 또는 AAV9로부터 유래하고, 각각 서열번호 20 또는 21, 또는 서열번호 20 또는 21과 적어도 98.5% 또는 99% 또는 99.5% 서열 동일성을 가진 서열을 포함하는 것인 바이러스 입자.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 치료에 사용하기 위한 바이러스 입자.

청구항 13

제12항에 있어서, 중증 조기 발병 간질성 뇌병증과 관련된 STXBP1 유전 장애의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 바이러스 입자.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 오타하라(Ohtahara) 증후군, 웨스트(West) 증후군 또는 드라벳(Dravet) 증후군의 치료에 사용하기 위한 바이러스 입자.

청구항 15

STXBP1 기능적 활성의 상실을 특징으로 하는 질환의 치료 및/또는 예방 방법으로서, 제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 바이러스 입자를, 상기 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 질환은 병리학적 STXBP1 변이체를 유발하는, 환자의 적어도 하나의 돌연변이와 관련되어 있고, 상기 병리학적 STXBP1 변이체는 서열번호 9에 대해 표 5 및/또는 표 6에 제시된 돌연변이 또는 돌연변이의 조합을 포함하는 것인 방법.

발명의 설명**기술 분야**

본 발명은 예를 들어, 간질과 관련된 신경발달 장애, 예컨대, 오타하라(Ohtahara) 증후군, 웨스트(West) 증후군

및 드라벡(Dravet) 증후군에서 확인된, 신타신(syntaxin) 결합 단백질 1(STXBP1) 기능적 활성의 상실과 관련된 질환의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 핵산 구축물, 바이러스 벡터 및 바이러스 입자에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 많은 신경발달 장애는 생애 초기에 심각한 임상 증상의 발현을 유발하는 유전적 변형과 관련되어 있다. STXBP1의 유전적 변형은 오타하라 증후군, 웨스트 증후군 및 드라벡 증후군과 같은 중증 초기 발병 간질성 뇌병증(EOEE)과 관련되어 있다(Saitou et al. 2008, Stamberger et al. 2016). STXBP1 뇌병증(STXBP1-E)은 큰 스펙트럼의 증상을 특징으로 하지만, 현재 모든 환자들이 심각한 지적 장애를 갖고 최대 85%의 환자들이 발작을 발생시키는 것으로 확립되었다(Abramov et al. 2020). STXBP1-E는 STXBP1(Munc-18) 유전자의 우성 이형접합성 드 노보(de novo) 돌연변이에 의해 야기될 수 있다. 미스센스(missense), 넌센스(nonsense), 프레임시프트(frameshift), 결실(deletion), 중복(duplication) 및 스플라이스(splice) 부위 변이체를 포함하는 다수의 유전적 변이체가 보고되었다. 대부분의 경우는 전형적으로 드 노보로 이형접합성 기능 상실(LoF) 돌연변이에 의해 야기되지만, 드문 경우 이형접합성 또는 모자이크 부모로부터 유전된다. STXBP1의 동형접합성 돌연변이를 유발하는 최근 변이체가 기재되었다. 유전형-표현형 상관관계 연구는 현재까지 돌연변이 유형과 STXBP1-E의 상이한 발현 사이의 명확한 연관성을 확인하지 못했다.
- [0003] STXBP1(Munc-18; 신타신 결합 단백질 1)은 뉴런 및 신경내분비 세포에서 SNARE 매개(N-에틸말레이미드 민감성 인자 부착 단백질 수용체) 막 융합을 조절하는 분자 기구의 필수 구성요소이다. STXBP1은 닫힌 입체구조의 신타신-1에 결합하여 SNARE 복합체의 형성을 조절하는데, 이것은 시냅스 소포의 융합 및 시냅스에서의 신경전달물질 방출을 유도하는 과정이다.
- [0004] 도 1은 정상 조건(A) 및 질환 조건(B) 하에 시냅스 전달에 대한 STXBP1 영향의 개략도를 보여준다. STXBP1(Munc18)은 시냅스 기구의 주요 구성요소이고 시냅스전 막에서 그와 신타신-1의 상호작용은 신경전달물질 방출을 유발하는 중요한 단계이다. 정상 조건(A) 하에, STXBP1은 시냅스전 막에서 풍부하게 발현되며, 신타신-1과의 복합체 형성은 신경전달물질 방출 및 시냅스후 전류의 생성을 야기하는 효율적인 시냅스 소포 융합을 보장한다. 질환 조건(B) 하에, 돌연변이체 STXBP1은 발현되지 않거나 신타신-1에 직접 결합할 수 없고, 남은 정상 STXBP1 수준은 효율적인 신경전달물질 방출을 유지하기에 충분하지 않아, 시냅스후 전류 감소를 초래한다[Patzke et al. 2015].
- [0005] STXBP1 녹아웃(KO) 연구는 뉴런에서의 상기 단백질의 부재가 발생 전반에 걸쳐 시냅스 소포로부터의 신경전달물질 분비의 완전한 상실을 유발한다는 것을 입증하였다(Verhage et al. 2000). STXBP1에 대한 이형접합성 KO 모델(HET)의 특징규범은 STXBP1 단백질 수준의 약 50% 감소가 근간대성 경련 및 스파이크파 방전을 특징으로 하는 강한 발작 표현형을 초래함을 시사하였다(Kovacevic et al. 2018, Orock et al. 2018, Chen et al. 2020). 이러한 HET 마우스의 확장된 표현형 분류는 손상된 인지 능력, 과다활동 및 불안증 유사 행동도 보여주었다. 가바성(GABAergic) 뉴런에서만 이형접합성 발현을 가진 마우스의 생성은 가바성 개재뉴런으로부터 글루타메이트성(glutamatergic) 피라미드 뉴런으로의 시냅스 전달의 차이를 강조함으로써 STXBP1 돌연변이의 기작에 대한 추가 통찰력을 제공하였다(Chen et al. 2020).
- [0006] STXBP1 HET 마우스 뉴런은 정상적인 시냅스 전달을 보여주지만, 보다 상세한 분석은 STXBP1 수준의 감소가 글루타메이트성 시냅스, 가바성 시냅스 및 신경근 시냅스에서 강한 자극 동안 시냅스 저하를 증가시킴을 시사하였다(Toonen et al. 2006). 줄기 세포 유래 인간 뉴런을 사용한 실험은 STXBP1 수준의 20% 내지 30% 감소가 정상적인 시냅스 기능을 현저히 감소시킴을 시사함으로써(Patzke et al. 2015), STXBP1 돌연변이의 효과가 뉴런 아형과 종 배경 사이에 달라질 수 있음을 더 강조하였다. 대조적으로, 정상 마우스 뉴런에서의 STXBP1의 과발현은 시냅스 기능을 증가시키고(Toonen et al. 2006), 뇌에서 단백질 이소형(isoform) munc18-1a를 과발현하는 형질 전환 마우스 변종의 표현형 분석은 여러 정신분열증 관련 행동을 나타내었다(Uriguen et al. 2013). STXBP1에 대한 추가 비-시냅스 역할이 설명되었으며 피질 뉴런의 방사형 이동 기작을 조절하는 것으로 제안되었다. 따라서, STXBP1은 또한 원형질막에서 소포 융합을 조절하여 다양한 단백질을 세포 표면에 분포시키고 골지체로부터 원형질막으로의 소포 수송을 조절할 수 있다(Hamada et al. 2016).
- [0007] 기능적 활성의 상실을 초래하는 STXBP1의 돌연변이는 뉴런 기능에 대한 영향을 확립하기 위해 시험관내 및 모델 시스템에서 특징규명되었다. 일반적으로 넌센스, 프레임시프트 또는 결실과 관련된, STXBP1 단백질의 절두로 이어지는 돌연변이는 뉴런 시스템에서 검출되지 않고, 이러한 돌연변이체 단백질은 그의 RNA 메신저의 넌센스 매개 붕괴 기작에 의해 빠르게 하향조절된다는 가설이 있다. STXBP1의 돌연변이 중 약 40% 내지 50%는 미스센스 돌연변이이고(Abramov et al. 2020), 시험관내 실험은 이러한 점 돌연변이가 STXBP1 단백질의 안정성을 감소시

키고 뉴런 시스템에서 발현 수준 감소를 유발함을 입증하였다(Kovacevik et al. 2018, Zhu et al. 2020). STXBP1 미스센스 돌연변이를 보유하는 오타하라 환자의 줄기 세포 유래 뉴런의 연구도 STXBP1 단백질 수준의 감소를 시사하였다(Yamashita et al. 2016). 보다 최근에는, 동형접합성 STXBP1 돌연변이가 확인되었으며, 시험관 내 연구는 동형접합성 L446F 돌연변이가 이형접합성 돌연변이에 대해 이전에 보고된 것보다 단백질 수준에 덜 영향을 미치면서 기능 획득 표현형을 야기함을 시사하였다(Lammertse et al. 2020).

[0008] 전반적으로, STXBP1 유전 장애는 STXBP1 단백질의 기능 상실과 연관되어 있고, 돌연변이체 형태의 응집을 방지하는 소분자 샤페론, 및 STXBP1 발현을 음성적으로 조절하는 특이적 miRNA를 하향조절하는 안티센스 올리고뉴클레오타드를 비롯한 다수의 치료 접근법들이 제안되었다(Abramov et al. 2020). STXBP1에 대한 질환 변형 요법을 개발하는 데 있어서 복잡성은 정상적인 STXBP1 기능적 활성을 회복시킬 수 있고 임상에 적용될 수 있는 새로운 특이적 도구의 개발에 있다. 이 시점에서 기저 질환 기작을 해결하는 승인된 약물 요법은 이용될 수 없다.

[0009] STXBP1 유전 장애의 효과적인 치료에 대한 분명한 충족되지 않은 의학적 요구가 존재한다. 본 개시내용은 치유 잠재력으로 정상적인 STXBP1 기능적 활성을 회복시키기 위해 STXBP1을 과발현하는 질환 변형 유전자 요법을 제공한다.

발명의 내용

[0010] 본 발명은 유전자 요법을 통해, STXBP1 돌연변이의 영향을 보상하고 정상적인 STXBP1 기능적 활성을 회복시킬 수 있는, STXBP1 유전자의 건강한 카피를 제공한다.

[0011] 본 발명은 형질전이유전자(transgene)를 포함하는 핵산 구축물로서,

[0012] i. 각각 서열번호 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16으로 제공된 서열을 가진 이소형 a, b, c, d, e, f, g 또는 h를 포함하는 신타신 결합 단백질 1(STXBP1); 또는

[0013] ii. 서열번호 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16과 적어도 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 또는 99.5% 서열 동일성을 갖고 STXBP1로서의 기능성을 보유하는 서열; 또는

[0014] iii. 서열번호 9에 대해 표 7에 제시된 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 천연 생성 변이체

[0015] 를 코딩하는 형질전이유전자를 포함하는 핵산 구축물을 제공한다.

[0016] 본 발명은

[0017] * 상기 핵산 구축물을 포함하는 바이러스 벡터;

[0018] * 상기 바이러스 벡터를 포함하는 바이러스 입자;

[0019] * STXBP1 유전 장애의 치료 및/또는 예방을 위한 상기 바이러스 입자의 의학적 용도; 및

[0020] * STXBP1 돌연변이(들)를 특징으로 하는 질환의 치료 및/또는 예방 방법으로서, 상기 바이러스 입자를, 상기 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법

[0021] 을 추가로 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1: 정상 조건(A) 및 질환 조건(B) 하에 시냅스 전달에 대한 STXBP1 영향의 개략도. STXBP1(Munc18)은 시냅스 기구의 주요 구성요소이며, 시냅스전 막에서 이와 신타신-1의 상호작용은 신경전달물질 방출을 유발하는 결정적인 단계이다. 정상 조건(A) 하에, STXBP1은 시냅스전 막에서 풍부하게 발현되고, 신타신-1과의 복합체 형성은 효율적인 시냅스 소포 융합을 보장하여, 신경전달물질 방출 및 시냅스후 전류의 생성을 야기한다. 질환 조건(B) 하에, 돌연변이체 STXBP1은 발현되지 않거나 신타신-1에 직접 결합할 수 없으며, 남은 정상 STXBP1 수준은 효율적인 신경전달물질 방출을 유지하기에 충분하지 않아, 시냅스후 전류의 감소를 야기한다[Patzke et al. 2015].

도 2: 인간, 원숭이 및 마우스 STXBP1 서열의 단백질 서열 정렬(서열번호 9에 따른 인간 이소형 a). 이 정렬은 종 전체에 걸쳐 높은 서열 상동성을 보여준다. 원숭이 및 마우스 아미노산 서열은 인간 아미노산 서열과 동일하다.

도 3: 설계된 구축물의 개략도. 이 도면에서, "prom"은 프로모터를 의미하고; "INT"는 인트론을 의미하고; "h"는 인간을 의미하며; SV40은 폴리아데닐화 서열 SV40을 의미하고; "태그"는 구축물의 N 또는 C 말단에 위치한

HA 또는 Myc 태그를 의미한다.

도 4: (A) 항-STXBP1 항체에 의해 검출된, 다양한 프로모터(CAG, MECP2 및 MECP2-인트론)에 의해 구동되는 hSTXBP1 플라스미드에 의해 형질감염된 AD-HEK293 세포의 면역형광 영상화. (B) 확대 구획은 STXBP1이 세포막에 국한되어 있음을 보여준다. AD=부착성, NC=음성 대조군.

도 5: (A) 항-STXBP1 항체에 의해 검출된, 다양한 프로모터(CAG, MECP2 및 MECP2-인트론)에 의해 구동되는 hSTXBP1 플라스미드에 의해 형질감염된 Neuro-2A 세포의 면역형광 영상화. (B) 확대는 STXBP1이 세포막에 국한되어 있음을 보여준다. NC=음성 대조군.

도 6: 다양한 프로모터(CAG, MECP2 및 MECP2-인트론)에 의해 구동되는 hSTXBP1에 의해 형질감염된 Neuro-2A 세포의 웨스턴 블롯 분석. 각각의 조건의 2회 기술적 재현실험이 제시되어 있다. NC = 음성 대조군, 1 = MECP2-인트론-hSTXBP1, 2 = CAG-hSTXBP1, 3 = MECP2-hSTXBP1.

도 7: (A) 항-Myc 항체에 의해 검출된 AD-HEK293 세포에서 CAG 프로모터에 의해 구동되는 Myc 태그부착된 hSTXBP1, 및 (B) 항-HA 항체에 의해 검출된 AD-HEK293 세포, SH-SY5Y 세포 및 Neuro-2a 세포에서 hSyn 프로모터에 의해 구동되는 HA 태그부착된 hSTXBP1의 웨스턴 블롯 분석. 각각의 조건의 2회 기술적 재현실험이 제시되어 있다. (C) 항-STXBP1 항체를 사용하여 AD-HEK293 세포에서도 에피토프 태그부착된 단백질을 검출하였다. NC = 음성 대조군, 1 = CAG-hSTXBP1-Myc, 2 = CAG-Myc-hSTXBP1, 3 = hSyn-HA-hSTXBP1. (A)의 NC 레인에 있는 배경 단백질 밴드는 항-Myc 항체에 의한 내인성 Myc의 검출로 인한 것이다.

도 8: iPSC 유래 글루타메이트성 뉴런에서 STXBP1 카세트의 렌티바이러스 벡터 형질도입. 영상은 대조군 조건(형질도입되지 않음) 하에서의 STXBP1 발현 및 hSyn 또는 MECP2 프로모터의 조절 하에 있는 카세트의 형질도입 후 STXBP1 발현의 대표적인 사진을 보여준다.

도 9: 마우스 1차 뉴런에서 STXBP1의 AAV9 형질도입. (A) MOI 5.0E+5 GC/세포에서 AAV9 바이러스 벡터가 형질도입된 1차 마우스 피질 뉴런에서 STXBP1 염색의 대표적인 영상. 사진은 대조군 조건(형질도입되지 않음), 및 hSyn, MECP2 또는 MECP2-인트론 프로모터의 조절 하에서의 STXBP1 발현을 보여준다. (B) 동일한 1차 마우스 피질 뉴런에서 HA 염색(우측)과 STXBP1 염색(좌측)의 비교.

도 10: MAP2 양성 뉴런에서 STXBP1 과발현의 공국소화. 영상은 AAV9 바이러스 벡터의 형질도입 후 마우스 1차 뉴런에서 항-HA 태그 염색(좌측 패널) 및 항-MAP2 염색(우측 패널)의 대표적인 사진이다. 화살표는 STXBP1(HA) 및 뉴런 마커(MAP2)를 발현하는 세포의 예를 표시한다.

도 11: 바이러스 벡터 DNA 카피 분석. AAV 치료 후 5주령 마우스의 좌측 해마 및 좌측 전두엽 피질로부터의 이 배제 마우스 계통의 수에 의해 정규화된 SV40pA(유인원 바이러스 40의 폴리A 신호)의 qPCR 데이터. 비히클 및 4 개의 AAV9 형질도입 군(대조군 바이러스, hSyn, MECP2, MECP2-인트론)에 대한 데이터가 제시되어 있다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다.

도 12: STXBP1 mRNA 발현 분석. 데이터는 2개의 기준 유전자로 정규화되고 모든 군의 평균 발현(평균 $\pm$ SD)으로 스케일링된 상대적 발현으로서 표현되어 있다. AAV 치료 후 5주령 마우스의 좌측 해마 및 좌측 전두엽 피질 조직으로부터 분석을 수행하였다. 비히클 및 4개의 AAV9 형질도입 군(대조군 바이러스, hSyn, MECP2, MECP2-인트론)에 대한 데이터가 제시되어 있다.

도 13: 웨스턴 블롯에 의한 단백질 분석. (도 13a) 피질에서 다양한 카세트들에 대한 HA 태그 발현을 보여주는 웨스턴 블롯(군당 n = 5 내지 7). GAPDH는 로딩 대조군으로서 사용되었다. (도 13b) HA 태그 밴드 강도의 정량, 각각의 샘플은 GAPDH 로딩 대조군으로 정규화된다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다.

도 14: AAV9-hSyn-NLS-eGFP-NLS 바이러스의 GFP 리포터를 사용하였을 때 마우스 뇌에서 감염된 세포의 분포. (A) AAV9-hSyn1-NLS-GFP-NLS icv를 제공받고 1개월 후에 희생되고 GFP를 표지부착하도록 면역염색된 마우스 뇌의 시상 절편. GFP를 발현하는 세포의 분포는 뇌 전체의 앞쪽에서 뒤쪽으로 관찰되었다. GFP+ 세포를 나타내는 주요 뇌 영역들 중 일부는 직사각형으로 강조되어 있다. (B 내지 G): A로부터의 GFP+ 세포를 보여주는 뇌 영역의 고배율(화살표는 GFP+ 세포를 표시함).

도 15: AAV9-hSyn-NLS-eGFP-NLS 바이러스로부터 GFP 리포터를 발현하는 세포의 특징구명. (A 내지 F) GFP 및 뉴런 마커 NeuN, (G 내지 L) GFP 및 성상세포 마커 GFAP를 검출하기 위해 이중 면역형광 표지부착을 수행하였다. (A 내지 C) GFP 및 (D 내지 F) NeuN 둘 다에 대해 양성을 띠는 세포는 모든 뇌 영역들에서 관찰되었으며(화살표는 이중 표지부착된 세포를 표시함), 이는 뉴런이 형질도입되어 상기 리포터 유전자를 발현했음을

시사한다. 대조적으로, GFAP 양성 세포(J 내지 L)에서 GFP 신호가 검출되지 않았는데(G 내지 I), 이는 정상세포가 상기 리포터 유전자를 발현하지 않았음을 암시한다.

도 16: AAV9 투여 후 마우스 뇌에서 다양한 프로모터들로부터의 HA-STXBP1 융합 단백질의 분포. 다양한 프로모터들로부터 과발현된 HA 태그부착된 STXBP1의 분포를 HA에 대한 면역조직화학으로 마우스의 뇌에서 연구하였다. 음성 대조군 조건으로서, (A) PBS만 또는 (B) AAV9-hSyn-GFP 바이러스 icv를 제공받은 동물에서는 HA 신호가 관찰되지 않았다. (C) 항체 선택성의 음성 대조군(NC)으로서, AAV9-MECP2-인트론-HA-STXBP1 바이러스를 제공받았지만 면역조직화학 절차 동안 1차 HA 항체가 생략된 동물에서는 HA 신호가 관찰되지 않았다. (D 내지 F) HA 신호는 다양한 프로모터들로부터 HA-STXBP1을 발현하는 다양한 바이러스가 주사된 모든 동물들의 뇌에서 관찰되었다. 3개의 프로모터는 대뇌 피질, 해마, 선조체, 후각 구근, 흑질 및 전뇌의 섬유관에서 관찰된 주요 발현과 함께 전체 뇌에 걸쳐 HA 분포의 공통 패턴을 유발하였다. 프로모터들 사이의 현저한 HA 분포 차이는 표 16에 보고되어 있다.

도 17: AAV9 투여 후 해마에서 다양한 프로모터들로부터의 HA-STXBP1 융합 단백질의 분포. 해마의 상이한 부분을 식별하는 데 사용되는 (A 내지 C) HA 및 (D 내지 F) 뉴런 마커 NeuN을 검출하기 위해 이중 면역형광 표지부착을 수행하였다. 3개의 프로모터 모두가 전체 해마, 주로 뉴런 돌기(Mol, LMol, Or, MF) 및 때때로 세포체에서 HA 발현을 유발하였다. (F) MECP2-인트론 프로모터는 다른 2개의 프로모터(D, E)에 비해 더 우수한 범위 및 더 높은 HA 신호 강도를 유발하였다. LMol: 해마의 라쿠노섬(lacunosum) 분자층; MF: 이끼 섬유; Mol: 치상회의 분자층; Or: 상행층(stratum oriens).

도 18: 다양한 프로모터들로부터 HA-STXBP1을 발현하는 세포의 특징규명. 이중 면역형광 표지부착을 수행하여 (A 내지 C) HA 및 (D 내지 F) 뉴런 마커 NeuN을 검출하였다. HA에 대해 양성을 나타내었고 종종 뇌의 상이한 영역에서 관찰된 세포체도 NeuN에 대해 양성을 나타내었는데, 이는 3개의 프로모터 모두가 뉴런에서 형질전이유전자 발현을 유도한다는 것을 뒷받침한다. 화살표는 이중 표지부착된 세포를 표시한다.

도 19: qPCR에 의한 마우스 뇌 내의 STXBP1 변이체 mRNA 수준 분석. WT(야생형) 한배새끼 및 HET(이형접합성) 마우스(군당 n = 11 내지 13)의 꼬리 피질(우측 반구)로부터 얻은 뇌 조직 샘플의 mRNA 분석. (도 19a): 총 내인성 STXBP1의 mRNA 발현 분석(모든 STXBP1 전사체를 인식하는 공통 프로브). (도 19b) 및 (도 19c): 긴 이소형(B) 또는 짧은 단백질 이소형(C)을 특이적으로 인식하는 2개의 상이한 프로브를 사용한, STXBP1 변이체의 mRNA 발현 분석. 데이터는 $2^{-\Delta Ct}$ 값을 계산함으로써 mRNA 발현 수준으로서 제시되고, 이때 발현은 2개의 기준 유전자의 평균으로 정규화되었다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다.

도 20: 웨스턴 블롯에 의한 마우스 뇌의 STXBP1 단백질 수준 분석. WT(야생형) 한배새끼 및 HET(이형접합성) 마우스(군당 n = 11 내지 13)의 우측 전두엽(내측) 피질의 조직 샘플을 분석하였다. (A): 총 STXBP1 단백질 발현을 나타내는 웨스턴 블롯. (B): (A)에서의 각각의 웨스턴 블롯의 정량 데이터. B-액틴은 정규화를 위한 로딩 대조군으로서 사용되었다. "WT" 군은 스케일링 군으로서 사용되었다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다.

도 21: LC-MS에 의한 마우스 뇌의 STXBP1 변이체 단백질 수준 분석. WT(야생형) 한배새끼 및 HET(이형접합성) 마우스(군당 n = 11 내지 13)의 전두엽 피질의 측면 절반의 조직 샘플을 분석하였다. (도 21a): 총 STXBP1 펩티드 대 STXBP1 긴 이소형 대 STXBP1 짧은 이소형의 정량. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다. (도 21b): STXBP1 짧은 이소형 및 긴 이소형을 나타내는 웨스턴 블롯. (도 21c): 도 21b에서의 웨스턴 블롯 각각의 조합된 정량 데이터. B-액틴은 로딩 대조군으로서 사용되었다. 데이터는 각각의 STXBP1 이소형의 밴드 강도와 각각의 B-액틴 밴드 사이의 비로서 제시되어 있다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다.

도 22: 웨스턴 블롯에 의한 마우스 뇌의 신타신-1A(STX1A) 단백질 수준 분석. 마우스 뇌 조직 샘플에서의 STX1A 단백질 발현의 정량(군당 n = 11 내지 13). B-액틴은 정규화를 위한 로딩 대조군으로서 사용되었다. "WT" 군은 스케일링 군으로서 사용되었다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다.

도 23: qPCR에 의한 마우스 뇌의 AAV 형질도입 효율 분석(주사 후 7주) (도 23a) 비히클-PBS가 주사된 WT 마우스(WT), 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스(HET), STXBP1 긴 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(L)) 및 STXBP1 짧은 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(S))에서 바이러스 게놈 카피의 qPCR에 의한 절대적 정량. 샘플을 꼬리 피질(우측 반구)로부터 채취하고 이배체 마우스 게놈의 절대적 수로 정규화된 SV40pA를 사용하여 정량하였다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다. 군당 n = 14마리 또는 15마리의 동물을 분석하고 비모수 일원 ANOVA(크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis) 검정)에 이어 던(Dunn) 사후 다중 비교 검정을 적용하였다. 형질도입 군 사이에는 유의미한 차이가 관찰되지 않았다. (도 23b) SV40 폴리A의 mRNA 발현 분석 및 (도 23c) 인간 특이

적 STXBP1. 데이터는 $2^{-\Delta Ct}$ 값을 계산함으로써 mRNA 발현 수준으로서 제시되고, 이때 발현은 2개의 기준 유전자의 평균으로 정규화되었다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다. 군당 n = 14마리 또는 15마리의 동물을 분석하고, 비모수 일원 ANOVA(크루스칼-왈리스 검정)에 이어 던 사후 다중 비교 검정을 적용하였다. 형질도입 군 사이에는 유의미한 차이가 관찰되지 않았다.

도 24: qPCR에 의한 마우스 뇌 내의 AAV 치료 후 STXBP1 변이체 발현 분석(주사 후 7주). 짧은 변이체(A) 또는 긴 변이체(B)의 총(마우스 및 인간) 수준을 구체적으로 측정하는 프로브를 사용하여 STXBP1 변이체 mRNA 발현 분석을 수행하였다. 데이터는 $2^{-\Delta Ct}$ 값을 계산함으로써 mRNA 발현 수준으로서 제시되고, 이때 발현은 2개의 기준 유전자의 평균으로 정규화되었다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다. 군당 n = 14마리 내지 16마리의 동물을 분석하였다.

도 25: 웨스턴 블롯에 의한 마우스 뇌 내의 AAV 치료 후 STXBP1 변이체 발현 분석(주사 후 7주). 비히클-PBS가 주사된 WT 마우스(WT), 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스(HET), STXBP1 긴 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(L)) 및 STXBP1 짧은 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(S))에서 우측 전두엽(내측) 피질의 샘플의 웨스턴 블롯에 의한 단백질 분석.

(도 25a) 총 STXBP1(긴 변이체 및 짧은 변이체) 단백질 발현에 대한 웨스턴 블롯 데이터의 정량.

(도 25b) 긴 STXBP1 변이체 단백질 발현에 대한 웨스턴 블롯 데이터의 정량.

(도 25c) 짧은 STXBP1 변이체 단백질 발현에 대한 웨스턴 블롯 데이터의 정량.

(도 25d) 신타신-1A 단백질 발현에 대한 웨스턴 블롯 데이터의 정량

B-액틴은 각각의 STXBP1 및 STX1A 밴드 강도의 정규화를 위한 로딩 대조군으로서 사용되었다. 비히클 WT 군(WT)은 스케일링 군으로서 사용되었다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다. 비모수 일원 ANOVA(크루스칼-왈리스 검정)에 이어 던 사후 다중 비교 검정을 이용하여 데이터를 분석하였다(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

도 26: 면역조직화학에 의한 마우스 뇌 내의 AAV 치료 후 HA 태그부착된 STXBP1 발현의 뇌 분포(주사 후 7주). HA 태그부착된 STXBP1 긴 변이체가 주사된 HET 마우스의 시상 절편에 대해 HA 태그 염색을 수행하였고 비히클(PBS)로 치료받은 마우스와 비교하였다. AAV 치료군(동물 6023) 및 비히클 치료군(동물 6009)에 대한 대표적인 뇌 절편의 예가 제시되어 있다. 동물 6023(AAV 치료)의 주요 뇌 영역에서는 강한 HA 염색이 관찰되는 반면, PBS 치료군(동물 6009)에서는 HA 염색이 관찰되지 않는다.

도 27: 주사 후 6주 내지 7주(도 27a 및 27b) 및 24주(도 27c 및 27d)에서 EEG에 의한 STXBP1 HET 마우스 뇌 내의 AAV 치료 후 스파이크와 방전(SWD) 분석. (도 27a) 비히클-PBS가 주사된 WT 마우스(WT, n=10), 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스(HET, n=19), STXBP1 긴 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(L), n=15) 및 STXBP1 짧은 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(S), n=16)에서 SWD의 평균 수. 주사 후 6주 내지 7주에서 연속 7일 동안 24시간에 걸쳐 SWD를 분석하였다. (도 27b) "발작이 없는" 동물(기록 동안 임의의 SWD가 검출되지 않음) 및 "발작이 있는" 동물(기록 동안 SWD가 검출됨)의 수의 분석. (도 27c) 비히클-PBS가 주사된 WT 마우스(WT, n=5), 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스(HET, n=12), STXBP1 긴 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(L), n=9) 및 STXBP1 짧은 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(S), n=11)에서 SWD의 평균 수. 주사 후 24주에서 연속 7일 동안 24시간에 걸쳐 SWD를 분석하였다. (도 27d) 주사 후 24주에서 "발작이 없는" 동물(기록 동안 임의의 SWD가 검출되지 않음)과 "발작이 있는" 동물(기록 동안 SWD가 검출됨)의 수의 분석. 비모수 일원 ANOVA(크루스칼-왈리스 검정)에 이어 던 사후 다중 비교 검정으로 군 사이의 차이를 분석하였고(**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$) 발작 없음 분석을 위해 카이제곱 우발성 검정을 이용하였다.

도 28: STXBP1 HET 마우스에서 AAV 치료 후 체중 분석(주사 후 1주 내지 22주) (A) 비히클-PBS가 주사된 WT(n=17) 및 HET 마우스(n=16)에서 연령의 함수로서 평균 체중. 이원 반복 측정 ANOVA에 이은 비보정 피셔(Fisher) LSD 사후 다중 비교 검정으로 군 사이의 차이를 분석하였다(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). (B) 비히클-PBS가 주사된 WT 마우스(WT, n=17) 및 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스(HET, n=16), STXBP1 긴 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(L), n=10) 및 STXBP1 짧은 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(S), n=13)에서 22주령에서 측정된 평균 체중. 모수 일원 ANOVA에 이어 비보정 피셔 LSD 사후 다중 비교 검정으로 군 사이의 차이를 분석하였다(** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$; ns, 유의미하지 않음). 막대 그래프는 평균 $\pm$ SEM이다.

도 29: STXBP1 HET 마우스에서 AAV 치료 후 뒷다리 움켜쥐기의 분석(주사 후 4주 내지 22주) (A) 비히클-PBS가 주사된 WT 마우스(WT, n=17), 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스(HET, n=16), STXBP1 긴 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(L), n=10) 및 STXBP1 짧은 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(S), n=13)에서 연령의 함수로서 평균 뒷다리 움켜쥐기 점수. (B) 비히클-PBS가 주사된 WT 마우스(n=17), 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스(n=16), AAV9/MECP2-int-STXBP1-L이 주사된 HET 마우스(n=10) 및 AAV9/MECP2-int-STXBP1-S가 주사된 HET 마우스(n=13)에서 22주령에서 기록된 평균 뒷다리 움켜쥐기 점수. 비모수 일원 ANOVA(크루스칼-왈리스 검정)에 이어 비보정 된 사후 다중 비교 검정으로 군 사이의 차이를 분석하였다(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; ns, 유의하지 않음). 막대 그래프는 평균 $\pm$ SEM이다.

도 30: AAV 치료 후 와이어 매달리기 시험에서 STXBP1 HET 마우스의 분석(주사 후 8주). 비히클-PBS가 주사된 WT 마우스(WT, n=17), 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스(HET, n=16), STXBP1 긴 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(L), n=10) 및 STXBP1 짧은 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(S), n=13)에서 8주령에서 사지 와이어 매달리기 시험에서 측정된 낙하 지연시간. 모수 일원 ANOVA에 이어 비보정 피쳐 LSD 사후 다중 비교 검정으로 군 사이의 차이를 분석하였다(**** $p < 0.0001$; ns, 유의하지 않음). 막대 그래프는 평균 $\pm$ SEM이다.

도 31: AAV 치료 후 공포 컨디셔닝 시험에서 STXBP1 HET 마우스의 분석(주사 후 10주) (A) 비히클-PBS가 주사된 WT 마우스(WT, n=17), 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스(HET, n=16), STXBP1 긴 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(L), n=10) 및 STXBP1 짧은 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(S), n=13)에서 공포 컨디셔닝 훈련 단계로부터 24시간 후 10주령에서 수행된 상황적 공포 기억 시험 동안 평균 오싹하는 듯한 행동. 모수 일원 ANOVA에 이어 비보정 피쳐 LSD 사후 다중 비교 검정으로 군 사이의 차이를 분석하였다(* $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$). (B) 상황적 공포 기억 시험 1시간 후 (A)에서와 동일한 동물에서 수행된 단서 공포 기억 시험 동안 평균 오싹하는 듯한 행동. 모수 일원 ANOVA에 이어 비보정 피쳐 LSD 사후 다중 비교 검정으로 군 사이의 차이를 분석하였다(* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). 막대 그래프는 평균 $\pm$ SEM이다.

서열의 간단한 설명

[표 1]

서열 요약

서열 식별기호	서열 명칭
서열번호 1	CAG 1.6kb 프로모터
서열번호 2	hSYN 프로모터
서열번호 3	MECP2 프로모터
서열번호 4	hNSE 프로모터
서열번호 5	CamKII 프로모터
서열번호 6	내인성 hSTXBP1 프로모터
서열번호 7	이소형 a를 코딩하는 인간 STXBP1 cDNA 서열
서열번호 8	SV40 폴리 A
서열번호 9	인간 STXBP1 이소형 a(603 개 아미노산)
서열번호 10	인간 STXBP1 이소형 b(594 개 아미노산)
서열번호 11	인간 STXBP1 이소형 c
서열번호 12	인간 STXBP1 이소형 d
서열번호 13	인간 STXBP1 이소형 e
서열번호 14	인간 STXBP1 이소형 f
서열번호 15	인간 STXBP1 이소형 g
서열번호 16	인간 STXBP1 이소형 h
서열번호 17	AAV9.hu14 DNA 서열
서열번호 18	3' ITR
서열번호 19	5' ITR
서열번호 20	AAVtt(아미노산 서열)
서열번호 21	AAV9(아미노산 서열)
서열번호 22	이소형 a를 코딩하는 인간 STXBP1(전사체 변이체 1)
서열번호 23	이소형 b를 코딩하는 인간 STXBP1(전사체 변이체 2)
서열번호 24	이소형 c를 코딩하는 인간 STXBP1(전사체 변이체 3)
서열번호 25	이소형 d를 코딩하는 인간 STXBP1(전사체 변이체 4)
서열번호 26	이소형 d를 코딩하는 인간 STXBP1(전사체 변이체 5)
서열번호 27	이소형 e를 코딩하는 인간 STXBP1(전사체 변이체 6)
서열번호 28	이소형 e를 코딩하는 인간 STXBP1(전사체 변이체 7)
서열번호 29	이소형 e를 코딩하는 인간 STXBP1(전사체 변이체 8)
서열번호 30	이소형 e를 코딩하는 인간 STXBP1(전사체 변이체 9)
서열번호 31	이소형 f를 코딩하는 인간 STXBP1(전사체 변이체 10)
서열번호 32	이소형 g를 코딩하는 인간 STXBP1(전사체 변이체 11)
서열번호 33	이소형 h를 코딩하는 인간 STXBP1(전사체 변이체 12)
서열번호 34	AAVtt DNA 서열
서열번호 35	MYC TAG
서열번호 36	HA TAG
서열번호 37	MECP2 인트론
서열번호 38	Munc18-1a(aa 568-603)
서열번호 39	Munc18-1b(aa 568-594)
서열번호 40	실시에 4에 사용된 정방향 프라이머
서열번호 41	실시에 4에 사용된 역방향 프라이머
서열번호 42	실시에 4에 사용된 프로브 6-Fam/Zen/3'IB FQ
서열번호 43	STXBP1 펩티드(실시에 9)
서열번호 44	STXBP1 펩티드(실시에 9)
서열번호 45	STXBP1 펩티드(실시에 9)
서열번호 46	STXBP1 펩티드 긴 이소형 특이적(실시에 9)
서열번호 47	STXBP1 펩티드 짧은 이소형 특이적(실시에 9)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 본 발명은 지금부터 특정 비제한적 측면 및 이의 실시양태에 대해 특정 도면 및 실시예를 참조함으로써 설명될 것이다.
- [0024] 달리 표시되지 않는 한, 기술 용어는 그의 일반적인 의미로 사용된다. 특정 의미가 특정 용어에 부여되는 경우, 용어의 정의는 그 용어가 사용되는 맥락에 따라 제공될 것이다.
- [0025] 단수 명사, 예를 들어, “하나”, “한” 또는 “상기 하나”를 언급할 때 부정관사 또는 정관사가 사용되는 경우, 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 이것은 그 명사의 복수형을 포함한다.
- [0026] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 “포함하는”은 다른 요소를 배제하지 않는다. 본 개시내용의 목적을 위해, 용어 “로 구성된”은 용어 “포함하는”의 바람직한 실시양태인 것으로 간주된다.
- [0027] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 “치료”, “치료하는” 등은 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 수득하는 것을 의미한다. 효과는 질환 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방한다는 관점에서 예방적일 수 있고/있거나, 질환 및/또는 질환에 기인한 불리한 증상에 대한 부분적 또는 완전한 치유의 관점에서 치료적일 수 있다. 따라서, 치료는 포유동물, 특히 인간에서 질환의 임의의 치료를 커버하고, (a) 질환에 걸리기 쉬운 경향이 있지만 아직 질환을 가진 것으로서 진단되지 않은 대상체, 즉 인간에서 질환 증상이 발생하는 것을 예방하는 것; (b) 질환을 억제하는 것, 즉 질환의 발병을 저지하는 것; 및 (c) 질환을 완화하는 것, 즉 질환의 퇴행을 야기하는 것을 포함한다.
- [0028] 신탄신 결합 단백질 1
- [0029] 8개의 단백질 이소형을 코딩하는, 인간 STXBP1의 12개 전사체 변이체가 확인되었다. 아미노산 서열은 설치류와 인간 사이에 고도로 보존되어 있다. 중추신경계에서, STXBP1은 뉴런에서 특이적으로 발현되며 피질, 소뇌, 해마 및 기저 신경절을 포함하는 주요 뇌 영역에 걸쳐 광범위하게 분포된다(Kalidas et al. 2000). 짧은 버전과 긴 버전을 포함하는 두 가지 주요 스플라이스 변이체가 설명되었다.
- [0030] Munc18-1a(aa 568-603): GSTHILTPKFLMDLRHPDFRESSRVSFEDQAPTME(서열번호 38).
- [0031] Munc18-1b(aa 568-594): GSTHILTPQKLLDTLKKLNKTDEEISS(서열번호 39).
- [0032] 더 긴 스플라이스 버전(M18L, Munc18-1a, 603개 아미노산)은 마지막 25개의 C-말단 아미노산에서 차이를 보여주고 래트 뇌의 시냅스 수준 및 가바성 뉴런에서 대부분 발현되는 것으로 보고되어 있다(Ramos et al. 2015). 더 작은 스플라이스 버전(M18S, Munc18-1b, 594개 아미노산)은 다양한 세포 구획에 국한되어 있으며 가바성 뉴런과 글루타메이트성 뉴런에서 더 편재적으로 발현된다. 기능적 연구는 STXBP1 스플라이스 변이체가 시냅스 가소성에서 다양한 역할을 할 수 있음을 시사하였다(Meijer et al. 2015).
- [0033] STXBP1 유전자는 염색체 9q34.11(GRCh38 게놈 좌표: chr9:127,579,370-127,696,029)에 위치하며, 인간 코딩된 단백질은 래트 및 뮤린 STXBP1과 높은 수준의 동일성을 가진다(Swanson et al. 1998). STXBP1 유전자는 25개의 엑손을 함유한다. STXBP1 1차 전사체에서 최종 엑손의 대안적 스플라이싱은 정지 코돈을 함유하는 110 bp의 서열을 포함하거나 건너뛰어, STXBP1에 대한 2개의 상이한 C-말단 아미노산 서열을 생성할 수 있다. 603개 아미노산 단백질(서열번호 9)을 코딩하는 STXBP1-202 전사체(ENST00000373302.8)(서열번호 22)는 가장 길다. STXBP1-201(ENST00000373299.5)(서열번호 23)은 594개 아미노산 단백질(서열번호 10)을 코딩한다. 이 변이체들 둘 다가 중추신경계에서 검출되지만, 이들의 발현 패턴은 뇌 조직과 세포 유형 사이에 달라질 수 있다(Ramos-Miguel et al. 2015).
- [0034] 인간 STXBP1의 12개 전사체 변이체 및 8개 단백질 이소형은 표 2에 요약되어 있다.

표 2

STXBP1 전사체 변이체 및 단백질 이소형

인간 STXBP1 이소형	단백질 서열 식별기호	전사체 변이체	DNA 서열 식별기호
이소형 a	서열번호 9	이소형 a를 코딩하는 전사체 변이체 1	서열번호 22
이소형 b	서열번호 10	이소형 b를 코딩하는 전사체 변이체 2	서열번호 23
이소형 c	서열번호 11	이소형 c를 코딩하는 전사체 변이체 3	서열번호 24
이소형 d	서열번호 12	이소형 d를 코딩하는 전사체 변이체 4	서열번호 25
		이소형 d를 코딩하는 전사체 변이체 5	서열번호 26
이소형 e	서열번호 13	이소형 e를 코딩하는 전사체 변이체 6	서열번호 27
		이소형 e를 코딩하는 전사체 변이체 7	서열번호 28
		이소형 e를 코딩하는 전사체 변이체 8	서열번호 29
		이소형 e를 코딩하는 전사체 변이체 9	서열번호 30
이소형 f	서열번호 14	이소형 f를 코딩하는 전사체 변이체 10	서열번호 31
이소형 g	서열번호 15	이소형 g를 코딩하는 전사체 변이체 11	서열번호 32
이소형 h	서열번호 16	이소형 h를 코딩하는 전사체 변이체 12	서열번호 33

[0035]

[0036]

신락신 결합 단백질 1 또는 STXBP1은 때때로 당업계에서 표 3에 나열된 대안적 명칭으로 지칭된다. 가장 일반적인 명칭은 "Munc18-1"이고 덜 일반적인 명칭은 "Sec1"이다. 허용되는 유전자 명칭은 STXBP1이다.

표 3

신타신 결합 단백질 1 대안적 명칭

신타신 결합 단백질 1
신타신 결합 단백질 1
MUNC18-1
단백질 Unc-18 상동체 1
단백질 Unc-18 상동체 A
Unc-18A
Unc18-1
N-Sec1
UNC18
P67
뉴런 SEC1
RBSEC1
STXBP1
HUNC18
RbSec1
UNC18A
NSEC1
M18

[0037]

[0038]

인간, 원숭이 및 마우스 STXBP1 서열(서열번호 9에 따른 인간 이소형 a)의 단백질 서열 정렬은 도 2에 제시되어 있다. 이 정렬은 종 전체에 걸쳐 높은 서열 상동성을 보여준다. 원숭이 및 마우스 아미노산 서열은 인간 아미노산 서열과 동일하다.

[0039]

형질전이유전자

[0040]

본 발명은

[0041]

i. 각각 서열번호 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16으로 제공된 서열을 가진 이소형 a, b, c, d, e, f, g 또는 h를 포함하는 신타신 결합 단백질 1(STXBP1); 또는

[0042]

ii. 서열번호 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16과 적어도 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 또는 99.5% 서열 동일성을 갖고 STXBP1로서의 기능성을 보유하는 서열; 또는

[0043]

iii. 서열번호 9에 대해 표 7에 제시된 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 천연 생성 변이체

[0044]

를 코딩하는 형질전이유전자를 포함하는 핵산 구축물을 제공한다.

[0045]

용어 "형질전이유전자"는 유전자 요법에서 활성 성분으로서 사용하기 위한 유전자 생성물을 코딩하는 핵산 분자 ("핵산 분자"와 "핵산"은 상호교환 가능하게 사용됨), DNA 또는 cDNA를 의미한다. 유전자 생성물은 하나 이상의 펩티드 또는 단백질일 수 있다.

[0046]

한 실시양태에서, 형질전이유전자는 서열번호 9로 제공된 서열; 또는 서열번호 9와 적어도 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 또는 99.5% 서열 동일성을 가진 서열을 가진 STXBP1 이소형 a를 코딩한다.

[0047]

한 실시양태에서, 형질전이유전자는 서열번호 10으로 제공된 서열; 또는 서열번호 10과 적어도 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 또는 99.5% 서열 동일성을 가진 서열을 가진 STXBP1 이소형 b를 코딩한다.

[0048]

한 실시양태에서, 형질전이유전자는 서열번호 11로 제공된 서열; 또는 서열번호 11과 적어도 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 또는 99.5% 서열 동일성을 가진 서열을 가진 STXBP1 이소형 c를 코딩한다.

[0049]

한 실시양태에서, 형질전이유전자는 서열번호 12로 제공된 서열; 또는 서열번호 12와 적어도 95% 또는 96% 또는

97% 또는 98% 또는 99% 또는 99.5% 서열 동일성을 가진 서열 을 가진 STXBP1 이소형 d를 코딩한다.

- [0050] 한 실시양태에서, 형질전이유전자는 서열번호 13으로 제공된 서열; 또는 서열번호 13과 적어도 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 또는 99.5% 서열 동일성을 가진 서열을 가진 STXBP1 이소형 e를 코딩한다.
- [0051] 한 실시양태에서, 형질전이유전자는 서열번호 14로 제공된 서열; 또는 서열번호 14와 적어도 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 또는 99.5% 서열 동일성을 가진 서열을 가진 STXBP1 이소형 f를 코딩한다.
- [0052] 한 실시양태에서, 형질전이유전자는 서열번호 15로 제공된 서열; 또는 서열번호 15와 적어도 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 또는 99.5% 서열 동일성을 가진 서열을 가진 STXBP1 이소형 g를 코딩한다.
- [0053] 한 실시양태에서, 형질전이유전자는 서열번호 16으로 제공된 서열; 또는 서열번호 16과 적어도 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 또는 99.5% 서열 동일성을 가진 서열을 가진 STXBP1 이소형 h를 코딩한다.
- [0054] 한 실시양태에서, 형질전이유전자는
- [0055] i. 각각 서열번호 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 또는 33으로 제공된 서열을 가진 STXBP1 전사체 변이체 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12; 또는
- [0056] ii. 서열번호 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 또는 33과 적어도 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 또는 99.5% 서열 동일성을 가진 서열
- [0057] 을 코딩한다.
- [0058] 당업계 통상적인 관행과 마찬가지로, STXBP1 전사체 변이체 1 내지 12의 mRNA 서열은 기준 게놈 서열과의 일관성을 위해 DNA 서열로서 보고된다(국립 생명공학 정보 센터, www.ncbi.nlm.nih.gov). 이것의 목표는 보고된 불일치가 더 적은 게놈 정렬을 보다 직접적으로 수행하는 것이다. 예를 들어, STXBP1 이소형 a, b 또는 c를 발현하기 위해, 당업자는 전사체 변이체 1, 2 또는 3으로부터 cDNA를 발현할 것이다.
- [0059] 한 실시양태에서, 형질전이유전자는 STXBP1 이소형 a를 코딩하고 서열번호 7의 cDNA 서열; 또는 서열번호 7과 적어도 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 또는 99.5% 서열 동일성을 가진 서열을 포함한다.
- [0060] 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "뉴클레오타이드 서열"은 단량체성 뉴클레오타이드로 구성되거나 이를 포함하는 임의의 분자를 지칭하기 위해 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 핵산은 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 뉴클레오타이드 서열은 DNA 또는 RNA일 수 있다. 뉴클레오타이드 서열은 화학적으로 변형될 수 있거나 인공적일 수 있다. 뉴클레오타이드 서열은 펩티드 핵산(PNA), 모르폴리노 및 잠금 핵산(LNA)뿐만 아니라, 글리콜 핵산(GNA) 및 트레오스 핵산(TNA)도 포함한다. 이 서열들 각각은 분자 골격의 변화에 의해 천연 생성 DNA 또는 RNA와 구별된다. 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드가 사용될 수 있다. 다른 테옥시뉴클레오타이드 유사체는 메틸포스포네이트, 포스포라미데이트, 포스포로디티오에이트, N3'P5'-포스포라미데이트 및 올리고리보뉴클레오타이드 포스포로티오에이트, 및 이들의 2'-O-알릴 유사체 및 2'-O-메틸리보뉴클레오타이드 메틸포스포네이트를 포함한다.
- [0061] 용어 "핵산 구축물"은 재조합 DNA 기술의 이용으로부터 생성된 비천연 생성 핵산을 의미한다. 특히, 핵산 구축물은 자연에 존재하지 않는 방식으로 조합되거나 병치된 핵산 서열의 분절을 함유하도록 변형된 핵산 분자이다.
- [0062] 특정 실시양태에서, 상기 핵산 구축물은 STXBP1의 천연 생성 또는 재조합 기능적 변이체의 코딩 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일성을 가진 코딩 핵산 서열의 전부 또는 단편을 포함한다.
- [0063] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "단편"은 기준 서열의 연속 부분을 의미한다. 예를 들어, 길이가 1000개 뉴클레오타이드인 서열의 단편은 상기 서열의 5개, 50개 또는 500개의 연속 뉴클레오타이드를 의미할 수 있다.
- [0064] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "병리학적 변이체"는 기준 서열에 비해 변형되어 있고 상기 기준 서열에 비해 손상된 기능을 가진 핵산 또는 아미노산 서열을 의미한다. STXBP1의 병리학적 변이체 및 가능한 병리학적 변이체는 각각 표 5 및 6에 제시되어 있다.
- [0065] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "기능적 변이체"는 기준 서열에 비해 변형되어 있지만 상기 기준 서열의 기능을 보유하는 핵산 또는 아미노산 서열을 의미한다. STXBP1의 기능적 변이체는 표 7에 제시되어 있다.
- [0066] 용어 "서열 동일성" 또는 "동일성"은 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드 서열들의 정렬로부터 위치에서 일치(동일한 핵산 또는 아미노산 잔기)의 수를 의미한다. 서열 동일성은 서열 겹을 최소화하면서 중첩 및 동일성을 최대화하도록 정렬될 때 서열들을 비교함으로써 측정된다. 구체적으로, 서열 동일성은 2개의 서열들의 길

이에 따라 다수의 수학적 전번적 또는 국소적 정렬 알고리즘들 중 임의의 정렬 알고리즘을 이용함으로써 측정될 수 있다. 유사한 길이의 서열은 바람직하게는 전체 길이에 걸쳐 서열들을 최적으로 정렬하는 전반적 정렬 알고리즘(예를 들어, 니들만(Needleman)과 분수(Wunsch) 알고리즘; Needleman and Wunsch, 1970, J Mol Biol.; 48(3):443-53)을 이용함으로써 정렬되는 반면, 실질적으로 상이한 길이의 서열들은 바람직하게는 국소적 정렬 알고리즘(예를 들어, 스미스(Smith)와 워터만(Waterman) 알고리즘(Smith and Waterman, 1981, J Theor Biol.; 91(2):379-80) 또는 알츠슐(Altschul) 알고리즘(Altschul SF et al., 1997, Nucleic Acids Res.; 25(17):3389-402; Altschul SF et al., 2005, Bioinformatics.; 21(8):1451-6))을 이용함으로써 정렬된다. 퍼센트 핵산 또는 아미노산 서열 동일성을 측정하기 위한 정렬은 당분야의 기술 내에 있는 다양한 방식들, 예를 들어, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> 또는 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/>와 같은 인터넷 웹 사이트 상에서 입수될 수 있는 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 이용함으로써 달성될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열들의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 비롯한, 정렬을 측정하는 데 적당한 파라미터를 결정할 수 있다. 본원의 목적상, % 핵산 또는 아미노산 서열 동일성 값은 니들만-분수 알고리즘을 이용하여 2개의 서열들의 최적 전반적 정렬을 생성하는 쌍별 서열 정렬 프로그램 EMBOS Needle을 이용함으로써 생성된 값을 지칭하고, 이때 모든 검색 파라미터들은 디폴트 값, 즉 점수화 매트릭스 = BLOSUM62, 갭 개방 = 10, 갭 연장 = 0.5, 말단 갭 페널티 = 거짓, 말단 갭 개방 = 10 및 말단 갭 연장 = 0.5로 설정된다.

[0067] 본 개시내용에 따른 핵산 구축물은 형질전이유전자; 및 적어도 이를 숙주 세포와 같은 숙주에서 발현시키기에 적합한 핵산 요소를 포함한다.

[0068] 예를 들어, 상기 핵산 구축물은 STXBP1을 코딩하는 형질전이유전자; 및 관련 숙주에서 STXBP1을 발현시키는 데 필요한 하나 이상의 조절 서열을 포함한다. 일반적으로, 핵산 구축물은 형질전이유전자; 및 STXBP1의 발현에 필요한, 형질전이유전자 앞(5' 비코딩 서열)과 뒤(3' 비코딩 서열)에 있는 조절 서열을 포함한다.

[0069] 프로모터

[0070] 한 실시양태에서, 핵산 구축물은 STXBP1을 코딩하는 형질전이유전자; 및 상기 형질전이유전자에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함한다. 바람직하게는, 형질전이유전자는 프로모터의 조절 하에 있다.

[0071] 용어 "프로모터"는 작동 가능하게 연결된 핵산의 전사를 유도하는 조절 요소를 지칭한다. 프로모터는 작동 가능하게 연결된 핵산의 전사의 속도 및 효율 둘 다를 조절할 수 있다. 프로모터는 핵산의 프로모터 의존적 전사를 향상시키거나("인핸서") 억제하는("리프레서") 다른 조절 요소에도 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 조절 요소는 전사 인자 결합 부위, 리프레서 및 활성화제 단백질 결합 부위, 및 프로모터로부터의 전사의 양을 조절하기 위해 직접적으로 또는 간접적으로 작용하는 것으로 당업자에 의해 공지되어 있는 임의의 다른 뉴클레오타이드 서열, 예를 들어, 어테뉴에이터(attenuator), 인핸서(enhancer) 및 사일런서(silencer)를 제한 없이 포함한다. 프로모터는 동일한 가닥 상에서 DNA 서열의 업스트림(센스 가닥의 5' 영역 쪽)에 작동 가능하게 연결된 유전자 또는 코딩 서열의 전사 시작 부위 근처에 위치된다. 프로모터는 길이가 약 100개 내지 1000개 염기쌍일 수 있다. 프로모터의 위치는 특정 유전자에 대한 전사 시작 부위를 기준으로 표기된다(즉, 업스트림에서 위치는 -1 부터 역으로 카운팅되는 음수임, 예를 들어, -100은 업스트림에서 100번째 염기쌍이 있는 위치임).

[0072] 용어 "5'에서 3' 방향으로 작동 가능하게 연결된" 또는 간단히 "작동 가능하게 연결된"은 2개 이상의 뉴클레오타이드 서열이 이러한 2개 이상의 서열 각각으로 하여금 그들의 정상 기능을 수행할 수 있게 하는 기능적 관계로 연결되는 것을 의미한다. 전형적으로, 용어 작동 가능하게 연결된은 프로모터와 같은 조절 요소와, 관심 있는 단백질을 코딩하는 형질전이유전자의 병치를 의미하는 데 사용된다. 예를 들어, 프로모터와 형질전이유전자 사이의 작동 가능한 연결은 프로모터가 세포와 같은 적합한 발현 시스템에서 형질전이유전자의 5' 발현을 유도하는 작용을 할 수 있게 한다.

[0073] 프로모터는 조직 또는 세포 유형 특이적 프로모터, 또는 장기 특이적 프로모터, 또는 다수의 장기에 특이적인 프로모터, 또는 전신 또는 편재 프로모터일 수 있다.

[0074] 용어 "편재 프로모터"는 보다 구체적으로 다양한 별개의 세포 또는 조직, 예를 들어, 뉴런 및 성상세포 둘 다에서 활성을 나타내는 프로모터를 의미한다.

[0075] 중추신경계 전체에 걸친 형질전이유전자의 발현에 적합한 프로모터의 예는 닭 베타 액틴(CBA) 프로모터(Miyazaki 1989, Gene 79:269-277), CAG 프로모터(Niwa 1991, Gene 108:193-199), 신장 인자 1 알파 프로모터(EF1 α)(Nakai 1998, Blood 91:4600-4607), 인간 시냅신 1 유전자 프로모터(hSyn)(Kugler S. et al. Gene Ther. 2003. 10(4):337-47) 또는 포스포글리세레이트 키나제 1 프로모터(PGK1)(Hannan 1993, Gene 130:233-

239), 메틸 CPG 결합 단백질 2(MECP2) 프로모터(Adachi et al., Hum. Mol. Genetics. 2005; 14(23): 3709-3722), 인간 뉴런 특이적 에놀라제(NSE) 프로모터(Twyman, R. M. and E. A. Jones (1997). J Mol Neurosci 8(1): 63-73)), 칼슘/칼모듈린 의존성 단백질-키나제 II(CAMKII) 프로모터(Nathanson, J. L., et al. (2009). Neuroscience 161(2): 441-450) 및 인간 유비퀴틴 C(UBC) 프로모터(Schorpp, M., et al. (1996). Nucleic Acids Res 24(9): 1787-1788)를 포함한다.

- [0076] 한 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 1의 CAG 1.6 kb 프로모터이다.
- [0077] 한 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 2의 hSYN 프로모터이다.
- [0078] 한 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 3의 MECP2 프로모터이다.
- [0079] 한 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 4의 hNSE 프로모터이다.
- [0080] 한 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 5의 CamKII 프로모터이다.
- [0081] 한 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 6의 내인성 hSTXBP1 프로모터이다.
- [0082] 한 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 37의 MECP2 인트론에 5'에서 3' 방향으로 작동 가능하게 연결된 서열번호 3의 MECP2 프로모터이다.
- [0083] 대안적 실시양태에서, 핵산 구축물은 STXBP1을 코딩하는 형질전이유전자; 및 상기 형질전이유전자에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함하고, 이때 프로모터는
 - [0084] (a) CAG 1.6 kb 프로모터(서열번호 1);
 - [0085] (b) hSYN 프로모터(서열번호 2);
 - [0086] (c) MECP2 프로모터(서열번호 3);
 - [0087] (d) hNSE 프로모터(서열번호 4);
 - [0088] (e) CamKII 프로모터(서열번호 5);
 - [0089] (f) 내인성 hSTXBP1 프로모터(서열번호 6); 또는
 - [0090] (g) MECP2 인트론(서열번호 37)에 5'에서 3' 방향으로 작동 가능하게 연결된 MECP2 프로모터(서열번호 3)
- [0091] 와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다.
- [0092] 프로모터는 본원에 기재된 프로모터의 기능적 변이체 또는 단편일 수 있다. 프로모터의 기능적 변이체 또는 단편은 상응하는 비변이체 또는 전체 길이 프로모터의 특성을 보유한다는 의미에서 기능적일 수 있다. 따라서, 프로모터의 기능적 변이체 또는 단편은 작동 가능하게 연결된 형질전이유전자의 전사를 유도하는 능력을 보유함으로써, 상기 형질전이유전자에 의해 코딩된 STXBP1의 발현을 유도한다. 프로모터의 기능적 변이체 또는 단편은 특정 조직 유형에 대한 특이성을 보유할 수 있다. 예를 들어, 프로모터의 기능적 변이체 또는 단편은 CNS의 세포에 특이적일 수 있다. 프로모터의 기능적 변이체 또는 단편은 뉴런에서 STXBP1의 발현을 특이적으로 유도할 수 있다.
- [0093] 프로모터는 충분한 길이를 갖고 프로모터로서 작용하는 데 필요한 요소를 함유하는, 즉 상기 프로모터에 작동 가능하게 연결된 형질전이유전자의 전사를 유도함으로써, STXBP1의 발현을 유도할 수 있는 프로모터의 뉴클레오타이드 서열을 의미하는 "최소 서열"을 포함할 수 있다.
- [0094] 본 발명의 핵산 구축물에 사용되는 최소 프로모터는 예를 들어, 서열번호 1을 포함하는 CAG 프로모터, 또는 서열번호 2를 포함하는 hSYN 프로모터, 또는 서열번호 3을 포함하는 MECP2 프로모터일 수 있다.
- [0095] 프로모터는 하나 이상의 인트론을 포함할 수 있다. 용어 "인트론"은 유전자내 비코딩 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 전형적으로, 인트론은 유전자의 전사 동안 DNA로부터 메신저 RNA(mRNA)로 전사되지만, 그의 번역 전에 스플라이싱에 의해 mRNA 전사체로부터 절제된다.
- [0096] 프로모터는 본원에 기재된 인트론의 기능적 변이체 또는 단편을 포함할 수 있다. 인트론의 기능적 변이체 또는 단편은 상응하는 비변이체 또는 전체 길이 인트론의 특성을 보유한다는 의미에서 기능적일 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 인트론의 기능적 변이체 또는 단편은 비코딩이다. 본원에 기재된 인트론의 기능적 변이체 또는 단편도 DNA로부터 mRNA로 전사되는 능력 및/또는 스플라이싱에 의해 mRNA로부터 절제되는 능력을 보유할 수 있다.

- [0097] 본 발명에 사용되는 프로모터에 혼입될 수 있는 인트론은 천연 비코딩 영역으로부터 유래할 수 있거나 조작될 수 있다.
- [0098] 한 실시양태에서, 인트론은 서열번호 37을 포함하거나 이로 구성된 MECP2 인트론; 또는 서열번호 37과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 99.9% 동일성을 가진 이의 기능적 변이체 또는 단편이다.
- [0099] 프로모터 및/또는 인트론은 하나 이상의 비발현 엑손 서열(들)과 조합될 수 있다. 비발현 엑손 서열은 전사체를 생성할 수 없으며 오히려 인트론 서열을 플랭킹하여 스플라이스 부위를 제공할 수 있다.
- [0100] 대안적으로, 프로모터는 화학적 유도성 프로모터일 수 있다. 화학적 유도성 프로모터는 화학적 유도제를, 프로모터의 조절을 필요로 하는 대상체에게 생체내 투여함으로써 조절되는 프로모터이다. 적합한 화학적 유도성 프로모터의 예는 테트라사이클린/미노사이클린 유도성 프로모터(Chtarto 2003, Neurosci Lett. 352:155-158) 또는 라파마이신 유도성 프로모터(Sanftner 2006, Mol Ther. 13:167-174)를 제한 없이 포함한다.
- [0101] 폴리아데닐화 신호 서열
- [0102] 핵산 구축물은 폴리아데닐화 신호 서열 및/또는 전사 터미네이터를 포함하는 3' 비번역 영역을 포함할 수 있다.
- [0103] 용어 "폴리아데닐화 신호 서열"(또는 모두 상호교환 가능하게 사용되는 "폴리아데닐화 부위" 또는 "폴리(A) 신호")은 전구체 mRNA로 전사되고 유전자 전사의 종료를 안내하는, 유전자의 3' 비번역 영역(3' UTR) 내의 특정 인식 서열을 의미한다. 폴리아데닐화 신호 서열은 새로 형성된 전구체 mRNA를 그의 3'-말단에서 핵산내부분해적으로 절단하고 아데닌 염기만으로 구성된 RNA 스트레치(폴리아데닐화 과정; 폴리(A) 꼬리)를 이 3'-말단에 추가하기 위한 신호로서 작용한다. 폴리아데닐화 신호 서열은 mRNA의 핵 이출, 번역 및 안정성에 중요하다. 본 발명과 관련하여, 폴리아데닐화 신호 서열은 포유동물 세포에서 포유동물 유전자 및/또는 바이러스 유전자의 폴리아데닐화를 유도할 수 있는 인식 서열이다.
- [0104] 폴리아데닐화 신호 서열은 전형적으로 (a) 전구-메신저 RNA(전구-mRNA)의 3'-말단 절단 및 폴리아데닐화 둘 다에 필요하고 다운스트림 전사 종결을 촉진하는 것으로 밝혀진 컨센서스 서열 AAUAAA; 및 (b) 폴리(A) 신호로서 AAUAAA의 활용 효율을 조절하는, AAUAAA의 업스트림 및 다운스트림에 있는 추가 요소로 구성된다. 포유동물 유전자에는 이 모티프들의 상당한 가변성이 있다.
- [0105] 한 실시양태에서, 임의로 본원에 기재된 다양한 실시양태의 하나 이상의 특징과 함께, 본 발명의 핵산 구축물의 폴리아데닐화 신호 서열은 포유동물 유전자 또는 바이러스 유전자의 폴리아데닐화 신호 서열이다. 적합한 폴리아데닐화 신호는 특히 SV40 초기 폴리아데닐화 신호, SV40 후기 폴리아데닐화 신호, HSV 타이미딘 키나제 폴리아데닐화 신호, 프로타틴 유전자 폴리아데닐화 신호, 아데노바이러스 5 E1b 폴리아데닐화 신호, 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호, PBGD 폴리아데닐화 신호, 또는 인 실리코(in silico) 설계된 합성 폴리아데닐화 신호를 포함한다.
- [0106] 한 실시양태에서, 폴리아데닐화 신호 서열은 서열번호 8을 포함하는 SV40 폴리아데닐화 신호 서열이다.
- [0107] 다른 조절 요소
- [0108] 핵산 구축물은 추가 조절 요소, 예를 들어, 인핸서 서열, 인트론, 마이크로RNA 표적화 서열, 벡터 내로의 DNA 단편의 삽입을 용이하게 하는 폴리링커 서열 및/또는 스플라이싱 신호 서열을 포함할 수 있다.
- [0109] 바이러스 벡터
- [0110] 본 발명은 본원에 기재된 핵산 구축물을 포함하는 바이러스 벡터를 추가로 제공한다.
- [0111] 용어 "바이러스 벡터"는 캡시드에 패키징될 수 있는, 본원에 개시된 바이러스 입자의 핵산 부분을 의미한다.
- [0112] 바이러스 벡터는 전형적으로 적어도 (i) 형질전이유전자, 및 이를 숙주에서 발현시키는 데 적합한 핵산 요소를 포함하는 핵산 구축물, 및 (ii) 바이러스 게놈의 전부 또는 일부, 예를 들어, 바이러스 게놈의 역위 말단 반복부를 포함한다.
- [0113] 용어 "역위 말단 반복부"(ITR)는 팔린드로믹(palindromic) 서열을 함유하고 DNA 복제의 시작 동안 프라이머로서 작용하는 T자형 헤어핀 구조를 형성하도록 접힐 수 있는, 바이러스의 5'-말단에 위치한 뉴클레오티드 서열(5' ITR)과 3'-말단에 위치한 뉴클레오티드 서열(3' ITR)을 의미한다. 이 서열은 숙주 게놈 내로의 바이러스 게놈 통합, 숙주 게놈으로부터의 레스큐(rescue), 및 성숙 비리온으로의 바이러스 핵산의 캡슐화에도 필요하다. ITR

은 벡터 게놈 복제 및 바이러스 입자 내로의 이의 패키징을 위해 시스(cis)로 요구된다.

[0114] 한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 바이러스의 5' ITR 및 3' ITR을 포함한다.

[0115] 한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 파코바이러스(특히 아데노 관련 바이러스), 아데노바이러스, 알파바이러스, 레트로바이러스(특히 감마 레트로바이러스 및 렌티바이러스), 헤르페스바이러스 및 SV40으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 바이러스의 5' ITR 및 3' ITR을 포함한다.

[0116] 한 실시양태에서, 바이러스는 아데노 관련 바이러스(AAV), 아데노바이러스(Ad) 또는 렌티바이러스이다.

[0117] 한 실시양태에서, 바이러스는 AAV이다.

[0118] 한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 AAV의 5' ITR 및 3' ITR을 포함한다.

[0119] AAV는 인간 유전자 요법을 위한 잠재적인 벡터로서 상당한 관심을 불러일으켰다. 상기 바이러스의 유리한 성질들 중에는 이 바이러스와 임의의 인간 질환의 연관성 결여, 분열 세포와 비분열 세포 둘 다를 감염시키는 그의 능력, 및 감염될 수 있는 다양한 조직으로부터 유래한 광범위한 세포주가 있다. AAV 게놈은 4681개의 염기를 함유하는 선형 단일 가닥 DNA 분자로 구성된다(Berns and Bozhzky, 1987, Advances in Virus Research (Academic Press, Inc.) 32:243-307). 게놈은 DNA 복제의 기원 및 바이러스에 대한 패키징 신호로서 시스로 작용하는 역위 말단 반복부(ITR)를 각각의 말단에서 포함한다. ITR은 길이가 전형적으로 약 100 내지 150 bp이다.

[0120] AAV ITR은 야생형 뉴클레오티드 서열을 가질 수 있거나, 공지된 AAV ITR에 비해 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환, 전형적으로 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하의 뉴클레오티드 삽입, 결실 또는 치환에 의해 변경될 수 있다. AAV 벡터의 역위 말단 반복부(ITR)의 혈청형은 임의의 공지된 인간 또는 비인간 AAV 혈청형으로부터 선택될 수 있다.

[0121] 특정 실시양태에서, 바이러스 벡터는 임의의 AAV 혈청형의 ITR을 포함할 수 있다. 공지된 AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3(유형 3A 및 3B 포함), AAV-LK03, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10(AAVrh10), AAV11, AAV12, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 양 AAV를 제한 없이 포함한다. 영장류 너로부터 확인된 Rec2 및 Rec3과 같은 재조합 혈청형도 포함된다.

[0122] 대안적으로, 바이러스 벡터는 합성 5' ITR 및/또는 3' ITR을 포함할 수 있다.

[0123] 한 실시양태에서, 본 발명의 핵산 구축물은 혈청형 AAV2의 AAV의 5' ITR 및/또는 3' ITR을 추가로 포함하는 바이러스 벡터에 포함된다.

[0124] 한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 각각 서열번호 18 및/또는 19로 제공된 서열; 또는 각각 서열번호 18 및/또는 19와 적어도 80% 또는 적어도 90% 동일성을 가진 서열을 가진, 혈청형 AAV2의 AAV의 3' ITR 및/또는 5' ITR을 포함한다.

[0125] 바이러스 입자

[0126] 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 핵산 구축물 또는 바이러스 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 추가로 제공한다.

[0127] 용어 "바이러스 입자"는 (i) 내부에 패키징된 바이러스 벡터(임의로 핵산 구축물을 포함함) 및 (ii) 캡시드를 포함하는 감염성 및 전형적으로 복제 결합 바이러스 입자를 의미한다.

[0128] 한 실시양태에서, 캡시드는 아데노 관련 바이러스의 캡시드 단백질로 형성된다.

[0129] 아데노 관련 바이러스의 바이러스 캡시드의 단백질은 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3을 포함한다. 다양한 AAV 혈청형의 캡시드 단백질 서열 사이의 차이로 인해 상이한 세포 표면 수용체가 세포 진입에 사용된다. 이것은 대안적 세포내 처리 경로와 함께, 각각의 AAV 혈청형에 대해 상이한 조직 친화성을 발생시킨다.

[0130] CNS를 표적화하는 AAV 기반 유전자 요법은 문헌[Pignataro D, Sucunza D, Rico AJ et al., J Neural Transm 2018;125:575-589]에서 검토되어 있다. 바이러스 입자는 뇌 및 CNS의 다양한 영역에서 적어도 뉴런 세포를 표적화하도록 선택될 수 있고/있거나 조작될 수 있다.

[0131] AAV 바이러스는 통상적으로 그의 혈청형의 관점에서 지칭된다. 혈청형은 그의 캡시드 표면 항원 발현 프로파일로 인해 다른 변이체 아종과 구별하는 데 사용될 수 있는 독특한 반응성을 가진 AAV의 변이체 아종에 상응한다. AAV 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV3(A 및 B 포함) AAV-LK03, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10

(AAVrh10) 또는 AAV11, 또는 이들의 조합을 포함한다. AAV는 영장류 뇌로부터 확인된 Rec2 또는 Rec3과 같은 재조합 혈청형; 및 AAV2-트루-타입(AAVtt) 일 수 있다. AAVtt는 문헌[Tordo et al., Brain. 2018; 141(7): 2014-2031] 및 국제 특허 출원 공개 제WO 2015/121501호에 상세히 설명되어 있다. AAV 혈청형의 검토는 문헌[Choi et al (Curr Gene Ther. 2005; 5(3); 299-310)] 및 문헌[Wu et al (Molecular Therapy. 2006; 14(3), 316-327)]에서 찾아볼 수 있다.

- [0132] 본 발명의 바이러스 입자에서, 캡시드는 임의의 AAV 혈청형 또는 혈청형의 조합(예컨대, 하나의 AAV 혈청형으로부터의 VP1 및 상이한 혈청형으로부터의 VP2 및/또는 VP3)으로부터 유래할 수 있다.
- [0133] 특정 실시양태에서, 캡시드 단백질은 AAV2, AAV5, AAV8, AAV9, AAV2-레트로 또는 AAVtt로부터 유래할 수 있다.
- [0134] 한 실시양태에서, 바이러스 입자는 적어도 AAV로부터의 VP1 캡시드 단백질을 포함하며, 이때 상기 캡시드 단백질은 AAV2, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9(예를 들어, 서열번호 21로 제시된 AAV9.hu14), AAV10, AAV-트루-타입(서열번호 20으로 제시된 AAVtt) 또는 이들의 조합으로부터 유래한다.
- [0135] 한 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 20으로 제시된 AAVtt로부터의 캡시드 단백질을 포함한다. 한 실시양태에서, 캡시드 단백질은 서열번호 20과 적어도 98.5%, 99% 또는 99.5% 동일하다.
- [0136] 한 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 21로 제시된 AAV9로부터의 캡시드 단백질을 포함한다. 한 실시양태에서, 캡시드 단백질은 서열번호 21과 적어도 98.5%, 99% 또는 99.5% 동일하다.
- [0137] 본 발명에 사용하기 위한 ITR 서열, rep 또는 cap 유전자를 포함하는 AAV 게놈 또는 AAV 게놈의 요소는 AAV 전체 게놈 서열에 대한 하기 수탁번호로부터 유래할 수 있다: 아데노 관련 바이러스 1 NC_002077, AF063497; 아데노 관련 바이러스 2 NC_001401; 아데노 관련 바이러스 3 NC_001729; 아데노 관련 바이러스 3B NC_001863; 아데노 관련 바이러스 4 NC_001829; 아데노 관련 바이러스 5 Y18065, 5AF085716; 아데노 관련 바이러스 6 NC_001862; 조류 AAV ATCC VR-865 AY186198, AY629583, NC_004828; 조류 AAV 변종 DA-1 NC_006263, AY629583; 소 AAV NC_005889, AY388617.
- [0138] AAV 바이러스는 분기군 또는 클론의 관점에서 지칭될 수도 있다. 이것은 천연 유래 AAV 바이러스의 계통발생적 관계, 전형적으로 공통 조상까지 추적될 수 있는 AAV 바이러스의 계통발생적 군을 의미하고 이들의 모든 후손을 포함한다. 추가로, AAV 바이러스는 특정 분리주, 즉 자연에서 발견되는 특정 AAV 바이러스의 유전적 분리주의 관점에서 지칭될 수 있다.
- [0139] 용어 "유전적 분리주"는 다른 천연 생성 AAV 바이러스와의 제한된 유전적 혼합을 겪음으로써, 유전적 수준에서 인식 가능하게 상이한 집단을 정의하는 AAV 바이러스 집단을 기술한다. 본 발명에 사용될 수 있는 AAV의 분기군 및 분리주의 예는 다음을 포함한다:

- 분기군 A: AAV1 NC_002077, AF063497, AAV6 NC_001862, Hu. 48 AY530611, Hu 43 AY530606, Hu 44 AY530607, Hu 46 AY530609;
- 분기군 B: Hu. 19 AY530584, Hu. 20 AY530586, Hu 23 AY530589, Hu22 AY530588, Hu24 AY530590, Hu21 AY530587, Hu27 AY530592, Hu28 AY530593, Hu 29 AY530594, Hu63 AY530624, Hu64 AY530625, Hu13 AY530578, Hu56 AY530618, Hu57 AY530619, Hu49 AY530612, Hu58 25 AY530620, Hu34 AY530598, Hu35 AY530599, AAV2 NC_001401, Hu45 AY530608, Hu47 AY530610, Hu51 AY530613, Hu52 AY530614, Hu T41 AY695378, Hu S17 AY695376, Hu T88 AY695375, Hu T71 AY695374, HuT70 AY695373, Hu T40 AY695372, Hu T32 AY695371, Hu T17 AY695370, Hu LG15 AY695377;
- 분기군 C: Hu9 AY530629, Hu10 AY530576, Hu11 AY530577, Hu53 AY530615, Hu55 AY530617, Hu54 AY530616, Hu7 AY530628, Hu18 AY530583, Hu15 AY530580, Hu16 AY530581, Hu25 AY530591, Hu60 AY530622, Ch5 AY243021, Hu3 AY530595, Hu1 AY530575, Hu4 AY530602 Hu2, AY530585, Hu61 AY530623;
- 분기군 D: Rh62 AY530573, Rh48 AY530561, Rh54 AY530567, Rh55 AY530568, C5 y2 AY243020, AAV7 AF513851, Rh35 AY243000, Rh37 AY242998, Rh36 AY242999, Cy6 AY243016, Cy4 AY243018, Cy3 AY243019, Cy5 AY243017, Rh13 AY243013;
- 분기군 E: Rh38 AY530558, Hu66 AY530626, Hu42 AY530605, Hu67 AY530627, Hu40 AY530603, Hu41 AY530604, Hu37 AY530600, Rh40 10 AY530559, Rh2 AY243007, Bbl AY243023, Bb2 AY243022, Rh10 AY243015, Hu17 AY530582, Hu6 AY530621, Rh25 AY530557, Pi2 AY530554, Pi1 AY530553, Pi3 AY530555, Rh57 AY530569, Rh50 AY530563, Rh49 AY530562, Hu39 AY530601, Rh58 AY530570, Rhbl AY530572, Rh52AY530565, Rh53 AY530566, Rh51 AY530564, Rh64 AY530574, Rh43 15 AY530560, AAV8 AF513852, Rh8 AY242997, Rh1 AY530556; 및
- 분기군 F: Hu 14 (AAV9) AY530579, Hu31 AY530596, Hu32 AY530597; 클론 분리주 AAV5 Y18065, AF085716, AAV 3 NC_001729, AAV 3B NC_001863, AAV4 15 NC_001829, Rh34 AY243001, Rh33 AY243002, Rh32 AY243003.

[0140]

[0141]

본 발명은 동일한 벡터 내에서 AAV의 다양한 혈청형, 분기군, 클론 또는 분리주로부터의 캡시드 단백질 서열의 용도를 포함한다. 본 발명은 또한 한 혈청형의 게놈을 또 다른 혈청형의 캡시드에 패키징하는 것, 즉 슈도타이핑(pseudotyping)도 포함한다. 키메라, 서플링 또는 캡시드 변형 유도체를 선택하여 하나 이상의 원하는 기능을 제공할 수 있다. 따라서, 이들 유도체는 천연 생성 AAV 캡시드를 포함하는 AAV 바이러스 벡터에 비해 증가된 유전자 전달 효율, 감소된 면역원성(체액성 또는 세포성), 변경된 친화성 범위 및/또는 특정 세포 유형의 개선된 표적화를 나타낼 수 있다. 증가된 유전자 전달 효율은 세포 표면에서의 개선된 수용체 또는 보조수용체 결합, 개선된 내재화, 세포 및 핵 내로의 개선된 수송, 바이러스 입자의 개선된 코팅 제거, 또는 이중 가닥 형태로의 단일 가닥 게놈의 개선된 전환에 의해 달성될 수 있다. 증가된 효율은 또한 변경된 친화성 범위 또는 특정 세포 집단의 표적화와 관련될 수도 있으므로, 벡터 용량은 벡터가 필요하지 않은 조직으로의 전달에 의해 희석되지 않는다.

[0142]

키메라 캡시드 단백질은 천연 생성 AAV 혈청형의 2개 이상의 캡시드 코딩 서열 사이의 재조합에 의해 생성된 키메라 캡시드 단백질을 포함한다. 이것은 예를 들어, 하나의 혈청형의 비감염성 캡시드 서열을 상이한 혈청형의 캡시드 서열과 함께 공형질감염시키고, 유도된 선택을 이용하여 원하는 성질을 가진 캡시드 서열을 선택하는 마커 레스큐 접근법에 의해 수행될 수 있다. 다양한 혈청형의 캡시드 서열은 세포 내에서의 상동성 재조합에 의해 변경되어 신규 키메라 캡시드 단백질을 생성할 수 있다.

[0143]

키메라 캡시드 단백질은 2개 이상의 캡시드 단백질 사이에, 예를 들어, 상이한 혈청형의 2개 이상의 캡시드 단백질 사이에 특정 캡시드 단백질 도메인, 표면 루프 또는 특정 아미노산 잔기를 전달하기 위한 캡시드 단백질 서열의 조작에 의해 생성된 키메라 캡시드 단백질을 포함한다. 서플링 또는 키메라 캡시드 단백질은 DNA 서플링 또는 오류 유발 PCR에 의해 생성될 수 있다. 하이브리드 AAV 캡시드 유전자는 관련 AAV 유전자의 서열, 예를 들어, 다수의 상이한 혈청형의 캡시드 단백질을 코딩하는 서열을 무작위로 단편화한 후, 서열 상동성을 가진 영역에서 교차를 야기할 수도 있는 자가-프라이밍 중합효소 반응에서 단편을 재조합함으로써 생성될 수 있다. 여러 혈청형의 캡시드 유전자를 서플링함으로써 이 방식으로 생성된 하이브리드 AAV 유전자의 라이브러리를 스크리닝하여 원하는 기능성을 가진 바이러스 클론을 확인할 수 있다. 유사하게, 오류 유발 PCR을 이용하여 AAV 캡시드

유전자를 무작위로 돌연변이시켜, 원하는 성질에 대해 선택될 수 있는 다양한 변이체 라이브러리를 생성할 수 있다.

- [0144] 캡시드 유전자의 서열은 천연 야생형 서열에 대한 특정 결실, 치환 또는 삽입을 도입하기 위해 유전적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 캡시드 유전자는 캡시드 코딩 서열의 개방 관독 프레임 내에서, 또는 캡시드 코딩 서열의 N-말단 및/또는 C-말단에서 무관한 단백질 또는 펩티드 서열을 삽입함으로써 변형될 수 있다. 무관한 단백질 또는 펩티드는 유리하게는 특정 세포 유형에 대한 리간드로서 작용함으로써, 표적 세포와의 개선된 결합을 부여하거나 특정 세포 집단으로의 바이러스 입자의 표적화의 특이성을 개선하는 단백질 또는 펩티드일 수 있다. 무관한 단백질은 생산 공정의 일부로서 바이러스 입자의 정제를 돕는 단백질, 즉 에피토프 또는 친화성 태그일 수 있다. 삽입 부위는 전형적으로 바이러스 입자의 내재화 또는 수송과 같은 바이러스 입자의 다른 기능을 방해하지 않도록 선택될 것이다. 적합한 삽입 부위는 문헌[Choi et al (Curr Gene Ther. 2005; 5(3); 299-310)]에 개시되어 있다.
- [0145] 한 실시양태에서, 바이러스 입자는 동일한 혈청형의 AAV에 상응하는 천연 Cap 단백질에 의해 형성된 바이러스 입자로 특정 AAV 혈청형으로부터 유래한 AAV 바이러스 벡터를 캡슐화함으로써 제조될 수 있다.
- [0146] 그럼에도 불구하고, 천연 생성 바이러스 입자의 구조적 및 기능적 성질을 변형하고 개선하기 위해 여러 기법이 개발되었다(Bunning H et al. J Gene Med 2008; 10: 717-733).
- [0147] 따라서, 또 다른 실시양태에서, 바이러스 입자는
- [0148] (a) 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래한 캡시드 단백질, 예를 들어, AAV2 ITR 및 AAV9 캡시드 단백질; 또는 AAV2 ITR 및 AAVtt 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 입자; 또는
- [0149] (b) 상이한 AAV 혈청형 또는 돌연변이체로부터 유래한 캡시드 단백질의 혼합물, 예를 들어, 2개 이상의 AAV 혈청형의 단백질에 의해 형성된 캡시드와 함께 AAV2 ITR을 포함하는 모자이크 바이러스 입자; 또는
- [0150] (c) 상이한 AAV 혈청형 또는 변이체 사이의 도메인 교환에 의해 절두된 캡시드 단백질, 예를 들어, AAV3 도메인을 포함하는 AAV5 캡시드 단백질과 함께 AAV2 ITR을 포함하는 키메라 바이러스 입자; 또는
- [0151] (d) 선택적 결합 도메인을 표시하여, 표적 세포 특이적 수용체와의 엄격한 상호작용을 가능하게 하도록 조작된 바이러스 입자
- [0152] 에 패키징된, 주어진 AAV 혈청형의 ITR(들)로 플랭킹된 STXBP1 코딩 형질전이유전자를 포함하는 핵산 구축물을 포함할 수 있다.
- [0153] AAV2 트루-타입 캡시드로서도 명명된 AAVtt 캡시드는 국제 특허 출원 공개 제W02015/121501호에 설명되어 있다. 한 실시양태에서, AAVtt VP1 캡시드 단백질은 AAV2 단백질 서열(NCBI 기준 서열: YP_680426.1)의 다음 위치들 중 하나 이상에 상응하는 위치에서 야생형 VP1 캡시드 단백질에 대한 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다: 125, 151, 162, 205, 312, 457, 492, 499, 533, 546, 548, 585, 588 및/또는 593.
- [0154] 한 실시양태에서, AAVtt는 야생형 AAV2 VP1 캡시드 단백질(NCBI 기준 서열: YP_680426.1)에 대한 다음 아미노산 치환들 중 하나 이상을 포함한다: V125I, V151A, A162S, T205S, N312S, Q457M, S492A, E499D, F533Y, G546D, E548G, R585S, R588T 및/또는 A593S.
- [0155] 한 실시양태에서, AAVtt는 위치 457, 492, 499 및 533에서 야생형 AAV2 VP1 캡시드 단백질에 대한 4개 이상의 돌연변이를 포함한다.
- [0156] 제조된 AAV 바이러스 입자의 구축은 일반적으로 당분야에 알려져 있으며, 예를 들어, 미국 특허 제5,173,414호; 미국 특허 제5,139,941호; 국제 특허 출원 공개 제W0 92/01070호; 국제 특허 출원 공개 제W0 93/03769호; 및 문헌[Lebkowski et al. (1988) Molec. Cell. Biol. 8:3988-3996]; 문헌[Vincent et al. (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press)]; 문헌[Carter, B. J. (1992) Current Opinion in Biotechnology 3:533-539]; 문헌[Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158:97-129]; 및 문헌[Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5:793-801]에 설명되어 있다.
- [0157] 바이러스 입자의 생성
- [0158] 본원에 기재된 바이러스 벡터 및 핵산 구축물을 운반하는 바이러스 입자의 생성은 생성될 바이러스 입자의 구조적 특징을 고려함으로써 선택되는 통상적인 방법 및 프로토콜에 의해 수행될 수 있다.

- [0159] 요약하면, 바이러스 입자는 헬퍼 벡터 또는 바이러스 또는 다른 DNA 구축물(들)의 존재 하에 핵산 구축물 또는 바이러스 벡터에 의해 형질감염되는 숙주 세포, 보다 구체적으로 특이적 바이러스 생성 세포(팩키징 세포)에서 생성될 수 있다.
- [0160] 용어 "팩키징 세포"는 핵산 구축물 또는 바이러스 벡터에 의해 형질감염될 수 있고 바이러스 벡터의 완전한 복제 및 팩키징에 필요한 모든 능력 기능을 트랜스로 제공하는 세포 또는 세포주를 의미한다. 팩키징 세포는 항시적 또는 유도적 방식으로 이러한 능력 바이러스 기능을 발현할 수 있다. 팩키징 세포는 부착 또는 현탁 세포일 수 있다.
- [0161] 전형적으로, 바이러스 입자를 생성하는 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0162] (a) 배양 배지에서 핵산 구축물 또는 바이러스 벡터를 포함하는 팩키징 세포를 배양하는 단계; 및
- [0163] (b) 세포 배양 상청액 및/또는 세포 내부로부터 바이러스 입자를 수거하는 단계.
- [0164] STXBP1을 코딩하는 형질전이유전자를 운반하는 핵산 구축물 또는 발현 벡터(예를 들어, 플라스미드); rep 및 cap 유전자를 코딩하지만 ITR 서열을 운반하지 않는 제2 핵산 구축물(예를 들어, AAV 헬퍼 플라스미드); 및 AAV 복제에 필요한 아데노바이러스 기능을 제공하는 제3 핵산 구축물(예를 들어, 플라스미드)을 사용하는 일시적인 세포 공형질감염을 포함하는 통상적인 방법을 이용하여 바이러스 입자를 생성할 수 있다.
- [0165] AAV 복제에 필요한 바이러스 유전자는 바이러스 헬퍼 유전자로서 지칭된다. 전형적으로, AAV 복제에 필요한 상기 유전자는 E1A, E1B, E2a, E4 또는 VA RNA와 같은 아데노바이러스 헬퍼 유전자이다. 한 실시양태에서, 아데노 바이러스 헬퍼 유전자는 Ad5 또는 Ad2 혈청형을 가진다.
- [0166] AAV 입자의 생성은 대안적으로 재조합 배클로바이러스의 조합으로 곤충 세포를 감염시킴으로써 수행될 수 있다 (Urabe et al. Hum. Gene Ther. 2002; 13: 1935-1943). SF9 세포는 팩키징될 AAV rep, AAV cap 및 AAV 벡터를 각각 발현하는 2개 또는 3개의 배클로바이러스 벡터에 의해 공감염된다. 재조합 배클로바이러스 벡터는 바이러스 복제 및/또는 팩키징에 필요한 바이러스 헬퍼 유전자 기능을 제공한다. 문헌[Smith et al 2009 (Molecular Therapy, vol.17, no.11, pp 1888-1896)]은 곤충 세포에서 AAV 입자의 대규모 생성을 위한 이중 배클로바이러스 발현 시스템을 설명한다.
- [0167] 적합한 배양 배지는 당업자에게 공지되어 있다. 배양 배지를 구성하는 성분은 배양될 세포의 유형에 따라 달라질 수 있다. 영양분 조성 이외에, 오스몰농도 및 pH가 배양 배지의 중요한 파라미터인 것으로 간주된다. 세포 성장 배지는 아미노산, 비타민, 유기 염과 무기 염, 탄수화물의 공급원, 지질, 미량 원소(몇 가지 예를 들어, CuSO₄, FeSO₄, Fe(NO₃)₃, ZnSO₄)를 포함하는, 당업자에 의해 잘 알려진 다수의 성분들을 포함하고, 이때 성분 각각은 시험관내에서의 세포의 배양(즉, 세포의 생존 및 성장)을 뒷받침하는 양으로 존재한다. 성분은 보조 물질, 예컨대, 완충제 물질(예를 들어, 중탄산나트륨, 헤페스(Hepes), 트리스(Tris) 또는 유사하게 수행하는 완충제), 산화 안정화제, 기계적 응력에 반작용하기 위한 안정화제, 프로테아제 억제제, 동물 성장 인자, 식물 가수분해물, 항응집제, 소포체도 포함할 수 있다. 세포 성장 배지의 특성 및 조성은 구체적인 세포 요건에 따라 달라진다. 상업적으로 입수될 수 있는 세포 성장 배지의 예는 MEM(최소 필수 배지), BME(기본 배지 이글(Eagle)), DMEM(둘베코(Dulbecco)의 변형 이글 배지), 이스코브스(Iscoves) DMEM(둘베코 배지의 이스코브 변형), GMEM, RPMI 1640, 레이보비츠(Leibovitz) L-15, McCoy's, 배지 199, Ham(Ham's 배지) F10 및 유도체, Ham F12, DMEM/F12를 포함한다.
- [0168] 본 개시내용에 따라 사용될 바이러스 벡터의 구축 및 제조를 위한 추가 지침은 문헌[Viral Vectors for Gene Therapy, Methods and Protocols. Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 737. Merten and Al-Rubeai (Eds.); 2011 Humana Press (Springer); Gene Therapy. M. Giacca. 2010 Springer-Verlag; Heilbronn R. and Weger S. Viral Vectors for Gene Transfer: Current Status of Gene Therapeutics. In: Drug Delivery, Handbook of Experimental Pharmacology 197; M. Schafer-Korting (Ed.). 2010 Springer-Verlag; pp. 143-170; Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols. R.O. Snyder and P. Moullier (Eds). 2011 Humana Press (Springer); Bunning H. et al. Recent developments in adeno-associated virus technology. J. Gene Med. 2008; 10:717-733; Adenovirus: Methods and Protocols. M. Chillon and A. Bosch (Eds.); Third Edition. 2014 Humana Press (Springer)]에서 발견될 수 있다.
- [0169] 숙주 세포
- [0170] 본 개시내용은 본원에 기재된 STXBP1을 코딩하는 핵산 구축물 또는 바이러스 벡터를 포함하는 숙주 세포를 추가

로 제공한다. 본 개시내용에 따른 숙주 세포는 헬퍼 벡터 또는 바이러스 또는 다른 DNA 구축물의 존재 하에 핵산 구축물 또는 바이러스 벡터에 의해 형질감염되고 바이러스 입자의 완전한 복제 및 패키징을 위해 요구되는 모든 누락 기능을 트랜스로 제공하는 패키징 세포로서도 명명된 바이러스 생성 세포이다. 상기 패키징 세포는 부착 또는 현탁 세포일 수 있다.

[0171] 패키징 세포는 원숭이, 인간, 개 및 설치류 세포를 비롯한 포유동물 세포와 같은 진핵 세포일 수 있다. 인간 세포의 예는 PER.C6 세포(W001/38362), MRC-5(ATCC CCL-171), WI-38(ATCC CCL-75), HEK-293 세포(ATCC CRL-1573), HeLa 세포(ATCC CCL2) 및 태아 레서스(rhesus) 폐 세포(ATCC CL-160)이다. 비인간 영장류 세포의 예는 Vero 세포(ATCC CCL81), COS-1 세포(ATCC CRL-1650) 또는 COS-7 세포(ATCC CRL-1651)이다. 개 세포의 예는 MDCK 세포(ATCC CCL-34)이다. 설치류 세포의 예는 BHK21-F, HKCC 세포 또는 CHO 세포와 같은 햄스터 세포이다.

[0172] 바이러스 입자를 생성하는 패키징 세포는 포유동물 공급원에 대한 대안으로서 닭, 오리, 거위, 메추라기 또는 꿩과 같은 조류 공급원으로부터 유래할 수 있다. 조류 세포주의 예는 조류 배아 줄기 세포(W001/8593; W003/076601), 불멸화된 오리 망막 세포(W02005/042728), 및 닭 세포(W02006/108846) 또는 오리 세포, 예컨대, EB66 세포주(W02008/129058; W02008/142124)를 비롯한 조류 배아 줄기 세포 유래 세포를 포함한다.

[0173] 또 다른 실시양태에서, 숙주 세포는 배칼로바이러스 감염 및 복제를 허용하는 임의의 패키징 세포일 수 있다. 한 예에서, 상기 세포는 곤충 세포, 예컨대, Sf9 세포(ATCC CRL-1711), Sf21 세포(IPLB-Sf21), MG1 세포(BTI-TN-MG1) 또는 High Five™ 세포(BTI-TN-5B1-4)이다.

[0174] 한 실시양태에서, 숙주 세포는

[0175] (a) 인간 STXBP1을 코딩하는 형질전이유전자를 포함하는 제1 핵산 구축물 또는 바이러스 벡터;

[0176] (b) AAV rep 및/또는 cap 유전자를 코딩하는 제2 핵산 구축물, 예를 들어, 플라스미드로서, ITR 서열을 운반하지 않는 제2 핵산 구축물; 및 임의로,

[0177] (c) 바이러스 헬퍼 유전자를 포함하는 제3 핵산 구축물, 예를 들어, 플라스미드 또는 바이러스

[0178] 를 포함한다.

[0179] 본 개시내용은 본 개시내용의 바이러스 입자가 형질도입된 숙주 세포도 제공하고, 본원에서 사용된 용어 "숙주 세포"는 관심 있는 바이러스에 의한 감염에 민감하고 시험관내에서 배양될 수 있는 임의의 세포주를 지칭한다.

[0180] 약학 조성물

[0181] 본 개시내용은 약학적으로 허용되는 부형제, 희석제 또는 담체와 함께 본 개시내용의 핵산 구축물, 바이러스 벡터, 바이러스 입자를 포함하는 약학 조성물도 제공한다.

[0182] 용어 "약학적으로 허용되는"은 규제 관청 또는 인정된 약전, 예컨대, 유럽 약전에 의해 동물 및/또는 인간에서 사용되도록 승인되었음을 의미한다. 용어 "부형제"는 치료제와 함께 투여되는 희석제, 보조제, 담체 또는 비히클을 지칭한다.

[0183] 임의의 적합한 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제가 약학 조성물의 제조에 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, April 1997] 참조). 약학 조성물은 전형적으로 멸균되어 있고 제조 및 저장의 조건 하에 안정적이다. 약학 조성물은 용액(예를 들어, 식염수, 텍스트로스 용액, 또는 완충된 용액, 또는 다른 약학적으로 허용되는 멸균 유체), 미세유화액, 리포솜, 또는 높은 생성물 농도를 수용하기에 적합한 다른 차수 구조물(예를 들어, 미세입자 또는 나노입자)로서 제제화될 수 있다. 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅제의 사용, 분산액의 경우 요구된 입자 크기의 유지, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우, 등장화제, 예를 들어, 당, 폴리알코올, 예컨대, 만니톨 또는 소르비톨, 또는 염, 예컨대, 염화나트륨을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 것이다.

[0184] 한 실시양태에서, 약학 조성물은 용액, 예를 들어, 완충된 식염수 용액으로서 제제화된다.

[0185] 보충 활성 화합물이 본 개시내용의 약학 조성물 내로 혼입될 수 있다. 추가 치료제의 공투여에 대한 지침은 캐나다 약사 협회의 의약품집(Compendium of Pharmaceutical and Specialties(CPS))에서 발견될 수 있다.

[0186] 한 실시양태에서, 약학 조성물은 실질내, 뇌내, 정맥내 또는 척수강내 투여에 적합한 조성물이다. 이 약학 조성

물은 예시하기 위한 것일 뿐이고 다른 비경구 투여 경로 및 비-비경구 투여 경로에 적합한 약학 조성물을 제한하지 않는다. 본원에 기재된 약학 조성물은 단일 유닛 제형 또는 다회 제형으로 패키징될 수 있다.

[0187] 의학 용도

[0188] 본 개시내용의 약학 조성물, 핵산 구축물, 바이러스 벡터 및 바이러스 입자는 STXBP1 기능적 활성의 상실과 연관된 임의의 상태, 예를 들어, STXBP1 돌연변이와 연관된 임의의 상태를 치료하거나 예방하는 데 사용될 수 있다.

[0189] 이러한 상태는 드라벡 증후군, 레녹스-가스타우트(Lennox-Gastaut) 증후군, 유아 경련, 근간대성 간질, 간질성 뇌병증, 조기 근간대성 뇌병증, 비-증후군성 간질, 오타하라 증후군, 조기 발병 간질성 뇌병증, 웨스트 증후군, 발달 지연, 자폐 스펙트럼 장애, 운동실조-떨림-지체 증후군, 레트(Rett) 증후군, 및 간질 없는 지적 장애를 포함한다.

[0190] 본 개시내용의 약학 조성물, 핵산 구축물, 바이러스 벡터 및 바이러스 입자는 STXBP1 유전자의 유전 돌연변이, 예를 들어, 오타하라, 드라벡 및 웨스트 증후군과 같은 증후군의 발생에 기여하는 돌연변이와 연관된 신경발달 및/또는 간질 장애를 치료하거나 예방하는 데 특히 유용할 수 있다.

[0191] 따라서, 한 실시양태에서, 약학 조성물, 핵산 구축물, 바이러스 벡터 또는 바이러스 입자는 치료에 사용하기 위해 제공된다.

[0192] 한 실시양태에서, 약학 조성물, 핵산 구축물, 바이러스 벡터 또는 바이러스 입자는 STXBP1 유전 장애의 치료에 사용하기 위해 제공된다.

[0193] 한 실시양태에서, STXBP1 유전 장애는 드라벡 증후군, 레녹스-가스타우트 증후군, 유아 경련, 근간대성 간질, 간질성 뇌병증, 조기 근간대성 뇌병증, 비증후군성 간질, 오타하라 증후군, 조기 발병 간질성 뇌병증, 웨스트 증후군, 발달 지연, 자폐 스펙트럼 장애, 운동실조-떨림-지체 증후군, 레트 증후군, 또는 간질 없는 지적 장애이다.

[0194] 한 실시양태에서, STXBP1 유전 장애는 드라벡 증후군, 오타하라 증후군 또는 웨스트 증후군이다.

[0195] 한 실시양태에서, STXBP1 유전 장애 치료용 의약의 제조를 위한 핵산 구축물, 바이러스 벡터 또는 바이러스 입자의 용도가 제공된다.

[0196] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 치료 유효량의 약학 조성물 또는 바이러스 입자를, STXBP1 유전 장애의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, STXBP1 유전 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

[0197] 용어 "치료 유효량"은 환자 또는 대상체에게 투여될 때 원하는 치료 결과를 달성하는 바이러스 입자 수, 또는 이러한 바이러스 입자를 포함하는 약학 제제의 양을 의미한다. 원하는 치료 결과는

[0198] • 다양한 발작 유형, 예를 들어, 무긴장 발작(낙하 발작), 근간대성 발작, 전신 발작, 부분 발작, 열성 발작, 유아 경련의 빈도 또는 지속시간의 유의미한 감소;

[0199] • 지속된 발작 부재의 유의미한 달성;

[0200] • 신경발달 증상, 예컨대, 발달 지연, 지적 장애, 언어 손상, 인지 손상, 비자발적 움직임, 보행 장애, 자폐증 특징의 진행에 대한 유의미한 영향

[0201] 을 포함한다.

[0202] 상호교환 가능하게 사용되는 용어 "환자" 또는 "대상체"는 포유동물을 지칭한다. 임의의 포유동물 종은 치료 방법으로부터 이익을 얻을 수 있다. 전형적으로, 환자는 인간이다. 환자는 신생아, 유아, 소아 또는 청소년일 수 있다.

[0203] STXBP1 유전 장애는 알려진 유전 돌연변이에 의해 확인될 수 있다.

[0204] 한 실시양태에서, STXBP1 유전 장애는 돌연변이 또는 돌연변이의 조합을 포함하는 병리학적 STXBP1 변이체와 연관되어 있다.

[0205] 용어 "병리학적 STXBP1 변이체"는 환자 샘플에서 발견되고 임상시험 또는 연구를 통해 확인된 STXBP1의 변이체를 의미하고, 이것은 병리학적 표현형과 연관되어 있는 것으로 보고되어 있다. 병리학적 STXBP1 변이체 및 가능

한 병리학적 STXBP1 변이체는 실시예 3에 설명되어 있고 각각 표 5 및 6에 예시되어 있다.

- [0206] 한 실시양태에서, 병리학적 STXBP1 변이체는 표 5에 나열된 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이(들)를 포함한다.
- [0207] 한 실시양태에서, 병리학적 STXBP1 변이체는 표 6에 나열된 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이(들)를 포함한다.
- [0208] 본원에 기재된 STXBP1 유전자 요법은 항간질 약물 또는 다른 신경조절 치료제와 함께 투여될 수 있다.
- [0209] 약학 조성물, 핵산 구축물, 바이러스 벡터 또는 바이러스 입자는 환자의 뇌 및/또는 뇌척수액(CSF)에 투여될 수 있다. 예를 들어, 이들은 주사에 의해 투여될 수 있거나 목적 특이적 투여 장치의 사용에 의해 투여될 수 있다. 뇌로의 전달은 대뇌내 전달, 실질내 전달, 피질내 전달, 해마내 전달, 피각내 전달, 소뇌내 전달 및 이들의 조합으로부터 선택될 수 있다. CSF로의 전달은 대수조내 전달, 척수강내 전달, 뇌실내(ICV) 전달 및 이들의 조합으로부터 선택될 수 있다.
- [0210] 치료는 단일 용량으로서 제공될 수 있지만, 예를 들어, 치료가 정확한 영역을 표적화하지 않았을 수 있는 경우, 또는 추후 수년 이내 및/또는 상이한 AAV 혈청형 사용 시 반복 용량이 고려될 수 있다.
- [0211] **서열**
- [0212] 본 발명에 포함된 서열은 표 4에 제시되어 있다.

표 4

서열

서열 식별기호 및 명칭	서열
서열번호 1 CAG 1.6kb 프로모터	CGTTACATAACTTACG6TAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGC CCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCC ATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC GCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACA TCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGCTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCT TCACTCTCCCCATCTCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTATTATTATT TTAATTATTTTATGCAAGCATGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGCGGG GGCGGGGGCGGGCGAGGGCGGGGGCGGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGCGCGCAGCC AATCAGAGCGGGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGGCGGGCGGC GGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCG
서열번호 2 hSYN 프로모터	AGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGTGCTACCTGACG ACCGACCCCGACCCACTGGACAAAGCACCCCAACCCCATTCCTCCAAATTGCGCATC CCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCACACTGCC AGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCTTCGCCCCCGCTGGCGGCGCGCGCCAGCGC CGCCTCAGCACTGAAGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGAAACTCCCC TTCCCGGCCACTTTGGTCGCGTCCGCGCGCGCGCGCCAGCCGACCGCGACCA CGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCGCGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCGGGC GACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGCTGCTGCTGA GAGCGCAG
서열번호 3 MECP2 프로모터	AGCTGAATGGGGTCCGCCTCTTTTCCCTGCCTAAACAGACAGGAAGTCTCTGCCAA TTGAGGGCGTCAACCGCTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACAACCAATGAAG GGTAATCTCGACAAAGAGCAAGGGGTGGGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCAC ACAGGCTGGTCGGGAGGGCGGGGCGCGACGTCTGCCGTGCGGGGTCCCGGCATCG GTTGCGCGC
서열번호 4 hNSE 프로모터	ATGCAGCTGGACCTAGGAGAGAAGCAGGAGAGGAAGATCCAGCACAAAAATCCG AAGCTAAAAACAGGACACAGAGATGGGGGAAGAAAGAGGGCAGAGTGAGGCAAA AAGAGACTGAAGAGATGAGGGTGGCCGCCAGGCACTTTAGATAGGGGAGAGGCTT TATTTACCTCTGTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCAGGTA GTCTTGCTTAGTCTCCAGGCTGGAGTGCAAGTGACAAATCTCAGCTCACTGCAAC TTCCACCTCCTGGGTTCAAGCAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGA CTACAGGCGCATGCAACCGCGCTGGCTAATTTTGTATTTTAGTAGAAACGGG GTTTCACCAAGTTAGCCAGGATGGTCTGGATCTCCTGACCTCGTGATCTGCCCGC CTCGCCTTCCAAAGTGCTGGGATTACAGGGGTGAGCCACAGCGCTGCTCCCTA TTTACTTCTGTCTTCTACCTCCAGGAGATCAAGACGCTGGCCTTCAGACCTGAT CAGACTCCCAGGGGCAGCCACCACATGTATGACAGAGAACAGAGGATGCCTGTTT TTGCCCAAGCTGGAAATTCATCACAACCTGAGGCCCAGGATCTGCTCTGTGCC GGTCCTCTGGGCAGTGTGGGGTGCAAGTGGGGTGCCTAGGCCTGAGCGTTGCCT GGAGCCTAGGCCGGGGGCCGCCCTCGGGCAGGCGTGGGTGAGAGCCAAGACCGCG TGGGCCGCGGGGTGCTGGTAGGAGTGGTTGGAGAGACTTGCAGAGCGGCTGGGG

[0213]

	TGTTCCGGATTTC AATAAGAAACAGAGTGATGCTCCTGTGTCTGACCGGGTTTG TGAGACATTGAGGCTGTCTTGGGCTTCACTGGCAGTGTGGGCCTTCGTACCCGGG CTACAGGGGTGCGGCTCTGCCTGTTACTGTCCAGTGGGTGCGGCCGTGGGTATGA GCGCTTGTGTGCGCTGGGGCCAGGTCTGTTGGTGGCCCCACCCTTCCCCCATCTC CTCCCTTCCCCACTCCACCTCGTCGGTCCCCACCCGCGCTCGTACGTGCGGCT CCGCGGCGAGCTCCTGACTCATCGGGGCTCCGGGTACATGCGCCCGCGCGGCC CTATAGGCGCTCTCTCGCCCGCGCCCGGGAGCCGAGCCGCGCGCCACTGC CACTCCCGCTCTCTCAGCGCCGCGTCCGCACCGCCACCGCCACCGCCACTACCA CCGAGATCTGCGGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCC
서열번호 5 CamKII 프로모터	CATTATGGCCTTAGGTCACCTTCATCTCCATGGGGTTCTTCTTCTGATTTTCTAGA AAATGAGATGGGGGTGCAGAGAGCTTCCTCAGTGACCTGCCAGGGTCACATCAG AAATGTGAGAGCTAGAACTGAACCTCAGATTACTAATCTTAAATTCCATGCGCTTG GGGGCATGCAAGTACGATATACAGAAGGAGTGAACCTATTAGGGCAGATGACCAA TGAGTTTAGGAAAGAGAGTCCAGGGCAGGGTACATCTACACCACCCGCCAGCC CTGGGTGAGTCCAGCCACGTTCACTCTATTATAGTTGCTCTCTCCAGTCTTACC TTGACGGGAAGCACAAAGCAGAACTGGGACAGGAGCCCGAGGAGACCAATCTTC ATGGTCCCTCTGGGAGGATGGGTGGGAGAGCTGTGGCAGAGGCTCAGGAGGGG CCCTGCTGCTCAGTGGTGACAGATAGGGGTGAGAAAGCAGACAGAGTCATTCCGT CAGCATCTGGGTCTGTTTGGTACTTCTTCTCACGCTAAGGTGGCGGTGTGATAT GCACAAATGGCTAAAGAGCAGGGAGAGCTGGAAAGAAACAAGGACAGAGACAGAG CCAAAGTCAACAGAGCAATTTCCAGAGGAAGCAAGAAACCATTACAGAGACTAC AAGGGGAAGGGAAGGAGAGATGAATTAGCTTCCCTGTAAACCTTAGAACCCAG CTGTTGCCAGGGCAACGGGGCAATACCTGTCTCTCAGAGGAGATGAAGTTGCCA GGGTAACTACATCTGTCTTTCTCAAGGACCATCCAGAAATGTGGCACCCACTAG CCGTACCATAGCAACTGCCTCTTTGCCCCACTTAATCCCATCCCGTCTGTAAA AGGGCCCTATAGTTGGAGGTGGGGGAGGTAGGAAGAGCGATGATCACTTGTGGAC TAAGTTTGTTCGCATCCCTTCTCCAACCCCTCAGTACATCACCTGGGGGAAC AGGGTCCACTTGCTCCTGGGCCACACAGTCTGTCAGTATTGTGTATATAAGGCC AGGGCAAAGAGGAGCAGGTTTAAAGTGAAAGGCAGGCAGGTGTTGGGGAGGCAG TTACCGGGGCAACGGGAACAGGGCGTTTCGGAGGTGGTTGCCATGGGGACCTGGA TGCTGACGAAGGCTCGCGAGGCTGTGAGCAGCCACAGTGCCCTGCTCAGAAGCCC CAAGCTCGTCAGTCAAGCCGTTCTCCGTTTGCACTCAGGAGCACGGGCAGGCGA GTGGCCCTTAGTTCTGGGGCAGC
서열번호 6 내인성 h5TXBP1 프로모터	TAAAAAGCAATGCCAGTGATTGGAGGATTTGATGAGATGATGCCCGCGAGGTGC TTGGCACGGAGTTTGACACAAGAACTCAGTGTGTTGTAATGCACGAATGCAGGTA CCCGAGCAGAGGGAGGTGCTGTGGGTGGATTACCCCTGGCTTCGCTGCGGCTGGG AGTGGGCGCTGCTAGTAAGAGATCTCGCTCCAAGCTCTTCCGTGGGCAGGAAA AAACGGAAGCTCCAGAAAGAGGAAAGACAGGACCCGAGCGGGTTTCAGGCAGA TGGAGCGCGTCGGTAGCCTGTGGCCAGGGATCCAGCACCGACGGGAAAGAGGAG GCCTGGGTACCTGCGCCCCGGGCGCGCGCGCGCTGAGGTGAGGGGGAGGGCG CGGCTCCGCACAGCCAGCGGCGCTGGCGCCAGCCGCATCTCGGGGGCGGG GTTGAGCTTCGGGGCGCAGTGCGATTGGCGGAGGCGAGTGGGTGACGCCAACGG CCGGCGGAGGCCCCCGCCCGGCTTCCCCCGCCCCGCGCGCGCGCGGGCGGG GCAGCCTCGCTCTGGCTCGCGCGCGCCCCCGCGCCAGTCCGCGCTCAGTCGG TCCTAGCGCGGTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCACCTGA

[0214]

	GGAGGCGGGGGTCCGACGGCGTCGCGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACT CGCGCAGCGCC
서열번호 7 인간 STXBP1	ATGGCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTGGAGAGAAGATTATGCATGATGTGA TAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGATCAGTTAAG CATGAGGATGCTGCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATA ACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTG TGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCACCTCTCTCATCAGTGACTTTAA GGACCCGCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGCTCTCTTCACTGACTCTTGT CCAGATGCCCTGTTTAAATGAACTGGTAAAAATCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAAA CTCTGACGGAATCAATATTGCAATTTCTCCCGTATGAATCCAGGTCTATTCTTT GGACTCTGTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAG AATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCCTTTGTGCCACCTGA AGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTGGC TCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGATCCAACAATGGGG GAGGSCCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACC CCAGTCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCT GCCTATCGAAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCGAGCGGCATCGGGGAGGCACGG GTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACA AGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAGAGATTTTCTTC TAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCAGATG CTGAAGAAGATGCCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGC ACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAAACTCTGCCG AGTGAGGACGAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGGAC CCTATGCGAGCCATCGTCCCAATTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATGACA AAATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAA CCTGAACAACTGATCCAGCAGCCAGATACCCCGGAGGATAGTGAGATCATC ACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCGCC GGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACG GTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACTTGAC ACCAAACTACCTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCTCCTTCAGCACCAACCG CCGTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCCAGGCGAGTACCG CAGTGGCCCCCGCTCATCATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATG CGCTGCGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAAGTGGGAGGTGCTGATAGGTT CTACTCACATTCTTACTCCACCAAATTTCTCATGGACCTGAGACACCCCGACTT CAGGGAGTCTCTAGGGTATCTTTTGGAGATCAGGCTCCAACAATGGAGTGA
서열번호 8 SV40 폴리 A	GATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGC AGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAAC CATTATAAGCTGCAATAAACAAAGTT
서열번호 9 인간 STXBP1 이소형 a	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKEKGENKVLVVDQLSMRMLSSCCCKMTDIMTEGI TIVEDINKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFTDSC PDALFNLVKSRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMK NPILERLAEQIATLCATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADPTMG EGPDKARSQQLLIDRGFDPSFVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSIGIGEAR VKEVLLDEDDDLWIALRHHKHAIEVSVQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQM LKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAGEKIKD PMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKNGITENLNKLIQHAQIPPEDSEII

[0215]

	TNMAHLGVP IVTDSLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTP I IKDIMEDTIEDKLD TKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHHKKNKAPGEYRSGPRL I IFILGGVSLNEM RCAYEVTQANGKEVLIGSTHILTPTKFLMDLRHDFRESSRVSFEDQAPTME
서열번호 10 인간 STXBP1 이소형 b	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGWVKLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGI TIVEDINKRREPLPSLEAVYLI TPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSC PDALFNLVKSRRAKVITL TEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMK NPILERLAEQIATLCATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKL DAYKADDPMTG EGPDKARSQLLILD RGFDPSSPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEAR VKEVLLDEDDDLWIALRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQM LKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKH YQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAGEKIKD PMRAIVPILLDANVSTYDKIRI ILLYIFLKN GITEENLNKLIQHAQIPPEDESEI I TNMAHLGVP IVTDSLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTP I IKDIMEDTIEDKLD TKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHHKKNKAPGEYRSGPRL I IFILGGVSLNEM RCAYEVTQANGKEVLIGSTHILTPQKLLDTLKKLNKTDEEISS
서열번호 11 인간 STXBP1 이소형 c	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGWVKLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGI TIVEDINKRREPLPSLEAVYLI TPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDYA LFNELVKSRRAKVITL TEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNP I LERLAEQIATLCATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKL DAYKADDPMTGEGP DKARSQLLILD RGFDPSSPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEARVKE VLLDEDDDLWIALRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKK MPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKH YQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAGEKIKDPMR AIVPILLDANVSTYDKIRI ILLYIFLKN GITEENLNKLIQHAQIPPEDESEI ITNM AHLGVP IVTDSLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTP I IKDIMEDTIEDKLDTKH YPYISTRSSASFSTTAVSARYGHHKKNKAPGEYRSGPRL I IFILGGVSLNEMRCA YEVTQANGKEVLIGSTHILTPQKLLDTLKKLNKTDEEISS
서열번호 12 인간 STXBP1 이소형 d	MHDVIKKVKKKGWVKLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIVEDINKRREPLP SLEAVYLI TPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFNLVKSRRA KVITL TEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIATL CATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKL DAYKADDPMTGEGPDKARSQLLILD RGFDPSSPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEARVKEVLLDEDDDLWI ALRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKY STHLHLAEDCMKH YQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAGEKIKDPMRAIVPILLDANV STYDKIRI ILLYIFLKN GITEENLNKLIQHAQIPPEDESEI ITNMAHLGVP IVTDS TLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTP I IKDIMEDTIEDKLDTKHYPYISTRSSAS FSTTAVSARYGHHKKNKAPGEYRSGPRL I IFILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKE VLIGSTHILTPTKFLMDLRHDFRESSRVSFEDQAPTME
서열번호 13 인간 STXBP1 이소형 e	MHDVIKKVKKKGWVKLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIVEDINKRREPLP SLEAVYLI TPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFNLVKSRRA KVITL TEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIATL CATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKL DAYKADDPMTGEGPDKARSQLLILD RGFDPSSPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEARVKEVLLDEDDDLWI ALRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKY STHLHLAEDCMKH YQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAGEKIKDPMRAIVPILLDANV STYDKIRI ILLYIFLKN GITEENLNKLIQHAQIPPEDESEI ITNMAHLGVP IVTDS TLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTP I IKDIMEDTIEDKLDTKHYPYISTRSSAS

[0216]

	FSTTAVSARYGHHKKNKAPGEYRSGPRLIIIFILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKWE VLIGSTHILTPQKLLDTLKKLNKTDEEISS
서열번호 14 인간 STXBP1 이소형 f	MAPIGLKAVVGEKIMHDIKVKKKGEWKVLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGI TIVEDINKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFTDSC PDALFNLVKSRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMK NPILERLAEQIATLCATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADPTMG EGPDKARSQLLILDRGFDPSSPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEAR VKEVLLEDDEDDLWIALRHHKHAIEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQM LKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYYQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAGEKIKD PMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKGITEENLNKLIQHAQIPPEDSEII TNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTPPIIKDIMEDTIEDKLD TKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHHKKNKAPGEYRSGPRLIIIFILGGVSLNEM RCAYEVTQANGKWEVLIGEWPFRTLAR
서열번호 15 인간 STXBP1 이소형 g	MAPIGLKAVVGEKIMHDIKVKKKGEWKVLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGI TIVEDINKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFTDSC PDALFNLVKSRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMK NPILERLAEQIATLCATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADPTMG EGPDKARSQLLILDRGFDPSSPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEAR VKEVLLEDDEDDLWIALRHHKHAIEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQM LKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYYQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAGEKIKD PMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKGITEENLNKLIQHAQIPPEDSEII TNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTPPIIKDIMEDTIEDKLD TKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHHKKNKAPGEYRSGPRLIIIFILGGVSLNEM RCAYEVTQANGKWEVLIVPVEAGS
서열번호 16 인간 STXBP1 이소형 h	MAPIGLKAVVGEKIMHDIKVKKKGEWKVLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGI TIVEDINKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFTDSC PDALFNLVKSRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMK NPILERLAEQIATLCATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADPTMG EGPDKARSQLLILDRGFDPSSPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKEVTRSLKDFS SSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYYQGTVDKLC RVEQDLAMGTDAGEKIKDPMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKGITEE NLNKLQHAQIPPEDSEIITNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLS RWTFPIIKDIMEDTIEDKLDTKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHHKKNKAPGEY RSGPRLIIIFILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKWEVLIGSTHILTPKFLMDLRHPD FRESSRVSFEDQAPIME
서열번호 17 AAV9.hu14 DNA 서열	AGAAAACTCATCGAGCATCAATGAAATTGCAATTTATTCATATCAGGATTATC AATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCAGAGG CAGTTCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAA CATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAA ATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAAATGGCAAAAGTTTATGCATTCT TTCCAGACTTGTTCACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCAT CAACCAAAACCGTTATTTCATTTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGGCGGAAATACGCGATC GCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAGTGCAACCGGCGCAGGAACACT GCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGA ACGCTGTTTTCCGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACG

[0217]

GATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGTGGCATAAATCCGTGAGCCAGTTTAGTCTG ACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACA ACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAAGCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCC GACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTT AATCGCGGCTCGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATATCTTCCCTTTTCAAT ATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATG TATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTCAGTGTTACAACCAATTAACCAATTCTG AACATTATCGCGAGCCCATTTATACCTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTTG CCTGGCGGAGTAGCGGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAAGTGAAGTGA AACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGACTCCCCATGCCGAGAGTAGGGAAGT CCAGGCATCAAAATAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCCTTCGCCCGGG CTAATTAGGGGGTGTGCGCCCTTCGCTGAAGTCTGTATTAGAGGTCACGTGAGTG TTTTGCGACATTTTGGACACCATGTGGTCACGCTGGGTATTTAAGCCCGAGTGA GCACGCAGGGTCTCCATTTTGAAGCGGGAGGTTTGAACGCGCAGCCGCCATGCCG GGGTTTTACGAGATTGTGATTAAAGTCCCAGCGACCTTGACGAGCATCTGCCCG GCATTTCTGACAGCTTTGTGAAGTGGGTGGCGAGAGGAATGGGAGTTGCCGCC AGATTCTGACATGGATCTGAATCTGATTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGGCCGAG AAGCTGCAGCGGACTTTCTGACGGAATGGCGCCGTGTGAGTAAGGCCCGGAGG CCCTTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAAGGAGAGAGCTACTTCCACATGCACGTGCT CGTGGAACACCCGGGTGAAATCCATGGTTTTGGGACGTTTCTGAGTCAGATT CGCGAAAACTGATTCAGAGAATTACCGCGGGATCGAGCCGACTTTGCCAACT GGTTGCGGTACAAAAGACCAGAAATGGCGCCGGAGCGGGAACAAGGTGGTGA TGAGTGCTACATCCCAATTACTTGCTCCCCAAAACCCAGCCTGAGCTCCAGTGG GCGTGGACTAATATGGAACAGTATTTAAGCGCCTGTTTGAATCTCACGAGCGTA AACGGTTGGTGGCGCAGCATCTGACGACGCTGTGCGAGAGCAGGAGCAGAACAA AGAGAAATCAGAAATCCCAATTCTGATGCGCCGGTGATCAGATCAAAAACCTCAGCC AGGTACATGGAGCTGGTGGGTGGCTCGTGGACAAGGGGATTACCTCGGAGAGC AGTGGATCCAGGAGGACCAGGCCCTACATACATCTCTTCAATGCGGCCCTCCAACTC GCGGTCCCAATCAAGGCTGCTTGGACAATGCGGGAAAGATTATGAGCCTGACT AAAACCGCCCCGACTACCTGGTGGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACATTTCCAGCA ATCGGATTTATAAAATTTTGAACATAACGGGTACGATCCCCAATATGCGGCTTC CGTCTTTCTGGGATGGGCCACGAAAAAGTTGGCAAGAGGAACCCATCTGGCTG TTTGGGCTGCAACTACCGGAAGACCAACATCGCGAGGCCATAGCCCACTG TGCCCTTCTACGGGTGCGTAAACTGGACCAATGAGAACTTCCCTTCAACGACTG TGTCGACAAGATGGTGATCTGGTGGGAGGAGGGGAAGATGACCGCCAAGGTGCTG GAGTCGGCCAAAGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGGTGCGCGTGACAGAAATGCA AGTCCTCGGCCAGATAGACCCGACTCCCGTGATCGTCACCTCCAACCCAACAT GTGCGCCGTGATTGACGGGAAGTCAACGACCTTCGAACACCAGCAGCCGTTGCAA GACCGGATGTTCAAATTTGAATCACCAGCCGCTCTGATCATGACTTTGGGAAGG TCACCAAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTTCCGGTGGGCAAGGATCAGTGTTGA GGTGGAGCATGAATTTACGTCAAAAAGGGTGGAGCCAAGAAAAGACCCGCCCTC AGTGACGAGATATAAGTGAGCCCAAACGGGTGCGGAGTCAGTTGCGCAGCCAT CGACGTGAGACGCGGAAGCTTCGATCAACTACGACAGCAGGTACCAAAACAAATG TTCTCGTCAGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTCCCTGACAGCAATGCGAGAGA CTGAATCAGAAATCAAAATATCTGCTTCACTCAGCGGTGTCAAAGACTGTTTAGAGT GCTTTCCGCTGTGAGAAATCTCAACCCGTTTCTGTGTCAAAAGGCGTATCAGAA ACTGTGCTACATTCATCACATCATGGGAAGGTGCCAGACGCTTGCACTGCTTGC GACCTGGTCAATGTGGACTTGGATGACTGTGTTCTGAACAATAAATGACTTAAA
--

[0218]

CCAGGTATGGCTGCCGATGGTTATCTTCAGATTGGCTCGAGGACAACCTTAGTG AAGGAATTCGCGAGTGGTGGGCTTTGAAACCTGGAGCCCTCAACCCAGGCAAA TCAACAACATCAAGACAACGCTCGAGGTCTTGTGCTTCGGGTTACAAATACCTT GGACCCGGCAACGGACTCGACAAGGGGAGCCGGTCAACGCAGCAGACGCGCGG CCCTCGAGCACGACAAGGCTTACGACCAGCAGCTCAAGGCCGGAGACAACCCGTA CCTCAAGTACAACCACGCCGACGCCGAGTTCCAGGAGCGGCTCAAAGAAGATACG TCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGAGGCTTCTTG AACCTCTTGGTCTGGTTGAGGAAGCGGCTAAGACGGCTCCTGGAAGAAGAGGCC TGTAGAGCAGTCTCCTCAGGAACCGGACTCCTCCGCGGTATTGGCAAATCGGGT GCACAGCCCGCTAAAAAGAGACTCAATTCGGTCAGACTGGCGACACAGAGTCAG TCCCAGACCCTCAACCAATCGGAGAACCCTCCGCGAGCCCTCAGGTGTGGGATC TCTTACAATGGCTTCAGGTGGTGGCGCACCACTGGCGAGACAATAACGAAGGTGCC GATGGAGTGGGTAGTTCTTCGGGAAATTGGCATTGCGATTCCCAATGGCTGGGGG ACAGAGTCATCACCCACAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCCACTACAACAATCA CCTCTACAAGCAAATCTCCAACAGCACATCTGGAGGATCTTCAAATGACAACGCC TACTTCGGGTACAGCACCCCTGGGGTATTTGACTTCAACAGATTCCACTGCC ACTTCTCACACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACCTGGGGATTCCGGCC TAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAAGTCAAAGAGGTTACGGACAAC AATGGAGTCAAGACCATCGCCAATAACCTTACCAGCACGGTCCAGGTCTTACGG ACTCAGACTATCAGCTCCCGTACGTGCTCGGGTGGGCTCAGGAGGGTGCCTCCC GCCGTTCACAGCGGACGTTTTTCATGATTCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAAT GATGGAAGCCAGGCGGTGGGTCGTTCGTCTTTTACTGCCTGGAATATTTCCCGT CSCAAATGCTAAGAACGGGTAAACAACCTCCAGTTCAGCTACGAGTTTGAGAACGT ACCTTTCCATAGCAGCTACGCTCACAGCCAAAGCCTGGACCGACTAATGAATCCA CTCATCGACCAATACTTGTACTATCTCTCAAAGACTATTAAACGGTCTGAGACAGA ATCAACAACGCTAAATTCAGTGTGGCCGGAACCCAGCAACATGGCTGTCCAGGG AAGAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACAACAACGTGCTCAACCACTGTG ACTCAAAACAACAACAGCGAATTTGCTTGGCCTGGAGCTTCTTCTTGGGCTCTCA ATGGACGTAATAGCTTGATGAATCCTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAGAAGG AGAGGACCGTTTCTTTCTTTGTCTGGATCTTTAATTTTGGCAACAAGGAACCT GGAAGAGACAACGTGGATGCGGACAAAGTCATGATAACCAACGAAGAAGAAATTA AAACTACTAACCCGGTAGCAACGGAGTCCTATGGACAAGTGGCCACAACCCCA GAGTGCCCAAGCACAGGCGCAGACCGGCTGGGTTCAAACCAAGGAATACTTCCG GGTATGGTTTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTGCAAGGACCCATTGGGCCAAAA TTCTCTCACACGGACGGCAACTTTCACCCCTTCTCCGCTGATGGGAGGGTTTGGAA GAAGCACCCGCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACACACCTGTACCTGCGGATCCT CCAACGGCTTCAACAAGGACAAGCTGAACTCTTTCATCACCAGTATTCTACTG GCCAAGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAGCGCTG GAACCCGGAGATCCAGTACACTTCCAATATTACAAGTCTAATAATGTTGAATTT GCTGTTAATACTGAAGGTGTATATAGTGAACCCCGCCCATTTGGCACCAGATACC TGACTCGTAATCTGTAATTGCTTGTAAATCAATAAACCGTTAATTCGTTTCAGT TGAACCTTTGGTCTCTGCGCGTCAAAAGGGCGACACAAAATTTATCTAAATGCAT AATAAATACTGATAACATCTTATAGTTTGTATTATATTTTGTATTATCGTTGACA TGTATAATTTTGATATCAAAAACGATTTTCCCTTTATTATTTTCGAGATTTATT TTCTTAATCTCTTTAACAACCTAGAAATATTGTATATACAAAAATCATAAATA ATAGATGAATAGTTTAAATTATAGGTGTTTCATCAATCGAAAAAGCAACGTATCTTA TTTAAAGTGCGTTGCTTTTTCTCATTTATAAGGTTAAATAATTCTCATATATCA AGCAAAAGTGACAGGCGCCCTTAAATATTCTGACAAATGCTCTTTCCCTAAACTCC

[0219]

	CCCCATAAAAAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTACGTTATTTGCGGATTAACGATT ACTCGTTATCAGAACCGCCAGGGGGCCGAGCTTAAGACTGGCCGTCGTTTTAC AACACAGAAAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAGGCCATCCGTCAGGGGCTTCTGC TTAGTTTGATGCCTGGCAGTTCCCTACTCTCGCCTTCCGCTTCCGCTCACTGA CTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCG GTAATACGGTTATCCACAGAAATCAGGGGATAACGCGAGGAAAGAACATGTAGCAA AAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCA TAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGG CGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCG TGCGCTCTCTGTTCCGACCCCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCC TTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTG TAGGTCTGTTGCTCCAGCTGGGCTGTGTSCACGAACCCCCGTTTACGCGGACC GCTGCGCTTATCCGGTAACATCTGTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTT ATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGC GGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAG TATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGAGTTGGTAG CTCTTGATCCGGCAACAAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAG CAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTA CGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGACGCGCGGTAACCTCACGTTAAGGGATTTG GTCATGAGCTTGCGCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCTT
서열번호 18 3' ITR	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGGGGCAGCAAAGGTCGCCCGACGCGCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGC
서열번호 19 5' ITR	GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGGCCGGGCAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACC TTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGAGTGCCAACT CCATCACTAGGGGTTCCT
서열번호 20 AAVtt	MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWKKLPGFPFFPKPAERHKDDSRGLVLPKYKYLGP FNGLDKGEVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNFYLYKNHADAEPQERLKEDTSF GGNLGRAVFAKKRILEPLGLVEEPVKTAPEGKKRPVEHSPAEPDSSSGTGKSGQQ PARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMASGSGAPMADNNEGADG VGNSSGNWHCDSTWMDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHVFGY STFWGYFDNRFHCHFSFRWQRLINNNWGFPRKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTT TIANNLTSTVQVFTDSEYQLFYVLGSAHQGCLPFPADVFMVPOYGYLTNNNGSQ AVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTFTSYTFEDVFPFHSSSYAHSQSLDRLMNPLIDQ YLYYLSRTNTPSGTTTMSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTAADN NNSDYSWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHKDDEEKYFPQSGVLIIPGKQDSGKT NVDIEKVMITDEEIRTTNPFVATEQYGSVSTNLQSGNTQAATSDVNTQGVLPGMV WQDRDVYLGQPIWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHFPQILIKNTFPVPANPSTT FSAAKFASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSRRWNPEIQYTSNYNKSNNVDFTVD TNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
서열번호 21 AAV9	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWNAKPGAFQPKANQQRQDNARGLVLPKYKYLGP GNGLDKGEVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNFYLYKNHADAEPQERLKEDTSF GGNLGRAVFAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQ PAKKRLNFGQTGDTEVDPQPIGEFPAAPSGVGLTMASSGGAPVADNNEGADG VGSSSGNWHCDSQWLGRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGSSNDNAYF

[0220]

	GYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDNNG VKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLDNG SQAVGRSSPYCLEYFPBQMLRTGNHPQFSYEFENVFFHSSYAHQSGLDRLMNFLI DQYLYYLSKTINGSGQNQOTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQ NNNEFAWPFGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFFLSGSLIFGKQGTGR DNVDADKVMITNEEEIKTTNFPVATESYGQVATNHQSAQAQQTGWVQNGGILPGM VWQDRDVYLQGPINAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPFQILIKNTFVPADPPT AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNEFAV NTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
서열번호 22 이소형 a를 코딩하는 인간 STXBP1 (전사체 변이체 1)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGGCC ACCTGAGGAGCGGCGGGGTCCGCGAGCGCTGCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGG GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCCCATTGGCCCTCAAAGCTGTTGTGGAGAGAA GATTATGCGATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTG GTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCTGCTGCAAGATGACAGACA TCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCT CCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAAGTCCGTCCACTCT CTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCGGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCT TCTTCACTGACTCTGTCCAGATGCCCTGTTTAAATGAACGGTAAAAATCCCGAGC AGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAATCAATATTGCATTCTCCCGTATGAA TCCGAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGACTCTTCCAAGCTTCTACAGTCCCC ACAAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGAC CCTTTGTGCGACCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAG GACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCATATAAGCTG ATGATCCAACAATGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCGAGCTCCTGATCCT GGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCT ATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCG GCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTG GATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCGAGGAAGTCACCCGGTCT CTGAAAGATTTTCTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAAGACCACCATGC GGGACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAA GTACTCCACCCAGCTGCACCTTGTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACC GTAGACAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGG GAGAGAAGATCAAGGACCCCTATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAA TGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTGAAGAA GGCATCACGGAGGAAACCTGAACAACTGATCCAGCACGCCAGATACCCCGG AGGATAGTGAGATCATCAACAATGGCTCACCTCGCGTGCCTCATCGTACCGA TTCCACGCTGCGTCCCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAG ACCTACCACTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTA TTGAGGACAACTTGACACCAAACTACCCCTATATCTCTACCCGTTCCCTCTGC CTCCTTCAGCACCAACGCGCTCAGCGCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAG GCCCGAGGCGAGTACCGAGTGGCCCCCGCTCATCATTTTCATCCTTGGGGGTG TGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAAGTG GGAGGTGCTGATAGGTCTACTCACATTCTTACTCCACCAAAATTTCTCATGGAC CTGAGACACCCGACTTCAGGGAGTCTCTAGGGTATCTTTTGAGGATCAGGCTC CAACAATGGAGTGAGAGCCAAAGAAACAAAGATCCACACACATCCTCACCCACA GAAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGT TAAAAAATAAGTCGCCCTCCAAACACGCCCCATCCACAGGCTCCGCAGC

[0221]

	TTCCACCACCGCCCGCTCAGTTCTTTGCGTCTGTTGCCCTCCACAGCCCTGCA CGCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTCAGTGATGCCCTCTTCT TGTTTGAACAAAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTAAAAAGAGTATCTTATAC ATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGACAGCAGGAGAAATTC TGGACTGTAGGATGAATGGACGCCCTTCCCGCTTATTTAAGATTTGTGACCTT GTACATAACCTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTG GGTGTTTTTAAACCTTGTTTGGGGTGTTCCTGTCTTGTGAGAATCATAGAG ATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTCACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATTCC AGTCCCTACCCCTCAGTGCCCTGCTCTCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCA GGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCCTTCCAGCGTCTC ATACCCCGGTAGTGCAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGG CCAGCGTCTCTCCACAGGCTGTCACTGCCCGCTCCCGAGCCTGTGTCCACAGT GCTGTGATCCCGAGGGAAGTCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCTGACAGGTGAG AAGCAAACCTCCCGCTGGAAGCTCCATCTCTTTGGA AAAACAGTTAGTCTGGAGC CTGTGGCCAGGCGCTTCTGTCCCGAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTA GTCCGCTTCTGTTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTTCTGGAGGCC TGGTGAGCACACCATTTGTGCTGCTGCTGTGTGCTGAAATATAATAACAGTGGA AGCTCAGCAAAATGTCCCTGCCAGCCCGCTCGCCGCTTGCCTCTGACAGG CATGTGTGATTACTTGTCTAGTGATGCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCG GCGCCACCTCCGCTCCCTTTCAGAGCTGTCTCCCGCTCTCTGTCTGCTGCA TTGTGGTGTCTCTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCTTGCAGTGTAGATTAGTCTG TCAGATCTCTCCCGCTCTCCCTCCCACTTATACGACCTGATTTCTTAGGACGG AACCAGAGGACCTGCGCGGGGCTCTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCCCTCC CTCGGACCAACAGTGCTCATGCTTCAGGACCTTGTGTGCAAGATGTTGGTTT CCCTTTCTCTGTTATTATATAAAAATAATTTATCAAAAGGATATTTAAAAAAG CTAGTCTGTCTTGAAGCTTGTTTACCTTAAATATCAGAAATCTCAGTGTGTTGAA AGTACTGAAGCACAAACATATATCATCTCTGTACCAATTCTGTACTAAAGCACTTG AGTCTAATAAATAAAGAAATCAGCACCCCT
서열번호 23 이소형 b를 코딩하는 인간 STXBP1 (전사체 변이체 2)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCC ACCTGAGGAGGCGCGGGGTCCGCAGGCGTTCGCGGGACGAGGAGATCGGAGCTGG GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAA GATTATGCATGATGTGATAAAGAGGTCAAGAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTG GTGGTGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCTGCTGCAAGATGACAGACA TCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCT CCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCTCCATCCGAGAACTCCGTCCACTCT CTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCT TCTTCACTGACTCTGTCCAGATGCCCTGTTTAAATGAACTGGTAAATCCCGAGC AGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAATCAATATTGCATTTCTCCGTATGAA TCCAGGCTTATTCCTTGGACTCTGCTGACTCTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCC ACAAGGCTCAGATGAAGAATCTTACTGGAGCGCTGGCAGAGCAGATCGCGAC CCTTTGTGCCACCTGAAGGAGTACCCGCTGTGCGGTATCGGGGGAATACAAG GACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAGCTG

[0222]

ATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATCCT GGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCT ATGAGTTATGATCTGCTGCCATCGAAAATGATGTATCAAGTATGAGACCAGCG GCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTCTCCTGGACGAGGACGACACCTGTG GATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGGTCT CTGAAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGC GGGACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAA GTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACC GTAGACAAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGG GAGAGAAGATCAAGGACCCCTATGCGAGCCATCGTCCCATCTCTGCTGGATGCCAA TGTGAGCACTTATGACAAAATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTGAAGAAT GGATCACGGGAGAAAACCTGAACAACTGATCCAGCACGCCACAGATACCCCGG AGGATAGTGAGATCATCAACAATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGA TTCCACGCTGCGTGCCTGGAGCAAGCGCGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAG ACCTACCAGCTCTCAGCGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTA TTGAGGACAAACTTGACACCAAACTACCCCTTATATCTCTACCGGTCTCTGCTGC CTCCTTCAGCACCCCGCGCTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAG GCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCTCATCTTTTCATCCTTGGGGGTG TGAGGCTGAATGAGATGCGCTGCGCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAGTG GGAGGTGCTGATAGGATCCACACATCCTCACCACACAGAACTGCTGGACACA CTGAAGAAACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGC CCTCCAAAACACGCCCCCATCCACAGCGCTCCGAGCTTCCACACCCGCCCG CCTCAGTTCTTTGCGTCTGTTGCCCTCCACGCTGCACGCTTGGCTGGCACT GTTGCCGCTGCATTTCTGTTTCAAGTATGCCCTCTTCTGTTTGAACAAAAGA AAATAATGCATTGTGTTTTTAAAGAGTATCTTATACATGTATCTAAAAAGA GAAGCTCATGTGCAATTGGTGCACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGA ATGGAGCGCTTCTCCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTTGTACATAACCTGGGT GACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAACCT TGTTTGGGGTGTCTCTGCTGTTGTTGAGAAATCATAGAGATGCTGTGTTCTTGG AGTATTTACACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAG TGCTGCTCTCATCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGT CCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCCTTCCAGCGCTCATACCCCGGTAGTGC AGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCTCA CAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCGAGCTGTGTCCACAGTGTGTGATCCCGAGGG AAGTCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCTGACAGGTGAGAAGCAAACTCCCGCTG GAAGCTCCATCTCTTTGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCT TCTGTCCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCTTCTGTTCAA GGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGGCTA TGGCTGTGGAGAAGGTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCTGTACCTCTC GGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGT GTTGTGTGGGGTCATACATCATCGTGTGTTGTAAGAGAAGATGTCATTTTATTCT CTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAAATGCAGGAAGGCTG TCTCGCCATCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCAT TGTGCTGCTGCTGTTGTCGTGAATATAATAACAGTGGAAGTCACAAAATGTCC CCTGCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTGTATTACTT GTCTAGTGATGCTCTCAAAGTGTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCCCTC CCTTTCAGAGCCTGCTCCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTTC TCAAGGCTTTGAAATCTCCCTTGCACTGAGATTAGTCGTGAGATCTCTCCCGT

[0223]

	CTCCCTCCCAACTTATACGACCTGATTTCCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGC GCCGGGCGCTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCCCTCCCTCGGACCAACAGTG CTCATGCTTCAGGACCTTGTTCGGAAGATGTTGGTTCCCTTTCTCTGTTATT TATATAAAAAATAATTATCAAAAGGATATTTAAAAAGCTAGTCTGTCTTGA CTTGTTTACCTTAAATTATCAGAATCTCAGTGTGAAAGTACTGAAGCAGAAA CATATATCATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAG AAATCAGCACCCCT
서열번호 24 이소형 c를 코딩하는 인간 STXB1 (전사체 변이체 3)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCC ACCTGAGGAGGGCGGGGTCCCGAGGCGTCCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGG GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTCGGAGAGAA GATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTG GTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCTGCTGCAAGATGACAGACA TCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCT CCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCT CTCATCAGTGACTTTAAGGACCGCGGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCT TCTTCACTGACTATGCCCTGTTTAAATGAAGTGGTAAATCCCGAGCAGCCAAAGT CATCAAACTCTGACGGAATCAATATTGCAATTTCTCCGATGAATCCCAAGTCT TATTCCTTGGACTCTGCTGACTCTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTC AGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCTGGCAGAGCAGATCGCGACCTTTGTGC CACCTGAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCC CTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCATAAAGCTGATGATCCAA CAATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGG CTTTGACCCAGCTCCCGTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTAT GATCTGCTGCCATCGAAAAATGATGTATACAAGTATGAGACAGCGGCATCGGG AGGACGGGTGAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACT GCGCCACAGCAGCATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTACCCGGTCTCTGAAGAT TTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGT CCAGATGCTGAAGAAGATGCCAGTACAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCAC CCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAAA CTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGA TCAAGGACCCATATGCGAGCCATCGTCCCATCTGCTGGATGCCAATGTGACGAC TTATGACAAAATCCGCATCATCTTCTCTACATCTTTTGAAGAATGGCATCAG GAGGAAAACCTGAACAACTGATCCAGCAGCCAGATACCCCGGAGGATAGTG AGATCATCACCACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTACCGATTCCACGCT GCGTCCCGGAGCAAGCCGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAG CTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACA AACTTGACACCAAACTACCTTATATCTCTACCGTTCTCTGCTCCTTCAG CACCACCGCGCTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAGGCCCCAGGC GAGTACCGCAGTGGCCCCCGCTCATATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGA ATGAGATGCGCTGCGCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAGTGGGAGGTGCT GATAGGATCCACACACATCCTCACCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAAA CTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCTCCAAA ACACGCCCCCATCCACAGCGCTCCGCACTTCCACACCGCCCGCTCAGTTT CTTTGCGTCTGTGCTTCCCGAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGCT GCATTCTCGTGTTCAGTGATGCCCTCTTCTTGTGTTGAACAAAAGAAAAATATGC ATTGTGTTTTTAAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCAT GTGCAATTGGTGCACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGCC TTCTCCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTTTGTACATAACCTGGGTGACGTGCAC ATTGCTTGGGTATGGAACGTTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAACCTTGTTTGGGG TTGTTCTGTCTTGTGAGAAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTCA CACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCACTCCAGTCCCTAOCCTCAGTGCCTGCTC TCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGG AACAGACCTCTTTGCCCTTCCAGCGTCTCATACCCCGGTAGTGCAGCTGTGGG TGGAGCTGGGGTGTCTGCAGAAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCCACAGCCTGTC

[0224]

	ACTGCCCCCTCCCGAGCCTGTGTCCACAGTGCTGTGATCCCGAGGGAAGTCTCC AGTCTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACCTCCCGCTGGAAGCCTCC ATCTCTTTGGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCCC AGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCCTTCGTTCAAGGGTCAGGA ATGGACCAGAACAGATGGGTTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGG AGAAAGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCCCTGTACCCCTCTCGGCAAGCAT CTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTGTGTGG GGTCATACATCATCGTGTGTTGTAAGAGAAGATGGTCATTTTATCTCTGTATAAA ACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCAT CCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTTGTGTGTGT GCTGTTGTGCGTGAATATAATAACAGTGGAAAGTCACAAAAATGTCCCTGCCCAG CCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTATTACTTGTCTAGTGA TGTCCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCCGCCACCTCCGCCCTCCCTTCAGA GCCTGCTCCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTTCTCAAGGCTT TGAAATCTCCCTTGCACTGAGATTAGTCGTGAGATCTCTCCCGCTCTCCCTCCC AACTTATACGACCTGATTTCTTAGGACGGAAACCGCAGGCACCTGCGCGGGCGT CTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCCCTCCCTCGGACCAACAGTGCTCATGCTT CAGGACCTTGTGTTGTCGAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTATTTATATAAAA ATAATTTATCAAAGGATATTTAAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAAGCTTGTTTAC CTTAAATTTATCAGAATCTCAGTGTTTGAAGTACTGAAGCACAACATATATCA TCTCTGTACCATCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAGAAATCAGCA CCCC
서열번호 25 이소형 d 를 코딩하는 인간 STXB1 (전사체 변이체 4)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGCCCCAGCGCGCCC ACCTGAGGAGGCGCGGGGTCCGCGAGCGCTCGCGGGACGAGGAGATCGGAGCGCG GAGACTCGCGCAGCGCCATGCCCCATTGGGCTCAAAGCTGTTGTGCGGAGAGAG AAAGAGGAAGACTACCTAGACATGTTGCTCCAGAGCAGAATTTCCAGCAGTAGAT TGAACCTTCGGAGGCGGAGTCCAGCCAGTGTAACCTGAGATTATGCATGATGT GATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGTGCTGGTGGTGGATCAGTTA AGCATGAGGATGCTGTCTCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCA TAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGC TGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTT AAGGACCCGCCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTCTCTCACTGACTCTT GTCCAGATGCCCTGTTTAATGAAGTGGTAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAA AACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCAGGTCTATTCC TTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGA AGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCCTTGTGCCACCT GAAGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTG GCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGATCCAACAATGG GGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATCTGGATCGAGGCTTTGA CCCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTG CTGCCATCGAAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGCATCGGGGAGGCAC GGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCA CAAGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGATTTTCT TCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCAGA TGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCT GCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAACTCTGC CGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGSGAGAGAAGATCAAGG ACCCATATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATGA CAAAATCCGCATCATCTCTCTACATCTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAA AACCTGAACAACTGATCCAGCACGCCAGATACCCCGGAGGATAGTGAGATCA TCACCAACATGGCTCAOCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCG

[0225]

	CCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCA CGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACTTG ACACCAAACTACTACCTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCCTCCTTCAGCACAC CGCCGTGACGCGCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAGGCCCCAGGCGAGTAC CGCAGTGGCCCCCGCTCATCTTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGA TGCGGTGCGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAAGTGGGAGGTGCTGATAGG TTCTACTCACATTCTTACTCCACCAAATTTCTCATGGACCTGAGACACCCCGAC TTCAGGGAGTCTCTAGGGTATCTTTGAGGATCAGGCTCCAACAATGGAGTGAG AGCCAAAGAAACAAAGATCCACACACATCTCACCCACAGAACTGCTGGACAC ACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCG CCCCTCCAAAACAGCCCCCATCCACAGCGCTCCGCAGCTTCCACCCACCGCCC GCCTCAGTTCTTTGCGTCTGTTGCCTCCCCAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCAC TGTGCGCGTGCATTCTCGTGTTCAGTGATGCCCTCTTCTTGTGTTGAAACAAAAG AAAAAATGATGTTGTTTAAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAAAAAG AGAAGCTCATGTGCAATTGGTGACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATG AATGGAGCCTTCTCCCGTTATTTAAGATTGTGACCTTGTACATAACCCCTGGG TGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAACC TTGTTTGGGGTGTGTTCTGTCTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTG GAGTATTTACACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCA GTGCCTGCTCTCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGG TCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCTTTCCAGCGTCTCATACCCCGGTAGTG CAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCTCC ACAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCCAGCCTGTGTCCACAGTGCTGTGATCCCGAGG GAAGTCTCCAGCTTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACCTCCCGCT GGAAAGCCTCCATCTCTTTGGAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCC TTCTGTCCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTCCCTAGTCCGCCTTCGTTCA AGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCT ATGGGTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCTGTACCCCTCT CGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTG TGTTGTGTGGGGTCATACATCATCGTGTGTTGTAAGAGAAGATGGTCATTTATTCT TCTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAATGCAGGAAGGCT GTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCAT TTGTGCTGCTGCTGTTGTGCGTGAATATAATAACAGTGGAAGTCACAAAAATGTC CCCTGCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTGTATTACT TGTCTAGTGATGTCCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCCT CCCTTTAGAGCCTGCTCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTT CTCAAGGCTTTGAAATCTCCCTTGCACTGAGATTAGTCGTGAGATCTCTCCCG TCTCCCTCCCACTTATACGACCTGATTTCCTTAGGACGGAAACCGCAGGCACCTG CGCCGGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCCCTCCCTCGGACCAACAGT GCTCATGCTTCAGGACCTTGTGTTGTCGAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTAT TTATATAAAATAATTTATCAAAGGATATTTAAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAA ACTTGTGTTACCTTAAATATCAGAATCTCAGTGTTTGAAGTACTGAAGCACAA ACATATATCATCTCTGTACCATCTGTACTAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAA GAAATCAGCACCCCT
서열번호 26	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCC ACCTGAGGAGCGCGGGGTCCGCAGGCGTCCGCGGACGAGGAGATCGGAGCCGG GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGGAGAGAG

[0226]

이소형 d를 코딩하는 인간 STXBP1 (전사체 변이체 5)	ATATATACCTAGGAATGGAGTTGCTGGATCTCTATGTTTGGTTATTTGAGGAGCT GCGGGCCTGTTTTCACATCAGCTGTACCATTTTACATTCTCACCAGCAGTGCAT GACGGTCCAGTGCCTTTTATCTTACTGCGCTTAAGGTGTAATTCCTTCTTCTC AGACTGGACTGTAAATTCTTTGAGAGATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAA GAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTG TCCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAAG ATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCAC TCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGACT GCTAAATAACGGGCTGCACACGTCTTCTCACTGACTCTTGTCAGATGCCCTGT TTAATGAACTGGTAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAT CAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCAGGTCTATTCTTGGAATCTGCTGAC TCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGG AGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCCTTTGTGCCACCTGAAGGAGTACCCGGC TGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAG GACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGACA AGGCACGCTCCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTGT GCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCATATCGAAAA GATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGC TCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGA GGTGTCCCAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAATG AATACTGGAGAGAAGACCAACCATGCGGGACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGC CTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGCACTTGTGAGGA CTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGAC CTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCCATGCGAGCCA TCGTCCCATCTGCTGGATGCCAATGTGAGCACTTATGACAAAATCCGCATCAT CCTTCTCTACATCTTTTGAAGAATGGCATCAGCGAGGAAAACCTGAACAACTG ATCCAGCAGCGCCAGATACCCCGGAGGATAGTGAGATCATCAACACATGGCTC ACCTCGCGTGGCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCCGCGGAGCAAGCCGGA GCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAAGCTCTCAGGTTGAGTCCGATT ATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACTTGACACCAACACTACC CTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCTCCTTCAGCACCACCGCGTCAAGCCCG CTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCGAGGAGTACCGCAGTGGCCCCCGC CTCATCATTTTCATCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCTACG AGGTGACCCAGGCCAACGGAAAGTGGGAGGTGCTGATAGGTTCTACTCACATCT TACTCCACCAAAATTTCTCATGGACCTGAGACACCCGACTTCAGGGAGTCTCT AGGGTATCTTTGAGGATCAGGCTCCAACAATGGAGTGAGAGCCAAAGAAACAAA GATCCACACACATCCTCACCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAA TAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCCCTCCAAACACG CCCCCATCCACAGCGCTCCGCGCTTCCCACACCGCCCGCTCAGTTCCTTTG CGTCTGTTGCCCTCCCGAGCCTGCACGCCCTGGCTGGCAGTGTGCGCTGCATT CTCGTGTTCAGTGATGCCCTCTTCTTGTGTTGAAACAAAAGAAAAATAATGCATTGT GTTTTTTAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAAAAGAGAGCTCATGTGCA ATTGGTGCACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTAGGATGAATGGACGCTTCTC CCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTTGTACATAACCTGGGTGACGTGCACATTGC TTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAACCTTGTGTTGGGGTGT CCTGTCCTTGTGAGAAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTACACTG AGGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCTGCTCTCATC CAATAAACCCTGGGAGGTGACAAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAG
---	--

[0227]

	ACCTCTTTGCCTTTCCAGCGTCTCATACCCCGGTAGTGCAGCTGTGGGTGGAG GCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCCTCCACAGCCTGTCACTGC CCCCTCCCAGCCTGTGTCCACAGTGTGTGATCCCGAGGGAAGTCTCCAGTCT AAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAATCCCGCTGGAAGCCTCCATCTC TTTGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCCAAGGCCCTTCTGTCCCAGGCA TCATCCCAACAGTCTATTTCCCTAGTCCGCCTTCGTTCAAGGGTCAGGAATGGA CCAGAACAGATGGGTTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAG GTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCCTGTACCTCTCGGCAAGCATCTTCA GTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGGGTCA TACATCATCGTGTGTGTAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAACTTA GCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAAATGCAGGAAGGCTGTCTGCCATCCTCA AGACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTTGTGCTGCTGCTGT TGTCGTGAAATATAATAACAGTGGAAATCACAAAATGTCCCTGCCAGCCCCC TCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTGTATTACTTGTCTAGTGATGTCC TCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCCGCCACCTCCGCCTCCCTTTCAGAGCCTG CTCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTTCTCAAGGCTTTGAAA TCTCCCTTGCACTGAGATTAGTCTGTCAGATCTCTCCCGCTCCTCCCAACTT ATACGACCTGATTTCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGCGCTTTAC TCCCGCTGCTTGTCTGTCCTCCCTCGGACCAAACAGTGCTCATGCTTCAGGA CCTTGTGTTGCGAAGATGTTGGTTTCCCTTCTCTGTTATTTATATAAAAAATAAT TTATCAAAAGGATATTTTAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAACCTTGTTTACCTTAA AATTATCAGAATCTCAGTGTTTGAAGTACTGAAGCACAACATATATCATCTCT GTACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAAGAAATCAGCACCCCT
서열번호 27 이소형 e 를 코딩하는 인간 STXP1 (전사체 변이체 6)	AGAAAGAGGAAAGACAGGACCCGAGCGGGGTTTCAGGCAGATGGAGCGCTCGGT AGCCTGTGGCCAGGGATCCCAGCACCGACGGGAAAGAGGAGGCTGGGTACCTTG CGCCCCGGGCGCGCGCGCGGTGAGAGATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTC AAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTATCAGTTAAGCATGAGGATGC TGTCCTCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGA AGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATC ACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCGGA CTGTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCT GTTTAAATGAACTGGTAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAA ATCAATATTGCAATTTCTCCCGTATGAATCCCAAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTG ACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACT GGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCTTTGTGCCACCTGAAGGAGTACCCG GCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCC AGGACAAGCTCGATGCCATATAAGCTGATGATCCAACAATGGGGAGGGCCAGGA CAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCT GTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAA ATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGT GCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCA GAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGCTCTCTGAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAA TGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGAT GCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGTGTAG GACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAACTCTGCCGAGTGGAGCAGG ACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGTCAAGGACCTATGCGAGC CATGCTCCCATTTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATC

[0228]

	ATCCTTCTCTACATCTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAACTGAACAAAC TGATCCAGCACGCCAGATACCCCGGAGGATAGTGAGATCATCACCACATGGC TCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTGGCCGGAGCAAGCCG GAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCCGA TTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACTTGACACCAACACTA CCCTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCTCCTCAGCACACCACCGCGTCAGCGCC CGCTATGGGCATGGCATAAGAACAAGGCCCGAGGAGTACCGCAGTGGCCCCC GCCTCATCATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTA CGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAAGTGGGAGGTGCTGATAGGATCCACACACATC CTCACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAG AAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTGGCCCTCCAAACACGCCCCATCCACAG CGCTCCGACGCTTCCACACCGCCCGCTCAGTTCTTTGCGTCTGTTGCGCTCC CCAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTCAGTGA TGCCCTCTTCTTGTGTTGAAACAAAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTAAAAAGA GTATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGCACAGCA GGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGCCCTTCTCCCGTTATTAAAGA TTTGTGACCTTGATACATAACCTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACG GTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAACCTTGTTTGGGGTTGTTCTGTCTTGTGA GAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTCACTAGGAGCTAATCTGCT ATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCTGCTCTCATCCAAATAAAGTGGGA GGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGTGGAAACAGACCTCTTTGCCCTTT CCAGCGTCTCATACCCCGGTAGTGCAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGC ACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCCACAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCGAGCCT GTGTCCACAGTGTGTGATCCCGAGGGAAGTCTCCAGTCTAAGTCACAGTGGCC TGACAGGTGAGAAGCAAACTCCCGTGGAAAGCCTCCATCTCTTTGAAAAACAGT TAGTCTGGAGCCTGTGGGCCAGGCCCTTCTGTCCCGAGGCATCATCCCAACAGCT CATTTTCCCTAGTCCGCTTCTGTTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGG TTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTT GGACTCACACAGACCCCTGTACCTCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTC AGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGGGGTCATACATCATCGTGT TGTAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAA ACTAAAGCAGCAAAATGCAGGAAGGCTGTCTGCCATCTCAAGACTCAGCAGCTC TCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTTGTGCTGCTGTTGTGCTGAAATATA ATAACAGTGGAAATCACAAAAATGTCCCTGCCAGCCCTCCGCCGCCCTTGAC CTCCTGCAGGCCATGTGTATTACTTGTCTAGTGATGCTCTCAAGTGTCTGT ACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCTCCCTTTAGAGCCTGCTCCCGCCCTCTC TGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCTTGCACT GAGATTAGTCGTGAGATCTCTCCCGTCTCCCTCCCACTTATACGACCTGATTT CCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGCGCTTACTCCCGCTGCTTGT CTGTCCCTCCCTCGGACCAACAGTGCTCATGCTCAGGACCTTGTGTGCGAA GATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTATTTATATAAAAAATAATTTATCAAAAGGATA TTTTAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAACCTGTTTACCTTAAATATCAGAATCT CAGTGTTTGAAAGTACTGAAGCACAAACATATATCATCTCTGTACCATTTCTGTAC TAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAAGAAATCAGCACCCCT
서열번호 28	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCC ACCTGAGGAGCGCGCGGGTCCGACGGCGTCCGCGGACGAGGAGATCGGAGCCGG GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAG

[0229]

이소형 e 를 코딩하는 인간 STXBPI (전사체 변이체 7)	ATATATACCTAGGAATGGAGTTGCTGGATCTCTATGTTTGGTTATTTGAGGAGCT GCCGGCCTGTTTTCACATCAGCTGTACCATTTTACATTCTCACCAGCAGTGCAT GACGGTCCAGTGCCCTTTTATCTTACTGCGCTTAAGGTGTAATTCCTTCTTTCTC AGACTGGACTGTAAATCTTTGAGAGATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAA GAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTG TCCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAG ATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCAC TCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGACT GCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGT TTAATGAACTGGTAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAAT CAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGAC TCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGG AGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCCTTTGTGCCACCCTGAAGGASTACCCGGC TGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAG GACAAGCTCGATGCCATAAAGCTGATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGACA AGGCACGCTCCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTGT GCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCATATCGAAAAAT GATGTATACAAGTATGAGACCAGCGCATCGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGC TCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGA GGTGTCCCAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAATG AATACTGGAGAGAAGACCAACCATGCGGGACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGC CTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGTGAGGA CTGTATGAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAACTCTGCCAGTGGAGCAGGAC CTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCTATGCCAGCCA TCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTGAGCACTTATGACAAAATCCGCATCAT CCTTCTCTACATCTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAACCTGAACAACTG ATCCAGCAGCGCCAGATACCCCGGAGGATAGTGAGATCATCACCAACATGGCTC ACCTCGGCTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCCGCGGAGCAAGCCGGA GCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCACTCTCACGGTGGACTCCGATT ATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACTTGACACCAACACTACC CTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCTCCTTCAGCACACCAGCGCTCAGCGCCCG CTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCGAGGTACCGCAGTGGCCCCCGC CTCATCATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCTACG AGGTGACCCAGGCCAACGGAAAGTGGGAGGTGCTGATAGGATCCACACACATCCT CACCOCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAA ATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCTCCAAAACACGCCCCATCCACAGCG CTCCGCACTTCCCAACACCGCCCGCTCAGTTCCCTTGGCTGTGTTGCCCTCCCC AGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCACGTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTCAGTGATG CCCTCTTCTGTTTGAACAAAAGAAAAAATGCAATTGTGTTTTTAAAAAGAGT ATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGCACAGCAGG AGAAATTTCTGGACTGTAGGATGAATGGACGCCCTTCTCCCGTTATTTAAGATT TGTGACCTTGTACATAACCTGSGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGT AGAAATTTGGGTGTTTTTAAACCTTGTGTTGGGGTGTCTCTGTCTTGTGAGA ATCATAGAGATGCTGTGTTCTTGGAGTATTCACACTGAGGACTAATCTGCTAT CTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCTGCTCTCATCCAAATAACCTGGGAGG TGACAACTCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTCCTTTCC CAGCGTCTCATACCCCGGTAGTGCAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCAC GAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCCACAGCTGTCACTGCCCCCTCCCGAGCTGT
--	--

[0230]

	GTCCACAGTGCTGTGATCCCGAGGGAAGTCCCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCCTG ACAGGTGAGAAGCAAACTCCCGCTGGAAGCCTCCATCTCTTTGGAAAAACAGTTA GTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCA TTTTCCCTAGTCCGCCTTCGTTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTT CTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTTGG ACTCACACAGACCCTGTACCTCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAG TTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGGGTCATACATCATCGTGTG TAAGAGAAGATGGTCATTTTATCTCTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAAAC TAAAGCAGCAAAATGCAGGAAGGCTGTCTGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTC ATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTTGTGCTGCTGCTGTTGTCGTGAAATATAAT AACAGTGGAAGTCACAAAAATGTCCCTGCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCT CCTGCAGGCCATGTGTGATTACTTGTCTAGTGATGTCCTCTCAAAGTGCTGTAC GCGAGCTCGGCCCCACCTCCGCCTCCCTTCAGAGCCTGCTCCCCGCCCTCTCTG CTCGGTGCATTGTGGTGTCTCTTCTCAAGGCTTGAAATCTCCCTTGCACTGA GATTAGTCGTGAGATCTCTCCCGTCTCCCTCCCACTTATACGACCTGATTTC TTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTCT GTCCCTCCCTCGGACCAACAGTGCTCATGCTTCAGGACCTTGTGTTGTCGAAGA TGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTATTATATAAAAAATAATTTATCAAAAGGATATT TTAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAACTTGTGTTACCTTAAATTTATCAGAATCTCA GTGTTTGAAAGTACTGAAGCACAAACATATATCATCTCTGTACCATTTCTGTACTA AAGCACTTGAGTCTAATAAAATAAGAAATCAGCACCCT
서열번호 29 이소형 e 를 코딩하는 인간 STXBP1 (전사체 변이체 8)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCC ACCTGAGGAGGCGGGGGGTCGCGAGGCGTCCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGG GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCGCCATTGGCCCTCAAAGCTGTTGTGCGGAGAG AAAGAGGAAGACTACCTAGACATGTTGCTCCAGAGCAGAATTTCCAGCAGTAGAT TGAACCTTCGGAGGCCGAGTCCAGCCAGTGTAAGCTGAGATTATGCATGATGT GATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTA AGCATGAGGATGCTGTCTCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCA TAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGC TGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTT AAGGACCCGCCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTCACTGACTCTT GTCCAGATGCCCTGTTTAAATGAACGGTAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAA AACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCAGGCTATTCC TTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGA AGAATCCTATACTGGAGCGCTGGCAGAGCAGATCGCGACCTTTGTGCCACCCT GAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTG GCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCATATAAGCTGATGATCCAACAATGG GGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGA CCCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTG CTGCTATCGAAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGCATCGGGAGGCAC GGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCA CAAGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGATTTTCT TCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCAGAG TGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCT GCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAACTCTGC CGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGG ACCCATATGCGAGCCATCGTCCCATTTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATGA

[0231]

	CAAAATCCGCATCATCCTTCTCAACATCTTTTGAAGAAATGGCATCACGGAGGAA AACCTGAACAAACTGATCCAGCACGCCAGATACCCCCGGAGGATAGTGAGATCA TCACCAACATGGCTCACTCGCGGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCG CGGGAGCAGCGCCGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCA CGGTGGAGTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAAACTTG ACACCAAACTACTACCTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCTCCTTTCAGCACCAC CGCCGTGAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAGAACAAGGCCCCAGGCGAGTAC CGCATGGCCCCCGCCTCATCATTTTATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGA TCGCTGTGCGCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAATGGGAGGTCTGATGAG ATCCACACACATCTCTACCCCCACAGAACTGCTGGACACATGAGAAAGTGAAT AAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCTTCCAAAACACGC CCCCATTCCACAGCGCTCGCGAGTCTCCACACACCGCCCGCCTCAGTTCCTTTGC GTCTGTTGCCCTCCCAAGCCTGCAAGCCCTGGCTGGCACTGTTGCGCTGCACTT TCGTGTTCAGTGTGCTCTCTTCTGTTTGAACAAAAGAAAATAGTCTGTTGTG TTTTTTAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAAAAGAGAAGCTCATGTGCAA TTGGTGCACAGCAGGAGAAAATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGCCCTTCTCC CGGTATATTAAGATTGTGACCTTGACATAACCTGGGTGAGGTGCACATTGCT TGGGTATGAACGGTAGAAAATTTGGGTGTTTTTAAAACCTTGTGTTGGGGTGTGTC CTGCTCTGTGTAGAACTCATAGATGTTCTGTGTTTGGAGTATTTACACTGA GGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCTGCTCTCATCC AAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGA CTTCTTTGCCCTTTCCACAGCTCTCATACCCCGGTAGTGACAGTGTGGGTGGAGG CTGGGGTGCTGTCACGAAGTCAGGCCAGCGGCTCCTCTCCACAGCCTCTCAGTCCG CCTCCCCAGCTGTGCTCCACAGTCTGTGATCCCGAGGGAAGTCTCCAGTCTA AGTCACAGTGCCTGACAGGTGAGAAGCAAATCCCGCTGGAAGCCTCCATCTCT TTGGA AAAACAGTTAGTCTGGAGCTGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCACAGGCAT CATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCTTCTGTTCAAGGGTCAGGAATGGAC CAGAACAGATGGGTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGGCTATGCTGTGGAGAGG TTCTTGGCCGTTGGACTCAGACAGCCCTGTACCTCTCGGCAGACTCTTCAG TCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGGGTCTAT ACATCATCGTGTTTTGAAGAGAAGATGGTCATTTATTCTGTATAAACTTAG CTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCTCAA GACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTTGTGCTGCTGCTGT GTGCTGAATAATAACAGTCAGTGGAGTGACAAAAATGTCCCTGCGCAGCCCTT CGCCGCCCTTGACCTCTGACAGGCCATGTGTGATTACTTGTCTAGTGATGTCT CTCAAAGTGTGTACGGAGCTCGCGGCCACCTCCGCTCTCCCTTTCAGAGCTGCT TCCCCGCCCTCTGTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTCTCAAGGCTTTGAAAT CTCCCTTTGCACTGAGATTAGTCGTAGATCTCTCCCCGTCTCCCTCCCACTTA TACGACTGATTTTCTTAGGACGGAACGCAAGCACTGCGCGGGGCTTTACT CCCGCTGCTTGTCTGTCCCCCTCCCTCGGACCAACAGTGCTCATGCTTCAGGAC CTGTTTGTGCAAGATGTGTTTCCCTTCTCTGTTATTTATATAAAAAATAATT TATCAAAAGGATATTTTTAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAACCTTGTTTACCTTAA ATTATCAGAATCTCAGTGTGTGAAGTACTGAAGCACAACATATATCATCTCTG TACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAAATAAAGAAATACGACCCCT
서열번호 30	AGTCGGTCCCTTAGCGCGGCTGCGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGGCC ACCTGAGGAGCGGCGGGGTCCGAGGCGTCGCGGACAGGAGATCGGAGCGCG GAGACTCGCGCAGCGECATGGCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGGAGAG

이소형 e 플 코딩하는 인간 STXBP1 (전사체 변이체 9)	AAAGAGGAAGACTACCTAGACATGTTGCTCCAGAGCAGAAATTCAGCAGTAGAT TGAACCTTCGGAGGCCGAGTCCCAGCCAGTGTAACTGGTAAAGAAGATTATGC ATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGA TCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACC GAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCCGAGAGAGCCGCTCCCCAGCC TGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCTCTCATCAG TGACTTTAAGGACCCGCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTCACT GACTCTTGTCAGATGCCCTGTTAATGAACTGGTAAATCCCGAGCAGCCAAAG TCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCCAGGT CTATTCCTTGGACTCTGCTGACTCTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCT CAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCTGGCAGAGCAGATCGCGACCTTTGTG CCACCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGAATACAAGGACAATGC CCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAGCTGATGATCCA ACAAATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAG GCTTTGACCCAGCTCCCCGTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTA TGATCTGCTGCCTATCGAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGG GAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCAC TGCGCCACAGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGCTCTCTGAAAGA TTTTCTCTTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTG TCCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCA CCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAA ACTCTGCGGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAG ATCAAGGACCTATGCGAGCCATCGTCCCATTTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCA CTTATGACAAAAATCCGCATCATCTTCTCTACATCTTTTGAAGAATGGCATCAC GGAGGAAAACCTGAACAAATGATCCAGCAGGCCAGATACCCCGGAGGATAGT GAGATCATCACCAACATGSGCTACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGC TGCGTGC CGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCA GCTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGAC AAACTTGACACCAAACTACCTTATATCTCTACCGTTCTCTGCTCCTTCA GCACCACCGCGCTCAGCGCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAAGCCCCAGG CGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCTCATCATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTG AATGAGATGCGCTGCGCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAAGTGGGAGGTGC TGATAGGATCCACACATCCTCACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAA ACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCCCTCCAA AACACGCCCCCATCCCACAGCGCTCCGAGCTTCCCACACCGCCCGCTCAGTT CCTTTGCGTCTGTTGCTTCCCGAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCACTGTTGCGC TGCATTCTCGTGTTTCTGATGATGCTCTTCTTGTGTTGAAACAAAAGAAAAATATG CATTGTGTTTTTAAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCA TGTGCAATTGGTGACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGC CTTCTCCCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTTGACATAACCCCTGGGTGACGTGCA CATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAACCTTGTGTTGGG GTTGTTCTGTCTTGTGAGAAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTT ACACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCTGCT CTCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTG GAACAGACCTCTTTGCCCTTCCAGCGTCTCATACCCCGGTAGTGCAGCTGTGG GTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCCACAGCCTGT CACTGCCCCCTCCCAGCCTGTGTCCACAGTGTGTGATCCCGAGGGAAGTCTC CAGTCTAAGTCACAGTCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACTCCCGCTGGAAGCCTC
--	--

[0233]

	CATCTCTTTGGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCC CAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTCCTAGTCCGCCCTTCGTTCAAGGGTCAGG AATGGACCAGAACAGATGGGTTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTG GAGAAAGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCTGTACCCTCTCGGCAAGCA TCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTGTGTG GGGTCATACATCATCGTGTTTGTAAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAA AACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCA TCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTGTGTGTGC TGCTGTTGTCTGTGAAATATAATAACAGTGGAAAGTCACAAAAATGTCCCTGCCCCA GCCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTATTACTTGTCTAGTG ATGTCTCTCAAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCCACCTCCGCCCTCCCTTTCAG AGGCTGTCCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTTCTCAAGGCT TTGAAATCTCCCTTGCACTGAGATTAGTCGTAGATCTCTCCCGCTCTCCCTCC CAACTATACGACCTGATTTCCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGGC TCTTACTCCCGTGCTGTGTTCTGTCCCTCCCTCGGACCAACAGTGCTCATGCT TCAGGACCTTGTGTTGTGCGAAGATGTTGGTTTCCCTTCTCTGTTATTATATAAA AATAATTTATCAAAAGGATATTTTAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAAGCTTGTGTA CCTTAAATTTATCAGAAATCTCAGTGTTTGAAGTACTGAAGCACAAACATATATC ATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAAGAAATCAGC ACCCCT
서열번호 31 이소형 I 를 코딩하는 인간 STXB1 (전사체 변이체 10)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCC ACCTGAGGAGGCGCGGGGTCGCGAGCGCTCGCGGACGAGGAGATCGGAGCCGG GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAA GATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTG GTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCTCTGCTGCAAGATGACAGACA TCATGACCGAGGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCT CCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCT CTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCGGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGCTCT TCTTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGTTTAAAGAACTGGTAAATCCCGAGC AGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTCTCCCGTATGAA TCCAGGCTCTATTCCTTGAGCTCTGTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCC ACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCTGSCAGAGCAGATCGCGAC CCTTGTGCCACCCCTGAAGGAGTACCGGCTGTGCGGTATCGGGGGAAATACAAG GACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCCTATAAAGCTG ATGATCCAACATGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATCCT GGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCT ATGAGTTATGATCTGCTGCCATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCG GCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTG GATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCGGTCT CTGAAAGATTTTCTTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGC GGGACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGCCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAA GTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACC GTAGACAAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGG GAGAGAAGATCAAGGACCTATGCGAGCCATCGTCCCATTTCTGCTGGATGCCAA TGTGAGCACTTATGACAAAATCCGCATCATCTTCTCTACATCTTTTGAAGAAT GGCATCAGGAGGAAAACCTGAACAACTGATCCAGCAGGCCAGATACCCCCGG AGGATAGTGAGATCATCAACACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGA TTCCACGCTGCTGCGCGGAGCAAGCCGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAG ACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACATA TTGAGGACAAACTTGACACCAACACTACCCCTTATATCTCTACCCGTTCTCTGTC CTCCTTACGACACACCGCGTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAAGAACAG GCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCCTCATCATTTTCATCCTTGGGGGTG

[0234]

	TGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAAGTG GGAGGTGCTGATAGGGGAATGGCCCTTCAGAACCTTGGCTAGGTGACATCAGAAG CTGCTTGTGTATGTAAGGAAAATGGGGCTTCTCTCTAAGGATCCACACACATCCT CACCACCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAA ATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCCCTCCAAAACACGCCCCCATCCCACAGCG CTCCGCAGCTTCCACACCACCGCCCGCTCAGTTCTTTGCGTCTGTTGCTTCCCC AGCCCTGCGACGCCCTGGCTGGCACGTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTCAGTGATG CCCTCTTCTTGTGTTGAAACAAAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTAAAAAGAGT ATCTTATACATGTATCTTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGACAGCAGG AGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGCCCTTCTCCCCGTTATTTAAGATT TGTGACCTTGTACATAACCCTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGT AGAAATTTGGGTGTTTTTAAAACTTGTGTTGGGGTGTCTCTGTCTTGTGAGA ATCATAGAGATGCTGTGTTCTTGGAGTATTTCCACTGAGGACTAATCTGCTAT CTTCATTTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCTGCTCTCATCCAAATAACCTGGGAGG TGACAAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCCTTCC CAGCCTCTCATACCCCGGTAGTGCAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCAC GAAGTCAGGCCAGCGCTCTCTCCACAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCCAGCCTGT GTCCACAGTGTGTGATCCCGAGGGAAGTCCCTCAGTCTAAGTCAAGTGCAGTGCCTG ACAGGTGAGAAGCAAACTCCCGCTGGAGCCTCCATCTCTTTGGAAAACAGTTA GTCTGGAGCCTGTGGCCCGAGGCCCTTCTGTCCCGAGCATCATCCAAACAGCTCA TTTTCCCTAGTCCGCCCTTCTGTTCAAGGGTCAGGAATGGACAGAACAGATGGGTT CTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTTGG ACTCACACAGACCTGTACCCCTCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAG TTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGGGGTCAATACATCATCGTGTGTTG TAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAAAC TAAAGCAGCAAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCTCAAGACTCAGCAGCTCTC ATTCCTCAGTGGTGAGCACACCATTTGTGCTGCTGCTGTTGTGCGTGAATATAAT AACAGTGGAGTCAAAAAATGTCCCTGCCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCT CCTGACAGGCCATGTGTATTACTTGTCTAGTGATGTCTCTCAAGTGCTGTAC CGAGCTCGGGCCACCTCCGCCCTCCCTTTCAGAGCCTGCTCCCGCCCTCTCTG CTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCTTGCACCTGA GATTAGTCTGTCAGATCTCTCCCGCTCTCCCTCCCACTTATACGACCTGATTTCC TTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTCT GTCCCTCCCTCGGACCAACAGTGTCTATGCTTCAGGACCTTGTGTCGAAGA TGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTATTTATATAAAAAATAATTTATCAAAAGGATATT TAAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAAACTTGTTCACCTTAAATTTATCAGAATCTCA GTGTTTGAAGTACTGAAGCACAAACATATATCATCTCTGTACCATCTGTACTA AAGCACTTGAGTCTAATAAATAAAGAAATCAGCACCCCT
서열번호 32 이소형 B를 코딩하는 인간 STXBP1 (전사체 변이체 11)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGGCCAGCGCGCC ACCTGAGGAGGCGGGGGTCCGACGGCGTCCGCGGACGAGGAGATCGGAGCCGG GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAA GATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTG GTGGTGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCTGCTGCAAGATGACAGACA TCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCT CCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCT CTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACAGTCT TCTTCACTGACTCTGTCCAGATGCCCTGTTAATGAACTGGTAAAAATCCCGAGC AGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAA TCCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGACTCTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCC ACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGAC CCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAG GACAAATGCCCTGTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCATATAAGCTG ATGATCCAACAATGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATCCT

[0235]

	GGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCT ATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCG GCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTG GATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGGTCT CTGAAAAGATTTTCTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACATGC GGGACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGCTCAGTACCAGAAAAGAGCTCAGCAA GTACTCCACCCAGCTGCACCTTGTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACC GTAGACAAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGG GAGAGAAGATCAAGGAACCTATGCGAGCCATCGTCCCATTTCTGCTGGATGCCAA TGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATCATCTTCTCTACATCTTTTGAAGAAT GGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAACTGATCCAGCAGGCCAGATACCCCGG AGGATAGTGAGATCATCACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGGCCATCGTCACCGA TTCCACGCTGCGTGCCTGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAG ACCTACCACTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTA TTGAGGACAACTTGACACCAAACTACCTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCTGC CTCCTTCAGCACCACCGCCGTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAG GCCCCAGGGGAGTACCGCAGTGGCCCGCCGCTCATCATTTTCATCCTTGGGGGTG TGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAGTG GGAGGTGCTGATAGTGCCCGTGGAGGCGGAAGCTGAGCCCGGCTCCAGGAAGC ACAGTGAGGGCTCAGCCATTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGA TGATGGTATGATGATGATGCTGCTGCTGTTGACGATGAGTCCAAGCCAAGCCTG GGGAGAAAAGAATAAATAGTCTCATAAATTTAAAAAGCCCAATGCTCATCAAGA AGAGAACAGATAAACTGTGTATTACCCCAATGGTGAGTTTAAAGCAGTTAAAAAT GCATGACACACAGTTGCATATGTCAACATGAATAGATCTCAGACACTTAACATG AGTGAAAAGAGCATTATGGGAGGACACAGACAGGATAGTGCACTTTATATAAAG CTTCAATGTTGCAGGCTGAAGAGTGAGGGTCTGATCAACTCAGTATCCTGGAG GCTACATGGGTAAACAGCAAACCTGTTCTCATAAATGCAGAATGTTGGCAAACCTGA CAAACCTGCATCTGCCGCCAGAAAGGAATGCGGAGGGCAGCCACTCCCTAAGCGCA GTTTTCTTGTGATTAGGTACATCTGAAGCCTGTTAGCAATAATGTGAACCTGTGA TCAATTAAGCAGCTGACCAATCATTACCTCCTCTTCCCTGCTCTTTCTACCCAGT AAATACAAAGGGCTGTAGAAGCTCAGAGCTGCTGCTTTTGTCTAGTAGAAGCAGG GAGTCTCTCTTCTTCTTCCCGGACCCCTTCTTTTAAACAGTTTCTTTTAAAGTTT TCATTTCTGCGTTTCATCCTCCTTCATTCACTCCCGTAGTAACCGTGGCAAACCCAC GGCACTTCAAAACCTCATAAAAAGCACCATATTGCTTATTTGGATACATATGT TGTAATATGTGTGAAAACATGCATGGGAATGACAAATACCAAAGTCAGGATAGTGA CTGGCCATGGGGAAGGGATGGTTATTATTGTCGTCTTATATCTTCAATTCCAAAT GAGCCACGGGCTTAAAAGTACTTCATTGAATAAAAAAAAACCAACAATGTATTAA TGCAA
서열번호 33 이소형 h 를 코딩하는 인간 STXBP1 (전사체 변이체 12)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCC ACCTGAGGAGCGCGCGGGTCCGCAGGCGTGCAGGACGAGGAGATCGGAGCCGG GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAA GATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTG GTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGCTCCTGCTGCAAGATGACAGACA TCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCT CCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCT CTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCT TCTTCACTGACTCTTGTCAGATGCCCTGTTTAAATGAAGTGGTAAATCCCGAGC

[0236]

AGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAA TCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCC ACAAGSCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCTGGCAGAGCAGATCGCGAC CCTTTGTGCCACCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAG GACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTG ATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATCCT GGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCT ATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGGAAGTCAACCGGT CTCTGAAAGATTTTCTTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCAT GCGGGACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAAGAGCTCAGC AAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCA CCGTAGACAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGA GGGAGAGAAGATCAAGGACCTATGCGAGCCATCGTCCCATCTCTGCTGGATGCC AATGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTGAAGA ATGGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAACTGATCCAGCACGCCCAGATACCCCC GGAGGATAGTGAGATCATCACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACC GATTCCACGCTGCGTCGCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGC AGACCTACCAAGCTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACAC TATTGAGGACAACTTGACACCAACACTACCTTATATCTCTACCCGTTCTCTCT GCCTCCTTCAGCACCCACCGCGTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAAACA AGGCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCTCATCATTTTTCATCCTTGGGGG TGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAAG TGGGAGGTGCTGATAGGTTCTACTCACATTTCTACTCCACCAAATTTCTCATGG ACCTGAGACACCCCGACTTCAGGGAGTCTCTAGGGTATCTTTGAGGATCAGGC TCCAACAATGGAGTGAGAGCCAAAGAAACAAAGATCCACACACATCTCACCCCA CAGAAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAACAGATGAAGAAATAAGCA GTTAAAAAATAAGTCGCCCCCTCCAAAACACGCCCCCATCCACAGCGCTCCGCA GCTTCCACACCGCCCGCTCAGTTCTTTGCGTCTGTTGCCCTCCCGAGCCCTG CACGCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTCAGTGATGCCCTCTT CTTGTTTGAACAAAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTAAAAAGAGTATCTTAT ACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGACAGCAGGAGAAATT TCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGCTTCTCCCCGTTATTTAAGATTGTGACC TTGTACATAACCTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATT TGGGTGTTTTTAAACCTTGTGTTGGGGTGTTCCTGTCTTGTGAGAATCATAG AGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTACACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATT CCAGTCCCTACCCCTCAGTGCTGCTCTCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAAT CAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCCTTCCAGCGTC TCATAACCCCGGTAGTGCAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCA GGCCAGCGTCTCTCCACAGCCTGTCACTGCCCTCCCGAGCCTGTGTCCACA GTGCTGTGATCCCGAGGGAAGTCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCTGACAGGTG AGAAGCAAACTCCGCTGGAAGCCTCCATCTCTTTGGAAAAACAGTTAGTCTGGA GCCTGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCCGAGGCATCATCCAAACAGCTCATTTTCCC TAGTCCGCTTCTGTTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTCTGGAGG CCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAAGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACA CAGACCCTGTACCTCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGA TACTTCATAATACCTTGTGTTGTGGGGTCATACATCATCGTGTGTTGAAGAGA AGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCA GCAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTCC
--

[0237]

	AGTGGTGAGCACACCATTTGTGCTGCTGCTGTTGTCGTGAAATATAATAACAGTG GAAGTCACAAAAATGTCCCTGCCAGCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAG GCCATGTGTATTACTTGTCTAGTGATGTCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCT CGGCGCCACCTCCGCCCTCCCTTTCAGAGCCTGCTCCCGCCCTCTCTGCTCGCTG CATTGTGGTGTCTCTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCTTGCACTGAGATTAGT CGTCAGATCTCTCCCGCTCTCCCTCCCACTTATACGACCTGATTTCCTTAGGAC GGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTCTCTCCCT CCCTCGGACCAACAGTGCTCATGCTTCAGGACCTTGTGTGCGAAGATGTTGGT TTCCCTTTCTCTGTTATTATATAAAAAATAATTATCAAAAGGATATTTAAAAA AGCTAGTCTGTCTTGAACCTTGTTTACCTTAAATATCAGAATCTCAGTGTGTG AAAGTACTGAAGCACAAACATATATCATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACT TGAGTCTAATAAATAAGAAATCAGCACCCCT
시열번호 34 AAVtt DNA 서열	TTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATAT TTGAATGTATTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTCAGTGTTACAACCAATTAACC AATTCTGAACATTATCGCGAGCCATTTATACCTGAATATGGCTCATAACACCCC TTGTTTGGCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCACCTGACCCCATGCCAACTCA GAAGTGAACGCGGTAGCGCGGATGGTAGTGTGGGGACTCCCATGCGGAGTAG GGAACCTGCCAGGCATCAAAATAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTC GCCCGGGCTAATTAGGGGGTGTGCGCCTTCGCTGAAGTCCTGTATTAGAGGTCAC GTGAGTGTTTTGGGACATTTTGGGACCATGTGGTCACGCTGGGTATTTAAGCC CGAGTGAGCAGCGAGGGTCTCCATTTTGAAGCGGGAGGTTTGAACGCGCAGCCGC CATGCCGGGGTTTACGAGATTGTGATTAAAGTCCCGAGCGACCTTGACGAGCAT CTGCCCGGCATTTCTGACAGCTTTGTGAACCTGGGTGGCGGAGAAGGAATGGGAGT TGCCGCCAGATTCTGACATGGATCTGAATCTGATTGAGCAGGCACCCCTGACCGT GGCCGAGAAAGCTGCAGCGCGACTTTCTGACGGAATGGCGCCGTGTGAGTAAGGCC CCGGAGGGCCCTTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGGCTACTTCCACATGC ACGTGCTCGTGGAAACCAACGGGGTGAAATCCATGGTTTGGGACGTTTCTGAG TCAGATTCCGCAAAAACTGATTGAGAGAAATTTACCGCGGGATCGAGCCGACTTTC CCAACTGGTTCGCGGTACAAAGACCAGAAATGGCGCCGGAGGCGGGAAACAAGG TGGTGGATGAGTGCTACATCCCAATTACTTGTCTCCCAAAACCCAGCCTGAGCT CCAGTGGGCGTGGACTAATATGGAACAGTATTTAAGCGCCTGTTTGAATCTCACG GAGCGTAAACGGTTGGTGGCGCAGCATCTGACGCACGTGTGCGAGACGCAGGAGC AGAACAAAGAGAAATCAGAATCCCAATTCTGATGCGCGGGTGTGATCAAAAAAC TTCAGCCAGGTACATGGAGCTGGTCCGGTGGCTCGTGGACAAGGGGATTACCTCG GAGAAGCAGTGGATCCAGGAGGACCAGGCTCATACATCTCCTTCAATGCGGCT CCAACCTCGCGGTCCCAATCAAGGCTGCCTTGGACAATGCGGGAAAGATTATGAG CCTGACTAAAACCGCCCGACTACCTGGTGGGCCAGCAGCCGTTGGAGGACATT TCCAGCAATCGGATTTATAAAATTTTGGAATAAACGGGTACGATCCCAATATG CGGCTTCCGTCTTTCTGGGATGGGCCACGAAAAAGTTCGGCAAGAGGAACCCAT CTGGCTGTTTGGGCTGCAACTACGGGAAGACCAACATCGCGAGGCCATAGCC CACACTGTGCGCTTCTACGGGTGCGTAACTGGACCAATGAGAACTTTCCTTCA ACGACTGTGTCGACAAGATGGTGATCTGGTGGGAGGAGGGGAAGATGACCGCCAA GGTCGTGGAGTCGGCCAAAGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGGTGCGCGTGGACAG AAATGCAAGTCTCGGCCAGATAGACCGGACTCCCGTGATCGTCACCTCCAACA CCAACATGTGCGCGGTGATTGACGGGAACCTCAACGACCTTCGAACACCAGCAGCC GTTGCAAGACCGGATGTTCAAATTTGAACTCACCCGCGGTCTGGATCATGACTTT GGGAAGGTCAACAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTTCGGGTGGGCAAGGATCAGG

[0238]

TGCTTGAGGTGGAGCATGAATTCACGTCAAAAAGGGTGGAGCCAAGAAAAGACC CGCCCCCAGTGACGCGAGATATAAGTGAGCCCAAACGGGTGCGCGAGTCAGTTGCG CAGCCATCGACGTGAGACGCGGAAGCTTCGATCAACTACGCGAGCAGGTACCAAA ACAAATGTTCTCGTCACTGGGCGATGAATCTGATGCTGTTCCCTGCGAGACAATG CGAGAGAATGAATCAGAATTCAAATATCTGCTTCACTCAGCGACAGAAAGACTGT TTAGAGTGCTTTCCCGTGTCAGAATCTCAACCCGTTTCTGTCGTCAAAAAGGCGT ATCAGAAACTGTCTACATTCATCATATCATGGGAAAGGTGCCAGACGCTTGAC TGCTGCGATCTGGTCAATGTGGATTGGATGACTGCATCTTTGAACAATAATG ATTTAAATCAGGTATGGCTGCCGATGTTATCTTCCAGATGGCTCGAGGACACT CTCTCTGAAGGAATAAGACAGTGGTGGAGCTCAAACTGGCCACCACCACCAA AGCCCGCAGAGCGGCATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGCTTCTGGGTACAA GTACCTCGGACCCCTCAACGGACTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAACGAGGACAG GCCGCGGCCCTCGAGCAGCAAAAGCCTACGACCGGCGAGCTCGACAGCGGAGACA ACCCGTACCTCAAGTACAACACGCGGAGCTTCAGGAGCGCCTTAAAGA AGATACGTCTTTGGGGGCAACCTCGGACGAGCAGTCTTCCAGGCGAAAAAGAGG ATCCTTGAACCTCTGGGCTGGTTGAGGAACCTGTTAAGACGGCTCGCGGAAAAA AGAGGCGCGTGAAGCACTCTCTGCGGAGCCAGACTCTCTCGGGAAACGGGAAA GAGCGGCCAGCAGCTGCAAGAAAAAGATTGAATTTGGTCAGACTGGAGACGCA GACTCAGTACCTGACCCCGACCTCTCGGACAGCCACCAGCAGCCCCCTCTGGTC TGGGAACTAATACGATGGCTAGCGGCGAGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACGA GGGCGCGGACGGAGTGGTAATCTCGGGAATTTGGCATTGCGATTCCCATGG ATGGGCGCAGAGTATCACACCAGCAGCCGAACTGGGCGCTGCCACCTACA ACAACCACCTCTACAAACAAATTTCCAGCCAACTAGGAGCCTCGAACGACAATCA CTACTTTGGCTACAGCACCCCTTGGGGGTATTTGACTTCAACAGATTCCACTGC CACTTTTACCACGCTGACTGGCAAGACTCATCAACAACAACTGGGGATTCCGAC CCAAGAGACTCAGCTCAAGCTCTTAACTTCAAGTCAAGAGGTACGCGAGAA TGACGGTACGAGCAGGATTGCAATAACCTTACAGCAGCGTTAGGTGTTACT GACTCGGAGTACCAGCTCCCGTACGTCTCGGCTCGGCGCATCAAGGATGCCTCC CGCCGTTCCAGCAGAGCTTCTATGTTGCCACAGTATGGATACCTCACCCGTAA CAACGGGAGTCAGGCGAGTAGGACGCTCTTCAATTTTACTGCTGGAGTACTTTCT TCTCAGATGCTGCTACCGGAAACAACCTTACCTTCACTACACTTTTGAGGACG TTCTTTCCACAGCAGCTACGCTCACAGCCAGAGTCTGGACCGTCTCATGAATCC TCTCATCGACAGTACCTGTATTACTTGAGCAGAACAACTCCAAGTGGAAAC ACCACGATGTCAAGGCTTCACTTTCTCAGGCGGAGCGAGTGACATTGGGAC AGTCTAGGAACTGGCTTCTGGACCTGTTACCGCCAGCAGCGAGTATCAAGAGC AGCCGCGGATAACAACAACAGTGACTACTCGTGGACTGGAGCTACCAAGTACCAC CTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCGGCAATGGCAAGCCACAAG ACGATGAAGAAAAGTACTTTCTCAGAGCGGGGTCTCATCTTTGGGAAGCAAGA CTCAGGCAAAACAAATGTGGACATTGAAAAGGTCATGATTACAGACGAAGAGGAA ATCAGGACAACCAATCCCGTGGCTACGGAGCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACC TCCAGAGCGGCAACACCAAGCAGCTACCAGCGATGTCAACACACAAGGCGTTCT TCCAGGCATGGTCTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTTCAAGGGCCCATCTGGGCA AAGATTCCACACACGGACGGACATTTTCAACCCCTCTCCCTCATGGGTGGATTCC GACTTAAACACCCCTCTCCACAGATTCTCATCAAGAACACCCCGGTACCTGCGAA TCCTTCGACCACCTTCACTGCGGCAAGTTTGTCTCTTTCATCACACAGTACTCC ACGGGACAGGTACGCTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAGGAAAAACAGCAAAC GCTGGAAATCCGAAATTCAGTACACTTCCAACACAAAGTCTGTTAATGTGGA CTTTACTGTGGACACTAATGGCGTATTACAGAGCTCGCCCATTTGGCACCAGA
--

[0239]

	TACCTGACTCGTAATCTGTAATTGCTTGTTAATCAATAAACCGTTTAATTCGTTT CAGTTGAACTTTGGTCTCTGCGCGTCAAAAGGGCGACACAAAATTTATTCTAAAT GCATAATAAATACTGATAACATCTTATAGTTTGATTATATTTTGTATTATCGTT GACATGTATAAATTTTCTAGAGCGGCGCAGATCTCAGCTGGATATCAAAAAGT ATTTTCCCTTTATTATTTTCGAGATTATTTTCTTAATCTCTTTAACAACTAG AAATATTGTATATACAAAAAATCATAAATAATAGATGAATAGTTAATTATAGGT GTTTCATCAATCGAAAAAGCAACGTATCTTATTTAAAGTGCCTTGCTTTTTTCTCA TTTATAAGGTTAAATAATTCTCATATATCAAGCAAAGTGACAGGCGCCCTTAAAT ATTCTGACAAATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCATAAAAAAACCCGCCGAAGCG GGTTTTACGTTATTTGCGGATTAAAGATTACTCGTTATCAGAACCGCCAGGGG GCCCGAGCTTAAGACTGGCCGTCGTTTACAACACAGAAAGAGTTTGTAGAAACG CAAAAAGGCCATCCGTCAGGGGCTTTCTGCTTAGTTTGATGCTGGCAGTTCCCT ACTCTCGCCTTCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGCTCGGCTG CGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGTAATACGGTTATCCACAGAACTCAG GGGATAACGACAGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCG TAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCGCCCTGACGAGCAT CACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGAT ACCGAGCGTTTCCCTTGGAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTTCCGACCCCTGCC GCTTACCGGATACCTGTCCGCCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCAT AGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGTTAGGTCTGTTCCGTCCAAGCTGGGCT GTGTGCACGAACCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCG TCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGT AACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAAGGT GGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAA GCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACACC GCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAG GATCTCAAGAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGA CGCGCGGTAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGCTTGCGCCCTCCCGTCA AGTCAGCGTAATGCTCTGCTTTTAGAAAACTCATCGAGCATCAATGAAACTGCA AATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTGAAGAGCCGTTTCTGTA ATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCGAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCG GTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCA AAAAAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGA ATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACG CTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAACCGTTATTCATTCTGTGATTGCGCC TGAGCGAGGCGAAATACGCGATCGCTGTTAAAGGACAATTACAAACAGGAATCG AGTGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATC AGGATATTCTTCTAATACCTGGAACGCTGTTTTCCGGGGATCGCAGTGGTGAGT AACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGTGGCATAA ATTCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTACATCATTGGCAACGCT ACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAAGCGA TAGATTGTGCGACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGGCCATTTATACCCATATA AATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCTCGACGTTTCCCGTTGAATATG GCTCATATTCTTCCTT
서열번호 35	GAGCAGAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG
MYC TAG	

[0240]

서열번호 36	TACCCCTTACGATGTACCGGATTACGCA
HA TAG	
서열번호 37	GCAGCTCCCTCCTCTCGGAGAGAGGGCTGTGGTAAAAACCGTCCGGAAATTGGCCG CCGCTGCCGCCACCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGG CGAGGAGGAGAGACTGTGAGTGGGACCGCCAAGGCCGCGGGCGGGGACCTTGCT GGGGGGCGGGTAGGGGCGGGACGTGGCGCGGGAGGGGCCCGCGGGGTGCGGCGAC ACGGCTGGCGGTGGCGTCCCTCCTCTCTACCTCCCCCTCCCTCTGCCGCCGGT GGTGGCTTTCTCCACTCGTCTCCCGCAATCGCGAGCGACGGTTCTCAGCGCGATC TCCCTGGAGCCACCTTCGATTGACGCCCTCCCGCTGCCCGGCCCATCTGTGCGCA TCCTAGGCCCCAGCTGTGCAAGCGCCCTTGTCGTCTGGGCTTCGCCAGTTGGGGC TGCGCGCGCTCCTGCCCTTCTTGGGGCTTGGGCTCGGCACTGTCCGCGCCCCG CGGTCGCCGCCCTCTCCCTGGATCGCGCTGTCCCTTCTCCCTCGCGCGCCCCAC TCCCGTTACTTGCTGCCCTCCCTCACACACACAGACTGGCGCGGTGCGCAGTCCAT CTCCGTTGGGAGAGTGCGGCCACAAGGGCTCCTGAGCTCTTACCCCATCTCTGG GTTTTGCTCCCTCCTCCTCTCCATTCCGTGACTTTTTGCCCCCACTGCAAG CGAGTCGGTCCATCAGCTCCATTCCCCACTTGGCAGGAACAAGTTGAGGGTTATT GTCCACCCACAAAAAGGACTAGACATTTTGTTCCTAGGTCCCAACTCATCATA AAGAGTTGGTTGTAGTTCTCATCAGGAACCGTGGGCAAGGGACTGTGCGTTCTC AGCACTCGAAGCTCTTCCGTGAGACCTTGCCCGCAGGGTGTCTGTTCTTTGGG GTTGCTGTGCTGTGGCTTCGGAATTTGAGCGTCTTCCACCCCTCCCTCCCTCCC TTCGCCAGCGTTCTGTCTACAGAAAGAAATAGGCAGGTGTCTTGGATATCGTAG TTGCTAATCGCCTATACACTGTTCTATTACACCTTTCTGCTAAGGATAGGGTTTT TGTTTTTGGTTTTTGGTTTTTGGTCCCAACCTCCAGTTGGTTTAGTTTTGGTTTT GGCATTTAGGGTTTTTTGGGGGGAGTAATATCTTGTGTTAAAGACCATCTGAC CCAAGATACCTTTTTTCTCATACTGGAACCTAGGCAGCAGTTGCTATTTCCCTG AGTTAGCAATAGTTTTACAGTATTTGAGGCCCTTTGTCCATAATTCTCAGCGAA TCCCTCAGGGATCAGATTAGCTGCTGTTGGGATCAGGAAATTGGGTTACACCGCT GAAATCTCTTGCTGGGGCCCTTGTTTTGAATTGGAAGTCAGGAGGCTGGAACGA AGGCTCACAAAGTTAACAGTGCCAGCTGCTCTTCCAGAAGCCCTGGATTACAGTCCC ACCAATCCATCGGGGTCACAACCATCTGTAACCTCAGTCCCAAGGGGTCCGAAG CCCTCTCTGGCTTTGCCCTATTATTTATTTATCTTATCTGTTTTTGTCTGTGTC ATCTGGCAAGCCAGGGGGCCATTGGGTGCAACTTATAAACTGACTTCTGTATCT TAAGAAGCCAACCATACAGTGCTTACATTCAGAAAAAAATCTGCCACTTTAAC AGCACTAGAACTAGGGTTTAGAGAAGTATCATAAAGGTCAAATATCTTTGACCAA TATCACCAGCAACCTAAAGCTGTTAAGAAATCTTTGGGCCCAGCTTGACCCAAG GATACAGTATCCTAGGGAAGTTACCAAAATCAGAGATAGTATGCAGCAGCCAGGG GTCTCATGTGTGGCACTCAAGCTCACCTATACTCACTACTGTGCAGACAGCTGTG TTCTCTGTAATACTTACATATTTGTTAATACTTCAGGGAGGAAAAGTCAGAAGA CCAGGATCTCCAGGGCCTCA
서열번호 38	GSTHILTPKFLMDLRHPDFRESSRVSFEDQAPTME
Munc18-1a (aa 568-603)	
서열번호 39	GSTHILTPQKLLDTLKKLNKTDEEISS

[0241]

Munc18-1b (aa 568-594)	
서열번호 40	GATCCAGACATGATAAGATACATTG
정방향 프라이머	
서열번호 41	GCAATAGCATCACAAATTCAC
역방향 프라이머	
서열번호 42	TGGACAAACCACAACCTAGAATGCA
프로브 6- Fam/Zen/3' 8 FQ	
서열번호 43	DNALLAQLIQDK
STXBP1 펩티드	
서열번호 44	YETSGIGEAR
STXBP1 펩티드	
서열번호 45	ISEQTVQLSR
STXBP1 펩티드	
서열번호 46	WEVLIGSTHILTPTK
STXBP1 펩티드(긴 이소형 특이적)	
서열번호 47	WEVLIGSTHILTPQK
STXBP1 펩티드(짧은 이소형 특이적)	

실시예

다음 실시예는 본 발명을 예시한다.

실시예 1: 구축물 설계, 생성 및 클로닝

본 연구에 사용된 플라스미드를 재조합 DNA 기법으로 구축하였다. AAV 시스 골격 플라스미드는 드-노보(de-novo)로 합성되었으며 2개의 AAV 역위 말단 반복부(ITR), 카나마이신 내성 카세트, 원핵 복제 기점 및 SV40 폴리아데닐화 서열을 함유하였다. 편리한 클로닝 제한 부위를 사용하여 인간 STXBP1의 이소형 변이체 X1을 코딩하는 DNA 서열(서열번호 7 포함)을 드-노보 합성하였다. 편리한 제한 부위를 사용하여 개별 프로모터를 드-노보 합성하였다. (각각 서열번호 33 및 32에 따른) 인간 인플루엔자 헤마글루티닌(HA) 또는 Myc 태그를 통합 DNA 기술(Integrated DNA Technologies)TM(미국 아이오와주 코럴빌)로부터 올리고뉴클레오타이드로서 합성하고 아미노 또는 카르복시 말단에서 삽입하였다. 7개의 상이한 프로모터(MECP2-인트론, MECP2, hNSE, CamKII, hSyn, hSTXBP1p, CAG)를 인간 STXBP1 유전자에 대해 시험하였다.

설계된 구축물의 개략도는 도 3에 제시되어 있다. 도면에서, "prom"은 프로모터를 의미하고, "INT"는 인트론을 의미하고, "h"는 인간을 의미하며, SV40은 폴리아데닐화 서열 SV40을 의미하고, "태그"는 구축물의 N 또는 C 말단에 위치한 HA 또는 Myc 태그를 의미한다.

[0248] **실시예 2: 다양한 프로모터 하에서의 STXBP1 발현의 평가**

[0249] 세포 배양

[0250] 인간 유래 AD-HEK293(Agilent Technologies™, 미국 캘리포니아주 산타클라라) 및 마우스 유래 Neuro-2A(ATCC™, 버지니아주 마나사스) 세포주를 DMEM + 10% FBS + 1% 페니실린/스트렙토마이신에서 계대배양하였다 (모두 미국 매사추세츠주 윌섬 소재의 Thermo Fisher Scientific™ 제품). 이전에 설명된 바와 같이(Tremblay, R.G. et al. 2010) 72시간 동안 10 μ M 레티노산(MilliporeSigma™, 미국 매사추세츠주 벌링턴)으로 생장 배지를 보충함으로써 Neuro-2A 세포를 분화시켰다. 제조업체의 프로토콜에 따라 X-tremeGene 360 형질감염 시약(Roche, 독일 만하임)을 사용하여 세포를 형질감염시켰다. 대조군 플라스미드를 사용한 대조군 형질감염도 포함되었다.

[0251] 면역형광 및 현미경관찰

[0252] 40배 대물렌즈 및 하마마츠 오르카(Hamamatsu Orca) 4 플래시 냉각 흑백 카메라(Hamamatsu Photonics KK™, 일본 하마마츠시)가 장착된 자이스 악시오 옵저버(Zeiss Axio Observer) 7 표면형광 현미경(Carl Zeiss AG™, 독일 오버코헨)으로 영상화 실험을 수행하였다. 형질감염된 AD-HEK293 및 Neuro-2A 세포를 4% 파라포름알데하이드(Electron Microscopy Sciences, 미국 19440 펜실베이니아주 헛필드)로 고정하고 1:500에서 토끼 다중클론 항-STXBP1(MilliporeSigma™, 미국 매사추세츠주 벌링턴)로 염색하였다. 그 다음, 영상화 전에 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 488에 접합된 당나귀 항-토끼 2차 항체를 1:1,000으로 사용하여 세포를 염색하였다.

[0253] 도 4: (A) 다양한 프로모터(CAG, MECP2 및 MECP2-인트론)에 의해 구동되는 hSTXBP1 플라스미드에 의해 형질감염되고 항-STXBP1 항체로 검출된 AD-HEK293 세포의 면역형광 영상화. (B) 확대 구획은 STXBP1이 세포막에 국한되어 있음을 보여준다. AD=부작성, NC=음성 대조군.

[0254] 도 4에 나타난 바와 같이, 형질감염된 세포는 편재성 CAG 프로모터 또는 신경 특이적 프로모터(MECP2 및 MECP2-인트론)의 구동 하에 인간 STXBP1 형질전이유전자의 상이한 발현 수준을 입증하였다.

[0255] 도 5에 나타난 바와 같이, 편재성 CAG 프로모터 및 신경 특이적 프로모터(MECP2 및 MECP2-인트론)에 의해 구동되는 STXBP1 플라스미드에 의해 형질감염된 Neuro-2A 형질감염 세포도 분석하였다.

[0256] 도 5: (A) 다양한 프로모터(CAG, MECP2 및 MECP2-인트론)에 의해 구동되는 hSTXBP1 플라스미드에 의해 형질감염되고 항-STXBP1 항체로 검출된 Neuro-2A 세포의 면역형광 영상화. (B) STXBP1이 세포막에 국한되어 있음을 보여주는 확대. NC=음성 대조군.

[0257] STXBP1은 한 세트의 막 관련 단백질과 상호작용하는 세포질 단백질이다. 형질감염된 AD-HEK293 및 Neuro-2A의 확대된 영상은 이들 플라스미드로부터 발현된 STXBP1이 예상된 바와 같이 원형질막(도 4(B)) 또는 뉴런 과정과 원형질막 둘 다(도 5(B))에 국한된다는 것을 보여준다.

[0258] 웨스턴 블롯 분석

[0259] 제조업체의 지침에 따라 1X 정지 프로테아제 및 포스파타제 억제제 칵테일(Thermo Fisher Scientific™, 미국 매사추세츠주 윌섬)을 함유하는 1X 세포 용해 완충제(Cell Signaling Technology™, 미국 매사추세츠주 댈러스)에서 형질감염된 AD-HEK 293 세포를 수거하였다. 10% 환원제로 보충된 도데실황산리튬(LDS) 샘플 완충제(둘 다 미국 매사추세츠주 윌섬 소재의 Thermo Fisher Scientific™ 제품)를 단백질 용해물에 첨가하여, 최종 농도가 1X가 되도록 하였다. 샘플을 1D SDS-PAGE 겔 전기영동으로 분리하였다. 각각의 샘플에 대해, 라인당 30 μ g의 단백질을 로딩하였다. 반건식 전달 장치(Bio-Rad Laboratories™, 캘리포니아주 허큘리스)를 사용하여 단백질을 니트로셀룰로스 막(Li-Cor Biosciences™, 미국 네바다주 링컨)으로 옮겼다. 옮긴 후, 막을 1시간 동안 실온에서 차단 용액(Li-Cor Biosciences™, 미국 네바다주 링컨)에서 인큐베이션하였다. 이어서, 막을 4℃에서 밤새 1차 항체 함유 차단 용액과 함께 인큐베이션하였다. 이 분석을 위해 다음 1차 항체를 사용하였다: 1:1,000에서 토끼 다중클론 항-STXBP1(MilliporeSigma™, 미국 매사추세츠주 벌링턴), 1:1,000에서 염소 다중클론 항-STXBP1(Abnova, 대만 타이완), 1,1000에서 토끼 다중클론 항 -c-myc(MilliporeSigma™, 미국 매사추세츠주 벌링턴), 1:1,000에서 토끼 단일클론 항-HA(Cell Signaling Technology™, 미국 매사추세츠주 댈러스), 1:1,000에서 마우스 단일클론 항-GAPDH(MilliporeSigma™, 미국 매사추세츠주 벌링턴). 막을 PBST 용액으로 3회 세척하고, 실온에서 1시간 동안 원적외선 스펙트럼을 검출하는 데 적합한 IRDye 680RD 당나귀 항-염소 또는 IRDye 680RD 당나귀 항-토끼 2차 항체 또는 800CW 당나귀 항-마우스(1:15,000; Li-Cor Biosciences™, 미국 네바다주 링컨)가 함유된 차단 용액에 넣어두었다. Li-Cor Odyssey CLx 원적외선 영상화기(Li-Cor

Biosciences™, 미국 네바다주 링컨)를 사용하여 단백질을 시각화하였다.

- [0260] 환원 조건 하에 STXBP1 단백질의 분자량은 약 70 kDa으로 예측되며, 웨스턴 블롯으로 상기 단백질을 단백질로서 검출하였다. GAPDH의 검출을 로딩 대조군으로서 사용하였다. 이러한 결과는 분화된 Neuro-2A에서 다양한 프로모터에 의해 강력한 발현이 달성되었음을 보여준다(도 6).
- [0261] 도 6: 다양한 프로모터(CAG, MECP2 및 MECP2-인트론)에 의해 구동되는 hSTXBP1에 의해 형질감염된 Neuro-2A 세포의 웨스턴 블롯 분석. 조건 각각의 2회 기술적 재현실험이 제시되어 있다. NC = 음성 대조군, 1 = MECP2-인트론-hSTXBP1, 2 = CAG-hSTXBP1, 3 = MECP2-hSTXBP1.
- [0262] 이 결과도 CAG 프로모터에 의해 구동되는 N-말단 태그부착된 구축물 및 C-말단 태그부착된 구축물 둘 다에 의해 강력한 발현이 달성되었음을 보여준다(도 7).
- [0263] 도 7: (A) 항-Myc 항체로 검출된 AD-HEK293 세포에서 CAG 프로모터에 의해 구동되는 Myc 태그부착된 hSTXBP1 및 (B) 항-HA 항체로 검출된 AD-HEK293 세포, SH-SY5Y 세포 및 Neuro-2a 세포에서 hSYN 프로모터에 의해 구동되는 HA 태그부착된 hSTXBP1의 웨스턴 블롯 분석. 조건 각각의 2회 기술적 재현실험이 제시되어 있다. (C) 항-STXBP1 항체를 사용하여 AD-HEK293 세포에서도 에피토프 태그부착된 단백질을 검출하였다. NC = 음성 대조군, 1 = CAG-hSTXBP1-Myc, 2 = CAG-Myc-hSTXBP1, 3 = hSYN-HA-hSTXBP1. (A)의 NC 라인에 있는 배경 단백질 밴드는 항-Myc 항체에 의한 내인성 Myc의 검출로 인한 것이다.
- [0264] **실시예 3: 천연 생성 변이체 및 병리학적 변이체 식별 및 분석**
- [0265] STXBP1 유전자 변이체를 식별하기 위해 검색어 “STXBP1” 및 “병원성” 또는 “가능한 병원성”을 사용하여 인간 변이와 표현형 사이의 관계의 보고서의 무료 접근 가능한 공개 아카이브인 ClinVar 데이터베이스 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)를 채굴하였다. 병원성 변이체의 목록은 과학 동료 검토 문헌에 공개된 돌연변이에 의해 보완되었고, 검색어 "STXBP1, Munc18, 변이체, 돌연변이"를 사용한 PubMed(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) 검색으로부터 수동으로 엄선되었고, ClinVar에 보고되지 않은 추가 STXBP1 병원성 변이체를 식별하기 위해 저자에 의해 병원성으로서 정의되었다.
- [0266] 그 다음, STXBP1 단백질의 변화를 유발하는 병리학적 변이체 및 가능한 병리학적 변이체를 식별하였다(각각 표 5 및 6).

표 5

(서열번호 9 에 대한) 병리학적 변이체 단백질 변화	
R190Q	Y531*
C516*, C549*, C552*, C538*	M294fs, M316fs, M327fs, M330fs
D371fs, D385fs, D382fs, D349fs	N489fs, N511fs, N522fs, N525fs
D76H, D90H	R278P, R289P, R292P
E12fs	R464fs, R428fs, R450fs, R461fs
E221fs, E218fs, E207fs	R388*
E273*	R100fs
E384*, E406*, E417*, E420*	C354Y
E39*, E53*	S533fs
F115fs	P480L
G193V	H245D
K340fs, K307fs, K329fs, K343fs	A297T
P125Q, P136Q, P139Q	C354R
Q203*	C366fs
R551H	D224fs
S155fs, S141fs, S152fs	E299fs, E302fs, E266fs, E288fs
S89fs	E302*
W478*	E337fs, E304fs, E326fs, E340fs
Y198*, Y209*, Y212*	F237fs
Y198*, Y209*, Y212*	G222fs, G233fs, G236fs
Y266*	G507E, G540E, G543E, G529E
E27*	I393fs
E418*, E407*, E421*, E385*	I490fs
E527*, E516*, E530*, E494*	I50fs
E67*, E81*	I539del
G508C, G530C, G541C, G544C	K196*

[0267]

G544D	K328fs, K364fs, K350fs, K361fs
H498fs, H462fs, H495fs, H484fs	K447fs, K458fs, K461fs, K425fs
I232fs	K98fs, K84fs
K111fs, K122fs, K125fs	L130fs
M252fs	L36*
M443R	L87fs, L73fs
Q336*	N134fs
S440*, S462*, S473*, S476*	P433fs
V84D	Q250*
Y330fs, Y344fs, Y308fs, Y341fs	Q338*
Y519*	Q359*
C180Y	Q558*
R122*	Q576fs
R292H	R157fs, R168fs, R171fs
R190W	R500fs, R522fs, R533fs, R536fs
R406C	R522fs, R500fs, R533fs, R536fs
R235Q	R551L
R235*	R551P
G544V	S292fs, S328fs, S314fs, S325fs
K461fs	S300fs
R551C	S42fs
R367*, R331*, R353*, R364*	T504fs
E470*	W28*
W522*	W563*
A214fs	Y140*
G319fs	Y344*, Y322*, Y355*, Y358*
G544fs	Y402fs
R292L	Y551*, Y554*, Y518*, Y540*

Y250*, Y261*, Y264*	S476*
K120fs	E283K
I88fs	H523fs
	Q229*

[0268]

[0269]

표 6

(서열번호 9에 대한) 가능한 병리적 변이체 단백질 변화	
G530R, G541R, G508R, G544R	S28Y, S42Y
H311D, H333D, H347D, H344D	Y75C
T129P	R406H, R370H, R403H, R392H
A102del, A88del	L426P
D248Y, D259Y, D262Y	E171G, E182G, E185G
H89P, H103P	E207fs, E218fs, E221fs
K194fs, K205fs, K208fs	L390R, L412R, L423R, L426R
L41Q, L27Q	A517S
P65L, P79L	E487D
Y145H	G236D
W274R, W285R, W288R	H293Y
R406L	I232N
R551S	I390V
P139L	I485N
R403G, R392G, R370G, R406G	L256P
T361I	L291P
K32E, K46E	P335S
E455del, E477del, E488del, E491del	T570A
P444S, P466S, P477S, P480S	N548D
Y358fs	T248I

[0270]

[0271]

STXBP1 유전자 변이체는 아미노산 치환으로 이어지는 미스센스 돌연변이를 포함할 수 있다. 예를 들어, 표 5의 R190Q는 서열번호 9에 대한 위치 190에서 아르기닌이 글루타민으로 대체되는 것을 의미한다.

[0272]

다른 돌연변이도 발생할 수 있다. 식별된 돌연변이 유형 중 하나는 변경된 염기쌍의 수가 3으로 나누어지지 않는 뉴클레오타이드의 삽입 또는 결실을 수반하는 돌연변이였고, 이것은 "fs"로서 표시되는 프레임시프트인 새로운 아미노산 서열의 생성을 유발한다. 돌연변이가 정확한 판독 프레임을 파괴하는 경우, 돌연변이 뒤의 전체 DNA 서열은 부정확하게 판독될 것이다. 예를 들어, 표 5의 E12fs는 서열번호 9에 대한 위치 12에서 글루탐산이 뉴클레오타이드의 프레임시프트로 인해 변화되어, 부정확한 아미노산 서열을 가진 비정상적인 단백질이 생성되는 것을 의미한다.

[0273]

변이체에서 발견된 또 다른 유형의 돌연변이는 단백질에서 하나 이상의 아미노산 잔기를 제거하는 DNA 수준의 돌연변이였다. 이러한 유형의 돌연변이는 표에서 결실(del)로서 표시된다. 예를 들어, 표 5의 I539del은 서열번호 9에 대한 위치 539에서 이소류신이 제거됨을 의미한다.

[0274]

다른 돌연변이는 별표(*)로 표시된, 정지 코돈의 도입을 포함하는데, 이것은 단백질의 번역이 이 위치에서 중단되어, 단백질이 짧아지거나 절두된다는 것을 의미한다. 예를 들어, 표 5에서 Y531*은 통상적으로 서열번호 9에 대한 티로신 531을 코딩하는 코돈에서 정지 돌연변이가 발생하여, 이 위치에서 단백질의 번역이 종료됨을 의미한다.

[0275]

건강한 집단의 천연 생성 변이체는 질의어 "STXBP1"을 사용하여 관련 없는 개체들의 60.146개 샘플로부터 얻은

유전 정보를 함유하는 공개적으로 이용 가능한 대조군 데이터 세트인 gnomAD(The Genome Aggregation Database - <https://gnomad.broadinstitute.org/v2.1.1>)로부터 유래하였다. 대조군 데이터 세트로부터 추출된 변이체는 아미노산 변화를 초래하는 미스센스 변이체, 시작 상실 변이체 및 정지 획득 변이체를 포함한다. 아미노산 변화를 초래하는 천연 생성 변이체는 표 7에 보고되어 있다.

표 7

(서열번호 9에 대한) 천연 생성 변이체				
Ala113Thr	Asp207Asn	Ile289Val	Pro67Leu	Val84Ile
Ala181Asp	Asp210Asn	Ile450Val	Pro94Leu	Val9Ile
Ala389Ser	Asp436Gly	Ile490Thr	Pro95Leu	Ala514dup
Ala430Thr	Asp49His	Leu169Met	Ser149Phe	Phe595LeufsTer30
Ala444Val	Asp586Asn	Leu414Ser	Ser328Thr	Val593TyrfTer32
Ala514Thr	Asp597Asn	Lys161Arg	Ser533Thr	
Ala527Thr	Gln154His	Lys25Asn	Ser70Thr	
Arg100Gln	Gln338Arg	Lys277Arg	Thr129Ile	
Arg100Trp	Glu12Asp	Lys314Asn	Thr401Ile	
Arg171His	Gly222Ser	Lys364Arg	Thr419Met	
Arg192Gln	Gly520Val	Met15Val	Thr455Met	
Arg305Gln	Gly529Ser	Met38Thr	Thr588Ile	
Arg305Trp	His16Arg	Met602Val	Tyr519Cys	
Arg457Cys	His357Pro	Phe91Leu	Val104Ile	
Arg505Cys	Ile168Val	Pro434Leu	Val448Met	
Arg583Ser	Ile271Val	Pro462Leu	Val451Ile	
Arg64Cys				
Asn398Ser				
Asn548Ser				

[0276]

[0277] 실시예 4: 바이러스 입자의 제조

[0278] AAV 제조

[0279] AAV2 Rep 서열에 이어 AAV9.hu14(이하 AAV9) 또는 AAV-트루 타입(이하 AAVtt) 캡시드 서열(각각 서열번호 17 및 34에 따름)을 함유하는 트랜스 플라스미드는 ATUM™(미국 캘리포니아주 뉴어크)에 의해 드-노보 합성되었다. AAV 헬퍼 플라스미드 pALD-X80은 알테브론 엘엘씨(Aldevron, LLC)™(미국 노스다코타주 파고)로부터 구입되었다.

[0280] 비-복제 AAV 벡터를 삼중 형질감염 방법으로 생성하였다. 진탕 플라스크에서 Expi293 발현 배지(Thermo Fisher™, 미국 매사추세츠주 월섬)를 사용하여 3일 또는 4일마다 3.0E+05개 내지 5.5E+05개 세포/мл의 시딩 밀도로 Expi293 세포(Thermo Fisher™, 미국 매사추세츠주 월섬)를 계대배양하였다. Expi293 세포를 37°C 및 5% CO₂로 설정된 에펜도르프(Eppendorf) 인큐베이터에서 125 rpm으로 웨도 진탕기에서 배양하였다. 제조 플라스크를 설정하기 위해, 바이러스 제제당 총 부피 30 내지 66 ml에서 1.5E+05개 세포/мл로 125 ml 진탕 플라스크를 형질감염 전날 접종하였다. Vi-Cell Blu(Beckman Coulter™, 미국 캘리포니아주 패서디나)를 사용하여 생존 세포 밀도를 계산하였다.

[0281] 작업 부피가 30 ml인 제조 플라스크의 경우 다음과 같이 각각의 플라스크에 대해 형질감염 복합체를 생성하였다: 1 mg/ml의 180 µl 폴리에틸렌이민(PEI) MAX(Polysciences Inc™, 미국 펜실베이니아주 워링톤)를

1.5 ml OptiPRO 무혈청 배지(Thermo Fisher™, 미국 매사추세츠주 월섬)로 희석하고, 설정 8에서 4회 볼텍싱하고 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 별도로, 20 μ g의 시스 플라스미드(표 10에 표시됨), 30 μ g의 Rep/Cap 플라스미드(AAV9 또는 AAVtt) 및 40 μ g의 헬퍼 플라스미드(pALD-X80)를 1.5 ml OptiPRO 무혈청 배지로 희석하고, 설정 8에서 4회 볼텍싱하고 실온에서 5분간 인큐베이션하였다. 이어서, 이 두 혼합물들을 조합하고, 설정 8에서 4회 볼텍싱하고 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 형질감염 복합체를 세포가 함유된 진탕 플라스크에 첨가하였다. 세포를 125 rpm에서 일정하게 교반하면서 37℃에서 형질감염 혼합물과 함께 배양하였다.

[0282] 96시간 후, 농축된 AAV 용해 완충제를 1X의 최종 농도(150 mM NaCl, 120 mM Tris-HCl[pH = 8.0], 2 mM MgCl₂, 0.1% 트리톤 X-100)까지 플라스크에 첨가하고 벤조나제(Benzonase)(MilliporeSigma™, 미국 매사추세츠주 벨링턴)를 50 U/ml의 최종 농도까지 플라스크에 첨가하였다. 이 혼합물을 125 rpm에서 일정하게 교반하면서 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 혼합물을 23℃에서 10분 동안 2,880 x g로 원심분리함으로써 정화하였다. 샘플을 추가 분석할 때까지 -80℃에서 저장하였다.

[0283] AAV 역가 측정

[0284] 각각의 샘플을 -80℃로부터 꺼내 실온에서 15분 동안 해동하였다. 일단 샘플이 해동되면, 샘플을 짧게 볼텍싱하고 1분 동안 원심분리하였다. 그 후, 10 μ l의 샘플을 96웰 PCR 플레이트의 개별 웰에 첨가하고 각각의 웰에서 100 μ l의 총 부피까지 10X DNase 완충제, 50 U DNase 및 DNase 무함유 물(모두 미국 위스콘신주 매디슨 소재의 Promega™ 제품)과 조합하였다.

[0285] 그 다음, 플레이트를 Bio-Rad™(미국 캘리포니아주 허큘리스) 열순환기로 옮기고 37℃에서 30분 동안 가열한 다음 4℃까지 냉각하였다. 그 다음, 샘플을 표 8에 기재된 바와 같이 연속적으로 희석하였다.

표 8

희석 단계	중간 희석율	중간 샘플	중간 부피 (μ l)	희석제 부피 (μ l)	총 부피 (μ l)	총 희석율
D0	10	DNase 처리 샘플	100	NA	100	10
D1	1.5	D0	100	50	150	1.5E+01
D2	10	D1	10	90	100	1.5E+02
D3	10	D2	10	90	100	1.5E+03
D4	10	D3	10	90	100	1.5E+04
D5	10	D4	10	90	100	1.5E+05

[0286]

[0287] 5 μ l의 희석액 D2, D3, D4 및 D5를 프로브용 슈퍼믹스(Supermix for Probes)(dUTP 없음, Bio-Rad™, 미국 캘리포니아주 허큘리스), 정방향 프라이머 GATCCAGACATGATAAGATACATTG(서열번호 40), 역방향 프라이머 GCAATAGCATCACAAATTCAC(서열번호 41), 프로브 6-Fam/Zen/3'IB FQ: TGGACAAACCACAACCTAGAATGCA(서열번호 42) 및 DNase 무함유 물로 구성된 20 μ l의 ddPCR 마스터 혼합물과 1X의 최종 농도로 혼합하였다. 이 프라이머 세트는 형질전이유전자의 SV40 폴리A 영역을 표적화한다. 각각의 샘플을 96웰 PCR 플레이트에서 이중으로 실행하였다.

[0288] 플레이트를 호일 덮개로 열 밀봉하고, 펄스 볼텍싱하고, 1,000 x g에서 5분 동안 원심분리하였다. 플레이트를 Bio-Rad™ QX-200 액적 생성기에 넣고 제조업체의 지침에 따라 액적을 생성하였다.

[0289] 액적 생성 후, 플레이트를 호일 덮개로 열 밀봉하고 표 9에 기재된 주기를 실행하도록 프로그래밍된 BioRad™ 열순환기에 넣었다.

표 9

PCR 증폭 설정(모든 승온속도는 2.5℃/초로 설정됨)			
주기 단계	온도	지속시간	주기 수
효소 활성화	95℃	10 분	1
변성	95℃	30 초	39
어닐링/연장	56℃	1 분	
효소 불활성화	98℃	10 분	1
유지	4℃	무한대	1

[0290]

[0291]

일단 완료되면, 제조업체의 지침에 따라 액적 판독을 위해 플레이트를 Bio-Rad™ QX200 액적에 넣었다. 하기 식을 이용하여 벡터 계놈의 농도(VG/mL)를 정량하였다:

[0292]

VG/ML: $X = [(aY)(1000/b)]D$, 여기서:

[0293]

X는 VG/mL이고;

[0294]

a는 ddPCR 반응의 부피(25 μ l)이고;

[0295]

Y는 마이크로리터당 커피의 ddPCR 판독값이고;

[0296]

b는 ddPCR에서 희석제 벡터의 부피(5 μ l)이고;

[0297]

D는 시험 물질에 적용된 총 희석율이다.

[0298]

어세이 허용 기준은 다음과 같이 정의되었다:

[0299]

재현실험 사이의 %CV는 $\leq 15\%$ 이어야 하고; $>15\%$ 인 경우, 하나의 이상치가 생략될 수 있다. 이상치가 생략되고 %CV가 $>15\%$ 로 유지되는 경우, 어세이를 반복해야 한다. 상호희석 %CV는 $\leq 20\%$ 이어야 하고, 보고된 희석은 적어도 2회 연속 희석이어야 한다. %CV가 $>20\%$ 인 경우, 보고된 희석이 적어도 2회 연속 희석인 한, 희석은 생략될 수 있다. 평균 희석이 여전히 $>20\%$ 인 경우, 어세이를 반복해야 한다. 각각의 반응 웰은 $\geq 1,000$ 개의 허용된 액적을 가져야 한다. 액적이 $<10,000$ 개인 경우, 웰은 분석으로부터 배제될 것이다.

[0300]

AAV 캡시드 ELISA에 의한 바이러스 입자 정량

[0301]

바이러스 입자 역가를 제조업체의 지침에 따라 ELISA 키트(PROGEN™ Biotechnik GmbH, 독일 하이델베르크)로 측정하였다. AAV9의 경우, 마우스 단일클론 ADK9 항체를 포획 및 검출 단계 둘 다에 사용하였다. AAVtt의 경우, A20R 단일클론 항체를 포획 및 검출 단계 둘 다에 사용하였다. 몰레큘라 디바이스(Molecular Devices)™(미국 캘리포니아주 산호세) 아쿠아맥스(AquaMax) 4000 마이크로플레이트 세척기를 이용하여 제공된 1X 어세이 완충제(ASSB)로 각각의 단계 사이에서 세척을 수행하였다. 몰레큘라 디바이스™ 스펙트라맥스(SpectraMax) M5e 플레이트 판독기로 샘플을 검출하였다. 캡시드 역가를 표준 곡선으로부터 보간하였고 표 10에 기록하였다.

표 10

시스 플라스미드	캡시드	총 바이러스 입자 (VP)	캡시드 역가 (VP/mL)	총 바이러스 계놈 (VG)	바이러스 계놈 역가 (VG/mL)
MECP2-hSTXBP1	AAV9	2.15E+13	7.17E+11	7.77E+11	2.59E+10
MECP2-인트론-hSTXBP1	AAV9	1.94E+13	6.47E+11	6.72E+11	2.24E+10
MECP2-hSTXBP1	AAVTT	6.72E+12	2.24E+11	6.06E+11	2.02E+10
MECP2-인트론-hSTXBP1	AAVTT	4.38E+12	1.46E+11	5.04E+11	1.68E+10

[0302]

[0303] ddPCR에 의해 수득된 바이러스 게놈 역가 및 ELISA에 의해 수득된 캡시드 역가는 인간 STXBP1 형질전이유전자에 작동 가능하게 연결된 표시된 프로모터를 포함하는 핵산을 가진 바이러스 벡터를 포함하는 AAV9 및 AAVtt 바이러스 입자 둘 다가 성공적으로 생성될 수 있음을 시사하였다.

[0304] **실시예 5: NGN2 분화된 글루타메이트성 뉴런에서 STXBP1 카세트의 렌티바이러스 발현**

[0305] DOX 유도성 NGN2 발현 카세트를 보유하는 유전자 편집된 iPSC 세포주(EBiSC, Ref: BIONi010-C-13)를 사용하여 iPSC 유래 글루타메이트성 뉴런을 생성하였다. 이 프로토콜에서, 뉴런 분화를 프라이밍하기 위해 9일 동안 독시사이클린으로 NGN2 전사 인자를 유도하였다. 분화(DIV) 21에서, hSyn 또는 MECP2 프로모터의 조절 하에 인간 STXBP1(서열번호 9)을 발현하는 렌티바이러스 벡터의 연속 희석액을 iPSC 유래 NGN2 뉴런에 형질도입하였다. 안전성 개선을 위해 3세대 시스템을 사용하여 HEK 293 세포에서 렌티바이러스 벡터를 생성하였다. DIV28에서, 면역세포화학(ICC) 분석을 다음과 같이 수행하였다: 세포를 2% 파라포름알데하이드로 고정하고 1:250의 희석비에서 1차 토끼 다중클론 항-STXBP1 항체(Sigma, Ref: HPA008209)로 염색하였다. 그 다음, 세포를 1:1000 희석비에서 알렉사 플루오르 568에 접합된 염소 항-토끼 2차 항체로 염색하였다. 경험적 파라미터를 사용하여 InCell 분석기 6000 기기로 영상화를 수행하였다.

[0306] 2의 감염다중도(MOI)로 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 세포의 대표적인 ICC 영상이 도 8에 제시되어 있다.

[0307] 도 8: iPSC 유래 글루타메이트성 뉴런에서 STXBP1 카세트의 렌티바이러스 벡터 형질도입. 영상은 대조군 조건(형질도입되지 않음) 하에서의 STXBP1 발현 및 hSyn 또는 MECP2 프로모터의 조절 하에 있는 카세트의 형질도입 후 STXBP1 발현의 대표적인 사진을 보여준다.

[0308] 모든 조건에 대해 동일한 획득 설정을 사용하여 사진을 촬영하였다. 신호와 형질도입되지 않은 세포의 비교는 인간 iPSC 유래 NGN2 뉴런에서 STXBP1의 과발현을 시각화할 수 있게 하였다. hSyn 프로모터의 조절 하에 있는 STXBP1은 MECP2 프로모터보다 더 높은 발현을 야기하였다(표 11에 요약됨).

표 11

iPSC 유래 글루타메이트성 뉴런에서 렌티바이러스 형질도입 후 STXBP1 발현 수준

형질도입되지 않음	hSyn-STXBP1	MECP2-STXBP1
검출되지 않음	++	+

[0309] (+) ICC 분석에 의해 관찰된 상대적 발현 수준

[0310] **실시예 6: 1차 마우스 뉴런에서 STXBP1 카세트의 AAV-9 형질도입**

[0311] AAV9 벡터는 실시예 4에 설명된 바와 같이 제조되었고 캡시드 특성은 표 12에 나열되어 있다. 형질전이유전자는 N-말단에서 HA 태그에 융합된 STXBP1 단백질(서열번호 9)을 발현하였고, 발현은 다음 프로모터에 의해 구동되었다: hSyn, MECP2 또는 MECP2-인트론. HA 태그부착된 단백질을 사용하여 내인성 STXBP1 수준으로부터 형질전이유전자 발현을 구별하였다. CAG-eGFP-NLS 카세트를 가진 AAV9 캡시드를, 형질도입 효율을 위한 대조군 벡터로서 사용하였다. 마우스 1차 피질 뉴런을 형질도입함으로써 시험관내에서 STXBP1 발현을 조사하였다. 형질도입되지 않은 세포를, 내인성 STXBP1 발현을 위한 대조군으로서 사용하였다.

표 12

AAV9 바이러스 벡터 성질

카세트	캡시드	바이러스 계놈 역가 (vg/ml)	내독소 (<10 EU/ml)
hSyn-eGFP	AAV9	1.36E+13	통과
MECP2-HA-hSTXBP1	AAV9	1.39E+13	통과
MECP2-인트론-HA-hSTXBP1	AAV9	1.35E+13	통과
hSyn-HA-hSTXBP1	AAV9	1.28E+13	통과
CAG-HA-hSTXBP1	AAV9	1.22E+13	통과
CAG-eGFP	AAV9	1.30E+13	통과

[0312]

[0313]

E17 마우스 배아의 피질 조직으로부터 마우스 1차 피질 뉴런 세포를 준비하였다. 37℃에서 30분 동안 파파인을 사용하여 피질 조직을 해리하고 B27 보충제 2%, GlutaMAX-I 1 mM 및 페니실린-스트렙토마이신 50 유닛/ml로 보충된 Neurobasal™ 배지 중의 배양물에서 유지하였다. 매주 절반의 배지 교체를 수행하였다.

[0314]

분할(DIV) 7에서, 세포를 두 상이한 MOI(2.5E+6 GC/세포 및 5.0E+5 GC/세포)에서 상이한 AAV9 구축물로 형질도입하였다. 두 MOI 조건에서 높은 hSyn-eGFP-NLS 구축물을 포함시킴으로써 형질도입 수준을 확인하였다. DIV13에서, 세포를 2% 파라포름알데하이드로 고정하고 1차 토끼 다중클론 항-STXBP1 항체(1:250; Sigma, Ref: HPA008209) 및 항-HA 태그 염색(1:100; Ref: 2367S Cell Signaling Technology)으로 염색하였다. 경험적 파라미터를 사용하여 InCell 분석기 6000 기기로 영상화를 수행하였다.

[0315]

도 9: 마우스 1차 뉴런에서 STXBP1의 AAV9 형질도입: (A) MOI 5.0E+5 GC/세포에서 AAV9 바이러스 벡터가 형질도입된 1차 마우스 피질 뉴런에서의 STXBP1 염색의 대표적인 영상. 사진은 대조군 조건(형질도입되지 않음), 및 hSyn, MECP2 또는 MECP2-인트론 프로모터의 조절 하에서의 STXBP1 발현을 보여준다. (B) 동일한 1차 마우스 피질 뉴런에서 HA 염색(우측)과 STXBP1 염색(좌측)의 비교.

[0316]

본 발명자들은 유사한 획득 파라미터를 사용하여 형질도입되지 않은 세포(도 9A)와 비교되었을 때 3개의 프로모터 모두에 대한 증가된 STXBP1 발현 수준을 확인하였고, 이는 AAV9 형질도입이 기준 수준을 넘는 STXBP1 발현을 달성할 수 있음을 암시한다. 인트론 프로모터를 가진 MECP2는 가장 높은 발현 수준을 보였고, hSyn 및 MECP2가 그 뒤를 이었다(표 13). 더욱이, 연구된 모든 바이러스 벡터들에 대해 항-HA와 STXBP1 염색의 공국소화가 관찰되었으며, 대표적인 영상은 도 9B에 제시되어 있다(화살표 참조).

표 13

다양한 뉴런 프로모터의 조절 하에 마우스 1차 뉴런에서 STXBP1의 AAV9 형질도입

	형질도입되지 않음	hSyn	MECP2	MECP2-인트론
STXBP1	-	++	+	+++

(+) ICC 분석에 의해 관찰된 상대적 발현 수준

[0317]

[0318] STXBP1 형질도입이 뉴런 세포에 특이적이라는 것을 입증하기 위해, 본 발명자들은 범 뉴런 마커 MAP2에 대해 유도된 항체(1:5000; Ref: ab5392; Abcam™, 미국 매사추세츠주 캠브리지)로 마우스 1차 배양물을 대조염색하였다.

[0319] 도 10: MAP2 양성 뉴런에서 STXBP1 과발현의 공국소화. 영상은 AAV9 바이러스 벡터의 형질도입 후 마우스 1차 뉴런에서 항-HA 태그 염색(좌측 패널) 및 항-MAP2 염색(우측 패널)의 대표적인 사진이다. 화살표는 STXBP1(HA) 및 뉴런 마커(MAP2)를 발현하는 세포의 예를 표시한다.

[0320] 도 10은 형질도입된 마우스 1차 피질 뉴런에서 뉴런 마커(MAP2)와 항-HA 염색의 공국소화를 보여준다(화살표 참조). 이 데이터는 다양한 뉴런 프로모터의 조절 하에 HA 태그부착된 STXBP1 형질전이유전자 생성물의 뉴런 발현을 확인시켜 주었다. HA-태그 신호의 강도(표 14)는 STXBP1 수준(표 13)과 상관관계를 가지며, 이는 프로모터 강도가 다음과 같이 순위매겨질 수 있음을 암시한다: MECP2-인트론 > hSyn > MECP2.

표 14

마우스 1차 뉴런에서 HA 태그의 발현 및 국소화

	형질도입되지 않음	hSyn- HA_STXBP1	MECP2- HA_STXBP1	MECP2-인트론- HA_STXBP
HA-태그 신호	-	++	+	+++
공-국소화		있음	있음	있음

(+) ICC 분석에 의해 관찰된 상대적 발현 수준

[0321]

[0322] **실시예 7: 마우스 뇌에서 AAV-9 매개 형질도입 후 STXBP1의 생체내 발현**

[0323] 마우스 뇌에서 STXBP1의 AAV9 매개 형질도입을 생체내에서 조사하였다. 양측 뇌실내(ICV) 주사를 통해 바이러스 벡터를 출생 후 1일 된 신생아 마우스(PND1)의 뇌에 투여하였다. ICV 신생아 주사 방법은 이전에 설명되었다(Bertrand-Mathon, et al. 2015; Kim, et al. 2014; Hamodi, et al. 2020). 주사된 동물을 5주 동안 모니터링 하고 뇌 조직에서의 STXBP1의 발현 및 분포를 생화학적 관독값으로 분석하였다.

[0324] 실험은 5개의 군, 즉 대조군(비히클 주사), 대조군 바이러스(AAV9/hSyn_eGFP), AAV9/hSyn-HA-STXBP1, AAV9/MECP2-HA-STXBP1 및 AAV9/MECP2-인트론-HA-STXBP1을 포함하였다. AAV9 벡터는 표 12에 기재된 바와 동일 하였다. 생체내 실험 조건의 요약은 표 15에 제시되어 있다.

표 15

생체내 실험 조건의 요약

치료 시 연령	전달 경로	바이러스 벡터 카세트	역가	생활 평가	최종 평가
출생 후 1 일째 날 PND1	ICV 양측 주사 2 μ l/ 반구	AAV9/hSyn- STXBP1	1.28E+13GC/ml	주사 후 5 주 동안 임상 징후, 부작용, 체중, 사망률	생화학적 분석, 조직병리학, 면역조직화학, 형질전이유전 자 발현을 위해 주사 후 5 주에서 뇌 및 장기 채취
		AAV9/ MECP2- STXBP1	1.39E+13GC/ml		
		AAV9/ MECP2- 인트론 STXBP1	1.35E+13GC/ml		
		AAV9/ hSyn_EGFP	1.36E+13GC/ml		
		비히클	(평균 인산염 완충 식염수 1X)		

[0325]

[0326]

마우스의 전반적인 건강을 평가하기 위해 연구 과정(주사 후 5주) 동안 체중 차이를 모니터링하였다. 마지막 평가 시 상이한 카세트 군의 체중의 유의미한 차이는 없었다. 어떤 군도 독성의 임의의 임상 징후를 보이지 않았다. 또한, AAV9/hSyn-HA-STXBP1, AAV9/MECP2-HA-STXBP1 또는 AAV9/MECP2-인트론-HA-STXBP1로 치료받은 성체 야생형 마우스에서는 이환율 또는 발달 지연의 명백한 징후가 없었다. 이 실험의 결과는 바이러스 벡터 카세트가 장기간 내약성 및 낮은 독성을 나타내었으므로, 임상전 설정에서 안전하게 사용될 수 있음을 입증하였다.

[0327]

주사 후 5주에서, 뇌 조직을 채취하고 해부하고 생화학적 분석을 위해 제출하였다. DNA/RNA는 좌측 전두엽 피질 및 해마로부터 추출된 반면, 단백질은 일치하는 우측 전두엽 피질로부터 추출되었다. RNA 추출을 위한 DNase 처리를 포함하는 DNA/RNA 추출을, 제조업체 지침에 따라 알프렙(AllPrep) 미니 키트(Qiagen, 80204)를 사용하여 수행하였다. 프리셀리스(Precellys) 24 기기(Bertin Technologies)를 사용하여 조직을 RLT Plus 완충제(β -머캅토에탄올로 보충됨)에 용해시켰다. 모든 샘플들에 대해 DNA 농도를 측정하고 20 ng/ μ l로 조절하였다. 그 다음, SV40 폴리A 신호(모든 AAV 카세트에 존재함)에 특이적인 프라이머/프로브를 사용하여 40 ng을 qPCR에 제출하였다. ValidPrime® 키트(tataabiocenter, A106P25)를 사용하여 마우스 게놈의 양을 분석하였다. ValidPrime® 서열은 반수체 정상 게놈당 정확히 하나의 카피로 존재하는 gDNA의 전사되지 않은 유전자좌에 특이적이다. qPCR 둘 다에 대해, 표준 곡선 방법을 이용하여 카피 수를 측정하였다. RNA 농도를 측정하였고, 키트 고품질 cDNA RT 키트 + RNase 억제제(Applied Biosystems 카탈로그 번호 4374966)를 사용하여 500 ng의 RNA를 RT에 제출하였다. 수득된 cDNA뿐만 아니라, 수득된 결과의 정규화를 위한 2개의 기준 유전자도 인간 STXBP1 신호 qPCR에 제출하였다. 상대적 발현을 측정하고 모든 군들에 대한 평균값으로 스케일링하였다. 단백질 추출을 위해, 프리셀리스 24 기기(Bertin Technologies) 및 냉각 시스템을 사용하여 조직을, 2배 농축된 프로테아제 및 포스파타제 억제제 콕테일(Cell Signaling Technology, #5872)을 포함하는 RIPA 완충제(Pierce, 89900)에 용해시켰다. 샘플을 얼음 위에 30분 동안 방치한 후 원심분리하였고, 상청액을 최종 단백질 추출물로서 모았다. BCA 단백질 어세이 키트(Pierce, 23227)를 사용하여 단백질 농도를 측정하였고 7.5 μ g의 단백질을 램리(Laemli) 완충제 및 β -머캅토에탄올과 혼합하고 SDS-Page 전에 90°C에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 겔을 니트로셀룰로스 막으로 옮기고 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 막을 4°C에서 1시간 동안 차단 용액(Ref: 927-50000; Li-Cor)에서 인큐베이션한 후, 1차 항체 마우스 단일클론 항-HA(1:2000; Ref: 2367S, Cell Signaling Technology) 및 마우스 단일클론 항-GAPDH(1:10000; Ref: G8795, Sigma)와 함께 인큐베이션하였다. 사용된 2차 항체는 IRDye® 680RD 당나귀 항-마우스 IgG 2차 항체(1:20000; Ref: 926-68072, Li-Cor) 및 IRDye® 800CW 당나귀 항-토끼 IgG 2차 항체(1:20000; Ref: 926-32213, Li-Cor)였다.

[0328]

도 11: 바이러스 벡터 DNA 카피 분석. AAV 치료 후 5주령 마우스의 좌측 해마 및 좌측 전두엽 피질로부터의 이

배체 마우스 계통 수에 의해 정규화된 SV40pA(유인원 바이러스 40의 폴리A 신호)의 qPCR 데이터. 비히클 및 4개의 AAV9 형질도입 군(대조군 바이러스, hSyn, MECP2, MECP2-인트론)에 대한 데이터가 제시되어 있다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다.

[0329] 도 12: STXBP1 mRNA 발현 분석. 데이터는 2개의 기준 유전자로 정규화되고 모든 군들의 평균 발현(평균 $\pm$ SD)으로 스케일링된 상대적 발현으로서 표현되어 있다. AAV 치료 후 5주령 마우스의 좌측 해마 및 좌측 전두엽 피질의 조직으로부터 분석을 수행하였다. 비히클 및 4개의 AAV9 형질도입 군(대조군 바이러스, hSyn, MECP2, MECP2-인트론)에 대한 데이터가 제시되어 있다.

[0330] 도 13: 웨스턴 블롯에 의한 단백질 분석. (도 13a) 피질에서 다양한 카세트에 대한 HA 태그 발현을 보여주는 웨스턴 블롯(군당 n = 5 내지 7). GAPDH는 로딩 대조군으로서 사용되었다. (도 13b) HA 태그 밴드 강도의 정량, 각각의 샘플은 GAPDH 로딩 대조군으로 정규화된다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다.

[0331] 도 11에 예시된 바와 같이, 이배체 마우스 계통당 유의미한 벡터 DNA 카피는 DNA 추출물에서 검출되었으며 해마 및 피질(N = 5마리 내지 7마리 마우스)에서 다양한 바이러스 벡터들 사이에 효율적인 AAV9 형질도입을 입증하였다. 인간 STXBP1 형질전이유전자 발현(mRNA)은 3개의 카세트 모두에 대해 관찰되었으며 hSyn 및 MECP2에 비해 MECP2-인트론 카세트에 대해 훨씬 더 강한 발현이 관찰되었다(도 12). HA 태그부착된 STXBP1 단백질의 웨스턴 블롯 분석은 연구된 모든 3개의 카세트에 대해 전두엽 피질에서 생체내 특이적 형질전이유전자 생성물 발현을 확인시켜주었다(도 13a 및 13b). 종합하면, 데이터는 바이러스 벡터 사이에 프로모터 강도의 일반적인 순위매김을 허용하였다. MECP2-인트론은 HA-태그 STXBP1 발현이 가장 높았고 hSyn과 MECP2가 그 뒤를 이었음을 보여주었다. 이 데이터는 유사한 상대적 순위매김이 관찰된 마우스 1차 피질 뉴런의 시험관내 데이터와 일치하였다.

[0332] 실시예 8: 마우스 뇌에서 AAV-9 매개 형질도입 후 STXBP1의 생체내 분포

[0333] AAV9 벡터의 PND1 주사 후 마우스 뇌에서의 STXBP1 발현 분포를 면역조직화학(IHC)으로 조사하였다. 실시예 7에 기재된 바와 동일한 동물로부터 마우스 뇌 조직을 채취하였다.

[0334] 고정된 동결 절편(12 μ m 두께, 시상 절편)을 크라이오스타트(cryostat)-마이크로톰(microtome)으로 생성하고 -80°C에서 저장하였다. 하기 인큐베이션 단계 모두를 실온에서 수행하였다. 냉동절편을 PBS 1X에서 10분 동안 세정한 다음, 단독으로 또는 이중 면역형광을 위해 조합으로 사용된, 0.3% 트리톤 X-100을 함유하는 PBS에 희석된 다음 1차 항체와 함께 가습 챔버에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다: GFP(1:2,000; #1020, Aves), HA(헤마글루티닌 태그; 1:5,000; #3724, Cell Signaling), NeuN(1:2,000; ab177487, Abcam), GFAP(1:2,000; #173006, Synaptic Systems), 파발부민(parvalbumin)(1:500; PV235, Swant). 인큐베이션 후, 절편을 PBS로 3회 세척한 다음, 적절한 알렉사 접합된 2차 항체(알렉사 488 또는 647에 접합된 항-마우스, 토끼, 닭 항체)와 함께 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 상기 절편을 DAPI(300 nM 희석액)로 대조염색하여 세포핵을 표지부착하고 PBS로 3회 세척하였다. 최종적으로 프로롱 골드(Prolong Gold) 변색방지 탑재 배지(Life Technologies)를 사용하여 상기 절편을 탑재하고 커버슬립을 적용하였다. 20배 대물렌즈(Zeiss)를 가진 악시오스캔(AxioScan) Z1 슬라이드 스캐너를 사용하여 염색된 절편의 디지털 영상을 획득하고 Zen 3 소프트웨어(Zeiss)를 사용하여 분석하였다. 뉴런 프로모터로부터 형질전이유전자를 발현하는 뇌에서 형질도입된 세포의 분포를 연구하기 위해, PND1에서 AAV9/hSyn_eGFP를 마우스 새끼에게 icv 주사하였다. 바이러스 투여 1개월 후에 동물을 희생시켰고, 뇌를 해부하고 면역조직화학용으로 처리하여 GFP를 표지부착하였다.

[0335] 도 14: AAV9-hSyn-NLS-eGFP-NLS 바이러스의 GFP 리포터를 사용하였을 때 마우스 뇌에서 감염된 세포의 분포. (A) AAV9-hSyn1-NLS-GFP-NLS icv를 제공받고 1개월 후에 희생되고 GFP를 표지부착하도록 면역염색된 마우스 뇌의 시상 절편. GFP를 발현하는 세포의 분포를 전체 뇌의 앞쪽부터 뒤쪽까지 관찰하였다. GFP+ 세포를 나타내는 주요 뇌 영역들 중 일부는 직사각형으로 강조되어 있다. (B 내지 G): A로부터의 GFP+ 세포를 보여주는 뇌 영역의 고배율(화살표는 GFP+ 세포를 표시함).

[0336] 도 15: AAV9-hSyn-NLS-eGFP-NLS 바이러스로부터 GFP 리포터를 발현하는 세포의 특징규명. (A 내지 F) GFP 및 뉴런 마커 NeuN, (G 내지 L) GFP 및 성상세포 마커 GFAP를 검출하기 위해 이중 면역형광 표지부착을 수행하였다. (A 내지 C) GFP 및 (D 내지 F) NeuN 둘 다에 대해 양성을 나타내는 세포는 모든 뇌 영역에서 관찰되었으며(화살표는 이중 표지부착된 세포를 표시함), 이는 뉴런이 형질도입되어 리포터 유전자를 발현했음을 시사한다. 대조적으로, GFAP 양성 세포(J 내지 L)에서는 GFP(G 내지 I) 신호가 검출되지 않았는데, 이는 성상세포가 리포터 유전자를 발현하지 않았음을 암시한다.

[0337] 도 16: AAV9 투여 후 마우스 뇌에서 다양한 프로모터로부터의 HA-STXBP1 융합 단백질의 분포. 다양한 프로모터

로부터 과발현된 HA 태그부착된 STXBP1의 분포를 HA에 대한 면역조직화학으로 마우스의 뇌에서 연구하였다. 음성 대조군 조건으로서, (A) PBS만 또는 (B) AAV9-hSyn-GFP 바이러스 icv를 제공받은 동물에서는 HA 신호가 관찰되지 않았다. (C) 항체 선택성의 음성 대조군(NC)으로서, AAV9-MECP2-인트론-HA-STXBP1 바이러스를 제공받았지만 면역조직화학 절차 동안 1차 HA 항체가 생략된 동물에서는 HA 신호가 관찰되지 않았다. (D 내지 F) HA 신호는 다양한 프로모터로부터 HA-STXBP1을 발현하는 다양한 바이러스가 주사된 모든 동물들의 뇌에서 관찰되었다. 3개의 프로모터는 대뇌 피질, 해마, 선조체, 후각 구근, 흑질 및 전뇌의 섬유관에서 관찰된 주요 발현과 함께 전체 뇌에 걸쳐 HA 분포의 공통 패턴을 유발하였다. 프로모터 사이에 HA 분포의 현저한 차이가 표 16에 보고되어 있다.

[0338] 도 17: AAV9 투여 후 해마에서 다양한 프로모터로부터의 HA-STXBP1 융합 단백질의 분포. 이중 면역형광 표지부착을 수행하여, 해마의 상이한 부분을 식별하는 데 사용된 (A 내지 C) HA 및 (D 내지 F) 뉴런 마커 NeuN을 검출하였다. 3개의 프로모터 모두가 전체 해마, 주로 뉴런 돌기(Mo1, LMo1, Or, MF) 및 때때로 세포체에서 HA 발현을 유발하였다. (F) MECP2-인트론 프로모터는 다른 2개의 프로모터(D, E)에 비해 더 우수한 범위 및 더 높은 HA 신호 강도를 유발하였다. LMo1: 해마의 라쿠노섬 분자층; MF: 이끼 섬유; Mo1: 치상회의 분자층; Or: 상행층.

[0339] 도 18: 다양한 프로모터로부터 HA-STXBP1을 발현하는 세포의 특징구명. 이중 면역형광 표지부착을 수행하여 (A 내지 C) HA 및 (D 내지 F) 뉴런 마커 NeuN을 검출하였다. HA에 대해 양성을 나타내었고 종종 뇌의 상이한 영역에서 관찰된 세포체도 NeuN에 대해 양성을 나타내었는데, 이는 3개의 프로모터 모두가 뉴런에서 형질전이유전자 발현을 유도한다는 것을 뒷받침한다. 화살표는 이중 표지부착된 세포를 표시한다.

[0340] 전반적으로, GFP+ 세포는 후각 구근부터 소뇌 및 뇌간까지 전체 뇌에 걸쳐 관찰되었다(도 14A 내지 14G). 많은 수의 감염된 세포가 특히 선조체(도 14D), 대뇌 피질(도 14B), 해마(도 14C) 및 후각 전구에서 관찰되었다. 이중 면역표지부착은 GFP와 뉴런 마커 NeuN 사이의 공국소화(도 15A 내지 15F) 및 GFP와 성상세포 마커 GFAP의 공국소화의 부재(도 15G 내지 15L)에 의해 입증된 바와 같이 GFP가 뉴런에 의해서만 발현되었음을 확인시켜주었다.

[0341] HA에 대한 면역조직화학을 수행하여 3개의 상이한 뉴런 프로모터인 hSyn, MECP2 또는 MECP2-인트론으로부터 과발현된 HA 태그부착된 STXBP1의 조직 분포를 분석하였다(도 16). 상기 3개의 프로모터는 전체 뇌에 걸쳐 HA 발현의 공통 패턴을 유발하였고(도 16D 내지 16F); HA 염색이 관찰된 주요 영역은 대뇌 피질, 해마, 선조체, 후각 구근, 흑질 및 전뇌의 섬유관이었다. HA 신호는 MECP2-인트론 프로모터를 포함하는 AAV가 주사된 동물에서만 소뇌에서 검출되었으며(도 16F); MECP2-인트론 프로모터는 2개의 다른 프로모터에 비해 뇌 전체에 걸쳐 가장 우수한 HA 신호 범위 및 신호 강도를 제공하였다(도 16D 내지 16F). 상기 3개의 프로모터로부터의 HA의 뇌 분포의 요약은 표 16에 제공되어 있다. 간질을 치료하는 치료 접근법의 개발이라는 목적에 중요한 HA 발현은 간질발생 및 발작 생성에 관여하는 핵심 영역인 해마 및 피질에서 관찰되었다. 모든 프로모터는 전체 해마(도 17), 주로 뉴런 돌기(해마의 이끼 섬유, 치상회의 분자층, 라쿠노섬 분자층 및 상행층)에서 HA 발현을 유발하였다. MECP2-인트론 프로모터의 사용 시 가장 높은 HA 신호 강도가 관찰되었고; hSyn 프로모터는 중간 수준의 발현을 유발한 반면, MECP2 프로모터는 가장 약한 신호 강도를 제공하였다(도 17A 내지 17C). 세포 수준에서, HA 발현은 주로 뉴로필에서 관찰되었고 종종 뉴런 마커 NeuN(도 18D 내지 18F)과 함께 공국소화된 세포체(도 18A 내지 18C)에서 관찰되었는데, 이는 3개의 프로모터 모두가 뉴런에서 발현을 유도한다는 것을 암시한다.

표 16

마우스 뇌에서 다양한 프로모터에 대한 HA-STXBP1 형질전이유전자 생성물의 분포의 요약

	hSyn	MECP2	MECP2-인트론
피질	x	x	x
해마	x	x	x
후각 구근	x	x	x
선조체	x	x	x
시상	x	x	x
섬유관(전뇌)	x	x	x
시상하부	x		x
중뇌	x		x
후질	x	x	x
소뇌 핵			x
수질			x

(x) 확인된 조직 발현

[0342]

[0343]

실시예 9: WT 및 이형접합성 STXBP1(HET) 마우스 뇌에서 STXBP1 변이체 발현의 특징규명

[0344]

정상 조건 및 질환 조건에서 STXBP1 단백질 변이체의 발현을 평가하기 위해, 인간 STXBP1 반수체기능부전 매개 간질을 재현하고 문헌[Kovacevic et al. (2018)]에 기재되어 있는 형질전환 마우스 모델을 생성하였다. 이 마우스 모델은 암스테르담 대학으로부터 라이선스를 통해 획득되었다. Stxbp1 유전자 내의 엑손 2의 어느 한 쪽에서 loxP 부위를 가진 Stxbp1 플록시드(floxed)(Stxbp1f1/f1) 마우스를 사용하여 이형접합성 모델을 생성하였다. Stxbp1f1/f1을 EIIa-Cre(Jax: 003724)와 교배시켜 생식세포주에서 Stxbp1 엑손 2를 결실시킴으로써, Stxbp1f1/- null 돌연변이체 마우스를 생성하였다. 플록시드 대립유전자를 C57BL/6J와 이계교배시켜, Stxbp1+/- KO HET 마우스 변종을 생성하였다. 하나의 대립유전자에서 엑손 2의 결실은 조기 정지 코돈을 생성하고 절두된 비기능적 STXBP1 단백질의 발현을 야기한다. 벨기에 법률에 따라 동물 실험 윤리 위원회에 의해 발행된 지침을 준수하면서 모든 생체내 실험을 수행하였다. 유럽 의회 위원회 지시(2010/63/EU)에 따라 상기 실험을 수행하였다. 동물 고통을 최소화하기 위해 모든 노력을 기울였다.

[0345]

내인성 STXBP1 변이체 발현을 평가하기 위해, 이형접합성 KO(STXBP1+/-) 및 야생형(WT) 한배새끼(STXBP1+/+) 수컷 마우스를 출생 후 5주 내지 7주에서 희생시켰고, 뇌 조직을 채취하고 해부하고 생화학적 판독값으로 분석하였다. RNA는 꼬리 피질(우측 반구)로부터 추출된 반면, 단백질은 웨스턴 블롯(WB) 분석을 위해 일치하는 우측 전두엽(내측) 피질 및 액체 크로마토그래피 질량 분광측정(LC-MS) 분석을 위해 전두엽 피질의 측면 절반으로부터 추출되었다.

[0346]

RNA 분석

[0347]

RNA 추출을 위해, 샘플을 RLT Plus 용해 완충제(10 μ l/ml의 β -머캅토에탄올 함유)(프리셀리스 용해 키트 CK14 - 2 ml(VWR, 432-3751))가 함유된 프리셀리스 튜브로 옮겼다. RNA에 대해 DNase 처리를 수행하였다. 매그-바인드(Mag-Bind) 총 RNA 96 키트(Omega, M6731)를 사용하여 킹피셔 플렉스(KingFisher Flex)(ThermoFisher)에서 RNA 추출을 수행하였다. RNA 농도를 나노드롭(Nanodrop)으로 측정하였고, 500 ng의 RNA를, 키트 고용량 cDNA RT 키트 + RNase 억제제(카탈로그 번호 4374966, ThermoFisher)를 사용하는 역전사에 제출하였다. 그 후, 상업적으로 입수 가능하고 맞춤형 제작된 프라이머 및 프로브, 마우스 STXBP1, 마우스 및 인간 STXBP1 긴 이소형, 및 마우스 및 인간 STXBP1 짧은 이소형뿐만 아니라, 2개의 기준 유전자도 사용하여 수득된 cDNA를 삼중으로 qPCR로

분석하였다. $2^{-\Delta Ct}$ 값을 계산하여 mRNA 발현 수준을 획득하였고, 이때 각각의 유전자의 발현은 2개의 기준 유전자의 평균으로 정규화되었다.

[0348] 웨스턴 블롯 분석

[0349] 단백질 추출을 위해, 프리셀리스 24 기기(Bertin Technologies) 및 냉각 시스템을 이용하여 조직을 2x 프로테아제 및 포스파타제 억제제 각테일(Cell Signaling Technology #5872) 함유 RIPA 완충제(Sigma R0278)에 용해시켰다. 샘플을 얼음 위에 30분 동안 방치한 후 원심분리하였고, 상청액을 최종 단백질 추출물로서 모았다. BCA 단백질 어세이(Thermo Scientific™)를 이용하여 단백질 농도를 측정하였고 10 μ g의 단백질을 램리 완충제 및 β -머캅토에탄올과 혼합하고 SDS-Page 전에 90°C에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 겔을 니트로셀룰로스 막으로 옮긴 다음, 표준 웨스턴 블롯 절차에 제출하였다. 먼저, 실온에서 막을 차단 용액(Ref: 927-50000; Li-Cor)에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 다음 1차 항체를 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다: 염소 다중클론 항-STXBP1(1:1000, Ref: PAB6504, Abnova), 토끼 다중클론 항-STXBP1(1:1000, Ref: 116002, SySy), 토끼 다중클론 항-STXBP1(1:1000, Ref: HPA008209, Sigma), 마우스 단일클론 항-신타신-1A(1:2500, Ref: 110111, SySy), 마우스 단일클론 항- β -액틴(1:10000, A2228, Sigma) 및 토끼 단일클론 항- β -액틴(1:10000, 8457P, Cell Signaling Technology). 2차 항체를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였고, 다음 항체를 사용하였다: IRDye® 680RD 당나귀 항-마우스 IgG 2차 항체(1:20000; Ref: 926-68072, Li-Cor), IRDye® 800CW 당나귀 항-토끼 IgG 2차 항체 항체(1:20000; Ref: 926-32213, Li-Cor) 및 IRDye® 800CW 당나귀 항-염소 IgG 2차 항체(1:20000; Ref: 926-32214, Li-Cor).

[0350] LC-MS 분석

[0351] LC-MS 분석을 위해, 프리셀리스 조직 균질화기(Bertin-Instruments)를 사용하여 조직 샘플을 5% SDS/50 mM TEAB/1x 프로테아제 억제제에 균질화하였다. BCA(Pierce, A53227)로 단백질 농도를 측정 후, 각각의 샘플 100 μ g를 환원시키고 알킬화하였다. 제조업체 지침(Protifi Llc, 뉴욕주 헌팅톤)에 따라 트립신/Lys-C(Promega, V5072)를 사용하여 96웰 플레이트 S-Trap에서 샘플 세정 및 분해를 수행하였다. 분해된 샘플을 플레이트로부터 용출하고 진공 하에 건조한 후, LC-MS 분석을 위해 재현탁시켰다. 재현탁 완충제는 물 중의 0.1% 포름산에 50 fmol/ μ l의 중질 표지부착된 AQUA 펩티드(Thermo, 영국 페이즐리)를 함유하였다. 총 용해물 샘플의 경우, 워터스 제보(Waters Xevo) TQ-XS에 연결된, IonKey 공급원을 가진 워터스 액퀴티(Waters Acquity) UPLC M-클래스를 사용하여 STXBP1 펩티드를 측정하였다. 펩티드를 워터스 나노이스(Waters nanoEase) M/Z Sym100 C18 컬럼(5 μ m, 300 μ m x 25 mm)에 포획하고 워터스 펩티드 BEH C18 iKey(150 μ m x 100 mm, 130 Å 1.7 μ m)에서 분리하였다. 이동상 A(0.1% 포름산/100% H₂O) 및 이동상 B(0.1% 포름산/100% 아세토니트릴)를 사용하여 3 μ l/분의 유속으로 17분 구배를 적용하였다. 사용된 구배는 다음과 같았다: 0분 내지 1분 동안 1.0% B, 1분 내지 3분 동안 1.0% 내지 25% B, 3분 내지 6분 동안 25% 내지 40% B, 6분 내지 9분 동안 40% 내지 99% B, 12분 내지 13분 동안 99% 내지 1% B. 컬럼 온도를 50°C로 설정하였다. 예정된 다중 반응 모니터링(MRM) 방법을 다음과 같은 공급원 파라미터와 함께 사용하였다: 모세관 전압 - 3.8 kV, 공급원 온도 - 150°C, 원뿔 기체 - 150 L/hr, 분무기 기체 - 5.3 bar, 나노유동 기체 - 0.3 bar. 모든 분석을 위해, 모니터링된 펩티드는 DNALLAQLIQDK(서열번호 43), YETSGIGEAR(서열번호 44), ISEQTYQLSR(서열번호 45), WEVLIGSTHILTPTK(서열번호 46)(긴 이소형 특이적), 및 WEVLIGSTHILTPQK(서열번호 47)(짧은 이소형 특이적)이었다. 펩티드당 3개의 전이를 모니터링하였다. 데이터 분석을 스카이라인(Skyline)에서 수행하였다(MacLean et al., 2010). 각각의 분석은 8점 표준 곡선 및 QC 샘플(낮음, 중간, 높음, n=2)을 포함하였다. 이것은 이. 콜라이(E. coli)에서의 재조합 발현으로부터 제조된 정제된 HA 태그부착된 STXBP1 단백질이 첨가된 블랭크 풀링된 마우스 간 균질화물로 구성되었다. 풀링된 마우스 뇌막 균질화물(블랭크, 및 추가 STXBP1이 첨가됨)로 구성된 내인성 QC 샘플도 포함되었다. 이 표준 곡선에 대해 총 단백질 및 짧은 이소형의 정량을 수행하였다. 이소형 특이적 펩티드의 상대적 정량을 이들 각각의 내부 표준에 대해 수행하였다.

[0352] 도 19: qPCR에 의한 마우스 뇌 내의 STXBP1 변이체 mRNA 수준 분석. WT(야생형) 한배새끼 및 HET(이형접합성) 마우스(군당 n = 11 내지 13)의 꼬리 피질(우측 반구)로부터 얻은 뇌 조직 샘플의 mRNA 분석. (도 19a): 총 내인성 STXBP1의 mRNA 발현 분석(모든 STXBP1 전사체를 인식하는 공통 프로브). (도 19b) 및 (도 19c): 긴 이소형(B) 또는 짧은 단백질 이소형(C)을 특이적으로 인식하는 2개의 상이한 프로브를 사용한 STXBP1 변이체의 mRNA 발현 분석. 데이터는 $2^{-\Delta Ct}$ 값을 계산함으로써 mRNA 발현 수준으로서 제시되고, 이때 발현은 2개의 기준 유전자의 평균으로 정규화되었다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다.

[0353] 도 20: 웨스턴 블롯에 의한 마우스 뇌 내의 STXBP1 단백질 수준 분석. WT(야생형) 한배새끼 및 HET(이형접합성)

마우스(군당 $n = 11$ 내지 13)의 우측 전두엽(내측) 피질의 조직 샘플을 분석하였다. (A): 총 STXBP1 단백질 발현을 나타내는 웨스턴 블롯. (B): (A)에서의 각각의 웨스턴 블롯의 정량 데이터. B-액틴은 정규화를 위한 로딩 대조군으로서 사용되었다. "WT" 군은 스케일링 군으로서 사용되었다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다.

[0354] 도 21: LC-MS에 의한 마우스 뇌 내의 STXBP1 변이체 단백질 수준 분석. WT(야생형) 한배새끼 및 HET(이형접합성) 마우스(군당 $n = 11$ 내지 13)의 전두엽 피질의 측면 절반의 조직 샘플을 분석하였다. (도 21a): 총 STXBP1 펩티드 대 STXBP1 긴 이소형 대 STXBP1 짧은 이소형의 정량. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다. (도 21b): STXBP1 짧은 이소형 및 긴 이소형을 나타내는 웨스턴 블롯. (도 21c): 도 21b에서의 웨스턴 블롯 각각의 조합된 정량 데이터. B-액틴은 로딩 대조군으로서 사용되었다. 데이터는 각각의 STXBP1 이소형의 밴드 강도와 각각의 B-액틴 밴드 사이의 비로서 제시되어 있다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다.

[0355] 도 22: 웨스턴 블롯에 의한 마우스 뇌 내의 신타신-1A(STX1A) 단백질 수준 분석. 마우스 뇌 조직 샘플에서의 STX1A 단백질 발현의 정량(군당 $n = 11$ 내지 13). B-액틴은 정규화를 위한 로딩 대조군으로서 사용되었다. "WT" 군은 스케일링 군으로서 사용되었다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다.

[0356] WT 및 이형접합성(+/-) KO 마우스(도면에서 HET로서 지칭됨)에서 RNA 전사체 분석의 결과는 도 19(19a 내지 19c)에 제시되어 있다. 총 STXBP1의 내인성 마우스 mRNA 전사체 수준은 HET 마우스에서 감소된다(도 19a). 본 발명자들은 또한 WT 한배새끼와 비교되었을 때 HET 마우스에서 STXBP1의 짧은 이소형과 긴 이소형이 감소됨(37% 내지 43%)을 관찰하였다(도 19b 및 19c). 총 STXBP1의 웨스턴 블롯 분석은 WT 동물과 비교되었을 때 HET 마우스에서 60% 내지 70% 단백질 감소를 확인시켜주었다(도 20).

[0357] LC-MS에 의한 STXBP1 단백질 이소형의 정량(도 21)은 긴 이소형의 전체 수준과 비교되었을 때 짧은 STXBP1 변이체가 WT 및 HET 동물의 마우스 뇌에 가장 풍부하다는 것을 시사하였다(도 21a). HET 동물에서 STXBP1 펩티드의 정량은 STXBP1의 총 변이체, 짧은 변이체 및 긴 변이체가 WT 한배새끼와 비교되었을 때 약 60% 감소됨을 시사하였다. 웨스턴 블롯 데이터도 WT 동물과 비교되었을 때 HET 동물에서 STXBP1 짧은 이소형 및 긴 이소형의 동일한 전체 감소를 확인시켜주었다(도 21b 및 21c).

[0358] STXBP1은 신타신-1A 단백질(STX1A)에 대한 샤페론으로서 작용하여, 시냅스 소포의 수송, 도킹 및 방출을 보장하는 것으로 보고되었다(Dulubova I. et al. 2007, Saitsu H. et al. 2008). 도 22에 예시된 바와 같이, STXBP1의 반수체기능부전은 WT 한배새끼와 비교되었을 때 HET 마우스에서 STX1A 단백질 수준의 50% 내지 60% 감소를 초래한다.

[0359] 종합하면, 상기 데이터는 마우스 뇌의 STXBP1 이소형 발현 수준의 광범위한 특징규명, 및 인간 STXBP1 반수체기능부전을 재현하는 형질전환 마우스 모델에서의 내인성 STXBP1 변이체 mRNA 및 단백질 수준의 감소의 검증을 처음으로 제공한다.

[0360] **실시예 10: 반수체기능부전 마우스 모델에서 STXBP1 변이체의 AAV 매개 과발현**

[0361] 실시예 7에 기재된 바와 같이, 양측 뇌실내(ICV) 주사로 바이러스 벡터를 출생 후 1일령 신생아 마우스(PND1)의 뇌에 투여하였다. ICV 신생아 주사 방법은 이전에 기재되어 있다(Bertrand-Mathon, et al. 2015; Kim, et al. 2014; Hamodi, et al. 2020). 주사된 동물을 7주의 기간 동안 모니터링하였고 뇌 조직에서의 STXBP1의 발현 및 분포를 생화학적 관독값으로 분석하였다. 실험은 다음 군을 포함하였다.

- [0362] • 이형접합성 KO(STXBP1+/-)(HET로서 지칭됨)
- [0363] • 야생형 한배새끼(STXBP1+/+) 수컷 마우스(WT로서 지칭됨)
- [0364] • 표 17에 기재된 2개의 바이러스 벡터 중 하나가 양측 주사된 HET 마우스

표 17

AAV9 바이러스 벡터 성질

벡터 ID	프로모터	STXBP1 변이체	캡시드	바이러스 게놈 역가 (vg/ml)	내독소 (<10 EU/ml)
AAV9(L)	Mecp2_인트론 (서열번호 3 + 서열번호 37)	긴 변이체 (서열번호 9)	AAV9	9.43E12	통과
AAV9(S)	Mecp2_인트론 (서열번호 3 + 서열번호 37)	짧은 변이체 (서열번호 10)	AAV9	6.91E12	통과

[0365]

[0366]

비히클-PBS를 WT 및 HET 마우스의 한 추가 군에 주사하여, 대조군으로서 사용하였다. 생체내 실험 조건의 요약은 표 18에 제시되어 있다.

[0367]

주사 후 7주에서, 뇌 조직을 채취하고 해부하고 생화학적 분석을 위해 추출하였다. DNA/RNA는 꼬리 피질(우측 반구)로부터 추출된 반면, 단백질은 일치하는 우측 전두엽(내측) 피질로부터 추출되었다. 실시예 7에 기재된 바와 같이, 동일한 용해 완충제 조성물을 사용하여 DNA 및 RNA 둘 다를 추출하였다. DNA에 대해 프로테아제 (Proteinase) K 및 RNase 처리를 수행하였다. 매그-바인드™ HDQ 혈액 DNA 및 조직 96 키트(Omega, M6399)를 사용하여 DNA를 추출하였다. Qubit™ dsDNA BR 어세이 키트(ThermoFisher, Q32853)와 함께 Qubit™ 플렉스 형광 측정기(Flex Fluorometer)(ThermoFisher)를 사용하여 DNA 농도를 측정하였고, 모든 샘플들에 대해 동일한 총 DNA 양을 조절하였으며, 이때 40 ng이 SV40 20 폴리A 신호(모든 AAV 카세트에 존재함)에 특이적인 프라이머/프로브와 함께 qPCR에 사용되었다. ValidPrime® 키트(tataabiocenter, A106P25)를 사용하여 마우스 게놈의 양을 분석하였다. ValidPrime® 서열은 반수체 정상 게놈당 정확히 하나의 카피로 존재하는 gDNA의 전사되지 않은 유전자좌에 특이적이다. 표준 곡선 방법을 이용하여 SV40p 및 ValidPrime® 둘 다에 대해 절대적 카피 수를 측정하였다.

[0368]

RNA 추출 단계 및 cDNA로의 전환은 실시예 7에 설명되어 있다. 상업적으로 입수 가능하고 맞춤 제작된 프라이머 및 프로브, 예컨대, SV40 폴리A, 인간 STXBP1, 마우스 STXBP1, 마우스 STX1A, 마우스 및 인간 STXBP1 긴 이소형, 및 마우스 및 인간 STXBP1 짧은 이소형뿐만 아니라, 2개의 기준 유전자도 사용하여 수득된 cDNA를 삼중으로 qPCR로 분석하였다. $2^{-\Delta Ct}$ 값을 계산함으로써 mRNA 발현 수준을 수득하였는데, 이때 각각의 유전자의 발현은 2개의 기준 유전자의 평균으로 정규화되었다. 단백질 추출 및 웨스턴 블롯 분석을 실시예 7에 설명된 바와 같이 수행하였다.

[0369]

도 23: qPCR에 의한 마우스 뇌 내의 AAV 형질도입 효율 분석(주사 후 7주). (도 23a) 비히클-PBS가 주사된 WT 마우스(WT), 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스(HET), STXBP1 긴 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(L)) 및 STXBP1 짧은 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(S))에서 바이러스 게놈 카피의 qPCR에 의한 절대적 정량. 샘플을 꼬리 피질(우측 반구)로부터 채취하고 이배체 마우스 게놈의 절대적 수로 정규화된 SV40pA를 사용하여 정량하였다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다. 군당 n = 14마리 또는 15마리의 동물을 분석하고 비모수 일원 ANOVA(크루스칼-왈리스 검정)에 이어 던 사후 다중 비교 검정을 적용하였다. 형질도입 군 사이에는 유의미한 차이가 관찰되지 않았다. (도 23b) SV40 폴리A의 mRNA 발현 분석 및 (도 23c) 인간 특이적 STXBP1. 데이터는 $2^{-\Delta Ct}$ 값을 계산함으로써 mRNA 발현 수준으로서 제시되고, 이때 발현은 2개의 기준 유전자의 평균으로 정규화되었다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다. 군당 n = 14마리 또는 15마리의 동물을 분석하고, 비모수 일원 ANOVA(크루스칼-왈리스 검정)에 이어 던 사후 다중 비교 검정을 적용하였다. 형질도입 군 사이에는 유의미한 차이가 관찰되지 않았다.

- [0370] 도 24: qPCR에 의한 마우스 뇌 내의 AAV 치료 후 STXBP1 변이체 발현 분석(주사 후 7주). 짧은 변이체(A) 또는 긴 변이체(B)의 총(마우스 및 인간) 수준을 특이적으로 측정하는 프로브를 사용하여 STXBP1 변이체 mRNA 발현 분석을 수행하였다. 데이터는 $2^{-\Delta Ct}$ 값을 계산함으로써 mRNA 발현 수준으로서 제시되고, 이때 발현은 2개의 기준 유전자의 평균으로 정규화되었다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다. 군당 n = 14마리 내지 16마리의 동물을 분석하였다.
- [0371] 도 25: 웨스턴 블롯에 의한 마우스 뇌 내의 AAV 치료 후 STXBP1 변이체 발현 분석(주사 후 7주). 비히클-PBS가 주사된 WT 마우스(WT), 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스(HET), STXBP1 긴 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(L)) 및 STXBP1 짧은 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(S))에서 우측 전두엽(내측) 피질의 샘플의 웨스턴 블롯에 의한 단백질 분석.
- [0372] (도 25a) 총 STXBP1(긴 변이체 및 짧은 변이체) 단백질 발현에 대한 웨스턴 블롯 데이터의 정량.
- [0373] (도 25b) 긴 STXBP1 변이체 단백질 발현에 대한 웨스턴 블롯 데이터의 정량.
- [0374] (도 25c) 짧은 STXBP1 변이체 단백질 발현에 대한 웨스턴 블롯 데이터의 정량.
- [0375] (도 25d) 신타신-1A 단백질 발현에 대한 웨스턴 블롯 데이터의 정량.
- [0376] B-액틴은 각각의 STXBP1 및 STX1A 밴드 강도의 정규화를 위한 로딩 대조군으로서 사용되었다. 비히클 WT 군(WT)은 스케일링 군으로서 사용되었다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시되어 있다. 비모수 일원 ANOVA(크루스칼-왈리스 검정)에 이어 던 사후 다중 비교 검정을 이용하여 데이터를 분석하였다(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).
- [0377] 도 26: 면역조직화학에 의한 마우스 뇌 내의 AAV 치료 후 HA 태그부착된 STXBP1 발현의 뇌 분포(주사 후 7주). HA 태그부착된 STXBP1 긴 변이체가 주사된 HET 마우스의 시상 절편에 대해 HA 태그 염색을 수행하였고 비히클(PBS)로 치료받은 마우스와 비교하였다. AAV 치료군(동물 6023) 및 비히클 치료군(동물 6009)에 대한 대표적인 뇌 절편의 예가 제시되어 있다. 동물 6023(AAV 치료)의 주요 뇌 영역에서는 강한 HA 염색이 관찰되는 반면, PBS 치료군(동물 6009)에서는 HA 염색이 관찰되지 않는다.
- [0378] 도 23a에 예시된 바와 같이, 이배체 마우스 게놈당 유의미한 바이러스 게놈 카피가 AAV 치료군의 마우스 뇌에서 검출되었는데, 이는 STXBP1의 긴 변이체 및 짧은 변이체를 코딩하는 2개의 카세트를 사용한 효율적인 바이러스 형질도입을 입증한다. 바이러스 벡터가 형질도입 군에서만 인간 STXBP1 형질전이유전자(도 23b) 및 SV40pA 발현(mRNA)(도 23c) 둘 다 검출되었는데, 이는 주사된 바이러스 DNA 양과 유사한 발현 경향을 보여준다.
- [0379] HET 동물의 AAV9 형질도입은 내인성 마우스 변이체 발현 수준에 영향을 미치지 않으면서 짧은 STXBP1 변이체 및 긴 STXBP1 변이체의 강력한 선택적 과발현을 야기하였다(도 24).
- [0380] 웨스턴 블롯 분석은 도 25a에 예시된 바와 같이 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스와 비교되었을 때 AAV 치료군 둘 다에서 총 STXBP1 수준의 유의미한 과발현을 확인시켜주었다. STXBP1 긴 이소형을 특이적으로 인식하는 항체를 사용한 웨스턴 블롯 정량은 STXBP1 긴 카세트를 사용하는 AAV 치료군에서만 긴 변이체의 유의미한 특이적 과발현을 보여주었다(도 25b). 유사하게, STXBP1 짧은 이소형에 대한 특이적 항체의 사용 시, HET-PBS가 주사된 동물에 비해 STXBP1 짧은 카세트가 형질도입 군에서만 유의미한 특이적 단백질 과발현이 관찰되었다(도 25c). 더욱이, 짧은 변이체 또는 긴 변이체를 사용한 AAV 치료는 신타신-1A(STX1A) 단백질 수준을 부분적으로 레스큐하였고, 이는 도 25d에 예시된 바와 같이 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스와 비교되었을 때 유의미하게 증가하였다. AAV 치료군에서 STX1A 수준의 증가는 인간 STXBP1 형질전이유전자 생성물 발현의 기능적 영향을 추가로 확인시켜 준다.
- [0381] 전반적으로, 짧은 변이체 또는 긴 변이체로 치료받은 HET 동물은 인간 STXBP1 형질전이유전자 생성물의 효율적인 과발현을 보여주었고, 이 마우스 모델에서 STXBP1 반수체기능부전의 유사한 레스큐를 야기하였다.
- [0382] STXBP1 긴 변이체를 가진 HA 태그부착된 융합체를 코딩하는 바이러스 카세트가 주사된 추가 동물 군을 사용하여 면역조직화학(IHC)으로, AAV9 벡터의 PND1 주사 후 마우스 뇌에서의 STXBP1 형질전이유전자 생성물 발현의 분포를 조사하였다(실시예 7에 기재됨). 고정된 동결 절편(12 μ m 두께; 시상 절편)을 크라이오스타트-마이크로톰으로 생성하고 -80°C에서 저장하였다. 염색 절차 및 검출 방법은 실시예 8에 기재된 바와 같았다.
- [0383] 도 26에 예시된 바와 같이, AAV 매개 형질전이유전자 STXBP1 단백질 발현은 전체 뇌(동물 6023), 시상 절편, 주로 선조체, 해마, 대뇌 피질, 시상하부, 담창구 및 중격에서 HA-태그 표지부착을 통해 7주 후에 검출되었다.

PBS만을 제공받은 HET 동물(동물 6009)에서 이 뇌 영역들 전체에 걸쳐 주요 HA 신호가 관찰되지 않았다. IHC 데이터는 Mecp2_인트론_STXBP1(긴) 카세트의 AAV 매개 형질도입이 STXBP1 단백질의 넓은 뇌 발현을 유발함을 확인시켜준다.

실시예 11: STXBP1 이형접합성 질환 모델에서 발작 표현형을 레스큐하기 위한 AAV 유전자 요법

정상 조건 및 질환 조건에서 AAV 벡터의 효능을 평가하기 위해, 인간 STXBP1 반수체기능부전 매개 간질을 재현하고 문헌[Kovacevic et al. (2018)]에 기재되어 있는 형질전환 마우스 모델을 생성하였다. 이 마우스 모델은 암스테르담 대학으로부터 라이선스를 통해 획득되었다. Stxbp1 유전자 내의 엑손 2의 어느 한 쪽에서 loxP 부위를 가진 Stxbp1 플록시드(Stxbp1f1/f1) 마우스를 사용하여 이형접합성 모델을 생성하였다. Stxbp1f1/f1을 EIIa-Cre(Jax: 003724)와 교배시켜 생식세포주에서 Stxbp1 엑손 2를 결실시킴으로써, Stxbp1f1/- null 돌연변이체 마우스를 생성하였다. 플록시드 대립유전자를 C57BL/6J와 이계교배시켜, Stxbp1+/- KO HET 마우스 변종을 생성하였다. 하나의 대립유전자에서 엑손 2의 결실은 조기 정지 코돈을 생성하고 절두된 비기능적 STXBP1 단백질의 발현을 야기한다. 벨기에 법률에 따라 동물 실험 윤리 위원회에 의해 발행된 지침을 준수하면서 모든 생체 내 실험을 수행하였다. 유럽 의회 위원회 지시(2010/63/EU)에 따라 상기 실험을 수행하였다. 동물 고통을 최소화하기 위해 모든 노력을 기울였다.

출생 후 1일째 날에 긴 또는 짧은 STXBP1 변이체(표 17 참조)를 코딩하는 2개의 바이러스 벡터들 중 하나를 이형접합성(HET) KO 및 야생형 한배새끼(WT) 수컷 마우스에 측뇌실 내로 양측 주사하였다. 실험 조건은 표 18에 요약되어 있다. 비히클-PBS를 각각의 유전형의 한 주가 마우스 군에 주사하여 대조군으로서 사용하였다. 마우스의 전반적인 건강 상태를 평가하기 위해 주사 후 3주의 과정에 걸쳐 일주일에 1회, 및 주사 후 3주부터 7주까지 매일 임상 징후를 모니터링하였다. 군 전체에 걸쳐 방법론적 절차 및 공격적인 행동과 관련된 제한된 사망률이 관찰되었으나, 치료 또는 유전형과 관련되어 있지 않았다.

표 18

생체내 실험 조건의 요약

유전형	치료 시 연령	전달 경로	치료	역가	샘플 크기	생활 평가	발작 모니터링	최종 평가
HET	출생 후 1 일째 날	ICV 양측 2 μl/반구	AAV9(L)*	E12	N=15	주사 후 7 주 동안 임상 징후, 부작용, 체중 증가 및 사망률	생체내 무선 임상 EEG 비디오- 원격측정 기록 (주사 후 6 주 내지 7 주)	생화학적 분석, 조직병리학, 면역조직화학, 형질전이유전자 발현을 위해 주사 후 7 주에서 뇌, 혈장 및 장기 채취
			AAV9(S)*	E12	N=16			
			비히클-PBS	--	N=19			
WT	출생 후 1 일째 날	ICV 양측 2 μl/반구	비히클-PBS	--	N=10			

*표 17에 기재됨

주사 후 6주에서, 발작 발생을 평가하기 위해 생체내 무선 EEG(뇌파도) 비디오-원격측정 기록을 1주 동안 수행하였다. 주사 후 5주에서, 피하 원격측정 송신기 및 피질 EEG 전극을 STXBP1+/- 마우스에 외과적으로 이식하였다. 멸균/무균 조건 하에 수술을 수행하였다. 마취된 마우스(산소 중 이소플루란 - 유도: 2 l/분에서 5%, 유지: 1.5 l/분에서 2.5% 내지 1.5%)를, 가열 패드를 가진 정위 프레임에 넣었고, 기록 전극을 위해 (브레그마 위에서) 전두엽 피질의 두개골 표면에 구멍을 뚫었고, 기준 전극을 위해 (람다 뒤에서) 소뇌의 두개골 표면에 구멍을 뚫었다. 그 후, 개방 공급원 기기(Open Source Instruments)(OSI) A3028S2 ECoG 송신기를 두개골까지 피하 연장되는 부착된 와이어를 사용하여 등 위에 피하 이식했으며, 이때 기록 전극 및 기준 전극은 각각의 구멍을 통해 뇌 실질 내로 약 0.5 mm 위치하였다. 각각의 전극을 나사(Plastics One)로 제자리에 고정하였다. 전

체 조립체를 시아노아크릴레이트 및 치과용 시멘트로 제자리에 고정하여, 작은 원형 헤드피스를 형성하였고, 등을 나일론 흡수성 봉합사 재료로 밀폐하였다. 수술 후 약물치료 및 통증 관리는 수술전 투약 후 24시간에서 제2 카프로펜 투약(10 mg/kg)을 포함하였다. 수술 후, 마우스는 따뜻한 챔버에서 2시간 내지 3시간 동안 회복하였다. 생체내 무선 EEG 비디오-원격측정 기록을 위해, 마우스를 군으로 수용하였다(케이지당 2마리 또는 3마리의 마우스). 기록을 용이하게 하기 위해 마우스 케이지를 패러데이 밀폐부(Faraday enclosure)에 넣었다. 이식된 마우스의 건강 모니터링을 2주 동안 하루에 1회 수행하였다. 마우스의 체중을 4일 동안 매일 측정 한 후, 매주 측정하였다. 주변 간섭을 줄이고 전송 신호의 수신을 개선하기 위해 온도 및 습도가 조절되는, 의도적으로 설계된 기록실에서 모든 기록을 수행하였다. 신호는 이식된 송신기로부터 패러데이 밀폐부 내부에 배치된 안테나까지 무선 전송되었다. 한 기록 채널로부터의 EEG 신호를 256 Hz(대역 통과 필터: 0.3 내지 80 Hz)에서 디지털화하였다. 발작 부재의 전형적인 특징인 스파이크파 방전(SWD)을 사내 자동화 발작 검출 소프트웨어로 분석하였다. SWD 검출 알고리즘은 이벤트 지속시간 분석(> 2초), 대역 주파수 분석(5 내지 9 Hz) 및 특정 기본 고조파 주파수의 식별에 기반하였다. 알고리즘에 의해 검출된 각각의 SWD는 적어도 한 명의 경험 있는 관찰자에 의해 블라인드 방식으로 확인되었다. 결과적으로, 이 기간 동안 다양한 카세트 벡터 및 비히클 군에 대해 EEG 분석을 수행하였다. 벡터 치료군에서 EEG 신호에 기술적인 인공물이 존재하였기 때문에 총 4마리의 동물을 분석으로부터 배제하였다: (AAV9-MECP2+인트론-hSTXBP1(긴 변이체))(17마리 중 2마리), 및 AAV9-MECP2+인트론-hSTXBP1(짧은 변이체))(18마리 중 2마리).

[0389] 도 27: 주사 후 6주 내지 7주(도 27a 및 27b) 및 24주(도 27c 및 27d)에서 EEG에 의한 STXBP1 HET 마우스 뇌 내의 AAV 치료 후 스파이크파 방전(SWD) 분석. (도 27a) 비히클-PBS가 주사된 WT 마우스(WT, n=10), 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스(HET, n=19), STXBP1 긴 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(L), n=15) 및 STXBP1 짧은 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(S), n=16)에서 SWD의 평균 수. 연속 7일 동안 24시간에 걸쳐 주사 후 6주 내지 7주에서 SWD를 분석하였다. (도 27b) "발작이 없는" 동물(기록 동안 임의의 SWD가 검출되지 않음) 및 "발작이 있는" 동물(기록 동안 SWD가 검출됨)의 수의 분석. (도 27c) 비히클-PBS가 주사된 WT 마우스(WT, n=5), 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스(HET, n=12), STXBP1 긴 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(L), n=9) 및 STXBP1 짧은 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(S), n=11)에서 SWD의 평균 수. 연속 7일 동안 24시간에 걸쳐 주사 후 24주에서 SWD를 분석하였다. (도 27d) 주사 후 24주에서 "발작이 없는" 동물(기록 동안 임의의 SWD가 검출되지 않음) 및 "발작이 있는" 동물(기록 동안 SWD가 검출됨)의 수의 분석. 비모수 일원 ANOVA(크루스칼-왈리스 검정)에 이어 던 사후 다중 비교 검정으로 군 사이의 차이를 분석하였고(****p<0.0001, ***p<0.001) 발작 없음 분석을 위해 카이제곱 우발성 검정을 이용하였다.

[0390] 도 27a에 예시된 바와 같이, 24시간 동안 연속 7일에 걸쳐 기록된 일당 평균 SWD 수는 비히클 군에 비해 긴 변이체(HET-AAV9(L)) 및 짧은 변이체(HET-AAV9(S)) 중 어느 하나로 치료받은 HET 마우스에서 70% 및 65%까지 유의미하게 감소되었다. 긴 변이체로 치료받은 HET 마우스는 발작이 없는 동물의 26%를 표시하였다(도 27b, 짧은 변이체에 비해 유의미한 차이). 상세한 EEG 분석은 기록(1주 24/7) 동안 치료받은 동물에서 경련성 발작의 발생을 검출하지 못했다.

[0391] 비모수 일원 ANOVA에 이어 사후 다중 비교 검정(****p<0.0001)으로 SWD 빈도에 대한 군 사이의 차이를 분석하였고 발작 없음 분석을 위해 카이제곱 우발성 검정을 이용하였다.

[0392] 나아가, 상이한 군이 주사된 동물의 뇌 및 장기 조직에 대해 생화학적 및 조직병리학적 분석을 수행하였다. 형질전이유전자 발현 평가를 위해, 실시예 7에 기재된 바와 동일한 방법론에 따라 주사 후 7주에서 마우스를 희생시켰다. 꼬리 피질을 채취하고 DNA/RNA 추출을 실시하였고 일치하는 절반 내측 전두엽 피질을, 실시예 7에 기재된 동일한 방법론을 이용한 단백질 추출에 사용하였다.

[0393] 동일한 실험 설계를 이용하여 STXBP1 유전자 요법 치료 효과의 지속성을 측정하기 위해 별도의 동물 군에서 종단적 6개월 연구를 수행하였다. 주사 후 24주에서, 발작 발생을 평가하기 위해 생체내 무선 EEG(뇌파도) 비디오-원격측정 기록을 1주 동안 수행하였다. 도 27c에 예시된 바와 같이, 24시간 동안 연속 7일에 걸쳐 기록된 일당 평균 SWD 수는 비히클 군에 비해 긴 변이체(HET-AAV9(L)) 또는 짧은 변이체(HET-AAV9(S))로 치료받은 HET 마우스에서 95% 및 92%까지 유의미하게 감소되었다. 긴 변이체 또는 짧은 변이체로 치료받은 HET 마우스는 발작이 없는 동물의 각각 78% 및 64%를 표시하였다(도 27d). 상세한 EEG 분석은 기록(1주 24/7) 동안 치료받은 동물에서 경련성 발작의 발생을 검출하지 못했다.

[0394] 실시예 12: STXBP1 이형접합성 질환 모델에서 행동 표현형을 레스큐하기 위한 AAV 유전자 요법

[0395] 이형접합성 STXBP1 KO(HET) 수컷 마우스들과 이들의 성별 및 연령 일치된 야생형(WT) 한배새끼에서 다양한 행동

질환 표현형에 대한 AAV 매개 유전자 요법의 효능을 평가하기 위해, Mecp2_인트론 프로모터의 조절 하에 인간 STXBP1의 긴 또는 짧은 변이체를 코딩하는 바이러스 벡터(표 17 참조)를 측뇌실 내로 양측 주사하였다. 이들 동물 군은 실시예 11에서 사용된 동물 군과 별개이었다.

[0396] 치료받은 동물은 4주령부터 22주령까지 일련의 행동 시험을 거쳤다. 비히클-PBS를 각각의 유전형으로부터의 한 추가 마우스 군에 주사하여 대조군으로서 사용하였다. 벨기에 법률에 따라 동물 실험 윤리 위원회에 의해 발행된 지침을 준수하면서 모든 행동 실험을 수행하였다. 실험을 유럽 의회 위원회 지시(2010/63/EU)에 따라 수행하였다. 동물 고통을 최소화하기 위해 모든 노력을 기울였다.

[0397] 도 28: STXBP1 HET 마우스에서 AAV 치료 후 체중 분석(주사 후 1주 내지 22주). (A) 비히클-PBS가 주사된 WT(n=17) 및 HET 마우스(n=16)에서 연령의 함수로서 평균 체중. 이원 반복 측정 ANOVA에 이어 비보정 피서 LSD 사후 다중 비교 검정으로 군 사이의 차이를 분석하였다(* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$). (B) 비히클-PBS가 주사된 WT 마우스(WT, n=17), 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스(HET, n=16), STXBP1 긴 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(L), n=10) 및 STXBP1 짧은 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(S), n=13)에서 22주령에서 측정된 평균 체중. 모수 일원 ANOVA에 이어 비보정 피서 LSD 사후 다중 비교 검정으로 군 사이의 차이를 분석하였다(** $p<0.01$, **** $p<0.0001$; ns, 유의미하지 않음). 막대 그래프는 평균 $\pm$ SEM이다.

[0398] 도 29: STXBP1 HET 마우스에서 AAV 치료 후 뒷다리 움켜쥐기의 분석(주사 후 4주 내지 22주) (A) 비히클-PBS가 주사된 WT 마우스(WT, n=17), 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스(HET, n=16), STXBP1 긴 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(L), n=10) 및 STXBP1 짧은 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(S), n=13)에서 연령의 함수로서 평균 뒷다리 움켜쥐기 점수. (B) 비히클-PBS가 주사된 WT 마우스(n=17), 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스(n=16), AAV9/Mecp2-int-STXBP1-L이 주사된 HET 마우스(n=10) 및 AAV9/Mecp2-int-STXBP1-S가 주사된 HET 마우스(n=13)에서 22주령에서 기록된 평균 뒷다리 움켜쥐기 점수. 비모수 일원 ANOVA(크루스칼-왈리스 검정)에 이어 비보정 던 사후 다중 비교 검정으로 군 사이의 차이를 분석하였다(* $p<0.05$; ** $p<0.01$; **** $p<0.0001$; ns, 유의미하지 않음). 막대 그래프는 평균 $\pm$ SEM이다.

[0399] 도 30: AAV 치료 후 와이어 매달리기 시험에서 STXBP1 HET 마우스의 분석(주사 후 8주). 비히클-PBS가 주사된 WT 마우스(WT, n=17), 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스(HET, n=16), STXBP1 긴 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(L), n=10) 및 STXBP1 짧은 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(S), n=13)에서 8주령에서 사지 와이어 매달리기 시험에서 측정된 낙하 지연시간. 모수 일원 ANOVA에 이어 비보정 피서 LSD 사후 다중 비교 검정으로 군 사이의 차이를 분석하였다(**** $p<0.0001$; ns, 유의미하지 않음). 막대 그래프는 평균 $\pm$ SEM이다.

[0400] 도 31: AAV 치료 후 공포 컨디셔닝 시험에서 STXBP1 HET 마우스의 분석(주사 후 10주). (A) 비히클-PBS가 주사된 WT 마우스(WT, n=17), 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스(HET, n=16), STXBP1 긴 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(L), n=10) 및 STXBP1 짧은 변이체가 주사된 HET 마우스(HET-AAV9(S), n=13)에서 공포 컨디셔닝 훈련 단계로부터 24시간 후 10주령에서 수행된 상황적 공포 기억 시험 동안 평균 오작하는 듯한 행동. 모수 일원 ANOVA에 이어 비보정 피서 LSD 사후 다중 비교 검정으로 군 사이의 차이를 분석하였다(* $p<0.05$; **** $p<0.0001$). (B) 상황적 공포 기억 시험 1시간 후 (A)에서와 동일한 동물에서 수행된 단서 공포 기억 시험 동안 평균 오작하는 듯한 행동. 모수 일원 ANOVA에 이어 비보정 피서 LSD 사후 다중 비교 검정으로 군 사이의 차이를 분석하였다(* $p<0.05$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$). 막대 그래프는 평균 $\pm$ SEM이다.

[0401] 체중

[0402] 주사 후 1주부터 22주까지 매주 동물 체중을 추적하였다. 도 28(A)에 표시된 바와 같이, 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스들은 비히클-PBS가 주사된 그들의 WT 한배새끼와 비교되었을 때 1주령부터 22주령까지 체중의 일관된 유의미한 감소를 보였다. 이러한 체중 부족은 22주에서 HET 비히클-PBS 군과 유의미한 차이를 보이는 STXBP1 긴 변이체(HET-AAV9(L))를 사용한 AAV 치료에 의해 레스큐될 수 있었다(도 28(B)). STXBP1 짧은 변이체 군은 22주령에서 체중이 증가하는 경향을 보였다.

[0403] 뒷다리 움켜쥐기

[0404] 뒷다리 움켜쥐기(Guyenet et al., 2010)를 4주령부터 10주령까지 일주일에 1회 기록하고 10주령부터 22주령까지 3주에 1회 기록하였다. 마우스는 그의 꼬리에 의해 매달렸고 뒷다리의 위치는 10초 동안 관찰되었다. 뒷다리가 일관되게 복부로부터 바깥쪽으로 벌어진 경우, 0의 점수를 배정받았다. 한 뒷다리가 매달린 시간의 50% 초과 동안 복부를 향해 오프러진 경우, 1의 점수를 받았다. 두 뒷다리가 매달린 시간의 50% 초과 동안 복부 쪽으로 부분적으로 오프러진 경우, 2의 점수를 받았다. 뒷다리가 완전히 오프러지고 매달린 시간의 50% 초과 동안 복부에

당은 경우, 3의 점수를 받았다. 각각의 마우스를 3회 관찰하였고, 평균 점수 값을 통계학적 분석에 사용하였다.

[0405]

도 29(A)는 4주와 22주 사이에 4개의 동물 군에서 뒷다리 움켜쥐기 점수의 진행을 보여준다. 5주령에서, 비히클 치료 HET 마우스(HET-veh)는 대조군 WT 한배새끼(WT-veh)와 비교되었을 때 7주령에서 안정화된 뒷다리 움켜쥐기를 나타내기 시작하였는데, 이는 STXBP1 반수체기능부전 모델에서 근긴장이상의 발생을 시사한다. HET 마우스에서 긴 또는 짧은 STXBP1 변이체를 사용한 AAV 치료는 5주 내지 22주의 기간에 걸쳐 HET 비히클 군에 비해 뒷다리 움켜쥐기의 진행을 약화시켰다. 22주령에서, STXBP1 긴 변이체로 치료받은 HET 마우스에서 기록된 뒷다리 움켜쥐기의 정도는 WT 대조군과 유사하였는데(유의미하지 않은 차이, ns), 이는 근긴장이상 표현형의 레스큐를 시사한다(도 29(B)). STXBP1 짧은 변이체는 22주령의 HET 마우스에서 뒷다리 움켜쥐기 심각도 점수를 유의미하게 감소시켰으나 근긴장이상 표현형을 WT 수준으로 회복시키지는 못했다(도 29(B)).

[0406]

와이어 매달리기 시험

[0407]

근력을 평가하기 위해 AAV 치료 후 8주에서 사지 와이어 매달리기 시험(Klein et al., 2012)을 마우스에 대해 수행하였다. 마우스를 와이어 메쉬 위에 놓은 후, 마우스가 와이어를 잡도록 상기 와이어 메쉬를 뒤집고 약하게 흔들었다. 90초 컷오프 시간을 사용하여 낙하 지연시간을 기록하였다. 도 30에 나타난 바와 같이, 비히클-PBS가 주사된 HET 마우스들은 비히클-PBS로 치료받은 그들의 WT 한배새끼와 비교되었을 때 8주령에서 낙하 지연시간의 유의미한 증가를 나타내었다. 긴 또는 짧은 인간 STXBP1 변이체를 코딩하는 AAV로 치료받은 HET 마우스에서는 낙하 지연시간의 증가가 없어졌는데, 이는 반수체기능부전 모델에서 상기 표현형의 완전한 레스큐를 암시한다(도 30).

[0408]

공포 컨디셔닝 시험

[0409]

AAV 치료 후 10주에서, 파블로비안(Pavlovian) 공포 컨디셔닝 패러다임(Curzon et al., 2009)을 이용하여 연관 학습 및 기억을 평가하였는데, 이때 마우스는 특정 환경(즉, 상황) 및 소리(즉, 단서)를 전기 발 충격과 연관시키는 것을 학습한다. 공포 기억은 마우스가 오싹하는 듯한 행동에 의해 발현되고, 그 후 전기 충격 없이 이 특정 상황 또는 단서에 노출된다. 전기 충격을 전달하기 위한 격자 바닥을 가진 챔버에서 공포 컨디셔닝 시험을 수행하였다(Ugo Basile). 챔버 위의 카메라를 사용하여 마우스를 모니터링하였다. 6분 훈련 단계 동안, 마우스를 2분 습관화 시간 동안 챔버(114 내지 116 룩스 광도, 하나의 회색 벽, 보이는 격자 바닥)에 배치하여 기준 오싹하는 듯한 행동을 평가한 다음, 소리(78 내지 80 dB, 4 kHz)를 30초 동안 켜 직후, 경미한 발 충격(2초, 0.5 mA)을 가하였다. 첫 번째 소리-발 충격 연관 후 1분 간격으로 동일한 소리-발 충격 연관을 2회 더 반복하였다. 훈련 단계 후, 마우스를 그의 홈 케이지로 돌려보냈다. 24시간 후, 마우스를 상황적 공포 기억에 대해 시험하였다. 이를 위해, 마우스를 동일한 훈련 챔버에 배치하고 임의의 소리 또는 발 충격 자극 없이 5분 동안 그의 오싹하는 듯한 행동을 모니터링하였다. 그 다음, 마우스를 그의 홈 케이지로 돌려보냈다. 1시간 후, 단서 공포 기억 시험을 위한 새로운 상황을 생성하기 위해 3개의 체크무늬 벽을 갖고 보이는 금속 격자가 없고 흰색 기저 바닥 및 14 내지 16 룩스 광도를 갖도록 챔버를 변경시킨 후 마우스를 상기 챔버로 옮겼다. 기준 오싹하는 듯한 행동을 측정하기 위해 챔버에서 2분 습관화 시간 후, 오싹하는 듯한 행동을 7.5분의 시험 시간 동안 모니터링하면서, 훈련 단계에서 사용된 소리 단서와 동일한 소리 단서를 발 충격 없이 30초 동안 4회 켜다. 에토비전(Ethovision) 소프트웨어(Noldus)를 사용하는 자동화 비디오 기반 시스템을 사용하여 오싹하는 듯한 행동 시간을 측정하였다.

[0410]

도 31은 4개의 동물 군에 대한 상황 시험(도 31(A)) 및 단서 시험(도 31(B))에 대한 결과를 보여준다. 비히클-PBS로 치료받은 STXBP1 HET 마우스들은 그들의 WT 한배새끼와 비교되었을 때 상황에 의해 유도된 오싹하는 듯한 행동 및 단서에 의해 유도된 오싹하는 듯한 행동 둘 다의 상당한 감소를 나타냈는데, 이는 STXBP1 반수체기능부전 모델에서 연관 학습 및 기억의 부족을 시사한다(도 31(A, B)). 긴 STXBP1 변이체 및 짧은 STXBP1 변이체를 사용한 AAV 치료는 상황 시험 및 단서 시험에서 오싹하는 듯한 행동을 증가시켰다(도 31(A,B)). 긴 변이체 치료의 효과는 HET 비히클 치료군과 유의미하게 상이하였는데, 이는 상황에 의해 유도된 오싹하는 듯한 행동 및 단서에 의해 유도된 오싹하는 듯한 행동의 레스큐를 시사한다. 짧은 STXBP1 변이체 치료는 HET 비히클 치료 동물과 비교되었을 때 단서 시험에서 유의미한 증가를 유발하였고(도 31(B)) 상황 시험에서 오싹하는 듯한 행동을 증가시키는 경향을 보여주었다(도 31(A)) 전반적으로, STXBP1 변이체를 사용한 AAV 치료는 STXBP1 반수체기능부전 마우스 모델에서 관찰된 연관 학습 및 기억 부족을 레스큐할 잠재력을 가졌다.

표 19

STXBP1 반수체기능부전 마우스 모델에서의 행동 질환 증상의 개요.
HET STXBP1 마우스의 관찰결과를 WT 한배새끼와 비교하였고 감소(↓) 또는 증가(↑)로서 분류하였다. STXBP1 긴 또는 짧은 변이체 과발현을 포함하는 AAV 치료의 효과는 "회복"(HET 비히클 치료 마우스에 대한 통계적으로 유의미한 변화) 또는 "경향"(변화가 관찰되었지만 통계적으로 유의미하지 않음)으로서 표지부착되었다.

증상	시험	(WT에 비해) HET에서의 관찰	AAV 치료군	
			긴 변이체	짧은 변이체
성장 부족	체중	↓	회복	경향
간질	발작(SWD)	↑	회복	회복
운동 기능장애	뒷다리 움켜쥐기(근긴장이상)	↑	회복	회복
	와이어 매달리기(근력)	↑	회복	회복
정신과 장애	공포 컨디셔닝 (연관 학습 기억)	↓	회복	경향

[0411]

[0412] 참고문헌

Abramov D, Guiberson NGL, Burre J (2020). STXBP1 encephalopathies: Clinical spectrum, disease mechanisms, and therapeutic strategies. Journal of neurochemistry.

Bertrand-Mathon et al. (2015). Increasing the effectiveness of intracerebral injections in adult and neonatal mice: a neurosurgical point of view. Neuroscience Bulletin, Springer Verlag, 2015, 31 (6), pp.685-696. hal-01196282.

Chen W, Cai ZL, Chao ES, Chen H, Longley CM, Hao S, et al. (2020). Stxbp1/Munc18-1 haploinsufficiency impairs inhibition and mediates key neurological features of STXBP1 encephalopathy. eLife 9.

Curzon et al. (2009) Methods of Behavior Analysis in Neuroscience. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, Chapter 2.

Dulubova I et al. (2007) Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 2697-2702.

Guyenet et al. (2010) A simple composite phenotype scoring system for evaluating mouse models of cerebellar ataxia, J Vis Exp. 21:1787.

Hamada N, Iwamoto I, Tabata H, Nagata KI (2017). MUNC18-1 gene abnormalities are involved in neurodevelopmental disorders through defective cortical architecture during brain development. Acta Neuropathol Commun 5: 92.

[0413]

Hamodi, A. et al. (2020). Transverse sinus injections drive robust whole-brain expression of transgenes. *eLIFE*. DOI: 10.7554/eLife.53639.

Kalidas S, Santosh V, Shareef MM, Shankar SK, Christopher R, Shetty KT (2000). Expression of p67 (Munc-18) in adult human brain and neuroectodermal tumors of human central nervous system. *Acta Neuropathol* 99: 191-198.

Kim, J.Y et al. (2014). Intracerebroventricular Viral Injection of the Neonatal Mouse Brain for Persistent and Widespread Neuronal Transduction. *J. Vis. Exp.* (91), e51863, doi:10.3791/51863 (2014).

Klein et al. (2012) Noninvasive in vivo assessment of muscle impairment in the mdx mouse model – a comparison of two common wire hanging methods with two different results, *J Neurosci Methods* 203:292-7,

Kovacevic J, Maroteaux G, Schut D, Loos M, Dubey M, Pitsch J, et al. (2018). Protein instability, haploinsufficiency, and cortical hyper-excitability underlie STXBP1 encephalopathy. *Brain : a journal of neurology* 141(5): 1350-1374.

MacLean B, et al. (2010). Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* 26(7) 966-968.

Meijer M, Cijssouw T, Toonen RF, Verhage M (2015). Synaptic Effects of Munc18-1 Alternative Splicing in Excitatory Hippocampal Neurons. *PLoS one* 10: e0138950.

Orock A, Logan S, Deak F (2018). Munc18-1 haploinsufficiency impairs learning and memory by reduced synaptic vesicular release in a model of Ohtahara syndrome. *Molecular and cellular neurosciences* 88: 33-42.

Patzke C, Han Y, Covy J, Yi F, Maxeiner S, Wernig M, et al. (2015). Analysis of conditional heterozygous STXBP1 mutations in human neurons. *The Journal of clinical investigation* 125: 3560-3571.

Ramos-Miguel A, Hercher C, Beasley CL, Barr AM, Bayer TA, Falkai P, et al. (2015). Loss of Munc18-1 long splice variant in GABAergic terminals is associated with cognitive decline and increased risk of dementia in a community sample. *Molecular neurodegeneration* 10: 65.

[0414]

Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, et al. (2008). De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nature Genetics* 40(6): 782-788.

Stamberger H, Nikanorova M, Willemsen MH, Accorsi P, Angriman M, Baier H, et al. (2016). STXBP1 encephalopathy: A neurodevelopmental disorder including epilepsy. *Neurology* 86: 954-962.

Swanson DA, Steel JM, Valle D (1998). Identification and characterization of the human ortholog of rat STXBP1, a protein implicated in vesicle trafficking and neurotransmitter release. *Genomics* 48: 373-376.

Toonen RF, Wierda K, Sons MS, de Wit H, Cornelisse LN, Brussaard A, et al. (2006). Munc18-1 expression levels control synapse recovery by regulating readily releasable pool size. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 18332-18337.

Tremblay, R.G. et al. (2010). Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *J Neurosci Methods* 186, 60-67, doi:10.1016/j.jneumeth.2009.11.004.

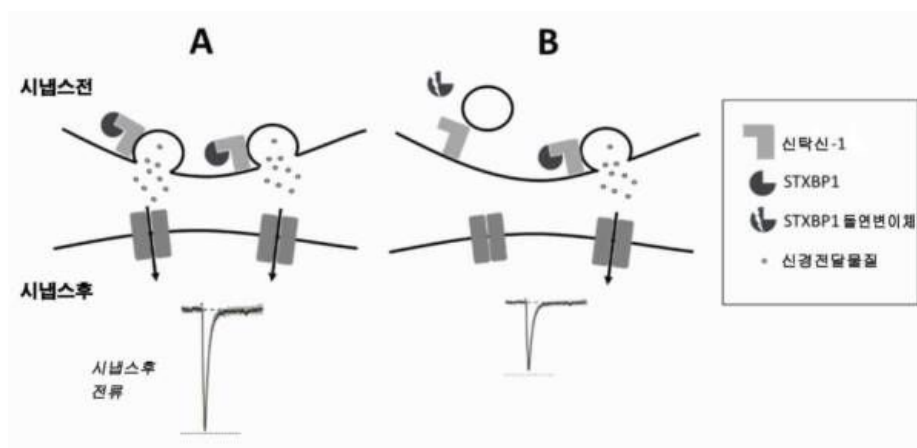
Uriguen L, Gil-Pisa I, Munarriz-Cuevas E, Berrocoso E, Pascau J, Soto-Montenegro ML, et al. (2013). Behavioral, neurochemical and morphological changes induced by the overexpression of munc18-1a in brain of mice: relevance to schizophrenia. *Translational psychiatry* 3: e221.

Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, et al. (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287: 864-869.

[0415]

도면

도면1



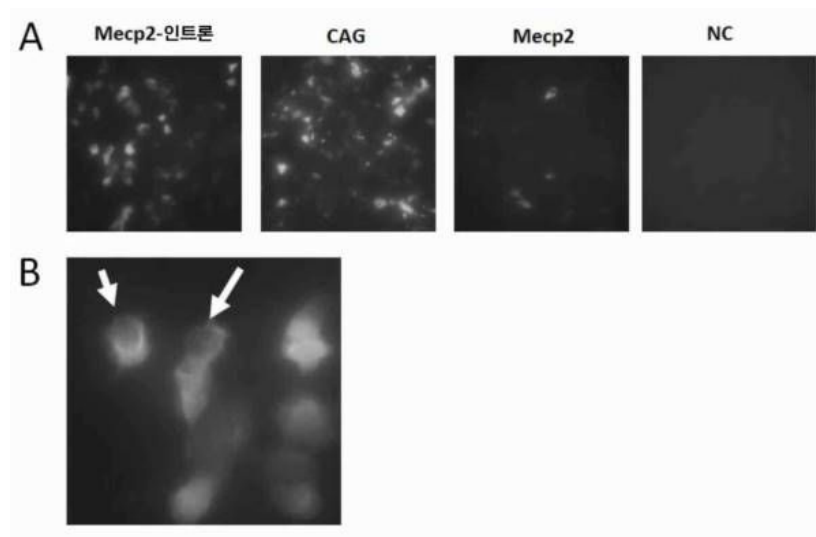
도면2

마우스_STXBP1_Iscah_MP_001107041.1	mapiglkavvgekimbvikkvkkgekvlvvdqlsmnm1scckntdmtgeitived	60
인간_STXBP1_Iscah_MP_003156.1	mapiglkavvgekimbvikkvkkgekvlvvdqlsmnm1scckntdmtgeitived	60
마우스_STXBP1_Iscah_MP_014972082.1	mapiglkavvgekimbvikkvkkgekvlvvdqlsmnm1scckntdmtgeitived	60
마우스_STXBP1_Iscah_MP_001107041.1	inkrreplpslaavyllfpseksvhs1sedfkdpptakyrnaheffcdscpdalfmelv	120
인간_STXBP1_Iscah_MP_003156.1	inkrreplpslaavyllfpseksvhs1sedfkdpptakyrnaheffcdscpdalfmelv	120
마우스_STXBP1_Iscah_MP_014972082.1	inkrreplpslaavyllfpseksvhs1sedfkdpptakyrnaheffcdscpdalfmelv	120
마우스_STXBP1_Iscah_MP_001107041.1	srakviktclteiniaflpyesqvs1dsadsfqsfyphkagmkppllelaeqiatlc	180
인간_STXBP1_Iscah_MP_003156.1	srakviktclteiniaflpyesqvs1dsadsfqsfyphkagmkppllelaeqiatlc	180
마우스_STXBP1_Iscah_MP_014972082.1	srakviktclteiniaflpyesqvs1dsadsfqsfyphkagmkppllelaeqiatlc	180
마우스_STXBP1_Iscah_MP_001107041.1	atlkaypavrvyrgyeykdna1laqligdk1daykadapltmgsgpdkareq11ldrgfdps	240
인간_STXBP1_Iscah_MP_003156.1	atlkaypavrvyrgyeykdna1laqligdk1daykadapltmgsgpdkareq11ldrgfdps	240
마우스_STXBP1_Iscah_MP_014972082.1	atlkaypavrvyrgyeykdna1laqligdk1daykadapltmgsgpdkareq11ldrgfdps	240
마우스_STXBP1_Iscah_MP_001107041.1	apvlheltfgamsydlipendvykyetsg1gearvkevl1deddd1w1alrhkh1aevs	300
인간_STXBP1_Iscah_MP_003156.1	apvlheltfgamsydlipendvykyetsg1gearvkevl1deddd1w1alrhkh1aevs	300
마우스_STXBP1_Iscah_MP_014972082.1	apvlheltfgamsydlipendvykyetsg1gearvkevl1deddd1w1alrhkh1aevs	300
마우스_STXBP1_Iscah_MP_001107041.1	qevtralkdftssckmntgektmtcd1sgm1kmpqyqkelskysth1haedcmkhyqg	360
인간_STXBP1_Iscah_MP_003156.1	qevtralkdftssckmntgektmtcd1sgm1kmpqyqkelskysth1haedcmkhyqg	360
마우스_STXBP1_Iscah_MP_014972082.1	qevtralkdftssckmntgektmtcd1sgm1kmpqyqkelskysth1haedcmkhyqg	360
마우스_STXBP1_Iscah_MP_001107041.1	tvdk1crveqdlamgtdaegekikdpmraiwp11danvstydkir11lyif1kingite	420
인간_STXBP1_Iscah_MP_003156.1	tvdk1crveqdlamgtdaegekikdpmraiwp11danvstydkir11lyif1kingite	420
마우스_STXBP1_Iscah_MP_014972082.1	tvdk1crveqdlamgtdaegekikdpmraiwp11danvstydkir11lyif1kingite	420
마우스_STXBP1_Iscah_MP_001107041.1	enlnk1lqnaq1pbedee1itmah1gpy1vdes1lrrrkspezker1seq1ysrwp	480
인간_STXBP1_Iscah_MP_003156.1	enlnk1lqnaq1pbedee1itmah1gpy1vdes1lrrrkspezker1seq1ysrwp	480
마우스_STXBP1_Iscah_MP_014972082.1	enlnk1lqnaq1pbedee1itmah1gpy1vdes1lrrrkspezker1seq1ysrwp	480
마우스_STXBP1_Iscah_MP_001107041.1	llkdmed1edk1dtkhypl1strssasfct1awsaryghnkhkagpyzsgpr11if	540
인간_STXBP1_Iscah_MP_003156.1	llkdmed1edk1dtkhypl1strssasfct1awsaryghnkhkagpyzsgpr11if	540
마우스_STXBP1_Iscah_MP_014972082.1	llkdmed1edk1dtkhypl1strssasfct1awsaryghnkhkagpyzsgpr11if	540
마우스_STXBP1_Iscah_MP_001107041.1	llgvgvlnmrcacayevtgangkwv1lgsthl1fpctf1mnl1rtpd1resarsvafedqap	600
인간_STXBP1_Iscah_MP_003156.1	llgvgvlnmrcacayevtgangkwv1lgsthl1fpctf1mnl1rtpd1resarsvafedqap	600
마우스_STXBP1_Iscah_MP_014972082.1	llgvgvlnmrcacayevtgangkwv1lgsthl1fpctf1mnl1rtpd1resarsvafedqap	600
마우스_STXBP1_Iscah_MP_001107041.1	time 603	
인간_STXBP1_Iscah_MP_003156.1	time 603	
마우스_STXBP1_Iscah_MP_014972082.1	time 603	

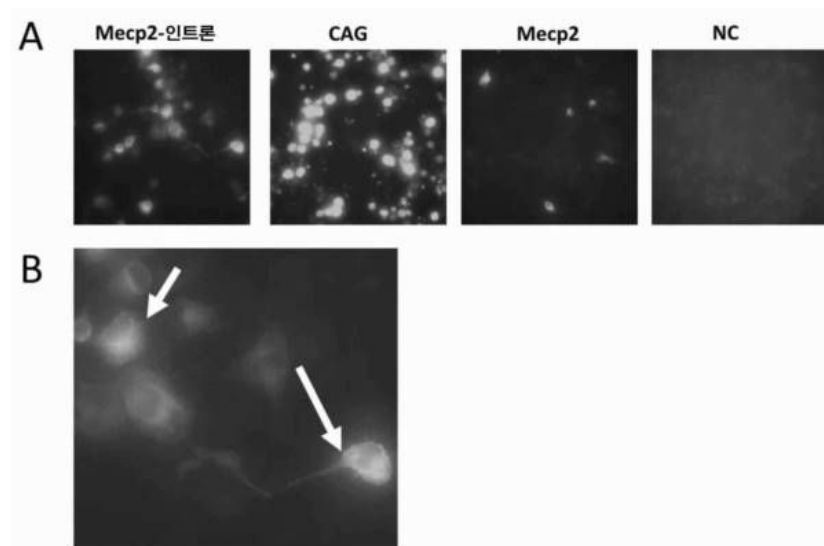
도면3



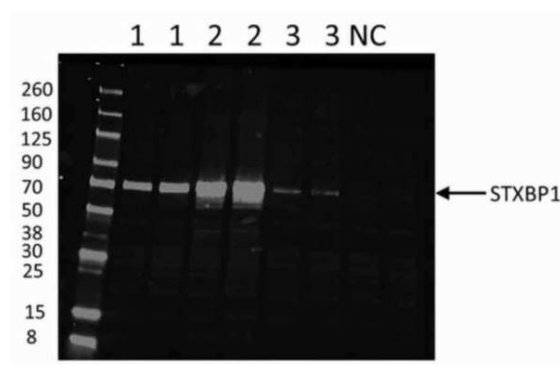
도면4



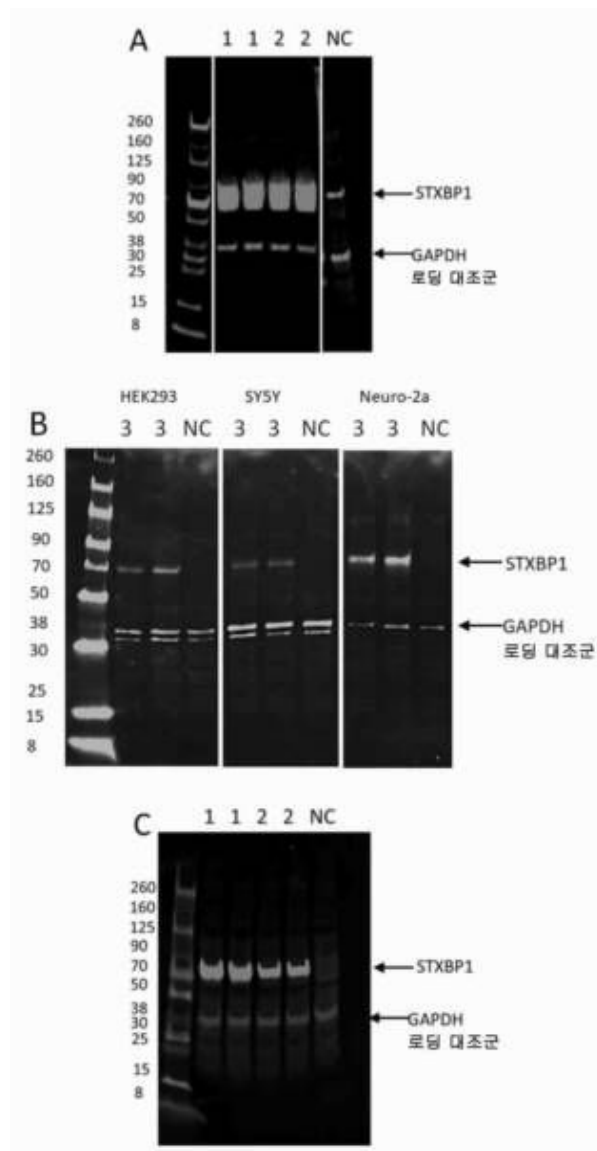
도면5



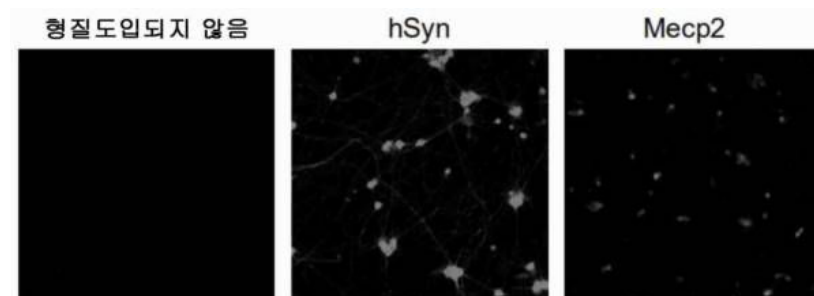
도면6



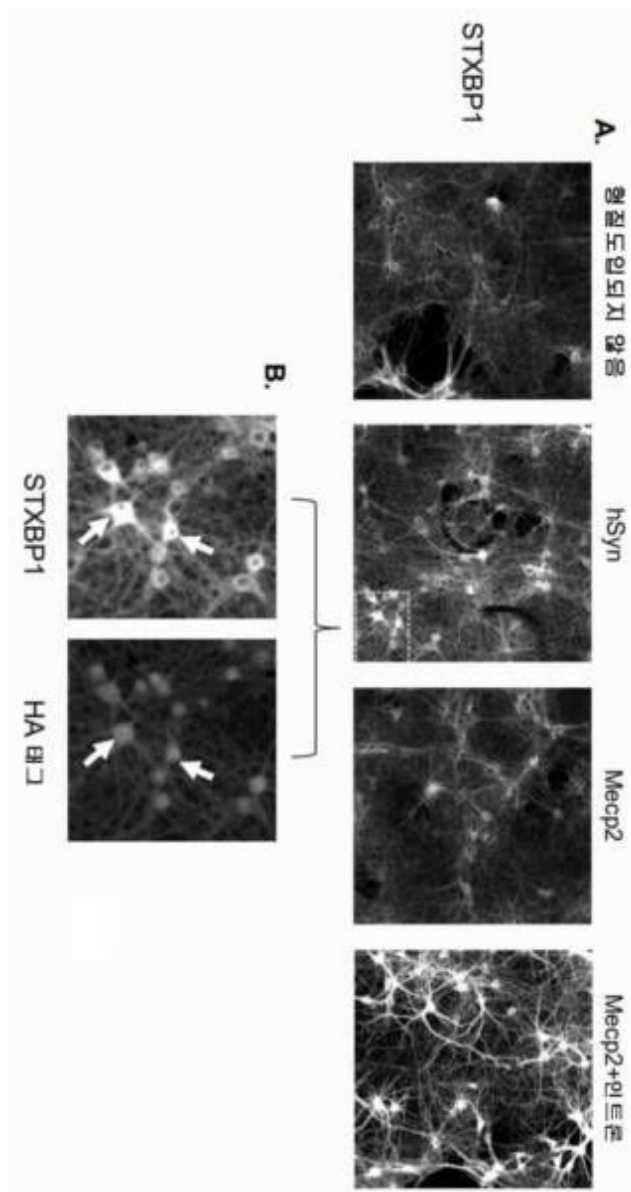
도면7



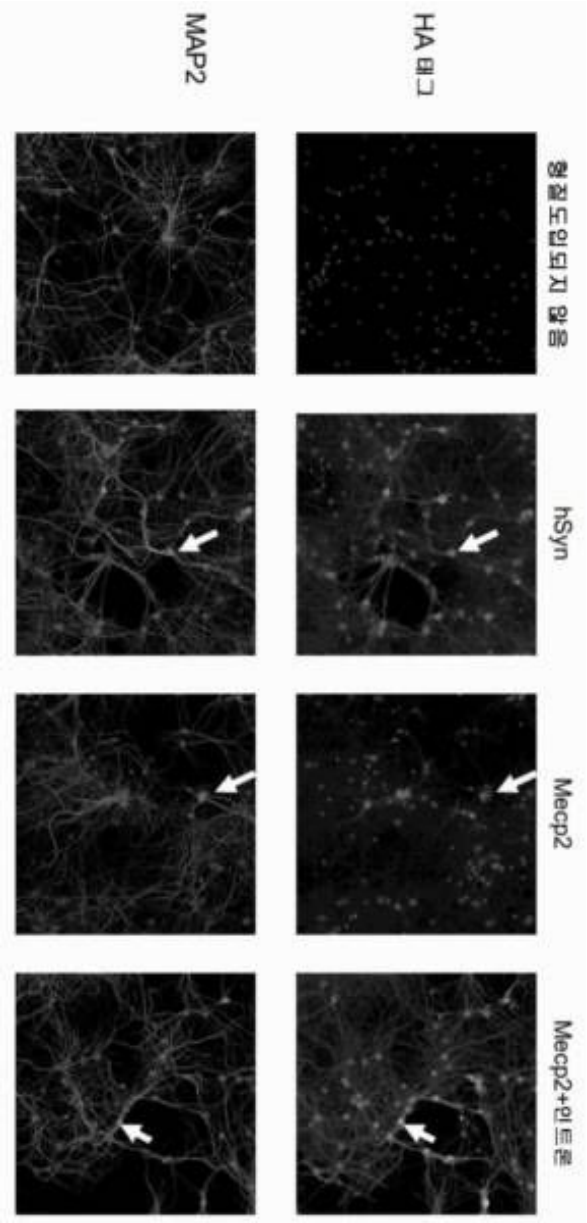
도면8



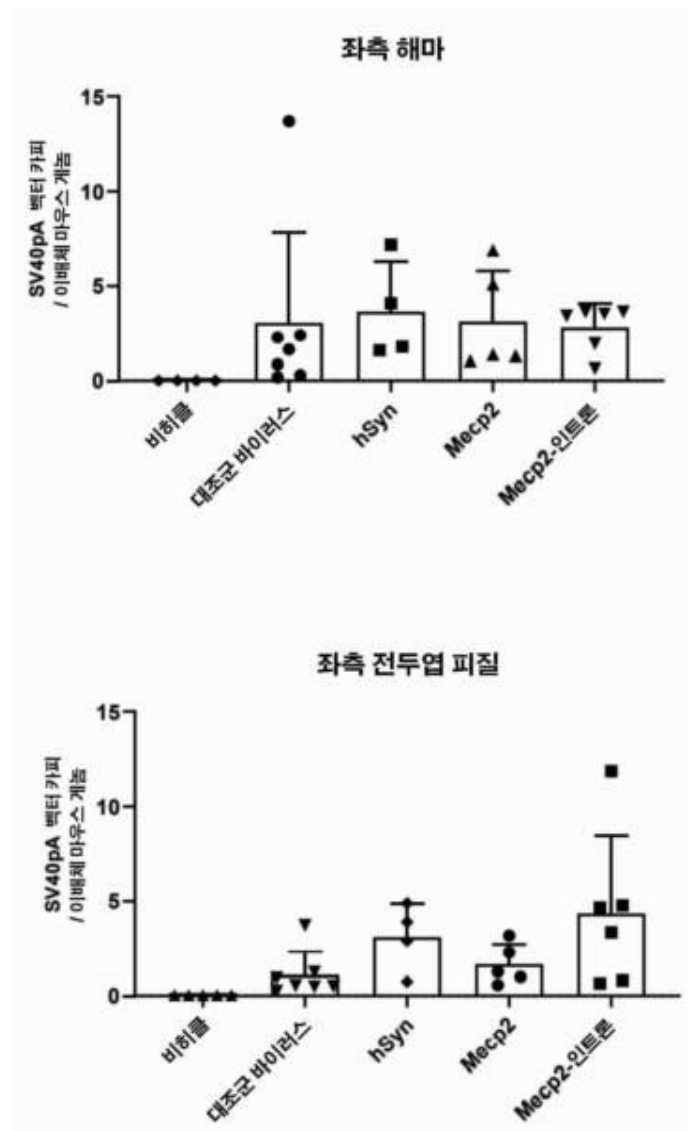
도면9



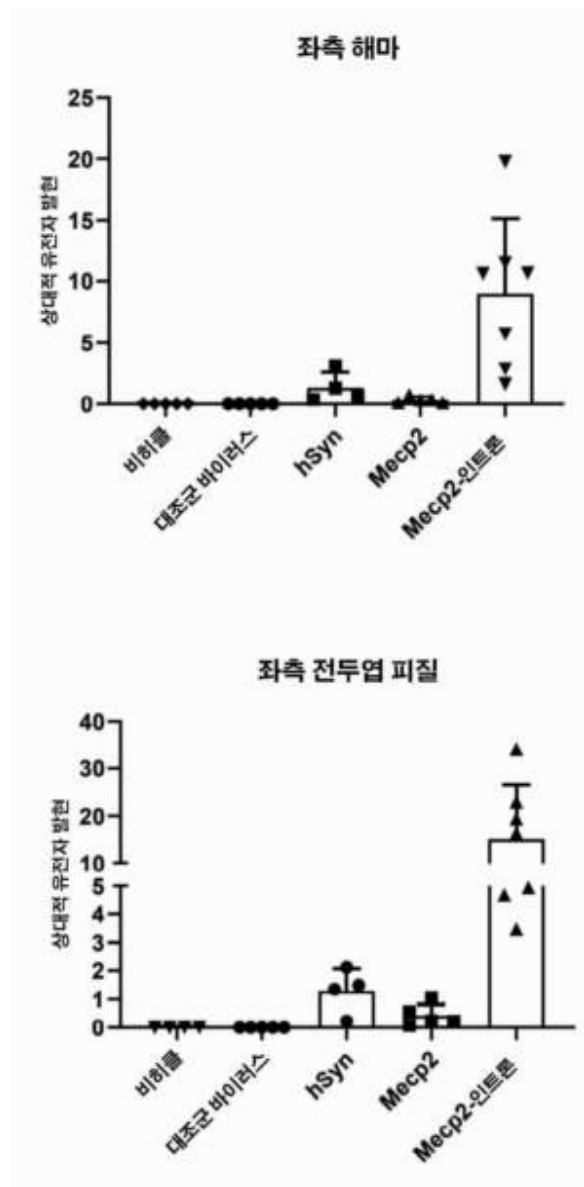
도면10



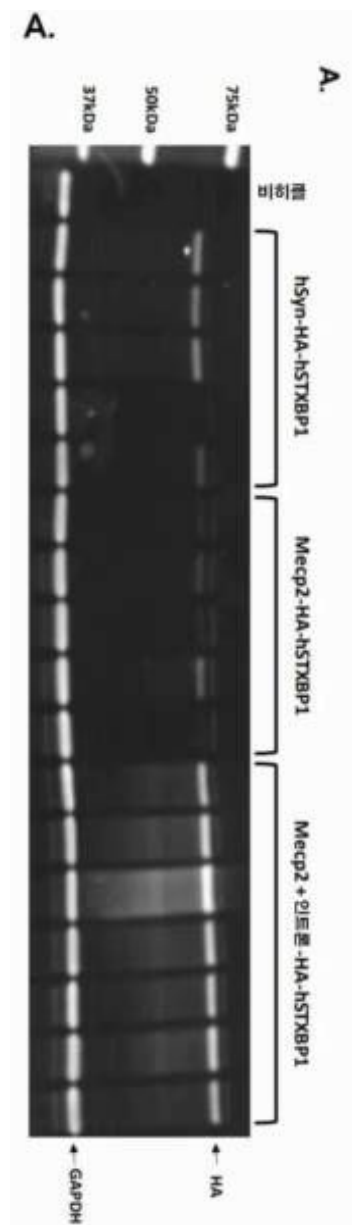
도면11



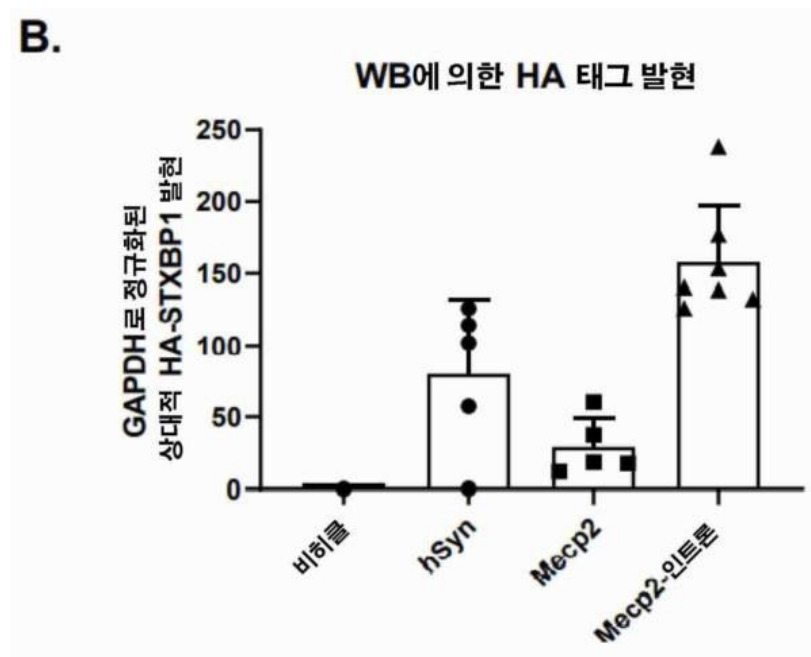
도면12



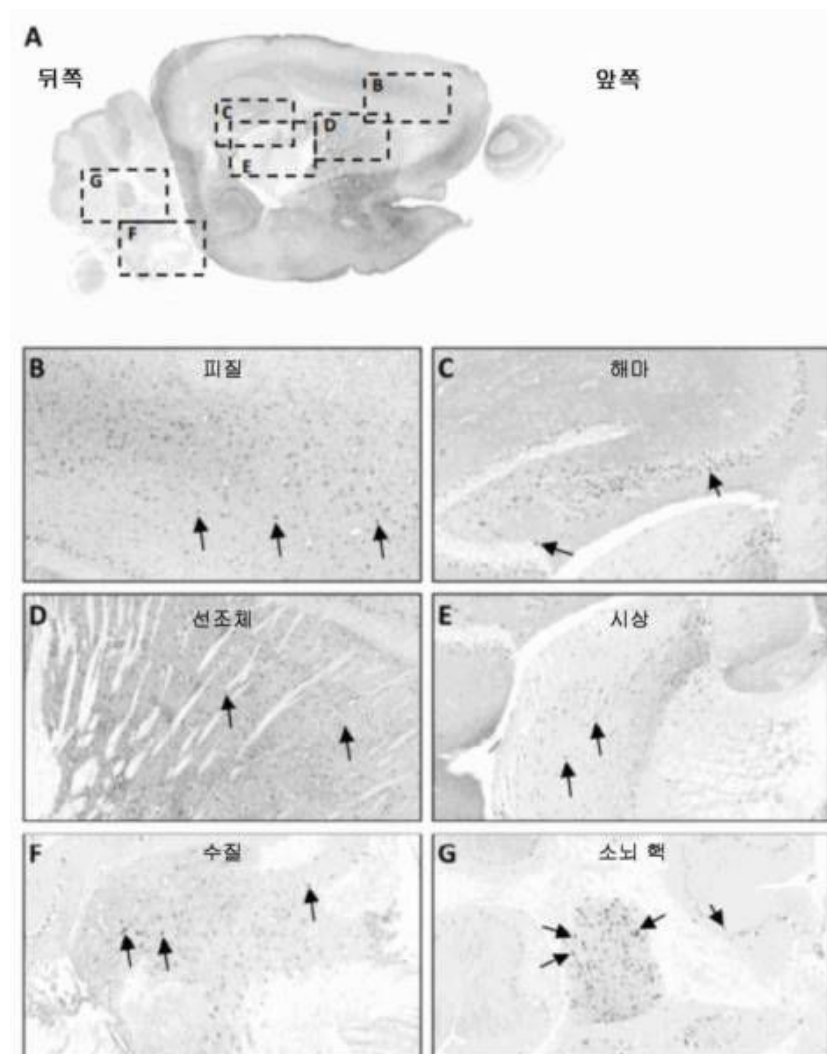
도면13a



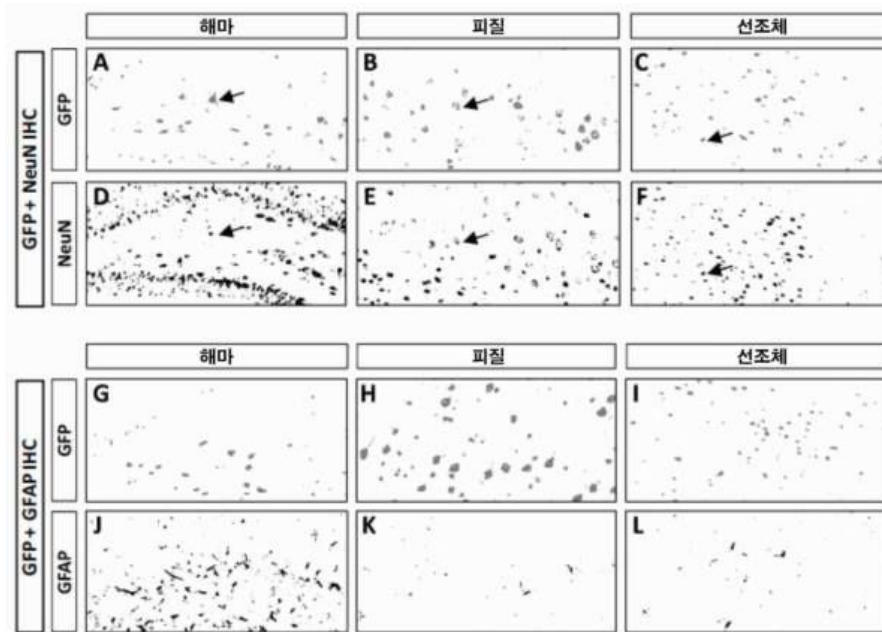
도면13b



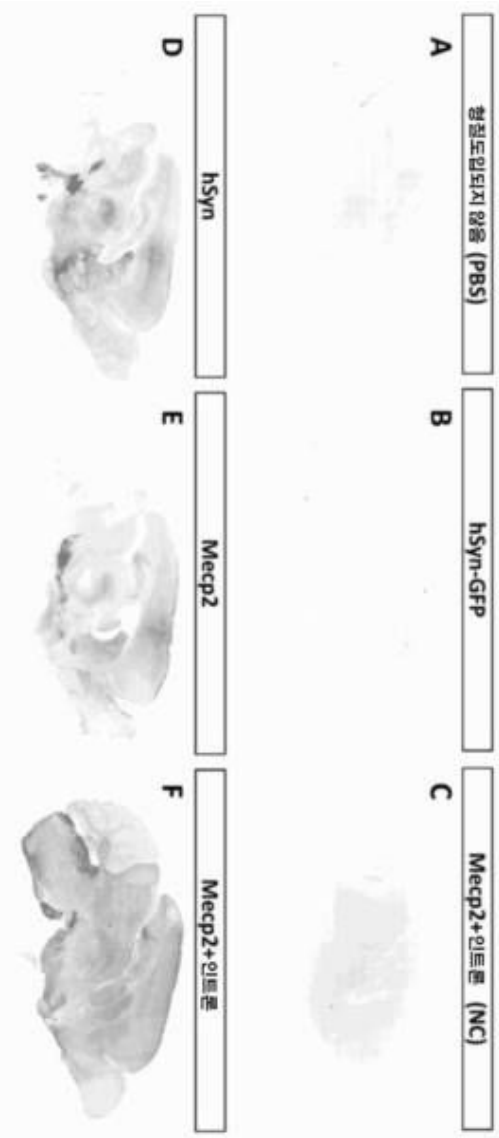
도면14



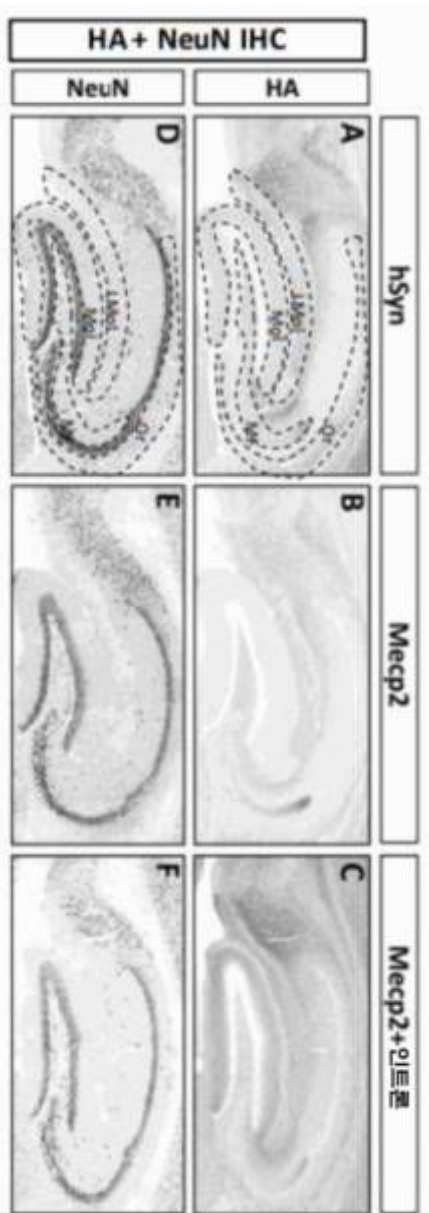
도면15



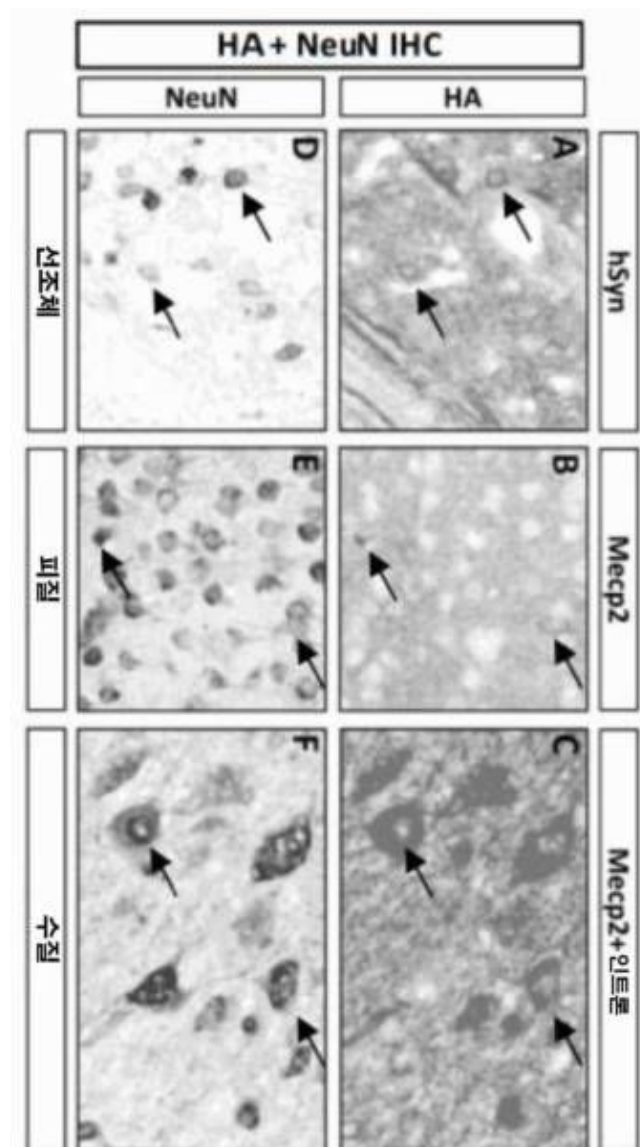
도면16



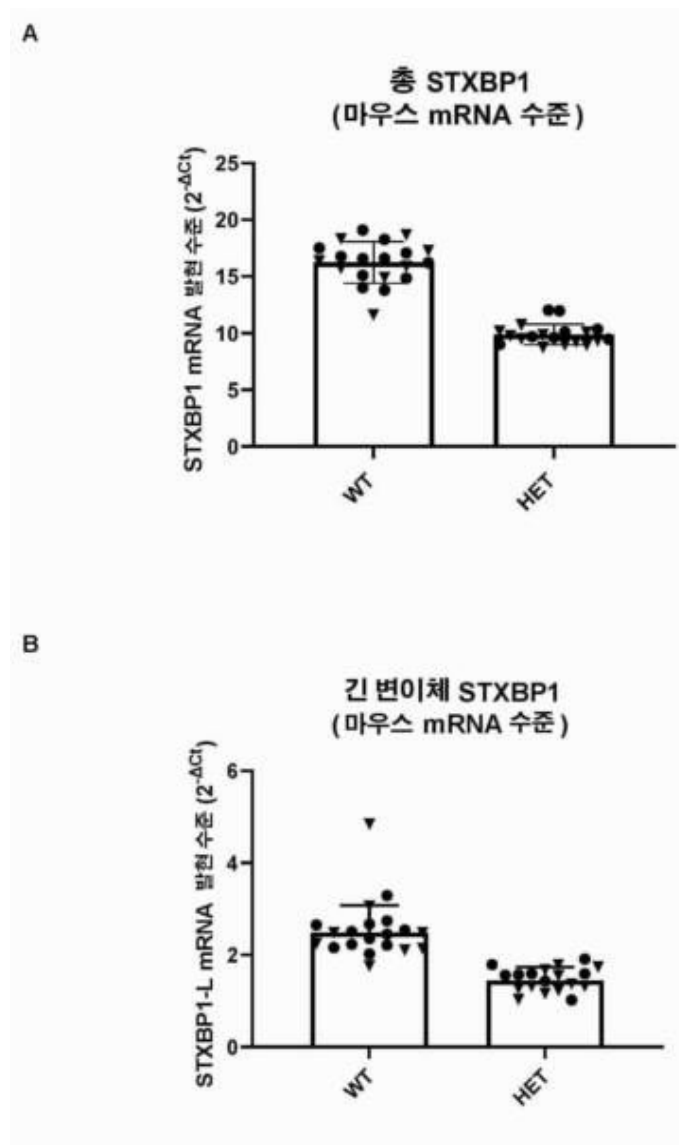
도면17



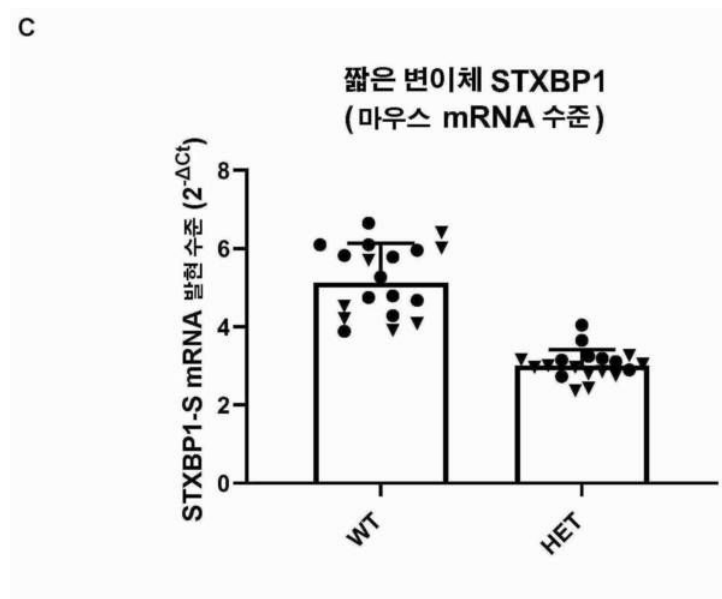
도면18



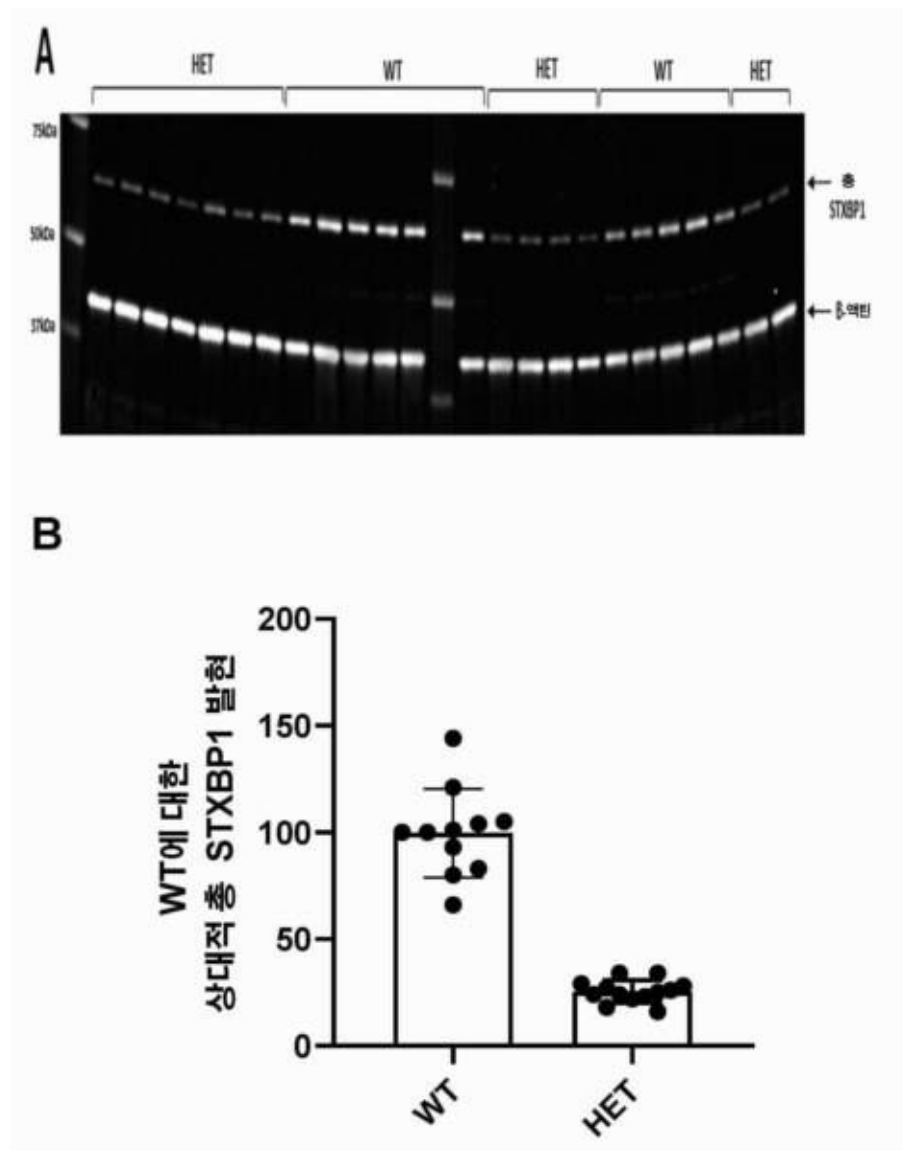
도면 19a



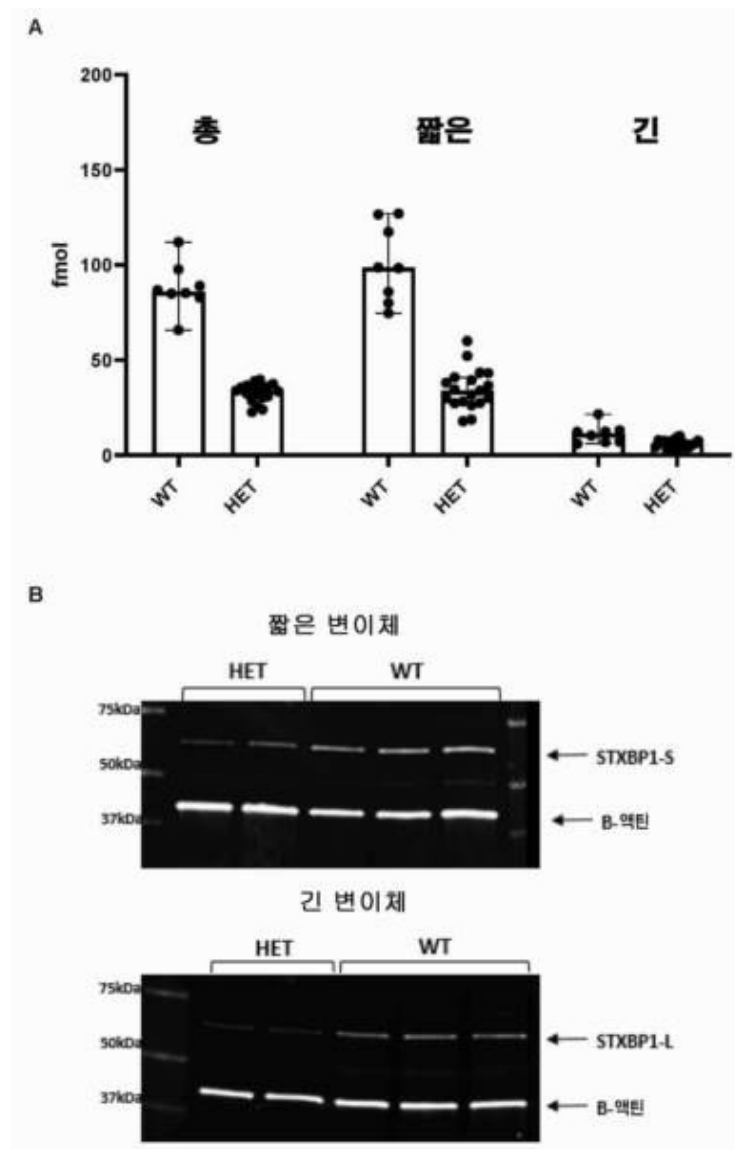
도면 19b



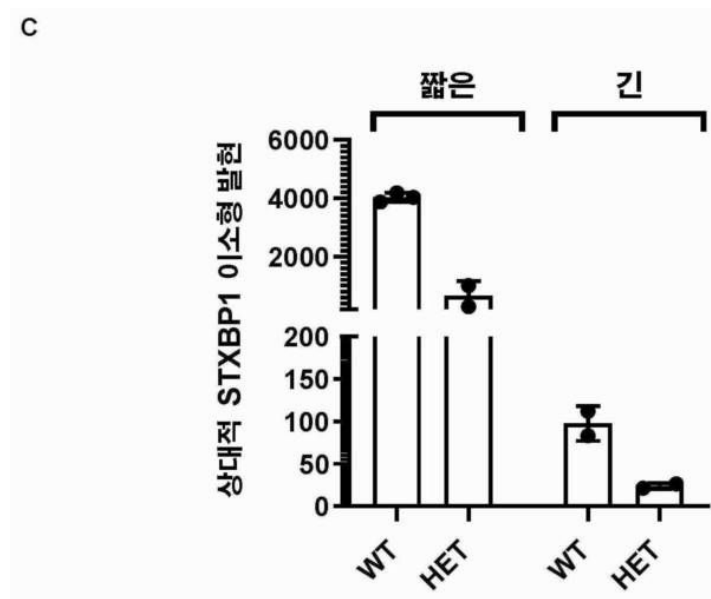
도면20



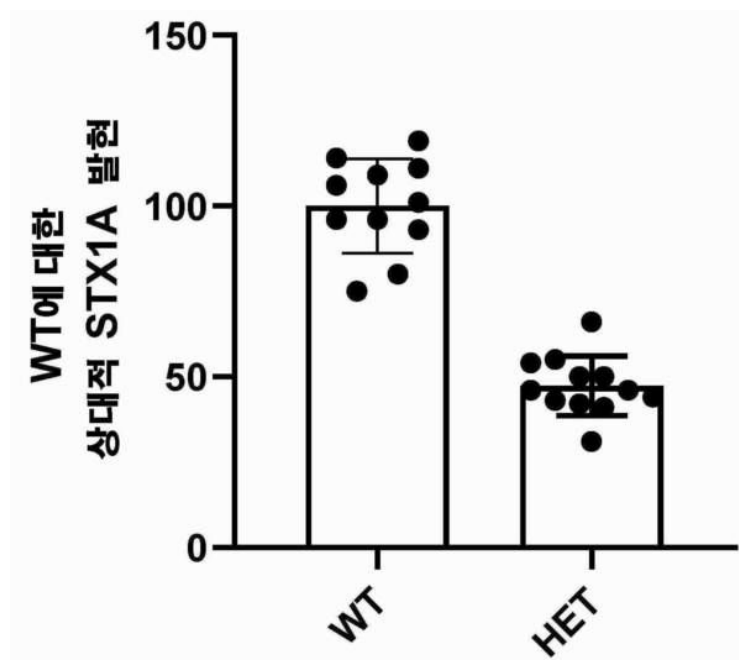
도면21a



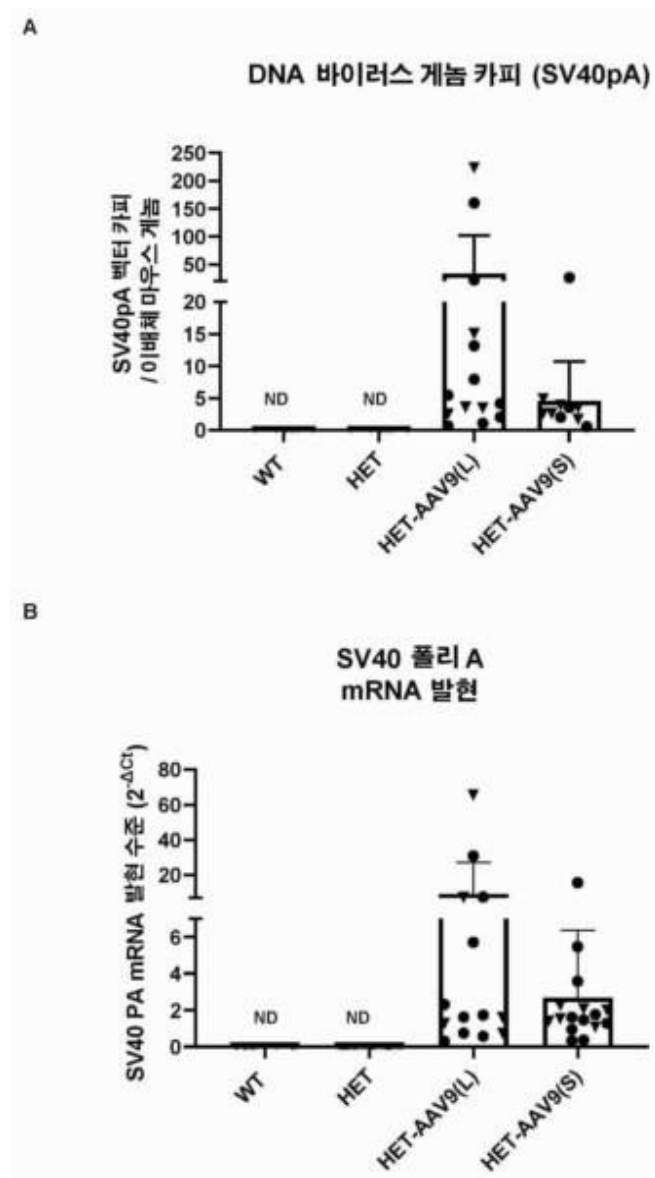
도면21b



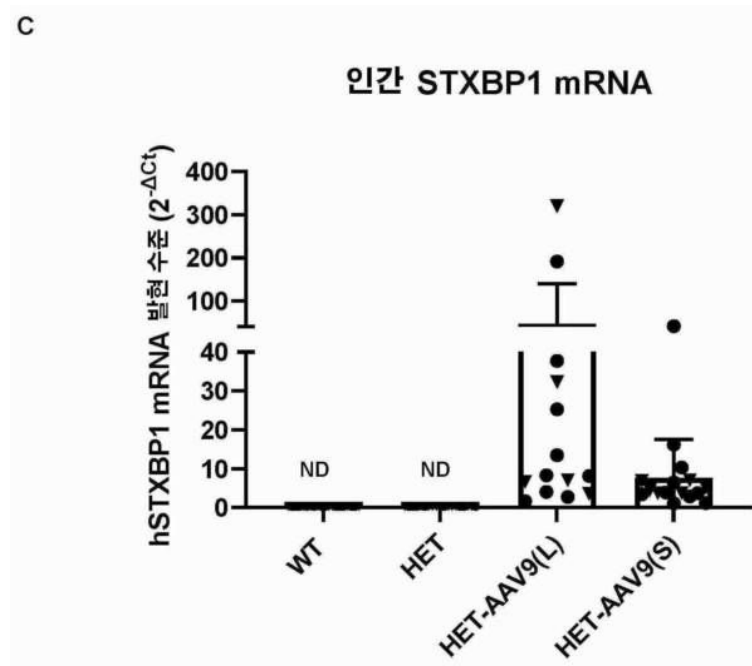
도면22



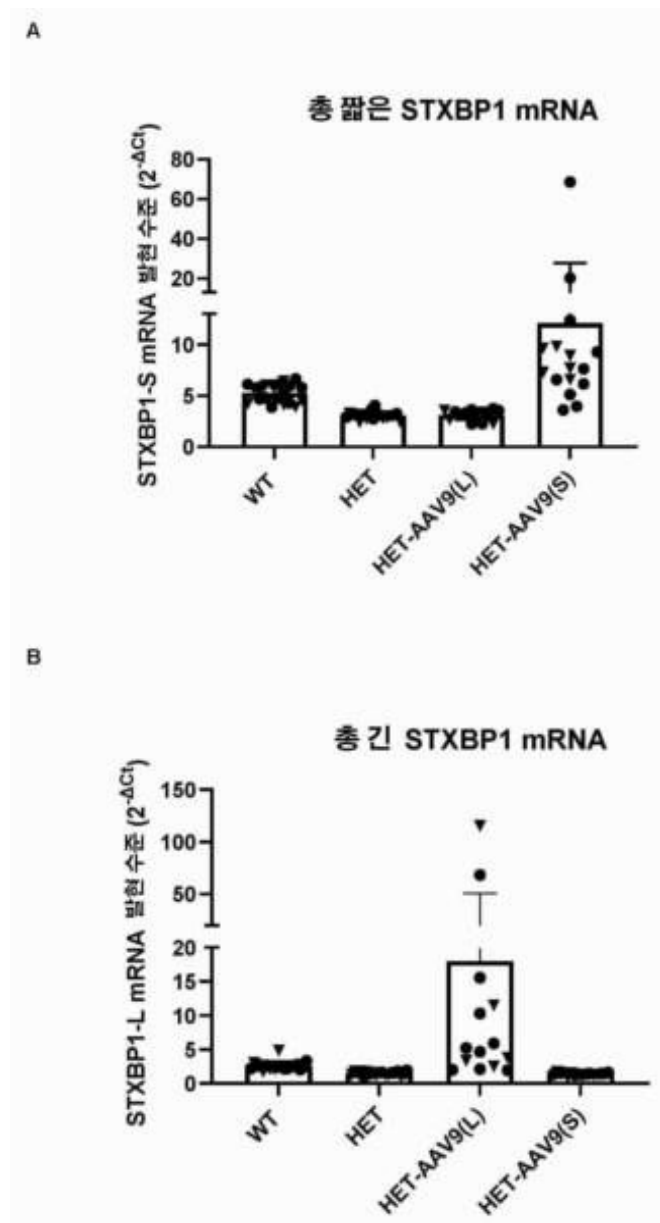
도면23a



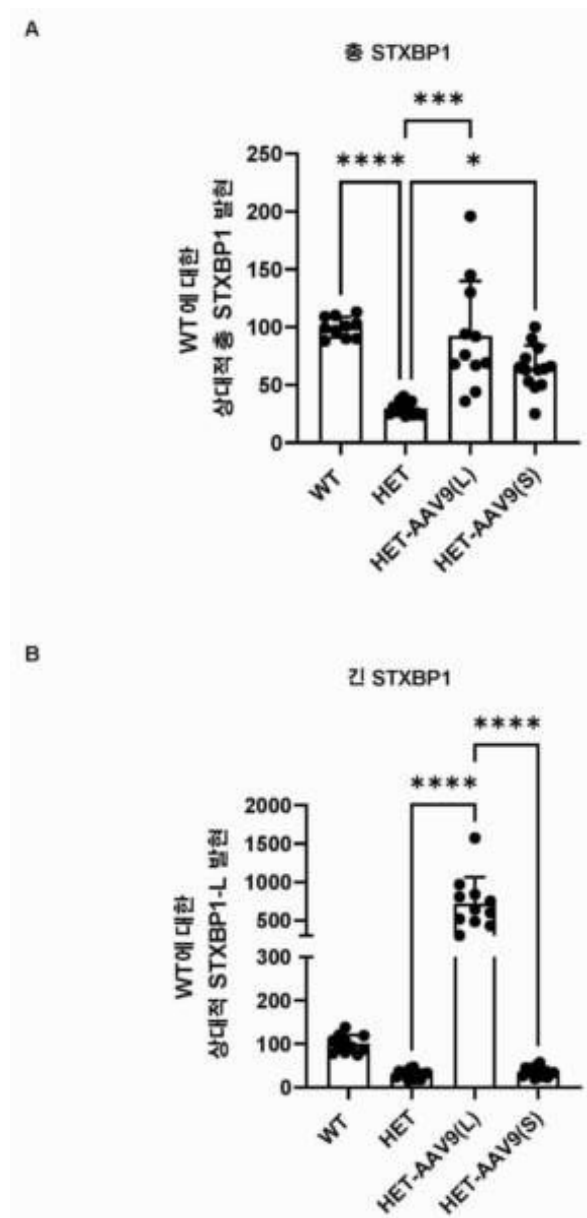
도면23b



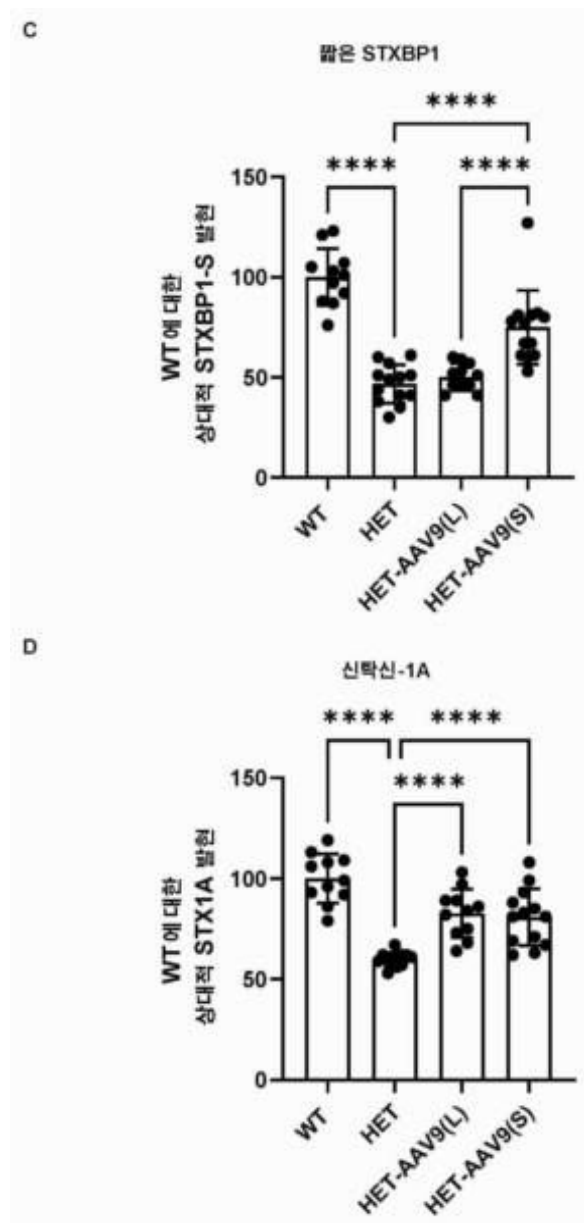
도면24



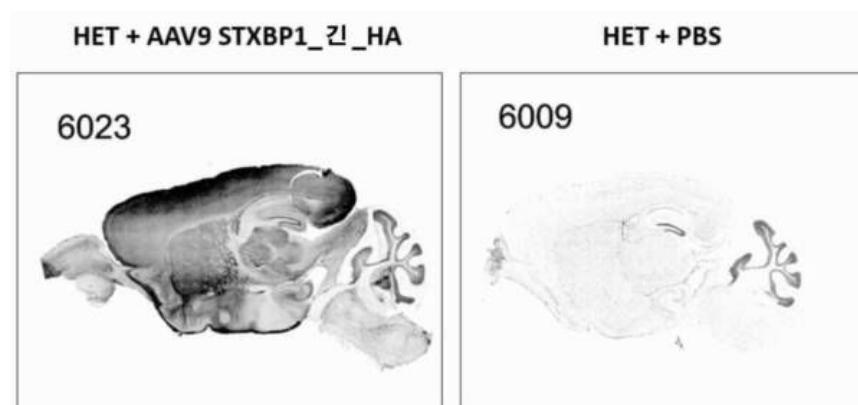
도면25a



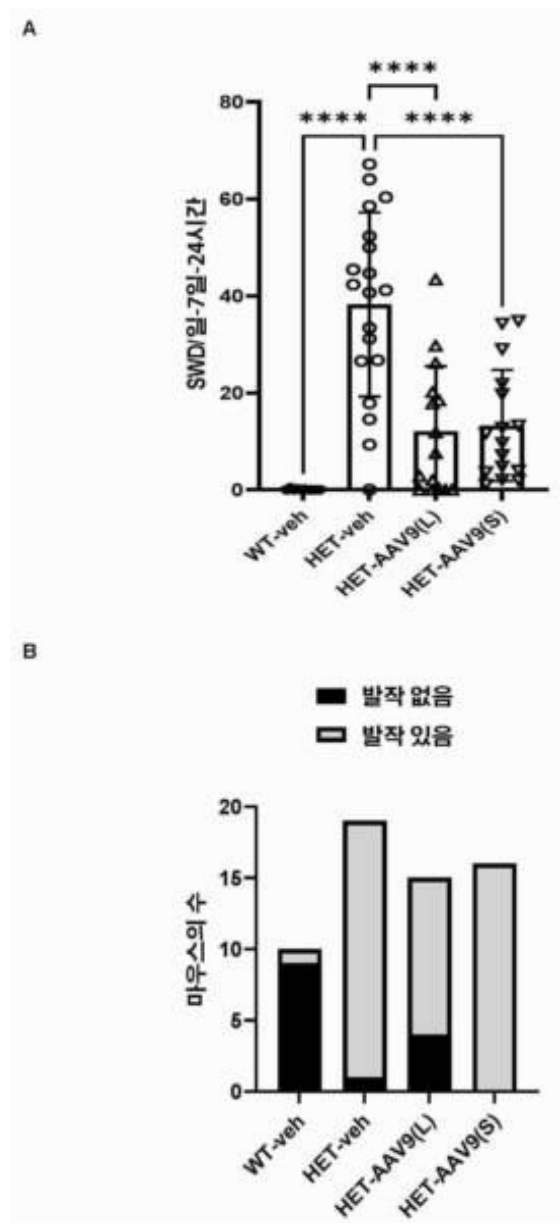
도면25b



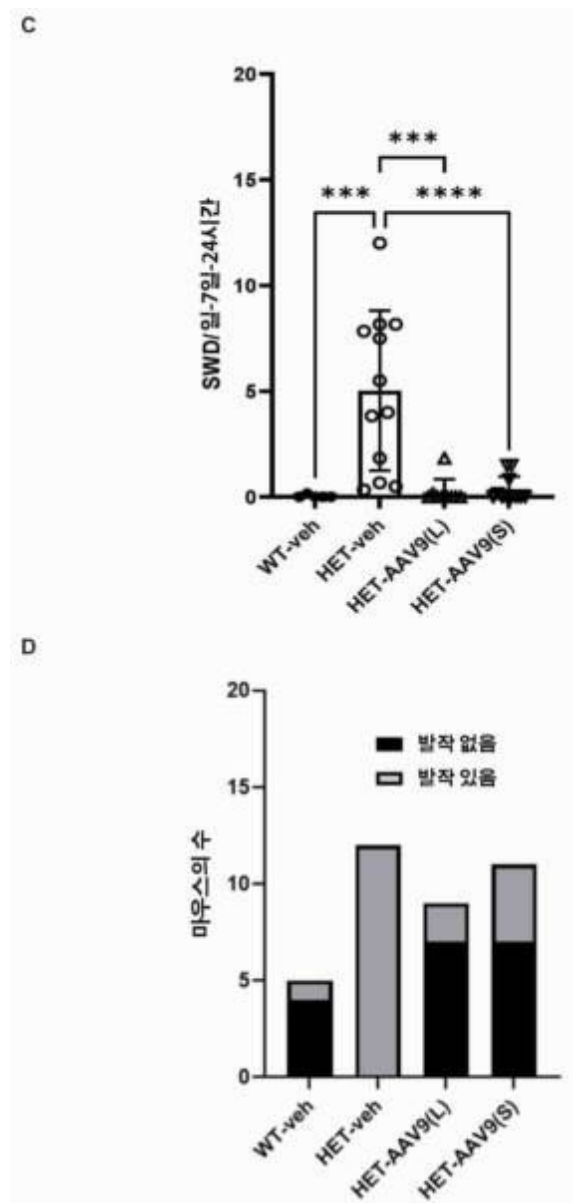
도면26



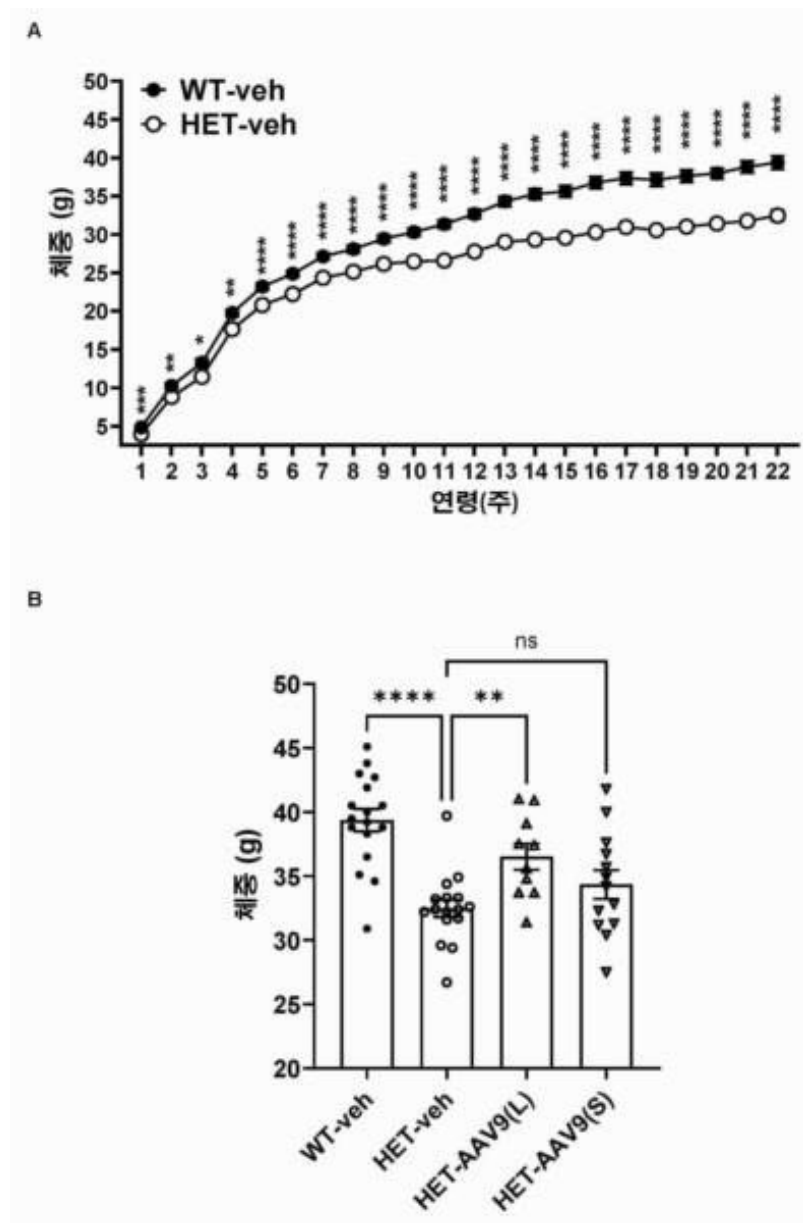
도면27a



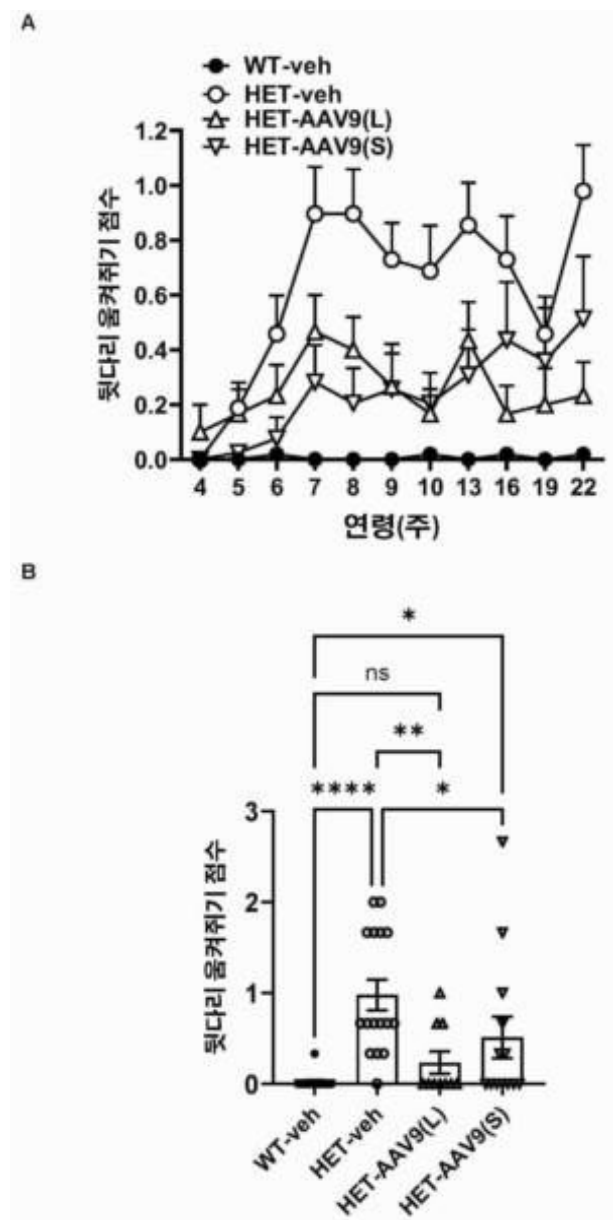
도면27b



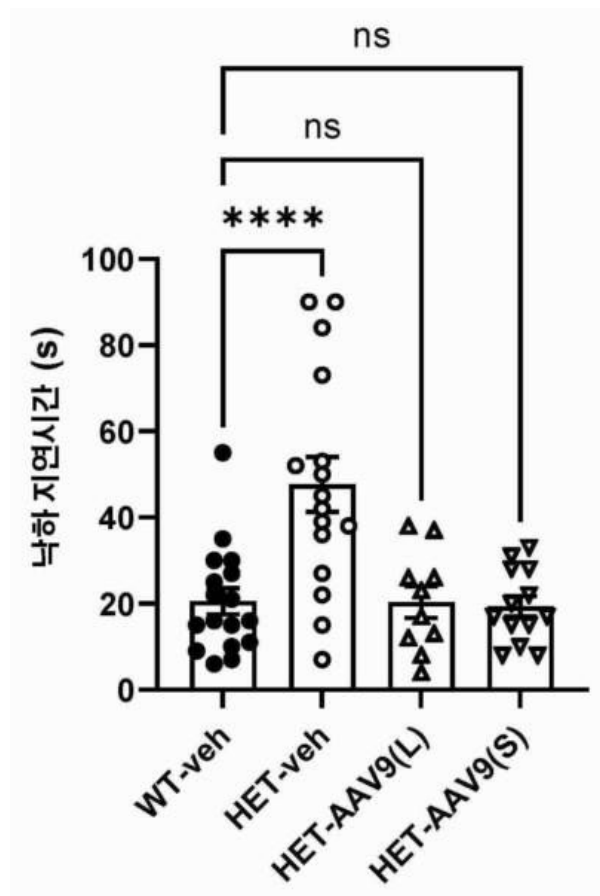
도면28



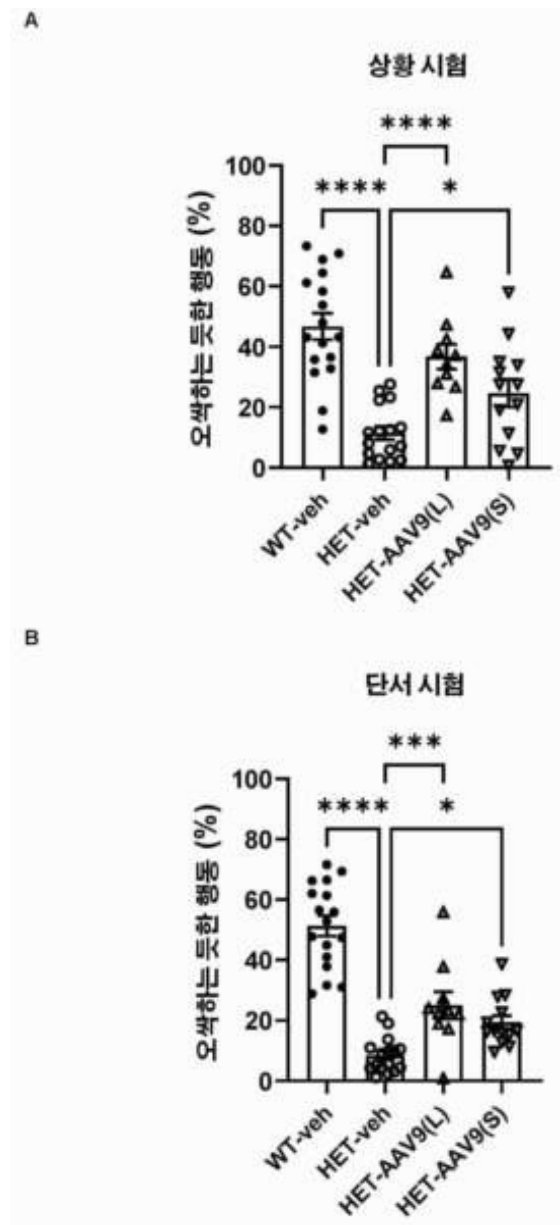
도면29



도면30



도면31



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.