(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년01월16일
(11) 등록번호 10-2489437
(24) 등록일자 2023년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/005 (2013.01)
A61K 48/0075 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7030911
(22) 출원일자(국제) 2017년03월27일
심사청구일자 2020년03월18일
(85) 번역문제출일자 2018년10월25일
(65) 공개번호 10-2018-0124980
(43) 공개일자 2018년11월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/024285
(87) 국제공개번호 WO 2017/172606
국제공개일자 2017년10월05일
(30) 우선권주장
62/314,128 2016년03월28일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2014116652 A2*
WO2016122791 A1
PLOS ONE. 2012. Vol.7, Issue 1, e30561.
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
더 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아
미합중국, 94607-5200 캘리포니아, 오클랜드, 프랭클린 스트리트 1111, 5th 플로어
(72) 발명자
마살라 마틴
미국 92093-0734 캘리포니아주 라 졸라 길먼 드라이브 9500 더 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아
(74) 대리인
특허법인코리아나

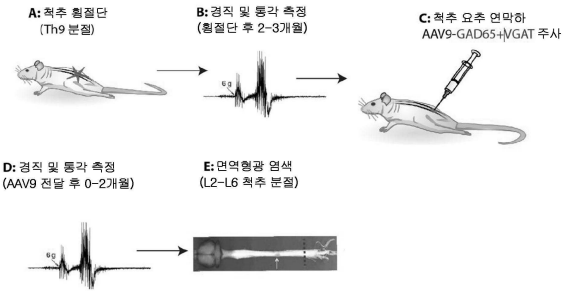
전체 청구항 수 : 총 16 항 심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 **뉴런 과흥분성 치료를 위한 방법 및 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 척추 손상 이후 GABA-매개된 시냅스이전 억제의 손실을 치료하기 위한 요법을 제공한다. 치료적 계획은 척추 외상성 또는 허혈성 손상 이후에 환자에서 만성 경직을 조정하도록 GAD65 (글루타메이트 디카복실라제) 및 VGAT (소포성 GABA 수송체)의 척추 분절-특이적 상향조절을 포함한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 21/00 (2018.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

글루타메이트 디카복실라제 (GAD65) 유전자 및 소포성 GABA 수송체 (VGAT) 유전자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 대상체에서의 경직 치료에서 사용을 위한 조성물로서,

(ⅰ) 상기 바이러스 벡터는 대상체의 연막하 공간에 직접적으로 투여되고;

(ii) 상기 조성물은 GAD65 유전자 및 VGAT 유전자를 발현 및 상향조절하고;

(iii) GAD65 유전자 및 VGAT 유전자의 발현 및 상향조절은 혼합된 억제성-흥분성 신경전달물질 표현형을 갖는 척추의 중간뉴런을 생성하고, 그리하여 대상체에서의 경직을 감소시키고 치료하는, 사용을 위한 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, GAD65 유전자 및 VGAT 유전자의 상향조절은 GAD65 유전자 및 VGAT 유전자의 척추-특이적 상향조절인, 사용을 위한 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, GAD65 및 VGAT는 과발현되는, 사용을 위한 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 벡터는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 (AV), 또는 아데노-연합 벡터 (AAV)인, 사용을 위한 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, AAV는 AAV9인, 사용을 위한 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 바이러스 벡터는 추가적으로 대상체의 척추 실질, 대상체의 척추강내 공간, 또는 대상체의 말초 경련성 근육으로 직접적으로 투여되는 것인, 사용을 위한 조성물.

청구항 7

척수 손상을 갖는 대상체의 치료에서 사용을 위한 바이러스 벡터로서, GAD65 및 VGAT를 발현시키기 위해 GAD65 및 VGAT를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고,

상기 바이러스 벡터는 대상체의 연막하 공간에 직접적으로 투여되고, GAD65 유전자 및 VGAT 유전자의 발현은 혼합된 억제성-흥분성 신경전달물질 표현형을 갖는 척추의 중간뉴런을 생성하고, 그리하여 척수 손상을 치료하는, 사용을 위한 바이러스 벡터.

청구항 8

제7항에 있어서, 척수 손상-유도 경직을 치료하는, 사용을 위한 바이러스 벡터.

청구항 9

제7항에 있어서, GAD65 및 VGAT가 과발현되는, 사용을 위한 바이러스 벡터.

청구항 10

제7항에 있어서, 벡터는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 (AV) 또는 아데노-연합 벡터 (AAV)인, 사용을

위한 바이러스 벡터.

청구항 11

제10항에 있어서, AAV 는 제9형 AAV (AAV9) 인, 사용을 위한 바이러스 벡터.

청구항 12

제7항에 있어서, 벡터는 추가적으로 대상체의 척추 실질, 대상체의 척추강내 공간, 또는 대상체의 말초 경련성 근육으로 직접적으로 투여되는 것인, 사용을 위한 바이러스 벡터.

청구항 13

GAD65 및 VGAT 의 발현 및 상향조절을 위해, GAD65 및 VGAT를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 기능적으로 연결되는 프로모터를 포함하는, 대상체에서의 경직 치료에서 사용을 위한 벡터로서,

상기 벡터는 대상체의 연막하 공간에 직접적으로 투여되고, GAD65 유전자 및 VGAT 유전자의 발현 및 상향조절은 혼합된 억제성-흥분성 신경전달물질 표현형을 갖는 척추의 중간뉴런을 생성하는, 벡터.

청구항 14

제13항에 있어서, 벡터는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연합 벡터 (AAV), 및 재조합 AAV 입자로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 벡터.

청구항 15

제14항에 있어서, 벡터는 재조합 제9형 AAV 입자 (rAAV9) 이고, 상기 rAAV9 은 AAV9-UBI-GAD65+VGAT인, 벡터.

청구항 16

제13항에 따른 벡터를 함유하는 단리된 포유동물 숙주 세포.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 교차 참조**

[0002] 본 출원은 그 전문이 본 명세서에 참조로 편입되는 2016년 3월 28일 출원된 미국 가출원 일련 번호 제 62/314,128호의 35 U.S.C. § 119(e) 하의 우선권 이득을 청구한다.

[0003] **연구보조금 정보**

[0004] 본 발명은 미국 국립 보건원이 수여하는 연구 보조금 번호 NS051644-02A2 하의 정부 지원에 의해 수행되었다. 미국 정부는 본 발명의 일정 권리를 갖는다.

[0005] **발명의 분야**

[0006] 본 발명은 일반적으로 척추 손상의 치료, 및 보다 구체적으로 척추 외상성 또는 허혈성 손상 이후 환자에서 만성 경직을 조정하기 위한 병용 치료 계획에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 척수 손상 (외상성 또는 허혈성)은 임상적으로 정의된 경직 및 강직의 발생을 초래할 수 있다. 척추 손상 이후 경직의 출현을 초래하는 기본적인 기전 중 하나는 국소 분절 억제의 손상 및 그 결과로 인한 i) 긴장성 운동뉴런 점화의 증가, ii) 근육 당김 동안 1차 구심성 입력의 증가, 및/또는 iii) 말초 감각 자극에 대한 악화된 반응 (즉, 이질통)으로 여겨진다. 감마-아미노부티르산 (GABA)-매개된 시냅스이전, 재발성 및 상호간 시냅스이후 억제의 상실을 비롯하여 굴근 구심성 경로에서 이의 억제성 효과의 상실은 핵심 기전 중 하나를 대표하는 것으로 확인되었다.

[0008] 그러나, 흥미롭게도, 이전의 연구들은 Th12 횡절단된 고양이의 허리 척수 분절에서 척추 실질 GAD67 발현의 상당한 증가를 보여주었다. 유의하게, α-운동뉴런막에 병치된 억제성 부톤의 증가된 밀도가 생후 5일에 수행된 중간흉곽 척수 횡절단이 수행된 성체 래트에서 확인되었다. 이들 데이타는 특이적인 억제성 뉴런-구동된 활성의 부재 하에서, 척수 중간뉴런 내 GABA 합성 효소의 정적 증가 또는 척추외상 이후 α-운동뉴런과의 억제성 접촉의 수 증가가 경직/반사항진의 발생을 방지하는데 충분하지 않다는 것을 시사한다. 감소된 억제의 역할 이외에도, 몇몇 다른 잠재적인 기전은 i) 뇌-유도된 세로토닌의 부재 하에 자발적으로 활성이 된 α-운동뉴런 5-HT_{2C} 수용체 활성의 점진적인 증가, 또는 ii) 운동뉴런 내 포타슘-클로라이드 공동-수송체 KCC2의 하향 조절 및 GABA-매개된 탈분극으로의 결과적인 전환을 포함하여, 척추외상 이후 경직의 발생의 원인이 된다는 것을 보여주었다. 공동으로, 이들 데이타는 척추 손상 (외상성 또는 허혈성) 이후 경직의 발생을 초래하는 기전이 복잡하고, 사용된 모델을 비롯하여 손상이 유도되었을 때 실험 동물의 연령에 의존적으로 가변적일 수 있다는 것을 의미한다.

[0009] 임상 약리학적-치료 실험들은 전신 또는 척추-투여된 바클로펜 ($GABA_B$ 수용체 효현제)의 사용이 가장 강력한 항-경직 약리학적 치료를 대표한다는 것을 보여준다. 척추외상, 근위축성 측색 경화증 또는 중추 졸중을 포함한 다양한 병인론의 경직을 조정하는데 효과적이지만, 주요 부작용 예컨대 전신 진정 및 점진적인 내성 발생은 종종 이의 만성적 사용을 제한한다. 전신-투여되는 GABA-모방체 화합물 예컨대 티아가빈 (GABA 재흡수 억제제)의 사용은 임상적으로 허용가능한 용량에서 항-경직 효과가 단지 약하거나 또는 전혀 없는 것으로 확인되었고, 이는 전신 전달 이후 뇌 또는 척추 실질 GABA 방출의 비교적 대단치 않은 강화작용과 상관있다. 또한, 현재 이용가능한 척추 약물 전달 시스템 (예컨대 경막외 또는 척추강내 전달)은 척추 분절-제한적인 치료적 효과를 허용하지 않는다. 개별 근육군에 영향을 미치는 경직의 기원은 특별한 척추 분절에 대해 체성감각적으로 맵핑될 수 있기 때문에, 분절-표적화 항-경직 치료의 개발은 원치않는 부작용을 감소시킴으로써 현행 치료적 접근법보다 분명한 장점을 나타내게 된다. 따라서, 신규한 항경직 치료에 대한 요구가 존재한다.

발명의 내용

[0010] 본 발명은 허혈-유도된 경직이 있는 래트에서 GAD65 (글루타메이트 디카복실라제: glutamate decarboxylase) 및 VGAT (소포성 GABA 수송체)의 척추 분절-특이적 상향조절로 구성된 병용 치료가 항경직 효과를 유발시키고, 그러한 병용 치료의 결과로 감소된 근육 경직이 초래된다는 관찰을 기반으로 한다.

[0011] 따라서, 본 발명은 대상체에서 경직을 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 GAD65 (글루타메이트 디카복실라제) 유전자 및 VGAT (소포성 GABA 수송체) 유전자의 상향조절 단계, 그리하여 대상체에서 경직을 치료하는 단계를 포함한다. GAD65 유전자 및 VGAT 유전자의 상향조절은 대상체에게 GAD65 및 VGAT를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터를 투여함으로써, GAD65 및 VGAT가 발현되고, 그리하여 경직이 감소하는 것에 의한 GAD65 유전자 및 VGAT 유전자의 척추-특이적 상향조절일 수 있다. GAD65 유전자 및 VGAT 유전자가 과발현될 수 있다. 벡터는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 또는 아데노-연합 벡터 (AAV)일 수 있다. AAV는 제9형 AAV (AAV9)일 수 있다. 다양한 구체예에서, 바이러스 벡터는 대상체의 척추 실질, 대상체의 척추강내 공간, 대상체의 척추 연막하 공간, 또는 대상체의 말초 경련성 근육으로 직접적으로 투여된다.

[0012] 다른 양상에서, 본 발명은 대상체에서 경직을 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 치료를 필요로 하는 대상체에게 GAD65 유전자 및 VGAT 유전자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터의 치료적 유효량을 투여하는 단계, 그리하여 대상체에서 경직을 치료하는 단계를 포함한다. 벡터는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 또는 아데노-연합 벡터 (AAV)일 수 있고, 대상체의 척추에 직접적으로 투여될 수 있다. AAV는 제9형 AAV (AAV9)일 수 있다. 다양한 구체예에서, 벡터는 대상체의 척추 실질, 대상체의 척추강내 공간, 대상체의 척추연막하 공간, 또는 대상체의 말초 경련성 근육에 직접적으로 투여된다.

[0013] 다른 양상에서, 본 발명은 척수 손상을 갖는 대상체를 치료하기 위한 치료 계획을 제공한다. 이 치료 계획은 GAD65 및 VGAT를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터를 투여하는 단계로서, 여기서 GAD65 및 VGAT가 발현되는 것인 단계, 그리하여 경직을 감소시키는 단계를 포함한다. GAD65 및 VGAT의 상향조절은 GAD65 및 VGAT를 코딩하는 바이러스 벡터를 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 GAD65 및 VGAT가 발현되어 경직을 감소시킨다. 벡터는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 또는 아데노-연합 벡터일 수 있고, 대상체의 척추 실질, 대상체의 척추강내 공간, 대상체의 척추연막하 공간, 또는 대상체의 말초 경련성 근육으로 직접적으로 투여될 수 있다. 다양한 구체예에서, 벡터는 대상체의 척추 실질, 대상체의 척추강내 공간, 대상체의 척추연막하 공간, 또는 대상체의 말초 경련성 근육으로 직접적으로 투여된다.

[0014] 다른 양상에서, 본 발명은 GAD65 및 VGAT를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 기능적으로 연결된 프로모터 또는 조절성 서열을 포함하는 발현 카세트를 제공한다. 또한 GAD65 및 VGAT를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 기능적으로 연결된 조절성 서열 예컨대 프로모터를 포함하는 벡터, 예컨대 AAV9를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명의 방법을 수행하기 위한 예시적인 방법론을 도시한 그림식 도표이다.

도 2는 요추 연막하 AAV9-UBI-GFP 전달 이후에 획득되는 이식유전자 발현의 분포를 도시한 그림식 도표이다. 회백질을 통한 중간뉴런 내 광범위 GFP 발현을 확인할 수 있다. GAD65 (글루타메이트-디카복실라제 65) 및 VGAT (소포성 GABA 수송체)를 코딩하는 AAV9 바이러스를 연막하 전달 방법을 사용하여 표적화된 분절에 주사하였다.

도 3A-3D는 만성 척추 횡절단-유도된 경련성 래트에서 요추 연막하 AAV9-UBI-GAD65+VGAT 전달 이후 강력한 항-경직 및 항-통각수용성 효과를 보여주는 그래프식 도표이다.

도 4A-4D는 요추 연막하 AAV9-UBI-GAD65 + VGAT 전달에 의한 척추의 흥분성 중간뉴런 내 혼합된 억제성-흥분성 신경전달물질 표현형의 유도를 도시하는 그림식 도표이다. 8주에 GAD65/VGAT 유전자-주사된 분절의 면역형광발광 분석은 양쪽 유전자의 유의한 상향조절 및 VGLUT2 (소포성 글루타메이트 수송체)와 혼합된 흥분성/억제성 신경전달물질 표현형 (GAD65 또는 VGAT의 공동발현)의 출현을 보여주었다 (도 4A 및 4B). 대조군 AAV9가 주사된 동물에서는 공동발현이 보이지 않았다 (도 4C 및 4D). 이들 데이타는 근육 경직의 감소를 아마도 매개하는 GAD65/VGAT 과발현 뉴런 내 억제성 구동의 효과적인 유도를 확증해 주었다.

도 5는 요추 연막하 AAV9-UBI-GAD65+VGAT 전달 이후에 경련성 래트에서 요추 척수 내 혼합된 억제성-흥분성 중간뉴런 및 돌출성 DRG 뉴런 수의 유의한 증가를 보여주는 그림식 도표이다. 표는 GAD65 및 VGAT 발현의 정량적 분석을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명은 허혈-유도된 경직을 갖는 래트에서 GAD65 (글루타메이트 디카복실라제) 유전자 및 VGAT (소포성 GABA 수송체) 유전자의 척추 분절-특이적 상향조절로 구성되는 병용 치료가 항경직 효과를 유발시키고, 그러한 병용 치료의 결과로서 감소된 근육 경직이 야기된다는 관찰을 기반으로 한다.

[0017] 본 조성물 및 방법을 설명하기 전에, 본 발명은 기술된 특정한 조성물, 방법, 및 실험 조건에 한정되지 않는데, 그러한 조성물, 방법, 및 조건이 가변적일 수 있기 때문이라는 것을 이해해야 한다. 또한 본 발명의 범주는 오직 첨부된 청구항으로만 한정하게 되므로, 본 명세서에서 사용되는 용어법은 단지 특정한 구체예를 설명하려는 목적이고, 한정하려는 의도가 아니라는 것을 이해해야 한다.

[0018] 본 명세서 및 첨부된 청구항에서 사용시, 단수형 "한", "하나", 및 "그"는 달리 내용에서 분명하게 지시하지 않으면 복수 참조를 포함한다. 따라서, 예를 들어, "그 방법"에 대한 참조는 본 개시내용 등을 읽을 때 당업자에게 자명하게 될 것인 본 명세서에 기술된 유형의 하나 이상의 방법들, 및/또는 단계들을 포함한다.

[0019] "포괄하는", "함유하는", 또는 "특징으로 하는"과 상호교환적으로 사용되는 용어 "포함하는"은 포괄적이거나 또는 제약이 없는 언어이고 추가적인 나열되지 않은 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다. 어구 "~로 이루어지는"은 청구항에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계, 또는 성분을 배제한다. 어구 "~로 본질적으로 이루어지는"은 명시된 재료 또는 단계 및 청구된 발명의 기본적이고 신규한 특징에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것들에 대해 청구의 범위를 한정한다. 본 개시 내용은 각각의 이들 어구의 범주에 상응하는 본 발명의 조성물 및 방법의 구체예를 고려한다. 따라서, 나열된 요소 또는 단계를 포함하는 조성물 또는 방법은 그 조성물 또는 방법이 그들 요소 또는 성분으로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어지는 특정한 구체예를 고려한다.

[0020] 달리 정의하지 않으면, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기술된 것과 유사하거나 또는 균등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료를 이제 기술한다.

[0021] 본 명세서에서 사용시 용어 "대상체"는 대상 방법이 수행되는 임의의 개체 또는 환자를 의미한다. 일반적으로, 대상체는 인간이지만, 당업자가 이해하게 되는 바와 같이, 대상체가 동물이어도 된다. 따라서, 포유동물 예컨대 설치류 (마우스, 래트, 햄스터 및 기니 피그 포함), 고양이, 개, 토끼, 소, 말, 염소, 양, 돼지 등을 포함한 농장 동물, 및 영장류 (원숭이, 침팬지, 오랑우탄 및 고릴라 포함)를 포함한 다른 동물이 대상체의 정의 내에 포함된다.

[0022] 본 명세서에서 사용시 "치료적 효과"는 본 명세서에서 기술하는 바와 같이 치료적 이득 및/또는 예방법적 이득을 포괄한다.

[0023] 본 명세서에서 사용시, 용어 "감소하다" 및 "억제하다"는 일부 경우에서 감소가 특정한 어세이의 검출 수준 이하로 감소될 수 있기 때문에 함께 사용된다. 그와 같이, 발현 수준 또는 활성이 어세이의 검출 수준 이하로 "감소되는"지 여부, 또는 완전하게 "억제되는"지 여부가 항상 명백하지 않을 수 있다. 그럼에도 불구하고, 본 방법에 따른 치료 이후에, 분명하게 결정가능하게 될 것이다.

[0024] 본 명세서에서 사용시, "치료" 또는 "치료하는"은 바람직하지 않은 병태를 갖는 대상체 또는 시스템에 조성물을 투여하는 것을 의미한다. 병태는 질환 또는 장애를 포함할 수 있다. "예방" 또는 "예방하는"은 그 병태에 대한 위험성이 있는 대상체 또는 시스템에 조성물을 투여하는 것을 의미한다. 병태는 질환 또는 장애에 대한 소인을 포함할 수 있다. 대상체에게 조성물의 투여의 효과 (치료 및/또는 예방)는 제한없이, 병태의 하나 이상의 증상의 중단, 병태의 하나 이상의 증상의 감소 또는 예방, 병태의 중증도의 감소, 병태의 완전한 제거, 특정한 사건 또는 특징의 발생 또는 진행의 안정화 또는 지연, 또는 특정한 사건 또는 특징이 일어날 수 있는 기회의 최소화일 수 있다.

[0025] 용어 "폴리펩티드", "펩티드", 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 의미하기 위해 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 이 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 천연 발생 아미노산의 인공적 화학 모방체인 아미노산 중합체를 비롯하여, 천연 발생 아미노산 중합체 및 비천연 발생 아미노산 중합체에 적용된다.

[0026] 용어 "아미노산"은 천연 발생 및 합성 아미노산을 비롯하여, 천연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 의미한다. 천연 발생 아미노산은 유전자 코드에 의해 코딩되는 것을 비롯하여, 이후에 변형된 아미노산, 예를 들어 히드록시프롤린, α-카복시글루타메이트, 및 O-포스포세린이다.

아미노산 유사체는 천연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조, 즉 수소, 카복실 기, 아미노 기, 및 R 기에 결합된 α 탄소를 갖는 화합물, 예를 들어, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 술폭시드, 메티오닌 메틸 술포늄을 의미한다. 이러한 유사체는 변형된 R 기 (예를 들어, 노르류신) 또는 변형된 펩티드 골격을 갖지만, 천연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 보유한다. 아미노산 모방체는 아미노산의 일반 화학 구조와 상이한 구조를 갖지만, 천연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 화학적 화합물을 의미한다.

[0027] 아미노산은 IUPAC-IUB 생화학 명명 위원회가 추천하는 그들의 통상적으로 공지된 3 글자 기호 또는 한 글자 기호로 본 명세서에서 언급될 수 있다. 유사하게, 뉴클레오티드도 그들의 통상적으로 허용되는 단일 글자 코드로 언급될 수 있다.

[0028] 본 명세서에서 사용시, "조절성 유전자" 또는 "조절성 서열"은 다른 유전자의 발현을 제어하는 생성물 (예를 들어, 전사 인자)을 코딩하는 핵산 서열이다.

[0029] 본 명세서에서 사용시, 특정한 단백질 또는 폴리펩티드를 코딩하는 서열 또는 "단백질 코딩 서열"은 적절한 조절 서열의 제어 하에 위치될 때 mRNA로 전사 (DNA의 경우)되고 시험관내 또는 생체내에서 폴리펩티드로 번역 (mRNA의 경우)되는 핵산 서열이다. 코딩 서열의 경계는 5' 말단 (N-말단)의 출발 코돈 및 3' 말단 (C-말단)의 번역 중지 넌센스 코돈에 의해 결정된다. 코딩 서열은 제한없이 진핵생물 mRNA 유래의 cDNA, 진핵생물 DNA 유래의 게놈 DNA 서열, 및 합성 핵산을 포함할 수 있다. 전사 종결 서열은 일반적으로 코딩 서열에 대해 3'에 위치될 것이다.

[0030] 본 명세서에서 사용시, "프로모터"는 RNA 중합효소가 DNA에 결합하도록 지정하고 RNA 합성을 개시함으로써 전사의 개시를 매개하는, 일반적으로 유전자의 상류에 위치되는 조절성 DNA 서열로서 정의된다. 프로모터는 항상적으로 활성인 프로모터 (즉, 항상적으로 활성/"온" 상태인 프로모터)일 수 있고, 유도성 프로모터 (즉, 그의 상태, 활성/"온" 또는 불활성/"오프"가 외부 자극, 예를 들어 특정한 화합물 또는 단백질의 존재에 의해 제어되는 프로모터)일 수 있고, 공간적으로 제한된 프로모터 (즉, 전사 제어 요소, 인핸서 등) (예를 들어, 조직 특이적 프로모터, 세포 유형 특이적 프로모터 등)일 수 있고, 일시적으로 제한된 프로모터 (즉, 프로모터가 배아 발생의 특별한 단계 동안 또는 생물학적 과정의 특별한 단계 동안 "온" 상태이거나 또는 "오프" 상태임)일 수도 있다.

[0031] 본 명세서에서 사용시, 용어 "유전자"는 구조적 유전자의 코딩 영역을 포함하는 데옥시리보뉴클레오티드 서열을 의미한다. "유전자"는 또한 유전자가 전체 길이 mRNA의 길이에 해당하도록 5' 및 3' 말단 둘 모두에서 코딩 영역에 인접해 위치된 비번역 서열을 포함할 수 있다. 코딩 영역의 5'에 위치하고 mRNA 상에 존재하는 서열은 5' 비번역 서열이라고 한다. 코딩 영역의 3' 또는 하류에 위치하고 mRNA 상에 존재하는 서열은 3' 비번역 서열이라고 한다. 용어 "유전자"는 유전자의 cDNA 및 게놈 형태 둘 모두를 포함한다. 유전자의 게놈 형태 또는 클론은 "인트론" 또는 "개재 영역" 또는 "개재 서열"이라고 하는 비코딩 서열로 차단된 코딩 영역을 함유한다. 인트론은 이종성 핵 RNA (hnRNA)로 전사되는 유전자의 분절이고, 인트론은 조절성 요소 예컨대 인핸서를 함유할 수 있다. 인트론은 핵 또는 1차 전사물로부터 제거되거나 또는 "스플라이싱 아웃"되며, 그러므로 인트론은 메신저 RNA (mRNA) 전사물에는 부재한다. mRNA는 발생기 폴리펩티드에서 아미노산의 순서 또는 서열을 지정하도록 번역 동안에 기능한다.

[0032] 본 명세서에서 사용시, 용어 "기능적으로 연결된" 및 "작동적으로 연결된"은 상호교환적으로 사용되고 둘 이상의 DNA 분절, 특히 발현시키려는 유전자 서열과 그들 발현을 제어하는 서열 간에 기능적인 관련성을 의미한다. 예를 들어, 시스-작용성 전사 제어 요소의 임의 조합을 포함하여, 프로모터/인핸서 서열은 적절한 숙주 세포 또는 다른 발현 시스템에서 코딩 서열의 전사를 자극하거나 또는 조정하게 되면 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 전사된 유전자 서열에 작동적으로 연결된 프로모터 조절 서열은 전사되는 서열과 물리적으로 인접한다.

[0033] "보존적으로 변형된 변이체"는 아미노산 및 핵산 서열 둘 모두에 적용된다. 특정한 핵산 서열과 관련하여, 보존적으로 변형된 변이체는 동일하거나 또는 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산, 또는 핵산이 아미노산 서열을 코딩하지 않는 경우에, 본질적으로 동일한 서열을 의미한다. 유전자 코드의 축퇴성 때문에, 대량의 기능적으로 동일한 핵산은 임의의 소정 단백질을 코딩한다. 예를 들어, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU 모두는 아미노산 알라닌을 코딩한다. 따라서, 코돈에 의해 알라닌이 지정되는 모든 위치에서, 코돈은 코딩되는 폴리펩티드를 변경시키지 않고 기술된 임의의 상응하는 코돈으로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이는 "침묵 변이"이며, 보존적으로 변형된 변이의 한 종이다. 폴리펩티드를 코딩하는 본 명세서의 모든 핵산 서열은 또한 핵산의 모든 가능한 침묵 변이를 기술한다. 당업자는 핵산의 각 코돈 (통상적으로 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG, 및 통상적으로 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG는 제외)은 기능적으로 동일한

분자를 산출하도록 변형될 수 있다는 것을 인식하게 될 것이다. 따라서, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 각각의 침묵 변이는 각각의 기술된 서열에 내포된다.

[0034] 아미노산 서열과 관련하여, 당업자는 코딩되는 서열에서 단일 아미노산 또는 적은 비율의 아미노산을 변경하거나, 첨가하거나 또는 결실시키는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질 서열에 대한 개별 치환, 결실 또는 첨가가 그 변경의 결과로서 아미노산을 화학적으로 유사한 아미노산으로 치환시키게 되는 경우에 "보존적으로 변형된 변이체"라는 것을 인식하게 될 것이다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존성 치환 표는 당분야에 잘 알려져 있다. 이러한 보존적으로 변형된 변이체는 그외에도 본 발명의 다형성 변이체, 종간 상동체, 및 대립유전자를 배제하지 않는다.

[0035] 다음의 8개 그룹 각각은 서로에 대한 보존성 치환인 아미노산을 함유한다:

[0036] 1) 알라닌 (A), 글리신 (G);

[0037] 2) 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E);

[0038] 3) 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q);

[0039] 4) 아르기닌 (R), 리신 (K);

[0040] 5) 이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V);

[0041] 6) 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W);

[0042] 7) 세린 (S), 트레오닌 (T); 및

[0043] 8) 시스테인 (C), 메티오닌 (M) (예를 들어, 문헌 [Creighton, Proteins (1984)] 참조).

[0044] 보존성 치환은 염기성을 염기성으로, 산성을 산성으로, 극성을 극성으로의 치환 등을 포함할 수 있다. 이렇게 유래된 아미노산 세트는 구조적 이유 때문에 아마도 보존되는 듯 하다. 이들 세트는 벤 다이어그램의 형태로 설명될 수 있다 (Livingstone C. D. and Barton G. J. (1993) "Protein Sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation" Comput. Appl Biosci. 9: 745-756; Taylor W. R. (1986) "The classification of amino acid conservation" J. Theor. Biol. 119; 205-218). 보존성 치환은 예를 들어 아미노산의 일반적으로 허용되는 벤 다이어그램 그룹화를 설명하는 하기 표에 따라서 이루어질 수 있다.

[0045] 표 1: 아미노산의 그룹화

특징	세트	특징	서브세트
소수성	F W Y H K M I L V A G C	방향족 지방족	F W Y H I L V
극성	W Y H K R E D C S T N Q	양으로 하전	H K R E D H K R
		음으로 하전	E D
소형	V C A G S P T N D	초소형	A G S

[0046]

[0047] "서열 동일성 백분율"은 비교창 상에서 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하여 결정되며, 여기서 비교창 내 폴리뉴클레오티드 서열의 일부분은 2개 서열의 최적 정렬을 위해서, 첨가 또는 결실을 포함하지 않는 기준 서열 (예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드)과 비교시 첨가 또는 결실 (즉, 갭)을 포함할 수 있다. 백분율은 양쪽 서열에서 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 존재하는 위치의 개수를 결정하여 일치되는 위치의 개수를 산출하고, 일치되는 위치의 개수를 비교창 내 전체 위치 개수로 나누고 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성 백분율을 산출하여 계산된다.

[0048] 둘 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열과 관련하여 용어 "동일한" 또는 "동일성" 백분율은 동일 서열인 둘 이상의 서열 또는 하위서열을 의미한다. 2개 서열이 하기의 서열 비교 알고리즘 중 하나 이상을 사용하거나 또는 수동 정렬 및 육안 검사에 의해 측정시 지정된 영역 또는 비교창 상에서 최대 대응성에 대해 비교되고 정렬되는 경우에, 동일한 (즉, 명시된 영역에서, 또는 명시되지 않을 경우, 전체 서열에서 60% 동일성, 임의로 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 동일성) 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 명시된 백분율을 가지면 2개 서열은 "실질적으로 동일"하다. 본 발명은 개별적으로 본 명세서에 예시된 폴리펩티드와 실질적으로 동일한

폴리펩티드를 비롯하여, 제한없이 신경학적 질환 또는 장애, 예를 들어 신경퇴행성 질환 또는 장애의 치료 또는 예방, 및/또는 SCI의 치료를 위한 용도를 포함한 이의 용도를 제공한다. 임의로, 동일성은 적어도 약 50개 뉴클레오티드 길이의 영역, 또는 보다 바람직하게 100 내지 500개 또는 1000개 또는 그 이상의 뉴클레오티드 길이, 또는 기준 서열의 전체 길이인 영역 상에 존재한다.

[0049] 서열 비교를 위해서, 전형적으로 하나의 서열은 기준 서열로서 작용하고, 그에 대해 시험 서열을 비교한다. 서열 비교 알고리즘을 사용하는 경우에, 시험 및 기준 서열은 컴퓨터에 입력되고, 하위 서열 좌표가 지정되며, 필요하다면, 서열 알고리즘 프로그램 변수가 지정된다. 디폴트 프로그램 변수가 사용될 수 있거나, 또는 대안적인 변수가 지정될 수 있다. 그러면 서열 비교 알고리즘은 프로그램 변수를 기반으로, 기준 서열에 대한 시험 서열의 서열 동일성 백분율을 계산한다.

[0050] 본 명세서에서 사용시 "비교창"은 2개 서열을 최적으로 정렬한 이후에 서열을 동일 개수의 인접한 위치의 기준 서열과 비교할 수 있는 20 내지 600개, 일반적으로 약 50 내지 약 200개, 보다 일반적으로 약 100 내지 약 150개로 이루어진 군으로부터 선택되는 인접한 위치의 개수 중 어느 하나의 분절에 대한 기준을 포함한다. 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 당분야에서 잘 알려져 있다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은 예를 들어 문헌 [Smith and Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c]의 국소 상동성 알고리즘에 의해서, 문헌 [Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443]의 상동성 정렬 알고리즘에 의해서, 문헌 [Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444]의 유사성 검색 방법에 의해서, 이들 알고리즘의 컴퓨터 실행 ([Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.]되는 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA)에 의해서, 또한 수동 정렬 및 육안 검사 (예를 들어, 문헌 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995 supplement)] 참조)에 의해서 수행될 수 있다.

[0051] 서열 동일성 및 서열 유사성 백분율을 결정하는데 적합한 알고리즘의 2가지 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘으로서, 각각 문헌 [Altschul et al. (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402], 및 [Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410]에 기술되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 미국 국립 생물공학 정보 센터를 통해 공개적으로 입수가능하다. 이 알고리즘은 데이타베이스 서열 내 동일한 길이의 단어와 정렬시 일부 양성값 역치 점수 T를 만족하거나 또는 그와 일치하는, 문의 서열 내 짧은 단어 길이 W를 식별하여 먼저 높은 점수의 서열쌍 (HSP)을 동정하는 것을 포함한다. T는 이웃 단어 점수 역치라고 한다 (Altschul et al., 상동). 이들 초기 이웃 단어 히트는 그들을 함유하는 보다 긴 HSP를 탐색하도록 검색을 개시하기 위한 씨드로서 작용한다. 단어 히트는 누적 정렬 점수를 증가시킬 수 있을 만큼 멀리 각 서열을 따라서 양쪽 방향으로 확장된다. 누적 점수는 뉴클레오티드 서열에 대해서, 변수 M (일치하는 잔기의 쌍에 대한 보상 점수; 항상 > 0) 및 N (불일치하는 잔기에 대한 패널티 점수; 항상 < 0)을 사용하여 계산된다. 아미노산 서열의 경우, 점수화 매트릭스를 사용하여 누적 점수를 계산한다. 각 방향에서 단어 히트의 연장은 누적 정렬 점수가 이의 최대 획득 값으로부터 X 분량만큼 떨어질 때, 하나 이상의 음성-점수 잔기 정렬의 축적으로 인해 누적 점수가 0 또는 그 이하가 될때, 또는 어느 하나의 서열의 말단에 도착할 때 중단된다. BLAST 알고리즘 변수 W, T, 및 X는 정렬의 속도 및 감도를 결정한다. BLASTN 프로그램 (뉴클레오티드 서열의 경우)은 디폴트로서 11의 단어길이 (W), 10의 기대값 (E), M=5, N=-4 및 양쪽 가닥의 비교를 사용한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 3의 단어길이, 및 10의 기대값 (E), 및 50의 BLOSUM62 점수 매트릭스 (문헌 [Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915] 참조) 정렬 (B), 10의 기대값 (E), M=5, N=-4, 및 양쪽 가닥의 비교를 사용한다.

[0052] BLAST 알고리즘은 또한 2개 서열 간 유사성의 통계적 분석을 수행한다 (예를 들어, 문헌 [Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787]을 참조함). BLAST 알고리즘에 의해 제공되는 유사성의 한 척도는 최소 총합 확률 (P(N))로서, 2개 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 간 일치가 우연히 발생되는 확률의 지표를 제공한다. 예를 들어, 핵산은 기준 핵산에 대한 시험 핵산의 비교에서 최소 총합 확률이 약 0.2 미만, 보다 바람직하게 약 0.01 미만, 가장 바람직하게 약 0.001 미만이면 기준 서열과 유사한 것으로 간주된다.

[0053] "핵산"은 단일 가닥 형태 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 및 이의 중합체 및 이의 상보체를 의미한다. 이 용어는 기준 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고, 기준 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 합성, 천연 발생 및 비천연 발생인 기지의 뉴클레오티드 유사체 또는 변형된 골격 잔기 또는 연결을 함유하는 핵산을 포괄한다. 이러한 유사체의 예에는 제한없이, 포스포로티오에이트, 포스포르아미데이트, 메틸 포스포네이트, 키랄-메틸 포스포네이트, 2-O-메틸 리보뉴클레오티드, 펩티드-핵산 (PNA)을 포함한다. 다양한 구체예에서, 핵산은 알칼리/SDS 처리, CsCl 밴딩, 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기

영동 및 당분야에 잘 알려진 다른 것들을 포함하는 표준 기술에 의해 다른 세포 성분들 또는 다른 오염물 (예를 들어, 세포에 존재하는 다른 핵산 또는 단백질)로부터 정제될 때 단리된다. 예를 들어, 문헌 [F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York]을 참조한다. 다양한 구체예에서, 핵산은 예를 들어 DNA 또는 RNA이고, 인트론 서열을 함유할 수 있거나 또는 함유하지 않을 수 있다. 바람직한 구체예에서, 핵산은 cDNA 분자이다.

[0054] 본 명세서에서 사용시 "약학적으로 허용되는 담체"는 임의의 표준 약학 담체, 예컨대 포스페이트 완충 염수 용액, 물 및 에멀션 예컨대 오일/물 또는 물/오일 에멀션, 다양한 유형의 습윤제를 포괄한다.

[0055] 본 명세서에서 사용시, 용어 "뉴런"은 뉴런 및 이의 일부분 또는 일부분들 (예를 들어, 뉴런 세포 몸체, 축삭돌기, 또는 수상돌기)을 포함한다. 본 명세서에서 사용시 용어 "뉴런"은 중심 세포체 또는 소마를 포함하는 신경계 세포, 및 2가지 유형의 연장부 또는 돌출부로서, 일반적으로 대부분의 뉴런 신호를 세포체로 수송하는 수상돌기, 및 일반적으로 대부분의 뉴런 신호를 세포체로부터 이펙터 세포, 예컨대 표적 뉴런 또는 근육에 수송하는 축삭돌기를 의미한다. 뉴런은 정보를 조직 및 장기로부터 중추 신경계 (구심성 또는 감각 뉴런)으로 수송할 수 있고 신호를 중추 신경계로부터 이펙터 세포 (원심성 또는 운동 뉴런)으로 전달할 수 있다. 중간 뉴런이라고 명명된 다른 뉴런은 중추 신경계 (뇌 및 척추) 내에서 뉴런을 연결한다. 본 발명에 따른 치료 또는 방법이 수행될 수 있는 뉴런 유형의 일부 특별한 예는 소뇌 과립 뉴런, 후근 신경절 뉴런, 및 대뇌피질 뉴런을 포함한다.

[0056] 용어 "신경 퇴행"은 광범위하게 사용되고 제한없이, 뉴런 세포의 사멸 또는 상실, 세포 사멸에 선행되는 임의의 변화, 및 신경 세포의 활성 또는 기능의 임의 감소 또는 상실을 포함하는, 뉴런 세포에서의 임의의 병리학적 변화를 의미한다. 병리학적 변화는 자발적일 수 있거나 또는 임의의 사건에 의해 유도될 수 있고 예를 들어, 아폽토시스와 연관된 병리학적 변화를 포함할 수 있다. 뉴런은 제한없이 감각, 교감, 부교감, 또는 장을 포함한 임의 뉴런, 예를 들어, 후근 신경절 뉴런, 운동 뉴런, 및 중추 뉴런, 예를 들어 척수 유래 뉴런일 수 있다. 뉴런 퇴행 또는 세포 상실은 다양한 신경학적 질환 또는 장애, 예를 들어 신경퇴행성 질환 또는 장애의 특징이다. 일부 구체예에서, 뉴런은 감각 뉴런이다. 일부 구체예에서, 뉴런은 운동 뉴런이다. 일부 구체예에서, 뉴런은 손상된 척수 뉴런이다.

[0057] 본 명세서에서 사용시, "경직"은 일정 근육이 연속적으로 수축하는 병태를 의미한다. 이러한 수축은 근육의 뻣뻣함 또는 긴장을 야기하고 정상적인 움직임, 말하기, 및 걸음걸이를 방해할 수 있다. 경직은 대개는 병변의 형태로 상위 운동 뉴런에 영향을 미치는 중추 신경계 (CNS)의 장애, 예컨대 경직성 양하지마비, 또는 상위 운동 뉴런 증후군에서 일어나고, 또한 다양한 유형의 다발성 경화증에서 존재할 수 있는데, 여기서는 미엘린 수초에 대한 점진적으로-악화된 공격의 증상으로서 발생되고, 따라서 신경근육 뇌성마비 근원의 경직 장애에서 존재하는 유형의 경직과는 무관하다. 이론에 국한되지 않지만, 경직은 척수 및/또는 중추 신경계에 대한 손상에 의해 야기되는 α 운동 뉴런에 대한 흥분성 및 억제성 입력에서 불균형이 일어날 때 발생된다. 손상은 신경계와 근육 간 신호의 균형에 변화를 야기시켜서, 근육에서 증가된 흥분성을 초래하게 된다. 경직은 뇌 및/또는 척수가 손상되거나 또는 정상적으로 발생되는데 실패한 병태에서 확인되고, 이들에는 뇌성마비, 다발성 경화증, 척수 손상, 및 졸중을 포함한 후천성 뇌손상이 포함된다.

[0058] 본 명세서에서 사용시, "신경퇴행성 장애" 또는 "신경학적 장애"는 신경 세포 또는 신경 세포 개체군의 형태학적 및/또는 기능적 비정상성을 야기하는 장애를 의미한다. 신경퇴행성 장애는 그 결과로서 대상체에서 비정상적인 신경학적 기능의 존재 또는 정상적인 신경학적 기능의 부재 또는 손상을 일으킬 수 있다. 예를 들어, 신경퇴행성 장애는 질환, 손상, 및/또는 노화의 결과일 수 있다. 형태학적 및 기능적 비이상성의 비제한적인 예는 신경 세포의 물리적 악화 및/또는 사멸, 신경 세포의 비정상적인 성장 패턴, 신경 세포 간 물리적 연결의 비정상성, 신경 세포에 의한 물질 또는 물질들, 예를 들어 신경전달물질의 과소 또는 과대 생산, 신경 세포의 정상적으로 생성되는 물질 또는 물질들의 생산 실패, 및/또는 비정상적인 패턴 또는 비정상적인 횟수의 물질, 예를 들어 신경전달물질의 생산, 및/또는 전기 임펄스의 전달을 포함한다. 신경퇴행은 대상체의 뇌의 임의 영역에서 발생할 수 있고 예를 들어, 두부 외상, 졸중, ALS, 다발성 경화증, 헌팅톤 질환, 파킨슨 질환 및 알츠하이머 질환을 포함하는 많은 장애와 함께 확인된다.

[0059] 본 명세서에서 사용시, 용어 "통각"은 어떠한 유해하거나 또는 잠재적으로 유해한 자극에 대한 감각 신경계의 반응을 의미한다. 통각에서, 통각수용기라고 불리는 자극 신경 세포의 강렬한 화학물 (예를 들어, 안구 내 칠리 분말), 기계적 (예를 들어, 절단, 파쇄), 또는 열적 (고온 및 저온) 자극은 척수를 통해서 뇌로 신경 섬유의 사슬을 따라 이동하는 신호를 생성시킨다. 통각은 다양한 생리학적 및 행동 반응을 촉발하고 일반적으로

지각있는 존재에서 통증의 주관적 경험을 일으킨다.

[0060] 감마-아미노부티르산 (GABA) 및 글루타메이트는 포유동물에서 주요한 억제성 및 흥분성 신경전달물질이다. GABA 및 글루타메이트 간 균형은 다양한 과정 예컨대 신경발생, 운동, 체내 시계, 조직 발생 및 혈당 조절을 제어한다. GABA는 피리독살 포스페이트 (PLP) 의존적 효소 글루탐산 디카복실라제의 65 kDa 및 67 kDa 이소폼 (GAD65 및 GAD67)에 의해 글루타메이트로부터 합성된다. 인간 GAD65 및 GAD67은 Bu 등 ((1992) Proc Natl Acad Sci 89:2115-2119)이 단리하여 클로닝하였다. 인간 GAD65 cDNA는 585개 아미노산 잔기를 갖는 Mr 65,000의 폴리펩티드 (유전자은행 등록 번호 NM000818; M81882)를 코딩하고, 인간 GAD67은 594개 아미노산 잔기를 갖는 Mr 67,000의 폴리펩티드 (유전자은행 등록 번호 NM013445; M81883)를 코딩하며, 이들 각각은 참조로 본 명세서에 편입된다. 또한, 참조로 본 명세서에 편입되는 미국 공개 특허 출원 제2016/0081956호를 참조한다.

[0061] 인간 GAD65에 대한 추가의 핵산 및 아미노산 서열은 당분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 아미노산 서열 (서열번호 3)을 제공하는, 유전자은행 등록 번호: Q05329, 인간 글루타메이트 디카복실라제 2 (GAD2/GAD65)를 참조한다:

```
        10         20         30         40         50
MASPGSGFWS FGSEDGSGDS ENPGTARAWC QVAQKFTGGI GNKLCALLYG
        60         70         80         90        100
DAEKPAESGG SQPPRAAARK AACACDQKPC SCSKVDVNYA FLHATDLLPA
       110        120        130        140        150
CDGERPTLAF LQDVMNILLQ YVVKSFDRST KVIDFHYPNE LLQEYNWELA
       160        170        180        190        200
DQPQNLEEIL MHCQTTLKYA IKTGHPRYFN QLSTGLDMVG LAADWLTSTA
       210        220        230        240        250
NTNMFTYEIA PVFVLLEYVT LKKMREIIGW PGGSGDGIFS PGGAISNMYA
       260        270        280        290        300
MMIARFKMFP EVKEKGMAAL PRLIAFTSEH SHFSLKKGAA ALGIGTDSVI
       310        320        330        340        350
LIKCDERGKM IPSDLERRIL EAKQKGFVPF LVSATAGTTV YGAFDPLLAV
       360        370        380        390        400
ADICKKYKIW MHVDAAWGG LMMSRKHKWK LSGVERANSV TWNPHKMMGV
       410        420        430        440        450
PLQCSALLVR EEGLMQNCNQ MHASYLFQQD KHYDLSYDTG DKALQCGRHV
       460        470        480        490        500
DVFKLWLMWK ARGTTGFEAH VDKCLELAEY LYNIIKNREG YEMVFDGKPQ
       510        520        530        540        550
HTNVCFWYIP PSLRTLEDNE ERMSRLSKVA PVIKARMMEY GTTMVSYQPL
       560        570        580
GDKVNFFRMV ISNPAATHQD IDFLIEEIER LGQDL
```

[0062]

[0063] 또한, 예를 들어, 핵산 서열 (서열번호 2)을 제공하는, 유전자은행 등록 번호: X69936, 글루타메이트 디카복실라제 (GAD2/GAD65)에 대한 호모 사피언스 mRNA를 참조한다:

```
   1 atgtccccta tacatcacca tcaccatcac ctggttccgc gtggatccga agctttgaat
  61 tctggctttt ggtctttcgg gtcggaagat ggctctgggg attccgagaa tcccggcaca
 121 gcgcgagcct ggtgccaagt ggctcagaag ttcacgggcg gcatcggaaa caaactgtgc
 181 gccctgctct acggagacgc cgagaagccg gcggagagcg gcgggagcca accccgcgg
 241 gccgccgccc ggaaggccgc ctgcgcctgc gaccagaagc cctgcagctg ctccaaagtg
 301 gatgtcaact acgcgtttct ccatgcaaca gacctgctgc cggcgtgtga tggagaaagg
 361 cccactttgg cgtttctgca agatgttatg aacattttac ttcagtatgt ggtgaaaagt
 421 ttcgatagat caaccaaagt gattgatttc cattatccta atgagcttct ccaagaatat
 481 aattgggaat tggcagacca accacaaaat ttggaggaaa ttttgatgca ttgccaaaca
 541 actctaaaat atgcaattaa aacagggcat cctagatact tcaatcaact ttctactggt
 601 ttggatatgg ttggattagc agcagactgg ctgacatcaa cagcaaatac taacatgttc
 661 acctatgaaa ttgctccagt atttgtgctt ttggaatatg tcacactaaa gaaaatgaga
 721 gaaatcattg gctggccagg gggctctggc gatgggatat tttctcccgg tggcgccata
 781 tctaacatgt atgccatgat gatcgcacgc tttaagatgt tcccagaagt caaggagaaa
 841 ggaatggctg ctcttcccag gctcattgcc ttcacgtctg aacatagtca ttttctctc
 901 aagaagggag ctgcagcctt agggattgga acagacagcg tgattctgat taaatgtgat
 961 gagagaggga aaatgattcc atctgatctt gaaagaagga ttcttgaagc caaacagaaa
1021 gggtttgttc ctttcctcgt gagtgccaca gctggaacca ccgtgtacgg agcatttgac
1081 cccctcttag ctgtcgctga catttgcaaa aagtatgaga tctggatgca tgtggatgca
1141 gcttgggggtg ggggattact gatgtcccga aaacacaagt ggaaactgag tggcgtggag
1201 agggccaact ctgtgacgtg gaatccacac aagatgatgg gagtcccttt gcagtgctct
1261 gctctcctgg ttagagaaga gggattgatg cagaattgca accaaatgca tgcctcctac
1321 ctctttcagc aagataaaca ttatgacctg tcctatgaca ctggagacaa ggccttacag
1381 tgcggacgcc acgttgatgt ttttaaacta tggctgatgt ggagggcaaa ggggactacc
1441 gggtttgaag cgcatgttga taaatgtttg gagttggcag agtatttata caacatcata
1501 aaaaaccgag aaggatatga gatggtgttt gatgggaagc ctcagcacac aaatgtctgc
1561 ttctggtaca ttcctccaag cttgcgtact ctggaagaca atgaagagag aatgagtcgc
1621 ctctcgaagg tggctccagt gattaaagcc agaatgatgg agtatggaac cacaatggtc
1681 agctaccaac ccttgggaga caaggtcaat ttcttccgca tggtcatctc aaacccagcg
1741 gcaactcacc aagacattga cttcctgatt gaagaaatag aacgccttgg acaagattta
1801 taa
```

[0064]

[0065] GABA는 시냅스이전 및 시냅스이후 뉴런 프로세스 둘 모두의 형질막에서 특이적 경막 수용체에 결합하여 뇌에서 억제성 시냅스에서 작용한다. 이러한 결합은 음으로 하전된 클로라이드 이온의 세포로의 흐름 또는 양으로 하전된 포타슘 이온의 세포 밖으로의 흐름을 가능하게 하도록 이온 채널의 개방을 야기한다. 이러한 작용은 그 결과로 경막 전위에서 음성적 변화를 일으키고, 일반적으로 과분극을 야기시킨다. 2가지 일반적인 부류의 GABA 수용체가 알려져 있는데, 수용체가 리간드-게이팅 이온 채널 복합체의 일부분인 $GABA_A$, 및 중간체 (G 단백질)를 통해서 이온 채널을 닫거나 또는 여는 G 단백질-커플링된 수용체인 $GABA_B$ 대사성 수용체이다.

[0066] 척추 손상 이후 GABA-매개된 시냅스이전 억제의 상실은 척추 반사의 점진적인 증가 및 경직의 출현에서 핵심 역할을 한다. 임상적 실험들은 바클로펜 ($GABA_B$ 수용체 효현제)의 사용이, 경직을 조정하는데 효과적이지만, 주요한 부작용 예컨대 전신 진정 및 점진적인 내성 발생과 연관되어 있음을 보여준다. 본 실험은 GAD65 (글루타메이트 디카복실라제) 유전자 및 VGAT (소포성 GABA 수송체) 유전자의 척추 분절-특이적 상향조절로 구성된 병용 요법이 항경직 효과를 유발시킬 수 있는지 여부에 관한 평가를 제공한다.

[0067] VGAT (소포성 GABA 수송체) (소포성 억제성 아미노산 수송체 (VIAAT)로서도 알려짐)는 인간에서 SLC32A1 유전자 (VGAT 유전자로도 알려짐)에 의해 코딩되는 단백질이다. VGAT는 뇌 및 척수 내 GABA성 뉴런의 신경 말단에 고도로 농축되어 있을 뿐만 아니라 또한 글리신성 신경 말단에도 고도로 농축되어 있다. 문헌 [Caudhry, et al., J. Neurosci., 18(23):9733-9750 (1998)]을 본 명세서에서 참조로 편입시킨다. 인간 VGAT에 대한 핵산 및 아미노산 서열은 당분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 아미노산 서열 (서열번호 3)을 제공하는, 유전자은행 등록 번호: Q9H598, 인간 소포성 억제성 아미노산 수송체 (VIAAT/VGAT)를 참조한다:

```
        10         20         30         40         50
MATLLRSKLS NVATSVSNKS QAKMSGMFAR MGFQAATDEE AVGFAHCDDL
        60         70         80         90        100
DFEHRQGLQM DILKAEGEPC GDEGAEAPVE GDIHYQRGSG APLPPSGSKD
       110        120        130        140        150
QVGGGGEFGG HDKPKITAWE AGWNVTNAIQ GMFVLGLPYA ILHGGYLGLF
       160        170        180        190        200
LIIFAAVVCC YTGKILIACL YEENEDGEVV RVRDSYVAIA NACCAPRFPT
       210        220        230        240        250
LGGRVVNVAQ IIELVMTCIL YVVVSGNLMY NSFPGLPVSQ KSWSIIATAV
       260        270        280        290        300
LLPCAFLKNL KAVSKFSLLC TLAHFVINIL VIAYCLSRAR DWAWEKVKFY
       310        320        330        340        350
IDVKKFPISI GIIVFSYTSQ IFLPSLEGNM QQPSEFHCMM NWTHIAACVL
       360        370        380        390        400
KGLFALVAYL TWADETKEVI TDNLPGSIRA VVNIFLVAKA LLSYPLPFFA
       410        420        430        440        450
AVEVLEKSLF QEGSRAFFPA CYSGDGRLKS WGLTLRCALV VFTLLMAIYV
       460        470        480        490        500
PHFALLMGLT GSLTGAGLCF LLPSLFHLRL LWRKLLWHQV FFDVAIFVIG
       510        520
GICSVSGFVH SLEGLIEAYR TNAED
```

[0068]

[0069] 또한, 예를 들어 핵산 서열 (서열번호 4)을 제공하는, 유전자은행 등록 번호: NM_080552, 호모 사피엔스 용질 캐리어 패밀리 32 구성원 1 (SLC32A1), mRNA를 참조한다:

```
   1 gctcgcgccc cgcggcagct ccgcagtgca ctagccacca ccgccgccgc cgccgctccg
  61 ccagacctgc tgccagcttg cccggtccag ccctgagaga gcctcgaacg ccagctgcga
 121 gggtcatgag ccagagagcc ccggggcgcc gcgcggagag caagcggaga tagcgacttt
 181 gcgcccccca gccctcgcct tcttgcatcg cgttccccgc atcctcgggt ccttctgtcc
 241 tttccgctgt ccccaccgcc gccatggcca ccttgctccg cagcaagctg tccaacgtgg
 301 ccacgtccgt gtccaacaag tcccaggcca agatgagcgg catgttcgcc aggatgggtt
 361 ttcaggcggc cacggatgag gaggcggtgg gcttcgcgca ttgcgacgac ctcgactttg
 421 agcaccgcca gggcctgcag atggacatcc tgaaagccga gggagagccc tgcggggacg
 481 agggcgctga agcgcccgtc gagggagaca tccattatca gcgaggcagc ggagctcctc
 541 tgccgccctc cggctccaag gaccaggtgg gaggtggtgg cgaattcggg ggccacgaca
 601 agcccaaaat cacggcgtgg gaggcaggct ggaacgtgac caacgccatc cagggcatgt
 661 tcgtgctggg cctaccctac gccatcctgc acggcggcta cctggggttg tttctcatca
 721 tcttcgccgc cgttgtgtgc tgctacaccg gcaagatcct catcgcgtgc ctgtacgagg
 781 agaatgaaga cggcgaggtg gtgcgcgtgc gggactcgta cgtggccata gccaacgcct
 841 gctgcgcccc gcgcttccca acgctgggcg gccgagtggt gaacgtagcg cagatcatcg
 901 agctggtgat gacgtgcatc ctgtacgtgg tggtgagtgg caacctcatg tacaacagct
 961 tcccggggct gcccgtgtcg cagaagtcct ggtccattat cgccacggcc gtgctgctgc
1021 cttgcgcctt ccttaagaac ctcaaggccg tgtccaagtt cagtctgctg tgcactctgg
1081 cccacttcgt catcaatatc ctggtcatag cctactgtct atcgcgggcg cgcgactggg
1141 cctgggagaa ggtcaagttc tacatcgacg tcaagaagtt ccccatctcc attggcatca
1201 tcgtgttcag ctacacgtct cagatcttcc tgccttcgct ggagggcaat atgcagcagc
1261 ccagcgagtt ccactgcatg atgaactgga cgcacatcgc agcctgcgtg ctcaagggcc
1321 tcttcgcgct cgtcgcctac ctcacctggg ccgacgagac caaggaggtc atcacggata
1381 acctgcccgg ctccatccgc gccgtggtca acatcttcct ggtggccaag gcgctgttgt
1441 cctatcccct gccattcttt gccgctgtcg aggtgctgga gaagtcgctc ttccaggaag
1501 gcagccgcgc ctttttcccg gcctgctaca gcggcgacgg gcgcctgaag tcctgggggc
1561 tgacgctgcg ctgcgcgctc gtcgtcttca cgctgctcat ggccatttat gtgccgcact
1621 tcgcgctgct catgggcctc acgggcagcc tcacgggcgc cggcctctgt ttcttgctgc
1681 ccagcctctt tcacctgcgc ctgctctggc gcaagctgct gtggcaccaa gtcttcttcg
1741 acgtcgccat cttcgtcatc ggcggcatct gcagcgtgtc cggcttcgtg cactccctcg
1801 agggcctcat cgaagcctac cgaaccaacg cggaggacta gggcgcaagg gcgagccccc
1861 gccgcgcttc tgcgctctct cccttctccc ctcaccccgc ccccaccagc ccagtgcgcc
1921 ctgccgccgc gcttgggagg ccaagcttta aacatctctg gttcctagtt tctgattatt
1981 cggggatggg ggggatggga ggggacaggg attcacgatc catcgcgtct gcgtttctgt
2041 tgtcctttct tttccacaac accctggttt tggggggagg cggggtgcat ttgcgggcag
2101 ggttctctgt ccttccaagt ggggccccga cactttggtt ccagtcatcg agggggttgg
2161 gaagggaggg agagggggcg cagctcgcag gcgtggcaac ttgaccttgg gggaatattt
2221 cacatccatc cagagctcgg aatctacagc gtccagccat ttccagcaag agcgcttccc
2281 attccggaga cgtttcaacc ctgcagcggg aaaggctgac tgggaaatcc attttgggtg
2341 ggcaatttcc ttcaacgaag ccggaaggcg agaagccgcg gcggggccag cttgcctgcc
2401 ggttttcagg aatctaaact ctcatcttgt gcaatttatc aggtgtggaa ctgttctact
2461 gtgcgtgtgg tgtgctcgtg gtgaataaga tgaaatgtat atcagaaaaa aatctatctc
2521 taatttagag tgcggtacat aattatatcc gcaaataaag aagagacaaa ggctaaaaaa
2581 a
```

[0070]

[0071] 따라서, 일 양상에서, 본 발명은 GAD65 및 VGAT를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 본 발명의 범주에는 또한 GAD65에 대해 적어도 60% 상동성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드 또는 이의 기능성 단편이 속한다. GAD65에 대해 약 70% 상동성, 약 75% 상동성, 약 80% 상동성, 약 85% 상동성, 약 90% 상동성, 약 95% 상동성, 약 99% 상동성의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드 또는 이의 단편. 본 발명의 범주 내에는 또한 VGAT에 대해 적어도 60% 상동성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드 또는 이의 단편이 속한다. VGAT에 대해 약 70% 상동성, 약 75% 상동성, 약 80% 상동성, 약 85% 상동성, 약 90% 상동성, 약 95% 상동성, 약 99% 상동성인 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드 또는 이의 단편.

[0072] 척추 GABA성 억제성 중간뉴런으로의 촉진성 척추위 입력의 감소 또는 완전하게 상실된 활성과 그 결과로 인한 국소 분절 억제의 감소는 척수 손상 (SCI)을 갖는 환자에서 근육 경직의 발생을 유발시키는 핵심 기전의 하나로서 상정되었다. 동등하게, 척수 허혈의 일시적인 에피소드 이후에 확인되는 바와 같이, 척추 억제성 중간뉴런의 상실은 기능적으로 정의된 근육 경직 및 강직의 발생을 유발시킨다. 상해 (예를 들어, 척추외상 또는 허혈) 성질과 독립적으로, 임상 및 실험 동물 약리학 실험은 가장 일반적으로 사용되는 항경직제인 바클로펜 ($GABA_B$ 수용체 효현제)에 의한 전신 또는 척추 치료 이후에 비슷하고 강력한 항경직 효과를 보여주었다. 바클로펜-매개된 과분극 작용의 주요 부위는 시냅스이전 Ia 구심성섬유라고 여겨진다.

[0073] 그러나, 전신 바클로펜 치료의 주요한 한계 중 하나는 국재화된 척추 분절-제한적 효과의 결여이고 경직의 임상적으로 관련된 경감을 획득하는데 요구되는 비교적 높은 용량은 원치않는 전신 부작용 예컨대 진정을 빈번하게 일으킨다. 만성 척추강내 카테터를 사용한 바클로펜의 직접 척추 전달은 현저한 전신 활성이 덜하고 보다 부위-제한적인 효과를 제공하지만, 외과적 중재술을 필요로 하고 만성 척추강내 카테터삽입과 연관된 이후의 합병증 예컨대 뇌척수액 누수 또는 감염이 기술되었다. 보다 중요한 것은 IT 바클로펜의 효과적인 장기간 사용의 한계는 바클로펜 내성의 발생 (즉, 일관적인 항경직 효과를 획득하기 위한 용량의 점진적인 상승) 및 바클로펜 치료의 갑작스런 종료 이후 금단을 포함한다.

[0074] 감염된 성상 세포 내에서 GAD65 유전자의 우선적인 발현 (뉴런과 대조적)은 기대되는 GABA 매개된 항경직 효과에 대해서 특별한 장점을 제공하는 것으로 나타났다 (예를 들어, 참조로 본 명세서에 편입되는 WO2014/116652 참조). 시험관내에서 확인된 바와 같이, 초대 성상세포의 감염은 세포외 GABA 농도의 Ca^{2+} 독립적 증가를 유발시켰다. 따라서, 척추 실질 내에서 성상세포-매개된 GABA 방출은 국소 신경 억제성 회로의 기능성 및 연결성과 독립적일 것이고 특히 Ia 구심성섬유 및/또는 α-운동뉴런 상에서 발현되는 $GABA_B$ 수용체에 대한 이의 과분극 효과를 발휘하게 될 것으로 예상된다. 성상세포-생성된 GABA의 생물학적 활성은 우선적으로 $GABA_A$ 수용체-발현되는 배양된 hNT 뉴런에 대한 이의 탈분극-유도 효과에 의해 확증되었다.

[0075] 이중 GAD65 및 VGAT 유전자 요법의 사용은 국지적 신경 억제를 증가시키려는 목적으로 척추 또는 뇌 전달과 관련하여 이전에 시험되지 않은 신규한 접근법을 의미한다. 이러한 발견의 핵심은 양쪽 유전자가, 그렇지 않으면 과흥분가능한 뉴런의 기능적으로 관련된 억제를 획득하기 위해 상향조절될 필요가 있다는 것이다. 이러한 치료 효과의 효력은 방출가능한 GABA의 충분한 분량이 시냅스 간극에서 이용가능하여 시냅스이후 막의 억제를 유도하게 되고, α-운동뉴런 흥분성과 최종적으로 근육 경직의 억제를 유발시킨다.

[0076] 따라서, 다른 양상에서, 본 발명은 GAD65 유전자 및 VGAT 유전자의 척추-특이적 상향조절에 의하여 대상체에서 경직을 치료하는 방법을 제공한다. 다양한 구체예에서, GAD65 및 VGAT의 상향조절은 GAD65 및 VGAT를 코딩하는 바이러스 벡터를 투여하는 단계, 및 대상체의 척수에서 GAD65 및 VGAT를 발현시키는 단계, 그리하여 대상체에서 경직을 감소시키는 단계를 포함한다.

[0077] 바이러스 벡터는 본 발명의 방법을 수행하는데 유용한 폴리뉴클레오티드를 표적 세포에 도입시키는데 특히 유용할 수 있다. 바이러스 벡터는 특히 숙주 시스템, 특히 포유동물 시스템에서 사용을 위해 개발되었고, 예를 들어 레트로바이러스 벡터, 다른 렌티바이러스 벡터 예컨대 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 아데노바이러스 벡터 (AV), 아데노-연합 바이러스 벡터 (AAV), 헤르페스 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터 등을 기반으로 하는 것들을 포함한다 (각각이 참조로 본 명세서에 편입되는 다음의 문헌들을 참조함: Miller and Rosman, *BioTechniques* 7:980-990, 1992; Anderson *et al.*, *Nature* 392:25-30 *Suppl.*, 1998; Verma and Somia, *Nature* 389:239-242, 1997; Wilson, *New Engl. J. Med.* 334:1185-1187 (1996)). 본 발명의 일 양상에서, 렌티바이러스, AV, 또는 AAV가 이용된다. 아데노바이러스는 그들이 엔도솜을 통해서 수송될 수 있는 최대 크기이므로 (즉, 엔벨로프 융합을 필요로 하지 않음), 가장 큰 비엔벨로프형 바이러스를 대표한다. 비리온은 또

한 숙주 세포와의 부착을 보조하는 캡시드의 각각의 펜톤 베이스와 회합된 고유한 "스파이크" 또는 섬유를 갖는다. AAV는 정의상 생산적인 감염성 순환을 개시하고 지속시키기 위해 다른 바이러스 (전형적으로 아데노바이러스 또는 헤르페스바이러스)와의 공동감염을 요구하는 의존적 파보바이러스이다. 이러한 헬퍼 바이러스의 부재 하에서, AAV는 여전히 수용체-매개된 결합 및 내재화에 의해 표적 세포를 감염시키거나 또는 형질도입되어서, 분열 및 비분열 세포 둘 모두에서 핵을 침투하는데 능숙하다.

[0078] 핵에 있으면, 바이러스는 코트를 벗고 이식유전자가 다수의 상이한 형태로부터 발현되는데, 가장 지속적인 형태는 원형 단량체이다. AAV는 안정하게 형질도입된 세포의 1 내지 5%의 게놈에 통합되게 될 것이다 (Nakai *et al.*, *J. Virol.* 76: 11343-349, 2002). 이식유전자의 발현은 예외적으로 안정할 수 있다. 자손 바이러스가 헬퍼 바이러스의 부재 하에서 AAV 감염으로부터 생산되지 않기 때문에, 형질도입 정도는 바이러스로 감염된 초기 세포로만 제한된다. 이것이 AAV를 본 발명에 적합한 유전자 요법 벡터로 만드는 특징이다.

[0079] 본 발명의 방법에서 사용할 수 있는 아데노바이러스 벡터 및 다른 바이러스 벡터를 설명하는 추가의 참조 문헌은 다음의 문헌들을 포함한다: Horwitz, M. S., Adenoviridae and Their Replication, in Fields, B., et al. (eds.) *Virology*, Vol. 2, Raven Press New York, pp. 1679-1721, (1990); Graham, F., et al., pp. 109-128 in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7: Gene Transfer and Expression Protocols, Murray, E. (ed.), Humana Press, Clifton, N.J. (1991); Miller, N., et al., FASEB Journal 9: 190-199, 1995; Schreier, H, *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 68: 145-159, 1994; Schneider and French, Circulation 88:1937-1942, 1993; Curiel D. T., et al., *Human Gene Therapy* 3: 147-154, 1992; Graham, F. L., et al., WO 95/00655 (5 Jan. 1995); Falck-Pedersen, E. S., WO 95/16772 (22 Jun. 1995); Denefle, P. et al., WO 95/23867 (8 Sep. 1995); Haddada, H. et al., WO 94/26914 (24 Nov. 1994); Perricaudet, M. et al., WO 95/02697 (26 Jan. 1995); Zhang, W., et al., WO 95/25071 (12 Oct. 1995). 다양한 아데노바이러스 플라스미드가 또한 예를 들어 Microbix Biosystems (캐나다, 온타리오, 토론토 소재)를 포함한 상업적 공급처로부터 입수가능하다 (예를 들어, 다음을 참조함: Microbix Product Information Sheet: Plasmids for Adenovirus Vector Construction, 1996).

[0080] 본 발명의 방법에서 사용할 수 있는 AAV 벡터를 설명하는 추가의 참조 문헌은 다음의 문헌들을 포함한다: Carter, B., *Handbook of Parvoviruses*, vol. I, pp. 169-228, 1990; Berns, *Virology*, pp. 1743-1764 (Raven Press 1990); Carter, B., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 3: 533-539, 1992; Muzyczka, N., *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 92-129, 1992; Flotte, T. R., et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7:349-356, 1992; Chatterjee et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, 770: 79-90, 1995; Flotte, T. R., et al., WO 95/13365 (18 May 1995); Trempe, J. P., et al., WO 95/13392 (18 May 1995); Kotin, R., *Human Gene Therapy,* 5: 793-801, 1994; Flotte, T. R., et al., *Gene Therapy* 2:357-362, 1995; Allen, J. M., WO 96/17947 (13 Jun. 1996); 및 Du et al., *Gene Therapy* 3: 254-261, 1996.

[0081] 본 명세서에서 사용시, 용어 "아데노-연합 바이러스" (AAV)는 제한없이, 제1형 AAV, 제2형 AAV, 제3형 AAV (제3A형 및 제3B형을 포함), 제4형 AAV, 제5형 AAV, 제6형 AAV, 제7형 AAV, 제8형 AAV, 제9형 AAV, 제10형 AAV, 제11형 AAV, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 양 AAV 및 임의의 다른 현재 공지된 AAV를 포함한다. 일 구체예에서, AAV는 제2형 AAV이다. 다른 구체예에서, AAV는 제9형 AAV이다.

[0082] 이용되는 숙주 세포/벡터 시스템에 따라서, 항상성 및 유도성 프로모터, 전사 인핸서 요소, 전사 종결인자 등을 포함한, 임의의 많은 적합한 전사 및 번역 요소들이 발현 벡터에 사용될 수 있다 (Bitter *et al., Meth. Enzymol.* 153:516-544, 1987). 상기에 정의된 바와 같이, "프로모터" 또는 "프로모터 서열"에 대한 언급은 이의 광범위한 문맥으로 받아들여지고 세포 내에서 RNA 중합효소가 결합할 수 있어서 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 코딩 서열 예컨대 메신저 RNA, 리보솜 RNA, 소형 핵 인 RNA 또는 임의 부류의 임의 RNA 중합효소에 의해 전사되는 임의 종류의 RNA의 전사를 개시할 수 있는 DNA 조절 영역을 포함한다. 본 명세서에서 고려되는 "프로모터"는 또한 CAT 박스 서열 및 추가적인 조절 요소 (즉, 상류 활성화 서열, 인핸서 및 사일렌서)가 있거나 또는 없이, 진핵생물 세포에서 정확한 전사 개시를 위해 요구되는 골드버그-호그네스 (Goldberg-Hogness) 박스를 포함하여, 고전적인 게놈 유전자의 전사 조절성 서열을 포함할 수도 있다.

[0083] 프로모터 서열의 조절 제어 하에 서열을 위치시킨다는 것은 상기 분자를 위치시켜서 발현이 프로모터 서열에 의해 제어되게 한다는 것을 의미한다. 프로모터는 일반적으로 그들이 제어하는 유전자에 대해 5' (상류)에 위치된다. 이종성 프로모터/구조적 유전자 조합의 구축에서, 일반적으로 프로모터 위치는 그 프로모터와 이의 천연 배경에서 제어하는 유전자, 즉 프로모터가 유래된 유전자 사이의 거리와 대략 동일한 유전자 전사 출

발 부위로부터의 거리일 수 있다. 당분야에 공지되어 있듯이, 이러한 거리의 일부 변이는 프로모터 기능의 손실없이 수용될 수 있다. 유사하게, 이의 제어 하에 위치시키려는 이종성 유전자에 대한 조절성 서열 요소의 배치는 이의 천연 배경, 즉 이것이 유래되는 유전자에서 요소의 배치로 정의된다. 다시, 당분야에 공지되어 있듯이, 이러한 거리의 일부 변이가 또한 일어날 수 있다.

[0084] 본 발명의 방법 및 치료 계획에서 유용한 예시적인 프로모터는 제한없이, 인간 유비퀴틴 프로모터 및 인간 시냅신 프로모터를 포함한다. 그러나, 다른 기지의 조직-특이적 또는 세포-특이적 프로모터가 사용될 수 있다.

[0085] 재조합 AAV 입자를 생산하기에 적합한 숙주 세포는 제한없이, 외생성 핵산 분자의 수용자로서 사용될 수 있거나, 또는 그것으로 사용되고 있는 미생물, 효모 세포, 곤충 세포, 및 포유동물 세포를 포함한다. 따라서, 본 명세서에서 사용시 "숙주 세포"는 일반적으로 외생성 핵산 분자로 형질감염된 세포를 의미한다. 숙주 세포는 세포 또는 세포주가 발현시키려는 단백질, 선택된 선택 시스템 또는 적용되는 발효 시스템과 상용성인 한, 임의의 진핵생물 세포 또는 세포주를 포함한다.

[0086] AAV 벡터는 그들을 적절한, 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제에 용해, 현탁 또는 유화시켜서 주사 또는 투여를 위한 조제물로 제제화될 수 있다. 그러한 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제의 예는 수성 또는 비수성 용매, 예컨대 오일, 합성 지방족 산 글리세리드, 고급 지방족 산 또는 프로필렌 글리콜의 에스테르, 및 바람직하다면 통상의 첨가제 예컨대 가용화제, 등장화제, 현탁제, 유화제, 안정화제 및 보존제를 포함한다.

[0087] 세포 유형에 특이적인 바이러스 벡터가 이용가능하지 않으면, 벡터는 표적 세포 상에서 발현되는 리간드 (또는 수용체)에 특이적인 수용체 (또는 리간드)를 발현하도록 변형될 수 있거나, 또는 그러한 리간드 (또는 수용체)를 포함하도록 역시 변형될 수 있는 리포솜 내에 캡슐화될 수 있다. 펩티드제는 예를 들어 펩티드를 세포로 펩티드의 전좌를 용이하게 할 수 있는 단백질 전달 도메인 예컨대 인간 면역결핍 바이러스 TAT 단백질 전달 도메인을 함유하도록 조작시키는 것을 포함하여, 다양한 방법에 의해 세포로 도입될 수 있다. 또한, 다양한 생물물질-기반 기술 예컨대 역시 이러한 기술을 수용하도록 변형될 수 있는 나노-케이지 및 약리학적 전달 웨이퍼 (예컨대 뇌암 화학요법제에서 사용됨)가 존재한다.

[0088] 렌티바이러스 벡터의 사용 이후 세포 통합 유전자 전달이외에도, 시상밑핵으로 AAV-GAD65 주사 이후에 성공적인 GAD65 유전자 과발현에 관한 보고가 존재한다. 이들 실험에서, 지속적인 GAD65 발현은 AAV-GAD65 주사 이후에 4개월 내지 5개월까지 확인되었다. 보다 중요하게, 최근의 전신 데이타는 제한적인 횟수의 AAV 주사 (1 내지 2회 주사) 이후에도 래트 또는 미니 돼지 선조체로 AAV-기반 유 전자 전달의 높은 효율성을 입증하였다. 따라서, 다른 구체예에서, 본 발명은 AAV-기반, 게놈-비통합 GAD65-코딩 및 VGAT-코딩 벡터를 적용하여 분절-특이적 GAD65 및 VGAT 발현을 달성하였다.

[0089] GAD65 및 VGAT의 척추 전달을 조합하여, 척추 경직 억제에서 유의하고 기능적으로 관련있는 증가가 달성되었다. 척추 억제의 효력은 래트에서 척추외상-유도된 근육 경직의 충분히 특징규명된 모델에서 시험되었다. 이러한 동물 모델은 척추 손상 이후에 만성 단계에서 분명하게 존재하는 고도로 전개된 척추 반사항진 및 그 결과로 인한 근육 경직의 존재를 특징으로 한다. GAD65+VGAT의 척추 연막하 주사 (AAV9-UBI 벡터로 전달)를 받은 만성 경련성 동물은 유전자 전달 이후 5주에 확인된 경직 반응의 유의한 저해가 확인되었고 이러한 유의한 치료 효과는 적어도 8번째 주 동안 계속되었다. 면역형광발광 분석은 글루타메이트성 마커 VGLUT1 및 VGLUT2와 GAD65 및 VGAT 발현의 공동국재를 통해 입증된 바와 같이 척추 중간뉴런에서 혼합된 억제성-흥분성 신경전달물질 표현형의 출현을 보여주었다. 대조군 GFP 벡터가 주사된 동물에서는 어떠한 항경직 효과도 확인되지 않았고 글루타메이트성 마커 VGLUT1 및 VGLUT2와 GAD65 및 VGAT 발현의 공동국재도 검출되지 않았다.

[0090] 본 병용 요법의 투여는 당업자에게 공지된 임의의 다양한 방법 및 전달 시스템을 사용하여 실시될 수 있거나 또는 수행될 수 있다. 본 명세서에서 사용시, 용어 "투여" 또는 "투여하는"은 본 발명의 방법을 수행하면서 대상체에게 본 발명의 화합물 또는 약학 조성물을 제공하는 행동을 포함하는 것으로 정의된다. 투여의 예시적인 경로는 제한없이, 정맥내, 관절내, 지주막하 수조내, 안구내, 심실내, 척추강내, 연막하, 근육내, 복강내, 피내, 체강내 등을 비롯하여, 임의의 이의 둘 이상의 조합을 포함한다. 일정 구체예에서, AAV는 GAD65 유전자 및 VGAT 유전자의 척추 상향조절을 달성하도록 척추 실질, 척추의 척추강내 공간, 대상체의 척추연막하 공간, 및/또는 말초 경련성 근육으로 직접적으로 전달될 수 있다. 예를 들어, 참조로 본 명세서에 편입되는 WO2016/122791을 참조한다.

[0091] 용어 "치료적 유효량" 또는 "유효량"은 연구자, 수의사, 의사, 또는 다른 임상의가 추구하는 조직, 시스템, 동물 또는 인간의 생물학적 또는 의학적 반응, 예를 들어 GAD65 유전자 및 VGAT 유전자의 척추 상향조절을 유발시

키게 되는 화합물 또는 조성물의 양을 의미한다. 따라서, 용어 "치료적 유효량"은 일정 기간 동안 반복적으로 발병 영역에 적용될 때 질환 상태에 실질적인 호전을 야기시키는 제제의 임의 양을 의미하고자 본 명세서에서 사용된다. 양은 치료하려는 병태, 병태의 진행 단계, 및 적용되는 제제의 유형 및 농도에 따라 가변적이게 될 것이다. 임의의 소정 예에서 적절한 양은 당업자에게 쉽게 명확해지거나 또는 통상의 실험으로 결정할 수 있다. 예를 들면, 대상 치료 방법에 대한, 예를 들어 GAD65 유전자 및 VGAT 유전자를 코딩하는 AAV 또는 GAD65 유전자 및 VGAT 유전자를 코딩하는 AAV를 포함하는 조성물의 "치료적 유효량"은 바람직한 치료 계획의 일부로서 적용될 때 GAD65 유전자 및 VGAT 유전자의 상향조절을 일으키는 조제물 중 AAV의 양을 의미한다.

[0092] 전달 벡터의 치료적 또는 예방법적 유효량의 결정은 통상의 컴퓨터 방법을 사용하여 동물 데이타를 기반으로 수행될 수 있다. 적절한 용량은 다른 인자들 중에서도, 선택된 전달 벡터의 세부 사항, 투여 경로, 치료되는 포유동물 (예를 들어, 인간 또는 인간이외의 영장류 또는 다른 포유동물), 치료하려는 대상체의 연령, 체중, 및 일반 상태, 치료되는 장애의 중증도, 치료하려는 심장 내 영역의 위치 및 투여 방식에 따라 좌우될 것이다. 따라서, 적절한 용량은 환자마다 다양할 수 있다. 적절한 유효량은 당업자가 쉽게 결정할 수 있다.

[0093] 용량 치료는 단일 용량 스케쥴 또는 다수 용량 스케쥴일 수 있다. 더욱이, 대상체는 적절하면 많은 용량으로 투여될 수 있다. 당업자는 적절한 용량수를 쉽게 결정할 수 있다. 그러나, 용량은 대안적인 투여 경로를 고려하거나, 또는 임의의 부작용에 대항하여 치료적 이득을 균형잡기 위해 조정될 필요가 있을 수 있다. 이러한 용량은 재조합 벡터가 적용되는 치료적 용도에 좌우되어 가변적일 수 있다.

[0094] 임의로, 본 발명에 따른 AAV-매개 전달은 다른 바이러스 및 비바이러스 벡터에 의한 전달과 조합될 수 있다. 제한없이 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 (HSV) 벡터, 및 배큘로바이러스 벡터를 포함하는 이러한 다른 바이러스 벡터는 당분야에 공지된 방법에 따라서 쉽게 선택하고 생성시킬 수 있다. 유사하게, 제한없이, 리포솜, 지질-기반 벡터, 폴리플렉스 벡터, 분자적 접합체, 폴리아민 및 폴리양이온 벡터를 포함하는 비바이러스 벡터는 당분야에 공지된 방법에 따라서 쉽게 선택되고 생성될 수 있다. 이들 대안적인 경로에 의한 투여시, 용량은 상기 기술된 범위에서 바람직할 수 있다.

[0095] 다른 양상에서, 본 발명은 또한 척수 손상을 갖는 대상체를 치료하기 위한 치료 계획을 제공한다. 치료 계획은 GAD65 유전자 및 VGAT 유전자의 척추-특이적 상향조절을 투여하는 단계를 포함한다. 상기에서 상세하게 설명된 바와 같이, GAD65 및 VGAT의 상향조절은 GAD65 및 VGAT를 코딩하는 바이러스 벡터를 투여하는 단계를 포함할 수 있고, 여기서 GAD65 및 VGAT가 발현되고, 척추 손상이 치료된다.

[0096] 또한, 본 발명의 방법은 중금속 (예를 들어, 납, 비소 및 수은) 및 산업적 용매를 포함한 독성 화합물을 비롯하여, 화학요법제 (예를 들어, 빈크리스틴 및 시스플라틴), 담손, HIV 약제 (예를 들어, 지도부딘, 디다노신, 스타부딘, 잘시타빈, 리토나비어, 및 암프레나비어), 콜레스테롤 저하 약물 (예를 들어, 로바스타틴, 인다파미드, 및 젬피브로질), 심장 또는 혈압 약제 (예를 들어, 아미오다론, 히드랄라진, 퍼헥실린), 및 메트로니다졸을 포함하는 약물에 노출로 인해 초래되는 신경 손상, 예컨대 말초 신경병증의 치료에서 사용될 수 있다.

[0097] 본 발명의 방법은 또한 물리적, 기계적, 또는 화학적 외상에 의해 초래되는 신경계에 대한 손상을 치료하는데 사용될 수 있다. 따라서, 이 방법은 물리적 손상 (예를 들어, 화상, 상처, 수술, 및 사고와 연관), 허혈, 장기간의 냉온 노출 (예를 들어, 동상)에 의해 초래되는 말초 신경 손상을 비롯하여, 예를 들어 졸중 또는 두개내 출혈 (예컨대, 뇌출혈)로 인한 중추 신경계의 손상의 치료에서 사용될 수 있다. 유사하게, 본 발명의 방법은 이러한 외상으로 초래되는 만성 통증/통각의 치료에서 사용될 수 있다.

[0098] 다음의 실시예는 본 발명을 예시하려는 것이며 한정하려는 것이 아니다.

[0099] **실시예 1**

[0100] GAD65 (글루타메이트-디카복실라제 65) 및 VGAT (소포성 GABA 수송체)를 코딩하는 AAV9 바이러스는 연막하 전달 방법을 사용하여 표적으로 삼은 분절에 주사된다 (도 1). 척추 손상-유도된 근육 경직을 갖는 동물 (래트)을 사용하였다. 요추 연막하 AAV9-UBI-GFP 전달 이후에 획득된 이식유전자 발현의 분포는 도 2에 도시되어 있다. 회백질을 통한 중간뉴런 내 광범위한 GFP 발현을 확인할 수 있다.

[0101] GAD65 및 VGAT 유전자 전달 이후 경직 반응은 유전자 전달 이후 최대 8주 동안 측정되었다. 대조군 경직 동물에서는 대조군 AAV9-UBI-GFP가 사용되었다. 도 3A-3D는 AAV9-UBI-GAD65+VGAT를 주사한 동물에서 경직 반응의 점진적인 감소를 보여준다. 유전자 전달 이후 최소 8주 동안 유의한 항-경직 효과가 계속된다 (도 3A 및 3B). 속도-의존적 억압의 측정 (노화 (altert) 척추 억제의 지수를 의미함)은 대조군 AAV9-주사된 동물

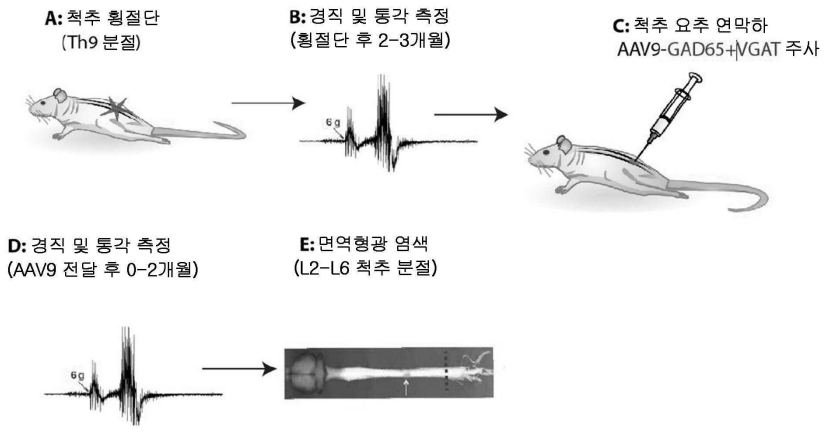
과 비교하면 유의한 회복을 보여준다 (도 3C).

[0102] 8주에 GAD65/VGAT 유전자-주사된 분절의 면역형광발광 분석은 양쪽 유전자의 유의한 상향조절 및 혼합된 억제성/흥분성 신경전달물질 표현형의 출현 (VGLUT2 (소포성 글루타메이트 수송체)와 GAD65 또는 VGAT의 공동발현)을 보여주었다 (도 4A 및 4B). 대조군 AAV9가 주사된 동물에서는 공동발현이 보이지 않았다 (도 4C 및 4D). 이들 데이타는 근육 경직의 감소를 아마도 매개하는 GAD65/VGAT 과발현되는 뉴런 내 억제성 구동의 효과적인 유도를 확증해 주었다.

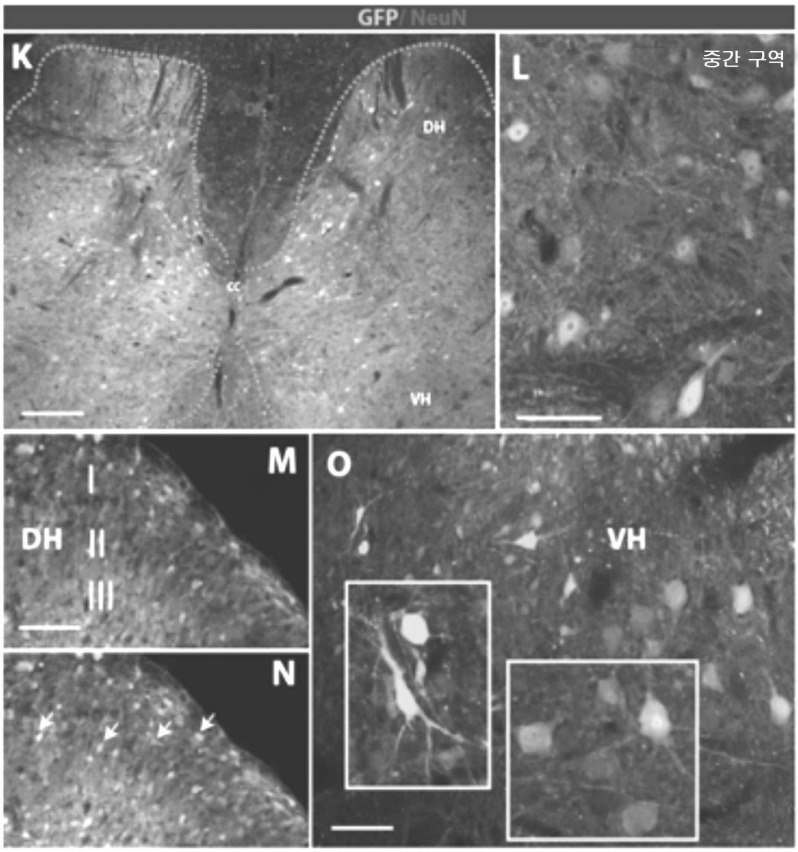
[0103] 본 발명은 상기 예를 참조하여 설명되었지만, 본 발명의 사조 및 범주 내에 변형 및 변이가 포함된다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명은 오직 하기의 청구항에 의해서만 한정된다.

도면

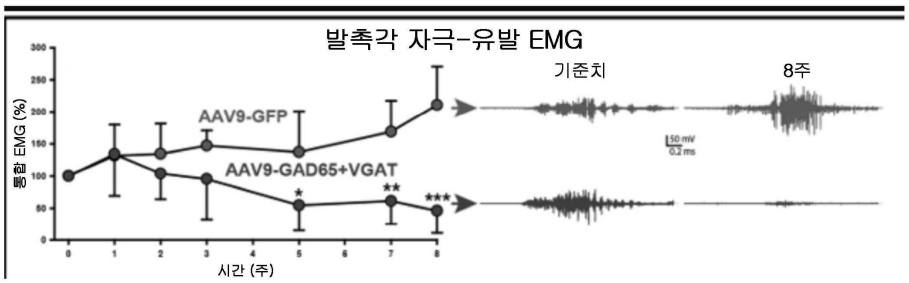
도면1



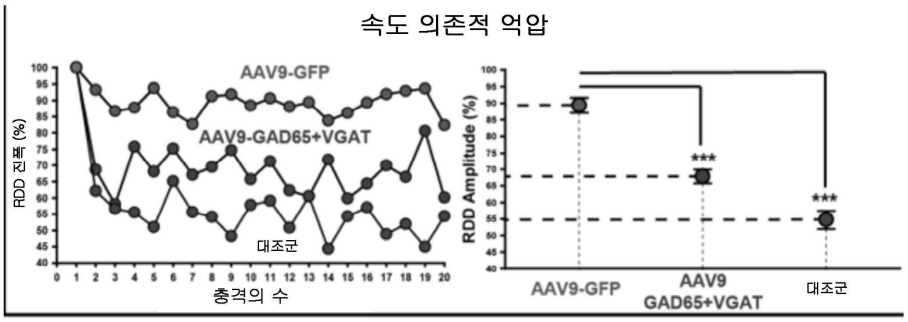
도면2



도면3

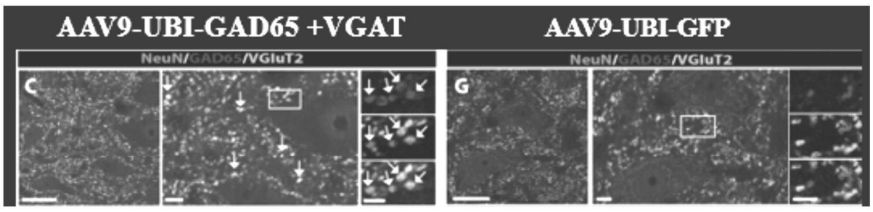


도.3A 도.3B

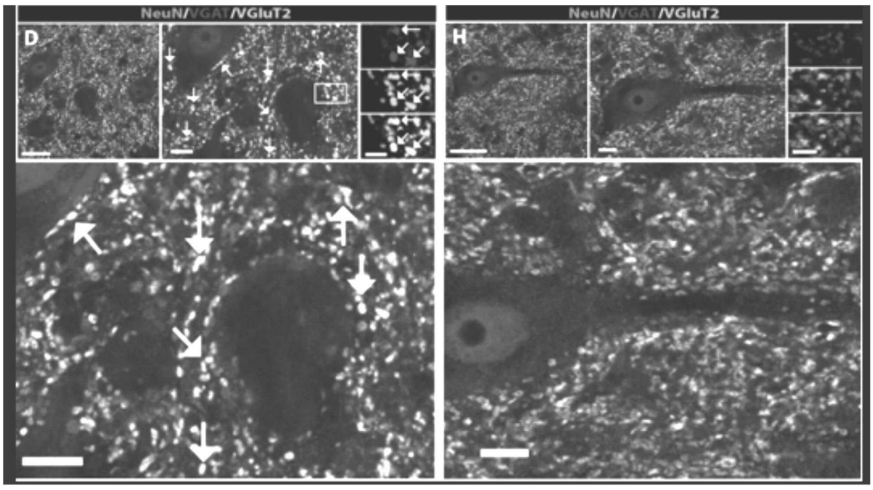


도.3C 도.3D

도면4

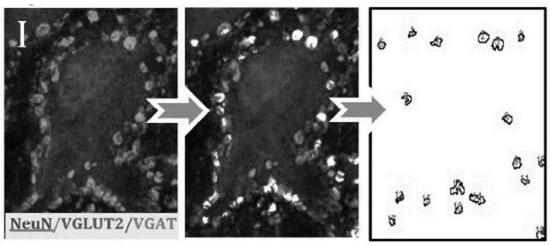


도.4A 도.4C



도.4B 도.4D

도면5



GAD65 및 VGAT 발현의 정량적 분석

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

서 열 목 록

<110> THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

<120> METHOD AND COMPOSITION FOR TREATING NEURONAL HYPER-EXCITABILITY

<130> 20378-201384

<140> PCT/US2017/024285

<141> 2017-03-27

<150> 62/314,128

<151> 2016-03-28

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ser Pro Gly Ser Gly Phe Trp Ser Phe Gly Ser Glu Asp Gly
1 5 10 15

Ser Gly Asp Ser Glu Asn Pro Gly Thr Ala Arg Ala Trp Cys Gln Val
20 25 30

Ala Gln Lys Phe Thr Gly Gly Ile Gly Asn Lys Leu Cys Ala Leu Leu
35 40 45

Tyr Gly Asp Ala Glu Lys Pro Ala Glu Ser Gly Gly Ser Gln Pro Pro
50 55 60

Arg Ala Ala Ala Arg Lys Ala Ala Cys Ala Cys Asp Gln Lys Pro Cys
65 70 75 80

Ser Cys Ser Lys Val Asp Val Asn Tyr Ala Phe Leu His Ala Thr Asp
85 90 95

Leu Leu Pro Ala Cys Asp Gly Glu Arg Pro Thr Leu Ala Phe Leu Gln
100 105 110

Asp Val Met Asn Ile Leu Leu Gln Tyr Val Val Lys Ser Phe Asp Arg
115 120 125

Ser Thr Lys Val Ile Asp Phe His Tyr Pro Asn Glu Leu Leu Gln Glu
130 135 140

Tyr Asn Trp Glu Leu Ala Asp Gln Pro Gln Asn Leu Glu Glu Ile Leu
145 150 155 160

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

                165                 170                 175
Arg Tyr Phe Asn Gln Leu Ser Thr Gly Leu Asp Met Val Gly Leu Ala
            180                 185                 190
Ala Asp Trp Leu Thr Ser Thr Ala Asn Thr Asn Met Phe Thr Tyr Glu
        195                 200                 205
Ile Ala Pro Val Phe Val Leu Leu Glu Tyr Val Thr Leu Lys Lys Met
    210                 215                 220
Arg Glu Ile Ile Gly Trp Pro Gly Gly Ser Gly Asp Gly Ile Phe Ser
225                 230                 235                 240

Pro Gly Gly Ala Ile Ser Asn Met Tyr Ala Met Met Ile Ala Arg Phe
                245                 250                 255
Lys Met Phe Pro Glu Val Lys Glu Lys Gly Met Ala Ala Leu Pro Arg
            260                 265                 270
Leu Ile Ala Phe Thr Ser Glu His Ser His Phe Ser Leu Lys Lys Gly
        275                 280                 285
Ala Ala Ala Leu Gly Ile Gly Thr Asp Ser Val Ile Leu Ile Lys Cys
    290                 295                 300
Asp Glu Arg Gly Lys Met Ile Pro Ser Asp Leu Glu Arg Arg Ile Leu

305                 310                 315                 320
Glu Ala Lys Gln Lys Gly Phe Val Pro Phe Leu Val Ser Ala Thr Ala
                325                 330                 335
Gly Thr Thr Val Tyr Gly Ala Phe Asp Pro Leu Leu Ala Val Ala Asp
            340                 345                 350
Ile Cys Lys Lys Tyr Lys Ile Trp Met His Val Asp Ala Ala Trp Gly
        355                 360                 365
Gly Gly Leu Leu Met Ser Arg Lys His Lys Trp Lys Leu Ser Gly Val
    370                 375                 380

Glu Arg Ala Asn Ser Val Thr Trp Asn Pro His Lys Met Met Gly Val
385                 390                 395                 400
Pro Leu Gln Cys Ser Ala Leu Leu Val Arg Glu Glu Gly Leu Met Gln
```

405 410 415

Asn Cys Asn Gln Met His Ala Ser Tyr Leu Phe Gln Gln Asp Lys His

420 425 430

Tyr Asp Leu Ser Tyr Asp Thr Gly Asp Lys Ala Leu Gln Cys Gly Arg

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

Glu Ile Glu Arg Leu Gly Gln Asp Leu

580 585

<210> 2

<211> 1803

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgtccccta tacatcacca tcaccatcac ctggttccgc gtggatccga agcttcgaat 60

tctggctttt ggtctttcgg gtcggaagat ggctctgggg attccgagaa tcccggcaca 120

gcgcgagcct ggtgccaagt ggctcagaag ttcacgggcg gcatcggaaa caaactgtgc 180

gccctgctct acggagacgc cgagaagccg gcggagagcg gcgggagcca acccccgcgg 240

gccgccgccc ggaaggccgc ctgcgcctgc gaccagaagc cctgcagctg ctccaaagtg 300

gatgtcaact acgcgtttct ccatgcaaca gacctgctgc cggcgtgtga tggagaaagg 360

cccactttgg cgtttctgca agatgttatg aacattttac ttcagtatgt ggtgaaaagt 420

ttcgatagat caaccaaagt gattgatttc cattatccta atgagcttct ccaagaatat 480

aattgggaat tggcagacca accacaaaat ttggaggaaa ttttgatgca ttgccaaaca 540

actctaaaat atgcaattaa aacagggcat cctagatact tcaatcaact ttctactggt 600

ttggatatgg ttggattagc agcagactgg ctgacatcaa cagcaaatac taacatgttc 660

acctatgaaa ttgctccagt atttgtgctt ttggaatatg tcacactaaa gaaaatgaga 720

gaaatcattg gctggccagg gggctctggc gatgggatat tttctcccgg tggcgccata 780

tctaacatgt atgccatgat gatcgcacgc tttaagatgt tcccagaagt caaggagaaa 840

ggaatggctg ctcttcccag gctcattgcc ttcacgtctg aacatagtca tttttctctc 900

aagaagggag ctgcagcctt agggattgga acagacagcg tgattctgat taaatgtgat 960

gagagaggga aaatgattcc atctgatctt gaaagaagga ttcttgaagc caaacagaaa 1020

gggtttgttc ctttcctcgt gagtgccaca gctggaacca ccgtgtacgg agcatttgac 1080

cccctcttag ctgtcgctga catttgcaaa aagtataaga tctggatgca tgtggatgca 1140

gcttggggtg ggggattact gatgtcccga aaacacaagt ggaaactgag tggcgtggag 1200

agggccaact ctgtgacgtg gaatccacac aagatgatgg gagtcccttt gcagtgctct 1260

gctctcctgg ttagagaaga gggattgatg cagaattgca accaaatgca tgcctcctac 1320

ctctttcagc aagataaaca ttatgacctg tcctatgaca ctggagacaa ggccttacag 1380

tgcggacgcc acgttgatgt ttttaaacta tggctgatgt ggagggcaaa ggggactacc 1440

gggtttgaag cgcatgttga taaatgtttg gagttggcag agtatttata caacatcata 1500

aaaaaccgag aaggatatga gatggtgttt gatgggaagc ctcagcacac aaatgtctgc 1560

ttctggtaca ttcctccaag cttgcgtact ctggaagaca atgaagagag aatgagtcgc 1620

ctctcgaagg tggctccagt gattaaagcc agaatgatgg agtatggaac cacaatggtc 1680

agctaccaac ccttgggaga caaggtcaat ttcttccgca tggtcatctc aaacccagcg 1740

gcaactcacc aagacattga cttcctgatt gaagaaatag aacgccttgg acaagattta 1800

taa 1803

<210> 3

<211> 525

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Thr Leu Leu Arg Ser Lys Leu Ser Asn Val Ala Thr Ser Val
1 5 10 15

Ser Asn Lys Ser Gln Ala Lys Met Ser Gly Met Phe Ala Arg Met Gly
20 25 30

Phe Gln Ala Ala Thr Asp Glu Glu Ala Val Gly Phe Ala His Cys Asp
35 40 45

Asp Leu Asp Phe Glu His Arg Gln Gly Leu Gln Met Asp Ile Leu Lys
50 55 60

Ala Glu Gly Glu Pro Cys Gly Asp Glu Gly Ala Glu Ala Pro Val Glu
65 70 75 80

Gly Asp Ile His Tyr Gln Arg Gly Ser Gly Ala Pro Leu Pro Pro Ser
85 90 95

Gly Ser Lys Asp Gln Val Gly Gly Gly Gly Glu Phe Gly Gly His Asp
100 105 110

Lys Pro Lys Ile Thr Ala Trp Glu Ala Gly Trp Asn Val Thr Asn Ala
115 120 125

Ile Gln Gly Met Phe Val Leu Gly Leu Pro Tyr Ala Ile Leu His Gly
130 135 140

Gly Tyr Leu Gly Leu Phe Leu Ile Ile Phe Ala Ala Val Val Cys Cys
145 150 155 160

Tyr Thr Gly Lys Ile Leu Ile Ala Cys Leu Tyr Glu Glu Asn Glu Asp
165 170 175

Gly Glu Val Val Arg Val Arg Asp Ser Tyr Val Ala Ile Ala Asn Ala
180 185 190

Cys Cys Ala Pro Arg Phe Pro Thr Leu Gly Gly Arg Val Val Asn Val
195 200 205

Ala Gln Ile Ile Glu Leu Val Met Thr Cys Ile Leu Tyr Val Val Val
210 215 220

Ser Gly Asn Leu Met Tyr Asn Ser Phe Pro Gly Leu Pro Val Ser Gln
225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Ala Arg Asp Trp Ala Trp Glu Lys Val Lys Phe Tyr Ile Asp Val Lys

290 295 300

Lys Phe Pro Ile Ser Ile Gly Ile Ile Val Phe Ser Tyr Thr Ser Gln

305 310 315 320

Ile Phe Leu Pro Ser Leu Glu Gly Asn Met Gln Gln Pro Ser Glu Phe

325 330 335

His Cys Met Met Asn Trp Thr His Ile Ala Ala Cys Val Leu Lys Gly

340 345 350

Leu Phe Ala Leu Val Ala Tyr Leu Thr Trp Ala Asp Glu Thr Lys Glu

355 360 365

Val Ile Thr Asp Asn Leu Pro Gly Ser Ile Arg Ala Val Val Asn Ile

370 375 380

Phe Leu Val Ala Lys Ala Leu Leu Ser Tyr Pro Leu Pro Phe Phe Ala

385 390 395 400

Ala Val Glu Val Leu Glu Lys Ser Leu Phe Gln Glu Gly Ser Arg Ala

405 410 415

Phe Phe Pro Ala Cys Tyr Ser Gly Asp Gly Arg Leu Lys Ser Trp Gly

420 425 430

Leu Thr Leu Arg Cys Ala Leu Val Val Phe Thr Leu Leu Met Ala Ile

435 440 445

Tyr Val Pro His Phe Ala Leu Leu Met Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr

450 455 460

Gly Ala Gly Leu Cys Phe Leu Leu Pro Ser Leu Phe His Leu Arg Leu

465 470 475 480

Leu Trp Arg Lys Leu Leu Trp His Gln Val Phe Phe Asp Val Ala Ile

485 490 495

Phe Val Ile Gly Gly Ile Cys Ser Val Ser Gly Phe Val His Ser Leu

500 505 510

Glu Gly Leu Ile Glu Ala Tyr Arg Thr Asn Ala Glu Asp

515 520 525

<210> 4

<211> 2581

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gctcgcgccc cgcggcagct ccgcagtgca ctagccacca ccgccgccgc cgccgctccg 60

ccagacctgc tgccagcttg cccggtccag ccctgagaga gcctcgaacg ccagctgcga 120

gggtcatgag ccagagagcc ccggggcgcc gcgcggagag caagcggaga tagcgacttt 180

gcgccccca gccctcgcct tcttgcatcg cgttccccgc atcctcgggt ccttctgtcc 240

tttccgctgt ccccaccgcc gccatggcca ccttgctccg cagcaagctg tccaacgtgg 300

ccacgtccgt gtccaacaag tcccaggcca agatgagcgg catgttcgcc aggatgggtt 360

ttcaggcggc cacggatgag gaggcggtgg gcttcgcgca ttgcgacgac ctcgactttg 420

agcaccgcca gggcctgcag atggacatcc tgaaagccga gggagagccc tgcggggacg 480

agggcgctga agcgcccgtc gagggagaca tccattatca gcgaggcagc ggagctcctc 540

tgccgccctc cggctccaag gaccaggtgg gaggtggtgg cgaattcggg ggccacgaca 600

agcccaaaat cacggcgtgg gaggcaggct ggaacgtgac caacgccatc cagggcatgt 660

tcgtgctggg cctaccctac gccatcctgc acggcggcta cctggggttg tttctcatca 720

tcttcgccgc cgttgtgtgc tgctacaccg gcaagatcct catcgcgtgc ctgtacgagg 780

agaatgaaga cggcgaggtg gtgcgcgtgc gggactcgta cgtggccata gccaacgcct 840

gctgcgcccc gcgcttccca acgctgggcg gccgagtggt gaacgtagcg cagatcatcg 900

agctggtgat gacgtgcatc ctgtacgtgg tggtgagtgg caacctcatg tacaacagct 960

tcccggggct gcccgtgtcg cagaagtcct ggtccattat cgccacggcc gtgctgctgc 1020

cttgcgcctt ccttaagaac ctcaaggccg tgtccaagtt cagtctgctg tgcactctgg 1080

cccacttcgt catcaatatc ctggtcatag cctactgtct atcgcgggcg cgcgactggg 1140

cctgggagaa ggtcaagttc tacatcgacg tcaagaagtt ccccatctcc attggcatca 1200

tcgtgttcag ctacacgtct cagatcttcc tgccttcgct ggagggcaat atgcagcagc 1260

ccagcgagtt ccactgcatg atgaactgga cgcacatcgc agcctgcgtg ctcaagggcc 1320

tcttcgcgct cgtcgcctac ctcacctggg ccgacgagac caaggaggtc atcacggata 1380

acctgcccgg ctccatccgc gccgtggtca acatctttct ggtggccaag gcgctgttgt 1440

cctatcctct gccattcttt gccgctgtcg aggtgctgga gaagtcgctc ttccaggaag 1500

gcagccgcgc ctttttcccg gcctgctaca gcggcgacgg gcgcctgaag tcctgggggc 1560

tgacgctgcg ctgcgcgctc gtcgtcttca cgctgctcat ggccatttat gtgccgcact 1620

tcgcgctgct catgggcctc accggcagcc tcacgggcgc cggcctctgt ttcttgctgc 1680

ccagcctctt tcacctgcgc ctgctctggc gcaagctgct gtggcaccaa gtcttcttcg 1740

acgtcgccat cttcgtcatc ggcggcatct gcagcgtgtc cggcttcgtg cactccctcg 1800

agggcctcat cgaagcctac cgaaccaacg cggaggacta gggcgcaagg gcgagccccc 1860

gccgcgcttc tgcgctctct cccttctccc ctcaccccgc ccccaccagc ccagtgcgcc 1920

ctgccgccgc gcttgggagg ccaagcttta aacatctctg gttcctagtt tctgattatt 1980

cggggatggg ggggatggga ggggacaggg attcacgatc catcgcgtct gcgtttctgt 2040

tgtcctttct tttccacaac accctggttt tgggggggagg cggggtgcat ttgcgggcag 2100

ggttctctgt ccttccaagt ggggccccga cactttggtt ccagtcatcg agggggttgg 2160

gaagggaggg agagggggcg cagctcgcag gcgtggcaac ttgaccttgg gggaatattt 2220

cacatccatc cagagctcgg aatctacagc gtccagccat ttccagcaag agcgcttccc 2280

attccggaga cgtttcaacc ctgcagcggg aaaggctgac tgggaaatcc attttgggtg 2340

ggcaatttcc ttcaacgaag ccggaaggcg agaagccgcg gcggggccag cttgcctgcc 2400

ggttttcagg aatctaaact ctcatcttgt gcaatttatc aggtgtggaa ctgttctact 2460

gtgcgtgtgg tgtgctcgtg gtgaataaga tgaaatgtat atcagaaaaa aatctatctc 2520

taatttagag tgcggtacat aattatatcc gcaaataaag aagagacaaa ggctaaaaaa 2580

a 2581