



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0021837
(43) 공개일자 2024년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/18 (2006.01) A61K 31/19 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/185 (2013.01)
A61K 31/19 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7045119
(22) 출원일자(국제) 2022년06월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년12월27일
(86) 국제출원번호 PCT/CA2022/050955
(87) 국제공개번호 WO 2022/261765
국제공개일자 2022년12월22일
(30) 우선권주장
63/202,549 2021년06월16일 미국(US)

(71) 출원인
트랑스페르 플러스, 에스.오.씨.
캐나다 퀘벡 지1피 4피5, 퀘벡 뒤 파크-테크놀로지크, 볼.1405
(72) 발명자
소레트, 로돌프
캐나다, 퀘벡 에이치2제이 2엔1, 몬트리올 루에리바드 4421
필론, 니콜라스
캐나다, 퀘벡 에이치2제이 1알9, 몬트리올 루에길포드 1458
(74) 대리인
특허법인이룸리온

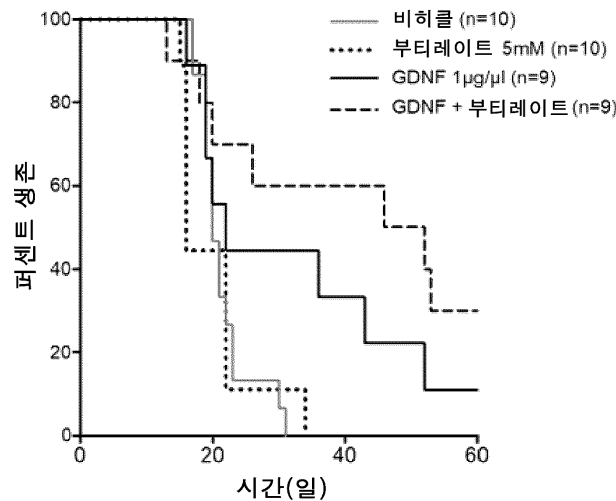
전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 발명의 명칭 장신경병증의 치료를 위한 조합 치료요법

(57) 요약

본 출원은 유효 용량의 (i) 신경교 세포주 유래 신경영양 인자(GDNF) 폴리펩티드 및 (ii) 단쇄 지방산 예컨대 부티르산을 포함하는 조합물을 투여하는 것을 통해 장신경병증, 예컨대 히르슈스프룽 질병(HSCR) 또는 창자 신경절 저하증을 앓는 인간 대상체를 치료하기 위한 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61P 25/02 (2018.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

명세서

청구범위

청구항 1

장신경병증을 앓는 인간 대상체를 치료하기 위한 방법으로서, 대상체에게 유효량의 (i) 신경교 세포주 유래 신경영양 인자(GDNF) 폴리펩티드; 및 (ii) 단쇄 지방산(SCFA), 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, GDNF 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 78-211과 적어도 70% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, GDNF 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 78-211과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, GDNF 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 78-211과 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, GDNF 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 78-211을 포함하는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 대상체에게 투여된 GDNF 폴리펩티드의 유효량은 마우스 새끼에서 약 5 μ g 내지 약 20 μ g의 용량에 해당하는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, SCFA는 C₃-C₅ SCFA인, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, SCFA는 부티르산인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르는 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 약학적 조성물 내 존재하는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 약학적으로 허용되는 담체는 식염수 용액 또는 겔화제를 포함하는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르는 관장을 통해 직장으로 투여되는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA 또는 이의 약학적으로 허용되는 염

또는 에스테르는 원위 결장 벽으로 주사에 의해 투여되는, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르는 1일 1회 최대 1일 4회 투여되는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르는 적어도 2 연속일 동안 투여되는, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 방법은 대상체에서 신경절 또는 저신경절 분절의 수술적 제거 전에 수행되는, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 방법은 대상체의 신경절 또는 저신경절 분절의 수술적 제거 후에 수행되는, 방법.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 신경절 또는 저신경절 분절의 수술적 제거는 폴쓰루 수술을 통해 이루어지는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 장신경병증은 창자 신경절저하증인, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 장신경병증은 히르슈스프룽 질병(HSCR)인, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 대상체는 단분절 HSCR을 앓는 것인, 방법.

청구항 21

제16항 또는 제17항에 있어서, HSCR은 콜라겐 VI 연관 HSCR인, 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 대상체는 5세 미만인, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 인간 대상체는 6개월 미만인, 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르는 직장 및/또는 구불결장 내로 투여되는, 방법.

청구항 25

제29항에 있어서, 약학적 조성물은 직장구불결장 영역으로 투여되거나 투여를 위한 것인, 방법.

청구항 26

장신경병증을 앓는 인간 대상체를 치료하는 용도를 위한 조합물로서, (i) GDNF 폴리펩티드; 및 (ii) SCFA, 또는

이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르를 포함하는, 조합물.

청구항 27

제26항에 있어서, GDNF 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 78-211과 적어도 70% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 용도를 위한 조합물.

청구항 28

제27항에 있어서, GDNF 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 78-211과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 용도를 위한 조합물.

청구항 29

제28항에 있어서, GDNF 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 78-211과 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 용도를 위한 조합물.

청구항 30

제29항에 있어서, GDNF 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 78-211을 포함하는, 용도를 위한 조합물.

청구항 31

제26항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 사용된 재조합 GDNF 폴리펩티드의 용량은 마우스 새끼에서 약 5 μ g 내지 약 20 μ g의 용량에 해당하는, 용도를 위한 조합물.

청구항 32

제26항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, SCFA는 C₃-C₅ SCFA인, 용도를 위한 조합물.

청구항 33

제26항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, SCFA는 부티르산인, 용도를 위한 조합물.

청구항 34

제26항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르는 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 약학적 조성물 내 존재하는, 용도를 위한 조합물.

청구항 35

제34항에 있어서, 약학적으로 허용되는 담체는 식염수 용액 또는 겔화제를 포함하는, 용도를 위한 조합물.

청구항 36

제26항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르는 관장을 통해 직장으로의 투여를 위한 것인, 용도를 위한 조합물.

청구항 37

제26항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르는 원위 결장 벽으로의 주사에 의해 투여를 위한 것인, 용도를 위한 조합물.

청구항 38

제26항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르는 1일 1회 최대 1일 4회 투여를 위한 것인, 용도를 위한 조합물.

청구항 39

제26항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA 또는 이의 약학적으로 허용되는 염

또는 에스테르는 적어도 2 연속일 동안 투여를 위한 것인, 용도를 위한 조합물.

청구항 40

제26항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 조합물은 대상체의 신경절 또는 저신경절 분절의 수술적 제거 전에 사용하기 위한 것인, 용도를 위한 조합물.

청구항 41

제26항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 조합물은 대상체의 신경절 또는 저신경절 분절의 수술적 제거 후에 사용하기 위한 것인, 용도를 위한 조합물.

청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서, 신경절 또는 저신경절 분절의 수술적 제거는 폴쓰루 수술을 통해 이루어지는, 방법.

청구항 43

제26항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 장신경병증은 참자 신경절저하증인, 용도를 위한 조합물.

청구항 44

제26항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 장신경병증이 히르슈스프룽 질병(HSCR)인, 용도를 위한 조합물.

청구항 45

제44항에 있어서, 대상체는 단분절 HSCR을 앓는 것인, 용도를 위한 조합물.

청구항 46

제44항 또는 제45항에 있어서, HSCR은 콜라겐 VI 연관 HSCR인, 용도를 위한 조합물.

청구항 47

제26항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 대상체는 5세 미만인, 용도를 위한 조합물.

청구항 48

제47항에 있어서, 인간 대상체는 6개월 미만인, 용도를 위한 조합물.

청구항 49

제26항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르는 직장 및/또는 구불결장으로 투여를 위한 것인, 용도를 위한 조합물.

청구항 50

제49항에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA는 직장구불결장 영역으로의 투여를 위한 것인, 용도를 위한 조합물.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원에 대한 상호 참조

본 출원은 2021년 6월 16일에 출원된 미국 가출원 특허 번호 63/202,549의 이익을 주장하며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

발명의 기술분야

본 개시는 일반적으로 장신경병증, 예컨대 히르슈스프룽 질병(HSCR) 및 참자 신경절저하증의 치료에 관한 것이

[0001]

[0002]

[0003]

[0004]

다.

배경 기술

- [0005] 장신경계(ENS)는 전체 위장관을 따라 확장되어 감각 자극에 반응하여 내장 운동성, 혈류 및 상피 활성을 제어한다(1). 뉴런과 신경교를 함유하는 상호 연결된 장신경절은 태아기 발달 동안 창자를 통해 이동하는 신경 능선 유래 전구 세포에서 발달한다. ENS 전구 세포에 의한 원위 결장의 불완전한 집락화는 신생아 5000명 중 1명에게 영향을 미치는 병태인 히르슈스프룽 질병(HSCR)을 유발한다(2,3). HSCR에서, 뉴런 신경매듭이 없는 원위 결장(즉, 신경절 결장)이 긴장성 수축됨을 지속하고 수축을 전파하지 않아 기능성 창자 폐색을 유발한다. HSCR 증상에는 대변과 공기가 정체되는 난치성 변비, 복부 팽만, 성장 장애, 간헐적인 구토, 내장 염증(장염), 박테리아의 혈액으로의 이동으로 패혈증과 조기 사망을 유발하는 위험이 포함된다(2).
- [0006] HSCR은 임상적으로 짧은 분절(S-HSCR)과 긴 분절 형태(L-HSCR)로 세분된다(4). >80%의 경우에서 야기되는 S-HSCR은 ENS가 직장과 구불결장에 부재함을 의미한다. L-HSCR은 원위 내장의 더 긴 영역이 신경절이라는 것을 의미한다. HSCR 병인은 불완전하게 이해되지 않아왔으나 많은 유전자가 HSCR 위험에 영향을 미친다(2). 더욱이, 유전적 위험 변이는 비유전적 인자와 조합하여 ENS 전구 세포에 의한 완전한 내장 집락화를 방지할 수 있다(5). 이러한 비멘델 유전은 정상적인 ENS 발달을 위해 많은 단백질이 함께 작용해야 하기 때문에 야기된다.
- [0007] 1948년 이래로, HSCR을 가진 대부분의 소아는 원위 신경절 내장의 수술적 제거에 의해 생명을 구했다(16, 17). 그러나 이 절차는 이상적이지 않다. 수술 후 합병증은 흔하며 오래 지속될 수 있어 생존(예를 들어, 장염) 및/또는 삶의 질(예를 들어, 요실금 또는 폐색 증상)에 영향을 미칠 수 있다(18-20). 하나의 유망한 접근법은 ENS를 재건하고 수술의 필요성을 저감하는 "재생 의학"일 것이다. 이 아이디어는 많은 군들이 세포 이식 기반 HSCR 치료요법을 발달시키도록 촉발하였다(21). 그러나 많은 고무적인 결과에도 불구하고 몇 가지 어려움이 지속된다(22). 줄기세포의 최적의 공급원, 이식 전 이상적인 증폭 및/또는 분화 전략, 세포 전달 방법, 이식 후 세포 기능 및 운명은 아직 잘 정의되어 있지 않다. 추가적으로, 비자율 세포 이식에는 면역억제가 요구될 수 있다.
- [0008] 창자 신경절저하증으로도 알려진 신경절저하증은 창자 벽 내 신경 수 저감을 유발하는 장애이다. 창자 신경절저하증은 HSCR을 모방할 수 있다; 두 병태를 모두 갖는 환자는 만성 변비, 창자 폐색 및 장염(창자의 염증)이 존재할 수 있다. 신경절저하증이 있는 환자는 또한 대변중(결장 내부 배설물의 경화), 창자의 출혈이나 천공, 팽창된 결장으로 초래되는 호흡 문제를 포함한 심각한 합병증을 앓을 수 있다. 신경절저하증의 정확한 원인은 종종 알려져 있지 않다. 어떤 경우에는 출생 시 존재하는 인자(선천적)로 인해 발생하는 반면, 다른 경우에는 후천적인 조건인 것으로 여겨진다. 독립성 신경절저하증의 관리에는 일반적으로 영향을 받은 내장 분절을 제거하는 수술을 수반한다.
- [0009] 따라서 장신경병증, 예컨대 HSCR 및 창자 신경절저하증에 대한 대안적인 치료, 특히 원위 결장의 신경발생을 유도하고 HSCR 및 창자 신경절저하증 환자의 원위 결장 운동성을 회복시키는 것을 목표로 하는 치료에 대한 분명한 필요가 존재한다.
- [0010] 본 설명은 다수의 문서를 참조하며, 그 내용 전체가 본원에 참조로 포함된다.

발명의 내용

- [0011] 본 개시는 장신경병증, 예컨대 히르슈스프룽 질병의 하나 이상의 병리학적 특징의 치료를 위한 GDNF와 단쇄 지방산의 조합물의 용도에 관한 것이다.
- [0012] 양태 및 구현예에서, 본 개시는 다음의 항목 1 내지 50에 관한 것이다:
- [0013] 1. 장신경병증을 앓는 인간 대상체를 치료하기 위한 방법으로서, 대상체에게 유효량의 (i) 신경교 세포주 유래 신경영양 인자(GDNF) 폴리펩티드; 및 (ii) 단쇄 지방산(SCFA), 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0014] 2. 항목 1에 있어서, GDNF 폴리펩티드는 서열번호 1(도 3a)의 아미노산 78-211과 적어도 70% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 방법.
- [0015] 3. 항목 2에 있어서, GDNF 폴리펩티드는 서열번호 1(도 3a)의 아미노산 78-211과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 방법.
- [0016] 4. 항목 3에 있어서, GDNF 폴리펩티드는 서열번호 1(도 3a)의 아미노산 78-211과 적어도 95% 동일성을 갖는 아

미노산 서열을 포함하는, 방법.

- [0017] 5. 항목 4에 있어서, GDNF 폴리펩티드는 서열번호 1(도 3a)의 아미노산 78-211을 포함하는, 방법.
- [0018] 6. 항목 1 내지 항목 5 중 어느 한 항목에 있어서, 인간 대상체에게 투여된 GDNF 폴리펩티드의 유효량은 마우스 새끼에서 약 5 μ g 내지 약 20 μ g의 용량에 해당하는, 방법.
- [0019] 7. 항목 1 내지 항목 6 중 어느 한 항목에 있어서, SCFA는 C3-C5 SCFA인, 방법.
- [0020] 8. 항목 1 내지 항목 7 중 어느 한 항목에 있어서, SCFA는 부티르산인, 방법.
- [0021] 9. 항목 1 내지 항목 8 중 어느 한 항목에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA는 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 약학적 조성물 내 존재하는, 방법.
- [0022] 10. 항목 9에 있어서, 약학적으로 허용되는 담체는 식염수 용액 또는 겔화제를 포함하는, 방법.
- [0023] 11. 항목 1 내지 항목 10 중 어느 한 항목에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA는 관장을 통해 직장으로 투여되는, 방법.
- [0024] 12. 항목 1 내지 항목 10 중 어느 한 항목에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA는 원위 결장 벽으로 주사에 의해 투여되는, 방법.
- [0025] 13. 항목 1 내지 항목 12 중 어느 한 항목에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA는 1일 1회 최대 1일 4회 투여되는, 방법.
- [0026] 14. 항목 1 내지 항목 13 중 어느 한 항목에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA는 적어도 2 연속일 동안 투여되는, 방법.
- [0027] 15. 항목 1 내지 항목 14 중 어느 한 항목에 있어서, 방법은 대상체에서 신경절 또는 저신경절 분절의 수술적 제거 전에 수행되는, 방법.
- [0028] 16. 항목 1 내지 항목 15 중 어느 한 항목에 있어서, 방법은 대상체의 신경절 또는 저신경절 분절의 수술적 제거 후에 수행되는, 방법.
- [0029] 17. 항목 15 또는 항목 16에 있어서, 신경절 또는 저신경절 분절의 수술적 제거는 폴쓰루 수술을 통해 이루어지는, 방법.
- [0030] 18. 항목 1 내지 항목 17 중 어느 한 항목에 있어서, 장신경병증은 창자 신경절저하증인, 방법.
- [0031] 19. 항목 1 내지 항목 17 중 어느 한 항목에 있어서, 장신경병증은 히르슈스프룽 질병(HSCR)인, 방법.
- [0032] 20. 항목 19에 있어서, 대상체는 단분절 HSCR을 앓는 것인, 방법.
- [0033] 21. 항목 16 또는 항목 17에 있어서, HSCR은 콜라겐 VI 연관 HSCR인, 방법.
- [0034] 22. 항목 1 내지 항목 21 중 어느 한 항목에 있어서, 인간 대상체는 5세 미만인, 방법.
- [0035] 23. 항목 22에 있어서, 인간 대상체는 6개월 미만인, 방법.
- [0036] 24. 항목 1 내지 항목 23 중 어느 한 항목에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA는 직장 및/또는 구불결장 내로 투여되는, 방법.
- [0037] 25. 제29항에 있어서, 약학적 조성물은 직장구불결장 영역으로 투여되거나 투여를 위한 것인, 방법.
- [0038] 26. 장신경병증을 앓는 인간 대상체를 치료하는 용도를 위한 조합물로서, (i) GDNF 폴리펩티드; 및 (ii) SCFA, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르를 포함하는, 조합물.
- [0039] 27. 항목 26에 있어서, GDNF 폴리펩티드는 서열번호 1(도 3a)의 아미노산 78-211과 적어도 70% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 용도를 위한 조합물.
- [0040] 28. 항목 27에 있어서, GDNF 폴리펩티드는 서열번호 1(도 3a)의 아미노산 78-211과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 용도를 위한 조합물.
- [0041] 29. 항목 28에 있어서, GDNF 폴리펩티드는 서열번호 1(도 3a)의 아미노산 78-211과 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 용도를 위한 조합물.

- [0042] 30. 항목 29에 있어서, GDNF 폴리펩티드는 서열번호 1(도 3a)의 아미노산 78-211을 포함하는, 용도를 위한 조합물.
- [0043] 31. 항목 26 내지 항목 30 중 어느 한 항목에 있어서, 사용된 재조합 GDNF 폴리펩티드의 용량은 마우스 새끼에서 약 5 μ g 내지 약 20 μ g의 용량에 해당하는, 용도를 위한 조합물.
- [0044] 32. 항목 26 내지 항목 31 중 어느 한 항목에 있어서, SCFA는 C3-C5 SCFA인, 용도를 위한 조합물.
- [0045] 33. 항목 26 내지 항목 32 중 어느 한 항목에 있어서, SCFA는 부티르산인, 용도를 위한 조합물.
- [0046] 34. 항목 26 내지 항목 33 중 어느 한 항목에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA는 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 약학적 조성물에 존재하는, 용도를 위한 조합물.
- [0047] 35. 항목 34에 있어서, 약학적으로 허용되는 담체는 식염수 용액 또는 겔화제를 포함하는, 용도를 위한 조합물.
- [0048] 36. 항목 26 내지 항목 35 중 어느 한 항목에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA는 관장을 통해 직장으로 투여되는, 용도를 위한 조합물.
- [0049] 37. 항목 26 내지 항목 35 중 어느 한 항목에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA는 원위 결장 벽으로 주사에 의해 투여되는, 용도를 위한 조합물.
- [0050] 38. 항목 26 내지 항목 37 중 어느 한 항목에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA는 1일 1회 최대 1일 4회 투여되는, 용도를 위한 조합물.
- [0051] 39. 항목 26 내지 항목 38 중 어느 한 항목에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA는 적어도 2 연속일 동안 투여되는, 용도를 위한 조합물.
- [0052] 40. 항목 26 내지 항목 39 중 어느 한 항목에 있어서, 조합물은 대상체의 신경절 또는 저신경절 분절의 수술적 제거 전에 사용하기 위한 것인, 용도를 위한 조합물.
- [0053] 41. 항목 26 내지 항목 40 중 어느 한 항목에 있어서, 조합물은 대상체의 신경절 또는 저신경절 분절의 수술적 제거 후에 사용하기 위한 것인, 용도를 위한 조합물.
- [0054] 42. 항목 40 또는 항목 41에 있어서, 신경절 또는 저신경절 분절의 수술적 제거는 폴쓰루 수술을 통해 이루어지는, 방법.
- [0055] 43. 항목 26 내지 항목 42 중 어느 한 항목에 있어서, 장신경병증은 창자 신경절저하증인, 용도를 위한 조합물.
- [0056] 44. 항목 26 내지 항목 42 중 어느 한 항목에 있어서, 장신경병증은 히르슈스프룽 질병(HSCR)인, 용도를 위한 조합물.
- [0057] 45. 항목 44에 있어서, 대상체는 단분절 HSCR을 앓는 것인, 용도를 위한 조합물.
- [0058] 46. 항목 44 또는 항목 45에 있어서, HSCR은 콜라겐 VI 연관 HSCR인, 용도를 위한 조합물.
- [0059] 47. 항목 26 내지 항목 46 중 어느 한 항목에 있어서, 인간 대상체는 5세 미만인, 용도를 위한 조합물.
- [0060] 48. 항목 47에 있어서, 인간 대상체는 6개월 미만인, 용도를 위한 조합물.
- [0061] 49. 항목 26 내지 항목 48 중 어느 한 항목에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA는 직장 및/또는 구불결장으로의 투여를 위한 것인, 용도를 위한 조합물.
- [0062] 50. 항목 49에 있어서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA는 직장구불결장 영역으로의 투여를 위한 것인, 용도를 위한 조합물.
- [0063] 본 발명의 다른 목적, 장점 및 특징은 첨부된 도면을 참조하여 단지 예로서 주어진 본 발명의 특정 구현예에 대한 다음의 비제한적인 설명을 읽으면 더욱 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0064] 첨부된 도면에서:

도 1a는 비히클, 부티레이트(5mM), GDNF(1 μ g/ μ l) 및 부티레이트 + GDNF의 조합물 투여 후 동형접합성 홀스타인^{Tg/Tg} 마우스의 생존을 나타내는 그래프이다.

도 1b는 도 1a에 나타난 생존 검정의 통계적 분석을 묘사한다.

도 1c는 도 1a에 나타난 특정 시점 당 생존율을 묘사한다.

도 2a는 GDNF 단독 투여 또는 다양한 신경영양 인자와의 조합 투여 후 동형접합성 홀스타인^{Tg/Tg} 마우스의 생존을 나타내는 그래프이다.

도 2b는 도 2a에 나타난 특정 시점 당 생존율을 묘사한다.

도 2c는 도 2a에 나타난 생존 검정의 통계적 분석을 묘사한다.

도 3a는 인간 GDNF 이소형 1(UniProtKB 수탁 번호 P39905, 서열번호 1)의 아미노산 서열을 나타내며, 신호 펩티드에 해당하는 서열은 밑줄쳐져 있고(잔기 1-19), 프로펩티드에 해당하는 서열은 이탤릭체로 표시되어 있고(잔기 20-75), 성숙 폴리펩티드에 해당하는 서열은 굵은 글씨로 표시되어 있다(잔기 78-211).

도 3b-c는 인간 GDNF 이소형 1을 암호화하는 cDNA의 뉴클레오타이드 서열(RefSeq 수탁 번호 NM_000514.4, 서열번호 2)을 나타내며, 신호 펩티드를 암호화하는 서열은 밑줄쳐져 있고(뉴클레오타이드 562-618), 프로펩티드를 암호화하는 서열은 이탤릭체로 표시되어 있고(뉴클레오타이드 619-786), 성숙 폴리펩티드를 암호화하는 서열은 굵은 글씨로 표시되어 있다(뉴클레오타이드 793-1194).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0065] 기술을 설명하는 맥락에서(특별히 다음 청구항의 맥락에서) 용어 "a", "an" 및 "the" 및 유사한 지칭어의 사용은 본원에 달리 가리키지 않거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한 단수 및 복수를 모두 포함하는 것으로 해석된다.
- [0066] 용어 "포함하는", "갖는", "포함하는" 및 "함유하는"은 달리 명시되지 않는 한 개방형 용어(즉, "포함하나 이에 제한되지 않음"을 의미)로 해석된다.
- [0067] 본원에 설명된 모든 방법은 본원에서 달리 가리키지 않거나 문맥상 명확하게 모순되지 않는 한 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다.
- [0068] 본원에 제공된 임의의 및 모든 예 또는 예시적인 언어("예를 들어", "예컨대")의 사용은 단지 청구된 기술의 구현예를 더 잘 예시하기 위한 것으로 의도되며 달리 청구되지 않는 한 범위에 제한을 두지 않는다.
- [0069] 명세서의 어떤 언어도 임의의 청구되지 않은 요소를 청구된 기술의 구현예 실시예 필수적인 것으로 가리키는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0070] 본원에서, 용어 "약"은 보통의 의미를 갖는다. 용어 "약"은 값이 값을 결정하기 위해 사용되는 장치 또는 방법에 대한 고유한 오류 변형을 포함하거나 인용된 값(또는 값의 범위)에 가까운 값, 예를 들어 인용된 값의 10% 이내를 포괄함을 가리키기 위해 사용된다.
- [0071] 본원에서 값의 범위를 언급하는 것은 본원에서 달리 가리키지 않는 한 단지 범위 내에 속하는 각 개별 값을 개별적으로 지칭하는 약식 방법의 역할을 하도록 의도되었으며, 각 개별 값은 본원에서 개별적으로 인용된 것처럼 명세서에 포함된다. 범위 내의 값의 모든 하위세트도 본원에 개별적으로 인용된 것처럼 명세서에 포함된다.
- [0072] 본 개시의 특징 또는 양태가 마쿠쉬 군 또는 대안 목록의 관점에서 설명되는 경우, 당업자는 본 개시가 또한 이로써 마쿠쉬 군 또는 대안 목록의 임의의 개별 구성원 또는 구성원의 하위군의 관점에서 설명된다는 것을 인식할 것이다.
- [0073] 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업자가 보통 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 간주되어야 한다(예를 들어, 줄기 세포 생물학, 세포 배양, 분자 유전학, 면역학, 면역조직화학, 단백질 화학, 생화학).
- [0074] 달리 가리키지 않는 한, 본 개시에서 활용되는 제조법 단백질, 세포 배양 및 면역학적 기법은 당업자에게 잘 알려진 표준 절차이다. 이러한 기법은 출처 문헌, 예컨대 J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook 외, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T. A. Brown (편집자), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D. M. Glover 및 B. D. Hames(편집자), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 및 1996), 및 F. M. Ausubel 외 (편집자), Current

Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 현재까지의 모든 업데이트 포함), Ed Harlow 및 David Lane (편집자) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), 및 J. E. Coligan 외 (편집자) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons(현재까지의 모든 업데이트 포함) 전체에 걸쳐 설명되고 기술되어 있다.

[0075] 장신경병증(예를 들어, 히르슈스프룽 질병(HSCR))의 마우스 모델을 사용한 본원에 설명된 연구에서, 본 발명자들은 원위 결장에서 단쇄 지방산(SCFA) 부티레이트와 조합된 재조합 GDNF의 투여가 생존을 유의하게 개선시킨다는 것을 나타낸다. 부티레이트 단독으로는 생존에 임의의 효과도 미치지 않았지만, 재조합 GDNF의 효과를 유의하게 강화시키는 것으로 나타내었다. 이들 결과는 단쇄 지방산과 조합된 재조합 GDNF가 장신경병증(예를 들어, ENS 결함, 예컨대 HSCR)의 치료, 즉 인간 환자에서 장신경병증의 병리학적 특징 및/또는 생존 중 하나 이상을 개선하기 위해 사용될 수 있다는 증거를 제공한다.

[0076] 그러므로, 제1 양태에서, 본 개시는 장신경병증(예를 들어, 히르슈스프룽 질병(HSCR) 또는 창자 신경절저하증)을 앓는 인간 대상체를 치료하기 위한 방법을 제공하며, 방법은 대상체에게 유효량의 (i) 신경교 세포주 유래 신경영양 인자(GDNF) 및 (ii) 단쇄 지방산(SCFA), 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르를 투여하는 단계를 포함한다. 본 개시는 또한 장신경병증(예를 들어, 히르슈스프룽 질병(HSCR) 또는 창자 신경절저하증)을 앓는 인간 대상체를 치료하기 위한 (i) GDNF 및 (ii) SCFA, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르의 용도를 제공한다. 본 개시는 또한 장신경병증(예를 들어, 히르슈스프룽 질병(HSCR) 또는 창자 신경절저하증)을 앓는 인간 대상체를 치료하기 위한 약제의 제작을 위한 (i) GDNF 및 (ii) SCFA, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르의 용도를 제공한다. 본 개시는 또한 장신경병증(예를 들어, 히르슈스프룽 질병(HSCR) 또는 창자 신경절저하증)을 앓는 인간 대상체를 치료하는 용도를 위한 조합물을 제공하며, 조합물은 (i) GDNF 및 (ii) SCFA, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르를 포함한다.

[0077] 본 개시는 또한 장신경병증(예를 들어, HSCR 또는 창자 신경절저하증)을 앓는 인간 대상체에서 원위 결장 운동성 및/또는 상피 장벽을 회복시키기 위한 방법을 제공하며, 방법은 유효량의 (i) 신경교 세포주 유래 신경영양 인자(GDNF) 및 (ii) 단쇄 지방산(SCFA), 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르를 투여하는 단계를 포함한다. 본 개시는 또한 장신경병증(예를 들어, HSCR 또는 창자 신경절저하증)을 앓는 인간 대상체에서 원위 결장 운동성을 회복시키기 위해 유효량의 (i) GDNF; 및 (ii) 단쇄 지방산(SCFA), 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르의 용도를 제공한다. 본 개시는 또한 장신경병증(예를 들어, HSCR 또는 창자 신경절저하증)을 앓는 인간 대상체에서 원위 결장 운동성을 회복시키기 위한 약제의 제작을 위해 유효량의 (i) GDNF; 및 (ii) 단쇄 지방산(SCFA), 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르의 용도를 제공한다. 본 개시는 또한 장신경병증(예를 들어, HSCR 또는 창자 신경절저하증)을 앓는 인간 대상체에서 원위 결장 운동성을 회복시키는 용도를 위한 조합물을 제공하며, 조합물은 (i) GDNF 및 (ii) SCFA, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르를 포함한다.

[0078] 본 개시는 또한 장신경병증(예를 들어, HSCR 또는 창자 신경절저하증)을 앓는 인간 대상체의 원위 결장의 신경절 또는 저신경절 분절에서 장신경발생을 유도하기 위한 방법을 제공하며, 방법은 유효량의 (i) GDNF; 및 (ii) 단쇄 지방산(SCFA), 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르를 투여하는 단계를 포함한다. 본 개시는 또한 장신경병증(예를 들어, HSCR 또는 창자 신경절저하증)을 앓는 인간 대상체의 원위 결장의 신경절 또는 저신경절 분절에서 장신경발생을 유도하기 위해 (i) GDNF; 및 (ii) 단쇄 지방산(SCFA), 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르의 용도를 제공하며, 여기서 조성물은 대상체의 원위 결장으로의 투여를 위한 것이다. 본 개시는 또한 장신경병증(예를 들어, HSCR 또는 창자 신경절저하증)을 앓는 인간 대상체의 원위 결장의 신경절 또는 저신경절 분절에서 장신경발생을 유도하기 위한 약제의 제작을 위해 (i) GDNF; 및 (ii) 단쇄 지방산(SCFA), 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르의 용도를 제공한다. 본 개시는 또한 장신경병증(예를 들어, HSCR 또는 창자 신경절저하증)을 앓는 인간 대상체의 원위 결장의 신경절 또는 저신경절 분절에서 장신경발생을 유도하는 용도를 위한 조합물을 제공하며, 조합물은 (i) GDNF 및 (ii) SCFA, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르를 포함한다.

[0079] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "단쇄 지방산"(SCFA)은 아세트산(C2), 프로피온산(C3), 부티르산 및 이소부티르산(C4)뿐만 아니라 발레르산, 이소발레르산 및 2-메틸부탄산(C5)도 포함하는 탄소수 2 내지 5개의 지방산을 지칭한다. SCFA의 약학적으로 허용되는 염, 예컨대 약학적으로 허용되는 아세테이트, 프로피오네이트, 부티레이트, 이소부티레이트, 발레레이트, 이소발레레이트 및 2-메틸부타노에이트 또한 본원에 설명된 방법 및 용도로 투여/사용될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약학적으로 허용되는 염"은 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않은 유리산의 생물학적 유효성 및 특성을 유지하는 이들 염을 의미하도록 의도된다. 이러한

염은 유기산에 무기 염기 또는 유기 염기의 첨가로부터 유래된다. 이들 염에는 알칼리 금속 염, 예컨대 소듐, 리튬 및 포타슘 염; 알칼리 토금속 염, 예컨대 칼슘염 및 마그네슘 염; 금속 염, 예컨대 알루미늄 염, 철 염, 아연 염, 구리 염, 니켈 염 및 코발트 염; 무기 아민 염, 예컨대 암모늄 또는 치환된 암모늄 염, 예컨대 트리메틸암모늄 염; 및 유기 염기(예를 들어, 유기 아민)를 갖는 염, 예컨대 클로로프로카인 염, 디벤질아민 염, 디시클로헥실아민 염, 디시클로헥실아민, 디에탄올아민 염, 에틸아민 염(디에틸아민 염 및 트리에틸아민 염 포함), 에틸렌디아민 염, 글루코사민 염, 구아니딘 염, 메틸아민 염(디메틸아민 염 및 트리메틸아민 염 포함), 모르폴린 염, 모르폴린 염, N,N'-디벤질에틸렌디아민 염, N-벤질-페네틸아민 염, N-메틸글루카민 염, 페닐글리신 알킬 에스테르 염, 피페라진 염, 피페리딘 염, 프로카인 염, t-부틸 아민 염, 테트라메틸암모늄 염, t-옥틸아민 염, 트리스-(2-히드록시에틸)아민 염, 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 염뿐만 아니라 아미노산 염, 예컨대 L-오르니틴 염, L-아르기닌 염 및 L-라이신)이 포함된다. 이러한 염은 표준 기법을 사용하여 당업자에 의해 매우 쉽게 형성될 수 있다. 실제로, 약학적 화합물(즉, 약물)의 염으로의 화학적 수정은 약학적 화학자들에게 잘 알려진 기법이다(예를 들어, H. Ansel 외, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*(6th Ed. 1995)의 pp. 196 및 1456-1457 참조). SCFA의 염은, 예를 들어 매질, 예컨대 염이 침전되는 매질 또는 수성 매질에서 SCFA를 일정량의 산 또는 염기, 예컨대 등가량과 반응시킨 후 동결건조함으로써 형성될 수 있다.

[0080] 구현예에서, SCFA의 약학적으로 허용되는 염은 금속 염, 예컨대 소듐, 포타슘, 리튬, 암모늄, 칼슘 또는 마그네슘 염이다. 추가 구현예에서, SCFA의 약학적으로 허용되는 염은 소듐 염이다.

[0081] SCFA의 에스테르는 또한 본 개시의 방법 및 용도에서 투여/사용될 수 있다. SCFA 에스테르의 예는 SCFA(3개 분자)와 글리세롤로 구성된 SCFA의 트리글리세리드이다. SCFA의 트리글리세리드는 생체 내에서 대사되어 3개의 SCFA 분자를 방출하므로 SCFA의 전구약물로 고려된다. SCFA의 트리글리세리드의 예에는 트리아세틴, 트리프로프리오닌, 트리부티린, 트리아소부티린, 트리발레린 및 트리아소발레린이 포함된다.

[0082] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "장신경병증"은 ENS의 비정상적인 발달, 예를 들어 뉴런의 비정상적인 수(신경절 저하증, 무신경절증) 및/또는 뉴런의 비정상적인 분화를 포함한 ENS의 이상과 연관된 질병을 지칭한다. 장신경병증의 예로는 장신경절이상증, 예컨대 HSCR 및 창자 신경절저하증이 포함된다. 구현예에서, 장신경병증은 HSCR이다. 또 다른 구현예에서, 장신경병증은 창자 신경절저하증이다.

[0083] 본원에 사용 바와 같이 표현 "장신경발생을 유도하는"은 인간 GDNF 폴리펩티드를 포함하는 조성물로 치료하기 전에 비해 장뉴런 및/또는 장신경교세포의 생산에서의 증가를 지칭한다. 장신경계는 장일차 구심성 뉴런(EPAN), 흥분성 원형근 운동뉴런, 억제성 원형근 운동뉴런, 세로근 운동뉴런, 상행 중간뉴런, 하행 중간뉴런, 분비운동 및 혈관운동뉴런, 인테스티노푸갈 뉴런을 포함한 다양한 유형의 뉴런뿐만 아니라 뉴런에 구조적 지지를 제공하고 뉴런 유지, 생존 및 기능에 기여하는 장신경교 세포(EGC)를 포함한다(Costa 외, *Gut* 2000;(Suppl IV) 47: iv15-iv19; De Giorgio 외, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, Vol.303, No. 8: G887-G893, 2012). 이들 세포 유형 중 하나 이상의 생산은 본원에 설명된 조합물의 투여/사용에 의해 유도될 수 있다.

[0084] 또 다른 구현예에서, 본원에 설명된 조합물의 투여/사용은 결장(예를 들어, 원위 결장)에서 염증 또는 면역 세포(예를 들어, 호중구)의 침윤을 저감시킨다. 또 다른 구현예에서, 본원에 설명된 조합물의 투여/사용은 결장(예를 들어, 원위 결장)에서 면역 세포의 비를(부분적으로 또는 완전히) 회복시킨다. 또 다른 구현예에서, 본원에 설명된 조합물의 투여/사용은 상피 불투과성을 회복시킨다.

[0085] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "인간 GDNF 폴리펩티드"는 근원 성숙 인간 GDNF 단백질 또는 근원 성숙 인간 GDNF 단백질의 생물학적 활성, 예를 들어 GDNF 수용체(특히 "형질감염 중 재배열된"(RET) 원암유전자 및/또는 신경 세포 접착 분자(NCAM) 수용체)에 결합하고 GDNF 수용체(예를 들어, RET 및/또는 NCAM)를 발현하는 세포에서 신호를 촉발하는 능력을 보유하는 이의 기능적 변이체 또는 단편을 지칭한다. 근원 인간 GDNF 단백질의 아미노산 서열(이소형 1, 표준 서열)은 도 3a(서열번호 1)에 묘사되고, 성숙 단백질(잔기 78-211)에 해당하는 서열은 굵은 글씨로 강조 되어 있다. GDNF 전구체 단백질은 호모다имер로 존재하는 성숙 분비 형태로 가공된다. 각 GDNF 단량체는 사슬 간 이황화 연결에 사용되는 Cys-101과 시스테인 매듭 구성으로 알려진 분자내 고리 형성에 관여하는 다른 잔기를 포함한 7개의 보존된 시스테인 잔기를 함유한다.

[0086] 구현예에서, 인간 GDNF 폴리펩티드는 재조합 인간 GDNF 폴리펩티드이다. 단백질 또는 폴리펩티드와 관련하여 만 들어지는 용어 "재조합"은 천연 공급원(예를 들어, 생물학적 샘플)으로부터 분리되지 않은, 예를 들어, 분자 생물학 기법에 의해 생성된 재조합 핵산 제작물로부터 발현되는 단백질 또는 폴리펩티드 분자를 지칭한다. 따라서 핵산 제작물을 "재조합"으로 지칭하는 것은 핵산 분자가 유전 공학을 사용하여, 즉 인간 개입에 의해 조작되었

음을 가리킨다. 제조합 핵산 제작물은 예를 들어 형질전환(예를 들어, 형질도입 또는 형질감염)에 의해 숙주 세포 내로 도입될 수 있다.

[0087] 근원 성숙 인간 GDNF 단백질의 기능적 변이체 또는 단편은 근원 성숙 인간 GDNF 단백질에 비해 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 및/또는 첨가를 포함할 수 있고, 근원 성숙 인간 GDNF 단백질의 활성보다 더 낮거나, 동등하거나, 더 높은 생물학적 활성을 가질 수 있다. 구현예에서, 기능적 변이체 또는 단편은 근원 성숙 인간 GDNF 단백질의 활성과 동등하거나(예를 들어, 90% 내지 110% 사이) 더 높은(예를 들어, 110% 초과) 활성을 갖는다. 구현예에서, 변이체는 하나 이상의 보존적 치환을 포함한다. 보존적 아미노산 치환은 당업계에서 알려져 있으며, 특정 물리적 및 또는 화학적 특성을 갖는 하나의 아미노산이 동일한 화학적 또는 물리적 특성을 갖는 또 다른 아미노산으로 교환되는 아미노산 치환을 포함한다. 예를 들어, 보존적 아미노산 치환은 또 다른 산성 아미노산으로 치환된 산성 아미노산(예를 들어, Asp에서 Glu로 또는 그 반대), 비극성 측쇄를 갖는 또 다른 아미노산으로 치환된 비극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val 등), 또 다른 염기성 아미노산(Lys, Arg 등)에 대하여 치환된 염기성 아미노산, 극성 측쇄가 있는 또 다른 아미노산에 대하여 치환된 극성 측쇄가 있는 아미노산(Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr 등)일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 변이체는 적어도 하나의 비보존적 아미노산 치환이 있는 근원 GDNF 단백질 또는 폴리펩티드의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 비보존적 아미노산 치환(들)은 근원 성숙 인간 GDNF 단백질의 활성에 비해 변이체의 활성을 향상시킨다. 구현예에서, 인간 GDNF 폴리펩티드는 RET 수용체에 결합하는 능력을 갖는다. 구현예에서, 인간 GDNF 폴리펩티드는 NCAM 수용체에 결합하는 능력을 갖는다. 구현예에서, 인간 GDNF 폴리펩티드는 GDNF 계열 공동수용체 알파(GFR α) 1-3에 결합하는 능력을 갖는다.

[0088] 구현예에서, 인간 GDNF 폴리펩티드는 성숙 인간 근원 GDNF 단백질로부터 적어도 10, 15 또는 20개의 아미노산(예를 들어, 근접 아미노산)을 포함한다. 구현예에서, 인간 GDNF 폴리펩티드는 서열번호 1의 잔기 153-167에 해당하고 NCAM 수용체에 대한 인간 GDNF의 추정 결합 도메인인 서열 ETTYDKILKNSLRNR(글리아핀)을 포함한다(Nielsen 외, *J Neurosci.* 2009 Sep 9; 29(36): 11360-11376 참조). 다른 구현예에서, 인간 GDNF 폴리펩티드는 서열번호 1의 잔기 153-167을 포함한 성숙 인간 근원 GDNF 단백질로부터 적어도 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100개의 아미노산(예를 들어, 근접 아미노산)을 포함한다.

[0089] 구현예에서, 인간 GDNF 폴리펩티드는 도 3a(서열번호 1)에 묘사된 잔기 78-211의 서열과 적어도 50%, 60% 또는 70% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 인간 GDNF 폴리펩티드는 도 3a(서열번호 1)에 묘사된 잔기 78-211의 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 인간 GDNF 폴리펩티드는 도 3a(서열번호 1)에 묘사된 잔기 78-211의 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 인간 GDNF 폴리펩티드는 도 3a(서열번호 1)에 묘사된 잔기 78-211의 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 인간 GDNF 폴리펩티드는 도 3a(서열번호 1)에 묘사된 잔기 78-211의 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 인간 GDNF 폴리펩티드는 도 3a(서열번호 1)에 묘사된 잔기 78-211의 서열과 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 인간 GDNF 폴리펩티드는 도 3a(서열번호 1)에 묘사된 잔기 78-211의 서열과 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 인간 GDNF 폴리펩티드는 도 3a(서열번호 1)에 묘사된 잔기 78-211의 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. "동일성"은 2개의 폴리펩티드 사이의 서열 동일성을 지칭한다. 정렬된 서열의 각 위치를 비교하여 동일성을 결정할 수 있다. 퍼센트 동일성을 결정하는 방법은 당업계에서 알려져 있으며, EMBL, ClustalW, SIM, DIALIGN 등을 포함한 아미노산 서열을 정렬하고 동일성의 백분율을 결정하는 여러 도구 및 프로그램이 이용가능하다. 본원에 사용된 바와 같이, 특정된 대상체 서열 또는 이의 특정된 부분과 관련하여 주어진 동일성의 백분율은 유사성 척도로서 BLOSUM 치환 행렬(Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-9(1992))를 사용하여 스미스 워터만 알고리즘(Smith & Waterman, *J. Mol. Biol.* 147: 195-7(1981))에 의해 일반화 된 바와 같이, 필요하다면 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해, 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후, 대상체 서열(또는 이의 특정된 부분)의 아미노산과 동일한 후보 유도체 서열 내 아미노산의 백분율로 정의될 수 있다. "% 동일성 값"은 일치하는 동일한 아미노산의 수를 퍼센트 동일성이 보고되는 서열 길이로 나누는 것에 의해 결정된다.

[0090] 인간 GDNF 폴리펩티드의 공유적 수정은 본 개시의 범위 내에 포함된다. 예를 들어, 인간 GDNF 폴리펩티드의 근원 글리코실화 패턴은 수정될 수 있고(Beck 외, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9: 482-501, 2008; Walsh, *Drug Discov. Today* 15: 773-780, 2010), 미국 특허 번호 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 또는 4,179,337에 제시된 방식으로 인간 GDNF 폴리펩티드를 다양한 비단백질성 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌 중 하나에 잇는다. 인간 GDNF 폴리펩티드는 추가적인

생물학적 특성, 예컨대 프로테아제 저항성, 혈장 단백질 결합, 증가된 혈장 반감기, 조직 또는 세포내 침투 등을 폴리펩티드에 부여하는 하나 이상의 수정을 포함할 수 있다. 이러한 수정에는 예를 들어 폴리펩티드에 대한 분자/모이어티, 예컨대 지방산(예를 들어, C₆-C₁₈)의 공유적 부착, 단백질, 예컨대 알부민의 부착(예를 들어, 미국 특허 번호 7,268,113 참조); 당/다당류(글리코실화), 비오틴화 또는 페길화(예를 들어, 미국 특허 번호 7,256,258 및 6,528,485 참조)를 포함한다.

[0091] 인간 GDNF 폴리펩티드는 또한 예를 들어 인간 GDNF 폴리펩티드를 올리고머화 도메인 또는 올리고머화될 수 있는 분자(예를 들어, 스트렙타비딘의 4개 결합 부위에 결합할 수 있는 비오틴)에 융합시킴으로써 그의 다량체화 또는 올리고머화(예를 들어, 사량체화)를 유도하기 위해 모이어티에 접합될 수 있다. 인간 GDNF 폴리펩티드는 또한, 예를 들어 원위 결합으로부터의 세포에 존재하는 마커에 결합하는 항체, 항체 단편 또는 리간드를 사용하여 GDNF 폴리펩티드를 원위 결합 또는 원위 결합의 특이적 세포(예를 들어, 슈만 세포 및/또는 그의 전구체, 장신 경교세포, 혈관주위세포)에 표적화 할 모이어티에 접합될 수 있다.

[0092] 인간 GDNF 폴리펩티드는 또한 하나 이상의 치료제 또는 활성제(예를 들어, 약물, 또는 융합 폴리펩티드를 형성 하기 위한 또 다른 폴리펩티드)에 접합될 수 있다. 이는 Hunter 외 (1962) *Nature*, **144**:945; David 외 (1974) *Biochemistry*, **13**:1014; Pain 외 (1981) *J. Immunol. Meth.*, **40**:219; Nygren, *J. Histochem. Cytochem.*, **30**:407 (1982) 및 Hermanson, *Bioconjugate Techniques* 1996, Academic Press, Inc., San Diego에 의해 설명 된 이들 방법을 포함하여, 인간 GDNF 폴리펩티드를 또 다른 모이어티(예를 들어, 활성제)에 접합시키기 위한 당 업계에 알려진 임의의 방법이 사용될 수 있다. 인간 GDNF 폴리펩티드는 직접적으로 또는 링커를 통해 또 다른 모이어티에 접합될 수 있다.

[0093] 구현예에서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA(또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르)는 약학적 조성물로 제형화된다. GDNF 폴리펩티드 및 SCFA(또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르)는 동일한 약학적 조성물 또는 뚜렷이 다른 약학적 조성물로 제형화 될 수 있다. 구현예에서, GDNF 폴리펩티드 및 SCFA(또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르)는 뚜렷이 다른 약학적 조성물로 제형화된다. 구현예에서, GDNF 폴리펩티드 및 SCFA(또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르)는 동일한 약학적 조성물로 제형화된다. 이러한 약학적 조성물은 전형적으로 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함한다.

[0094] 본원에 사용된 바와 같이 "부형제"는 당업계에서 일반적인 의미를 가지며 활성 성분(약물) 자체가 아닌 임의의 성분이다. 부형제에는 예를 들어 완충제, 결합제, 윤활제, 희석제, 충전제, 증점제, 붕해제, 가소제, 코팅제, 장벽층 제형, 안정화제, 방출 지연제 및 다른 구성성분이 포함된다. 본원에 사용된 바와 같이 "약학적으로 허용되는 부형제"는 활성 성분의 생물학적 활성의 효용성을 방해하지 않고 대상체에게 독성이 없는 임의의 부형제, 즉 부형제의 한 유형이고/유형이거나 대상체에게 독성이 없는 양으로 사용하기 위한 것을 지칭한다. 부형제는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 조성물은 이러한 점에 제한되지 않는다. 담체/부형제는 예를 들어 정맥내, 비경 구, 피하, 근육내, 두개내, 안와내, 안과, 뇌실내, 피막내, 척수내, 척수강내, 경막외, 수조내, 복강내, 비강내, 직장 또는 폐(예를 들어, 에어로졸) 투여에 대하여 적합할 수 있다. 치료적 조성물은 원하는 순도를 갖 는 활성 성분을 하나 이상의 선택적 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 및/또는 안정제와 혼합함으로써 당업계 에 알려진 표준 방법을 사용하여 제조된다(Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, by Loyd V Allen, Jr, 2012, 22nd edition, Pharmaceutical Press; *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, by Rowe 외, 2012, 7th edition, Pharmaceutical Press 참조).

[0095] 구현예에서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA(또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르)는 경구 투여용으 로 제형화된다. 경구 투여용으로 적합한 제형은 (a) 액체 용액, 예컨대 희석제, 예컨대 물, 식염수 또는 PEG 400에 현탁된 유효량의 활성제(들)/조성물(들); (b) 각각 미리 결정된 양의 액체, 고체, 과립 또는 젤라틴으로 서 활성 성분을 함유하는 캡슐, 봉지 또는 정제; (c) 적절한 액체 내 현탁액; 및 (d) 적합한 에멀전이 포함될 수 있다. 정제 형태에는 락토스, 수크로스, 만니톨, 소르비톨, 칼슘 포스페이트, 옥수수 전분, 감자 전분, 미세 결정성 셀룰로오스, 젤라틴, 콜로이드성 실리콘 디옥사이드, 활석, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 및 다른 부형제, 착색제, 충전제, 결합제, 희석제, 완충제, 습윤제, 방부제, 향미제, 염료, 붕해제 및 약학적으로 양립 가능한 담체 중 하나 이상이 포함될 수 있다. 로젠지 형태는 향미료, 예를 들어, 수크로스 내 활성 성분뿐만 아 니라 활성성분 성분 이외에, 당업계에 알려진 담체를 함유하는 불활성 베이스, 예컨대 젤라틴 및 글리세린 또는 수크로스 및 아카시아 에멀전, 겔 등 내 활성성분을 포함하는 알약을 포함할 수 있다.

[0096] 구현예에서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA(또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르)는 비경구 투여

(예를 들어, 주사) 용으로 제형화된다. 비경구 투여를 위한 제형에는 예를 들어 부형제, 멸균수 또는 식염수, 폴리알킬렌 글리콜, 에컨대 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 기원의 오일 또는 수소화 나프탈렌을 함유할 수 있다. 생체 적합성, 생분해성 락타이드 중합체, 락타이드/글리콜라이드 공중합체 또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체를 사용하여 화합물의 방출을 제어할 수 있다. 잠재적으로 유용한 다른 비경구 전달계에는 에틸렌비닐 아세테이트 공중합체 입자, 삼투압 펌프, 이식형 주입계 및 리소솜이 포함된다. 흡입용 제형은 부형제(예를 들어, 락토스)를 함유할 수 있거나, 예를 들어 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르, 글리코콜레이트 및 테옥시콜레이트를 함유하는 수용액일 수 있거나, 점비제 형태로 투여하기 위한 유성 용액 또는 겔일 수 있다.

[0097] 구현예에서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA(또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르)는 장전달, 즉 창자 내로의 전달을 위해 제형화된다. 이는 당업계에 잘 알려진 방법에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA(또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르)는 장제 또는 재료로 코팅되거나 캡슐화될 수 있다. 장제는 예를 들어 특정 pH에서 또는 방출이 요구되는 GI 관의 특이적 위치(예를 들어, 소장자, 대장자 또는 이의 특정 영역)에 특징적으로 존재하는 분해 효소 또는 박테리아의 존재 하에서 방출을 허용한다. 구현예에서, 장재료는 pH 민감성이고 위장관 내에서 일어나는 pH 변화에 의해 영향을 받는다(pH 민감성 방출). 장재료는 전형적으로 위 pH에서 불용성으로 지속되며, 이후 하류 위장관(예를 들어, 종종 십이지장 또는 때때로 결장)의 더 높은 pH 환경에서 활성 성분의 방출을 허용한다. 또 다른 구현예에서, 장재료는 하부 위장관, 특히 결장에 존재하는 박테리아 효소(예를 들어, 탄수화물 가공 효소, 에컨대 글리코시다제, 다당류 분해효소 및 탄수화물 에스테라제)에 의해 분해되는 효소적으로 분해가능한 중합체를 포함한다. 이러한 장재료는, 예를 들어 셀룰로오스성 중합체, 에컨대 히드록시프로필 셀룰로오스, 히드록시에틸 셀룰로오스, 히드록시메틸 셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸 셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸 셀룰로오스 아세테이트 숙시네이트, 히드록시프로필메틸 셀룰로오스 프탈레이트, 메틸셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 셀룰로오스 아세테이트, 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트, 셀룰로오스 아세테이트 트리멜리테이트 및 카르복시메틸셀룰로오스 소듐; 바람직하게는, 아크릴산, 메타크릴산, 메틸 아크릴레이트, 에틸 아크릴레이트, 메틸 메타크릴레이트 및/또는 에틸 메타크릴레이트 및 상표명 Acryl-EZE®(Colorcon, USA), Eudragit® L30D-55 및 L100-55(pH 5.5 초과에서 가용성), Eudragit® L100(pH 6.0 초과에서 가용성), Eudragit® S(더 높은 정도의 에스테르화의 결과로 인해 pH 7.0 초과에서 가용성) 및 Eudragits® NE, RL 및 RS(상이한 정도의 투과성과 팽창성을 갖는 수불용성 중합체)를 포함하는 Eudragit®(Rohm Pharma; Westerstadt, Germany)하에 상업적으로 이용가능한 다른 메타크릴 수지로부터 형성되는 아크릴산 중합체 및 공중합체; 비닐 중합체 및 공중합체 에컨대 폴리비닐 피롤리돈, 비닐 아세테이트, 비닐 아세테이트 프탈레이트, 비닐아세테이트 크로톤산 공중합체, 에틸렌-비닐아세테이트 공중합체; 효소 분해성 중합체, 에컨대 아조 중합체, 펙틴, 키토산, 아밀로스 및 구아 검; 제인 및 셀락을 포함한다. 상이한 장재료의 조합도 사용될 수 있다. 결장 특이적 약물 전달을 위한 접근법은 당업계에 잘 알려져 있으며(예를 들어, Philip 외, *Oman Med J.* 2010 Apr; 25(2): 79-87; Lee 외, *Pharmaceutics.* 2020 Jan; 12(1): 68), pH 의존성계(예를 들어, pH 의존성 중합체 사용), 수용체 매개계, 자기 구동계, 지연 또는 시간 의존성계, 미생물 촉발 약물 전달계(예를 들어, 결장 미생물 에컨대 글루코코니다제, 자일로시다제, 아라비노시다제, 갈락토시다제에 의해 생산된 효소에 의해 분해될 수 있는 당 기반 중합체 포함), 압력 제어 결장 전달 캡슐(결장에서 일어나는 더 높은 압력에 의해 유도된 약물 방출), 삼투압 제어 약물 전달뿐만 아니라 이들 접근법 중 임의의 조합(예를 들어, pH 의존적 및 미생물 촉발 약물 전달의 조합된 접근법을 사용하는 결장 표적 전달계(CODESTM))를 포함한다.

[0098] 구현예에서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA(또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르)는 장재료로 만들어진 캡슐(장캡슐)로 제형화된다.

[0099] 구현예에서, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA(또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르)는 대상체의 원위 결장으로의 투여를 위해 제형화된다.

[0100] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "원위 결장"은 결장의 마지막 3개의 분절, 즉 하행 결장, 구불결장 및 직장을 지칭한다. 구현예에서, 약학적 조성물은 직장 및/또는 구불결장으로 투여되거나 투여를 위한 것이다. 구현예에서, 약학적 조성물은 구불결장의 마지막 부분과 직장의 시작을 포함하는 직장구불결장 영역에 투여되거나 투여를 위한 것이다. 당업자는 GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA(또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르)가 원위 결장으로 직접 투여될 수 있거나, 원위 결장으로부터 떨어진 부위에 투여될 수 있지만 원위 결장으로의 GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA(또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르)의 전달을 제공하기 위한 적합한 수단을 사용하여 투여될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 제형(들)은 원위 결장의 조건(예를 들어, pH, 효소적 환경, 박테리아 환경 등) 하에서 특이적으로 분해되는 코팅을 포함할 수 있고, 따라서 제형(들)은 위-창자계의 또 다른 영역에 투여될 수 있으나, GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA(또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는

는 에스테르)는 제형이 결장, 보다 구체적으로 원위 결장에 도달한 후에만 방출될 것이다. 결장 특이적 약물 전달을 위한 접근법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Philip 외, *Oman Med J.* 2010 Apr; 25(2): 79-87; Lee 외, *Pharmaceutics.* 2020 Jan; 12(1): 68 참조), pH 의존성계(예를 들어, pH 의존성 중합체 사용), 수용체 매개계, 자기 구동계, 지연 또는 시간 의존성계, 미생물 촉발 약물 전달계(예를 들어, 결장 미생물, 예컨대 글루코노시다제, 자일로시다제, 아라비노시다제, 갈락토시다제에 의해 생산된 효소에 의해 분해될 수 있는 당 기반 중합체 포함), 압력 제어 결장 전달 캡슐(결장에서 일어나는 더 높은 압력에 의해 유도되는 약물 방출), 삼투압 제어 약물 전달뿐만 아니라 이들 접근법의 임의의 조합(예를 들어, pH 의존적 및 미생물 촉발 약물 전달의 조합된 접근법을 사용하는 결장 표적 전달계(CODESTM))을 포함한다.

[0101] 직장/원위 결장 투여를 위한 제형은 좌제로 제시될 수 있으며, 이는 대상 조성물을, 예를 들어 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 좌제 왁스 또는 살리실레이트를 포함하는 하나 이상의 적합한 비자극성 담체와 혼합하여 제조될 수 있고, 이는 실온에서는 고체이지만 체온에서는 액체이므로 적절한 체강에서 녹아 GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA(또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르)를 방출할 것이다. 최근에는, 액상 좌제가 발달되었다. 액상 좌제는 전형적으로 감열성 및/또는 점막접착성 중합체, 예컨대 폴록사머, Carbopol®(가교결합된 폴리아크릴산 중합체), 소듐 알지네이트, 폴리카보필, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스(HPMC), 히드록시에틸 셀룰로오스 및 메틸셀룰로오스를 함유한다.

[0102] 직장/원위 결장 투여를 위한 제형은 직장 및 원위 결장에 주사되는 관장제, 액체 약물 용액, 현탁액 또는 에멀전으로 또한 제시될 수 있다. GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA(또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르)가 희석되는 액체는 예를 들어 물, 식염수 용액 또는 현탁액일 수 있다.

[0103] 직장/원위 결장 투여를 위한 제형은 또한 직장 폼 또는 겔의 형태일 수 있다. 직장 겔은 점성 농도를 생성하기 위해 중합체 네트워크 내에 갇힌 용매를 함유하는 반고체 제형이다. 겔의 점도는 공용매(예를 들어, 글리세린 및 프로필렌 글리콜)와 전해질의 첨가에 의해 수정될 수 있다. 폼은 발포제를 함유한 친수성 액체 연속상과 전체에 분배된 기체 분산상을 포함한다. 직장 투여 후, 점막 표면에서는 폼 상태에서 액체 또는 반고체 상태로 전환된다. 발포제는 전형적으로 폼 생성 및 안정화에 중요한 양친매성 물질이다. 분자는 수상에 용해성인 친수성 구성성분과 수상과의 접촉을 최소화하기 위해 미셀을 형성하는 소수성 구성성분을 함유한다.

[0104] 직장/원위 결장으로의 투여는 현재 이용가능한 내시경 또는 직장 투여용으로 설계된 특수 카테터 또는 원위 결장 벽에 약 및 액체를 주사하여 수행할 수 있으며, 이는 반복 사용을 위해 직장 내 안전하게 배치되고 편안하게 지속될 수 있다.

[0105] GDNF 폴리펩티드 및/또는 SCFA(또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르)는 임의의 적합한 투여량 요법, 예를 들어 1일 4회, 1일 2회, 1일 1회, 주 2회, 주 1회 등에 따라 투여될 수 있다. 원하는 효과를 달성하기 위해 임의의 적합한 기간, 예를 들어 1주, 2주, 3주 이상 동안 치료를 수행할 수 있다.

[0106] 구현예에서, 인간 대상체에 투여되거나 투여를 위한 GDNF 폴리펩티드의 유효 용량은 마우스 새끼에서 약 5 µg 내지 약 20 µg의 용량에 해당하며, 이는 본원에 설명된 연구에서 효과적인 것으로 나타내는 범위이다. 제조된 GDNF 용액을 포함하는 10 µl 관장을 마우스 새끼에게 투여하였다. 10 µl는 새끼의 원위 결장과 직장을 채우는 데 필요한 부피에 해당하는 것으로 추정된다. 그러므로, 마우스(새끼)에 5 µg GDNF의 투여는 0.5 µg/µl GDNF 용액을 10 µl 투여함으로써 달성되고 마우스(새끼)에 20 µg GDNF 투여는 2.0 µg/µl GDNF 용액을 10 µl 투여함으로써 달성된다. 인간 아기의 원위 결장과 직장을 채우는 데 요구되는 부피는 다음의 공식을 사용하여 추정할 수 있다: 10ml x 아기 중량(kg). 그러므로, 마우스의 5 µg GDNF 용량은 인간 아기의 kg 당 약 5mg에 해당하고, 마우스의 20 µg GDNF 용량은 인간 아기의 kg 당 약 20mg에 해당한다. 따라서, 구현예에서, 인간 대상체에게 투여되거나 투여를 위한 GDNF 폴리펩티드의 유효 용량은 kg 당 약 5mg 내지 약 20mg, 바람직하게는 kg 당 약 10mg 내지 약 15mg이다. 구현예에서, GDNF 폴리펩티드는 0.5mg/ml 내지 2mg/ml 조성물(용액 또는 겔)을 통해 투여되거나 투여를 위한 것이다.

[0107] 구현예에서, 치료제(GDNF 폴리펩티드 및 SCFA 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르)의 조합물은 임의의 통상적인 투여량 형태로 투여되거나 공동투여될 수 있다(예를 들어, 연속적으로, 동시에, 상이한 시간에). 본 개시의 맥락에서 공동투여는 개선된 임상 성과를 달성하기 위해 조정된 치료 과정에서 하나 초과와 치료요법을 사용하는 것을 지칭한다. 본원에 설명된 GDNF 폴리펩티드 및 SCFA 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르의 조합물은 다른 치료요법 또는 약물, 예를 들어 진통제 또는 항염증제와 조합하여 사용될 수 있다.

[0108] 구현예에서, GDNF 폴리펩티드 및 SCFA 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르를 포함하는 조합물을

사용한 상기 언급된 치료는 수술과 조합하여 수행될 수 있다(예를 들어, 스웬슨, 소아베 또는 뒤아멜 유형의 접근법으로 수술). 특히 HSCR이 있는 신생아의 경우, 임상의는 종종 수술 전에 매일 관장 치료를 시도해 볼 것을 권장한다. 본원에 개시된 GDNF + SCFA의 조합물을 관장에 첨가하면 HSCR이 있는 소아가 수술전 관장 치료요법에 잘 반응할 가능성이 증가할 수 있다. 그러므로, 구현예에서, GDNF 폴리펩티드 및 SCFA 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르를 포함하는 조합물을 사용한 상기 언급된 치료는 폴쓰루 수술 전에 수행된다. 식염수 관장은 폴쓰루 수술 후 HSCR이 있는 소아에게도 보통 사용된다. HSCR 환자의 수술 후 문제는 소위 "전시대"라고 불리는 보유된 원위 내장의 신경절저하증에 적어도 부분적으로 기인하는 것으로 여겨진다. 따라서, GDNF 폴리펩티드 및 SCFA 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르를 포함하는 조합물을 관장에 첨가하는 것은 수술 후 보유된 원위 내장의 신경절저하증 및/또는 전시대 내 신경 하위유형 불균형을 교정하는 데 유용할 수 있다. 그러므로, 또 다른 구현예에서, GDNF 폴리펩티드 및 SCFA 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르를 포함하는 조합물을 사용한 상기 언급된 치료는 폴쓰루 수술 후에 수행된다.

[0109] 구현예에서, GDNF 폴리펩티드 및 SCFA 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르를 포함하는 조합물을 사용한 상기 언급된 치료는 HSCR의 치료를 위해 고려되고 있는 ENS 줄기 세포 기반 치료요법과 조합하여 수행된다. GDNF는 생장을 촉진하기 위해 이들 치료요법에 유용한 보조제가 될 수 있다.

[0110] HSCR은 임상적으로 짧은 분절(S-HSCR)과 긴 분절(L-HSCR) 형태로 세분된다. >80%의 경우에서 야기되는 S-HSCR은 ENS가 직장과 구불결장에 부재함을 의미한다. L-HSCR은 원위 내장의 더 긴 영역이 신경절이라는 것을 의미한다. 본원에 설명된 방법/용도는 S-HSCR 또는 L-HSCR을 앓는 인간 환자의 치료를 위한 것이다. 구현예에서, 본원에 설명된 방법/용도는 S-HSCR을 앓는 인간 환자의 치료를 위한 것이다. 구현예에서, 본원에 설명된 방법/용도는 L-HSCR을 앓는 인간 환자의 치료를 위한 것이다.

[0111] HSCR 환자는 성인 환자 또는 소아 환자일 수 있다. 구현예에서, HSCR 환자는 소아 환자, 바람직하게는 5세, 4세, 3세 또는 2세 미만의 환자, 더욱 바람직하게는 1세 미만 또는 6개월 미만의 환자이다. 또 다른 구현예에서, 환자는 남성이다.

[0112] HSCR은 RET, EDNRB, SOX10, PHOX2B 및 ZFH1B의 돌연변이뿐만 아니라 다운 증후군 또는 삼염색체 21(콜라겐 VI 연관 HSCR)과도 연관되어 있다. 또한 5 대 1 만큼 높은 남성 대 여성 비율로 유의미한 성별 차이가 있다. 구현예에서, HSCR은 콜라겐 VI 연관 HSCR이다. 또 다른 구현예에서, HSCR은 EDNRB 돌연변이 연관 HSCR이다. 구현예에서, HSCR은 남성 편향 HSCR이다. 구현예에서, HSCR은 RET 돌연변이 연관 HSCR, 예를 들어 원위 결장으로부터의 세포에서 RET 발현 및/또는 활성을 저감시키는 돌연변이와 연관된 HSCR이다. 돌연변이는 RET의 돌연변이이거나 RET 신호전달에 관여하는 단백질의 돌연변이일 수 있다. 구현예에서, 돌연변이는 RET 단백질의 돌연변이이다. 염색체 10q11.2상의 RET 유전자의 돌연변이는 가족성 HSCR의 50%, 산발성인 경우 HSCR의 15-20%를 차지하는 것으로 나타났으며, 그 중 대부분(~75%)은 L-HSCR과 연관이 있었다.

[0113] 또 다른 구현예에서, HSCR은 RET 돌연변이 연관 HSCR이 아니다.

[0114] 실시예

[0115] 본 발명은 다음의 비제한적인 실시예에 의해 더욱 상세하게 예시된다.

[0116] 실시예 1: 재료 및 방법

[0117] **마우스.** 동형접합성 홀스타인^{Tg/Tg} 마우스(Ho1^{Tg/Tg}, 삼염색체 21 [콜라겐 VI] 연관 HSCR)에 대한 모델은 10 μl의 GDNF 관장(1 μg/μl) 또는 5mM 아미노 부티레이트산(부티레이트)과 조합된 10 μl의 GDNF, 또는 다른 성장 인자 1 μg/μl, 또는 대조군으로서 비히클(1X PBS)중 하나로 처리되었다. 관장은 출생 후 4일(P) 부터 P8까지 하루에 한 번 투여되었으며, 마우스는 P60 또는 거대결장 연관 사망까지 매일 모니터링되었다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 생존 그래프와 통계 분석을 생성하였다. 일원 분산 분석 후 사후 투키 다중 비교 테스트가 시행되었으며, 유의미한 수준은 P < 0.05로 설정되었다. 각 코호트의 생물학적 복제물 수(n)는 관련되는 경우 도면에 명시된다.

[0118] 실시예 2: Ho1^{Tg/Tg} 마우스의 생존에 대한 신경영양 인자와 조합된 GDNF의 효과 평가

[0119] 신경영양 효과를 가진 것으로 알려진 분자가 삼염색체 21 [콜라겐 VI] 연관 HSCR)에 대한 마우스 모델에서 생존에 대한 GDNF의 효과를 개선시킬 수 있는지 여부를 테스트하였다(39). 동일한 마우스 모델을 사용한 이전 연구에서, 신경영양 효과를 가진 것으로 알려진 세 가지 분자(비타민 C, 세로토닌 및 엔도텔린 3)와 GDNF의 조합은

GDNF 단독에 비해 마우스의 생존을 개선시키지 못했다(Soret 외, *Gastroenterology*. 2020 Nov;159(5):1824-1838.e17. doi: 10.1053/j.gastro.2020.07.018. Epub 2020 Jul 17 참조, 보충도 1g).

[0120] 본 연구에서 테스트한 분자는 다음과 같다: 뼈 형태발생 단백질 4(BMP4), 신경 성장 인자(NGF), 뇌 유래 신경영양 인자(BDNF), 중뇌 성상세포 유래 신경영양 인자(MANF), 대뇌 도파민 신경영양 인자(CDNF), 표피 성장 인자(EGF), 뉴르투린(NRTN), 섬유아세포 성장 인자 2(FGF2), 부티레이트 및 레티노산(RA). 이들 분자는 다양한 조건 하에 신경영양 활성을 발휘하는 것으로 보고되었다(표 1).

[0121] 표1

분자	보고된 신경영양 활성	참고자료
부티레이트	부티레이트 관장은 신생 레트 결장의 신경근 전송뿐만 아니라 장관근 뉴런의 골린성 및 질소성 표현형을 모두 향상시킨다.	Soret 외, <i>Gastroenterology</i> 2010; Suply 외, <i>Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol</i> 2012
BMP4	BMP 신호전달은 장신경계의 신경 능선 세포 이동과 신경절 형성에 필요하다.	Goldstein AM 외, <i>Mech Dev</i> , 2005; Fu M 외, <i>Dev Biol</i> 2006
NGF	NGF는 슈반 세포 전구체 세포주에 대한 화학유인물질 화학동력학적 분자이다.	Cornejo 외, <i>Neurochem Res</i> 2010; Piovesana R 외, <i>Sci Rep</i> 2020
BDNF	슈반 세포 및 뉴런 유래 BDNF는 모두 절단된 말초 신경의 축삭 재생에 중요하며 BDNF는 시험관 내 기능성 장뉴런의 분화를 유도한다.	Wilhelm 외, <i>J Neurosci</i> 2012; Takaki M 외, <i>Stem Cells</i> 2006
MANF	MANF는 피질 뇌졸중 레트 모델에서 신경 전구 세포의 분화 및 이동을 통해 신경 재생 활성을 갖는다.	Tseng 외, <i>eNeuro</i> 2017; Lindahl M 외, <i>Neurobiol Dis</i> 2017
CDNF	CDNF는 장 뉴런 발달에 필수적이며 생체 내 중뇌 도파민 뉴런을 보호한다.	Lindholm 외, <i>Nature</i> 2007; Lindahl M 외, <i>Neurobiol Dis</i> 2020; Chalazonitis A 외, <i>J Comp Neurol</i> 2020
EGF	EGF는 슈반 세포 전구체 세포주에 대한 화학유인물질이자 화학동력학적 분자이며 시험관 내 인간 장신경구의 증식과 분화를 향상시킨다.	Cornejo 외, <i>Neurochem Res</i> 2010; Pan WK 외, <i>Neuroreport</i> 2016
NRTN	뉴르투린과 GDNF는 시험관 내 장뉴런과 신경교 전구 세포의 증식과 생존을 촉진한다.	Heuckeroth RO 외, <i>Dev Biol</i> 1998
FGF2	FGF2는 시험관 내 인간 장신경구의 증식과 분화를 향상시킨다.	Fattahi 외, <i>Nature</i> 2016; Pan WK 외, <i>Neuroreport</i> 2016
RA	레티노산은 쥐의 장신경계 전구체 증식을 조절하고 뉴런 전구체 분화를 향상시킨다.	Fattahi 외, <i>Nature</i> 2016; Frith T 외, <i>Stem Cell Reports</i> 2020; Sato Y 외, <i>Dev Biol</i> 2008

[0122]

[0123] 도 1a-c에 묘사된 결과는 부티레이트 단독은 마우스 생존에 효과가 없는 반면(비히클과 유사), GDNF의 효과를 유의미하게 개선시키는 것으로 나타났으며, 이는 GDNF + 부티레이트 조합이 생존에 시너지 효과를 발휘함을 가리킨다. 도 2a-c에 묘사된 결과에 의해 입증된 바와 같이, 테스트된 다른 신경영양 인자 중 어느 것도 이 마우스 모델에서 생존에 대한 GDNF의 효과를 유의미하게 개선시킬 수 없었다. 실제로, GDNF를 신경영양 인자 중 일부와 조합하면 GDNF 단독 투여에 비해 생존율도 저감시킨다(도 2c).

[0124] 본원에 제시된 결과는 신경영양 활성을 발휘하는 것으로 알려진 다른 분자가 아닌 부티레이트가 GDNF와 시너지적으로 작용하여 $Ho1^{Tg/Tg}$ 마우스의 생존율을 개선시키고, 따라서 GDNF와 부티레이트의 조합물이 인간의 장신경병증, 예컨대 히르슈스프룽 질병의 치료에 유용할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0125] 본 발명은 특정 구현예를 통해 상기 설명되었지만, 첨부된 청구항에 정의된 대상 발명의 사상과 본질을 벗어나지 않고 수정될 수 있다. 청구항에서, 단어 "포함하는"은 "포함하나 이에 제한되지 않는"이라는 문구와 실질적으로 동등한 개방형 용어로 사용된다. 단수형 "a", "an" 및 "the"는 문맥에서 달리 명시하지 않는 한 해당하는 복수형 지칭을 포함한다.

[0126] 참고자료:

[0127] 1. J. B. Furness, The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*

9, 286-294 (2012).

- [0128] 2. R. O. Heuckeroth, Hirschsprung disease - integrating basic science and clinical medicine to improve outcomes. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **15**, 152-167 (2018).
- [0129] 3. M. Rao, M. D. Gershon, Enteric nervous system development: what could possibly go wrong? *Nat Rev Neurosci* **19**, 552-565 (2018).
- [0130] 4. J. Amiel *et al*, Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet* **45**, 1-14 (2008).
- [0131] 5. R. O. Heuckeroth, K. H. Schafer, Gene-environment interactions and the enteric nervous system: Neural plasticity and Hirschsprung disease prevention. *Dev Biol* **417**, 188-197 (2016).
- [0132] 6. O. Mwizerwa *et al*, Gdnf is mitogenic, neurotrophic, and chemoattractive to enteric neural crest cells in the embryonic colon. *Dev Dyn* **240**, 1402-1411 (2011).
- [0133] 7. D. Natarajan, C. Marcos-Gutierrez, V. Pachnis, E. de Graaff, Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development* **129**, 5151-5160 (2002).
- [0134] 8. H. M. Young *et al*, GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells. *Dev Biol* **229**, 503-516 (2001).
- [0135] 9. C. S. Tang *et al*, Identification of Genes Associated With Hirschsprung Disease, Based on Whole-Genome Sequence Analysis, and Potential Effects on Enteric Nervous System Development. *Gastroenterology* **155**, 1908-1922 e1905 (2018).
- [0136] 10. E. S. Emison *et al*, Differential contributions of rare and common, coding and noncoding Ret mutations to multifactorial Hirschsprung disease liability. *Am J Hum Genet* **87**, 60-74 (2010).
- [0137] 11. J. M. Tilghman *et al*, Molecular Genetic Anatomy and Risk Profile of Hirschsprung's Disease. *N Engl J Med* **380**, 1421-1432 (2019).
- [0138] 12. H. Gui *et al*, Whole exome sequencing coupled with unbiased functional analysis reveals new Hirschsprung disease genes. *Genome Biol* **18**, 48 (2017).
- [0139] 13. N. Nagy, A. M. Goldstein, Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. *Semin Cell Dev Biol* **66**, 94-106 (2017).
- [0140] 14. C. S. Tang *et al*, Uncovering the genetic lesions underlying the most severe form of Hirschsprung disease by whole-genome sequencing. *Eur J Hum Genet* **26**, 818-826 (2018).
- [0141] 15. F. Friedmacher, P. Puri, Hirschsprung's disease associated with Down syndrome: a meta-analysis of incidence, functional outcomes and mortality. *Pediatric surgery international* **29**, 937-946 (2013).
- [0142] 16. O. Swenson, H. F. Rheinlander, I. Diamond, Hirschsprung's disease; a new concept of the etiology; operative results in 34 patients. *N Engl J Med* **241**, 551-556 (1949).
- [0143] 17. O. Swenson, A. H. Bill, Jr., Resection of rectum and rectosigmoid with preservation of the sphincter for benign spastic lesions producing megacolon; an experimental study. *Surgery* **24**, 212-220 (1948).
- [0144] 18. P. K. Tam, Hirschsprung's disease: A bridge for science and surgery. *J Pediatr Surg* **51**, 18-22 (2016).
- [0145] 19. A. Coe *et al*, Reoperation for Hirschsprung disease: pathology of the resected problematic distal pull-through. *Pediatr Dev Pathol* **15**, 30-38 (2012).
- [0146] 20. A. Pini Prato *et al*, Hirschsprung disease: do risk factors of poor surgical outcome exist? *J Pediatr Surg* **43**, 612-619 (2008).
- [0147] 21. A. J. Burns *et al*, White paper on guidelines concerning enteric nervous system stem cell therapy for

enteric neuropathies. *Dev Biol* **417**, 229-251 (2016).

- [0148] 22. C. J. McCann, O. Borrelli, N. Thapar, Stem cell therapy in severe pediatric motility disorders. *Current opinion in pharmacology* **43**, 145-149 (2018).
- [0149] 23. K. F. Bergeron, D. W. Silversides, N. Pilon, The developmental genetics of Hirschsprung's disease. *Clin Genet* **83**, 15-22 (2013).
- [0150] 24. F. Obermayr, R. Hotta, H. Enomoto, H. M. Young, Development and developmental disorders of the enteric nervous system. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10**, 43-57 (2013).
- [0151] 25. C. L. Yntema, W. S. Hammond, The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *J Comp Neurol* **101**, 515-541 (1954).
- [0152] 26. N. R. Chevalier *et al*, How Tissue Mechanical Properties Affect Enteric Neural Crest Cell Migration. *Scientific reports* **6**, 20927 (2016).
- [0153] 27. R. Hotta, R. B. Anderson, K. Kobayashi, D. F. Newgreen, H. M. Young, Effects of tissue age, presence of neurones and endothelin-3 on the ability of enteric neurone precursors to colonize recipient gut: implications for cell-based therapies. *Neurogastroenterol Motil* **22**, 331-e386 (2010).
- [0154] 28. N. M. Le Douarin, M. A. Teillet, The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *Journal of embryology and experimental morphology* **30**, 31-48 (1973).
- [0155] 29. T. Uesaka, M. Nagashimada, H. Enomoto, Neuronal Differentiation in Schwann Cell Lineage Underlies Postnatal Neurogenesis in the Enteric Nervous System. *J Neurosci* **35**, 9879-9888 (2015).
- [0156] 30. Y. Watanabe *et al*, Morphological investigation of the enteric nervous system in Hirschsprung's disease and hypoganglionosis using whole-mount colon preparation. *J Pediatr Surg* **34**, 445-449 (1999).
- [0157] 31. T. Uesaka, M. Nagashimada, H. Enomoto, GDNF signaling levels control migration and neuronal differentiation of enteric ganglion precursors. *J Neurosci* **33**, 16372-16382 (2013).
- [0158] 32. S. Gianino, J. R. Grider, J. Cresswell, H. Enomoto, R. O. Heuckeroth, GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation. *Development* **130**, 2187-2198 (2003).
- [0159] 33. H. Wang *et al*, The timing and location of glial cell line-derived neurotrophic factor expression determine enteric nervous system structure and function. *J Neurosci* **30**, 1523-1538 (2010).
- [0160] 34. A. Hoke *et al*, Glial cell line-derived neurotrophic factor alters axon schwann cell units and promotes myelination in unmyelinated nerve fibers. *J Neurosci* **23**, 561-567 (2003).
- [0161] 35. G. Paratcha, F. Ledda, C. F. Ibanez, The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* **113**, 867-879 (2003).
- [0162] 36. D. Sjostrand, C. F. Ibanez, Insights into GFRalphal regulation of neural cell adhesion molecule (NCAM) function from structure-function analysis of the NCAM/GFRalphal receptor complex. *J Biol Chem* **283**, 13792-13798 (2008).
- [0163] 37. E. Suply, P. de Vries, R. Soret, F. Cossais, M. Neunlist, Butyrate enemas enhance both cholinergic and nitrgergic phenotype of myenteric neurons and neuromuscular transmission in newborn rat colon. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **302**, G1373-1380 (2012).
- [0164] 38. A. M. Toure, M. Landry, O. Souchkova, S. W. Kembel, N. Pilon, Gut microbiota-mediated Gene-Environment interaction in the TashT mouse model of Hirschsprung disease. *Scientific reports* **9**, 492 (2019).
- [0165] 39. R. Soret *et al*, A collagen VI-dependent pathogenic mechanism for Hirschsprung's disease. *J Clin Invest* **125**, 4483-4496 (2015).
- [0166] 40. K. F. Bergeron *et al*, Male-Biased Aganglionic Megacolon in the TashT Mouse Line Due to Perturbation of Silencer Elements in a Large Gene Desert of Chromosome 10. *PLoS Genet* **11**, e1005093 (2015).

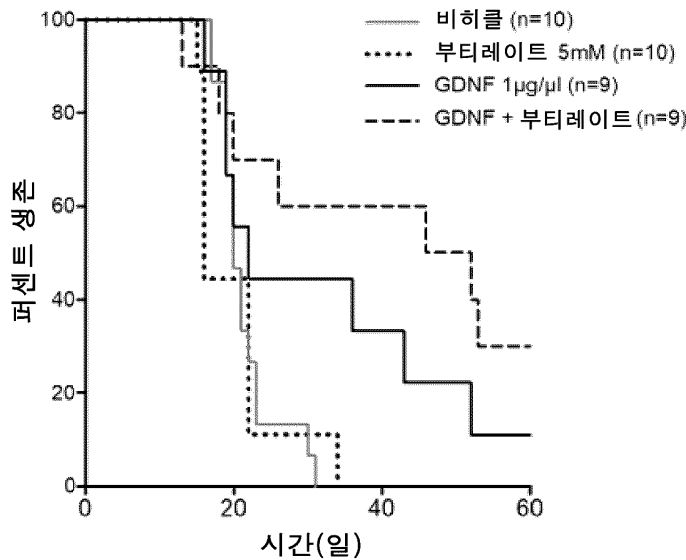
- [0167] 41. K. Hosoda *외*, Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* **79**, 1267-1276 (1994).
- [0168] 42. J. I. Lake, O. A. Tusheva, B. L. Graham, R. O. Heuckeroth, Hirschsprung-like disease is exacerbated by reduced de novo GMP synthesis. *J Clin Invest* **123**, 4875-4887 (2013).
- [0169] 43. A. Schuchardt, V. D'Agati, L. Larsson-Blomberg, F. Costantini, V. Pachnis, Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* **367**, 380-383 (1994).
- [0170] 44. F. Fattahi *외*, Deriving human ENS lineages for cell therapy and drug discovery in Hirschsprung disease. *Nature*, (2016).
- [0171] 45. Z. Li *외*, Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. *J Neurosci* **31**, 8998-9009 (2011).
- [0172] 46. N. Bondurand, D. Natarajan, A. Barlow, N. Thapar, V. Pachnis, Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. *Development* **133**, 2075-2086 (2006).
- [0173] 47. Z. Cheng *외*, Murine model of Hirschsprung-associated enterocolitis. I: phenotypic characterization with development of a histopathologic grading system. *J Pediatr Surg* **45**, 475-482 (2010).
- [0174] 48. L. S. Cheng, D. M. Schwartz, R. Hotta, H. K. Graham, A. M. Goldstein, Bowel dysfunction following pullthrough surgery is associated with an overabundance of nitrergic neurons in Hirschsprung disease. *J Pediatr Surg* **51**, 1834-1838 (2016).
- [0175] 49. D. Coyle, A. M. O'Donnell, J. Gillick, P. Puri, Altered neurotransmitter expression profile in the ganglionic bowel in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* **51**, 762-769 (2016).
- [0176] 50. A. M. Toure, B. Charrier, N. Pilon, Male-specific colon motility dysfunction in the TashT mouse line. *Neurogastroenterol Motil* **28**, 1494-1507 (2016).
- [0177] 51. I. Zaitoun *외*, Altered neuronal density and neurotransmitter expression in the ganglionated region of Ednrb null mice: implications for Hirschsprung's disease. *Neurogastroenterol Motil* **25**, e233-244 (2013).
- [0178] 52. M. Luz, E. Mohr, H. C. Fibiger, GDNF-induced cerebellar toxicity: A brief review. *Neurotoxicology* **52**, 46-56 (2016).
- [0179] 53. D. J. Creedon *외*, Neurturin shares receptors and signal transduction pathways with glial cell line-derived neurotrophic factor in sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7018-7023 (1997).
- [0180] 54. N. Pilon, D. Raiwet, R. S. Viger, D. W. Silversides, Novel pre- and post-gastrulation expression of Gata4 within cells of the inner cell mass and migratory neural crest cells. *Dev Dyn* **237**, 1133-1143 (2008).
- [0181] 55. T. Shimotake, S. Go, K. Inoue, H. Tomiyama, N. Iwai, A homozygous missense mutation in the tyrosine E kinase domain of the RET proto-oncogene in an infant with total intestinal aganglionosis. *Am J Gastroenterol* **96**, 1286-1291 (2001).
- [0182] 56. S. Ro, S. J. Hwang, M. Muto, W. K. Jewett, N. J. Spencer, Anatomic modifications in the enteric nervous system of piebald mice and physiological consequences to colonic motor activity. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **290**, G710-718 (2006).
- [0183] 57. N. M. Joseph *외*, Enteric glia are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut. *J Clin Invest* **121**, 3398-3411 (2011).
- [0184] 58. G. M. Kruger *외*, Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* **35**, 657-669 (2002).

- [0185] 59. C. Laranjeira *et al*, Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. *J Clin Invest* **121**, 3412-3424 (2011).
- [0186] 60. M. Metzger, C. Caldwell, A. J. Barlow, A. J. Burns, N. Thapar, Enteric nervous system stem cells derived from human gut mucosa for the treatment of aganglionic gut disorders. *Gastroenterology* **136**, 2214-2225 e2211-2213 (2009).
- [0187] 61. M. T. Liu, Y. H. Kuan, J. Wang, R. Hen, M. D. Gershon, 5-HT₄ receptor-mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice. *J Neurosci* **29**, 9683-9699 (2009).
- [0188] 62. K. Badizadegan *et al*, Presence of intramucosal neuroglial cells in normal and aganglionic human colon. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **307**, G1002-1012 (2014).
- [0189] 63. D. J. Wilkinson, G. S. Bethell, R. Shukla, S. E. Kenny, D. H. Edgar, Isolation of Enteric Nervous System Progenitor Cells from the Aganglionic Gut of Patients with Hirschsprung's Disease. *PLoS One* **10**, e0125724 (2015).
- [0190] 64. S. Almond, R. M. Lindley, S. E. Kenny, M. G. Connell, D. H. Edgar, Characterisation and transplantation of enteric nervous system progenitor cells. *Gut* **56**, 489-496 (2007).
- [0191] 65. S. Hetz *et al*, In vivo transplantation of neurosphere-like bodies derived from the human postnatal and adult enteric nervous system: a pilot study. *PLoS One* **9**, e93605 (2014).
- [0192] 66. R. Hotta *et al*, Transplanted progenitors generate functional enteric neurons in the postnatal colon. *J Clin Invest* **123**, 1182-1191 (2013).
- [0193] 67. J. E. Cooper *et al*, In Vivo Transplantation of Enteric Neural Crest Cells into Mouse Gut; Engraftment, Functional Integration and Long-Term Safety. *PLoS One* **11**, e0147989 (2016).
- [0194] 68. J. E. Cooper *et al*, In vivo transplantation of fetal human gut-derived enteric neural crest cells. *Neurogastroenterol Motil* **29**, (2017).
- [0195] 69. R. Hotta *et al*, Isogenic enteric neural progenitor cells can replace missing neurons and glia in mice with Hirschsprung disease. *Neurogastroenterol Motil* **28**, 498-512 (2016).
- [0196] 70. L. A. Stamp *et al*, Optogenetic Demonstration of Functional Innervation of Mouse Colon by Neurons Derived From Transplanted Neural Cells. *Gastroenterology* **152**, 1407-1418 (2017).
- [0197] 71. C. J. McCann *et al*, Transplantation of enteric nervous system stem cells rescues nitric oxide synthase deficient mouse colon. *Nature communications* **8**, 15937 (2017).
- [0198] 72. J. Belkind-Gerson *et al*, Colitis promotes neuronal differentiation of Sox2⁺ and PLP1⁺ enteric cells. *Scientific reports* **7**, 2525 (2017).
- [0199] 73. J. Belkind-Gerson *et al*, Colitis induces enteric neurogenesis through a 5-HT₄-dependent mechanism. *Inflamm Bowel Dis* **21**, 870-878 (2015).
- [0200] 74. M. Meir *et al*, Neurotrophic factor GDNF regulates intestinal barrier function in inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* **129**, 2824-2840 (2019).
- [0201] 75. D. K. Zhang *et al*, Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. *J Pathol* **222**, 213-222 (2010).
- [0202] 76. A. J. Burns, D. Champeval, N. M. Le Douarin, Sacral neural crest cells colonise aganglionic hindgut in vivo but fail to compensate for lack of enteric ganglia. *Dev Biol* **219**, 30-43 (2000).
- [0203] 77. Y. Watanabe *et al*, Extrinsic nerve strands in the aganglionic segment of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* **33**, 1233-1237 (1998).
- [0204] 78. H. Nakamura, T. Lim, P. Puri, Inflammatory bowel disease in patients with Hirschsprung's disease: a systematic review and meta-analysis. *Pediatric surgery international* **34**, 149-154 (2018).

- [0205] 79. S. J. McKeown, M. Mohsenipour, A. J. Bergner, H. M. Young, L. A. Stamp, Exposure to GDNF Enhances the Ability of Enteric Neural Progenitors to Generate an Enteric Nervous System. *Stem Cell Reports* **8**, 476-488 (2017).
- [0206] 80. S. Srinivas *et al*, Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* **1**, 4 (2001).
- [0207] 81. H. Enomoto *et al*, RET signaling is essential for migration, axonal growth and axon guidance of developing sympathetic neurons. *Development* **128**, 3963-3974 (2001).
- [0208] 82. S. Jain *et al*, Mice expressing a dominant-negative Ret mutation phenocopy human Hirschsprung disease and delineate a direct role of Ret in spermatogenesis. *Development* **131**, 5503-5513 (2004).
- [0209] 83. A. Boulende Sab *et al*, An Ebox element in the proximal Gata4 promoter is required for Gata4 expression in vivo. *PLoS ONE* **6**, e29038 (2011).
- [0210] 84. I. Laforest-Lapointe, A. Paquette, C. Messier, S. W. Kembel, Leaf bacterial diversity mediates plant diversity and ecosystem function relationships. *Nature* **546**, 145-147 (2017).
- [0211] 85. P. D. Schloss *et al*, Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7537-7541 (2009).
- [0212] 86. D. McDonald *et al*, The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome. *Gigascience* **1**, 7 (2012).
- [0213] 87. R. C. Team, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (2014).

도면

도면1a



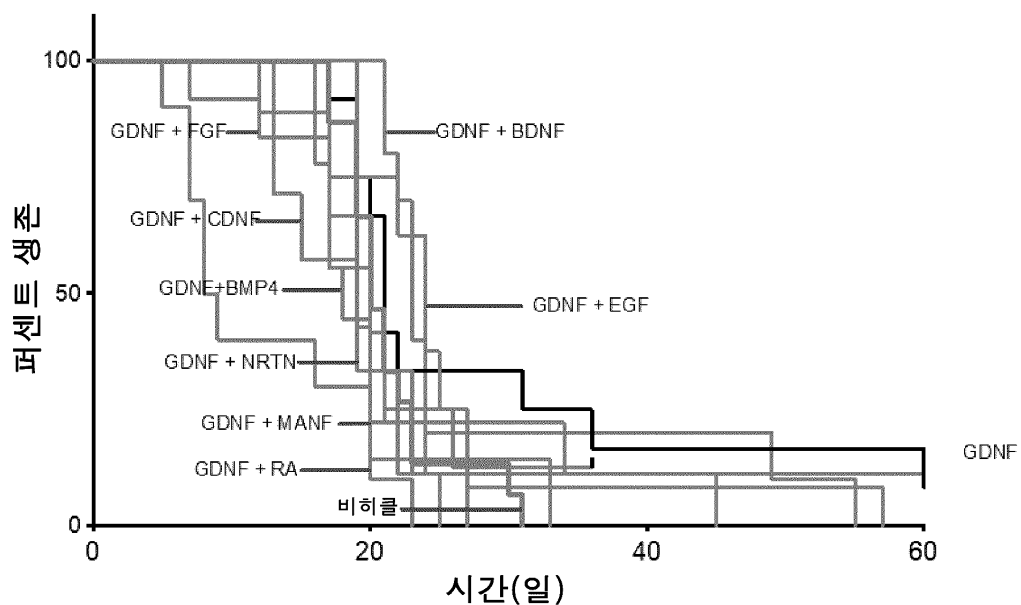
도면1b

엔드 포인트에서의 전체 생존 (조합된 모든 일수)	
투키의 다중 비교 테스트	Adj. P-값
비히클 대 부티레이트	0.7698
비히클 대 GDNF	0.006
비히클 대 GDNF + 부티레이트	0.0002
부티레이트 대 GDNF	0.0011
부티레이트 대 GDNF + 부티레이트	<0.0001
GDNF 대 GDNF + 부티레이트	<0.0001

도면1c

연령	출생 후(P) 일 당 생존의 %			
	비히클 (n =10)	부티레이트 5 mM (n =10)	GDNF 1μg/μl (n = 9)	GDNF + 부티레이트 (n = 9)
P20 (젖먹는 연령)	46.7	44.4	55.6	77.8
P25	13.3	11.1	44.4	77.8
P30	6.7	11.1	44.4	66.7
P35	0	0	44.4	66.7
P40	0	0	33.3	66.7
P45	0	0	22.2	66.7
P50	0	0	11.1	44.4
P60	0	0	11.1	33.3

도면2a



도면2b

연령	출생 후(P) 일 당 생존의 %										
			하기와 조합된 GDNF								
	비히클 (n = 15)	GDNF (n = 12)	BMP4 (n = 9)	NGF (n = 9)	BDNF (n = 10)	MANF (n = 9)	CDNF (n = 7)	EGF (n = 8)	NRTN (n = 9)	FGF (n = 12)	RA (n = 10)
P20	46.7	66.7	33.3	22.2	100	22.2	14.3	75	33.3	41.7	10
P25	13.3	33.3	11.1	11.1	20	22.2	14.3	25	0	25	0
P30	6.7	33.3	11.1	0	20	22.2	14.3	12.5	0	8.3	0
P35	0	25	11.1	0	20	22.2	0	12.5	0	8.3	0
P40	0	16.7	11.1	0	20	11.1	0	12.5	0	8.3	0
P45	0	16.7	11.1	0	20	0	0	12.5	0	8.3	0
P50	0	16.7	11.1	0	10	0	0	12.5	0	8.3	0
P60	0	8.3	11.1	0	0	0	0	12.5	0	0	0

도면2c

엔드 포인트에서의 전체 생존 (조합된 모든 일수)	
투키의 다중 비교 테스트	Adj. P-값
비히클 대 GDNF	0.0045
GDNF 대 GDNF + BMP4	0.0334
GDNF 대 GDNF + NGF	0.0057
GDNF 대 GDNF + BDNF	0.9996
GDNF vs. GDNF + MANF	0.0414
GDNF vs. GDNF + CDNF	0.0079
GDNF vs. GDNF + EGF	0.4778
GDNF vs. GDNF + NRTN	0.0037
GDNF vs. GDNF + FGF2	0.0125
GDNF vs. GDNF + RA	0.0278

도면3a

MKLWDVVAVCLVLLHTASAFPLPAGKRPPPEAPAEDRSLGRRRAPFALSSDSNMPEDY
PDQFDDVMDFIQATIKRLKRSPDKQMAVLPRRERNRQAAAANPENSRGKGRRGQRGK
NRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILKNLSRNRRLVS
DKVGQACCRPIAFDDDLNFLDDNLVYHILRKHSKRKCGCI

도면3b

1 agcctgcgct cctggcgccc tcatgtcttc acgggactcc ccgcgccggt tgacgtggtg
 61 tctcgttcgg atctccaggc aagacctcag ctccggcagc agcatcagac aaaccagtct
 121 cgtgctccca ggcagtgcgc ccagaggagg cgcagagcgc ggcagctgcc gctgagccgc
 181 ccgcagcgcc ccgggccccg gcagccccag ccaagagcgc gacgcgcgca gccctgtcag
 241 cccccaccac aaagcagcgg cggtgctcgc gacctcggct tctgggggtg cgggggcccg
 301 gcgggagagt tgccggcagc cctcgccctg ttggcgcgcg cggcgggcgg agtcttgccc
 361 gccgcctcca gcgcgccctt gctgccccgc gcgacccag gattgcgaac tcttgccctt
 421 gacctgttgg gcggggctcc gcgctccagc catcagcccc gatgggtctc ctggctggga
 481 cttggggcac ctggagttaa tgtccaacct agggctcgcg gagacccgat ccgaggtgcc
 541 gccgcccggac gggactttta gatgaagtta tgggatgtcg tggctgtctg cctgggtgctg
 601 ctccacaccg cgtccgcctt ccgctgccc gccggaaga ggcctcccga ggcgcccgcg
 661 gaagaccgct ccctcgcccg ccgcccgcgc cccttcgcgc tgagcagtga ctcaaatatg
 721 ccagaggatt atcctgatca gttcgatgat gtcatggatt ttattcaagc caccattaaa
 781 agactgaaaa ggtcaccaga taaacaaatg gcagtgtctc ctagaagaga gcggaatcgg
 841 caggctgcag ctgccaaccc agagaattcc agaggaaaag gtccggagagg ccagaggggc
 901 aaaaaccggg gttgtgtctt aactgcaata catttaaatg tcaactgactt gggctctgggc
 961 tatgaaacca aggaggaact gatttttagg tactgcagcg gctcttgcaa tgcagctgag
 1021 acaacgtacg acaaaatatt gaaaaactta tccagaaata gaaggtggtt gagtgaacaa
 1081 gtagggcagg catgttgtag acccatcgcc tttgatgatg acctgtcgtt tttagatgat
 1141 aacctggttt accatattct aagaaagcat tccgctaaaa ggtgtggatg tatctgactc
 1201 cggctccaga gactgctgtg tattgcatct ctgctacagt gcaaagaaa ggaccaaggt
 1261 tcccaggaaa tgtttgccca gaatggaaga tgaggaccaa ggagcggag gaggaggaa
 1321 aagaagagga ggagaggagg gaggaggagg aggagaggga aggcagccat catgggagcc
 1381 tggtagaggg agatccagct acagacaact ggacaggaga gagagaaaa agccctcttg
 1441 atttcccagg atggcagccg atgtcactag aagctcaggg ctgatgttcc tggttggcta
 1501 ttgccaccat ttcagctgat acagtccacc atcactgatt accggcgcgg ttgcggtgga
 1561 tgcaacttgaa ccaaaccagt gtatctcctg tgatttgttt tcatgtgtcc gaagacacca
 1621 gggaaacaga gatcctggtg ttgttccttg ttattacgtt ttactgctga aagtaagagg
 1681 tttatttttc tgtcactcag tggagacata ccctggaaa gagaggggaa aaaaaagca
 1741 aagatacaag agataatcac ctttgcatth gaaagttag gcccagggtt tactacaacc
 1801 agcatttttg ccaacgggtg gtgattgatt tccatcacgg tgtgtggggg ggaagaagt
 1861 tggctaggaa ccaaaaaggc tgtgtcatg attaaacaca aacctgaagg tatttccttt
 1921 atgtccttgg aaacaggaaa cgagttgtgg ttttcgccag cattcttgta ggagagaatc
 1981 ggggaaggcc ccgaactgcc ccggggcagg gagagccctt caggcctggt ggtttacaga
 2041 gagacagatg ttacataacc agctccgttg atgctgggtc accagtgacc agagaagcta
 2101 ctcgatgcaa tgcactgtgt tcagatacag aaatatagag aagatattta ttgaaattta
 2161 agttattgtt atttattacc gttcactaat gaatttctct tttttccctt atttattaaa
 2221 gttttctttt aaaggtgcca aagtatatgt gctcgcaaaa tgcaaaagaa ggtgacaaaa
 2281 ggaaatttga atttggaaca aggttccatg cttttcaaag tattaaaaag ttttttgcca
 2341 ggcaaaaatc acttacttta cttttttaag aaaatttgct attaatcttc ccagatttc
 2401 agcatttttc ccaattttta tttgtggagc atctcaggca agccccctt cctggagcag
 2461 cgtgcagaga ccactggcac ttgactttat ttcttccttg ctccattgct gaacagaaat
 2521 gtcgtgggct ccacttctcg ttgtctttaa gctcttagtc ccctccacgt atacctatct
 2581 gtactatgca taaccatatg tagaaaagg tccagttcctt ttagtaggta gtcctggatt
 2641 taatgctgac ctaaaagtaa tgtcgacaa gctgtcagg agctgccgtt ctaccgactc
 2701 cctccatccc tgcccacca ctgccctccc gagaatatgc tggctgccc gtgcagccc
 2761 ggagacacag gggccttcca gaggtagggt ctaccaggtc ctgtacaacc cctgggctgt
 2821 caccgggggt caacagctgc tgctcctata taccacaaac cctgacagct ccctggggag
 2881 cagatggctg agaagggtgc tgaggaagcc atattgggac cagccacagc cacacacatg

도면3c

```

2941 gagcctcata cttaggagcg tgctgccttt aaatgaaggt ggtcggggcc agtgcagcgg
3001 ctcacaccca taatcccaac actttggaaa gccaaagggtg gaggatctct tgaaccagg
3061 agtttgagac cagcttgggc aacataggga gacctgtct ctacagaaac tttaaaatt
3121 aggcaggcat gatggtgcac acctgtggtc ccagctactc aagaggctga aggaggatca
3181 cttgagtcca gaaggtcgag gctgcagtga gctgtgatca tgccactgca ctccagccta
3241 agtgacagtg cggtagcctg tctcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaagag gttggagcag
3301 gaggaagcat aggggcgga acagccacct cctccatgcc ctagattgtg aatttatcgg
3361 gcagccaaca catgtatgac acactaggcc ctgtattaca gcttggtacg catttcataa
3421 aagggaattt cattaaggag ataacttatt actacctacc ttagtggcta ctagtataaa
3481 actatgacag atttagcaat taaatgaaat actggcctcc atcaaataat catagtaaca
3541 agaagcagca gttaccagac atctgatccc cttcccccac aatacccaaa ttcttcatgg
3601 ttctgccctt ctctgtcctt tctgtcctcc ttgctcgcct gggaaatgga ggaaaggcct
3661 tccctctcac actgtcttgg gatcttgctg agaattcaga ctgctcgaaa cagtgcacaa
3721 ccccgcccat ccagtcattc gtggagcaca atttgatgt ggccccagg gcactgtctc
3781 cattcagaga accttggcag tgcgatggcc actgttccca ggcttcaacc tcagtaccc
3841 ccccaacaa ctccccatgg agagtccctg cccaaaaaag ctgtaggatc caaggggtgt
3901 caatagctcg ttcccggcat cacctacaca ccacaagcag gttttaatgg aagcaagtgt
3961 ctccacaaa tccacaaaag ggtaaagttt gtgatttttc tttatcattg cgatcaccat
4021 ctgataccgt aaggagtgc cttgtttgga agttctgact tctctgatct gtcttggtcg
4081 tttgtgttat aaaaccaaag ttctctacag actttatttt tgtacaatat cattttgtaa
4141 ctttttacaa ataaaaactc atttctattg c

```

서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Soret, Rodolphe

Pilon, Nicolas

<120> COMBINATION THERAPY FOR THE TREATMENT OF ENTERIC NEUROPATHIES

<130> G12810-00827

<150> US 63/202,549

<151> 2021-06-16

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 211

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(19)

<220><221> PROPEP

<222> (20)..(75)

<220><221> mat_peptide

<222> (78)..(211)

<400> 1

Met Lys Leu Trp Asp Val Val Ala Val Cys Leu Val Leu Leu His Thr

-75 -70 -65

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

-60 -55 -50

Ala Glu Asp Arg Ser Leu Gly Arg Arg Arg Ala Pro Phe Ala Leu Ser

-45 -40 -35 -30

Ser Asp Ser Asn Met Pro Glu Asp Tyr Pro Asp Gln Phe Asp Asp Val

-25 -20 -15

Met Asp Phe Ile Gln Ala Thr Ile Lys Arg Leu Lys Arg Ser Pro Asp

-10 -5 -1 1

Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala

5 10 15

Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg

20 25 30 35

Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr

40 45 50

Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr

55 60 65

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

70 75 80

Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys Val Gly Gln

85 90 95

Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp

100 105 110 115

Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys

120 125 130

Gly Cys Ile

<210> 2

<211> 4171

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

agcctgcgct cctggcgccc tcatgtcttc acgggactcc ccgcgccggt tgacgtggtg      60
tctcgttcgg atctccaggc aagacctcag ctccggcagc agcatcagac aaaccagtct      120
cgtgctccca ggcagtgccg ccagaggagg cgcagagcgc ggcagctgcc gctgagccgc      180
ccgcagcgcc cggggcccg gcagccccag ccaagagcgc gacgcgcgca gccctgtcag      240
ccccccacc aaagcagcgg cggctgctcg gacctcggct tctgggggtg cgggggcccg      300

gcgggagagt tgccggcagc cctcgccctg ttggcgcgcg cgccggcggg agtcttggcc      360
gccgcctcca gcgcgccctt gctgccccgc gcgaccccag gattgcgaac tcttgccct      420
gacctgttgg gcggggctcc gcgctccagc catcagcccg gatgggtctc ctggctggga      480
cttggggcac ctggagttaa tgtccaacct agggctctcg gagacccgat ccgaggtgcc      540
gccgcgggac gggactttaa gatgaagtta tgggatgtcg tggctgtctg cctggtgctg      600
ctccacaccg cgtccgcctt cccgtgccc gccggtgaaga ggccctccga ggcgcccgc      660
gaagaccgct cctcggccg ccgcgcgcgc cccttcgcgc tgagcagtga ctcaaatatg      720

ccagaggatt atctgatca gttcgatgat gtcatggatt ttattcaagc caccattaaa      780
agactgaaaa ggtcaccaga taaacaaatg gcagtgttc ctagaagaga gcggaatcgg      840
caggctgcag ctgccaacc agagaattcc agaggaaaag gtcggagagg ccagaggggc      900
aaaaaccggg gttgtgtctt aactgcaata catttaaatg tcactgactt gggctctggc      960
tatgaaacca aggaggaact gattttagg tactgcagcg gctcttgca tgcagctgag      1020
acaacgtacg acaaaatatt gaaaaactta tccagaaata gaaggctggt gagtgacaaa      1080
gtagggcagg catgttcag acccatcgcc tttgatgatg acctgtcgtt tttagatgat      1140

aacctggttt accatattct aagaaagcat tccgctaaaa ggtgtggatg tatctgactc      1200
cggctccaga gactgctgtg tattgcattc ctgctacagt gcaaagaaag ggaccaaggt      1260
tcccaggaaa tgtttgccca gaatggaaga tgaggaccaa ggaggcggag gaggaggaag      1320
aagaagagga ggaggaggag gaggaggagg aggaggagga aggcagccat catgggagcc      1380
tggtagaggg agatccagct acagacaact ggacaggaga gagagaaaac agccctctgg      1440
attctccagg atggcagccg atgtcactag aagctcaggg ctgatgttcc tggttggtta      1500
ttgccacat ttcagctgat acagtccacc atcactgatt accggcgcgg ttgcggtgga      1560

tgcacttgaa ccaaaccagt gtatctctg tgatttgtt tcatgtgtcc gaagacacca      1620
gggaaacaga gatcctggtg ttgttccttg ttattacgtt ttactgctga aagtaagagg      1680
tttatttttc tgcactcag tggagacata ccctggaaag gagaggggaa aaaaaagca      1740

```

aagatacaag agataatcac ctttgcattt gaaagttgag gcccagaggtt tactacaacc 1800
agcatttttg ccaacgggtg gtgattgatt tccatcacgg tgtgtggggg gggaagaagt 1860
tggttaggaa ccaaaaaggc tgtgtcatg attaaacaca aacctgaagg tatttccttt 1920
atgtccttgg aaacaggaaa cgagttgtgg ttttcgccag cattcttgta ggagagaatc 1980

ggggaaggcc ccgaactgcc cccgggcagg gagagcccct caggcctgtt ggtttacaga 2040
gagacagatg ttacataacc agctccgttg atcggtggtc accagtgacc agagaagcta 2100
ctcgaatgca tgcattctgt tcagatacag aaatatagag aagatatatta ttgaaattta 2160
agttattgtt atttattacc gtctactaat gaatttctct tttttccctt atttattaaa 2220
gtttcttttc aaaggtgcca aagtatatgt gctcgcaaaa tgcaaagaaa ggtgacaaaa 2280
ggaaatttga attgggaaca agggctcatg cttttcaaag tattaaaaag ttttttgcca 2340
ggcaaaaatc acttacttta cttttttaag aaaatttgc attaattttc cccagatttc 2400

agcatttttc ccaattttta tttgtggagc atctcaggca agccccctt cctggagcag 2460
cgtgcagaga ccaactggcac ttgactttat ttcttccttg ctccattgct gaacagaaat 2520
gtcgtgggct ccacttcctg ttgtctttta gctcttagtc cctccacgt atacctatct 2580
gtactatgca taaccatatg tagaaaaggt tcagttcctt ttagtaggta gtcctggatt 2640
taatgtgac ctaaaagtaa tgtcgacaat gctgtcaggt agctgccgtt ctaccgactc 2700
cctccatccc tgcccaccca ctgccctccc gagaatatgc tggtgcccga gtgcagcccg 2760
ggagacacag gggccttcca gaggtagggt ctaccaggtc ctgtacaacc cctgggctgt 2820

cacgggggt caacagctgc tgctcctata tacccaaaca cctgacagct ccctggggag 2880
cagatggctg agaaggggtg tgaggaagcc atattgggac cagccacagc cacacacatg 2940
gagcctcata cttaggagcg tgctgccttt aaatgaaggt ggtcggggcc agtgcagcgg 3000
ctcacaccca taatcccaac actttgaaa gccaaaggtg gaggatctct tgaaccagg 3060
agtttgagac cagcttgggc aacataggga gaccctgtct ctacagaaac tttaaaatt 3120
aggcaggcat gatggtgcac acctgtggtc ccagctactc aagaggctga aggaggatca 3180
cttgagtcca gaaggtcgag gctgcagtga gctgtgatca tgccactgca ctccagccta 3240

agtgacagtg cggtaccctg tctcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagag gttggagcag 3300
gaggaagcat aggggcggga acagccacct cctccatgcc ctagattgtg aatttatcgg 3360
gcagccaaca catgtatgac acactaggcc ctgtattaca gcttgttacg catttcataa 3420
aagggtttt cattaaggag ataactatt actacctacc ttagtggcta ctagtataaa 3480
actatgacag atttagcaat taaatgaaat actggcctcc atcaataat catagtaaca 3540
agaagcagca gttaccagac atctgatccc ctcccccaa aatacccaa tcttcatgg 3600

ttctgccctt ctctgtcctt tctgtcctcc ttgctcgcct gggaaatgga ggaaaggcct	3660
tccctctcac actgtcttgg gatcttgcctg agaattcaga ctgctcgaaa cagtgcacaaa	3720
ccccagccat ccagtcattc gtggagcaca atttggatgt ggccccagg gcatctgtcc	3780
cattcagaga accttggcag tgcgatggcc actgttccca ggcttcaacc tcagtgaccc	3840
cccccaacaa ctcccatgg agagtccttg cccaaaaaag ctgtaggac caaggggtgt	3900
caatagctcg ttcccggcat cacctacaca ccacaagcag gttttaatgg aagcaagttg	3960
ctccacaaa tccacaaaag ggtaaagttt gtgatttttc tttatcattg cgatcaccat	4020
ctgataccgt aaggagtga cttgtttgga agttctgact tctctgatct gtcttggtcg	4080
tttgtgttat aaaaccaaag ttctctacag actttatatt tgtacaatat cattttgtaa	4140
ctttttacaa ataaaaactc atttctattg c	4171