



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0140255
(43) 공개일자 2020년12월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/196 (2006.01)
A61K 31/197 (2006.01) A61K 31/436 (2006.01)
A61K 31/444 (2006.01) A61K 38/44 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01) A61P 25/08 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/005 (2013.01)
A61K 31/196 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7026886

(22) 출원일자(국제) 2019년02월12일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2020년09월17일

(86) 국제출원번호 PCT/US2019/017623

(87) 국제공개번호 WO 2019/164703

국제공개일자 2019년08월29일

(30) 우선권주장

62/634,092 2018년02월22일 미국(US)

(71) 출원인

워싱턴 스테이트 유니버시티

미국, 99164-1060 워싱턴, 풀만 피오 박스
641060, 라이티 280/286

(72) 발명자

보겔, 카라 레인

미국 53705 위스콘신 매디슨 이글 헤이즈 303 아
파트먼트 이

집슨, 케네스 마이클

미국 99203 워싱턴 스포칸 웨스트 17 스트리트
1118

에인슬리, 개럿 로버트

미국 94010 캘리포니아 벨링게임 모렐 애비뉴 801

(74) 대리인

특허법인 남앤남

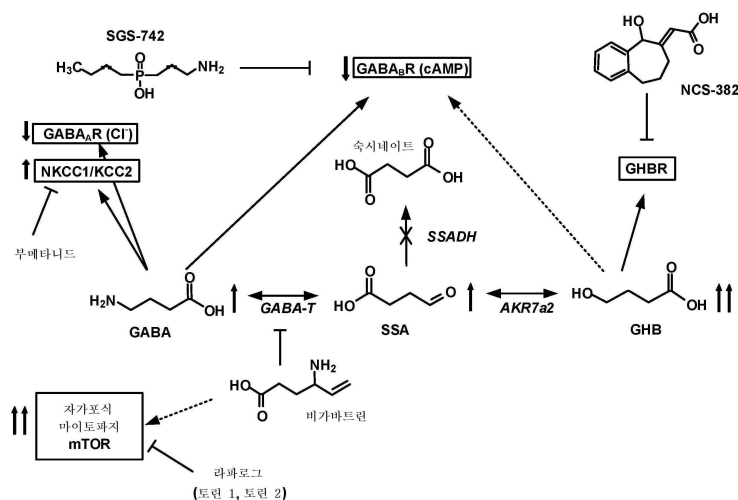
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 숙시닉 세미알데하이드 데하이드로게나제 결핍(SSADHD)을 치료하기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

숙시닉 세미알데하이드 데하이드로게나제 결핍(SSADHD)을 치료하기 위한 조성물 및 방법이 본원에 제공된다. 조성물은 표적화 벡터에 작동 가능하게 연결된 기능성 숙시닉 세미알데하이드 데하이드로게나제(SSADH) 효소를 인코딩하는 유전자, 예를 들어, *ALDH5A1*을 포함할 수 있다. 기능성 SSADH 효소는 순환 감마-하이드록시부티르산(GHB) 및 γ -아미노부티르산(GABA)의 수준을 낮추는 것으로 예상된다. 일부 구현예에서, 치료적 유효량의 표적화 벡터에 작동 가능하게 연결된 기능성 SSADH 효소를 인코딩하는 유전자를 포함하는 조성물; 하나 이상의 mTOR 억제제; 및 GABA-T 억제제를 대상체에 투여하는 것을 포함하는 조합 요법이 예상된다. 적합한 mTOR 억제제는 라파마이신을 포함하는 한편, 적합한 GABA-T 억제제는 비가바트린을 포함한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 31/197 (2013.01)

A61K 31/436 (2013.01)

A61K 31/444 (2013.01)

A61K 38/443 (2013.01)

A61P 21/00 (2018.01)

A61P 25/08 (2018.01)

C12N 9/0008 (2013.01)

C12Y 102/01024 (2013.01)

C12N 2740/16043 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

표적화 벡터에 작동 가능하게 연결된 기능성 숙시닉 세미알데하이드 데하이드로게나제(SSADH) 효소를 인코딩하는 유전자를 포함하는 숙시닉 세미알데하이드 데하이드로게나제 결핍(SSADHD)을 치료하기 위한 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 유전자가 *ALDH5A1*인 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 표적화 벡터가 바이러스 벡터인 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 바이러스 벡터가 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 아데노-관련 바이러스 벡터인 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 레트로바이러스 벡터가 렌티바이러스 벡터인 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 표적화 벡터가 간을 표적으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 기능성 SSADH 효소가 순환 감마-하이드록시부티르산(GHB) 및 γ -아미노부티르산(GABA)의 수준을 낮추는 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 혈액뇌장벽을 통과하지 않는 조성물.

청구항 9

치료적 유효량의 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 SSADHD의 치료를 필요로 하는 대상체에서 SSADHD를 치료하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 치료적 유효량이 1-10,000 μ g 기능성 SSADH 효소/체중 kg/일의 범위를 포함하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 조성물이 주 1회, 격주 1회 또는 월 1회 투여되는 방법.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 정맥내 투여되는 방법.

청구항 13

대상체에 치료적 유효량의 표적화 벡터에 작동 가능하게 연결된 기능성 SSADH 효소를 인코딩하는 유전자를 포함하는 조성물; 하나 이상의 mTOR 억제제; GABA-T 억제제; 또는 이들의 조합물을 투여하는 것을 포함하는 SSADHD

의 치료를 필요로 하는 대상체에서 SSADHD를 치료하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 하나 이상의 mTOR 억제제가 라파마이신(rapamycin), 시롤리무스(sirolimus), 템시롤리무스(temsirolimus), 에베롤리무스(everolimus), 및 리다포롤리무스(ridaforolimus), 토린(Torin) 1, 및 토린 2 중 하나 이상을 포함하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, mTOR 억제제가 라파마이신인 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, GABA-T 억제제가 비가바트린(vigabatrin)인 방법.

청구항 17

제13항에 있어서, 치료적 유효량의 토린 2, 비가바트린, 및 표적화 벡터에 작동 가능하게 연결된 기능성 SSADH 효소를 인코딩하는 유전자를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 치료적 유효량의 토린 2 및/또는 비가바트린이 1-25 μg /체중 kg/일을 포함하는 방법.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 토린 2 및/또는 비가바트린이 1일 2회 또는 3회 투여되는 방법.

청구항 20

제13항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 증가된 수준의 순환 대사물을 갖는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 순환 대사물이 GHB, GABA 또는 둘 모두인 방법.

청구항 22

치료적 유효량의 NKCC1 억제제를 대상체에 투여하는 것을 포함하는 SSADHD의 치료를 필요로 하는 대상체에서 SSADHD를 치료하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, NKCC1 억제제가 부메타니드(bumetanide), 알로프레그나놀론(allopregnanolone), 프레그나놀론(pregnanolone), 프로게스테론(progesterone), 가복사돌(gaboxadol), 에티폭신(etifoxine), XBD-173, FG-7142, 가바진(gabazine), 이소니아지드(isoniazid), 엔세니클린(encenicline) 및 AVL-3288로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, NKCC1 억제제가 부메타니드인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 본 출원은 2018년 2월 22일에 출원된 미국 가출원 번호 62/634,092호의 이익을 주장한다. 상기 확인된 출원의 전체 내용은 참조로서 본원에 완전히 포함된다.

[0003] 미 연방 후원 연구에 관한 설명

[0004] 본 발명은 미국 국립보건원에 의해 수여되는 수여 번호 NS082286, NS098856, NS085369 및 EY027476 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에 특정 권리를 갖는다.

[0005] 기술 분야

[0006] 본원에 개시된 주제는 일반적으로 신경계 장애를 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 숙시닉 세미알데하이드 데하이드로게나제 결핍(SSADHD)의 병태생리학 및 임상적 특징을 이해하는 과정은 1980년대에 설명된 이후 계속되었다(Jakobs et al. Clin Chim Acta 111:169-178 (1981); Gibson et al. Clin Chim Acta 133:33-42 (1983)). 소위 알데하이드 데하이드로게나제 5a1(aldehyde 5a1/-) 마우스라는 뮤린 녹아웃 모델의 개발과 함께 1999년에 주요 발견이 이루어졌다(Hogema et al. 2000). 이러한 동물 모델의 표현형은 심각하고, 생후 약 3주에 조기 치사가 있지만, GABA성, 글루타메이트성, GHB성, 대사성, 산화 스트레스, 및 달리 이용 가능하지 않은 기타 파라미터에 대한 통찰력을 제공하였다(Gupta et al. J Pharmacol Exp Ther 302:180-187 (2002); Cortez et al. Pharmacol Biochem Behav 79:547-553 (2004); Buzzi et al. Brain Res 1090:15-22 (2006); Wu et al. Ann Neurol 59:42-52 (2006); Jansen et al. BMC Dev Biol 8:112 (2008); Pearl et al. J Inherit Metab Dis 32:343-352 (2009); Vogel et al. Ann Clin Transl Neurol 2:699-706 (2015); Vogel et al. J Inherit Metab Dis 39:877-886 (2016); Vogel et al. Clin Pharmacol Ther 101:458-461 (2017); Vogel et al. Toxicol In Vitro 40:196-202 (2017); Vogel et al. Pediatr Neurol 66:44-52.e1. (2017); Vogel et al. Biochim Biophys Acta 1863:33-42 (2017); Vogel et al. Toxicol In Vitro 46:203-212 (2017); Vogel et al. PLoS One 12(10):e0186919 (2017)). 지금까지, 조기 치사로부터 상기 모델을 구제하는 치료제는 GABAB 및 GHB 수용체 길항제, 비-생리학적 아미노산 타우린, 항간질제 비가바트린(vigabatrin), 케톤체형성 식이, 및 토린 2(Torin 2)와 같은 라파로그(rapalog) 제제를 포함하며, 후자는 mTOR 억제제이다. GABABR 길항제인 SGS742는 진행 중인 임상 시험의 주제이다(www.clinicaltrials.gov; NCT02019667).

[0008] 주요 중추 억제 신경전달물질인 GABA(Schousboe and Waagepetersen Prog Brain Res 160:9-19 (2007)) 및 이의 관련 구조 유사체인 감마-하이드록시부티르산(GHB)은 SSADHD에서 초생리적 수준으로 축적된다(Malaspina et al. Neurochem Int 99:72-84 (2016))(도 1). 각각이 병태생리학에 기여하는 정도는 공지되어 있지 않다. 그러나, GABA에 대한 새로운 역할은 장-뇌 축, 자가포식, 일주기 리듬 및 기타를 따르는 신경-내분비 효과를 포함하여 억제성 신경전달물질의 역할을 넘어서 출현하고 있다(Kilb Neuroscientist 18:613-630 (2012); Lakhani et al. EMBO Mol Med 6:551-566 (2014); Chellappa et al. Sci Rep 6:33661 (2016); Mittal et al. J Cell Physiol 232:2359-2372 (2017)). 이들 역할은 SSADHD의 병리기전(pathomechanism)을 탐구하는 새로운 기회를 제공한다. SSADHD 치료를 위한 연구 및 전임상 약물 개발을 위한 새로운 방향이 필요하다.

발명의 내용

[0009] 일 양태에서, 표적화 벡터에 작동 가능하게 연결된 기능성 숙시닉 세미알데하이드 데하이드로게나제(SSADH) 효소를 인코딩하는 유전자를 포함하는 숙시닉 세미알데하이드 데하이드로게나제 결핍(SSADHD)을 치료하기 위한 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 유전자는 *ALDH5A1*일 수 있다.

[0010] 일부 구현예에서, 표적화 벡터는 바이러스 벡터이다. 적합한 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 또는 아데노-관련 바이러스 벡터를 포함하나, 반드시 이에 제한되지는 않는다. 특정 구현예에서, 레트로바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0011] 일부 구현예에서, 표적화 벡터는 간을 표적화한다.

[0012] 일부 구현예에서, 기능성 SSADH 효소는 순환 감마-하이드록시부티르산(GHB) 및 γ -아미노부티르산(GABA)의 수준을 낮춘다. 일부 구현예에서, 조성물은 혈액뇌장벽을 통과하지 않는다.

[0013] 또 다른 양태에서, 본 발명은 치료적 유효량의 본원에 기재된 조성물 중 임의의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 SSADHD의 치료를 필요로 하는 대상체에서 SSADHD를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 치료적 유효량은 1-10,000 μ g 기능성 SSADH 효소/체중 kg/일의 범위를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 주 1회, 격주 1회 또는 월 1회 투여된다. 일부 구현예에서, 조성물은 정맥내 투여된다.

- [0014] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에 치료적 유효량의 표적화 벡터에 작동 가능하게 연결된 기능성 SSADH 효소를 인코딩하는 유전자를 포함하는 조성물; 하나 이상의 mTOR 억제제; GABA-T 억제제; 또는 이들의 조합물을 투여하는 것을 포함하는 SSADHD의 치료를 필요로 하는 대상체에서 SSADHD를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0015] 적합한 mTOR 억제제는 라파마이신(rapamycin), 시롤리무스(sirolimus), 템시롤리무스(temsirolimus), 에베롤리무스(everolimus), 및 리다포롤리무스(ridaforolimus), 토린 1, 및 토린 2를 포함할 수 있으나, 반드시 이에 제한되지는 않는다. 특정 구현예에서, mTOR 억제제는 라파마이신이다. 특정 구현예에서, GABA-T 억제제는 비가바트린이다.
- [0016] 일부 구현예에서, 치료적 유효량의 토린 2, 비가바트린, 및 표적화 벡터에 작동 가능하게 연결된 기능성 SSADH 효소를 인코딩하는 유전자를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 조합 요법이 구상된다.
- [0017] 특정 구현예에서, 치료적 유효량의 토린 2 및/또는 비가바트린은 1-25 $\mu\text{g}/\text{체중 kg}/\text{일}$ 을 포함한다. 일부 구현예에서, 토린 2 및/또는 비가바트린은 1일 2회 또는 3회 투여된다.
- [0018] 일부 구현예에서, 대상체는 증가된 수준의 순환 대사물을 가질 수 있다. 상기 순환 대사물은 GHB, GABA 또는 둘 모두를 포함할 수 있으나, 반드시 이에 제한되지는 않는다.
- [0019] 또 다른 양태에서, 본 발명은 치료적 유효량의 NKCC1 억제제를 대상체에 투여하는 것을 포함하는 SSADHD의 치료를 필요로 하는 대상체에서 SSADHD를 치료하는 방법을 제공한다. NKCC1 억제제는 부메타나이드(bumetanide), 알로프레그나놀론(allopregnanolone), 프레그나놀론(pregnanolone), 프로게스테론(progesterone), 가복사돌(gaboxadol), 에티폭신(etifoxine), XBD-173, FG-7142, 가바진(gabazine), 이소니아지드(isoniazid), 엔세니클린(encenicline), 및 AVL-3288을 포함할 수 있으나, 반드시 이에 제한되지는 않는다. 특정 구현예에서, NKCC1 억제제는 부메타나이드이다.
- [0020] 예시적인 구현예의 이들 및 다른 양태, 목적, 특징 및 장점은 예시된 예시적인 구현예의 하기의 상세한 설명을 고려할 때 당업자에게 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 본 발명의 특징 및 장점의 이해는 본 발명의 원리가 이용될 수 있는 예시적 구현예 및 첨부된 도면을 설명하는 하기 상세한 설명을 참조하여 획득될 것이다:

도 1 - GABA 대사 및 세포내 상호작용을 예시하는 개략도. SSADHD를 갖는 환자의 결함 부위는 "X"로 표시된다. 약어: GABA, γ -아미노부티르산; GABAAR, 이오노트로픽(ionotropic) GABAA 수용체; GABABR, 메타보트로픽(metabotropic) GABAB 수용체. GABA-T, GABA-트랜스아미나제; SSA, 숙시닉 세미알데하이드; AKR7a2, 알도-케토 환원효소 7a2; GHB, γ -하이드록시부티르산; cAMP, 고리형 AMP; NKCC1, 소듐 포타슘 클로라이드 공동수송체 1; KCC2, 신경세포 포타슘 클로라이드 공동수송체 2. SSADHD에서, GABA, SSA 및 GHB는 축적된다($\uparrow$). 증가된 GABA 및 GHB는 GABAA 및 GABAB 수용체 및 추정 GHB 수용체(공지되지 않은 분자 식별)를 활성화시킨다. 그러나, GABA 및 GHB 수용체의 보상적 하향조절($\downarrow$)이 SSADHD에서 보고되었으며, 이는 과도한 GABA가 생체 내에서 증가된 억제성 신경전달을 발생시키지 않음을 시사한다. NKCC1 및 KCC2는 막횡단 클로라이드 구배를 제어하며, GABAA 수용체 방향성 막횡단 클로라이드 흐름을 결정한다. 실험 SSADHD에서, NKCC1 및 KCC2(NKCC1/KCC2)의 발현 비율은 상승되며(Vogel et al. Pediatr Neurol 66:44-52.e1. (2017c)), 이는 GABAA 수용체의 활성화가 뇌 세포로부터의 클로라이드 유출, 막 탈분극 및 신경전달의 활성화를 야기시킴을 시사한다(추가 세부사항에 대해서는 도 3 참조). 부메타나이드와 같은 NKCC1 억제제는 세포내 클로라이드 농도를 낮춘다. 따라서, SSADHD에서, 부메타나이드는 GABA 억제성 신경전달 활성을 회복하고, 발작을 효과적으로 억제할 수 있다. 마지막으로, SSADHD뿐만 아니라 비가바트린-처리 동물에서, 증가된 GABA는 이차적으로 증가된 미토콘드리아 수, 산화 스트레스, 자가포식 및 마이토파지(mitophagy)와 함께 mTOR 경로를 활성화시킨다. 토린 1 및 토린 2와 같은 mTOR 억제제는 GABA-유도, mTOR-경로 매개 세포 내 결함을 개선하고, aldh5a1-결핍 마우스의 수명을 유의하게 연장시킨다.

도 2 - NCS-382 투여(7일, q.i.d., 300 mg/kg) 후 aldh5a1-/- 마우스에서 용질 담체(Slc)의 피질 유전자 발현 프로파일을 예시하는 그래프. 상대 수준이 표시되고, 비히클을 투여받는 대조군 aldh5a1-/- 마우스에 대해 표준화된다. 담체의 기능적 역할: *17a6, *17a7, *17a8, 각각 소포성 글루타메이트(glu) 수송체, glul 공동수송체, 및 glul 수송체 3; 1a1, *1a2, 1a3, 1a4, 각각 흥분 아미노산 수송체 3, 2, 1 및 4; *32a1, GABA 소포성 수송체; 38a1, Na⁺-커플링된 아미노산 수송체 1(글루타민 수송); *6a1, 형질막 GABA 수송체; *6a11, 6a12, 6a13, 각각 Na⁺-의존성 GABA 시냅스전 말단 재흡수, Na⁺/Cl⁻-의존성 베타인, 및 Na⁺/Cl⁻-의존성 GABA 2

수송체; 7a11, 글루타메이트-시스테인 역수송체(antiporter). 별표로 표시된 유전자는 만성 NCS-382 투여 후 발현의 교정을 입증하였다. 값은 생물학적 삼중의 푸올링된 데이터를 나타낸다(n= 각각 3마리의 동물, NCS-382 및 비히클).

도 3a 및 3b - 실험적 SSADHD에서의 효소 대체 요법(ERT). (도 3a) 효소 대체 개입의 함수로서 생존일(DOL 30)까지의 Aldh5a1-/- 마우스 생존률. 정제된 인간 ALDH5A1가 i.p. 주사를 통해 DOL 10에서 시작하여 매일 투여(1 mg/kg/일)되었다. (도 3b) aldh5a1-/- 마우스에서 ERT 후 GABA-관련 유전자의 발현(aldh5a1+/+ 마우스에 비해 배수 변화; 21일령 마우스의 시상 슬라이스). 약어: Gabra5, GABAA 수용체 서브유닛 α 5; Gabra6, α -6; Gabrb1, β -1; Gabrb3, β -3; Gabrd, δ ; Gabre, ϵ ; Gabrg1, γ -1; Gabrg2, γ -2; Gabrg3, γ -3; Gabrq, Θ . 별표로 표시된 값은 ERT의 함수로서 발현의 방향성 교정을 나타낸다.

도 4a 및 4b - ERT로 처리된 동물에서의 대사 측정. 치료 계획은 도 3의 범례에 설명되어 있다. (도 4a) 유전형의 함수로서의 뇌 GHB 함량(WT=야생형, aldh5a1+/+ 마우스; MT=돌연변이체, aldh5a1-/- 마우스; PBS, 포스페이트 완충 염수; SSADH, 재조합 SSADH. (도 4b) 혈청 내 GABA. 평균 $\pm$ SD로 도시된 데이터. 통계 분석은 사후 분석(t 검정)과 함께 일원 분산 분석을 이용하였다.

도 5a-5c - SSADHD에서의 세포내 클로라이드 항상성, GABA성 신경전달 및 부메타니드(약어에 대해서는, 도 1 참조). (도 5a) 막 이온 수송 및 부메타니드의 작용 메커니즘의 개략도. (도 5b) 출생 후 생존일 20일에 수집된 aldh5a1+/+ (n=5) 및 aldh5a1-/- (n=5) 마우스의 시상하부에서의 NKCC1 및 KCC2 유전자 발현. 발현 데이터는 Bio-Rad로부터의 검증된 경로 플레이트인 q-RT-PCR을 사용하여 획득되었다. (도 5c) 100 mg/kg 부메타니드의 급성 투여 후 진정까지의 시간. 동물은 발작 사건 동안 생존일(DOL) 20 및 24일에 평가되었고, 고정(진정)까지의 시간은 Noldus 기술(텍스트 참조)을 이용하여 시각적 기록에 의해 결정되었다. 부메타니드는 초기 관찰 기록 20분 후에 이어 추가 20분의 기록 후에 대상 마우스에 복강 내 투여되었다. 발작의 전체 수는 전체 40분의 기록 기간 중 5분의 블록으로 정량화되었다. 부메타니드는 Enzo Life Sciences, Inc.(Farmingdale, NY, USA)로부터 획득되었고, DMSO 비히클에 무균 용해되었다. 비히클-처리된 대상체는 진정을 나타내지 않았다. Aldh5a1-/- 마우스(돌연변이체; MT)는 aldh5a1+/+(야생형; WT) 마우스와 비교하여 부메타니드의 진정 효과에 유의하게 더 내성이 있었으며, 후자는 거의 즉각적인 고정을 나타내었다. 고정 전 aldh5a1-/- 마우스의 활동 기간 동안(약 3-8분), 발작 활동이 관찰되지 않았다. 또한, 상기 내성은 aldh5a1-/- 마우스에서 나이가 들면서 유의하게 증가하였다(t 검정, $p < 0.05$). 사용된 약어: n, 연구된 동물 수; DOL, 생존일; sec, 초; min, 분.

도 6 - 자가포식 조절에서 AMPK 및 mTORC1의 역할의 단순화된 개략도. AMPK(아데노신 모노포스페이트-활성화 단백질 키나제) 및 mTOR(라파마이신의 기계적 표적) 둘 모두는 세포 내 에너지학, 성장 및 생존의 조절에 중요한 역할을 한다. Prkag1 및 Prkag2(단백질 키나제 cAMP-활성화 γ 서브유닛 1 및 2)는 활성 AMPK 삼량체 구조의 구성요소를 나타낸다. 반대로, RagB 및 D(ras-관련 GTP-결합 단백질 B 및 D)는 mTORC1 기능의 조절에 관여한다. Tsc1/2(결절성 경화증 단백질 1 및 2)는 mTORC1의 음성 조절인자이다. 약어: HMG-CoA 환원효소, 3-하이드록시-3-메틸글루타릴-보조효소 A 환원효소; ACC, 아세틸-CoA 카르복실라제; ATP, 아데노신 트리포스페이트; AMP, 아데노신 모노포스페이트.

도 7 - aldh5a1-/- 마우스에서 발작 유형의 대표적인 피질뇌파검사 기록. 이들 데이터는 표 2의 데이터를 생성하는 데 사용되는 대표 추적이다.

본원의 도면은 예시 목적일 뿐이며, 반드시 일정한 비율로 그려진 것은 아니다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

일반적 정의

달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 기술 및 과학 용어는 본 발명의 개시가 속하는 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 분자생물학에서 일반적인 용어 및 기술의 정의는 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition (1989) (Sambrook, Fritsch, and Maniatis); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th edition (2012) (Green and Sambrook); Current Protocols in Molecular Biology (1987) (F.M. Ausubel et al. eds.); the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (1995) (M.J. MacPherson, B.D. Hames, and G.R. Taylor eds.): Antibodies, A Laboratory Manual (1988) (Harlow and Lane, eds.): Antibodies A Laboratory Manual, 2nd edition 2013 (E.A. Greenfield ed.); Animal Cell Culture (1987) (R.I. Freshney, ed.); Benjamin Lewin, Genes IX, published by Jones and Bartlet, 2008 (ISBN 0763752223); Kendrew et al. (eds.), The

Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0632021829); Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 9780471185710); Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994), March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992); 및 Marten H. Hofker and Jan van Deursen, Transgenic Mouse Methods and Protocols, 2nd edition (2011)]에서 발견될 수 있다.

[0024] 본원에서 사용되는 단수 형태는 문맥이 명백히 달리 지시하지 않는 한 단수 및 복수의 지시대상 둘 모두를 포함한다.

[0025] 용어 "선택적" 또는 "선택적으로"는 후속 설명되는 사건, 상황 또는 치환기가 발생할 수 있거나, 발생하지 않을 수 있고, 상기 설명은 사건 또는 상황이 발생하는 경우 및 발생하지 않는 경우를 포함하는 것을 의미한다.

[0026] 종점에 의한 숫자 범위의 언급은 언급된 종점뿐만 아니라 각각의 범위 내에 포함된 모든 숫자 및 분수를 포함한다.

[0027] 파라미터, 양, 시간적 기간 등과 같은 측정 가능한 값을 언급하는 경우 본원에서 사용되는 용어 "약" 또는 "대략"은 변동이 개시된 본 발명을 수행하기에 적절한 한 특정 값의 $\pm 10\%$ 이하, $\pm 5\%$ 이하, $\pm 1\%$ 이하 및 $\pm 0.1\%$ 이하 및 특정 값으로부터의 $\pm 10\%$ 이하, $\pm 5\%$ 이하, $\pm 1\%$ 이하 및 $\pm 0.1\%$ 이하의 변동과 같은 특정 값의 변동 및 특정 값으로부터의 변동을 포함하는 것을 의미한다. 수식어 "약" 또는 "대략"이 나타내는 값은 그 자체가 또한 구체적이고 바람직하게는 개시되는 것으로 이해되어야 한다.

[0028] 본원에서 사용되는 "생물학적 샘플"은 전체 세포 및/또는 살아 있는 세포 및/또는 세포 파편을 함유할 수 있다. 생물학적 샘플은 "체액"을 함유(또는 이로부터 유래)할 수 있다. 본 발명은 체액이 양수, 방수, 유리체액, 담즙, 혈청, 모유, 뇌척수액, 귀지(귀에지), 유미, 미즙, 내림프, 외림프, 삼출물, 대변, 여성 사정액, 위산, 위액, 림프, 점액(비강 배액 및 점액질을 포함함), 심장막액, 복막액, 흉수, 고름, 점막분비물, 타액, 피지(피부 오일), 정액, 가래, 윤활액, 땀, 눈물, 소변, 질 분비물, 구토물 및 이들 중 하나 이상의 혼합물로부터 선택되는 구현예를 포함한다. 생물학적 샘플은 세포 배양물, 체액, 체액으로부터의 세포 배양물을 포함한다. 체액은, 예를 들어, 천공, 또는 기타 수집 또는 샘플링 절차에 의해 포유동물 유기체로부터 획득될 수 있다.

[0029] 용어 "대상체", "개체" 및 "환자"는 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 더욱 바람직하게는 인간을 나타내기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 포유동물은 무린, 유인원, 인간, 농장 동물, 스포츠 동물 및 애완 동물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 생체 내에서 획득되거나 시험관 내에서 배양된 조직, 세포 및 이들의 생물학적 존재물의 프로제니가 또한 포함된다.

[0030] 다양한 구현예가 이하 기재된다. 특정 구현예는 총망라된 설명 또는 본원에 논의된 더 넓은 양태에 대한 제한으로 의도되지 않는다는 점에 유의해야 한다. 특정 구현예와 함께 기재된 일 양태는 반드시 그 구현예로 제한되지 않고, 임의의 다른 구현예(들)로 실행될 수 있다. "일 구현예", "구현예", "예시적 구현예"에 대한 본 명세서 전체에 걸친 언급은 구현예와 관련하여 기재된 특정 특징, 구조 또는 특성이 본 발명의 적어도 하나의 구현예에 포함된다는 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸쳐 다양한 곳에서의 어구 "일 구현예", "구현예" 또는 "예시적 구현예"의 출현은 반드시 동일한 구현예를 모두 지칭하는 것은 아니지만, 그럴 수도 있다. 또한, 특정 특징, 구조 또는 특성은 하나 이상의 구현예에서 본 발명의 개시로부터 당업자에게 명백한 바와 같이 임의의 적합한 방식으로 조합될 수 있다. 또한, 본원에 기재된 일부 구현예는 다른 구현예에 포함된 일부 특징을 포함하나, 다른 특징을 포함하지 않지만, 상이한 구현예의 특징의 조합은 본 발명의 범위 내에 있는 것을 의미한다. 예를 들어, 첨부된 청구 범위에서, 청구된 구현예 중 임의의 것이 임의의 조합으로 사용될 수 있다.

[0031] 본원에 인용된 모든 간행물, 공개된 특허 문헌 및 특허 출원은 각각의 개별적 간행물, 공개된 특허 문헌 또는 특허 출원이 구체적 및 개별적으로 참조로서 포함되는 것으로 지정되는 것과 동일한 정도로 참조로서 본원에 포함된다.

[0032] **조성물**

[0033] 특정 양태에서, 본 발명은 SSADHD를 치료하기 위한 하나 이상의 조성물을 포함한다. 일부 구현예에서, SSADHD는 대사물의 순환 수준을 정상 수준보다 높게 나타낼 수 있다. 상기 대사물은 감마-하이드록시부티르산(GHB) 및 γ -아미노부티르산(GABA)을 포함하나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0034] 이러한 맥락에서 사용되는 바와 같이, "치료하다"는 적어도 하나의 증상 또는 질병, 병리학적 질환 또는 장애의 중증도를 치료하거나, 개선시키거나, 안정화시키거나, 예방하거나, 감소시키는 것을 의미한다. 이 용어는 능동 치료, 즉, 질병, 병리학적 질환 또는 장애의 개선을 특별히 지향하는 치료를 포함하고, 또한 인과적 치료, 즉, 관련 질병, 병리학적 질환 또는 장애의 원인 제거를 지향하는 치료를 포함한다. 또한, 이 용어는 완화 치료, 즉, 질병, 병리학적 질환 또는 장애의 치유보다는 증상의 완화를 위해 고안된 치료; 예방 치료, 즉, 관련 질병, 병리학적 질환 또는 장애의 발생을 최소화하거나 부분적으로 또는 완전히 억제하는 것을 지향하는 치료; 및 지지 치료, 즉, 관련 질병, 병리학적 질환 또는 장애의 개선을 지향하는 또 다른 특정 치료를 보충하기 위해 이용되는 치료를 포함한다. 치료는 질병, 병리학적 질환 또는 장애를 치료하거나, 개선시키거나, 안정화시키거나, 예방하기 위한 것이지만 실제로 치료, 개선, 안정화 또는 예방을 발생시킬 필요는 없다는 것이 이해된다. 치료의 효과는 관련된 질병, 병리학적 질환 또는 장애에 적합한 바와 같이 본원에 기재되고 당 분야에 공지된 바와 같이 측정되거나 평가될 수 있다. 상기 측정 및 평가는 정성적 및/또는 정량적 용어로 이루어질 수 있다. 따라서, 예를 들어, 질병, 병리학적 질환 또는 장애 및/또는 질병, 병리학적 질환 또는 장애의 증상의 특성 또는 특징은 임의의 효과 또는 임의의 양으로 감소될 수 있다.
- [0035] 본원에서 사용되는 용어 "치료를 필요로 하는"은 간병인(예를 들어, 의사, 간호사, 간호 숙련자, 또는 인간의 경우 개인; 비-인간 동물을 포함하는 동물의 경우 수의사)에 의해 이루어진 판단을 나타내며, 대상체는 치료를 요구하거나 치료로부터 이익을 얻을 것이다. 이러한 판단은 간병인의 경험 영역에 있는 다양한 요인에 기초하여 이루어지지만, 이는 본원에 기재된 조성물 및 치료제로 치료 할 수 있는 질환의 결과로서 대상체가 아프거나 아플 것이라는 지식을 포함한다.
- [0036] 본원에서 사용되는 용어 "기능성" 또는 "기능성 SSADH 효소"는 효소가 존재하지 않거나, 결핍되거나, 결함이 있거나, 기능성이지 않게 만드는 돌연변이를 갖는 유전자에서 유래하는 효소와 대조적으로 정상적으로 기능하는 효소를 나타낸다. 일부 구현예에서, 기능성 SSADH 효소는 SSADH를 코딩하는 야생형 유전자를 보유하는 건강한 개체에서 발견되는 효소와 같은 완전히 작동 가능한 효소일 것이다.
- [0037] 숙시닉 세미알데하이드 데하이드로게나제(SSADH)는 숙시닉 세미알데하이드를 크랩스 회로의 필수 구성요소인 숙시네이트로 전환시키는 GABA 분해 경로의 효소이다. SSADH 결핍의 경우, GABA 분해 경로의 최종 중간체인 숙시닉 세미알데하이드(SSA)는 축적되고, 숙신산으로 산화될 수 없다. 결과적으로, SSA는 감마-하이드록시부티릭 데하이드로게나제에 의해 GHB로 환원된다. 이는 GABA 및 GHB 둘 모두의 상승된 순환 수준을 발생시킨다.
- [0038] 본원에서 사용되는 "벡터"는 한 환경으로부터 또 다른 환경으로의 존재물의 전달을 가능케 하거나 촉진하는 도구이다. 이는 삽입된 세그먼트의 복제를 발생시키기 위해 또 다른 DNA 세그먼트가 삽입될 수 있는 레플리콘, 예를 들어, 플라스미드, 파지 또는 코스미드이다. 일반적으로, 벡터는 적절한 제어 요소와 회합되는 경우 복제할 수 있다. 일반적으로, 용어 "벡터"는 이에 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 나타낸다. 벡터는 단일-가닥, 이중-가닥 또는 부분적 이중-가닥인 핵산 분자; 하나 이상의 자유 말단, 비 자유 말단 (예를 들어, 환형)을 포함하는 핵산 분자; DNA, RNA 또는 이 둘 모두를 포함하는 핵산 분자; 및 당 분야에 공지된 다른 다양한 폴리뉴클레오티드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 한 유형의 벡터는 "플라스미드"이며, 이는 환형의 이중 가닥 DNA 루프를 나타내는 것으로서, 여기에, 예를 들어, 표준 분자 클로닝 기술에 의해 추가적인 DNA 세그먼트가 삽입될 수 있다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터이며, 여기서 바이러스-유래된 DNA 또는 RNA 서열이 바이러스(예를 들어, 레트로바이러스, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스, 복제 결함 아데노바이러스, 및 아데노-관련 바이러스(AAV)) 내로 패키징하기 위한 벡터에 존재한다. 바이러스 벡터는 또한 숙주 세포의 형질감염을 위해 바이러스에 의해 운반된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 특정 벡터는 이들이 도입되는 숙주 세포에서 자율 복제할 수 있다(예를 들어, 박테리아 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 기타 벡터(예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포로 도입시 숙주 세포의 유전체로 통합되어, 이에 의해 숙주 유전체와 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 이들이 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 상기 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 언급된다. 재조합 DNA 기술에서 유용한 일반적인 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다.
- [0039] 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 핵산의 발현에 적합한 형태로 본 발명의 핵산을 포함할 수 있으며, 이는 재조합 발현 벡터가 발현을 위해 사용되도록, 즉, 발현될 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되도록 숙주 세포를 기반으로 선택될 수 있는 하나 이상의 조절 요소를 포함함을 의미한다. 재조합 및 클로닝 방법과 관련하여, US 2004-0171156 A1으로서 2004년 9월 2일에 공개된 미국 특허 출원 10/815,730호에 언급되어 있으며, 이의 내용은 그 전체내용이 참조로서 본원에 포함된다.

- [0040] 일부 구현예에서, 벡터는 레트로바이러스 벡터일 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터를 포함할 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다. 렌티바이러스는 유사분열 세포 및 유사분열 후 세포 둘 모두에서 이들의 유전자를 감염시키고 발현하는 능력을 갖는 복잡한 레트로바이러스이다. 가장 일반적으로 공지된 렌티바이러스는 인간 면역결핍 바이러스(HIV)로, 이는 광범위한 세포 유형을 표적화하기 위해 다른 바이러스의 외피 당단백질을 사용한다.
- [0041] 렌티바이러스는 당 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 하나의 예시적 방법은 관심 유전자를 렌티바이러스 전달 플라스미드 백본을 함유하는 플라스미드로 클로닝하는 것을 포함할 수 있다. 세포는 항생제 없이 10% 우 태아 혈청을 갖는 DEME에서 형질감염 전달 50% 컨플루언스(confluence)까지 T-75 플라스크에서 낮은 계대(p=5)로 시딩될 수 있다. 20시간 후, 배지는 OptiMEM(혈청 비함유) 배지로 변경될 수 있고, 형질감염은 4시간 후에 수행될 수 있다. 세포는 10 μ g의 렌티바이러스 전달 플라스미드와 다음의 패키징 플라스미드로 형질감염될 수 있다: 5 μ g의 pMD2.G(VSV-g 슈도타입), 및 7.5 μ g의 psPAX2 (gag/pol/rev/tat). 형질감염은 양이온성 지질 전달제(50 μ L Lipofectamine 2000 및 100 μ L Plus 시약)를 갖는 4mL OptiMEM에서 수행될 수 있다. 6시간 후, 배지는 10% 우 태아 혈청을 갖는 항생제 비함유 DMEM으로 변경될 수 있다. 이들 방법은 세포 배양 동안 혈청을 사용하지만, 혈청 비함유 방법이 선호된다.
- [0042] 렌티바이러스는 다음과 같이 정제될 수 있다. 바이러스 상층액은 48시간 후에 수확될 수 있다. 상층액은 먼저 파편이 제거되고, 0.45 μ m 저 단백질 결합(PVDF) 필터를 통해 여과될 수 있다. 이들은 이후 24,000 rpm에서 2시간 동안 초원심분리기에서 회전된다. 바이러스 파편은 4°C에서 밤새 50 μ L의 DMEM에 재현탁된다. 이들은 이후 분취되고, -80°C에서 즉시 동결된다.
- [0043] 또 다른 구현예에서, 특히 안구 유전자 요법을 위해 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV)에 기초한 최소 비-영장류 렌티바이러스 벡터가 또한 고려된다(예를 들어, 문헌[Balagaan, J Gene Med 2006; 8: 275 - 285] 참조). 또 다른 구현예에서, 연령 관련 황반 변성의 웹 형태의 치료를 위해 망막하 주사를 통해 전달되는 혈관억제 단백질 엔도스타틴 및 안지오스타틴을 발현하는 말 감염성 빈혈 바이러스 기반 렌티바이러스 유전자 요법 벡터인 RetinoStat®이 또한 고려되며(예를 들어, 문헌[Binley et al., HUMAN GENE THERAPY 23:980-991 (September 2012)] 참조), 이러한 벡터는 본 발명에 적합하도록 필요에 따라 변형될 수 있다.
- [0044] 또 다른 구현예에서, HIV tat/rev에 의해 공유되는 공통 엑손을 표적으로 하는 siRNA, 핵소체-국소화 TAR 디코이 및 항-CCR5 특이적 망치머리형 리보자임을 갖는 자가-비활성화 렌티바이러스 벡터(예를 들어, 문헌[DiGiusto et al. (2010) Sci Transl Med 2:36ra43] 참조)가 본 발명의 시스템에 사용되고/되거나 이를 구성할 수 있다. 환자 체중 킬로그램 당 최소 2.5 x 10⁶개의 CD34⁺ 세포가 수집될 수 있고, 2 x 10⁶ 세포/ml의 밀도로 2 μ mol/L-글루타민, 줄기 세포 인자(100 ng/ml), Flt-3 리간드(Flt-3L)(100 ng/ml) 및 트롬보포이에틴(10 ng/ml)(CellGenix)을 함유하는 X-VIVO 15 배지(Lonza)에서 16 내지 20시간 동안 사전 자극될 수 있다. 사전 자극된 세포는 피브로넥틴(25 mg/cm²)(RetroNectin, Takara Bio Inc.)으로 코팅된 75-cm² 조직 배양 플라스크에서 16 내지 24시간 동안 5의 감염다중도에서 렌티바이러스로 형질도입될 수 있다.
- [0045] 렌티바이러스 벡터는 파킨슨병에 대한 치료에서와 같이 개시되어 있으며, 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 20120295960호 및 미국 특허 번호 7303910호 및 7351585호를 참조한다. 렌티바이러스 벡터는 또한 안구 질병의 치료에 대해 개시되어 있으며, 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 20060281180호, 20090007284호, US20110117189호; US20090017543호; US20070054961호, US20100317109호를 참조한다. 렌티바이러스 벡터는 또한 뇌로의 전달에 대해 개시되어 있으며, 예를 들어, US 특허 공개 번호 US20110293571호; US20110293571호, US20040013648호, US20070025970호, US20090111106호 및 미국 특허 번호 US7259015호를 참조한다.
- [0046] 특정 구현예에서, 표적화 벡터는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 아데노-관련 바이러스 벡터를 포함하나, 반드시 이에 제한되지는 않는 바이러스 벡터이다. 특정 구현예에서, 레트로바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.
- [0047] 예를 들어, 아데노-관련 바이러스 벡터(AAV)의 경우, 투여 경로, 제형 및 용량은 미국 특허 번호 8,454,972호에서와 같고, 아데노-관련 바이러스 벡터를 포함하는 임상 시험에서와 같을 수 있다. 아데노바이러스의 경우, 투여 경로, 제형 및 용량은 미국 특허 번호 8,404,658호에서와 같고, 아데노바이러스를 포함하는 임상 시험에서와 같을 수 있다. 플라스미드 전달의 경우, 투여 경로, 제형 및 용량은 미국 특허 번호 5,846,946호에서와 같고, 플라스미드를 포함하는 임상 연구에서와 같을 수 있다. 용량은 평균 70 kg의 개인(예를 들어, 성인 남성)을 기준으로 하거나 이에 외삽될 수 있으며, 상이한 체중 및 종의 환자, 대상체, 포유동물에 대해 조정될 수 있다. 투여 빈도는 연령, 성별, 일반적인 건강, 환자 또는 대상체의 다른 질환 및 해결될 특정 질환 또는 증상을 포함

하는 일반적인 요인에 따라 의료 또는 수의 종사자(예를 들어, 의사, 수의사)의 범위 내에 있다. 바이러스 벡터는 관심 조직에 주사될 수 있다. 세포 유형 특이적 발현은 세포 유형 특이적 프로모터에 의해 구동될 수 있다. 예를 들어, 간 특이적 발현은 알부민 프로모터를 사용할 수 있고, 뉴런 특이적 발현(예를 들어, CNS 장애를 표적으로 하기 위함)은 시냅신 I 프로모터를 사용할 수 있다.

[0048] 생체 내 전달 측면에서, AAV는 몇 가지 이유로 다른 바이러스 벡터에 비해 유리하다. 이는 낮은 독성을 갖고(면역 반응을 활성화할 수 있는 세포 입자의 초원심분리를 필요로 하지 않는 정제 방법으로 인한 것일 수 있음), 숙주 유전체로 통합되지 않기 때문에 삽입 돌연변이유발을 일으킬 가능성이 낮다. AAV에 관하여, AAV는 AAV1, AAV2, AAV5 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 표적화될 세포와 관련하여 AAV의 AAV를 선택할 수 있으며; 예를 들어, 뇌 또는 신경 세포를 표적화하기 위해 AAV 혈청형 1, 2, 5 또는 하이브리드 캡시드 AAV1, AAV2, AAV5 또는 이들의 임의의 조합을 선택할 수 있고; 심장 조직을 표적화하기 위해 AAV4를 선택할 수 있다. AAV8은 간으로의 전달에 유용하다.

[0049] 일부 양태 또는 구현예에서, 전달 입자 제형을 포함하는 조성물이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 전달 입자는 지질 기반 입자, 선택적으로 지질 나노입자, 또는 양이온성 지질 및 선택적으로 생물분해성 중합체를 포함한다. 일부 구현예에서, 양이온성 지질은 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP)을 포함한다. 일부 구현예에서, 친수성 중합체는 에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 일부 구현예에서, 전달 입자는 지질단백질, 바람직하게는 콜레스테롤을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 전달 입자는 직경이 500 nm 미만, 선택적으로 직경이 250 nm 미만, 선택적으로 직경이 100 nm 미만, 선택적으로 직경이 약 35 nm 내지 약 60 nm이다.

[0050] 여러 유형의 입자 전달 시스템 및/또는 제형이 다양한 스펙트럼의 생물학 적용에 유용한 것으로 공지되어 있다. 일반적으로, 입자는 이의 수송 및 특성과 관련하여 전체 단위로서 거동하는 작은 개체로 정의된다. 입자는 직경에 따라 추가로 분류된다. 거친 입자는 2,500 내지 10,000 나노미터 범위를 포함한다. 미세 입자는 100 내지 2,500 나노미터 크기이다. 초미세 입자 또는 나노입자는 일반적으로 크기가 1 내지 100 나노미터이다. 100-nm 한계의 기초는 입자를 벌크 물질과 구별하는 새로운 특성이 전형적으로 100 nm 미만의 임계 길이 척도에서 발생한다는 사실이다.

[0051] 본원에서 사용되는 입자 전달 시스템/제형은 본 발명에 따른 입자를 포함하는 임의의 생물학적 전달 시스템/제형으로 정의된다. 본 발명에 따른 입자는 100 마이크로미터(μm) 미만의 가장 큰 치수(예를 들어, 직경)를 갖는 임의의 존재물이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 입자는 10 μm 미만의 가장 큰 치수를 갖는다. 일부 구현예에서, 본 발명의 입자는 2000 나노미터(nm) 미만의 가장 큰 치수를 갖는다. 일부 구현예에서, 본 발명의 입자는 1000 나노미터(nm) 미만의 가장 큰 치수를 갖는다. 일부 구현예에서, 본 발명의 입자는 900 nm, 800 nm, 700 nm, 600 nm, 500 nm, 400 nm, 300 nm, 200 nm 또는 100 nm 미만의 가장 큰 치수를 갖는다. 전형적으로, 본 발명의 입자는 500 nm 이하의 가장 큰 치수(예를 들어, 직경)를 갖는다. 일부 구현예에서, 본 발명의 입자는 250 nm 이하의 가장 큰 치수(예를 들어, 직경)를 갖는다. 일부 구현예에서, 본 발명의 입자는 200 nm 이하의 가장 큰 치수(예를 들어, 직경)를 갖는다. 일부 구현예에서, 본 발명의 입자는 150 nm 이하의 가장 큰 치수(예를 들어, 직경)를 갖는다. 일부 구현예에서, 본 발명의 입자는 100 nm 이하의 가장 큰 치수(예를 들어, 직경)를 갖는다. 예를 들어, 50 nm 이하의 가장 큰 치수를 갖는 더 작은 입자가 본 발명의 일부 구현예에서 사용된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 입자는 25 nm 내지 200 nm 범위의 가장 큰 치수를 갖는다.

[0052] 일반적으로, "나노입자"는 1000 nm 미만의 직경을 갖는 임의의 입자를 나타낸다. 특정한 바람직한 구현예에서, 본 발명의 나노입자는 500 nm 이하의 가장 큰 치수(예를 들어, 직경)를 갖는다. 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명의 나노입자는 25 nm 내지 200 nm 범위의 가장 큰 치수를 갖는다. 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명의 나노입자는 100 nm 이하의 가장 큰 치수를 갖는다. 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명의 나노입자는 35 nm 내지 60 nm 범위의 가장 큰 치수를 갖는다. 입자 또는 나노입자에 대해 본원에서 이루어진 언급은 적절한 경우 상호 교환적일 수 있음이 인지될 것이다.

[0053] 입자의 크기는 로딩 전 또는 후에 측정되는지의 여부에 따라 달라질 것임이 이해될 것이다. 따라서, 특정 구현예에서, 용어 "나노입자"는 로딩 전 입자에만 적용될 수 있다.

[0054] 본 발명에 포함되는 나노입자는, 예를 들어, 고체 나노입자(예를 들어, 은, 금, 철, 티타늄과 같은 금속), 비-금속, 지질-기반 고체, 중합체), 나노입자의 현탁액, 또는 이들의 조합물의 상이한 형태로 제공될 수 있다. 금속, 유전체 및 반도체 나노입자뿐만 아니라 하이브리드 구조(예를 들어, 코어-셸 나노입자)가 제조될 수 있다. 반도체 물질로 제조된 나노입자는 또한 전자 에너지 수준의 양자화가 발생할 수 있을만큼 충분히 작은(전형적으로

로, 10 nm 미만) 경우 양자점으로 표지될 수 있다. 상기 나노스케일 입자는 약물 담체 또는 영상화제와 같은 생물학 응용분야에서 사용되며, 본 발명에서 유사한 목적에 적용될 수 있다.

[0055] 반고체 및 연결 나노입자가 제조되었으며, 본 발명의 범위 내에 있다. 반고체 특성의 원형(prototype) 나노입자는 리포솜이다. 다양한 유형의 리포솜 나노입자가 현재 항암 약물 및 백신에 대한 전달 시스템으로 임상적으로 사용된다. 절반이 친수성이고 나머지 절반이 소수성인 나노입자는 야누스 입자(Janus particle)로 언급되며, 에멀전을 안정화시키는 데 특히 효과적이다. 이들은 물/오일 계면에서 자가 조립될 수 있으며, 고체 계면활성제로 작용할 수 있다.

[0056] 입자 특성규명(예를 들어, 특성화 형태, 치수 등을 포함함)은 다양한 상이한 기술을 사용하여 수행된다. 일반적인 기술은 전자현미경검사(TEM, SEM), 원자력 현미경검사(AFM), 동적 광 산란(DLS), X-선 광전자 분광법(XPS), 분말 X-선 회절(XRD), 푸리에 변환 적외선 분광법(FTIR), 매트릭스-보조 레이저 탈착/이온화 비행 시간 질량 분광분석법(MALDI-TOF), 자외선-가시 분광법, 이중 편광 간섭법 및 핵 자기 공명(NMR)이다. 특성규명(치수 측정)은 본 발명의 임의의 시험관 내, 생체 외 및/또는 생체 내 적용을 위한 전달을 위한 최적 크기의 입자를 제공하기 위해 고유 입자(즉, 로딩 전)에 대해 또는 화물(본원에서 화물은, 예를 들어, 기능성 SSADH 효소를 인코딩하는 유전자, 약물 또는 이들의 조합물을 나타내며, 추가 담체 및/또는 부형제를 포함할 수 있음)의 로딩 후에 이루어질 수 있다. 특정한 바람직한 구현예에서, 입자 치수(예를 들어, 직경) 특성규명은 동적 레이저 산란(DLS)을 사용한 측정에 기초한다. 입자, 이를 제조하고 사용하는 방법 및 이의 측정에 관하여 미국 특허 번호 8,709,843호; 미국 특허 번호 6,007,845호; 미국 특허 번호 5,855,913호; 미국 특허 번호 5,985,309호; 미국 특허 번호 5,543,158호; 및 2014년 5월 11일에 온라인 공개된 간행물[James E. Dahlman and Carmen Barnes et al. Nature Nanotechnology (2014), doi:10.1038/nnano.2014.84]이 언급된다.

[0057] 본 발명의 범위 내의 입자 전달 시스템은 고체, 반고체, 에멀전 또는 콜로이드 입자를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 형태로 제공될 수 있다. 이와 같이, 예를 들어, 지질 기반 시스템, 리포솜, 마이셀, 미세소포, 엑소솜 또는 유전자 총을 포함하나 이에 제한되지는 않는 본원에 기재된 임의의 전달 시스템은 본 발명의 범위 내에서 입자 전달 시스템으로서 제공될 수 있다.

[0058] 또 다른 구현예에서, 지질 나노입자(LNP)가 고려된다. 항트랜스스티레틴 작은 간섭 RNA는 지질 나노입자에 캡슐화되어 인간에게 전달되었고(예를 들어, 문헌[Coelho et al., N Engl J Med 2013;369:819-29] 참조), 상기 시스템은 본 발명의 시스템을 구성하고, 이에 적용될 수 있다. 정맥 내 투여되는 체중 kg 당 약 0.01 내지 약 1 mg의 용량이 고려된다. 텍사메타손, 아세트아미노펜(acetaminophen), 디펜히드라민 또는 세티리진과 같은 주입-관련 반응의 위험을 감소시키는 약물이 고려되고, 라니티딘이 고려된다. 5회 용량에 대해 4주마다 킬로그램 당 약 0.3 mg의 다중 용량이 또한 고려된다.

[0059] 주 등(Zhu et al.)(US20140348900호)은 다중-포트 매니폴드를 사용하여 리포솜, 지질 디스크 및 기타 지질 나노입자를 제조하기 위한 공정을 제공하며, 여기서 유기 용매를 함유하는 지질 용액 스트림은 수용액(예를 들어, 완충액)의 2개 이상의 스트림과 혼합된다. 일부 양태에서, 지질 및 수용액의 스트림 중 적어도 일부는 서로 직접적으로 반대되지 않는다. 따라서, 공정은 추가 단계로서 유기 용매의 회석을 필요로 하지 않는다. 일부 구현예에서, 용액 중 하나는 또한 활성 약학 성분(API)을 함유할 수 있다. 본 발명은 상이한 지질 제형 및 상이한 페이로드를 갖는 리포솜 제조의 강력한 공정을 제공한다. 입자 크기, 형태 및 제조 규모는 매니폴드 포트의 포트 크기 및 수를 변경시키고, 지질 및 수용액의 유량 또는 유속을 선택함으로써 제어될 수 있다.

[0060] 참조로서 본원에 포함된 미국 특허 번호 8,709,843호는 치료제 함유 입자의 조직, 세포 및 세포 내 구획으로의 표적화된 전달을 위한 약물 전달 시스템을 제공한다. 본 발명은 계면활성제, 친수성 중합체 또는 지질에 컨쥬게이션된 중합체를 포함하는 표적화된 입자를 제공한다.

[0061] 상기 기재된 지질 또는 지질-유사 화합물은 화합물 자체뿐만 아니라 적용 가능한 경우 이들의 염 및 용매화물을 포함한다. 예를 들어, 음이온과 지질-유사 화합물 상의 양성으로 하전된 기(예를 들어, 아미노) 사이에 염이 형성될 수 있다. 적합한 음이온은 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 시트레이트, 메탄설포네이트, 트리플루오로아세테이트, 아세테이트, 말레이트, 토실레이트, 타르트레이트, 푸무레이트(fumurate), 글루타메이트, 글루쿠로네이트, 락테이트, 글루타레이트 및 말레에이트를 포함한다. 마찬가지로, 염은 또한 양이온과 지질-유사 화합물 상의 음성으로 하전된 기(예를 들어, 카르복실레이트) 사이에 형성될 수 있다. 적합한 양이온은 소듐 이온, 포타슘 이온, 마그네슘 이온, 칼슘 이온, 및 암모늄 양이온, 예를 들어, 테트라메틸암모늄 이온을 포함한다. 지질-유사 화합물은 또한 4차 질소 원자를 함유하는 염을 포함한다. 용매화물은 지질-유사 화합물과 약학적으로 허용되는 용매 사이에 형성된 복합체를 나타낸다. 약학적으로 허용되는 용매

의 예는 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 아세테이트, 아세트산 및 에탄올아민을 포함한다.

- [0062] 본 발명에 따른 전달 또는 투여는 리포솜과 함께 수행될 수 있다. 리포솜은 내부 수상 구획을 둘러싸는 단일층 또는 다중층 지질 이중층과 상대적으로 불투과성인 외부 친유성 인지질 이중층으로 구성된 구형 소포 구조이다. 리포솜은 이들이 생체적합성이고, 비독성이고, 친수성 및 친유성 약물 분자 둘 모두를 전달하고, 혈장 효소에 의한 분해로부터 이들의 화물을 보호하고, 생물학적 막 및 혈액뇌장벽(BBB)을 통해 이들의 짐(load)를 수송할 수 있으므로 약물 전달 담체로서 상당한 주목을 받았다(예를 들어, 개관을 위해 문헌[Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011. doi:10.1155/2011/469679] 참조).
- [0063] 리포솜은 여러 상이한 유형의 지질로부터 제조될 수 있으나, 인지질이 약물 담체로서 리포솜을 생성하는 데 가장 일반적으로 사용된다. 리포솜 형성은 지질막이 수용액과 혼합되는 경우에 자발적이지만, 균질화기, 초음파처리기 또는 압출 장치를 사용하여 진탕 형태로 힘을 가하여 촉진될 수도 있다(예를 들어, 개관을 위해 문헌[Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011. doi:10.1155/2011/469679] 참조).
- [0064] 구조 및 특성을 변형시키기 위해 여러 다른 첨가제가 리포솜에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 콜레스테롤 또는 스펅고미엘린은 리포솜 구조를 안정화시키는 것을 돕고, 리포솜 내부 화물의 누출을 방지하기 위해 리포솜 혼합물에 첨가될 수 있다. 또한, 리포솜은 수소화된 난(egg) 포스파티딜콜린 또는 난 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 디세틸 포스페이트로부터 제조되며, 이의 평균 소포 크기는 약 50 내지 100 nm로 조정되었다. (예를 들어, 개관을 위해 문헌[Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011. doi:10.1155/2011/469679] 참조).
- [0065] 리포솜 제형은 주로 천연 인지질 및 지질, 예를 들어, 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스파티딜 콜린(DSPC), 스펅고미엘린, 난 포스파티딜콜린 및 모노시알로강글리오시드로 구성될 수 있다. 이러한 제형은 인지질로만 구성되기 때문에, 리포솜 제형은 많은 난제에 직면해 왔으며, 그 중 하나는 혈장에서의 불안정성이다. 특히 지질막의 조작에서 상기 난제를 극복하기 위한 몇 가지 시도가 이루어졌다. 이들 시도 중 하나는 콜레스테롤의 조작에 집중되었다. 통상적인 제형으로의 콜레스테롤의 첨가는 캡슐화된 생물활성 화합물의 혈장으로의 신속한 방출을 감소시키거나, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE)은 안정성을 증가시킨다(예를 들어, 개관을 위해 문헌[Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011. doi:10.1155/2011/469679] 참조).
- [0066] 특정 세포 상의 항원을 표적화하는 특정 표적화 벡터가 개발될 수 있다. 국소 또는 전신 도입시, 이들 벡터는 순환하여 특정 세포로 귀환할 수 있다. 특정 세포 및 조직의 표적화는 유전자 치료 적용의 안정성을 크게 향상시킬 것이다. 무관한 세포 또는 조직의 부주의한 감염으로 인한 부적절한 발현은 유전자 요법 적용에서 우려할 한가지 원인이다. 따라서, 특정 세포에 대한 표적화는 부작용의 가능성을 감소시킬 것이다. 일부 구현예에서, 상기 표적 세포는 간 세포, 림프, 혈액, 혈장, 뇌척수액, 췌장, 네프론, 아교세포, 성상교세포, 희소돌기아교세포, 뉴런, 별아교세포, 간세포, 백혈구 세포, 단핵구, 백혈구, 비장, 혈소판, 생식샘, 난소, 눈, 망막 색소 상피, 무축삭 세포, 두극세포, 유리체액, 방수, 망막, 수정체를 포함할 수 있으나, 반드시 이에 제한되지는 않는다. 특정 구현예에서, 표적 세포는 간 세포이다.
- [0067] 재조합 발현 벡터 내에서, "작동 가능하게 연결된"은 관심 뉴클레오티드 서열 또는 유전자가 뉴클레오티드 서열 또는 유전자의 발현을 가능하게 하는 방식으로(예를 들어, 시험관 내 전사/번역 시스템에서 또는 벡터가 숙주 세포로 도입되는 경우 숙주 세포에서) 조절 요소(들) 또는 표적화 벡터에 연결되거나 이와 복합체화됨을 의미하고자 하는 것이다.
- [0068] 일부 구현예에서, 본 발명은 표적화 벡터에 작동 가능하게 연결된 기능성 SSADH 효소를 인코딩하는 유전자를 포함하는 SSADHD를 치료하기 위한 조성물을 포함한다. 특정 구현예에서, 유전자는 *ALDH5A1*일 수 있다. *ALDH5A1* 유전자는 단백질의 알데하이드 데하이드로게나제 패밀리에 속한다. 상기 유전자는 미토콘드리아 NAD^+ -의존성 숙시닉 세미알데하이드 데하이드로게나제(SSADH)를 인코딩한다. 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 이러한 효소의 결핍은 신경전달물질 GABA의 대사에서 드문 선천적 오류이다. 결핍에 대한 반응으로, 환자로부터의 생리학적 체액은 다수의 신경조절 특성을 갖는 화합물인 GHB를 축적한다.
- [0069] 일부 구현예에서, *ALDH5A1*은 실시예에 기재된 바와 같이 박테리아 세포주에서 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, *ALDH5A1*은 HEK, 효모 및 CHO 세포를 포함하나, 반드시 이에 제한되지는 않는 다수의 박테리아 및

포유동물 세포에서 생성될 수 있다.

- [0070] 기능성 SSADH 효소의 존재는 순환 대사물의 수준을 낮출 수 있다. 상기 순환 대사물은 GHB 및 GABA를 포함할 수 있으나, 반드시 이에 제한되지는 않는다. 특정 구현예에서, 기능성 SSADH 효소는 순환 GHB 및 GABA의 수준을 낮춘다.
- [0071] 일부 구현예에서, 조성물은 혈액뇌장벽을 통과하지 않는다. 혈액뇌장벽은 뇌로부터의 순환 혈액과 중추신경계의 세포외액을 분리하는 매우 선택적인 반투과성 경계이다. 혈액뇌장벽은 모세혈관벽의 내피 세포, 모세관 피포 성상세포 말단(astrocyte end-feet) 및 모세혈관 기저막에 엠베딩된 혈관주위세포에 의해 형성된다. 이는 수동 확산에 의한 물, 일부 가스 및 지용성 분자의 통과뿐만 아니라 뉴런 기능에 중요한 글루코스 및 아미노산과 같은 분자의 선택적 수송을 허용한다. 혈액뇌장벽은 혈액 내 용질(예를 들어, 박테리아) 및 크거나 친수성인 분자의 뇌척수액으로의 확산을 제한하는 반면 소수성 분자(산소, 이산화탄소, 호르몬) 및 작은 극성 분자의 확산을 허용한다. 장벽의 세포는 특정 수송 단백질을 사용하여 장벽을 통해 글루코스와 같은 대사 생성물을 능동 수송한다.
- [0072] **치료 방법**
- [0073] 또한, 본 발명의 범위 내에서 SSADHD의 치료를 필요로 하는 대상체에서 SSADHD를 치료하는 방법이 구상된다. 상기 방법은 치료적 유효량의 본원에 기재된 임의의 조성물을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 "치료하다"는 적어도 하나의 증상 또는 질병, 병리학적 질환 또는 장애의 중증도를 치료하거나, 개선시키거나, 안정화시키거나, 예방하거나, 감소시키는 것을 의미한다.
- [0074] 특정 구현예에서, 대상체는 SSADHD를 갖는다. 특정 구현예에서, 대상체는 대사물의 증가된 순환 수준을 갖는다. 용어 "높은", "더 높은", "증가된", "상승된" 또는 "상승"은, 예를 들어, 대조군과 비교하여 기저 수준 이상의 증가를 나타낸다. 용어 "낮은", "더 낮은", "감소된" 또는 "감소"는, 예를 들어, 대조군과 비교하여 기저 수준 이하의 감소를 나타낸다.
- [0075] 용어 "대조군"은 시험 샘플에서 발현 생성물과의 비교를 제공하기에 적합한 임의의 참조 표준을 나타낸다. 일 구현예에서, 대조군은 발현 생성물 수준이 검출되고, 시험 샘플로부터의 발현 생성물 수준과 비교되는 "대조군 샘플"을 획득하는 것을 포함한다. 상기 대조군 샘플은 공지된 결과를 갖는 대조군 환자의 샘플(저장된 샘플이거나 이전 샘플 측정일 수 있음); 대상체, 예를 들어, 표준 환자 또는 관심 질환을 갖는 환자로부터 분리된 표준 조직, 유체 또는 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 적합한 샘플을 포함할 수 있다.
- [0076] 용어 "변경된 양" 또는 "변경된 수준"은 대조군 샘플 내의 대사물 또는 바이오마커 핵산의 발현 수준 또는 카피수와 비교하여 대사물 또는 바이오마커 핵산의 증가되거나 감소된 카피수(예를 들어, 생식선 및/또는 체세포)를 나타낸다. 용어 바이오마커의 "변경된 양"은 또한 정상 대조군 샘플에서 상응하는 단백질 수준과 비교하여 샘플에서 바이오마커 단백질의 증가되거나 감소된 단백질 수준을 포함한다. 또한, 바이오마커 단백질의 변경된 양은 바이오마커 단백질의 발현 또는 활성에 영향을 미칠 수 있는 마커의 메틸화 상태와 같은 번역 후 변형을 검출함으로써 결정될 수 있다.
- [0077] 대상체에서 대사물 또는 바이오마커의 양은, 상기 바이오마커의 양이 정상 또는 대조군 수준보다 양을 평가하기 위해 사용된 검정의 표준 오차보다 큰 양만큼, 바람직하게는 상기 양보다 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 350%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000%만큼 각각 더 크거나 작은 경우 대사물 또는 바이오마커의 정상 양보다 "유의하게" 높거나 낮다. 대안적으로, 대상체에서 바이오마커의 양은, 상기 양이 바이오마커의 정상 및/또는 대조군 양보다 각각 적어도 약 2, 바람직하게는 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 165%, 170%, 175%, 180%, 185%, 190%, 195%, 2배, 3배, 4배, 5배 이상, 또는 그 사이의 임의의 범위, 예를 들어, 5%-100% 더 높거나 낮은 경우 정상 및/또는 대조군 양보다 "유의하게" 높거나 낮은 것으로 간주될 수 있다. 상기 유의한 조절 값은 변경된 발현 수준, 변경된 활성, 암 세포 과증식 성장에서의 변화, 암 세포 사멸에서의 변화, 바이오마커 억제에서의 변화, 시험 체제 결합에서의 변화 등과 같은 본원에 기재된 임의의 메트릭(metric)에 적용될 수 있다.
- [0078] 용어 마커의 "변경된 발현 수준"은 발현 또는 카피수를 평가하기 위해 사용되는 검정의 표준 오차보다 크거나 작고, 바람직하게는 대조군 샘플(예를 들어, 관련 질병을 갖지 않는 건강한 대상체로부터의 샘플)에서의 마커 또는 염색체 영역의 발현 수준 또는 카피수, 바람직하게는 여러 대조군 샘플에서의 마커 또는 염색체 영역의 평균 발현 수준 또는 카피수보다 적어도 2배, 더욱 바람직하게는 3배, 4배, 5배 또는 10배 이상인 시험 샘플, 예

를 들어, 암으로 고통받는 대상체로부터 유래된 샘플에서의 마커의 발현 수준 또는 카피수를 나타낸다. 변경된 발현 수준은 발현 또는 카피수를 평가하기 위해 사용되는 검정의 표준 오차보다 크거나 작고, 바람직하게는 대조군 샘플(예를 들어, 관련 질병을 갖지 않는 건강한 대상체로부터의 샘플)에서의 마커의 발현 수준 또는 카피수, 바람직하게는 여러 대조군 샘플에서의 마커의 평균 발현 수준 또는 카피수보다 적어도 2배, 더욱 바람직하게는 3배, 4배, 5배 또는 10배 이상이다.

[0079] 용어 마커의 "변경된 활성"은 정상 대조군 샘플에서의 마커의 활성에 비해 질병 상태, 예를 들어, 암 샘플에서 증가되거나 감소되는 마커의 활성을 나타낸다. 마커의 변경된 활성은, 예를 들어, 마커의 변경된 발현, 마커의 변경된 단백질 수준, 마커의 변경된 구조 또는, 예를 들어, 마커와 동일하거나 상이한 경로와 관련된 다른 단백질과의 변경된 상호작용, 또는 전사 활성인자 또는 억제제와의 변경된 상호작용의 결과일 수 있다.

[0080] 대상체에서 대사물 또는 마커의 "양", 예를 들어, 대사물 또는 마커의 발현 또는 카피수, 또는 마커의 단백질 수준은, 마커의 양이 양을 평가하기 위해 사용된 검정의 표준 오차보다 큰 양만큼 정상 수준보다 각각 크거나 작고, 바람직하게는 상기 양의 적어도 2배, 더욱 바람직하게는 3배, 4배, 5배, 10배 이상인 경우에, 마커의 정상적인 양보다 "유의하게" 높거나 낮다. 대안적으로, 대상체에서의 마커의 양은, 양이 마커의 정상적인 양보다 각각 적어도 약 2배, 바람직하게는 적어도 약 3배, 4배 또는 5배 더 높거나 낮은 경우에 정상적인 양보다 "유의하게" 높거나 낮은 것으로 간주될 수 있다.

[0081] 특정 구현예에서, 대상체는 순환 대사물의 증가된 수준을 갖는다. 상기 대사물은 알콜, 아미노산, 뉴클레오타이드, 항산화제, 유기산, 폴리올 및 비타민을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 대사물은 GHB, GABA 또는 둘 모두를 포함하나, 반드시 이에 제한되지는 않는다. 특정 구현예에서, SSADHD 질환을 갖는 대상체는 GHB, GABA 또는 둘 모두의 정상 순환 수준보다 증가하거나 더 높은 것을 나타낸다.

[0082] 일부 구현예에서, 벡터, 예를 들어, 플라스미드 또는 바이러스 벡터는, 예를 들어, 정맥내, 피내, 경피, 피하, 근내, 복강내, 직장내, 동맥내, 임파선내, 척수강내, 기관내, 비내, 경구, 점막 또는 다른 전달 방법에 의해 관심 조직에 전달된다. 전달 방법은 국소 또는 전신 치료가 필요한 지의 여부 및 치료될 영역에 좌우될 수 있다. 사용되는 경우, 비경구 투여는 일반적으로 주사를 특징으로 한다. 주사제는 액체 용액 또는 현탁액, 주사 전 액체의 용액 또는 현탁액에 적합한 고체 형태, 또는 에멀전으로서 통상적인 형태로 제조될 수 있다.

[0083] 상기 전달은 단일 용량 또는 다중 용량을 통해 이루어질 수 있다. 당업자는 본원의 전달될 실제 투여량이 벡터 선택, 표적 세포, 유기체 또는 조직, 치료할 대상체의 일반적인 상태, 원하는 형질전환/변형의 정도, 투여 경로, 투여 방식, 원하는 형질전환/변형의 유형 등과 같은 다양한 요인에 따라 크게 달라질 수 있음을 이해한다.

[0084] 상기 투여량은, 예를 들어, 담체(물, 염수, 에탄올, 글리세롤, 락토스, 수크로스, 칼슘 포스페이트, 젤라틴, 텍스트란, 아가, 펙틴, 땅콩유, 참기름 등), 희석제, 약학적으로 허용되는 담체(예를 들어, 포스페이트 완충 염수), 약학적으로 허용되는 부형제 및/또는 당 분야에 공지된 다른 화합물을 추가로 함유할 수 있다. 투여량은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 염, 예를 들어, 무기산염, 예를 들어, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 포스페이트, 설페이트 등; 및 유기산의 염, 예를 들어, 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트, 벤조에이트 등을 추가로 함유할 수 있다. 또한, 보조 물질, 예를 들어, 습윤제 또는 에멀전화제, pH 완충 물질, 겔 또는 겔화 물질, 착향제, 착색제, 미세구, 중합체, 현탁제 등이 또한 여기에 존재할 수 있다. 또한, 특히 투여 형태가 재구성 가능한 형태인 경우에 하나 이상의 다른 통상적인 약학적 성분, 예를 들어, 보존제, 습윤제, 현탁제, 계면활성제, 항산화제, 고결방지제, 충전제, 킬레이트제, 코팅제, 화학 안정제 등이 또한 존재할 수 있다. 적합한 예시적인 성분은 미정질 셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스 소듐, 폴리소르베이트 80, 페닐에틸 알콜, 클로로부탄올, 포타슘 소르베이트, 소르브산, 이산화황, 프로필 갈레이트, 파라벤, 에틸 바닐린, 글리세린, 페놀, 파라클로로페놀, 젤라틴, 알부민 및 이들의 조합물을 포함한다. 약학적으로 허용되는 부형제에 대한 충분한 논의는 참조로서 본원에 포함되는 문헌[REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991)]에서 이용 가능하다.

[0085] 본원의 일 구현예에서, 전달은 아데노바이러스를 통해 이루어지며, 이는 적어도 1×10^5 개의 입자(입자 단위, pu로도 언급됨)의 아데노바이러스 벡터를 함유하는 단일 부스터 용량일 수 있다. 본원의 일 구현예에서, 용량은 바람직하게는 적어도 약 1×10^6 개의 입자(예를 들어, 약 1×10^6 - 1×10^{12} 개의 입자), 더욱 바람직하게는 적어도 약 1×10^7 개의 입자, 더욱 바람직하게는 적어도 약 1×10^8 개의 입자(예를 들어, 약 1×10^8 - 1×10^{11} 개의 입자 또는 약 1×10^8 - 1×10^{12} 개의 입자), 가장 바람직하게는 적어도 약 1×10^9 개의 입자(예를 들어, 약 1×10^9 - 1×10^{10} 개의 입자 또는 약 1×10^9 - 1×10^{12} 개의 입자) 또는 심지어 적어도 약 1×10^{10} 개의 입자(예를

들어, 약 1×10^{10} - 1×10^{12} 개의 입자)의 아데노바이러스 벡터이다. 대안적으로, 용량은 약 1×10^{14} 개 이하의 입자, 바람직하게는 약 1×10^{13} 개 이하의 입자, 더욱 더 바람직하게는 약 1×10^{12} 개 이하의 입자, 더욱 더 바람직하게는 약 1×10^{11} 개 이하의 입자, 가장 바람직하게는 약 1×10^{10} 개 이하의 입자(예를 들어, 약 1×10^9 개 이하의 입자)를 포함한다. 따라서, 용량은, 예를 들어, 약 1×10^6 입자 단위(pu), 약 2×10^6 pu, 약 4×10^6 pu, 약 1×10^7 pu, 약 2×10^7 pu, 약 4×10^7 pu, 약 1×10^8 pu, 약 2×10^8 pu, 약 4×10^8 pu, 약 1×10^9 pu, 약 2×10^9 pu, 약 4×10^9 pu, 약 1×10^{10} pu, 약 2×10^{10} pu, 약 4×10^{10} pu, 약 1×10^{11} pu, 약 2×10^{11} pu, 약 4×10^{11} pu, 약 1×10^{12} pu, 약 2×10^{12} pu 또는 약 4×10^{12} pu의 아데노바이러스 벡터를 갖는 아데노바이러스 벡터의 단일 용량을 함유할 수 있다. 예를 들어, 본원에 참조로서 포함되는 2013년 6월 4일에 승인된 미국 특허 번호 8,454,972 B2호(Nabel, et. al.)의 아데노바이러스 벡터, 및 이의 29열 36-58행의 투여량을 참조한다. 본원의 일 구현예에서, 아데노바이러스는 다중 용량을 통해 전달된다.

[0086] 본원의 일 구현예에서, 전달은 AAV를 통해 이루어진다. 인간으로의 AAV의 생체 내 전달을 위한 치료학적 유효 투여량은 약 1×10^{10} 내지 약 1×10^{10} 기능성 AAV/ml 용액을 함유하는 약 20 내지 약 50 ml의 염수 용액의 범위 내인 것으로 생각된다. 투여량은 임의의 부작용에 대한 치료적 이점의 균형을 맞추기 위해 조정될 수 있다. 본원의 일 구현예에서, AAV 용량은 일반적으로 약 1×10^5 내지 1×10^{50} 유전체 AAV, 약 1×10^8 내지 1×10^{20} 유전체 AAV, 약 1×10^{10} 내지 약 1×10^{16} 유전체, 또는 약 1×10^{11} 내지 약 1×10^{16} 유전체 AAV의 농도 범위 내이다. 인간 투여량은 약 1×10^{13} 유전체 AAV일 수 있다. 상기 농도는 약 0.001 ml 내지 약 100 ml, 약 0.05 내지 약 50 ml, 또는 약 10 내지 약 25 ml의 담체 용액 내에서 전달될 수 있다. 다른 효과적인 투여량은 용량 반응 곡선을 확립하는 일상적인 시험을 통해 당업자에 의해 용이하게 확립될 수 있다. 예를 들어, 2013년 3월 26일에 승인된 미국 특허 번호 8,404,658 B2호(Hajjar, et al.)의 27열, 45-60행을 참조한다.

[0087] 본원의 일 구현예에서, 전달은 플라스미드를 통해 이루어진다. 상기 플라스미드 조성물에서, 투여량은 반응을 유발하기에 충분한 플라스미드 양이어야 한다. 예를 들어, 플라스미드 조성물에서 플라스미드 DNA의 적합한 양은 개체 70 kg 당 약 0.1 내지 약 2 mg, 또는 약 1 µg 내지 약 10 µg일 수 있다.

[0088] 본원의 용량은 개체 평균 70 kg을 기준으로 한다. 투여 빈도는 의료 또는 수의 개입의(예를 들어, 의사, 수의사) 또는 당 분야의 숙련된 과학자의 범위 내이다. 또한, 실험에 사용된 마우스는 전형적으로 약 20 g이고, 마우스 실험으로부터 70 kg 개체까지 규모가 확장될 수 있음을 주목한다.

[0089] 본원에 제공된 조성물에 사용되는 투여량은 반복 투여 또는 반복 용량을 위한 투여량을 포함한다. 특정 구현예에서, 투여는 주, 수 개월 또는 수년의 기간 내에 반복된다. 최적 투여 요법을 획득하기 위해 적합한 검정이 수행될 수 있다. 반복 투여는 더 낮은 투여량의 사용을 가능하게 할 수 있으며, 이는 표적 외 변형에 긍정적인 영향을 미칠 수 있다.

[0090] 본원에 제공된 바와 같은 화합물, 조성물 또는 약물의 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 비독성이지만, 원하는 결과를 제공하기에 충분한 조성물의 양을 의미한다. 필요한 정확한 양은 대상체의 종, 연령, 및 전반적 상태, 치료되는 질병의 중증도, 사용되는 특정 조성물, 이의 투여 방식 등에 따라 대상체마다 다양할 것이다. 따라서, 정확한 "유효량"을 지정할 수 없다. 그러나, 적절한 유효량은 단지 일상적인 실험을 이용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0091] 일부 구현예에서, 치료적 유효량은 1-10,000 µg 기능성 SSADH 효소/체중 kg/일의 범위를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 주 1회, 격주 1회 또는 월 1회 투여될 수 있다.

[0092] 일부 구현예에서, 본 발명은 대상체에 치료적 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 표적화 벡터에 작동 가능하게 연결된 기능성 SSADH 효소를 인코딩하는 유전자를 포함하는 조성물, 및 하나 이상의 mTOR 억제제, GABA-T 억제제, 또는 이들의 조합물을 투여하는 것을 포함하는 SSADHD의 치료를 필요로 하는 대상체에서 SSADHD를 치료하는 방법을 포함한다.

[0093] mTOR(라파마이신의 포유동물 표적)는 단백질 키나제의 포스파티딜이노시톨 3-키나제-관련 키나제 패밀리의 구성원인 키나제이다. mTOR는 다른 단백질과 연결되며, 상이한 세포 과정을 조절하는 2개의 별개의 단백질 복합체인 mTOR 복합체 1 및 mTOR 복합체 2의 핵심 구성요소 역할을 한다. 특히, 둘 모두의 복합체의 핵심 성분으로서, mTOR는 세포 성장, 세포 증식, 세포 운동성, 세포 생존, 단백질 합성, 자가포식 및 전사를 조절하는 세린/트레오닌 단백질 키나제로 기능한다. mTOR 억제제는 mTOR 키나제를 억제하는 약물의 한 부류이다.

[0094] 용어 "억제하다" 또는 "하향 조절하다"는, 예를 들어, 특정 작용, 기능 또는 상호작용의 감소, 제한 또는 차단을 포함한다. 단백질의 기능과 같은 생물학적 기능은 야생형 상태와 같은 대조군과 같은 참조 상태에 비해 감소

되는 경우에 억제된다. 상기 억제 또는 결핍은, 예를 들어, 특정 시간 및/또는 장소에서 제제의 적용에 의해서와 같이 유도될 수 있거나, 유전성 돌연변이에 의해서와 같이 항시성일 수 있다. 상기 억제 또는 결핍은 또한 부분적이거나 완전(예를 들어, 야생형 상태와 같은 대조군과 같은 참조 상태와 비교하여 본질적으로 측정 가능한 활성이 없음)할 수 있다. 본질적으로 완전한 억제 또는 결핍은 차단된 것으로 언급된다. 용어 "촉진하다" 또는 "상향 조절하다"는 반대의 의미를 갖는다.

[0095] 예시적 mTOR 억제제는 라파로그로 공지된 약물의 한 부류를 포함하나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다. 라파로그는 라파마이신 및 그의 유사체, 예를 들어, 시롤리무스, 템시롤리무스, 에베롤리무스 및 리다포롤리무스를 포함하나, 반드시 이에 제한되지는 않는다. 특정 구현예에서, 바람직한 라파로그는 라파마이신이다.

[0096] 다른 구현예에서, mTOR 억제제는 토린 1 및 토린 2를 포함할 수 있다.

[0097] GABA-T(GABA 트랜스아미나제)는 GABA를 대사하고 분해하는 효소이다. GABA-T 억제제는 GABA-T에 작용하여 그의 기능을 억제하는 효소 억제제이다. GABA-T 억제제의 예는 발프로산, 비가바트린, 페닐에틸리텐히드라진, 에탄올아민-O-설페이트(EOS) 및 L-사이클로세린을 포함하나, 반드시 이에 제한되지는 않는다. 특정 구현예에서, 바람직한 GABA-T 억제제는 비가바트린이다.

[0098] 특정 구현예에서, 조합 요법은 치료적 유효량의 표적화 벡터에 작용 가능하게 연결된 기능성 SSADH 효소를 인코딩하는 유전자를 포함하는 조성물, 토린 2 및 비가바트린의 투여를 포함할 수 있다.

[0099] 일부 구현예에서, mTOR 억제제 및/또는 GABA-T 억제제는 1-25 μ g/체중 kg/일 범위의 용량으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, mTOR 억제제 및/또는 GABA-T 억제제는 1일 2회 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, mTOR 억제제 및/또는 GABA-T 억제제는 1일 3회 투여될 수 있다.

[0100] 대안적 구현예에서, 본 발명은 치료적 유효량의 Na-K-Cl 공동수송체 1(NKCC1) 억제제를 대상체에 투여하는 것을 포함하는 SSADHD의 치료를 필요로 하는 대상체에서 SSADHD를 치료하는 방법을 포함한다.

[0101] NKCC 단백질은 세포막을 통해 소듐, 포타슘 및 클로라이드 이온을 수송하는 막 수송 단백질이다. 이들은 각각의 용질을 동일 방향으로 이동시키므로, NKCC 단백질은 공수송체(symporter)로 간주된다. 이들은 2개의 양으로 하전된 용질(소듐 및 포타슘)을 음으로 하전된 용질(클로라이드)의 2개의 부분과 함께 이동시켜 전기중성(electroneutrality)을 유지시킨다. NKCC1은 인체 전체에 걸쳐, 특히 외분비샘으로 언급되는 체액을 분비하는 기관에 널리 분포된다.

[0102] NKCC1은 또한 초기 발달 동안 뇌의 많은 영역에서 발현되나, 성인기에는 발현되지 않는다. NKCC1 존재의 이러한 변화는 신경전달물질 GABA 및 글리신에 대한 반응을 흥분성에서 억제성으로 변화시키는 원인이 되는 것으로 보이며, 이는 초기 신경 발달에 중요하다고 제안되었다. NKCC1 수송체가 주로 활성인 한, 각각의 리간드-게이팅된 음이온 채널이 클로라이드에 침투성이기 때문에 GABA 및 글리신 반응에 중요한 성숙 클로라이드 농도와 비교하여 뉴런의 내부 클로라이드 농도가 상승된다. 내부 클로라이드 농도가 높을수록, 이러한 이온에 대한 외부 구동력이 증가하고, 이에 따라 채널 개방은 클로라이드가 세포를 떠나게 하여 이를 탈분극시킨다. 이후, 발달에서, NKCC1의 발현이 감소되는 반면, KCC2 K-Cl 공동수송체의 발현은 증가하고, 따라서 뉴런의 내부 클로라이드 농도를 성인 값으로 낮춘다.

[0103] 실시예 3에 기재된 바와 같이, SSADHD 환자에서 나타나는 출생후 발작은 NKCC1의 과발현에 의해 유발될 수 있다. 따라서, NKCC1의 억제는 SSADHD에서 긍정적인 치료 효과를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, SSADHD는 치료적 유효량의 NKCC1 억제제를 이를 필요로 하는 대상체에 투여함으로써 치료될 수 있다.

[0104] 적합한 NKCC1 억제제는 부메타니드, 알로프레그나놀론, 프레그나놀론, 프로게스테론, 가복사돌, 에티폭신, XBD-173, FG-7142, 가바진, 이소니아지드, 엔세니클린, 및 AVL-3288을 포함하나, 반드시 이에 제한되지는 않는다. 특정 구현예에서, NKCC1 억제제는 부메타니드이다.

[0105] 본 발명은 청구항에 기재된 본 발명의 범위를 제한하지는 않는 하기 실시예에서 추가로 기재된다.

[0106] **실시예**

[0107] **실시예 1 - NCS-382, SSADHD를 위한 잠재적 신규 치료제**

[0108] *약리학적 및 구조적 고려사항*

[0109] NCS-382는 GHB의 것보다 14배 낮은 K_i 를 갖는 추정 GHB 수용체(GHBR) 길항제이고(도 1)(Maitre Prog Neurobiol

51:337-361 (1997); Vogensen et al. J Med Chem 56:8201-8205 (2013)), GHBR의 유일한 공지된 길항제일 수 있으며(Bay et al. Biochem Pharmacol 87:220-228 (2014)), 이의 분자 구조(들)는 정의되지 않은 상태로 남아 있다. NCS-382는 조기 치사로부터 aldh5a1 -/- 마우스를 구제하고, GHB 프로드러그인 감마-부티로락톤(GBL)에 의해 유발되는 운동 결핍을 차단하는 데 효과적이었다(Ainslie et al. Pharmacol Res Perspect 4:e00265 (2016); Gupta et al. J Pharmacol Exp Ther 302:180-187 (2002)). NCS-382는 라세미 혼합물로 존재한다(하이드록실-탄소; 도 1). R-이성질체는 라세미 혼합물보다 2배 강력하고, S-거울상 이성질체보다 13배 더 강력하다(Castelli et al. CNS Drug Rev 10:243-260 (2004)). 하기 기재되는 출원인의 초기 연구 이전에는, 임상 개입 전 필수 고려사항인 NCS-382의 전임상 약동학/독성학적 분석이 보고되지 않았다.

[0110] NCS-382의 약동학 및 독성학, 및 잠재성

[0111] NCS-382의 약역학적 특징에 대한 제한된 초기 연구는 개코원숭이 및 비둘기에서 수행되었으며, GHB의 중심 효과를 조사하기 위해 GHBR에 대한 길항제 특이성을 활용하도록 설계되었다(Quang et al. Life Sci 71:771-778 (2002); Castelli et al. J Neurochem 87:722-732 (2003); Castelli et al. CNS Drug Rev 10:243-260 (2004)). 출원인은 C57/B6 마우스에서 NCS-382(100 내지 500 mg/kg)의 i.p. 투여 후 상세한 약동학적 측정을 획득하였다(Ainslie et al. Pharmacol Res Perspect 4:e00265 (2016)). NCS-382에 대한 혈장 제거 t_{1/2}는 용량 의존적 방식으로 0.25-0.68시간 범위였다. NCS-382에 대한 뇌 체류시간은 더 길었고, t_{1/2}는 0.76-0.97시간 범위였으며, 용량이 증가함에 따라 감소하였다. 농도-시간 곡선(AUC) 아래 면적을 기반으로 한 뇌-혈장 비율은 0.72-1.8 범위였다. 용량이 증가함에 따라 뇌 t_{1/2}가 감소하는 경향은 전신 순환으로 복귀하기 위한 더 많은 결합되지 않은 NCS-382를 남기는 중앙 GHB 결합 부위의 포화를 반영할 수 있다. 소변에서 회수된 전체 NCS-382 용량의 분획은 낮았고(<4%), 대변에서 검출 가능하지 않았으며(<150 ng/mg 대변), 이는 하이드록실-모이어티에서의 글루코로니화(주 생성물) 및 탈수소화(부 생성물)를 특징으로 하는 주요 제거 경로로서의 대사를 시사한다(도 1). NADPH의 존재하에서 모체 소멸(parent disappearance)을 모니터링함으로써 평가된 NCS-382(C_{int})의 고유 청소율은 마우스 및 인간 간 미세소체(MLM, HLM)에서 각각 0.587 및 0.513 mL/min/mg 단백질이었다. 계산된 묶임 및 인간 간 청소율은 각각 5.2 및 1.2 L/h/kg 체중이었다. 탈수소화에 대한 미카엘리스 상수(K_m)는 마우스 및 인간에서 각각 29.5 ± 10 및 12.7 ± 4.9 μM이었다. 글루쿠로니드 형성은 둘 모두의 종에서 최대 100 μM까지 선형이었다. UGT2B7(우리딘 5'-디포스포글루쿠로노실트랜스페라제; UDP-글루쿠로노실트랜스페라제 2B7)은 UGT2B7 억제제인 디클로페낙과의 경쟁 연구에 기초하여 NCS-382 대사를 담당하는 글루쿠로니드화 효소의 일차 아이소형으로 의심되었다(Ainslie et al. Pharmacol Res Perspect 4:e00265 (2016)). 디클로페낙(25 mg/kg)의 공동 투여는 NCS-382(300 mg/kg)의 효능을 개선시켜 GBL로 치료된 동물의 진정 및 운동 효과를 차단하였다. NCS-382 및 디클로페낙의 글루쿠로니드의 혈장 수준은 어느 한 제제 단독을 투여받는 마우스에 비해 조합 치료에서 감소하였다.

[0112] NCS-382의 생체변환(들)에서 활성인 약물 대사 효소의 정체는 또한 보고되지 않았으며, 약물의 대사에 관여하는 전형적인 효소, 즉, 사이토크롬 P450(CYP)을 억제하는 NCS-382의 능력도 보고되지 않았다. 따라서, 출원인은 7 개의 CYP 아이소형(CYP 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 및 3A4)에 의해 촉매되는 반응에서 HLM 및 FDA 권장 프로브 기질을 사용하였다(Vogel et al. Toxicol In Vitro 40:196-202 (2017)). NCS-382는 가장 높은 시험된 용량(30 μM)에서 시험된 효소 중 어느 것도 억제하지 않았다. 또한, NCS-382는 초생리학적 용량(최대 500 μM)에서 약물 생체변환 및 수송과 관련된 핵 수용체(아릴 탄화수소, 구성적 안드로스탄, 및 프레그난 X 수용체)를 유도하는 최소한의 능력을 나타내었다. 종합적으로, 이들 발견은 CYP P450-매개 약물-약물 상호작용에 대한 낮은 위험을 나타낸다.

[0113] 이후, HepG2 세포가 사용되어 최대 1 mM에서 NCS-382의 세포 독성을 시험하였다. 세포 온전성, 생존 및 소기관 기능을 평가하는 다수의 바이오마커는 NCS-382 세포독성에 대한 증거가 거의 없음을 나타내었다(Vogel et al. Toxicol In Vitro 40:196-202 (2017)). HepG2 세포에서 NCS-382를 사용하는 유전자 발현 연구는 조절장애를 나타내는 단지 소수의 유전자(시험된 370개 중)를 나타내었다(표 1). 또한, 고용량 NCS-382는 aldh5a1-/- 마우스(예를 들어, aldh5aJ-/- NSC)에서 유래된 신경 줄기 세포(NSC 또는 신경 전구 세포)에서 단지 최소의 약독성(pharmacotoxicity)을 나타내었다(Vogel et al. Toxicol In Vitro 46:203-212 (2017)). 이들 세포는 SSADHD의 시험관 내 모델로서 개발되었으며, 이는 배양 배지에서의 증가된 GHB 함량, 산화 스트레스의 향상된 바이오마커 및 증가된 미토콘드리아 수를 나타내며, SSADHD에 대한 치료제를 평가하기 위한 유용한 전임상 스크리닝 도구로서 NSC의 유용성을 강조한다(Vogel et al. PLoS One 12(10):e0186919 (2017)). 요약하면, 다수의 추가 연구가 필요하지만, 파일럿 약동학/안전성/독성학적 평가는 SSADHD에서 NCS-382의 임상적 적용을 위한 잠재성을 뒷받침한다.

[0114] 표 1. HepG2 세포에서 NCS-382(0.5 mM)에 의해 4배 초과로 변경된 유전자.

유전자	유전자 생성물	기능	유전자 그룹화	변화
CD36	CD36 분자	혈소판 활성화, 신호전달 및 응집 및 대사에 관여	지방증	↓
HTRA4	고온 요구 인자 A4	미스폴딩된 분비 단백질을 분해함	ER 스트레스 & 폴딩되지 않은 단백질 반응	↑
SERPINA3	세르핀 패밀리 A 구성원 3	혈장 프로테아제 억제제; 결핍은 간 질환과 관련이 있음	인지질증	↓
SLC2A3	글루코스 수송체 타입 3, 뇌	축진 글루코스 수송체	인지질증	↓
SLC51A	OST-알파	담즙산의 주요 종을 수송함	쓸개증정체	↓
TNFRSF1A	종양 괴사 인자 수용체 상파, 구성원 1A	NF-kB를 활성화시키고, 아포토시스를 매개하고, 염증의 조절제로 작용함	아포토시스 & 괴사	↑

[0115]

[0116]

aldh5a1^{-/-} 마우스에서의 NCS-382의 전임상 효능

[0117]

이후, 출원인은 시험관 내에서 NCS-382의 수송에 관심을 돌렸다. 여기서 목표는 GHB의 흡수를 차단하는 NCS-382의 잠재성을 조사하는 것이었다. 출원인은 NCS-382가 능동적으로 수송되고, GHB 수송을 억제할 수 있는 것을 마딘-다비 개 신장(Madin-Darby Canine Kidney; MDCK) 세포를 사용하여 처음으로 입증하였다(Vogel et al. Toxicol In Vitro 46:203-212 (2017)). *aldh5a1*^{-/-} 마우스에서의 생체 내 연구와 함께 이들 시험관 내 검증 후, 출원인은 뇌/간 GHB의 비가 만성 NCS-382 투여(300mg/kg; 연속 7일)에 의해 영향을 받지 않는 것을 발견하였으며, 이는 역설적으로 보였다. 이러한 발견은 NCS-382의 잠재적인 향후 적용이 뇌 GHB 수준이 만성 치료로 변형되는 것으로 보이지 않기 때문에 단지 약간만 유익할 수 있음을 시사한다. 출원인은 NCS 처리된 마우스의 피질 영역을 시험하였고, 신경전달물질 수송에 관여하는 다수의 용질 담체의 발현을 평가하였다. 도 2에 제시된 바와 같이, 출원인은 본질적으로 이들 모든 수송체가 치료의 부재하에서 *aldh5a1*^{-/-} 피질에서 하향 조절됨을 발견하였다. NCS-382는 글루타메이트 및 GABA 수송체 둘 모두를 포함하여 이들 담체 중 7개의 비정상적인 발현을 정상화하였고, 6개에 영향을 미치지 않았으며, 글루타메이트-시스틴 역수송체의 유의한 하향조절을 실제로 유도하였다. 이러한 발견은 이러한 동물 모델에서 글루타티온의 유의한 고갈, 글루타티온이 글루타메이트, 시스테인 및 글리신으로 구성된다는 관찰, 및 글루타메이트/글루타민 수준이 *aldh5a1*^{-/-} 뇌에서 비정상이라는 이전 발견의 관점에서 흥미롭다(Gupta, J Pharmacol Exp Ther 302:180-187 (2004); Chowdhury, (2007)). 이들 결과는 SSADHD에서 NCS-382의 사용에 대한 적절한 전임상 지원을 제공한다. 추가 생체 내 연구는 NCS-382를 사용하고, 수명, 체중 및 신경행동 결과를 평가하고, 만성 및 급성 투여 패러다임 둘 모두를 사용하여 *aldh5a1*^{-/-} 마우스에서 진행 중이다.

[0118]

실시예 2 - SSADHD에 대한 효소 대체 요법

[0119]

치료적 접근법으로서, 효소 대체 요법(ERT)은 리소좀 저장 장애에서 현저하게 나타났지만, 유기 산혈증에서 실행 가능해야 한다(Darvish-Damavandi et al. Mol Genet Metab Rep 8:51-60 (2016)). 출원인은 대장균에서 앰피실린 내성이 동반되는 GST-hSSADH 융합 단백질을 과발현하는 GST(글루타티온)-태깅된 인간 ALDH5A1 유전자 작제물을 사용하여 *aldh5a1*^{-/-} 마우스에서 ERT의 실행 가능성을 시험하였다(DNASU Plasmid Repository; Ramachandran et al. (2004)). 밤새 37°C에서 앰피실린이 보충된 표준 LB 브로쓰에서 형질감염되고 성장된 E. 콜리의 미정제 추출물을 수확하고, Pefabloc(프로테아제 억제제; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) 및 리소자임으로 펠렛화시키고 용해시켰다. E. 콜리의 미정제 용해질에 존재하는 GST-hSSADH를 Pierce™ GST 스핀 정제 키트를 사용하여 정제한 후, 투석 후 폴리에테르설폰(PES) 컬럼을 사용하여 농축하였다. 결과로서 생성된 단백질 함량을 표준 BCA 단백질 검정을 사용하여 정량하였다. GST-태깅된 효소 활성을 트롬빈으로 분열시켰고, ALDH5A1의 활성을 NAD/NADH 커플을 기반으로 한 형광분석법(spectrofluorometry)을 사용하여 결정하였다(Gibson et al. Clin Chim Acta 196:219-221 (1991)).

[0120]

박테리아 생성된 ALDH5A1을 사용한 ERT의 실행 가능성을 이후 *aldh5a1*^{-/-} 마우스에서 평가하였다. 종점으로서, 출원인은 초기 치사(생존일(DOL) 21-23; 종점, DOL 30, 이는 매우 유의한 생존임)로부터 상기 모델의 구제를 이용하였고, 후자의 종점은 치료 단백질의 제한된 이용 가능성을 고려하여 선택되었다. 생존일 10일에 시작하여

정제된 ALDH5A1(i.p., PBS 중 1 mg/kg, q.d.)를 투여하였다. 비히클 처리된 *aldh5a1*^{-/-} 마우스의 중간 생존기간(median survival)은 ERT 치료로 30일까지 80% 생존률(5마리 중 4마리)에 비해 22일이었었다(Logrank; p 0.04; 도 3(삽입)). 뇌, 간 및 혈청을 DOL 30에서 수확된 생존 ERT 처리된 대상체로부터 수집하였다. GABA 수용체 유전자의 발현은 DOL 21 *aldh5a1*^{+/+} 마우스에 대한 데이터 표준화와 함께 ERT(DOL 30) 및 미처리(DOL 21) *aldh5a1*^{-/-} 마우스 사이에서 대조되었다. 여러 GABAA 수용체 서브유닛(주로 $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ 및 $\alpha 5$)의 발현은 효소 개입으로 *aldh5a1*^{-/-} 마우스에서 유의하게 교정되었다(도 3). 출원인은 비경구 투여된 SSADH가 혈액 및 다른 조직에서 대사물(GHB, GABA)을 낮춘다는 가설을 세웠으므로, LC/MS-MS를 사용하여 모의 및 효소-처리 대상체에서 이들 중간체를 정량하였다(도 4)(Gibson et al. Biomed Environ Mass Spectrom 19:89-93 (1990); Kok et al. J Inherit Metab Dis 16:508-512 (1993)). 비록 수가 낮았으나, 출원인은 효소 처리된 동물의 뇌에서 GHB의 유의한 교정, 및 혈액에서 GABA의 개선된 수준에 대한 경향을 발견하였다. 이러한 유망한 시험은 생화학적 측정에 대해 충분히 유력하지 않았으며, 더 큰 n 값으로 더욱 광범위한 평가가 필요하다. 특히, 출원인은 혈액 및 장기에서 SSADH 활성의 수준을 평가할 것이며, 단백질 t_{1/2}를 증가시키고, 번역원성을 감소시키기 위해 PEG화가 이용될 수 있다(Bell et al. PLOS ONE 12:e0173269 (2017)).

[0121] 실시예 3 - 과GABA성 장애인 SSADHD에서의 발작의 역설

[0122] 포유동물 뇌에서 GABAA 수용체를 통한 클로라이드 방향성 흐름은 소듐-포타슘-클로라이드 공수송체(NKCC1) 및 포타슘-클로라이드 공동수송체(KCC2)의 주로 2개의 수송체에 의해 자체적으로 제어되는 막횡단 클로라이드 구배에 의해 조절된다(도 5a)(Kilb Neuroscientist 18:613-630 (2012)). NKCC1의 활성이 증가되고, 세포 내 클로라이드 농도가 상승되는 경우에 GABAA 수용체의 활성화는 클로라이드 유출, 원형질막 탈분극 및 역설적 신경전달 활성화를 발생시킨다. 상기 상황은 태아 뇌에서 관찰되지만, GABAA 수용체 활성화가 지속적으로 클로라이드 세포 흡수 증가, 과분극 및 신경전달 억제로 이어질 때 출생 후 반전된다. 출원인은 SSADHD에서 출생 후 발작이 NKCC1의 과발현 및 출생 후 GABAA 수용체의 지속적인 흥분 능력으로 인한 것으로 가정하였다. 확인되는 경우, 이러한 메카니즘은 과GABA성 질환에서의 발작의 역설을 설명할 것이다(Vogel et al. Pediatr Neurol 66:44-52.e1. (2017)). 또한, 이는 NKCC1의 억제가 SSADHD에서 긍정적인 치료 효과를 가질 수 있음을 또한 시사한다. 이들 가설의 뒷받침에서, 출원인은 NKCC1이 *aldh5a1*^{-/-} 뇌에서 고도로 과발현된 것을 발견하였다(도 5b). 세포 외부로 클로라이드 이온을 수송하는 KCC2의 발현이 또한 증가되었으나, NKCC1의 것보다 유의하게 적었다(도 5b). 그러므로, NKCC1 대 KCC2 비율은 유의하게 증가되었으며, 이는 세포 내 클로라이드 농도가 *aldh5a1*^{-/-} 뇌에서 증가되어, GABAA 수용체의 주된 역할로서 탈분극 및 흥분 활성을 선호할 수 있음을 시사한다. 이는 패치-클램프 방법론을 통해 시험관 내에서 또는 아마도 클로라이드 이온 프로브로 2-광자 측정을 사용하여 생체 내에서 신경생리학적 평가를 이용하여 정량적으로 평가되어야 하는 것으로 남아있다.

[0123] SSADHD에서 NKCC1 억제의 잠재적인 치료적 역할을 다음으로 시험하였다. 이러한 맥락에서, 출원인은 NKCC1의 증가된 발현으로 인해 SSADHD에서 NKCC1 억제제의 진정 활성화에 대한 내성이 있을 것이라고 가정하였다. 출원인은 발작 활동의 비디오 기록 및 고정까지의 시간의 평가와 함께 급성 i.p. 용량의 부메타니드(25 및 100 mg/kg 체중)로 *aldh5a1*^{+/+} 및 *aldh5a1*^{-/-} 마우스를 처리하였다. 부메타니드는 원래 부중에 대해 승인된 NKCC1 및 2 둘 모두의 공지된 억제제이나, 불량한 뇌 침투에도 불구하고 여러 신경학적/간질 장애에서 항간질 효능을 나타내었다(Levy et al. Curr Emerg Hosp Med Rep 1(2) doi:10.1007/s40138-013-0012-8. (2013); Oliveros et al. Pediatr Crit Care Med 12:210-214 (2011); Rahmzadeh et al. Schizophr Res 184:145-146 (2016); Cleary et al. PLOS ONE 8:e57148 (2013)). 출원인은 발작 활동을 평가하기 위해 Noldus technology(<http://www.noldus.com/animal-behavior-research>)에 의해 개발된 루브릭(rubric)과 함께 동물 행동 기록을 위해 Pinnacle technology(<https://www.pinnaclet.com>) 기술을 사용하였다. 출원인의 계획은 연속적으로 40분 동안 5분 에포크(epoch)에서 전신 긴장-간대 발작을 정량화하는 것이었다. 20분 표시에서, 부메타니드(25 또는 100 mg/kg)의 단일 복강내 투여가 제공되었고, 동물은 개방된 야외 환경으로 복귀되었다. 25 mg/kg 부메타니드의 용량은 *aldh5a1*^{+/+} 또는 *aldh5a1*^{-/-} 마우스에 대해 40분 기록 기간 동안 고정을 유도하지 않았다. 반대로, 100 mg/kg은 고정의 신속한 유도를 발생시켰다(도 5c). 그러나, 흥미로운 것은 *aldh5a1*^{-/-}가 DOL 20 및 24 둘 모두에서 부메타니드의 효과에 대해 유의하게 더 내성이 있었으며, 이러한 내성은 나이가 많은 *aldh5a1*^{-/-} 마우스에서 약 3배 더 컸다는 관찰이었다. 또한, 부메타니드 주사와 고정 시작 사이의 대략 3-8분의 기간 동안 돌연변이체 마우스에서 발작 활동이 관찰되지 않았다. 또한, 더 낮은 용량의 부메타니드(25 mg/kg)는 또한 진정 없이 *aldh5a1*^{-/-} 마우스에서 발작 활동을 감소시켰다(데이터는 제시되지 않음). 이들 전임상 데이터는 부메타니드의 진정 효과에 대한 *aldh5a1*^{-/-} 마우스의 내성이 증가된 NKCC1 활성 및 클로라이드 구배의 파괴에 이차적인 것임을 시사하며, 이는 NKCC1의 조작 및 세포 내 클로라이드 항상성의 회복이 SSADHD에서 잠재적으로 매

력적인 치료 표적임을 시사한다.

[0124] 실시예 4 - GABA 및 mTOR: SSADHD에서의 치료 전략 및 병태생리학적 통찰력

[0125] SSADHD에서 치료 표적인 mTOR의 억제

[0126] 증가된 미토콘드리아 수(소기관의 크기 및 전체 수 둘 모두를 포함함)는 피라미드형 해마 뉴런에서의 *aldh5a1*^{-/-} 마우스에서 처음 문서화되었다(Nylen et al. 2009). 이후, Lakhani 및 동료(EMBO Mol Med 6:551-566 (2014))는 S. 세레비시에에서 증가된 GABA 수준이 상승된 미토콘드리아 수 및 향상된 산화 스트레스로서 나타나는 mTOR(라파마이신의 분자 표적)의 활성화를 발생시켰음을 입증하였다. 이러한 동일 그룹의 연구자들은 *aldh5a1*^{-/-} 마우스로부터 유래된 뇌 및 간에서의 미토콘드리아 수가 증가되었고, 향상된 산화 스트레스와 관련이 있으며, 이 모두가 mTOR 억제제인 라파마이신에 의해 정상화될 수 있음을 추가로 기록하였다.

[0127] 이들 연구는 mTOR 억제제(라파마이신, 텀시롤리무스), 이중 mTORC1/2 및 PI3K 억제제뿐만 아니라 mTOR-독립적 자가포식 유도 약물을 이용한 *aldh5a1*^{-/-} 마우스에서의 추가 전임상 개입 연구의 기원이었다(Vogel et al. J Inherit Metab Dis 39:877-886 (2016); 도 6). *aldh5a1*^{-/-} 마우스의 수명 연장(조기 치사로부터의 구제)은 다수의 mTOR 특이적 및 이중 억제제에서 관찰되었으며, 이중 억제제 XL765 및 토린2의 발견을 놀라웠다. XL765는 *aldh5a1*^{-/-} 마우스에서 DOL 50에서 희생때까지 35일에 걸쳐 약간의 체중 개선을 유도하였다(Vogel et al. J Inherit Metab Dis 39:877-886 (2016)). 반대로, 자가포식의 mTOR-독립적 유도인자는 조기 치사를 완화시키는데 도움이 되지 않았다. 이들 데이터는 mTOR-독립적 메커니즘을 통한 자가포식의 유도가 구제를 위해 불충분한 것을 시사하며, 이는 mTOR와 관련된 다른 기능이 *aldh5a1*^{-/-} 마우스에서 mTOR 차단에 임상 효능에 관여할 수 있음을 시사한다.

[0128] 상승하는 용량 패러다임 하에 DOL10에서 시작하여 *aldh5a1*^{-/-} 마우스에서 토린 2 투여를 이용한 연구는 3 채널 기록 피질뇌파검사(Pinnacle Technology; <https://www.pinnaclet.com/eeg-emg-systems.html>) 및 전국-이식 *aldh5a1*^{+/+} 및 *aldh5a1*^{-/-} 마우스를 사용하여 발작에 대해 평가하였다. EEG는 발작 빈도(발작의 전체 수) 및 전체 발작 시간(발작에 소요된 누적 시간)에 대해 반자동 검출(Neuroscore, Data Sciences International, St. Paul, MN)을 사용하여 오프라인으로 스코어링하였고; 발작 사건은 EEG에서 지속 시간이 3초 이상인 연속 스파이크의 실행으로 정의되었다. 자동으로 검출된 사건은 육안 검사로 확인되었다(Dhamne et al. Mol Autism 8:26 (2017)). 본 출원인의 예측은 토린 2 투여가 둘 모두의 파라미터의 개선을 발생시킬 것이라는 것이었다. 출원인은 토린 2가 *aldh5a1*^{-/-} 마우스에서 발작 빈도를 감소시키는 데 효과가 없음을 발견하였으며(표 2), 예기치 않게 전체 발작 시간을 유의하게 연장시켰음을 발견하였다(표 2). 토린 2가 다수의 GABA(A)성 수용체 서브유닛을 교정(상향 조절)한 것이 흥미롭다(Vogel et al. J Inherit Metab Dis 39:877-886 (2016)). 이들 수용체가 부메타니드에 대한 본 발명의 가설(상기 참조)과 일치하여 미성숙한 상태로 유지되는 경우, 이들의 후속 상향 조절은 생각할 수 있는 바로는 탈분극을 악화시킬 수 있으며, 따라서 출원인이 관찰한 바와 같이 누적 간질 폭발 기간을 향상시킬 수 있다(표 2). 다른 한편으로, 다른 사람들은 mTOR 억제제가 간질에서 발생하는 시냅스 재구성의 형태인 이끼 섬유의 발아를 방지하고, 반복 흥분성 회로의 형성을 발생시킬 수 있다는 증거를 제공하였다(Dudek et al. 2017). 토린 2의 향상된 발작 활동을 설명하는 메커니즘은 연구 중이다.

[0129] 표 2. *aldh5a1*^{+/+} 및 *aldh5a1*^{-/-} 마우스에서의 발작 빈도 및 전체 발작 시간에 대한 토린 2의 효과.

	비히클	토린 2 (10 mg/kg)	t 검정 (비히클 대 토린)
발작 빈도 (avg/hr)			
<i>aldh5a1</i> ^{+/+}	5.4 ± 0.8	0.50 ± 0.59	p=0.12
<i>aldh5a1</i> ^{-/-}	3.2 ± 0.8	9.6 ± 1.3	p=0.11
t 검정	p=0.41	p=0.23	
전체 발작 시간 (초) (avg/hr)			
<i>aldh5a1</i> ^{+/+}	22 ± 1.7	2.1 ± 1.2	p=0.15
<i>aldh5a1</i> ^{-/-}	19 ± 2.0	282 ± 8.0	p=0.03
t 검정	p= 0.90	p= 0.30	

데이터는 평균±SEM으로 도시되었다. 발작 사건은 스파이크-트레인(spike-train), 아마도 근간대성뿐만 아니라 소발작 및 긴장-간대 발작을 포함하였다.

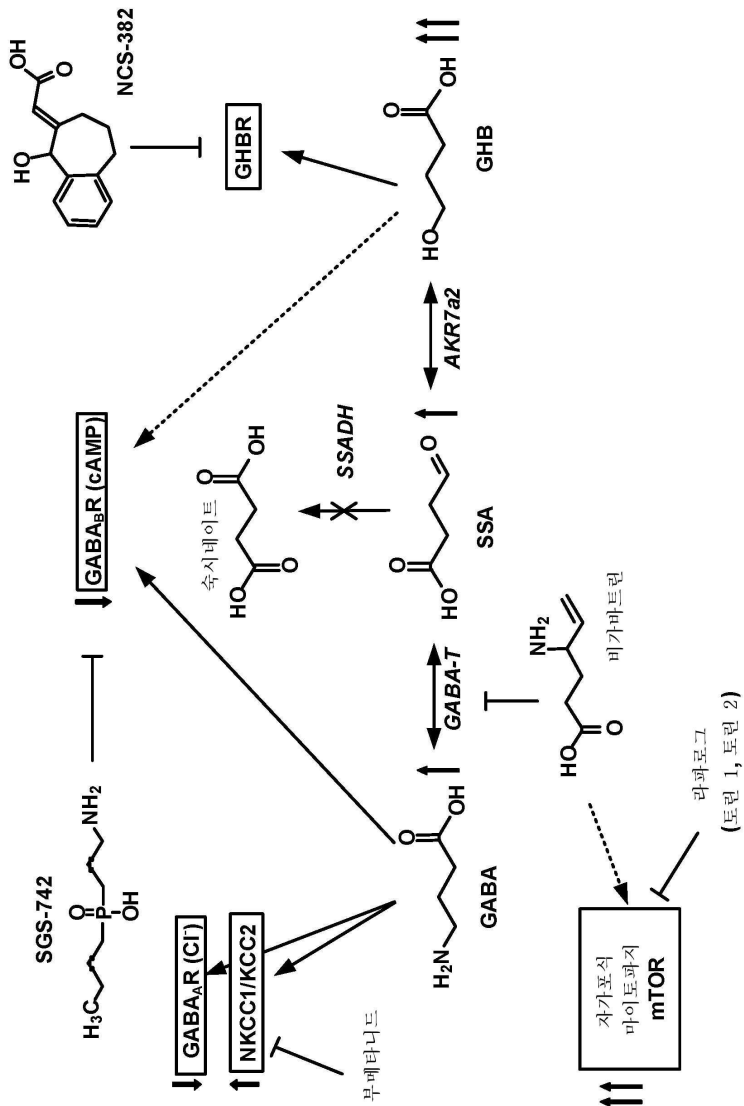
[0130]

[0131] 실시예 4 - 향후 방향

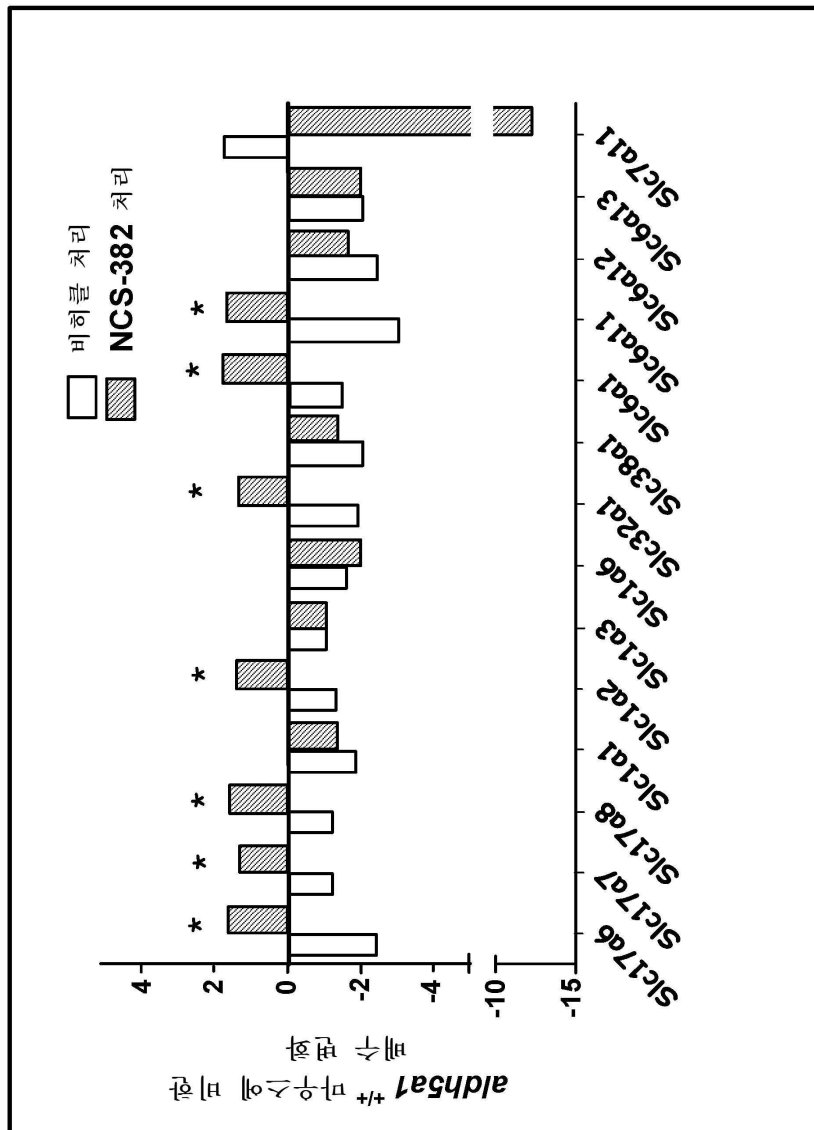
- [0132] 비가바트린-처리 및 *aldh5a1*^{-/-} 마우스를 사용한 mTOR 역할 해부.
- [0133] 비가바트린(VGB) 처리 마우스는 GABA-트랜스아미나제 결핍의 약물 유도 형태를 나타내는 데, 이는 VGB가 GABA 대사의 상기 첫 번째 효소를 비가역적으로 억제하기 때문이다(도 1). VGB를 사용하면, CNS에서 유의하게 상승된 GABA가 비교적 낮은 일일 용량(약 10 mg/kg)으로 달성될 수 있거나, 보정된 삼투압 미니펌프를 사용한 만성 피하 전달을 통해 달성될 수 있다(Vogel et al. J Inherit Metab Dis 39:877-886 (2016); Vogel et al. Toxicol In Vitro 40:196-202 (2017)). 이들 "모델" 사이의 주요한 차이는 VGB 처리 마우스에서 상승된 GHB의 부재에 있으며, 이는 GABA의 역할과 mTOR에 대한 이의 효과를 보다 명확하게 분리하는 것을 시작할 수 있게 한다. 출원인은 이들 상이한 모델에서 유전자 발현을 사용하여 상기 양태를 탐구하기 시작했다.
- [0134] mTOR는 성장 및 분해대사(즉, 번역, 자가포식)를 조절하는 역할을 하는 다수의 세포 내 생물에너지 신호를 조정한다(도 6). 다수의 유전자 발현 변화는 2개의 동물 모델 사이에 상관 관계가 있다. Prkag1은 둘 모두의 모델의 뇌에서 하향 조절되었다(Vogel et al. Toxicol In Vitro 40:196-202 (2017); Vogel et al. Pediatr Neurol 66:44-52.e1. (2017)). Prkag1은 이중삼량체 AMP-활성화 단백질 키나제(AMPK)의 감마 조절 서브유닛이며, 이는 또한 알파 촉매 서브유닛 및 비-촉매 베타 서브유닛을 함유한다(도 6). AMPK는 세포 에너지 상태를 모니터링하는 중요한 에너지-감지 효소이다. 세포 대사 스트레스에 대한 반응으로, AMPK는 활성화되고, 이에 따라 지방산 및 콜레스테롤의 새로운 생합성을 조절하는 데 관여하는 주요 효소인 아세틸-CoA 카르복실라제(ACC) 및 3-하이드록시 3-메틸글루타릴-CoA 환원효소(HMGCR)를 인산화시키고 비활성화시킨다. AMPK는 대사 효소의 직접적인 인산화를 통해 작용하고; 전사 조절인자의 인산화를 통해 장기적으로 작용한다. 저 에너지 상태 동안, AMPK는 mTOR 활성화의 중요한 부정적인 효과기이다.
- [0135] Prkag2는 또한 *aldh5a1*^{-/-} 뇌에서 하향 조절되었다(그리고 VGB 처리된 마우스 눈에서 하향 조절되었다). Prkag1 및 2의 감소된 발현은 mTOR 억제제 토린 1에 의해 정상화되었고, AMPK의 활성화제(*aldh5a1*^{-/-} 마우스에서 하향 조절됨) Stk11의 보정은 토린 2에 의해 정상화되었다. 또한, AMPK의 하류 신호전달 시스템인 Tsc1 및 2는 또한 *aldh5a1*^{-/-} 마우스 뇌에서 토린 1 및 토린 2에 의해 정상화된 낮은 발현을 나타내었다. Rag GTPases는 이의 아미노산 감지 경로를 통해 mTOR를 활성화시키고, RagB/RagD 발현은 *aldh5a1*^{-/-} 뇌에서 상향 조절되었다(RagB는 VGB 처리된 눈 조직에서 상향조절된 반면, RagD는 VGB 처리된 뇌 조직에서 상향조절되었다). 종합적으로, 이들 발견은 AMPK의 교정이 *aldh5a1*^{-/-} 마우스에서 토린 약물의 생존 촉진 효과에 관여한다는 것을 강하게 시사한다. GABA 대사의 장애를 치료하기 위해 mTOR 억제제의 잠재적인 임상적 유용성을 이해하는 것은 계속하여 본 출원인의 실험실의 중심 주제가 될 것이다.
- [0136] SSADHD의 다중시스템 기능장애를 감압할 때, 표현형의 점진적 개선을 활용하기 위해 조합 요법이 필요할 가능성이 있다. 안구 독성의 문제를 극복할 수 있다면 논리적 출발점은 VGB가 될 것이다. 실제로, 이와 관련하여, mTOR의 억제제가 첨가되어 VGB와 관련된 추가로 증가된 GABA의 효과를 완화할 수 있다. 이러한 장애에서 산화 스트레스에 대한 증거를 고려할 때 항산화제는 또한 가치가 있을 것이다(Gupta et al. J Pharmacol Exp Ther 302:180-187 (2002)). 현재 보고에서 볼 수 있듯이, ERT는 CRISPRCas9 접근법과 같은 향후 유전자 조작과 조합될 수 있는 치료적 이점을 가질 수 있다. 그럼에도 불구하고, 출원인의 단기 목표는 SSADHD에 대한 표적화된 요법의 개발로 남아 있다.
- [0137] ***
- [0138] 본 발명의 기재된 방법, 약학적 조성물 및 키트의 다양한 변형 및 변화는 본 발명의 범위 및 사상으로부터 벗어남이 없이 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명은 특정된 구현예와 관련하여 기재되었으나, 추가 변형이 있을 수 있고, 청구된 바와 같은 본 발명은 상기 특정 구현예로 부당하게 제한되지 않아야 함이 이해될 것이다. 실제로, 당업자에게 명백한 본 발명을 수행하기 위한 기재된 방식의 다양한 변형은 본 발명의 범위 내인 것으로 의도된다. 본 출원은 일반적으로 본 발명의 원리를 따르고, 본 발명이 속하는 기술 내에서 공지된 관례적 관행 내에 있는 본 발명의 개시로부터의 상기 일탈을 포함하는 본 발명의 임의의 변형, 사용 또는 적응을 포함하도록 의도되며, 이는 이전에 본원에 기재된 본질적 특징에 적용될 수 있다.

도면

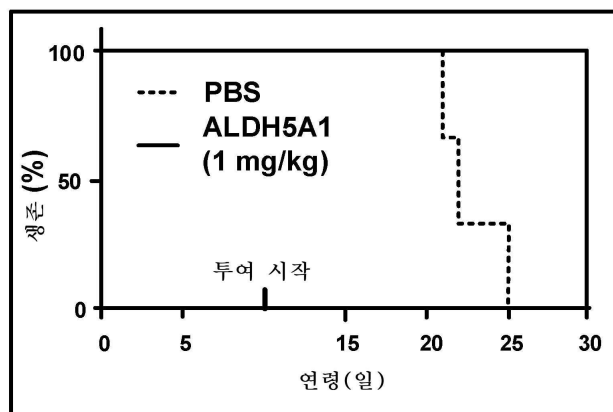
도면1



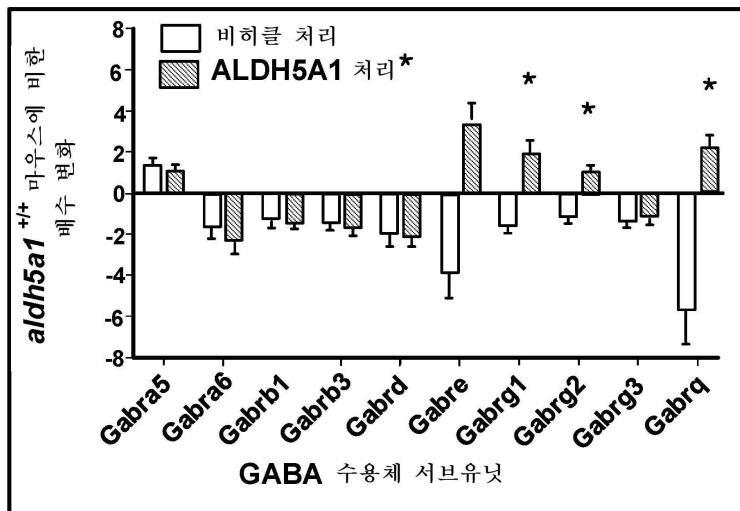
도면2



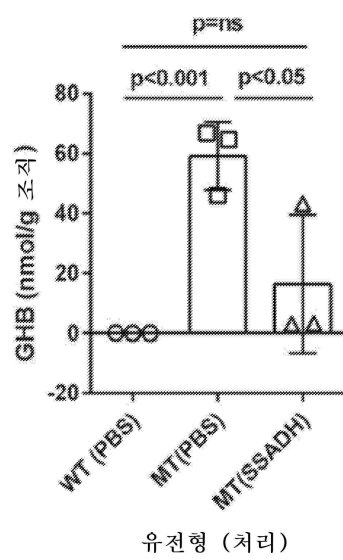
도면3a



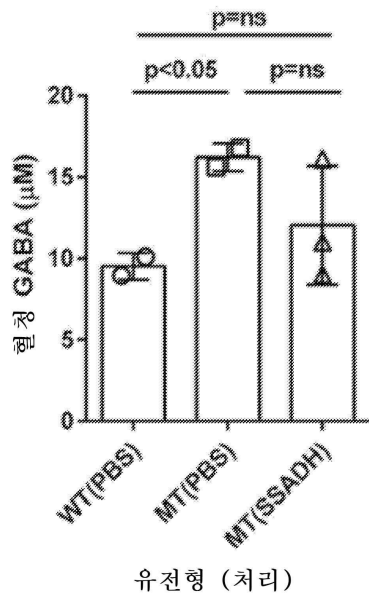
도면3b



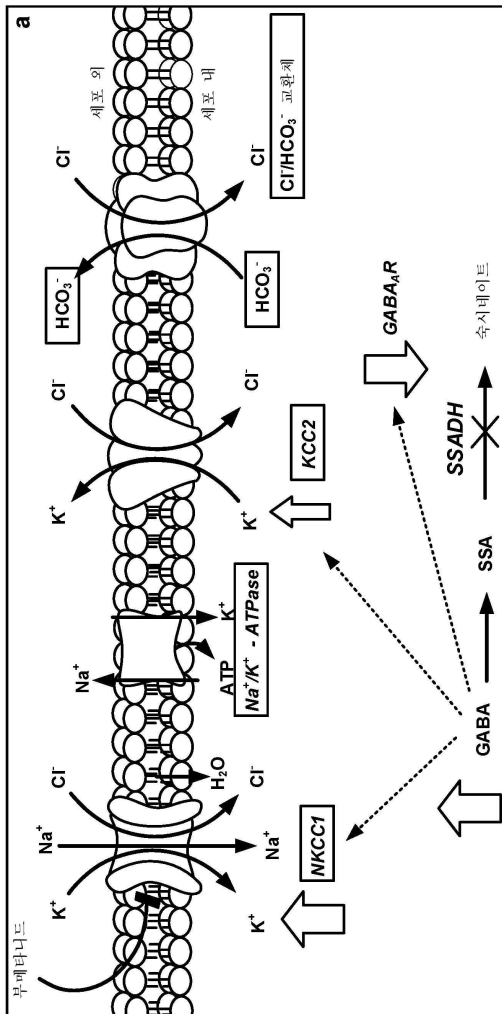
도면4a



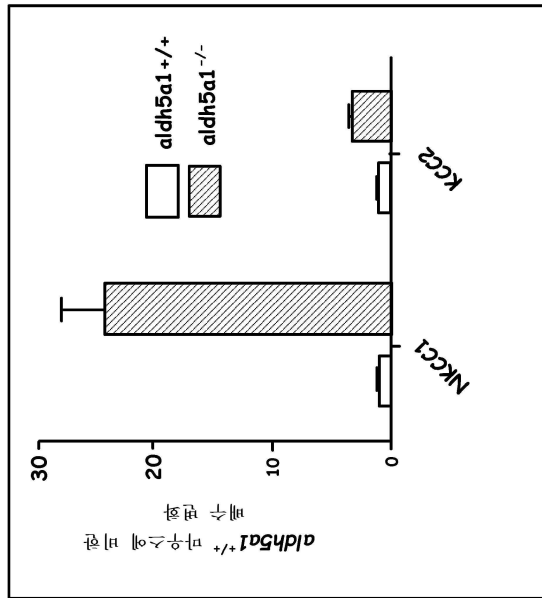
도면4b



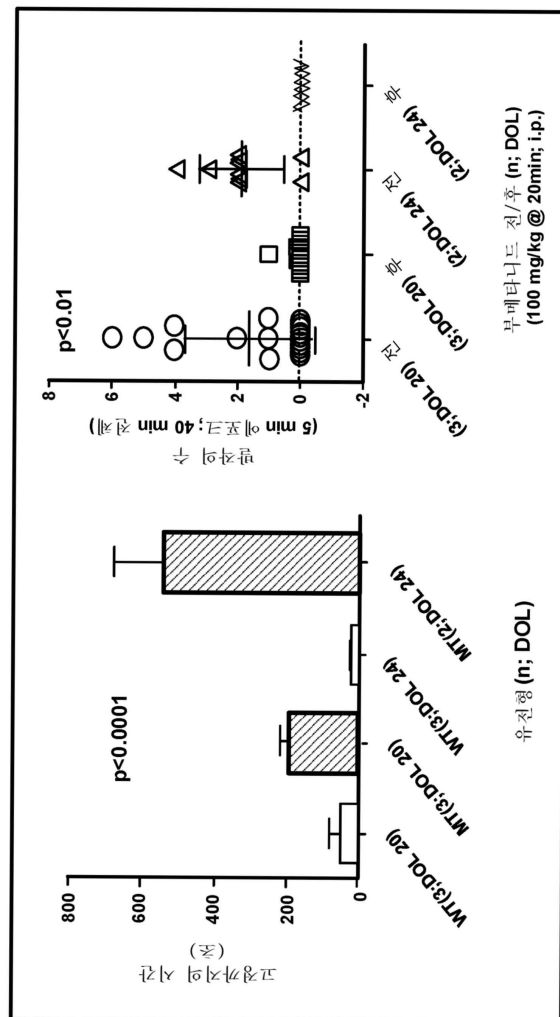
도면5a



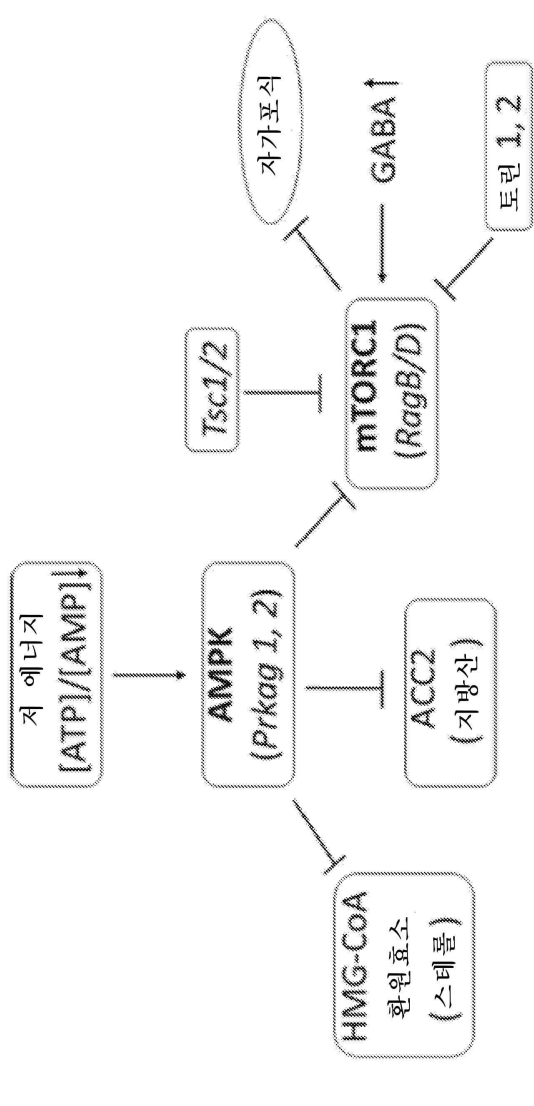
도면5b



도면5c

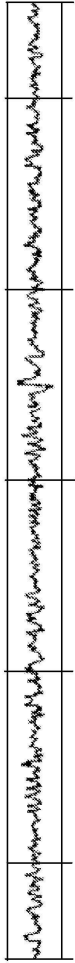


도면6

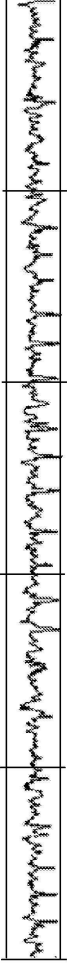


도면7

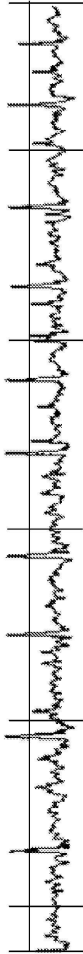
스파이크가 없는 기준선



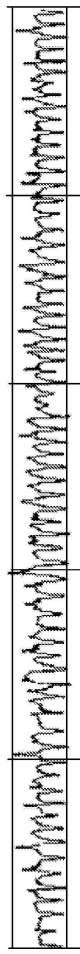
스파이크-트레인



가능 근간대성 발작



가능 소발작 또는 긴장성 발작



트레인 발작