



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0007968
(43) 공개일자 2008년01월23일

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
A61P 25/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0067264

(22) 출원일자 2006년07월19일

심사청구일자 2006년07월19일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

장진우

서울 양천구 신정동 85번지 삼성세르빌 1단지 A동 2204호

이희란

서울 송파구 문정동 올림픽훼밀리타운 227-1001호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장성구, 이현실, 김순웅

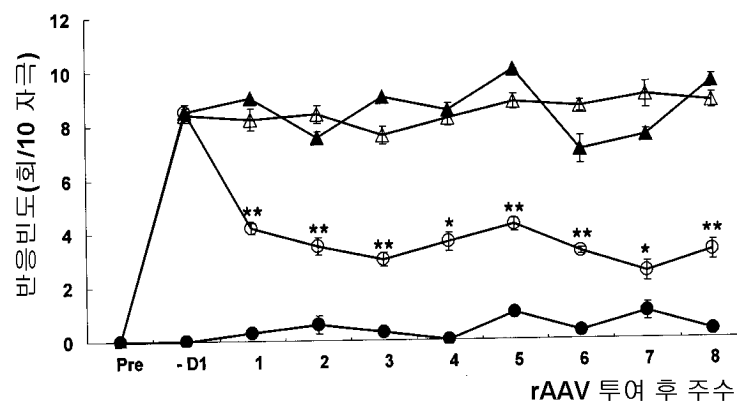
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) GAD65를 발현하는 재조합 벡터를 포함하는 신경병증성통증 완화용 조성물

(57) 요약

본 발명은 GAD65를 발현하는 재조합 벡터를 포함하는 신경병증성 통증 완화용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 약학 조성물을 좌골 신경에 직접 도입하면 말초 신경병증성 통증에 대한 치료 효과가 즉각적으로 나타나 수개월 동안 지속되며, 지속기간 동안 그 효과가 거의 일정하게 나타나므로, 본 발명의 조성물은 말초 신경병증성 통증을 완화하기 위해 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

이보영

서울 동대문구 휘경동 183-311

김재형

서울 동작구 신대방동 395-73 캐릭터그린빌 519호

김성진

충북 충주시 호암동 643-1

특허청구의 범위

청구항 1

GAD65를 발현하는 재조합 벡터를 포함하는 포유동물의 신경병증성 통증 완화용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 재조합 벡터가 GAD65 유전자를 포함하는 재조합 바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 재조합 바이러스 벡터가 재조합 아데노 부속 바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 재조합 벡터가 도 1에 도시된 유전자 지도를 갖는 rAAV-GAD65 벡터인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

신경병증성 통증이 말초신경병증성 통증인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 포유동물이 사람인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항의 약학 조성물을 포함하는 주사제.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <7> 본 발명은 GAD65를 발현하는 재조합 벡터를 포함하는 신경병증성 통증 완화용 조성물에 관한 것이다.
- <8> 말초 신경병증성 통증(peripheral neuropathic pain)은 임상적으로 매우 흔하지만, 아직까지 치료법이 별로 개발되지 못했다.
- <9> 신경병증성 통증은 다양한 신경계의 일차적 병소에서 또는 신경계의 기능장애에 의해 시작되거나 야기되는 통증을 의미하며, 복수의 병인학적 요인들에 의해 유도될 수 있다(Bridges D., *Br. J. Anaesth.*, 87: 12-26 (2001)). 광범위한 병리학적 과정들을 특징으로 하는 말초 신경병증성 통증은 질병 상태에 따라 상이한 부위 및 시간에 발생하는 다수의 현상으로 이루어진다(Decosterd I. 및 Woolf C.J., *Pain*, 87: 149-158 (2000)). 신경병증성 통증의 근원이 되는 복잡한 기전들(mechanisms) 중에서, 부분적인 신경 손상이 척수에서 가바작용성(GABAergic) 저해성 시냅스 전류의 선택적 상실을 일으키는 것으로 보인다. 이러한 특징은 신경병증성 통증 증후군의 표현형에 기여한다(Moore K.A. *et al.*, *J. Neurosci.*, 22: 6724-6731 (2002); Bennett G.J. *et al.*, *Neurochemical and anatomical changes in the dorsal horn of rats with an experimental peripheral neuropathy. In: Processing of sensory information in the superficial dorsal horn of the spinal cord*,

Plenum: New York, 1989, pp. 463-471; Moore K. *et al.*, *Neurosci News*, 4: 5-10 (2001)). 글루타메이트 디카복실레이즈(GAD)에 의해 생성되는 GABA(γ -aminobutyric acid)는 척수의 후각(dorsal horn)에 있는 주요 저해성 신경전달물질이며, 전각(ventral horn)에서도 역시 중요한 역할을 한다(Todd A.J. 및 Maxwell D.J., *GABA in the mammalian spinal cord. In: GABA in the nervous systems: the view at fifty years (Martin D.L., Olsen R.W., eds)*, 2000).

<10> 전이 유전자(transgene)의 도입에 의한 뉴런의 유전학적 변형은 알츠하이머병, 파킨슨병, 또는 만성 통증 증후군과 같은, 현재 치료 방법이 거의 없는 다양한 신경학적 질환에 대해 효과적인 치료법이 될 수 있다. 이전의 보고들은 벡터-매개된 외래 GAD 및 그 결과 생성된 GABA가 척수 손상 후 신경병증 통증을 일시적으로 경감시키는 것을 제시하였다(Liu J. *et al.*, *Mol. Ther.* 10: 57-66 (2004)). 지금까지, 장기간의 효과적인 유전자 전달 및 최소한의 부작용과 같은 몇몇 장점들로 인해(Rolling F. 및 Samulski R.J., *Mol. Biotechnol.*, 3:9-15 (1995); Kaplitt M.G. *et al.*, *Nat. Genet.*, 8:148-154 (1994); Bankiewicz K.S. *et al.*, *Exp. Neurol.*, 144: 147-156 (1997); Burger C. *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 16: 781-791 (2005)), 인간 아데노 부속 바이러스(hAAV)에 기초한 벡터 시스템이 신경계에 가장 널리 적용되어 왔다(Mandel R.J. *et al.*, *Mol. Ther.*, 13: 463-483(2006)). 또한, 재조합 AAV2 (rAAV2)는 중추 신경계의 1차 뉴런을 우선적으로 형질전환시킨다(Bankiewicz K.S. *et al.*, 상기 문헌; Mandel R.J. *et al.*, *J. Neurosci.*, 18: 4271-4284 (1998); Wang L. *et al.*, *Gene Ther.*, 9: 381-389 (2002); Clark K.R. *et al.*, *J. Drug Target*, 7: 269-283 (1999); Burger C. *et al.*, *Mol Ther*, 10: 302-317 (2004)).

<11> 포유동물 GAD의 두 가지 아형(isoforms)이 동정된 바 있으며, 이들은 별개의 유전자에 의해 코딩된다(Erlander M.G. *et al.*, *Neuron*, 7: 91-100 (1991)). GAD65는 시냅스에서 막-결합된 형태로 존재하고, 소포성 분비(vesicular release)를 위한 시냅스성 GABA를 생산하는데 주로 관여한다. 이와 대조적으로, GAD67은 세포 전체에 분포하며, 비-소포성 기전을 통해 GABA를 분비함으로써 세포질성 GABA의 생산을 주로 담당한다(Soghomonian J.J. 및 Martin D.L., *Trends Pharmacol. Sci.*, 19: 500-505 (1998); Martin D.L. 및 A.J. T., *Mechanisms controlling GABA synthesis and degradation in the brain. In: GABA in the nervous system: the view at fifty years*. Williams & Wilkins: Philadelphia, pp.25-41 (2000); Mi J. *et al.*, *J. Neurosci. Res.*, 57: 137-148 (1999); Mackie M. *et al.*, *Neuroscience*, 119: 461-472 (2003)). 무어(Moore) 등은 GAD65 농도가 래트 통증 모델에서 신경 손상 부위에 동측성인 후각에서 현저히 감소하지만, GAD67 발현은 그렇지 않다고 보고하였다(Moore KA *et al.*, *J. Neurosci.*, 22: 6724-6731 (2002)).

<12> 최근, Hao 등은 인간 GAD67(QHGAD67)을 암호화하는 재조합 단순 포진 바이러스(HSV)-기반 벡터를 제조하였으며, QHGAD67의 발바닥 피하 투여가 말초 신경병증성 통증을 경감시킨다는 것을 보고하였다(Hao S. *et al.*, *Ann. Neurol.*, 57: 914-918 (2005)). 그러나, 통증 경감은 오직 2주에서 5주 동안 지속된 QHGAD67 투여에 따라 수 주 내에 최대화되었고, 이후 급격히 사라졌다.

<13> 따라서, 말초 신경병증성 통증에 대해 지속적으로 통증 완화 효과를 나타낼 수 있는 치료제의 개발이 계속 요구되어 왔다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<14> 따라서, 본 발명의 목적은 신경병증성 통증을 효과적으로 완화시킬 수 있는 약학 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<15> 상기 목적에 따라, 본 발명에서는 GAD65를 발현하는 벡터를 포함하는, 포유동물의 신경병증성 통증 완화를 약학 조성물을 제공한다.

<16> 본 발명의 약학 조성물의 활성 성분인 GAD65 발현 벡터는 GAD65 유전자를 포함하는 바이러스 벡터(예, DNA 또는 RNA 바이러스 벡터)일 수 있다. 이러한 바이러스 벡터로서는 아데노바이러스 벡터, 아데노 부속 바이러스 벡터 등을 예시할 수 있으며, 아데노 부속 바이러스 벡터는 유전자 발현을 장기적으로 유도하므로 통증치료에 더욱 적합한 벡터 체계이다. 본 발명에서는 CMV 프로모터를 근간으로 하는 아데노 부속 바이러스 벡터에 GAD65 유전자를 삽입하여 도 1의 유전자 지도를 갖는 통증 치료용 rAAV-GAD65 아데노 부속 바이러스 벡터를 제작하였으며, rAAV-GAD65는 신경병증성 통증에 대해 지속적으로 통증 완화 효과를 나타낸다.

<17> GAD65 및 GABA 발현율이 높은 상기 rAAV-GAD65 벡터를 좌골신경손상(sciatic nerve injury)으로 인한 신경병증성 통증을 앓고 있는 래트의 후근신경절(DRGs)에 직접 주입하면, 주입 후 8주 이상까지 DRGs에서 지속적인

GAD65 발현 및 결과적인 GABA 방출이 유도되며, 이로 인해 신경병증성 통증이 현저히 개선된다. 이러한 치료 효과는 즉각적으로 나타나고 수개월 동안 지속되며, 지속기간 동안 그 효과가 거의 일정하게 나타나는 장점이 있다. 따라서, GAD65를 발현하는 벡터를 포함하는 본 발명의 조성물은 신경병증성 통증, 특히 말초 신경병증성 통증의 완화를 위해 매우 효과적이다.

- <18> 본 발명의 조성물은 활성성분인 GAD65 발현 벡터 외에도 하나 또는 다수의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 및 선택적으로 다른 치료적으로 유용한 성분을 포함할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제와 같은 보조제 등을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 제제화할 수 있다. 예를 들어, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액의 형태가 바람직하다.
- <19> 본 발명의 조성물은 일반에 공지된 유전자치료법에 따라 포유동물, 예를 들어, 사람과 같은 대상에 다수의 비경구 경로중 임의의 경로로 적절히 투여할 수 있는데, 특히, 후근신경절에 직접 주사를 통해 투여하는 것이 가장 효과적이다.
- <20> 상기 조성물은 유효 성분인 GAD65 발현 벡터가 사람을 포함하는 포유동물에 대해 하루에 1 ng 내지 100 μ g/kg (체중), 바람직하게는 10 ng 내지 10 μ g/kg(체중)의 양으로 투여되도록 1일 1회 또는 분할하여 투여할 수 있다.
- <21> 그러나, 활성 성분의 실제 투여량은 통증의 중증도, 선택된 투여 경로, 대상의 연령, 성별, 체중 및 건강상태 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.
- <22> 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- <23> **참고예: 통계 분석**
- <24> 모든 데이터는 평균 \pm SEMs으로 표시하였다. 통계 분석은 가변 분석(전기생리학적 기록 데이터) 또는 가변 프로토콜의 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis) 일방 분석을 사용하여 수행한 후, 각 군의 행동 데이터의 비교를 위한 맨-휘트니(Mann-Whitney) U-테스트를 수행하였다. <0.01 및 <0.05의 p-값을 통계학적으로 유의미한 것으로 간주하였다. 모든 통계 분석은 SPSS(버전 11.5; SPSS Inc., 시카고, IL)를 사용하여 수행하였다.
- <25> **실시예 1: 재조합 아데노 부속 바이러스의 제조**
- <26> 본 발명에 필요한 아데노 부속 바이러스는 스트라타진사(Stratagene; Kirkland, WA)에서 입수한 AAV 헬퍼-프리(helper-free) 시스템을 기반으로 하여 제조 및 생산하였다.
- <27> rAAV2-JDK-GAD65(이후 "rAAV-GAD65"로 약칭함)는 변형된 CMV 프로모터(JDK; 서열번호: 1)를 포함하는 아데노 부속 바이러스인 pJDK 플라스미드에 래트의 GAD65를 코딩하는 유전자가 삽입된 것이다(Lee B. *et al.*, *Gene Ther.*, 12: 1215-1222 (2005)).
- <28> rAAV-GAD65의 제작
- <29> 우선, 다음과 같이 래트(rat) GAD65의 cDNA를 RT-PCR(역전사-중합효소연쇄반응)을 이용하여 합성하였다.
- <30> 래트의 해마(hippocampus)를 취한 후, 트라이졸(Trizol) 용액 (Invitrogen)을 이용하여 총 RNA를 추출한 다음, 이를 주형으로 하고 프라이머로서 GAD mRNA의 3'말단 부분과 상보적인 서열번호: 2의 서열 (5'-GCCCTCGAGTTACAAATCTGTGCCAGGCG-3'; 밑줄친 부분은 *Xba*I 제한효소 인식부위임)을 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이어서, 합성된 cDNA를 주형으로 하고 프라이머로서 상기 프라이머 및 GAD mRNA의 5'말단 부분과 상보적인 서열번호: 3의 서열 (5'-GTCTCTAGACCATGGCATCTCCGGGCTCTG-3'; 밑줄친 부분은 *Xho*I 제한효소 인식부위임)을 이용한 PCR을 시행하여 래트 GAD65에 대한 PCR 산물을 획득하였다. 이를 *Xba*I과 *Xho*I로 절단하고 동일한 효소로 자른 pBluescript SK(+)(Stratagen)에 삽입하여 pBluescript SK-GAD65를 얻었다. 이를 서열분석하여 뉴클레오타이드 서열이 맞는지를 재확인하였다.
- <31> rAAV-GAD65 바이러스를 생산하는 데 필요한 GAD65 내재 벡터 pAAV-GAD65를 제작하기 위해 아데노 부속 바이러스용 pJDK 플라스미드 (성균관대의대 김덕경 박사로부터 입수함; Byun J. *et al.*, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 33: 295-305 (2001))에 pBluescript SK-GAD65의 GAD65 유전자를 서브클로닝하였다. 즉, pJDK 플라스미드 및 pBluescript SK-GAD65를 각각 *Eco*R I (NEB사) 제한효소로 절단한 후, GAD65 DNA 조각을 절단된 pJDK 플라스미드에 T4 DNA 연결효소(ligase, TaKaRa사)를 이용하여 삽입시켰다. 얻어진 플라스미드로 컴피턴트(competent) 세포

인 대장균 XL-1 blue를 형질전환시키고, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 카나마이신이 포함된 LB 플레이트에서 배양, 선별하여 플라스미드 pAAV-GAD65를 회수하였다. 플라스미드 pAAV-GAD65의 유전자 지도(rAAV-GAD65 바이러스도 동일)가 도 1에 나타나 있는데, 여기에서 TR은 말단 반복부위(terminal repeat)를, P JDK는 변형된 CMV 프로모터인 JDK 프로모터를, 그리고 Poly A는 폴리아데닐레이트 서열을 각각 나타낸다.

- <32> pAAV-GFP는 pAAV 벡터(Stratagene)의 기본골격(backbone) 내에서 범용 CMV 프로모터의 조절 하에 인간화된 레닐라 GFP(hrGFP) 유전자(Stratagene에서 구입)를 포함한다.
- <33> 한편, 아데노 부속 바이러스의 제작을 위해 필요한 pRepCap 및 pHelper 벡터또한 스트라타진사(Stratagen)에서 구입하였다.
- <34> rAAVs의 순수한 제제를 얻기 위하여, 10×10 cm 디쉬에서 배양중인 293T 세포(하버드 의과대학의 Dr. J. Jung으로부터 입수)를 인산칼슘법을 사용하여 pAAV-GAD65 또는 pAAV-GFP와 함께 pRepCap 또는 pHelper로 트랜스펙션시키고(Nam Y. R. *et al.*, *Oncol. Rep.*, 12: 761-766 (2004)), SSCP법에 의해 유리시켜 정제하였다(Auricchio A. *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 12: 71-76 (2001)). 정제한 바이러스 용액을 PBS 완충액(PH 7.4)에서 투석한 후, 정제된 고농축의 rAAVs를 -80℃에서 2 % 슬비톨을 포함한 PBS 완충액에 저장하였다 (Kim S. J. *et al.*, *Oncol. Rep.*, 14: 1475-1479 (2005)).
- <35> 전체 및 감염성 바이러스 입자들을 ELISA 키트(Progen Inc., 하이델베르그, 독일)를 이용한 분석 및 GAD65(Chemicon, CA)에 대한 면역세포화학법에 의해 각각 분석하였다(Nam Y. R. *et al.*, 상기 문헌 참조).
- <36> **실시예 2: 신경병증성 통증 동물모델의 제조**
- <37> 체중 180-200 g의 8-10 주령 수컷 스프라그 돌리(Sprague Dawley) 래트를 우리마다 다섯 마리씩 넣고, 12시간의 명/암 주기, 온도 22±1℃, 및 습도 50±5 %로 일정하게 조절되는 사육장에서 사육하면서 먹이와 물은 항상 먹을 수 있도록 하였다.
- <38> 래트를 소듐 펜토바비탈 용액(50 mg/kg)으로 마취시킨 후, 왼쪽 좌골 신경의 체절(segment)을 넓적다리 중간쯤에서 노출시켰다. 주변 조직을 조심스럽게 제거하고, 핀셋으로 좌골 신경을 조심스럽게 고정시켰다. 좌골 신경의 세 가지 주요 부분들(경골, 장딴지 및 일반 종아리뼈 신경)을 외과용 현미경(Olympus, 일본) 하에서 명확히 분리하였다. 효과적인 신경병증성 통증 모델을 만들기 위하여, 경골 및 장딴지 신경을 완전히 절단한 후 단단히 결찰하고, 종아리뼈 신경은 그대로 두었다. 지혈 처리 후 절단부위를 근육 및 피부와 함께 봉합하였다.
- <39> **시험예: DRGs에 대한 rAAV의 형질도입 효율 조사**
- <40> 후근절(DRGs)에 대한 rAAV의 형질도입 효율을 조사하기 위하여, 실시예 2와 같이 수술에 의해 동물 모델(n=6)을 확립한 지 2주 후, 마취된 래트의 척추골의 일부를 제거함으로써 동측 요부(ipsilateral lumbar) L4 및 L5 후근절(DRGs)을 외과적으로 노출시켰다. rAAV-GFP를 식염수에 현탁한 용액 3 μl (1.3×10^7 의 감염 입자/ml)를 해밀턴 주사기에 연결된 유리 마이크로피펫을 통해 각 DRG 뉴론에 20분동안 전달시킨 후, 수술 부위를 다시 봉합하였다.
- <41> 도 2는 상기 주입 후 3주 또는 8주 후의 GFP 발현 양상을 형광현미경으로 관찰한 것으로(배율: x100), 3주 후에 GFP의 축적에 의하여 L4 및 L5가 밝은 형광성이 되었음을 보여준다. 또한, rAAV-GFP를 DRGs로 도입한 후, 지속적으로 GFP가 합성되었으며 GFP 신호는 8주에서 현저한 변화없이 양성을 유지하였다.
- <42> **실시예 3: 신경병증성 통증 모델의 DRGs내 GAD65 검사**
- <43> 신경병증성 통증 모델에서의 DRGs내 GAD65를 검사하기 위하여, 실시예 2에서와 같이 확립된 동물 모델에 시험예에서와 같은 방법으로 rAAV-GAD65를 식염수에 현탁한 용액 3 μl (2.4×10^6 감염 입자/ml)(n=6) 또는 식염수 3 μl (대조군)(n=5)를 L4 또는 L5 DRGs로 직접 도입시켰다.
- <44> 8주 후, 래트를 치사시키고, T13-L1 척수 및 L4-L5 DRGs를 분리하여 후고정시킨 다음, 30 % 수크로즈 용액으로 평형화하였다(Lee B. *et al.*, 상기 문헌 참조). 이후 동결절편(cryosection)을 제작한 후, 각 절편을 다클론성 GAD65 항체(Chemicon, CA)로 염색한 후, 다시 FITC-접합 2차 항체(Santa Cruz Biotech)에 의해 면역화학적으로 염색하였다.
- <45> 도 3은 rAAV-GAD65 투여 8주 후에 DRG를 면역조직화학적으로 염색한 결과(배율: x100)로서, GAD65에 특이적인 면역조직화학적 염색에 의해 DRG 내 GAD65의 발현이 쉽게 검출되었으며, rAAV-GAD65를 주입한 DRG 내의 GAD65

농도가 식염수를 주입한 대조군에서의 GAD65 농도보다 현저하게 높음을 알 수 있다.

<46> **실시예 4: DRGs내의 GAD65 발현으로 인한 신경병증성 통증에 의해 유도되는 기계적 이질통(allodynia) 및 통각과민(hyperalgesia)의 감소 효과**

<47> (1) 기계적 이질통의 감소 효과

<48> 실시예 2에서와 같이 확립된 동물 모델에 시험예에서와 같은 방법으로 rAAV-GAD65의 식염수 현탁액 3 μ l (2.4×10^6 감염 입자/ml)(n=10), rAAV-GFP의 식염수 현탁액 3 μ l (1.3×10^7 의 감염 입자/ml)(n=4), 식염수 3 μ l (대조군)(n=5)를 L4 또는 L5 DRGs로 직접 도입시킨 후, 1주에서 8주까지 매주 본 프레이 실험(von Frey testing)에 의해 기계적 이질통을 측정하였다. 아무런 처리도 하지 않은 정상 래트를 대조군으로 사용하였다.

<49> 래트들을 다리부위로의 접근이 가능하도록 와이어 매쉬 그리드(wire mesh grid) 상부의 아크릴 유리($8 \times 10 \times 20$ cm) 내에 수용했다. 30분간의 적응 후, 본 프레이(von Frey) 필라멘트(8 mN 굽힘력(bending force))를 이용하여 좌측 및 우측 뒷발의 측면 가장자리에 무해한 기계적 자극을 10회 가하고, 각 동물이 좌측 및 우측 뒷발 모두를 드는 총 횟수를 측정하였다.

<50> 10회의 기계적 자극에서의 발 후퇴 빈도를 4개의 개별적인 군, 즉 rAAV-GAD65 투여군(n=10), rAAV-GFP 투여군(n=4), 식염수 투여 대조군(n=7), 및 무처리 대조군에서 측정하여 기록하였다(도 4). 투여 후 1주에, rAAV-GFP 투여군 및 식염수 투여 대조군에서는 10회의 자극 당 각각 8.8 ± 0.2 회 및 8.5 ± 0.3 회의 이질통 발생률을 나타내었으나, rAAV-GAD65 투여군에서는 기계적 이질통 발생률이 10회의 자극 당 4.2 ± 0.2 회로 급격하게 감소하였다(식염수 투여 대조군 대비 감소율: 49.4 %). 더욱 중요한 것은, rAAV-GAD65 투여군에서는 기계적 이질통에 대한 현저한 개선 효과가 전체 실험 기간 내내 지속되었다는 점이다. 대조적으로, rAAV-GFP 투여군 및 식염수 투여 대조군에서는 기계적 이질통에 대한 개선효과가 관찰되지 않았다. 또한, 무처리 대조군에서는 기계적 이질통이 전혀 나타나지 않았다.

<51> (2) 기계적 통각과민의 개선 효과

<52> DRGs내의 GAD65 발현으로 인한 기계적 통각과민의 개선효과를 확인하기 위해, 상기 (1)에서와 같이 rAAV-GAD65 투여군(n=6), rAAV-GFP 투여군(n=5), 식염수 투여 대조군(n=7), 및 무처리 대조군을 설정하고, 주사기에 연결된 굽은 침(22 게이지)을 사용하여 침통각 실험(pinprick test)을 수행하였다. 이 경우, 좌측 및 우측 뒷발의 발바닥의 측면 가장자리에 실험 동물이 아닌 경우에도 반사적 후퇴 반응(reflex withdrawal response)을 일으키기에 충분한 강도로 침 자극을 주었다. 발들기 지속 시간을 스톱워치를 사용하여 기록하였다.

<53> 그 결과, rAAV-GAD65 투여군(n=6), rAAV-GFP 투여군(n=5), 및 식염수 투여 대조군(n=7)은 투여 전에 각각 9.8 ± 0.4 , 11 ± 0.7 및 10.5 ± 1.0 초의 현저하게 증가된 발들기 지속 시간을 나타내었다(도 5). 이들 중, rAAV-GAD65 투여군에서만 바이러스 주입 1주 후에 발들기 지속 시간의 급격한 감소(5.5 ± 0.4 초($P < 0.05$); 식염수 투여 대조군의 발들기 지속시간인 12.5 ± 1.0 대비 감소율: 44 %)를 비롯하여 통각과민으로 인한 증상들에 대한 개선이 나타났다. rAAV-GAD65에 의한 개선은 전체 실험 기간 동안 지속되었으며, rAAV-GFP 투여군 및 식염수 투여군에서는 모두 감소(diminishing) 효과가 관찰되지 않았다.

<54> **실시예 5: 척수 후각에서의 GABA 방출량 측정**

<55> DRGs내 GAD65 도입유전자 발현에 따라 척수 후각에서 GABA의 현저한 농도 증가가 관찰되는지 여부를 확인하기 위하여, 실시예 2에서와 같이 확립된 동물 모델에 시험예에서와 같은 방법으로 rAAV-GAD65의 식염수 현탁액 3 μ l (2.4×10^6 감염 입자/ml)(n=8) 또는 식염수 3 μ l (대조군)(n=7)를 투여한 지 8주 후에 척수 후각(dorsal horn)에서의 GABA 농도를 다음과 같이 측정하였다.

<56> 우레탄(1.25 mg/kg)으로 마취된 래트를 정위 틀(stereotaxic frame) 위에 올려놓고, 척추골 T13의 후면을 노출시킨 후 척추골 클램프로 수평면상에 고정시켰다. 경질막(dura)을 조심스럽게 개방하고 미세투석 탐침(CMA/11, 스웨덴)을 척수로 삽입하였다. 탐침을 인공 뇌척수액(CSF)(145 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.2 mM $CaCl_2$, 1.0 mM $MgCl_2$ 및 2.0 mM NaH_2PO_4 , pH 7.4)으로 관류하였다. 유량은 CMA/102 펌프(CMA/미세투석, 스웨덴)를 이용하여 분당 1.0 μ l로 조심스럽게 조절하였다. 그 후, 30 μ l의 각 뇌척수액을 채취하여, 3 ml의 OPA 모액(1 ml의 MeOH 중 2.7 mg O-프탈디알데하이드, 5 μ l 2-머캅토에탄올 및 9 ml 0.1 M 소듐 테트라보레이트) 및 1 ml의 소듐 테트라보레이트로 구성된 60 μ l의 작업액(working solution)과 혼합한 혼합액을 HPLC로 분석하였다. HPLC에는 역상(reverse phase) 컬럼(AccQ-Tag, 3.9×150 mm, Waters for amino acid analysis, Ireland)을 사용하였으며, 이

동상은 30 % 아세토니트릴을 포함하는 0.02 M 소듐 아세테이트 완충액 (pH 4.6)이었다. 피크는 RF-10Ax1(Shimazu Corp., 일본)을 사용하여 30℃에서 유량 0.7 ml/분으로 각각 340 nm의 여기(excitation) 파장 및 460 nm의 방사(emission) 파장에서 검출하였다.

<57> 그 결과, 도 6에서 볼 수 있듯이, rAAV-GAD65 투여군의 래트에서는 척수 후각의 GABA 농도가 0.619 ± 0.064 pmol/ μ l ($P < 0.01$)로 현저히 증가하였으나, 식염수 투여 대조군에서는 이러한 증가가 나타나지 않았다(0.284 ± 0.065 pmol/ μ l).

발명의 효과

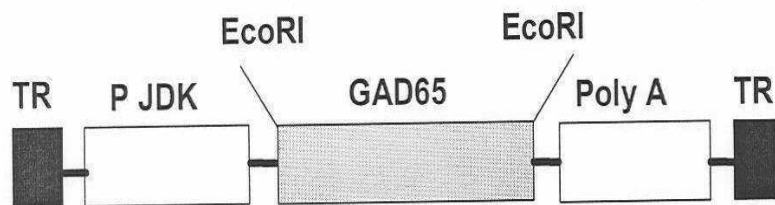
<58> GAD65를 발현하는 벡터를 포함하는 본 발명의 약학 조성물을 좌골 신경에 직접 도입하면 말초 신경병증성 통증에 대한 치료 효과가 즉각적으로 나타나 수개월 동안 지속되며, 지속기간 동안 그 효과가 거의 일정하게 나타나므로, 본 발명의 조성물은 말초 신경병증성 통증의 완화를 위해 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

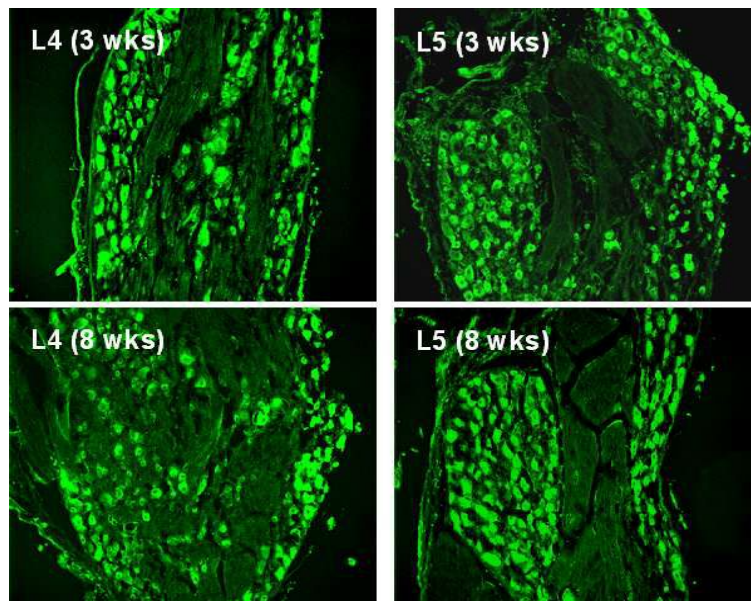
- <1> 도 1은 rAAV-GAD65 아데노 부속 바이러스 벡터의 유전자 지도를 나타낸 것이다.
- <2> 도 2는 신경병증성 통증 모델 래트의 L4 및 L5 후근신경절(DRG)로 rAAV-GFP를 직접 주입한 지 3주 또는 8주 후의 녹색형광단백질(GFP)의 발현 양상을 형광현미경으로 관찰한 결과이다(배율: x100).
- <3> 도 3은 신경병증성 통증 모델 래트의 L4 및 L5 DRGs로 rAAV-GAD65 또는 식염수를 주입한 지 8주 후에 DRG 내 GAD65의 발현을 확인한 면역조직화학적 염색 결과이다(배율: x100).
- <4> 도 4는 신경병증성 통증 모델 래트에서 rAAV-GAD65 투여가 기계적 이질통(allodynia)에 미치는 효과를 나타낸 것이다(무처리 대조군(●), rAAV-GAD65 투여군(○), rAAV-GFP 투여군(△) 및 식염수 투여 대조군(▲), *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$).
- <5> 도 5는 신경병증성 통증 모델 래트에서 rAAV-GAD65 투여가 기계적 통각과민(hyperalgesia)에 미치는 효과를 나타낸 것이다(무처리 대조군(●), rAAV-GAD65 투여군(○), rAAV-GFP 투여군(△) 및 식염수 투여 대조군(▲), *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$).
- <6> 도 6은 신경병증성 통증 모델 래트의 DRG로 rAAV-GAD65 또는 식염수를 주입한 지 8주 후 후각(dorsal horn)에서의 GABA (γ -aminobutyric acid)의 농도를 HPLC로 측정한 결과이다(*: $P < 0.01$).

도면

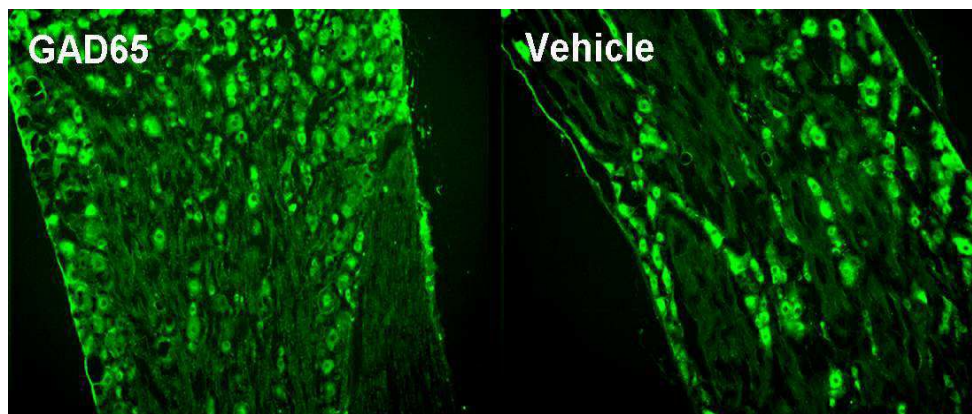
도면1



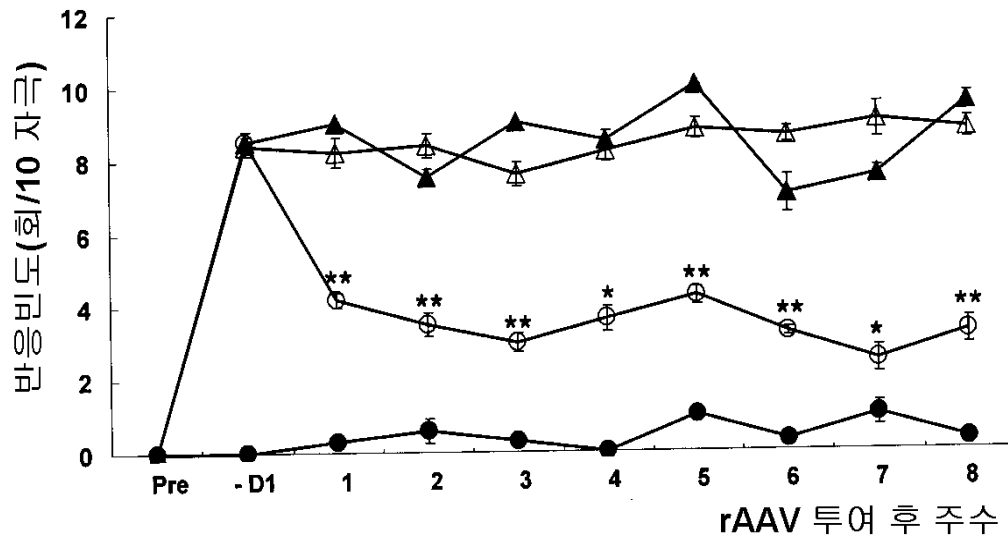
도면2



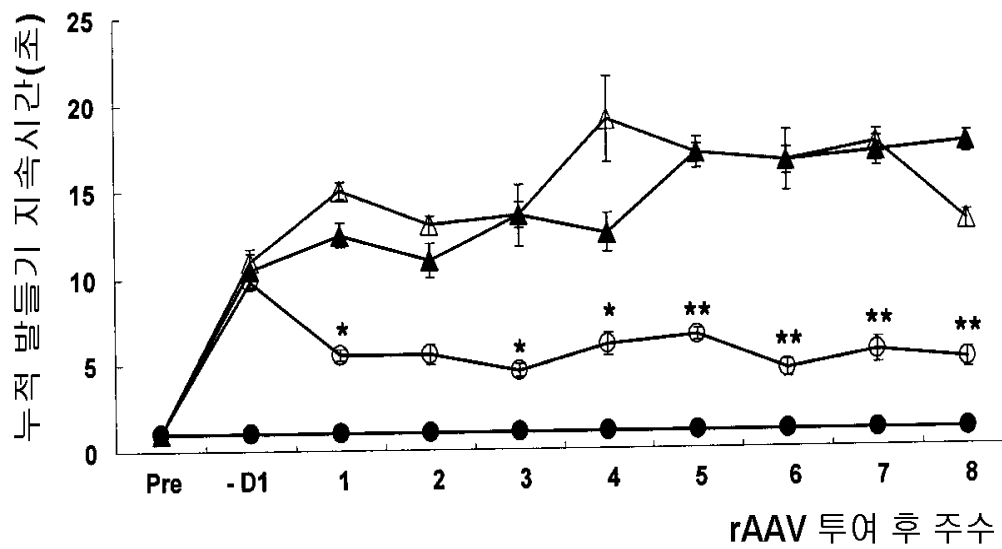
도면3



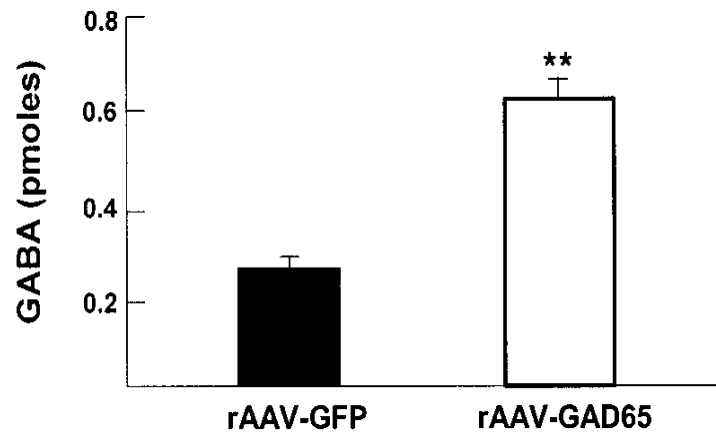
도면4



도면5



도면6



서열목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> Composition for attenuating neuropathic pain comprising a recombinant vector expressing GAD65

<130> FPD/200603-0115

<160> 3

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 693

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> JDK promoter

<400> 1

ggccaactcc atcactagg gttcctgcgg ccgcacgcgt ggagctagtt attaatagta 60

atcaattacg gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac 120

ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccac cgacccccgc ccattgacgt caataatgac 180

glatgttccc atagtaacgt caataggacgac ttccattga cgtcaatggg tggagtattt 240

acggtaaact gcccaattgg cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cggcccctat 300

tgacgtcaat gacggtaaat ggcccgccctg gcattatgcc cagtacatga cttatggga 360

ctttcctact tggcagtaca tctacgtatt agtcacgct attaccatgg tgatgcggtt 420

ttggcagtag atcaatgggc gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca 480

ccccattgac gtcaatggga gtttgttttg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt 540

cgtaacaact ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat 600

ataagcagag ctctgttagt gaaccgtcag atgcctgga gacgcatcc acgtgtttt 660

gacctccata gaagacaccg ggaccgatcc agc 693

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer complementary to the 3'-end of GAD mRNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(9)

<223> XbaI recognition site

<400> 2

gccctcgagt tacaaatctt gtcccaggcg 30

<210> 3
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer complementary to the 5'-end of the GAD mRNA

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(9)
 <223> XhoI recognition site

<400> 3
 gtctctagac caccatggca tctccgggct ctg

33