명세서

발명의 명칭: 통증 완화 또는 치료용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 통증의 완화 또는 치료용 조성물 및 이를 이용한 통증의 완화 또는 치료방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 통증이란 실제 또는 잠재적인 조직 손상이나 그러한 손상과 관련된 불쾌한 감각 및 감정의 경험을 의미한다. 통증은 손상 받은 상황으로부터 손상이 치유되는 동안 손상된 신체 일부를 보호하고, 앞으로 유사한 경험을 피하려고 하는 동기를 부여한다. 대부분의 통증은 원인 자극이 제거되면 서서히 완화되지만, 때때로 자극이 사라짐과 동시에 손상 부위가 분명히 치유되었음에도 불구하고 통증이 지속되거나, 어떠한 자극, 손상 또는 질병이 없는 상태에서 통증이 발생하기도 한다.

[3] 통증 치료에는 주로 아편알카로이드인 모르핀 등의 마약성 진통제나 아세틸살리실산, 이부프로펜, 또는 아세트아미노펜 성분의 비스테로이드성항염제 (NSAID)와 같은 비마약성 진통제가 널리 사용되고 있다.

[4] 마약성 진통제는 용량 반응성과 높은 효력을 나타내는 장점이 있으나, 신경계 부작용 및 장기간 사용하게 되면 내성과 신체적 의존성이 나타나며, 통증이 악화될 수 있다.

[5] 비마약성 진통제인 아세틸살리실산을 주성분으로 하는 아스피린을 진통의 목적으로 사용하는 경우 최소한 500 mg 이상의 고용량으로 투여해야 한다. 하지만, 아스피린은 비스테로이드성 소염진통제로서 위를 보호하는 역할을 하는 프로스타글란딘의 생성을 촉진하는 효소 (COX-1)를 차단하여 위 점막이 만들어지는 것을 막는다. 따라서, 위장이 위산에 의해 쉽게 다치게 되고 위장관 출혈이 일어날 수 있다. 또한, 이부프로펜도 비스테로이드성 소염진통제 성분이므로 위장 장애를 일으킬 수 있다. 그리고 타이레놀과 같은 아세트아미노펜을 주성분으로 하는 진통제의 경우 아세트아미노펜이 대부분 간으로 대사되기 때문에 간 손상을 일으킬 수 있다.

[6] 상기 진통제들은 초기에는 효과가 있더라도 장기간 사용시 내성이 생겨 효과가 없어지는 경우도 빈번하다. 특히, 신경병증성 통증의 경우 비스테로이드성 소염진통제가 최대 용량에도 반응하지 않는 문제점이 있어 단기간 고용량 투여하고 있는 실정이다.

[7] 최근, 새로운 신경병증성 통증 치료제가 개발되고 있지만 여전히 부작용이 존재한다. 예를 들면, 나트륨 채널 저해제는 대부분 소분자 (small molecules) 형태로써, 동형 (isoform) 단백질에 선택성이 낮다. 또한, 심장 독성, 거동 장애 등의 부작용이 존재한다.

[8] 따라서, 부작용을 낮추면서도 진통 효과가 우수한 새로운 신경병증성 통증 진통제의 개발이 절실히 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 이에 본 발명자들은 저용량으로도 진통 효과가 우수한 새로운 신경병증성 통증의 진통제를 개발하고자 노력한 결과, 글루타메이트 디카르복실라제, 항염증성 사이토카인, 및 신경교세포 유래 영양인자 중 2종 이상의 조합을 이용하는 경우, 단독 이용에 비해 통증이 현저하게 완화 또는 치료될 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[10] 본 발명은 글루타메이트 디카르복실라제 (Glutamate decarboxylase, GAD)를 암호화하는 유전자, 인터루킨-10 (Interleukin-10, IL-10)을 암호화하는 유전자, 및 신경교세포 유래 영양 인자 (Glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF)를 암호화하는 유전자로 구성되는 군으로부터 선택되는 2종 이상을 포함하는 통증의 완화 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[11] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 통증의 완화 또는 치료방법을 제공한다.

발명의 효과

[12] 본 발명의 약학 조성물은 GAD, IL-10, 및 GDNF를 암호화하는 유전자로 구성되는 군으로부터 선택되는 2종 이상을 포함한다. 따라서, 본 발명의 약학 조성물은 유전자를 병용 투여함으로써 단독 투여하는 경우보다 적은 투여량으로도 우수한 진통 효과를 나타내므로 종래 부작용 및 독성을 낮출 수 있다. 이에, 본 발명의 약학 조성물은 통증의 완화 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[13] 도 1은 재조합 아데노 부속 바이러스 제작에 이용한 플라스미드인 pAAV-GAD65 및 pAAV-GAD65-modi의 개열지도를 나타낸 도면이다:

[14] (a)는 pAAV-GAD65의 개열지도를 나타낸 것이며, (b)는 pAAV-GAD65-modi의 개열지도를 나타낸 것이다.

[15] 도 2는 재조합 아데노 부속 바이러스 제작에 이용한 플라스미드인 pAAV-IL-10의 개열지도를 나타낸 도면이다.

[16] 도 3은 재조합 아데노 부속 바이러스 제작에 이용한 플라스미드인 pAAV-GDNF의 개열지도를 나타낸 도면이다.

[17] 도 4는 pAAV-GDNF-IL-10 플라스미드를 도식화한 도면이다.

[18] 도 5는 pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, 또는 pAAV-GDNF 플라스미드에 의한 각각의 도입 유전자 발현을 확인한 도면이다:

[19] (a)는 pAAV-GAD65 플라스미드에 의한 GAD65 발현을 확인한 도면이다; (b)는

pAAV-IL-10 플라스미드에 의한 IL-10 발현을 확인한 도면이다; (c)는 pAAV-GDNF 플라스미드에 의한 GDNF 발현을 확인한 도면이다.

[20] 도 6은 pAAV-GDNF-IL-10 플라스미드에 의한 GDNF 및 IL-10 유전자 발현을 확인한 도면이다:

[21] (a)는 pAAV-GDNF-IL-10 플라스미드에 의한 IL-10 발현을 확인한 도면이다; (b)는 는 pAAV-GDNF-IL-10 플라스미드에 의한 GDNF 발현을 확인한 도면이다.

[22] 도 7은 GAD65, IL-10, 또는 GDNF 유전자가 각각 도입된 재조합 아데노 부속 바이러스를 제조한 후, 각각의 재조합 아데노 부속 바이러스를 293T 또는 HeLa 세포에 처리한 후 웨스턴 블랏을 통해 각 단백질의 발현을 확인한 도면이다:

[23] (a)는 재조합 아데노 부속 바이러스 AAV-GAD65를 293T 또는 HeLa 세포에 처리한 후 GAD65 발현을 확인한 도면이다; (b)는 재조합 아데노 부속 바이러스 AAV-GAD65-modi를 293T 또는 HeLa 세포에 처리한 후 GAD65 발현을 확인한 도면이다; (c)는 재조합 아데노 부속 바이러스 AAV-IL-10를 293T 또는 HeLa 세포에 처리한 후 IL-10 발현을 확인한 도면이다; (d)는 재조합 아데노 부속 바이러스 AAV-GDNF를 293T 또는 HeLa 세포에 처리한 후 GDNF 발현을 확인한 도면이다.

[24] 도 8은 재조합 아데노 부속 바이러스 AAV-GAD65 또는 AAV-GAD65-modi를 293T 또는 HeLa 세포에 처리한 후 ELISA를 통해 GABA 발현양을 측정한 도면이다:

[25] (a)는 재조합 아데노 부속 바이러스 AAV-GAD65를 293T 또는 HeLa 세포에 처리한 후 GABA 발현양을 측정한 도면이다; (b)는 재조합 아데노 부속 바이러스 AAV-GAD65-modi를 293T 또는 HeLa 세포에 처리한 후 GABA 발현양을 측정한 도면이다.

[26] 도 9는 AAV-GAD65, AAV-IL-10, 또는 AAV-GDNF 바이러스를 단독 투여하는 경우와 AAV-GAD65 및 AAV-GDNF, 또는 AAV-IL-10 및 AAV-GDNF 바이러스를 병용 투여하는 경우의 통증완화 효능을 비교한 그래프이다.

[27] 도 10은 AAV-GAD65, AAV-IL-10, 또는 AAV-GDNF 바이러스를 단독 투여하는 경우와 AAV-GAD65 및 AAV-IL-10 바이러스를 모두 병용 투여하는 경우의 통증완화 효능을 비교한 그래프이다.

[28] 도 11은 AAV-GAD65 및 AAV-GDNF, 또는 AAV-IL-10 및 AAV-GDNF 바이러스를 병용 투여하는 경우와 AAV-GAD65, AAV-IL-10, 및 AAV-GDNF 바이러스를 모두 병용 투여하는 경우의 통증완화 효능을 비교한 그래프이다.

[29] 도 12는 pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, 또는 pAAV-GDNF 플라스미드를 단독 투여하는 경우와 pAAV-GAD65 및 pAAV-GDNF, 또는 pAAV-IL-10 및 pAAV-GDNF 플라스미드를 병용 투여하는 경우의 통증완화 효능을 비교한 그래프이다.

[30] 도 13은 pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, 또는 pAAV-GDNF 플라스미드를 단독 투여하는 경우와 pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, 및 pAAV-GDNF 플라스미드를

모두 병용 투여하는 경우의 통증완화 효능을 비교한 그래프이다.

[31] 도 14는 pAAV-GAD65 및 pAAV-GDNF, 또는 pAAV-IL-10 및 pAAV-GDNF 플라스미드를 병용 투여하는 경우와 pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, 및 pAAV-GDNF 플라스미드를 모두 병용 투여하는 경우의 통증완화 효능을 비교한 그래프이다.

[32] 도 15는 AAV-GAD65-modi 및 AAV-GDNF-IL-10 바이러스를 병용 투여하는 경우와 AAV-GAD65, AAV-IL-10, 및 AAV-GDNF 바이러스를 모두 병용 투여하는 경우의 통증완화 효능을 비교한 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[33] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[34] 본 발명은 글루타메이트 디카르복실라제 (GAD)를 암호화하는 유전자, 인터루킨-10 (IL-10)을 암호화하는 유전자, 및 신경교세포 유래 영양 인자 (GDNF)를 암호화하는 유전자로 구성되는 군으로부터 선택되는 2종 이상을 포함하는 통증의 완화 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[35] 일 구체예로, 상기 2종 이상의 조합은 GAD 및 IL-10, GAD 및 GDNF, IL-10 및 GDNF, 또는 GAD, IL-10, 및 GDNF일 수 있다.

[36] 상기 GAD를 암호화하는 유전자, IL-10을 암호화하는 유전자, 및 GDNF를 암호화하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 2종 이상의 유전자는 전달체에 포함된 형태일 수 있다. 이때, 상기 전달체는 바이러스성 벡터, 또는 플라스미드나 리포좀 등의 비바이러스성 벡터일 수 있다. 또한, 상기 유전자의 일부는 바이러스성 벡터에 포함되고, 나머지 유전자는 비바이러스성 벡터에 포함된 형태일 수 있다.

[37] 일 구체예로, GAD는 바이러스성 벡터에 포함되고, IL-10은 비바이러스성 벡터에 포함된 형태일 수 있다. 또한, GAD는 바이러스성 벡터에 포함되고, GDNF는 비바이러스성 벡터에 포함된 형태일 수 있다. 나아가, IL-10은 바이러스성 벡터에 포함되고, GDNF는 비바이러스성 벡터에 포함된 형태일 수 있다. 또한, GAD는 바이러스성 벡터에 포함되고, IL-10 및 GDNF는 비바이러스성 벡터에 포함된 형태일 수 있다. 또한, GAD 및 IL-10은 바이러스성 벡터에 포함되고, GDNF는 비바이러스성 벡터에 포함된 형태일 수 있다. 또한, GAD 및 GDNF는 바이러스성 벡터에 포함되고, IL-10은 비바이러스성 벡터에 포함된 형태일 수 있다. 또한, IL-10은 바이러스성 벡터에 포함되고, GAD 및 GDNF는 비바이러스성 벡터에 포함된 형태일 수 있다. 또한, IL-10 및 GDNF는 바이러스성 벡터에 포함되고, GAD는 비바이러스성 벡터에 포함된 형태일 수 있다. 또한, GDNF은 바이러스성 벡터에 포함되고, GAD 및 IL-10은 비바이러스성 벡터에 포함된 형태일 수 있다.

[38] 또한, 상기 유전자는 작동 가능하도록 벡터에 포함된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 유전자는 작동 가능하도록 바이러스성 벡터 또는

비바이러스성 벡터에 포함된 형태일 수 있다.

[39] 상기 바이러스성 벡터는 아데노바이러스 (Adenovirus), 아데노 부속 바이러스 (Adeno-associated virus; AAV), 허피스 심플렉스 바이러스 (Herpes simplex virus), 렌티바이러스 (Lentivirus), 레트로바이러스 (Retrovirus), 싸이토메갈로 바이러스 (Cytomegalovirus), 배큘로바이러스 (baculovirus), 및 폭스바이러스 (Poxvirus) 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다. 구체적으로, 상기 바이러스성 벡터는 아데노 부속 바이러스일 수 있다.

[40] 일 구체예로, 상기 GAD를 암호화하는 유전자는 작동 가능하도록 전달체1 (예를 들면, 제1벡터)에 포함되고, 상기 IL-10을 암호화하는 유전자는 작동 가능하도록 전달체2 (예를 들면, 제2벡터)에 포함되며, 상기 GDNF를 암호화하는 유전자는 작동 가능하도록 전달체3 (예를 들면, 제1벡터)에 포함된 것일 수 있다. 또한, 하나의 전달체에 2개 이상의 유전자가 포함된 것일 수 있다.

[41] 또한, 상기 비바이러스성 벡터는 플라스미드, 리포좀, 양이온성 고분자, 마이셀(micelle), 에멀젼, 및 고형 지질 나노입자(solid lipid nanoparticles)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[42] 본 발명에서 사용하는 용어 "플라스미드"란, 세균의 염색체 외에 따로 존재하는 원형의 DNA 조각을 의미한다. 플라스미드는 세균의 생존에 필수적인 유전자는 없지만, 특정 항생물질에 대한 내성, 세균 간 유전자 교환에 필수적인 유전자를 포함한다. 또한, 플라스미드는 염색체와 독립적으로 증식할 수 있으며, 선택표지(selectable marker)를 포함할 수 있다.

[43] 본 발명에서 사용하는 용어 "리포좀"이란, 인지질과 같이 한 분자안에 소수성(hydrophobic)을 띠는 부분과 친수성(hydrophilic)을 띠는 부분을 동시에 가지는 분자를 수용액에 현탁하면 친수성 부분과 소수성 부분으로 인해 이중층을 이루면서 형성되는 소포체를 의미한다. 리포좀은 지질이중층으로 구성된 막에 의해 외막과 격리되어 있으며, DNA, mRNA 등을 내포한 리포솜이 유전정보의 매개체로서 사용할 수 있다.

[44] 본 발명에서 사용하는 용어 "양이온성 고분자"란, 양이온성 지질 또는 고분자 화합물로 음이온성인 DNA와 이온결합에 의해 복합체를 형성해 세포내로 전달하는 물질을 의미한다.

[45] 본 발명에서 사용하는 용어 "마이셀"이란, 계면활성제와 지방질분자와 같이 극성기와 무극성 소수기로 이루어져 있는 분자가 용액 중에서 반데르발스(van der Waals) 힘 등에 의해서 회합하여 만들어진 열역학적으로 안정한 콜로이드성 회합체를 의미한다. 또한, DNA, mRNA 등을 내포한 마이셀을 유전정보의 매개체로서 사용할 수 있다.

[46] 본 발명에서 사용하는 용어 "에멀젼"이란, 상이 다른 두 용액을 혼합할 때, 한쪽 액체가 미세한 입자를 형성하여 다른 액체 속에 분산되어 있는 것을 의미한다. 상기 에멀젼 입자의 중심부에 DNA, mRNA 등을 내포시켜 유전정보의 매개체로서 사용할 수 있다.

[47] 본 발명에서 사용하는 용어 "고형 지질 나노입자"란, 액상의 지질 대신에 고형의 지질로 이루어진 나노 크기의 미립자 중에 약물을 내포하는 형태의 제제를 의미한다.

[48] 본 발명에 따른 GAD, IL-10, 및 GDNF로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 유전자를 포함하는 전달체1 (예를 들면, 제1벡터) 및 상기 전달체1에 포함되지 않은 나머지 유전자 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유전자를 포함하는 전달체2 (예를 들면, 제2벡터)는 단위 부피당 바이러스 역가 기준 혼합비가 1:1 내지 100 또는 1 내지 100:1일 수 있다. 구체적으로, 상기 전달체1 및 전달체2의 단위 부피당 바이러스 역가 기준 혼합비가 1:1 내지 10 또는 1 내지 10:1일 수 있다.

[49] 본 발명에 따른 GAD 암호화 유전자를 포함하는 전달체1 (예를 들면, 제1벡터), IL-10의 암호화 유전자를 포함하는 전달체2 (예를 들면, 제2벡터) 및 GDNF 암호화 유전자를 포함하는 전달체3 (예를 들면, 제3벡터)는 단위 부피당 바이러스 역가 기준 혼합비가 1:0.1 내지 10:0.1 내지 10 일 수 있다.

[50] 본 발명에서 사용하는 용어 "작동 가능하도록"이란, 도입 유전자가 숙주 세포에서 발현이 이루어질 수 있도록 하는 방식으로 조절서열에 연결되어 있다는 것을 의미한다. 상기 조절서열은 유전자의 발현을 조절하는 DNA 염기서열로, 프로모터 및 인핸서나 폴리아데닐화와 같은 다른 조절 요소를 포함할 수 있다. 또한, 상기 조절서열은 도입 유전자의 발현을 조절하는 전사인자가 결합하는 자리를 제공하며, 전사인자와의 복합체 구조에 영향을 주어 전사인자의 기능을 결정할 수 있다.

[51] 본 발명에서 사용하는 용어 "GAD" 란, 글루타메이트를 탈카르복실화시켜 GABA (gamma-aminobutyric acid)를 생성하는 효소를 의미한다. 상기 GAD는 GAD65 또는 GAD67일 수 있다. 구체적으로, 상기 GAD65은 이에 한정되는 것은 아니나 사람, 래트 (rat), 개, 고양이, 말 유래일 수 있다. 상기 GAD를 암호화하는 유전자는 서열번호 1, 4, 32, 34, 또는 36로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열일 수 있다.

[52] 또한, 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열은 서열번호 2 또는 3으로 표시되는 DNA 서열일 수 있으며, NCBI Reference Sequence: NM_000818.2에 표시된 mRNA 서열일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열은 서열번호 5로 표시되는 DNA 서열 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 유전자를 사람에게 맞게 코돈 최적화한 염기서열일 수 있으며, NCBI Reference Sequence: NM_000817.2에 표시된 mRNA 서열일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 32로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열은 서열번호 33으로 표시되는 DNA 서열일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 34로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열은 서열번호 35로 표시되는 DNA 서열일 수 있으며, 서열번호 36으로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열은 서열번호

37로 표시되는 DNA 서열일 수 있다.

[53] 또한, 상기 GAD 암호화 유전자는 GAD의 활성을 유지하여 GABA를 생산할 수 있도록 하는 GAD 변이체를 암호화하는 염기서열일 수 있다. 상기 GAD 변이체는 GABA를 생산하는 GAD의 특성이 유지되는 모든 서열을 포함하며 어느 하나에 특정되는 것은 아니나, 바람직하게 상기 GAD 변이체를 암호화하는 염기서열은 상기 표시된 GAD 아미노산 서열과 적어도 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열일 수 있으며, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열일 수 있다.

[54] 또한, GAD 변이체를 암호화하는 염기서열은 상기 표시된 GAD 염기서열과 적어도 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열일 수 있으며, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[55] 상기 "서열 상동성의 %"는 두 개의 서열을 최적으로 배열한 상태에서 비교 영역을 비교함으로써 확인한다. 또한, 비교 영역에서의 염기서열 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열 (추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제 (즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[56] 본 발명에서 사용하는 용어 “IL-10” 이란, 클래스 II 사이토카인에 속하는 항염증성 사이토카인을 의미한다 (Renauld, Nat Rev Immunol, 2003). 상기 IL-10은 178개 아미노산 길이의 서브유니트 (subunit) 두 개로 이루어지는 호모다이머 (homodimer) 형태이다. 사람의 사이토카인 합성 저해인자 (Cytokine synthesis inhibitory factor; CSIF)로도 알려져 있다. IL-10은 면역반응에서 NK (Natural killer) 세포의 활성을 억제하는 기능을 수행하며, IL-10 수용체와 복합체를 형성하여 신호전달에 관여한다. 상기 IL-10은 이에 한정되는 것은 아니나 사람, 래트 (rat), 개, 고양이, 말 유래 단백질일 수 있다. 상기 IL-10을 암호화하는 유전자는 서열번호 6, 9, 38, 40, 또는 42로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열일 수 있다.

[57] 구체적으로, 상기 서열번호 6으로 표시되는 아미노산을 암호화하는 염기서열은 서열번호 7 또는 8로 표시되는 DNA 서열일 수 있으며, NCBI Reference Sequence: NM_012854.2에 표시된 mRNA 서열일 수 있다. 또한, 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열은 서열번호 10 또는 14로 표시되는 DNA 서열일 수 있으며, NCBI Reference Sequence: NM_000572.2에 표시된 mRNA 서열일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 38로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열은 서열번호 39로 표시되는 DNA 서열일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 40으로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열은 서열번호 41로 표시되는 DNA 서열일 수 있으며, 서열번호 42로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열은 서열번호 43으로 표시되는 DNA 서열일 수 있다.

[58] 또한, 상기 IL-10 암호화 유전자는 IL-10의 활성을 유지하는 IL-10 변이체를 암호화하는 염기서열일 수 있다. 상기 IL-10 변이체를 암호화하는 염기서열은 상기 표시된 IL-10 아미노산 서열과 적어도 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열일 수 있으며, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열일 수 있다.

[59] 또한, IL-10 변이체를 암호화하는 염기서열은 상기 표시된 IL-10 염기서열과 적어도 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열일 수 있으며, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[60] 본 발명에서 사용하는 용어 "GDNF"이란, GDNF 리간드 패밀리를 구성하는 하나의 단백질을 의미한다. GDNF 리간드 패밀리는 GDNF, 뉴투린 (neuturin; NRTN), 아르테민 (artemin; ARTN), 및 페르세핀 (persephin; PSPN)으로 구성되어 있다. 또한, 상기 GDNF는 많은 종류의 신경세포의 생존을 촉진시키는 단백질이며, GFRα1 수용체를 통해 신호를 전달한다. 상기 GDNF는 이에 한정되는 것은 아니나 사람, 래트 (rat), 개, 고양이, 말 유래 단백질일 수 있다. 상기 GDNF를 암호화하는 서열번호 11, 44, 46, 또는 48로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열일 수 있다.

[61] 구체적으로, 상기 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열은 서열번호 12 또는 13으로 표시되는 DNA 서열일 수 있으며, NCBI Reference Sequence: NM_199231.2에 표시된 mRNA 서열일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 44로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열은 서열번호 45로 표시되는 DNA 서열일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 46으로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열은 서열번호 47로 표시되는 DNA 서열일 수 있으며, 서열번호 48로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열은 서열번호 49로 표시되는 DNA 서열일 수 있다.

[62] 또한, 상기 GDNF 암호화 유전자는 GDNF의 활성을 유지하는 GDNF 변이체를 암호화하는 염기서열일 수 있다. 상기 GDNF 변이체를 암호화하는 염기서열은 상기 표시된 GDNF 아미노산 서열과 적어도 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산을 암호화하는 염기서열일 수 있으며, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열일 수 있다.

[63] 또한, GDNF 변이체를 암호화하는 염기서열은 상기 표시된 GDNF 염기서열과 적어도 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열일 수 있으며, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[64] GAD 유전자의 산물인 GABA는 통증 신호 전달을 차단하는 효과가 있으나 양이 지나치게 많아질 경우 심장 박동이 증가하거나 호흡이 빨라지는 등의

부작용과 더불어 가려움증이나 어지러움, 졸음 등의 증상이 나타날 수 있다 (Longo, Am Fam Physician, 2000).

[65] IL-10은 항염 작용을 하는 사이토카인으로 알려져 있으나, 독감 증상 등의 부작용이 나타날 수 있다 (Friedrich, J Invest Dermatol, 2002).

[66] 나아가, GDNF의 발현은 신경병증성 통증 등의 다양한 통증에 대한 진통 효과를 나타내는 것으로 알려져 있으나, 원숭이 실험에서 이를 과량 투여하는 경우 뇌 신경세포 손상을 일으키는 것으로 보고되었다 (Hovland, Toxicol Pathol, 2007).

[67] 본 발명의 약학 조성물은 적은 양의 유전자 또는 이를 포함하는 전달체로 진통 작용을 나타낼 수 있다. 본 발명의 조성물은 GAD 암호화 유전자를 포함하는 벡터, 신경조직 내 항염작용 사이토카인 암호화 유전자를 포함하는 벡터 및/또는 GDNF 암호화 유전자를 포함하는 벡터로 구성되어, 서로 다른 진통 메커니즘을 가진 물질들을 병용 투여함으로써 단독 투여 시에 비해 적은 양으로도 동등 또는 그 이상의 통증 완화 또는 치료 효과를 달성할 수 있다.

[68] 특히, 본 발명에 따르면 GAD65, IL-10, 및 GDNF를 암호화하는 유전자로 구성되는 군으로부터 선택되는 2종 이상 유전자를 병용 투여하였을 때 상승적 통증 완화 효과가 나타난다. 따라서, 본 발명의 약학 조성물은 통증의 완화 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[69] 본 발명의 일 구체예에 따라, 상기 제1벡터, 제2벡터, 및/또는 제3벡터는 아데노 부속 바이러스일 수 있다. 상기 아데노 부속 바이러스는 특정 혈청형 (serotype)에 한정되지 않으며, 바람직하게는 AAV1 내지 AAV9 중 어느 하나일 수 있다.

[70] 상기 통증은 통각 통증, 심인성 통증, 염증성 통증, 병적 통증, 신경병증성 통증 (neuropathic pain), 암성 통증 (cancer pain), 수술 후 통증 (postoperative pain), 삼차 신경통 (trigeminal neuralgia pain), 특발성 통증 (idiopathic pain), 당뇨성 신경병증성 통증 (diabetic neuropathic pain), 또는 편두통 (migraine) 일 수 있다. 구체적인 일예로, 상기 통증은 요천추 신경근병증 (lumbosacral radiculopathy; LSR)일 수 있다.

[71] 상기 염증성 통증은 조직 손상 및 면역 세포의 침윤과 관련된 통증을 의미한다. 또한, 상기 병적 통증은 신경 조직의 손상 또는 그것의 비정상적 기능에 의해 통증이 유발되는 질병 상태를 의미한다. 또한, 상기 병적 통증은 섬유 근육통, 과민성 대장 증후군, 또는 긴장성 두통과 같은 기능 장애 통증일 수 있다.

[72] 또한, 통증은 해부학상 구분되는 등 통증을 포함할 수 있다: 목 통증, 등 가운데 통증 (middle back pain), 등 아래쪽 통증 또는 꼬리뼈 통증 (tailbone pain). 또한, 상기 통증은 신경병증성 통증 (neuropathic pain), 암성 통증 (cancer pain), 수술 후 통증 (postoperative pain), 삼차 신경통 (trigeminal neuralgia pain), 특발성 통증 (idiopathic pain), 당뇨성 신경병증성 통증 (diabetic neuropathic pain), 편두통 (migraine) 등으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다. 구체적인 일예로, 상기 통증은 요천추 신경근병증 (lumbosacral radiculopathy; LSR)일 수

있다.

[73] 신경병증성 통증은 체성 감각 (somatosensory) 시스템에 영향을 주는 손상 또는 질병으로부터 유발될 수 있다. 신경병증성 통증은 지각이상 (dysesthesia)이라고 불리는 비정상적 감각 및 이질통 (allodynia)일 수 있다. 또한, 신경병증성 통증의 일반적인 특성은 뜨거움 또는 추위, 다리가 저리는 감각 (pins and needles), 무감각 (numbness) 및 가려움 (itching)을 포함한다. 대조적으로, 통각 통증은 흔히 아픔 (aching)으로 표현된다.

[74] 또한, 편두통은 다수의 자율신경계 증상과 관련되어 있으며, 일반적인 정도부터 심각한 정도까지의 두통을 유발하는 만성적인 장애 (chronic disorder)이다. 편두통은 대뇌피질 (cerebral cortex)의 증가된 흥분도 및 뇌 줄기 (brainstem)의 삼차 신경 핵 (trigeminal nucleus)에서 통증 신경세포의 비정상적인 조절과 관련되어 있다고 알려져 있다 (Noseda, Pain, 2013).

[75] 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물은 신경병증성 통증 (neuropathic pain), 만성 암통증 (chronic cancer pain)의 완화 또는 치료용으로 사용될 수 있다.

[76] 본 발명에서 사용하는 용어 "완화 또는 치료"란, 본 발명의 조성물을 투여함으로써 통증 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[77] 본 발명의 약학 조성물은 생리적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제, 또는 주사제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 구체적으로, 상기 약학 조성물은 주사제의 형태일 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 1985)에 게시되어 있는 것을 사용할 수 있다.

[78] 또한, 상기 약학 조성물은 담체, 부형제 및 희석제로 소금 (sodium chloride), 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함할 수 있다. 상기 약학 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[79] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[80] 또한, 본 발명은 GAD, IL-10, 및 GDNF를 암호화하는 유전자로 구성되는 군으로부터 선택되는 2종 이상을 포함하는 약학 조성물을 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 통증의 완화 또는 치료방법을 제공한다.

[81] 상기 통증은 약학 조성물에서 상술한 바와 같다.

[82] 상기 대상은 사람을 포함하는 포유류, 또는 사람을 포함하는 포유류로부터 분리된 세포 및/또는 조직일 수 있다. 또한, 상기 대상은 인간이 아닌 동물일 수 있으며, "인간이 아닌 동물"이라는 용어는 모든 척추동물, 예컨대, 인간이 아닌 영장류, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류, 파충류 등과 같은 포유동물 및 비 (非) 포유동물을 포함한다.

[83] 상기 약학 조성물의 투여경로, 투여량 및 투여횟수는 환자의 상태 및 부작용의 유무에 따라 다양한 방법 및 양으로 대상에게 투여될 수 있고, 최적의 투여방법, 투여량 및 투여횟수는 통상의 기술자가 적절한 범위로 선택할 수 있다. 또한, 상기 약학 조성물은 치료하고자 하는 질환에 대하여 치료효과가 공지된 다른 약물 또는 생리학적 활성물질과 병용하여 투여되거나, 다른 약물과의 조합 제제 형태로 제형화될 수 있다.

[84] 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물은 주사제 형태로 제공될 수 있다. 예를 들면, 피하주사, 근육 내 주사, 정맥 주사, 경막외 주사, 또는 척수관 주사 등을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 약학 조성물은 경막외 주사 또는 척수관 주사를 통해 투여될 수 있으며, 보다 구체적으로는 경추간공 경막외 주사 또는 척수관 주사를 통해 투여될 수 있다.

[85] 본 발명에서 사용하는 용어 "경추간공 경막외 주사 (transforaminal epidural injection)"란, 척수에서부터 신경이 척추뼈 사이를 통해 나오는 공간인 추간공 내부, 척수 및 척추신경을 감싸고 있는 경막의 바깥쪽 공간에 약물을 주사하는 방법을 의미한다. 일 구체예로, 본 발명의 약학 조성물이 바이러스인 경우, 대상의 추간공 내부에 경막외 주사요법을 실시하여 약물을 투여할 수 있다.

[86] 본 발명에서 사용하는 용어 "척수관 주사 (intrathecal injection)"란, 척수관 경막 안으로 약물을 주사하여 투여하는 방법을 의미한다. 일 구체예로, 본 발명의 약학 조성물이 플라스미드인 경우, 대상의 척수관 안에 척수관 주사요법을 실시하여 약물을 투여할 수 있다.

[87] 구체적으로, 상기 약학 조성물이 바이러스성 벡터인 경우, 성인 기준 1일 1.0×10^{6} 내지 1.0×10^{14} vg의 양으로 투여될 수 있다. 또한, 투여하는 바이러스가 두 개인 경우, 각각의 바이러스를 5.0×10^{5} 내지 5.0×10^{13} vg의 양으로 각각 투여할 수 있다. 투여하는 바이러스가 세 개인 경우, 각각의 바이러스를 3.0×10^{5} 내지 3.0×10^{13} vg의 양으로 각각 투여할 수 있다.

[88] 또한, 상기 약학 조성물이 비바이러스성 벡터인 경우, 성인 기준 1일 0.1 ㎎/1 ㎖ 내지 10 ㎎/1 ㎖의 농도로 투여될 수 있다. 또한, 상기 약학 조성물이 플라스미드 벡터인 경우, 투여량은 0.1 ㎖, 1 ㎖, 2 ㎖, 3 ㎖, 4 ㎖, 5 ㎖, 6 ㎖, 7 ㎖, 8 ㎖, 9 ㎖, 10 ㎖ 또는 그 이상, 이 사이의 모든 값과 범위를 포함할 수 있다.

[89] 상기 투여횟수는 바이러스성 벡터인 경우, 1회 이상, 1 내지 10회 투여될 수 있으며, 이를 반복 투여하는 경우에는 1일 내지 1개월, 1개월 내지 1년 간격으로 투여할 수 있다. 또한, 상기 약학 조성물이 비바이러스성 벡터인 경우 1회 이상, 1내지 10회 투여될 수 있으며, 이를 반복 투여하는 경우에는 12 내지 24시간, 1일 내지 14일 간격으로 투여할 수 있다.

[90] 본 발명은 통증을 완화 또는 치료하기 위한 본 발명의 약학 조성물의 용도를 제공한다.

[91] 본 발명은 통증 완화 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 본 발명의 약학 조성물의 용도를 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

[92] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[93] **실시예 1. 재조합 아데노 부속 바이러스의 제조 및 특성 분석**

[94] 본 발명에 필요한 아데노 부속 바이러스는 AAV 헬퍼-프리 (helper-free) 시스템 (Agilent)을 기반으로 하여 제작 및 생산하였다.

[95] **실시예 1.1. pAAV-GAD65 플라스미드 제작**

[96] 도 1의 pAAV-GAD65 플라스미드를 제작하기 위하여, pJDK-rGAD65 (Lee, Gene Ther, 2005)의 CMV 프로모터 부위를 PCR로 증폭한 후, pGEM-T (Promega)에 도입하여 pGEM-T-CMV를 제작하였다. CMV 프로모터 증폭에 사용한 프라이머 서열은 다음과 같다:

[97] F-JDK (서열번호 15): 5'-TTCGGCCGTCGAGGAGCTTGGCCCATTG-3'

[98] R-JDK (서열번호 16):
5'-GACGTCGACCTAGCTAGCGAATTCGGGGCCGCGGAG-3'

[99] GAD65 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 인간 GAD65 (NCBI NM_000818.2)를 바탕으로 인간에게 맞게 코돈 최적화하여 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 유전자를 바이오니아사에 의뢰하여 유전자를 합성하였다. pGEM-T에 도입된 hGAD65 유전자는 NheI과 SalI을 처리하여 1.7 Kb의 DNA 절편으로 준비하였다. 그 후, pGEM-T-CMV를 NheI과 SalI으로 처리하여 얻은 3.7 Kb의 DNA 절편과 라이게이션 (ligation)하여 pGEM-T-CMV-hGAD65를 완성하였다.

[100] SV40pA는 pCI (Invitrogen)를 주형으로 PCR을 수행하여 유전자를 증폭한 후 ClaI과 SalI을 처리하여 222 bp의 DNA 절편으로 준비하였다. 이를 pGEM-T-CMV-hGAD65를 ClaI과 SalI으로 잘라 준비한 5.4 Kb DNA 절편과 함께 라이게이션하여 최종적으로 pGEM-T-CMV-hGAD65-SV40pA를 제작하였다. SV40pA 증폭에 사용한 프라이머 서열은 다음과 같다:

[101] F-SV40pA (서열번호 17):
5'-CCATCGATCAGACATGATAAGATACATTGATGAG-3'

[102] R-SV40pA (서열번호 18):
5'-GACGTCGACGCGGCCGCTACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTG-3'

[103] 아데노 부속 바이러스 벡터 제작을 위해 pAAV-MCS (Agilent) 내의 암피실린 저항 유전자를 카나마이신 저항 유전자로 교체하였다. 카나마이신 저항 유전자는 pET-28(a) (Novagen)를 주형으로 하여 PCR로 증폭하였다. 증폭된 816 bp의 카나마이신 저항 유전자를 pGEM-T와 라이게이션하여 pGEM-T-Kan^{r}를 제작하였다. 카나마이신 저항 유전자 증폭에 사용한 프라이머 서열은 다음과 같다:

[104] F-Kan (서열번호 19): 5'-AGGCGCCATGAGCCATATTCAACGGGAA-3'

[105] R-Kan (서열번호 20): 5'-TTCATGATTAGAAAAACTCATCGAGCATC-3'

[106] 카나마이신 저항 유전자의 도입을 위하여 pAAV-MCS 내 암피실린 저항 유전자 앞뒤에 돌연변이 생성 (mutagenesis)을 통해 각각 SpeI과 EcoRV 사이트를 생성한 후, 이를 다시 SpeI과 EcoRV로 처리하였다. 앞서 제작한 pGEM-T-Kan^{r}를 NheI과 EcoRV로 잘라 얻은 DNA 절편과 라이게이션하여 pAAV-MCS-Kan^{r}를 제작하였다.

[107] 제작된 pAAV-MCS-Kan^{r}를 NotI과 BamHI으로 처리한 후 pGEM-T-CMV-hGAD65-SV40pA를 EagI과 PvuI으로 잘라 얻은 2.7 Kb의 DNA 절편과 함께 라이게이션하여 pssAAV-GAD65를 제작하였다.

[108] pVAX1 (Invitrogen)에 GAD65 발현 카세트를 도입하기 위해 bGHpA 뒤쪽에 돌연변이 생성을 통해 BamHI 사이트를 생성하였다. 그 후, 이를 MluI과 NheI으로 잘라 DNA 절편을 준비하였다. pssAAV-GAD65를 주형으로 LITR과 CMV 프로모터 부위를 PCR로 증폭하여 pGEM-T easy (Promega)에 클로닝하였다. 그 후, 이를 AscI과 NheI으로 자른후, 앞서 준비한 pVAX1 벡터와 라이게이션하여 pVAX1-LITR-CMV를 제작하였다. LITR과 CMV 프로모터 부위 증폭에 이용한 프라이머 서열은 다음과 같다:

[109] F-ITR (서열번호 21): 5'-ATGGCGCGCCCCTGGCCTTTTGCTGGCC-3',

[110] R-JDK (서열번호 16):
5'-GACGTCGACCTAGCTAGCGAATTCGGGGCCGCGGAG-3'

[111] pVAX1-LITR-CMV를 다시 NotI과 NheI으로 잘라 DNA 절편으로 준비하였다. pssAAV-GAD65를 EagI과 NheI으로 자른 후, 준비한 DNA 절편과 함께 라이게이션하여 pVAX1-LITR-CMV-hGAD65-SV40pA를 제작하였다.

[112] pVAX1-LITR-CMV-hGAD65-SV40pA를 HpaI과 BamHI으로 잘라 DNA 절편을 준비하였다. 또한, pssAAV-GAD65를 주형으로 PCR로 증폭하여 pGEM-T easy에 클로닝한 pGEM-T easy-SV40pA-RITR을 HpaI과 BamHI을 처리하여 DNA 절편을 준비하였다. 상기 두 DNA 절편을 라이게이션 함으로써 pVAX1-LITR-CMV-hGAD65-SV40pA-RITR (이하"pAAV-GAD65"로 약칭함)를 완성하였다. SV40pA와 RITR 부위 증폭에 이용한 프라이머 서열은 다음과 같다.

[113] F-SV40pA (서열번호 17):

5'-CCATCGATCAGACATGATAAGATACATTGATGAG-3'

[114] R-ITR (서열번호 22): 5'-ATGGATCCGCTAGTAAATACCGCATCAG-3'

[115] pAAV-GAD65 플라스미드의 개열지도를 도 1에 나타냈다.

[116] 변형된 pAAV-GAD65를 제작하기 위해 다음과 같은 과정을 진행하였다.

[117] 첫 번째로, 벡터를 Nhe1으로 자른 후, CMV 프로모터와 GAD65 유전자 사이에 임의의 무작위 염기서열을 주입 (infusion) 방법으로 삽입하였다. 삽입한 염기서열은 다음과 같다.

[118] Scramble stuffer (서열번호 29):

[119] 5'-GTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCC-3'

[120] Stuffer_scramble_F (서열번호 30):

[121] 5'-CTAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCC-3'

[122] Stuffer_scramble_R (서열번호 31):

[123] 5'-CTAGGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGAC-3'

[124] 다음으로, 종양성 영향 (oncogenic effect)을 줄 수 있는 X-단백질 부위가 제거된 WPRE 염기서열 (Schambach, Gene Ther, 2006)을 PCR을 이용해 증폭하였고, Pac1과 Hpa1 제한효소를 사용하여 GAD65 유전자 뒤에 삽입하였다. 동시에 SV40pA 일부를 제거하여 변형된 SV40pA로 제작하였다. WPRE 증폭에 사용한 프라이머 서열은 다음과 같다.

[125] WPRE_Pac1_F (서열번호 25):

[126] 5'-GGTGGTTTAATTAAAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTG-3'

[127] WPRE_modi_Hpa1_R (서열번호26): 5'-GGTGGTGTTAACGACAACACCACGGAATTG-3'

[128] 최종 변형된 플라스미드는 pVAX1-LITR-CMV-scramble stuffer-hGAD65-WPRE(modi)-SV40pA(modi)-RITR (이하"pAAV-GAD65-modi"로 약칭함)이며, 이의 개열 지도를 도 1에 나타냈다.

[129] **실시예 1.2. pAAV-IL-10 플라스미드 제작**

[130] pAAV-IL-10 플라스미드는 실시예 1.1.과 동일한 방법으로 제작되었다. 래트 IL-10 유전자는 서열번호 6의 아미노산 서열로 표시되는 인간 IL-10 (NCBI NM_012854)을 바탕으로 래트에 맞게 코돈 최적화하여 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 유전자를 바이오니아사에 의뢰하여 합성하였다. pGEM-T easy에 도입된 래트 IL-10 유전자를 주형으로 PCR을 수행하여 rIL-10 유전자를 증폭한 후 NheI과 SalI으로 처리하여 0.5 Kb의 DNA 절편을 준비하였다. 또한, pGEM-T-CMV를 NheI과 SalI으로 처리하여 3.7 Kb의 DNA 절편을 준비하였다. 상기 두 DNA 절편을 라이게이션하여 pGEM-T-CMV-rIL-10을 제작하였다. rIL-10 증폭에 이용한 프라이머 서열은 다음과 같다.

[131] F-rIL-10 (서열번호 23): 5'-CCGCTAGCGCCACCATGCCT-3'

[132] R-rIL-10 (서열번호 24): 5'-GACGTCGACGCCATCGATGGCTTAATTAATCAATTCTTC-3'

[133] SV40pA는 pCI를 주형으로 PCR을 수행하여 유전자를 증폭한 후 NotI과 SalI을 처리하여 222 bp의 DNA 절편을 준비하였다. 또한, 상기 pGEM-T-CMV-rIL-10에 ClaI과 SalI을 처리하여 4.2 Kb DNA 절편을 준비하였다. 상기 두 DNA 절편을 라이게이션하여 pGEM-T-CMV-rIL-10-SV40pA를 제작하였다. SV40pA 증폭에 이용한 프라이머 서열은 다음과 같다.

[134] F-SV40pA (서열번호 17):
5'-CCATCGATCAGACATGATAAGATACATTGATGAG-3'

[135] R-SV40pA (서열번호 18):
5'-GACGTCGACGCGGCCGCTACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTG-3'

[136] pGEM-T-CMV-rIL-10-SV40pA를 EagI으로 처리하여 1.6 Kb의 DNA 절편을 준비하였다. 또한, pAAV-MCS-Kan^{r}에 NotI과 BamHI을 처리하여 DNA 절편을 준비하였다. 그 후, 상기 두 DNA 절편을 라이게이션하여 pssAAV-CMV-rIL-10-SV40pA (이하 "pAAV-IL-10"으로 약칭함)을 제작하였다. pAAV-IL-10 플라스미드의 개열 지도를 도 2에 나타냈다.

[137] **실시예 1.3. pAAV-GDNF 플라스미드 제작**

[138] 인간 GDNF 유전자는 서열번호 11의 아미노산 서열로 표시되는 인간 GDNF (NCBI NM_199231.2)를 바탕으로 사람에 맞게 코돈을 최적화하여 서열번호 13의 염기서열로 표시되는 바이오니아사에 의뢰하여 유전자를 합성하였다. pGEM-B1 플라스미드에 도입된 hGDNF 유전자를 NheI과 PacI으로 처리하여 약 0.6 kb의 DNA 절편을 준비하였다. 또한, pGEM-T-CMV-rIL-10-SV40pA 플라스미드에서 NheI과 PacI으로 처리하여 rIL-10 유전자가 제거된 2.8 kb 절편을 준비하였다. 상기 두 DNA 절편을 라이게이션하여 pGEM-T-CMV-hGDNF-SV40pA 플라스미드를 제작하였다.

[139] 그 후, 완성된 pGEM-T-CMV-hGDNF-SV40pA 플라스미드를 EagI으로 처리하여 1.5 kb의 DNA 절편을 준비하였다. 또한, pAAV-MCS-Kan^{r}을 NotI과 BamHI으로 처리하여 1.8 kb의 DNA 절편을 준비하였다. 상기 두 DNA 절편을 라이게이션하여 pssAAV-CMV-hGDNF-SV40pA-Kan^r (이하 "pAAV-GDNF"로 약칭함)를 제작하였다. pAAV-GDNF 플라스미드의 개열지도를 도 3에 나타냈다.

[140] **실시예 1.4. pAAV-GDNF-IL-10 플라스미드 제작**

[141] CAG promoter (cytomegalovirus enhancer, chicken β-actin pro-moter, rabbit β-globin poly A signal)는 Adenovirus dual expression kit (Takara) 내에 포함되어 있는 pAxCAwtit2에서 PCR 증폭하였고, 발현을 증가 시키기 위한 목적으로 ApaI과 XbaI을 처리하여 CAG 프로모터 내 chicken β-actin 부분의 약 80%를 제거하여 short CAG (sCAG) 프로모터를 제작하였다 (Fagoe, Gene Ther, 2014). 인간 IL-10 유전자는 서열번호 9를 암호화하는 유전자를 사람에게 맞게 코돈을 최적화하여 서열번호 14 염기서열로 표시되는 바이오니아사에 의뢰하여 유전자를 합성하였다. 다음으로 bovine growth hormone (bGH) poly A는 PCR 증폭하여 얻은 DNA 절편을 사용하였다. pVAX1 (Invitrogen)에 상기 프로모터와

poly A, 인간 IL-10 유전자를 포함하는 pVAX1/sCAG-hIL-10-bGHpA를 제조하였다.

[142] 다음으로 실시예 1.1.과 동일한 방법으로 상기 실시예 1.3.의 인간 GDNF 유전자를 사용하여 pVAX1/CMV-hGDNF-SV40pA를 제조하였다. 그 후, pVAX1/CMV-hGDNF-SV40pA를 주형으로 PCR을 수행하여 SV40pA-hGDNF-CMV 유전자 카세트를 증폭하여 1.5 kb DNA 절편을 준비하였다. 상기 유전자 카세트 증폭에 이용한 프라이머 서열은 다음과 같다.

[143] SV40-CMV-sCAG-bGHpA-Infu-F (서열번호 27):

[144] 5'-CCTGCGGCCGGTCGACTACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGC-3'

[145] SV40-CMV-sCAG-bGHpA-Infu-R (서열번호 28):

[146] 5'-AATAATCAATGTCGACTCGAGGAGCTTGGCCCATT-3'

[147] 다음으로 pVAX1/sCAG-hIL-10-bGHpA에 SalI을 처리하여 약 3.9 kp DNA 절편을 준비한 후, 상기 1.5 kb DNA 절편을 In-Fusion HD Cloning Kit (Clonetech) 사용해 상기 3.9 kb DNA 절편에 내부 삽입시켜 pVAX1/SV40pA-hGDNF-CMV-sCAG-hIL-10-bGHpA (이하, "pAAV-GDNF-IL-10"으로 약칭함)를 제작하였다. pAAV-GDNF-IL-10 플라스미드 모식도를 도 4에 나타내었다.

[148] **실험예** 1. pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, pAAV-GDNF 및 pAAV-GDNF-IL-10 플라스미드 발현 확인

[149] 상기 실시예 1.1. 내지 1.4.에서 제작한 pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, pAAV-GDNF 또는 pAAV-GDNF-IL-10 플라스미드를 각각 jetPRIME (Polyplus)를 이용하여 인체 배아 신장 세포주인 293T 세포에 형질주입하였다. 형질주입한 세포는 37℃ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포배양 배지 혹은 배양세포를 회수하였다. 세포는 용해제로 용해한 후, 준비된 샘플에 GAD65 (Merck Millipore), IL-10 (Santa Cruz), GDNF (R&D systems)에 대한 항체를 각각 처리하여 웨스턴 블랏을 진행하였다.

[150] 구체적으로, pAAV-GAD65의 경우, 인체 배아신장 세포주인 293T 세포에 pAAV-GAD65 플라스미드 2 ㎍을 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 그 후, 배양 세포를 용해하여 웨스턴 블랏을 통해 세포 내 GAD65의 발현을 확인하였다.

[151] pAAV-IL-10과 pAAV-GDNF 플라스미드의 경우, 인체 배아신장 세포주인 293T 세포에 pAAV-IL-10 또는 pAAV-GDNF 플라스미드를 각각 1 ㎍씩 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 그 후, 배양 배지를 회수하여 웨스턴 블랏을 통해 배지 내 IL-10 혹은 GDNF의 발현을 확인하였다.

[152] pAAV-GDNF-IL-10 플라스미드의 경우, 인체 배아신장 세포주인 293T 세포에 pAAV-GDNF-IL-10 플라스미드를 1 ㎍을 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 그 후, 배양 세포를 용해하여 웨스턴 블랏을 통해 세포 내 IL-10 및 GDNF 발현을 확인하였다.

[153] 그 결과, 상기 형질주입한 pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, pAAV-GDNF 또는

pAAV-GDNF-IL-10 플라스미드가 발현하는 것을 확인하였다 (도 5 및 도 6).

[154] **실시예 2. 재조합 아데노 부속 바이러스의 제조**

[155] 실험에 이용한 AAV-IL-10 바이러스는 UNC vector core에서 생산 및 정제를 하였으며 생산 방법은 다음과 같다. pVax-rIL-10과 pHelper, pRC5와 함께 인체 배아 신장 세포주인 293T 세포에 형질주입하였다. 그 후, 컬럼 크로마토그래피 방법으로 정제하여 AAV5-IL-10 바이러스를 확보하였다. 생산된 바이러스 역가는 qPCR을 이용하여 측정하였다.

[156] AAV-GAD65 및 AAV-GDNF 바이러스는 KRcrogen사에서 생산 및 정제하였으며 생산 방법은 다음과 같다. 상기 AAV-transgene (pAAV-GAD65, pAAV-GDNF 플라스미드) 각각을 pHelper, pRC와 함께 인산칼슘법을 이용하여 인체 배아 신장 세포주인 293T 세포에 형질주입하였다. GAD65의 경우 혈청형 5의 캡시드 유전자가 도입된 pRC5를 이용하였다. GDNF의 경우 AAV 혈청형 1의 캡시드 유전자가 도입된 pRC1을 이용하였다. 형질주입한 세포는 37 인큐베이터에서 배양하였고 48시간 후 세포를 회수하였다.

[157] 그 후, 세슘 농도 구배에 따른 초고속 원심분리법을 통해 바이러스가 포함된 밴드만을 분리 정제하여 AAV5-GAD65, AAV1-GDNF 바이러스를 확보하였다. 생산된 바이러스의 역가는 qPCR을 이용하여 측정하였다.

[158] AAV-GDNF-IL-10 바이러스는 Cdmogen사에서 생산 및 정제하였으며 생산 방법은 다음과 같다. 상기 AAV-transgene (pAAV-GDNF-IL-10 플라스미드)를 pHelper, pRC5와 함께 인산칼슘법을 이용하여 인체 배아 신장 세포주인 293T 세포에 형질주입하였다. 형질주입한 세포는 37℃ 인큐베이터에서 배양하였고 48시간 후 세포를 회수하였다.

[159] 그 후, 세슘 농도 구배에 따른 초고속 원심분리법을 통해 바이러스가 포함된 밴드만을 분리 정제하여 AAV5-GDNF-IL-10 바이러스를 확보하였다. 생산된 바이러스의 역가는 qPCR을 이용하여 측정하였다.

[160] AAV-GAD65-modi 바이러스는 Cdmogen사에서 생산 및 정제하였으며 생산 방법은 다음과 같다. 상기 AAV-transgene (pAAV-hGAD65-modi 플라스미드)를 pHelper, pRC5와 함께 인산칼슘법을 이용하여 인체 배아 신장 세포주인 293T 세포에 형질주입하였다. 형질주입한 세포는 37℃ 인큐베이터에서 배양하였고 48시간 후 세포를 회수하였다.

[161] 그 후, 세슘 농도 구배에 따른 초고속 원심분리법을 통해 바이러스가 포함된 밴드만을 분리 정제하여 AAV5-GAD65-modi 바이러스를 확보하였다. 생산된 바이러스의 역가는 qPCR을 이용하여 측정하였다.

[162] **실험예 2. 재조합 아데노 부속 바이러스의 특성 분석**

[163] 세포로 전달된 재조합 아데노 부속 바이러스의 단백질 발현을 확인하기 위해 상기 확보한 AAV-GAD65, AAV-GAD65-modi, AAV-IL-10 또는 AAV-GDNF 바이러스를 인체 배아 신장 세포주인 293T 혹은 HeLa 세포에 처리하고 웨스턴 블랏을 통해 단백질 발현을 확인하였다. 구체적으로 293T 혹은 HeLa 세포를

6-well plate에 5 x 10^5 cells/well로 분주하고, 다음날 3종의 바이러스를 각각 10,000 vg/well로 처리한 후 37℃ 배양기에서 배양하였다. 48시간 후 세포를 수확하여 세포는 용해제로 용해하였고, 배양 배지는 아미콘 (amicon) (Merck Millipore)을 이용하여 농축하였다. 그 후, 준비된 샘플에 GAD65 (Cell signaling), IL-10 (Santa Cruz), GDNF (R&D systems)에 대한 항체를 각각 처리하여 웨스턴 블랏을 진행하였다.

[164] 그 결과, AAV-GAD65, AAV-GAD65-modi, AAV-IL-10 또는 AAV-GDNF 바이러스가 처리된 인체 배아신장 세포주인 293T 혹은 HeLa 세포주의 세포 용해물에서 각각의 목적 단백질이 발현됨을 확인하였다 (도 7). 따라서, 실험에 이용한 재조합 아데노 부속 바이러스의 구조 및 특성에 이상이 없음을 확인하였다.

[165] 또한, AAV-GAD65 또는 AAV-GAD65-modi 바이러스에 의해 GABA가 생산됨을 확인하기 위해 상기 AAV-GAD65 또는 AAV-GAD65-modi 바이러스를 처리한 세포의 배양 배지를 회수하여 GABA ELISA (LDN) 분석을 진행하였다. 각 실험군별로 동일한 두 개의 샘플을 따로 제작하여 분석을 진행하였으며, 막대그래프는 각각의 샘플에 대한 값을 나타낸다.

[166] 그 결과, AAV-GAD65 또는 AAV-GAD65-modi 바이러스에 의해 세포 내로 도입된 GAD65에 의해 GABA가 배양 배지로 분비됨을 확인하였다 (도 8).

[167] **실험예** 3. AAV-GAD65, AAV-IL-10 또는 AAV-GDNF 바이러스 단독 투여와 AAV-GAD65 및 AAV-GDNF 또는 AAV-IL-10 및 AAV-GDNF 바이러스 병용 투여 시의 진통 효능 비교

[168] **실험예 3.1. 투여 시료 제조**

[169] 실시예 2.에서 제조한 바이러스를 시험에 이용하였으며, 동물 투여 실험 30분 전에 -80℃에 보관 중인 시약을 상온에서 해동시킨 후 볼텍서 (vortexer)로 섞어 준비하였다. AAV-GAD65, AAV-IL-10, AAV-GDNF, 및 AAV-GFP 바이러스를 표 1에 명시된 바이러스 역가가 되도록 PBS에 희석하였다. AAV-GFP 바이러스는 다른 재조합 아데노 부속 바이러스와 동일한 양을 투여하였다. 상기 GFP는 진통효과가 없는 단백질이다. 표 1에서 명시된 함량으로 필요한 바이러스를 섞어서 동물 개체당 9.0 x 10^8 vg/5 $\mu\ell$를 투여하였다 (vg : virus genome).

[170] [표1]

시 료	바이러스 종류 및 함량			
	AAV-GAD65	**AAV-IL-10**	**AAV-GDNF**	**AAV-GFP**
AAV-GFP	-	-	-	9.0 x 10^8vg/5 ㎕
AAV-GAD65	9.0 x 10^8vg/5 ㎕	-	-	-
AAV-IL-10	-	9.0 x 10^8vg/5 ㎕	-	-
AAV-GDNF	-	-	9.0 x 10^8vg/5 ㎕	-
AAV-GAD65+AAV-GDNF	4.5 x 10^8vg/5 ㎕	-	4.5 x 10^8vg/5 ㎕	-
AAV-IL-10+AAV-GDNF	-	4.5 x 10^8vg/2.5 ㎕	4.5 x 10^8vg/2.5 ㎕	-

[171] **실험예** 3.2. 신경병증성 통증 유발 래트 제작 및 시료 투여

[172] 150 내지 200 g SD-래트 수컷을 흡입 마취한 후, 종아리 위쪽을 절개하고 총비골신경 (common peroneal nerve)과 경골신경 (tibial nerve)의 양쪽 끝부분을 7-0 봉합사로 0.5 내지 1 ㎝ 간격을 두고 매듭을 만들어 묶었다. 매듭이 있는 2개의 신경 다발 사이를 가위로 자르고 절개 부위를 봉합하였다. 그 후, 래트가 마취에서 깨어날 수 있도록 회복시켜 케이지로 돌려보냈다. 2주 뒤 본 프레이 필라멘트 테스트 (*von* Frey filament test)를 실시하여 통증 유발을 확인한 후, 실시예 2.1.에서 제조한 시료를 각각 투여하였다 (Decosterd, Pain, 2000).

[173] 상기 시료는 후근 신경절 (dorsal root ganglion; DRG)에 인접한 위치에 경추간공 경막외 주사 (transforaminal epidural injection) 방법으로 투여하였다. 통증 유발 래트를 흡입 마취한 후, 래트의 요추 L3에서 L5 부위까지 등을 일자로 절개하여 척추뼈를 노출시켰다. 노출된 측면에 등뼈의 돌기 중 하나인 L4 횡돌기 (transverse process)가 보이게 하였다. 래트의 측면이 위쪽에서 볼 수 있도록 옆으로 눕혀 L4의 추간공이 보이도록 하였다.

[174] 그 후, 카테터에 부착된 니들을 상기 제조된 시료에 넣고, 해밀턴 시린지 (Hamilton syringe)를 반대편 카테터 끝에 연결하여 눈금이 5 ㎕가 되도록 잡아당겨 시료를 카테터 내부로 주입하였다. 해밀턴 시린지를 카테터에서 분리한 후, 할스테드 모스키토 (Halsted-Mosquito)로 니들 끝 부분에서 1 ㎝ 떨어진 곳을 쥐어 고정하였다. 그 후, 핀셋으로 L4 등뼈를 쥐고 위로 당기면서 반대편 손으로 할스테드 모스키토로 고정된 니들 끝 부분을 L4 추간공 주변으로

가져갔다. 공간이 확보된 추간공으로 니들 끝을 니들이 꺾어진 부분까지 추간공 내부로 들어가게 삽입하였다. 그 후, 쥐고 있던 니들을 풀어주었다.

[175] 니들이 고정된 것을 확인한 후, 니들 반대편에 연결된 카테터에 1 ㎖ 시린지를 연결하였다. 시린지의 피스톤을 살짝 눌러서 시료를 천천히 래트 후근 신경절 주변으로 투여하였다. 그 후, 절개부위를 봉합하여 마무리 하였다. 시료 투여 4주 후 본 프레이 필라멘트 테스트를 이용한 통증 반응을 관찰하였다.

[176] **실험예 3.3. 본 프레이 필라멘트 테스트를 이용한 통증 관찰**

[177] 본 프레이 필라멘트 테스트를 이용하여 통증을 관찰하였다. 상기 방법은 0.4, 0.6, 1, 2, 4, 6, 8, 15 g인 총 8개의 실로 통증 반응의 정해진 패턴에 따라서 역치값을 계산해 내는 방법이다.

[178] 통증이 발생한 발바닥의 맨 바깥쪽 발가락이 시작되는 부위에서 발 뒤꿈치까지 위치를 바꿔가면서 통증이 발생하는 부위를 찾았다. 통증이 발생하면 래트는 발바닥을 급작스레 떼면서 움츠러들거나 발바닥을 입으로 핥으므로, 통증 발생 부위를 찾았다. 각 단계의 실로 주변 부위를 5회 찔러서 3회 이상의 반응이 있으면 통증 반응으로 간주하였고, 그 다음 단계의 실로 바꾸어 진행하였다. 이러한 방식으로 각 단계의 패턴을 기록하였다.

[179] 통증 패턴은 S.R. Chaplan이 확립한 패턴 표를 근거해서 기록하고 이를 이용하여 역치값을 계산하였다 (Chaplan, J Neurosci Methods, 1994). 행동 분석은 지정된 시기에 동물 그룹을 블라인드로 처리하고, 최소 3명이 관찰하고 기록된 패턴의 결과를 통계처리 하여 통증 결과를 분석하였다.

[180] 그 결과, AAV-GAD65, AAV-IL-10, 또는 AAV-GDNF 바이러스를 각각 단독 투여하는 경우보다 AAV-GAD65 및 AAV-GDNF, 또는 AAV-IL-10 및 AAV-GDNF 바이러스를 배합하여 병용 투여하는 경우가 통증 완화 효과가 높은 것으로 나타났다 (도 9).

[181] **실험예** 4. AAV-GAD65, AAV-IL-10, 또는 AAV-GDNF 바이러스 단독 투여와 AAV-GAD65, AAV-IL-10, 및 AAV-GDNF 바이러스 병용 투여 시의 진통 효능 비교

[182] 실시예 2.에서 제조한 바이러스를 시험에 이용하였으며, 동물 투여 실험 30분 전에 -80℃에 보관 중인 시약을 상온에서 해동시킨 후, 볼텍서로 섞어 준비하였다. AAV-GAD65, AAV-IL-10, AAV-GDNF, 및 AAV-GFP를 표 2에 명시된 바이러스 역가가 되도록 PBS에 희석하였다. AAV-GFP는 다른 재조합 아데노 부속 바이러스와 동일한 양을 투여하였다. 상기 GFP는 진통효과가 보고된 바 없는 단백질이다. 표 2에 명시된 함량으로 필요한 바이러스를 섞어서 동물 개체당 9.0×10^8 vg/5 ㎕를 투여하였다.

[183] [표2]

시 료	바이러스 종류 및 함량			
	AAV-GAD65	**AAV-IL-10**	**AAV-GDNF**	**AAV-GFP**
AAV-GFP	-	-	-	9.0 x 10^8vg/5 ㎕
AAV-GAD65	9.0 x 10^8vg/5 ㎕	-	-	-
AAV-IL-10	-	9.0 x 10^8vg/5 ㎕	-	-
AAV-GDNF	-	-	9.0 x 10^8vg/5 ㎕	-
AAV-GAD65+AAV-IL-10+AAV-GDNF	3.0 x 10^8vg/5 ㎕	3.0 x 10^8vg/5 ㎕	3.0 x 10^8vg/5 ㎕	-

[184] 실험예 3.2.과 동일한 방법으로 제작한 통증 동물 모델에 표 2에 명시된 바이러스 함량으로 제조한 시료를 투여하였다. 그 후, 실험예 3.3.과 동일한 방법으로 본 프레이 필라멘트 테스트를 진행하여 통증 반응을 관찰하였다.

[185] 그 결과, AAV-GAD65, AAV5-IL-10, 및 AAV5-GDNF 바이러스를 모두 병용 투여하는 경우가 AAV-GAD65, AAV-IL-10, 또는 AAV-GDNF 바이러스를 각각 단독 투여하는 경우보다 통증 완화 효과가 높은 것으로 나타났다 (도 10).

[186] **실험예** 5. AAV-GAD65 및 AAV-GDNF, 또는 AAV-IL-10 및 AAV-GDNF 바이러스 병용 투여와 AAV-GAD65, AAV-IL-10, 및 AAV-GDNF 바이러스 병용 투여 시의 진통 효능 비교

[187] 실시예 2.에서 제조한 아데노 부속 바이러스를 시험에 이용하였으며, 동물 투여 실험 30분 전에 -80℃에 보관 중인 시약을 상온에서 해동시킨 후 볼텍서로 섞어 준비하였다. AAV-GAD65, AAV-IL-10, AAV-GDNF, 및 AAV-GFP 바이러스를 표 3에 명시된 바이러스 역가가 되도록 PBS에 희석하였다. AAV-GFP는 다른 재조합 아데노 부속 바이러스와 동일한 양을 투여하였다. 상기 GFP는 진통효과가 없는 단백질이다. 표 3에 명시된 함량으로 필요한 바이러스를 섞어서 동물 개체당 9.0 x 10^8 vg/5 ㎕를 투여하였다.

[188] [표3]

시 료	바이러스 종류 및 함량			
	AAV-GAD65	**AAV-IL-10**	**AAV-GDNF**	**AAV-GFP**
AAV-GFP	-	-	-	9.0 x 10^8vg/5 ㎕
AAV-GAD65+AAV-GDNF	4.5 x 10^8vg/5 ㎕	-	4.5 x 10^8vg/5 ㎕	-
AAV-IL-10+AAV-GDNF	-	4.5 x 10^8vg/5 ㎕	4.5 x 10^8vg/5 ㎕	-
AAV-GAD65+AAV-IL-10+AAV-GDNF	3.0 x 10^8vg/5 ㎕	3.0 x 10^8vg/5 ㎕	3.0 x 10^8vg/5 ㎕	-

[189] 실험예 3.2에서 기술한 것과 동일한 방법으로 제작한 통증 동물 모델에 표 3에 명시된 바이러스 함량으로 제조한 시료를 투여하였다. 그 후, 실험예 3.3.과 동일한 방법으로 본 프레이 필라멘트 테스트를 진행하여 통증 반응을 관찰하였다.

[190] 그 결과, AAV-GAD65, AAV5-IL-10, 및 AAV5-GDNF 바이러스를 모두 병용 투여하는 경우가 AAV-GAD65 및 AAV-GDNF, 또는 AAV-IL-10 및 AAV-GDNF 바이러스를 병용 투여하는 경우보다 통증 완화 효과가 높은 것으로 나타났다 (도 11).

[191] **실험예** 6. pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, 또는 pAAV-GDNF 플라스미드의 단독 투여와 pAAV-GAD65 및 pAAV-GDNF, 또는 pAAV-IL-10 및 pAAV-GDNF 플라스미드의 병용 투여 시의 진통 효능 비교

[192] **실험예 6.1. 투여 시료 제조**

[193] 실시예 1.에서 제조한 플라스미드를 시험에 이용하였으며, 동물 투여 실험 30분 전에 -80℃에 보관 중인 시약을 상온에서 해동시킨 후 볼텍서로 섞어 준비하였다. pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, pAAV-GDNF, 및 pVAX1 플라스미드를 표 4에 명시된 농도가 되도록 Tris-EDTA 버퍼에 희석하였다. pVAX1 플라스미드는 다른 플라스미드와 동일한 양을 투여하였다. 상기 pVAX1 플라스미드는 진통효과가 보고된 바 없다. 표 4에 명시된 함량으로 필요한 플라스미드를 섞어서 동물 개체당 30 ㎍/50 ㎕를 투여하였다.

[194] [표4]

시 료	플라스미드 종류 및 함량			
	pAAV-GAD65	**pAAV-IL-10**	**pAAV-GDNF**	**pVAX1**
pVAX1	-	-	-	30 ㎍/50 ㎕
pAAV-GAD65	30 ㎍/50 ㎕	-	-	-
pAAV-IL-10	-	30 ㎍/50 ㎕	-	-
pAAV-GDNF	-	-	30 ㎍/50 ㎕	-
pAAV-GAD65+ pAAV-GDNF	15 ㎍/50 ㎕	-	15 ㎍/50 ㎕	-
pAAV-IL-10+pA AV-GDNF	-	15 ㎍/50 ㎕	15 ㎍/50 ㎕	-

[195] **실험예** 6.2. 신경병증성 통증 동물 모델의 제작 및 시료 투여

[196] 150 내지 200 g SD-래트 수컷을 흡입 마취한 후 종아리 위쪽을 절개하고 총비골신경과 경골신경의 양쪽 끝부분을 7-0 봉합사로 0.5 내지 1 ㎝ 간격을 두고 매듭을 만들어 묶었다. 매듭이 있는 2개의 신경 다발 사이를 가위로 자르고 절개 부위를 봉합하였다. 그 후, 래트가 마취에서 깨어날 수 있도록 회복시켜 케이지로 돌려보냈다. 2주 뒤 본 프레이 필라멘트 테스트를 실시하여 통증 유발을 확인한 후 실험예 6.1.에서 제조한 시료를 투여하였다 (Decosterd, Pain, 2000).

[197] 상기 시료는 척수관 주사 (intrathecal injection) 방법으로 투여하였다. 통증 유발 래트를 흡입 마취한 후, 래트의 요추 L5 부위의 등을 일자로 절개하여 극돌기 (spinous process)를 노출시켰다. 50 ㎖ 튜브를 래트 밑에 두어 L5와 L6 사이의 간격을 넓힌 후, 27 G x 13 ㎜ 사이즈의 니들을 삽입하였다. 그 후, 50 ㎕의 시료가 주입된 1 ㎖ 시린지를 니들에 연결하였다. 시린지의 피스톤을 살짝 눌러 시료를 천천히 주입하였다. 그 후, 절개부위를 봉합하여 마무리 하였다. 물질 투여 1일 후 본 프레이 필라멘트 테스트를 이용한 통증 반응을 관찰하였다.

[198] **실험예** 6.3. 본 프레이 필라멘트 테스트를 이용한 통증 관찰

[199] 실험예 3.3.과 동일한 방법으로 본 프레이 필라멘트 테스트를 수행하였다. 그 결과, pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, 또는 pAAV-GDNF 플라스미드를 각각 단독 투여하는 경우보다 pAAV-GAD65 및 pAAV-GDNF, 또는 pAAV-IL-10 및 pAAV-GDNF 플라스미드 병용 투여하는 경우가 통증 완화 효과가 높은 것으로 나타났다 (도 12).

[200] **실험예** 7. pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, 또는 pAAV-GDNF 플라스미드의 단독 투여와 pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, 및 pAAV-GDNF 플라스미드의 병용 투여 시의 진통 효능 비교

[201] 실시예 1.에서 제조한 플라스미드를 시험에 이용하였으며, 동물 투여 실험 30분 전에 -80℃에 보관 중인 시약을 상온에서 해동시킨 후 볼텍서로 섞어 준비하였다. pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, pAAV-GDNF, 및 pVAX1 플라스드를 표 5에 명시된 농도가 되도록 Tris-EDTA 버퍼에 희석하였다. pVAX1 플라스미드는 다른 플라스미드와 동일한 농도 및 양으로 투여하였다. 상기 pVAX1 플라스미드는 진통효과가 보고된 바 없다. 표 5에서 명시된 함량으로 필요한 플라스미드를 섞어서 동물 개체당 30 ㎍/50 ㎕를 투여하였다.

[202] [표5]

시 료	플라스미드 종류 및 함량			
	pAAV-GAD65	**pAAV-IL-10**	**pAAV-GDNF**	**pVAX1**
pAAV-VAX1	-	-	-	30 ㎍/50 ㎕
pAAV-GAD65	30 ㎍/50 ㎕	-	-	-
pAAV-IL-10	-	30 ㎍/50 ㎕	-	-
pAAV-GDNF	-	-	30 ㎍/50 ㎕	-
pAAV-GAD65+ pAAV-IL-10+pAAV-GDNF	10 ㎍/50 ㎕	10 ㎍/50 ㎕	10 ㎍/50 ㎕	-

[203] 실험예 6.2.와 동일한 방법으로 제작한 통증 동물 모델에 표 5에 명시된 플라스미드 함량으로 제조한 시료를 투여하였다. 그 후, 실험예 3.3.과 동일한 방법으로 본 프레이 필라멘트 테스트를 진행하여 통증 반응을 관찰하였다.

[204] 그 결과, pAAV-GAD65, pAAV5-IL-10, 및 pAAV5-GDNF 플라스미드를 모두 병용 투여하는 경우가 pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, 또는 pAAV-GDNF 플라스미드를 각각 단독 투여하는 경우보다 통증 완화 효과가 높은 것으로 나타났다 (도 13).

[205] **실험예** 8. pAAV-GAD65 및 pAAV-GDNF, 또는 pAAV-IL-10 및 pAAV-GDNF 플라스미드의 병용 투여와 pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, 및 pAAV-GDNF 플라스미드의 병용 투여 시의 진통 효능 비교

[206] 실시예 1.에서 제조한 플라스미드를 시험에 이용하였으며, 동물 투여 실험 30분 전에 -80℃에 보관 중인 시약을 상온에서 해동시킨 후 볼텍서로 섞어 준비하였다. pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, pAAV-GDNF, 및 pVAX1 플라스미드를 표 6에 명시된 농도가 되도록 Tris-EDTA 버퍼에 희석하였다. pVAX1은 다른 플라스미드와 동일한 농도 및 양으로 투여하였다. 상기 pVAX1 플라스미드는 진통효과가 보고된 바 없다. 표 6에 명시된 함량으로 필요한 플라스미드를 섞어서 동물 개체당 30 ㎍/50 ㎕를 투여하였다.

[207] [표6]

시 료	플라스미드 종류 및 함량			
	pAAV-GAD65	**pAAV-IL-10**	**pAAV-GDNF**	**pVAX1**
pVAX1	-	-	-	30 ㎍/50 ㎕
pAAV-GAD65+ pAAV-GDNF	15 ㎍/50 ㎕	-	15 ㎍/50 ㎕	-
pAAV-IL-10+pAAV-GDNF	-	15 ㎍/50 ㎕	15 ㎍/50 ㎕	-
pAAV-GAD65+ pAAV-IL-10+pAAV-GDNF	10 ㎍/50 ㎕	10 ㎍/50 ㎕	10 ㎍/50 ㎕	-

[208] 실험예 6.2에서 기술한 것과 동일한 방법으로 제작한 통증 동물 모델에 표 6에 명시된 플라스미드 함량으로 제조한 시료를 투여하였다. 그 후, 실험예 6.3.과 동일한 방법으로 본 프레이 필라멘트 테스트를 진행하여 통증 반응을 관찰하였다.

[209] 그 결과, pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, 및 pAAV-GDNF 플라스미드를 모두 병용 투여하는 경우가 pAAV-GAD65 및 pAAV-GDNF, 또는 pAAV-IL-10 및 pAAV-GDNF 플라스미드를 병용 투여하는 경우보다 통증 완화 효과가 높은 것으로 나타났다 (도 14).

[210] **실험예** 9. AAV-GAD65-modi 및 AAV-GDNF-IL-10 바이러스의 병용 투여와 AAV-GAD65, AAV-IL-10, 및 AAV-GDNF 바이러스의 병용 투여 시의 진통 효능 비교

[211] 실시예 2.에서 제조한 아데노 부속 바이러스를 시험에 이용하였으며, 동물 투여 실험 30분 전에 -80℃에 보관 중인 시약을 상온에서 해동시킨 후 볼텍서로 섞어 준비하였다. AAV-GAD65-modi, AAV-GDNF-IL-10, AAV-GAD65, AAV-IL-10, 및 AAV-GDNF 바이러스를 표 7에 명시된 바이러스 역가가 되도록 PBS에 희석하였다. 표 7에 명시된 함량으로 필요한 바이러스를 섞어서 동물 개체당 1.0 x 10^9 vg/5 ㎕ 또는 1.5 x 10^9 vg/5 ㎕를 투여하였다.

[212] [표7]

시 료	바이러스 종류 및 함량				
	AAV-GAD65-modi	**AAV-GDNF-IL-10**	**AAV-GAD65**	**AAV-IL-10**	**AAV-GDNF**
대조군	-	-	-	-	-
AAV-GAD65-modi+AAV-GDNF-IL-10	5.0 x 10^8vg/5 $\mu\ell$	5.0 x 10^8vg/5 $\mu\ell$	-	-	-
AAV-GAD65+AAV-IL-10+AAV-GDNF	-	-	5.0 x 10^8 vg/5 $\mu\ell$	5.0 x 10^8vg/5 $\mu\ell$	5.0 x 10^8 vg/5 $\mu\ell$

[213] 실험예 3.2.에서 기술한 것과 동일한 방법으로 제작한 통증 동물 모델에 표 7에 명시된 바이러스 함량으로 제조한 시료를 투여하였다. 그 후, 실험예 3.3.과 동일한 방법으로 본 프레이 필라멘트 테스트를 진행하여 통증 반응을 관찰하였다.

[214] 그 결과, AAV-GAD65-modi 및 AAV-GDNF-IL-10 바이러스를 병용 투여하는 경우가 AAV-GAD65, AAV-IL-10, 및 AAV-GDNF 바이러스를 모두 병용 투여하는 경우보다 통증 완화 효과가 높은 것으로 나타났다 (도 15).

청구범위

[청구항 1] 글루타메이트 디카르복실라제 (GAD)를 암호화하는 유전자, 인터루킨-10 (IL-10)을 암호화하는 유전자, 및 신경교세포 유래 영양 인자 (GDNF)를 암호화하는 유전자로 구성되는 군으로부터 선택되는 2종 이상을 포함하는 통증의 완화 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 유전자는 작동 가능하도록 벡터에 포함된 형태인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

[청구항 3] 제 2항에 있어서,
상기 벡터는 아데노바이러스, 아데노 부속 바이러스, 허피스 심플렉스 바이러스, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 및 폭스바이러스로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 바이러스성 벡터인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

[청구항 4] 제 2항에 있어서,
상기 벡터는 플라스미드, 리포좀, 양이온성 고분자, 마이셀(micelle), 에멀젼, 및 지질 나노입자(solid lipid nanoparticles)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 비바이러스성 벡터인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

[청구항 5] 제 1항에 있어서,
상기 GAD는 GAD65 또는 GAD67 인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

[청구항 6] 제 1항에 있어서,
상기 GAD를 암호화하는 유전자가 서열번호 1, 서열번호 4, 서열번호 32, 서열번호 34, 또는 서열번호 36으로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열인 것인, 약학 조성물.

[청구항 7] 제 1항에 있어서,
상기 GAD를 암호화하는 유전자가 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 33, 서열번호 35, 또는 서열번호 37로 표시되는 염기서열인 것인, 약학 조성물.

[청구항 8] 제 1항에 있어서,
상기 IL-10을 암호화하는 유전자가 서열번호 6, 서열번호 9, 서열번호 38, 서열번호 40, 또는 서열번호 42로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열인 것인, 약학 조성물.

[청구항 9] 제 1항에 있어서,
상기 IL-10을 암호화하는 유전자가 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 10, 서열번호 14, 서열번호 39, 서열번호 41, 또는 서열번호 43으로 표시되는 염기서열인, 약학 조성물.

[청구항 10] 제 1항에 있어서,

상기 GDNF를 암호화하는 유전자가 서열번호 11, 서열번호 44, 서열번호 46, 또는 서열번호 48로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열인 것인, 약학 조성물.

[청구항 11] 제 1항에 있어서,
상기 GDNF를 암호화하는 유전자가 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 45, 서열번호 47, 또는 49로 표시되는 염기서열인, 약학 조성물.

[청구항 12] 제 1항에 있어서,
상기 통증은 통각 통증 (nociceptive pain), 심인성 통증 (psychogenic pain), 염증성 통증 (inflammatory pain), 병적 통증 (pathological pain), 신경병증성 통증 (neuropathic pain), 암성 통증 (cancer pain), 수술 후 통증 (postoperative pain), 삼차 신경통 (trigeminal neuralgia pain), 특발성 통증 (idiopathic pain), 당뇨성 신경병증성 통증 (diabetic neuropathic pain), 또는 편두통 (migraine)인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

[청구항 13] 제 1항에 있어서,
상기 약학 조성물은 생리적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

[청구항 14] 제 1항에 있어서,
상기 약학 조성물은 주사제인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

[청구항 15] 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 통증의 완화 또는 치료방법.

[청구항 16] 제 15항에 있어서,
상기 투여는 경막외 주사 또는 척수관 주사를 통해 투여하는 것을 특징으로 하는, 통증의 완화 또는 치료방법.

[청구항 17] 제 15항에 있어서,
상기 통증은 통각 통증 (nociceptive pain), 심인성 통증 (psychogenic pain), 염증성 통증 (inflammatory pain), 병적 통증 (pathological pain), 신경병증성 통증 (neuropathic pain), 암성 통증 (cancer pain), 수술 후 통증 (postoperative pain), 삼차 신경통 (trigeminal neuralgia pain), 특발성 통증 (idiopathic pain), 당뇨성 신경병증성 통증 (diabetic neuropathic pain), 또는 편두통 (migraine)인 것을 특징으로 하는, 치료방법.

[청구항 18] 통증을 완화 또는 치료하기 위한 제1항의 약학 조성물의 용도.

[청구항 19] 통증 완화 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 제1항의 약학 조성물의 용도.