(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0113511
(43) 공개일자 2020년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/10 (2006.01) *A23L 33/18* (2016.01)
A61P 25/04 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/10 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0033788
(22) 출원일자 2019년03월25일
심사청구일자 2019년03월25일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김동운
세종특별자치시 보람동로 13, 603동 704호(보람동, 호려울마을6단지)
홍진표
서울특별시 영등포구 당산로50길 17(당산동6가)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

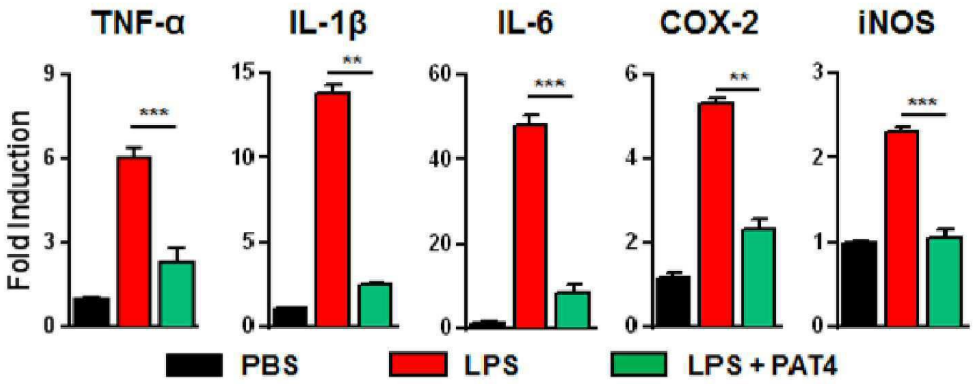
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **PAT4를 포함하는 만성통증 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 PAT4를 포함하는 만성통증 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 신경병증성 통증의 예방, 개선 또는 치료를 위한 식품 또는 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 PAT4는 미세아교세포를 타겟하여 전염증 매개인자의 발현을 억제, 활성산소종 생성 억제, 미세아교세포의 활성을 억제 및 기계적 역치를 증가시키는 효과를 가지고 있고, 그 효과가 종래 만성통증 치료제보다 오랫동안 지속되는바, PAT4는 만성통증의 치료제로서 만성통증의 예방, 개선 및 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 25/04 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
(72) 발명자
이선열
대전광역시 서구 둔산로 155, 117동 1301호(
둔산동, 크로바아파트)

윤옥화
대전광역시 중구 문화로 282(대사동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016M3C7A1905074
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 뇌과학원천기술개발(R&D)
연구과제명 신경손상 연관 뇌기능조절 microglia 타겟 발굴 및 제어 융합기술 개발
기 여 율 25/100
과제수행기관명 서울대학교
연구기간 2016.06.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016R1A2B4009409
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 신경병증성통증에서 p66shc의 미토콘드리아 ROS제어기전연구
기 여 율 25/100
과제수행기관명 충남대학교(의대)
연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017R1D1A1B03028839
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명 PLGA 나노입자를 이용한 신경병증성통증 유전자치료제 개발
기 여 율 25/100
과제수행기관명 서울대학교
연구기간 2017.06.01 ~ 2020.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017R1A1A1A05001310
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 복합부위통증증후군의 편도체에서 미세아교세포의 기능 연구
기 여 율 25/100
과제수행기관명 충남대학교병원
연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 PAT4를 유효성분으로 포함하는, 만성통증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 만성통증 질환은 신경병증성 통증, 관절염에 의한 만성통증, 복합부위 통증 증후군, 대상포진 후 신경통 및 척추 수술 후 통증 증후군으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 질환인, 만성통증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 신경병증성 통증은 말초 신경 손상 또는 중추 신경 손상에 의해 유도된 것인, 만성통증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 신경병증성 통증은 말초신경계 이상 또는 손상, 척수신경 손상을 포함한 다발성경화증, 척수부상, 통각과민, 감각과민, 신경병증, 당뇨성 신경장애, 신경염, 신경통, 작열통, 이질통, 포진후신경통, 요추 신경근압박, 암과 관련된 통증, 알코올 중독, 비정형 안면통증, 포진성 신경통, 중풍후통증, HIV 연관 신경병증, 골관절염 및 환상사지통증으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 질환인, 만성통증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 PAT4는 미세아교세포(microglia cell), 뉴런 세포(neuronal cell) 및 성상세포(astrocytic cell)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 타겟하는, 만성통증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 PAT4를 유효성분으로 포함하는, 만성통증 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 만

성통증 질환의 치료방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 PAT4를 포함하는 만성통증 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 신경병증성 통증의 예방, 개선 또는 치료를 위한 식품 또는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 통증은 부상이나 수술 후의 수백만의 사람들 및 관절염, 암 및 당뇨병과 같은 질환을 겪는 사람들에게 영향을 미친다. 통각수용(Nociception)(유해 자극 또는 위해 자극의 검출)은 중대한 생물학적 목적을 제공한다. 통증은 발생부위, 원인, 성질 및 발생기전 등을 고려하여 구분할 수 있다. 예를 들면, 통각 수용성 통증은 병태 생리학 기전에 의한 분류로서 조직 손상에 따라 발생하고, 유해한 자극에 비례하여 통증이 증가하는 경향을 보인다.

[0003] 통증은 그 지속기간에 따라서는 급성과 만성통증으로 나눌 수 있다. 대표적인 만성통증 질환으로는 신경병증성 통증, 복합부위 통증 증후군, 대상포진 후 신경통, 척추 수술 후 통증 증후군 등이 있다. 만성통증은 단순히 급성통증의 연장선이 아니며, 통증의 정도는 원래의 손상 정도와 비례하지 않고 자극이 없이도 자발적으로 일어날 수 있다. 통증의 기간과 강도가 환자의 기능이나 생활에 유해한 효과를 일으키거나 또는 정상적인 조직 치유기간, 보통 3개월을 넘어서서 지속되는 경우는 만성통증으로 정의하며 증상이 아닌 하나의 질병으로 간주한다. 만성통증은 무자비하고 자기-제어적이지 않으며 초기 부상 후 수년 및 수십 년 까지도 지속될 수 있다. 만성통증은 성질에 있어서 주로 신경병성이며 말초 또는 중추신경계 손상을 포함할 수 있다.

[0004] 다양한 통증의 종류 중, 외견상으로는 상처나 동통의 원인이 없는데도 발생하는 통증이 바로 신경성 동통, 신경병증성 통증(neuropathic pain)이다. 신경병증성 통증은 암, 자가면역 질환 또는 대상포진 감염에 의한 신경 압박(nerve compression), 신경 외상(nerve trauma)과 같은 신경세포의 손상이나 신경계의 이상으로 생기는 통증을 총칭하며, 이는 정상적인 상태에서는 통증을 유발하지 않는 자극에도 통증반응을 보이는 이질통(allodynia)과 통증자극에 대해 더욱 민감한 반응을 보이는 통각과민(hyperalgesia), 또한, 자극이 없는 상태에서도 화끈거리거나 타는듯한 감각(spontaneous burning sensation)을 느끼는 등의 임상적 특성을 보이는 만성통증이다. 이와 같은 신경병증성 통증은 이로움을 주는 급성 통증과는 달리 통증을 전달하는 신경계의 변형으로 인해 질병 이상의 통증을 가져오게 된다.

[0005] 전통적으로 이러한 신경병증성 통증은 신경세포의 변성에 의해 야기되는 감각뉴런(sensory neuron)의 과흥분성(hyperexcitability)에 기인한다고 생각되어져 왔으며, 이러한 감각뉴런의 과흥분성의 원인으로는, 1) 신경세포 손상에 의한 세포주변 환경의 항상성 (extraneuronal homeostasis)의 변화, 2) 신경세포 손상에 따른 감각뉴런 세포막 이온통로 발현 및 이온통로 조절 단백질 활성의 변화, 3) 중추 시냅스 재조정 (synaptic reorganization)에 의한 새로운 통증전달 회로의 형성, 4) 억제성 인터뉴런의 사멸에 의한 감각신경세포의 과흥분과 같은 몇 가지 원인들이 가설로 제기되었다.

[0006] 현재 신경병증성 통증에는 신경흥분성이나 감각축삭전도성을 감소시키는 물질을 투여하는데, 항간질약, 국소리도카인, 진통제, 비스테로이드 소염 진통제, 오피아드 등 다양한 약물을 사용하고 있다. 그러나 여전히 신경병증성 통증을 효과적으로 치료할 수 있는 물질에 대한 연구가 많이 이루어지지 않았으며, 약에 따른 효능과 부작용 차이로 인하여 신경병증성 통증을 치료하기 위한 약물의 선택이 어려워, 새로운 신경병증성 통증 치료제 개발에 대한 필요성이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 부작용이 적고 지속시간이 긴 만성통증 치료제에 대해 연구하던 중 PAT4가 만성통증 동물모델에서 기계적 역치를 증가 및 전염증 매개인자의 발현 억제를 통해 만성통증을 감소시킨다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은, 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 PAT4를 유효성분으로 포함하는 만성통증 질

환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은, 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 PAT4를 유효성분으로 포함하는 만성통증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 만성통증 질환의 치료방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 PAT4를 유효성분으로 포함하는 만성통증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 또한 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 PAT4를 유효성분으로 포함하는 만성통증 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 PAT4를 유효성분으로 포함하는 만성통증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 만성통증 질환의 치료방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 PAT4는 미세아교세포를 타겟하여 전염증 매개인자의 발현을 억제, 활성산소종 생성 억제, 미세아교세포의 활성을 억제 및 기계적 역치를 증가시키는 효과를 가지고 있고, 그 효과가 종래 만성통증 치료제보다 오랫동안 지속되는바, PAT4는 만성통증의 치료제로서 만성통증의 예방, 개선 및 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 마우스 미세아교세포주에서 본 발명에 따른 PAT4가 전염증 매개인자의 발현을 억제하는 효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 2는 신경병증성 통증 동물 모델에서 본 발명에 따른 PAT4가 타겟하는 세포를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 3은 신경병증성 통증 동물 모델에서 본 발명에 따른 PAT4의 진통 감소 및 미세아교세포 활성 억제 효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 4 및 5는 신경병증성 동물 모델에서 본 발명에 따른 PAT4의 신경병증성 통증 감소 효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 6은 무릎 관절염 통증 모델에서 PAT4의 통증 감소 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 PAT4를 유효성분으로 포함하는 만성통증 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명에 따른 PAT4는 전염증 매개인자의 발현을 억제, 활성산소종 생성 억제 및 기계적 역치를 증가시킴으로써 만성통증을 감소시키는 효과가 있다. 또한 종래 만성통증의 치료제로 알려져 있는 가바펜틴(gabapentin)의 약효 지속시간이 약 1일인 반면, 본 발명에 따른 PAT4는 진통 감소 효과의 지속시간이 21일 이상이다.

[0018] 본 발명의 구체예에서, 상기 PAT4는 이의 기능적 동등물을 포함한다.

[0019] 상기 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80% 이상의, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%이상의 서열 상동성(즉, 동일성)을 갖는 것으로 예를 들면, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 것을 포함하며, 서열번호 1의 PAT4와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 펩타이드를 말한다. 또한, 본 발명의 PAT4에는 이의 천연형 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 이의 아미노산 서열 변이체가 또한 본 발명의 범위에 포함된다. PAT4의 변이체란 PAT4

의 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다. 상기 PAT4 또는 이의 변이체는 천연에서 추출하거나 합성(Merrifleld, J. Amer. chem. Soc. 85:2149-2156, 1963) 또는 DNA 서열을 기본으로 하는 유전자 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다(Sambrook et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2판, 1989).

[0020] 또한 상기 서열 상동성은 단백질을 구성하는 아미노산 서열의 유사한 부분을 비교하기 위해 사용되는 일반적인 표준 방법에 의해 결정할 수 있다. BLAST 또는 FASTA와 같은 컴퓨터 프로그램은 두 개 이상의 단백질을 각각 구성하는 아미노산이 최적으로 매칭(matching) 되도록 정렬한다(하나 또는 두 서열의 전장서열을 따라 또는 하나 또는 두 서열의 예측된 부분을 따라). 상기 프로그램은 디펄트 오프닝 패널티(default opening penalty) 및 디펄트 갭 페널티(default gap penalty)를 제공하며 컴퓨터 프로그램과 함께 연계되어 사용될 수 있는 PAM250(표준 스코링 매트릭스; Dayhoff et al., in Atlas of Protein Sequence and Structure, vol 5, supp. 3, 1978)와 같은 스코링 매트릭스를 제공한다. 예를 들어, 백분율로 표시되는 서열 상동성은 다음과 같이 계산할 수 있다: 일치하는 서열(indentical matches)의 총 수에 100을 곱한 다음 대응되는 스팬(machted span) 내의 보다 긴 서열의 길이와두 서열을 정렬하기 위해 보다 긴 서열내로 도입된 갭(gaps)의 수의 합으로 나눈다.

[0021] 상기에서 "실질적으로 동질의 생리활성"이란 항염증 활성과, 만성통증의 개선, 예방 또는 치료 활성을 의미한다.

[0022] 또한 상기 기능적 동등물의 범위에는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 PAT4의 기본골격; 및 항염증, 만성통증의 개선, 예방 또는 치료 활성을 유지하면서 구성하는 아미노산의 일부 화학 구조가 변형된 유도체;가 포함된다. 예를 들어 단백질의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경이 이에 포함된다.

[0023] 본 발명에 있어서, “만성통증 질환”은 몸의 한 곳 또는 여러 곳에 영향을 주고 3개월 이상 지속되는 다소 심한 고통을 의미하며, 시간이 지남에 따라 그 강도가 달라질 수 있는 통증 증후군을 포함한다.

[0024] 본 발명의 구체예에서, 상기 만성통증 질환은 신경병증성 통증, 관절염에 의한 만성통증, 복합부위 통증 증후군, 대상포진 후 신경통 및 척추 수술 후 통증 증후군으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 질환인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명에 있어서, “신경병증성 통증(neuropathic pain)”은 외상(trauma)이나 염증, 허혈성 손상, 또는 대사산물 등 다양한 원인에 의해 신경계가 손상될 때 유발되는 만성적 신경질환을 의미한다.

[0026] 본 발명의 구체예에서, 상기 신경병증성 통증은 말초 신경 손상 또는 중추 신경 손상에 의해 유도된 것이 바람직하다. 또한 상기 신경병증성 통증은 말초신경계 이상 또는 손상, 척수신경 손상을 포함한 다발성경화증, 척수부상, 통각과민, 감각과민, 신경병증, 당뇨성 신경장애, 신경염, 신경통, 작열통, 이질통, 포진후신경통, 요추신경근압박, 암과 관련된 통증, 알코올 중독, 비정형 안면통증, 포진성 신경통, 중풍후통증, HIV 연관 신경병증, 골관절염 및 환상사지통증으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 질환을 포함하는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명의 구체예에서, PAT4는 미세아교세포(microglia cell), 뉴런 세포(neuronal cell) 및 성상세포(astrocytic cell)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 타겟하는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 미세아교세포를 타겟하나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명에 있어서, “예방”은 본 발명의 조성물에 의해 병인을 제거하거나 조기 발견하여 해당질환을 막는 모든 행위를 의미한다.

[0029] 본 발명에 있어서, “치료”는 본 발명의 조성물에 의해 질환의 증세가 호전되는 모든 행위를 의미한다.

[0030] 본 발명에 있어서, “개선”은 본 발명의 조성물에 의해 생체 대사, 세포 또는 기관의 기능이 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0031] 본 발명의 조성물은 상기 PAT4와 함께 만성통증의 예방, 개선 도는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.

[0032] 본 발명의 구체예에서, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 PAT4를 유효성분으로 포함하는 만성

통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0033] 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위하여 약학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로오스 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 이상의 성분을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화 할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 제제화 할 수 있다.

[0034] 상기 약학적 조성물은 추가적인 성분을 더 포함할 수 있다. 상기 추가적인 성분의 예로는 유당, 탈크, 전분, 스테아린산 마그네슘, 결정성 셀룰로오스, 락토오스, 젤라틴, 만니톨, 과옥소산, 이성화당, 폴리비닐알코올, 붕산 및 탄산나트륨이 있다.

[0035] 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여할 수 있으며, 신속한 효과를 위하여 비경구 투여하는 것이 바람직하며, 척수강에 척수관 주사되는 것이 더 바람직하다. 비경구 투여를 하는 경우, 정맥내 주입, 근육내 주입, 관절내(intra-articular) 주입, 활액내(intra-synovial) 주입, 수망강내 주입, 간내(intrahepatic) 주입, 병변내(intralesional) 주입 또는 두 개강내(intracranial) 주입 등으로 투여할 수 있다. 상기 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0036] 본 발명의 구체예에서, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 PAT4를 유효성분으로 포함하는 만성통증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품, 식품 첨가제 또는 식이보조제일 수 있다. 본 발명의 조성물이 식품 첨가제인 경우, PAT4를 그대로 첨가하거나, 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 혼합하여 사용되는 등 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0038] 구체적인 예로, 식품 또는 음료의 제조 시에는 본 발명의 PAT4는 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하여 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 양으로 첨가될 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없으나, 본 발명의 PAT4를 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료, 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0039] 본 발명의 식품 조성물이 음료로 제조될 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등의 추가 성분을 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당 등의 모노사카라이드; 말토오스, 수크로오스 등의 디사카라이드; 덱스트린, 사이클로덱스트린 등의 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐 등의 합성 감미제 등이 사용될 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 10중량%, 바람직하게는 0.01 내지 0.1중량%로 포함된다.

[0040] 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있으며, 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기의 첨가제 비율은 크게 제한되지는 않으나, 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 0.1중량% 범위내로 포함되는 것이 바람직하다.

[0041] 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취인 경우, 본 발명의 식품 조성물은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 장기간 복용이 가능하다.

[0043] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 PAT4를 유효성분으로 포함하는 만성통증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 만성통증 질환의 치료방법을 제공한다.

[0044] 본 발명의 바람직한 구체예에 따르면, 상기 약학적 조성물은 개체의 척수에 주입되는 것이 바람직하나, 이에 제

한되지 않는다.

[0045] 본 발명에 따른 만성통증 치료방법은 PAT4가 미세아교세포를 타겟하여 전염증 매개인자의 발현을 억제, 활성산소종 생성 억제, 미세아교세포의 활성을 억제 및 기계적 역치를 증가시킴으로써, 만성통증을 치료할 수 있다.

[0047] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0049] **실험예 1. 신경병증성 통증 동물 모델 제조**

[0050] 만성통증 질환으로는 신경병증성 통증, 복합부위 통증 증후군, 대상포진 후 신경통, 척추 수술 후 통증 증후군 등이 있다. 만성통증의 일종인 신경병증성 통증에 대한 동물 모델을 제조하였으며, 이를 이용하여 만성통증 치료제의 활성을 검증하였다.

[0052] **1-1. 동물 실험**

[0053] 신경병증성 통증 동물 모델을 제조하기 위하여, 대한 바이오링크(DBL, 충북)에서 Sprague-Dawley 래트(6 wks males, 150-200 g)를 구입하여 1주일 동안 새로운 환경에 적응시켰다. 모든 동물은 12시간의 밝음/어두움 주기에서 1 케이지 당 3마리씩 사육하였으며, 음식 및 물에 대한 자유로운 접근이 가능한 환경에서 사육하였다. 본 실시예의 동물실험은 충남대학교의 동물 관리 및 이용위원회(CNUH-A019-P0001)의 승인을 받았으며, 식약처의 통증 연구의 윤리 가이드라인에 따라 수행되었다.

[0055] **1-2. L5 SNL(L5 spinal nerve ligation) 유도된 신경병증성 통증 동물 모델 제조**

[0056] 실험예 1-1의 Sprague-Dawley 래트를 아이소플루레인(isoflurane, 2% in oxygen mixture; Hana pharm, Kyung-gi, Republic of Korea)으로 마취하고, 시각적으로 L4 및 L5 척추 신경을 확인할 수 있도록 왼쪽 6번 횡돌기(left lumbar(L) 6 transverse process)를 제거하였다. 이어서 왼쪽 L5 척추 신경을 분리하고 3-0 실크실로 타이트하게 묶었다. 완전히 지혈한 후에 상처를 봉합하였다. 제조된 신경병증성 통증 동물 모델은 기계적 역치가 낮아 외부 자극이 없이도 기계적 이질통(Mechanical allodynia)이 지속적으로 발생한다.

[0057] 대조군은 실험군과 동일한 방법으로 수술하되, SNL을 유도하지 않은 것이다.

[0059] **실험예 2. 본 프레이 필라멘트(von frey filament)를 이용한 통증 행동 시험**

[0060] 통증 행동 시험은 J. M. Chung, H. K. Kim and K. Chung, **Segmental spinal nerve ligation model of neuropathic pain**. *Methods Mol Med*. 2004;99:35-45에 기재된 방법으로 수행하였다. 기계적 이질통(Mechanical allodynia)은 수술 후 3, 7, 10, 12 및 14일 째에 본 프레이 필라멘트(NC12775-99, Touch Test® Sensory Evaluators, 20-Piece Hand Kit, North Coast Medical & Rehabilitation Products, Camino Arroyo Gilroy, CA)를 이용하여 측정하였다. 구체적으로, 동물모델의 뒷발의 발바닥 표면에 본 프레이 필라멘트를 1 내지 2초 동안 3회 적용하였으며, 업-다운 테스트 패러다임을 통해 각 발의 역치를 측정하였다. 역치 측정 시 기준선을 설정하기 위하여 10-g 자극을 사용하였으며, 신경병증성 통증의 발생을 판단하기 위하여 4-g의 자극을 먼저 적용하였다. 자극을 적용하였을 시 긍정적 응답이 발생하는 경우 더 작은 본 프레이 헤어를 사용하였다. 이와 반대로, 부정적인 응답이 발생하는 경우 더 높은 힘을 가하였다.

[0062] **실험예 3. 척수관 주사(Intrathecal injection)**

[0063] 척수관 주사는 J. L. Hylden and G. L. Wilcox, **Intrathecal morphine in mice: a new technique**. *Eur J Pharmacol*. 1980;67:313-6에 기재된 방법으로 수행하였다.

[0064] 구체적으로, 래트를 수술대에 눕힌 후 아이소플루레인을 이용하여 마취시켰다. 해밀톤 주사기(50 μl; Reno, NV)를 이용하여, 마취된 래트의 5번 요추(L5) 및 6번 요추(L6)의 사이의 요추강에 농도가 20nmol인 PAT4를 20μl만큼 주사하였으며, 대조군은 PBS를 동량 주입하였다. 척수관 주사가 완료되었을 시 꼬리-플릭 반응(tail-flick response, TFR)이 관찰되었다.

[0065] 또한, PAT4가 표적한 세포의 유형을 확인하기 위해 FITC(fluorescein isothiocyanate)가 접합된 TAP2(Peptron, Daejeon, Korea)를 사용하였다.

[0067] **실험예 4. 정량적 RT-PCR(quantitative real time PCR)**

[0068] Hybrid-R 키트(GeneAll, Seoul, Korea)를 이용하여 동물모델의 척수 등쪽뿔의 동측(ipsilateral side of the spinal dorsal horn)(L4-L5 segment, 0.7 cm) 또는 BV2 세포로부터 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 전체 RNA에 TOPscript RT DryMix(Enzynomics, 대전, 한국) 20μl를 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 정량적 RT-PCR을 수행하였다. 구체적으로, 상기 정량적 RT-PCR은 95℃에서 10분, 그 후 95℃에서 15초, 60℃에서 1분을 40회 반복하였다. 또한 상기 정량적 RT-PCR에 사용된 프라이머는 다음과 같다;mouse GAPDH, forward: 5' - ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG -3' , reverse: 5' - CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC -3' ; mouse TNF- α, forward: 5' - AGC AAA CCA CCA AGT GGA GGA-3' ,reverse: 5' - GCT GGC ACC ACT AGT TGG TTG T -3' ;mouse IL-1β, forward: 5' - TTG TGG CTG TGG AGA AGC TGT -3' , reverse: 5' - AAC GTC ACA CAC CAG CAG GTT -3' ; mouse IL-6, forward: 5' - TCC ATC CAG TTG CCT TCT TGG -3' , reverse: 5' - CCA CGA TTT CCC AGA GAA CAT G -3' ; mouse COX-2, forward: 5' - TGA GTA CCG CAA ACG CTT CT - 3' , reverse: 5' - CTC CCC AAA GAT AGC ATC TGG - 3' ; mouse iNOS, forward: 5' - GGC AAA CCC AAG GTC TAC GTT - 3' , reverse: 5' - TCG CTC AAG TTC AGC TTG GT - 3' ; rat GAPDH, forward: 5′ - CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC -3′ , reverse: 5′ - TTC AGC TCT GGG ATG ACC TT -3′ ; rat TNF-α, forward: 5′ - AGA TGT GGA ACT GGC AGA GG -3′ , reverse: 5′ - CCC ATT TGG GAA CTT CTC CT -3′ ; rat IL-1β, forward: 5′ - CAG CAG CAT CTC GAC AAG AG -3′ , reverse: 5′ - CAT CAT CCC ACG AGT CAC AG -3′ ; rat IL-6, forward: 5′ - CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG -3′ , reverse: 5′ - ACA GTG CAT CAT CGC TGT TC -3′ ; rat COX-2 forward: 5′ - CAG TAT CAG AAC CGC ATT GCC -3′ , reverse: 5′ - GAG CAA GTC CGT GTT CAA GGA-3′ ; rat TLR4 forward: 5' - TGA GCA GTC GTG CTG GTA TC -3' , reverse: 5' - CAG GGC TTT TCT GAG TCG TC -3' . 각 표적 유전자의 mRNA 발현 수준은 GAPDH mRNA의 발현 수준으로 정규화 하였으며, 그 값은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법으로 계산하였다(K. J. Livak and T. D. Schmittgen, **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method**. *Methods*. 2001;25:402-8).

[0070] **실험예 5. 면역조직화학염색**

[0071] 래트를 소디움펜토바비탈(100mg/kg, i.p.)로 마취시킨 후 헤파린화된 PBS(pH 7.4)를 관류(perfuse)시켰다. 그 후, 연동 펌프를 사용하여, 래트에 4% 파라포름알데하이드(Merck, Darmstadt, Wetzlar, Germany)(in PBS)를 20ml/min의 속도로 10분 동안 관류하였다. 관류를 마친 후 래트의 척수(L4-L6) 절편을 즉시 채취하여 고정액에 밤새도록 담근 후, 10 내지 30% 수크로오스 용액에 담갔다. 2일 후 척추 절편을 크라이오스탯(CM1950, Leica Biosystems, Germany)을 이용하여 30μm의 두께로 절단하였으며, 절단된 절편을 저장 버퍼(30% 글리세롤, 30% 에틸렌글리콜 in PBS)에 담가 4℃로 유지하였다.

[0072] 면역염색을 위하여, 유지된 절편을 블로킹 버퍼(5% 정상 혈청, 0.3% Triton X-100 in PBS)와 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 절편과 1차 항체((iNOS, 1:100 [BD-610329; BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ]; Iba1, 1:400 [019-19741; Wako, Osaka, Japan]; Arg1, 1:100 [sc-271430; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA])를 함께 배양한 후 세척하였다. 절편을 1차 항체와 동일한 버퍼에 희석된 Cy^3 또는 FITC(1:400, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)와 접합된 이차 항체와 함께 배양한 후 세척하여 준비하였다. 준비된 절편을 DAPI(5μg/ml)로 대조 염색하였으며, 마운팅 배지(Biomeda, Foster city, CA)를 포함하는 슬라이드에 장착하였다. 면역 염색된 절편의 이미징은 공초점 현미경(TCS SP8, Leica)을 이용하였다.

[0073] DAB(diaminobenzidine) 염색을 위하여, 척추 조직을 0.3 % H_2O_2(in PBS)에 10분 동안 노출시킨 후 블로킹 버퍼(5% 정상 혈청, 0.3% Triton X-100 in PBS)로로 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 내인성 퍼옥시다제의 활성이

차단된 조직을 1차 항체(Iba-1, 1 : 400, Wako)와 4℃에서 밤새도록 배양한 후, 바이오티닐화된(biotinylated) 2차 항체와 스트렙타비딘 퍼옥시다아제 복합체(streptavidin peroxidase complex, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)를 처리하였다. 제작된 표본을 DAB-퍼옥시다아제 기질 용액(PBS 중 0.05% DAB/0.015%H_2O_2)으로 시각화하고 폴리마운트(Polysciences, Warrington, PA)를 사용하여 유리 슬라이드 상에 올려놓았다. 상기 슬라이드를 명시야 현미경(ECLIPSE E600 POL, Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰 및 이미징을 수행하였다. 이미지 J 소프트웨어(NIH, Bethesda, MD)를 사용하여, 얻어진 이미지로부터 척수 등쪽뿔에서 Iba1 면역 반응을 측정 하였다.

[0075] **실험예 6. 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 검출 분석**

[0076] 척수의 과산화물 음이온(Superoxide anion)의 농도는 Zhang Y, et al.의 방법(Zhang Y, Yu XJ, Chen WS, Gao HL, Liu KL, Shi XL, et al. Exercise training attenuates renovascular hypertension partly via RAS- ROS-glutamate pathway in the hypothalamic paraventricular nucleus. Sci Rep. 2016; 6: 37467.)으로 검출하였다. 구체적으로, 척추 절편과 DHE(1μM) 용액을 실온에서 5분 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 척추 절편을 슬라이드 글라스에 올린 후 공촛점 현미경(Leica Biosystems, Germany)을 이용하여 신호를 검출하였으며, 형광 강도는 Image J 프로그램(NIH, Bethesda, MD, USA)을 통해 정량화하였다.

[0078] **실험예 7. MIA(monoiodoactate)로 유도된 무릎 관절염(knee osteoarthritic, OA) 통증 모델 및 행동 검사**

[0079] 무릎 관절염 통증 모델은 “Thakur M, Rahman W, Hobbs C, Dickenson AH, Bennett DL. Characterisation of a peripheral neuropathic component of the rat monoiodoacetate model of osteoarthritis. PLoS One. 2012; 7: e33730.”에 기재된 동물 모델을 이용하였다. 구체적으로, 아이소플루레인(2% in oxygen mixture; Hana Pharm, 대한민국)을 이용하여 래트를 마취시킨 후 MIA(식염수 25μl에 MIA가 2mg 포함된 것)를 26.5G 주사 바늘이 달린 해밀턴 주사기를 사용하여 왼쪽 슬개건을 통해 왼쪽 뒷다리의 무릎 관절의 관절 내 공간에 주사하였다. 대조군은 MIA 대신 PBS 25μl를 주사하였다. MIA 주사 후 7일째에 무릎 관절염 통증 모델의 무릎 관절염 통증이 확립되었다. 상기 무릎 관절염 통증 모델의 척수강에 PAT4(25nmol)를 주입하였으며, PAT4의 진통 감소 효과를 확인하기 위하여 본 프레이 필라멘트 행동 검사를 실시하였다.

[0081] **실시예 1. PAT4 제작**

[0082] 신경병증성 통증의 치료를 위해 TLR4에 특이적으로 결합하는 펩타이드를 제작하였으며, 제작된 펩타이드 중 TLR4와 결합 친화도가 높은 PAT4(peptide antagonist of Toll-like receptor 4)를 선별하였다. 상기 PAT4는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시된다.

[0084] **실시예 2. 마우스 미세아교세포주에서 PAT4의 전염증 매개인자의 발현 억제 효과 확인**

[0085] 마우스 미세아교세포주인 BV2 세포를 이용하여 상기 실시예 1에서 제작된 PAT4의 전염증 매개인자의 발현 억제 효과를 확인하였다. 구체적으로, BV2 세포를 PAT4(10mM)로 30분 동안 전처리하였다. 전처리된 BV2 세포를 LPS(lipopolysaccharide)(1000ng/ml)와 함께 3시간 동안 추가 배양하였다. 음성 대조군은 PAT4 대신 PBS를 처리한 BV2 세포이며, 양성 대조군은 PBS로 전처리한 후 LPS로 자극한 BV2 세포이다. 배양 종료 후 전염증 매개인자인 TNF-α, IL-1β, IL-6, COX-2 및 iNOS의 발현을 정량적 RT-PCR(실험예 4)을 통해 확인하였으며, 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0086] 도 1에 나타낸 바와 같이, PAT4를 처리한 LPS로 자극된 BV2 세포는 전염증 매개인자인 TNF-α, IL-1β, IL-6, COX-2 및 iNOS의 발현이 음성 대조군 수준으로 감소하는 것을 확인하였다. 상기 결과는 PAT4가 미세아교세포에서 항염증 효과를 나타낸다는 것을 의미한다.

[0088] **실시예 3. 신경병증성 통증 동물 모델에서 PAT4의 타겟 세포 확인**

[0089] SNL 수술 후 신경병증성 통증 동물 모델의 미세아교세포에서 TLR4의 발현이 급증하기 때문에, 실험예 1의 신경

병증성 통증 동물 모델에서 PAT4가 미세아교세포를 표적하는지 확인하였다. 구체적으로, SNL 수술 후 3일 째에 FITC가 결합된 PAT4를 신경병증성 통증 동물 모델의 척수강 내에 투여하였다(실험예 3). 투여 4일 후 L5 척추 절편을 제조하고, 미세아교세포 마커인 Iba1에 대한 항체와 함께 배양하여 면역염색하였다(실험예 5). 면역염색 결과는 도 2에 나타내었다.

[0090] 도 2에 나타낸 바와 같이, 척수 등쪽뿔(Ipsi)의 PAT4/Iba1 양성 세포의 수는 배측(contra)보다 3배 이상 많은 것을 확인하였다.

[0092] **실시예 4. 신경병증성 통증 동물 모델에서 PAT4의 진통 감소 및 미세아교세포 활성 억제 효과 확인**

[0093] 실험예 1의 신경병증성 통증 동물 모델을 이용해서 PAT4가 SNL 수술에 의해 유발된 통증을 감소시키는지 여부를 조사하였다. 구체적으로, SNL 수술 3일 째인 래트 중 본 프레이 필라멘트에 민감한 래트(<2g)의 척수강 내에 PAT4(25nmol) 20㎕를 투여하였다(실험예 3). 음성 대조군은 SNL 수술 3일 째인 신경병증성 통증 동물 모델에 PAT4 대신 PBS 20㎕을 투여하였고, 양성 대조군은 신경병증성 통증 치료제인 가바펜틴 5mg을 투여하였다. 상기 실험예 2의 통증 행동 시험을 통해 동물 모델의 기계적 역치를 측정하였으며 그 결과는 도 3A에 나타내었다.

[0094] 도 3A에 나타낸 바와 같이, PAT4를 투여한 신경병증성 통증 동물 모델은 기계적 역치가 음성 대조군(PBS)보다 현저히 증가하는 것을 확인하였다. 또한 신경병증성 통증의 치료제로 사용되는 가바펜틴은 진통 감소 효과가 약 1일 정도 유지되는 반면, PAT4는 21일 이상 진통 감소 효과가 지속되는 것을 확인하였다.

[0096] 신경병증성 통증 동물 모델에서 PAT4의 미세아교세포 활성 억제 효과를 조사하였다. 구체적으로, SNL 수술 3일 째인 신경병증성 통증 동물 모델의 척수강 내에 PAT4(25nmol) 20㎕를 투여하였다(실험예 3). PAT4 투여 4일 후 L5 척추 절편을 제작하고, 항 Iba1 항체와 배양하였다(실험예 5). 음성 대조군은 SNL 수술을 하지 않은 개체이며, 양성 대조군은 SNL 수술 3일째인 신경병증성 통증 동물 모델에 PAT4 대신 PBS 20㎕을 투여하였다. 항 Iba1 항체의 결합 강도는 NIH Image J 소프트웨어를 사용하여 측정하였으며, 그 결과는 도 3B에 나타내었다.

[0097] 도 3B에 나타낸 바와 같이, PAT4 처리군의 Iba1 면역 염색의 강도는 PBS로 처리한 대조군에 비해 67% 감소하였으며, 이는 PAT4가 미세아교세포의 활성을 감소시킨다는 것을 의미한다.

[0099] 상기 결과는 PAT4가 척수에서 미세아교세포를 표적하고, 미세아교세포의 활성을 감소시킴으로써 SNL 수술로 유도된 신경병증성 통증을 감소시킨다는 의미한다.

[0101] **실시예 5. 신경병증성 통증 동물 모델에서 PAT4의 신경병증성 통증 감소 효과 확인**

[0102] **5-1. PAT4의 전염증 매개인자의 발현 억제 효과 확인**

[0103] 신경병증성 통증 동물모델에서 상기 실시예 2에서 제작된 PAT4의 전염증 매개 인자의 발현 억제 효과를 확인하였다. 구체적으로, 실험예 1에서 제조된 신경병증성 통증 동물 모델의 척수강에 PAT4(25nmol) 20㎕를 주입하였다. PAT4 투여 4일 후 L5 척추 절편(0.7cm)로부터 전체 RNA를 분리하였다. 음성 대조군은 SNL 수술을 하지 않은 동물이며, 양성 대조군은 신경병증성 통증 동물 모델에 PBS 20㎕을 투여하였다. 전염증 매개인자인 TNF-α, IL-1β, IL-6, COX-2 및 iNOS의 발현을 정량적 RT-PCR(실험예 4)을 통해 확인하였으며, 그 결과는 도 4A에 나타내었다.

[0104] 도 4A에 나타낸 바와 같이, PAT4를 투여한 신경병증성 통증 동물 모델에서 전염증 매개인자인 TNF-α, IL-1β, IL-6, COX-2 및 iNOS의 발현이 양성 대조군(SNL+PBS)보다 현저히 감소한 것을 확인하였다.

[0106] **5-2. PAT4의 미세아교세포 활성 억제 효과 확인**

[0107] 실험예 1에서 제조된 신경병증성 통증 동물 모델의 척수강에 PAT4(25nmol) 20㎕를 주입하였다. PAT4 투여 4일 후 L5 척추 절편을 제작하였다. 상기 L5 척추 절편을 미세아교세포 마커인 Iba1에 대한 항체와 함께 배양하여 면역염색 하였다(실험예 5). 음성 대조군은 SNL 수술을 하지 않은 동물이며, 양성 대조군은 신경병증성 통증 동

물 모델에 PBS 20㎕을 투여하였다. 면역염색 결과는 도 4B에 나타내었다.

[0108] 도 4B에 나타낸 바와 같이, PAT4를 투여한 신경병증성 통증 동물 모델에서 iNOS 및 iNOS/Iba1 양성 세포 수가 양성 대조군(PBS)에 비해 각각 39% 및 46% 감소한 것을 확인하였다.

[0110] **5-3. PAT4의 활성산소종 생성 억제 효과 확인**

[0111] 활성산소종(ROS)은 SNL 수술에 의한 미세아교세포의 활성을 향상시키므로, 본 실시예에서는 PAT4 투여에 따른 활성산소종 생성 억제여부를 확인하였다. 구체적으로, 실험예 1에서 제조된 신경병증성 통증 동물 모델의 척수강에 PAT4(25nmol) 20㎕를 주입하였다. PAT4 투여 4일 후 L5 척추 절편을 제작하였다. L5 척추 절편을 이용하여 상기 실험예 6의 활성산소종 검출 분석을 수행하였다. 대조군은 신경병증성 통증 동물 모델에 PBS 20㎕을 투여하였다. 활성산소종 검출 분석 결과는 도 5에 나타내었다.

[0112] 도 5에 나타낸 바와 같이, PAT4를 투여한 신경병증성 통증 동물 모델에서 활성산소종이 대조군에 비해 약 55% 감소된 것을 확인하였다.

[0114] 상기 결과는 PAT4가 신경병증성 통증 동물 모델에서 전염증 매개인자의 발현 감소, 미세아교세포의 활성 억제 및 활성산소종 생성 억제를 통해 신경병증성 통증을 감소시킨다는 것을 의미한다.

[0116] **실시예 6. 무릎 관절염 통증 모델에서 PAT4의 통증 감소 효과 확인**

[0117] 신경병증성 통증과 생리학적으로 관련이 있는 MIA로 유도된 무릎 관절염 통증 모델을 이용하여, PAT4의 통증 감소 효과를 상기 실험예 7의 방법으로 확인하였다. 구체적으로, MIA를 주사한지 7일째인 MIA로 유도된 무릎관절염 통증 동물 모델을 PBS(20㎕, 25 nmol)를 척수강 내에 투여하였다. PAT4를 투여한 동물 모델의 기계적 역치는 주사 후 1 내지 24일(MIA 주사 후 7 내지 31일)에 조사하였다. 대조군으로는 PAT4 대신 PBS 20㎕를 투여하였다. 기계적 역치를 조사한 결과는 도 6에 나타내었다.

[0118] 도 6에 나타낸 바와 같이, PAT4를 투여한 무릎 관절염 통증 모델은 대조군에 비해 기계적 역치가 현저히 증가한 것을 확인하였다. 또한 PAT4는 통증 감소 효과가 24일 이상 유지되는 것을 확인하였다. 상기 결과는 PAT4가 MIA에 의해 유발된 무릎 관절염 통증을 장기적으로 감소시킨다는 것을 의미하며, 무릎 관절염 통증을 포함하는 신경병증성 통증의 치료에 이용할 수 있다는 것을 시사한다.

[0120] 종합적으로 본 발명자들은 PAT4가 미세아교세포를 타겟하여 전염증 매개인자의 발현을 억제, 활성산소종 생성 억제, 미세아교세포의 활성을 억제 및 기계적 역치를 증가시킴으로써, 만성통증을 감소시킨다는 것을 확인하였다. 이는 PAT4가 만성통증의 치료제로서 이용될 수 있음을 의미하는 바, 본 발명의 PAT4는 만성통증의 예방, 개선 및 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

[0122] 이하, 제제예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 제제예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 제제예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는다.

[0124] **제제예 1. 만성통증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조**

[0125] **1-1. 산제의 제조**

[0126] PAT4 20 mg

[0127] 유당 100 mg

[0128] 탈크 10 mg

[0129] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[0131] **1-2. 정제의 제조**

[0132] PAT4 10 mg

[0133] 옥수수전분 100 mg

[0134] 유당 100 mg

[0135] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0136] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0138] **1-3. 캡슐제의 제조**

[0139] PAT4 10 mg

[0140] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0141] 락토오스 14.8 mg

[0142] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0143] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0145] **1-4. 주사제의 제조**

[0146] PAT4 10 mg

[0147] 만니톨 180 mg

[0148] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0149] 인산이나트륨 이수화물 26 mg

[0150] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0152] **1-5. 액제의 제조**

[0153] PAT4 20 mg

[0154] 이성화당 10 g

[0155] 만니톨 5 g

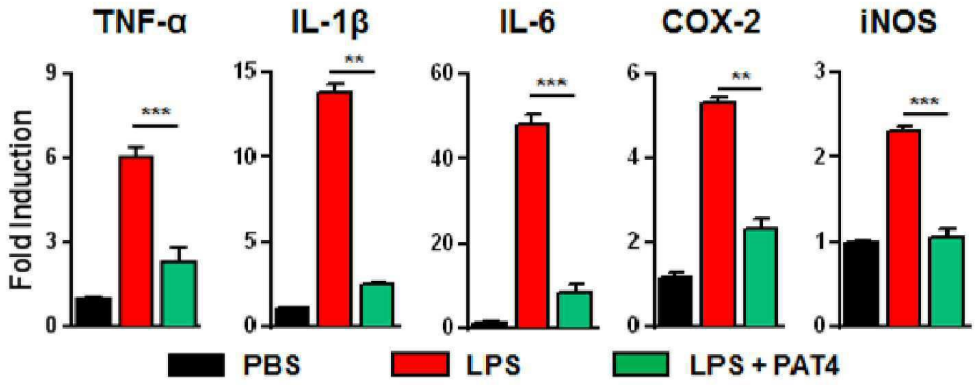
[0156] 정제수 적량

[0157] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

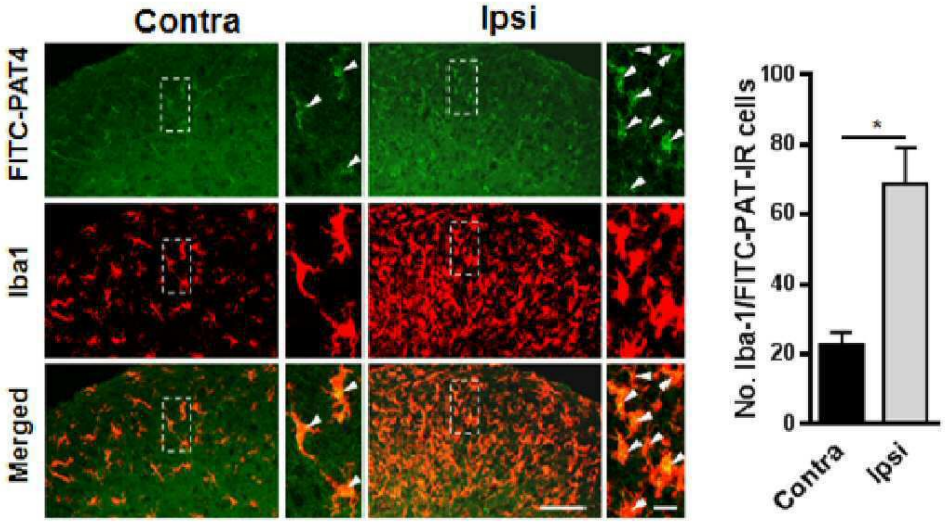
[0159] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

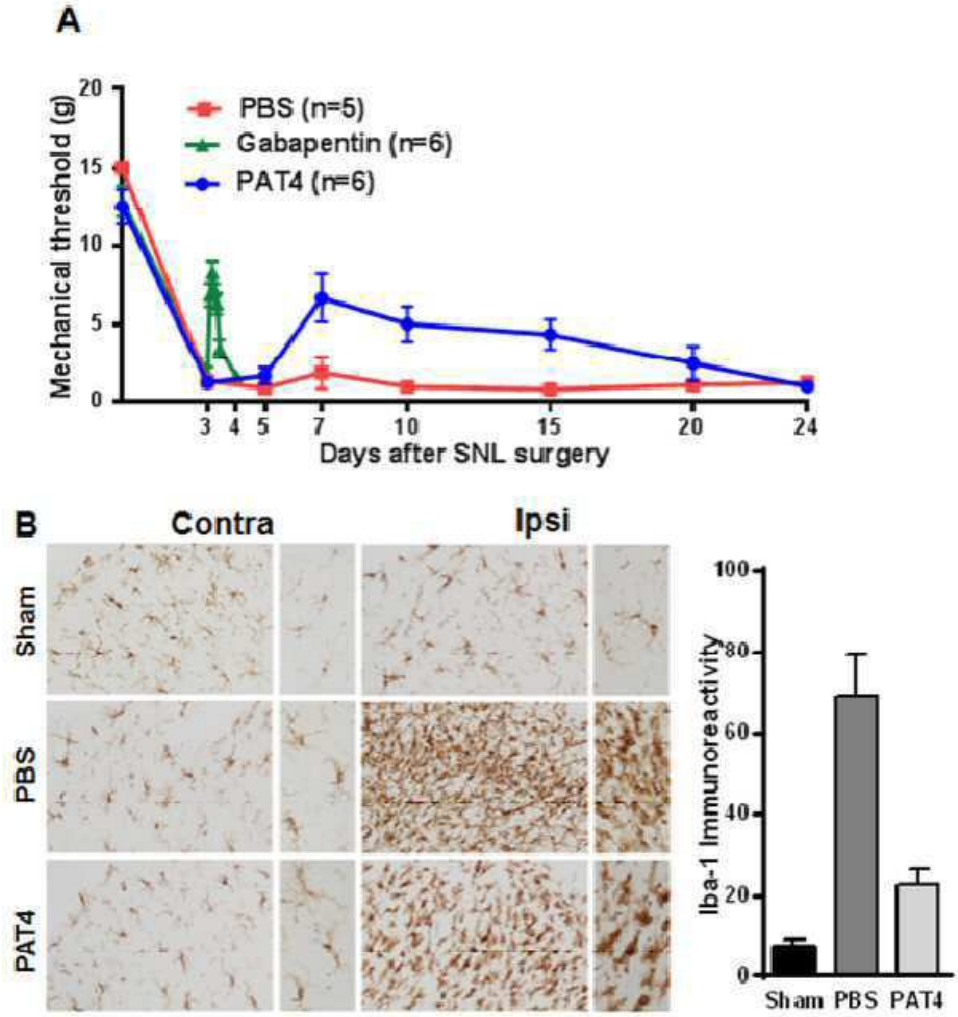
도면1


TNF-α
IL-1β
IL-6
COX-2
iNOS
Fold Induction
PBS
LPS
LPS + PAT4

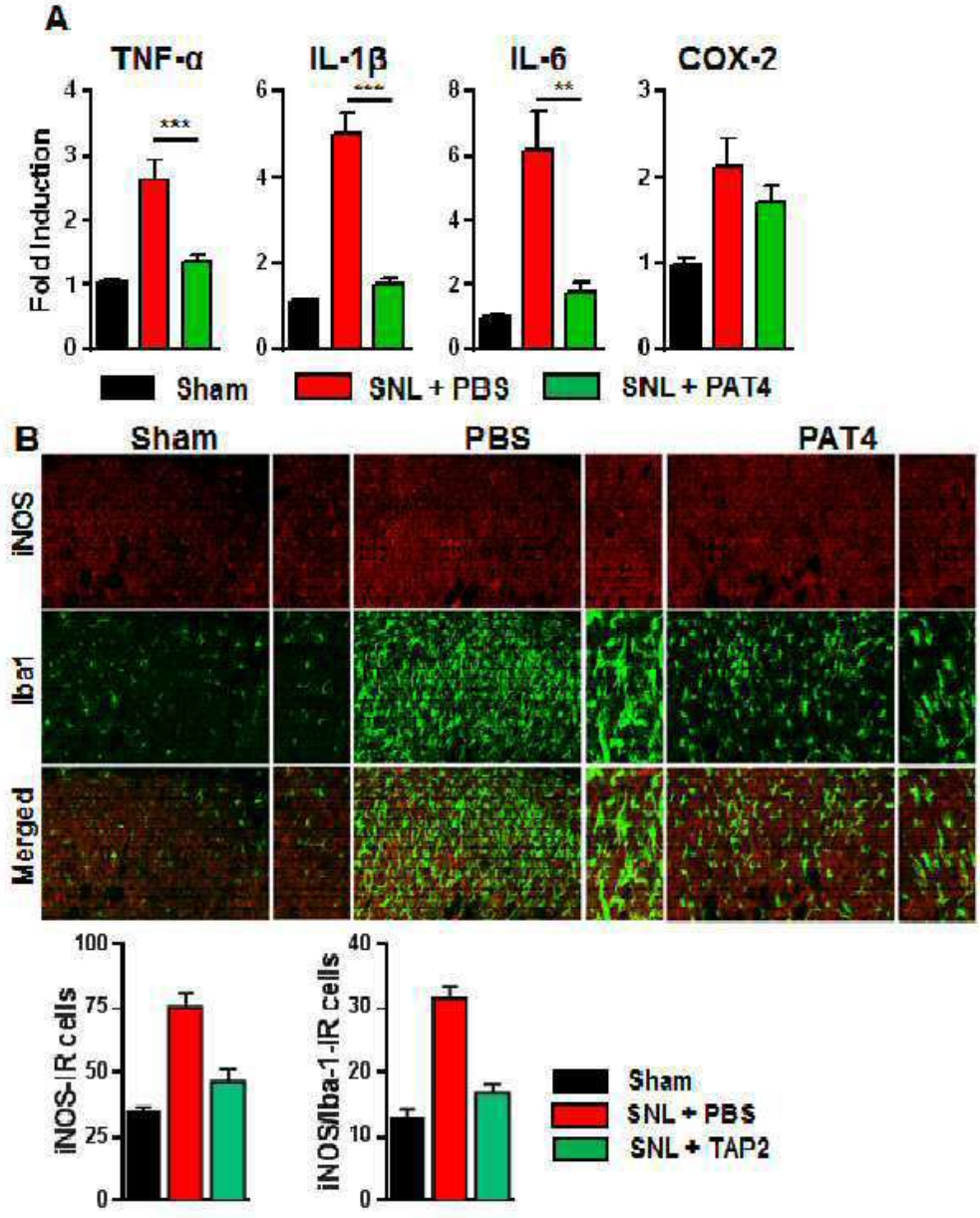
도면2


Contra
Ipsi
FITC-PAT4
Iba1
Merged
No. Iba-1/FITC-PAT-IR cells
Contra
Ipsi

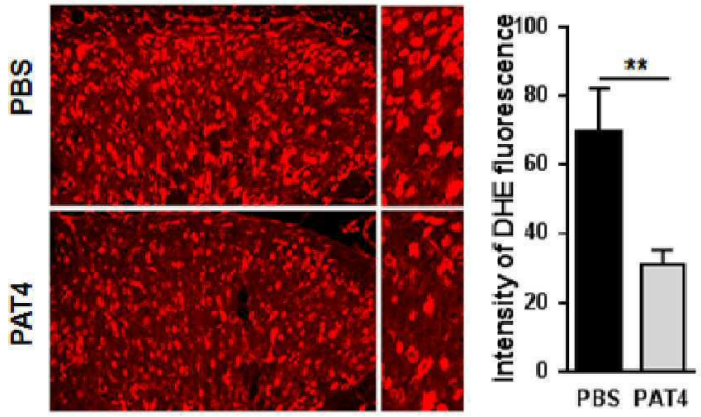
도면3


A
Mechanical threshold (g)
20
15
10
5
0
PBS (n=5)
Gabapentin (n=6)
PAT4 (n=6)
3 4 5 7 10 15 20 24
Days after SNL surgery
B
Contra
Ipsi
Sham
PBS
PAT4
Iba-1 Immunoreactivity
100
80
60
40
20
0
Sham PBS PAT4

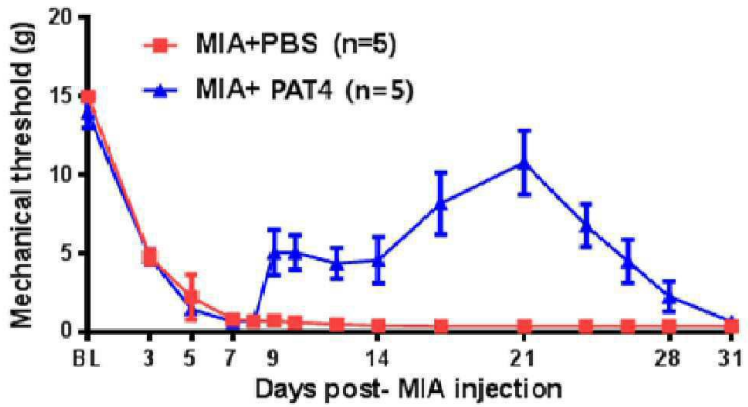
도면4


A
TNF-α
IL-1β
IL-6
COX-2
Fold Induction
***
***
**
Sham
SNL + PBS
SNL + PAT4
B
Sham
PBS
PAT4
iNOS
Iba1
Merged
iNOS-IR cells
iNOS/Iba-1-IR cells
Sham
SNL + PBS
SNL + TAP2

도면5



도면6



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Composition for prevention, improving or treatment of chronic pain comprising PAT4

<130> 1-69P

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAT4

<400> 1

Ala Met Ala Leu Asp Cys Phe Arg Trp Gly Trp Arg Met Trp Cys Ser

1 5 10 15