(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0150313
(43) 공개일자 2022년11월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/54 (2017.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 47/60 (2017.01) *A61K 47/69* (2017.01)
A61P 25/00 (2006.01) *C07K 7/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/542 (2017.08)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7031597
(22) 출원일자(국제) 2021년03월05일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년09월13일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/055678
(87) 국제공개번호 WO 2021/176094
국제공개일자 2021년09월10일
(30) 우선권주장
20161493.0 2020년03월06일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
유니버시티 오브 코펜하겐
덴마크, 디케이-1165 코펜하겐 케이, 뇌레가데 10
(72) 발명자
매드센 케네스 엘.
덴마크, 2830 비룸, 비룸바이 144
게테르 울릭
덴마크, 2920 샤를로텐룬, 호브마르크스바이 85
크리스텐센 니콜라이 리스
덴마크, 3450 알레뢰드, 샤엘소 알레 1에프
(74) 대리인
특허법인한얼

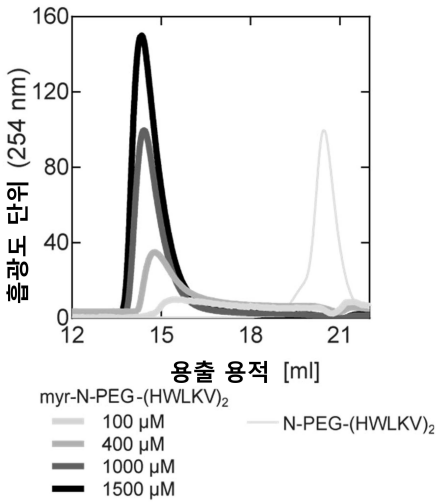
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **PICK1의 지질 접합 펩티드 억제제**

(57) 요 약

본 발명은, C 키나제-1과 상호작용하는 단백질(PICK1; Protein Interacting with C Kinase-1)과 결합하고, 이에 의해 PICK1을 억제하는, 지질 접합 2가 펩티드 리간드에 관한 것이다. 본 개시의 PICK1 억제제는 PICK1의 2개의 펩티드 리간드를 포함하는 펩티드 부분, 및 2개의 펩티드 리간드를 연결하는 링커 및 지질을 포함하는 비-펩티드 부분을 포함한다. 본 개시는 추가로, 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애의 치료를 위한 상기 PICK1 억제제의 치료적 및 진단적 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/60 (2017.08)
A61K 47/6907 (2017.08)
A61P 25/00 (2018.01)
C07K 7/06 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

펩티드 부분 및 비-펩티드 부분을 포함하는 PICK1 억제제로서,

상기 펩티드 부분은

a) 일반식 $X_1X_2X_3X_4X_5$의 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩티드; 및

b) 일반식 $X_1X_2X_3X_4X_5$의 아미노산 서열을 포함하는 제2 펩티드로 이루어지고;

여기서, X_1은 H, N, F 또는 T이거나, 부재하고;

X_2는 W, S, E 또는 Y이거나, 부재하고;

X_3은 L, V 또는 I이고;

X_4는 K, I 또는 R이고;

X_5는 V이고;

상기 비-펩티드 부분은

c) 제1 펩티드를 제2 펩티드에 연결하는 링커(linker), 및

d) 친유성 지방족 그룹(lipophilic aliphatic group)을 포함하는, PICK1 억제제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1 및/또는 제2 펩티드가 3 내지 5개 범위의 아미노산 잔기의 길이를 갖는, PICK1 억제제.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 및/또는 제2 펩티드가 HWLKV(서열번호 54), FEIRV(서열번호 34), NSIIV(서열번호 5), NSVRV(서열번호 8), NSLRV(서열번호 53), NSIRV(서열번호 6), NYIIV(서열번호 13), NYIRV(서열번호 14), TSIRV(서열번호 18), YIIV(서열번호 49), SVRV(서열번호 44), EIRV(서열번호 46), LRV, IIV, VRV 및 IRV로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, PICK1 억제제.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및/또는 제2 펩티드가 HWLKV(서열번호 54), NSVRV(서열번호 8), SVRV(서열번호 44) 및 LRV로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, PICK1 억제제.

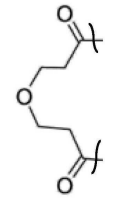
청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커는 NPEG 링커, 예컨대, 하나 이상의 골격 산소 원자가 질소 원자로 치환되어 있는 1 내지 24개 범위의 에틸렌 글리콜 모이어티(moiety), 예컨대, 하나 이상의 골격 산소 원자가 질소 원자로 치환되어 있는 1 내지 20개 범위, 예를 들면, 1 내지 16개 범위, 예컨대, 1 내지 14개 범위, 예를 들면, 1 내지 12개 범위, 예를 들면, 1 내지 10개 범위, 예컨대, 1 내지 8개 범위, 예를 들면, 1 내지 6개 범위, 예컨대, 1 내지 4개 범위, 예를 들면, 1 내지 2개 범위의 에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 NPEG 링커이고, 바람직하게는 NPEG-링커는 하나 이상의 골격 산소 원자가 질소 원자로 치환되어 있는 4개 에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는, PICK1 억제제.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커가 하기 화학식 III에 따른 구조를 갖는, PICK1 억제제:

화학식 III



.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 친유성 지방족 그룹이 지방족 쇄, 예컨대, 지방족 분지 쇄(aliphatic branched chain), 지방족 비분지 쇄, 포화 쇄 또는 불포화 쇄 또는 지방족 환, 예컨대, 고난(gonane) 또는 스테로이드, 바람직하게는 콜레스테롤인, PICK1 억제제.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 친유성 지방족 그룹이 C_4-C_{26} 지방산, 예컨대, C_{14}-C_{16} 지방산인, PICK1 억제제.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 친유성 지방족 그룹이 카프르산, 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 마가르산(magaric acid) 및 스테아르산으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, PICK1 억제제.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 친유성 지방족 그룹이 미리스트산인, PICK1 억제제.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-펩티드 부분이 하나의 아미노산, 예컨대, Asp, β-Asp, β-Ser, β-호모-Ser 및 β-Lys을 추가로 포함하는, PICK1 억제제.

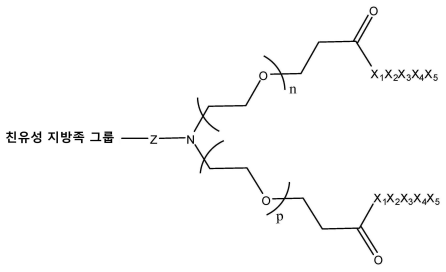
청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 검출가능한 모이어티를 추가로 포함하는, PICK1 억제제.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PICK1 억제제가 화학식 I의 일반 구조를 갖는, PICK1 억제제:

화학식 I



상기 화학식 I에서,

Z는 결합 또는 단일 아미노산이고;

n은 0 내지 12의 정수이고;

p는 0 내지 12의 정수이다.

청구항 14

a) 일반식 $X_1X_2X_3X_4X_5$(서열번호 1)의 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩티드;

b) 일반식 $X_1X_2X_3X_4X_5$(서열번호 1)의 아미노산 서열을 포함하는 제2 펩티드

(여기서, X_1은 H, N, F 또는 T이거나, 부재하고;

X_2는 W, S, E 또는 Y이거나, 부재하고;

X_3은 L, V 또는 I이고;

X_4는 K, I 또는 R이고;

X_5는 V이다);

c) 제1 펩티드를 제2 펩티드에 연결하는 링커, 및

d) 친유성 지방족 그룹을 포함하는, PICK1 억제제를 포함하는 미셀(micelle).

청구항 15

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 PICK1 억제제 또는 제14항에 따른 미셀을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 의약(medicament)으로서 사용하기 위한, PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 부적응 가소성(maladaptive plasticity)과 관련된 질환 또는 장애, 예컨대, 통증(pain), 약물 중독(drug addiction), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 간질(epilepsy), 이명(tinnitus), 편두통(migraine), 암(cancer), 허혈(ischemia), 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 및/또는 파킨슨병(Parkinson's disease)의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한, PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물,

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 통증이 기계적 또는 열적 이질통(allodynia) 또는 통각과민(hyperalgesia)이거나, 상기 통증이 염증성 통증(inflammatory pain)인, PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항 또는 제14항에 있어서, 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애의 진단에 사용하기 위한, PICK1 억제제 또는 미셀.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, C 키나제-1과 상호작용하는 단백질(PICK1; Protein Interacting with C Kinase-1)과 결합하고, 이에 의해 PICK1을 억제하는, 지질 접합 2가 펩티드 리간드에 관한 것이다. 본 발명은 추가로, 상기 PICK1 억제제의 치료적 및 진단적 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 시냅스 가소성은, 학습과 기억을 위한 분자 기질로서 기능한다. 글루타메이트성 시냅스에서 Glu의 방출은 특히 N-메틸-다스파르테이트 수용체(NMDAR)와 α-아미노-3-하이드록시-5-메틸-4-이속사졸-프로피온산 수용체(AMPAR)를 활성화하고, 둘 다는 리간드-게이트 이온-채널이다. 이러한 수용체의 활성화에 의해, AMPAR에서는 Na+가 유입하고, NMDAR에서는 Ca2+가 유입한다.

[0003] 뇌졸중 및 두부 손상 후의 허혈, 신경병성 통증 및 중독 등의 병적 상태에서, 비정상적 시냅스 자극은 부적응 가소성(maladaptive plasticity)을 유발하고, 이는 칼슘 투과성(CP) AMPA 유형 글루타메이트 수용체(CP-AMPAR)의 발현을 통해 글루타메이트성 시냅스의 과민화를 유발한다.

[0004] 다수의 질환 상태가 글루타메이트 시스템의 과활성화 또는 과민 반응을 포함하지만, 글루타메이트 시스템을 표적화하는 현재 사용되는 유일한 약물은 마취제로 사용되는 케타민 등의 NMDA 수용체 길항제이다. 약물을 표적화하는 신규한 글루타메이트 시스템의 개발은 심각한 부작용을 수반하는 일반적 문제로 인해 곤란한 것으로 증명되었다. 신경병성 통증, 허혈 후의 흥분독성 및 약물 중독 등의 질환은 현재 효과적 치료법이 없다. 따라서, 이들 질환의 치료가 필요하다.

[0005] C 키나제-1과 상호작용하는 단백질(PICK1)은 시냅스 가소성에서 중심적 역할을 하는 스캐폴딩 단백질을 포함하는 PDZ 도메인이다. PICK1은 주로 AMPAR의 트래피킹 제어를 통해 AMPAR 기능에 필수적이다. PICK1의 PDZ 도메인은 단백질 키나제 A 및 C뿐만 아니라 AMPA 수용체(AMPAR)의 GluA2 서브유닛의 C-말단과 직접 상호작용하고, 이에 의해 AMPAR 포스포릴화 및 표면 발현을 조절하고, 결국 개개 시냅스의 효능을 조정하여 시냅스 가소성을 조절한다. PICK1은 PDZ 도메인을 통해 단백질-단백질 상호작용(PPI)을 매개 및 촉진함으로써 주로 단백질 트래피킹 및 세포 이동의 조절에 관여하는 세포내 스캐폴드 단백질이다. PICK1의 세포에서의 역할의 핵심은 막 인지질뿐만 아니라 다양한 단백질 파트너를 포함하는 다수의 세포내 분자에 결합하여 상호작용하는 능력이다. PICK1은 기능적 이량체이고, 2개의 PDZ 도메인이 중앙 막 결합 BAR 도메인에 인접하고, 이는 이량체화를 매개한다.

[0006] 단백질-단백질 상호작용(PPI)은 대부분의 생화학적 및 세포 프로세스에 필수적이고, 종종 스캐폴드 및 신호 전달 복합체에 의해 매개된다. PPI의 인간 촉진제의 가장 풍부한 부류 중 하나는 시냅스후 밀도 단백질-95(PSD-95)/디스크-거대/ZO-1(PDZ) 도메인 패밀리이다. 시냅스후 밀도의 PICK1 등의 PDZ 도메인 단백질은 글루타메이트 수용체의 표면 발현 및 활성을 동적으로 조절하고, 따라서 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애의 치료를 위한 매력적 약물 표적을 나타낸다. 그러나, 이러한 표적에 대해 충분히 강력한 억제제를 개발하는 것은 곤란한 것으로 입증되었다.

[0007] PSD-95의 PDZ 도메인의 표적화는 2가 펩티드 리간드를 사용하여 성공적으로 시도되었다. PSD-95는 PDZ1 및 PDZ2를 포함하여 보다 많은 PDZ 도메인을 포함하고, 이는 리간드 선호도를 공유하여, 2가 리간드로 양쪽 PDZ 도메인을 표적화한다는 사고를 유도한다. 최초의 2가 억제제는 롱 등[참조: Long, et al. (2003)]에 의해 제안되었고, 이는 PSD-95 PDZ12에 대해 약간의 친화성만이 제공된다. 그 후, 더 성공적 2가 펩티드 리간드가 개발되었다[참조: Bach et al. 2009].

[0008] PSD-95를 표적화하는 이량체 펩티드 리간드는 지방산으로 관능화되었다. 이 변형은 PDZ 도메인에 대한 친화성에 영향을 미치지 않으면서 펩티드의 혈장 반감기 및 피하 안정성의 개선을 제공하는 것으로 밝혀졌다(WO 2015/078477).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 상기 기재된 바와 같이, 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애의 치료를 위한 PICK1-PDZ 도메인의 강력한 억제제를 제공할 필요성이 높다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 C 키나제-1과 상호작용하는 단백질(PICK1)에 대한 고친화성 펩티드 억제제를 제공한다. 본 발명자들은 놀랍게도 PICK1의 2가 펩티드 리간드에 지질을 부착시킴으로써 효능의 유의한 증가가 수득될 수 있음을 발견하였다. 이러한 효능 증가는 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애의 치료 개발에 필요한 PICK1-PDZ 도메인의 강력한 억제제를 제공하는 데 매우 중요하다. 이론에 얽매이지 않고, 본 개시의 지질 접합된 2가 펩티드 리간드의 효능의 증가는 미셀(micelle) 형성의 결과인 것으로 생각되고, 이는 결합시에 PICK1의 보다 높은 올리고머 작제물을 형성하고, 이에 의해 PICK1의 억제를 초래한다. 이러한 효능의 증가는 약동학을 개선하기 위해 현재

사용되는 지질 접합으로부터는 예측할 수 없다.

[0011] AMPA 수용체의 트래피킹을 담당하는 스캐폴딩 단백질 PICK1을 표적화함으로써, 수용체를 직접 표적화하는 경우와 비교하여, 화합물의 부작용 위험의 가능성이 감소한다. 본 개시의 화합물은 신경병성 통증, 허혈 후의 흥분독성 또는 약물 중독 등의 상태를 갖는 환자의 치료를 제공할 것이다.

[0012] 제1 태양에서, 본 개시는 펩티드 부분 및 비-펩티드 부분을 포함하는 PICK1 억제제를 제공하고, 상기 펩티드 부분은

[0013] a) 일반식 $X_1X_2X_3X_4X_5$의 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩티드; 및

[0014] b) 일반식 $X_1X_2X_3X_4X_5$의 아미노산 서열을 포함하는 제2 펩티드로 이루어지고;

[0015] 여기서, X_1은 H, N, F 또는 T이거나, 부재하고;

[0016] X_2는 W, S, E 또는 Y이거나, 부재하고;

[0017] X_3은 L, V 또는 I이고;

[0018] X_4는 K, I 또는 R이고;

[0019] X_5는 V이고;

[0020] 상기 비-펩티드 부분은

[0021] c) 제1 펩티드를 제2 펩티드에 연결하는 링커(linker), 및

[0022] d) 친유성 지방족 그룹(lipophilic aliphatic group)을 포함하는, PICK1 억제제를 제공한다.

[0023] 제2 태양에서, 본 개시는

[0024] a) 일반식 $X_1X_2X_3X_4X_5$의 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩티드;

[0025] b) 일반식 $X_1X_2X_3X_4X_5$의 아미노산 서열을 포함하는 제2 펩티드

[0026] (여기서, X_1은 H, N, F 또는 T이거나, 부재하고;

[0027] X_2는 W, S, E 또는 Y이거나, 부재하고;

[0028] X_3은 L, V 또는 I이고;

[0029] X_4는 K, I 또는 R이고;

[0030] X_5는 V이다)

[0031] c) 제1 펩티드를 제2 펩티드에 연결하는 링커, 및

[0032] d) 친유성 지방족 그룹을 포함하는, PICK1 억제제를 포함하는 미셀을 제공한다.

[0033] 추가 태양에서, 본 개시는 본 명세서에 개시된 PICK1 억제제 또는 미셀을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0034] 추가 태양에서, 본 명세서에 개시된 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물은 의약(medicament)으로서 사용하기 위해 제공된다.

[0035] 추가 태양에서, 본 개시는 대상체에서 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애의 예방 및/또는 치료를 제공하는 방법을 제공하고, 이 방법은 본 명세서에 개시된 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0036] 추가 태양에서, 유방암의 진단을 필요로 하는 대상체에서 유방암을 진단하는 방법이 제공되고, 이 방법은

[0037] a. 상기 대상체로부터 조직 샘플을 수득하는 단계;

[0038] b. 본 명세서에 개시된 검출가능한 모이어티(moiety)를 포함하는 PICK1 억제제로 샘플을 염색하는 단계;

[0039] c. 샘플 중의 PICK1의 수준을 결정하는 단계; 및

[0040] d. 샘플 중의 PICK1 수준을 건강한 기준과 비교하는 단계를 포함하고,

[0041] 여기서, 샘플 중의 PICK1 수준의 증가는 상기 대상체가 유방암을 갖는 것을 나타낸다.

[0042] 추가 태양에서, 유방암을 앓고 있는 대상체에 대한 예후를 예측하는 방법이 제공되고, 상기 방법은

[0043] a. 상기 대상체로부터 조직 샘플을 수득하는 단계;

[0044] b. 본 명세서에 개시된 검출가능한 모이어티를 포함하는 PICK1 억제제로 샘플을 염색하는 단계;

[0045] c. 샘플 중의 PICK1의 수준을 결정하는 단계; 및

[0046] d. 샘플 중의 PICK1 수준을 건강한 기준과 비교하는 단계를 포함하고,

[0047] 여기서, 샘플 중의 PICK1 수준의 증가는 불량한 예후를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0048] **도 1**: 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 제시된 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 농도 의존적 자가-조립. 제어에 사용되는 NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$.

도 2: a) myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 일련의 농도를 사용한 소각(small angle) X선 산란 분석에 의해, myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 미셀 구조로의 자가 조립이 확인된다. b) 상이한 농도의 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$에 대한 쌍 거리 분포 함수(PDDF). c) PDDF 유래 샘플 파라미터. M_w/M_{wteo}는 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$가 5-8개 개별 분자의 범위에서 고차 조립되어 있는 것을 시사한다.

도 3: PICK1에 대한 올리고머 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 결합. 트레이서로서 5FAM-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$(5nM 대 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$) 또는 5FAM-HWLKV(20nM 대 HWLKV)를 사용하여, myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$(Ki,app = 3.0nM, SEM 간격 [2.3-3.8]nM, n = 6), HWLKV(Ki, app = 6998nM, SEM 간격 [4972-9849]nM, n = 3) 및 NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$(Ki,app = 179nM, SEM 간격 [169-189], n = 6)의 형광 편광 경쟁 결합 곡선, (오차 막대는 n = 3의 SEM으로 표시된다).

도 4: myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 부재(회색) 또는 존재(흑색)하에 각각 4:1의 PICK1:myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$ 분자 비율에서 PICK1의 SEC 용출 프로파일. 용출 프로파일은 고차 올리고머의 형성을 명확하게 나타낸다.

도 5: 결합 친화성에 대한 DAT C5(HWLKV)의 단일 아미노산 치환의 효과. 서열 HWLKV의 X_1 내지 X_5 위치에 단일 아미노산 치환을 갖는 95개 HWLKV 펩티드의 라이브러리를 형광 표지된 HWLKV와 경쟁하는 형광 편광 결합에서 시험했다. 데이터는 참조 펩티드 HWLKV(1로 설정)와 비교하여 배수 변화로 제공되고, 어두운 음영은 친화성의 증가(최대 3배)를 나타내고, 밝은 음영은 친화성의 감소를 나타낸다. 백색은 결합의 붕괴를 나타내고, 십자는 불용성 펩티드를 나타낸다. %로 표시된 펩티드는 완충액에 용해되지 않았고, 10% DMSO에 용해되었다.

도 6: 이전 단일 치환 스크린으로부터 단일 아미노산 치환을 조합하는 조합 펩티드 라이브러리의 FP 경쟁을 사용하여 측정된 친화성 변화의 배수. 스크린은 최적 5-mer 서열로서 NSVRV/TSIRV, 최적의 4-mer 서열로서 EIRV/YIIV, 최적의 3-mer 서열로서 IIV/IRV를 시사한다. 이러한 서열은 초기 5-mer 서열인 HWLKV로부터 예측할 수 없었다. x는 불용성 또는 비결합성 펩티드를 나타낸다.

도 7: 지질-잔기를 갖지 않지만, HWLKV의 N-말단 아민(PEG$_0$-(C5)$_2$, PEG$_1$-(C5)$_2$, PEG$_2$-(C5)$_2$, PEG$_3$-(C5)$_2$, PEG$_4$-(C5)$_2$)에 연결되거나, 또는 서열 HWLKV의 리신(K) 측쇄 아민(ac-(HWLK$_{PEG4}$V)$_2$에 연결된 상이한 PEGx 링커를 갖는 시험된 2가 PICK1 억제제의 화학 구조.

도 8: 정제된 PICK1에 대한 다양한 PEG 링커 화합물에 대하여, 단량체 C5(HWLKV) 펩티드에 대한 배수 친화성 증가

도 9a-c: **a)** 급성 염증성 통증에 대한 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 효능. myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$가 염증성 통증의 완전 프로인트 애주번트 모델에서 유발된 통증을 복수의 투여 경로에서 완화하는 능력을 보여주는 생체내 실험. **a)** 피

하 투여, b) 피하 투여, 2, 10 및 50㎛ol/kg의 용량 반응, c) 족저내 투여. 점선 곡선은 동물의 내부 대조군으로 사용되는 반대측 좌측 뒷발의 데이터를 나타낸다. 모든 데이터는 평균 ±SEM으로 표시된다. 약어; adm.. = 투여, BL = 기준선, CFA = 완전 프로인트 애주번트, i.pl. = 족저내, i.t. = 척추강내, s.c. = 피하.

도 10: 신경병성 통증에 대한 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 효능. myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$가 통증의 신경병성 SNI 모델에서 유발된 통증을 완화하는 능력을 보여주는 생체내 실험. 점선 곡선은 동물의 내부 대조군으로 사용되는 반대측 좌측 뒷발의 데이터를 나타낸다. 모든 데이터는 평균 ±SEM으로 표시된다. 약어; PWT = 발 움츠림 역치, SNI = 신경 손상을 회피했다.

도 11: 마우스에게 SNI 수술을 실시하고, 수술 후 9일차에, 신경병성 통증 상태에 해당하는, 동측 뒷발의 폰 프레이 필라멘트에 대한 역치 반응의 감소가 폰 프레이 필라멘트에 의해 확인되었다. 9일차에, 마우스는 지질화 없이 10㎛ol/kg의 $NPEG_4$-$(HWLKV)_2$(회색)로 처리했고, 이는 통증 움츠림 역치의 유의한 증가를 유발하지 않았다. 비교를 위해, 도 10의 10㎛ol/kg myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$에 대한 반응이 도시된다(흑색 점선). 모든 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다. 약어; PWT = 발 움츠림 역치, SNI = 신경 손상을 회피했다.

도 12: 1년간의 만성 통증 후 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 효과. 마우스에게 SNI 수술을 실시하고, 수술 2일 후에, 동측 뒷발의 폰 프레이 필라멘트에 대한 역치 반응의 감소가 1년 동안 월 1회 관찰된 폰 프레이 필라멘트에 의해 확인되었다(데이터는 도시되지 않음). 52주 후, 마우스를 10㎛ol/kg의 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$로 처리했고, 이는 5시간에서 PWT가 대폭 감소했다. 모든 데이터는 평균 ±SEM으로 표시된다. 약어; PWT = 발 움츠림 역치, SNI = 신경 손상을 회피했다.

도 13: myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$ 당뇨병성 신경병의 효능. 마우스에게 당뇨병을 유발하기 위해 200㎍/mL 스트렙토조신 용액을 단일 IP 주사로 제공하고(STZ 모델), 주사 전 및 주사 7일 후에 혈당을 시험했다. 수술 13일 후, 당뇨병성 신경병에 해당하는, 동측 뒷발의 폰 프레이 필라멘트에 대한 역치 반응의 감소가 폰 프레이 필라멘트에 의해 확인되었다. S.C. myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 주사는 프레가발린과 유사한 효능으로 PWT의 용량 의존적 증가를 입증했다. 모든 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다. 약어; PWT = 발 움츠림 역치, STZ = 스트렙토조신.

도 14: PDZ 결합 모티프의 변이체의 효능. 마우스에게 50㎕L의 CFA로 우측 뒷발에 i.pl로 주사했다. CFA 주사 후 2일차에, 마우스에게 0.4㎛ol/kg 및 5일차에는 C5 서열 치환을 갖는 2㎛ol/kg의 myr-$NPEG_4$ 펩티드를 사용하여 지시된 바와 같이 피하 주사했다. 0.4㎛ol/kg의 myr-$NPEG_4$-$(NSVRV)_2$에 의한 처리는 PWT를 유의하게 증가시킨 반면, 2㎛ol/kg의 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$ 및 myr-$NPEG_4$-$(SVRV)_2$는 PWT를 유의하게 증가시켰다. 2㎛ol/kg에서, myr-$NPEG_4$-$(NSVRV)_2$는 충분히 용해되지 않았다. 모든 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다. 약어; PWT = 발 움츠림 역치, CFA = 완전한 프로인트 애주번트.

도 15: 자발적 통증의 경감에서 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 효능. 마우스에게, 줄무늬 챔버에 생리식염수 및 좌측에 표시된 장치의 회색 챔버에 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$(30㎛ol/kg)를 단일 주입하기 전에, 50㎕L의 CFA를 우측 뒷발에 i.pl. 주사했다. 별도의 날에, 챔버에 대한 선호도는 각 챔버에서 경과한 시간에 따라 결정되었다. CFA를 주사한 마우스는, 자발적 통증의 경감을 입증하는 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$를 주사한 챔버에서 경과한 시간이 대폭 증가했다. 나이브 마우스(CFA로 처리되지 않음)는 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 단일 투여에 대한 장소 선호도를 나타내지 않았다.

도 16: myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 용량 의존적 혈장 노출. myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$를 지시된 바와 같이 3개의 상이한 용량으로 마우스에게 피하 투여하고, 상이한 시간에서 혈장 노출을 LC-MS에 의해 측정했다. 혈장 농도는, 주사 후 1시간에서 용량 의존적 방식으로 피크에 도달하고, 선형 속도로 감소하지만, 비-지질화 펩티드 Tat-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$와 비교하여 수명의 증가는 나타나지 않는다.

도 17: myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 용해도. 130mM(250mg/ml)에서 PBS에 용해된 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 사진.

도 18: 염증성 통증의 동물 모델에서 본 발명의 상이한 화합물의 효능 시험의 결과. 마우스에게 50㎕L의 CFA를 우측 뒷발에 i.pl 주사했다. CFA 주사 후 2-5일차에, 마우스에게, 지시된 바와 같이 지질 대체물(X)을 지시된 바와 같이 피하 주사했다. 모든 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다. 약어; PWT = 뒷발 움츠림 역치, CFA = 완

전 프로인트 애주번트.

A: 불포화 지방산 및 지방산 이산.

B: 지방산 길이.

C: 아미노산 부가물 및 콜레스테롤.

도 19: 열 과민증에 대한 mPD5의 효능. 마우스에게 50 μL의 CFA를 우측 뒷발에 i.pl 주사했다. CFA 주사 후 3일차에, 하그레브(Hargreaves) 시험에서 레이저 빔을 사용한 자극에 대한 PWL의 감소에 의해 열 과민증이 확인되었다. 마우스를 10 μmol/kg(10 μl PBS/g)의 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$(mPD5)를 피하 주사하여, 건강한(반대측) 발의 PWL에 영향을 미치지 않으면서 CFA 주사된 발(ipsi)에서 PWL의 유의한 증가를 생성한다. PBS 주사는 어느 쪽 발에서도 PWL에 영향을 미치지 않았다. n = 6마리 마우스/그룹. 모든 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다. 약어; PWT= 발 움츠림 잠복기, CFA = 완전한 프로인트 애주번트.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] **정의**

[0050] 본 명세서에서 **비-펩티드**는 펩티드를 포함하지 않는 PICK1 억제제의 부분을 지칭한다. 펩티드는 아미드 결합(들)을 통해 연결된 2개 이상의 α- 또는 β-아미노산을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 비-펩티드는 아미드 결합(들)을 통해 연결된 2개 이상의 α- 또는 β-아미노산을 포함하지 않는 화합물을 지칭한다. 비-펩티드 부분은 단일 아미노산을 포함할 수 있다.

[0051] 본 명세서에서 **친유성 지방족 그룹**은 친유성을 갖는 지방족 그룹을 지칭한다. 이는 지방족 쇄 또는 지방족 환을 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 **지질**은 이러한 친유성 지방족 그룹을 지칭한다. 친유성 지방족 그룹은 관능기를 포함할 수 있고, 이는 친유성 지방족 그룹을, 예를 들면, NPEG 링커에 부착시켜 본 개시의 PICK1 억제제를 형성하기 위해 사용될 수 있다. 친유성 지방족 그룹의 예에는 지방산, 고난(gonane), 스테롤 및 스테로이드가 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0052] 본 명세서에서 **2가**는 PICK1 등의 단백질에 배위(결합 등)할 수 있는 2개의 펩티드 리간드를 포함하는 것 등의 배위를 위한 2개 부위를 포함하는 화합물을 지칭한다. 본 명세서에 언급된 2가 펩티드 리간드는 펩티드의 이량체를 형성하기 위해 링커를 통해 접합된 2개의 펩티드 리간드를 포함하는 화합물일 수 있다. 따라서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 2가 펩티드 리간드는 또한 이량체 펩티드 리간드로 지칭될 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 **관능기**는 화합물에 존재하는 화학 그룹을 지칭한다. 관능기는 친핵체 또는 친전자체 등의 반응성을 포함하고, 상기 화합물을 다른 화합물에 접합하기 위해 사용될 수 있다. 관능기의 예에는 카복실산, 알코올 및 아민이 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0054] 본 명세서에서 **미셀 구조 또는 미셀**은 PICK1 억제제의 배열을 지칭한다. 이 용어가 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 미셀은 비극성 테일이 내측으로 향하고 극성 테일이 외측으로 향하는 수용액 중의 배열을 갖는다(실시예 3).

[0055] 본 명세서에서 **회전 반경(R_g)**은 상기 물체의 회전 축으로부터 물체의 다양한 입자의 제곱 평균 제곱근 거리를 지칭한다. 따라서, 회전 반경은 상기 물체의 크기의 척도이다.

[0056] 본 명세서에서 **검출가능한 모이어티**는 검출가능한 신호를 유발하는 모이어티를 지칭한다. 형광단, 발색단, 방사성 동위원소 또는 효소 등의 검출을 위해 당업자에게 공지된 종래의 모이어티가 사용될 수 있다.

[0057] 단백질원성인 **아미노산**은 IUPAC의 권장 사항에 따라 1문자 또는 3문자 코드를 사용하여 본 명세서에서 명명된다(참조, 예를 들면, http://www. chem.qmw.ac.uk/iupac). 달리 명시되지 않은 경우, 아미노산은 D 또는 L 형태일 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 본 개시의 아미노산은 L-아미노산이다.

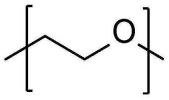
[0058] 본 명세서에서 **α-카복실산**은 아미노산의 α-탄소에 접합된 카복실산을 지칭한다.

[0059] 본 명세서에서 **α-아민**은 α-아미노산의 α-탄소에 접합된 아민을 지칭한다.

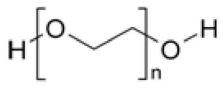
[0060] 본 명세서에서 **β-아민**은 β-아미노산의 β-탄소에 접합된 아민을 지칭한다.

[0061] 본 명세서에서 **에틸렌 글리콜 모이어티**는 PEG 또는 NPEG 링커를 구성하는 구조 단위를 지칭한다. '에틸렌 글리

콜 모이어티'의 보다 기술적 명칭은 '옥시에틸렌'이고, 단위의 화학식은 본 명세서에서 다음과 같다:

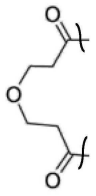
[0062] 

[0063] **PEG**, 폴리에틸렌 글리콜; PEG는 화학식 $C_{2n+2}H_{4n+6}O_{n+2}$ 및 반복 구조:

[0064]  를 갖는 에틸렌 글리콜의 중합체이고,

[0065] 여기서, PEG_x는 x개의 반복 에틸렌 글리콜 단위를 갖는 PEG 링커를 지칭하고, 예를 들면, PEG_4는 4개의 에틸렌 글리콜 모이어티(x=4)의 중합체에 상응한다. PEG_0은 x=0을 갖는 링커를 지칭하고, 각각의 프로피온산 모이어티의 C3 탄소를 통해 에테르 결합에 의해 공유 결합된 2개의 프로피온산을 포함하는 링커를 지칭한다. 이러한 구조는 본 명세서에서 PEG_0(도 7)으로 지칭되고, 하기 화학식 III에 따른 구조를 갖는다:

[0066] [화학식 III]

[0067] 

[0068] **NPEG**는 본 명세서에 기재된 링커 유형이고, 이는 고전적 PEG 링커로부터 유래하고, 하나 이상의 골격 산소 원자가 질소 원자로 치환되어 있다. $NPEG_x$는 x개의 반복 에틸렌 글리콜 단위를 갖는 NPEG 링커를 지칭하고, 예를 들면, $NPEG_4$는 4개의 에틸렌 글리콜 모이어티(x=4)의 중합체에 상응하고, 여기서 하나 이상의 골격 산소 원자는 질소 원자로 치환되어 있다. $NPEG_0$은 상기 정의된 x=0을 갖는 링커를 지칭하고, 여기서 에테르는 아민으로 치환된다.

[0069] **PDZ**, 도메인을 공유하는 것으로 발견된 최초 3개 단백질의 두문자를 조합한 두문어, 시냅스후 밀도 단백질-95(PSD-95), 드로소필라 상동체 디스크 거대 종양 억제인자(DlgA) 및 조눌라 옥클루덴스(Zonula occludens)-1 단백질(zo-1). PDZ 도메인은 신호 전달 단백질에서 발견되는 80-90개 아미노산의 일반적 구조 도메인이다. PDZ 도메인을 포함하는 단백질은 막 내의 수용체 단백질을 세포골격 성분에 고정할 때에 중요한 역할을 한다.

[0070] **아미드 결합**은 카복실산과 아민 사이의 반응에 의해 형성된다(부수하는 물의 제거에 의해). 반응이 2개의 아미노산 잔기 사이에 일어나는 경우, 반응의 결과로서 형성되는 결합은 펩티드 연결(펩티드 결합)이라고 한다.

[0071] **에스테르 결합**은 카복실산과 알코올 사이의 반응에 의해 형성된다(부수하는 물의 제거에 의해).

[0072] **폰 프레이 시험**, 폰 프레이 필라멘트로 터치 감도를 평가한다. 이 필라멘트는 마우스가 천공된 바닥을 갖는 제한된 영역 내에서 쾌적한 위치에 정착한 후, 발의 하측에 적용된다. 필라멘트는 설정된 힘이 발에 적용될 때에 굴곡되도록 조정된다. 발 움츠림이 검출될 때까지, 필라멘트는 강성이 높은 순서로 제시된다.

[0073] **부재**는 부재 아미노산에 직접 인접한 아미노산 잔기가 종래의 아미드 결합에 의해 서로 직접 연결되는 것으로 이해되어야 한다.

[0074] **AMPAR**은 AMPA 수용체, AMPA 유형 글루타메이트 수용체, 또는 α-아미노-3-하이드록시-5-메틸-4-이속사졸프로피온(AMPA) 산 수용체로도 지칭될 수 있고, 중추신경계(CNS)의 고속 시냅스 전달을 매개하는 글루탐산의 이온트로픽 막관통 수용체이다. PICK1은 PDZ 도메인을 통해 AMPAR과 상호작용한다.

[0075] **2가 PICK1 억제제의 화학 구조**

[0076] 본 개시는 PICK1에 결합할 수 있는 2가 펩티드 리간드를 포함하는 PICK1 억제제를 제공하고, 2가 펩티드 리간드는 지질에 추가로 접합된다. 지질 접합된 2가 펩티드 리간드는 매우 강력한 PICK 억제제를 제공하고, 이는 부적

응 가소성과 관련된 질환 또는 장애의 치료에 사용될 수 있다.

[0077] 일 실시형태에서, 펩티드 부분 및 비-펩티드 부분을 포함하는 PICK1 억제제가 제공되고, 상기 펩티드 부분은

[0078] a) 일반식 $X_1X_2X_3X_4X_5$의 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩티드; 및

[0079] b) 일반식 $X_1X_2X_3X_4X_5$의 아미노산 서열을 포함하는 제2 펩티드로 이루어지고;

[0080] 여기서,

[0081] X_1은 H, N, F 또는 T이거나, 부재하고;

[0082] X_2는 W, S, E 또는 Y이거나, 부재하고;

[0083] X_3은 L, V 또는 I이고;

[0084] X_4는 K, I 또는 R이고;

[0085] X_5는 V이고;

[0086] 상기 비-펩티드 부분은

[0087] c) 제1 펩티드를 제2 펩티드에 연결하는 링커, 및

[0088] d) 친유성 지방족 그룹을 포함한다.

[0089] 일 실시형태에서, 펩티드 부분 및 비-펩티드 부분을 포함하는 PICK1 억제제가 제공되고, 상기 펩티드 부분은

[0090] a) 일반식 $X_1X_2X_3X_4X_5$의 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩티드; 및

[0091] b) 일반식 $X_1X_2X_3X_4X_5$의 아미노산 서열을 포함하는 제2 펩티드로 이루어지고;

[0092] 여기서,

[0093] X_1은 H, N, F 또는 T이거나, 부재하고;

[0094] X_2는 W, S, E 또는 Y이거나; 부재하고;

[0095] X_3은 L, V 또는 I이고;

[0096] X_4는 K, I 또는 R이고;

[0097] X_5는 V이고;

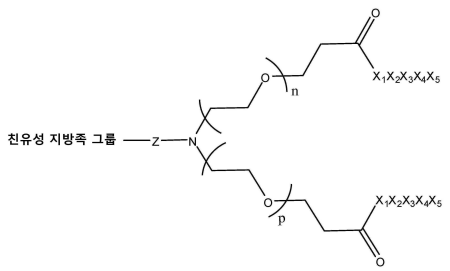
[0098] 상기 비-펩티드 부분은

[0099] c) 제1 펩티드를 제2 펩티드에 연결하는 링커, 및

[0100] d) 친유성 지방족 그룹을 포함한다.

[0101] 일 실시형태에서, PICK1 억제제는 하기 화학식 I의 일반 구조를 갖는다:

[0102] [화학식 I]

[0103] 

[0104] 상기 화학식 1에서,

[0105] Z는 결합 또는 단일 아미노산이고;

[0106] n은 0 내지 12의 정수이고;

[0107] p는 0 내지 12의 정수이다.

[0108] *펩티드 부분*

[0109] 본 개시의 PICK1 억제제의 펩티드 리간드 부분은 PICK1의 PDZ-도메인에 대한 PICK1 억제제의 결합을 제공한다. 본 개시의 PICK1 억제제의 펩티드 부분은 제1 및 제2 펩티드를 포함한다. 일 실시형태에서, 제1 및 제2 펩티드는 동일하다. 별도의 실시형태에서, 제1 및 제2 펩티드는 서로 상이하다. 일 실시형태에서, 제1 및 제2 펩티드는, 예를 들면, 2가 펩티드 리간드를 형성하기 위해 링커를 통해 연결된다.

[0110] 일 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 펩티드는 HWLKV(서열번호 54), FEIRV(서열번호 34), NSIIV(서열번호 5), NSVRV(서열번호 8), NSLRV(서열번호 53), NSIRV(서열번호 6), NYIIV(서열번호 13), NYIRV(서열번호 14), TSIRV(서열번호 18), YIIV(서열번호 49), SVRV(서열번호 44), EIRV(서열번호 46), LRV, IIV, VRV 및 IRV로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0111] 일 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 펩티드는 HWLKV, NSVRV, NSLRV, NSIRV, TSIRV, EIRV, YIIV, IIV, VRV 및 IRV로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0112] 일 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 펩티드는 NSVRV, NSLRV, NSIRV, TSIRV, EIRV, YIIV, IIV, VRV 및 IRV로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0113] 일 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 펩티드는 HWLKV, FEIRV, NSIIV, NSVRV, NSLRV, NSIRV, YIIV, SVRV, VRV 및 LRV로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0114] 일 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 펩티드는 FEIRV, NSIIV, NSVRV, NSLRV, NSIRV, YIIV, SVRV, VRV 및 LRV로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0115] 일 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 펩티드는 HWLKV, NSVRV 또는 NSIRV이다.

[0116] 일 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 펩티드는 HWLKV이다.

[0117] 일 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 펩티드는 일반식 $X_1X_2X_3X_4X_5$의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서,

[0118] X_1은 N, F 또는 T이거나, 부재하고;

[0119] X_2는 S, E 또는 Y이거나, 부재하고;

[0120] X_3은 V, L 또는 I이고;

[0121] X_4는 I 또는 R이고;

[0122] X_5는 V이다.

[0123] 일 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 펩티드는 일반식 $X_1X_2X_3X_4X_5$의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서,

[0124] X_1은 N 또는 T이거나, 부재하고;

[0125] X_2는 S, E 또는 Y이거나; 부재하고;

[0126] X_3은 V, L 또는 I이고;

[0127] X_4는 I 또는 R이고;

[0128] X_5는 V이다.

[0129] 일 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 펩티드는 일반식 $X_1X_2X_3X_4X_5$의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서,

[0130] X_1은 N 또는 F이거나, 부재하고;

[0131] X_2는 S, E 또는 Y이거나; 부재하고;

[0132] X_3은 V, L 또는 I이고;

[0133] X_4는 I 또는 R이고;

[0134] X_5는 V이다.

[0135] 일 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 펩티드는 3 내지 15개 범위의 아미노산, 예컨대, 3 내지 14개 범위의 아미노산, 예를 들면, 3 내지 13개 범위의 아미노산, 예컨대, 3 내지 12개 범위의 아미노산, 예를 들면, 3 내지 11개 범위의 아미노산, 예컨대, 3 내지 10개 범위의 아미노산, 예를 들면, 3 내지 9개 범위의 아미노산, 예컨대, 3 내지 8개 범위의 아미노산, 예를 들면, 3 내지 7개 범위의 아미노산, 예컨대, 3 내지 6개 범위의 아미노산, 예를 들면, 3 내지 5개 범위의 아미노산 길이를 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0136] 바람직한 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 펩티드는 3 내지 5개 범위의 아미노산 길이, 예컨대, 3개 아미노산 길이, 예컨대, 4개 아미노산 길이, 예를 들면, 5개의 아미노산 길이를 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0137] 본 개시의 실시예 12 및 도 14에서 입증된 바와 같이, 5, 4 또는 3개의 아미노산 길이를 갖는 제1 및 제2 펩티드로 이루어진 펩티드 부분을 포함하는 PICK1 억제제는 염증성 통증 완화 등의 통증 완화 효능을 입증한다.

[0138] 본 개시의 제1 및/또는 제2 펩티드의 서열을 포함하는 더 긴 펩티드에 대해, PICK1에 대한 유사 또는 더 높은 친화성이 이전에 입증되었다(WO 2020/083905).

[0139] *비-펩티드 부분*

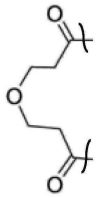
[0140] 본 개시의 PICK1 억제제는 비-펩티드 부분을 포함한다. PICK1 억제제의 비-펩티드 부분은, 예를 들면, 제1 및 제2 펩티드를 조합하여 2가 펩티드 리간드를 형성하는 링커를 포함한다. 비-펩티드 부분은 상기 링커에 접합될 수 있는 지질을 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 지질은 링커의 질소 원자에 직접 연결된다.

[0141] 별도의 실시형태에서, 비-펩티드 부분은 단일 아미노산을 추가로 포함한다. 상기 정의된 바와 같이, 비-펩티드 부분에 단일 아미노산이 존재하여도, 펩티드가 비-펩티드 부분에 도입되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 상기 정의된 바와 같이, 펩티드는 아미드 결합을 통해 연결된 2개 이상의 α- 또는 β-아미노산을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 단일 아미노산의 존재는 정의된 바와 같은 펩티드를 도입하지 않는다. 일 실시형태에서, 비-펩티드 부분에 존재하는 단일 아미노산은 검출가능한 모이어티의 부착을 위한 핸들을 제공하도록 기능한다.

[0142] *링커*

[0143] 일 실시형태에서, 링커는 NPEG 링커이다. NPEG 링커는, 하나 이상의 골격 산소 원자가 질소 원자로 치환되어 있는 0 내지 24개 범위의 에틸렌 글리콜 모이어티, 예컨대, 하나 이상의 골격 산소 원자가 질소 원자로 치환되어 있는 0 내지 20개 범위, 예를 들면, 0 내지 16개 범위, 예컨대, 0 내지 14개 범위, 예를 들면, 0 내지 12개 범위, 예를 들면, 0 내지 10개 범위, 예컨대, 0 내지 8개 범위, 예를 들면, 0 내지 6개 범위, 예컨대, 0 내지 4개 범위, 예를 들면, 0 내지 2개 범위의 에틸렌 글리콜 모이어티를 포함할 수 있다. 바람직하게는, NPEG-링커는 하나 이상의 골격 산소 원자가 질소 원자로 치환되어 있는 4개의 에틸렌 글리콜 모이어티를 포함한다. 일 실시형태에서, NPEG-링커는 하나 이상의 골격 산소 원자가 질소 원자로 치환되어 있는 3개의 에틸렌 글리콜 모이어티를 포함한다. 일 실시형태에서, NPEG-링커는 하나 이상의 골격 산소 원자가 질소 원자로 치환되어 있는 2개의 에틸렌 글리콜 모이어티를 포함한다. 일 실시형태에서, NPEG-링커는 하나 이상의 골격 산소 원자가 질소 원자로 치환되어 있는 1개의 에틸렌 글리콜 모이어티를 포함한다. 일 실시형태에서, NPEG-링커는 하나 이상의 골격 산소 원자가 질소 원자로 치환되어 있는 0개의 에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하고, 즉 링커는 산소 원자가 질소로 치환된 도 7에 개시된 바와 같은 PEG_0의 구조를 갖는다. 상기 정의된 바와 같이, $NPEG_0$ 링커는 x=0을 갖는 링커를 지칭하고, 각각의 프로피온산 모이어티의 C3 탄소를 통해 아민 결합으로 결합된 2개의 프로피온산 모이어티를 포함하는 링커를 지칭한다. 일 실시형태에서, 링커는 화학식 III에 따른 구조를 갖는다:

[0144] 화학식 III

[0145]  .

[0146] 일 실시형태에서, 링커는 NPEG 링커이다. NPEG 링커는 하나 이상의 골격 산소 원자가 질소 원자로 치환되어 있는 1 내지 24개 범위의 에틸렌 글리콜 모이어티, 예컨대, 하나 이상의 골격 산소 원자가 질소 원자로 치환되어 있는 1 내지 20개 범위, 예를 들면, 1 내지 16개 범위, 예컨대, 1 내지 14개 범위, 예를 들면, 1 내지 12개 범위, 예를 들면, 1 내지 10개 범위, 예컨대, 1 내지 8개 범위, 예를 들면, 1 내지 6개 범위, 예컨대, 1 내지 4개 범위, 예를 들면, 1 내지 2개 범위의 에틸렌 글리콜 모이어티를 포함할 수 있다.

[0147] NPEG 링커의 하나 이상의 질소 원자는 NPEG 링커를 따라 임의의 위치, 예를 들면, NPEG 링커의 중앙에 위치하거나, 또는 NPEG 링커의 한쪽 말단을 향해 위치하는 것과 같이 위치할 수 있다.

[0148] 일 실시형태에서, NPEG-링커의 하나의 골격 산소는 질소 원자로 치환된다.

[0149] NPEG 링커는 제1 및 제2 펩티드에 대한 접합을 제공하기 위해 각 말단에 관능기를 포함한다. 일 실시형태에서, NPEG 링커는 각 말단에 카복실산을 포함한다. NPEG 링커의 카복실산은 제1 및 제2 펩티드의 N-말단에 결합되어 아미드 결합을 통해 링커를 제1 및 제2 펩티드에 접합시킬 수 있다.

[0150] *친유성 지방족 그룹*

[0151] 본 개시의 PICK1 억제제의 비-펩티드 부분은 지질을 포함한다. 지질은 링커에 직접 접합될 수 있거나, 단일 아미노산을 통해 링커에 접합될 수 있다.

[0152] 본 개시의 지질은 친유성 지방족 그룹이다. 본 발명의 PICK1 억제제의 비-펩티드 부분에 존재하는 친유성 지방족 그룹은 지방족 쇄 또는 지방족 환일 수 있다.

[0153] 일 실시형태에서, 친유성 지방족 그룹은 지방족 쇄이다. 지방족 쇄는 분지형 또는 비분지형 쇄일 수 있다. 지방족 쇄는 포화 또는 불포화 쇄일 수 있다.

[0154] 일 실시형태에서, 친유성 지방족 그룹은 지방족 환이다. 지방족 환은 스테롤 등의 고난 구조를 포함할 수 있다. 또는, 지방족 환은 콜레스테롤 등의 스테로이드를 포함할 수 있다. 실시예 16에서는 콜레스테롤을 갖는 작제물이 통증 동물 모델에서 활성을 갖는다는 것이 입증되었다. 바람직하게는, 콜레스테롤 모이어티는 아미노산, 예를 들면, 아스파라긴, 예를 들면, 베타Asp를 통해 N-PEG에 연결된다.

[0155] 일 실시형태에서, 본 개시의 PICK1 억제제의 비-펩티드 부분에 존재하는 친유성 지방족 그룹은 카복실산, 알코올 또는 아민 등의 관능기를 추가로 포함한다. 상기 관능기는 PICK1 억제제의 잔여 부분에 대한 친유성 지방족 그룹의 접합, 예를 들면, 링커에 직접적으로 또는 단일 아미노산을 통해 링커에 대한 접합을 제공한다.

[0156] 일 실시형태에서, 친유성 지방족 그룹은 알코올을 포함한다.

[0157] 일 실시형태에서, 친유성 지방족 그룹은 카복실산을 포함한다.

[0158] 일 실시형태에서, 친유성 지방족 그룹은 카복실산을 포함하는 지방족 쇄이고, 따라서 지방산이다.

[0159] 친유성 지방족 그룹은 C_4-C_{26} 지방산일 수 있다. 친유성 지방족 그룹은 포화 지방산 또는 불포화 지방산일 수 있다. 일 실시형태에서, 친유성 지방족 그룹은 C_{16} 지방산 또는 C_{18} 지방산이다.

[0160] 일 실시형태에서, 친유성 지방족 그룹은 4 내지 26개 범위, 예를 들면, 4 내지 24개 범위의 탄소 원자, 예를 들면, 4 내지 22개 범위, 예컨대, 4 내지 20개 범위, 예를 들면, 4 내지 18개 범위, 예컨대, 4 내지 16개 범위, 예를 들면, 4 내지 14개 범위, 예컨대, 4 내지 12개 범위, 예를 들면, 4 내지 10개 범위, 예컨대, 4 내지 8개 범위, 예를 들면, 4 내지 6개 범위의 탄소 원자를 포함한다.

[0161] 일 실시형태에서, 친유성 지방족 그룹은 4 내지 26개 범위의 탄소 원자, 예컨대, 6 내지 26개 범위, 예를 들면, 8 내지 26개 범위, 예컨대, 10 내지 26개 범위, 예를 들면, 12 내지 26개 범위, 예컨대, 14 내지 26개 범위, 예를 들면, 16 내지 26개 범위, 예컨대, 18 내지 26개 범위, 예를 들면, 20 내지 26개 범위, 예컨대, 22 내지 26

개 범위, 예를 들면, 24 내지 26개 범위의 탄소 원자를 포함한다.

[0162] 일 실시형태에서, 친유성 지방족 그룹은 4 내지 26개 범위의 탄소 원자, 예컨대, 6 내지 24개 범위, 예를 들면, 8 내지 22개 범위, 예컨대, 10 내지 20개 범위, 예를 들면, 12 내지 18개 범위, 예컨대, 14 내지 18개 범위, 예를 들면, 14 내지 16개 범위의 탄소 원자 또는 16 내지 18개 범위의 탄소 원자를 포함한다.

[0163] 일 실시형태에서, 친유성 지방족 그룹은 아세트산, 부티르산, 카프로산, 카프릴산, 카프르산, 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 마가르산(magaric acid), 스테아르산, 아라키드산, 베헨산, 리그노세르산, 세로트산, 카프롤레산, 라우롤레산, 미리스톨레산, 팔미톨레산, 올레산, 리놀레산, 리놀렌산, 가돌레산, 에루크산으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 바람직한 실시형태에서, 친유성 지방족 그룹은 카프르산, 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 마르가르산, 스테아르산으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 보다 바람직한 실시형태에서, 친유성 지방족 그룹은 미리스트산이다.

[0164] 친유성 지방족 그룹이 지방산 모이어티인 실시형태에서는 시스 또는 트랜스 배열에서 포화 또는 불포화될 수 있다. 실시예 16은 C14 지방산 모이어티에 대해 불포화(시스 또는 트랜스) 및 포화 모이어티가 생체내에서 유사한 효과를 갖는다는 것을 입증한다. 일 실시형태에서, 지방산 모이어티는 1, 2 또는 3개의 이중 결합을 갖는 것과 같이 다중불포화된다. 일부 실시형태에서, 1개의 이중 결합은 n-3 또는 n-6 위치에 있다.

[0165] 카복실산 그룹의 반대측 말단에 추가의 관능기를 가짐으로써 지방산 모이어티를 변형시킬 수 있다. 이러한 관능기는 추가의 카복실산, 알코올, 케톤 또는 알데히드일 수 있다. 실시예 16은 친유성 지방족 그룹이 말단 카복실산을 포함할 수 있고, 통증의 동물 모델에서 효능을 가질 수 있음을 입증한다.

[0166] 일 실시형태에서, 친유성 지방족 그룹은 미리스토일로도 본 명세서에서 지칭되는 미리스트산 또는 myr이다.

[0167] 일 실시형태에서, 친유성 지방족 그룹은 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 도코사헥사엔산(DHA) 및 시스-9-옥타데센산으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0168] 일 실시형태에서, 친유성 지방족 그룹은, 예를 들면, 테트라데칸이산, 헥사데칸이산 또는 옥타데칸이산 등의 이산이다.

[0169] *임의의 아미노산*

[0170] 비-펩티드 부분은 단일 아미노산을 추가로 포함할 수 있다. 비-펩티드 부분에 존재하는 이러한 단일 아미노산은 친유성 지방족 그룹의 부착 또는 검출가능한 모이어티의 부착을 위한 핸들을 제공하도록 기능할 수 있다.

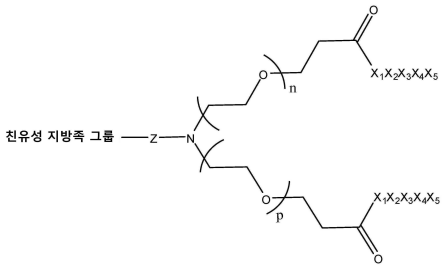
[0171] 일 실시형태에서, 1개의 아미노산은 α-아미노산 또는 β-아미노산이다. 1개의 아미노산은 Asp, β-Asp, β-Ser(3-아미노-2-(하이드록시메틸)프로판산), β-호모-Ser(3-아미노-4-하이드록시부티르산) 및 β-Lys(3,6-디아미노헥산산)으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.

[0172] 본 발명자들이 실시예 11에서 나타낸 바와 같이, 친유성 지방족 그룹은 본 발명이 생체내에서 기능적 효과를 갖기 위해 필수적이다.

[0173] *연결성*

[0174] 일 실시형태에서, 본 개시의 PICK1 억제제의 펩티드 및 비-펩티드 부분은 접합되어, 화학식 I의 일반 구조를 갖는 PICK1 억제제를 형성한다.

[0175] 화학식 I



[0176] .

[0177] 예를 들면, 친유성 지방족 그룹이 지방산인 것으로 기재되어 있는 경우, 지방산의 카복실산의 카보닐 그룹만이 PICK1 억제제에 존재하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들면, 링커의 아민에 대한 지방산의 접합에 의해, 아미

드 결합은 부수하는 물의 소실과 함께 형성된다. 따라서, 본 개시의 PICK1 억제제를 형성하기 위해 조합되는 상이한 성분들은 기재된 화합물로부터 발생할 수 있다. 친유성 지방족 그룹이 이산인 특정 경우에, 일 실시형태에서, 카복실산 중 1개만이 반응하여 링커의 아민과 아미드를 형성하는 반면, 제2 카복실산은 최종적 PICK1 억제제에서 카복실산으로 잔류한다.

[0178] 본 개시의 NPEG 링커는, 예를 들면, 각 말단에 카복실산을 포함할 수 있다. 수득된 PICK1 억제제에서 발견되는 NPEG 링커는 카복실산을 포함하지 않고, NPEG 링커를 제1 및/또는 제2 펩티드에 접합시킬 때에 형성된 아미드 결합에 존재하는 카보닐 그룹만을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 일 실시형태에서, NPEG 링커는 NPEG 링커의 카복실산과 제1 및/또는 제2 펩티드의 N-말단 사이에 형성된 아미드 결합을 통해 제1 및/또는 제2 펩티드에 접합된다. 일 실시형태에서, NPEG 링커는, NPEG 링커의 카복실산과 제1 및/또는 제2 펩티드 중의 아미노산의 측쇄 관능기 사이에 형성된 아미드 결합을 통해, 예를 들면, NPEG 링커의 카복실산과 제1 및/또는 제2 펩티드에서 라이신 측쇄의 아민 사이에 아미드 결합을 형성하여 아미드를 형성함으로써 제1 및/또는 제2 펩티드에 접합된다.

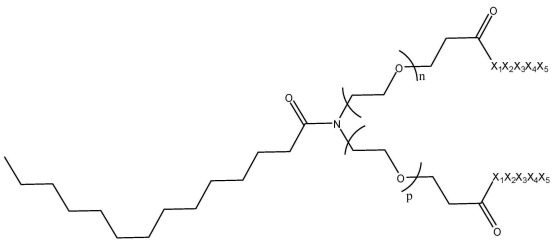
[0179] NPEG 링커의 질소 원자는 친유성 지방족 그룹에 직접적으로 또는 단일 아미노산을 통해 추가로 접합될 수 있다. 따라서, 일 실시형태에서, 친유성 지방족 그룹은 카복실산 등의 관능기를 통해, 예를 들면, 아미드를 형성함으로써 NPEG 링커의 질소 원자에 접합된다.

[0180] 일 실시형태에서, 단일 아미노산은 α-카복실산을 통해 NPEG 링커의 질소 원자에 접합되어 아미드를 형성하고, 추가로 친유성 지방족 그룹에 접합된다. 친유성 지방족 그룹에 대한 추가 접합은 α- 또는 β-아민(각각 α- 또는 β-아미노산)을 통해 아미드 결합을 형성하거나, 또는 카복실산, 알코올 또는 아민 등의 측쇄 관능기를 통해 아미드 결합 또는 에스테르 결합을 형성할 수 있다.

[0181] *바람직한 구조*

[0182] 일 실시형태에서, PICK1 억제제는 하기 화학식 II에 따른 구조를 갖는다:

[0183] [화학식 II]

[0184] 

[0185] 상기 화학식 II에서,

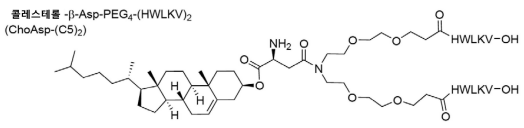
[0186] n은 0 내지 12의 정수, 바람직하게는 2이고;

[0187] p는 0 내지 12의 정수, 바람직하게는 2이다.

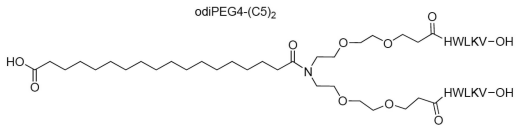
[0188] 바람직한 실시형태에서, PICK1 억제제는, n이 2이고 p가 2인 화학식 II에 따른 구조를 갖는다. 이러한 구조는 본 명세서에서 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$로 지칭된다.

[0189] 다른 바람직한 구조는 하기에 개시되어 있다. 불포화는 트랜스 또는 시스 배치일 수 있다.

[0190] [화학식 IV]

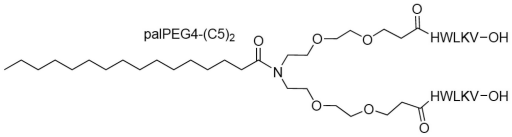
[0191] 

[0192] [화학식 V]



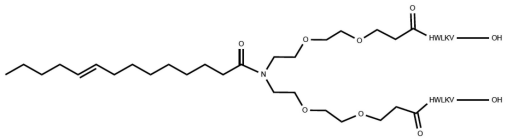
[0193]

[0194] [화학식 VI]



[0195]

[0196] [화학식 VII]



[0197]

[0198] **작용 메커니즘**

[0199] 본 개시의 실시예 3에서 입증된 바와 같이, 놀랍게도, 본 발명의 PICK1 억제제가 미셀 구조를 형성할 수 있다는 것이 발견되었다. 지질을 포함하지 않고, 따라서 미셀 구조를 형성할 수 없는 2가 펩티드 리간드와 비교하여, 본 발명의 PICK1 억제제의 개선된 효능은 이러한 미셀 구조의 형성에 기인하는 것으로 가정된다.

[0200] PICK1은 이량체 입체구조로 존재하는 것으로 공지되어 있고, 이량체화는 BAR 도메인에 의해 매개된다. 사량체 등의 이량체의 이량체를 제공하는 이량체 PICK1의 이량체화는 단백질 기능의 자가 억제를 초래하는 것으로 보고되었다[참조: Karlsen, M. L. et al. 2015]. 따라서, 미셀 PICK1 억제제는 몇몇 PICK1 단백질에 결합 및 조합할 수 있고, 이에 의해 PICK1의 효과적 억제가 관찰된다고 가정할 수 있다.

[0201] 따라서, 일 실시형태에서, PICK1 억제제는 미셀 구조를 형성하기 위한 자가 조립화 등의 용액에서 고차 구조로 자가 조립된다.

[0202] 일 실시형태에서, 고차 구조는 적어도 15Å, 예컨대, 적어도 17Å, 예를 들면, 적어도 19Å, 예컨대, 적어도 20Å, 예를 들면, 적어도 21Å, 예컨대, 적어도 22Å, 예를 들면, 적어도 23Å의 회전 반경(Rg)을 갖는다.

[0203] 일 실시형태에서, 고차 구조는 적어도 15Å, 예컨대, 적어도 17Å, 예를 들면, 적어도 19Å, 예컨대, 적어도 20Å, 예를 들면, 적어도 21Å, 예컨대, 적어도 22Å, 예를 들면, 적어도 23Å, 예컨대, 적어도 24Å, 예를 들면, 적어도 25Å, 예컨대, 적어도 26Å, 예를 들면, 적어도 27Å, 예컨대, 적어도 28Å, 예를 들면, 적어도 29Å, 예컨대, 적어도 30Å, 예를 들면, 적어도 31Å의 회전 반경(Rg)을 갖는다.

[0204] 일 실시형태에서, 고차 구조는 4 내지 20개 범위의 PICK1 억제제, 예컨대, 4 내지 18개 범위, 예를 들면, 4 내지 16개 범위, 예컨대, 4 내지 14개 범위, 예를 들면, 4 내지 12개 범위, 예컨대, 4 내지 10개 범위, 예를 들면, 4 내지 8개 범위, 예컨대, 6 내지 8개 범위의 PICK1 억제제로부터 형성된다.

[0205] 일 실시형태에서, 고차 구조는 4 내지 40개 범위의 PICK1 억제제, 예컨대, 6 내지 40개 범위, 예를 들면, 8 내지 40개 범위, 예컨대, 10 내지 40개 범위, 예를 들면, 12 내지 40개 범위, 예를 들면, 14 내지 40개 범위, 예를 들면, 16 내지 40개 범위, 예컨대, 18 내지 40개 범위, 예를 들면, 20 내지 40개 범위, 예컨대, 22 내지 40개 범위, 예를 들면, 24 내지 40개 범위, 예컨대, 26 내지 40개 범위, 예를 들면, 28 내지 40개 범위, 예컨대, 30 내지 40개 범위, 예를 들면, 32 내지 40개 범위, 예컨대, 34 내지 40개 범위, 예를 들면, 36 내지 40개 범위, 예컨대, 38 내지 40개 범위의 PICK1 억제제로부터 형성된다.

[0206] 일 실시형태에서, 고차 구조는 4 내지 40개 범위의 PICK1 억제제, 예컨대, 4 내지 38개 범위, 예를 들면, 4 내지 36개 범위, 예컨대, 4 내지 34개 범위, 예를 들면, 4 내지 32개 범위, 예컨대, 4 내지 30개 범위, 예를 들면, 4 내지 28개 범위, 예컨대, 4 내지 26개 범위, 예를 들면, 4 내지 24개 범위, 예컨대, 4 내지 22개 범위, 예를 들면, 4 내지 20개 범위, 예컨대, 4 내지 18개 범위, 예를 들면, 4 내지 16개 범위, 예컨대, 4 내지 14개

범위, 예를 들면, 4 내지 12개 범위, 예컨대, 4 내지 10개 범위, 예를 들면, 4 내지 8개 범위, 예컨대, 4 내지 6개 범위의 PICK1 억제제로부터 형성된다.

[0207] 일 실시형태에서, 고차 구조는 4 내지 40개 범위의 PICK1 억제제, 예컨대, 6 내지 38개 범위, 예를 들면, 6 내지 36개 범위, 예컨대, 8 내지 34개 범위, 예를 들면, 8 내지 32개 범위, 예컨대, 10 내지 30개 범위, 예를 들면, 10 내지 28개 범위, 예컨대, 12 내지 26개 범위, 예를 들면, 14 내지 24개 범위, 예컨대, 16 내지 24개 범위, 예를 들면, 16 내지 22개 범위, 예컨대, 18 내지 22개 범위, 예를 들면, 19 내지 21개 범위, 예컨대, 20개의 PICK1 억제제로부터 형성된다.

[0208] 일 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 PICK1 억제제를 포함하는 미셀이 제공된다.

[0209] 일 실시형태에서, 하기를 포함하는 PICK1 억제제를 포함하는 미셀이 제공된다:

[0210] a) 일반식 $X_1X_2X_3X_4X_5$(서열번호 1)의 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩티드;

[0211] b) 일반식 $X_1X_2X_3X_4X_5$(서열번호 1)의 아미노산 서열을 포함하는 제2 펩티드

[0212] (여기서, X_1은 H, N, F 또는 T이거나, 부재하고;

[0213] X_2는 W, S, E 또는 Y이거나, 부재하고;

[0214] X_3은 L, V 또는 I이고;

[0215] X_4는 K, I 또는 R이고;

[0216] X_5는 V이다);

[0217] c) 제1 펩티드를 제2 펩티드에 연결하는 링커, 및

[0218] d) 친유성 지방족 그룹.

[0219] 본 명세서에서 입증된 바와 같이, 본 개시의 PICK1 억제제는 PICK1의 PDZ 도메인에 결합할 수 있다.

[0220] 천연 PICK1 이량체 입체구조에서, PICK1 이량체의 PDZ 도메인 사이의 거리는 약 180Å으로 추정된다. 4개의 에틸렌 글리콜 모이어티의 길이를 갖는 NPEG 링커를 포함하는 PICK1 억제제에서, 제1 및 제2 펩티드 사이의 거리는 약 43Å에 걸쳐 있는 것으로 추정된다. 따라서, 이러한 PICK1 억제제는 단일 PICK1 이량체에서 발견되는 2개의 PDZ 도메인에 결합시킬 수 없다. 이는 본 명세서에 개시된 단일 PICK1 억제제가 2개의 PICK1 이량체를 결합 및 함께 조합함으로써 기능하고, PICK1의 억제를 유도한다는 가설을 뒷받침한다. 따라서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 몇몇 PICK1 억제제에 의해 형성된 미셀 구조는 2개 이상의 PICK1 이량체에 결합 및 함께 조합할 수 있고, 이에 의해 본 명세서에 개시된 바와 같은 PICK1의 효과적 억제를 유도할 수 있다.

[0221] 따라서, 일 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 PICK1 억제제 또는 미셀 구조는 2개 이상의 PICK1 단백질의 PDZ 도메인에 결합하여, PICK1의 억제를 유도한다. 일 실시형태에서, 본 개시의 PICK1 억제제에 의해 결합된 2개 이상의 PICK1 단백질은 PICK1의 2개 이상의 이량체에 존재한다.

[0222] 일 실시형태에서, PICK1 억제제의 PICK1에 대한 결합은 PICK1의 삼량체, 사량체, 오량체, 육량체, 칠량체 또는 팔량체 등의 PICK1의 보다 높은 올리고머 상태의 형성을 초래한다. 일 실시형태에서, PICK1 억제제가 PICK1에 결합하면, PICK1의 사량체, 육량체 또는 팔량체가 형성된다.

[0223] 일 실시형태에서, 본 개시의 PICK1 억제제는 2개 이상의 PICK1 단백질을 함께 조합한다. 일 실시형태에서, 화합물은 4개의 PICK1 단백질, 예컨대, 5개의 PICK1 단백질, 예를 들면, 6개의 PICK1 단백질, 예컨대, 7개의 PICK1 단백질, 예를 들면, 8개의 PICK1 단백질, 예컨대, 9개의 PICK1 단백질, 예를 들면, 10개의 PICK1 단백질을 함께 조합한다.

[0224] 본 개시의 PICK1 억제제에 대한 결합에 의한 PICK1의 억제는 PICK1 단백질이 더 이상 AMPAR과 상호작용할 수 없도록 하고, 이에 의해 PICK1이 AMPAR의 트래피킹을 제어하는 것을 방지할 수 있다. 따라서, 일 실시형태에서, PICK1 억제제는 PICK1과 AMPAR 사이의 단백질-단백질 상호작용을 억제할 수 있다. 따라서, 이는 PICK1이 GluA2를 하향-조절하는 것을 방지하고, CP-AMPAR 형성을 방지하고, 이에 의해 시냅스에서 비정상적 수준의 글루타메이트에 반응하여 부적응 유형의 가소성을 방지할 수 있다. 이에 의해, 예를 들면, 신경병성 통증과 코카인 중독

등을 예방할 수 있다.

[0225] 본 개시의 PICK1 억제제는 PICK1의 PDZ 도메인에 대해 높은 친화성을 갖는다. 일 실시형태에서, 본 개시의 PICK1 억제제는 PICK1에 대한 Ki가 10nM 이하, 예컨대, 9nM 이하, 예컨대, 8nM 이하, 예컨대, 7nM 이하, 예컨대, 6nM 이하, 예컨대, 5nM 이하, 예컨대, 4nM 이하, 예컨대, 3nM 이하, 예컨대, 2nM 이하, 예컨대, 1nM 이하, 예컨대, 0.5nM 이하이다.

[0226] PICK1의 PDZ 도메인에 대한 본 개시의 PICK1 억제제의 친화성은 본 명세서의 실시예 4에 기재된 바와 같은 형광 편광(FP)에 의해 결정될 수 있다.

[0227] 고차 구조를 형성하는 본 개시의 PICK1 억제제의 능력은 본 명세서, 실시예 3에 기재된 바와 같은 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 또는 소각 X-선 산란(SAXS)에 의해 결정될 수 있다.

[0228] **검출가능한 모이어티**

[0229] 일 실시형태에서, 본 개시의 PICK1 억제제는 검출가능한 모이어티를 추가로 포함한다. 형광단, 발색단, 방사성 동위원소 또는 효소 등의 검출을 위해 당업자에게 공지된 종래의 모이어티를 사용할 수 있다. PICK1 억제제에 검출가능한 모이어티가 존재하면, PICK1 억제제에 결합할 때의 PICK1의 표지 및 시각화가 가능해진다.

[0230] 일 실시형태에서, 검출가능한 모이어티는 제1 및/또는 제2 펩티드에 접합된다. 일 실시형태에서, 검출가능한 모이어티는 비-펩티드 부분의 단일 아미노산에 접합된다.

[0231] 일 실시형태에서, 검출가능한 모이어티는 5,6-카복실테트라메틸로다민(TAMRA) 또는 인도디카보시아닌(Cy5) 등의 형광단이다.

[0232] 또 다른 실시형태에서, 검출가능한 모이어티는 방사성 동위원소를 포함하거나, 또는 이들로 이루어진다. 방사성 동위원소는 ^{125}I, ^{99m}Tc, ^{111}In, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{72}As, ^{89}Zr, ^{123}I, ^{18}F 및 ^{201}Tl로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.

[0233] **질환 및 장애**

[0234] 본 발명은 부적응 가소성과 관련된 질환 및/또는 장애를 치료하기 위한 약제학적 조성물을 제공한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 PICK1 억제제 또는 본 명세서에 개시된 미셀을 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체에 본 발명의 PICK1 억제제 또는 미셀을 포함할 수 있다.

[0235] AMPA형 글루타메이트 수용체(AMPAR)는 NMDA형 글루타메이트 수용체(NMDAR)와는 대조적으로 4량체 수용체 복합체에 GluA2 서브유닛이 존재하기 때문에 통상 1가 양이온(즉, Na^+ 및 K^+)만을 투과한다. 그러나, 강력하고 지속적인 탈분극에 반응하여 가소성이 변화하면, 몇몇 유형의 시냅스에서 전도도 및 Ca^{2+} 투과성이 증가된 AMPAR(CP-AMPAR)로의 스위치가 초래하고, 이 스위치에 의해 시냅스가 과민해진다. 기계적으로, CP-AMPAR의 발현에는, PICK1 PDZ 도메인과 AMPAR의 GluA2 서브유닛의 C-말단 사이의 상호작용에 의해 매개되는 AMPAR을 포함하는 GluA2의 초기 PICK1-의존적 하향-조절이 포함된다. 이것은 차례로 시냅스에 수용체를 결여하는 GluA2의 삽입을 가능하게 하고(슬롯 가설), 시냅스를 Ca^{2+}-투과성 및 과민성으로 되게 한다.

[0236] CP-AMPAR은 랫트의 코카인 자가-투여로부터의 중단 후에 갈망의 매개에 결정적으로 관여한다[참조: Conrad et al 2008]. PICK1은 코카인에 대한 갈망의 발달 동안 중뇌의 VTA 도파민성 뉴런 및 측좌핵에서 CP-AMPAR의 발현에 관여하고[참조: Luscher et al 2011 and Wolf et al 2010], 이는 PICK1이 코카인 중독의 표적임을 시사한다. PICK1의 CPP-접합 2가 펩티드 억제제는 랫트에서 코카인 탐색의 회복을 용량-의존적으로 약화시키는 것으로 보고되었다[참조: Turner et al. 2020]. 따라서, 일 실시형태에서, 본 개시의 PICK1 억제제의 투여는 코카인 중독 등의 약물 중독에서 코카인 갈망을 감소시킨다.

[0237] 후각(DH) 뉴런에서 AMPA 유형 글루타메이트 수용체(AMPAR)의 상향조절은, 장기간 지속되는 DH에서 특정 형태의 시냅스 가소성인 중추 감작을 유발한다[참조: Woolf et al 2000 and Ji et al 2003]. 또한, 말초 염증성 통증과 신경 손상 유발 통증은 모두 Ca^{2+}-투과성 AMPAR(CP-AMPAR)의 상향조절을 유발한다[참조: Vikman et al 2008, Gangadharan et al 2011 and Chen et al 2013]. 신경병성 통증에서 PICK1의 역할에 대한 초기 증거는 PICK1의 펩티드 억제제가 만성 수축 손상(CCI)에 의해 유발된 통증을 경감한다는 것을 입증하는 문헌[참조: Garry et al 2003]으로부터 수득되었다. 그 후, shRNA 매개 PICK1의 녹다운이 완전 프로인트 애주번트(CFA) 유발 염증성 통증을 완화시키는 것이 입증되었고, PICK1 녹아웃 마우스는 척수 신경 결찰(SNL)에 반응하여 완전히 통증을 발증

하지 않는 것으로 판명되었다[참조: Wang et al. 2011 and Atianjoh et al 2010]. 실제로, 본 개시의 PICK1 억제제의 투여는 신경병성 통증 모델에서 기계적 이질통(SNI 모델 - 실시예 8), 염증성 통증(CFA 모델 - 실시예 7 및 16) 및 염증성 통증의 모델에서 열(열) 이질통(CFA 모델 - 실시예 17)을 감소시킨다. 따라서, 일 실시형태에서, 통증은 기계적 또는 열적 이질통 또는 통각과민이다. 또 다른 실시형태에서, 통증은 염증성 통증이다.

[0238] TAR DNA-결합 단백질 43(TDP-43) 병태 및 AMPA 수용체 서브유닛 GluA2의 RNA 편집 실패는 모두 근위축성 측삭 경화증(ALS) 환자 대부분의 운동 뉴런에서 동시에 발생하는 병인-관련 분자 이상이다. RNA 2(ADAR2)에 작용하는 RNA 편집 효소 아데노신 디아미나제의 조건부 녹-아웃을 수반하는 마우스 모델의 통증 증상은 AMPAR 길항제 페람파넬에 의해 경감되고, 이는 본 개시의 PICK1 억제제에 의한 증상 완화의 가능성을 시사한다.

[0239] 통증 및 중독에 대한 본 개시의 화합물의 효과를 고려할 때, 병존질환을 갖는 환자, 예를 들면, 중독을 앓고 있는 통증 환자에 대해서도 우수한 효능을 기대하는 것은 합리적이다.

[0240] 유사한 중추성 감작은 통각과민 프라이밍에서 이질통의 기초가 되는 것으로 생각되고, 이는 요통 및 편두통에 대한 실험 모델로서 기능한다[참조: Kandasamy et al 2015].

[0241] 유사하게는, 이명의 병인은 중추 감작을 포함한 신경증성 통증과 몇몇 유사점이 있다[참조: Vanneste et al 2019, Peker et al 2016, and Moller et al 2007].

[0242] CP-AMPAR의 표면 안정화/삽입에서 PICK1의 역할은 배양된 해마 뉴런에서 산소-글루코스 고갈에 대해 설명되었다[참조: Clem et al 2010 and Dixon et al 2009]. 이것은 허혈성 상해 후에 신경세포사를 보호하는 잠재적인 표적으로 PICK1을 생각하게 한다.

[0243] PICK1의 손실은 아밀로이드 베타에 대한 반응으로 척추 손실에 대해 시험관내 및 생체내에서 뉴런을 보호하는 것으로 입증되었다[참조: Marcotte et al 2018 and Alfonso et al 2014]. 결과적으로, PICK1은 알츠하이머병의 대증요법 및 아마도 예방적 치료를 위한 추정 표적이다.

[0244] PICK1은 미토파지에 관여하는 E3 유비퀴틴 리가제 파킨(Parkin)과 상호작용하고 억제한다. 파킨의 기능 상실은 산발성 및 가족성 파킨슨병(PD)과 관련되어 있다. 결과적으로, PICK1 KO 마우스는 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘(MPTP)-매개 독성에 내성이 있다[참조: He et al 2018]. 결과적으로, PICK1은 파킨슨병의 대증요법 및 아마도 예방적 치료를 위한 추정 표적이다.

[0245] 과도한 세포내 칼슘 농도를 초래하는 글루타메이트 수용체의 과잉자극은 간질에서 신경 세포 사멸의 주요 원인이다. GluR2(GluA2) 가설은 간질 발작 등의 신경학적 손상 후에 AMPA 수용체 서브유닛 GluR2 단백질이 하향조절된다고 서술한다. 이는 GluR2 결핍, 칼슘 투과성 AMPA 수용체의 형성 가능성을 증가시키고, 이는 신경전달물질인 글루타메이트의 독성을 추가로 증강시킬 수 있다[참조: Lorgen et al 2017].

[0246] PICK1은 유방암, 폐암, 위암, 결장직장암 및 난소암에서 인접한 정상 상피와 비교하여 종양 세포에서 과발현된다. 유방암 조직 마이크로어레이의 면역염색에 의해 판단되는 바와 같이, 높은 수준의 PICK1 발현은 전체 생존 기간의 단축과 상관관계가 있다. 따라서, PICK1 siRNA에 의한 MDA-MB-231 세포의 형질감염은 시험관내에서 세포 증식 및 콜로니 형성을 감소시키고 누드 마우스에서 종양 형성을 억제했다[참조: Zhang et al 2010]. 결과적으로, PICK1은 암 치료 및 예후를 위한 추정 표적이다.

[0247] 일 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물은 의약으로서 사용하기 위해 제공된다.

[0248] 일 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물은 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위해 제공된다.

[0249] 일 실시형태에서, 대상체에서 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애의 예방 및/또는 치료를 제공하는 방법이 제공되고, 이 방법은 본 개시의 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0250] 일 실시형태에서, 본 개시의 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물의 용도는 부적응 가소성과 관련된 질환 및/또는 장애의 치료를 위한 의약의 제조에 제공된다.

[0251] 일 실시형태에서, 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애는 통증(pain), 약물 중독(drug addiction), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 간질(epilepsy), 이명(tinnitus), 편두통(migraine), 암(cancer), 허혈(ischemia), 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 및/또는 파킨슨병(Parkinson's disease)이다.

[0252] 일 실시형태에서, 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애는 신경병성 통증 등의 통증이다. 통증은 염증성 통증 또는 신경병성 통증일 수 있다. 치료되는 통증은 만성 신경병성 통증 또는 만성 염증성 통증일 수 있는 만성 통증일 수 있다. 신경병성 통증은 외상성 손상, 수술 또는 당뇨병이나 자가면역 장애 등의 질환의 결과로서 말초 신경계 또는 중추 신경계의 손상에 의해 유발될 수 있다. 신경병성 통증은 화학요법에 의한 치료에 의해 유발될 수 있다. 통증이 지속되는 경우, 이의 상태는 만성 신경병성 통증이다. 만성 염증성 통증은 신경 손상 후의 염증에 의해 유발될 수 있을 뿐만 아니라, 면역 세포에 의해 방출된 매개인자가 통증 경로의 감작, 즉 척수에 위치하는 감각 뉴런의 "와인드 업(wind up)"을 유발하는 외래 물질에 의해 유발된 염증에 의해 유발될 수 있다. 따라서, 효과적 진통제는 통증-완화 효과를 수득하기 위해 척수 조직에 도달하고, 그 표적(이 경우는 PICK1)을 발견할 수 있어야 한다. 따라서, 화합물은 척수 조직에 도달할 수 있도록 혈액-뇌 장벽 및/또는 혈액-척수 장벽을 통과할 수 있어야 한다.

[0253] 일 실시형태에서, 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애는 코카인 중독, 오피오이드 중독 또는 모르핀 중독 등의 약물 중독이다.

[0254] 일 실시형태에서, 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애는 유방암, 예를 들면, 조직학적 등급, 림프절 전이, Her-2/neu-양성, 및 삼중-음성 기저-유사 유방암 등의 암이다.

[0255] 일 실시형태에서, 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애는 근위축성 측삭 경화증이다.

[0256] 일 실시형태에서, 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애는 간질이다.

[0257] 일 실시형태에서, 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애는 이명이다.

[0258] 일 실시형태에서, 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애는 편두통이다.

[0259] 일 실시형태에서, 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애는 뇌졸중 또는 허혈이다.

[0260] 일 실시형태에서, 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애는 알츠하이머병이다.

[0261] 일 실시형태에서, 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애는 파킨슨병이다.

[0262] 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 화합물은 두부 손상의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0263] 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 화합물은 유방암 등의 암의 예방 및/또는 치료 및/또는 진단에 사용하기 위한 것이다.

[0264] 상기 장애 및 질환에 걸릴 위험이 있거나, 또는 현재 이들로 고통받고 있는 대상체는 장애 또는 질환 발증의 위험을 감소시키기 위한 예방적 치료, 또는 장애 또는 질환 발증 후의 치료적 치료를 제공할 수 있다. 대상체는 포유동물 또는 인간 환자일 수 있다.

[0265] **투여**

[0266] 의약 분야의 당업자에게 공지된 종래의 방법을 사용하여, 본 개시의 PICK1 억제제를 환자에게 투여할 수 있다. 본 개시의 PICK1 억제제는 단독으로, 또는 다른 치료제 또는 개입과 조합하여 투여할 수 있다.

[0267] 일 실시형태에서, 본 개시의 PICK1 억제제는 정맥내, 복강내, 근육내, 척추강내, 경피, 경점막 또는 피하 투여 등의 비경구 투여에 의해 투여된다. 일 실시형태에서, 본 개시의 PICK1 억제제는 척수강내 또는 피하 투여에 의해 투여된다. 바람직한 실시형태에서, 본 개시의 PICK1 억제제는 피하 투여에 의해 투여된다. 실시예 15에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 PICK1 억제제는 높은 용해도를 갖고, 유효 용량에서 이러한 피하 투여에 적합하다.

[0268] **진단**

[0269] 본 개시의 PICK1 억제제는 검출가능한 모이어티를 포함할 수 있다. 따라서, 이러한 PICK1 억제제는 조직 또는 샘플 중의 PICK1을 검출하는 것과 같은 진단에 사용될 수 있다.

[0270] 따라서, 본 개시는 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애의 진단에 사용하기 위한 본 명세서에 개시된 PICK1 억제제를 제공한다.

[0271] PICK1은 유방암, 폐암, 위암, 결장직장암 및 난소암에서 인접한 정상 상피와 비교하여 종양 세포에서 과발현된다. 유방암 조직 마이크로어레이의 면역염색에 의해 판단되는 바와 같이, 높은 수준의 PICK1 발현은 전체 생존 기간의 단축과 상관관계가 있다. 따라서, PICK1 siRNA에 의한 MDA-MB-231 세포의 형질감염은 시험관내에서 세포 증식 및 콜로니 형성을 감소시키고, 누드 마우스에서 종양 형성을 억제했다[참조: Zhang et al 2010]. 결과적으

로, PICK1은 암 치료 및 예후를 위한 추정 표적이다.

[0272] 일 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 PICK1 억제제는 유방암 등의 암인 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애의 진단에 사용하기 위한 것이다. 일 실시형태에서, 유방암은 조직학적 등급, 림프절 전이, Her-2/neu-양성 및 삼중-음성 기저-유사 유방암으로부터 선택된다.

[0273] 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 유방암을 진단하는 방법을 추가로 제공하고, 이 방법은

[0274] a. 상기 대상체로부터 조직 샘플을 수득하는 단계;

[0275] b. 본 명세서에 개시된 화합물로 샘플을 염색하는 단계;

[0276] c. 샘플 중의 PICK1의 수준을 결정하는 단계; 및

[0277] d. 샘플 중의 PICK1 수준을 건강한 기준과 비교하는 단계

[0278] 를 포함하고,

[0279] 여기서, 샘플 중의 PICK1 수준의 증가는 상기 개체가 유방암을 갖는 것을 나타낸다.

[0280] 본 개시는 유방암을 앓고 있는 대상체에 대한 예후를 예측하는 방법을 추가로 제공하고, 상기 방법은

[0281] a. 상기 대상체로부터 조직 샘플을 수득하는 단계;

[0282] b. 본 명세서에 개시된 화합물로 샘플을 염색하는 단계;

[0283] c. 샘플 중의 PICK1의 수준을 결정하는 단계; 및

[0284] d. 샘플 중의 PICK1 수준을 건강한 기준과 비교하는 단계

[0285] 를 포함하고,

[0286] 여기서, 샘플 중의 PICK1 수준의 증가는 예후 불량을 나타낸다.

[0287] 일 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 PICK1 억제제는 부적응 가소성과 관련된 질환을 앓고 있는 대상체를, 상기 PICK1 억제제에 의한 치료의 반응자 및 비반응자로 계층화할 때에 사용된다. 이러한 계층화는 PICK1 억제 등의 유사한 치료 메커니즘을 초래하는 AAV 기반 요법 등의 다른 치료 방법을 개시하기 전에 PICK1과 2가 또는 다가 상호작용을 갖는 PICK1 억제제의 효능을 평가하는 데 사용될 수 있다. 이러한 계층화의 이점은 PICK1 억제 등의 치료 메커니즘에 대한 반응자만이 AAV 기반 요법의 장기간에 걸친 비가역적 치료를 받을 것이라는 점이다. AAV 기반 요법은 동시 계류 중의 출원(PCT/EP2019/078736 및 EP20161524.2)에 기재되어 있다.

[0288] 따라서, 일 실시형태에서, 본 개시의 PICK1 억제제는 부적응 가소성과 관련된 질환 및/또는 장애를 갖는 환자를 유전자 요법의 예측가능한 치료 반응자로 계층화하기 위해 사용된다.

[0289] 일 실시형태에서, 본 개시의 PICK1 억제제는 부적응 가소성과 관련된 질환을 앓고 있는 대상체를 상기 화합물에 의한 치료의 반응자 및 비반응자로 계층화하는 데 사용된다.

[0290] **항목**

[0291] 1. 펩티드 부분 및 비-펩티드 부분을 포함하는 PICK1 억제제로서, 상기 펩티드 부분은

[0292] a) 일반식 $X_1X_2X_3X_4X_5$의 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩티드; 및

[0293] b) 일반식 $X_1X_2X_3X_4X_5$의 아미노산 서열을 포함하는 제2 펩티드로 이루어지고;

[0294] 여기서, X_1은 H, N, F 또는 T이거나, 부재하고;

[0295] X_2는 W, S, E 또는 Y이거나, 부재하고;

[0296] X_3은 L, V 또는 I이고;

[0297] X_4는 K, I 또는 R이고;

[0298] X_5는 V이고;

[0299] 상기 비-펩티드 부분은

[0300] c) 제1 펩티드를 제2 펩티드에 연결하는 링커, 및

[0301] d) 친유성 지방족 그룹을 포함하는, PICK1 억제제.

[0302] 2. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및/또는 제2 펩티드가 HWLKV, FEIRV, NSIIV, NSVRV, NSLRV, NSIRV, NYIIV, NYIRV, TSIRV, YIIV, SVRV, EIRV, LRV, IIV, VRV 및 IRV로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, PICK1 억제제.

[0303] 3. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및/또는 제2 펩티드가 HWLKV, NSVRV, NSLRV, NSIRV, TSIRV, EIRV, YIIV, IIV, VRV 및 IRV로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, PICK1 억제제.

[0304] 4. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및/또는 제2 펩티드가 NSVRV, NSLRV, NSIRV, TSIRV, EIRV, YIIV, IIV, VRV 및 IRV로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, PICK1 억제제.

[0305] 5. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및/또는 제2 펩티드가 HWLKV, FEIRV, NSIIV, NSVRV, NSLRV, NSIRV, YIIV, SVRV, VRV 및 LRV로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, PICK1 억제제.

[0306] 6. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및/또는 제2 펩티드가 FEIRV, NSIIV, NSVRV, NSLRV, NSIRV, YIIV, SVRV, VRV 및 LRV로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, PICK1 억제제.

[0307] 7. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및/또는 제2 펩티드가 HWLKV인, PICK1 억제제.

[0308] 8. 항목 1에 있어서,

[0309] X_1이 N, F 또는 T이거나, 부재하고;

[0310] X_2가 S, E 또는 Y이거나, 부재하고;

[0311] X_3이 V, L 또는 I이고;

[0312] X_4가 I 또는 R이고;

[0313] X_5가 V인, PICK1 억제제.

[0314] 9. 항목 1에 있어서,

[0315] X_1이 N 또는 T이거나, 부재하고;

[0316] X_2가 S, E 또는 Y이거나; 부재하고;

[0317] X_3이 V, L 또는 I이고;

[0318] X_4가 I 또는 R이고;

[0319] X_5가 V인, PICK1 억제제.

[0320] 10. 항목 1에 있어서,

[0321] X_1이 N 또는 F이거나, 부재하고;

[0322] X_2가 S, E 또는 Y이거나, 부재하고;

[0323] X_3이 V, L 또는 I이고;

[0324] X_4가 I 또는 R이고;

[0325] X_5가 V인, PICK1 억제제.

[0326] 11. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 펩티드가 제2 펩티드와 동일한, PICK1 억제제.

[0327] 12. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 링커가 NPEG 링커인, PICK1 억제제.

[0328] 13. 선행 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 NPEG 링커는, 하나 이상의 골격 산소 원자가 질소 원자로 치환되어 있는 0 내지 24개 범위의 에틸렌 글리콜 모이어티, 예컨대, 하나 이상의 골격 산소 원자가 질소 원자로 치환되어 있는 0 내지 20개 범위, 예를 들면, 0 내지 16개 범위, 예컨대, 0 내지 14개 범위, 예를 들면, 0 내지 12개 범위, 예를 들면, 0 내지 10개 범위, 예컨대, 0 내지 8개 범위, 예를 들면, 0 내지 6개 범위, 예컨대, 0 내지 4개 범위, 예를 들면, 0 내지 2개 범위의 에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하고, 바람직하게는 상기 NPEG-링커는 하나 이상의 골격 산소 원자가 질소 원자로 치환되어 있는 4개 에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는, PICK1 억제제.

[0329] 14. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 NPEG-링커의 하나의 골격 산소가 질소 원자로 치환되어 있는, PICK1 억제제.

[0330] 15. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 NPEG 링커가 각 말단에 카복실산을 포함하는, PICK1 억제제.

[0331] 16. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 NPEG 링커의 하나 이상의 질소 원자가 NPEG 링커를 따라 임의의 위치에 위치되고, 예를 들면, NPEG 링커의 중간에 위치하거나, NPEG 링커의 한쪽 말단을 향해 위치하는, PICK1 억제제.

[0332] 17. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 NPEG 링커가 NPEG 링커의 카복실산과 제1 및/또는 제1 및/또는 제2 펩티드의 N-말단 사이에 형성된 아미드 결합을 통해 제1 및/또는 제2 펩티드에 접합되어 있는, PICK1 억제제.

[0333] 18. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 친유성 지방족 그룹이 지방족 쇄 또는 지방족 환인, PICK1 억제제.

[0334] 19. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 친유성 지방족 쇄가 지방족 분지형 또는 비분지형 쇄인, PICK1 억제제.

[0335] 20. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 친유성 지방족 그룹이 지방족 포화 또는 불포화 쇄인, PICK1 억제제.

[0336] 21. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 친유성 지방족 그룹이 스테롤 등의 고난 구조를 포함하는 지방족 환인, PICK1 억제제.

[0337] 22. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 친유성 지방족 그룹이 콜레스테롤 등의 스테로이드를 포함하는 지방족 환인, PICK1 억제제.

[0338] 23. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 친유성 지방족 그룹이 카복실산, 알코올 또는 아민 등의 관능기를 추가로 포함하는, PICK1 억제제.

[0339] 24. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 친유성 지방족 그룹이 알코올을 포함하는, PICK1 억제제.

[0340] 25. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 친유성 지방족 그룹이 카복실산을 포함하는, PICK1 억제제.

[0341] 26. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 친유성 지방족 그룹이 지방산인, PICK1 억제제.

[0342] 27. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 친유성 지방족 그룹이 C_4-C_{26} 지방산인, PICK1 억제제.

[0343] 28. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 친유성 지방족 그룹이 포화 지방산 또는 불포화 지방산인, PICK1 억제제.

[0344] 29. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 친유성 지방족 그룹이 아세트산, 부티르산, 카프로산, 카프릴산, 카프르산, 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 마가르산, 스테아르산, 아라키드산, 베헨산, 리그노세르산, 세로트산, 카프롤레산, 라우롤레산, 미리스톨레산, 팔미톨레산, 올레산, 리놀레산, 리놀렌산 및 가돌레산, 에루크산으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, PICK1 억제제.

[0345] 30. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 친유성 지방족 그룹이 카프르산, 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 마르가르산 및 스테아르산으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, PICK1 억제제.

[0346] 31. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 친유성 지방족 그룹이 미리스트산인, PICK1 억제제.

[0347] 32. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 친유성 지방족 그룹이 이산, 예를 들면, 테트라데칸이산, 헥사데칸이산 또는 옥타데칸이산인, PICK1 억제제.

[0348] 33. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 친유성 지방족 그룹이 카복실산 등의 관능기를 통해, 예를 들면, 아미드를 형성함으로써 NPEG 링커의 질소 원자에 접합되어 있는, PICK1 억제제.

[0349] 34. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 비-펩티드 부분이 1개의 아미노산을 추가로 포함하는, PICK1 억제제.

[0350] 35. 항목 14 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 1개의 아미노산이 α-아미노산 또는 β-아미노산인, PICK1 억제제.

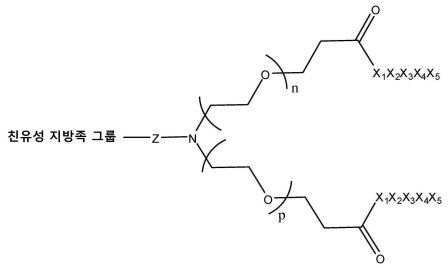
[0351] 36. 항목 14 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 1개의 아미노산이 Asp, β-Asp, β-Ser, β-호모-Ser 및 β-Lys로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, PICK1 억제제.

[0352] 37. 항목 14에 있어서, 1개의 아미노산이 α-카복실산을 통해 NPEG 링커의 질소 원자에 접합되어 아미드를 형성하고, 추가로 친유성 지방족 그룹에 접합되어 있는, PICK1 억제제.

[0353] 38. 항목 14 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 1개의 아미노산이 α- 또는 β-아민을 통해 친유성 지방족 그룹에 접합되어 아미드 결합을 형성하거나, 카복실산, 알코올 또는 아민 등의 측쇄 관능기를 통해 접합되어 아미드 결합 또는 에스테르 결합을 형성하는, PICK1 억제제.

[0354] 39. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 PICK1 억제제가 화학식 I의 일반 구조를 갖는, PICK1 억제제:

[0355] 화학식 I



[0356]

[0357] 상기 화학식 1에서,

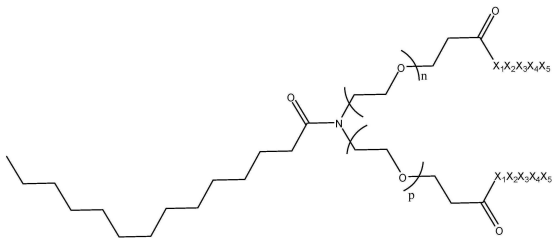
[0358] Z는 결합 또는 단일 아미노산이고;

[0359] n은 0 내지 12의 정수이고;

[0360] p는 0 내지 12의 정수이다.

[0361] 40. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 PICK1 억제제가 하기 화학식 II에 따른 구조를 갖는다:

[0362] 화학식 II



[0363]

[0364] 상기 화학식 II에서,

[0365] n은 0 내지 12의 정수, 바람직하게는 2이고;

[0366] p는 0 내지 12의 정수, 바람직하게는 2이다.

[0367] 41. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 PICK1 억제제가 자가-조립화 등으로 용액 중에서 고차 구조로 자가-조립화하여 미셀 구조를 형성하는, PICK1 억제제.

[0368] 42. 항목 20 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 상기 고차 구조가 적어도 15Å, 예컨대, 적어도 17Å, 예를 들면,

적어도 19Å, 예컨대, 적어도 20Å, 예를 들면, 적어도 21Å, 예컨대, 적어도 22Å, 예를 들면, 적어도 23Å, 예컨대, 적어도 24Å, 예를 들면, 적어도 25Å, 예컨대, 적어도 26Å, 예를 들면, 적어도 27Å, 예컨대, 적어도 28Å, 예를 들면, 적어도 29Å, 예컨대, 적어도 30Å, 예를 들면, 적어도 31Å의 회전 반경(R_g)을 갖는, PICK1 억제제.

[0369] 43. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 PICK1 억제제가 PICK1의 PDZ 도메인에 결합하는, PICK1 억제제.

[0370] 44. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 PICK1 억제제가 2개 이상의 PICK1 단백질의 PDZ 도메인에 결합하는, PICK1 억제제.

[0371] 45. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 PICK1 억제제가 PICK1과 AMPAR 사이의 단백질-단백질 상호작용을 억제할 수 있는, PICK1 억제제.

[0372] 46. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 PICK1 억제제가 PICK1을 억제할 수 있는, PICK1 억제제.

[0373] 47. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 펩티드가 10nM 미만, 예컨대, 9nM 미만, 예컨대, 8nM 미만, 예컨대, 7nM 미만, 예컨대, 6nM 미만, 예컨대, 5nM 미만, 예컨대, 4nM 미만, 예컨대, 3nM 미만, 예컨대, 2nM 미만, 예컨대, 1nM 미만, 예컨대, 0.5nM 미만의 PICK1에 대한 Ki를 갖는, PICK1 억제제.

[0374] 48. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, PICK1에 대한 PICK1 억제제의 결합이 PICK1의 삼량체, 사량체, 오량체, 육량체, 칠량체 또는 팔량체 등의 PICK1의 고차 올리고머 상태의 형성을 초래하는, PICK1 억제제.

[0375] 49. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, PICK1에 대한 PICK1 억제제의 결합이 PICK1의 사량체, 육량체 또는 팔량체의 형성을 초래하는, PICK1 억제제.

[0376] 50. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 검출가능한 모이어티를 추가로 포함하는, PICK1 억제제.

[0377] 51. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 검출가능한 모이어티가 제1 및/또는 제2 펩티드에 접합되어 있는, PICK1 억제제.

[0378] 52. 선행 항목 중 어느 하나에 있어서, 상기 검출가능한 모이어티가 비-펩티드 부분의 1개의 아미노산에 접합되어 있는, PICK1 억제제.

[0379] 53. 항목 27에 있어서, 상기 검출가능한 모이어티가 형광단, 발색단 또는 효소인, PICK1 억제제.

[0380] 54. 항목 27에 있어서, 상기 검출가능한 모이어티가 5,6-카복실테트라메틸로다민(TAMRA) 또는 인도디카보시아닌(Cy5)인, PICK1 억제제.

[0381] 55. 항목 27에 있어서, 상기 검출가능한 모이어티가 방사성 동위원소를 포함하거나, 또는 이들로 이루어지는, PICK1 억제제.

[0382] 56. 항목 30에 있어서, 상기 방사성 동위원소가 ^{125}I, ^{99m}Tc, ^{111}In, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{72}As, ^{89}Zr, ^{123}I, ^{18}F 및 ^{201}Tl로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, PICK1 억제제.

[0383] 57. 선행 항목 중 어느 하나에 따른 PICK1 억제제를 포함하는 미셀.

[0384] 58. 항목 1 내지 56 중 어느 하나에 따른 PICK1 억제제 또는 항목 57에 따른 미셀을 포함하는 약제학적 조성물.

[0385] 59. 의약으로서 사용하기 위한, 선행 항목 중 어느 하나에 따른 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물.

[0386] 60. 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한, 선행 항목 중 어느 하나에 따른 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물.

[0387] 61. 대상체에서 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애의 예방 및/또는 치료를 제공하는 방법으로서, 선행 항목 중 어느 하나에 따른 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

[0388] 62. 부적응 가소성과 관련된 질환 및/또는 장애의 치료용 의약의 제조를 위한, 선행 항목 중 어느 하나에 따른 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물의 용도.

[0389] 63. 항목 59 내지 60, 항목 61 또는 항목 62에 있어서, 상기 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애가 통증, 약물 중독, 근위축성 측삭 경화증, 간질, 이명, 편두통, 암, 허혈, 알츠하이머병 및/또는 파킨슨병인, 사용하기

위한 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물, 방법 또는 용도.

[0390] 64. 항목 59 내지 60, 항목 61 또는 항목 62에 있어서, 상기 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애가 통증, 예컨대, 염증성 통증 또는 신경병성 통증인, 사용하기 위한 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물, 방법 또는 용도.

[0391] 65. 항목 64에 있어서, 상기 통증이 기계적 또는 열적 이질통 또는 통각과민인, 사용하기 위한 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물.

[0392] 66. 항목 59 내지 60, 항목 61 또는 항목 62에 있어서, 상기 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애가 코카인 중독, 오피오이드 중독 또는 모르핀 중독 등의 약물 중독인, 사용하기 위한 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물, 방법 또는 용도.

[0393] 67. 항목 59 내지 60, 항목 61 또는 항목 62에 있어서, 상기 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애가 유방암 등의 암, 예를 들면, 조직학적 등급, 림프절 전이, Her-2/neu-양성 및 삼중-음성 기저 유사 유방암인, 사용하기 위한 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물, 방법 또는 용도.

[0394] 68. 항목 59 내지 60, 항목 61 또는 항목 62에 있어서, 상기 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애가 근위축성 측삭 경화증인, 사용하기 위한 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물, 방법 또는 용도.

[0395] 69. 항목 59 내지 60, 항목 61 또는 항목 62에 있어서, 상기 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애가 간질인, 사용하기 위한 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물, 방법 또는 용도.

[0396] 70. 항목 59 내지 60, 항목 61 또는 항목 62에 있어서, 상기 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애가 이명인, 사용하기 위한 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물, 방법 또는 용도.

[0397] 71. 항목 59 내지 60, 항목 61 또는 항목 62에 있어서, 상기 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애가 편두통인, 사용하기 위한 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물, 방법 또는 용도.

[0398] 72. 항목 59 내지 60, 항목 61 또는 항목 62에 있어서, 상기 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애가 허혈인, 사용하기 위한 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물, 방법 또는 용도.

[0399] 73. 항목 59 내지 60, 항목 61 또는 항목 62에 있어서, 상기 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애가 알츠하이머병인, 사용하기 위한 PICK1 억제제, 미셀 또는 약학적 조성물, 방법 또는 용도.

[0400] 74. 항목 59 내지 60, 항목 61 또는 항목 62에 있어서, 상기 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애가 파킨슨병인, 사용하기 위한 PICK1 억제제, 미셀 또는 약제학적 조성물, 방법 또는 용도.

[0401] 75. 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애의 진단에 사용하기 위한, 항목 1 내지 56 중 어느 하나에 따른 PICK1 억제제 또는 항목 57에 따른 미셀.

[0402] 76. 항목 75에 있어서, 상기 부적응 가소성과 관련된 질환 또는 장애가 유방암 등의 암인, 진단에 사용하기 위한 PICK1 억제제 또는 미셀.

[0403] 77. 항목 76에 있어서, 상기 유방암이 조직학적 등급, 림프절 전이, Her-2/neu-양성 및 삼중-음성 기저-유사 유방암으로부터 선택되는, 사용하기 위한 PICK1 억제제.

[0404] 78. 이를 필요로 하는 대상체에서 유방암을 진단하는 방법으로서,

[0405] a. 상기 대상체로부터 조직 샘플을 수득하는 단계;

[0406] b. 상기 샘플을 항목 50 내지 56에 따른 PICK1 억제제로 염색하는 단계;

[0407] c. 샘플 중의 PICK1의 수준을 결정하는 단계; 및

[0408] d. 샘플 중의 PICK1 수준을 건강한 기준과 비교하는 단계

[0409] 를 포함하고,

[0410] 여기서, 상기 샘플 중의 PICK1 수준의 증가는 상기 개체가 유방암을 갖는 것을 나타내는, 방법.

[0411] 79. 유방암을 앓고 있는 대상체의 예후를 예측하는 방법으로서,

[0412] a. 상기 대상체로부터 조직 샘플을 수득하는 단계;

[0413] b. 상기 샘플을 항목 50 내지 56에 따른 PICK1 억제제로 염색하는 단계;

[0414] c. 샘플 중의 PICK1의 수준을 결정하는 단계; 및

[0415] d. 샘플 중의 PICK1 수준을 건강한 기준과 비교하는 단계

[0416] 를 포함하고,

[0417] 여기서, 상기 샘플 중의 PICK1 수준 증가는 예후 불량을 나타내는, 방법.

[0418] **실시예**

[0419] **실시예 1: PICK1 발현 및 정제**

[0420] 전장 랫트 PICK1(pET41)은 이전에 기재된 바와 같이 제조했다[참조: Madsen et al., 2005]. 간단히 말해서, PICK1을 BL21-DE3-pLysS 세포에서 발현시키고, 37℃에서 성장시키고, OD_{600} = 0.6에서 1mM 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노사이드(IPTG)로 유도하고, 20℃에서 16시간 성장시켰다. 배양물을 회수하고, 50mM 트리스아미노메탄(Tris), 125mM NaCl, 2mM 디티오트레이톨(DTT, Sigma), 1% 트리톤 X-100(Sigma), 20㎍/mL DNAse 1 및 ½ 정제 cOmplete 프로테아제 억제제 칵테일(Roche) pr. 1L 배양물에 재현탁시켰다. 재현탁된 펠릿은 추후 정제를 위해 -80℃에서 동결했다. 용해물을 원심분리(4℃에서 30분 동안 36,000 × g)로 정화시키고, 상청액을 글루타티온-세파로스 4B 비드(GE Healthcare)와 함께 4℃에서 2시간 동안 온화하게 회전시키면서 인큐베이팅하고, 이어서 4,000 × g에서 5분 동안 원심분리했다. 상청액을 제거하고, 비드를 35mL 50mM 트리스, 125mM NaCl, 2mM DTT 및 0.01% 트리톤-X100에서 2회 세척했다. 비드를 PD-10 Bio-Spin® 크로마토그래피 컬럼(Bio-Rad)으로 옮기고, 추가의 3 컬럼 용적으로 세척했다. 각 컬럼을 밀봉하고, 0.075 U/㎕L, 노바겐(Novagen®)을 첨가하여, 온화하게 회전시키면서 4℃에서 절단 O/N을 수행했다. PICK1을 아이스 상에서 용출시키고, 280nm에서의 흡광도를 TECAN 플레이트 판독기 또는 NanoDrop3000에서 측정했다. 단백질 농도는 램버트 비어 법칙(A=εcl), $\varepsilon_{A280PICK1}=32320(cm*mol/L)^{-1}$을 사용하여 결정되었다.

[0421] **실시예 2: 화합물의 합성**

[0422] PEG_0-$(HWLKV)_2$, PEG_1-$(HWLKV)_2$, PEG_2-$(HWLKV)_2$, PEG_3-$(HWLKV)_2$, PEG_4-$(HWLKV)_2$, Ac-$(HWLK_{PEG4}V)_2$ 및 $NPEG_4$-$(HWLKV)_2$는 문헌[참조: Bach et al., 2012]에 기재된 바와 같이 고체상 펩티드 합성에 의해 합성했다.

[0423] $NPEG_4$-$(HWLKV)_2$는 문헌[참조: Nissen et al., 2015]에 기재된 바와 같이 미리스토일화되어 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$를 제공한다.

[0424] 형광 표지된 펩티드(5-FAM)는 5-FAM을 NPEG-링커의 아민에 직접 접합시키거나, 또는 5-FAM을 6-아미노헥산산(Ahx) 링커를 통해 펩티드의 N-말단에 접합시킴으로써 제조했다.

[0425] **실시예 3: myr-NPEG-$(HWLKV)_2$의 용액내 거동의 특성화**

[0426] myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 용액내 거동을 시험하기 위해, 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 수행하고, 대조군으로서 비접합 $NPEG_4$-$(HWLKV)_2$와 비교했다. 또한, 용액 중의 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 소각 X선 산란(Small Angle X-ray scattering; SAXS)를 수행하여, 입자 크기와 형상의 전체적 추정치를 수득했다.

[0427] **재료 및 방법:**

[0428] 크기 배제 크로마토그래피: 크기 배제 크로마토그래피는, 지시된 농도의 $NPEG_4$-$(HWLKV)_2$ 또는 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$ 500㎕L가 컬럼에 주입된, Superdex200 인크리즈(Increase) 10/300 컬럼을 갖는 액타(Akta) 정제기를 사용하여 수행했다. 흡광도 프로파일은 280nm에서 측정하고, 그래프 패드 프리즘(Graph Pad Prism) 8.3을 사용하여 용출 용적에 대해 플롯팅했다.

[0429] 소각 X선 산란:

[0430] 0.18mg/ml 내지 9.37mg/mL 범위의 myr-NPEG-$(HWLKV)_2$의 일련의 농도를 50mM 트리스(pH 7.4), 125mM NaCl을 함유하는 완충액에서 제조했다. 샘플은 독일 함부르크 소재의 DESY, 페트라(Petra) III, P12 SAXS 빔라인(Beamline)에서 측정되었다. 반경 방향의 평균화 및 산란 벡터 q의 함수로서 데이터의 절대 스케일 산란 강도

I(q)의 변환을 포함하는 예비적 데이터 삭감을 수행했고, 여기서, q= 4π sin(Θ)/λ(λ = 절반 산란각)은 빔라인에서 표준 절차를 사용하여 수행했다.

[0431] SAXS 데이터의 모델링은, 먼저 쌍 거리 분포 함수를 사용하고, 후속적으로 다분산 구체에 대한 분자 구속 코어-쉘 모델을 사용하는 2개 방법으로 수행되었다. 요약하면, 펩티드가 다분산 구형 미셀로 응집되는 것으로 가정했다. 여기서, 소수성 테일이 코어를 형성하고, 이들은 구형 미셀에서 친수성 부분(쉘)으로 둘러싸여 있다. 모델링을 위해, 헤드 그룹과 테일에 각각 2.26e-10cm 및 2.96e-11cm의 산란 길이를 사용했다. 이것은, 분자 구조 내의 전자 수를 계수하고, 전자의 산란 길이를 곱하여 계산되었다. 산란 길이 밀도의 계산을 위해, C_{13} 알킬 쇄의 분자 용적이 탠포드(Tanfords) 실험식($V=27.4 + 26.9n_C$)로부터 추정되는 바와 같이 377Å^{3}인 것으로 가정했고, 여기서, n_C는 탄소 수를 나타내고, 즉, 이 경우는 13이다. 친수성 헤드 그룹은, 제1 추정치로서, 가용성 단백질의 질량 밀도(즉, 1.35g/cm^3)에 상응하는 질량 밀도를 갖는 것으로 가정되고, 이에 의해 2078Å^{3}의 분자 용적이 수득되었다. 이 값은 적합도에서 자유 파라미터로서 채용되고, 1.39g/cm^{3}의 질량 밀도에 상응하는 약 2010Å^{3}의 분자 용적으로 정련되고, 다양한 샘플 농도에 대한 적합의 변동은 거의 없었다. 이어서, 과잉 산란 길이 밀도를 물(9.4e10 1/cm^2)과 관련하여 계산했다. 이 분자 구속 모델을 사용하여, 코어 및 쉘의 용적은 적합된 응집 수(N_{agg})를 통해 내부적으로 커플링되었다. 다분산성은 N_{agg}의 가우스 함수에 의해 기술되었다. 가우스는 ±3시그마에서 절단되었다. 적합에는 윌트피트(WillItFit) 소프트웨어의 모델 모듈 "PolydisperseMicelles"을 사용했다. 평소와 같이, 모델을 수렴하기 위해서는 작은 표면 거칠기와 작은 일정한 배경도 필요했다.

[0432] 산란 데이터가 병합되었고; 1.02의 비닝 계수와 함께 WillItRebin을 사용하여 버퍼를 차감하여 비닝했다. 쌍 거리 분포 함수(pddf)는 베예사프(bayesapp)(http://www.bayesapp.org/)를 사용하여 간격 [0.0122-0.4] Å^{-1}에서 적합시켰고, 적합 파라미터는 하기 데이터 수집 표에 보고되어 있다.

표 1

[0433]

샘플 상세	$Myr-APEG_4-(HWLKV)_2$					
펩티드	$C_{14}-PEG_4-(HWLKV)_2$					
완충제	50mM Tris, 125mM NaCl, pH 7.4					
흡광 계수	11000 M^{-1} cm^{-1}					
분자량	1874 g/mol					
펩티드 농도	0.19 - 9.37 mg/ml					
SAXS 데이터 수집 상세						
장치	P12, Petra III, DESY [1]					
데이터 수집 일자	09-05-2019					
파장 (Å)	1.24					
측정된 q-범위 (Å^{-1})	0.0025-0.73					
절대 보정	물					
노출 시간 (ms)	10					
온도 (K)	293.35					
소프트웨어						
데이터 레빈	WillItRebin					
쌍 거리 분포 함수의 도출 결과						
분자량 (kDa)	14.8	13.2	13.8	11.2	10.4	9.2
$n_{myr-NPEG4-(HWLKV)2}$	7.9	7.1	7.3	6.0	5.5	4.9
코어 쉘 모델 수득 결과						
농도	300 μM	400 μM	1000 μM	3000 μM	5000 μM	
$n_{myr-NPEG4-(HWLKV)2}$	19	22	22	21	19	

각주 및 참고문헌

[1] C. E. Blanchet, A. Spilotros, F. Schwemmer, M. A. Graewert, A. Kikhney, C. M. Jeffries, D. Franke, D. Mark, R. Zengerle, F. Cipriani, S. Fiedler, M. Roessle, D. I. Svergun, *J Appl Crystallogr* **2015**, *48*, 431.

[2] S. Hansen, *Journal of Applied Crystallography* **2012**, *45*, 566.

[3] S. Hansen, *Journal of Applied Crystallography* **2014**, *47*, 1469.

[0434] **결과:**

[0435] 이 일련의 실험에서는 SEC 및 SAXS를 사용하여 myr-NPEG4-(HWLKV)2를 고차 올리고머 구조로 조립하는 능력에 대해 시험했다.

[0436] 크기 배제 크로마토그래피: 비접합 NPEG-$(HWLKV)_2$와 비교하여, myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 자가 조립화에 대한 농도 의존성을 나타내기 위해 SEC 실험을 수행했고, myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$는 보다 낮은 용출 용적에서 용출한 것으로 밝혀졌고, 이는 보다 큰 유체역학적 반경, 따라서 보다 큰 분자 조립을 시사한다(도 1).

[0437] 소각 X선 산란: myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 자가 조립화에 대한 농도 의존성을 나타내기 위해 SAXS 실험을 수행했고, 쌍 거리 분포 함수를 분석하는 표준 분석을 사용하여, myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$는 5-8개의 개별 분자로 이루어진 20-23.6Å의 회전 반경(Rg)을 갖는 미셀 구조로 명백히 조립되는 것으로 밝혀졌다(도 2a-c).

[0438] 쌍 거리 분포 함수는 지방족 그룹의 음의 산란 기여를 고려하지 않기 때문에, 이 분석은 분자 조립의 분자 수를 과소평가한다. 상기에서 설명한 코어-쉘 모델을 사용한 데이터 분석은 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$가 19-22개의 개별 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$ 분자를 포함하는, 반경 직경 20-24Å의 구상 코어-쉘 형상과 같이 미셀 구조로 조립되는 것을 시사했다.

[0439] **결론**

[0440] 본 실시예는 본 개시의 PICK1 억제제가 용액 중에서 미셀 구조 등의 고차 구조를 형성할 수 있음을 입증한다.

[0441] **실시예 4: PICK1에 대한 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 결합**

[0442] 재조합 PICK1에 대한 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 결합을 시험하기 위해, 형광 편광을 수행했다. 결합시 PICK1의 고차 복합체 형성을 검증하기 위해, 크기 배제 크로마토그래피를 수행했다.

[0443] **재료 및 방법**

[0444] PICK1은 실시예 1에 기재된 바와 같이 발현 및 정제되었다.

[0445] 형광 편광: 형광 편광은 일정 농도의 단백질 및 트레이서(5FAM-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$, 5nM 또는 5FAM-HWLKV, 20nM)에서 경쟁 모드에서 지시된 비표지 펩티드의 농도 증가에 대해 수행되었다. 플레이트를 흑색 절반-면적 코닝 블랙(Corning Black) 비결합 표면 96웰 플레이트의 아이스 상에서 2시간 동안 인큐베이팅했다. 형광 편광은, 488nm에서 여기 필터와 535nm에서 롱 패스 방출 필터를 사용하여 오메가 폴라스타(Omega POLARstar) 플레이트 판독기에서 직접 측정되었다. 데이터는 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 8.3을 사용하여 플롯되었고, Ki,app 값을 추출하기 위해 원 사이트(One site) 경쟁에 적합시켰다.

[0446] 크기 배제 크로마토그래피: 크기 배제 크로마토그래피는 Superdex200 인크리즈(Increase) 10/300 컬럼을 갖는 액타(Akta) 정제기를 사용하여 수행했고, 여기서 10 μM myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 존재 또는 부재하에 500 μL의 40 μM PICK1을 컬럼에 로딩했다. 흡광도 프로파일은 280nm에서 측정하고, 그래프 패드 프리즘(Graph Pad Prism) 8.3을 사용하여 용출 용적에 대해 플롯팅했다.

[0447] **결과**

[0448] 이 일련의 실험에서는, 형광 편광을 사용하여, myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$를 재조합 정제 PICK1에 결합하는 능력, 및 SEC에 의해 입증된 바와 같이 복합체를 형성할 때에 PICK1의 고차 올리고머를 유도하는 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 능력을 시험했다(도 4).

[0449] PICK1에 대한 결합 친화성을 결정하기 위해 형광 편광(FP) 실험을 수행했다. 5FAM-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$ 또는 5FAM-HWLKV를 형광 트레이서로서 사용한 경쟁 실험은 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$(Ki,app = 3.0nM, SEM 간격 [2.3-3.8] nM, n = 6) HWLKV(Ki,app = 6998 nM, SEM 간격 [4972-9849] nM, n = 3)와 비교하여 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 >1000배 친화성 증가, 및 MPEG$_4$-(HWLKV)$_2$ (Ki,app = 179 nM, SEM 간격 [169-189], n = 6)와 비교하여 myr-MPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 >50배 친화성 증가를 입증했다(도 3).

[0450] 크기 배제 크로마토그래피는 PICK1과 복합체를 형성한 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 용액 중 거동을 평가하기 위해 수행했다. 용출 용적은 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$가 결합시 PICK1의 고차 올리고머 구조를 형성하는 것을 시사했다(도 4).

[0451] **결론**

[0452] 본 실시예는 본 개시의 PICK1 억제제가 PICK1에 대한 높은 친화성 결합을 나타내는 것을 입증한다. 2가 펩티드 리간드에 대한 지질의 접합은 비접합 NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$와 비교하여 >50배 친화성 증가를 제공한다.

[0453] 본 실시예는 본 개시의 PICK1 억제제가 결합시에 PICK1의 고차 구조를 유도할 수 있음을 추가로 입증한다. 이러한 PICK1의 고차 구조를 유도함으로써 단백질 기능이 억제될 가능성이 높다.

[0454] **실시예 5: 고친화성 결합제를 동정하기 위한 PICK1 결합 펩티드 리간드의 서열 최적화**

[0455] DAT-C5(HWLKV) 서열(즉, 위치 X_1 - X_5)에서 PICK1 PDZ 결합 모티프의 엄격성을 시험하고 보다 양호한 친화성을 갖는 펩티드를 추정하기 위해, HWLKV 서열의 각 잔기가 19개의 기타 천연 아미노산 중 하나로 치환된 95개의 상이한 펜타-펩티드의 정제된 PICK1에 대한 형광 편광 결합을 사용하여 초기 연구를 수행했다.

[0456] 추가로, 상기 실험에서 수득된 데이터를 취득하고, 아미노산의 조합 치환에서 유래하는 52개의 상이한 펜타, 테트라 및 트리-펩티드를 설계하기 위한 지침으로 이용했다. 보다 양호한 친화성을 갖는 추정 펩티드를 검증하기 위해, 정제된 PICK1에 대한 결합 친화성을 형광 편광 결합 검정으로 연구했다.

[0457] **재료 및 방법:**

[0458] 형광 편광: 형광 편광은 일정 농도의 단백질 및 트레이서(5FAM-HWLKV, 20nM)에서 경쟁 모드에서 지시된 비표지 펩티드의 농도 증가에 대해 수행되었다. 플레이트를 아이스 상에서 20분 동안, 흑색 절반-영역 코닝 블랙(Corning Black) 비결합 표면 96웰 플레이트에서 인큐베이팅하고, 형광 편광은 488nm에서 여기 필터 및 535nm에서 롱 패스 방출 필터를 사용하여 오메가 폴라스타(Omega POLARstar) 플레이트 판독기로 직접 측정했다. 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 6.0을 사용하여 데이터를 플롯팅하고, 원 사이트(One site) 경쟁에 적합시켜, HWLKV 친화성과 모두 상관관계가 있는 K_d 값을 추출했다.

[0459] **결과**

[0460] 단일 치환 실험:

[0461] X_1 및 X_3의 치환은, 친화성을 증가시키는 X_3으로부터 V 및 I로의 치환을 제외하고는 대부분 결합을 파괴했다(밝은 음영으로 표시됨)(도 5). 위치 X_2에서, R, C, I 및 L로의 치환은 모두 친화성을 증가시켰고, 대부분의 치환은 허용되었다. 유사하게는, X_4 및 X_5의 치환은, 친화성을 감소시키는 X_4의 양으로 하전된 잔기의 현저한 예외를 제외하고는 일반적으로 충분히 허용되었다. 위치 X_4에서, Y, E, S, Q, C, A 및 G로의 치환은 친화성을 증가시켰다. 대부분의 치환(Y, F, T, S, Q, N, C, V, M, I, G, A를 포함)은 위치 X_5에서 친화성을 증가시켰지만, 몇몇 치환에서는 용해도가 저하되었다.

[0462] 52개의 조합 펩티드:

[0463] 클래스 II 결합 모티프의 이중 치환에 기초하여, 다수의 조합이 충분히 허용되고, 일반적으로 위치 X_1에서 N, 위치 X_2에서 S/E, 위치 X_4에서 R이 더 양호한, 또는 섭동되지 않은 친화성을 갖는 반면, 위치 X_1에서 F는 일반적으로 충분히 허용되지 않았다(도 6).

[0464] **결론**

[0465] 이 실시예는 아미노산 치환에 의한 HWLKV 서열의 최적화가 PICK1에 대해 동등하고 훨씬 더 높은 친화성을 나타내는 펩티드 리간드를 제공하는 것을 입증한다.

[0466] **실시예 6: PEG의 변이체 및 펩티드 리간드에 대한 PEG의 부착 부위의 변이체**

[0467] 이 일련의 실험에서, 정제된 PICK1에 대한 2가 펩티드 리간드(도 7)를 포함하는 다양한 PEG_x(x = 0-4 에틸렌 글리콜 모이어티)의 친화성을 시험하고자 했다. 또한, PEG_4가 서열 HWLKV의 라이신(K) 아미노산 측쇄에 연결된 상이한 링커 부착을 사용하는 경우의 정제된 PICK1에 대한 친화성을 시험하고자 했다(도 7, ac-$(HWLK_{PEG4}V)_2$).

[0468] **재료 및 방법**

[0469] PICK1은 실시예 1에 기재된 바와 같이 발현 및 정제되었다.

[0470] 형광 편광: 형광 편광은, 표지되지 않은 PEG_x-$(HWLKV)_2$의 증가하는 농도에 대하여, 고정 농도의 단백질 및 트레이서(5FAM-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$, 5nM)에서 경쟁 모드로 수행되었다. 플레이트를 아이스 상에서 2-4시간 동안 흑색 절반-영역 코닝 블랙(Corning Black) 비결합 표면 96웰 플레이트에서 인큐베이팅하고, 488-nm의 여기 필터 및 535-nm의 통 패스 방출 필터를 사용하여 오메가 폴라스타(Omega POLARstar) 플레이트 판독기에서 형광 편광을 측정했다. 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 6.0을 사용하여 데이터를 플로팅하고, 원 사이트(One site) 경쟁에 적합시켜 K_I 값을 추출하고, 이는 HWLKV 펩티드의 친화성과 모두 상관관계가 있고, 최종적으로 친화성 증가의 배수로서 플로팅되었다.

[0471] **결과**

[0472] 2개의 동일한 펜타 펩티드 사이에 필요한 최소 거리를 시험하기 위해, 상이한 PEG 링커 길이와 위치를 시험하기로 결정했다. 상이한 길이의 PEG 링커 사이에서 친화성의 변화가 거의 없음이 발견되었고, 모두가 HWLKV 펩티드와 비교하여 PICK1 친화성을 증강시킨다(도 8).

[0473] 또한, N-말단 아민 대신에, X_4 라이신 측쇄 아민에 대한 PEG_4 링커의 부착은 PEG_4-HWLKV와 비교하여 현저하게 친화성을 변화시키지 않는 것으로 밝혀졌다.

[0474] **결론**

[0475] 본 실시예는 본 개시의 PICK1 억제제에서 링커의 길이 및 부착 부위의 변동이 충분히 허용된다는 것을 입증한다.

[0476] **실시예 7: 염증성 통증에서 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 효능 평가**

[0477] 이 일련의 실험에서, 마우스의 완전 프로인트 애주번트(Complete Freund's Adjuvant; CFA) 모델에서 염증성 통증을 완화하기 위한 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 치료 효능을 평가하는 것을 목적으로 한다.

[0478] **재료 및 방법.**

[0479] 염증성 통증: 실험을 시작하기 전에, 동물을 최소 60분 동안 실험실에 순응시켰다. 기계적 통증 역치는 양쪽 뒷발의 폰 프레이(von Frey) 측정에 의해 결정되었다. 손상은 우측 뒷발에서 유발했고, 반대측 좌측 뒷발은 동물의 내부 대조군으로 사용했다. 0.04 내지 2g(g = 그램-포스)(0.04, 0.07, 0.16, 0.4, 0.6, 1.0, 1.4, 2.0) 범위의 폰 프레이 필라멘트를 사용하여 기계적 통증 역치를 측정했다. 현재 실험에서, 오름차순으로 필라멘트를 뒷발의 전두 중앙 발바닥 표면에 적용했다. 마우스를 와이어 메쉬 상의 PVC 플라스틱 박스(11.5cm × 14cm)에 넣고, 순응하기 전에 30분 동안 적응시켰다. 각각의 폰 프레이(von Frey) 모발은 5회 적용하고, 각 적용 사이에 적절한 휴식 시간을 두고, 움츠림 회수를 기록했다. 움츠림 역치는 폰 프레이 필라멘트가 2개의 연속 필라멘트에서 5회의 적용 중 적어도 3회의 양성 시험을 유도하는 것으로서 결정되었다. 양성 시험은 필라멘트에 의해 유발된 돌연한 발 움츠림, 움찔 및/또는 발 핥기로서 정의되었다. 염증성 통증은 50 μL 희석되지 않은 완전 프로인트 애주번트(Complete Freund's Adjuvant; CFA)(F5881, Sigma)를 우측 뒷발의 발바닥 표면에 편측으로 주사함으로써 유발한 반면, 대조군 마우스에는 동일한 양의 0.9% 생리식염수(B. Braun, Germany)를 주사했다. 모든 발바닥 주사는, 동물이 최대 60초 동안 이소플루란 마취(2%)하에 있는 동안, 인슐린 바늘(0.3mL BD Micro-Fine)을 사용하여 수행되었다. 폰 프레이(Von Frey)는 실험에 따라 편측 CFA 주사 후 11일까지 적용되었다. myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$는 상이한 경로(척수강내(i.t.(7 μL)) 또는 피하(10 μL/g))를 통해 상이한 농도(2, 10 또는

50μmol/kg)로 투여되었다. 통계 분석은 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 6.0을 사용하여 수행했다. 양방향 RM ANOVA 및 이어서 본페로니(Bonferroni)의 사후 검정. 유의 수준은 $p< 0.05$로 설정되었다.

[0480] **결과**:

[0481] 하기에서, 3개의 상이한 치료법을 사용하여 CFA 모델에서 염증성 통증을 완화하는 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 효능을 나타낸다.

[0482] 0일차에 마우스에게 50μL의 CFA 또는 생리식염수를 우측 뒷발에 i.pl 주사했다. 2일 후, 마우스에 50μmol/kg(10μL/g) myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$ 또는 생리식염수를 피하 주사했다. 유발된 통증은 주사 전, 주사 후 1, 5, 24시간에 폰 프레이 필라멘트를 사용하여 시험했다. 양방향(Two-way) ANOVA 및 이어서 본페로니(Bonferroni)의 사후 분석에 의해, myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 전체적으로 유의한 효과가 나타났고, 주사 후 1시간 동안 시험한 경우, 유의한 통증 완화가 관찰되었다. 또한, 데이터는 CFA 대신에 뒷발에 생리식염수를 주사하여도 효과가 없는 것을 나타냈고, 통각과민에 대한 CFA 효과는 주사 후 11일차에 소실되었다(도 9a).

[0483] 0일차에, 마우스에게 50μL의 CFA 또는 생리식염수를 우측 뒷발에 i.pl 주사했다. 2일 후, 폰 프레이 필라멘트를 사용하여 통각과민을 확인하고, 마우스에게 2, 10 또는 50μmol/kg(10μL/그램) myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$ 또는 생리식염수(10μL/그램)을 피하 주사했다. 주사 후 1, 5 및 24시간에 폰 프레이 필라멘트를 사용하여 유발된 통증을 다시 시험했다. 양방향 ANOVA 및 이어서 본페로니의 사후 분석은 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 전체적으로 유의한 효과를 나타냈고, 시험한 최고 농도의 경우 주사 후 최대 5시간까지 유의한 통증 완화가 나타났고, 2개의 보다 낮은 농도의 경우 주사 1시간에 시험시 유의한 통증 완화가 나타났다(도 9b).

[0484] 0일차에, 마우스에게 50μL의 CFA 또는 생리식염수를 우측 뒷발에 i.pl 주사했다. 2일 후, 폰 프레이(von Frey) 필라멘트를 사용하여 통각과민을 확인하고, 마우스에게 20μM myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$ 또는 생리식염수를 7μL의 용적으로 척수강내 주사했다. 유발된 통증은, 주사 후 1, 5 및 24시간에서 폰 프레이 필라멘트를 사용하여 다시 시험했다. 양방향 ANOVA 및 이어서 본페로니(Bonferroni)의 사후 분석에 의해, myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 전체적으로 유의한 효과가 나타났고, myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$ 투여 후 1시간과 5시간에서 유의한 통증 완화가 나타났지만, 투여 후 24시간에서는 효과가 없었다(도 9c).

[0485] **결론**

[0486] 이 실시예는 염증성 통증의 CFA 모델에서 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$가 발 움츠림 역치의 증가에 의해 밝혀진 바와 같이 염증성 통증을 유의하게 완화시킨다는 것을 입증한다(도 9a-c). 또한, 무손상의 반대측 발에서 발 움츠림 역치는 변화되지 않은 상태로 유지되는 것으로 밝혀졌다. myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$는 2회 용량을 피하 주사한 후 통증을 완화하는 데 효과적이었다(도 9a-b). 추가로, myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$는 척추강내 주사 후 염증성 통증을 완화시키고(도 9c), 이는 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$가 중추 감작화를 억제하는 것을 확인시켰다.

[0487] **실시예 8: 신경병성 통증에서 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 효능 평가**

[0488] 이 실험에서, myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 치료 효능을 평가하여, 마우스의 절제된 신경 손상(SNI) 모델에서 신경병성 통증을 완화하는 것을 목적으로 한다.

[0489] **재료 및 방법**

[0490] 신경병성 통증. SNI 통증 실험은 스테판 게일라드 박사(Stephane Gaillard, PhD(CEO))의 감독하에 표현형 전문 지식(Phenotype Expertise) - 통증 및 CNS 행동 CRO에 의해 수행되었다. 연구는 8주령 C57Bl6J 수컷 마우스(Charles River)에서 수행되었다. 절제된 신경 손상 수술은 마취된 마우스에서 수행되었다. 좌골 신경의 총비골 및 경골 원위 분지의 결찰 및 절개를 수행하여, 비복 분지를 손상시키지 않았다. 수술 7일 후, 동측 뒷발의 폰 프레이 필라멘트에 대한 역치 반응의 감소는 신경병성 통증 상태에 상응하는 폰 프레이 필라멘트에 의해 확인되었다. 수술한 마우스의 기계적 역치 반응은 보정된 폰 프레이 필라멘트("업/다운(up/down)" 방법)로 측정하고, 50% 역치(g)를 계산했다. 실험자는 마우스 치료에 대해 블라인드되었다. 기계적 역치를 수술 전에 측정하고, 약물 투여 후 0시간, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 및 6시간에서 7일차에 다시 측정했다. 모든 화합물을 PBS에 희석하고, 10μL/g로 피하 투여했다. 통계 분석은 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 6.0을 사용하여 수행했다.

양방향 RM ANOVA 및 이어서 본페로니(Bonferroni)의 사후 시험. 유의 수준은 $p< 0.05$로 설정되었다.

[0491] **결과:**

[0492] 마우스는 비골 신경과 경골 신경의 절단에 의해 부분 신경 손상을 유도하는 수술을 받았고, 나머지 비복 신경(SNI)의 과민증을 생성했다. 7일 후, 통각과민은 폰 프레이 필라멘트를 사용하여 확인하고, 마우스에게 2 또는 10 μmol/kg(10 μL/g) myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$ 또는 생리식염수(10 μL/g 마우스)를 피하 주사했다. 주사 후 1, 2, 3, 4 및 6시간에서 폰 프레이 필라멘트를 사용하여 유발된 통증을 다시 시험했다. 양방향 ANOVA 및 이어서 본페로니의 사후 분석에 의해, myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 전체적으로 유의한 효과가 나타났고, 시험한 최고 농도에서는 주사 후 3시간까지 유의한 통증 완화가 나타났고, 이보다 낮은 농도에서는 유의한 통증 완화가 나타나지 않았다.

[0493] **결론**

[0494] 이 실시예는 신경병성 통증의 SNI 모델에서 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$가 치료 후 마우스에서 발 움츠림 역치의 증가에 의해 밝혀진 바와 같이 신경병성 통증을 유의하게 완화시킨다는 것을 입증한다. 또한, 무손상의 반대측 발에서 발 움츠림 역치가 변화되지 않은 상태로 유지되는 것으로 밝혀졌다. 이에 의해, myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$가 피하 주사 후의 통증을 용량 의존적 방식으로 완화시키는 데 효율적인 것이 확인되었다(도 10).

[0495] **실시예 9: 신경병성 통증에서 $NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 효능 평가**

[0496] 이 실험에서는, $NPEG_4$-$(HWLKV)_2$(지방족 쇄, PD5를 갖지 않음)의 치료 효능을 평가하여 마우스의 절제된 신경 손상(Spred Nerve Injury; SNI) 모델 후의 신경병성 통증을 완화하는 것을 목적으로 했다.

[0497] **재료 및 방법**

[0498] 신경병성 통증. 연구는 8주령 C57Bl6J 수컷 마우스(Charles River)에서 수행되었다. 절제된 신경 손상 수술은 마취된 마우스에서 수행되었다. 좌골 신경의 총비골 및 경골 원위 분지의 결찰 및 절개를 수행하여, 비복 분지를 손상시키지 않았다. 수술 9일 후, 동측 뒷발의 폰 프레이 필라멘트에 대한 역치 반응의 감소는 신경병성 통증 상태에 상응하는 폰 프레이 필라멘트에 의해 확인되었다. 수술한 마우스의 기계적 역치 반응은 보정된 폰 프레이 필라멘트("업/다운(up/down)" 방법)로 측정하고, 50% 역치(g)를 계산했다. 실험자는 마우스 치료에 대해 블라인드되었다. 기계적 역치를 수술 전에 측정하고, 9일차에 약물 투여 후 0시간, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 및 6시간에서 다시 측정했다. 모든 화합물을 PBS에 희석하고, 10 μmol/kg(10 μL/g) $NPEG_4$-$(HWLKV)_2$를 10 μL/g에서 피하 투여했다. 통계 분석은 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 6.0을 사용하여 수행되었다. 양방향 RM ANOVA 및 이어서 본페로니의 사후 시험. 유의 수준은 $p< 0.05$로 설정되었다.

[0499] **결과:**

[0500] 마우스는 비골 신경과 경골 신경의 절단에 의한 부분 신경 손상을 유도하는 수술을 받았고, 나머지 비복 신경(SNI)에 과민증을 유도했다. 9일 후, 통각과민은 폰 프레이 필라멘트를 사용하여 확인하고, 마우스에게 10 μmol/kg(10 μL/g) $NPEG_4$-$(HWLKV)_2$(PD5)를 피하 주사했다. 유발된 통증은 주사 후 1, 2, 3, 4 및 6시간에서 폰 프레이 필라멘트를 사용하여 다시 시험했다. 양방향 ANOVA 및 이어서 본페로니의 사후 분석에 의해, 지방족 그룹을 포함하지 않는 $NPEG_4$-$(HWLKV)_2$에 의한 치료의 유의한 효과가 없는 것으로 나타났다(도 11). 비교를 위해, myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$ 및 실시예 8의 비히클 그룹(도 10)을 점선으로 표시한다.

[0501] **결론**

[0502] 이 실시예는 신경병성 통증의 SNI 모델에서 $NPEG_4$-$(HWLKV)_2$(지방족 쇄를 갖지 않음)가 치료 후 마우스에서 발 움츠림 역치의 증가에 의해 밝혀진 바와 같이 신경병성 통증을 유의하게 완화시키지 않는다는 것을 입증한다.

[0503] **실시예 10: 만성 신경병성 통증에서 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 효능 평가**

[0504] 이 실험의 목적은 마우스에서 절제된 신경 손상(Spred Nerve Injury; SNI) 모델로부터 1년 후의 신경병성 통증을 완화하기 위한 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 치료 효능을 평가하는 것이었다.

[0505] **재료 및 방법**

[0506] 신경병성 통증. 연구는 8주령의 C57Bl6J 수컷 마우스(Charles River)에서 수행되었다. 절제된 신경 손상 수술은

마취된 마우스에서 수행되었다. 좌골 신경의 총비골 및 경골 원위 분지의 결찰 및 절개를 수행하여 비복 분지를 손상시키지 않았다. 수술 2일 후, 동측 뒷발의 폰 프레이 필라멘트에 대한 역치 반응의 감소가 신경병성 통증 상태에 상응하는 폰 프레이 필라멘트에 의해 확인되었다. 마우스는 매달 폰 프레이에서 시험되었고, 52주에서의 통각과민 반응이 지속되었다.

[0507] 수술한 마우스의 기계적 역치 반응은 보정된 폰 프레이 필라멘트("업/다운(up/down)" 방법)로 측정하고, 50% 역치(g)를 계산했다. 실험자는 마우스 치료에 대해 블라인드되었다. 주사 후, 2시간 및 5시간에서 기계적 역치를 측정했다. 모든 화합물을 PBS에 희석하고, 10 μL/g, 30 μmol/kg에서 피하 투여했다. 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 6.0을 사용하여 통계 분석을 수행했다. 일방향 분산 분석 및 이어서 둔네트(Dunnett)의 다중 비교 검정. ****, p< 0.0001.

[0508] **결과:**

[0509] 마우스는 비골 신경과 경골 신경의 절단에 의해 부분 신경 손상을 유발하는 수술을 받았고, 나머지 비복 신경(SNI)에 과민증을 유발했다. 2일 후, 폰 프레이 필라멘트를 사용하여 통각과민을 확인했다(도 12). 이것은 52주 후에도 변화되지 않았다. 마우스에게 30 μmol/kg(10 μL/g) myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$(10 μL/g 마우스)를 피하 주사했다. 유발된 통증은 주사 후 2시간과 5시간에서 폰 프레이 필라멘트를 사용하여 다시 시험했다. 일방향 ANOVA 및 이어서 둔네트(Dunnett)의 다중 비교 검정에 의해, 5시간에서 매우 유의한 처리 효과가 나타났다(p<0.0001).

[0510] **결론**

[0511] 이 실시예는 신경병성 통증의 SNI 모델에서 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$가 치료 후 마우스에서 발 움츠림 역치의 증가에 의해 밝혀진 바와 같이 SNI 손상의 유도 후 1년 동안 신경병성 통증을 유의하게 완화시킨다는 것을 입증한다.

[0512] **실시예 11: 당뇨병성 신경병에서 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 효능 평가**

[0513] 이 실험의 목적은 1형 당뇨병의 스트렙토조신(streptozocin; STZ) 모델을 사용하여 당뇨병성 신경병을 완화하기 위한 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 치료 효능을 평가하는 것이었다.

[0514] **재료 및 방법**

[0515] 당뇨병성 신경병성(STZ) 모델. 당뇨병은 200 μg/mL의 단일 IP 주사로 유발된다. 스트렙토조신 용액(100 μl/10g, Sigma-aldrich S0130, 배치 #WXBB7152V). 혈당치는 주사 전과 주사 후 7일에 시험한다. 주사된 모든 마우스는 D+7에서 > 350 mg/dL의 혈당 농도를 나타내고, 이어서 D+14에서 화합물의 진통 시험에 사용된다. 1마리의 마우스를 주사 후 7일차에 안락사시켜야 했다.

[0516] 수술한 마우스의 기계적 역치 반응은 보정된 폰 프레이 필라멘트("업/다운(up/down)" 방법)로 측정하고, 50% 역치(g)를 계산했다. 실험자는 마우스 치료에 대해 블라인드되었다. 수술 13일 후, 동측 뒷발의 폰 프레이 필라멘트에 대한 역치 반응의 감소가 당뇨병성 신경병에 상응하는 폰 프레이 필라멘트에 의해 확인되었다. myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 주사 후, 기계적 역치를 1, 2, 4 및 6시간 및 15일차에 다시 측정했다. 화합물을 PBS(비히클)에 희석하고, 표시된 용량(가바펜틴, 5MPK)으로 10 μL/g 피하 투여했다. 통계 분석은 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 6.0을 사용하여 수행되었다. 일방향 분산 분석 및 이어서 둔네트(Dunnett)의 다중 비교 검정. ****, p< 0.0001.

[0517] **결과:**

[0518] STZ 투여 7일 후, 모든 마우스는 혈당의 급격한 증가(197.4 +/- 4.4 mg/dL로부터 533.5 +/- 10.4로, 별지 참조)를 나타내어, 마우스의 당뇨병 상태를 입증했다. 도 13에서 보는 바와 같이, STZ 주사 13일 후, 당뇨병-유발 신경병성 통증은 기계적 반응 역치의 저하(기계적 이질통)에 의해 명확하게 확립되었다. 프레가발린(5MPK) 투여는 비히클 그룹과 비교하여 기계적 반응 역치의 유의한 증가를 유도했고(투여 후 1시간, 2시간 및 4시간에서 p<0.001), 최대 역전은 +2시간에서 기준선의 최대 84.7 ± 10.5%이다. 2 및 10 μmol/kg의 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$(mPD5) 용액 모두는 비히클 그룹과 비교하여 기계적 반응 역치의 유의한 증가를 유도했다(최저 농도에서는 1h에서 p=0.006 및 2h에서 p=0.003; 10 μmol/kg 용액에서는 1시간 및 2시간에서 p<0.001, 4시간에서 p<0.006). 최대 역전은 투여 후 2시간 후에 도달되었다(2 및 10 μmol/kg 용액에서, 각각 기준선의 49.2 ± 7.9% 및 67.3 ± 4.5%). 흥미롭게도, 또한 1시간과 2시간에 mPD5로 치료한 두 그룹 사이의 통계적 차이가 관찰되었다

(각각 p=0.013 및 p=0.008).

[0519] **결론**

[0520] 이 연구에서, 마우스의 STZ-유발성 신경병성 통증 모델에 대한 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 진통 효과를 시험했다. 흥미롭게도, 10μmol/kg의 투여 후 최대 4시간까지, 강력하고 장기 지속되는 효과가 관찰되었다. 동시에, 펩티드의 용량 의존적 효과도 관찰되었고, 2μmol/kg 용량에서는 효과가 더욱 약했다. 참고로, 눈에 띄는 부작용은 관찰되지 않았다.

[0521] **실시예 12: 염증성 통증에서 myr-NPEG$_4$-(NSVRV)$_2$, myr-NPEG$_4$-(SVRV)$_2$ 및 myr-NPEG$_4$-(LRV)$_2$의 효능 평가**

[0522] 이 일련의 실험에서, 목적은 마우스의 완전 프로인트 애주번트(Complete Freund's Adjuvant; CFA) 모델에서 염증성 통증을 완화하기 위해 실시예 5에 기재된 펩티드 최적화에 의해 정의된 바와 같이 PDZ 도메인 결합 서열에 대한 변이체의 치료 효능을 평가하는 것이었다. 이는 실시예 5에서 스크리닝으로부터 생체내 효능으로의 변환을 정의하고, 더 짧은 결합 모티프(C4 및 C3)의 효과를 입증한다.

[0523] **재료 및 방법.**

[0524] 염증성 통증(CFA 모델): 실험을 개시하기 전에, 동물을 최소 60분 동안 실험실에 순응시켰다. 기계적 통증 역치는 양쪽 뒷발의 폰 프레이 측정에 의해 결정되었다. 우측 뒷발에 손상을 유발한 반면, 반대측 좌측 뒷발은 동물의 내부 대조군으로 사용했다.

[0525] 0.04 내지 2g(g = 그램 포스)(0.04, 0.07, 0.16, 0.4, 0.6, 1.0, 1.4, 2.0)의 범위의 폰 프레이 필라멘트를 사용하여 기계적 통증 역치를 결정했다. 현재의 실험에서, 필라멘트를 오름차순으로 뒷발의 전두 중앙 발바닥 표면에 적용했다. 마우스를 와이어 메쉬 상의 PVC 플라스틱 상자(11.5cm × 14cm)에 넣고, 시험 전에 30분 동안 순응시켰다. 폰 프레이의 모발은 각각 5회 적용시키고, 각 적용의 사이에 충분한 휴식 기간을 갖고, 움츠림 회수가 기록된다. 움츠림 역치는 2개의 연속한 필라멘트에서 5회의 적용 중 적어도 3회의 양성 시험을 유발하는 폰 프레이 필라멘트로서 결정되었다. 양성 시험은 필라멘트에 의해 유발된 돌연한 발 움츠림, 움찔 및/또는 발 핥기로서 정의되었다.

[0526] 염증성 통증은 50μL 희석되지 않은 완전 프로인트 애주번트(Complete Freund's Adjuvant; CFA)(F5881, Sigma)를 우측 뒷발의 발바닥 표면에 편측으로 주사하여 유발한 반면, 대조군 마우스에는 동일한 양의 0.9% 생리식염수(B. Braun, Germany)를 주사했다. 모든 발바닥 주사는 동물이 최대 60초 동안 이소플루란 마취(2%)하에 있는 동안 인슐린 바늘(0.3mL BD Micro-Fine)로 수행되었다. 폰 프레이는 실험에 따라 편측 CFA 주사 후 6일까지 적용되었다. 펩티드를 (10μL/g) 및 상이한 농도(0.4 및 2μmol/kg)에서 피하 투여했다. 통계 분석은 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 6.0을 사용하여 수행되었다. 양방향 RM ANOVA 및 이어서 둔네트(Dunnett)의 사후 검정. 유의 수준은 $p< 0.05$로 설정되었다.

[0527] **결과:**

[0528] 0일차에, 마우스에게 50μL의 CFA 또는 생리식염수를 우측 뒷발에 i.pl 주사했다.

[0529] CFA 주사 후 2일차에, 마우스에게 0.4μmol/kg(10μL/g) myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$, myr-NPEG$_4$-(NSVRV)$_2$, myr-NPEG$_4$-(SVRV)$_2$ 또는 myr-NPEG$_4$-(LRV)$_2$를 피하 주사하고, 5일차에 2μmol/kg(10μL/g) myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$, myr-NPEG$_4$-(NSVRV)$_2$, myr-NPEG$_4$-(SVRV)$_2$ 또는 myr-NPEG$_4$-(LRV)$_2$를 피하 주사했다. 이 농도에서, myr-NPEG$_4$-(NSVRV)$_2$는 완전히 용해되지 않았다. 2일차 및 5일차에, 주사 전과 주사 후 1, 5, 24시간에 폰 프레이 필라멘트를 사용하여, 유발된 통증을 시험했다. 개별적으로 투여한 날에 대한 양방향 ANOVA 및 이어서 둔네트(Dunnett)의 사후 분석은 가장 높은 친화성 화합물, myr-NPEG$_4$-(NSVRV)$_2$가 0.4μmol/kg의 피하 용량에서 통증을 완화시켰고, 추가로 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$ 및 myr-NPEG$_4$-(SVRV)$_2$ 모두가 2.0μmol/kg의 피하 용량에서 통증을 완화시켰음을 나타냈다(도 XX). 이 농도에서, myr-NPEG$_4$-(NSVRV)$_2$는 완전히 용해되지 않았다. myr-NPEG$_4$-(LRV)$_2$는 이 용량에서 통증 완화의 경향을 나타냈지만, 실험에서는 유의하지 않았다(도 14).

[0530] **결론**

[0531] 이 실시예는 염증성 통증의 CFA 모델에서 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$와 유사한 myr-NPEG$_4$-(NSVRV)$_2$, myr-NPEG$_4$-(SVRV)$_2$ 또는 myr-NPEG$_4$-(LRV)$_2$가, 발 움츠림 역치의 증가에 의해 밝혀진 바와 같이, 2μmol/kg(10μL/g)에서 염증성 통

증을 완화시킨다는 것을 입증한다(도 14). 이는 C5 PICK1 PDZ 결합 모티프에 추가하여 더 짧은 PICK1 PDZ 결합 모티프(C4 및 C3)의 효능을 확인하고, 추가로 실시예 5에서 관찰된 친화성과 일치한다. 이에 추가하여, 최적화의 최고 친화성 펩티드(NSVRV)를 운반하는 myr-NPEG$_4$-(NSVRV)$_2$(실시예 5)는 0.4 μmol/kg(10 μL/g)에서 유의한 통증 완화를 입증했다.

[0532] **실시예 13: 자발 염증성 통증의 완화에서 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 효능 평가**

[0533] 이 실험의 목적은 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$가, 실험자가 염증이 있는 발에 접촉하여 유발된 통증을 완화하는 능력 뿐만 아니라, 진행중의 통증, 단일 노출 장소 선호를 사용하여 자발적 통증을 완화하는 능력을 평가하는 것이었다. 이것은 임상 번역을 위해 가장 중요한 것으로 간주된다.

[0534] **재료 및 방법**.

[0535] 염증성 통증(CFA 모델): 실험을 개시하기 전에, 동물을 최소 60분 동안 실험실에 순응시켰다. 양쪽 뒷발의 기계적 통증 역치는 폰 프레이 측정에 의해 결정되었다. 손상은 우측 뒷발에서 유발한 반면, 반대측 좌측 뒷발은 동물의 내부 대조군으로 사용했다. 0.04 내지 2g(g = 그램-포스)(0.04, 0.07, 0.16, 0.4, 0.6, 1.0, 1.4, 2.0) 범위의 폰 프레이 필라멘트를 사용하여 기계적 통증 역치를 측정했다. 현재 실험에서, 오름차순으로 필라멘트를 뒷발의 전두 중앙 발바닥 표면에 적용했다. 마우스를 와이어 메쉬 상의 PVC 플라스틱 박스(11.5cm × 14cm)에 넣고, 시험 전에 30분 동안 순응시켰다. 각 폰 프레이 필라멘트를 5회 적용하고, 각 적용 사이에 적절한 휴식 시간을 두고, 움츠림 회수를 기록했다. 움츠림 역치는 2개의 연속 필라멘트에서 5회의 적용 중 적어도 3회의 양성 시험을 유발하는 폰 프레이 필라멘트로서 결정되었다. 양성 시험은 필라멘트에 의해 유발된 돌연한 발 움츠림, 움찔 및/또는 발 핥기로서 정의되었다. 염증성 통증은 50 μL의 희석되지 않은 완전 프로인트 애주번트(CFA)(F5881, Sigma)를 우측 뒷발의 발바닥 표면에 편측으로 주사하여 유발시켰다. 모든 발바닥 주사는 인슐린 바늘(0.3mL BD Micro-Fine)을 사용하여 수행되었고, 그 사이, 동물은 최대 60초 동안 이소플루란 마취(2%)하에 있었다. 폰 프레이는 CFA 주사 전, CFA 주사 2일 후, CFA 주사 5일 후에 수행했고, 하기 기재된 단일 노출 장소 선호 실험의 전후 모두에서 과민성을 확인했다. 통계 분석: 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 6.0을 사용하여 수행했다. 스튜던트 t-검정. 유의 수준은 $p< 0.05$로 설정되었다.

[0536] 단일 노출 장소 선호(sePP): sePP 실험은 중간에 중립 구역(11.5 × 24cm)과, 상이한 벽 패턴 뿐만 아니라 상이한 바닥 텍스처를 갖는 말단에 2개의 긴 구획(28 × 24cm)으로 구성된 3구획 직사각형 장치에서 수행되었다. 노출 세션 동안, 구획은 2개의 회백색 플렉시글라스(Plexiglas®) 파티션(24 × 40cm)에 의해 서로 분리되었고, 시험 당일 해당 파티션은 제거되었다.

[0537] sePP 프로토콜은 3일에 걸쳐 수행되었고, 최초 2일간은 노출 세션이 수행되고, 3일차에는 시험이 수행되었다. 모든 3일 동안, 실험을 개시하기 전에 적어도 60분 동안 마우스를 룸에 순응하도록 했다. mPD5는 회색 벽과 천공 바닥을 갖는 구획과 쌍을 이루었고, 이는 이전에 가장 선호하지 않는 구획으로 나타났다. 케이지의 모든 마우스가 동시에 시험되었지만, 모두가 동일한 치료를 받은 것은 아니다.

[0538] 노출 당일에, 마우스의 체중을 측정하고, 펩티드(30 μmol/kg) 또는 비히클(10 μL/g)을 피하 주사하고, 즉시 지정된 구획에 60분 동안 넣었다. 시험 그룹은 가장 선호하지 않는 구획에서 펩티드에 노출시키고, 선호하는 구획에서 비히클(PBS)에 노출시킨 반면, 대조군은 양쪽 구획 모두에서 비히클을 주사했다.

[0539] 3일차 선호도 시험을 위해, 플렉시글라스(Plexiglas®)를 제거하고, 마우스는 20분 동안 3개 구획 사이를 자유롭게 이동할 수 있었다. 상이한 구획에서 소비된 시간은 에토비젼(Ethovision)(Noldus, Wageningen, Netherlands)에 의해 측정되었다. 추가 실험은 손상이 없는 동물에 대해 실행되었고, 이는 mPD5 의존적 선호도의 변화가 없는 것을 나타낸다.

[0540] **결과:**

[0541] myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$에 대한 단일 노출은 CFA 손상 동물의 장소 선호도를 변화하기에 충분하다. 선호도 시험에서, myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$ 치료된 동물은 비히클 치료된 대조군 마우스와 비교하여 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$ 쌍의 구획에서 유의하게 더 많은 시간을 소비했고(도 15A 및 B), 이는 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$로 치료된 동물의 구획에 대한 선호도를 나타낸다. 확실히 하기 위해, 선호도의 변화는 통증 완화에 의한 것이고, 펩티드 자체가 선호도를 변화시키는 것이 아니며, 정확히 동일한 실험이 손상이 없는 마우스(나이브)에서 실행되었고, 이는 myr-NPEG$_4$-

$(HWLKV)_2$-치료된 동물의 선호도에 변화가 없었다. 이것은 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 남용 경향이 없는 것을 추가로 나타낸다.

[0542] **결론:**

[0543] 이 실시예는 염증성 통증을 갖는 마우스가 이전에 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$를 제공받은 챔버로 선호도를 이동시켰음을 입증하고, 이는 마우스가 약물을 인지하여 진행 중의 통증, 자발적 통증을 완화한다는 것을 입증한다. 대부분의 환자 고통은 진행 중의 통증과 관련되어 있기 때문에, 이것은 변화 가능성(translational potential)에 대해 가장 중요한 것으로 간주된다.

[0544] **실시예 14: Tat-PD5와 비교한 상이한 농도에서의 mPD5의 혈장 농도**

[0545] 이 실험의 목적은 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 혈장 농도와 수명을 평가하고, myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 아실화가 모 분자 Tat-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$와 비교하여 혈장 반감기를 연장하는지의 여부를 결정하는 것이었다.

[0546] **재료 및 방법:**

[0547] *myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 노출*. mPD5 곡선은 WUXI, DMPK에 의해 결정되었고, 멸균 PBS 중의 각 농도의 mPD5(2, 10 및 50 μmuol/kg)를 3마리의 수컷 C57BL/6N 마우스(절식)에게 피하 주사에 의해 수행하고, 혈액 샘플을 30분, 1시간, 2시간, 5시간, 12시간의 시점에서 채취하고, 혈장을 LC-MS에 적용했다. 다운-슬로프의 3점은 제거 단계의 3점으로부터 결정되었다.

[0548] 비오틴화된 Tat-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 혈장 노출의 측정.

[0549] *혈액 샘플 수집*. 0.9% NaCl에 희석된 비오틴화된 TAT-다이-PEG4-DATC5(biot-TPD5; 34mg/kg = 10 μmol) 또는 비오틴화된 myr-di-PEG4-DATC5(biot-mPD5; 10 μmol)를 8주령 수컷 C57b16N 마우스(총 18마리)에게 1회 피하 주사하고, 아프로티닌 함유 BD 바큐테이너(Vacutainer®) K3EDTA 튜브(BD 진단)을 사용하여 15분, 30분, 1시간, 2시간 및 6시간 후에 혈액 샘플을 수집했다(시점마다 6마리 마우스로부터의 혈액 샘플). 혈액 샘플을 4℃에서 15분 동안 3500RPM으로 원심분리하고, 혈장을 새로운 튜브에 수집하고, -20℃에서 동결시켰다.

[0550] *ELISA*. 96웰 NUNC IMMOBILIZER(Cat. No. 436006) 플레이트를 100mM 탄산나트륨 완충액(pH 9.6)에서 희석된 15 μg/mL 비오틴화 알부민(Sigma-Aldrich, 제품 번호 A8549)으로 코팅하고, 진탕기에서 실온으로 2시간 동안 인큐베이팅했다. 인큐베이팅 후, 플레이트를 PBS-T(0.1% TWEEN® 20(Sigma-Aldrich)가 포함된 1X 인산염 완충 식염수)로 3회 세척하고, 1회 세척 단계를 실온에서 진탕기에서 밤새 수행했다. 0.1% PBST(1:5000)로 사전-희석된 HRP 결합 스트렙트아비딘(DAKO, 참조 번호 P0397, 0.83g/L)을, 별도의 96웰 환저 플레이트(Thermo Scientific)에서 상이한 희석률(10x 및 20x)로 biot-TPD5와 혼합하고, 진탕기에서 20분 동안 인큐베이팅했다. 용액(100 μL/웰)을 코팅된 96웰 플레이트에 로딩하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅했다. 인큐베이팅 후, 플레이트를 PBS-T로 3회 세척하고, 100 μL TMB 플러스(Sigma, SLBT4708, T0440 - 1L)에서 3-5분간 현상했다. 100 μL 0.2M 황산(H_2SO_4)을 첨가하여 현상을 중단했다. 플레이트는 퍼킨엘머(PerkinElmer)(Hvidovre, Denmark)의 왈락(Wallac) VICTOR2 1420 멀티라벨 카운터(Multilabel Counter)에서 450nm(및 570nm)에서 판독했다. 측정된 흡광도는 biot-TPD5의 표준 희석액으로부터 생성된 표준 곡선에 대해 보정되었다.

[0551] **결과:**

[0552] 본 발명자는 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$의 경우, 1시간 후(3.75mg/kg(2 μmol/kg) 주사 후 1446 ± 106ng/ml; 18.8mg/kg(10 μmol/kg) 주사 후 6173 ± 508ng/ml; 93.8mg/kg(50 μmol/kg) 주사 후 20258 ± 642ng/ml)에 최대 농도에 도달한 혈장 농도의 초기 증가를 관찰하였고, 이어서 세미-로그 스케일 표시 1차 키네틱(semi-log scale indication 1 order kinetic)에서의 선형 제거 상(linear elimination phase)을 관찰하였다. 최대 용량과 곡선 하 면적은 모두 $T_{1/2}$로 용량과 비례하여 스케일링되었다(3.75mg/kg(2 μmol/kg) 주사 후 0.50 ± 0.07h; 18.8mg/kg(10 μmol/kg) 주사 후 0.59 ± 0.07h; 93.8mg/kg(50 μmol/kg) 주사 후 0.84 ± 0.03h)(도 16). 비오틴화된 Tat-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$(10 μmol/kg)의 경우, 혈장 농도의 증가가 관찰되고, 30분에 피크에 도달하고, 이어서 비선형 제거 프로파일이 관찰되고, 이는 후기에 감속되었다. 최대 농도는 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$(10 μmol/kg)에서 관찰된 것과 유사하다(도 16).

[0553] **결론:**

[0554] myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$는 피하 투여 후에 용량 의존적 방식으로 혈장에 분포하고, 1차 키네틱스(1 order kinetics) 및 30-45분의 반감기로 제거된다. 이것은 거동 효과와 일치하게 Tat-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$와 유사하고, 이는 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$에 대한 아실화가 혈장 노출 또는 수명의 증가에 의해 이의 효과를 발휘하지 않는다는 것을 입증한다.

[0555] **실시예 15: myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 용해도 및 안정성의 평가**

[0556] 목적은 선호하는(피하) 투여 경로에 중요한 용해도와, myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 저장 수명에 중요한 화학적 안정성을 결정하는 것이었다.

[0557] **재료 및 방법:**

[0558] 용해도는 10mM PBS에서 농도를 증가시키면서 용해된 샘플을 육안 검사함으로써 결정되었다. 안정성은, 4개 농도 2, 20, 50 및 200 μM에 대해, myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$를 5도 및 25도에서 PBS에 30일 동안 방치한 후, HPLC-UV-MS 방법에 의해, 이어서 REDGLEAD에 의해 처리되었다.

[0559] **결과:**

[0560] 육안 검사에 의해 myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$의 용해도가 적어도 250mg/ml(130mM)인 것으로 결정되었고(도 17); 이는 미셀 구조 때문일 것으로 생각된다.

[0561] 분해는 관찰되지 않았고, 순도는 200 및 50 μM의 샘플에서 >98%로 측정되었다. 20 및 2 μM 샘플의 낮은 흡수로 인해, 이러한 샘플 중 어느 것에서도 분해가 발견되지 않았지만, 순도를 확실하게 결정할 수 없었다. 펩티드 mPD5는 비히클 조성물에서 +5℃ 및 +25℃에서 적어도 30일 동안 화학적으로 안정하다. 검량선의 표준 샘플을 포함하는 모든 샘플에 대한 질량을 확인했다.

표 2

[0562]

	명목 농도 mPD5 (μM)	*pH*	*UV-HPLC 피크 면적*	*측정 농도 mPD5 (μM)*
5℃에서 30일	200	7.37	6665	194
	50	7.39	3347	49
	20	7.40	1196	17
	2	7.37	37	0.5
	0		ND	<0.2
25℃에서 30일	200	7.36	7005	203
	50	7.41	3325	48
	20	7.39	1161	17
	2	7.37	26	0.4
	0		ND	<0.2

[0563] **결론:**

[0564] myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$는 매우 양호한 용해도를 나타내고, 관찰된 효능으로 인간의 피하 투여(최대 용적 800 μl)에 충분한 것으로 간주된다. 이에 추가하여, 안정성은 양호하고, 이는 화합물이 저장 수명의 요구 사항에 적합하다는 것을 시사한다.

[0565] **실시예 16: 친유성 지방족 쇄의 변형**

[0566] 이 일련의 실험에서, 목적은 마우스에서 완전 프로인트 애주번트(Complete Freund's Adjuvant; CFA) 모델에서 지방족 쇄의 치환에 의한 치료 효능 및 작용의 연장을 평가하는 것이었다.

[0567] **재료 및 방법.**

[0568] 염증성 통증(CFA 모델): 염증성 통증은 50 μL의 희석되지 않은 완전 프로인트 애주번트(CFA)(F5881, Sigma)를

우측 뒷발의 발바닥 표면에 편측으로 주사하여 유발한 반면, 대조군 마우스에는 동일한 양의 0.9% 생리식염수(B. Braun, Germany)를 주사했다. 모든 발바닥 주사는 동물이 최대 60초 동안 이소플루란 마취(2%)하에 있는 동안 인슐린 바늘(0.3mL BD Micro-Fine)로 수행되었다. 손상은 우측 뒷발에 유발한 반면, 반대측 좌측 뒷발은 동물의 내부 대조군으로 사용했다.

[0569] 실험을 개시하기 전에, 동물을 최소 60분 동안 실험실에 순응시켰다. 기계적 통증 역치는 양쪽 뒷발의 폰 프레이 측정에 의해 결정되었다. 0.04 내지 2g(g = 그램-포스)(0.04, 0.07, 0.16, 0.4, 0.6, 1.0, 1.4, 2.0) 범위의 폰 프레이 필라멘트를 사용하여 기계적 통증 역치를 측정했다. 현재 실험에서, 오름차순으로 필라멘트를 뒷발의 전두 중앙 발바닥 표면에 적용했다. 마우스를 와이어 메쉬 상의 PVC 플라스틱 박스(11.5cm × 14cm)에 넣고, 시험 전에 30분 동안 순응시켰다. 각각의 폰 프레이 모발은 5회 적용하고, 각 적용 사이에 충분한 휴식 시간을 두고, 움츠림 회수를 기록했다. 움츠림 역치는 폰 프레이 필라멘트가 2개의 연속 필라멘트에서 5회의 적용 중 적어도 3회의 양성 시험을 유발하는 것으로서 결정되었다. 양성 시험은 필라멘트에 의해 유발된 돌연한 발 움츠림, 움찔 및/또는 발 핥기로서 정의되었다.

[0570] 폰 프레이는 실험에 따라 편측 CFA 주사 후 5일까지 적용되었다. 펩티드를 (PBS 중 10μL/g) 및 2μmol/kg에서 크로스-오버 스케쥴로 각 화합물의 5회 주사로 피하 투여하여 염증성 통증 완화에서 이들의 효능을 평가했다. 통계 분석은 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 8.0을 사용하여 수행되었다. 양방향 RM ANOVA 및 이어서 둔네트(Dunnett)의 사후 검정. 유의 수준은 $p< 0.05$로 설정되었다.

[0571] **결과:**

[0572] 0일차에, 50μL의 CFA 또는 생리식염수를 우측 뒷발에 발바닥내 주사하기 전에 폰 프레이 필라멘트를 사용하여 마우스의 기준선 발 움츠림 반응을 결정했다.

[0573] CFA 주사 후 2-5일차에, 마우스에게 PBS 또는 2.0μmol/kg(10μL/g)의 myr(C14)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$, myr(C14)(불포화, 트랜스)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$, myr(C14)(불포화, 트랜스)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$, (C18)(이산)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$, (C16)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$, 콜레스테롤-β-Asp-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$를 피하 주사했다.

[0574] 모든 날에, 주사 전과 주사 후 2시간 및 5시간에서 폰 프레이 필라멘트를 사용하여, 유발된 통증을 시험했다. 개별 투여일에 대한 양방향 ANOVA 및 이어서 둔네트(Dunnett)의 사후 분석을 수행했다.

[0575] PBS의 주사는 통증 움츠림 역치의 어떠한 변화도 유발하지 않은 반면, myr(C14)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$(mPD5)는 완전하고 매우 유의한 통증 완화를 유발했다(도 18A). 유사하게는, myr(C14)(불포화, 트랜스)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$, myr(C14)(불포화, 시스)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$, (C18)(이산)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$는 매우 유의한 통증 완화를 유발했다. 유사하게는, (C16)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$에 대한 아실 쇄의 신장은 매우 유의한 통증 완화를 초래했다(도 18B). 마지막으로, 콜레스테롤-β-Asp-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$는 유의한 통증 완화를 초래했다(도 18C).

[0576] **결론**

[0577] 이 예는 염증성 통증의 CFA 모델에서 추가 산 그룹을 이산으로 되게 하여 불포화를 아실 쇄에 도입할 수 있음을 입증한다. 이에 추가하여, 14개 내지 16개 탄소와 18개(이산 포함)의 아실 쇄는 효능과 관련하여 동등하게 나타난다. 마지막으로, β-Asp에 의한 친유성 지방족 그룹(이 경우 콜레스테롤)의 접합은 활성을 나타낸다.

[0578] **실시예 17: 감작화된 열 통증의 완화에 대한 mPD5의 효능**

[0579] 이 실험에서, 목적은 완전 프로인트 애주번트(CFA)의 족저내 주사에 의해 유발된 열 통각의 감작화의 치료 효능 mPD5를 평가하는 것이었다.

[0580] **재료 및 방법.**

[0581] 염증성 통증(CFA 모델): 실험을 개시하기 전에, 동물을 최소 60분 동안 실험실에 순응시켰다. 하그레브(Hargreave)의 시험은 양쪽 뒷발의 발바닥 표면에 방사열 광을 적용하여 수행되었다. 응답 잠복기는 자동 판독(Ugo Basile, Italy)에 의해 측정되었다. 방사열 자극에 대한 반응으로 양쪽 뒷발의 기준선 발 움츠림 잠복기는 CFA 주사 전에 수행했고, 사전-선택된 2개 그룹 사이에 차이가 발견되지 않았다. 염증성 통증은 50μL의 희석되지 않은 완전 프로인트 애주번트(Complete Freund's Adjuvant; CFA)(F5881, Sigma)를 우측 뒷발의 발바닥 표면에 편측으로 10회 주사함으로써 유도한 반면, 대조군 마우스에는 동일한 양의 0.9% 생리식염수(B. Braun,

Germany)를 주사했다. 모든 발바닥 주사는, 동물이 최대 60초 동안 이소플루란 마취(2%)하에 있는 동안, 인슐린 바늘(0.3mL BD Micro-Fine)을 사용하여 수행되었다. CFA 주사 후 3일차에, 마우스를 개별 적색 실린더(직경 8cm, 높이 7.5cm)에 넣고, 열 통각과민은 IR 20의 기준선 판독에 의해 확인했다. 각 마우스의 각 뒷발에서 3회의 측정을 수행했다. 양성 시험은 적외선에 의해 유발된 돌연한 발 움츠림, 움찔 및/또는 발 핥기로서 정의되었다. 측정은 CFA 주사 전과 CFA 주사 후 3+4일에 수행되었다. 3일차에, 측정은 치료 전과 치료 후 1, 5, 21시간에 수행했다. 펩티드 및 비히클을 (10μL/g)) 및 0 또는 10μmol/kg의 농도에서 피하 투여했다. 통계 분석은 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 6.0을 사용하여 수행했다. 양방향 RM ANOVA 및 이어서 본페로니(Bonferroni)의 사후 검정. 유의 수준은 $p< 0.05$로 설정되었다.

[0582] **결과:**

[0583] 발바닥 CFA 주사 후 3일차에, 열 통각과민은, 하그레브(Hargreave)의 시험을 사용하여, 주사된 뒷발(동측)에서 확인하였다. 10μmol/kg(10μL/g)의 myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$(mPD5)의 피하 투여 후, 감작화된 발에서 발 움츠림 잠복기의 매우 유의한 증가를 관찰했지만, 반대측 (건강한) 발에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 통증 완화는 5시간 후에는 덜 두드러졌고, 다음날(21h)에는 완전히 소실되었다. PBS(비히클)의 유사한 주사는 양쪽 발의 발 움츠림 잠복기에 영향을 미치지 않았다(도 19).

[0584] **결론:**

[0585] 이 실시예는, 영향을 받지 않는 건강한 발의 열 감수성에 영향을 미치지 않고서, mPD5가 염증성 통증의 CFA 모델에서 관찰된 열 과민증을 완전히 완화시킬 수 있음을 입증한다. 이것은 접촉에 대한 전달 과민증으로부터 통각수용기의 상이한 서브세트에 의해 신경지배되는 통증의 중요한 양상으로 작용을 확장한다.

[0586] **서열**

표 3

[0587]

서열번호	**서열**
서열번호 1	$X_1X_2X_3X_4X_5$, 여기서, X_1은 H, N, F 또는 T이거나, 부재하고; X_2는 W, S, E 또는 Y이거나, 부재하고; X_3는 L, V 또는 I이고; X_4는 K, I 또는 R이고; X_5는 V이다.
서열번호 2	$X_1X_2X_3X_4X_5$, 여기서, X_1은 N, F 또는 T이거나, 부재하고; X_2는 S, E 또는 Y이거나, 부재하고; X_3은 V, L 또는 I이고; X_4는 I 또는 R이고; X_5는 V이다.
서열번호 3	$X_1X_2X_3X_4X_5$, 여기서, X_1은 N 또는 T이거나, 부재하고; X_2는 S, E 또는 Y이거나; 부재하고; X_3은 V, L 또는 I이고; X_4는 I 또는 R이고; X_5는 V이다.
서열번호 4	$X_1X_2X_3X_4X_5$, 여기서, X_1은 N 또는 F이거나, 부재하고; X_2는 S, E 또는 Y이거나, 부재하고; X_3은 V, L 또는 I이고; X_4는 I 또는 R이고; X_5는 V이다.
서열번호 5	NSIIV
서열번호 6	NSIRV
서열번호 7	NSVIV
서열번호 8	NSVRV
서열번호 9	NEIIV

서열번호 10	NEIRV
서열번호 11	NEVIV
서열번호 12	NEVRV
서열번호 13	NYIIV
서열번호 14	NYIRV
서열번호 15	NYVIV
서열번호 16	NYVRV
서열번호 17	TSIIV
서열번호 18	TSIRV
서열번호 19	TSVIV
서열번호 20	TSVRV
서열번호 21	TEIIV
서열번호 22	TEIRV
서열번호 23	TEVIV
서열번호 24	TEVRV
서열번호 25	TYIIV
서열번호 26	TYIRV
서열번호 27	TYVIV
서열번호 28	TYVRV
서열번호 29	FSIIV
서열번호 30	FSIRV
서열번호 31	FSVIV
서열번호 32	FSVRV
서열번호 33	FEIIV
서열번호 34	FEIRV
서열번호 35	FEVIV
서열번호 36	FEVRV
서열번호 37	FYIIV
서열번호 38	FYIRV
서열번호 39	FYVIV
서열번호 40	FYVRV
서열번호 41	SIIV
서열번호 42	SIRV
서열번호 43	SVIV
서열번호 44	SVRV
서열번호 45	EIIV
서열번호 46	EIRV
서열번호 47	EVIV
서열번호 48	EVRV
서열번호 49	YIIV
서열번호 50	YIRV
서열번호 51	YVIV
서열번호 52	YVRV
서열번호 53	NSLRV
서열번호 54	HWLKV
N/A	IIV
N/A	IRV
N/A	VIV
N/A	VRV
N/A	LRV

[0588] N/A: 해당 없음

[0589] **참고문헌**

[0590] ALFONSO, S., et al., Synapto-depressive effects of amyloid beta require PICK1. Eur J Neurosci, 2014. 39(7): p. 1225-33.

[0591] ATIANJOH, F.E., et al., Spinal cord protein interacting with C kinase 1 is required for the maintenance of complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain but not for incision-induced post-operative pain. Pain, 2010. 151(1): p. 226-34.

[0592] BACH, A. et al. (2009). Design and synthesis of highly potent and plasma-stable dimeric inhibitors of the PSD-95-NMDA receptor interaction. Angew Chem Int Ed Engl 48, 9685-9689.

[0593] BACH, A et al., 2012. A high-affinity, dimeric inhibitor of PSD-95 bivalently interacts with PDZ1-2 and protects against ischemic brain damage. Proc Natl Acad Sci U S A, 109, 3317-22.

[0594] BLANCHET, C. E. et al. J. Appl. Crystallogr. 2015, 48, 431.

[0595] CHEN, S.R., et al., Nerve injury increases GluA2-lacking AMPA receptor prevalence in spinal cords: functional significance and signaling mechanisms. J Pharmacol Exp Ther, 2013. 347(3): p. 765-72.

[0596] CLEM, R.L., V. Anggono, and R.L. Huganir, PICK1 regulates incorporation of calcium-permeable AMPA receptors during cortical synaptic strengthening. J Neurosci, 2010. 30(18): p. 6360-6.

[0597] CONRAD, K.L., et al., Formation of accumbens GluR2-lacking AMPA receptors mediates incubation of cocaine craving. Nature, 2008. 454(7200): p. 118-21.

[0598] DIXON, R.M., J.R. Mellor, and J.G. Hanley, Pick1-mediated glutamate receptor subunit 2 (GLUR2) trafficking contributes to cell death in oxygen/glucose deprived hippocampal neurons. Journal of Biological Chemistry, 2009.

[0599] GANGADHARAN, V., et al., Peripheral calcium-permeable AMPA receptors regulate chronic inflammatory pain in mice. J Clin Invest, 2011. 121(4): p. 1608-23.

[0600] GARRY, E.M., et al., Specific involvement in neuropathic pain of AMPA receptors and adapter proteins for the GluR2 subunit. Mol.Cell Neurosci., 2003. 24(1): p. 10-22.

[0601] HANSEN S. et al. Journal of Applied Crystallography 2012, 45, 566.

[0602] HANSEN S. et al. Journal of Applied Crystallography 2014, 47, 1469.

[0603] HE, J., et al., PICK1 inhibits the E3 ubiquitin ligase activity of Parkin and reduces its neuronal protective effect. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. 115(30): p. E7193-E7201.

[0604] JI, R.R., et al., Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? Trends Neurosci, 2003. 26(12): p. 696-705.

[0605] KANDASAMY, R. and T.J. Price, The pharmacology of nociceptor priming. Handb Exp Pharmacol, 2015. 227: p. 15-37.

[0606] KARLSEN, M.L. et al. 2015. Structure of Dimeric and Tetrameric Complexes of the BAR Domain Protein PICK1 Determined by Small-Angle X-Ray Scattering. Structure 23, 1258-70.

[0607] LONG, J. F. et al. Supramodular structure and synergistic target binding of the N-terminal tandem PDZ domains of PSD-95. J. Mol. Biol. 2003, 327, 203-214.

[0608] LORGEN, JØ., PICK1 facilitates lasting reduction of GluA2 concentration in the hippocampus during chronic epilepsy. Epilepsy Res, 2017. 137: 25-32

[0609] LUSCHER, C. and R.C. Malenka, Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. Neuron, 2011. 69(4): p. 650-63.

[0610] MADSEN, K.L. et al., 2005. Molecular determinants for the complex binding specificity of the PDZ domain in PICK1. Journal of Biological Chemistry 280, 20539-20548.

[0611] MARCOTTE, D.J., et al., Lock and chop: A novel method for the generation of a PICK1 PDZ domain and piperidine-based inhibitor co-crystal structure. Protein Sci, 2018. 27(3): p. 672-680.

[0612] MOLLER, A.R., Tinnitus and pain. Prog Brain Res, 2007. 166: p. 47-53.

[0613] NISSEN et al. Design, synthesis, and characterization of fatty acid derivatives of a dimeric peptide-based postsynaptic density-95 (PSD-95) inhibitor. J. Med. Chem. 2015 Feb 12;58(3):1575-80.

[0614] PEKER, S. and A. Sirin, Parallels between phantom pain and tinnitus. Med Hypotheses, 2016. 91: p. 95-97.

[0615] TURNER et al. Administration of a novel high affinity PICK1 PDZ domain inhibitor attenuates cocaine seeking in rats. Neuropharmacology, 164(1), 2020, 107901.

[0616] VANNESTE, S., W.T. To, and D. De Ridder, Tinnitus and neuropathic pain share a common neural substrate in the form of specific brain connectivity and microstate profiles. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2019. 88: p. 388-400.

[0617] VIKMAN, K.S., B.K. Rycroft, and M.J. Christie, Switch to Ca2+-permeable AMPA and reduced NR2B NMDA receptor-mediated neurotransmission at dorsal horn nociceptive synapses during inflammatory pain in the rat. J Physiol, 2008. 586(2): p. 515-27.

[0618] WANG, W., et al., Preserved acute pain and impaired neuropathic pain in mice lacking protein interacting with C Kinase 1. Mol Pain, 2011. 7: p. 11.

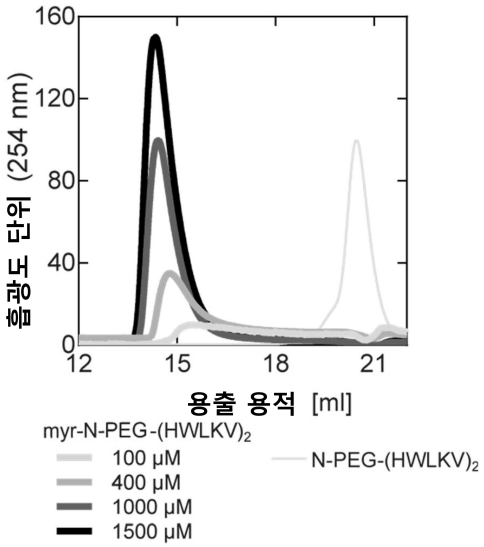
[0619] WOLF, M.E. and C.R. Ferrario, AMPA receptor plasticity in the nucleus accumbens after repeated exposure to cocaine. Neurosci Biobehav Rev, 2010. 35(2): p. 185-211.

[0620] WOOLF, C.J. and M.W. Salter, Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. Science, 2000. 288(5472): p. 1765-9.

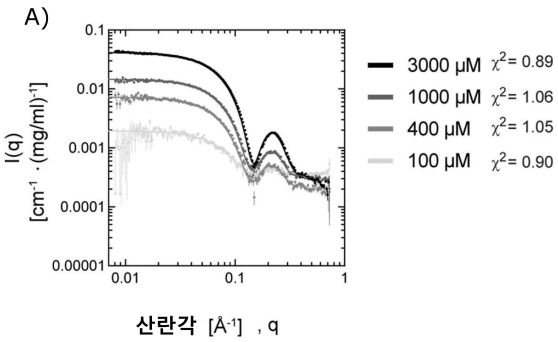
[0621] ZHANG et al. Protein interacting with C alpha kinase 1 (PICK1) is involved in promoting tumor growth and correlates with poor prognosis of human breast cancer. Cancer Sci. 2010 Jun;101(6):1536-42.

도면

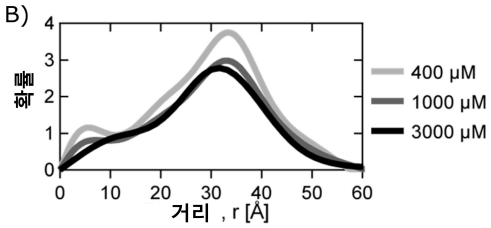
도면1



도면2a



도면2b

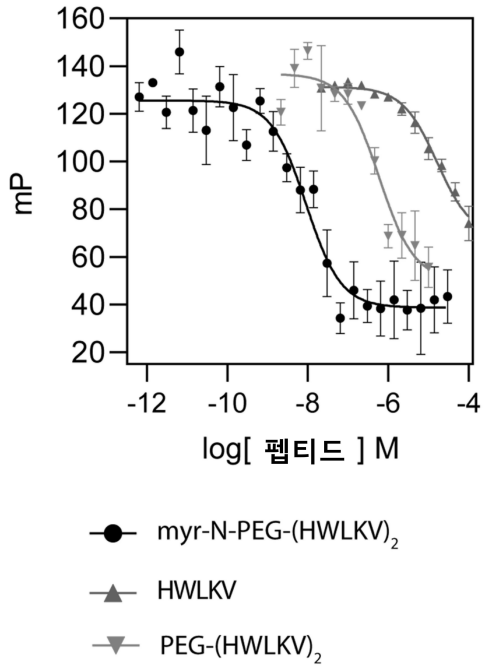


도면2c

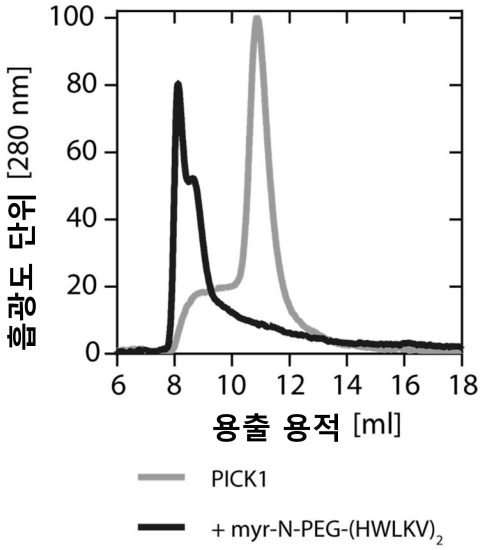
C)

	R_g	D_{max}	M_w	M_w/M_{wteo}
100 μM	20.1	51.0	14.8	7.9
400 μM	22.2	57.0	13.8	7.3
1000 μM	22.5	60.2	11.2	6.0
3000 μM	23.6	115.6	10.4	5.5
	[Å]	[Å]	[kDa]	

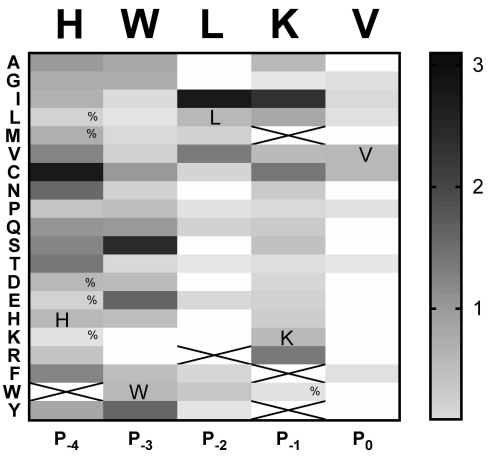
도면3


160
140
120
100
80
60
40
20
mP
-12
-10
-8
-6
-4
log[펩티드] M
myr-N-PEG-(HWLKV)2
HWLKV
PEG-(HWLKV)2

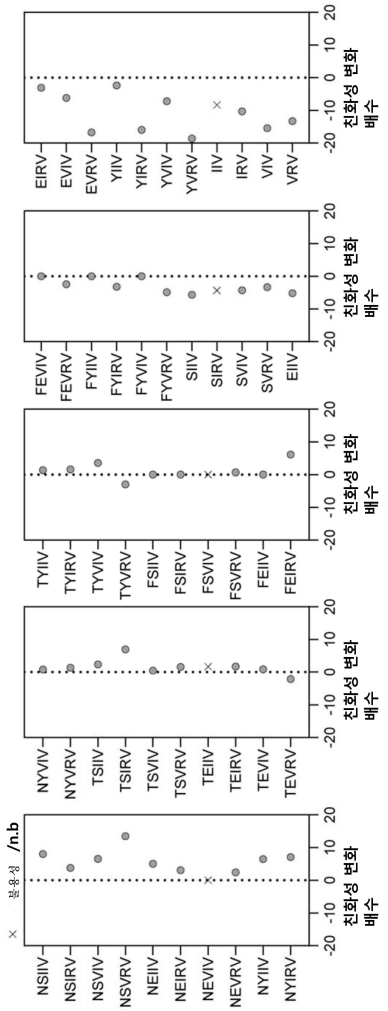
도면4


100
80
60
40
20
0
흡광도 단위 [280 nm]
6
8
10
12
14
16
18
용출 용적 [ml]
PICK1
+ myr-N-PEG-(HWLKV)2

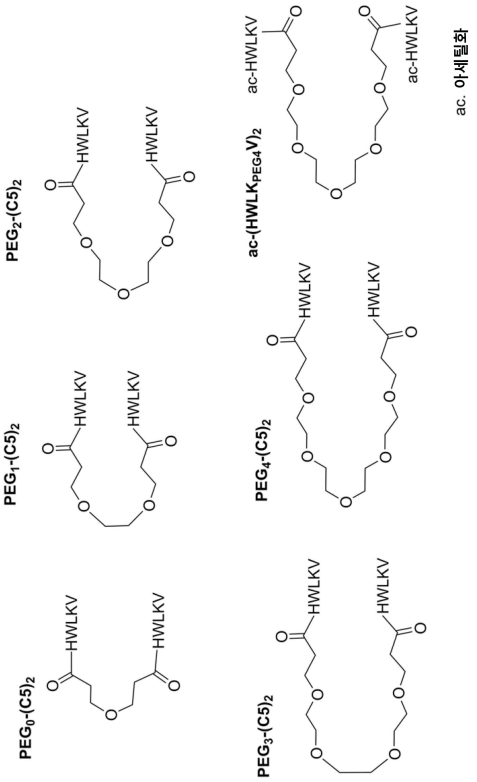
도면5


H W L K V
A G I L M V C N P Q S T D E H K R F W Y
P-4 P-3 P-2 P-1 P0
3
2
1

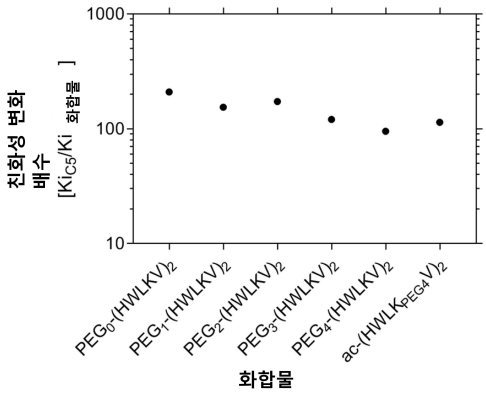
도면6


진화성 변화 배수
EIRV EVIV EVRV YIIV YIRV YVIV YVRV IIV IRV VIV VRV
FEVIV FEVRV FYIIV FYIRV FYVIV FYVRV SIIV SIRV SVIV SVRV EIIV
TYIIV TYIRV TYVIV TYVRV FSIIV FSIRV FSVIV FSVRV FEIIV FEIRV
NYVIV NYVRV TSIIV TSIRV TSVIV TSVRV TEIIV TEIRV TEVIV TEVRV
NSIIV NSIRV NSVIV NSVRV NEIIV NEIRV NEVIV NEVRV NYIIV NYIRV

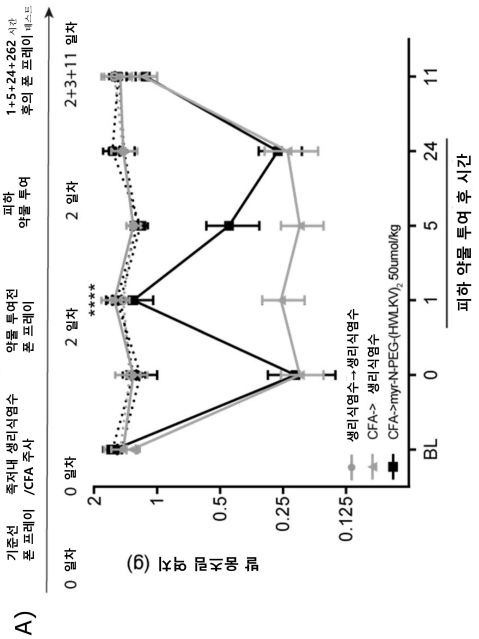
도면7


PEG2-(C5)2
HWLKV
HWLKV
ac-(HWLKPEG4V)2
ac-HWLKV
ac-HWLKV
ac. 아세틸화
PEG1-(C5)2
HWLKV
HWLKV
PEG4-(C5)2
HWLKV
HWLKV
PEG0-(C5)2
HWLKV
HWLKV
PEG3-(C5)2
HWLKV
HWLKV

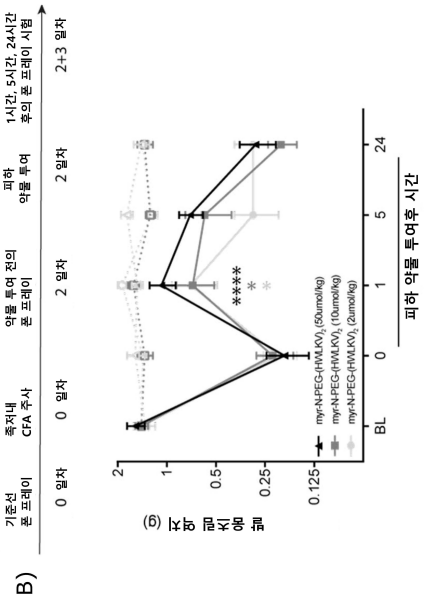
도면8


친화성 변화 배수
[KiC5/Ki 화합물]
1000
100
10
PEG0-(HWLKV)2
PEG1-(HWLKV)2
PEG2-(HWLKV)2
PEG3-(HWLKV)2
PEG4-(HWLKV)2
ac-(HWLKPEG4V)2
화합물

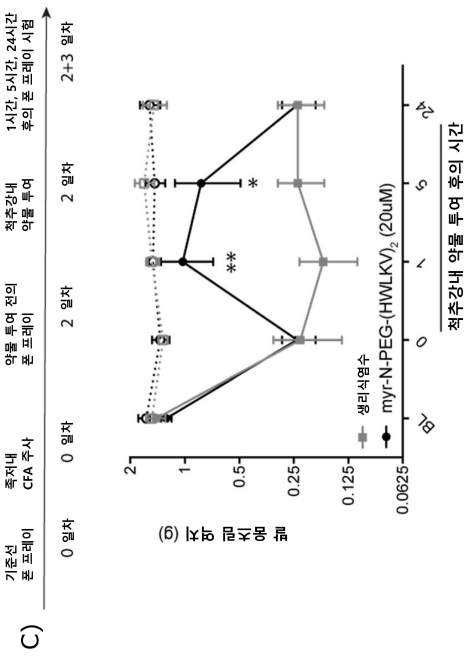
도면9a


A)
기준선 폰 프레이
0 일차
족저내 생리식염수 /CFA 주사
0 일차
약물 투여전 폰 프레이
2 일차
피하 약물 투여
2 일차
1+5+24+262 시간 후의 폰 프레이 테스트
2+3+11 일차
발 움츠림 역치 (g)
2
1
0.5
0.25
0.125
****
생리식염수→생리식염수
CFA-> 생리식염수
CFA->myr-N-PEG-(HWLKV)2 50umol/kg
BL
0
1
5
24
11
피하 약물 투여 후 시간

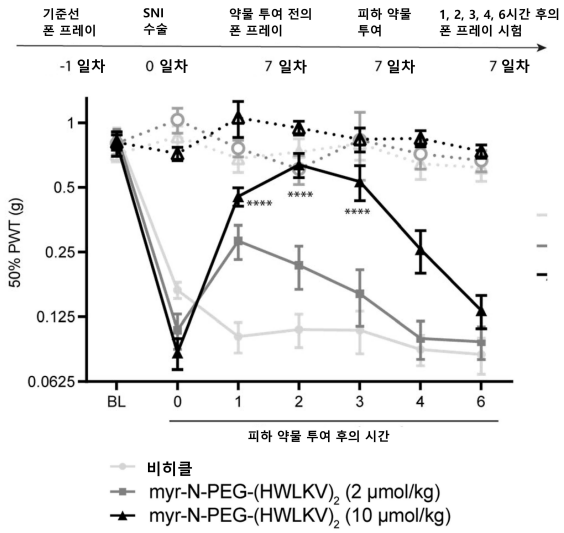
도면9b


B)
기준선 폰 프레이
0 일차
족저내 CFA 주사
0 일차
약물 투여 전의 폰 프레이
2 일차
피하 약물 투여
2 일차
1시간, 5시간, 24시간 후의 폰 프레이 시험
2+3 일차
발 움츠림 역치 (g)
2
1
0.5
0.25
0.125
*****
*
myr-N-PEG-(HWLKV)2 (50umol/kg)
myr-N-PEG-(HWLKV)2 (10umol/kg)
myr-N-PEG-(HWLKV)2 (2umol/kg)
BL
0
1
5
24
피하 약물 투여후 시간

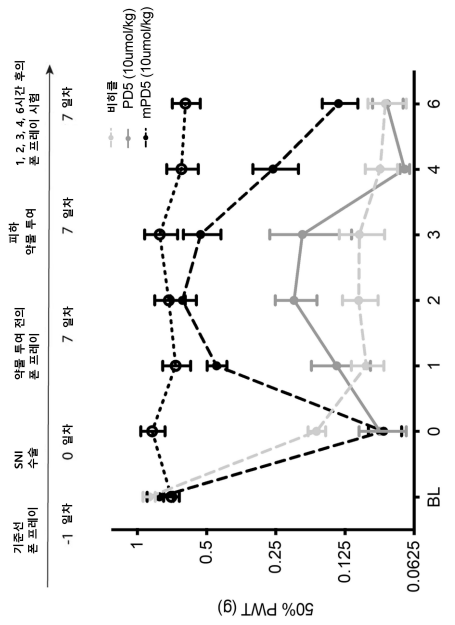
도면9c


C)
기준선 폰 프레이
0 일차
척추내 CFA 주사
0 일차
약물 투여 전의 폰 프레이
2 일차
척추강내 약물 투여
2 일차
1시간, 5시간, 24시간 후의 폰 프레이 시험
2+3 일차
뒷 움츠림 역치 (g)
2
1
0.5
0.25
0.125
0.0625
생리식염수
myr-N-PEG-(HWLKV)2 (20uM)
BL
0
1
5
24
척추강내 약물 투여 후의 시간
*
**

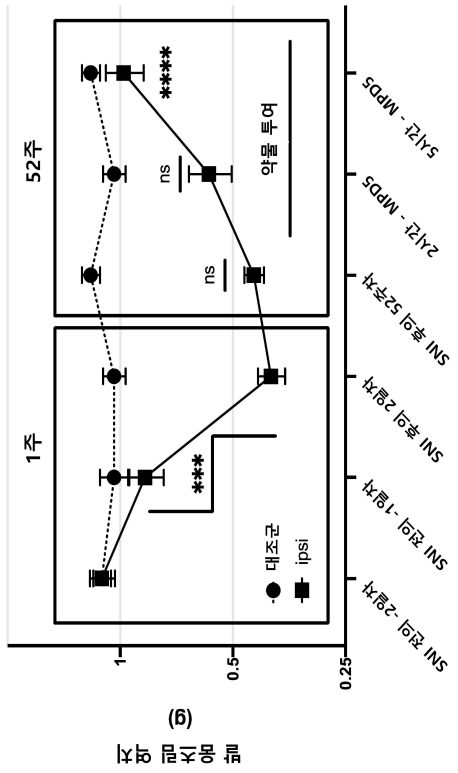
도면10


기준선 폰 프레이
-1 일차
SNI 수술
0 일차
약물 투여 전의 폰 프레이
7 일차
피하 약물 투여
7 일차
1, 2, 3, 4, 6시간 후의 폰 프레이 시험
7 일차
50% PWT (g)
1
0.5
0.25
0.125
0.0625
BL
0
1
2
3
4
6
피하 약물 투여 후의 시간
****
비히클
myr-N-PEG-(HWLKV)2 (2 μmol/kg)
myr-N-PEG-(HWLKV)2 (10 μmol/kg)

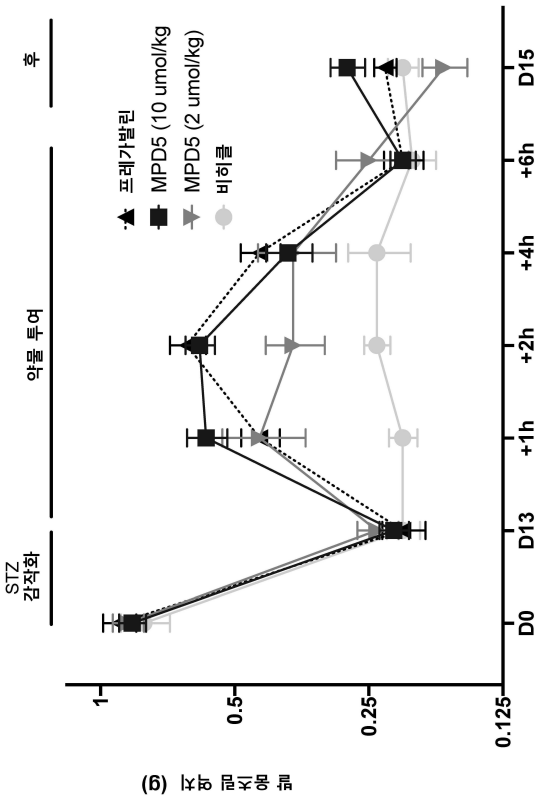
도면11


기준선 폰 프레이
SNI 수술
약물 투여 전의 폰 프레이
피하 약물 투여
1, 2, 3, 4, 6시간 후의 폰 프레이 시험
-1 일차
0 일차
7 일차
7 일차
7 일차
비히클
PD5 (10umol/kg)
mPD5 (10umol/kg)
50% PWT (g)
1
0.5
0.25
0.125
0.0625
BL
0
1
2
3
4
6

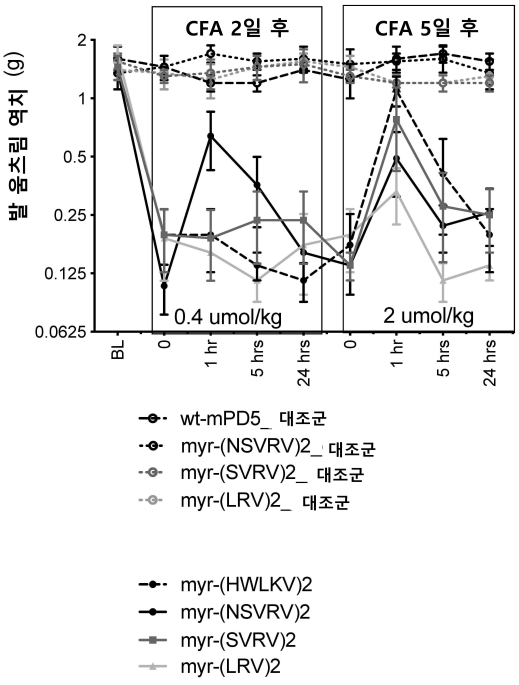
도면12


뒷 움츠림 역치 (g)
1주
52주
대조군
ipsi
약물 투여
***
****
ns
ns
1
0.5
0.25
SNI 전의 -2일차
SNI 전의 -1일차
SNI 후의 2일차
SNI 후의 52주차
2시간 - MPD5
5시간 - MPD5

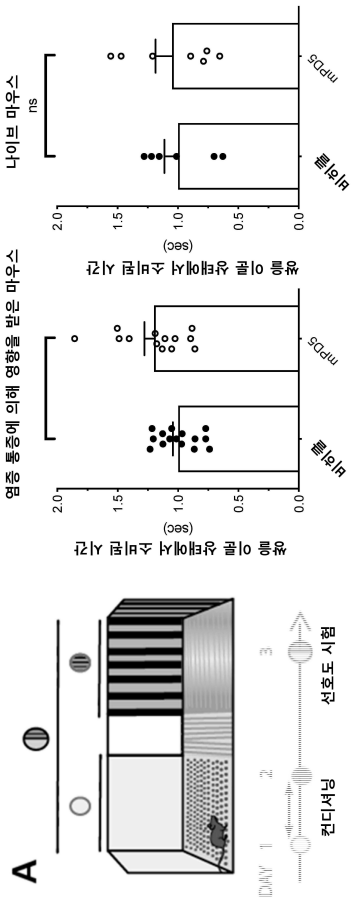
도면13


후
약물 투여
STZ
감작화
프레가발린
MPD5 (10 umol/kg
MPD5 (2 umol/kg)
비히클
D15
+6h
+4h
+2h
+1h
D13
D0
1
0.5
0.25
0.125
발 움츠림 역치 (g)

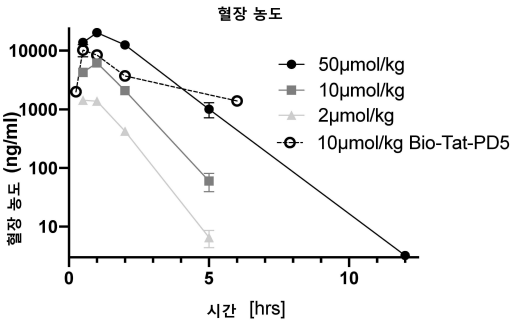
도면14


CFA 2일 후
CFA 5일 후
발 움츠림 역치 (g)
2
1
0.5
0.25
0.125
0.0625
0.4 umol/kg
2 umol/kg
BL
0
1 hr
5 hrs
24 hrs
wt-mPD5_ 대조군
myr-(NSVRV)2_ 대조군
myr-(SVRV)2_ 대조군
myr-(LRV)2_ 대조군
myr-(HWLKV)2
myr-(NSVRV)2
myr-(SVRV)2
myr-(LRV)2

도면15


나이브 마우스
ns
mPD5
비히클
뒷발을 이른 상태에서 소비된 시간
(sec)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
염증 통증에 의해 영향을 받은 마우스
mPD5
비히클
뒷발을 이른 상태에서 소비된 시간
(sec)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
A
DAY 1
2
3
컨디셔닝
선호도 시험

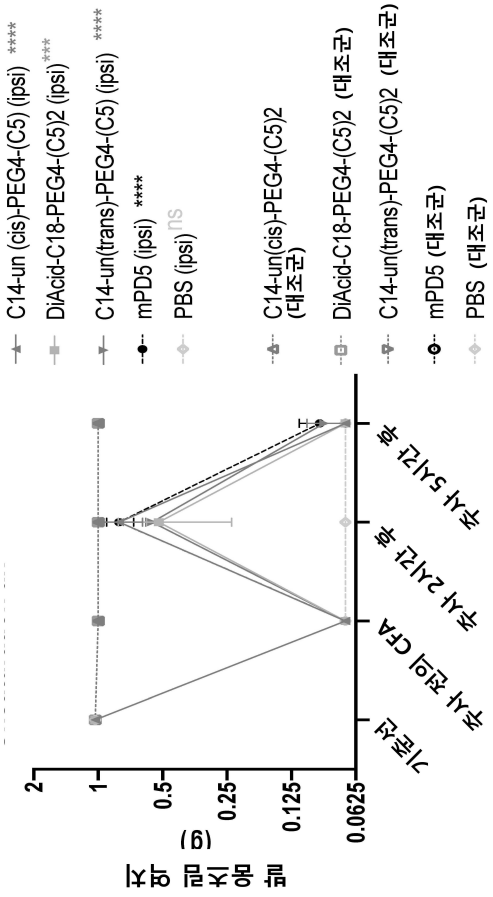
도면16


혈장 농도
10000
1000
100
10
혈장 농도 (ng/ml)
0
5
10
시간 [hrs]
50μmol/kg
10μmol/kg
2μmol/kg
10μmol/kg Bio-Tat-PD5

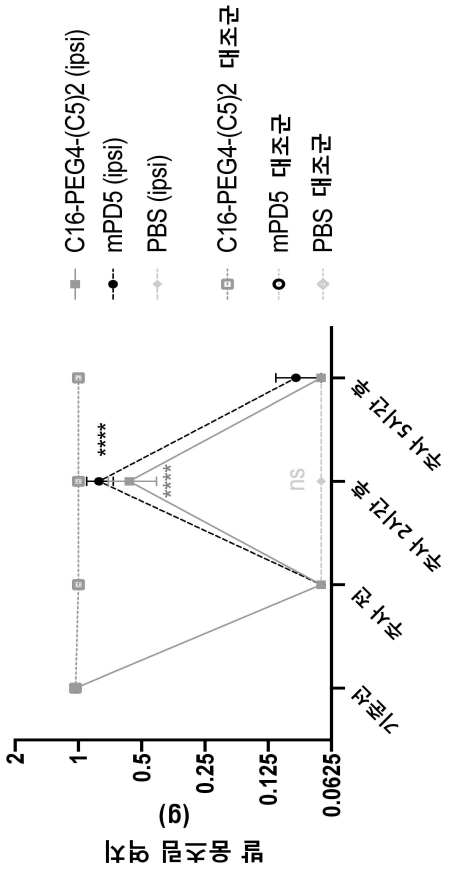
도면17


mPD5
250 mg/ml
0.13M
IN PBS

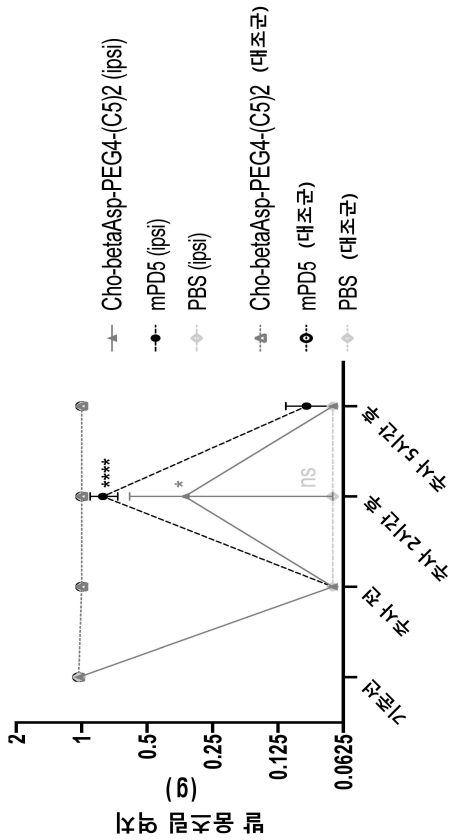
도면18a


C14-un (cis)-PEG4-(C5) (ipsi) ****
DiAcid-C18-PEG4-(C5)2 (ipsi) ***
C14-un(trans)-PEG4-(C5) (ipsi) ****
mPD5 (ipsi) ****
PBS (ipsi) ns
C14-un(cis)-PEG4-(C5)2 (대조군)
DiAcid-C18-PEG4-(C5)2 (대조군)
C14-un(trans)-PEG4-(C5)2 (대조군)
mPD5 (대조군)
PBS (대조군)
발 움츠림 역치 (g)
2
1
0.5
0.25
0.125
0.0625
기준선
주사 전의 CFA
주사 2시간 후
주사 5시간 후

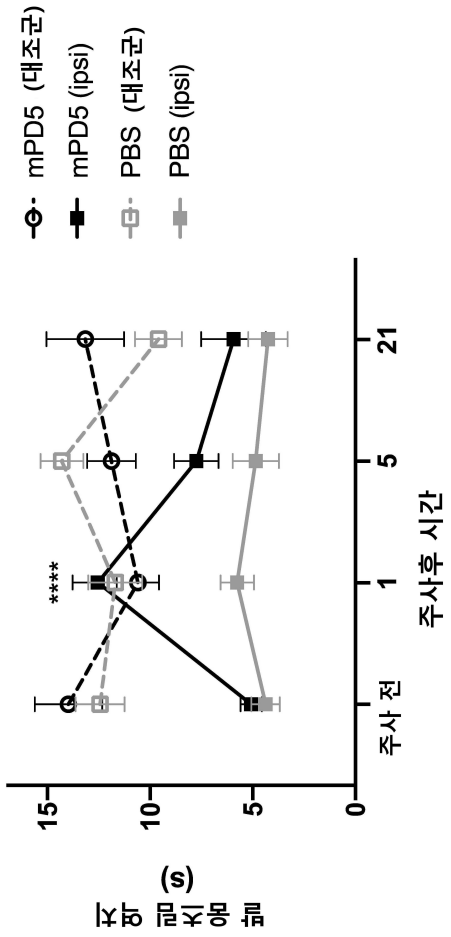
도면18b


C16-PEG4-(C5)2 (ipsi)
mPD5 (ipsi)
PBS (ipsi)
C16-PEG4-(C5)2 대조군
mPD5 대조군
PBS 대조군
벨 움직임 역치
(g)
2
1
0.5
0.25
0.125
0.0625
****
****
ns
기준선
주사 전
주사 2시간 후
주사 5시간 후

도면18c


Cho-betaAsp-PEG4-(C5)2 (ipsi)
mPD5 (ipsi)
PBS (ipsi)
Cho-betaAsp-PEG4-(C5)2 (대조군)
mPD5 (대조군)
PBS (대조군)
발 움츠림 역치 (g)
2
1
0.5
0.25
0.125
0.0625
****
*
ns
기준선
주사 전
주사 2시간 후
주사 5시간 후

도면19



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> University of Copenhagen

<120> Lipid conjugated peptide inhibitors of PICK1

<130> P5521PC00

<160> 54

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Generic DAT-C5 variants

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> H, N, F, or T; or is absent;

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> W, S, E, or Y; or is absent;

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> L, V, or I;

<220

><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> K, I, or R;

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> V;

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Generic DAT-C5 variants

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> N, F, or T; or is absent;

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> S, E, or Y; or is absent;

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> V, L, or I;

<220><221>

MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> I, or R;

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> V;

<400> 2

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Generic DAT-C5 variants

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> N, or T; or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> S, E, or Y; or is absent;

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> V, L, or I;

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> I, or R;

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> V;

<400> 3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Generic DAT-C5 variants

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> N, or F; or is absent;

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> S, E, or Y; or is absent;

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> V, L, or I;

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> I, or R;

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> V;

<400> 4

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 5

Asn Ser Ile Ile Val

1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 6

Asn Ser Ile Arg Val

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 7

Asn Ser Val Ile Val

1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 8

Asn Ser Val Arg Val

1 5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 9

Asn Glu Ile Ile Val

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 10

Asn Glu Ile Arg Val

1 5

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 11

Asn Glu Val Ile Val

1 5

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 12

Asn Glu Val Arg Val

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 13

Asn Tyr Ile Ile Val

1 5

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> DAT-C5 variant

<400> 14

Asn Tyr Ile Arg Val

1 5

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 15

Asn Tyr Val Ile Val

1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 16

Asn Tyr Val Arg Val

1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 17

Thr Ser Ile Ile Val

1 5

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 18

Thr Ser Ile Arg Val

1 5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 19

Thr Ser Val Ile Val

1 5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 20

Thr Ser Val Arg Val

1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 21

Thr Glu Ile Ile Val

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 22

Thr Glu Ile Arg Val

1 5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 23

Thr Glu Val Ile Val

1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 24

Thr Glu Val Arg Val

1 5

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 25

Asp Ala Thr Cys Val Ala Arg Ile Ala Asn Thr Thr Tyr Ile Ile Val

1 5 10 15

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 26

Thr Tyr Ile Arg Val

1 5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400>

27

Thr Tyr Val Ile Val

1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 28

Thr Tyr Val Arg Val

1 5

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 29

Phe Ser Ile Ile Val

1 5

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 30

Phe Ser Ile Arg Val

1 5

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 31

Phe Ser Val Ile Val

1 5

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 32

Phe Ser Val Arg Val

1 5

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 33

Phe Glu Ile Ile Val

1 5

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> DAT-C5 variant

<400> 34

Phe Glu Ile Arg Val

1 5

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 35

Phe Glu Val Ile Val

1 5

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 36

Phe Glu Val Arg Val

1 5

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 37

Phe Tyr Ile Ile Val

1 5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 38

Phe Tyr Ile Arg Val

1 5

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 39

Phe Tyr Val Ile Val

1 5

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 40

Phe Tyr Val Arg Val

1 5

<210> 41

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 41

Ser Ile Ile Val

1

<210> 42

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 42

Ser Ile Arg Val

1

<210> 43

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 43

Ser Val Ile Val

1

<210> 44

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 44

Ser Val Arg Val

1

<210> 45

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 45

Glu Ile Ile Val

1

<210> 46

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 46

Glu Ile Arg Val

1

<210> 47

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 47

Glu Val Ile Val

1

<210> 48

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400

> 48

Glu Val Arg Val

1

<210> 49

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 49

Tyr Ile Ile Val

1

<210> 50

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 50

Tyr Ile Arg Val

1

<210> 51

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 51

Tyr Val Ile Val

1

<210> 52

<211> 4

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 52

Tyr Val Arg Val

1

<210> 53

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 53

Asn Ser Leu Arg Val

1 5

<210> 54

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAT-C5 variant

<400> 54

His Trp Leu Lys Val

1 5