(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0126864
(43) 공개일자 2024년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/52 (2006.01) *A61K 38/19* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 25/04* (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/521 (2013.01)
A61K 38/195 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7023481
(22) 출원일자(국제) 2022년12월19일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년07월12일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/086559
(87) 국제공개번호 WO 2023/111348
국제공개일자 2023년06월22일
(30) 우선권주장
21306835.6 2021년12월17일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
타팔지 세러퓨틱스
프랑스 13009 마르세유 아브뉘 드 뤼미니 163 파르끄 시앙티피끄 에 테크놀로지끄 드 뤼미니 바띠망 씨씨아이엠피
(72) 발명자
가이야르 스테빤
프랑스 13009 마르세유
까스트 프랑시
프랑스 13011 마르세유
모크리치 압델아지즈
프랑스 13009 마르세유
(74) 대리인
특허법인코리아나

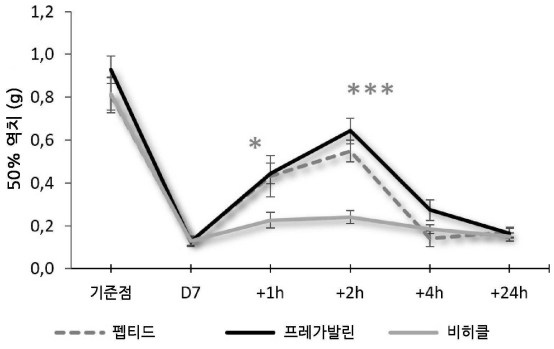
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **통증 치료에서 사용을 위한 펩티드 및 방법**

(57) 요 약

본 발명은 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 통증을 예방 또는 치료하기 위한 활성 성분으로서 사용을 위한, 신규 펩티드, 펩티드를 포함하는 조성물 및 키트에 관한 것이다. 본 명세서는 또한 이들 펩티드의 발현을 조절하기 위한 시험관내 또는 생체외 방법을 기술한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 25/04 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열 SEQ ID NO: 1의 단리된, 합성 또는 재조합 펩티드, 또는 SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 펩티드는 척수 개재뉴런 (바람직하게 척수 판 IIi 개재뉴런)의 흥분성을 조절하는 것인 펩티드.

청구항 3

제2항에 있어서, 서열 CFPGQVAGTTRA**Q**PSCVEASIVIQKWWCHMNPCLEGEDCKVLPD**Y**SGWSCSSGNKVKTTKVTR (SEQ ID NO: 1)에서 굵게 표시된 아미노산 Q 및 Y는 SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 펩티드의 아미노산 서열에서는 변화되지 않은 채로 유지되는 것인 펩티드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 펩티드는 재조합 펩티드인 펩티드.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 펩티드는 SEQ ID NO: 5의 펩티드인 펩티드.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 의약으로서 사용을 위한 것인 펩티드.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 따른 펩티드 또는 제6항에 따라 사용을 위한 펩티드를 코딩하는 핵산 서열.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 따른 펩티드 또는 제6항에 따라 사용을 위한 펩티드의 발현을 허용하는 벡터.

청구항 9

제7항에 따른 핵산 서열을 포함하거나, 또는 제8항에 따른 벡터를 사용하여 변형된 세포.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 따른 펩티드, 제7항의 핵산, 제8항의 벡터, 또는 제9항의 세포, 및 식이적으로 또는 약학적으로 허용가능한 지지체를 포함하는 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 적어도 하나의 추가 활성 화합물, 바람직하게 통증에 효율적인 활성제, 보다 더 바람직하게 SAID, NSAID 또는 오피오이드 약물을 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 12

의약으로서 사용을 위한 제6항의 펩티드, 제10항 또는 제11항에 따른 조성물로서, 상기 펩티드 또는 조성물은 대상체에게 근육내로, 정맥내로, 복강내로, 경구로 (*per os*), 항문으로, 피부로, 피하로, 진피적으로, 경피로

또는 척수강내로, 바람직하게 피하로 또는 경구로, 보다 더 바람직하게 경구로 투여되는 것인 펩티드 또는 조성물.

청구항 13

의약으로서 사용을 위한 제6항 또는 제12항의 펩티드, 또는 제10항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 따른 조성물로서, 펩티드의 용량은 포유동물에서 1 ㎍과 100 mg/kg/일 사이이고, 바람직하게 인간 대상체에서 2.5 ㎍/kg/일과 0.6 mg/kg/일 사이인 펩티드 또는 조성물.

청구항 14

예방 또는 치료를 필요로 하는 대상체에서 통증을 예방하거나 또는 치료하기 위한 활성 성분으로서 사용을 위한, 제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항의 펩티드, 제7항의 핵산, 제8항의 벡터, 또는 제9항의 세포.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 통증은 만성 통증, 신경병증성 통증, 수술후 통증, 염증성 통증, 통각과민증, 또는 이질통증인 펩티드, 핵산, 벡터, 또는 세포.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 대상체는 포유동물, 특히 인간인 펩티드, 핵산, 벡터, 또는 세포.

청구항 17

제16항에 있어서, 대상체는 *myo1A* 유전자에 적어도 하나의 돌연변이된 대립유전자를 갖는 것인 펩티드, 핵산, 벡터, 또는 세포.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 일반적으로 통증 관리 분야에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 활성 성분으로서 TAFA-4 단백질의 펩티드 단편을 포함하는 통증의 예방 및/또는 치료를 위한 조성물, 및 신경병증성 통증, 수술후 통증, 또는 염증성 통증에서 기원하는 통증, 특히 급성, 아급성, 또는 만성 통증의 예방 및/또는 치료, 또는 손상-유도 통증으로 인한 통각과민증 또는 이질통증의 예방 및/또는 치료를 위한 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 통증은 일반적으로 급성 또는 만성으로 분류된다. 급성 통증은 수명이 짧고 우리의 신체적 무결성의 유지에 필수적인데 반해서, 만성 통증은 정상적인 치유 시간을 넘어서 지속되고 웰빙에 부정적인 영향을 미친다. 만성 염증, 신경병증성 또는 수술후 통증은 장기간 지속되는 감각 이상 예컨대 통각과민증 (유해 자극으로 인해 유발되는 극심한 통증) 및 기계적 이질통증 (무해한 기계 자극으로 인해 유발되는 통증)을 일으킨다. 이들 통증 범주는 병인학 및 임상적 특징의 관점에서 상이하지만, 말초 및 중추 둘 모두에서, 신경-면역 상호작용 및 뉴런 감작에 대한 변경을 포함하여, 몇가지 공통적인 기전을 갖는다 (Costigan et al., 2009). 억제 상실은 만성 통증의 근본적인 핵심 기전일 수 있다는 것을 시사하는 증거가 증가하고 있다 (Bourane et al., 2015a; Bourane et al., 2015b; Boyle et al., 2019; Coull et al., 2005; Duan et al., 2014; Peirs et al., 2015; Petitjean et al., 2019; Petitjean et al., 2015; Zeilhofer et al., 2012; Zhang et al., 2018). 그러나, 설치류에서 만성 통증의 근본이 되는 기전 및 회로에 대한 광범위한 우리의 지식에도 불구하고, 이들 발견을 인간에서 만성 통증에 대한 효과적인 치료로 해석하는 것은 여전히 만족스럽지 않다 (Colloca et al., 2017). 실제로, 비-스테로이드 항염증제 (NSAID)는 만성 통증에 대해 제한적인 효능을 가지며, 오피오이드는 잠재적으로 치명적인 호흡 저하, 구역, 변비, 통각과민증, 내성, 신체적 및 정신적 의존을 포함한, 다수 유해 효과를 갖는다 (Benyamin et al., 2008). 따라서, 만성 통증의 치료를 위한 무통성 또는 진통성 잠재력을 갖는 새로운 표적을 발견하려는 노력이 장려되어야 한다.

[0003] 지난 수년간, 발명자들은 만성 통증의 치료를 위한 흥미로운 약물일 수 있음을 시사하는 분비형 단백질 TAFA-4의 놀라운 특성을 발굴하였다 (WO2014180853). TAFA-4는 5개의 고도로 보존된 분비형 뉴로카인 패밀리에 속한다 (Sarver et al., 2021). TAFA-4는 신호펩티드에 이어서 사이토카인과 유사하게 만드는 CC-케모카인

모티프를 포함하는 10개 시스테인 잔기를 갖는 고도로 보존된 코어 영역을 함유한다 (Tom Tang et al., 2004).

[0004] 또한, 발명자는 TAFA-4 유전자가 결실된 마우스에서, 신경 손상으로 유도된 기계적 과민증이 야생형 (WT) 마우스에 비해 훨씬 더 오래 지속된다는 것을 이전에 확인하였다 (Delfini et al., 2013). 이들 표현형은 재조합 TAFA-4의 척수강내 주사에 의해 반전된다.

[0005] WO2014180853에 기술된 바와 같이, 발명자는 TAFA-4가 병리학적으로 증가된 기계적 통증에 대한 강력한 작용을 보유한다는 것을 입증하는 실험적 증거를 이전에 보고하였다. 숫컷 및 암컷 마우스 둘 모두에서, 인간 재조합 TAFA-4의 척수강내 및 피하 투여는 염증성, 수술후, 및 신경 손상-유도된 기계적 과민증을 반전시키는 것으로 확인되었다. 그들은 또한 TAFA-4가 기계적 역치 변경을 담당하는 것으로 보고된 척수 판 II 개재뉴런의 신경 손상-유도된 뉴런 감작을 반전시킬 수 있다는 것을 확인하였다.

[0006] 그러나, 재조합 성숙 TAFA-4 단백질의 생산은 TAFA-4가 시스테인-풍부 단백질 (총 10개 시스테인)이기 때문에 도전일 수 있다. 실제로, 재폴딩은 단백질의 활성에 상당히 영향을 미칠 수 있는 비천연 입체형태 또는 부적절한 디술피드 가교 패턴을 얻게 할 수 있다. 더욱이, 높은 순도로 재조합 TAFA-4 단백질을 얻는데 필요한 몇몇 정제 단계와 함께, 가능한 응집 문제는 적절하게 폴딩된 단백질의 수율을 제한할 수 있다. 더 나아가서, TAFA-4 단백질의 화학 합성이 구현될 수 있지만, 4개 이상의 (보호되거나 또는 부분적으로 보호된) 펩티드 절편 (N-말단에서 시작하여 가장 C-말단의 펩티드에서 종료)의 조립을 요구하는 단백질의 길이로 인해서 또한 어려운 일이다. 일반적으로, 전체 길이 TAFA-4 경우에, 3개의 결찰 정제 단계가 필요하여서, 산업적 규모의 생산에 적합하지 않은 저수율을 초래하게 된다. 따라서, 산업적 규모로 비용 효율적인 방식으로 제조할 수 있는, TAFA-4 단백질과 유사한 활성을 갖는 신규 화합물을 발견하는데 실질적인 장점이 있을 것이다.

[0007] 따라서, 통증, 특히 급성, 아급성 또는 만성 통증을 효율적으로 예방하거나 또는 치료하는데 사용을 위한 대체 치료제 및 방법에 대한 강력한 요구가 존재한다.

발명의 내용

[0008] 본 발명은 적어도 부분적으로, 진통 또는 무통 활성, 특히 진통 활성을 갖는, 본 명세서에서 확인된 "TT6" 펩티드와 같은, 신규한 펩티드 (또한 본 명세서에서 "TT1"로서 확인됨) 및 이의 변이체의 발견을 기반으로 한다. 관심 펩티드는 인간 TAFA-4 단백질의 특이적 단편이거나, 또는 그로부터 유래된다. 유리하게, 이러한 펩티드 및 이의 변이체는 생산이 용이하고, 통증, 특히 급성, 아급성 또는 만성 통증, 전형적으로 손상-유도 통증에 대해 매우 효과적이다.

[0009] 본 발명은 서열 SEQ ID NO: 1의 단리된, 합성 또는 재조합 펩티드, 또는 SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 펩티드 (본 명세서에서 또한 "펩티드 변이체" 또는 "서열 SEQ ID NO: 1의 펩티드의 변이체"로서 확인됨)에 관한 것이다. 특정 양태에서, 서열 SEQ ID NO: 1의 펩티드, 또는 이의 변이체는 재조합 펩티드이다. 특정 양태에서, 펩티드 변이체는 서열 SEQ ID NO: 5의 단리된, 합성 또는 재조합 펩티드이다.

[0010] 바람직하게, SEQ ID NO: 1의 펩티드와 유사하게, SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 펩티드 변이체, 예컨대, 예를 들어, SEQ ID NO: 5의 펩티드 ("TT6")는 척수 개재뉴런 (바람직하게 척수 판 IIi 개재뉴런)의 흥분성을 조절한다. 바람직한 양태에서, SEQ ID NO: 1에 기재된 위치에 대해서, 위치 13의 글루타민 (Q) 및 위치 45의 티로신 (Y)의 아미노산 잔기는 SEQ ID NO: 1의 펩티드의 펩티드 변이체에서 변화되지 않은 채로 남아있는다.

[0011] 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산; 상기 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드 또는 펩티드 변이체의 발현을 허용하는 벡터; 및 이러한 펩티드 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포, 또는 본 발명의 벡터를 사용하여 변형되는 세포에 관한 것이다.

[0012] 다른 양태에서, 본 발명은 활성 성분, 예를 들어, 약물 또는 의약으로서 사용을 위한, 본 명세서에 기술된 펩티드, 또는 이의 변이체에 관한 것이다. 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 또는 이의 변이체, 이러한 펩티드 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산, 및/또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 벡터 또는 세포, 및 약학적으로 및/또는 식이적으로 허용가능한 지지체를 포함하는 조성물, 전형적으로, 치료적, 수의학적 또는 식이적 조성물에 관한 것이다.

[0013] 이러한 특정한 양태에서, 조성물은 적어도 하나의 추가적인 (별도의) 활성 화합물, 바람직하게 통증에 효율적인 활성제 (급성, 아급성 또는 만성 통증), 보다 더 바람직하게 스테로이드 항염증 약물 (SAID), 비-스테로이드 항염증 약물 (NSAID) 또는 오피오이드 약물을 더 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 추가 목적은 이를 필요로 하는 대상체에서 통증을 예방하거나 또는 치료하기 위한 활성 성분으로서 사용을 위한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 또는 세포에 관한 것이다. 또한, 이를 필요로 하는 대상체에서 통증을 예방하거나 또는 치료하기 위한 의약의 제조를 위한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 세포, 또는 조성물의 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 만성 통증, 신경병증성 통증, 수술후 통증, 염증성 통증, 통각과민증 또는 이질통증을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0015] 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물 또는 SEQ ID NO: 1의 펩티드, 또는 SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 이의 변이체 예컨대 SEQ ID NO: 5의 펩티드의 (치료적) 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 통증을 예방하거나 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0016] 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드 또는 조성물은 대상체에게 임의 경로, 예컨대, 예를 들어, 근육내로, 정맥내로, 복강내로, 경구로 (*per os*), 항문으로, 피부로, 피하로, 진피로, 경피적으로 또는 척수강내로 투여될 수 있다. 바람직하게 본 명세서에 기술된 펩티드 또는 조성물은 대상체에게 피하로 또는 경구로, 보다 더 바람직하게 경구로 투여된다.

[0017] 본 명세서에 기술된 펩티드 또는 조성물은 키트의 일부일 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 i) 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 또는 조성물, ii) 통증, 바람직하게 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드 또는 이의 변이체와 별개인, 통증에 효율적인 적어도 하나의 추가 활성 화합물, 및 임의로 iii) 키트 사용에 대한 서면 설명서를 포함하는 키트에 관한 것이다. 본 명세서에 기술된 키트는 전형적으로 통증의 예방 또는 치료 상황에서 사용된다.

[0018] 특정 양태에서, 본 발명의 생성물은 또한 연구 상황에서 사용될 수도 있다. 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드 또는 변이체를 코딩하는 핵산, 이의 발현을 허용하는 벡터, 또는 이러한 핵산을 포함하거나 또는 이러한 벡터를 사용하여 변형된 세포는 SEQ ID NO: 1의 펩티드 또는 SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 이의 기능적 변이체, 예컨대 SEQ ID NO: 5의 펩티드의 발현을 시험관내 또는 생체외에서 조절하거나 또는 발현시키는데 사용될 수 있다. 다른 특정 양태에서, 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 핵산을 발현하도록 변형된 유전자이식 동물에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0019] **도 1: 신경병증성 통증의 예비 신경 손상(Spared Nerve Injury) (SNI) 모델에서 생체내 피하 투여된 SEQ ID NO: 1의 펩티드의 진통 효과.** 이 도면은 시간 함수에 따라 마우스의 50%에서 발 움츠림을 유발시키는데 필요한 기계적 힘 (이의 그램 단위 무게의 당량으로 표시됨)을 나타낸다. SEQ ID NO: 1의 펩티드 ("펩티드"라고 함)는 음성 대조군 (비히클) 및 양성 대조군 (프레가발린)과 비교된다. 비히클 그룹과 비교하여 펩티드 처치된 마우스 간 통계적 차이가 표시된다 (이원 RM ANOVA에 이어서, Bonferroni 사후 검정: * p <0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

도 2: 신경병증성 통증의 SNI 모델에서 생체내 경구 투여된 SEQ ID NO: 1의 펩티드의 진통 효과. 이 도면은 시간 함수에 따라 마우스의 50%에서 발 움츠림을 유발시키는데 필요한 기계적 힘 (이의 그램 단위 무게의 당량으로 표시됨)을 나타낸다. SEQ ID NO: 1의 펩티드 ("펩티드"라고 함)는 음성 대조군 (비히클) 및 양성 대조군 (프레가발린)과 비교된다. 비히클 그룹과 비교하여 펩티드 처치된 마우스 간 통계적 차이가 표시된다 (이원 RM ANOVA에 이어서, Bonferroni 사후 검정: * p <0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

도 3: 신경병증성 통증의 SNI 모델에서 생체내 경구로 투여된 SEQ ID NO: 1의 펩티드의 용량-의존적 진통 효과. 데이터는 기준점 수준에 대한 반응 백분율로서 표시된다. SEQ ID NO: 1의 펩티드 (""펩티드"라고 함)는 음성 대조군 (비히클) 및 양성 대조군 (프레가발린)과 비교된다. 측정은 경구 위관영양 후 1시간, 2시간, 4시간 및 24시간에 수행되었다. 비히클 그룹과 비교하여 펩티드 처치된 마우스 간 통계적 차이를 표에 표시한다 (이원 RM ANOVA에 이어서, Bonferroni 사후 검정: * p <0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

도 4: 신경병증성 통증의 SNI 모델에서 피하로 또는 경구로 투여된 SEQ ID NO: 1의 펩티드와 TAFA-4 (전체 길이 단백질)의 진통 효과의 비교. 이 도면은 시간 함수에 따라 마우스의 50%에서 발 움츠림을 유발시키는데 필요한 기계적 힘 (이의 그램 단위 무게의 당량으로 표시됨)을 나타낸다. SEQ ID NO: 1의 펩티드 (""펩티드"라고 함)는 음성 대조군 (비히클) 및 TAFA-4 단백질 (전체 길이) ((TAFA4 s.c)라고 함)과 비교된다. 비히클 그룹과 비교하여 펩티드 또는 TAFA4 처치된 마우스 간 통계적 차이가 표시된다 (이원 RM ANOVA에 이어서, Bonferroni 사후 검정: * p <0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

도 5: 신경병증성 통증의 SNI 모델에서 생체내 경구로 투여된 TAFA-4 (전체 길이) 단백질의 진통 효과. 이 도면은 시간 함수에 따라 마우스의 50%에서 발 움츠림을 유발시키는데 필요한 기계적 힘 (이의 그램 단위 무게의 당량으로 표시됨)을 나타낸다. TAFA-4 (전체 길이) 단백질은 음성 대조군 (비히클) 및 양성 대조군 (프레가발린)과 비교된다. 비히클 그룹과 비교하여 프레가발린 처치된 마우스 간 통계적 차이가 표시된다 (이원 RM ANOVA에 이어서, Bonferroni 사후 검정: * p <0.05, ** p<0.01, *** p<0.001). TAFA4의 경구 투여 경우에 통계적 차이가 검출되지 않는다.

도 6: 염증성 통증 모델 (카라기난 모델)에서 생체내 경구로 투여된 SEQ ID NO: 1의 펩티드의 진통 효과. 이 도면은 시간 함수에 따라 마우스의 50%에서 발 움츠림을 유발시키는데 필요한 기계적 힘 (이의 그램 단위 무게의 당량으로 표시됨)을 나타낸다. SEQ ID NO: 1의 펩티드 (""펩티드"라고 함)는 음성 대조군 (비히클) 및 양성 대조군 (셀레콕십)과 비교된다. 비히클 그룹과 비교하여 펩티드 또는 셀레콕십 처치된 마우스 간 통계적 차이가 표시된다 (이원 RM ANOVA에 이어서, Bonferroni 사후 검정: * p <0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

도 7: 수술후 통증 모델 (Brennan 발 절개 통증 모델)에서 생체내 경구로 투여된 SEQ ID NO: 1의 펩티드의 진통 효과. 이 도면은 시간 함수에 따라 마우스의 50%에서 발 움츠림을 유발시키는데 필요한 기계적 힘 (이의 그램 단위 무게의 당량으로 표시됨)을 나타낸다. SEQ ID NO: 1의 펩티드 (""펩티드"라고 함)는 음성 대조군 (비히클) 및 양성 대조군 (모르핀)과 비교된다. 비히클 그룹과 비교하여 펩티드 또는 모르핀 처치된 마우스 간 통계적 차이가 표시된다 (이원 RM ANOVA에 이어서, Bonferroni 사후 검정: * p <0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

도 8: 신경병증성 통증의 SNI 모델에서 경구로 투여된 화학 합성으로 수득된 TT1 및 재조합 TT1 (생체 생산)의 통증 완화 효능의 비교.

이 도면은 시간 함수에 따라 마우스의 50%에서 발 움츠림을 유발시키는데 필요한 기계적 힘 (이의 그램 단위 무게의 당량으로 표시됨)을 나타낸다. 화학 합성으로 생산된 SEQ ID NO: 1의 펩티드 ("TT1 synth")의 통증 완화 효능은 박테리아에서 (생체)생산된 SEQ ID NO: 1의 펩티드 ("TT1 prod Bact")의 것과 비교된다. 비히클 그룹과 비교하여 "TT1 synth" 또는 "TT1 prod bact" 처치된 마우스 간 통계적 차이가 표시된다 (이원 RM ANOVA에 이어서, Bonferroni 사후 검정: * p <0.05, ** p<0.01, *** p<0.001). n=8; 모델 = SNI; 성별: 숫컷; 투여: 경구; TT1 synth 농도: 300 μg/kg, TT1 prod bact 농도: 300 μg/kg.

도 9: 신경병증성 통증의 SNI 모델에서 경구로 또는 피하로 투여된 생체생산 TT1 및 TT6 간 통증 완화 효능의 비교.

이 도면은 시간 함수에 따라 마우스의 50%에서 발 움츠림을 유발시키는데 필요한 기계적 힘 (이의 그램 단위 무게의 당량으로 표시됨)을 나타낸다. SEQ ID NO: 1의 펩티드 ("TT1")는 SEQ ID NO: 5의 펩티드 ("TT6")와 비교되고, 각각의 펩티드는 피하 (A) 또는 경구 (B)로 투여된다. 비히클 그룹과 비교하여 TT1 또는 TT6 처치된 마우스 간 통계적 차이가 표시된다 (이원 RM ANOVA에 이어서, Bonferroni 사후 검정: * p <0.05, ** p<0.01, *** p<0.001). n=8; 모델 = SNI; 성별: 숫컷; 투여: 경구 또는 피하; TT1 농도: 300 μg/kg, TT6 농도: 300 μg/kg.

도 10: 수술후 통증 모델 (Brennan 발 절개 모델)에서 생체내 피하 투여된 SEQ ID NO: 1의 펩티드의 예방적 진통 효과

A. 개략적인 프로토콜 대표도. TT1 또는 비히클은 수술 전날 (D-1), 당일 (디데이) 수술 (및 각성) 전 1시간 및 이후 1시간, D+1 및 D+2의 상이한 시점에 1일 2회 피하로 투여되었다. D+1 및 D+2에 기계적 역치 반응 측정은 SEQ ID NO: 1의 펩티드 ("TT1")의 투여 전에 수행되었다.

B. 이 도면은 시간 함수에 따라 마우스의 50%에서 발 움츠림을 유발시키는데 필요한 기계적 힘 (이의 그램 단위 무게의 당량으로 표시됨)을 나타낸다. SEQ ID NO: 1의 펩티드 ("TT1"이라고 함)는 음성 대조군 (비히클)과 비교된다. 데이터는 기준점 수준에 대한 반응 백분율로서 표시된다. 비히클 그룹과 비교하여 펩티드 처치된 마우스 간 통계적 차이가 표시된다 (이원 RM ANOVA에 이어서, Bonferroni 사후 검정: * p <0.05, ** p<0.01, *** p<0.001). TT1 경우 n=23, 비히클 경우 n=22; 모델 = 수술후 통증 모델; 성별: TT1-처치 마우스 경우 11마리 숫컷 및 12마리 암컷, 비히클 그룹 경우 11마리 숫컷 및 11마리 암컷; 투여: 피하; TT1 농도: 300 μg/kg.

도 11: 만성 수축성 손상 (CCI) 신경병증성 통증 모델에 대한 SEQ ID NO: 1의 펩티드의 반복 경구 투여 이후 내

성 부재

CCI 신경병증성 통증 모델의 확립 후에, 마우스는 수술 후 10일에 시작하여 연속 14일 동안 SEQ ID NO: 1의 펩티드 ("TT1") 또는 비히클로 처치되었다. TT1의 진통 효과는 2일마다 결정되었다. 이 도면은 시간 함수에 따라 마우스의 50%에서 발 움츠림을 유발시키는데 필요한 기계적 힘 (이의 그램 단위 무게의 당량으로 표시됨)을 나타낸다. SEQ ID NO: 1의 펩티드 ("TT1"이라고 함)는 음성 대조군 (비히클)과 비교된다. 비히클 그룹과 비교하여 펩티드 처치된 마우스 간 통계적 차이가 표시된다 (이원 RM ANOVA에 이어서, Bonferroni 사후 검정: * p <0.05, ** p<0.01, *** p<0.001). 모델 = CCI 신경병증성 통증 모델; 성별: TT1-처치된 마우스 경우 10마리 숫컷, 비히클 그룹 경우 n=5; 투여: 경구; TT1 농도: 300 μg/kg.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 정의

[0021] 본 명세서에서 사용되는 용어는 일반적으로 본 명세서의 상황 내에서 각 용어가 사용되는 특별한 상황 내에서 당분야의 일반적인 의미를 갖는다. 특정 용어는 본 발명의 방법 및 이를 사용하는 방법을 설명하는데서 숙련된 독자에게 추가 지침을 제공하기 위해, 하기, 또는 명세서의 다른 곳에서 논의된다. 더욱이, 동일한 항목이 1가지가 넘는 방식으로 언급될 수 있다는 것을 이해하게 된다. 결론적으로, 대체 언어 및 동의어가 본 명세서에 논의되는 어느 하나 이상의 용어에 대해 사용될 수 있다. 특정 용어에 대한 동의어가 제공된다. 하나 이상의 동의어의 설명은 다른 동의어의 사용을 배제하지 않는다.

[0022] 용어 "펩티드", "펩티드 변이체", "단백질 단편", "단백질 절편"은 아미노산 잔기의 중합체를 언급하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 아미노산 잔기의 이러한 중합체는 천연 또는 비-천연 아미노산 잔기를 함유할 수 있다. 이 용어는 또한 펩티드의 발현 후 변형, 예를 들어, 글리코실화, 시알릴화, 아세틸화, 인산화, 카바메틸화 등을 포함한다. 또한, 본 발명의 상황에서, "펩티드"는 펩티드가 바람직한 활성을 유지하는 한, 즉 통증을 예방하거나 또는 치료하는 한, 천연 (야생형) 서열에 대해서, 변형, 예컨대 결실, 첨가, 및 치환 (일반적으로, 천연적으로 보존적)을 포함하는, 단백질 단편 또는 절편을 의미한다. 이들 변형은 바람직하게 의도적인 돌연변이이고, 예를 들어, 부위-지정 돌연변이유발법을 통해서 수득된다.

[0023] 용어 "단리된 펩티드"는 이의 본래 환경 (즉, 천연 발생 경우에, 천연 환경)으로부터 제거된 펩티드를 의미한다. 자연계, 예를 들어, 살아있는 동물에 천연적으로 존재하는 펩티드는 상기 자연계에 공존하는 물질의 전부 또는 일부로부터 분리된, 동일 펩티드와 구별되어야 한다. 분리된 펩티드는 본 명세서에서 "단리된 펩티드"라고 명명된다. 달리 말해서, 본 발명의 상황에서, 단리된 펩티드는 자연에서 그 자체로 존재하지 않는 TAFA-4 단백질의 단편이다.

[0024] 용어 "합성 펩티드"는 화학 합성으로 수득된 펩티드를 의미한다.

[0025] 용어 "재조합 펩티드"는 외생성 유전자의 발현을 지원하기 위해 외래 발현 시스템에 클로닝된 재조합 DNA에 의해 코딩되는 펩티드를 의미한다. 재조합 DNA는 일반적으로 표적 펩티드의 cDNA 서열로서, 전형적으로 선택된 숙주 세포 내에서 표적 펩티드의 발현을 허용하는 프로모터의 제어 하에 배치되도록 디자인된다. 당업자는 높은 수준의 단백질 발현을 달성하기 위해서 적절한 프로모터를 선택할 수 있다.

[0026] 용어 "서열 동일성", "적어도 X% 동일성을 갖는 서열" 및 "에 대해 서열 X% 동일한"은 비교창 상에서 뉴클레오티드 대 뉴클레오티드 기반 또는 아미노산 대 아미노산 기반으로 서열이 동일한 정도를 의미하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 따라서, "서열 동일성의 백분율"은 비교창에서 2개의 최적으로 정렬된 서열에 의해 계산될 수 있으며, 비교창에서 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 일부는 2개 서열의 최적 정렬을 위해 기준 서열과 비교하여 첨가 또는 결실 (즉, 갭)을 포함할 수 있다. 백분율은 동일한 핵산 염기 (예를 들어, A, T, C, G, U) 또는 동일한 아미노산 잔기 (예를 들어, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys 및 Met)가 양쪽 서열에서 발생되는 위치의 개수를 결정하여 일치되는 위치의 개수를 산출하고, 일치되는 위치의 개수를 비교창의 전체 위치 개수 (즉, 창 크기)로 나누어서, 그 결과에 100을 곱해 서열 동일성 백분율을 산출하여 계산될 수 있다. 대안적으로, 백분율은 양쪽 서열에서 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 발생되거나 또는 아미노산 잔기가 갭과 정렬되는 위치의 개수를 결정하여 일치되는 위치의 개수를 산출하고, 일치되는 위치의 개수를 비교창의 전체 위치 개수로 나누어서, 그 결과에 100을 곱해 서열 동일성의 백분율을 산출하여 계산될 수 있다. 바람직하게, 서열 동일성은 기준 서열, 여기서 SEQ ID NO: 1 ("CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWWCHMNPCLEGEDCKVLPDYSGWSCSSGNKVKTTKVTR")의 전체 길이 상에서 결정된다. SEQ ID NO: 5 ("SFPGQVAGTTRAQPSSVEASIVIQKWWSHMNPSLEGEDSKVLPDYSGWSSSSGNKVKTTKVTR")의

특정 예를 고려하면, 상기 서열은 SEQ ID NO: 1에 대해 90% 초과로 동일하고, 구체적으로 BLAST 알고리즘을 사용하여 SEQ ID NO: 1에 대해 90,48% 동일하다.

[0027] 비교를 위한 서열의 최적 정렬은 예를 들어, [Smith and Waterman, (1981) Adv. Appl. Math. 2:482]의 국소 상동성 알고리즘, [Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443]의 상동성 정렬 알고리즘, [Pearson and Lipman, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444]의 유사성 검색 방법, 이들 알고리즘의 컴퓨터 구현 (GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA), 또는 육안 검사 (일반적으로, 다음을 참조함: Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement))를 통해서 수행될 수 있다.

[0028] 서열 동일성 및 서열 유사성 백분율을 결정하는데 적합한 알고리즘의 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘으로서, 각각 다음의 문헌에 기술된다: Altschul et al., (1990), J. Mol. Biol. 215: 403-410 및 Altschul et al., (1977) Nucleic Acids Res. 3389-3402. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립 생물정보 센터 (National Center for Biotechnology Information) 웹사이트를 통해 공공으로 입수가능하다. 이러한 알고리즘은 먼저 데이터베이스 서열에서 동일 길이의 단어와 정렬될 때 일부 양의 값 역치 점수 "T"와 일치하거나 또는 그를 만족하는, 문의 서열의 길이 "W"의 짧은 단어를 확인하여서 높은 점수 서열 쌍 (HSP)을 확인하는 단계를 포함한다. T는 이웃 단어 점수 역치라고 한다 (Altschul *et al.*, 상동). 이들 초기 이웃 단어 적중은 그들을 함유하는 더 긴 HSP를 찾기 위한 검색을 개시하는 시드로서 작용한다. 단어 적중은 이후에 누적 정렬 점수가 증가할 수 있는 한 각 서열을 따라 양 방향으로 연장된다. 누적 점수는 뉴클레오티드 서열 경우, 매개변수 "M" (일치 잔기 쌍에 대한 보상 점수; 항상 >0) 및 "N" (불일치 잔기에 대한 패널티 점수; 항상 <0)을 사용해 계산된다. 아미노산 서열 경우에, 채점 매트릭스는 누적 점수를 계산하는데 사용된다. 각 방향에서 단어 적중의 연장은 누적 정렬 점수가 이의 최대 획득값으로부터 "X" 분량만큼 떨어지고; 하나 이상의 음의 점수 잔기 정렬의 축적으로 인해, 누적 점수가 0 이하가 될 때; 또는 양쪽 서열의 끝에 도달했을 때 중단된다. BLAST 알고리즘 매개변수 W, T, 및 X는 정렬 감도 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램 (뉴클레오티드 서열 경우)은 디폴트로서 11의 단어 길이 (W), 10의 기대값 ("E"), M=5, N=-4, 및 양 가닥 비교를 사용한다. 아미노산 서열 경우에, BLASTP 프로그램은 디폴트로서, 3의 단어 길이 (W), 10의 기대값 (E), 및 BLOSUM62 채점 매트릭스를 사용한다 (참조: Henikoff and Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915).

[0029] 아미노산 서열 동일성 백분율 정도는 또한 정렬에서 동일한 일치 개수를 계측하고 이러한 동일한 일치 개수를 기준 서열의 길이로 나누어서, ClustalW 분석 (버전 W 1.8)을 통해서도 얻을 수 있는데, 느리고/정확한 쌍별 최적 정렬을 달성하도록 다음의 디폴트 ClustalW 매개변수를 사용한다: 갭 개방 패널티: 10; 갭 연장 패널티: 0.10; 단백질 가중 매트릭스: Gonnet 시리즈; DNA 가중 매트릭스: IUB; Toggle Slow/Fast 쌍별 정렬=SLOW 또는 FULL 정렬.

[0030] 본 명세서에서 사용되는 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드의, 임의 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태를 의미한다. 따라서, 이들 용어는 단일 가닥, 이중 가닥, 또는 다수 가닥 DNA 또는 RNA, 게놈 DNA, cDNA, DNA-RNA 하이브리드, 또는 푸린 및 피리미딘 염기, 또는 다른 천연, 화학적 또는 생화학적 변형된, 비천연, 또는 유도체화된 뉴클레오티드 염기를 포함하는 중합체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 폴리뉴클레오티드의 골격은 당 및 포스페이트 기 (전형적으로 RNA 또는 DNA에서 발견될 수 있음), 또는 변형되거나 또는 치환된 당 또는 포스페이트 기를 포함할 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오티드의 골격은 폴스포르아미데이트같은 합성 서브유닛의 중합체를 포함할 수 있고, 따라서 올리고데옥시뉴클레오시드 포스포르아미데이트 (P-NH2) 또는 혼합 포스포르아미데이트-포스포디에스테르 올리고머일 수 있다. 또한, 이중 가닥 폴리뉴클레오티드는 상보적 가닥을 합성하고 적절한 조건 하에서 가닥을 어닐링하거나, 또는 적절한 프라이머와 DNA 폴리머라제를 사용해 새로운 상보적 가닥을 합성하여서, 화학 합성의 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 생성물로부터 수득될 수 있다.

[0031] 용어 "벡터"는 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 분자를 의미한다. 벡터는 일반적으로 핵산 분자가 도입되는 세포에서, 이식유전자라고도 하는, 코딩 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 유도할 수 있는 조절 구성요소를 함유한다. 용어 "이식유전자"는 세포에 도입되어서, RNA로 전사될 수 있고, 임의로 적절한 조건 하에서 번역 및/또는 발현되는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.
일정 양태에서, 이것은 도입된 세포에 바람직한 성질을 부여하거나, 또는 달리 바람직한 기술적 효과, 여기서는 전형적으로 치료 효과를 초래한다. 이식유전자는 하나 이상의 단백질 또는 단백질의 하나 이상의 단편

을 코딩하는 서열을 함유할 수 있다.

[0032] 용어 "유전자 요법"은 질환의 예방 또는 치료 목적을 위해서 개체의 세포에 유전자/핵산의 전달을 포함하는 대상체의 치료를 의미한다.

[0033] 용어 "형질감염"은 세포, 예컨대 원핵생물 또는 진핵생물 세포에 의한 외래 폴리뉴클레오티드의 흡수를 의미한다. 세포는 외생성 폴리뉴클레오티드가 세포에 도입되었을 때 "형질감염"된 것으로 확인된다. 다수의 형질감염 기술이 일반적으로 당분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 다음의 문헌들을 참조한다: Graham *et al.*, Virology 52:456 (1973), Sambrook et al, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York (1989), Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier (1986), 및 Chu *et al.*, Gene 13:197 (1981). 이러한 기술은 적합한 숙주 세포에 하나 이상의 외생성 핵산을 도입시키는데 사용될 수 있다.

[0034] 용어 "형질도입"은 예컨대 유전자 전달 벡터, 예를 들어, 재조합 바이러스 벡터, 특히 레트로바이러스, 아데노바이러스, 재조합 아데노-연관 바이러스 (AAV), 헤르페스 심플렉스 바이러스 및 렌티바이러스를 통해서, 수용자 숙주 세포로 핵산 분자의 전달을 의미한다. 예를 들어, rAAV 비리온에 의한 표적 세포의 형질도입은 형질도입되는 세포로 그 비리온에 함유된 rAAV 벡터의 전달을 초래한다.

[0035] 재조합 "아데노-연관 바이러스 (AAV)"는 재조합 방법을 사용하여 인공적으로 생산된, 낮은 면역원성을 나타내고, 병원성이 결여된, 단일 가닥 선형 DNA 게놈을 갖는 소형 디펜도파르보바이러스이다. 재조합 AAV (rAAV)는 바람직하게 조직/세포-특이적 표적화 능력을 가져서, rAAV의 이식유전자는 하나 이상의 사전결정된 조직(들)/세포(들)에 특이적으로 또는 우선적으로 전달되게 된다. AAV 캡시드를 비롯하여 조절 영역의 유형 및 투여 경로는 이들 조직-특이적 표적화 능력의 결정에서 중요한 요소이다.

[0036] 용어 "통증"은 본 발명의 상황 내에서 조직 손상과 연관된 임의의 통증 또는 민감성을 의미한다. 바람직하게, 본 명세서에서 사용되는 용어 통증은 비정상적인 민감성, 즉, 전형적으로 통각수용기 및 비-통각수용기를 포함하여 모든 유형의 감각 뉴런의 이상적으로 증가된 활성에 의해 매개되는 과민성으로 이해된다. 용어 통증은 통각수용기-매개 통증 (본 명세서에서 "통각수용성 통증"이라고도 함), 신경병증성 통증, 염증성 통증, 병리학적 통증, 급성 통증, 아급성 통증, 만성 통증, 기계적 통증, 화학적 통증, 체성 통증, 내장 통증, 심부 체성 통증, 표재성 체성 통증, 신체형 통증, 이질통증, 통각과민증, 또는 신경 손상과 연관된 통증으로부터 선택되는 임의 통증을 포함한다.

[0037] "통각수용성" 통증 또는 "통각수용기-매개" 통증은 강렬하거나 또는 유해한 자극에 의한 말초 감각 뉴런 (통각수용기)의 특정 서브세트의 활성화에 대한 반응으로 발생된다. 본 발명에 따른 통각수용성 통증은 기계적 통증 (압박, 찢김 등) 및 화학적 통증 (상처 부위 요오드, 눈에 고추가루)을 포함한다. 통각수용성 통증의 예는 외상성 또는 외과적 통증, 분만통, 염좌, 뼈 골절, 화상, 타박상, 멍, 주사, 치과 시술, 피부 생검, 및 폐색을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 통각수용성 통증은 내장 통증 및 체성 통증, 특히 심부 체성 통증 및 표재성 체성 통증을 포함한다.

[0038] 내장 통증은 분산되어서, 위치를 찾는 것이 어렵고, 종종 멀리 떨어진, 일반적으로 표면적인 구조를 의미한다. 구역 및 구토를 동발할 수 있고, 구역질나고, 깊은 곳에서, 쥐어짜는 느낌 및/또는 둔한 느낌으로 설명될 수 있다. 심부 체성 통증은 인대, 힘줄, 뼈, 혈관, 근막 및 근육에서 통각수용기의 자극에 의해 시작되고, 둔하고, 아프며, 위치를 찾기 힘든 통증이다. 심부 체성 통증의 예는 염좌 및 부러진 뼈를 포함한다. 표재성 통증은 피부 및 다른 표재성 조직에서 통각수용기의 활성화에 의해 시작되고, 날카롭고, 명확하며, 위치가 분명하다. 표재성 체성 통증을 일으키는 손상의 예는 경미한 상처 및 경미한 (1도) 화상을 포함한다.

[0039] 용어 "손상-유도 통증"은 본 발명의 상황 내에서 신경병증성 통증, 염증성 통증 및 수술후 통증을 포괄한다.

[0040] 염증성 통증은 수술후, 외상후 통증, 관절염 (류마티스성 또는 골관절염) 통증, 자가면역 질환 (예컨대, 건손)과 연관된 통증 및 축성 요통같이 관절, 근육 및 힘줄의 손상과 연관된 통증을 포함하여, 조직 손상 또는 염증 존재 하에서 발생되는 통증이다. 염증은 말초 감각 뉴런의 감작을 담당하여서, 자발적 통증을 초래하고 통증 과민성을 무효화시킨다. 급성 또는 만성 병리학적 조직 염증은 말초 감각 뉴런을 감작화시켜서, 국소적이고 무력한 통증 과민증을 일으켜서, 통증 인식에 강력하게 영향을 미친다. 염증 매개인자는 신경 말단에 존재하는 이온 채널의 발현 및/또는 기능을 변형시켜서 부분적으로 통각수용성 1차 구심성 섬유 흥분성을 증강시키는 것으로 알려져 있다.

[0041] 신경병증성 통증은 말초 또는 중추 신경계에서 손상 또는 기능장애의 결과인, 일반적인 유형의 만성, 비악성 통

증이다. 신경병증성 통증은 상이한 병인을 가질 수 있고, 예를 들어, 외상, 수술, 추간판 탈출, 척수 손상, 당뇨병, 헤르페스 조스터 감염 (대상포진), HIV/AIDS, 말기암, 절단 (유방절제술 포함), 수근관 증후군, 만성 알콜 사용, 방사선 노출, 및 신경독성 치료제, 예컨대 일정 항-HIV 및 화학요법제의 의도하지 않은 부작용의 결과로서 발생될 수 있다. 특정 유형의 신경병증성 통증은 ≪화학요법-유도된 말초 신경병증성 통증≫ (CIPN) 또는 ≪화학요법-유도된 신경병증성 통증≫ (CINP)이다. CINP 또는 CIPN은 항암제, 예컨대 백금-유래 약물 및 탁산-유래 약물 (옥살리플라틴, 시스플라틴, 카르보플라틴 및 파클리탁셀)의 가장 심각한 부작용 중 하나이다. CINP는 심지어 치료 중단 요인일 수 있고, 결과적으로 사망 위험성을 증가시킨다. 신경병증성 통증은 종종 만성 이질통증 (가벼운 접촉같이, 통상적으로는 통증성 반응을 유발하지 않는 자극으로 인한 통증으로 정의됨) 및/또는 통각과민증 (일반적으로 통증성 자극에 대한 증가된 민감성으로 정의됨)의 출현을 특징으로 하거나 또는 그의 원인이고, 임의의 손상된 조직의 분명한 치유 이후 수개월 또는 수년 동안 지속될 수도 있다.

통증은 또한 염증, 압박, 침윤, 뼈 또는 다른 조직으로 전이성 확산같이, 다수의 원인으로 인해서, 암 환자에서 발생될 수도 있다. 또한, 통증은 뇌수막에 분포하는 감각 섬유의 활성화와 연관된 두통 및 편두통을 포함한다. 본 발명에 따른 펩티드, 예컨대 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 5의 펩티드는 이러한 상기 기술된 유형의 통증을 치료하는데 사용된다.

[0042] 본 발명의 펩티드는 또한 만성 근육 및/또는 뼈 및/또는 관절 통증을 포함한 엘러스-단로스 증후군과 관련된 통증을 치료하는데도 사용될 수 있다.

[0043] 바람직하게, 본 발명의 펩티드는 손상-유도 통증의 예방 또는 치료에 사용된다. 보다 바람직하게, 본 발명의 펩티드는 신경병증성 통증 (예컨대, 화학요법-유도된 신경병증성 통증 또는 화학요법-유도된 말초 신경병증성 통증), 수술후 통증 및/또는 염증성 통증의 예방 또는 치료에 사용된다. 실험 부분에서 볼 수 있듯이, 발명자는 또한 본 발명의 펩티드가 대상체에서 수술후 기계적 이질통증의 발생을 예방하는데 적합하다는 것을 입증한다. 유리하게, 본 발명의 펩티드는 대상체에서 임의의 내성을 유도하지 않고 사용될 수 있다.

[0044] 전형적으로, 본 발명의 펩티드는 만성 손상-유도 통증을 예방 또는 치료하는데 사용된다. 전형적으로, 본 발명의 펩티드는 만성 신경병증성 통증 예컨대 만성 화학요법-유도된 말초 신경병증성 통증 (CIPN), 만성 화학요법-유도된 신경병증성 통증 (CINP) 또는 만성 신경 손상-유도 통증; 만성 수술후 통증; 및/또는 만성 염증성 통증의 예방 또는 치료에서 사용된다.

[0045] 본 발명의 상황 내에서, 용어 대상체에서 통증을 "치료하는" 또는 "치료"는 서열 SEQ ID NO: 1의 적합한 펩티드 또는 본 명세서에 정의된 바와 같은 이의 변이체, 또는 본 발명에 따른 조성물의 적용 또는 투여 이후에, 본 명세서에 기술된 바와 같이 대상체에서 임의 형태의 통증, 또는 통증, 특히 급성, 아급성 또는 만성 통증 (특히 전형적으로 신경병증성 통증, 수술후 통증 또는 염증성 통증으로 인한 만성 통증과 연관된 임의의 신경병증성 병태)과 연관된 임의 질환 또는 병태, 또는 이러한 질환 또는 병태의 임의 증상의 지연, 안정화, 치유, 회복, 완화, 경감, 변경, 호전, 개선, 구제 또는 영향을 미치는 것을 의미한다.

[0046] 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 또한 임의의 객관적 또는 주관적 매개변수, 예컨대 감퇴, 관해, 진행 또는 중증도 둔화, 안정화, 통증의 증상 축소, 또는 대상체가 견딜 수 있게 또는 더 견딜 수 있게 만드는 것을 포함하여, 통증 (임의 손상, 병리 또는 병태와 연관될 수 있음)의 치료에서 성공의 임의 지표를 의미한다. 또한 용어 통증을 "치료하는"은 통증 내성 증가 및/또는 인지된 통증 감소를 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명의 방법, 화합물 및 조성물은 통증 내성 증가 및/또는 인식된 통증 감소를 위한 것이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "통증 내성"은 또한 대상체가 감정적으로 및/또는 신체적으로 무너지기 전에 인식하고 견딜 수 있는 통증의 양을 의미한다. 통증 내성은 통증 역치 (통증을 일으키는데 필요한 최소 기계적 자극)와 구별된다. 본 명세서에서 사용되는, "통증 내성 증가"는 일반적으로 이전 상태와 비교했을 때, 예를 들어, 서열 SEQ ID NO: 1의 적합한 펩티드 또는 이의 변이체 또는 상기 펩티드 또는 변이체를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여 후, 대상체가 더 큰 통증 내성 (즉, 덜 인식되는 통증)을 발생시키는 상황을 의미한다.

[0047] 본 발명의 상황 내에서, 대상체의 통증과 관련하여 "예방하는" 또는 "예방"은 서열 SEQ ID NO: 1의 적합한 펩티드 또는 이의 변이체, 또는 본 발명에 따른 조성물의 적용 또는 투여 후에, 대상체가 임의 종류의 통증을 획득할 위험 (또는 획득할 감수성)의 가능성에 대한 적어도 감소를 의미한다. 예를 들어, "예방하는"은 통증의 증상에 노출될 수 있거나 또는 그러한 성향이 있지만, 아직 통증의 증상을 경험하지 않았거나 또는 나타내지 않는 대상체에서 통증의 적어도 하나의 임상 증상이 발생되지 않도록 하는 것을 포함한다.

[0048] 본 발명의 상황에서, "대상체" 또는 "환자"는 동물, 특히, 질환 또는 장애 또는 이의 증상에 대한 치료를 필요로 하는 포유동물을 의미한다. 대상체는 질환 또는 장애를 앓고 있는 것으로 진단받았거나, 또는 질환 또는

장애가 발생될 위험성이 있다고 결정된 대상체일 수 있고, 상기 질환 또는 장애는 대상체가 통증을 느끼게 하는 것으로 알려져 있다. 특정 예에서, 대상체는 신경병증성 통증, 수술후 통증, 염증성 통증, 통각과민증 및/또는 이질통증을 포함하여, 급성 통증 및/또는 아급성 통증 또는 만성 통증과 같은, 통증을 앓고 있거나 또는 그로 진단된다.

[0049] 특정 양태에서, 대상체는 인간이다.

[0050] 다른 특정 양태에서, 대상체는 동물, 특히 가축 또는 번식 동물, 특히 말, 개, 고양이, 소 등이다.

[0051] 다른 특정 양태에서, 대상체는 *myo1A* 유전자에 적어도 하나의 돌연변이된 대립유전자를 갖는다.

[0052] 펩티드

[0053] 발명자는 통증을 예방하거나 또는 치료할 수 있고, 특히 손상되거나 또는 염증이 있는 신경계의 상황에서 기계적 과민증을 반전시키는 신규 펩티드를 발견하였다. 발명자는 척수 네트워크의 흥분성을 조절함으로써, 이들 펩티드가 기계적으로 및/또는 화학적으로 유도된 통각수용성 신호를 특이적으로 표적화하여, 진통 또는 무통 활성, 특히 진통 활성을 나타낸다고 믿는다.

[0054] 본 명세서에 기술된 펩티드는 105개 아미노산 잔기의 인간 TAFA-4 성숙 단백질로부터의 특이적 단편이고/그로 이루어진다 (신호 서열의 절단으로 생성되고, 등록 # NP_0011005527 또는 [Tang *et al*., 2004]가 개시한 바와 같은 Genbank 등록번호 AAP92409 하에 공공 데이터베이스에서 확인됨).

[0055] 제1 양태에서, 본 발명은 서열 SEQ ID NO: 1의 단리된, 합성 또는 재조합 펩티드, 또는 SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 펩티드, 예컨대 SEQ ID NO: 5의 변이체 펩티드에 관한 것이다.

[0056] 특정 양태에서, 서열 SEQ ID NO: 1의 펩티드, 또는 이의 변이체 예컨대 SEQ ID NO: 5의 변이체 펩티드는 재조합 펩티드 (즉, 생체-생산 펩티드)이다.

[0057] 특정 양태에서, 본 발명에 따른 펩티드는 아미노산 서열 CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWWCHMNPCLEGEDCKVLPDYSGWSCSSGNKVKTTKVTR (SEQ ID NO: 1), 즉, Cys-Phe-Pro-Gly-Gln-Val-Ala-Gly-Thr-Thr-Arg-Ala-Gln-Pro-Ser-Cys-Val-Glu-Ala-Ser-Ile-Val-Ile-Gln-Lys-Trp-Trp-Cys-His-Met-Asn-Pro-Cys-Leu-Glu-Gly-Glu-Asp-Cys-Lys-Val-Leu-Pro-Asp-Tyr-Ser-Gly-Trp-Ser-Cys-Ser-Ser-Gly-Asn-Lys-Val-Lys-Thr-Thr-Lys-Val-Thr-Arg을 포함하는 펩티드로서, 분자량이 6920 g/mol이다.

[0058] 다른 특정 양태에서, 본 발명에 따른 펩티드는 SEQ ID NO: 1로 기재되는 아미노산 서열로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어지는 펩티드이다.

[0059] 추가의 특정한 양태에서, 본 발명에 따른 펩티드는 SEQ ID NO: 5로 기재된 아미노산 서열로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어지는 펩티드이다.

[0060] 용어 "본질적으로 이루어지는"은 일반적으로 그에 부여된 의미를 갖는데, 예를 들어, 명시적으로 언급되지 않은 구성요소는 허용하지만, 선행 기술에서 발견되거나 또는 본 발명의 기본 또는 신규 특징에 영향을 미치는 구성요소는 배제한다. 이와 같이, 명시된 서열로 "본질적으로 이루어지는" 펩티드는 이 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지고, 펩티드의 활성에 필수적이지 않은 다른 특성을 포함하는 펩티드를 의미한다.

[0061] SEQ ID NO: 1의 펩티드는 인간 TAFA-4 성숙 단백질의 63개 C-말단 아미노산 잔기로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어지고, UniProt 등록 # Q96LR4의 아미노산 78-140으로서 확인될 수 있다.

[0062] SEQ ID NO: 1에 기재된 위치를 참조하여, SEQ ID NO: 1 (CFPGQVAGTTRA**Q**PSCVEASIVIQKWWCHMNPCLEGEDCKVLPD**Y**SGWSCSSGNKVKTTKVTR)에서 굵은체로 표시되는 위치 13의 Q (Glu) 및 위치 45의 Y (Tyr)의 2개 아미노산 잔기는 본 발명자들에게 특히 척수 개재뉴런, 바람직하게 척수 판 IIi 개재뉴런의 흥분성 조절에서, 펩티드의 생물학적 활성에 관여하는 것으로 여겨진다.

[0063] SEQ ID NO: 1의 펩티드의 변이체는 또한 본 발명자가 본 명세서에서 최초로 개시한다. 변이체는 SEQ ID NO: 1의 펩티드로부터 유래되고, SEQ ID NO: 1의 펩티드의 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 아미노산의 치환 및/또는 하나 이상의 아미노산의 결실 또는 첨가로 인해 생성되는 펩티드를 의미하고자 한다. 변이체는 변이체가 SEQ ID NO: 1의 펩티드의 기능적 활성을 실질적으로 보유하거나, 또는 심지어 통증 예방 또는 치료를 허용하는 상기 기능적 활성을 개선시키면 기능성 변이체로 간주된다. 활성은 실험 부분에서 수행되는 바와 같은 행동 어세이같은 기능적 어세이를 사용해 측정될 수 있다.

[0064] 본 발명의 상황에서 유용한 펩티드의 변이체는 SEQ ID NO: 1에 대해서 적어도 90%, 90.5%, 91%, 92%, 92.1%, 93%, 93.7%, 94%, 95%, 95.2%, 96%, 96.8%, 97%, 98%, 98.4% 또는 99% 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0065] SEQ ID NO: 1의 펩티드의 특히 바람직한 변이체 ("TT1")는 SEQ ID NO: 5의 펩티드 ("TT6"): SFPGQVAGTTRAQPSSVEASIVIQKWWSHMNPSLEGEDSKVLPDYSGWSSSSGNKVKTTKVTR, 즉, Ser-Phe-Pro-Gly-Gln-Val-Ala-Gly-Thr-Thr-Arg-Ala-Gln-Pro-Ser-Ser-Val-Glu-Ala-Ser-Ile-Val-Ile-Gln-Lys-Trp-Trp-Ser-His-Met-Asn-Pro-Ser-Leu-Glu-Gly-Glu-Asp-Ser-Lys-Val-Leu-Pro-Asp-Tyr-Ser-Gly-Trp-Ser-Ser-Ser-Ser-Gly-Asn-Lys-Val-Lys-Thr-Thr-Lys-Val-Thr-Arg이고, 6820 g/mol의 분자량을 갖는다.

[0066] 특정 양태에서, SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 변이체는 척수 개재뉴런 (바람직하게 척수 판 IIi 개재뉴런)의 흥분성을 조절한다. 바람직한 양태에서, 변이체는 SEQ ID NO: 1에 존재하는 임의 아미노산을 첨가, 결실 또는 치환시킨 하나 이상의 점 돌연변이(들)(예를 들어, 2, 3, 4, 5 또는 6개 점 돌연변이)를 포함하는 펩티드이고, 단 SEQ ID NO: 1의 위치 13의 Q 및 위치 45의 Y의 아미노산 잔기는 변화되지 않은 채로 남아있는다 (위치 13 및 45는 SEQ ID NO: 1에 기재된 위치를 참조함).

[0067] 따라서, 본 발명의 바람직한 양태에서, 2개 아미노산 (SEQ ID NO: 1의 위치 13의 Q 및 위치 45의 Y)은 예를 들어, SEQ ID NO: 5의 펩티드의 경우처럼, SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 펩티드의 변이체의 아미노산 서열에서 변화되지 않은 채로 남아있는다.

[0068] 다른 특정 양태에서, 본 발명의 상황에서 유용한 펩티드의 변이체는 SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 84.1%, 85%, 85.7%, 86%, 87%, 87.3%, 88%, 88.9% 또는 89% 서열 동일성을 가질 수 있다. 바람직하게, SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 85% 동일성을 갖는 변이체는 척수 개재뉴런 (바람직하게 척수 판 IIi 개재뉴런)의 흥분성을 조절한다.

[0069] 특정 양태에서, 변이체는 SEQ ID NO: 1에 존재하는 임의 아미노산을 첨가, 결실 또는 치환시킨 7개 이상의 점 돌연변이 (예를 들어, 8, 9 또는 10개 점 돌연변이)를 포함하는 펩티드이고, 단 SEQ ID NO: 1의 위치 13의 Q 및 위치 45의 Y의 아미노산 잔기는 변화되지 않은 채로 남아있는다 (위치 13 및 45는 SEQ ID NO: 1에 기재된 위치를 참조함).

[0070] 특정 양태에서, 하나 이상의 결실은 SEQ ID NO: 1의 N-말단에 있다. 다른 양태에서, 하나 이상의 결실은 SEQ ID NO: 1의 C-말단 또는 임의의 다른 위치에 있고, 단 SEQ ID NO: 1의 위치 13 및 위치 45의 2개 아미노산 (Q 및 Y)은 변화되지 않은 채로 남아있는다. 역시 다른 양태에서, 둘 이상의 결실은 SEQ ID NO: 1의 N-말단 및 C-말단 둘 모두에 존재한다. SEQ ID NO: 1의 펩티드의 N-말단 및/또는 C-말단 또는 이의 중심부에서 이러한 결실은 SEQ ID NO: 1의 절두된 인간 펩티드 변이체를 생성시킬 수 있다.

[0071] 또한, 본 발명에 따른 펩티드는 본 명세서에 기술된 방법에서 유용한 접합체를 형성하도록 다른 펩티드 또는 단백질에 융합될 수 있다. 이러한 상황에서 용어 "접합체"는 예를 들어, 표적 세포와 특이적으로 상호작용하거나 또는 결합하는 폴리펩티드와 함께, 예를 들어 통각수용기 또는 개재뉴런의 흥분성을 조절할 수 있는, 2개 분자의 생물학적 기능을 단일 폴리펩티드, 즉 SEQ ID NO: 1의 펩티드 또는 이의 변이체 내에서 조합한 조작된 융합 구성체를 의미한다.

[0072] 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 SEQ ID NO: 1의 펩티드 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 (SEQ ID NO: 2 또는 9)에 관한 것이다. SEQ ID NO: 1의 펩티드 또는 이의 변이체를 코딩하는 임의 서열을 비롯하여 유전자 코드의 축퇴성으로 생성되는 유사한 서열이 본 발명에 포괄된다. 특정 양태에서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드를 코딩하는 핵산은 SEQ ID NO: 2의 서열: TGCTTCCCGGGACAGGTGGCGGGCACAACTCGGGCTCAACCTTCTTGTGTTGAAGCTTCCATTGTGATTCAGAAATGGTGGTGTCACATGAATCCGTGTTTGGAAGGAGAGGATTGTAAAGTGCTGCCAGATTACTCAGGTTGGTCCTGTAGCAGTGGCAATAAAGTCAAAACTACGAAGGTAACGCGG을 포함하거나, 그로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어진다.

[0073] 다른 특정 양태에서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드를 코딩하는 핵산은 SEQ ID NO: 9의 서열: TGCTTTCCAGGTCAAGTTGCGGGAACAACTCGTGCACAACCATCGTGCGTAGAGGCCTCAATTGTTATCCAAAAGTGGTGGTGTCACATGAACCCCTGCCTCGAAGGAGAGGACTGTAAGGTACTGCCTGACTACAGCGGGTGGTCATGTTCATCAGGCAATAAGGTGAAGACGACCAAAGTTACCCGT을 포함하거나, 그로 이루어지거나 또는 그로 본질적으로 이루어진다. SEQ ID NO:9의 핵산은 특히 박테리아에서 SEQ ID NO: 1의 펩티드의 생산을 위해 적합화된다.

[0074] 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 SEQ ID NO: 5의 펩티드 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 (SEQ

ID NO: 6)에 관한 것이다. SEQ ID NO: 5의 펩티드 또는 이의 변이체를 코딩하는 임의 서열을 비롯하여 유전자 코드의 축퇴성으로 생성된 유사한 서열은 본 발명에 포괄된다. 특정 양태에서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드를 코딩하는 핵산은 SEQ ID NO: 6의 서열: TCGTTTCCAGGTCAAGTTGCGGGAACAACTCGTGCACAACCATCGTCGGTAGAGGCCTCAATTGTTATCCAAAAGTGGTGGTCGCACATGAACCCCTCGCTCGAAGGAGAGGACTCGAAGGTACTGCCTGACTACAGCGGGTGGTCATCGTCATCAGGCAATAAGGTGAAGACGACCAAAGTTACCCGT을 포함하거나, 그로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어진다.

[0075] SEQ ID NO: 1의 펩티드 또는 이의 변이체를 코딩하는 상기 언급된 핵산 서열은 적절한 숙주 세포에서 이의 발현을 제어하기 위한 조절 서열이 측접될 수 있다.

[0076] 다른 양태에서, 본 발명은 또한 5'에서 3'의 순서로, 다음을 포함하는 발현 카세트에 관한 것이다:

[0077] - 프로모터,

[0078] - 본 명세서에 기술된 바와 같은 SEQ ID NO: 1의 펩티드 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 서열; 및

[0079] - 종결 서열, 예컨대, 예를 들어, 폴리아데닐화 신호.

[0080] SEQ ID NO: 1의 펩티드 또는 이의 변이체를 코딩하는 상기 언급된 핵산 서열, 또는 본 명세서에 개시된 발현 카세트는 세포에서 이의 전사 및/또는 번역을 최적화시키는 벡터로 그들 포장에 적합한 서열이 측접될 수 있다.

[0081] 다른 양태에서, 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드의 발현을 허용하는 벡터에 관한 것이다.

[0082] 펩티드를 제조하기 위한 방법

[0083] 숙주세포에서 발현을 허용하기 위해, 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드 (또는 이의 변이체 중 하나)를 코딩하는 핵산은 벡터에 존재할 수 있고, 적합한 숙주 세포로 상기 벡터의 도입 이후에, 서열은 당분야에 충분히 공지된 (예를 들어, [Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989]에 기술된 바와 같은), 표준 클로닝 및 발현 기술에 따라서 본 명세서에 기술된 코팅된 펩티드를 생산하도록 발현될 수 있다. 다양한 발현 벡터가 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 발현하도록 적용될 수 있다. 본 발명에서 사용할 수 있는 발현 벡터는 숙주 세포에서 본 명세서에 기술된 펩티드 중 어느 하나를 생산하기 위해서, 비제한적으로, 진핵생물 발현 벡터, 특히 포유동물 발현 벡터, 바이러스-기반 발현 벡터, 배큘로바이러스 발현 벡터, 식물 발현 벡터, 및 임의의 플라스미드 발현 벡터를 포함한다. 발현 벡터는 또한 박테리아 시스템에서 펩티드의 발현을 허용하는 벡터일 수 있다.

[0084] 발현 벡터의 선택은 벡터를 발현시키고자 의도된 숙주 세포에 따라 좌우된다. 당업자는 쉽게 이러한 선택을 할 수 있을 것이다. 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 세포, 특히 숙주 세포에 관한 것이다. 본 명세서에 기술된 바와 같은 벡터를 사용하여 변형되는 (숙주) 세포는 또한 본 발명자가 최초로 본 명세서에 개시한다.

[0085] 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포에서, 본 발명의 펩티드, 또는 이의 변이체를 발현시키는 것이 가능하다. 대표적인 숙주 세포는 많은 이. 콜라이 (*E. coli*) 균주, 포유동물 세포주, 예컨대, 예를 들어, CHO, CHO-K1, 및 HEK293; 곤충 세포, 예컨대 Sf9 세포; 및 효모 세포, 예컨대, 에스. 세레비지아에 (*S. cerevisiae*) 및 피. 파스토리스 (*P. pastoris*)를 포함한다.

[0086] 본 명세서에 기술된 핵산 또는 벡터는 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포에 외생성 DNA의 도입을 위해 통상적으로 사용되는 표준 기술, 예컨대, 예를 들어, 전기천공, 칼슘 포스페이트 침전, DEAE-덱스트란 형질감염 등을 통해서 숙주 세포로 형질감염될 수 있다. 대안적으로 본 명세서에 기술된 핵산 또는 벡터는 바이러스-기반 벡터를 사용한 형질도입을 통해서 숙주 세포에 전달될 수 있다.

[0087] 순도는 임의의 적절한 표준 방법, 예를 들어, 컬럼 크로마토그래피, 박층 크로마토그래피, 또는 고성능 액상 크로마토그래피 (HPLC) 분석을 통해서 측정될 수 있다. 단리 또는 합성 펩티드는 또한 인간 대상체에게 투여에 안전한, 예를 들어, 감염원 또는 독소원이 결여된, 무균성 정도를 정의한다.

[0088] 본 명세서에 기술된 조성물 및 방법에서 사용되는 펩티드는 또한 고체상 합성 기술을 통해 생산될 수 있다. 펩티드의 직접 화학 합성은 당업자에게 매우 잘 알려진 방법, 예컨대 천연 화학 결찰 (Native Chemical Ligation)(NCL)을 통해서 수행될 수 있다. 이러한 화학적 접근법은 비보호된 펩티드 단편의 커플링 단계로 이루어지고, N-말단 시스테인을 갖는 펩티드는 C-말단 티오에스테르 펩티드와 반응한다. 이러한 트랜스티오

에스테르화는 결찰 부위에서 천연 아미드 결합의 형성을 일으키는 분자내 S,N-아실 이동으로 빠르게 이어진다.

2개 펩티드가 1-단계 결찰에서 결찰된 후 1-단계 정제가 후속될 때, 예상 수율은 매우 높고 따라서 치료적 용도를 위한 대규모 생산에 적합하다.

[0089] 유전자 요법

[0090] 적절한 벡터로 본 명세서에 기술된 펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 코딩하여서, 본 발명자는 또한 본 명세서에서 통증, 특히 급성, 아급성 또는 만성 통증, 바람직하게 만성 통증의 유전자 요법을 위한 신규 유전자 전달 도구, 특히 유전자 구성체 (예컨대, 예를 들어, 발현 카세트 또는 벡터)를 제공한다. 유전자 요법은 대상체에서 특별한 세포에 의해서, TAFA-4-펩티드, TT1 펩티드 또는 이의 변이체, 예컨대 TT6 펩티드의 내생성 생산을 허용하도록 적용될 수 있다. 유전자 요법은 생체내에서 또는 생체외에서 일어날 수 있다. 생체외 유전자 요법은 적어도 대상체 세포 샘플의 단리 및 정제, 단리된 세포로 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드를 코딩하는 핵산 서열 (즉, 이식유전자)의 도입, 및 대상체에게 유전자 변경/변형 세포의 재도입을 필요로 한다.

대조적으로, 생체내 유전자 요법에서, 이식유전자는 전형적으로 대상체에게 투여를 위해 포장된다. 유전자 전달 구성체는 비바이러스 또는 바이러스일 수 있다. 바람직하게, 본 명세서에 기술되는 유전자 구성체는 표적화된 조직/세포에서 이식유전자/코딩 서열 (즉, SEQ ID NO: 1의 펩티드 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 서열)을 발현하는데 사용될 수 있는 바이러스 구성요소, 바이러스 벡터 및/또는 임의의 바이러스 포장 시스템(들)에 의해 제조된다. 바이러스 벡터는 표적화된 조직/세포에서 이식유전자 생산물의 발현을 허용하거나 또는 촉진하는 임의의 적합한 프로모터 및 다른 전사 조절자를 포함할 수 있다. 바이러스 포장 시스템은 바람직하게 표적화된 세포에 대해 적합화된다. 표적 세포로 들어가면, 이러한 시스템은 표적화된 조직으로 전달을 촉진한다. 본 명세서에 기술된 방법에서 유용한 바이러스 벡터는 바람직하게 복제-결함 바이러스, 예컨대, 예를 들어, 아데노바이러스 또는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터이다.

[0091] 일부 양태에서, 본 발명은 이의 게놈에, 전형적으로 프로모터에 작동적으로 연결된, SEQ ID NO: 1의 펩티드 또는 이의 변이체, 예컨대 SEQ ID NO: 5의 펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스 (AAV)에 관한 것이다.

[0092] 지금까지, 그들 표면 성질에 변이를 갖는 AAV의 적어도 수십종의 상이한 혈청형이 인간 또는 비인간 영장류 (NHP)에서 단리되었고 특징규명되었다. 용어 "혈청형"은 당업자가 혈청학적으로 상이한 캡시드를 갖는 AAV를 구별할 수 있게 한다. 혈청학적 특수성은 다른 AAV 혈청형과 비교하여 한 AAV 혈청형에 대한 항체들 간 교차 반응성의 결여를 기반으로 결정된다. 본 명세서에 기술되는 rAAV는 또한 rAAV 벡터 또는 rAAV 입자라고도 하고, 하기의 알려진 혈청형 중 어느 하나를 가질 수 있고, 다시 말해서, 예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, AAV.rh8, AAV.rhIO, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu37, AAV.Anc80, AAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV.PHP.B, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, AAV.HSC16 및 AAVhu68로부터 선택될 수 있다. rAAV 벡터는 특정 세포, 조직 또는 장기에 대해 증강된 향성을 가질 수 있다. 경구 경로를 통한 투여의 상황에서, rAAV 벡터는 위, 소장 또는 결장 조직, 및 보다 특별히 이들 조직을 구성하는 세포, 특히 상피 세포, 예컨대, 예를 들어, 장세포, 고블렛 세포, 장내분비 세포, 파네스 세포, 술세포에 대한 증강된 향성을 가질 수 있다. 장에 위치하는 표적 세포, 또는 장으로 전달되는 표적화 세포 경우에, AAV 4, AAV7, AAV8, AAV9 또는 AAV10 중 어느 하나가 특히 효율적인 것으로 선택될 수 있다.

[0093] 본 발명의 유전자 요법 벡터 또는 카세트는 예를 들어, PCT 국제 특허 출원 공개 번호 WO03042397 및 미국 특허 제6,632,670호에 이전에 기술되고, 당업자에게 충분히 공지된 당분야에 알려진 방법으로 생산될 수 있다.

[0094] 본 설명은 또한, 예를 들어, 하기 단계를 포함하는, 재조합 벡터, 예를 들어, 바이러스 벡터, 예컨대 AAV를 제조하기 위한 방법에 관한 것이다:

[0095] a) 본 명세서에 기술된 재조합 벡터가 형질감염/형질도입된 세포를 배양하는 단계; 및

[0096] b) 형질감염/형질도입된 세포의 상청액으로부터 재조합 벡터를 회수하는 단계.

[0097] 본 발명의 유전자 요법 벡터는 293 또는 293T 인간 배아 신장 세포주로 2개 또는 3개 플라스미드의 형질감염을 통해서 생산될 수 있다. 일부 양태에서, 치료 유전자를 코딩하는 DNA은 하나의 플라스미드에 의해 제공되고, 하나 이상의 혈청형의 AAV로부터 발생되는 캡시드 단백질 및 복제 유전자, 및 예를 들어 아데노바이

러스로부터 발생되는 헬퍼 기능은 모두 제2 플라스미드에 의해 트랜스로 제공된다. 일부 양태에서, SEQ ID NO: 1의 펩티드 또는 이의 변이체를 코딩하는 DNA는 하나의 플라스미드가 제공하고; 하나 이상의 혈청형의 AAV로부터 발생되는 캡시드 단백질 및 복제 유전자는 제2 플라스미드에 의해 트랜스로 제공되고, 예를 들어, 아데노바이러스로부터 발생되는 헬퍼 기능은 제3 플라스미드에 의해 제공된다. 특정 양태에서, 제3 플라스미드는 2개의 측접한 반전 말단 반복부 (ITR)를 포함하여, 프로모터에 작동적으로 연결된 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.

[0098] 세포 배양 이후에, 유전자 요법 벡터는 예를 들어, 냉동 해동 사이클을 통해서 세포로부터 방출될 수 있고, 당업자에게 충분히 공지된 임의 방법, 예컨대, 예를 들어 이오딕사놀 단계 구배에 이어서 Hi-Trap QHP 컬럼에서 이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있다. 다음으로, 최종 유전자 요법 벡터는 스핀 컬럼을 통해서 농축될 수 있고, 정제된 벡터는 예를 들어, 포스페이트 완충 염수 중에 냉동 (-60℃ 이하)되어 저장될 수 있다.

[0099] 본 발명의 관련 양태는 재조합 벡터가 형질감염되거나 또는 형질도입된, 예를 들어, 본 명세서에 기술된, AAV 벡터가 형질도입된 숙주 세포를 포함한다. 본 발명의 추가 관련 양태는 본 명세서에 기술된, 재조합 벡터, 예를 들어, AAV의 게놈을 포함하거나, 또는 그로 (본질적으로) 이루어지는 임의의 핵산 분자를 포함한다.

[0100] 조성물

[0101] 본 명세서에 기술된 하나 이상의 펩티드는 별도로 또는 병용하여, 그리고 개별적으로 또는 조성물의 형태로 사용을 위해 제제화될 수 있다. 조성물은 식이 조성물 또는 약학 조성물일 수 있고, 본 명세서에 기술된 바와 같이 치료적이거나 또는 예방적으로 사용될 수도 있다.

[0102] 추가 양태에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터 또는 세포, 및 식이적으로 또는 약학적으로 허용가능한 지지체를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0103] 용어 "식이적으로 허용가능한 지지체"는 대상체가 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산 서열, 벡터 또는 세포를 포함하는 조성물을 위험없이 섭취하고 소화하도록 허용하고, 통증의 성질 및 국소 부위에 따라 올바른 부위 및 올바른 순간에 이의 치료적 작용을 일으키기 전에 변형될 수 있는, 특히 음식 소화와 관련된 임의의 공격으로부터 상기 펩티드를 보호할 수 있는 담체에 관한 것이다.

[0104] 경구 투여의 상황에서, 조성물은 대상체의 위 pH를 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 및 보다 바람직하게 적어도 5 또는 6 까지 상승시키는데 유효한 양으로 존재하는, 적어도 하나의 위장 보호제, 바람직하게 산 억제제를 더 포함할 수 있다. 용어 "산 억제제"는 위산 분비를 억제하고 위 pH를 증가시키는 작용제를 의미한다. 산 억제제는 시메티딘, 라니티딘, 에브로티딘, 파부티딘, 라푸티딘, 록스티딘, 파모티딘을 포함하는 H2 차단제; 오메프라졸, 에소메프라졸, 판토프라졸, 란소프라졸, 덱슬란소프라졸, 라베프라졸, 파리프라졸, 레미노프라졸 및 테나토프라졸; 또는 이의 임의 조합을 포함하는 양자 펌프 억제제를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0105] "약학적으로 허용가능한 지지체/비히클/담체"는 활성제(들) (즉, 본 발명의 펩티드 또는 이의 변이체 및 임의로 임의의 추가적인 별도 활성제와 투여되는 희석제, 보조제 또는 부형제일 수 있다. 이러한 약학 담체는 석유, 동물성, 식물성 또는 합성 기원의 것, 예컨대 땅콩유, 대두유, 미네랄유, 참깨유 등을 포함한, 오일 또는 물과 같은, 멸균 액체일 수 있다. 약학 조성물이 정맥내로 투여될 때 물이 바람직한 담체이다. 염수 용액 및 수성 덱스트로스 및 글리세롤 용액이 또한 특히 주사용 용액을 위한, 액체 담체로서 적용될 수 있다. 적합한 약학 부형제는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 소듐 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 소듐 클로라이드, 탈지유, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다.

[0106] 약학 조성물이 경구 투여용으로 적합화되는 경우에, 정제 또는 캡슐은 약학적으로 허용가능한 부형제 예컨대 결합제 (예를 들어, 전호화 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 히드록시프로필 메틸셀룰로스); 충전제 (예를 들어, 락토스, 미세결정질 셀룰로스 또는 칼슘 수소 포스페이트); 윤활제 (예를 들어, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 또는 실리카); 붕해제 (예를 들어, 감자 전분 또는 소듐 전분 글리콜레이트); 또는 습윤제 (예를 들어, 소듐 라우릴 술페이트)와 함께 통상적인 수단을 통해서 제조될 수 있다. 정제는 당분야에 충분히 공지된 임의 방법을 통해서 코팅될 수 있다. 경구 투여를 위한 액체 조제물은 예를 들어, 용액, 시럽 또는 현탁액의 형태를 취할 수 있거나, 또는 그들은 사용 전에 물 또는 다른 적합한 비히클로 재구성을 위한 건조 생성물로서 존재할 수도 있다. 이러한 액체 조제물은 약학적으로 허용가능한 첨가제 예컨대 현탁제 (예를 들어, 솔비톨 시럽, 셀룰로스 유도체 또는 수첨 식용 지방); 유화제 (예를 들어, 레시틴 또는 아카시아); 비-수성 비히클 (예를 들어, 아몬드유, 유성 에스테르, 에틸 알콜 또는 분별 식물성 오일); 및 보존제 (예를 들어, 메틸 또는 프로필-

p-히드록시벤조에이트 또는 솔브산)와 함께 통상적인 수단을 통해서 제조될 수 있다. 조제물은 또한 완충염, 풍미제, 착색제 및 감미제를 절적하게 함유할 수도 있다.

[0107] 본 발명의 조성물은 적어도 하나의 추가 활성 화합물을 더 포함할 수 있다. 바람직하게, 추가 활성 화합물은 통증에 효율적인 활성제이다. "통증에 효율적인"이란 (대상체가 측정가능하게 느끼는) 무통 또는 진통 성질을 갖는 활성제를 의미한다. 보다 바람직하게, 추가 활성 화합물은 스테로이드 항염증 약물 (SAID), 비스테로이드 항염증 약물 (NSAID) 또는 오피오이드 약물이다.

[0108] SAID는 히드로코르티손, 코르티손, 에타메타소넵, 프레드니손, 프레드니솔론, 트리암시놀론, 덱사메타손, 플루드로코르티손, 또는 이의 임의 조합을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0109] NSAID는 셀레콕십, 로페콕십, 루미라콕십, 루미라콕십, 발데콕십, 파레콕십, 에토리콕십, CS-502, JTE-522, L-745,337, NS398, 아스피린, 아세타미노펜 (본 개시의 목적을 위한 NSAID로 고려됨), 이부프로펜, 플루르비프로펜, 케토프로펜, 나프록센, 옥사프로진, 에토돌락, 인도메타신, 케토롤락, 로르녹시캄, 멜록시캄, 피록시캄, 드록시캄, 테녹시캄, 나부메톤, 디클로페낙, 메클로페나메이트, 메페남산, 디플루니살, 술린닥, 놀메틴, 페노프로펜, 수프로펜, 베녹사프로펜, 아세클로페낙, 톨페남산, 옥시펜부타존, 아자프로파존, 페닐부타존, 또는 이의 임의 조합을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0110] 오피오이드 약물은 (덱스트로)프로폭시펜, A-메틸펜타닐, 알펜타닐, 알릴프로딘, 벤지트라미드, 부프레노르핀, 부토르파놀, 카르펜타닐, 데스메틸프로딘, 덱스트로모라미드, 데조신, 디아세틸모르핀, 디히드로코데이논, 디히드로에토르핀, 디모르폰, 디페녹실레이트, 디피파논, 에토르핀, 펜타닐, 펜토베미돈, 레페타민, 레바세틸메타돌, 레보메토르판, 레보르파놀, 로페라미드, 메페리딘, 멥타지놀, 메타돈, 메틸모르핀, 모르핀, 날부핀, 니코모르핀, 오메펜타닐, 오리파빈, 옥시코돈, 옥시모르폰, PEPAP, 파라모르핀, 펜타조신, 페나조신, 피리트라미드, 프로딘, 레미펜타닐, 술펜타닐, 타펜타돌, 틸리딘, 트라마돌, 또는 오피오이드 길항제 예컨대 날메펜, 날록손, 날트렉손 또는 이의 임의 조합을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0111] 치료적 및 예방적 용도

[0112] 본 명세서에 기술된 펩티드는 전형적으로 통증을 예방하거나 또는 치료하는데 사용된다.

[0113] 본 발명은 또한 의약으로서 사용을 위한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 특히 서열 SEQ ID NO: 1의 단리된, 재조합 또는 합성 펩티드, 또는 SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 펩티드에 관한 것이다.

[0114] 다른 특히 바람직한 양태에서, 본 발명은 의약으로서 사용을 위한, 서열 SEQ ID NO: 5의 단리된, 합성 또는 재조합 펩티드, 또는 본 명세서에 정의된 바와 같은 이의 변이체에 관한 것이다.

[0115] 다른 양태에서, 본 발명자는 본 명세서에서 이를 필요로 하는 대상체에서 통증의 예방 또는 치료를 위한 활성 성분/활성제로서 사용을 위한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터 또는 세포를 기술한다.

[0116] 특정 양태에서, 본 발명자는 본 명세서에서 이를 필요로 하는 대상체에서 통증의 치료를 위한 약물의 제조를 위한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 또는 조성물의 용도를 기술한다. 그들은 또한 본 명세서에서 이를 필요로 하는 대상체에서 통증을 예방하거나 또는 치료하는데서 사용을 위한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 또는 조성물, 및 이를 필요로 하는 대상체에게 본 명세서에 기술된 바와 같은 상기 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 및/또는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 통증을 예방하거나 또는 치료하기 위한 상응하는 방법을 기술한다.

[0117] 특정 양태에서, 본 발명자는 본 명세서에서 통증, 특히 급성, 아급성 또는 만성 통증, 바람직하게 만성 통증을 예방하거나 또는 치료하기 위한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 또는 조성물의 용도를 기술한다.

[0118] 바람직하게, 통증은 신경병증성 통증 (예컨대, 화학요법-유도된 말초 신경병증성 통증 또는 화학요법-유도된 신경병증성 통증), 수술후 통증, 염증성 통증, 통각과민증, 또는 이질통증이다.

[0119] 특정 양태에서, 본 발명자는 본 명세서에서 신경병증성 통증 (예컨대, 화학요법-유도된 말초 신경병증성 통증 또는 화학요법-유도된 신경병증성 통증), 수술후 통증 또는 염증성 통증의 예방 또는 치료를 위한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 또는 조성물의 용도를 기술한다.

[0120] 특정 양태에서, 본 발명자는 본 명세서에서 만성 신경병증성 통증 (예컨대, 만성 화학요법-유도된 말초 신경병증성 통증 또는 만성 화학요법-유도된 신경병증성 통증), 만성 수술후 통증 또는 만성 염증성 통증의 예방 또는

치료를 위한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 또는 조성물의 용도를 기술한다.

[0121] 특정 양태에서, 본 발명자는 본 명세서에서 통각과민증, 특히 열적 (예컨대, 열 또는 저온 통각과민증, 바람직하게 저온 통각과민증) 또는 기계적 통각과민증, 바람직하게 기계적 통각과민증, 보다 더 바람직하게 손상-유도 기계적 통각과민증의 예방 또는 치료를 위한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 또는 조성물의 용도를 기술한다.

[0122] 다른 특정 양태에서, 본 발명자는 본 명세서에서 이질통증, 특히 기계적 이질통증의 예방 또는 치료를 위한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 또는 조성물의 용도를 기술한다. 바람직하게, 기계적 이질통증은 신경 손상-유도 기계적 이질통증 또는 정적 유형의 기계적 이질통증이다.

[0123] 추가의 특정한 양태에서, 본 발명자는 본 명세서에서 이질통증, 특히 열적 이질통증, 예컨대 열 이질통증 (즉, 정상적으로 비-통증성 온열 자극에 대해 인지된 통증) 또는 저온 이질통증 (즉, 정상적으로 비-통증성 저온 자극에 대해 인지된 통증), 바람직하게 저온 이질통증의 예방 또는 치료를 위한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 또는 조성물의 용도를 기술한다.

[0124] 특정 양태에서, 본 발명자는 본 명세서에서 이를 필요로 하는 대상체에서, 기계적 과민증 (기계적 자극에 대한 과민증 또는 단순히 통각과민증이라고도 함), 바람직하게 손상-유도 기계적 과민증을 예방 또는 치료하기 위한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 또는 조성물의 용도를 기술한다.

[0125] 치료는 촉감, 불타는 느낌 또는 차가운 느낌, "핀과 바늘로 찌르는 듯한 느낌", 무감각, 가려움증, 극심한 통증 및 온도를 정확하게 감지하기 어려움 중 하나 이상의 감각의 개선을 야기할 수 있다. 특정 양태에서, 치료는 통증을 제거한다. 다른 특정 양태에서, 치료는 통증의 증상, 특히 신경병증성 통증 (이질통증 및/또는 통각과민증)의 증상을 감소시킨다. 본 발명의 방법은 신경병증성 통증을 제거하지 못하더라도 이를 더 잘 관리할 수 있게 한다 (즉, 삶의 질 개선).

[0126] 통증, 특히 (만성) 신경병증성 통증이 본 발명의 특정 펩티드를 사용하여 치료되었는지 여부를 평가하기 위해 당업자에게 충분히 공지된 표준 검사가 당분야에서 이용가능하다. 예를 들어, 대상체에서 통증 민감성의 평가는 정량적 감각 검사 (핀프릭, 압력 측각계, 폰 프레이 필라멘트, 접촉, 꼬집기, 또는 손가락으로 가벼운 압력)를 사용하거나 또는 통증 등급 척도를 사용하여 표준화되었다.

[0127] 대상체

[0128] 본 발명의 상황에서, 대상체 또는 환자는 동물, 바람직하게 포유동물이다. 특정 양태에서, 대상체는 가축, 예컨대, 예를 들어, 말, 개, 고양이, 소 등이다. 다른 특정한 바람직한 양태에서, 대상체는 인간이다.

[0129] 신경병증성 통증에서 기원하는 만성 통증을 갖는 대상체는 이러한 신경병증성 통증과 전형적으로 연관된 질환, 예컨대 예를 들어 섬유근육통, 복합 국소 통증 증후군, 포진후 신경통, 엘러스-단로스 증후군 및 홍반성 사지 통증을 앓을 수 있다.

[0130] 특정 양태에서, 대상체는 섬유근육통 (FM)을 갖는다. 섬유근육통은 만성 근골격계 통증을 특징으로 하는 증후군이다 (Siracusa *et al*., 2021). FM은 구심성 통각수용성 자극의 인식, 전달, 및 처리를 포함하는 신경 회로의 기능장애를 특징으로 하는 중추 감작 현상에 의해 유발되고, 운동계 수준에서 통증 발현에 우세하다. 이 질환의 주요 증상은 근육 경직, 관절 경직, 불면증, 피로, 기분 장애, 인지 기능장애, 불안, 우울, 전반적 민감증 및 정상적인 일상 활동 수행 불능이다. FM은 또한 특정 질환, 예컨대, 감염, 당뇨병, 류마티스 질환 및/또는 정신과적 또는 신경학적 장애와 연관될 수도 있다.

[0131] 특정 양태에서, 본 발명자는 본 명세서에서 섬유근육통 (FM)의 예방 또는 치료를 위한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 또는 조성물의 용도를 기술한다.

[0132] 다른 양태에서, 대상체는 복합 국소 통증 증후군 (CRPS)을 앓는다. 복합 국소 통증 증후군은 감각, 자율신경, 운동 및 영양 장애와 함께 중증 통증을 특징으로 하는 사지와 관련된 만성 신경학적 병태이다 (Goh et al., 2017). 이러한 병태는 수술, 외상 또는 경미한 부상으로 유도될 수 있고, 경증 및 자기 제한적인 것에서 부터, 일상 생활 활동 및 건강 관련 삶의 질을 손상시키는 만성 질환에 이르는 범위로, 다양한 과정을 갖는다. CRPS는 다음의 2개 유형으로 분류될 수 있다: 확인가능한 신경 손상의 부재 또는 존재를 특징으로 하는 CRPS I형 및 II형. CRPS I형은 일반적으로 유해한 사건이 시작된 이후에 발생되는 증후군으로서, 단일 말초 신경의 분포에 제한되지 않고, 자극된 사건에 대해 불균형적이다. 이것은 부종, 피부 혈류의 변화, 통증 영역에서 비정상적 발한 운동 활성, 이질통증 및 통각과민증과 연관되고, 일반적으로 영향받은 말단의 원위 측면 또는

원위부터 근위 구배과 관련된다. CRPS II형은 신경 또는 그 영역에 신경분포되는 이의 주요 분지 중 하나의 부분 손상 이후에 사지 영역에서 발생되는 작열통, 이질통증 및 통각과민으로서 정의될 수 있다.

[0133] 특정 양태에서, 본 발명자는 본 명세서에서 복합 국소 통증 증후군 (CRPS)의 예방 또는 치료를 위한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 또는 조성물의 용도를 기술한다.

[0134] 여전히 다른 양태에서, 대상체는 포진후 신경통 (PHN)을 갖는다. 포진후 신경통은 감각 신경절에서 휴면 중인 바리셀라 조스터 바이러스의 재활성화를 통해 유발되는 감염인, 헤르페스 조스터 (HZ)의 가장 일반적인 합병증이다 (Ngo *et al*., 2020). 이는 연관된 피부 분절을 따라서 국재화된 수포성 발진 및 통증을 특징으로 한다. PHN은 HZ 발진의 초기 발병 이후 적어도 90일 동안 지속되는 통증으로서 정의되고, 영향받은 환자의 삶의 질을 상당히 감소시킨다. PHN은 과민성 통각수용기 및 구심로차단 모델로 하위분류된다. VZV의 재활성화 동안, 바이러스는 등근 신경절에서 이의 각 주변부로 복제되어 확산된다. 전파는 말초 신경을 손상시키는 면역 반응 및 염증을 유발시킨다. 이러한 손상은 통증의 뉴런 억제를 감소시키고, 통증 신호의 탈분극 역치를 저하시킨다. 그 결과로 비통증성 자극에 대응하는 통증성 인식이 야기되고, 이 과정은 말초 감작이라고 한다. 아형 C-통각수용기의 반복 활성화는 또한 배각에서 흥분의 고조된 상태를 초래한다. HZ에 의한 직접적인 바이러스 손상은 하행 억제성 통증 경로를 약화시켜서, 배각의 2차 뉴런의 만성 활성화를 야기한다. 더 나아가서, 배각에서 억제성 감마 아미노부티르산 (GABA) 생성 개재뉴런의 손실이 PHN 없는 HZ 환자와 비교하여 PHN을 갖는 HZ 환자에서 보고된 바 있다. 이들 요인은 중추 감작이라고 하는 과정으로 구심성 입력으로부터의 모든 후속 반응을 증폭시킨다. PHN에서, 이 과정은 일반적으로 중추 신경계에 무해한 촉각 자극을 전달하는, Aβ-섬유로 불리는, 저-역치 기계수용성 구심성 신경의 해부학적 재구성을 동반한다. 바이러스 손상이 말초에서 C-통각수용기의 손실을 초래하는 경우에, 이들 섬유는 보상적인 방식으로 본래 C-통각수용기 구심성 신경에 연결되 있는 2차 뉴런에 연결된다. 이러한 과정을 구심로차단이라고 하고, 이질통증을 앓는 환자는 감각 기능의 심각한 손실을 나타낸다.

[0135] 특정 양태에서, 본 발명자는 본 명세서에서 포진후 신경통 (PHN)의 예방 또는 치료를 위한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 또는 조성물의 용도를 기술한다.

[0136] 여전히 다른 양태에서, 대상체는 홍반성 사지 통증 (EM)을 앓는다. 홍반성 사지 통증은 주로 양쪽 하지에 양측 및 대칭으로, 또는 일측으로 영향을 미치는 드문 삽화성 말단증후군으로서, 홍반, 온기 및 작열통의 고전적 3개 증상이 존재한다 (Maria Bibiana Leroux, 2018). EM은 만성 통증 증후군과 함께 분류된다. 원발성 EM은 #133020으로서 OMIN (Online Mendelian Inheritance in Man)에 의해 암호화된 상염색체 우성 유전장애이다. 이것은 등근 신경절 및 교감 신경절 뉴런에서 주로 발현되는 Nav1.7 채널에 영향을 미치는, 소듐 채널 9형의 α 서브유닛 단백질 (SCN9A)의 변형과 연관된다. 속발성 EM은 골수증식성 질환, 부신생물증, 자가면역 질환, 독소 접촉 및 감염과 연관된다.

[0137] 특정 양태에서, 본 발명자는 홍반성 사지 통증 (EM)의 예방 또는 치료를 위한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 또는 조성물의 용도를 기술한다.

[0138] 특정 양태에서, 본 발명자는 본 명세서에서 통각수용기 또는 개재뉴런에 의해 전달되는 신호가 손상되는 임의의 통증-연관 병태의 예방 또는 치료를 위한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 또는 조성물의 용도를 기술한다.

[0139] 본 발명자는 기능성 Myo1a를 발현하는 $Myo1a^{+/+}$ 기준 대상체에서 관찰되는 발현과 비교했을 때 대상체에서 Myosin IA (Myo1a)의 없거나, 감소되거나 또는 불충분한 발현 또는 비기능성 발현이 대상체를 손상-유도 만성 기계적 통증 및/또는 염증-유도 만성 열적 통증이 발생되는데 취약하게 만든다는 것을 이전에 확립하였다 (WO2017153424).

[0140] 여전히 다른 양태에서, 대상체는 *myo1A* 유전자에 하나 또는 2개의 돌연변이된 대립유전자를 갖는 대상체이다. "돌연변이된" 대립유전자란 Myo1a의 발현 또는 발현 수준을 변경시키는 *myo1A* 유전자의 핵산 (코딩 또는 비코딩 영역)에 치환, 결실 또는 삽입을 의미한다. 돌연변이는 하나 이상의 핵염기에 영향을 미칠 수 있다. 치환은 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP)일 수 있다.

[0141] 특정 양태에서, 본 발명자는 본 명세서에서 이러한 대상체에서 손상-유도 만성 기계적 통증 및/또는 염증-유도 만성 열적 통증의 예방 또는 치료를 위한 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 또는 조성물의 용도를 기술한다.

[0142] 용량

[0143] 본 발명에 따른 조성물은 바람직하게 치료적 유효량으로 대상체에게 직접 투여된다. 용어 "치료적 유효량"은 대상체에서 통증을 치료하거나, 개선시키거나, 또는 예방하는데 필요한 SEQ ID NO: 1의 펩티드, 또는 이의 임의 변이체의 양을 의미한다. 치료적 유효량은 초기에 세포 배양 어세이, 또는 동물 모델에서 추정될 수 있다. 동물 모델은 또한 펩티드의 적절한 농도 범위 및 투여 경로를 결정하는데 사용될 수 있다. 이러한 정보는 이후에 인간에서 투여를 위한 유용한 용량 및 경로를 결정하는데 사용될 수 있다.

[0144] 본 명세서에 기술된 방법에서 사용되는 펩티드의 투약량은 대상체의 일반 건강 상태, 연령, 성별 및 체중, 통증의 성질 및/또는 중증도/강도, 투여 시간, 빈도 및 지속기간, 사용되는 특정 펩티드, 약물 병용물(들), 반응 민감도, 및 요법에 대한 내성/반응에 의존하여 가변적일 수 있다. 이러한 적합한 유효 투약량은 통상의 실험을 통해서 결정될 수 있고, 임상의의 판단 하에 있다.

[0145] 적합한 진통 또는 무통 효과를 수득하기 위해서, 24시간 당, 체중 1 kg 당, 본 발명자가 본 명세서에 기술한 바와 같은 펩티드 또는 이의 변이체의 유효 용량은 동물, 전형적으로 인간에서, 1 ㎍과 100 mg/kg/일 사이, 바람직하게 5 ㎍과 80 mg/kg/일 사이, 보다 바람직하게 10 ㎍과 50 mg/kg/일 사이이다.

[0146] 대상체가 인간일때, 본 발명자가 본 명세서에 기술한 바와 같은 펩티드 또는 이의 변이체의 유효 용량은 인간 대상체에서 바람직하게 2.5 ㎍/kg/일과 0.6 mg/kg/일 사이, 바람직하게 5 ㎍ 또는 10㎍/kg/일과 0.5 mg/kg/일 사이, 보다 바람직하게 50 ㎍ 또는 75 ㎍/kg/일과 0.3 mg/kg/일 사이이다.

[0147] 용량은 불루스 형태로 투여될 수 있거나 또는 하루에 걸쳐서 별도로 투여되는, 몇개 부분으로 나뉠 수도 있다. 달리 말해서, 치료는 단일 용량 일정 또는 다수 용량 일정일 수 있다. 유효 용량은 며칠, 몇 주, 몇 개월 또는 몇 년의 기간 동안 투여될 수도 있다.

[0148] 대상체에게 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드 또는 조성물의 전달은 몇개 경로를 통해서 수행될 수도 있다.

[0149] 특정 양태에서, 본 명세서에 기술된 펩티드 또는 조성물은 대상체에게 근육내로, 정맥내로, 복강내로, 경구로(*per os*), 항문으로, 피부로, 피하로, 피부적으로, 경피적으로 또는 척수강내로, 바람직하게 피하로 또는 구강으로, 보다 더 바람직하게 경구로 투여된다.

[0150] 실험 부분에서 확인되는 바와 같이, 발명자는 SEQ ID NO: 1의 펩티드, 및 SEQ ID NO: 5의 이의 변이체는 신경병증성 통증, 수술후 통증 및/또는 염증성 통증을 치료하기 위해 피하로 투여될 때 진통 효과를 갖는다는 것을 입증한다. 유사하게, SEQ ID NO: 1 또는 5의 펩티드를 경구로 (*per os*) 투여할 때도 역시 동일한 진통 효과가 관찰된다. 보다 더 놀랍고도 유리하게, 본 발명의 펩티드는 TAFA-4 (전체 길이) 단백질과 비교하여, 상기 전체 길이 단백질에 비해 환자에게 투여하는 것을 더 편리하고 적합하게 만드는, 경구로 (*per os*) 투여했을 때 더 나은 진통 효과를 보인다.

[0151] 발명자는 본 명세서에서 SEQ ID NO: 1의 펩티드와 대략 90%의 동일성을 포함하는 SEQ ID NO: 5의 변이체가 SEQ ID NO: 1의 펩티드와 비교했을 때 효능 관점에서 유사한 결과를 획득한다는 것을 입증한다.

[0152] 키트

[0153] 본 발명은 또한 i) 본 명세서에 개시된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 및/또는 조성물, 및 ii) 바람직하게 본 명세서에 기술된 바와 같은 펩티드 또는 이의 변이체와 별도의, 통증에 효율적인 적어도 하나의 추가적인 별개 활성 화합물을 포함하는 키트에 관한 것이다. 특정 양태에서, 키트는 iii) 키트의 사용을 위한 서면 설명서를 더 포함한다.

[0154] 키트는 바람직하게 적어도 2개 부품, 예를 들어, 2개의 별개 용기를 포함하는 부품 키트이고, 제1 부품은 본 명세서에 개시된 바와 같은 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 또는 조성물을 포함하고, 제2 부품은 통증에 효율적인 적어도 하나의 추가적인 별개 활성 화합물을 포함한다. 바람직하게, 통증에 효율적인 활성 화합물은 본 명세서에 개시된 바와 같은 스테로이드 항염증 약물 (SAID), 비스테로이드 항염증 약물 (NSAID) 또는 오피오이드 약물이다.

[0155] 특정 양태에서, 키트는 i) SEQ ID NO: 1의 펩티드, ii) 통증에 효율적인 적어도 하나의 추가적인 별개 활성 화합물, 및 iii) 임의로 키트 사용을 위한 서면 설명서를 포함한다.

[0156] 다른 특정 양태에서, 키트는 i) SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 펩티드 예컨대 SEQ ID NO: 5의 펩티드, ii) 통증에 효율적인 적어도 하나의 추가적인 별개 활성 화합물, 및 iii) 임의로 키트 사용을 위한

서면 설명서를 포함한다.

[0157] 일 양태에서, 키트의 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 또는 조성물은 근육내, 정맥내, 복강내, 경구 (*per os*), 항문, 피부, 피하, 진피, 경피 또는 척추강내 경로, 바람직하게 피하 또는 경구 경로, 보다 더 바람직하게 경구 경로에 적합화된 형태이다.

[0158] 다른 양태에서, 통증에 효율적인 적어도 하나의 추가적인 별개 활성 화합물은 근육내, 정맥내, 복강내, 경구 (*per os*), 항문, 피부, 피하, 진피, 경피, 또는 척추강내 경로에 적합화된 형태이다.

[0159] 치료하려는 통증의 성질, 기원, 강도에 의존하여, 또한 펩티드, 핵산, 벡터, 세포 또는 조성물의 내용물의 성질 및 통증에 효율적인 적어도 하나의 추가적인 별개 활성 화합물의 성질에 의존하여, 상기 생성물은 동시에/동시 발생적으로 또는 순차적으로 공동-투여되거나 또는 그렇지 않을 수 있다.

[0160] 본 발명은 또한 본 명세서에서 상기 기술된 바와 같은 통증, 예를 들어, 만성 통증, 신경병증성 통증, 수술후 통증, 염증성 통증, 통각과민증 또는 이질통증의 예방 또는 치료를 위한 본 발명의 키트의 생체내, 생체외 또는 시험관내 용도에 관한 것이다. 본 발명의 키트는 또한 급성 또는 아급성 통증의 예방 또는 치료에서 사용될 수도 있다.

[0161] 본 명세서는 또한 이를 필요로 하는 대상체에서 상기 본 명세서에 기술된 바와 같은 통증, 예를 들어, 만성 통증, 신경병증성 통증, 수술후 통증, 염증성 통증, 통각과민증 또는 이질통증을 예방하거나 또는 치료하기 위한 약물의 제조를 위한 본 발명의 키트의 용도를 개시한다. 본 발명의 키트는 또한 이를 필요로 하는 대상체에서 급성 또는 아급성 통증의 예방 또는 치료를 위한 약물의 제조에 사용될 수도 있다.

[0162] 연구 도구

[0163] 본 발명은 또한 통증을 연구하기 위한 연구 도구로서 상기 본 명세서에 기술된 펩티드 또는 임의의 생성물의 용도를 포함한다.

[0164] 본 명세서에 기술된 펩티드는 예를 들어 기계적으로 및/또는 화학적으로 유도된 통증 통각수용성 신호를 연구하기 위해 생물학적 조직 또는 세포 배양에서 뉴런 흥분성을 조절하는데 사용될 수 있다.

[0165] 본 발명은 또한 생물학적 조직 또는 세포의 배양에서, SEQ ID NO: 1의 펩티드 또는 SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 펩티드, 예컨대 SEQ ID NO: 5의 펩티드를 발현시키거나 또는 발현(의 수준)을 조절하기 위한, SEQ ID NO: 1의 펩티드 또는 SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 펩티드 예컨대 SEQ ID NO: 5의 펩티드를 코딩하는 핵산, 또는 이의 발현을 허용하는 벡터의 용도에 관한 것이다.

[0166] 본 명세서에 기술된 핵산 분자는 유전자이식 동물을 생성시키는데 사용될 수도 있다. 이것은 유전적 변형을 포함하도록 생식 세포에 대한 배선 요법을 통해서 또는 체세포의 변형을 통해 국소적으로 수행될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 SEQ ID NO: 2, 6 또는 9 또는 이의 변이체의 핵산; SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 또는 9 또는 이의 변이체의 핵산을 포함하는 벡터; 또는 SEQ ID NO: 1의 펩티드 또는 SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 펩티드 예컨대 SEQ ID NO: 5의 펩티드를 포함 (즉, 함유)하는 유전자이식 유기체 (예를 들어, 동물)에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 임의의 펩티드를 코딩하는 핵산 서열, 또는 이의 발현을 허용하는 벡터를 함유하는 숙주 세포 또는 유전자이식 유기체에 관한 것이다.

[0167] 하기 실시예는 본 발명의 일정한 바람직한 양태를 입증하고 추가로 예시하기 위해서 제공되고, 이의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0168] **실시예**

[0169] **실시예 1: 화학 합성에 의한 생산**

[0170] **재료 및 방법**

[0171] **펩티드 합성**

[0172] 천연 화학 결찰 (NCL) 방법이 SEQ ID NO: 1의 펩티드를 생산하기 위해 사용된다. 간략하게, 2개의 짧은 펩티드가 생산된다. 아미노산 서열 CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWW (SEQ ID NO: 3)을 갖는 첫번째 27개 아미노산 N-말단 펩티드가 합성된다. 아미노산 서열 CHMNPCLEGEDCKVLPDYSGWSCSSGNKVKTTKVTR (SEQ ID NO: 4)을 갖는 두번째 36개 아미노산 C-말단 펩티드 (이의 N-말단 부분에 시스테인 잔기 함유)가 합성된다. 2개 펩티드

는 1-단계 결찰에 이어서 1-단계 정제를 사용하여 결찰된다.

[0173] **마우스**

[0174] 57/B16J 마우스 (8 내지12주령)는 Charles River Laboratories에서 구매하였다. 양쪽 성별의 마우스가 모든 실험에서 사용되었다. 숫컷과 암컷 간에 차이가 나타나지 않았으므로, 2개 성별에 대한 데이터를 이후 조합하였다. 마우스는 표준 사육 조건 (22℃, 40% 습도, 12시간 명주기, 및 사료 및 식수에 대한 자유로운 접근) 하에서 유지되었다. 이 연구에서 사용되는 마우스의 마릿수, 및 그들이 겪는 스트레스와 고통을 최소화하기 위해 특히 노력하였다. 모든 실험은 실험실 동물의 관리 및 사용에 관한 유럽 지침 (협의회 지침 86/609/EEC)에 따라서 수행되었다. 모든 실험 절차는 동물 실험에 대한 프랑스 법률의 관련 기관 규정에 따르고, 프랑스 법률의 요구에 따라 동물 실험에 관한 독립 윤리 위원회 (independent ethics committee for animal experimentation)(APAFIS)의 승인을 받았다. 모든 실험은 ARRIVE 지침에 따라서 수행되었다.

[0175] **통증 모델 1: 예비 신경 손상 (SNI) 모델 - 신경병증성 통증.**

[0176] [Decosterd and Woolf, 2000; Pain, Vol. 87, p 149-158]에 따라 개발된, 예비 신경 손상 (SNI) 모델이 사용되었다. 이것은 신경병증성 통증 모델로서 사용되었다. SNI 모델은 경골 가지 및 좌골 신경의 총비골 신경의 절개로 이루어지고, 비복 신경은 온전한 채로 남아있는다. 후자는 이후에 상당한 기계적 이질통증을 동반한 신경병증성 통증의 징후가 발생된다. SNI 모델은 다음의 많은 장점을 갖는다:

[0177] - 신경병증성 통증은 지속된다. 이것은 펩티드의 반복 주사 시에 습관화 현상을 파악하도록 허용한다.

[0178] - 생성된 통증은 강력하다.

[0179] - 모델은 매우 재현가능하다.

[0180] 마우스는 케타민 (100 mg/kg IP) 및 자일라진 (10 mg/kg IP)으로 마취되었고, 좌측 좌골 신경을 무균 조건 하에서 노출시켰다. 좌골 신경의 원위 삼분지를 확인하였고, 경골 및 총비골 가지는 폴리프로필렌 비흡수성 6-0 봉합사 (Ethicon)로 결찰시켰고; 1 ㎜를 절단하여서, 비복 가지를 온전한 채로 남겨두었다. 상처를 봉합사로 봉합하였고, 동물이 회복되도록 하고 그들 케이지로 돌려보냈다.

[0181] **통증 모델 2: 발 절개 - 수술후 통증.**

[0182] 발 절개 수술은 Brennan 및 동료 (1999) (Brennan, 1999)가 기술한 대로 수행하였다. 마우스는 케타민 (100 mg/kg IP) 및 자일라진 (10 mg/kg IP)으로 마취시켰고, 오른쪽 뒷발의 피부 및 근막을 통한 세로 방향 절개를 수행하였다. 겸자를 사용하여 단지굴근을 세로로 들어올리고 메스를 사용하여 근육을 절개하여서, 2개 반쪽으로 잘랐다. 상처는 봉합사로 봉합하였고, 동물이 회복되도록 하고 그들 케이지로 돌려보냈다. 발 절개는 수술후 통증 모델로서 사용되었다.

[0183] **통증 모델 3: 카라기난 주사 - 염증성 통증.**

[0184] 발명자는 1 x PBS 중 20 ㎕의 1% λ-카라기난 (Sigma-Aldrich, 22049-5G-F)을 해밀톤 주사기를 사용하여 마우스의 왼쪽 뒷발의 발바닥 표면에 주사하였다. 카라기난 주사가 염증성 통증 모델로서 사용되었다.

[0185] **폰 프레이 시험**

[0186] 폰 프레이 (Von Frey)는 기계적 자극에 대한 설치류의 민감도를 검사하기 위해서 대략 50 ㎜ 길이의, 나일론 막대의 작은 조각인 폰 프레이 (VF) 털 또는 섬유를 사용한다. 이러한 시험에서, 동물은 높은 메쉬 플랫폼 위에 서있고, 폰 프레이 털을 메쉬를 통해 삽입하여서 동물의 뒷발을 찔러준다. 동물의 정상 반응은 발을 움추리거나 또는 핥거나 또는 흔드는 것을 포함한다. "업-다운" 폰 프레이 방법은 동물의 50%에서 발 움츠림을 유발하는데 필요한 기계적 힘을 결정하는데 사용된다. 여기서, 마우스는 와이어 메쉬 그리드 상의 플라스틱 챔버에 배치시켰고, 1 g 필라멘트로 시작하고, 컷오프로서 0.04 g 및 4 g 필라멘트를 사용하는, "업-다운" 방법 (45)을 통해서 폰 프레이 필라멘트 (Bioseb)로 자극하였다.

[0187] **통계적 분석**

[0188] 결과는 평균 ± SEM으로 표시된다. 통계적 분석은 Prism 7 (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA)로 수행하였다.

[0189] **결과**

[0190] **통증 모델 1: 예비 신경 손상 (SNI) 모델 - 신경병증성 통증.**

[0191] 1.1 피하로 투여된 SEQ ID NO: 1의 펩티드의 진통 효과

[0192] 이들 실험의 목적은 신경병증성 통증을 생성시키는, 예비 신경 손상 (SNI) 모델에서 피하 주사에 의한 본 발명에 따른 SEQ ID NO: 1의 펩티드 (본 명세서에서 "TT1"이라고 확인됨)의 진통 효과를 평가하는 것이었다.

[0193] 실험은 8주령 숫컷 WT C57B16 마우스에서 수행되었다. 8마리의 마우스의 3개 그룹이 사용되었다. SEQ ID NO: 1의 펩티드는 0.9% NaCl에 [0.6 mg/mL]으로 재현탁되었다. 펩티드는 희석되어서, 이 연구에서 0,3 mg/kg의 농도로 사용되었다.

[0194] 0.9% NaCl 용액은 음성 대조군 (비히클)으로서 사용되었고, 신경병증성 통증을 치료하는데 사용되는 잘 알려진 약물인, 프레가발린 5 mg/kg이 양성 대조군으로서 사용된다.

[0195] 업/다운 방법을 통해 폰 프레이 (VF) 필라멘트로 마우스의 기본 역치를 측정한 후에, SNI 모델을 제자리에 둔다. 마우스를 마취시키고, 경골 신경 및 비골 신경의 봉합을 실행하고, 이들 2개 신경을 이어서 절단한다. 온전하게 남겨둔 비복 신경은 신경병증을 매우 빠르게 발생시킨다. 신경병증의 발생은 수술 후 3일 후에 확인한다. 그리하여 동측 발의 폰 프레이 필라멘트에 대한 반응 역치의 감소가 관찰된다.

[0196] 수술 후 7일에, 반응 역치를 다시 측정한다. 100 ㎕/10 g의 각각의 펩티드 용액, 비히클 및 프레가발린 용액은 이어서 실험자에게 피하로 맹검-주사한다.

[0197] 반응 역치는 주사 후 1시간, 2시간, 4시간, 및 이어서 24시간 후에 측정된다.

[0198] SNI 후 7일에, 모든 마우스는 기계적 역치의 급격한 감소를 나타낸다 (도 1). SEQ ID NO: 1의 펩티드 ("펩티드" 또는 "TT1"이라고 함)의 피하 주사는 투여 후 1시간이 되자마자 반응 (즉, 발 움츠림) 역치의 강력한 증가를 유도하였고, 2시간에 최대 증가되어서, 프레가발린과 비슷한 값이었다. 통계적 분석은 음성 대조군과 비교하여 2시간에 매우 유의한 결과 (p 값 <0,001)를 보인다.

[0199] 1.2 경구로 투여된 SEQ ID NO: 1의 펩티드의 진통 효과

[0200] 펩티드, 비히클 및 프레가발린의 투여가 펩티드 및 비히클에 대한 경구 투여를 사용하여 수술 후 14일에 수행되었다는 것을 제외하고 1.1.에 기술된 바와 동일한 프로토콜을 사용하였다.

[0201] 경구 투여 경우, SEQ ID NO: 1의 펩티드를 30 ㎍/mL의 농도로, 이후 HPMC 용액 (비히클)이라고 하는 1% w/v 히드록시프로필메틸셀룰로스 (Sigma-aldrich #423238, batch MKCD3665), 0.5% v/v Tween 80 (Euromedex #2002-A, batch 100412/16S407)의 용액에 희석하였다.

[0202] 비히클 및 펩티드 용액은 2개 위관영양 바늘을 사용해 경구로 투여되었다. 프레가발린 (5mg/kg)은 상이한 실험자에 의해서, 피하로 주사되었고, 따라서 VF 측정을 수행하는 실험자는 치료에 대해 맹검이었다 (각 치료에 대해 n=8). 투여는 수술 후 14일에 수행되었다.

[0203] SNI 후 14일에, 모든 마우스는 기계적 역치의 급격한 감소를 나타낸다 (도 2). 비히클의 경구 투여는 효과가 없었다. SEQ ID NO: 1의 펩티드의 경구 투여는 투여 후 1시간이 되자마자 반응 (즉, 발 움츠림) 역치의 강력한 증가를 유도하였고 24시간까지 서서이 감소되었다. 최대 4시간까지 비히클-처치된 마우스와 비교하여 유의하게 상이하였다 (1시간 및 2시간에 p값 <0.001, 및 4시간에 p 값 <0.05).

[0204] 1.3 경구로 투여된 SEQ ID NO: 1의 펩티드의 용량-의존적 진통 효과

[0205] SEQ ID NO: 1의 펩티드는 HMPC 용액에 5개의 상이한 농도 (1 ㎍/mL, 5 ㎍/mL, 30 ㎍/mL, 90 ㎍/mL 및 180 ㎍/mL)로 재현탁되었다.

[0206] 이전에 기술한 바와 같이, 업/다운 방법을 사용한 폰 프레이 필라멘트 측정을 기준점을 결정하기 위해 수행한다. 다음으로, SNI 모델을 제자리에 둔다. 수술 후 14일 (14일차 - D14)에 반응 역치을 측정하여 신경병증성 통증의 발생을 검토한다. 이어서, 5개의 상이한 농도 (10 ㎍/kg 경우 n=8; 50 ㎍/kg 경우 n=8; 300 ㎍/kg 경우 n=13; 900 ㎍/kg 경우 n=8; 1,8 mg/kg 경우 n=8)에서 100 ㎕/10 g의 펩티드 용액의 맹검 경구 투여를 수행한다. 반응 역치는 경구 투여 후 1시간, 2시간, 4시간, 및 이어서 24시간에 측정된다. 프레가발린 (5 mg/kg, n=6) 및 비히클 (n=9)이 또한 위관영양으로 투여되었다.

[0207] SNI 후 14일에 모든 마우스는 기준점 역치와 비교하여, 강력한 기계적 과민증을 의미하는, 기계적 역치의 급격

한 감소를 나타낸다 (도 3). 비히클의 경구 투여는 효과가 없었다. SEQ ID NO: 1의 펩티드의 진통 효과는 용량 의존적이고, 300 ㎍/kg 용량에서 2시간에 기계적 역치에 대한 최대 반전 효과가 관찰되었다. 흥미롭게도, 2개의 최대 용량 (0.9 및 1.8 mg/kg)은 2시간에 동일한 효과를 일으켰지만, 또한 투여 후 4시간에 여전히 유의한 효과를 보이면서 더 긴 시간 동안 지속되었다. 기계적 역치에 대한 프레가발린의 최대 반전 효과는 투여 후 2시간에 관찰되고; 이 효과는 투여 후 4시간에 완전하게 없어진다.

[0208] 1.4 피하 또는 경구로 투여된 SEQ ID NO: 1의 펩티드와 TAFA-4 (전체 길이 단백질)의 진통 효과의 비교

[0209] 본 발명자는 선행 기술의 TAFA-4 (전체 길이) 단백질과 본 발명의 펩티드의 진통 효과를 비교하였다. 펩티드 및 TAFA-4 (전체 길이) 단백질의 투여가 수술 후 14일에 수행된 것을 제외하고 1.1 및 1.2에 기술된 바와 동일한 프로토콜이 사용되었다.

[0210] 본 발명의 펩티드는 놀랍게도 피하로 투여했을 때 TAFA-4 전체 길이 단백질과 동일한 진통 효과를 유지한다 (도 4).

[0211] 본 발명자는 또한 경구로 투여했을 때 TAFA-4 전체 길이 단백질과 본 발명의 펩티드를 비교하였다. 동일한 실험을 TAFA-4 전체 길이 단백질을 사용해 수행하였다 (TAFA-4 단백질의 투여는 수술 후 7일에 수행됨). TAFA-4 전체 길이 단백질은 경구로 (즉, *per os*) 투여했을 때 유의한 진통 효과를 보이지 않았다 (도 5).

[0212] 도 4 및 5에서 보여지는 결과로부터, 경구로 투여했을 때, 본 발명의 펩티드가 TAFA-4 (전체 길이) 단백질에 비해서 훨씬 더 양호한 진통 효과를 갖는다고 결론내릴 수 있다.

[0213] 전체적으로, 실시예 1은 SNI 모델 (신경병증성 통증 모델)에서 피하 및 경구 투여를 통해서 진통 효과를 유도하였다는 것을 보여준다. 유리하게, 본 발명의 펩티드는 피하로 투여되었을 때 TAFA-4 (전체 길이) 단백질과 비교하여 이의 활성을 유지한다. 더욱 놀랍게도, 본 발명의 펩티드는 경구로 투여했을 때 TAFA-4 (전체 길이) 단백질에 비해서 더 양호한 진통 효과를 보인다.

[0214] **통증 모델 2: 카라기난 주사 - 염증성 통증.**

[0215] 실험은 8주령 숫컷 WT C57B16에서 수행되었다. 8마리 마우스의 3개 그룹이 사용되었다. SEQ ID NO: 1의 펩티드는 그램 당 10 ㎕ 주사를 위해서, HMPC 용액에 30 ㎍/mL의 농도로 재현탁된다.

[0216] 이전에 기술한 바와 같이, 기준점을 결정하기 위해 업/다운 방법을 통한 폰 프레이 필라멘트를 사용한 측정을 수행하였다. 다음으로, 20 ㎕의 카라기난 (1%)의 발바닥내 주사가 뒷발에 수행되었다. 주사 후 24시간 (D1)에 반응 역치를 치료하고 나서, 0,3 mg/kg (n=8)의 펩티드 용액, 또는 비히클 용액 (n=8)의 경구 투여, 또는 20 mg/kg (n=8)의 셀레콕십 용액의 피하 주사를 투여하였고, 실험자에게는 맹검으로 하였다. 셀레콕십은 양성 대조군으로서 사용되는 잘 알려진 약물이다. 몇몇 질환에서 통증 및 염증을 치료하는데 사용되는 COX-2 억제제 및 비스테로이드 항염증 약물 (NSAID)이다. 반응 역치는 펩티드 또는 셀레콕십의 투여 후 1시간, 2시간, 4시간 및 24시간에 투여되었다.

[0217] 카라기난의 주사 후에, 마우스는 기계적 이질통증이 발생되었다 (D1 참조) (도 6). 양성 대조군 (셀레콕십)의 피하 투여는 반응 역치의 증가를 야기한다. 유사하게, 본 발명의 펩티드의 경구 (*per os*) 투여는 또한 반응 역치에서 통계적으로 유의한 증가를 유도하였다. 흥미롭게도, 펩티드의 최대 진통 효과는 1시간 후에 수득된데 반해서, 셀레콕십 경우는 2시간이 걸린다.

[0218] 이들 결과는 본 발명의 펩티드가 카라기난 모델 (염증성 통증 모델)에서 경구 투여를 통해 진통 효과를 야기한다는 것을 보여준다. 유리하게, 본 발명의 펩티드는 진통 효과를 신속하게 개시하였다.

[0219] **통증 모델 3: 발 절개 - 수술후 통증.**

[0220] 실험연 8주령 숫컷 WT C57B16에서 수행되었다. 8마리 마우스의 3개 그룹이 사용되었다. SEQ ID NO: 1의 펩티드는 그램 당 10 ㎕ 주사를 위해서, HMPC 용액 NaCl에 30 ㎍/mL의 농도로 재현탁되었다.

[0221] 이전에 수행된 바와 같이, 기준점을 결정하기 위해 업/다운 방법을 통한 폰 프레이 필라멘트를 통한 측정을 수행하였다. 다음으로, 발 절개 수술은 상기 기술된 프로토콜에 따라서 수행되었다. 주사 후 24시간 (D1)에, 반응 역치를 측정하고 나서 0.3 mg/kg (n=8)의 펩티드 용액, 비히클 용액 (n=8) 또는 1 mg/kg의 모르핀 용액 (양성 대조군) (n=8)의 경구 투여를 수행하였고, 실험자에게는 맹검으로 하였다. 반응 역치는 투여 후 1시간, 2시간, 4시간, 및 24시간에 측정되었다.

[0222] 발 절개 이후에, 마우스는 기계적 이질통증이 발생되었다 (도 7의 D1 참조). 양성 대조군 (모르핀)의 경구 투여는 반응 역치의 증가를 야기한다. 유사하게, 본 발명의 펩티드의 경구 투여는 또한 투여 후 1시간에 반응 역치에서 통계적으로 유의한 증가를 유도하였고, 투여 후 2시간에 최대 효과가 발생되었다.

[0223] 이들 결과는 발 절개 모델 (수술후 통증 모델)에서 경구 투여를 통해 진통 효과를 야기한다는 것을 보여준다.

[0224] 결론:

[0225] 전체적으로 본 발명자의 결과는 신경병증성, 염증성 및 수술후 통증 모델에서 SEQ ID NO: 1의 펩티드의 진통 효과를 보여준다. 이들 모델에 의해 유도된 기계적 이질통증 (반응 역치의 감소)은 상기 펩티드의 피하 주사 또는 경구 (*per os*) 투여를 통해서 억제될 수 있다. 본 발명자는 또한 SEQ ID NO: 1의 펩티드의 진통 효과가 용량-의존적이라는 것을 입증하였다.

[0226] 유리하게, 본 발명의 펩티드는 전체 길이 TAFA-4 단백질에 비해서 생산 및 수득이 훨씬 쉽지만 (결론적으로 더 저렴), 피하로 투여되었을 때 후자와 비교하여 이의 진통 활성을 유지한다. 더욱 더 놀랍고 유리하게, 경구 (*per os*) 투여 시, 본 발명의 펩티드는 TAFA-4 (전체 길이) 단백질과 비교하여 더 양호한 진통 효과를 보여서, TAFA-4 전체 길이 단백질에 비해서 환자에게 투여하는 것을 훨씬 편리하고 적합하게 만든다.

[0227] **실시예 2: TT1 및 이의 변이체 TT6의 생체생산**

[0228] 본 발명자는 SEQ ID NO: 1 ("TT1") 및 SEQ ID NO: 5 ("TT6")의 펩티드를 히가 본 명세서에 기술한 프로토콜을 사용하는 재조합 경로 ("TT1 생체생성물" 및 "TT6 생체-생성물")를 통해서 생산하였다.

[0229] SEQ ID NO: 5의 펩티드의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 1의 펩티드의 아미노산 서열과 90,48% 동일하다.

[0230] 실시예 1에 기술된 행동 어세이 (통증 모델 1: SNI)를 사용하여, 본 발명자는 합성으로 수득된 TT1 및 그에 따라 수득된 생체생산 TT1 펩티드가 동일한 통증-완화 효능을 갖는다는 확인을 얻었다 (도 8 참조). 그들은 또한 이렇게 수득된 생체생산 TT1 및 TT6 펩티드가 합성적으로 수득된 TT1 펩티드에서 관찰되는 것과 동일한 통증-완화 효능을 갖는다는 확인을 얻었다 (도 9 참조).

[0231] **재료**

[0232] 플라스미드 pEt28A+, 카나마이신-내성

[0233] 이. 콜라이 (*E. coli*) BL21 (DE3) pLysS 균주, 수용능, 클로람페니콜-내성

[0234] 재조합 6xHis-TEV 프로테아제, AFMB lab (academic MTA)에서 생산 및 정제

[0235] NZY 자가-유도 LB 배지 (분말): nzytech (MB17903)

[0236] 2xYT 액체 배지 (분말): MP Biomedicals (3012032)

[0237] 초음파처리기, 원심분리기, 페트리 디쉬 (d 10 cm)

[0238] MF-Millipore 막, 셀룰로스 에스테르, 친수성, 0.22 μm, 47 mm, 백색: MERCK

[0239] HisTrap excel 5 mL 카트리지: Cytiva

[0240] 이미다졸 완충제 물질 ACS. CAS 288-32-4: Millipore (MERCK)

[0241] 투석 도관 Zellu/Trans/ROTH T2: MWO 6000-8000, 50 mm, 30 m: CARL ROTH

[0242] 친화성 크로마토그래피 매질, Chelating SepharoseTM Fast Flow: Cytiva

[0243] AMICON Ultra-15 원심분리 필터 유닛, 3K: Millipore

[0244] Superdex S200 increase 10/300 GL 컬럼: Cytiva

[0245] 20% 망상조직의 SDS-PAGE 겔

[0246] **방법**

[0247] **1. 6xHis-(TEV 부위)-TT1 (또는 6xHis-(TEV 부위)-TT6) 융합 단백질 (본 명세서에서 각각 SEQ ID NO: 7 및 8으로 확인됨)의 생산**

[0248] a. 이. 콜라이 BL21 (DE3) pLysS 균주의 형질전환

[0249] - 클로람페니콜에 내성인, 수용능 박테리아 BL21 (DE3) pLySs를 해동한다.

[0250] - 50 ㎕의 수용능 박테리아 당 1 ㎕의 플라스미드 (1000 ng/㎕)를 첨가한다.

[0251] - 5분간 얼음에서 유지시킨다.

[0252] - 37℃에서 1분 간 열 충격을 수행한다.

[0253] - 5분간 얼음에서 유지시킨다.

[0254] - 500 ㎕의 NZY 자가-유도 LB 배지 또는 2YT 액체배지 (멸균 상태)를 첨가한다.

[0255] - 37℃에서 적어도 30분 동안 교반 (200 rpm)하면서 인큐베이션시킨다.

[0256] - 완전 용해까지 LB 한천을 가열한다.

[0257] ■ 2개 페트리 디쉬에 다음을 혼합하여 붓는다:

[0258] . 40 mL의 용융된 LB 한천

[0259] . 플라스미드를 위한, 40 ㎕의 카나마이신

[0260] . 균주를 위한, 40 ㎕의 클로람페니콜

[0261] ■ 고형화되면, 형질전환된 박테리아를 디쉬 당 50-100 ㎕로 펴준다.

[0262] b. 전배양

[0263] 500 mL의 배양 경우:

[0264] - 30 mL의 NZY 자가-유도 LB 배지 또는 2YT 액체 배지

[0265] - 플라스미드를 위한, 30 ㎕의 카나마이신,

[0266] - 균주를 위한, 30 ㎕의 클로람페니콜,

[0267] - 1 콜로니

[0268] 밤새 37℃에서 교반 (200 rpm)하면서 인큐베이션시킨다.

[0269] c. 배양

[0270] - 2 L 엘렌메이어 플라스크 중에;

[0271] . NZY 자가-유도 LB 배지 사용

[0272] - 500 mL의 배지

[0273] - 플라스미드를 위한, 500 ㎕의 카나마이신

[0274] - 균주를 위한, 500 ㎕의 클로람페니콜

[0275] - ca. 0.1의 OD600 nm에 도달을 위한 전배양 부피

[0276] - OD600 nm가 ca. 0.6-0.8에 도달할때까지 37℃에서 교반 (200 rpm)하면서 인큐베이션시킨다.

[0277] 밤새 17℃에서 교반 (200 rpm)하면서 인큐베이션시킨다.

[0278] . 2YT 액체 배지 사용

[0279] - 500 mL의 배지

[0280] - 플라스미드를 위한, 500 ㎕의 카나마이신

[0281] - 균주를 위한, 500 ㎕의 클로람페니콜

[0282] - ca. 0.1의 OD600 nm에 도달을 위한 전배양의 부피

[0283] - OD600 nm가 ca. 0.6-0.8에 도달할 때까지 37℃에서 교반 (200 rpm)하면서 인큐베이션시킨다.

[0284] - 500 $\mu\ell$의 IPTG (원액 1 M)를 첨가한다.

[0285] - 밤새 17℃에서 교반 (200 rpm)하면서 인큐베이션시킨다.

[0286] - 5000 rpm으로 20분 동안 실온에서 원심분리한다.

[0287] - 50 mL의 용해 완충액: Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM, 이미다졸 10 mM pH 8.0, 리소자임 0.5 mg/mL에 펠렛을 재현탁한다.

[0288] - 액체 질소에 급속 냉동한다.

[0289] - -80℃에 저장한다.

[0290] **2. 융합 단백질의 정제 및 절단**

[0291] **a. 세포 용해: 전체 용해**

[0292] - 저장된 펠렛 (용해 완충액에 재현탁)을 10분 동안 37℃에서 해동한다.

[0293] - DNAse 1/100 (v/v) (*2 mg/mL 원액*) 및 $MgSO_4$ 1/200 (v/v) (*2 M 원액*)를 첨가한다.

[0294] - 20분 동안 4℃에서 진탕/인큐베이션한다.

[0295] - 6분 동안, 예컨대 30초 ON, 30초 OFF, 40% 진폭 (샘플을 함유하는 비이커는 얼음에 유지시켜야 함)으로 초음파처리한다.

[0296] - 20 000 rpm으로 40분 동안 4℃에서 원심분리한다.

[0297] - 0.22 μm 필터 막을 통해서 상청액을 여과한다.

[0298] **b. 표준 고정화 금속 킬레이트화 크로마토그래피 (IMAC) (AKTA Purifier)**

[0299] - 3 mL/분의 유속으로 HisTrap excel 5 mL 컬럼을 완충액 A: Tris 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, 이미다졸 10 mM pH 8)로 평형화시킨다.

[0300] - 상청액을 로딩한 다음에, 컬럼을 20 CV 즉, 100 mL의 완충액 A로 세척한다.

[0301] - 융합 단백질을 10 CV, 즉 50 mL의 완충액 B: Tris 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, 이미다졸 250 mM pH 8)로 용리한다.

[0302] - 모아진 용리 분획의 부피 및 OD280 nm를 측정하고 - 280 nm에서 A1‰ = 1,1 UDO/mg (디술피드 결합없는 경우)을 사용하여 농도 및 양을 계산한다.

[0303] - 6-8 kDa 컷오프의 투석 도관을 사용하여, 2 L의 완충액 A: Tris 50 mM pH 8, NaCl 1 M, 이미다졸 10 mM pH 8)에 대해 4℃에서 밤새 용리액 풀을 투석한다.

[0304] **c. 절단**

[0305] - 투석된 용리액의 OD280 nm를 측정한다.

[0306] - 절단이 올바르게 일어나기 위해서, 용리액은 0.5-0.7 mg/mL 사이의 농도를 갖도록 희석되어야 한다.

[0307] - 용리액에 재조합 TEV (1/10 w/w)를 첨가한다.

[0308] - 4시간 동안 실온에서 인큐베이션한다.

[0309] - 밤새 4℃에서 인큐베이션한다.

[0310] - 용리액에 재조합 TEV (1/20 w/w)를 첨가한다.

[0311] - 4시간 동안 실온에서 인큐베이션시킨다.

[0312] - 밤새 4℃에서 인큐베이션한다.

[0313] - 15분 동안 4℃에서 7500 rpm으로 원심분리하여 임의 침전물을 제거한다.

[0314] **3. TT1 또는 TT6의 정제**

[0315] **a. 수지 제조**

[0316] 1 L 박테리아 배양으로 발생된 샘플 경우:

[0317] - 4 mL의 수지

[0318] - 800 ㎕의 $NiSO_4$ 0.2 M, 및 15-30분 동안 인큐베이션한다.

[0319] - 15 mL의 H_2O로 세척하고 5분 동안 5 000 rpm으로 4℃에서 원심분리한다.

[0320] - 상청액을 버린다.

[0321] - 15 mL의 H_2O로 세척하고, 5분 동안 5 000 rpm으로 4℃에서 원심분리한다.

[0322] - 상청액을 버린다.

[0323] - 15 mL의 Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 1 M로 세척하고, 5분 동안 5 000 rpm으로 4℃에서 원심분리한다.

[0324] - 상청액을 버린다.

[0325] - 액체가 투명해질 때까지 작업을 반복한다.

[0326] - 15 mL의 Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 1 M, 이미다졸 10 mM pH 8.0으로 세척하고, 10분 동안 인큐베이션하고, 5분 동안 5 000 rpm으로 4℃에서 원심분리한다.

[0327] - 상청액을 버린다.

[0328] - 15 mL의 Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 1 M, 이미다졸 10 mM pH 8.0로 세척하고, 10분 동안 인큐베이션하고, 5분 동안 5 000 rpm으로 4℃에서 원심분리한다.

[0329] - 상청액을 버린다.

[0330] - 15 mL의 Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 1 M, 이미다졸 10 mM pH 8.0로 세척하고, 밤새 4℃에서 인큐베이션한다.

[0331] **b. "통과액" 고정화 금속 (Ni^{2+}) 킬레이트화 크로마토그래피 (IMAC) (회분식)**

[0332] - 절단된 샘플을 사전-평형화된 수지와 2시간 동안 4℃에서 인큐베이션한다

[0333] - 수지/절단된 용리 혼합물을 빈 컬럼으로 전달한다.

[0334] - TT1, 또는 TT6 만을 함유하는 통과액을 수집한다 (잔류 융합 단백질 -있는 경우- 및 TEV는 컬럼 상에 잔류)

[0335] **c. 농축**

[0336] - 200-500 ㎕의 부피가 수득될 때까지 (적을수록 더 좋음) AMICON 3K concentrator를 사용하여 통과액을 농축한다 (3900 rpm, 4℃)

[0337] - 10 000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 임의 침전물을 제거하고, 상청액을 깨끗한 튜브로 전달한다.

[0338] **d. 크기-배제 크로마토그래피 (SEC) (AKTA Purifier)**

[0339] - 0.5 mL/분의 유속을 사용하여, Superdex S200 increase 10/300 GL 컬럼을 완충액 Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 1 M, 이미다졸 10 mM pH 8.0으로 평형화시킨다.

[0340] - 농축된 통과액을 로딩하고 용리한다 (TT1 및 TT6은 ca. 19 mL에서 용리되기 시작함)

[0341] - 풀링된 TT1, 또는 TT6 분획의 부피 및 OD280 nm를 측정하고 - 280 nm에서 A1‰ = 2,6 UDO/mg (디술피드 결합이 없는 경우)를 사용하여 농도 및 양을 계산한다.

[0342] **e. SDS-PAGE (20% 망상구조 겔, 환원 조건)**

[0343] - 각 정제 단계 및 각 용리 피크 경우: 1-4 ㎍ 단백질을 분리하고, 샘플을 변성 (SDS) 및 환원 (DTT 또는 2/베타-머캅토에탄올)시키고 최종 사용까지 4℃ 또또는 -20℃에 보관한다.

[0344] - SDS-PAGE 겔에 로딩시켜서, 이동시킨다 (200 V).

[0345] **실시예 3: TT1의 예방적 진통 효과**

[0346] 이 실험의 목적은 SEQ ID NO: 1의 펩티드 ("TT1")가 또한 발 절개 모델 (상기 기술된 바와 같음)에서 TT1의 피하 주사를 통한 예방적 진통 효과를 갖는지 여부를 평가하는 것이었다.

[0347] **재료 및 방법**

[0348] TT1 또는 비히클은 다음과 같이 상이한 시점에 1일 2회 피하 투여되었다: 수술 전날 (D-1), 당일 (디데이)에 수술 (및 각성) 전 1시간 및 이후 1시간, 및 D+1 및 D+2 (도 10A). D+1 (D+1에 TT1 주사 전), D+2 (D+2에 TT1 주사 전) 및 D+3에 기계적 역치 반응 측정을 수행하였다.

[0349] **결과**

[0350] 발 절개 후, 비히클 처치된 마우스는 기계적 이질통증이 발생되었다 (도 10B의 D1, D2 및 D3 참조). 대조적으로, TT1이 처치된 마우스는 기계적 이질통증이 발생되지 않았다. 비히클이 처치된 마우스와 비교하여, TT1이 처치된 마우스는 D1, D2 및 D3에 통계적으로 유의한 더 높은 반응 역치를 나타낸다.

[0351] 이들 결과는 본 발명의 펩티드 TT1이 발 절개 모델 (수술후 통증 모델)에서 예방적으로 사용될 수 있다는 것을 보여준다.

[0352] **실시예 4: CCI 신경병증성 통증 모델에 대한 TT1의 경구 반복 투여 후 내성 부재**

[0353] 이 실험의 목적은 SEQ ID NO: 1의 펩티드 ("TT1")가 처치된 대상체가 이 펩티드에 대한 내성을 유도할 수 있는지 여부를 평가하는 것이었다.

[0354] **재료 및 방법**

[0355] CCI 신경병증성 통증 모델: 만성 수축성 손상 (CCI)은 Bennett 및 Xie 1988 (A peripheral mononeuropathy in rats that produces disorders of pain sensation like those in man. Pain vol 33: pp87-107)가 이전에 기술한 대로 수행되었다. 간략하게, 2개 결찰대 (6-0 모노크릴, Ethicon)가 총좌골 신경 주변을 느슨하게 (약 1 mm 간격으로) 묶어서, 케타민/자일라신 (각각 100 mg/kg and 10 mg/kg ip)으로 마취된 마우스에서 일측 말초 단일신경병증을 유도하였다. 신경은 거의 식별가능하지 않은 정도로 수축되어서, 경피신경 혈관계를 통한 순환은 방해받지 않았다.

[0356] 상기 기술된 바와 같이 CCI 신경병증성 통증 모델의 확립 후에, 마우스는 수술 후 10일 (D10)에 시작하여 연속 14일 동안 SEQ ID NO: 1의 펩티드 ("TT1") 또는 비히클로 매일 처치되었다. TT1의 진통 효과는 수술 후 24일차 (D24)까지 2일마다 결정되었다.

[0357] **결과**

[0358] TT1의 펩티드의 피하 주사는 반응 (즉, 발 움츠림) 역치의 강력한 증가를 유도하여서, TT1의 진통 효과를 입증하였다. 흥미롭게도, TT1의 진통 효과는 D24에도, TT1 효능의 어떠한 감소도 없이 전체 치료 기간 (14일) 동안 일정하게 유지되었다. 이들 결과는 본 발명의 펩티드 TT1이 대상체에서 내성을 유도하지 않고 장기간 동안 반복적으로 사용될 수 있다는 것을 보여준다.

[0359] **참조문헌**

Benyamin, R., Trescot, A.M., Datta, S., Buenaventura, R., Adlaka, R., Sehgal, N., Glaser, S.E., and Vallejo, R. (2008). Opioid complications and side effects. Pain Physician 11, S105-120.

Bourane, S., Duan, B., Koch, S.C., Dalet, A., Britz, O., Garcia-Campmany, L., Kim, E., Cheng, L., Ghosh, A., Ma, Q., et al. (2015a). Gate control of mechanical itch by a subpopulation of spinal cord interneurons. Science 350, 550-554.

Bourane, S., Grossmann, K.S., Britz, O., Dalet, A., Del Barrio, M.G., Stam, F.J., Garcia-Campmany, L., Koch, S., and Goulding, M. (2015b). Identification of a spinal circuit for light touch and fine motor control. Cell 160, 503-515.

Boyle, K.A., Gradwell, M.A., Yasaka, T., Dickie, A.C., Polgar, E., Ganley, R.P., Orr, D.P.H., Watanabe, M., Abraira, V.E., Kuehn, E.D., et al. (2019). Defining a Spinal Microcircuit that Gates Myelinated Afferent Input: Implications for Tactile Allodynia. Cell reports 28, 526-540 e526.

Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A.H., Yarnitsky, D., Freeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N.B., et al. (2017). Neuropathic pain. Nat Rev Dis Primers 3, 17002.

Costigan, M., Scholz, J., and Woolf, C.J. (2009). Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. Annu Rev Neurosci 32, 1-32.

Coull, J.A., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M.W., and De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. Nature 438, 1017-1021.

Delfini, M.C., Mantilleri, A., Gaillard, S., Hao, J., Reynders, A., Malapert, P., Alonso, S., Francois, A., Barrere, C., Seal, R., et al. (2013). TAFA4, a chemokine-like protein, modulates injury-induced mechanical and chemical pain hypersensitivity in mice. Cell reports 5, 378-388.

Duan, B., Cheng, L., Bourane, S., Britz, O., Padilla, C., Garcia-Campmany, L., Krashes, M., Knowlton, W., Velasquez, T., Ren, X., et al. (2014). Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain. Cell 159, 1417-1432.

Goh, EL., Chidambaram, S., Ma, D. (2017). Complex regional pain syndrome: a recent update. Burns & Trauma 5:2.

Leroux, Maria Bibiana (2018). Erythromelalgia: a cutaneous manifestation of neuropathy ? An Bras Dermatol. 93(1):86-94.

Ngo, AL., Urits, I., Yilmaz, M., Fortier, L., Anya, A., Oh, JH., Berger, AA., Kassem, H., Sanchez, MG., Kaye, AD, et al. (2020). Postherpetic Neuralgia: Current Evidence on the Topical Film-

[0360]

Forming Spray with Bupivacaine Hydrochloride and a Review of Available Treatment Strategies. Adv Ther. 37(5): 2003–2016.

Peirs, C., Williams, S.P., Zhao, X., Walsh, C.E., Gedeon, J.Y., Cagle, N.E., Goldring, A.C., Hioki, H., Liu, Z., Marell, P.S., et al. (2015). Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain. Neuron 87, 797-812.

Petitjean, H., F, B.B., Tsao, D., Davidova, A., Sotocinal, S.G., Mogil, J.S., Kania, A., and Sharif-Naeini, R. (2019). Recruitment of Spinoparabrachial Neurons by Dorsal Horn Calretinin Neurons. Cell reports 28, 1429-1438 e1424.

Petitjean, H., Pawlowski, S.A., Fraine, S.L., Sharif, B., Hamad, D., Fatima, T., Berg, J., Brown, C.M., Jan, L.Y., Ribeiro-da-Silva, A., et al. (2015). Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury. Cell reports 13, 1246-1257.

Sarver, D.C., Lei, X., and Wong, G.W. (2021). FAM19A (TAFA): An Emerging Family of Neurokines with Diverse Functions in the Central and Peripheral Nervous System. ACS Chem Neurosci 12, 945-958.

Siracusa, R., Di Paola, R., Cuzzocrea, S., Impellizzeri, D. (2021). Fibromyalgia: Pathogenesis, Mechanisms, Diagnosis and Treatment Options Update. Int J Mol Sci. 22(8): 3891.

Tom Tang, Y., Emtage, P., Funk, W.D., Hu, T., Arterburn, M., Park, E.E., and Rupp, F. (2004). TAFA: a novel secreted family with conserved cysteine residues and restricted expression in the brain. Genomics 83, 727-734.

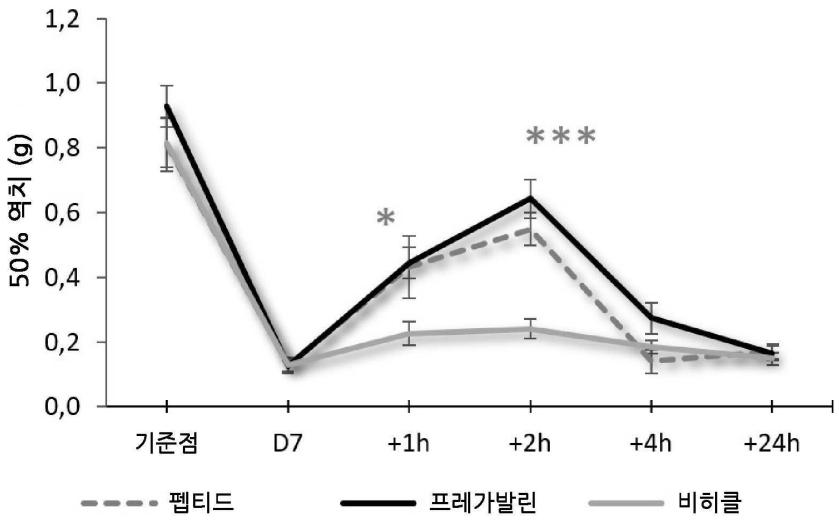
Zeilhofer, H.U., Wildner, H., and Yevenes, G.E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. Physiol Rev 92, 193-235.

Zhang, Y., Liu, S., Zhang, Y.Q., Goulding, M., Wang, Y.Q., and Ma, Q. (2018). Timing Mechanisms Underlying Gate Control by Feedforward Inhibition. Neuron 99, 941-955 e944.

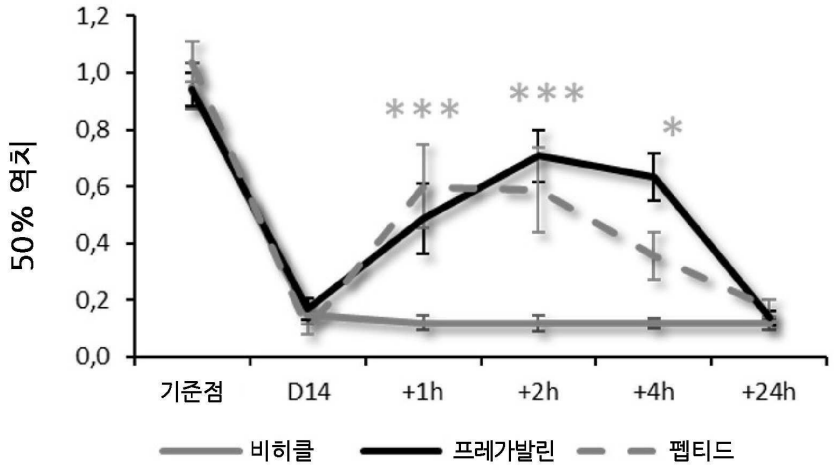
[0361]

도면

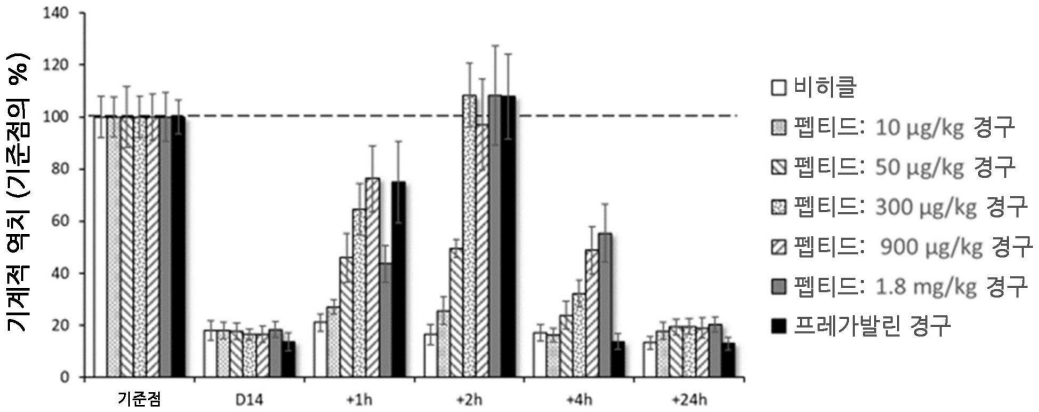
도면1



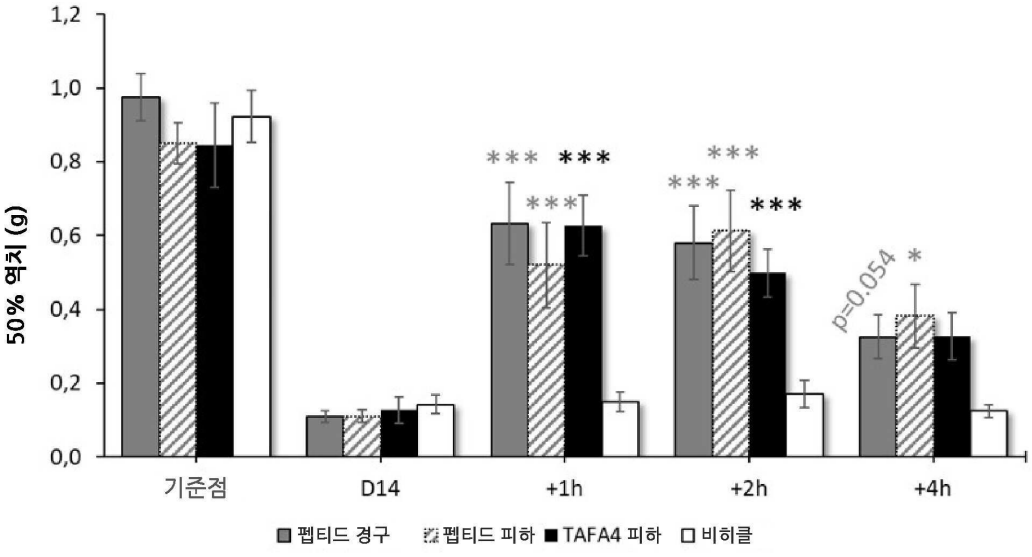
도면2


50% 역치
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
***
***
*
기준점
D14
+1h
+2h
+4h
+24h
비히클
프레가발린
펩티드

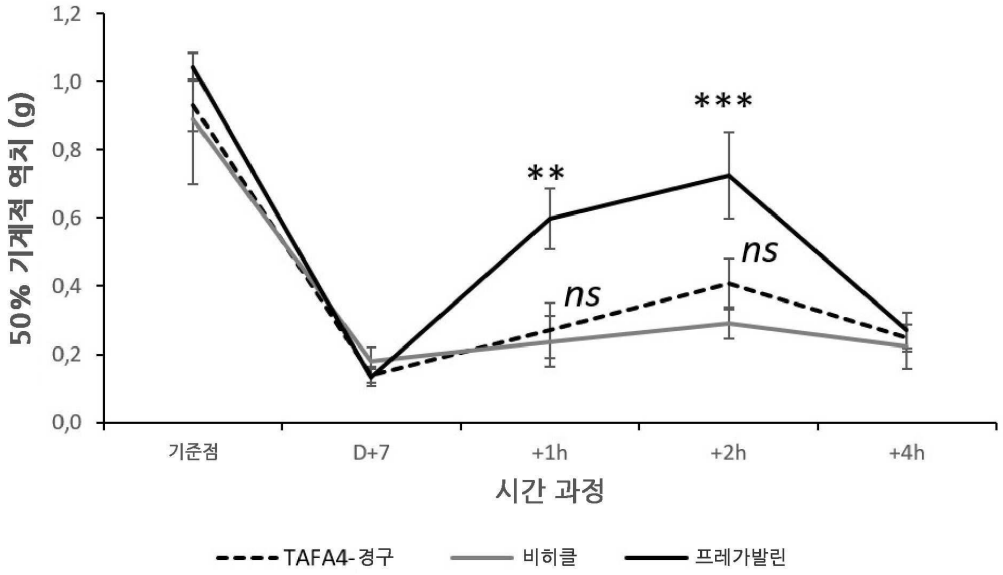
도면3


기계적 역치 (기준점의 %)
140
120
100
80
60
40
20
0
기준점
D14
+1h
+2h
+4h
+24h
비히클
펩티드: 10 μg/kg 경구
펩티드: 50 μg/kg 경구
펩티드: 300 μg/kg 경구
펩티드: 900 μg/kg 경구
펩티드: 1.8 mg/kg 경구
프레가발린 경구

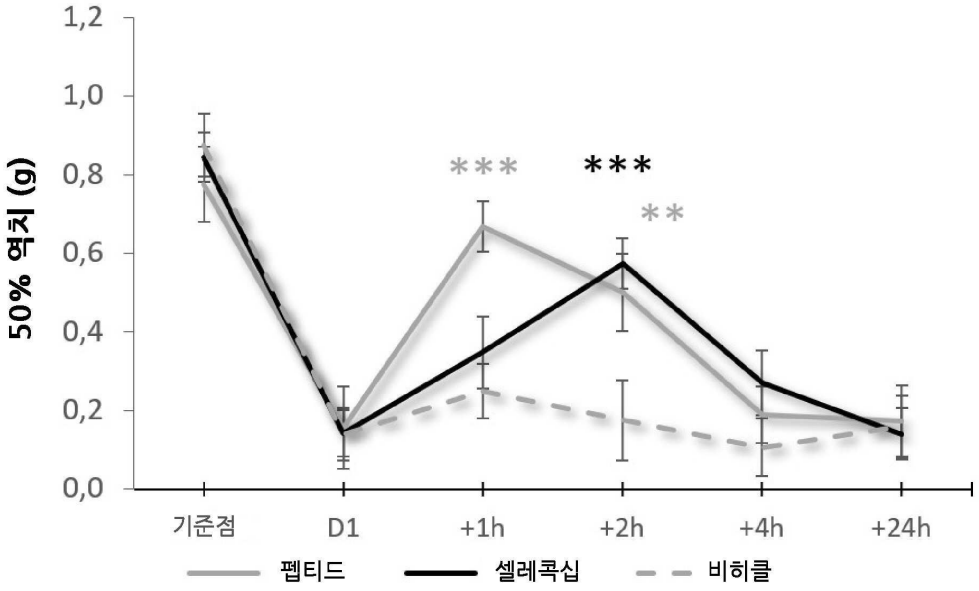
도면4


50% 역치 (g)
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
***
***
***
***
***
***
p=0.054
*
기준점
D14
+1h
+2h
+4h
펩티드 경구
펩티드 피하
TAFA4 피하
비히클

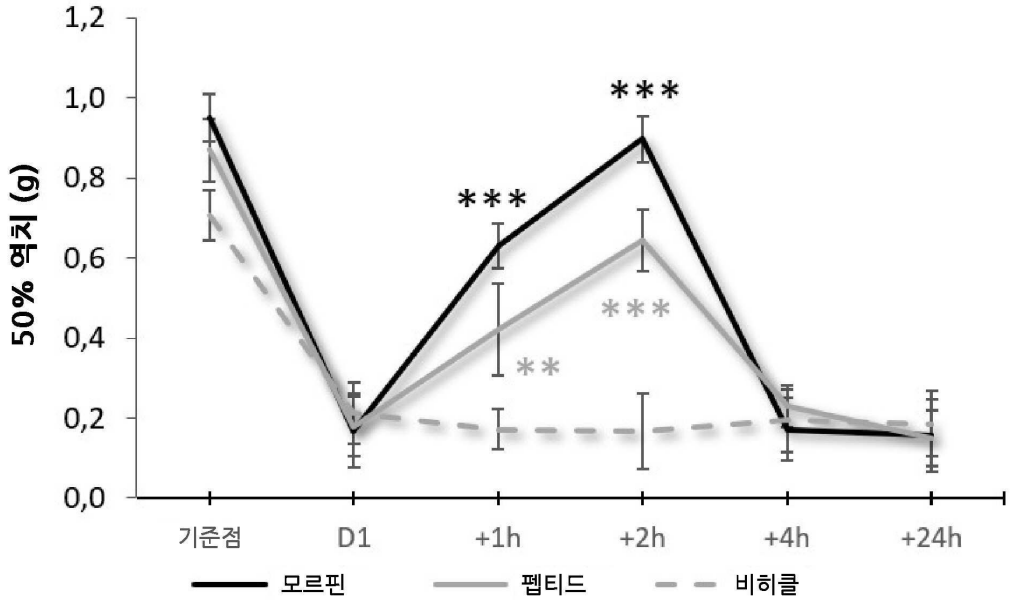
도면5


50% 기계적 역치 (g)
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
**
***
ns
ns
기준점
D+7
+1h
+2h
+4h
시간 과정
TAFA4-경구
비히클
프레가발린

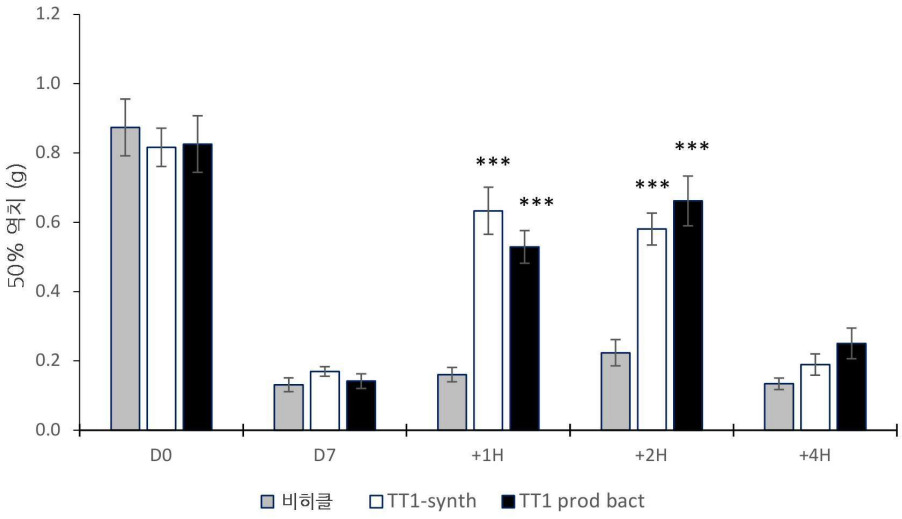
도면6


50% 역치 (g)
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
***
***
**
기준점
D1
+1h
+2h
+4h
+24h
펩티드
셀레콕십
비히클

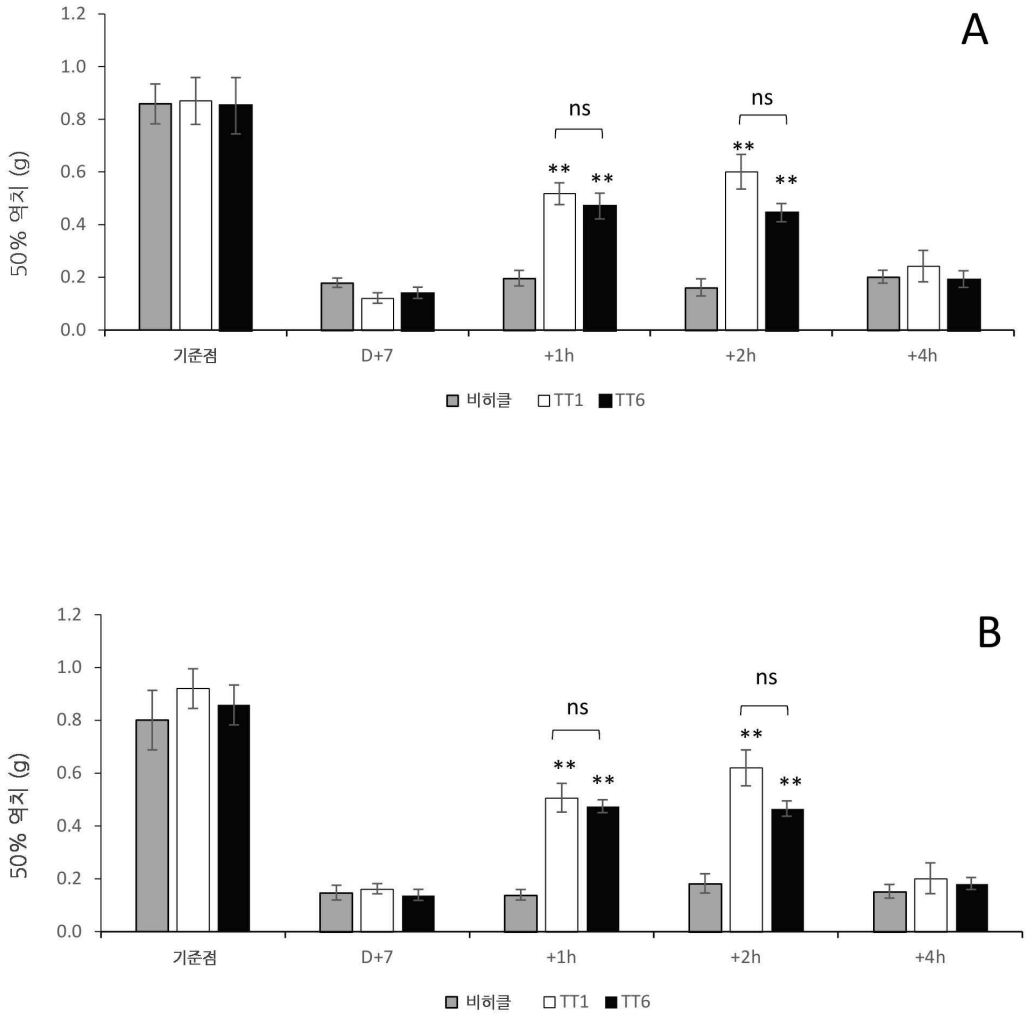
도면7


1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
50% 역치 (g)
***
***
***
**
기준점
D1
+1h
+2h
+4h
+24h
모르핀
펜티드
비히클

도면8

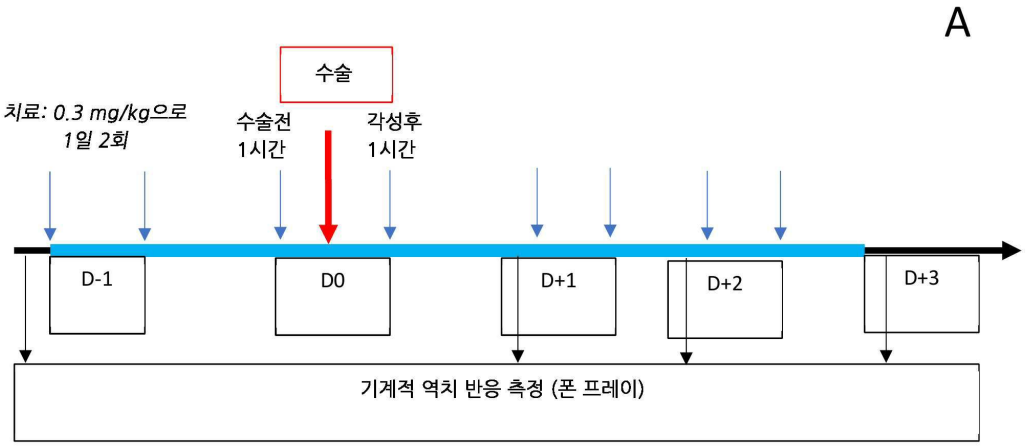

1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
50% 역치 (g)
***
***
***
***
D0
D7
+1H
+2H
+4H
비히클
TT1-synth
TT1 prod bact

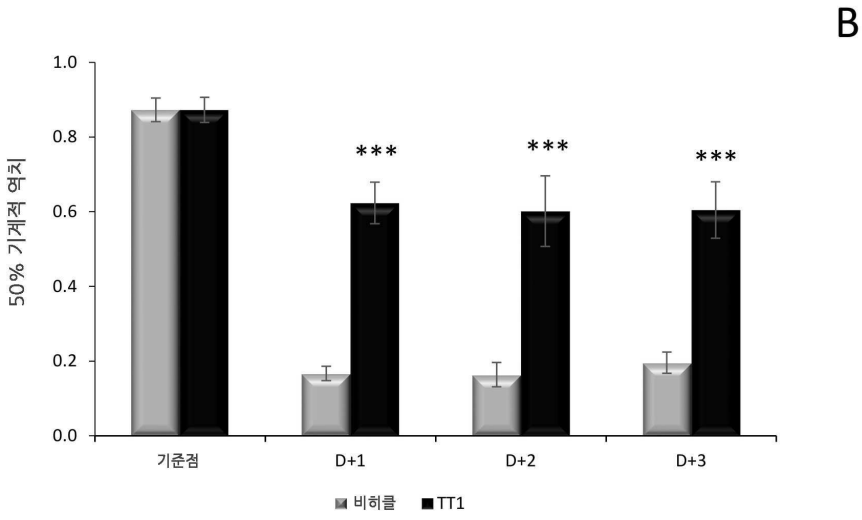
도면9


A
50% 역치 (g)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
ns
ns
**
**
**
**
기준점
D+7
+1h
+2h
+4h
비히클
TT1
TT6

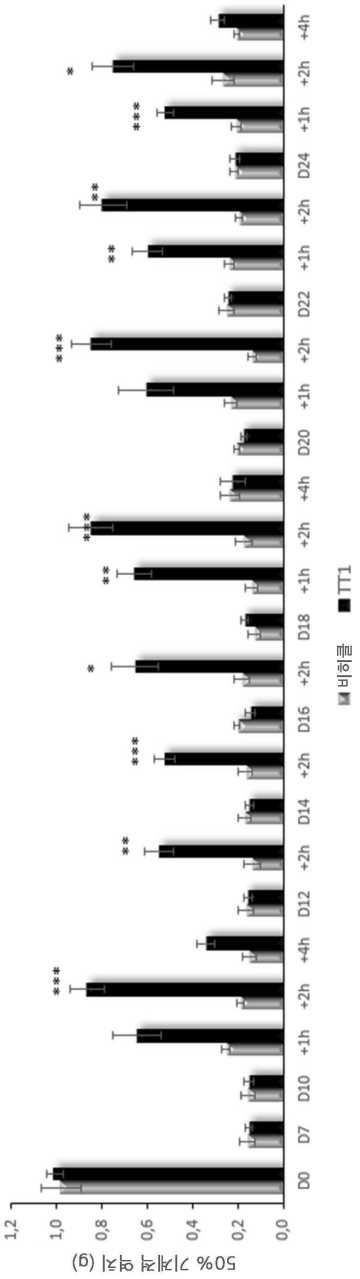
B
50% 역치 (g)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
ns
ns
**
**
**
**
기준점
D+7
+1h
+2h
+4h
비히클
TT1
TT6

도면10


A
수술
치료: 0.3 mg/kg으로
1일 2회
수술전
1시간
각성후
1시간
D-1
D0
D+1
D+2
D+3
기계적 역치 반응 측정 (폰 프레이)


B
50% 기계적 역치
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
***
***
***
기준점
D+1
D+2
D+3
비히클
TT1

도면11


50% 기계적 역치 (g)
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
D0
D7
D10
+1h
+2h
+4h
D12
D14
D16
D18
D20
D22
D24
비허클
TT1

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.