

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024 년 5 월 23 일 (23.05.2024)



(10) 국제공개번호

WO 2024/106815 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 25/04 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A23L 33/13 (2016.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/017457

(22) 국제출원일:

2023 년 11 월 3 일 (03.11.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0154268 2022 년 11 월 17 일 (17.11.2022) KR

(71) 출원인: 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 44610 울산광역시 남구 대학로 93, Ulsan (KR). 재단법인 아산사회복지재단 (THE ASAN

FOUNDATION) [KR/KR]; 05505 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동), Seoul (KR).

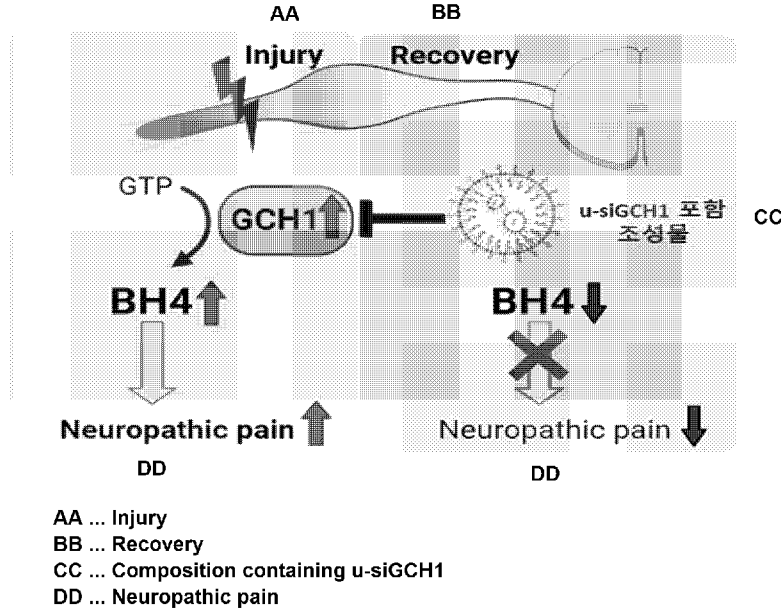
(72) 발명자: 김지현 (KIM, Jihyun); 05790 서울특별시 송파구 위례송파로89, 1502-802, Seoul (KR). 우하나 (WOO, Ha-Na); 05507 서울특별시 송파구 올림픽로 435, 224-302, Seoul (KR). 이경진 (LEE, Kyoung Jin); 03939 서울특별시 마포구 모래내로3길 4, 101-1504, Seoul (KR). 이희란 (LEE, Heuiran); 12273 경기도 남양주시 와부읍 덕소로 180, 119-1105, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08505 서울특별시 금천구 가산디지털2로 101, 비동 1802호(가산동,한라원엔원타워), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING NEUROPATHIC PAIN, COMPRISING GCH1-TARGETING siRNA AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: GCH1 표적 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing or treating neuropathic pain, the composition comprising GCH1-targeting siRNA as an active ingredient. The present inventors selected target sequences from conserved sequence patterns in various species of GCH1, designed 10 types of siRNA in the confirmed conserved sequence patterns, and selected 3 types of siRNA candidates with good efficacy from among the 10 types of designed siRNA. It was confirmed that the GCH1-targeting siRNA according to the present invention has the effect of inhibiting the mRNA and protein expression of GCH1 and thereby also reducing the concentration of BH4, a neurotransmitter produced by GCH1. Accordingly, the GCH1-targeting siRNA according to the present invention inhibits GCH1 overexpressed in a patient with neuropathic pain and thus can be effectively used as a pain control therapeutic agent.

[다음 쪽 계속]



CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 GCHI 표적 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명자들은 다양한 종의 GCHI에서의 보존 서열 패턴(**conserved sequence pattern**)으로부터 표적 서열을 선정하여, 확인한 보존 서열 패턴 내에서 10 종의 siRNA를 설계하였으며, 상기 설계한 10 종의 siRNA 중에서 효능이 좋은 siRNA 후보군 3종을 선별하였다. 본 발명에 따른 GCHI 표적 siRNA는 GCHI의 mRNA 및 단백질 발현을 억제함으로써, GCHI에 의해 생성되는 신경전달물질인 BH4의 농도까지 감소시키는 효과가 있음을 확인하였다. 이에 본 발명에 따른 GCHI 표적 siRNA는 신경병증성 통증 환자에서 과발현하는 GCHI를 억제하여 통증 조절 치료제로 유용하게 활용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: GCH1 표적 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 GCH1 표적 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.

배경기술

- [2] 신경병증성 통증(Neuropathic pain)은 말초 신경계(peripheral nervous system, PNS) 또는 중추 신경계(central nervous system, CNS)의 질환에 의해 일어나며, 특히 뇌 손상에 의해 유발된다. 특히 말초 신경병증성 통증은 말초 구심의 비정상적인 활성화에 의해 기인된 통증으로 정의된다. PNS에서의 비정상은 말초와 CNS 모두에 다양한 변화를 유도하고 통증을 유발한다. 이는 척추 신경의 활성화와 흥분성에서의 변화로 이어지는 증폭된 감각 전달(중추 민감화)을 일으킨다. 신경병증성 통증은 다양한 신경-생리학적 과정에 의해 유발된다. 이 통증은 피부, 뼈, 연결 조직 및 근육에 존재하는 A-델타 및 C-신경섬유상 수용체에 의해 매개된다. 이 수용체는 유해 화합물, 열 및 기계적 자극과 같은 상이한 정보를 감지하고 그 다음 뇌로 전달한다. 이러한 감지에 의한 연장되고 일관된 고통은 심각한 어려움이 될 수 있다. 이러한 비정상적인 감각은 일반적으로 이질통(allodynia) 및 통각과민(hyperalgesia)에 의해 나타난다. 이질통은 일반적으로 통증을 일으키지 않는 자극(예, 가벼운 접촉)에 대하여 통증 반응을 보인다. 통각과민은 보통의 통증을 일으키는 자극에 대하여 민감성이 증가된다.

- [3] 현재 신경병증성 통증의 약물 요법은 크게 두 가지 유형의 약물에 기초한다. 비스테로이드 염증제 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 및 아편양제제 (opioid)이다. 이 약물들은 오랫동안 확립되어 왔음에도 불구하고 종종 부분적이고 일시적인 고통 경감 효과를 보인다는 결함이 있다. 또한, 상기 약물의 반복적인 이용은 우울증과 조직 독성과 같은 부작용을 유발할 수 있다. 따라서 통증 경감을 위한 다른 전략이 요구된다. 만성적 통증의 경감을 위한 또 다른 전략으로서, 유전자 기반 치료는 단일 치료만으로도 효과적이고 덜 침습성이라는 점 등에서 다양한 이점을 가지고 있다. 또한, 효과는 장기간 지속되고 상대적으로 부작용이 적다. 이를 위해서는 적절한 치료 유전자를 선택하고 유전자 전달 비히클을 포함하여 더욱 효과적인 유전자 발현 시스템을 개발할 필요가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 본 발명의 목적은 GCH1 표적 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

- [5] 본 발명은 서열번호 7 내지 서열번호 9로 표시되는 siRNA로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [6] 또한, 본 발명은 서열번호 7 내지 서열번호 9로 표시되는 siRNA로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [7] 본 발명은 GCH1 표적 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명자들은 다양한 종의 GCH1에서의 보존 서열 패턴(conserved sequence pattern)으로부터 표적 서열을 선정하여, 확인한 보존 서열 패턴 내에서 10종의 siRNA를 설계하였으며, 상기 설계한 10종의 siRNA 중에서 효능이 좋은 siRNA 후보군 3종을 선별하였다. 본 발명에 따른 GCH1 표적 siRNA는 GCH1의 mRNA 및 단백질 발현을 억제함으로써, GCH1에 의해 생성되는 신경전달물질인 BH4의 농도까지 감소시키는 효과가 있음을 확인하였다. 이에 본 발명에 따른 GCH1 표적 siRNA는 신경병증성 통증 환자에서 과발현하는 GCH1을 억제하여 통증 조절 치료제로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [8] 도 1은 인간(a), 랫트(b), 원숭이(c) 세포주에서 siRNA 3종과 기존 특허 siRNA에 따른 GCH1 mRNA 감소 효능 비교 결과이다.
- [9] 도 2는 인간 세포주(293T)에서 siRNA 3종과 기존 특허 siRNA에 따른 GCH1 단백질 감소 효능 비교 결과이다.
- [10] 도 3은 인간 세포주(293T)에서 u-siGCH1 #8에 따른 BH4 농도 감소 효능 비교 결과이다.
- [11] 도 4는 본 발명의 모식도를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [12] 본 발명은 서열번호 7 내지 서열번호 9로 표시되는 siRNA로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [13] 바람직하게는, 상기 siRNA는 GCH1을 표적으로 하고, 보다 바람직하게는, 상기 siRNA는 인간 GCH1(NCBI accession no. NM_000161.3), 랫트 GCH1(NCBI accession no. NM_024356.1) 및 원숭이 GCH1(NCBI accession no. XM_003930511.3)를 표적으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [14]
- [15] 본 발명의 약학 조성물 또는 복합 제제는 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유

효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

- [16] 본 발명의 약학조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 죽, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 약학조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [17] 본 발명의 약학조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 한정되는 것은 아니다.
- [18]
- [19] 본 발명은 서열번호 7 내지 서열번호 9로 표시되는 siRNA로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [20] 바람직하게는, 상기 siRNA는 GCH1을 표적으로 하고, 보다 바람직하게는, 상기 siRNA는 인간 GCH1(NCBI accession no. NM_000161.3), 랫트 GCH1(NCBI accession no. NM_024356.1) 및 원숭이 GCH1(NCBI accession no. XM_003930511.3)를 표적으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [21]
- [22] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품 조성물은 유효성분 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [23] 상기 건강기능식품 조성물에 함유된 유효성분의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으

며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

- [24] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[25]

- [26] 본 발명의 GCH1(GTP cyclohydrolase I)은 신경병증성 통증과 관련된 인자 중 하나이다. GCH1은 28kDa의 동중 서브유닛 집합체로서, GTP의 디히드로네오테린 트리포스페이트(dihydroneopterin triphosphate 또는 neopterin)로의 전환을 촉매한다. GCH1은 BH4 생합성에서 초기 속도 제한 효소로서 알려져 있다. BH4는 티로신 합성에 관여하는 페닐알라닌 하이드록실라제, 카테콜아민 생산에 관여하는 티로신 하이드록실라제, 세로토닌 합성에 관여하는 트립토판 하이드록실라제 및 질산 합성에서 질산 합성효소의 필수적인 보조인자이다. 신경병증성 통증 동물 모델을 이용한 연구를 통하여 BH4 합성 효소가 손상된 감각 신경에서 활성화됨이 규명되었다. BH4 또는 이와 유사한 분자의 직접 주입은 통증을 유발하는 자극에 대한 동물의 반응을 증가시킬 수 있다. 따라서, 신경병증성 통증을 완화하기 위해서는 BH4의 생산을 효과적으로 억제하여야 한다.

발명의 실시를 위한 형태

- [27] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.

[28]

[29] <실시예>

[30] 1. siRNA의 설계

- [31] 다양한 종의 GCH1에서의 보존 서열 패턴(conserved sequence pattern)으로부터 표적 서열을 선정하였다. 이때, 사용된 종은 인간(NM_000161.3), 랫트(NM_024356.1)를 포함하며, 보존 서열 패턴 확인에 필요한 각종의 GCH1 서열 정렬에는 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)를 사용했다.

- [32] 확인한 보존 서열 패턴 내에서 10종의 siRNA를 설계했으며, 각 siRNA의 특성은 표 1에 나타냈다.

[33]

[34]

[35]

[36] [표1]

siRNA 10종 후보군의 서열정보 및 특성

서열 번호	Target Sequence (5'→3')	Start (Codon#)	Multi-species compatibility (Yes or No)	siRNA score	GC (%)	Tm (°C)
1	GCAGTTCTTCA CCAAGGGCTA	306	No	11.5	52.4	62.1
2	CAGTTCTTCAC CAAGGGCTAC	307	No	8.5	52.4	60.7
3	GGCTACCAGG AGACCATCTCA	322	No	12	57.1	64.4
4	TTGAAGCAAC ACACATGTGTA	617	No	10	38.1	55.7
5	AAGCAACACA CATGTGTATGG	620	No	9.5	42.9	56.7
6	GTCCTAAACG ATGCTATATTT	346	No	12.5	33.3	50.2
7	CCATATTGGT TATCTTCCTAA	456	Yes	14.5	33.33	50.5
8	GGTTATCTTCC TAACAAGCAA	463	Yes	15	38.1	54
9	CTTCCTAACAA GCAAGTCCTT	469	Yes	13.5	42.86	56.7
10	GAAGCAACAC ACATGTGTATG	619	No	13.5	42.86	55.2
진하게 표시한 서열은 종간 미스매치되는 뉴클레오티드이다.						

- [37] * multi-species compatibility: 설계한 siRNA 서열과 원숭이(XM_003930511.3)의 GCH1 서열을 비교했을 때 100% 일치하는지 여부를 나타낸다. * siRNA score: siRNA의 기능 발현에 중요한 역할을 하는 서열상 특징을 항목화 하여 각 항목에 따라 점수를 부여한다. 점수가 높을수록 siRNA로서의 효능이 우수할 확률이 높다.
- [38] * GC contents(%): siRNA 전체 서열 내 Guanine(G)와 Cytosine(C)의 백분율.
- [39] * Tm(°C): 이중가닥 RNA의 녹는점(melting temperature)으로 RNA의 folding 안정성을 예측할 수 있는 척도.
- [40]

[41] **2. 효과적인 siRNA 후보군 3종 선별**

[42] 설계한 10종의 siRNA 중에서 효능이 좋은 siRNA 후보군 3종(#7, #8, #9)을 선별했고, 뉴클레오타이드 서열에 따른 2차 구조를 예측할 수 있는 시뮬레이션 예측 RNAfold webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)를 이용하여 후보군 3종의 2차 구조를 예측했다.

[43] siRNA의 서열을 결정한 후, 비특이적인 대조군 siRNA를 Bioneer (Seoul, Korea) 으로부터 구입하였다. siRNA 이중가닥 올리고뉴클레오타이드는 제조업자에 의해 지시된 바에 따라 뉴클레아제가 없는 물에 재현탁하였다. 본 발명에서 이용된 siRNA 후보군 3종의 서열은 표 2와 같다.

[44] [표2]

선별된 siRNA 3종의 서열 및 2차 구조 예측 결과

이름	서열 번호	서열	*Probab ility(%)	2차 구조
u-siGC H1 #7	7	CCATATTGGT TATCTTCCTAA	24.09	
u-siGC H1 #8	8	GGTTATCTTCC TAACAAGCAA	52.23	
u-siGC H1 #9	9	CTTCCTAACAA GCAAGTCCTT	54.76	
* Probability: 2차 구조의 빈도				

[45]

[46] **3. 세포 배양 및 형질감염**

[47] HeLa, Vero 및 C6 세포는 ATCC(American Type Culture Collection)으로부터 구매했다. 상기 세포는 5% CO₂ 배양기에서 37°C에서 10% FBS(Fetal Bovine Serum), 글루타맥스-1(2mM), 페니실린(100IU/ml) 및 스트렙토마이신(50μg/ml)으로 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco BRL) 배지에서 배양했다.

[48]

[49] 1) Real-time RT-PCR 샘플 준비: 일시적인 형질감염을 위하여, 무혈청 상태에서 올리고펙타민 시약(Invitrogen)을 이용하여 세포를 100nM siRNA으로 6시간 동안 배양한 후, 10% FBS를 함유한 신선한 배지를 첨가했다. 1차 형질감염 24시간 후, 동일한 방법으로 2차 형질감염을 시행하고 24시간 뒤에 추가 실험을 위해 세포를 수확했다.

[50]

[51] 2) Western Blot 및 BH4 ELISA 샘플 준비: 일시적인 형질감염을 위하여, 무혈청 상태에서 올리고펙타민 시약(Invitrogen)을 이용하여 세포를 100nM siRNA으로 6시간 동안 배양한 후, 10% FBS를 함유한 신선한 배지를 첨가했다. 1차 형질감염 24시간 후, 무혈청 상태에서 리포펙타민 시약(Invitrogen)을 이용하여 100nM siRNA와 human GCH1 plasmid 400ng을 처리하고 6시간 배양한 후, 10% FBS를 함유한 신선한 배지를 첨가했다. 2차 형질감염을 시행하고 24시간 뒤에 추가 실험을 위해 세포를 수확했다.

[52]

[53] 4. Real-time RT-PCR

[54] 총 RNA는 HeLa, Vero 및 C6 세포로부터 트리졸 시약(Invitrogen)을 이용하여 추출했다. 역전사(RT)는 올리고-dT 프라이머(Invitrogen)를 이용하여 55°C에서 슈퍼스크립트 III (Invitrogen)로 수행했다. 합성된 cDNA는 iQ SYBR 그린 슈퍼믹스 (Bio-rad)를 이용하여 real-time RT-PCR에 의해 증폭되었다.

[55] 상기 반응은 폴리머라아제 활성화를 위한 95°C에서 3분, 및 [95°C에서 15초(변성), 60°C에서 30초(어닐링), 72°C에서 30초(연장)]의 39회 주기로 구성되었다. β -액틴은 상대적인 유전자 발현의 정도를 평가하기 위한 정상 대조군으로 사용되었다.

[56] 이때, 사용된 프라이머는 인간, 원숭이, 랫트 3가지 종간 교차 사용이 가능한 GCH1 센스 및 안티센스 프라이머와 일반 β -액틴-센스 및 안티센스 프라이머였다(표 3).

[57] [표3]

Real-time RT-PCR에 사용된 프라이머 목록

타겟 단백질	센스/안티센스	서열(5'→3')	합성서열 크기(bp)	Tm(°C)	서열번호
GCH1	센스	GAGATGGTGA TTGTGAAGGAC	110	HeLa:79.0 Vero:79.0 C6:80.5	11
	안티센스	CCAAGGACTT GCTTGTTAGG			12

β -액틴	센스	TGAAGATCAA GATCATTGCTC	80	HeLa:82.5 Vero:85.0 C6:84.0	13
	안티센스	TGCTTGCTGA TCCACATCTG			14

[58]

[59] 상대적인 유전자 발현은 GeneXpression Macro chromo4 software(Bio-Rad)에 의해 평가되었다. 그 결과, 도 1a와 같이 3종의 siRNA 모두 HeLa 세포주에서 GCH1 mRNA 발현을 억제했고, 이는 기존 특허 siRNA 보다 더 억제 효과가 컸다. 다른 세포주에서도 도 1b 및 도 1c와 같이 3종의 siRNA 모두 GCH1 mRNA 발현을 억제했다.

[60]

[61] 5. 웨스턴 블롯 분석

[62] 세포를 회수하여 100 μ l의 용균 완충용액(Thermofisher, Seoul, Korea)으로 용균했다. 용균물은 5x 시료 완충용액과 함께 100°C에서 5분간 끓여주고 변성 단백질은 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 분리한 후 semi-drier(Bio-Rad)를 이용하여 20V에서 30분간 PVDF 멤브레인으로 전달시켰다.

[63] 실온에서 1시간 동안 블록 용액(0.4 % Tween 20 및 5 % BSA in TBS)으로 처리한 후 멤브레인을 일차 항체: GCH1 (1:1000, Abnova), β -actin(1:5000, Sigma)과 하룻밤 동안 정치하였다. TBST로 세척한 후 호스 라디쉬 퍼옥시다제가 접합된 이차 항체(Jackson laboratory)는 적용되었고 블롯은 개선된 화학발광 시약(Pierce Biotechnology)으로 발현시켰다.

[64] 그 결과, 도 2a와 같이 3종의 siRNA와 기존 특허 siRNA 모두 HeLa 세포주에서 GCH1 단백질 발현을 억제하였는데, 선별된 3종의 siRNA가 기존 특허 siRNA보다 GCH1 단백질 억제 효과가 탁월했다. 도 2b 및 도 2c와 같이 웨스턴 블롯 상의 밴드를 정량화 하여 통계 분석을 실시한 결과, 선별된 3종의 siRNA 처리군에서 유의미한 GCH1 단백질 감소효과를 확인했다.

[65]

[66] 6. Tetrahydrobiopterin (BH4) ELISA 분석

[67] 세포를 회수하여 400 μ l의 PBS와 함께 Freezing and thawing 과정을 3회 반복함으로써 용균했다. 용균물은 BH4 ELISA kit(Tetrahydrobiopterin ELISA Kit, Novus)에 시료로 사용했다. ELISA 과정을 간략히 서술하면, 용균물과 BH4 일차 항체 각 50 μ l씩을 ELISA plate에 넣고 45분간 37°C에서 반응시켰다. 그 후, washing 용액으로 3회 세척을 실시했고, 호스 라디쉬 퍼옥시다제가 접합된 이차 항체를 100 μ l 처리 후 30분간 37°C에서 반응시켰다. 이후, washing 용액으로 5회 세척을 실시했고, 화학적 발색 기질(substrate, TMB)을 100 μ l 처리 후 15분간 빛을 차단한 상태로 37°C에서 반응시킨 뒤에 stop 용액 90 μ l 처리 후 450nm의 발색 값을 측정했다.

[68]

[69] 도 3a 와 같이 siCon에 비해 u-siGCH1 #8 처리군에서 BH4 농도가 유의미하게 감소된 것을 확인했다. 이는 도 3b에서 통계 분석 후 도출된 결과이다. 이를 통해 u-siGCH1 #8은 GCH1 의 mRNA, 단백질 발현을 감소함으로써 GCH1에 의해 생성되는 신경전달물질인 BH4의 농도까지 감소시키는 효과가 있음을 입증했다.

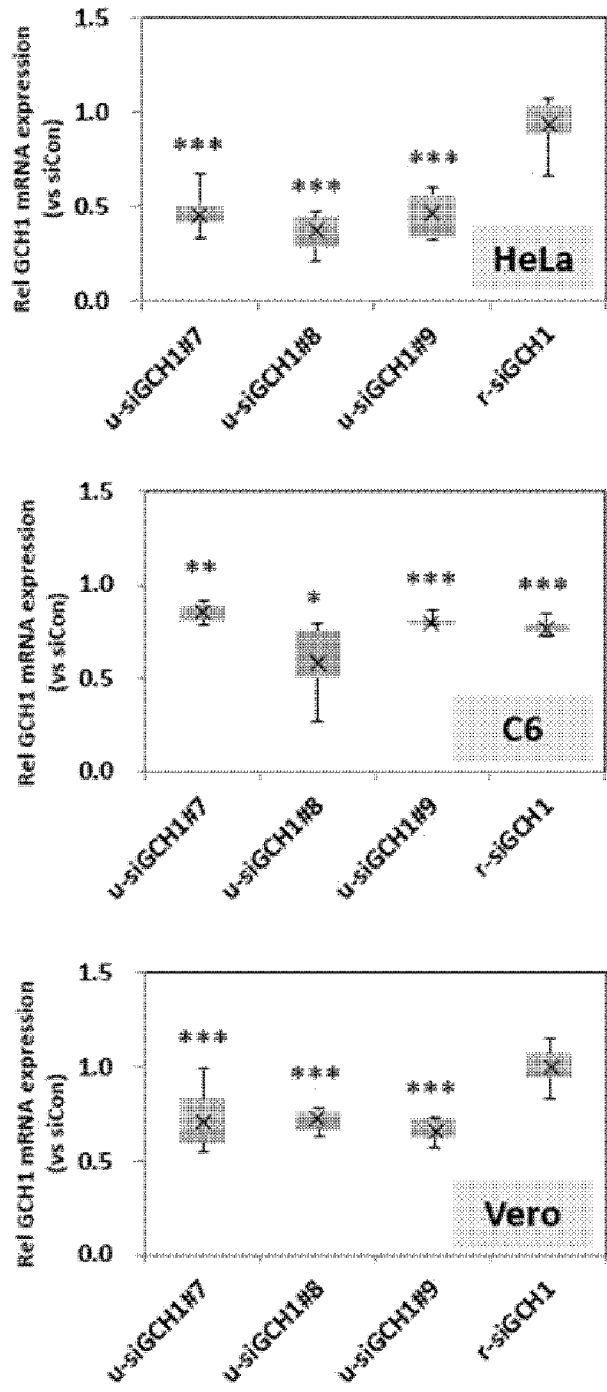
[70]

[71] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

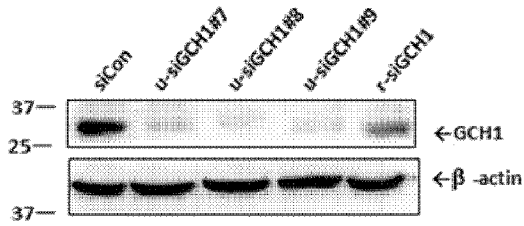
- [청구항 1] 서열번호 7 내지 서열번호 9로 표시되는 siRNA로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 siRNA는 GCH1을 표적으로 하는 것을 특징으로 하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 siRNA는 인간 GCH1(NCBI accession no. NM_000161.3), 랫트 GCH1(NCBI accession no. NM_024356.1) 및 원숭이 GCH1(NCBI accession no. XM_003930511.3)를 표적으로 하는 것을 특징으로 하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학조성물.
- [청구항 4] 서열번호 7 내지 서열번호 9로 표시되는 siRNA로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 siRNA를 유효성분으로 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 siRNA는 GCH1을 표적으로 하는 것을 특징으로 하는 신경병증성 통증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 siRNA는 인간 GCH1(NCBI accession no. NM_000161.3), 랫트 GCH1(NCBI accession no. NM_024356.1) 및 원숭이 GCH1(NCBI accession no. XM_003930511.3)를 표적으로 하는 것을 특징으로 하는 신경병증성 통증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

[도 1]

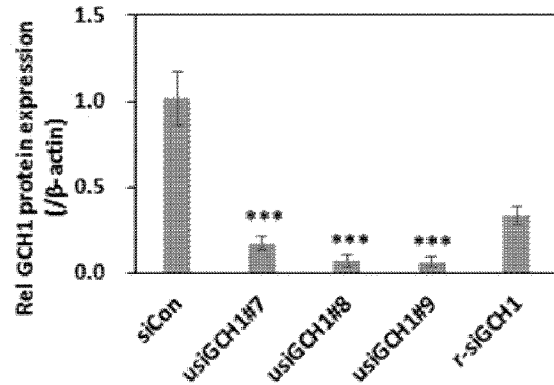


[도2]

a. WB



b. WB 정량분석

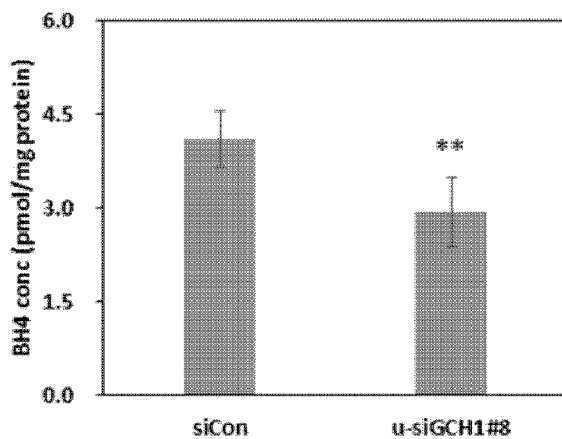


c. WB 통계분석

	siCon	u-siGCH1#7	siCon	u-siGCH1#8	siCon	u-siGCH1#9
평균	0.959332289	0.314222	0.959332289	0.16997	0.959332289	0.221983879
분산	0.129772338	0.012254	0.129772338	0.000905	0.129772338	0.019245499
관측수	6	7	6	7	6	9
공동(Pooled) 분산	0.06567151		0.05948087		0.061755822	
가설 평균차	0		0		0	
자유도	11		11		13	
t 통계량	4.524793075		5.817556881		5.629697311	
P(T<=t) 단측 검정	0.0004326		5.81328E-05		4.10236E-05	
t 기각치 단측 검정	1.795884819		1.795884819		1.770933396	
P(T<=t) 양측 검정	0.000865201		0.000116266		8.20471E-05	
t 기각치 양측 검정	2.20098516		2.20098516		2.160368656	

[도3]

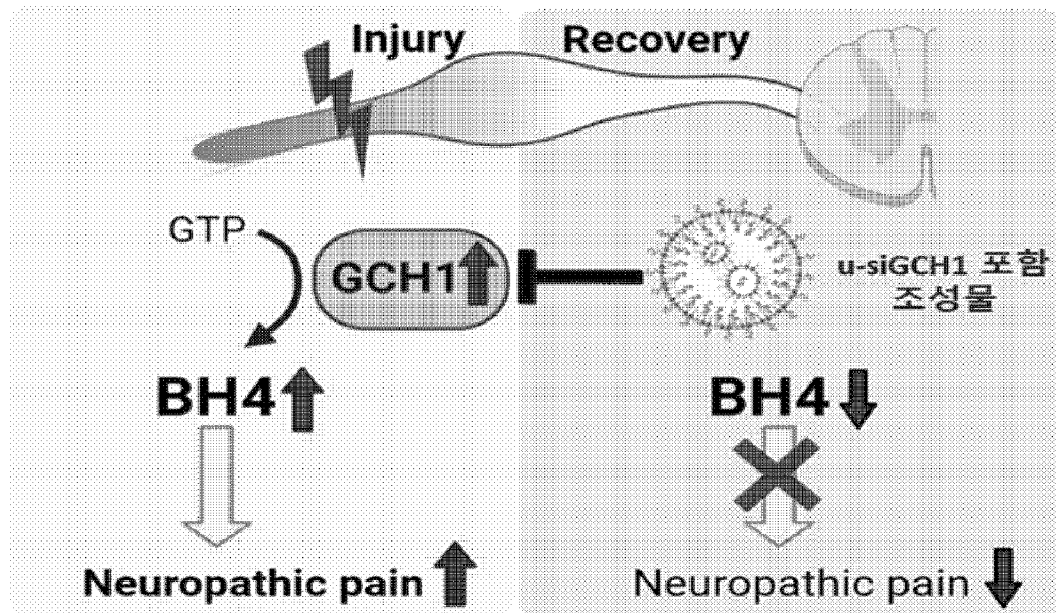
a. BH4 ELISA



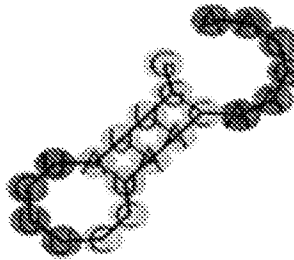
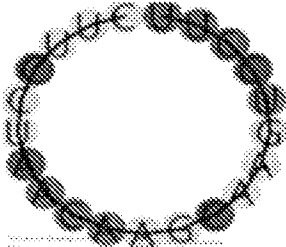
b. BH4 ELISA 통계분석

	siCon	u-siGCH1#8
평균	4.108018	2.9360623
분산	0.207136	0.3069236
관측수	6	6
공동(Pooled) 분산	0.25703	
가설 평균차	0	
자유도	10	
t 통계량	4.003873	
P(T<=t) 단측 검정	0.001251	
t 기각치 단측 검정	1.812461	
P(T<=t) 양측 검정	0.002503	
t 기각치 양측 검정	2.228139	

[도4]



[도 5]

이름	서열 번호	서열	*Probability(%)	2차 구조
u-siGCH1 #7	7	CCATATTGGTTATCTTCCTAA	24.09	
u-siGCH1 #8	8	GGTTATCTTCCTAACAAGCAA	52.23	
u-siGCH1 #9	9	CTTCCTAACAAGCAAGTCCTT	54.76	
* Probability: 2차 구조의 빈도				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/017457

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 48/00(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61P 25/04(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A23L 33/13(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 48/00(2006.01); A61K 38/46(2006.01); C12N 15/113(2010.01); C12N 9/22(2006.01); C12N 9/24(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: GTP cyclohydrolase 1(GCH1), 짧은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA), 신경병증성 통증(neuropathic pain), 저해(inhibition), 유전자 치료(gene therapy)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2011-0132307 A (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) 07 December 2011 (2011-12-07) See paragraph [0001].	1-6
Y	NCBI website. GenBank XM_003930511.3. Saimiri boliviensis boliviensis GTP cyclohydrolase 1 (GCH1). 12 February 2021. Retrieved from (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_003930511.3). See pages 1 and 2.	1-6
A	KIM, S. J. et al. Effective relief of neuropathic pain by adeno-associated virus-mediated expression of a small hairpin RNA against GTP cyclohydrolase 1. Molecular Pain. 18 November 2009 (publication date), vol. 5, article no. 67, inner pp. 1-9. See abstract.	1-6
A	US 2022-0211871 A1 (PREVAIL THERAPEUTICS, INC.) 07 July 2022 (2022-07-07) See entire document.	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 February 2024

Date of mailing of the international search report

29 February 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/017457

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2017-0035860 A1 (FLYNN, Alexander C.) 09 February 2017 (2017-02-09) See entire document.	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/017457

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/017457

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2011-0132307	A	07 December 2011	KR	10-1252891	B1	09 April 2013
				KR	10-1292924	B1	08 August 2013
				KR	10-2010-0037237	A	09 April 2010
				WO	2010-038965	A2	08 April 2010
				WO	2010-038965	A3	22 July 2010
US	2022-0211871	A1	07 July 2022	AU	2020-270984	A1	02 December 2021
				AU	2020-272974	A1	11 November 2021
				AU	2020-273182	A1	02 December 2021
				BR	112021019880	A2	15 February 2022
				BR	112021020183	A2	03 March 2022
				CA	3134841	A1	15 October 2020
				CA	3136004	A1	15 October 2020
				CA	3136117	A1	15 October 2020
				CN	114025806	A	08 February 2022
				CN	114026115	A	08 February 2022
				CN	114174324	A	11 March 2022
				EA	202192737	A1	27 January 2022
				EA	202192739	A1	15 February 2022
				EP	3952923	A1	16 February 2022
				EP	3953377	A1	16 February 2022
				EP	3953378	A1	16 February 2022
				IL	286582	A	01 December 2021
				IL	286582	D0	01 December 2021
				IL	286901	A	31 October 2021
				JP	2022-526021	A	20 May 2022
				JP	2022-526823	A	26 May 2022
				JP	2022-527015	A	27 May 2022
				KR	10-2021-0150486	A	10 December 2021
				KR	10-2021-0150487	A	10 December 2021
				KR	10-2022-0006527	A	17 January 2022
				MX	2021011958	A	15 December 2021
				MX	2021012184	A	24 January 2022
				MX	2021012467	A	10 December 2021
				US	2020-0332265	A1	22 October 2020
				US	2020-0338148	A1	29 October 2020
				WO	2020-210615	A1	15 October 2020
				WO	2020-210698	A1	15 October 2020
				WO	2020-210713	A1	15 October 2020
US	2017-0035860	A1	09 February 2017	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 48/00(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61P 25/04(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A23L 33/13(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 48/00(2006.01); A61K 38/46(2006.01); C12N 15/113(2010.01); C12N 9/22(2006.01); C12N 9/24(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: GTP cyclohydrolase 1(GCH1), 짧은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA), 신경병증성 통증(neuropathic pain), 저해(inhibition), 유전자 치료(gene therapy)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2011-0132307 A (울산대학교 산학협력단) 2011.12.07 단락 [0001]	1-6
Y	NCBI website, GenBank XM_003930511.3, 'Saimiri boliviensis boliviensis GTP cyclohydrolase 1 (GCH1)', 2021년 2월 12일 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_003930511.3) 페이지 1, 2	1-6
A	KIM, S. J. 등, "Effective relief of neuropathic pain by adeno-associated virus-mediated expression of a small hairpin RNA against GTP cyclohydrolase 1", Molecular Pain, 2009년 11월 18일(공개일), 5권, 기사번호 67, 내부페이지 1-9 요약	1-6
A	US 2022-0211871 A1 (PREVAIL THERAPEUTICS, INC.) 2022.07.07 전체 문헌	1-6
A	US 2017-0035860 A1 (FLYNN, ALEXANDER C.) 2017.02.09 전체 문헌	1-6

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2024년02월29일(29.02.2024)

국제조사보고서 발송일

2024년02월29일(29.02.2024)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동,
정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0132307 A	2011/12/07	KR 10-1252891 B1	2013/04/09
		KR 10-1292924 B1	2013/08/08
		KR 10-2010-0037237 A	2010/04/09
		WO 2010-038965 A2	2010/04/08
		WO 2010-038965 A3	2010/07/22
US 2022-0211871 A1	2022/07/07	AU 2020-270984 A1	2021/12/02
		AU 2020-272974 A1	2021/11/11
		AU 2020-273182 A1	2021/12/02
		BR 112021019880 A2	2022/02/15
		BR 112021020183 A2	2022/03/03
		CA 3134841 A1	2020/10/15
		CA 3136004 A1	2020/10/15
		CA 3136117 A1	2020/10/15
		CN 114025806 A	2022/02/08
		CN 114026115 A	2022/02/08
		CN 114174324 A	2022/03/11
		EA 202192737 A1	2022/01/27
		EA 202192739 A1	2022/02/15
		EP 3952923 A1	2022/02/16
		EP 3953377 A1	2022/02/16
		EP 3953378 A1	2022/02/16
		IL 286582 A	2021/12/01
		IL 286582 D0	2021/12/01
		IL 286901 A	2021/10/31
		JP 2022-526021 A	2022/05/20
		JP 2022-526823 A	2022/05/26
		JP 2022-527015 A	2022/05/27
		KR 10-2021-0150486 A	2021/12/10
		KR 10-2021-0150487 A	2021/12/10
		KR 10-2022-0006527 A	2022/01/17
		MX 2021011958 A	2021/12/15
		MX 2021012184 A	2022/01/24
		MX 2021012467 A	2021/12/10
		US 2020-0332265 A1	2020/10/22
		US 2020-0338148 A1	2020/10/29
		WO 2020-210615 A1	2020/10/15
		WO 2020-210698 A1	2020/10/15
		WO 2020-210713 A1	2020/10/15
US 2017-0035860 A1	2017/02/09	없음	