



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년08월07일
 (11) 등록번호 10-1886029
 (24) 등록일자 2018년08월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 25/04* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-7011264
 (22) 출원일자(국제) 2011년09월30일
 심사청구일자 2016년09월29일
 (85) 번역문제출일자 2013년04월30일
 (65) 공개번호 10-2013-0108380
 (43) 공개일자 2013년10월02일
 (86) 국제출원번호 PCT/DK2011/050369
 (87) 국제공개번호 WO 2012/041328
 국제공개일자 2012년04월05일
 (30) 우선권주장
 61/390,791 2010년10월07일 미국(US)
 PA 2010 70423 2010년10월01일 덴마크(DK)
 (56) 선행기술조사문헌
 JP2007530064 A
 KR1020070012664 A*
 KR100823156 B1
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
호바 세라퓨틱스 에이피에스
 덴마크 2200 코펜하겐 올레 말레스 베이 3
 (72) 발명자
요한센 데이트 이.
 덴마크 디케이-2970 회르스홀름 스타텐겐 26
바홀베리 라르스 올리크
 미국 로드 아일랜드 02878 티버튼 리버사이드 디
 알. 259
에르겐센 에스페르 톨란
 덴마크 디케이-2000 프레데릭스베르 2. 티브이.
 마리엔달스베이 73
 (74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 51 항

심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 **무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및 헛통증의 치료를 위한 메테오린의 용도**

(57) 요약

본 발명은 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및 헛통증의 치료를 위한 메테오린의 용도에 관한 것이다. 바람직한 양태에서, 치료되는 장애는, 온도 및 촉각 무해자극통증을 포함하는, 무해자극통증 및 통각과민증, 보다 바람직하게는 무해자극통증이다.

명세서

청구범위

청구항 1

i) 서열번호 3의 아미노산 서열; 및

ii) 서열번호 3의 상기 아미노산 서열의 생물학적 활성 서열 변이체로서, 서열번호 3과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 변이체

로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 향신경성(neurotrophic) 폴리펩타이드를 포함하는,

무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증의 치료 방법에 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 향신경성 폴리펩타이드가 서열번호 3의 서열을 갖는 단백질에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는, 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 향신경성 폴리펩타이드가 서열번호 11의 컨센서스(consensus) 서열을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 향신경성 폴리펩타이드가 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 위치 7, 28, 59, 95, 148, 151, 161, 219, 243 및 265에서 시스테인 잔기를 갖는, 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 향신경성 폴리펩타이드가 변이체 폴리펩타이드이고, 이때 아미노산 치환이 보존적 치환인, 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 향신경성 폴리펩타이드가 분자내 시스테인 브릿지를 적어도 하나 형성할 수 있는, 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 치료에 의해 치료받는 피험자들 중의 적어도 일부에서 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 또는 헛통증이 실질적으로 완전히 회복되는, 약제학적 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 치료에 의해 치료받는 피험자들 중의 적어도 일부에서 질환 개변(disease modification)이 일어나는, 약제학적 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 무해자극통증 및/또는 통각과민증의 치료 방법에 사용되는, 약제학적 조성물.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 무해자극통증이 온도(thermal) 무해자극통증인, 약제학적 조성물.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 무해자극통증이 냉기(cold) 무해자극통증인, 약제학적 조성물.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 무해자극통증이 열기(heat) 무해자극통증인, 약제학적 조성물.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 무해자극통증이 기계적(mechanical) 무해자극통증인, 약제학적 조성물.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 치료가 자발통증을 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 치료가 통각과민증을 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 통각과민증이 온도 통각과민증인, 약제학적 조성물.

청구항 17

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 통각과민증이 냉기 통각과민증인, 약제학적 조성물.

청구항 18

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 통각과민증이 열기 통각과민증인, 약제학적 조성물.

청구항 19

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 통각과민증이 기계적 통각과민증인, 약제학적 조성물.

청구항 20

제1항 또는 제2항에 있어서, 치료받는 피험자가 체중 손실을 경험하지 않는, 약제학적 조성물.

청구항 21

제1항 또는 제2항에 있어서, 치료받는 피험자가 사람인, 약제학적 조성물.

청구항 22

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 전신 투여로 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 23

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 비경구 주사로 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 피하 주사 또는 수막강내(intrathecal) 주사로 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 25

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 치료가 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중 내지 10,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중의 투여량으로 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 투여가 매일 반복되는, 약제학적 조성물.

청구항 27

제25항에 있어서, 상기 투여가 주당 적어도 1 내지 3회 반복되는, 약제학적 조성물.

청구항 28

제1항 또는 제2항에 정의된 향신경성 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는, 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증의 치료 방법에 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 무해자극통증 및/또는 통각과민증의 치료 방법에 사용하기 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 30

제1항 또는 제2항의 향신경성 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 포함하는, 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증의 치료 방법에 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 핵산 분자에 작동적으로 연결된 프로모터를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 벡터가 알파바이러스, 아데노바이러스, 아데노-수반 바이러스, 배칼로바이러스, HSV, 코로나바이러스, 소유두종(bovine papilloma) 바이러스 및 Mo-MLV로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 33

제30항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 무해자극통증 및/또는 통각과민증의 치료 방법에 사용하기 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 34

제30항의 벡터로 형질전환되거나 형질도입된 세포주를 포함하는, 무해자극통증, 통각과민증 및/또는 자발통증의 치료 방법에 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 세포가 사람 세포인, 약제학적 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 세포주가, 사람 신경 줄기 또는 전구 세포, 사람 아교 줄기 또는 전구 세포 및 태아 줄기 세포를 포함하는, 불멸화(immortalised) 망막 색소 상피 세포, 불멸화 사람 섬유모세포, 불멸화 사람 성상교 세포, 줄기 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 37

제35항에 있어서, 상기 세포주가 ARPE-19 세포인, 약제학적 조성물.

청구항 38

제34항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 무해자극통증 및/또는 통각과민증의 치료 방법에 사용하기 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 39

분비된 생물학적 활성 메테오린(meteorin)을 피험자에게 전달함으로써 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증의 치료 방법에 사용하기 위한 약제학적 조성물로서,

- i) 생체적합성 외막 및 내부 코어를 포함하고,
- ii) 상기 내부 코어가 제34항에 따른 세포를 포함하는 생체적합성 캡슐을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 생체적합성 막이 상기 화합물의 통과를 허용하는 반투과성 외막인, 약제학적 조성물.

청구항 41

제39항에 있어서, 상기 내부 코어가 매트릭스를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 42

제39항에 있어서, 상기 캡슐이 적어도 1 μ L의 캡슐 용적을 갖는 마이크로캡슐인, 약제학적 조성물.

청구항 43

제39항에 있어서, 10,000 내지 250,000개의 세포/ μ L 캡슐 용적을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 44

제39항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 무해자극통증 및/또는 통각과민증의 치료 방법에 사용하기 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 45

서열번호 3의 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 항신경성 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물로서, 신경병성 통증의 치료가 필요한 사람 피험자에게 주당 3회 또는 더 낮은 빈도로 투여하여 사람 피험자에서의 신경병성 통증 치료 방법에 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 투여가 매주 마다 또는 더 낮은 빈도로 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 47

제45항에 있어서, 상기 투여가 2주 마다 또는 더 낮은 빈도로 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 48

제45항에 있어서, 상기 치료의 치료 효과가 폴리펩타이드 투여 간의 전체 기간 동안 신경병성 통증의 적어도 하나의 증상을 개선시키는, 약제학적 조성물.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 증상이 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증, 헛통증, 작열, 저림, 전기, 핀 및 바늘로 인한 감각, 감각이상(paresthesia), 이상감각(dysesthesia), 경직, 사지 무감각(numbsness), 신체 뒤틀림(bodily distortion) 느낌 및 통각과민(hyperpathia)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 50

제45항에 있어서, 상기 치료가 폴리펩타이드 투여 간의 전체 기간 동안 상기 피험자의 혈청 중의 상기 폴리펩타이드의 측정가능한 수준을 유지하지 않는, 약제학적 조성물.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 피험자의 혈청 중의 상기 폴리펩타이드의 수준이 폴리펩타이드 투여 간에 10 ng/mL 이하로 감소하는, 약제학적 조성물.

- 청구항 52
- 삭제
- 청구항 53
- 삭제
- 청구항 54
- 삭제
- 청구항 55
- 삭제
- 청구항 56
- 삭제
- 청구항 57
- 삭제
- 청구항 58
- 삭제
- 청구항 59
- 삭제
- 청구항 60
- 삭제
- 청구항 61
- 삭제
- 청구항 62
- 삭제
- 청구항 63
- 삭제
- 청구항 64
- 삭제
- 청구항 65
- 삭제
- 청구항 66
- 삭제
- 청구항 67
- 삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 명세서, 또는 본 명세서에 인용된 모든 특허 및 비특허 문헌은 전문이 또한 참조로 본원에 포함된다. 본 명세서는 2010년 10월 7일자로 출원된 미국 특허원 제61/390,791호를 우선권으로 주장하며, 이의 내용이 참조로 본원에 포함된다.

[0002] **기술 분야**

[0003] 본원은 무해자극통증(allodynia), 통각과민증(hyperalgesia), 자발통증(spontaneous pain) 및 헛통증(phantom pain)의 치료를 위한 메테오린(meteorin)의 용도에 관한 것이다. 바람직한 양태에서, 치료될 장애는, 온도(thermal) 및 촉각(tactile) 무해자극통증을 포함한, 무해자극통증 및 통각과민증, 보다 바람직하게는 무해자극통증이다. 또 다른 바람직한 양태에서, 장애는 온도 통각과민증이다.

배경 기술

[0004] 비-스테로이드성 소염제(NSAID), 오피오이드, 항경련제, 항부정맥제, 트리사이클릭 항우울제 및 국소 제제를 포함한, 많은 치료요법이 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및 헛통증의 치료를 위해 다양한 성공도로 개발되었다. 대체 접근법은 마취 블럭, 스테로이드의 경막외 투여 및 신경외과적 병변을 포함한다. 그러나, 현재의 모든 치료요법은 대부분의 환자에서 그다지 크지 않은 효능을 가지며, 치유보다는 일시적인 처방이며, 이들의 부작용은 상당한 한계를 나타낸다.

[0005] 따라서, 바람직하게는 환자의 일반적 건강에 영향을 주지 않으면서 단지 적은 부작용으로, 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및 헛통증을 효과적으로 치료하는 치료요법이 매우 필요하다.

발명의 내용

[0006] **발명의 요약**

[0007] 본 발명은 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및 헛통증을 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 메테오린 단백질, 메테오린을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 메테오린을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 발현 벡터, 메테오린을 암호화하는 발현 벡터로 형질전환/형질감염된 세포주 또는 분비되는 메테오린을 전달하는 생체적합성 캡슐을 사용한다.

[0008] 따라서, 제1 국면에서, 본 발명은, 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증 치료 방법에 사용하기 위한, 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩타이드에 관한 것이다:

[0009] 상기 폴리펩타이드는

[0010] i) 서열 번호 3의 아미노산 서열;

- [0011] ii) 서열 번호 3의 상기 아미노산 서열의 생물학적 활성 서열 변이체(여기서, 상기 변이체는 서열 번호 3과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는다); 및
- [0012] iii) a) 또는 b)의 적어도 50개의 인접 아미노산의 생물학적 활성 단편(여기서, 상기 단편은 서열 번호 3과 적어도 70% 동일하다).
- [0013] 본 발명자들은 메테오린이 온도(thermal) 및 기계적(mechanical) 무해자극통증 및 자발통증(체중 부하 결함) 모두에 대한 동물 모델에서 무해자극통증을 경감시킬 수 있다는 것을 밝혀내었다. 중요하게도, 상기 동물은 실험 기간에 걸쳐 어떠한 체중 손실 또는 독성의 징후도 경험하지 않았으며, 어떠한 아픈 부작용도 관측되지 않았다. 긍정적 효과들이 수개의 상이한 무해자극통증 및 자발통증 모델에서 전신(피하) 및 국소(수막강내 (intrathecal)) 투여 둘 다를 사용하여 독립적으로 관측되었다.
- [0014] 추가의 국면에서, 본 발명은, 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증 치료 방법에 사용하기 위한, 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자에 관한 것이다:
- [0015] 상기 폴리펩타이드는
- [0016] i) 서열 번호 3의 아미노산 서열;
- [0017] ii) 서열 번호 3의 상기 아미노산 서열의 생물학적 활성 서열 변이체(여기서, 상기 변이체는 서열 번호 3과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는다); 및
- [0018] iii) a) 또는 b)의 적어도 50개의 인접 아미노산의 생물학적 활성 단편(여기서, 상기 단편은 서열 번호 3과 적어도 70% 동일하다).
- [0019] 추가의 국면에서, 본 발명은, 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증 치료 방법에 사용하기 위한, 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0020] 추가의 국면에서, 본 발명은, 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증 치료 방법에 사용하기 위한, 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 분리된 숙주 세포에 관한 것이다. 특히, 본 발명은, 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증 치료 방법에 사용하기 위한, 나출형(naked) 세포계 치료요법 또는 캡슐화된 세포 치료요법인 세포계 치료요법에 유용한, 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0021] 추가의 국면에서, 본 발명은 분비되는 생물학적 활성 메테오린을 피험자에게 전달함으로써 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증의 치료 방법에 사용하기 위한 이식가능한 생체적합성 캡슐에 관한 것으로서,
- [0022] i) 상기 캡슐은 생체적합성 외막 및 내부 코어를 포함하고,
- [0023] ii) 상기 내부 코어는 본 발명에 따른 세포를 포함하고,
- [0024] iii) 상기 세포는 본 발명에 따른 벡터를 포함한다.
- [0025] 추가의 국면에서, 본 발명은, 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증의 치료 방법에 사용하기 위한, 하기를 포함하는 조성물에 관한 것이다:
- [0026] i) 본 발명에 따른 분리된 폴리펩타이드;
- [0027] ii) 본 발명에 따른 분리된 핵산;
- [0028] iii) 본 발명에 따른 발현 벡터;
- [0029] iv) 본 발명에 따른 세포주; 또는
- [0030] v) 본 발명에 따른 이식가능한 생체적합성 캡슐.
- [0031] 추가의 국면에서, 본 발명은, 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증 치료용 약제를 제조하기 위한 하기의 용도에 관한 것이다:
- [0032] i) 본 발명에 따른 분리된 폴리펩타이드;
- [0033] ii) 본 발명에 따른 분리된 핵산;
- [0034] iii) 본 발명에 따른 발현 벡터;

[0035] iv) 본 발명에 따른 세포주; 및

[0036] v) 본 발명에 따른 이식가능한 생체적합성 캡슐.

[0037] 추가의 국면에서, 본 발명은 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증의 치료가 필요한 피험자에게 본 발명에 따른 분리된 폴리펩타이드의 치료학적 유효량을 투여함을 포함하는, 피험자에서 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증을 치료하는 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 좌골 신경 손상 후 폰 프레이 헤어즈(von Frey hairs)를 사용한 기계적 자극에 대한 동측(ipsilateral) 뒷발 움츠림 역치를 도시한다. 메테오린 치료는 용량-의존적으로 기계적 무해자극통증을 경감시킨다. 화살표는 치료 시점을 나타낸다. 데이터는 평균±SEM으로 나타내며, 스코어링은 맹검으로(blinded) 수행되었다. *p<0.05.

도 2는 좌골 신경 손상 후 냉기 자극에 대한 동측 뒷발 반응 스코어를 도시한다. 1은 무반응이고, 1은 정상 랫트에서 보여지는 놀람-유사 반응에 상응하며, 2 및 3은 경증 및 중증 통증 반응을 나타낸다. 메테오린 치료는 용량-의존적으로 냉기 무해자극통증을 경감시킨다. 화살표는 치료 시점을 나타낸다. 스코어링은 맹검으로 수행되었으며, 데이터는 평균±SEM으로 나타낸다. *p<0.05.

도 3은 좌골 신경 손상 랫트에서의 체중 변화를 도시한다. 모든 동물은 연구 동안 내내 정상적으로 체중이 늘었다. 화살표는 치료 시점을 나타낸다. 스코어링은 맹검으로 수행되었으며, 데이터는 평균±SEM으로 나타낸다. *p<0.05.

도 4는 CCI(만성 수축 손상) 후 랫트에서의 체중 부하 결함을 도시한다. 인커패시턴스 미터(incapitance meter)를 사용하여 각각의 뒷다리에 의해 적용되는 하향 힘(downward force)를 평가하였다. 수술 전, 모든 동물은 뒷다리 둘 다에 동일하게 체중이 실렸으므로 결함이 없었다. 12일 후, 치료 개시 직전, 동측 다리와 비교하여 약 50 g 이상이 반대측(contralateral) 다리에 실렸다. 메테오린 치료는 체중 부하 결함을 경감시킨다. 스코어링은 맹검으로 수행되었으며, 데이터는 평균±SEM으로 나타낸다. *p<0.05.

도 5는 CCI 랫트에서의 체중 변화를 도시한다. 모든 동물은 연구 동안 정상적으로 체중을 얻었다. 화살표는 치료 시점을 나타낸다. 스코어링은 맹검으로 수행되었으며, 데이터는 평균±SEM으로 나타낸다. *p<0.05.

도 6은 메테오린의 CLUSTAL W(1.82) 다수 서열 정렬을 도시한다.

도 6a는 사람(서열 번호 2), 랫트(서열 번호 9) 및 마우스(서열 번호 5)로부터의 메테오린 전구체의 정렬을 도시한다.

도 6b는 사람(서열 번호 3), 랫트(서열 번호 10) 및 마우스(서열 번호 6)로부터의 성숙한 메테오린의 정렬을 도시한다.

도 6c는 사람, 마우스 및 랫트 서열에서 완전히 보존된 잔기로부터 생성되는 성숙한 메테오린, 컨센서스 서열(서열 번호 11)을 도시한다. X는 DNA에 의해 암호화되는 21개 천연 발생 아미노산 중 어느 것을 나타낸다.

도 7은 CCI 랫트에서의 기계적 과민성에 대한 메테오린의 영향을 도시한다. 화살표는 동물이 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg 또는 1.8 mg/kg의 재조합 메테오린으로 또는 음성 대조군으로서 비히클로 전신 주사된 치료일을 나타낸다. 랫트를 폰 프레이 필라멘트를 사용하여 변형된 통각에 대해 시험하고, 그 결과를 평균±SEM로 표시하였다. *는 비히클 치료받은 동물과 비교한 유의적 차이(p<0.05)를 나타낸다.

도 8은 CCI 랫트에서의 온도 과민성에 대한 메테오린의 영향을 도시한다. 화살표는 동물이 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg 또는 1.8 mg/kg의 재조합 메테오린으로 또는 음성 대조군으로서 비히클로 전신 주사된 치료일을 나타낸다. 하그리브즈(Hargreaves) 디바이스를 사용하여 온도 움츠림 잠복기를 평가하고, 그 결과를 평균±SEM로 표시하였다. *는 1.8 mg/kg의 메테오린과 비히클 치료받은 동물 사이의 유의적 차이(p<0.05)를 나타낸다. #는 0.5 mg/kg의 메테오린과 비히클 치료받은 동물 사이의 유의적 차이(p<0.05)를 나타낸다. 메테오린은 상당히 용량-의존적으로 온도 무해자극통증을 감소시켰다.

도 9는 CCI 랫트에서의 차등 체중 부하에 대한 메테오린의 영향을 도시한다. 화살표는 동물이 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg 또는 1.8 mg/kg의 재조합 메테오린으로 또는 음성 대조군으로서 비히클로 전신 주사된 치료일을

나타낸다. 손상된 다리와 손상되지 않은 다리 사이의 차등 체중 부하를 인커퍼시턴스 미터를 사용하여 측정하고, 차이를 %로 나타내었다. 데이터는 평균±SEM로 나타낸다. *는 1.8 mg/kg의 메테오린과 비히클 치료받은 동물 사이의 유의적 차이(p<0.05)를 나타낸다. #는 0.5 mg/kg의 메테오린과 비히클 치료받은 동물 사이의 유의적 차이(p<0.05)를 나타낸다. \$는 0.1 mg/kg의 메테오린과 비히클 치료받은 동물 사이의 유의적 차이(p<0.05)를 나타낸다. 메테오린은 상당히 용량-의존적으로 체중 부하 결함을 감소시켰다.

도 10은 CCI 연구 동안의 동물 체중을 도시한다. 화살표는 동물이 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg 또는 1.8 mg/kg의 재조합 메테오린으로 또는 음성 대조군으로서 비히클로 전신 주사된 치료일을 나타낸다. 비히클과 비교하여 메테오린 치료군에서는 체중 변화가 없었다.

도 11은 전신 투여 후 랫트 혈청 중의 메테오린을 도시한다. 동물들을 39일(t=0)에 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg 또는 1.8 mg/kg의 재조합 메테오린으로 전신 주사하였다. 혈청 샘플은 주사 후 2, 6, 24시간에 수집하고, 메테오린 농도를 ELISA를 사용하여 측정하였다. 메테오린은 나이브(naive) 대조군 랫트로부터의 혈청 샘플에서 검출되지 않았다.

도 12는 허혈성 좌골 신경 손상 후 기계적 자극에 대한 발 움츠림 역치에 있어서 메테오린의 영향을 도시한다. 화살표는 수막강내 주사 시점을 나타낸다. 데이터는 평균±SEM로 나타낸다. *는 비히클과 6 µg 메테오린 사이의 유의적 차이(p<0.05)를 나타내고, #는 비히클과 2 µg 메테오린 사이의 유의적 차이(p<0.05)를 나타낸다.

도 13은 허혈성 좌골 신경 손상 후 냉기 자극에 대한 반응에 있어서 메테오린의 영향을 도시한다. 화살표는 수막강내 주사 시점을 나타낸다. 데이터는 평균±SEM로 나타낸다. *는 비히클과 6 µg 메테오린 사이의 유의적 차이(p<0.05)를 나타내고, #는 비히클과 2 µg 메테오린 사이의 유의적 차이(p<0.05)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0039] 정의
- [0040] 본원에서 사용되는 "생체적합성 캡슐"은, 캡슐을 숙주 포유동물에 이식하는 경우 이를 거부하거나, 예를 들어 분해(degradation)를 통해 수술을 불가능하게 하기에 충분한 유해한 숙주 반응을 유도하지 않는다는 것을 의미한다.
- [0041] 본원에서 사용되는 "암호화 서열"은 폴리펩타이드로 전사 및 해독되는 폴리뉴클레오타이드 서열이다.
- [0042] 본원에서 사용되는 "제어 서열"은 이들이 결합되는 암호화 및 비암호화 서열의 발현에 영향을 미치는데 필수적인 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 제어 서열은 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위 및 전사 종결 서열을 포함한다. 또한, "제어 서열"은 암호화 서열 내에 암호화된 펩타이드의 프로세싱을 제어하는 서열을 지칭한다; 이들은, 이로 제한됨이 없이, 펩타이드의 분비, 프로테아제 절단 및 글리코실화를 제어하는 서열을 포함할 수 있다. 용어 "제어 서열"은, 최소한도로, 이의 존재가 발현에 영향을 미칠 수 있는 성분을 포함하는 것으로 의도되며, 또한 이의 존재가 유리한 추가의 성분, 예를 들어 리더 서열(leader sequence) 및 융합 파트너 서열을 포함할 수 있다.
- [0043] 프로모터의 "하향 조절"은, 이식유전자(transgene) 생성물의 발현을, 생체내 이식 후 이식유전자 생성물의 유일한 생물학적 활성을 결여시킬 수 있는 수준으로 감소시키는 것을 의미한다. 본원에서 사용되는 "하향 조절에 적용되지 않는 프로모터"는, 포유동물 숙주에 생체내 이식 후, 이식유전자의 발현을 생물학적으로 활성인 수준으로 이끌거나 지속적으로 이끄는 프로모터를 의미한다.
- [0044] 본원에서 사용되는 용어 "발현 벡터"는 작동적으로 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있는 벡터를 지칭한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용성을 갖는 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태이다.
- [0045] 본원에서 사용되는 용어 "유전적 변형" 및 "유전자 조작"은 외인성 DNA의 의도적 도입에 의해 세포의 유전형을 안정적으로 또는 일시적으로 변형시키는 것을 지칭한다. DNA는 합성적으로 또는 천연적으로 유도될 수 있으며, 유전자, 유전자의 일부 또는 다른 유용한 DNA 서열을 함유할 수 있다. 용어 "유전적 변형"은 천연 바이러스 활성, 천연 유전자 재조합 등을 통해 생기는 것과 같은 천연 발생 변형을 포함하지 않는다.
- [0046] 본원에서 사용되는 "면역격리(immunoisulatory) 캡슐"은, 캡슐이 포유동물 숙주로 이식되었을 때 이의 코어 내에 있는 세포에 대한 숙주 면역계의 유해한 영향을 최소화하는 것을 의미한다.
- [0047] 본원에서 사용되는 "생물학적 활성 화합물의 장기간 안정적 발현"은, 1개월 초과, 바람직하게는 3개월 초과 및 가장 바람직하게는 6개월 초과 기간 동안 생물학적 활성 화합물의 유용한 생물학적 활성을 유지시키기에 충분

한 수준으로 생물학적 활성 화합물을 연속적으로 생산하는 것을 의미한다.

- [0048] "포유동물 프로모터"는 포유동물 세포에서 기능할 수 있는 프로모터를 의도한다.
- [0049] 본원에서 사용되는 메테오린은, 천연, 합성, 반합성 또는 재조합인 임의의 공급원으로부터의, 임의의 종, 특히 포유동물(침팬지, 소, 양, 돼지, 뮤린(murine), 말 및 바람직하게는 사람을 포함)로부터 취득되는 실질적으로 정제된 메테오린의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 지칭한다. 또한, 이 용어는 이들 중 중 임의의 것으로부터 취득되는 메테오린의 생물학적 활성 단편 및 이들의 생물학적 활성 서열 변이체 및 번역후 변형된 단백질질을 지칭한다.
- [0050] 본원에서 사용되는 성장 인자 특성은, 표적 세포에서 증식을 포함한 성장, 분화, 생존, 재생, 이동, 기능 회복, 기능 영양 서포트, 예를 들어 향신경성(neurotrophic) 서포트의 개선 중 하나 이상의 반응을 일으키도록 수용체를 통해 표적 세포에 대해 작용하는 분비되는 단백질인, 종래의 성장 인자와 유사한 서열-관련된 특징을 정의한다.
- [0051] 본원에서 사용되는 용어 "작동적으로-연결된"은, 관심 뉴클레오타이드 서열이(예를 들어, 시험관내 전사/번역 시스템에서 또는 벡터가 숙주 세포에 도입되는 경우 숙주 세포에서) 재조합 발현 벡터 내의 조절 서열(들)에 뉴클레오타이드 서열의 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된다는 것을 의미하는 것으로 의도된다.
- [0052] 본원에서 사용되는 용어 "조절 서열"은 프로모터, 인핸서 및 기타 발현 제어 요소(예를 들어, 폴리아데닐화 시그널)를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0053] "서열 동일성": 높은 수준의 서열 동일성은 제1 서열이 제2 서열로부터 유래된다는 가능성을 나타낸다. 아미노산 서열 동일성은 2개의 정렬된 서열들 간의 동일한 아미노산 서열을 필요로 한다. 따라서, 참조 서열과 70% 아미노산 동일성을 갖는 후보 서열은, 정렬 후, 후보 서열에 있는 아미노산의 70%가 참조 서열에 있는 상응하는 아미노산과 동일할 것을 요구한다. 동일성은 컴퓨터 분석, 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, ClustalW 컴퓨터 정렬 프로그램[참조: Higgins D., Thompson J., Gibson T., Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673-4680] 및 이에 제시된 디폴트 파라미터를 이용하여 측정될 수 있다. ClustalW 소프트웨어는 <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>로부터 기관(the European Bioinformatics Institute)에서 ClustalW WWW Service로서 시판된다. 디폴트 세팅과 함께 이러한 프로그램을 사용하여, 의문의 폴리펩타이드 및 참조 폴리펩타이드의 성숙(생체활성) 부분을 정렬시킨다. 완전히 보존된 잔기의 수를 계수하고, 참조 폴리펩타이드의 길이로 나눈다.
- [0054] 유사하게, ClustalW 알고리즘은 뉴클레오타이드 서열을 정렬하는데 사용될 수 있다. 서열 동일성은 아미노산 서열에 대해 지시되는 바와 유사한 방식으로 계산될 수 있다.
- [0055] 본원에서 사용되는 용어 "피험자"는 메테오린 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드, 치료용 세포 또는 생체적 합성 캡슐이 투여될 수 있는 임의의 포유동물을 의미하고자 한다. 본 발명의 방법으로 구체적으로 치료하고자 하는 피험자는 사람 및 비사람 영장류, 양, 말, 소, 염소, 돼지, 개, 고양이, 토끼, 기니아 피그, 햄스터, 게르빌(gerbil), 랫트 및 마우스, 및 이들 숙주로부터 유도되거나 유래되는 기관, 종양 및 세포를 포함한다.
- [0056] 본원에서 사용되는 용어 "형질전환"은 외인성 폴리뉴클레오타이드(즉, "이식유전자")를 숙주 세포로 삽입하는 것을 지칭한다. 외인성 폴리뉴클레오타이드는 숙주 게놈 내로 통합된다.
- [0057] "치료"는 치유, 개선 및 예방을 포함한 수개의 상이한 방식으로 수행될 수 있다. 치유적 치료는 일반적으로, 치료받는 개체에 이미 존재하는, 임상적 상태, 예를 들어 질환 또는 감염을 치료하는 것을 목적인다. 개선 치료는 일반적으로 개체에서 기존의 임상적 상태를 호전시키고자 치료하는 것을 의미한다. 예방적 치료는 일반적으로 임상적 병태를 예방하거나 병태에 걸릴 위험을 감소시키거나 병태의 정도를 감소시키는 것을 목적인다.
- [0058] 치료는 질환의 근본적인 전개를 변경시킬 수 있다. "질환 개변(disease modification)"이 일어나는 치료요법은, 실제 질환 과정에 영향을 줌으로써, 증상의 진행을 지연시키거나 역전시키거나 방지하거나 질환의 장기간 경과를 변화시킬 수 있다.
- [0059] 본원에서 사용되는 용어 "벡터"는 이에 연결된 또 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 하나의 유형의 벡터는, 추가의 DNA 분절이 결합될 수 있는 고리형 이분쇄 DNA 루프를 지칭하는, "플라스미드"이다. 본원에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 플라스미드가 가장 일반적으로 사용되는 형태의 벡터이기 때문에 상호교환적

으로 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 하는 바이러스 벡터(예를 들어, 복제 결핍 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-수반(adeno-associated) 바이러스)와 같은 다른 형태의 발현 벡터를 포함하는 것으로 의도된다.

- [0060] **무해자극통증**
- [0061] "기타 통증"을 의미하는, 무해자극통증은 정상적으로는 통증을 유발하지 않는 자극에 의한 통증이며, 온도 또는 기계적/촉각적일 수 있다. 이는 정상적으로는 통증 감각을 이끌지 않는 자극으로부터의 통증이며, 손상 후 한 부위에서 발생할 수 있다. 무해자극통증은, 각각 "통각과민증" 및 "자발통증" 단락에서 기술되는, 통각과민증 및 자발통증과는 상이하다.
- [0062] 상이한 종류 및 유형의 무해자극통증이 있다:
- [0063] · 기계적 무해자극통증(촉각 무해자극통증으로도 공지됨)
- [0064] ○ 정적 기계적 무해자극통증 - 광 접촉/압력에 반응하는 통증
- [0065] ○ 동적 기계적 무해자극통증 - 브러싱에 반응하는 통증
- [0066] · 온도(열기 또는 냉기) 무해자극통증 - 환부에서 보통의 약한 피부 온도로부터의 통증
- [0067] 무해자극통증은 신경병증, 복합 부위 통증 증후군, 대상포진후 신경통, 섬유근육통 및 편두통과 같은 많은 통증 병태에 대한 임상적 특징이다. 또한, 무해자극통증은 척수 손상을 포함한 신경 손상을 치료하는데 사용되는 줄기 세포의 일부군에 의해서도 야기될 수 있다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 치료될 무해자극통증은 냉기 무해자극통증이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 양태에서, 치료될 무해자극통증은 열기 무해자극통증이다.
- [0068] 통각 및 기계적 감각에 수반되는 세포 유형이 무해자극통증에 책임이 있는 세포이다. 건강한 개체에서, 통각수용기는 세포 스트레스 또는 손상 및 피부 온도에 대한 정보를 감지하고, 이를 척수에 전달한다. 이들 뉴우런의 세포체는 척수의 양측에 위치되는 중요한 구조물인 배근신경절에 위치된다. 이어서, 액손이 배각을 통과하여 제2 뉴우런과 연결된다. 제2 뉴우런은 척수의 다른 측(반대측)으로 크로스 오버(cross over)하고, 시상의 핵에 도달한다. 이곳으로부터 정보가 하나 이상의 뉴우런을 통해 뇌의 체성감각 피질로 옮겨진다. 기계수용체도 동일한 일반적 경로를 따른다. 그러나, 이들은 척수의 수준에서가 아닌 하부의 연수에서 크로스 오버한다. 또한, 이들은 통각수용 트랙과는 공간적으로 떨어진 트랙에서 그룹화된다.
- [0069] 이러한 해부학적 분리에도 불구하고, 기계수용체는 동일한 개재뉴우런(이의 활성화는 통증 감각을 감소시키거나 완전히 제거시킬 수 있다)과 연락함으로써 통각수용기의 산출에 영향을 끼칠 수 있다. 통증 정보의 전달을 조절하는 또 다른 방법은 뇌로부터의 하행 섬유를 통하는 것이다. 이들 섬유는 상이한 개재뉴우런을 통해 작용하며 통각수용기로부터 제2 뉴우런까지 정보를 전달하는 것을 차단한다.
- [0070] 통증 조절을 위한 이러한 기작 모두 무해자극통증의 병리에 연루되어 있다. 몇몇 연구는 척수에 대한 손상이 통각수용기, 기계수용체 및 개재뉴우런을 손실 및 재조직화시켜 기계수용체에 의해 통증 정보를 전달하게 한다고 제시한다. 상이한 연구는 손상 부위에서 하행 섬유의 출현을 보고한다. 이들 변화 모두 궁극적으로 척수 내의 회로에 영향을 끼치며, 변경된 시그널 밸런스가 아마도 무해자극통증과 연관된 강한 느낌의 통증을 이끌 것이다.
- [0071] 또한, 상이한 세포 유형도 무해자극통증과 연관되어 있다. 예를 들어, 시상 내의 소교세포가 제2 통각수용기의 특성을 변화시킴으로써 무해자극통증의 원인이 될 수 있다. 동일한 효과가 단구/대식구 및 T 림프구와 같은 면역계 세포의 보충에 의해 척수에서 성취된다.
- [0072] 이미 기술된 바와 같이, 통증 자극을 조절하는 하행 뉴우런이 있다. 이들 뉴우런 중 많은 수가 뇌줄기 내의 핵에서 기원하며, 중뇌의 수관주위회색질(PAG) 영역을 통과한다.
- [0073] 신체는, 특히 PAG의 수준에서, 통증을 제어(내인성 오피오이드의 방출)하는 추가의 기작을 갖는다. 엔케팔린, 엔도르핀 및 디노르핀을 PAG에서 방출하고 이러한 방식으로 이의 능력을 조절하여 통증 자극을 조절하는 뉴우런이 있다. 다른 뉴우런도 또한 이들의 내인성 오피오이드를 통증의 출처에서 방출할 수 있다. 이것이 일어나는 경우, 통각수용기로부터 제2 뉴우런으로의 통증 정보의 전달이 차단되고, 통증을 느낄 수 없다. 불행하게도, 이들 내인성 기작이 종종 무해자극통증을 앓는 사람에서 손상되고 비기능적이어서 약제의 투여가 필요하다.

[0074] 다수의 화합물이 무해자극통증으로부터 통증을 경감시킨다. 일부는 특정 유형의 무해자극통증에 대해 특이적이고, 다른 것들은 일반적이다. 이들은 비스테로이드성 소염제(NSAID), 오피오이드 및 상이한 이온 채널을 표적하는 화합물을 포함한다.

[0075] 본 발명은 무해자극통증의 치료를 위한 메테오린의 용도에 관한 것이다. 바람직하게는, 치료될 무해자극통증은 온도 무해자극통증이다.

[0076] 실시예 4에 의해 입증되는 바와 같이, 정상 감각 기능으로의 완전한 역전이 가장 높은 투여량의 메테오린(1.8 mg/kg)이 투여된 그룹의 동물 대다수에서 달성되었다. 따라서, 메테오린이 적어도 하나의 아집단(subset)의 치료받은 피험자에서 무해자극통증을 실질적으로 완전히 역전시킬 수 있다고 생각된다. 바람직한 양태에서, 치료에 의해 적어도 하나의 아집단의 치료받은 피험자에서 질환이 변형된다.

[0077] **통각과민증**

[0078] 통각과민증은 일반적으로 아픈 것으로 감지되는 자극에 대한 극심한 반응이다. 자극은 기계적/촉각 또는 온도일 수 있다.

[0079] 통각과민증은 무해자극통증과 같은 신경 손상과 관련된 다른 종류의 통증과 유사하며, 그 결과 "무해자극통증" 부에서 기술된 바와 같이 이러한 상태를 위한 표준 치료에 반응할 수 있다.

[0080] 하나의 양태에서, 본 발명은 통각과민증의 치료를 위한 메테오린의 용도에 관한 것이다. 바람직하게는, 치료될 통각과민증은 온도 통각과민증이다. 본 발명의 하나의 양태에서, 치료될 통각과민증은 냉기 통각과민증이다. 본 발명의 하나의 양태에서, 치료될 통각과민증은 열기 통각과민증이다. 상술된 바와 같이, 정상 감각 기능을 위한 실질적인 완전한 역전이 최고 투여량의 메테오린이 투여된 동물에서 달성되었다. 따라서, 메테오린이 적어도 하나의 아집단의 치료받은 피험자에서 통각과민증을 완전히 역전시킬 수 있다고 생각된다. 바람직한 양태에서, 치료에 의해 적어도 하나의 아집단의 치료받은 피험자에서 질환이 변형된다.

[0081] **자발통증**

[0082] 자발통증은 어떠한 계기도 없이 발생하는 통증으로 특징지어진다. 자발통증의 임상 증상은 핀 및 바늘 감각, 슈팅(shooting), 화상, 자상 및 발작(전기 쇼크와 유사) 통증(때때로 이상감각(dysesthesia) 및/또는 감각이상(paresthesia)과 연관됨)을 포함한다. 이상감각은 불쾌한 비정상적 촉각으로 정의되며, 이는 자발적으로 발생하는 일종의 통증으로 간주될 수 있다. 감각이상은 뚜렷한 장기간의 신체적 영향 없이 피험자의 피부가 저리거나 따끔거리거나 무감각한 감각으로 정의된다. 자발통증은 아마도 구심성 경로에서 뉴우런의 자발 활성화에 의해 야기되는 것일 수 있다.

[0083] 하나의 양태에서, 본 발명은 자발통증의 치료를 위한 메테오린의 용도에 관한 것이다. 따라서, 메테오린이 적어도 하나의 아집단의 치료받은 피험자에서 자발통증을 완전히 역전시킬 수 있다고 생각된다. 바람직한 양태에서, 치료에 의해 적어도 하나의 아집단의 치료받은 피험자에서 질환이 변형된다.

[0084] **헛통증**

[0085] 헛통증 감각은 사지 또는 몸의 신체 부분이 아닌 기관과 관련된 피험자가 경험하는 자각으로 기술된다. 헛통증의 감각은 가장 빈번하게는 팔 또는 다리의 절단 후 기록되나, 가슴 또는 내부 기관의 적출 후 발생할 수도 있다. 헛통증 감각은 개체마다 다양하다. 헛통증은 이동, 접촉, 온도, 압력 및 가려움과 관련된 감각으로 경험될 수 있다.

[0086] 하나의 양태에서, 본 발명은 헛통증의 치료를 위한 메테오린의 용도에 관한 것이다.

[0087] **무해자극통증 및 통각과민증의 원인**

[0088] 무해자극통증, 통각과민증 및 일반적으로 과민성은 다양한 장애로부터 발생할 수 있으며, 일부가 하기에 열거된다:

부류	위인의 서브-타입(sub-type)
이상성 기계적 손상	포괄 신경병증 신경 횡절단 척수 손상 수술 후 통증 헛 사지 통증 흉터 형성 좌골 신경통
대사 또는 영양	알콜성 신경병증 펠라그라 각기병 화상 발 증후군
바이러스	포진후 신경통 HIV/AIDS 통증
신독성	빈크리스틴 시스플라틴 탁솔 탈륨 비소 방사선 치료요법
질환 (비-바이러스)	당뇨병 약성 중양 다발성 경화증 삼차 신경통 결막-바레 증후군 파브리 질환 탄지에르 질환 맥관/혈관병증 아밀로이드 특발병
허혈	시상 증후군 뇌졸중후 통증
신경전달자 작용	복합 부위 통증 증후군

[0089]

[0090]

따라서, 하나의 양태에서, 본 발명은 상기 표에 열거된 장애를 갖는 것으로 진단된 피험자에서 무해자극통증, 통각과민증 또는 과민증의 치료에 관한 것이다. 바람직하게는, 본 발명은 고통스러운 당뇨병성 신경병증, 포진 후 신경통 또는 좌골 신경통을 갖는 것으로 진단된 피험자에서 과민증의 치료에 관한 것이다. 보다 바람직하게는, 본 발명은 고통스러운 당뇨병성 신경병증, 포진후 신경통 또는 좌골 신경통을 갖는 것으로 진단된 피험자에서 무해자극통증 또는 통각과민증의 치료에 관한 것이다. 보다 바람직한 양태에서, 본 발명은 고통스러운 당뇨병성 신경병증, 포진후 신경통 또는 좌골 신경통을 갖는 것으로 진단된 피험자에서 무해자극통증의 치료에 관한 것이다.

[0091]

무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증의 치료 방법

[0092]

하나의 양태에서, 본 발명은 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증의 치료를 위한 메테오린의 용도에 관한 것이다. 보다 바람직한 양태에서, 본 발명은 무해자극통증, 통각과민증 및/또는 자발통증의 치료를 위한 메테오린의 용도에 관한 것이다. 더욱더 바람직한 양태에서, 본 발명은 통각과민증 및/또는 무해자극통증의 치료를 위한 메테오린의 용도에 관한 것이다.

[0093]

바람직한 양태에서, 본 발명은 무해자극통증을 치료하기 위한 메테오린의 용도에 관한 것이다. 보다 바람직한 양태에서, 본 발명은 기계적 무해자극통증을 치료하기 위한 메테오린의 용도에 관한 것이다. 더욱더 바람직한 양태에서, 본 발명은 온도 무해자극통증을 치료하기 위한 메테오린의 용도에 관한 것이다. 더욱더 바람직한 양태에서, 본 발명은 냉기 무해자극통증을 치료하기 위한 메테오린의 용도에 관한 것이다. 더욱더 바람직한 양태에서, 본 발명은 열기 무해자극통증을 치료하기 위한 메테오린의 용도에 관한 것이다.

[0094]

또 다른 바람직한 양태에서, 본 발명은 자발통증을 치료하기 위한 메테오린의 용도에 관한 것이다.

[0095]

또 다른 바람직한 양태에서, 본 발명은 통각과민증을 치료하기 위한 메테오린의 용도에 관한 것이다. 보다 바람직한 양태에서, 본 발명은 기계적 통각과민증을 치료하기 위한 메테오린의 용도에 관한 것이다. 더욱더 바람직한 양태에서, 본 발명은 온도 통각과민증을 치료하기 위한 메테오린의 용도에 관한 것이다. 더욱더 바람직한 양태에서, 본 발명은 냉기 통각과민증을 치료하기 위한 메테오린의 용도에 관한 것이다. 더욱더 바람직한 양태에서, 본 발명은 열기 통각과민증을 치료하기 위한 메테오린의 용도에 관한 것이다.

[0096]

첨부된 실시예(실시예 4)는 특히 메테오린의 상대적으로 짧은 혈청 반감기에 비추어 봤을 때 메테오린의 효과가

오래 지속된다는 것을 입증한다(도 11). 이는, 메테오린이 통각과민증, 과민증, 무해자극통증 및 자발통증의 증상을 경감시킬 뿐만 아니라 근본적인 질환 또는 장애를 실제로 변형시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 따라서, 하나의 양태에서, 치료는 질환 개변이 일어나는 치료이다.

[0097] 또한, 실시예는 시험된 피험자가 이들의 감각 기능 이상의 완전한 역전을 경험하였다는 것을 입증한다. 따라서, 하나의 양태에서, 치료에 의해 적어도 하나의 아집단의 치료받은 피험자에서 감각 기능이상이 완전히 역전되고, 바람직하게는 무해자극통증이 완전히 역전되고, 보다 바람직하게는 촉각 무해자극통증이 완전히 역전된다. 또 다른 바람직한 양태에서, 치료에 의해 적어도 하나의 아집단의 치료받은 피험자에서 통각과민증이 실질적으로 완전히 역전된다.

[0098] **신경병성 통증의 치료**

[0099] 신경병성 통증은 몇몇 형태의 만성 통증을 포함하고 신체 조직보다는 신경의 기능이상으로부터 초래되는 범주의 통증이다. 중추 또는 말초 신경계의 기능이상으로부터 유래되는 통증인 신경병성 통증은 또한 말초 신경 또는 중추 신경계 영역의 손상에 따른 결과이거나, 질환으로부터 생기거나, 특발병일 수 있다. 신경병성 통증의 증상은 화상 감각, 저림, 전기, 핀 및 바늘, 감각이상, 이상감각, 경직, 사지 무감각(numbsness), 신체 변형 느낌, 무해자극통증(정상적으로 무해한 자극에 의해 유발되는 통증), 통각과민증(통증에 대한 비정상적 감수성), 통각과민(hyperpathia)(통증 자극에 멈춘 후 오랫동안 지속되는 과장된 통증 반응), 헛통증 및 자발통증을 포함한다.

[0100] 신경병성 통증의 관리를 위한 최근의 치료요법이 많은 환자에게 제한된 이점을 가지며 바람직하지 못한 부작용 또는 용량-제한적 독성을 포함한다. 또한, 최근 치료요법은 대증요법이며, 질환을 변형시키는 것이 아니다. 신경병성 통증을 관리 및 치료하기 위한 개선된 치료요법, 특히 질환을 변형시키는 능력을 갖는 치료요법이 필요하다.

[0101] 일련의 동물 연구에서, 본 발명자들은 메테오린 투여량들의 투여로 자발통증뿐만 아니라 촉각 및 온도 무해자극 통증이 오랫동안 지속적으로 개선된다는 것을 관측하였다. 몇몇 사례에서, 치료 효과는 마지막 투여량을 투여한 지 1주일 후 동물에서 여전히 검출가능하다. 또 다른 사례에서, 치료 효과는 마지막 투여량을 투여한 지 2주 또는 심지어 3주와 같이 오랫동안 여전히 검출가능하고 대조군 치료와는 유의하게 상이하다.

[0102] 관측 사례에서, 메테오린 폴리펩타이드는 9일 또는 11일 동안 2일 또는 3일마다 피하 또는 수막강내 주사로 전달되었다. 메테오린은 피하 주사한 지 24시간 후 동물의 혈청에서 검출가능하지 않았다. 따라서, 사용된 관측 투여 계획 하에서 메테오린에 대한 어떠한 빌드업(build-up)도 불가능할 것이다. 메테오린의 장기간 지속 효과는 동물에서 후생적 변화에 의하거나 신경 손상의 복구에 의해 야기될 수 있다. 복구는 기능 회복, 신경형성 또는 뉴우린 전구체의 분화를 통할 수 있다.

[0103] 어떠한 경우에도 치료를 중단한 후 그렇게 오랫동안 치료 효과가 관측될 수 있었다는 것은 매우 놀라운 것이다. 승인된 신경병성 통증 약물, 예를 들어 가바펜틴, 세로토닌-노르에피네프린 재흡수 억제제, 트리사이클릭 항우울제, 통증 킬러, 칸나비노이드 및 오피오이드에서, 치료 효과는 최종 투여량의 투여 후 그렇게 길지 않다. 예를 들어, 오피오이드의 경우, 효능은 혈청 중에 존재하는 약물의 여부에 따른다. 약물 드롭의 혈청 수준이 특정 역치 미만일 경우, 치료 효과는 관찰되지 않는다.

[0104] 본 발명자들은 긴 투여 간격으로 투여된 메테오린이 온도 및 촉각 무해자극통증 및 자발통증을 포함한 상이한 유형의 신경병성 통증의 상이한 증상들을 치료하는데 효과적이라는 것을 입증하였으므로, 신경병성 통증이 일반적으로 상대적으로 긴 투여 간격으로 메테오린 폴리펩타이드를 투여함으로써 치료될 수 있다고 생각한다.

[0105] 상대적으로 긴 투여 간격은, 투여들 간 적어도 2일, 예를 들어 투여들 간 적어도 3일, 예를 들어 주당 2회 투여로 의도된다. 보다 바람직하게는, 긴 투여 간격은 적어도 1주, 예를 들어 적어도 2주, 보다 바람직하게는 적어도 3주, 예를 들어 적어도 4주 또는 적어도 1개월이다.

[0106] 달리 표현하여, 투여 간격은, 일 용량의 메테오린 폴리펩타이드 투여 후 다음 투여량의 메테오린 폴리펩타이드가 투여되는 때 치료될 피험자의 혈청 중에서 폴리펩타이드가 더 이상 검출가능하지 않을 정도로 길다. 또 다른 양태에서, 혈청 수준은 10 ng/mL 미만, 예를 들어 5 ng/mL 미만, 보다 바람직하게는 1 ng/mL 미만, 예를 들어 0.5 ng/mL 미만, 예를 들어 0.1 ng/mL 미만이다.

[0107] 일부 양태에서, 긴 투여 범위에 앞서 메테오린의 보다 잦은 초기 투여, 예를 들어 1일 2회, 1일 1회, 2일 1회,

3일 1회 또는 4일 1회의 투여가 있다. 이러한 초기 투여 스케줄은, 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 14, 21일 이상 동안 유지될 수 있다. 이러한 투여 스케줄을 마친 후, 메테오린은 덜 빈번하게, 예를 들어 상술된 바와 같이 투여될 수 있다.

- [0108] 따라서, 하나의 국면에서, 본 발명은 서열 번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 향신경성 폴리펩타이드의 치료학적 유효량을 신경병성 통증의 치료가 필요한 사람 피험자에게 투여함을 포함하여 피험자에서 신경병성 통증을 치료하는 방법에 관한 것이며, 상기 투여는 주당 3회 또는 더 낮은 빈도로 투여된다.
- [0109] 바람직하게는, 투여는 매주 마다 또는 더 낮은 빈도로 투여된다. 보다 바람직하게는, 투여는 2주 마다 또는 더 낮은 빈도로 투여된다.
- [0110] 하나의 양태에서, 상기 치료의 치료 효과는 폴리펩타이드 투여들 간의 전체 기간 동안 신경병성 통증의 적어도 하나의 증상을 개선한다. 적어도 하나의 증상은 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증, 헛통증, 화상 감각, 저림, 전기, 핀 및 바늘, 감각이상, 이상감각, 경직, 사지 무감각, 신체 변형 느낌 및 통각과민(통증 자극이 멈춘 후 오랫동안 지속되는 과장된 통증 반응)으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 적어도 하나의 증상은 무해자극통증, 통각과민증 및 자발통증으로부터 선택된다. 보다 바람직하게는 무해자극통증이다.
- [0111] 바람직하게는, 상기 치료는 폴리펩타이드 투여들 간의 전체 기간 동안 상기 피험자의 혈청 중의 상기 폴리펩타이드의 측정가능한 수준을 유지하지 않는다.
- [0112] 바람직하게는, 상기 피험자의 혈청 중 상기 폴리펩타이드의 수준은 폴리펩타이드 투여들 간에 10 ng/mL 미만, 예를 들어 5 ng/mL 미만, 보다 바람직하게는 1 ng/mL 미만, 예를 들어 0.5 ng/mL 미만, 예를 들어 0.1 ng/mL 미만으로 감소한다.
- [0113] 또 다른 관련된 국면에서, 본 발명은 서열 번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 향신경성 폴리펩타이드의 치료학적 유효량을 신경병성 통증의 치료가 필요한 사람 피험자에게 투여함을 포함하여 상기 피험자에서 신경병성 통증을 치료하는 방법에 관한 것이며, 상기 치료는 폴리펩타이드 투여들 간의 전체 간격 동안 상기 피험자의 혈청 중의 상기 폴리펩타이드의 측정가능한 수준을 유지하지 않는다.
- [0114] 또한, 본 발명은 신경병성 통증의 상기 치료 방법에서 본 발명의 폴리펩타이드의 용도 및 상기 신경병성 통증의 치료를 위한 약제의 제조에서 본 발명의 폴리펩타이드의 용도에 관한 것이다.
- [0115] 바람직하게는, 상기 피험자의 혈청 중 상기 폴리펩타이드의 수준은 폴리펩타이드 투여들 간에 10 ng/mL 미만, 예를 들어 5 ng/mL 미만, 보다 바람직하게는 1 ng/mL 미만, 예를 들어 0.5 ng/mL 미만, 예를 들어 0.1 ng/mL 미만으로 감소한다.
- [0116] 긴 투여 간격을 이용하는 신경병성 통증의 치료와 관련된 본 발명의 이러한 국면에 대해, 향신경성 폴리펩타이드는 바람직하게는 서열 번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 85%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0117] 하나의 양태에서, 향신경성 폴리펩타이드는 서열 번호 11의 컨센서스(consensus) 서열을 포함한다.
- [0118] 바람직하게는, 향신경성 폴리펩타이드는 서열 번호 3의 아미노산 서열에 대해 위치 7, 28, 59, 95, 148, 151, 161, 219, 243 및 265에서 시스템인 잔기를 갖는다.
- [0119] **메테오린**
- [0120] 본 발명은 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증의 치료에 있어서의 메테오린 단백질로 확인되는 폴리펩타이드 및 이러한 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 용도에 관한 것이다. 하나의 양태에서, 피험자에게 분비되는 생물학적 활성 메테오린 및/또는 이의 상동체를 전달하기 위해 캡슐을 사용하는 전달이 고려된다. 메테오린 단백질은 사람(서열 번호 2), 마우스(서열 번호 5) 및 랫트(서열 번호 8) 및 다양한 다른 종들에서 확인되었다.
- [0121] 사람 메테오린은 293개 아미노산 전구체로서 존재하며, 이는 적어도 하나의 생물학적 활성 펩타이드를 생성하도록

록 프로세싱될 수 있다. 메테오린은 신경계 및 눈 및 특히 뇌의 아영역(subregion)에서 높은 수준으로 발현된다. 마우스(서열 번호 5) 및 랫트(서열 번호 8) 메테오린 전구체는 291개의 아미노산으로 구성되며, 사람 메테오린 단백질(서열 번호 2)과의 동일성(%)은 각각 80.3 및 80.2이다(도 6 참조).

[0122] 사람 메테오린은 23개 아미노산의 N-말단 시그널 펩타이드 서열을 함유하며, 이는 서열 모티프 ARA-GY에서 절단된다. 이러한 시그널 펩타이드 절단 부위는 SignalP 방법으로 예측된다. 마우스 메테오린의 N-말단은 N-말단 서열분석에 의해 확인되었다[참조: Jorgensen et al., Characterization of meteorin - An evolutionary conserved neurotrophic factor, J mol Neurosci 2009 Sep; 39(1-2): 104-116].

[0123] 표 1은 전체 길이의 사람 메테오린 대 마우스 및 랫트 서열 간의 서열 동일성(%)을 나타낸다. 도 6a의 정렬을 참조한다.

표 1

서열	동일성 %
사람	-
마우스	80.3
랫트	80.2

[0125] 표 2는 N-말단 시그널 펩타이드의 제거 후 사람 메테오린 대 마우스 및 랫트 서열 간의 서열 동일성(%)을 나타낸다. 도 6b의 정렬을 참조한다.

표 2

서열	동일성 %
사람	-
마우스	81.9
랫트	79.6

[0127] 완전히 보존된 잔기에 기초하여, 성숙한 메테오린의 컨센서스 서열이 유도될 수 있으며(도 6c), 여기서 X는 DNA에 의해 암호화되는 21개의 천연 발생 아미노산 중 임의의 것으로부터 독립적으로 선택된다. 바람직한 양태에서, 변이체 메테오린은 컨센서스 서열을 포함한다.

[0128] 메테오린의 치료 효과는 향신경성 효과, 증식을 포함한 성장에 대한 효과, 재생, 기능 회복, 기능 개선, 생존, 이동 및/또는 표적 세포의 분화를 통해 매개될 수 있다.

[0129] 메테오린의 하나의 생물학적 기능은 문헌[참조: Jorgensen et al., Characterization of meteorin - An evolutionary conserved neurotrophic factor, J mol Neurosci 2009 Sep; 39(1-2): 104-116 and Nishino et al., "Meteorin: a secret3ed protein that regulates glial cell differentitaion and promotes axonal extension", EMBO J., 23(9):1998-2008(2004)]에 기술되어 있는 바와 같이 해리된 배근신경절(DRG) 배양물에서 신경돌기 증식을 유도하는 능력이다.

[0130] 시스테인의 높은 보존 때문에, 이들 잔기가 생체활성 단백질의 2차 및 3차 구조에 중요한 역할을 하는 것으로 예측된다. 하나 이상의 시스테인이 분자내 및/또는 분자간 시스틴-브릿지 형성에 참여할 수 있다.

[0131] 메테오린이 사람 신경 줄기 세포주(hNS1, 이전에는 HNSC.100이라 불림)에 의해 생성되는 뉴우런의 비율(%)에 고무적인 효과를 갖고 또한 랫트 선조체 세포(striatal cell)의 일차 배양물에서 뉴우런의 생성에 고무적인 효과를 갖는다는 것이 입증되었다[참조: 국제 특허 출원 공보 제WO 2005/095450호].

[0132] 투여 및 제형화

[0133] 메테오린 폴리펩타이드는 의학적으로 허용되는 임의의 방식으로 투여될 수 있다. 이러한 방식은 비경구 경로, 예를 들어 정맥내, 혈관내, 동맥내, 피하, 근육내, 종양내, 복강내, 심실내, 경막외내(intraepidural), 수막강내, 뇌실내, 뇌내 등 및 코 경로에 의한 주사, 또는 국소 경로를 포함할 수 있다. 데포(depot) 주사 또는 침식 가능 이식물과 같은 수단에 의한 서방출 투여도 또한 본 발명에 특별히 포함된다.

- [0134] 본 발명에 따른 메테오린의 투여는 하기를 포함하는 임의의 적합한 전달 수단을 사용하여 달성될 수 있다:
- [0135] 피하, 정맥내, 동맥내, 근육내, 수막강내 또는 다른 적합한 부위로의 주사,
- [0136] 펌프[참조: Annals of Pharmacotherapy, 27:912(1993); Cancer, 41:1270(1993); Cancer Research, 44:1698(1984), 본원에 참조로 포함됨],
- [0137] 마이크로캡슐화[참조: 예를 들어, 미국 특허 제4,352,883호; 제4,353,888호; 및 제5,084,350호, 본원에 참조로 포함됨],
- [0138] 서방출 중합체 이식물[참조: 예를 들어, Sabel의 미국 특허 제4,883,666호, 본원에 참조로 포함됨],
- [0139] 캡슐화된 세포("생체적합성 캡슐" 참조),
- [0140] 비캡슐화된 세포 이식편[참조: 예를 들어, 미국 특허 제5,082,670호 및 제5,618,531호, 각각 본원에 참조로 포함됨]; 및
- [0141] 흡입.
- [0142] 투여는 하나의 볼루스(bolus)의 제제를 주기적 주사에 의해 수행하거나 외부 저장기(예를 들어, IV 백) 또는 내부 저장기(예를 들어, 생체부식성 이식물, 생체합성 기관, 메테오린 생성 세포의 생체적합성 캡슐 또는 이식된 메테오린 생성 세포의 콜로니)로부터 정맥내 또는 복강내 투여에 의해 더욱 연속적으로 수행될 수 있다[참조: 예를 들어, 미국 특허 공보 제US 4,407,957호, 제5,798,113호 및 제5,800,828호, 각각 본원에 참조로 포함됨].
- [0143] 카테터를 통한 전달과 같은 수단에 의해 하나 이상의 동맥에 국소 전달될 수 있다. 본 발명의 하나의 양태에서, 국소 전달은("생체적합성 캡슐"부에서 기술되는 바와 같이) 캡슐화된 세포를 사용하는 전달을 포함한다. 추가의 유형의 국소 전달은 통상적으로 주사되는 유전자 치료요법 벡터의 국소 전달을 포함한다.
- [0144] 본 발명의 바람직한 양태에서, 투여는 비경구 주사, 바람직하게는 피하 주사 또는 수막강내 주사이다.
- [0145] 본 발명의 화합물은 원료 화학물질로서 투여될 수 있으나, 이를 약제학적 제형의 형태로 존재하게 하는 것이 바람직하다. 약제학적 제형은 통상의 기술에 의해, 예를 들어 문헌[참조: Remington: The Science and Practice of Pharmacy 2005, Lippincott, Williams & Wilkins]에 기술되는 바와 같이 제조될 수 있다.
- [0146] 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"는 메테오린 폴리펩타이드의 적용을 용이하게 하도록 메테오린 폴리펩타이드와 배합되는 천연 또는 합성인 하나 이상의 유기 또는 무기 성분을 의미한다. 약제학적으로 허용되는 공지된 다른 수성 및 비-수성 등장성 멸균 용액 및 멸균 현탁액이 당업자에게 공지되어 있지만, 적합한 담체는 멸균 식염수를 포함한다.
- [0147] 본 발명의 화합물은 비경구 투여를 위해 제형화될 수 있으며, 임의로 첨가된 보존제와 함께 앰플, 미리-충진된 주사기, 소용적 주입물 또는 다용량 용기에 단위 용량 형태로 제조될 수 있다. 본 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 에멀전, 예를 들어 수성 폴리에틸렌 글리콜 중의 용액과 같은 형태를 취할 수 있다. 유성 또는 비-수성 담체, 희석제, 용매 또는 비히클의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 유(예를 들어, 올리브유) 및 주사가 가능한 유기산 에스테르(예를 들어, 에틸 올레레이트)를 포함하고, 보존제, 습윤제, 유화제 또는 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제제를 함유할 수 있다. 또는, 활성 성분은, 적합한 비히클, 예를 들어 멸균된 발열물질-비함유 물을 사용하여 사용 전에 구성되는, 멸균 고체의 무균 분리에 의해 수득되거나 용액으로부터 동결건조에 의해 수득되는 분말 형태일 수 있다.
- [0148] "유효량"은 질환, 퇴행 또는 손상 상태의 진행을 개선 또는 지연시킬 수 있는 양을 지칭한다. 유효량은 개별 기준에 기초하여 결정될 수 있으며, 부분적으로는 치료될 증상 및 목적하는 결과의 고려하에 기초할 것이다. 유효량은 이러한 인자 및 단지 통상의 실험을 사용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다.
- [0149] 리포솜 시스템은 임의의 다양한 단층 소포, 다층 소포 또는 안정한 다층 소포일 수 있으며, 당업자에게 널리 공지된 방법에 따라, 예를 들어 미국 특허 제5,169,637호, 제4,762,915호, 제5,000,958호 또는 제5,185,154호의 교시에 따라 제조되고 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 신규 폴리펩타이드 및 리포단백질로서의 다른 분비되는 폴리펩타이드는, 리포솜에 대한 이들의 결합을 증진시키기 위해 발현시키는 것이 바람직할 수 있다. 재조합 메테오린 단백질은, 예를 들어 CHO 세포로부터 면역친화성 크로마토그래피 또는 임의의 다른 편리한 방법으로 정제된 후, 리포솜과 혼합되고, 고효율로 리포솜에 포함된다. 리포솜-캡슐화된 단백질은 세포 성장 자극에 대

한 임의의 효과를 위해 시험관내에서 시험될 수 있다.

- [0150] 메테오린 폴리펩타이드의 서방출 투여를 필요로 하는 임의의 질환 또는 장애를 치료하는데 적합한 방출 특성을 갖는 제형으로의 메테오린 폴리펩타이드의 투여가 필요한 경우, 메테오린 폴리펩타이드의 마이크로캡슐화가 고려된다. 서방출을 위한 제조합 단백질의 마이크로캡슐화는 사람 성장 호르몬(rhGH), 인터페론-(rhIFN-), 인터류킨-2 및 MN rgp120으로 성공적으로 수행되었다[참조: Johnson et al., Nat. Med., 2:795-799(1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27:1221-1223(1993); Hora et al., Bio/Technology, 8:755-758(1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds,(Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; 국제 특허 출원 공보 제WO 97/03692호, 제WO 96/40072호, 제WO 96/07399호; 및 미국 특허 공보 제 5,654,010호].
- [0151] 이들 단백질의 서방출 제형이, 폴리-락틱-코글리콜산(PLGA) 중합체의 생체적합성 및 광범위한 생분해성 특성에 기인하여 이를 이용하여 개발되었다. PLGA의 분해 생성물인 락트산과 글리콜산은 사람 신체에서 신속히 제거될 수 있다. 또한, 이러한 중합체의 분해성은 이의 분자량 및 조성에 따라 수개월 내지 수년으로 조절될 수 있다 [참조: Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer," in: M. Chasin and R. Langer(Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems(Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41].
- [0152] 본 발명의 하나의 양태에서, 메테오린을 포함하는 조성물이 고려된다. 본 조성물은 본원에서 기술되는 바와 같은 분리된 폴리펩타이드, 본원에서 기술되는 바와 같은 분리된 핵산, 본원에서 기술되는 바와 같은 메테오린 암호화 발현 벡터, 본원에서 기술되는 바와 같은 메테오린 발현 세포주 또는 본원에서 기술되는 바와 같은 메테오린을 분비하는 생체적합성 캡슐을 포함할 수 있다.
- [0153] **투여량**
- [0154] 전신 투여를 위한 다양한 투여 요법이 고려된다. 하나의 양태에서, 메테오린 폴리펩타이드를 포함하는 제형을 피험자에게 투여하는 방법은 용량당 1 µg/kg 피험자 체중 내지 10,000 µg/kg 피험자 체중의 투여량으로 메테오린을 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 양태에서, 투여량은 용량당 1 µg/kg 피험자 체중 내지 7,500 µg/kg 피험자 체중이다. 추가 양태에서, 투여량은 용량당 1 µg/kg 피험자 체중 내지 5,000 µg/kg 피험자 체중이다. 상이한 양태에서, 투여량은 용량당 1 µg/kg 피험자 체중 내지 2,000 µg/kg 피험자 체중이다. 또 다른 양태에서, 투여량은 용량당 1 µg/kg 피험자 체중 내지 1,000 µg/kg 피험자 체중이다. 또 다른 양태에서, 투여량은 용량당 1 µg/kg 피험자 체중 내지 700 µg/kg 피험자 체중이다. 보다 바람직한 양태에서, 투여량은 용량당 5 µg/kg 피험자 체중 내지 500 µg/kg 피험자 체중이다. 가장 바람직한 양태에서, 투여량은 용량당 10 µg/kg 피험자 체중 내지 100 µg/kg 피험자 체중이다. 바람직한 양태에서, 치료될 피험자는 사람이다.
- [0155] 특수 투여량 및 전달 방법에 대한 교시가 문헌[참조: 예를 들어, 국제 특허 출원 공보 제WO 02/78730호 및 제WO 07/100898호]에 제공되어 있다. 동물 실험에 사용된 투여량에 기초하여 사람 동등 투여량을 계산하는 것에 대한 교시가 문헌[참조: Reagan-Shaw et al., FASEB J, 22, 659-661(2007)]에 제공되어 있다.
- [0156] 투여되는 용량은 치료되는 개체의 연령, 체중 및 상태 및 투여 경로, 투여 형태 및 요법 및 목적하는 결과에 따라 주의 깊게 조절되어야 하며, 정확한 투여량은 의사에 의해 결정되어야 한다.
- [0157] 본 발명의 하나의 양태에서, 투여는 매일 반복된다. 또 다른 양태에서, 투여는 주당 적어도 1 내지 3회, 예를 들어 주당 2 내지 5회, 예를 들어 주당 3 내지 6회, 3일마다 1회, 4일마다 1회, 5일마다 1회, 6일마다 1회 또는 7일마다 1회 반복된다.
- [0158] 다른 양태에서, 메테오린은 상대적으로 긴 투여 간격으로 투여된다. 상대적으로 긴 투여 간격은, 투여들 간 적어도 2일, 예를 들어 투여들 간 적어도 3일, 예를 들어 주당 2회 투여를 포함하는 것이 의도된다. 보다 바람직하게는, 긴 투여 간격은 적어도 1주, 예를 들어 적어도 2주, 보다 바람직하게는 적어도 3주, 예를 들어 적어도 4주 또는 적어도 1개월이다.
- [0159] 달리 표현하여, 투여 간격은, 메테오린 폴리펩타이드의 하나의 투여량 후 다음 투여량이 투여되는 때 치료될 피험자의 혈청 중에서 폴리펩타이드가 더 이상 검출가능하지 않을 정도로 길다. 또 다른 양태에서, 혈청 수준은 10 ng/mL 미만, 예를 들어 5 ng/mL 미만, 보다 바람직하게는 1 ng/mL 미만, 예를 들어 0.5 ng/mL 미만, 예를

들어 0.1 ng/mL 미만이다.

- [0160] 일부 양태에서, 메테오린의 초기 투여는, 예를 들어 1일 2회, 1일 1회, 2일 1회, 3일 1회 또는 4일 1회이다. 이러한 투여 스케줄은, 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 14, 21일 이상 동안 유지될 수 있다. 이러한 투여 스케줄이 끝난 후, 메테오린은, 예를 들어 상술된 바와 같이, 덜 빈번하게 투여될 수 있다.
- [0161] **메테오린 폴리펩타이드**
- [0162] 본 발명은, 전체 길이의 메테오린, 실질적으로 전체 길이의 메테오린 및 프로-메테오린 이외에, 이 폴리펩타이드의 생물학적 활성 변이체를 제공한다. 메테오린 폴리펩타이드 또는 단편은 본원에서 기술되는 바와 같은 천연 발생 메테오린의 생물학적 활성, 예를 들어 향신경성을 나타내는 경우 생물학적으로 활성이다. 본 발명은 본원에서 정의되는 메테오린에 관한 것으로 이해될 것이다.
- [0163] 본 발명은, 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증 치료 방법에 사용하기 위한, 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩타이드 분자에 관한 것이다:
- [0164] a) 서열 번호 3, 6 및 9로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열;
- [0165] b) 서열 번호 3, 6 및 9에 대해 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는, 서열 번호 3, 6 및 9로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열의 생물학적 활성 서열 변이체; 및
- [0166] c) 서열 번호 3, 6 및 9와 적어도 70% 동일한, a) 또는 b)의 적어도 50개의 인접 아미노산의 생물학적 활성 단편.
- [0167] 하나의 양태에서, 본 발명은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 분리된 폴리펩타이드에 관한 것이다:
- [0168] i) 서열 번호 2의 AA₃₀-AA₂₈₈, 및 서열의 한쪽 끝 또는 양쪽 끝 모두에서 천연 서열로부터 1 내지 5개의 추가의 아미노산을 갖는, 서열 번호 2의 AA₂₅-AA₂₉₃까지의 폴리펩타이드;
- [0169] ii) 서열 번호 8의 AA₂₈-AA₂₈₆, 및 서열의 한쪽 끝 또는 양쪽 끝 모두에서 천연 서열로부터 1 내지 5개의 추가의 아미노산을 갖는, 서열 번호 8의 AA₂₃-AA₂₉₁까지의 폴리펩타이드;
- [0170] iii) 서열 번호 5의 AA₃₁-AA₂₈₉, 및 서열의 한쪽 끝 또는 양쪽 끝 모두에서 천연 서열로부터 1 내지 5개의 추가의 아미노산을 갖는, 서열 번호 5의 AA₂₆-AA₂₉₄까지의 폴리펩타이드; 및
- [0171] iv) 선택된 서열에서 지정된 임의의 아미노산이 상이한 아미노산으로 변화되고, 단 서열 내의 20개 이하의 아미노산 잔기가 변형되는, 상기 폴리펩타이드의 변이체.
- [0172] 생물학적 활성은 바람직하게는 향신경성 활성이다. 향신경성적으로 활성인 변이체는 WO 2005/095450에 기술된 시험관내 및/또는 생체내 향신경성 검사, 특히 DRG 검사에서 하나 이상의 다른 것을 참조하여 규정될 수 있다.
- [0173] 바람직한 생물학적 활성은 문헌[참조: Jorgensen et al., Characterization of meteorin - An evolutionary conserved neurotrophic factor, J mol Neurosci 2009 Sep; 39(1-2): 104-116]에 기술된 DRG 검사에서와 실질적으로 동일한 반응을 유도하는 능력이다. 이러한 검사에서 DRG 세포는 전체 길이의 사람 메테오린 암호화 서열(서열 번호 3)의 존재 하에서 성장된다. DRG 세포로부터 신경 돌기 증식이 문헌[참조: Jorgensen et al., Characterization of meteorin - An evolutionary conserved neurotrophic factor, J mol Neurosci 2009 Sep; 39(1-2): 104-116]에 기술된 DRG 검사에서 얻어진 수의 적어도 20%, 보다 바람직하게는 적어도 30%, 보다 바람직하게는 적어도 40%, 보다 바람직하게는 적어도 50%, 보다 바람직하게는 적어도 60%, 보다 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%인 것이 DRG 검사에서 실질적으로 동일한 반응으로 의도된다. 메테오린의 단편 또는 변이체의 생물학적 활성은 또한 천연 발생 메테오린(서열 번호 3)의 생물학적 활성보다 더 높을 수 있다.
- [0174] 변이체는 천연 발생 메테오린과는 아미노산 서열에서 또는 서열을 포함하지 않는 방식에서 또는 둘 다의 방식에서 상이할 수 있다. 아미노산 서열의 변이체("서열 변이체")는 천연 발생 메테오린의 하나 이상의 아미노산이 상이한 천연 아미노산, 아미노산 유도체 또는 비-천연 아미노산으로 치환되는 경우 생성된다. 특히 바람직한 변이체는, 서열이 통상적으로 단백질 또는 펩타이드의 2차 및 3차 구조 및 소수성 특성에 대해 최소한의 영향을

갖는 하나 이상의 보존적 및/또는 반-보존적 아미노산 치환에 의해 야생형 서열과 상이한, 천연 발생 메테오린 또는 이의 생물학적 활성 단편을 포함한다. 또한, 변이체는 메테오린 생물학적 활성을 없애지 않는 하나 이상의 비-보존적 아미노산 치환, 결실 또는 삽입에 의해 상이한 서열을 가질 수 있다. 도 6의 Clustal W 정렬을 사용하여 어떤 아미노산 잔기가 단백질의 생물학적 활성에 실질적으로 영향을 끼치지 않고 치환될 수 있는지 예측할 수 있다. 바람직한 양태에서, 변이체 메테오린 서열은 서열 번호 11을 갖는 컨센서스 서열을 포함한다.

- [0175] 하기 그룹(Clustal W, 'strong' conservation group) 내의 치환이 본 발명이 의미내에서 보존적 치환으로 간주될 수 있다.
- [0176] -S,T,A; N,E,Q,K; N,H,Q,K; N,D,E,Q; Q,H,R,K; M,I,L,V; M,I,L,F; H,Y; F,Y,W.
- [0177] 하기 그룹(Clustal W, 'week' conservation group) 내의 치환이 본 발명이 의미에서 반-보존적 치환으로 간주될 수 있다.
- [0178] -C,S,A; A,T,V; S,A,G; S,T,N,K; S,T,P,A; S,G,N,D; S,N,D,E,Q,K; N,D,E,Q,H,K; N,E,Q,H,R,K; V,L,I,M; H,F,Y.
- [0179] 본 발명 내의 다른 변이체는 펩타이드 안정성을 증가시키는 변형을 갖는 것들이다. 이러한 변이체는, 예를 들어 펩타이드 서열에 하나 이상의 비펩타이드 결합(이는 펩타이드 결합을 대체한다)을 함유할 수 있다. 또한, 천연 발생 L-아미노산 이외의 잔기, 예를 들어 D-아미노산 또는 비천연 발생 또는 합성 아미노산, 예를 들어 베타 또는 감마 아미노산 및 사이클릭 변이체를 포함하는 변이체가 포함된다. 폴리펩타이드로 L-아미노산 대신 D-아미노산의 포함은 프로테아제에 대한 이의 내성을 증가시킬 수 있다[참조: 미국 특허 공보 제US 5,219,990호]. 스플라이싱 변이체가 특별히 본 발명에 포함된다.
- [0180] 해당 치환 결과가 확실하게 예측되지 않을 수 있는 경우, 유도체는 향신경성 활성의 존재 또는 부재를 측정하기 위해 본원에 기술된 방법에 따라, 바람직하게는 예를 들어 문헌[참조: Jorgensen et al., Characterization of meteorin - An evolutionary conserved neurotrophic factor, J mol Neurosci 2009 Sep; 39(1-2): 104-116]에 기재된 DRG 검사를 사용하여 쉽게 검사될 수 있다.
- [0181] 하나의 양태에서, 폴리펩타이드는 서열 서열 번호 3, 6 및 9로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 서열의 천연 발생 대립형질 변이체이다. 이러한 폴리펩타이드는 서열 번호 1, 4 및 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열로부터의 단일 뉴클레오타이드가 상이한 핵산 서열의 해독물인 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0182] 하나의 양태에서, 본원에서 기술되는 변이체 폴리펩타이드는 선택된 서열 내에서 구체화된 임의의 아미노산이 보존적 치환을 제공하도록 변형된 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0183] 하나의 양태에서, 본 발명의 범위 내의 변이체는 사람, 뮤린(murine) 또는 랫트 메테오린(서열 번호 3, 6 및 9)과 적어도 70%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 펩타이드를 포함한다. 보다 바람직하게는, 서열 동일성은 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98 %이다.
- [0184] 바람직한 양태에서, 변이체 메테오린의 서열 동일성은 사람 메테오린 폴리펩타이드(서열 번호 3)를 참조하여 결정된다.
- [0185] 하나의 양태에서, 변이체는 서열 번호 3과 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98%의 서열동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 포함한다.
- [0186] 하나의 양태에서, 바람직한 변이체는 서열 번호 6과 적어도 70% 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 포함한다.
- [0187] 하나의 양태에서, 바람직한 변이체는 서열 번호 9와 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 포함한다.
- [0188] 하나의 양태에서, 메테오린의 바람직한 변이체는 50 내지 270개의 아미노산, 보다 바람직하게는 75 내지 270개

의 아미노산, 보다 바람직하게는 90 내지 270개의 아미노산, 보다 바람직하게는 100 내지 270개의 아미노산, 보다 바람직하게는 125 내지 270개의 아미노산, 보다 바람직하게는 150 내지 270개의 아미노산, 보다 바람직하게는 175 내지 270개의 아미노산, 보다 바람직하게는 200 내지 270개의 아미노산, 보다 바람직하게는 225 내지 270개의 아미노산, 보다 바람직하게는 250 내지 270개의 아미노산을 포함하는 단백질을 포함한다.

- [0189] 하나의 양태에서, 상응하는 위치에서 변이체 메테오린은 완전히 보존되는 잔기로서 도 6에 표시된 잔기를 포함하며(*), 보다 바람직하게는 변이체 메테오린은 또한 상응하는 위치에서 강력히 보존되는 잔기로서 도 6에 표시된 잔기를 포함한다(: 강력히 보존되는 그룹은 다음을 포함한다: S,T,A; N,E,Q,K; N,H,Q,K; N,D,E,Q; Q,H,R,K; M,I,L,V; M,I,L,F; H,Y; F,Y,W), 보다 바람직하게는, 변이체 메테오린은 또한 상응하는 위치에 덜 보존된 잔기로서 도 6에 표시된 잔기를 포함한다(. 덜 보존되는 그룹은 다음을 포함한다: C,S,A; A,T,V; S,A,G; S,T,N,K; S,T,P,A; S,G,N,D; S,N,D,E,Q,K; N,D,E,Q,H,K; N,E,Q,H,R,K; V,L,I,M; H,F,Y). 특히, 보존된 시스테인은 변이체 메테오린의 상응하는 위치에 두어야 한다는 것이 고려된다. 따라서, 하나의 양태에서, 변이체 메테오린 서열은 서열 번호 3의 아미노산 서열에 대해 위치 7, 28, 59, 95, 148, 151, 161, 219, 243 및 265에서 시스테인 잔기를 갖는다.
- [0190] 하나의 양태에서, 향신경성 폴리펩타이드는 서열 번호 11의 컨센서스 서열을 포함한다. 컨센서스 서열은 도 6에 도시되는 바와 같이 사람, 마우스 및 랫트 메테오린에서 보존되는 아미노산 잔기를 포함한다. 바람직하게는, 향신경성 폴리펩타이드는 서열 번호 3의 아미노산 서열에 대해 위치 7, 28, 59, 95, 148, 151, 161, 219, 243 및 265에서 시스테인 잔기를 갖는다.
- [0191] 비-서열 변형은, 예를 들어 천연 발생 메테오린의 부분들을 생체내 또는 시험관내 화학적 유도체화 및 아세틸화, 메틸화, 포스포릴화, 카복실화, PEG화 또는 글리코실화하는 것을 포함할 수 있다. 단백질의 치환체를 대체할 수 있는 것과 같이, 단백질에 결합된 작용기를 유사한 특성으로 특징지어지는 그룹으로 치환할 수도 있다. 이러한 변형은 1차 서열을 변경시키지 않는다. 이들은 원래 보존적일 것이며, 즉, 대체 그룹이 최초 그룹과 거의 동일한 크기, 모양, 소수성 및 전하를 가질 것이다.
- [0192] 말단 아미노산을 포함한 많은 아미노산들이 천연적 과정, 예를 들어 글리코실화 및 다른 해독 후 변형에 의하거나 당해 기술 분야에 널리 알려진 화학적 변형 기술에 의해 해당 폴리펩타이드에서 변형될 수 있다. 본 발명의 폴리펩타이드에 존재할 수 있는 공지된 변형 중에 예시를 소수만 들자면, 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유적 부착, 헴(heme) 모이어티(moiety)의 공유적 부착, 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 유도체의 공유적 부착, 지질 또는 지질 유도체의 공유적 부착, 포스포티딜이노시톨의 공유적 부착, 가교결합, 사이클화, 디설파이드 결합 형성, 탈메틸화, 공유적 가교결합의 형성, 시스테인의 형성, 피코글루타메이트의 형성, 포밀화, 감마-카복실화, 무효소당화(glycation), 글리코실화, GPI 앵커 형성, 하이드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 단백질해 프로세싱, 포스포릴화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황산화, 아미노산의 단백질로의 트랜스퍼-RNA 매개된 첨가, 예를 들어 아르기닐화 및 유비퀴틴화가 있다.
- [0193] 이러한 변형은 당업자에게 널리 알려져 있으며, 과학 문헌에 매우 상세히 기술되어 있다. 몇몇 특히 일반적인 변형, 예를 들어 글리코실화, 지질 부착, 황산화, 글루탐산 잔기의 감마-카복실화, 하이드록실화 및 ADP-리보실화가 대부분의 기본 교재, 예를 들어 문헌[참조: I. E. Creighton, Proteins-Structure and Molecular Properties, 2nd Ed., W. H. Freeman and Company, New York, 1993]에 기재되어 있다. 이러한 주제에 대한 많은 상세한 검토, 예를 들어 문헌[참조: 국제 특허 출원 공보 제W01d, F., in Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp 1-12, 1983; Seifter et al., Meth. Enzymol. 182: 626-646, 1990 and Rattan et al., Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging, Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48-62, 1992]에서 제공되는 검토가 이용가능하다.
- [0194] 또한, 단백질은, 후속 정제 및 임의로 엔도키프타다제를 사용한 태그(tag)의 제거가 가능하게 하는, 단백질 태그를 포함할 수 있다. 태그는 또한 태그의 후속적 제거를 용이하게 하기 위한 프로테아제 절단 부위를 포함할 수 있다. 친화성 태그의 비제한적 예는 폴리히스(polyhis) 태그, GST 태그, HA 태그, Flag 태그, C-myc 태그, HSV 태그, V5 태그, 말토스 결합 단백질 태그, 셀룰로즈 결합 도메인 태그를 포함한다. 바람직하게는, 생성 및 정제를 위한 태그는 폴리히스태크이다. 바람직하게는, 태그는 단백질의 C-말단부분에 있다.
- [0195] 메테오린의 천연 시그널 서열은 또한 다른 포유동물 세포 유형에서 재조합 생산되는 단백질의 분비를 증가시키기 위해 대체될 수 있다.
- [0196] 변형은 펩타이드 골격(backbone), 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카복실 말단을 포함하여 폴리펩타이드의 어디

에서든 일어날 수 있다. 사실, 공유적 변형에 의한 폴리펩타이드 내의 아미노 또는 카복실 그룹 또는 둘 다의 차단이 천연 발생 폴리펩타이드 및 합성 폴리펩타이드에서 일반적이며, 이러한 변형이 본 발명의 폴리펩타이드에도 존재할 수 있다. 예를 들어, 단백질해 프로세싱 전, 이. 콜라이(E.Coli)에서 만들어진 폴리펩타이드의 아미노 말단 잔기는 거의 예외없이 N-포르밀메티오닌일 것이다.

[0197] 폴리펩타이드에 발생하는 변형은 종종 변형이 만들어지는 방식의 기능일 것이다. 예를 들어, 숙주에서 클로닝된 유전자를 발현시켜 제조되는 폴리펩타이드에 대해, 변형의 특성 및 정도의 많은 부분이 숙주 세포의 해독 후 변형 능력 및 폴리펩타이드 아미노산 서열에 존재하는 변형 시그널에 의해 결정될 것이다. 예를 들어, 글리코실화는 종종 세균 숙주, 예를 들어 이. 콜라이에서는 일어나지 않는다. 따라서, 글리코실화가 요구되는 경우, 폴리펩타이드는 글리코실화 숙주, 일반적으로 진핵세포에서 발현되어야 한다. 곤충 세포는 종종 포유동물 세포와 동일한 해독 후 글리코실화를 수행하며, 이러한 이유 때문에 특히 글리코실화의 천연적 패턴을 갖는 포유동물 단백질을 효과적으로 발현시키기 위해 곤충 세포 발현 시스템이 개발되었다. 유사한 고려사항들을 다른 변형에 적용한다.

[0198] 동일한 유형의 변형이 해당 폴리펩타이드 내의 수개의 부위들에 동일하거나 변동되는 정도로 존재할 수 있다는 것이 명백할 것이다. 또한, 해당 폴리펩타이드는 많은 유형의 변형들을 함유할 수 있다.

[0199] 일반적으로, 본원에서 사용되는 용어 폴리펩타이드는 모든 이러한 변형, 특히 숙주 세포에서 폴리뉴클레오타이드를 발현시켜 합성된 폴리펩타이드에 존재하는 변형을 포함한다.

[0200] **메테오린 뉴클레오타이드 서열**

[0201] 본 발명은, 예를 들어 사람 cDNA 뉴클레오타이드 서열(서열 번호 1 및 10), 마우스 cDNA 서열(서열 번호 4) 및 랫트 cDNA 서열(서열 번호 7)을 포함한, 메테오린을 암호화하는 게놈 DNA 및 cDNA의 의학적 용도를 제공한다.

[0202] 이들 서열의 변이체도 또한 본 발명의 범위에 포함된다.

[0203] 본 발명은 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증 치료 방법에 사용하기 위한, 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자에 관한 것이다:

[0204] i) 서열 번호 3의 아미노산 서열;

[0205] ii) 서열 번호 3과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는, 서열 번호 3의 아미노산 서열의 생물학적 활성 서열 변이체; 및

[0206] iii) 서열 번호 3과 적어도 70% 동일한, i) 또는 ii)의 적어도 50개의 인접 아미노산의 생물학적 활성 단편.

[0207] 하나의 양태에서, 본 발명은 무해자극통증, 통각과민증, 자발통증 및/또는 헛통증 치료 방법에 사용하기 위한, 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산 분자에 관한 것이다:

[0208] i) 서열 번호 2의 AA₃₀-AA₂₈₈, 및 서열의 한쪽 끝 또는 양쪽 끝 모두에서 천연 서열로부터 1 내지 5개의 추가의 아미노산을 갖는, 서열 번호 2의 AA₂₅-AA₂₉₃까지의 폴리펩타이드;

[0209] ii) 서열 번호 8의 AA₂₈-AA₂₈₆, 및 서열의 한쪽 끝 또는 양쪽 끝 모두에서 천연 서열로부터 1 내지 5개의 추가의 아미노산을 갖는, 서열 번호 8의 AA₂₃-AA₂₉₁까지의 폴리펩타이드;

[0210] iii) 서열 번호 5의 AA₃₁-AA₂₈₉, 및 서열의 한쪽 끝 또는 양쪽 끝 모두에서 천연 서열로부터 1 내지 5개의 추가의 아미노산을 갖는, 서열 번호 5의 AA₂₆-AA₂₉₄까지의 폴리펩타이드; 및

[0211] iv) 선택된 서열에서 지정된 임의의 아미노산이 상이한 아미노산으로 변화되고, 단 서열 내의 20개 이하의 아미노산 잔기가 변형되는, 상기 폴리펩타이드의 변이체.

[0212] 핵산 분자는 천연 발생 대립형질 핵산 변이체의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

[0213] 본 발명의 핵산 분자는 천연 발생 폴리펩타이드 변이체의 폴리펩타이드 서열을 갖는 변이체 폴리펩타이드를 암

호화할 수 있다.

- [0214] 하나의 양태에서, 핵산 분자는 서열 번호 1, 4, 7 및 10으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열과 하나의 뉴클레오타이드가 상이하다.
- [0215] 바람직하게는, 암호화되는 폴리펩타이드는 서열 번호 3으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 서열에 대해 적어도 60% 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 65% 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 70% 서열 동일성, 보다 바람직하게는, 75% 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 80% 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 85% 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 90% 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 95% 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 98% 서열 동일성을 가지며, 보다 바람직하게는 상기 폴리펩타이드는 상기 서열번호 3으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖는다. 상기 서열은 사람 메테오린을 구성한다.
- [0216] 바람직한 양태에서, 암호화되는 폴리펩타이드는 서열 번호 11을 갖는 컨센서스 서열을 포함한다.
- [0217] 바람직한 양태에서, 암호화되는 폴리펩타이드는 서열 번호 3에 대해 적어도 70% 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98%의 서열 동일성을 가지며, 보다 바람직하게는 상기 폴리펩타이드는 서열 번호 3의 서열을 갖는다.
- [0218] 하나의 국면에서, 핵산 분자는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다:
- [0219] a) 서열 번호 1, 4, 7 및 10으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열;
- [0220] b) 서열 번호 1, 4, 7 및 10으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열; 및
- [0221] c) 서열 번호 1, 4, 7 및 10으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 서열의 적어도 150개의 인접 뉴클레오타이드의 핵산 서열.
- [0222] 하나의 양태에서, 본 발명의 분리된 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호 1로 제시되는 폴리뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 60%, 보다 바람직하게는 적어도 65%, 보다 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 서열 동일성을 갖는다.
- [0223] 하나의 바람직한 양태에서, 본 발명의 분리된 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호 10으로 제시되는 폴리뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60%, 보다 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 서열 동일성을 갖는다.
- [0224] 하나의 양태에서, 본 발명의 바람직한 분리된 폴리뉴클레오타이드 변이체는 150 내지 900 핵산, 보다 바람직하게는 175 내지 900 핵산, 보다 바람직하게는 200 내지 900 핵산, 보다 바람직하게는 225 내지 900 핵산, 보다 바람직하게는 250 내지 900 핵산, 보다 바람직하게는 300 내지 900 핵산, 보다 바람직하게는 350 내지 900 핵산, 보다 바람직하게는 400 내지 900 핵산, 보다 바람직하게는 450 내지 900 핵산, 보다 바람직하게는 500 내지 900 핵산, 보다 바람직하게는 550 내지 900 핵산, 보다 바람직하게는 600 내지 900 핵산, 보다 바람직하게는 650 내지 900 핵산, 보다 바람직하게는 700 내지 900 핵산, 보다 바람직하게는 750 내지 900 핵산, 보다 바람직하게는 800 내지 900 핵산, 보다 바람직하게는 850 내지 900 핵산을 포함한다.
- [0225] 분리된 폴리뉴클레오타이드의 바람직한 그룹은 사람 메테오린 cDNA 서열인 서열 번호 1 및 10을 포함한다. 일반적으로, cDNA 서열은 게놈 서열보다 훨씬 짧고, 적합한 발현 벡터로 보다 쉽게 삽입되며, 생체내 또는 생체외에서 생산 세포 또는 사람 세포로 형질도입/형질감염된다.
- [0226] 또한, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 이들 서열의 유도체인 서열을 포함한다. 또한, 본 발명은 이들 서열 중 하나 또는 이들 서열 중 하나의 유도체를 포함하는 벡터, 리포솜 및 다른 캐리어 비히클을 포함한다. 또한, 본 발명은, 이로 제한됨이 없이, 사람 메테오린 및 유도체 및 변이체를 포함하는, 메테오린 cDNA, 바람직하게는 사람 메테오린 cDNA로부터 전사되고 해독된 단백질을 포함한다.
- [0227] 또한, 이, 콜라이, 효모 종, 차이니스 햄스터, 베이비 햄스터, 곤충, 진균 및 사람을 포함하고 이로 제한되지 않는, 선택된 숙주 세포에서 향상된 발현을 위한 코돈 최적화된 핵산 분자가 고려된다.
- [0228] 변이체 핵산은 최신식의 돌연변이유발법에 의해 제조될 수 있다. 또한, 사람으로부터의 암호화 서열을 마우스,

랫트 또는 침팬지와 서플링하는 방법도 고려된다.

- [0229] 변이체 핵산은, 마우스 또는 랫트 메테오린에 존재하는 아미노산이 사람 메테오린에 존재하는 아미노산과 상이한 경우, 사람 메테오린에 존재하는 아미노산을 상응하는 위치에서 마우스 또는 랫트 메테오린에 존재하는 아미노산으로 교환함으로써 제조되었다.
- [0230] **바이러스 벡터**
- [0231] 대체로, 유전자 치료요법은 환자의 세포에 신규한 유전 물질을 전달하여 환자에게 치료학적 이점을 제공하기 위한 것이다. 이러한 이익에는 광범위한 질환, 장애 및 기타 병태의 치료 또는 예방이 포함된다.
- [0232] 생체의 유전자 치료요법 접근은 분리된 세포(줄기 세포, 신경 및 아교 전구세포 및 태아 줄기 세포)의 변형을 포함하는데, 이것은 후속적으로 환자에게 주입, 이식 또는 그 밖의 방식으로 이식된다[참조 미국 특허 제 4,868,116호, 제5,399,346호 및 제5,460,959호]. 생체내 유전자 치료요법은 생체내에서 숙주 환자 조직을 직접적으로 표적화하기 위함이다.
- [0233] 유전자 전달 벡터로서 유용한 바이러스에는 파포바바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 아데노-수반 바이러스, 헤르페스바이러스 및 레트로바이러스가 포함된다. 적합한 레트로바이러스에는 HIV, SIV, FIV, EIAV 및 MoMLV로 이루어진 그룹이 포함된다. 적합한 레트로바이러스의 추가 그룹은 HIV, SIV, FIV, EAIV 및 CIV로 이루어진 그룹을 포함한다. 바람직한 바이러스 벡터의 다른 그룹은 알파바이러스, 아데노바이러스, 아데노-수반 바이러스, 배큘로바이러스, HSV, 코로나바이러스, 소유두종(bovine papilloma) 바이러스, Mo-MLV로 이루어진 그룹을 포함하며, 바람직하게는 아데노-수반 바이러스이다.
- [0234] 신경계 장애의 치료에 바람직한 바이러스는 렌티바이러스 및 아데노-수반 바이러스이다. 이들 두 유형의 바이러스들은 모두 세포 분열 없이 게놈 내로 통합될 수 있고, 두 유형 모두 신경계, 특히 중추신경계의 징후에 대해 임상전(pre-clinical) 동물 연구에서 시험되었다.
- [0235] AAV 제조방법은 당해 분야, 예를 들어 미국 특허 제5,677,158호에 기술되어 있다. 미국 특허 제6,309,634호 및 제6,683,058호에는 중추신경계로 AAV를 전달하는 예시가 기술되어 있다.
- [0236] 바람직하게는, 렌티바이러스 벡터는 복제-결합 렌티바이러스 입자이다. 이러한 렌티바이러스 입자는 5' 렌티바이러스 LTR, tRNA 결합 부위, 패키징 시그널, 상기 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 시그널에 작동가능하게 연결된 프로모터, 제2 쇠 DNA 합성 오리진 및 3' 렌티바이러스 LTR을 포함하는 렌티바이러스 벡터로부터 생성될 수 있다. 렌티바이러스의 제조방법 및 신경세포로의 렌티바이러스의 생체내 투여 방법이 미국 특허 제20020037281호(렌티바이러스 벡터를 이용한 신경 세포의 형질도입 방법)에 기술되어 있다.
- [0237] 레트로바이러스 벡터는 사람의 임상 시험에 가장 일반적으로 사용되는 벡터이며, 이는 이들 벡터가 7 내지 8kb를 운반하고, 세포 감염력이 있으며, 숙주 세포에 높은 효율로 안정되게 통합되는 유전 물질을 지니고 있기 때문이다[참조: 국제 특허 출원 공보 제WO 95/30761호; 제WO 95/24929호]. 종양바이러스(oncovirinae)는 외인성 핵산 서열을 환자에게 전달 및 통합시키기 위해 적어도 1회의 표적 세포 증식을 필요로 한다. 레트로바이러스 벡터는 환자의 게놈으로 무작위적으로 통합된다. 신경계(특히, CNS)의 다른 세포에서는 세포 분열이 거의 일어나지 않기 때문에, 레트로바이러스를 사용하여 신경계의 줄기 세포를 표적할 수 있다.
- [0238] 레트로바이러스 입자의 세가지 부류는 다음과 같이 기술되었다: 무린 세포를 효율적으로 감염시킬 수 있는 동종 숙주역(ecotropic) 및 다수의 종의 세포를 감염시킬 수 있는 양종숙주역(amphotropic). 제3의 부류는 바이러스를 생산한 종과 다른 종의 세포를 감염시킬 수 있는 이종숙주역(xenotropic) 레트로바이러스를 포함한다. 분열성 세포의 게놈으로만 통합되는 이들의 능력은 레트로바이러스를 발생 연구에서 세포 계통을 표식하고, 치료학적 또는 자살 유전자를 암이나 종양으로 전달하기에 바람직한 바이러스가 되도록 하였다.
- [0239] 사람 환자에게 사용하기 위해서, 레트로바이러스 벡터는 복제 결합성이여야 한다. 이는 표적 조직 내에서 감염성 레트로바이러스 입자의 추가 생성을 방지하고, 대신에 복제-결합 벡터는 표적 세포 게놈으로 안정되게 통합된 "포획적(captive)" 이식유전자가 된다. 전형적으로, 복제-결합 벡터에는 gag, env 및 pol 유전자가(나머지 바이러스 게놈 대부분과 함께) 결실되어 있다. 결실된 바이러스 유전자 대신에 이중 DNA가 삽입된다. 이중 유전자는 내인성 이중 프로모터, 또는 표적 세포에서 활성인 다른 이중 프로모터, 또는 레트로바이러스 5' LTR(바이러스 LTR은 다양한 조직에서 활성이다)의 제어 하에 놓일 수 있다. 전형적으로, 레트로바이러스 벡터는 약 7

내지 8 kb의 이식유전자 수용력을 갖고 있다.

[0240] 복제-결합 레트로바이러스 벡터는, 예를 들어 유전자조작된 패키징 세포주로부터 복제 및 트랜스로의 어셈블리에 필요한 바이러스 단백질의 제공을 필요로 한다. 패키징 세포가 복제 적격(competent) 바이러스 및/또는 헬퍼 바이러스를 방출하지 않는다는 것이 중요하다. 이는, Ψ 시그널이 결합된 RNA로부터 바이러스 단백질을 발현시키고, 별도의 전사 단위로부터 gag/pol 유전자 및 env 유전자를 발현시켜 달성되었다. 또한, 몇몇 2세대 및 3세대 레트로바이러스에서 5' LTR은 이들 유전자의 발현을 제어하는 비-바이러스 프로모터로 치환되었고, 근접 프로모터만을 함유하기 위해 3' 프로모터가 최소화되었다. 이러한 고안은 복제 적격 벡터 또는 헬퍼 바이러스를 생산시키는 재조합 가능성을 최소화한다.

[0241] **발현 벡터**

[0242] 본 발명에 사용하기 위한 메테오린 폴리펩타이드의 재조합 발현용 벡터의 작제는 당해 분야의 숙련자에게 상세한 설명을 할 필요가 없는 통상적인 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 그러나, 검토를 위해 당해 분야의 숙련가는 문헌[참조: Maniatis et al., in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, (NY 1982)]의 참고를 원할 수 있다. 발현 벡터는, 의학적 사용을 위한 메테오린 폴리펩타이드의 재조합 생산용 생산자 세포를 제조하고, 나출형(naked) 또는 캡슐화 치료요법용 메테오린 폴리펩타이드를 분비하는 치료용 세포를 제조하기 위해 사용될 수 있다.

[0243] 간략히 설명하면, 재조합 발현 벡터의 작제는 표준 연결 기술을 이용한다. 작제된 벡터에서 정확한 서열을 확인하기 위한 분석의 경우, 예를 들어 메싱 등의 방법[참조: Messing, et al., *Nucleic Acids Res.*, 9: 309-, 1981], 막삼 등의 방법[참조: Maxam, et al., *Methods in Enzymology*, 65: 499, 1980] 또는 당해 분야의 숙련자에게 공지된 기타 적합한 방법을 이용하여 유전자를 서열분석한다.

[0244] 절단된 단편의 크기 분리는, 예를 들어 문헌[참조: Maniatis, et al., *Molecular Cloning*, pp. 133-134, 1982]에 기술되어 있는 바와 같은 통상적인 겔 전기영동법을 이용하여 수행된다.

[0245] 효과적인 발현 벡터의 제조를 위해, 이들은 암호화된 유전자를 정확한 판독 프레임에서 발현하기 위해 필수적인 조절 서열을 함유해야 한다. 유전자의 발현은 전사, 해독 또는 해독후 수준에서 제어된다. 전사 개시는 유전자 발현에 있어 초기의 중요한 사건이다. 이는 프로모터 및 인핸서 서열에 좌우되며 이들 서열과 상호작용하는 특정한 세포 인자에 의해 영향을 받는다. 많은 유전자의 전사 단위는 프로모터 및, 일부 경우, 인핸서 또는 조절 요소로 구성된다[참조: Banerji et al., *Cell* 27: 299(1981); Corden et al., *Science* 209: 1406(1980); 및 Breathnach and Chambon, *Ann. Rev. Biochem.* 50: 349(1981)]. 레트로바이러스의 경우, 레트로바이러스 게놈의 복제에 관여하는 제어 요소는 장말단 반복체(LTR)에 존재한다[참조: Weiss et al., eds., *The molecular biology of tumor viruses: RNA tumor viruses*, Cold Spring Harbor Laboratory, (NY 1982)]. 물론니 뮤린 백혈병 바이러스(MLV) 및 로우스 육종 바이러스(RSV) LTR은 프로모터 서열과 인핸서 서열을 함유한다[참조: Jolly et al., *Nucleic Acids Res.* 11: 1855(1983); Capecchi et al., In : *Enhancer and eukaryotic gene expression*, Gulzman and Shenk, eds., pp. 101-102, Cold Spring Harbor Laboratories(NY 1991)]. 다른 강력한 프로모터에는 사이토메갈로바이러스(CMV) 유래 프로모터 및 다른 야생형 바이러스 프로모터가 포함된다.

[0246] 또한, 수많은 비-바이러스성 프로모터들의 프로모터 및 인핸서 영역도 기술되어 있다[참조: Schmidt et al., *Nature* 314: 285(1985); Rossi and deCrombrugge, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84: 5590-5594(1987)]. 휴지 세포에서 이식유전자의 발현을 유지시키고 증가시키는 방법은 콜라겐 I형(1 및 2)[참조: Prockop and Kivirikko, *N. Eng. J. Med.* 311: 376(1984); Smith and Niles, *Biochem.* 19: 1820(1980); de Wet et al., *J. Biol. Chem.*, 258: 14385(1983)], SV40 및 LTR 프로모터를 포함하는 프로모터의 사용을 포함한다.

[0247] 본 발명의 한 양태에 따라, 상기 프로모터는 유비퀴틴 프로모터, CMV 프로모터, JeT 프로모터[참조: 미국 특허 제6,555,674호], SV40 프로모터, 신장 인자 1 알파 프로모터(EF1-알파), RSV, CAG로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 구성적 프로모터이다. 유도성/억제성 프로모터의 예에는 Tet-On, Tet-Off, 라파마이신 유도성 프로모터, Mx1, Mo-MLV-LTR, 프로게스테론, RU486이 포함된다.

[0248] 바람직한 프로모터의 그룹에는 CAG, CMV, 사람 UbiC, JeT, SV40, RSV, Tet-조절성 프로모터, Mo-MLV-LTR, Mx1, Mt1 및 EF-1 알파가 포함된다.

[0249] 이식유전자 발현을 유도하기 위해 바이러스성 및 비바이러스성 프로모터를 사용하는 것 외에도, 이식유전자 발

현의 수준을 증가시키기 위해 인헨서 서열을 사용할 수 있다. 인헨서는 이의 고유 유전자뿐만 아니라 일부 외래 유전자의 전사 활성을 증가시킬 수 있다[참조: Armelior, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 2702(1973)]. 예를 들어, 본 발명에서 콜라겐 인헨서 서열은 이식유전자 발현을 증가시키기 위해 콜라겐 프로모터 2(I)와 함께 사용될 수 있다. 또한, SV40 바이러스에서 발견되는 인헨서 요소를 사용하여 이식유전자 발현을 증가시킬 수 있다. 이러한 인헨서 서열은 문헌[참조; Gruss et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 943(1981); Benoist and Chambon, Nature 290: 304(1981), 및 Fromm and Berg, J. Mol. Appl. Genetics, 1: 457(1982); 모두 본원에 참조로 포함된다]에 기술되어 있는 바와 같이 72개 염기쌍 반복체로 구성되어 있다. 이러한 반복 서열은 각종 프로모터와 일렬로 존재하는 경우에 다수의 상이한 바이러스 및 세포 유전자의 전사를 증가시킬 수 있다[참조: Moreau et al., Nucleic Acids Res. 9: 6047(1981)].

[0250] 추가의 발현 향상 서열에는 우드처크(Woodchuck) 간염 바이러스 전사후 조절 요소, WPRE, SP163, CMV 인헨서 및 치킨[베타]-글로빈 인슐레이터 또는 기타 인슐레이터가 포함되나 이에 제한되지 않는다.

[0251] **세포주**

[0252] 하나의 국면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 벡터로 유전적으로 변형된 분리된 숙주 세포에 관한 것이다.

[0253] 또한, 본 발명은, 메테오린을 과발현하도록 유전적으로 변형되고 생체활성 메테오린 폴리펩타이드를 국소적으로 전달하도록 환자에게 이식될 수 있는, 나출형 또는 캡슐화된 세포를 통한 메테오린의 생체전달에 적합한 세포에 관한 것이다. 이러한 세포는 광범위하게 치료용 세포로 지칭될 수 있다.

[0254] 생체의 유전자 치료요법의 경우, 세포의 바람직한 그룹에는 신경세포, 신경 전구 세포, 신경 선조 세포, 신경 줄기 세포, 사람 아교 줄기 세포, 사람 전구 세포, 줄기 세포 및 태아 세포가 포함된다.

[0255] 캡슐화를 위한 바람직한 세포에는 ARPE-19 세포를 포함하는 망막 색소 상피 세포; 사람 불멸화(immortalised) 섬유모세포; 및 사람 불멸화 성상교세포가 포함된다.

[0256] ARPE-19 세포주는 캡슐화된 세포계 전달 기술을 위한 우수한 플랫폼 세포주이며, 또한 비캡슐화된 세포계 전달 기술에도 유용하게 사용된다. ARPE-19 세포주는 강건하다(즉, 이 세포주는 중추신경계 또는 안내 환경으로의 이식과 같은 엄중한 조건하에서 생존할 수 있다). ARPE-19 세포는 치료학적 관심의 물질을 분비하도록 유전적으로 변형될 수 있다. ARPE-19 세포는 수명이 비교적 길다. ARPE-19 세포는 사람 기원의 세포이다. 또한, 캡슐화된 ARPE-19 세포는 생체내 디바이스 생존능력이 양호하다. ARPE-19 세포는 유효량의 성장인자를 전달할 수 있다. ARPE-19 세포는 무시할만한 숙주 면역 반응을 유도한다. 더욱이, ARPE-19 세포는 비종양원성이다. ARPE-19 세포의 배양 및 캡슐화 방법은 미국 특허 제6,361,771호에 기술되어 있다.

[0257] 다른 양태에서, 치료용 세포주는 사람 섬유모세포 세포주, 사람 성상교세포 세포주, 사람 증뇌 세포주 및 사람 내피 세포주로 이루어진 그룹으로부터 선택되며, 바람직하게는 TERT, SV40T 또는 vmyc로 불멸화된 세포주이다.

[0258] **세포의 매트릭스**

[0259] 본 발명은 추가로 메테오린 생성 세포를 포유동물 신경계로 이식하기에 앞서 세포의 매트릭스 상에서 시험관내 배양하는 것을 포함한다. 이식 전 마이크로캐리어(microcarrier)에 세포를 예비부착시키는 것은 이식된 세포의 장기 생존능력을 향상시키고 장기간 기능상 이점을 제공하도록 고안된다.

[0260] 지지체 매트릭스를 구성할 수 있는 재료에는, 세포가 시험관내 항온배양 후 부착하여, 세포가 성장할 수 있으며, 이식 세포를 파괴하거나 또는 그렇지 않으면 이식 세포의 생물학적 또는 치료학적 활성을 방해하는 염증 반응이나 독성 반응을 유발함이 없이 포유동물 신체내로 이식될 수 있는 재료가 포함된다. 이러한 재료는 합성 또는 천연 화학 물질 또는 생물 기원의 물질일 수 있다.

[0261] 이러한 매트릭스 재료에는, 이에 제한됨 없이, 유리 및 기타 실리콘 산화물, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리비닐리덴 플루오라이드, 폴리우레탄, 폴리알기네이트, 폴리설폰, 폴리비닐 알코올, 아크릴로니트릴 중합체, 폴리아크릴아미드, 폴리카보네이트, 폴리펜텐트, 나일론, 아밀라제, 천연 및 변형 젤라틴 및 천연 또는 변형 콜라겐, 천연 및 변형 폴리사카라이드(덱스트란 및 셀룰로스(예를 들어, 니트로셀룰로스)를 포함), 한천 및 마그네타이트가 포함된다. 재흡수성 또는 비-재흡수성 재료가 사용될 수 있다. 또한, 당해 분야에 익히 공지된 세포의 매트릭스 재료도 사용될 수 있다. 세포의 매트릭스 재료는 시판되고 있거나, 이러한 매트릭스를

분비하는 세포를 성장시키고, 분비 세포를 분리시킨 다음, 이 세포를 매트릭스와 상호작용하고 매트릭스에 부착 되도록 이식함으로써 제조될 수 있다. 이식될 세포가 성장하는 매트릭스 재료 또는 세포와 혼합되는 매트릭스 재료는 RPE 세포의 고유 산물일 수 있다. 따라서, 예를 들어 매트릭스 재료는 이식될 RPE 세포에 의해 생성되고 분비되는 세포의 매트릭스 또는 기저 막 재료일 수 있다.

[0262] 세포 부착, 생존 및 기능을 개선하기 위해, 고체 매트릭스는 임의로 세포 부착, 성장 또는 생존을 촉진하는 것으로 당해 분야에 공지된 인자들로 외부 표면이 피복될 수 있다. 이러한 인자에는 세포 부착 분자, 세포의 매트릭스, 예를 들어 피브로넥틴, 라미닌, 콜라겐, 엘라스틴, 글리코사미노글리칸 또는 프로테오글리칸 또는 성장인자가 포함된다.

[0263] 또는, 이식된 세포가 부착되는 고체 매트릭스가 다공성 재료로 작제되는 경우, 성장 또는 생존 촉진 인자(들)를 매트릭스 재료에 포함시켜, 생체내 이식후 서서히 방출될 수 있게 할 수 있다.

[0264] 지지체의 형상은 비드처럼 구형인 것이 바람직하나, 원통형, 타원형, 평판 시트 또는 스트립, 바늘 또는 핀 모양 등일 수도 있다. 지지체 매트릭스의 바람직한 형태는 유리 비드이다. 다른 바람직한 비드는 폴리스티렌 비드이다.

[0265] 비드 크기는 직경이 약 10 μ m 내지 1mm 범위, 바람직하게는 약 90 μ m 내지 약 150 μ m 범위일 수 있다. 각종 마이크로캐리어 비드에 대한 설명은 문헌[참조: 예를 들어, Fisher Biotech Source 87-88, Fisher Scientific Co., 1987, pp. 72-75; Sigma Cell Culture Catalog, Sigma Chemical Co., St. Louis, 1991, pp. 162-163; Ventrex Product Catalog, Ventrex Laboratories, 1989; 이들 문헌은 본원에 참고로 포함된다]을 참조한다. 비드 크기의 상한 한계는, 이식된 세포의 기능을 방해하거나 주위 조직에 손상을 유발할 수 있는, 비드에 의한 부적절한 숙주 반응의 자극에 의해 좌우될 수 있다. 또한, 비드 크기의 상한 한계는 투여 방법에 의해서도 좌우될 수 있다. 이러한 한계는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0266] **생체적합성 캡슐**

[0267] 하나의 국면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 벡터로 유전적으로 변형되는 분리된 숙주 세포를 포함하는 생체적합성 캡슐에 관한 것이다.

[0268] 캡슐화된 세포 생체 전달 치료요법은 숙주에게 이식하기 전에 세포를 반투과성 생체적합성 물질로 둘러싸으로써 수용 숙주의 면역계로부터 세포를 분리시킨다는 개념에 근거한다. 본 발명은 세포가 면역분리성 캡슐에 캡슐화된 캡슐을 포함한다. 마이크로다공성 막으로 형성된 이식용 중합체 캡슐 내에 세포를 봉입시킴으로써 세포를 숙주로부터 면역분리시킨다. 이러한 접근법은 숙주와 이식된 조직 사이의 세포간 접촉을 방지하여 직접적 제시를 통한 항원 인식을 배제시킨다.

[0269] 하기에 캡슐로 지칭되는 세포 캡슐은 분자량에 근거하여 성장 인자 호르몬, 신경전달자, 펩타이드, 항체 및 보체와 같은 분자의 확산을 제어할 수 있도록 가공된 막을 갖는다[참조: Lysaght et al., 56 J. Cell Biochem. 196(1996), Colton, 14 Trends Biotechnol. 158(1996)]. 캡슐화 기술을 이용하면, 면역억제성 약물의 사용 여부에 관계없이, 세포를 면역 거부없이 숙주에 이식할 수 있다. 유용한 생체적합성 중합체 캡슐은 일반적으로 액체 매질에 현탁되어 있거나 고정화 매트릭스에 고정화되어 있는 세포를 함유하는 코어, 및 분리된 세포를 함유하지 않고 생체적합성이며 유해한 면역학적 공격으로부터 코어 중의 세포를 방어하기에 충분한 투과선택성 매트릭스 또는 막("재킷")의 주위 또는 주변 영역을 함유한다. 캡슐화는 면역계의 요소가 캡슐로 유입되는 것을 방해하여 캡슐화된 세포를 면역 파괴로부터 보호한다. 또한, 캡슐 막의 반투과성은 관심의 생물학적 활성 분자가 캡슐로부터 주위 숙주 조직으로 용이하게 확산되게 하며, 영양소가 용이하게 캡슐로 확산되고 캡슐화된 세포를 지지하게 한다. 캡슐은 생체적합성 물질로 제조될 수 있다. "생체적합성 물질"이란, 숙주에 이식된 후, 캡슐 거부를 초래하거나, 예를 들어 분해를 통해 수행이 불가하도록 하기에 충분한 유해 숙주 반응을 유도하지 않는 물질이다. 생체적합성 물질은 거대 분자, 예를 들어 숙주 면역계의 성분에 대해서는 비교적 비투과성이지만, 작은 분자, 예를 들면 인슐린, 성장인자 및 영양소에 대해서는 투과성이며, 대사 폐기물은 제거시킨다. 본 발명의 조성물을 통해 성장 인자를 전달하기에 적합한 다양한 생체적합성 물질이 있다. 다양한 외부 표면 형태와 기타 기계적 및 구조적 특징을 갖는 다수의 생체적합성 물질이 공지되어 있다. 바람직하게는, 본 발명의 캡슐은 본원에서 참고로 포함되는 국제 특허 출원 공보 제WO 92/19195호, 제WO 95/05452호 또는 제WO 2005/095450호; 또는 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 제5,639,275호; 제5,653,975호; 제4,892,538호; 제5,156,844호; 제5,283,187호; 또는 제5,550,050호에 기술되어 있는 것과 유사할 것이다.

- [0270] 이러한 캡슐은 숙주 면역계의 유해 효과를 최소화하면서 대사물질, 영양소 및 치료학적 물질을 통과시킨다. 생체적합성 물질의 성분은 주위 반투과성 막 및 내부 세포-지지 스캐폴딩(scaffolding)을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 제조할 세포는 스캐폴딩에 씨딩되고, 투과선택성 막에 의해 캡슐화된다. 필라멘트형 세포-지지 스캐폴드는 아크릴, 폴리에스테르, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리아세토니트릴, 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 나일론, 폴리아미드, 폴리우레탄, 폴리부테스테르, 실크, 면, 키틴, 탄소 또는 생체적합성 금속으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 임의의 생체적합성 물질로 제조될 수 있다. 또한, 세포 이식용으로는 결합된 섬유 구조체를 사용할 수 있다[참조: 미국 특허 제5,512,600호]. 생체분해성 중합체에는 폴리(락트산) PLA, 폴리(락트-코글리콜산) PLGA 및 폴리(글리콜산) PGA 및 이의 등가물로 구성된 중합체가 포함된다. 이식되는 세포가 부착될 수 있는 표면을 제공하기 위해 폼(foam) 스캐폴드가 사용되었다[참조: 국제 특허 출원 공보 제WO2005/095450호 및 제WO 98/05304호]. 제조된 망상 튜브는 혈관 이식편으로서 사용되었다[참조: 국제 특허 출원 공보 제WO 99/52573호]. 또한, 코어는 세포의 위치를 안정화시키는, 하이드로겔로부터 형성된 고정화 매트릭스로 구성될 수 있다. 하이드로겔은 실질적으로 물로 구성된, 겔 형태의 가교 결합된 친수성 중합체의 3차원 네트워크이다.
- [0271] 재킷은 바람직하게는 분자량으로 정의되는 분자량 컷오프를 가지며, 여기서 막(재킷)은 1000 kD 미만, 보다 바람직하게는 50 내지 700 kD, 보다 바람직하게는 70 내지 300 kD, 보다 바람직하게는 70 내지 150 kD, 예를 들어 70 내지 130 kD의 용질을 90% 거부할 것이다. 분자량 컷오프는, 환자의 면역계로부터 캡슐화된 세포는 보호하면서 생체활성 분자는 캡슐로부터 빠져나올 수 있도록 선택되어야 한다.
- [0272] 재킷의 두께는 통상적으로 2 내지 200 마이크로미터, 보다 바람직하게는 50 내지 150 마이크로미터의 범위이다. 재킷은 캡슐이 세포의 캡슐화를 유지하기에 충분한 강도를 제공하는 두께를 가져야 하며, 가능한 한 적은 공간을 차지하도록 가능한 한 얇아야 한다.
- [0273] 주위 반투과성 막의 제조에 다양한 중합체 및 중합체 블렌드를 사용할 수 있으며, 예에는 폴리아크릴레이트(아크릴 공중합체 포함), 폴리비닐리덴, 폴리비닐 클로라이드 공중합체, 폴리우레탄, 폴리스티렌, 폴리아미드, 셀룰로스 아세테이트, 셀룰로스 니트레이트, 폴리설폰(폴리에테르 설폰 포함), 폴리포스파젠, 폴리아크릴로니트릴, 폴리(아크릴로니트릴/코비닐 클로라이드)뿐만 아니라, 이의 유도체, 공중합체 및 혼합물이 포함된다. 바람직하게는, 이러한 주위 반투과성 막은 생체적합성 반투과성 중공 섬유막이다. 이러한 막 및 이의 제조방법은 미국 특허 제5,284,761호 및 제5,158,881호에 기술되어 있다. 또한, 주위 반투과성 막은 미국 특허 제4,976,859호 또는 미국 특허 제4,968,733호에 기술되어 있는 바와 같은 폴리에테르 설폰 중공 섬유로부터 형성될 수 있다. 또 다른 주위 반투과성 막 재료로는 폴리(아크릴로니트릴/코비닐 클로라이드)(Pan-PVC)가 있다.
- [0274] 캡슐은 생물학적 활성을 유지하고 생성물의 전달 또는 작용에 대한 접근의 제공에 적합한 임의의 형상일 수 있으며, 예를 들어 원통형, 직사각형, 원반형, 패치형, 난형, 별형 또는 구형이 포함된다. 또한, 캡슐은 망상형 또는 등지형 구조로 감기거나 둘러싸일 수 있다. 캡슐이 이식 후 회수되어야 한다면, 이식 부위로부터 캡슐의 이동을 유도하는 경향이 있는 형상, 예를 들어 수용 숙주의 혈관에서 이동하기에 충분히 작은 구형 캡슐은 바람직하지 않다. 회수하고자 한다면, 직사각형, 패치형, 원반형, 원통형 및 평판 시트형과 같은 특정 형태가 보다 높은 구조 통합성을 제공하며 바람직하다. 특히 바람직한 모양은 산업적으로 생산가능한 중공 섬유로부터 용이하게 생산되는 모양과 같은 원통형이다.
- [0275] 이러한 맥락에서 마이크로캡슐은 적어도 1 μL , 예를 들어 1 내지 10 μL 의 용적을 갖는 캡슐이다.
- [0276] 마이크로캡슐이 사용되는 경우, 각각의 디바이스에서 바람직하게는 적어도 10^3 개 세포가 캡슐화되고, 예를 들어 10^3 내지 10^8 개의 세포가 캡슐화되며, 가장 바람직하게는 10^5 내지 10^7 개 세포가 캡슐화된다. 물론, 각각의 캡슐 내의 세포수는 캡슐의 크기에 의존적이다. 경험상,(후술되는) 폼을 갖는 캡슐에서, 본 발명자는 캡슐 μL (폼을 포함한 내부 용적으로서 계산된 용적)당 10,000 내지 100,000개 세포, 보다 바람직하게는 μL 당 25,000 내지 50,000개의 세포, 보다 바람직하게는 μL 당 30,000 내지 40,000개의 세포의 로딩이 우수한 캡슐 충전을 달성한다는 것을 밝혀내었다. 또한, 로딩되는 세포수는 세포의 크기에 의존적이다.
- [0277] 투여량은 캡슐의 크기(길이, 직경)를 변화시키고/시키거나 캡슐의 수를 적게 또는 많이 이식하여 제어할 수 있으며, 특히 환자당 1 내지 10개의 캡슐이 바람직하다.
- [0278] 스캐폴딩은 세포의 매트릭스(ECM) 분자로 코팅될 수 있다. 세포의 매트릭스 분자의 적합한 예에는, 예를 들어 콜라겐, 라미닌 및 피브로넥틴이 포함된다. 스캐폴딩 표면은 또한 세포의 부착을 향상시키기 위해 전하를 부여

하는 플라즈마 조사 처리로 변형될 수도 있다.

- [0279] 캡슐을 밀봉하는 임의의 적합한 방법은 중합체 접착제의 사용 또는 주름잡기, 매듭짓기 및 열 밀봉을 포함하는 임의의 적합한 방법을 사용할 수 있다. 또한, 예를 들어, 미국 특허 제5,653,687호에 기술되어 있는 바와 같은 임의의 적합한 "드라이" 밀봉 방법도 사용할 수 있다.
- [0280] 캡슐화된 세포 디바이스는 공지된 기술에 따라 이식된다. 다수의 이식 부위가 본 발명의 디바이스 및 방법을 위해 고려된다. 이러한 이식 부위에는 뇌, 척수를 포함하는 중추신경계[참조: 미국 특허 제5,106,627호, 제 5,156,844호 및 제5,554,148호] 및 안구의 수액 및 유리체액[참조: 국제 특허 출원 공보 제WO 97/34586호]이 포함되나 이에 제한되지 않는다.
- [0281] 상술된 캡슐은 캡슐에서 뺀고, 적어도 치료 부위로부터 삽입 부위 근처에 이르기엔 충분한 길이이기에 삽입 부위, 예를 들어 두개골의 외부 표면에 캡슐을 고정시키는 것을 용이하게 하는 일체로 된 줄(tether)을 포함할 수 있다. 후속적으로, 삽입 부위는 피부로 커버된다.
- [0282] 예를 들어 치료가 끝나갈 때나 캡슐을 대체해야 하는 경우, 조직으로부터 캡슐의 제거를 용이하게 하기 위해서, 캡슐과 줄 간의 전환은 매끄러울 수 있으며, 어떠한 종류의 용기 없이 캡슐로부터 줄 쪽으로 치수가 증가될 수 있다. 이는 분명히 2개의 부분 간에 모서리를 만드나, 비교적 작은 캡슐이 치료요법 시스템의 원위 말단, 즉 신체를 향하는 말단을 형성하므로, 캡슐 제거 동안 부수적 손상이 방지될 수 있다. 캡슐 및 줄이 환형 단면 모양을 갖는 튜브인 경우, 따라서 캡슐의 방사상 크기는 바람직하게는 줄의 방사상 크기보다 적을 수 있고, 캡슐 및 줄은 바람직하게는 서로 동축으로 연결될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 캡슐은 문헌[참조: 국제 특허 출원 공보 제WO 2006/122551호 및 제WO 2005/095450호]에 기술되어 있는 것과 디자인이 유사할 것이다.
- [0283] 캡슐은 주사기를 사용하여 충전될 수 있거나, 또는 문헌[참조: 국제 특허 출원 공보 제WO2007/048413호]에 기술되어 있는 바와 같이 자동 또는 반자동 충전을 사용할 수 있다.

[0284] **실시예**

[0285] **실시예 1**

[0286] **단백질 정제**

[0287] 마우스 메테오린(Uniprot Accession # Q8C1Q4; 서열 번호 5)(hCD33으로부터의 시그널 펩타이드를 갖는 aa22-291(서열 번호 6))을 발현 벡터에 클로닝하였다. 벡터를 전기천공에 의해 NS0 마우스 골수종 세포주로 형질감염시켰다. 안정한 클론을 분리하고, Gt x mMETRN 다클론 항체(AF3475)를 사용하여 웨스턴 분석으로 m메테오린(mMeteorin)의 발현에 대해 스크리닝하였다. 마우스 메테오린을 함유하는 배양물로부터의 조절된(conditioned) 배지를 농축시키고, 20 mM MOPS로 보충한 후, pH를 6.5로 조절하고, 0.2 μm 필터를 통해 여과했다. 샘플을 20 mM MOPS, 0.1M NaCl, pH 6.5로 평형화된 음이온 교환 크로마토그래피 수지에 적용하였다. 마우스 메테오린을 함유하는 분획물을 2M NaCl로 보충하고, pH를 7.0으로 조절한 후, 페닐 세파로즈 수지에 적용하였다. 결합된 단백질을 하향 구배의 NaCl로 용출시켰다. 마우스 메테오린이 농축된 분획물을 풀링(pooling)하고, 농축시키고, 슈퍼덱스 겔 여과 컬럼에 로딩한 후, PBS에 평형화시켰다. 마우스 메테오린은 약 30 kDa 분자량 단백질로서 용출되었다. 관심 분획물을 풀링하고, 농축시키고, PBS에 대해 투석시킨 후, -80 °C에서 저장하였다.

[0288] **실시예 2**

[0289] **광화학적으로 유도된 좌골 신경 손상**

[0290] 전신적으로(sc) 투여된 메테오린의 효과를, 손상 후 1주일 내에 기계적 및 냉기 자극 둘 다에 대해 무해자극통증을 발병시키는 것으로 알려진 광화학적으로 유도된 좌골 신경 손상된 랫트에서 조사하였다[참조: Kupers,R., Yu,W., Persson,J.K., Xu,X.J., and Wiesenfeld-Hallin,Z.(1998); Photochemically-induced ischemia of the rat sciatic nerve produces a dose-dependent and highly reproducible mechanical, heat and cold allodynia, and signs of spontaneous pain. Pain 76, 45-59].

[0291] 간단히 요약하면, 동물의 좌골 신경을 편측 광유도 손상시킨 후, 동물을 무작위로 4개의 그룹(그룹당 n=8)으로 나누고, 음성 대조군으로서 식염수 또는 3가지 상이한 농도의 메테오린(0.05, 0.2 및 0.8 mg/kg)을 주사하였다.

각각의 랫트는 동요되지 않는 무해자극통증이 발병된 지 7일 후부터 시작하여 2주의 기간에 걸쳐 6회의 주사가 투여되었다. 치료기간 동안 및 추가 2주 동안 각각의 주사 전에 거동 평가를 수행하였다.

[0292] 도 1로부터 분명한 바와 같이, 식염수 및 저용량(0.05 mg/kg)의 메테오린은 동측 뒷발의 기계적 자극에 대한 반응에 영향을 끼치지 않았다. 0.2 mg/kg의 메테오린은 기계적 무해자극통증을 중등도로 감소시켰으나, 이 그룹은 식염수 대조군과 통계학적으로 상이하지 않았다. 이와는 대조적으로, 0.8 mg/kg의 메테오린의 반복된 주사는 기계적 무해자극통증을 유의하고 현저하게 경감시켰다. 이 그룹은, 21일에 치료를 끝낸 후, 적어도 1주 동안 비히클과는 상당히 상이하였다. 기계적 무해자극통증은 시간이 경과함에 따라 점진적으로 복구되었다.

[0293] 간단히 뒷발의 발바닥 표면에 에틸 클로라이드를 분무하고 이에 대한 동물 거동을 스코어링함으로써 냉기에 대한 반응을 평가하였다. 도 2는 0.8 mg/kg의 메테오린으로의 치료가 냉기 무해자극통증 자극을 크게 경감시키고, 0.2 mg/kg의 메테오린도 유의한 긍정적 효과를 갖는다는 것을 도시한다. 치료를 마친 후, 0.8mg/kg의 메테오린으로 치료받은 그룹은 적어도 1주 동안 비히클과는 상당히 상이하였으며 심지어 2주 후에도 개선 경향이 있었다. 냉기 무해자극통증은 시간이 경과함에 따라 점진적으로 복구되었으나, 이는 실험의 말기에 완전하지 않았다. 0.05 mg/kg의 메테오린은 효과가 없었으며, 이는 연구 동안 내내 대조군 그룹과 유사하였다.

[0294] 중요하게도, 모든 동물은 연구 동안 내내 정상적으로 체중을 얻었으며, 어떠한 부작용도 관측되지 않았다(도 3).

[0295] 결론적으로, 메테오린은 기계적 및 냉기 무해자극통증 둘 다를 용량-의존적으로 감소시켰으며, 치료를 중단한 지 적어도 1주일 동안 그 효과가 지속되었다. 치료를 중단한 지 2주 후, 과민증이 점차 복구되는 듯하였다. 어떠한 부작용도 관측되지 않았다.

[0296] **실시예 3**

[0297] **만성 수축 손상(CCI)**

[0298] 메테오린의 효과를 잘 확립된 만성 수축 손상(CCI) 모델에서 추가로 조사하였다[참조: Bennett,G.J., and Xie,Y.K.(1988); A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain 33, 87-107]. 간단히 요약하면, 손상 후 12일 후에, 동물에게 동요되지 않는 기계적 무해자극통증이 확립되면 후속 2 주에 걸쳐 메테오린(0.1, 0.5, 2.0 mg/kg) 또는 비히클을 6회 피하 주사로 투여하였다(그룹당 n= 7 내지 8). 마지막 주사한 후 3주까지 연구 동안 내내 동물 거동을 연구하였다.

[0299] 자발통증에 대한 대응 마커로서 체중 부하를 치료 직전 및 후에 평가하였다. 치료 전(12일) 모든 그룹은 약 50 g의 사이드-투-사이드 결함(side-to-side deficit)을 가졌으며, 메테오린으로 치료받은 그룹은 10 내지 15 g으로 감소되었다. 치료를 마친 후, 효과가 점진적으로 감소되었으며, 3주 후 그룹 간에는 유의한 차이가 없었다.

[0300] 또한, 기계적 무해자극통증을 CCI 동물에서 평가하였다. 보정된 폰 프레이 헤어즈를 사용한 기계적 자극에 대한 평균 기본 발 움츠림 역치는 15 g이었으며, 이는 치료를 시작한 12일에 2g으로 점진적으로 감소되었다. 비히클 그룹은 연구 동안 내내 여전히 과민성인 반면(약 2g), 메테오린은 시험된 모든 용량에서 기계적 무해자극통증을 효과적으로 경감시켰다(8 내지 11g). 치료를 멈춘 후, 메테오린 치료 그룹의 동물은 약 1주 동안 대조군과 상당히 상이하였으나, 무해자극통증은 점진적으로 복구되었으며 3주 후에는 그룹 간에 차이가 없었다. 효과의 크기를 평가하기 위해서, 대조군 동물에 비교용의 고용량(200 mg/kg) 가바펜틴(Gabapentin)을 투여하였다. 가바펜틴으로 치료한 지 1시간 후, 기계적 자극에 대한 역치는 9.7 ± 1.9 g이었으며, 치료 전의 1.9 ± 0.7 g과 비교된다. 분명히, 메테오린과 가바펜틴은 유사하게 효과적이거나, 중요한 것은 가바펜틴은 진통제인 반면, 메테오린은 장기간 지속적이고, 잠재적으로 질환 개변이 일어나는 효과를 갖는다.

[0301] 메테오린 주사는 체중 손실 또는 대조 동물과 치료받은 동물 간의 일반적인 거동 차이를 일으키지 않았다.

[0302] **실시예 4**

[0303] **만성 수축 손상(CCI)**

[0304] **목적**

[0305] 본 연구는 랫트에서 만성 수축 손상(CCI)에 의해 야기된 무해자극통증 및 자발통증을 경감시키기 위해 피하 투

여된(s.c) 투여된 재조합 메테오린의 효과를 조사하기 위해 고안되었다[참조: Bennett and Xie, "A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like thos seen in man", 1988, Pain 33; p. 87-107].

[0306] **방법**

[0307] 재조합 메테오린. 재조합 마우스 메테오린(Uniprot Accession # Q8C1Q4)은 본원의 다른 부분에서 기술되는 바와 같이 생성되었다.

[0308] 수술: 체중이 250 내지 280 g인 30마리의 스프라그-둘리(Sprague-Dawley) 수컷 랫트를 4-0 크롬처리된 장 봉합선을 사용하여 4번의 느슨한 결찰로 좌측 좌골 신경에 만성 수축을 일으키도록 수술하였다(CCI 모델)[참조: Bennett and Xie, "A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like thos seen in man", 1988, Pain 33; p. 87-107]. 랫트를 이소플루오란 가스를 흡입시켜 마취시켰다. 랫트의 좌측 뒷다리의 넙적다리 중간의 대퇴이두근에 대해 정확히 꼬리 쪽에 있는 피부를 절개하였다. 이어서, 아래에 있는 근육층을 작게 절개하고, 좌골 신경을 건드리지 않도록 조심하고 지혈제를 사용하면서 부드럽게 분리시켰다. 이어서, 좌골 신경을 확인하고, 부착 조직을 제거한 후, 45도 집계를 사용하여 약간 들어올렸다. 4 피스의 4-0 크롬처리된 장 봉합선 재료(미리 멸균 식염수로 세척됨)를 신경 아래에 둔 후, 각각을 움매듭으로 신경을 빙 돌아서 느슨하게 묶었다. 매듭들을 1 mm 떨어뜨렸다. 이들 느슨한 결찰은 혈액 공급을 차단함이 없이 신경을 만성 수축시켰다. 근육층을 4-0 비크릴(vicryl) 봉합선으로 봉합하고, 피부를 상처 클립으로 단았다.

[0309] 그룹화 및 거동 분석: 실험 0일에 모든 랫트를 폰 프레이 필라멘트를 사용하여 기계적 무해자극통증에 대해 시험하고, 하그리브즈 방법을 이용하여 온도 무해자극통증을 시험하고, 인커파시턴스 미터를 사용하여 뒷다리에 대한 체중 부하를 시험하였다. 24마리의 랫트를 선택하여 연구를 계속하고, 후에 4개의 치료군(n=6)으로 나누었다. 수술 후 10, 12, 14, 17 및 19일에 동물에 비히클, 0.1, 0.5 또는 1.8 mg/kg의 메테오린 단백질을 피하로 5회 주사하였다. 모든 동물을 수술 후 10, 12, 14, 17, 19, 21, 26, 32 및 39일에 기계적 및 온도 무해자극통증 및 인커파시턴스에 대해 시험하였다. 중요하게, 즉각적 진통 효과를 배제시키고 장기간 지속되는 잠재적인 질환 개변이 일어나는 효과에 초점을 맞추기 위해 메테오린 주사 전에 거동 분석을 수행하였다. 연구 동안 내내 동물을 관측하고 체중을 재었다. 치료 조건에 대해 맹검으로 실험하였으며, 어떠한 동물도 연구에서 빠지지 않았다.

[0310] 혈청 중 메테오린에 대한 검사: 수술 후 39일에 거동 시험 후, 0.1, 0.5 및 2 mg/kg의 메테오린을 동물에 투여하고, 랫트 혈청 샘플을 약물 투여 후 2, 6, 24시간에 수집하였다. 또한, 비치료 대조군 랫트로부터도 혈청을 수집하였다. 각각의 시점에 2마리의 랫트가 존재하였다. 모든 랫트 혈청 샘플을 마우스 메테오린 ELISA(R&D Systems, DY3475)로 검사하였다.

[0311] **결과**

[0312] 랫트에서 실험적 무해자극통증 및 자발통증을 CCI에 의해 유도하고[참조: Bennett and Xie, 1988], 촉각 무해자극통증을 폰 프레이 헤어즈로 평가하였다(도 7). 랫트는 약 15 g의 기본 움즈림 역치를 가졌으며, 이는 CCI 후 10일에 1.5 g으로 감소되었다. 분명히, 메테오린으로의 치료가 무해자극통증을 신속히 감소시켰으며, 1.8 mg/kg의 메테오린 치료 랫트에 의해 이겨낸 힘은 비히클로 치료받은 랫트와 비교하여 17, 19, 21, 26 및 32일에 유의하였다. 그러한 것으로서, 치료를 멈춘 지 적어도 13일에 유의한 차이가 유지되었으며, 감소된 무해자극통증 경향이 20일 후에도 관측되었다. 1.8 mg/kg의 메테오린으로 치료받은 그룹 중의 대부분의 동물이 15 g으로 역전되었으나, 한 마리의 동물은 반응하지 않았으며, 이는 이러한 특정 그룹에서 증가된 표준오차를 설명한다.

[0313] 온도 민감도와 관련하여(도 8), 랫트는 16.5초의 기본 움즈림 잠복기를 가졌으며, 이는 온도 무해자극통증을 나타내는 CCI 후 10일에 약 7초로 감소되었다. 비히클 치료받은 동물은 연구 동안 내내 과민성을 유지하였으나, 1.8 mg/kg의 메테오린으로 치료받은 동물은 곧 14일부터 발 움즈림 잠복기가 상당히 줄어들었으며, 이는 치료를 중단한 지 적어도 3주에서를 포함하여 나머지 실험까지 지속되었다. 흥미롭게도, 발 움즈림 잠복기가, 비히클 그룹의 무해자극통증 수준으로 돌아가지 않고, 이러한 메테오린 그룹에 대해 10.5초로 평균화되었다. 또한,

0.5 mg/kg 용량의 메테오린도 19 및 21일에 발 움츠림 잠복기가 유의하게 감소되었다. 또한, 통계학적으로 유의한 수준은 아니지만 0.1mg/kg의 메테오린으로도 무해자극통증이 감소되는 경향이 있었다. 요약하면, 메테오린은 치료기간 및 그 이상에서 온도 무해자극통증을 상당한 효과로 용량-의존적으로 감소시켰다.

[0314] 수술 후 기본 스크린에서, 랫트는 뒷다리들 간에 동일한 체중 분포를 가졌다(도 9). 그러나, CCI 손상 후, 약 60% 미만의 체중이 동측 뒷다리에 실렸으며, 이는 자발통증에 대한 대응 마커로서 간주된다. 60%의 체중 부하 결함이 연구 동안 내내 비히클 그룹에서 유지되었다. 이와는 대조적으로, 0.5 및 1.8 mg/kg의 메테오린 모두 신속히 체중 부하 결함을 감소시켰으며, 두 경우 모두에서 양성 효과가 치료를 멈춘 지 적어도 3주 동안 상당히 개선되었다. 또한, 통계학적 유의 효과가 19일에 저용량 메테오린으로도 나타났다. 일반적으로, 26일부터 실험 끝까지, 체중 부하 결함은 모든 메테오린 치료받은 그룹에서 비히클 그룹보다 낮은 항정(steady) 수준이었다. 비히클 대조군은 60% 이상이었으며, 메테오린 치료받은 그룹에 대한 평균 체중 부하 결함은 0.1, 0.5 및 1.8 mg/kg의 메테오린에 대해 각각 약 55%, 48% 및 40%였다.

[0315] 어떠한 즉각적 부작용도 관측되지 않았으며, 모든 동물은 연구 동안 내내 정상적으로 체중을 얻었다(도 10).

[0316] 39일에 마지막 거동 시험 후, 동물에 0.1, 0.5 및 1.8 mg/kg의 메테오린이 투여되었으며, 혈청 샘플을 약동학 평가를 위해 2, 6 및 24시간 후에 수집하였다(도 11). 메테오린은 0.1 mg/kg 주사 후 혈청에서 거의 검출가능하지 않았으나, 2개의 고용량들 간에는 용량과 혈청 농도 간의 양호한 상호작용이 관측되었다. 또한, 도 11로부터 분명하게, 메테오린은 주사한 지 24시간 후 혈청에서 더 이상 검출가능하지 않았다. 이와 관련하여, 흥미롭게도, 관측된 유리한 효과가 마지막 주사한 지 수주 후 동안 지속되나 메테오린은 더 이상 혈청에 존재하지 않는다(도 7, 8 및 9). 또한, 메테오린 치료는 과민성 기본 수준으로 돌아가지 않고 새로운 덜 과민한 수준을 이끈다. 이들을 종합하면, 메테오린은 질환 개변이 일어나는 특성을 갖는 듯하다. 그 자체로서, 긴 지속 효과는 신경 기능의 정상화 또는 회복을 반영할 수 있다.

[0317] **결론**

[0318] 무해자극통증 및 자발통증-유사 증후군을 나타내기 위해 수술된 동물에 대해 메테오린 투여는 온도 및 촉각 무해자극통증 모두의 감소로 추론되는 무해자극통증 및 자발통증의 현저한 감소 및 차등 체중 부하의 정상화를 초래하였다. 주사한 지 24시간 후 메테오린이 혈청에 부재함에도 불구하고, 양성 효과는 수주 동안 지속되며, 이는 질환 개변이 일어나는 특성을 입증한다.

[0319] **실시예 5: 광화학적으로 유도된 좌골 신경 손상, 수막강내 투여**

[0320] **방법**

[0321] 수술. 체중이 380 내지 450 g인 스프라그-둘리(Sprague-Dawley) 수컷 랫트(Harlan, The Netherlands)의 요부팽대에 틱을 갖는 장기적 수막강내 카테터를 달았다[참조: Storkson,R.V., Kjorsvik,A., Tjolsen,A., and Hole,K.(1996). Lumbar catheterization of the spinal subarachnoid space in the rat. J. Neurosci. Methods 65, 167-172]. 카테터 이식 3 내지 5일 후, 광화학적 방법을 이용하여 허혈성 좌골 신경 손상을 일으켰다[참조: Kupers,R., Yu,W., Persson,J.K., Xu,X.J., and Wiesenfeld-Hallin,Z.(1998); Pain 76, 45-59]. 간단히 설명하면, 일반적인 마취(클로랄 하이드레이트 300 mg/kg) 하에, 좌측 좌골 신경을 중간-대퇴부 수준에서 노출시키고, 0.17 W의 평균 전력에서 514 nm에서 작동하는 아르곤 레이저로 1.5분 동안 조사하였다. 에리트로신 B(0.9% 식염수에 용해된 32.5 mg/kg)를 조사 직전 꼬리 정맥을 통해 정맥내 주사하였다. 이러한 조작은 7일 내에 높은 재생성 과민성을 이끈다.

[0322] 무해자극통증의 평가. 기계적 무해자극통증을 평가하기 위해서, 하나의 세트의 보정된 나일론 모노필라멘트(von Frey hairs, Stoelting, IL)를 동물이 사지를 움츠릴 때까지 힘을 증가시키면서 발의 평활 피부에 적용하였다. 각각의 모노필라멘트를 5회 적용하고, 동물이 5회의 연속 자극 중 적어도 3회 발을 움츠리는 힘으로 움츠림 역치를 측정하였다. 냉기에 대한 반응을 뒷발의 발다닥 표면에 간단히(1초 미만) 분무되는 에틸 클로라이드로 시험하였다. 반응을 하기와 같이 스코어링하였다: 0 = 무반응, 1 = 놀람-유사 반응, 뒷발 움츠림 없음(정상), 2 = 자극된 뒷발의 짧은 움츠림(경증 통증), 3 = 자극된 뒷발의 지속 또는 반복된 움츠림, 짧은 리킹(licking) 또

는 흔들림(shaking)(극심한 통증). 모든 시험은 실험 조건에 대해 맹검인 실험자에 의해 수행되었다.

[0323] 실험 준비. 카테터 이식 후 및 다시 좌골 신경 조사 전에 기본 반응을 평가하였다. 신경 손상 후 7일에 기계적 및 냉기 자극에 대해 무해자극통증을 발생시킨 랫트를 무작위로 4개의 그룹(N=8)으로 나누고, 음성 대조군으로서의 비히클 및 재조합 메테오린(0.5, 2 및 6 µg)의 3개 용량을 10 µL의 용적으로 수막강내 투여하였다. 2주 기간에 걸쳐(신경 손상 시점으로부터 계산하여 7, 9, 11, 14, 16 및 18일) 각각의 랫트에 6회 주사하였다. 거동 시험을 수막강내 주사 전 각각의 치료일 및 추가로 치료를 마친 후 21, 25, 28 및 35일에 수행하였다.

[0324] **결과**

[0325] 도 12에 도시되는 바와 같이, 기계적 자극에 대한 기본 발 움츠림 역치는 약 50 g이었다. 광화학적으로 유도된 좌골 신경 손상 후 7일에, 랫트는 약 8 g의 감소된 발 움츠림 역치로 입증되는 상당한 기계적 무해자극통증을 발생시켰다. 이어서, 랫트를 무작위로 4개의 그룹으로 나눈 후, 2주 동안 6회의 수막강내 주사로 비히클 또는 메테오린을 투여하였다. 메테오린은 0.5 µg, 2 µg 또는 6 µg이 랫트에 투여되었다. 분명히, 메테오린의 수막강내 주사는 기계적 무해자극통증을 상당히 용량-의존적으로 감소시켰다(도 12). 기계적 무해자극통증은 치료를 마친 후 1주 내에 점진적으로 복구되었다. 비히클의 수막강내 주사는 실험 동안 내내 기계적 과민증에 영향을 끼치지 않았다.

[0326] 도 13에 도시되는 바와 같이, 기본 냉기 반응은 정상 놀람-유사반응에 상응하는 1이다. 광화학적으로 유도된 좌골 신경 손상 후 7일에, 랫트는 경증 통증 반응으로 입증되는 뚜렷한 냉기 무해자극반응을 발생하였다. 2 µg 및 6 µg의 메테오린으로의 치료는 냉기 무해자극통증을 신속히 역전시켰으며, 동물은 치료기간 내에 냉기에 대해 거의 정상 반응을 보였다. 또한, 6 µg의 메테오린의 유의한 양성 효과가 치료를 마친 후 3일에 관측되었다. 그러나, 냉기 무해자극통증은 치료를 마친 후 1주일에 완전히 복구되었다. 비히클은 냉기 무해자극통증에 효과가 없었다.

[0327] **결론**

[0328] 메테오린의 반복된 수막강내 주사는 랫트에서 허혈성 좌골 신경 손상 후 기계적 및 냉기 무해자극통증을 유의적으로 감소시킨다.

[0329] **실시예 6: 서열 목록**

[0330] 서열 번호 1: 사람 메테오린 cDNA

[0331] 서열 번호 2: 사람 메테오린 전체 길이 아미노산 서열

[0332] 서열 번호 3: 시그널 펩타이드가 없는 사람 메테오린 아미노산 서열

[0333] 서열 번호 4: 마우스 메테오린 cDNA

[0334] 서열 번호 5: 마우스 메테오린 전체 길이 아미노산 서열

[0335] 서열 번호 6: 시그널 펩타이드가 없는 마우스 메테오린 아미노산 서열

[0336] 서열 번호 7: 랫트 메테오린 cDNA

[0337] 서열 번호 8: 랫트 메테오린 전체 길이 아미노산 서열

[0338] 서열 번호 9: 시그널 펩타이드가 없는 랫트 메테오린 아미노산 서열

[0339] 서열 번호 10: 사람 코돈 최적화된 DNA 서열

[0340] 서열 번호 11: 성숙한 메테오린, 컨센서스 서열

[0341] 사람 메테오린 cDNA(1109 bp; CDS=118-999) (서열 번호 1)

[0342] >gi|34147349|ref|NM_024042.2| 호모 사피엔스 가상 단백질 MGC2601(MGC2601), mRNA

```
GCTTCGCCGGGGCCGGGGCGGGCCGCCCGGGCTGCTCCCGCCGCCCGCCGACCCGCGCCCGCCGGG
GCAGCGGTGGTGAGAGCCCGGACTCCCGGAGCGCCCGCCCGCTGCCATGGGGTCCCGGCCGCGCGCT
GCTCTGCGCGCTGTGTGCGGCTCCTGGCCCGGCTGCCCGCGCCGGCTACTCCGAGGAGCGGTGCAGC
TGGAGGGGCAGCGGCTCACCAGGAGCCCGGCAGCGTGGGGCAGCTGGCCCTGGCCTGTGCGGAGGGCG
CGGTTGAGTGGCTGTACCCGGCTGGGGCGCTGCGCCTGACCCTGGGCGGCCCGATCCAGAGCGCGGCC
CGGCATCGCCTGTCTGCGGCCGTGCGGCCCTTCGCGGGCGCCAGGTTCTCGCGGAGCGCGCAGGGGGC
GCCCTGGAGTGTGCTGGCCGAGGGCCCGGGCCCGGAGGGGGCCGCTGCGTGCCTGGGGTCCCGCG
AGCGCCGGGGCCCTTCTCCTGACAGGCCACGCGCCAGGACATCAGCCGCGCGTGGCCGCTTCCGCTT
TGAGCTGCGCGAGGACGGGGCCCGGAGCTGCCCGGAGGCCACGGTCTCGCGTAGACGGTGCCTGC
AGGCCCTGCAGCGACGCTGAGCTGTCTGGCCGATGCACCAGCGACTTCGTAATTCACGGGATATCC
ATGGGGTACCCATGACGTGGAGTGCAGGAGTCTGTATCAGTGTGGTGGCCCGCCGTCTCCCGCCA
GACACCGCCGCTGTCCAGGGGGGCGATCCGGGGACCAGGGGCTGACCTCCATTGTAACCCACTGCGC
TGTGGCGTCCACCCGGGCCACGGCACCTTCTTTCATGGGCTGGAGCCGCTTGGGGAGGCCCGGCTGG
GCTGTGCCCCAGATTCCAGGAGTTCGCGCGTGCCTACGAGGCTGCCCGTGTGCCACCTCCACCCTG
CGAGGTGGCGCTGCACTGAGGGGCTGGGTGCTGGGGAGGGGCTGGTAGGAGGAGGGTGGGCCACTGCT
TTGGAGGTGATGGGACTATCAATAAGAACTCTGTTACGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

[0343]

[0344] 사람 메테오린 전체 길이 아미노산 서열(서열 번호 2)

[0345] >UPI00031531.1 REFSEQ_NP:NP_076947 TREMBL:Q9UJH9

[0346] ENSEMBL:ENSP00000219542 Tax_Id=9606 C380A1.2.1(신규한 단백질)

```
MGFPAALLC ALCCGLLAPA ARAGYSEERC SWRGSGLTQE PGVSVQLALA CAEGAVEWLY
PAGALRLTLG GPDPRARPGI ACLRPVRFPA GAQVFAERAG GALELLLAEG PGPAGRCVR
WGPFRERRALF LQATPHQDIS RRVAARFREL REDGRPELPP QAHGLGVDGA CRPCSDAELL
LAACTSDFVI HGIIHGVTVD VELQESVITV VAARVLRQTP PLFQAGRSGD QGLTISIRIPL
RCGVHPGPGT FLFMGWSRFG EARLGCAPRF QEFRRAYEAA RAAHLHPCEV ALH
```

[0347]

[0348] 사람 메테오린, 시그널 펩타이드가 없는 단백질(서열 번호 3)

```
GYSEERCSWR GSGLTQEPGS VGQALALACAE GAVEWLYPAG ALRLTLGGPD PRARPGIACL
RPVRFAGAQ VFAERAGGAL ELLLAEGPGE AGGRCVWRGP RRRALFLQA TPHQDISRRV
AAFRFELRED GRPELPPQAH GLGVDGACRP CSDAELLALAA CTSDFVIHGI IHGVTHDVEL
QESVITVVAA RVLRQTPPLF QAGRSGDQGL TSIRIPLRCG VHPGPGTFLF MGWSRFGEAR
LGCAPRFQEF RRAYEAAAA HLHPCEVALH
```

[0349]

[0350] 마우스 메테오린 cDNA, 1363 bp, CDS 84..959(서열 번호 4)

[0351] NM_133719. Mus musculus 메테오린.[gi:56550040]

```
NM_133719. Mus musculus meteorin.[gi:56550040]
gggcagccgc gccgcgggct gctcgcgctg cggccccgac cctcccgggg cagcagtcgc
aggccccggc gctccccctc accatgctgg tagccacgct tctttgcgcg ctctggttgcg
gcctcctggc cgcgctccgct cacgctggct actcggaga ccgctgcagc tggaggggca
gcggtttgac ccaggagcct ggcagcgtgg ggcagctgac cctggactgt actgagggcg
ctatcgagtg gctgtaccca gctggggcgc tgcgctgac cctggggcgc cccgatcccg
gcacacggcc cagcatcgtc tgtctgcgcc cagagcggcc cttcgtggt gccaggtct
tcgctgaacg tatgaccggc aatctagagt tgctactggc cgaggggccc gacctggctg
ggggccgctg catgctgctg ggtccccgcg agcgcgagc cctttcctg caggccacac
cacaccgca catcagccgc agagttgctg ccttccggtt tgaactgcac gaggaccaac
gtgcagaaat gtctcccag gctcaaggct ttggtgtgga tgggtcctgc aggccctgca
gtgatgccga gctcctcctg gctgcatgca ccagtattt tgtgatccac gggaccatcc
atggggctgc ccatgacaca gagctgcaag aatcagtcac cactgtggtg gttgctcgtg
tcatccgcca gacactgcca ctgttcaagg aaggagctc ggaggggcaa ggcgggccc
ccattcgtac cttgctgctg tgtggtgtgc gtcctggccc aggcctcttc ctcttcatgg
gctggagccg atttggcgaa gcttggctgg gctgtgctcc ccgcttccaa gattcagcc
gtgtctattc agctgctctc acgaccatc tcaaccatg tgagatggca ctggactgag
agacctggga gcaagccctg gatggacctt cttctggaga tgggtgttg gggaggggtg
tgggaggggt ggtgagaagg gtgtggctcg gatggcatcc tggtaaccac agtgagctgg
tagaatacta agtaactctg accataaccg ccaactgagt catggtcttc tgtggcaggc
agcataccca gctctgtgct tgcctcaact tgtctactct ccagtctgct gcccttctaa
cccttcttag cctgctgacc agtgagctca tgttttcctc gaattccagg gtgctgctgg
ggttcagagc aaccgtgccc tagttggaa gacttgagct aattgttttt tttttgtttg
ttttttgtt tgtttaaagg tggcctgggg ggggcggcaa aca
```

[0352]

[0353] 마우스 메테오린 전체 길이 아미노산 서열(서열 번호 5)

- [0354] ref|NP_598480.1| 메테오린[Mus musculus]
 MLVATLLCAL CCGLLAASAH AGYSEDRCWS RSGSLTQEPG SVGQLTLDCT EGAIWLYPA
 GALRLTLGGP DPGTRPSIVC LRPERPFAGA QVFAERMTGN LELLLAEGPD LAGGRCMRWG
 PRERRALFLQ ATPHRDISRR VAAFRFELHE DQRAEMSPQA QGLGVDGACR PCSDAELLLA
 ACTSDFVIHG TIHGVVHDME LQESVITVVV ARVIRQTLPL FKEGSSEGGQ RASIRTLRLC
 GVRPGPGSFL FMGWSRFGEA WLGCAPRFQE FSRVYSAALT THLNPCEMAL D
- [0355] 마우스 메테오린 시그널 펩타이드가 없는 단백질(서열 번호 6)
 GYSEDRCSWR GSGLTQEPGS VGQLTLDCTE GAIEWLYPAG ALRLTLGGPD PGTRPSIVCL RPERPFAGA
 VFAERMTGN ELLLAEGPD AGGRCMRWGP RERRALFLQA TPHRDISRRV AAFRFELHED QRAEMSPQA
 GLGVDGACRP CSDAELLLA CTSDFVIHGT IHGVVHDTEL QESVITVVVA RVIRQTLPLF KEGSSEGGQR
 ASIRTLRLRC VRRPGPGSFL MGWSRFGEAW LGCAPRFQEF SRVYSAALTT HLNPCEMALD
- [0357] 랫트 메테오린 cDNA(1026 bp; CDS=1-876)(서열 번호 7)
 >gi|34870570|ref|XM_213261.2| Rattus norvegicus similar to 1810034B16Rik 단백질(LOC287151), mRNA
 ATGCTGGTAGCGGCGCTTCTCTGCGCGCTGTGCTGCGGCCTCTTGGCTGCGTCCGCTCGAGCTGGCTACT
 CCGAGGACCGCTGCAGCTGGAGGGGCGAGCGTTTGACCCAGGAACCTGGCAGCGTGGGGCAGCTGACCC
 GGATTGTACTGAGGGTGTATCGAGTGGCTGTATCCAGCTGGGGCGCTGCGCCTGACTCTAGGCGGCTCT
 GATCCGGGACGCGGCCAGCATCGTCTGTCTGCGCCCAACACGCGCCTTCGCTGGTGCCAGGCTCTTCG
 CTGAACGGATGGCCGCAACCTAGAGTGTACTGGCCGAGGGCCAAGGCCTGGCTGGGGGCGGCTGCAT
 GCGTGGGGTCTCGGAGCGCCGAGCCCTTTTCTGCAAGGCCACGCCACACCGGGACATCAGCCGCGAGA
 GTTGTGCCTTCCAATTGAACTGCACGAGGACCAACGTGCAGAAATGTCTCCCCAGGCCCAAGGTTTTG
 GTGTGGATGGTGCCTGCAGGCCCTGCAGTGTGCCGAGCTCCTTCTGACTGCATGCACCAGTGACTTTGT
 GATCCATGGGACCATCCATGGGGTGCATGACATGGAGCTGCAAGAATCAGTCATCACTGTGGTGGCC
 ACTCGTGTATCCGCCAGACACTGCCACTGTTCCAGGAAGGGAGCTCGGAGGGCCGGGGCCAGCCCTCCG
 TTCGTACCTTGTGGCTGTGGTGTGCGTCTGGCCAGGCTCCTTCTTCTCATGGGCTGGAGCCGATT
 TGGCGAAGCTTGGCTGGGCTGCGCTCCCGCTTCCAAGAGTTCAGCCGTGTCTATTACGCTGCTCTCGCG
 GCCACCTCAACCCATGTGAGGTGGCACTGGACTGAGAGACCTGGGAGCAAGCCCTGGATGGATCTTCT
 CTGGGGATGGGGTGTGGGGAGGGGTGATAGGAGGGTGGGTGGGAAGGGTGTGGCTCAGATGGCATCTCT
 GTACCCACAGTGAGGTGGTAGAATACTAAATAACCTGGATCACACC
- [0360] 랫트 메테오린 전체 길이 아미노산 서열(서열 번호 8)
 >IPI00369281.1 |REFSEQ_XP:XP_213261|ENSEMBL:ENSRNOP0000026676
MLVAALLCAL CCGLLAASAR AGYSEDRCWS RSGSLTQEPG SVGQLTLDCT EGAIWLYPA
 GALRLTLGGS DPGTRPSIVC LRPRPFAGA QVFAERMAGN LELLLAEGQG LAGGRCMRWG
 PRERRALFLQ ATPHRDISRR VAAFQFELHE DQRAEMSPQA QFGVDGACR PCSDAELLLT
 ACTSDFVIHG TIHGVVHDME LQESVITVVA TRVIRQTLPL FQEGSSEGRG QASVRTLLRC
 GVRPGPGSFL FMGWSRFGEA WLGCAPRFQE FSRVYSAALA AHLNPCEVAL D
- [0363] 랫트 메테오린, 시그널 펩타이드가 없는 단백질(서열 번호 9)
 GYSEDRCSWR GSGLTQEPGS VGQLTLDCTE GAIEWLYPAG ALRLTLGGSD PGTRPSIVCL
 RPRPFAGA QVFAERMAGN ELLLAEGQGL AGGRCMRWGP RERRALFLQA TPHRDISRRV
 AAFQFELHED QRAEMSPQA QFGVDGACRP CSDAELLTA CTSDFVIHGT IHGVVHDMEL
 QESVITVVAT RVIRQTLPLF QEGSSEGRGQ ASVRTLLRC VRRPGPGSFL MGWSRFGEAW
 LGCAPRFQEF SRVYSAALAA HLNPCEVALLD
- [0365] 작제물 pCAn. 메테오린 및 pT2.CAn. 메테오린에 존재하는 코돈 최적화된 메테오린 뉴클레오타이드 서열(서열 번호 10)

ATGGGCTTTCCCGCTGCCGCCCTGCTGTGCGCTCTGTGCTGCGGACTGCT
 GGCTCCTGCAGCCAGAGCCGGCTACAGCGAGGAACGGTGCAGCTGGCGGG
 GCAGCGGCCTGACCCAGGAACCTGGCAGCGTCGGCCAGCTCGCACTGGCC
 TGTGCAGAAGGCGCCGTGGAGTGGCTGTACCCCGCAGGCGCCCTGAGACT
 GACCCCTGGGCGGACCCCGACCCAGAGCCAGACCCGGCATTGCCGTGTCTGA
 GGCCCGTGC CGCCCTTTTCGCTGGCGCCAGGTGTTTCGCCGAGAGAGCCGGC
 GGAGCCCTGGAACCTCCTGCTCGCCGAAGGCCCTGGTCCAGCCGGCGGAAG
 ATGCGTGAGATGGGGCCCAAGAGAGCGGAGAGCCCTGTTCTGCAAGCCA
 CCCCCACCAGGACATCAGCAGACGGGTGGCCGCCTTCAGATTGAGCTG
 CGGGAGGACGGTAGACCCGAGCTGCCACCTCAGGCCACGGACTGGGAGT
 GGACGGCGCCTGCAGACCCTGTAGCGACGCCGAGCTGCTGCTCGCCGCCT
 GCACCAGCGACTTCGTGATCCACGGCATCATCCACGGCGTGACCCACGAC
 GTGGAGCTGCAGGAAAGCGTCATCACCGTCGTCGCCGCCAGAGTGCTGAG
 ACAGACCCCCCTCTGTTCCAGGCCGGCAGAAGCGGCGACCAGGGCCTGA
 CCAGCATCCGGACCCCTGAGATGCGGCGTGATCCCGGACCCGGCACC
 TTCCCTGTTTCATGGGCTGGTCCAGATTCGGCGAGGCCCGGCTGGGCTGCGC
 TCCCCGGTTCCAGGAATTCAGACGGGCCTACGAGGCCGCCAGGGCCGCTC
 ATCTGCACCCCTGCGAGGTGGCCCTGCATTGA

[0367]

[0368] 컨센서스 서열, 성숙한 메테오린(서열 번호 11)

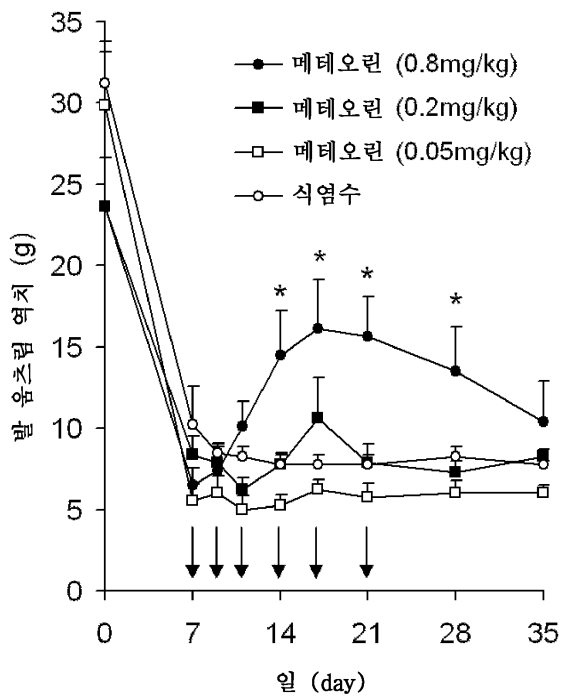
GYSEXRCSWR	GSGLTQEPGS	VGQLXLXCXE	GAXEWLYPAG	ALRLTLGGXD	PXXRPXIXCL	60
RPXRPFAGAQ	VFAERXXGXL	ELLLAEGXXX	AGGRCXRWGP	RERRALFLQA	TPHXDISRRV	120
AAFXFELXED	XRXEXXPQAX	GXGVDGACRP	CSDAELLXA	CTSDFVIHGX	IHGVDXDXEL	180
QESVITVVXX	RVXRQTXPLF	XXGXSXXGX	XSXRTXLRCG	VXPGPGXFLF	MGWSRFGEAX	240
LGCAPRFQEF	XRXYXAAXXX	HLXPCEXALX				270

[0369]

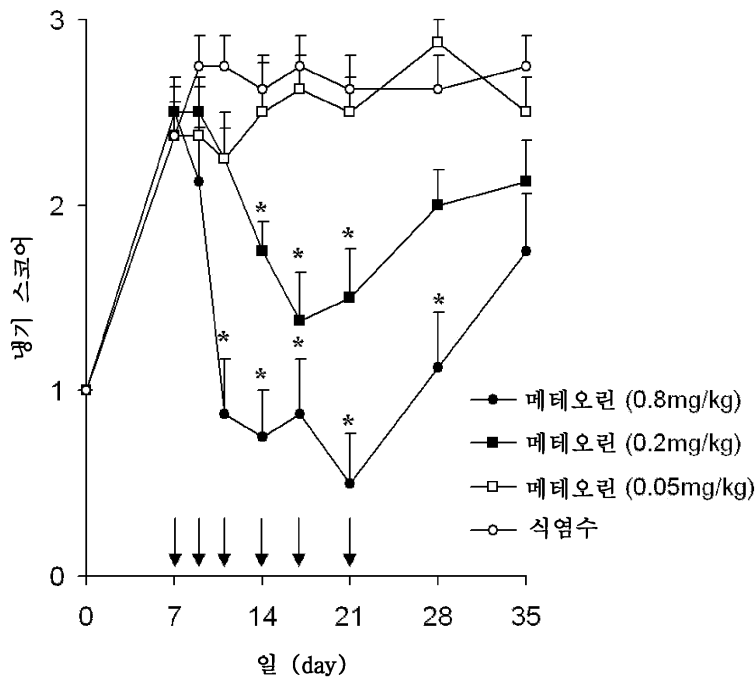
[0370] X는 DNA에 의해 암호화될 수 있는 21개의 아미노산 중 임의의 것이다.

도면

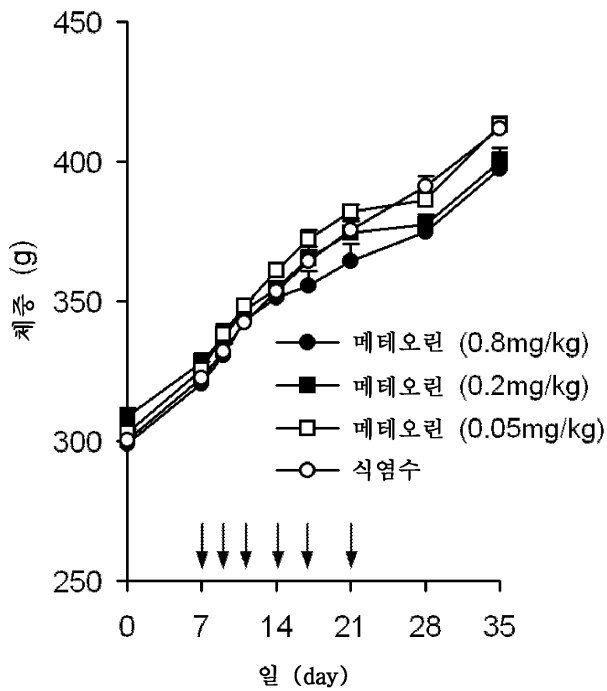
도면1



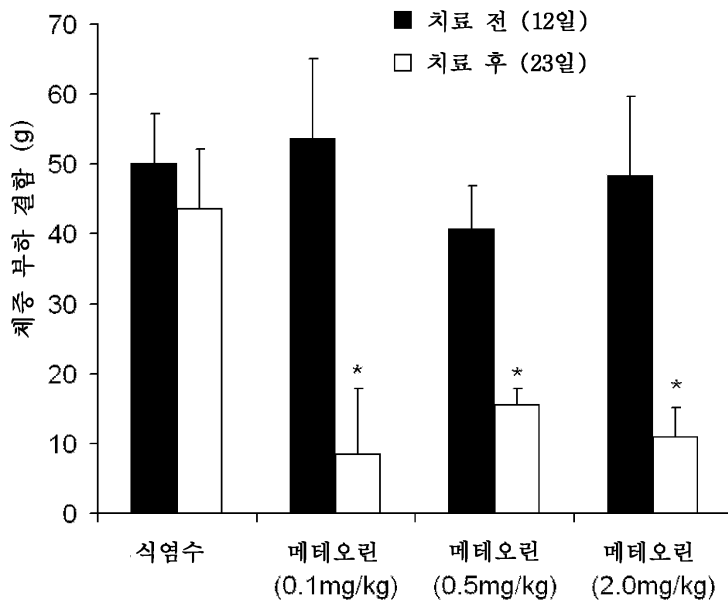
도면2



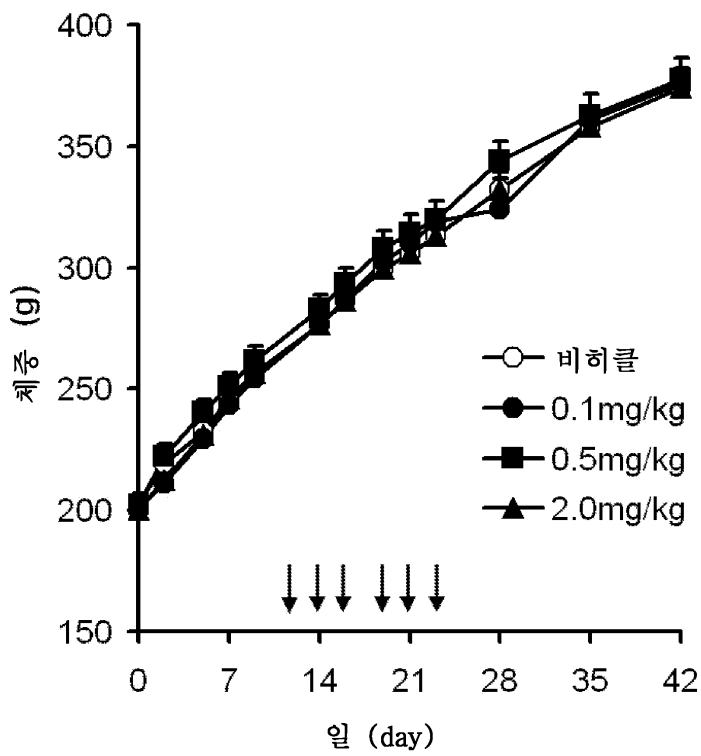
도면3



도면4



도면5



도면6a

마우스 --MIVATLLCALCCGLLAASAHAGYSEDRCSWRGSGLTQEPGSGVQLTLDCTEGAIEWLY 58
 랫트 --MIVAAALLCALCCGLLAASARAGYSEDRCSWRGSGLTQEPGSGVQLTLDCTEGAIEWLY 58
 사람 MGFPAAALLCALCCGLLAPAARAGYSEERCSWRGSGLTQEPGSGVQLALACAEGAVEWLY 60
 :.*:*****.*:*****:*****:*****.* *:*:*:*:*

마우스 PAGALRLTLGGDPGTRPSIVCLRPFRPFAGAQVFAERMTGNLELLLAEGPDLAGGRCMR 118
 랫트 PAGALRLTLGGSDPGTRPSIVCLRPFRPFAGAQVFAERMAGNLELLLAEGQLAGGRCMR 118
 사람 PAGALRLTLGGDPDRARPGIACLRVPRPFAGAQVFAERAGGALELLLAEGPDPAGGRCVR 120
 *****.* :*.*.*.***** ***** * ***** . *****.*

마우스 WGPERRALFLQATPHRDISRRVAAFREFELHEDQRAEMSPQAQGLGVDGACRPCSDAELL 178
 랫트 WGPERRALFLQATPHRDISRRVAAFREFELHEDQRAEMSPQAQGFVGDGACRPCSDAELL 178
 사람 WGPERRALFLQATPHQDISRRVAAFREFELREDGRPELPPQAHGLGVDGACRPCSDAELL 180
 *****:*****:*****:*****.* *.*.*.*:*****:*****

마우스 LAACTSDFVIHGIIHGVAHDTELQESVITVVVARVIRQTLPLFKESSEGGQGRASIRTL 238
 랫트 LTACTSDFVIHGIIHGVDHDMELQESVITVVATRIRQTLPLFQEGSSEGRQASVIRTL 238
 사람 LAACTSDFVIHGIIHGVDHDELQESVITVVAARVLRQTPPLFQAGRSQDGLTIRTL 240
 *:*****.* *.*.*.*****.*:*****.* *.*.*.* *.*.*.*:*****.*

마우스 RCGVPRPGSGFLFMGWSRFGEAWLGCAPRFQEF SRVYS AAL TTHLNPCEMALD 291
 랫트 RCGVPRPGSGFLFMGWSRFGEAWLGCAPRFQEF SRVYS AAL A AHLNPCVALD 291
 사람 RCGVPRPGTFFLFMGWSRFGEARLGCAPRFQEFRRAYEAARA AHLHPCEVALH 293
 *****:*****:***** ***** *.*.*.* :*:*:*:*:*

도면6b

마우스 GYSEDRCSWRGSGLTQEPGSGVQLTLDCTEGAIEWLYPAGALRLTLGGDPGTRPSIVCL 60
 랫트 GYSEDRCSWRGSGLTQEPGSGVQLTLDCTEGAIEWLYPAGALRLTLGGSDPGTRPSIVCL 60
 사람 GYSEERCSWRGSGLTQEPGSGVQLALACAEGAVEWLYPAGALRLTLGGDPDRARPGIACL 60
 *****:*****:*****.* *:*:*:*:*:*****:*****.* *:*.*.*

마우스 RPERPFAGAQVFAERMTGNLELLLAEGPDLAGGRCMRWGPERRALFLQATPHRDISRRV 120
 랫트 RPTRPFAGAQVFAERMAGNLELLLAEGQLAGGRCMRWGPERRALFLQATPHRDISRRV 120
 사람 RPVRPFAGAQVFAERAGGALELLLAEGPDPAGGRCVRWGPERRALFLQATPHQDISRRV 120
 ** ***** * ***** . *****:*****:*****:*****

마우스 AAFREFELHEDQRAEMSPQAQGLGVDGACRPCSDAELLAACTSDFVIHGIIHGVAHDTEL 180
 랫트 AAFQFELHEDQRAEMSPQAQGFVGDGACRPCSDAELLTACTSDFVIHGIIHGVDHDMEL 180
 사람 AAFREFELREDGRPELPPQAHGLGVDGACRPCSDAELLAACTSDFVIHGIIHGVDHDEL 180
 *****:*****.* *.*.*.*:*****:*****:***** *****.* * *

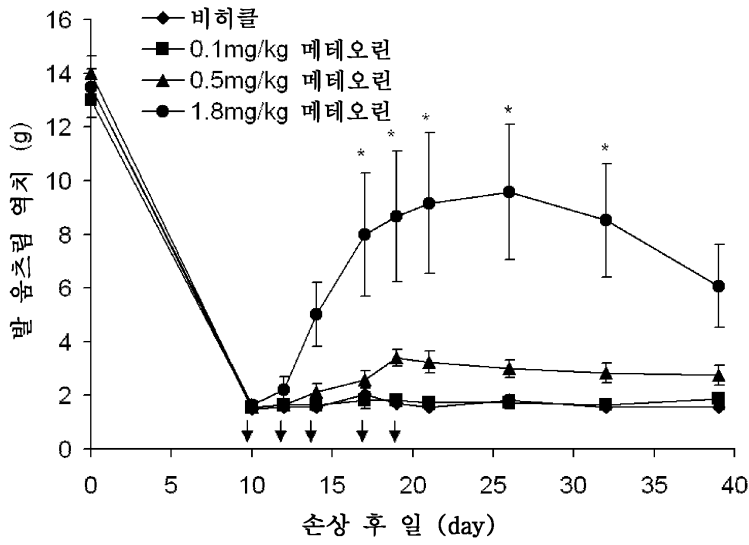
마우스 QESVITVVVARVIRQTLPLFKESSEGGQGRASIRTLRCGVPRPGSGFLFMGWSRFGEAW 240
 랫트 QESVITVVATRIRQTLPLFQEGSSEGRQASVIRTLRCGVPRPGSGFLFMGWSRFGEAW 240
 사람 QESVITVVAARVLRQTPPLFQAGRSQDGLTIRTLPLRCGVHPGPGTFFLFMGWSRFGEAR 240
 *****.*:*****.* * * *.* *:*:*:*:*:*:*****:*****:*****

마우스 LGCAPRFQEF SRVYS AAL TTHLNPCEMALD 270
 랫트 LGCAPRFQEF SRVYS AAL A AHLNPCVALD 270
 사람 LGCAPRFQEFRRAYEAARA AHLHPCEVALH 270
 ***** *.*.*.* :*:*:*:*:*

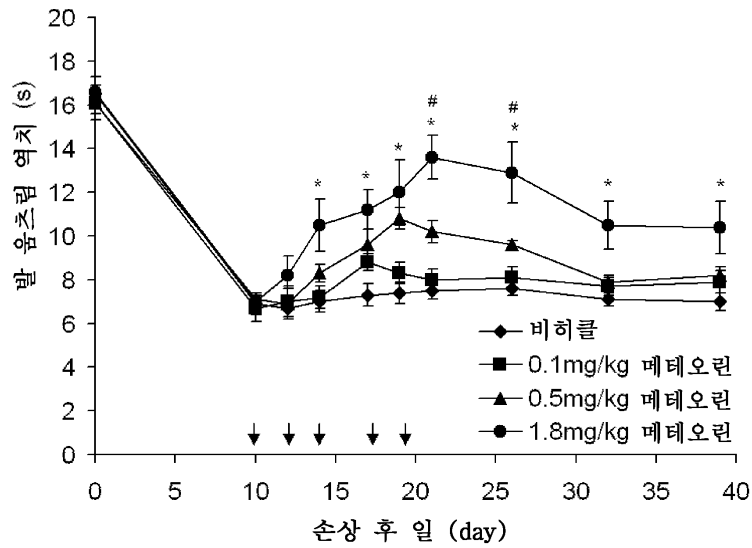
도면6c

킨센서스 GYSEXRCSWRGSGLTQEPGSGVQLXLXCXEGAXEWLYPAGALRLTLGGDXPXXRPXIXCL 60
 킨센서스 REXRPFAGAQVFAERXXGXLELLLAEGXXXAGGRCXRWGPERRALFLQATPHXDISRRV 120
 킨센서스 AAFXELXEDXRKEXXPQAXGXGVDGACRPCSDAELLXACTSDFVIHGXIHGVDHDXEL 180
 킨센서스 QESVITVVXXRVRQTXPLFXGXGXXXGXSRXTLRCGVXPGGXFLFMGWSRFGEAX 240
 킨센서스 LGCAPRFQEFXRXYYAAXXXHLXPCEXALX 270

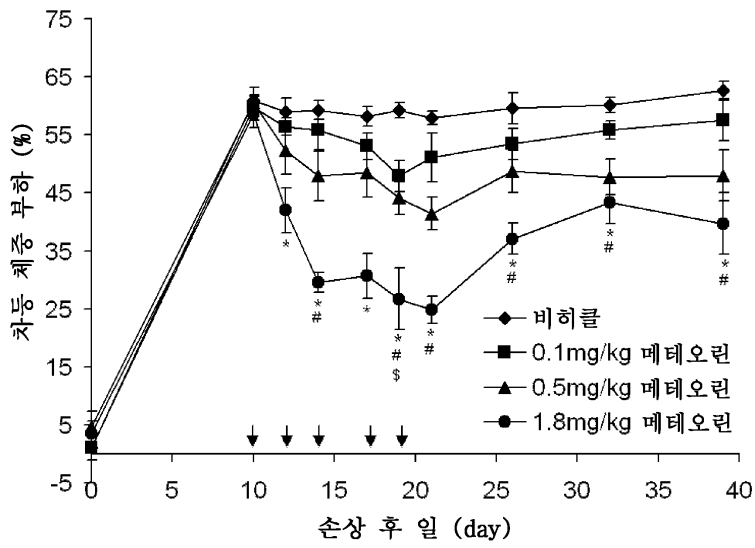
도면7



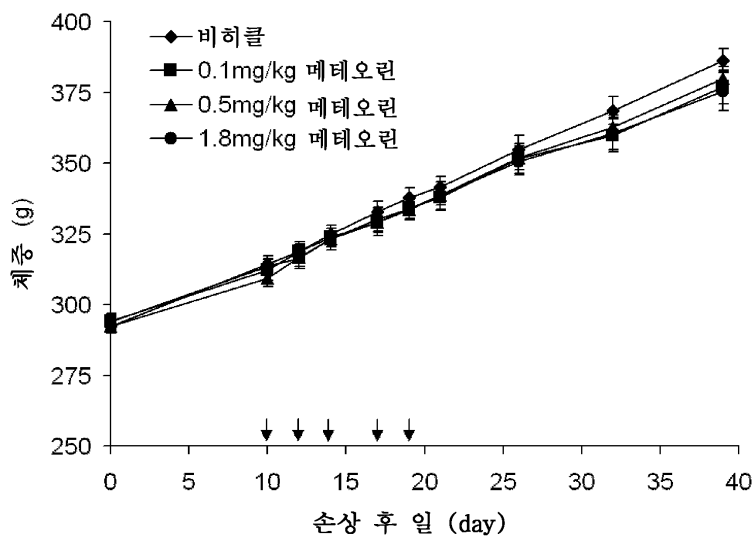
도면8



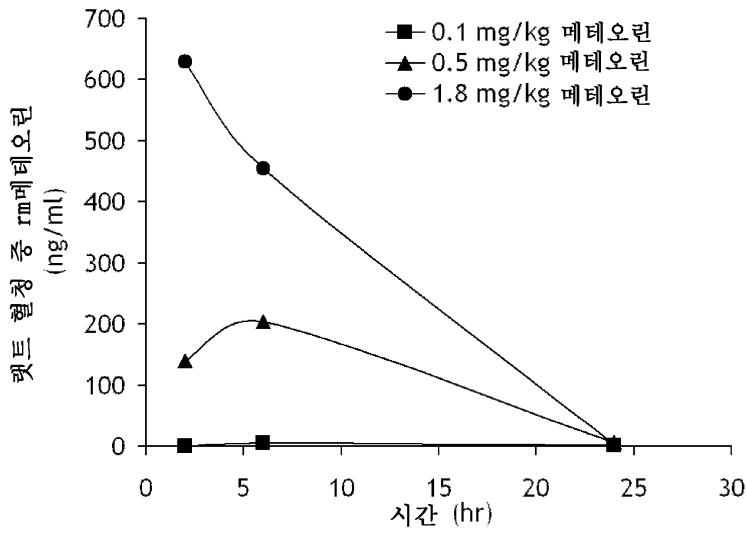
도면9



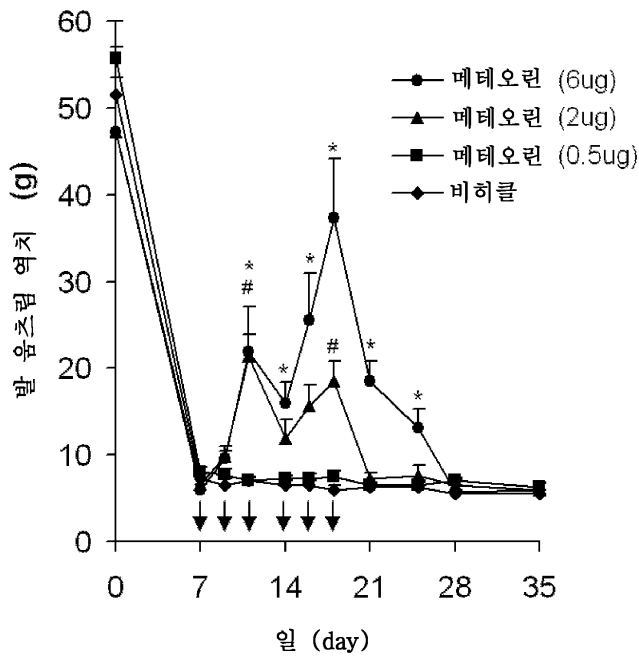
도면10



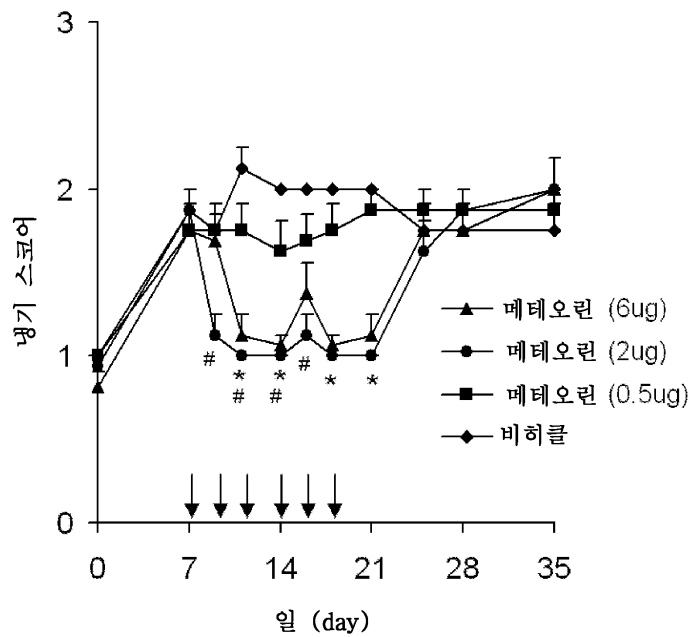
도면11



도면12



도면13



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> NSGENE A/S

<120> USE OF METEORIN FOR THE TREATMENT OF ALLODYNIA, HYPERALGESIA, SPONTANEOUS PAIN AND PHANTOM PAIN

<130> P2413PC00

<150> DK PA 2010 70423

<151> 2010-10-01

<150> US 61/390,791

<151> 2010-10-07

<160> 11

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1109

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (118)..(999)

<400> 1

gcttcgccgg ggccggggcgg ccggcgcccc cgctgtctcc cgccgccgcc cggaccgcgcg

60

cccgcggg gcagcgggtgg tgagagcccc gactccccgg acgccgcccg cegtgcc 117

 atg ggg ttc ceg gcc gcg gcg ctg ctc tgc gcg ctg tgc tgc ggc ctc 165
 Met Gly Phe Pro Ala Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu Cys Cys Gly Leu
 1 5 10 15
 ctg gcc ceg get gcc cgc gcc ggc tac tcc gag gag cgc tgc agc tgg 213
 Leu Ala Pro Ala Ala Arg Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Arg Cys Ser Trp
 20 25 30
 agg ggc agc ggc ctc acc cag gag ccc ggc agc gtg ggg cag ctg gcc 261

 Arg Gly Ser Gly Leu Thr Gln Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Ala
 35 40 45
 ctg gcc tgt gcg gag ggc gcg gtt gag tgg ctg tac ccg gct ggg gcg 309
 Leu Ala Cys Ala Glu Gly Ala Val Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala
 50 55 60
 ctg cgc ctg acc ctg ggc ggc ccc gat ccc aga gcg cgg ccc ggc atc 357
 Leu Arg Leu Thr Leu Gly Gly Pro Asp Pro Arg Ala Arg Pro Gly Ile

 65 70 75 80
 gcc tgt ctg cgg ccg gtg cgg ccc ttc gcg ggc gcc cag gtc ttc gcg 405
 Ala Cys Leu Arg Pro Val Arg Pro Phe Ala Gly Ala Gln Val Phe Ala
 85 90 95
 gag cgc gca ggg ggc gcc ctg gag ctg ctg ctg gcc gag ggc ccg ggc 453
 Glu Arg Ala Gly Gly Ala Leu Glu Leu Leu Leu Ala Glu Gly Pro Gly
 100 105 110

 ccg gca ggg ggc cgc tgc gtg cgc tgg ggt ccc cgc gag cgc cgg gcc 501
 Pro Ala Gly Gly Arg Cys Val Arg Trp Gly Pro Arg Glu Arg Arg Ala
 115 120 125
 ctc ttc ctg cag gcc acg ccg cac cag gac atc agc cgc cgc gtg gcc 549
 Leu Phe Leu Gln Ala Thr Pro His Gln Asp Ile Ser Arg Arg Val Ala
 130 135 140
 gcc ttc cgc ttt gag ctg cgc gag gac ggg cgc ccc gag ctg ccc ccg 597

 Ala Phe Arg Phe Glu Leu Arg Glu Asp Gly Arg Pro Glu Leu Pro Pro

145 150 155 160
 cag gcc cac ggt ctc ggc gta gac ggt gcc tgc agg ccc tgc agc gac 645
 Gln Ala His Gly Leu Gly Val Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp
 165 170 175
 gct gag ctg ctc ctg gcc gca tgc acc agc gac ttc gta att cac ggg 693
 Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly
 180 185 190
 atc atc cat ggg gtc acc cat gac gtg gag ctg cag gag tct gtc atc 741
 Ile Ile His Gly Val Thr His Asp Val Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile
 195 200 205
 act gtg gtg gcc gcc cgt gtc ctc cgc cag aca ccg ccg ctg ttc cag 789
 Thr Val Val Ala Ala Arg Val Leu Arg Gln Thr Pro Pro Leu Phe Gln
 210 215 220

 gcg ggg cga tcc ggg gac cag ggg ctg acc tcc att cgt acc cca ctg 837
 Ala Gly Arg Ser Gly Asp Gln Gly Leu Thr Ser Ile Arg Thr Pro Leu
 225 230 235 240
 cgc tgt ggc gtc cac ccg ggc cca ggc acc ttc ctc ttc atg ggc tgg 885
 Arg Cys Gly Val His Pro Gly Pro Gly Thr Phe Leu Phe Met Gly Trp
 245 250 255
 agc cgc ttt ggg gag gcc cgg ctg ggc tgt gcc cca cga ttc cag gag 933

 Ser Arg Phe Gly Glu Ala Arg Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu
 260 265 270
 ttc cgc cgt gcc tac gag gct gcc cgt gct gcc cac ctc cac ccc tgc 981
 Phe Arg Arg Ala Tyr Glu Ala Ala Arg Ala Ala His Leu His Pro Cys
 275 280 285
 gag gtg gcg ctg cac tga ggggctgggt gctggggagg ggctggtagg 1029
 Glu Val Ala Leu His

 290
 agggagggtg ggcccactgc tttggagggtg atgggactat caataagaac tctgttcacg 1089
 caaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1109
 <210> 2

<211> 293

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Phe Pro Ala Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu Cys Cys Gly Leu

1 5 10 15

Leu Ala Pro Ala Ala Arg Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Arg Cys Ser Trp

 20 25 30

Arg Gly Ser Gly Leu Thr Gln Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Ala

 35 40 45

Leu Ala Cys Ala Glu Gly Ala Val Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala

 50 55 60

Leu Arg Leu Thr Leu Gly Gly Pro Asp Pro Arg Ala Arg Pro Gly Ile

65 70 75 80

Ala Cys Leu Arg Pro Val Arg Pro Phe Ala Gly Ala Gln Val Phe Ala

 85 90 95

Glu Arg Ala Gly Gly Ala Leu Glu Leu Leu Leu Ala Glu Gly Pro Gly

 100 105 110

Pro Ala Gly Gly Arg Cys Val Arg Trp Gly Pro Arg Glu Arg Arg Ala

 115 120 125

Leu Phe Leu Gln Ala Thr Pro His Gln Asp Ile Ser Arg Arg Val Ala

 130 135 140

Ala Phe Arg Phe Glu Leu Arg Glu Asp Gly Arg Pro Glu Leu Pro Pro

145 150 155 160

Gln Ala His Gly Leu Gly Val Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp

 165 170 175

Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly

 180 185 190

Ile Ile His Gly Val Thr His Asp Val Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile

 195 200 205

Thr Val Val Ala Ala Arg Val Leu Arg Gln Thr Pro Pro Leu Phe Gln

115 120 125
 Glu Asp Gly Arg Pro Glu Leu Pro Pro Gln Ala His Gly Leu Gly Val
 130 135 140
 Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala
 145 150 155 160
 Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly Ile Ile His Gly Val Thr His
 165 170 175

Asp Val Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile Thr Val Val Ala Ala Arg Val
 180 185 190
 Leu Arg Gln Thr Pro Pro Leu Phe Gln Ala Gly Arg Ser Gly Asp Gln
 195 200 205
 Gly Leu Thr Ser Ile Arg Thr Pro Leu Arg Cys Gly Val His Pro Gly
 210 215 220
 Pro Gly Thr Phe Leu Phe Met Gly Trp Ser Arg Phe Gly Glu Ala Arg
 225 230 235 240

Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu Phe Arg Arg Ala Tyr Glu Ala
 245 250 255
 Ala Arg Ala Ala His Leu His Pro Cys Glu Val Ala Leu His
 260 265 270

<210> 4
 <211> 1363
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <220><221> CDS
 <222> (84)..(959)
 <400> 4

gggcagccgc gccgcccggct gctcgcgctg cggccccgac cctcccgggg cagcagtcgc 60
 aggccccggc gcgcccccta acc atg ctg gta gcc acg ctt ctt tgc gcg etc 113

Met Leu Val Ala Thr Leu Leu Cys Ala Leu
 1 5 10
 tgt tgc ggc ctc ctg gcc gcg tcc gct cac gct ggc tac tcg gaa gac 161
 Cys Cys Gly Leu Leu Ala Ala Ser Ala His Ala Gly Tyr Ser Glu Asp

15	20	25	
cgc tgc agc tgg agg ggc agc ggt ttg acc cag gag cct ggc agc gtg			209
Arg Cys Ser Trp Arg Gly Ser Gly Leu Thr Gln Glu Pro Gly Ser Val			
30	35	40	
ggg cag ctg acc ctg gac tgt act gag ggc gct atc gag tgg ctg tac			257
Gly Gln Leu Thr Leu Asp Cys Thr Glu Gly Ala Ile Glu Trp Leu Tyr			
45	50	55	
cca gct ggg gcg ctg cgc ctg acc ctg ggc ggc ccc gat ccg ggc aca			305
Pro Ala Gly Ala Leu Arg Leu Thr Leu Gly Gly Pro Asp Pro Gly Thr			
60	65	70	
cgg ccc agc atc gtc tgt ctg cgc cca gag cgg ccc ttc gct ggt gcc			353
Arg Pro Ser Ile Val Cys Leu Arg Pro Glu Arg Pro Phe Ala Gly Ala			
75	80	85	90
cag gtc ttc gct gaa cgt atg acc ggc aat cta gag ttg cta ctg gcc			401
Gln Val Phe Ala Glu Arg Met Thr Gly Asn Leu Glu Leu Leu Leu Ala			
95	100	105	
gag ggc ccg gac ctg gct ggg ggc cgc tgc atg cgc tgg ggt ccc cgc			449
Glu Gly Pro Asp Leu Ala Gly Gly Arg Cys Met Arg Trp Gly Pro Arg			
110	115	120	
gag cgc cga gcc ctt ttc ctg cag gcc aca cca cac cgc gac atc agc			497
Glu Arg Arg Ala Leu Phe Leu Gln Ala Thr Pro His Arg Asp Ile Ser			
125	130	135	
cgc aga gtt gct gcc ttc cgt ttt gaa ctg cac gag gac caa cgt gca			545
Arg Arg Val Ala Ala Phe Arg Phe Glu Leu His Glu Asp Gln Arg Ala			
140	145	150	
gaa atg tct ccc cag gct caa ggt ctt ggt gtg gat ggt gcc tgc agg			593
Glu Met Ser Pro Gln Ala Gln Gly Leu Gly Val Asp Gly Ala Cys Arg			
155	160	165	170
ccc tgc agt gat gcc gag ctc ctc ctg gct gca tgc acc agt gat ttt			641
Pro Cys Ser Asp Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala Cys Thr Ser Asp Phe			

175	180	185	
gtg atc cac ggg acc atc cat ggg gtc gcc cat gac aca gag ctg caa			689
Val Ile His Gly Thr Ile His Gly Val Ala His Asp Thr Glu Leu Gln			
190	195	200	
gaa tca gtc atc act gtg gtg gtt gct cgt gtc atc cgc cag aca ctg			737
Glu Ser Val Ile Thr Val Val Val Ala Arg Val Ile Arg Gln Thr Leu			
205	210	215	
cca ctg ttc aag gaa ggg agc tgc gag ggc caa ggc cgg gcc tcc att			785
Pro Leu Phe Lys Glu Gly Ser Ser Glu Gly Gln Gly Arg Ala Ser Ile			
220	225	230	
cgt acc ttg ctg cgc tgt ggt gtg cgt cct ggc cca ggc tcc ttc etc			833
Arg Thr Leu Leu Arg Cys Gly Val Arg Pro Gly Pro Gly Ser Phe Leu			
235	240	245	250
ttc atg ggc tgg agc cga ttt ggc gaa gct tgg ctg ggc tgt gct ccc			881
Phe Met Gly Trp Ser Arg Phe Gly Glu Ala Trp Leu Gly Cys Ala Pro			
255	260	265	
cgc ttc caa gag ttc agc cgt gtc tat tca gct gct ctc acg acc cat			929
Arg Phe Gln Glu Phe Ser Arg Val Tyr Ser Ala Ala Leu Thr Thr His			
270	275	280	
ctc aac cca tgt gag atg gca ctg gac tga gagacctggg agcaagccct			979
Leu Asn Pro Cys Glu Met Ala Leu Asp			
285	290		
ggatggacct tcttctggag atggggtgtt ggggaggtg atgggaggt gggtgagaag			1039
gggtgtggctc ggatggcatc ctggfaccac cagttagctg gtagaatact aagtaatctg			1099
gaccatacca gccactgtag tcatggtctt ctgtggcagg cagcataccc agctctgtgc			1159
ctgcctcaact ttgtctactc tccagtctgc tgccttcta acccttctta gcctgctgac			1219
cagttagctc atgttttctc cgaattccag ggtgctgctg gggttcagag caaccgtgcc			1279
gtagtttggga agacttgagc taattgtttt tttttgttt gttttttgt ttgtttaaag			1339
gtggcctggg gggggcggca aaca			1363

<210> 5

<211> 291

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Met Leu Val Ala Thr Leu Leu Cys Ala Leu Cys Cys Gly Leu Leu Ala

1 5 10 15

Ala Ser Ala His Ala Gly Tyr Ser Glu Asp Arg Cys Ser Trp Arg Gly

 20 25 30

Ser Gly Leu Thr Gln Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Thr Leu Asp

 35 40 45

Cys Thr Glu Gly Ala Ile Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Leu Arg

 50 55 60

Leu Thr Leu Gly Gly Pro Asp Pro Gly Thr Arg Pro Ser Ile Val Cys

65 70 75 80

Leu Arg Pro Glu Arg Pro Phe Ala Gly Ala Gln Val Phe Ala Glu Arg

 85 90 95

Met Thr Gly Asn Leu Glu Leu Leu Leu Ala Glu Gly Pro Asp Leu Ala

 100 105 110

Gly Gly Arg Cys Met Arg Trp Gly Pro Arg Glu Arg Arg Ala Leu Phe

 115 120 125

Leu Gln Ala Thr Pro His Arg Asp Ile Ser Arg Arg Val Ala Ala Phe

 130 135 140

Arg Phe Glu Leu His Glu Asp Gln Arg Ala Glu Met Ser Pro Gln Ala

145 150 155 160

Gln Gly Leu Gly Val Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp Ala Glu

 165 170 175

Leu Leu Leu Ala Ala Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly Thr Ile

 180 185 190

His Gly Val Ala His Asp Thr Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile Thr Val

 195 200 205

Val Val Ala Arg Val Ile Arg Gln Thr Leu Pro Leu Phe Lys Glu Gly

Glu Asp Gln Arg Ala Glu Met Ser Pro Gln Ala Gln Gly Leu Gly Val
 130 135 140

Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala
 145 150 155 160

Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly Thr Ile His Gly Val Ala His
 165 170 175

Asp Thr Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile Thr Val Val Val Ala Arg Val
 180 185 190

Ile Arg Gln Thr Leu Pro Leu Phe Lys Glu Gly Ser Ser Glu Gly Gln
 195 200 205

Gly Arg Ala Ser Ile Arg Thr Leu Leu Arg Cys Gly Val Arg Pro Gly
 210 215 220

Pro Gly Ser Phe Leu Phe Met Gly Trp Ser Arg Phe Gly Glu Ala Trp
 225 230 235 240

Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu Phe Ser Arg Val Tyr Ser Ala
 245 250 255

Ala Leu Thr Thr His Leu Asn Pro Cys Glu Met Ala Leu Asp
 260 265 270

<210> 7

<211> 1026

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220><221> CDS

<222> (1)..(876)

<400> 7

atg ctg gta gcg gcg ctt ctc tgc gcg ctg tgc tgc ggc ctc ttg gct 48

Met Leu Val Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu Cys Cys Gly Leu Leu Ala
 1 5 10 15

gcg tcc gct cga gct ggc tac tcc gag gac cgc tgc agc tgg agg ggc 96

Ala Ser Ala Arg Ala Gly Tyr Ser Glu Asp Arg Cys Ser Trp Arg Gly
 20 25 30

agc ggt ttg acc cag gaa cct ggc agc gtg ggg cag ctg acc ctg gat 144
 Ser Gly Leu Thr Gln Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Thr Leu Asp
 35 40 45
 tgt act gag ggt gct atc gag tgg ctg tat cca gct ggg gcg ctg cgc 192
 Cys Thr Glu Gly Ala Ile Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Leu Arg
 50 55 60
 ctg act cta ggc ggc tct gat ccg ggc acg cgg ccc agc atc gtc tgt 240

 Leu Thr Leu Gly Gly Ser Asp Pro Gly Thr Arg Pro Ser Ile Val Cys
 65 70 75 80
 ctg cgc cca aca cgg ccc ttc gct ggt gcc cag gtc ttc gct gaa cgg 288
 Leu Arg Pro Thr Arg Pro Phe Ala Gly Ala Gln Val Phe Ala Glu Arg
 85 90 95
 atg gcc ggc aac cta gag ttg cta ctg gcc gag ggc caa ggc ctg gct 336
 Met Ala Gly Asn Leu Glu Leu Leu Leu Ala Glu Gly Gln Gly Leu Ala
 100 105 110
 ggg ggc cgc tgc atg cgc tgg ggt cct cgc gag cgc cga gcc ctt ttc 384
 Gly Gly Arg Cys Met Arg Trp Gly Pro Arg Glu Arg Arg Ala Leu Phe
 115 120 125
 ctg cag gcc acg cca cac cgg gac atc agc cgc aga gtt gct gcc ttc 432
 Leu Gln Ala Thr Pro His Arg Asp Ile Ser Arg Arg Val Ala Ala Phe
 130 135 140

 caa ttt gaa ctg cac gag gac caa cgt gca gaa atg tct ccc cag gcc 480
 Gln Phe Glu Leu His Glu Asp Gln Arg Ala Glu Met Ser Pro Gln Ala
 145 150 155 160
 caa ggt ttt ggt gtg gat ggt gcc tgc agg ccc tgc agt gat gcc gag 528
 Gln Gly Phe Gly Val Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp Ala Glu
 165 170 175
 etc ctt ctg act gca tgc acc agt gac ttt gtg atc cat ggg acc atc 576

 Leu Leu Leu Thr Ala Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly Thr Ile
 180 185 190
 cat ggg gtc gtc cat gac atg gag ctg caa gaa tca gtc atc act gtg 624

His Gly Val Val His Asp Met Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile Thr Val
 195 200 205
 gtg gcc act cgt gtc atc cgc cag aca ctg cca ctg ttc cag gaa ggg 672
 Val Ala Thr Arg Val Ile Arg Gln Thr Leu Pro Leu Phe Gln Glu Gly
 210 215 220
 agc tcg gag ggc cgg ggc cag gcc tcc gtt cgt acc ttg ttg cgc tgt 720
 Ser Ser Glu Gly Arg Gly Gln Ala Ser Val Arg Thr Leu Leu Arg Cys
 225 230 235 240
 ggt gtg cgt cct ggc cca ggc tcc ttc ctc ttc atg ggc tgg agc cga 768
 Gly Val Arg Pro Gly Pro Gly Ser Phe Leu Phe Met Gly Trp Ser Arg
 245 250 255
 ttt ggc gaa gct tgg ctg ggc tgc gct ccc cgc ttc caa gag ttc agc 816
 Phe Gly Glu Ala Trp Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu Phe Ser
 260 265 270
 cgt gtc tat tca gct gct ctc gcg gcc cac ctc aac cca tgt gag gtg 864
 Arg Val Tyr Ser Ala Ala Leu Ala Ala His Leu Asn Pro Cys Glu Val
 275 280 285
 gca ctg gac tga gagacctggg agcaagccct ggatggatct tcctctgggg 916
 Ala Leu Asp
 290
 atggggtgtt ggggaggggt gataggaggg tgggtgggaa ggggtgtggct cagatggcat 976
 cctggtacce acagtgaggt ggtagaatac taataacct ggatcacacc 1026
 <210> 8
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 8
 Met Leu Val Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu Cys Cys Gly Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Ser Ala Arg Ala Gly Tyr Ser Glu Asp Arg Cys Ser Trp Arg Gly
 20 25 30

Ser Gly Leu Thr Gln Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Thr Leu Asp
 35 40 45
 Cys Thr Glu Gly Ala Ile Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Leu Arg
 50 55 60
 Leu Thr Leu Gly Gly Ser Asp Pro Gly Thr Arg Pro Ser Ile Val Cys
 65 70 75 80

 Leu Arg Pro Thr Arg Pro Phe Ala Gly Ala Gln Val Phe Ala Glu Arg
 85 90 95
 Met Ala Gly Asn Leu Glu Leu Leu Leu Ala Glu Gly Gln Gly Leu Ala
 100 105 110
 Gly Gly Arg Cys Met Arg Trp Gly Pro Arg Glu Arg Arg Ala Leu Phe
 115 120 125
 Leu Gln Ala Thr Pro His Arg Asp Ile Ser Arg Arg Val Ala Ala Phe
 130 135 140

 Gln Phe Glu Leu His Glu Asp Gln Arg Ala Glu Met Ser Pro Gln Ala
 145 150 155 160
 Gln Gly Phe Gly Val Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp Ala Glu
 165 170 175
 Leu Leu Leu Thr Ala Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly Thr Ile
 180 185 190
 His Gly Val Val His Asp Met Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile Thr Val
 195 200 205

 Val Ala Thr Arg Val Ile Arg Gln Thr Leu Pro Leu Phe Gln Glu Gly
 210 215 220
 Ser Ser Glu Gly Arg Gly Gln Ala Ser Val Arg Thr Leu Leu Arg Cys
 225 230 235 240
 Gly Val Arg Pro Gly Pro Gly Ser Phe Leu Phe Met Gly Trp Ser Arg
 245 250 255
 Phe Gly Glu Ala Trp Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu Phe Ser
 260 265 270

 Arg Val Tyr Ser Ala Ala Leu Ala Ala His Leu Asn Pro Cys Glu Val

Ile Arg Gln Thr Leu Pro Leu Phe Gln Glu Gly Ser Ser Glu Gly Arg
 195 200 205

Gly Gln Ala Ser Val Arg Thr Leu Leu Arg Cys Gly Val Arg Pro Gly
 210 215 220

Pro Gly Ser Phe Leu Phe Met Gly Trp Ser Arg Phe Gly Glu Ala Trp
 225 230 235 240

Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu Phe Ser Arg Val Tyr Ser Ala
 245 250 255

Ala Leu Ala Ala His Leu Asn Pro Cys Glu Val Ala Leu Asp
 260 265 270

<210> 10

<211> 882

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Codon optimised

<400> 10

atgggctttc ccgctgccgc cctgctgtgc gctctgtgct gcgactgct ggctcctgca 60
 gccagagccg gctacagcga ggaacgggtgc agctggcggg gcagcggcct gaccaggaa 120

cctggcagcg tcggccagct cgactggcc tgtgcagaag ggcctgga gtggctgtac 180
 cccgcaggcg ccctgagact gacctgggc ggaccgacc ccagagccag acccgccatt 240
 gcctgtctga ggcccgtcgc gcctttcgtc ggcgccagg tgttcgccga gagagccggc 300
 ggagccctgg aactcctgct cgccaaggc cctggtccag ccggcgggaag atgcgtgaga 360
 tggggcccaa gagagcggag agccctgttc ctgcaagcca cccccacca ggacatcagc 420
 agacgggtgg ccgccttcag attcgagctg cgggaggacg gtagaccga gctgccacct 480
 caggcccacg gactgggagt ggacggcgc tgcagacct gtagcgacgc cgagctgctg 540

ctcggccct gcaccagcga cttcgtgatc cacggcatca tccacggcgt gaccacgac 600
 gtggagctgc agaaagcgt catcacctc gtcgcccca gactgctgag acagacccc 660
 cctctgttcc aggccggcag aagcggcgc cagggcctga ccagcatccg gaccccctg 720
 agatgcggcg tgcattccgg acccgccacc ttctgttca tgggctggtc cagattcggc 780
 gaggcccggc tgggctgccc tcccgggttc caggaattca gacgggccta cgaggccgc 840
 agggccgctc atctgaccc ctgagaggtg gcctgcatt ga 882

<210> 11

<211> 270
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220><223> Consensus sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature
 <222> (49)..(49)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (52)..(53)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (56)..(56)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (58)..(58)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (63)..(63)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220
 ><221> misc_feature
 <222> (76)..(77)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (79)..(79)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (88)..(90)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (96)..(96)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (114)..(114)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (124)..(124)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (128)..(128)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (131)..(131)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (133)..(133)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (135)..(136)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature

<222> (140)..(140)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (142)..(142)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (159)..(159)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (170)..(170)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (175)..(175)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

 <220><221> misc_feature
 <222> (178)..(178)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (189)..(190)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (193)..(193)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (197)..(197)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (201)..(202)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

 <220><221> misc_feature
 <222> (204)..(204)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature

<222> (206)..(208)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (210)..(211)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (213)..(213)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (216)..(216)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

 <220><221> misc_feature
 <222> (222)..(222)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (227)..(227)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (240)..(240)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (251)..(251)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (253)..(253)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

 <220><221> misc_feature
 <222> (255)..(255)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (258)..(260)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature

<222> (263)..(263)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (267)..(267)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (270)..(270)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 11

Gly Tyr Ser Glu Xaa Arg Cys Ser Trp Arg Gly Ser Gly Leu Thr Gln

1 5 10 15

Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Xaa Leu Xaa Cys Xaa Glu Gly Ala

20 25 30

Xaa Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Leu Arg Leu Thr Leu Gly Gly

35 40 45

Xaa Asp Pro Xaa Xaa Arg Pro Xaa Ile Xaa Cys Leu Arg Pro Xaa Arg

50 55 60

Pro Phe Ala Gly Ala Gln Val Phe Ala Glu Arg Xaa Xaa Gly Xaa Leu

65 70 75 80

Glu Leu Leu Leu Ala Glu Gly Xaa Xaa Xaa Ala Gly Gly Arg Cys Xaa

85 90 95

Arg Trp Gly Pro Arg Glu Arg Arg Ala Leu Phe Leu Gln Ala Thr Pro

100 105 110

His Xaa Asp Ile Ser Arg Arg Val Ala Ala Phe Xaa Phe Glu Leu Xaa

115 120 125

Glu Asp Xaa Arg Xaa Glu Xaa Xaa Pro Gln Ala Xaa Gly Xaa Gly Val

130 135 140

Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp Ala Glu Leu Leu Leu Xaa Ala

145 150 155 160

Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly Xaa Ile His Gly Val Xaa His

165 170 175

Asp Xaa Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile Thr Val Val Xaa Xaa Arg Val

180	185	190	
Xaa Arg Gln Thr Xaa Pro Leu Phe Xaa Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa Xaa			
195	200	205	
Gly Xaa Xaa Ser Xaa Arg Thr Xaa Leu Arg Cys Gly Val Xaa Pro Gly			
210	215	220	
Pro Gly Xaa Phe Leu Phe Met Gly Trp Ser Arg Phe Gly Glu Ala Xaa			
225	230	235	240
Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu Phe Xaa Arg Xaa Tyr Xaa Ala			
245	250	255	
Ala Xaa Xaa Xaa His Leu Xaa Pro Cys Glu Xaa Ala Leu Xaa			
260	265	270	