

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202491581 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.10.04

(51) Int. Cl. *A61K 38/17* (2006.01)  
*A61P 25/04* (2006.01)  
*A61P 29/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.12.19

---

(54) ПЕПТИДЫ И СПОСОБЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛИ

---

(31) 21306835.6

(72) Изобретатель:

(32) 2021.12.17

Гайар Стефан, Касте Франсис,  
Мокрих Абделаиз (FR)

(33) EP

(86) PCT/EP2022/086559

(74) Представитель:

(87) WO 2023/111348 2023.06.22

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

ТАФАЛЬЖИ ТЕРАПЬЮТИКС (FR)

---

(57) Настоящее изобретение относится к новым пептидам, композициям и наборам, содержащим пептиды, для применения в качестве активного ингредиента для предотвращения или лечения боли у нуждающегося в этом субъекта. Также в данном документе описан способ модуляции экспрессии этих пептидов *in vitro* или *ex vivo*.

202491581 A1

202491581

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 581413EA/042

### ПЕПТИДЫ И СПОСОБЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛИ

#### Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящая заявка в целом относится к области управления болью. Более конкретно, настоящее изобретение относится к композициям для предотвращения и/или лечения боли, содержащим пептидный фрагмент белка TAFA-4 в качестве активного ингредиента, и способам предотвращения и/или лечения боли, в частности острой, подострой или хронической боли, возникающей в результате нейропатической боли, послеоперационной боли или воспалительной боли, или для предотвращения и/или лечения гипералгезии или аллодинии, возникающих в результате боли, вызванной травмой.

#### Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Боль обычно классифицируют как острую или хроническую. Острая боль кратковременна и необходима для поддержания нашей физической целостности, тогда как хроническая боль сохраняется дольше обычного времени заживления и отрицательно влияет на самочувствие. Хронические воспалительные, нейропатические или послеоперационные боли приводят к длительным сенсорным нарушениям, таким как гипералгезия (сильная боль, вызванная болевыми раздражителями) и механическая аллодиния (боль, вызванная неболевыми механическими раздражителями). Эти категории боли различаются по этиологии и клиническим особенностям, но имеют несколько общих механизмов, включая изменения нейроиммунных взаимодействий и сенсибилизацию нейронов, как периферическую, так и центральную (Costigan et al., 2009). Появляется все больше доказательств того, что потеря торможения может быть ключевым механизмом, лежащим в основе хронической боли (Bourane et al., 2015a; Bourane et al., 2015b; Boyle et al., 2019; Coull et al., 2005; Duan et al., 2014; Peirs et al., 2015; Petitjean et al., 2019; Petitjean et al., 2015; Zeilhofer et al., 2012; Zhang et al., 2018). Однако, несмотря на наши обширные знания о механизмах и схемах, лежащих в основе хронической боли у грызунов, применение этих результатов в эффективных способах лечения хронической боли у людей остается неудовлетворительным (Colloca et al., 2017). Действительно, нестероидные противовоспалительные средства (NSAID) имеют ограниченную эффективность против хронической боли, а опиоиды имеют множество побочных эффектов, включая потенциально летальную угнетение дыхания, тошноту, запор, гипералгезию, толерантность, физическую и психологическую зависимость (Venjamin et al., 2008). Таким образом, следует поощрять усилия по выявлению новых целей с анальгетическим или болеутоляющим потенциалом для лечения хронической боли.

За последние несколько лет авторы изобретения обнаружили поразительные особенности секретируемого белка TAFA-4, что позволяет предположить, что он может быть интересным лекарством для лечения хронической боли (WO2014180853). TAFA-4 принадлежит к семейству пяти высококонсервативных секретируемых нейрокинов (Sarver

et al., 2021). TAFA-4 содержит сигнальный пептид, за которым следует высококонсервативная сердцевинная область с 10 остатками цистеина, включая мотив СС-хемокина, который делает его похожим на цитокин (Tom Tang et al., 2004).

Авторы изобретения также ранее показали, что у мышей, у которых удален ген TAFA-4, механическая гиперчувствительность, вызванная повреждением нерва, сохраняется намного дольше, чем у мышей дикого типа (WT) (Delfini et al., 2013). Эти фенотипы устраняют путем интратекальной инъекции рекомбинантного TAFA-4.

Как описано в WO2014180853, авторы изобретения ранее сообщали об экспериментальных данных, демонстрирующих, что TAFA-4 обладает мощным действием против патологически повышенной механической боли. Было показано, что как у самцов, так и у самок мышей интратекальное и подкожное введение человеческого рекомбинантного TAFA-4 обращает вспять воспалительную, послеоперационную и вызванную повреждением нервов механическую гиперчувствительность. Они также показали, что TAFA-4 может обратить вспять вызванную повреждением нерва нейронную сенсбилизацию интернейронов спинальной пластинки II, которые, как сообщается, ответственны за механические пороговые изменения.

Однако получение рекомбинантного зрелого белка TAFA-4 может оказаться сложной задачей, поскольку TAFA-4 представляет собой белок, богатый цистеином (всего 10 цистеинов). Действительно, рефолдинг может привести к получению ненативных конформаций или неправильному паттерну дисульфидных мостиков, что может сильно повлиять на действие белка. Более того, несколько стадий очистки, необходимые для получения рекомбинантного белка TAFA-4 с высокой степенью чистоты, вместе с возможными проблемами агрегации могут ограничивать выход правильно свернутого белка. Кроме того, хотя химический синтез белка TAFA-4 был реализован, он также сложен из-за длины белка, требующей сборки не менее 4 (защищенных или частично защищенных) пептидных сегментов (начиная с N-концевого и заканчивая наиболее С-концевым пептидом). Для получения полноразмерного TAFA-4 необходимы три стадии очистки путем лигирования, что приводит к низкому выходу, который несовместим с производством в промышленных масштабах. Таким образом, существенным преимуществом была бы идентификация новых соединений, обладающих действием, аналогичной активности белка TAFA-4, которые можно было бы производить в промышленных масштабах и экономически эффективным способом.

Таким образом, существует острая потребность в альтернативных терапевтических средствах и способах для эффективного предотвращения или лечения боли, в частности острой, подострой или хронической боли.

### **Сущность настоящего изобретения**

Настоящее изобретение основано, по крайней мере частично, на идентификации нового пептида (также обозначенного в данном документе как «ТТ1») и его вариантов, таких как идентифицированный в данном документе пептид «ТТ6», обладающий болеутоляющим или анальгетическим действием, в частности болеутоляющим действием.

Представляющий интерес пептид представляет собой специфический фрагмент человеческого белка TAFA-4 или получен из него. Преимущество заключается в том, что этот пептид и его варианты легко получить, и они высокоэффективны против боли, в частности острой, подострой или хронической боли, обычно против боли, вызванной травмой.

Настоящее изобретение относится к выделенному, синтетическому или рекомбинантному пептиду с последовательностью SEQ ID NO: 1 или пептиду, идентичному по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 1 (также обозначенному в настоящем документе как «пептидный вариант» или «вариант пептида с последовательностью SEQ ID NO: 1»). В конкретном аспекте пептид с последовательностью SEQ ID NO: 1 или его вариант представляет собой рекомбинантный пептид. В конкретном аспекте вариант пептида представляет собой выделенный, синтетический или рекомбинантный пептид с последовательностью SEQ ID NO: 5.

Предпочтительно, подобно пептиду SEQ ID NO: 1, вариант пептида, идентичного по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 1, такой как, например, пептид SEQ ID NO: 5 («ТТ6»), модулирует возбудимость интернейронов спинного мозга (предпочтительно интернейронов пластинки III спинного мозга). В предпочтительном аспекте аминокислотные остатки глутамина (Q) в позиции 13 и тирозина (Y) в позиции 45, относительно позиций, указанных в SEQ ID NO: 1, в пептидном варианте пептида SEQ ID NO: 1 остаются неизменными.

Настоящее изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей пептид или его вариант, описанный в данном документе; к вектору, обеспечивающему экспрессию пептида или варианта пептида, описанного выше; и к клетке, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую такой пептид или его вариант, или к клетке, модифицированной с использованием вектора согласно изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к описанному в данном документе пептиду или его варианту для применения в качестве активного ингредиента, например, в качестве лекарственного средства или медикамента. Оно также относится к композиции, обычно терапевтической, ветеринарной или диетической композиции, содержащей пептид, который описан в настоящем документе, или его вариант, нуклеиновую кислоту, кодирующую такой пептид или его вариант, и/или вектор или клетку, которая описана в настоящем документе, и фармацевтически и/или диетически приемлемый носитель.

В этом конкретном аспекте композиция может дополнительно содержать по меньшей мере одно дополнительное (отдельное) активное соединение, предпочтительно активное средство, эффективное против боли (острой, подострой или хронической боли), еще более предпочтительно стероидное противовоспалительное средство (SAID), нестероидное противовоспалительное средство (NSAID) или опиоидное средство.

Дополнительная цель настоящего изобретения относится к пептиду, нуклеиновой кислоте, вектору или клетке, описанным в настоящем документе, для использования в

качестве активного ингредиента для предотвращения или лечения боли у нуждающегося в этом субъекта. Она также относится к использованию пептида, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции, описанных в настоящем документе, для получения лекарственного средства для предотвращения или лечения боли у нуждающегося в этом субъекта. В частности, изобретение можно использовать для лечения хронической боли, нейропатической боли, послеоперационной боли, воспалительной боли, гипералгезии или аллодинии.

Настоящее изобретение также относится к способу предотвращения или лечения боли у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение (терапевтически) эффективного количества композиции, описанной в настоящем документе, или пептида SEQ ID NO: 1 или его варианта, идентичного по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 1, например, пептида SEQ ID NO: 5.

Пептиды или композиции, описанные в настоящем документе, можно вводить субъекту любым путем, например, внутримышечно, внутривенно, внутривентриально, перорально (через рот), анально, кожно, подкожно, дермально, чрескожно или интратекально. Предпочтительно пептиды или описанные в данном документе композиции вводят субъекту подкожно или перорально, еще более предпочтительно перорально.

Пептид или композиция, описанные в данном документе, могут быть частью набора. Таким образом, настоящее изобретение также относится к набору, содержащему i) пептид, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или композицию, описанные в данном документе, ii) по меньшей мере одно дополнительное активное соединение, эффективное против боли, предпочтительно отличное от пептида, такого как описан в данном документе или его вариант, и необязательно iii) письменные инструкции по использованию набора. Описанный в данном документе набор обычно используют в контексте профилактики или лечения боли.

В конкретном аспекте продукты согласно настоящему изобретению также можно использовать в контексте исследований. Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид или вариант, описанный в настоящем документе, вектор, обеспечивающий его экспрессию, или клетка, содержащая такую нуклеиновую кислоту или модифицированная с использованием такого вектора, может быть использована для экспрессии или модуляции *in vitro* или *ex vivo* экспрессии пептида SEQ ID NO:1 или его функционального варианта, идентичного по меньшей мере на 90% SEQ ID NO:1, такого как пептид SEQ ID NO:5. В другом конкретном аспекте настоящее изобретение также относится к трансгенному животному, модифицированному для экспрессии нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе.

#### **Краткое описание чертежей**

Фиг. 1: Болеутоляющее действие пептида SEQ ID NO: 1, введенного подкожно *in vivo* в модели нейропатической боли с частичным повреждением нерва (SNI). На фигуре представлена необходимая механическая сила (выраженная в ее эквиваленте по весу в

граммах), чтобы вызвать реакцию отдергивания лапы у 50% мышей в зависимости от времени. Пептид SEQ ID NO: 1 (называемый «Пептид») сравнивали с отрицательным контролем (носитель) и положительным контролем (прегабалин). Показаны статистические различия между мышами, получавшими пептид, по сравнению с группой носителя (двусторонний дисперсионный анализ с повторными измерениями с последующим апостериорным тестом Бонферрони: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Фиг. 2: Болеутоляющее действие пептида SEQ ID NO: 1, введенного перорально *in vivo* на модели нейропатической боли SNI. На фигуре представлена необходимая механическая сила (выраженная в ее эквиваленте по весу в граммах), чтобы вызвать реакцию отдергивания лапы у 50% мышей в зависимости от времени. Пептид SEQ ID NO: 1 (называемый «Пептид») сравнивали с отрицательным контролем (носитель) и положительным контролем (прегабалин). Показаны статистические различия между мышами, получавшими пептид, по сравнению с группой носителя (двусторонний дисперсионный анализ с повторными измерениями с последующим апостериорным тестом Бонферрони: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Фиг. 3: Дозозависимое болеутоляющее действие пептида SEQ ID NO: 1, введенного перорально *in vivo* в модели нейропатической боли SNI. Данные представлены в виде ответа в процентах к исходному уровню. Пептид SEQ ID NO: 1 (называемый «Пептид») сравнивали с отрицательным контролем (носитель) и положительным контролем (прегабалин). Измерения проводили через 1, 2, 4 и 24 часа после желудочного зонда. Статистические различия между мышами, получавшими пептид, по сравнению с группой носителя, указаны в таблице (двусторонний дисперсионный анализ с повторными измерениями с последующим апостериорным тестом Бонферрони: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Фиг. 4: Сравнение болеутоляющего действия TAFA-4 (полноразмерного белка) с пептидом SEQ ID NO: 1, введенным подкожно или перорально в модели нейропатической боли SNI. На фигуре представлена необходимая механическая сила (выраженная в ее эквиваленте по весу в граммах), чтобы вызвать реакцию отдергивания лапы у 50% мышей в зависимости от времени. Пептид SEQ ID NO: 1 (называемый «Пептид») сравнивали с отрицательным контролем (носитель) и с белком TAFA-4 (полноразмерным) (называемым (TAFA4 s.c.)). Статистические различия между мышами, получавшими пептид или TAFA4, показаны по сравнению с группой носителя (двусторонний дисперсионный анализ с повторными измерениями с последующим апостериорным тестом Бонферрони: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Фиг. 5: Болеутоляющее действие белка TAFA-4 (полноразмерного), введенного перорально *in vivo* на модели нейропатической боли SNI. На фигуре представлена необходимая механическая сила (выраженная в ее эквиваленте по весу в граммах), чтобы вызвать реакцию отдергивания лапы у 50% мышей в зависимости от времени. Белок TAFA-4 (полноразмерный) сравнивали с отрицательным контролем (носитель) и положительным контролем (прегабалин). Показаны статистические различия между

мышами, получавшими прегабалин, по сравнению с группой носителя (двусторонний дисперсионный анализ с повторными измерениями с последующим апостериорным тестом Бонферрони: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Никаких статистических различий при пероральном введении ТАФА4 не обнаружено.

Фиг. 6: Болеутоляющее действие пептида SEQ ID NO: 1, введенного перорально *in vivo* на модели воспалительной боли (каррагинановая модель). На фигуре представлена необходимая механическая сила (выраженная в ее эквиваленте по весу в граммах), чтобы вызвать реакцию отдергивания лапы у 50% мышей в зависимости от времени. Пептид SEQ ID NO: 1 (называемый «Пептид») сравнивали с отрицательным контролем (носитель) и положительным контролем (целекоксиб). Показаны статистические различия между мышами, получавшими пептид или целекоксиб, по сравнению с группой носителя (двусторонний дисперсионный анализ с повторными измерениями с последующим апостериорным тестом Бонферрони: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Фиг. 7: Болеутоляющее действие пептида SEQ ID NO: 1, введенного перорально *in vivo* в модели послеоперационной боли (модель боли с разрезом лапы Бреннана). На фигуре представлена необходимая механическая сила (выраженная в ее эквиваленте по весу в граммах), чтобы вызвать реакцию отдергивания лапы у 50% мышей в зависимости от времени. Пептид SEQ ID NO: 1 (называемый «Пептид») сравнивали с отрицательным контролем (носитель) и положительным контролем (морфин). Показаны статистические различия между мышами, получавшими пептид или морфин, по сравнению с группой носителя (двусторонний дисперсионный анализ с повторными измерениями с последующим апостериорным тестом Бонферрони: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Фиг. 8: Сравнение эффективности обезболивания рекомбинантного ТТ1 (биологического происхождения) и ТТ1, полученного путем химического синтеза, вводимого перорально, в модели нейропатической боли SNI.

На фигуре представлена необходимая механическая сила (выраженная в ее эквиваленте по весу в граммах), чтобы вызвать реакцию отдергивания лапы у 50% мышей в зависимости от времени. Эффективность облегчения боли пептида SEQ ID NO:1, полученного путем химического синтеза («ТТ1 синтез»), сравнивали с эффективностью пептида SEQ ID NO:1 (био), полученного в бактериях («ТТ1 prod Bact»). Показаны статистические различия между мышами, получавшими «ТТ1 synth» или «ТТ1 prod bact», по сравнению с группами носителя (двусторонний дисперсионный анализ с повторными измерениями с последующим апостериорным тестом Бонферрони: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).  $n=8$ ; Модель=SNI; Пол: мужской; Введение: перорально; Концентрация ТТ1 synth: 300 мкг/кг, концентрация ТТ1 prod bact: 300 мкг/кг.

Фиг. 9: Сравнение эффективности обезболивания биопродуцируемых ТТ1 и ТТ6, вводимых перорально или подкожно в модели нейропатической боли SNI.

На фигуре представлена необходимая механическая сила (выраженная в ее эквиваленте по весу в граммах), чтобы вызвать реакцию отдергивания лапы у 50% мышей в зависимости от времени. Пептид SEQ ID NO: 1 («ТТ1») сравнивали с пептидом SEQ ID

NO: 5 («ТТ6»), причем каждый пептид вводили либо подкожно (А), либо перорально (В). Показаны статистические различия между мышами, получавшими ТТ1 или ТТ6, по сравнению с группой носителя (двусторонний дисперсионный анализ с повторными измерениями с последующим апостериорным тестом Бонферрони: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).  $n=8$ ; Модель=SNI; Пол: мужской; Способ применения: перорально или подкожно; Концентрация ТТ1: 300 мкг/кг, концентрация ТТ6: 300 мкг/кг.

Фиг. 10: Профилактическое болеутоляющее действие пептида SEQ ID NO: 1, введенного подкожно *in vivo* на модели послеоперационной боли (модель разреза лапы Бреннана)

А. Схематичное изображение протокола. ТТ1 или носитель вводили подкожно два раза в день в разные моменты времени: за день до операции (D-1), за 1 час до и через 1 час после операции (и пробуждения) в день D, а также в D+1 и D+2. Измерения механического порогового ответа в D+1 и D+2 проводили перед введением пептида SEQ ID NO:1 («ТТ1»).

В. На фигуре представлена необходимая механическая сила (выраженная в ее эквиваленте по весу в граммах), чтобы вызвать реакцию отдергивания лапы у 50% мышей в зависимости от времени. Пептид SEQ ID NO: 1 (обозначаемый как «ТТ1») сравнивали с отрицательным контролем (носителем). Данные представлены в виде ответа в процентах к исходному уровню. Показаны статистические различия между мышами, получавшими пептид, по сравнению с группой носителя (двусторонний дисперсионный анализ с повторными измерениями с последующим апостериорным тестом Бонферрони: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).  $n=23$  для ТТ1,  $n=22$  для носителя; Модель=модель послеоперационной боли; Пол: 11 самцов и 12 самок для мышей, получавших ТТ1, 11 самцов и 11 самок для группы носителя; Введение: подкожно; Концентрация ТТ1: 300 мкг/кг.

Фиг. 11: Отсутствие толерантности после повторного перорального введения пептида SEQ ID NO:1 на модели нейропатической боли при хроническом сдавливании нерва (CCI).

После создания модели нейропатической боли CCI мышей лечили пептидом SEQ ID NO: 1 («ТТ1») или носителем в течение 14 дней подряд, начиная с 10 дня после операции. Болеутоляющее действие ТТ1 определяли каждые два дня. На фигуре представлена необходимая механическая сила (выраженная в ее эквиваленте по весу в граммах), чтобы вызвать реакцию отдергивания лапы у 50% мышей в зависимости от времени. Пептид SEQ ID NO: 1 (обозначаемый как «ТТ1») сравнивали с отрицательным контролем (носителем). Показаны статистические различия между мышами, получавшими пептид, по сравнению с группой носителя (двусторонний дисперсионный анализ с повторными измерениями с последующим апостериорным тестом Бонферрони: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Модель=модель нейропатической боли CCI; Пол: 10 самцов мышей, получавших ТТ1,  $n=5$  в группе носителя; Введение: перорально; Концентрация ТТ1: 300 мкг/кг.



## Подробное раскрытие настоящего изобретения

### Определения

Термины, используемые в данном описании, обычно имеют свои обычные значения в данной области техники в контексте данного изобретения и конкретного контекста, в котором используется каждый термин. Некоторые термины обсуждаются ниже или где-либо в описании, чтобы предоставить квалифицированному читателю дополнительные рекомендации по описанию способов изобретения и способов их использования. Более того, следует понимать, что одно и то же понятие можно обозначить более чем одним способом. Следовательно, альтернативный язык и синонимы могут использоваться для любого одного или нескольких терминов, обсуждаемых в настоящем документе. Приведены синонимы некоторых терминов. Указание одного или нескольких синонимов не исключает использования других синонимов.

Термины «пептид», «вариант пептида», «фрагмент белка», «сегмент белка» используются взаимозаменяемо для обозначения полимера аминокислотных остатков. Такие полимеры аминокислотных остатков могут содержать природные или неприродные аминокислотные остатки. Термины также включают модификации пептида после экспрессии, например, гликозилирование, сиамирование, ацетилирование, фосфорилирование, карбаметилирование и тому подобное. Кроме того, в контексте настоящего изобретения «пептид» относится к фрагменту или сегменту белка, который включает такие модификации, как делеции, добавления и замены (обычно консервативные по природе) нативной последовательности (дикого типа), при условии, что пептид сохраняет нужное действие, т.е. предотвращение или лечение боли. Эти модификации предпочтительно представляют собой преднамеренные мутации, например, полученные посредством сайт-направленного мутагенеза.

Термин «выделенный пептид» относится к пептиду, который извлечен из его исходной среды (т.е. природной среды, если он встречается в природе). Пептид, естественным образом присутствующий в природной системе, например, в живом животном, следует отличать от того же пептида, который был отделен от всех или части сосуществующих материалов в указанной природной системе. Отделенный пептид обозначен в данном документе как «выделенный пептид». Другими словами, в контексте настоящего изобретения выделенный пептид представляет собой фрагмент белка TAFA-4, который отсутствует как таковой в природе.

Термины «синтетический пептид» относятся к пептиду, полученному путем химического синтеза.

Термины «рекомбинантный пептид» относятся к пептиду, кодируемому рекомбинантной ДНК, которая была клонирована в чужой системе экспрессии для поддержки экспрессии экзогенного гена. Рекомбинантную ДНК, обычно последовательность cDNA целевого пептида, обычно конструируют так, чтобы она находилась под управлением промотора, обеспечивающего экспрессию целевого пептида в выбранной клетке-хозяине. Специалист в данной области техники может выбрать

подходящий промотор для достижения высокого уровня экспрессии белка.

Термины «идентичность последовательности», «последовательность, имеющая по меньшей мере X% идентичности» и «последовательность, идентичная на X%» используются взаимозаменяемо для обозначения степени, в которой последовательности идентичны по нуклеотидам или по аминокислотам в окне сравнения. Таким образом, «процент идентичности последовательностей» можно рассчитать путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, при этом часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. пробелы) по сравнению с эталонной последовательностью для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент может быть рассчитан путем определения количества позиций, в которых идентичные основания нуклеиновой кислоты (например A, T, C, G, U) или идентичные аминокислотные остатки (например Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys и Met) встречаются в обеих последовательностях, чтобы получить количество совпадающих позиций, разделив количество совпадающих позиций на общее количество позиций в окне сравнения (т.е. размер окна) и умножив результата на 100 для получения процента идентичности последовательностей. Альтернативно, процент можно рассчитать путем определения количества позиций, в которых либо идентичное основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток встречается в обеих последовательностях, либо основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток выравнивают с пробелом для получения количества совпадающих позиций, разделив количество совпавших позиций на общее количество позиций в окне сравнения и умножив результат на 100, чтобы получить процент идентичности последовательности. Предпочтительно идентичность последовательности определяют по всей длине эталонной последовательности, в данном документе SEQ ID NO: 1 («CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWWCHMNPCLEGEDCKVLPDYSWSSSGNKKV KTKVTR»). Учитывая конкретный пример SEQ ID NO: 5 («SFPGQVAGTTRAQPSSVEASIVIQKWWSHMNPSLEGEDSKVLPDYSWSSSSGNKKV KTKVTR»), указанная последовательность более чем на 90% идентична SEQ ID NO: 1, а точнее, она на 90,48% идентична SEQ ID NO: 1 с использованием алгоритма BLAST.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно провести, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith and Waterman, (1981) Adv. Appl. Math. 2:482, с помощью алгоритма выравнивания гомологии Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443, с помощью способа поиска подобия Pearson and Lipman, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, путем компьютеризированного осуществления этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA) или путем визуального осмотра (см. в целом Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement)).

Примерами алгоритмов, которые подходят для определения процента идентичности и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0,

которые описаны Altschul et al., (1990), J. Mol. Биол. 215: 403-410 и Altschul et al. (1977) Nucleic Acids Res. 3389-3402, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализа BLAST общедоступно на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации. Этот алгоритм включает в себя сначала идентификацию пар последовательностей с высокой оценкой (HSP) путем идентификации коротких слов длиной «W» в последовательности запроса, которые либо соответствуют, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому баллу «Т» при сопоставлении со словом той же длины в последовательности базы данных. Т называется порогом оценки слов соседства (Altschul et al., см. выше). Эти первоначальные совпадения слов из соседства действуют как семена для начала поиска более длинных HSP, содержащих их. Затем совпадения слов расширяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока может быть увеличен совокупный показатель выравнивания. Совокупные оценки рассчитывают с использованием для нуклеотидных последовательностей параметров «М» (оценка вознаграждения за пару совпадающих остатков; всегда >0) и «N» (штрафная оценка за несовпадающие остатки; всегда <0). Для аминокислотных последовательностей для расчета совокупного балла используется оценочная матрица. Расширение попаданий слова в каждом направлении прекращается, когда: совокупный балл выравнивания падает на величину «X» от максимального достигнутого значения; совокупная оценка становится равной нулю или ниже из-за накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательной оценкой; или достигнут конец любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST W, T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) по умолчанию использует длину слова (W) 11, математическое ожидание («E») 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей программа BLASTP использует по умолчанию длину слова (W) 3, математическое ожидание (E) 10 и оценочную матрицу BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. США 89:10915).

Степень процентной идентичности аминокислотной последовательности также можно получить с помощью анализа ClustalW (версия W 1.8) путем подсчета количества идентичных совпадений при выравнивании и деления такого количества идентичных совпадений на длину эталонной последовательности и использования по умолчанию следующих параметров ClustalW для достижения медленного/точного парного оптимального выравнивания - штраф за открытие пробела: 10; штраф за расширение пробела: 0,10; матрица сравнения аминокислот: серия Gonnet; матрица сравнения нуклеотидов: IUB; переключение медленное/быстрое парное выравнивание=МЕДЛЕННОЕ или ПОЛНОЕ выравнивание.

Термины «нуклеиновая кислота» или «полинуклеотид» в рамках настоящего изобретения относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо рибонуклеотидов, либо дезоксирибонуклеотидов. Таким образом, эти термины включают без ограничения одно-, двух- или многоцепочечную ДНК или РНК, геномную ДНК,

cDNA, гибриды ДНК-РНК или полимер, содержащий пуриновые и пиримидиновые основания, или другие природные, химически или биохимически модифицированные, неприродные или дериватизированные нуклеотидные основания. Основная цепь полинуклеотида может содержать сахара и фосфатные группы (которые обычно встречаются в РНК или ДНК) или модифицированные или замещенные сахара или фосфатные группы. Альтернативно, основная цепь полинуклеотида может содержать полимер из синтетических субъединиц, таких как фосфорамидаты, и, таким образом, может представлять собой олигодезоксинуклеозидфосфорамидат (P-NH<sub>2</sub>) или смешанный фосфорамидат-фосфодиэфирный олигомер. Кроме того, двухцепочечный полинуклеотид может быть получен из продукта химического синтеза одноцепочечного полинуклеотида либо путем синтеза комплементарной цепи и отжига цепей в соответствующих условиях, либо путем синтеза комплементарной цепи *de novo* с использованием ДНК-полимеразы с соответствующим праймером.

Термин «вектор» относится к молекуле ДНК или РНК, которая содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую пептид, полипептид или белок. Вектор обычно содержит регуляторные элементы, способные управлять экспрессией кодирующей полинуклеотидной последовательности, также называемой трансгеном, в клетках, в которые введена молекула нуклеиновой кислоты. Термин «трансген» относится к полинуклеотиду, который вводится в клетку и способен транскрибироваться в РНК и, необязательно, транслироваться и/или экспрессироваться в соответствующих условиях. В некоторых аспектах он придает нужное свойство клетке, в которую он был введен, или иным образом приводит к нужному техническому эффекту, в данном случае обычно терапевтическому эффекту. Трансген может содержать последовательность, кодирующую один или несколько белков или один или несколько фрагментов белков.

Термин «генная терапия» относится к лечению субъекта, которое включает доставку гена/нуклеиновой кислоты в клетки индивидуума с целью предотвращения или лечения заболевания.

Термин «трансфекция» относится к поглощению чужеродного полинуклеотида клеткой, такой как прокариотическая или эукариотическая клетка. Клетка идентифицируется как «трансфицированная», когда в клетку введен экзогенный полинуклеотид. В данной области техники общеизвестен ряд способов трансфекции. См., например, Graham et al., *Virology* 52:456 (1973), Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York (1989), Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier (1986), and Chu et al., *Gene* 13:197 (1981). Такие способы можно использовать для введения одной или нескольких экзогенных нуклеиновых кислот в подходящие клетки-хозяева.

Термин «трансдукция» относится к доставке молекулы нуклеиновой кислоты в клетку-реципиента-хозяина, например, с помощью вектора доставки гена, например рекомбинантного вирусного вектора, в частности ретровируса, аденовируса, рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV), вируса простого герпеса и

лентивируса. Например, трансдукция клетки-мишени вирионом rAAV приводит к переносу вектора rAAV, содержащегося в этом вирионе, в трансдуцированную клетку.

Рекомбинантный «аденоассоциированный вирус (AAV)» представляет собой небольшой Dependoparvovirus с одноцепочечным линейным ДНК-геномом, лишенный патогенности и обладающий низкой иммуногенностью, искусственно полученный с использованием рекомбинантных способов. Рекомбинантные AAV (rAAV) предпочтительно обладают способностью нацеливаться на ткань/клетку, так что трансген rAAV будет доставляться специфично или предпочтительно в одну или несколько заранее определенных тканей/клеток. Капсид AAV, а также тип регуляторной области и путь введения являются важными элементами в определении возможностей тканеспецифичного нацеливания.

Термин «боль» в контексте настоящего изобретения относится к любой боли или чувствительности, связанной с повреждением ткани. Предпочтительно термин «боль» в рамках настоящего изобретения понимается как аномальная чувствительность, т.е. обычно как гиперчувствительность, которая опосредована aberrантно повышенной активностью всех типов сенсорных нейронов, включая ноцицепторы и неноцицепторы. Термин «боль» включает в себя любую боль, выбранную из боли, опосредованной ноцицепторами (также называемой в данном документе «ноцицептивной болью»), нейропатической боли, воспалительной боли, патологической боли, острой боли, подострой боли, хронической боли, механической боли, химической боли, соматической боли, висцеральной боли, глубокой соматической боли, поверхностной соматической боли, соматоформной боли, аллодинии, гипералгезии или боли, связанной с повреждением нерва.

«Ноцицептивная» боль или «ноцицепторно-опосредованная» боль возникает в ответ на активацию определенного подмножества периферических сенсорных нейронов (ноцицепторов) интенсивными или болевыми раздражителями. Ноцицептивная боль согласно изобретению включает механическую боль (раздавливающая, рвущая и т.п.) и химическую (йод при порезе, порошок чили в глазах). Примеры ноцицептивной боли включают без ограничения травматическую или хирургическую боль, родовую боль, растяжения связок, переломы костей, ожоги, шишки, ушибы, инъекции, стоматологические процедуры, биопсию кожи и препятствия. Ноцицептивная боль включает висцеральную боль и соматическую боль, в частности глубокую соматическую боль и поверхностную соматическую боль.

Висцеральная боль носит диффузный характер, ее трудно локализовать и часто относится к отдаленной, обычно поверхностной, структуре. Она может сопровождаться тошнотой и рвотой и может описываться как тошнотворная, глубокая, сжимающая и/или тупая. Глубокая соматическая боль инициируется стимуляцией ноцицепторов в связках, сухожилиях, костях, кровеносных сосудах, фасциях и мышцах и представляет собой тупую, ноющую и плохо локализованную боль. Примеры глубокой соматической боли включают растяжения и переломы костей. Поверхностная боль возникает в результате

активации ноцицепторов в коже или других поверхностных тканях и является острой, четко выраженной и четко локализованной. Примеры травм, вызывающих поверхностную соматическую боль, включают легкие раны и легкие ожоги (первой степени).

Термины «боль, вызванная травмой» в контексте настоящего изобретения охватывают нейропатическую боль, воспалительную боль и послеоперационную боль.

Воспалительная боль - это боль, которая возникает при повреждении или воспалении тканей, включая послеоперационную, посттравматическую боль, боль при артрите (ревматоидном или остеоартрите), боль, связанную с аутоиммунным заболеванием (например псориазом), и боль, связанную с повреждением суставов, мышц и сухожилий, как при осевой боли в пояснице. Воспаление ответственно за сенсбилизацию периферических сенсорных нейронов, что приводит к спонтанной боли и аннулированию болевой гиперчувствительности. Острое или хроническое патологическое воспаление тканей сильно влияет на восприятие боли, сенсбилизуя периферические сенсорные нейроны, вызывая местную и инвалидизирующую болевую гиперчувствительность. Известно, что медиаторы воспаления усиливают возбудимость первичных ноцицептивных афферентных волокон, частично изменяя экспрессию и/или функцию ионных каналов, присутствующих в нервных окончаниях.

Нейропатическая боль - распространенный тип хронической, доброкачественной боли, возникающей в результате травмы или нарушения функции периферической или центральной нервной системы. Нейропатическая боль может иметь различную этиологию и возникать, например, вследствие травмы, хирургического вмешательства, грыжи межпозвоночного диска, травмы спинного мозга, диабета, заражения опоясывающим герпесом (опоясывающим лишаем), ВИЧ/СПИДа, поздней стадии рака, ампутация (включая мастэктомия), туннельный синдром запястья, хроническое употребление алкоголя, воздействие радиации, а также непреднамеренный побочный эффект нейротоксических средств лечения, таких как некоторые препараты против ВИЧ и химиотерапевтические препараты. Особым типом нейропатической боли является «периферическая нейропатическая боль, вызванная химиотерапией» (CIPN) или «нейропатическая боль, вызванная химиотерапией» (CINP). CINP или CIPN являются одними из наиболее серьезных побочных эффектов противораковых препаратов, таких как препараты платины и таксанов (оксалиплатин, цисплатин, карбоплатин и паклитаксел). CINP может даже стать фактором прерывания лечения и, следовательно, увеличивает риск смерти. Нейропатическая боль часто характеризуется или является причиной появления хронической аллодинии (определяемой как боль, возникающая в результате раздражителя, который обычно не вызывает болевой реакции, например легкого прикосновения) и/или гипералгезии (определяемой как повышенная чувствительность к обычно болевому раздражителю) и может сохраняться в течение месяцев или лет после видимого заживления поврежденных тканей. Боль также может возникать у пациентов с раком, что может быть вызвано множеством причин, таких как воспаление, сдавливание, инвазия, распространение метастазов в кость или другие ткани. К боли также относятся мигрень и

головная боль, связанная с активацией сенсорных волокон, иннервирующих мозговые оболочки. Пептиды согласно изобретению, такие как пептиды SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:5, используются для лечения таких вышеописанных типов боли.

Пептиды согласно изобретению можно также использовать для лечения боли, связанной с синдромом Элерса-Данлоса, который включает хроническую боль в мышцах/или костях, и/или суставах.

Предпочтительно пептиды согласно изобретению используют для предотвращения или лечения боли, вызванной травмой. Более предпочтительно пептиды согласно изобретению используют для предотвращения или лечения нейропатической боли (такой как нейропатическая боль, вызванная химиотерапией, или периферическая нейропатическая боль, вызванная химиотерапией), послеоперационной боли и/или воспалительной боли. Как показано в экспериментальной части, авторы изобретения также демонстрируют, что пептиды согласно изобретению подходят для предотвращения развития у субъекта послеоперационной механической аллодинии. Преимущественно пептиды согласно изобретению можно использовать, не вызывая у субъекта какой-либо толерантности.

Обычно пептиды согласно изобретению используют для предотвращения или лечения хронической боли, вызванной травмой. Обычно пептиды согласно изобретению используют для предотвращения или лечения хронической нейропатической боли, такой как хроническая периферическая нейропатическая боль, вызванная химиотерапией (CIPN), хроническая нейропатическая боль, вызванная химиотерапией (CINP) или хроническая боль, вызванная повреждением нерва; хроническая послеоперационная боль; и/или хроническая воспалительная боль.

В контексте настоящего изобретения термин «лечение» боли у субъекта означает задержку, стабилизацию, излечение, заживление, смягчение, ослабление, изменение, облегчение, улучшение, устранение или воздействие на любую форму боли у субъекта, как описано в настоящем документе, или любого заболевания или состояния, связанного с болью, в частности острой, подострой или хронической болью (в частности, любым нейропатическим состоянием, связанным с хронической болью, обычно возникающим в результате нейропатической боли, послеоперационной боли или воспалительной боли), или любого симптома такого заболевания или состояния после применения или введения подходящего пептида с последовательностью SEQ ID NO: 1 или его варианта, согласно определению в данном документе, или композиции согласно изобретению.

Термин «лечение» также относится к любому показателю успеха в лечении боли (который может быть связан с любой травмой, патологией или состоянием), включая любой объективный или субъективный параметр, такой как уменьшение, ремиссия, замедление прогрессирования или тяжести, стабилизация, ослабление симптомов боли или успеха в трансформации ее в терпимую или более терпимую для субъекта. Термин «лечение» боли также включает повышение толерантности к боли и/или уменьшение воспринимаемой боли. В конкретных аспектах способы, соединения и композиции

согласно настоящему изобретению предназначены для повышения толерантности к боли и/или для уменьшения воспринимаемой боли. В настоящем документе термин «толерантность к боли» относится к силе боли, которую субъект может воспринимать и выдерживать, прежде чем боль станет нестерпимой эмоционально и/или физически. Толерантность к боли отличается от болевого порога (минимального механического раздражителя, необходимого для возникновения боли). В настоящем документе «повышение толерантности к боли» обычно относится к ситуации, когда у субъекта может развиться большая толерантность к боли (то есть меньшая воспринимаемая боль) по сравнению с предыдущим состоянием, например, после введения субъекту подходящего пептида с последовательностью SEQ ID NO: 1 или его варианта, или композиции, содержащей указанный пептид или вариант.

В контексте данного изобретения «профилактика» или «предотвращение» боли у субъекта относится, по меньшей мере, к уменьшению вероятности возникновения (или предрасположенности к приобретению) любого вида боли у субъекта после применения или введения подходящего пептида с последовательностью SEQ ID NO: 1 или его варианта, или композиции согласно изобретению. Например, «предотвращение» включает предотвращение развития по меньшей мере одного из клинических симптомов боли у субъекта, который может подвергаться воздействию боли или быть предрасположен к ней, но еще не испытывает или не ощущает симптомов боли.

В контексте изобретения «субъект» или «пациент» обозначает животное, в частности млекопитающее, нуждающееся в лечении заболевания или расстройства или его симптома. Субъектом может быть субъект, у которого диагностировано заболевание или расстройство или установлено, что он подвержен риску развития заболевания или расстройства, при этом известно, что указанное заболевание или расстройство вызывает у субъекта чувство боли. В конкретном примере у субъекта диагностирована боль или он страдает от боли, такой как острая боль и/или подострая боль или хроническая боль, включая нейропатическую боль, послеоперационную боль, воспалительную боль, гипералгезию и/или аллодинию.

В конкретном аспекте субъектом является человек.

В другом конкретном аспекте субъектом является животное, в частности домашнее или племенное животное, в частности лошадь, собака, кошка, корова и т.д.

В другом конкретном аспекте субъект имеет по меньшей мере один мутантный аллель в гене *muo1A*.

#### Пептиды

Авторы изобретения выявили новые пептиды, которые могут предотвращать или лечить боль, в частности, обратить вспять механическую гиперчувствительность при повреждении или воспалении нервной системы. Авторы изобретения полагают, что, модулируя возбудимость сети спинного мозга, эти пептиды проявляют либо болеутоляющее, либо анальгетическое действие, в частности болеутоляющее действие, путем специфического воздействия на механически и/или химически индуцированные



ноцицептивные сигналы.

Описанные в данном документе пептиды представляют собой/состоят из специфических фрагментов зрелого белка TAFA-4 человека из 105 аминокислотных остатков (полученных в результате расщепления сигнальной последовательности и идентифицированных в общедоступной базе данных под номером NP\_0011005527 или под номером Genbank AAR92409, как раскрыто Tang et al., 2004).

В первом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному, синтетическому или рекомбинантному пептиду с последовательностью SEQ ID NO: 1 или к пептиду, идентичному по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 1, такому как вариант пептида с SEQ ID NO: 1, такой как вариант пептида с SEQ ID NO: 5.

В конкретном аспекте пептид с последовательностью SEQ ID NO: 1 или его вариант, такой как вариант пептида с SEQ ID NO: 5, представляет собой рекомбинантный пептид (т.е. пептид, полученный биологическим путем).

В конкретном аспекте пептид согласно настоящему изобретению представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWWCHMNPCLEGEDCKVLPDYSWSSSGNKVKT TKVTR (SEQ ID NO: 1), т.е. Cys-Phe-Pro-Gly-Gln-Val-Ala-Gly-Thr-Thr-Arg-Ala-Gln-Pro-Ser-Cys-Val-Glu-Ala-Ser-Ile-Val-Ile-Gln-Lys-Trp-Trp-Cys-His-Met-Asn-Pro-Cys-Leu-Glu-Gly-Glu-Asp-Cys-Lys-Val-Leu-Pro-Asp-Tyr-Ser-Gly-Trp-Ser-Cys-Ser-Ser-Gly-Asn-Lys-Val-Lys-Thr-Thr-Lys-Val-Thr-Arg, с молекулярной массой 6920 г/моль.

В другом конкретном аспекте пептид согласно настоящему изобретению представляет собой пептид, состоящий или по существу состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1.

В следующем конкретном аспекте пептид согласно настоящему изобретению представляет собой пептид, состоящий или по существу состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5.

Термины «состоящие по существу из» имеют то значение, которое им обычно приписывается, например, они допускают элементы, не указанные явно, но исключают элементы, которые встречаются в уровне техники или которые влияют на основные или новые характеристики изобретения. В связи с этим, пептид, «состоящий по существу из» указанной последовательности, относится к пептиду, содержащему или состоящему из этой последовательности и имеющему другие признаки, не существенные для активности пептида.

Пептид SEQ ID NO: 1 состоит или по существу состоит из 63 С-концевых аминокислотных остатков зрелого белка TAFA-4 человека и может быть идентифицирован как аминокислоты 78-140 UniProt, регистрационный номер Q96LR4.

Как полагают авторы, два аминокислотных остатка Q (Glu) в позиции 13 и Y (Tyr) в позиции 45, выделенные жирным шрифтом в SEQ ID NO: 1 (CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWWCHMNPCLEGEDCKVLPDYSWSSSGNKVKT TTKVTR), со ссылкой на позиции, указанные в SEQ ID NO: 1, связаны с биологическим

действием пептида, в частности, с модуляцией возбудимости интернейронов спинного мозга, предпочтительно интернейронов пластинки ІІІ спинного мозга.

Также авторами изобретения впервые раскрыты в данном документе варианты пептида SEQ ID NO: 1. Варианты предназначены для обозначения пептида, полученного из пептида с SEQ ID NO: 1 и возникшего в результате делеции или добавления одной или нескольких аминокислот и/или замены одной или нескольких аминокислот в одном или нескольких сайтах в пептиде с SEQ ID NO: 1. Варианты будут считаться функциональными вариантами, если вариант по существу сохраняет функциональное действие пептида SEQ ID NO: 1 или даже улучшает указанное функциональное действие, позволяя предотвращать или лечить боль. Действие можно измерить с помощью функциональных анализов, таких как поведенческие анализы, проводимые в экспериментальной части.

Вариант пептида, применимый в контексте настоящего изобретения, может быть идентичен по меньшей мере на 90%, 90,5%, 91%, 92%, 92,1%, 93%, 93,7%, 94%, 95%, 95,2%, 96%, 96,8%, 97%, 98%, 98,4% или 99% последовательности SEQ ID NO: 1.

Конкретным и предпочтительным вариантом пептида SEQ ID NO: 1 («ТТ1») является пептид SEQ ID NO: 5 («ТТ6»): SFPGQVAGTTRAQPSSVEASIVIQKWWSHMNPSLEGEDSKVLPDYSGWSSSSGNKVKTT KVTR, т.е. Ser-Phe-Pro-Gly-Gln-Val-Ala-Gly-Thr-Thr-Arg-Ala-Gln-Pro-Ser-Ser-Val-Glu-Ala-Ser-Ile-Val-Ile-Gln-Lys-Trp-Trp-Ser-His-Met-Asn-Pro-Ser-Leu-Glu-Gly-Glu-Asp-Ser-Lys-Val-Leu-Pro-Asp-Tyr-Ser-Gly-Trp-Ser-Ser-Ser-Ser-Gly-Asn-Lys-Val-Lys-Thr-Thr-Lys-Val-Thr-Arg, с молекулярной массой 6820 г/моль.

В конкретном аспекте вариант, идентичный по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 1, модулирует возбудимость интернейронов спинного мозга (предпочтительно интернейронов пластинки ІІІ спинного мозга). В предпочтительном аспекте вариант представляет собой пептид, содержащий одну или несколько точечных мутаций (например 2, 3, 4, 5 или 6 точечных мутаций), которые добавляют, удаляют или заменяют любую из аминокислот, присутствующих в SEQ ID NO: 1, при условии, что аминокислотные остатки Q в позиции 13 и Y в позиции 45 в SEQ ID NO: 1 остаются неизменными (позиции 13 и 45 относятся к позициям, указанным в SEQ ID NO: 1).

Таким образом, в предпочтительном аспекте изобретения две аминокислоты (Q в позиции 13 и Y в позиции 45 SEQ ID NO:1) остаются неизменными в аминокислотной последовательности варианта пептида, идентичного по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 1, как, например, для пептида SEQ ID NO: 5.

В другом конкретном аспекте вариант пептида, применимого в контексте настоящего изобретения, может быть идентичен по меньшей мере на 84,1%, 85%, 85,7%, 86%, 87%, 87,3%, 88%, 88,9% или 89% последовательности SEQ ID NO: 1. Предпочтительно вариант, идентичный по меньшей мере на 85% SEQ ID NO: 1, модулирует возбудимость интернейронов спинного мозга (предпочтительно интернейронов пластинки ІІІ спинного мозга).

В конкретном аспекте вариант представляет собой пептид, содержащий семь или более точечных мутаций (например 8, 9 или 10 точечных мутаций), которые добавляют, удаляют или заменяют любую из аминокислот, присутствующих в SEQ ID NO: 1, при условии, что аминокислотные остатки Q в позиции 13 и Y в позиции 45 в SEQ ID NO: 1 остались неизменными (позиции 13 и 45 относятся к позициям, указанным в SEQ ID NO: 1).

В конкретном аспекте одна или несколько делеций находятся на N-конце SEQ ID NO: 1. В другом аспекте одна или несколько делеций находятся на C-конце или в любом другом положении SEQ ID NO: 1 с при условии, что две аминокислоты в позиции 13 и в позиции 45 SEQ ID NO:1 (Q и Y) остаются неизменными. В еще одном аспекте две или более делеции находятся как на N-, так и на C-конце SEQ ID NO: 1. Такие делеции на N-и/или C-конце пептида SEQ ID NO: 1 или в его ядре могут приводить к усеченному варианту человеческого пептида SEQ ID NO: 1.

Кроме того, пептид согласно настоящему изобретению может быть слит с другим пептидом или белком с образованием конъюгата, пригодного для использования в описанных в данном документе способах. Термин «конъюгат» в этом контексте относится к сконструированной слитой конструкции, объединяющей биологические функции двух молекул в одном полипептиде, а именно пептиде SEQ ID NO: 1 или его варианте, например, способном модулировать возбудимость ноцицептора или интернейрона вместе, например, с полипептидом, который специфически взаимодействует или связывается с клеткой-мишенью.

Настоящее изобретение также относится к нуклеиновой кислоте (SEQ ID NO: 2 или 9), кодирующей пептид SEQ ID NO: 1 или его вариант, описанный в данном документе. Любая последовательность, кодирующая пептид SEQ ID NO: 1 или его вариант, входит в настоящее изобретение, также как аналогичные последовательности, возникающие в результате дегенерации генетического кода. В конкретном аспекте нуклеиновая кислота, кодирующая описанный в настоящем документе пептид, содержит, состоит или по существу состоит из последовательности SEQ ID NO: 2: TGCTTCCCGGGACAGGTGGCGGGCACAACTCGGGCTCAACCTTCTTGTGTTGAAGCT TCCATTGTGATTCAGAAATGGTGGTGTACATGAATCCGTGTTTGAAGGAGAGGAT TGTAAGGTGCTGCCAGATTACTCAGGTTGGTCCCTGTAGCAGTGGCAATAAAGTCAAA АСТАСГААГГТААСГСГГ.

В другом конкретном аспекте нуклеиновая кислота, кодирующая описанный в настоящем документе пептид, содержит, состоит или по существу состоит из последовательности SEQ ID NO: 9: TGCTTTCCAGGTCAAGTTGCGGGAACAACCTCGTGCACAACCATCGTGCAGTAGAGGCC TCAATTGTTATCCAAAAGTGGTGGTGTACATGAACCCCTGCCTCGAAGGAGAGGA CTGTAAGGTAAGTGCCTGACTACAGCGGGTGGTCATGTTTCATCAGGCAATAAAGGTGA AGACGACCAAAGTTACCCGT. Нуклеиновая кислота SEQ ID NO:9 особенно адаптирована для выработки пептида SEQ ID NO:1 в бактериях.

Настоящее изобретение также относится к нуклеиновой кислоте (SEQ ID NO: 6), кодирующей пептид SEQ ID NO: 5 или его вариант, описанный в данном документе. Любая последовательность, кодирующая пептид SEQ ID NO: 5 или его вариант, входит в настоящее изобретение, также как аналогичные последовательности, возникающие в результате дегенерации генетического кода. В конкретном аспекте нуклеиновая кислота, кодирующая описанный в настоящем документе пептид, содержит, состоит или по существу состоит из последовательности SEQ ID NO: 6: TCGTTTCCAGGTCAAGTTGCGGGAACAACCTCGTGCACAACCATCGTTCGGTAGAGGCC TCAATTGTTATCCAAAAGTGGTGGTCGCACATGAACCCCTCGCTCGAAGGAGAGGA CTCGAAGGTA CTGCTGACTACAGCGGGTGGTCATCGTCATCAGGCAATAAGGTGA AGACGACCAAAGTTACCCGT.

Вышеупомянутая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая пептид SEQ ID NO: 1 или его вариант, может быть фланкирована регуляторными последовательностями для управления ее экспрессией в соответствующей клетке-хозяине.

В другом аспекте настоящее изобретение также относится к кассете экспрессии, содержащей в следующем порядке от 5' до 3':

- промотор,
- последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая пептид SEQ ID NO: 1 или его вариант, описанный в настоящем документе; и
- сигналы терминации, такие как, например, сигнал полиаденилирования.

Вышеупомянутая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая пептид SEQ ID NO: 1 или его вариант, или кассета экспрессии, раскрытая в настоящем документе, может быть фланкирована последовательностями, подходящими для их упаковки в вектор, который оптимизирует ее транскрипцию и/или трансляцию в клетке.

В другом аспекте настоящее изобретение также относится к вектору, обеспечивающему экспрессию пептида, описанного в данном документе.

#### Способы получения пептида

Чтобы обеспечить экспрессию в клетках-хозяевах, нуклеиновая кислота, кодирующая пептид (или один из его вариантов), описанный в настоящем документе, может присутствовать в векторе, и после введения указанного вектора в подходящую клетку-хозяин последовательность может быть экспрессирована для получения кодируемого пептида, описанного в данном документе, в соответствии со стандартными способами клонирования и экспрессии, которые хорошо известны в данной области техники (например как описано в Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). Для экспрессии полинуклеотидной последовательности, кодирующей пептид, который описан в данном документе, можно использовать различные векторы экспрессии. Вектор экспрессии, который можно использовать в настоящем изобретении, включает в себя без ограничения эукариотический вектор экспрессии, в частности вектор экспрессии млекопитающих,

вектор экспрессии на основе вируса, вектор экспрессии бакуловируса, вектор экспрессии растений и любой плазмидный вектор экспрессии для получения любого из описанных в данном документе пептидов в клетке-хозяине. Вектор экспрессии также может представлять собой вектор, обеспечивающий экспрессию пептида в бактериальной системе.

Выбор вектора экспрессии зависит от предполагаемых клеток-хозяев, в которых должен экспрессироваться вектор. Этот выбор легко делает опытный человек. Настоящее изобретение также относится к клетке, в частности клетке-хозяину, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую описанный в данном документе пептид. Клетка (хозяин), модифицированная с использованием вектора, описанного в настоящем документе, также впервые раскрыта авторами изобретения.

Пептид согласно настоящему изобретению или его варианты можно экспрессировать как в прокариотических, так и в эукариотических клетках-хозяевах. Типичные клетки-хозяева включают множество штаммов *E. coli*, клеточные линии млекопитающих, такие как, например, CHO, CHO-K1 и HEK293; клетки насекомых, такие как клетки Sf9; и дрожжевые клетки, такие как *S. cerevisiae* и *P. pastoris*.

Описанные в данном документе нуклеиновая кислота или вектор могут быть трансфицированы в клетку-хозяин стандартными способами, обычно используемыми для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяин, такими как, например, электропорация, осаждение фосфатом кальция, трансфекция DEAE-декстраном и т.д. Альтернативно, описанные в данном документе нуклеиновая кислота или вектор могут быть доставлены в клетку-хозяин путем трансдукции с использованием вектора на основе вируса.

Чистоту можно измерить любым подходящим стандартным способом, например, с помощью анализа путем колоночной хроматографии, тонкослойной хроматографии или высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Выделенный или синтетический пептид также определяет степень стерильности, безопасную для введения человеку, например, при отсутствии инфекционных или токсичных агентов.

Пептиды, используемые в описанных в данном документе композициях и способах, также могут быть получены способом твердофазного синтеза. Прямой химический синтез пептидов можно осуществить способами, хорошо известными специалистам в данной области, такими как нативное химическое лигирование (NCL). Этот химический подход заключается в сочетании незащищенных пептидных фрагментов: пептид с N-концевым цистеином реагирует с C-концевым тиоэфирным пептидом. За этой транстиоэтерификацией быстро следует внутримолекулярный S,N-ацильный сдвиг, который приводит к образованию нативной амидной связи в месте лигирования. Когда два пептида лигируют в одностадийном лигировании с последующей одностадийной очисткой, ожидаемый выход очень высок и, таким образом, совместим с крупномасштабным получением для терапевтического использования.

Генная терапия

Клонирова последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие описанные в данном документе пептиды, в соответствующие векторы, авторы настоящего изобретения также предлагают новые средства доставки генов, в частности генетические конструкции (такие как, например, экспрессионная кассета или вектор) для генной терапии боли, в частности острой, подострой или хронической боли, предпочтительно хронической боли. Генную терапию можно применять для обеспечения эндогенной выработки пептида ТАФА-4, пептида ТТ1 или его варианта, такого как пептид ТТ6, специфическими клетками субъекта. Генная терапия может происходить либо *in vivo*, либо *ex vivo*. Генная терапия *ex vivo* требует выделения и очистки, по крайней мере, образца клеток субъекта, введения последовательности нуклеиновой кислоты (т.е. трансгена), кодирующей пептид, который описан в данном документе, в выделенные клетки и повторного введения субъекту генетически измененных/модифицированных клеток. Напротив, при генной терапии *in vivo* трансген обычно упаковывают для введения субъекту. Конструкции для доставки генов могут быть как невирусными, так и вирусными. Предпочтительно описанную в данном документе генетическую конструкцию получают с использованием вирусных элементов, вирусных векторов и/или любой вирусной упаковочной системы (систем), которые можно использовать для экспрессии трансгена/кодирующей последовательности (т.е. последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид SEQ ID NO: 1 или его вариант) в ткани/клетке-мишени. Вирусные векторы могут включать любой подходящий промотор и другой регулятор транскрипции, которые обеспечивают или облегчают экспрессию трансгенного продукта в ткани/клетке-мишени. Система вирусной упаковки предпочтительно адаптирована к клетке-мишени. Попав в клетку-мишень, такая система облегчает доставку в ткань-мишень. Вирусный вектор, используемый в описанных в данном документе способах, предпочтительно представляет собой вирус с дефицитом репликации, такой как, например, вектор аденовируса или аденоассоциированного вируса (AAV).

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к рекомбинантному аденоассоциированному вирусу (AAV), содержащему в своем геноме последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пептид SEQ ID NO: 1 или его вариант, такой как пептид SEQ ID NO: 5, который обычно функционально связан с промотором.

На сегодняшний день от человека и приматов (NHP) выделены и охарактеризованы по меньшей мере десятки различных серотипов AAV с вариантами поверхностных свойств. Термин «серотип» позволяет специалисту различать AAV, имеющие серологически разные капсиды. Серологические отличия определяют на основании отсутствия перекрестной реактивности между антителами к одному серотипу AAV по сравнению с другими серотипами AAV. Описанный в данном документе rAAV, также называемый вектором rAAV или частицей rAAV, может иметь любой из следующих известных серотипов, т.е. может быть выбран, например, из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu37,

AAV.Anc80, AAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV.PHP.B, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, AAV.HSC16 и AAVhu68. Вектор rAAV может обладать повышенным тропизмом к конкретной клетке, ткани или органу. В контексте перорального введения вектор rAAV может обладать повышенным тропизмом к ткани желудка, тонкой или толстой кишки и, более конкретно, к клеткам, которые составляют эти ткани, в частности к эпителиальным клеткам, таким как, например, энтероциты, бокаловидные клетки, энтероэндроциновые клетки, клетки Панета или клетки Тафта. Для клеток-мишеней, расположенных в кишечнике или клеток-мишеней, доставленных в кишечник, любой из AAV 4, AAV7, AAV8, AAV9 или AAV10 может быть выбран как особенно эффективный.

Векторы или кассеты генной терапии согласно настоящему изобретению могут быть получены способами, известными в данной области техники, хорошо известными специалистам и ранее описанными, например, в публикации заявки на патент РСТ № WO03042397 и патенте США № 6632670.

Настоящее описание также относится к способу получения рекомбинантного вектора, например вирусного вектора, такого как AAV, включающему:

- a) культивирование клетки, которая была трансфицирована/трансдуцирована рекомбинантным вектором, описанным в настоящем документе; и
- b) выделение рекомбинантного вектора из супернатанта трансфицированных/трансдуцированных клеток.

Вектор для генной терапии согласно настоящему изобретению можно получить путем трансфекции двух или трех плазмид в линию клеток эмбриональной почки человека 293 или 293Т. В некоторых аспектах ДНК, кодирующая терапевтический ген, обеспечивается одной плазмидой; капсидные белки и гены репликации, происходящие из AAV одного или нескольких серотипов, и хелперные функции, обеспечиваемые, например, аденовирусом, все они обеспечиваются в конфигурации транс второй плазмидой. В некоторых аспектах ДНК, кодирующая пептид SEQ ID NO: 1 или его вариант, обеспечивается одной плазмидой; капсидные белки и гены репликации, происходящие из AAV одного или нескольких серотипов, обеспечиваются в конфигурации транс второй плазмидой, а хелперные функции, обеспечиваемые, например, аденовирусом, обеспечиваются третьей плазмидой. В конкретном аспекте первая плазида содержит кассету экспрессии, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пептид, который описан в настоящем документе, функционально связанный с промотором, включая два фланкирующих инвертированных концевых повтора (ITR).

После культивирования клеток вектор для генной терапии может быть, например, высвобожден из клеток с помощью циклов замораживания-оттаивания и очищен любым способом, хорошо известным специалисту в данной области, например, с использованием

ступенчатого градиента йодиксанола с последующей ионообменной хроматографией на колонках Hi-Trar QHP. Затем полученный вектор генной терапии можно концентрировать на центрифужной колонке, а очищенный вектор можно хранить замороженным (при  $-60^{\circ}\text{C}$  или ниже), например, в фосфатно-солевом буфере.

Связанные аспекты изобретения включают клетку-хозяин, трансфицированную или трансдуцированную рекомбинантным вектором, например, трансдуцированную вектором AAV, описанным в настоящем документе. Дополнительные родственные аспекты изобретения включают любую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую или состоящую (по существу) из генома рекомбинантного вектора, например AAV, описанного в настоящем документе.

#### Композиции

Один или несколько описанных в данном документе пептидов могут быть составлены для применения по отдельности или в комбинации, индивидуально или в форме композиции. Композиция может представлять собой диетическую композицию или фармацевтическую композицию и может использоваться в терапевтическом или профилактическом способе, как описано в данном документе.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей пептид, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку, описанные в данном документе, и диетически или фармацевтически приемлемый носитель.

Термины «диетически приемлемый носитель» относятся к носителю, позволяющему субъекту без риска проглатывать и переваривать композицию, содержащую пептид, последовательность нуклеиновой кислоты, вектор или клетку, которая описана в настоящем документе, и способный защищать указанный пептид от любого воздействия, в частности, связанного с перевариванием пищи, которое могло бы изменить его до того, как он окажет свое терапевтическое действие в нужном месте и в нужный момент в зависимости от характера и локализации боли.

В контексте перорального введения композиция может дополнительно содержать по меньшей мере одно желудочно-кишечное защитное средство, предпочтительно ингибитор кислоты, присутствующий в количестве, эффективном для повышения pH желудка субъекта по меньшей мере до 2, по меньшей мере до 3, по меньшей мере до 4, а более предпочтительно по меньшей мере до 5 или 6. Термин «ингибитор кислоты» относится к средствам, которые ингибируют секрецию желудочной кислоты и повышают pH желудка. Ингибитор кислоты может включать без ограничения блокаторы  $\text{H}_2$ , включая циметидин, ранитидин, эбротидин, пабутидин, лафутидин, локстидин, фамотидин; ингибиторы протонной помпы, включая омепразол, эзомепразол, пантопразол, лансопразол, декслансопразол, рабепразол, парипразол, леминопразол и тенатопразол; или любую их комбинацию.

«Фармацевтически приемлемая основа/среда/носитель» может представлять собой разбавитель, адъювант или вспомогательное средство, с которым вводят активное средство (средства) (т.е. пептид или его вариант согласно изобретению и, необязательно,



любое дополнительное отдельное активное средство). Такой фармацевтический носитель может представлять собой стерильную жидкость, такую как вода или масло, в том числе нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, например арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобное. Вода является предпочтительным носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. В качестве жидких носителей также можно использовать солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина, особенно для растворов для инъекций. Подходящие фармацевтические наполнители включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и тому подобное.

Когда фармацевтическая композиция адаптирована для перорального введения, таблетки или капсулы можно приготовить обычными способами с фармацевтически приемлемыми наполнителями, такими как связывающие средства (например прежелатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлоза); наполнители (например лактоза, микрокристаллическая целлюлоза или гидрофосфат кальция); смазочные материалы (например стеарат магния, тальк или диоксид кремния); разрыхлители (например картофельный крахмал или гликолат крахмала натрия); или смачивающие средства (например лаурилсульфат натрия). Таблетки могут быть покрыты любым способом, хорошо известным в данной области. Жидкие препараты для перорального введения могут иметь форму, например, растворов, сиропов или суспензий, или они могут быть представлены в виде сухого продукта для разведения водой или другим подходящим носителем перед применением. Такие жидкие препараты можно приготовить обычными способами с фармацевтически приемлемыми добавками, такими как суспендирующие средства (например сироп сорбита, производные целлюлозы или гидрогенизированные пищевые жиры); эмульгаторы (например лецитин или акация); неводные носители (например миндальное масло, маслянистые эфиры, этиловый спирт или фракционированные растительные масла); и консерванты (например метил- или пропил-п-гидроксibenзоаты или сорбиновая кислота). Препараты могут также содержать при необходимости буферные соли, ароматизаторы, красители и подсластители.

Композиция согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере одно дополнительное активное соединение. Предпочтительно дополнительное активное соединение представляет собой активное средство, эффективное против боли. Под «эффективным против боли» подразумевается активное средство, обладающее анальгезирующими или болеутоляющими свойствами (измеримо ощущаемыми субъектом). Более предпочтительно, дополнительное активное соединение представляет собой стероидное противовоспалительное средство (SAID), нестероидное противовоспалительное средство (NSAID) или опиоидное лекарственное средство.

SAID может включать без ограничения гидрокортизон, кортизон, этаметазон, преднизолон, преднизолон, триамцинолон, дексаметазон, флудрокортизон или любую их

комбинацию.

NSAID может включать без ограничения целекоксиб, рофекоксиб, лумиракоксиб, валдекоксиб, парекоксиб, эторикоксиб, CS-502, JTE-522, L-745,337, NS398, аспирин, ацетаминофен (считающийся NSAID для целей настоящего изобретение), ибупрофен, флурбипрофен, кетопрофен, напроксен, оксaproзин, этодолак, индометацин, кеторолак, лорноксикам, мелоксикам, пироксикам, дроксикам, теноксикам, набуметон, диклофенак, меклофенамат, мефенаминовая кислота, дифлунизал, сулиндак, толметин, супрофен, беноксапрофен, ацклофенак, толфенаминовая кислота, оксифенбутазон, азапропазон, фенилбутазон или любую их комбинацию.

Опиоидное лекарственное средство может включать без ограничения (декстро)пропоксифен, А-метилфентанил, альфентанил, аллилпродин, безитрамид, бупренорфин, буторфанол, карфентанил, десметилпродин, декстроморамид, дезоцин, диацетилморфин, дигидрокодеион, дигидроэторфин, диморфон, дифеноксилат, дипипанон, эторфин, фентанил, кетобемидон, лефетамин, левацетилметадол, левометорфан, леворфанол, лоперамид, меперидин, мептазинол, метадон, метилморфин, морфин, налбуфин, никоморфин, омефентанил, орипавин, оксикодон, оксиморфон, РЕРАР, параморфин,, феназоцин, пиритрамид, продин, ремифентанил, суфентанил, тапентадол, тилидин, трамадол или антагонисты опиоидов, такие как налмефен, налоксон, налтрексон или любую их комбинацию.

#### Лечебное и профилактическое применение

Описанные в данном документе пептиды обычно используют для предотвращения или лечения боли.

Настоящее изобретение также относится к пептиду, который описан в данном документе, в частности к выделенному, рекомбинантному или синтетическому пептиду с последовательностью SEQ ID NO:1, или к пептиду, идентичному по меньшей мере на 90% SEQ ID NO:1, для применения в качестве лекарственного средства.

В другом конкретном и предпочтительном аспекте изобретение относится к выделенному, синтетическому или рекомбинантному пептиду с последовательностью SEQ ID NO: 5 или его варианту, согласно определению в данном документе, для применения в качестве лекарственного средства.

В другом аспекте авторы настоящего изобретения описывают пептид, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку, которая описана в настоящем документе, для применения в качестве активного ингредиента/средства для предотвращения или лечения боли у нуждающегося в этом субъекта.

В конкретном аспекте авторы настоящего изобретения описывают применение пептида, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции, которые описаны в настоящем документе, для получения лекарственного средства для лечения боли у нуждающегося в этом субъекта. В настоящем документе также описаны пептид, нуклеиновая кислота, вектор, клетка или композиция, которые описаны в настоящем документе, для применения в профилактике или лечении боли у нуждающегося в этом

субъекта, и соответствующие способы предотвращения или лечения боли, включающие этап введения нуждающемуся в этом субъекту указанного пептида, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки и/или композиции, описанных в настоящем документе.

В конкретном аспекте авторы настоящего изобретения описывают применение пептида, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции, которые описаны в настоящем документе, для предотвращения или лечения боли, в частности острой, подострой или хронической боли, предпочтительно хронической боли.

Предпочтительно, боль представляет собой невропатическую боль (такую как периферическая невропатическая боль, вызванная химиотерапией, или нейропатическая боль, вызванная химиотерапией), послеоперационную боль, воспалительную боль, гипералгезию или аллодинию.

В конкретном аспекте авторы изобретения описывают в настоящем документе применение пептида, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции, которые описаны в настоящем документе, для предотвращения или лечения нейропатической боли (такой как периферическая невропатическая боль, индуцированная химиотерапией, или невропатическая боль, индуцированная химиотерапией), послеоперационной боли или воспалительной боли.

В конкретном аспекте авторы изобретения описывают в настоящем документе применение пептида, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции, которые описаны в настоящем документе, для предотвращения или лечения хронической нейропатической боли (такой как хроническая периферическая невропатическая боль, индуцированная химиотерапией, или хроническая невропатическая боль, индуцированная химиотерапией), хронической послеоперационной боли или хронической воспалительной боли.

В конкретном аспекте авторы изобретения описывают в настоящем документе применение пептида, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции, которые описаны в настоящем документе, для предотвращения или лечения гипералгезии, в частности термической (например тепловой или холодовой гипералгезии, предпочтительно холодовой гипералгезии) или механической гипералгезии, предпочтительно механической гипералгезии, еще более предпочтительно механической гипералгезии, вызванной повреждением.

В другом конкретном аспекте авторы настоящего изобретения описывают применение пептида, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции, которые описаны в настоящем документе, для предотвращения или лечения аллодинии, в частности механической аллодинии. Предпочтительно механическая аллодиния представляет собой механическую аллодинию, вызванную повреждением нерва, или механическую аллодинию статического типа.

В следующем конкретном аспекте авторы настоящего изобретения описывают применение пептида, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции, которые описаны в настоящем документе, для предотвращения или лечения аллодинии, в

частности термической аллодинии, такой как тепловая аллодиния (т.е. ощущение боли от обычно неболезненного теплового раздражителя) или холодовая аллодиния (т.е. ощущение боли от обычно неболезненного холодового раздражителя), предпочтительно холодовая аллодиния.

В конкретном аспекте авторы изобретения описывают в настоящем документе применение пептида, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции, которые описаны в настоящем документе, для предотвращения или лечения механической гиперчувствительности (также называемой гиперчувствительностью к механическим раздражителям или просто гипералгезией), предпочтительно механической, вызванной повреждением гиперчувствительности у нуждающегося в этом субъекта.

Лечение может привести к улучшению ощущений одного или нескольких прикосновений, жжения или холода, «покалывания», онемения, зуда, мучительной боли и затруднений в правильном измерении температуры. В конкретном аспекте лечение устраняет боль. В другом конкретном аспекте лечение уменьшает симптомы боли, в частности симптомы нейропатической боли (аллодинии и/или гипералгезии). Способы согласно настоящему изобретению делают нейропатическую боль более управляемой, даже если они не устраняют ее (т.е. не улучшают качество жизни).

В данной области техники доступны стандартные тесты, хорошо известные специалисту, для оценки того, лечилась ли боль, в частности (хроническая) нейропатическая боль, с использованием конкретного пептида согласно изобретению. Например, оценка болевой чувствительности у субъекта была стандартизирована с использованием количественного сенсорного тестирования (тест с булавочным уколом, альгометром давления, нитями фон Фрея, прикосновением, пощипыванием или легким давлением пальцем) или с использованием шкалы оценки боли.

#### Субъект

В контексте настоящего изобретения субъектом или пациентом является животное, предпочтительно млекопитающее. В конкретном аспекте субъектом является домашнее животное, такое как, например, лошадь, собака, кошка, корова и т.д. В другом конкретном и предпочтительном аспекте субъектом является человек.

Субъект, имеющий хроническую боль, вызванную нейропатической болью, может страдать от заболевания, классически связанного с такой нейропатической болью, такого как, например, фибромиалгия, комплексный регионарный болевой синдром, постгерпетическая невралгия, синдром Элерса-Данлоса и эритромелалгия.

В конкретном аспекте субъект страдает фибромиалгией (FM). Фибромиалгия - синдром, характеризующийся хронической скелетно-мышечной болью (Sircusa et al., 2021). FM обусловлена явлением центральной сенсibilизации, характеризующимся дисфункцией нейроцепей, включающей восприятие, передачу и обработку афферентных неболевых раздражителей, с преобладающим проявлением боли на уровне опорно-двигательного аппарата. Основными симптомами этого заболевания являются ригидность мышц, ригидность суставов, бессонница, утомляемость, расстройства настроения,

когнитивная дисфункция, тревога, депрессия, общая чувствительность и неспособность выполнять нормальную повседневную деятельность. FM также может быть связана с конкретными заболеваниями, такими как инфекция, диабет, ревматическое заболевание и/или психиатрическое или неврологическое расстройство.

В конкретном аспекте авторы настоящего изобретения описывают применение пептида, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции, которые описаны в настоящем документе, для предотвращения или лечения фибромиалгии (FM).

В другом аспекте субъект страдает комплексным регионарным болевым синдромом (CRPS). Комплексный региональный болевой синдром - хроническое неврологическое заболевание конечностей, характеризующееся выраженной болью наряду с сенсорными, вегетативными, двигательными и трофическими нарушениями (Goh et al., 2017). Это состояние может быть вызвано хирургическим вмешательством, травмой или незначительным повреждением и имеет различное течение: от легкого и самопроизвольного до хронического заболевания, которое ухудшает повседневную деятельность и качество жизни, связанное со здоровьем. CRPS можно разделить на два типа: CRPS I и II типа, которые характеризуются отсутствием или наличием определяемого повреждения нервов. CRPS I типа - это синдром, который обычно развивается после исходного вредного события, не ограничивается распространением одного периферического нерва и непропорционален провоцирующему событию. Он связано с отеком, изменениями кожного кровотока, аномальной судомоторной действием в области боли, аллодинией и гипералгезией и обычно поражает дистальную часть пораженной конечности или имеет градиент от дистальной к проксимальной части. CRPS II типа можно определить как жгучую боль, аллодинию и гиперпатию, возникающую в области конечности после частичного повреждения нерва или одной из его основных ветвей, иннервирующих эту область.

В конкретном аспекте авторы настоящего изобретения описывают применение пептида, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции, которые описаны в настоящем документе, для предотвращения или лечения комплексного регионарного болевого синдрома (CRPS).

В еще одном аспекте субъект страдает постгерпетической невралгией (PHN). Постгерпетическая невралгия является наиболее частым осложнением опоясывающего герпеса (HZ), инфекции, вызванной реактивацией дремлющего вируса ветряной оспы в сенсорных ганглиях (Ngo et al., 2020). Он характеризуется локализованной пузырьчатой сыпью и болью вдоль соответствующего дерматома. PHN определяется как затяжная боль в течение как минимум 90 дней после первоначального появления сыпи HZ, которая значительно снижает качество жизни больных пациентов. PHN подразделяется на модели раздражительных ноцицепторов и модели деафферентации. Во время реактивации VZV вирус реплицируется и распространяется от ганглия дорсального корешка к его соответствующей периферии. Распространение вызывает иммунный ответ и воспаление, которое повреждает периферический нерв. Это повреждение уменьшает торможение боли

нейроном, снижая порог деполяризации болевых сигналов. Это приводит к болезненному восприятию в ответ на неболевые раздражители - процесс, называемый периферической сенсibilизацией. Повторная активация ноцицепторов подтипа С также вызывает состояние повышенного возбуждения в дорсальном роге. Прямое вирусное повреждение НЗ ослабляет нисходящий тормозной путь боли, что приводит к хронической активации нейронов второго порядка в дорсальном роге. Кроме того, у пациентов с НЗ с PHN сообщалось о потере ингибирующей гамма-аминомасляной кислоты (GABA), продуцирующей интернейроны в дорсальном роге, по сравнению с пациентами с НЗ без PHN. Эти факторы усиливают все последующие реакции афферентного входа в процессе, называемом центральной сенсibilизацией. При PHN этот процесс сопровождается анатомической реорганизацией низкопороговых механорецепторных афферентов, называемых А $\beta$ -волоконками, которые в норме передают неболевые тактильные раздражители в центральную нервную систему. Когда вирусное повреждение приводит к потере С-ноцицепторов на периферии, эти волокна соединяются с нейронами второго порядка, которые изначально были компенсаторно связаны с афферентами С-ноцицепторов. Этот процесс называется деафферентацией, и у пациентов, страдающих аллодинией, наблюдается серьезная потеря сенсорных функций.

В конкретном аспекте авторы настоящего документа описывают применение пептида, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции, которые описаны в настоящем документе, для предотвращения или лечения постгерпетической невралгии (PHN).

В еще одном аспекте субъект страдает эритромелалгией (EM). Эритромелалгия - редкий эпизодический акросиндром, поражающий преимущественно обе нижние конечности двусторонне и симметрично или односторонне, с классической триадой эритемы, тепла и жгучей боли (Maria Bibiana Leroux, 2018). EM классифицируется наряду с хроническими болевыми синдромами. Первичная EM - это аутосомно-доминантное наследственное заболевание, кодируемое OMIN (онлайн-менделевское наследование у человека) под номером 133020. Это связано с изменением белка  $\alpha$ -субъединицы натриевого канала типа 9 (SCN9A), затрагивающего канал Nav1.7, который экспрессируется главным образом в ганглиях дорсальных корешков и нейронах симпатических ганглиев. Вторичная EM связана с миелопролиферативными заболеваниями, паранеоплазиями, аутоиммунными заболеваниями, контактом с токсином и инфекциями.

В конкретном аспекте авторы настоящего документа описывают применение пептида, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции, которые описаны в настоящем документе, для предотвращения или лечения эритромелалгии (EM).

В конкретном аспекте авторы настоящего документа описывают применение пептида, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции, которые описаны в настоящем документе, для предотвращения или лечения любого состояния, связанного с болью, при котором нарушен сигнал, передаваемый ноцицепторами или интернейронами.

Авторы изобретения ранее установили, что отсутствие, пониженная или недостаточная экспрессия или нефункциональная экспрессия миозина IA (Myo1a) у субъекта по сравнению с экспрессией, наблюдаемой у эталонного субъекта Myo1a +/+, экспрессирующего функциональный Myo1a, предрасполагает развитие у субъекта хронической механической боли, вызванной травмой, и/или хронической термической боли, вызванной воспалением (WO2017153424).

В еще одном аспекте субъектом является субъект, имеющий один или два мутантных аллеля в гене myo1A. Под «мутантным» аллелем подразумевают замену, делецию или вставку в нуклеиновую кислоту гена myo1A (в кодирующей или некодирующей области), которые изменяют экспрессию или уровень экспрессии Myo1a. Мутация может затрагивать одно или несколько азотистых оснований. Замена может представлять собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP).

В конкретном аспекте авторы изобретения описывают в настоящем документе применение пептида, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции, которые описаны в настоящем документе, для предотвращения или лечения хронической механической боли, вызванной повреждением, и/или хронической термической боли, вызванной воспалением, у такого субъекта.

#### Дозы

Композиции согласно изобретению предпочтительно вводят непосредственно субъекту в терапевтически эффективном количестве. Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству пептида SEQ ID NO: 1 или любого его варианта, необходимому для лечения, облегчения или предотвращения боли у субъекта. Терапевтически эффективное количество можно первоначально оценить либо с помощью анализов на клеточных культурах, либо на животных моделях. Животную модель также можно использовать для определения подходящего диапазона концентраций и пути введения пептида. Такая информация затем может быть использована для определения полезных доз и путей введения людям.

Дозировка пептида, используемого в описанных в данном документе способах, может варьироваться в зависимости от общего состояния здоровья, возраста, пола и веса субъекта, характера и тяжести/интенсивности боли, времени, частоты и продолжительности введения, конкретного используемого пептида, комбинации (комбинаций) лекарств, чувствительности реакции и переносимости/ответа на терапию. Эта подходящая эффективная дозировка может быть определена путем рутинных экспериментов и остается на усмотрение врача.

Для получения подходящего анальгезирующего или анальгезирующего эффекта эффективная доза пептида или его варианта, который описан в данном документе авторами изобретения, на 1 кг массы тела в течение 24 часов составляет от 1 мкг до 100 мг/кг/день, предпочтительно от 5 мкг до 80 мг/кг/день, более предпочтительно от 10 мкг до 50 мг/кг/день у животного, обычно млекопитающего.

Когда субъектом является человек, эффективная доза пептида или его варианта,

который описан в данном документе авторами изобретения, предпочтительно составляет от 2,5 мкг/кг/день до 0,6 мг/кг/день, предпочтительно от 5 мкг или 10 мкг/кг/день до 0,5 мкг/кг/день, более предпочтительно от 50 мкг или 75 мкг/кг/день до 0,3 мг/кг/день для человека.

Дозу можно вводить в виде болюса или можно разделить на несколько порций, которые вводят отдельно в течение дня. Другими словами, лечение может представлять собой схему введения одной дозы или схему введения нескольких доз. Эффективную дозу можно вводить в течение периода дней, недель, месяцев или лет.

Доставку пептида или композиции, описанной в настоящем документе, субъекту можно осуществлять несколькими путями.

В конкретном аспекте описанный в данном документе пептид или композицию вводят субъекту внутримышечно, внутривенно, внутривенно, внутривенно, перорально (через рот), анально, кожно, подкожно, дермально, чрескожно или интратекально, предпочтительно подкожно или перорально, еще более предпочтительно перорально.

Как показано в экспериментальной части, авторы изобретения демонстрируют, что пептид SEQ ID NO: 1 и его вариант SEQ ID NO: 5 обладают болеутоляющим действием при подкожном введении для лечения нейропатической боли, послеоперационной боли и/или воспалительной боли. Неожиданно то же болеутоляющее действие наблюдается также при пероральном введении пептида SEQ ID NO: 1 или 5 (через рот). Еще более удивительно и полезно то, что пептид согласно изобретению демонстрирует лучшее болеутоляющее действие по сравнению с белком TAFA-4 (полноразмерным) при пероральном введении, что делает его более удобным и подходящим для введения пациенту, чем указанный полноразмерный белок.

Авторы настоящего изобретения демонстрируют, что вариант SEQ ID NO:5, идентичный по меньшей мере на 90% пептиду SEQ ID NO:1, достигает аналогичных результатов с точки зрения эффективности по сравнению с пептидом SEQ ID NO:1.

#### Наборы

Изобретение также относится к набору, содержащему i) пептид, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку и/или композицию, раскрытые в настоящем документе, и ii) по меньшей мере одно дополнительное отдельное активное соединение, эффективное против боли, предпочтительно отличное от пептида, описанного в данном документе, или его варианта. В конкретном аспекте набор дополнительно содержит iii) письменные инструкции по использованию набора.

Набор предпочтительно представляет собой набор частей, включающий по меньшей мере две части, например, два отдельных контейнера, где первая часть содержит пептид, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или композицию, раскрытые в настоящем документе, а вторая часть содержит по меньшей мере одно дополнительное отдельное активное соединение, эффективное против боли. Предпочтительно активное соединение, эффективное против боли, представляет собой стероидное противовоспалительное средство (SAID), нестероидное противовоспалительное средство (NSAID) или опиоидное



лекарственное средство, описанное в данном документе.

В конкретном аспекте набор содержит i) пептид SEQ ID NO: 1, ii) по меньшей мере одно дополнительное активное соединение, эффективное против боли, и iii) необязательно письменные инструкции по использованию набора.

В другом конкретном аспекте набор содержит i) пептид, идентичный по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 1, такой как пептид SEQ ID NO: 5, ii) по меньшей мере одно дополнительное отдельное активное соединение, эффективное против боли, и iii) необязательно письменные инструкции по использованию набора.

В одном аспекте пептид, нуклеиновая кислота, вектор, клетка или композиция набора находятся в форме, адаптированной для внутримышечного, внутривенного, внутрибрюшинного, перорального (через рот), анального, кожного, подкожного, кожного, чрескожного или интратекального пути, предпочтительно подкожного или перорального пути, еще более предпочтительно перорального пути.

В другом аспекте по меньшей мере одно дополнительное отдельное активное соединение, эффективное против боли, находится в форме, адаптированной для внутримышечного, внутривенного, внутрибрюшинного, перорального (через рот), анального, кожного, подкожного, кожного, чрескожного или интратекального введения.

В зависимости от природы, происхождения, интенсивности боли, подлежащей лечению, а также в зависимости от природы пептида, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или содержимого композиции и от природы по меньшей мере одного дополнительного отдельного активного соединения, эффективного против боли, указанные продукты вводят совместно или нет, одновременно/параллельно или последовательно.

Настоящее изобретение также относится к использованию *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro* набора согласно настоящему изобретению для предотвращения или лечения боли, как описано выше, например, хронической боли, нейропатической боли, послеоперационной боли, воспалительной боли, гипералгезии или аллодинии. Набор согласно изобретению также можно использовать для профилактики или лечения острой или подострой боли.

Также в данном документе раскрыто применение набора согласно настоящему изобретению для получения лекарственного средства для предотвращения или лечения боли, как описано выше, у нуждающегося в этом субъекта, например, хронической боли, нейропатической боли, послеоперационной боли, воспалительной боли, гипералгезии или аллодинии. Набор согласно изобретению также можно использовать для изготовления лекарственного средства для профилактики или лечения острой или подострой боли у нуждающегося в этом субъекта.

#### Инструменты исследования

Настоящее изобретение также включает применение пептида или любого продукта, описанного выше, в качестве исследовательского инструмента для изучения боли.

Описанные в данном документе пептиды можно использовать для модуляции

возбудимости нейронов в биологической ткани или в клеточных культурах, например, для изучения механически и/или химически индуцированных болевых ноцицептивных сигналов.

Настоящее изобретение также относится к использованию нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид SEQ ID NO: 1 или пептид, идентичного по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 1, такой как пептид SEQ ID NO: 5, или вектор, обеспечивающий его экспрессию, для экспрессии или модуляции (уровня) экспрессии пептида SEQ ID NO: 1 или пептида, идентичного по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 1, такого как пептид SEQ ID NO: 5, в биологической ткани или культуре клеток.

Описанные в данном документе молекулы нуклеиновой кислоты также можно использовать для создания трансгенных животных. Это можно сделать локально путем модификации соматических клеток или с помощью терапии зародышевой линии для включения в зародышевые клетки наследственных модификаций. Таким образом, настоящее изобретение также относится к трансгенному организму (например животному), содержащему (т.е. включающему в себя) нуклеиновую кислоту SEQ ID NO: 2, 6 или 9 или ее вариант; вектор, содержащий нуклеиновую кислоту SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или 9 или ее вариант; или пептид SEQ ID NO: 1, или пептид, идентичный по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 1, такой как пептид SEQ ID NO: 5. Таким образом, изобретение также относится к клеткам-хозяевам или трансгенным организмам, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую последовательность или вектор, обеспечивающий экспрессию любого пептида, описанного в настоящем документе.

Следующие примеры представлены с целью продемонстрировать и дополнительно проиллюстрировать некоторые предпочтительные аспекты настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие его объем.

#### Примеры

Пример 1: Получение путем химического синтеза

Материалы и способы

#### **Синтез пептидов**

Для получения пептида SEQ ID NO: 1 используют способ нативного химического лигирования (NCL). Коротко, получают два коротких пептида. Синтезируют первый N-концевой пептид из 27 аминокислот, имеющий аминокислотную последовательность CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWW (SEQ ID NO: 3). Синтезируют второй C-концевой пептид из 36 аминокислот (содержащий остаток цистеина в своей N-концевой части), имеющий аминокислотную последовательность CHMNPCLEGEDCKVLPDYSWSSGNKVKTTKVTR (SEQ ID NO: 4). Два пептида лигируют с использованием одностадийного лигирования с последующей одностадийной очисткой.

#### **Мыши**

Мышей C57/B16J (в возрасте от 8 до 12 недель) покупали в компании Charles River Laboratories. Для всех экспериментов использовали мышей обоих полов. Поскольку

различий между самцами и самками не наблюдалось, данные для обоих полов затем были объединены. Мышей содержали в стандартных условиях содержания (22°C, влажность 40%, 12-часовой световой цикл, свободный доступ к пище и воде). Особые усилия были предприняты, чтобы свести к минимуму количество мышей, использованных в этом исследовании, а также стресс и страдания, которым они подвергались. Все эксперименты проводили в соответствии с европейскими рекомендациями по уходу и использованию лабораторных животных (Директива Совета 86/609/ЕЕС). Все экспериментальные процедуры были одобрены независимым комитетом по этике экспериментов на животных (APAFIS), как того требует французское законодательство и соответствующие институциональные позиции французского законодательства об экспериментах на животных. Все эксперименты проводили в соответствии с рекомендациями ARRIVE.

Модель боли 1: Модель нейропатической боли с частичным повреждением нерва (SNI).

Модель с частичным повреждением нерва (SNI), разработанная Декостером и Вульфом, 2000; Pain, Vol. 87, p 149-158. Его использовали в качестве модели нейропатической боли. Модель SNI заключается в перерезке ветвей большеберцовой кости и общего малоберцового нерва седалищного нерва: икроножный нерв остается интактным. У последнего затем развиваются признаки нейропатических болей со значительной механической аллодинией. Модель SNI имеет множество преимуществ:

- Невропатическая боль носит постоянный характер. Это позволяет уловить явления привыкания при повторных инъекциях пептида.
- Сильная возникающая боль.
- Модель очень воспроизводима.

Мышей анестезировали кетамин (100 мг/кг IP) и ксилазином (10 мг/кг IP), и в асептических условиях обнажали левый седалищный нерв. Идентифицировали дистальную трифуркацию седалищного нерва, большеберцовую и общую малоберцовую ветви лигировали полипропиленовыми нерассасывающимися швами 6-0 (Ethicon); вырезали 1 мм, оставив суральную ветвь нетронутой. Рану закрыли швами, животным дали восстановиться, и вернули их в клетки.

Модель боли 2: Разрез лапы - послеоперационная боль.

Операцию по разрезу лапы проводили, как описано Бреннаном и соавторами (1999) (Brennan, 1999). Мышей анестезировали кетамин (100 мг/кг внутривенно) и ксилазином (10 мг/кг внутривенно), и делали продольный разрез через кожу и фасцию правой задней лапы. С помощью щипцов приподнимали короткий сгибатель пальцев в продольном направлении, и через мышцу делали разрез скальпелем, чтобы разрезать ее на две половины. Рану закрыли швами, животным дали восстановиться, и вернули их в клетки. Разрез лапы использовали в качестве модели послеоперационной боли.

Модель боли 3: Инъекция каррагинана - воспалительная боль.

Авторы изобретения инъекцировали 20 мкл 1%  $\lambda$ -каррагинана (Sigma-Aldrich,

22049-5G-F) в 1 x PBS в подошвенную поверхность левой задней лапы мыши с помощью шприца Гамильтона. Инъекцию каррагинана использовали в качестве модели воспалительной боли.

#### Тест фон Фрея

В тесте фон Фрея используют волосы или волокна фон Фрея (VF), которые представляют собой небольшие кусочки нейлонового стержня длиной примерно 50 мм, для проверки чувствительности грызунов к механическим раздражителям. В этом тесте животное стоит на приподнятой сетчатой платформе, и волосы Фон Фрея вставляют через сетку, чтобы протыкать заднюю лапу животного. Нормальные реакции животного включают отдергивание, облизывание или встряхивание лапы. Способ фон Фрея «вверх-вниз» используют для определения механической силы, необходимой для того, чтобы вызвать реакцию отдергивания лапы у 50% животных. В данном документе мышей помещали в пластиковые камеры на проволочной сетке и стимулировали нитями фон Фрея (Bioseb) по способу «вверх-вниз» (45), начиная с нити весом 1 г и используя нити 0,04 и 4 г в качестве отсечек.

#### Статистический анализ

Результаты выразили как средние значения  $\pm$  SEM. Статистический анализ проводили с помощью Prism 7 (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA).

#### Результаты

Модель боли 1: Модель нейропатической боли с частичным повреждением нерва (SNI).

##### 1.1 Болеутоляющее действие пептида SEQ ID NO:1, введенного подкожно

Целью этих экспериментов была оценка болеутоляющего действия пептида SEQ ID NO: 1 согласно изобретению (идентифицированного в настоящем документе как «ТТ1») путем подкожной инъекции в модели с частичным повреждением нерва (SNI), которая вызывает нейропатическую боль.

Эксперименты проводили на мышах-самцах WT C57Bl6 восьминедельного возраста. Использовали три группы по 8 мышей. Пептид SEQ ID NO: 1 ресуспендировали в 0,9% NaCl при [0,6 мг/мл]. В этом исследовании пептид разводили и использовали в концентрации 0,3 мг/кг.

0,9% раствор NaCl использовали в качестве отрицательного контроля (носитель), а 5 мг/кг прегабалина, известного препарата, используемого для лечения нейропатической боли, использовали в качестве положительного контроля.

После измерения базового порога мышей с нитями фон Фрея (VF) способом вверх/вниз создавали модель SNI. Мышей анестезировали, перевязывали большеберцовый нерв и малоберцовый нерв, а затем эти два нерва перерезали. В икроножном нерве, оставленном неповрежденным, довольно быстро развивается нейропатия. Возникновение нейропатии констатировали через 3 дня после операции. При этом наблюдалось снижение порога ответа на нити фон Фрея ипсилатеральной лапы.

Через 7 дней после операции снова измеряли порог ответа. Затем экспериментатор

вслепую подкожно вводил по 100 мкл/10 г каждого из растворов пептидов, носителя и раствора прегабалина.

Порог ответа измеряли через 1 час, 2 часа, 4 часа и затем через 24 часа после инъекции.

На 7 день после SNI у всех мышей наблюдалось резкое снижение механических порогов (фиг. 1). Подкожная инъекция пептида SEQ ID NO: 1 (называемого «Пептид» или «ТТ1») вызывала сильное увеличение порога ответа (т.е. отдергивания лапы) уже через 1 час после введения с максимальным увеличением через 2 часа со значениями, сопоставимыми с прегабалином. Статистический анализ показал большой значимый результат (со значением  $p < 0,001$ ) через 2 часа по сравнению с отрицательным контролем.

### 1.2 Болеутоляющее действие пептида SEQ ID NO: 1, введенного перорально

Использовали тот же протокол, что описан в пункте 1.1, за исключением того, что введение пептида, носителя и прегабалина осуществляли через 14 дней после операции с использованием перорального введения пептида и носителя.

Для перорального введения пептид SEQ ID NO: 1 разводили до концентрации 30 мкг/мл в растворе 1% м/о гидроксипропилметилцеллюлозы (Sigma-aldrich #423238, партия MKCD3665), 0,5% о/о Tween 80 (Euromedex #2002-A, партия 100412/16S407), именуемом далее раствором НРМС (носитель).

Раствор носителя и пептида вводили перорально с использованием двух зондовых игл. Прегабалин (5 мг/кг) вводил подкожно другой экспериментатор, поэтому экспериментатор, выполнявший измерения VF, проводил их вслепую ( $n=8$  для каждого лечения). Введение осуществляли через 14 дней после операции.

На 14 день после SNI у всех мышей наблюдалось резкое снижение механических порогов (фиг. 2). Пероральное введение носителя не оказало никакого эффекта. Пероральное введение пептида SEQ ID NO: 1 также вызывало сильное увеличение порога ответа (т.е. отдергивания лапы) уже через 1 час после введения с медленным снижением до 24 часов. Оно значительно отличалось от мышей, получавших носитель, в течение периода до 4 часов (со значением  $p < 0,001$  через 1 и 2 часа и значением  $p < 0,05$  через 4 часа).

### 1.3 Дозозависимое болеутоляющее действие пептида SEQ ID NO: 1, введенного перорально

Пептид SEQ ID NO: 1 ресуспендируют в растворе НРМС в 5 различных концентрациях (1, 5, 30, 90 и 180 мкг/мл).

Как описано ранее, измерение нитью фон Фрея способом вверх/вниз выполняют для определения исходного уровня. Затем создавали модель SNI. Порог ответа через четырнадцать дней (ДЕНЬ 14 - Д14) после операции измеряли для проверки возникновения нейропатической боли. Затем проводили слепое пероральное введение 100 мкл/10 г раствора пептида в 5 различных концентрациях ( $n=8$  для 10 мкг/кг;  $n=8$  для 50 мкг/кг;  $n=13$  для 300 мкг/кг  $n=8$  для 900 мкг/кг,  $n=8$  для 1,8 мг/кг). Порог ответа измеряли через 1 час, 2 часа, 4 часа и затем через 24 часа после перорального введения. Также через

зонд вводили прегабалин (5 мг/кг, n=6) и носитель (n=9).

На 14 день после SNI у всех мышей наблюдалось резкое снижение механических порогов, что свидетельствует о сильной механической гиперчувствительности, по сравнению с исходными порогами (фиг. 3). Пероральное введение носителя не оказывало никакого эффекта. Болеутоляющее действие пептида SEQ ID NO: 1 является дозозависимым, при этом максимальное обратное действие на механический порог наблюдается через 2 часа при дозе 300 мкг/кг. Интересно, что две самые высокие дозы (0,9 и 1,8 мг/кг) вызывали одинаковый эффект через 2 часа, но сохранялись и в течение более длительного времени, сохраняя значительный эффект через 4 часа после введения. Максимальное обратное действие прегабалина на механический порог наблюдается через 2 часа после введения; этот эффект полностью исчезает через 4 часа после введения.

1.4. Сравнение болеутоляющего действия TAFA-4 (полноразмерного белка) с пептидом SEQ ID NO: 1, вводимым подкожно или перорально.

Авторы изобретения сравнили болеутоляющее действие пептида согласно изобретению с (полноразмерным) белком TAFA-4 предшествующего уровня техники. Использовали тот же протокол, что описан в 1.1 и 1.2, за исключением того, что введение (полноразмерного) пептида и белка TAFA-4 осуществляли через 14 дней после операции.

Неожиданно пептид согласно изобретению сохранял то же болеутоляющее действие, что и полноразмерный белок TAFA-4, при подкожном введении (фиг. 4).

Авторы изобретения также провели сравнение полноразмерного белка TAFA-4 и пептида согласно изобретению при пероральном введении. Тот же эксперимент был проведен с полноразмерным белком TAFA-4 (введение белка TAFA-4 проводили через 7 дней после операции). Полноразмерный белок TAFA-4 не проявлял значительного болеутоляющего действия при пероральном введении (т.е. перорально) (фиг.5).

Из результатов, представленных на фиг. 4 и 5, можно сделать вывод, что при пероральном введении пептид согласно изобретению оказывает гораздо лучшее болеутоляющее действие, чем (полноразмерный) белок TAFA-4.

В целом пример 1 показывает, что пептид согласно изобретению вызывает болеутоляющее действие при подкожном и пероральном введении в модели SNI (модели нейропатической боли). Преимущественно пептид согласно изобретению сохраняет свое действие по сравнению с (полноразмерным) белком TAFA-4 при подкожном введении. Еще более удивительно то, что пептид согласно изобретению демонстрирует лучшее болеутоляющее действие, чем (полноразмерный) белок TAFA-4 при пероральном введении.

Модель боли 2: Инъекция каррагинана - воспалительная боль.

Эксперименты проводили на восьминедельных самцах WT C57Bl6. Использовали три группы по 8 мышей. Пептид SEQ ID NO: 1 ресуспендировали в растворе НМРС в концентрации 30 мкг/мл для инъекции 10 мкл на грамм.

Как описано ранее, были проведены измерения с помощью нитей фон Фрея способом вверх/вниз для определения исходного уровня. Затем осуществляли

внутриподошвенную инъекцию 20 мкл каррагинана (1%) в заднюю лапу. Порог ответа через 24 часа после инъекции (D1) измеряли с последующим пероральным введением раствора пептида в дозе 0,3 мг/кг (n=8) или раствора носителя (n=8) или подкожной инъекции раствора целекоксиба в дозе 20 мг/кг (n=8) слепым методом. Целекоксиб - хорошо известный препарат, используемый в качестве положительного контроля. Это ингибитор COX-2 и нестероидное противовоспалительное средство (NSAID), используемое для лечения боли и воспаления при некоторых заболеваниях. Порог ответа измеряли через 1, 2, 4 и 24 часа после введения пептида или целекоксиба.

После инъекции каррагинана у мышей развилась механическая аллодиния (см. D1) (фиг. 6). Подкожное введение положительного контроля (целекоксиба) вызывало повышение порога ответа. Аналогичным образом, пероральное (через рот) введение пептида согласно изобретению также вызывало статистически значимое увеличение порога ответа. Интересно, что максимальное болеутоляющее действие пептида достигалось через 1 час, тогда как в случае целекоксиба оно занимало 2 часа.

Эти результаты показывают, что пептид согласно изобретению вызывал болеутоляющее действие при пероральном введении на модели каррагинана (модель воспалительной боли). Преимущественно пептид согласно изобретению имел быстрое начало болеутоляющего действия.

Модель боли 3: Разрез лапы - послеоперационная боль.

Эксперименты проводили на восьминедельных самцах WT C57Bl6. Использовали три группы по 8 мышей. Пептид SEQ ID NO: 1 ресуспендировали в растворе HMPC NaCl в концентрации 30 мкг/мл для инъекции 10 мкл на грамм.

Как и ранее, были проведены измерения с помощью нитей фон Фрея способом «вверх/вниз» для определения исходного уровня. Затем проводили операцию разреза лапы по протоколу, описанному выше. Порог ответа через 24 часа после инъекции (D1) измеряли с последующим пероральным введением раствора пептида в дозе 0,3 мг/кг (n=8), раствора носителя (n=8) или раствора морфина (положительный контроль) в дозе 1 мг/кг (n=8), слепым методом. Порог ответа измеряли через 1, 2, 4 и 24 часа после введения.

После разреза лапы у мышей развилась механическая аллодиния (см. D1 на фиг. 7). Пероральное введение положительного контроля (морфина) вызывает повышение порога ответа. Аналогичным образом, пероральное введение пептида согласно изобретению также вызывало статистически значимое увеличение порога ответа через 1 час после введения, причем максимальный эффект наблюдался через 2 часа после введения.

Эти результаты показывают, что пептид согласно изобретению вызывал болеутоляющее действие при пероральном введении на модели разреза лапы (модели послеоперационной боли).

Заключение:

В целом результаты изобретателя демонстрируют болеутоляющее действие пептида SEQ ID NO: 1 на модели нейропатической, воспалительной и послеоперационной боли. Механическую аллодинию (снижение порога ответа), вызванную этими моделями,

можно ингибировать путем подкожной инъекции или перорального (через рот) введения указанного пептида. Авторы изобретения также продемонстрировали, что болеутоляющее действие пептида SEQ ID NO: 1 является дозозависимым.

Преимущество заключается в том, что пептид согласно настоящему изобретению, хотя его намного проще (и, следовательно, дешевле) производить и получать, чем полноразмерный белок TAFA-4, сохраняет свое болеутоляющее действие по сравнению с последним при подкожном введении. Еще более удивительно и полезно, что когда дело доходит до перорального (через рот) введения, пептид согласно изобретению проявляет лучший болеутоляющее действие по сравнению с белком TAFA-4 (полноразмерным), что делает его более удобным и подходящим для введения пациенту, чем полноразмерный белок TAFA-4.

Пример 2: Биологическое получение tt1 и его варианта tt6

Авторы изобретения получили пептиды SEQ ID NO: 1 («ТТ1») и SEQ ID NO: 5 («ТТ6») рекомбинантным путем («биопродукт ТТ1» и «биопродукт ТТ6»), используя протокол, описанный ниже.

Аминокислотная последовательность пептида SEQ ID NO: 5 на 90,48% идентична аминокислотной последовательности пептида SEQ ID NO: 1.

Используя поведенческий анализ, описанный в примере 1 (модель боли 1: SNI), авторы изобретения получили подтверждение того, что синтетически полученные пептиды ТТ1 и полученные таким образом биопродуцированные пептиды ТТ1 обладают одинаковой обезболивающей эффективностью (см. фиг. 8). Они также получили подтверждение того, что оба биопродуцируемых пептида ТТ1 и ТТ6, полученные таким образом, обладают такой же эффективностью обезболивания, как и пептид ТТ1, полученный синтетическим путем (см. фиг. 9).

Материалы

Плазмида pEt28A+, устойчивая к канамицину

Штамм E. coli BL21 (DE3) pLysS, компетентный, устойчивый к хлорамфениколу.

Рекомбинантная 6xHis-TEVпротеаза, полученная и очищенная в лаборатории AFMB (академический МТА)

NZY Автоиндукционная среда LB (порошок): nzytech (MB17903)

2xYT бульон (порошок): MP Biomedicals (3012032)

Гомогенизатор, Центрифуга, чашки Петри (d 10 см)

Мембрана MF-Millipore, сложный эфир целлюлозы, гидрофильная, 0,22 мкм, 47 мм, белая: MERCK

HisTrap excel, картридж 5 мл: Cytiva

Имидазольное буферное вещество ACS. CAS 288-32-4: Millipore (MERCK)

Диализная трубка Zellu/Trans/ROTH T2: MWO 6000-8000, 50 мм, 30 м: CARL ROTH

Среда для аффинной хроматографии, Хелатирующая сефароза™ Fast Flow: Cytiva

Центробежный фильтрующий блок AMICON Ultra-15, 3К: Millipore



Колонка Superdex S200 увеличения 10/300 GL: Cytiva

Гель SDS-PAGE с 20% ретикуляцией

## СПОСОБЫ

1. Получение слитого белка 6xHis-(TEV-сайт)-ТТ1 (или 6xHis-(TEV-сайт)-ТТ6) (в данном документе соответственно идентифицированного как SEQ ID NO: 7 и 8).

а. Трансформация штамма *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

- Размораживание компетентных бактерий BL21 (DE3) pLysS, устойчивых к хлорамфениколу.

- Добавление 1 мкл плазмиды (1000 нг/мкл) на 50 мкл компетентных бактерий.

- Выдерживание 5 минут на льду

- Выполнение термического шока: 1 минута при 37°C.

- Выдерживание 5 минут на льду

- Добавление 500 мкл автоиндукционной среды LB NZY или бульонной среды 2YT (в стерильных условиях).

- Инкубация при 37°C не менее 30 мин при перемешивании (200 об/мин).

- Нагревание агара LB до полного растворения.

■ Для 2 чашек Петри перемешивание и объединение:

• 40 мл расплавленного агара LB

• 40 мкл канамицина для плазмиды

• 40 мкл хлорамфеникола для штамма

■ После затвердевания распределение трансформированных бактерий по 50-100 мкл на чашку.

б. Прекультура

На 500 мл культуры:

- 30 мл автоиндукционной среды LB NZY или бульонной среды 2YT

- 30 мкл канамицина для плазмиды

- 30 мкл хлорамфеникола для штамма

- 1 колония

Инкубация в течение ночи при 37°C при перемешивании (200 об/мин).

с. Культура

- В колбе Эрленмейера емкостью 2 л:

С автоиндукционной средой LB для NZY

- 500 мл среды

- 500 мкл канамицина для плазмиды

- 500 мкл хлорамфеникола для штамма

- Объем прекультуры для достижения OD600 нм ок. 0,1

- Инкубация при 37°C при перемешивании (200 об/мин) до тех пор, пока OD600 нм не достигнет ок. 0,6-0,8

Инкубация в течение ночи при 17°C при перемешивании (200 об/мин).

С бульонной средой 2YT

- 500 мл среды
  - 500 мкл канамицина для плазмиды
  - 500 мкл хлорамфеникола для штамма
  - Объем прекультуры для достижения OD600 нм ок. 0,1
  - Инкубация при 37°C при перемешивании (200 об/мин) до тех пор, пока OD600 нм не достигнет ок. 0,6-0,8.
  - Добавление 500 мкл IPTG (маточный раствор 1 М)
  - Инкубация в течение ночи при 17°C при перемешивании (200 об/мин).
  - Центрифугирование при 5000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре.
  - Ресуспендирование осадка в 50 мл лизирующего буфера: Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, имидазол 10 mM, pH 8,0, лизоцим 0,5 мг/мл.
  - Мгновенная заморозка в жидком азоте
  - Хранение при -80°C.
2. Очистка и расщепление слитого белка.
- а. Лизис клеток: полный лизис
- Размораживание хранящегося осадка (ресуспендированного в буфере для лизиса) в течение 10 минут при 37°C.
  - Добавление ДНКазы 1/100 (о/о) (2 мг/мл маточного раствора) и MgSO<sub>4</sub> 1/200 (о/о) (2 М исходного раствора).
  - Встряхивание/Инкубация 20 минут при 4°C.
  - Обработка ультразвуком в течение 6 минут, например, 30 секунд ВКЛ, 30 секунд ВЫКЛ, амплитуда 40% (стакан, содержащий образец, следует хранить на льду)
  - Центрифугирование при 20000 об/мин в течение 40 мин при 4°C.
  - Фильтрация надосадочной жидкости через мембранный фильтр 0,22 мкм.
- б. Стандартная иммобилизованная металлохелатная хроматография (ИМАС) (очищающая машина АКТА)
- Уравновешивание колонки HisTrap excel объемом 5 мл буфером А: Tris 50 mM, pH 8, NaCl 300 mM, имидазол 10 mM, pH 8) со скоростью потока 3 мл/мин.
  - Загрузка надосадочной жидкости, а затем промывание колонки 20 CV, т.е. 100 мл буфера А.
  - Элюирование слитого белка с помощью 10 CV, т.е. 50 мл буфера В: Tris 50 mM, pH 8, NaCl 300 mM, имидазол 250 mM, pH 8)
  - Измерение объема и OD280 нм объединенных фракций элюата - расчет концентрации и количества, используя A1%<sub>o</sub>=1,1 UDO/мг при 280 нм (если нет дисульфидных связей).
  - Используя диализную трубку с отсечкой 6-8 кДа: диализация пула элюата в течение ночи при 4°C с 2 л буфера А: Tris 50 mM, pH 8, NaCl 1 М, имидазол 10 mM, pH 8)
- с. Расщепление
- Измерение OD280 нм диализуемого элюата.

- Чтобы расщепление происходило правильно, элюат необходимо разбавить до концентрации 0,5-0,7 мг/мл.

- Добавление рекомбинантных TEV (1/10 м/м) в элюцию.

- Инкубация 4 часа при комнатной температуре.

- Инкубация в течение ночи при 4°C.

- Добавление рекомбинантных TEV (1/20 м/м) в элюцию.

- Инкубация 4 часа при комнатной температуре.

- Инкубация в течение ночи при 4°C.

- Центрифугирование в течение 15 минут при 4°C и 7500 об/мин для удаления осадка.

3. Очистка ТТ1 или ТТ6.

а. Подготовка смолы

Для образца, полученного из бактериальной культуры объемом 1 л:

- 4 мл смолы

- 800 мкл NiSO<sub>4</sub> 0,2 М и инкубация 15-30 мин.

- Промывка 15 мл H<sub>2</sub>O и центрифугирование 5 мин при 5000 об/мин при 4°C.

- Выпуск надосадочной жидкости

- Промывка 15 мл H<sub>2</sub>O и центрифугирование 5 мин при 5000 об/мин при 4°C.

- Выпуск надосадочной жидкости

- Промывка 15 мл Tris 50 мМ, рН 8,0, 1 М NaCl и центрифугирование в течение 5 минут при 5000 об/мин при 4°C.

- Выпуск надосадочной жидкости

- Повтор операции, пока жидкость не станет прозрачной.

- Промывка 15 мл Tris 50 мМ рН 8,0, 1 М NaCl, 10 мМ имидазола рН 8,0, инкубация 10 минут и центрифугирование 5 минут при 5000 об/мин при 4°C.

- Выпуск надосадочной жидкости

- Промывка 15 мл Tris 50 мМ рН 8,0, 1 М NaCl, 10 мМ имидазола рН 8,0, инкубация 10 минут и центрифугирование 5 минут при 5000 об/мин при 4°C.

- Выпуск надосадочной жидкости

- Добавление 15 мл 50 мМ Tris, рН 8,0, 1 М NaCl, 10 мМ имидазола, рН 8,0, Инкубация в течение ночи при 4°C.

б. «Проточная» хелатная хроматография с иммобилизованным металлом (Ni<sup>2+</sup>) (IMAC) (партия)

- Инкубация расщепленного образца с предварительно уравновешенной смолой в течение 2 часов при 4°C.

- Перенос смеси смолы/расщепленного элюата в пустую колонку.

- Сбор проточного потока, содержащего только ТТ1 или ТТ6 (остаточного слитого белка, если таковой имеется, и TEV остаются на колонке).

с. Концентрация

- Концентрация проточного раствора с помощью концентратора AMICON 3K (3900

об/мин, 4°C) до получения объема 200-500 мкл (чем меньше, тем лучше).

- Центрифугирование при 10000 об/мин в течение 5 мин, чтобы избавиться от осадка, перенос надосадочной жидкости в чистую пробирку.

d. Эксклюзионная хроматография (SEC) (очищающая машина АКТА)

- Уравновешивание колонки Superdex S200 увеличения 10/300 GL буфером Tris 50 mM, pH 8,0, 1 M NaCl, 10 mM имидазола, pH 8,0: используя скорость потока 0,5 мл/мин.

- Загрузка концентрированного проточного раствора и элюирование (ТТ1 и ТТ6 начинают элюировать примерно при 19 мл).

- Измерение объема и OD280 нм объединенных фракций ТТ1 или ТТ6 - расчет концентрации и количества, используя  $A1\% = 2,6 \text{ UDO/мг}$  при 280 нм (если нет дисульфидных связей)

e. SDS-PAGE (20% ретикуляционный гель, условия восстановления)

- Для каждого этапа очистки и каждого пика элюирования: отбор 1-4 мкг белка, денатурация (SDS) и восстановление образцов (DTT или 2/бета-меркаптоэтанола) и хранение при 4°C или -20°C до окончательного использования.

- Загрузка и миграция геля SDS-PAGE (200 В)

Пример 3: профилактическое болеутоляющее действие ТТ1

Целью этого эксперимента было оценить, оказывает ли пептид SEQ ID NO: 1 («ТТ1») также профилактическое болеутоляющее действие при подкожной инъекции ТТ1 в модели разреза лапы (как описано выше).

Материалы и способы

ТТ1 или носитель вводили подкожно два раза в день в разные моменты времени: за день до операции (D-1), за 1 час до и через 1 час после операции (и пробуждения) в день D, а также в D+1 и D+2 (фиг. 10А). Были проведены измерения механического порогового ответа в D+1 (перед инъекцией ТТ1 в D+1), D+2 (перед инъекцией ТТ1 в D+2) и D+3.

Результаты

После разреза лапы у мышей, обработанных наполнителем, развилась механическая аллодиния (см. D1, D2 и D3 на фиг. 10В). Напротив, у мышей, получавших ТТ1, не развивалась механическая аллодиния. По сравнению с мышами, получавшими носитель, мыши, получавшие ТТ1, имели статистически значимо более высокий порог ответа в D1, D2 и D3.

Эти результаты показывают, что пептид ТТ1 согласно изобретению можно использовать профилактически в модели разреза лапы (модель послеоперационной боли).

Пример 4: Отсутствие толерантности после повторного перорального введения ТТ1 на модели нейропатической боли ССИ

Целью этого эксперимента было оценить, может ли субъект, получавший лечение пептидом SEQ ID NO: 1 («ТТ1»), индуцировать толерантность к этому пептиду.

Материалы и способы

Модель нейропатической боли ССИ: хроническое сдавливание нерва (CCI) проводили, как описано ранее Bennett and Xie 1988 (A peripheral mononeuropathy in rats that

produces disorders of pain sensation like those in man. *Pain* vol 33: pp87-107). Вкратце, односторонняя периферическая мононевропатия была вызвана у мышей, анестезированных кетамин/ксилазином (соответственно 100 мг/кг и 10 мг/кг внутривенно) с помощью двух ниток для перевязки (6-0 Monocryl, Ethicon), свободно завязанных (с интервалом около 1 мм) вокруг общего седалищного нерва. Нерв был сдавлен до едва различимой степени, так что кровообращение через эпинеуральную сосудистую сеть не прерывалось.

После создания модели нейропатической боли ССИ, как описано выше, мышам ежедневно вводили пептид SEQ ID NO:1 («ТТ1») или носитель в течение 14 дней подряд, начиная через 10 дней после операции (D10). Болеутоляющее действие ТТ1 определяли каждые два дня до 24- го дня после операции (D24).

#### ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Подкожная инъекция пептида ТТ1 вызывала сильное увеличение порога ответа (т.е. отдергивания лапы), демонстрируя болеутоляющее действие ТТ1. Интересно, что болеутоляющее действие ТТ1 остается постоянным на протяжении всего курса лечения (14 дней) без какого-либо снижения эффективности ТТ1, даже на 24 день. Эти результаты показывают, что пептид ТТ1 согласно изобретению можно использовать повторно в течение длительного периода времени, не вызывая толерантности у субъекта.

#### Использованная литература

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

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

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

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

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

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

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

Delfini, M.C., Mantilleri, A., Gaillard, S., Hao, J., Reynders, A., Malapert, P., Alonso, S., Francois, A., Barrere, C., Seal, R., et al. (2013). TAF4, a chemokine-like protein, modulates injury-induced mechanical and chemical pain hypersensitivity in mice. *Cell reports* 5, 378-388.

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

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

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

Ngo, AL., Urits, I., Yilmaz, M., Fortier, L., Anya, A., Oh, JH., Berger, AA., Kassem, H., Sanchez, MG., Kaye, AD, et al. (2020). Postherpetic Neuralgia: Current Evidence on the Topical Film-Forming Spray with Bupivacaine Hydrochloride and a Review of Available Treatment Strategies. *Adv Ther.* 37(5): 2003-2016.

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

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

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

Sarver, D.C., Lei, X., and Wong, G.W. (2021). FAM19A (TAF4): An Emerging Family of Neurokinins with Diverse Functions in the Central and Peripheral Nervous System. *ACS Chem Neurosci* 12, 945-958.

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

Tom Tang, Y., Emtage, P., Funk, W.D., Hu, T., Arterburn, M., Park, E.E., and Rupp, F. (2004). TAF4: a novel secreted family with conserved cysteine residues and restricted expression in the brain. *Genomics* 83, 727-734.

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

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

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный синтетический или рекомбинантный пептид с последовательностью SEQ ID NO: 1 или пептид, идентичный по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 1.
2. Пептид по п. 1, отличающийся тем, что пептид, идентичный по меньшей мере на 90% SEQ ID NO:1, модулирует возбудимость интернейронов спинного мозга (предпочтительно интернейронов пластинки ІІІ спинного мозга).
3. Пептид по п. 2, отличающийся тем, что аминокислоты Q и Y, выделенные жирным шрифтом в последовательности CFPGQVAGTTRA**Q**PSCVEASIVIQKWWCHMNPCLGEDCKVLPDYSGWSCSSGNKVKT TKVTR (SEQ ID NO: 1), остаются неизменными в аминокислотной последовательности пептида, идентичного по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 1.
4. Пептид по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что пептид представляет собой рекомбинантный пептид.
5. Пептид по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанный пептид представляет собой пептид SEQ ID NO:5.
6. Пептид по любому из пп.1-5 для применения в качестве лекарственного средства.
7. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая пептид по любому из пп. 1-5 или пептид для применения по п. 6.
8. Вектор, обеспечивающий экспрессию пептида по любому из пп. 1-5 или пептида для применения по п. 6.
9. Клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты по п. 7 или модифицированная с использованием вектора по п. 8.
10. Композиция, содержащая пептид по любому из пп. 1-5, нуклеиновую кислоту по п. 7, вектор по п. 8 или клетку по п. 9 и диетически или фармацевтически приемлемый носитель.
11. Композиция по п. 10, дополнительно содержащая по меньшей мере одно дополнительное активное соединение, предпочтительно активное средство, эффективное против боли, еще более предпочтительно SAID, NSAID или опиоидное лекарственное средство.
12. Пептид по п. 6 или композиция по п. 10 или 11 для применения в качестве лекарственного средства, причем указанный пептид или композицию вводят субъекту внутримышечно, внутривенно, внутривентриально, перорально (через рот), анально, кожно, подкожно, дермально, чрескожно. или интратекально, предпочтительно подкожно или перорально, еще более предпочтительно перорально.
13. Пептид по пп. 6 или 12, или композиция по пп. 10, 11 или 12 для применения в качестве лекарственного средства, причем доза пептида составляет от 1 мкг до 100 мг/кг/день у млекопитающего и предпочтительно составляет от 2,5 мкг/кг/день и 0,6 мг/кг/день у человека.
14. Пептид по любому из пп. 1-6, нуклеиновая кислота по п. 7, вектор по п. 8 или

клетка по п. 9 для применения в качестве активного ингредиента для предотвращения или лечения боли у нуждающегося в этом субъекта.

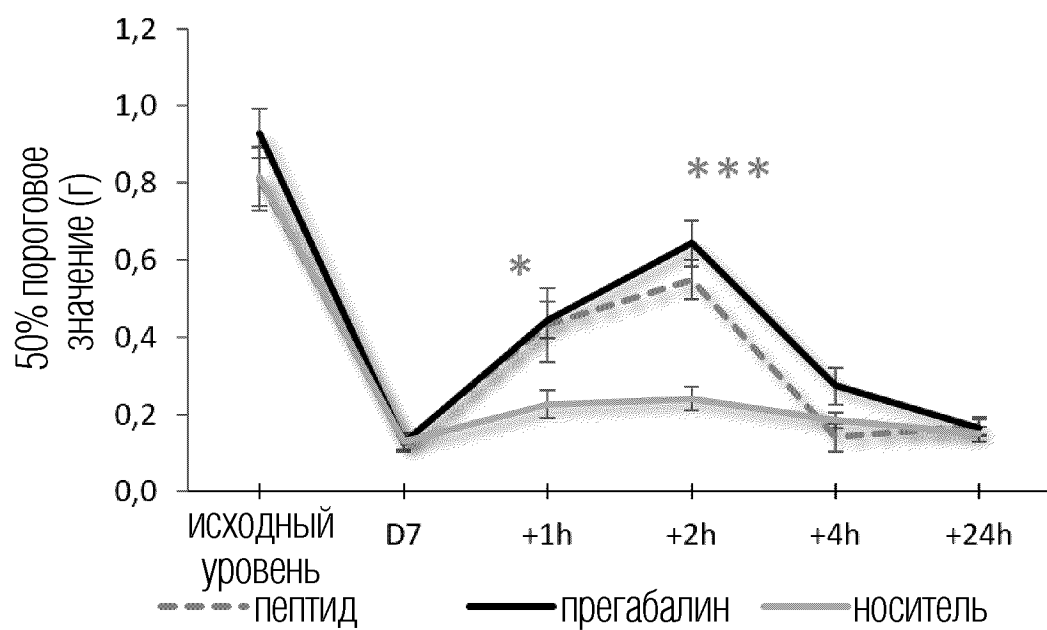
15. Пептид, нуклеиновая кислота, вектор или клетка по п. 14, причем указанная боль представляет собой хроническую боль, нейропатическую боль, послеоперационную боль, воспалительную боль, гипералгезию или аллодинию.

16. Пептид, нуклеиновая кислота, вектор или клетка по п. 14 или 15, причем субъектом является млекопитающее, в частности человек.

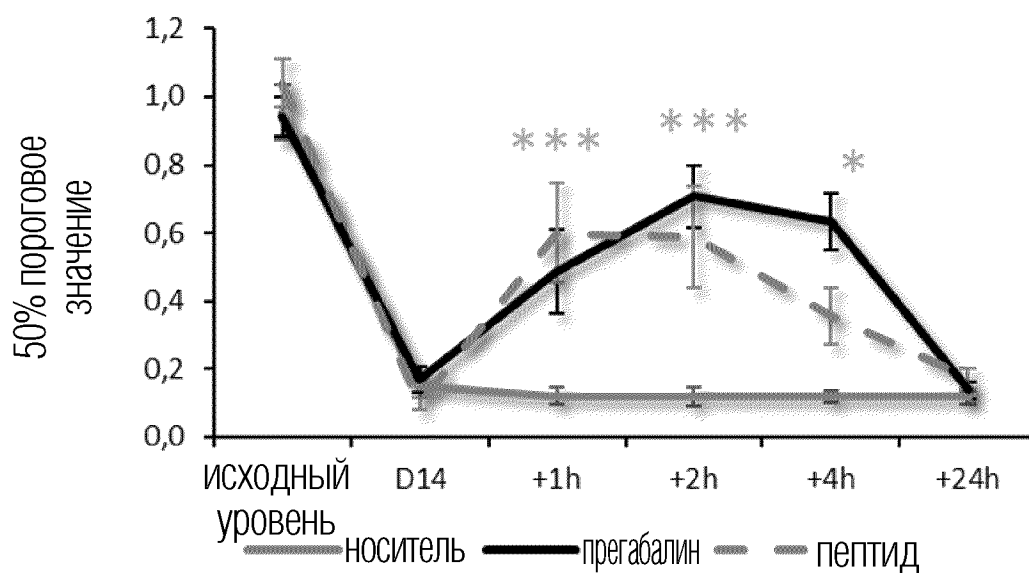
17. Пептид, нуклеиновая кислота, вектор или клетка по п. 16, причем субъект имеет по меньшей мере один мутантный аллель в гене *muo1A*.



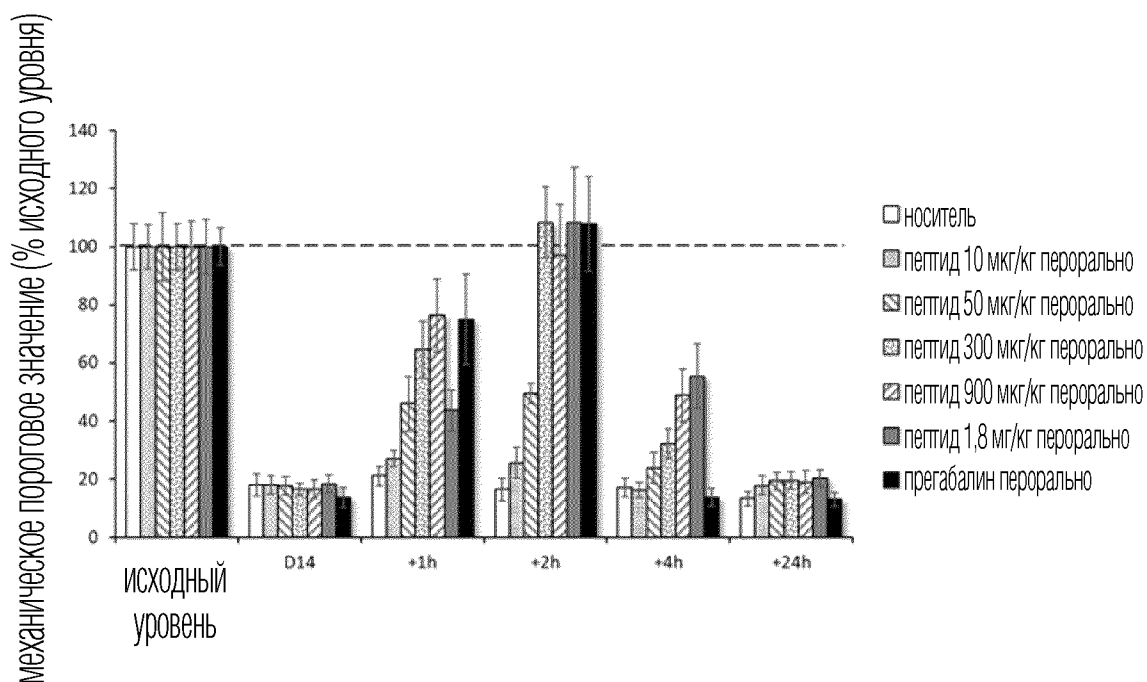
1/8



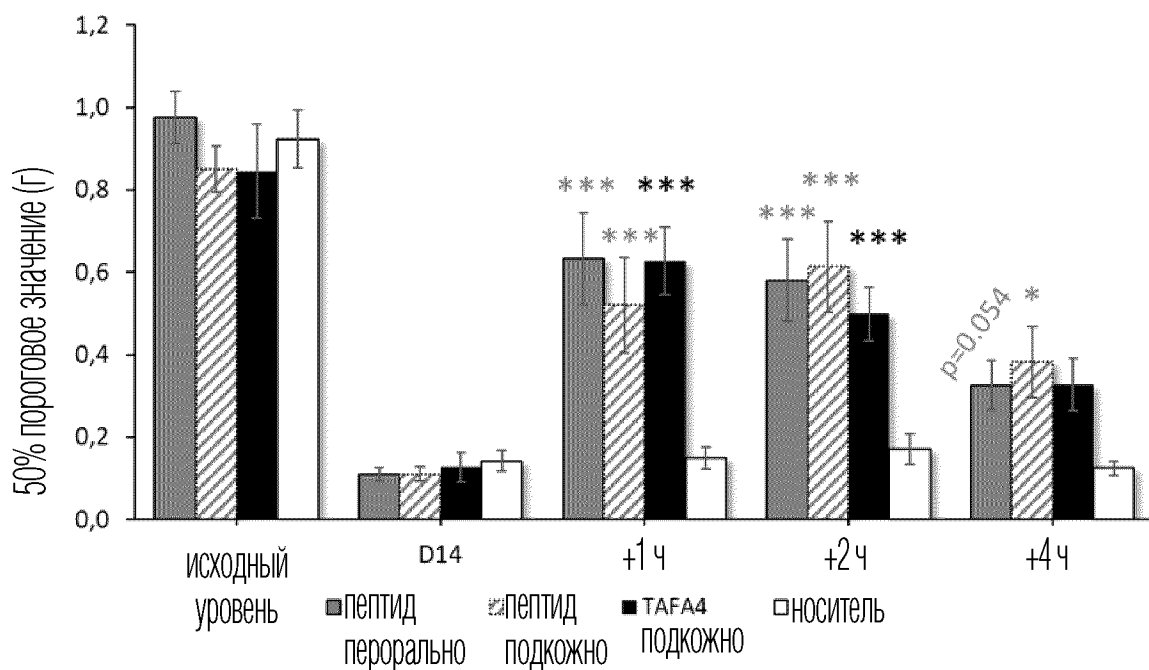
ФИГ. 1



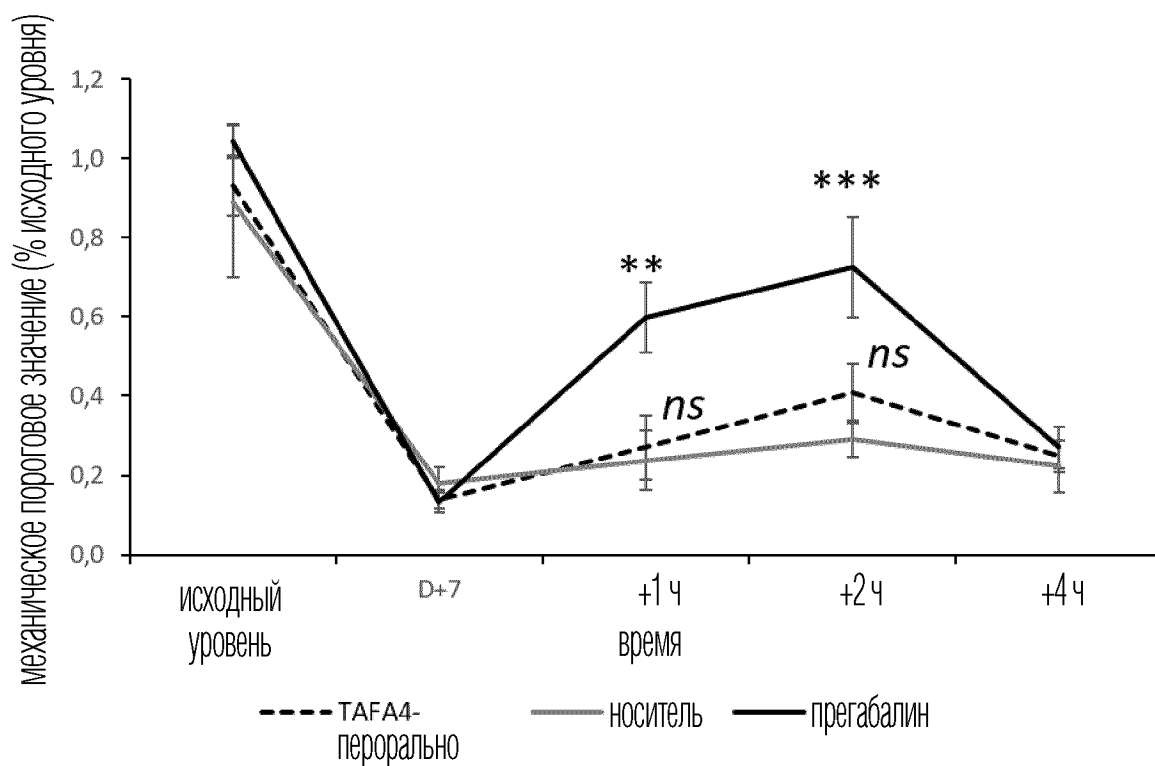
ФИГ. 2



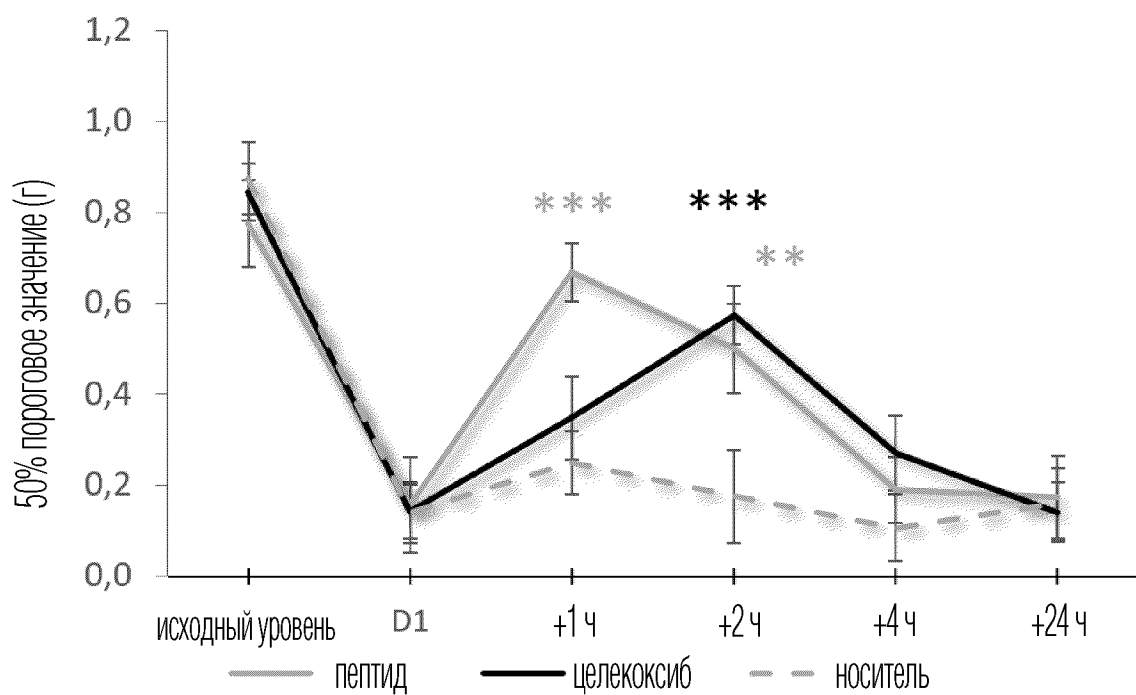
ФИГ. 3



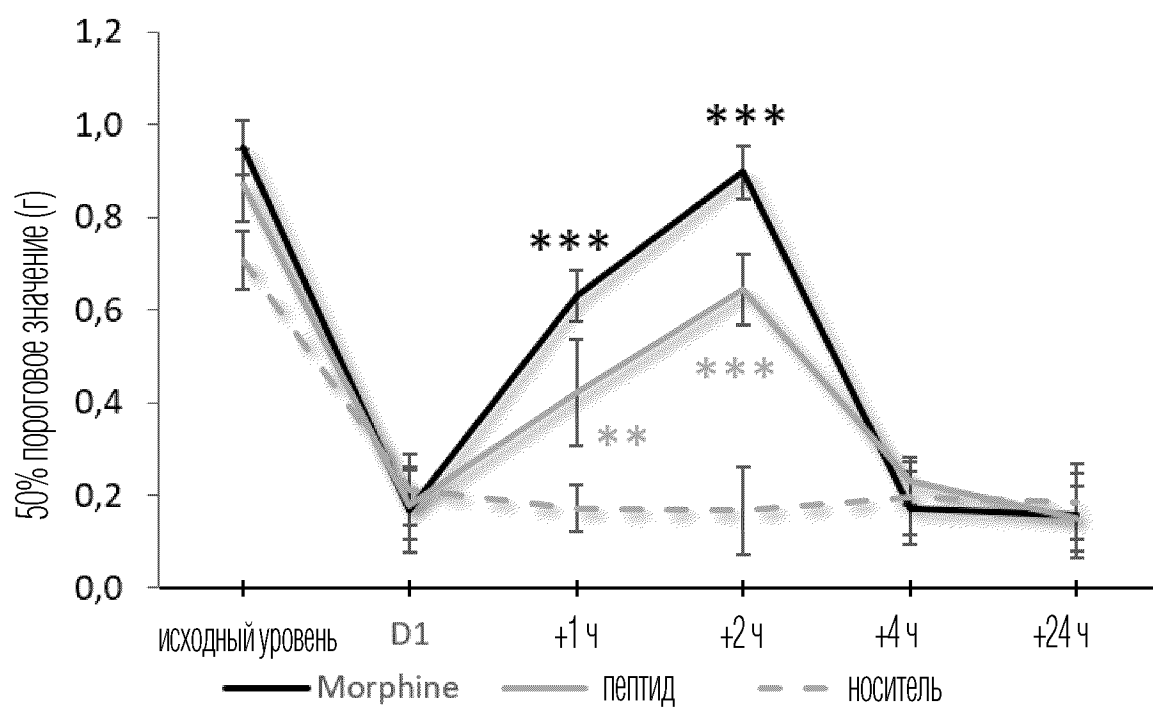
ФИГ. 4



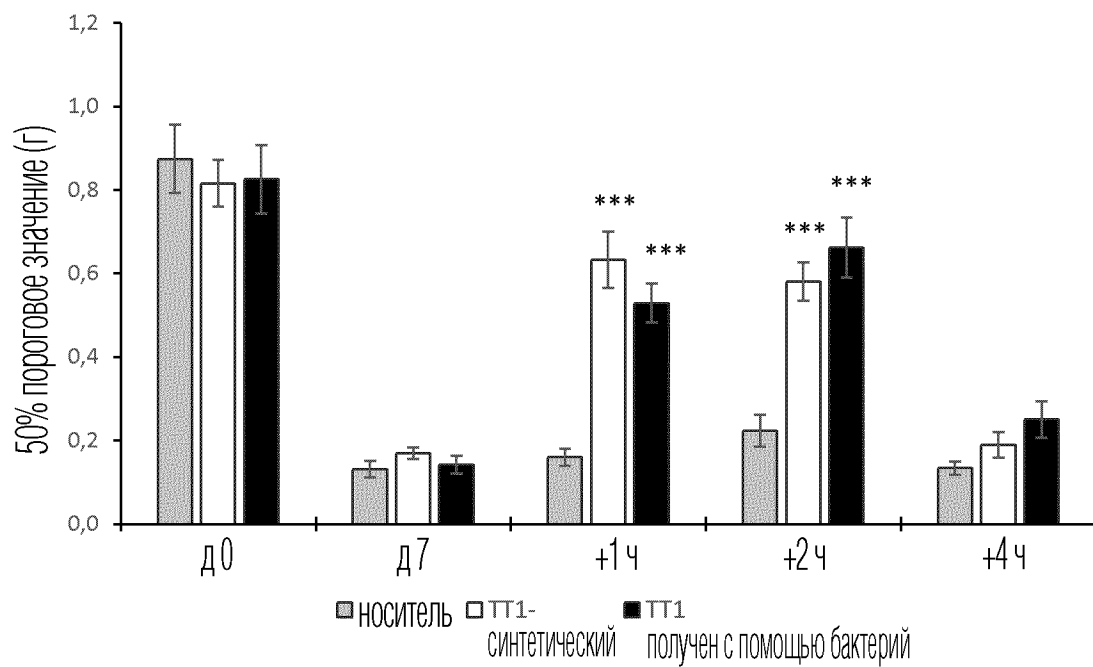
ФИГ. 5



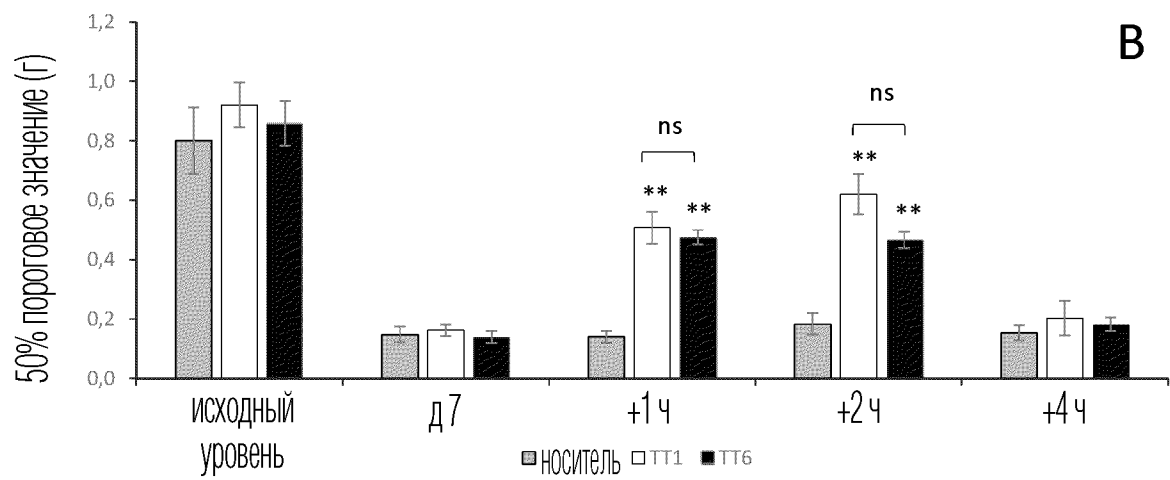
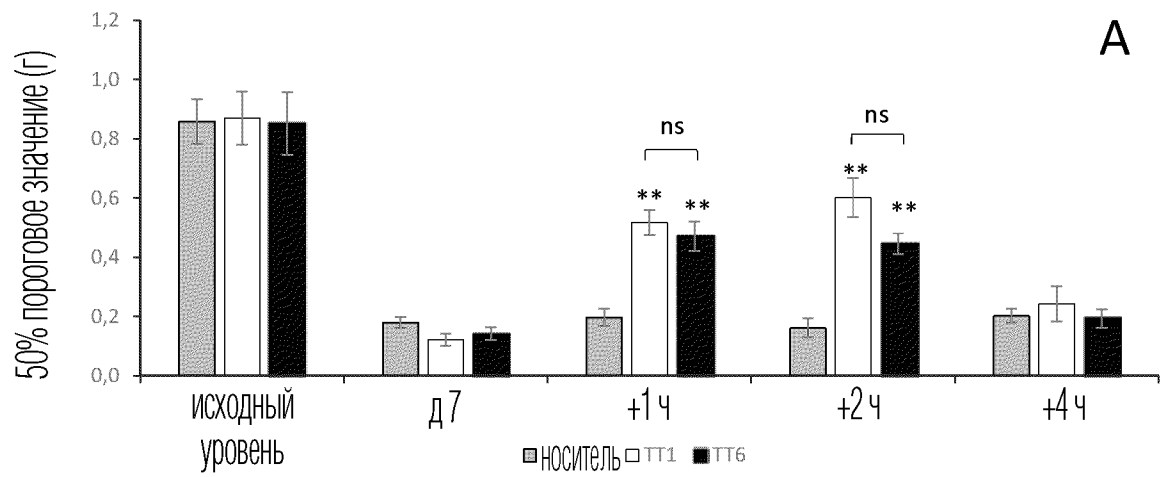
ФИГ. 6



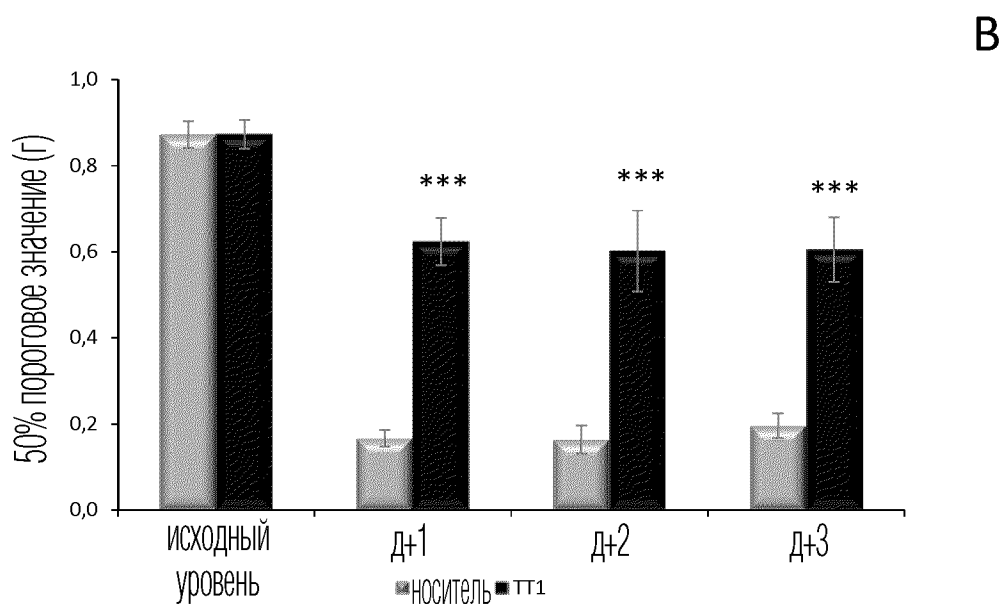
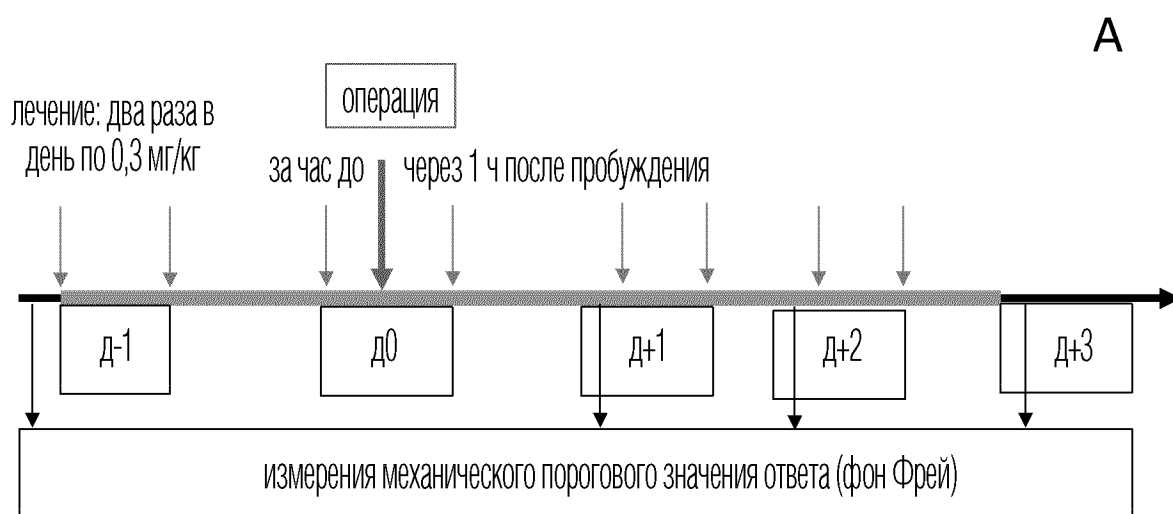
ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9



ФИГ. 10

ФИГ. 11

