(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-551467
(P2022-551467A)
(43)公表日　令和4年12月9日(2022.12.9)

| (51)国際特許分類 | | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *C07K* | *7/06* | *(2006.01)* | C07K | 7/06 | | 4C084 |
| *A61K* | *38/08* | *(2019.01)* | A61K | 38/08 | ZNA | 4C086 |
| *A61K* | *38/10* | *(2006.01)* | A61K | 38/10 | | 4H045 |
| *A61K* | *45/00* | *(2006.01)* | A61K | 45/00 | | |
| *A61P* | *1/04* | *(2006.01)* | A61P | 1/04 | | |

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全51頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-521298(P2022-521298)
(86)(22)出願日　令和2年10月12日(2020.10.12)
(85)翻訳文提出日　令和4年6月6日(2022.6.6)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/055289
(87)国際公開番号　WO2021/072392
(87)国際公開日　令和3年4月15日(2021.4.15)
(31)優先権主張番号　62/913,512
(32)優先日　令和1年10月10日(2019.10.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　519411043
ザ リサーチ ファウンデイション フォー ザ ステイト ユニバーシティー オブ ニューヨーク
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 １４２２８‐２５６７、バッファロー、スウィート １０９、リー エントランス ５２０、ユービー コモンズ、ユニバーシティー アト バッファロー、テクノロジー トランスファー
(74)代理人　110000475
特許業務法人みのり特許事務所
(72)発明者　バッターチャルジー，アリンダム
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 １４２２２、バッファロー、アッシュランド
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　鎮痛性及び麻酔性ペプチド及び他の薬剤

(57)【要約】
疼痛を治療又は予防するため及び/又は麻酔を誘導するための薬剤及び前記薬剤を使用する方法が開示される。前記薬剤は、アダプチンタンパク質２-クラスリン媒介エンドサイトーシス（ＡＰ２-ＣＭＥ)を標的とするペプチド、ｓｉＲＮＡ、及び／又はｓｈＲＮＡであってもよい。本開示のペプチドは、以下の配列を含んでもよい：$X^1X^2X^3X^4LX^5$（配列番号７；ここで、$X^1$はＤ、Ｅ、Ｓ、又はＴであり、ここで、Ｄ、Ｅ、Ｓ、及び/又はＴは、任意にリン酸化され、$X^2$、$X^3$、及び$X^4$は、任意のアミノ酸から独立して選択される。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
次の配列：$X^1X^2X^3X^4LX^5$(配列番号7)を含むペプチド
（ここで、
$X^1$はD、E、S、及びTから選択され、
$X^2$、$X^3$、及び$X^4$は、任意のアミノ酸から独立して選択され；及び
$X^5$は、L及びIから選択され、且つ、
L、$X^1$、及び/又は$X^5$は、任意でリン酸化され、前記ペプチドは6～20アミノ酸残基長である）。
【請求項２】
C末端アミノ酸残基、又は、C末端アミノ酸の直前のアミノ酸残基が、リン酸化されている、請求項１に記載のペプチド。
【請求項３】
前記ペプチドが脂質付加されている、請求項１に記載のペプチド。
【請求項４】
N末端アミノ酸残基にて脂質付加されている、請求項３に記載のペプチド。
【請求項５】
脂質付加が、ミリストイル化、オクタノイル化、ラウロイル化、パルミトイル化、又はステアロイル化である、請求項３に記載のペプチド。
【請求項６】
前記ペプチドが、次の配列：$X^6X^1X^2X^3X^4LX^5$(配列番号8)を有し、
ここで、$X^6$はS及びTから選択され、$X^6$は任意でリン酸化されている、
請求項１に記載のペプチド。
【請求項７】
配列番号1、2、3、4、5、8、9、10、11、及び12から選択される配列を含む、請求項１に記載のペプチド。
【請求項８】
請求項１に記載の１種以上のペプチド、及び、薬学的に許容される担体を含む組成物。
【請求項９】
１種以上の鎮痛剤及び/又は１種以上の麻酔剤をさらに含む、請求項８に記載の組成物。
【請求項１０】
１種以上の鎮痛剤及び/又は１種以上の麻酔剤が、アセトアミノフェン、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、メロキシカム、ケトロラク、ジクロフェナク、ケトプロフェン、ピロキシカム、メタミゾール、ブピバカイン、エチドカイン、レボブピバカイン、リドカイン、メピバカイン、プリロカイン、ロピバカイン、プロカイン、クロロプロカイン、ヒドロコルチゾン、トリアムシノロン、メチルプレドニゾロン、又はそれらの組み合わせである、請求項８に記載の組成物。
【請求項１１】
AP2-CMEを標的とするshRNA及び/又はAP2-CMEを標的とするsiRNAをさらに含む、請求項８に記載の組成物。
【請求項１２】
治療を必要とする対象において疼痛を治療するか又は疼痛感受性を増加させる方法であって、
治療を必要とする対象に、請求項８に記載の１又は複数の組成物を、治療有効量で投与することを含み、
治療を必要とする対象の疼痛が改善されるか、又は治療を必要とする対象の疼痛感受性が増加する、方法。
【請求項１３】
１種以上の鎮痛剤及び/又は１種以上の麻酔剤を投与することをさらに含む、請求項１

２に記載の方法。
【請求項１４】
投与工程が、痛みを予期して行われる、請求項１２に記載の方法。
【請求項１５】
治療を必要とする対象が、損傷、慢性疾患、慢性炎症、モートン神経腫、手術/術後の疼痛又はそれらの組み合わせを有する、請求項１２に記載の方法。
【請求項１６】
前記損傷が、脊髄損傷、神経損傷、熱傷、又はそれらの組み合わせである、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
慢性疾患が、糖尿病、帯状疱疹、大うつ病性障害、線維筋痛、片頭痛、関節炎、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、炎症性腸疾患、統合失調症、自閉症スペクトラム障害、癌、神経根障害、又はそれらの組み合わせである、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
対象に投与されるペプチドが、配列番号1、2、3、4、5、8、9、10、11、12、及びそれらの組み合わせから選択される配列を有する、請求項１２に記載のペプチド。
【請求項１９】
一回の投与工程後に1～120時間、対象の痛みが改善される、請求項１２に記載の方法。
【請求項２０】
一回の投与工程後に24～120時間、対象の痛みが改善される、請求項１２に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【関連出願の相互参照】
【０００１】
本願は、2019年10月10日に出願された米国仮出願第62/913,512号に基づく優先権を主張し、その開示は参照により本明細書に包含される。
【０００２】
<u>連邦支援研究に関する声明</u>
本発明は、国立衛生研究所によって付与された認可番号NS108087の下で、政府支援を受けて発明された。政府は、本発明に所定の権利を有する。
【背景技術】
【０００３】
炎症性疼痛の生理学には、一次求心性ニューロン、中枢神経系、及び免疫系の統合が含まれる。後根神経節(DRG)侵害受容器の末梢鋭敏化は、炎症性疼痛を開始し、免疫細胞及び損傷組織から放出される炎症性メディエーターによって駆動される。近年、侵害受容器を含むカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)が、種々の疼痛モデルにおいて、熱的及び機械的感受性の主要なコーディネーターとして同定された。したがって、$CGRP^{+}$侵害受容器を潜在的な鎮痛ターゲットとみなすことは合理的である。
【０００４】
副作用が少なく、効果的な鎮痛剤に対する満たされていない需要が存在する。オピオイド薬物(米国において最も広く処方されるクラスの薬物)は、疼痛治療のために一般的に使用されている。依存の可能性が高いことに加えて、オピオイドは、低血圧、睡眠時無呼吸、ホルモン産生の減少につながるという懸念があり、及び、高齢者では、転倒及び股関節骨折の増加につながる懸念がある。オピオイドはまた、呼吸抑制を引き起こし、現在では、Covid-19パンデミックとオピオイドエピデミックとの関連に対する関心がますます高まっている。炎症性疼痛のための他の治療オプションには、非ステロイド性抗炎症薬及びコルチコステロイドが含まれるが、有害な副作用のため、広範な使用が禁忌とされることが増えてきている。侵害受容性イオンチャネル阻害剤は、鎮痛のために魅力的な分子であると思われたが、限定された臨床的効力が実証され、現在は治療オプションとして使用さ

れていない。3,000を超えるトランスジェニックマウスのノックアウト系統をスクリーニングした後、エンドサイトーシス関連アダプチンプロテインキナーゼ1(AAKl)は、疼痛治療のための推定上の標的と考えられ、この酵素を阻害するための小分子が開発された。しかしながら、AAK1を全身的に標的化することは、その遍在的な発現のために問題となる可能性があり、疼痛緩和のためのAAK1インヒビターのさらなる開発はまだ探求されていない。それにもかかわらず、この研究は、エンドサイトーシスを薬理学的に阻害することによって鎮痛を提供するための、最初の前臨床的試みを記録した。

【０００５】

ニューロン中の一次エンドサイトーシス機構は、多量体アダプタータンパク質複合体2(AP2)を利用し、これは、そのα-サブユニットアイソフォームの差次的発現を有する（αlアイソフォームは、シナプスコンパートメントに局在化し、一方、α2アイソフォームは、ロバストなシナプス外発現を示す）。AP2クラスリン-媒介エンドサイトーシス(AP2-CME)は、インビトロで、ナトリウム活性化カリウムチャネル($K_{Na}$)の内部移行を通じてDRGニューロン感作の基礎となり、及び、AP2α2サブユニットは、プロテインキナーゼA(PKA)刺激後にこれらのチャネルに関連するようになることが示された。

【発明の概要】

【０００６】

本開示は、疼痛を治療又は予防するため、及び/又は、麻酔(感覚消失)を誘導するための薬剤、及びこれらの薬剤を使用する方法を提供する。これらの薬剤は、アダプチンタンパク質2-クラスリン媒介エンドサイトーシス(AP2-CME)を標的とするペプチド、siRNA、及び/又はshRNAである。１つの態様では、これらの薬剤の使用は、痛みと戦うための麻酔薬(例えば、オピオイド)の必要性を減少又は排除するであろう。

【図面の簡単な説明】

【０００７】

本開示の性質及び目的をより完全に理解するために、添付の図面を参照して、以下の詳細な説明が参照される。

【０００８】

図1は、マウスにおける急性炎症性疼痛様行動を減弱させるAP2A2サブユニットの遺伝子ノックダウンを示す。パネルAは、5％ホルマリンを注射後の、C57BL/6マウスの疼痛様行動を要約したものである。第I相は注射後0～10分であり、第II相は注射後11～60分である(スクランブルshRNA群でn＝6；AP2A2群でn＝6)。表示データは、累積平均±s.e.mとして提示される。有意差、* (p＜0.05)、** (p＜0.01)は、ボンフェローニ補正を伴う二元配置ANOVAを用いて決定された。パネルBは、C57BL/6マウスにおける疼痛様行動を示す代表的な画像を提示し、ホルマリン注射から、左側の画像は2分、中央の画像は20分、右側の画像は60分である。パネルBの右下に示されている矢印は、AP2A2が枯渇したマウスにおける炎症を起こした足の使用を強調している。パネルCの上部に示されているのは、AP2A2ノックダウンの程度を示す代表的なウエスタンブロットである。代表的なウエスタンブロットは、同一動物から採取された、一対の対側及び同側サンプルである。パネルCの下部には、ウエスタンブロットのデンシトメトリー分析が示されている(n＝3)。データは、平均±s.e.m.として表される。有意差、* (p＜0.05)は、ボンフェローニ補正を伴う二元配置ANOVAを用いて決定された。

【０００９】

図2は、慢性炎症性疼痛モデルにおける熱感受性の発生及び維持に対するAP2A2ノックダウンのインパクトを示す。パネルAの上部は、先行的ノックダウンモデルにおける慢性炎症性疼痛のためのタイムラインである(時点を強調)。パネルAの下部は、Hargreavesアッセイから要約されたデータを示す。スクランブル(n＝11)及びAP2A2(n＝12)shRNA群について、対側及び同側の足を引っ込めるまでの時間(逃避反応を示すまでの潜時略称PWL：paw withdrawal latency)が示されている。表示データは、平均±s.e.m.として提示される。有意差、* (p＜0.05)、** (p＜0.01)は、ボンフェローニ補正を伴う二元配置ANOVA用いて決定された。パネルBの上部は、事後ノックダウンモデルにお

ける慢性炎症性疼痛のための時点を記述するタイムラインである。パネルBの下部は、Hargreavesアッセイから要約されたデータを示す。スクランブル(n＝8)及びAP2α2(n＝8)shRNA群について、対側及び同側のPWLが示されている。データは、平均±s.e.m.として表される。有意差、* (p＜0.05)、** (p＜0.01)は、ボンフェローニ補正を伴う二元配置ANOVA用いて決定された。

【００１０】

図3は、マウスにおいて急性及び慢性の炎症性疼痛行動を減弱させるAP2抑制ペプチドの足底内注射を示す。パネルAは、5％ホルマリン注射後、C57BL/6マウスの疼痛様行動を要約したものである。注射後0～10分である第I相と、注射後11～60分である第II相とが示されている(スクランブルペプチド群 n＝6；AP2抑制ペプチド群 n＝6)。表示データは、累積平均±s.e.mとして提示される。有意差、* (p＜0.05)は、ボンフェローニ補正を伴う二元配置ANOVAを用いて決定された。パネルBは、Hargreavesアッセイから要約されたデータを示す。スクランブル及びAP2抑制ペプチド群について、対側及び同側のPWLが示されている。データは平均±s.e.m.として表される。有意差、* (p＜0.05)、** (p＜0.01)、*** (p＜0.005)は、二元配置ANOVAを用いて決定された。パネルCは、Von Freyアッセイから要約したデータを示す。このデータは、足引っ込め応答を誘発するのに必要な平均力±s.e.m.として提示される。有意差、* (p＜0.05)は、多重t-検定を用いて決定された。

【００１１】

図4は、AP2複合体のペプチド阻害のために提案されたメカニズムを示す。脂質付加(脂質修飾)ペプチドが、フリップフロップメカニズムによって細胞に入ることが提案されている。一旦細胞内に入ると、ペプチドは、細胞膜の内葉に繋ぎ留められたままである。次いで、ペプチド(ジロイシン-ベース)は、AP2複合体と相互作用する。この相互作用が、AP2複合体がその基質に結合すること、及び、エンドサイトーシスを阻害することを防ぐ。

【００１２】

図5は、マウスにおいて、急性炎症性疼痛行動を部分的に減弱するペプチド類似体を示す。5％ホルマリンを注射した後のC57BL/6マウスの疼痛様行動の要約して示す。２つの相が示され、第I相は注入後0～10分を表し、第II相は注射後11～60分を表す(スクランブルペプチドの群 n＝6；AP2抑制ペプチドの群 n＝6；P1群 n＝3；P2群 n＝3；P3群 n＝3、P4群 n＝3)。P3ペプチドのリン酸化変異体であるP4ペプチドは、リッキング挙動及びリフティング挙動の両方において有意な減少を示した唯一のペプチドであった。データは累積平均±s.e.m.として提示される。有意差、* (p＜0.05)は、多重t検定を用いて決定された。

【００１３】

図6は、AP2媒介エンドサイトーシスの消失が、同側後足における浮腫に影響を及ぼさなかったことを示す。パネルAに示されているのは、CFA注射の24時間前及び後のC57BL/6マウスの同側足の断面積の要約である；shRNA神経注射後7日。測定は、足の最も厚い部分について、キャリパーを用いて行った。データは、平均断面積±s.e.m(n＝3)として提示される。パネルBは、CFA注射の24時間前及び後の、C57BL/6マウスの同側足の断面積の要約を示す。「Pre-CFA」を測定する24時間前に、両方の群にペプチドをあらかじめ注射した。測定は、足の最も厚い部分について、キャリパーを用いて行った。データは、平均断面積±s.e.m(n＝3)として提示される。

【００１４】

図7は、AP2α2が、$IB4^-$、$CGRP^+$侵害受容器で発現されていること、及びインビボAP2α2ノックダウンが、防衛挙動を減弱させることを示す。（A）AP2α2及びCGRPの発現パターンを示す代表的な免疫蛍光画像。IB4反応性を使用して、ペプチド作動性と非ペプチド作動性DRGニューロンとの間を線引きした。AP2α2は、小サイズ及び中サイズの$CGRP^+$DRGニューロンにおいて優先的に発現されるが、$IB4^+$ニューロンではそうではない。矢印は、CGRP及びAP2α2の強力な共局在化を強調する。（B）同じ動物から採

取した対側DRGと比較した、インビボAP2α2ノックダウン後の同側DRG中のAP2α2免疫反応性(ノックダウン後7日)。（C）[左]AP2α2ノックダウンの程度を示す代表的ウエスタンブロット。一対の対側及び同側サンプルを同じ動物から採取する。[右]ウエスタンブロットのデンシトメトリー分析(n＝3)。ノックダウンの7日後に動物を　　殺した。データは平均±s.e.m.として提示される。有意差は、Holms-Sidak補正を伴う一元配置ANOVAによって決定した。* p＜0.05；（D）条件を変えて記録された、解離した成体DRGニューロンからの代表的なトレース：[上]対照条件、[中]PKA刺激条件の間にスクランブルshRNAをトランスフェクトしたDRGニューロン、[下]PKA刺激条件の間にAP2α2 shRNAをトランスフェクトしたDRGニューロン。IB4-は、IB4-alexa fluor 488コンジュゲートとのインキュベーション後、蛍光が存在しないことにより測定され、選択的に記録された。（E）5％ホルマリン注射後のC57BL/6マウスの防御挙動の要約。第I相、注射後0～10分、第II相；注射後11～60分(スクランブルshRNA群 n＝6；AP2α2群 n＝6)。（F）C57BL/6マウスにおける疼痛様行動を示す代表画像。ホルマリン注射後、[左]2分、[中]20分、[右]60分。矢印は、炎症を起こした同側足の使用を強調している。データは、累積平均±s.e.mとして提示される。有意差は、ボンフェローニ補正を伴う反復測定二元配置ANOVAを用いて決定した。p＜0.05；*, p＜0.01；**

【００１５】

図8は、AP2α2ノックダウンが、慢性炎症性疼痛における熱感受性の発生及び維持を妨害することを示す。（A）CFA疼痛モデルにおける動物の熱感受性(スクランブル(n＝11)及びAP2α2(n＝12)shRNA群について、炎症前ノックダウンパラダイム)。データは、平均PWL(足を引っ込めるまでの時間)±s.e.m.として表される。有意差は、ボンフェローニ補正を伴う反復測定二元配置ANOVAを用いて決定された。p＜0.05; *, p＜0.01; ** （B）炎症が惹起される前にノックダウンを生じさせた慢性炎症性疼痛モデルにおける、同側後足の機械的感受性。スクランブル(n＝8)及びAP2α2(n＝8)shRNA群に関するデータが、ベースラインの平均割合±s.e.m.として表される。有意差は、ボンフェローニ補正を伴う反復測定二元配置ANOVAを用いて決定された。p＜0.05; *　対側のPWTは、図13に示される。（C）炎症の確立後、スクランブル(n＝8)及びAP2α2(n＝8)shRNAを注射した動物の熱感受性。データは、平均PWL±s.e.m.として表される。有意差は、ボンフェローニ補正を伴う反復測定二元配置ANOVAを用いて決定された。p＜0.05; *, p＜0.01; **

【００１６】

図9は、脂質付加ペプチドが、末梢ニューロン求心性神経に浸潤することを示している。（A）抗原性脂質付加-HAペプチドを、対照条件下で、ナイーブC57BL/6マウスの後足に注射する。HAペプチドは、注射後の脂質付加ペプチド分布の免疫蛍光可視化を可能にした。[A’]免疫反応性のヒートマップ分析；[A”]真皮に、脂質密領域内に、優先的に分配された脂質付加-HAペプチド；[A1]インサートは、真皮内の末梢求心性神経におけるHA免疫反応性を示す。[A2]インサートは、筋肉組織内の末梢求心性神経における免疫反応性を示す。求心性神経は免疫標識されたが、筋肉細胞はされなかった。（B）CFA-誘発炎症下のナイーブC57BL/6マウスの後足への抗原性脂質付加ペプチド模倣体の注射。[B’]ヒートマップ分析は、炎症組織内のペプチドのより大きな保持を示した。[B”]ここでも、脂質付加-HAペプチドは、真皮、具体的には脂質密領域に優先的に分配される。[B1]インサートは、真皮内の末梢求心性神経における免疫反応性を示す。[B2]インサートは、末梢求心性神経における及び筋肉組織における免疫反応性を示す。

【００１７】

図10は、急性及び慢性炎症の間の、脂質付加AP2抑制ペプチドが、疼痛行動を減弱したことによって、末梢エンドサイトーシスの薬理学的阻害を示す。（A）5％ホルマリンの注射後のC57BL/6マウスの防衛挙動の要約。AP2抑制ペプチド阻害剤を、ホルマリン注射の24時間前に後足に局所的に注射した。第I相；注射後0～10分、第II相；注射後15～60分(スクランブルshRNA群 n＝6；AP2α2群 n＝6)。データは平均±s.e.m.として提示される。ボンフェローニ補正を伴う反復測定二元配置ANOVAを用いて有意差を決

定した。p＜0.05; * （B-D）確立されたCFA誘発炎症性疼痛の間の動物における熱感受性。データは、平均PWL±s.e.m.で表される。ボンフェローニ補正を伴う反復測定二元配置ANOVAを用いて有意差を決定した。p＜0.05; *, p＜0.01; **, p＜0.005; *** （B）スクランブルペプチド(n＝8)又はAP2抑制ペプチド(n＝8)のいずれかを受けた全ての動物の複合グラフ。各群にCFAの24時間後に各ペプチドを注射した。（C）CFA後にスクランブル(n＝4)及びAP2抑制(n＝4)ペプチドを注射したオス動物の熱感受性。オスはAP2抑制ペプチド注射後にベースラインに即時に戻った。（D）スクランブル(n＝4)及びAP2抑制(n＝4)ペプチドを注射したメス動物の熱感受性。AP2抑制ペプチドを注射したメスは、スクランブルペプチドと比較して促進された回復を示したが、オスマウスと比較すると遅かった。（E-G）各実験条件についての定量曲線下面積(A.U.C.)の総計。データは平均A.U.C.±s.e.m.として提示される。Holms-Sidak補正を伴う一元配置ANOVAを使用して統計的有意性を決定した。p＜0.05; *, p＜0.01; **, p＜0.005; ***, p＜0.001; **** （E）全ての動物について(B)に示された実験条件下での全A.U.C.；スクランブルペプチド(n＝8)及びAP2抑制ペプチド(n＝8)。エンドサイトーシスの薬理学的阻害は、同側足についてのA.U.C.の有意な増加を生じた。（F）実験条件[スクランブルペプチド(n＝4)及びAP2抑制ペプチド(n＝4)]下でのオス動物の全A.U.C.。全データセットからオス対象を単離すると、(E)で観察される鎮痛用効果の保持が明らかになる。（G）実験条件[スクランブルペプチド(n＝4)及びAP2抑制ペプチド(n＝4)]下でのメス動物の全A.U.C.。興味深いことに、全データセットからのメス対象の単離は、鎮痛用効果が弱められたことを明らかにする。（H-J）回復曲線は、指数関数的減衰方程式にフィットする。（H）(B)からの回復曲線をフィッティングすることは、エンドサイトーシスの阻害が、τの減少によって示されるように回復率を加速したことを明らかにする。（I）(C)から得られ、指数関数的減衰方程式にフィットするオスについての回復曲線。オスの動物は、τのロバストな減少によって示されるように、エンドサイトーシスの阻害に十分に応答した。（J）(D)から得られ、指数関数的減衰方程式にフィットするメスについての回復曲線。メスの動物は、エンドサイトーシスの阻害後、回復率の変化を示さなかった。（K）CFA-誘発性炎症性疼痛の確立に続く、スクランブルペプチド(n＝11)又はAP2抑制ペプチド(n＝11)群のいずれかにおける動物の機械的同側PWT。データは平均PWL(ベースラインPWTの割合として)±s.e.m.として表される。ボンフェローニ補正を伴う反復測定二元配置ANOVAを用いて有意差を決定した。p＜0.05; * 対側PWTは、図14に示される。

【００１８】

図11は、脂質付加AP2抑制ペプチドが、術後疼痛モデルにおいて、熱感受性を減弱したことによって、末梢エンドサイトーシスの薬理学的阻害を示す。（A）脂質付加AP2抑制ペプチドの注射プロトコルを示す模式図。（B-D）切開後疼痛モデルにおける動物の熱感受性。データは、平均PWL±s.e.m.で表される。ボンフェローニ補正を伴う反復測定二元配置ANOVAを用いて有意差を決定した。p＜0.05; *, p＜0.01; **, p＜0.005; ***, p＜0.001; **** （B）足底筋肉切開、及び、スクランブルペプチド(n＝12)又はAP2抑制ペプチド(n＝12)注射後の動物における熱感受性を表す複合グラフ。（C）足底の切開に続いて、スクランブル(n＝6)及びAP2抑制ペプチド(n＝6)を注射したオス動物の熱感受性。オスは、エンドサイトーシス局所的阻害への初期相応答を示し、これは、1日～4日のPWTの統計的に有意な増加によって特徴付けられる。（D）足底の切開に続いて、スクランブル(n＝6)及びAP2抑制ペプチド(n＝6)を注射したメス動物の熱感受性。メスは、エンドサイトーシス局所的阻害への後期相応答を示し、これは、3日～6日のPWTの統計的に有意な増加によって特徴付けられる。（E-G）各実験条件についての定量曲線下面積(A.U.C.)の合計。データは、平均A.U.C.±s.e.m.で表される。Holms-Sidak補正を伴う一元配置ANOVAを使用して統計的有意性を決定した。 p＜0.05; *, p＜0.01; **, p＜0.005; ***, p＜0.001; **** （E）全ての動物について(B)に示された実験条件下での全A.U.C.；スクランブルペプチド(n＝12)及びAP2抑制ペプチド(n＝12)。エンドサイトーシスの薬理学的阻害は、同側足について、A.U.C.の有意な増加を生じ

た。（F）実験条件[スクランブルペプチド(n＝6)及びAP2抑制ペプチド(n＝6)]下でのオス動物についての全A.U.C.。全データセットからオスの対象を単離すると、鎮痛様効果の傾向が明らかになった。（G）実験条件[スクランブルペプチド(n＝6)及びAP2抑制ペプチド(n＝6)]下でのメス動物についての全A.U.C.。興味深いことに、全データセットからのメス対象の単離は、同様に鎮痛様効果の傾向を明らかにする。（H-J）回復曲線は、指数関数的減衰方程式にフィットする。（H）(B)からの回復曲線のフィッティングは、エンドサイトーシスの阻害が、τの減少によって示されるように回復率を加速したことを明らかにする。（I）(C)から得られ、指数関数的減衰方程式にフィットするオスについての回復曲線。オス動物は、τのロバストな減少によって示されるように、エンドサイトーシスの阻害に十分に応答した。（J）(D)から得られ、指数関数的減衰方程式にフィットするメスについての回復曲線。（K）切開後の、スクランブルペプチド(n＝11)又はAP2抑制ペプチド(n＝11)のいずれかにおける動物の機械的同側PWT。データは、平均PWL(ベースラインPWTの割合として)±s.e.m.として表される。ボンフェローニ補正を伴う反復測定二元配置ANOVAを用いて有意差を決定した。p＜0.05; * 対側PWTは、図16に示されている。

【００１９】

図12は、末梢侵害受容器におけるエンドサイトーシスの局所阻害が、真皮の表層におけるCGRP免疫反応性を増強し、AP2α2がCGRP$^+$ヒトDRGニューロンに特異的に分布していることを示す。（A）スクランブルペプチドを注射した未炎症の後足におけるCGRP免疫反応性を示す代表的な画像。典型的には、CGRP免疫反応性は、近位顆粒層(SG)において終了する。（B）AP2抑制ペプチドを注射した未炎症の後足におけるCGRP免疫反応性を示す代表的な画像。白色の矢印；末梢神経線維は、SGの極めて遠位の層においてロバストなCGRP免疫反応性を示し、いくつかのCGRP免疫反応性線維は、ごく表面の角質層(SC)に見られた。黄色の矢印；SCの表層におけるCGRP免疫反応性を示す末梢神経線維。（A’及びB’）拡大部分はSGクワドラントを示している。（C）各SGクワドラントにおけるCGRP$^+$求心性神経末端の定量化(n＝3)。有意差は、多重t検定を用いて決定した。p＜0.05;* データは、平均±s.e.m.として提示される。（D）代表的な免疫蛍光画像は、hDRG中のAP2α2(左)及びCGRP(中央)の発現パターンを示す。AP2α2は、CGRP$^+$DRGニューロンにおいて特異的に発現される。矢印は、CGRPとAP2α2との強い共局在化を強調している。

【００２０】

図13は、AP2α2のshRNA媒介性ノックダウンが、CFA-誘発性の同側腫脹又は対側機械的挙動を有意に損なわないことを示す。（A）CFA注射の24時間前と後の同側後足の断面積。測定は、キャリパーを用いて、覚醒C57BL/6マウスについて行った。幅と高さは、後足の最も広い部分から測定した。各群(スクランブルshRNA及びAP2α2shRNA)は、n＝3である。同じ動物を、CFA注射の前及び後に測定した。データは、断面積の平均±s.e.m.として表され、ボンフェローニ補正を伴う二元配置ANOVA統計試験を用いて分析される。p＜0.05 （B-D）CFA誘発性慢性炎症性疼痛モデルにおける動物のVon freyフィラメント試験。データは、平均PWT(ベースラインPWTの割合として)±s.e.m.として表される。統計的有意性は、ボンフェローニ補正を伴う反復測定二元配置ANOVA統計試験を用いて決定した。p＜0.05; * （B）対側PWT。データは、図2Bに示されたデータに対して補足的である。（C）[左]スクランブルshRNA(n＝4)又はAP2α2 shRNA(n＝4)のいずれかを注射したオス動物の対側PWT。[右]同側足。（D）[左]スクランブルshRNA(n＝4)又はAP2α2 shRNA(n＝4)のいずれかを注射したメス動物の対側PWT。[右]同側足。

【００２１】

図14は、脂質付加HA-ペプチドが、有糸分裂細胞及び有糸分裂後ニューロンにおいてロバストな安定性を示すことを示す。CHO細胞を、播種後少なくとも2日間、適切な条件下で培養した。実験日に、培地を変更し、HA-ペプチド(10μM)を補充した増殖培地に置き換えた。細胞をHA-ペプチド補充培地中で3時間インキュベートし、その時点で培地

を除去し、細胞をPBSで洗浄し、収集するまで増殖させた。細胞を固定し、HA-特異的抗体を用いて染色した。（A）異なる透過処理条件下及び時点での、HA-ペプチドに曝露された培養CHO細胞からの代表的な画像。「-Triton x-100」は、細胞外のみのHA-ペプチドを示すが、「+Triton x-100」は、全HA-ペプチド免疫反応性を示す。透過処理条件及び非透過処理条件を使用して、HA-ペプチドが、細胞膜の左右から連続的にフリップフロップでき、それゆえ、主に膜で区切られていることを実証した。（B）HA-ペプチドに対する最初の曝露後、3日間培養された胚性DRGニューロン中のHA免疫反応性の代表的な画像。(下部)上部画像のルックアップテーブル変換は、染色の強さを示している。

【００２２】

図15は、エンドサイトーシスの薬理学的阻害が、CFA-誘発性炎症の発生及び機械的感受性を変化させなかったことを示す。（A）CFA注射の24時間前と24時間後の同側後足の断面積。測定は、キャリパーを用いて覚醒C57BL/6マウスについて行った。幅と高さは後足の最も広い部分から測定した。各群(スクランブル及びAP2α2ペプチド模倣体)は、n＝3であった。同じ動物を、CFA注射の前及び後に測定した。データは、断面積の平均±s.e.m.として表され、ボンフェローニ補正を伴う二元配置ANOVA統計試験を用いて分析される。p＜0.05 （B-D）CFA誘発性慢性炎症性疼痛モデルにおける動物のVon freyフィラメント試験。データは、平均PWT(ベースラインPWTの割合として)±s.e.m.として表される。統計的有意性は、ボンフェローニ補正を伴う反復測定二元配置ANOVA統計試験を用いて決定した。p＜0.05.（B）対側PWT。データは、図4Kに示されたデータに対して補足的である。（C）[左]スクランブルペプチド(n＝7)又はAP2α2抑制ペプチド(n＝7)のいずれかを注射したオス動物の対側PWT。[右]同側足。（D）[左]スクランブルshRNA(n＝4)又はAP2α2 shRNA(n＝4)のいずれかを注射したメス動物の対側PWT。[右]同側足。

【００２３】

図16は、エンドサイトーシスの薬理学的阻害が、切開後疼痛モデルにおいて対側の機械的感受性を変化させなかったことを示す。慢性炎症性疼痛モデル(切開後)における動物の動的Von freyフィラメント試験。データは、平均PWT(ベースラインPWTの割合として)±s.e.m.として表される。統計的有意性は、ボンフェローニ補正を伴う反復測定二元配置ANOVA統計試験を用いて決定した。p＜0.05 データは、図11Kに示されたデータに対して補足的である。

【００２４】

図17は、スクランブルペプチド注射動物における切開後疼痛モデルの早期回復の程度が、わずかな性依存傾向を示すことを表す。切開後疼痛モデルからの対照動物は、熱刺激によるPWLによって測定される初期の回復の間に、性によるわずかな差異を示した。メスの対照動物(n＝6)は、比較的平坦な回復率を示しつつ、切開後24時間、PWLがより高い傾向があった。一方、オスの対照動物(n＝6)は、24時間後の回復において、より低いPWLを示し、その後に線形の回復率が続いた(より遅い時点でメスの動物と対等になった)。

【００２５】

図18は、鎮痛効果がペプチド配列に依存することを示す。（A）5％ホルマリンを注射後のC57BL/6マウスの疼痛様行動の要約。第I相；注射後0-10分、第II相；注射後11-60分後(スクランブルペプチド群 n＝6；AP2抑制ペプチド群 n＝6；P1群 n＝3；P2群 n＝3；P3群 n＝3；P4群 n＝3)。ペプチド配列は、表1に示されている。データは、累積平均±s.e.m.として表される。有意差は、ボンフェローニ補正を伴う二元配置ANOVAを用いて決定した。p＜0.05; *（B）異なる$Na_V1.8$標的ペプチド模倣体を注射したラットの熱感受性の要約を表す：Ch1001(n＝10)及びCh1002(n＝10)(Pryce et al., ref 17から)。明るい灰色の線は、AP2ペプチド模倣体の平均を基準として表す。すべてのデータは、平均±s.e.m.として表され、ボンフェローニ補正を伴う二元配置ANOVAを用いて分析される。p＜0.05; +.「+」は、Ch1002とスクランブル群との間の統計的有意性を表す。

【００２６】
図19は、エンドサイトーシスの局所的阻害が、免疫細胞の動員を変化させなかったが、切開疼痛モデルにおいて肉芽腫様アーチファクトを生じさせたことを示す。（Ａ）方法のセクションで前述したようにして、動物を処置した。しかしながら、挙動は収集せず、代わりに、経心的灌流によって動物を犠牲にし、染色するために組織を採取した。(上部)スクランブル(ｎ＝２)及びＡＰ２抑制ペプチド群(ｎ＝２)における、ラット後足のヘマトキシリン及びエオシン染色を示す代表的な画像。各条件下で、局在化した免疫細胞が真皮中で観察できる。(下部)切開の２４時間後に、免疫細胞の数が急速に増加する。(下部右)エンドサイトーシスの阻害は、免疫細胞の密なクラスタリングをもたらした。ペプチド注射は、歩行運動において観察可能な変化を増やさなかった。（Ｂ）スクランブルペプチド(上部)又はＡＰ２抑制ペプチド(下部)のいずれかを受けた動物における切開部位の代表的な画像。黒の矢印は、有意な肉芽腫様構造を強調している。
【００２７】
図20は、エンドサイトーシスの阻害が、炎症を起こした足において、真皮のＣＧＲＰ免疫反応性を有意に変化させなかったことを示す。（Ａ）２４時間ＣＦＡ誘発性炎症を生じさせた後足(スクランブルペプチド模倣体を注射)における、ＣＧＲＰ免疫反応性を示す代表的な画像。(Ｂ)ＡＰ２抑制ペプチド模倣体を注射した炎症後の後足における、ＣＧＲＰ免疫反応性を示す代表画像。
【００２８】
図21は、ＡＰ２α２ ｓｈＲＮＡの注射が、同側ＤＲＧにおいて、ＡＰ２α２タンパク質の発現を有意に減少させることを示す。(上部)図７からの全ウエスタンブロット画像。可視バンドは、ＡＰ２α２に対応する。(下部)図７からの全ウエスタンブロット画像。可視バンドは、アクチンに対応する。
【発明を実施するための形態】
【００２９】
特許請求の範囲に記載された主題は、特定の実施形態/実施例によって説明されるが、本明細書に記載される利点及び特徴の全てを提供しない実施形態/実施例を含む他の実施形態/実施例も、本開示の範囲内である。本開示の範囲から逸脱することなく、様々な構造的、論理的、及びプロセスステップを変更することができる。
【００３０】
値の範囲が本明細書に開示される。この範囲は、下限値と上限値とを設定している。特に断らない限り、前記範囲は、最小値の大きさ(下限値又は上限値のいずれか)までのすべての値、及び上記範囲の値の間の範囲を含む。
【００３１】
この出願を通して、単数形は複数形を包含し、その逆も同様である。この出願で引用されている参考文献は、参照により本明細書に組み込まれる。任意の補足的なセクション又は図面を含むこの出願の全てのセクションは、完全にこの出願の一部である。
【００３２】
本明細書で使用される「治療」という用語は、治療される特定のコンディションの存在に関連する１つ以上の症状又は特徴の軽減を指す。治療は必ずしも完全な治癒又は寛解を意味するものではなく、再発又は再燃を排除するものではない。例えば、本開示における治療は、疼痛を減少させること(例えば、疼痛感受性を低下させる)又は疼痛感受性を増加させることを意味する。
【００３３】
本明細書中で使用される「治療的有効量」という用語は、１つ又は複数の用量で、治療の意図された目的を達成するのに十分な薬剤の量を指す。治療は、完全な治癒をもたらす必要はないが、もたらしてもよい。治療は、症状又は徴候マーカーのうちの１つ又は複数の軽減を意味することができる。所望の又は必要とされる正確な量は、使用される特定の化合物又は組成物、その投与形態、患者の詳細などに応じて変化する。適切な有効量は、通常の実験のみを用いて本開示から情報を得た当業者によって決定されることができる。

治療は、例えば、症状を抑制するために、対症的に適応される。それは、短期にわたって、中期にわたって行われてもよく、又は長期の治療であってもよい（例えば、維持療法の枠内でなど）。治療は、連続的であっても断続的であってもよい。

【００３４】

特に断らない限り、核酸は5'から3'方向に、左から右に書かれる；アミノ酸配列は、それぞれアミノからカルボキシル方向に、左から右に書かれる。明細書内に記載された数値範囲は、範囲を規定する数字を包含し、定義された範囲内の各整数を含む。アミノ酸は、本明細書では、一般に知られている三文字記号、又はIUPAC-IUB生化学命名委員会によって推奨される一文字記号のいずれかによって、言及されてもよい。同様に、ヌクレオチドは、それらの一般に承認された一文字コードによって言及されてもよい。

【００３５】

本開示は、疼痛を治療又は予防し、及び麻酔(痛覚消失)を誘導するための薬剤、並びに、これらの薬剤を使用する方法を提供する。この薬剤は、アダプチンタンパク質2(AP2)-クラスリン媒介エンドサイトーシス(CME)を標的とするペプチド、siRNA、及び/又はshRNAであってもよい。ある態様では、これらの薬剤の使用は、痛みと戦うための麻薬(例えば、オピオイド)の必要性を減少又は排除するであろう。

【００３６】

本開示は、表１に記載の配列を有するペプチドを提供する。

【表１】

| 表１：ジ-ロイシンベースのペプチド | 親タンパク質 | 配列 |
|---|---|---|
| Ap2 抑制ペプチド | CD4 | RMS*EIKRLL*SE (配列番号 1) |
| P1 | EGFR | RLR***T****LRRLL*QE (配列番号 2) |
| P2 | Kcnt1 | RLEPN*DIVYLI*RS (配列番号 3) |
| P3 | CD3 | RAS*DKQTLL*PNQ (配列番号 4) |
| P4 | CD3 | RA**S***DKQTLL*PNQ (配列番号 5) |
| スクランブル配列 | CD4 | IERLSEM**S**LRK (配列番号 6) |

アンダーライン－(D/E/**S**/**T**)XXXL(L/I) 実験で示される AP2 結合モチーフ
太字－リン酸化された残基

【００３７】

本開示はまた、この配列(D/E/S/T)XXXL(L/I)(配列番号7)を含むペプチドを提供する。この配列は、$X^1X^2X^3X^4LX^5$(配列番号7)として表されてもよく、ここで$X^1$はD、E、S又はTであり、ここでD、E、S及び/又はTは任意でリン酸化され、$X^2$、$X^3$、及び$X^4$は、任意のアミノ酸から独立して選択される(例えば、標準アミノ酸(例えば、$X^2$は、I、L、又はKであってもよく；$X^3$は、K、R、V、又はQであってもよく；$X^4$は、R、Y、又はTであってもよい)又は非標準アミノ酸)、及び$X^5$は、L又はIである。本開示のペプチドは、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20アミノ酸残基長であってもよい。種々の例において、ペプチドは以下の配列を有する：EIKRLL(配列番号9)、TLRRLL(配列番号10)、DIVYLI(配列番号11)、又は、DKQTLL(配列番号12)。種々の例では、前記ペプチドは、10～13個のアミノ酸残基長(例えば、10、11、12、又は13)である。特定の理論に拘束されることを意図するものではないが、全長で10～13アミノ酸を有するペプチドは、望ましい細胞透過特性及び標的結合特性を有し得ると考えられる。様々な例において、配列番号7の任意のアミノ酸残基(例えば、アミノ酸残基の任意の組み合わせ又は全て)は、リン酸化されてもよい。

【００３８】

一実施形態では、ペプチド配列中のD/E/S/Tはリン酸化される。本明細書で報告された実験では、Tはリン酸化された。拡張により、リン酸化されたTは、リン酸化されたSに

よって置換され得る。

【００３９】

一実施形態では、(D/E/S/T)XXXL(L/I)(配列番号7)では、S又Tが先行し((S/T)(D/E/S/T)XXXL(L/I)(配列番号8))、任意でリン酸化されてもよい。配列番号8は、$X^6X^1X^2X^3X^4LX^5$(配列番号8)として表されてもよく、ここで、$X^1$は、D、E、S、又はTであり、$X^1$は任意でリン酸化され、$X^2$、$X^3$、及び$X^4$は、任意のアミノ酸から独立して選択され(例えば、$X^2$は、I、L、又はKであってもよく；$X^3$は、K、R、V、又はQであってもよく；$X^4$は、R、Y、又はTであってもよい)、$X^5$はL又はIであり、$X^6$はS又はTである。

【００４０】

別の実施形態では、本開示のペプチドのC末端又はC末端直前のアミノ酸は、任意でリン酸化され得る。

【００４１】

好ましい実施形態では、ペプチドは脂質付加(脂質修飾)される。脂質付加に使用され得る成分には、ミリストイル($C_{14}$)、オクタノイル($C_8$)、ラウロイル($C_{12}$)、パルミトイル($C_{16}$)、及びステアロイル($C_{18}$)が含まれる。

【００４２】

様々な実施形態では、N末端又はN末端部分のペプチド(単数又は複数)は、ミリストイル化される。従って、ペプチドのN末端は、脂質付加されてもよい。あるいは、ペプチドのC末端が脂質付加されてもよい。例えば、C末端の脂質付加は、C末端がリジンである場合に有用であり得る。

【００４３】

さらに、本開示は、AP2-CME mRNAに対して指向されたRNAi剤(AP2-CME mRNAのRNA干渉媒介サイレンシング又はダウンレギュレーションに使用するための薬剤)を記載している。RNAi剤は、一般に、低分子ヘアピン型RNA(shRNA)として細胞内で発現される。shRNAは、センス鎖、アンチセンス鎖、及び前記センスフラグメントとアンチセンスフラグメントとの間の短いループ配列を含むRNA分子である。shRNAは、細胞質に輸送され、そこでダイサーによって低分子干渉RNA(siRNA)にプロセシングされる。siRNAは、典型的には、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)によって認識される20～23ヌクレオチド二本鎖RNA分子である。RISCに組み込まれると、siRNAは、標的mRNAの切断及び分解を促進する。従って、RNAi剤は、siRNAであってもshRNAであってもよい。一実施形態では、薬剤は、AP2-CME mRNAのRNA干渉(RNAi)媒介サイレンシング又はダウンレギュレーションに使用するためのsiRNAである。RNAi剤は、ヒト、非ヒト又は部分的にヒト化されていてもよい。

【００４４】

shRNAは、組換えウイルスベクターなどの任意の適切なベクターから、２つの別個の相補的なRNA分子として、又は２つの相補的な領域を有する単一のRNA分子として、発現させることができる。この点に関して、発現されるshRNA分子のコード配列を受容することができる任意のウイルスベクターを使用することができる。適切なベクターの例として、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス(例えば、レンチウイルス)、ラブドウイルス、マウス白血病ウイルス、ヘルペスウイルス等に由来するベクターが挙げられるが、これらに限定されない。好ましいウイルスはレンチウイルスである。ウイルスベクターの指向性はまた、他のウイルスからのエンベロープタンパク質又は他の表面抗原を用いてベクターをシュードタイピングすることによって改変することもできる。化学的に安定化されたshRNAあるいはsiRNAも(組換えベクターから細胞中にshRNAを発現させる代替物として)、本開示の方法における薬剤として使用/投与され得る。shRNA(細胞内に導入されるとsiRNAを産生する)を発現するベクターは、商業的に入手可能である。さらに、実質的に全ての既知のヒト遺伝子を標的とするshRNA又はsiRNAも知られており、市販されている。

【００４５】

本開示はまた、薬学的に許容される担体と、AP2-CME mRNAに対する前記ペプチド

及び/又はRNAi剤とを含み、及び任意で、鎮痛剤(例えば、非ステロイド性抗炎症薬(NSAID))及び/又は麻酔剤及び/又は抗炎症剤(例えば、グルココルチコイド)を含む医薬組成物を提供する。鎮痛剤の例には、アセトアミノフェン、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、メロキシカム、ケトロラク、ジクロフェナク、ケトプロフェン、ピロキシカム及びメタミゾールが含まれるが、これらに限定されない。麻酔薬の例には、ブピバカイン、エチドカイン、レボブピバカイン、リドカイン、メピバカイン、プリロカイン、ロピバカイン、プロカイン、クロロプロカイン、ヒドロコルチゾン、トリアムシノロン、メチルプレドニゾロンが含まれるが、これらに限定されない。当業者に知られている技術及び担体(例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2005) 21 st Edition, Philadelphia, PA. Lippincott Williams & Wilkins)を使用して、前記組成物を、例えば、筋肉内、静脈内、動脈内、皮内、髄腔内、皮下、腹腔内、肺内、鼻腔内、頭蓋内注射又は組成物として製剤化することができる。それらはまた、例えば、経口、バッカル、又は舌下組成物、坐剤、局所クリーム、又は経皮パッチとして製剤化することもできる。

【００４６】

組成物の非限定的な例には、溶液、懸濁液、エマルジョン、使用前に溶媒に溶解又は懸濁される固体注射用組成物などが含まれる。注射は、１種以上の活性成分を希釈剤中に溶解、懸濁又は乳化することによって調製することができる。希釈剤の例としては、注射用蒸留水、生理食塩水、植物油、アルコール、及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、注射剤は、安定剤、可溶化剤、懸濁剤、乳化剤、無痛化剤、緩衝剤、防腐剤等を含有してもよい。注射は、最終製剤化工程で滅菌してもよいし、滅菌手順により調製してもよい。本開示の組成物はまた、滅菌固体調製物として製剤化することができ（例えば凍結乾燥によって）、及び、滅菌された後、又は使用直前に滅菌注射用水又は他の滅菌希釈剤に溶解されてから、使用されてもよい。

【００４７】

一態様において、本開示は、AP2-CME mRNAに対する前記ペプチド及び／又は前記RNAi剤を、治療的、予防的又は麻酔的に有効な量で、それを必要とする対象に投与することによって、疼痛を治療又は予防する、又は麻酔を誘導する方法を提供する。

【００４８】

一実施形態では、対象は、ヒト又は非ヒト哺乳動物である。

【００４９】

さらなる実施形態では、対象は、オピオイドを摂取しないか、オピオイドに十分な耐性がないか、オピオイド依存症であるか、又はオピオイド依存症を再発するリスクがある。オピオイド耐性、依存(中毒)、又は再発リスクは、被験者及び/又は医療専門家（医師又は他の臨床家など）によって主観的又は客観的に決定され得る。

【００５０】

一実施形態では、疼痛は侵害受容性である。別の実施形態では、疼痛は神経障害性である。疼痛は、任意の疾患の症状、状態、又は発生であってもよく、例えば、損傷(例えば、脊髄損傷、神経損傷、身体的傷害又は火傷)、慢性疾患(例えば、糖尿病、帯状疱疹、大うつ病性障害、線維筋痛、片頭痛、関節炎、癌、多発性硬化症、炎症性腸疾患又はHIV/AIDS)、神経根障害、慢性炎症(例えば、反復性ストレスに関連する慢性炎症、例えば、手根管症候群など)、化学療法、放射線、モートン神経腫、機械的/熱的ストレス、アロディニア/痛覚過敏(その各々が、機械的、熱的又は運動に関連してもよい)が挙げられる。一実施形態では、痛覚過敏はオピオイドによって誘発される。疼痛は、手術後の痛みであってもよい。予防される痛みは、予想される痛み、例えば、外科手術、腹腔鏡検査、化学療法、歯科作業、放射線、及び出産の間の痛みなどであってもよい。疼痛は、慢性疼痛及び/又は急性疼痛であってもよい。

【００５１】

慢性疼痛は、約12週間以上持続する痛みである。別の実施形態では、慢性疼痛は、予想される治癒の期間を超える痛みである。

【００５２】
急性疼痛はシャープであり、典型的には約6ヶ月より長く続かない。急性疼痛は、痛みの根本的な原因がもはや存在しないときには消失する。急性疼痛の原因には、外科手術、腹腔鏡検査、骨折、歯科作業、火傷、切り傷、分娩/出産、及びそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。
【００５３】
疼痛の治療又は予防は、例えば、種々の検証済み疼痛測定ツール(例えば、視覚アナログ疼痛スケール(VAS)、数値評価疼痛(NRS)、カテゴリー言語式評価疼痛スケール(VRS)、感覚成分並びに疼痛の認知及び心理的側面を評価する多次元スケール、健康関連QOL評価、疼痛関連機能評価)を用いる疼痛評価に基づいて、対象からの記述によって、決定することができる。疼痛測定ツールの非限定的な例として、VAS、NRS、VRS、マクギル疼痛質問表(MPQ)及びその短縮形、簡易疼痛質問表(BPI)、神経障害性疼痛スコア(NPS)、疼痛自己効力質問票、患者の全体的な変化の印象尺度、欧州式QOL評価法(EQ 5D)、疼痛障害インデックス(PDI)、Oswestry障害インデックス(ODI)、ベックうつ病質問票及び感情プロフィール検査、Wong-Baker表情疼痛スケール、FLACCスケール(表情、下肢、活動、啼泣、及び癒し[consolability])、CRIESスケール(啼泣、$SaO_2$＜95%のための$O_2$の必要性、バイタルサイン(BP及びHR)の上昇、表情、不眠)、COMFORTスケール、Mankoski疼痛スケール、疼痛強度の記述式識別スケールなど及びそれらの組み合わせが挙げられる。
【００５４】
疼痛は、それが少なくとも部分的に改善されたときは、治療されているか又は予防されている。同様に、前記方法は完全な麻酔(痛覚消失)を必要としない。例えば、対象の機械的/触覚的感受性が少なくとも部分的に減少している場合、治療又は予防は麻酔的に有効であると考えられる。対象の機械的/触覚的感受性は、主観的又は客観的に、対象及び/又は医療専門家(外科医、他の医師又は他の臨床家など)によって、決定されてもよい。麻酔は局所的であっても中枢的であってもよい。
【００５５】
対象の疼痛(例えば、疼痛感受性)が減少した場合、対象の疼痛は改善され得る。例えば、対象の疼痛は、対象の疼痛(例えば、疼痛感受性)が所望のレベルである(例えば、疼痛が不快でない)場合に改善されている。
【００５６】
ある実施形態では、投与に続いて、対象の疼痛が、0.25～120時間(例えば、24～120時間、1～48時間、12～48時間、又は24～48時間)(それらの間の、すべての整数及び100位までの小数点及びそれらの間のすべての範囲を含む)、改善/治療/予防される。別の実施形態では、投与に続いて、0.25～100時間(それらの間の、すべての整数及び100位までの小数点及びそれらの間のすべての範囲を含む)、麻酔が誘発される。
【００５７】
AP2-CME mRNAに対するペプチド及び/又はRNAi剤は、単独で、又は鎮痛剤及び/又は麻酔剤及び/又は抗炎症剤と組み合わせて投与又は使用することができる。鎮痛剤、麻酔剤及び抗炎症剤の例は、上述の通りである。組み合わせて投与する場合、投与又は使用は、同時に又は順次(任意の順序で)行われ得る。前述のいずれも、組み合わせ製剤又は別々の製剤として製剤化することができる。
【００５８】
上記投与のいずれか又は全ては、例えば、筋肉内、静脈内、動脈内、皮内、髄腔内、腹腔内、肺内、鼻腔内、頭蓋内、経口、バッカル、舌下、皮下、肛門、局所、経皮、又は神経注射によるものであってもよい。一実施形態では、前記投与は、ニードルレス注射によって行われる。
【００５９】
好ましい実施態様において、shRNAは神経に直接投与される。
【００６０】

１つの実施態様において、AP2-CME mRNAに対する前記ペプチド及び/又は前記RNAi剤は、外科的処置又は分娩/出産の間に投与される。

【００６１】

一態様では、本開示はさらにキットを提供する。キットは、AP2-CME mRNAに対するペプチド及び/又はRNAi剤を含む医薬組成物を含むことができる。

【００６２】

一実施形態では、キットは、医薬組成物を含むパッケージ(例えば、密閉又は密封パッケージ)を含み、これは例えば、１つ以上の密閉又は密封のバイアル、ボトル、ブリスター(バブル)パックなど、又は医薬組成物を販売、配布、又は使用するための任意の他の適切なパッケージである。

【００６３】

一実施形態では、前記キットはさらに印刷物を含む。印刷物は、印刷された情報を含むが、これに限定されない。印刷された情報は、例えば、ラベル上、又は挿入紙上に提供されてもよく、又は包装材料自体に印刷されてもよい。印刷された情報は、例えば、パッケージ内の組成物、他の活性成分及び/又は不活性成分の量及び種類を特定するための情報、ならびに組成物を服用するための指示(例えば、所与の期間にわたって服用するための投与数など)、及び/又は薬剤師及び/又は別の医療提供者(医師など)、あるいは患者に向けられた情報を含み得る。一例では、製品はラベルを含み、このラベルは、容器の内容物を記載し、容器の内容物の使用に関する表示及び/又は指示を提供する。

【００６４】

本明細書で開示される様々な実施形態及び例に記載された方法のステップは、本開示の方法を実施するのに十分である。従って、一実施形態では、方法は、本質的に、本明細書に開示された方法のステップの組み合わせのみからなる。別の実施形態では、この方法は、そのようなステップのみからなる。

【００６５】

以下の陳述において、本開示のペプチド、組成物、及び本開示のペプチド及び組成物を使用する方法の種々の例が記載される。

陳述１

以下の配列：$X^1X^2X^3X^4LX^5$(配列番号7)を含むペプチド
ここで、$X^1$は、D、E、S、及びTから選択され；$X^2$、$X^3$、及び$X^4$は、独立して任意のアミノ酸から選択され、$X^5$は、L及びIから選択され、ここで、L、$X^1$、及び/又は$X^5$は、任意でリン酸化されており、及び、前記ペプチドは、6～20(例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20)アミノ酸残基長である(例えば、10～13(例えば、10、11、12、又は13)アミノ酸残基長)。

陳述２

C末端アミノ酸残基、又は、C末端アミノ酸の直前のアミノ酸残基が、リン酸化されている、陳述１に記載のペプチド。

陳述３

ペプチドが脂質付加されている、陳述１又は２に記載のペプチド。

陳述４

N末端アミノ酸残基にて脂質付加されている、陳述３に記載のペプチド。

陳述５

脂質付加が、ミリストイル化、オクタノイル化、ラウロイル化、パルミトイル化、又はステアロイル化である、陳述３又は４に記載のペプチド。

陳述６

前記ペプチドが、以下の配列：$X^6X^1X^2X^3X^4LX^5$(配列番号8)を有し、ここで、$X^6$はS及びTから選択され、$X^6$は任意でリン酸化されている、前記陳述のいずれか１つに記載のペプチド。

陳述７

配列番号1、2、3、4、5、8、9、10、11、及び12から選択される配列を含む、前

記陳述のいずれか１つに記載のペプチド。
陳述８
前記陳述のいずれか１項に記載の１種以上のペプチド、及び、薬学的に許容される担体を含む組成物。
陳述９
１種以上の鎮痛剤及び/又は１種以上の麻酔剤をさらに含む、陳述８に記載の組成物。
陳述１０
１種以上の鎮痛剤及び/又は１種以上の麻酔剤が、アセトアミノフェン、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、メロキシカム、ケトロラク、ジクロフェナク、ケトプロフェン、ピロキシカム、メタミゾール、ブピバカイン、エチドカイン、レボブピバカイン、リドカイン、メピバカイン、プリロカイン、ロピバカイン、プロカイン、クロロプロカイン、ヒドロコルチゾン、トリアムシノロン、メチルプレドニゾロン、又はそれらの組み合わせである、陳述８又は９に記載の組成物。
陳述１１
AP2-CMEを標的とするshRNA及び/又はAP2-CMEを標的とするsiRNAをさらに含む、陳述８～１０のいずれか１つに記載の組成物。
陳述１２
治療を必要とする対象において疼痛を治療するか又は疼痛感受性を増加させる方法であって、
治療を必要とする対象に、陳述８～１０のいずれか１つに記載の１又は複数の組成物を、治療有効量で投与することを含み、
治療を必要とする対象の疼痛が改善されるか、又は治療を必要とする対象の疼痛感受性が増加する、方法。
陳述１３
１種以上の鎮痛剤及び/又は１種以上の麻酔剤を投与することをさらに含む、陳述１２に記載の方法。
陳述１４
投与工程が、痛みを予期して行われる、陳述１２又は１３に記載の方法。
陳述１５
治療を必要とする対象が、損傷、慢性疾患、慢性炎症、モートン神経腫、手術/術後の疼痛又はそれらの組み合わせを有する、陳述１２～１４のいずれか１つに記載の方法。
陳述１６
前記損傷が、脊髄損傷、神経損傷、熱傷、又はそれらの組み合わせである、陳述１５に記載の方法。
陳述１７
慢性疾患が、糖尿病、帯状疱疹、大うつ病性障害、線維筋痛、片頭痛、関節炎、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、炎症性腸疾患、統合失調症、自閉症スペクトラム障害、癌、神経根障害、又はそれらの組み合わせである、陳述１６に記載の方法。
陳述１８
対象に投与されるペプチドが、配列番号1、2、3、4、5、8、9、10、11、12、及びそれらの組み合わせから選択される配列を有する、陳述１２～１７のいずれか１つに記載の方法。
陳述１９
一回の投与工程後に1～120時間、対象の痛みが改善される、陳述１２～１８のいずれか１つに記載の方法。
陳述２０
一回の投与工程後に24～120時間、対象の痛みが改善される、陳述１２～１９のいずれか１つに記載の方法。
【００６６】
以下の実施例は、本開示を例示するために提示される。これは、いかなる点における限

定も意図しない。
【００６７】
［実施例１］
本実施例は、本開示の方法の説明を提供する。
【００６８】
インビボDRGニューロン遺伝子ノックダウン技術を使用して、以前の研究からのインビトロデータを補強した。AP2-CMEがどのようにして、インビボ研究における挙動プロセスに影響を及ぼし得るかを理解することは困難である。トランスジェニックベースのアプローチは、発生過程においてAP2-CMEが果たす重要な役割のために制限される。この制限を克服するために、脊髄神経注射技術を利用して、インビボにてAP2複合体のα-2サブユニット(AP2A2)を標的とするshRNAを、ナイーブマウスの坐骨神経に一側性にトランスフェクトした。急性及び慢性の炎症性疼痛モデルにおいて、AP2A2欠損は、疼痛様行動を有意に減少させた。具体的には、ホルマリンアッセイにおいて、AP2A2欠損マウスは、末梢侵害受容器鋭敏化に起因する疼痛様行動の改善を示した。完全フロイントアジュバント(CFA)媒介性慢性疼痛の間、AP2A2欠損マウスは、熱行動試験中、PWLの有意な増加を示し、AP2-CMEが慢性疼痛状態の開始に必要であることを示唆している。さらに、確立されたCFA慢性疼痛の間、AP2A2サブユニットのノックダウンは、熱痛覚過敏を急速に逆転し、AP2-CMEが慢性疼痛状態の維持に必要であることを示唆している。
【００６９】
最後に、AP2-CMEの局所的薬理学的阻害を用いて遺伝子研究を補完し、同様に急性及び慢性の熱疼痛行動における減弱を見出した。ここでは、疼痛のシグナル伝達における後根神経節AP2-CMEの特定の機能を記載し、疼痛マネジメントのための薬理学的標的としての末梢神経終末を特定した。
【００７０】
遺伝的及び薬理学的アプローチの両方によるエンドサイトーシスの阻害は、マウスにおいて疼痛様行動のロバストな減少をもたらし、これは驚くべきことであった。いかなる理論にも拘束されないが、エンドサイトーシスの阻害は、炎症の間、DRGにおいてSlack $K_{Na}$チャネルなどの膜タンパク質の内部移行を防止する、膜「サスペンション」を誘導すると考えられる。Slackチャネル内部移行を防止することは、例えば、炎症前に膜にこれらのチャネルを固定し、基底膜の興奮性を維持し、炎症誘発性の侵害受容器過剰興奮を防止するであろう。
【００７１】
それにもかかわらず、他の固定化された膜タンパク質が疼痛行動の減少に寄与している可能性を排除することはできない。例えば、DRGニューロンは、促進性-及び抗-侵害受容性のG-タンパク質共役受容体(GPCR)の両方を発現する。抗-侵害受容性GPCRを鈍性化できないことが、観察された効果に寄与している可能性がある。促進性-侵害受容性GPCRを鈍性化することが、痛みを悪化させる可能性も同様にある。実際、研究は、ホルマリン第II相炎症性疼痛が、β2-アレスチンノックアウトマウスにおいて悪化したことを示した。いかなる理論にも拘束されないが、サスペンドされたGPCRエンドサイトーシスが、疼痛シグナル伝達に与える可能性のある正味の影響は最小であり、及び、興奮性を制御する膜イオンチャネルがこのプロセスにおいてより適切であると考えられる。
【００７２】
遺伝的及び薬理学的アプローチの両方を使用して、これらの結果は、炎症性疼痛状態の開始が、ニューロンエンドサイトーシスに依存することを明らかにした。慢性炎症性疼痛状態の間の、PKAシグナル伝達からPKCシグナル伝達への移行について、広範囲にわたる文献が存在する。従来の研究は、PKC活性化が、Slackチャネル増強を引き起こすことを示していたため(CHO細胞で異種発現された場合)、慢性炎症性疼痛を維持する上で、Slack $K_{Na}$チャネルのエンドサイトーシスが重要であることは驚くべきことであった。しかしながら、SlackチャネルとYwhazとの異種同時発現の間に、PKC活性化が、Slackチャネルのエンドサイトーシス及びSlack $K_{Na}$電流のダウンレギュレーションを引き起

こすことが観察された。これらの観察は、DRGニューロンのエンドサイトーシスが、慢性炎症性疼痛状態を維持するために重要であるという考え方とより一致している。

【００７３】

さらに、密接に関連したSlickチャネルも、AP2エンドサイトーシス・ジロイシンモチーフを含む。従来の研究は、DRGニューロンにおいて急速活性化Slickチャネルが過剰発現すると、閾値上刺激の間にニューロンが活動電位を発火できなくなることを示した。さらに、Slickチャネルが、CGRPを含有する大きな有芯小胞に局在化することが示された。いかなる理論にも拘束されないが、炎症性シグナル伝達の間にSlickチャネルがDRGニューロン膜に蓄積し、それらを内在化することができないことが、疼痛行動、特に熱痛覚過敏の減少に寄与する可能性がある。Slickチャネルは、CGRP陽性ニューロンにおいて排他的に発現され、これは熱検出をコードする。

【００７４】

AP2A2を遺伝的に標的化した後、ミリストイル化細胞透過性ペプチドを用いて、エンドサイトーシスの薬理学的阻害を追跡した。いかなる理論にも拘束されないが、AP2-CMEは炎症性疼痛の開始及び維持に重要であると考えられる。DRG末梢端エンドサイトーシスの役割は、遺伝子操作アプローチに関連して起こり得る中枢効果からも、差別化された。言い換えると、ペプチドの作用は局所的であると解された。細胞透過性ペプチドは、鎮痛用の小分子として使用した。炎症部分へのAP2抑制ペプチドの直接投与は、急性炎症性疼痛モデルにおいてリッキング挙動を減弱し、及び、CFA慢性炎症性疼痛モデルにおいて注射の24時間後、動物の熱過敏性を着実に減少させた。いかなる理論にも拘束されないが、ペプチドの効力は、軸索を通って横方向及び縦方向に拡散するその能力に起因する。種々のジロイシンペプチドの効果の違いは、急性ホルマリン誘導性疼痛におけるリッキング挙動-対-リフティング挙動で確認され、ペプチドのリン酸化状態は、それぞれの挙動における有効性に決定的な影響を及ぼすように思われる(表1及び図18A)。データは、膜を通る迅速な側方拡散を示す(単回注射は、注射後24時間効果があった)。データはまた、より遅い縦拡散を実証する(効果の持続時間が、慢性疼痛モデルで72時間を超える)。いかなる理論にも拘束されないが、AP2抑制ペプチドが、エンドサイトーシスを長期に阻害し、侵害受容器膜タンパク質のAP2-CME-依存性変化を防止したと我々は考えている。いかなる理論にも拘束されないが、我々は、このことが本質的に、膜を生物学的な静止状態にロックし、侵害受容性促進状態へのさらなる進行を防止し、DRGの回復を強化したと考えている。いかなる理論にも拘束されないが、ペプチドのリン酸化は、ペプチドの取り込み及び/又はAP2複合体を阻害する効果を増強し得ると我々は考えている。

【００７５】

インビボのAP2A2ノックダウンは、急性炎症性疼痛行動を減少させた。以前の研究は、AP2-CMEのインビトロでの阻害が、PKA誘導性DRGニューロン過剰興奮を減少させることを実証し、AP2A2サブユニットが、PKA刺激後、DRGニューロンにおいてSlack $K_{Na}$チャネルに直接結合することが示された。疼痛行動に対するAP2A2のインビボノックダウンの意義を調べた。低分子ヘアピン型RNA(shRNA)配列を含む非ウイルスベクターの脊髄神経注射技術を使用した。この技術は、軸索逆行性輸送を介して、DRG感覚ニューロン細胞体へのshRNAプラスミド送達を可能にした。AP2A2 shRNAの脊髄内神経注射を、ナイーブのオスマウス及びメスマウスに行い、7日後に、ホルマリンアッセイを用いて急性疼痛を評価した。5％ホルマリンの足底内(i.pl.)注射は、この急性炎症性疼痛モデルに関連する二相炎症性疼痛応答を誘発した。簡単に述べると、ホルマリンアッセイは、２つの相(第I相及び第II相)に分割することができる。第I相は、ホルマリンによる侵害受容器の直接活性化に起因すると考えられる短い挙動応答を特徴とし、第II相は、末梢及び中枢両方の鋭敏化に起因する長期の応答であり、後者は脊髄への持続性侵害受容性インプットによるものである。AP2A2サブユニットのノックダウンは、第I相応答を有意に変化させなかった；しかしながら、第II相応答の有意な減少が認められた(図1A)。疼痛表現型の減少は、マウスが防衛応答の減少を示すため、容易に観察できる(図1B)。タンパク質ノックダウンを検証するために、アッセイ後にマウスを　　殺し、AP2A2サイレン

シングをウエスタン分析により確認した。AP2A2タンパク質の発現は、一側性shRNA依存性ノックダウン後に有意に減少することが見出された(図1C)。

【００７６】

インビボAP2A2ノックダウンは、慢性炎症性疼痛行動を減少させた。CFAは齧歯類の後足に注射されると、種々の無害な刺激に対して過敏性を生じる強力な免疫媒介性炎症反応を誘発する(これは、ヒトにおける慢性炎症性疼痛応答をそっくり模倣するものである)。CFA-誘発性炎症性疼痛の発生におけるAP2A2欠損の意義を調べた。実験のアウトラインは、図2の上部に模式的に示されている。ベースライン熱応答性は、ナイーブのオス及びメスマウスにAP2A2 shRNAを脊髄内神経注射する前に行われたものである。脊髄神経術の後、動物をCFA注射の前に7日間回復させた。CFAを同側後足に注射し、熱応答性を測定した。CFAアンプル(Thermo Scientific)を使用して、同じ活性を有するCFAを各動物が受けることを確実にし、結果の再現性を向上させた。このマウス種で以前に観察されたように、対照shRNAを注射したマウスは、CFAを注射した後、予想通りPWLが減少した。しかし、AP2A2欠損は、複数の試験時点でPWLを増加させた(図2A)。如何なる理論にも拘束されないが、これらの結果は、AP2A2がCFA-誘導性痛覚過敏の発生に必要とされることを示唆している。AP2A2ノックダウンが、確立されたCFA-炎症性疼痛を減弱させるかどうかを調査した。実験のアウトラインは、図2Bの上部に模式的に示されている。再び、同側及び対側足におけるベースの熱応答性を確立し、続いてCFA注射を行った。図2Aに示されるように、CFAは、24時間でピークPWLを生じ、続いて、ベースライン値に徐々に戻り、典型的なCFA応答を示している。マウスにおいて、脊髄神経注射技術は、侵襲性が最小であり、ロバストで、迅速で、高い再現性を有することが見出された。マウスは、麻酔から回復した後、すぐに探査行動及びクライミングを示した。ゆえに、CFAを後足に注射した24時間後に手術を行い、手術後4日目に熱行動試験を開始して、痛覚過敏挙動を回復前に評価することができると決定された。AP2A2をノックダウンすると、対照shRNAと比較してPWLに有意な増加が生じ、ベースライン熱応答性への回復が促進されることが見いだされた(図2B)。これらの結果は、確立された慢性炎症性疼痛の間にAP2-CMEを標的化すると、痛みが軽減されることを示唆している。

【００７７】

細胞透過性AP2ペプチド阻害剤は、急性及び慢性炎症性疼痛行動を減少させた。プレシナプスアイソフォームAP2A1とは異なり、AP2A2がシナプス外に発現していることが示されたが、AP2A2ノックダウンは脊髄内のシナプス伝達に影響を及ぼさなかった。第I相ホルマリン挙動に有意な減少がないこと(図1A)は、シナプス伝達が遺伝的操作によって変化しなかったことを示唆した。このことにも関わらず、細胞透過性AP2阻害剤を局所的に使用して、末梢神経終末機能を調節した。

【００７８】

ミリストイル化ペプチドは、インビボで神経終末機能を標的とするために使用されてきた。具体的には、AP2阻害剤は、ジロイシンベースのペプチドである。ジロイシンベースのペプチドは、AP2複合体のσ2界面に、構造的に結合することが示されている。さらに、AP2抑制ペプチドが、膜へのクラスリン補充をブロックし、一次DRGニューロンにおけるSlackチャネル内部移行をブロックし、そしてPKA刺激の間の過剰興奮を防止することが以前に示されている。

【００７９】

マウスに、AP2抑制ペプチド又はスクランブルペプチド(１００μＭ、２０μｌ)のいずれかを、右後足に単回i.pl.注射した(５％ホルマリンを同じ足に注射する２４時間前に)。ペプチド配列は表１に示されている。AP2抑制ペプチドを用いた前処理は、スクランブルペプチドと比較して、第II相の足のリッキング疼痛様行動を有意に減少させた(図3A)。一連のジロイシンベースのペプチドを試験すると、第II相の疼痛行動の減少が観察された(表1及び図18A)。このことは、AP2-CMEが、これらのジロイシンベースのペプチドを使用して、インビボで局所的に抑制され得ることを示唆する。

【００８０】

ホルマリンアッセイ及びこの局所ペプチドアプローチ使用することの一つの制限は、ホルマリン注射の部位求心性神経が、最も高い濃度のホルマリンを受け、最も固定されやすいことである。これらの同じ求心性神経はまた、最も高い濃度のペプチドを受け、それゆえホルマリンアッセイは、これらのペプチドの真の鎮痛ポテンシャルを潜在的に過小評価した。このようにして、確立されたCFA-誘発性慢性疼痛の間の鎮痛特性が決定された。このケースでは、AP2ペプチド阻害剤及びスクランブルペプチド対照を、CFA注射の24時間後に、炎症を起こした足に直接注射した。その後、AP2ペプチドの単回局所投与に続く熱応答性を評価し、スクランブルペプチド対照と比較した。AP2阻害剤投与から1日以内に、熱痛覚過敏の有意な減弱が観察された。さらに、熱痛覚過敏の減少は、1回の注射の後、96時間持続した(図3B)。機械的アロディニアは、von Frey試験を使用して評価され、AP2ペプチド阻害剤の1回の投与により、投与後24時間の疼痛行動がわずかだが有意に減少したことが見い出された。しかしながら、この効果は中程度であり、長く持続しなかった(図3C)。これらのデータは、AP2阻害及び疼痛行動の減少が、機械的アロディニアよりも熱痛覚過敏に対して選択性を示すことを示唆する。遺伝的ノックダウンもペプチド阻害も、炎症性浮腫に影響を与えないことも注目された(図15A)。このことは、疼痛行動効果が、炎症性細胞エンドサイトーシスの阻害ではなく、ニューロンAP2-CME阻害に起因することを示唆した。

【００８１】

実験材料及び方法

【００８２】

動物：C57BL/6マウスをEnvigoから購入した。使用した全ての動物は、12時間の明/暗サイクルで「University at Buffalo Jacobs School of Medicine and Biomedical Sciences」に所在する実験動物施設で飼育された。オスのC57BL/6マウスは、攻撃性の問題により単独で飼育され、メスはケージ当たり4匹にグループ分けして飼育された。全ての動物は、食物及び水に自由にアクセスできた。すべての動物実験は、国立衛生研究所の「実験動物の飼育及び使用に関するガイド」によって設定されたガイドラインに準拠して行われた。全ての動物プロトコルは、バッファロー大学の動物実験委員会によってレビューされ、承認された。

【００８３】

JetPEI(登録商標)によるインビボトランスフェクション

神経注射は、既報のようにして行った。簡単に述べると、C57BL/6マウスを麻酔し(誘導：3％、維持：2％)、腹臥位に置いた。動物を手術水準の麻酔下においた後(尾及び後足をつまんでも両方とも反応が無いことによって確認される)、同側後肢の背側領域の毛を、生えている向きに逆らって剃った(腰椎領域から膝蓋骨の真上まで)。次いで、この領域をクロロヘキシジンを用いて消毒し、続いて綿棒でエタノールを塗布し、最後に数滴のヨウ素で消毒した。消毒後、脊椎の腰椎部分で3cmの後方長手切開を行った。滅菌したつまようじを用いて、同側の傍脊柱筋を、L4椎骨の近くで注意深く分離して坐骨神経を露出させた。その後、神経をわずかに操作して注射を容易にした。1.5μLのPEI/shRNAプラスミドDNAポリプレックス(N/P比8)を、32ゲージ針に接続されたシリンジを用いて、右後足の脊髄神経にゆっくり直接注射した(Hamilton 80030, Hamilton, Reno, NV)。AP2α2 shRNA及び対照shRNAを、Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)から購入した。注射後、針を坐骨神経に少なくとも1分間維持して溶液の拡散を促進し、同時に漏れを最小にした。完全な止血が確認された後、創傷を創傷クリップで縫合し、マウスを手術後に観察し、注射による副作用が無いことを確認した。侵害受容試験を再開する前に、マウスに7日間の回復期間を与えた。

【００８４】

細胞透過性ペプチド製剤

特注のミリストイル化ペプチドをGenscriptから注文し、到着してすぐ-20℃のフリーザーに貯蔵した。ミリストイル化ペプチドを500μLのDMSOに溶解して、作業原液を作成した。適切な体積のDMSO原液を1mLの滅菌生理食塩水に溶解して、将来の試験の

ために100μMのアリコートを作製した。原液と並行してこれらのアリコートを、必要となるまで-80℃で凍結し、必要な時点で１つのアリコートを解凍し、注射し、次いで廃棄して、サンプルの凍結-解凍サイクルを最小にした。ホルマリン-ペプチド実験では、実験の24時間前に、20μLの溶解したペプチドを動物の足底内に注射した。FCA-ペプチド実験では、FCA注射の24時間後に、20μLの溶解したペプチドを動物の足底内に注射した。

【００８５】

手短に説明すると、固相合成法によりペプチドを合成した。これは、C末端からN末端方向(インビボでの生物系におけるタンパク質合成の方向とは反対)に、インビトロでアミノ酸を段階的に取り込むことを含んだ。合成は、２つのアミノ酸の間のペプチド結合(この結合では、１つのアミノ酸のカルボキシル基が、他のアミノ酸のアミノ基に結合している)の形成に基づくものであった。このプロセスを、所望のペプチド配列が得られるまで繰り返した。全てのアミノ酸の側鎖を、周期的な合成段階全体にわたる連続的な化学処理に耐えることができ、且つ、新生ペプチド鎖の精製の直前に開裂させることができる特定の「パーマネント」基でキャップした。さらに、各後続アミノ酸のN末端を、9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)基で保護し、これを各サイクル中に弱塩基により除去して、鎖に次のアミノ酸を組み込むことを可能にした。これらのFmoc基は、ペプチド鎖の長さ又は分枝の変化を引き起こす合成中の非特異的反応を防止した。脱保護は、通常、ペプチド鎖上の官能基をアルキル化する可能性のあるカチオンの生成をもたらす。従って、脱保護の間、遊離の反応種をブロックするために、水、アニソール又はチオール誘導体のようなスカベンジャーを添加した。ミリストイル化は、タンパク質N-ミリストイル化(N-末端にて)を触媒する酵素であるN-ミリストイルトランスフェラーゼによって達成された。これらのヒドロキシ-アミノ酸の１つ以上を含むペプチドのための選択的リン酸化は、オルソゴナル(orthogonal)保護又はFmoc-保護リン酸化アミノ酸によって達成され得る。

【００８６】

RNAi

shRNAは、組換えウイルスベクターなどの任意の適切なベクターから、２つの別個の相補的なRNA分子として、又は２つの相補的な領域を有する単一のRNA分子として、発現させることができる。この点に関して、発現されるshRNA分子のコード配列を受容することができる任意のウイルスベクターを使用することができる。適切なベクターの例として、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス(例えば、レンチウイルス)、ラブドウイルス、マウス白血病ウイルス、ヘルペスウイルス等に由来するベクターが挙げられるが、これらに限定されない。好ましいウイルスはレンチウイルスである。ウイルスベクターの指向性はまた、他のウイルスからのエンベロープタンパク質又は他の表面抗原を用いてベクターをシュードタイピングすることによって改変することもできる。化学的に安定化されたshRNAあるいはsiRNAを(組換えベクターから細胞中にshRNAを発現させる代替物として)を使用してもよい。shRNA(細胞内に導入されるとsiRNAを産生する)を発現するベクターは、商業的に入手可能である。

【００８７】

ホルマリンアッセイ

オス及びメスのC57BL/6マウスを、対照群又は実験群のいずれかにランダムに割り当てた。実験の日に、動物を、30分間又は探索行動を停止するまでホルマリン試験チャンバーに慣らした。慣らし期間後、動物をチャンバーから取り出し、同側後足に5%ホルマリンを足底内注射し、次いで直ちに試験チャンバーに戻して記録した。Active WebCamソフトウェアを用いて、ホルマリン注射後少なくとも90分間、動物を記録した。次に、ビデオを用いて、足を舐める(リッキング)数、足を持ち上げる(リフティング)数、及び全身フリンチ数を得点した。全ての行動は、丸1分、5分毎に得点された(ビデオ記録は90分間)。

【００８８】

フロイント完全アジュバント慢性疼痛モデル

C57BL/6マウスを麻酔し(誘導：3%、維持：2%)、腹臥位に置いた。動物を、手術水準の麻酔下においた後(尾及び後足をつまんでも両方とも反応が無いことによって確認される)、20μLのImject™フロイント完全アジュバント(FCA; Thermo Fisher Scientific)を注射し、回復させた。行動試験は、FCA注射の24時間後に再開した。動物の各コホートは、グループ間の変動を最小にするために、未開封の真空密閉ガラスアンプルからのFCAを受けた。

【００８９】

Hargreavesアッセイ

動物を、囲まれた高い位置にあるすりガラスプラットフォーム(Ugo Baseline)上に置き、30分間慣らした。探索行動が止まると、動物の後足の下で自動Hargreaves装置を操作した(Ugo Baseline)。PWLは、後肢毎の4回のトライアルの平均として計算した。トライアル間に適切な回復時間を設けるために、各トライアルに続いて5分間の潜時を設けた。

【００９０】

Von freyアッセイ

動物を、囲まれた高い位置にあるワイヤメッシュプラットホーム(Ugo Baseline)上に置き、30分間放置してその囲いに慣らした。その後、Touch Test Sensory Probes(Stoelting)を、対側及び同側後足の足底表面に適用した。機械的痛覚試験のための簡略化Up-Down法(SUDO)に従って、フィラメントを、小さい順に適用し、フィラメントプレゼンテーションの間に5分間の潜時を設けた。手短に言えば、一連のフィラメントのうち中間フィラメントを、動物の後足に押し付けた。反応があった場合、次に押し付けるフィラメントは、一連のフィラメントのうち、次に小さいフィラメントである。反応がなかった場合、次に押し付けるフィラメントは、一連のフィラメントのうち、次に大きいフィラメントである。このフィラメントプレゼンテーション法は5回繰り返され、5回目のフィラメントプレゼンテーションが最後である。次に、フィラメント値に調整係数を加え、一連の変換式を利用して、足を引っ込める力を算出した。

【００９１】

ウエスタンブロット分析

総タンパク質を、実験後の動物から採取した後根神経節(DRG)から採取した。DRGを、プロテアーゼ阻害剤(Sigma)を含有する冷却RIPA緩衝液中で均質化し、必要になるまで-80℃で保存した。全ての試料を、Mini-PROTEAN TGX Precast Gel(Bio-Rad)上で泳動し、0.45μmニトロセルロース膜(BioRad)に移した。ウサギ抗-AP2α2(1：1000、Abcam)及びウサギ抗-β-アクチン(1：1000、Sigma)を用いて、lxトリス緩衝生理食塩水-tween(TBST)中に調製した5%ウシ血清アルブミン(BSA)中で、膜を4℃にて一晩プローブした。翌日、膜を3回洗浄し(lx TBST溶液中で5分間)、その後、5%BSA(1x TBST溶液中)で調製した二次抗-ウサギ西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗体(1：5000；Promega)中で、室温にて1時間インキュベートした。二次抗体インキュベーションの後、膜を4回以上洗浄し(洗浄1回当たり5分間)その後、現像し、画像化した。バンドをChemidoc Touch Imaging System(Bio-rad)にて、増強化学発光で可視化し、Image J Software(NIH)で定量した。各実験を少なくとも3回繰り返した。

【００９２】

統計方法

全ての統計試験は、Prism(GraphPad)を用いて行われた。データは平均±s.e.m.で示される。動物実験について検出力分析を行い、0.05に設定されたα値で検出限界を達成した。統計的有意性は、全ての実験について、p値＜0.05を用いて決定した。特に断らない限り、全ての統計学的分析のために、複数回の比較を伴う二元配置ANOVA統計試験、及びボンフェローニ事後補正を用いた。

［実施例２］

【００９３】

この実施例は、本開示の方法の説明を提供する。

【００９４】

侵害受容器エンドサイトーシスを局所的に破壊し、種々の炎症性疼痛モデルを用いて、炎症性疼痛に対するシナプス外AP2-CMEのインビボ寄与を明らかにする。ペプチド作動性侵害受容器について、炎症性疼痛の上級調節因子として、さらなるエビデンスが提供される。本開示は、脂質付加ペプチド模倣体が、表在神経求心性神経を標的とし、長時間続く鎮痛を提供する能力を強調する。さらに、疼痛モデル及び動物種にわたって、炎症間の疼痛行動における性的二型性差異が記載される。

【００９５】

動物

全ての動物を、Envigoから購入し、年齢/体重を全ての実験で一致させた。使用した全ての動物は、12時間の明/暗サイクルで「University at Buffalo (UB) Jacobs School of Medicine and Biomedical Sciences」に所在する実験動物施設で飼育された。一貫性を保つために、実験の期間中、全ての動物を単独で収容した。全ての動物は、食物及び水に自由にアクセスできた。すべての動物実験は、国立衛生研究所の「実験動物の飼育及び使用に関するガイド」によって設定されたガイドラインに準拠して行われた。全ての動物プロトコルは、バッファロー大学の動物実験委員会によってレビューされ、承認された。

【００９６】

α２標的shRNA及びin vivo-JetPEI(登録商標)を用いた坐骨神経のインビボトランスフェクション

神経注射は、既報のように行った。簡単に述べると、C57BL/6マウスを麻酔し、腹臥位に置いた。消毒後、脊椎の腰椎部分で3cmの後方長手切開を行った。滅菌したつまようじを用いて、同側の傍脊柱筋を、注意深く分離して坐骨神経を露出させた。オートクレーブしたスティックを用いて、神経をわずかに操作して注射を容易にした。1.5μLのPEI/shRNAプラスミドDNAポリプレックス(N/P比8)を、32ゲージ針に接続されたシリンジを用いて、右坐骨神経に直接注射した(Hamilton 80030, Hamilton, Reno, NV)。AP2α2 shRNA及び対照shRNAを、Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)から購入した。注射後、針を坐骨神経に少なくとも1分間維持してポリプレックスの拡散を促進した。傷を創傷クリップで閉じ、マウスを手術後に観察し、注射による副作用が無いことを確認した。行動試験を再開する前に、マウスに7日間の回復期間を与えた。

【００９７】

ミリストイル化ペプチド調製

特注の脂質付加ペプチド模倣体をGenscript(登録商標)から注文し、到着してすぐ凍結乾燥サンプルを-20℃のフリーザーに貯蔵した。研究で使用されるペプチドの配列は、表１に記載されている。脂質付加ペプチド模倣体を最初に10μLのDMSOに溶解して、作業原液を作成した。適切な容量のDMSO原液を、1mLの滅菌生理食塩水に溶解して、将来の試験のために100μMのアリコートを作製した。最終DMSO濃度は＜0.05％であった。原液と並行してこれらのアリコートを、必要となるまで-80℃で凍結し、必要な時点で１つのアリコートを解凍し、注射し、次いで廃棄して、サンプルの凍結-解凍サイクルを最小にした。

【００９８】

ホルマリンアッセイ

オス及びメスのC57BL/6マウスを、対照群又は実験群のいずれかにランダムに割り当てた。動物は、実験の24時間前に、脂質付加ペプチド模倣体100μM(合計3.154μg)の足底内注射(20μL)を受けた。実験の日に、動物を、30分間又は探索行動を停止するまでホルマリン試験チャンバーに慣らした。慣らし期間後、動物をチャンバーから取り出し、同側後足に5％ホルマリンを足底内注射し、次いで直ちに試験チャンバーに戻して記録した。Active WebCamソフトウェアを用いて、動物をホルマリン注射後少なくとも9

0分間記録した。次に、ビデオを用いて、足を舐める(リッキング)数、足を持ち上げる(リフティング)数、及び全身フリンチ数を得点した。全ての行動は、丸1分、5分毎に得点された(ビデオ記録は90分間)。実験条件は得点係に知らされなかった。

【００９９】

完全フロイントアジュバント誘発性炎症性疼痛

オス及びメスのC57BL/6マウスを実験群及び対照群にランダム化した。注射部位に関して一貫性を維持するために、マウスを麻酔し、20μLのImject™完全フロイントアジュバント(Thermo Fisher Scientific)を充填した32ゲージの使い捨て注射器を用いて、右後足の足底表面に注射を行い、回復させた。行動試験は、CFA注射後24時間再開し、この時点で、動物は、100μM(合計3.154μg)の脂質付加ペプチド模倣体を足底内に注射された(20μL)(1日目の行動試験が終了した直後)。動物の各群は、群間の実験誤差を最小にするために、未開封の真空密閉ガラスアンプルからCFAを受けた(同一比活性のCFAを確実にした)。

【０１００】

切開術後疼痛モデル

術後疼痛をモデル化するために、確立されたラットの切開モデルを使用した。簡単に述べると、オス及びメスのラットを、実験群又は対照群のいずれかにランダム化した。手術の日に、動物を麻酔し、腹臥位に置いた。動物は、手術水準の麻酔下におかれた後、脂質付加ペプチド模倣体100μM(合計31.54μg)の足底内注射(200μL)を同側後足に受けた。その後、動物をそのホームケージに戻し、回復させた。同一日に、プレ注射の6時間後、動物を麻酔し、腹臥位に置き、切開損傷のための準備をした。クロルヘキシジン、70%エタノール、及びヨウ素の連続スワブを使用して、同側後足を消毒した。次に、サイズ10のメスを使用して、1cm長の切開部を同側後足の足底表面に形成した。短い、安定したストロークを使用して、後足の皮膚、筋膜、及び筋肉を介して切開を行った。切開に続いて、脂質付加ペプチド模倣体を100μM(7.885μg/注射)含む2つの50μL注射を、切開された足底筋肉の各「半分」に注射した。筋肉への注射に続いて、6/0シルク縫合糸(Ethicon)を使用して連続的に(縫合糸が外れにくいように)皮膚を縫合した。縫合が終了すると、脂質付加ペプチド模倣体を100μM(3.9425μg/注射)含む4つの25μL注射を、切開に隣接する「クワドラント」に注射した。最後に、動物をそのホームケージに戻し、少なくとも16時間回復させた。

【０１０１】

熱感受性試験

試験前に、毎日1時間動物を試験室に慣らした。動物を、囲まれた高い位置にあるすりガラスプラットフォーム(Ugo Baseline)上に置き、30分間慣らした。探索行動が止まると、動物の後足の下で自動Hargreaves装置を操作した(Ugo Baseline)。PWLは、後肢毎の4回のトライアルの平均として計算した。トライアル間に適切な回復時間を設けるために、各トライアルに続いて5分間の潜時を設けた。

【０１０２】

機械的感受性試験

毎日、動物を、囲まれた高い位置にあるワイヤメッシュプラットホーム(Ugo Baseline)上に置き、1時間放置してその囲いに慣らした。Touch Test(登録商標)Sensory Probes(Stoelting)を、マウスの対側及び同側後足の足底表面に適用した。機械的痛覚試験のための簡略化Up-Down法(SUDO)に従って、フィラメントを、小さい順又は大きい順に適用した。手短に言えば、一連のフィラメントのうち中間フィラメントを、動物の後足に押し付けた。反応があった場合、一連のフィラメントのうち、次に小さいフィラメントを押し付けた。反応がなかった場合、一連のフィラメントのうち、次に大きいフィラメントを押し付けた。このフィラメントプレゼンテーション法は5回繰り返され、5回目のフィラメントプレゼンテーションが最後である。次に、フィラメント値に調整係数を加え、一連の変換式を利用して、足を引っ込める(逃避行動)に至る力を算出した。動物の各足に、フィラメントプレゼンテーション間に5分間の潜時を与えて、足の鋭敏化機会を減少さ

せた。

【０１０３】

ラットの機械的感受性試験を、自動化Dynamic Plantar Aesthesiometer(Ugo Basile)を用いて行った。ラットを、ワイヤメッシュプラットフォーム上の高さのある囲いの中に置いた。各試験日に、ラットを1時間、部屋及びチャンバーに慣らした。試験はマウスと同様の方法で行ったが、ミラーを付けた自動プローブを使用した。プローブは、20秒のスパンにわたって50グラムの最大押上げ力を発揮するように設定された。応答を誘発するのに必要な力(プローブから足をすぐ離すことによって測定される)をトライアルとして記録した。鋭敏化を最小限にするために、各動物に、記録と記録との間に少なくとも5分間を与えた。各後足を動物当たり合計5回試験した。

【０１０４】

免疫蛍光染色

動物組織は、既報のように、標準経心腔的灌流プロトコルに従って採取した。染色のためのスライスは、DRG(マウス及びヒト)に対して15ミクロン、後足のために50ミクロンで作製した。マウスDRG(mDRG)組織を、帯電したSuperfrost顕微鏡スライド(Fisherbrand)に固定した。切片を最初にPBSで3回洗浄し、次いでブロッキング培地(PBS中、10％正常ヤギ血清、3％ウシ血清アルブミン、及び0.025％Triton X-100)中で一晩インキュベートした。翌日、スライドを一次抗体(マウス抗-CGRP；1：500 Abcam、ウサギ抗-AP2α2 1：500 Abeam)中で一晩インキュベートした。翌日、スライドを二次抗体(ヤギ抗-ウサギ546 1：1000 Invitrogen、ロバ抗-マウス488 Abcam)と共にインキュベートした。翌日、スライドをPBSで3回すすぎ、室温で2時間、IB4-647コンジュゲート(Invitrogen)と共にインキュベートした。その後、スライドを2回以上すすぎ、ProLong™ Glass Antifade Mountant(Invitrogen)を用いてマウントした。

【０１０５】

ヒトL5後根神経節(hDRG)をAnabiosから購入した。ドナーは49歳の女性であり、過去の病歴は平凡であった。hDRGがドナーから採取され、身元情報が研究者にシェアされていないので、この研究は、バッファロー大学の内部審査委員会によって、免除と認定を受けた。hDRGは、最初はホルムアルデヒド中に保存され、70％エタノール中のドライアイス上で輸送された。到着すると、hDRGは、PBS-対-水(この比は減少する)中で順次再水和された：50％PBS中で24時間、次いで30％PBS中で24時間。再水和に続いて、hDRGを4℃にて30％スクロース中で凍結保護し、組織凍結培地(Electron Microscopy Sciences)中に浸漬し、ドライアイスで冷却した2-メチルブタンを用いて凍結した。得られたブロックが完全に凍結した後、それらを-80℃の冷凍庫に48時間置いた。凍結切片を取り出し、帯電したSuperfrost顕微鏡スライド上にマウントした。hDRGを、同じ抗体濃度を使用して、mDRGについて上述したのと同様の方法で薄片とし、染色した。

【０１０６】

後足を浮遊性切片として染色し、DRG組織について記載したのと同様の方法でプローブした。適用可能な場合、以下の一次抗体を使用した：マウス抗-HA一次抗体(1：500 Abcam)、及びマウス抗-CGRP(1：500 Abcam)。両方の例で用いた二次抗体は、ヤギ抗-マウス555二次抗体(1：1000 Abcam)であった。二次抗体を洗浄した後、これらの切片を、量を増加したチオジエタノール(TDE)中でインキュベートした。TDEは、蛍光シグナルの浸透を助ける組織透明化剤として作用する。第一インキュベーションは、1：1のPBS-$ddH_2O$溶液中の10％TDEからなった(一晩)。第二インキュベーションは、1：1のPBS-$ddH_2O$中の25％TDE中であった(一晩)。第三インキュベーションは、1：1のPBS-$ddH_2O$中の50％TDE中であった(一晩)。最終インキュベーションは、1：1のPBS-$ddH_2O$中の97％TDE中であった。最終TDE浸漬後、切片を、1：1のPBS-$ddH_2O$で1回すすぎ、ProLong™ Glass Antifade Mountantを使用して、帯電したSuperfrost顕微鏡スライド上にマウントした。

【０１０７】

全てのスライドを24時間放置して、イメージングの前に4℃に設定した。全ての画像

は、sCMOS Leicaカメラ(Lieca)を備えたLeica DMi 8倒立蛍光顕微鏡を用いて取得され、THUNDER対応LAS Xイメージングソフトウェアを搭載したHP Z4 G4 Workstation(HP)に接続された。全ての画像は、LAS Xイメージングソフトウェアをロードした別個のHP Z4 G4ワークステーションを用いて分析した。画像はエクスポートされ、ImageJ(NIH)を用いてさらに改変され(すなわち、スケールバーの付加、ヒートマップ変換)、Adobe Illustrator(Adobe)を用いてファイルにコンパイルされた。

【０１０８】

電気生理学

ガラス電極を垂直ピペットプラー(Narishige Group)を用いて引っ張り、5～8MΩの抵抗となるよう火炎ポリッシュした。電流-クランプ記録は、スクランブル対照shRNA又はα2標的化shRNAのいずれかをインビボトランスフェクトされたマウスからの分離成体DRGニューロンで実施された。成体マウスニューロンは、先に記載したように分離した。電気生理学的実験は、前述のように行った。分離したニューロンを、Alexa fluor-488コンジュゲートIB4(Invitrogen I21411)と共に5分間インキュベートし、記録を開始する前に滅菌PBSで3回洗浄した。非蛍光性の小及び中サイズDRGニューロンのみが記録された。閾値超刺激(400pA／1000ms)を注入することによって、発火頻度を調べた。124mMのグルコン酸カリウム、2mMの$MgCl_2$、13.2mMのNaCl、1mMのEGTA、10mMのHEPESからなるピペット溶液を用いた(pH7.2)。140mMのNaCl、5.4mMのKCl、1mMの$CaCl_2$、1mMの$MgCl_2$、15.6mMのHEPES、及び10mMのグルコースからなる浴液を用いた(pH7.4)。全てのデータを、Multiclamp-700B(Molecular Devices)を用いて取得し、デジタル化し、2kHzで濾過した。データの取得をpClamp10.2を使用してモニターし、制御し、Clampex(Molecular Devices)を用いて分析した。

【０１０９】

ウエスタンブロット分析

総タンパク質を、実験後の動物から採取したDRG組織から採取した。DRGを、プロテアーゼ阻害剤(Sigma)を含有する冷却RIPA緩衝液中で均質化し、必要になるまで-80℃で保存した。全ての試料をMini-PROTEAN TGX Precast Gel(Bio-Rad)上で泳動し、0.45μmニトロセルロース膜(BioRad)に移した。ウサギ抗-AP2α2(1：1000、Abcam)又はウサギ抗-β-アクチン(1：1000、Sigma)を用いて、5%ウシ血清アルブミン(BSA)(lxトリス緩衝生理食塩水-tween(TBST)で調製)中で、膜を4℃にて一晩プローブした。翌日、膜を3回洗浄し(lx TBST中で5分間)、その後、5%BSA(1x TBST溶液中)で調製した二次抗-ウサギ西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗体(1：5000；Promega)中で、室温にて1時間インキュベートした。二次抗体インキュベーションの後、膜を4回以上洗浄し(洗浄1回当たり5分間)その後、現像し、画像化した。バンドを、Chemidoc Touch Imaging System(Bio-rad)にて増強化学発光で可視化し、Image J Software(NIH)で定量した。各実験を少なくとも3回繰り返した。

【０１１０】

統計

全ての統計試験は、Prism(GraphPad)を用いて行った。データは平均±s.e.m.で示される。動物実験について検出力分析を行い、0.05に設定されたα値で検出限界を達成した。統計的有意性は、全ての実験についてp値＜0.05を用いて決定された。特に断らない限り、全ての統計学的分析のために、必要に応じて、複数回の比較及びストリンジェントなボンフェローニ補正を伴う反復測定二元配置ANOVA統計試験、Holms-Sidak補正を伴う一元配置ANOVA、及びスチューデントt検定を使用した。タウ解析は、以下の式を用いて行った：

【数１】

$W(t) = (W_0 - p)e^{-kt+p}$

式中、「$W_t$」は所定の時間「t」での逃避反応閾値、「$W_0$」は「t=0」での逃避反応閾値、「p」はプラトー値、「k」は速度定数、「t」は時間(日)である。

**無限に近いτ値を防止するために制限が付された；$W_0$＞1、及び、p＜16。**
**二相減衰フィッティングについて、以下の式を用いた：**
**【数２】**

数２

$W(t) = p + Fe^{-at} + Se^{-lt}$

($W_t$：所定の時間「t」での逃避反応閾値、F：速い減衰成分 [$F=(W_0 - p)F_p$]、S：遅い減衰成分 [$S=(W_0 - p)(1 - F_p)$]、$F_p$：速い相による逃避反応閾値のフラクション、$W_0$：t＝0での逃避反応閾値、p：プラトー値、a；速い速度定数、l：遅い速度定数、t：時間(日))

**【０１１１】**
**結果**
**【０１１２】**
**ＡＰ２α２は、ＤＲＧニューロンを含有するＣＧＲＰにおいて優先的に発現される。げっ歯類後角の表在性薄層中のＡＰ２α２の以前の免疫学的標識は、侵害受容器におけるＡＰ２α２の推定上の差次的発現を示唆した。これを解決するために、ｍＤＲＧニューロンを、ＡＰ２α２、ＣＧＲＰ及びＡｌｅｘａ ｆｌｕｏｒ-コンジュゲートＩＢ４に対する抗体でプローブした。興味深いことに、ＣＧＲＰとＡＰ２α２との間の強力な免疫蛍光共局在が観察されたが、その一方、ほとんどのＩＢ４$^+$ニューロンは、ＡＰ２α２を発現しなかった(図７Ａ)。ＡＰ２α２とＣＧＲＰとの重複免疫反応性は、ＩＢ４$^+$ニューロンにおける免疫反応性の欠如と並んでおり、ＡＰ２α２が、ペプチド作動性ＤＲＧニューロンシグナル伝達に関与することを示唆し、それを疼痛の間の熱感受性と関連付ける。**
**【０１１３】**
**インビボＤＲＧニューロンのＡＰ２α２ノックダウンは、末梢侵害受容器興奮性を調節し、急性炎症性疼痛行動を減少させる：**
**ＣＧＲＰ発現は、一過性受容体電位バニロイド１(ＴＲＰＶ１)イオンチャネルのロバストな共発現のために、熱的侵害受容器に対する強力なマーカーである。ＴＲＰＶ１は、主として、侵害性の熱及び化学的感覚並びに酸性ｐＨに対する侵害受容器応答を支配することが知られている。炎症誘発性の進行性疼痛は、それゆえ、ＴＲＰＶ１侵害受容性線維によって駆動される。ＡＰ２α２及びＣＧＲＰの高度な共発現の観察は、ＡＰ２α２が熱的及び化学的応答性に寄与することを示唆した。これを試験するために、ＡＰ２α２に対するｓｈＲＮＡの片側注射を、Ｃ５７ＢＬ/６マウスの坐骨神経に行った。これは、ｓｈＲＮＡ注射後７日目にＡＰ２α２タンパク質発現レベルを有意に減少させ(図７Ｂ及び７Ｃ)、これらのマウスからの分離成体ＤＲＧニューロンにおけるＰＫＡ誘導性過剰興奮を低下させるのに十分であった(図７Ｄ)。分離対側ＩＢ４$^-$ＤＲＧニューロンは、対照条件下で発火順応を示した(ｎ＝１０；１０のうち２のみが、２を超える活動電位を示した。図７Ｄ上部)。スクランブルｓｈＲＮＡ動物から培養された同側ＩＢ４$^-$ＤＲＧニューロンは、ＰＫＡ刺激条件下で、発火順応の典型的な欠落を示した(ｎ＝７；５/７が過興奮性、図７Ｄ中間)。ＡＰ２α２ ｓｈＲＮＡ動物から培養された同側ＤＲＧニューロンは、発火順応を示した(ｎ＝９；２/９が過興奮性、図７Ｄ下部)。**
**【０１１４】**
**インビボＤＲＧニューロンのＡＰ２α２ノックダウンの行動帰結を、まずホルマリン急性炎症性疼痛アッセイを用いて評価した。このアッセイの二相の性質は、明確な神経生理学的変化に対して観察される行動的影響の区画化を提供する。ＡＰ２α２のＤＲＧニューロンノックダウンは、一過性の第Ｉ相疼痛様行動を変化させなかったが(図７Ｅ)、有意な減少が、炎**

症第II相の足のリッキング(スクランブルshRNA 406±70；AP2 shRNA 193±73)及びリフティング挙動(図7E、スクランブルshRNA 246±23；AP2 shRNA 99±43)において観察された。さらに、動物の安静時挙動に経時的変化が観察された(図7F)。観察開始時に、第I相では、両方の群が、痛みの兆候である、足のリッキング挙動の増加を示した(図7Fの左側)。しかしながら、第II相の開始時に、スクランブルshRNA群は足のリッキング挙動を行い続け、その一方、AP2α2 shRNA群は毛づくろい挙動を行った(図7Fの中央)。最後に、観察の終了時に、スクランブル群は足のリッキング挙動を継続し、その一方、AP2α2群は探索行動を示し始めた(図7Fの右)。

【０１１５】

慢性炎症性疼痛に対するAP2α2の寄与を評価するために、完全フロイントアジュバント(CFA)の足底内注射を行った。CFAは、免疫細胞の動員及び活性化を介して疼痛及び局所的炎症を誘発する。このモデルを使用して、慢性炎症性疼痛シグナル伝達の発生(炎症前AP2ノックダウン、図8A)及び維持(炎症後AP2ノックダウン、8C)におけるエンドサイトーシスの寄与及び維持を評価した。炎症前状態では、対照動物(n＝11)は、CFA注射後24時間、熱刺激に対する感受性を示したが(2.3±0.2s)、AP2α2群(n＝12)は、CFA注射後の熱感受性が低下していた(4.2±0.8s)。PWLの差は、両方の群が熱感受性の完全な回復を示すまで、実験期間中に持続した。shRNA媒介AP2α2ノックダウン実験を、炎症後に行った(図8C)。AP2α2ノックダウン動物(n＝8、5日：7.0±0.6s；9日：7.5±0.6s；13日：8.1±0.8s)は、対照shRNA動物(n＝8、5日：6.2±0.7s；9日：5.2±0.5s；13日：5.4±0.8s)と比較して、より迅速に回復した。ペプチド作動性ニューロンにおけるAP2α2の局在化のために、ノックダウンが機械的感受性を変えることは期待されなかったが、驚くべきことに、AP2α2が先制的にノックダウンされた場合には、機械的感受性のわずかな低下が、13日目に観察された(図8B)。対側の機械的応答性データが図13に示される。これらのデータは、DRGニューロンのAP2α2ノックダウンが、炎症の間の熱的及び機械的感受性の両方に必要な神経可塑性プロセスを妨害することを示唆した。

【０１１６】

脂質付加ペプチド模倣体は、齧歯類の後足の脂質コンパートメントに局在化する：

低分子ミリストイル化ペプチドは、侵害受容器の末端を標的化し、疼痛行動を改変するために、以前にも使用されている。低分子脂質付加ペプチドは、細胞の内部にアクセスするフリップフロップ機構によって膜を横断することができる(図4)。どのようにして脂質付加ペプチドが侵害受容性神経末端に入り、投与後に細胞及び組織中に残存しうるかを探求した。脂質付加AP2抑制ペプチドの使用も記載される。インフルエンザ血球凝集素(HA)タンパク質(HA-ペプチド)の脂質付加バージョンを作製し、その局在化を免疫細胞化学により可視化した。HA-ペプチドがCHO細胞の膜中に埋め込まれ、強固な膜標識をもたらすことが見出された(図14)。これは、以下の実験の条件を考慮すると驚くべきことであった；HA-ペプチドに3時間暴露し、続いて一連の洗浄及び培地交換を行った。長時間にわたるHA免疫反応性の持続(少なくとも72時間)は、同様に驚くべきことであり、これは、低分子脂質付加ペプチドが、有糸分裂のような大きな細胞事象の間、安定度を維持することを示唆した。脂質付加ペプチドの持続性は、培養DRGニューロンにおいても同様に観察され、最初の適用及び一連の培地変化後72時間検出された(図14)。

【０１１７】

次に、脂質付加HA-ペプチドが、インビボで適用されたときにも、同様に安定性を示すかどうか、及び炎症がペプチドの吸収及び分布に影響を及ぼすかどうかを判定した。HA-ペプチドをマウスの後足に注射すると、真皮及び脂質密コンパートメントでロバストなHA免疫反応性が生じ、一方、表皮及び筋肉は、局所注射の24時間後に弱い免疫反応性を示した(図9A)。真皮中の神経様線維中のHA免疫反応性の存在(図9A-1)が示され、同様に筋組織(図9A-2)が示される。神経様線維に局在化した筋肉中のHA-ペプチドの存在は、脂質付加ペプチドが、線維の長さに沿って横方向に拡散できることを示唆した。同様の分布パターンが、炎症状態下でも観察された(図9B)。非炎症条件下で、真皮(図9B-1)及

び筋肉(図９Ｂ-２)を神経支配する神経様線維のかなりの標識が観察された。炎症条件下では、より強いグローバルな免疫反応性(図９Ｂ”)が観察された。

【０１１８】

AP2抑制ペプチドは、炎症の間の疼痛行動を減弱させた：

炎症の間の末梢侵害受容器求心性神経におけるエンドサイトーシスの薬理学的阻害の意義を、低分子脂質付加ペプチドAP2-CME阻害剤を用いて評価した。N-末端にミリストイル部分が結合しているヒトCD4ジ-ロイシンモチーフ由来の短いペプチド(表1)を、ホルマリン投与の24時間前に、片側性に注射した。このペプチド配列は、AP2複合体に対して高い親和性(650nM)を有することが示された。脂質付加AP2抑制ペプチドの単回注射は、第II相の足リッキング挙動(累積)のロバストな減少を生じ(スクランブルペプチド n＝6、184±22；AP2抑制ペプチド n＝6、89±23)、その一方、他の疼痛様行動の程度は比較的変わらなかった(図10A)。この挙動の代表的なビデオが参照のために提供される。このことから、AP2α2ノックダウン実験で観察された疼痛行動の減少のいくつかが再現され、局所的な侵害受容器エンドサイトーシスが、炎症性疼痛の発生に関与するという前提を強化した。

【０１１９】

確立されたCFA誘発性炎症性疼痛の間のAP2抑制ペプチドの鎮痛ポテンシャルを調査した。最初に、CFA炎症が24時間誘発され、次いで、シンプルな単回用量注射で、炎症を起こした足にペプチドが直接送達された。AP2抑制ペプチドのこの単回注射は、4日間続くPWLの持続的な増加を生じ(n＝8、1日：2.2±0.3s；2日：6.1±0.8s；3日：7.3±0.6s；5日：8.3±0.7s；9日：8.0±0.6s)、その一方、スクランブルペプチド群(n＝8、1日：2.4±0.3s；2日：3.8±0.5s；3日：3.8±0.4s；5日：5.5±0.6s；9日：7.0±0.8s)は、このアッセイのステレオタイプの熱応答性回復曲線を示した(図10B)。興味深いことに、性別によってデータを分けた後、鎮痛の開始に予想外の性依存性経時的コンポーネントが認められた(図10C及び10D)。オスマウス(スクランブルペプチド；n＝4、AP2抑制ペプチド；n＝4)では、ペプチドに対するより即時的な応答があり(図10C)、一方、メスマウス(スクランブルペプチド；n＝4、AP2抑制ペプチド；n＝4)は、行動の開始が遅かった(図10D)。曲線下面積(A.U.C.)の定量は、グループ化された動物が、AP2抑制ペプチドで鎮痛を経験したことを明らかにし(図10E)、及びデータを分離することは、AP2抑制ペプチドがオス(図10F)及びメス(図10G)の両方で鎮痛様効果を生じることができたことを明らかにした。熱回復における性別差をさらに理解するために、回復率を時定数として表現する方法が考案された。熱感受性はCFAモデルにおいて時間依存性回復を示すため、スクランブルペプチド群の回復相(1日～11日)が、熱感受性の自力回復の尺度として選択された。この曲線を一次指数関数的減衰方程式にフィッティングすることにより、時定数タウ(τ)が算出された。非慣習的であるが、タウの定量化は、単回用量投与後の熱回復のキネティクスのより包括的な理解を可能にし、これは臨床的に関連する新規鎮痛薬の開発にとって重要である。AP2抑制ペプチドの適用は、対照($\tau_{対照}$＝4.82；図10H)と比較して、より迅速な熱感受性の回復($\tau_{AP2}$＝2.21)をもたらした。性別による元データの分離は、スクランブル及びAP2抑制ペプチド群の両方における炎症の間のオスとメスの回復の間の差異をカバーしなかった；オスのマウスは、τのロバストな減少を経験し(図10I、$\tau_{対照}$＝6.45、$\tau_{AP2}$＝2.04)のロバストな減少を経験し、一方、メスのマウスはτの小幅な減少を示した(図10J；$\tau_{対照}$＝3.23、$\tau_{AP2}$＝2.40)。AP2抑制ペプチドの投与は、機械的感受性に、わずかに影響を与えただけであった(適用の24時間後に有意差付近に達する)。他の全ての時点では区別がつかず、このことは、エンドサイトーシスの薬理学的阻害が、主に熱感受性を標的とするが(図10L)、機械的感受性に対して、派生的な間接的影響を有し得ることを示唆する。

【０１２０】

化学的誘発性炎症に加えて、損傷誘発性炎症/ラット術後疼痛モデルにおけるAP2抑制ペプチドの鎮痛ポテンシャルも探究された。前臨床的切開モデルは、術後相初期の間の薬理学的治療の有効性を決定するのに有用である。このアッセイのために、潜在的な臨床適

用スケジュールを、AP2抑制ペプチドのためにシミュレートした；切開の6時間前に、ラットの後足へ皮下投与を行った後、切開直後に、一連のより少ない皮下及び筋肉内注射を行った(図11A)。AP2抑制ペプチド(n＝12)の適用は、スクランブルペプチド(n＝8；図11B)と比較して、熱感受性の著明な及び長期持続性の低下を生じた。以前のモデルと同様に、AP2抑制ペプチドは、単回適用に続く実験の持続時間の間、熱感受性閾値を増加させることができた(スクランブルペプチド 1日：5.7±0.4s；2日：6.4±0.4；3日：7.4±0.5s；4日：7.4±0.5s；5日：8.3±0.6s；6日：8.6±0.5s；7日：11.7±0.6s；8日：11.4±0.4s；9日：12.0±0.6s vs AP2抑制ペプチド 1日：8.4±0.4s；2日：9.0±0.3；3日：10.4±0.5s；4日：10.4±0.6s；5日：11.4±0.5s；6日：11.0±0.6s；7日：12.1±0.6s；8日：11.5±0.5s；9日：12.0±0.5s)。CFAモデルで記載されているように、データを性別によって分けた後、AP2抑制ペプチドに対する明らかな性別依存性応答が観察された。第一に、スクランブル群において、オスは、損傷の24時間後にメスよりも速い逃避反応を示した(図16)。第二に、オスのラットは、オスのマウスについて同様に報告されたように、切開損傷後に進行性回復を示し、一方、メスは6日に亘って比較的一定の熱応答性を示し、その後7日目にベースラインに迅速に戻る(図11D、図17)。AP2抑制ペプチドが注射されたオスラットでは、熱感受性が有意に低下するが、比較的類似した回復パターンが観察された(図11C)。注目すべきことに、メスでは、AP2抑制ペプチドは、3日目という早期でベースラインに戻る熱応答性を生じた(図11D)。A.U.C.の定量は、AP2抑制ペプチドが、スクランブルペプチドと比較して、A.U.C.を増加させることができる(鎮痛様効果の指標)ことを明らかにした(図11E)。この効果は、性別に基づいてデータを分離する場合に保存された；AP2抑制ペプチドは、オス(図11F)及びメス(図11G)の両方で鎮痛様効果を生じた。さらに、AP2抑制ペプチドは、切開後の回復率を増加させることができた(図11H；$\tau_{対照}$＝9.09、$\tau_{AP2}$＝3.37)。このパラメータでは、両方の性別で、回復の増大が示された(オス：図11I；$\tau_{対照}$＝7.46、$\tau_{AP2}$＝2.70、メス：図11J；$\tau_{対照}$＝11.72、$\tau_{AP2}$＝5.28)。熱感受性に対する有意な影響があったが、同側の機械的感受性には有意な変化はなかった(図11K)。

【０１２１】

他のヒトタンパク質から誘導されたジ-ロイシンベースのペプチドの有効性を試験したところ、種々の防衛挙動において、配列依存性の減少が観察された(図18)。しかしながら、ホルマリンの最高濃度を受けることになるホルマリン注射部位の求心性神経は、固定、不活性化及び/又は減感を経験する可能性が高い。従って、ホルマリンアッセイは、求心性神経末端に浸透するように設計された脂質付加ペプチドの鎮痛ポテンシャルを、本質的に過小評価する。エンドサイトーシスの遺伝的及び薬理学的阻害は、浮腫を防止せず(図13及び15)、免疫細胞の活性化及び浸潤もなかった(図19)。

【０１２２】

AP2抑制ペプチドの足底内注射は、表皮の表層内に侵害受容器CGRPの滞留をもたらした：末梢侵害受容器求心性神経は、真皮及び表皮中の構造的に異なる組織層で終結することが以前に示された。具体的には、$CGRP^{+}$侵害受容器求心性神経は、有棘層で終結することが示された。非炎症性条件下での24時間のエンドサイトーシスの局所阻害は、顆粒層(SG)の非常に遠位の層におけるCGRP免疫反応性の可視化をもたらし(n＝3マウス)、CGRPの色調放出が減少したことを示した(図12)。これらのデータは、CGRP侵害受容器求心性神経は、実際には、以前に考えられていたよりも真皮中でより表面的に遠くまで延びていることを示唆している。しかしながら、CFA誘発性炎症の確立後24時間目にAP2抑制ペプチドを投与した動物では、末梢線維におけるCGRP保持は観察されなかった(図20)。従来の研究は、末梢炎症に伴う最大痛覚過敏の期間中、一次求心性ニューロンからのCGRPの放出が増加し、それゆえ、CFAの24時間後に投与されたAP2抑制ペプチドは、末梢端においてCGRP免疫反応性を変化させるとは期待されないかもしれないことを示した。また、切開損傷後、免疫細胞の肉芽腫様クラスター化が観察され(以前に、CFA注射後に観察された)、免疫細胞協調の変化の可能性を示唆している；しかしながら、AP2抑制ペプチドは、損傷部位への免疫細胞の誘引を中断する形跡がなかった(図19)。使用

された疼痛モデルにおけるこれらの肉芽腫様アーチファクトの病態生理学的帰結は現在知られていないが、CGRPの放出が減少するためかもしれない。

【０１２３】

CGRP$^{+}$ニューロンにおけるAP2α2の差次的発現が、ヒトDRGでも観察された：ヒト及びマウスAP2α2は、～９８％のアミノ酸同一性(データは示さず)を共有し、このことはタンパク質機能を保存するための強力な進化的圧力を示唆する。ここで、我々は、AP2α2及びCGRPをプローブするhDRG免疫組織化学研究を実施し、hDRGも、CGRP$^{+}$ニューロン内でAP2α2の差次的発現を示すことを観察した(図１２D)。従って、ヒト炎症性疼痛も、AP2α2-媒介性侵害受容器エンドサイトーシスに依存すと思われ、脂質付加AP2抑制ペプチドによる薬理学的操作に役立つはずである。この研究における全てのAP2標的化ペプチドは、ヒトタンパク質由来の配列を利用した(表１)。

【０１２４】

考察

【０１２５】

非トランスジェニック動物における遺伝的及び薬理学的アプローチを使用して、シナプス外侵害受容器エンドサイトーシスの阻害が、炎症性疼痛様行動を有意に変化させることを実証した。侵害受容器は局所的に標的化され、将来の鎮痛剤の開発のための新しい道を開く長期持続性鎮痛を提供した。

【０１２６】

我々が行った、マウスDRGニューロンにおけるAP2α2発現の特性評価は、ペプチド作動性IB4$^{-}$ニューロンが、AP2α2を優先的に発現することを明らかにした(図7A)。ヒトDRGニューロン中でのCGRPとの高レベルの共発現(図12D)も観察され、これは、AP2α2がCGRP$^{+}$侵害受容器シグナル伝達に関与することを示唆した。CGRP$^{+}$侵害受容器は、大型有芯小胞(LDCV)中に神経ペプチドをパッケージする。それらは、$Ca^{2+}$依存的様式で放出され、炎症、痛覚及び免疫細胞活性化を増強する。また、LDCVは、膜への融合の際に完全に崩壊し得る。ロバストな膜修復機構、すなわちエンドサイトーシスが、神経ペプチド放出後、さらなるLDCV放出を可能にするために必要とされるであろう。シナプス小胞膜修復におけるAP2-CMEのメカニズムは、シナプス小胞放出後、膜をリサイクルすることが十分に確立されている。IB4$^{-}$ニューロンにおけるシナプス外AP2α2の優先的発現は、シナプスの外側で生じるLDCV放出後の膜修復の特異的な依存関係に起因すると思われる。AP2抑制ペプチド注射後の真皮のSG層における顕著なCGRP免疫反応性(図6)は、疼痛様行動の変化が、CGRP放出機構の破壊に部分的に起因することを示唆した。エンドサイトーシスのエキソサイトーシスからのデカップリングは(使用される遺伝的又は薬理学的手段を通じた)、膜ホメオスタシスを破壊し、膜局在化受容体シグナル伝達(すなわち、TrkA)、イオンチャネル輸送、及びペプチド作動性シグナル伝達に負の影響を与えるはずである。その結果、動物は、急性及び慢性炎症性疼痛モデルにおいて、疼痛様行動の強い減弱を示した(図7D、8、１０、１１)。機械的感受性に対して観察された効果は、炎症の間の機械的及び熱的感受性の協調におけるペプチド作動性ニューロンを示唆する以前に公表された研究を裏付ける。しかしながら、機械的感受性に対する我々の効果の程度は、末梢ニューロンからのCGRP放出が機械的感受性の発生に間接的に寄与することを示唆する。

【０１２７】

さらに、膜局在化された$K_{Na}$チャネルの蓄積は、疼痛様行動で観察された変化にも寄与し得る。以前に、ニューロンエンドサイトーシスの阻害が、大コンダクタンスKcnt1(Slack)$K_{Na}$チャネルの膜保持をもたらし、これは培養DRGニューロンにおいてPKA-誘導性過剰興奮性の欠如を引き起こしたというエビデンスが得られた。AP2α2から急速に分離したニューロンにおいても(インビボノックダウン)、我々は、PKA-誘導性過剰興奮性の欠如を見出した(図6C)。エンドサイトーシスを伴わないLDCVの持続性エキソサイトーシスはまた、膜Kcnt2(Slick)チャネルの増加を引き起こす可能性があり、他の大コンダクタンス$K_{Na}$チャネルは、LDCVを含むCGRPに局在化されていることが示された。我々

は、AP2抑制ペプチドの注射後、CFA-誘発性熱感受性の有意な減少を観察し(図10B、C)、これは、進行中のエンドサイトーシスをブロックすることが(本格的な神経因性炎症の後でさえ)(図20)、ニューロン興奮性を変化させることを示唆している。実際に、DRGニューロンにおけるKcnt2チャネルの過剰発現は、活動電位形成を鈍らせることが示された。

【0128】

抗原性脂質付加ペプチド模倣体(HA-ペプチド)を用いて、我々は、非炎症状態(図9A)及び炎症状態(図9B)の両方における分子分配を示した。HA-ペプチドを代理として使用して、どのようにして低分子脂質付加ペプチドがニューロン求心性神経末端に浸透するかを理解した。両方の条件は、真皮におけるHA-免疫反応性を示し、一方、表皮及び筋肉組織は、シグナルを欠いているようであった。これらの知見は、脂質付加ペプチドが後足のこれらのコンパートメントから迅速に除去されたか、又は親水性細胞外マトリクスが、ペプチドの浸透を防止したことを示唆している。行動試験は、1回の注射後、インビトロでHA-ペプチドについて観察されたものと類似する長寿命を、脂質付加ペプチドがインビボで有することを示した(図14)。低分子脂質付加ペプチドの長寿命は、膜のターンオーバーキネティクスに依存するかもしれない。我々の脂質付加AP2抑制ペプチドの注射は、他のFDA-認可済み脂質付加ペプチドの現在の臨床的投与に同調している。例えば、デュラグルチド(Trulicity登録商標)及びセマグルチド(Ozempic登録商標)は、糖尿病を治療するために皮下注射される(時に毎日)異なる脂質付加グルカゴン様ペプチド1(GLP-1ペプチド)である。GLP-1ペプチド(～30アミノ酸)は、ここに記載されるペプチドよりもかなり大きい。また、全身吸収及び長期安定性を達成するために、GLP-1ペプチドは、齧歯類に投与される脂質付加ペプチドの濃度より100～1000倍高い濃度で投与される。最小の全身吸収を有するであろう用量にて、末梢神経求心性神経を局所的に標的化することが想定される。しかしながら、AP2抑制ペプチド及び$Na_V1.8$チャネルを標的とするペプチドの両方を投与するには(図18)、さらなる調査が必要となる。

【0129】

また、2つの異なる炎症性疼痛モデルにおける、及び二種の動物における性依存性疼痛様行動も明らかにされた。これらの結果は、$CGRP^+$侵害受容器の長期持続的な薬理学的阻害、及び、熱応答性を解釈するための指数関数的減衰ベストフィットモデルの実現のためにのみ証明された。これにより、我々のAP2抑制ペプチドの効力を明らかにし、回復キネティクスを定量化することができる。しかしながら、性依存性の差異は、AP2抑制ペプチドが、炎症が発現する前又は炎症が確立した後に投与されたかどうかに依存した。CFAにより誘発された炎症の後、対照ペプチドを注射したオス及びメスの動物は、延長された熱痛覚過敏を示し、回復するのに多くの日数がかかった。AP2抑制ペプチドの注射は、オス動物において熱感受性の迅速な回復をもたらし、その一方、メス動物は遅い応答を示した。さらに、対照及びAP2抑制ペプチドに対するメスにおけるτ値は類似していた。回復キネティクスの比較は、AP2阻害剤がメスの動物にとって効果的ではなかったことを示したかもしれないが、A.U.C.分析は、両方の性について鎮痛が提供されたことを明らかにした(図10F及び10G)。対照的に、切開疼痛モデルでは、損傷及び炎症の発生前にAP2抑制ペプチドを与えた場合、回復τ値は、性別に関係なく、対照とAP2抑制ペプチドとの間でかなり異なった(図11I及び11J)。

【0130】

切開後疼痛モデルにおいて、従来の研究では、機械的感受性及びホットプレート評価における性差の欠如が見い出された。控えめな片側性の熱応答性を評価するために、Hargreaves法を使用することにより、性的二形疼痛応答を観察した。しかしながら、このモデルでは、6時間の後足プレ注射手順が含まれていた(図11C、11D、11I、11J；図17)。対照のオス動物は、後足の切開後に典型的な疼痛行動を示した(熱感受性の有意な増加と、それに続く線形に近い回復段階)。メスの熱感受性はオスよりも低く(図17)、有意までもう少し($p=0.08$)であった。より多くの動物が試験された場合、これらのデータは統計的有意性を達成したと考えられる。さらに、メス対照動物は、後足切開後に独特の行

動プロフィールを示した(熱痛覚過敏のプラトー。術後7日まで回復しなかった)(図11D)。回復は、一相ではなく、二相減衰式(データは示されていない)に最もよくフィットし、このことは、メスにおける切開疼痛による熱痛覚過敏が、オスと比較して複数のプロセスを利用することを示唆している。オスラットは、より速い切開後の回復時定数を有し(図11I、J)、これは末梢ベースのメカニズムの結果である可能性がある。対照的に、メスラットは、一旦それが始まると持続的な熱感受性を維持するために最適化された生理学的システムを有するように思われる。これは、末梢及び中枢メカニズムの両方の動員を示唆するであろう。同等レベルのCGRP mRNAにもかかわらず、三叉神経節、髄質及び脊髄内のCGRP受容体成分には性差がある。$CGRP^+$侵害受容器の長期間の阻害を通じて、熱痛覚過敏がどのように現れるかについての性差が明らかにされた。これらのデータは、ヒトにおける慢性炎症性疼痛及び術後疼痛の有症率及び強度の両方に、性差が存在するという考え方と一致している。

【0131】

末梢の侵害受容器求心性神経を標的とする治療薬の局所投与は、中毒を含む副作用を減少させるので、痛みを治療するためのより好ましいアプローチとなりつつある。例えば、改良された麻酔薬の局所注射は、疼痛軽減のためのオピオイド使用に代わる現行の代替物である。しかしながら、局所的に適用される薬物について、2つの主要な課題(特異性及び作用の持続時間)が残っている。進行中の損傷関連疼痛及び関連する炎症を有する患者のために、求心性神経線維の$TRPV1/CGRP^+$クラスを特異的に標的化することは、効果的な疼痛緩和を提供する上で重要であり得る。ここで、我々は、脂質付加ペプチド模倣体を使用して、特異的かつ長期持続性の疼痛行動の減少を実証し、これは、これらのタイプの分子を新しいクラスの鎮痛薬として位置付ける。

【0132】

本開示は、1つ以上の特定の実施形態及び/又は実施例を参照して記載されてきたが、本開示の他の実施形態及び/又は実施例が、本開示の範囲から逸脱することなく実施し得ることが理解されるであろう。

【図面】

【図１Ａ】

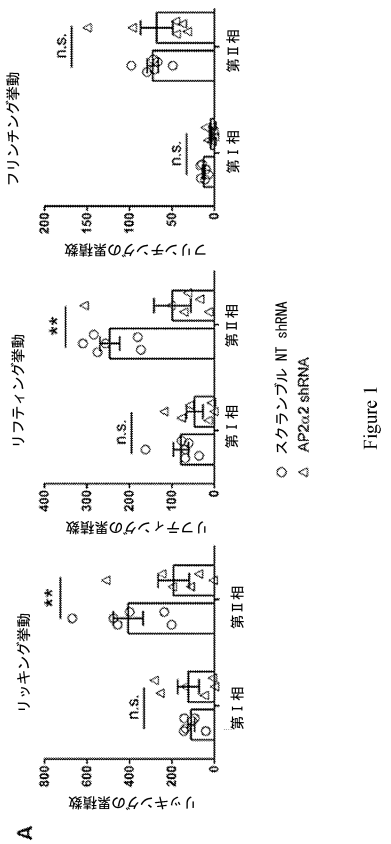


Figure 1

【図１Ｂ】

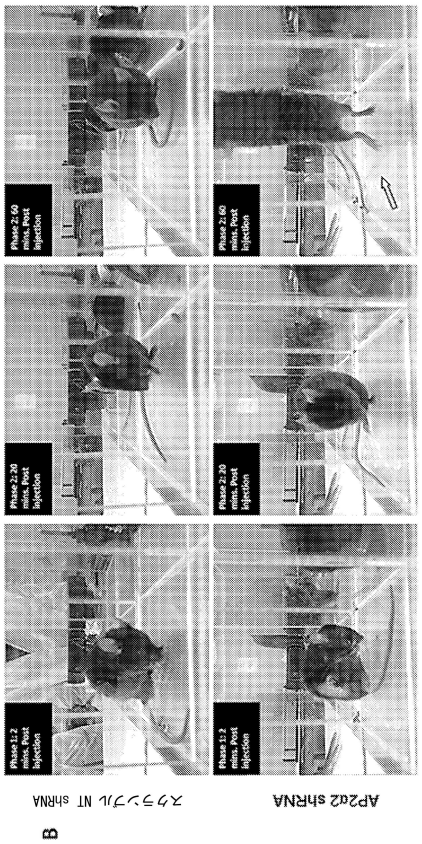


Figure 1 (continued)

【図１Ｃ】

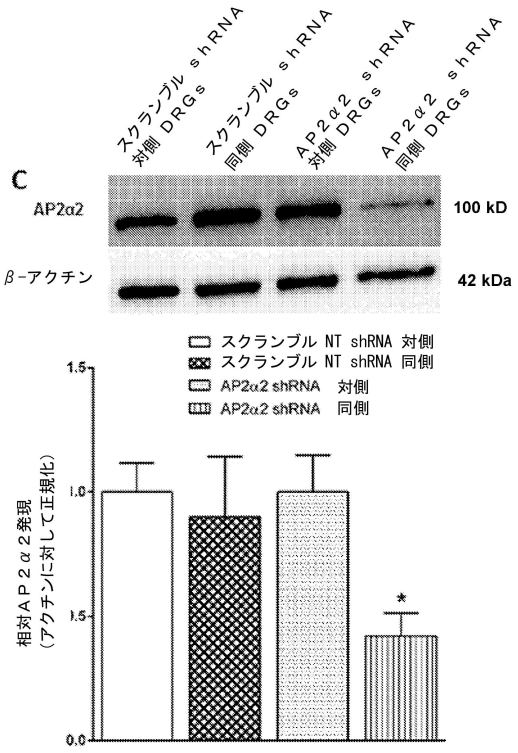


Figure 1 (continued)

【図２Ａ】

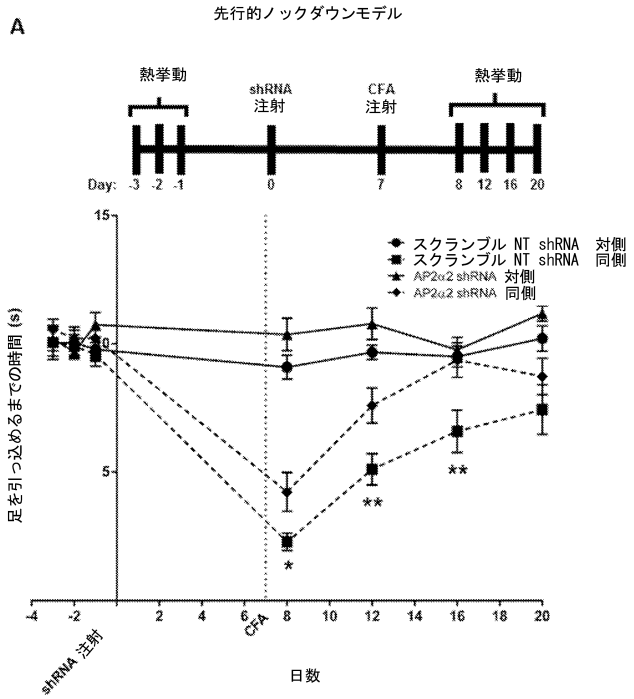


Figure 2

【図２Ｂ】

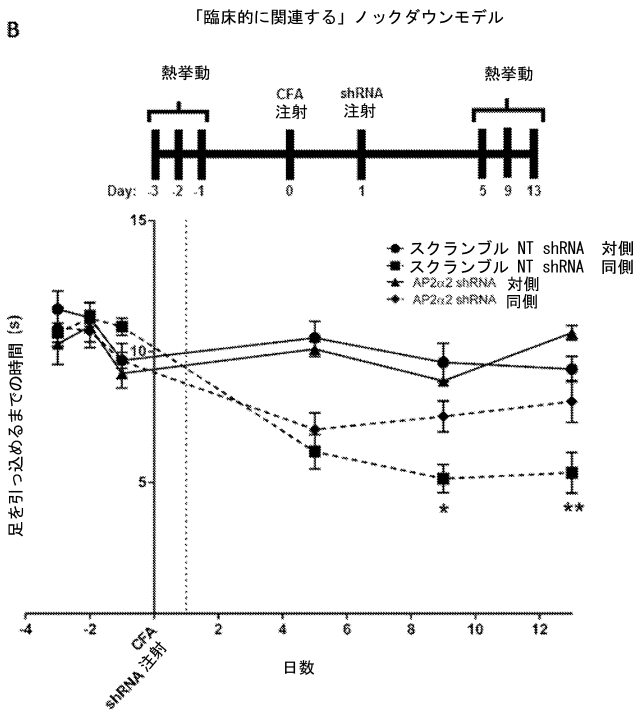


Figure 2 (continued)

【図３Ａ】

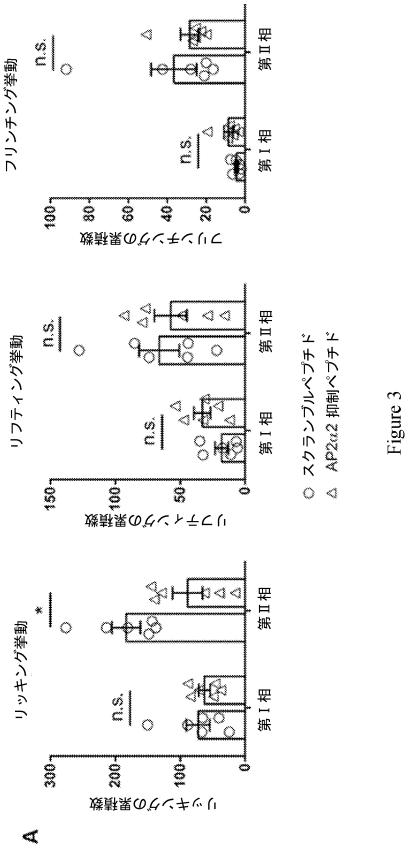


Figure 3

【図３Ｂ】

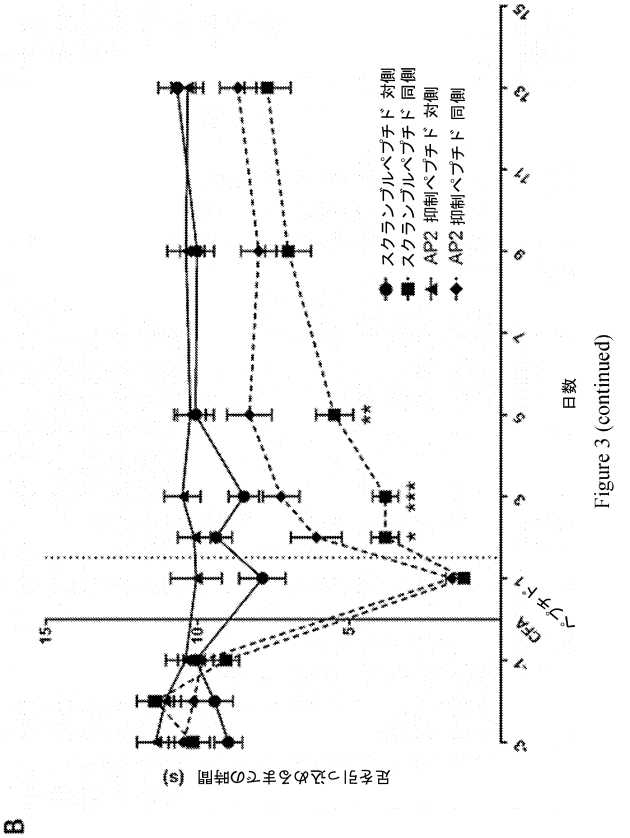


Figure 3 (continued)

【図３Ｃ】

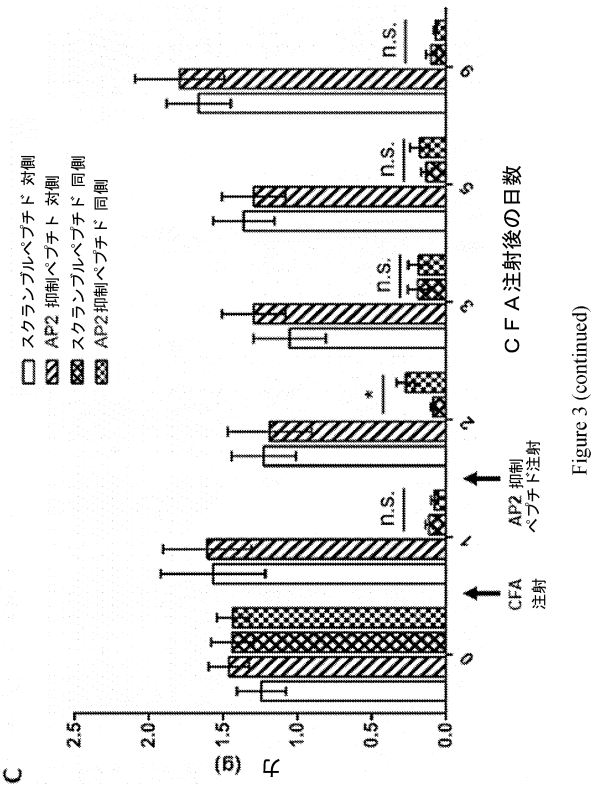


Figure 3 (continued)

【図４】

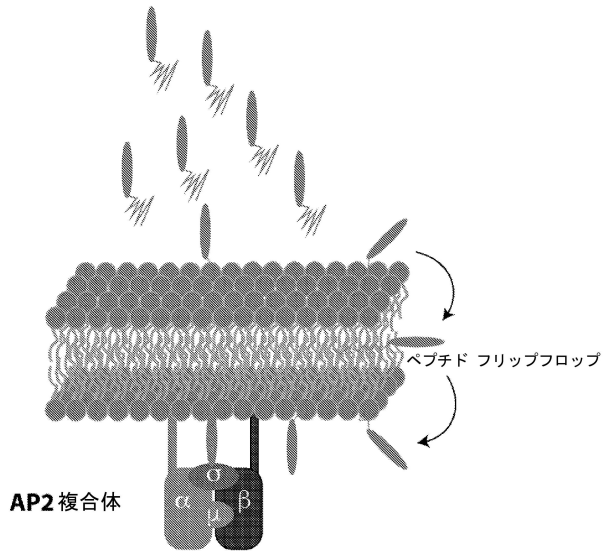


Figure 4

【図５】

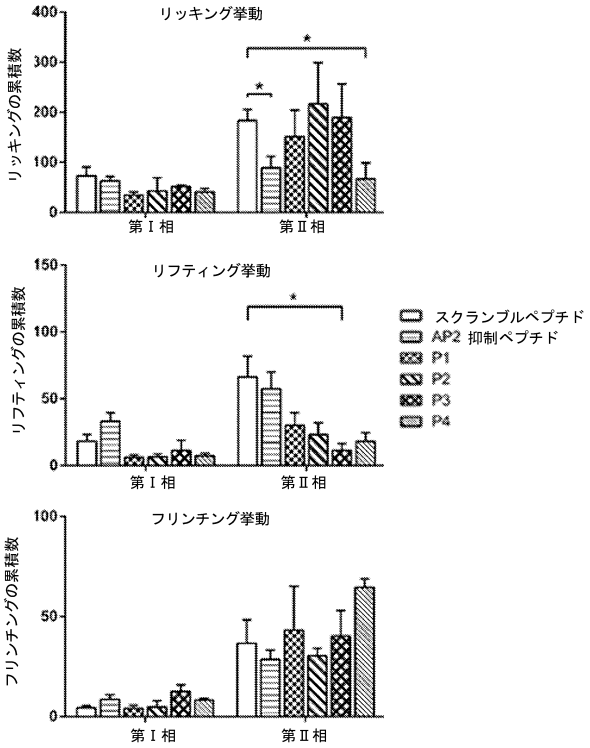


Figure 5

【図６】

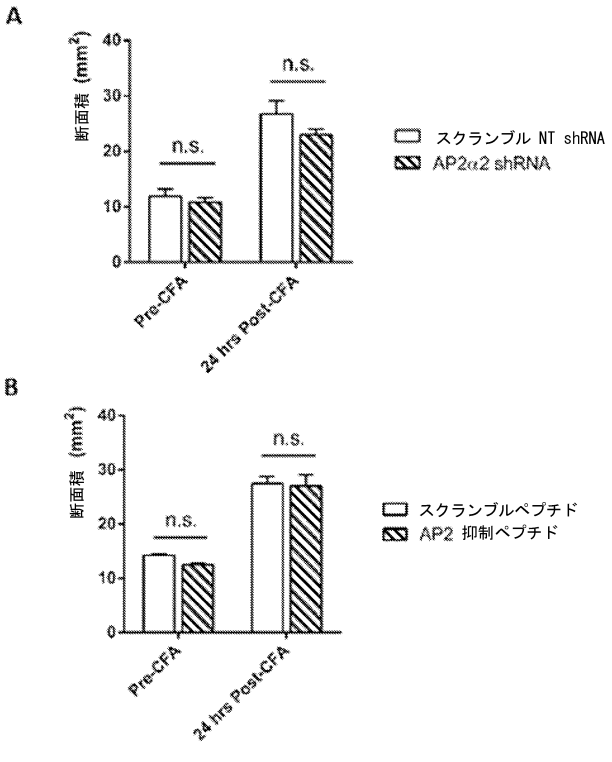


Figure 6

【図７ＡＢ】

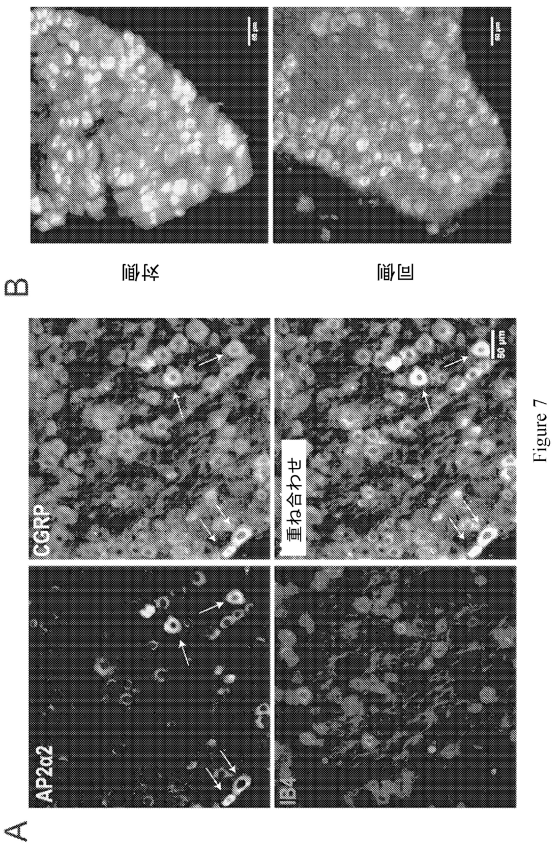


Figure 7

【図７Ｃ】

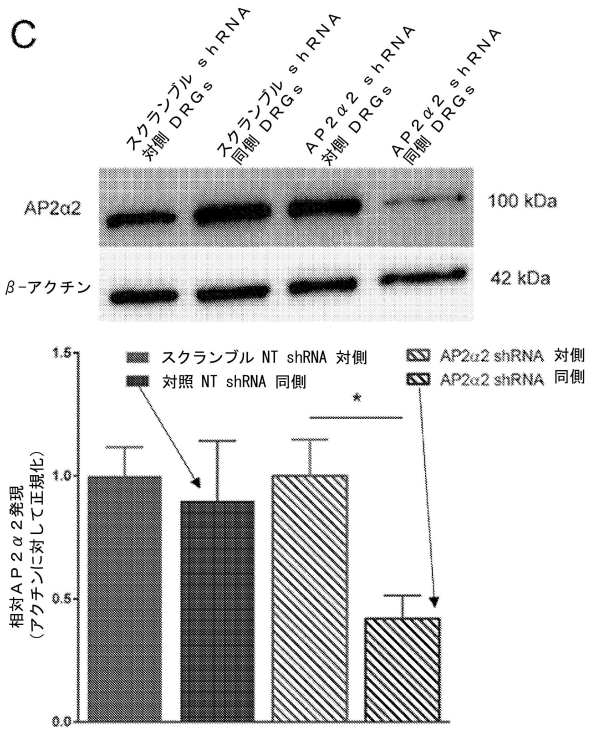


Figure 7 (continued)

【図７Ｄ】

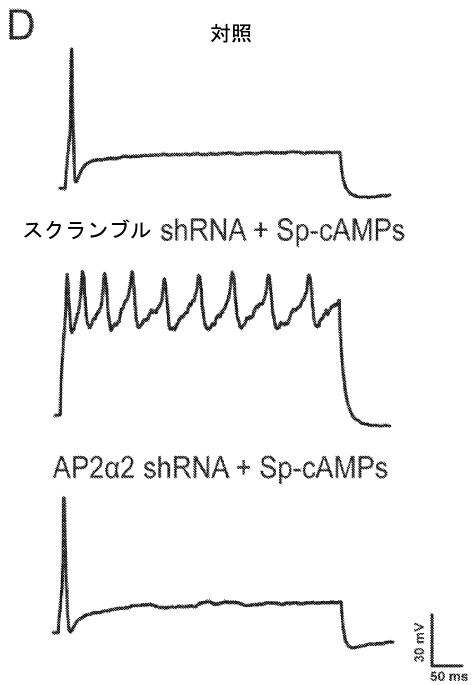


Figure 7 (continued)

【図７Ｅ】

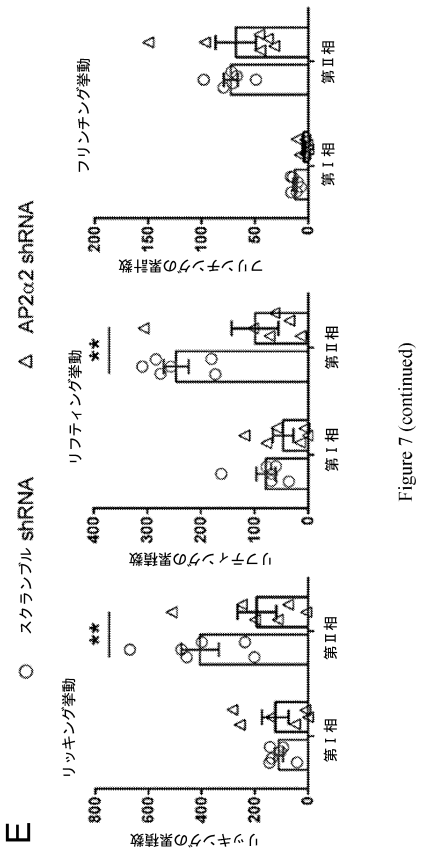


Figure 7 (continued)

【図７Ｆ】

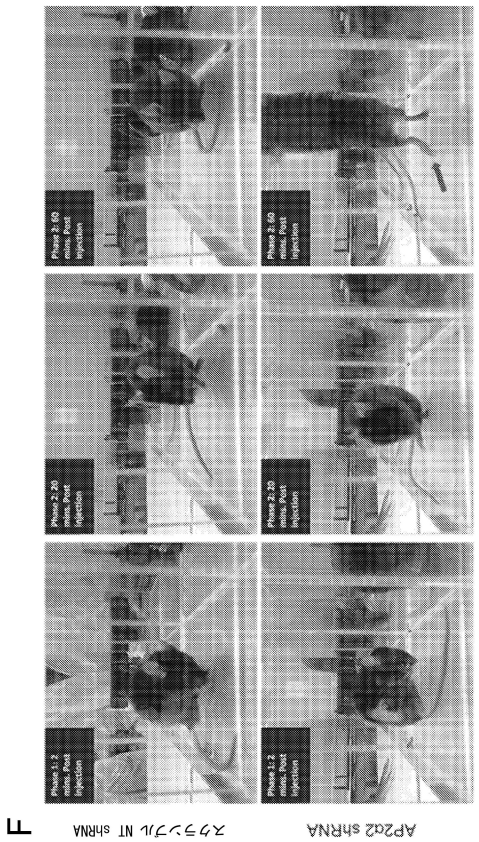


Figure 7 (continued)

【図８Ａ】

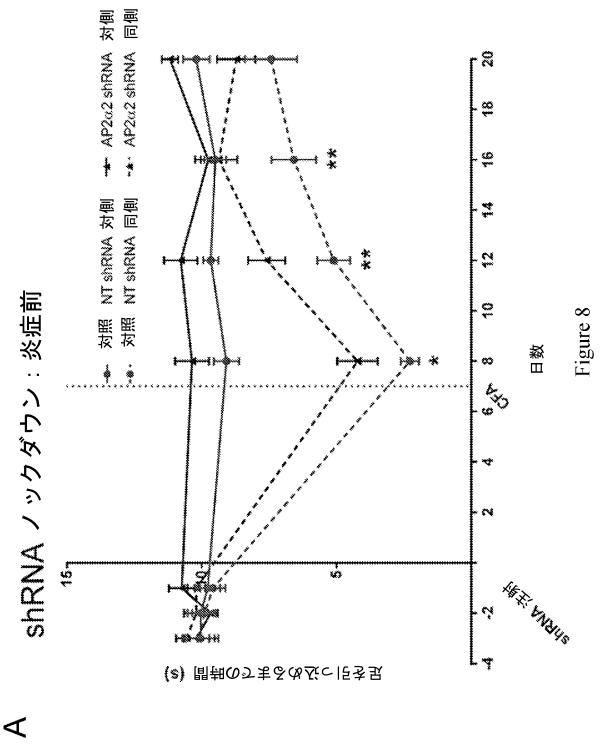


Figure 8

【図８Ｂ】

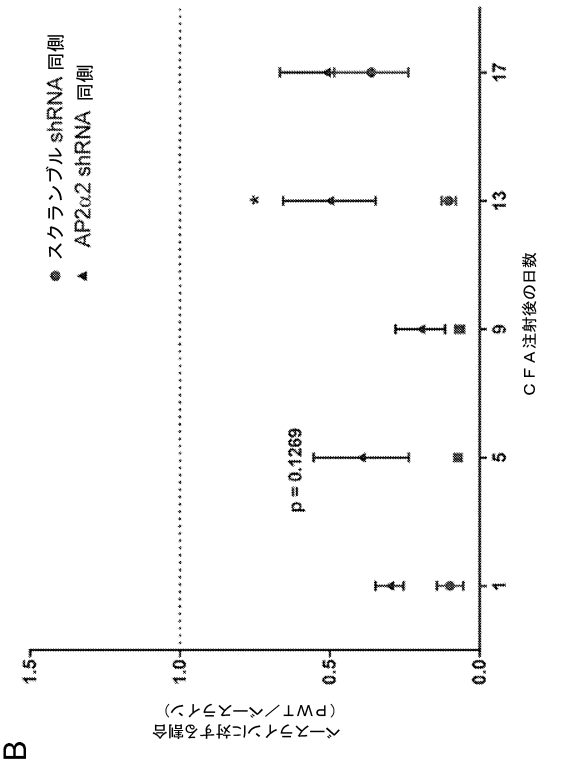


Figure 8 (continued)

【図８Ｃ】

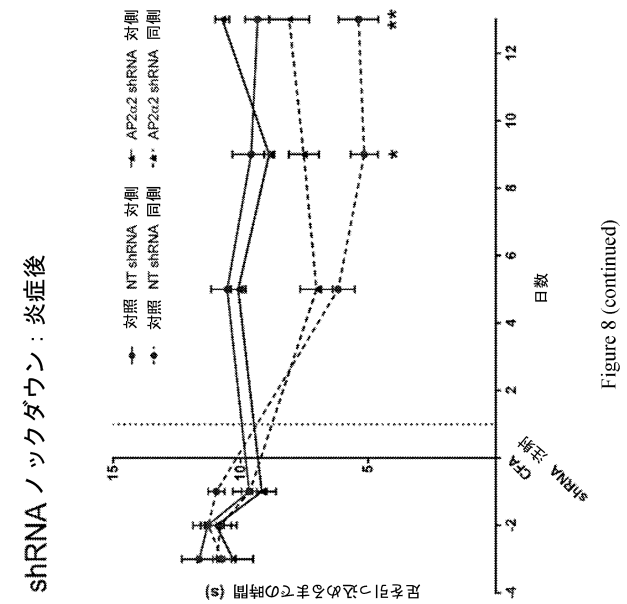


Figure 8 (continued)

【図９－１】

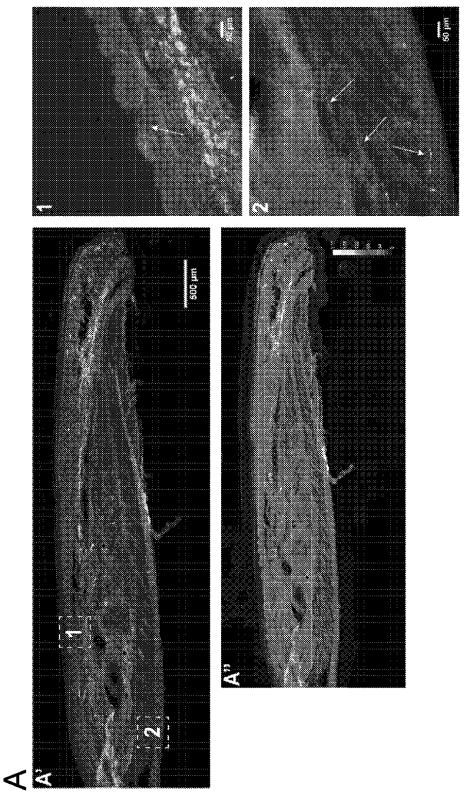


Figure 9

【図９－２】

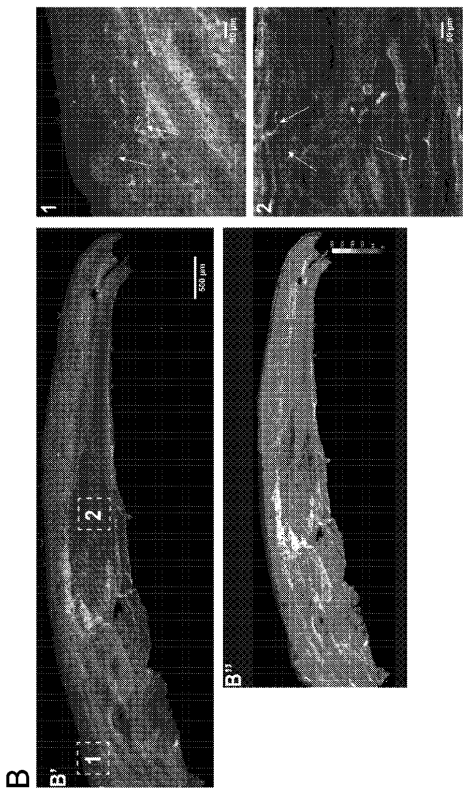

Figure 9 (continued)

【図１０Ａ】

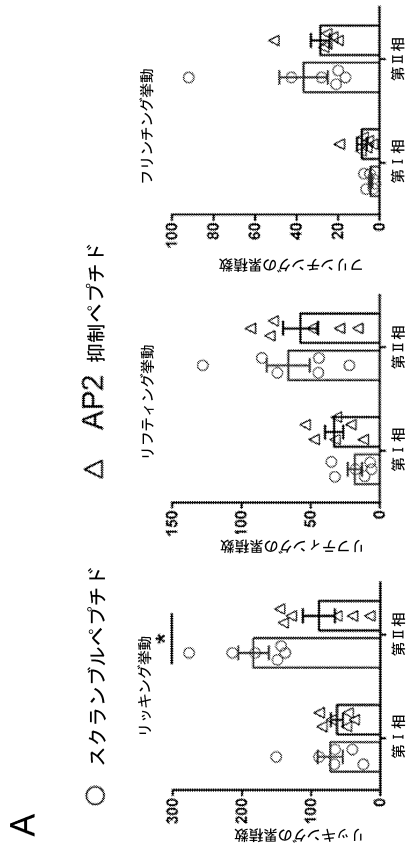

Figure 10

【図１０Ｂ】

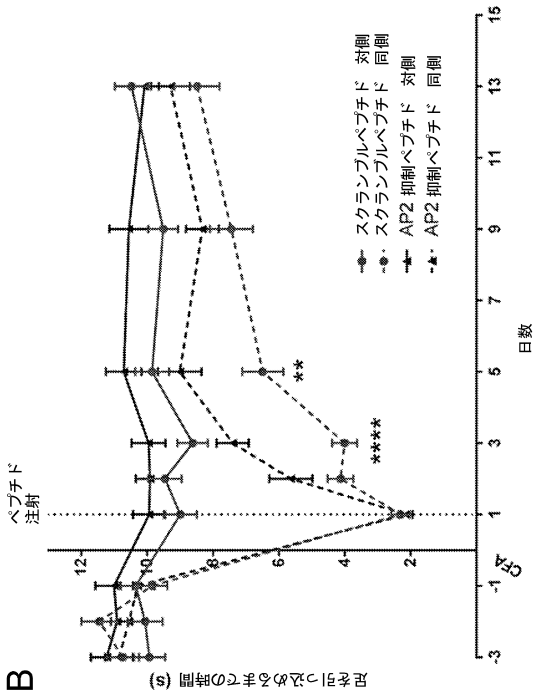

Figure 10 (continued)

【図１０ＣＤ】

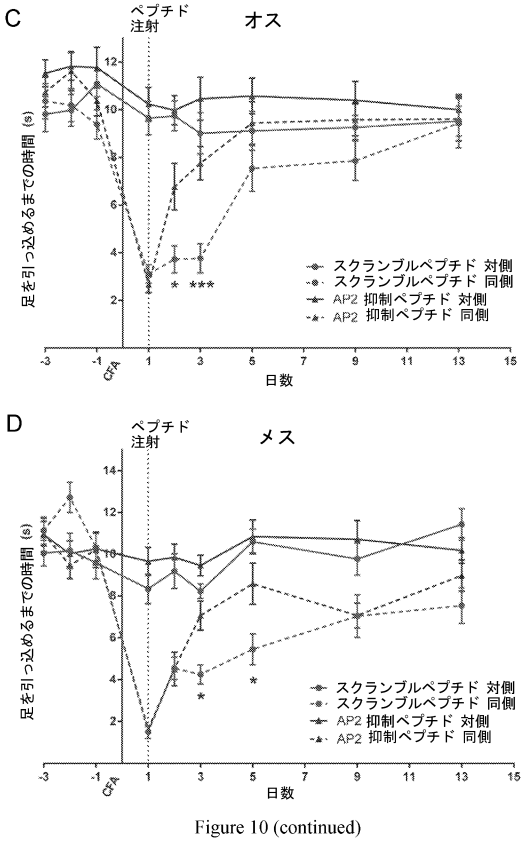

Figure 10 (continued)

【図１０ＥＦＧ】

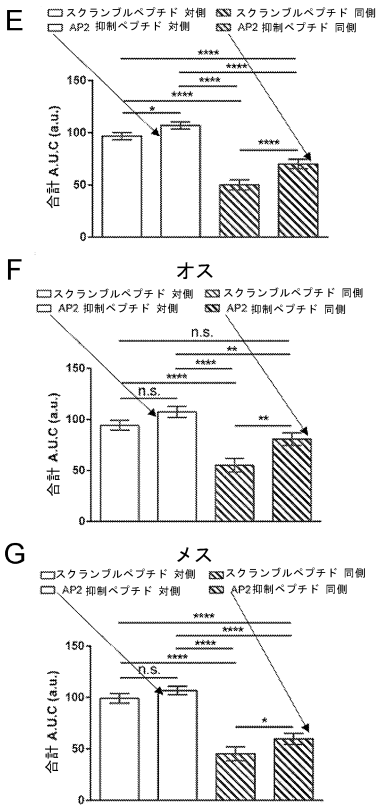


Figure 10 (continued)

【図１０ＨＩＪ】

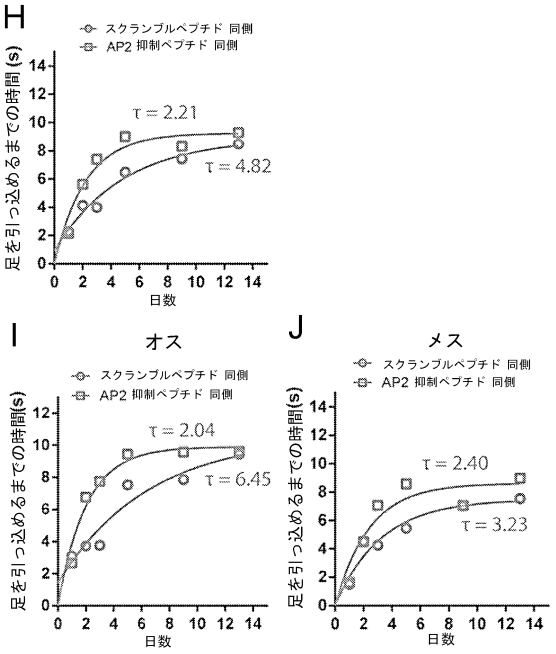


Figure 10 (continued)

【図１０Ｋ】

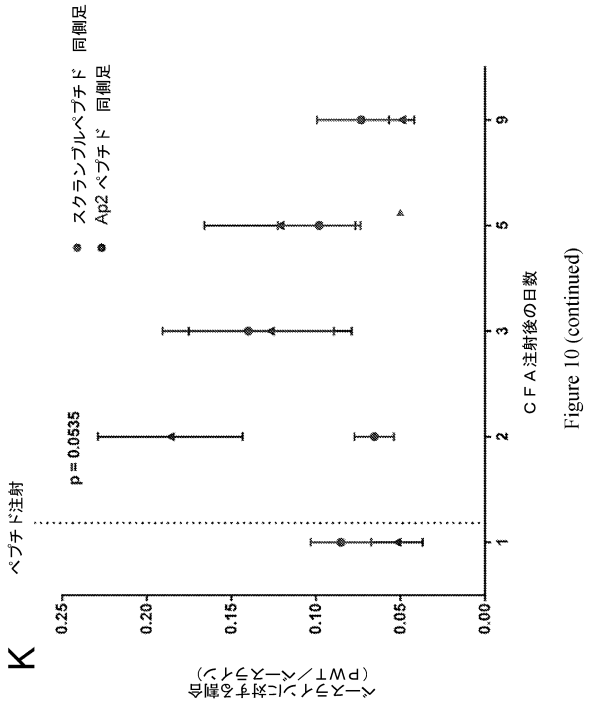


Figure 10 (continued)

【図１１ＡＢ】

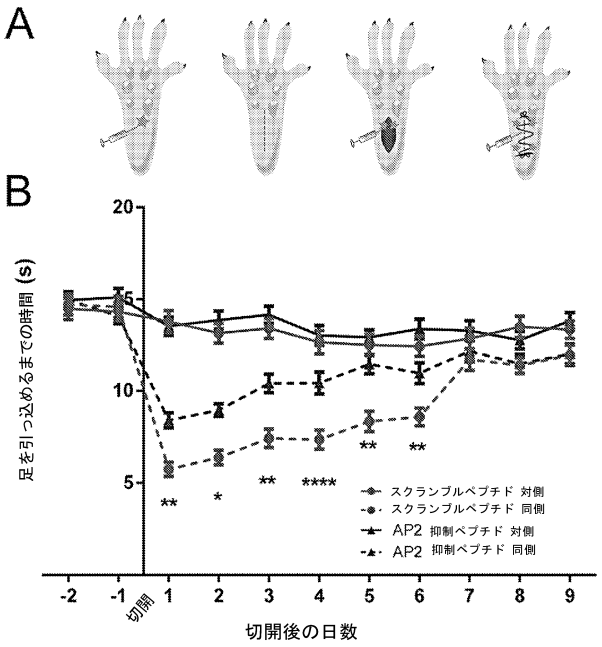


Figure 11

【図１１ＣＤ】

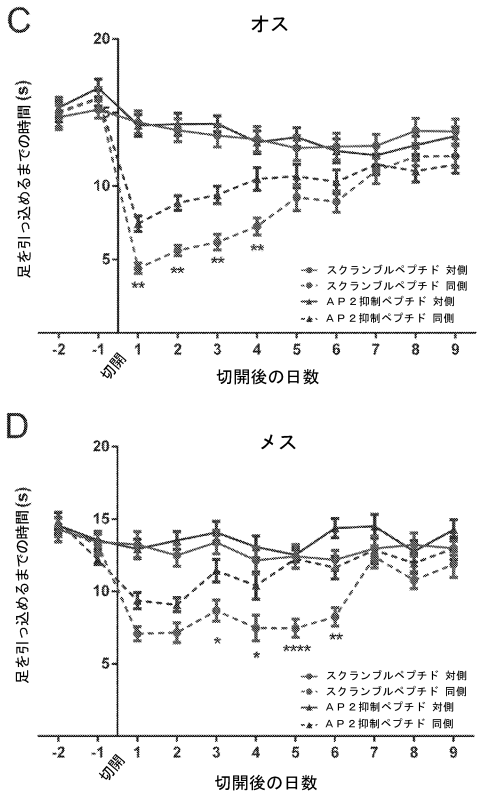


Figure 11 (continued)

【図１１ＥＦＧ】

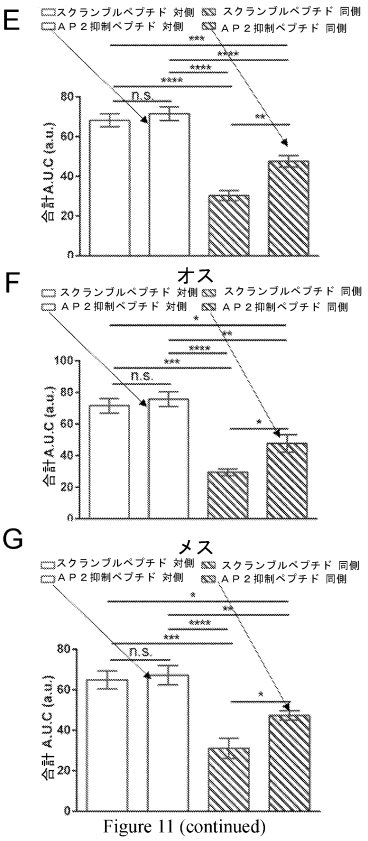


Figure 11 (continued)

【図１１ＨＩＪ】

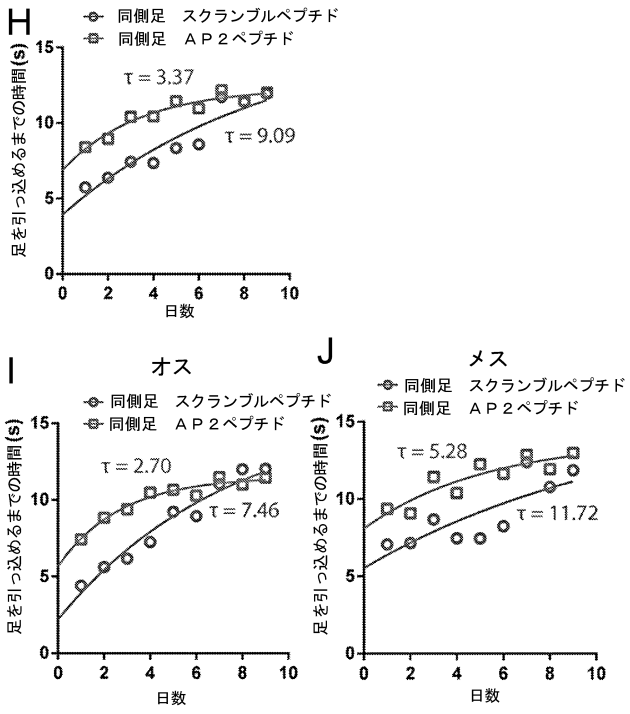


Figure 11 (continued)

【図１１Ｋ】

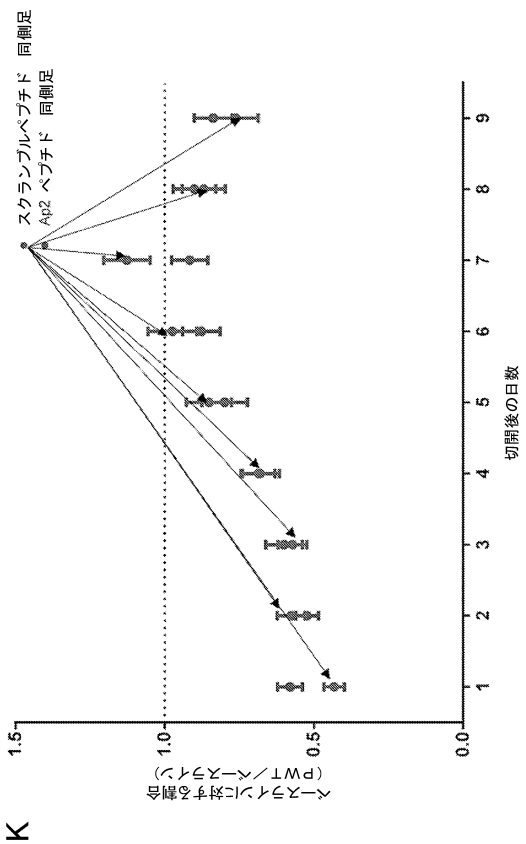


Figure 11 (continued)

【図１２ＡＢＣ】

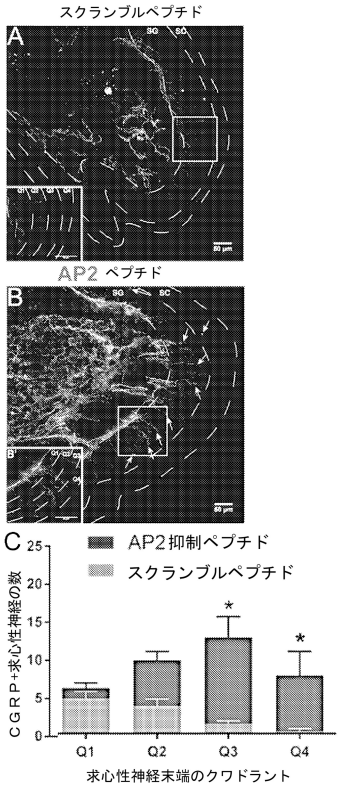


Figure 12

【図１２Ｄ】

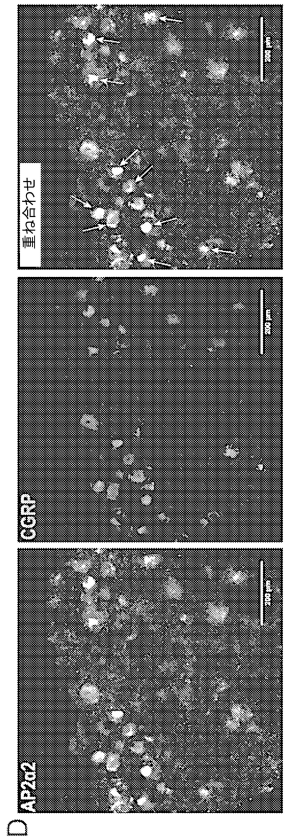


Figure 12 (continued)

【図１３ＡＢ】

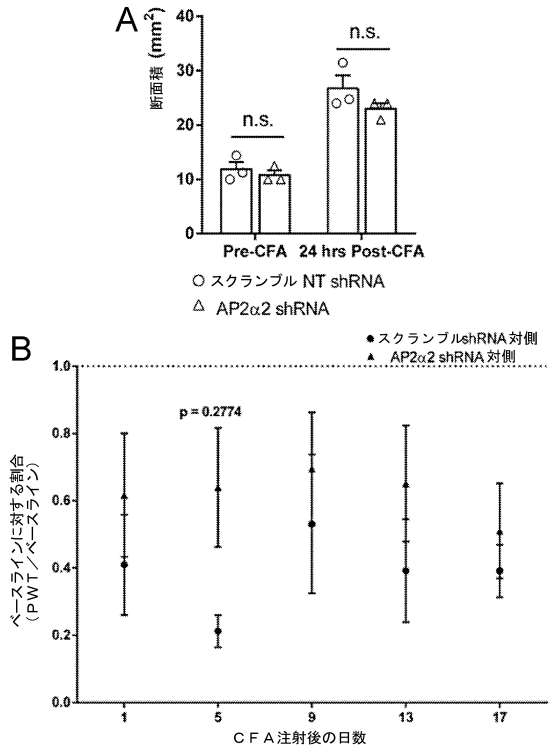


Figure 13

【図１３Ｃ】

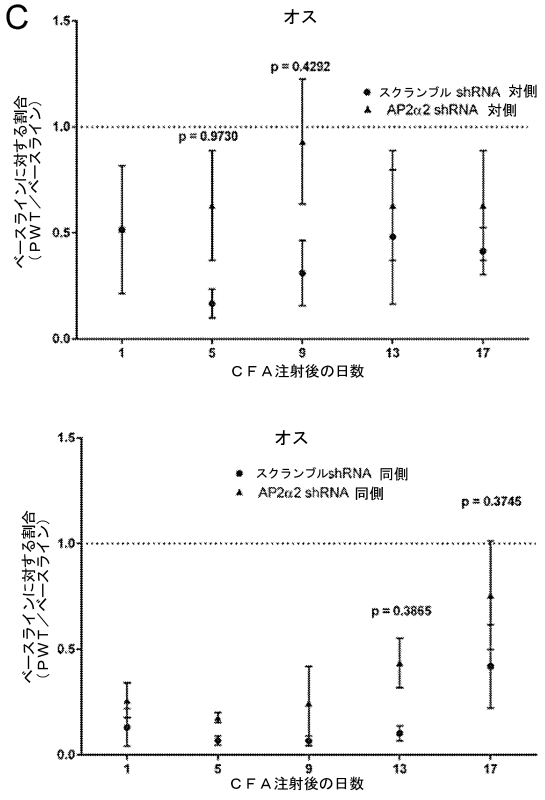


Figure 13 (continued)

【図１３Ｄ】

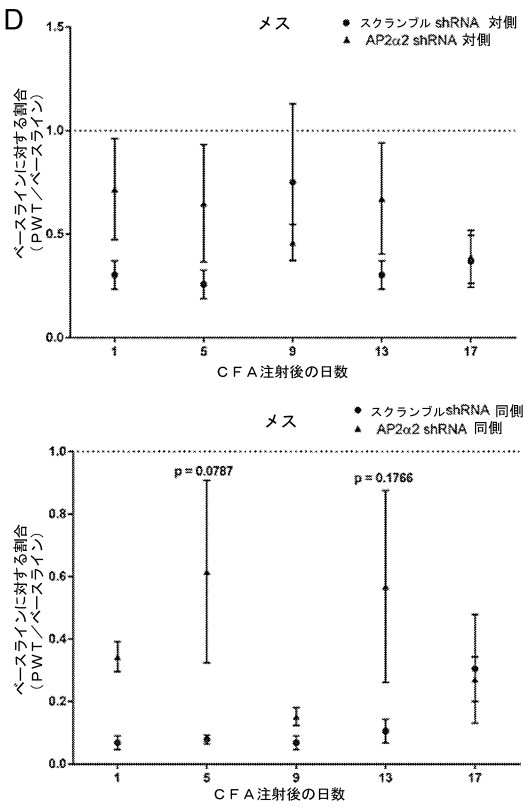


Figure 13 (continued)

【図１４Ａ】

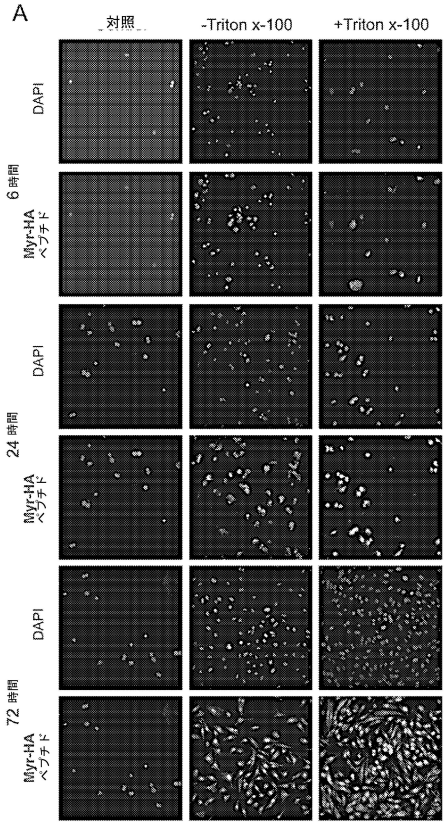


Figure 14

【図１４Ｂ】

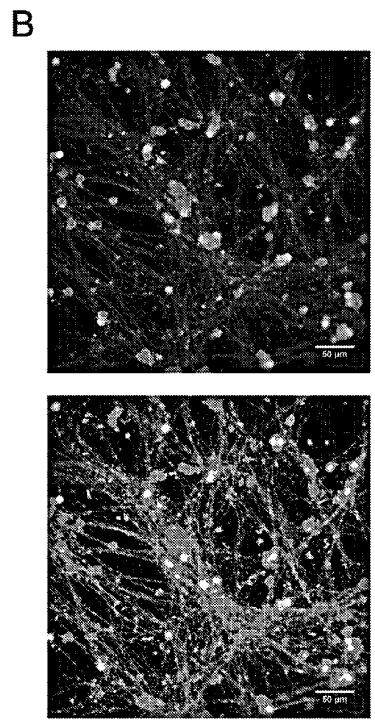


Figure 14 (continued)

【図１５ＡＢ】

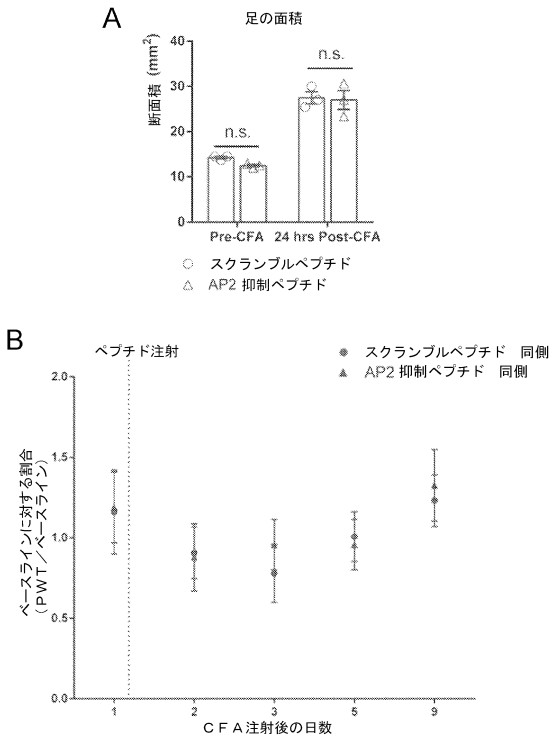


Figure 15

【図１５Ｃ】

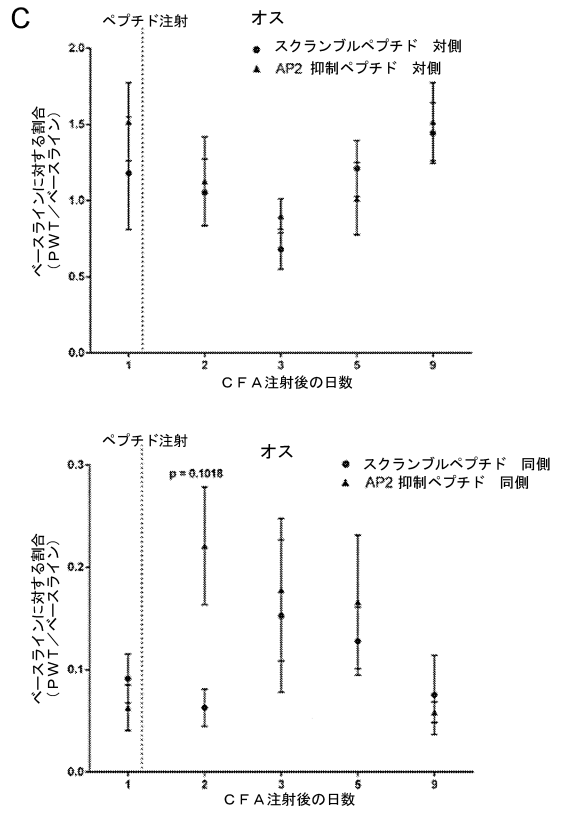


Figure 15 (continued)

【図１５Ｄ】

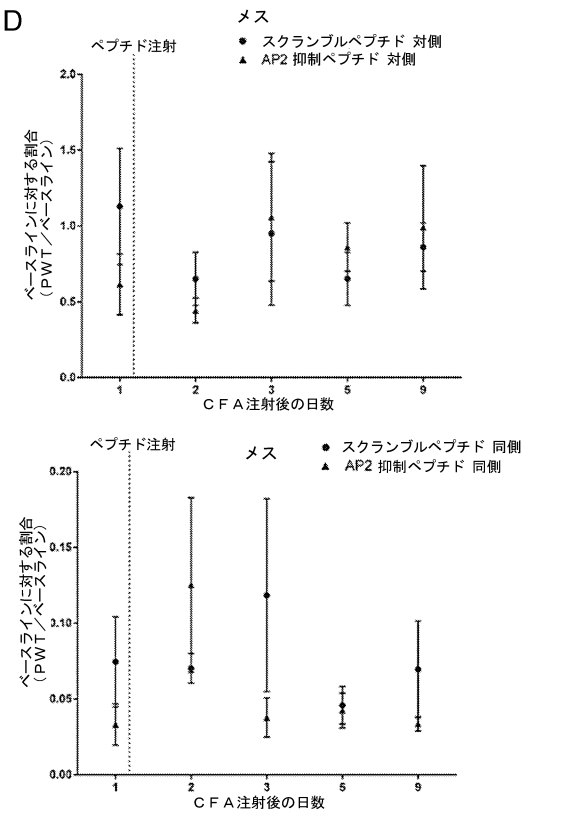


Figure 15 (continued)

【図１６】

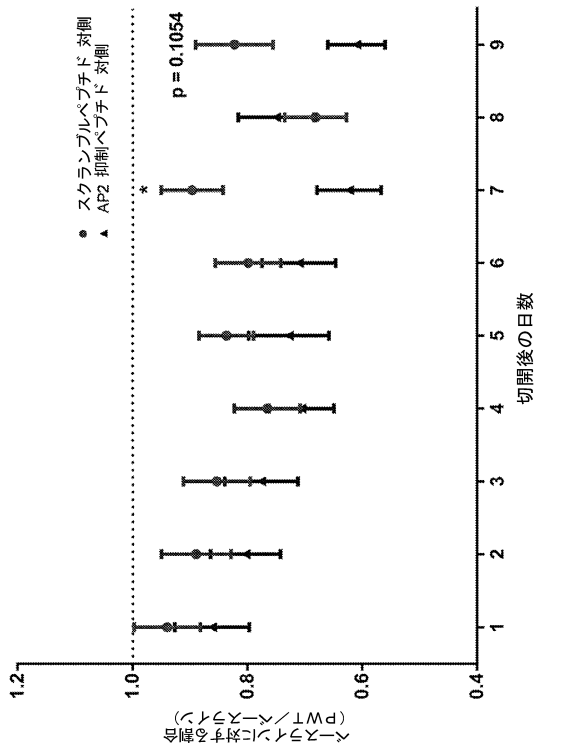


Figure 16

【図１７】

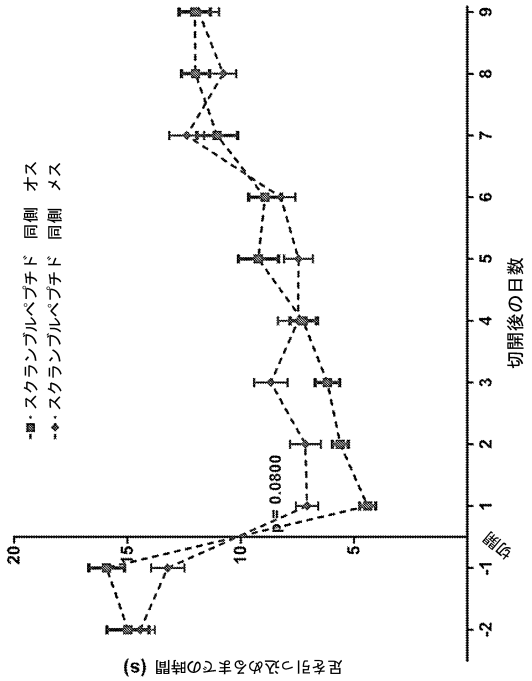


Figure 17

【図１８Ａ】

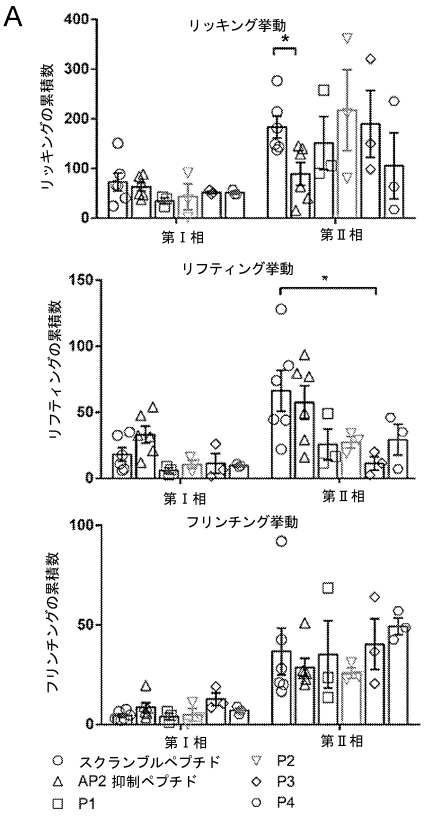


Figure 18

【図１８Ｂ】

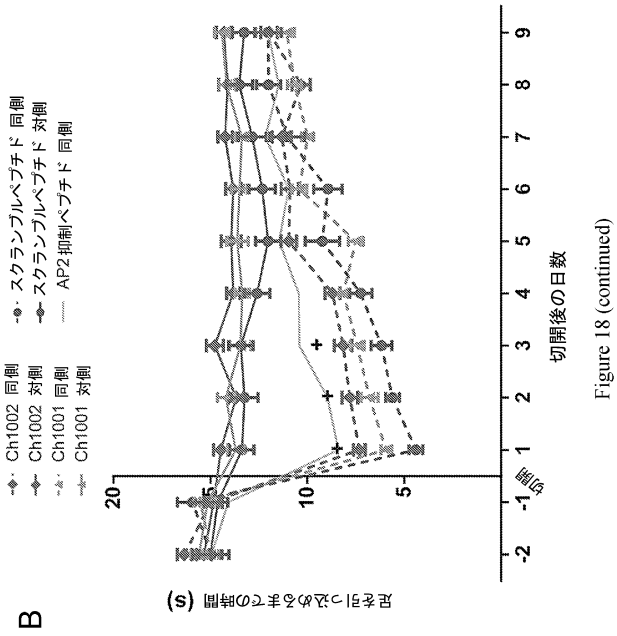


Figure 18 (continued)

【図１９】

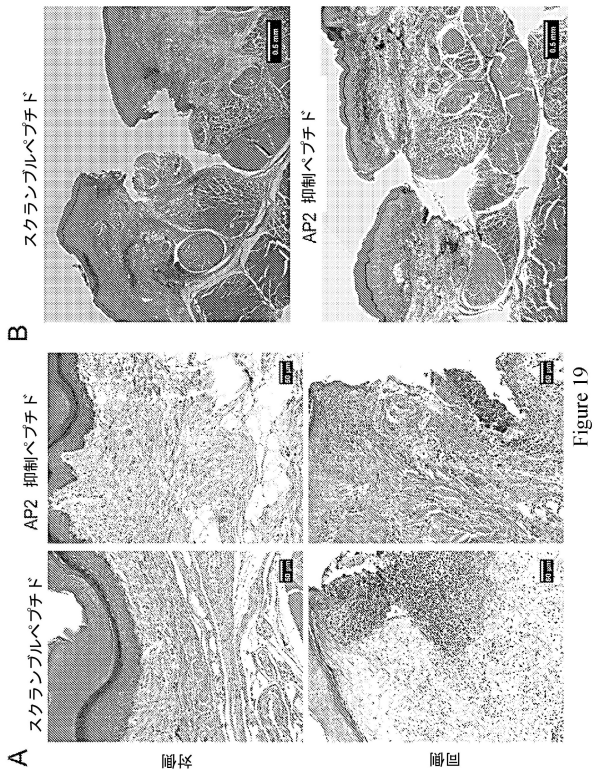


Figure 19

【図２０】

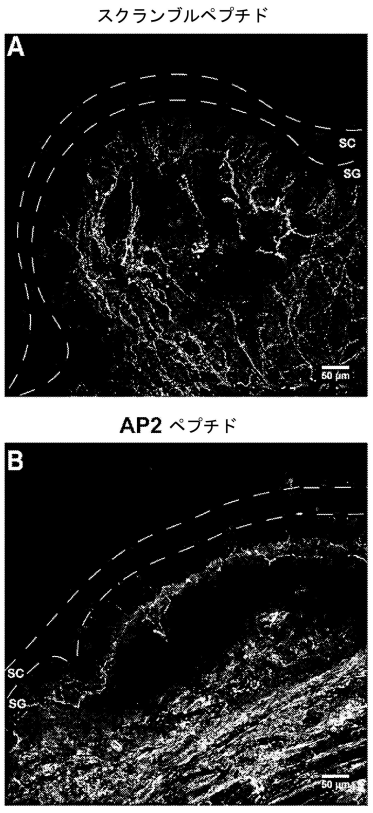


Figure 20

【図２１】

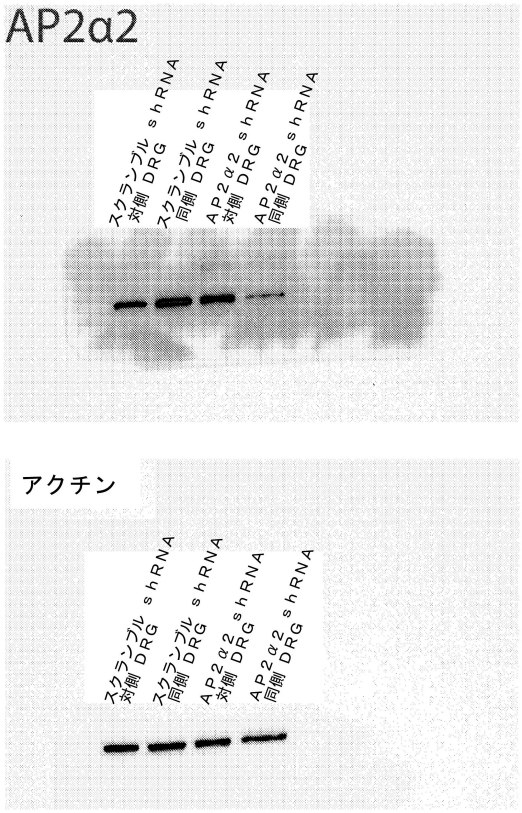


Figure 21

【配列表】

2022551467000001.app

【国際調査報告】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US20/55289

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C07K 4/12; C07K 7/06; C07K 7/08; A61P 29/02 (2020.01)

CPC - C07K 4/12; C07K 7/06; C07K 7/08; A61P 29/02

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y<br>---<br>A | GURURAJ. "Protein kinase A-induced internalization of Slack channels from the neuronal membrane occurs by adaptor protein-2/clathrin-mediated endocytosis" 19304-19314. J. Biol. Chem. . 05 October 2017; Entire Document; DOI: 10.1074/jbc.M117.804716 | 1, 3-10, 12-20<br>---<br>2 |
| X<br>---<br>Y<br>---<br>A | KELLY. "A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex" 976-981. Nature. . 25 December 2008; Entire Document; DOI: 10.1038/nature07422 | 1<br>---<br>1, 3-10, 12-20<br>---<br>2 |
| Y | WO 2019/118779 A2 (THE RESEARCH FOUNDATION FOR THE STATE UNIVERSITY OF NEW YORK) 20 June 2019; paragraphs [0007], [0008], [0013], [0059], [0063], [0064], [0072], [0079], Figure 1A | 8-10, 12-20 |
| A | WO 2019/136528 A1 (LATERAL IP PTY LTD) 18 July 2019; Entire document | 1-10, 12-20 |
| A | WO 2009/053967 A1 (AMORPHICAL LTD.) 30 April 2009; Entire document | 1-10, 12-20 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 11 February 2021 (11.02.2021) | 08 MAR 2021 |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-8300 | Authorized officer<br>Shane Thomas<br>Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300 |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US20/55289

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US20/55289

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***-Please See Supplemental Page-***-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-10 and 12-20

**Remark on Protest**

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US20/55289

-***-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-20, SEQ ID NO: 1 (peptide sequence), acetaminophen (agent) are directed toward peptides, compositions comprising the peptides, and methods related thereto.

The peptides, compositions, and methods will be searched to the extent they encompass SEQ ID NO: 1 (first exemplary peptide sequence), acetaminophen (first exemplary agent). Applicant is invited to elect additional peptide(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO:, such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and/or additional agent(s), to be searched. Additional peptide(s) and/or agent(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-10 (each in-part), and 12-20 (each in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (peptide sequence), acetaminophen (agent). Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected peptide(s) and/or agent(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 2 (peptide sequence).

No technical features are shared between the peptides and/or agents of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a peptide, wherein the peptide is 6-20 amino acid residues long; a composition comprising one or more peptides and a pharmaceutically acceptable carrier; a method of treating pain or increasing pain sensitivity in a subject in need of treatment comprising: administering to the subject in need of treatment a therapeutically effective amount of one or more composition, wherein pain of the subject in need of treatment is ameliorated or the pain sensitivity of the subject in need of treatment is increased; these shared technical features are previously disclosed by WO 2019/118779 A2 to The Research Foundation for the State University of New York (hereinafter 'SUNY').

SUNY discloses a peptide, wherein the peptide is 6-20 amino acid residues long (a peptide, wherein the peptide is 6-20 amino acid residues long; paragraphs [0005], [0047]); a composition comprising one or more peptides and a pharmaceutically acceptable carrier (a composition comprising one or more peptides and a pharmaceutically acceptable carrier; paragraph [0007]); a method of treating pain in a subject in need of treatment (a method of inducing local analgesia in a subject (in need of treatment); paragraph [0009]) comprising: administering to the subject in need of treatment a therapeutically effective amount of the composition, wherein pain of the subject in need of treatment is ameliorated (comprising: administering to the subject in need of treatment a therapeutically effective amount of the composition to produce analgesia (wherein pain of the subject in need of treatment is ameliorated); paragraph [0009]).

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the SUNY reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

| (51)国際特許分類 | | FＩ | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|
| *Ａ６１Ｐ* | *3/10 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 3/10 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *17/02 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 17/02 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *25/00 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 25/00 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *25/18 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 25/18 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *25/24 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 25/24 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *25/04 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 25/04 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *25/06 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 25/06 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *31/22 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 31/22 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *35/00 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 35/00 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *37/02 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 37/02 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *21/00 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 21/00 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *19/02 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 19/02 | |
| *Ａ６１Ｋ* | *48/00 (2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 48/00 | |
| *Ａ６１Ｋ* | *31/7105(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 31/7105 | |
| *Ｃ０７Ｋ* | *7/08 (2006.01)* | Ｃ０７Ｋ | 7/08 | |
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/113(2010.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/113 | Ｚ |

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＲＩＴＯＮ

２．ＴＷＥＥＮ

アベニュー ８３

Ｆターム（参考） 4C084 AA02 AA07 AA13 AA19 BA01 BA08 BA17 BA18 BA23 BA33 BA36 CA62 MA02 NA05 NA06 NA14 ZA011 ZA012 ZA021 ZA022 ZA041 ZA042 ZA081 ZA082 ZA121 ZA122 ZA181 ZA182 ZA211 ZA212 ZA661 ZA662 ZA891 ZA892 ZA941 ZA942 ZA961 ZA962 ZB071 ZB072 ZB111 ZB112 ZB261 ZB262 ZB331 ZB332 ZB351 ZB352 ZC351 ZC352

4C086 AA01 AA02 BA04 EA16 MA01 MA04 NA05 NA06 ZA01 ZA02 ZA12 ZA18 ZA66 ZA89 ZA94 ZA96 ZB07 ZB11 ZB26 ZB33 ZB35 ZC35

4H045 AA10 AA20 AA30 BA14 BA15 BA16 BA17 BA50 BA55 CA40 EA21 FA33 FA51 FA52 GA25