(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118401249 A
(43)申请公布日 2024.07.26

(21)申请号 202280083300.3
(22)申请日 2022.12.19
(30)优先权数据
21306835.6 2021.12.17 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.06.14
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2022/086559 2022.12.19
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/111348 EN 2023.06.22
(71)申请人 塔法吉斯生技公司
地址 法国马赛
(72)发明人 S•盖拉德 F•卡斯特茨 A•莫克里赫
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 涂滔
(51)Int.Cl.
A61K 38/17(2006.01)
A61P 25/04(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书29页
序列表（电子公布） 附图7页

(54)发明名称

用于治疗疼痛的肽和方法

(57)摘要

本发明涉及新型肽、包含该肽的组合物和试剂盒，其用作用于预防或治疗有此需要的受试者中的疼痛的活性成分。本文还描述了用于调节这些肽的表达的体外或离体方法。

CN 118401249 A

1.分离的、合成的或重组的序列SEQ ID NO:1的肽,或与SEQ ID NO:1具有至少90％同一性的肽。

2.权利要求1所述的肽,其中所述与SEQ ID NO:1具有至少90％同一性的肽调节脊髓中间神经元(优选脊髓lamina IIi中间神经元)的兴奋性。

3.权利要求2所述的肽,其中序列CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWWCHMNPCLEGEDCKVLPDYSGWS CSSGNKVKTTKVTR(SEQ ID NO:1)中以粗体显示的氨基酸Q和Y在所述与SEQ ID NO:1具有至少90％同一性的肽的氨基酸序列中保持不变。

4.权利要求1至3中任一项所述的肽,其中所述肽是重组肽。

5.权利要求1至4中任一项所述的肽,其中所述肽是SEQ ID NO:5的肽。

6.权利要求1至5中任一项所述的肽,其用作药物。

7.核酸序列,其编码根据权利要求1至5中任一项所述的肽或根据权利要求6使用的肽。

8.载体,其允许表达根据权利要求1至5中任一项所述的肽或根据权利要求6使用的肽。

9.细胞,其包含根据权利要求7所述的核酸序列,或使用根据权利要求8所述的载体修饰。

10.组合物,其包含权利要求1至5中任一项所述的肽、权利要求7所述的核酸、权利要求8所述的载体或权利要求9所述的细胞,以及饮食或药学上可接受的支持物。

11.权利要求10所述的组合物,其进一步包含至少一种另外的活性化合物,优选对疼痛有效的活性剂,甚至更优选SAID、NSAID或阿片类药物。

12.权利要求6所述的肽,或权利要求10或11中描述的组合物,其用作药物,其中所述肽或组合物肌肉内、静脉内、腹膜内、口服(经口)、肛门地、皮肤地、皮下地、真皮地、透皮地或鞘内地施用于受试者,优选皮下地或口服,甚至更优选口服。

13.权利要求6或12所述的肽,或权利要求10、11或12所述的组合物,其用作药物,其中肽的剂量在哺乳动物中为1μg至100mg/kg/天,并且在人受试者中优选为2.5μg/kg/天至0.6mg/kg/天。

14.权利要求1至6中任一项所述的肽、权利要求7所述的核酸、权利要求8所述的载体或权利要求9所述的细胞,其用作用于预防或治疗有此需要的受试者中的疼痛的活性成分。

15.权利要求14所述的肽、核酸、载体或细胞,其中所述疼痛是慢性疼痛、神经病理性疼痛、术后疼痛、炎性疼痛、痛觉过敏或痛觉超敏。

16.权利要求14或15所述的肽、核酸、载体或细胞,其中所述受试者是哺乳动物,尤其是人类。

17.根据权利要求16所述的肽、核酸、载体或细胞,其中所述受试者具有在myo1A基因中的至少一个突变的等位基因。

用于治疗疼痛的肽和方法

技术领域

[0001] 本申请整体涉及疼痛管理领域。更具体地,本发明涉及用于预防和/或治疗疼痛的组合物,其包含TAFA-4蛋白的肽片段作为活性成分,以及用于预防和/或治疗疼痛的方法,特别是源自神经病理性疼痛、术后疼痛或炎症性疼痛的急性、亚急性或慢性疼痛,或用于预防和/或治疗由损伤引起的疼痛所导致的痛觉过敏或痛觉超敏的方法。

背景技术

[0002] 疼痛通常分为急性疼痛或慢性疼痛。急性疼痛是短暂的并且对于维持我们的身体完整性必不可少,而慢性疼痛则会持续超过正常的愈合时间,并对健康产生不利影响。慢性的炎症性、神经病理性或术后疼痛会引起长期感觉异常,例如痛觉过敏(由有害刺激引起的极度疼痛)和机械性痛觉超敏(由无害的机械刺激引起的疼痛)。这些疼痛类别在病因和临床特征方面有所不同,但它们具有几种共同的机制,包括神经免疫相互作用的改变以及神经元敏化(包括外周和中枢)(Costigan et al,2009)。越来越多的证据表明,抑制丧失可能是慢性疼痛的关键机制(Bourane et al.,2015a;Bourane et al.,2015b;Boyle etal.,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)。然而,尽管我们对啮齿动物慢性疼痛的机制和回路有广泛的了解,但仍然不能满足将这些发现转化为人类慢性疼痛的有效治疗方法(Colloca et al,2017)。事实上,非甾体抗炎剂(NSAID)对慢性疼痛的疗效有限,而阿片类药物有多种副作用,包括潜在致命的呼吸抑制、恶心、便秘、痛觉过敏、耐受性、身体和心理依赖(Benyamin et al,2008)。因此,应鼓励努力鉴定具有镇痛或止痛潜力的治疗慢性疼痛的新靶点。

[0003] 在过去的几年里,发明人发现了分泌蛋白TAFA-4的显著特征,表明它可能成为治疗慢性疼痛的感兴趣药物(WO2014180853)。TAFA-4属于五种高度保守的分泌神经因子家族(Sarver et al,2021年)。TAFA-4含有信号肽,随后是具有10个半胱氨酸残基高度保守的核心区域,该核心区域包括使其类似于细胞因子的CC-趋化因子基序(Tom Tang et al,2004)。

[0004] 发明人先前还证明,在将TAFA-4基因删除的小鼠中,神经损伤引起的机械超敏反应持续时间比野生型(WT)小鼠长得多(Delfini et al,2013)。通过鞘内注射重组TAFA-4可以逆转这些表型。

[0005] 如WO2014180853中所述,发明人先前报道了实验证据,证明TAFA-4对病理性增加的机械疼痛具有强大的作用。研究表明,在雄性和雌性小鼠中,鞘内和皮下施用人重组TAFA-4逆转炎症性、术后和神经损伤引起的机械超敏反应。他们还表明,TAFA-4可以逆转神经损伤引起的脊髓lamina II中间神经元的神经元敏化,据报道,脊髓lamina II中间神经元负责机械阈值改变。

[0006] 然而,由于TAFA-4是富含半胱氨酸的蛋白质(总共10个半胱氨酸),重组成熟TAFA-4蛋白的生产可能具有挑战性)。事实上,重折叠可以导致获得非天然构象或不适当的二硫

化物桥接模式,这可能会极大地影响蛋白质的活性。此外,获得高纯度重组TAFA-4蛋白所需的数个纯化步骤以及可能的聚集问题可以限制正确折叠蛋白质的产量。此外,虽然实现了TAFA-4蛋白的化学合成,但是由于蛋白质的长度,也具有挑战性,需要组装不少于4个(保护或部分保护的)肽段(从N端开始,到最C端肽结束)。为了生成全长的TAFA-4,需要三个连接纯化步骤,导致产量低,不适合工业规模生产。因此,鉴定能以工业规模和有成本效益的方式生产的、与TAFA-4蛋白具有相似活性的新型化合物,将具有巨大的优势。

[0007] 因此,对于用于有效预防或治疗疼痛,特别是急性、亚急性或慢性疼痛的替代的治疗剂和方法具有强烈需要。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明至少部分基于对具有止痛或镇痛活性,特别是止痛活性的新型肽(在本文中也标识为为“TT1”)及其变体(例如本文中标识为“TT6”肽)的鉴定。感兴趣的肽是或衍生自人类TAFA-4蛋白的特定片段。有利的是,这种肽及其变体易于生产,并且对疼痛,特别是急性、亚急性或慢性疼痛,通常针对损伤引起的疼痛具有高效性。

[0010] 本发明涉及序列分离的、合成的或重组的SEQ ID NO:1的肽,或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽(在本文中也标识为“肽变体”或“序列SEQ ID NO:1的肽的变体”)。在具体的方面,序列SEQ ID NO:1的肽或其变体是重组肽。在具体的方面,肽变体是分离的、合成的或重组的序列SEQ ID NO:5的肽。

[0011] 优选地,与SEQ ID NO:1的肽类似,与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽变体(例如SEQ ID NO:5(“TT6”)的肽)调节脊髓中间神经元(优选脊髓lamina IIi中间神经元)的兴奋性。在优选的方面,参考SEQ ID NO:1中所示的位置,位置13的氨基酸残基谷氨酰胺(Q)和位置45的酪氨酸(Y)在SEQ ID NO:1的肽的肽变体中保持不变。

[0012] 本发明还涉及编码本文所述的肽或其变体的核酸;允许表达本文上述肽或肽变体的载体;以及包含编码此类肽或其变体的核酸的细胞,或使用本发明的载体修饰的细胞。

[0013] 在另一方面,本发明涉及本文描述的肽或其变体,其用作活性成分,例如作为药物或药剂。本发明还涉及组合物,通常为治疗、兽医或饮食组合物,其包含本文所述的肽或其变体、编码此类肽或其变体的核酸、和/或本文所述的载体或细胞、以及药学和/或饮食上可接受的支持物。

[0014] 在此具体的方面,该组合物可以进一步包含至少一种另外的(不同的)活性化合物,优选地是对疼痛(急性、亚急性或慢性疼痛)有效的活性剂,甚至更优选地是甾体抗炎药(SAID)、非甾体抗炎药(NSAID)或阿片类药物。

[0015] 本发明的进一步目的涉及本文所述的肽、核酸、载体或细胞,其用作预防或治疗有此需要的受试者的疼痛的活性成分。本发明还涉及本文所述的肽、核酸、载体、细胞或组合物在制备用于预防或治疗有此需要的受试者的疼痛的药物中的用途。具体而言,本发明可用于治疗慢性疼痛、神经病理性疼痛、术后疼痛、炎症性疼痛、痛觉过敏或痛觉超敏。

[0016] 本发明还涉及预防或治疗有此需要的受试者疼痛的方法,其包括施用(治疗)有效量的本文所述的组合物或SEQ ID NO:1的肽,或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的其变体,例如SEQ ID NO:5的肽。

[0017] 本文所述的肽或组合物可以通过任何途径施用于受试者,例如肌肉内、静脉内、腹膜内、口服(经口,per os)、肛门、皮肤、皮下、真皮、透皮或鞘内。优选地,本文描述的肽或组

合物通过皮下或口服施用于受试者,甚至更优选地通过口服施用于受试者。

[0018] 本文描述的肽或组合物可以是试剂盒的一部分。因此,本发明还涉及试剂盒,其包含i)如本文所述的肽、核酸、载体、细胞或组合物,ii)至少一种对疼痛有效的另外的活性化合物,优选不同于本文所述的肽或其变体,以及任选地iii)使用该试剂盒的书面说明。本文描述的试剂盒通常用于预防或治疗疼痛。

[0019] 在具体方面,本发明的产品还可以用于研究背景中。编码本文所述肽或变体的核酸、允许其表达的载体、或包含此类核酸或使用此类载体修饰的细胞可以用于在体外或离体表达或调节SEQ ID NO:1的肽或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的其功能变体(例如SEQ ID NO:5的肽)的表达。在另一个特定的方面,本发明还涉及经过修饰以表达本文所述的核酸的转基因动物。

[0020] 附图简要说明

[0021] 图1:体内皮下施用SEQ ID NO:1的肽在神经病理性疼痛的保留神经损伤(SNI)模型中的止痛效果。该图表示在时间的函数中引起50%的小鼠的缩爪反应所需的机械力(以克表示其重量的当量)。将SEQ ID NO:1的肽(称为"肽")与阴性对照(媒介物)和阳性对照(普瑞巴林)进行比较。显示了肽治疗小鼠与媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验:$^{*}p<0.05$,$^{**}p<0.01$,$^{***}p<0.001$)。

[0022] 图2:体内口服施用SEQ ID NO:1的肽在神经病理性疼痛的SNI模型中的止痛效果。该图表示在时间的函数中引起50%的小鼠的缩爪反应所需的机械力(以克表示其重量的当量)。将SEQ ID NO:1的肽(称为"肽")与阴性对照(媒介物)和阳性对照(普瑞巴林)进行比较。显示了肽治疗小鼠与媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验:$^{*}p<0.05$,$^{**}p<0.01$,$^{***}p<0.001$)。

[0023] 图3:体内口服施用SEQ ID NO:1的肽在神经病理性疼痛的SNI模型中的剂量依赖性止痛效果。数据表示为对基线水平的百分比响应。将SEQ ID NO:1的肽(称为"肽")与阴性对照(媒介物)和阳性对照(普瑞巴林)进行比较。在口服管饲后1、2、4和24小时进行测量。显示了肽治疗小鼠与媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验:$^{*}p<0.05$,$^{**}p<0.01$,$^{***}p<0.001$)。

[0024] 图4:皮下或口服施用的TAFA-4(全长蛋白)与SEQ ID NO:1的肽在神经病理性疼痛的SNI模型中止痛效果的比较。该图表示在时间的函数中引起50%的小鼠的缩爪反应所需的机械力(以克表示其重量的当量)。将SEQ ID NO:1的肽(称为"肽")与阴性对照(媒介物)和TAFA-4蛋白(全长)(称为(TAFA4sc)进行比较。显示了肽或TAFA4治疗小鼠与媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验:$^{*}p<0.05$,$^{**}p<0.01$,$^{***}p<0.001$)。

[0025] 图5:体内口服施用TAFA-4(全长)蛋白在神经病理性疼痛的SNI模型中的止痛效果。该图表示在时间的函数中引起50%的小鼠的缩爪反应所需的机械力(以克表示其重量的当量)。将TAFA-4(全长)蛋白与阴性对照(媒介物)和阳性对照(普瑞巴林)进行比较。显示了肽治疗小鼠与媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验:$^{*}p<0.05$,$^{**}p<0.01$,$^{***}p<0.001$)。口服施用TAFA4未发现统计学差异。

[0026] 图6:体内口服施用SEQ ID NO:1的肽在炎症性疼痛模型(角叉菜胶模型)中的止痛效果。该图表示在时间的函数中引起50%的小鼠的缩爪反应所需的机械力(以克表示其重

量的当量)。将SEQ ID NO:1的肽(称为“肽”)与阴性对照(媒介物)和阳性对照(塞来昔布)进行比较。显示了肽或塞来昔布治疗小鼠与媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验:*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。

[0027] 图7:体内口服施用SEQ ID NO:1的肽在术后疼痛模型(Brennan爪切口疼痛模型)中的止痛效果。该图表示在时间的函数中引起50%的小鼠的缩爪反应所需的机械力(以克表示其重量的当量)。将SEQ ID NO:1的肽(称为“肽”)与阴性对照(媒介物)和阳性对照(吗啡)进行比较。显示了肽或塞来昔布治疗小鼠与媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验:*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。

[0028] 图8:口服施用的重组TT1(生物产生的)和通过化学合成获得的TT1在神经病理性疼痛SNI模型中疼痛缓解功效的比较。

[0029] 该图表示在时间的函数中引起50%的小鼠的缩爪反应所需的机械力(以克表示其重量的当量)。将通过化学合成产生的SEQ ID NO:1的肽(“TT1synth”)的疼痛缓解功效与细菌中(生物)产生的SEQ ID NO:1的肽(“TT1 prod Bact”)的疼痛缓解功效进行比较。显示了“TT1 synth”或“TT1 prod bact”治疗小鼠与媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验):*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。n=8;模型=SNI;性别:雄性;施用:口服;浓度TT1 synth:300μg/kg,浓度TT1 prod bact:300μg/kg。

[0030] 图9:口服或皮下施用的生物产生的TT1和TT6在神经病理性疼痛的SNI模型中疼痛缓解功效的比较。

[0031] 该图表示在时间的函数中引起50%的小鼠的缩爪反应所需的机械力(以克表示其重量的当量)。将SEQ ID NO:1的肽(“TT1”)与SEQ ID NO:5的肽(“TT6”)进行比较,每种肽均通过皮下施用(A)或口服施用(B)。显示了TT1或TT6治疗小鼠与媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验):*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。n=8;模型=SNI;性别:雄性;施用:口服或皮下;浓度TT1:300μg/kg,浓度TT6:300μg/kg。

[0032] 图10:皮下施用SEQ ID NO:1的肽在术后疼痛模型(Brennan爪切口模型)中的预防性止痛效果

[0033] A.方案的示意图。TT1或媒介物在不同时间点每天两次皮下施用:手术前一天(D-1),D天手术前1小时和手术后(和醒来)1小时,以及D+1天和D+2天)。在施用SEQ ID NO:1的肽(“TT1”)之前,在D+1天和D+2天进行机械阈值反应测量。

[0034] B.该图表示在时间的函数中引起50%的小鼠的缩爪所需的机械力(以克表示其重量的当量)。将SEQ ID NO:1的肽(称为“TT1”)与阴性对照(媒介物)进行比较。数据表示为对基线水平的百分比响应。显示了肽治疗小鼠与媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验:*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。TT1组n=23,媒介物组n=22;模型=术后疼痛模型;性别:TT1处理小鼠为11只雄性和12只雌性,媒介物组为11只雄性和11只雌性;施用:皮下;浓度TT1:300μg/kg。

[0035] 图11:重复口服施用SEQ ID NO:1的肽对慢性压迫性损伤(CCI)神经病理性疼痛模型无耐受性

[0036] 建立CCI神经病理性疼痛模型后,从手术后第10天开始,用SEQ ID NO:1的肽(“TT1”)或媒介物治疗小鼠连续14天。每两天检测一次TT1的止痛效果。该图表示在时间的函数中引起50%的小鼠的缩爪反应所需的机械力(以克表示其重量的当量)。将SEQ ID NO:

1的肽(称为“TT1”)与阴性对照(媒介物)进行比较。显示了肽治疗小鼠与媒介物组之间的统计差异(双向RM ANOVA,然后进行Bonferroni事后检验:*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。模型=CCI神经病理性疼痛模型;性别:TT1治疗小鼠为10只雄性,载体组n=5;施用:口服;浓度TT1:300μg/kg。

[0037] 发明详述

[0038] 定义

[0039] 本说明书中使用的术语通常具有其在本发明的上下文中以及使用每个术语的特定上下文中的本领域的普通含义。下面或说明书其他地方讨论了一些术语,以便为熟练的读者描述本发明的方法及如何使用这些方法提供额外的指导。此外,可以理解的是,可以用一种以上的方式说明同一项目。因此,对于本文讨论的一个或多个术语可以使用替代语言和同义词。提供了某些术语的同义词。一个或多个同义词的叙述并不排除其他同义词的使用。

[0040] 术语“肽”、“肽变体”、“蛋白质片段”、“蛋白质区段”可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。此类氨基酸残基的聚合物可以含有天然或非天然的氨基酸残基。该术语还包括肽的表达后修饰,例如糖基化、唾液酸化、乙酰化、磷酸化、氨基甲基化等。此外,在本发明的上下文中,“肽”是指蛋白质片段或区段,其包括对天然(野生型)序列的修饰,例如删除、添加和替换(通常在性质上是保守的),只要该肽保持期望的活性,即预防或治疗疼痛。这些修饰优选地是故意突变,例如通过定点诱变获得。

[0041] 术语“分离肽”是指从其原始环境(即,如果它是天然存在的,则是自然环境)中移除的肽。在天然系统中(例如在活体动物中)天然存在的肽应与从所述天然系统中的全部或部分共存材料中分离的相同肽相区别。分离的肽在此被称为“分离肽”。换句话说,在本发明的上下文中,分离肽是自然界中不存在的TAFA-4蛋白的片段。

[0042] 术语“合成肽”是指通过化学合成获得的肽。

[0043] 术语“重组肽”是指由重组DNA编码的肽,该肽已被克隆到外来表达系统中以支持外源基因的表达。重组DNA(通常是靶标肽的cDNA序列)通常被设计为置于启动子的控制之下,从而允许靶标肽在所选宿主细胞内表达。本领域的普通技术人员能够选择合适的启动子以实现高水平的蛋白质表达。

[0044] 术语“序列同一性”、“具有至少X%同一性的序列”和“X%相同的序列”可互换使用,指在比较窗口内序列在核苷酸与核苷酸基础上或氨基酸与氨基酸基础上相同的程度。因此,可以通过在比较窗口上比较两个最佳比对的序列来计算“序列同一性百分比”,其中与参考序列相比,比较窗口中的多核苷酸或多肽序列部分可能包含添加或缺失(即缺口),以实现两个序列的最佳比对。该百分比可以通过确定两个序列中出现相同核酸碱基(例如,A、T、C、G、U)或相同氨基酸残基(例如,Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)的位置数以产生匹配位置的数量来计算,将匹配位置的数量除以比较窗口中的总位置数(即,窗口大小),并将结果乘以100以产生序列同一性的百分比。或者,可以通过确定两个序列中出现相同的核酸碱基或氨基酸残基的位置数或核酸碱基或氨基酸残基与缺口比对的位置数以产生匹配位置的数量来计算百分比,将匹配位置的数量除以比较窗口中的总位置数,并将结果乘以100以产生序列同一性的百分比。优选地,在参考序列(本文为SEQ ID NO:1(“CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWWCHMNPCLEG

EDCKVLPDYSG WSCSSGNKVKTTKVTR"))的整个长度上确定序列同一性)。考虑到SEQ ID NO:5("SFPGQVAGTTRAQPSSVEASIVIQKWWSHMNPSLEGEDSKVLPDYSGW SSSSGNKVKTTKVTR")的具体实例),所述序列与SEQ ID NO:1的同一性超过90%,具体地,使用BLAST算法,其与SEQ ID NO:1的同一性为90.48%。

[0045] 用于比较的序列的最佳比对可以通过以下进行:例如,通过Smith和Waterman,的局部同源性算法,(1981)Adv.Appl.Math.2:482,通过Needleman和Wunsch的同源性比对算法,(1970)J.Mol.Biol.48:443,通过Pearson和Lipman的相似性搜索方法,(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444,通过这些算法的计算机实现(GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA),或者通过目视检查(通常参见Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel et al.,eds.,Current Protocols,Greene Publishing Associates,Inc.and John Wiley&Sons,Inc.,(1995Supplement))。

[0046] 适用于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的实例是BLAST和BLAST 2.0算法,它们分别在Altschul et al.,(1990),J.Mol.Biol.215:403-410和Altschul et al.,(1977)Nucleic Acids Res.3389-3402中描述。执行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心网站公开获取。该算法首先通过识别查询序列中长度为"W"的短词来识别高分序列对(HSP),当与数据库序列中相同长度的词比对时,这些短词匹配或满足某个正值阈值评分"T"。T被称为邻域词评分阈值(Altschul et al.,supra)。这些初始的邻域词击中充当启动搜索的种子,以找到包含它们的更长的HSP。然后,沿着每个序列在两个方向上扩展单词击中,直到累积比对评分可以增加为止。对于核苷酸序列,累积评分是使用参数"M"(一对匹配残基的奖励评分;始终>0)和"N"(错配残基的惩罚评分;始终<0)来计算的。对于氨基酸序列,使用评分矩阵来计算累积评分。当出现以下情况时,每个方向的单词击中的延伸都会停止:累积比对评分从其最大达到值下降数量"X";由于一个或多个负评分残基比对的积累,累积评分变为零或以下;或者到达任一序列的末尾。BLAST算法参数W、T、X确定了比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)默认使用11的字长(W)、10的期望值("E")、M=5、N=-4,以及两条链的比较。对于氨基酸序列,BLASTP程序默认使用3的字长(W)、10的期望值(E),以及BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff and Henikoff,(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915)。

[0047] 氨基酸序列同一性百分比的程度也可以通过ClustalW分析(版本W1.8)来获得,通过计算比对中相同匹配的数量,然后将该相同匹配的数量除以参考序列的长度,并使用以下默认ClustalW参数来实现慢速/准确的成对最佳比对-缺口开放罚分:10;缺口延伸罚分:0.10;蛋白质权重矩阵:Gonnet系列;DNA权重矩阵:IUB;切换慢速/快速成对比对=慢速或完全比对。

[0048] 本文使用的术语"核酸"或"多核苷酸"是指任意长度的核苷酸的聚合形式,无论是核糖核苷酸还是脱氧核糖核苷酸。因此,这些术语包括但不限于单链、双链或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂交体、或包含嘌呤和嘧啶碱基的聚合物、或其他天然的、化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基。多核苷酸的主链可以包含糖和磷酸基团(通常在RNA或DNA中发现),或者修饰或取代的糖或磷酸基团。或者,多核苷酸的主链可以包含合成亚基的聚合物,例如磷酸酰胺,因此可以是寡脱氧核苷磷酸酰胺(P-NH2)或混合磷酸酰胺-磷酸二酯寡聚物。此外,可以通过合成互补链并在适当条件下使链退火,或者通

过使用DNA聚合酶和适当的引物从头合成互补链,从化学合成的单链多核苷酸产物中获得双链多核苷酸。

[0049] 术语“载体”是指包含编码肽、多肽或蛋白质的多核苷酸序列的DNA或RNA分子。载体通常含有能够指导编码多核苷酸序列(也称为转基因)在引入核酸分子的细胞中表达的调控元件。术语“转基因”是指引入细胞并能够转录为RNA并任选地在适当条件下翻译和/或表达的多核苷酸。在某些方面,它赋予引入它的细胞期望的特性,或以其他方式导致期望的技术效果,这里通常是治疗效果。转基因可能含有编码一种或多种蛋白质或一个或多个蛋白质片段的序列。

[0050] 术语“基因治疗”是指为了预防或治疗疾病而将基因/核酸递送到个体细胞中的治疗。

[0051] 术语“转染”是指细胞(例如原核生物或真核生物细胞)吸收外来多核苷酸。当外源多核苷酸被引入细胞时,该细胞即被认定为“转染”。多种转染技术是本领域中公知的。参见例如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),和Chu et al.,Gene 13:197(1981)。此类技术可用于将一种或多种外源核酸引入合适的宿主细胞。

[0052] 术语“转导”是指将核酸分子递送到受体宿主细胞中,例如通过基因递送载体,例如重组病毒载体,特别是逆转录病毒、腺病毒、重组腺相关病毒(AAV)、单纯疱疹病毒和慢病毒。例如,通过rAAV病毒体转导靶细胞会导致该病毒体中所含的rAAV载体转移到转导细胞中。

[0053] 重组“腺相关病毒(AAV)”是具有单链线性DNA基因组,缺乏致病性且免疫原性低的小型Dependoparvovirus,其使用重组方法人工产生。重组AAV(rAAV)优选具有组织/细胞特异性靶向能力,使得rAAV的转基因被特异性地或优选地递送到一个或多个预定的组织/细胞。AAV衣壳以及调节区的类型和施用途径是确定这些组织特异性靶向能力的重要因素。

[0054] 在本发明的上下文中,术语“疼痛”是指与组织损伤相关的任何疼痛或敏感。优选地,本文中使用的术语“疼痛”应理解为异常敏感性,即,通常为由所有类型的感觉神经元(包括伤害感受器和非伤害感受器)的异常增强的活性介导的超敏反应。术语疼痛包括选自下组的任何疼痛:伤害感受器介导的疼痛(本文中也称为“伤害性疼痛”)、神经病理性疼痛、炎症性疼痛、病理性疼痛、急性疼痛、亚急性疼痛、慢性疼痛、机械性疼痛、化学性疼痛、躯体疼痛、内脏疼痛、深部躯体疼痛、浅表躯体疼痛、躯体形式疼痛、痛觉超敏、痛觉过敏或与神经损伤相关的疼痛。

[0055] “伤害性”疼痛或“伤害感受器介导的”疼痛是由于强烈或有害刺激激活外周感觉神经元(伤害感受器)的特定子集的而发生的。根据本发明,伤害性疼痛包括机械性疼痛(挤压、撕裂等)和化学性疼痛(伤口处的碘、眼睛里的辣椒粉)。伤害性疼痛的实例包括但不限于创伤或手术疼痛、分娩疼痛、扭伤、骨折、烧伤、撞伤、擦伤、注射、牙科手术、皮肤活检和阻塞。伤害性疼痛包括内脏疼痛和躯体疼痛,特别是深部躯体疼痛和浅表躯体疼痛。

[0056] 内脏疼痛是弥漫性的,难以定位,通常涉及远处的、通常是浅表的结构。它可能伴有恶心和呕吐,并可能被描述为令人恶心、深沉、挤压和/或沉闷。深部躯体疼痛是由韧带、肌腱、骨骼、血管、筋膜和肌肉中的伤害感受器的刺激引起的,是钝痛和局部不佳的疼痛。深

部躯体疼痛的实例包括扭伤和骨折。浅表疼痛是由皮肤或其他浅表组织中的伤害感受器的激活引起的,并且是尖锐的、边界清晰的和位置明确的。产生浅表躯体疼痛的损伤的实例包括轻微伤口和轻微(一度)烧伤。

[0057] 在本发明的上下文中,术语“损伤引起的疼痛”涵盖神经病理性疼痛、炎症性疼痛和术后疼痛。

[0058] 炎症性疼痛是在组织损伤或炎症存在的情况下发生的疼痛,包括术后疼痛、创伤后疼痛、关节炎(类风湿性关节炎或骨关节炎)疼痛、与自身免疫性疾病(如牛皮癣)相关的疼痛以及与关节、肌肉和肌腱损伤相关的疼痛,如轴性下腰疼痛。炎症导致外周感觉神经元的敏感化,从而引起自发性疼痛并使疼痛超敏反应失效。急性或慢性病理组织炎症通过外周感觉神经元的敏感化强烈影响疼痛知觉,引起局部和失能性疼痛超敏反应。已知炎症介质能够部分通过改变存在于神经末梢中的离子通道的表达和/或功能来增强伤害性初级传入纤维的兴奋性。

[0059] 神经病理性疼痛是常见的慢性非恶性疼痛,是由于外周或中枢神经系统受伤或功能障碍引起的。神经病理性疼痛可能具有不同的病因,并且可能由于以下原因发生:例如,创伤、手术、椎间盘突出、脊髓损伤、糖尿病、带状疱疹感染(带状疱疹)、HIV/AID、晚期癌症、截肢(包括乳房切除术)、腕管综合症、长期饮酒、暴露于辐射以及神经毒性治疗药物(例如某些抗HIV和化疗药物)的意外副作用。特殊类型的神经病理性疼痛是“化疗引起的外周神经病理性疼痛”(CIPN)或“化疗引起的神经病理性疼痛”(CINP)。CINP或CIPN是抗癌药物(例如铂类和紫杉烷衍生药物(奥沙利铂、顺铂、卡铂和紫杉醇))最严重的副作用之一。CINP甚至可以是中断治疗的因素,从而增加死亡风险。神经病理性疼痛通常以出现慢性痛觉超敏(定义为由通常不会引起疼痛反应的刺激所引起的疼痛,例如轻触)和/或痛觉过敏(定义为对通常疼痛刺激的增加的敏感性)为特征或导致其出现,并且可能会在任何受损组织明显愈合之后持续数月或数年。癌症患者也可能出现疼痛,这可能是由于炎症、压迫、侵袭、转移扩散到骨骼或其他组织等多种原因造成的。疼痛还包括偏头痛和与支配脑膜的感觉纤维的激活有关的头痛。根据本发明的肽,例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5的肽,用于治疗上述类型的疼痛。

[0060] 本发明的肽还可用于治疗与Ehlers-Danlos综合症相关的疼痛,其包括慢性肌肉和/或骨骼和/或关节疼痛。

[0061] 优选地,本发明的肽用于预防或治疗损伤引起的疼痛。更优选地,本发明的肽用于预防或治疗神经病理性疼痛(例如化疗引起的神经病理性疼痛或化疗引起的外周神经病理性疼痛)、术后疼痛和/或炎症性疼痛。如实验部分所示,发明人还证明本发明的肽适合于预防受试者发生术后机械性痛觉超敏。有利的是,本发明的肽可以在不引起受试者任何耐受性的情况下使用。

[0062] 通常,本发明的肽用于预防或治疗慢性损伤引起的疼痛。通常,本发明的肽用于预防或治疗慢性神经病理性疼痛,例如慢性化疗引起的外周神经病理性疼痛(CIPN)、慢性化疗引起的神经病理性疼痛(CINP)或慢性神经损伤引起的疼痛;慢性术后疼痛;和/或慢性炎症性疼痛。

[0063] 在本发明的上下文中,术语“治疗)”)受试者的疼痛是指在应用或施用本文定义的序列SEQ ID NO:1或其变体的合适肽或根据本发明的组合物之后,延迟、稳定、治愈、愈合、

减轻、缓解、改变、改善、改进、补救或影响本文所述受试者的任何形式的疼痛,或与疼痛相关的任何疾病或病症,特别是急性、亚急性或慢性疼痛(特别是与通常由神经病理性疼痛引起的慢性疼痛、术后疼痛或炎症性疼痛相关的任何神经性病症),或此类疾病或病症的任何症状。

[0064] 术语“治疗))”也指治疗疼痛(可能与任何损伤、病理或病症相关)的任何成功指标,包括任何客观或主观参数,例如减轻、缓解、减缓进展或严重程度、稳定、减轻疼痛症状,或使受试者可以忍受或更能忍受疼痛。术语“治疗”疼痛还包括增加疼痛耐受性和/或减少感知到的疼痛。在特定方面,本发明的方法、化合物和组合物用于增加疼痛耐受性和/或减少感知到的疼痛。本文使用的术语“疼痛耐受性”是指受试者在情绪和/或身体崩溃之前可以感知和承受的疼痛量。疼痛耐受性不同于疼痛阈值(产生疼痛所需的最小机械刺激)。本文中使用的“增加疼痛耐受性”通常是指与之前的状态相比,受试者可以产生更大的疼痛耐受性(即,感知到的疼痛更少)的情况,例如,在向受试者施用序列SEQ ID NO:1的合适肽或其变体或包含所述肽或变体的组合物之后。

[0065] 在本发明的上下文中,与受试者的疼痛相关的“预防”或“防止”是指在应用或施用序列SEQ ID NO:1或其变体的适当肽或根据本发明的组合物后,至少降低受试者患上(或易患上)任何类型疼痛的风险的可能性。例如,“预防”包括使可能接触或易受疼痛影响但尚未经历或显示疼痛症状的受试者不出现至少一种疼痛临床症状。

[0066] 在本发明的上下文中,“受试者”或“患者”是指动物,特别是需要治疗疾病或病症或其症状的哺乳动物。受试者可以是已被诊断为患有疾病或病症、或被确定为处于罹患疾病或病症的风险中的受试者,所述疾病或病症已知会导致受试者感到疼痛。在具体实例中,受试者被诊断或患有疼痛,例如急性疼痛和/或亚急性疼痛或慢性疼痛,包括神经病理性疼痛、术后疼痛、炎症性疼痛、痛觉过敏和/或痛觉超敏。

[0067] 在具体方面,受试者是人。

[0068] 在另一个具体的方面,受试者是动物,特别是家养动物或繁殖动物,特别是马、狗、猫、牛等。

[0069] 在另一个具体方面,受试者具有myo1A基因中的至少一个突变等位基因。

[0070] 肽

[0071] 发明人发现了可以预防或治疗疼痛的新型肽,特别是在受伤或发炎的神经系统的情况下逆转机械超敏反应。发明人认为,通过调节脊髓网络的兴奋性,这些肽表现出止痛或镇痛活性,特别是通过专门针对机械和/或化学诱导的伤害感受信号表现出止痛活性。

[0072] 本文描述的肽是/由来自人类TAFA-4成熟蛋白的105个氨基酸残基的特定片段组成(由信号序列的切割产生,并在公共数据库中识别,如Tanget al,2004年所公开的登记号#NP_0011005527或Genbank登记号AAP92409)。

[0073] 在第一方面,本发明涉及序列SEQ ID NO:1的分离的、合成的或重组的肽,或涉及与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽,例如SEQ ID NO:5的变体肽。

[0074] 在具体方面,序列SEQ ID NO:1的肽或其变体例如SEQ ID NO:5的变体肽是重组肽(即生物产生的肽)。

[0075] 在具体方面,根据本发明的肽是包含以下氨基酸序列的肽,CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWWCHMNPCLEGEDCKVLPDYSGWS CSSGNKVKTTKVTR(SEQ ID NO:1),即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,分子量为6920g/mol。

[0076] 在另一个具体方面,本发明的肽是由SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列组成,或基本由SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列组成的肽。

[0077] 在进一步的具体方面,根据本发明的肽是由SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列组成,或基本由SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列组成的肽。

[0078] 术语“基本由.....组成”具有通常赋予它们的含义,例如,它们允许未明确叙述的要素,但排除在现有技术中发现的要素或影响本发明的基本或新颖特征的要素。因此,“基本由特定序列组成”的肽是指包含该序列或由该序列组成的肽,并且包括对于肽活性非必需的其他特征。

[0079] SEQ ID NO:1的肽由人TAFA-4成熟蛋白的63个C端氨基酸残基组成,或基本由其组成,并且可以被鉴定为UniProt登记号#Q96LR4的氨基酸78-140。

[0080] 发明人认为,参照SEQ ID NO:1中所示的位置,SEQ ID NO:1(CFPGQVAGTTRAQPSCV EASIVIQKWWCHMNPCLEGEDCKVLPDYSG WSCSSGNKVKTTKVTR)中以粗体显示的两个氨基酸残基,位置13处的Q(Glu)和位置45处的Y(Tyr),与该肽的生物活性有关,特别是与脊髓中间神经元,优选脊髓lamina IIi中间神经元的兴奋性的调节有关。

[0081] SEQ ID NO:1的肽的变体也是发明人本文首次公开的。变体是指从SEQ ID NO:1的肽衍生的肽,并且是由于在SEQ ID NO:1的肽中的一个或多个位点处删除或添加一个或多个氨基酸和/或替换一个或多个氨基酸而产生的。如果变体基本上保留了SEQ ID NO:1的肽的功能活性,或者甚至改善了所述功能活性以允许预防或治疗疼痛,则该变体将被视为功能性变体。可以使用功能测定(例如实验部分中进行的行为测定)来测量活性。

[0082] 在本发明的背景下可用的肽变体可以与SEQ ID NO:1具有至少90%、90.5%、91%、92%、92.1%、93%、93.7%、94%、95%、95.2%、96%、96.8%、97%、98%、98.4%或99%的序列同一性。

[0083] SEQ ID NO:1的肽(“TT1”)的特定且优选的变体是SEQ ID NO:5的肽(“TT6”):SFP GQVAGTTRAQPSSVEASIVIQKWWSHMNPSLEGEDSKVLPDYSGWSS SSGNKVKTTKVTR,即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,分子量为6820g/mol。

[0084] 在特定方面,与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的变体调节脊髓中间神经元(优选脊髓lamina IIi中间神经元)的兴奋性。在优选的方面,变体是包含一个或多个点突变(例如2、3、4、5或6个点突变)的肽,所述点突变添加、删除或替换SEQ ID NO:1中存在的任何氨基酸,前提是SEQ ID NO:1中位置13处的氨基酸残基Q和位置45处的氨基酸残基Y保持不变(位置13和45是参考SEQ ID NO:1中所示的位置)。

[0085] 因此,在本发明的优选方面,在与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽变体的氨基酸序列中,两个氨基酸(SEQ ID NO:1的位置13处的Q和位置45处的Y)保持不变,以SEQ ID

NO:5的肽为例。

[0086] 在另一个特定方面,可用于本发明上下文的肽的变体可以与SEQ ID NO:1具有至少84.1%、85%、85.7%、86%、87%、87.3%、88%、88.9%或89%的序列同一性。优选地,与SEQ ID NO:1具有至少85%同一性的变体调节脊髓中间神经元(优选脊髓lamina IIi中间神经元)的兴奋性。

[0087] 在特定方面,变体是包含七个或更多个点突变(例如8、9或10个点突变)的肽,所述点突变添加、删除或替换SEQ ID NO:1中存在的任何氨基酸,前提是SEQ ID NO:1中位置13处的氨基酸残基Q和位置45处的氨基酸残基Y保持不变(位置13和45是参考SEQ ID NO:1中所示的位置)。

[0088] 在特定方面,一个或多个缺失位于SEQ ID NO:1的N端。在另一个方面,一个或多个缺失位于C末端,或位于SEQ ID NO:1的任何其他位置,前提是SEQ ID NO:1的位置13和位置45的两个氨基酸(Q和Y)保持不变。在又一方面,两个或更多个缺失位于SEQ ID NO:1的N端和C端。在SEQ ID NO:1的肽的N和/或C端或其核心处的此类缺失可以产生SEQ ID NO:1的截短的人肽变体。

[0089] 此外,本发明的肽可以与另一种肽或蛋白质融合以形成可用于本文所述方法的缀合物。本文中的术语“缀合物”是指在单个多肽内将两个分子的生物学功能结合的工程融合构建体,即SEQ ID NO:1的肽或其变体,例如能够调节伤害感受器或中间神经元的兴奋性,与例如与靶细胞特异性相互作用或结合的多肽一起。

[0090] 本发明还涉及编码本文所述的SEQ ID NO:1的肽或其变体的核酸(SEQ ID NO:2或9)。本发明涵盖编码SEQ ID NO:1的肽或其变体的任何序列,以及由遗传密码简并而产生的类似序列。在特定方面,编码本文所述肽的核酸包含SEQ ID NO:2的序列、由或基本由SEQ ID NO:2的序列组成,SEQ ID NO:2:TGCTTCCCGGGACAGGTGGCGGGCACAACTCGGGCTCAACCTTCTTGTGTTGAAGCTTCCATTGTGATTCAGAAATGGTGGTGTCACATGAATCCGTGTTTGGAAGGAGAGGATTGTAAAGTGCTGCCAGATTACTCAGGTTGGTCCTGTAGCAGTGGCAATAAAGTCAAAACTACGAAGGTAACGCGG.

[0091] 在另一个特定方面,编码本文所述肽的核酸包含SEQ ID NO:9的序列、由或基本由SEQ ID NO:9的序列组成,SEQ ID NO:9:TGCTTTCCAGGTCAAGTTGCGGGAACAACTCGTGCACAACCATCGTGCGTAGAGGCCTCAATTGTTATCCAAAAGTGGTGGTGTCACATGAACCCCTGCCTCGAAGGAGAGGACTGTAAGGTACTGCCTGACTACAGCGGGTGGTCATGTTCATCAGGCAATAAGGTGAAGACGACCAAAGTTACCCGT.SEQ ID NO:9的核酸特别适用于在细菌中生产SEQ ID NO:1的肽。

[0092] 本发明还涉及编码本文所述的SEQ ID NO:5的肽或其变体的核酸(SEQ ID NO:6)。本发明涵盖编码SEQ ID NO:5的肽或其变体的任何序列,以及由遗传密码简并而产生的类似序列。在特定方面,编码本文所述肽的核酸包含SEQ ID NO:6的序列、由或基本由SEQ ID NO:6的序列组成,SEQ ID NO:6的序列:TCGTTTCCAGGTCAAGTTGCGGGAACAACTCGTGCACAACCATCGTCGGTAGAGGCCTCAATTGTTATCCAAAAGTGGTGGTCGCACATGAACCCCTCGCTCGAAGGAGAGGACTCGAAGGTACTGCCTGACTACAGCGGGTGGTCATCGTCATCAGGCAATAAGGTGAAGACGACCAAAGTTACCCGT

[0093] 编码SEQ ID NO:1的肽或其变体的上述核酸序列可与调节序列相邻,以控制其在适当的宿主细胞中的表达。

[0094] 在另一方面,本发明还涉及表达盒,其从5’至3’按以下顺序包含:

[0095] -启动子,

[0096] 编码本文所述的SEQ ID NO:1的肽或其变体的核酸序列;和

[0097] -终止信号,例如多聚腺苷酸化信号。

[0098] 编码SEQ ID NO:1的肽或其变体的上述核酸序列或本文公开的表达盒的两侧可以有适合于将其包装到载体中的序列,该载体优化其在细胞中的转录和/或翻译。

[0099] 在另一方面,本发明还涉及允许表达本文所述肽的载体。

[0100] 产生该肽的方法

[0101] 为了允许在宿主细胞中表达,编码本文所述肽(或其变体之一)的核酸可以存在于载体中,并且在将所述载体引入合适的宿主细胞后,可以根据本领域公知的标准克隆和表达技术表达该序列以产生本文所述的编码肽(例如,如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中所述)。可以采用各种表达载体来表达编码本文所述肽的多核苷酸序列。可用于本发明的表达载体不完全包括真核表达载体,特别是哺乳动物表达载体、基于病毒的表达载体、杆状病毒表达载体、植物表达载体和任何质粒表达载体,以便在宿主细胞中产生任一种本文所述的肽。表达载体也可以是允许在细菌系统中表达肽的载体。

[0102] 表达载体的选择取决于载体所要表达的预期宿主细胞。本领域技术人员可以轻松做出这一选择。本发明还涉及包含编码本文所述肽的核酸序列的细胞,特别是宿主细胞。本发明人还首次公开了利用本文所述的载体修饰的(宿主)细胞。

[0103] 可以在原核或真核宿主细胞中表达本发明的肽或其变体。代表性宿主细胞包括许多大肠杆菌菌株、哺乳动物细胞系,例如CHO、CHO-K1和HEK293;昆虫细胞,例如Sf9细胞;以及酵母细胞,例如酿酒酵母和巴斯德毕赤酵母。

[0104] 本文所述的核酸或载体可通过通常用于将外源DNA引入原核或真核宿主细胞的标准技术转染到宿主细胞中,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。或者,本文所述的核酸或载体可通过使用基于病毒的载体的转导递送到宿主细胞中。

[0105] 纯度可以通过任何适当的标准方法测量,例如通过柱色谱法、薄层色谱法或高效液相色谱(HPLC)分析。分离或合成肽还定义了对人受试者安全施用的无菌程度,例如没有传染性或毒性剂。

[0106] 本文描述的组合物和方法中使用的肽也可以通过固相合成技术生产。肽的直接化学合成可以通过本领域技术人员熟知的方法来完成,例如天然化学连接(NCL)。该化学方法由未保护的肽片段的偶联组成:N端半胱氨酸的肽与C端硫酯肽发生反应。该转硫酯化反应之后迅速发生分子内S,N-酰基转移,导致在连接位点形成天然酰胺键。当两个肽在一步连接中连接,然后进行一步纯化时,预期产量非常高,因此适合大规模生产用于治疗用途。

[0107] 基因治疗

[0108] 通过将编码本文所述肽的核酸序列克隆到适当的载体中,本发明人还提供了新的基因传递工具,特别是用于疼痛,特别是急性、亚急性或慢性疼痛,优选慢性疼痛的基因治疗的遗传构建体(例如表达盒或载体)。可以采用基因治疗以允许受试者的特定细胞内源性产生TAFA-4-肽、TT1肽或其变体(例如TT6肽)。基因治疗可以在体内或体外进行。体外基因治疗需要分离和纯化至少受试者的细胞样品,将编码本文所述肽的核酸序列(即转基因)引入分离的细胞,并将遗传改变/修饰的细胞重新引入受试者体内。相反,在体内基因治疗中,

转基因通常被包装起来施用于受试者。基因传递构建体可以是非病毒的,也可以是病毒的。优选地,本文描述的遗传构建体用病毒元件、病毒载体和/或任何病毒包装系统制备,该病毒包装系统可用于在靶标组织/细胞中表达转基因/编码序列(即编码SEQ ID NO:1的肽或其变体的核酸序列)。病毒载体可以掺入任何合适的启动子和其他转录调节子,以允许或促进转基因产物在靶标组织/细胞中的表达。病毒包装系统最好适应靶标细胞。一旦进入靶标细胞,该系统就会促进向靶标组织的递送。本文所述方法中可用的病毒载体优选为复制缺陷型病毒,例如腺病毒或腺相关病毒(AAV)载体。

[0109] 在一些方面,本发明涉及重组腺相关病毒(AAV),其基因组中包含编码SEQ ID NO:1的肽或其变体(例如SEQ ID NO:5的肽)的核酸序列,该核酸序列通常可操作地连接至启动子。

[0110] 迄今为止,已经从人或非人灵长类动物(NHP)中分离出至少几十种具有不同表面特性的不同的AAV血清型并进行了表征。术语“血清型”允许技术人员区分具有血清学上不同衣壳的AAV。血清学特异性是根据一种AAV血清型的抗体与其他AAV血清型相比缺乏交叉反应性来确定的。本文描述的rAAV,也称为rAAV载体或rAAV颗粒,可以具有以下已知血清型中的任一种,即可以选自例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV.rh8、AAV.rhIO、AAV.rh20、AAV.rh39、AAV.Rh74、AAV.RHM4-1、AAV.hu37、AAV.Anc80、AAV.Anc80L65、AAV.7m8、AAV.PHP.B、AAV2.5、AAV2tYF、AAV3B、AAV.LK03、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15、AAV.HSC16和AAVhu68。rAAV载体可能对特定细胞、组织或器官具有增强的向性。在通过口服途径施用的情况下,rAAV载体可能对胃、小肠或结肠组织具有增强的向性,更具体地说,对构成这些组织的细胞,特别是上皮细胞,例如肠细胞、杯状细胞、肠内分泌细胞、潘氏细胞或簇细胞。对于位于肠道内的靶细胞或递送到肠道的靶细胞,可以选择AAV4、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10中的任何一个作为特别有效的。

[0111] 本发明的基因治疗载体或盒可以通过本领域技术人员熟知的和先前描述于例如PCT专利申请公开号WO03042397和美国专利号6,632,670中的方法产生。

[0112] 本说明书还涉及生产重组载体(例如病毒载体如AAV)的方法,包括:

[0113] a)培养已用本文所述重组载体转染/转导的细胞;以及

[0114] b)从转染/转导细胞的上清液中回收重组载体。

[0115] 本发明的基因治疗载体可以通过将两个或三个质粒转染到293或293T人胚肾细胞系中产生。在一些方面,编码治疗基因的DNA由一个质粒提供;由一种或多种血清型的AAV产生的衣壳蛋白和复制基因、以及例如由腺病毒产生的辅助功能均由第二个质粒反式提供。在一些方面,编码SEQ ID NO:1的肽或其变体的DNA由一个质粒提供;由一种或多种血清型的AAV产生的衣壳蛋白和复制基因由第二个质粒反式提供,并且例如由腺病毒产生的辅助功能由第三个质粒提供。在特定方面,第一质粒包含表达盒,该表达盒包含编码本文所述肽的核酸序列,该核酸序列可操作地连接至启动子,包括两个侧翼倒置末端重复序列(ITR)。

[0116] 在细胞培养之后,基因治疗载体可以例如通过冻融循环从细胞中释放出来,并通过本领域技术人员熟知的任何方法纯化,例如通过使用碘克沙醇分级梯度,然后在Hi-Trap QHP柱上进行离子交换色谱。然后,可以通过旋转柱浓缩所得的基因治疗载体,并且可以将

纯化的载体冷冻保存(在-60℃或以下),例如在磷酸盐缓冲盐水中。

[0117] 本发明的相关方面包括用本文描述的重组载体转染或转导的宿主细胞,例如用AAV载体转导。本发明的进一步相关方面包括包含本文所述的重组载体(例如AAV)的基因组或(基本)由其组成的任何核酸分子。

[0118] 组合物

[0119] 本文描述的一种或多种肽可以配制用于分开使用或组合使用,以及单独使用或以组合物的形式使用。该组合物可以是饮食组合物或药物组合物,并且可以用于本文所述的治疗或预防方法。

[0120] 在另一方面,本发明涉及包含本文所述的肽、核酸、载体或细胞以及饮食或药学上可接受的支持物的组合物。

[0121] 术语"饮食上可接受的支持物"涉及载剂,该载剂允许受试者无风险地摄取和消化包含本文所述的肽、核酸序列、载体或细胞的组合物,并且能够保护所述肽免受任何攻击,特别是与食物消化相关的攻击,这些攻击可能会在肽根据疼痛的性质和定位在正确的位置和正确的时间产生治疗作用之前改变肽。

[0122] 在口服施用的情况下,该组合物还可以包含至少一种胃肠道保护剂,优选酸抑制剂,其存在量可有效将受试者的胃部pH值升高到至少2、至少3、至少4,和更优选到至少5或6。术语"酸抑制剂"是指抑制胃酸分泌并增加胃液pH值的药物。酸抑制剂可以包括但不限于H2阻滞剂,包括西咪替丁、雷尼替丁、乙溴替丁、帕布替丁、拉呋替丁、洛替丁、法莫替丁;质子泵抑制剂,包括奥美拉唑、埃索美拉唑、泮托拉唑、兰索拉唑、右兰索拉唑、雷贝拉唑、帕利拉唑、来明拉唑和泰妥拉唑;或其任意组合。

[0123] "药学上可接受的支持物/媒介物/载剂"可以是与活性剂(即本发明的肽或其变体以及任选的任何另外的不同的活性剂)一起施用的稀释剂、佐剂或赋形剂。这样的药物载剂可以是无菌液体,例如水或油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用药物组合物时,水是优选的载剂。盐溶液、水葡萄糖和甘油水溶液也可用作液体载剂,特别是对于注射溶液。合适的药用赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。

[0124] 当该药物组合物用于口服施用时,片剂或胶囊可通过常规方法用药学上可接受的赋形剂制备,例如粘合剂(例如预胶化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素);填充剂(例如乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙);润滑剂(例如硬脂酸镁、滑石粉或二氧化硅);崩解剂(例如马铃薯淀粉或淀粉甘醇酸钠);或润湿剂(例如十二烷基硫酸钠)。可以用本领域中熟知的任何方法对片剂进行包衣。用于口服施用的液体制剂可以采用例如溶液、糖浆或混悬剂的形式,或者它们可以作为干燥产品存在,在使用前用水或其他合适的媒介物重构。此类液体制剂可以通过常规方法用药学上可接受的添加剂制备,例如悬浮剂(例如山梨醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪);乳化剂(例如卵磷脂或阿拉伯胶);非水媒介物(例如杏仁油、油性酯、乙醇或分馏植物油);和防腐剂(例如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯或山梨酸)。该制剂还可根据情况含有缓冲盐、调味剂、着色剂和甜味剂。

[0125] 本发明的组合物还可包含至少一种另外的活性化合物。优选地,另外的活性化合物是有效对抗疼痛的活性剂。"有效对抗疼痛"是指活性剂具有镇痛或止痛特性(受试者可测量地感觉到)。更优选地,另外的活性化合物是甾体抗炎药(SAID)、非甾体抗炎药(NSAID)

或阿片类药物。

[0126] SAID可包括但不限于氢化可的松、可的松、乙塞米松、泼尼松、泼尼松龙、去炎松、地塞米松、氟氢可的松或其任意组合。

[0127] NSAID可包括但不限于塞来昔布、罗非昔布、罗美昔布、伐地考昔、帕瑞考昔、依托考昔、CS-502、JTE-522、L-745,337、NS398、阿司匹林、对乙酰氨基酚(就本公开的目的被视为NSAID)、布洛芬、氟比洛芬、酮洛芬、萘普生、奥沙普秦、依托度酸、吲哚美辛、酮咯酸、氯诺昔康、美洛昔康、吡罗昔康、屈昔康、替诺昔康、萘丁美酮、双氯芬酸、甲氯芬那酸、甲芬那酸、二氟尼柳、舒林酸、托美丁、非诺洛芬、舒洛芬、苯恶洛芬、醋氯芬酸、托芬那酸、羟基保泰松,阿扎丙宗、苯基丁氮酮或其任意组合。

[0128] 阿片类药物可以包括但不限于(右)丙氧芬、A-甲基芬太尼、阿芬太尼、烯丙罗定、贝齐米特、丁丙诺啡、布托啡诺、卡芬太尼、去甲罗定、右吗拉胺、地佐辛、二乙酰吗啡、二氢可待因酮、二氢埃托啡、二吗啡酮、地芬诺酯、地匹哌酮、埃托啡、芬太尼、酮贝米酮、利非他明、左乙酰美沙朵、左美沙芬、左吗啡诺、洛哌丁胺、哌替啶、美普他酚、美沙酮、甲基吗啡、吗啡、纳布啡、尼可吗啡、奥美芬太尼、奥利帕文、羟可酮、羟吗啡酮、PEPAP、对吗啡、喷他佐辛、非那佐辛、哌啶胺、罗定、瑞芬太尼、舒芬太尼、他喷他多、替利定、曲马多,或阿片类拮抗剂如纳美芬、纳洛酮、纳曲酮或其任意组合。

[0129] 治疗和预防用途

[0130] 本文描述的肽通常用于预防或治疗疼痛。

[0131] 本发明还涉及本文所述的肽,特别是序列SEQ ID NO:1的分离、重组或合成肽,或与SEQ ID NO:1具有至少90％同一性的肽,用作药物。

[0132] 在另一个特定且优选的方面,本发明涉及序列SEQ ID NO:5的分离、合成或重组肽,或本文定义的其变体,用作药物。

[0133] 在另一个方面,本文的发明人描述了如本文所述的肽、核酸、载体或细胞,用作预防或治疗有此需要的受试者的疼痛的活性成分/药剂。

[0134] 在特定方面,本文的发明人描述了本文所述的肽、核酸、载体、细胞或组合物用于制备用于治疗有此需要的受试者的疼痛的药物的用途。他们还在本文中描述了用于预防或治疗有此需要的受试者的疼痛的本文所述的肽、核酸、载体、细胞或组合物,以及用于预防或治疗疼痛的相应方法,包括向有此需要的受试者施用本文所述的所述肽、核酸、载体、细胞和/或组合物的步骤。

[0135] 在特定方面,本文的发明人描述了本文所述的肽、核酸、载体、细胞或组合物用于预防或治疗疼痛,特别是急性、亚急性或慢性疼痛,优选慢性疼痛的用途。

[0136] 优选地,疼痛是神经病理性疼痛(例如化疗引起的外周神经病理性疼痛或化疗引起的神经病理性疼痛)、术后疼痛、炎症性疼痛、痛觉过敏或痛觉超敏。

[0137] 在特定方面,本文的发明人描述了本文所述的肽、核酸、载体、细胞或组合物用于预防或治疗神经病理性疼痛(例如化疗引起的外周神经病理性疼痛或化疗引起的神经病理性疼痛)、术后疼痛或炎症性疼痛的用途。

[0138] 在特定方面,本文的发明人描述了本文所述的肽、核酸、载体、细胞或组合物用于预防或治疗慢性神经病理性疼痛(例如慢性化疗引起的外周神经病理性疼痛或慢性化疗引起的神经病理性疼痛)、慢性术后疼痛或慢性炎症性疼痛的用途。

[0139] 在特定方面,本文的发明人描述了本文所述的肽、核酸、载体、细胞或组合物用于预防或治疗痛觉过敏,特别是热(例如热或冷痛觉过敏,优选冷痛觉过敏)或机械性痛觉过敏,优选机械性痛觉过敏,甚至更优选损伤引起的机械性痛觉过敏的用途。

[0140] 在另一个特定方面,本文的发明人描述了本文所述的肽、核酸、载体、细胞或组合物用于预防或治疗痛觉超敏、特别是机械性痛觉超敏的用途。优选地,所述机械性痛觉超敏为神经损伤引起的机械性痛觉超敏或静态型的机械性痛觉超敏。

[0141] 在进一步的特定方面,本发明人描述了本文所述的肽、核酸、载体、细胞或组合物用于预防或治疗痛觉超敏、特别是热痛觉超敏、例如热痛觉超敏(即,对通常无痛的温暖刺激感知到的疼痛)或冷痛觉超敏(即,对通常无痛的冷刺激感知到的疼痛),优选冷痛觉超敏的用途。

[0142] 在特定方面,本文的发明人描述了本文所述的肽、核酸、载体、细胞或组合物用于在有此需要的受试者中预防或治疗机械性超敏反应(也称为对机械刺激的超敏反应或简称为痛觉过敏),优选损伤引起的机械性超敏反应的用途。

[0143] 治疗可改善触觉、灼热感或寒冷感、针刺感、麻木感、瘙痒感、剧烈疼痛和难以正确感知温度等一种或多种感觉。在特定方面,该治疗可消除疼痛。在另一个特定方面,该治疗减轻了疼痛的症状,特别是神经病理性疼痛(痛觉超敏和/或痛觉过敏)的症状。本发明的方法即使不能消除神经病理性疼痛,也能使神经病理性疼痛更易于控制(即改善生活质量)。

[0144] 可以使用本领域技术人员熟知的标准测试来评估疼痛,特别是(慢性)神经病理性疼痛是否已经使用本发明的特定肽进行了治疗。例如,已使用定量感觉测试(针刺试验、压力痛觉计、von Frey测痛实验、触觉、捏或用手指轻压)或使用疼痛评定量表对受试者的疼痛敏感度的评估进行了标准化。

[0145] 受试者

[0146] 在本发明的上下文中,受试者或患者是动物,优选哺乳动物。在特定方面,受试者是家养动物,例如马、狗、猫、牛等。在另一特定的且优选的方面,受试者是人类。

[0147] 患有源自神经病理性疼痛的慢性疼痛的受试者可能患有典型与此类神经病理性疼痛相关的疾病,例如纤维肌痛、复杂性局部疼痛综合症、带状疱疹后神经痛、Ehlers-Danlos综合症和红斑性肢痛症。

[0148] 在特定方面,受试者患有纤维肌痛(FM)。纤维肌痛是以慢性肌肉骨骼疼痛为特征的综合症(Siracusaet al,2021)。FM是由中枢敏化现象引起的,其特征是神经回路功能障碍,涉及传入伤害性刺激的感知、传递和处理,在运动系统层面普遍表现为疼痛。该疾病的主要症状是肌肉僵硬、关节僵硬、失眠、疲劳、情绪障碍、认知功能障碍、焦虑、抑郁、全身敏感以及无法进行正常的日常活动。FM还可能与特定疾病有关,例如感染、糖尿病、风湿病和/或精神或神经疾病。

[0149] 在特定方面,本文的发明人描述了本文所述的肽、核酸、载体、细胞或组合物用于预防或治疗纤维肌痛(FM)的用途。

[0150] 在另一方面,受试者患有复杂性局部疼痛综合征(CRPS)。复杂性局部疼痛综合症是涉及四肢的慢性神经性病症,其特征是剧烈疼痛,伴有感觉、自主神经、运动和营养障碍(Gohet al,2017)。该病症可能是由手术、创伤或轻伤引起的且具有不同的病程,从轻微和自限性,到慢性病,其影响日常生活活动和与健康相关的生活质量。CRPS可分为两种类型:

CRPS类型I和II的特征是不存在或存在可识别的神经损伤。CRPS I型是通常在起始有害事件后发生的综合症,并不局限于单个外周神经的分布,并且与诱发事件不成比例。它与水肿、皮肤血流变化、疼痛区域的异常汗腺活动、痛觉超敏和痛觉过敏有关,并且通常涉及患肢的远端或具有远端到近端的梯度。CRPS II型可被定义为灼痛、痛觉超敏和痛觉过敏,其发生在神经或支配该区域的主要分支之一的局部损伤后的肢体区域。

[0151] 在特定方面,本文的发明人描述了本文所述的肽、核酸、载体、细胞或组合物用于预防或治疗复杂性局部疼痛综合征(CRPS)的用途。

[0152] 在另一方面,受试者患有带状疱疹后神经痛(PHN)。带状疱疹后神经痛是带状疱疹(HZ)最常见的并发症,带状疱疹是由感觉神经节中休眠的水痘带状疱疹病毒的重新激活引起的感染(Ngoet al,2020)。其特征是局部起泡皮疹并伴随相关皮节疼痛。PHN被定义为在首次出现HZ皮疹后至少90天内持续的疼痛,并且它会显著降低受影响患者的生活质量。PHN细分为易激性伤害感受器模型和传入神经阻滞模型。在VZV重新激活期间,病毒会复制并从脊神经节扩散到其各自的外围环境。这种增殖会引起损伤外周神经的免疫应答和炎症。这种损伤会降低神经元对疼痛的抑制能力,从而降低疼痛信号去极化的阈值。这会导致对非疼痛刺激产生疼痛感知,这个过程称为外周敏化。C亚型伤害感受器的反复激活也会导致增强的背角兴奋状态。HZ造成的直接损伤会削弱下行抑制性疼痛通路,导致背角二级神经元的慢性激活。此外,据报道,与不患有PHN的HZ患者相比,患有PHN的HZ患者背角中缺失抑制性γ氨基丁酸(GABA)产生的中间神经元。这些因素在称为中枢敏化的过程中会放大传入输入的所有后续反应。在PHN中,该过程伴随着低阈值机械感受性传入(称为Aβ纤维)的解剖重组,这些机械感受性传入通常将无害的触觉刺激传递到中枢神经系统。当病毒损伤导致外周C伤害感受器丢失时,这些纤维会以补偿的方式与最初连接到C伤害感受器传入的二级神经元连接。这一过程称为传入神经阻滞,患有痛觉超敏的患者会表现出严重的感觉功能丧失。

[0153] 在特定方面,本文的发明人描述了本文所述的肽、核酸、载体、细胞或组合物用于预防或治疗带状疱疹后神经痛(PHN)的用途。

[0154] 在另一方面,受试者患有红斑性肢痛症(EM)。红斑性肢痛症是罕见的发作性肢端综合症,主要影响双侧对称性或单侧下肢,具有红斑、温热和灼痛的经典三联症(Maria Bibiana Leroux,2018)。EM与慢性疼痛综合症归为一类。原发性EM是常染色体显性遗传疾病,由OMIN(人类在线孟德尔遗传)编码为#133020。它与9型钠通道(SCN9A)的α亚基蛋白的改变有关,影响主要在背根神经节和交感神经节神经元中表达的Nav1.7通道。继发性EM与骨髓增殖性疾病、副肿瘤、自身免疫性疾病、接触毒素和感染有关。

[0155] 在特定方面,本文的发明人描述了本文所述的肽、核酸、载体、细胞或组合物用于预防或治疗红斑性肢痛症(EM)的用途。

[0156] 在特定方面,本文的发明人描述了本文所述的肽、核酸、载体、细胞或组合物用于预防或治疗其中伤害感受器或中间神经元传导的信号转导受损的任何疼痛相关病症的用途。

[0157] 发明人先前确定,当与表达功能性Myo1a的$Myo1a^{+/+}$参考受试者中观察到的表达相比时,受试者中肌球蛋白IA(Myo1a)的缺失、表达减少或不足或无功能性表达使受试者易于发生损伤引起的慢性机械性疼痛和/或炎症引起的慢性热痛(WO2017153424)。

[0158] 在另一方面,受试者是具有myo1A基因中一个或两个突变的等位基因的受试者。“突变”等位基因是指改变Myo1a的表达或表达水平的myo1A基因核酸(在编码或非编码区)的替换、缺失或插入。突变可以影响一个或多个核碱基。该替换可以是单核苷酸多态性(SNP)。

[0159] 在特定方面,本文的发明人描述了本文所述的肽、核酸、载体、细胞或组合物用于预防或治疗此类受试者的损伤引起的慢性机械性疼痛和/或炎症引起的慢性热痛的用途。

[0160] 剂量

[0161] 根据本发明的组合物优选以治疗有效量直接施用于受试者。术语“治疗有效量”是指治疗、改善或预防受试者疼痛所需的SEQ ID NO:1的肽或其任何变体的量。治疗有效量可在细胞培养试验或动物模型中初步估计。还可以使用动物模型来确定肽的适当浓度范围和施用途径。这些信息可以用来确定人体施用的有用剂量和途径。

[0162] 本文所述方法中使用的肽的剂量可能因受试者的一般健康状况、年龄、性别和体重、疼痛的性质和严重程度/强度、施用的时间、频率和持续时间、所使用的特定肽、药物组合、反应敏感性和对治疗的耐受性/反应而异。该合适的有效剂量可以通过常规实验确定,并由临床医生判断。

[0163] 为了获得合适的止痛或镇痛效果,本发明人在此所述的肽或其变体的有效剂量,每1kg体重,每24小时,在动物(通常是哺乳动物)中为1μg至100mg/kg/天之间,优选地为5μg至80mg/kg/天之间,更优选地为10μg至50mg/kg/天之间。

[0164] 当受试者为人类时,本发明人在此所述的肽或其变体的有效剂量在人类受试者中优选在2.5μg/kg/天至0.6mg/kg/天之间,优选在5μg或10μg/kg/天至0.5mg/kg/天之间,更优选在50μg或75μg/kg/天至0.3mg/kg/天之间。

[0165] 剂量可以以丸剂形式施用,也可以分成几部分,在一天内分别施用。换句话说,治疗可以是单剂量方案或多剂量方案。有效剂量可连续施用数天、数周、数月或数年。

[0166] 可以通过几种途径将本文所述的肽或组合物递送至受试者。

[0167] 在特定方面,本文描述的肽或组合物通过肌肉内、静脉内、腹膜内、口服(per os)、肛门、皮肤、皮下、真皮、透皮或鞘内方式施用于受试者,优选皮下或口服,甚至更优选口服。

[0168] 如实验部分所示,发明人证明了SEQ ID NO:1的肽和其SEQ ID NO:5的变体当皮下施用时具有止痛效果,以治疗神经病理性疼痛、术后疼痛和/或炎症性疼痛。令人惊讶的是,当口服(per os)施用SEQ ID NO:1或5的肽时也观察到相同的止痛效果。更令人惊奇和有利的是,本发明的肽与TAFA-4(全长)蛋白相比,当口服施用时表现出更好的止痛效果,这使得它比所述全长蛋白更方便和适合施用于患者。

[0169] 本发明人在此证明,与SEQ ID NO:1的肽具有约90%同一性的SEQ ID NO:5的变体,当与SEQ ID NO:1的肽相比时在功效方面达到相似的结果。

[0170] 试剂盒

[0171] 本发明还涉及试剂盒,其包含i)本文公开的肽、核酸、载体、细胞和/或组合物,以及ii)至少一种另外的对抗疼痛有效的不同活性化合物,优选不同于本文描述的肽或其变体。在特定方面,该试剂盒还包括iii)使用该试剂盒的书面说明。

[0172] 该试剂盒优选为包含至少两部分(例如两个不同的容器)的试剂盒套件,其中第一部分包含本文公开的肽、核酸、载体、细胞或组合物,而第二部分包含至少一种对抗疼痛有

效的另外的不同活性化合物。优选地,对抗疼痛有效的活性化合物是本文公开的甾体抗炎药(SAID)、非甾体抗炎药(NSAID)或阿片类药物。

[0173] 在特定方面,该试剂盒包括i)SEQ ID NO:1的肽、ii)至少一种对抗疼痛有效的另外的不同活性化合物、以及iii)任选地使用该试剂盒的书面说明。

[0174] 在另一个特定方面,该试剂盒包括i)与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的肽,例如SEQ ID NO:5的肽,ii)至少一种对抗疼痛有效的另外的不同活性化合物,以及iii)任选地使用该试剂盒的书面说明。

[0175] 在一个方面,试剂盒中的肽、核酸、载体、细胞或组合物为适合于肌肉内、静脉内、腹膜内、口服、肛门、皮肤、皮下、真皮、透皮或鞘内途径的形式,优选皮下或口服途径,甚至更优选口服途径。

[0176] 在另一方面,至少一种另外的对抗疼痛有效的不同活性化合物为适合于肌肉内、静脉内、腹膜内、口服(经口)、肛门、皮肤、皮下、真皮、透皮或鞘内途径的形式。

[0177] 根据所要治疗的疼痛的性质、来源和强度,也根据肽、核酸、载体、细胞或组合物的内容物的性质以及根据至少一种另外的对抗疼痛有效的不同活性化合物的性质,所述产品可以同时/伴随或顺序共同或不共同施用。

[0178] 本发明还涉及本发明的试剂盒在体内、离体或体外用于预防或治疗如上所述的疼痛(例如慢性疼痛、神经病理性疼痛、术后疼痛、炎症性疼痛、痛觉过敏或痛觉超敏)的用途。本发明的试剂盒还可用于预防或治疗急性或亚急性疼痛。

[0179] 本文还公开了本发明的试剂盒在制备用于预防或治疗有此需要的受试者的上述疼痛的药物中的用途,例如慢性疼痛、神经病理性疼痛、术后疼痛、炎症性疼痛、痛觉过敏或痛觉超敏。本发明的试剂盒还可以用于制备用于预防或治疗有此需要的受试者的急性或亚急性疼痛的药物。

[0180] 研究工具

[0181] 本发明还包括使用上文所述的肽或任何产品作为研究疼痛的研究工具。

[0182] 本文描述的肽可用于调节生物组织或细胞培养中的神经元兴奋性,例如研究机械和/或化学诱导的疼痛伤害性信号。

[0183] 本发明还涉及编码SEQ ID NO:1的肽或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽(例如SEQ ID NO:5的肽)的核酸或允许其表达的载体的用途,以在生物组织或细胞培养物中表达或调节SEQ ID NO:1的肽或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽(例如SEQ ID NO:5的肽)的表达(水平)。

[0184] 本文描述的核酸分子也可用于产生转基因动物。这可以通过局部体细胞修饰或通过生殖系治疗使生殖细胞包含可遗传的修饰来实现。因此,本发明还涉及转基因生物体(例如动物),其包含(即含有)SEQ ID NO:2、6或9的核酸或其变体;包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6或9的核酸或其变体的载体;或SEQ ID NO:1的肽或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的肽,例如SEQ ID NO:5的肽。因此,本发明还涉及含有编码本文所述任何肽的核酸序列或允许其表达的载体的宿主细胞或转基因生物体。

[0185] 提供下面的实施例是为了证明并进一步说明本发明的某些优选方面,但不应理解为限制本发明的范围。

实施例

[0186] 实施例1:通过化学合成的产生

[0187] 材料和方法

[0188] 多肽合成

[0189] 采用天然化学连接(NCL)法产生SEQ ID NO:1的肽。简而言之,产生了两种短肽。合成具有氨基酸序列CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWW(SEQ ID NO:3)的第一种27个氨基酸N端肽。合成具有氨基酸序列CHMNPCLEGEDCKVLPDYSGWSCSSGNKVKTTKVTR(SEQ ID NO:4)的第二种36个氨基酸C端肽(在其N端部分含有半胱氨酸残基)。采用一步连接将两种肽连接,然后进行一步纯化。

[0190] 小鼠

[0191] C57/B16J小鼠(8至12周龄)从Charles River Laboratories购买。所有实验均使用两种性别的小鼠。由于没有注意到雄性和雌性之间的差异,因此将两种性别的数据组合起来。小鼠维持在标准居住条件(22℃、40%湿度、12h光周期并且自由获取食物和水)下。做出了特别的努力以最小化本研究中使用的小鼠数量,以及它们所承受的压力和痛苦。所有实验均与欧洲实验动物护理和使用指南(Council Directive86/609/EEC)一致。所有实验程序均由动物实验独立伦理委员会(APAFIS)批准,如法国法律所要求的并根据法国动物实验立法的相关机构规定。所有实验均根据ARRIVE指南进行。

[0192] 疼痛模型1:保留神经损伤(SNI)模型-神经病理性疼痛。

[0193] 使用了Decosterd和Woolf,2000;Pain,Vol.87,p 149-158开发的保留神经损伤(SNI)模型。将其用作神经病理性疼痛模型。SNI模型包括胫骨分支和坐骨神经的腓总神经的横断:腓肠神经保持完整。后者随后会发展出神经病理性疼痛的体征,伴有显著的机械性痛觉超敏。SNI模型有很多优点:

[0194] -神经病理性疼痛是持续性的。这允许在重复注射肽后掌握习惯化现象。

[0195] -产生的痛苦是稳健的。

[0196] -模型非常可重复。

[0197] 用氯胺酮(100mg/kg IP)和赛拉嗪(10mg/kg IP)麻醉小鼠,并在无菌条件下暴露左侧坐骨神经。确定坐骨神经远端三分叉,用聚丙烯不可吸收6-0缝线(Ethicon)结扎胫骨分支和腓总分支;切除1mm,使腓肠分支保持完整。用缝线缝合伤口,并允许动物恢复并回到它们的笼子。

[0198] 疼痛模型2:爪子切口——术后疼痛。

[0199] 爪子切口手术如Brennan及其同事(1999)(Brennan,1999)所述进行。用氯胺酮(100mg/kg IP)和赛拉嗪(10mg/kg IP)麻醉小鼠,并经右后爪的皮肤和筋膜进行纵向切口。使用镊子纵向提起趾短屈肌,并用手术刀经肌肉做出切口,以将其切成两半。用缝线缝合伤口,语序动物恢复并回到它们的笼子。将爪子切口用作术后疼痛模型。

[0200] 疼痛模型3:角叉菜胶注射——炎症性疼痛。

[0201] 本发明人用Hamilton注射器将1x PBS中的20μl 1%λ-角叉菜胶(Sigma-Aldrich,22049-5G-F)的注射到小鼠左后爪的趾面。将角叉菜胶注射用作炎症性疼痛模型。

[0202] VonFrey's测试

[0203] Von Frey使用Von Frey(VF)毛发或纤维(其是小段尼龙棒,长度约为50mm)来测试

啮齿动物对机械刺激的敏感性。在这个测试中,动物站在一个升高的网状平台上,并穿过网插入Von Frey毛发以刺入动物的后爪。动物的正常反应包括缩回或舔或摇晃爪子。采用“上下”Von Frey法来确定引起50%动物中的爪子缩回反应所需的机械力。在此,将小鼠放置在金属丝网格上的塑料室中,并通过“上下”法(45)用von Frey细丝(Bioseb)进行刺激,从1g细丝开始,并使用0.04和4g细丝作为截断。

[0204] 统计分析

[0205] 结果表达为平均值±SEM。用Prism 7(Graphpad Software,La Jolla,CA,USA))进行统计分析。

[0206] 结果

[0207] 疼痛模型1:保留神经损伤(SNI)模型-神经病理性疼痛。

[0208] 1.1皮下施用SEQ IDNO:1的肽的止痛效果

[0209] 这些实验的目的是在产生神经病理性疼痛的保留神经损伤(SNI)模型中通过皮下注射评估根据本发明的SEQ ID NO:1的肽(本文中标识为“TT1”)的止痛效果。

[0210] 实验在八周大的雄性WT C57B16小鼠上进行。使用了三组小鼠,每组8只。将SEQ ID NO:1的肽以[0.6mg/mL]重悬于0.9%NaCl中。在本研究中,将该肽稀释并以0.3mg/kg的浓度使用。

[0211] 将0.9%NaCl溶液用作阴性对照(媒介物),将5mg/kg普瑞巴林(用于治疗神经病理性疼痛的众所周知的药物)用作阳性对照。

[0212] 在已经通过上/下法用Von Frey(VF)细丝测量小鼠的基础阈值后,将SNI模型放置到位。将小鼠麻醉,胫神经和腓骨神经的结扎开始实施,并然后切断这两条神经。剩下的完整的腓肠神经很快发展出神经病变。术后3天后确定神经病变的发生。从而观察到Von Frey细丝对同侧爪子的的反应阈值中的降低。

[0213] 手术后7天,再次测量反应阈值。然后为实验者皮下盲注射100μl/10g的每个肽溶液、每个媒介物和普瑞巴林溶液。

[0214] 注射后1小时、2小时、4小时和然后的24小时测量反应阈值。

[0215] 在SNI后第7天,所有小鼠的机械阈值中展现出急剧的下降(图1)。皮下注射SEQ ID NO:1的肽(其称为“肽”或“TT1”)施用后1小时就诱导反应(即缩爪)阈值中的强烈增加,其中在2小时处具有最大增加,其值与普瑞巴林相当。统计分析显示出,在2小时处与阴性对照相比的强显著的结果(其中p值<0.001)。

[0216] 1.2经口施用SEQ IDNO:1的肽的止痛效果

[0217] 使用与1.1中描述的相同的方案,除了肽、媒介物和普瑞巴林的施用是在手术后14天使用经口施用肽和媒介物进行的。

[0218] 对于经口施用,将SEQ ID NO:1的肽以30μg/mL的浓度稀释在1%w/v羟丙基甲基纤维素(Sigma-aldrich#423238,批次MKCD3665)、0.5%v/v Tween80(#2002-A,批次100412/16S407)溶液中,此后称为HPMC溶液(媒介物)。

[0219] 使用两根灌胃针经口施用媒介物和肽溶液。普瑞巴林(5mg/kg)由不同的实验者皮下注射,因此进行VF测量的实验者对治疗是盲目的(每个治疗n=8)。手术后14天进行施用。

[0220] 在SNI后第14天,所有小鼠表现出机械阈值中的急剧的下降(图2)。经口施用媒介物没有效果。经口施用SEQ ID NO:1的肽还在施用后1小时就诱导反应(即缩爪)阈值中的强

烈增加,其中具有缓慢下降直至24小时。与最多4h的媒介物处理的小鼠相比,其是显著不同的(1和2小时的p值<0.001,并且4小时的p值<0.05)。

[0221] 1.3 经口施用SEQ ID NO: 1的肽的剂量依赖性止痛效果

[0222] 将SEQ ID NO:1的肽以5种不同浓度(1、5、30、90和180μg/mL)重悬于HMPC溶液中。

[0223] 如前所述,用上/下方法进行Von Frey细丝测量以确定基线。然后,将SNI模型放置到位。测量手术后十四天(第14天-D14)的反应阈值,以检查神经病理性疼痛的发生。然后,进行了5种不同浓度(对于10μg/kg,n=8;对于50μg/kg,n=8;对于300μg/kg,n=13;对于900μg/kg,n=8;对于1.8mg/kg,n=8)的100μl/10g肽溶液的盲目经口施用。口服施用后1小时、2小时、4小时和然后的24小时测量反应阈值。还通过灌胃施用普瑞巴林(5mg/kg,n=6)和媒介物(n=9)。

[0224] 在SNI后第14天,与基线阈值相比,所有小鼠表现出机械阈值中的急剧下降,说明强烈的机械性超敏反应(图3)。口服施用媒介物没有效果。SEQ ID NO:1的肽的止痛效果是剂量依赖性的,其中用300μg/kg剂量在2h时观察到对机械阈值的最大逆转效果。有趣的是,两个最高剂量(0.9和1.8mg/kg)在2h时产生相同的效果,但还持续了时间更长,在施用后4h仍然具有显著效果。普瑞巴林对机械阈值的最大逆转效果在施用后2h观察到;施用后4h该效果被完全废除。

[0225] 1.4TAFA-4(全长蛋白)与皮下或经口施用的SEQ ID NO:1的肽的止痛效果的比较

[0226] 本发明人已经对本发明的肽与现有技术的TAFA-4(全长)蛋白的止痛效果进行了比较。使用与1.1和1.2中描述的相同的方案,除了肽和TAFA-4(全长)蛋白的施用是在手术后14天进行的。

[0227] 本发明的肽在皮下施用时令人惊讶地保持了与TAFA-4全长蛋白相同的止痛效果(图4)。

[0228] 本发明人还在经口施用时的TAFA-4全长蛋白和本发明的肽之间进行了比较。用TAFA-4全长蛋白进行了相同的实验(TAFA-4蛋白的施用是在手术后7天进行的)。TAFA-4全长蛋白口服(即,经口)施用时未表现出显著的止痛效果(图5)。

[0229] 从图4和图5上显示的结果可以得出结论,当经口施用时,本发明的肽具有比TAFA-4(全长)蛋白好得多的止痛效果。

[0230] 总而言之,实施例1表明本发明的肽在SNI模型(神经病理性疼痛模型)中通过皮下和经口施用诱导了止痛效果。有利的是,当皮下施用时,与TAFA-4(全长)蛋白相比,本发明的肽保持了其活性。甚至更令人惊奇的是,当口服施用时,本发明的肽表现出比TAFA-4(全长)蛋白更好的止痛效果。

[0231] 疼痛模型2:角叉菜胶注射——炎症性疼痛。

[0232] 实验在八周大的雄性WT C57B16上进行。使用了三组小鼠,每组8只。将SEQ ID NO:1的肽以30μg/mL的浓度重悬于HMPC溶液中,以用于每克10μl注射。

[0233] 如前所述,通过上/下法用Von Frey细丝进行测量以确定基线。然后,将20μl角叉菜胶(1%)足底注射到后爪中。测量注射后24h(D1)的反应阈值,然后经口施用0.3mg/kg的肽溶液(n=8),或媒介物溶液(n=8),或皮下注射20mg/kg的塞来昔布溶液(n=8),这对实验者而言是盲目的。塞来昔布是众所周知的用作阳性对照的药物。它是用于治疗多种疾病中的疼痛和炎症的COX-2抑制剂和非甾体抗炎药(NSAID)。在施用肽或塞来昔布后1h、2h、4h

和24h测量反应阈值。

[0234] 注射角叉菜胶后,小鼠发展出机械性痛觉超敏(见D1)(图6)。皮下施用阳性对照(塞来昔布)导致反应阈值增加。相似地,口服(经口)施用本发明的肽还诱导反应阈值的统计上显著的增加。有趣的是,该肽的最大止痛效果在1h后获得,而对于塞来昔布则需要2h。

[0235] 这些结果表明,本发明的肽经由经口施用在角叉菜胶模型(炎症性疼痛模型)中导致了止痛效果。有利的是,本发明的肽具有快速发作的止痛效果。

[0236] 疼痛模型3:爪子切口——术后疼痛。

[0237] 实验在八周大的雄性WT C57B16上进行。使用了三组小鼠,每组8只。将SEQ ID NO:1的肽以30μg/mL的浓度重悬于HMPC溶液NaCl中,已用于每克10μl注射。

[0238] 与以前所做一样,通过上/下法用Von Frey细丝进行测量以确定基线。然后,根据上述方案进行爪子切口手术。注射后24h(D1)测量反应阈值,然后经口施用0.3mg/kg的肽溶液(n=8)、媒介物溶液(n=8)或1mg/kg的吗啡溶液(阳性对照)(n=8),这对于实验者而言是盲目的。施用后1h、2h、4h和24h测量反应阈值。

[0239] 进行爪子切口后,小鼠发展出机械性痛觉超敏(见图7上的D1)。口服施用阳性对照(吗啡)导致反应阈值中的增加。相似地,口服施用本发明的肽也在施用后1小时诱导反应阈值中的统计上的显著增加,其中最大效果发生在施用后2小时。

[0240] 这些结果表明,本发明的肽在爪子切开模型(术后疼痛模型)中通过经口施用导致了止痛效果。

[0241] 结论:

[0242] 总之,本发明人的结果显示了SEQ ID NO:1的肽在神经性、炎症性和术后疼痛模型中的止痛效果。这些模型诱导的机械性痛觉超敏(反应阈值中的降低)可以通过皮下注射或口服(经口)施用所述肽来抑制。本发明人还证明,SEQ ID NO:1的肽的止痛效果是剂量依赖性的。

[0243] 有利的是,本发明的肽虽然比全长TAFA-4蛋白更容易产生和获得(因此更便宜),但是当皮下施用时与后者相比保持了其止痛活性。甚至更令人惊奇和有利的是,就口服(经口)施用而言,本发明的肽与TAFA-4(全长)蛋白相比表现出更好的止痛效果,这使得它比TAFA-4全长蛋白更方便且更适合施用于患者。

[0244] 实施例2:TT1及其变体TT6的生物产生

[0245] 本发明人采用下述方案,通过重组途径产生了SEQ ID NO:1(“TT1”)和SEQ ID NO:5(“TT6”)的肽(“TT1生物产品”和“TT6生物产品”)。

[0246] SEQ ID NO:5的肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:1的肽的氨基酸序列90.48%相同。

[0247] 使用实施例1中描述的行为测定(疼痛模型1:SNI),本发明人获得了以下证实:合成获得的TT1与由此获得的生物产生的TT1肽具有相同的缓解疼痛的功效(见图8)。他们还获得了以下证实:由此获得的生物产生的TT1肽和TT6肽两者具有与合成获得的TT1肽相同的缓解疼痛的功效(见图9)。

[0248] 材料

[0249] 质粒pEt28A+,具有卡那霉素抗性

[0250] 大肠杆菌BL21(DE3)pLysS菌株,感受态,具有氯霉素抗性

[0251] 重组6xHis-TEV蛋白酶,在AFMB实验室(学术MTA)产生和纯化

[0252] NZY自诱导LB培养基(粉末):nzytech(MB17903)

[0253] 2xYT肉汤(粉末):MP生物医学(3012032)

[0254] 超声波破碎仪、离心机、培养皿(d 10cm)

[0255] MF-Millipore膜,纤维素酯,亲水性,0.22μm,47mm,白色:MERCKHisTrap excel 5mL墨盒:Cytiva

[0256] 咪唑缓冲物质ACS。CAS288-32-4:Millipore(MERCK)

[0257] 透析管Zellu/Trans/ROTH T2:MWO 6000-8000,50mm,30m:CARL ROTH

[0258] 亲和色谱介质,Chelating SepharoseTM Fast Flow:CytivaAMICON Ultra-15离心过滤装置,3K:Millipore

[0259] Superdex S200增加10/300GL柱:Cytiva

[0260] 20％网状SDS-PAGE凝胶

[0261] 方法

[0262] 1.6xHis-(TEV位点)-TT1(或6xHis-(TEV位点)-TT6)融合蛋白(本文分别标识为SEQ ID NO:7和8)的产生

[0263] a.大肠杆菌BL21(DE3)pLysS菌株的转化

[0264] 解冻感受态细菌BL21(DE3)pLySs,氯霉素抗性

[0265] -每50μL感受态细菌添加1μL质粒(1000ng/μL)

[0266] -冰上放置5分钟

[0267] 进行热冲击:37℃下1分钟

[0268] -冰上放置5分钟

[0269] 添加500μL NZY自诱导LB培养基或2YT肉汤培养基(无菌条件下)-搅拌(200rpm)下37℃孵育至少30分钟

[0270] 加热LB琼脂直至完全溶解

[0271] 对于2个培养皿,混合并稀释:

[0272] 40mL融化的LB琼脂

[0273] 40μL卡那霉素,用于质粒

[0274] 40μL氯霉素,用于菌株

[0275] 一旦凝固,将转化的细菌分散开,每皿50-100μL

[0276] b.预培养

[0277] 对于500mL培养物:

[0278] -30mL NZY自诱导LB培养基或2YT肉汤培养基

[0279] -30μL卡那霉素,用于质粒

[0280] -30μL氯霉素,用于菌株

[0281] -1个克隆

[0282] 搅拌下37℃孵育过夜

[0283] c.培养

[0284] -在2L锥形瓶中:

[0285] 用NZY自诱导LB介质

[0286] -500mL培养基

[0287] -500μL卡那霉素,用于质粒

[0288] -500μL氯霉素,用于菌株

[0289] -预培养体积达到ca.0.1的OD600 nm

[0290] -搅拌(200rpm)下37℃孵育,直至OD600 nm达到ca.0.6-0.8

[0291] 搅拌(200rpm)下17℃孵育过夜。

[0292] 用2YT肉汤培养基

[0293] -500mL培养基

[0294] -500μL卡那霉素,用于质粒

[0295] -500μL氯霉素,用于菌株

[0296] -预培养体积达到ca.0.1的OD600 nm

[0297] -搅拌(200rpm)下37℃孵育直至OD600 nm达到ca.0.6-0.8。

[0298] -加入500μL IPTG(原液1M)

[0299] -搅拌(200rpm)下17℃孵育过夜

[0300] -室温下以5000rpm离心20分钟

[0301] -将沉淀物悬浮于50mL裂解缓冲液中:Tris 50mM pH 8.0、NaCl 300mM、咪唑10mM pH 8.0、溶菌酶0.5mg/mL

[0302] -在液氮中快速冷冻

[0303] -在-80℃下储存

[0304] 2.融合蛋白的纯化和裂解

[0305] a.细胞裂解:完全裂解

[0306] -将储存的沉淀物(悬浮在裂解缓冲液中)在37℃下解冻10分钟

[0307] -添加DNAse 1/100(v/v)(2mg/mL原液)和$MgSO_4$ 1/200(v/v)(2M原液)

[0308] -4℃下摇动/孵育20分钟

[0309] -超声处理6分钟,例如30秒开启,30秒关闭,振幅40%(含有样品的烧杯应保持置于在冰上)

[0310] -4℃下以20 000rpm离心40分钟

[0311] -将上清液通过0.22μm滤膜过滤

[0312] b.标准固定化金属螯合色谱(IMAC)(AKTA纯化仪)

[0313] -使用缓冲液A平衡HisTrap excel 5mL柱:Tris 50mM pH 8、NaCl 300mM、咪唑10mM pH 8),流速为3mL/分钟

[0314] -上样上清液,然后用20CV即100mL缓冲液A清洗柱

[0315] 用10CV即50mL缓冲液B洗脱融合蛋白:Tris 50mM pH 8,NaCl 300mM,咪唑250mM pH 8)

[0316] -测量汇集的洗脱级分的体积和OD280 nm-在280nm处使用A1‰=1,1UDO/mg计算浓度和量(如果没有二硫键)

[0317] -使用6-8kDa截留透析管:将洗脱池在4℃下用2L缓冲液A透析过夜:Tris 50mM pH 8,NaCl 1M,咪唑10mM pH 8)

[0318] c.裂解

[0319] -测量透析洗脱液的OD280 nm

[0320] -为了正确进行裂解,必须将洗脱液稀释至具有0.5-0.7mg/mL之间的浓度

[0321] -在洗脱液中添加重组TEV(1/10w/w)

[0322] -室温下孵育4小时

[0323] -4℃孵育过夜

[0324] -在洗脱液中添加重组TEV(1/20w/w)

[0325] -室温下孵育4小时

[0326] -4℃孵育过夜

[0327] -在4℃下以7500rpm离心15分钟,以去除任何沉淀物

[0328] 3.TT1或TT6的纯化

[0329] a.树脂制备

[0330] -对于从1L细菌培养得到的样品:

[0331] -4mL树脂

[0332] -800μL 0.2M $NiSO_4$并孵育15-30分钟

[0333] -用15mL H_2O清洗,并在4℃下以5 000rpm离心5分钟

[0334] -弃去上清液

[0335] -用15mL H_2O清洗,并在4℃下以5 000rpm离心5分钟

[0336] -弃去上清液

[0337] -用15mL Tris 50mM pH 8.0、NaCl 1M清洗,并在4℃下以5 000rpm离心5分钟

[0338] -弃去上清液

[0339] -重复操作直至液体透明

[0340] -用15mL Tris 50mM pH 8.0、NaCl 1M、咪唑10mM pH 8.0清洗,孵育10分钟,在4℃下以5 000rpm离心5分钟

[0341] -弃去上清液

[0342] -用15mL Tris 50mM pH 8.0、NaCl 1M、咪唑10mM pH 8.0清洗,孵育10分钟,在4℃下以5 000rpm离心5分钟

[0343] -弃去上清液

[0344] -加入15mL Tris 50mM pH 8.0、NaCl 1M、咪唑10mM pH 8.0,4℃孵育过夜

[0345] b.“流动式”固定化金属(Ni^{2+})螯合色谱(IMAC)(批量)

[0346] -将裂解样品与预平衡树脂在4℃下孵育2小时

[0347] -将树脂/裂解洗脱混合物转移到空柱中

[0348] -收集仅含有TT1或TT6的流出液(残留融合蛋白(如果有)和TEV仍留在柱上)

[0349] c.浓缩

[0350] -使用AMICON 3K浓缩器(3900rpm,4℃)浓缩流出液,直至获得200-500μL(越小越好)体积

[0351] -以10,000rpm离心5分钟,以除去任何沉淀物,将上清液转移到干净的试管中

[0352] d.尺寸排阻色谱(SEC)(AKTA纯化仪)

[0353] -使用缓冲液Tris 50mM pH 8.0、NaCl 1M、咪唑10mM pH 8.0平衡Superdex S200增加10/300GL柱:流速为0.5mL/分钟

[0354] -上样浓缩的流出液和洗脱液(TT1和TT6在ca.19mL开始洗脱)

[0355] -测量汇集的TT1或TT6级分的体积和OD280 nm-在280nm处使用A1‰＝2,6UDO/mg计算浓度和含量(如果没有二硫键)

[0356] e.SDS-PAGE(20％网状凝胶,还原条件)

[0357] -对于每个纯化步骤和每个洗脱峰:取1-4μg蛋白质,变性(SDS)并还原(DTT或2/β-巯基乙醇)样品,并在4℃或-20℃下储存直至最终使用-上样至SDS-PAGE凝胶并迁移(200V)

[0358] 实施例3:TT1的预防性止痛效果

[0359] 本实验的目的是通过在爪切口模型(如上所述)中皮下注射TT1来评估SEQ ID NO:1(“TT1”)的肽是否也具有预防性止痛效果。

[0360] 材料和方法

[0361] TT1或媒介物每天两次在不同时间点皮下施用:手术前一天(D-1)、D天手术前1小时和手术后(和醒来)1小时、以及D+1天和D+2天(图10A)。在D+1(D+1天TT1注射之前)、D+2(D+2天TT1注射之前)和D+3进行机械阈值响应测量。

[0362] 结果

[0363] 切开爪口后,用媒介物治疗的小鼠发生了机械性痛觉超敏(见图10B中的D1、D2和D3)。相反,用TT1治疗的小鼠并没有发生机械性痛觉超敏。与用媒介物治疗的小鼠相比,用TT1治疗的小鼠在D1、D2和D3时表现出统计学上显著更高的反应阈值。

[0364] 这些结果表明,本发明的肽TT1可以在爪切口模型(术后疼痛模型)中预防性地使用。

[0365] 实施例4:重复口服施用TT1后在CCI神经病理性疼痛模型上无耐受性

[0366] 本实验的目的是评估用SEQ ID NO:1(“TT1”)的肽治疗的受试者是否会对该肽产生耐受性。

[0367] 材料和方法

[0368] CCI神经病理性疼痛模型:慢性压迫性损伤(CCI)按照Bennett和Xie1988(A peripheral mononeuropathy in rats that produces disorders of pain sensation like those in man.Pain vol 33:pp87-107)先前描述的进行。简而言之,用氯胺酮/赛拉辛(Xylasine)(分别为100mg/kg和10mg/kg ip)麻醉小鼠,并用两根线(6-0Monocryl,Ethicon)宽松地(间距约1mm)绑在坐骨总神经周围,诱发单侧外周单神经病。神经收缩到几乎难以察觉的程度,因此神经外血管系统的循环不会中断。

[0369] 如上所述建立CCI神经病理性疼痛模型后,从手术后第10天(D10)开始,连续14天每天用SEQ ID NO:1(“TT1”)的肽或媒介物治疗小鼠。每两天检测一次TT1的止痛效果,直至术后第24天(D24)。

[0370] 结果

[0371] TT1肽的皮下注射引起反应(即缩爪)阈值的强烈增加,证明了TT1的止痛效果。有趣的是,TT1的止痛效果在整个治疗期间(14天)保持恒定,即使在D24TT1功效也没有任何降低。这些结果表明,本发明的肽TT1可以长期重复使用而不会在受试者中引起耐受性。

[0372] 参考文献

[0373] 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.

[0374] 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.

[0375] 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.

[0376] Boyle,K.A.,Gradwell,M.A.,Yasaka,T.,Dickie,A.C.,Polgar,E.,Ganley,R.P.,Orr,D.P.H.,Watanabe,M.,Abraira,V.E.,Kuehn,E.D.,et al.(2019).Defining a Spinal Microcircuit that Gates Myelinated Afferent Input:Implications for Tactile Allodynia.Cell reports 28,526-540e526.

[0377] 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.

[0378] Costigan,M.,Scholz,J.,and Woolf,C.J.(2009).Neuropathic pain:amaladaptive response of the nervous system to damage.Annu Rev Neurosci 32,1-32.

[0379] 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.

[0380] Delfini,M.C.,Mantilleri,A.,Gaillard,S.,Hao,J.,Reynders,A.,Malapert,P.,Alonso,S.,Francois,A.,Barrere,C.,Seal,R.,et al.(2013).TAFA4,a chemokine-like protein,modulates injury-induced mechanical and chemical pain hypersensitivity in mice.Cell reports 5,378-388.

[0381] Duan,B.,Cheng,L.,Bourane,S.,Britz,O.,Padilla,C.,Garcia-Campmany,L.,Krashes,M.,Knowlton,W.,Velasquez,T.,Ren,X.,et al.(2014).Identificationof spinal circuits transmitting and gating mechanical pain.Cell 159,1417-1432.

[0382] Goh,EL.,Chidambaram,S.,Ma,D.(2017).Complex regional pain syndrome:a recent update.Burns&Trauma 5:2.

[0383] Leroux,Maria Bibiana(2018).Erythromelalgia:a cutaneous manifestation ofneuropathy?An Bras Dermatol.93(1):86-94.

[0384] 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 BupivacaineHydrochloride and a Review of Available Treatment Strategies.Adv Ther.37(5):2003-2016.

[0385] 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 Circuitsfor Persistent Mechanical Pain.Neuron 87,797-812.

[0386] Petitjean,H.,F,B.B.,Tsao,D.,Davidova,A.,Sotocinal,S.G.,Mogil,J.S.,Kania,A.,and Sharif-Naeini,R.(2019).Recruitment of SpinoparabrachialNeurons

by Dorsal Horn Calretinin Neurons.Cell reports 28,1429-1438 e1424.

[0387] 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 HornParvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury.Cell reports 13,1246-1257.

[0388] Sarver,D.C.,Lei,X.,and Wong,G.W.(2021).FAM19A(TAFA):AnEmerging Family of Neurokines with Diverse Functions in the Central andPeripheral Nervous System.ACS Chem Neurosci 12,945-958.

[0389] Siracusa,R.,Di Paola,R.,Cuzzocrea,S.,Impellizzeri,D.(2021).Fibromyalgia:Pathogenesis,Mechanisms,Diagnosis and Treatment OptionsUpdate.Int J Mol Sci.22(8):3891.

[0390] Tom Tang,Y.,Emtage,P.,Funk,W.D.,Hu,T.,Arterburn,M.,Park,E.E.,andRupp,F.(2004).TAFA:a novel secreted family with conserved cysteine residuesand restricted expression in the brain.Genomics 83,727-734.

[0391] Zeilhofer,H.U.,Wildner,H.,and Yevenes,G.E.(2012).Fast synapticinhibition in spinal sensory processing and pain control.Physiol Rev 92,193-235.

[0392] Zhang,Y.,Liu,S.,Zhang,Y.Q.,Goulding,M.,Wang,Y.Q.,and Ma,Q.(2018).Timing Mechanisms Underlying Gate Control by Feedforward Inhibition.Neuron99,941-955 e944.

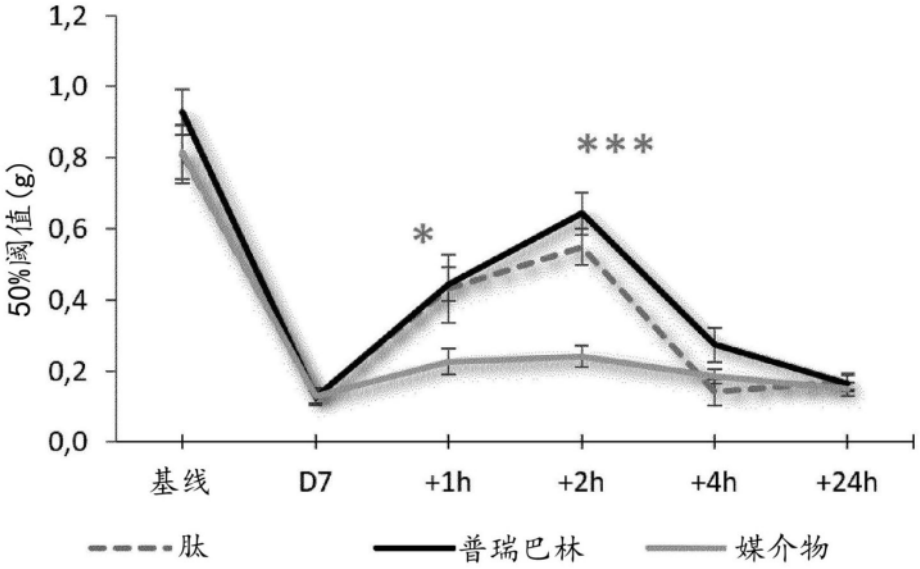

1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
50%阈值(g)
*
***
基线
D7
+1h
+2h
+4h
+24h
肽
普瑞巴林
媒介物

图1

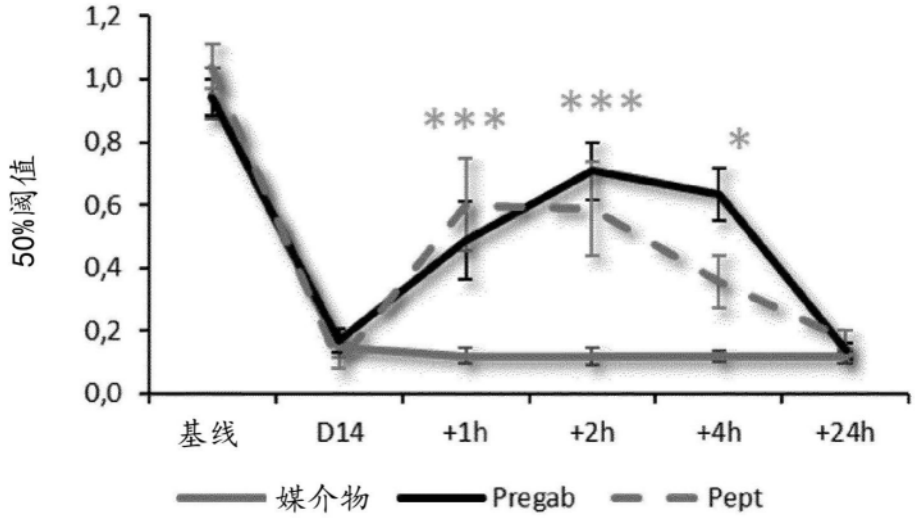

1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
50%阈值
***
***
*
基线
D14
+1h
+2h
+4h
+24h
媒介物
Pregab
Pept

图2

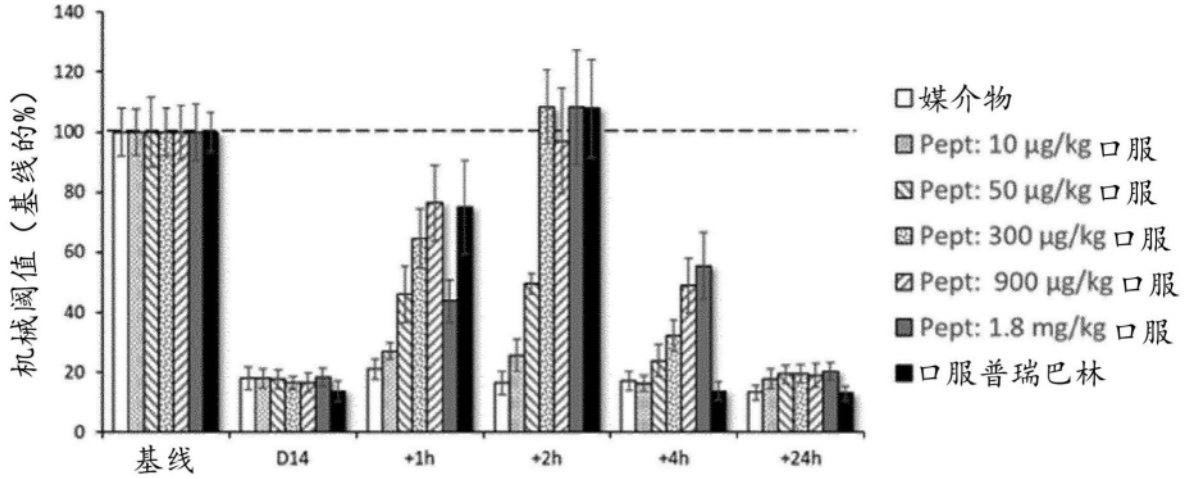

机械阈值（基线的%）
140
120
100
80
60
40
20
0
基线
D14
+1h
+2h
+4h
+24h
媒介物
Pept: 10 μg/kg 口服
Pept: 50 μg/kg 口服
Pept: 300 μg/kg 口服
Pept: 900 μg/kg 口服
Pept: 1.8 mg/kg 口服
口服普瑞巴林

图3

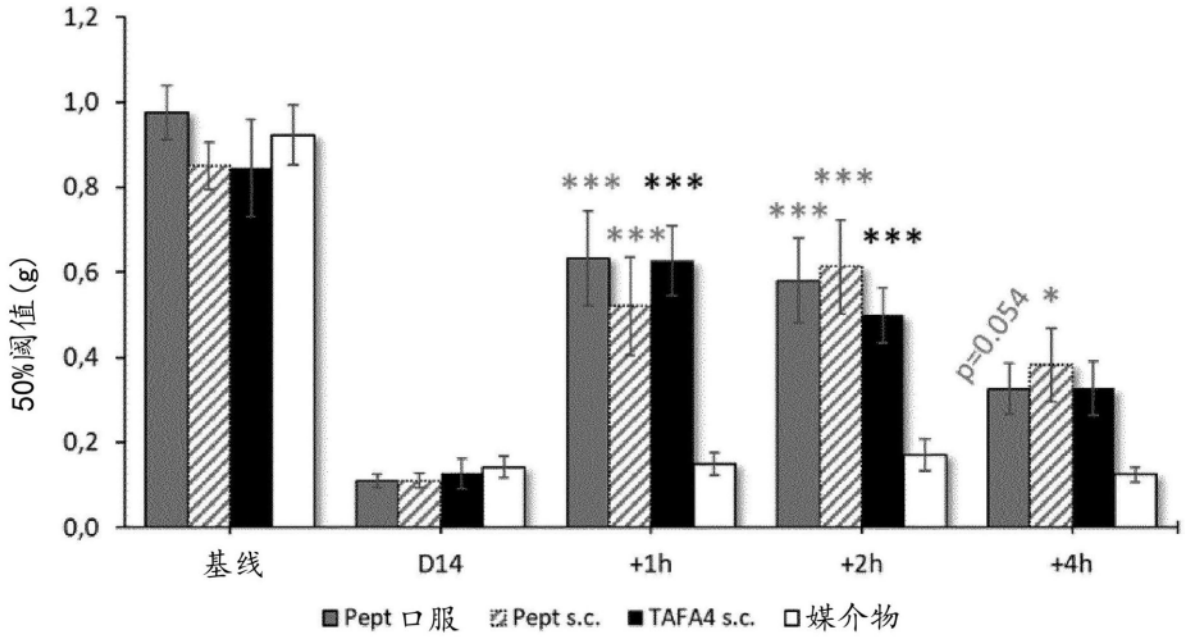

50%阈值(g)
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
***
***
***
***
***
***
p=0.054
*
基线
D14
+1h
+2h
+4h
Pept 口服
Pept s.c.
TAFA4 s.c.
媒介物

图4

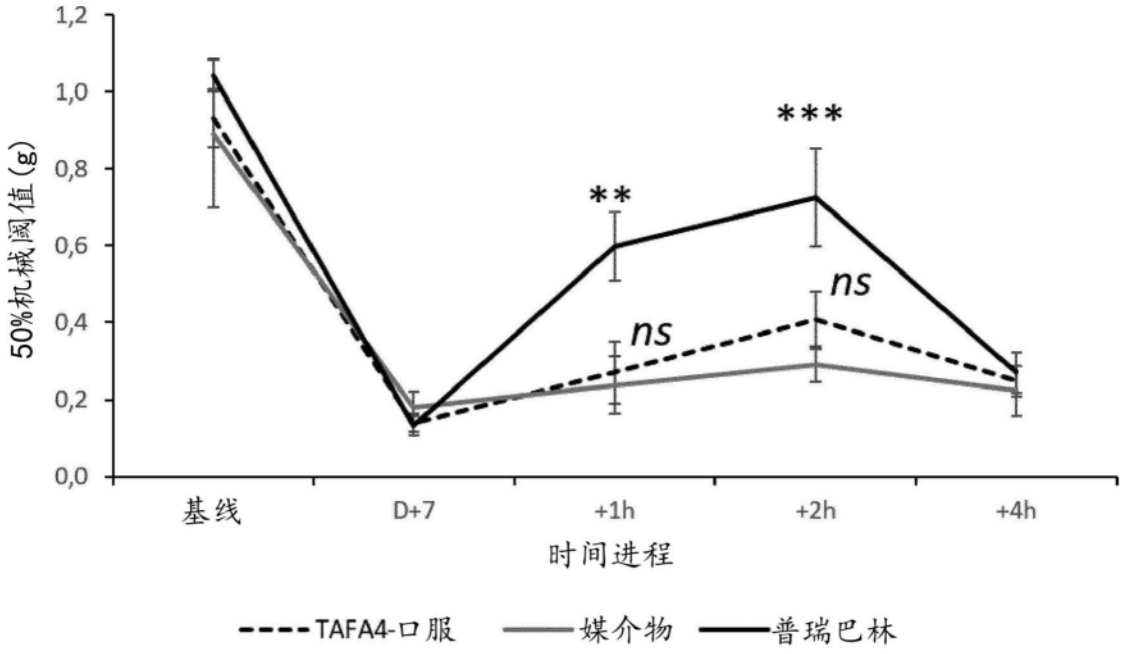

1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
50%机械阈值(g)
**
***
ns
ns
基线
D+7
+1h
+2h
+4h
时间进程
TAFA4-口服
媒介物
普瑞巴林

图5

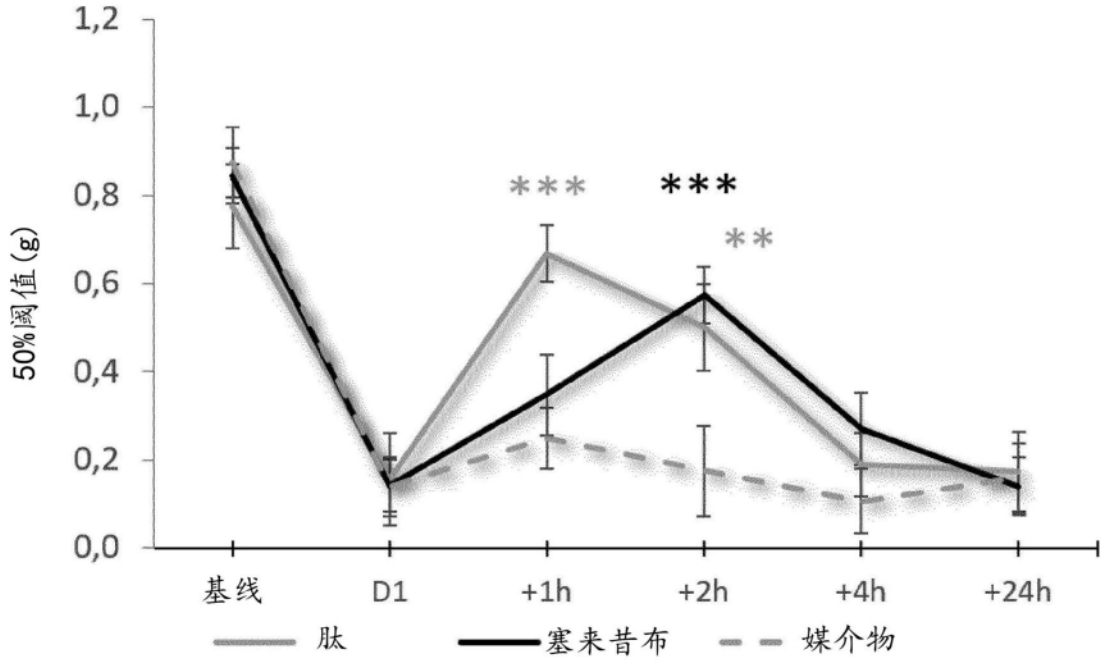

1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
50%阈值(g)
***
***
**
基线
D1
+1h
+2h
+4h
+24h
肽
塞来昔布
媒介物

图6

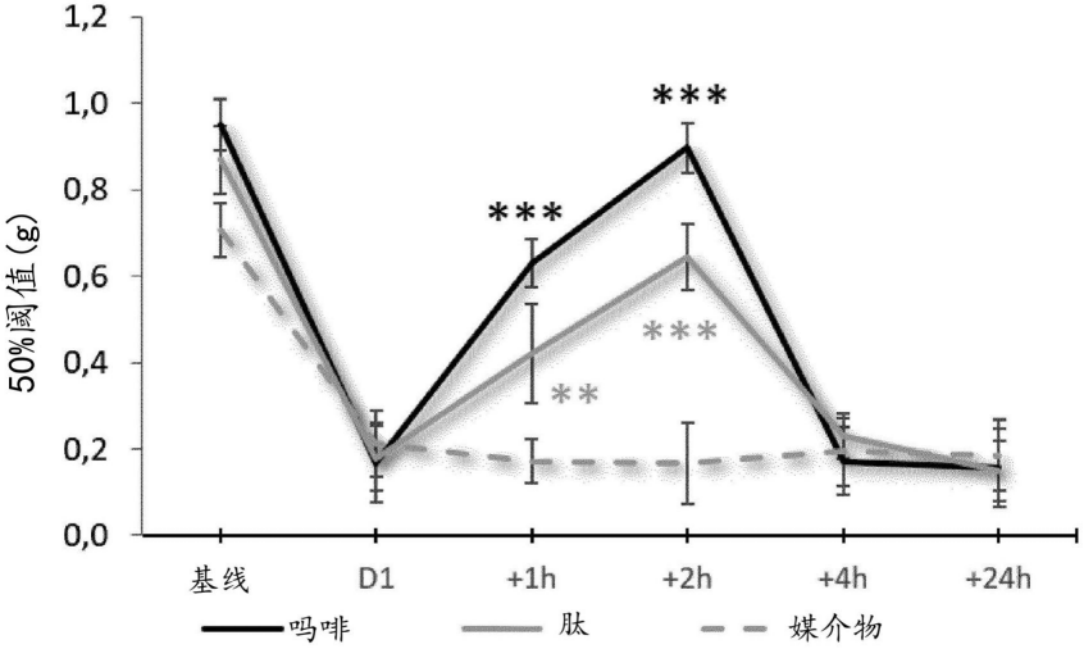

1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
50%阈值(g)
***
***
***
**
基线
D1
+1h
+2h
+4h
+24h
吗啡
肽
媒介物

图7

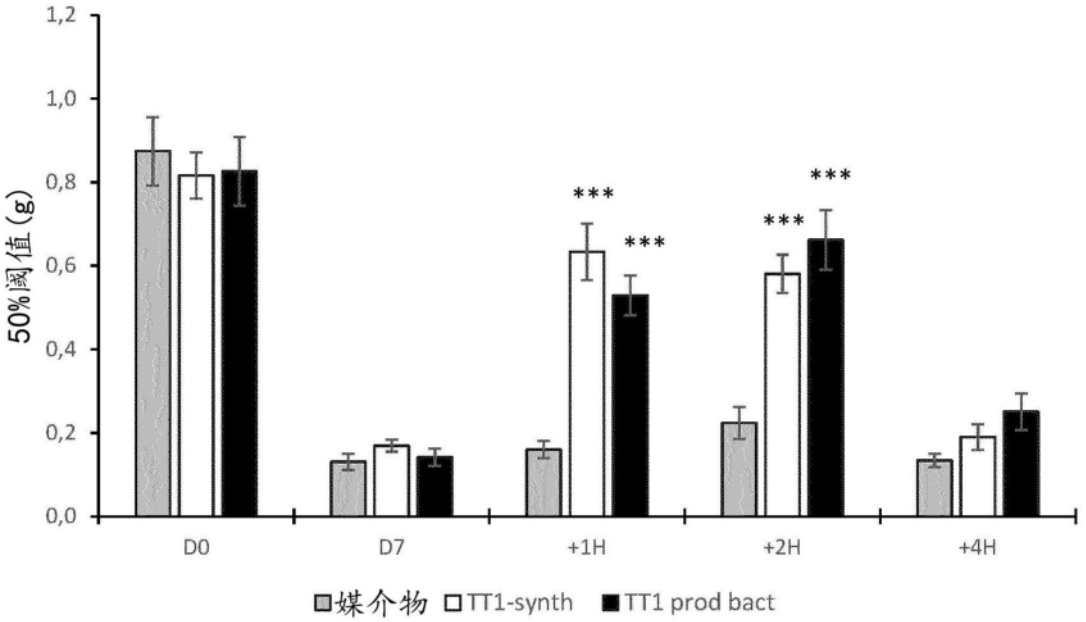

1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
50%阈值(g)
***
***
***
***
D0
D7
+1H
+2H
+4H
媒介物
TT1-synth
TT1 prod bact

图8

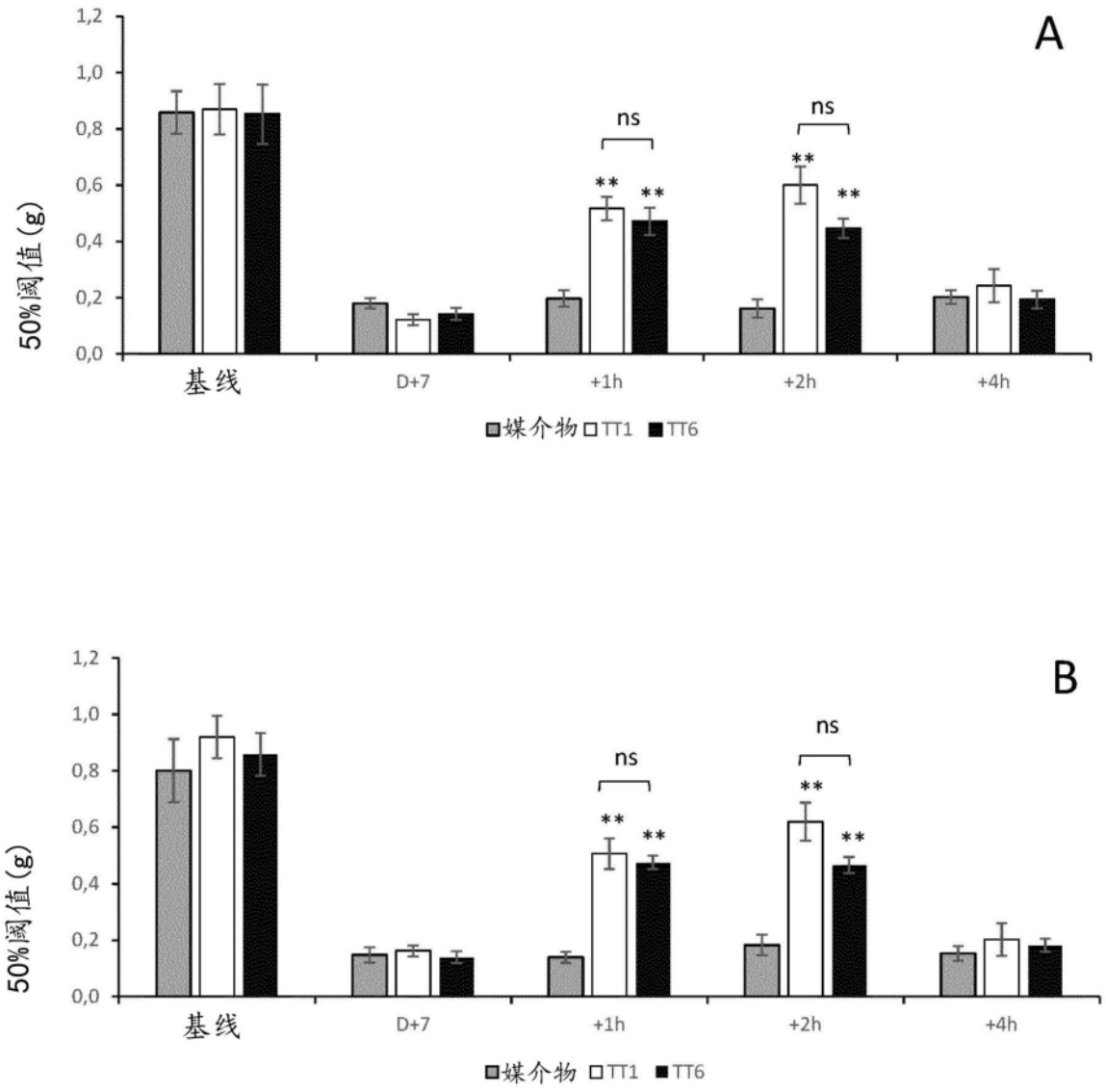

A
50%阈值(g)
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
ns
ns
**
**
**
**
基线
D+7
+1h
+2h
+4h
媒介物 TT1 TT6
B
50%阈值(g)
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
ns
ns
**
**
**
**
基线
D+7
+1h
+2h
+4h
媒介物 TT1 TT6

图9

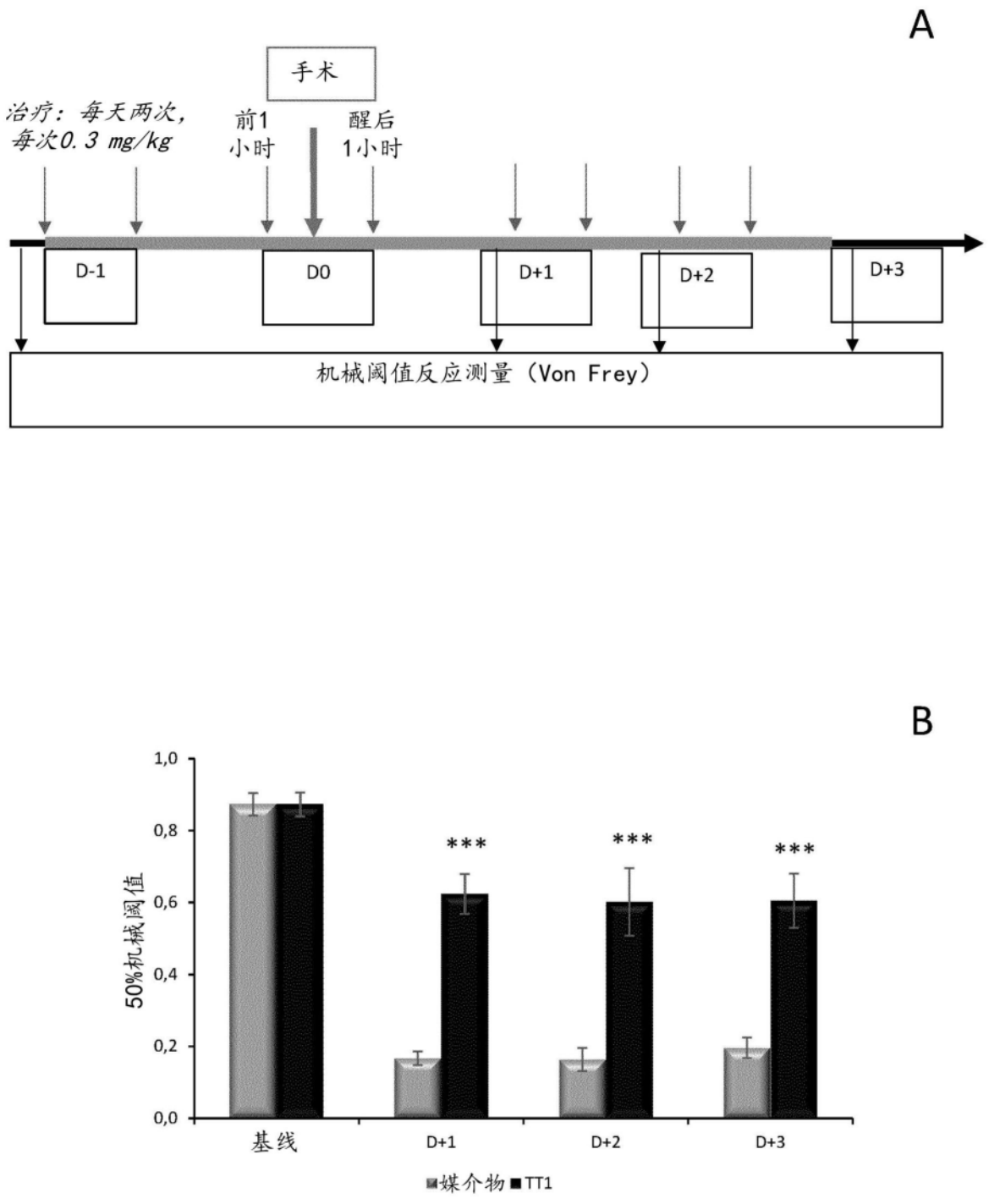

A
手术
治疗：每天两次，
每次0.3 mg/kg
前1
小时
醒后
1小时
D-1
D0
D+1
D+2
D+3
机械阈值反应测量（Von Frey）
B
50%机械阈值
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
***
***
***
基线
D+1
D+2
D+3
媒介物 TT1

图10

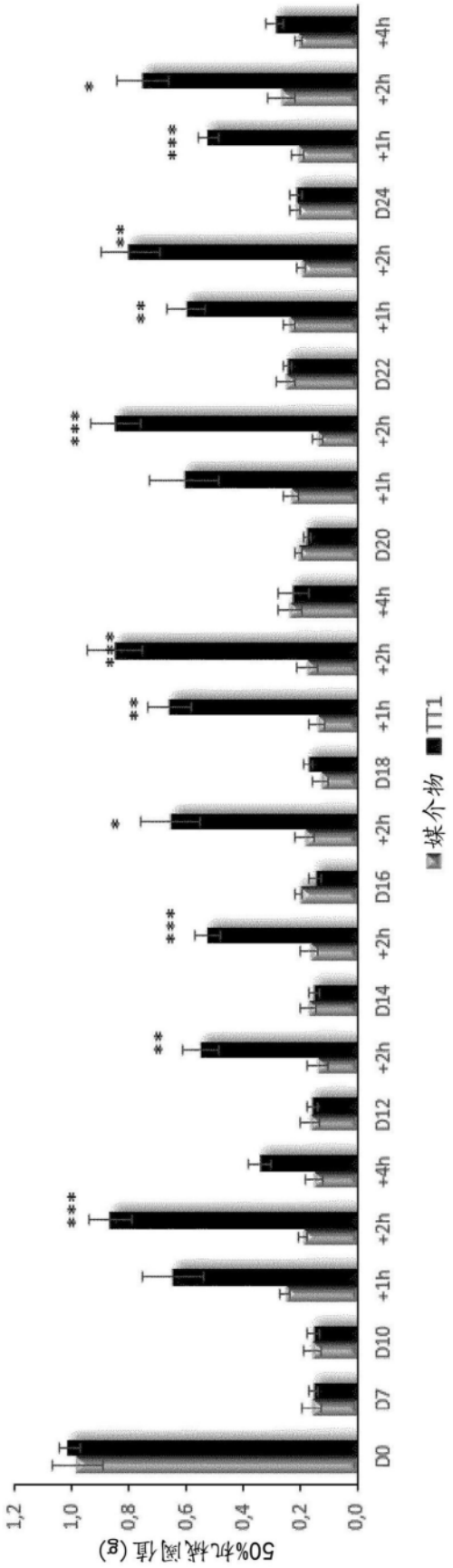

50%抗坏血酸阈值 (g)
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
D0
D7
D10
+1h
+2h
+4h
D12
+2h
D14
+2h
D16
+2h
D18
+1h
+2h
+4h
D20
+1h
+2h
D22
+1h
+2h
D24
+1h
+2h
+4h
***
**
*
雄个物
TT1

图11