(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-519127
(P2025-519127A)
(43)公表日　令和7年6月24日(2025.6.24)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*38/17*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/17		４Ｂ０６５
Ａ６１Ｐ	*25/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/04	ＺＮＡ	４Ｃ０７６
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ	*47/22*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/22		４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ	*35/12*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/12		４Ｈ０４５

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全52頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-569387(P2024-569387)
(86)(22)出願日　令和5年5月25日(2023.5.25)
(85)翻訳文提出日　令和7年1月21日(2025.1.21)
(86)国際出願番号　PCT/EP2023/064091
(87)国際公開番号　WO2023/227731
(87)国際公開日　令和5年11月30日(2023.11.30)
(31)優先権主張番号　22305773.8
(32)優先日　令和4年5月25日(2022.5.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,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
最終頁に続く

(71)出願人　524229303
タファルジー・セラピューティクス
フランス・１３００９・マルセイユ・アヴニュ・ドゥ・リュミニー・１６３・パルク・シアンティフィック・エ・テクノロジーク・ドゥ・リュミニー・バティマン・セセイエムペ
(74)代理人　100108453
弁理士　村山 靖彦
(74)代理人　100188558
弁理士　飯田 雅人
(74)代理人　100110364
弁理士　実広 信哉
(72)発明者　アブデラジズ・モクリッチ
フランス・１３００９・マルセイユ・リ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　疼痛の処置で使用されるペプチド及び方法

(57)【要約】
本発明は、ペプチドのセット、前記ペプチドを含むか又は前記ペプチドの発現を可能にする組成物及びキット、並びに特にそれを必要とする対象の疼痛の予防又は処置でのこれらの使用に関する。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号1の第1のペプチド又は配列番号1に対して少なくとも90％の同一性を有するペプチドと、配列番号2の第2のペプチド又は配列番号2に対して少なくとも90％の同一性を有するペプチドとを含む組成物であって、前記2種のペプチドは、互いに連結されていない、組成物。
【請求項２】
組成物が、配列番号1に対して少なくとも90％の同一性を有するペプチド及び/又は配列番号2に対して少なくとも90％の同一性を有するペプチドを含む場合、配列番号1のペプチド中の13位でのグルタミン(Q)残基は、配列番号1に対して少なくとも90％の同一性を有するペプチドのアミノ酸配列において変化しないままであり、且つ配列番号2のペプチド中の18位でのチロシン(Y)残基は、配列番号2に対して少なくとも90％の同一性を有するペプチドのアミノ酸配列において変化しないままであるか又はセリン(S)に置き換えられている、請求項1に記載の組成物。
【請求項３】
互いに連結されていない2種のペプチドの発現を可能にする核酸を含む構成成分のセット又は組成物であって、第1の核酸は、配列番号1のペプチド又は配列番号1に対して少なくとも90％の同一性を有するペプチドをコードする配列を含み、第2の核酸は、配列番号2のペプチド又は配列番号2に対して少なくとも90％の同一性を有するペプチドをコードする配列を含む、構成成分のセット又は組成物。
【請求項４】
互いに連結されていない2種のペプチドの発現を可能にするベクターを含む構成成分のセット又は組成物であって、第1のベクターは、配列番号1のペプチド又は配列番号1に対して少なくとも90％の同一性を有するペプチドをコードする配列を含み、第2のベクターは、配列番号2のペプチド又は配列番号2に対して少なくとも90％の同一性を有するペプチドをコードする配列を含む、構成成分のセット又は組成物。
【請求項５】
細胞、又は前記細胞と許容される支持体とを含む組成物であって、細胞は、互いに連結されていない2種のペプチドの発現を可能にし、細胞は、配列番号1のペプチド又は配列番号1に対して少なくとも90％の同一性を有するペプチドをコードする第1の核酸配列又はベクターと、配列番号2のペプチド又は配列番号2に対して少なくとも90％の同一性を有するペプチドをコードする第2の核酸配列又はベクターとを含む、細胞又は組成物。
【請求項６】
組成物は、少なくとも1種の追加の活性化合物、好ましくは、疼痛に対して効果のある活性化合物、更により好ましくは、SAID、NSAID、又はオピオイド系薬物を更に含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７】
組成物は、薬学的に及び/又は栄養学的に許容される支持体を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８】
組成物は、アスコルビン酸又はアスコルビン酸塩を更に含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９】
配列番号1の第1のペプチド若しくは配列番号1に対して少なくとも90％の同一性を有するペプチドと、配列番号2の第2のペプチド若しくは配列番号2に対して少なくとも90％の同一性を有するペプチドとのセットであって、前記2種のペプチドは、互いに連結されていおらず、セットが、それを必要とする対象における医薬としての使用のためのものである、セット、それを必要とする対象における医薬としての使用のためのものである、請求項3若しくは4に記載のセット、それを必要とする対象における医薬としての使用のためのものである、請求項1～8のいずれか一項に記載の組成物、又はそれを必要とする

対象における医薬としての使用のためのものである、請求項5に記載の細胞。
【請求項１０】
配列番号1の第1のペプチド若しくは配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチドと、配列番号2の第2のペプチド若しくは配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチドとのセットであって、前記2種のペプチドは、互いに連結されておらず、セットが、それを必要とする対象の疼痛の予防又は処置での使用のためのものである、セット、それを必要とする対象の疼痛の予防又は処置での使用のためのものである、請求項3若しくは4に記載のセット、それを必要とする対象の疼痛の予防又は処置での使用のためのものである、請求項1～8のいずれか一項に記載の組成物、又はそれを必要とする対象の疼痛の予防又は処置での使用のためのものである、請求項5に記載の細胞。
【請求項１１】
疼痛は、慢性疼痛、神経障害性疼痛、術後疼痛、炎症性疼痛、関節炎性疼痛、関節への損傷に関連する疼痛、エーラース・ダンロス症候群に関連する疼痛、日焼けによる疼痛、氷焼けによる疼痛、痛覚過敏、アロディニア、又は急性疼痛である、請求項10に記載のセット、組成物、又は細胞。
【請求項１２】
対象は、哺乳動物であり、特にヒトである、請求項9～11のいずれか一項に記載のセット、組成物、又は細胞。
【請求項１３】
組成物は、対象に、筋肉内投与されるか、静脈内投与されるか、腹腔内投与されるか、経口(oraly)(経口(per os))投与されるか、肛門投与されるか、皮膚投与されるか、皮下投与されるか、局所投与されるか、経皮(dermically)投与されるか、経皮(transdermically)投与されるか、又は髄腔内投与され、好ましくは、皮下投与されるか又は経口投与される、請求項9～12のいずれか一項に記載のセット又は組成物。
【請求項１４】
セット又は組成物は、単用量当たり1μg～100mgの、好ましくは25μg～10mgの、第1及び第2のペプチドの両方を含む、請求項9～13のいずれか一項に記載のセット又は組成物。
【請求項１５】
前記セット又は組成物は、哺乳動物に対して1μg/kg/日～100mg/kg/日の、好ましくは2.5μg/kg/日～0.6mg/kg/日の用量で投与される、請求項9～13のいずれか一項に記載のセット又は組成物。
【請求項１６】
i)配列番号1の第1のペプチド若しくは配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチド、又は前記ペプチドをコードする核酸配列、ii)配列番号2の第2のペプチド若しくは配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチド、又は前記ペプチドをコードする核酸配列、及び任意選択的にiii)キットを使用するための書面の使用説明書を含むキットであって、第1及び第2のペプチド又は前記ペプチドをコードする核酸は別個の容器中にある、キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、疼痛管理の分野に概して関する。より具体的には、本発明は、ペプチドのセット、前記ペプチドを含むか又は前記ペプチドの発現を可能にする組成物及びキット、並びにこれらの使用、具体的には、それを必要とする対象の疼痛を予防するか又は処置するためであるこれらに関する。このセットのペプチドは、疼痛(具合的には、神経障害性疼痛、術後疼痛、若しくは炎症性疼痛に起因する急性の、亜急性の、若しくは慢性の疼痛)の予防又は処置のための活性成分又は損傷誘発性の疼痛に起因する痛覚過敏若しくはアロディニア(allodynia)の予防若しくは処置のための活性成分として使用可能なヒトTAFA

-4タンパク質の特定の断片又はその等価の断片である。

【背景技術】

【０００２】

疼痛は、一般に、急性又は慢性に分類されている。急性疼痛は一時的であり、身体の健全性の維持に不可欠であるが、慢性疼痛は、通常の治癒期間を超えて持続し、健康に悪影響を及ぼす。慢性の炎症性疼痛、神経障害性疼痛、又は術後疼痛は、痛覚過敏(有害な(noxious)刺激により引き起こされる極度の疼痛)及び機械的アロディニア(無害な機械的刺激により引き起こされる疼痛)等の長期にわたる感覚異常を引き起こす。これらの疼痛のカテゴリは、病因及び臨床的特徴の点で異なるが、末梢及び中枢の両方における神経免疫相互作用及びニューロン感作の変化等のいくつかの共通の機序を有する(Costigan他, 2009)。阻害の喪失が慢性疼痛の根底にある重要な機序であり得ることを示唆する証拠が増えている(Bourane他, 2015a;Bourane他, 2015b;Boyle他, 2019;Coull他, 2005;Duan他, 2014;Peirs他, 2015;Petitjean他, 2019;Petitjean他, 2015;Zeilhofer他, 2012;Zhang他, 2018, Yoo他, 2021)。しかしながら、齧歯類の慢性疼痛の根底にある機序及び回路に関する広範な知識にもかかわらず、これらの発見をヒトの慢性疼痛の効果的な処置に移行させることは、不十分なままである(Colloca他, 2017)。実際に、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)は、慢性疼痛に対する有効性が限られており、オピオイドには、致命的となる可能性のある呼吸抑制、吐き気、便秘、痛覚過敏、耐性、身体的依存及び心理的依存等の複数の副作用がある(Benyamin他, 2008)。そのため、慢性疼痛の処置のための鎮痛(analgesic)又は鎮痛(antalgic)の可能性を有する新規の標的を同定する努力が奨励されるべきである。

【０００３】

ここ数年、本発明者らは、分泌タンパク質TAFA-4の顕著な特徴を発見しており、これは、慢性疼痛の処置用の興味深い薬剤となる可能性があることを示唆する(国際公開第2014180853号)。TAFA-4は、5つの高度に保存された分泌ニューロカインのファミリーに属する(Sarver他、2021)。TAFA-4は、シグナルペプチドと、その後の10個のシステイン残基を含む高度に保存されたコア領域とを含み、高度に保存されたコア領域はCC-ケモカインモチーフを含み、これにより、サイトカインに類似している(Tom Tang他, 2004)。

【０００４】

本発明者らはまた、TAFA-4遺伝子が欠失したマウスでは、神経損傷により誘発される機械的過敏症が野生型(WT)マウスよりもはるかに長く続くことも既に示している(Delfini他, 2013)。これらの表現型は、組換えTAFA-4の髄腔内注射により反転する。

【０００５】

国際公開第2014180853号で説明されているように、本発明者らは、TAFA-4が病的に増加した機械的疼痛に対して強力な作用を有することを示す実験的証拠を既に報告した。雄及び雌の両方のマウスにおいて、ヒト組換えTAFA-4の髄腔内投与及び皮下投与により、炎症、術後、及び神経損傷誘発性の機械的過敏症が反転することが示されている。本発明者らはまた、TAFA-4が、機械的閾値の変化の原因であると報告されている脊髄II層介在ニューロンの神経損傷誘発性神経感作を反転させ得ることも示している。しかしながら、TAFA-4はシステインリッチのタンパク質(合計10個のシステイン)であることから、組換え成熟TAFA-4タンパク質の製造は困難な場合がある。実際、リフォールディングにより、非ネイティブな高次構造又は不適切なジスルフィド架橋パターンが生じ得、これはタンパク質の活性に大きな影響を及ぼす場合がある。更に、高純度の組換えTAFA-4タンパク質を得るのに必要ないくつかの精製工程と、起こりうる凝集の問題とにより、適切に折り畳まれたタンパク質の収量が制限される場合がある。更に、TAFA-4タンパク質の化学合成が実行されたが、タンパク質の長さに起因して、これも困難であり、少なくとも4つの(保護されたか又は部分的に保護された)ペプチドセグメント(N末端から始まり、最もC末端のペプチドで終わる)の組み立てが必要である。完全長TAFA-4を生成するためには、3回のライゲーション精製工程が必要であり、工業規模の製造に適合しない低収率

につながる。そのため、疼痛(具合的には、急性、亜急性、又は慢性の疼痛)を効果的に予防するか又は処置するために使用される代替治療薬及び代替治療方法が強く必要とされており、工業規模で且つ費用対効果の高い方法で製造され得る、完全長TAFA-4タンパク質と同等以上の活性を有する新規化合物を同定することに大きな利点があるだろう。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００６】

【特許文献１】国際公開第2014180853号

【特許文献２】国際公開第03042397号

【特許文献３】米国特許第6,632,670号

【特許文献４】国際公開第2017153424号

【非特許文献】

【０００７】

【非特許文献１】Smith及びWaterman, (1981) Adv. Appl. Math. 2:482頁

【非特許文献２】Needleman及びWunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443頁

【非特許文献３】Pearson及びLipman, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444頁

【非特許文献４】Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel他編, Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995増補)

【非特許文献５】Altschul他, (1990), J. Mol. Biol. 215: 403～410頁

【非特許文献６】Altschul他, (1977) Nucleic Acids Res. 3389～3402頁

【非特許文献７】Henikoff及びHenikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915頁

【非特許文献８】Graham他, Virology 52:456 (1973)

【非特許文献９】Sambrook他, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York (1989)

【非特許文献１０】Davis他, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier (1986)

【非特許文献１１】Chu他, Gene 13:197 (1981)

【非特許文献１２】Sambrook, J., Fritsh, E. F.,及びManiatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第2編., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989

【非特許文献１３】Decosterd及びWoolf, 2000; Pain, 第87巻, 149～158頁

【非特許文献１４】A peripheral mononeuropathy in rats that produces disorders of pain sensation like those in man. Pain 第33巻:87～107頁

【発明の概要】

【０００８】

本発明は、少なくともその一部が、鎮痛(antalgic)活性又は鎮痛(analgesic)活性、特に鎮痛(antalgic)活性、を示すペプチドの同定に基づいている。本発明者らは、これらのペプチドが、神経損傷、手術、又はカラゲナン等の炎症性物質の注射により誘発される機械的過敏症を有利に反転させ得ること、即ち、神経障害性疼痛、術後疼痛、又は炎症性疼痛を処置可能であることを発見している。

【０００９】

目的のペプチドは、ヒトTATF-4タンパク質の特定の断片であるか、又はこの断片に由来している。このペプチドは、ヒトTAFA-4完全長タンパク質(本明細書では、「TAFA-4 FL」とも識別される)と比べて疼痛に対して(特に、慢性的疼痛に対して、典型的には損傷により誘発された疼痛に対して)有効であり、且つ製造が容易である。実際に、これらのペプチドは、治療効果を得るために互いに連結させる必要がない短いペプチドである。本発明者らは、本明細書において、疼痛処置への依存の問題を軽減可能な新規のツール

を患者に提供する。

【００１０】

本発明者らは、本明細書において具体的に、製品又は組成物のセット、具体的には、ペプチド、そのようなペプチドをコードする核酸、ベクター、及び/又はそのようなペプチドの発現を可能にする細胞のセットを初めて説明しており、ペプチドは、配列番号1(CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWW)の第1のペプチド又は配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチド(本明細書ではまた、配列番号1の配列の「バリアント」、「ペプチドバリアント」、若しくは「ペプチドのバリアント」とも識別される)と、配列番号2(CHMNPCLEGEDCKVLPDYSGWSCSSGNKVKTTKVTR)の第2のペプチド又は配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチド(本明細書ではまた、配列番号2の配列の「バリアント」、「ペプチドバリアント」、若しくは「ペプチドのバリアント」とも識別される)とを含むか又はからなり、前記(少なくとも2種の)ペプチドは、互いに連結されていない。バリアントは、典型的には、機能的バリアントであり、即ち、配列番号1又は配列番号2のペプチドに関して本明細書において本発明者らが説明しているものと同一の(治療)効果を有するバリアントである。

【００１１】

配列番号1の配列のペプチド又はそのバリアント(即ち、配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチド)と、配列番号2の配列のペプチド又はそのバリアント(即ち、配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチド)とを含む組成物も本明細書で説明されており、前記(少なくとも2種の)ペプチドは、互いに連結されていない。

【００１２】

特定の態様では、配列番号1及び配列番号2のペプチドと同様に、これらの本明細書で説明されているバリアントは、脊髄介在ニューロン(好ましくは、脊髄IIi層介在ニューロン)の興奮性を調節する。

【００１３】

好ましい態様では、配列番号1のペプチド中の13位でのグルタミン(Q)残基(配列番号1に記載されている位置を基準にする)は、配列番号1のペプチドのバリアントにおいて変化しないままである。同様に、配列番号2のペプチド中の18位でのチロシン(Y)残基(配列番号2に記載されている位置を基準にする)は、配列番号2のペプチドのバリアントにおいて変化しないままであるか、又はセリン(S)に置き換えられている。

【００１４】

本発明者らは、本明細書において、具体的には、互いに連結されていない(少なくとも2種の)ペプチドの発現を可能にする核酸のセットであって、(第1の)核酸は、配列番号1のペプチド又は配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチドをコードする配列を含み、(第2の)核酸は、配列番号2のペプチド又は配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチドをコードする配列を含む、核酸のセット、及びそのような核酸のセットを含む組成物を説明している。

【００１５】

互いに連結されていない(少なくとも2種のペプチドの)発現を可能にするベクターのセットであって、(第1の)ベクターは、配列番号1のペプチド又は配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチドをコードする配列を含み、(第2の)ベクターは、配列番号2のペプチド又は配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチドをコードする配列を含む、ベクターのセット、及びそのようなベクターのセットを含む組成物も本明細書で開示されている。

【００１６】

互いに連結されていない本明細書で説明されている(少なくとも2種の)ペプチド(又はそのバリアント)の発現を可能にする細胞であって、i)配列番号1のペプチド又は配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチドをコードする(第1の)核酸配列又はベクターと、配列番号2のペプチド又は配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を

有するペプチドをコードする(第2の)核酸配列又はベクターとを含む細胞が更に本明細書で開示されている。そのような細胞と、許容される支持体とを含む組成物も開示されている。

【００１７】

有効な治療成分又は予防成分としての使用に関して(典型的には、医薬組成物、薬物、又は医薬としての使用に関して)初めて本明細書で開示されているセット、組成物、又は細胞も本明細書で説明されている。

【００１８】

本明細書で説明されている組成物はいずれも、典型的には、(少なくとも2種の)ペプチドに加えて、薬学的に、及び/又は栄養学的に/食事的に許容される支持体を含む医薬組成物、治療用組成物、獣医用組成物、又は栄養学的/食事用組成物である。

【００１９】

特定の態様では、本組成物は、少なくとも1種の追加の(別個の)活性化合物/薬剤を更に含み得、好ましくは、疼痛(急性疼痛、亜急性疼痛、又は慢性疼痛)に対して有効な活性剤を更に含み得、更により好ましくは、ステロイド系抗炎症薬(SAID)、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、又はオピオイド系薬物を更に含み得る。

【００２０】

本発明はまた、それを必要とする対象の疼痛を予防するか又は処置するための[活性成分としての]使用のための、本明細書で説明されているセット又は細胞にも関し、典型的には、ペプチドのセット、そのようなペプチドをコードする核酸のセット、又はそのようなペプチドの発現を可能にするベクターのセット、又はそのようなセットを含むか若しくは発現する細胞にも関する。本発明はまた、それを必要とする対象の疼痛を予防するか又は処置するための医薬組成物、薬物、又は医薬の製造のための、そのようなペプチド又はそのようなセットの使用にも関する。具体的には、本発明を使用して、慢性疼痛、神経障害性疼痛、術後疼痛、炎症性疼痛、痛覚過敏、アロディニア、又は急性疼痛を処置し得る。同様に、本発明を使用して、関節痛、関節への損傷に関連する疼痛、エーラース・ダンロス症候群に関連する疼痛、日焼けによる疼痛、又は氷焼け(ice burn)による疼痛も処置し得る。

【００２１】

本発明はまた、それを必要とする対象の疼痛を予防するか又は処置する方法であって、本明細書で説明されているセット及び/又は組成物等の製品の(治療上有効な)量を投与することを含み、好ましくは、配列番号1のペプチド、又は配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有する、このペプチドのバリアントと、配列番号2のペプチド、又は配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有する、このペプチドのバリアントとを含むペプチドのセット、又はそのようなセットを含む組成物の(治療上有効な)量を投与することを含む方法にも関する。

【００２２】

本明細書で説明されている製品(具体的には、ペプチド、セット、及び組成物)を、任意の経路により対象に投与し得、例えば、筋肉内、静脈内、腹腔内、(経口(per os))、肛門、皮膚、皮下、局所、経皮(dermically)、経皮(transdermically)、又は髄腔内で投与し得る。好ましくは、本明細書で説明されている製品(例えば、ペプチド又は組成物)を、皮下、経口、又は静脈内で対象に投与し、更により好ましくは皮下又は経口で対象に投与する。

【００２３】

本明細書で説明されている製品(例えば、ペプチド又は組成物)のそれぞれは、キットの一部であり得る。

【００２４】

本発明の特定のキットは、i)配列番号1の第1のペプチド、配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチド、又はそのようなペプチドをコードする核酸配列、ii)配列番号2の第2のペプチド、配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するペプ

チド、又はそのようなペプチドをコードする核酸配列、並びに任意選択のiii)キットを使用するための書面の使用説明書を含み、第1及び第2のペプチド、又は前記ペプチドをコードする核酸は別個の容器中にある。本明細書で説明されているキットは、典型的には、疼痛の予防又は処置に関連して使用される。

【００２５】

特定の態様では、本発明の製品をまた、研究にも関連して使用し得る。本明細書で説明されているペプチド若しくはそのバリアントをコードする核酸、その発現を許容するベクター、又はそのような核酸を含むか若しくはそのようなベクターを使用して改変された細胞を使用して、配列番号1のペプチド、若しくは配列番号1に対して少なくとも９０％の同一性を有する、このペプチドの機能的バリアント、及び/又は配列番号2のペプチド、若しくは配列番号2に対して少なくとも９０％の同一性を有する、このペプチドの機能的バリアントをインビトロ若しくはエクスビボで発現させ得るか、又はこの発現をインビトロ若しくはエクスビボで調節し得る。別の特定の態様では、本発明はまた、少なくとも2種の別個の本明細書で説明されている核酸を発現するように改変された遺伝子導入動物にも関する。

【図面の簡単な説明】

【００２６】

【図１】神経障害性疼痛の神経部分損傷(SNI)モデルにおいてインビボで皮下投与された場合での、TAFA-4(完全長タンパク質)と配列番号1及び配列番号2の2種のペプチドのセットとの鎮痛効果の比較。機械的過敏症に罹患しているマウスに、配列番号1及び配列番号2の2種のペプチドのセット(このセットは、本明細書では「ペプチド1+2」と識別される)、TAFA-4完全長タンパク質(「TAFA4 FL」と識別される)、陰性コントロール(ビヒクル)、又は陽性コントロール(プレガバリン)を皮下投与する。この図は、各条件下での時間の関数として、マウスの50％において足の引っ込め反応を生じさせるのに必要な機械的な力(グラム当量で表される)を示す。データを、ベースラインレベルに対する反応の割合として表す。測定を、SNI疼痛モデルの実施前(T0=ベースライン)に実施し、機械的アロディニアの確立を検証するためにSNIの14日後に実施し、次いで皮下注射の1、2、及び4時間後に実施した。「ペプチド1+2」処置マウス、「TAFA-4 FL」処置マウス、及びビヒクル群の間の統計的差違を示す(2元配置RM ANOVA、続いてBonferroni事後検定:*p〈0.05、**p〈0.01、***p〈0.001)。

【図２】神経障害性疼痛のSNIモデルにおいてインビボで経口投与された場合での、TAFA-4(完全長タンパク質)と配列番号1及び配列番号2の2種のペプチドのセットとの鎮痛効果の比較。機械的過敏症に罹患しているマウスに、配列番号1及び配列番号2の2種のペプチドのセット(このセットは、本明細書では「ペプチド1+2」と識別される)、TAFA-4完全長タンパク質(「TAFA4 FL」と識別される)、陰性コントロール(ビヒクル)、又は陽性コントロール(プレガバリン)を経口投与する。この図は、各条件下での時間の関数として、マウスの50％において足の引っ込め反応を生じさせるのに必要な機械的な力(グラム当量で表される)を示す。データを、ベースラインレベルに対する反応の割合として表す。測定を、SNI疼痛モデルの実施前(T0=ベースライン)に実施し、機械的アロディニアの確立を検証するためにSNIの14日後に実施し、次いで強制経口の1、2、及び4時間後に実施した。「ペプチド1+2」処置マウス、「TAFA-4 FL」処置マウス、及びビヒクル群の間の統計的差違を示す(2元配置RM ANOVA、続いてBonferroni事後検定:*p〈0.05、**p〈0.01、***p〈0.001)。

【図３】神経障害性疼痛のSNIモデルにおいてインビボで静脈内投与された場合での、配列番号1及び配列番号2の2種のペプチドのセットの鎮痛効果。機械的過敏症に罹患しているマウスに、配列番号1及び配列番号2の2種のペプチドのセット(このセットは、本明細書では「ペプチド1+2」と識別される)、又は陰性コントロール(ビヒクル)を静脈内投与する。この図は、各条件下での時間の関数として、マウスの50％において足の引っ込め反応を生じさせるのに必要な機械的な力(グラム当量で表される)を示す。データを、ベースラインレベルに対する反応の割合として表す。測定を、SNI疼痛モデルの実施前(T0

=ベースライン)に実施し、機械的アロディニアの確立を検証するためにSNIの14日後に実施し、次いで静脈内注射の1、2、及び4時間後に実施した。「ペプチド1+2」処置マウス、及びビヒクル群の間の統計的差違を示す(2元配置RM ANOVA、続いてBonferroni事後検定:*p〈0.05、**p〈0.01、***p〈0.001)。

【図４】雄及び雌の両方のマウスにおける術後疼痛モデル(Brennan足切開モデル)においてインビボで皮下投与された場合での、配列番号1及び配列番号2の2種のペプチドのセットの鎮痛効果。図4A.このプロトコルの概略図。配列番号1及び配列番号2の2種のペプチドのセット、又は陰性コントロール(ビヒクル)を、下記の様々な時点で1日2回皮下投与した:手術前日(D-1)、手術当日(D0)、並びに手術後D+1日及びD+2日。D0での投与を、手術の1時間前並びに手術の1時間後(及び目覚め後)それぞれで実施した。D+1及びD+2での機械的閾値反応の測定を、2種のペプチドのセット又はビヒクルの投与前に実施した。図4B.この図は、時間の関数でマウスの50%において足の引っ込め反応を生じさせるのに必要な機械的な力(ベースラインレベルの割合で表される)を示す。配列番号1及び配列番号2のペプチドのセット(このセットは、本明細書では「ペプチド1+2」と識別される)で処置されたマウスを、陰性コントロール(ビヒクル)で処置されたマウスと比較した。「ペプチド1+2」処置マウス、及びビヒクル群の間の統計的差違を示す(2元配置RM ANOVA、続いてBonferroni事後検定: ***p〈0.001)。「ペプチド1+2」処置群:24匹のマウス、ビヒクル群:22匹のマウス;モデル=術後疼痛モデル;性別:「ペプチド1+2」で処置されたマウスの場合は12匹の雄及び12匹の雌、ビヒクル群の場合は11匹の雄及び11匹の雌;投与:皮下;「ペプチド1+2」の総濃度:300μg/kg。(ペプチド1:128μg/kg及びペプチド2:172μg/kgにほぼ相当する)

【図５】慢性絞扼性神経損傷(CCI)神経障害性疼痛モデルへの配列番号1及び配列番号2のペプチドのセットの皮下投与の反復後の耐性の欠如。図5A.このプロトコルの概略図。CCI神経障害性疼痛モデルの確立後、マウスを、手術後7日で開始して連続14日にわたり1日2回、配列番号1及び配列番号2のペプチドのセット(このセットは、本明細書では「ペプチド1+2」と識別される)、又は陰性コントロール(ビヒクル)で処置した。「ペプチド1+2」の鎮痛効果を、2日毎に決定した。図5B.この図は、時間の関数でマウスの50%において足の引っ込め反応を生じさせるのに必要な機械的な力(ベースラインレベルの割合で表される)を示す。「ペプチド1+2」で処置されたマウスを、陰性コントロール(ビヒクル)で処置されたマウスと比較した。「ペプチド1+2」処置マウス及びビヒクル群の最初及び最後の投与後での鎮痛効果の統計的差違を示す(2元配置RM ANOVA、続いてBonferroni事後検定:ns:有意でない)。モデル=CCI神経障害性疼痛モデル;性別:「ペプチド1+2」処置マウスの場合は10匹の雄、ビヒクル群の場合はn=9;投与:皮下;「ペプチド1+2」の総濃度:300μg/kg。

【図６】雄及び雌の両方のマウスにおける術後疼痛モデル(Brennan足切開モデル)においてインビボで皮下投与された場合での、配列番号1及び配列番号2のペプチドのセットによる処置の様々な薬量の比較。図6A.このプロトコルの概略図。配列番号1及び配列番号2の2種のペプチドのセット(「ペプチド1+2」)、又は陰性コントロール(ビヒクル)を、3つの異なるプロトコルに従って1日2回皮下投与した。「D-1/D0」プロトコル:手術前日(D-1)及び手術当日(D0);「D0」プロトコル:手術当日(D0);「D0/D+1/D+2」プロトコル:手術前日(D-1)、手術当日(D0)、並びに手術後のD+1日目及びD+2日目。D0での投与を、手術の1時間前並びに手術の1時間後(及び目覚め後)それぞれで実施した。D+1及びD+2での機械的閾値反応の測定を、2種のペプチドのセット又はビヒクルの投与前に実施した。図6B.この図は、時間の関数でマウスの50%において足の引っ込め反応を生じさせるのに必要な機械的な力(ベースラインレベルの割合で表される)を示す。「ペプチド1+2」で処置されたマウスを、上記の3つの異なるプロトコル「D-1/D0」、「D0」、「D0/D+1/D+2」に従って陰性コントロール(ビヒクル)で処置されたマウスと比較した。「ペプチド1+2」処置マウスとビヒクル群との間の統計的差違を示す(2元配置RM ANOVA、続いてBonferroni事後検定:**p〈0.01、***p〈0.001)。「ペプチド1+2」処置群:16匹のマウス、ビヒクル群:11匹のマウス;モデル=術後疼痛モデル;性別:「ペプ

チド1+2」で処置されたマウスの場合は8匹の雄及び8匹の雌、ビヒクル群の場合は6匹の雄及び5匹の雌;投与:皮下;「ペプチド1+2」の総濃度:300μg/kg。
【図７】炎症性疼痛モデル(カプサイシン炎症性疼痛モデル)においてインビボで皮下投与された配列番号1及び配列番号2のペプチドのセットの鎮痛効果。この図は、時間の関数でマウスの50%において足の引っ込め反応を生じさせるのに必要な機械的な力(ベースラインレベルの割合で表される)を示す。配列番号1及び配列番号2のペプチドのセット(このセットは、本明細書では「ペプチド1+2」と識別される)で処置されたマウスを、陰性コントロール(ビヒクル)で処置されたマウスと比較した。「ペプチド1+2」処置マウスとビヒクル群との間の統計的差違を示す(2元配置RM ANOVA、続いてBonferroni事後検定:*p〈0.05、**p〈0.01、***p〈0.001)。モデル=炎症性疼痛モデル;「ペプチド1+2」処置群:8匹の雄のマウス、ビヒクル群:8匹の雄のマウス;投与:皮下;「ペプチド1+2」の総濃度:300μg/kg。
【図８】変形性関節炎疼痛モデル(モノヨードアセテートモデル)においてインビボで皮下投与された配列番号1及び配列番号2のペプチドのセットの鎮痛効果。この図は、時間の関数でマウスの50%において足の引っ込め反応を生じさせるのに必要な機械的な力(ベースラインレベルの割合で表される)を示す。配列番号1及び配列番号2のペプチドのセット(このセットは、本明細書では「ペプチド1+2」と識別される)で処置されたマウスを、陰性コントロール(ビヒクル)で処置されたマウスと比較した。「ペプチド1+2」処置マウスとビヒクル群との間の統計的差違を示す(2元配置RM ANOVA、続いてBonferroni事後検定:*p〈0.05、**p〈0.01、***p〈0.001)。モデル=変形性関節炎疼痛モデル;「ペプチド1+2」処置群:8匹の雄のマウス、ビヒクル群:8匹の雄のマウス;投与:皮下;「ペプチド1+2」の総濃度:300μg/kg。
【図９】冷凍焼け疼痛モデルにおいてインビボで皮下投与された配列番号1及び配列番号2のペプチドのセットの鎮痛効果。この図は、時間の関数でマウスの50%において足の引っ込め反応を生じさせるのに必要な機械的な力(ベースラインレベルの割合で表される)を示す。配列番号1及び配列番号2のペプチドのセット(このセットは、本明細書では「ペプチド1+2」と識別される)で処置されたマウスを、陰性コントロール(ビヒクル)で処置されたマウスと比較した。「ペプチド1+2」処置マウスとビヒクル群との間の統計的差違を示す(2元配置RM ANOVA、続いてBonferroni事後検定:*p〈0.05、**p〈0.01、***p〈0.001)。モデル=冷凍焼け疼痛モデル;「ペプチド1+2」処置群:8匹の雄のマウス、ビヒクル群:8匹の雄のマウス;投与:皮下;「ペプチド1+2」の総濃度:300μg/kg。
【図１０】紫外線火傷疼痛モデルにおいてインビボで皮下投与された配列番号1及び配列番号2のペプチドのセットの鎮痛効果。この図は、時間の関数でマウスの50%において足の引っ込め反応を生じさせるのに必要な機械的な力(グラム当量で表される)を示す。データを、ベースラインレベルに対する反応の割合で示す。配列番号1及び配列番号2のペプチドのセット(このセットは、本明細書では「ペプチド1+2」と識別される)で処置されたマウスを、陰性コントロール(ビヒクル)で処置されたマウスと比較した。「ペプチド1+2」処置マウスとビヒクル群との間の統計的差違を示す(2元配置RM ANOVA、続いてBonferroni事後検定:*p〈0.05、**p〈0.01、***p〈0.001)。モデル=紫外線火傷疼痛モデル;各群に関して16匹のマウス(8匹の雄及び8匹の雌のマウス);投与:皮下;「ペプチド1+2」の総濃度:300μg/kg。
【発明を実施するための形態】
【００２７】
定義
本明細書で使用されている用語は、一般に、本発明の文脈内で、及び各用語が使用される具体的な文脈内で、当技術分野における通常の意味を有する。本発明の方法及びその使用方法の説明において、熟練した読者にさらなる指針を提供するために、ある特定の用語を、下記で又は本明細書の他の箇所で論じる。更に、同一の事柄を複数の方法で述べることができることが理解されるだろう。従って、本明細書で論じられている用語の内のいずれか1つ又は複数に関して、代替言語及び同義語を使用し得る。ある特定の同義語が提供

される。1つ又は複数の同義語の詳説は、他の同義語の使用を排除するものではない。
【００２８】
「ペプチド」、「ペプチドバリアント」、「タンパク質断片」、「タンパク質セグメント」という用語は、アミノ酸残基の配列又はポリマーを指すために同義で使用される。そのようなアミノ酸残基のポリマーは、天然又は非天然のアミノ酸残基を含み得る。この用語はまた、ペプチドの発現後改変(例えば、例えば、グリコシル化、シアリル化、アセチル化、アミド化、リン酸化、カルバメチル化、及び同類のもの)も含む。更に、本発明に関連して、「ペプチド」は、このペプチドが所望の活性(即ち、疼痛の予防又は処置)を維持する限り、任意選択で、天然(野生型)配列に対する欠失、付加、及び置換等の1つ又はいくつかの改変(一般に、本質的には保存的)と共に、そのような発現後改変又はそのような改変の組み合わせを含み得るタンパク質の断片又はセグメントを指す。この改変は、好ましくは意図的な変異であり、例えば、部位特異的変異誘発により得られる。
【００２９】
「単離ペプチド」という用語は、元々の環境(即ち、天然に存在する場合には天然環境)から取り出されているペプチドを指す。自然系中に(例えば、生きている動物中に)天然に存在しているペプチドは、前記天然系中で共存する物質の全て又は一部から分離されている同一のペプチドとは区別されるべきである。分離されたペプチドは、本明細書では「単離ペプチド」と称される。換言すると、本発明に関連して、単離ペプチドは、TAFA-4タンパク質の断片であって、それ自体が天然に存在していない断片である。
【００３０】
「合成ペプチド」という用語は、化学合成により得られたペプチドを指す。
【００３１】
「ペプチドのセット」又は「ペプチドセット」という用語は、本明細書で使用される場合、場合によって組成物中で混合されているが、互いに連結されていない、(セットの)活性成分として組み合わせて使用される少なくとも2種のペプチドを指す。2種のペプチドが存在する場合には、このセットのペプチドは、いかなる結合によっても、例えば、ペプチド(アミノ酸の配列)からなる結合/連結によっても、又は化学的性質の若しくは有機的性質及び化学的性質の両方の結合/連結によっても、互いに結合していない(このセットのペプチドが2種超である場合には、これらのペプチドは、互いに結合していない)。このセットのペプチドは、単離ペプチド、合成ペプチド、又はこれらの混合物である。このセットは、乾燥粉末、溶液、懸濁液、又はコロイドの形態で存在し得、且つ均一であってもよいし不均一であってもよい。ペプチドのセットは、一般に、組成物の一部である。この組成物はまた、典型的には、薬学的に及び/又は栄養学的に許容される支持体、担体、賦形剤、又はビヒクルも含む。典型的には、賦形剤は、アスコルビン酸及び/又はアスコルビン酸塩である。アスコルビン酸又はL-アスコルビン酸(IUPAC名:(5R)-5-[(1S)-1,2-ジヒドロキシエチル]-3,4-ジヒドロキシフラン-2(5H)-オン)は、ビタミンCとして一般に既知の、天然に存在する水溶性ビタミンである。アスコルビン酸塩の例として、アスコルビン酸マグネシウム、アスコルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸カルシウム、及びパルミチン酸アスコルビルが挙げられるが、これらに限定されない。L-アスコルビン酸及びそのナトリウム塩は、抗酸化物質であり、ペプチドのセットと組み合わせて使用された場合には、保存料又は安定剤として有用である。他の抗酸化物質(例えば、メチオニン)も使用することが可能である。
【００３２】
「配列同一性」、「少なくともX%の同一性を有する配列」、及び「にX%同一の配列」(Xは、例えば90である)という用語は、比較ウィンドウ全体にわたりヌクレオチド単位又はアミノ酸単位で配列が同一である程度を指すために同義で使用される。そのため、「配列同一性の割合」は、比較ウィンドウ全体にわたり、2つの最適にアラインされた配列を比較することにより算出され得、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列の一部は、2つの配列の最適なアラインメント用の基準配列と比較して、付加又は欠失(即ち、ギャップ)を含み得る。この割合を、両方の配列において同一の核酸塩

基(例えば、A、T、C、G、U)又は同一のアミノ酸残基(例えば、Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys、及びMet)が存在する位置の数を決定して、一致した位置の数を得、この一致した位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数(即ち、ウィンドウサイズ)で除算し、その結果に100を乗算して配列同一性の割合を得ることにより算出し得る。或いは、この割合を、両方の配列において同一の核酸塩基若しくはアミノ酸残基が存在するか又は核酸塩基若しくはアミノ酸残基がギャップと共にアラインされている位置の数を決定して、一致した位置の数を得、この一致した位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で除算し、その結果に100を乗算して配列同一性の割合を得ることにより算出し得る。好ましくは、配列同一性は、基準配列(本明細書では、配列番号1又は配列番号2)の全長にわたり決定される。

【００３３】

比較のための配列の最適なアラインメントを、例えば、Smith及びWaterman, (1981) Adv. Appl. Math. 2:482頁の局所相同性アルゴリズムにより実行し得るか、Needleman及びWunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443頁の相同アラインメントアルゴリズムにより実行し得るか、Pearson及びLipman, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444頁の類似性検索方法により実行し得るか、これらのアルゴリズムのコンピュータ実装(GAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA)により実行し得るか、又は目視検査(一般には、Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel他編, Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995増補)を参照されたい)により実行し得る。

【００３４】

配列同一性及び配列類似性のパーセントを決定するのに適したアルゴリズムの例は、BLAST及びBLAST 2.0アルゴリズムであり、それぞれAltschul他, (1990), J. Mol. Biol. 215: 403～410頁、及びAltschul他, (1977) Nucleic Acids Res. 3389～3402頁で説明されている。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationウエブサイトから公的に利用可能である。このアルゴリズムは、最初に、クエリ配列中の長さ「W」の短い単語を同定することにより高スコアリング配列対(HSP)を同定することを含み、この短い単語は、データベース配列中の同一長さの単語とアラインされた場合に、一致するか又はいくつかの正の値の閾値スコア「T」を満たす。Tは、近傍語スコア閾値と称される(Altschul他, 上記参照)。この最初の近傍語ヒットは、これを含むより長いHSPを見つけるための検索を開始するためのシードとして機能する。次いで、累積アラインメントスコアを増加させ得る限り、各配列に沿って両方向に単語ヒットを拡張する。累積スコアを、ヌクレオチド配列に対して、パラメータ「M」(一致する残基の対に対する報酬スコア;常に〉0)と、「N」(不一致残基に対するペナルティスコア;常に〈0)とを使用して算出する。アミノ酸配列の場合には、スコアリングマトリックスを使用して、累積スコアを算出する。各方向での単語ヒットの拡張は、累積アラインメントスコアが最大値から量「X」だけ減少した場合に停止されるか、1つ若しくは複数の負のスコアリング残基アラインメントの蓄積に起因して累積スコアが0以下になる場合に停止されるか、又はいずれかの配列の終わりに達した場合に停止される。BLASTアルゴリズムパラメータW、T、Xにより、アラインメントの感度及び速度が決定される。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列の場合)は、デフォルトで、単語長(W) 11、期待値(「E」) 10、M=5、N=-4、及び両方の鎖の比較を使用する。アミノ酸配列の場合には、BLASTPプログラムは、デフォルトで、単語長(W) 3、期待値(E) 10、BLOSUM62スコアリングマトリックスを使用する(Henikoff及びHenikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915頁を参照されたい)。

【００３５】

アミノ酸配列の同一性パーセントの程度をまた、アラインメント内の同一一致の数を計数し、そのような同一一致の数を基準配列の長さで除算し、続いて下記のデフォルトのClustalWパラメータ:ギャップ開始ペナルティ:10;ギャップ伸長ペナルティ:0.10、タン

パク質量マトリックス:Gonnetシリーズ;DNA質量マトリックス:IUB、低速/高速ペアワイズアラインメントの切り替え=低速又は完全アラインメントを使用して、低速/正確なペアワイズ最適アラインメントを達成することにより、ClustalW解析(バージョンW 1.8)によっても得ることができる。

【００３６】

「核酸」又は「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書で使用される場合、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドのいずれかの任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。そのため、これらの用語には、一本鎖、二本鎖、若しくは多重鎖のDNA若しくはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、又はプリン塩基及びピリミジン塩基を含むポリマー、又は他の天然の、化学的に若しくは生化学的に改変された、非天然の、又は誘導体化されたヌクレオチド塩基が含まれるが、これらに限定されない。ポリヌクレオチドの骨格は、糖及びリン酸基(RNA若しくはDNAで典型的に見出され得る)、又は改変されているか若しくは置換されている糖若しくはリン酸基を含み得る。或いは、ポリヌクレオチドの骨格は、ホスホラミデート等の合成サブユニットのポリマーを含み得、そのため、オリゴデオキシヌクレオシドホスホラミデート(P-NH_2)又は混合ホスホラミデート-ホスホジエステルオリゴマーであり得る。加えて、二本鎖ポリヌクレオチドを、相補鎖を合成し、適切な条件下でこの鎖をアニールさせることにより、又は適切なプライマーと共にDNAポリメラーゼを使用して相補鎖を新規に合成することにより、化学合成の一本鎖ポリヌクレオチド生成物から得ることができる。

【００３７】

「発現カセット」、「核酸構築物(nucleic acid construction)」、又は「核酸構築物(nucleic acid construct)」という用語は、本明細書では同義で使用されており、目的の1つ若しくは複数の(コード)配列に(当業者に理解される意味で)作動可能に連結された少なくとも1つの転写プロモーターを含む核酸を指すか、典型的には、発現産物が細胞内での目的の機能の発生に寄与する目的のいくつかのコード配列を含むオペロンを指すか、又は活性化配列及び/若しくは転写ターミネーターを更に含む核酸を指す。

【００３８】

「ベクター」という用語は、i)ペプチド、ポリペプチド、若しくはタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列(例えば、発現カセット若しくは導入遺伝子)を含むDNA分子若しくはRNA分子、又はii)そのようなDNA分子若しくはRNA分子を包む製品を指す。ベクターは、一般に、核酸分子が導入された細胞中において、コードするポリヌクレオチド配列(導入遺伝子と呼ばれる)の発現を誘導可能な調節エレメントを含む。「導入遺伝子」という用語は、細胞に導入され、RNAに転写され得、任意選択で、適切な条件下で翻訳され得、及び/又は発現され得るポリヌクレオチドを指す。ある特定の態様では、導入遺伝子は、この導入遺伝子が導入された細胞に所望の特性を付与するか、又は別の方法で、所望の技術的効果(本明細書では、典型的には治療効果)をもたらす。導入遺伝子は、1種若しくは複数種のタンパク質又は1種若しくは複数種のタンパク質断片をコードする配列を含み得る。特定の態様では、ベクターは、プラスミドである。或いは、ベクターは、本明細書で説明されている目的の外因性核酸配列を人工的に保有可能な任意の公知のビヒクルであり、例えば、本明細書で説明されている目的の生成物を包んで目的の部位に送達するために使用可能なウイルスベクター、コスミド、ファージ、又は二重脂質膜(例えば、リポソーム)等が挙げられる。

【００３９】

「遺伝子治療」という用語は、疾患の予防又は処置を目的とする個体の細胞中への遺伝子/核酸の送達を伴う、対象の処置を指す。

【００４０】

「遺伝子導入」という用語は、原核生物細胞又は真核生物細胞等の細胞による外因性ポリヌクレオチドの取込みを指す。外因性ポリヌクレオチドが細胞に導入された場合には、この細胞は、「遺伝子導入された」と識別される。多くの遺伝子導入技術が、当技術分野で一般に既知である。例えば、Graham他, Virology 52:456 (1973)、Sambrook

他, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York (1989)、Davis他, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier (1986)、及びChu他, Gene 13:197 (1981)を参照されたい。そのような技術を使用して、1種又は複数種の外因性核酸を適切な宿主細胞に導入し得る。

【００４１】

「形質導入」という用語は、遺伝子送達ベクター(例えば、組換えウイルスベクター、具体的には、レトロウイルス、アデノウイルス、組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)、単純ヘルペスウイルス、又はレンチウイルス)等による、受容宿主細胞への核酸分子の送達を指す。例えば、rAAVウイルス粒子による標的細胞の形質導入により、このウイルス粒子に含まれるrAAVベクターが形質導入細胞に導入される。

【００４２】

組換え「アデノ随伴ウイルス(AAV)」は、一本鎖の線状DNAゲノムを有しており、病原性を欠いており、且つ免疫原性が低い小さいディペンドパルボウイルス属(Dependoparvovirus)であり、組換え法を使用して人工的に製造されている。組換えAAV(rAAV)は、好ましくは、組織/細胞特異的なターゲティング能力を有しており、そのため、rAAVの導入遺伝子は、1種又は複数種の所定の組織/細胞に特異的に又は優先的に送達される。AAVカプシド、並びに調節領域及び投与経路の種類は、これらの組織特異的なターゲティング能力の決定において重要な要素である。

【００４３】

「疼痛」という用語は、本発明に関連して、組織損傷に関連するあらゆる疼痛又は感受性(sensitivity)を指す。好ましくは、本明細書で使用される疼痛という用語は、異常な感受性として理解されており、即ち、典型的には、侵害受容器及び非侵害受容器を含む全てのタイプの感覚ニューロンの異常に増加した活動により媒介される感受性として理解されている。疼痛という用語には、侵害受容器媒介疼痛(本明細書では、「侵害受容性疼痛」とも呼ばれる)、神経障害性疼痛、炎症性疼痛、病理学的疼痛、急性疼痛、亜急性疼痛、慢性疼痛、機械的疼痛、化学的疼痛、体性痛、内臓痛、深部体性痛、表在性体性痛、身体表現性疼痛、アロディニア、痛覚過敏、又は神経損傷に関連する疼痛から選択される任意の疼痛が挙げられる。

【００４４】

「侵害受容性」疼痛又は「侵害受容器媒介性」疼痛は、強い刺激又は有害な刺激による末梢感覚ニューロン(侵害受容器)の特定のサブセットの活性化に反応して発生する。本発明に係る侵害受容性疼痛として、機械的疼痛(圧迫、裂傷等)及び化学的疼痛(切り傷におけるヨウ素、目に入った唐辛子粉)が挙げられる。侵害受容性疼痛の例として、外傷性疼痛又は術後疼痛、陣痛、捻挫、骨折、火傷、打撲、あざ、注射、歯科処置、皮膚生検、及び閉塞が挙げられるが、これらに限定されない。侵害受容性疼痛として、内臓痛及び体性痛が挙げられ、特に、特に深部体性痛及び表在性体性痛が挙げられる。

【００４５】

「内臓痛」は、広範性であり、位置を決めるのが難しく、且つ遠位で通常は表面的な構造を指すことが多い。吐き気及び嘔吐を伴う場合があり、気分が悪い、深い、締め付けられる、及び/又は元気がないと説明される場合がある。深部体性痛は、靭帯、腱、骨、血管、筋膜、及び筋肉の侵害受容器の刺激により引き起こされ、鈍く、うずくような、及び局所性の乏しい疼痛である。深部体性痛の例として、捻挫及び骨折が挙げられる。表在痛は、皮膚又は他の表面組織の侵害受容器の活性化により生じ、鋭く、明確であり、且つ位置が明確に決められる。表在性体性痛を生じる傷害の例として、軽度の創傷、及び軽度(第1度)の火傷が挙げられる。

【００４６】

「損傷誘発性疼痛」という用語は、本発明に関連して、神経障害性疼痛、炎症性疼痛、及び術後疼痛を包含する。

【００４７】

「炎症性疼痛」は、組織の損傷又は炎症の存在下で生じる疼痛であり、術後疼痛、外傷

後疼痛、関節炎(リウマチ又は変形性関節症)疼痛、自己免疫疾患(例えば、乾癬)に関連する疼痛、及び軸性腰痛等の関節、筋肉、及び腱への損傷に関連する疼痛が挙げられる。炎症は、末梢感覚ニューロンの感作を引き起こし、自発痛を引き起こし、痛覚過敏を無効にする。急性又は慢性の病的な組織炎症は、末梢感覚ニューロンを感作し、局所的で耐え難い痛覚過敏を引き起こすことにより、疼痛知覚に強い影響を及ぼす。炎症性メディエータは、神経末端に存在しているイオンチャネルの発現及び/又は機能を変更することにより、侵害受容性一次求心性線維の興奮性を増強することが知られている。

【００４８】

「神経障害性疼痛」は、末梢神経系又は中枢神経系の損傷又は機能不全の結果として生じる、一般的なタイプの慢性の非悪性疼痛である。神経障害性疼痛には様々な病因があり、例えば、外傷、手術、椎間板ヘルニア、脊髄損傷、糖尿病、帯状疱疹(herpes zoster)(帯状疱疹(shingles))の感染、HIV/AIDS、末期がん、切断(乳房切除を含む)、手根管症候群、慢性的なアルコール摂取、放射線被曝、並びにある特定の抗HIV薬及び化学療法薬等の神経毒性治療薬の意図しない副作用として生じる場合がある。特定のタイプの神経障害性疼痛は、「化学療法誘発性末梢神経障害性疼痛」(CIPN)又は「化学療法誘発性神経障害性疼痛」(CINP)である。CINP又はCIPNは、プラチナ及びタキサン由来の薬剤(オキサリプラチン、シスプラチン、カルボプラチン、及びパクリタキセル)等の抗がん剤の最も重篤な副作用の1つである。CINPは、治療中断の要因となり、その結果、死亡リスクを高める可能性さえある。神経障害性疼痛は、慢性アロディニア(通常は痛みの反応を引き起こさない刺激、例えば軽い接触により生じる疼痛と定義される)、及び/又は痛覚過敏(通常は痛みを伴う刺激に対する高い感受性と定義される)の出現を特徴とするか又はその原因であることが多く、任意の損傷組織の明らかな治癒後も数か月又は数年にわたり持続する場合がある。がん患者にも疼痛が生じる場合があり、この疼痛は、炎症、圧迫、浸潤、骨又は他の組織への転移等の複数の原因に起因し得る。疼痛として、脳の髄膜を支配する感覚線維の活性化に関連する片頭痛及び頭痛も挙げられる。

【００４９】

本発明の製品(具体的には、ペプチド、セット、細胞、又は組成物)を、慢性疼痛、神経障害性疼痛、術後疼痛、炎症性疼痛、痛覚過敏、アロディニア、又は急性疼痛の予防又は処置に使用し得る。

【００５０】

別の特定の実施形態では、本発明の製品(具体的には、ペプチド、セット、細胞、又は組成物)を、関節痛、関節の損傷に関連する疼痛、エーラス・ダンロス症候群に関連する疼痛、日焼けによる疼痛、又は氷焼けによる疼痛の予防又は処置に使用し得る。

【００５１】

特に、本発明の製品(具体的には、ペプチド、セット、細胞、又は組成物)を、慢性の筋肉痛及び/又は骨痛及び/又は関節痛を含むエーラス・ダンロス症候群に関連する疼痛の予防又は処置に使用し得、特に処置に使用し得る。本発明の製品(具体的には、ペプチド、セット、細胞、又は組成物)を使用して、日焼け(即ち、紫外線への過剰曝露に起因するもの)に起因する疼痛、又は氷焼け(冷凍焼け(freezer burn)若しくは冷凍焼け(freeze-burn)とも呼ばれる)に起因する疼痛も予防し得るか、又は処置し得、特に処置し得る。

【００５２】

好ましくは、本発明の製品(具体的には、ペプチド、セット、細胞、又は組成物)は、損傷誘発性疼痛の予防又は処置に使用される。より好ましくは、本発明の製品(具体的には、ペプチド、セット、細胞、又は組成物)は、神経障害性疼痛(例えば、化学療法誘発性神経障害性疼痛、若しくは化学療法誘発性末梢神経障害性疼痛)、術後疼痛、及び/又は炎症性疼痛の予防又は処置に使用される。

【００５３】

典型的には、本発明の製品(具体的には、ペプチド、セット、細胞、又は組成物)は、慢性損傷誘発性疼痛の予防又は処置に使用される。典型的には、本発明の製品は、慢性神経障害性疼痛(例えば、慢性化学療法誘発性末梢神経障害性疼痛(CIPN)、慢性化学療法誘

発性神経障害性疼痛(CINP)、若しくは慢性神経損傷誘発性疼痛;慢性術後疼痛;及び/又は慢性炎症性疼痛;重度の火傷に関連するか若しくは重度の火傷から生じる慢性疼痛)の予防又は処置に使用される。

【００５４】

本発明に関連して、対象の疼痛の「処置」又はこの疼痛を「処置する」という用語は、本発明の適切な製品又は製品のセットの対象への曝露(即ち、適用又は投与)後での、具体的には、i)ペプチドのセット(ペプチドは、互いに連結されていない)、好ましくは、本明細書で定義されている配列番号1及び配列番号2の配列若しくはこれらのバリアントのペプチド、ii)互いに連結されていないペプチドのそのようなセットの発現を可能にする核酸若しくは核酸のセット、iii)本明細書で定義されている核酸のセットを含む発現カセット若しくは発現カセットのセット、iv)互いに連結されていないそのようなペプチドのセットの発現を可能にするベクター若しくはベクターのセット、v)互いに連結されていないそのようなペプチドのセットの発現を可能にする細胞若しくは細胞のセット、又はvi)そのようなペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、及び/若しくは細胞を含む本発明に係る組成物の対象への曝露(即ち、適用又は投与)後での、本明細書で説明されている対象の任意の形態の疼痛、又は疼痛に関連する任意の疾患若しくは状態、具体的には、急性、亜急性、若しくは慢性の疼痛(具体的には、典型的には神経障害性疼痛、術後疼痛、若しくは炎症性疼痛に起因する慢性疼痛に関連する任意の神経障害性状態)、又はそのような疾患若しくは状態の任意の症状の遅延、安定化、治癒(curing)、治癒(healing)、緩和、軽減、変更、軽快、改善、治療、又は影響を及ぼすことを指す。

【００５５】

「処置」又は「処置する」という用語はまた、疼痛(任意の傷害、病理、又は状態に関連する場合がある)の処置における成功のあらゆる指標も指しており、疼痛の軽減、寛解、進行若しくは重症度の緩和、安定化、疼痛の症状の軽減、又は対象者にとって疼痛を耐えられるものにするか若しくはより耐えられるものにする等の任意の客観的又は主観的なパラメータが含まれる。疼痛を「処置する」という用語にはまた、疼痛耐性を高めること、及び/又は知覚される疼痛を軽減することも含む。特定の態様では、本発明の方法、化合物、及び組成物は、疼痛耐性を高めるため、及び/又は知覚される疼痛を軽減するためのものである。本明細書で使用される場合、「疼痛耐性」という用語は、対象が感情的及び/又は身体的に崩壊する前に知覚して耐え得る疼痛の量を指す。疼痛耐性は、疼痛閾値(疼痛を生じるのに必要な最小限の機械的刺激)とは異なる。本明細書で使用される場合、「疼痛耐性の増加」は、一般に、例えば、対象への、配列番号1の配列及び配列番号2の配列若しくはこれらのバリアントの適切なペプチド、又は前記ペプチド若しくはバリアントを含む組成物の投与後に、対象が、以前の状態と比較した場合に大きな疼痛耐性(即ち、知覚される疼痛の減少)を発現し得る状況を指す。

【００５６】

本発明に関連して、対象の疼痛に関連する「予防する」又は「予防」は、本発明の製品の対象への曝露(即ち、適用又は投与)後での、具体的には、i)ペプチドの適切なセット(ペプチドは、互いに連結されていない)、好ましくは、本明細書で定義されている配列番号1及び配列番号2の配列若しくはこれらのバリアント(典型的には、機能的バリアント)のペプチドの適切なセット、ii)互いに連結されていないペプチドのそのようなセットの発現を可能にする核酸若しくは核酸のセット、iii)本明細書で定義されている核酸のセットを含む発現カセット若しくは発現カセットのセット、iv)互いに連結されていないそのようなペプチドのセットの発現を可能にするベクター若しくはベクターのセット、v)互いに連結されていないそのようなペプチドのセットの発現を可能にする細胞若しくは細胞のセット、又はvi)そのようなペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、及び/若しくは細胞を含む本発明に係る組成物の対象への曝露(即ち、適用又は投与)後での、対象が任意の種類の疼痛を経験するリスク(又は経験しやすさ)の可能性の少なくとも低減を指す。例えば、「予防する」には、疼痛に曝露され得るか又は疼痛の素因を持ち得るが、まだ疼痛の症状を経験していないか又は呈していない対象において、疼痛の臨床症状の内の少な

くとも1つが発生しないようにすることを含む。

【００５７】

本発明に関連して、「対象」又は「患者」は、疾患若しくは障害又はこれらの症状の処置が必要な動物(具体的には、哺乳動物)を指す。対象は、疾患若しくは障害に罹患していると診断された対象であり得るか、又は疾患若しくは障害を発症するリスクがあると判断された対象であり得、前記疾患又は障害は、対象に疼痛を感じさせることが知られている。特定の例では、対象は、疼痛と診断されているか、又は罹患しており、例えば、急性疼痛、及び/若しくは亜急性疼痛、又は慢性疼痛(例えば、神経障害性疼痛、術後疼痛、炎症性疼痛、痛覚過敏、及び/若しくはアロディニア)と診断されているか、又は罹患している。

【００５８】

特定の態様では、対象は、ヒトである。

【００５９】

別の特定の態様では、対象は、動物であり、具体的には、家畜又は繁殖動物であり、具体的には、ウマ、イヌ、ネコ、ウシ等である。

【００６０】

別の特定の態様では、対象は、myo1A遺伝子において少なくとも1つの変異対立遺伝子を有する。

【００６１】

ペプチド

本発明者らは、本明細書において、組み合わせて(同時又は順次のいずれかで、好ましくは同時で)使用された場合に疼痛を予防し得るか又は処置し得、特に、損傷したか又は炎症した神経系に関連する機械的過敏症を反転させ得る構成成分の新規のセット、特に、ペプチドのセット(前記ペプチドは互いに連結されていない)を同定している。いかなる理論にも拘束されるものではないが、本発明者らは、脊髄ネットワークの興奮性を調節することにより、これらのペプチドが、機械的及び/又は化学的に誘発される痛覚シグナルを特異的に標的とすることによって、鎮痛(antalgic)活性又は鎮痛(analgesic)活性のいずれかを示し、特に鎮痛(antalgic)活性を示すと考えている。

【００６２】

本明細書で説明されているペプチドは、105個のアミノ酸残基のヒトTAFA-4成熟タンパク質由来の特定の断片(配列番号5: SQHLRGHAGHHQIKQGTCEVVAVHRCCNKNRIEERSQTVKCSCFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWWCHMNPCLEGEDCKVLPDYSGWSCSSGNKVKTTKVTR)であり、即ち、この特定の断片からなる(Tang他, 2004により開示されているように、シグナル配列の開裂により生じており、且つアクセッション番号NP_0011005527又はGenbankアクセッションAAP92409にて公的なデータベースで同定されている)。

【００６３】

本明細書において具体的に、製品/構成成分のセットを初めて説明しており、具体的には、i)配列番号1の第1のペプチド(CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWW、即ち、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)又は配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチド(本明細書ではまた、配列番号1の配列の「バリアント」、「ペプチドバリアント」、又は「ペプチドのバリアント」とも識別される)と、ii)配列番号2の第2のペプチド(CHMNPCLEGEDCKVLPDYSGWSCSSGNKVKTTKVTR、即ち、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)又は配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチド(本明細書ではまた、配列番号2の配列の「バリアント」、「ペプチドバリアント」、又は「ペプチドのバリアント」とも識別される)とを含むか、からなるか、又はから本質的になる単離ペプチド又は合成ペプチドのセットを説明しており、前記(少なくとも2種)のペプチ

ドは、互いに連結されていない。
【００６４】
特定のアミノ酸/ペプチド配列に対して少なくとも９０％の同一性を有するペプチドは、本明細書では、前記配列を有する「バリアント」、「ペプチドバリアント」、又は「ペプチドのバリアント」として同定される。好ましい態様では、セット中に存在しているか又はそのようなセットを含む/発現する組成物中に存在している任意のバリアントは、本明細書の下記で更に説明されている機能的バリアントである。
【００６５】
「から本質的になる」という用語は、一般に付与されている意味を有しており、例えば、この用語は、明示的に列挙されていない要素を許容するが、先行技術に見出されるか又は本発明の基本的な若しくは新規の特性に影響を及ぼす要素を除外する。従って、特性の配列「から本質的になる」ペプチドのセットは、ペプチドであって、これらの配列(これらの配列は、互いに連結されていない)を含むか又はからなり、且つこのペプチドの活性に必須ではない他の特徴を含むペプチドを指す。
【００６６】
配列番号1のペプチドは、ヒトTAFA-4成熟タンパク質の27個のC末端アミノ酸残基からなり、UniProtアクセッション番号Q96LR4のアミノ酸78～104として同定され得る。
【００６７】
配列番号2のペプチドは、ヒトTAFA-4成熟タンパク質の36個のアミノ酸残基からなり、UniProtアクセッション番号Q96LR4のアミノ酸105～140として同定され得る。
【００６８】
特定の態様では、配列番号1のペプチド及び/又は配列番号2のペプチドは、N末端位置でアセチル化されており、及び/又はC末端位置でアミド化されている。
【００６９】
【化１】

配列番号1: CFPGQVAGTTRA**Q**PSCVEASIVIQKWW

【００７０】
内の13位にて太字で表されているQ(Glu)、及び
【００７１】
【化２】

配列番号2: CHMNPCLEGEDCKVLPD**Y**SGWSCSSGNKVKTTKVTR

【００７２】
内の18位置に太字で表されているY(Tyr)の2つのアミノ酸残基(配列番号1及び配列番号2にそれぞれ記載されている位置を基準にする)は、これらのペプチドの生物学的活性を暗示していると、本発明者らは考えている。
【００７３】
配列番号1及び配列番号2のペプチドのバリアントもまた、本明細書において、本発明者らにより初めて開示されている。バリアントは、配列番号1のペプチド又は配列番号2のペプチドに由来しており且つ配列番号1又は配列番号2の前記ペプチドにおける1箇所又は複数箇所の部位での1つ若しくは複数のアミノ酸の欠失若しくは付加、及び/又は1つ若しくは複数のアミノ酸の置換により生じているペプチドを指定することが意図されている。バリアントは、配列番号1又は配列番号2のペプチドの機能的活性を実質的に保持している場合には、更には疼痛の予防又は処置を可能にする前記機能的活性を改善する場合には、「機能的バリアント」とみなされることになる。この活性を、実験パートで実施されているような挙動アッセイ等の機能アッセイを使用して測定し得る。
【００７４】

本発明に関連して使用可能なペプチドのバリアントは、前記ペプチドをコードする配列(例えば、配列番号1又は配列番号2)に対して、上記で説明されているように少なくとも90%の配列同一性を有し得、例えば、(少なくとも)90.5%、91%、92%、92.1%、93%、93.7%、94%、95%、95.2%、96%、96.8%、97%、98%、98.4%、又は99%の配列同一性を有し得る。

【００７５】

特定の態様では、配列番号1又は配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するバリアントは、脊髄介在ニューロン(好ましくは、脊髄IIi層介在ニューロン)の興奮性を調節する。好ましい態様では、このバリアントは、本明細書で説明されている目的のペプチド配列(例えば、具体的には配列番号1又は配列番号2)に存在しているアミノ酸の内のいずれかを付加するか、欠失させるか、又は置換する1つ又は複数の点変異(例えば、2、3、4、5、又は6つの点変異)を含むペプチドである。

【００７６】

特に、配列番号1又は配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチドバリアントに関して、配列番号1中の13位でのアミノ酸残基Qが、配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチドのアミノ酸配列において変化しないままであるという条件で、且つ配列番号2中の18位でのアミノ酸残基Yが、配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチドのアミノ酸配列において変化しないままであるか、又はセリン(S)に置き換えられているという条件で(13位及び18位は、それぞれ配列番号1及び配列番号2に記載されている位置を基準にする)、先の段落が適用される。18位でアミノ酸残基Sを有するペプチドは、配列番番号6(CHMNPCLEGEDCKVLPDSSGWSCSSGNKVKTTKVTR、即ち、Cys-His-Met-Asn-Pro-Cys-Leu-Glu-Gly-Glu-Asp-Cys-Lys-Val-Leu-Pro-Asp-Ser-Ser-Gly-Trp-Ser-Cys-Ser-Ser-Gly-Asn-Lys-Val-Lys-Thr-Thr-Lys-Val-Thr-Arg)である。

【００７７】

そのため、本発明の好ましい態様では、配列番号1のペプチド中の13位でのアミノ酸Q(グルタミン残基)(配列番号1に記載されている位置を基準にする)は、配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチドのバリアントのアミノ酸配列において変化しないままである。同様に、別の好ましい態様では、配列番号2のペプチド中の18位でのアミノ酸Y(チロシン残基)(配列番号2に記載されている位置を基準にする)は、配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチドのバリアントのアミノ酸配列において変化しないままであるか、又はS(セリン)に置き換えられている。

【００７８】

本発明の別の好ましい態様では、(配列番号1を基準とする)13位でのアミノ酸Qは、配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチドのバリアントのアミノ酸配列において変化しないままであり、(配列番号2を基準とする)18位でのアミノ酸Yは、配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチドのバリアントのアミノ酸配列において変化しないままであるか、又はセリン(S)に置き換えられている。

【００７９】

別の特定の態様では、好ましくは、配列番号1を基準とする13位でのアミノ酸残基Qに関して上記で説明されていることを条件として、本発明に関連して使用可能な配列番号1のペプチドのバリアントは、配列番号1のペプチド配列に対して少なくとも88.8%、92.5%、96.2%の配列同一性を有し得る。別の特定の態様では、好ましくは、配列番号2を基準とする18位でのアミノ酸残基Yに関して上記で説明されていることを条件として、本発明に関連して使用可能な配列番号2のペプチドのバリアントは、配列番号2のペプチド配列に対して少なくとも91.6%、94.4%、97.2%の配列同一性を有し得る。好ましくは、前記バリアントは、脊髄介在ニューロン(好ましくは、脊髄IIi層介在ニューロン)の興奮性を調節する。

【００８０】

特定の態様では、本バリアントは、配列番号1を基準とする13位でのアミノ酸残基Q及

び配列番号2を基準とする18位でのYに関して上記で説明されていることを条件として、本明細書で説明されている目的のペプチド配列(例えば、具体的には配列番号1又は配列番号2)に存在しているアミノ酸の内のいずれかを付加するか、欠失させるか、又は置換する1つ又は複数の点変異(例えば、1、2、又は3つの点変異)を含むペプチドである。

【００８１】

特定の態様では、1つ又は複数の欠失は、配列番号1又は配列番号2等の目的の配列のN末端に存在している。別の態様では、1つ又は複数の欠失は、配列番号1を基準とする13位でのアミノ酸残基Q、及び配列番号2を基準とする18位でのYに関して、配列番号1及び配列番号2に関連して上記で説明されていることを条件として、C末端に存在しているか、又は配列番号1若しくは配列番号2等の目的の配列の任意の他の位置に存在している。再度別の態様では、2つ以上の欠失は、配列番号1又は配列番号2等の目的の配列のN末端及びC末端の両方に存在している。例えば配列番号1若しくは配列番号2のペプチドのN末端及び/若しくはC末端での又はそのコア中でのそのような欠失により、配列番号1又は配列番号2のトランケート型ヒトペプチドバリアントが生じ得る。

【００８２】

加えて、本発明に係るペプチドのセットの任意のペプチドを、別のペプチド又はタンパク質と融合させて、本明細書で説明されている方法で使用可能なコンジュゲートを形成し得、但し、前記「別のペプチド又はタンパク質」は、本発明のセットの「少なくとも2種の」ペプチドの内の1つではない。実際に、本明細書で説明されているペプチドのセットのペプチド(このセットの活性成分)は、互いに連結されるべきではない。この文脈における「コンジュゲート」という用語は、例えば標的細胞と特異的に相互作用するか又はこの標的細胞に結合するポリペプチドと共に、単一のポリペプチド(具体的には、例えば侵害受容器又は介在ニューロンの興奮性を調節可能な、配列番号1若しくは2のペプチド又はそのバリアント)内の2種の分子の生物学的機能を組み合わせている、操作された融合構築物を指す。

【００８３】

本発明はまた、本発明のセットのペプチド(例えば、配列番号1の配列のペプチド、配列番号2の配列のペプチド、又は本明細書で説明されているこれらのバリアント)をコードする核酸にも関する。例えば、配列番号1のペプチド、配列番号2のペプチド、又はこれらのバリアントをコードする任意の配列は、遺伝コードの縮退により生じる類似の配列と同様に、本発明に包含される。特定の態様では、本明細書で説明されているペプチドをコードする核酸は、配列番号3:TGCTTCCCGGGACAGGTGGCGGGCACAACTCGGGCTCAACCTTCTTGTGTTGAAGCTTCCATTGTGATTCAGAAATGGTGG、又は配列番号4:TGTCACATGAATCCGTGTTTGGAAGGAGAGGATTGTAAAGTGCTGCCAGATTACTCAGGTTGGTCCTGTAGCAGTGGCAATAAAGTCAAAACTACGAAGGTAACGCGGを含むか、からなるか、又はから本質的になる。

【００８４】

本発明者らは、本明細書において具体的に、互いに連結されていない(少なくとも2種の)ペプチドの発現を可能にする核酸のセットを説明しており、(第1の)核酸は、目的の(第1の)ペプチド(例えば、配列番号1のペプチド、又は配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチド)をコードする配列を含み、(第2の)核酸は、目的の(第2の)ペプチド(例えば、配列番号2のペプチド、又は配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチド)をコードする配列を含む。本発明者らはまた、本明細書において、好ましくは本明細書で説明されている許容される支持体、担体、賦形剤、又はビヒクルと共に、そのような核酸のセットを含む組成物も説明している。

【００８５】

配列番号1、配列番号2、又はこれらのバリアントのペプチドをコードする上述の核酸配列を、適切な宿主細胞中でのその発現を制御するための調節配列に隣接させ得る。

【００８６】

別の態様では、本発明はまた、発現カセットであって、5'から3'の順で、

- プロモーター、
- 本明細書で説明されている配列番号1、配列番号2、又はこれらのバリアント等の目的のペプチドをコードする核酸配列、及び
- 終結シグナル、例えば、ポリアデニル化シグナル

を含む発現カセットにも関する。

【００８７】

目的のペプチドをコードする上述の核酸配列、又は本明細書で開示されている発現カセットを、細胞中での転写及び/又は翻訳を最適化するベクターへのパッケージングに適した配列に隣接させ得る。

【００８８】

別の態様では、本発明はまた、本明細書で説明されているペプチド又はペプチドのセットの発現を許容するベクターにも関する。本発明はまた、互いに連結されていない(少なくとも2種の)ペプチドの発現を可能にする核酸のセット、又は本明細書で定義されている発現カセットのセットを含むベクターにも関する。

【００８９】

さらなる態様では、本発明は、互いに連結されていない(少なくとも2種のペプチドの)発現を可能にするベクターのセットに関し、(第1の)ベクターは、目的の(第1の)ペプチド(例えば、配列番号1のペプチド、又は配列番号1に対して少なくとも90％の同一性を有するペプチド)をコードする配列を含み、(第2の)ベクターは、目的の別の(第2の)ペプチド(例えば、配列番号2のペプチド、又は配列番号2に対して少なくとも90％の同一性を有するペプチド)をコードする配列を含む。本発明者らはまた、本明細書において、好ましくは、本明細書で説明されている許容される支持体、担体、賦形剤、又はビヒクルと共に、そのようなベクターのセットを含む組成物も説明している。

【００９０】

ペプチドを製造する方法

宿主細胞中での発現を可能にするために、本明細書で説明されているペプチド(又はそのバリアント)をコードする核酸は、ベクター中に存在し得、前記ベクターの適切な宿主細胞中への導入後、当技術分野で公知の標準的なクローニング技術及び発現技術に従って、この配列を発現させて、本明細書で説明されているコードされたペプチドを産生させ得る(例えば、Sambrook, J., Fritsh, E. F.,及びManiatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第2編., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989で説明されている)。様々な発現ベクターを利用して、本明細書で説明されているペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を発現させ得る。本発明で使用され得る発現ベクターとして、本明細書で説明されているペプチドの内のいずれかを宿主細胞中で産生するために、真核生物発現ベクター、具体的には哺乳動物発現ベクター、ウイルスベースの発現ベクター、バキュロウイルス発現ベクター、植物発現ベクター、及び任意のプラスミド発現ベクターが非網羅的に挙げられる。発現ベクターはまた、細菌系中でのペプチドの発現を可能にするベクターの可能性もある。単一の核酸がいくつかのペプチドをコードする場合には、又は単一のベクターがいくつかのペプチドの発現を可能にする場合には、結果として得られるペプチドは、互いに連結されていない。

【００９１】

発現ベクターの選択は、このベクターが発現され得る意図された宿主細胞により異なる。この選択は、当業者により容易に行われるであろう。本発明はまた、本明細書で説明されているペプチドをコードする核酸配列を含む細胞(具体的には宿主細胞)にも関する。本明細書で説明されているベクターを使用して改変されている(宿主)細胞も、本明細書において、本発明者らにより初めて開示されている。

【００９２】

互いに連結されていない、本明細書で説明されている(少なくとも2種の)ペプチド(又はこれらのバリアント)の発現を可能にする細胞本明細書で具体的に開示されている。こ

の細胞は、典型的には、目的のペプチド(例えば、配列番号1のペプチド、又は配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチド)をコードする(第1の)核酸配列又はベクターと、目的の(第2の/異なる)ペプチド(例えば、配列番号2のペプチド、又は配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチド)をコードする(第2の)核酸配列又はベクターとを含む。好ましくは、本明細書で説明されている許容される支持体、担体、賦形剤、又はビヒクルと共に、そのような細胞を含む組成物も開示されている。

【００９３】

互いに連結されていない、本明細書で説明されている(少なくとも2種の)ペプチド(又はこれらのバリアント)の発現を可能にする細胞のセット本明細書で具体的に開示されている。各細胞は、典型的には、目的のペプチド(例えば、配列番号1若しくは配列番号2のペプチド、又は配列番号1若しくは配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチド)をコードする核酸配列又はベクターを含む。好ましくは、本明細書で説明されている許容される支持体、担体、賦形剤、又はビヒクルと共に、そのような細胞を含む組成物も開示されている。

【００９４】

本発明のペプチド又はそのバリアントを、原核生物宿主細胞又は真核生物宿主細胞のいずれかで発現することが可能である。代表的な宿主細胞として、多くの大腸菌(E. coli)株、哺乳動物細胞株、例えば、CHO、CHO-K1、及びHEK293;昆虫細胞、例えば、Sf9細胞;並びに酵母細胞、例えば、S.セレビシエ(S. cerevisiae)及びP.パストリス(P. pastoris)が挙げられる。

【００９５】

本明細書で説明されている核酸又はベクターを、原核生物宿主細胞又は真核生物宿主細胞への外因性DNAの導入に一般的に使用される標準的技術(例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラン遺伝子導入等)により、宿主細胞に遺伝子導入し得る。或いは、本明細書で説明されている核酸又はベクターを、ウイルスベースのベクターを使用する形質導入により、宿主細胞中に送達し得る。

【００９６】

純度を、任意の適切な標準的方法により測定し得、例えば、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、又は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析により測定し得る。「単離」又は「合成」ペプチドはまた、ヒト対象への投与に関して安全な無菌性の程度も定義する(例えば、感染性物質又は毒性物質を欠いている)。

【００９７】

本明細書で説明されている組成物及び方法で使用されるペプチドをまた、固相合成技術によっても製造し得る。ペプチドの直接化学合成を、ネイティブ・ケミカル・ライゲーション(NCL)等の当業者に非常に公知の方法により達成し得る。この化学的アプローチは、N末端システインを有するペプチドがC末端チオエステルペプチドと反応する非保護ペプチド断片のカップリングからなる。このチオエステル交換反応の直後に分子内S,N-アシルシフトが起こり、これにより、ライゲーション部位で天然のアミド結合が形成される。

【００９８】

遺伝子治療

本明細書で説明されているペプチドをコードする核酸配列を適切なベクターにクローニングすることにより、本発明者らはまた、本明細書において、疼痛(具体的には、急性疼痛、亜急性疼痛、又は慢性疼痛、好ましくは慢性疼痛)の遺伝子治療用の新規の遺伝子送達ツール(具体的には、例えば発現カセット又はベクター等の遺伝子構築物)も提供する。遺伝子治療を利用して、対象の特定の細胞によるTAFA-4-ペプチド又はそのバリアントの内因性産生も可能にし得る。遺伝子治療を、インビボ又はエクスビボのいずれかで行い得る。エクスビボ遺伝子治療は、少なくとも対象の細胞のサンプルの単離及び精製、本明細書で説明されているペプチドのセットをコードする少なくとも1種の核酸配列(即ち、導入遺伝子)の単離細胞への導入、並びに遺伝子変更された/改変された細胞の対象への

再導入を必要とする。対照的に、インビボ遺伝子治療では、導入遺伝子は、典型的には、対象への投与用にパッケージ化されている。遺伝子送達構築物は、非ウイルス性又はウイルス性のいずれかであり得る。好ましくは、本明細書で説明されている遺伝子構築物は、標的組織/細胞中において導入遺伝子/コード配列(即ち、目的のセットのペプチド又はそのバリアントをコードする核酸配列)を発現するために使用され得るウイルス要素、ウイルスベクター、及び/又は任意のウイルスパッケージングシステムにより調製されている。ウイルスベクターは、任意の適切なプロモーター、及び標的組織/細胞中での導入遺伝子産物の発現を可能にするか又は容易にする他の転写調節因子を組み込み得る。ウイルスパッケージングシステムは、好ましくは、標的細胞に適合されている。標的細胞に入ると、そのようなシステムは、標的組織への送達を容易にする。本明細書で説明されている方法で使用可能なウイルスベクターは、好ましくは、例えばアデノウイルスベクター又はアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター等の複製欠損性ウイルスである。

【００９９】

いくつかの態様では、本発明は、組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)であって、そのゲノム中に、目的のセットの少なくとも1種のペプチド(好ましくは、少なくとも2種のペプチド、例えば、配列番号1のペプチド、及び/若しくは配列番号2のペプチド)又はそのバリアントをコードする核酸配列を含む組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)に関する。この核酸のコード部分は、典型的には、プロモーターに作動可能に連結されている。

【０１００】

現在までに、表面特性が様々なAAVの少なくとも数十種の異なる血清型が、ヒト又は非ヒト霊長類(NHP)から単離されてキャラクタライズされている。「血清型」という用語は、血清学的に異なるカプシドを有するAAVを当業者が区別することを可能にする。血清学的な特徴は、他のAAV血清型と比較した、あるAAV血清型に対する抗体間の交差反応性の欠如に基づいて決定される。本明細書で説明されているrAAV(rAAVベクター又はrAAV粒子とも呼ばれる)は、下記の既知の血清型の内のいずれか1つを有し得、即ち、例えば下記から選択され得る: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、及びAAVhu68。rAAVベクターは、特定の細胞、組織、又は臓器に対する指向性が強化され得る。経口投与に関連して、rAAVベクターは、胃、小腸、又は結腸組織に対する指向性が強化され得、より具体的には、これらの組織を構成する細胞、具体的には、上皮細胞、例えば、腸細胞、杯細胞、腸内分泌細胞、パネート細胞、又はタフト細胞に対する指向性が強化され得る。腸内に位置する標的細胞、又は腸に送達される標的細胞の場合には、AAV4、AAV7、AAV8、AAV9、又はAAV10の内のいずれかを、特に効果的として選択し得る。

【０１０１】

本発明の遺伝子治療用ベクター又はカセットを、当業者に公知であり且つ例えば国際公開第03042397号及び米国特許第6,632,670号で既に説明されている方法により製造し得る。

【０１０２】

本明細書はまた、組換えベクター(例えば、AAV等のウイルスベクター)を製造する方法であって、

a)本明細書で説明されている組換えベクターで遺伝子導入されている/形質導入されている細胞を培養する工程;及び

b)遺伝子導入されている/形質導入されている細胞の上清から組換えベクターを回収する工程

を含む方法にも関する。

【０１０３】

本発明の遺伝子治療用ベクターを、２９３又は２９３Ｔヒト胚腎細胞株への２又は３種のプラスミドの遺伝子導入により製造し得る。特定の態様では、治療用ペプチドをコードするＤＮＡは、１つのプラスミドで提供されており、１種又は複数種の血清型のＡＡＶに由来するカプシドタンパク質及び複製遺伝子、並びに例えばアデノウイルスに由来するヘルパー機能は全て、第２のプラスミドによりトランスで提供される。別の特定の態様では、配列番号１及び配列番号２のペプチド又はこれらのバリアントをコードするＤＮＡは、１つのプラスミドで提供され、１種又は複数種の血清型のＡＡＶに由来するカプシドタンパク質及び複製遺伝子は、第２のプラスミドによりトランスで提供され、例えばアデノウイルスに由来するヘルパー機能は、第３のプラスミドで提供される。特定の態様では、第１のプラスミドは、２つの隣接する逆位末端配列(ＩＴＲ)等のプロモーターに作動可能に連結されている、本明細書で説明されている配列番号１のペプチド及び配列番号２のペプチド又はこれらのバリアントをコードする核酸配列を含む発現カセットを含む。別の特定の態様では、治療用ペプチドのそれぞれをコードするＤＮＡは、下記の２種の異なるプラスミドにより提供される:配列番号１のペプチド又はそのバリアントをコードする核酸配列を含む第１のプラスミド、及び配列番号２のペプチド又はそのバリアントをコードする核酸配列を含む第２のプラスミド。

【０１０４】

細胞培養後、遺伝子治療用ベクターを、例えば、凍結融解サイクルにより細胞から放出させて、当業者に公知の任意の方法により精製し得、例えば、イオジキサノール段階勾配及びその後のHi-Trap QHPカラムでのイオン交換クロマトグラフィーを使用することにより精製し得る。次いで、得られた遺伝子治療用ベクターをスピンカラムで濃縮し得、精製されたベクターを、例えばリン酸緩衝生理食塩水中で凍結保存(-６０℃以下)し得る。

【０１０５】

本発明の関連する態様として、本明細書で説明されている少なくとも１種の組換えベクターで遺伝子導入されているか若しくは形質導入されている(例えば、少なくとも１種のＡＡＶベクターで形質導入されている)宿主細胞;又は本明細書で定義されている治療用ペプチド又はそのバリアントをコードするＤＮＡを含むベクター若しくはベクターのセットで遺伝子導入されている細胞のセットが挙げられる。本発明の更に関連する態様として、本明細書で説明されている組換えベクター(例えば、ＡＡＶ)のゲノムを含むか又はから(本質的に)なる任意の核酸分子が挙げられる。

【０１０６】

組成物

本明細書で説明されている互いに連結されていない(少なくとも２種の)ペプチドのセット、又は前記(少なくとも２種の)ペプチドの発現を可能にする、本明細書で説明されている生成物(例えば、核酸、細胞、核酸のセット、若しくは細胞のセット)を含む、本明細書で説明されている組成物は、医薬組成物、治療用組成物、予防用組成物、又は獣医用組成物であり得る。この組成物はまた、(場合によっては同時に)栄養学的/食事用組成物でもあり得る。

【０１０７】

本明細書で説明されている特定の組成物は、配列番号１の配列のペプチド又はその(典型的には機能的)バリアント(即ち、配列番号１に対して少なくとも９０％の同一性を有するペプチド)と、配列番号２の配列のペプチド又はその(典型的には機能的)バリアント(即ち、配列番号２に対して少なくとも９０％の同一性を有するペプチド)とを含み、前記(少なくとも２種の)ペプチドは、互いに連結されていない。

【０１０８】

本明細書で説明されている２種以上のペプチドのセットは、これらのペプチドを別々に又は同時に組み合わせて使用するのに有利に製剤化されている。そのため、このセットの各ペプチドは、別個の形態で調製され得るか、又はこのセットの少なくとも２種のペプチ

ドの混合物を含む組成物の形態で調製され得る。この組成物は、食事療法用/栄養学的組成物、及び/又は医薬組成物であり得、且つ本明細書で説明されている治療方法又は予防方法で使用され得る。

【０１０９】

特定の態様では、本発明は、本明細書で説明されている、互いに連結されていない少なくとも2種のペプチド若しくはこれらのバリアント、典型的には、互いに連結されていない(少なくとも2種の)ペプチドのセット、互いに連結されていない(少なくとも2種の)ペプチドをコードする核酸若しくは核酸のセット、互いに連結されていない(少なくとも2種の)ペプチドの発現を可能にする発現カセット若しくは発現カセットのセット、互いに連結されていない(少なくとも2種の)ペプチドの発現を可能にするベクター若しくはベクターのセット、又は互いに連結されていない(少なくとも2種の)ペプチドの発現を可能にする細胞若しくは細胞のセットと、好ましくは、本明細書で説明されている許容される支持体、担体、賦形剤、又はビヒクル、具体的には、食事的に及び/又は薬学的に許容される支持体、担体、賦形剤、又はビヒクルとを含む組成物に関する。

【０１１０】

「食事的に許容される支持体」という用語は、本明細書で説明されているペプチド若しくはペプチドのセット、核酸配列若しくは核酸配列のセット、発現カセット若しくは発現カセットのセット、ベクター若しくはベクターのセット、又は細胞若しくは細胞のセットを含む組成物を、リスクを伴うことなく、対象が摂取するか又は消化することを許容し、且つ疼痛の性質及び局在に応じて、前記ペプチドが適切な部位に適切な時間で治療作用を発揮する前に、このペプチドを変化させる可能性があるあらゆる攻撃(具体的には、食物消化に関するあらゆる攻撃)からこのペプチドを保護することが可能な担体に関する。

【０１１１】

組成物が2種のペプチドを含む特定の態様では、第1及び第2のペプチドは、等しい割合か又は異なる割合で、本発明の組成物中に存在し得る。特定の組成物では、第1及び第2のペプチドは、等しい(等モルの)割合で組成物中に存在し、即ち、各ペプチドは、この組成物のペプチド成分の50%を占めており、このことは、この組成物が、2種のペプチドのそれぞれを同じモル数で含むことを意味する。

【０１１２】

別の特定のペプチド組成物は、別のペプチド又は他のペプチドと比較して特定のペプチドを高い割合で含み得る。例えば、特定のペプチドは、組成物のペプチド成分の少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%を占め得る。

【０１１３】

経口投与に関連して、この組成物は、対象の胃のpHを少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、より好ましくは少なくとも5又は6に上昇させるのに有効な量で存在している少なくとも1種の胃腸保護剤(好ましくは、酸阻害剤)を更に含み得る。「酸阻害剤」という用語は、胃酸の分泌を阻害して胃のpHを上昇させる薬剤を指す。酸阻害剤として下記が挙げられ得るが、これらに限定されない:H_2ブロッカー、例えば、シメチジン、ラニチジン、エブロチジン、パブチジン、ラフチジン、ロクスチジン、ファモチジン;プロトンポンプ阻害剤、例えば、オメプラゾール、エソメプラゾール、パントプラゾール、ランソプラゾール、デクスランソプラゾール、ラベプラゾール、パリプラゾール、レミノプラゾール、及びテナトプラゾール;又はこれらの任意の組み合わせ。

【０１１４】

「薬学的に許容される支持体/ビヒクル/担体」は、活性剤(即ち、本発明の少なくとも2種のペプチド又はこれらのバリアント、及び任意選択で任意の追加の異なる活性剤)と共に投与される希釈剤、アジュバント、又は賦形剤であり得る。そのような医薬担体は、

水又は油等の無菌液体であり得、石油、動物、植物、又は合成起源のものが挙げられ、例えば、ラッカセイ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油、及び同類のものが挙げられる。水は、医薬組成物が静脈内投与される場合に好ましい担体である。生理食塩水、並びに水性デキストロース溶液及びグリセロール溶液もまた、特に注射溶液用の液体担体として利用され得る。好適な医薬賦形剤として、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノール、及び同類のものが挙げられる。

【０１１５】

薬学的に許容される支持体/ビヒクル/担体は、アスコルビン酸及び/又はアスコルビン酸塩からなり得るか、又は含み得る。アスコルビン酸塩の例は、アスコルビン酸マグネシウム、アスコルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸カルシウム、及びパルミチン酸アスコルビルである。

【０１１６】

一実施形態では、本発明の組成物は、アスコルビン酸又はアスコルビン酸塩を含む。

【０１１７】

組成物(例えば、医薬組成物)が経口投与に適している場合には、錠剤又はカプセル剤を、薬学的に許容される賦形剤により従来の手段で調製し得、この賦形剤として下記が挙げられる:結合剤(例えば、プレゼラチン化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、若しくはヒドロキシプロピルメチルセルロース);充填剤(例えば、ラクトース、微結晶セルロース、若しくはリン酸水素カルシウム);潤滑剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、若しくはシリカ)、崩壊剤(例えば、ジャガイモデンプン若しくはデンプングリコール酸ナトリウム);又は湿潤剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム)。錠剤を、当技術分野で公知の任意の方法によりコーティングし得る。経口投与用の液体製剤は、例えば、溶液、シロップ、若しくは懸濁液の形態を取り得るか、又は使用前に水若しくは別の適切なビヒクルで復元するための乾燥製品として提示され得る。そのような液体製剤を、薬学的に許容される添加剤により従来の手段で調製し得、この添加剤として下記が挙げられる:懸濁化剤(例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体、又は水素添加食用脂);乳化剤(例えば、レシチン又はアカシア);非水性ビヒクル(例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコール、又は分留植物油);及び防腐剤(例えば、メチル又はプロピル-p-ヒドロキシベンゾエート又はソルビン酸)。この製剤はまた、必要に応じて、緩衝塩、香料、着色料、及び甘味料も含み得る。

【０１１８】

本発明の組成物(例えば、医薬組成物、予防用組成物、又は治療用組成物)は、少なくとも1種の追加の(異なる)活性化合物を更に含み得る。好ましくは、この追加の活性化合物は、疼痛に対して有効な活性剤である。「疼痛に対して有効」とは、鎮痛(antalgic)特性又は鎮痛(analgesic)特性(対象により測定可能に感じる)を有する活性剤を意味する。より好ましくは、この追加の活性化合物は、ステロイド系抗炎症薬(SAID)、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、又はオピオイド系薬物である。

【０１１９】

SAIDとして下記が挙げられ得るが、これらに限定されない:ヒドロコルチゾン、コルチゾン、エタメタゾネブ(ethamethasoneb)、プレドニゾン、プレドニゾロン、トリアムシノロン、デキサメタゾン、フルドロコルチゾン、又はこれらの任意の組み合わせ。

【０１２０】

NSAIDとして下記が挙げられ得るが、これらに限定されない:セレコキシブ、ロフェコキシブ、ルミラコキシブ、バルデコキシブ、パレコキシブ、エトリコキシブ、CS-502、JTE-522、L-745,337、NS398、アスピリン、アセトアミノフェン(本開示の目的のためにNSAIDとみなされる)、イブプロフェン、フルルビプロフェン、ケトプロフェン、ナプロキセン、オキサプロジン、エトドラク、インドメタシン、ケトロラク、ロルノキシカム、メロキシカム、ピロキシカム、ドロキシカム、テノキシカム、ナブメトン、ジクロ

フェナク、メクロフェナメート、メフェナム酸、ジフルニサル、スリンダク、トルメチン、フェノプロフェン、スプロフェン、ベノキサプロフェン、アセクロフェナク、トルフェナム酸、オキシフェンブタゾン、アザプロパゾン、フェニルブタゾン、又はこれらの任意の組み合わせ。

【０１２１】

オピオイド系薬物として下記が挙げられ得るが、これらに限定されない:(デキストロ)プロポキシフェン、A-メチルフェンタニル、アルフェンタニル、アリルプロジン、ベジトラミド、ブプレノルフィン、ブトルファノール、カルフェンタニル、デスメチルプロジン、デキストロモラミド、デゾシン、ジアセチルモルヒネ、ジヒドロコデイノン、ジヒドロエトルフィン、ジモルホン、ジフェノキシレート、ジピパノン、エトルフィン、フェンタニル、ケトベミドン、レフェタミン、レバセチルメタドール、レボメトルファン、レボルファノール、ロペラミド、メペリジン、メプタジノール、メタドン、メチルモルヒネ、モルヒネ、ナルブフィン、ニコモルヒネ、オーメフェンタニル、オリパビン、オキシコドン、オキシモルホン、PEPAP、パラモルヒネ、ペンタゾシン、フェナゾシン、ピリトラミド、プロジン、レミフェンタニル、スフェンタニル、タペンタドール、チリジン、トラマドール、又はオピオイド系アンタゴニスト、例えば、ナルメフェン、ナロキソン、ナルトレキソン、又はこれらの任意の組み合わせ。

【０１２２】

治療的使用及び予防的使用

本明細書では、活性の予防的成分又は治療的成分としての使用のための、好ましくは、医薬組成物、薬物、又は医薬としての使用のための、上記で説明されているペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、及びこれらのセット、又はこれらの任意の組み合わせ、並びにそのようなペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、及び/又はこれらのセットを含む組成物が開示されている。

【０１２３】

特定の態様では、本明細書で説明されているペプチド、具体的には、配列番号1の単離ペプチド若しくは合成ペプチド、及び/又は配列番号2の単離ペプチド若しくは合成ペプチド、好ましくは、前記ペプチドのセット、そのようなペプチドの発現を可能にする任意のセット、又はそのようなペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、及び/若しくはセットを含む任意の組成物は、医薬組成物、薬物、又は医薬として使用するためのものであり、具体的には、疼痛を予防するか又は処置することを目的として使用するためのものである。

【０１２４】

別の態様では、本明細書は、それを必要とする対象の疼痛を予防するか処置するための活性の成分/薬剤としての使用のための、本明細書で説明されているペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、若しくは細胞、及び/又は本明細書で説明されているセットに関する。

【０１２５】

本明細書は、具体的には、それを必要とする対象の疼痛を予防するか又は処置するための[活性成分としての]使用のための、本明細書で開示されている製品、又は本明細書で開示されている製品のいずれかのセット、例えば、本明細書で説明されている細胞のセットに関し、典型的には、ペプチドのセット、又はそのようなペプチドのセットを含むか若しくは発現する細胞に関する。

【０１２６】

特定の態様では、本発明者らは、本明細書において、それを必要とする対象の疼痛の予防及び処置のための医薬組成物、薬物、又は医薬の製造のための、本明細書で説明されている本発明のいずれかの製品の使用を説明しており、例えば、本明細書で説明されているペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、及びこれらの対応するセット、又は本明細書で説明されているこれらの任意の組み合わせの使用を説明している。本発明者らはまた、本明細書において、疼痛を予防するか又は処置するための対応する方法であって、

典型的には、それを必要とする対象に、本明細書で説明されている前記ペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、セット、及び/又は組成物を投与する工程を含む方法も説明している。

【０１２７】

本明細書では、具体的には、それを必要とする対象の疼痛を予防するか又は処置する方法であって、製品(例えば、具外的には、本明細書で説明されているペプチドのセット及び/又は組成物、好ましくは、配列番号1のペプチド又は配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するそのバリアント、及び配列番号2のペプチド又は配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するそのバリアントを含むペプチドのセット、又はそのようなセットを含む組成物)の(治療上)有効な量を投与する工程を含む方法が提供される。

【０１２８】

特定の態様では、本発明者らは、本明細書において、疼痛(具体的には、急性疼痛、亜急性疼痛、又は慢性疼痛、好ましくは、慢性疼痛)を予防するか又は処置するための、本明細書で説明されている本発明のいずれかの製品の使用を説明しており、例えば、本明細書で説明されているペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、及びこれらの対応するセット、又は本明細書で説明されているこれらの任意の組み合わせ若しくは組成物の使用を説明している。

【０１２９】

好ましくは、この疼痛は、神経障害性疼痛(例えば、化学療法誘発性の末梢神経障害性疼痛、若しくは化学療法誘発性の神経障害性疼痛)、術後疼痛、炎症性疼痛、痛覚過敏、又はアロディニアである。

【０１３０】

特定の態様では、本発明者らは、本明細書において、神経障害性疼痛(例えば、化学療法誘発性の末梢神経障害性疼痛、若しくは化学療法誘発性の神経障害性疼痛)、術後疼痛、又は炎症性疼痛を予防するか又は処置するための、本明細書で説明されている本発明のいずれかの製品の使用を説明しており、例えば、本明細書で説明されているペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、及び/又はこれらの本明細書で説明されているセット、又は本明細書で説明されているこれらの任意の組み合わせ若しくは組成物の使用を説明している。

【０１３１】

特定の態様では、本発明者らは、本明細書において、慢性の神経障害性疼痛(例えば、慢性の化学療法誘発性の末梢神経障害性疼痛、若しくは慢性の化学療法誘発性の神経障害性疼痛)、慢性術後疼痛、又は慢性炎症性疼痛を予防するか又は処置するための、本明細書で説明されている本発明のいずれかの製品の使用を説明しており、例えば、本明細書で説明されているペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、及び本明細書で説明されているこれらの対応するセット、又は本明細書で説明されているこれらの任意の組成物の使用を説明している。

【０１３２】

より特定の態様では、本発明者らは、本明細書において、変形性関節炎疼痛を予防するか又は処置するための、本明細書で説明されている本発明のいずれかの製品の使用を説明しており、例えば、本明細書で説明されているペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、及びこれらの対応するセット、又は本明細書で説明されているこれらの任意の組成物の使用を説明している。

【０１３３】

特定の態様では、本発明者らは、本明細書において、痛覚過敏、具体的には、熱性痛覚過敏(例えば、熱的痛覚過敏若しくは冷的痛覚過敏、好ましくは、冷的痛覚過敏)又は機械的痛覚過敏、好ましくは、機械的痛覚過敏、更により好ましくは、損傷誘発性の痛覚過敏を予防するか又は処置するための、本明細書で説明されている本発明のいずれかの製品の使用を説明しており、例えば、本明細書で説明されているペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、及びこれらの対応するセット、又は本明細書で説明されているこれら

の任意の組成物の使用を説明している。

【０１３４】

別の特定の態様では、本発明者らは、本明細書において、アロディニア(具体的には、機械的アロディニア)を予防するか又は処置するための、本明細書で説明されている本発明のいずれかの製品の使用を説明しており、例えば、本明細書で説明されているペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、及びこれらの対応するセット、又は本明細書で説明されているこれらの任意の組成物の使用を説明している。好ましくは、この機械的アロディニアは、神経損傷誘発性の機械的アロディニア、又は静的タイプの機械的アロディニア(mechanical allodynia of the static type)である。

【０１３５】

更に特定の態様では、本発明者らは、本明細書において、アロディニア、具体的には、熱性アロディニア、例えば、熱的アロディニア(即ち、通常は痛みを伴わない温刺激に対して知覚される疼痛)、又は冷的アロディニア(即ち、通常は痛みを伴わない冷刺激に対して知覚される疼痛)、好ましくは、冷的アロディニアを予防するか又は処置するための、本明細書で説明されている本発明のいずれかの製品の使用を説明しており、例えば、本明細書で説明されているペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、及びこれらの対応するセット、又は本明細書で説明されているこれらの任意の組成物の使用を説明している。

【０１３６】

特定の態様では、本発明者らは、本明細書において、それを必要とする対象の機械的過敏症(機械的刺激に対する過敏症、又は単に痛覚過敏とも称される)、好ましくは、損傷誘発性の機械的過敏症を予防するか又は処置するための、本明細書で説明されている本発明のいずれかの製品の使用を説明しており、例えば、本明細書で説明されているペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、及びこれらの対応するセット、又は本明細書で説明されているこれらの任意の組成物の使用を説明している。

【０１３７】

特定の態様では、本発明者らは、本明細書において、日焼けによる疼痛、又は氷焼けによる疼痛を予防するか又は処置するための、本明細書で説明されている本発明のいずれかの製品の使用を説明しており、例えば、本明細書で説明されているペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、及びこれらの対応するセット、又は本明細書で説明されているこれらの任意の組成物の使用を説明している。

【０１３８】

処置により、触覚、灼熱感又は冷感、「チクチクする感じ」、しびれ、痒み、激痛、及び温度を正確に感知することの困難さの内の1つ又は複数の感覚が改善され得る。特定の態様では、この処置により、疼痛が解消される。別の特定の態様では、この処置により、疼痛の症状が軽減され、具体的には、神経障害性疼痛(アロディニア及び/又は痛覚過敏)の症状が軽減される。本発明の方法により、たとえ神経障害性疼痛が解消されなくても、神経障害性疼痛がより管理しやすくなる(即ち、生活の質が改善される)。

【０１３９】

当業者に公知の標準的な試験は、本発明の特定のペプチドを使用して疼痛(具体的には、(慢性)神経障害性疼痛)が処置されているかどうかを評価するために、当技術分野で利用可能である。例えば、対象の疼痛感受性の評価は、定量的感覚検査(針刺し、圧痛計、フォン・フライ繊維、触覚、つまむこと、又は指による軽い圧力)を使用するか又は疼痛評価尺度を使用して標準化されている。

【０１４０】

対象

本発明に関連して、対象又は患者は、動物であり、好ましくは哺乳動物である。特定の態様では、対象は、家畜であり、例えば、ウマ、イヌ、ネコ、ウシ等である。別の特定の好ましい態様では、対象は、ヒトである。

【０１４１】

神経障害性疼痛に起因する慢性疼痛を有する対象は、そのような神経障害性疼痛と典型的に関連している疾患(例えば、線維筋痛症、複合性局所疼痛症候群、帯状疱疹後神経痛、エーラス・ダンロス症候群、及び肢端紅痛症)に罹患している場合がある。

【０１４２】

特定の態様では、対象は、線維筋痛症(ＦＭ)を患っている。線維筋痛症は、慢性の筋骨格痛を特徴とする症候群である(Siracusa他, ２０２１)。ＦＭは、求心性痛覚刺激の知覚、伝達、及び処理に関与する神経回路の機能不全を特徴とする中枢性感作現象により引き起こされ、運動系のレベルで疼痛が広く現れている。この疾患の主な症状は、筋硬直、関節硬直、不眠症、疲労、気分障害、認知機能障害、不安、うつ病、全身の過敏症、及び正常な日常の活動を行うことができないことである。ＦＭはまた、感染、糖尿病、リウマチ性疾患、及び/又は精神障害若しくは神経障害等の特定の疾患と関連している可能性もある。

【０１４３】

特定の態様では、本発明者らは、本明細書において、線維筋痛症(ＦＭ)を予防するか又は処置するための、本明細書で説明されているペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、及びこれらの対応するセット(即ち、そのようなペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、若しくは細胞のセット)、又は本明細書で説明されているそのようなペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、若しくはセットを含む組成物の使用を説明している。

【０１４４】

別の態様では、対象は、複合性局所疼痛症候群(ＣＲＰＳ)に罹患している。複合性局所疼痛症候群は、四肢に影響を及ぼす慢性の神経学的状態であり、感覚障害、自律神経障害、運動障害、及び栄養障害を伴う重度の疼痛を特徴とする(Goh et al., ２０１７)。この状態は、手術、外傷、又は軽度の損傷により誘発される場合があり、軽度で自己限定性であるものから、日常生活の活動及び健康関連の生活の質を損なう慢性疾患まで経過が様々である。ＣＲＰＳは、下記の2つの型に分類され得る:識別可能な神経損傷の有無を特徴とするＣＲＰＳ Ｉ型及びII型。ＣＲＰＳ Ｉ型は、通常は起因有害事象の後に発症しており、単一の末梢神経の分布に限定されず、且つ誘発事象に対して不釣り合いな症候群である。これは、浮腫、皮膚血流の変化、疼痛領域における異常な発汗活動、アロディニア、及び痛覚過敏を伴い、通常は患肢の遠位部に影響を及ぼすか、又は遠位から近位への勾配を伴う。ＣＲＰＳ II型は、肢の領域であって、この領域に分布している神経又はその主要な枝の部分的な損傷後の肢の領域に発生する灼熱痛、アロディニア、及び痛覚過敏と定義され得る。

【０１４５】

特定の態様では、本発明者らは、本明細書において、複合性局所疼痛症候群(ＣＲＰＳ)を予防するか又は処置するための、本明細書で説明されているペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、及びこれらの対応するセット(即ち、そのようなペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、若しくは細胞のセット)、又は本明細書で説明されているそのようなペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、若しくはセットを含む組成物の使用を説明している。

【０１４６】

更に別の態様では、対象は、帯状疱疹後神経痛(ＰＨＮ)を患っている。帯状疱疹後神経痛は、感覚神経節中で休眠中の水痘帯状疱疹ウイルスの再活性化により引き起こされる感染症である帯状疱疹(ＨＺ)の最も一般的な合併症である(Ngo他, ２０２０)。ＰＨＮは、局所性の水疱性発疹と、関連する皮膚分節に沿った疼痛とを特徴とする。ＰＨＮは、ＨＺ発疹の初期症状の発現後少なくとも90日にわたり持続する疼痛と定義され、影響を受けた患者の生活の質を著しく低下させる。ＰＨＮは、刺激性侵害受容器と、求心路遮断モデルとに再分類される。ＶＺＶの再活性化中に、ウイルスが複製され、脊髄後根神経節からそれぞれの末梢へと広がる。この伝播により免疫反応及び炎症が誘発され、これにより末梢神経が損傷する。この損傷により、ニューロンの疼痛阻害が低下し、疼痛シグナルの脱分極の閾値が低下する。この結果、末梢感作と呼ばれるプロセスである、非疼痛刺激に対する痛

覚が生じる。サブタイプC侵害受容器の反復活性化により、後角における興奮状態の増大も引き起こされる。HZによる直接的なウイルス損傷により、下行性抑制性疼痛経路が弱まり、後角の2次ニューロンの慢性的活性化が引き起こされる。更に、PHNを患っているHZ患者では、PHNを患っていないHZ患者と比較した場合に、後角における阻害性ガンマアミノ酪酸(GABA)産生介在ニューロンの喪失が報告されている。これらの要因は、中枢感作と呼ばれるプロセスで求心性入力からの全ての後続の反応を増幅する。PHNでは、このプロセスは、通常は無害な触覚刺激を中枢神経系に伝達する低閾値機械受容性求心性線維(Aβ線維と呼ばれる)の解剖学的再編成を伴う。ウイルス感染による損傷が末梢のC侵害受容器の喪失につながる場合には、この繊維は、元々のC侵害受容器求心性繊維に配線されていた二次ニューロンと補償的に接続する。このプロセスは、求心路遮断と呼ばれており、アロディニアに罹患している患者は、感覚機能の重度の喪失を示す。

【０１４７】

特定の態様では、本発明者らは、本明細書において、帯状疱疹後神経痛(PHN)を予防するか又は処置するための、本明細書で説明されているペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、及びこれらの対応するセット(即ち、そのようなペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、若しくは細胞のセット)、又は本明細書で説明されているそのようなペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、若しくはセットを含む組成物の使用を説明している。

【０１４８】

更に別の態様では、対象は、肢端紅痛症(EM)に罹患している。肢端紅痛症は、主に両下肢に左右対称又は片側で発症するか又はまれに発生する突発性肢端症候群であり、紅斑、熱感、及び灼熱痛という典型的な三徴候を伴う(Maria Bibiana Leroux, 2018)。EMは、慢性疼痛症候群に分類される。原発性EMは、#133020としてOMIN(Online Mendelian Inheritance in Man)によりコードされている常染色体優性遺伝病である。EMは、主に後根神経節及び交感神経節ニューロンで発現されるナトリウムチャネルタイプ9(SCN9A)のαサブユニットタンパク質の改変(Nav1.7チャネルに影響を及ぼす)に関連している。二次性EMは、骨髄増殖性疾患、腫瘍随伴症、自己免疫疾患、毒素との接触、及び感染と関連している。

【０１４９】

特定の態様では、本発明者らは、本明細書において、肢端紅痛症(EM)を予防するか又は処置するための、本明細書で説明されているペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、及びこれらの対応するセット(即ち、そのようなペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、若しくは細胞のセット)、又は本明細書で説明されているそのようなペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、若しくはセットを含む組成物の使用を説明している。

【０１５０】

特定の態様では、本発明者らは、本明細書において、侵害受容器又は介在ニューロンにより伝達されるシグナルが損なわれている任意の疼痛関連状態を予防するか又は処置するための、本明細書で説明されているペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、及びこれらの対応するセット(即ち、そのようなペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、若しくは細胞のセット)、又は本明細書で説明されているそのようなペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、若しくはセットを含む組成物の使用を説明している。

【０１５１】

本発明者らは、機能的Myo1aを発現する$Myo1a^{+/+}$参照対象で観察されている発現と比較した場合に、対象におけるミオシンIA(Myo1a)の発現の欠如、低下したか若しくは不十分な発現、又は非機能的発現が、対象に、損傷誘発性慢性機械的疼痛、及び/又は炎症誘発性慢性熱痛を発症させやすくすることを既に確立した(国際公開第2017153424号)。

【０１５２】

更に別の態様では、対象は、myo1A遺伝子において1つ又は2つの変異対立遺伝子を有

する対象である。「変異」対立遺伝子は、Myo1aの発現又は発現レベルを変更する、myo1A遺伝子の核酸(コード領域又は非コード領域)における置換、欠失、又は挿入を意味する。変異は、1つ又は複数の核酸塩基に影響を及ぼし得る。置換は、一塩基多型(SNP)であり得る。

【０１５３】

特定の態様では、本発明者らは、本明細書において、そのような対象における、損傷誘発性の慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性の慢性熱痛を予防するか又は処置するための、本明細書で説明されているペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、及びこれらの対応するセット(即ち、そのようなペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、若しくは細胞のセット)、又は本明細書で説明されているそのようなペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、若しくはセットを含む組成物の使用を説明している。

【０１５４】

用量

本発明に係る製品(具体的には、ペプチド、ペプチドのセット、又はそのようなセットを含むか若しくはその発現を可能にする組成物)を、好ましくは、治療上有効な量で対象に直接投与する。「治療上有効な量」という用語は、対象の疼痛を処置するか、軽快させるか、又は予防するのに必要な、目的のペプチド(具体的には、配列番号1及び配列番号2のペプチド、又はこれらの機能的バリアント)の量を指す。治療上有効な量を、最初に、細胞培養アッセイ又は動物モデルで推定し得る。動物モデルを使用して、ペプチド(のセット)の適切な濃度範囲及び投与経路も決定し得る。次いで、そのような情報を使用して、ヒトでの有用な用量及び投与経路を決定し得る。

【０１５５】

本明細書で説明されている方法で使用されるペプチドの投与量は、対象の全身の健康状態、年齢、性別、及び体重、疼痛の性質及び重症度/強度、投与の時間、頻度、及び持続期間、使用される特定のペプチド、薬物の組み合わせ、反応感度、並びに治療に対する耐性/反応に応じて異なり得る。この適切で有効な投与量は、日常的な実験により決定され得、且つ臨床医の判断に委ねられている。

【０１５６】

用量を、ボーラス形態で投与し得るか、又はいくつかの部分(/単位)に分割し得、これらを、1日を通して別々に投与する。換言すると、処置は、単回用量スケジュール又は複数回用量スケジュールであり得る。有効な用量を、数日、数週間、数か月、又は数年にわたり投与し得る。

【０１５７】

適切な鎮痛(antalgic)効果又は鎮痛(analgesic)効果を得るために、本発明者らにより本明細書で説明されているペプチドのセット中に存在しているか又はそのようなペプチドのセットを含む組成物中に存在しているペプチド又はそのバリアントの有効な総用量(典型的には、配列番号1のペプチド及び配列番号2のペプチドの両方の有効な総用量)は、単位用量当たり1μg～10gであり、好ましくは1μg～100mgであり、より好ましくは25μg～10mgであり、更により好ましくは2mg～10mgである。

【０１５８】

本発明の特定の態様では、ペプチドのセット、又はそのようなペプチドのセットを含む組成物を、哺乳動物の場合には、24時間当たり体重1kg当たり1μg(即ち、1μg/kg/日)～100mg/kg/日の用量で投与し、好ましくは2.5μg/kg/日～0.6mg/kg/日の用量で投与する。

【０１５９】

対象がヒトである場合には、対象に投与される、本発明者らにより本明細書で説明されているペプチド又はそのバリアントの有効な用量は、対象がヒト対象である場合には好ましくは2.5μg/kg/日～0.6mg/kg/日であり、好ましくは5μg又は10μg/kg/日～0.5mg/kg/日であり、より好ましくは50μg又は75μg/kg/日～0.3mg/kg/日である。

【０１６０】

本発明の特定の態様では、ペプチドのセット、又はそのようなペプチドのセットを含む組成物を、配列番号1のペプチド及び配列番号2のペプチドが等モル濃度である用量で投与する。

【０１６１】

本発明のより特定の態様では、ペプチドのセット、又はそのようなペプチドのセットを含む組成物を、50μg/kg～150μg/kgの配列番号1のペプチドと、100μg/kg～250μg/kgの配列番号2のペプチドとを含む用量で投与する。

【０１６２】

本明細書で説明されている製品(具体的には、本明細書で説明されているペプチド又は組成物)の、それを必要とする対象への送達を、任意の経路により達成し得る。

【０１６３】

本明細書で説明されている製品を、例えば、筋肉内、静脈内、腹腔内、経口(orally)(経口(per os))、肛門、皮膚、皮下、局所、経皮(dermically)、経皮(transdermically)、又は髄腔内に投与し得る。好ましくは、本明細書で説明されている製品を、皮下、経口、又は静脈内に投与し、更により好ましくは、皮下又は経口で投与する。

【０１６４】

実験パートで示されているように、本発明者らは、配列番号1のペプチド及び配列番号2のペプチドを含むペプチドのセットが、疼痛(具体的には、神経障害性疼痛)を処置するために皮下投与された場合に鎮痛効果を有することを実証している。驚くべきことに、この鎮痛効果はまた、配列番号1のペプチド及び配列番号2のペプチドを含むペプチドセットを経口(orally)(経口(per os))投与したか又は静脈内投与した場合にも観察される。更により驚くべきことに、且つ有利なことに、本発明のペプチドのセットは、経口投与されたか又は皮下投与された場合に、TAFA-4(完全長)タンパク質と比べて優れた鎮痛効果を示し、これにより、このセットは、前記完全長タンパク質と比べて患者への投与に便利であり、且つ適している。

【０１６５】

有利なことに、本発明の2種のペプチドのセット、又はそのようなセットを含む組成物は、完全長TAFA-4タンパク質と比べてはるかに容易に(及びその結果として安価に)製造されるが、皮下投与された場合には、後者と比較して高い鎮痛活性/効果を誘発する。更により驚くべきことに、経口(oral)(経口(per os))投与される場合には、本発明のペプチドのセットは、TAFA-4(完全長)タンパク質と比較して優れた鎮痛効果を示しており、そのため、前記TAFA-4完全長タンパク質と比べて患者への投与に便利であり、且つ適している。この2種のペプチドのセットの静脈内注射は、神経障害性疼痛を処置するための第3の投与経路を有利に提供する。

【０１６６】

キット

本明細書で説明されている製品のそれぞれ(例えば、本明細書で説明されている製品のそれぞれ、好ましくは、本明細書で説明されている各ペプチド、各ペプチドのセット、又は各組成物)は、キットの一部であり得る。

【０１６７】

本発明の典型的なキットは、ペプチド又はそのバリアント、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、ペプチドのセット、核酸のセット、発現カセットのセット、ベクターのセット、細胞のセット、及びそのようなペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、又はセットを含む組成物から選択される、本明細書で説明されている少なくとも2種の製品と、任意選択で、疼痛に対して有効な少なくとも1種の追加の異なる活性化合物とを含む。特定の態様では、このキットは、キットを使用するための、書面の使用説明書を更に含む。

【０１６８】

このキットは、好ましくは、少なくとも2つのパーツ(例えば、2つの異なる容器)を含むキットオブパーツであり、第1のパーツは、本明細書で説明されているペプチド、核酸

、発現カセット、ベクター、細胞、ペプチドのセット、核酸のセット、発現カセットのセット、ベクターのセット、若しくは細胞のセット、又は組成物を含み、第2のパーツは、疼痛に対して有効な少なくとも1種の追加の異なる活性化合物を含む。好ましくは、疼痛に対して有効な活性化合物は、本明細書で開示されているステロイド系抗炎症薬(SAID)、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、又はオピオイド系薬物である。

【０１６９】

特定の態様では、このキットは、i)配列番号1の第1のペプチド、配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチド、若しくはそのようなペプチドをコードする核酸配列、ii)配列番号2の第2のペプチド、配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチド、若しくはそのようなペプチドをコードする核酸配列、並びに任意選択的に、iii)疼痛に対して有効な少なくとも1種の追加の異なる活性化合物、及び/又はiv)キットを使用するための書面の使用説明書を含み、第1及び第2のペプチド、又は前記ペプチドをコードする核酸は別個の容器中にある。

【０１７０】

一態様では、このキットのペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、セット、又は組成物は、筋肉内、静脈内、腹腔内、経口(oral)(経口(per os))、肛門、皮膚、皮下、局所、経皮(dermical)、経皮(transdermical)、又は髄腔内経路に適した形態であり、好ましくは皮下又は経口経路に適した形態であり、更により好ましくは経口経路に適した形態である。

【０１７１】

別の態様では、疼痛に対して有効な少なくとも1種の追加の異なる活性化合物は、筋肉内、静脈内、腹腔内、経口(oral)(経口(per os))、肛門、皮膚、皮下、局所、経皮(dermical)、経皮(transdermical)、又は髄腔内経路に適した形態である。

【０１７２】

処置される疼痛の性質、原因、強度に応じて、並びにペプチド、核酸、発現カセット、ベクター、細胞、セット、又は組成物の内容物の性質、及び疼痛に対して有効な少なくとも1種の追加の異なる活性化合物の性質にも応じて、前記製品を、同時に(simultaneously)/同時に(concomitantly)又は順次に共投与するか、又は共投与しない。

【０１７３】

本発明はまた、上記で説明した疼痛(例えば、慢性疼痛、神経障害性疼痛、術後疼痛、炎症性疼痛、痛覚過敏、又はアロディニア)を予防するか又は処置するための、本発明のキットのインビボ、エクスビボ、又はインビトロでの使用にも関する。本発明のキットをまた、急性疼痛又は亜急性疼痛の予防又は処置でも使用し得る。

【０１７４】

それを必要とする対象における上記で説明した疼痛(例えば、慢性疼痛、神経障害性疼痛、術後疼痛、炎症性疼痛、痛覚過敏、又はアロディニア)を予防するか又は処置するための医薬組成物、薬物、又は医薬の製造のための、本発明のキットの使用も本明細書で開示されている。本発明のキットをまた、それを必要とする対象の急性疼痛又は亜急性疼痛の予防又は処置のための医薬組成物、薬物、又は医薬の製造にも使用し得る。

【０１７５】

研究ツール

特定の態様では、本発明の製品をまた、研究に関連しても使用し得る。

【０１７６】

本発明はまた、研究ツールとしての、本明細書で説明されているペプチド又はそのバリアント(具体的には、ペプチドのセット)の使用も含むか、又は上記で説明されている任意の他の製品の使用も含む。

【０１７７】

本明細書で説明されているペプチド若しくはそのバリアントをコードする核酸、これらの発現を許容する発現カセット若しくはベクター、又はそのような核酸を含むか又はそのような発現カセット若しくはベクターを使用して改変されている細胞を、典型的には使用

して、目的のペプチド(具体的には、配列番号1のペプチド若しくは配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するその機能的バリアント、及び/又は配列番号2のペプチド若しくは配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するその機能的バリアント)をインビトロ若しくはエクスビボで発現させるか、又はこのペプチドの発現をインビトロ若しくはエクスビボで調節する。

【０１７８】

このツールを使用して、疼痛を研究するか、又は生物学的組織若しくは細胞培養物中での神経細胞の興奮性を調節して、例えば、機械的誘発性及び/又は化学的誘発性の疼痛侵害受容シグナルを研究し得る。

【０１７９】

本発明はまた、生物組織又は細胞の培養物中において、配列番号1のペプチド若しくは配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチドと、配列番号2のペプチド若しくは配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチドとを発現するか又はこの発現(のレベル)を調節するための、配列番号1のペプチド若しくは配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチドと、配列番号2のペプチド若しくは配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチドとをコードする核酸の使用、又はこの発現を許容する発現カセット若しくはベクターの使用にも関する。

【０１８０】

本明細書で説明されている核酸分子を使用して、トランスジェニック動物も作成し得る。このことは、体細胞の改変により局所的に行われ得るか、又は生殖細胞に遺伝的改変を組み込むための生殖細胞系列療法により行われ得る。従って、本発明はまた、配列番号3及び/若しくは配列番号4の核酸又はこれらのバリアントを含む(即ち、包含する)か;配列番号3及び/若しくは配列番号4の核酸又はこれらのバリアントを含む発現カセット又はベクターを含むか;又は配列番号1のペプチド若しくは配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチド、及び/又は配列番号2のペプチド若しくは配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有するペプチドを発現するトランスジェニック生物(例えば、動物)にも関する。従って、本発明はまた、本明細書で説明されている(少なくとも2種の)ペプチドの任意のセットをコードする核酸配列、又はこの任意のセットの発現を許容する発現カセット若しくはベクターを含む宿主細胞又はトランスジェニック生物(具体的には、トランスジェニック動物)にも関する。

【０１８１】

下記の実施例は、本発明のある特定の好ましい態様を実証し且つ更に説明するために提供されるものであり、本発明の範囲を制限するものとして解釈されるべきではない。

【実施例】

【０１８２】

材料及び方法

ペプチド合成

全てのペプチドを、Symphony X装置(Protein Technologies社, USA)でFmoc-SPPSを使用して、200μモルスケールで合成した。合成グレードのFmoc-AA試薬を、Iris Biotech社から購入した。特定のL-擬似プロリンジペプチドを使用して、ペプチド合成を容易にした。HATU、2-クロロトリチルクロリド樹脂(200～400メッシュ、1.2mmol/g)、RINKアミド樹脂(200～400メッシュ、0.42mmol/g)を、IRIS Biotech社から購入した。DMF、DCM、メタノール、ジエチルエーテル、及びHPLCグレードのアセトニトリルを、Aldrich社から購入した。各残留物に関する標準的な脱保護-カップリングサイクルは、下記の6つの工程からなった:

1.DMF 5mLで洗浄する(3回×30秒)

2.DMF中の20% ピペリジン 5mLでFmoc基を脱保護する(3回×3分)

3.DMF 5mLで洗浄する(3回×30秒)

4.Fmoc-AAを共役する(2回×60分)

a.Fmoc-AA 5mLを、DMFに200mMで溶解させる

b.HATU 2mLを、NMPに500mMで溶解させる
c.iPr_2NEt 2mLを、NMPに1Mで溶解させる
5.DMF中の10% Ac_2O 5mLによるキャッピング(7分)
6.DMF 5mLで洗浄する(3回×30秒)

【0183】
この合成の完了時に、ペプチド樹脂をDMFで3回洗浄し、DCMで3回洗浄した。次いで、ペプチド樹脂を、(100μモルスケール合成毎に)下記の3種のTFA開裂カクテルの内の1つで開裂させた:
・ TFA 35mL、TIS 1000μL、水 2000μL、DTT 1000mg

【0184】
3時間のTFA開裂後に、この樹脂から開裂溶液をろ過し、氷冷エーテル 40mLに添加してペプチドを沈殿させた。-20℃での1時間超後、エーテル溶液を3500RCFで遠心分離し、上清をデカントした。ペレットをエーテルで更に2回超洗浄し、次いで、真空デシケータ中で3時間超にわたり乾燥させた後、溶解させ、分析キャラクタリゼーションを行い、且つ精製した。

【0185】
ペプチド樹脂ヒドラジドの概略的な調製方法
Fmoc-$NH-NH_2$ 0.35mmolをDCM 30mLに溶解させ、次いで、この溶液にDIPEA 1.5mmolを添加した。次に、この溶液を樹脂 1gに添加し、室温で2時間にわたり混合した。未反応基を、30分にわたり17:2:1 DCM:MeOH:DIPEAでキャップした。次いで、Fmoc-AA樹脂をDMFで3回洗浄し、DCMで3回洗浄し、20分超にわたり真空乾燥させた。担持量を、Fmoc基脱保護の滴定(UV、301nm)により決定した。

【0186】
分析及び精製
ペプチドを、UPLC及びESI-MS質量分析により分析した。この装置は、BEH C18(WATERS社), 150×2.1mm(150×2.1mm)(流速:0.6mL/分)を備えていた。溶媒A及びBは、水中の0.1% TFA、及びアセトニトリル中の0.1% TFAであった。

【0187】
粗ペプチドの精製を、逆相カラム(Vydac Denali prep C-18、10μm、120Å、50×300mm)と、緩衝液A中での緩衝液Bの濃度上昇の適切な勾配(流速80mL/分)とを使用する分取逆相HPLC(Waters Delta Prep 4000)システムで実施した。精製された標的ペプチドを含む画分を、214nmにてUV測定(Waters 2489 UV/Visible検出器)で同定し、次いで、選択された画分をまとめて凍結乾燥させた。

【0188】
Ac-CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWW-$NHNH_2$(ペプチドF1-配列番号1)の合成:
ペプチドF1(Ac- CFPGQVAGTTRAQPSCVEASIVIQKWW-$NHNH_2$)を、ヒドラジド樹脂を使用して、上記で説明した標準的なFmoc-SPPSにより調製し、標準的なペプチド開裂条件(上記で説明した)を、下記で採用した。

【0189】
標準的な開裂手順後、F1粗ペプチドを水に溶解させ、RP-HPLCを精製した。精製された標的ペプチドを含む画分を同定し、次いで、選択された画分をまとめて凍結乾燥させた。

【0190】
CHMNPCLEGEDCKVLPDYSGWSCSSGNKVKTTKVTR-NH_2(ペプチドF2-配列番号2)の合成:
ペプチドF2(CHMNPCLEGEDCKVLPDYSGWSCSSGNKVKTTKVTR-NH_2)を、RINKアミド樹脂を使用して、上記で説明した標準的なFmoc-SPPSにより調製した。

【0191】
標準的な開裂手順後、F2粗ペプチドを水に溶解させ、RP-HPLCを精製した。精製された標的ペプチドを含む画分を同定し、次いで、選択された画分をまとめて凍結乾燥させた

。

【０１９２】

マウス

C57/Bl6Jマウス(8～12週齢)を、Charles River Laboratories社から購入した。全ての実験に、両性のマウスを使用した。雌雄間で差違が認められなかったことから、2つの性に関するデータを統合した。マウスを、標準的な飼育条件(22℃、湿度40%、12時間照明サイクル、並びに飼料及び水への自由アクセス)下で維持した。本研究で使用されたマウスの数を最小限に抑え、且つマウスが受けるストレス及び苦痛を最小限に抑えるよう特に努力した。全ての実験を、実験動物の世話及び使用に関する欧州ガイドライン(Council Directive 86/609/EEC)に沿って実行した。全ての実験手順は、フランスの法律で義務付けられている通りに、且つ動物実験に関するフランス法律の関連法規に従って、独立倫理委員会(APAFIS)により承認された。全ての実験を、ARRIVEガイドラインに従って実施した。

【０１９３】

疼痛モデル1:神経部分損傷(Spared Nerve Injury; SNI)モデル-神経障害性疼痛.

Decosterd及びWoolf, 2000; Pain, 第87巻, 149～158頁により開発された神経部分損傷(SNI)モデルを使用した。このモデルを、神経障害性疼痛モデルとして使用した。SNIモデルは、坐骨神経の脛骨枝及び総腓骨神経の離断からなり、腓腹神経は無傷なままである。次いで、後者は、相当な機械的アロディニアを伴う神経因性疼痛の兆候を呈する。SNIモデルには、下記の多くの利点がある:

- 神経障害性疼痛は、持続性である。これにより、ペプチドの反復注射時の慣れ現象を把握することが可能になる。
- 生じる疼痛は、頑強である。
- このモデルは、非常に再現性がある。

【０１９４】

マウスを、ケタミン(100mg/kg IP)及びキシラジン(10mg/kg IP)で麻酔し、無菌条件下で左坐骨神経を露出させた。坐骨神経の遠位三分岐を特定し、脛骨枝及び総腓骨枝を、ポリプロピレン非吸収性6-0縫合糸(Ethicon社)で結紮し、1mm切断して、腓骨枝を無傷のまま残した。創傷を縫合し、この動物を回復させてケージに戻した。

【０１９５】

疼痛モデル2:足切開-術後疼痛.

Brennan及び共同研究者(1999)(Brennan,1999)により説明されているように、足切開手術を実施した。マウスを、ケタミン(100mg/kg、IP)及びキシラジン(10mg/kg、IP)で麻酔し、右後足の皮膚及び筋膜を縦切開した。鉗子を使用して短趾屈筋を縦方向に持ち上げ、メスで筋肉を切開して2つに切断した。創傷を縫合し、動物を回復させてケージに戻した。足切開を、術後疼痛モデルとして使用した。

【０１９６】

疼痛モデル3:カラギーナン注射-炎症性疼痛.

本発明者らは、Hamiltonシリンジにより、マウスの左後足の足底表面に1×PBS中の1% λ-カラギーナン(Sigma-Aldrich社,22049-5G-F) 20μlを注入した。このカラギーナン注射を、炎症性疼痛モデルとして使用した。

【０１９７】

疼痛モデル4:慢性絞扼性神経損傷(CCI)モデル-神経障害性

CCI神経障害性疼痛モデル:Bennett及びXie 1988(A peripheral mononeuropathy in rats that produces disorders of pain sensation like those in man. Pain 第33巻:87～107頁)により既に説明されているように、慢性絞扼性神経損傷(CCI)を実施した。簡潔に説明すると、ケタミン/キシラシン(それぞれ100mg/kg及び10mg/kg ip)で麻酔したマウスに、総坐骨神経の周囲に2本の結紮糸(6-0 Monocryl、Ethicon社)を緩く(約1mm間隔で)結んで、片側末梢単神経障害を誘発した。神経は、辛うじて認識出来る程度に狭窄されており、そのため、神経鞘血管を通る循環は遮断されなか

った。
【０１９８】
疼痛モデル5:カプサイシン炎症性疼痛.
カプサイシン(Sigma社)ストック溶液(無水エタノールに溶解させた、16.7mg/mL)を、NaCl 0.9%で0.25mg/mLに希釈し、次いで、Hamiltonシリンジ及び26G針を使用して、マウスの左後足の足底表面に10μL注射した。
【０１９９】
疼痛モデル6:変形性関節炎疼痛モデル(モノヨードアセテートモデル).
MIAモデルは、齧歯類の変形性関節炎における関節破壊の標準的なモデルである。簡潔に説明すると、マウスを、ケタミン(100mg/kg IP)及びキシラジン(10mg/kg IP)で麻酔し、続いて、Pitcher他(2016)により説明されているように、Hamiltonシリンジ及び26G針を使用して、NaCl 0.9%中の1mg/10μLのMIA(モノヨードアセテート, Sigma社)を、マウスの左後足の膝関節の滑液に注入した。
【０２００】
疼痛モデル7:紫外線火傷疼痛モデル
マウスを、ケタミン(100mg/kg IP)及びキシラジン(10mg/kg IP)で麻酔し、片後足の足底側を除いて完全に覆った。この足に、60分にわたり20cmの距離で、312nmの波長のUVランプ(VL-215.MC Vilmer)を使用して照射した。目覚めると、動物をケージに戻す。
【０２０１】
疼痛モデル8:冷凍焼け疼痛モデル
マウスを、ケタミン(100mg/kg IP)及びキシラジン(10mg/kg IP)で麻酔した。後足を、ドライアイスに入れた銅管を介して冷気に曝露し、40秒にわたり、NaClに浸した一片のろ紙に接触させた。目覚めると、動物をケージに戻す。
【０２０２】
フォン・フライ試験
フォン・フライでは、長さ約50mmのナイロン棒の小片であるフォン・フライ(VF)毛又は繊維を使用して、機械的刺激に対する齧歯類の感受性を試験する。この試験では、動物を、高いメッシュのプラットフォームの上に立たせ、メッシュを通してフォン・フライの毛を挿入して動物の後足を突く。動物の通常の反応として、足を引っ込める、又は舐める、又は震わせるが挙げられる。「アップダウン」フォン・フライ法を使用して、動物の50%において足の引っ込め反応を生じさせるのに必要な機械的な力を決定する。ここで、マウスを、金網グリッド上のプラスチックチャンバに入れ、1gの繊維から開始して、且つカットオフとして0.04g及び4gの繊維を使用して、「アップダウン」法(45)によりフォン・フライ繊維(Vivotech社)で刺激した。
【０２０３】
統計解析
結果を、平均±SEMで表す。統計解析を、Prism 7(Graphpad Software社, La Jolla, CA, USA)で実施した。
【０２０４】
結果
(実施例1:疼痛モデル1:神経部分損傷(SNI)モデル-神経障害性疼痛.)
1.1 皮下投与におけるTAFA-4完全長タンパク質(「TAFA-4 FL」)と配列番号1及び配列番号2の2種のペプチドのセット(「ペプチド1+2」)との鎮痛効果の比較。
これらの実験の目的は、神経障害性疼痛の神経部分損傷(SNI)モデルでの皮下注射による、本発明に係る2種のペプチドのセット(このセットは、本明細書では、「ペプチド1+2」又は「ペプチドF1+F2」と識別される)の鎮痛効果(antalgic effect)を評価し、この効果と、TAFA-4完全長タンパク質(「TAFA-4 FL」)で得られた効果とを比較することであった。
【０２０５】

この実験を、8週齢の雄WT C57Bl6マウスで実行した。6～12匹のマウスからなる4つの群を使用した。配列番号1及び配列番号2のペプチドを、[0.6mg/mL]で0.9% NaClに再懸濁させた。この研究では、0.3mg/kgの「ペプチド1+2」の最終総濃度で使用するために、2種のペプチドを希釈して、等モル濃度(配列番号1のペプチドの場合は12.8μg/ml、配列番号2のペプチドの場合は17.2μg/ml)を得た。同様に、TAFA-4 FLを0.9% NaClに再懸濁させ、希釈し、0.3mg/kgの最終濃度で使用した。

【０２０６】

0.9% NaCl溶液を、陰性コントロール(ビヒクル)として使用し、神経障害性疼痛を処置するために使用される公知の薬物である3mg/kgのプレガバリンを、陽性コントロールとして使用する。

【０２０７】

フォン・フライ(VF)繊維を用いてアップ/ダウン法[様々な条件下での時間の関数として、マウスの50%において足の引っ込め反応を生じさせるのに必要な機械的な力(グラム当量で表される)を示す]によりマウスの基本閾値(「ベースライン」)を測定した後、SNIモデルをセットアップする。マウスを麻酔し、脛骨神経と腓骨神経の結紮を実施し、次いで、これら2種の神経を切断する。無傷のままの腓骨神経は、神経障害を非常に急速に発症する。神経障害の発生は、手術の3日後に確認される。これにより、同側足のフォン・フライ繊維に対する反応閾値の低下が観察される。

【０２０８】

手術の14日後に、反応閾値を再度測定する(図1の「D14」を参照されたい)。次いで、2種のペプチドのセット、TAFA-4完全長タンパク質、ビヒクル、又はプレガバリンをそれぞれ含む溶液のそれぞれ100μl/10gを、実験者によりマウスに盲検皮下注射する。

【０２０９】

投与/注射の1時間、2時間、次いで4時間後に、反応閾値を測定する。

【０２１０】

SNI後14日目に、全てのマウスは、機械的閾値の大幅な低下を示しており、ベースライン閾値と比較して強い機械的過敏症を示した(図1を参照されたい)。ビヒクルの皮下投与は、効果がなかった。驚くべきことに、投与後1時間で、配列番号1及び配列番号2の2種のペプチドのセット/組成物(「ペプチド1+2」)の鎮痛効果が最大であり、TAFA-4完全長タンパク質(「TAFA4 FL」)の鎮痛効果と比べて有意に高く(p値〈0.01)、プレガバリンの鎮痛効果と比べても高かった。統計解析により、陰性コントロール(ビヒクル)と比較して2種のペプチドのセット/組成に関して1時間及び2時間で強い有意な結果(p値〈0.001)が示されている。

【０２１１】

1.2 経口投与におけるTAFA-4完全長タンパク質(「TAFA-4 FL」)と配列番号1及び配列番号2の2種のペプチドのセット(「ペプチド1+2」)との鎮痛効果の比較。

2種のペプチドのセット、TAFA-4 FL、ビヒクル、及びプレガバリンの投与を、経口投与を使用して手術の14日後に行ったことを除いて、1.1で説明されているプロトコルを使用した。

【０２１２】

経口投与に関して、配列番号1及び配列番号2の2種のペプチドを、1%w/v ヒドロキシプロピルメチルセルロース(Sigma-aldrich社 #423238,バッチMKCD3665)、0.5%v/v Tween 80(Euromedex社 #2002-A,バッチ100412/16S407)の溶液(以降、HPMC溶液又は「ビヒクル」と称される)で30μg/mLの総濃度に希釈した。TAFA-4 FLに関しても、同様のプロトコルを適用した。

【０２１３】

ビヒクル、TAFA-4 FL溶液、及び2種のペプチドのセットを含む溶液を、2本の強制経口用針を使用して経口投与した。プレガバリン(3mg/kg)を、VF測定を実施した実験者とは別の実験者により強制経口(「経口」)投与し、そのため、後者は、処置について盲検で作業した(各処置に関してn=8)。投与を手術後14日で実施した。

【０２１４】
SNI後14日目に、全てのマウスは、機械的閾値の大幅な低下を示した(図2)。ビヒクルの経口投与は、効果がなかった。TAFA-4完全長タンパク質は、経口(orally)投与(即ち、経口(per os))した場合に有意な鎮痛効果を示さなかった。驚くべきことに、本発明の2種のペプチドのセット/組成物の経口投与により、投与後1時間ですぐに機械的閾値に対する統計的に有意な反転効果が誘発され(p値〈0.01)、投与後2時間で最大効果が現れた(p値〈0.001)。本発明の2種のペプチドのセット/組成物の鎮痛効果は、投与後1時間及び2時間でプレガバリンの鎮痛効果と類似していたが、投与後2時間ではTAFA-4完全長タンパク質(「TAFA-4 FL」)の鎮痛効果と比べて有意に高かった。図2から、経口投与された場合には、本発明の2種のペプチドのセット/組成物は、TAFA-4完全長タンパク質と比べてはるかに優れた鎮痛効果を有することが結論付けられ得る。
【０２１５】
1.3 静脈内投与された配列番号1及び配列番号2の2種のペプチドのセット(「ペプチド1+2」)の鎮痛効果
2種のペプチドのセット又はビヒクルの投与を、静脈経路を使用して手術の14日後に行ったことを除いて、1.1で説明されているプロトコルを使用した。
【０２１６】
配列番号1及び配列番号2のペプチドを、150μg/mLの総濃度で0.9% NaClに再懸濁させた。
【０２１７】
既に説明したように、アップ/ダウン法によるフォン・フライ繊維測定を行って、ベースラインを決定する。次いで、SNIモデルをセットアップする。手術の14日後(14日目-D14)に反応閾値を測定して、神経障害性疼痛の発生を確認する。次いで、300μg/kgの総濃度での2種のペプチドのセットを含む20μl/10gの溶液の盲検注射を、尾静脈で緩やかに実施した。反応閾値を、静脈内投与の1時間、2時間、次いで4時間後に測定した。ビヒクル(n=11)もまた、静脈内投与した。
【０２１８】
SNI後14日目に、全てマウスは、機械的閾値の大幅な低下を示しており、ベースライン閾値と比較して強い機械的過敏症を示した(図3)。ビヒクルの静脈内投与は、効果がなかった。驚くべきことに、配列番号1及び配列番号2の2種のペプチドのセット(「ペプチド1+2」)の強い有意な鎮痛効果が観察され、機械的閾値に対する最大の反転効果が2時間に観察された(p〈0.001)。
【０２１９】
全体として、本実験から、本発明の2種のペプチドのセットは、SNIモデル(神経障害性疼痛モデル)において皮下投与、経口投与、及び静脈内投与により鎮痛効果を誘発したことが示されている。有利なことに、本発明の2種のペプチドのセットの非常に早い(即ち、投与後1時間での)鎮痛効果は、皮下投与された場合にTAFA-4(完全長)タンパク質で観察される鎮痛効果と比べて顕著である。更に驚くべきことに、本発明の2種のペプチドのセットは、投与後2時間で経口投与された場合にTAFA-4(完全長)タンパク質と比べて優れた鎮痛効果を示す。
【０２２０】
本発明者の結果から、神経障害性疼痛モデルにおける配列番号1及び配列番号2の2種のペプチドのセットの鎮痛効果が実証された。このモデルにより誘発される機械的アロディニア(疼痛感受性の閾値の低下)は、本発明のペプチドのセットの皮下投与、静脈内投与、又は経口(oral)(経口(per os))投与により軽減され得る。
【０２２１】
有利なことに、本発明の2種のペプチドのセット、又はそのようなセットを含む組成物は、完全長TAFA-4タンパク質と比べてはるかに容易に(及びその結果として安価に)製造されるが、皮下投与された場合には、後者と比較して高い鎮痛活性/効果を誘発する。更に驚くべきことに、経口(oral)(経口(per os))投与される場合には、本発明のペプチド

のセットは、TAFA-4(完全長)タンパク質と比較して優れた鎮痛効果を示しており、そのため、前記TAFA-4完全長タンパク質と比べて患者への投与に便利であり、且つ適している。この2種のペプチドのセットの静脈内注射は、神経障害性疼痛を処置するための第3の投与経路を有利に提供する。

【０２２２】

(実施例2:足切開-術後疼痛-)

これらの実験の目的は、術後疼痛モデル(Brennan足切開モデル)における皮下注射による、本発明に係る配列番号1及び配列番号2の2種のペプチドのセット(このセットは、本明細書では、「ペプチド1+2」と識別される)の鎮痛効果(antalgic effect)を評価することであった。

【０２２３】

この実験を、8週齢の雄及び雌のWT C57Bl6マウスで実行した。「ペプチド1+2」処置群に関しては、12匹の雄及び12匹の雌を使用し、ビヒクル群に関しては、11匹の雄及び11匹の雌を使用した。配列番号1のペプチド及び配列番号2のペプチドの等モル組み合わせを、[4mg/mL]で超純水に再懸濁させた。この研究では、これら2種のペプチドを希釈して、0.3mg/kgの「ペプチド1+2」の最終総濃度を得た。

【０２２４】

「ペプチド1+2」又はビヒクルを、下記の様々な時点:手術前日(D-1)、手術当日(D0)、並びに手術後D+1及びD+2で、1日2回皮下投与した。D0での投与を、手術の1時間前並びに手術の1時間後(及び目覚め後)それぞれで実施した。機械的閾値反応の測定を、D+1(D+1での注射前)、D+2(D+2での注射前)、及びD+3で実施した(図4A)。

【０２２５】

足切開後、ビヒクルで処置されたマウスは、機械的アロディニアを発症した(図4BのD+1、D+2、及びD+3を参照されたい)。対照的に、「ペプチド1+2」で処置されたマウスは、機械的アロディニアを発症しなかった。ビヒクルで処置されたマウスと比較して、「ペプチド1+2」で処置されたマウスは、D+1、D+2、及びD+3で統計的に有意に高い反応閾値を示した(図4B)。

【０２２６】

これらの結果から、本発明のペプチドのセットは、足切開モデル(術後疼痛モデル)において鎮痛剤として使用され得ることが示されている。

【０２２７】

(実施例3:慢性絞扼性神経損傷(CCI)神経障害性疼痛モデルにおける耐性の欠如)

この実験の目的は、配列番号1及び配列番号2のペプチドのセット(「ペプチド1+2」)で処置された対象が、ペプチドのセットの反復の皮下投与後に、このペプチドのセットに対する耐性を誘発し得るかどうかを評価することであった。

【０２２８】

CCIモデルを、上記で説明したプロトコルに従って導入する。手術後D7から開始して、マウスに、連続14日にわたり、「ペプチド1+2」(0.3mg/kg)を1日2回皮下注射した。手術前及び手術の7日後に、アップ/ダウン法によりフォン・フライ繊維を使用して機械的感受性を試験して、CCI誘発性機械的アロディニアを検証する。最初の投与後に、経時的反応を実施した。次いで、1日置きに、「ペプチド1+2」の鎮痛効果を試験した。次いで、最後の投与(D20)後に、完全な経時的反応を実施した(図5A)。D+30(処置終了の10日後)に最後の測定を実施して、マウスの正しい回復を検証した。

【０２２９】

「ペプチド1+2」の最初の皮下注射は、反応(即ち、足の引っ込め)閾値の大幅な増加を引き起こし、これにより、「ペプチド1+2」の鎮痛効果が実証された(図5B-「薬物前」の状態で測定された反応と、最初の注射での投与の2時間後に測定された反応との比較)。興味深いことに、「ペプチド1+2」の鎮痛効果は、D20に対応する最後の注射時であっても効力が全く低下することなく、処置期間全体(14日間)にわたり一定のままである(図5B、最後の注射で測定された反応と比較した最初の注射で測定された反応の有意差な

し)。これらの結果から、本発明のペプチドのセットを、対象に耐性を誘発することなく長期間にわたり繰り返し使用し得ることが示されている。

【０２３０】

(実施例4:術後疼痛モデルの処置の様々な薬量の比較-予防効果)

この実験の目的は、術後疼痛モデルにおいてインビボで皮下投与された場合に、配列番号1及び配列番号2のペプチドのセット(「ペプチド1+2」)により術後疼痛に罹患している対象を処置するための様々な薬量(posology)を試験することであった。

【０２３１】

「ペプチド1+2」又はビヒクルを、3つの異なるプロトコルに従って1日2回皮下投与した。「D-1/D0」プロトコル:投与を、手術前日(D-1)及び手術当日(D0)に実施し;「D0」プロトコル:投与を、手術当日(D0)に実施し;「D0/D+1/D+2」プロトコル:投与を、手術前日(D-1)、手術当日(D0)、並びに手術後D+1日及びD+2日に実施した。D0での投与を、手術の1時間前並びに手術の1時間後(及び目覚め後)それぞれで実施した。D+1及びD+2での機械的閾値反応測定を、2種のペプチドのセット又はビヒクルの投与前に実施した(図6A)。

【０２３２】

足切開後、ビヒクルで処置されたマウスは、機械的アロディニアを発症した(図6BのD+1、D+2、及びD+3を参照されたい)。対照的に、「ペプチド1+2」で処置されたマウスは、使用されたプロトコルに関係なく機械的アロディニアを発症しなかった。興味深いことに、手術後に処置されていない「D-1/D0」及び「D0」プロトコルで処置されたマウスは、機械的アロディニアを発症しておらず、それにより、本発明のペプチドのセットを足切開モデル(術後疼痛モデル)において予防的に使用し得ることが示された。

【０２３３】

(実施例5:炎症性疼痛モデルにおける鎮痛効果)

この実験の目的は、炎症性疼痛モデル(カプサイシン炎症性疼痛モデル)においてインビボで皮下投与された配列番号1及び配列番号2のペプチドのセット(「ペプチド1+2」)の鎮痛効果(antalgic effect)を評価することであった。

【０２３４】

この実験を、8週齢の雄WT C57Bl6マウスで実行した。8匹のマウスからなる2つの群を使用した。「ペプチド1+2」を、1グラム当たり10μl注射用に、30μg/mLの濃度でHMPC溶液に再懸濁させる。

【０２３５】

カプサイシン(Sigma社)ストック溶液(無水エタノールに溶解させた、16.7mg/mL)を、NaCl 0.9%で0.25mg/mLに希釈し、次いで、Hamiltonシリンジ及び26G針を使用して、マウスの左後足の足底表面に10μL注射した。既に説明したように、ベースラインを決定するためのアップ/ダウン方法によるフォン・フライ繊維での測定を実行した。カプサイシンの注射の24時間後(D+1)、2つの群のマウスを、「ペプチド1+2」又はビヒクルそれぞれで処置した。反応閾値を、0,3mg/kg(n=8)での「ペプチド1+2」溶液又はビヒクル溶液(n=8)の皮下投与後1時間(+1h)、2時間(+2h)、次いで4時間(+4h)で測定した。

【０２３６】

カプサイシンの注射の24時間後、マウスは、機械的アロディニアを発症した(図7のD+1を参照されたい)が、本発明のペプチドのセットの皮下投与は、投与の2時間後に反応閾値の統計的に有意な増加を誘発した。

【０２３７】

これらの結果から、本発明のペプチドのセットがカプサイシンモデル(炎症性疼痛モデル)において皮下投与により鎮痛効果を引き起こしたことが示されている。

【０２３８】

(実施例6:変形性関節炎疼痛モデルにおける鎮痛効果)

この実験の目的は、変形性関節炎疼痛モデル(モノヨードアセテートモデル)においてイ

ンビボで皮下投与された配列番号1及び配列番号2のペプチドのセット(「ペプチド1+2」)の鎮痛効果(antalgic effect)を評価することであった。

【０２３９】

8匹のマウスからなる2つの群を使用した。各群においてモノヨードアセテート(MIA)注射の前(ベースライン)及び14日後に、アップ/ダウン法によりフォン・フライ繊維を使用して、機械的感受性を試験した。MIAの注射の14日後に、2つの群のマウスを、「ペプチド1+2」又はビヒクル(NaClの溶液)それぞれで処置した。経時的反応を実施して、「ペプチド1+2」の鎮痛効果を追跡した。反応閾値を、「ペプチド1+2」又はビヒクルの投与後1時間(+1h)、2時間(+2h)、次いで4時間(+4h)で測定した。

【０２４０】

MIA注射後の14日目に、全てのマウスは、機械的閾値の大幅な低下を示しており、ベースライン閾値と比較して強い機械的過敏症を示した(図8)。ビヒクルの皮下投与は、鎮痛効果がなかった。対照的に、投与後1時間及び2時間では、「ペプチド1+2」の鎮痛効果は、陰性コントロール(ビヒクル)と比較して統計的に有意であった(図8)。

【０２４１】

これらの結果から、本発明のペプチドのセットは、関節炎疼痛モデルにおいて皮下投与により鎮痛効果を引き起こしたことが示されている。

【０２４２】

(実施例7:冷凍焼け疼痛モデルにおける鎮痛効果)

この実験の目的は、冷凍焼け疼痛モデルにおいてインビボで皮下投与された配列番号1及び配列番号2のペプチドのセット(「ペプチド1+2」)の鎮痛効果(antalgic effect)を評価することであった。

【０２４３】

16匹のマウスからなる2つの群を使用した。各群は、8匹の雄、及び8匹の雌からなる。低温曝露前(ベースライン)及び24時間後(D+1)に、アップ/ダウン法によりフォン・フライ繊維を使用して、機械的感受性を試験した。低温曝露の24時間後での「ペプチド1+2」又はビヒクル(NaCl溶液)の投与後に、経時的反応を実施して、投与後1時間(D1+1)、2時間(D1+2h)、及び4時間(D1+4h)での「ペプチド1+2」の鎮痛効果を追跡した。

【０２４４】

低温曝露の24時間後に、全てのマウスは、機械的閾値の大幅な低下を示しており、ベースライン閾値と比較して強い機械的過敏症を示した(図9)。ビヒクルの皮下投与は、鎮痛効果がなかった。対照的に、投与後1時間及び2時間では、「ペプチド1+2」の鎮痛効果は、陰性コントロール(ビヒクル)と比較して統計的に有意であった(図9)。

【０２４５】

これらの結果から、本発明のペプチドのセットが冷凍焼け(又は氷焼け)疼痛モデルにおいて皮下投与により鎮痛効果を引き起こしたことが示されている。そのようなモデルは、急性疼痛モデルの一種ともみなされる。

【０２４６】

(実施例8:紫外線火傷疼痛モデルにおける鎮痛効果)

この実験の目的は、紫外線火傷疼痛モデル(日焼け疼痛モデルとも呼ばれる)においてインビボで皮下投与された配列番号1及び配列番号2のペプチドのセット(「ペプチド1+2」)の鎮痛効果(antalgic effect)を評価することであった。

【０２４７】

16匹のマウスからなる2つの群を使用した。各群は、8匹の雄、及び8匹の雌からなる。紫外線照射前(ベースライン)及び24時間後(D+1)に、アップ/ダウン法によりフォン・フライ繊維を使用して、機械的感受性を試験した。「ペプチド1+2」又はビヒクル(NaCl溶液)の投与後に、経時的反応を実施して、投与後1時間(D1+1h)、2時間(D1+2h)、及び4時間(D1+4h)での「ペプチド1+2」の鎮痛効果を追跡した。

【０２４８】

紫外線照射の24時間後に、全てのマウスは、機械的閾値の大幅な低下を示しており、

ベースライン閾値と比較して強い機械的過敏症を示した(図10)。ビヒクルの皮下投与は、鎮痛効果がなかった。対照的に、投与後1時間及び2時間では、セット「ペプチド1+2」の鎮痛効果は、陰性コントロール(ビヒクル)と比較して統計的に有意であった(図10)。

【０２４９】

これらの結果から、本発明のペプチドのセットがUV火傷(又は日焼け)疼痛モデルにおいて皮下投与により鎮痛効果を引き起こしたことが示されている。そのようなモデルは、急性疼痛モデルの一種ともみなされる。

【０２５０】

参考文献

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

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

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

Boyle, K.A., Gradwell, M.A., Yasaka, T., Dickie, A.C., Polgar, E., Ganley, R.P., Orr, D.P.H., Watanabe, M., 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, 526-540 e526.

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

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

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

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

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

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

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

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

Ther. 37(5): 2003-2016.
Peirs, C., Williams, S.P., Zhao, X., Walsh, C.E., Gedeon, J.Y., Cagle, N.E., Goldring, A.C., Hioki, H., Liu, Z., Marell, P.S., et al. (2015). Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain. Neuron 87, 797-812.
Petitjean, H., F, B.B., Tsao, D., Davidova, A., Sotocinal, S.G., Mogil, J.S., Kania, A., and Sharif-Naeini, R. (2019). Recruitment of Spinoparabrachial Neurons by Dorsal Horn Calretinin Neurons. Cell reports 28, 1429-1438 e1424.
Petitjean, H., Pawlowski, S.A., Fraine, S.L., Sharif, B., Hamad, D., Fatima, T., Berg, J., Brown, C.M., Jan, L.Y., Ribeiro-da-Silva, A., et al. (2015). Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury. Cell reports 13, 1246-1257.
Sarver, D.C., Lei, X., and Wong, G.W. (2021). FAM19A (TAFA): An Emerging Family of Neurokines with Diverse Functions in the Central and Peripheral Nervous System. ACS Chem Neurosci 12, 945-958.
Siracusa, R., Di Paola, R., Cuzzocrea, S., Impellizzeri, D. (2021). Fibromyalgia: Pathogenesis, Mechanisms, Diagnosis and Treatment Options Update. Int J Mol Sci. 22(8): 3891.
Tom Tang, Y., Emtage, P., Funk, W.D., Hu, T., Arterburn, M., Park, E.E., and Rupp, F. (2004). TAFA: a novel secreted family with conserved cysteine residues and restricted expression in the brain. Genomics 83, 727-734.
Zeilhofer, H.U., Wildner, H., and Yevenes, G.E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. Physiol Rev 92, 193-235.
Zhang, Y., Liu, S., Zhang, Y.Q., Goulding, M., Wang, Y.Q., and Ma, Q. (2018). Timing Mechanisms Underlying Gate Control by Feedforward Inhibition. Neuron 99, 941-955 e944.

【図面】

【図１】

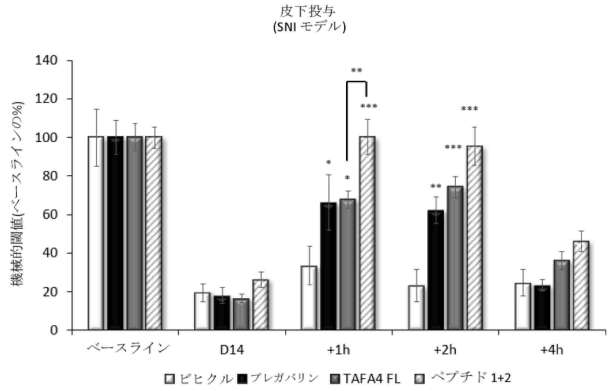


FIGURE 1

【図２】

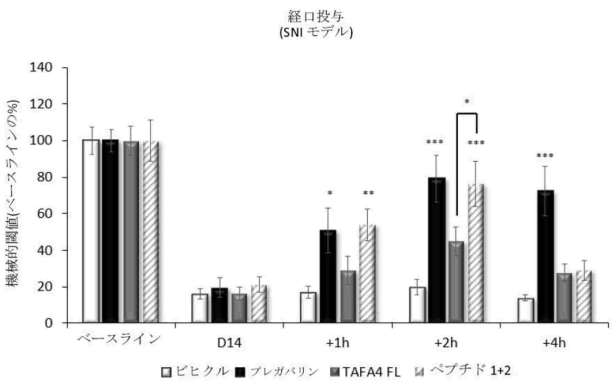


FIGURE 2

【図３】

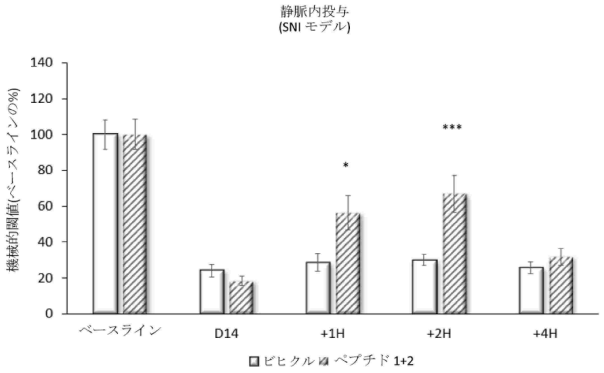


FIGURE 3

【図４】

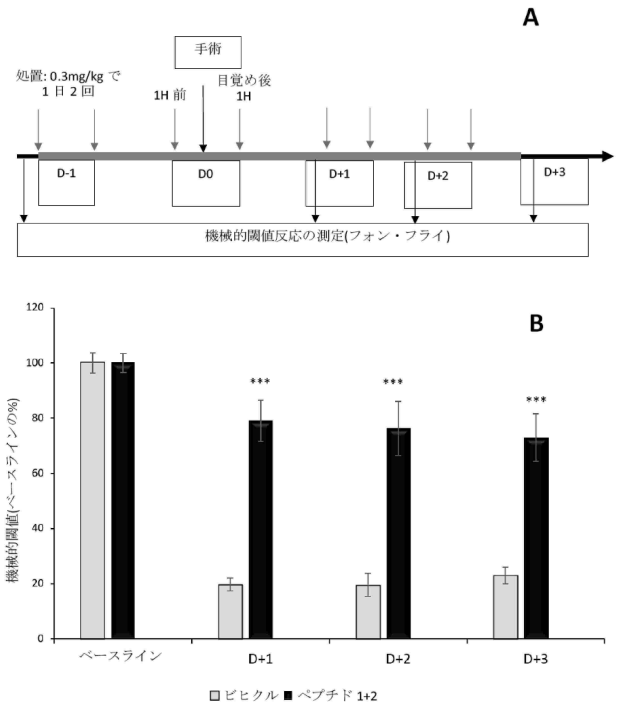


FIGURE 4

【図５】

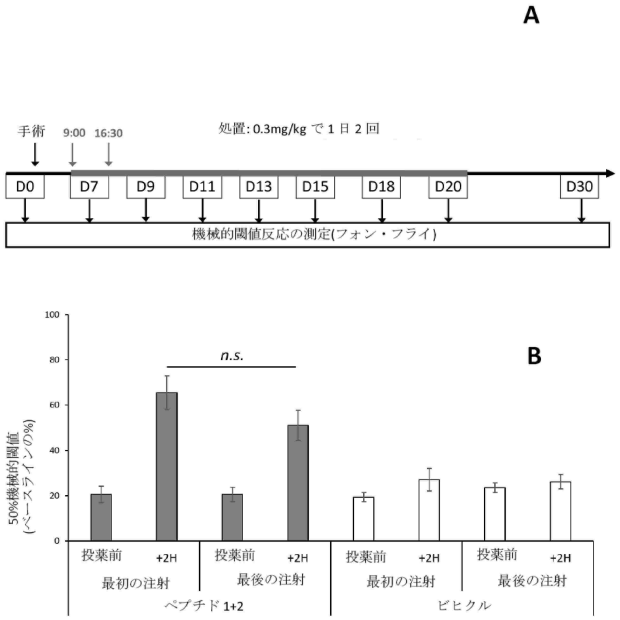


FIGURE 5

【図６】

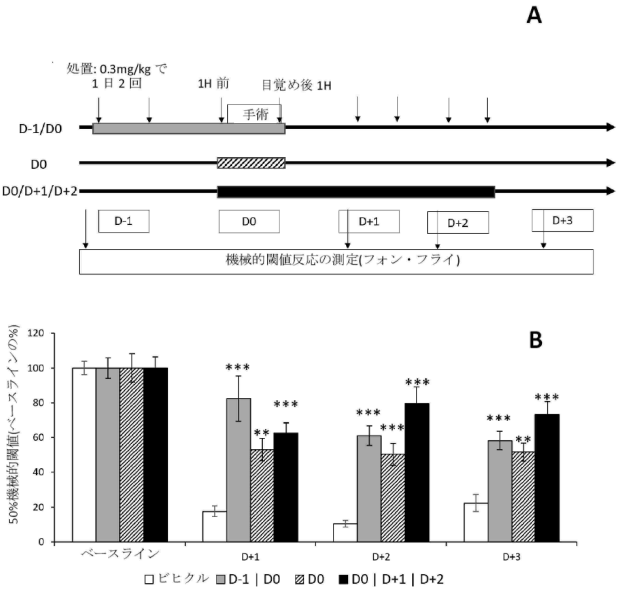


FIGURE 6

【図７】

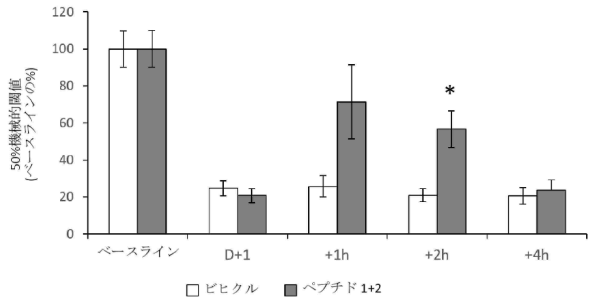


FIGURE 7

【図８】

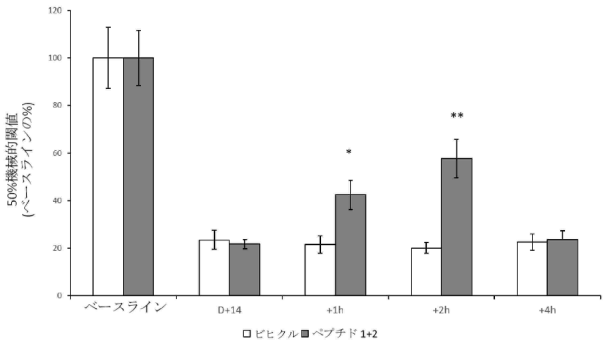


FIGURE 8

【図９】

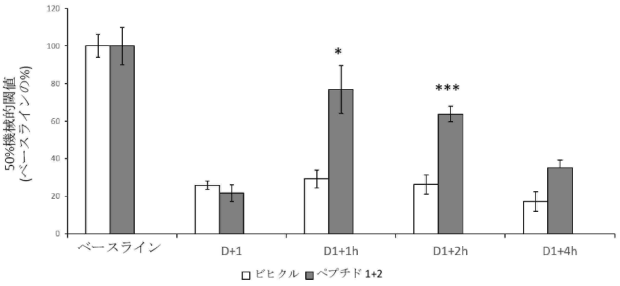


FIGURE 9

【図１０】

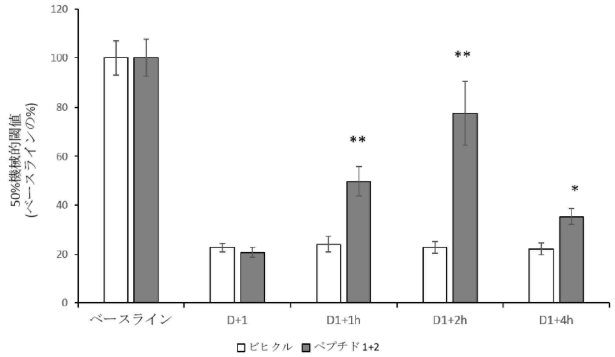


FIGURE 10

【配列表】

2025519127000001.xml

【国際調査報告】

International application No.
PCT/EP2023/064091

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

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. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/064091

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K38/17 A61P25/04 A61P29/00 C07K14/47 C07K14/52
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K A61P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, INSPEC, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/180853 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; UNIV AIX MARSEILLE [FR]) 13 November 2014 (2014-11-13) cited in the application the whole document claims; examples; compound TAFA4	1-16
Y	WO 2006/013462 A2 (NSGENE AS [DK]; PETERSEN THOMAS NORDAHL [DK] ET AL.) 9 February 2006 (2006-02-09) the whole document claims; examples; compound NsG28; sequence 6	1-16
Y	US 2018/110829 A1 (MOQRICH AZIZ [FR] ET AL) 26 April 2018 (2018-04-26) the whole document claims; examples; compound TAFA4	1-16

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] 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
"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
25 July 2023	01/08/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Orlando, Michele

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/064091

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2019/017089 A1 (MOQRICH ABDELAZIZ [FR]) 17 January 2019 (2019-01-17) the whole document -----	1-16
A	CN 103 382 220 A (UNIV BEIJING) 6 November 2013 (2013-11-06) the whole document compound FAM19A4 -----	1-16

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/064091

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014180853 A1	13-11-2014	CA 2910652 A1	13-11-2014
		CN 105209056 A	30-12-2015
		DK 2994157 T3	24-08-2020
		EP 2801369 A1	12-11-2014
		EP 2994157 A1	16-03-2016
		ES 2813629 T3	24-03-2021
		JP 6487419 B2	20-03-2019
		JP 2016519138 A	30-06-2016
		US 2016113996 A1	28-04-2016
		US 2018110829 A1	26-04-2018
		WO 2014180853 A1	13-11-2014
WO 2006013462 A2	09-02-2006	US 2009136552 A1	28-05-2009
		WO 2006013462 A2	09-02-2006
US 2018110829 A1	26-04-2018	CA 2910652 A1	13-11-2014
		CN 105209056 A	30-12-2015
		DK 2994157 T3	24-08-2020
		EP 2801369 A1	12-11-2014
		EP 2994157 A1	16-03-2016
		ES 2813629 T3	24-03-2021
		JP 6487419 B2	20-03-2019
		JP 2016519138 A	30-06-2016
		US 2016113996 A1	28-04-2016
		US 2018110829 A1	26-04-2018
		WO 2014180853 A1	13-11-2014
US 2019017089 A1	17-01-2019	CA 3013681 A1	14-09-2017
		CN 108699604 A	23-10-2018
		JP 2019512213 A	16-05-2019
		US 2019017089 A1	17-01-2019
		WO 2017153424 A1	14-09-2017
CN 103382220 A	06-11-2013	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

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）
Ｃ１２Ｎ	*15/63*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*5/10*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ｃ０７Ｋ	*14/52*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/52		
Ｃ１２Ｎ	*15/19*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/19		
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		

,MC,ME,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,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

ュ・アンリ・トマジ・７４・バティマン・ル・ミストラル

(72)発明者　ステファーヌ・ガイヤール

フランス・１３００７・マルセイユ・アヴニュ・デュ・ジェネラル・グロセティ・４

Ｆターム（参考）　4B065　AA90X AA93Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA44
4C076　CC01 DD59S FF63
4C084　AA02 BA01 BA08 BA19 BA23 CA18 MA02 MA52 MA56 MA60 MA63 MA65 MA66 NA14 ZA08 ZC75
4C087　AA01 AA02 BB65 MA02 MA52 MA56 MA60 MA63 MA65 MA66 NA14 ZA08 ZC75
4H045　AA10 AA30 BA10 BA19 CA40 DA01 EA20 FA74