

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6000245号
(P6000245)

(45) 発行日 平成28年9月28日 (2016. 9. 28)

(24) 登録日 平成28年9月9日 (2016. 9. 9)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 14/46 (2006. 01)

C O 7 K 14/46 Z N A

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 16 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-521194 (P2013-521194)
 (86) (22) 出願日 平成23年7月26日 (2011. 7. 26)
 (65) 公表番号 特表2013-535965 (P2013-535965A)
 (43) 公表日 平成25年9月19日 (2013. 9. 19)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2011/051800
 (87) 国際公開番号 WO2012/022894
 (87) 国際公開日 平成24年2月23日 (2012. 2. 23)
 審査請求日 平成26年6月24日 (2014. 6. 24)
 (31) 優先権主張番号 1003136
 (32) 優先日 平成22年7月26日 (2010. 7. 26)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

前置審査

(73) 特許権者 513019379
 セントレ ナショナル デ ラ リシエル
 シェ サイエнтиフィック
 Centre National De
 La Recherche Scient
 ifique
 フランス国 75794 パリ セデック
 ス 16, リュ ミシェル アンジュ
 3
 3, rue Michel Ange, P
 aris Cedex 16, 75794
 France
 (74) 代理人 100107766
 弁理士 伊東 忠重

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 鎮痛作用とASICチャンネルを阻害する新規ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ペプチドであり、前記ペプチドは、アミノ酸配列 L K C X⁴ Q H G K V V T C H R D M
 K F C Y H N T G M P F R N L K L I L Q G C S S S C S E T E N N K C C S T D R C N
 K (配列番号 1) を持ち、X⁴ は、Y 又は F を表す、アミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 2】

前記ペプチドは少なくとも1つのASICチャンネルのブロッカーである、請求項1に
 記載のペプチド。

【請求項 3】

前記ペプチドが、ASIC1a及びASIC1bサブユニットからなる群から選択され
 る少なくとも1つのサブユニットを含む少なくとも1つのASICチャンネルのブロッ
 カーである、請求項2に記載のペプチド。

【請求項 4】

前記ペプチドが、ホモメリックASIC1aチャンネル、ホモメリックASIC1bチ
 ャンネル、ヘテロメリックASIC1a+ASIC1bチャンネル及び/又はヘテロメリ
 ックASIC1a+ASIC2aチャンネルのブロッカーである、請求項3に記載のペプ
 チド。

【請求項 5】

請求項1乃至4のいずれか一項に記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む
 ポリヌクレオチド。

10

20

【請求項 6】

ヌクレオチド配列：a t g a a a c t c t g c t g c c t t g c t g g t g
 g t g a c a a t c g t g t g c c t a g a c t t a g g a t a c t c c c t g a a a t
 g t ^{7 3} t x x ^{7 5} c a a c a t g g t a a a g t t g t g a c t t g t c a t c g a g
 a t a t g a a g t t t t g c t a t c a t a a c a c t g g c a t g c c t t t t c g
 a a a t c t c a a g c t c a t c c t a c a g g g a t g t t c t t c t t c g t g c
 a g t g a a a c a g a a a a c a a t a a g t g t t g c t c a a c a g a c a g a t
 g c a a c a a a t a g (配列番号 4) ; 又は
 c t g a a a t g t ^{1 0} t x x ^{1 2} c a a c a t g g t a a a g t t g t g a c t t g t
 c a t c g a g a t a t g a a g t t t t g c t a t c a t a a c a c t g g c a t g c
 c t t t t c g a a a t c t c a a g c t c a t c c t a c a g g g a t g t t c t t c
 t t c g t g c a g t g a a a c a g a a a a c a a t a a g t g t t g c t c a a c a
 g a c a g a t g c a a c a a a t a g (配列番号 22) ; を含み、配列中 ^{7 3} t x x ^{7 5}
⁵ 及び ^{1 0} t x x ^{1 2} が、t a c、t a t、t t t 又は t t c を表す、請求項 5 に記載の
 ポリヌクレオチド。

10

【請求項 7】

請求項 5 又は 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のベクターであり、前記ベクターが発現ベクターである、ベクター。

【請求項 9】

請求項 7 又は 8 のいずれか一項に記載のベクターを含む宿主細胞。

20

【請求項 10】

請求項 1 乃至 4 のいずれか一項に記載の 1 以上のペプチドを含む医薬組成物。

【請求項 11】

医薬として使用されるための、請求項 1 乃至 4 のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 12】

前記医薬が鎮痛剤である、請求項 11 に記載の使用されるためのペプチド。

【請求項 13】

前記鎮痛剤が、A S I C チャンネルの活性化を含む痛みもしくは病態の予防もしくは治療のためである、請求項 12 に記載の使用されるためのペプチド。

30

【請求項 14】

前記 A S I C チャンネル活性化を含む痛みもしくは病態が、炎症性、神経障害、癌関連、術後関連、筋骨格、及び内臓痛み、炎症、癌、線維筋痛症及び過敏性腸症候群からなる群から選択される、請求項 13 に記載の使用されるためのペプチド。

【請求項 15】

前記医薬が、うつ病、不安症、脳卒中、癲癇、中枢炎症及び神経変性疾患からなる群から選択される中枢神経疾患の予防及び治療のために使用される、請求項 11 に記載の使用されるためのペプチド。

【請求項 16】

前記医薬が、中枢内に、皮下、経皮的に、全身、経口又は呼吸経路を介して、投与される、請求項 11 乃至 15 のいずれか一項に記載の使用されるためのペプチド。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は新規ペプチドに関連し、これは鎮痛を誘導し、かつ A S I C 1 a チャンネル (酸感受性イオンチャンネル) を阻害するものであり、より具体的にはホモメリック A S I C 1 a、ホモメリック A S I C 1 b チャンネル及び / 又はヘテロメリックチャンネルであって少なくとも 1 つの A S I C 1 a 及び A S I C 1 b から選択されるサブユニットを持ち、前記ペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びまた、医薬組成物、宿主細胞及びそ

50

れに含まれるペプチド、に関する。特に、前記ペプチドは、配列表の配列番号1のアミノ酸配列と最低限56%同一性を示す。これらは、特に2つの57-アミノ酸ペプチドA S I C a i g e n - 1 (- D p 1) と A I S C a l g i n - 2 (- D p 2) であり、これは蛇ブラックマンバ(ブラックマンバ)から単離され、配列番号2と3にそれぞれ対応する。

【0002】

本発明はまた、それらの診断用ツール又は医薬、特に鎮痛薬を得るための使用、及びA S I Cチャンネルを阻害する鎮痛分子の同定のための使用に関する。

【0003】

本発明は、特に次の痛み、即ち、A S I C Sチャンネル(例えば、炎症、神経障害、癌関連、術後、筋骨格系、内蔵などの痛み)の活性化に伴う痛み、中枢神経疾患(例えば、心的外傷後ストレス、うつ病、不安、心臓発作、癲癇、多発性硬化症、脳炎症、神経変性疾患など)、及びA S I Cチャンネルの関与が提案されている病的状態(例えば、炎症、癌、線維筋痛症、過敏性腸症候群など)の防止及び治療において応用される。

【0004】

以下明細書で、カッコ内の参照番号は、最後にまとめた参考文献番号である。

【背景技術】

【0005】

痛みの処置を考慮することは、患者の生活品質改善のために本質的な側面である。痛みは、欧州では毎年約6千万人の相当数の個人の影響を与えており、これ痛みを処置するための鎮痛薬での年間コストが1億ドルであることを表す。世界中で鎮痛薬に費やす年間費用は、約25億ドルであり、2010年には42億ドルに達するものとなる。痛みは2つのカテゴリーに分類される：急性と慢性の痛みである。急性の痛みは、時間的に制限された急激かつ短い痛みである。逆に、慢性の痛みは、持続性であり、例えば痛覚過敏にリンクしており、大きな疾患負担となり、大人の約20%及び高齢者の約50%に影響を与えている。

【0006】

痛みの処置は本質的に抗炎症剤に基づくものであり、これは非ステロイド系(N S A I D)又はステロイド系(コルチコイド)のいずれかであり、弱い又は強いアヘンに基づく。N S A I Dは、世界中で最も広く処方される治療薬の部類であり、これは炎症及び痛み自体の両方に効果があるからである。これらは、急性であっても慢性であっても炎症性痛みの全てのタイプに使用される(B e r t i n a n d V e r g n e - S a l l e , 2007)[1])。N S A I D及び/又はコルチコイドが炎症性痛みを十分緩和しない場合には、処方する医者は、非抗炎症鎮痛剤、例えばパラセタモール、弱いアヘン(コデイン、トラマドル)を組み合わせ、及び前記痛みがかかる処理でも続く場合には、強いアヘン(モルヒネ、オキシコデイン、フェンタニル)を組み合わせる([G u t s t e i n & A k i l , 2006][2])。

【0007】

N S A I Dが非常に効果的である一方で、それにもかかわらずこれらは大きな副作用をももたらす。最も普通の副作用には、消化不良がしばしば見られることから、N S A I Dの使用が多くの臨床状態では制限されている。また、腎臓、皮膚、粘膜、アレルギー及び呼吸器、血液、肝臓などの起こり、最終的には感覚神経及び心理的に悪い副作用が存在する([B e r t i n a n d V e r g n e - S a l l e , 2007, m e n t i o n e d a b o v e][1])。さらに、N S A I Dは、全てのタイプの痛みには効果的ではない。アヘンはまた、痛みを抑える主な役割を果たすが、幻覚症状と心肺機能低下をもたらす。鎮痛薬はまた、依存性、例えばモルヒネ、メタドン依存症の原因となり得る。これらはまた鎮痛薬への慣れの原因となり、即ち、一定の効果を得るために投与量が増加する必要がある。この慣れは時間とともに強くなり、従って、投与量の増加をさらに必要とし、薬物がその効果を失うこととなる。実際、痛みを抑える必要のある投与量は、前記薬

10

20

30

40

50

物の毒性量よりも大きくなり得る。最終的に、アヘンでの処置はまた、治療が停止される場合に重度の便秘又は痛覚過敏などの悪影響を与える（例えば術後痛み）（Gutstein & Akil、2006、mentioned above; Bannister & Dickenson、2010）[2、3]）。

【0008】

既存の治療薬の多様性にもかかわらず、多くのタイプの痛みが知られている薬物には比較的効果的ではなく、例えば、神経系の障害に続く神経痛（50%の患者が開放されていない）、過敏性腸症候群又は慢性炎症腸疾患、線維筋痛症などの慢性内蔵痛及び癌及び骨移植に伴う痛みなどである（[Yennurajalingam et al.、2004; Mizoguchi et al.、2009] [4、5]）。

10

【0009】

この意味で、これらの欠点を解消する新規鎮痛薬の発見及び/又は新規鎮痛目標は、真実の発展を示すべきである。痛みについての医薬業界の研究は過去数年においていくつかの限定的進歩にとどまってきた。例えば、片頭痛に対してはトリプタンが注目され、なお限定的であるが新規薬物が、例えば癌関連及び神経因性痛みに対してテトラヒドロカンナビノール及びカンナビジオールの組合せなどである。事実、過去20年間でなされた進歩は、本質的に前記利用可能な鎮痛薬のより好ましい使用及び投与量の調整からなされたものである。これらの鎮痛薬の主要なファミリーのどれもが、限定的効果及び/又は相当な副作用のために最適な効果/リスク比を持たない。

【0010】

20

過去数年の同定された分子目標の中で、イオンチャンネルは特に重要な位置を占めるが、それはそれらが感覚中枢神経による痛みシグナリの検出及び伝達に關与するからである。ASICチャンネル（酸感受性イオンチャンネル）は、細胞外媒体の酸性化により活性化されるカチオンチャンネル（細胞外アシドーシス）である（Waldmann & Lazdunski、1998; Wemmie et al.、2006; Lingueglia et al.、2007）[6、7、8]）。これまで、少なくとも7つのサブユニット（ASIC1a、ASIC1b、ASIC1b2、ASIC2a、ASIC2b、ASIC3及びASIC4）をコードする4つの遺伝子が哺乳類で同定されている。機能性ASICチャンネルは、トリマーとして種々のASICサブユニットの關与により生じており（[Jasti et al.、2007] [9]）、ホモメリック又はヘテロメリックチャンネルとなる（[Lingueglia et al.、1997; Benson et al.、2002; Hesselager et al.、2004] [10、11、12]）。ASICチャンネルは、本質的に末梢神経系の侵害受容感覚神経で発現される（Waldmann et al.、1997a; Lingueglia et al.、2007、mentioned above; Noel et al.、2010）[13、8、14]）。ASIC1a及びASIC2イソフォームは、中枢神経系及び末梢神経系の両方に存在するが、ASIC1b及びASIC3の発現は感覚ニューロンに限定されている（Waldmann et al.、1997b; Bassler et al.、2001; Chen et al.、1998）[15、16、17]）。

30

40

【0011】

次の仮説がなされている、即ち、感覚ニューロンで発現されるASICチャンネル、特にASIC3チャンネルは、虚血、炎症、血腫、骨折、病変、外科手術（術後痛み）又はある種の腫瘍の進展の際に細胞外酸性化を検出することが可能であるということである（Reeh and Steen、1996）[18]）。次のことが偶然に知られて数年になる、即ち、細胞外酸性化が痛みを起こすこと（Steen et al.、1995a; Issberner et al.、1996）[19、20]）、及び健康なヒトのボランティアで実施された実験で、酸性皮膚痛みにおけるASICチャンネルの關与が示されたことであり、これはアミロリド及びASICチャンネルの非特異的インヒビターであるNSAIDの手段によりなされた（[Waldmann et al.、

50

、 1997a、 mentioned above; Voilley et al.、 2001][13、23])。神経活動(扁桃体の、海馬のシナプス可塑性)での中枢神経系ニューロンで発現されるある種のASICチャンネルの重要な役割、及び脊髄ニューロンによる痛み情報の伝達の神経変調(ASIC1aチャンネル)がまた示された([Noel et al.、 2010][14])。

【0012】

最近まで、ASICチャンネルを阻害可能な活性リガンドの範囲は、アミロリド、ある種のNSAID及び化合物A-317567に限定されていた([Dube et al.、 2005][24])。しかし、これらのどの分子も、ASICチャンネル又は特定のASICサブユニットに完全には特異的ではなかった。ASICチャンネル特異的エフェクターの同定を目的として、多数のサソリ、蜂、蜘蛛、蛇又はイソギンチャクの毒が調べられてきた。最近、2つの動物性ペプチド毒、PcTx1及びAPETx2が同定され、これらはホモメリックASC1aチャンネル及びASIC3サブユニットを含むチャンネルをそれぞれ阻害する(Escoubas et al.、 2000; Diochot et al.、 2004)[25、26])。APETx2の末梢(皮下)注射は、ラットで炎症性及び酸性痛みに対し([Deval et al.、 2008][27])及び

APETx2の術中塗布のりの術後痛みに対し([Deval et al.、 J. Neurosci.、 31(16): 6059-6066、 2011][36])鎮痛効果を誘導し、一方でPcTx1の中央注射はマウスで強力な鎮痛作用を誘導した([Mazzuca et al.、 2007][28])。これらの2つの毒物の鎮痛作用は、痛み情報の受容及び伝達におけるASICチャンネルの関与を示すものである。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Bertin and Vergne-Salle、 "Traitements medicamenteux de l'inflammation et des douleurs inflammatoires" ["Drug treatments for inflammation and inflammatory pain"] UP SA Pain Institute - A Editorial Paris、 p.113-132、 2007

【非特許文献2】Gutstein and Akil、 "Opioid analgesics"、 in "The Pharmacological Basis of Therapeutics" Brunton et al.、 Eds. McGraw-Hill、 2006.

【非特許文献3】Bannister & Dickenson、 Curr. Opin. Support Palliat. Care、 4: 1-5、 2010

【非特許文献4】Yennurajalingam et al.、 Support Cancer Ther.、 1: 97-110、 2004

【非特許文献5】Mizoguchi et al.、 Int. Rev. Neurobiol.、 85: 249-260、 2009

【非特許文献6】Waldmann and Lazdunski、 Curr. Opin. Neurobiol.、 3: 418-424、 1998

【非特許文献7】Wemmie et al.、 Trends Neurosci.、 29: 578-586、 2006

【非特許文献8】Lingueglia et al.、 J. Biol. Chem.、 282: 17325-17329、 2007

【非特許文献9】Jasti et al.、 Nature、 449: 316-323、 2007

10

20

30

40

50

【非特許文献10】Lingueglia et al., J. Biol. Chem., 272: 29778-29783、1997

【非特許文献11】Benson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95: 10240-10245、2002

【非特許文献12】Hesselager et al., J. Biol. Chem., 279: 11006-11015、2004

【非特許文献13】Waldmann et al., Nature, 386: 173-177、1997a

【非特許文献14】Noel et al., "Current perspectives on acid-sensing ion channels: new advances and therapeutic implications" Expert Rev. Clin. Pharmacol. "Clinical Pharmacology of Ion Channels", 3: 331-346、2010

10

【非特許文献15】Waldmann et al., J. Biol. Chem., 272: 20975-20978、1997b

【非特許文献16】Bassler et al., J. Biol. Chem., 276: 33782-33787、2001

【非特許文献17】Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95: 10240-10245、1998

20

【非特許文献18】Reeh and Steen, Prog. Brain Res., 113: 143-151、1996

【非特許文献19】Steen et al., Neurosci. Lett., 199: 29-32、1995a

【非特許文献20】Issberner et al., Neurosci. Lett., 208: 191-194、1996

【非特許文献21】Ugawa et al., J. Clin. Invest., 10: 1185-1191、2002

【非特許文献22】Jones et al., J. Neurosci., 24: 10974-10979、2004

30

【非特許文献23】Voilley et al., J. Neurosci., 21: 8026-8033、2001

【非特許文献24】Dube et al., Pain, 117: 88-96、2005

【非特許文献25】Escoubas et al., J. Biol. Chem., 275: 25116-25121、2000

【非特許文献26】Diochot et al., EMBO J., 23: 1516-1525、2004

【非特許文献27】Deval et al., EMBO J., 27: 3047-3055、2008

40

【非特許文献28】Mazzuca et al., Nature Neuroscience, 10: 943-945、2007

【非特許文献29】Deval et al., J. Neurosci., 31(16): 6059-6066、2011

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

従って、ASICチャンネル又は特定のASICサブユニットに特異的であり、鎮痛効果を持ち、一方で同時に、従来の鎮痛薬の依存性、欠点及び障害を解消する、他のエフェクターを同定する真の必要性がある。

50

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明者は、ブラックマンバ蛇の毒から、新規なペプチドであって、鎮痛効果を誘導し、ASICチャンネル（酸性感受性イオンチャンネル）、より具体的にはホモメリックASIC1aチャンネル、ホモメリックASIC1bチャンネル、ヘテロメリックASIC1a+2aチャンネル及びヘテロメリックASIC1a+1bチャンネルを阻害するペプチドを見出し、同定した。

【0016】

これらは特にペプチドASICalgln-1（-Dp1）及びASICalgln-2（-Dp2）であり、これらは、マウスにインピボで中央（髄腔内及び脳室内）注射後、異なる痛みモード（化学的、熱的、炎症性）で強い鎮痛効果を示し、これはモルヒネと同等であるが、アヘンレセプター活性とは独立している。さらに、これらのペプチドは、中央に注射した場合に神経毒性を示さない。皮下抹消注射による投与の場合、これらのペプチドはまた鎮痛効果を持ち、炎症性痛覚過敏を回復させた。これらの2つのペプチドは、鎮痛効果を持つ、ブラックマンバ蛇毒から抽出された最初のペプチドである。

【0017】

この説明に限定されるものではないが、これらのペプチドの最も可能性のあるメカニズムは、ASICイオンチャンネルの阻害であり、ASICイオンチャンネルは痛み情報の受容、伝達及び変調において重要な役割を演じている。事実、これらのペプチドは効果的に、ラット及びヒトの、ASIC1aチャンネル、ホモメリックASIC1bチャンネル及び/又はASIC1a及び/又はASIC1bサブユニットを含むのヘテロメリックチャンネルを阻害する。これらの2つのペプチドは、特に、ホモメリックASIC1b及びASIC1aチャンネル及びヘテロメリックASIC1a+ASIC1b及びASIC1a+ASIC2aチャンネルの最初に知られたインヒビター（阻害剤）である。

【0018】

前記ASICalgln-1（-Dp1）及びASICalgln-2（-Dp2）ペプチドはまた、感覚ニューロン及び中枢神経ニューロンに存在するASICの伝達を阻害する。これらは、これ自体が痛み受容に関与する、カプサイシン及び熱により活性化されるTRPV1伝達への効果を持たない。これらは、基底状態でのニューロンの電氣的性質を変更せず、ASICチャンネル活性化可能な細胞外酸性化に応じるニューロン興奮可能性を低下させる。

【0019】

ASICalgln-1（-DP1）及びASICalgln-2（-DP2）ペプチドは従って、げっ歯類では、モルヒネと匹敵する強力な鎮痛性を持ち、これはアヘンレセプターがブロックされている場合でも観察され、このことはある種類のげっ歯類及びヒトASICチャンネルを特異的に阻害することができるということで説明され得る。前記ペプチドの中央注射は、毒性を示さず（神経毒性、痙攣など）、運動活性（加速ローターロッド試験）にもなんら効果を持たない。

【0020】

ASICalgln-1（-DP1）及びASICalgln-2（-DP2）ペプチドは、従って、人の痛みに対する治療可能性を持つ分子に含まれ得る（例えば、癌関連痛み、神経因性痛み、術後痛みなど）。

【0021】

本発明の対象は従ってペプチドであって：

(i) アミノ酸配列

L K C X⁴ Q H G K V V T C H R D M K F C Y H N T G M P F R N L K L I L Q G C S S
S C S E T E N N K C C S T D R C N K（配列番号1）

（配列中X⁴は、いずれかのアミノ酸を表す）；又は

(ii) 配列番号1と少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、好適には少なく

10

20

30

40

50

とも80%、最も好ましくは少なくとも98%の同一性を示す天然又は合成配列であって、上記配列番号1のペプチドの生物学的性質を保持するものであり、即ち、鎮痛効果を誘導し、前記ASIC1a及びASIC1bサブユニットとからなる群から選択される少なくとも1つのサブユニットを含む少なくとも1つのASICチャンネルを阻害する配列、を有するペプチドである。

【0022】

本発明による前記ペプチドは、より具体的には、ホモメリックASIC1aチャンネル、ホモメリックASIC1bチャンネル及び/又は前記ASIC1a及びASIC1bサブユニットとからなる群から選択される少なくとも1つのサブユニットを含むヘテロメリックASICチャンネル、特にヘテロメリックASIC1a+ASIC1bチャンネル及び/又はヘテロメリックASIC1a+ASIC2aチャンネルのブロッカーとして作用する。

10

【0023】

本発明の目的で、用語「ブロッカー」とは、前記チャンネルによる生成される伝達を濃度依存的に阻害することができるペプチドを意味する。例えば、PcTx1([Escoubas et al., 2000, mentioned above][25])などのペプチドは、1nM濃度でホモメリックASIC1aチャンネルにより生成される伝達の50%を阻害することができ、又はPcTx2([Diochot et al., 2004, mentioned above][26])などのペプチドは、2μM濃度でラットで、ヘテロメリックASIC1a+ASIC3チャンネルにより生成される伝達の50%を阻害することができる。

20

【0024】

好ましくは、本発明の前記ペプチドは、蛇マンバ属ブラックマンバから抽出される。例えば、これらは、前記毒から、逆極性高性能液体クロマトグラフ(RP-HPLC)手段により連続的に分離して得られる。前記ペプチドはまた、DNA組み換え方法、又は化学的合成で製造され得る。

30

【0025】

好ましくは、本発明の前記ペプチドは、ASICα1gln-1(-Dp1)又はASICα1gln-2(-Dp2)ペプチドを含み、これらは、配列番号1の配列を持ち、ここでX⁴はそれぞれY又はFである(それぞれ配列番号2及び3)。

【0026】

本発明の課題はまた、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドである。

【0027】

好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、配列：

a t g a a a a c t c t g c t g c t g a c c t t g c t g g t g g t g a c a a t c g
t g t g c c t a g a c t t a g g a t a c t c c c t g a a a t g t ^{7 3} t x x ^{7 5} c
a a c a t g g t a a a g t t g t g a c t t g t c a t c g a g a t a t g a a g t t
t t g c t a t c a t a a c a c t g g c a t g c c t t t t c g a a a t c t c a a g
c t c a t c c t a c a g g g a t g t t c t t c t t c g t g c a g t g a a a c a g
a a a a c a a t a a g t g t t g c t c a a c a g a c a g a t g c a a c a a a t a
g (配列番号4)；

40

又は

c t g a a a t g t ^{1 0} t x x ^{1 2} c a a c a t g g t a a a g t t g t g a c t t g t
c a t c g a g a t a t g a a g t t t t g c t a t c a t a a c a c t g g c a t g c
c t t t t c g a a a t c t c a a g c t c a t c c t a c a g g g a t g t t c t t c
t t c g t g c a g t g a a a c a g a a a a c a a t a a g t g t t g c t c a a c a

50

g a c a g a t g c a a c a a a t a g (配列番号22);であり、
ここで⁷ t x x⁷及び¹⁰ t x x¹²はt a c、t a t、t t t又はt t cを表す。

【0028】

好ましくは、本発明の前記ポリヌクレオチドは、ストリンジェントな条件で、配列番号4又は配列番号22の核酸配列とハイブリダイズできる核酸配列又はその相補的配列を含む。例えば、配列番号4又は配列番号22の配列と少なくともとも76%、好ましくは少なくともとも80%、最も好ましくは98%の同一性を示す天然又は合成配列を含むポリヌクレオチドである。

【0029】

本発明の課題はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターである。

10

【0030】

好ましくは前記ベクターは発現ベクターである。

【0031】

本発明の課題はまた、本発明の1以上を含む、本発明のポリヌクレオチド又は本発明のベクターを含む宿主細胞である。

【0032】

本発明の課題はまた、本発明の1以上のペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター又は本発明の宿主細胞を含む医薬組成物である。本発明の医薬組成物はまた、1以上の薬学的に許容される担体(炭酸カルシウム、澱粉、タルク、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、アカシアゴムなど)を含んでよく、かつ溶液、懸濁、ペースト、ゲルカプル、錠剤、カプセル、粉末、顆粒、凍結乾燥物、制御徐放性剤、ミクロ粒子、ミクロ又はナノスフェア、リポソームなどの剤形であり得る。本発明による医薬組成物は、経口、筋肉内、静脈内、皮下、局所的、肺経由、鼻腔内、直腸、舌下、皮内、腹腔内、くも膜下などに投与可能である。活性成分(本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター又は宿主細胞)の、本発明の医薬組成物中での有効量は、有効投与量が得られるように及び鎮痛量が哺乳類に投与されるように変更し得るものである。特定の哺乳類へ投与される量は、いくつかの因子で決定され、例えば:投与経路、処置期間、哺乳類の大きさと生理的状态、活性成分の力価及び前記活性成分への哺乳類の応答性などである。例えば、くも膜下投与される活性成分の鎮痛有効量は、一般に、約5 ng/kgから500 µg/kg(哺乳類の体重)の範囲、好ましくは約50 ng/kgから50 µg/kg(哺乳類の体重)、最も好ましくは約500 ng/kgから5 µg/kg(哺乳類の体重)の範囲である。活性成分の有効量は、他の投与経路を使用する場合には変更され得る。有効鎮痛量は、哺乳類に投与されるべき活性成分の量を決定するために、活性成分を以下説明する1以上の痛み試験を行い、その投与量を前記の判断基準により変更することで推定され得る。

20

30

【0033】

本発明の課題はまた、本発明のペプチド、本発明のヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の宿主細胞又は本発明の医薬組成物から選択される物質を医薬として応用することである。

【0034】

好ましくは、前記医薬は、鎮痛剤であり、例えば、ASICチャンネル特に、前記ASIC1a及びASIC1bサブユニットからなる群から選択される少なくとも1つのサブユニット、最も好ましくはホモメリックASIC1aチャンネル、ホモメリックASIC1bチャンネル、ヘテロメリックASIC1a+ASIC1bチャンネル及び/又はヘテロメリックASIC1a+ASIC2aチャンネルを含むASICチャンネルの活性化に伴う痛みの防止及び治療のための使用である。例えば、前記痛みは(i)中枢又は末梢ASICをチャンネルの活性化から生じるか又は(ii)その活性化を誘導する。例えば、前記痛みは、ASICチャンネル活性化を伴う痛みであり、炎症性、神経性、癌関連性、術後関連、筋骨格系、内臓系などの痛みからなる群から選択される。

40

【0035】

好ましくは、前記医薬は、例えば、ASICチャンネル特に、前記ASIC1a及びA

50

S I C 1 b サブユニットからなる群から選択される少なくとも1つのサブユニット、最も好ましくはホモメリック A S I C 1 a チャンネル、ホモメリック A S I C 1 b チャンネル、ヘテロメリック A S I C 1 a + A S I C 1 b チャンネル及び/又はヘテロメリック A S I C 1 a + A S I C 2 a チャンネルを含む A S I C チャンネルの活性化に伴う病的症状防止及び治療のための使用である。例えば、前記症状は、炎症、癌、線維筋痛症、過敏性腸症候群などの症状である。

【0036】

好ましくは、前記医薬は、例えば心的外傷後ストレス、うつ病、不安、発作、癲癇、中央炎症、多発性硬化症、神経変性疾患などからなる群から選択される中枢神経系疾患の予防及び治療のためである。

10

【0037】

好ましくは、前記医薬は、非経口で、即ち局所的又は中央（腹腔内、硬膜外腔内、髄腔内、脳室内、皮内など）及び全身（筋肉内、静脈内、皮下など）、経口、曲種的（経皮など）又は呼吸系（呼吸など）を介して投与される。最も好ましくは、前記医薬は、髄腔外腔内、硬膜内、脳室内、又は腹腔内投与である。

【0038】

本発明の課題はまた、本発明のペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の宿主細胞又は本発明の医薬組成物から選択される物質の診断用ツールとしての使用である。

【0039】

20

本発明の課題はまた、本発明のペプチドの鎮痛活性を模倣する化合物の同定の方法であり、前記方法は次のステップ：

- (a) 本発明によるペプチドの鎮痛活性を決定し；
- (b) 候補化合物の鎮痛活性を決定し；
- (c) ステップ (a) 及び (b) で得られた鎮痛活性とを比較し；及び
- (d) 本発明のペプチドと同等又はそれを超える活性を持つ候補化合物を選択するステップ、とを含む。

【0040】

本発明の課題はまた、本発明のペプチドの鎮痛活性を模倣する化合物を同定するための方法であり、前記方法は次にステップ：

30

- (a) 本発明のペプチドをサンプルと接触させ、前記サンプルとの前記ペプチドの結合を測定し；
- (b) 候補化合物を添加し、及び前記サンプルと前記ペプチドとの結合への前記化合物の効果を評価し；
- (c) 前記サンプルと前記ペプチドとの結合を変動させることができる候補化合物を選択する、ステップを含む。

【0041】

本発明の目的で、表現「本発明のペプチドの鎮痛活性を模倣する化合物」とは、次のような候補化合物を意味することを意図しており、鎮痛を誘導することができ、及び本発明のペプチドが結合する A S C I チャンネルに結合し、又は本発明のペプチドと同一又は類似の生理的方法で作用することができ、即ち、前記 A S I C 1 a 及び A S I C 1 b サブユニットからなる群から選択される少なくとも1つのサブユニット、特にホモメリック A S I C 1 a チャンネル、ホモメリック A S I C 1 b チャンネル、ヘテロメリック A S I C 1 a + A S I C 1 b チャンネル及び/又はヘテロメリック A S I C 1 a + A S I C 2 a チャンネルを含む少なくとも1つのチャンネルで生成される伝達を、可逆的にかつ用量依存的に変調（阻害又は刺激）することができる、候補化合物である。例えば、それは P c T x 1 ([E s c o u b a s e t a l . , 2 0 0 0 , m e n t i o n e d a b o v e] [2 5]) などのペプチドを含み、これは 1 n M 濃度で、50%のホモメリック A S I C 1 a チャンネルにより生成される伝達を阻害することができ、又は A P E T x 2 ([D i o c h o t e t a l . , 2 0 0 4 , m e n t i o n e d a b o v e] [

40

50

26]) などのペプチドは、2 μ M の濃度で、50 % のラットヘトロメリックASIC1a + ASIC3 チャンネルを阻害する。

【0042】

本発明の目的で、用語「サンプル」とは、昆虫又は哺乳類の全有機体又は不死化細胞から前もって分離された細胞又は組織を意味する。

【0043】

用語「鎮痛活性」とは、以下で説明される痛みの試験又は鎮痛評価のための従来の実験室モデルにより示されるような、本発明のペプチドの哺乳類の痛みを処置又は軽減するための容量を意味する。従って、本発明のペプチドの鎮痛活性は例えば次の方法で決定され得る、

(i) 尾 / 足引っ込み時間 (熱侵害測定) ([Abbott et al . , 1982 ; Cridland and Henry , 1992] [29 , 30]) 、
(ii) 熱 / 冷プレート閾値 (熱侵害測定) ([Woolfe and Macdonald , 1944 , Ankier , 1974] [31 , 32]) 、
(iii) フォンフレイフィラメント閾値又はランドール - セリット又は装置ピンチ試験 (機械的侵害活性測定) ([Kim et al . , 1993] [33]) 。

(iv) 動的重量分布試験 (姿勢リンク侵害活性測定) 、

(v) 自発的侵害挙動の測定、及び / 又は 1 以上のインビトロ試験：例えば、候補化合物の選別を次のように行う、ラベル化 (例えば、C14、H3 又は I125 などの放射性元素ラベル、パーオキシダーゼ又はアルカリ又は酸ホスファターゼの酵素ラベル、FITC 又はローダミンなどの蛍光ラベル、抗体、抗原、ビオチン、常磁性イオン、ラテックス粒子などで) した本発明のペプチドを前記サンプルと結合することができる条件下でサンプルと接触させ、前記サンプルに結合した前記ラベル化ペプチドの結合を測定し、および、前記ラベル化ペプチドの活性を模倣する前記化合物が前記レセプター (ASIC1a 及び ASIC1b サブユニットからなる群から選択される少なくとも 1 つを含む ASIC チャンネル) のサイトへの結合を前記ペプチドと競争させる。従って、より少ない量の検出可能なラベル剤が、前記試験化合物が前記ペプチドの活性を模倣せず前記レセプターと結合しないか、より小さい親和性で結合する場合よりも、より強く前記試験化合物が前記ペプチドの活性を、前記レセプターに結合することで模倣する場合に、測定される。又は、競争選別方法は、本発明のペプチドをラベル化する代わりに候補化合物をラベル化することで実施され得る。従って、より高い量の検出可能なラベル剤が、前記試験化合物が前記ペプチドの活性を模倣せず前記レセプターと結合しないか、より小さい親和性で結合する場合よりも、より強く前記試験化合物が前記ペプチドの活性を、前記レセプターに結合することで模倣する場合に、測定される。

【0044】

ペプチドの鎮痛活性を模倣する化合物を同定する方法の例は、例えば (これには限定されるものではないが) 米国特許第 5 877 026 [34] に記載されている。

【0045】

他の利点は、添付図面により示される以下の実施例に基づき、当業者にはより明らかなものとなる。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】図1の (A) は、蛇ブラックマンバの毒から分離された ASICalgln - 1 (- DP1) 及び ASICalgln - 2 (- Dp2) のアミノ酸配列 (それぞれ配列番号 2 、及び 3) を表し、(B) は、ASICalgln - 1 をコードする相補的 DNA (cDNA) のヌクレオチド配列 (配列番号 5) を示す。シグナル配列 (イタリック) 及び最終ペプチド (太字) (配列番号 6 参照) 及び停止コドン (*) が示される。5' 非コード末端の配列は表されていない (対応する配列番号 9) 。

【図2】図2は、ASICalgln - 1 (- Dp1) 及び ASICalgln - 2 (- Dp2) ペプチドのマウスへのインビボ鞘内注射後の鎮痛効果を示す。化学的痛み (

10

20

30

40

50

ホルマリン)：(A) 5 分間隔で測定された自発的痛み挙動の動力学、(B) 急性痛みの相 I (0 から 10 分) 及び炎症性痛みの相 II (10 から 45 分) の合計経過時間。急性熱痛み：(C) 尾引っ込み時間の速度論、(D) それぞれの動物で測定された曲線下面積 (AUC) の平均、炎症性痛覚過敏：(E) 足引っ込み時間の速度論。コントロール値に対して痛覚過敏の有意性：#、 $p < 0.05$ ；##、 $P < 0.01$ ；###、 $p < 0.001$ ；Newman Keuls 多重比較による ANOVA 試験による。(F) 痛覚過敏レベル (T - 7 分) から、それぞれの動物について測定された曲線下面積 (AUC) の平均。平均値 \pm sem (平均値の標準偏差) が表され、試験された動物数 (n) が脚注で示される。ベヒクル \pm ナキソロン (NAL) の注射又はラインで図に示されるそれぞれに対する有意性：有意性なし ns、 $p > 0.05$ ；*、 $p < 0.05$ ；**、 $p < 0.01$ ；***、 $p < 0.001$ ；Newman Keuls 多重比較による ANOVA 試験による。

10

【図 3】図 3 は、ASICalg in - 1 (- Dp1) ペプチドのマウスへのインビボ脳室内注射後の急性熱痛み試験での、鎮痛効果：(A) 尾引き込み時間の速度、(B) それぞれの動物で測定した曲線下面積 (AUC) の平均を示す。平均値 \pm sem (平均値の標準偏差) が表される。試験された動物数 (n) が脚注で示される。ベヒクルの注射又はラインで図に示されるそれぞれに対する有意性：有意性なし ns、 $p > 0.05$ ；*、 $p < 0.05$ ；**、 $p < 0.01$ ；***、 $p < 0.001$ ；Newman Keuls 多重比較による ANOVA 試験による。

【図 4】図 4 は、ASICalg in - 1 (- Dp1) ペプチドの皮下インビボ注射後の炎症性痛覚過敏試験での鎮痛効果：(A) 後ろ足引き込み時間の試験の鎮痛効果を示す。ASICalg in - 1 (- Dp1) ペプチドは、左後足の皮下に注射され、同時にカラギーナン () が再度 2 時間後に注射された (時間、0 又は T0、)。同様の手順を実施した、ただし、ASICalg in - 1 ペプチドの注射は T0 のみであり、即ち炎症性痛覚過敏の現れた後である ()。(B) 時間 T - 7 分から、それぞれの動物で推定された曲線下面積 (AUC) の平均。平均 \pm sem (平均値の標準偏差) が表される。試験された動物数 (n) が脚注で示される。ベヒクルの注射に対する有意性：*、 $p < 0.05$ ；**、 $p < 0.01$ ；***、 $p < 0.001$ ；Newman Keuls 多重比較による ANOVA 試験による。カラギーナンの注射の前のコントロール値に対しての有意性：#、 $p < 0.05$ ；##、 $P < 0.01$ ；###、 $p < 0.001$ ；ペア T -

20

30

【図 5】図 5 は、ASICalg in - 1 (- Dp1) 及び S I C a l g i n - 2 (- Dp2) ペプチドによる、COS 細胞中で異種的に発現される ASIC チャンネルによる生成される伝達の阻害を示す。それぞれ、ラットホモメリック ASIC1a 伝達の ASICalg in - 1 (- Dp1) による阻害の用量応答曲線、 $IC_{50} = 49 \text{ nM}$ (A)、ヒトホモメリック ASIC1a 伝達の ASICalg in - 1 (- Dp1) による阻害の用量応答曲線、 $IC_{50} = 127 \text{ nM}$ (B)、ラットホモメリック ASIC1b 伝達の ASICalg in - 1 (- Dp1) による阻害の用量応答曲線、 $IC_{50} = 650 \text{ nM}$ (C)、ラットヘテロメリック ASIC1a + ASIC1b (比率 1 : 1) 伝達の ASICalg in - 1 (- Dp1) による阻害の用量応答曲線、 $IC_{50} = 223 \text{ nM}$ (C)、及びラットヘテロメリック ASIC1a + ASIC1b (比率 2 : 1) 伝達の ASICalg in - 1 (- Dp1) による阻害の用量応答曲線、 $IC_{50} = 308 \text{ nM}$ (C) である。4 から 15 実験例に基づき、平均値 \pm sem (平均値の標準偏差) が表される。ASICalg in - 1 (- Dp1、 674 nM) 及び ASICalg in - 2 (- Dp2、 852 nM) による伝達阻害のオリジナルプロットが示される。(F) オリジナルプロット伝達は、ASICalg in - 2 (- Dp2、 674 nM) によるヒトヘテロメリック ASIC1a + ASICalg in - 2 (比率 2 : 1) の阻害を示す。休止電位：-60 mV、白棒：pH 7.4 から 5.5 へ低下、黒棒：ペプチドの適用。

40

【図 6】図 6 は、ASICalg in - 1 (- Dp1) 及び ASICalg in - 2 (

50

- D p 2) ペプチドによる、培地内のネズミの感覚ニューロン及び中枢ニューロンの天然 A S I C を伝達の阻害を示す。(A) A S I C a l g i n - 2 (- D p 2、8 5 2 n M、) 及び A S I C a l g i n - 1 (- D p 1、6 7 4 n M、) によるラット (n = 3 4) の感覚ニューロンの A S I C を伝達の平均阻害。右側には、休止電位 - 5 0 m V での最初の伝達、及び p H を 7 . 4 から 6 へ低下させた場合 (白棒) の記録された伝達の例を示す。前記感覚ニューロンでは、合計 A S I C 伝達は、ホモメリック A S I C 1 a 伝達、A S I C 1 b 伝達及び A S I C 3 タイプの伝達の混合からの結果である。(B) A S I C a l g i n - 2 (- D p 2、8 5 2 n M、) 及び A S I C a l g i n - 1 (- D p 1、6 7 4 n M、) によるマウス (n = 1 8) の背側脊髄ニューロンの A S I C を伝達の平均阻害。右側には、休止電位 - 5 0 m V での最初の伝達、及び p H を 7 . 4 から 6 へ低下させた場合 (白棒) の記録された伝達の例を示す。(C) (B) A S I C a l g i n - 2 (- D p 2、2 9 3 n M、8 5 2 n M 及び 2 . 9 μ M、) 及び A S I C a l g i n - 1 (- D p 1、2 2 4 n M 及び 2 . 2 μ M、) によるマウス (n = 2 6) の海馬ニューロンの A S I C を伝達の平均阻害。右側には、休止電位 - 5 0 m V での最初の伝達、及び p H を 7 . 4 から 5 . 5 へ低下させた場合 (白棒) の記録された伝達の例を示す。前記中枢ニューロン (ナウス脊髄及び海馬) では、合成 A S I C 伝達は、ホモメリック A S I C 1 a 伝達及びヘテロメリック A S I C を 1 a + A S I C 2 a 伝達の混合の結果となる。平均値 \pm s e m (平均値の標準偏差) が表される。

【図 7】図 7 は、A S I C a l g i n - 1 (- D p 1) 及び A S I C a l g i n - 2 (- D p 2) ペプチドによる、マウスの背側脊髄ニューロンの膜電位への効果を示す。(A) 自発作用電位はシナプス活性を反映するニューロンの膜電位 (点線 : 0 m V)。p H 7 . 4 から 6 への低下による A S I C 伝達の活性化は、前記ピークが作用電位をトリガーする脱分極を誘導する (拡大図)。A S I C a l g i n - 1 ペプチド (- D p 1、6 7 4 n M) の適用は、前記ニューロンの休止電位を変更せず、自発作用も変更しない。一方で、前記酸 p H 低下による誘導された脱分極は、もはや作用電位を誘導しない。(B) 電気刺激により誘発される作用電位 (上に対応する方形型伝達) 4 つの応答が重ねられており (左側図面) : 2 つの閾下脱分極と作用電位をトリガーする 2 つの他の電位 (点線 : 0 m V) である。

【実施例】

【 0 0 4 7 】

実施例 1 : 2 つのペプチド、A S I C a l g i n - 1 (- D p 1) 及び A S I C a l g i n - 2 (- D p 2) を蛇ブラックマンバからの分離

毒物及びペプチド毒の生成

凍結乾燥毒は L a t o x a n (V a l e n c e、F r a n c e) . 社から入手した。毒を酢酸 (1 %) で希釈し、それを S e p h a d e x G 5 0 樹脂を含むカラムに通して分画した。ペプチド画分を回収し、続いて高性能液体クロマトグラフ (H P L C) システムで分画した :

(1) ペプチド画分を、カチオン交換樹脂に負荷し、溶媒 p H 3 . 0 の 1 % 酢酸及び 1 M の酢酸アンモニウムで p H 勾配を付けた。A S I C a l g i n を含む画分を、6 0 % 酢酸アンモニウムから出発して流出させた。

(2) このペプチド画分を、C 1 8 逆相カラムに負荷し、内容物を、溶媒水 - 0 . 1 % T F A とアセトニトリル - 0 . 1 % T F A の間で疎水性勾配で溶出させた。A S I C a l g i n - 1 及び A S I C a l g i n - 2 ペプチドは、それぞれアセトニトリルの 2 6 % 及び 2 7 % で純粋に溶出された。

【 0 0 4 8 】

ペプチド分析

アミノ酸分析

A S I C a l g i n - 1 及び A S I C a l g i n - 2 は 2 つの塩基性イソペプチドであり、5 7 アミノ酸を持ち、8 個のシステインを持っており 4 個のジスルフィド架橋を形成しており (図 1 A、それぞれ配列番号 2 及び 3)、2 1 個のアミノ酸 (図 1 B、配列番号

6 参照) のシグナル配列が先行している。これらはお互いに、配列番号 1、2 又は 3 の 4 番目のアミノ酸の点でのみ相違する(配列番号 6 の 25 番目の位置)

クローン化によるアミノ酸配列決定

ASICalglin-1 の全アミノ酸配列(図 1 B) は、粗毒内に痕跡量存在するメッセージ RNA (mRNA) から、PCR により cDNA をクローニングすることで決定された。蛇ブラックマンバ毒(Sigma)の毒 25 mg を、溶解緩衝液(500 mM の LiCl、10 mM の EDTA、1% (重量/容積) の LiDS 及び pH 7.5 の 100 mM の トリス-HCl 緩衝液中の 5 mM のジチオスレイトール)に懸濁させた。メッセンジャー RNA を、dT25 オリゴヌクレオチドでグラフト化磁気ビーズ(Dynal、UK)の手段で補足した。このオリゴヌクレオチドを、PrimeScript™ 逆転写酵素(Takara Bio Inc.、Japan)を用いて、mRNA から cDNA への逆転写を実施するためのプライマーとして直接使用した。得られた固相 cDNA ライブラリーを、直接 N 末端配列決定に寄る前記毒の部分タンパク質配列から定められた、センス(TGTTTTCARCA YGGIAARGT、配列番号 7) 及びアンチセンス(YTTTIA RRTTICGRAAIGGCAT、配列番号 8) オリゴヌクレオチドを用いて、縮重 PCR の実施に使用された。前記ポリメラーゼによるエラーを除外するために、3 つの独立した PCR を実施し、望ましいサイズ(89 塩基対)を持つ断片を生成し、続いてこれらを pGEMTeasy ベクター(Promega)にサブクローニングして配列決定された。これらの配列により、付加 EcoRI 制限サイトを持たせた特定のセンスオリゴヌクレオチド(ACAC(GAATTC)GCTATCATTAACACTGGCAATG、配列番号 9) を合成し、同様に付加 EcoRI サイトを持たせた特定のポリ-dT30 アンチセンスオリゴヌクレオチド(ACAC(GAATTC)dT30、配列番号 10) を合成した。これらの 2 つのオリゴヌクレオチドは、PCR によって、同定目的で全 3' コード及び 3' 非コード末端を増幅することができた。3 つの独立した約 400 塩基対の PCR 生成バンドが生成され、これらを EcoRI 制限サイトで pGEMTeasy ベクターにサブクローニングすることで、ポリメラーゼにより生成されるエラーを除外して配列を決定することができた。

【0049】

3' 末端及び 5' 非コード配列にもとづいて、前記コード配列を含むセンスオリゴヌクレオチド(ACAC(GAATTC)TCCAGAGAAAGATCGCAAGATG、配列番号 11) 及びアンチセンスオリゴヌクレオチド(ACAC(GAATTC)ATTTAGCCACTCGTAGAGCTA、配列番号 12) を合成した。4 つの独立した PCR を、固相 cDNA ライブラリー上で実施し、得られた PCR 産物を再び pGEMTeasy ベクターにサブクローニングして、ASICalglin-1 毒前駆体の完全ヌクレオチド配列を得た。

【0050】

ペプチド配列

前記配列は、自動配列決定装置(LC491、Applied Biosystems、USA)で、前記制限されアルキル化されたペプチドのアミノ酸 Asp40 までを直接 N-末端配列方法で確認した。

【0051】

酵素開裂

前記配列を確認するために、ペプチドを次の酵素処理に付した：

(a) C18 逆相 HPLC カラム上の消化ペプチドの分離に伴う、V8 プロテアーゼ。D15 及び E43 での開裂及び 2 つのペプチドの分子量 1786.9 Da (ペプチド 1 から 15) (完全に再配列化)、及び 3194.5 Da (ペプチド 16 から 43) (部分配列)の HPLC における分離は、N 末端配列を確認することを可能にする。

(b) 質量スペクトル測定による直接分析に伴う、トリプシン消化。トリプシン消化は、N 末端配列をも確認し、かつ ASICalglin のペプチド配列の他の部分をも確認する。MS/MS 分析により検出及び配列化されたトリプシンペプチドは、以下表 1 に与えら

れている。

【 0 0 5 2 】

【 表 1 】

表1

位置	ペプチド配列	Mw (Da)
3-8	CFQHGK (配列番号13)	775. 27
3-8	CYQHGK (配列番号14)	791. 27
3-14	CFQHGKVVTCR (配列番号15)	1527. 58
3-14	CYQHGKVVTCR (配列番号16)	ND
9-14	VVTCR (配列番号17)	770. 31
15-28	DMKFCYHNTGMPFR (配列番号18)	1803. 57
32-48	LILQGCSSSCSETENNK (配列番号19)	1925. 63
49-54	CCSTDR (配列番号20)	797. 24
32-54	LILQGCSSSCSETENNKCCSTDR (配列番号21)	2705. 78

【 0 0 5 3 】

質量分析 (MALDI-TOF)

全ての場合に、質量スペクトル分析は、MALDI-TOF-TOFスペクトル装置 (Applied Biosystems, USA) で実施された。

【 0 0 5 4 】

シナピン酸マトリクス (Sigma Aldrich, USA) を用いて、既知分子量のタンパク質の混合物の内部較正を用いて、検量天然タンパク質が陽イオンリニアモードで分析された。

【 0 0 5 5 】

測定された分子量は、ASICalg in - 1 で 6 5 5 4 . 8 Da、ASICalg in - 2 で 6 5 3 8 . 4 Da であった。これは、GPM AW タンパク質分析ソフトウェアで、配列から計算される分子量と完全に一致した。これらの結果は、遊離カルボン酸 C で末端を示唆する。280 nm で計算される分子吸収係数は、 $\epsilon = 3040$ (ASICalg in - 1) 及び $\epsilon = 1760$ (ASICalg in - 2) である。

【 0 0 5 6 】

ホモログのデータベース検索

ASICalg in - 1 及び ASICalg in - 2 は、データベースにはなく、知られたペプチド又は毒との完全な配列一致はなかった。

【 0 0 5 7 】

BLAST 配列整列プログラムは、ASICalg in - 1 及び ASCalg in - 2 はそれにもかかわらず、種々のコブラ蛇 (ナジャ属 Naja 及び リングルス Ringhals) からの毒から精製されたペプチド CM - 1 b、CM - 3 及び CM - 2 a、また、キングコブラ Ophiophagus hannah の毒中に存在する - 神経毒 OH - 26 と 47 % から 55 % の配列同一性 (63 % から 66 % 配列ホモロジー) を示すことを表す。しかし、これらの CM 及び OH - 26 神経毒は、ASIC をチャンネルへの作用を記載されておらず、インビボでの鎮痛活性についても示されておらず、むしろ細胞毒性効果が示されている。従って、ASICalg in - 1 又は ASICalg in - 2 との 55 % 未満の配列同一性では、本発明のペプチドで示される生理学的性質は失われる、と考えられる。一方で、当該技術分野では、イソフォーム及び / 又はオーソログ毒物は、約 70 % の配列同一性の結果それらのタンパク質配列におけるいくらかの相違にもかかわらず保持された活性を示す、ということ

が知られている。従って、ASICailgin-1又はASICalgin-2と少なくとも56%から70%の配列同一性を示すイソフォーム及び/又はオーソログ毒物は、本発明のペプチドの性質を保持し得る。

【0058】

実施例2：ASICailgin-1(-Dp1)及びASICalgin-2(-Dp2)ペプチドの、髄膜注射後の鎮痛効果

マウス(C57B16J、7-から11週齢オス)の痛み挙動が、Hylden及びWilcox [1980][35]の手順に従い、脊椎のL5とL6の間に、前記ペプチドを髄膜注射(IT)した後、評価された。34 μ MのASICalgin-1(0.34nmol)又は2 μ MのASICalgin-2(0.2nmol)の効果を、3.1mMのモルヒネ(31nmol)又は10 μ lの生理的食塩水(145mMのNaCl、5mMのKCl、2mMのCaCl₂、10mMのHEPES、pH7.4、0.05%ウシ血清アルブミン)のIT注射の効果と比較した。実験のいくつかの系列で、ナキソロン、アヘンレセプター阻害剤(特に μ タイプ)を、50 μ lの0.9%のNaCl中で2mg/kgを、前記ASICalginペプチドのIT注射の10分前に、皮下に注射した。

10

【0059】

毒性

ASICalgin-1及びASICalgin-2ペプチドの髄膜注射は、マウスの運動障害の挙動、平衡障害、無関心、麻痺又は痙攣タイプに何ら変化を誘導せず、いかなる死亡をも引き起こさない。

20

【0060】

急性化学的及び炎症性痛み

ホルマリン(0.9%NaCl溶液中、2%で15 μ l)をマウスの後足のアーチ部分へ皮下注射して、2つの相の痛みを誘導した：相Iは化学的痛みが10分間の急性痛み、相IIは炎症性痛みで15から45分間(図2A)である。

【0061】

前記痛みは、棒物の自発的痛み挙動を観察することで測定され、即ち、マウスが注射された足を持ち上げる、そこをつつき、舌でなめ、足を振る間の時間を計測することで、測定される(統合自発挙動)。

30

【0062】

ASICalgin-1の前記IT注射は、相Iの痛みを40%、相IIの痛みを70%まで大きく低減する。この鎮痛効果は、モルヒネと類似する(図2B)。

【0063】

ASICalgin-2のIT注射は、ASICalgin-1と同一の効果である。

【0064】

ナキソロン、アヘンレセプター阻害剤での前処置は、前記2つの相II及び相IIのいずれにおいてもASICalgin-1の鎮痛効果に影響はない。

【0065】

ASICalgin-1及びASICalgin-2ペプチドは、蛇ブラックマンバの毒から抽出された最初の鎮痛性ペプチドである。

40

【0066】

急性熱痛み

熱痛みが、マウスを用いて、46(反射運動、動物はブレースされている)の水中に浸漬させた尾を引っ張る時間を、30秒の時間に限定して、研究した。

【0067】

ASICalgin-1ペプチドは、モルヒネと同等の強さの鎮痛効果を誘導したが(IT注射後7分間)、より高濃度ではより長い時間である(図2C)。

【0068】

50

ASICalgin-1の鎮痛効果は、ナキソロンの前処置によって大きくは阻害されない(図2D)。

【0069】

炎症性過敏痛感

マウスの後ろ脚のアーチ内に2%のカラギーナンを皮下注射は、炎症性及び過敏痛感を誘導し、これは、46の水中に浸漬された後ろ脚を引き込む時間(統合自発運動、動物はブレースされている)が、30秒限定で、カラギーナンの注射後2時間、測定される(図2E、#)。

【0070】

ASICalgin-1のIT注射は、急激に鎮痛効果を誘導し、これは、モルヒネと同程度であり、実験期間を通じて持続した(67分間、図2E)。

【0071】

ASICalgin-1の鎮痛効果は、ナキソランの前処理により20%程度の僅かな阻害を受けるのみである。

【0072】

運動活性

ASICalgin-1への運動活動への効果は、ローターロード試験の手段で評価された。マウスを1分間で4回転(rpm)する軸回転体上に置き、5rpmから40rpmまで一定に加速して実施する。落下するまでの時間を、最大300秒限定で測定する。

【0073】

ASICalgin-1ペプチドのIT注射は、ベヒクル溶液の注射と比較して運動活性に関してはマウスの性能レベルでなんら有意な効果(ANOVA試験)も誘導しない。

【0074】

実施例3: ASICalgin-1(-Dp1)の、インビボ脳室内注射後の鎮痛効果

ASICalgin-1の脳室内(ICV)注射は、定位置座標(皮質表面下-2.4mm、前後軸で-0.5mm、前頂に対して中外軸で+1.6mm)を用いて、前記第3脳室内にイソフラン(1.5%)で麻酔されたマウス(57B16J、7-から11週齢オス)に実施された。34μMのASICalgin-1(0.34nmol)を含む溶液の5μlのICV注射の効果が、5μlの生理的食塩水(145mMのNaCl、5mMのKCl、2mMのCaCl₂、10mMのHEPES、pH7.4、0.05%ウシ血清アルブミン)の効果と比較された。アヘンレセプター(特にμタイプ)の阻害剤であるナキソロンが、ASICalgin-1のICV注射の10分前に、0.9%のNaClの50μl中の2mg/kgで皮下注射された。

【0075】

毒性

ASICalgin-1のICV注射は、マウスの、運動問題、平衡問題、無関心、麻痺又は痙攣タイプに変化を誘導せず、3日後でさえ死亡もない。

【0076】

急性熱痛み

熱的痛みが、マウスを用いて、46の水に浸漬された尾を引き上げる(反射運動、動物はブレースされている)時間を、限度を30秒として測定することで研究された。

【0077】

ASICalgin-1のICV注射は、強い鎮痛効果を示し、実験を通じて持続し(67分、図3)、この効果は、ナキソロンの前処理で変化はなかった。鎮痛効果は、尾の引き込み時間値は、コントロール値まで戻るまで数時間持続する。

【0078】

実施例4: ASICalgin-1ペプチド(-Dp1)の皮下注射後の鎮痛効果

ASICalgin-1ペプチドの皮下(SC)注射の効果が、カラギーナン誘導炎症性痛覚過敏について試験された。

10

20

30

40

50

【0079】

マウス(C57B16J、7 - から11週齢のオス)の後ろ脚のアーチ内に2%のカラギーナンの皮下注射は、炎症性及び過敏痛感を誘導し、これは、46 の水中に浸漬された後ろ脚を引き込む時間(統合自発運動、動物はブレースされている)が、30秒限定で、カラギーナンの注射後2時間、測定される。

【0080】

ASICalgln-1ペプチド(0.9%のNaCl、0.05%のウシ血清アルブミン中の34 μ MのASICalgln-1(0.34nmol)を含む10 μ l)をカラギーナンの注射と共に注射した場合、熱的炎症過敏痛感は観察されない(図4、)。この条件下で、2時間後のASICalgln-1の第2のSC注射は、なんらさらなる有意な効果を生じない(図4、)。ASICalgln-1ペプチドをカラギーナンの注射と共に注射しなかった場合、前記炎症が既に生じている場合に、カラギーナンのみの注射の2時間後の前記ペプチドのSC注射は、炎症性痛感過敏を逆転させ、さらに、カラギーナンの注射前のコントロールと比較して鎮痛効果を発揮した(図4、及び#)。

10

【0081】

実施例5: ASICalgln-1(-Dp1)及びASICalgln-2(-Dp2)ペプチドの前記ASICを伝達に対する活性

ASICalgln-1(-Dp1)及びASICalgln-2(-Dp2)ペプチドは、COS細胞で異種的に発現され「全細胞」構成でパッチクランプ技術を用いて記録されるASICチャンネルにより精製される伝達を阻害する(「適用電位」モード)。

20

【0082】

ペプチドは、pH7.4から6又は5.5へ細胞外で低下させる前にpH7.4で30秒、適用される。

【0083】

ASICalgln-1及びASICalgln-2ペプチドは同じ効果を持ち、ラットホモメリックASIC1aチャンネルにより生成される伝達を49nMで50%阻害(IC₅₀)を生成する濃度で(図5A)、ヒトホモメリックASICチャンネルにより生成される伝達を127nMでIC₅₀で阻害する(図5B)。ラットホモメリックASIC1bチャンネルで生成される伝達は、650nMのIC₅₀で阻害され(図5C)、ラット及びヒトヘテロメリックASIC1a+ASIC2aチャンネルでは308nMのIC₅₀、及びラットヘテロメリックASIC1a+ASIC1bチャンネルでは223nMのIC₅₀で阻害される(図5D)(ASICチャンネルはヒトでは記載されていない)。

30

【0084】

ASICalgln-1及びASICalgln-2ペプチドは、ラット及びヒトホモメリックASIC2a及びASIC3チャンネルは阻害せず、またラットヘテロメリックASIC1a+ASIC3及びASIC1b+ASIC3チャンネルも阻害しない。

【0085】

前記ペプチドの適用が停止されると、ASICalgln-1及びASICalgln-2ペプチドの効果は可逆的である。

40

【0086】

ASICalgln-1及びASICalgln-2ペプチドは、現在まで、ホモメリックASIC1bチャンネル及びヘテロメリックASIC1a+ASIC1b及びASIC1a+ASIC2aチャンネルの阻害可能として記載された最初の例である。

【0087】

他方では、ASICalgln-1ペプチド(2 μ M)は、カブサイシン(1 μ M)で活性化させたラットTRPV1チャンネル(これはまた感覚神経端部で痛み伝達の関与する)により生成される伝達を阻害しない。

【0088】

50

この説明に限定されるものではないが、ASICalign-1及びASICalign-2ペプチドの鎮痛効果は、中枢神経系ニューロンでのホモメリックASICする1aチャンネル及びヘテロメリックASICする1a+ASIC2aチャンネルの阻害を含み（IT及びICV注射）、及び感覚ニューロンでのホモメリックASIC1a及びASIC1bチャンネル、及びヘテロメリックASICする1a+ASIC1bチャンネルの阻害を含む（皮下注射、IT注射、ただしホモメリックASIC1a及びASIC1b及びヘテロメリックASIC1a+ASIC1bが、脊髄後角のレベルで感覚ニューロンの中枢端部に存在する場合）。

【0089】

実施例6： 中枢神経系ニューロン及び感覚ニューロンの天然ASIC伝達におけるASICalign-1（-Dp1）及びASICalign-2（-Dp2）の活性

ASICalign-1及びASICalign-2ペプチドは、大人ラット脊髄神経節から（図6A）、マウス胚背側脊髄から（図6B）、及び新生マウス（2日）海馬から（図6C）から単離された主培地でのニューロンでの「全細胞」構成（「適用電位」モード）でのパッチクランプ技術を用いて記録されたASIC伝達を阻害する。

【0090】

ASICalign-1及びASICalign-2ペプチドの、感覚ニューロンの全ASIC伝達の部分的阻害は、感覚ニューロンでのASIC3タイプ（これはASICalign-1及びASICalign-2ペプチドでは阻害されない）の大部分からなる、一方で、中枢系（海馬及び脊髄）SIC伝達は、ホモメリックASIC伝達及びヘテロメリックASIC1a+ASIC2a伝達（共にASICalign-1及びASICalign-2ペプチドで阻害される）の混合からなる、ことで説明される。

【0091】

実施例7： ニューロンへの、ASICalign-1（-Dp1）及びASICalign-2（-Dp2）ペプチドの活性

培地での脊髄ニューロンへのASICalign-1及びASICalign-2ペプチドの適用は、基底伝達レベルになんの変更も誘導しないし、「全細胞」構成でのパッチクランプ技術を用いて記録される静止電位にも変化を誘導しない（図7A）。

【0092】

ASICalign-1及びASICalign-2ペプチドの適用は、培地中の脊髄ニューロンの自発的シナプス電気活性を変更せず、電気刺激（「パッチクランプの「適用」モード」により誘導される作用電位の形状及び閾値も変化させない（図7B））。

【0093】

この結果は、ASICalign-1及びASICalign-2ペプチドは、ニューロンの本質的な興奮性、シナプス機能又は作用電位の生成（Na⁺チャンネル）又は脱分極（K⁺チャンネル）で関与する電位依存伝達にも、影響を与えないということを示す。

【0094】

他方で、ASICalign-1及びASICalign-2ペプチドでのASICチャンネルの阻害は、酸性pH低下（7.4から6.0）に応答するニューロン興奮を低減させ、ASIC伝達により生成される脱分極が作用電位を生じさせるには十分ではない（図7A）。

（参考文献）

1. Bertin and Vergne-Salle, "Traitements medicamenteux de l'inflammation et des douleurs inflammatoires" ["Drug treatments for inflammation and inflammatory pain"] UP SA Pain Institute - A Editorial Paris, p. 113 - 132, 2007
2. Gutstein and Akil, "Opioid analgesics", in "The Pharmacological Basis of Ther

10

20

30

40

50

- apeutics" Brunton et al., Eds. McGraw-Hill, 2006.
3. Bannister & Dickenson, Curr. Opin. Support Palliat. Care, 4: 1-5, 2010
 4. Yennurajalingam et al., Support Cancer Ther., 1: 97-110, 2004
 5. Mizoguchi et al., Int. Rev. Neurobiol., 85: 249-260, 2009
 6. Waldmann and Lazdunski, Curr. Opin. Neurobiol., 3: 418-424, 1998 10
 7. Wemmie et al., Trends Neurosci., 29: 578-586, 2006
 8. Lingueglia et al., J. Biol. Chem., 282: 17325-17329, 2007
 9. Jasti et al., Nature, 449: 316-323, 2007
 10. Lingueglia et al., J. Biol. Chem., 272: 29778-29783, 1997
 11. Benson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95: 10240-10245, 2002 20
 12. Hesselager et al., J. Biol. Chem., 279: 11006-11015, 2004
 13. Waldmann et al., Nature, 386: 173-177, 1997a
 14. Noel et al., "Current perspectives on acid-sensing ion channels: new advances and therapeutic implications" Expert Rev. Clin. Pharmacol. "Clinical Pharmacology of Ion Channels", 3: 331-346, 2010
 15. Waldmann et al., J. Biol. Chem., 272: 20975-20978, 1997b 30
 16. Bassler et al., J. Biol. Chem., 276: 33782-33787, 2001
 17. Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95: 10240-10245, 1998
 18. Reeh and Steen, Prog. Brain Res., 113: 143-151, 1996
 19. Steen et al., Neurosci. Lett., 199: 29-32, 1995a
 20. Issberner et al., Neurosci. Lett., 208: 191-194, 1996 40
 21. Ugawa et al., J. Clin. Invest., 10: 1185-1191, 2002
 22. Jones et al., J. Neurosci., 24: 10974-10979, 2004
 23. Voilley et al., J. Neurosci., 21: 8026-8033, 2001
 24. Dube et al., Pain, 117: 88-96, 2005
 25. Escoubas et al., J. Biol. Chem., 275: 25116-25121, 2000 50

26. Diocot et al., EMBO J., 23: 1516-1525, 2004
27. Deval et al., EMBO J., 27: 3047-3055, 2008
28. Mazzuca et al., Nature Neuroscience, 10: 943-945, 2007
29. Abbott et al., Pharmacol. Biochem. Behav., 17(6): 1213-1219, 1982
30. Cridland and Henry, Brain Res., 584(1-2): 163-168, 1992
31. Woolfe and Macdonald, J. Pharmacol. Exp. Ther., 80: 300-307, 1944
32. Ankier, Eur. J. Pharmacol., 27(1): 1-4, 1974
33. Kim et al., Pain, 55: 85-92, 1993
34. 米国特許第5,877,026号
35. Hylden and Wilcox, Eur. J. Pharmacol., 67: 313-316, 1980
36. Deval et al., J. Neurosci., 31(16): 6059-6066, 2011

10

20

【 図 1 A 】

A

ASiCalgine-1 **LKCYQHGVVTC**HRDMKFCYHNTGMPFRNLKLILQGCSSSSCSE TENNKCCSTDRCNK
ASiCalgine-2 **LKCYQHGVVTC**HRDMKFCYHNTGMPFRNLKLILQGCSSSSCSE TENNKCCSTDRCNK

【 図 1 B 】

B

M T K T L L T L T L V T V T I V C G D T 18
 ATG AAAAATCTGTGCTGAC TTGCTGTGTGACACAATGTGCTGCCTACGAT 19
 G T Y S L K C A Y Q H K G K V T T C H R 20
 GGA TATCTCTAAATGTTTACCAATCATGGTAAATGTGTGCTACTGTCATCGA 108
 ATG A G T T C G Y H N T G M P F R N L K L C 154
 MTK AAGTTTTCCTCATCAACACTGGCATCTTCTTGCGAATCTAAGCTAC 162
 L Q G G S S S C T E N N K K C 216
 CTACGACGAATGTTTCTTCGTCAGTGAACAAAGAAATAGTTCGCTGCA 216
 T D R C N K * 278
 ACAGACAGACATGCAAAATG cctacgcagctgacatcaattgagttgctcctacatccttgagacacatc 284
 aaattatgctgctgctgctgacacacagacagatgctacacacccctccctccctccct 391
 cctgctgctgctgctgctgctgctgctgacacaaataaagctacac-Poly(A)⁺ 496

【圖 2】

A 5分を超える痛み行動

● ASCigen-1 (n = 16)
□ ASCigen-1 + NAL (n = 21)
○ ΔCFL (n = 16)
△ ΔCFL + NAL (n = 20)
▲ ELC (n = 12)

5分を超える痛み行動

終了時間(分)

B

時間(秒)

組1
0-10分

組2
10-45分

ΔCFL ELC ASCigen-1 ASCigen-1 + NAL ΔCFL + NAL

C

● ELC (n = 23)
■ ASCigen-1 (n = 23)
▲ ASCigen-1 + NAL (n = 16)
○ ΔCFL (n = 16)
△ ΔCFL + NAL (n = 17)

尾引き込み時間(秒)

時間(分)

D

由標準下閾値(ΔC)

ΔCFL ELC ASCigen-1 ASCigen-1 + NAL ΔCFL + NAL

E

● ELC (n = 10)
■ ASCigen-1 (n = 10)
▲ ASCigen-1 + NAL (n = 8)
○ ΔCFL (n = 8)
△ ΔCFL + NAL (n = 11)

足引き込み時間(秒)

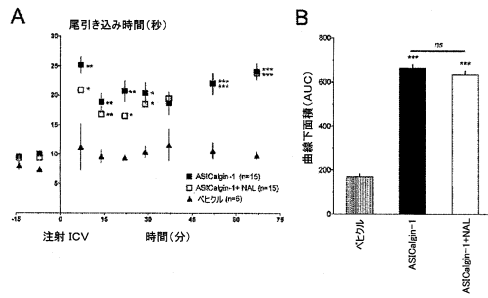
時間(分)

F

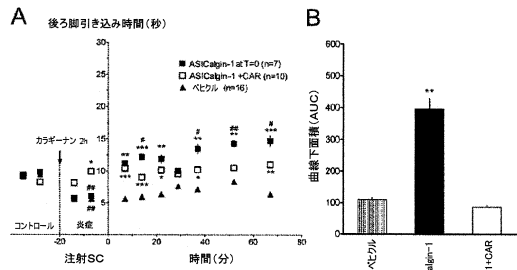
由標準下閾値(ΔC)

ΔCFL ELC ASCigen-1 ASCigen-1 + NAL ΔCFL + NAL

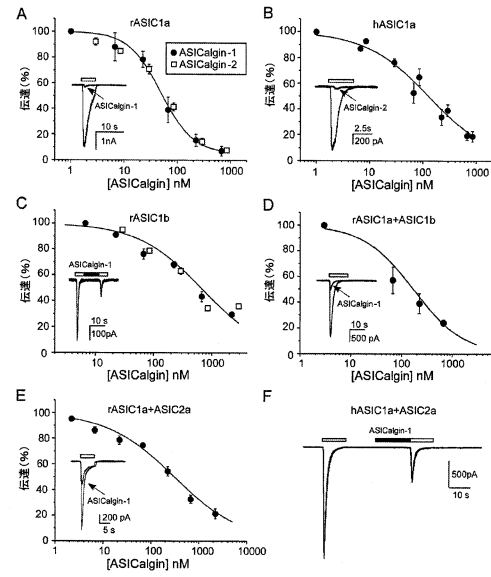
【図 3】



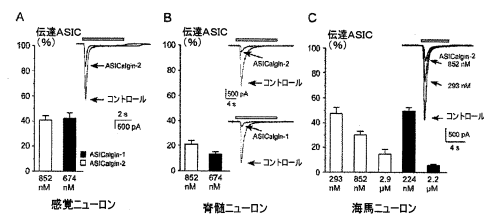
【図 4】



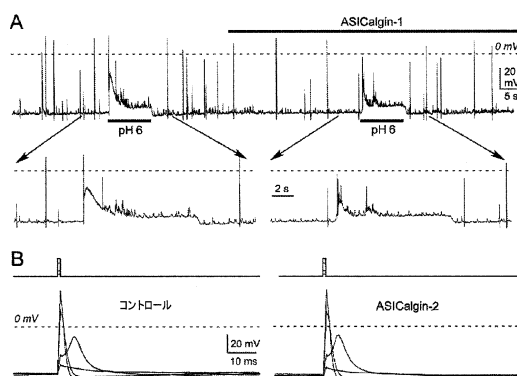
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【配列表】

0006000245000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	25/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/04	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/00	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	25/24	(2006.01)	A 6 1 P	25/24	
A 6 1 P	25/22	(2006.01)	A 6 1 P	25/22	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	

(74)代理人 100070150

弁理士 伊東 忠彦

(74)代理人 100091214

弁理士 大貫 進介

(72)発明者 リングエグリア, エリック

フランス国、0 6 0 0 0 ニース, 3 7 アベニュー エディス カーベル

(72)発明者 ディオチョット, シルビア

フランス国、0 6 5 6 0 ヴァルボンヌ, 1 2 プラセット デ エグランティエール

(72)発明者 バロン フォスター, アン

フランス国、0 6 5 6 0 ヴァルボンヌ, 8 8 0 シェマン デ ビーデサレ

(72)発明者 サリーナ, ミグエル

フランス国、0 6 8 0 0 カーニュ シュル メール, エデン パーク, パーチメント エーデル
ワイス, 4 8 シェマン デ ラヴァンディン

(72)発明者 ラズンスキー, ミシェル

フランス国、0 6 0 0 0 ニース, 2 1 アベニュー コロンボ

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 特開2 0 0 7 - 3 0 6 8 6 6 (J P , A)

特開2 0 0 8 - 1 9 3 9 2 3 (J P , A)

JOUBERT, F.J., "Snake venom toxins. The amino acid sequences of two toxins (CM-2a and CM-3) from Naja haje annulifera (Egyptian cobra) venom.", HOPPE-SEYLER'S Z. PHYSIOL. C HEM., 1 9 7 7 年 3 月, Vol.358, No.3, P.377-390

LIANG, L.X. et al., "Peripheral and spinal antihyperalgesic activity of najanalgesin i solated from Naja naja atra in a rat experimental model of neuropathic pain.", NEUROSC I. LETT., 2 0 0 9 年 9 月 4 日, Vol.460, No.3, P.191-195

JOUBERT, F.J., "The amino acid sequence of protein CM-3 from Dendroaspis polylepis pol ylepis (black mamba) venom.", INT. J. BIOCHEM., 1 9 8 5 年, Vol.17, No.6, P.695-699

MOLLAY, C. et al., "Bv8, a small protein from frog skin and its homologue from snake v enom induce hyperalgesia in rats.", EUR. J. PHARMACOL., 1 9 9 9 年 6 月 1 8 日, Vol.37 4, No.2, P.189-196

DIOCHOT, S. et al., "Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to ab

olish pain.", NATURE, 2012年10月25日, Vol.490, No.7421, P.552-555

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00 - 19/00

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq

UniProt/GenSeq

PubMed