(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2023-506598
(P2023-506598A)
(43)公表日　令和5年2月16日(2023.2.16)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*38/08*	*(2019.01)*	Ａ６１Ｋ	38/08		４Ｃ０７６
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ	*47/54*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/54		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｋ	*47/60*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/60		
Ａ６１Ｋ	*47/28*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/28		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全70頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-553063(P2022-553063)
(86)(22)出願日　令和3年3月5日(2021.3.5)
(85)翻訳文提出日　令和4年10月4日(2022.10.4)
(86)国際出願番号　PCT/EP2021/055678
(87)国際公開番号　WO2021/176094
(87)国際公開日　令和3年9月10日(2021.9.10)
(31)優先権主張番号　20161493.0
(32)優先日　令和2年3月6日(2020.3.6)
(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,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　508335820
ユニバーシティ オブ コペンハーゲン
デンマーク国 １１６５ コペンハーゲン
コー ノーレガーデ １０
(74)代理人　100114775
弁理士　高岡 亮一
(74)代理人　100121511
弁理士　小田 直
(74)代理人　100202751
弁理士　岩堀 明代
(74)代理人　100208580
弁理士　三好 玲奈
(74)代理人　100191086
弁理士　高橋 香元
(72)発明者　マドセン，ケネス，エル．
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＰＩＣＫ１の脂質共役ペプチド阻害剤

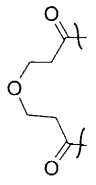
(57)【要約】
本開示は、Ｃキナーゼ－１と相互作用するタンパク質（ＰＩＣＫ１）に結合し、それによりＰＩＣＫ１を阻害する、脂質共役二価ペプチドリガンドに関する。本開示のＰＩＣＫ１阻害剤は、ＰＩＣＫ１の２つのペプチドリガンドを含むペプチド部分、および２つのペプチドリガンドを連結するリンカーを含む非ペプチド部分、および脂質を含む。本開示はさらに、不適応可塑性に関連する疾患または障害の処置のための、前記ＰＩＣＫ１阻害剤の治療的および診断的使用に関する。
【選択図】なし

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ペプチド部分および非ペプチド部分を含むＰＩＣＫ１阻害剤であって、前記ペプチド部分が、
ａ）一般式：$X_1X_2X_3X_4X_5$のアミノ酸配列を含む第１のペプチド；および
ｂ）一般式：$X_1X_2X_3X_4X_5$のアミノ酸配列を含む第２のペプチド
（式中、
X_1は、Ｈ、Ｎ、Ｆ、もしくはＴである、または存在しない；
X_2は、Ｗ、Ｓ、Ｅ、もしくはＹである；または存在しない；
X_3は、Ｌ、Ｖ、またはＩである；
X_4は、Ｋ、Ｉ、またはＲである；および
X_5は、Ｖである）
からなり；
前記非ペプチド部分が：
ｃ）前記第２のペプチドに前記第１のペプチドを連結するリンカー、および
ｄ）親油性脂肪族基
を含む、ＰＩＣＫ１阻害剤。
【請求項２】
前記第１および／または前記第２のペプチドが、３個～５個のアミノ酸残基の範囲の長さを有する、請求項１に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【請求項３】
前記第１および／または前記第２のペプチドが、ＨＷＬＫＶ（配列番号５４）、ＦＥＩＲＶ（配列番号３４）、ＮＳＩＩＶ（配列番号５）、ＮＳＶＲＶ（配列番号８）、ＮＳＬＲＶ（配列番号５３）、ＮＳＩＲＶ（配列番号６）、ＮＹＩＩＶ（配列番号１３）、ＮＹＩＲＶ（配列番号１４）、ＴＳＩＲＶ（配列番号１８）、ＹＩＩＶ（配列番号４９）、ＳＶＲＶ（配列番号４４）、ＥＩＲＶ（配列番号４６）、ＬＲＶ、ＩＩＶ、ＶＲＶ、およびＩＲＶからなる群より選択される、請求項１または２のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【請求項４】
前記第１および／または前記第２のペプチドが、ＨＷＬＫＶ（配列番号５４）、ＮＳＶＲＶ（配列番号８）、ＳＶＲＶ（配置番号４４）、およびＬＲＶからなる群より選択される、請求項１～３のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【請求項５】
前記リンカーが、１つまたは複数の骨格酸素原子が窒素原子で置き換えられる１個～２４個の範囲のエチレングリコール部分、例えば１つまたは複数の骨格酸素原子が窒素原子で置き換えられる１個～２０個の範囲など、例えば１個～１６個の範囲、１個～１４個の範囲など、例えば１個～１２個の範囲、例えば１個～１０個の範囲、１個～８個の範囲など、例えば１個～６個の範囲、１個～４個の範囲など、例えば１個～２個の範囲のエチレングリコール部分を含むＮＰＥＧリンカーなどの、ＮＰＥＧリンカーであり、好ましくはＮＰＥＧリンカーが、１つまたは複数の骨格酸素原子が窒素原子で置き換えられる４個のエチレングリコール部分を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【請求項６】
前記リンカーが、式（ＩＩＩ）：

【化１】



式（ＩＩＩ）

による構造を有する、請求項１～５のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。

【請求項７】

前記親油性脂肪族基が、脂肪族分岐鎖、脂肪族非分岐鎖、飽和鎖もしくは不飽和鎖などの、脂肪族鎖またはゴナンもしくはステロイドなどの、脂肪族環、好ましくはコレステロールである、請求項１～６のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。

【請求項８】

前記親油性脂肪族基が、C_{14}～C_{16}脂肪酸などの、C_4～C_{26}脂肪酸である、請求項１～７のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。

【請求項９】

前記親油性脂肪族基が、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、マルガリン酸、ステアリン酸からなる群より選択される、請求項１～８にのいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。

【請求項１０】

前記親油性脂肪族基が、ミリスチン酸である、請求項１～９のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。

【請求項１１】

前記非ペプチド部分が、Ａｓｐ、β－Ａｓｐ、β－Ｓｅｒ、β－ホモ－Ｓｅｒおよびβ－Ｌｙｓなどの、１つのアミノ酸をさらに含む、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。

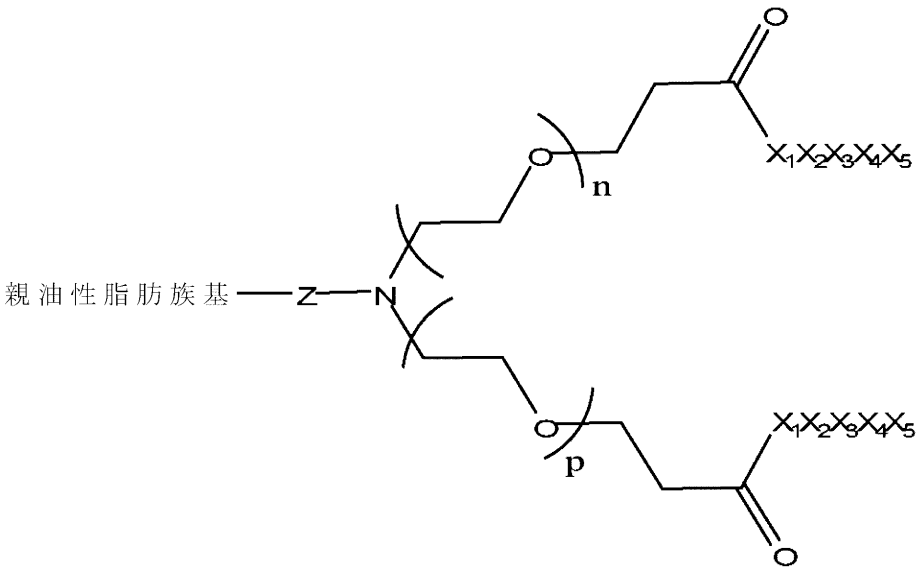
【請求項１２】

検出可能な部分をさらに含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。

【請求項１３】

式（Ｉ）：

【化２】



式（Ｉ）

の一般構造を有し、
式中、
Ｚが、単結合または単一のアミノ酸であり；
ｎが、０～１２の整数であり；
ｐが、０～１２の整数である、
請求項１～１２のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【請求項１４】
ａ）一般式：$X_1X_2X_3X_4X_5$（配列番号１）のアミノ酸配列を含む第１のペプチド；および
ｂ）一般式：$X_1X_2X_3X_4X_5$（配列番号１）のアミノ酸配列を含む第２のペプチド；
（式中：
X_1は、Ｈ、Ｎ、Ｆ、もしくはＴである、または存在しない；
X_2は、Ｗ、Ｓ、Ｅ、もしくはＹである；または存在しない；
X_3は、Ｌ、Ｖ、またはＩである；
X_4は、Ｋ、Ｉ、またはＲである；および
X_5は、Ｖである）
ｃ）前記第２のペプチドに前記第１のペプチドを連結するリンカー、および
ｄ）親油性脂肪族基
を含むＰＩＣＫ１阻害剤を含むミセル。
【請求項１５】
請求項１～８のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤または請求項１４に記載のミセルを含む医薬組成物。
【請求項１６】
医薬品としての使用のための請求項１～１５のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルまたは医薬組成物。
【請求項１７】
疼痛、薬物中毒、筋萎縮性側索硬化症、癲癇、耳鳴症、偏頭痛、癌、虚血、アルツハイマー病、および／またはパーキンソン病などの、不適応可塑性に関連する疾患または障害の予防および／または処置における使用のための、請求項１～１６のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルまたは医薬組成物。
【請求項１８】
前記疼痛が、機械的もしくは熱的アロディニアまたは痛覚過敏である、または前記疼痛が、炎症性疼痛である、請求項１７に記載のＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルまたは医薬組成物。
【請求項１９】
不適応可塑性に関連する疾患または障害の診断における使用のための、請求項１～８のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤または請求項１４に記載のミセル。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、Ｃキナーゼ－１と相互作用するタンパク質（ＰＩＣＫ１）に結合し、それによってＰＩＣＫ１を阻害する、脂質共役二価ペプチドリガンドに関する。本発明はさらに、上記ＰＩＣＫ１阻害剤の治療的および診断的使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
シナプス可塑性は、学習および記憶のための分子基質として機能する。Ｇｌｕのグルタミン酸作動性シナプス放出は、両方ともリガンド開口型イオンチャネルであるＮ－メチル－Ｄアスパラギン酸受容体（ＮＭＤＡＲ）およびα－アミノ－３－ヒドロキシ－５－メチル－４－イソキサゾール－プロピオン酸受容体（ＡＭＰＡＲ）を特に活性化する。これらの受容体の活性化は、ＡＭＰＡＲにおけるＮａ＋およびＮＭＤＡＲの場合におけるCa^{2}

＋の流入を可能にする。脳卒中および頭部外傷後の虚血、神経因性疼痛および中毒などの、疾患状態において、異常なシナプス刺激は、不適応可塑性を引き起こし、カルシウム透過性（ＣＰ）ＡＭＰＡ型グルタミン酸受容体（ＣＰ－ＡＭＰＡＲ）の発現を通じてグルタミン酸作動性シナプスの過敏化をもたらす。

【０００３】

多くの疾患状態がグルタミン酸系の過剰活性化または過敏化に関与しているが、グルタミン酸系を標的とする現在使用されている唯一の薬物は、麻酔薬として使用されるケタミンなどの、ＮＭＤＡ受容体アンタゴニストである。新規グルタミン酸系標的化薬物の開発は、重度の副作用を伴う一般的な問題のために困難であることが証明されている。神経因性疼痛、虚血後の興奮毒性および薬物中毒などの疾患は、現在、効果的な治療がない。したがって、これらの疾患の処置の必要性がある。

【０００４】

Ｃキナーゼ－１と相互作用するタンパク質（ＰＩＣＫ１）は、シナプス可塑性において中心的な役割を果たすＰＤＺドメイン含有足場タンパク質である。ＰＩＣＫ１は、主にＡＭＰＡＲ往来の制御を通じて、ＡＭＰＡＲの機能に不可欠である。ＰＩＣＫ１のＰＤＺドメインは、ＡＭＰＡ受容体（ＡＭＰＡＲ）のＧｌｕＡ２サブユニットのＣ末端ならびにタンパク質キナーゼＡおよびＣと直接相互作用し、それによりＡＭＰＡＲリン酸化および表面発現を調節し、今度は個々のシナプスの有効性を調整することによりシナプス可塑性を調節する。ＰＩＣＫ１は、そのＰＤＺドメインを介してタンパク質－タンパク質相互作用（ＰＰＩ）を媒介して促進することにより、タンパク質往来および細胞移動の調節に主に関与する、細胞内足場タンパク質である。ＰＩＣＫ１の細胞の役割の中心は、種々のタンパク質パートナーを含む多数の細胞内分子、ならびに膜リン脂質と結合し相互作用するその能力である。ＰＩＣＫ１は、二量体化を媒介する、中央膜結合ＢＡＲドメインに隣接する２つのＰＤＺドメインを有する、機能的二量体である。

【０００５】

タンパク質－タンパク質相互作用（ＰＰＩ）は、ほとんどの生化学的および細胞プロセスに不可欠であり、多くの場合、足場およびシグナル伝達複合体により媒介される。ＰＰＩのヒト促進因子の最も豊富なクラスの１つは、シナプス後肥厚部タンパク質－９５（ＰＳＤ－９５）／ディスク－ラージ／ＺＯ－１（ＰＤＺ）ドメインのファミリーである。シナプス後肥厚部において、ＰＩＣＫ１などのＰＤＺドメインタンパク質は、グルタミン酸受容体の表面発現および活性を動的に調節し、そのため不適応可塑性に関連する疾患または障害の処置のための魅力的な薬物標的を提示する。しかし、これらの標的について十分に強力な阻害剤を開発することは困難であると証明されている。

【０００６】

ＰＳＤ－９５のＰＤＺドメインの標的化は、二価ペプチドリガンドを使用することにより成功裏に試みられている。ＰＳＤ－９５は、リガンドの優先性を共有するＰＤＺ１およびＰＤＺ２を含む、より多くのＰＤＺドメインを含み、二価リガンドを用いて両方のＰＤＺドメインを標的化する考えをもたらす。第１の二価阻害剤は、Ｌｏｎｇ，ｅｔ　ａｌ．（２００３）により提案され、ＰＳＤ－９５　ＰＤＺ１２に対するほんの僅かな親和性をもたらした。よりうまくいく二価ペプチドリガンドが、後に開発された（Ｂａｃｈ　ｅｔ　ａｌ．２００９）。

【０００７】

ＰＳＤ－９５を標的化する二量体ペプチドリガンドが、脂肪酸で官能化された。修飾は、ＰＤＺドメインに対する親和性に影響することなく、ペプチドの改善された血漿半減期および皮下安定性をもたらすと認められた（国際公開第２０１５／０７８４７７号）。

【０００８】

上で記載されるように、不適応可塑性と関連する疾患または障害の処置のためのＰＩＣＫ１－ＰＤＺドメインの強力な阻害剤を提供する高い必要性がある。

【発明の概要】

【０００９】

本発明は、Ｃキナーゼ－１と相互作用するタンパク質（ＰＩＣＫ１）に対する高親和性ペプチド阻害剤を提供する。本発明者らは、驚いたことに、ＰＩＣＫ１の二価ペプチドリガンドへの脂質の付着により、効力における有意な向上を得ることができることを認めた。効力におけるそのような向上は、不適応可塑性に関連する疾患または障害の処置のための開発に必要とされる、ＰＩＣＫ１－ＰＤＺドメインの強力な阻害剤を提供するために非常に需要である。理論に縛られることなく、本開示の二価ペプチドリガンドに共役された脂質の効力の向上は、ミセル形成の結果と考えられ、これは今度は、結合時にＰＩＣＫ１の高次のオリゴマー構造の形成をもたらし、それによりＰＩＣＫ１の阻害をもたらす。そのような効力における向上は、改善された薬物動態を提供するとは脂質共役の現在の使用からは予見できなかった。

【００１０】

ＡＭＰＡ受容体の往来を担う足場タンパク質ＰＩＣＫ１を標的化することにより、受容体を直接標的化することと比較して、化合物の副作用の可能性のリスクが低減される。本開示の化合物は、神経因性疼痛、虚血後の興奮毒性または薬物中毒などの状態を有する患者の処置を提供する。

【００１１】

第１の態様において、本開示は、ペプチド部分および非ペプチド部分を含むＰＩＣＫ１阻害剤を提供し、ペプチド部分は、

ａ）一般式：$X_1X_2X_3X_4X_5$のアミノ酸配列を含む第１のペプチド；および

ｂ）一般式：$X_1X_2X_3X_4X_5$のアミノ酸配列を含む第２のペプチド

（式中、

X_1は、Ｈ、Ｎ、Ｆ、もしくはＴであるか存在しない；

X_2は、Ｗ、Ｓ、Ｅ、もしくはＹである；または存在しない；

X_3は、Ｌ、Ｖ、またはＩである；

X_4は、Ｋ、Ｉ、またはＲである；および

X_5は、Ｖである）

からなり；

非ペプチド部分は：

ｃ）第１のペプチドを第２のペプチドに連結するリンカー、および

ｄ）親油性脂肪族基

を含む。

【００１２】

第２の態様において、本開示は、

ａ）一般式：$X_1X_2X_3X_4X_5$のアミノ酸配列を含む第１のペプチド；

ｂ）一般式：$X_1X_2X_3X_4X_5$のアミノ酸配列を含む第２のペプチド；

（式中、

X_1は、Ｈ、Ｎ、Ｆ、もしくはＴであるか存在しない；

X_2は、Ｗ、Ｓ、Ｅ、もしくはＹである；または存在しない；

X_3は、Ｌ、Ｖ、またはＩである；

X_4は、Ｋ、Ｉ、またはＲである；および

X_5は、Ｖである）

ｃ）第１のペプチドを第２のペプチドに連結するリンカー、および

ｄ）親油性脂肪族基

を含むＰＩＣＫ１阻害剤を含むミセルを提供する。

【００１３】

さらなる態様において、本開示は、本明細書に開示されるようなＰＩＣＫ１阻害剤またはミセルを含む医薬組成物を提供する。

【００１４】

さらなる態様において、本明細書に開示されるようなＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルまたは医薬組成物は、医薬品としての使用のために提供される。

【００１５】
さらなる態様において、本開示は、被験者における不適応可塑性に関連する疾患または障害の予防および／または処置を提供する方法を提供し、方法は、本明細書に開示されるようなＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルまたは医薬組成物を投与することを含む。
【００１６】
さらなる態様において、それを必要とする被験者における乳癌を診断する方法が提供され、方法は：
ａ．組織試料を上記被験者から得るステップ；
ｂ．試料を、本明細書に開示されるような検出可能な部分を含むＰＩＣＫ１阻害剤で染色するステップ；
ｃ．試料中のＰＩＣＫ１のレベルを測定するステップ；ならびに
ｄ．試料中のＰＩＣＫ１のレベルを健康な標準と比較するステップ
を含み、
試料中のＰＩＣＫ１の増加したレベルは、上記個体が乳癌を有することを示唆する。
【００１７】
さらなる態様において、乳癌に罹患している被験者について予後を予測する方法が提供され、方法は：
ａ．組織試料を上記被験者から得るステップ；
ｂ．試料を、本明細書に開示されるような検出可能な部分を含むＰＩＣＫ１阻害剤で染色するステップ；
ｃ．試料中のＰＩＣＫ１のレベルを測定するステップ；ならびに
ｄ．試料中のＰＩＣＫ１のレベルを健康な標準と比較するステップ
を含み、
試料中のＰＩＣＫ１の増加したレベルは、予後不良を示唆する。
【図面の簡単な説明】
【００１８】
【図１】サイズ排除クロマトグラフィ（ＳＥＣ）により示されるｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の濃度依存性自己集合。ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$は、対照のために使用された。
【図２】ａ）ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の濃度系列を使用する小角Ｘ線散乱分析は、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$のミセル構造への自己集合を確認する。ｂ）異なる濃度のｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$のための対距離分布関数（ＰＤＤＦ）。ｃ）ＰＤＤＦ由来試料パラメータ。M_w／M_{wteo}は、５個～８個の個々の分子の範囲で、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の高次集合を示唆する。
【図３】ＰＩＣＫ１へのオリゴマーｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の結合。トレーサとして５ＦＡＭ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$（ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$に対して５ｎＭ）または５ＦＡＭ－ＨＷＬＫＶ（ＨＷＬＫＶに対して２０ｎＭ）を使用する、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$（Ｋｉ，ａｐｐ＝３．０ｎＭ、ＳＥＭインターバル［２．３～３．８］ｎＭ、ｎ＝６）、ＨＷＬＫＶ（Ｋｉ，ａｐｐ＝６９９８ｎＭ、ＳＥＭインターバル［４９７２～９８４９］ｎＭ、ｎ＝３）およびＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$（Ｋｉ，ａｐｐ＝１７９ｎＭ、ＳＥＭインターバル［１６９～１８９］、ｎ＝６）の蛍光偏光競合結合曲線（エラーバーは、ｎ＝３のＳＥＭとして示される）。
【図４】ＰＩＣＫ１：ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の分子比４：１で、それぞれｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の非存在下（灰色）または存在下（黒色）でのＰＩＣＫ１のＳＥＣ溶出プロファイル。溶出プロファイルは、高次オリゴマーの形成を明らかに示唆する。
【図５】結合親和性に対するＤＡＴ　Ｃ５（ＨＷＬＫＶ）における単一アミノ酸置換の影響。配列ＨＷＬＫＶの位置X_1～X_5における単一アミノ酸置換を有する９５のＨＷＬＫＶペプチドのライブラリを、蛍光標識されたＨＷＬＫＶとの競合において蛍光偏光結合で試験した。データは、参照ペプチドＨＷＬＫＶ（１に設定）と比較した倍率変化として与

えられ、より暗い色合いは、親和性における増加（最大で３倍）を示唆し、より明るい色合いは、低下した親和性を示唆する。白色は、結合の崩壊を示唆し、十字は、不溶性ペプチドを示唆する。％で示されたペプチドは、緩衝液中で可溶でなく、１０％ＤＭＳＯに溶解された。

【図６】以前の単一置換スクリーンからの単一アミノ酸置換を組み合わせる連結ペプチドライブラリのＦＰ競合を使用して測定された倍率親和性変化。スクリーンは、最適な５ｍｅｒ配列としてのＮＳＶＲＶ／ＴＳＩＲＶ、最適な４ｍｅｒ配列としてのＥＩＲＶ／ＹＩＩＶ、最適な３ｍｅｒ配列としてのＩＩＶ／ＩＲＶを示唆する。これらの配列は、最初の５ｍｅｒ配列であるＨＷＬＫＶから予測できなかった。ｘは、不溶性のまたは非結合のペプチドを示唆する。

【図７】脂質残基はないが、ＨＷＬＫＶ（PEG_0－（Ｃ５）$_2$、PEG_1－（Ｃ５）$_2$、PEG_2－（Ｃ５）$_2$、PEG_3－（Ｃ５）$_2$、PEG_4－（Ｃ５）$_2$）のＮ末端アミンに連結されるまたは配列ＨＷＬＫＶのリジン（Ｋ）側鎖アミン（ａｃ－（$HWLK_{PEG_4}V$）$_2$に連結されるいずれかの、異なるＰＥＧｘリンカーを有する、試験された二価ＰＩＣＫ１阻害剤の化学構造。

【図８】精製ＰＩＣＫ１に向けられる種々のＰＥＧリンカー化合物についてのモノマーＣ５（ＨＷＬＫＶ）ペプチドに対する倍率親和性の増大

【図９ａ－ｃ】ａ）急性炎症性疼痛に対するmyr－$NPEG_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の有効性。インビボ実験は、複数の投与経路を通じた炎症性疼痛の完全フロイントアジュバントモデルにおける誘発された疼痛を緩和するためのmyr－$NPEG_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の能力を明らかにする。ａ）ｓ．ｃ．投与、ｂ）ｓ．ｃ．投与、２μｍｏｌ／ｋｇ、１０μｍｏｌ／ｋｇ、および５０μｍｏｌ／ｋｇの用量応答、ｃ）ｉ．ｔ．投与。破線の曲線は、動物の内部対照として使用される対側の左後足からのデータを表す。すべてのデータは、中央値±ＳＥＭとして表される。略語；ａｄｍ．＝投与、ＢＬ＝ベースライン、ＣＦＡ＝完全フロイントアジュバント、ｉ．ｐｌ．＝足底内、ｉ．ｔ．＝髄腔内、ｓ．ｃ．＝皮下。

【図１０】神経因性疼痛に対するmyr－$NPEG_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の有効性。インビボ実験は、疼痛の神経因性ＳＮＩモデルにおける誘発された疼痛を緩和するためのmyr－$NPEG_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の能力を明らかにする。破線の曲線は、動物の内部対照として使用される対側の左後足からのデータを表す。すべてのデータは、中央値±ＳＥＭとして表される。略語；ＰＷＴ＝足引っ込め閾値、ＳＮＩ＝神経部分損傷。

【図１１】マウスをＳＮＩ外科手術に供し、外科手術９日後に、同側の後足のフォン・フライ・フィラメントに対する閾値応答の低下が、神経因性疼痛状態に対応して、フォン・フライ・フィラメントにより確認された。９日目に、マウスを、疼痛引っ込め閾値における有意な増加を誘発しない、脂質化なしの１０μｍｏｌ／ｋｇの$NPEG_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$（灰色）で処置した。比較のため、図１０からの１０μｍｏｌ／ｋｇのmyr－$NPEG_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$に対する応答を示す（黒色破線）。すべてのデータは、中央値±ＳＥＭとして表される。略語；ＰＷＴ＝足引っ込め閾値、ＳＮＩ＝神経部分損傷。

【図１２】慢性疼痛１年後のmyr－$NPEG_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の効果。マウスをＳＮＩ外科手術に供し、外科手術２日後に、同側の後足のフォン・フライ・フィラメントに対する閾値応答の低下が、１年間の毎月１回の観察を用いるフォン・フライ・フィラメントにより確認された（データを示さず）。５２週間後に、マウスを、５時間でＰＷＴの非常に有意な緩和を生じる、１０μｍｏｌ／ｋｇのmyr－$NPEG_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$で処置した。すべてのデータは、中央値±ＳＥＭとして表される。略語；ＰＷＴ＝足引っ込め閾値、ＳＮＩ＝神経部分損傷。

【図１３】myr－$NPEG_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$糖尿病性神経障害の有効性。マウスに単回ＩＰ注射、２００μｇ／ｍＬストレプトゾシン溶液を与えて、糖尿病（ＳＴＺモデル）を誘導し、血糖を、注射前、および注射後７日目に試験する。外科手術１３日後に、同側の後足のフォン・フライ・フィラメントに対する閾値応答の低下が、糖尿病性神経障害に対応するフォン・フライ・フィラメントにより確認された。myr－$NPEG_4$－（Ｈ

ＷＬＫＶ）$_2$のＳ．ｃ．注射は、プレガバリンと類似の有効性でＰＷＴにおける用量依存的増加を示した。すべてのデータは、中央値±ＳＥＭとして表される。略語；ＰＷＴ＝足引っ込め閾値、ＳＴＺ＝ストレプトゾシン。

【図１４】ＰＤＺ結合モチーフの変異型の有効性。マウスは右後足に、５０μＬのＣＦＡをｉ．ｐｌ．注射された。示されるようにマウスに、Ｃ５配列置換を有するｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$ペプチドを、ＣＦＡ注射後２日目に０．４μｍｏｌ／ｋｇ、５日目に２μｍｏｌ／ｋｇでｓ．ｃ．注射した。０．４μｍｏｌ／ｋｇのｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＮＳＶＲＶ）$_2$での処置は、ＰＷＴを有意に増加し、一方で２μｍｏｌ／ｋｇのｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$およびｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＳＶＲＶ）$_2$は、ＰＷＴを有意に増加した。２μｍｏｌ／ｋｇで、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＮＳＶＲＶ）$_2$は、十分に溶解しなかった。すべてのデータは、中央値±ＳＥＭとして表される。略語；ＰＷＴ＝足引っ込め閾値、ＣＦＡ＝完全フロイントアジュバント。

【図１５】自発痛の緩和におけるｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の有効性。マウスは、縞模様のチャンバでの生理食塩水、および左に図示された装置の灰色チャンバでのｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$（３０μｍｏｌ／ｋｇ）の単回注射の前に、右後足に、５０μＬのＣＦＡをｉ．ｐｌ．注射された。別の日に、チャンバの優先性が、各チャンバで過ごす時間により決定された。ＣＦＡ注射マウスは、自発痛の緩和を示すｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$が注射されたチャンバで有意に長い時間過ごした。ナイーブマウス（ＣＦＡで処置されていない）は、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の単回投与に対する場所優先性を示さなかった。

【図１６】ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の用量依存的血漿曝露。ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$を、示されるように３つの異なる用量でマウスにＳ．ｃ．投与し、異なる時間での血漿曝露を、ＬＣ－ＭＳにより測定した。血漿濃度ピークは、用量依存的に注射後１時間でピークに達し、線形動力学的に低下するが、非脂質化ペプチドＴａｔ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$と比較して寿命の延長を示さない。

【図１７】ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の溶解度。１３０ｍＭ（２５０ｍｇ／ｍｌ）でＰＢＳに溶解されたｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の写真。

【図１８】炎症性疼痛の動物モデルにおける本発明の異なる化合物の有効性試験からの結果。マウスは、５０μＬのＣＦＡを右後足にｉ．ｐｌ．注射された。ＣＦＡ注射後２～５日目に、マウスに、示されるように、２μｍｏｌ／ｋｇの脂質置換基（Ｘ）を有するＸ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$をｓ．ｃ．注射した。すべてのデータは、中央値±ＳＥＭとして表される。略語；ＰＷＴ＝足引っ込め閾値、ＣＦＡ＝完全フロイントアジュバント。Ａ：不飽和脂肪酸および脂肪二酸。Ｂ：脂肪酸長。Ｃ：アミノ酸付加物およびコレステロール。

【図１９】熱過敏症に対するｍＰＤ５の有効性。マウスは、５０μＬのＣＦＡを右後足にｉ．ｐｌ．注射された。ＣＦＡ注射後３日目に、ハーグリーブステストにおけるレーザビームでの刺激に対するＰＷＬの低下は、熱過敏症を確認した。マウスに１０μｍｏｌ／ｋｇ（１０μｌ　ＰＢＳ／ｇ）のｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$（ｍＰＤ５）をｓ．ｃ．注射し、健康な（対側の）足のＰＷＬに影響することなく、ＣＦＡ注射した（同側の）足におけるＰＷＬの有意な増加を生じた。ＰＢＳ注射は、ｎ＝６マウス／群でいずれの足にもＰＷＬに影響しなかった。すべてのデータは、中央値±ＳＥＭとして表される。略語；ＰＷＴ＝足引っ込め潜伏期間、ＣＦＡ＝完全フロイントアジュバント。

【発明を実施するための形態】

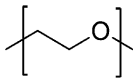
【００１９】

定義

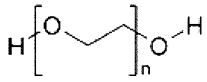
本明細書において、非ペプチドは、ペプチドを含まないＰＩＣＫ１阻害剤の一部を指す。ペプチドは、アミド結合（複数を含む）を介して連結された２つのまたはそれより多いα－またはβ－アミノ酸を含むものと理解される。したがって、非ペプチドは、アミド結合（複数を含む）を介して連結された２つのまたはそれより多いα－またはβ－アミノ酸を含まない化合物を指す。非ペプチド部分は、単一のアミノ酸を含む可能性がある。

【００２０】
本明細書において、親油性脂肪族基は、親油性の特徴を有する脂肪族基を指す。それは、脂肪族鎖または脂肪族環を含む可能性がある。本明細書で使用されるような用語、脂質は、そのような親油性脂肪族基を指す。親油性脂肪族基は、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤を形成するように例えばＮＰＥＧリンカーへの親油性脂肪族基の付着のために使用される可能性がある官能基を含む可能性がある。親油性脂肪族基の例は、脂肪酸、ゴナン、ステロールおよびステロイドを含むがこれらに限定されない。
【００２１】
本明細書において、二価は、配位のための２つの部位を含む、例えばＰＩＣＫ１などのタンパク質に結合するなど、配位できる２つのペプチドリガンドを含む、化合物を指す。二価ペプチドリガンドは、本明細書で言及されるように、ペプチドの二量体を形成するなど、リンカーを介して共役される２つのペプチドリガンドを含む化合物であり得る。したがって、本明細書に開示されるような二価ペプチドリガンドはまた、二量体ペプチドリガンドと呼ばれる場合がある。
【００２２】
本明細書において、官能基は、化合物中に存在する化学基を指す。官能基は、求核性または求電子性であるなどの、反応性を含み、他の化合物へ上記化合物をコンジュゲートするために使用できる。官能基の例は、カルボン酸、アルコールおよびアミンを含むがこれらに限定されない。
【００２３】
本明細書において、ミセル構造またはミセルは、ＰＩＣＫ１阻害剤の配置を指す。本明細書においてその用語が使用されるとき、ミセルは、非極性テールが内側に面しており、かつ極性ヘッドが外側に面している、水溶液中の配置を有する（実施例３）。
【００２４】
本明細書において、回転半径（Ｒｇ）は、物体の回転軸から上記物体の種々の粒子の二乗平均平方根距離を指す。回転半径はしたがって、上記物体のサイズの尺度である。
【００２５】
本明細書において、検出可能な部分は、検出可能な信号を引き起こす部分を指す。検出のための当業者に既知である従来の部分は、発蛍光団、発色団、放射性同位体または酵素などを使用できる。
【００２６】
本明細書において、タンパク質を構成するアミノ酸は、ＩＵＰＡＣからの推奨にしたがって一文字または三文字コードのいずれかを使用して命名され、例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｈｅｍ．ｑｍｗ．ａｃ．ｕｋ／ｉｕｐａｃを参照されたい。特に何も指定されない場合、アミノ酸は、Ｄ型またはＬ型であり得る。好ましい実施形態において、本開示のアミノ酸は、Ｌ－アミノ酸である。
【００２７】
本明細書において、α－カルボン酸は、アミノ酸のα－炭素に共役されたカルボン酸を指す。
【００２８】
本明細書において、α－アミンは、α－アミノ酸のα－炭素に共役されたアミンを指す。本明細書において、β－アミンは、β－アミノ酸のβ－炭素に共役されたアミンを指す。
【００２９】
ここで、エチレングリコール部分は、ＰＥＧまたはＮＰＥＧリンカーを構成する構造単位を指す。「エチレングリコール部分」のより技術的な名称は、「オキシエチレン」であり、その単位の化学式は、ここに示される：
【００３０】

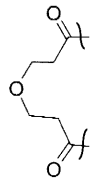
【化１】



【００３１】
ＰＥＧ、ポリエチレングリコール；ＰＥＧは、化学式$C_{2n+2}H_{4n+6}O_{n+2}$および繰り返し構造：
【００３２】
【化２】



【００３３】
を有するエチレングリコールのポリマーであり、
式中、PEG_xは、ｘ個の繰り返しエチレングリコール単位を有するＰＥＧリンカー、例えば、４個のエチレングリコール部分（ｘ＝４）のポリマーに対応するPEG_4を指す。PEG_0は、ｘ＝０を有するリンカーを指し、各プロピオン酸部分のＣ３炭素を介したエーテル結合により共有結合される２つのプロピオン酸を含むリンカーを指す。そのような構造は、本明細書においてPEG_0（図７）とも呼ばれ、式（ＩＩＩ）：
【００３４】
【化３】

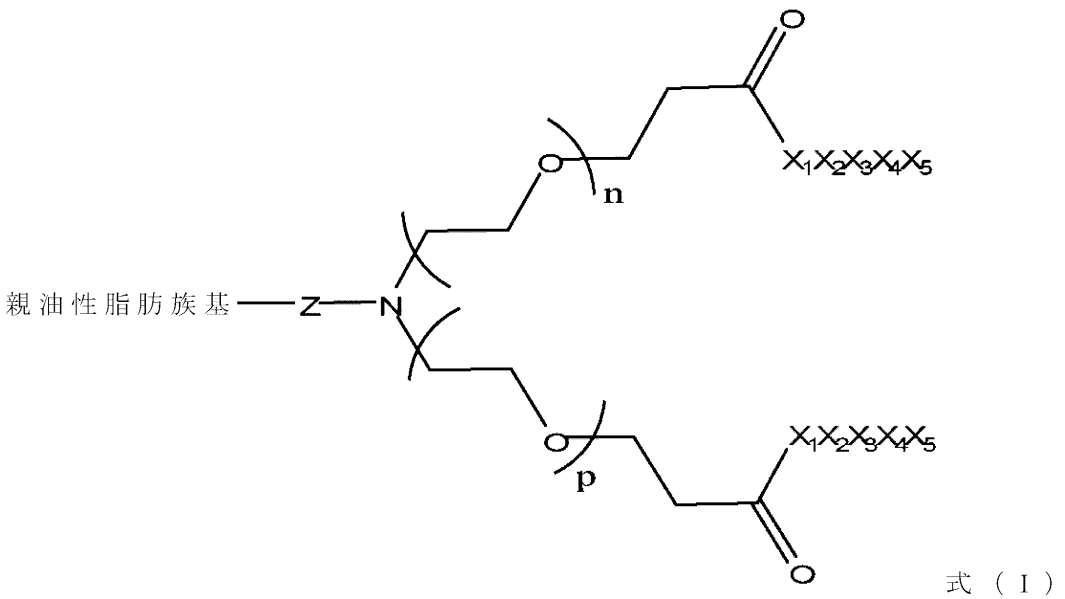


式（ＩＩＩ）

【００３５】
による構造を有する。
【００３６】
ＮＰＥＧは、本明細書に記載のリンカー種であり、古典的なＰＥＧリンカーに由来し、骨格酸素原子の１つまたは複数は、窒素原子により置き換えられる。$NPEG_x$は、ｘ個の繰り返しエチレングリコール単位を有するＮＰＥＧリンカー、例えば４個のエチレングリコール部分（ｘ＝４）のポリマーに対応する$NPEG_4$を指し、骨格酸素原子の１つまたは複数は、窒素原子により置き換えられる。$NPEG_0$は、上で定義されたようにｘ＝０を有するリンカーを指し、エーテルは、アミンにより置き換えられる。
【００３７】
ＰＤＺは、ドメインシナプス後肥厚部タンパク質－９５（ＰＳＤ－９５）、ショウジョウバエホモログディスクラージ腫瘍サプレッサー（ＤｌｇＡ）、および閉鎖帯－１タンパク質（ｚｏ－１）を共有すると発見された最初の３個のタンパク質の最初の文字を組み合わせた頭文字である。ＰＤＺドメインは、シグナル伝達タンパク質に認められる８０～９０個のアミノ酸の一般的な構造ドメインである。ＰＤＺドメインを含むタンパク質は、膜内の受容体タンパク質を細胞骨格成分に固定することにおいて重要な役割を果たす場合が多い。
【００３８】
アミド結合は、カルボン酸とアミンの間の反応（水の随伴除去による）により形成される。反応が２つのアミノ酸残基間である場合、反応の結果として形成される結合は、ペプ

チド結合（peptide linkage）（ペプチド結合（peptide bond））として既知である。
【００３９】
エステル結合は、カルボン酸とアルコールの間の反応（水の随伴除去による）により形成される。
【００４０】
フォン・フライテストは、フォン・フライ・フィラメントとの接触感度を評価する。これらのフィラメントは、マウスが穴あきの床を有する制限された領域内で快適な位置に落ち着いた後、足の下側に適用される。フィラメントは、設定された力が足に適用されると屈曲するように校正される。フィラメントは、足の引っ込めが検出されるまで、増加する剛性の順に提示される。
【００４１】
存在しないは、存在しないアミノ酸に直接隣接するアミノ酸残基が、従来のアミド結合により互いに直接連結されると理解されるべきである。
【００４２】
ＡＭＰＡＲはまた、ＡＭＰＡ受容体、ＡＭＰＡ型グルタミン酸受容体、またはα－アミノ－３－ヒドロキシ－５－メチル４－イソキサゾールプロピオン（ＡＭＰＡ）酸受容体とも呼ばれてよく、中枢神経系（ＣＮＳ）における高速シナプス伝達を媒介するグルタミン酸に対するイオンチャネル型膜貫通受容体である。ＰＩＣＫ１は、ＰＤＺドメインを介してＡＭＰＡＲと相互作用する。
【００４３】
二価ＰＩＣＫ１阻害剤の化学構造
本開示は、ＰＩＣＫ１に結合できる二価ペプチドリガンドを含むＰＩＣＫ１阻害剤を提供し、二価ペプチドリガンドはさらに、脂質に共役される。二価ペプチドリガンドに共役された脂質は、ＰＩＣＫの非常に強力な阻害剤を提供し、これは不適応可塑性に関連する疾患または障害の処置のために使用できる。
【００４４】
一実施形態において、ペプチド部分および非ペプチド部分を含むＰＩＣＫ１阻害剤が提供され、ペプチド部分は、
ａ）一般式：$X_1X_2X_3X_4X_5$のアミノ酸配列を含む第１のペプチド；および
ｂ）一般式：$X_1X_2X_3X_4X_5$のアミノ酸配列を含む第２のペプチド
（式中、
X_1は、Ｈ、Ｎ、Ｆ、もしくはＴであるか存在しない；
X_2は、Ｗ、Ｓ、Ｅ、もしくはＹである；または存在しない；
X_3は、Ｌ、Ｖ、またはＩである；
X_4は、Ｋ、Ｉ、またはＲである；および
X_5は、Ｖである）
からなり；
非ペプチド部分は：
ｃ）第２のペプチドに第１のペプチドを連結するリンカー、および
ｄ）親油性脂肪族基
を含む。
【００４５】
一実施形態において、ペプチド部分および非ペプチド部分を含むＰＩＣＫ１阻害剤が提供され、ペプチド部分は、
ａ）一般式：$X_1X_2X_3X_4X_5$のアミノ酸配列からなる第１のペプチド；および
ｂ）一般式：$X_1X_2X_3X_4X_5$のアミノ酸配列からなる第２のペプチド
からなり；
（式中、
X_1は、Ｈ、Ｎ、Ｆ、もしくはＴであるか存在しない；
X_2は、Ｗ、Ｓ、Ｅ、もしくはＹである；または存在しない；

Ｘ３は、Ｌ、Ｖ、またはＩである；
Ｘ４は、Ｋ、Ｉ、またはＲである；および
Ｘ５は、Ｖである）
非ペプチド部分は：
ｃ）第２のペプチドに第１のペプチドを連結するリンカー、および
ｄ）親油性脂肪族基
を含む。
【００４６】
一実施形態において、ＰＩＣＫ１阻害剤は、式（Ｉ）：
【００４７】
【化４】



式（Ｉ）

【００４８】
の一般構造を有し、
式中、
Ｚは、単結合または単一アミノ酸である；
ｎは、０～１２の整数である；
ｐは、０～１２の整数である。
【００４９】
ペプチド部分
本開示のＰＩＣＫ１阻害剤のペプチドリガンド部分は、ＰＩＣＫ１のＰＤＺドメインへのＰＩＣＫ１阻害剤の結合を提供する。本開示のＰＩＣＫ１阻害剤のペプチド部分は、第１および第２のペプチドを含む。一実施形態において、第１および第２のペプチドは同一である。別個の実施形態において、第１および第２のペプチドは、互いに異なる。一実施形態において、第１および第２のペプチドは、二価ペプチドリガンドを形成するように、リンカーを介して連結される。
【００５０】
一実施形態において、第１および／または第２のペプチドは、ＨＷＬＫＶ（配列番号５４）、ＦＥＩＲＶ（配列番号３４）、ＮＳＩＩＶ（配列番号５）、ＮＳＶＲＶ（配列番号８）、ＮＳＬＲＶ（配列番号５３）、ＮＳＩＲＶ（配列番号６）、ＮＹＩＩＶ（配列番号１３）、ＮＹＩＲＶ（配列番号１４）、ＴＳＩＲＶ（配列番号１８）、ＹＩＩＶ（配列番号４９）、ＳＶＲＶ（配列番号４４）、ＥＩＲＶ（配列番号４６）、ＬＲＶ、ＩＩＶ、ＶＲＶ、およびＩＲＶからなる群より選択される。
【００５１】

一実施形態において、第１および／または第２のペプチドは、ＨＷＬＫＶ、ＮＳＶＲＶ、ＮＳＬＲＶ、ＮＳＩＲＶ、ＴＳＩＲＶ、ＥＩＲＶ、ＹＩＩＶ、ＩＩＶ、ＶＲＶおよびＩＲＶからなる群より選択される。

【００５２】

一実施形態において、第１および／または第２のペプチドは、ＮＳＶＲＶ、ＮＳＬＲＶ、ＮＳＩＲＶ、ＴＳＩＲＶ、ＥＩＲＶ、ＹＩＩＶ、ＩＩＶ、ＶＲＶ、およびＩＲＶからなる群より選択される。

【００５３】

一実施形態において、第１および／または第２のペプチドは、ＨＷＬＫＶ、ＦＥＩＲＶ、ＮＳＩＩＶ、ＮＳＶＲＶ、ＮＳＬＲＶ、ＮＳＩＲＶ、ＹＩＩＶ、ＳＶＲＶ、ＶＲＶ、およびＬＲＶからなる群より選択される。

【００５４】

一実施形態において、第１および／または第２のペプチドは、ＦＥＩＲＶ、ＮＳＩＩＶ、ＮＳＶＲＶ、ＮＳＬＲＶ、ＮＳＩＲＶ、ＹＩＩＶ、ＳＶＲＶ、ＶＲＶ、およびＬＲＶからなる群より選択される。

【００５５】

一実施形態において、第１および／または第２のペプチドは、ＨＷＬＫＶ、ＮＳＶＲＶまたはＮＳＩＲＶである。

【００５６】

一実施形態において、第１および／または第２のペプチドは、ＨＷＬＫＶである。

【００５７】

一実施形態において、第１および／または第２のペプチドは、一般式：$X_1X_2X_3X_4X_5$のアミノ酸配列を含み、式中：
X_1は、Ｎ、Ｆ、もしくはＴであるか存在しない；
X_2は、Ｓ、Ｅ、もしくはＹである；または存在しない；
X_3は、Ｖ、ＬもしくはＩである；
X_4は、ＩまたはＲである；および
X_5は、Ｖである。

【００５８】

一実施形態において、第１および／または第２のペプチドは、一般式：$X_1X_2X_3X_4X_5$のアミノ酸配列を含み、式中：
X_1は、ＮもしくはＴであるか存在しない；
X_2は、Ｓ、Ｅ、もしくはＹである；または存在しない；
X_3は、Ｖ、Ｌ、またはＩである；
X_4は、ＩまたはＲである；および
X_5は、Ｖである。

【００５９】

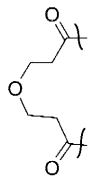
一実施形態において、第１および／または第２のペプチドは、一般式：$X_1X_2X_3X_4X_5$のアミノ酸配列を含み、式中：
X_1は、ＮもしくはＦであるか存在しない；
X_2は、Ｓ、Ｅ、もしくはＹである；または存在しない；
X_3は、Ｖ、Ｌ、またはＩである；
X_4は、ＩまたはＲである；および
X_5は、Ｖである。

【００６０】

一実施形態において、第１および／または第２のペプチドは、３個～１５個の範囲のアミノ酸、例えば３個～１４個の範囲のアミノ酸、例えば３個～１３個の範囲のアミノ酸、例えば３個～１２個の範囲のアミノ酸、例えば３個～１１個の範囲のアミノ酸、例えば３個～１０個の範囲のアミノ酸、例えば３個～９個の範囲のアミノ酸、例えば３個～８個の範囲のアミノ酸、例えば３個～７個の範囲のアミノ酸、例えば３個～６個の範囲のアミノ

酸、例えば３個～５個の範囲のアミノ酸の長さを有するアミノ酸配列を含む。
【００６１】
好ましい実施形態において、第１および／または第２のペプチドは、３個～５個の範囲のアミノ酸長を有する、例えば３個のアミノ酸長を有する、例えば４個のアミノ酸長を有する、例えば５個のアミノ酸長を有するアミノ酸配列を含む。
【００６２】
本開示の実施例１２および図１４において示されるように、５個、４個または３個のアミノ酸長を有する第１および第２のペプチドからなるペプチド部分を含むＰＩＣＫ１阻害剤は、炎症性疼痛の緩和などの、疼痛の緩和において有効性を示す。
【００６３】
ＰＩＣＫ１に対する類似またはより高い親和性は、本開示の第１および／または第２のペプチドの配列を含む、より長いペプチドについて、以前に示されている（国際公開第２０２０／０８３９０５号）。
【００６４】
非ペプチド部分
本開示のＰＩＣＫ１阻害剤は、非ペプチド部分を含む。ＰＩＣＫ１阻害剤の非ペプチド部分は、二価ペプチドリガンドを形成するように、第１および第２のペプチドを組み合わせるリンカーを含む。非ペプチド部分は、上記リンカーに共役されてよい脂質をさらに含む。一実施形態において、脂質は、リンカーの窒素原子に直接連結される。
【００６５】
別個の実施形態において、非ペプチド部分は、単一のアミノ酸をさらに含む。上で定義されるように、非ペプチド部分における単一のアミノ酸の存在は、非ペプチド部分にペプチドを導入しないことが理解される。上で定義されるように、ペプチドは、アミド結合を介して連結された２つのまたはそれより多いα－またはβ－アミノ酸を含むと理解される。単一のアミノ酸の存在は、定義されるような、そのようなペプチドを導入しない。一実施形態において、非ペプチド部分に存在する単一のアミノ酸は、検出可能な部分の付着のためのハンドルを提供するように機能する。
【００６６】
リンカー
一実施形態において、リンカーは、ＮＰＥＧリンカーである。ＮＰＥＧリンカーは、１つまたは複数の骨格酸素原子が窒素で置き換えられる０個～２４個の範囲のエチレングリコール部分、例えば１つまたは複数の骨格酸素原子が窒素原子で置き換えられる、０個～２０個の範囲、例えば０個～１６個の範囲、例えば０個～１４個の範囲、例えば０個～１２個の範囲、例えば０個～１０個の範囲、例えば０個～８個の範囲、例えば０個～６個の範囲、例えば０個～４個の範囲、例えば０個～２個の範囲のエチレングリコール部分を含む可能性がある。好ましくはＮＰＥＧ－リンカーは、１つまたは複数の骨格酸素原子が窒素原子で置き換えられる４個のエチレングリコール部分を含む。一実施形態において、ＮＰＥＧ－リンカーは、１つまたは複数の骨格酸素原子が窒素原子で置き換えられる３個のエチレングリコール部分を含む。一実施形態において、ＮＰＥＧ－リンカーは、１つまたは複数の骨格酸素原子が窒素原子で置き換えられる２個のエチレングリコール部分を含む。一実施形態において、ＮＰＥＧ－リンカーは、１つまたは複数の骨格酸素原子が窒素原子で置き換えられる１個のエチレングリコール部分を含む。一実施形態において、ＮＰＥＧ－リンカーは、１つまたは複数の骨格酸素原子が窒素原子で置き換えられる０個のエチレングリコール部分を含む、すなわち、リンカーは、酸素原子が窒素原子で置き換えられる、図７に開示されるようなＰＥＧ$_0$の構造を有する。上で定義されるように、ＮＰＥＧ$_0$リンカーは、ｘ＝０を有するリンカーを指し、かつ各プロピオン酸部分のＣ３炭素を介してアミン結合において組み合わされる２つのプロピオン酸部分を含むリンカーを指す。一実施形態において、リンカーは、式（ＩＩＩ）、
【００６７】

【化５】



式（ＩＩＩ）

【００６８】
による構造を有する。

【００６９】
一実施形態において、リンカーは、ＮＰＥＧリンカーである。ＮＰＥＧリンカーは、１つまたは複数の骨格酸素原子が窒素原子で置き換えられる１個～２４個の範囲のエチレングリコール部分、例えば１つまたは複数の骨格酸素原子が窒素原子で置き換えられる、１個～２０個の範囲、例えば１個～１６個の範囲、例えば１個～１４個の範囲、例えば１個～１２個の範囲、例えば１個～１０個の範囲、例えば１個～８個の範囲、例えば１個～６個の範囲、例えば１個～４個の範囲、例えば１個～２個の範囲のエチレングリコール部分を含んでよい。

【００７０】
ＮＰＥＧリンカーの１つまたは複数の窒素原子は、例えばＮＰＥＧリンカーの中央に位置する、またはＮＰＥＧリンカーの一端に向かって位置するなど、ＮＰＥＧリンカーに沿った任意の位置に位置してよい。

【００７１】
一実施形態において、ＮＰＥＧ－リンカーの１つの骨格酸素は、窒素原子で置き換えられる。

【００７２】
ＮＰＥＧリンカーは、各端に官能基を含んで、第１および第２のペプチドへの共役のために提供される。一実施形態において、ＮＰＥＧリンカーは、各端にカルボン酸を含む。ＮＰＥＧリンカーのカルボン酸は、第１および第２のペプチドのＮ末端に結合されてよく、アミド結合を介して第１および第２のペプチドへのリンカーの共役を提供する。

【００７３】
親油性脂肪族基
本開示のＰＩＣＫ１阻害剤の非ペプチド部分は、脂質を含む。脂質は、リンカーに直接共役されてよい、または単一のアミノ酸を介してリンカーに共役されてよい。

【００７４】
本開示の脂質は、親油性脂肪族基である。本開示のＰＩＣＫ１阻害剤の非ペプチド部分に存在する親油性脂肪族基は、脂肪族鎖または脂肪族環であり得る。

【００７５】
一実施形態において、親油性脂肪族基は、脂肪族鎖である。脂肪族鎖は、分岐したまたは非分岐の鎖であり得る。脂肪族鎖は、飽和したまたは不飽和の鎖であり得る。

【００７６】
一実施形態において、親油性脂肪族基は、脂肪族環である。脂肪族環は、ステロールなどのゴナン構造を含んでよい。代わりに、脂肪族環は、コレステロールなどのステロイドを含んでよい。実施例１６において、コレステロールを有するコンストラクトが疼痛の動物モデルにおいて活性を有することが、示される。好ましくは、コレステロール部分は、例えばアスパラギン、例えばベータＡｓｐなどのアミノ酸を介してＮ－ＰＥＧに連結される。

【００７７】
一実施形態において、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤の非ペプチド部分に存在する親油性脂肪族基は、カルボン酸、アルコールまたはアミンなどの官能基をさらに含む。上記官能基

は、直接リンカーにまたは単一のアミノ酸を介してリンカーに、などの、ＰＩＣＫ１阻害剤の残りの部分への親油性脂肪族基の共役を与える。

【００７８】

一実施形態において、親油性脂肪族基は、アルコールを含む。

【００７９】

一実施形態において、親油性脂肪族基は、カルボン酸を含む。

【００８０】

一実施形態において、親油性脂肪族基は、カルボン酸を含む脂肪族鎖である、したがって脂肪酸である。

【００８１】

親油性脂肪族基は、C_4～C_{26}脂肪酸であり得る。親油性脂肪族基は、飽和脂肪酸または不飽和脂肪酸であり得る。一実施形態において、親油性脂肪族基は、C_{16}脂肪酸またはC_{18}脂肪酸である。

【００８２】

一実施形態において、親油性脂肪族基は、４個～２６個の範囲の炭素原子、例えば４個～２４個の範囲、例えば４個～２２個の範囲、例えば４個～２０個の範囲、例えば４個～１８個の範囲、例えば４個～１６個の範囲、例えば４個～１４個の範囲、例えば４個～１２個の範囲、例えば４個～１０個の範囲、例えば４個～８個の範囲、例えば４個～６個の範囲の炭素原子を含む。

【００８３】

一実施形態において、親油性脂肪族基は、４個～２６個の範囲の炭素原子、例えば６個～２６個の範囲、例えば８個～２６個の範囲、例えば１０個～２６個の範囲、例えば１２個～２６個の範囲、例えば１４個～２６個の範囲、例えば１６個～２６個の範囲、例えば１８個～２６個の範囲、例えば２０個～２６個の範囲、例えば２２個～２６個の範囲、例えば２４個～２６個の範囲の炭素原子を含む。

【００８４】

一実施形態において、親油性脂肪族基は、４個～２６個の範囲の炭素原子、例えば６個～２４個の範囲、例えば８個～２２個の範囲、例えば１０個～２０個の範囲、例えば１２個～１８個の範囲、例えば１４個～１８個の範囲、例えば１４個～１６個の範囲の炭素原子または１６個～１８個の炭素原子を含む。

【００８５】

一実施形態において、親油性脂肪族基は、酢酸、酪酸、カプロン酸、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、マルガリン酸、ステアリン酸、アラキドン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、セロチン酸、カプロレイン酸、ラウロレイン酸、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、ガドレイン酸、エルカ酸からなる群より選択される。好ましい実施形態において、親油性脂肪族基は、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、マルガリン酸、ステアリン酸からなる群より選択される。より好ましい実施形態において、親油性脂肪族基は、ミリスチン酸である。

【００８６】

親油性脂肪族基が脂肪酸部分である実施形態において、それは飽和したまたは不飽和のシス配置またはトランス配置であり得る。実施例１６は、Ｃ１４脂肪酸部分について、不飽和（シスまたはトランス）および飽和部分がインビボで類似の効果を有することを示す。一実施形態において、脂肪酸部分は、１つ、２つまたは３つの二重結合を有するなどの多価不飽和である。いくらかの実施形態において、１つの二重結合は、ｎ－３またはｎ－６位にある。

【００８７】

脂肪酸部分は、カルボン酸基と反対の端に追加の官能基を有することにより修飾されてよい。そのような官能基は、追加のカルボン酸、アルコール、ケトンまたはアルデヒドであり得る。実施例１６は、親油性脂肪族基が末端カルボン酸を含んでよく、疼痛の動物モ

デルにおいて有効性を有することを示す。

【００８８】

一実施形態において、親油性脂肪族基は、ミリスチン酸であり、本明細書でミリストイルまたはｍｙｒとも呼ばれる。

【００８９】

一実施形態において、親油性脂肪族基は、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、ドコサヘキサエン酸（ＤＮＡ）、およびシス－９－オクタデセン酸からなる群より選択される。

【００９０】

一実施形態において、親油性脂肪族基は、例えばテトラデカン二酸、ヘキサデカン二酸、またはオクタデカン二酸などの、二酸である。

【００９１】

随意選択のアミノ酸

非ペプチド部分は、単一のアミノ酸をさらに含んでよい。非ペプチド部分に存在するそのような単一のアミノ酸は、親油性脂肪族基の付着のためまたは検出可能な部分の付着のためのハンドルを提供するように機能してよい。

【００９２】

一実施形態において、１つのアミノ酸は、α－アミノ酸またはβ－アミノ酸である。１つのアミノ酸は、Ａｓｐ、β－Ａｓｐ、β－Ｓｅｒ（３－アミノ－２－（ヒドロキシメチル）プロパン酸）、β－ホモ－Ｓｅｒ（３－アミノ－４－ヒドロキシ酪酸）およびβ－Ｌｙｓ（３，６－ジアミノヘキサン酸）からなる群より選択されてよい。

【００９３】

実施例１１において本発明者らが示すように、親油性脂肪族基は、インビボで機能的効果を有するために、本発明にとって必須である。

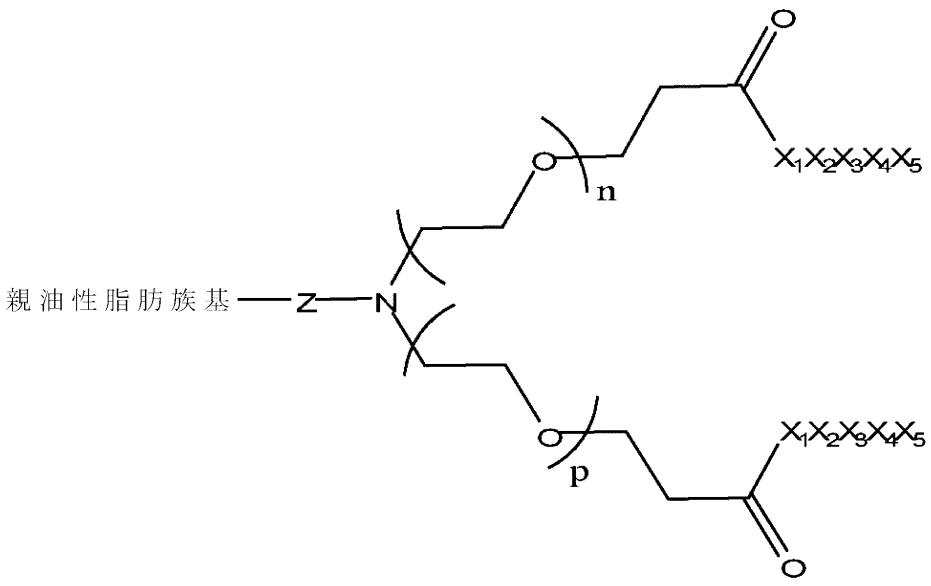
【００９４】

連結性

一実施形態において、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤のペプチドおよび非ペプチド部分は、式（Ｉ）の一般構造を有するＰＩＣＫ１阻害剤を形成するために共役される。

【００９５】

【化６】



式（Ｉ）

【００９６】

例えば親油性脂肪族基が脂肪酸であると説明される場合、脂肪酸のカルボン酸のカルボニル基のみがＰＩＣＫ１阻害剤に存在すると理解される。例えばリンカーのアミンへの脂

肪酸の共役時に、アミド結合が形成され、同時に水が失われる。したがって、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤を形成するために組み合わせられる異なる成分は、説明された化合物から生じる可能性がある。親油性脂肪族基が二酸である特定の場合、一実施形態において、カルボン酸の１つのみが反応してリンカーのアミンとのアミドを形成し、一方で第２のカルボン酸は、最終のＰＩＣＫ１阻害剤においてカルボン酸のままである。

【００９７】

本開示のＮＰＥＧリンカーは例えば、各端でカルボン酸を含んでよい。ＰＩＣＫ１阻害剤中に認められる、得られるＮＰＥＧリンカーは、カルボン酸を含まないがＮＰＥＧリンカーを第１および／または第２のペプチドに共役する場合に形成されるアミド結合に存在するカルボニル基のみを含むと理解される。したがって、一実施形態において、ＮＰＥＧリンカーは、ＮＰＥＧリンカーのカルボン酸と第１および／または第２のペプチドのＮ末端の間に形成されたアミド結合を介して第１および／または第２のペプチドに共役される。一実施形態において、ＮＰＥＧリンカーは、ＮＰＥＧリンカーのカルボン酸と第１および／または第２のペプチドにおけるアミノ酸の側鎖官能基の間に形成されたアミド結合を介して、例えばアミドを形成するためにＮＰＥＧリンカーのカルボン酸と第１および／または第２のペプチドにおけるリジン側鎖のアミンの間のアミド結合の形成により、第１および／または第２のペプチドに共役される。

【００９８】

ＮＰＥＧリンカーの窒素原子はさらに、直接または単一のアミノ酸を介してのいずれかで親油性脂肪族基に共役されてよい。したがって一実施形態において、親油性脂肪族基は、カルボン酸などの官能基を介して、例えばアミドを形成することにより、ＮＰＥＧリンカーの窒素原子に共役される。

【００９９】

一実施形態において、単一のアミノ酸は、アミドを形成するためにα－カルボン酸を介してＮＰＥＧリンカーの窒素原子に共役され、さらに親油性脂肪族基に共役される。親油性脂肪族基へのさらなる共役は、アミド結合を形成するためにα－またはβ－アミン（それぞれα－またはβ－アミノ酸）を介するか、アミド結合またはエステル結合を形成するためにカルボン酸、アルコールまたはアミンなどの側鎖官能基を介してよい。

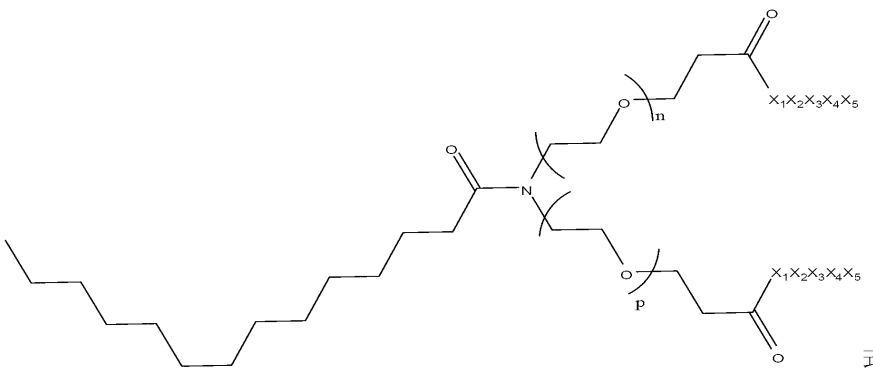
【０１００】

好ましい構造

一実施形態において、ＰＩＣＫ１阻害剤は、式（ＩＩ）

【０１０１】

【化７】



式（ＩＩ）

【０１０２】

による構造を有しており、

式中、

ｎは０～１２の整数、好ましくは２である；

ｐは０～１２の整数、好ましくは２である。

【０１０３】

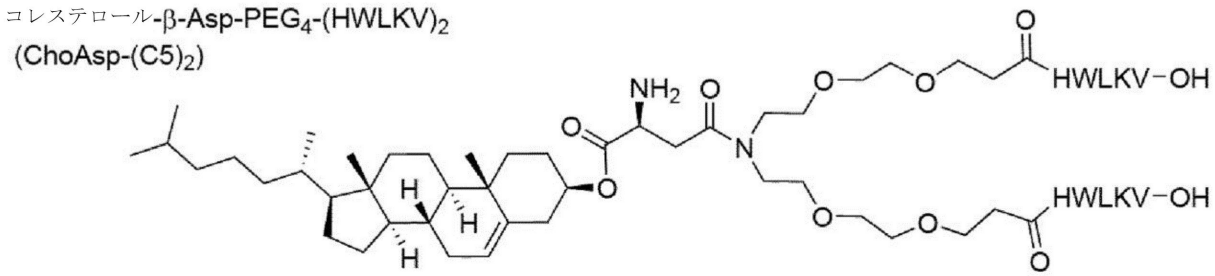
好ましい実施形態において、ＰＩＣＫ１阻害剤は、式（ＩＩ）による構造を有しており、式中、ｎは２であり、ｐは２である。そのような構造は、本明細書ではｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$と呼ばれる。

【０１０４】

他の好ましい構造を、以下に開示する。不飽和化は、トランス配置またはシス配置であり得る。

【０１０５】

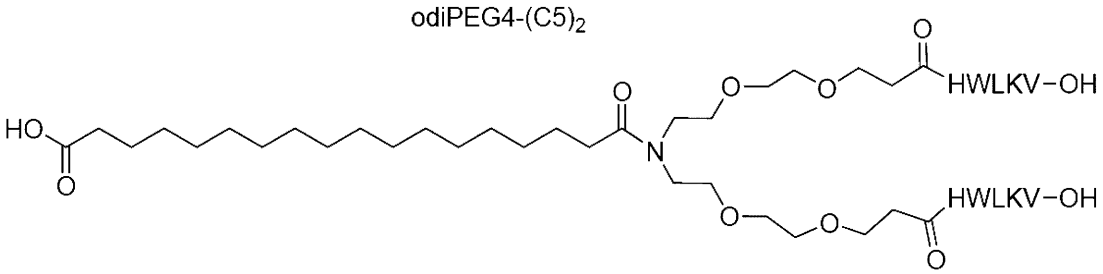
【化８】



式（ＩＶ）

【０１０６】

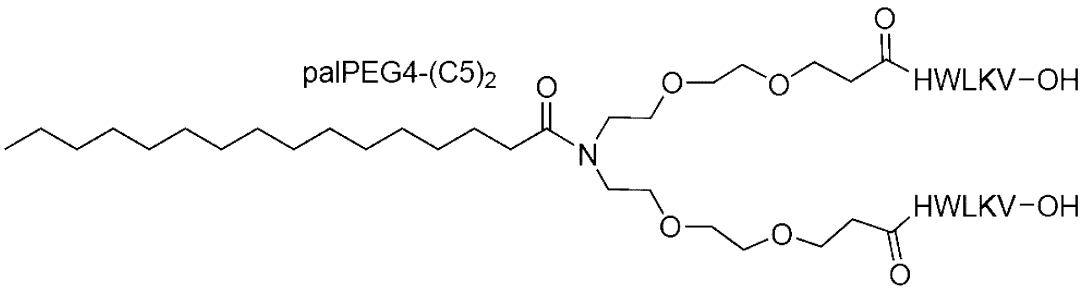
【化９】



式（Ｖ）

【０１０７】

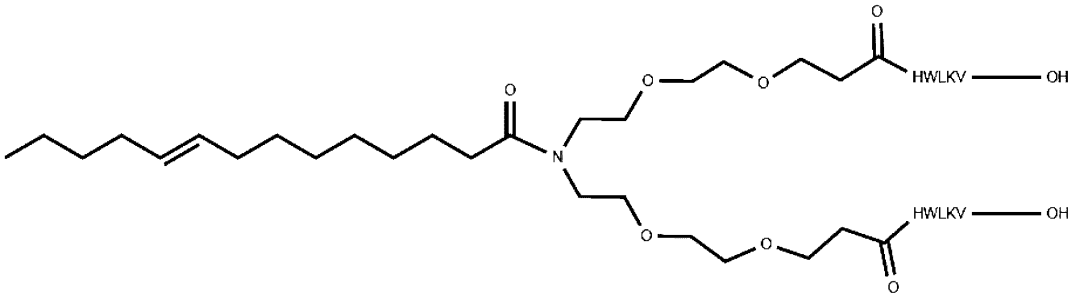
【化１０】



式（ＶＩ）

【０１０８】

【化１１】



式（ＶＩＩ）

【０１０９】
作用の機序
本開示、実施例３において示されるように、驚いたことに、本発明のＰＩＣＫ１阻害剤はミセル構造を形成できることが認められた。脂質を含まずそのためミセル構造を形成できない二価ペプチドリガンドと比較して、本発明のＰＩＣＫ１阻害剤の改善された効力は、このミセル構造の形成のためであると仮定される。
【０１１０】
ＰＩＣＫ１は二量体構造で存在することが既知であり、二量体化はＢＡＲドメインにより媒介される。四量体などの二量体の二量体を提供する二量体ＰＩＣＫ１の二量体化が、タンパク質機能の自己阻害をもたらすことが報告されている（Ｋａｒｌｓｅｎ，Ｍ．Ｌ．ｅｔ　ａｌ．２０１５）。したがって、ミセルＰＩＣＫ１阻害剤はいくつかのＰＩＣＫ１タンパク質を結合しまとめることができ、それによりＰＩＣＫ１の観察された効果的な阻害をもたらすと仮定できる。
【０１１１】
したがって、一実施形態において、ＰＩＣＫ１阻害剤は、自己集合してミセル構造を形成するなど、溶液中で高次構造に自己集合する。
【０１１２】
一実施形態において、高次構造は、少なくとも１５Å、例えば少なくとも１７Å、例えば少なくとも１９Å、例えば少なくとも２０Å、例えば少なくとも２１Å、例えば少なくとも２２Å、例えば少なくとも２３Åの回転半径（Ｒｇ）を有する。
【０１１３】
一実施形態において、高次構造は、少なくとも１５Å、例えば少なくとも１７Å、例えば少なくとも１９Å、例えば少なくとも２０Å、例えば少なくとも２１Å、例えば少なくとも２２Å、例えば少なくとも２３Å、例えば少なくとも２４Å、例えば少なくとも２５Å、例えば少なくとも２６Å、例えば少なくとも２７Å、例えば少なくとも２８Å、例えば少なくとも２９Å、例えば少なくとも３０Å、例えば少なくとも３１Åの回転半径（Ｒｇ）を有する。
【０１１４】
一実施形態において、高次構造は、４個～２０個の範囲のＰＩＣＫ１阻害剤、例えば４個～１８個の範囲、例えば４個～１６個の範囲、例えば４個～１４個の範囲、例えば４個～１２個の範囲、例えば４個～１０個の範囲、例えば４個～８個の範囲、例えば６個～８個の範囲のＰＩＣＫ１阻害剤から形成される。
【０１１５】
一実施形態において、高次構造は、４個～４０個の範囲のＰＩＣＫ１阻害剤、例えば６個～４０個の範囲、例えば８個～４０個の範囲、例えば１０個～４０個の範囲、例えば１２個～４０個の範囲、例えば１４個～４０個の範囲、例えば１６個～４０個の範囲、例えば１８個～４０個の範囲、例えば２０個～４０個の範囲、例えば２２個～４０個の範囲、

例えば２４個～４０個の範囲、例えば２６個～４０個の範囲、例えば２８個～４０個の範囲、例えば３０個～４０個の範囲、例えば３２個～４０個の範囲、例えば３４個～４０個の範囲、例えば３６個～４０個の範囲、例えば３８個～４０個の範囲のＰＩＣＫ１阻害剤から形成される。

【０１１６】

一実施形態において、高次構造は、４個～４０個の範囲のＰＩＣＫ１阻害剤、例えば４個～３８個の範囲、例えば４個～３６個の範囲、例えば４個～３４個の範囲、例えば４個～３２個の範囲、例えば４個～３０個の範囲、例えば４個～２８個の範囲、例えば４個～２６個の範囲、例えば４個～２４個の範囲、例えば４個～２２個の範囲、例えば４個～２０個の範囲、例えば４個～１８個の範囲、例えば４個～１６個の範囲、例えば４個～１４個の範囲、例えば４個～１２個の範囲、例えば４個～１０個の範囲、例えば４個～８個の範囲、例えば４個～６個の範囲のＰＩＣＫ１阻害剤から形成される。

【０１１７】

一実施形態において、高次構造は、４個～４０個の範囲のＰＩＣＫ１阻害剤、例えば６個～３８個の範囲、例えば６個～３６個の範囲、例えば８個～３４個の範囲、例えば８個～３２個の範囲、例えば１０個～３０個の範囲、例えば１０個～２８個の範囲、例えば１２個～２６個の範囲、例えば１４個～２４個の範囲、例えば１６個～２４個の範囲、例えば１６個～２２個の範囲、例えば１８個～２２個の範囲、例えば１９個～２１個の範囲、例えば２０個のＰＩＣＫ１阻害剤から形成される。

【０１１８】

一実施形態において、本明細書に開示されるようなＰＩＣＫ１阻害剤を含むミセルが提供される。

【０１１９】

一実施形態において、

ａ）一般式：$X_1X_2X_3X_4X_5$のアミノ酸配列を含む第１のペプチド；および

ｂ）一般式：$X_1X_2X_3X_4X_5$のアミノ酸配列を含む第２のペプチド；

（式中：

X_1は、Ｈ、Ｎ、Ｆ、もしくはＴであるか存在しない；

X_2は、Ｗ、Ｓ、Ｅ、もしくはＹである；または存在しない；

X_3は、Ｌ、Ｖ、またはＩである；

X_4は、Ｋ、Ｉ、またはＲである；および

X_5は、Ｖである）

ｃ）第２のペプチドに第１のペプチドを連結するリンカー、および

ｄ）親油性脂肪族基

を含むＰＩＣＫ１阻害剤を含むミセルが、提供される。

【０１２０】

本明細書において示されるように、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤は、ＰＩＣＫ１のＰＤＺドメインに結合できる。

【０１２１】

天然のＰＩＣＫ１二量体構造において、ＰＩＣＫ１二量体のＰＤＺドメイン間の距離は、約１８０Åであると推定される。４個のエチレングリコール部分の長さを有するＮＰＥＧリンカーを含むＰＩＣＫ１阻害剤において、第１および第２のペプチド間の距離は、約４３Åの範囲と推定される。そのため、そのようなＰＩＣＫ１阻害剤は、単一のＰＩＣＫ１二量体に認められる２つのＰＤＺドメインを結合できない。これは、本明細書に開示されるような単一のＰＩＣＫ１阻害剤が、２つのＰＩＣＫ１二量体を結合してまとめ、ＰＩＣＫ１の阻害をもたらすことにより機能するという仮定を支持する。したがって、本明細書に開示されるようないくつかのＰＩＣＫ１阻害剤により形成されたミセル構造は、ＰＩＣＫ１の２つのまたはそれより多い二量体を結合しまとめることができ、それにより本明細書に開示されるようなＰＩＣＫ１の効果的な阻害をもたらす可能性がある。

【０１２２】

したがって、一実施形態において、本明細書に開示されるようなＰＩＣＫ１阻害剤またはミセル構造は、２つのまたはそれより多いＰＩＣＫ１タンパク質のＰＤＺドメインに結合し、ＰＩＣＫ１の阻害をもたらす。一実施形態において、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤により結合された２つのまたはそれより多いＰＩＣＫ１タンパク質は、ＰＩＣＫ１の２つのまたはそれより多い二量体に存在する。

【０１２３】

一実施形態において、ＰＩＣＫ１阻害剤のＰＩＣＫ１への結合は、ＰＩＣＫ１の三量体、四量体、五量体、六量体、七量体または八量体などのＰＩＣＫ１の高次のオリゴマー状態の形成をもたらす。一実施形態において、ＰＩＣＫ１阻害剤のＰＩＣＫ１への結合は、ＰＩＣＫ１の四量体、六量体または八量体の形成をもたらす。

【０１２４】

一実施形態において、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤は、２個のまたはそれより多いＰＩＣＫ１タンパク質をまとめる。一実施形態において、化合物は、４個のＰＩＣＫ１タンパク質、例えば５個のＰＩＣＫ１タンパク質、例えば６個のＰＩＣＫ１タンパク質、例えば７個のＰＩＣＫ１タンパク質、例えば８個のＰＩＣＫ１タンパク質、例えば９個のＰＩＣＫ１タンパク質、例えば１０個のＰＩＣＫ１タンパク質をまとめる。

【０１２５】

本開示のＰＩＣＫ１阻害剤へのＰＩＣＫ１の阻害は、ＰＩＣＫ１タンパク質がもはやＡＭＰＡＲと相互作用できなくなり、それによりＰＩＣＫ１がＡＭＰＡＲの往来を制御するのを防ぐ可能性がある。したがって、一実施形態において、ＰＩＣＫ１阻害剤は、ＰＩＣＫ１とＡＭＰＡＲの間のタンパク質－タンパク質相互作用を阻害できる。これはしたがって、ＰＩＣＫ１がＧｌｕＡ２をダウンレギュレートするのを防ぎ、かつＣＰ－ＡＭＰＡＲ形成を防ぐ可能性があり、それによりシナプスにおいて異常なレベルのグルタミン酸に反応する不適応型の可塑性を防ぐ。これは今度は、例えば神経因性疼痛およびコカイン中毒を防ぐことができる。

【０１２６】

本開示のＰＩＣＫ１阻害剤は、ＰＩＣＫ１のＰＤＺドメインに対して高親和性を保持する。一実施形態において、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤は、１０ｎＭ未満、例えば９ｎＭ未満、例えば８ｎＭ未満、例えば７ｎＭ未満、例えば６ｎＭ未満、例えば５ｎＭ未満、例えば４ｎＭ未満、例えば３ｎＭ未満、例えば２ｎＭ未満、例えば１ｎＭ未満、例えば０．５ｎＭ未満のＰＩＣＫ１のＫｉを有する。

【０１２７】

本開示のＰＩＣＫ１阻害剤の、ＰＩＣＫ１のＰＤＺドメインへの親和性は、本明細書、実施例４に記載されるような蛍光偏光（ＦＰ）により測定できる。

【０１２８】

高次構造を形成する本開示のＰＩＣＫ１阻害剤の能力は、本明細書、実施例３に記載されるようなサイズ排除クロマトグラフィ（ＳＥＣ）または小角Ｘ線散乱（ＳＡＸＳ）により測定できる。

【０１２９】

検出可能な部分

一実施形態において、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤は、検出可能な部分をさらに含む。発蛍光団、発色団、放射性同位体または酵素などの検出のために当業者に既知である従来の部分を、使用できる。ＰＩＣＫ１阻害剤における検出可能な部分の存在は、ＰＩＣＫ１阻害剤への結合時にＰＩＣＫ１の標識および可視化を可能にする。

【０１３０】

一実施形態において、検出可能な部分は、第１および／または第２のペプチドに共役される。一実施形態において、検出可能な部分は、非ペプチド部分の単一のアミノ酸に共役される。

【０１３１】

一実施形態において、検出可能な部分は、５，６－カルボキシルテトラメチルローダミ

ン（ＴＡＭＲＡ）またはインドジカルボシアニン（Ｃｙ５）などの、発蛍光団である。
【０１３２】
別の実施形態において、検出可能な部分は、放射性同位体を含むか、それからなる。放射性同位体は、^{125}Ｉ、^{99m}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{67}Ｇａ、^{68}Ｇａ、^{72}Ａｓ、^{89}Ｚｒ、^{123}Ｉ、^{18}Ｆおよび^{201}Ｔｌからなる群より選択されてよい。
【０１３３】
疾患および障害
本発明は、不適応可塑性に関連する疾患および／または障害の処置のための医薬組成物を提供する。一実施形態において、本明細書に開示されるようなＰＩＣＫ１阻害剤または本明細書に記載されるようなミセルを含む医薬組成物が、提供される。医薬組成物は、医薬適合性のある担体中に本開示のＰＩＣＫ１阻害剤またはミセルを含んでよい。
【０１３４】
ＡＭＰＡ型グルタミン酸受容体（ＡＭＰＡＲ）は、ＮＭＤＡ型グルタミン酸受容体（ＮＭＤＡＲ）とは対照的に、通常、四量体受容体複合体におけるＧｌｕＡ２サブユニットの存在のため一価カチオン（すなわちNa^+およびK^+）に対してのみ透過性である。強力で持続的な脱分極に応答する可塑性の変化は、しかし、いくつかのシナプスのタイプにおいて増加したコンダクタンスおよびCa^{2+}透過性（ＣＰ－ＡＭＰＡＲ）を有するＡＭＰＡＲへの切り替えをもたらし、この切り替えは、シナプスを過敏性にする。機械的に、ＣＰ－ＡＭＰＡＲの発現は、ＰＩＣＫ１　ＰＤＺドメインとＡＭＰＡＲのＧｌｕＡ２サブユニットのＣ末端の間の相互作用により媒介される、ＡＭＰＡＲを含むＧｌｕＡ２の初期ＰＩＣＫ１依存性ダウンレギュレーションを含む。これは今度は、シナプスにおけるＧｌｕＡ２欠損受容体の挿入を可能にし（スロット仮説）、シナプスCa^{2+}透過性かつ過敏性にする。
【０１３５】
ＣＰ－ＡＭＰＡＲは、ラットにおけるコカイン自己投与から遮断後の媒介性渇望に決定的に関与する（Ｃｏｎｒａｄ　ｅｔ　ａｌ　２００８）。ＰＩＣＫ１は、コカインの渇望の発生中に中脳でのＶＴＡドーパミン作動性ニューロンおよび側坐核でのＣＰ－ＡＭＰＡＲの発現に関与し（Ｌｕｓｃｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ　２０１１およびＷｏｌｆ　ｅｔ　ａｌ　２０１０）コカイン中毒における標的としてＰＩＣＫ１を示唆する。ＰＩＣＫ１のＣＰＰ－共役二価ペプチド阻害剤は、ラットにおけるコカイン探索の回復を用量依存的に減衰させることが報告されている（Ｔｕｒｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．２０２０）。したがって一実施形態において、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤の投与は、コカイン中毒などの薬物中毒におけるコカイン渇望を低減する。
【０１３６】
脊髄後角（ＤＨ）ニューロンにおけるＡＭＰＡ型グルタミン酸受容体（ＡＭＰＡＲ）のアップレギュレーションは、長期間持続するＤＨにおけるシナプス可塑性の特異的形態である中枢性感作を引き起こす（Ｗｏｏｌｆ　ｅｔ　ａｌ　２０００およびＪｉ　ｅｔ　ａｌ　２００３）。さらに、末梢炎症性疼痛および神経損傷誘導性疼痛の両方は、Ca^{2+}透過性ＡＭＰＡＲ（ＣＰ－ＡＭＰＡＲ）のアップレギュレーションを引き起こす（Ｖｉｋｍａｎ　ｅｔ　ａｌ　２００８、Ｇａｎｇａｄｈａｒａｎ　ｅｔ　ａｌ　２０１１およびＣｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ　２０１３）。神経因性疼痛におけるＰＩＣＫ１の役割についての初期の証拠は、ＰＩＣＫ１のペプチド阻害剤が慢性狭窄損傷（ＣＣＩ）により誘導される疼痛を緩和したことを示すＧａｒｒｙ　ｅｔ　ａｌ　２００３から来た。したがって、ＰＩＣＫ１のｓｈＲＮＡ媒介ノックダウンが、完全フロイントアジュバント（ＣＦＡ）誘導炎症性疼痛を軽減することが示され、ＰＩＣＫ１ノックアウトマウスが、脊髄神経結紮（ＳＮＬ）に応答して疼痛を完全に発症しないことが認められた（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ　２０１１およびＡｔｉａｎｊｏｈ　ｅｔ　ａｌ　２０１０）。確かに、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤の投与は、神経因性疼痛のモデルにおける機械的アロディニア（ＳＮＩモデル－実施例８）、炎症性疼痛（ＣＦＡモデル－実施例７および１６）、および炎症性疼痛のモデルにおける熱的（熱）アロディニア（ＣＦＡモデル－実施例１７）を軽減する。そのた

め、一実施形態において、疼痛は、機械的もしくは熱的アロディニアまたは痛覚過敏である。別の実施形態において、疼痛は、炎症性疼痛である。

【０１３７】

ＴＡＲ　ＤＮＡ結合タンパク質４３（ＴＤＰ－４３）病理およびＡＭＰＡ受容体サブユニットＧｌｕＡ２のＲＡＮ編集の失敗は両方とも、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）患者の大部分の運動ニューロンにおいて同時に発生する病因関連分子異常である。ＲＮＡ２（ＡＤＡＲ２）に対し作用するＲＮＡ編集酵素アデノシンデアミナーゼの条件付きノックアウトを伴うマウスモデルの疼痛症状は、ＡＭＰＡＲアンタゴニストであるペランパネルにより軽減され、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤による症状緩和の可能性を示唆する。

【０１３８】

本開示の化合物の疼痛および中毒に対する効果を考慮すると、併存疾患を有する患者、例えば中毒にも悩まされている疼痛患者に対する良好な有効性も予想することは、合理的である。

【０１３９】

類似の中枢性感作は、腰痛および偏頭痛の実験モデルとして機能する、痛覚過敏プライミングにおけるアロディニアが根底にあると考えられる（Ｋａｎｄａｓａｍｙ　ｅｔ　ａｌ　２０１５）。

【０１４０】

同様に、耳鳴症の病因は、中枢性感作を含む神経因性疼痛といくらかの類似点を保持する（Ｖａｎｎｅｓｔｅ　ｅｔ　ａｌ　２０１９、Ｐｅｋｅｒ　ｅｔ　ａｌ　２０１６、およびＭｏｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ　２００７）。

【０１４１】

ＣＰ－ＡＭＰＡＲの表面安定化／挿入におけるＰＩＣＫ１の役割は、培養された海馬ニューロンにおける酸素－グルコース枯渇について説明されている（Ｃｌｅｍ　ｅｔ　ａｌ　２０１０およびＤｉｘｏｎ　ｅｔ　ａｌ　２００９）。これは、虚血性傷害後の神経細胞死の保護における推定上の標的としてＰＩＣＫ１を誘発する。

【０１４２】

ＰＩＣＫ１の喪失は、アミロイドベータに応答する脊椎の喪失に対してインビトロおよびインビボでニューロンを保護することが示されている（Ｍａｒｃｏｔｔｅ　ｅｔ　ａｌ　２０１８およびＡｌｆｏｎｓｏ　ｅｔ　ａｌ　２０１４）。その結果、ＰＩＣＫ１は、アルツハイマー病の対症療法およびおそらく予防処置のための推定上の標的である。

【０１４３】

ＰＩＣＫ１は、マイトファジーに関与しているＥ３ユビキチンリガーゼであるパーキンと相互作用し阻害する。パーキンの機能喪失は、散発性および家族性のパーキンソン病（ＰＤ）の両方に関連している。結果として、ＰＩＣＫ１　ＫＯマウスは、１－メチル－４－フェニル－１，２，３，６－テトラヒドロピリジン（ＭＰＴＰ）媒介毒性に耐性である（Ｈｅ　ｅｔ　ａｌ　２０１８）。その結果、ＰＩＣＫ１は、パーキンソン病の対症療法およびおそらく予防処置のための推定上の標的である。

【０１４４】

過剰の細胞内カルシウム濃度をもたらすグルタミン酸受容体の過剰刺激は、癲癇における神経細胞死の主な原因である。ＧｌｕＲ２（ＧｌｕＡ２）の仮説は、癲癇発作などの神経学的損傷に続いて、ＡＭＰＡ受容体サブユニットＧｌｕＲ２タンパク質がダウンレギュレートされることを述べている。これは、ＧｌｕＲ２欠失のカルシウム透過性ＡＭＰＡ受容体の形成の可能性を高め、これは神経伝達物質であるグルタミン酸の毒性をさらに強める可能性がある（Ｌｏｒｇｅｎ　ｅｔ　ａｌ　２０１７）。

【０１４５】

ＰＩＣＫ１は、乳癌、肺癌、胃癌、結腸直腸癌、および卵巣癌において隣接する正常な上皮と比較して腫瘍細胞で過剰発現される。乳癌組織マイクロアレイを免疫染色することにより判定されるように、高レベルのＰＩＣＫ１発現は、全体的な生存期間の短縮と相関する。したがって、ＰＩＣＫ１　ｓｉＲＮＡでのＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞のトランスフ

ェクションは、インビトロでの細胞増殖およびコロニー形成を減少させ、かつヌードマウスにおける腫瘍原生を阻害した（Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ　２０１０）。したがって、ＰＩＣＫ１は、癌の処置および予後徴候のための推定上の標的である。

【０１４６】

一実施形態において、本明細書に開示されるようなＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルまたは医薬組成物は、医薬品としての使用のために提供される。

【０１４７】

一実施形態において、本明細書に開示されるようなＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルまたは医薬組成物は、不適応可塑性に関連する疾患または障害の予防および／または処置における使用のために提供される。

【０１４８】

一実施形態において、被験者における不適応可塑性に関連する疾患または障害の予防および／または処置を提供する方法が提供され、方法は、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルまたは医薬組成物を被験者に投与することを含む。

【０１４９】

一実施形態において、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルまたは医薬組成物の使用は、不適応可塑性に関連する疾患および／または障害の処置のための医薬品の製造のために提供される。

【０１５０】

一実施形態において、不適応可塑性に関連する疾患または障害は、疼痛、薬物中毒、筋萎縮性側索硬化症、癲癇、耳鳴症、偏頭痛、癌、虚血、アルツハイマー病、および／またはパーキンソン病である。

【０１５１】

一実施形態において、不適応可塑性に関連する疾患または障害は、神経因性疼痛などの、疼痛である。疼痛は、炎症性疼痛または神経因性疼痛であり得る。処置される疼痛は、慢性神経因性疼痛または慢性炎症性疼痛であり得る、慢性疼痛であり得る。神経因性疼痛は、外傷性損傷、外科手術、または糖尿病もしくは自己免疫疾患などの疾患の結果として末梢または中枢神経系を損傷することにより誘導される可能性がある。神経因性疼痛は、化学療法を用いる処置により誘導される可能性がある。疼痛が持続する場合、その状態は、慢性神経因性疼痛である。慢性炎症性疼痛は、神経損傷後の炎症により誘導される可能性があり、また、免疫細胞により放出されたメディエータが疼痛経路の感作、すなわち脊髄に位置する感覚ニューロンの「ワインドアップ」を引き起こす異物により誘導される炎症により開始される可能性がある。したがって、効果的な鎮痛剤は、脊髄組織に到達でき、かつ疼痛緩和効果を有するために、その標的、この場合はＰＩＣＫ１、を見つける必要がある。それによって、化合物は、脊髄組織に到達できるように、血液脳関門および／または血液脊髄関門を通過できる必要がある。

【０１５２】

一実施形態において、不適応可塑性に関連する疾患または障害は、コカイン中毒、オピオイド中毒、またはモルヒネ中毒などの、薬物中毒である。

【０１５３】

一実施形態において、不適応可塑性に関連する疾患または障害は、乳癌、例えば組織学的グレード、リンパ節転移、Ｈｅｒ－２／ｎｅｕ陽性、およびトリプルネガティブ基底膜細胞様乳癌などの癌である。

【０１５４】

一実施形態において、不適応可塑性に関連する疾患または障害は、筋萎縮性側索硬化症である。

【０１５５】

一実施形態において、不適応可塑性に関連する疾患または障害は、癲癇である。

【０１５６】

一実施形態において、不適応可塑性に関連する疾患または障害は、耳鳴症である。

【０１５７】
一実施形態において、不適応可塑性に関連する疾患または障害は、偏頭痛である。
【０１５８】
一実施形態において、不適応可塑性に関連する疾患または障害は、脳卒中または虚血である。
【０１５９】
一実施形態において、不適応可塑性に関連する疾患または障害は、アルツハイマー病である。
【０１６０】
一実施形態において、不適応可塑性に関連する疾患または障害は、パーキンソン病である。
【０１６１】
さらに別の実施形態において、本明細書に開示されるような化合物は、頭部外傷の予防および／または処置における使用のためである。
【０１６２】
さらに別の実施形態において、本明細書に開示されるような化合物は、乳癌などの癌の予防および／または処置および／または診断における使用のためである。
【０１６３】
上記障害および疾患の危険性があるか、現在罹患している被験者は、障害もしくは疾患の発症の危険性を低減する予防的処置または障害もしくは疾患の発症後の治療的処置のいずれかが与えられる可能性がある。被験者は、哺乳動物またはヒト患者であってよい。
【０１６４】
投与
医学の当業者に既知である従来の方法は、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤を患者に投与するために使用できる。本開示のＰＩＣＫ１阻害剤は、単独でまたは他の治療剤もしくは介入と組み合わせて投与できる。
【０１６５】
一実施形態において、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤は、静脈内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、髄腔内投与、経皮投与、経粘膜投与、または皮下投与などの、非経口投与により投与される。一実施形態において、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤は、腔内投与または皮下投与により投与される。好ましい実施形態において、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤は、皮下投与により投与される。実施例１５に示されるように、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤は、高い溶解度を保持し、それを有効用量でのそのような皮下投与に適するようにする。
【０１６６】
診断
本開示のＰＩＣＫ１阻害剤は、検出可能な部分を含んでよい。そのようなＰＩＣＫ１阻害剤はしたがって、組織または試料中にＰＩＣＫ１を検出することによるなどの、診断のために使用できる。
【０１６７】
したがって、本開示は、不適応可塑性に関連する疾患または障害の診断における使用のための、本明細書に開示されるようなＰＩＣＫ１阻害剤を提供する。
【０１６８】
ＰＩＣＫ１は、乳癌、肺癌、胃癌、結腸直腸癌、および卵巣癌において隣接する正常な上皮と比較して腫瘍細胞で過剰発現される。乳癌組織マイクロアレイを免疫染色することにより判定されるように、高レベルのＰＩＣＫ１発現は、全体的な生存期間の短縮と相関する。したがって、ＰＩＣＫ１　ｓｉＲＮＡによるＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞のトランスフェクションは、インビトロで細胞増殖およびコロニー形成を減少させ、ヌードマウスで腫瘍原生を阻害した（Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ　２０１０）。したがって、ＰＩＣＫ１は、癌の処置および予後徴候のための推定上の標的である。
【０１６９】

一実施形態において、本明細書に開示されるようなＰＩＣＫ１阻害剤は、乳癌などの癌である不適応可塑性に関連する疾患または障害の診断における使用のためである。一実施形態において、乳癌は、組織学的グレード、リンパ節転移、Ｈｅｒ－２／ｎｅｕ陽性、およびトリプルネガティブ基底膜細胞様乳癌から選択される。

【０１７０】

本開示は、それを必要とする被験者における乳癌を診断する方法をさらに提供し、方法は：

ａ．上記被験者から組織試料を得るステップ；

ｂ．本明細書に開示されるような化合物で試料を染色するステップ；

ｃ．試料中のＰＩＣＫ１のレベルを測定するステップ；および

ｄ．試料中のＰＩＣＫ１のレベルを健康な標準と比較するステップ

を含み、

試料中のＰＩＣＫ１のレベルの増加は、上記個体が乳癌を有していることを示唆する。

【０１７１】

本開示は、乳癌に罹患している被験者の予後を予測する方法をさらに提供し、方法は、

ａ．上記被験者から組織試料を得るステップ；

ｂ．本明細書に開示されるような化合物で試料を染色するステップ；

ｃ．試料中のＰＩＣＫ１のレベルを測定するステップ；および

ｄ．試料中のＰＩＣＫ１のレベルを健康な標準と比較するステップ

を含み、

試料中のＰＩＣＫ１のレベルの増加は、予後不良を示唆する。

【０１７２】

一実施形態において、本明細書に開示されるようなＰＩＣＫ１阻害剤は、上記ＰＩＣＫ１阻害剤での処置の応答者および非応答者へと、不適応可塑性に関連する疾患に罹患している被験者を階層化することにおいて使用される。そのような階層化は、ＰＩＣＫ１阻害などの、処置の類似のメカニズムをもたらすＡＡＶベースの療法などの他の処置の方法を開始する前に、ＰＩＣＫ１と二価または多価の相互作用を有するＰＩＣＫ１阻害剤の有効性を評価するために使用できる。そのような階層化の利点は、ＰＩＣＫ１阻害などの処置メカニズムに対する応答者のみがＡＡＶベースの療法の長期間の不可逆的処置を受けることを含む。ＡＡＶベースの療法は、同時係属中の出願に記載される（ＰＣＴ／ＥＰ２０１９／０７８７３６およびＥＰ２０１６１５２４．２）。

【０１７３】

したがって、一実施形態において、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤は、不適応可塑性に関連する疾患および／または障害を有する患者を、遺伝子療法の予測可能な処置応答者に階層化するために使用される。

【０１７４】

一実施形態において、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤は、上記化合物での処置の応答者および非応答者へと不適応可塑性に関連する疾患に罹患している被験者を階層化することにおいて使用される。

【０１７５】

条項

１．ペプチド部分および非ペプチド部分を含むＰＩＣＫ１阻害剤であって、ペプチド部分が、

ａ）一般式：$XX_2X_3X_4X_5$のアミノ酸配列を含む第１のペプチド；および

ｂ）一般式：$X_1X_2X_3X_4X_5$のアミノ酸配列を含む第２のペプチド

（式中、

X_1は、Ｈ、Ｎ、Ｆ、もしくはＴであるか存在しない；

X_2は、Ｗ、Ｓ、Ｅ、もしくはＹである；または存在しない；

X_3は、Ｌ、Ｖ、またはＩである；

X_4は、Ｋ、Ｉ、またはＲである；および

X_5は、Ｖである）
からなり；
非ペプチド部分が：
ｃ）第２のペプチドに第１のペプチドを連結するリンカー、および
ｄ）親油性脂肪族基
を含む、ＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１７６】
２．第１および／または第２のペプチドが、ＨＷＬＫＶ、ＦＥＩＲＶ、ＮＳＩＩＶ、ＮＳＶＲＶ、ＮＳＬＲＶ、ＮＳＩＲＶ、ＮＹＩＩＶ、ＮＹＩＲＶ、ＴＳＩＲＶ、ＹＩＩＶ、ＳＶＲＶ、ＥＩＲＶ、ＬＲＶ、ＩＩＶ、ＶＲＶ、およびＩＲＶからなる群より選択される、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１７７】
３．第１および／または第２のペプチドが、ＨＷＬＫＶ、ＮＳＶＲＶ、ＮＳＬＲＶ、ＮＳＩＲＶ、ＴＳＩＲＶ、ＥＩＲＶ、ＹＩＩＶ、ＩＩＶ、ＶＲＶおよびＩＲＶからなる群より選択される、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１７８】
４．第１および／または第２のペプチドが、ＮＳＶＲＶ、ＮＳＬＲＶ、ＮＳＩＲＶ、ＴＳＩＲＶ、ＥＩＲＶ、ＹＩＩＶ、ＩＩＶ、ＶＲＶ、およびＩＲＶからなる群より選択される、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１７９】
５．第１および／または第２のペプチドが、ＨＷＬＫＶ、ＦＥＩＲＶ、ＮＳＩＩＶ、ＮＳＶＲＶ、ＮＳＬＲＶ、ＮＳＩＲＶ、ＹＩＩＶ、ＳＶＲＶ、ＶＲＶ、およびＬＲＶからなる群より選択される、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１８０】
６．第１および／または第２のペプチドが、ＦＥＩＲＶ、ＮＳＩＩＶ、ＮＳＶＲＶ、ＮＳＬＲＶ、ＮＳＩＲＶ、ＹＩＩＶ、ＳＶＲＶ、ＶＲＶ、およびＬＲＶからなる群より選択される、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１８１】
７．第１および／または第２のペプチドが、ＨＷＬＫＶである、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１８２】
８．X_1が、Ｎ、Ｆ、もしくはＴであるか存在しない；
X_2が、Ｓ、Ｅ、もしくはＹである；または存在しない；
X_3が、Ｖ、ＬまたはＩである；
X_4が、ＩまたはＲである；および
X_5が、Ｖである、
条項１に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１８３】
９．X_1が、ＮもしくはＴであるか存在しない；
X_2が、Ｓ、Ｅ、もしくはＹである；または存在しない；
X_3が、Ｖ、ＬまたはＩである；
X_4が、ＩまたはＲである；および
X_5が、Ｖである、
条項１に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１８４】
１０．X_1が、ＮもしくはＦであるか存在しない；
X_2が、Ｓ、Ｅ、もしくはＹである；または存在しない；
X_3が、Ｖ、ＬまたはＩである；
X_4が、ＩまたはＲである；および
X_5が、Ｖである、

条項１に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１８５】
１１．第１のペプチドが、第２のペプチドと同一である、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１８６】
１２．リンカーが、ＮＰＥＧリンカーである、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１８７】
１３．ＮＰＥＧリンカーが、１つまたは複数の骨格酸素原子が窒素で置き換えられる０個～２４個の範囲のエチレングリコール部分、例えば１つまたは複数の骨格酸素原子が窒素原子で置き換えられる、０個～２０個の範囲、例えば０個～１６個の範囲、例えば０個～１４個、例えば０個～１２個の範囲、例えば０個～１０個の範囲、例えば０個～８個の範囲、例えば０個～６個の範囲、例えば０個～４個の範囲、例えば０個～２個の範囲のエチレングリコール部分を含み、好ましくはＮＰＥＧ－リンカーが、１つまたは複数の骨格酸素原子が窒素で置き換えられる４個のエチレングリコール部分を含む、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１８８】
１４．ＮＰＥＧ－リンカーの１つの骨格酸素が、窒素原子で置き換えられる、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１８９】
１５．ＮＰＥＧリンカーが、各端にカルボン酸を含む、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１９０】
１６．ＮＰＥＧリンカーの１つまたは複数の窒素原子が、例えばＮＰＥＧリンカーの中央に位置する、またはＮＰＥＧリンカーの一端に向かって位置するなどの、ＮＰＥＧリンカーに沿った任意の位置に位置する、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１９１】
１７．ＮＰＥＧリンカーが、ＮＰＥＧリンカーのカルボン酸と第１および／または第２のペプチドのＮ末端の間に形成されるアミド結合を介して第１および／または第２のペプチドに共役される、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１９２】
１８．親油性脂肪族基が、脂肪族鎖または脂肪族環である、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１９３】
１９．親油性脂肪族基が、脂肪族の分岐したまたは非分岐の鎖である、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１９４】
２０．親油性脂肪族基が、脂肪族の飽和したまたは不飽和の鎖である、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１９５】
２１．親油性脂肪族基が、ステロールなどのゴナン構造を含む脂肪族環である、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１９６】
２２．親油性脂肪族基が、コレステロールなどのステロイドを含む脂肪族環である、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１９７】
２３．親油性脂肪族基が、カルボン酸、アルコールまたはアミンなどの官能基をさらに含む、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０１９８】
２４．親油性脂肪族基が、アルコールを含む、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ

１阻害剤。
【０１９９】
２５．親油性脂肪族基が、カルボン酸を含む、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２００】
２６．親油性脂肪族基が、脂肪酸である、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２０１】
２７．親油性脂肪族基が、C_4～C_{26}脂肪酸である、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２０２】
２８．親油性脂肪族基が、飽和脂肪酸または不飽和脂肪酸である、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２０３】
２９．親油性脂肪族基が、酢酸、酪酸、カプロン酸、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、マルガリン酸、ステアリン酸、アラキドン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、セロチン酸、カプロレイン酸、ラウロレイン酸、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、ガドレイン酸、エルカ酸からなる群より選択される、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２０４】
３０．親油性脂肪族基が、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、マルガリン酸、ステアリン酸からなる群より選択される、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２０５】
３１．親油性脂肪族基が、ミリスチン酸である、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２０６】
３２．親油性脂肪族基が、例えばテトラデカン二酸、ヘキサデカン二酸、またはオクタデカン二酸などの、二酸である、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２０７】
３３．親油性脂肪族基が、カルボン酸などの官能基を介して、例えばアミドを形成することにより、ＮＰＥＧリンカーの窒素原子に共役される、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２０８】
３４．非ペプチド部分が、１つのアミノ酸をさらに含む、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２０９】
３５．１つのアミノ酸が、α－アミノ酸またはβ－アミノ酸である、条項１４～１５のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２１０】
３６．１つのアミノ酸が、Ａｓｐ、β－Ａｓｐ、β－Ｓｅｒ、β－ホモ－Ｓｅｒおよびβ－Ｌｙｓからなる群より選択される、条項１４～１６のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２１１】
３７．１つのアミノ酸が、アミドを形成するためにα－カルボン酸を介してＮＰＥＧリンカーの窒素原子に共役され、かつ親油性脂肪族基にさらに共役される、条項１４に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２１２】
３８．１つのアミノ酸が、アミド結合を形成するためにα－もしくはβ－アミンを介して、またはアミド結合もしくはエステル結合を形成するためにカルボン酸、アルコールもし

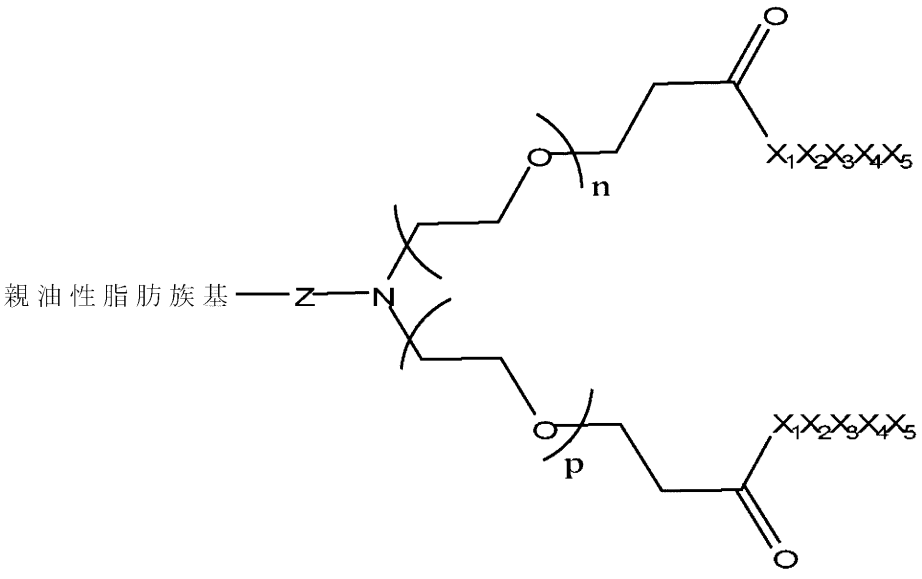
くはアミンなどの側鎖官能基を介して親油性脂肪族基に共役される、条項１４～１７のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。

【０２１３】

３９．式（Ｉ）：

【０２１４】

【化１２】



式（Ｉ）

【０２１５】

の一般構造を有し、

式中、

Ｚが、単結合または単一のアミノ酸である；

ｎが、０～１２の整数である；

ｐが、０～１２の整数である、

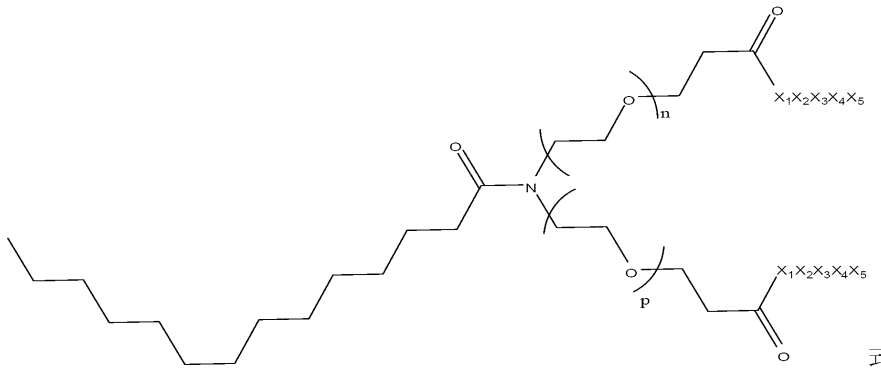
上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。

【０２１６】

４０．式（ＩＩ）：

【０２１７】

【化１３】



式（ＩＩ）

【０２１８】

による構造を有し、

式中、

ｎが、０～１２の整数、好ましくは２である；

ｐが、０～１２の整数、好ましくは２である、
上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２１９】
４１．自己集合してミセル構造を形成するなど、溶液中で高次構造に自己集合する、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２２０】
４２．高次構造が、少なくとも１５Å、例えば少なくとも１７Å、例えば少なくとも１９Å、例えば少なくとも２０Å、例えば少なくとも２１Å、例えば少なくとも２２Å、例えば少なくとも２３Å、例えば少なくとも２４Å、例えば少なくとも２５Å、例えば少なくとも２６Å、例えば少なくとも２７Å、例えば少なくとも２８Å、例えば少なくとも２９Å、例えば少なくとも３０Å、例えば少なくとも３１Åの回転半径（Ｒｇ）を有する、条項２０～２１のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２２１】
４３．ＰＩＣＫ１のＰＤＺドメインに結合する、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２２２】
４４．２つのまたはそれより多いＰＩＣＫ１タンパク質のＰＤＺドメインに結合する、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２２３】
４５．ＰＩＣＫ１とＡＭＰＡＲの間のタンパク質－タンパク質相互作用を阻害できる、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２２４】
４６．ＰＩＣＫ１を阻害できる、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２２５】
４７．上記ペプチドが、１０ｎＭ未満、例えば９ｎＭ未満、例えば８ｎＭ未満、例えば７ｎＭ未満、例えば６ｎＭ未満、例えば５ｎＭ未満、例えば４ｎＭ未満、例えば３ｎＭ未満、例えば２ｎＭ未満、例えば１ｎＭ未満、例えば０．５ｎＭ未満のＰＩＣＫ１のＫｉを有する、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２２６】
４８．ＰＩＣＫ１阻害剤のＰＩＣＫ１への結合が、ＰＩＣＫ１の三量体、四量体、五量体、六量体、七量体または八量体などの、ＰＩＣＫ１の高次のオリゴマー状態の形成をもたらす、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２２７】
４９．ＰＩＣＫ１阻害剤のＰＩＣＫ１への結合が、ＰＩＣＫ１の四量体、六量体または八量体の形成をもたらす、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２２８】
５０．検出可能な部分をさらに含む、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２２９】
５１．検出可能な部分が、第１および／または第２のペプチドに共役される、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２３０】
５２．検出可能な部分が、非ペプチド部分の１つのアミノ酸に共役される、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２３１】
５３．検出可能な部分が、発蛍光団、発色団または酵素である、条項２７に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２３２】
５４．検出可能な部分が、５，６－カルボキシルテトラメチルローダミン（ＴＡＭＲＡ）またはインドジカルボシアニン（Ｃｙ５）である、条項２７に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。

【０２３３】
５５．検出可能な部分が、放射性同位体を含むか、それからなる、条項２７に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２３４】
５６．放射性同位体が、^{125}Ｉ、^{99m}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{67}Ｇａ、^{68}Ｇａ、^{72}Ａｓ、^{89}Ｚｒ、^{123}Ｉ、^{18}Ｆおよび^{201}Ｔｌからなる群より選択される、条項３０に記載のＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２３５】
５７．上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤を含むミセル。
【０２３６】
５８．条項１～５６のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤または条項５７に記載のミセルを含む医薬組成物。
【０２３７】
５９．医薬品としての使用のための、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルまたは医薬組成物。
【０２３８】
６０．不適応可塑性に関連する疾患または障害の予防および／または処置における使用のための、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルまたは医薬組成物。
【０２３９】
６１．被験者における不適応可塑性に関連する疾患または障害の予防および／または処置を提供する方法であって、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルまたは医薬組成物を被験者に投与することを含む、方法。
【０２４０】
６２．不適応可塑性に関連する疾患および／または障害の処置のための医薬品の製造のための、上記条項のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルまたは医薬組成物の使用。
【０２４１】
６３．不適応可塑性に関連する疾患または障害が、疼痛、薬物中毒、筋萎縮性側索硬化症、癲癇、耳鳴症、偏頭痛、癌、虚血、アルツハイマー病、および／またはパーキンソン病である、条項５９～６０のいずれか一項に記載の使用のためのＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルもしくは医薬組成物、条項６１に記載の方法または条項６２に記載の使用。
【０２４２】
６４．不適応可塑性に関連する疾患または障害が、炎症性疼痛または神経因性疼痛などの疼痛である、条項５９～６０のいずれか一項に記載の使用のためのＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルもしくは医薬組成物、条項６１に記載の方法または条項６２に記載の使用。
【０２４３】
６５．疼痛が、機械的もしくは熱的アロディニアまたは痛覚過敏である、条項６４に記載の使用のためのＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルまたは医薬組成物。
【０２４４】
６６．不適応可塑性に関連する疾患または障害が、コカイン中毒、オピオイド中毒、またはモルヒネ中毒などの薬物中毒である、条項５９～６０のいずれか一項に記載の使用のためのＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルもしくは医薬組成物、条項６１に記載の方法または条項６２に記載の使用。
【０２４５】
６７．不適応可塑性に関連する疾患または障害が、乳癌、例えば組織学的グレード、リンパ節転移、Ｈｅｒ－２／ｎｅｕ陽性、およびトリプルネガティブ基底膜細胞様乳癌などの癌である、条項５９～６０のいずれか一項に記載の使用のためのＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルもしくは医薬組成物、条項６１に記載の方法または条項６２に記載の使用。
【０２４６】
６８．不適応可塑性に関連する疾患または障害が、筋萎縮性側索硬化症である、条項５９

～６０のいずれか一項に記載の使用のためのＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルもしくは医薬組成物、条項６１に記載の方法または条項６２に記載の使用。
【０２４７】
６９．不適応可塑性に関連する疾患または障害が、癲癇である、条項５９～６０のいずれか一項に記載の使用のためのＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルもしくは医薬組成物、条項６１に記載の方法または条項６２に記載の使用。
【０２４８】
７０．不適応可塑性に関連する疾患または障害が、耳鳴症である、条項５９～６０のいずれか一項に記載の使用のためのＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルもしくは医薬組成物、条項６１に記載の方法または条項６２に記載の使用。
【０２４９】
７１．不適応可塑性に関連する疾患または障害が、偏頭痛である、条項５９～６０のいずれか一項に記載の使用のためのＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルもしくは医薬組成物、条項６１に記載の方法または条項６２に記載の使用。
【０２５０】
７２．不適応可塑性に関連する疾患または障害が、虚血である、条項５９～６０のいずれか一項に記載の使用のためのＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルもしくは医薬組成物、条項６１に記載の方法または条項６２に記載の使用。
【０２５１】
７３．不適応可塑性に関連する疾患または障害が、アルツハイマー病である、条項５９～６０のいずれか一項に記載の使用のためのＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルもしくは医薬組成物、条項６１に記載の方法または条項６２に記載の使用。
【０２５２】
７４．不適応可塑性に関連する疾患または障害が、パーキンソン病である、条項５９～６０のいずれか一項に記載の使用のためのＰＩＣＫ１阻害剤、ミセルもしくは医薬組成物、条項６１に記載の方法または条項６２に記載の使用。
【０２５３】
７５．不適応可塑性に関連する疾患または障害の診断における使用のための、条項１～５６のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤または条項５７に記載のミセル。
【０２５４】
７６．不適応可塑性に関連する疾患または障害が、乳癌などの癌である、条項７５に記載の診断における使用のためのＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２５５】
７７．乳癌が、組織学的グレード、リンパ節転移、Ｈｅｒ－２／ｎｅｕ陽性、およびトリプルネガティブ基底膜細胞様乳癌から選択される、条項７６に記載の使用のためのＰＩＣＫ１阻害剤。
【０２５６】
７８．それを必要とする被験者における乳癌を診断する方法であって、
ａ．組織試料を上記被験者から得るステップ；
ｂ．試料を、条項５０～５６のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤で染色するステップ；
ｃ．試料中のＰＩＣＫ１のレベルを測定するステップ；ならびに
ｄ．試料中のＰＩＣＫ１のレベルを健康な標準と比較するステップ
を含み、
その試料中のＰＩＣＫ１のレベルの増加が、上記個体が乳癌を有していることを示唆する、方法。
【０２５７】
７９．乳癌に罹患している被験者について予後を予測するための方法であって、
ａ．組織試料を上記被験者から得るステップ；
ｂ．試料を、条項５０～５６のいずれか一項に記載のＰＩＣＫ１阻害剤で染色するステッ

プ；
ｃ．試料中のＰＩＣＫ１のレベルを測定するステップ；ならびに
ｄ．試料中のＰＩＣＫ１のレベルを健康な標準と比較するステップ
を含み、
その試料中のＰＩＣＫ１のレベルの増加が、予後不良を示唆する、方法。
【０２５８】
実施例
実施例１：ＰＩＣＫ１発現および精製
完全長ラットＰＩＣＫ１（ｐＥＴ４１）を、以前に記載された（Ｍａｄｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，２００５）ように調製した。簡潔に言うと、ＰＩＣＫ１を、ＢＬ２１－ＤＥ３－ｐＬｙｓＳ細胞で発現させ、３７℃で増殖させＯＤ$_{600}$＝０．６で１ｍＭイソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を用いて誘導し、２０℃で１６時間増殖させた。培養物を、回収し、１Ｌの培養あたり、５０ｍＭトリスアミノメタン（Ｔｒｉｓ）、１２５ｍＭ ＮａＣｌ、２ｍＭジチオトレイトール（ＤＴＴ、シグマ）、１％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００（シグマ）、２０μｇ／ｍＬ ＤＮＡｓｅ１および１／２錠のｃＯｍｐｌｅｔｅプロテアーゼ阻害剤カクテル（ロシュ）に再懸濁した。再懸濁したペレットを、後での精製のために－８０℃で凍結した。溶菌液を、遠心分離（４℃、３６，０００×ｇで３０分間）により清澄化し、上清を、穏やかな回転下で４℃で２時間グルタチオン－セファロース４Ｂビーズ（ＧＥヘルスケア）とインキュベートし、その後５分間４，０００×ｇで遠心分離した。上清を、除去し、ビーズを、３５ｍＬの５０ｍＭ Ｔｒｉｓ、１２５ｍＭ ＮａＣｌ、２ｍＭ ＤＴＴおよび０．０１％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ１００中で２回洗浄した。ビーズを、ＰＤ－１０Ｂｉｏ－Ｓｐｉｎ（登録商標）クロマトグラフィカラム（バイオラッド）に移し、さらに３カラム体積で洗浄した。各カラムを、シールし、０．０７５Ｕ／μＬのＮｏｖａｇｅｎ（登録商標）を、穏やかな回転下にて４℃でＯ／Ｎでの開裂のために加えた。ＰＩＣＫ１を、氷上で溶出し、２８０ｎｍでの吸光度を、ＴＥＣＡＮプレートリーダーまたはＮａｎｏＤｒｏｐ３０００で測定した。タンパク質濃度を、ランベルト・ベールの法則（Ａ＝εｃｌ）を使用して測定し、それはεＡ２８０ＰＩＣＫ１＝３２３２０（ｃｍ×ｍｏｌ／Ｌ）$^{-1}$であった。
【０２５９】
実施例２：化合物の合成
ＰＥＧ$_0$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$、ＰＥＧ$_1$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$、ＰＥＧ$_2$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$、ＰＥＧ$_3$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$、ＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$、Ａｃ－（ＨＷＬＫ$_{PEG4}$Ｖ）$_2$、およびＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$を、Ｂａｃｈ ｅｔ ａｌ．，２０１２に記載されるような固相ペプチド合成により合成した。
【０２６０】
ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）２を、Ｎｉｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，２０１５に記載されるようにミリストイル化して、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$を与えた。
【０２６１】
蛍光標識ペプチド（５－ＦＡＭ）を、ＮＰＥＧリンカーのアミンへの５－ＦＡＭの直接共役により、または６－アミノヘキサン酸（Ａｈｘ）リンカーを介したペプチドのＮ末端への５－ＦＡＭの共役により調製した。
【０２６２】
実施例３：ｍｙｒ－ＮＰＥＧ－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の溶液中の挙動の特徴づけ
ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の溶液中の挙動を試験するため、我々は、対照として未共役ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$と比較してサイズ排除クロマトグラフィ（ＳＥＣ）を行った。我々はまた、溶液中でのｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の小角Ｘ線散乱分析（ＳＡＸＳ）を行って、粒子サイズおよび形状の全体的な推定値を得た。
【０２６３】
材料および方法：
サイズ排除クロマトグラフィ：サイズ排除クロマトグラフィを、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００

Ｉｎｃｒｅａｓｅ １０／３００カラムを備えたＡｋｔａ清浄器を使用して行い、示された濃度でＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$またはｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の５００μＬをカラムに注入した。吸光度プロファイルを、２８０ｎｍで測定し、Ｇｒａｐｈ Ｐａｄ Ｐｒｉｓｍ８．３を使用して溶出量に対してプロットした。

【０２６４】

小角Ｘ線散乱分析：

０．１８ｍｇ／ｍｌ～９．３７ｍｇ／ｍＬの範囲のｍｙｒ－ＮＰＥＧ－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の濃度系列を、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．４）、１２５ｍＭ ＮａＣｌを含む緩衝液中で調製した。試料を、Ｐ１２ ＳＡＸＳビームライン、Ｐｅｔｒａ ＩＩＩ、ＤＥＳＹ、ハンブルグ、ドイツで測定した。半径方向の平均化および散乱ベクトルｑ（ｑ＝４πｓｉｎ（θ）／λ（λ＝半散乱角））の関数としての絶対スケール散乱強度、Ｉ（ｑ）へのデータの変換を含む予備的データ整理を、ビームラインで標準手順を使用して行った。

【０２６５】

ＳＡＸＳデータのモデリングを、２つの方法で実行し、最初に対距離分布関数を使用し、次に多分散球体の分子拘束コア－シェルモデルを使用した。簡潔に言うと、ペプチドが多分散球体ミセルに凝集したと仮定された。ここで、疎水性テールがコアを形成し、これらは、球体ミセル中の親水性部分（シェル）により囲まれている。モデリングのため、２．２６ｅ－１０ｃｍおよび２．９６ｅ－１１ｃｍの散乱長を、それぞれ、ヘッド基およびテールについて使用した。これは、分子構造内の電子の数を数えること、および電子の散乱長を掛けることにより算出された。散乱長密度の算出のため、Ｃ$_{13}$アルキル鎖の分子体積は、タンフォードの実験式

【０２６６】

【数１】

$$(V = 27.4 + 26.9n_c)$$

【０２６７】

（式中、ｎ$_c$は、炭素数、すなわち、この場合１３を示す）から推定されるように３７７Å^{3}であったと推測された。親水性ヘッド基は、可溶性タンパク質の質量密度（すなわち１．３５ｇ／ｃｍ^3）に対応する質量密度を有すると推測された最初の推定値であり、これにより、２０７８Å^{3}の分子体積が得られた。この値は、フィッティングの自由パラメータとして採用され、異なる試料濃度に対するフィッティングの変動がほとんどなく質量密度１．３９ｇ／ｃｍ^{3}に対応する約２０１０Å^{3}の分子体積に精緻化された。過剰散乱長密度をその後、水に関して算出した（９．４ｅ１０ １／ｃｍ^2）。この分子拘束モデルを使用して、コアおよびシェルの体積は、フィッティングされた凝集数、Ｎａｇｇを通じて内部で結び付けられた。多分散性は、Ｎａｇｇのガウス関数により説明された。ガウスは、±３シグマで切り捨てられた。ＷｉｌｌＩｔＦｉｔソフトウエアからのモデルモジュール「ＰｏｌｙｄｉｓｐｅｒｓｅＭｉｃｅｌｌｅｓ」を、フィッティングに使用した。通常通り、小さい表面粗さおよび小さい一定のバックグラウンドもまた、モデルを収束させるために必要であった。

【０２６８】

散乱データを統合した；１のビニング係数でＷｉｌｌＩｔＲｅｂｉｎを使用して緩衝液を差し引き、ビニングした。対距離分布関数（ｐｄｄｆ）を、間隔［０．０１２２～０．４］Å^{-1}でｂａｙｅｓａｐｐ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂａｙｅｓａｐｐ．ｏｒｇ／）を使用してフィッティングし、フィッティングパラメータを、以下のデータ収集表で報告する。

【０２６９】

【表１】

試料の詳細	Myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$					
ペプチド	C_{14}-PEG$_4$-(HWLKV)$_2$					
緩衝液	50mM Tris, 125mM NaCl, pH 7.4					
透過係数	11000 M^{-1} cm^{-1}					
分子量	1874 g/mol					
ペプチド濃度	0.19 - 9.37 mg/ml					
SAXS データ収集の詳細						
機器	P12, Petra III, DESY [1]					
データ収集の日付	09-05-2019					
波長(Å)	1.24					
測定された q-範囲(Å^{-1})	0.0025-0.73					
絶対校正	水					
曝露時間(ms)	10					
温度(K)	293.35					
ソフトウエア						
データリバイナリ	WillItRebin					
対距離分布関数 導出結果						
分子量(kDa)	14.8	13.2	13.8	11.2	10.4	9.2
$n_{myr\text{-}NPEG4\text{-}(HWLKV)2}$	7.9	7.1	7.3	6.0	5.5	4.9
コアシェルモデル 取得結果						
濃度	300 µM	400 µM	1000 µM	3000 µM	5000 µM	
$n_{myr\text{-}NPEG4\text{-}(HWLKV)2}$	19	22	22	21	19	

脚注および参考文献

[1] C. E. Blanchet, A. Spilotros, F. Schwemmer, M. A. Graewert, A. Kikhney, C. M. Jeffries, D. Franke, D. Mark, R. Zengerle, F. Cipriani, S. Fiedler, M. Roessle, D. I. Svergun, J Appl Crystallogr **2015**, 48, 431.

[2] S. Hansen, Journal of Applied Crystallography **2012**, 45, 566.

[3] S. Hansen, Journal of Applied Crystallography **2014**, 47, 1469.

【０２７０】

結果：

この一連の実験において、我々は、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$を、ＳＥＣおよびＳＡＸＳを使用して高次オリゴマー構造に組織化するその能力について試験した。

【０２７１】

サイズ排除クロマトグラフィ：ＳＥＣ実験を実行して、非共役ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$と比較してｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の自己集合に対する濃度依存性を示し、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$がより低い溶出量で溶出したことを認め、それは、より大きな流体力学的半径、およびしたがってより大きな分子集合体を示唆した

（図１）。
【０２７２】
小角Ｘ線散乱分析：ＳＡＸＳ実験を実行して、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の自己集合に対する濃度依存性を示し、対距離分布関数を分析する標準的な分析を使用して、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$が５～８個の個々の分子からなる２０～２３．６Åの回転半径（Ｒｇ）を有するミセル構造に組織化したように見えることを認めた（図２ａ～図２ｃ）。対距離分布関数は脂肪族基の負の散乱寄与を考慮しないので、この分析は、分子集合体における分子の数を過小評価する。上述したようなコア－シェルモデルを使用するデータの分析は、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$が、１９～２２個の個々のｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$分子を含む、２０～２４Åの外半径を有する球体コア－シェル形状のような、ミセル構造へと集合したことを示唆した。
【０２７３】
結論
本実施例は、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤が溶液中でミセル構造などの高次構造を形成できることを示す。
【０２７４】
実施例４：ＰＩＣＫ１へのｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の結合
組換えＰＩＣＫ１へのｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の結合を試験するため、蛍光偏光法を実行した。結合時のＰＩＣＫ１の高次複合体の形成を検証するため、サイズ排除クロマトグラフィを実行した。
【０２７５】
材料および方法
ＰＩＣＫ１を、実施例１に記載されるように発現させ精製した。
【０２７６】
蛍光偏光法：蛍光偏光法を、示された未標識のペプチドの濃度増加に対して、タンパク質およびトレーサ（５ＦＡＭ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$、５ｎＭまたは５ＦＡＭ－ＨＷＬＫＶ、２０ｎＭ）の固定濃度で競合モードにおいて実行した。プレートを、氷上で２時間、黒色ハーフエリアコーニングブラック非結合表面９６ウェルプレートでインキュベートした。蛍光偏光を、４８８ｎｍでの励起フィルタおよび５３５ｎｍでのロングパス蛍光フィルタを使用するＯｍｅｇａ　ＰＯＬＡＲｓｔａｒプレートリーダー上で直接測定した。データを、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ８．３を使用してプロットし、ワンサイト競合にフィッティングして、Ｋｉ，ａｐｐ値を抽出した。
【０２７７】
サイズ排除クロマトグラフィ：サイズ排除クロマトグラフィを、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００Ｉｎｃｒｅａｓｅ　１０／３００カラムを備えたＡｋｔａ清浄器を使用して実行し、ここで１０μＭ　ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の不在下または存在下で４０μＭ　ＰＩＣＫ１の５００μＬを、カラムにロードした。吸光度プロファイルを、２８０ｎｍで測定し、Ｇｒａｐｈ　Ｐａｄ　Ｐｒｉｓｍ８．３を使用して溶出量に対しプロットした。
【０２７８】
結果
この一連の実験において、我々は、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$を、ＳＥＣにより証明されるような複合体において、蛍光偏光法を使用して組換え精製ＰＩＣＫ１に結合するその能力、およびＰＩＣＫ１の高次オリゴマーを誘導するｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の能力について試験した（図４）。
【０２７９】
蛍光偏光（ＦＰ）実験を実行して、ＰＩＣＫ１に対する結合親和性を決定した。蛍光トレーサとして５ＦＡＭ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$または５ＦＡＭ－ＨＷＬＫＶを使用する競合実験は、ＨＷＬＫＶ（Ｋｉ，ａｐｐ＝６９９８ｎＭ、ＳＥＭインターバル［４９７２～９８４９］ｎＭ、ｎ＝３）と比較してｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の＞１０００倍の親和性の増加（Ｋｉ，ａｐｐ＝３．０ｎＭ、ＳＥＭインターバル［２．３

～３．８］ｎＭ、ｎ＝６）、およびＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$（Ｋｉ，ａｐｐ＝１７９ｎＭ、ＳＥＭインターバル［１６９～１８９］、ｎ＝６）と比較してｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の＞５０倍の親和性の増加を示した（図３）。

【０２８０】

サイズ排除クロマトグラフィを、ＰＩＣＫ１との複合体におけるｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の溶液中の挙動を評価するために行った。溶出体積は、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$が、結合時にＰＩＣＫ１の高次オリゴマー構造を形成することを示唆した（図４）。

【０２８１】

結論

本実施例は、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤が、ＰＩＣＫ１の高い結合親和性を示すことを示す。二価ペプチドリガンドへの脂質の共役は、非共役ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$と比較して＞５０倍の親和性の増加を与える。

【０２８２】

本実施例は、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤が結合時にＰＩＣＫ１の高次構造を誘導できることを、さらに示す。タンパク質機能の阻害は、ＰＩＣＫ１の高次構造のそのような誘導に起因する可能性がある。

【０２８３】

実施例５：高親和性バインダを同定するためのＰＩＣＫ１結合ペプチドリガンドの配列の最適化

ＤＡＴ－Ｃ５（ＨＷＬＫＶ）配列（すなわち、位置Ｘ$_1$～Ｘ$_5$）におけるＰＩＣＫ１ＰＤＺ結合モチーフの厳密性を試験するため、かつより良好な親和性を有する推定ペプチドを示すため、我々は、１９個の他の天然アミノ酸のいずれかに置換されたＨＷＬＫＶの配列における各残基を有する９５個の異なるペンタペプチドの精製ＰＩＣＫ１への蛍光偏光結合を使用して、初期研究を実行した。

【０２８４】

さらに、我々は、上記の実験で得られたデータを利用し、アミノ酸の組み合わせ置換に由来する、５２個の異なるペンター、テトラおよびトリ－ペプチドを設計するためにガイダンスとしてそれをを利用した。より良好な親和性を有する推定ペプチドを検証するため、精製ＰＩＣＫ１への結合親和性が、蛍光偏光結合アッセイにより研究された。

【０２８５】

材料および方法：

蛍光偏光法：蛍光偏光法を、競合モードにおいて、示された未標識のペプチドの濃度増加に対し、タンパク質およびトレーサ（５ＦＡＭ－ＨＷＬＫＶ、２０ｎＭ）の固定濃度で実行した。プレートを、氷上で２０分間、黒色ハーフエリアコーニングブラック非結合表面９６ウェルプレートでインキュベートし、蛍光偏光を、４８８ｎｍでの励起フィルタおよび５３５ｎｍでのロングパス蛍光フィルタを使用するＯｍｅｇａ　ＰＯＬＡＲｓｔａｒプレートリーダー上で直接測定した。データを、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ６．０を使用してプロットし、ワンサイト競合にフィッティングして、最終的にプロットされたＨＷＬＫＶ親和性にすべて相関した、Ｋ$_d$値を抽出した。

【０２８６】

結果

単一置換実験：

Ｘ$_1$およびＸ$_3$の置換は、Ｘ$_3$のＶおよびＩへの置換を除いて、結合に対しほとんど破壊的であり（明るい色合いで示される）、これは親和性を増加させた（図５）。位置Ｘ$_2$で、Ｒ、Ｃ、ＩおよびＬへの置換は、すべて親和性を増加させ、ほとんどの置換は許容された。同様に、Ｘ$_4$およびＸ$_5$の置換は一般に、Ｘ$_4$での正に電荷した残基の注目に値する例外を除いて、十分に許容され、これは、親和性を低下させた。位置Ｘ$_4$でのＹ、Ｅ、Ｓ、Ｑ、Ｃ、ＡおよびＧへの置換は、親和性を増加させた。ほとんどの置換（Ｙ、Ｆ、Ｔ、Ｓ、Ｑ、Ｎ、Ｃ、Ｖ、Ｍ、Ｉ、Ｇ、Ａを含む）は、いくらかの置換が溶解度を損なった

にもかかわらず、位置X_5での親和性を増加させた。
【０２８７】
５２個の組み合わせペプチド：
クラスＩＩ結合モチーフにおける二重置換に基づいて、我々は、多くの組み合わせが十分に許容され、一般に位置X_1でのＮ、位置X_2でのＳ／Ｅ、位置X_4でのＲは、より良好な、または非摂動の親和性を有したが、一方で、位置X_1でのＦは、一般に、十分に許容されなかったことを認めた（図６）。
【０２８８】
結論
この実施例は、アミノ酸置換によるＨＷＬＫＶ配列の最適化が、ＰＩＣＫ１に対して同等およびさらに高い親和性を示すペプチドリガンドを提供することを示す。
【０２８９】
実施例６：ＰＥＧの変異型およびペプチドリガンドへのＰＥＧの付着部位の変異型
この一連の実験において、我々は、精製ＰＩＣＫ１に対する二価ペプチドリガンドを含む種々のPEG_x（ｘ＝０～４個のエチレングリコール部分）（図７）の親和性を試験したいと考えた。加えて、我々はまた、PEG_4が配列ＨＷＬＫＶのリジン（Ｋ）アミノ酸の側鎖に連結される異なるリンカー結合を使用する場合の、精製ＰＩＣＫ１に対する親和性を試験したいと考えた（図７；ａｃ－$(HWLKV_{PEG4}V)_2$。
【０２９０】
材料および方法
ＰＩＣＫ１を、実施例１に記載されるように発現させ精製した。
【０２９１】
蛍光偏光法：蛍光偏光法を、未標識PEG_x－$(HWLKV)_2$の濃度増加に対して、タンパク質およびトレーサ（５ＦＡＭ－$NPEG_4$－$(HWLKV)_2$、５ｎＭ）の固定濃度で競合モードにおいて実行した。プレートを、氷上で２～４時間、黒色ハーフエリアコーニングブラック非結合表面９６ウェルプレートでインキュベートし、蛍光偏光を、４８８ｎｍでの励起フィルタおよび５３５ｎｍでのロングパス蛍光フィルタを使用するＯｍｅｇａ　ＰＯＬＡＲｓｔａｒプレートリーダー上で測定した。データを、ＧｒａｐｈＰａｄＰｒｉｓｍ６．０を使用してプロットし、ワンサイト競合にフィッティングしてK_i値を抽出し、これを、ＨＷＬＫＶペプチドの親和性にすべて相関させ、それを、倍率親和性増加として最終的にプロットした。
【０２９２】
結果
２つの同一のペンタペプチド間で必要とされる最小距離を試験するため、我々は、異なるＰＥＧリンカー長および位置を試験することを決定した。我々は、異なる長さのＰＥＧリンカー間の親和性における僅かな変動を認め、すべてはＨＷＬＫＶペプチドと比較してＰＩＣＫ１親和性の強化を与えた（図８）。
【０２９３】
さらに、我々は、Ｎ末端アミンの代わりにX_4リジン側鎖アミンへのPEG_4リンカーの付着が、PEG_4－ＨＷＬＫＶと比較して顕著に親和性を変化させなかったことを認めた。
【０２９４】
結論
本実施例は、本開示のＰＩＣＫ１阻害剤におけるリンカーの長さおよび付着部位の変動が十分に許容されることを示す。
【０２９５】
実施例７：炎症性疼痛におけるmyr－$NPEG_4$－$(HWLKV)_2$の有効性評価
この一連の実験において、我々は、マウスにおける完全フロイントアジュバント（ＣＦＡ）モデルで炎症性疼痛を緩和するためのmyr－$NPEG_4$－$(HWLKV)_2$の治効を評価することを目的とする。

【０２９６】
材料および方法。
炎症性疼痛：動物を、実験の開始前に最低６０分間実験室に慣れさせた。機械的疼痛閾値を、両方の後足のフォン・フライ測定により決定した。損傷を、右後足に誘導し、対側の左後足を動物の内部対照として使用した。０．０４ｇ～２ｇ（ｇ＝グラム－力）の範囲のフォン・フライ・フィラメント（０．０４、０．０７、０．１６、０．４、０．６、１．０、１．４、２．０）を、機械的疼痛閾値の決定に使用した。現在の実験において、昇順でフィラメントを、後足の前中央足底表面に適用した。マウスを、ワイヤメッシュ上のＰＶＣプラスチック箱（１１．５ｃｍ×１４ｃｍ）に入れ、順応前に３０分間順応させた。各フォン・フライヘアを、各適用の間に十分な休息期間を入れて５回適用し、引っ込め回数を記録した。引っ込め閾値を、２つの連続したフィラメントでの５回の適用のうち、少なくとも３回の陽性試験を引き出したフォン・フライ・フィラメントとして決定した。陽性試験を、フィラメントにより誘導された突然の足の引っ込め、怯みおよび／または足舐めとして定義した。炎症性疼痛を、未希釈完全フロイントアジュバント（ＣＦＡ）（Ｆ５８８１、シグマ）５０μＬの右後足の足底表面への片側注射により誘導し、対照マウスは、同量の０．９％生理食塩水（ビー・ブラウン、ドイツ）を注射された。すべての足底注射を、動物が最長６０秒間イソフルラン麻酔（２％）下にある間、インスリン針（０．３ｍＬ　ＢＤ　Ｍｉｃｒｏ－Ｆｉｎｅ）を用いて実行した。フォン・フライを、実験に応じて片側ＣＦＡ注射後最大で１１日適用した。ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$を、異なる経路（髄腔内（ｉ．ｔ．（７μＬ））またはｓ．ｃ．（１０μＬ／ｇ））を介して、異なる濃度（２μｍｏｌ／ｋｇ、１０μｍｏｌ／ｋｇまたは５０μｍｏｌ／ｋｇ）で投与した。統計分析を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ６．０を使用して実行した。二元配置反復測定分散分析にボンフェローニの事後検定が続いた。有意差水準を、ｐ＜０．０５に設定した。
【０２９７】
結果：
以下に、３つの異なる処置を使用するＣＦＡモデルにおける炎症性疼痛の緩和におけるｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の有効性を示す。
【０２９８】
０日目に、マウスは、５０μＬのＣＦＡまたは生理食塩水を右後足にｉ．ｐｌ．注射された。２日後、マウスは、５０μｍｏｌ／ｋｇ（１０μＬ／グラム）のｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$または生理食塩水をｓ．ｃ．注射された。誘発された疼痛を、注射前ならびに注射後１時間、５時間および２４時間にフォン・フライ・フィラメントの使用により試験した。二元配置分散分析とそれに続くボンフェローニの事後検定は、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の全体的な有意な効果を明らかにし、注射後１時間の試験時に有意な疼痛緩和があった。加えて、データは、ＣＦＡの代わりに後足への生理食塩水の注射は効果がなく、痛覚過敏に対するＣＦＡ効果は、注射後１１日目になくなっていることを明らかにする（図９ａ）。
【０２９９】
０日目に、マウスは、５０μＬのＣＦＡまたは生理食塩水を右後足にｉ．ｐｌ．注射された。２日後、痛覚過敏を、フォン・フライ・フィラメントを使用することにより確認し、マウスは、２μｍｏｌ／ｋｇ、１０μｍｏｌ／ｋｇまたは５０μｍｏｌ／ｋｇ（１０μＬ／グラム）のｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$または生理食塩水（１０μＬ／グラム）をｓ．ｃ．注射された。誘発された疼痛を、注射後１時間、５時間および２４時間にフォン・フライ・フィラメントの使用により再度試験した。二元配置分散分析とそれに続くボンフェローニの事後検定は、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の全体的な有意な効果を明らかにし、試験された最も高い濃度について注射後５時間まで有意な疼痛緩和があり、２つのより低い濃度について注射後１時間の試験時に有意な疼痛緩和があった（図９ｂ）。
【０３００】

０日目に、マウスは、５０μＬのＣＦＡまたは生理食塩水を右後足にｉ．ｐｌ．注射された。２日後、痛覚過敏を、フォン・フライ・フィラメントを使用することにより確認し、マウスは、２０μＭ　ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$または生理食塩水を７μＬの体積で髄腔内に注射された。誘発された疼痛を、注射後１時間、５時間および２４時間で、フォン・フライ・フィラメントの使用により再度試験した。二元配置分散分析とそれに続くボンフェローニの事後検定は、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の全体的な有意な効果を明らかにし、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$投与後１時間および５時間で有意な疼痛緩和があり、投与後２４時間では効果がなかった（図９ｃ）。

【０３０１】

結論

この実施例は、炎症性疼痛のＣＦＡモデルにおいて、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$が、足引っ込め閾値の増加により明らかにされるように、炎症性疼痛を有意に緩和することを示す（図９ａ～図９ｃ）。加えて、足引っ込め閾値は、無傷の対側の足では変動しないままであったことが認められた。ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$は、２つの投与量の皮下注射後の疼痛を緩和するのに効果的であった（図９ａ～図９ｂ）。さらに、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$は、髄腔内注射後に炎症性疼痛を緩和し（図９ｃ）、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$が中枢性感作を阻害することを確認した。

【０３０２】

実施例８：神経因性疼痛におけるｍｙｒ－ＮＰＥＧ４－（ＨＷＬＫＶ）２の有効性評価

この実験において、我々は、マウスの神経枝結紮損傷（ＳＮＩ）モデルにおける神経因性疼痛を緩和するためのｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の治効を評価することを目的とする。

【０３０３】

材料および方法

神経因性疼痛。ＳＮＩ疼痛実験を、Ｓｔｅｐｈａｎｅ　Ｇａｉｌｌａｒｄ博士（ＣＥＯ）の監督の下で表現型専門知識－疼痛およびＣＮＳ挙動ＣＲＯにより実行した。研究を、８週齢のＣ５７Ｂｌ６Ｊオスマウス（チャールズリバー）に対して実行した。神経枝結紮損傷外科手術を、麻酔したマウスで実行した。坐骨神経の総腓骨および脛骨末梢分岐の結紮および切断を実行し、腓腹分岐は無傷のままにした。外科手術７日後に、同側の後足のフォン・フライ・フィラメントに対する閾値応答の低下を、神経因性疼痛状態に対応するフォン・フライ・フィラメントにより確認した。操作されたマウスの収縮閾値応答を、校正されたフォン・フライ・フィラメント（「アップ／ダウン」法）で測定し、５０％閾値（ｇ）を算出した。実験者を、マウスの処置について盲検化した。収縮閾値を、外科出樹前に測定し、薬物投与後０時間、１時間、２時間、３時間、４時間および６時間で、７日目に再度測定した。全化合物を、ＰＢＳ中で希釈し、１０μＬ／ｇでｓ．ｃ．投与した。統計分析を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ６．０を使用して実行した。二元配置反復測定分散分析にボンフェローニの事後検定が続いた。有意差水準を、ｐ＜０．０５に設定した。

【０３０４】

結果：

マウスは、腓骨神経および脛骨神経を切断することにより、部分的神経損傷をもたらす外科手術を受け、残りの腓腹神経（ＳＮＩ）の過敏症を生じさせた。７日後に、痛覚過敏を、フォン・フライ・フィラメントを使用することにより確認し、マウスに、２μｍｏｌ／ｋｇまたは１０μｍｏｌ／ｋｇ（１０μＬ／グラム）のｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$または生理食塩水（１０μＬ／マウス１グラム）をｓ．ｃ．注射した。誘発された疼痛を、注射後１時間、２時間、３時間、４時間および６時間で、フォン・フライ・フィラメントの使用により再度試験した。二元配置分散分析とそれに続くボンフェローニの事後検定は、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の全体的な有意な効果を明らかにし、試験された最も高い濃度については注射後３時間まで有意な疼痛緩和があり、より低い

濃度については有意な疼痛緩和はなかった。

【０３０５】

結論

この実施例は、神経因性疼痛のＳＮＩモデルにおいて、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$が、処置後のマウスにおける増加した足引っ込め閾値により明らかにされるように、神経因性疼痛を有意に緩和することを示す。加えて、足引っ込め閾値が無傷の対側の足では変動しないままであったことが認められた。これは、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$が用量依存的に皮下注射後の疼痛の緩和に効果的であることを確認する（図１０）。

【０３０６】

実施例９：神経因性疼痛におけるＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の有効性評価

この実施例において、目的は、マウスの神経枝結紮損傷（ＳＮＩ）モデルの後の神経因性疼痛を緩和するためのＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$（脂肪族鎖を保持していない、ＰＤ５）の治効を評価することであった。

【０３０７】

材料および方法

神経因性疼痛。研究を、８週齢のＣ５７Ｂｌ６Ｊオスマウス（チャールズリバー）に対して実行した。神経枝結紮損傷外科手術を、麻酔したマウスで実行した。坐骨神経の総腓骨および脛骨末梢分岐の結紮および切断を、実行し、腓腹分岐は無傷のままにした。外科手術９日後、同側の後足のフォン・フライ・フィラメントに対する閾値応答の低下を、神経因性疼痛状態に対応するフォン・フライ・フィラメントにより確認した。操作されたマウスの収縮閾値応答を、校正されたフォン・フライ・フィラメント（「アップ／ダウン」法）で測定し、５０％閾値（ｇ）を算出した。実験者を、マウスの処置について盲検化した。収縮閾値を、外科手術前に測定し、薬物投与後０時間、１時間、２時間、３時間、４時間および６時間で、９日目に再度測定した。全化合物を、ＰＢＳ中で希釈し、１０μｍｏｌ／ｋｇ（１０μＬ／グラム）のＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$を１０μＬ／ｇでｓ．ｃ．投与した。統計分析を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ６．０を使用して、統計分析を実行した。ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ６．０を使用して実行した。二元配置反復測定分散分析にボンフェローニの事後検定が続いた。有意差水準を、ｐ＜０．０５に設定した。

【０３０８】

結果：

マウスは、腓骨神経および脛骨神経を切断することにより、部分的神経損傷をもたらす外科手術を受け、残りの腓腹神経（ＳＮＩ）の過敏症を生じさせた。９日後、痛覚過敏を、フォン・フライ・フィラメントを使用することにより確認し、マウスに１０μｍｏｌ／ｋｇ（１０μＬ／グラム）のＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$（ＰＤ５）をｓ．ｃ．注射した。誘発された疼痛を、注射後１時間、２時間、３時間、４時間および６時間で、フォン・フライ・フィラメントの使用により再度試験した。二元配置分散分析とそれに続くボンフェローニの事後検定は、脂肪族基がないＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$での処置の有意な効果を明らかにしなかった（図１１）。比較のため、実施例８からのｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$およびビヒクル群（図１０）を、破線で示す。

【０３０９】

結論

この実施例は、神経因性疼痛のＳＮＩモデルにおいて、ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$（脂肪族鎖を保持していない）は、処置後のマウスにおける増加した足引っ込め閾値により明らかにされるように、神経因性疼痛を有意に緩和しないことを示す。

【０３１０】

実施例１０：慢性神経因性疼痛におけるｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の有効性評価

この実験において、目的は、マウスの神経枝結紮損傷（ＳＮＩ）モデルの１年後の神経

因性疼痛を緩和するためのｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の治効を評価することであった。

【０３１１】

材料および方法

神経因性疼痛。研究を、８週齢のＣ５７Ｂｌ６Ｊオスマウス（チャールズリバー）に対して実行した。神経枝結紮損傷外科手術を、麻酔したマウスで実行した。坐骨神経の総腓骨および脛骨末梢分岐の結紮および切断を実行し、腓腹分岐は無傷のままにした。外科手術２日後、同側の後足のフォン・フライ・フィラメントに対する閾値応答の低下を、神経因性疼痛状態に対応するフォン・フライ・フィラメントにより確認した。マウスを、毎月フォン・フライで試験し、５２週での痛覚過敏応答が持続した。

【０３１２】

操作されたマウスの収縮閾値応答を、校正されたフォン・フライ・フィラメント（「アップ／ダウン」法）で測定し、５０％閾値（ｇ）を算出した。実験者を、マウスの処置について盲検化した。注射後、収縮閾値を、２時間および５時間で測定した。全化合物を、ＰＢＳ中で希釈し、１０μＬ／ｇ、３０μｍｏｌ／ｋｇでｓ．ｃ．投与した。統計分析を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ６．０を使用して実行した。一元配置分散分析にダネットの多重比較検定が続いた。＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１。

【０３１３】

結果：

マウスは、腓骨神経および脛骨神経を切断することにより、部分的神経損傷をもたらす外科手術を受け、残りの腓腹神経（ＳＮＩ）の過敏症を生じさせた。２日後、痛覚過敏を、フォン・フライ・フィラメントの使用により確認した（図１２）。これは、５２週間後に変更されなかった。マウスに、３０μｍｏｌ／ｋｇ（１０μＬ／グラム）のｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$（１０μＬ／マウス１グラム）をｓ．ｃ．注射した。誘発された疼痛を、注射後の２時間および５時間で、フォン・フライ・フィラメントの使用により再度試験した。一元配置分散分析とそれに続くダネットの多重比較検定は、５時間での処置の非常に有意な効果を明らかにした（ｐ＜０．０００１）。

【０３１４】

結論

この実施例は、神経因性疼痛のＳＮＩモデルにおいて、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$が、処置後のマウスにおける増加した足引っ込め閾値により明らかにされるように、ＳＮＩ損傷の誘導後の丸１年神経因性疼痛を有意に緩和することを示す。

【０３１５】

実施例１１：糖尿病性神経障害におけるｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の有効性評価

この実験において、目的は、１型糖尿病のストレプトゾシン（ＳＴＺ）モデルを使用する糖尿病性神経障害を緩和するためのｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の治効を評価することであった。

【０３１６】

材料および方法

糖尿病性神経障害（ＳＴＺ）モデル。糖尿病を、２００μｇ／ｍＬストレプトゾシン溶液（１００μｌ／１０ｇ、シグマ－アルドリッチＳ０１３０、バッチ＃ＷＸＢＢ７１５２Ｖ）の単回ＩＰ注射により誘導した。血糖値を、注射前、および注射７日後に試験する。すべての注射されたマウスは、Ｄ＋７で＞３５０ｍｇ／ｄＬの血糖値を提示し、その後Ｄ＋１４で化合物の鎮痛性試験のために使用される。１匹のマウスを、注射後７日で安楽死させる必要があった。

【０３１７】

操作されたマウスの収縮閾値応答を、校正されたフォン・フライ・フィラメント（「アップ／ダウン」法）で測定し、５０％閾値（ｇ）を算出した。実験者を、マウスの処置について盲検化した。外科手術１３日後、同側の後足のフォン・フライ・フィラメントに対

する閾値応答の低下を、糖尿病性神経障害に対応するフォン・フライ・フィラメントにより確認した。ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の注射後、収縮閾値を、１時間、２時間、４時間および６時間で測定し、１５日目に再度測定した。化合物を、ＰＢＳ（ビヒクル）中で希釈し、示されるような用量で、１０μＬ／ｇ（ガバペンチン、５ＭＰＫ）でｓ．ｃ．投与した。統計分析を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ６．０を使用して実行した。一元配置分散分析にダネットの多重比較検定が続いた。＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１。

【０３１８】

結果：

ＳＴＺ投与の７日後、すべてのマウスは、マウスの糖尿病状態を検証する血糖値の急激な上昇（１９７．４＋／－４．４ｍｇ／ｄＬから５３３．５＋／－１０．４；添付書類を参照されたい）を示した。図１３に示すように、ＳＴＺ注射の１３日後、糖尿病誘導神経因性疼痛が、機械的応答閾値（機械的アロディニア）の低下により明らかに確立される。プレガバリン（５ＭＰＫ）投与は、ビヒクル群と比較して機械的応答閾値の有意な上昇を誘導し（投与後１時間、２時間および４時間でｐ＜０．００１）＋２時間でベースラインの最大８４．７±１０．５％の最大反転を有した。２μｍｏｌ／ｋｇおよび１０μｍｏｌ／ｋｇでのｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$（ｍＰＤ５）溶液は両方とも、ビヒクル群と比較して機械的応答閾値の有意な増加を誘導した（最低濃度について１時間でｐ＝０．００６および２時間でｐ＝０．００３；１０μｍｏｌ／ｋｇ溶液について１時間および２時間でｐ＜０．００１、４時間でｐ＜０．００６）。投与後の２時間後に最大逆転に到達した（２μｍｏｌ／ｋｇ溶液および１０μｍｏｌ／ｋｇ溶液についてそれぞれベースラインの４９．２±７．９％および６７．３±４．５％）。興味深いことに、我々はまた、１時間および２時間で、ｍＰＤ５で処置した２群間に統計的有意差を観察した（それぞれｐ＝０．０１３およびｐ＝０．００８）。

【０３１９】

結論

この研究において、我々は、マウスにおけるＳＴＺ誘導神経因性疼痛モデルに対するｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の鎮痛効果を試験した。興味深いことに、我々は、１０μｍｏｌ／ｋｇでの投与後４時間まで強力で長期継続する効果を観察した。同時に、我々はまた、ペプチドの用量依存的効果を観察し、それは２μｍｏｌ／ｋｇの用量でより弱い効果であった。注目すべきこととして、目に見える副作用は観察されなかった。

【０３２０】

実施例１２：炎症性疼痛におけるｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＮＳＶＲＶ）$_2$、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＳＶＲＶ）$_2$およびｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＬＲＶ）$_2$の有効性評価

この一連の実験において、目的は、マウスにおける完全フロイントアジュバント（ＣＦＡ）モデルで炎症性疼痛を緩和するための実施例５に記載のペプチド最適化により定義されるようなＰＤＺドメイン結合配列に対する変異型の治効を評価することであった。これは、実施例５におけるスクリーニングからインビボ有効性への変換を定義し、より短い結合モチーフ（Ｃ４およびＣ３）の効果を示す。

【０３２１】

材料および方法。

炎症性疼痛（ＣＦＡモデル）：動物を、実験の開始前に最低６０分間実験室に慣れさせた。機械的疼痛閾値を、両方の後足のフォン・フライ測定により決定した。損傷を、右後足に誘導し、対側の左後足を動物の内部対照として使用した。

【０３２２】

０．０４ｇ～２ｇ（ｇ＝グラム－力）の範囲のフォン・フライ・フィラメント（０．０４、０．０７、０．１６、０．４、０．６、１．０、１．４、２．０）を、機械的疼痛閾値の決定に使用した。現在の実験において、昇順でフィラメントを、後足の前中央足底表面に適用した。マウスを、ワイヤメッシュ上のＰＶＣプラスチック箱（１１．５ｃｍ×１４ｃｍ）に入れ、試験の前に３０分間順応させた。各フォン・フライヘアを、各適用の間

に十分な休息期間を入れて５回適用し、引っ込め回数を記録した。引っ込め閾値を、２つの連続したフィラメントでの５回の適用のうち、少なくとも３回の陽性試験を引き出したフォン・フライ・フィラメントとして決定した。陽性試験を、フィラメントにより誘導された突然の足の引っ込め、怯みおよび／または足舐めとして定義した。

【０３２３】

炎症性疼痛を、未希釈完全フロイントアジュバント（ＣＦＡ）（Ｆ５８８１、シグマ）５０μＬの右後足の足底表面への片側注射により誘導し、対照マウスには、同量の０．９％生理食塩水（ビー・ブラウン、ドイツ）を注射した。すべての足底注射を、動物が最長６０秒間イソフルラン麻酔（２％）下にある間、インスリン針（０．３ｍＬ　ＢＤ　Ｍｉｃｒｏ－Ｆｉｎｅ）を用いて実行した。フォン・フライを、実験に応じて片側ＣＦＡ注射後最大で６日適用した。ペプチドを、（１０μＬ／ｇ））、および異なる濃度（０．４μｍｏｌ／ｋｇおよび２μｍｏｌ／ｋｇ）でｓ．ｃ．投与した。統計分析を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ６．０を使用して実行した。二元配置反復測定分散分析にダネットの事後検定が続いた。有意差水準を、ｐ＜０．０５に設定した。

【０３２４】

結果：

０日目に、マウスは、５０μＬのＣＦＡまたは生理食塩水を右後足にｉ．ｐｌ．注射された。ＣＦＡ注射後の２日目に、マウスに、０．４μｍｏｌ／ｋｇ（１０μＬ／グラム）のｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＮＳＶＲＶ）$_2$、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＳＶＲＶ）$_2$またはｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＬＲＶ）$_2$をｓ．ｃ．注射し、５日目に、マウスに、２μｍｏｌ／ｋｇ（１０μＬ／グラム）のｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＮＳＶＲＶ）$_2$、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＳＶＲＶ）$_2$またはｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＬＲＶ）$_2$をｓ．ｃ．注射した。この濃度で、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ４－（ＮＳＶＲＶ）$_2$は、完全に溶解しなかった。２日目および５日目の両方で、注射前ならびに注射後１時間、５時間および２４時間で、誘発された疼痛を、フォン・フライ・フィラメントの使用により試験した。投与の各日について別々の二元配置分散分析とそれに続くダネットの事後分析は、最も高い親和性化合物、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ４－（ＮＳＶＲＶ）$_2$が、０．４μｍｏｌ／ｋｇのＳ．ｃ．用量で疼痛を緩和すること、さらにｍｙｒ－ＮＰＥＧ４－（ＨＷＬＫＶ）$_2$およびｍｙｒ－ＮＰＥＧ４－（ＳＶＲＶ）$_2$の両方が、２．０μｍｏｌ／ｋｇのＳ．ｃ．用量で疼痛を緩和することを明らかにした（図ＸＸ）。この濃度で、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ４－（ＮＳＶＲＶ）$_2$は、完全に溶解しなかった。ｍｙｒ－ＮＰＥＧ４－（ＬＲＶ）$_2$は、この容量で疼痛緩和の傾向を示したが、これは、実験で有意ではなかった（図１４）。

【０３２５】

結論

この実施例は、炎症性疼痛のＣＦＡモデルにおいて、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$と同様にｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＮＳＶＲＶ）$_2$、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＳＶＲＶ）$_2$またはｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＬＲＶ）$_2$が、足引っ込め閾値の増加により明らかにされるように、２μｍｏｌ／ｋｇ（１０μＬ／グラム）で炎症性疼痛を緩和することを示す（図１４）。これは、より短いＰＩＣＫ１　ＰＤＺ結合モチーフ（Ｃ４およびＣ３）、さらにＣ５　ＰＩＣＫ１　ＰＤＺ結合モチーフの有効性を確認し、さらに、実施例５において観察された親和性と一致する。これに加えて、最適化の最高の親和性ペプチド（ＮＳＶＲＶ）を保持するｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＮＳＶＲＶ）$_2$（実施例５）は、０．４μｍｏｌ／ｋｇ（１０μＬ／グラム）で有意な疼痛緩和を示した。

【０３２６】

実施例１３：自発性炎症性疼痛の緩和におけるｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の有効性評価

この実験の目的は、実験者が炎症を起こした足に触れることから誘発される疼痛を緩和するだけでなく、単一の曝露場所の優先性を使用して進行中の疼痛、自発痛を緩和する、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の能力を評価することであった。これは、臨床解

釈にとって最も重要であるとみなされる。
【０３２７】
材料および方法。
炎症性疼痛（ＣＦＡモデル）：動物を、実験の開始前に最低６０分間実験室に慣れさせた。両方の後足の機械的疼痛閾値を、フォン・フライ測定により決定した。損傷を、右後足に誘導し、対側の左後足を動物の内部対照として使用した。０．０４ｇ～２ｇ（ｇ＝グラム－力）の範囲のフォン・フライ・フィラメント（０．０４、０．０７、０．１６、０．４、０．６、１．０、１．４、２．０）を、機械的疼痛閾値の決定に使用した。現在の実験において、昇順でフィラメントを、後足の前中央足底表面に適用した。マウスを、ワイヤメッシュ上のＰＶＣプラスチック箱（１１．５ｃｍ×１４ｃｍ）に入れ、試験前に３０分間順応させた。各フォン・フライ・フィラメントを、各適用の間に十分な休息期間を入れて５回適用し、引っ込め回数を記録した。引っ込め閾値を、２つの連続したフィラメントでの５回の適用のうち、少なくとも３回の陽性試験を引き出したフォン・フライ・フィラメントとして決定した。陽性試験を、フィラメントにより誘導された突然の足の引っ込め、怯みおよび／または足舐めとして定義した。炎症性疼痛を、未希釈完全フロイントアジュバント（ＣＦＡ）（Ｆ５８８１、シグマ）５０μＬの右後足の足底表面への片側注射により誘導した。すべての足底注射を、インスリン針を用いて実行し（０．３ｍＬ　ＢＤ　Ｍｉｃｒｏ－Ｆｉｎｅ）、一方で、動物は、最長６０秒間イソフルラン麻酔（２％）下にあった。フォン・フライは、ＣＦＡ注射の前、ＣＦＡ注射の２日後、およびＣＦＡ注射の５日後であり、以下に記載の単一の曝露場所の優先性の実験の前および後の両方で、過敏症を確認した。統計分析を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ６．０を使用して実行した。スチューデントのｔ検定。有意差水準を、ｐ＜０．０５に設定した。
【０３２８】
単一の曝露場所の優先性（ｓｅＰＰ）：ｓｅＰＰ実験を、中央のニュートラルゾーン（１１．５×２４ｃｍ）、および異なる床の風合いならびに異なる壁パターンを有する端での２つの細長い区画（２８×２４ｃｍ）からなる３区画の長方形装置内で実行した。曝露セッションの間、区画を、２つのオフホワイトＰｌｅｘｉｇｌａｓ（登録商標）パーティション（２４×４０ｃｍ）により互いから分離し、試験日に、それらのパーティションを除去した。
【０３２９】
ｓｅＰＰプロトコルを、３日間かけて、最初の２日間での曝露セッション、および３日目での試験で実行した。３日間とも、マウスを、実験開始前に少なくとも６０分間部屋へ順応させた。ｍＰＤ５を常に、最も好ましくない区画であることが以前に示されている、灰色の壁および穴あきの床を有する区画と対にした。ケージからのすべてのマウスを、同時に試験したが、すべては同じ処置を受けなかった。
【０３３０】
曝露日に、マウスを、計量し、ペプチド（３０μｍｏｌ／ｋｇ）またはビヒクル（１０μＬ／ｇ）でｓ．ｃ．注射し、すぐに指定された区画に６０分間入れた。試験群を、最も好ましくない区画内でペプチドに、および好ましい区画内でビヒクル（ＰＢＳ）に曝露し、対照群は、両方の区画でビヒクルを注入された。
【０３３１】
３日目に優先性試験のため、Ｐｌｅｘｉｇｌａｓ（登録商標）を除去し、マウスは３つの区画の間を２０分間自由に移動できた。異なる区画内で過ごした時間を、エソビジョン（Ｎｏｌｄｕｓ、ヴァーヘニンゲン、オランダ）により測定した。追加の実験を、損傷のない動物で行い、ｍＰＤ５依存的優先性変化を示さなかった。
【０３３２】
結果：
ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$への単回曝露は、ＣＦＡ損傷動物の場所優先性を変化させるのに十分である。優先性試験で、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$処置動物は、ビヒクル処置対照マウスと比較してｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$対

区画で有意により長い時間過ごし（図１５Ａおよび図１５Ｂ）、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$で処置された動物の区画への優先性を示唆した。念のため、優先性の変化は、疼痛緩和のためであり、ペプチド自体がそれらの優先性を変化させたのではなく、全く同じ実験を、損傷なしのマウス（ナイーブ）で実行したところ、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$処置動物での優先性における変化を示さなかった。これはさらに、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の乱用傾向の欠如を示唆する。

【０３３３】

結論：

この実施例は、炎症性疼痛を有するマウスが、それらがｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$を以前に受け取ったチャンバへと優先性をシフトさせることを示し、マウスが、薬物が進行性疼痛、自発痛を緩和することを認識することを示唆する。患者の苦痛のほとんどが進行性疼痛に関連しているので、このことは翻訳ポテンシャルにとって最も重要であると考えられる。

【０３３４】

実施例１４：Ｔａｔ－ＰＤ５と比較した異なる濃度でのｍＰＤ５の血漿濃度

この実験の目的は、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の血漿濃度および寿命を評価すること、ならびにｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$のアクリル化が、親分子Ｔａｔ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$と比較して血漿半減期を延長するかどうかを決定することであった。

【０３３５】

材料および方法：

ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の曝露　ｍＰＤ５曲線を、ＷＵＸＩ、ＤＭＰＫにより決定し、滅菌ＰＢＳ中各濃度のｍＰＤ５（２μｍｏｌ／ｋｇ、１０μｍｏｌ／ｋｇおよび５０μｍｏｌ／ｋｇ）での３匹のオスＣ５７ＢＬ／６Ｎマウス（絶食）のＳ．ｃ．注射により行い、血液試料を、３０分、１時間、２時間、５時間、１２時間の時点で採取し、血漿を、ＬＣ－ＭＳに供した。ダウンスロープの３点を、除去フェーズでの３点から決定した。

【０３３６】

ビオチン化Ｔａｔ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の血漿曝露の決定

血液試料採取。０．９％ＮａＣｌに希釈したビオチン化ＴＡＴ－ジ－ＰＥＧ４－ＤＡＴＣ５（ｂｉｏｔ－ＴＰＤ５；３４ｍｇ／ｋｇ＝１０μｍｏｌ）またはビオチン化ｍｙｒ－ジ－ＰＥＧ４－ＤＡＴＣ５（ｂｉｏｔ－ｍＰＤ５；１０μｍｏｌ）を、一旦８週齢オスＣ５７ｂｌ６Ｎマウス（合計１８匹のマウス）にｓ．ｃ．注射し、血液試料を、アプロチニン入りＢＤバキュテイナ（登録商標）Ｋ３ＥＤＴＡチューブ（ＢＤ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）を使用して１５分後、３０分後、１時間後、２時間後および６時間後に採取した（各時点で６匹のマウスからの血液試料）。血液試料を、４℃で１５分間、３５００ＲＰＭで遠心分離し、血漿を、新しいチューブに収集し－２０℃で凍結した。

【０３３７】

ＥＬＩＳＡ。９６ウェルＮＵＮＣイモビライザー（カタログ番号４３６００６）プレートを、１００ｍＭ炭酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ９．６）に希釈した１５μｇ／ｍＬビオチン化アルブミン（シグマ－アルドリッチ、製品番号Ａ８５４９）でコートし、シェーカー上、室温で２時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを、ＰＢＳ－Ｔ（０．１％ＴＷＥＥＮ（登録商標）２０（シグマ－アルドリッチ）を有する１×リン酸緩衝生理食塩水）で３回洗浄し、１回の洗浄ステップは、シェーカー上、室温で一晩であった。０．１％ＰＢＳＴを有する希釈済みＨＲＰ共役ストレプトアビジン（ＤＡＫＯ、引用番号Ｐ０３９７、０．８３ｇ／Ｌ）（１：５０００）を、別の丸底９６ウェルプレート（サーモサイエンティフィック）中、ｂｉｏｔ－ＴＰＤ５と異なる希釈（１０×および２０×）で混合し、シェーカー上で２０分間インキュベートした。溶液（１００μＬ／ウェル）を、コーティングした９６ウェルプレートに入れ、室温で１時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを、ＰＢＳ－Ｔで３回洗浄し、ＴＭＢプラス（シグマ、Ｓ

ＬＢＴ４７０８、Ｔ０４４０－１Ｌ）１００μＬ中、３～５分間展開した。展開を、０．２Ｍ硫酸（Ｈ２ＳＯ４）１００μＬの添加により停止した。プレートを、パーキンエルマー（ビズオウア、デンマーク）からのＷａｌｌａｃ　ＶＩＣＴＯＲ２　１４２０マルチラベルカウンタ上、４５０ｎｍ（および５７０ｎｍ）で読み取った。測定された吸光度を、ｂｉｏｔ－ＴＰＤ５の標準希釈液から生成された標準曲線に対して較正した。

【０３３８】

結果：

ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$について、我々は、１時間後最大濃度に到達（３．７５ｍｇ／ｋｇ（２μｍｏｌ／ｋｇ）の注射後１４４６±１０６ｎｇ／ｍｌ；１８．８ｍｇ／ｋｇ（１０μｍｏｌ／ｋｇ）の注射後６１７３±５０８ｎｇ／ｍｌ；９３．８ｍｇ／ｋｇ（５０μｍｏｌ／ｋｇ）の注射後２０２５８±６４２ｎｇ／ｍｌ）し、その後の片対数スケールの表示１オーダーの速度での線形除去フェーズが続く、血漿濃度における初期の増加を観察した。最大用量および曲線下面積は両方とも、Ｔ$_{1/2}$の用量で直線的に増加した（３．７５ｍｇ／ｋｇ（２μｍｏｌ／ｋｇ）の注射後０．５０±０．０７時間；１８．８ｍｇ／ｋｇ（１０μｍｏｌ／ｋｇ）の注射後０．５９±０．０７時間；９３．８ｍｇ／ｋｇ（５０μｍｏｌ／ｋｇ）の注射後０．８４±０．０３時間）（図１６）。ビオチン化Ｔａｔ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$（１０μｍｏｌ／ｋｇ）について、我々は、３０分にピークを有し後期で減速する非線形除去プロファイルが続く、血漿濃度の増加を観察した。最大濃度は、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$（１０μｍｏｌ／ｋｇ）について観察されたものと類似である（図１６）。

【０３３９】

結論：

ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$は、Ｓ．ｃ．投与後、用量依存的に血漿に分布し、１オーダーの速度および３０～４５分の半減期で除去される。これは、挙動の効果と一致してＴａｔ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$と類似であり、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$に対するアクリル化が、血漿曝露または寿命を延ばすことによりその効果を発揮しないことを示す。

【０３４０】

実施例１５：ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の溶解度および安定性の評価

目的は、好ましい（皮下）投与経路にとって重要である溶解度およびｍｙｒ－ＮＰＥＧ４－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の貯蔵寿命にとって重大である化学的安定性を決定することであった。

【０３４１】

材料および方法：

溶解度を、１０ｍＭ　ＰＢＳ中で濃度を上げながら溶解した試料の目視検査により決定した。安定性を、３０日間５度および２５度でＰＢＳ中にｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$を放置し続いてＨＰＬＣ－ＵＶ－ＭＳ法により、４つの濃度２μＭ、２０μＭ、５０μＭおよび２００μＭについてＲＥＤＧＬＥＡＤにより検討した。

【０３４２】

結果：

目視検査により、我々は、ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$の溶解度が、少なくとも２５０ｍｇ／ｍｌ（１３０ｍＭ）であると決定した（図１７）；これはミセル構造による可能性がある。

【０３４３】

分解は観察されず、純度は、２００μＭおよび５０μＭの試料について＞９８％であると決定された。２０μＭおよび２μＭの試料について吸収が低いため、分解はこれらの試料のいずれにも認められなかったが、純度を確実に決定できなかった。ペプチドｍＰＤ５は、ビヒクル組成物中、＋５℃および＋２５℃で少なくとも３０日間、化学的に安定である。質量を、検量線のための標準試料を含むすべての試料について確認した。

【０３４４】

【表２】

	名目上 濃度 mPD5 (μM)	pH	UV-HPLC ピーク面積	測定濃度 mPD5 (μM)
30 日 @5℃	200	7.37	6665	194
	50	7.39	3347	49
	20	7.40	1196	17
	2	7.37	37	0.5
	0		ND	<0.2
30 日 @25℃	200	7.36	7005	203
	50	7.41	3325	48
	20	7.39	1161	17
	2	7.37	26	0.4
	0		ND	<0.2

【０３４５】
結論：
ｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$は、非常に良好な安定性を示し、これは、観察された有効性を有しヒト皮下投与（最大量８００μｌ）のために十分であるとみなされる。これに加えて、安定性は良好であり、化合物が貯蔵寿命の要件に適合していることを示唆する。
【０３４６】
実施例１６：親油性脂肪族鎖のバリエーション
この一連の実験において、目的は、マウスの完全フロイントアジュバント（ＣＦＡ）モデルにおける脂肪族鎖のサブステーションによる治効および作用の延長を評価することであった。
【０３４７】
材料および方法。
炎症性疼痛（ＣＦＡモデル）：炎症性疼痛を、未希釈完全フロイントアジュバント（ＣＦＡ）（Ｆ５８８１、シグマ）５０μＬの右後足の足底表面への片側注射により誘導し、対照マウスには、同量の０．９％生理食塩水（ビー・ブラウン、ドイツ）を注射した。すべての足底注射を、動物が最長６０秒間イソフルラン麻酔（２％）下にある間、インスリン針（０．３ｍＬ　ＢＤ　Ｍｉｃｒｏ－Ｆｉｎｅ）を用いて実行した。損傷を、右後足に誘導し、対側の左後足を、動物の内部対照として使用した。
【０３４８】
動物を、実験の開始前に最低６０分間実験室に慣れさせた。機械的疼痛閾値を、両方の後足のフォン・フライ測定により決定した。０．０４ｇ～２ｇ（ｇ＝グラム－力）の範囲のフォン・フライ・フィラメント（０．０４、０．０７、０．１６、０．４、０．６、１．０、１．４、２．０）を、機械的疼痛閾値の決定に使用した。現在の実験において、昇順でフィラメントを、後足の前中央足底表面に適用した。マウスを、ワイヤメッシュ上のＰＶＣプラスチック箱（１１．５ｃｍ×１４ｃｍ）に入れ、試験前に３０分間順応させた。各フォン・フライヘアを、各適用の間に十分な休息期間を入れて５回適用し、引っ込め回数を記録した。引っ込め閾値を、２つの連続したフィラメントでの５回の適用のうち、少なくとも３回の陽性試験を引き出したフォン・フライ・フィラメントとして決定した。陽性試験を、フィラメントにより誘導された突然の足の引っ込め、怯みおよび／または足舐めとして定義した。
【０３４９】

フォン・フライを、実験に応じて片側ＣＦＡ注射後最大で５日適用した。ペプチドを、炎症性疼痛の緩和における有効性を評価するためにクロスオーバースケジュールで各化合物の５回の注射で、ｓ．ｃ．で（ＰＢＳ中１０μＬ／ｇ））、および２μｍｏｌ／ｋｇで投与した。統計分析を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ８．０を使用して実行した。二元配置反復測定分散分析にダネットの事後検定が続いた。有意差水準を、ｐ＜０．０５に設定した。

【０３５０】

結果：

０日目に、マウスのベースラインの足引っ込め応答を、ＣＦＡまたは生理食塩水５０μＬの右後足への足底内注射の前に、フォン・フライ・フィラメントを使用して決定した。

【０３５１】

ＣＦＡ注射後２～５日目に、マウスに、ＰＢＳまたは２．０μｍｏｌ／ｋｇ（１０μＬ／グラム）のｍｙｒ（Ｃ１４）－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$、ｍｙｒ（Ｃ１４）（不飽和、トランス）－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$、ｍｙｒ（Ｃ１４）（不飽和、トランス）－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$、（Ｃ１８）（二酸）－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$、（Ｃ１６）－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$、コレステロール－β－Ａｓｐ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$をｓ．ｃ．注射した。

【０３５２】

すべての日に、誘発された疼痛を、注射前ならびに注射後２時間および５時間で、フォン・フライ・フィラメントの使用により試験した。投与の各日についての別々の二元配置分散分析にダネットの事後分析が続いた。

【０３５３】

ＰＢＳの注射は、疼痛引っ込め閾値における変化を誘発しなかったが、ｍｙｒ（Ｃ１４）－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$（ｍＰＤ５）は、完全で非常に有意な疼痛緩和を誘発した（図１８Ａ）。同様に、ｍｙｒ（Ｃ１４）（不飽和、トランス）－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$、ｍｙｒ（Ｃ１４）（不飽和、シス）－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$、（Ｃ１８）（二酸）－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$は、非常に有意な疼痛緩和を誘発した。同様に、アシル鎖の（Ｃ１６）－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$への延長は、非常に有意な疼痛緩和を生じた（図１８Ｂ）。最後に、コレステロール－ｂ－Ａｓｐ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$は、有意な疼痛緩和を生じた（図１８Ｃ）。

【０３５４】

結論

この実施例は、炎症性疼痛のＣＦＡモデルにおいて、不飽和をアシル鎖に導入でき、追加の酸基を二酸にできることを示す。これに加えて、１４個～１６個の炭素および１８個（二酸を有する）のアシル鎖は、有効性に関して同等に見える。最後に、β－Ａｓｐを介した親油性脂肪族基（この場合にはコレステロール）の共役は、活性を提示する。

【０３５５】

実施例１７：感作された熱痛の緩和に対するｍＰＤ５の有効性

この実験において、目的は、完全フロイントアジュバント（ＣＦＡ）の足底内注射により誘発された熱痛覚の感作の治効ｍＰＤ５を評価することであった。

【０３５６】

材料および方法。

炎症性疼痛（ＣＦＡモデル）：動物を、実験の開始前に、最低６０分間実験室に慣れさせた。ハーグリーブステストを、両後足の足底表面への輻射熱光の適用により実行した。応答潜伏期間を、自動読み取り（Ｕｇｏ　Ｂａｓｉｌｅ、イタリア）により測定した。輻射熱刺激に応答した両後足のベースライン足引っ込め潜伏期間を、ＣＦＡ注射前に実行し、２つの事前に選択された群間に差異は認められなかった。炎症性疼痛を、未希釈完全フロイントアジュバント（ＣＦＡ）（Ｆ５８８１、シグマ）５０μＬの右後足の足底表面への１０回の片側注射により誘導し、対照マウスには、同量の０．９％生理食塩水（ビー・ブラウン、ドイツ）を注射した。すべての足底注射を、動物が最長６０秒間イソフルラン麻

酔（２％）下にある間、インスリン針（０．３ｍＬ　ＢＤ　Ｍｉｃｒｏ－Ｆｉｎｅ）を用いて実行した。ＣＦＡ注射後３日目に、マウスを、個々の赤色円筒（直径８ｃｍ、高さ７．５ｃｍ）に入れ、熱痛覚過敏を、ＩＲ２０のベースライン読み取りにより確認した。３回の測定を、各マウスの各後足で実行した。陽性試験を、赤外線により誘導された突然の足の引っ込め、怯みおよび／または足舐めとして定義した。測定を、ＣＦＡ注射前、およびＣＦＡ注射の３＋４日後に実行した。３日目に、測定を、処置の前、ならびに処置後１時間、５時間および２１時間で実行した。ペプチドおよびビヒクルを、ｓ．ｃ．（１０μＬ／ｇ））、および０μｍｏｌ／ｋｇまたは１０μｍｏｌ／ｋｇの濃度で投与した。統計分析を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ６．０を使用して実行した。二元配置反復測定分散分析にボンフェローニの事後検定が続いた。有意差水準を、ｐ＜０．０５に設定した。

【０３５７】

結果：

足底内ＣＦＡ注射後３日目に、熱痛覚過敏を、ハーグリーブステストを使用して注射された後足（同側）で確認した。１０μｍｏｌ／ｋｇ（１０μＬ／グラム）のｍｙｒ－ＮＰＥＧ$_4$－（ＨＷＬＫＶ）$_2$（ｍＰＤ５）のｓ．ｃ．投与に続いて、我々は、感作された足での足引っ込め潜伏期間における非常に有意な延長を観察し、一方で有意な変化は、対側の（健康な）足では観察されなかった。疼痛緩和は、５時間でそれほどはっきりせず、翌日（２１時間）に完全に消失した。ＰＢＳ（ビヒクル）の同様の注射は、いずれの足の足引っ込め潜伏期間にも影響しなかった（図１９）。

【０３５８】

結論：

この実施例は、ｍＰＤ５が、影響されない健康な足での熱感受性に影響することなく、炎症性疼痛のＣＦＡモデルにおいて観察された熱過敏症を完全に緩和できることを示す。これは、接触に対し伝達する過敏性から侵害受容器の異なるサブセットにより神経支配される疼痛の重要なモダリティへと作用を広げる。

【０３５９】

【表３】

配列

配列番号	配列
配列番号 1	$X_1X_2X_3X_4X_5$、式中： X_1 はH、N、F、もしくはTであるか存在しない； X_2 はW、S、E、もしくはYである；または存在しない； X_3 はL、V、またはIである； X_4 はK、I、またはRである；および X_5 はVである；
配列番号 2	$X_1X_2X_3X_4X_5$、式中： X_1 はN、F、もしくはTであるか存在しない； X_2 はS、E、もしくはYである；または存在しない； X_3 はV、LまたはIである； X_4 はIまたはRである；および X_5 はVである
配列番号 3	$X_1X_2X_3X_4X_5$、式中： X_1 はNもしくはTであるか存在しない； X_2 はS、E、もしくはYである；または存在しない； X_3 はV、LまたはIである； X_4 はIまたはRである；および X_5 はVである
配列番号 4	$X_1X_2X_3X_4X_5$、式中： X_1 はNもしくはFであるか存在しない； X_2 はS、E、もしくはYである；または存在しない； X_3 はV、LまたはIである； X_4 はIまたはRである；および X_5 はVである
配列番号 5	NSIIV
配列番号 6	NSIRV
配列番号 7	NSVIV
配列番号 8	NSVRV
配列番号 9	NEIIV
配列番号 10	NEIRV
配列番号 11	NEVIV
配列番号 12	NEVRV
配列番号 13	NYIIV
配列番号 14	NYIRV
配列番号 15	NYVIV
配列番号 16	NYVRV
配列番号 17	TSIIV
配列番号 18	TSIRV
配列番号 19	TSVIV

配列番号 20	TSVRV
配列番号 21	TEIIV
配列番号 22	TEIRV
配列番号 23	TEVIV
配列番号 24	TEVRV
配列番号 25	TYIIV
配列番号 26	TYIRV
配列番号 27	TYVIV
配列番号 28	TYVRV
配列番号 29	FSIIV
配列番号 30	FSIRV
配列番号 31	FSVIV
配列番号 32	FSVRV
配列番号 33	FEIIV
配列番号 34	FEIRV
配列番号 35	FEVIV
配列番号 36	FEVRV
配列番号 37	FYIIV
配列番号 38	FYIRV
配列番号 39	FYVIV
配列番号 40	FYVRV
配列番号 41	SIIV
配列番号 42	SIRV
配列番号 43	SVIV
配列番号 44	SVRV
配列番号 45	EIIV
配列番号 46	EIRV
配列番号 47	EVIV
配列番号 48	EVRV
配列番号 49	YIIV
配列番号 50	YIRV
配列番号 51	YVIV
配列番号 52	YVRV
配列番号 53	NSLRV
配列番号 54	HWLKV
N/A	IIV
N/A	IRV
N/A	VIV
N/A	VRV
N/A	LRV

Ｎ／Ａ：該当なし

【０３６０】

参考文献

ＡＬＦＯＮＳＯ，Ｓ．，ｅｔ ａｌ．，Ｓｙｎａｐｔｏ－ｄｅｐｒｅｓｓｉｖｅ ｅｆｆｅｃｔｓ ｏｆ ａｍｙｌｏｉｄ ｂｅｔａ ｒｅｑｕｉｒｅ ＰＩＣＫ１．Ｅｕｒ Ｊ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ，２０１４．３９（７）：ｐ．１２２５－３３．
ＡＴＩＡＮＪＯＨ，Ｆ．Ｅ．，ｅｔ ａｌ．，Ｓｐｉｎａｌ ｃｏｒｄ ｐｒｏｔｅｉｎ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｎｇ ｗｉｔｈ Ｃ ｋｉｎａｓｅ １ ｉｓ ｒｅｑｕｉｒｅｄ ｆｏｒ ｔｈｅ ｍａｉｎｔｅｎａｎｃｅ ｏｆ ｃｏｍｐｌｅｔｅ Ｆｒｅｕｎｄ’ｓ ａｄｊｕｖａｎｔ－ｉｎｄｕｃｅｄ ｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ ｐａｉｎ ｂｕ

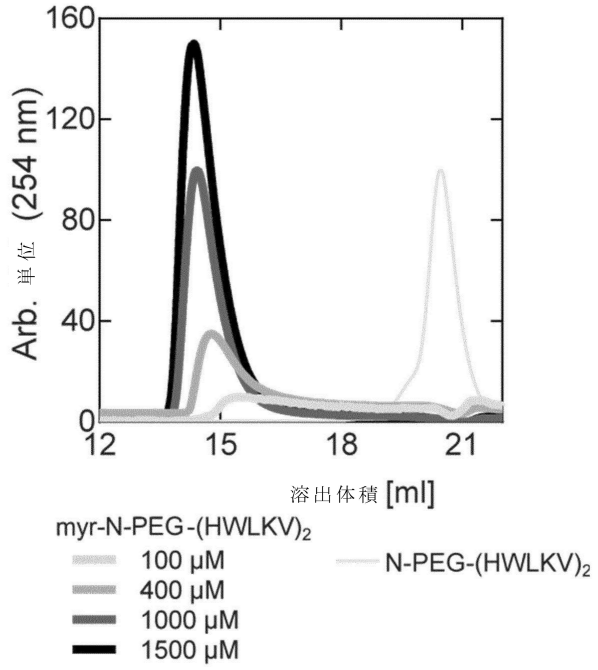
t not for incision-induced post-operative pain. Pain, 2010. 151(1): p. 226-34.
BACH, A. et al. (2009). Design and synthesis of highly potent and plasma-stable dimeric inhibitors of the PSD-95-NMDA receptor interaction. Angew Chem Int Ed Engl 48, 9685-9689.
BACH, A et al., 2012. A high-affinity, dimeric inhibitor of PSD-95 bivalently interacts with PDZ1-2 and protects against ischemic brain damage. Proc Natl Acad Sci U S A, 109, 3317-22.
BLANCHET, C. E. et al. J. Appl. Crystallogr. 2015, 48, 431.
CHEN, S.R., et al., Nerve injury increases GluA2-lacking AMPA receptor prevalence in spinal cords: functional significance and signaling mechanisms. J Pharmacol Exp Ther, 2013. 347(3): p. 765-72.
CLEM, R.L., V. Anggono, and R.L. Huganir, PICK1 regulates incorporation of calcium-permeable AMPA receptors during cortical synaptic strengthening. J Neurosci, 2010. 30(18): p. 6360-6.
CONRAD, K.L., et al., Formation of accumbens GluR2-lacking AMPA receptors mediates incubation of cocaine craving. Nature, 2008. 454(7200): p. 118-21.
DIXON, R.M., J.R. Mellor, and J.G. Hanley, Pick1-mediated glutamate receptor subunit 2 (GLUR2) trafficking contributes to cell death in oxygen/glucose deprived hippocampal neurons. Journal of Biological Chemistry, 2009.
GANGADHARAN, V., et al., Peripheral calcium-permeable AMPA receptors regulate chronic inflammatory pain in mice. J Clin Invest, 2011. 121(4): p. 1608-23.
GARRY, E.M., et al., Specific involvement in neuropathic pain of AMPA receptors and adapter proteins for the GluR2 subunit. Mol.Cell Neurosci., 2003. 24(1): p. 10-22.
HANSEN S. et al. Journal of Applied Crystallography 2012, 45, 566.
HANSEN S. et al. Journal of Applied Crystallography 2014, 47, 1469.
HE, J., et al., PICK1 inhibits the E3 ubiquitin ligase activity of Parkin and reduces its neuronal protective effect. Pro

c Natl Acad Sci U S A, 2018. 115(30): p. E7193-E7201.
JI, R.R., et al., Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? Trends Neurosci, 2003. 26(12): p. 696-705.
KANDASAMY, R. and T.J. Price, The pharmacology of nociceptor priming. Handb Exp Pharmacol, 2015. 227: p. 15-37.
KARLSEN, M.L. et al. 2015. Structure of Dimeric and Tetrameric Complexes of the BAR Domain Protein PICK1 Determined by Small-Angle X-Ray Scattering. Structure 23, 1258-70.
LONG, J. F. et al. Supramodular structure and synergistic target binding of the N-terminal tandem PDZ domains of PSD-95. J. Mol. Biol. 2003, 327, 203-214.
LORGEN, JO., PICK1 facilitates lasting reduction of GluA2 concentration in the hippocampus during chronic epilepsy. Epilepsy Res, 2017. 137: 25-32
LUSCHER, C. and R.C. Malenka, Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. Neuron, 2011. 69(4): p. 650-63.
MADSEN, K.L. et al., 2005. Molecular determinants for the complex binding specificity of the PDZ domain in PICK1. Journal of Biological Chemistry 280, 20539-20548.
MARCOTTE, D.J., et al., Lock and chop: A novel method for the generation of a PICK1 PDZ domain and piperidine-based inhibitor co-crystal structure. Protein Sci, 2018. 27(3): p. 672-680.
MOLLER, A.R., Tinnitus and pain. Prog Brain Res, 2007. 166: p. 47-53.
NISSEN et al. Design, synthesis, and characterization of fatty acid derivatives of a dimeric peptide-based postsynaptic density-95 (PSD-95) inhibitor. J. Med. Chem. 2015 Feb 12;58(3):1575-80.
PEKER, S. and A. Sirin, Parallels between phantom pain and tinnitus. Med Hypotheses, 2016. 91: p. 95-97.
TURNER et al. Administration of a novel high affinity PICK1 PDZ domain inhibitor attenuates cocaine seeking in rats. Neuropharmacology, 164(1), 2020, 107901.
VANNESTE, S., W.T. To, and D. De Ridder,

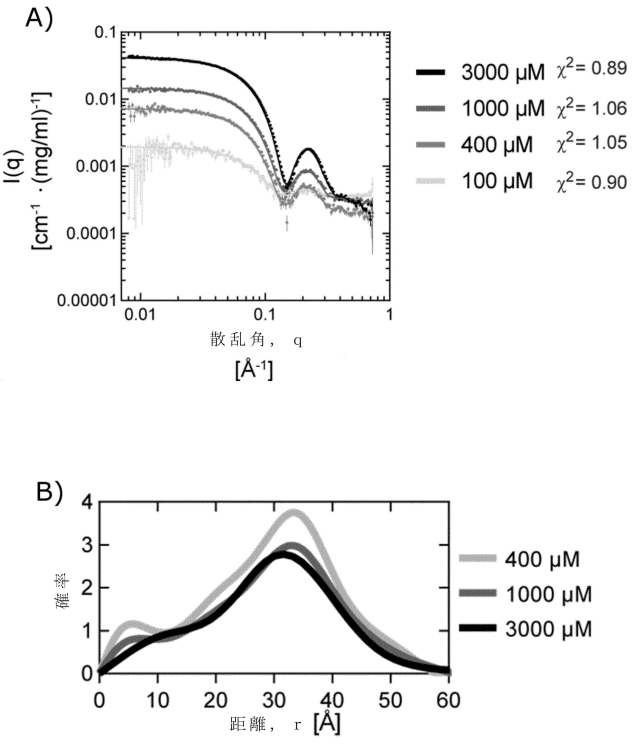
Tinnitus and neuropathic pain share a common neural substrate in the form of specific brain connectivity and microstate profiles. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2019. 88: p. 388-400.
VIKMAN, K.S., B.K. Rycroft, and M.J. Christie, Switch to Ca2+-permeable AMPA and reduced NR2B NMDA receptor-mediated neurotransmission at dorsal horn nociceptive synapses during inflammatory pain in the rat. J Physiol, 2008. 586(2): p. 515-27.
WANG, W., et al., Preserved acute pain and impaired neuropathic pain in mice lacking protein interacting with C Kinase 1. Mol Pain, 2011. 7: p. 11.
WOLF, M.E. and C.R. Ferrario, AMPA receptor plasticity in the nucleus accumbens after repeated exposure to cocaine. Neurosci Biobehav Rev, 2010. 35(2): p. 185-211.
WOOLF, C.J. and M.W. Salter, Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. Science, 2000. 288(5472): p. 1765-9.
ZHANG et al. Protein interacting with C alpha kinase 1 (PICK1) is involved in promoting tumor growth and correlates with poor prognosis of human breast cancer. Cancer Sci. 2010 Jun;101(6):1536-42.

【図面】

【図１】



【図２】



【図２－１】

C)

	R_g	D_{max}	M_w	M_w/M_{wteo}
100 µM	20.1	51.0	14.8	7.9
400 µM	22.2	57.0	13.8	7.3
1000 µM	22.5	60.2	11.2	6.0
3000 µM	23.6	115.6	10.4	5.5
	[Å]	[Å]	[kDa]	

【図３】

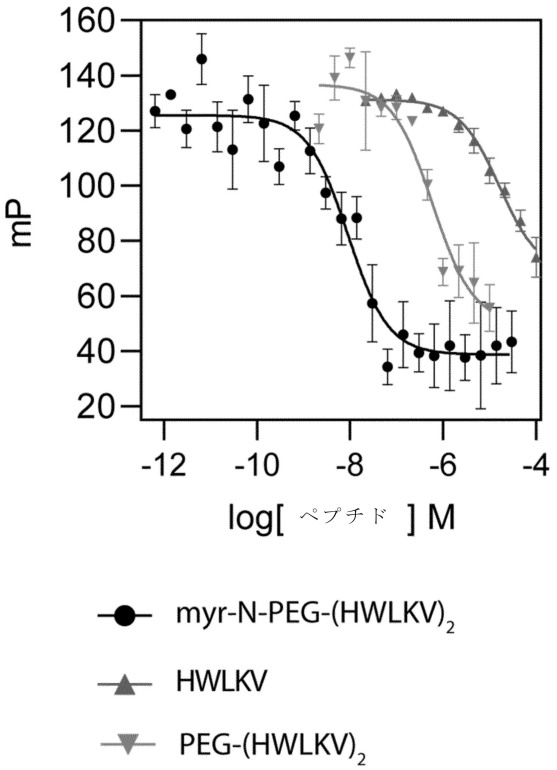
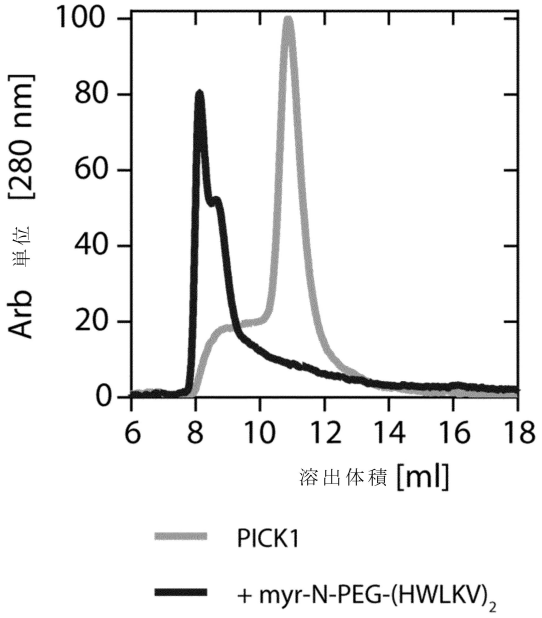


Fig. 2 (contd.)

【図４】



【図５】

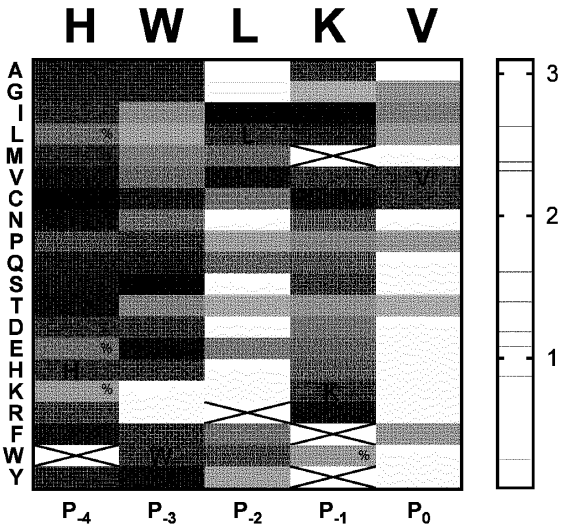
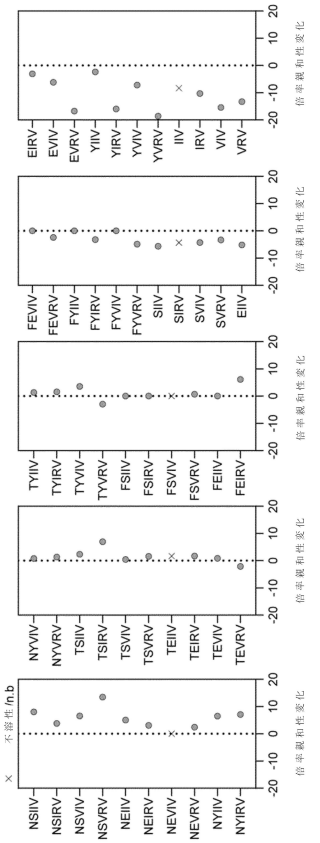
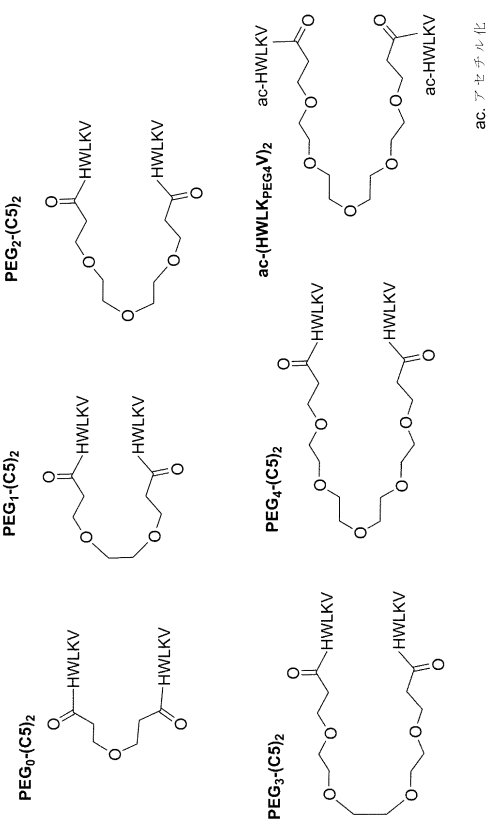


Fig. 5

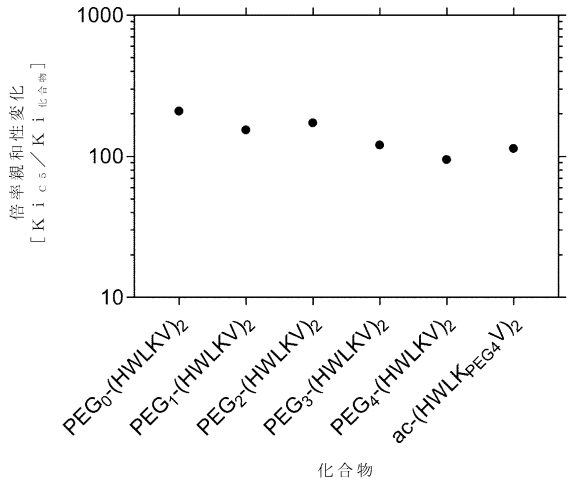
【図６】


NSIIV
NSIRV
NSVIV
NSVRV
NEIIV
NEIRV
NEVIV
NEVRV
NYIIV
NYIRV
NYVIV
NYVRV
TSIIV
TSIRV
TSVIV
TSVRV
TEIIV
TEIRV
TEVIV
TEVRV
TYIIV
TYIRV
TYVIV
TYVRV
FSIIV
FSIRV
FSVIV
FSVRV
FEIIV
FEIRV
FEVIV
FEVRV
FYIIV
FYIRV
FYVIV
FYVRV
SIIV
SIRV
SVIV
SVRV
EIIV
EIRV
EVIV
EVRV
YIIV
YIRV
YVIV
YVRV
IIV
IRV
VIV
VRV
倍率親和性変化
不溶性/n.b

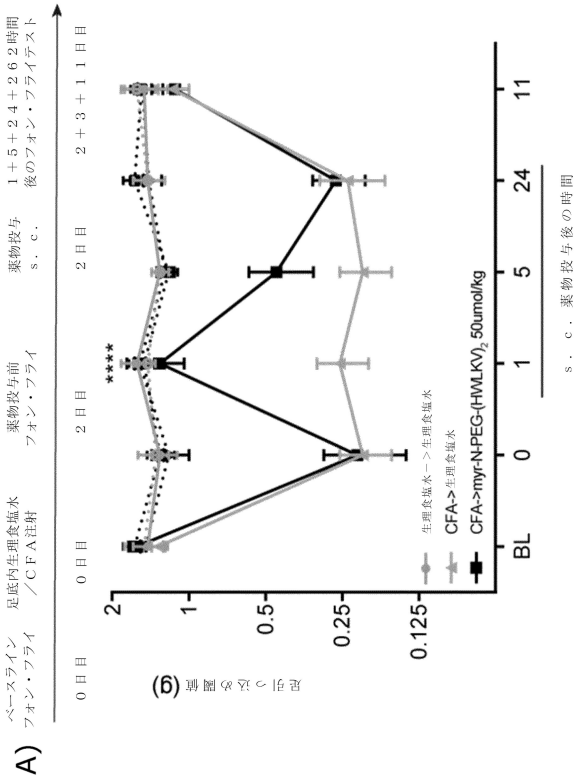
【図７】


PEG0-(C5)2
PEG1-(C5)2
PEG2-(C5)2
PEG3-(C5)2
PEG4-(C5)2
ac-(HWLKPEG4V)2
HWLKV
ac-HWLKV
ac. アセチル化

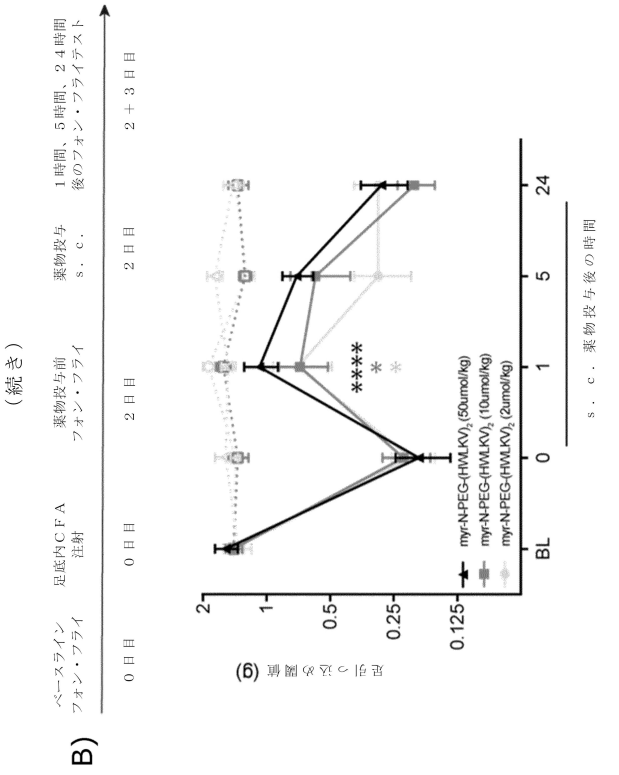
【図８】


倍率親和性変化
[Kic5／Kic化合物]
1000
100
10
PEG0-(HWLKV)2
PEG1-(HWLKV)2
PEG2-(HWLKV)2
PEG3-(HWLKV)2
PEG4-(HWLKV)2
ac-(HWLKPEG4V)2
化合物

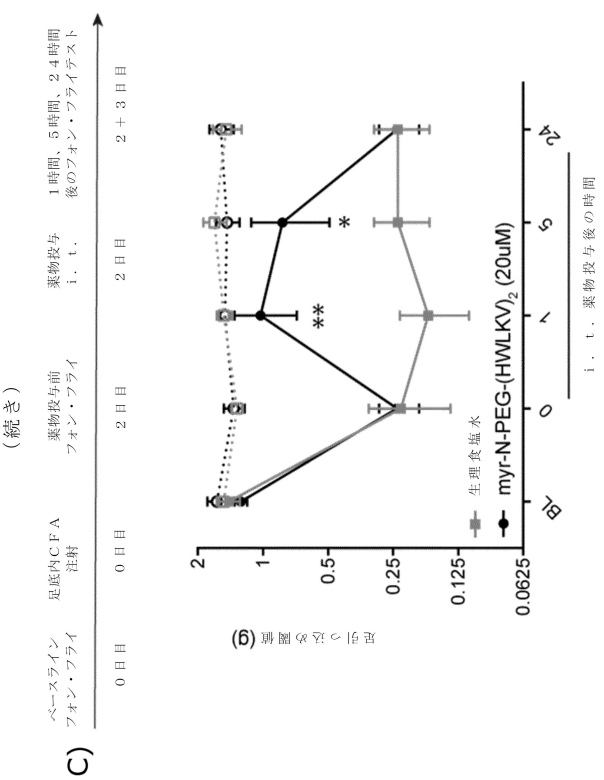
【図９－１】


A)
ベースライン フォン・フライ
0日目
足底内生理食塩水 ／CFA注射
0日目
2日目
薬物投与前 フォン・フライ
2日目
薬物投与 s.c.
2+3+11日目
1+5+24+262時間後のフォン・フライテスト
****
足引っ込め閾値 (g)
2
1
0.5
0.25
0.125
BL
0
1
5
24
11
生理食塩水→生理食塩水
CFA->生理食塩水
CFA->myr-N-PEG-(HWLKV)2 50umol/kg
s.c. 薬物投与後の時間

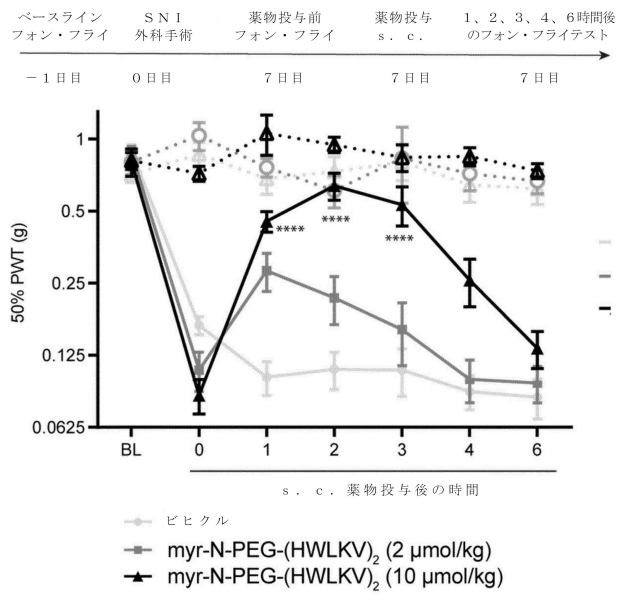
【図９－２】



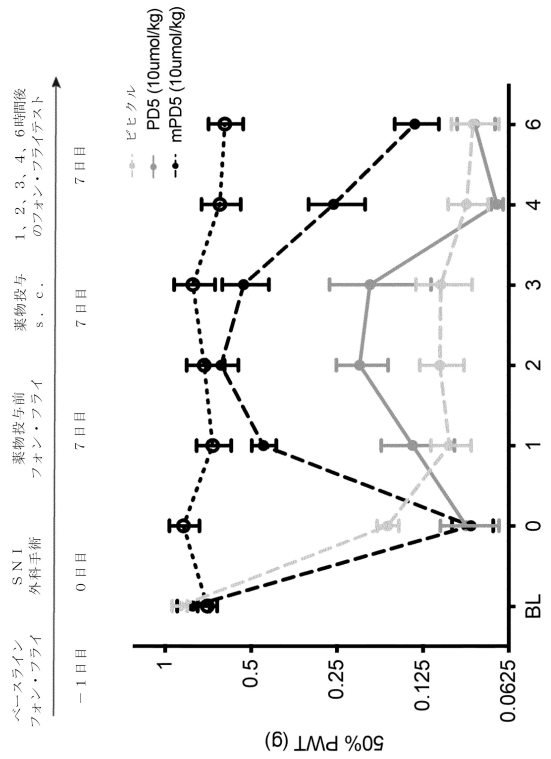
【図９－３】



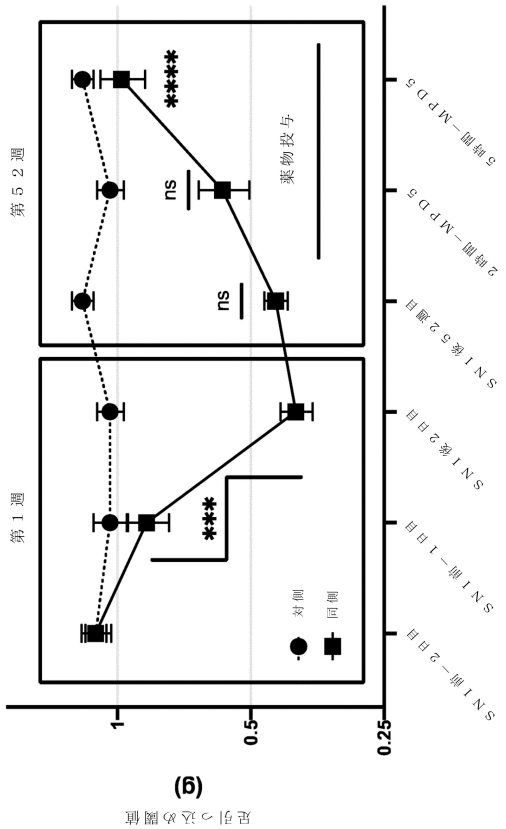
【図１０】



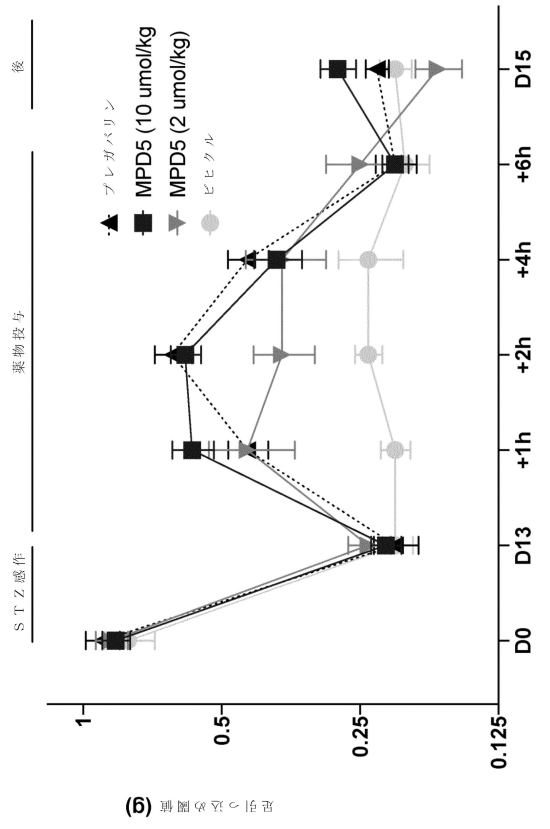
【図１１】



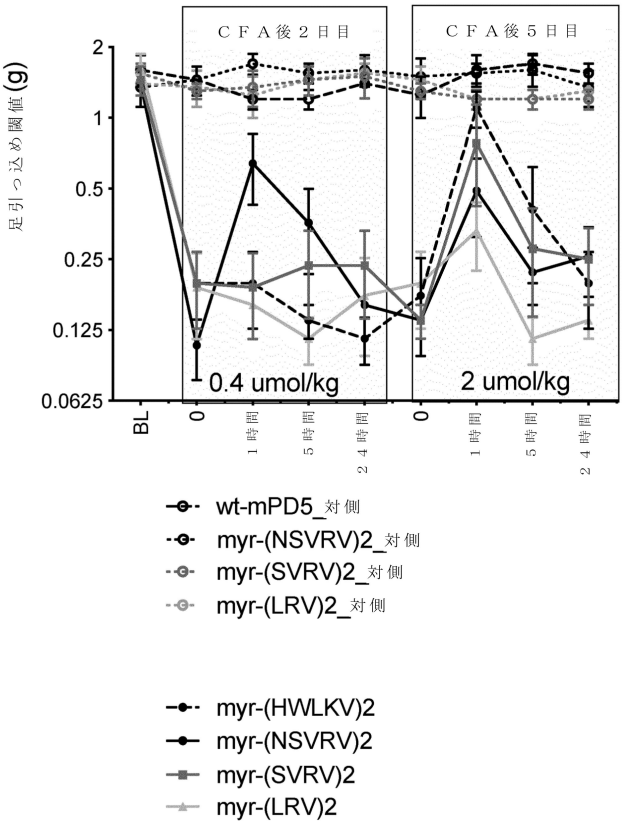
【図１２】



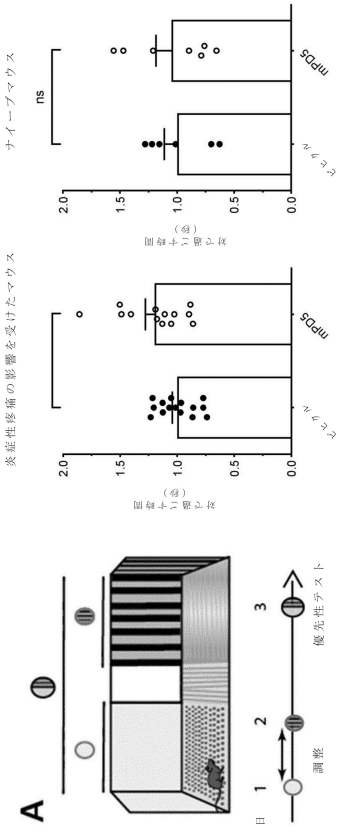
【図１３】



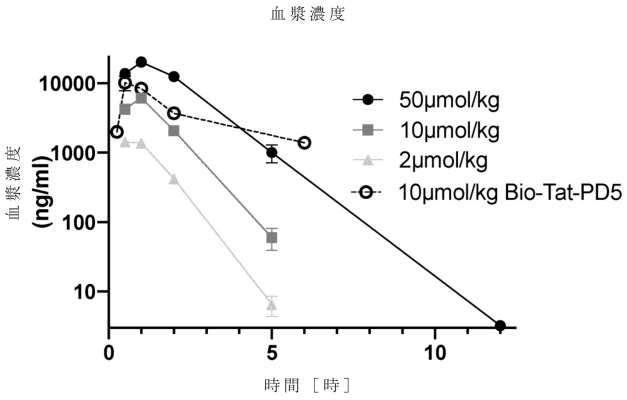
【図１４】



【図１５】



【図１６】



【図１７】

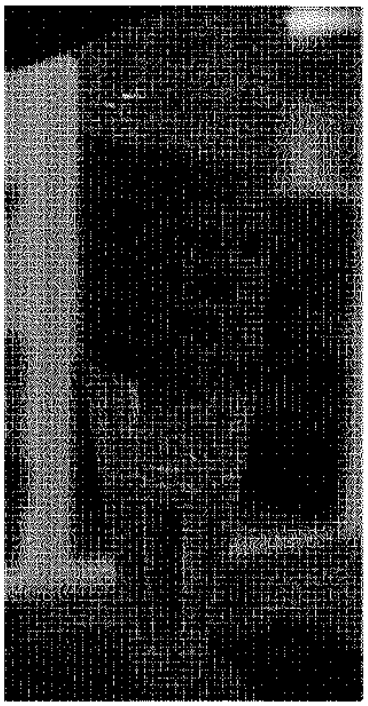
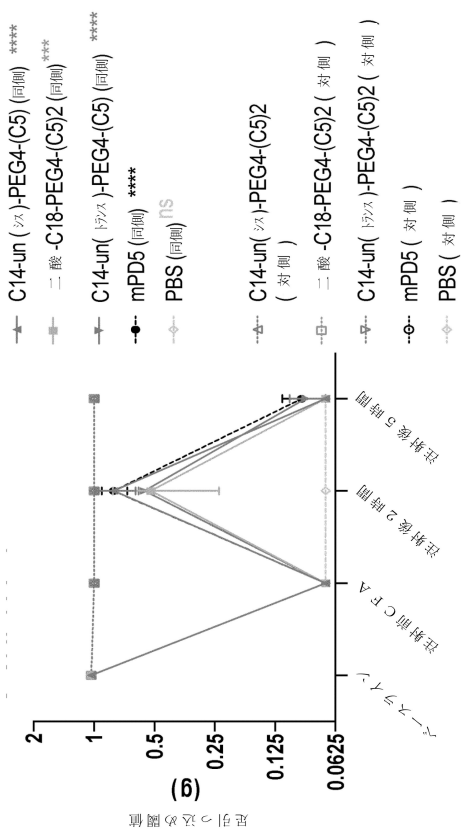
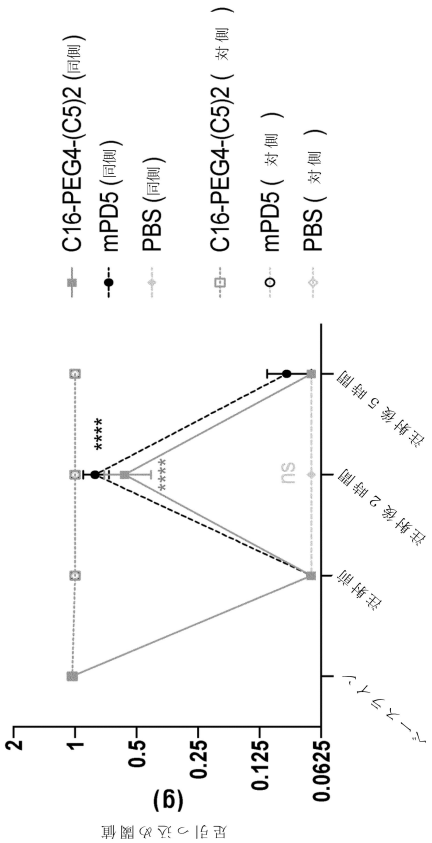


Fig. 17

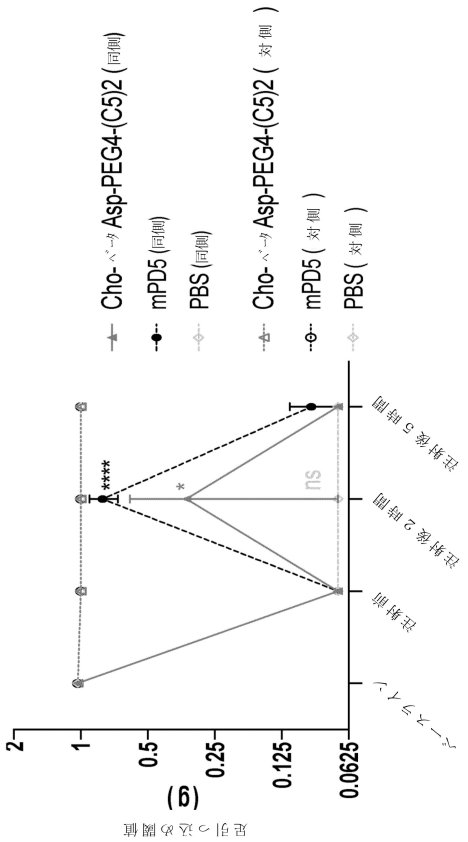
【図１８Ａ】



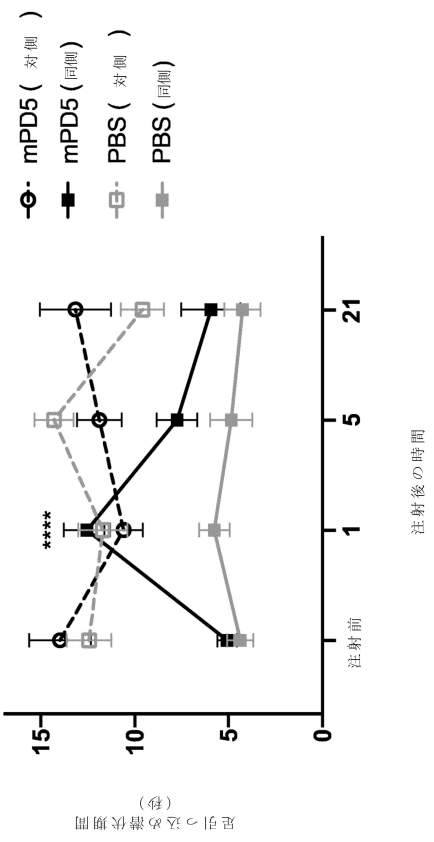
【図１８Ｂ】



【図１８Ｃ】


Cho-ペンタ Asp-PEG4-(C5)2 (同側)
mPD5 (同側)
PBS (同側)
Cho-ペンタ Asp-PEG4-(C5)2 (対側)
mPD5 (対側)
PBS (対側)
ベースライン
注射前
注射後 2 時間
注射後 5 時間
****
*
ns
2
1
0.5
0.25
0.125
0.0625
(g)
足引っ込め閾値

【図１９】


mPD5 (対側)
mPD5 (同側)
PBS (対側)
PBS (同側)
****
15
10
5
0
注射前
1
5
21
注射後の時間
足引っ込め潜伏期間
(秒)

【手続補正書】
【提出日】令和４年１２月６日(２０２２.１２.６)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
２０２３５０６５９８０００００１.ａｐｐ

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/055678

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61P25/00 A61K38/00 A61K47/54
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 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, WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TURNER CHRISTOPHER ET AL: "Administration of a novel high affinity PICK1 PDZ domain inhibitor attenuates cocaine seeking in rats", NEUROPHARMACOLOGY, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 164, 2 December 2019 (2019-12-02), XP086022443, ISSN: 0028-3908, DOI: 10.1016/J.NEUROPHARM.2019.107901 [retrieved on 2019-12-02]	1-7, 11-13, 15-19
Y	page 3; figure 1 -----	8-10,14
Y	WO 2008/101160 A2 (GENENTECH INC [US]; APPLETON BRENT A [US] ET AL.) 21 August 2008 (2008-08-21) Pages 14-20, 23; figures 7,8 ----- -/--	1-19

[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
7 June 2021	22/06/2021

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	Pinheiro Vieira, E

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/055678

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2015/078477 A1 (UNIV COPENHAGEN [DK]) 4 June 2015 (2015-06-04) cited in the application figures 1,3	1-19
Y	A. BACH ET AL: "A high-affinity, dimeric inhibitor of PSD-95 bivalently interacts with PDZ1-2 and protects against ischemic brain damage", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 109, no. 9, 28 February 2012 (2012-02-28), pages 3317-3322, XP055023131, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1113761109 cited in the application figure 4	1-19
Y	SIMON ERLENDSSON ET AL: "Protein Interacting with C-kinase 1 (PICK1) Binding Promiscuity Relies on Unconventional PSD-95/Discs-Large/ZO-1 Homology (PDZ) Binding Modes for Nonclass II PDZ Ligands", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 289, no. 36, 5 September 2014 (2014-09-05), pages 25327-25340, XP055702445, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M114.548743 tables 1,5,7	1-19

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2021/055678

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:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2021/055678

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008101160 A2	21-08-2008	AR 065370 A1	03-06-2009
		CL 2008000493 A1	27-06-2008
		EP 2111413 A2	28-10-2009
		PE 20081795 A1	08-01-2009
		TW 200846358 A	01-12-2008
		WO 2008101160 A2	21-08-2008
WO 2015078477 A1	04-06-2015	AU 2014356912 A1	09-06-2016
		BR 112016012391 A2	26-09-2017
		CA 2931694 A1	04-06-2015
		CN 105828832 A	03-08-2016
		DK 3074032 T3	15-04-2019
		EP 3074032 A1	05-10-2016
		ES 2716890 T3	17-06-2019
		IL 245904 A	31-10-2017
		JP 6633523 B2	22-01-2020
		JP 2017501132 A	12-01-2017
		KR 20160091980 A	03-08-2016
		PL 3074032 T3	28-06-2019
		US 2016303245 A1	20-10-2016
		WO 2015078477 A1	04-06-2015

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）
Ａ６１Ｋ	*47/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/12		
Ａ６１Ｋ	*9/107*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/107		
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00		
Ａ６１Ｐ	*25/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/04		
Ａ６１Ｐ	*25/36*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/36		
Ａ６１Ｐ	*21/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/02		
Ａ６１Ｐ	*25/08*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/08		
Ａ６１Ｐ	*27/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/16		
Ａ６１Ｐ	*25/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/06		
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*9/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/10		
Ａ６１Ｐ	*25/28*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/28		
Ａ６１Ｐ	*25/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/16		
Ｃ０７Ｋ	*7/06*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	7/06	ＺＮＡ	

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

デンマーク国，２８３０ ビールム，ビールムヴェイ １４４

(72)発明者 ゲザー，ウルリク

デンマーク国，２９２０ シャーロテンルン，ホブマークスヴェイ ８５

(72)発明者 クリステンセン，ニコライ，リース

デンマーク国，３４５０ アレロド，サジェルソ アレ １階

Ｆターム（参考） 4C076 AA17 CC01 CC04 CC10 CC11 CC27 CC41 DD40 DD41 DD70 EE23 EE59
4C084 AA01 AA02 BA15 BA16 BA17 NA05 NA14 ZA02 ZA06 ZA08 ZA23 ZA34 ZA36 ZB11 ZB26 ZC39 ZC41
4H045 BA13 EA20 FA10 FA20