

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2023年10月5日(05.10.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/190496 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 39/00 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)  
C07K 16/18 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)  
A61K 47/64 (2017.01) A61P 25/04 (2006.01)  
C12N 1/15 (2006.01)

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,  
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/012470

(22) 国際出願日: 2023年3月28日(28.03.2023)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2022-056428 2022年3月30日(30.03.2022) JP

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 山下 俊英 (YAMASHITA Toshihide); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 岩谷 龍 (IWATANI Ryo); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番31号 京阪堂島ビル6階 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: ANTI-NETRIN-4 ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 抗ネトリン-4抗体およびその利用

(57) Abstract: The present invention provides: an anti-netrin-4 antibody capable of recognizing, as an epitope, an amino acid sequence (SEQ ID NO: 2) lying between position-192 to position-202 in an amino acid sequence (SEQ ID NO: 1) for human netrin-4; and a pharmaceutical composition for preventing or treating pain, which contains the antibody or a functional fragment thereof as an active ingredient.

(57) 要約: 本発明は、ヒトネトリン-4のアミノ酸配列(配列番号1)の192位~202位のアミノ酸配列(配列番号2)をエピトープとして認識する抗ネトリン-4抗体、および当該抗体または当該抗体の機能的断片を有効成分として含有する疼痛の予防または治療用医薬組成物を提供する。



WO 2023/190496 A1

## 明 細 書

発明の名称：抗ネトリンー4抗体およびその利用

### 技術分野

[0001] 本発明は、抗ヒトネトリンー4抗体およびその利用に関するものである。

### 背景技術

[0002] 疼痛は、その激しい痛みから身体の生理機能と精神状態に著しい影響を及ぼし、患者のQOL (Quality Of Life) を低下させる。慢性疼痛の患者数は全世界で2000万人を超えると報告されており、疼痛治療薬の市場規模は日米欧で約2兆円と言われている。またがん、脳卒中、糖尿病、エイズといった疼痛発症の原因となり得る疾患の患者数が増加していることから、疼痛治療法の確立は非常に重要な医療課題の一つである。特に、非ステロイド性抗炎症薬や麻薬性鎮痛薬による治療効果が低い神経因性疼痛の治療薬開発に対する医療ニーズは、今後も高まることが予想される。しかしながら、神経障害性疼痛の発症原因は多岐に渡り、その分子作用機序も非常に複雑であることから、いまだに根本的な治療薬が開発されていない（非特許文献1）。神経因性疼痛の発症・維持に関与する分子メカニズムを明らかにすることで、画期的な治療薬の開発に繋げていくことは21世紀における医療の最大課題の一つである。

[0003] 脊髄の背側に存在する後角内神経回路の可塑的な変化は神経障害性疼痛の発症原因の一つであると考えられている（非特許文献2）。末梢からの感覚入力は脊髄後角内で増幅、抑制、統合など様々な修飾を受けてから脳へと伝達される。しかし末梢神経が障害されると、異常な軸索側枝形成、シナプス伝達の亢進など、脊髄後角内神経回路網が可塑的に変化して疼痛の発症に繋がってしまうことが過去に報告されている（非特許文献3）。このことから、後角内における神経回路網の可塑性を制御する分子メカニズムを明らかにすることは新たな疼痛治療法の開発に繋がることが期待される。

[0004] ネットリンー4 (Netrin-4) は分泌性タンパク質ネットリンファミリー

一の一つである。ネトリン-4は細胞外基質ラミニンの $\beta$ 鎖とよく似た構造を持ち、神経突起形成、細胞移動、細胞生存、血管形成やがん細胞の増殖といった様々な役割があることが知られている（非特許文献4）。本発明者らは、ネトリン-4が疼痛の発症に関与しているかどうかを検証するためにネトリン-4ノックアウト動物（ラット）で疼痛モデルを作製し、機械刺激に対する応答をvon Frey filamentテストによって調べた。その結果、神経障害性疼痛モデルおよび慢性炎症性疼痛モデルの両方において、野生型の動物で観察されるような痛覚過敏状態が観察されなかった。この実験結果からネトリン-4が様々な種類の疼痛の発症に関与している可能性が初めて示唆された（非特許文献5、特許文献1）。

### 先行技術文献

### 特許文献

[0005] 特許文献1：WO2015/025770

### 非特許文献

[0006] 非特許文献1：Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, Jensen TS, Kalso EA, Loeser JD, Miaskowski C, Nurmikko TJ, Portenoy RK, Rice AS, Stacey BR, Treede RD, Turk DC, Wallace MS: Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain*. 2007 Dec 5;132(3):237-251.

非特許文献2：Woolf CJ, Salter MW: Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*. 2000 Jun 9;288(5472):1765-1769.

非特許文献3：Markman JD, Dworkin RH: Ion channel targets and treatment efficacy in neuropathic pain. *Journal of Pain* 2006;7(1):S38-S47.

非特許文献4：Lai Wing Sun K, Correia JP, Kennedy TE: Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development*. 2011 Jun;138(11):2153-2169.

非特許文献5：Hayano, Y., Takasu, K., Koyama, Y., Ogawa, K., Minami, K., Asaki, T., Kitada, K., Kuwabara, S. and Yamashita, T.: Dorsal horn

interneuron-derived Netrin-4 contributes to spinal sensitization in chronic pain via Unc5B 2016 Dec 12;213(13):2949-2966.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、ネトリン-4に結合し、疼痛の予防または治療に有用な抗体を提供すること、および当該抗体を有効成分とする疼痛の予防または治療用医薬組成物を提供することを課題とする。

### 課題を解決するための手段

[0008] 本発明は、上記課題を解決するために、以下の各発明を包含する。

[1] ヒトネトリン-4のアミノ酸配列（配列番号1）の192位～202位のアミノ酸配列（配列番号2）をエピトープとして認識する抗ネトリン-4抗体。

[2] 以下の（a）および（b）を含む、前記[1]に記載の抗ネトリン-4抗体：

（a）配列番号7のアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、および配列番号9のアミノ酸配列からなる重鎖CDR3を含む重鎖可変領域、ならびに

（b）配列番号10のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号11のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、および配列番号12のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域。

[3] ヒト型キメラ抗体またはヒト化抗体である、前記[1]または[2]に記載の抗体。

[4] ハイブリドーマHuman Netrin-4（192-202）-6A1（受託番号NITE BP-03603）によって産生される、前記[2]に記載の抗体。

[5] ハイブリドーマHuman Netrin-4（192-202）-6A1（受託番号NITE BP-03603）。

[6] 前記[1]～[4]に記載の抗体の機能的断片。

[7] 前記 [1] ~ [4] に記載の抗体の重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド。

[8] 前記 [1] ~ [4] に記載の抗体の軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド。

[9] 前記 [7] および／または [8] に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[10] 前記 [9] に記載の発現ベクターを含む形質転換細胞。

[11] 前記 [1] ~ [4] に記載の抗体または前記 [6] に記載の機能的断片を有効成分として含有する疼痛の予防または治療用医薬組成物。

[12] 後根神経節投与用である、前記 [11] に記載の医薬組成物。

[13] ヒトネトリン-4のアミノ酸配列（配列番号1）の192位~202位のアミノ酸配列（配列番号2）を含むペプチドとキャリアタンパク質を含む、疼痛の予防または治療用ワクチン組成物。

## 発明の効果

[0009] 本発明により、ネトリン-4に結合し、疼痛の予防または治療に有用な抗体を提供することができる。また、本発明により、当該抗体を有効成分とする疼痛の予防または治療用医薬組成物を提供することができる。

## 図面の簡単な説明

[0010] [図1]神経障害性疼痛モデルラットを用いて、抗ネトリン-4ポリクローナル抗体の髄腔内投与による痛覚応答の変化を評価した結果を示す図である。

[図2]神経障害性疼痛モデルラットを用いて、抗ネトリン-4モノクローナル抗体の髄腔内投与による痛覚応答の変化を評価した結果を示す図である。

[図3]神経障害性疼痛モデルラットを用いて、抗ネトリン-4モノクローナル抗体の後根神経節投与による痛覚応答の変化を評価した結果を示す図である。

## 発明を実施するための形態

[0011] [抗ネトリン-4抗体]

本発明は、ヒトネトリン-4のアミノ酸配列（配列番号1、アクセシヨ

ン番号：NP\_067052.2) の192位～202位のアミノ酸配列をエピトープとして認識する抗ネトリン-4抗体（以下「本発明の抗体」という）を提供する。ヒトネトリン-4のアミノ酸配列の192位～202位はTGGEVIFKALS（配列番号2）である。したがって、アミノ酸配列TGGEVIFKALS（以下「エピトープ配列」という）からなるペプチドに結合する抗体は、本発明の抗体である。本発明の抗体は、神経障害性疼痛モデルラットへの投与により、痛覚過敏症状を改善することが確認されている（実施例参照）。

[0012] 本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であってもよく、モノクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体は、例えば以下のようにして作製し、取得することができる。すなわち、エピトープ配列（配列番号2）を含むペプチドをPBSに溶解し、所望により通常のアジュバント（例えばフロイント完全アジュバント）を適量混合したものを免疫原として哺乳動物（マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等）を免疫する。免疫方法は特に限定されず、例えば、1回または適当な間隔で複数回、皮下注射または腹腔内注射する方法であってもよい。次いで、常法に従い、免疫した動物から血液を採取して血清を分離し、ポリクローナル抗体画分を精製することにより取得することができる。

[0013] モノクローナル抗体は、上記免疫された哺乳動物から得た免疫細胞（例えば脾細胞）とミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを得、当該ハイブリドーマの培養物から抗体を採取することによって取得することができる。また、公知の遺伝子組換え技術を用いて抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主細胞に導入し、組換え型のモノクローナル抗体を産生させることもできる。さらに、ファージディスプレイ法を用いて作製することもできる。

[0014] 本発明の抗体がモノクローナル抗体である場合、本発明の抗体は、ハイブリドーマHuman Netrin-4 (192-202)-6A1（受託番号NITE BP-03603）によって産生される抗体であってもよい。ハイブリドーマHuman Netrin-4 (192-202)-6A1（

受託番号N I T E B P - 0 3 6 0 3) は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに国際寄託済みである(受託日: 2022年2月14日)。

[0015] ハイブリドーマHuman Netrin-4 (192-202)-6A1によって産生される抗体は、配列番号3で示されるアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号4で示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を有する。重鎖可変領域は配列番号5で示されるアミノ酸配列からなり、軽鎖可変領域は配列番号6で示されるアミノ酸配列からなる。さらに、重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、以下の相補性決定領域(CDR: complementarity determining region)を含んでいる。

配列番号7で示されるアミノ酸配列(DYEMH)からなる重鎖CDR1、

配列番号8で示されるアミノ酸配列(AIDPETGDTVYNQKFKG)からなる重鎖CDR2、

配列番号9で示されるアミノ酸配列(GFSDHY)からなる重鎖CDR3、

配列番号10で示されるアミノ酸配列(RSSQSLVHSSGNTFLH)からなる軽鎖CDR1、

配列番号11で示されるアミノ酸配列(KVSSRFS)からなる軽鎖CDR2、および

配列番号12で示されるアミノ酸配列(SQSTHIPYT)からなる軽鎖CDR3。

[0016] 本発明の抗体は、(a)配列番号7のアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、および配列番号9のアミノ酸配列からなる重鎖CDR3を含む重鎖可変領域、ならびに(b)配列番号10のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号11のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、および配列番号12のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域を含むことが好ましい。

[0017] 本発明の抗体は、ヒト型キメラ抗体またはヒト化抗体であることが好ましい。ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物由来の抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域と、ヒト抗体の重鎖定常領域および軽鎖定常領域からなる抗体

をいう。ヒト化抗体は、ヒト以外の動物由来の抗体のCDRをヒト抗体のCDRへ移植したものをいい、CDR移植抗体、再構成抗体などとも称される。ヒト化抗体のFR（フレームワーク領域：framework region）は、CDRが良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、ヒト化抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるFRのアミノ酸配列を置換してもよい。

[0018] キメラ抗体およびヒト化抗体の定常領域には、ヒト抗体の定常領域が使用され、例えば重鎖では、C $\gamma$ 1、C $\gamma$ 2、C $\gamma$ 3、C $\gamma$ 4を、軽鎖ではC $\kappa$ 、C $\lambda$ を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体定常領域を修飾してもよい。ヒト化の際に用いられるヒト抗体は、IgG、IgM、IgA、IgE、IgDなどいずれのアイソタイプのヒト抗体でもよいが、IgGを用いることが好ましく、さらにIgG1またはIgG3が好ましく、特にIgG1が好ましい。ヒト抗体の定常領域のアミノ酸配列は、公知のデータベース（Protein Data Bank等）から取得することができる。

[0019] 本発明のヒト型キメラ抗体としては、配列番号5示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号6で示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域と、ヒト抗体の重鎖定常領域および軽鎖定常領域からなる抗体が好ましい。また、重鎖可変領域は、配列番号5で示されるアミノ酸配列中のCDR1、CDR2およびCDR3以外のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であってもよく、軽鎖可変領域は、配列番号6で示されるアミノ酸配列中のCDR1、CDR2およびCDR3以外のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であってもよい。「1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された」とは、部位特異的変異法等の公知の変異ペプチド作製法により欠失、置換もしくは付加できる程度の数（好ましくは10個以下、より好ましくは7個以下、さらに好ましくは5個以下）のアミノ酸が欠失

、置換もしくは付加されることを意味する。

[0020] 本発明のヒト化抗体としては、配列番号7で示されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、配列番号8で示されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、配列番号9で示されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3、配列番号10で示されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号11で示されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、および配列番号12で示されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3がヒト抗体のCDRへ移植された抗体が好ましい。

[0021] ヒト型キメラ抗体およびヒト化抗体は、公知の遺伝子組換え技術を用いて、組換え抗体として製造することができる。例えば、ヒト型キメラ抗体の重鎖をコードする遺伝子は、ハイブリドーマからクローニングした抗体遺伝子の重鎖可変領域をコードする部分をヒト抗体の重鎖定常領域をコードする遺伝子と結合して作製することができる。同様に、ヒト型キメラ抗体の軽鎖をコードする遺伝子は、ハイブリドーマからクローニングした抗体遺伝子の軽鎖可変領域をコードする部分をヒト抗体の軽鎖定常領域をコードする遺伝子と結合して作製することができる。例えば、ヒト化抗体の重鎖をコードする遺伝子は、ハイブリドーマからクローニングした抗体遺伝子の重鎖可変領域のCDR1、2および3をコードする部分をヒト抗体の重鎖をコードする遺伝子の対応するCDR部分と置換することで作製することができる。同様に、ヒト化抗体の軽鎖をコードする遺伝子は、ハイブリドーマからクローニングした抗体遺伝子の軽鎖可変領域のCDR1、2および3をコードする部分をヒト抗体の軽鎖をコードする遺伝子の対応するCDR部分と置換することで作製することができる。

[0022] 本発明には、上記本発明の抗体の機能的断片が含まれる。本発明における「機能的断片」は、上記本発明の抗体の一部（部分断片）であって、上記エピトープ配列、すなわち、ヒトネトリン-4のアミノ酸配列192位～202位のアミノ酸配列（TGGEVIFKALS）を認識する機能を維持しているものであればいかなるものでもよい。具体的には、例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>

、Fab'、Fv、scFv、dsFv、ダイアボディ、ナノボディなどが挙げられる。これらの機能的断片は、公知の方法に従って作製することができる。

[0023] [ポリヌクレオチド]

本発明は、本発明の抗体の重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドおよび軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドは、本発明の抗体を組換え抗体として製造する際に有用である。

[0024] 本明細書において「ポリヌクレオチド」は、「遺伝子」、「核酸」または「核酸分子」と交換可能に使用される。本発明のポリヌクレオチドは、RNA（例えば、mRNA）の形態、またはDNAの形態（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）で存在することができる。DNAは、二本鎖でもよく一本鎖でもよい。一本鎖DNAまたはRNAは、コード鎖（センス鎖）、または、非コード鎖（アンチセンス鎖）のいずれであってもよい。

[0025] 本発明の重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号5で示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドが挙げられ、配列番号6で示される塩基配列からなるポリヌクレオチドであってもよい。本発明の軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号13で示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドが挙げられ、配列番号14で示される塩基配列からなるポリヌクレオチドであってもよい。

[0026] 本発明のポリヌクレオチドを取得する方法としては、PCR等の増幅手段を用いる方法を挙げることができる。例えば、配列番号13または14で示される塩基配列の5'側および3'側の配列（またはその相補配列）に基づいてそれぞれプライマーを設計し、これらプライマーを用いてハイブリドーマHuman Netrin-4 (192-202)-6A1のRNAから調製したcDNA等を鋳型にしてPCR等を行い、両プライマー間に挟まれるDNA領域を増幅することで、本発明のポリペプチドをコードするポリヌク

レオチドを含むDNA断片を大量に取得することができる。

[0027] [発現ベクター]

本発明は、上記本発明のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。本発明の発現ベクターは、上記本発明の抗体や当該抗体の機能的断片を製造するために使用することができる。本発明の発現ベクターは、上述した本発明のポリヌクレオチドを含むものであれば特に限定されないが、RNAポリメラーゼの認識配列を有するプラスミドベクターが好ましい。また、本発明の抗体を製造するために使用する発現ベクターの場合、重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドおよび軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドの他に、重鎖定常領域をコードするポリヌクレオチドおよび軽鎖定常領域をコードするポリヌクレオチドを含むことが好ましい。具体的には、重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドと重鎖定常領域をコードするポリヌクレオチドとが結合した重鎖をコードするポリヌクレオチドと、軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドと軽鎖定常領域をコードするポリヌクレオチドとが結合した軽鎖をコードするポリヌクレオチドとを含むことが好ましい。

[0028] 組換え発現ベクターの作製方法としては、プラスミド、ファージ、またはコスミドなどを用いる方法が挙げられるが特に限定されない。発現ベクターの具体的な種類は特に限定されず、宿主細胞中で発現可能なベクターを適宜選択することができる。すなわち、宿主細胞の種類に応じて、確実に本発明のポリヌクレオチドを発現させるために適宜プロモーター配列を選択し、これと本発明のポリヌクレオチドを各種プラスミド等に組み込んだベクターを発現ベクターとして用いればよい。また、少なくとも1つの選択マーカを含むことが好ましい。このようなマーカとしては、宿主が真核生物細胞の場合はジヒドロ葉酸レダクターゼまたはネオマイシン耐性遺伝子、宿主が大腸菌または他の細菌の場合はテトラサイクリン耐性遺伝子またはアンピシリン耐性遺伝子が挙げられる。上記選択マーカを用いれば、本発明に係るポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されたか否か、さらには宿主細胞中で確実

に発現しているか否かを確認することができる。

[0029] 〔形質転換細胞〕

本発明は、上記本発明の発現ベクターを含む形質転換細胞を提供する。本発明の形質転換細胞には、宿主細胞として公知の各種微生物、植物または動物の細胞を用いることができる。具体的には、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) 等の細菌、酵母 (出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*)、アフリカツメガエル卵母細胞、昆虫細胞、動物細胞 (例えば、CHO細胞、COS細胞等) などが挙げられる。

[0030] 本発明の発現ベクターを宿主細胞に導入する方法は特に限定されず、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法等の従来公知の方法を好適に用いることができる。本発明の形質転換細胞は、本発明のポリヌクレオチドがコードするタンパク質を安定的に発現することが好ましいが、一過性に発現してもよい。

[0031] 〔医薬組成物〕

本発明は、本発明の抗体またはその機能的断片を有効成分として含有する疼痛の予防または治療用医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、経口投与または非経口投与で、ヒトまたはヒト以外の動物に投与することができる。また、投与経路に応じて適当な剤形とすることができる。具体的には顆粒剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤、注射剤、点滴剤、外用剤、坐剤などの各種製剤形態に調製することができる。これらの各種製剤は、通常用いられている賦形剤、増量剤、結合剤、浸潤剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、着色料、香味剤、安定化剤などを用いて常法により製造することができる。

[0032] 賦形剤としては、例えば乳糖、果糖、ブドウ糖、コーンスターチ、ソルビット、結晶セルロース、滅菌水、エタノール、グリセロール、生理食塩水、緩衝液などが挙げられる。崩壊剤としては、例えば澱粉、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、炭酸カルシウム、クエン酸カルシウム、デキストリン、炭酸マグネシウム、合成ケイ酸マグネシウムなどが挙げられる。結合剤として

は、例えばメチルセルロース、エチルセルロース、アラビアゴム、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。滑沢剤としては、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、硬化植物油などが挙げられる。安定化剤としては、例えばアルギニン、ヒスチジン、リジン、メチオニンなどのアミノ酸、ヒト血清アルブミン、ゼラチン、デキストラン40、メチルセルロース、亜硫酸ナトリウム、メタ亜硫酸ナトリウムなどが挙げられる。その他の添加剤としては、シロップ、ワセリン、グリセリン、エタノール、プロピレングリコール、クエン酸、塩化ナトリウム、亜硝酸ソーダ、リン酸ナトリウムなどが挙げられる。

[0033] 好ましい投与経路は非経口投与であり、好ましい剤形としては、注射剤、経鼻投与剤、経肺投与剤、経皮投与剤などが挙げられる。注射剤は、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。本発明の医薬組成物の投与量としては、例えば、有効成分を1回につき体重1kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲で選択することが可能であるが、限定されるものではない。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動し、当業者は適宜選択することが可能である。

[0034] [疼痛の予防または治療用ワクチン組成物]

本発明は、ヒトネトリン-4のアミノ酸配列（配列番号1）の192位～202位のアミノ酸配列（配列番号2）を含むペプチドとキャリアタンパク質を含む、疼痛の予防または治療用ワクチン組成物（以下「本発明のワクチン組成物」と記す）を提供する。本発明のワクチン組成物を投与することにより、生体内でヒトネトリン-4のアミノ酸配列（配列番号1）の192位～202位のアミノ酸配列（配列番号2）をエピトープとして認識する抗ネトリン-4抗体の産生を誘導することにより、疼痛を予防または治療することが可能になる。

[0035] 本発明のワクチン組成物に含まれるヒトネトリン-4のアミノ酸配列（配

列番号1)の192位~202位のアミノ酸配列を含むペプチド(以下「抗原性ペプチド」と記す)は、アミノ酸配列TGGEVIFKALSからなるペプチドであってもよく、アミノ酸配列TGGEVIFKALSを含むヒトネトリン-4のフラグメントであってもよい。フラグメントの長さは特に限定されないが、例えば、20アミノ酸以下、18アミノ酸以下、16アミノ酸以下、15アミノ酸以下、14アミノ酸以下、13アミノ酸以下、12アミノ酸以下であってもよい。抗原性ペプチドのアミノ酸配列は、リンカーを介してキャリアタンパク質と連結(コンジュゲート)するためにN末端またはC末端に1個のアミノ酸(例えば、システイン)が付加されたアミノ酸配列であってもよい。

[0036] キャリアタンパク質は特に限定されず、ワクチンに使用できる公知のキャリアタンパク質の中から適宜選択して用いることができる。公知のキャリアタンパク質としては、例えばアルブミン、オボアルブミン、スカシガイヘモシアニン(KLH:keyhole limpet hemocyanin)、緑膿菌外毒素、破傷風毒素、リシン毒素、ジフテリア毒素、コレラ毒素、易熱性エンテロトキシン、上皮細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子、トランスフェリン、血小板由来増殖因子、ポリ- $\text{L}$ -リジン、ポリ- $\text{L}$ -グルタミン、マンノース-6-ホスフェート、B型肝炎ウイルスコアタンパク質などが挙げられる。

[0037] 抗原性ペプチドとキャリアタンパク質は、連結(コンジュゲート)していることが好ましい。ペプチドとキャリアタンパク質は、融合タンパク質のように直接連結されていてもよく、リンカー(スペーサーと同義)を介して連結されていてもよい。リンカーは抗原性ペプチドとキャリアタンパク質を連結できるものであれば特に限定されない。例えば、 $\beta$ -アミノアラニン、 $\gamma$ -アミノ酪酸、 $\epsilon$ -アミノカプロン酸、7-アミノヘプタン酸、12-アミノラウリン酸、グルタミン酸、 $p$ -アミノ安息香酸等のアミノカルボン酸を用いることができる。また、天然のタンパク質に存在する $\text{L}$ -アミノ酸やそれらの $\text{D}$ -アミノ酸も用いることができる。また、EMCS(N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimide)、グルタルアルデヒド、スルホGMB S(N- $\gamma$ -maleimidobutyryl-oxysulfosuccinimide ester)などのクロスリンカーを用い

ることができる。

[0038] 抗原性ペプチドとキャリアタンパク質との複合体（コンジュゲート）は、そのN末端のアミノ酸がアセチル化されていることが好ましい。また、当該複合体はそのC末端のアミノ酸がアミド化されていることが好ましい。より好ましくは、複合体のN末端のアミノ酸がアセチル化されており、かつC末端のアミノ酸がアミド化されていることである。

[0039] 本発明のワクチン組成物は、さらに1種以上のアジュバントを含んでもよい。アジュバントは、公知のアジュバントの中から適宜選択して用いることができる。具体的には、例えば、アルミニウムアジュバント（例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウム等のアルミニウム塩またはその組み合わせ）、フロイントアジュバント（完全または不完全）、TLRリガンド（例えば、CpG、Poly(I:C)、Pam3CSK4など）、BAY、DC-choI、pcpp、モノホスホリル脂質A、QS-21、コレラ毒素、ホルミルメチオニルペプチドなどが挙げられる。

[0040] 本発明のワクチン組成物は、経口投与または非経口投与により投与することができる。非経口投与としては、例えば腹腔内投与、皮下投与、皮内投与、筋肉内投与、静脈内投与、鼻腔内投与、経皮投与、経粘膜投与、舌下投与、吸入投与などが挙げられる。好ましくは、非経口投与であり、より好ましくは、皮内投与、皮下投与または筋肉内投与である。

[0041] 本発明のワクチン組成物は、抗原性ペプチドとキャリアタンパク質と薬学的に許容される担体、さらに添加剤を適宜配合して製剤化することができる。具体的には錠剤、被覆錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、液剤、懸濁剤、乳剤等の経口投与用製剤；注射剤、輸液、坐剤、軟膏、パッチ剤等の非経口投与用製剤とすることができる。担体または添加剤の配合割合については、医薬品分野において通常採用されている範囲に基づいて適宜設定すればよい。配合できる担体または添加剤は特に制限されないが、例えば、水、生理食塩水、その他の水性溶媒、水性または油性基剤等の各種担体；賦形剤

、結合剤、pH調整剤、崩壊剤、吸収促進剤、滑沢剤、着色剤、矯味剤、香料等の各種添加剤が挙げられる。

[0042] 本発明のワクチン組成物の投与回数および投与間隔は特に限定されない。例えば、単回投与でもよく、約2日～約8週間の間隔で複数回投与してもよい。ワクチン組成物の投与量は、投与対象、投与方法などにより異なるが、1回投与量を、抗原性ペプチド量として約0.01 $\mu$ g～約10mgとすることが好ましく、約0.1 $\mu$ g～約1mgとすることがより好ましく、約1 $\mu$ g～約0.1mgとすることがさらに好ましい。

[0043] 本発明には、以下の各発明が含まれる。

本発明の抗体またはその機能的断片を投与することを含む、疼痛の治療方法。

疼痛の予防または治療に用いるための本発明の抗体またはその機能的断片。

疼痛の予防または治療用医薬組成物を製造するための本発明の抗体またはその機能的断片の使用。

## 実施例

[0044] 以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0045] [実施例1：神経障害性疼痛モデルラットにおける抗ネトリン-4ポリクローナル抗体の効果]

### (1) ポリクローナル抗体の作製

ヒトネトリン-4のアミノ酸配列（配列番号1）の第192位～第202位（TGGEVIFKALS、配列番号2）からなる合成ペプチドを抗原とし、定法に従いSPFウサギ2匹に免疫してポリクローナル抗体を作製した。ペプチドカラムを用いて抗体を精製した。

[0046] (2) 神経障害性疼痛モデルラットの作製

神経障害性疼痛モデルラットとして、坐骨神経部分絞扼モデル（非特許文献5参照）を用いた。イソフルラン吸入麻酔液2.0%で麻酔し、抗体を髄腔内に

投与するためにポリエチレンチューブのカテーテルを第4腰椎と第5腰椎の間に挿入した (Day-7)。カテーテル挿入の7日後 (Day0) に、イソフルラン吸入麻酔液2.0%で麻酔し、ラットの左後肢大腿部とその付け根付近を剃毛し、大腿骨と腰骨の関節部分の皮膚と筋肉を切開し、大腿骨に沿って走る坐骨神経を露出させた。4-0号ナイロン縫合糸で坐骨神経の1/2~1/3を結紮し、筋肉および皮膚を縫合した。対側である右後肢は、左後肢と同様に、大腿骨と腰骨の関節部分の皮膚と筋肉を切開して坐骨神経の露出を行い、坐骨神経を結紮せずに縫合し、偽手術側とした。

[0047] (3) 抗体投与

坐骨神経部分絞扼手術の7日後 (Day7) に、抗ネトリン-4ポリクローナル抗体 (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 30  $\mu\text{l}$ を髄腔内に投与した。対照群にはマウスコントロールIgG (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 30  $\mu\text{l}$ を髄腔内に投与した。

[0048] (4) 痛み関連行動の評価

機械性刺激に対する応答を計測するために、von Frey filamentテストを行った。金網の上にプラスチックケースを置き、神経障害性疼痛モデルラットをケースに入れて落ち着くまで5~10分間慣らした。フィラメント (Semmes-Weinstein Von Frey Anesthesiometer、室町機械) を後肢足裏中央に3~5秒間押し当てて逃避反応を起こす閾値 (g) を測定した。カテーテル挿入日 (Day-7) から抗体投与の4日後 (Day11) まで、両足について逃避閾値の測定を行った。

[0049] (5) 結果

結果を図1に示した。坐骨神経部分絞扼手術により逃避閾値が低下した神経障害性疼痛モデルラットに抗ネトリン-4ポリクローナル抗体を投与すると、コントロールIgGを投与した対照群と比較して逃避閾値が有意に改善した。すなわち、抗ネトリン-4ポリクローナル抗体の投与は、坐骨神経部分絞扼による痛覚過敏症状を緩和することが示された。

[0050] [実施例2：神経障害性疼痛モデルラットにおける抗ネトリン-4モノクローナル抗体の効果]

## 2-1 抗ネトリン-4モノクローナル抗体の作製

### (1) エピトープペプチド

ヒトネトリン-4のアミノ酸配列（配列番号1）の第192位～第202位（TGGEVIFKALS、配列番号2）を含むペプチド：C-Ahx-TGGEVIFKALSを合成し、このエピトープペプチドに、キャリアタンパク質としてウシサイログロブリンを結合させた。

### [0051] (2) モノクローナル抗体の作製

上記エピトープペプチドをマウス4匹に免疫を行った。4回免疫終了後、試験採血を行い、組換えヒトネトリン-4およびTGGEVIFKALSペプチドを標的とするELISAにて抗体価を測定した。抗体価の上昇したマウスのリンパ球をミエロマ細胞と融合させ、HAT培地で培養することにより、ハイブリドーマを作製した。細胞融合の約10日後に培養上清中の抗体産生を、ELISA（組換えヒトネトリン-4およびTGGEVIFKALSペプチドを標的に使用）でスクリーニングした。その結果、95個の陽性ウェルを選択した。次に、限界希釈法による1次クローニングおよびELISA（組換えヒトネトリン-4およびTGGEVIFKALSペプチドを標的に使用）によるスクリーニングを実施した。続いて、限界希釈法による2次クローニングおよびELISA（組換えヒトネトリン-4およびTGGEVIFKALSペプチドを標的に使用）によるスクリーニングを実施した。その結果、1クローンを選択した。選択したクローンを増殖させ、無血清培地を用いて高密度細胞培養し、培地を回収してプロテインAカラムを用いてIgGを精製した。AKTA-FPLCで純度を確認し、ELISAで力価を測定した。さらにLow Endotoxin対応を行い、以下の実験に使用した。

[0052] 上記選択したハイブリドーマクローン（Human Netrin-4(192-202)-6A1）は、受託番号NITE BP-03603として独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに国際寄託済みである（受託日：2022年2月14日）。

### [0053] 2-2 抗ネトリン-4モノクローナル抗体の髄腔内投与による効果

実施例1の抗ネトリン-4ポリクローナル抗体に代えて抗ネトリン-4モノクローナル抗体（1 $\mu$ g/ $\mu$ l）を使用したことを除いて、実施例1と同じ方法で

、疼痛モデルラットにおける抗ネトリン-4モノクローナル抗体の効果を評価した。

[0054] 結果を図2に示した。坐骨神経部分絞扼手術により逃避閾値が低下した神経障害性疼痛モデルラットに抗ネトリン-4モノクローナル抗体を髄腔内投与すると、損傷側の逃避閾値は偽手術側の逃避閾値とほぼ同じレベルまで改善した。図1に示した抗ネトリン-4ポリクローナル抗体の疼痛改善効果と比較しても、抗ネトリン-4モノクローナル抗体の効果は顕著に高いことが示された。

[0055] 2-3 抗ネトリン-4モノクローナル抗体の後根神経節投与による効果

Day0にvon Frey filamentテストを行った後、実施例1と同様に、ラットの左後肢の坐骨神経部分絞扼手術を行った。右後肢は坐骨神経の露出のみを行い、偽手術側とした。坐骨神経部分絞扼手術の7日後 (Day7) に、ラットの後根神経節に抗ネトリン-4モノクローナル抗体 ( $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )  $3\mu\text{l}$ を、ガラスキャピラリーを用いて手動で投与した。Day0からDay11までvon Frey filamentテストを行い、両足について逃避閾値の測定を行った。

[0056] 結果を図3に示した。坐骨神経部分絞扼手術により逃避閾値が低下した神経障害性疼痛モデルラットに抗ネトリン-4モノクローナル抗体を後根神経節投与すると、損傷側の逃避閾値は偽手術側の逃避閾値とほぼ同じレベルまで改善した。この結果から、後根神経節投与でも坐骨神経部分絞扼による疼痛を改善できることが明らかになった。

[0057] なお本発明は上述した各実施形態および実施例に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせ得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

## 受託番号

[0058] 微生物の表示

識別の表示 : Human Netrin-4 (192-202) -6A1

受託番号：N I T E B P - 0 3 6 0 3

受託日

2 0 2 2 年 2 月 1 4 日

寄託機関

名称：独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター

住所：〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 12  
2号室

## 請求の範囲

- [請求項1] ヒトネトリン-4のアミノ酸配列（配列番号1）の192位～202位のアミノ酸配列（配列番号2）をエピトープとして認識する抗ネトリン-4抗体。
- [請求項2] 以下の（a）および（b）を含む、請求項1に記載の抗ネトリン-4抗体：  
（a）配列番号7のアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、および配列番号9のアミノ酸配列からなる重鎖CDR3を含む重鎖可変領域、ならびに  
（b）配列番号10のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号11のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、および配列番号12のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域。
- [請求項3] ヒト型キメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項1または2に記載の抗体。
- [請求項4] ハイブリドーマHuman Netrin-4（192-202）-6A1（受託番号NITE BP-03603）によって産生される、請求項2に記載の抗体。
- [請求項5] ハイブリドーマHuman Netrin-4（192-202）-6A1（受託番号NITE BP-03603）。
- [請求項6] 請求項1～4に記載の抗体の機能的断片。
- [請求項7] 請求項1～4に記載の抗体の重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド。
- [請求項8] 請求項1～4に記載の抗体の軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド。
- [請求項9] 請求項7および／または8に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
- [請求項10] 請求項9に記載の発現ベクターを含む形質転換細胞。
- [請求項11] 請求項1～4に記載の抗体または請求項6に記載の機能的断片を有

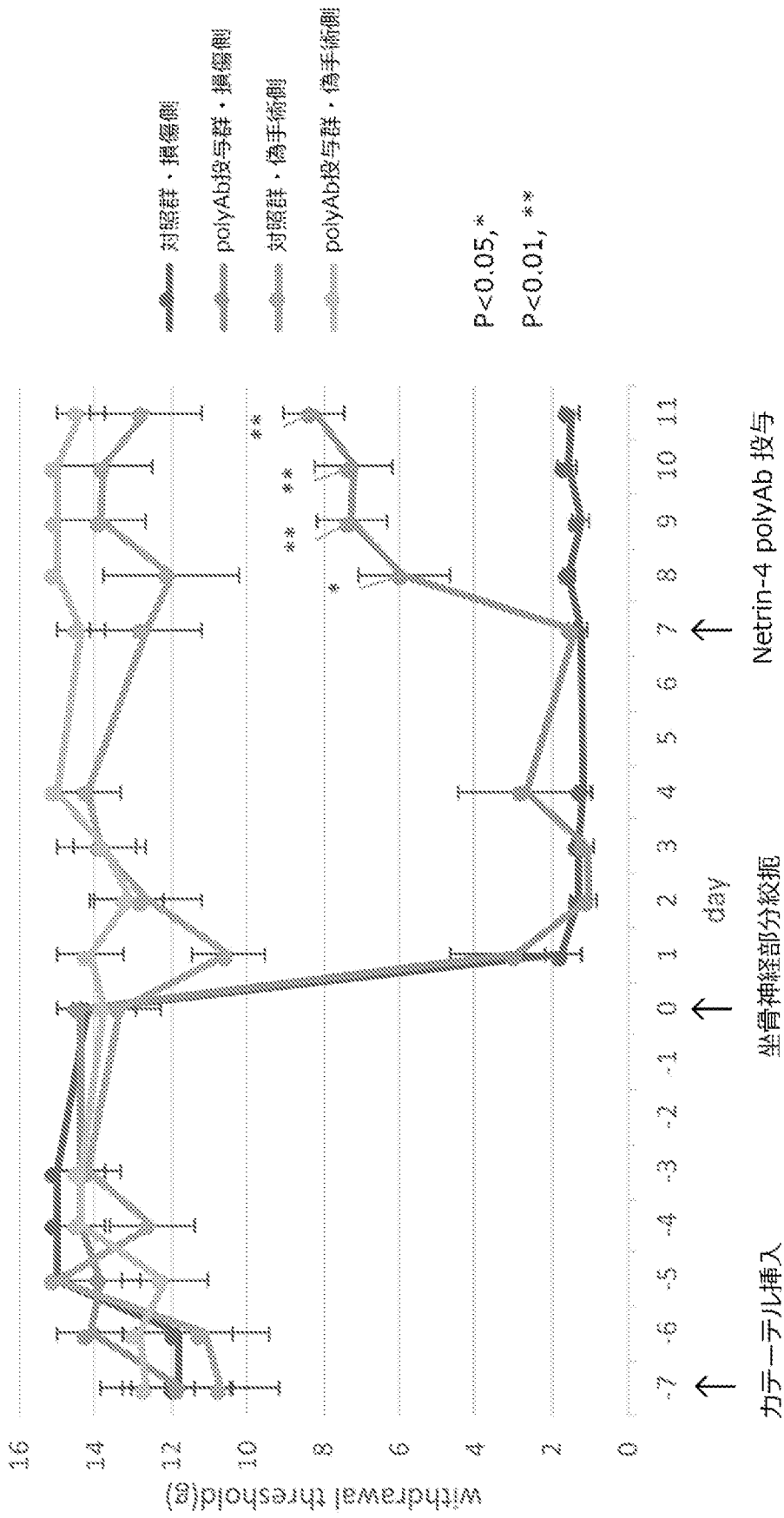
効成分として含有する疼痛の予防または治療用医薬組成物。

[請求項12] 後根神経節投与用である、請求項11に記載の医薬組成物。

[請求項13] ヒトネトリン-4のアミノ酸配列（配列番号1）の192位～202位のアミノ酸配列（配列番号2）を含むペプチドとキャリアタンパク質を含む、疼痛の予防または治療用ワクチン組成物。

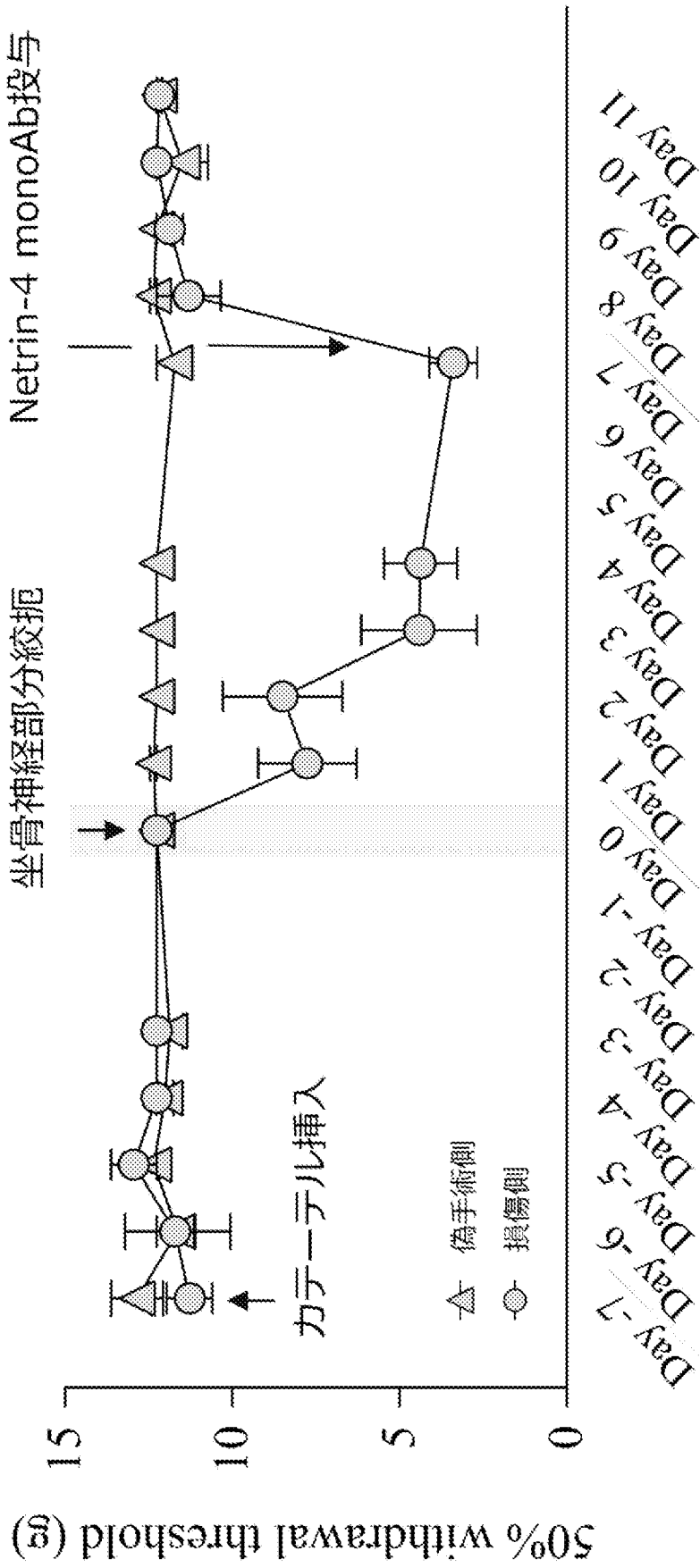
[図1]

von Frey Filament test

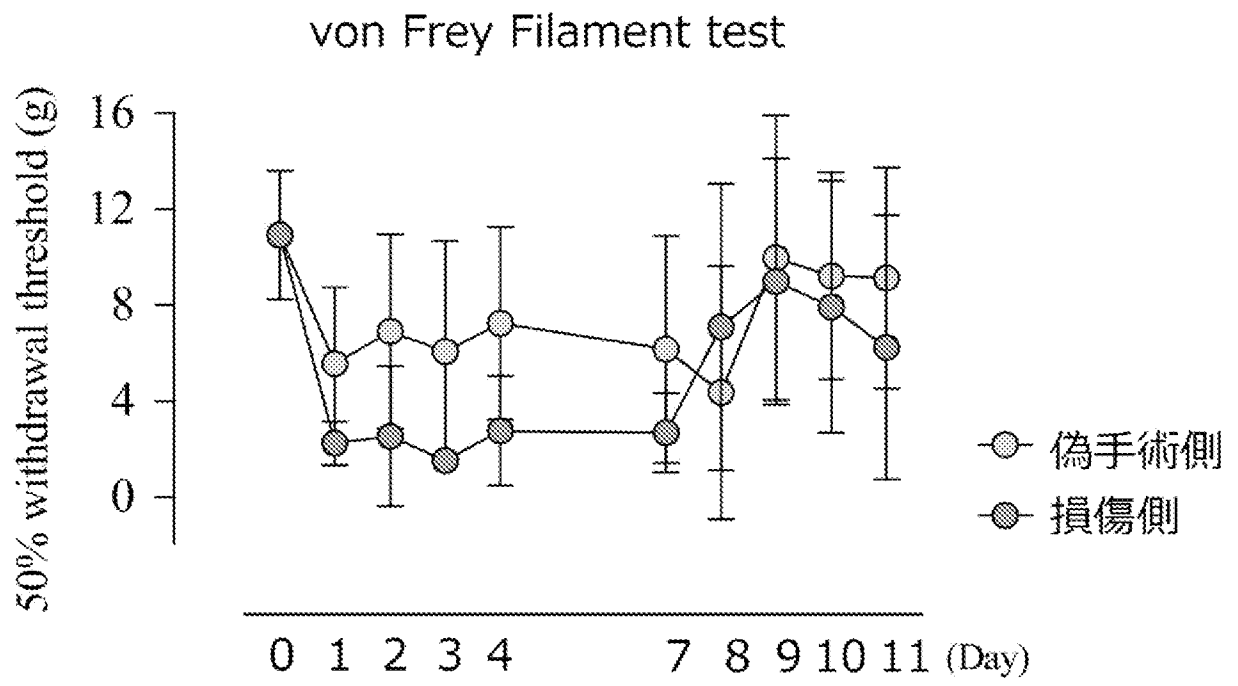


[図2]

## von Frey Filament test



[図3]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/012470

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<p><b>A61K 39/00</b>(2006.01)i; <b>A61K 39/395</b>(2006.01)i; <b>C07K 16/18</b>(2006.01)i; <b>C12N 5/10</b>(2006.01)i; <b>A61K 47/64</b>(2017.01)i; <b>C12N 1/15</b>(2006.01)i; <b>C12N 1/19</b>(2006.01)i; <b>C12N 1/21</b>(2006.01)i; <b>C12N 15/13</b>(2006.01)i; <b>C12N 15/63</b>(2006.01)i; <b>A61P 25/04</b>(2006.01)i</p> <p>FI: C12N15/13 ZNA; C12N15/63 Z; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C07K16/18; A61K39/395 D; A61K39/395 N; A61P25/04; A61K47/64; A61K39/00 Z</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K39/00; A61K39/395; C07K16/18; C12N5/10; A61K47/64; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/13; C12N15/63; A61P25/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
<p>Published examined utility model applications of Japan 1922-1996</p> <p>Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023</p> <p>Registered utility model specifications of Japan 1996-2023</p> <p>Published registered utility model applications of Japan 1994-2023</p>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CApus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); PubMed		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/025770 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 26 February 2015 (2015-02-26)	1-3, 6-13
A	claims 8, 11, paragraphs [0029]-[0033], example 4, fig. 17	4-5
X	HAYANO, Y. et al. Dorsal horn interneuron-derived Netrin-4 contributes to spinal sensitization in chronic pain via Unc5B. The Journal of Experimental Medicine. 2016, vol. 213, no. 13, pp. 2949-2966, <a href="https://doi.org/10.1084/jem.20160877">https://doi.org/10.1084/jem.20160877</a>	1-3, 6-13
A	abstract, fig. 6	4-5
X	HONJO, Y. et al. Increased expression of Netrin-4 is associated with allodynia in a trigeminal neuropathic pain model rats by infraorbital nerve injury. PLOS ONE. 2021, vol. 16, no. 4, e0251013, pp. 1-15, <a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251013">https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251013</a>	1-3, 6-13
A	abstract, fig. 2	4-5
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
05 June 2023		20 June 2023
Name and mailing address of the ISA/JP		Authorized officer
<p>Japan Patent Office (ISA/JP)</p> <p>3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915</p> <p>Japan</p>		Telephone No.

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.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 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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:

"The form of Annex C/ST.25 text file" above shall read as "the form of ST.26".

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2023/012470**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2015/025770 A1	26 February 2015	US 2016/0202269 A1 claim 20, paragraphs [0053]- [0057], example 4, fig. 17 EP 3037817 A1	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 39/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; C07K 16/18(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 47/64(2017.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61P 25/04(2006.01)i</p> <p>FI: C12N15/13 ZNA; C12N15/63 Z; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C07K16/18; A61K39/395 D; A61K39/395 N; A61P25/04; A61K47/64; A61K39/00 Z</p>																	
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K39/00; A61K39/395; C07K16/18; C12N5/10; A61K47/64; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/13; C12N15/63; A61P25/04</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2023年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); PubMed</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年							
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																
日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年																
日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年																
日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年																
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2015/025770 A1 (国立大学法人大阪大学) 26.02.2015 (2015 - 02 - 26) 請求項8,11, 段落0029-0033, 実施例4, 図17</td> <td>1-3, 6-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>4-5</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>HAYANO, Y. et al., Dorsal horn interneuron-derived Netrin-4 contributes to spinal sensitization in chronic pain via Unc5B, The Journal of Experimental Medicine, 2016, Vol. 213, No. 13, pp. 2949-2966, <a href="https://doi.org/10.1084/jem.20160877">https://doi.org/10.1084/jem.20160877</a> Abstract, Figure 6</td> <td>1-3, 6-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>4-5</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	WO 2015/025770 A1 (国立大学法人大阪大学) 26.02.2015 (2015 - 02 - 26) 請求項8,11, 段落0029-0033, 実施例4, 図17	1-3, 6-13	A		4-5	X	HAYANO, Y. et al., Dorsal horn interneuron-derived Netrin-4 contributes to spinal sensitization in chronic pain via Unc5B, The Journal of Experimental Medicine, 2016, Vol. 213, No. 13, pp. 2949-2966, <a href="https://doi.org/10.1084/jem.20160877">https://doi.org/10.1084/jem.20160877</a> Abstract, Figure 6	1-3, 6-13	A		4-5
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号															
X	WO 2015/025770 A1 (国立大学法人大阪大学) 26.02.2015 (2015 - 02 - 26) 請求項8,11, 段落0029-0033, 実施例4, 図17	1-3, 6-13															
A		4-5															
X	HAYANO, Y. et al., Dorsal horn interneuron-derived Netrin-4 contributes to spinal sensitization in chronic pain via Unc5B, The Journal of Experimental Medicine, 2016, Vol. 213, No. 13, pp. 2949-2966, <a href="https://doi.org/10.1084/jem.20160877">https://doi.org/10.1084/jem.20160877</a> Abstract, Figure 6	1-3, 6-13															
A		4-5															
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																	
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</p> <p>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>																	
<p>国際調査を完了した日</p> <p>05.06.2023</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>20.06.2023</p>																
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>茅根 文子 4B 6219</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>																

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	HONJO, Y. et al., Increased expression of Netrin-4 is associated with allodynia in a trigeminal neuropathic pain model rats by infraorbital nerve injury, PLOS ONE, 2021, Vol. 16, No. 4, e0251013, pp. 1-15, <a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251013">https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251013</a> Abstract, Fig. 2	1-3, 6-13
A		4-5

## 第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表  
     附属書C/ST.25テキストファイル形式  
     紙形式又はイメージファイル形式
- b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表  
     附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))  
     紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

国際調査報告  
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/012470

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2015/025770 A1	26.02.2015	US 2016/0202269 A1 Claim 20, [0053]-[0057], Example 4, Fig. 17 EP 3037817 A1	