

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-509046

(P2016-509046A)

(43) 公表日 平成28年3月24日 (2016. 3. 24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/06 (2006. 01)	A 6 1 K 45/06	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/575 (2006. 01)	A 6 1 K 31/575	4 C 2 0 6
A 6 1 P 25/04 (2006. 01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 K 31/133 (2006. 01)	A 6 1 K 31/133	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-558457 (P2015-558457)	(71) 出願人	511025226
(86) (22) 出願日	平成26年2月21日 (2014. 2. 21)		ユニヴェルシテ デクスーマルセイユ
(85) 翻訳文提出日	平成27年10月21日 (2015. 10. 21)		UNIVERSITE D' AIX-MA
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/053390		RSEILLE
(87) 国際公開番号	W02014/128240		フランス、エフー13284 マルセイユ
(87) 国際公開日	平成26年8月28日 (2014. 8. 28)		セデックス 07、プールパール シャ
(31) 優先権主張番号	13305198.7		ルル リヴォン、ジャルダンデュ ファ
(32) 優先日	平成25年2月22日 (2013. 2. 22)		ロ、58
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		Jardin du Pharo, 58
			, Bld Charles Livon
			, F-13284 Marseille
			cedex 07, France

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NA (V) 1. 9チャンネル活性の阻害物質および疼痛治療のためのその使用

(57) 【要約】

本発明は、対象体における疼痛の予防、緩和または治療に使用するための新規化合物に関する。また、本明細書には、医薬組成物、それらの調製、ならびに該化合物および組成物を使用して疼痛を予防、緩和または治療する方法が記載されている。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象体における疼痛を予防、緩和または治療するための活性成分として使用するための、 $\text{Na}_v 1.9$ チャネル活性を阻害する脂質。

【請求項 2】

$\text{Na}_v 1.9$ チャネル活性を阻害する脂質が、好ましくは、コレステロール、特に可溶性コレステロール、スフィンゴ脂質およびその組合せから選択される、請求項 1 記載の脂質。

【請求項 3】

疼痛が、急性疼痛、亜急性疼痛および慢性疼痛から選択される、請求項 1 または 2 記載の脂質。 10

【請求項 4】

疼痛が、アロディニアおよび痛覚過敏から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の脂質。

【請求項 5】

疼痛が、炎症性疼痛；器質的高温または低温過感受性；内臓痛、特に、腸痛；および体性痛、特に、三叉神経痛から選択される、請求項 1 ~ 4 いずれか 1 項記載の脂質。

【請求項 6】

疼痛が、胃腸症候群に関連している、請求項 3 ~ 5 いずれか 1 項記載の脂質。

【請求項 7】

疼痛が、ステロイド系抗炎症薬（ SAID ）、非ステロイド系抗炎症薬（ NSAID ）またはオピオイドに感受性がある疼痛であり、疼痛が、該脂質と、 SAID 、 NSAID またはオピオイド単独の投与と比べて少ない量の SAID 、 NSAID およびオピオイドとの組合せで処置される、請求項 1 ~ 6 いずれか 1 項記載の脂質。 20

【請求項 8】

対象体が、 SAID 、 NSAID およびオピオイドから選択される薬物に抵抗性があるか、または該薬物によって誘発した胃腸および / または腎臓の副作用に苦しんでいる、請求項 1 ~ 7 いずれか 1 項記載の脂質。

【請求項 9】

脂質が、該対象体への、皮膚（cutaneous）投与、皮下投与、クモ膜下腔内投与、脊髄内投与、皮膚（dermic）投与、経皮投与、眼球投与または直腸投与のため、好ましくは炎症部位での局所投与のためである、請求項 1 ~ 8 いずれか 1 項記載の脂質。 30

【請求項 10】

対象体が、脊椎動物、典型的には、哺乳動物、好ましくはヒトである、請求項 1 ~ 9 いずれか 1 項記載の脂質。

【請求項 11】

活性成分として請求項 1 ~ 10 いずれか 1 項記載の脂質、および好ましくは医薬上許容される担体を含む組成物。

【請求項 12】

さらに、少なくとも 1 種類のさらなる活性化合物を含む、請求項 11 記載の組成物。 40

【請求項 13】

少なくとも 1 種類のさらなる活性化合物が、 $\text{Na}_v 1.9$ チャネル活性を阻害する脂質の分解の阻害剤であり、好ましくはコレステロールオキシダーゼ阻害物質およびスフィンゴミエリナーゼ酵素阻害物質から選択される、請求項 12 記載の組成物。

【請求項 14】

局所鎮痛 / 抗痛覚過敏組成物である、請求項 11 ~ 13 いずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 15】

i) 請求項 1 ~ 10 いずれか 1 項記載の脂質または該脂質を含む請求項 11 ~ 14 いずれか 1 項記載の組成物、および ii) 疼痛に有効な少なくとも 1 種類のさらなる異なる活性化合物を含むキット。 50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、対象体における疼痛を予防、軽減または治療するための新規化合物に関する。また、本明細書には、医薬組成物、その調製、ならびに当該化合物および組成物を用いて疼痛を予防、軽減または治療するための使用および方法が記載される。

【背景技術】

【0002】

疼痛が、50%を超えるケースにおいて救急科を訪れる主な理由であり（非特許文献1）、地域医療訪問の30%に見られる（非特許文献2）。さまざまな国からのいくつかの疫学的調査は、人口の12～80%の範囲のかなり幅広い慢性疼痛の有病率を報告している（非特許文献3）。人々が死に近づいている時には、それは、さらに一般的になってくる。4,703人の患者の研究から、26%が人生最後の2年間疼痛を有しており、最後の月には46%に増大することが判明した（非特許文献4）。

10

【0003】

疼痛治療としては、ニューロン伝達を遮断し、感覚および疼痛に影響を及ぼす局所麻酔薬の使用、および、疼痛を緩和し、さらに炎症の化学伝達物質の活性を妨害し得る鎮痛薬が挙げられる。

【0004】

急性疼痛は、通常、鎮痛薬および麻酔薬のような薬物で管理される。しかしながら、慢性疼痛の管理は、より一層困難であり、典型的には医師、臨床心理学者、理学療法士、作業療法士、医師助手およびナース・プラクティショナーを含む疼痛管理チームの組織的な取り組みを必要とすることがある（非特許文献5）。

20

【0005】

鎮痛薬（痛み止め（painkiller）としても知られている）は、疼痛を緩和する（鎮痛を達成する）ために使用される薬物群のメンバーである。それらの効果は、疼痛受容体によって脳へ送られる神経伝達をいかに遮断するかに依存している。それらは、また、体温に対して影響を及ぼし体温を上げたり（発熱として知られている）、体温を下げたりする（非特許文献6）。

【0006】

鎮痛薬は、様々な方法で末梢神経系および中枢神経系に作用する；それらは、パラセタモール（パラ-アセチルアミノフェノール、米国ではアセトアミノフェンまたは簡単にAPAPとしても知られている）、サリチル酸塩のような非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）、ならびに、モルヒネおよびヘロインのようなオピオイド薬を包含する。それらは、感覚を可逆的になくす麻酔薬とは異なる。

30

【0007】

鎮痛薬を選択する際には、他の薬物に対する厳しさおよび反応が薬剤の選択を決定する；当初は癌関連疼痛において開発された世界保健機構（WHO）疼痛ラダーは、段階的に好適な薬物を見出すために広く適用されている（非特許文献7）。それは、疼痛がどのように管理されるべきかについてのガイドラインである。第一段階は、アスピリン、イブプロフェンまたはパラセタモールのような軽度の鎮痛薬を含む。痛みが持続または増強する場合には、患者は、コデインのような弱オピオイドである第二段階の鎮痛薬で処置されるべきである。疼痛がなおも持続する場合には、モルヒネのような強オピオイドを使用すべきである（非特許文献8）。鎮痛薬の選択は、疼痛のタイプによっても決められる：神経障害性疼痛については、伝統的な鎮痛薬はあまり有効ではなく、しばしば、三環系抗うつ薬および抗痙攣薬のような通常考えられない鎮痛薬である薬物のクラスからの利益がある（非特許文献9）。

40

【0008】

パラセタモール/アセトアミノフェンの作用の正確なメカニズムは、不確定であるが、末梢的よりも中枢的に（神経終末におけるよりも脳において）作用すると思われる。アス

50

ピリンおよび他の非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）は、シクロオキシゲナーゼを阻害し、プロスタグランジン産生の減少をもたらす。これは、（パラセタモールおよびオピオイドと比べて）疼痛を減少させ、また、炎症も減少させる。

【0009】

パラセタモールは、副作用がほとんどなく、安全とみなされているが、推奨量を超えて摂取すれば、重症で生命を危うくすることがある肝損傷をもたらす、場合によっては腎損傷をもたらす可能性がある。パラセタモールは、通常、経口または直腸投与されるが、2002年に導入された静脈用製剤は、疼痛緩和を改善し、手術前環境においてオピオイド消費を減少させることが示されている。

【0010】

NSAIDは、消化性潰瘍、腎不全、アレルギー反応、および場合によっては難聴に罹りやすく、それらは、血小板機能に影響を及ぼすことによって、出血のリスクを増加させる可能性がある。ウィルス性疾患に罹患している16歳未満の子どもにおけるアスピリンの使用は、稀少であるが重症の肝障害であるライ症候群に関連付けられている。

【0011】

典型的なオピオイドであるモルヒネ、および種々の他の物質（例えば、コデイン、オキシコドン、ヒドロコドン、ジヒドロモルヒネ、ペチジン）は、全て、脳のオピオイド受容体系に類似の影響を及ぼす。ブプレノルフィン、オピオイド受容体の部分アゴニストであると考えられており、トラマドールは、SNRI（セロトニン・ノルエピネフリン再取り込み阻害薬）特性を有するオピエートアゴニストである。トラマドールは、構造的に、コデインよりもベンラファキシンに近く、「オピエート様」効果（ μ 受容体の軽度アゴニズムを介する）を送達することによるだけでなく、弱い速効性のセロトニン放出薬およびノルエピネフリン再取り込み阻害薬として作用することによっても鎮痛を送達する（非特許文献10）。全オピオイドの投与は、オピオイド毒性（錯乱、呼吸抑制、ミオクロヌス反射および縮腫）、発作（トラマドール）によって制限されることがあるが、耐性を蓄積する患者における投与量の上限はない。特許文献1には、ブトルファノール（オピオイド鎮痛薬）の制御放出のためのリポソーム薬物送達および放出系が記載されている。

【0012】

フルピルチンは、弱いNMDAアゴニスト特性を有する中枢作用性 K^+ チャネルオープナーである（非特許文献11）。フルピルチンは、欧州では、中等度から強い疼痛および片頭痛ならびにその筋肉弛緩特性のために使用される。フルピルチンは、抗コリン特性を持っておらず、ドーパミン受容体、セロトニン受容体またはヒスタミン受容体に対していかなる活性も持っていないと考えられる。フルピルチンは、習慣性はなく、通常、耐性は生じない（非特許文献12）。しかしながら、単独のケースでは、耐性が生じる可能性がある（非特許文献13）。

【0013】

慢性疼痛または神経障害性疼痛を持つ患者においては、種々の他の物質が鎮痛特性を有することができる。三環系抗うつ薬、特にアミトリプチリンは、中枢的であると考えられる方法で疼痛の治療を改善することが示されている。ネホパムは、欧州では、オピオイドの同時併用で疼痛緩和に使用される。カルバマゼピン、ガバペンチンおよびプレガバリンの正確なメカニズムは、同様に明らかでないが、これらの抗痙攣薬は、成功の程度は異なるが、神経障害性疼痛を治療するために使用される。抗痙攣薬の作用機序は、痛覚を阻害する傾向があるので、神経障害性疼痛に対して最も一般的に使用される。

【0014】

多くの非処方鎮痛薬に見られるパラセタモール製剤およびコデイン製剤のような鎮痛薬は、しばしば、併用される。それらは、また、洞関連製剤のためのプロシドエフェドリンのような血管収縮薬との併用、またはアレルギー患者のための抗ヒスタミン剤との併用にも見られる。

【0015】

抗痛覚過敏薬は、痛覚過敏に対抗する役割を果たす化合物または疼痛に対する感受性を

10

20

30

40

50

低下させる化合物を有すると言われている。痛覚過敏は、有痛性刺激に対する反応の増大（疼痛増幅）である。S N R I（セロトニン・ノルエピネフリン再取り込み阻害薬）、N S A I D（非ステロイド系抗炎症薬）、グルココルチコイド、オピオイド、ガバペンチンおよびプレガバリンは、抗痛覚過敏薬としても認定されている。

【 0 0 1 6 】

パラセタモール、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセンおよび他の N S A I D の、弱から中級オピエート（mid-range opiate）（ほぼヒドロコドンレベルまで）との同時使用は、複数の作用部位で疼痛と闘うことによって有益な相乗効果を示すと言われている（非特許文献 1 4）、いくつかの併用鎮痛薬は、それらの個々の成分の同様の投与量と比べて、ほとんど有効な利益を有しないことが示されている。さらにまた、これらの併用鎮痛薬は、しばしば、これらの組合せの複数の（かつ、しばしば非作用性の）成分により生じる混同（confusion）に最もよく起因して、過失による過量投薬を包含する重要な有害事象を引き起こす可能性がある（非特許文献 1 5）。

【 0 0 1 7 】

特許文献 1 には、疼痛を緩和するためのスフィンゴシン - 1 - リン酸（S I P）の推定使用が記載されている。S I P は、逐次的な、スフィンゴミエリンからセラミドへの（スフィンゴミエリナーゼ酵素活性による）分解、および、セラミドから S I P への（セラミダーゼ活性による）さらなる分解によって産生される脂質二次メッセンジャーである。

【 0 0 1 8 】

疼痛の不適切な処置は、外科病棟、集中治療室および救急救命科の全体において、また、一般診療において、癌性疼痛を包含する全ての形態の慢性疼痛の管理において、そして、終末期医療において、広がっている。この粗略な扱い（neglect）は、新生児から虚弱な高齢者までのあらゆる年齢にまで拡大されている。アフリカ人およびヒスパニック系アメリカ人は、他の人種よりも不必要に医師の管理下に置かれる可能性が高く；また、女性の疼痛は、男性の疼痛よりも処置不十分である可能性が高い（非特許文献 1 6）。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 9 】

【 特許文献 1 】 米国特許第 7 , 6 9 1 , 5 6 3 号明細書

【 非特許文献 】

【 0 0 2 0 】

【 非特許文献 1 】 Cordell WH, Keene KK, Giles BK, Jones JB, Jones JH, Brizendine E J. The high prevalence of pain in emergency medical care. American Journal of Emergency Medicine. 2002;20(3):165-9.

【 非特許文献 2 】 Hasselstroem J, Liu-Palmgren J, Rasjoe-Wraak G. Prevalence of pain in general practice. Eur J Pain. 2002;6(5):375-85

【 非特許文献 3 】 Abu-Saad Huijjer H. Chronic pain: a review. J Med Liban. 2010;58(1):21-7

【 非特許文献 4 】 Smith AK, Cenzer IS, Knight SJ, Puntillo KA, Widera E, Williams BA, Boscardin WJ, Covinsky KE. The epidemiology of pain during the last 2 years of life. Ann. Intern. Med.. 2010;153(9):563-9

【 非特許文献 5 】 Thienhaus, O; Cole, BE (2002). "The classification of pain". In Weiner, RS. Pain management: A practical guide for clinicians. American Academy of Pain Management. p. 29. ISBN 0-8493-0926-3

【 非特許文献 6 】 Neuss, G. (2007). Chemistry: Course Companion. Oxford: Oxford University Press. p. 628

【 非特許文献 7 】 Anonymous (1990). Cancer pain relief and palliative care; report of a WHO expert committee. World Health Organization Technical Report Series, 804. Geneva, Switzerland: World Health Organization. pp. 1-75

【 非特許文献 8 】 Neuss, G. (2007). Chemistry: Course Companion. Oxford: Oxford Un

10

20

30

40

50

iversity Press. pp. 628

【非特許文献 9】Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, et al. (2003). "Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations". Arch. Neurol. 60 (11): 1524-34

【非特許文献 10】Driessen B, Reimann W (January 1992). "Interaction of the central analgesic, tramadol, with the uptake and release of 5-hydroxytryptamine in the rat brain in vitro". British Journal of Pharmacology 105 (1): 147-51

【非特許文献 11】Kornhuber J, Bleich S, Wiltfang J, Maler M, Parsons CG (1999). "Flupirtine shows functional NMDA receptor antagonism by enhancing Mg²⁺ block via activation of voltage independent potassium channels. Rapid communication". J Neural Transm 106 (9-10): 857-67

【非特許文献 12】Klawe, C; Maschke, M (2009). "Flupirtine: pharmacology and clinical applications of a nonopioid analgesic and potentially neuroprotective compound". Expert opinion on pharmacotherapy 10 (9): 1495-500

【非特許文献 13】Stoessel C, Heberlein A, Hillemacher T, Bleich S, Kornhuber J (August 2010). "Positive reinforcing effects of flupirtine-two case reports". Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 34 (6): 1120-1

【非特許文献 14】Mehlich DR (2002). "The efficacy of combination analgesic therapy in relieving dental pain". J Am Dent Assoc 133 (7): 861-71

【非特許文献 15】Murnion B. "Combination analgesics in adults". Australian Prescriber (33): 113-5. <http://www.australianprescriber.com/magazine/33/4/113/5>. Retrieved 12 August 2010

【非特許文献 16】Hoffmann DE, Tarzian AJ. The girl who cried pain: a bias against women in the treatment of pain. J Law Med Ethics. 2001;29(1):13-27. PMID 11521267

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

特に選択された既知の鎮痛分子がどのようなものであっても処置が不十分なままの炎症および/または慢性疼痛について考えた場合には、患者にとって、疼痛の処置の改善が現在でもなお非常に必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0022】

本発明者らは、このたび、本明細書において、有害な副作用、特に胃腸および腎臓の有害な副作用を回避しながら、疼痛、例えば、急性疼痛、亜急性疼痛、慢性疼痛、アロディニア、痛覚過敏、不十分に処置された疼痛 (partially treated pain)、および治療抵抗性疼痛 (refractory pain) を十分に管理する新しい解決手段を提供する。好ましい実施態様において、当該解決手段は、炎症性疼痛、特に炎症性の慢性疼痛；器質的な高温または低温感受性（または疼痛）、典型的には過敏症；内臓痛、特に腸痛、特に胃腸痛、または胃腸症候群に伴う疼痛；および/または体性疼痛、例えば、神経痛、特に三叉神経痛を十分に管理することである。

【0023】

この解決手段は、対象体における疼痛の予防、緩和または治療のための活性成分として使用するための、Na_v1.9チャネル活性を阻害する物質 (product)、好ましくはNa_v1.9チャネル活性を阻害する脂質および/または該脂質の分解阻害物質の使用に関する。

【0024】

SCN11A、SCN12A、SNS2またはNa_v1.9としても知られている電位依存性ナトリウムチャネルαサブユニットXI型は、ヒトにおいてSCN11A遺伝子 (HUGO遺伝子命名委員会 (HUGO Gene Nomenclature Committee) ID = HGNC __ ID :

10

20

30

40

50

10583)によってコードされている電位依存性ナトリウムイオンチャネルタンパク質である。電位依存性ナトリウムチャネルは、ニューロンおよび筋肉細胞のような興奮性細胞における活動電位の発生および閾値下脱分極の発生において基本的な役割を果たす膜タンパク質複合体である。Na_v1.9 αサブユニットは、後根神経節および三叉神経節における疼痛伝達ニューロン(例えば、侵害受容器)において選択的に発現する。その機能は侵害受容器において、脱分極ドライブを保持すること、および活動電位の緊張性活動を発生することである。腸の筋層間神経叢および粘膜下神経叢からの腸ニューロンにおける強い発現もまた報告されている。SCN11Aのようなαサブユニットは、電位依存性ゲート開閉およびイオン輸送を媒介し、一方、補助的なβサブユニットは、チャネルの電位依存特性を調節し、チャネルの細胞膜への局在化を促進する。各αサブユニットは、3つの細胞内ループによって連結している4つのドメインからなっている;各ドメインは、6つの膜貫通領域と細胞内および細胞外リンカーとからなっている。αサブユニットの異常な発現パターン、調節または変異は、数多くの疾患の基礎となっている。

10

20

30

40

50

【0025】

Na_v1.9チャネル活性、すなわち、侵害受容器の緊張性興奮の保持ならびに継続した高温および器質的疼痛過敏性におけるNa_v1.9の役割を阻害する脂質が対象体における疼痛の予防、緩和または処置のための活性成分として使用される場合には、この脂質は、好ましくは、コレステロール、スフィンゴ脂質、好ましくはスフィンゴミエリン、およびそれらの組合せから選択され、さらに好ましくは、可溶性コレステロールである。特定の理論に束縛されるわけではないが、本発明者らは、このような脂質は、侵害受容性ニューロンの興奮性を制御するイオンチャネルを調節することによって新しい鎮痛経路を活性化

【0026】

別の解決手段は、上記脂質の代わり、または該脂質に加えてもしくは該脂質と組み合わせて、典型的にはさらなる活性化化合物として、Na_v1.9チャネル活性を阻害する脂質の分解阻害物質を、好ましくは、コレステロールオキシダーゼ阻害物質、例えば、モルホリン誘導体(Paul G.M. Hesselink, Antonius Kerkenaar, Bernard Witholt. (1990). Inhibition of microbial cholesterol oxidases by dimethylmorpholines. Journal of Steroid Biochemistry, 35(1) 107-113)またはCu²⁺キレート剤クリオキノール(Luigi Puglielli, Avi L. Friedlich, Kenneth D.R. Setchell, Seiichi Nagano, Carlos Opazo, Robert A. Cherny, Kevin J. Barnham, John D. Wade, Simon Melov, Dora M. Kovacs, and Ashley I. Bush. (2005). Alzheimer disease β-amyloid activity mimics cholesterol oxidase J. Clinical Invest. 115(9) 2556-63)、および/またはスフィンゴミエリナーゼ阻害物質、例えば、GW4869(Luberto, C., Hassler, D.F., Signorelli, P., et al. (2002) "Inhibition of tumor necrosis factor-induced cell death in MCF7 by a novel inhibitor of neutral sphingomyelinase". J Biol Chem 277(43) 41128-41139)、またはグルタチオン(Shin-ichi Yoshimura, Yoshiko Banno, Shigeru Nakashima, Katsuhiko Hayashi, Haruki Yamakawa, Motoshi Sawada, Noboru Sakai, Yoshinori Nozawa. (1999). Inhibition of Neutral Sphingomyelinase Activation and Ceramide Formation by Glutathione in Hypoxic PC12 Cell Death J. Neurochemistry 73(2)675-683)から選択される化合物を使用することに関する。

【0027】

特定の実施態様において、当該物質は、Na_v1.9チャネル活性を阻害する脂質とNa_v1.9チャネル活性を阻害する脂質の分解阻害物質との組合せである。

【0028】

本発明は、また、i)活性成分として、少なくとも当該物質、典型的にはNa_v1.9チャネル活性を阻害する脂質および/または該脂質の分解阻害物質、および好ましくは医薬上許容される担体および/または少なくとも1つのさらなる異なる化合物を含む組成物、典型的には、医薬組成物、ならびにii)その使用、特に局所用鎮痛または抗痛覚過敏組成物に関する。

【0029】

当該組成物は、有利には、ゲル剤、クリーム剤、軟膏剤、遊離した脂質もしくはリポソーム小胞中に包埋した脂質を含有する徐々に拡散するパッチ剤、またはくも膜下腔内もしくは脊髄内注射用液剤として製剤化され得る。

【0030】

さらなる態様において、対象体において疼痛を予防、緩和または治療する方法を記載する。典型的には、当該方法は、このような処置を必要とする対象体に、本明細書に記載されるように $\text{Na}_v 1.9$ チャネル活性を阻害する物質または組成物を、可能であれば少なくとも1つの他の異なる活性化化合物と合わせて、投与するかまたは曝露する工程を含む。

【0031】

本発明は、また、 $\text{Na}_v 1.9$ チャネル活性を調節する薬剤を同定するためのインビトロ、インビボまたはエクスビボ・スクリーニング方法である。

【0032】

本発明の特定の方法は、 $\text{Na}_v 1.9$ チャネル活性を調節する薬剤を同定するためのインビトロまたはエクスビボ・スクリーニング方法であって、

a) $\text{Na}_v 1.9$ チャネルを発現する細胞、典型的には真核細胞、好ましくはニューロンを試験化合物に曝露または接触させること、および

b) 該曝露または接触に起因する、疼痛刺激に対する反応の減少を検出すること（ここで、該減少は試験化合物を鎮痛/抗痛覚過敏剤であると同定する）を含む方法である。

【0033】

該応答の減少は、さらに以下に記載するように、当業者に公知の方法のいずれか1つを用いて測定することができる、 $\text{Na}_v 1.9$ チャネルによって活性化された電気的活動（電位）（図11を参照）と関連し得る。

【0034】

本発明のさらなる方法は、 $\text{Na}_v 1.9$ チャネル活性を調節する薬剤を同定するためのインビトロまたはエクスビボ・スクリーニング方法であって、

a) 神経および $\text{Na}_v 1.9$ チャネルを含む組織、例えば皮膚・神経標本または人工組織を試験化合物に曝露または接触させること、および

b) 該曝露または接触に起因する、疼痛刺激に対する反応の減少を検出すること（ここで、該減少は試験化合物を鎮痛/抗痛覚過敏剤であると同定する）を含む方法である。

【0035】

本発明は、また、鎮痛/抗痛覚過敏剤を同定するインビボ方法であって、

a) 動物に、試験化合物、特に上記の方法で活性を有する薬剤を投与すること、および

b) 該動物において、該投与に起因する疼痛刺激に対する反応の減少を検出すること（ここで、該動物は、好ましくは、生理学的条件下で器質的感受性を保持し、好ましくは非侵害受容性感覚刺激（典型的には、高温、低温および接触）に反応する能力もまた保持している）（ここで、該減少は、試験化合物を鎮痛/抗痛覚過敏剤であると同定する）を含む方法である。

【0036】

この方法は、さらに、 $\text{Na}_v 1.9$ KO動物に試験化合物を投与すること、および該KO動物の反応（疼痛刺激に対する反応）を野生型の同腹子（littermate）の反応と比較することを含むことができる。

【0037】

本発明の別の目的は、キットであって、i) $\text{Na}_v 1.9$ チャネル活性を阻害する本明細書に記載の物質、または該物質を含む組成物、好ましくはii) 疼痛に対して有効な少なくとも1つのさらなる異なる活性化化合物、および所望によりiii) 該キットの使用説明書を含む、キットである。本発明はさらに、疼痛を予防、緩和または治療するためのキットの使用を包含する。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0038】

発明の詳細な説明

疼痛は、炎症、虚血、または器質的もしくは他の刺激作用に起因する実際のまたは可能性のある損傷 (injury) または組織損傷 (tissue damage) の指標として周知の減少である。疼痛科学では、身体に与えた電流または熱のような刺激の強度を漸増して閾値を測定する。痛覚閾値は、刺激が痛みを与え始める時点であり、疼痛許容閾値は、対象体が疼痛を止めるように行動した時である。

【0039】

1994年には、慢性疼痛を説明するためのより有用なシステムの必要性に応じて、国際疼痛学会 (International Association for the Study of Pain) (IASP) は、特定の特徴に従って疼痛を分類した：(1) 関連する身体の領域 (例えば、腹部、下肢)、(2) 疼痛を引き起こしている機能障害の系 (例えば、神経系、胃腸系)、(3) 発生の期間およびパターン、(4) 強さおよび発症からの時間、ならびに (5) 原因 (Merskey H & Bogduk N. Classification of Chronic Pain. 2 ed. Seattle: International Association for the Study of Pain; 1994, pp. 3-4)。このシステムは、Clifford J. Woolf (Woolf CJ, Bennett GJ, Doherty M, Dubner R, Kidd B, Koltzenburg M, Lipton R, Loeser JD, Payne R, Torebjork E. Towards a mechanism-based classification of pain? Pain. 1998; 77(3):227-9) および他の研究者によって、研究および治療の指針が不適切であるとして批判された。Woolf (Woolf CJ. What is this thing called pain?. Journal of Clinical Investigation. 2010;120(11):3742-4.) によると、疼痛は3つに分類される：侵害受容性疼痛；組織損傷および免疫細胞の浸潤に関連する炎症性疼痛；ならびに神経系への損傷が原因である病態である病理的疼痛 (神経障害性疼痛) または神経系の異常な機能が原因である病態である病理的疼痛 (線維筋痛症、過敏性腸症候群、緊張型頭痛などにおけるような機能障害性疼痛)。

【0040】

疼痛は、通常、一過性であるが、侵害刺激が除去されるまで、または根底にある損傷もしくは病態が治癒されるまでは持続し、いくつかの有痛状態、例えば、関節リウマチ、末梢神経障害、癌および特発性疼痛 (外傷もしくは病態が治癒された後も持続する疼痛、または明らかな原因もなく生じる疼痛) は、数年間持続する可能性がある。長期間続く疼痛は慢性と称され、短期間で直る疼痛は急性と称される。伝統的には、急性疼痛と慢性疼痛の区別は、発症からの時間の任意区間に依存してきた；最も一般的に使用される2つのマーカーは、疼痛発生から3か月と6か月である (Turk DC, Okifuji A. Pain terms and taxonomies of pain. In: Bonica JJ, Loeser JD, Chapman CR, Turk DC, Butler SH. Bonica's management of pain. Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.) が、12か月目に急性疼痛から慢性疼痛への移行を設定している理論家と研究者もいる (Spannick CC, Main CJ. Pain management: an interdisciplinary approach. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2000.)。他には、持続が30日未満の疼痛を急性とし、6か月間を超える疼痛を慢性とし、1か月～6か月持続する疼痛を亜急性とする者がいる (Thienhaus O, Cole BE. Classification of pain. In: Weiner R. Pain management: a practical guide for clinicians. Boca Raton: CRC Press; 2002.)。任意に固定された期間を含まない慢性疼痛の一般に知られている別の定義は、「予想される治癒期間を超えて続く疼痛」である (Turk, D.C.; Okifuji, A. (2001). "Pain terms and taxonomies". In Loeser, D.; Butler, S. H.; Chapman, J.J. et al.. Bonica's management of pain (3 ed.). Lippincott Williams & Wilkins. pp. 18-25. ISBN 0-683-30462-3.)。慢性疼痛は、癌性疼痛または良性に分類されることがある (Thienhaus, O.; Cole, B.E. (2002). "Classification of pain". In Weiner, R.S.. Pain management: A practical guide for clinicians (6 ed.). American Academy of Pain Management. ISBN 0-8493-0926-3.)。

【0041】

10

20

30

40

50

侵害受容性疼痛は、有害な強さに近づくかまたはそれを越える刺激に対してだけ反応する末梢神経線維（侵害受容器）の刺激が原因であり、侵害刺激の様式に従って分類される；最も一般的なカテゴリーは、「熱的」（高温または低温）、「器質的」（挫滅（crushing）、裂傷（tearing）等）および「化学的」（切り傷にヨード、目にチリ・パウダー）である。

【 0 0 4 2 】

侵害受容性疼痛は、また、「内臓」痛、「深部体性」痛および「表層体性」痛に分けることもできる。内臓構造は、伸展、虚血および炎症に対して高い感受性があるが、熱傷および切り傷のような通常他の構造において痛みを引き起こす他の刺激に対しては比較的感受性がない。

10

【 0 0 4 3 】

内臓痛は、びまん性であり、位置を特定するのが困難であり、しばしば、遠位の、通常表層の、構造に言及される。内臓痛は、悪心および嘔吐を伴うことがあり、吐き気を覚える（sickening）、深い（deep）、締め付けられるような（squeezing）、および鈍い（dull）と説明され得る。深部体性痛は、靱帯、腱、骨、血管、筋膜および筋肉にある侵害受容器の刺激によって始まり、鈍く、うずく、局在のはっきりしない痛みである。例えば、捻挫および骨折が挙げられる。表層痛は、皮膚または他の表層組織にある侵害受容器の活性化によって始まり、鋭く、明確に定義され、明確に位置が特定される。表層体性痛を生じる損傷の例としては、軽傷および軽い（第1度）熱傷が挙げられる。

20

【 0 0 4 4 】

神経障害性疼痛は、身体感覚に関与する神経系（体性感覚系）のいずれかの部分に影響を及ぼす損傷または疾患が原因である（Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*. 2008;70(18):1630-5.）。末梢神経障害性疼痛は、しばしば、「焼けるような」、「チクチクする」、「電気的な」、「突き刺すような」または「しびれてビリビリする」と説明される（Paice JA. Mechanisms and management of Neuropathic pain in cancer. *J. Support Oncol.* 2003;1(2):107-20.）

【 0 0 4 5 】

心因性疼痛は、精神疼痛または身体表現性疼痛とも称され、精神的要因、情動的要因または行動要因によって引き起こされ、増強され、または長引く疼痛である（“Psychogenic pain - definition from Biology-Online.org” *Biology-online.org*. Retrieved 2008-11-05）。頭痛、腰痛および胃痛は、心因性と診断されることもある。医療専門家と一般大衆のどちらも、心理的な原因に由来する疼痛は「現実」ではないと考える傾向にあるので、患者は、しばしば、非難される。しかしながら、専門家は、他の原因に由来する疼痛と同じ程度に現実的または有害であると考えている。

30

【 0 0 4 6 】

長期疼痛を抱えている人々は、高い頻度で、ミネソタ多面人格目録（Minnesota Multiphasic Personality Inventory）スケールでヒステリー、うつ状態および心気症（「神経症の三徴候」）のスコアが高い精神的障害（psychological disturbance）を示す。この神経症的傾向が急性損傷を引き起こして慢性に転じると主張している研究者もいるが、臨床的証拠は、反対に、慢性疼痛が神経症的傾向を引き起こすことを示している。長期疼痛が治療的介入によって緩和された場合、神経症の三徴候および不安のスコアは、しばしば、正常レベルとなる。慢性疼痛患者において低いことが多い自尊心もまた、疼痛が硝酸するとすぐに改善を示す（Wall PD, Melzack R. *The challenge of pain*. New York: Penguin in Books; 1996.）。

40

【 0 0 4 7 】

より正確に同定されない限り、本明細書で用いられる場合の用語「疼痛」は、いずれかの疼痛または感受性（本明細書では、異常な感受性として、すなわち、典型的には過感受性として理解される）、典型的には、いずれもの $Na_v 1.9$ 媒介疼痛、特に、侵害受容性

50

疼痛、炎症性疼痛、病理的疼痛、神経障害性疼痛、特発性疼痛、慢性疼痛、急性疼痛、亜急性疼痛、熱痛、器質的疼痛、化学的疼痛、内臓痛、深部体性痛、表層体性痛、身体表現性疼痛、心因性疼痛、および精神疼痛から選択されるいずれもの疼痛をいう。

【 0 0 4 8 】

炎症は、自発痛を引き起こして疼痛過感受性を無効にする末梢感覚神経の感作が原因であることが知られている。急性または慢性の病理的組織炎症は、末梢感覚神経を感作させることによって痛覚に強く影響を与え、普通に生活できなくする (incapacitate) 局所的な疼痛過感受性を生じさせる。炎症メディエーターは、神経末端に存在するイオンチャネルの発現および/または機能を変更することを一因として、侵害受容性一次求心性線維興奮性を増強することが知られている (Woolf CJ, Costigan M (1999), Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 7723-7730)。

10

【 0 0 4 9 】

電位依存性ナトリウムチャネル (VGSC) は、活動電位の開始および伝播の直接原因であるので、神経細胞の興奮性において基本的な役割を果たし、炎症性疼痛を包含する種々の慢性疼痛障害へのそれらの関与は、比較的十分に確立されている (Lai J, Porreca F, Hunter JC, Gold MS (2004) Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia. Annu Rev Pharmacol Toxicol 44: 371-397)。

【 0 0 5 0 】

10種類のVGSCアイソフォームのうち、2つのテトロドトキシン耐性 (TTX-R) チャネル、 $Na_v 1.8$ および $Na_v 1.9$ は、侵害受容性経路への特異的な関与と一致して、侵害受容器においてほとんど排他的に発現する (Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN (1996) A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. Nature 379: 257-262; Persson AK, Black JA, Gasser A, Fischer T, Waxman SG (2010))。侵害受容器は、外部からまたは内部からの侵害刺激を感知することができる身体のいかなる領域にもある感覚神経のような、疼痛刺激の受容体として作用する細胞である。例えば、外部侵害受容器は、皮膚 (皮膚侵害受容器)、角膜および粘膜のような組織にある。内部侵害受容器は、筋肉、関節、膀胱、腸のような種々の器官にあり、該消化管に沿って続いている。これらのニューロンの細胞本体は、後根神経節または三叉神経節のどちらかにある。三叉神経節は、顔面に特殊な神経であるが、後根神経節は、身体

20

30

【 0 0 5 1 】

本明細書において「 $Na_v 1.9$ チャネル」または「 $Na_v 1.9$ 」としても同定される該 $Na_v 1.9$ チャネルは、末梢炎症後の疼痛行動に関与する侵害受容性後根神経節 (「DRG」) ニューロンにおいて発現する。疼痛行動への関与、特に自発痛行動への関与、および古典的に炎症に付随して起こる持続性の熱および器質的痛覚過敏への関与に $Na_v 1.9$ チャネルが果たす役割を裏付ける研究がある (Priest BT, Murphy BA, Lindia JA, Diaz C, Abbadie C, Ritter AM, Liberator P, Iyer LM, Kash SF, Kohler MG, Kaczorowski G J, MacIntyre DE, Martin WJ. Contribution of the tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel $Na_v 1.9$ to sensory transmission and nociceptive behavior. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005, 102(26):9382-7; Amaya F, Wang H, Costigan M, Allchorne AJ, Hatcher JP, Egerton J, Stean T, Morisset V, Grose D, Gunthorpe MJ, Chessell IP, Tate S, Green PJ, Woolf CJ. The voltage-gated sodium channel $Na(v)1.9$ is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity. J Neurosci. 2006; 26(50):12852-60.)。本発明者らは、この $Na_v 1.9$ チャネルが、最小限副作用プロフ

40

50

ファイルを持つ新たなタイプの鎮痛のための分子標的としての役割を果たし得ることを示唆している (Padilla et al. Expression and localization of the sodium channel in enteric neurons and in trigeminal sensory endings: Implication for intestinal reflex function and orofacial pain. Mol. Cell. Neurosci. 35(2007)138-152)。Maingret らは、 $\text{Na}_v 1.9$ チャンネルが、末梢炎症の間に侵害受容器の過剰興奮性に関与し得る炎症メディエーターの協調作用によって強化されることを示した (Inflammatory mediators increase $\text{Na}_v 1.9$ current and excitability in nociceptors through a coincident detection mechanism. J Gen Physiol. (2008) 131(3), 211-225)。

【0052】

最近、本発明者らによって、この $\text{Na}_v 1.9$ ナトリウムチャンネルは、基底疼痛閾値に関与しないが、亜急性および慢性の両方の炎症性疼痛モデルにおいて、その維持において低い程度に、熱および器質的疼痛過感受性の発生に重要であると特徴付けられている (Lolignier et al., PLoS ONE, August 2011, Vol. 6, Issue 8, e23083)。

10

【0053】

活性成分

本発明の目的は、対象体において、好ましくは、有利には、有害な副作用、特に胃腸および腎臓の有害な副作用を回避しながら、疼痛、特に、本明細書に記載されるいずれかの疼痛、例えば急性疼痛、亜急性疼痛、慢性疼痛、アロディニア、痛覚過敏、不十分に処置された疼痛 (partially treated pain)、および治療抵抗性疼痛 (refractory pain) を予防するために、軽減するために、緩和するために、疼痛を耐えられるようにするために、または疼痛を治療するために、活性成分として使用するための $\text{Na}_v 1.9$ チャンネル活性を阻害する物質 (product) である。

20

【0054】

好ましい実施態様において、該物質は、炎症性疼痛、特に炎症性の慢性疼痛；器質的疼痛、特に高温または低温感受性（または疼痛）；内臓痛、特に腸痛、例えば胃腸痛もしくは胃腸症候群に関連する疼痛；および／または体性痛、例えば神経痛、特に三叉神経痛、例えば眼痛 (ocular pain) を効果的に管理することができる。

【0055】

本発明の化合物は、また、一般的に鎮痛剤（例えば、モルヒネ）が、所望により遅延型で、長期にわたって投与され得る癌、熱傷などのような病態に罹患している対象体において慢性疼痛を予防または治療するために使用することもできる。

30

【0056】

本発明の化合物は、患者の臨床像を（例えば、腸障害のようなモルヒネ様薬剤の副作用を制限することによって）改善するためにモルヒネの日用量を減らして、一緒に使用することもできる。

【0057】

本発明の物質は、さらに、対象体が罹患している疼痛の原因である疾患に関連する症状、または該疾患の憎悪（例えば、特に、発熱）に関連する症状を隠さないという点で優れている。

【0058】

特定の実施態様において、本発明の物質は、対象体において、疼痛、特に本明細書に記載の疼痛を予防するため、緩和するため、または治療するために活性成分として使用するための $\text{Na}_v 1.9$ キャンナル (canal) 活性を阻害する脂質である。

40

【0059】

細胞の細胞膜は、脂質ラフトと称される糖リポタンパク質 (glycolipoprotein) マイクロドメイン中にて構築されるスフィンゴ糖脂質およびタンパク質受容体の組合せからなる (Levitan et al.(2010), review; Thomas S., Pais A.P., Casares S and Brumeanu T.D.(2004). Analysis of lipid rafts in T cells. Molecular Immunology 41: 399-409.)。これらの特殊な膜マイクロドメインは、シグナル伝達分子のアセンブリーのための構築中心としての役割を果たし、膜流動性および膜タンパク質輸送に影響を及ぼし、神経伝

50

達および受容体輸送を調節することによって、細胞プロセスを区画化する (Korade, Z.; Kenworthy, A. K. (2008). "Lipid rafts, cholesterol, and the brain". *Neuropharmacology* 55(8): 1265.)。脂質ラフトは、周囲の二重層よりも多く配列され、密にパックされているが、膜二重層中で自由に浮遊している (Simons, K.; Ehehalt, R. (2002). "Cholesterol, lipid rafts, and disease". *Journal of Clinical Investigation* 110(5): 597.)。脂質ラフトと該脂質ラフトが由来する細胞膜との1つの重要な違いは、脂質組成である。研究によって、脂質ラフトは、一般的に、周囲の二重層中に存在するコレステロールの量の3~5倍を含有することが示されている。また、脂質ラフトは、スフィンゴミエリンに富んでおり、細胞膜と比べて、典型的に50%高い。

【0060】

10

本発明者らは、このたび、本明細書において、 $\text{Na}_v 1.9$ チャネルが、脂質ラフト、特にDRGニューロンの細胞膜に由来する脂質ラフト中に存在していることを示す。本発明者らは、また、脂質欠乏、好ましくはコレステロール欠乏がインビボで $\text{Na}_v 1.9$ チャネル活性を非常に増強することを見出した。そして、それを本明細書において示す。

【0061】

本発明に関する活性成分として所用するための脂質は、好ましくは、コレステロール、特に可溶性コレステロール、スフィンゴ脂質、好ましくはスフィンゴミエリン、およびこれらの組合せから選択される。

【0062】

別の実施態様において、上記の脂質の代わりに、または上記の脂質に加えて、または上記の脂質と合わせて、使用できる活性成分は、有利には、コレステロールの阻害物質および/またはスフィンゴミエリン分解酵素の阻害物質から選択され得る。上記で詳述したように、このような化合物の一例としては、GW4869化合物があり、これは、Lubertoとその共同研究者によって記載されている (Luberto, C., Hassler, D.F., Signorelli, P., et al. (2002) "Inhibition of tumor necrosis factor-induced cell death in MC F7 by a novel inhibitor of neutral sphingomyelinase". *J Biol Chem* 277(43) 41128-41139)。

20

【0063】

特定の実施態様において、本発明の当該脂質、特にコレステロール、またはコレステロールおよび/またはスフィンゴ脂質分解酵素の阻害物質は、 $\text{Na}_v 1.9$ に加えて、少なくとも1つの他のイオンチャネル、例えばカリウムチャネル、カルシウムチャネル、イオン共輸送体および類似のものの活性を有利に調節し、および/または、hERGチャネルもしくは別の生理学的に関連しているチャネルに影響を及ぼす。

30

【0064】

対象体

本発明に関して、患者または対象体は、動物であり、好ましくは脊椎動物であり、典型的には哺乳動物である。好ましい実施態様において、哺乳動物はヒトであり、その年齢または性別は問わない。該哺乳動物は、また、動物、特に家畜または繁殖動物、特にウマ、イヌなどであってよい。

【0065】

特定の実施態様において、該対象体は、炎症性疼痛、特に慢性の炎症性疼痛に苦しんでいる。

40

【0066】

別の特定の実施態様において、該対象体は、施された疼痛治療またはすでに試験された疼痛治療に対して、特にパラセタモールに対して、耐性があるか、または、例えばアスピリンもしくはイブプロフェンによって誘発された胃腸および/または腎臓の副作用に苦しんでいる。

【0067】

組成物

本発明のさらなく目的は、活性成分として、本明細書に記載される $\text{Na}_v 1.9$ チャネル

50

活性を阻害する物質、および好ましくは医薬上許容される担体を含む医薬組成物に関する。

【0068】

「医薬組成物」とは、本発明の化合物（活性成分）と、生物学的に活性な化合物をそれを必要とする対象体へ送達するための技術分野で一般的に許容される媒体とを含む製剤をいう。したがって、該担体としては、全ての医薬上許容される担体、希釈剤、媒体または支持体が挙げられる。この担体は、例えば、メチル-β-シクロデキストリンまたは他のβ-シクロデキストリン、アクリル酸のポリマー（例えば、カルボポール）、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールの混合物、モノエタノールアミンおよびヒドロキシメチルセルロースから選択され得る。

10

【0069】

活性成分としてコレステロールを使用する場合、このような担体は、単に任意である。可溶性形態のコレステロールを使用する場合、例えば、メチル-β-シクロデキストリンは、単独の媒体として、または上記したような別の媒体と一緒に、適切にはコレステロールと合わせて使用することができる。

【0070】

適切な製剤または組成物を、例えば単位投与剤形で、対象体へ投与するために、慣用の医薬プラクティスを用いることができる。

【0071】

この組成物は、典型的には、局所麻酔/抗痛覚過敏組成物である。

20

【0072】

本発明の物質（脂質、脂質分解阻害物質、および組成物）は、対象体における疼痛を予防するために、軽減するために、緩和するために、疼痛を耐えられるようにするために、または疼痛を治療するために、使用するためのものである。上記で説明したように、疼痛は、典型的には、急性疼痛；亜急性疼痛；および慢性疼痛から選択される。疼痛は、さらに、器質的感受性または疼痛、例えば高温もしくは低温感受性または疼痛；炎症性疼痛；内臓痛、特に腸痛、特に胃腸痛または胃腸症候群に関連する疼痛；アロディニア；痛覚過敏；体性痛、例えば神経痛、特に三叉神経痛（例えば、眼痛（ophthalmic pain））；およびなんらかの治療抵抗性疼痛（refractory pain）から選択され得る。

【0073】

疼痛は、好ましくは、慢性および/または炎症性疼痛であり、より好ましくは慢性の炎症性疼痛である。

30

【0074】

特定の実施態様において、疼痛は、ステロイド系抗炎症薬（SAID）、非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）またはオピオイドに感受性がある疼痛であり、該疼痛は、本発明による物質と、SAID、NSAIDまたはオピオイドを単独で投与する場合と比べて少ない量のSAID、NSAIDまたはオピオイドとの組合せで処置され得る。

【0075】

別の特定の実施態様において、疼痛は、オピオイド、イブプロフェンまたはアスピリンの1つが古典的に使用され、それらの副作用を回避するため、典型的には胃腸および/または腎臓の副作用を回避するために投与量が減らされるべきである、疼痛である。

40

【0076】

別の特定の実施態様において、対象体またはその疼痛自体は、ステロイド系抗炎症薬（SAID）、非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）およびオピオイドから選択される薬物に耐性があるか、または該対象体は、該薬物によって誘発された胃腸および/または腎臓の副作用に苦しんでいる。

【0077】

特定の実施態様において、疼痛は、パラセタモールに耐性のある疼痛である。

【0078】

本発明の組成物は、さらに、少なくとも1つのさらなる活性化合物を含み得る。この化

50

合物は、有利には、S A I D、N S A I Dまたはオピオイドから選択され得る。好ましい実施態様において、このさらなる化合物は、疼痛を治療するかまたは弱める、本発明の物質とは異なる薬物である。

【0079】

別の実施態様において、本発明の化合物または組成物は、また、鎮痛薬および抗腫瘍薬と一緒にまたは同時に投与される場合のように、例えば同時発生の症状を治療することを意図される薬剤と一緒に投与され得る。

【0080】

処置

本明細書では、また、対象体における疼痛の予防、緩和または治療方法を教示する。当該方法の目的は、N a_v1.9ポリペプチドのイオン流活性 (ion flux activity) を減少させ得る。

10

【0081】

処置を必要とする対象体におけるN a_v1.9媒介疼痛の予防、緩和または治療のための特定の方法は、該対象体に、本明細書に記載されるN a_v1.9チャネル活性を阻害する物質の有効量を投与することを含む。

【0082】

疼痛、典型的には、処置を必要とする対象体におけるN a_v1.9媒介疼痛の予防、緩和または治療のためのさらなる特定の方法は、本明細書に記載されるN a_v1.9チャネル活性を阻害する化合物または組成物の治療有効量を、場合により少なくとも1つの他の活性化合物、例えば従来技術の項に記載された分子のいずれか1つ、例えば、アスピリン、イブプロフェン、パラセタモール、オピオイド、または好ましくはコレステロールオキシダーゼ阻害物質およびスフィンゴミエリナーゼ酵素阻害物質から選択される本明細書に記載されるN a_v1.9チャネル活性を阻害する脂質の分解の阻害物質と合わせて、対象体に投与する工程、または対象体に曝露する工程を含む。

20

【0083】

さらなる態様において、本発明は、N a_v1.9媒介疾患、例えば、限定されないが本明細書に記載の疼痛、典型的には炎症性疼痛、特に炎症性の慢性疼痛に苦しんでいる対象体の病態を処置する方法であって、該対象体に本発明の物質の有効量を投与することを含む方法に関する。

30

【0084】

本明細書で使用される場合、「N a_v1.9媒介疾患」は、N a_v1.9チャネル活性の調節、好ましくは阻害によって引き起こされるかまたは治療可能である広範囲の障害、病態および疾患を包含する。このような疾患としては、疼痛（慢性、急性、炎症性などのいずれか）、神経痛、神経障害性疼痛、オイディニア (eudynia)、内臓痛、外傷性疼痛、術後疼痛、熱感受性、過敏性腸症候群、クローン病、多発性硬化症、糖尿病性ニューロパチー、関節痛、関節リウマチ、ナトリウムチャネル毒素関連疾患誘発性疼痛、家族制直腸癌、化学療法に関連する癌および疼痛、三叉神経痛、片頭痛、ならびに他の頭痛が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、N a_v1.9媒介疾患としては、炎症性疾患、ニューロパチー（例えば、糖尿病性ニューロパチー）、ジストロフィー（例えば、反射性交感神経性ジストロフィー、帯状疱疹後神経痛）；および外傷（ならかの原因による組織損傷）のような病状が挙げられる。炎症性疾患としては、内臓炎症性症状および体性炎症性症状を挙げることができるが、これらに限定されない。急性炎症性症状としては、直腸炎 (proctite)、直腸炎 (rectite)、および関節炎が挙げられるが、これらに限定されない。慢性炎症性症状としては、サルコイドーシス、慢性炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、およびクローン病、乾癬、酒さ、ならびに血管炎症性症状、例えば、限定されないが播種性血管内凝固、アテローム性動脈硬化症および川崎病が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、N a_v1.9媒介疾患としては、また、良性前立腺肥大症 (BPH)、高コレステロール血症、癌および掻痒症が挙げられる。特に、直腸炎 (proctite)、クローン病および潰瘍性大腸炎は、内臓痛として同定され、関節炎、ぶどう膜炎、乾癬および酒さは体

40

50

性痛として同定される。

【 0 0 8 5 】

本明細書に記載される場合、「疾患」としては、includes 障害、病態、疾患の症状、初期段階の疾患、予測される疾患または予測される症状、ならびに類似するものが挙げられる。

【 0 0 8 6 】

プロトコール / レジメン

本発明の化合物または組成物は、種々の方法または経路で投与され得る。本発明の物質は、好ましくは、対象体への、皮膚 (cutaneous) 投与、皮下投与、クモ膜下腔内投与、脊髄内投与、皮膚 (dermic) 投与、経皮投与、眼球 (例えば、角膜) 投与または直腸投与用、好ましくは炎症部位での局所投与用である。

10

【 0 0 8 7 】

好ましい実施態様において、本発明の脂質は、いくつかの活性成分のうちの 1 つの活性成分として使用する場合、局所投与用、好ましくは対象体への皮膚 (cutaneous) 投与、皮下投与または経皮投与を介するもの、好ましくは炎症部位での局所投与用である。

【 0 0 8 8 】

N a_v 1.9 媒介疾患の治療の典型的なレジメンは、1 日または数日間にわたって、1 週間から約 6 か月間を含み最長で 1 年間、有効量を投与することを含むか、慢性投与であり得る。インビボで投与される本発明の医薬化合物または医薬組成物の投与量は、レシピエント (対象体) の年齢、健康状態、性別および体重、併用治療が施されている場合にはその種類、治療の頻度、ならびに所望の医薬効果の性質に依存すると解される。本明細書に挙げられている有効投与量の範囲は、限定されることは意図されておらず、好ましい投与量の範囲を表している。しかしながら、最も好ましい投与量の範囲は、当然のことであるが個々の対象体に合わせられ、関連分野の当業者によって決定され得る (例えば、以下の文献を参照 : Berkow et al., eds., The Merck Manual, 16th edition, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Goodman et al., eds., Goodman and Gilman's The pharmacological Basis of Therapeutics, 10th edition, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (2001); Avery's drug treatment: Principles and practice of clinical pharmacology and therapeutics, 3rd edition, ADIS Press, LTD., Williams and Wilkins, Baltimore, MD.(1987), Ebadi, Pharmacology, Little, Brown and Co., Boston,(1985); Osolci et al., eds., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Mack Publishing Co., Easton, PA(1990); Katzung, Basic and clinical pharmacology, Appleton and Lange, Norwalk, CT(1992))。

20

30

【 0 0 8 9 】

各治療に必要な全投与量が、複数回投与または単回投与で、好ましくは、疼痛の初期症状が出現するとすぐに、または予防的に、例えば必要とされる手術の前または該手術の間に、投与され得る。当該医薬化合物は、単独で、または、当該病態を対象とするかまたは当該病態の別の症状を対象とする少なくとも 1 種類の他の医薬と合わせて、投与され得る。本発明の化合物または組成物の有効量は、最長で 1 年間 4 ~ 7 2 時間間隔で投与される体重 1 k g につき約 0.1 μ g ~ 約 1 0 0 m g であり、および / またはそのいずれかの範囲または値、例えば、0.0001 ~ 1.0、1 ~ 10、10 ~ 50 および 50 ~ 100、0.0001 ~ 0.001、0.001 ~ 0.01、0.01 ~ 0.1、0.1 ~ 1.0、1.0 ~ 10、5 ~ 10、10 ~ 20、20 ~ 50、ならびに 50 ~ 100 m g / k g、例えば、1 ~ 100 m g / k g、好ましくは 1 ~ 5 m g / k g、例えば 1.4、1.5、1.6、1.7、1.8 または 2 m g / k g のようなその範囲内または値で、1 ~ 4、4 ~ 10、10 ~ 16、16 ~ 24、24 ~ 36、36 ~ 48、48 ~ 72 時間間隔で、1 ~ 14、14 ~ 28 もしくは 30 ~ 44 日間、または 1 ~ 24 週間の間、またはそのいずれかの範囲または値である。本発明の化合物および / または組成物のレシピエントは、本明細書で定義されるいずれの対象体であってもよく、好ましくは、ヒトである。

40

【 0 0 9 0 】

50

製剤 / 濃度

本発明の化合物および / または組成物は、種々の剤形で投与され得る。かくして、それらは、軟膏剤、ゲル剤、ペースト剤、液剤、懸濁剤、錠剤、ゼラチンカプセル剤、カプセル剤、リポソーム、坐剤（特に、胃腸症候群に関連する疼痛用）、散剤、点鼻薬、またはエアゾール剤の剤形に、好ましくは軟膏剤の剤形に、製剤化され得る。製剤を調製する分野で周知の方法は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (19th ed.) ed. A.R. Gennaro AR., 1995, Mack Publishing Company, Easton, PAに記載されている。

【0091】

本発明の化合物は、典型的には、軟膏剤、ゲル剤、オイル剤、錠剤、坐剤、散剤、ゼラチンカプセル剤、カプセル剤などの剤形で、所望によっては持続および / または遅延放出を確実にする投与剤形またはデバイスによって、投与される。この種の製剤化には、有利には、セルロース、カーボネートまたはデンプンのような薬剤が使用される。

10

【0092】

注射のためには、一般的に、当該化合物は、例えば注射または灌流を介して注入され得る液体懸濁剤の剤形でパッケージングされる。これに関して、当該化合物は、一般的に、医薬用途に適しており、かつ、当業者に知られている、生理食塩水、生理溶液、等張溶液または緩衝溶液などに溶解される。かくして、当該組成物は、分散剤、可溶化剤、安定剤、保存剤などから選択される１種類以上の薬剤または賦形剤を含有し得る。液体製剤および / または注射用製剤で使用され得る薬剤または賦形剤は、とりわけ、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ポリソルベート 80、マンニトール、ゼラチン、ラクトース、植物油、アカシアなどである。

20

【0093】

投与される流速および / または投与量は、患者、観察される疼痛、処置される部位、関連する活性物質、投与様式などに従って当業者によって調節され得ると解される。

【0094】

局所投与のためには、処置されるべき対象体に、処置されるべき末梢神経に隣接する標的部位、例えば、皮膚の表面、口腔内粘膜および類似する部位に、本発明の医薬化合物または医薬組成物の有効量を曝露するのが好ましい。典型的には、当該化合物は、予防的使用であるか治療的使用であるかにかかわらず上記の基準に依存して、また、用いられる局所ビヒクルの性質に依存して、体重 1 kg につき本発明の化合物約 0.0001 mg ~ 約 1 g / kg で変化し得る投与量で、より一般的には、投与 1 回につき約 1 ~ 100 mg / kg で投与される。好ましい局所用製剤は、軟膏剤またはゲル剤であり、この場合、軟膏剤基剤またはゲル剤基剤 1 cc (cm³) につき活性成分約 1 ~ 約 100 mg / kg が使用される。

30

【0095】

さらにまた、注射による投与は、要すれば、１日数回（２回、３回または４回）の投与を含み得る。

【0096】

さらに、慢性治療のためには、対象体への有効かつ長期の治療を確実にする遅延系または持続系が有利であり得る。

40

【0097】

スクリーニング

また、本明細書では、Na_v1.9 チャンネルまたはチャネル（典型的には、マウス、ラットまたはヒト起源から）活性を調節する薬剤を同定するためのインビトロ、インビボまたはエクスビボ・スクリーニング方法を記載する。

【0098】

本明細書に記載される特定の方法は、isNa_v1.9 チャンネル活性を調節する薬剤を同定するインビトロまたはエクスビボ・スクリーニング方法であって、

a) Na_v1.9 チャンネルを発現する、細胞、典型的には真核細胞、好ましくは本明細書

50

の同定されるようなニューロンに試験化合物を曝露するかまたは接触させること、および
b) 該曝露または接触に起因する、疼痛刺激に対する反応の減少を検出すること（ここで、該減少は、試験化合物を鎮痛 / 抗痛覚過敏剤であると同定する）を含む方法である。

【0099】

反応の減少は、さらに以下に記載するように、当業者に公知の方法のいずれか1つを用いて測定することができる、 $Na_v 1.9$ チャネルによって活性化された電氣的活動（電位）（図11を参照）と関連し得る。

【0100】

該細胞は、 $Na_v 1.9$ チャネルを自然に発現する細胞（内因性発現）であるか、または特異的な $Na_v 1.9$ チャネルを発現するように遺伝子組換えされた細胞（外因性発現）であり得る。

10

【0101】

本明細書に記載されるさらなる方法は、 $Na_v 1.9$ チャネル活性を調節する薬剤を同定するためのインビトロまたはエキスピボ・スクリーニング方法であって、

a) 神経および $Na_v 1.9$ チャネルを含む組織、例えば皮膚 - 神経標本または人工組織を試験化合物に曝露または接触させること、および

b) 該曝露または接触に起因する、疼痛刺激に対する反応の減少を検出すること（ここで、該減少は試験化合物を鎮痛 / 抗痛覚過敏剤であると同定する）を含む方法である。

20

【0102】

該接触は、典型的には、組織表面で化合物を適用することによる。

【0103】

発現の変化は、好ましくは、試験化合物を、対象体における疼痛の予防、緩和または治療に使用可能な $Na_v 1.9$ 活性阻害物質であると同定する発現減少である。疼痛刺激に対する反応の検出は神経またはニューロン活性の電気生理学的変化、典型的には、鎮痛化合物の不在下での神経またはニューロン活性の増加または本明細書に記載される鎮痛化合物の存在下で測定した場合の神経またはニューロン活性の減少を記録することによって行われ得る。該反応は、エキスピボ神経 - 皮膚標本における神経線維の細胞外記録、インビトロで培養されたニューロンの活性を探索するためのカルシウムイメージングプラットフォームおよび / またはニューロンの電氣的活動を記録するためのパッチクランプ生理学的リグ（patch-clamp electrophysiological rig）を用いて検出され得る。

30

【0104】

好ましくは、この試験化合物は、他のナトリウムチャネルサブユニットを超える $Na_v 1.9$ の感受性を示している。

【0105】

本明細書には、また、鎮痛 / 抗痛覚過敏剤を同定するインピボ方法であって、

a) 動物に、試験化合物、特に上記の方法で活性を有する薬剤を投与すること、および

b) 該動物において、該投与に起因する疼痛刺激に対する反応の減少を検出すること（ここで、該動物は、好ましくは、生理学的条件下で器質的感受性を保持し、好ましくは非侵害受容性感覚刺激（典型的には、高温、低温および接触）に反応する能力もまた保持している）（ここで、該減少は、試験化合物を鎮痛 / 抗痛覚過敏剤であると同定する）を含む方法が記載されている。

40

【0106】

この方法は、さらに、 $Na_v 1.9 KO$ 動物に試験化合物を投与すること、および該 KO 動物の反応（疼痛刺激に対する反応）を野生型の同腹子（littermate）の反応と比較することを含むことができる。

【0107】

治療価値を有する可能性があると考えられる化合物は、続いて、当該技術分野で公知の疾患徴候についてのいずれかの標準的なインビトロアッセイまたはインピボ動物モデルを

50

使用して分析される。これらの化合物は、本発明の物質であるとみなされ、上記で説明したように利用可能である。

【0108】

本発明のさらなる目的は、キットであって、i) $\text{Na}_v 1.9$ キャンダル活性を阻害する本明細書に記載の物質、または該物質を含む組成物、好ましくはii) 疼痛に対して有効な少なくとも1つのさらなる異なる活性化化合物、および所望によりiii) 該キットの使用説明書を含む、キットである。

【0109】

特定の実施態様に従って、本発明は、また、本明細書に記載される方法による処置に適しているキットに関する。これらのキットは、本発明に従って有効量で、i)、典型的には本明細書に示される投与量の、 $\text{Na}_v 1.9$ キャンダル活性を阻害する本明細書に記載の物質、または該物質を含む組成物、およびii) 同時投与、分離投与または連続投与のための、古典的に処方される量と比べて一般的に少ない投与量の、鎮痛化合物、好ましくはオピオイド化合物を含有する第二の組成物を含む。

【0110】

本発明のさらなる目的は、疼痛を予防するため、緩和するため、または治療するための、本明細書の記載のキットの使用に関する。

【0111】

図面および実施例は、本発明を例示するものであって、その範囲を限定するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0112】

【図1】A) ラットおよびマウスのDRGニューロン中のフロチリン含有膜画分中の $\text{Na}_v 1.9$ 濃縮物。optiprep不連続勾配液を用いてDRG溶解物を分画した。画分1は、勾配液の最高点を表す。勾配液を分画し、SDS-PAGEによって、対応する分画から等量のタンパク質を分取した。ウエスタンブロットを $\text{Na}_v 1.9$ 、 β アクチン、フロチリンおよびTfR1について探索した。脂質ラフト膜のマーカーであるフロチリンは脂質ラフト画分のマーカーとして使用し、一方、TfR1および β アクチンは重膜画分をマークするために使用した。これらの結果は、少なくとも3つの独立した実験の代表である。B) 炎症メディエーターのカクテルへ曝露後、 $\text{Na}_v 1.9$ を非ラフトドメイン（右側のパネル）と偽処理マウスDRG（左側のパネル）に分けて比較する。C) 少なくとも3つの独立した実験からのシグナルの定量化は、炎症性カクテルは、フロチリン分布に影響を及ぼさずに $\text{Na}_v 1.9$ を脂質ラフトと特異的に区別することを示している。

【図2】A) メチル- β -シクロデキストリン（40 mM）または生理食塩水20 μl を足底注射した野生型マウスおよび $\text{Na}_v 1.9$ KOマウスにおいてフォンフライフィラメントを用いて測定した接触性痛覚過敏の時間経過。抗炎症性分子イブプロフェン（75 mg/kg）の足底注射は、メチル- β -シクロデキストリン誘発性接触性痛覚過敏を変えない。B) メチル- β -シクロデキストリン溶液（40 mM）または α -シクロデキストリン（40 mM）溶液20 μl を足底注射した野生型マウスおよび $\text{Na}_v 1.9$ KOマウスにおいてフォンフライフィラメントを用いて測定した接触性痛覚過敏の時間経過。C) 抗炎症性分子イブプロフェン（75 mg/kg）の腹腔内注射はアロディニア表現型を逆転させないので、M β CD注射は炎症過程を誘発しない（緑色：野生型；青色：KO）。

【図3】メチル- β -シクロデキストリン（40 mM）溶液または α シクロデキストリン（40 mM）溶液20 μl を足底注射したマウスにおいてフォンフライフィラメントを用いて測定した接触性痛覚過敏の時間経過。 α シクロデキストリンは、接触性痛覚過敏を誘発しない。

【図4】A) およびB) は、2% λ -カラギーナン20 μl を足底注射したマウスにおいてフォンフライフィラメントを用いて測定した接触性痛覚過敏の時間経過を示し、イブプロフェンの腹腔内注射は λ -カラギーナン誘発性接触性痛覚過敏を逆転させないことを示す。コレステロールとメチル- β -シクロデキストリンとの複合体（可溶性コレステロー

10

20

30

40

50

ル、5.6 mM コレステロール) の足底注射は、また、 λ -カラギーナン誘発性接触性痛覚過敏を対照レベル(生理食塩水を注射した動物)にまで逆転させる。コレステロールは、対照非炎症動物において器質的感受性を変えない(黒色)。

【図5】非炎症動物において、可溶性コレステロールの足底注射は、生理学的な非炎症条件下の野生型マウスおよび $\text{Na}_v 1.9$ KO マウスの器質的閾値を変えない。

【図6】炎症は、皮膚およびニューロン膜中のコレステロールを減少させる。A) λ -カラギーナンの足底注射によって誘発される持続性炎症の時間経過の前およびその間の皮膚組織中のコレステロールレベルを定量した。コレステロールレベルは、炎症発症から最初の2時間は有意に減少する。B) 炎症メディエーターは、培養物中の感覚神経のコレステロールレベルを減少させる($n = 4$)。

【図7】コレステロールの関節周囲注射は、慢性疼痛行動を改善する。関節炎マウスにおいて、コレステロールの関節周囲注射(青色)は、生理食塩水を注射した動物(赤色)と比べて、試験された全ての姿勢パラメーターを改善した。A - B) コレステロール(5.6 mM 溶液 $20 \mu\text{l}$ 、青色の線)を1回注射した炎症の肢は、生理食塩水($20 \mu\text{l}$)を注射した肢よりも重い重量を支える。C) 重篤な疼痛の肢の結果として、マウスは、その炎症の肢にあまり体重をかけず、尾に体重をかける(示していない)。コレステロール注射は、生理食塩水注射マウスと比べて尾にかかる体重を減少させる。

【図8】コレステロールの経皮送達は、カラギーナン誘発性疼痛を緩和する。5.6 mM コレステロールを含有するヒドロキシセルロースゲルの1.5時間適用は、ヒドロキシセルロース単独による対照ゲルと比べて、器質的アロディニアを消失させる。

【図9】コレステロールの経皮送達は、慢性の関節炎疼痛の有効な痛み止め(pain killer)である。コレステロールを含有するヒドロキシセルロースゲルの適用(2.8 mM、黒色の三角形)は、数時間、関節炎マウスの慢性疼痛を救う。5%イブプロフェンヒドロキシセルロースゲルの適用は、コレステロールよりも非常に低い程度に器質的疼痛を減少させる(灰色の丸印)。ヒドロキシセルロースゲルで処理したマウスだけは、実験の時間経過の間じゅう疼痛表現型の変化を示さない(白丸)。

【図10】経皮送達は、ヒトの病態に対する可能な局所投与経路である。コレステロールを含有するヒドロキシセルロースゲルの適用は、12時間適用期間の後(示していない)または24時間適用期間の後のヒトの真皮領域中のコレステロール含有量の増加をもたらす。カルボポールゲルは、ヒトの皮膚内においてコレステロールの表皮送達を可能にする。

【図11】コレステロールは、 $\text{Na}_v 1.9$ 活性を調節し、チャネルの活性化特性に対する炎症性カクテル抗過を逆転することができる。A) 炎症性カクテルは、対照ニューロン(黒色の曲線)と比べて、 $\text{Na}_v 1.9$ 活性化曲線をより過分極電位へシフトする(青色の曲線)。このようなシフトは、炎症後のニューロンの興奮性の亢進を説明する。コレステロール供給は、該シフトを逆転させる(赤色の曲線)。B) $\text{M}\beta\text{CD}$ によるコレステロール欠乏(赤色の曲線)またはコレステロールオキシダーゼによるコレステロール酸化(青色の曲線)は、炎症性カクテルと同じシフトを誘発する。C) コレステロール自体(青色の曲線)は、 $\text{Na}_v 1.9$ の活性化特性を変えない。

【実施例】

【0113】

本発明者らは、野生型(wt)またはノックアウト(KO)マウスにおける疼痛表現型を比べて、コレステロール取り込みによる脂質ラフト構造の妨害が、疼痛シグナル伝達に關与する $\text{Na}_v 1.9$ 活性化を引き起こすという概念実証を確立した。

【0114】

本発明者らは、 $\text{Na}_v 1.9$ チャネルが、後根神経節の侵害受容性ニューロンの細胞膜にある脂質ラフトマイクロドメイン内に局在すること(図1A)、および炎症性分子のカクテルが脂質ラフトドメインから $\text{Na}_v 1.9$ を分割すること(図1B - C)を示した。本明細書で説明するように、本発明者らは、細胞膜からコレステロールを選択的に抽出するためにメチル- β -シクロデキストリン(MBCD)を使用した。本発明者らは、フォンフ

10

20

30

40

50

ライフラインメント試験で測定して、MBCDの40 mM溶液20 μ lの足底注射が強い器質的アロディニアを誘発することを示した。このMBCD誘発性アロディニアは、Na_v1.9 KO動物において顕著に減少した。本発明者らは、イブプロフェン(75 mg/kg)の腹腔内注射が野生型動物においてもNa_v1.9 KO動物においても器質的閾値を変えなかったため、このアロディニアが炎症過程に起因しないことを示した(図2A、2C)。さらにまた、膜からコレステロールを抽出することができないメチル- β -シクロデキストリンの不活性アナログである40 mMの α -シクロデキストリン(α -CD)の同様の注射は、器質的アロディニアを誘発しなかった(野生型動物およびNa_v1.9 KO動物のどちらも; 図2B; 図3)。

【0115】

全てのことを考え合わせると、これらの結果は、MBCD誘発性コレステロール流出がNa_v1.9チャネルを活性化し、器質的アロディニアを引き起こすことを示している。

【0116】

反対に、本発明者らは、生理学的器質的閾値を変えことなく(野生型動物およびNa_v1.9 KO動物のどちらもn=9; 図4B-5)、コレステロールの局所投与が炎症誘発疼痛を阻害し(図4A-B)、関節炎マウスの行動パラメーターを改善する(図7)ことを示した。

【0117】

本発明者らは、カラギーナン足底注射によって誘発される炎症の間、内因性コレステロールのレベルが減少すること(図6A)、およびDRGニューロンと炎症メディエーターのカクテルと一緒にインビトロインキュベートすることによっても、処置されたニューロンの膜コレステロール含有量が減少すること(図6B)を示した。この結果は、疼痛を緩和するためのコレステロールの供給の理論的根拠を説明している。

【0118】

本発明者らは、コレステロールの経皮送達のカラギーナン誘発性疼痛を鎮め(図8)、関節炎性炎症性疼痛を処置するのに5%イブプロフェンゲルよりも有効であること(図9)ことを示した。

【0119】

本発明者らは、経皮送達が生体の医学的処置に関して可能であることも示した(図10)。

【0120】

本発明者らは、MBCDまたはコレステロールオキシダーゼインキュベーションによるコレステロール欠乏の方が、炎症性カクテルよりも、同程度の振幅でNa_v1.9活性化曲線を過分極電位までシフトすることを示した。さらにまた、コレステロール供給は、この活性化シフトを逆転させる(図11)。

【0121】

材料および方法

全ての動物は、動物の管理および使用の欧州共同体ガイド(European Community guiding in the care and use of animals)(86/609/CEE)に従って使用した。該動物は、制御した環境条件下で飼育し、食餌と水を自由に摂取させながら、12/12時間の明/暗サイクルの下に維持した。

【0122】

ラフト勾配画分:

脂質リッチ細胞膜ドメインを、主に、非イオン性界面活性剤Triton X-100を含有する不連続または連続密度勾配液を介して濃い溶液からの浮力によって、界面活性剤不溶性膜画分(DRM)として単離した。

【0123】

1匹のマウスから新しく分離したDRGを、0.5%Triton X-100および1%プロテイナーゼ阻害物質カクテル(Roche)を含む溶解バッファー140 μ l中にてホモジナイズした。該ホモジネートを4にて1,000gで10分間遠心分離し、上清

10

20

30

40

50

を氷上で1時間インキュベートし、次に、OptiPrepTMステップ密度勾配液と一緒に密度勾配超遠心分離にかけた。

【0124】

TLS-55超遠心分離管に以下のとおり下から上に充填した：上清140 μ lを60%OptiprepTM280 μ lと混合した。これの上に30%OptiprepTM(60%optiprep溶液と溶解バッファの1:1混合物)1.6mlを積層し、次に、0%OptiprepTM(溶解バッファのみ)200 μ lを積層した。該管を4にて5500rpm(200,000g)で4時間遠心分離した。該管の上から各150 μ lの画分12個をゆっくりと取り出し、個々にアリコートとした。低密度画分(番号1)から高密度画分(番号12)まで画分に番号を付した。該画分を-80で最長6ヶ月間貯蔵した。

10

【0125】

画分をウエスタンブロットによりさらに分析した。タンパク質濃度が画分間の比較のための真のベースラインパラメータを提供しないので、ウエスタンブロットのために等しいサンプル容量負荷を使用した。この負荷方法は、密度超遠心分離後のタンパク質の特異的画分への差動分離を説明する。各画分から、等しいサンプル容量(30 μ l)を4~12%SDSポリアクリルアミドゲル中に分離した。タンパク質をニトロセルロース膜上に移した。膜を抗体対フロチリン1(Sigma)の1:1,000希釈液と一緒にインキュベートして、低密度ラフト画分を同定した。膜を、さらに、抗体対TfR(Invitrogen)の1:500希釈液で探索し、次に、 β アクチン(Sigma)の1:10000希釈液で探索して、非ラフト画分を同定した。それとは別に、膜を、本出願人の研究所で製造したNa_v1.9抗体の1:2000希釈液で探索した。タンパク質検出には、Roche POD Western Chemiluminescentキットを使用した。

20

【0126】

薬物インキュベーションのために、炎症性カクテルまたはDMEM中にてDRGを回収し、37で15分間インキュベートした。溶解バッファで数回洗浄した後、それらを上記のとおり処理した。

【0127】

シクロデキストリンおよびコレステロール操作：

注射の前に、メチル- β -シクロデキストリンまたは α -シクロデキストリン(共に、Sigmaから)を生理食塩水バッファで希釈した。可溶性コレステロールとも称されるメチル- β -シクロデキストリン/コレステロール複合体(複合体1gあたりコレステロール40mg)を購入した(Sigmaから)。特記しない限り、全てのシクロデキストリンまたはシクロデキストリン/コレステロール複合体は、該複合体中5.6mMのコレステロールに相当する40mM濃度のシクロデキストリンで注射した。

30

【0128】

カラギーナンモデル：

マウスにおいて、2% λ -カラギーナン(Sigma)20 μ lの足底注射によって、足の持続性炎症を誘発させた。対照動物には、ビヒクル生理食塩水(0.9%NaCl)だけを投与した。

40

【0129】

カラギーナン注射の1時間前に、動物に、生理食塩水またはイブプロフェン(生理食塩水中75mg/kg)のいずれかを腹腔内注射した。

【0130】

フロイント完全アジュバント(CFA)誘発慢性炎症：

2%イソフルラン麻酔下で、マウスの脛-足根関節の周囲に、5 μ g/ μ lの加熱死菌マイクロバクテリウム・ブチリクム(Becton, Dickinson and cie)を含有するフロイント完全アジュバント(CFA)15 μ lの皮下注射を2回行うことによって、慢性炎症(単一関節炎モデル)を誘発した。

【0131】

50

行動アッセイ

フォンフライ試験

0.008 から 4.000 g まで校正されたフォンフライフィラメント (BioSeb) を使用して、器質的疼痛閾値を評価した。力を増強させるために、該フィラメントをそれぞれ 5 回適用し、後足の足底表面に垂直に、それらが曲がるまで押しつけた。少なくとも 3 / 5 の反応を誘発した最初のフィラメントをグラムで疼痛閾値として割り当てた。

【0132】

動力学荷重負荷 (dynamic weight bearing)

動力学荷重負荷試験 (BioSeb) を使用して、該動物の四肢における体重分布を評価した。この新しいインキャパシタンス (incapacitance) 試験は、足の器質的アロディニアによって引き起こされる体重不均衡の定量的評価を可能にする、自由に動く動物によって加えられる全ての圧点の連続測定からなる。床に 44 × 44 のセンサーセルグリッドをもつ 11 × 11 × 22 cm のケージにマウスを入れた。該動物の足によってセンサーセルに加えられる圧を 10 Hz の周波数で 5 分間にわたって記録する。Dynamic weight bearing 1.3.2 h ソフトウェア (Bioseb) によって、各動物について、圧および表面検出閾値を自動的に決定した。手動で各圧点に対応する足に帰属させた後、各足に加えられた平均重量を算出する。最後に、同側性 / 対側性の後足重量比、前足に加えられた重量、および同側性の後足に費やされる時間のパーセンテージを介して、片側痛を評価する。

10

【0133】

DRG ニューロン培養

DRG ニューロンの分離は、従前に記載されている (Coste et al., 2004; Coste et al., 2007)。すなわち、胸腰椎 DRG ニューロンを切り取り、2 mg / ml のコラゲナーゼ I A (Sigma) を含有する酵素溶液中にて 37 °C で 45 分間インキュベートした後、ハンクス培地 (Life Technologies) 中にてトリチュレートした。培養培地は、10 % 熱不活化ウシ胎仔血清、50 U / ml のペニシリン - ストレプトマイシン、2 mM の L - グルタミン、25 mM のグルコース、2 ng / ml のグリア由来神経栄養因子 (GDNF) (全て、Life Technologies から)、および 25 ng / ml の神経成長因子 (NGF、Millipore) を補充したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM、Life Technologies) であった。2 mg / ml のラミニン (Sigma) を塗布した 35 mm 培養皿 (Nunc) に細胞を播き、湿環境 (5 % CO₂、37 °C) で 16 ~ 24 時間維持した後、さらなるコレステロール操作または電気生理学的記録を行った。

20

30

【0134】

コレステロール定量化

炎症を起こした対側性皮膚足 (skin paw) を直径 3.5 mm の生検パンチで切り出した。

DRG ニューロンの培養のために、炎症性カクテルと一緒にインキュベートした後、細胞を 37 °C の D - P B S (Life Technologies) で 3 回洗浄し、次に、5 分間の 0.05 % トリプシン - E D T A インキュベーションによって分離した。次に、細胞を、3300 rpm で 5 分間遠心分離し、次に、ペレットを溶解バッファー (150 mM NaCl、20 mM Tris pH 7.5、2 mM EDTA、1 % Triton X - 100、およびプロテアーゼ阻害物質カクテル (Roche)) 50 μl に再懸濁し、ボルテックスと超音波処理によってホモジナイズした。細胞溶解物を 10,000 rpm で 2 分間遠心分離した。上清 10 μl を使用し、B C A タンパク質アッセイキット (Pierce) によってタンパク質濃度を決定した。残りの上清 (40 μl) から脂質を抽出した。

40

酵素蛍光定量的アッセイ (Biovision) を用いて、製造業者の使用説明書に従って、コレステロール含有量の決定を行った。

【0135】

薬物および化学薬品

炎症性カクテルは、50 nM ブラジキニン (BK)、500 nM プロスタグランジン -

50

E 2 (P G E 2)、1 μ M ヒスタミン (H i s)、5 0 0 n M ノルエピネフリン (N E)、および 2 μ M A T P (全て、Sigma-Aldrich から) を含有していた。

水溶性コレステロールとは、M β C D - コレステロール複合体をいい、sigma Aldrich、MP bio または cyclodextrin CT から購入した。The molar ratio between M β C D とコレステロールのモル比は、7.14 : 1 であり、本明細書で引用した濃度は、M β C D 濃度である。

他の化学薬品：ヒドロキシエチルセルロース M β C D、および α C D は、Sigma Aldrich から購入した。コレステロールオキシダーゼは、Calbiochem から購入した。

【 0 1 3 6 】

電気生理学

パッチピペットは、全細胞電圧固定記録のために 3 ~ 3.5 M Ω の抵抗を有していた。この研究で使用した細胞内溶液は、以下のものを含有していた：130 C s C l、10 H E P E S、8 N a C l、5 E G T A、2.4 C a C l₂、1 M g C l₂ (p H 7.3、298 m O s m / l)。N a⁺電流の電圧固定記録については、細胞外溶液は、N a⁺のための標準的な駆動力を有していた (m M)：130 N a C l、10 グルコース、3 K C l、1 M g C l₂、10 H E P E S、2.5 C a C l₂ (p H 7.35、293 m O s m / l)。N a N / N a_v 1.9 特性 (Coste et al., 2007) を変えずに、C a²⁺電流を遮断するために、細胞外溶液は、500 n M テトロドトキシン (T T X) ならびに 1 m M アミロライドおよび 50 μ M L a³⁺を含有していた。全ての実験は、室温で行われ、化学薬品は、Sigma-Aldrich から入手した (ただし、T T X は Abcam から入手した)。浴溶液を連続吸引によって除去しながら、細胞外培地を、重力送り浴灌流システム (gravity-fed bath perfusion system) を流速 2 ~ 5 m l / 分で使用して交換した。使用する T T X の量を減らすために再利用した。T T X (0.1 m M) および L a³⁺ (1 M) の貯蔵液を水で調製した。アミロライド塩酸塩 (1 M) の貯蔵液をジメチルスルホキシド (最終濃度、0.1 %) で調製した。

薬物適用については、D R G 培養物を、新しく調製した M β C D (20 m M)、水溶性コレステロール (20 m M)、またはコレステロールオキシダーゼ (4 U / m l) を含有する D M E M 中にて 37 で 15 分間インキュベートした。炎症性カクテルを細胞外溶液中にて室温 (R T) で少なくとも 20 分間インキュベートした。

【 0 1 3 7 】

データ収集および解析

データを A x o p a t c h 200 B 増幅器 (Axon Instruments) で収集し、2 K H z でフィルターにかけ、P C L A M P 10 ソフトウェアを使用して 20 k H z でデジタル的に抽出した。電流は、P / 6 プロトコルを使用して漏れを差し引いた。電圧誤差は、70 ~ 85 % のシリーズ抵抗代償を使用して最小化した。C s⁺の平衡を保たせ、N a_v 1.9 チャネルをゆっくりとした不活性化から回復させるために、全細胞記録は、全細胞配置を達成してから 1 分後に開始した。方程式 $G = I / V (V - E_{rev})$ [式中、V は、試験パルス電位であり、E_{rev} は、ネルンストの式に従って算出された逆転電位である] に従って、ピーク電流からコンダクタンス電圧曲線を算出した。ボルツマン関数： $G / G_{max} = 1 / (1 + \exp [(V_{1/2} - V) / k])$ [式中、G / G_{max} は、正規化コンダクタンスであり、V_{1/2} は、半値チャネル活性化の電位であり、k は、傾しさファクター (steepness factor) である] を使用して、活性化曲線 (G - V) にフィットさせた。

P R I S M 4.0 (GraphPad) ソフトウェアを使用して、データの線形および非線形フィッティングを行った。結果は、平均 $\pm$ S E M として表され、n は、試験した細胞の数を表す。スチューデント t 検定および P < 0.05 を使用した統計的解析は、統計学的に有意であると考えられた。

【 0 1 3 8 】

結論

本発明者らは、N a_v 1.9 チャネル活性を阻害する脂質、特にコレステロールの供給が、持続性および / または慢性の疼痛を緩和、軽減および / または予防する、新しい痛み止

10

20

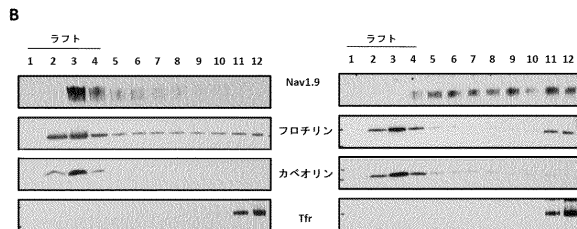
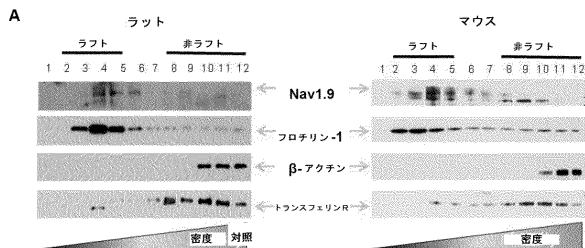
30

40

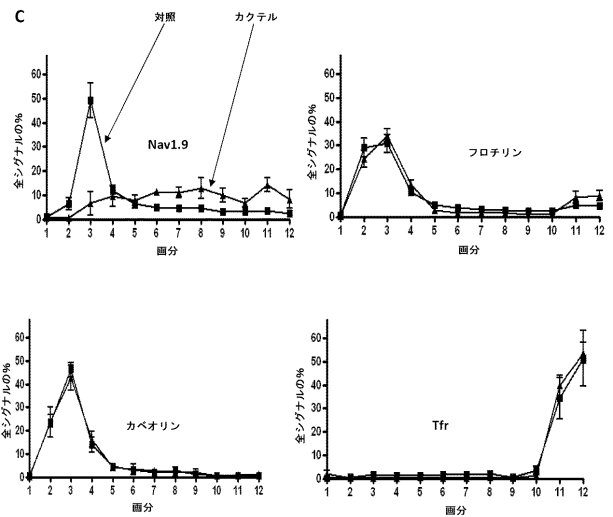
50

め薬戦略であることを示した。コレステロールは、特に、 $\text{Na}_v1.9$ チャンネルの活性を調節し、侵害受容器興奮性を軽減する。これらの新しい鎮痛／抗痛覚過敏分子は、 NSAID 、オピオイド分子およびとは異なる分子経路を介して作用し、慢性の関節炎疼痛を軽減するのにイブプロフェンよりも強力である。これらの結果は、本明細書に記載の分子の1つまたはいくつかの組合せによって新規の強力な痛み止め戦略を設計する可能性を開く。

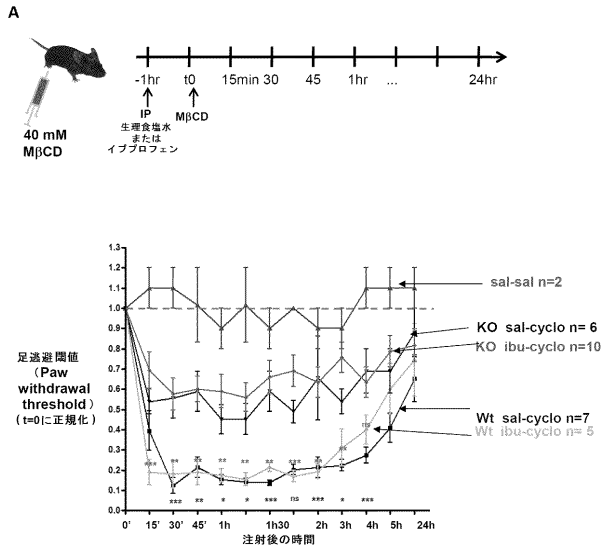
【図1-1】



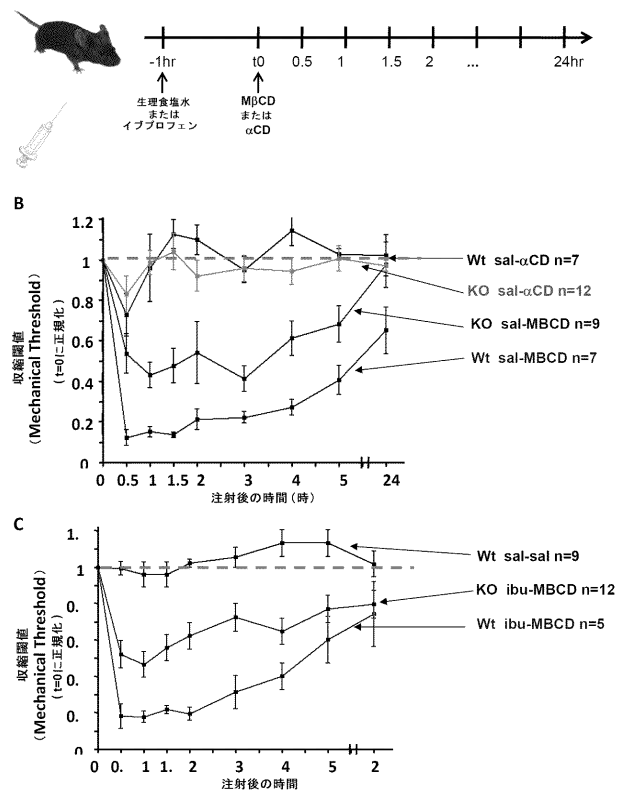
【図1-2】



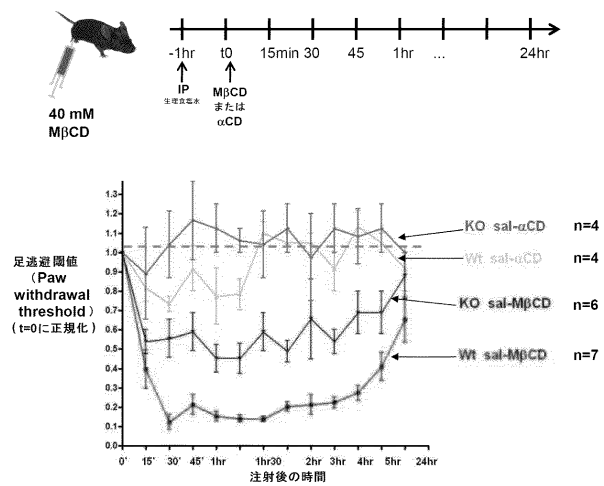
【図 2 - 1】



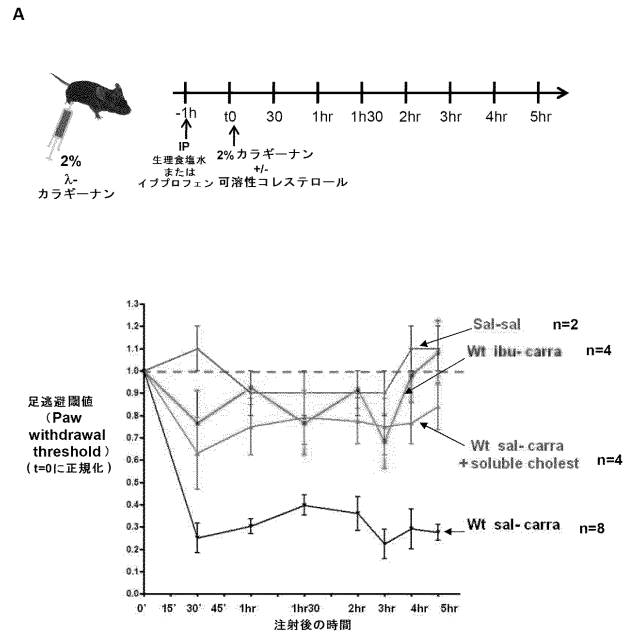
【図 2 - 2】



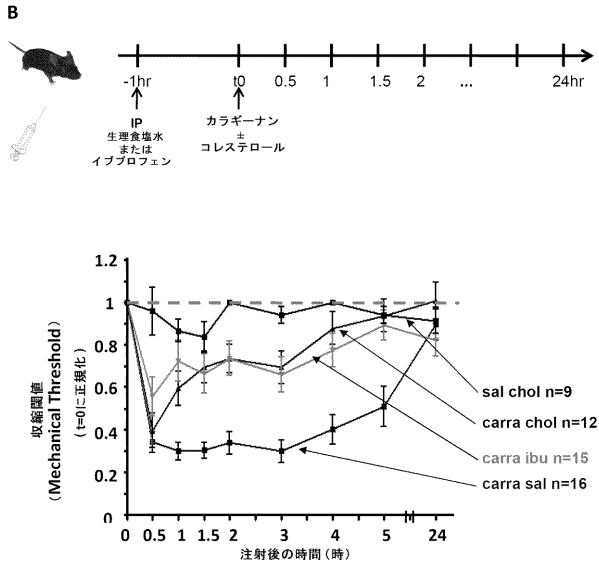
【図 3】



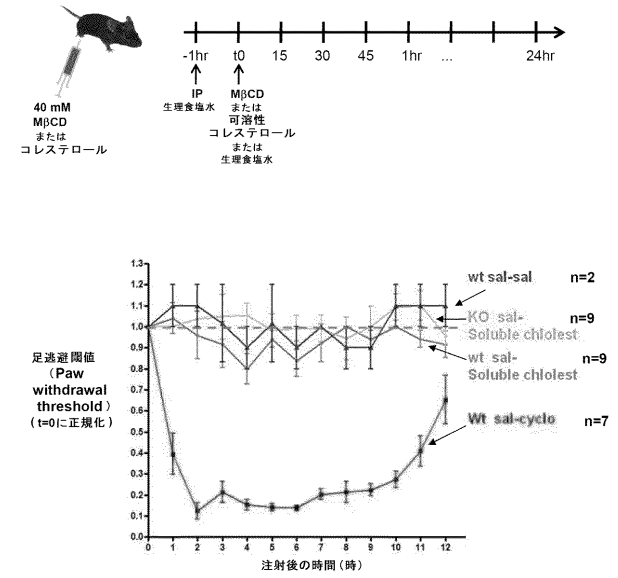
【図 4 - 1】



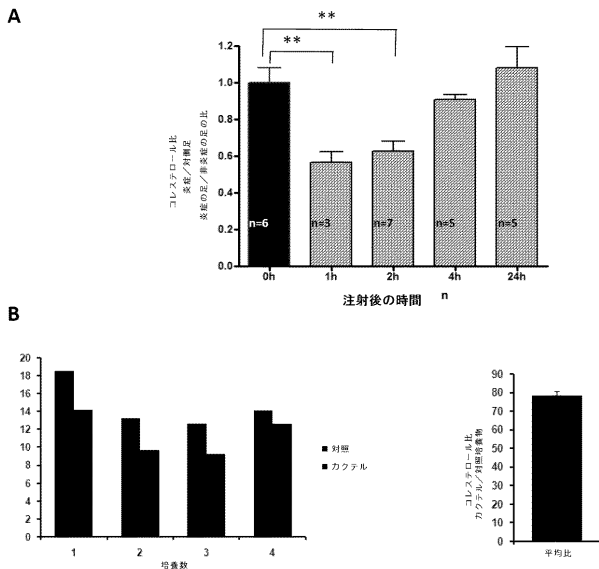
【図 4 - 2】



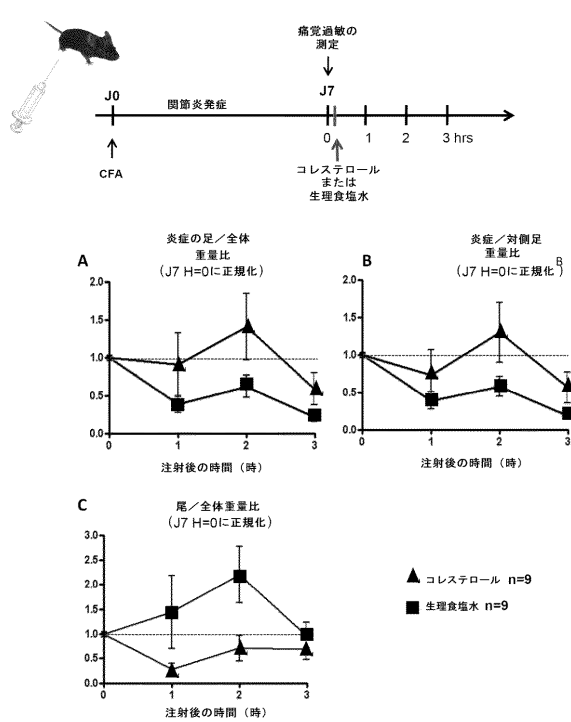
【図 5】



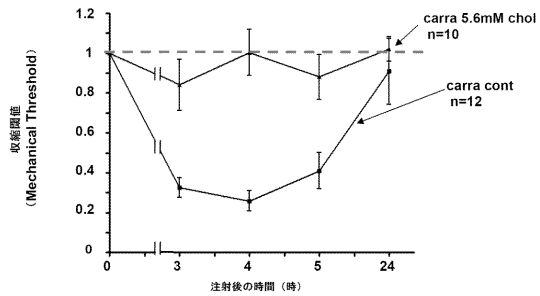
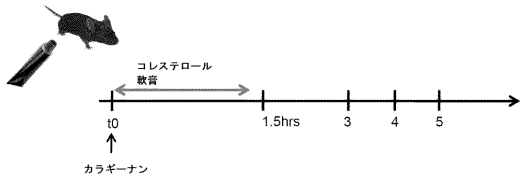
【図 6】



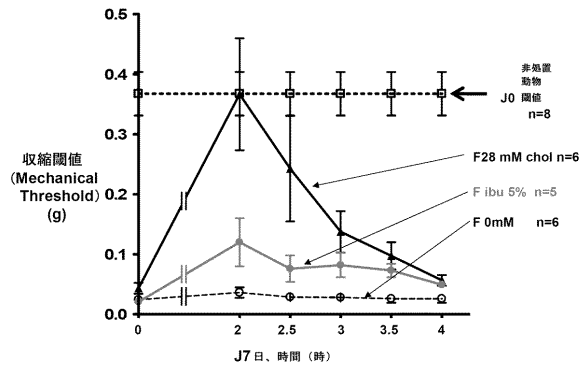
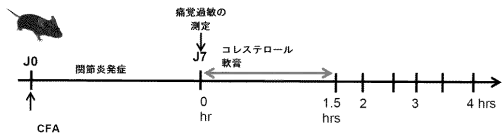
【図 7】



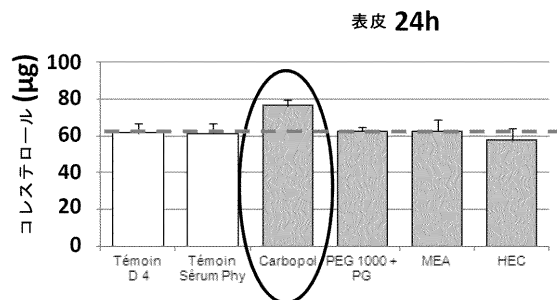
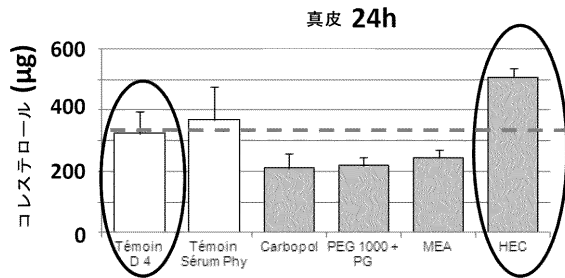
【図 8】



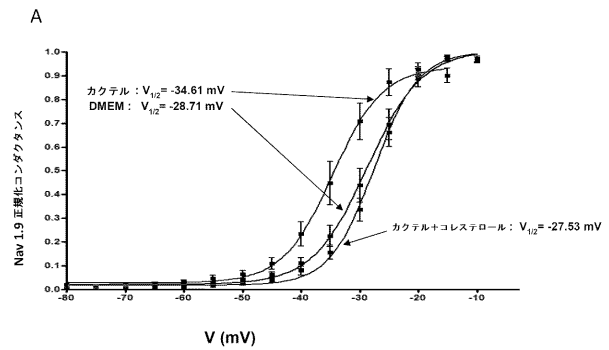
【図 9】



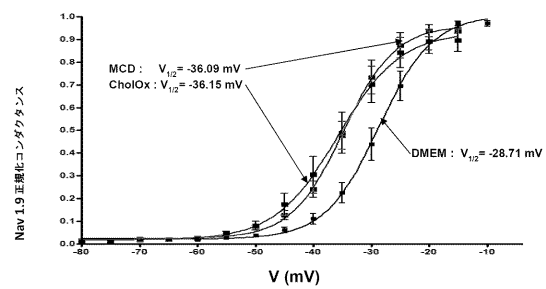
【図 10】



【図 11 - 1】

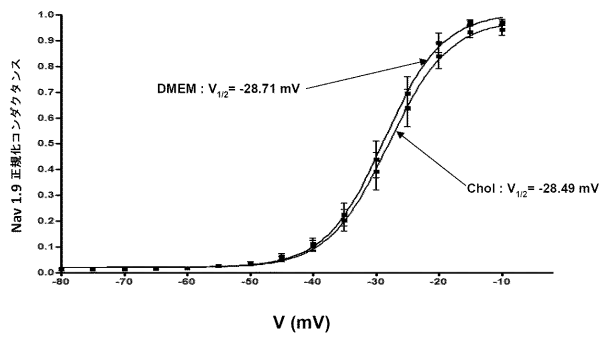


B



【図 11 - 2】

C



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/053390

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K31/575 A61P29/00
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

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, 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	EP 0 300 806 A1 (VESTAR INC [US]) 25 January 1989 (1989-01-25) page 3 - column 4; example 1 -----	11,12,14
X	US 7 691 563 B2 (MICHAELIS MARTIN [DE] ET AL) 6 April 2010 (2010-04-06) column 1, line 1 - line 27 column 1, line 64 - column 2, line 3 -----	1-15
A	WO 2011/022638 A1 (TRANSPOSAGEN BIOPHARMACEUTICALS INC [US]; CRAWFORD JOHN STUART [US]; O) 24 February 2011 (2011-02-24) page 52 - paragraph 169 page 75; table 11 -----	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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

13 May 2014

Date of mailing of the international search report

21/05/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Trifilieff-Riolo, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/053390

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0300806	A1	25-01-1989	AT 110959 T 15-09-1994
			AU 614527 B2 05-09-1991
			AU 1926988 A 27-01-1989
			CA 1339076 C 29-07-1997
			DE 3851389 D1 13-10-1994
			DE 3851389 T2 19-01-1995
			DK 408188 A 25-01-1989
			EP 0300806 A1 25-01-1989
			ES 2063758 T3 16-01-1995
			IE 63515 B1 03-05-1995
			JP H01110621 A 27-04-1989
			NO 883250 A 25-01-1989

US 7691563	B2	06-04-2010	AT 532522 T 15-11-2011
			AU 2004243475 A1 09-12-2004
			AU 2010235846 A1 04-11-2010
			BR P10410960 A 04-07-2006
			CA 2527759 A1 09-12-2004
			CA 2809131 A1 09-12-2004
			CN 1838961 A 27-09-2006
			DK 1641468 T3 27-02-2012
			EP 1481680 A1 01-12-2004
			EP 1641468 A2 05-04-2006
			IL 172203 A 24-09-2012
			JP 4843492 B2 21-12-2011
			JP 5460627 B2 02-04-2014
			JP 2007518698 A 12-07-2007
			JP 2011168589 A 01-09-2011
			KR 20060054188 A 22-05-2006
			RU 2362565 C2 27-07-2009
			US 2005032744 A1 10-02-2005
			US 2010137257 A1 03-06-2010
			WO 2004105773 A2 09-12-2004

WO 2011022638	A1	24-02-2011	EP 2467398 A1 27-06-2012
			US 2012148604 A1 14-06-2012
			WO 2011022638 A1 24-02-2011

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 1 1

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(71)出願人 592236245
 サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシェルシュ・シアンティフィック
 CENTRE NATIONAL DE LARECHERCHE SCIENTIFIQUE
 フランス75794パリ、セデックス16、リュ・ミケランジュ3番

(74)代理人 100101454
 弁理士 山田 卓二

(74)代理人 100062144
 弁理士 青山 葆

(74)代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子

(74)代理人 100156144
 弁理士 落合 康

(72)発明者 パトリック・デルマ
 フランス、エフ - 05190ルモロン、シュマン・デ・メアン13番

(72)発明者 ムリエル・エディト・アムサレム
 フランス、エフ - 13127ヴィトロル、アヴニユ・ドゥ・フランス、レジドンス・ラ・コルニッシュ、パティマン・ウ

(72)発明者 フランソワーズ・マリー - ドミニク・パディーヤ
 フランス、エフ - 13530トレ、アヴニユ・ドゥ・サン・ザシャリー54番

Fターム(参考) 4C084 AA17 AA20 MA02 MA55 MA56 MA58 MA60 MA63 MA65 NA14
 ZA08 ZC41
 4C086 AA01 AA02 DA11 MA01 MA02 MA04 MA55 MA56 MA58 MA60
 MA63 MA65 MA67 NA14 ZA08 ZC41
 4C206 AA01 AA02 FA02 MA01 MA02 MA04 MA75 MA76 MA78 MA80
 MA83 MA85 MA87 NA14 ZA08 ZC41