等式を立て（ａｎ　ｅｑｕａｌｉｔｙ　ｉｓ　ｓｅｔ　ｕｐ）（方程式１ａ＝方程式２ａ）、C_Dに関して解く：

【０２９０】

【数４】

$$C_D = \frac{A_{252} - 0.37A_{280}}{24{,}681}$$

【０２９１】

[231] 一度C_Dを計算したら、その値を用いて上記の方程式１ａ（または２ａ）においてC_{Ab}に関して解く。次いで、ＤＭ１：Ａｂの比率を計算することができる。抗体のｍｇ／ｍＬ（ｇ／Ｌ）濃度は、１４７，０００ｇ／モルの分子量を用いて計算され、ＤＭ１の濃度は７３６．５ｇ／モル（連結されたＤＭ１）の分子量を用いて計算される。

【０２９２】

ジスルフィド交換の効率がＳＳＮＰＰにより増大する。

[232] 表１において示されているように、コンジュゲーションの効率は、ＳＳＮＰＰがクロスリンカーとして用いられる反応において、ＳＰＰを用いる反応と比較して増進される。そのパーセント効率は、抗体あたりのＤＭ１に関する値を抗体あたりのリンカーに関する値により割った比を１００倍することにより計算された。ＳＳＮＰＰを用いたＮ９０１抗体のコンジュゲーションは、結果としてｐＨ６．５および７．４の両方において９３％のクロスリンク効率をもたらした。これらの実験におけるＳＰＰを用いたＮ９０１のコンジュゲーションの効率は、ｐＨ６．５において７０％およびｐＨ７．４において７７％であった。ＳＳＮＰＰによる効率の増大は、目標のＤＭ１対抗体比を、低減された数のリンカー分子を用いて修飾された抗体を用いて達成することができることを示している。事実、ＳＳＮＰＰを用いて導入された抗体あたり４．２個の（５－ニトロピリジル－２－ジチオ）－基を有する抗体調製物を用いた最終的なコンジュゲートにおいて、ＳＰＰを用いて導入された５．６個のピリジル－２－ジチオ基を有する抗体と比較して、類似の薬物対抗体比（４．３）が達成された（表２）。従って、同程度のコンジュゲーション結果を得るのに必要な薬物の量は、これらの条件下で、ＳＳＮＰＰで修飾された抗体に関して、ＳＰＰで修飾された抗体よりも２５％少なかった。ＳＳＮＰＰによる効率の増大の、さらなる利益の可能性は、低減されたモル過剰量のＤＭ１をコンジュゲーション反応において用いてよいことである。その反応におけるある範囲の薬物の当量（０．８～１．７倍過剰）とのコンジュゲーション後の抗体あたりのＤＭ１の比率の比較は、１．１倍モル過剰はＳＳＮＰＰクロスリンカーを用いた１００％のコンジュゲーション効率を達成するのに十分であることを示している（図７）。ＤＭ１とＳＳＮＰＰまたはＳＰＰを用いて修飾された抗体の反応の時間経過の比較は、例えば図８において示されている。それぞれの場合において、修飾された抗体を、組み込まれたリンカー１モルあたり１．１倍モル過剰のＤＭ１で処理した。ＳＳＮＰＰで修飾された抗体を用いた反応は、ＳＰＰで修飾された抗体を用いた反応よりもかなり速い（図８）。１．７倍のモル過剰ですら、ＳＰＰを用いて類似の効率を達成するのに十分ではない。ＳＰＰの代わりにＳＳＮＰＰをクロスリンカーとして用いる場合、１）より低いモル過剰のＤＭ１および２）抗体あたりより少ないリンカーを用いる能力は、目標のＤＭ１対抗体比を達成するのに必要な薬物の量を５０％も減らすことを可能にする。

【０２９３】

[233] ＳＳＮＰＰリンカーを用いて増大したコンジュゲーションの効率は、コンジュゲートの単量体的特徴における、およびその抗体コンジュゲートと関係するコンジュゲートしていない（遊離の）薬物の量における妥協無しに成し遂げられる。単量体、二量体、三量体、またはより高い分子量の集合体（ａｇｇｒｅｇａｔｅｓ）の量を決定するために、ＳＥＣ分析が用いられる。表１に示したように、どちらのリンカーを用いても、単量体が９０％を超える典型的な結果が得られた。コンジュゲートしていない薬物のレベルを、コンジュゲート試料の逆相ＨＰＣＬ分析により測定した。それぞれの反応に関する遊離の

薬物のパーセントは２％未満であった。加えて、ＳＳＮＰＰを用いると、ＳＰＰと比較してより短いコンジュゲーション反応時間が可能であり（米国特許第６，９１３，７４８号）、それはコンジュゲーション反応において必要な有機溶媒に長くさらされることに影響を受けやすい一部の抗体の喪失を減少させる可能性がある。より短い反応時間は、コンジュゲーションの間の競合する副反応であるＤＭ１の二量体化による薬物の喪失も減少させるはずである。結果として得られる収率の増大および副反応の低減は、ＤＭ１の必要量の低減にさらに貢献するはずである。

【０２９４】

[234] ＳＳＮＰＰを用いる場合の増進されたコンジュゲーションの速度および効率は、異なる薬物をその抗体にコンジュゲートさせる際にも観察され、これはこの新規のリンカー試薬の広い適用可能性を示している。Ｎ９０１抗体をＤＮＡアルキル化剤、ＤＣ４、ＣＣ－１０６５類似体とコンジュゲートする際の、ＳＳＮＰＰおよびＳＰＰを用いたコンジュゲーション効率の比較が、例えば表３において示されている。２時間までにＳＳＮＰＰクロスリンク試薬を用いた反応は完了したが、一方でＳＰＰ試薬を用いた反応は２時間までに７３％の完了度しか示さず、２時間を過ぎても薬物のかなりの組み込みを示した（１８時間後に９１％）。大きく延長された反応時間のみが１００％の完了度に至る可能性がある。

【０２９５】

実施例３．スルホネート基を含むチオエーテル（切断可能で無い）およびジスルフィドリンカー類を有する抗体のマイタンシノイドコンジュゲートのインビトロ細胞毒性の評価：

[235] スルホネート基を含むチオエーテルおよびジスルフィドリンカー類を有する抗体－マイタンシノイドコンジュゲートの細胞毒性作用は、典型的には癌細胞をそのコンジュゲートと共に４～５日間継続的に培養した後にＷＳＴ－８細胞生存度アッセイを用いて評価された。抗原を発現する癌細胞（ウェルあたり約１０００～５０００細胞）を９６ウェルプレートにおいてウシ胎仔血清を含む通常の増殖培地中で、様々な濃度の抗体－マイタンシノイドコンジュゲートと共に約５日間培養した。次いでＷＳＴ－８試薬を添加し、約２～５時間後に、プレートの吸光度を４５０ｎｍにおいて測定した。生存の割合をコンジュゲート濃度に対してプロットし、そのコンジュゲートのIC_{50}値（５０％の細胞を殺す濃度）を決定した。

【０２９６】

[236] 図６０および６１は、６．０～７．６マイタンシノイド／Ａｂを有する、スルホネートを含むジスルフィド結合したリンカーを有する抗ＣａｎＡｇ（ｈｕＣ２４２）－マイタンシノイドコンジュゲート（ｈｕＣ２４２－スルホ－ＳＰＤＢ－ＤＭ４）の、３．３マイタンシノイド／Ａｂを有するコンジュゲートと比較した、ＣａｎＡｇ陽性ＣＯＬＯ２０５およびＣＯＬＯ２０５－ＭＤＲ細胞に対する細胞毒性の増進を示す。高いマイタンシノイド類のロードを有するコンジュゲートの効力は、８個までのマイタンシノイド分子による抗体の装飾は標的のＣＯＬＯ２０５細胞へのそのコンジュゲートの結合に影響を与えなかったことを示している。

【０２９７】

[237] 図６４は、類似のマイタンシノイドのロードを有する抗ＣａｎＡｇ　Ａｂ－マイタンシノイドコンジュゲートの、ＣａｎＡｇ抗原陽性ＣＯＬＯ２０５－ＭＤＲ細胞に対する細胞毒性活性を示す。ジスルフィドリンカー中のスルホネート基の存在は、これらの多剤耐性細胞に対するコンジュゲートの効力を著しく増進させた。スルホネートで連結されたコンジュゲートのその増進された効力は新しい発見であり、療法的適用に関して非常に期待できる可能性がある。

【０２９８】

[238] 図６３は、類似のマイタンシノイドのロードを有する抗ＥｐＣＡＭ　Ａｂ－マイタンシノイドコンジュゲートの、ＥｐＣＡＭ抗原陽性ＣＯＬＯ２０５－ＭＤＲ細胞に対する細胞毒性活性を示す。ジスルフィドリンカー中のスルホネート基の存在は、これらの

多剤耐性細胞に対するコンジュゲートの効力を著しく増進させた。スルホネートで連結されたコンジュゲートのその増進された効力は新しい発見であり、療法的適用に関して非常に期待できる可能性がある。

【０２９９】

[239] 図６４は、類似のマイタンシノイドのロードを有する抗ＥｐＣＡＭ Ａｂ-マイタンシノイドコンジュゲートの、ＥｐＣＡＭ抗原陽性ＨＣＴ細胞に対する細胞毒性活性を示す。ジスルフィドリンカー中のスルホネート基の存在は、これらの多剤耐性細胞に対するコンジュゲートの効力を著しく増進させた。スルホネートで連結されたコンジュゲートのその増進された効力は新しい発見であり、療法的適用に関して非常に期待できる可能性がある。

【０３００】

[240] 図６５は、類似のマイタンシノイドのロードを有する抗ＥｐＣＡＭ Ａｂ-マイタンシノイドコンジュゲートの、ＥｐＣＡＭ抗原陽性ＣＯＬＯ２０５-ＭＤＲ細胞に対する細胞毒性活性を示す。チオエーテルリンカー中のスルホネート基の存在は、これらの多剤耐性細胞に対するコンジュゲートの効力を著しく増進させた。スルホネートで連結されたコンジュゲートのその増進された効力は新しい発見であり、療法的適用に関して非常に期待できる可能性がある。

【０３０１】

実施例４．抗ＥｐＣＡＭ-マイタンシノイドコンジュゲート、Ｂ３８．１-ＳＰＤＢ-ＤＭ４およびＢ３８．１-スルホ-ＳＰＤＢ-ＤＭ４の、結腸癌、ＣＯＬＯ２０５およびＣＯＬＯ２０５-ＭＤＲ、異種移植片に対するインビボでの抗腫瘍活性の比較：

[241] Ｂ３８．１-ＳＰＤＢ-ＤＭ４およびＢ３８．１-スルホ-ＳＰＤＢ-ＤＭ４コンジュゲートの抗腫瘍作用を、ヒト結腸癌腫の異種移植片モデルであるＣＯＬＯ２０５およびＰ糖タンパク質を過剰発現するように設計されたＣＯＬＯ２０５-ＭＤＲにおいて評価した。その細胞をＳＣＩＤマウスの右肩の下の領域中に皮下注射した。その腫瘍の体積がおおよそ２００ｍｍ^{3}の大きさに達した時に、そのマウスを腫瘍の体積によりランダム化し、３個のグループに分けた。それぞれのグループをＢ３８．１-ＳＰＤＢ-ＤＭ４（１０ｍｇコンジュゲートタンパク質／ｋｇ）、Ｂ３８．１-スルホ-ＳＰＤＢ-ＤＭ４（１０ｍｇコンジュゲートタンパク質／ｋｇ）またはリン酸緩衝生理食塩水（ヒビクル対照）のいずれかの１回の静脈内大量瞬時投与で処理した。腫瘍の成長を、週に２回腫瘍の大きさを測定することにより監視した。腫瘍の大きさは、次の式により計算された：長さ×幅×高さ×１／２。

【０３０２】

[242] 個々のＣＯＬＯ２０５-ＭＤＲ腫瘍の体積の変化を図６６において示す。どちらかのコンジュゲートを用いた処理は、結果として腫瘍の成長の有意な遅延をもたらした。Ｂ３８．１-スルホ-ＳＰＤＢ-ＤＭ４はこのヒト結腸癌の異種移植片モデルにおいてＢ３８．１-スルホ-ＳＰＤＢ-ＤＭ４よりも有効であった。

【０３０３】

[243] 個々のＣＯＬＯ２０５腫瘍の体積の変化を図６７において示す。どちらかのコンジュゲートを用いた処理は、結果として腫瘍の成長の有意な遅延をもたらした。Ｂ３８．１-スルホ-ＳＰＤＢ-ＤＭ４で処理された６匹の動物の内の２匹は、完全な腫瘍の退縮を示した。従って、このモデルにおいてＢ３８．１-スルホ-ＳＰＤＢ-ＤＭ４はＢ３８．１-スルホ-ＳＰＤＢ-ＤＭ４よりも有意に有効であった。

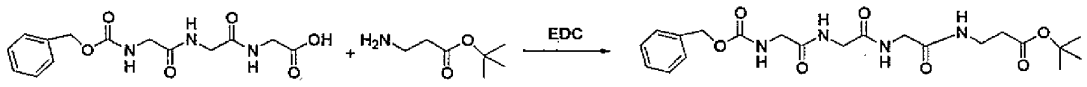
【０３０４】

実施例５．プロ荷電リンカー類（ＣＸ１-１）の合成：

Ｚ-Ｇｌｙ-Ｇｌｙ-Ｇｌｙ-β-Ａｌａ-ＯｔＢｕ

【０３０５】

【化５８】



【０３０６】

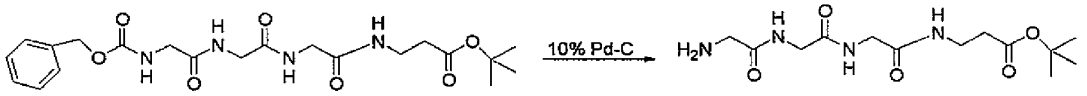
[244] １．３ｇ（４．０ｍｍｏｌ）のＺ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－ＯＨ、０．５８３ｇ（４．０ｍｍｏｌ）のｔｅｒｔ－ブチル－３－アミノプロピオネート、０．６５１ｇ（４．２５ｍｍｏｌ）のヒドロキシベンゾトリアゾールおよび０．８１ｇ（４．２３ｍｍｏｌ）のＮ－（３－ジメチルアミノプロピル）－Ｎ’－エチルカルボジイミド塩酸塩を、５０ｍＬフラスコの中に量り取り、次いで２０ｍＬのジメチルホルムアミド中で窒素雰囲気下での電磁式撹拌により溶解した。３時間後、反応混合物を５ｍＬ部分において５．０ｃｍ×２５ｃｍ Ｃ１８カラムを用いた逆相ＨＰＬＣにより精製した。カラムを１００ｍＬ／分で、０．３％ギ酸、５％アセトニトリルを含む脱イオン水で１０分間、続いて５％アセトニトリルから９０％アセトニトリルまでの１５分間の直線勾配を用いて流した（ｒｕｎ）。生成物の画分（１９分の保持時間）を合わせ、真空下でのロータリーエバポレーションにより溶媒を除去すると、１．３５ｇ（７５％）の表題化合物が得られた。^{1}H NMR (d_6-DMSO) 8.16 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 8.10 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 7.82 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 7.25 - 7.4 (m, 5H), 5.04 (s, 2H), 3.74 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.67 (t, J = 6.4 Hz, 4H), 3.25 (q, J = 6.1 Hz, 2H), 2.35 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.39 (s, 9H). ^{13}C NMR (d_6-DMSO) 170.45, 169.61, 169.00, 168.63, 156.49, 136.94, 128.30, 127.76, 127.69, 79.89, 65.51, 43.56, 42.10, 41.90, 34.89, 34.78, 27.70. HRMS (M+Na$^+$) 計算値473.2012 実測値473.1995。

【０３０７】

Ｈ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－β－Ａｌａ－ＯｔＢｕ

【０３０８】

【化５９】



【０３０９】

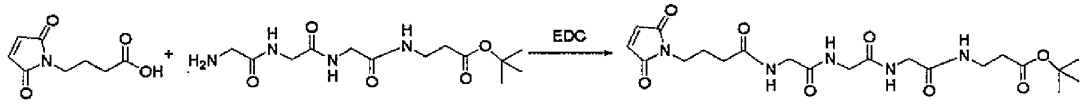
[245] １．３ｇ（２．８９ｍｍｏｌ）のＺ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－β－Ａｌａ－ＯｔＢｕを、２５０ｍＬパールシェーカー（ｐａｒｒ ｓｈａｋｅｒ）フラスコ中で８０ｍＬの９５：５ メタノール：脱イオン水中で溶解し、それに０．１２ｇの炭素上１０％パラジウムを添加した。そのフラスコを水素雰囲気下（４２ＰＳＩ）で７時間振とうした。混合物をセライト濾過助剤を通して真空濾過し、濾液を真空下でのロータリーエバポレーションにより濃縮すると、０．８８ｇ（９６％）の表題化合物が得られた。^{1}H NMR (d_6-DMSO) 8.12 (t, J = 1.6Hz 2H), 8.08 (t, J =1.6 Hz, 1H), 3.75 (s, 2H), 3.64 (d, J = 5.9 2H), 3.28 (bs, 2H), 3.24 (q, J = 6.0 Hz, 2H), 3.13 (s, 2H), 2.35 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.39 (s, 9H). ^{13}C NMR (d_6-DMSO) 173.38, 170.46, 169.18, 168.70, 79.89, 44.65, 41.95, 34.88, 34.78, 27.71. HRMS (M + H$^+$) 計算値317.1825、実測値317.1801。

【０３１０】

Ｍａｌ－Ｇａｂａ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－β－Ａｌａ－ＯｔＢｕ

【０３１１】

【化６０】



【０３１２】

[246] ５１３ｍｇ（２．８ｍｍｏｌ）の４－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ブタン酸、８００ｍｇ（０．２．８ｍｍｏｌ）のｔｅｒｔ－ブチル　３－（２－（２－（２－アミノアセトアミド）アセトアミド）アセトアミド）プロパノエートおよび５８３ｍｇ（３．０ｍｍｏｌ）のＮ－（３－ジメチルアミノプロピル）－Ｎ’－エチルカルボジイミド塩酸塩を、１２ｍＬのジメチルホルムアミド中で溶解し、３時間撹拌した。反応混合物を、４つの同量の部分において、５．０ｃｍ×２５ｃｍＣ１８カラムを用いた逆相ＨＰＬＣにより精製した。カラムを１００ｍＬ／分で、０．３％ギ酸および５％アセトニトリルを含む脱イオン水で１０分間、続いて５％アセトニトリルから３３％アセトニトリルまでの１３分間の直線勾配により溶離した。生成物の画分（２１分の保持時間）を合わせ、真空下でのロータリーエバポレーションにより溶媒を除去すると、８３２ｍｇ（６２％）の表題化合物が得られた。^{1}H NMR (d_6-DMSO) 8.10-8.16 (m, 2H), 8.07 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 7.0 - 7.15(m, 1H), 3.747 (t, J = 6.0 Hz, 3H), 3.64 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.41 (t, J = 6.8, 2H), 3.1-3.33 (m, 1H), 3.19-3.26 (m, 2H), 2.348 (t, J = 6.8, 2H), 2.132 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.67 - 1.76 (m, 2H), 1.39 (s, 9H). ^{13}C NMR (d_6-DMSO) 171.80, 170.98, 170.39, 169.48, 168.96, 168.56, 134.37, 79.83, 42.05, 41.83, 37.38, 34.82, 34.71, 32.26, 27.83, 23.95. HRMS (M + Na^+) 計算値504.2070　実測値504.2046。

【０３１３】

Ｍａｌ－Ｇａｂａ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－β－Ａｌａ－ＯＨ

【０３１４】

【化６１】



【０３１５】

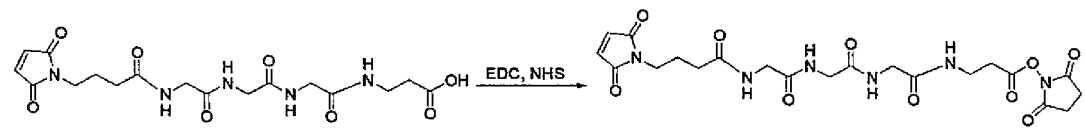
[247] ８２０ｍｇ（１．７ｍｍｏｌ）のＭａｌ－Ｇａｂａ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－β－Ａｌａ－ＯｔＢｕを、９．０ｍｌの９５：５　トリフルオロ酢酸：脱イオン水中で溶解し（ｄｉｓｏｌｖｅｄ）、３時間電磁式撹拌した。真空下でのロータリーエバポレーションにより溶媒を除去すると、７３０ｍｇ（１００％）の表題化合物が得られた。^{1}H NMR (d_6-DMSO) 12.1 (bs, 1H), 8.05-8.20 (m, 3H), 7.82 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.00 (s, 2H), 3.71 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 3.65 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 3.41 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.26 (q, J = 5.6 Hz, 2H), 2.38 (t, J = 7.2 Hz, 2H,), 2.14 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 1.67-1.77 (m, 2H). ^{13}C NMR (d_6-DMSO) 172.70, 171.83, 171.01, 169.50, 168.99, 168.51, 134.38, 42.07, 41.84, 36.75, 34.70, 33.69, 32.28, 23.97 HRMS (M + Na^+) 計算値448.1444　実測値448.1465。

【０３１６】

Ｍａｌ－Ｇａｂａ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－β－Ａｌａ－ＯＮＨＳ（ＣＸ１－１）

【０３１７】

【化６２】



【０３１８】

[248] ７６ｍｇ（０．１８ｍｍｏｌ）のＭａｌ－Ｇａｂａ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－β－Ａｌａ－ＯＨ、７２ｍｇ（０．３７６ｍｍｏｌ）のＮ－（３－ジメチルアミノプロピル）－Ｎ’－エチルカルボジイミド塩酸塩および６６ｍｇ（０．５７５ｍｍｏｌ）のＮ

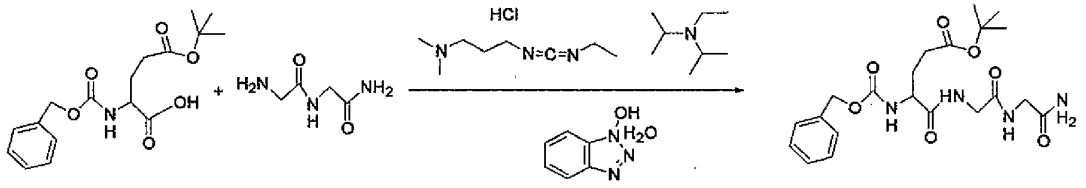
-ヒドロキシスクシンイミドを、１．０ｍＬのジメチルホルムアミド中で、電磁式撹拌により溶解した（ｄｉｓｏｌｖｅｄ）。２時間後、反応混合物を２つの同量の部分において１．９ｃｍ×１０ｃｍ　Ｃ８カラムを用いる逆相ＨＰＬＣにより精製した。カラムを１８ｍＬ／分で、０．３％ギ酸および５％１，４-ジオキサンを含む脱イオン水で３分間、続いて５％１，４-ジオキサンから３０％１，４-ジオキサンまでの１５分間の直線勾配により溶離した。生成物の画分（保持時間６．５分）をフラスコ中に集め、ドライアイスアセトン浴中で急速凍結させた。周囲温度における凍結乾燥により溶媒を除去すると、４０ｍｇ（４２％）の表題化合物が得られた。^{1}H NMR (d_6-DMSO) 8.08-8.11 (m, 3H), 7.99 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 7.00 (s, 2H), 3.6-3.75 (m, 6H), 3.0-3.2 (m, 4H), 2.84 (s, 4H), 2.13 (t, J = 7.6 Hz), 1.83-1.93 (m, 2H), 1.69-1.72 (m, 2H). HRMS (M + Na^+) 計算値545.1608　実測値545.1638。

【０３１９】

Ｚ-Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）-Ｇｌｙ-Ｇｌｙ-ＮＨ$_2$

【０３２０】

【化６３】



【０３２１】

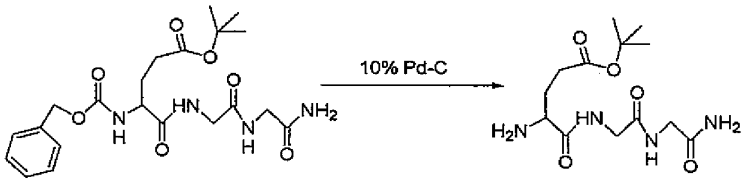
[249]　４０ｍｌのジメチルホルムアミドを、２．５２ｇ（７．４７ｍｍｏｌ）のＺ-Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）-ＯＨ、１．３ｇ（８．４９ｍｍｏｌ）のヒドロキシベンゾトリアゾール、１．３ｇ（７．７６ｍｍｏｌ）のＨ-Ｇｌｙ-ＧｌｙＮＨ２、および１．５２ｇ（７．９３ｍｍｏｌ）のＮ-（３-ジメチルアミノプロピル）-Ｎ’-エチルカルボジイミド塩酸塩に添加した。２．５ｍｌ（１４．３ｍｍｏｌ）のジイソプロピルエチルアミンを添加し、反応物を一夜撹拌した。反応混合物を、３つの同量の部分において、分取５ｃｍ×２５ｃｍ　Ｃ１８　ＨＰＬＣカラムへの直接注入により精製した。カラムを１００ｍＬ／分で、０．３％ギ酸および５％アセトニトリルを含む脱イオン水で１０分間、続いて５％アセトニトリルから９０％アセトニトリルまでの１５分間の直線勾配を用いて流した（ｒｕｎ）。生成物の画分（保持時間１８～２０分）を合わせ、真空下でのロータリーエバポレーションにより溶媒を除去すると、２．９ｇ（８３％）の表題化合物が得られた。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.79 - 7.68 (m, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.27 (q, J = 4.9, 5H), 6.90 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.35 (d, J = 6.8, 1H), 5.08 (d, J = 12.0, 1H), 4.98 (d, J = 12.2, 1H), 4.20 (dd, J = 12.9, 7.6, 1H), 3.84-3.95 (m, 2H), 3.83 (d, J = 5.0, 2H), 2.42 - 2.19 (m, 2H), 2.07 (d, J = 6.9, 1H), 1.96 - 1.83 (m, 1H), 1.39 (s, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 171.79, 171.65, 170.82, 168.87, 163.04, 156.08, 136.86, 128.31, 127.74, 79.64, 65.58, 53.96, 42.17, 41.81, 31.25, 27.73, 27.01。

【０３２２】

Ｈ-Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）-Ｇｌｙ-Ｇｌｙ-ＮＨ２

【０３２３】

【化６４】



【０３２４】

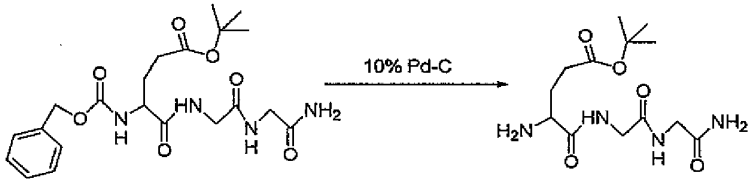
[250] ９４０ｍｇ（２．０９ｍｍｏｌ）のＺ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－Ｇｌｙ－ＧｌｙＮＨ２を、２５０ｍＬガラスＰＡＲＲ水素化シェーカーフラスコ（ｆｌａｋ）中の４０ｍｌの９５：５　メタノール：脱イオン水中で溶解した。２２２ｍｇの１０％炭素上パラジウムをフラスコに添加し、内容物を水素（４０ＰＳＩ）の下で４時間振とうして水素化した。混合物をセライト濾過助剤を通して真空濾過し、ロータリーエバポレーションにより溶媒を濾液から除去すると、６４０ｍｇ（９４％）の表題化合物が得られた。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 4.03 (s, 1H), 3.75 (d, J = 3.3, 2H), 3.63 (s, 2H), 3.30 - 3.22 (m, J = 3.6, 1H), 3.14 - 3.10 (m, 1H), 2.27 (t, J = 7.9, 2H), 1.84 (td, J = 13.6, 7.4, 1H), 1.63 (td, J = 15.0, 7.5, 1H), 1.39 (s, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 176.53, 174.24, 172.00, 170.32, 81.82, 55.21, 43.64, 43.16, 40.44, 32.31, 30.45, 28.41. HRMS (M + H^{+}) 計算値317.1825　実測値317.1800。

【０３２５】

Ｅ００１００８－２８　Ｍａｌ－Ｇａｂａ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－ＮＨ$_{2}$

【０３２６】

【化６５】



【０３２７】

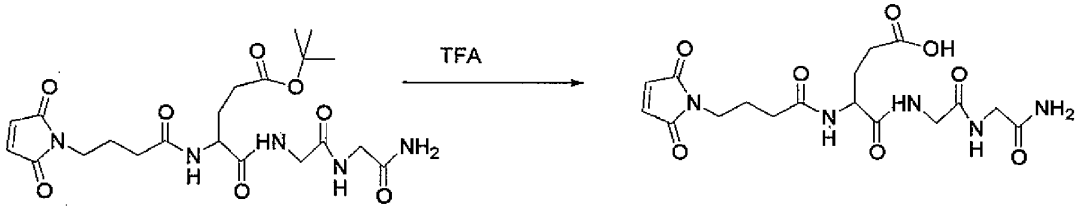
[251] ６０３ｍｇ（１．９ｍｍｏｌ）のＨ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－Ｇｌｙ－ＧｌｙＮＨ２、３７２ｍｇ（２．０３ｍｍｏｌ）のＭａｌ－Ｇａｂａ－ＯＨおよび４３０ｍｇ（２．２４ｍｍｏｌ）のＮ－（３－ジメチルアミノプロピル）－Ｎ’－エチルカルボジイミド塩酸塩を、４．５ｍｌのジメチルホルムアミドおよび８００μＬのジクロロメタン中で溶解した。反応物を周囲温度で３時間攪拌した。反応混合物を、２つの同量の部分において、分取５ｃｍ×２５ｃｍ　Ｃ１８　ＨＰＬＣカラムへの直接注入により精製した。カラムを１００ｍＬ／分で、０．３％ギ酸および５％アセトニトリルを含む脱イオン水で１０分間、続いて５％アセトニトリルから９０％アセトニトリルまでの１５分間の直線勾配を用いて流した（ｒｕｎ）。生成物の画分（保持時間１７．４～１９．２分）を合わせ、真空下でのロータリーエバポレーションにより溶媒を除去すると、２．９ｇ（８３％）の表題化合物が得られた。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.16 (t, J = 5.7, 1H), 8.06 (d, J = 7.4, 1H), 7.99 (t, J = 5.8, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.06 (s, 2H), 4.18 (dd, J = 13.4, 7.9, 1H), 3.70 (d, J = 5.7, 2H), 3.62 (d, J = 5.8, 2H), 3.42 - 3.37 (m, 2H), 2.23 (t, J = 8.0, 2H), 2.12 (dd, J = 8.1, 6.4, 2H), 1.87 (dt, J = 14.2, 7.9, 1H), 1.70 (dt, J = 13.7, 6.8, 2H), 1.38 (s, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 173.12, 171.77, 171.65, 171.03, 170.79, 168.89, 134.43, 79.62, 52.02, 42.14, 41.81, 36.80, 32.29, 31.22, 27.73, 26.95, 24.02. HRMS (M + Na^{+}) 計算値504.2070　実測値504.2053。

【０３２８】

Ｍａｌ－Ｇａｂａ－Ｇｌｕ（ＯＨ）－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－ＮＨ$_2$

【０３２９】

【化６６】



【０３３０】

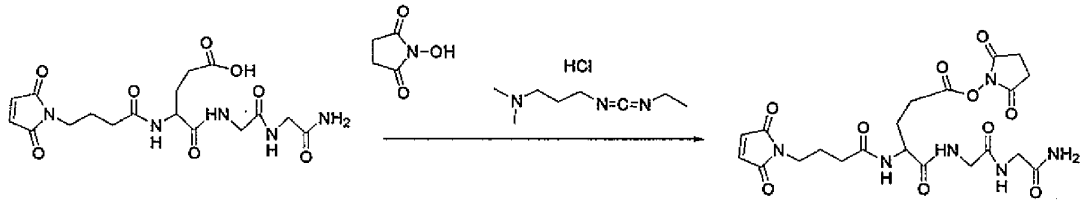
[252] １０５ｍｇ（０．２１８ｍｍｏｌ）のＭａｌ－Ｇａｂａ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－ＮＨ２を、５ｍｌの９５：５トリフルオロ酢酸：脱イオン水中で溶解し、２時間電磁式撹拌した。溶媒をロータリーエバポレーションにより除去し、残留物を６ｍＬアセトニトリル＋１．５ｍＬトルエン中で回収して（ｔａｋｅｎ　ｕｐ）懸濁液を得た。溶媒を懸濁液から真空下でのロータリーエバポレーションにより蒸発させると、９２ｍｇ（１００％）の表題化合物が得られた。^{1}H NMR（400 MHz, DMSO) δ 6.99 (s, 2H), 4.18 (dd, J = 8.2, 5.7, 1H), 3.70 (s, 2H), 3.61 (s, 2H), 3.40 (t, J = 6.8, 2H), 2.26 (t, J = 7.8, 2H), 2.19 - 2.05 (m, 2H), 1.90 (dt, J = 13.7, 7.4, 1H), 1.73 (dt, J = 14.2, 7.5, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 173.76, 171.72, 170.99, 170.70, 168.81, 134.37, 52.00, 41.97, 41.63, 36.75, 32.19, 29.95, 26.79, 23.93。

【０３３１】

Ｍａｌ－Ｇａｂａ－Ｇｌｕ（ＯＮＨＳ）－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－ＮＨ$_2$

【０３３２】

【化６７】



【０３３３】

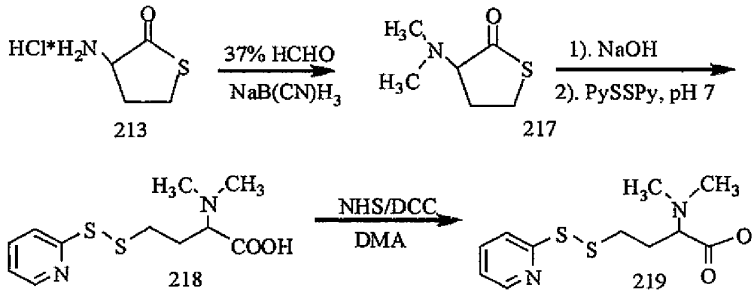
[253] ９４ｍｇ（０．２２ｍｍｏｌ）のＭａｌ－Ｇａｂａ－Ｇｌｕ（ＯＨ）－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－ＮＨ$_2$、７５ｍｇ（０．６５ｍｍｏｌ）のＮ－ヒドロキシスクシンイミドおよび１１０ｍｇ（０．５７ｍｍｏｌ）のＮ－（３－ジメチルアミノプロピル）－Ｎ’－エチルカルボジイミド塩酸塩を、１ｍｌのジメチルホルムアミド中で３時間電磁式撹拌した。粗製の反応混合物を、３つの同量の部分において、１．９ｃｍ×１０ｃｍ　Ｃ８カラムへの直接注入により精製した。カラムを１８ｍＬ／分で、０．３％ギ酸および５％１，４－ジオキサンを含む脱イオン水で３分間、続いて５％１，４－ジオキサンから３０％１，４－ジオキサンまでの１８分間の直線勾配を用いて流した。生成物の画分（保持時間７．３分）をフラスコ中に集め、ドライアイス／アセトン浴中で急速凍結させた。凍結した物質を合わせて凍結乾燥すると、８０ｍｇ（７０％）の表題化合物が得られた。^{1}H NMR（400 MHz, DMSO) δ 8.20 (t, J = 5.4, 1H), 8.13 (d, J = 7.3, 1H), 8.03 (t, J = 5.6, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.01 (s, 2H), 4.29 (dd, J = 13.7, 6.5, 1H), 3.84 - 3.69 (m, 2H), 3.63 (d, J = 5.7, 2H), 3.57 (s, 2H), 3.41 (t, J = 6.8, 2H), 2.81 (s, 3H), 2.78 - 2.69 (m, 2H), 2.15 (dd, J = 9.1, 6.2, 1H), 2.10 - 1.95 (m, 1H), 1.88 (dt, J = 17.0, 7.5, 1H), 1.73 (dd, J = 14.0, 6.9, 2H). HRMS（M + Na$^+$）計算値545.1608　実測値545.1627。

【０３３４】

実施例６．正に荷電したリンカーの合成

【０３３５】

【化６８】



【０３３６】

３－（ジメチルアミノ）ジヒドロチオフェン－２（３Ｈ）－オン（２１７）．

[254] メタノール中の３－アミノジヒドロチオフェン－２（３Ｈ）－オン塩酸塩（２１３）（１．０ｇ，６．５１ｍｍｏｌ）およびホルムアルデヒド（３ｍｌ，４０．３ｍｍｏｌ）に、シアノ水素化ほう素ナトリウム（ｓｏｄｉｕｍ　ｃｙｎｏｂｏｒｏｎｈｙｄｒｉｄｅ）（０．４０９ｇ，６．５１ｍｍｏｌ）を５つの部分で１時間で添加した。２時間撹拌した後、混合物を蒸発させ、ＥｔＡｃ中で再溶解し、１Ｍ　NaH_2PO_4 で洗浄し、$MgSO_4$ で乾燥させ、濾過し、濃縮し、SiO_2 カラムにより、ＭｅＯＨ／ＤＣＭ（１：３０）で溶離して精製すると、０．８１２ｇ（８６％）の表題化合物が得られた。1H NMR ($CDCl_3$) 3.49 (dd, 1H, J = 6.3, 12.1 Hz), 3.24 (m, 2H), 2.42 (s, 6H), 2.38 (m, 1H), 2.21 (m, 1H); 13C NMR 206.58, 73.24, 41.62, 27.47, 25.51; ESI MS m/z+146.0 (M+H), 168.0 (M+Na)。

【０３３７】

２－（ジメチルアミノ）－４－（ピリジン－２－イルジスルファニル）ブタン酸（２１８）．

[255] ３－（ジメチルアミノ）ジヒドロチオフェン－２（３Ｈ）－オン（２１７）（０．９５ｇ，６．５４ｍｍｏｌ）を、１５ｍＬの０．５Ｍ　ＮａＯＨおよび１０ｍｌのメタノール溶液中で３０分間撹拌し、H_3PO_4 でｐＨ７．２に中和し、５０ｍｌのメタノール中の１，２－ジ（ピリジン－２－イル）ジスルファン（５．７６ｇ，２６．２ｍｍｏｌ）を添加した。混合物を一夜撹拌し、濃縮し、ＥｔＡｃで洗浄し、水溶液をＣ－１８カラム上に入れ、０．０１％ギ酸中５％メタノールから０．０１％ギ酸中３０％メタノールまで溶離して表題生成物を得た（３６８ｍｇ，収率２０．６５％）。1H NMR (CDI_3OD) 8.31 (dd, 1H, J = 0.7, 4.7 Hz), 7.77 (m, 2H), 7.15 (dd, 1H, J = 0.8, 5.8 Hz), 3.22 (m, 1H), 2.85 (m, 2H), 2.51 (s, 6H), 2.05 (m, 2H); 13C NMR 175.00, 161.28, 150.46, 139.40, 122.60, 121.49, 71.20, 42.46, 36.29, 29.88; ESI MS m/z+ 272.9 (M+H), 295.0 (M+Na)。

【０３３８】

２，５－ジオキソピロリジン－１－イル　２－（ジメチルアミノ）－４－（ピリジン－２－イルジスルファニル）ブタノエート（２１９）

[256] ２－（ジメチルアミノ）－４－（ピリジン－２－イルジスルファニル）ブタン酸（２１８）（９２ｍｇ，０．３３８ｍｍｏｌ）、１－ヒドロキシピロリジン－２，５－ジオン（６５ｍｇ，０．５６５ｍｍｏｌ）およびＥＤＣ（１８５ｍｇ，０．９６５ｍｍｏｌ）を、３ｍｌのＤＭＡ中で５０℃において一夜撹拌した。混合物を蒸発させ、SiO_2 カラム上で１：１０～１：４のメタノール／CH_2Cl_2 で溶離して精製すると、４３ｍｇ（３５％）の表題生成物が得られた。1H NMR (CDI_3OD) 8.40 (m, 1H), 7.83 (m, 2H), 7.22 (m, 1H), 3.34 (m, 1H), 2.82 (m, 2H), 2.75 (s, 4H), 2.66 (s, 6H), 1.98 (m, 2H); 13C NMR 177.21, 161.78, 161.12, 150.68, 139.37, 122.70, 121.66, 70.80, 44.16

, 43.15, 36.06, 27.38; ESI MS m/z+ 369.2 (M + H)。

【０３３９】

実施例７．ｈｕＭｙ９－６－ＣＸ１－１－ＤＭ１プロ荷電リンカーコンジュゲートの調製：

[257] 次のストック溶液を用いた：ＤＭＡ中３９．６ｍＭ ＤＭ１；（２）ＣＸ１－１リンカーのＤＭＡ中１７．８ｍＭ溶液；（３）２ｍＭ ＥＤＴＡを含む２００ｍＭコハク酸緩衝液、ｐＨ５．０。抗体に対して８、１２または１６の間の当量のリンカーを含む反応混合物を、９０％リン酸緩衝液ｐＨ６．５）／１０％ＤＭＡ中４ｍｇ／ｍｌの抗体の溶液に添加し、２５℃、ｐＨ５．０で２時間反応させ、続いてＤＭ１と反応させた。

【０３４０】

[258] Ａｂコンジュゲートを、過剰な低分子反応物から、ＰＢＳ ｐＨ７．４中で平衡化したＧ２５カラムを用いて分離した。精製されたコンジュゲートを２５℃で２日間保ち、あらゆる不安定な薬物の連結を加水分解させ、次いでそのコンジュゲートを、ＰＢＳ中で一夜、次いで１０ｍＭヒスチジン／１３０ｍＭグリシン緩衝液ｐＨ５．５（１× ｏ／ｎ）中で透析して遊離の薬物からさらに精製した。透析したコンジュゲートを０．２ｕｍフィルターを用いて濾過し、ＵＶ／Ｖｉｓにより分析して、マイタンシノイドおよび抗体に関する２５２および２８０ｎｍにおける既知の吸光係数を用いてＡｂあたりのマイタンシノイドの数を計算した。回収率は約７０％であり、それぞれのコンジュゲートに関して測定されたマイタンシノイド／抗体の数は、用いられたリンカーの過剰度に依存して３．７から６．８までの範囲であった。

【０３４１】

実施例８．インビボでの薬物動態：

[259] ヒト化抗体Ｃ２４２の、^{3}Ｈ標識ＤＭ４との荷電したスルホ－Ｍａｌリンカーコンジュゲート（３．５および６．４ＤＭ４／Ａｂ）の、ＣＤ－１マウスにおける血漿薬物動態を、抗体ＥＬＩＳＡにより、および^{3}Ｈの計数により分析した（図７２）。３．５および６．４Ｄ／Ａを有するＡｂ－スルホ－Ｍａｌ－[^{3}Ｈ]－ＤＭ４コンジュゲートを、それぞれ１２．９および７．９ｍｇ／ｋｇ（抗体の用量）で静脈内投与した。血漿試料の抗体価を（ヤギ抗ｈｕＩｇＧ抗体を用いた捕捉およびロバ抗ｈｕＩｇＧ抗体－ホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲートを用いた検出に基づく）ＥＬＩＳＡにより、および^{3}Ｈの計数（シンチレーション計数）により測定した。図７２Ａは、ＥＬＩＳＡによる、および^{3}Ｈの計数による、コンジュゲート濃度のこれら２種類の測定が、それぞれのコンジュゲートに関して類似の値を示したことを示している。３．５および６．４Ｄ／Ａの抗体－スルホ－Ｍａｌ－ＤＭ４コンジュゲートは両方とも４週間にわたって優れた血漿安定性を示し、半減期はそれぞれおおよそ１４．９日および９．７日であり、それはコンジュゲートしていない抗体に関するおおよそ１１．８日の半減期に類似している。２種類のＡｂ－スルホ－Ｍａｌ－ＤＭ４コンジュゲートのＤＭ４／Ａｂ比（最初は３．５および６．４Ｄ／Ａ）も、血漿循環中での４週間にわたって、重要なことに比較的高い６．４Ｄ／Ａのロードにおいてさえも安定であった（図７２Ｂ）。１２ｍｇ／ｋｇで投与された、類似した４．２Ｄ／Ａのロードを有する、ＳＭＣＣで連結されたｈｕＣ２４２ Ａｂ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１コンジュゲートに関する半減期の１２．６日（ＡＵＣ＝２５９１０時間μｇ／ｍＬ）と比較して、１２．９ｍｇ／ｋｇで投与された、３．５Ｄ／Ａのロードを有する、スルホ－Ｍａｌで連結されたｈｕＣ２４２ Ａｂ－スルホ－Ｍａｌ－ＤＭ４コンジュゲートの半減期は１４．９日（ＡＵＣ＝３８４４９時間μｇ／ｍＬ）であり、このようにＳＭＣＣコンジュゲートのそれを超えて大きく向上した（図３８Ｂ）。

【０３４２】

表１．Ｎ９０１抗体のＤＭ１とのコンジュゲーションにおけるＳＳＮＰＰおよびＳＰＰリンカーの比較。コンジュゲーションは、示したｐＨにおいてリンカーあたり１．７倍モル過剰のＤＭ１を用いて２時間実施した。

【０３４３】

【表３】

リンカー	pH	リンカー/Ab	DM1/Ab	%効率	% 遊離の薬物	SEC 分析			
						単量体	二量体	三量体	HMW
SSNPP	7.4	4.1	3.8	93	0.8	91.9	6.3	0.6	0.1
SPP	7.4	5.6	4.3	77	1.8	93.6	4.9	0.4	0.2
SSNPP	6.5	4.0	3.7	93	0.9	-	-	-	-
SPP	6.5	6.6	4.6	70	1.9	-	-	-	-

【０３４４】
表２．ＳＳＮＰＰをリンカーとして用いて低減された、目標のＤＭ１対抗体比に達するのに必要なリンカー対抗体比。コンジュゲーションは、ｐＨ７．４においてリンカーあたり１．１倍モル過剰のＤＭ１を用いて２時間実施した。
【０３４５】
【表４】

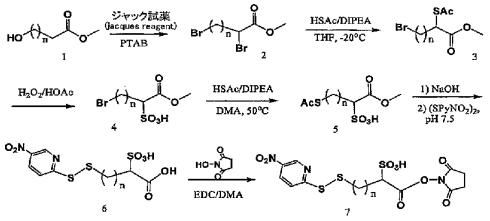
リンカー	リンカー/Ab	DM1/Ab
SSNPP	4.2	4.3
SPP	5.6	4.3

【０３４６】
表３．Ｎ９０１抗体のＤＣ４とのコンジュゲーションにおける、ＳＳＮＰＰおよびＳＰＰリンカーの比較。コンジュゲーションは、ｐＨ７．４においてリンカーあたり１．４倍モル過剰のＤＣ４を用いて示した時間実施した。
【０３４７】
【表５】

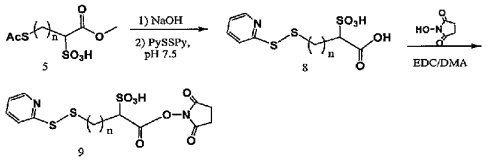
リンカー	時間, h	リンカー/Ab	DC4/Ab	% 効率
SSNPP	2	4.2	4.3	102
SSNPP	18	4.2	4.1	98
SPP	2	5.6	4.1	73
SPP	18	5.6	5.1	91

OnCusp
Ex. 1002

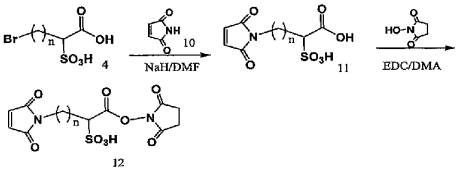
【図１】



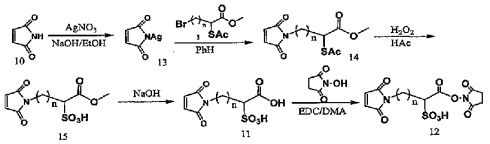
【図２】



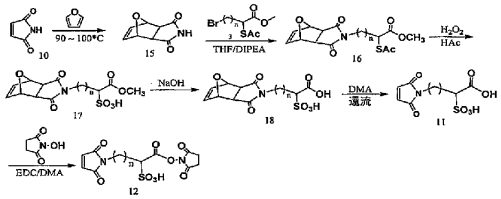
【図３】



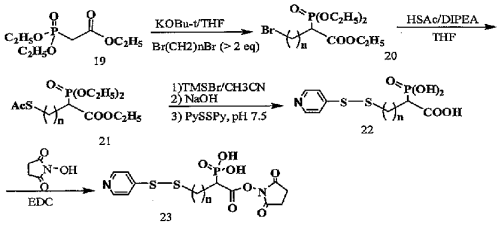
【図４】



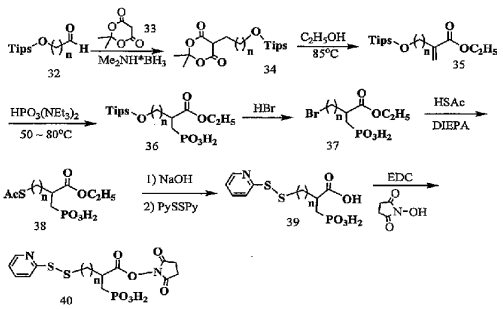
【図５】



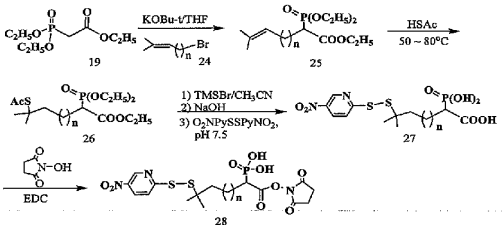
【図６】



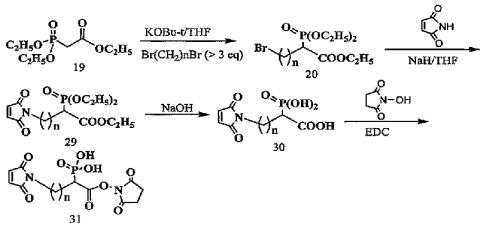
【図７】



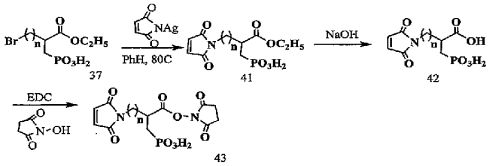
【図８】



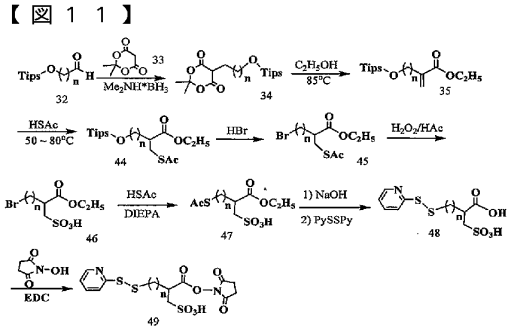
【図９】



【図１０】

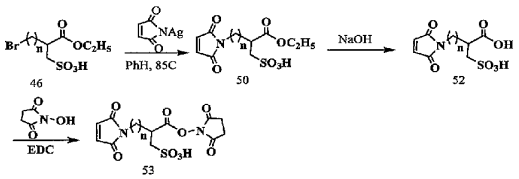


【図１１】

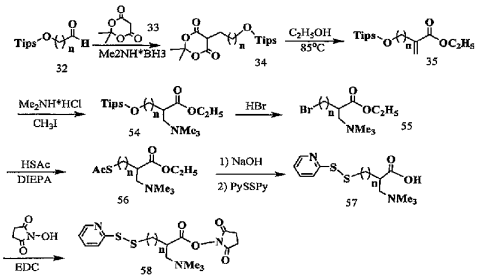


OnCusp
Ex. 1002

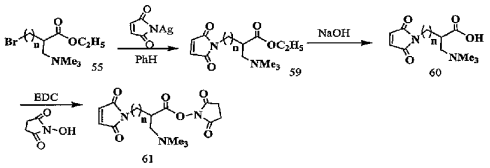
【図１２】



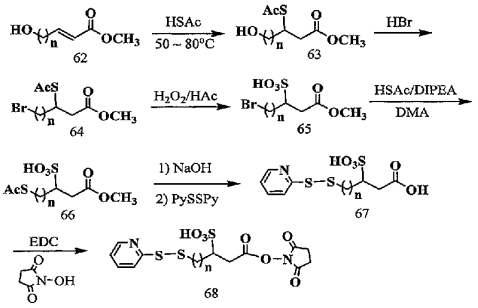
【図１３】



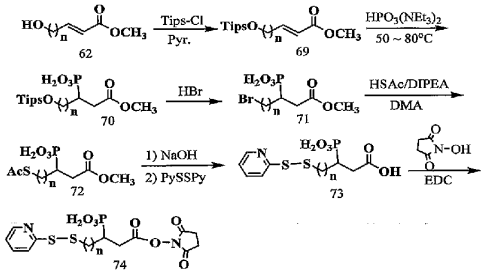
【図１４】



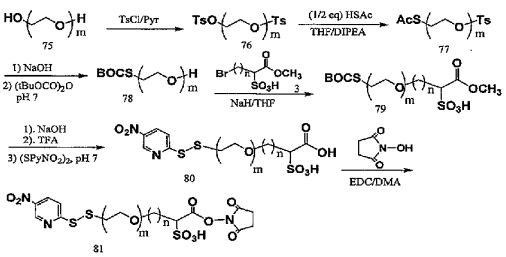
【図１５】



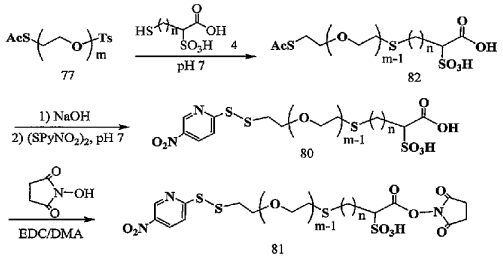
【図１６】



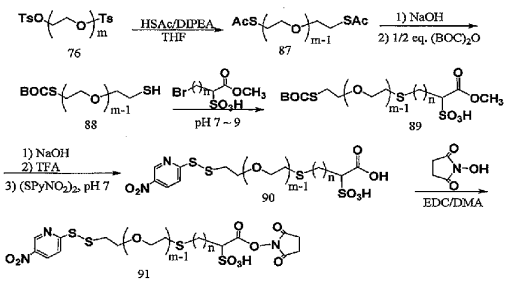
【図１７】



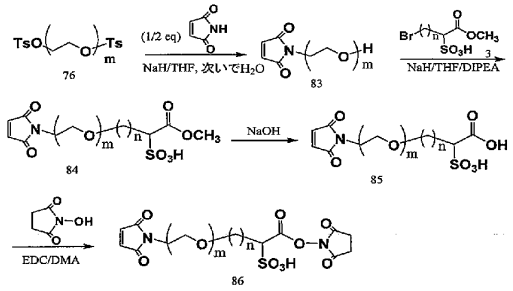
【図１８】



【図１９】

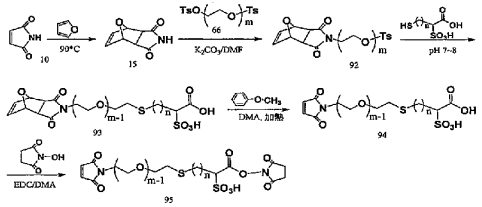


【図２０】

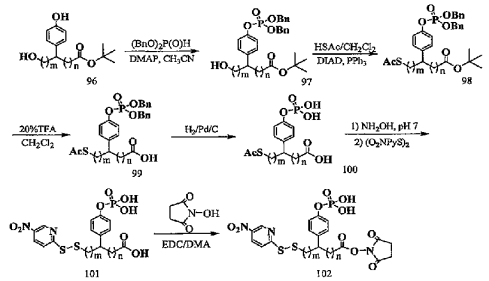


OnCusp
Ex. 1002

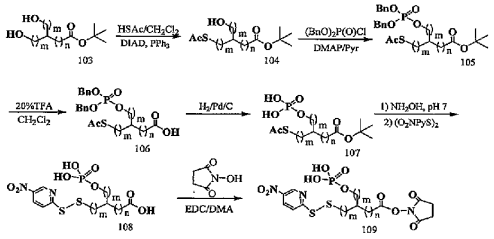
【図２１】



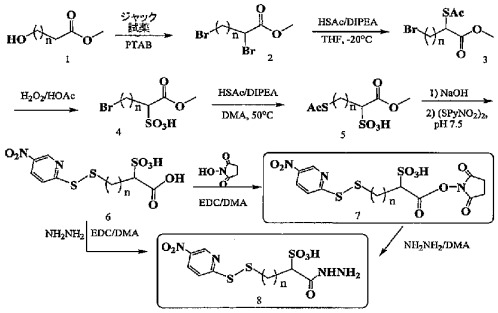
【図２２】



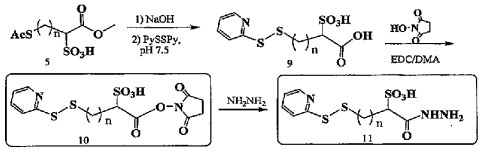
【図２３】



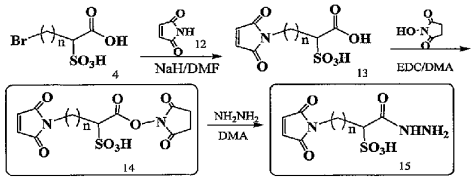
【図２４】



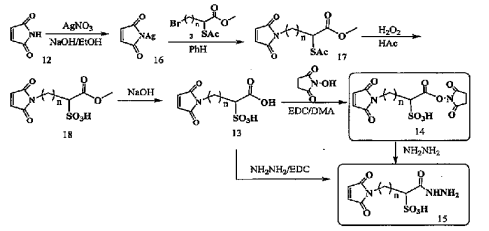
【図２５】



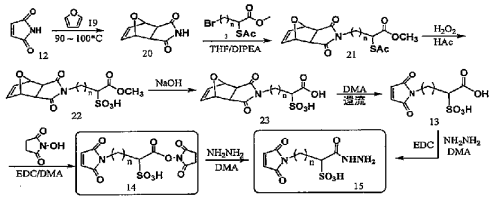
【図２６】



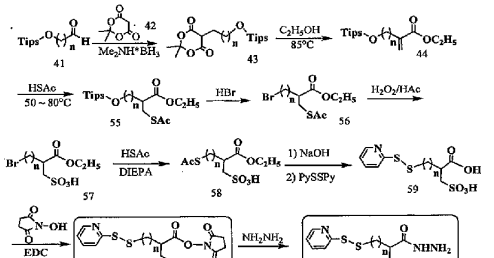
【図２７】



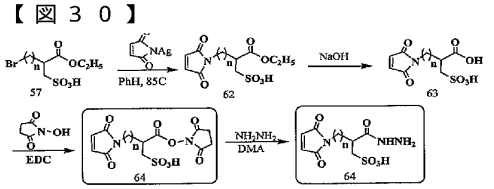
【図２８】



【図２９】

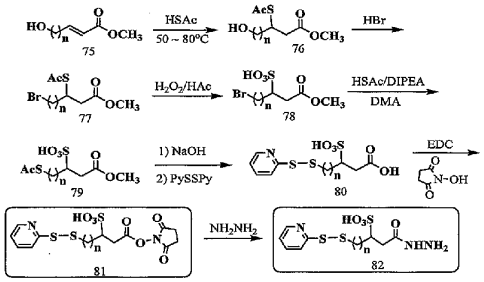


【図３０】

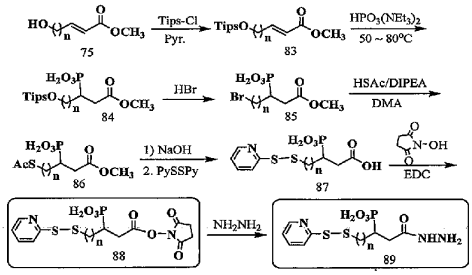


OnCusp
Ex. 1002

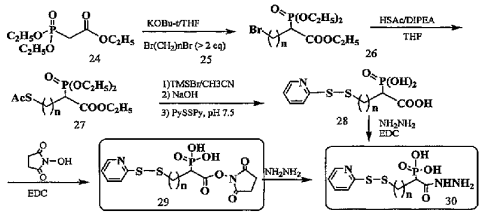
【図３１】



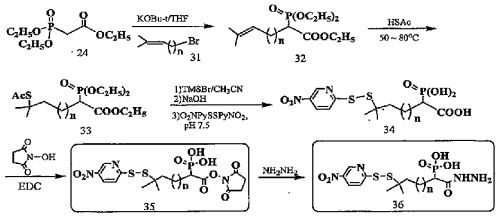
【図３２】



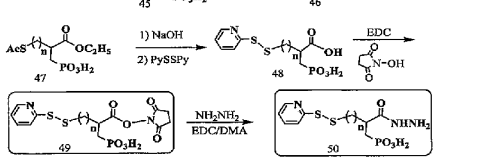
【図３３】



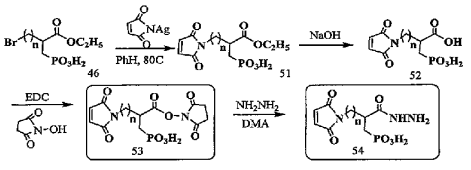
【図３４】



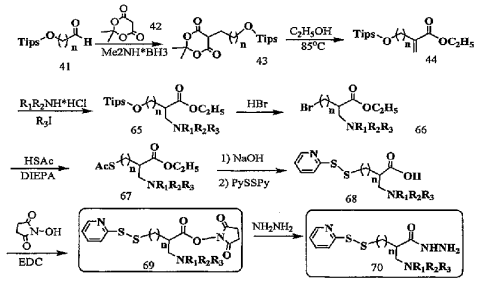
【図３５】



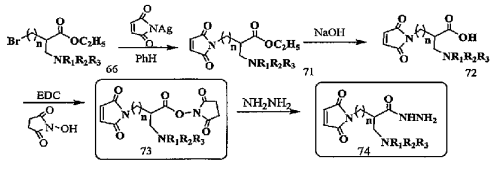
【図３６】



【図３７】

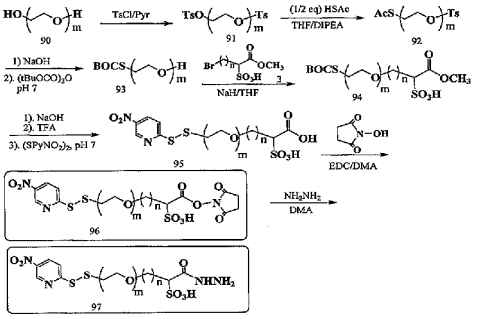


【図３８】

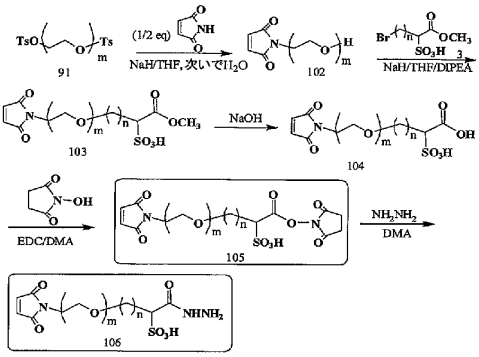


OnCusp
Ex. 1002

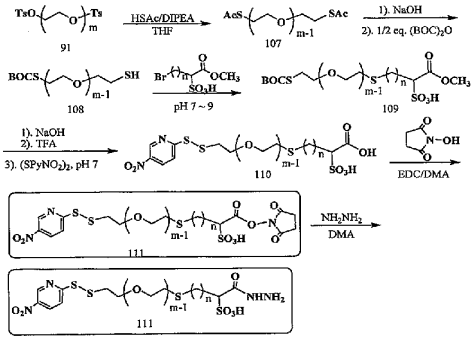
【図３９】



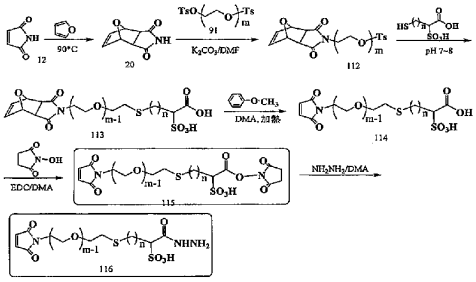
【図４０】



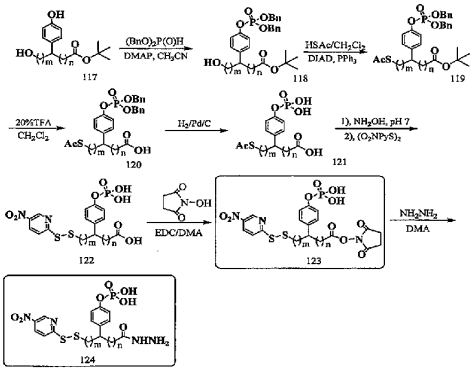
【図４１】



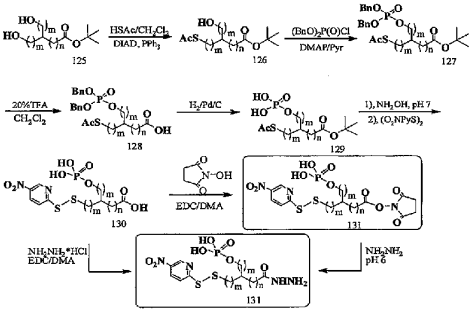
【図４２】



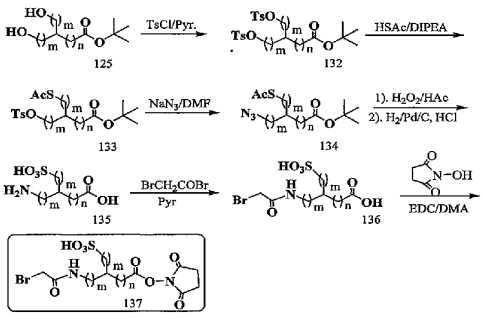
【図４３】



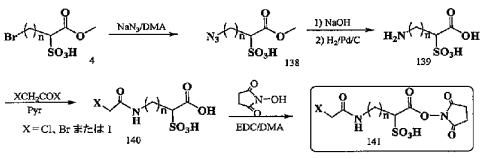
【図４４】



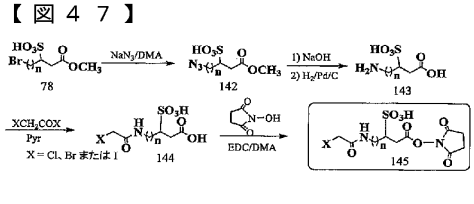
【図４５】



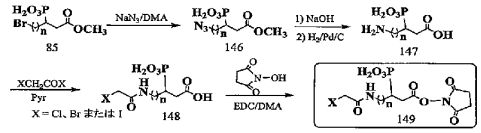
【図４６】



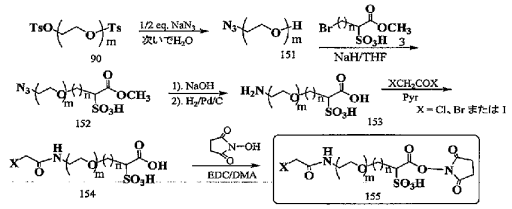
【図４７】



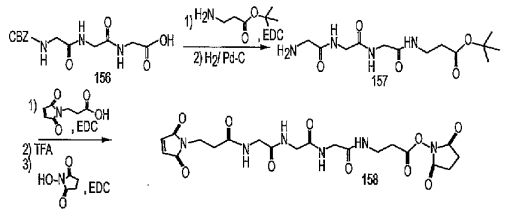
【図４８】



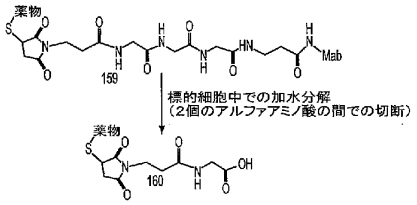
【図４９】



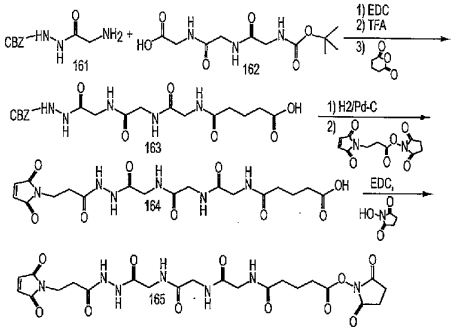
【図５０】



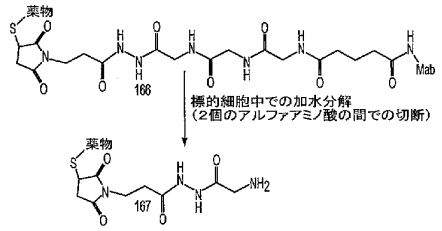
【図５１】



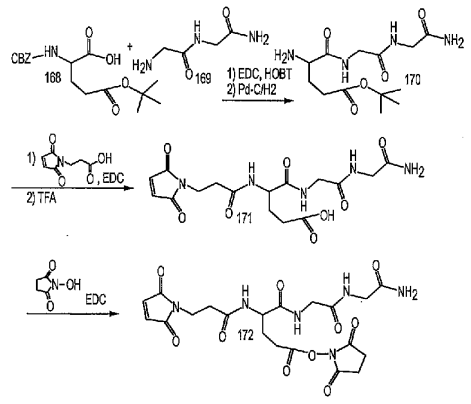
【図５２】



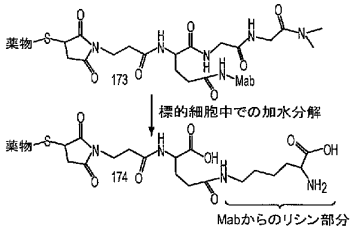
【図５３】



【図５４】

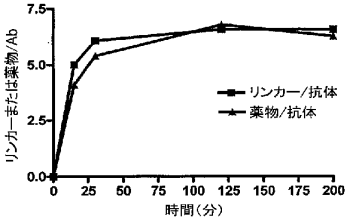


【図５５】



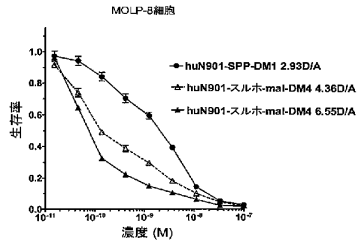
【図５６】

スルホネートリンカーを有するC242-DM4



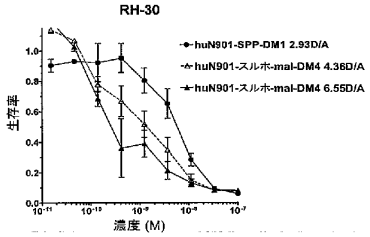
【図５７Ａ】

抗CD56(huN901)抗体－マイタンシノイドコンジュゲートの細胞毒性



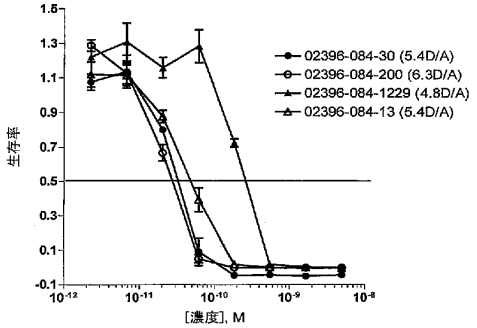
【図５７Ｂ】

抗CD56(huN901)抗体－マイタンシノイドコンジュゲートの細胞毒性

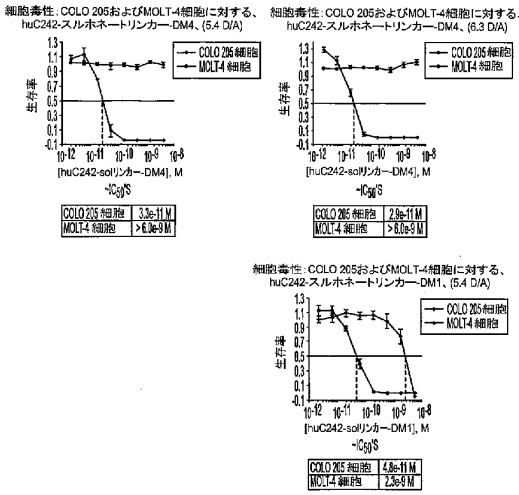


【図５７Ｃ】

抗CD56(huN901)抗体－マイタンシノイドコンジュゲートの細胞毒性

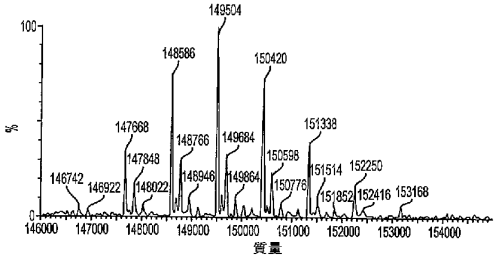


【図５８】



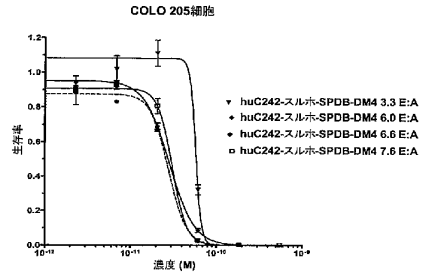
【図５９】

huC242-スルホネートリンカー-DM1コンジュゲートの質量スペクトル分析



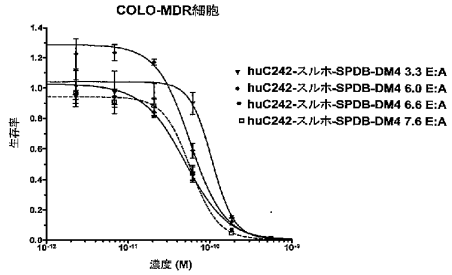
【図６０】

抗CanAg(huC242)-スルホネートリンカー－マイタンシノイドコンジュゲートの、
マイタンシノイドのロード(E:A)の増大に伴う、COLO205細胞に対する細胞毒性。



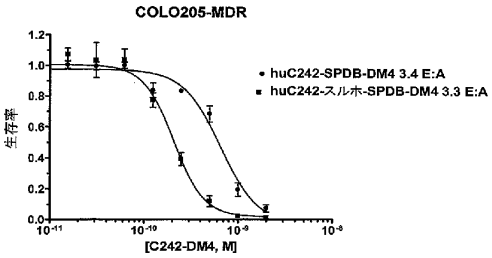
【図６１】

抗CanAg(huC242)-スルホネートリンカー-マイタンシノイドコンジュゲートの、マイタンシノイドのロード(E:A)の増大に伴う、多剤耐性COLO205-MDR細胞に対する細胞毒性。



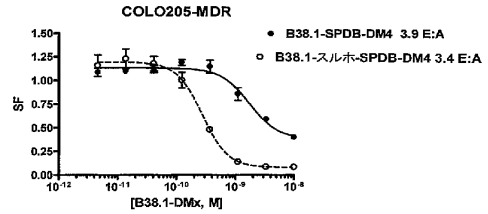
【図６２】

スルホネートリンカーを有する、または有しない抗CanAg(huC242)-マイタンシノイドコンジュゲートの、多剤耐性COLO205-MDR細胞に対する細胞毒性。



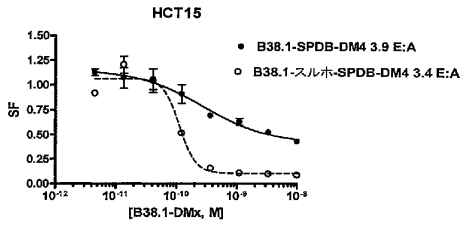
【図６３】

スルホネートリンカーを有する、または有しない抗EpCAM(B38.1)-マイタンシノイドコンジュゲートの、多剤耐性COLO205-MDR細胞に対する細胞毒性。



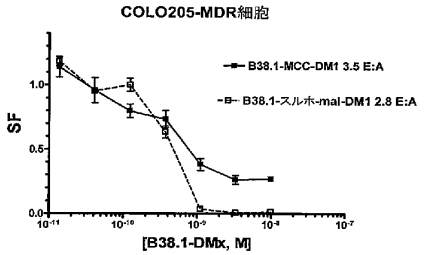
【図６４】

スルホネートリンカーを有する、または有しない抗EpCAM(B38.1)-マイタンシノイドコンジュゲートの、多剤耐性HCT15細胞に対する細胞毒性。



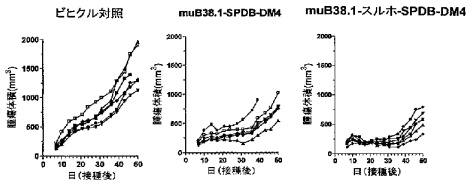
【図６５】

スルホネートリンカーを有する、または有しない抗EpCAM(B38.1)-マイタンシノイドコンジュゲートの、多剤耐性COLO205-MDR細胞に対する細胞毒性。

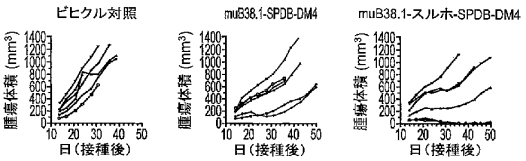


【図６６】

抗EpCAM抗体-マイタンシノイドコンジュゲートのCOLO205 mdr異種移植片(別個の腫瘍)に対するインビボでの抗腫瘍活性

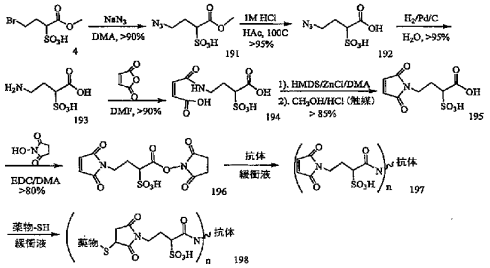


【図６７】

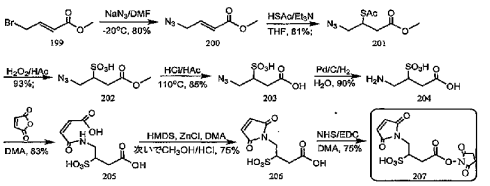


OnCusp
Ex. 1002

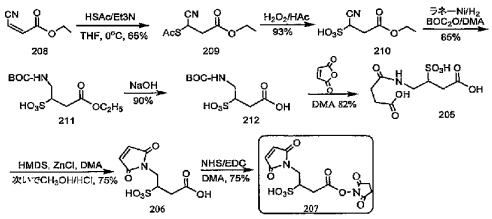
【図６８】



【図６９】

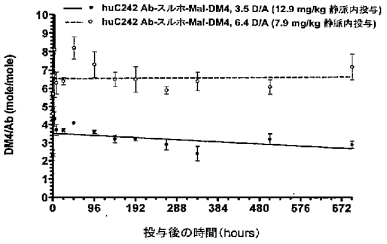


【図７０】

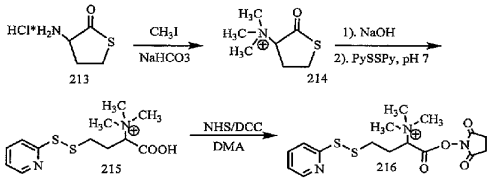


【図７２Ｂ】

FIGURE 72 (B)



【図７１】



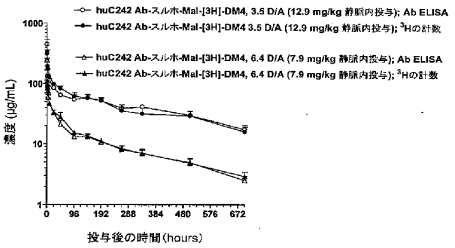
【図７２Ａ】

図72(A)および(B). CD-1マウスにおいてそれぞれ12.9mg/kgおよび7.9mg/kg (静脈内)で投与された、3.5DM4/Abまたは6.4DM4/Abを有するhuC242抗体-スルホ-Mal-[3H標識]-DM4コンジュゲートの血漿薬物動態。

A. Ab濃度(ELISAにより、または3Hの計数により測定した)対投与後の時間。

B. マイタンシノイド(DM4)/抗体(Ab)比対投与後の時間。

FIGURE 72(A)



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/42267

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C07K 17/00, 17/14 (2009.01)
USPC - 530/391.1
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)
USPC- 530/391.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC- 424/178.1; 424/181.1; 435/7.23; 514/8 (see keywords below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WEST: DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; Google: Scholar/patents: charged crosslinkers drug conjugates

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHARI et al . Targeted delivery of chemotherapeutics: tumor-activated prodrug therapy. Advanced Drug Delivery Reviews, 1998, Vol 31, pp 89-104, esp. pg 90, col 2, para 2-3; pg 92, col 2, para 2; pg 93, Fig 3;pg 94, Fig 4, Compound 1; pg 95, col 1, para 1; pg 97, col 2, para 3; pg 98, Fig 6; pg 98, col 1 and col 2	1-16
Y	US 5,219,564 A (ZALIPSKY et al.) 15 June 1993 (15.06.1993) col 2, ln 34-37; col 2, ln 65-68; col 3, ln 1-18	1-16
Y	US 2006/0233814 A1 (GOLDMAKHER et al.) 19 October 2006 (19.10.2006) para [0062], [0064], [0144]; pg 24, Claims 46-47, 50-51	6-11

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

* 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
09 June 2009 (09.06.2009)	17 JUN 2009
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード（参考）
	C07D 401/12	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(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,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,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,IS,JP,KE,KG,KM,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,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100128750
弁理士 廣瀬 しのぶ
(72)発明者 チャリ，ラビ・ヴイ・ジェイ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４６１，ニュートン，ウィンチェスター・ストリート １７４
(72)発明者 チャオ，ロバート・ヨンシン
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４２０，レキシントン，ドナルド・ストリート ３
(72)発明者 コヴトゥン，エレーナ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０１７７５，ストウ，エレイン・ストリート ７
(72)発明者 シン，ラジーヴァ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０１７０１，フレーミングハム，レーンウッド・アベニュー ４０
(72)発明者 ウィディソン，ウェイン・チャールズ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４７８，ベルモント，ホールデン・ロード ７

Fターム(参考) 4C063 AA01 BB07 CC12 DD04 EE05
4C076 AA95 CC42 EE59N FF34
4C085 AA13 AA14 AA16 AA22 AA23
4H045 AA11 DA75 EA20

(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2011-524001
(P2011-524001A)

(43)公表日　平成23年8月25日(2011.8.25)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/531	(2006.01)	G01N	33/531	A	2G041
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D	2G045
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	U	4C085
G01N 30/06	(2006.01)	G01N	30/06	E	
G01N 30/88	(2006.01)	G01N	30/88	101M	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 53 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-509610 (P2011-509610)
(86)(22)出願日　平成21年5月12日 (2009.5.12)
(85)翻訳文提出日　平成23年1月17日 (2011.1.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2009/043560
(87)国際公開番号　WO2009/140242
(87)国際公開日　平成21年11月19日 (2009.11.19)
(31)優先権主張番号　61/052,727
(32)優先日　平成20年5月13日 (2008.5.13)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　509012625
ジェネンテック，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　サウス　サンフランシスコ　ディーエヌエー　ウェイ　1
(74)代理人　100109726
弁理士　園田　吉隆
(74)代理人　100101199
弁理士　小林　義教
(72)発明者　カウル，　シュリンダー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４５４９，　ラファイエット，　スウィート　ドライブ　３３８６

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ビーズに基づく親和性キャプチャおよび質量分析による抗体薬剤コンジュゲートの分析

(57)【要約】
抗体コンジュゲートである式Ｉ：Ａｂ-（Ｌ- Ｄ）ｐの抗体- 薬剤コンジュゲート（このときＡｂが抗体であり、Ｄが薬剤部分であり、Ｌが共有結合的にＡｂに付着し、共有結合的にＤに付着したリンカーであり、そして、ｐが１、２、３、４、５、６、７又は８である）及びその断片及び代謝産物を投与した後に、免疫親和性ビーズ分離、クロマトグラフィおよび質量分析によって、生物学的試料を検出し、特徴付けし、定量化するための方法が、開示される。

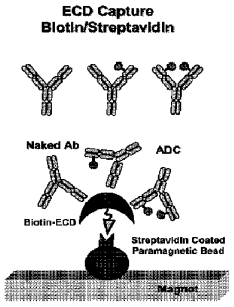


Figure 1a

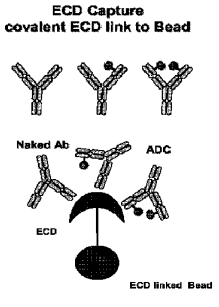


Figure 1b

【特許請求の範囲】
【請求項１】
(ｉ) 以下の式Ｉを有する抗体－薬剤コンジュゲート化合物を提供すること：
Ａｂ－（Ｌ－Ｄ）ｐ　　Ｉ
このとき、
Ａｂが抗体であり、
Ｄはメイタンシノイド又はモノメチルアウリスタチン薬剤部分であり、
Ｌは、共有結合でＡｂに付着し、共有結合でＤに付着したリンカーであり、そして、
ｐは、１、２、３、４、５、６、７又は８であり；
(ｉｉ) 抗体－薬剤コンジュゲート化合物と、場合によってｐが０である式Ｉｐの抗体又はその抗体断片ないし代謝産物を、哺乳動物、組織、細胞培養物、血漿又は血清から選択される生物学的な供給源と接触させること；
(ｉｉｉ) 生物学的な供給源から生体試料を採取すること；
(ｉｖ)処方し、固定し、遠心し、単離し、消化し、血液細胞凝集を誘導ないし予防し、加水分解し、又は精製することによって分析試料を生成するために生物学的試料を処理し、処理済みの分析試料を生成すること；
(ｖ) 処理済みの分析試料に特異的な抗原を含む親和性成熟ビーズにて処理した分析試料を捕獲すること；
(ｖｉ) 処理した分析試料を溶出すること；
(ｖｉｉ)分離培地に溶出した分析試料を置き、１より多くの試料成分を分離すること、このとき分離した試料成分は式Ｉを有する抗体－薬剤コンジュゲート化合物又はその抗体断片ないし代謝物を含み、ｐは０、１、２、３、４、５、６、７又は８である；そして、
(ｖｉｉｉ)一又は複数の分離した試料成分の質量電荷比を質量分析によって確認すること
を含む、抗体－薬剤コンジュゲート化合物の検出方法。
【請求項２】
さらに、(ｉｉｉ)から(ｖｉｉｉ)の工程を１回又は複数回繰り返すことを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
生物学的試料が血液であり、この血液が処理されて血漿又は血清を形成する、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
分析試料が変性している、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
分析試料がホルムアミド、ジメチルホルムアミドおよびアセトニトリルから選択される変性試薬によって変性される、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
分析試料が還元剤で処理される、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
還元剤がＤＴＴ又はＴＣＥＰである、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
抗原が標的レセプタータンパク質の細胞外ドメイン(ＥＣＤ)である、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
ＥＣＤがビオチン化されている、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
ビオチン化されたＥＣＤがストレプトアビジンコート常磁性免疫親和性ビーズに結合する、請求項８に記載の方法。
【請求項１１】
抗原が抗薬剤抗体である、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】

免疫親和性ビーズが磁気ビーズである、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
免疫親和性ビーズが多孔質ポリマーモノリスを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１４】
免疫親和性ビーズが、回収貯蔵部を有する流体連結内の流入チャネルに設置される、請求項１に記載の方法。
【請求項１５】
免疫親和性ビーズが流入管に設置され、このとき、生物源からの試料が一端又は開口部に導入され、試料が他端又は開口部から溶出される、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
免疫親和性ビーズが、それぞれ別々の回収貯蔵部に連結した複数の流入管に分配されている、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
管および貯蔵部が１２×８の段と列の９６マイクロタイターウェル様式、又は２４×１６の段と列の３８４マイクロタイターウェル様式に設置されている、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
さらに、分析試料を脱グリコシル化試薬で処理する工程を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１９】
脱グリコシル化試薬がＰＮＧａｓｅＦである、請求項１に記載の方法。
【請求項２０】
分離培地がクロマトグラフィ支持体である、請求項１に記載の方法。
【請求項２１】
クロマトグラフィ支持体が逆相吸着剤である、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
逆相がポリスチレン、又はポリスチレンのグラフトないしコポリマーである、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
クロマトグラフィ支持体からの溶出物が質量分析によって間欠的に分析され、１より多くの質量電荷比の被分離清浄成分を得る、請求項２１に記載の方法。
【請求項２４】
試料成分が重鎖又は軽鎖の抗体断片を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２５】
重鎖又は軽鎖の抗体断片がさらに一又は複数の薬剤部分を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２６】
式Ｉ有する抗体－薬剤コンジュゲート化合物又はその抗体断片ないし代謝産物が、生物源の腫瘍関連抗原又は細胞表面レセプターに結合する、請求項１に記載の方法。
【請求項２７】
抗体－薬剤コンジュゲート化合物の抗体が、以下の(1)から(36)から選択される一又は複数の腫瘍関連抗原又は細胞表面レセプターに結合する、請求項２６に記載の方法：
(1) ＢＭＰＲ１Ｂ(骨形成タンパク質レセプター－タイプＩＢ)；
(2) Ｅ１６(ＬＡＴ１、ＳＬＣ７Ａ５)；
(3) ＳＴＥＡＰ１(前立腺の６回膜貫通上皮抗原)；
(4) ０７７２Ｐ(ＣＡ１２５、ＭＵＣ１６)；
(5) ＭＰＦ(ＭＰＦ、ＭＳＬＮ、ＳＭＲ、巨核球増強因子、メソテリン)；
(6) Ｎａｐｉ３ｂ(ＮＡＰＩ-３Ｂ、ＮＰＴＩＩｂ、ＳＬＣ３４Ａ２、溶質担体ファミリ３４(リン酸ナトリウム)、メンバー２、タイプＩＩナトリウム依存性リン酸輸送体３ｂ)；
(7) Ｓｅｍａ５ｂ(ＦＬＪ１０３７２、ＫＩＡＡ１４４５、Ｍｍ.４２０１５、ＳＥＭＡ５

Ｂ、ＳＥＭＡＧ、セマフォリン５ｂ　Ｈｌｏｇ、ｓｅｍａドメイン、７回トロンボスポンジンリピート(タイプ１およびタイプ１様)、膜貫通ドメイン(ＴＭ)および短い細胞質ドメイン、(セマフォリン)５Ｂ)；
(8) ＰＳＣＡ　ｈｌｇ(２７０００５０Ｃ１２Ｒｉｋ、Ｃ５３０００８Ｏ１６Ｒｉｋ、ＲＩＫＥＮ　ｃＤＮＡ　２７０００５０Ｃ１２、ＲＩＫＥＮ　ｃＤＮＡ　２７０００５０Ｃ１２遺伝子)；
(9) ＥｔＢｒ(エンドセリンＢ型レセプター)；
(10) ＭＳＧ７８３(ＲＮＦ１２４、仮定タンパク質ＦＬＪ２０３１５)；
(11) ＳＴＥＡＰ２(ＨＧＮＣ＿８６３９、ＩＰＣＡ-１、ＰＣＡＮＡＰ１、ＳＴＡＭＰ１、ＳＴＥＡＰ２、ＳＴＭＰ、前立腺癌関連遺伝子１、前立腺癌関連タンパク質１、前立腺２の６回膜貫通上皮抗原、６回膜貫通前立腺タンパク質)；
(12) ＴｒｐＭ４(ＢＲ２２４５０、ＦＬＪ２００４１、ＴＲＰＭ４、ＴＲＰＭ４Ｂ、一過性レセプター電位陽イオンチャネル、サブファミリＭ、メンバー４)；
(13) ＣＲＩＰＴＯ(ＣＲ、ＣＲ１、ＣＲＧＦ、ＣＲＩＰＴＯ、ＴＤＧＦ１、テラトカルシノーマ由来の増殖因子)；
(14) ＣＤ２１(ＣＲ２(補体レセプター２)又はＣ３ＤＲ(Ｃ３ｄ／エプスタイン・バーウイルスレセプター)又はＨｓ．７３７９２　Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号Ｍ２６００４)；
(15) ＣＤ７９ｂ(ＣＤ７９Ｂ、ＣＤ７９、ＩＧｂ(免疫グロブリン関連β)、Ｂ２９)；
(16) ＦｃＲＨ２(ＩＦＧＰ４、ＩＲＴＡ４、ＳＰＡＰ１Ａ(ホスファターゼアンカータンパク質１ａを含むＳＨ２ドメイン)、ＳＰＡＰ１Ｂ、ＳＰＡＰ１Ｃ)；
(17) ＨＥＲ２；
(18) ＮＣＡ；
(19) ＭＤＰ；
(20) ＩＬ２０Ｒ；
(21) ブレビカン；
(22) Ｅｐｈｂ２Ｒ；
(23) ＡＳＬＧ６５９；
(24) ＰＳＣＡ；
(25) ＧＥＤＡ；
(26) ＢＡＦＦ-Ｒ(Ｂ細胞活性化因子レセプター、ＢＬｙＳレセプター３、ＢＲ３)；
(27) ＣＤ２２(Ｂ細胞レセプターＣＤ２２-Ｂアイソフォーム)；
(28) ＣＤ７９ａ(ＣＤ７９Ａ、ＣＤ７９、免疫グロブリン関連α)；
(29) ＣＸＣＲ５(バーキットリンパ腫レセプター１)；
(30) ＨＬＡ-ＤＯＢ(ＭＨＣクラスＩＩ分子(Ｉａ抗原)のβ サブユニット；
(31) Ｐ２Ｘ５(プリンレセプターＰ２Ｘリガンドゲートイオンチャネル５)；
(32) ＣＤ７２(Ｂ細胞分化抗原ＣＤ７２、Ｌｙｂ-２)；
(33) ＬＹ６４(Ｌｙｔ抗原６４(ＲＰ１０５))；
(34) ＦＣＲＨ１(Ｆｃレセプター様タンパク質１)；
(35) ＩＲＴＡ２(免疫グロブリンスーパーファミリレセプター転座関連２)；及び、
(36) ＴＥＮＢ２(推定膜貫通プロテオグリカン、増殖因子のＥＧＦ／ヘレグリンファミリおよびフォリスタチンに関連)。

【請求項２８】
抗体－薬剤コンジュゲート化合物が０．１～１０ｍｇ／ｋｇ体重の用量で哺乳動物に投与される、請求項１に記載の方法。

【請求項２９】
ＬがＡｂのアミノ、カルボキシル又はチオールに共有結合的に付着している、請求項１に記載の方法。

【請求項３０】
Ｌが、Ｎ-スクシンイミジル-４(２-ピリジルチオ)プロパノエート(ＳＰＤＰ)、Ｎ-スクシンイミジル-４-(Ｎ-マレイミドメチル)シクロヘキサン-１-カルボキシレート(ＳＭＣＣ

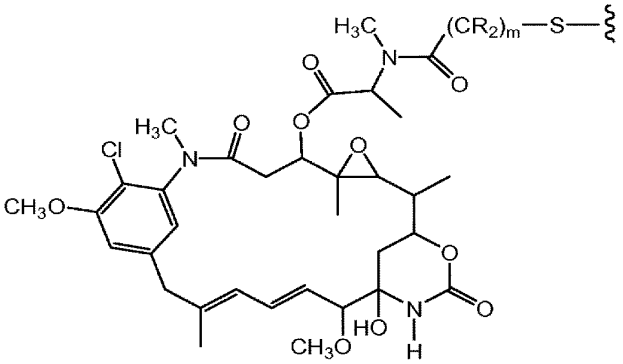
)及びN-スクシンイミジル-４-(２-ピリジルチオ)ペンタノエート(ＳＰＰ)から選択されるリンカー試薬から形成される、請求項１に記載の方法。

【請求項３１】

Ｌが、マレイミドカプロイル(ＭＣ)、マレイミドプロパノイル(ＭＰ)、およびマレイミドカプロイル－バリン－シトルリン－パラ－アミノベンジルオキシカルボニル(ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ)から選択される、請求項１に記載の方法。

【請求項３２】

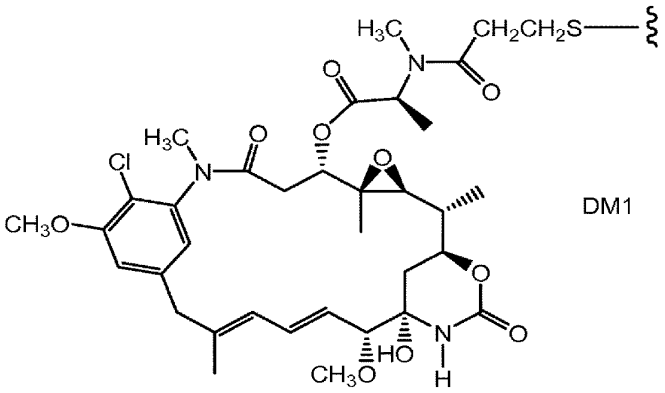
Ｄが以下の構造：



を有するメイタンシノイドであり、このとき波線が抗体薬剤コンジュゲートのリンカー(Ｌ)へのＤの硫黄原子の共有結合を示し、そして、ＲがＨおよびＣ１－Ｃ６アルキルからそれぞれ選択されるものである、請求項１に記載の方法。

【請求項３３】

Ｄが以下の構造を有するＤＭ１である、請求項３２に記載の方法。



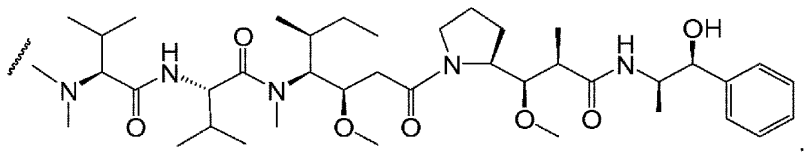
DM1

【請求項３４】

Ｄがモノメチルアウリスタチンである、請求項１に記載の方法。

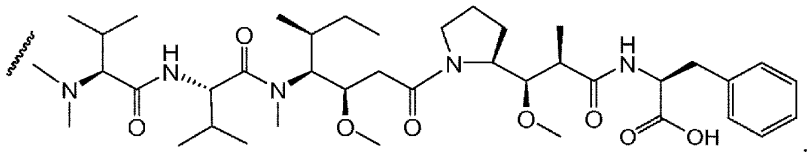
【請求項３５】

Ｄが以下の構造を有するＭＭＡＥである、請求項３４に記載の方法。



【請求項３６】

Ｄが以下の構造を有するＭＭＡＦである、請求項３４に記載の方法。



【請求項３７】
(ｉ) 以下の式Ｉを有する抗体－薬剤コンジュゲート化合物の混合物を提供すること、
Ａｂ－（Ｌ－Ｄ）ｐ　　Ｉ
このとき、
Ａｂが抗体であり、
Ｄがメイタンシノイド又はモノメチルアウリスタチン薬剤部分であり、
Ｌが、Ａｂに共有結合的に付着し、Ｄに共有結合的に付着したリンカーであり、
ｐが１、２、３、４、５、６、７又は８であり、そして、場合によって該混合物が、ｐが０である抗体又はその断片ないし代謝産物を含んでおり；
(ｉｉ) 哺乳動物に該混合物を投与すること；
(ｉｉｉ) 該混合物が投与された哺乳動物から血液試料又は排出物を採取すること；
(ｉｖ) 処方し、固定し、遠心し、単離し、消化し、血液細胞凝集を誘導ないし予防し、加水分解し、又は精製することによって分析試料を生成するために血液試料又は排出物を処理し、処理済みの分析試料を生成すること；
(ｖ) 処理済みの分析試料に特異的な抗原を含む免疫親和性ビーズにて処理済みの分析試料を捕獲すること；
(ｖｉ) 処理済みの分析試料を溶出すること；
(ｖｉｉ) 分離培地に血液試料、排出物又は分析試料を置き、１より多くの試料成分を分離すること、このとき分離した試料成分は式Ｉを有する抗体－薬剤コンジュゲート化合物又はその抗体断片ないし代謝物を含み、ｐは０、１、２、３、４、５、６、７又は８であり；そして、
(ｖｉｉｉ) 一又は複数の分離した試料成分の質量電荷比を質量分析によって確認すること
を含む、哺乳動物において、抗体－薬剤コンジュゲート化合物の混合物をスクリーニングして、化合物又はその断片ないし代謝物のクリアランスを決定する方法。
【請求項３８】
さらに、(ｉｉｉ)から(ｖｉｉｉ)の工程を１回又は複数回繰り返すことを含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
さらに、質量分析を実行する前に、分離した試料成分を変性剤と接触させることを含む、請求項３７に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願の説明）
米国特許法規則１．５３(ｂ)に基づき出願した非仮出願は、米国特許法１１９(ｅ)に基づき、２００８年５月１３日に出願の仮出願第６１／０５２７２７号の優先権を主張し、出典明記によりその内容全体を援用するものである。
【０００２】
（発明の分野）
本発明は概して、抗体－薬剤コンジュゲートやその断片および代謝産物を含む抗体コンジュゲート化合物を、質量分析によって、捕獲し、検出し、分析し、スクリーニングし、特徴付けし、定量化するための方法に関する。また、本発明は、薬物動態学研究および毒物動態学研究のために質量分析用試料を調製するための方法にも関する。
【背景技術】

【０００３】
抗体－薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)は、非特異的な毒性を低減し、従来の小分子および抗体癌化学療法と比較して有効性を増やすように設計された標的抗癌治療法である。抗体－薬剤コンジュゲートは、非常に強力なコンジュゲートした小分子治療法を癌細胞に特異的に供給するために、モノクローナル抗体の強力なターゲティング能力を利用する。これらの抗体－薬剤コンジュゲートの薬物動態および毒性といった性質を評価するために、血漿、尿および他の生物学的な試料からそれらを特徴付けし、定量化することが可能であることは、有用である。さらに、同じ試料および同じクロマトグラフィの注入物による方法における遊離薬剤(抗体にコンジュゲートされていない薬剤)を定量化する能力も、有用である。
様々な質量分析技術、例えば電子衝撃(ＥＩ)、化学イオン化(ＣＩ)、脱着化学イオン化(ＤＣＩ)、高速原子衝撃(ＦＡＢ)、エレクトロスプレーイオン化(ＥＳＩ)、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化(ＭＡＬＤＩ)、及び逆重畳積分のためのイオン選別の単イオンモニタリング(ＳＩＭ)(Souppart et al (2002) Jour. of Chrom B 774:195-203; Wong et al (2001) Jour. of Chrom 765:55-62; Yao et al (1998) Jour. of Chrom B 718:77-85; Abdel-Hamid et al (2001) Jour. of Chrom B 753:401-408; Marques et al (2001) Jour. of Chrom 762:87-95)を含むタンデム質量分析(ＭＳ／ＭＳ)(Yao et al (2001) Jour. of Chrom B 752:9-16; Royer et al (1995) Rapid Comm in Mass Spec. 9:495-502)は、薬物動態学研究における小分子療法の同定および定量化のために使用されている。これらの方法および測定器は、十分な感度を得るために生体液から様々な分析物を分離することが必要である。このような精製は大きな労力を要する上に遅く、細胞培養培地、ヒトの血漿、尿および胆汁といった試料における対象の分析物の濃度が低いために大量の試料体液を必要とする。
【０００４】
質量分析による検出／特徴付け／定量化と分離／単離／精製の初期段階工程との直接の組合せは、複合体生体試料の代謝研究に有用である。一般的に、ＬＣ／ＭＳは抗体の特徴付けのために使われ(Martin et al (1997) Cancer Chemother. Pharmacol. 40:189-201; 国際公開０３／０４６５７１; 国際公開０３／０４６５７２)、ＥＬＩＳＡは生物学的基質の定量化のために使われる(Murray et al (2001) J. Imm Methods 255:41-56; Kirchner et al (2004) Clin. Pharmacokinetics 43(2): 83-95)。ＥＬＩＳＡアッセイは一般的に、高処理のスクリーニングに感受性が高く、適している。
質量分析(ＭＳ)によるタンパク質分析の最近の進歩は、エレクトロスプレーイオン化(ＥＳＩ)、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(ＭＡＬＤＩ、米国公開特許２００３／００２７２１６)および表面増強レーザー脱離イオン化(ＳＥＬＤＩ、米国特許第６０２０２０８号)といった初期段階の気相イオン化と導入技術、並びに、計測器感度、分解能、質量精度、バイオインフォマティックスおよびソフトウェアデータ逆重畳積分アルゴリズム("Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications", Cole, R.B., Ed. (1997) Wiley, New York; "Modern Protein Chemistry: Practical Aspects", Howard, G.C. and Brown, W.E., Eds. (2002) CRC Press, Boca Raton, FL, p. 71-102;)の改良に因るものである。タンパク質の一次(配列)、二次及び三次構造はプローブ化され、ＭＳにより解明されうる。エレクトロスプレーイオン化(ＥＳＩ)は、液体試料の大気圧イオン化(ＡＰＩ)を提供する。エレクトロスプレー法は、蒸発の下で、溶液中に含まれる種を表すイオンを作り出す高度に荷電したドロップレットを作り出す。質量分析機のイオン-試料採集用開口部は、質量分析のためのこれらの気相イオンの見本を取るために用いられる。質量分析検出器によって測定される分析物の応答は、体液の分析物の濃度に依存し、体液流速には依存していない。
免疫親和性メンブラン(ＩＡＭ)キャプチャおよび質量分析による抗体－薬剤コンジュゲートを検出及びスクリーニングするための方法は開示されている(米国公開特許２００５／０２３２９２９)。
【発明の概要】

【０００５】
本発明の一態様は、抗体コンジュゲート化合物及び組成物、抗体、及びそれらの断片ないし代謝産物を、免疫親和性ビーズキャプチャ、分離、クロマトグラフィおよび質量分析によって検出、スクリーニング、及び定量化するための方法を含む。質量分析の例示的な方法には、エレクトロスプレーイオン化(ＥＳＩ)、及び全スキャン質量分析(ＭＳ)が含まれる。
免疫親和性ビーズキャプチャは、(i) 強いストレプトアビジン－ビオチン相互作用、(ii) 対象タンパク質の分析のために十分な物質を捕獲する高い結合能、(iii) 低い非特異的結合、(iv) 質量分析適合溶剤による試料成分溶出、(v) 良好な試料回復、及び(vi) 自動化への従順さ、を利用するストレプトアビジンコート常磁性ビーズによって実施してよい。

【０００６】
以下の式Ｉを有し、
Ａｂ－（Ｌ－Ｄ）ｐ　　Ｉ
このとき、
Ａｂが抗体であり、
Ｄがメイタンシノイド又はモノメチルアウリスタチン薬剤部分であり、
Ｌが、共有結合的にＡｂに接着し、共有結合的にＤに接着したリンカーであり、そして、ｐが１、２、３、４、５、６、７又は８である、本発明の抗体コンジュゲート化合物。

【０００７】
本発明の一態様には、以下の工程を含む抗体－薬剤コンジュゲート化合物の検出方法が含まれる：
(i) 式Ｉを有する抗体－薬剤コンジュゲート化合物を提供すること；
(ii) 抗体－薬剤コンジュゲート化合物と、場合によってｐが０である式Ｉの抗体又はその抗体断片ないし代謝産物を、哺乳動物、組織、細胞培養物、血漿又は血清から選択される生物学的な供給源と接触させること；
(iii) 生物学的な供給源から生体試料を採取すること；
(iv) 処方し、固定し、遠心し、単離し、消化し、血液細胞凝集を誘導ないし予防し、加水分解し、又は精製することによって分析試料を生成するために生物学的試料を処理し、処理済みの分析試料を生成すること；
(v) 処理済みの分析試料に特異的な抗原を含む親和性成熟ビーズにて処理した分析試料を捕獲すること；
(vi) 処理した分析試料を溶出すること；
(vii) 分離培地に溶出した分析試料を置き、１より多くの試料成分を分離すること、このとき分離した試料成分は式Ｉを有する抗体－薬剤コンジュゲート化合物又はその抗体断片ないし代謝物を含み、ｐは０、１、２、３、４、５、６、７又は８である；そして、
(viii) 一又は複数の分離した試料成分の質量電荷比を質量分析によって確認すること。

【０００８】
本発明の他の態様には、以下の工程を含む、哺乳動物において、抗体－薬剤コンジュゲート化合物の混合物をスクリーニングして、化合物又はその断片ないし代謝物のクリアランスを決定する方法を含む：
(i) 式Ｉを有する抗体－薬剤コンジュゲート化合物の混合物を提供すること、このとき該混合物は場合によって、ｐが０である抗体又はその断片ないし代謝物を含み；
(ii) 哺乳動物に混合物を投与すること；
(iii) 混合物が投与された哺乳動物から血液試料又は排出物を採取すること；
(iv) 処方し、固定し、遠心し、単離し、消化し、血液細胞凝集を誘導ないし予防し、加水分解し、又は精製することによって分析試料を生成するために血液試料又は排出物を処理し、処理済みの分析試料を生成すること；

(v) 処理済みの分析試料に特異的な抗原を含む免疫親和性ビーズにて処理済みの分析試料を捕獲すること；
(vi) 処理済みの分析試料を溶出すること；
(vii) 分離培地に血液試料、排出物又は分析試料を置き、１より多くの試料成分を分離すること、このとき分離した試料成分は式Ｉを有する抗体－薬剤コンジュゲート化合物又はその抗体断片ないし代謝物を含み、ｐは０、１、２、３、４、５、６、７又は８であり；そして、
(viii) 一又は複数の分離した試料成分の質量電荷比を質量分析によって確認すること。

【０００９】
本発明は、添付の図面、図および実施例と併せて、以下の例示的な実施態様の詳細な解説を参照することによって理解されるであろう。下記の考察は記載、図示そして例示であって、添付の特許請求の範囲のいずれかによって定義される範囲を限定するものとみなされるものではない。

【図面の簡単な説明】

【００１０】
【図１ａ】磁石と接触してストレプトアビジンコート常磁性ビーズに結合されるビオチン化ＥＣＤタンパク質のＥＣＤ(細胞外ドメイン)に結合する、抗体(ＭＡｂ)および抗体－薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)の例を示す。
【図１ｂ】ビーズに共有結合的に連結されるＥＣＤタンパク質のＥＣＤ(細胞外ドメイン)に結合する、抗体(ＭＡｂ)および抗体－薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)の例を示す。
【図２】磁石と接触してストレプトアビジンコート常磁性ビーズに結合されるビオチン化抗薬剤モノクローナル抗体(ビオチン－抗薬剤ＭＡｂ)に結合する、抗体－薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)の例を示す。
【図３】システイン改変抗体－薬剤コンジュゲートの例を示す。上から下の順に、軽鎖に位置する２つのＭＭＡＥ薬剤部分－Ｔｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＨＥＲ２　４Ｄ５　ＬＣ　Ｖ２０５Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ；重鎖に位置する２つのＭＭＡＥ薬剤部分－Ｔｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＨＥＲ２　４Ｄ５　ＨＣ　Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ；重鎖のＦｃ領域に位置する２つのＭＭＡＥ薬剤部分－Ｔｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＨＥＲ２　４Ｄ５　Ｆｃ　Ｓ４００Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ；及びコンジュゲートのためのシステイン改変抗体：Ｔｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＨＥＲ２　４Ｄ５　Ｆｃ　Ｓ４００Ｃ。
【図４】０、８、２４、４８および９６時間の時点で採取したインビトロ血漿安定試料の、免疫親和性ＥＣＤ改変ビーズキャプチャ及び質量分析特徴付け後の、血漿における軽鎖(Ｔｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＨＥＲ２　４Ｄ５　ＬＣ　Ｖ２０５Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ)(上)および重鎖(Ｔｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＨＥＲ２　４Ｄ５　ＨＣ　Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ)(下)ＡＤＣ変異体についての、薬剤／抗体比(ＤＡＲ)分布の変化を示す。試料成分を、０(ネイキッド抗体)、１(１のＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ薬剤リンカーユニット)および２(２のＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ薬剤リンカーユニット)のＤＡＲとした。
【図５】図４(下)にプロットしたように、０、８、２４、４８および９６時間の時点で採取したＴｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＨＥＲ２　４Ｄ５　ＨＣ　Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ(３７℃でインキュベートしたラット血漿中の１００μｇ／ｍｌ)試料の安定性の逆重畳積分した質量分析データを示す。試料成分を、＋０(ネイキッド抗体)、＋１Ｄ(１のＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ薬剤リンカーユニット)および＋２Ｄ(２のＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ薬剤リンカーユニット)のＤＡＲとした。およそ１５１０００ａｍｕの小さいピークは、不完全に脱グリコシル化された試料成分である。
【図６】０、６、２４、４８および９６時間の時点で採取したＴｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＭＵＣ１６(３Ａ５)　ＨＣ　Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ(３７℃でインキュベートしたラット血漿中の１００μｇ／ｍｌ)の安定性の逆重畳積分した質量分析データを示す。試料成分を、＋０(ネイキッド抗体)、＋１Ｄ(１のＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ

薬剤リンカーユニット)および＋２Ｄ(２のＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ薬剤リンカーユニット)のＤＡＲとした。
【図７】Ｔｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＭＵＣ１６(３Ａ５)　ＨＣ　Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥのラット血漿安定性試験における経時的な薬剤／抗体(ＤＡＲ)分布変化を示す。
【図８】９６時間の時点で採取し、ｒｈｕＭＵＣ１６　ＥＣＤによって捕獲した、ラット、カニクイザルおよびヒトの血漿とバッファ(０．５％ＢＳＡを含む２０ｍＭ　ヒスチジン／酢酸塩、２４０ｍＭ　トレハロース、０．０２％ポリソルベート２０、ｐＨ５．５)における、Ｔｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＭＵＣ１６(３Ａ５)　ＨＣ　Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ(３７℃でインキュベートした１００μｇ／ｍｌ)試料の安定性の逆重畳積分した質量分析データを示す。
【図９】３８ｍｇ／ｋｇのＴｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＭＵＣ１６(３Ａ５)　ＨＣ　Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥを投与したカニクイザルにおけるインビボ動態学の逆重畳積分した質量分析データを示す。平均薬剤負荷は１．６のＭＭＡＥ／３Ａ５であった。投与したＡＤＣのおよそ３０％はＤＡＲ＋１であった。血漿試料は、５分、６時間、２４時間、７２時間、６日、８日、１５日および２２日の時点に採取し、免疫親和性ＥＣＤ改変ビーズ法によって捕獲した。試料成分を、＋０(ネイキッド抗体)、＋１Ｄ(１のＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ薬剤リンカーユニット)および＋２Ｄ(２のＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ薬剤リンカーユニット)のＤＡＲとした。およそ１４９０００ａｍｕ及び１５００００ａｍｕの小さいピークは、不完全に脱グリコシル化された試料成分である。
【図１０ａ】レセプターのＥＣＤが抗体又は抗体－薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)への結合のために固体担体上に固定されている総ＥＬＩＳＡアッセイフォーマットを示す。ＡＤＣは、化学発光検出のために$F(ab')_2$ヤギ抗ヒトＦｃ－ＨＲＰ(西洋ワサビペルオキシダーゼ)に結合する。
【図１０ｂ】抗薬剤ＭＡｂが抗体－薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)への結合のために固体担体上に固定されているコンジュゲートＥＬＩＳＡアッセイフォーマットを示す。ＡＤＣは、溶液中のレセプターのビオチン化ＥＣＤに結合する。次いで、複合体は、化学発光検出のためにストレプトアビジン－西洋ワサビペルオキシダーゼ(ＨＲＰ)に結合しうる。
【図１１】ラット血漿試料中の薬剤部分にコンジュゲートした残りの抗体の割合をプロットすることによる、ＥＬＩＳＡ法、及び免疫親和性ＥＣＤ改変ビーズキャプチャ／質量分析(ＭＳ)法による試料成分の検出の比較を９６時間内の時間につれて示す。
【発明を実施するための形態】
【００１１】
例示的実施態様の詳細な説明
ここで、本発明のある実施態様を詳細に参照するが、その例を添付の構造及び式で例証する。本発明を列挙する実施態様と併せて説明するが、それらは本発明をその実施態様に限定することを意図するものではないことは理解されよう。それどころか、本発明は特許請求の範囲によって定まる本発明の範囲に含まれうるあらゆる代替例、変形例、及び均等物を包含することが意図される。当業者であれば、本発明の実施において使用されうるここに記載のものと同様な又は均等な多くの方法及び材料が分かるであろう。本発明は記載された方法及び材料に決して限定されるものではない。
特に定義のない限り、本明細書中で用いた技術及び科学用語は、本発明が属する分野の当業者が共通して理解するものと同じ意味を有し、以下と一致している：Singleton et al, (1994) "Dictionary of Microbiology and Molecular Biology", 2nd Ed., J. Wiley & Sons, New York, NY；及びJaneway, et al (2001) "Immunobiology", 5th Ed., Garland Publishing, New York。本明細書中で商標名が用いられる場合、出願人は、商品名生成物の商品名生成物製剤、後発品および活性な製薬成分(一又は複数)をそれぞれ含むことを意図する。
【００１２】
定義

特段の記載がない限り、本明細書中で用いる以下の用語及び表現は以下の意味を有することが意図される。

【００１３】

「抗体」は最も広い意味で用いられ、特に、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体(例えば二重特異性抗体)および抗体断片を包含する。抗体は、マウス、ヒト、ヒト化、キメラ、または他の種由来のものであってよい。抗体は、特異的な抗原を認識して結合することができる免疫系によって生成されるタンパク質である。(Janeway, et al (2001) "Immunobiology", 5th Ed., Garland Publishing, New York)。標的抗原は一般に、エピトープとも呼ばれ、複数の抗体上のＣＤＲによって認識される多数の結合部位を有する。異なるエピトープに特異的に結合する各々の抗体は異なる構造を有する。よって、１つの抗原は１より多い対応する抗体を有しうる。また、抗体は、完全長免疫グロブリン分子又は完全長免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち限定するものではないが、癌細胞又は自己免疫性疾患と関連した自己免疫抗体を産生する細胞を含む標的などの対象の標的の抗原ないしその一部を免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子を指す。本明細書において開示される免疫グロブリンは、免疫グロブリン分子のいずれかのタイプ(例えばＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤおよびＩｇＡ)、クラス(例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２)又はサブクラスのものであってよい。免疫グロブリンは任意の種から得られてよい。一態様では、しかしながら、免疫グロブリンは、ヒト、マウス又はウサギ起源のものである。

【００１４】

「抗体断片」には、完全長抗体の一部、一般に抗原結合又はその可変領域が含まれる。抗体断片の例には、Ｆａｂ、Ｆａｂ'、$F(ab')_2$およびＦｖ断片；ダイアボディ；線状抗体；Ｆａｂ発現ライブラリーによって生産される断片、抗イディオタイプ(抗Ｉｄ)抗体、ＣＤＲ(相補性決定領域)、ＥＣＤ(細胞外ドメイン)、及び癌細胞抗原、ウイルス抗原又は微生物抗原、単鎖抗体分子に免疫特異的に結合する上記の何れかのエピトープ結合断片；及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれる。

本明細書における「インタクトな抗体」は、抗原結合性可変領域ＶＬおよびＶＨドメイン、並びに完全な軽鎖および重鎖定常ドメイン(ＣＬ)および重鎖定常ドメイン、ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３を含むものである。定常ドメインは、天然の配列定常ドメイン(例えばヒト天然配列定常ドメイン)又はそのアミノ酸配列変異体であってもよい。インタクトな抗体は、抗体のＦｃ領域(天然配列Ｆｃ領域又はアミノ酸配列変異体Ｆｃ領域)に起因する生物活性を意味する一又は複数の「エフェクター機能」を有してよい。抗体エフェクター機能の例には、Ｃ１ｑ結合；補体依存性細胞障害作用；Ｆｃレセプター結合；抗体依存性細胞媒介性細胞障害作用(ＡＤＣＣ)；食作用；細胞表面レセプターの下方制御(例えばＢ細胞レセプター；ＢＣＲ)などが含まれる。

【００１５】

「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団に含まれる個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対している。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体によって汚染されずに合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、抗体の実質的に均一な集団から得られている抗体の性質を表すものであって、抗体を何か特定の方法で生成しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体は、最初にKohler et al (1975) Nature 256:495により記載されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換えＤＮＡ法(米国特許第４８１６５６７号を参照)によって作られてもよい(例えば、米国特許第４８１６５６７号参照)。また「モノクローナル抗体」は、例えばClackson et al (1991) Nature, 352:624-628；Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリーから

単離してもよい。

【００１６】

本明細書中のモノクローナル抗体には特に、特定の種由来または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列に同一または類似する重鎖および／または軽鎖の一部を含み、残りの鎖は、所望の生物学的活性を表す限り、他の種由来または他の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体並びに該抗体の抗体断片の対応する配列に同一または類似する「キメラ」抗体が含まれる（米国特許第４８１６５６７号；およびMorrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855)。ここで対象とするキメラ抗体には、非ヒト霊長類(例えば旧世界ザル、サルなど)及びヒト定常領域配列由来の可変ドメイン抗原結合配列を含む「霊長類化」抗体が含まれる。

【００１７】

「生物学的試料(生体試料)」は、(i) 血液、胆汁、尿又は糞便；(ii) 組織抽出物；及び(iii) 細胞培養物、細胞溶解物又は細胞抽出物を意味する。

「生体起源」は、(i) 哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル又はヒト；(ii) 哺乳類の組織；及び(iii) 培養細胞を意味する。

「標識」は、抗体に共有結合的に接着し得、(i) 検出可能なシグナルを生じる；(ii) 第二標識と相互作用して、第一又は第二標識、例えばＦＲＥＴ(蛍光共鳴エネルギー転移)によって生じる検出可能なシグナルを修飾する；(iii) 抗原又はリガンドとの相互作用を安定させるかまたは結合の親和性を増やす；(iv) 電荷、疎水性、形状又は他の物理学的パラメータによって、移動度、例えば電気泳動移動度又は細胞透過性に作用する、又は(v) キャプチャ分子を生じさせ、リガンド親和性、抗体／抗原結合又はイオン複合体調節するために機能する、任意の部分を意味する。

【００１８】

抗体

式Ｉの抗体ユニット(Ａｂ－)は、所定の標的細胞集団と関連するレセプター、抗原又は他の受容性部分と結合するか又は反応的に結合するか又は複合体化する抗体(Ａｂ)の任意のユニットをその範囲内に包含する。抗体は、治療上又は生物学上修飾される細胞集団の部分と結合する、複合体化する又は相互作用する任意のタンパク質ないしタンパク質様分子でありうる。一態様では、抗体ユニットは、抗体ユニットが反応する特定の標的細胞集団へ薬剤ユニットを運搬するように働く。このような抗体には、限定するものではないが、完全長抗体及び抗体断片といった大きな分子量タンパク質が含まれる。

式Ｉの抗体－薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)にＡｂを含み、癌の治療に有用となりうる抗体には、腫瘍関連抗原(ＴＡＡ)に対する抗体を含むが、これに限定されるものではない。このような腫瘍関連抗原は当分野で公知であり、当分野で周知である方法および情報を使用して抗体を生成するために調製されてよい。癌の診断及び治療のために有効な細胞標的を発見するために、研究者は、一又は複数の正常非癌性細胞と比較して、一又は複数の特定の種類の癌細胞の表面上に特異的に発現される膜貫通あるいは腫瘍関連のポリペプチドを同定することを目的としている。多くの場合、このような腫瘍関連ポリペプチドは、非癌性細胞の表面上と比較して癌細胞の表面上に多く発現される。このような腫瘍関連細胞表面抗原ポリペプチドの同定により、抗体ベースの治療法による破壊のために癌細胞を特異的に標的化する能力が生じる。

【００１９】

ＴＡＡの例には以下に列挙するＴＡＡ(１)－(３５)が含まれるが、これらに限定されるものではない。便宜上、これらの抗原に関する情報(その全ては当分野で公知である)を以下に列挙し、名前、別名、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号および基本的な参照(一又は複数)を含む。抗体の標的となる腫瘍関連抗原には、引例文献において同定された配列と比較して少なくともおよそ７０％、８０％、８５％、９０％又は９５％の配列同一性を有するか又は、引用文献に見られる配列を有するＴＡＡと実質的に同じ生物学的特性又は特徴を表すすべてのアミノ酸配列変異体及びアイソフォームが含まれる。例えば、変異配列を有するＴＡＡは一般に、列挙した対応する配列を有するＴＡＡに特異的に結合する抗体に結合する

ことが可能である。本明細書において特別に引用される文献中の配列と開示内容は、出典明記によって特別に本明細書中に援用される。

【００２０】

腫瘍関連抗原(１)-(３６)：

(１) ＢＭＰＲ１Ｂ（骨形態形成タンパク質レセプタータイプＩＢ、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ_００１２０３）ten Dijke,P., et al Science 264 (5155): 101-104 (1994), Oncogene 14 (11): 1377-1382 (1997))；国際公開２００４０６３３６２(請求項２)；国際公開２００３０４２６６１(請求項１２)；米国公開特許２００３１３４７９０Ａ１(３８～３９頁)；国際公開２００２１０２２３５(請求項１３；２９６頁)；国際公開２００３０５５４４３(９１～９２頁)；国際公開２００２９９１２２(実施例２；５２８～５３０頁)；国際公開２００３０２９４２１(請求項６)；国際公開２００３０２４３９２(請求項２；図１１２)；国際公開２００２９８３５８(請求項１；１８３頁)；国際公開２００２５４９４０(１００～１０１頁)；国際公開２００２５９３７７(３４９～３５０頁)；国際公開２００２３０２６８(請求項２７；３７６頁)；国際公開２００１４８２０４(実施例；図４)。ＮＰ__００１１９４骨形態形成タンパク質レセプタータイプＩＢ／ｐｉｄ＝ＮＰ__００１１９４.１-相互参照：ＭＩＭ：６０３２４８;ＮＰ__００１１９４.１；ＮＭ_００１２０３_１

【００２１】

(２) Ｅ１６（ＬＡＴ１、ＳＬＣ７Ａ５、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ_００３４８６）Biochem Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999)、Nature 395 (6699): 288-291 (1998)、Gaugitsch, H.W, et al (1992) J. Biol. Chem 267 (16): 11267-11273)；国際公開２００４０４８９３８(実施例２)；国際公開２００４０３２８４２(実施例ＩＶ)；国際公開２００３０４２６６１(請求項１２)；国際公開２００３０１６４７５(請求項１)；国際公開２００２７８５２４(実施例２)；国際公開２００２９９０７４(請求項１９；１２７～１２９頁)；国際公開２００２８６４４３(請求項２７；２２２頁、３９３頁)；国際公開２００３００３９０６(請求項１０；２９３頁)；国際公開２００２６４７９８(請求項３３；９３～９５頁)；国際公開２０００１４２２８(請求項５；１３３～１３６頁)；米国公開特許２００３２２４４５４(図３)；国際公開２００３０２５１３８(請求項１２；１５０頁)；ＮＰ__００３４７７溶質輸送体ファミリ７(カチオンアミノ酸輸送体、ｙ＋ｓｙｓｔｅｍ)、メンバー５／ｐｉｄ＝ＮＰ__００３４７７.３－ヒト。相互参照：ＭＩＭ：６００１８２;ＮＰ__００３４７７.３；ＮＭ_０１５９２３；ＮＭ_００３４８６_１

【００２２】

(３) ＳＴＥＡＰ１（前立腺の６回膜貫通上皮性抗原、Ｇｅｎｂａｎｋ 受託番号ＮＭ_０１２４４９）Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001)、Hubert, R.S., et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (25): 14523-14528)；国際公開２００４０６５５７７(請求項６)；国際公開２００４０２７０４９(図１Ｌ)；ＥＰ１３９４２７４(実施例１１)；国際公開２００４０１６２２５(請求項２)；国際公開２００３０４２６６１(請求項１２)；米国公開特許２００３１５７０８９(実施例５)；米国公開特許２００３１８５８３０(実施例５)；米国公開特許２００３０６４３９７(図２)；国際公開２００２８９７４７(実施例５；６１８～６１９頁)；国際公開２００３０２２９９５(実施例９；図１３Ａ、実施例５３；１７３頁、実施例２；図２Ａ)；ＮＰ__０３６５８１ 前立腺の６回膜貫通上皮性抗原。相互参照：ＭＩＭ：６０４４１５;ＮＰ__０３６５８１.１；ＮＭ_０１２４４９_１

【００２３】

(４) ０７７２Ｐ（ＣＡ１２５、ＭＵＣ１６、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＦ３６１４８６）Ｊ. Biol. Chem 276 (29): 27371-27375 (2001))；国際公開２００４０４５５５３(請求項１４)；国際公開２００２９２８３６(請求項６；図１２)；国際公開２００２８３８６６(請求項１５；１１６～１２１頁)；米国公開特許２００３１２４１４０(実施例１６)；米国公開特許２００３０９１５８０(請求項６)；国際公開２００２０６３１７(請求項６

；４００～４０８頁)；相互参照：ＧＩ：３４５０１４６７；ＡＡＫ７４１２０．３；ＡＦ３６１４８６＿１

【００２４】

(５) ＭＰＦ（ＭＰＦ、ＭＳＬＮ、ＳＭＲ、拒核球増強因子、メソテリン、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿００５８２３）Yamaguchi, N., et al Biol. Chem 269 (2), 805-808 (1994)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (20): 11531-11536 (1999)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (1): 136-140 (1996)、J. Biol. Chem 270 (37): 21984-21990 (1995))；国際公開２００３１０１２８３(請求項１４)；(国際公開２００２１０２２３５(請求項１３；２８７～２８８頁)；国際公開２００２１０１０７５(請求項４；３０８～３０９頁)；国際公開２００２７１９２８(３２０～３２１頁)；国際公開９４１０３１２(５２～５７頁)；相互参照：ＭＩＭ：６０１０５１；ＮＰ＿００５８１４．２；ＮＭ＿００５８２３＿１

【００２５】

(６) Ｎａｐｉ３ｂ（ＮＡＰＩ-３Ｂ、ＮＰＴＩＩｂ、ＳＬＣ３４Ａ２、溶質輸送体ファミリ３４(リン酸ナトリウム)、メンバー２、タイプＩＩナトリウム依存性リン酸輸送体３ｂ、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿００６４２４）Ｊ. Biol. Chem 277 (22): 19665-19672 (2002)、Genomics 62 (2): 281-284 (1999)、Feild, J.A., et al (1999) Biochem Biophys. Res. Commun. 258 (3): 578-582)；国際公開２００４０２２７７８(請求項２)；ＥＰ１３９４２７４(実施例１１)；国際公開２００２１０２２３５(請求項１３；３２６頁)；欧州特許第８７５５６９号(請求項１；１７～１９頁)；国際公開２００１５７１８８(請求項２０；３２９頁)；国際公開２００４０３２８４２(実施例ＩＶ)；国際公開２００１７５１７７(請求項２４；１３９～１４０頁)；相互参照：ＭＩＭ：６０４２１７；ＮＰ＿００６４１５．１；ＮＭ＿００６４２４＿１

【００２６】

(７) Ｓｅｍａ ５ｂ（ＦＬＪ１０３７２、ＫＩＡＡ１４４５、Ｍｍ．４２０１５、ＳＥＭＡ５Ｂ、ＳＥＭＡＧ、セマフォリン５ｂ Ｈｌｏｇ、セマドメイン、７トロンボスポンジンリピート(タイプ１及びタイプ１様)、膜貫通ドメイン(ＴＭ)及び短い細胞質ドメイン、(セマフォリン)５Ｂ、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＢ０４０８７８）Nagase T., et al (2000) DNA Res. 7 (2): 143-150)；国際公開２００４０００９９７(請求項１)；国際公開２００３００３９８４(請求項１)；国際公開２００２０６３３９(請求項１；５０頁)；国際公開２００１８８１３３(請求項１；４１～４３頁、４８～５８頁)；国際公開２００３０５４１５２(請求項２０)；国際公開２００３１０１４００(請求項１１)；受託：Ｑ９Ｐ２８３；ＥＭＢＬ；ＡＢ０４０８７８；ＢＡＡ９５９６９．１。Ｇｅｎｅｗ；ＨＧＮＣ：１０７３７；

【００２７】

(８) ＰＳＣＡ ｈｌｇ(２７０００５０Ｃ１２Ｒｉｋ、Ｃ５３０００８Ｏ１６Ｒｉｋ、ＲＩＫＥＮ ｃＤＮＡ ２７０００５０Ｃ１２、ＲＩＫＥＮ ｃＤＮＡ ２７０００５０Ｃ１２遺伝子、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＹ３５８６２８)；米国公開特許２００３１２９１９２(請求項２)；米国公開特許２００４０４４１８０(請求項１２)；米国公開特許２００４０４４１７９(請求項１１)；米国公開特許２００３０９６９６１(請求項１１)；米国公開特許２００３２３２０５６(実施例５)；国際公開２００３１０５７５８(請求項１２)；米国公開特許２００３２０６９１８(実施例５)；ＥＰ１３４７０４６(請求項１)；国際公開２００３０２５１４８(請求項２０)；相互参照：ＧＩ：３７１８２３７８；ＡＡＱ８８９９１．１；ＡＹ３５８６２８＿１

【００２８】

(９) ＥＴＢＲ（エンドセリンタイプＢレセプター、Ｇｅｎｂａｎｋ 受託番号ＡＹ２７５４６３)；Nakamuta M, et al Biochem Biophys. Res. Commun. 177, 34-39, 1991；Ogawa Y., et al Biochem Biophys. Res. Commun. 178, 248-255, 1991；Arai H., et al Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992；Arai H., et al J. Biol. Chem 268, 3463-3470, 1993；Sakamoto A., Yanagisawa M, et al Biochem Biophys. Res. Commun. 178, 656-

663, 1991；Elshourbagy N.A., et al J. Biol. Chem 268, 3873-3879, 1993；Haendler B., et al J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1-S4, 1992；Tsutsumi M, et al Gene 228, 43-49, 1999；Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002；Bourgeois C., et al J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997；Okamoto Y., et al Biol. Chem 272, 21589-21596, 1997；Verheij J.B., et al Am J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002；Hofstra R.M.W., et al Eur. J. Hum Genet. 5, 180-185, 1997；Puffenberger E.G., et al Cell 79, 1257-1266, 1994；Attie T., et al, Hum Mol. Genet. 4, 2407-2409, 1995；Auricchio A., et al Hum Mol. Genet. 5:351-354, 1996；Amiel J., et al Hum Mol. Genet. 5, 355-357, 1996；Hofstra R.M.W., et al Nat. Genet. 12, 445-447, 1996；Svensson P.J., et al Hum Genet. 103, 145-148, 1998；Fuchs S., et al Mol. Med. 7, 115-124, 2001；Pingault V., et al (2002) Hum Genet. 111, 198-206；国際公開２００４０４５５１６(請求項１)；国際公開２００４０４８９３８(実施例２)；国際公開２００４０４０００００(請求項１５１)；国際公開２００３０８７７６８(請求項１)；国際公開２００３０１６４７５(請求項１)；国際公開２００３０１６４７５(請求項１)；国際公開２００２６１０８７(図１)；国際公開２００３０１６４９４(図６)；国際公開２００３０２５１３８(請求項１２；１４４頁)；国際公開２００１９８３５１(請求項１；１２４～１２５頁)；欧州特許第５２２８６８号(請求項８；図２)；国際公開２００１７７１７２(請求項１；２９７～２９９頁)；米国公開特許２００３１０９６７６；米国特許第６５１８４０４(図３)；米国特許第５７７３２２３(請求項１ａ；段落３１～３４)；国際公開２００４００１００４；

【００２９】

(１０)ＭＳＧ７８３(ＲＮＦ１２４、推定タンパク質ＦＬＪ２０３１５、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ_０１７７６３)；国際公開２００３１０４２７５(請求項１)；国際公開２００４０４６３４２(実施例２)；国際公開２００３０４２６６１(請求項１２)；国際公開２００３０８３０７４(請求項１４；６１頁)；国際公開２００３０１８６２１(請求項１)；国際公開２００３０２４３９２(請求項２；図９３)；国際公開２００１６６６８９(実施例６)；相互参照：ＬｏｃｕｓＩＤ：５４８９４；ＮＰ＿０６０２３３.２；ＮＭ_０１７７６３_１

【００３０】

(１１)ＳＴＥＡＰ２(ＨＧＮＣ_８６３９、ＩＰＣＡ-１、ＰＣＡＮＡＰ１、ＳＴＡＭＰ１、ＳＴＥＡＰ２、ＳＴＭＰ、前立腺癌関連遺伝子１、前立腺癌関連タンパク質１、前立腺の６回膜貫通上皮性抗原２、６回膜貫通前立腺タンパク質、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＦ４５５１３８) Lab. Invest. 82 (11): 1573-1582 (2002))；国際公開２００３０８７３０６；米国公開特許２００３０６４３９７(請求項１；図１)；国際公開２００２７２５９６(請求項１３；５４～５５頁)；国際公開２００１７２９６２(請求項１；図４Ｂ)；国際公開２００３１０４２７０(請求項１１)；国際公開２００３１０４２７０(請求項１６)；米国公開特許２００４００５５９８(請求項２２)；国際公開２００３０４２６６１(請求項１２)；米国公開特許２００３０６０６１２(請求項１２；図１０)；国際公開２００２２６８２２(請求項２３；図２)；国際公開２００２１６４２９(請求項１２；図１０)；相互参照：ＧＩ：２２６５５４８８；ＡＡＮ０４０８０.１；ＡＦ４５５１３８＿１

【００３１】

(１２)ＴｒｐＭ４(ＢＲ２２４５０、ＦＬＪ２００４１、ＴＲＰＭ４、ＴＲＰＭ４Ｂ、一過性受容器電位カチオンチャネル、サブファミリＭ、メンバー４、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ_０１７６３６) Xu, X.Z., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (19): 10692-10697 (2001)、Cell 109 (3): 397-407 (2002)、J. Biol. Chem 278 (33): 30813-30820 (2003))；米国公開特許２００３１４３５５７(請求項４)；国際公開２０００４０６１４(請求項１４；１００～１０３頁)；国際公開２００２１０３８２(請求項１；図９Ａ)；国際公開２００３０４２６６１(請求項１２)；国際公開２００２３０２６８(請求項２７；３９１頁)；米国公開特許２００３２１９８０６(請求項４)；国際公開２００１６２７９４(請求項１４；図１Ａ－Ｄ)；相互参照：ＭＩＭ：６０６９３６；ＮＰ＿０６０１０

６．２；ＮＭ＿０１７６３６＿１
【００３２】
（１３）ＣＲＩＰＴＯ（ＣＲ、ＣＲ１、ＣＲＧＦ、ＣＲＩＰＴＯ、ＴＤＧＦ１、テトラカルチノーマ由来の増殖因子、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＰ＿００３２０３又はＮＭ＿００３２１２）Ciccodicola, A., et al EMBO J. 8(7): 1987-1991 (1989)、Am J. Hum Genet. 49(3): 555-565 (1991))；米国公開特許２００３２２４４１１(請求項１)；国際公開２００３０８３０４１(実施例１)；国際公開２００３０３４９８４(請求項１２)；国際公開２００２８８１７０(請求項２；５２～５３頁)；国際公開２００３０２４３９２(請求項２；図５８)；国際公開２００２１６４１３(請求項１；９４～９５頁、１０５頁)；国際公開２００２２２８０８(請求項２；図１)；米国特許第５８５４３９９(実施例２；段落１７－１８)；米国特許第５７９２６１６(図２)；相互参照：ＭＩＭ：１８７３９５；ＮＰ＿００３２０３．１；ＮＭ＿００３２１２＿１
【００３３】
（１４）ＣＤ２１（ＣＲ２（補体レセプター２)又はＣ３ＤＲ（Ｃ３ｄ/エプスタインバーウイルスレセプター)又はＨｓ．７３７９２ Ｇｅｎｂａｎｋ 受託番号Ｍ２６００４）Fujisaku et al (1989) J. Biol. Chem 264(4): 2118-2125)；Weis J.J., et al J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988；Mbore M, et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 9194-9198, 1987；Barel M, et al Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998；Weis J.J., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5639-5643, 1986；Sinha S.K., et al (1993) J. Immunol. 150, 5311-5320；国際公開２００４０４５５２０(実施例４)；米国公開特許２００４００５５３８(実施例１)；国際公開２００３０６２４０１(請求項９)；国際公開２００４０４５５２０(実施例４)；国際公開９１０２５３６(図９．１－９．９)；国際公開２００４０２０５９５(請求項１)；受託：Ｐ２００２３；Ｑ１３８６６；Ｑ１４２１２；ＥＭＢＬ；Ｍ２６００４；ＡＡＡ３５７８６．１。
【００３４】
（１５）ＣＤ７９ｂ（ＣＤ７９Ｂ、ＣＤ７９、ＩＧｂ（免疫グロブリン関連β)、Ｂ２９、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿０００６２６又は１１０３８６７４）Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100(7): 4126-4131、Blood (2002) 100(9): 3068-3076、Muller et al (1992) Eur. J. Immunol. 22(6): 1621-1625)；国際公開２００４０１６２２５(請求項２、図１４０)；国際公開２００３０８７７６８、米国公開特許２００４１０１８７４(請求項１、１０２頁)；国際公開２００３０６２４０１(請求項９)；国際公開２００２７８５２４(実施例２)；米国公開特許２００２１５０５７３(請求項５、１５頁)；米国特許第５６４４０３３号；国際公開２００３０４８２０２(請求項１、３０６および３０９頁)；国際公開　９９／５５８６５８、米国特許第６５３４４８２号(請求項１３、図１７Ａ／Ｂ)；国際公開２０００５５３５１(請求項１１、１１４５～１１４６頁)；相互参照：ＭＩＭ：１４７２４５；ＮＰ＿０００６１７．１；ＮＭ＿０００６２６＿１
【００３５】
（１６）ＦｃＲＨ２（ＩＦＧＰ４、ＩＲＴＡ４、ＳＰＡＰ１Ａ（ＳＨ２ドメイン含有ホスファターゼアンカータンパク質１ａ)、ＳＰＡＰ１Ｂ、ＳＰＡＰ１Ｃ、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿０３０７６４）Genome Res. 13(10): 2265-2270 (2003)、Immunogenetics 54(2): 87-95 (2002)、Blood 99(8): 2662-2669 (2002)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98(17): 9772-9777 (2001)、Xu, MJ., et al (2001) Biochem Biophys. Res. Commun. 280(3): 768-775；国際公開２００４０１６２２５(請求項２)；国際公開２００３０７７８３６；国際公開２００１３８４９０(請求項５；図１８Ｄ－１～１８Ｄ－２)；国際公開２００３０９７８０３(請求項１２)；国際公開２００３０８９６２４(請求項２５)；相互参照：ＭＩＭ：６０６５０９；ＮＰ＿１１０３９１．２；ＮＭ＿０３０７６４＿１
【００３６】
（１７）ＨＥＲ２（ＥｒｂＢ２、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号Ｍ１１７３０）Coussens L., et al Science (1985) 230(4730): 1132-1139)；Yamamoto T., et al Nature 319, 230-234, 1986；Semba K., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6497-6501, 1985；Swier

cz J.M, et al J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004；Kuhns J.J., et al J. Biol. Chem. 274, 36422-36427, 1999；Cho H.-S., et al Nature 421, 756-760, 2003；Ehsani A., et al (1993) Genomics 15, 426-429；国際公開２００４０４８９３８(実施例２)；国際公開２００４０２７０４９(図１Ｉ)；国際公開２００４００９６２２；国際公開２００３０８１２１０；国際公開２００３０８９９０４(請求項９)；国際公開２００３０１６４７５(請求項１)；米国公開特許２００３１１８５９２；国際公開２００３００８５３７(請求項１)；国際公開２００３０５５４３９(請求項２９；図１Ａ－Ｂ)；国際公開２００３０２５２２８(請求項３７；図５Ｃ)；国際公開２００２２２６３６(実施例１３；９５～１０７頁)；国際公開２００２１２３４１(請求項６８；図７)；国際公開２００２１３８４７(７１～７４頁)；国際公開２００２１４５０３(１１４～１１７頁)；国際公開２００１５３４６３(請求項２；４１～４６頁)；国際公開２００１４１７８７(１５頁)；国際公開２０００４４８９９(請求項５２；図７)；国際公開２０００２０５７９(請求項３；図２)；米国特許第５８６９４４５号(請求項３；段落３１－３８)；国際公開９６３０５１４(請求項２；５６～６１頁)；欧州特許第１４３９３９３号(請求項７)；国際公開２００４０４３３６１(請求項７)；国際公開２００４０２２７０９；国際公開２００１００２４４(実施例３；図４)；受託：Ｐ０４６２６；ＥＭＢＬ；Ｍ１１７６７；ＡＡＡ３５８０８.１。ＥＭＢＬ；Ｍ１１７６１；ＡＡＡ３５８０８.１。抗ＨＥＲ２抗体は以下を含む：ハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５-８)完全長ヒト化抗ＨＥＲ２(ＭＷ１４５１６７)、トラスツズマブＦ(ａｂ’)２＝抗ＨＥＲ２酵素処理由来(ＭＷ１０００００)、４Ｄ５＝完全長マウス抗ＨＥＲ２、ハイブリドーマ由来、ｒｈｕ４Ｄ５＝過渡的に発現される完全長ヒト化抗体、ｒｈｕＦａｂ４Ｄ５＝組換えヒト化Ｆａｂ(ＭＷ４７７３８)、４Ｄ５Ｆｃ８＝完全長マウス抗ＨＥＲ２、変異ＦｃＲｎ結合ドメインを有する、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５-１、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５-２、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５-３、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５-４、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５-５、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５-６、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５-７及び(トラスツズマブ)。

【００３７】

(１８)ＮＣＡ(ＣＥＡＣＡＭ６、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号Ｍ１８７２８)；Barnett T., et al Genomics 3, 59-66, 1988；Tawaragi Y., et al Biochem Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988；Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:16899-16903, 2002；国際公開２００４０６３７０９；欧州特許第１４３９３９３号(請求項７)；国際公開２００４０４４１７８(実施例４)；国際公開２００４０３１２３８；国際公開２００３０４２６６１(請求項１２)；国際公開２００２７８５２４(実施例２)；国際公開２００２８６４４３(請求項２７；４２７頁)；国際公開２００２６０３１７(請求項２)；継承：Ｐ４０１９９；Ｑ１４９２０；ＥＭＢＬ；Ｍ２９５４１；ＡＡＡ５９９１５.１。ＥＭＢＬ；Ｍ１８７２８；

【００３８】

(１９)ＭＤＰ(ＤＰＥＰ１、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＢＣ０１７０２３) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26): 16899-16903 (2002))；国際公開２００３０１６４７５(請求項１)；国際公開２００２６４７９８(請求項３３；８５～８７頁)；日本特許第０５００３７９０号(図６－８)；国際公開９９４６２８４(図９)；相互参照：ＭＩＭ：１７９７８０；ＡＡＨ１７０２３.１；ＢＣ０１７０２３＿１

【００３９】

(２０)ＩＬ２０Ｒ(ＩＬ２０Ｒａ、ＺＣＹＴＯＲ７、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＦ１８４９７１)；Clark H.F., et al Genome Res. 13, 2265-2270, 2003；Mungall A.J., et al Nature 425, 805-811, 2003；Blumberg H., et al Cell 104, 9-19, 2001；Dumoutier L., et al J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001；Parrish-Novak J., et al J. Biol. Chem 277, 47517-47523, 2002；Pletnev S., et al (2003) Biochemistry 42:12617-12624；Sheikh F., et al (2004) J. Immunol. 172, 2006-2010；欧州特許１３９４２７４(実施例１１)；米国公開特許２００４００５３２０(実施例５)；国際公開２００３０２９２６２(７４～７５頁)；国際公開２００３００２７１７(請求項２；６３頁)；国際公開２０

０２２２１５３（４５～４７頁）；米国公開特許２００２０４２３６６（２０～２１頁）；国際公開２００１４６２６１（５７～５９頁）；国際公開２００１４６２３２（６３～６５頁）；国際公開９８３７１９３（請求項１；５５～５９頁）；受託：Ｑ９ＵＨＦ４；Ｑ６ＵＷＡ９；Ｑ９６ＳＨ８；ＥＭＢＬ；ＡＦ１８４９７１；ＡＡＦ０１３２０．１。

【００４０】

（２１）Ｂｒｅｖｉｃａｎ（ＢＣＡＮ、ＢＥＨＡＢ、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＦ２２９０５３）Gary S.C., et al Gene 256, 139-147, 2000；Clark H.F., et al Genome Res. 13, 2265-2270, 2003；Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002；米国公開特許２００３１８６３７２（請求項１１）；米国公開特許２００３１８６３７３（請求項１１）；米国公開特許２００３１１９１３１（請求項１；図５２）；米国公開特許２００３１１９１２２（請求項１；図５２）；米国公開特許２００３１１９１２６（請求項１）；米国公開特許２００３１１９１２１（請求項１；図５２）；米国公開特許２００３１１９１２９（請求項１）；米国公開特許２００３１１９１３０（請求項１）；米国公開特許２００３１１９１２８（請求項１；図５２）；米国公開特許２００３１１９１２５（請求項１）；国際公開２００３０１６４７５（請求項１）；国際公開２０００２０２６３４（請求項１）；

【００４１】

（２２）ＥｐｈＢ２Ｒ（ＤＲＴ、ＥＲＫ、Ｈｅｋ５、ＥＰＨＴ３、Ｔｙｒｏ５、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿００４４４２）Chan, J. and Watt, V.M, Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991) Oncogene 10 (5): 897-905 (1995)、Annu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998)、Int. Rev. Cytol. 196:177-244 (2000))；国際公開２００３０４２６６１（請求項１２）；国際公開２０００５３２１６（請求項１；４１頁）；国際公開２００４０６５５７６（請求項１）；国際公開２００４０２０５８３（請求項９）；国際公開２００３００４５２９（１２８～１３２頁）；国際公開２０００５３２１６（請求項１；４２頁）；相互参照：ＭＩＭ：６００９９７；ＮＰ＿００４４３３．２；ＮＭ＿００４４４２＿１

【００４２】

（２３）ＡＳＬＧ６５９（Ｂ７ｈ、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＸ０９２３２８）米国公開特許２００４０１０１８９９（請求項２）；国際公開２００３１０４３９９（請求項１１）；国際公開２００４０００２２１（図３）；米国公開特許２００３１６５５０４（請求項１）；米国公開特許２００３１２４１４０（実施例２）；米国公開特許２００３０６５１４３（図６０）；国際公開２００２１０２２３５（請求項１３；２９９頁）；米国公開特許２００３０９１５８０（実施例２）；国際公開２００２１０１８７（請求項６；図１０）；国際公開２００１９４６４１（請求項１２；図７ｂ）；国際公開２００２０２６２４（請求項１３；図１Ａ－１Ｂ）；米国公開特許２００２０３４７４９（請求項５４；４５～４６頁）；国際公開２００２０６３１７（実施例２；３２０～３２１頁、請求項３４；３２１～３２２頁）；国際公開２００２７１９２８（４６８～４６９頁）；国際公開２００２０２５８７（実施例１；図１）；国際公開２００１４０２６９（実施例３；１９０～１９２頁）；国際公開２０００３６１０７（実施例２；２０５～２０７頁）；国際公開２００４０５３０７９（請求項１２）；国際公開２００３００４９８９（請求項１）；国際公開２００２７１９２８（２３３～２３４頁、４５２～４５３頁）；国際公開０１１６３１８；

【００４３】

（２４）ＰＳＣＡ（前立腺幹細胞抗原前駆体、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＪ２９７４３６）Reiter R.E., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 1735-1740, 1998；Gu Z., et al Oncogene 19, 1288-1296, 2000；Biochem Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3): 783-788；国際公開２００４０２２７０９；欧州特許第１３９４２７４号（実施例１１）；米国公開特許２００４０１８５５３（請求項１７）；国際公開２００３００８５３７（請求項１）；国際公開２００２８１６４６（請求項１；１６４頁）；国際公開２００３００３９０６（請求項１０；２８８頁）；国際公開２００１４０３０９（実施例１；図１７）；米国公開特許２００１０５５７５１（実施例１；図１ｂ）；国際公開２０００３２７５２（請求項１８；図１）；国際公開９８５１８０５（請求項１７；９７頁）；国際公開９８５１８２４（

請求項１０；９４頁)；国際公開９８４０４０３(請求項２；図１Ｂ)；受託：Ｏ４３６５３；ＥＭＢＬ；ＡＦ０４３４９８；ＡＡＣ３９６０７．１。

【００４４】

(２５) ＧＥＤＡ（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＹ２６０７６３)；ＡＡＰ１４９５４脂肪腫ＨＭＧＩＣ融合－パートナー様タンパク質／ｐｉｄ＝ＡＡＰ１４９５４．１－ヒト種：ホモサピエンス(ヒト) 国際公開２００３０５４１５２(請求項２０)；国際公開２００３００８４２(請求項１)；国際公開２００３０２３０１３(実施例３、請求項２０)；米国公開特許２００３１９４７０４(請求項４５)；相互参照：ＧＩ：３０１０２４４９；ＡＡＰ１４９５４．１；ＡＹ２６０７６３＿１

【００４５】

(２６) ＢＡＦＦ-Ｒ（Ｂ細胞活性化因子レセプター、ＢＬｙＳレセプター３、ＢＲ３、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＰ＿４４３１７７．１)；ＮＰ＿４４３１７７ ＢＡＦＦレセプター／ｐｉｄ＝ＮＰ＿４４３１７７．１－ホモサピエンス；Thompson, J.S., et al Science 293 (5537), 2108-2111 (2001)；国際公開２００４０５８３０９；国際公開２００４０１１６１１；国際公開２００３０４５４２２(実施例；３２～３３頁)；国際公開２００３０１４２９４(請求項３５；図６Ｂ)；国際公開２００３０３５８４６(請求項７０；６１５～６１６頁)；国際公開２００２９４８５２(段落１３６－１３７)；国際公開２００２３８７６６(請求項３；１３３頁)；国際公開２００２２４９０９(実施例３；図３)；相互参照：ＭＩＭ：６０６２６９；ＮＰ＿４４３１７７．１；ＮＭ＿０５２９４５＿１

【００４６】

(２７) ＣＤ２２（Ｂ細胞レセプターＣＤ２２-Ｂアイソフォーム、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＰ-００１７６２．１)；Stamenkovic, I. and Seed, B., Nature 345 (6270), 74-77 (1990)；米国公開特許２００３１５７１１３；米国公開特許２００３１１８５９２；国際公開２００３０６２４０１(請求項９)；国際公開２００３０７２０３６(請求項１；図１)；国際公開２００２７８５２４(実施例２)；相互参照：ＭＩＭ：１０７２６６；ＮＰ＿００１７６２．１；ＮＭ＿００１７７１＿１

【００４７】

(２８) ＣＤ７９ａ（ＣＤ７９Ａ、ＣＤ７９、免疫グロブリン関連α、Ｉｇβと共有結合的に相互作用し(ＣＤ７９Ｂ)、ＩｇＭ分子と表面上で複合体を形成し、Ｂ細胞分化に関与するシグナルを伝達するＢ細胞特異的タンパク質 ＰＲＯＴＥＩＮ ＳＥＱＵＥＮＣＥ Ｆｕｌｌ ｍｐｇｇｐｇｖ...ｄｖｑｌｅｋｐ（１..２２６；２２６ａａ)、ｐＩ：４．８４、ＭＷ：２５０２８ ＴＭ：２ [Ｐ] 遺伝子染色体：１９ｑ１３．２、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＰ＿００１７７４．１０）国際公開２００３０８８８０８、米国公開特許２００３０２２８３１９；国際公開２００３０６２４０１(請求項９)；米国公開特許２００２１５０５７３(請求項４、１３～１４頁)；国際公開９９５８６５８(請求項１３、図１６)；国際公開９２０７５７４(図１)；米国特許第５６４４０３３号；Ha et al (1992) J. Immunol. 148(5): 1526-1531；Mueller et al (1992) Eur. J. Biochem 22:1621-1625；Hashimoto et al (1994) Immunogenetics 40(4): 287-295；Preud'homme et al (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1): 141-146；Yu et al (1992) J. Immunol. 148(2) 633-637；Sakaguchi et al (1988) EMBO J. 7(11): 3457-3464；

【００４８】

(２９) ＣＸＣＲ５（バーキットリンパ腫レセプター１、ＣＸＣＬ１３ケモカインによって活性化され、リンパ球移動及び体液性免疫において機能し、ＨＩＶ－２感染並びに、おそらくＡＩＤＳ、リンパ腫、メラノーマ及び白血病の発達において働くＧタンパク質結合レセプター）ＰＲＯＴＥＩＮ ＳＥＱＵＥＮＣＥ Ｆｕｌｌ ｍｎｙｐｌｔｌ...ａｔｓｌｔｔｆ（１..３７２；３７２ａａ)、ｐＩ：８．５４ ＭＷ：４１９５９ ＴＭ：７ [Ｐ] 遺伝子染色体：１１ｑ２３．３、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＰ＿００１７０７．１）国際公開２００４０４０００；国際公開２００４０１５４２６；米国公開特許２００３１０５２９２(実施例２)；米国特許第６５５５３３９(実施例２)；国際公開２００２６１０８７(図１)；国際公開２００１５７１８８(請求項２０、２６９頁)；国際公開２００１７２８３

0(１２～１３頁)；国際公開２０００２２１２９(実施例１、１５２～１５３頁、実施例２、２５４～２５６頁)；国際公開９９２８４６８(請求項１、３８頁)；米国特許第５４４００２１号(実施例２、段落４９－５２)；国際公開９４２８９３１(５６～５８頁)；国際公開９２１７４９７(請求項７、図５)；Dobner et al (1992) Eur. J. Immunol. 22:2795-2799；Barella et al (1995) Biochem J. 309:773-779；

【００４９】

(３０) ＨＬＡ-ＤＯＢ(ペプチドを結合し、ＣＤ４＋Ｔリンパ球に対してそれらを提示するＭＨＣクラスＩＩ分子(Ｉａ抗原)のβ サブユニット) ＰＲＯＴＥＩＮ ＳＥＱＵＥＮＣＥ Ｆｕｌｌ ｍｇｓｇｗｖｐ...ｖｌｌｐｑｓｃ (１..２７３; ２７３ａａ, ｐＩ: ６.５６ ＭＷ: ３０８２０ ＴＭ: １ [Ｐ] 遺伝子染色体: ６ｐ２１.３、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＰ_００２１１１.１) Tonnelle et al (1985) EMBO J. 4(11): 2839-2847；Jonsson et al (1989) Immunogenetics 29(6): 411-413；Beck et al (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441；Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903；Servenius et al (1987) J. Biol. Chem 262:8759-8766；Beck et al (1996) J. Mol. Biol. 255:1-13；Naruse et al (2002) Tissue Antigens 59:512-519；国際公開９９５８６５８(請求項１３、図１５)；米国特許第６１５３４０８号(段落３５－３８)；米国特許第５９７６５５１号(段落１６８－１７０)；米国特許第６０１１１４６号(段落１４５－１４６)；Kasahara et al (1989) Immunogenetics 30(1): 66-68；Larhammar et al (1985) J. Biol. Chem 260(26): 14111-14119；

【００５０】

(３１) Ｐ２Ｘ５ (細胞外ＡＴＰによってゲートされるイオンチャネルであるプリンレセプターＰ２Ｘリガンドゲートイオンチャネル５はシナプス伝達及び神経発生に関与し得、欠損すると特発性の排尿筋不安定性の病態生理をもたらしうる) ＰＲＯＴＥＩＮ ＳＥＱＵＥＮＣＥ Ｆｕｌｌ ｍｇｑａｇｃｋ...ｌｅｐｈｒｓｔ (１..４２２; ４２２ａａ)、ｐＩ: ７.６３、ＭＷ: ４７２０６ ＴＭ: １ [Ｐ] 遺伝子染色体: １７ｐ１３.３、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＰ_００２５５２.２) Le et al (1997) FEBS Lett. 418(1-2): 195-199；国際公開２００４０４７７４９；国際公開２００３０７２０３５(請求項１０)；Touchman et al (2000) Genome Res. 10: 165-173；国際公開２００２２２６６０(請求項２０)；国際公開２００３０９３４４４(請求項１)；国際公開２００３０８７７６８(請求項１)；国際公開２００３０２９２７７(８２頁)；

【００５１】

(３２) ＣＤ７２ (Ｂ細胞分化抗原ＣＤ７２、Ｌｙｂ-２) ＰＲＯＴＥＩＮ ＳＥＱＵＥＮＣＥ Ｆｕｌｌ ｍａｅａｉｔｙ...ｔａｆｒｆｐｄ (１..３５９; ３５９ａａ)、ｐＩ: ８.６６、ＭＷ: ４０２２５ ＴＭ: １ [Ｐ] 遺伝子染色体: ９ｐ１３.３、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＰ_００１７７３.１) ＷＯ２００４０４２３４６ (ｃｌａｉｍ ６５)；国際公開２００３０２６４９３(５１～５２頁、５７～５８頁)；国際公開２０００７５６５５(１０５～１０６頁)；Von Hoegen et al (1990) J. Immunol. 144(12): 4870-4877；Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903；

【００５２】

(３３) ＬＹ６４ (ロイシンリッチリピート(ＬＲＲ)ファミリのタイプＩ膜タンパク質であるリンパ球抗原６４ (ＲＰ１０５)はＢ細胞活性化及びアポトーシスを調節し、機能が欠損すると全身性エリテマトーデス患者における疾患活性の増加に関連する) ＰＲＯＴＥＩＮ ＳＥＱＵＥＮＣＥ Ｆｕｌｌ ｍａｆｄｖｓｃ...ｒｗｋｙｑｈｉ (１..６６１; ６６１ａａ)、ｐＩ: ６.２０、ＭＷ: ７４１４７ ＴＭ: １ [Ｐ] 遺伝子染色体: ５ｑ１２、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＰ_００５５７３.１) 米国公開特許２００２１９３５６７；国際公開９７０７１９８(請求項１１、３９～４２頁)；Mura et al (1996) Genomics 38(3): 299-304；Mura et al (1998) Blood 92:2815-2822；国際公開２００３０８３０４７；国際公開９７４４４５２(請求項８、５７～６１頁)；国際公開２０００１２１３０(２４～２６頁)；

【００５３】

(３４) ＦＣＲＨ１（Ｃ２タイプ Ｉｇ様及びＩＴＡＭドメインを含む免疫グロブリンＦｃドメインの推定レセプターであるＦｃレセプター様タンパク質１はＢリンパ球分化において働きを有しうる）ＰＲＯＴＥＩＮ ＳＥＱＵＥＮＣＥ Ｆｕｌｌ ｍｌｐｒｌｌｌ...ｖｄｙｅｄａｍ（１..４２９；４２９ａａ）、ｐＩ：５.２８、ＭＷ：４６９２５ ＴＭ：１［Ｐ］遺伝子染色体：１ｑ２１-１ｑ２２、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＰ_４４３１７０.１）国際公開２００３０７７８３６；国際公開２００１３８４９０(請求項６、図１８Ｅ－１－１８－Ｅ－２)；Ｄａｖｉｓ ｅｔ ａｌ（２００１）Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ ＵＳＡ ９８(１７)：９７７２-９７７７；国際公開２００３０８９６２４(請求項８)；欧州特許第１３４７０４６号(請求項１)；国際公開２００３０８９６２４(請求項７)；

【００５４】

(３５) ＩＲＴＡ２（Ｂ細胞発生及びリンパ球発生において役割を有しうる推定免疫レセプターである免疫グロブリンスーパーファミリレセプター転座関連２；いくつかのＢ細胞悪性腫瘍において転座による遺伝子の制御不能が生じる）ＰＲＯＴＥＩＮ ＳＥＱＵＥＮＣＥ Ｆｕｌｌ ｍｌｌｗｖｉｌ...ａｓｓａｐｈｒ（１..９７７；９７７ａａ）、ｐＩ：６.８８ ＭＷ：１０６４６８ ＴＭ：１［Ｐ］遺伝子染色体：１ｑ２１、Ｇｅｎｂａｎｋ 受託番号ＮＰ_１１２５７１.１）国際公開２００３０２４３９２（請求項２、図９７）；Ｎａｋａｙａｍａ ｅｔ ａｌ（２０００）Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ. Ｒｅｓ. Ｃｏｍｍｕｎ. ２７７(１)：１２４-１２７；国際公開２００３０７７８３６；国際公開２００１３８４９０(請求項３、図１８Ｂ－１－１８Ｂ－２)

【００５５】

(３６) ＴＥＮＢ２(ＴＭＥＦＦ２、ｔｏｍｏｒｅｇｕｌｉｎ、ＴＰＥＦ、ＨＰＰ１、ＴＲ、推定膜貫通プロテオグリカン、増殖因子のＥＧＦ／ヘレグリンファミリおよびフォリスタチンに関連する)；３７４ａａ、ＮＣＢＩ受託：ＡＡＤ５５７７６、ＡＡＦ９１３９７、ＡＡＧ４９４５１、ＮＣＢＩ ＲｅｆＳｅｑ：ＮＰ＿０５７２７６；ＮＣＢＩ Ｇｅｎｅ：２３６７１；ＯＭＩＭ：６０５７３４；ＳｗｉｓｓＰｒｏｔ Ｑ９ＵＩＫ５；Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＦ１７９２７４；ＡＹ３５８９０７、ＣＡＦ８５７２３、ＣＱ７８２４３６。国際公開２００４０７４３２０；日本公開特許２００４１１３１５１；国際公開２００３０４２６６１；国際公開２００３００９８１４；欧州特許第１２９５９４４号(６９～７０頁)；国際公開２００２３０２６８(３２９頁)；国際公開２００１９０３０４；米国公開特許２００４２４９１３０；米国公開特許２００４０２２７２７；国際公開２００４０６３３５５；米国公開特許２００４１９７３２５；米国公開特許２００３２３２３５０；米国公開特許２００４００５５６３；米国公開特許２００３１２４５７９；Ｈｏｒｉｅ ｅｔ ａｌ（２０００）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ６７:１４６-１５２；Ｕｃｈｉｄａ ｅｔ ａｌ（１９９９）Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ. Ｒｅｓ. Ｃｏｍｍｕｎ. ２６６:５９３-６０２；Ｌｉａｎｇ ｅｔ ａｌ（２０００）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ. ６０: ４９０７-１２；Ｇｌｙｎｎｅ-Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ（２００１）Ｉｎｔ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ. Ｏｃｔ １５;９４(２): １７８-８４。

【００５６】

本発明の抗体－薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)の抗体は、ＥｒｂＢ遺伝子によってコード化されるレセプターに特異的に結合しうる。抗体は、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３およびＨＥＲ４から選択されるＥｒｂＢレセプターに特異的に結合してよい。ＡＤＣは、ＨＥＲ２レセプターの細胞外ドメインに特異的に結合しても、ＨＥＲ２レセプターを過剰発現する腫瘍細胞の増殖を阻害してもよい。ハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ)は、ヒト上皮細胞増殖因子レセプター２タンパク質、ＨＥＲ２(ＥｒｂＢ２)の細胞外ドメイン(ＥＣＤ)に選択的に結合する(米国特許第５８２１３３７号；米国特許第６０５４２９７号；米国特許第６４０７２１３号；米国特許第６６３９０５５号；Ｃｏｕｓｓｅｎｓ ｅｔ ａｌ（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３０:１１３２-９；Ｓｌａｍｏｎ, ｅｔ ａｌ（１９８９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４４:７０７-１２)。トラスツズマブは、ＨＥＲ２に結合するマウス抗体(４Ｄ５)の相補性決定領域(ＣＤＲ)を有するヒトフレームワーク領域を含むＩｇＧ１κ 抗体である。トラスツズマブはＨＥＲ２抗原に結合し、それによってＨＥＲ２を過剰に発現するヒト腫瘍細胞の増殖を阻害する(Ｈｕｄｚｉａｋ ＲＭ ｅｔ ａｌ（１９８９）Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ ９:１１６５-７２；Ｌｅｗｉｓ ＧＤ, ｅｔ ａｌ（１９９３）Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ; ３７:２５５-６３；Ｂａｓｅｌｇａ Ｊ, ｅｔ ａｌ（１９９８）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ. ５８: ２８２５-２８３１)。

【００５７】

抗体は、様々な技術を用いて測定することができる発色性基質の化学的な変化を触媒する酵素によって標識されるか、コンジュゲートされてよい。例えば、酵素は、分光光度的に測定することができる基質に色彩変化を触媒してよい。あるいは、酵素は基質の発光又は化学発光を変化しうる。発光の変化を定量化するための技術は公知である。化学発光基質は、ジオキセタン基のO－O結合の切断といった化学反応によって電子的に励起されるようになり、その後(例えば化学発光測定器を使用して)測定することができ、又は蛍光アクセプターにエネルギーを供与する光を発しうる。酵素的標識の例は、ルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ；米国特許第４７３７４５６号)、ルシフェリン、２，３－ジヒドロフタラジンジオン類、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼ、例えば西洋わさびペルオキシダーゼ(ＨＲＰ)、アルカリホスファターゼ(ＡＰ)、β－ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ(例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース－６－ホスフェートデヒドロゲナーゼ)、複素環式オキシダーゼ(例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ)、ラクトペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ等々を含む。抗体に酵素をコンジュゲートさせるための技術は、O'Sullivan et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay, Methods in Enzym (J. Langone及びH. Van Vunakis編), Academic press, New York, 73: 147-166 (1981)に記載されている。

【００５８】

酵素－基質の組合せの例には、例えば以下のものが含まれる：(ｉ) 基質として水素ペルオキシダーゼを有する西洋わさびペルオキシダーゼ(ＨＲＰ)、ここで水素ペルオキシダーゼが染料前駆体(例えば、オルソフェニレン(orthophenylene)ジアミン(ＯＰＤ)又は３，３'，５，５'テトラメチルのベンジジン塩酸塩(ＴＭＢ))を酸化する；(ｉｉ) 色素生産性基質としてリン酸パラグラフ-ニトロフェニルを有するアルカリホスファターゼ(ＡＰ)；及び(ｉｉｉ) 色素生産性基質(例えばｐ-ニトロフェニル-β-Ｄ-ガラクトシダーゼ)又は蛍光発生基質４-メチルウンベリフェリル(methylumbelliferyl)-β-Ｄ-ガラクトシダーゼを有するβ-Ｄ-ガラクトシダーゼ(β-Ｄ-Ｇａｌ)。多数の他の酵素－基質の組合せは当業者にとって利用可能である(米国特許第４２７５１４９号；同第４３１８９８０号)。

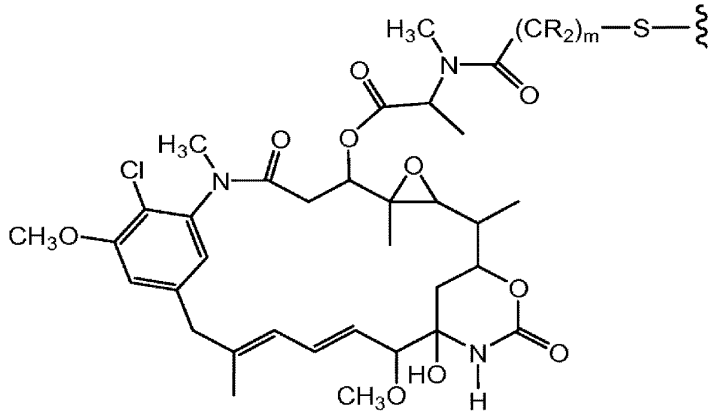
標識は、抗体と直接又は非共有的にコンジュゲートされてよい。例えば、抗体は、ビオチンとコンジュゲートさせることができ、前述した分類のうちの何れかはストレプトアビジンなどのアビジンとコンジュゲートさせることができ、その逆もまた可能である。ビオチンは選択的にアビジンと結合し、したがって、標識はこの間接的な方法でポリペプチド変異体にコンジュゲートさせることができる。

【００５９】

薬剤部分

式Ｉの抗体－薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)の薬剤部分(Ｄ)は、細胞障害効果又は細胞分裂停止効果を有する任意の化合物、部分又は基を含む。薬剤部分は、マイクロチューブリンインヒビター、有糸分裂インヒビター、トポイソメラーゼインヒビター又はＤＮＡ干渉物質として機能しうる化学療法剤と、癌療法のために用いられる特別なものとを含む。式Ｉの抗体－薬剤コンジュゲートの薬剤部分は、他の作用機構を有してもよく、いずれかのメカニズムに限定されるものではない。

式Ｉの抗体薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)の薬剤部分(Ｄ)は以下の構造を有するメイタンシノイドを含む：



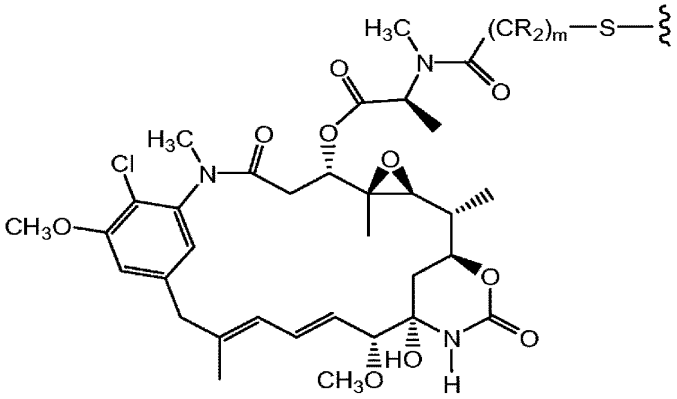
このとき、波線は抗体薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)のリンカー(Ｌ)へのＤの硫黄原子の共有結合を示す。Ｒはそれぞれ Ｈ 又は C_1 － C_6 アルキルであってよい。硫黄原子にアミド基を付着しているアルキレン鎖はメチル、エチル又はプロピルであってよく、すなわち、ｍは１、２又は３である。

【００６０】

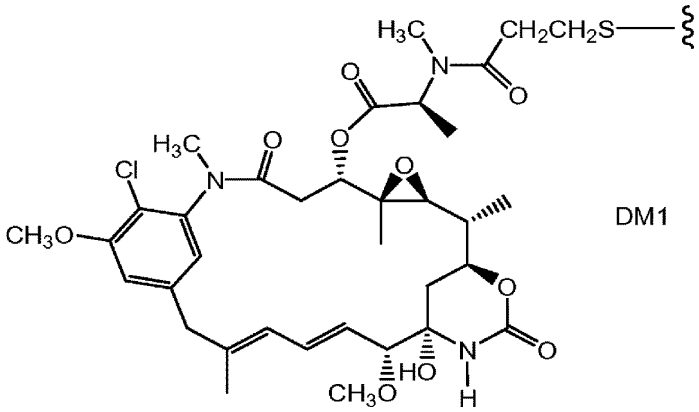
メイタンシン化合物は、マイクロチューブリンタンパク質であるチューブリンの重合阻害により有糸分裂中の微小管の形成を阻害することによって細胞増殖を阻害する(Remillard et al (1975) Science 189:1002-1005；米国特許第５２０８０２０号)。メイタンシンは、東アフリカの低木Ｍａｙｔｅｎｕｓ ｓｅｒｒａｔａから単離され、メトトレキセート、ダウノルビシンおよびビンクリスチンのような従来の癌化学療法剤の１００～１０００倍もの細胞障害性があることが示された(米国特許第３８９６１１１号)。その後、いくつかの微生物もメイタンシノール及びメイタンシノールのＣ－３エステルといったメイタンシノイドを生成することが発見された(米国特許第４１５１０４２号)。また、メイタンシノールおよびメイタンシノールの類似体の合成Ｃ－３エステルも報告された(Kupchan et al., (1978) J. Med. Chem 21:31-37；Higashide et al. (1977) Nature 270:721-722；Kawai et al., 32 Chem Pharm (1984) Bull. 3441-3451)。Ｃ－３エステルが調製されているメイタンシノールの類似体は、芳香族環(例えばデクロロ)上に、又は、Ｃ－９、Ｃ－１４(例えばヒドロキシル化したメチル基)、Ｃ－１５、Ｃ－１８、Ｃ－２０及びＣ-４，５に修飾を有するメイタンシノールを含む。天然に生じる及び合成のＣ－３エステルは２つのグループに分類されうる：(ａ) 単一のカルボン酸を有するＣ－３エステル(米国特許第４２４８８７０号；米国特許第４２６５８１４号；米国特許第４３０８２６８号；米国特許第４３０８２６９号；米国特許第４３０９４２８号；米国特許第４３１７８２１号；米国特許第４３２２３４８号；及び米国特許第４３３１５９８号)と、(ｂ) Ｎ-メチル-Ｌ-アラニンの誘導体を有するＣ-３エステル(米国特許第４１３７２３０号及び米国特許第４２６０６０８号；及びKawai et al., (1984) Chem Pharm Bull. 32:3441-3451)。グループ(ｂ)のエステルは、グループ(ａ)のエステルより非常に細胞障害作用があることが明らかとされた。

【００６１】

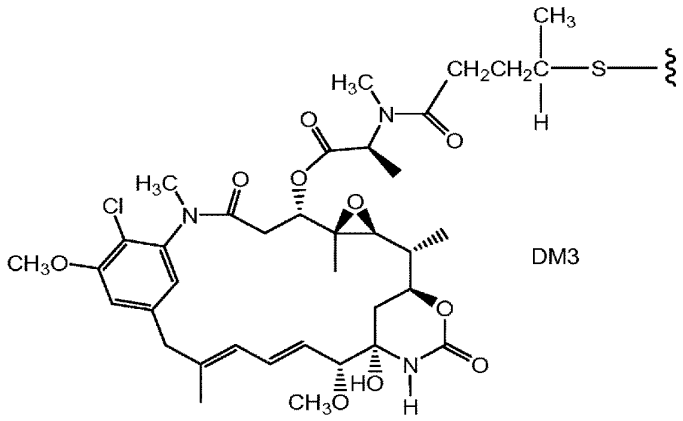
他の薬剤部分と同様に、メイタンシノイド薬剤部分のすべての立体異性体、Ｄのキラル炭素でのＲ及びＳ配位の組合せは、本発明の化合物のために考慮される。一実施態様では、メイタンシノイド薬剤部分(Ｄ)は以下の立体化学を有する：



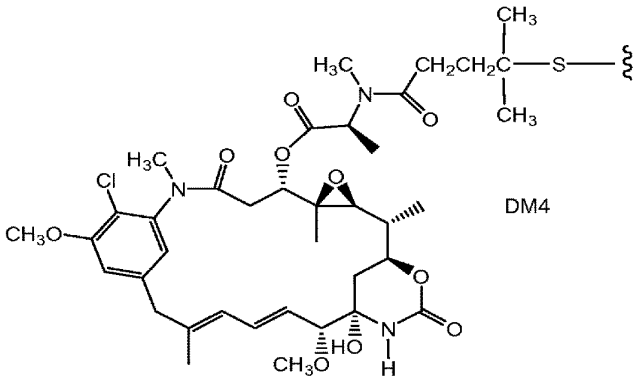
メイタンシノイド薬剤部分の例示的な実施態様は、以下を含む：ＤＭ１、（ＣＲ$_2$）$_m$＝ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$；ＤＭ３、（ＣＲ$_2$）$_m$＝ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ（ＣＨ$_3$）；及びＤＭ４、（ＣＲ$_2$）$_m$＝ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｃ（ＣＨ$_3$）$_2$、以下の構造を有する：



DM1



DM3

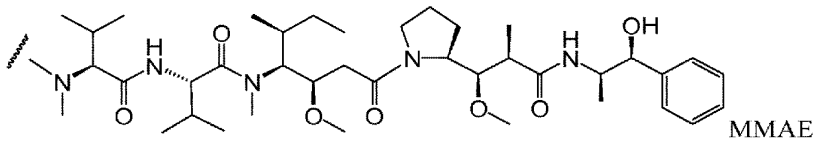


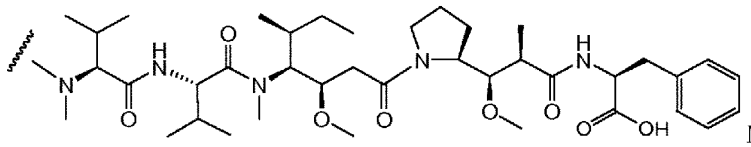
【００６２】

また、抗体薬剤イムノコンジュゲート(ＡＤＣ)の薬剤部分(Ｄ)は、ドラスタチン及びそのペプチジル類似体及び誘導体、アウリスタチン(auristatin)を含む(米国特許第５６３５４８３号；同第５７８０５８８号)。ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管動態、ＧＴＰ加水分解及び核と細胞の分割を妨げ(Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584)、抗癌活性(米国特許第５６６３１４９号)及び抗真菌性活性(Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2961-2965)を有することが示されている。アウリスタチンペプチドである、アウリスタチンＥ(ＡＥ)とドラスタチンの合成類似体であるモノメチルアウリスタチン(ＭＭＡＥ)(国際公開０２／０８８１７２)は、(i) キメラモノクローナル抗体ｃＢＲ９６(カルチノーマ上のルイスＹに特異的)、(ii) 血液系悪性腫瘍上のＣＤ３０に特異的であるｃＡＣ１０(Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4): 765-773; Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7): 778-784; Francisco et al (2003) Blood 102(4): 1458-1465; 米国公開特許２００４／００１８１９４)、(iii) ＣＤ２０発現癌及び免疫不全の治療のためのリツキサンなどの抗ＣＤ２０抗体、(iv) 結腸直腸癌の治療のための抗ＥｐｈＢ２Ｒ抗体２Ｈ９(Mao et al (2004) Cancer Research 64(3): 781-788)、(v) Ｅセレクチン抗体(Bhaskar et al (2003) Cancer Res. 63: 6387-6394)、(vi) トラスツズマブ(ハーセプチン(登録商標)、米国公開特許２００５／０２３８６４９)、及び(vi) 抗ＣＤ３０抗体(国際公開０３／０４３５８３)へ、薬剤成分としてコンジュゲートされていた。アウリスタチンＥの変異体は、米国特許第５７６７２３７号及び米国特許第６１２４４３１号において開示され、モノクローナル抗体にコンジュゲートされるモノメチルアウリスタチンＥが含まれる(２００４年３月２８日に発表されたSenter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623)。アウリスタチン類似体ＭＭＡＥおよびＭＭＡＦは、様々な抗体にコンジュゲートされている(米国公開特許２００５／０２３８６４９)。

【００６３】

式Ｉの抗体－薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)のモノメチルアウリスタチン薬剤部分(Ｄ)は、アウリスタチン薬剤部分であるＭＭＡＥ(米国特許第７０９０８４３号)およびＭＭＡＦ(米国公開特許２００５／０２３８６４９)を含む。ＭＭＡＥ又はＭＭＡＦ薬剤部分のＮ末端は、抗体の設計されたシステインに、リンカーを介して共有結合的に付着される。




MMAF

他の例示的なアウリスタチン薬剤部分には、ペンタペプチドアウリスタチン薬剤成分のＣ末端にフェニルアラニンカルボキシ修飾を有するモノメチルバリン化合物(国際公開２００７／００８８４８)及びペンタペプチドアウリスタチン薬剤成分のＣ末端にフェニルアラニン側鎖修飾を有するモノメチルバリン化合物(国際公開２００７／００８６０３)が含まれる。

【００６４】

リンカー

リンカーは、式Ｉの抗体－薬剤コンジュゲートに従って抗体(Ａｂ)を薬剤成分(Ｄ)に共有結合的に接着させる原子の鎖又は共有結合を含む、二官能性ないしは多機能性の化学部分である。抗体－薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)は、薬剤及び抗体への結合について反応性機能を有するリンカー(Ｌ)を用いて都合良く調製されうる。リンカーは、チオール又はアミノといった抗体上に存在する求核基と反応する求電子基を有してもよい。抗体のシステインチオールは、リンカー上の求電子基と反応することができ、リンカーとの共有結合を形成する。有用な求電子基には、マレイミドおよびハロアセトアミド基を含むが、これらに限定されるものではない。また、リンカーは、アルキルジイルといった二価のラジカル、アリーレン、ヘテロアリーレン、アルキルオキシ(例としてポリエチレンオキシ、ＰＥＧ、ポリメチレンオキシ)とアルキラミノ(例えばポリエチレンアミノ、Jeffamine™)の繰り返しユニットである－(CR_2)$_n$Ｏ(CR_2)$_n$－などの部分、及び、スクシナート、スクシンアミド、ジグリコレート、マロネート及びカプロアミドを含む二酸エステル及びアミドが含まれる。抗体上の有用な求核基には、スルフヒドリル、ヒドロキシルおよびアミノ基が含まれるがこれらに限定されるものではない。

他の実施態様では、リンカー試薬又は薬剤-リンカー試薬は、抗体上に存在する求電子基と反応することができる反応性の求核官能基を有し、共有結合を形成する。抗体上の有用な求電子基には、アルデヒドおよびケトンカルボニル基が含まれるが、これらに限定されるものではない。リンカー上の有用な求核基には、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレートおよびアリールヒドラジドが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【００６５】

リンカーは一又は一又は複数のリンカー成分から成ってもよい。例示的なリンカー成分には、６-マレイミドカプロイル(「ＭＣ」)、マレイミドプロパノイル(「ＭＰ」)、バリン－シトルリン(「ｖａｌ－ｃｉｔ」又は「ｖｃ」)、アラニン－フェニルアラニン(「ａｌａ－ｐｈｅ」又は「ａｆ」)、ｐ-アミノベンジルオキシカルボニル(「ＰＡＢ」)、Ｎ-スクシンイミジル４-(２-ピリジルチオ)ペンタノエート(「ＳＰＰ」)、Ｎ-スクシンイミジル４-(Ｎ-マレイミドメチル)シクロヘキサン-１カルボキシレート(「ＳＭＣＣ」)、Ｎ-スクシンイミジル(４-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(「ＳＩＡＢ」)、一又は複数の繰り返しユニットとしてのエチレンオキシ－CH_2CH_2O－(「ＥＯ」又は「ＰＥＯ」)が含まれる。更なるリンカー成分は当分野において周知であり、そのいくつかを本明細書中に記載する。

他の実施態様では、抗体は、一又は複数のスルフヒドリル基を導入するために化学的に改変されうる一又は複数のリジン残基を有する。抗体ユニットは、スルフヒドリル基の硫黄原子を介してリンカーユニットに結合する。リジンを改変するために用いられうる試薬には、限定するものではないが、Ｎ-スクシンイミジル Ｓ-アセチルチオアセテート(ＳＡＴＡ)及び２-イミノチオラン ヒドロクロライド(トラウト試薬)が含まれる。

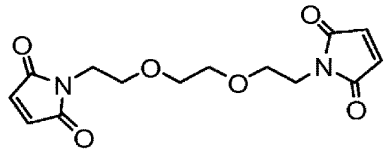
【００６６】

他の実施態様では、抗体は、一又は複数のスルフヒドリル基を持つように化学的に改変されうる一又は複数の糖質基を持っていてもよい。抗体ユニットは、リンカー、例としてストレッチャーユニットに、スルフヒドリル基の硫黄原子を介して結合する。さらに他の実施態様では、抗体は、酸化されて、アルデヒド(-ＣＨＯ)基を提供しうる一又は複数の糖質基を持っていてもよい(例としてLaguzza, et al, J. Med. Chem 1989, 32(3), 548-55を参照)。対応するアルデヒドはストレッチャー上の反応部位と結合しうる。抗体上のカルボニル基と反応しうるストレッチャー上の反応部位には、限定するものではないが、ヒドラジンおよびヒドロキシルアミンが含まれる。薬剤ユニットの接着又は会合のためにタンパク質を改変するための他のプロトコールは、Coligan et al., Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John Wiley & Sons (2002)に記載されており、該文献は出典明記によって本明細書中に援用される。

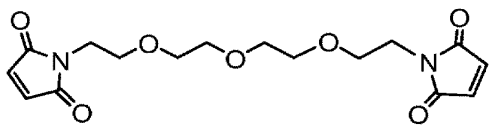
他の実施態様では、リンカーは、溶解性又は反応性を調節した基と置換してもよい。例えば、ＡＤＣを調製するために用いる合成手段に応じて、スルホン酸(-SO_3^-)又はアンモニウムなどの荷電性の置換基は、試薬の水溶性を増し、抗体又は薬剤成分とリンカー試薬とのカップリング反応を容易にしうるか、又はＤとＡｂ-Ｌ(抗体-リンカー)とのカップリング反応、又はＡｂとＤ-Ｌ(薬剤-リンカー試薬)とのカップリング反応を容易にしうる。

【００６７】

本発明の化合物は、限定するものではないが、以下のクロスリンカー試薬：ＢＭＰＥＯ、ＢＭＰＳ、ＥＭＣＳ、ＧＭＢＳ、ＨＢＶＳ、ＬＣ-ＳＭＣＣ、ＭＢＳ、ＭＰＢＨ、ＳＢＡＰ、ＳＩＡ、ＳＩＡＢ、ＳＭＣＣ、ＳＭＰＢ、ＳＭＰＨ、スルホ-ＥＭＣＳ、スルホ-ＧＭＢＳ、スルホ-ＫＭＵＳ、スルホ-ＭＢＳ、スルホ-ＳＩＡＢ、スルホ-ＳＭＣＣ、及びスルホ-ＳＭＰＢ、及びＳＶＳＢ(スクシンイミジル-(４-ビニルスルホン)ベンゾアート)、例えばPierce Biotechnology, Inc.から市販されているビスマレイミド試薬：ＤＴＭＥ、ＢＭＢ、ＢＭＤＢ、ＢＭＨ、ＢＭＯＥ、$BM(PEO)_2$、及び$BM(PEO)_3$にて調製されるＡＤＣを特別に意図する。ビスマレイミド試薬により、連続した様式又は同時の様式で、チオール含有薬剤成分、標識又はリンカー中間生成物に抗体のシステイン残基のチオール基が付着することができる。抗体、薬剤部分、標識又はリンカー中間生成物のチオール基と反応することができるマレイミド以外の他の官能基には、ヨードアセトアミド、ブロモアセトアミド、ビニルピリジン、ジスルフィド、ピリジルジスルフィド、イソシアネート及びイソチオシアネートが含まれる。また、有用なリンカー試薬は、Molecular Biosciences Inc.(Boulder, CO)などの他の商業的供給源により得ることができるし、Toki et al (2002) J. Org. Chem 67:1866-1872；Firestone et alの米国特許第６２１４３４５号；国際公開０２／０８８１７２；米国特許公開２００３１３０１８９；米国公開特許２００３０９６７４３；国際公開０３／０２６５７７；国際公開０３／０４３５８３；及び国際公開０４／０３２８２８に記載の手段に従って合成してもよい。



$BM(PEO)_2$



BM(PEO)$_3$

【００６８】

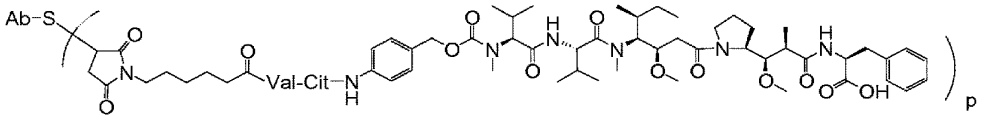
Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4): 765-773の７６６頁のコンジュゲーション法に従って、システイン改変抗体の反応性チオール基(米国公開特許２００７／００９２９４０)は、リンカー試薬又は薬剤-リンカー中間体と、マレイミド又はα-ハロカルボニルといった求電子官能基と、反応する。

【００６９】

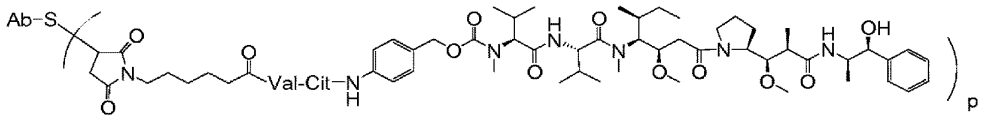
抗体薬剤コンジュゲート

式ＩのＡＤＣの実施態様には、米国公開特許２００５／０２３８６４９にて開示されるように、モノメチルアウリスタチン薬剤部分(Ｄ)であるＭＭＡＥおよびＭＭＡＦと、マレイミドカプロイル(ＭＣ)、バリン-シトルリン(ｖｃ)およびパラ-アミノベンジルカルバモイル(ＰＡＢ)サブユニットを含むリンカーとが含まれる。例示的なＡＤＣは以下を含む：

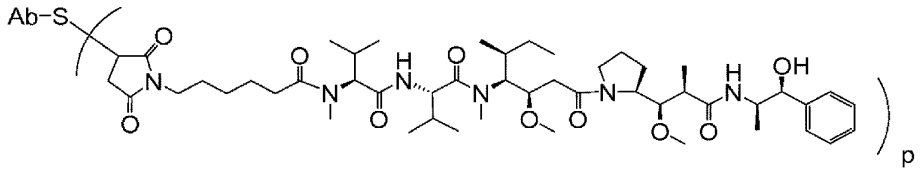
Ab-MC-vc-PAB-MMAF:



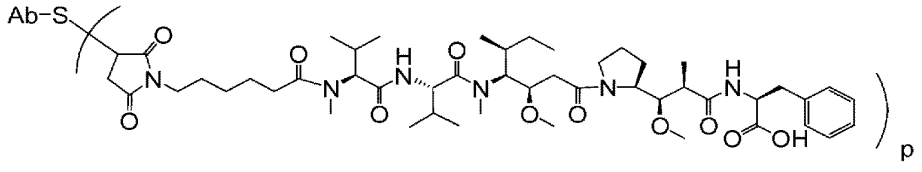
Ab-MC-vc-PAB-MMAE:



Ab-MC-MMAE:



Ab-MC-MMAF:



【００７０】

上記の例示的なモノメチルアウリスタチンＡＤＣは、反応性のシステインチオール基を有する抗体、例えばシステイン改変抗体(米国公開特許２００７／００９２９４０)と、薬剤リンカー試薬ＭＣ－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＰＡＢ－ＭＭＡＦ、ＭＣ－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ、ＭＣ－ＭＭＡＦおよびＭＣ－ＭＭＡＥそれぞれから調製されてよい(Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7): 778-784; Francisco et al (2003) Blo

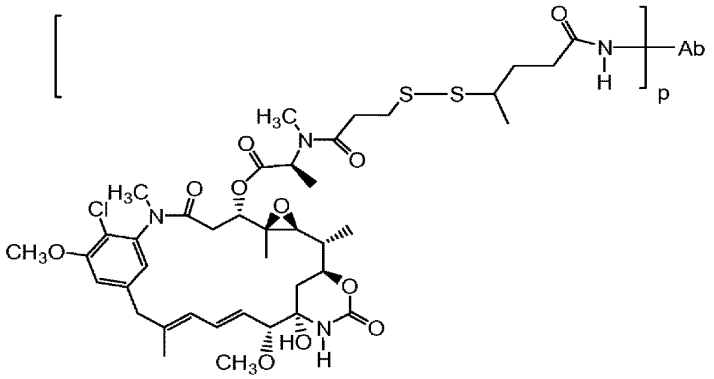
od 102:1458-1465；米国公開特許２００５／０２３８６４９)。

システイン改変抗体および対応するＡＤＣの特定の実施態様を図３に示し、上から下へ順に、軽鎖に位置する２つのＭＭＡＥ薬剤部分－Ｔｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＨＥＲ２　４Ｄ５　ＬＣ　Ｖ２０５Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ；重鎖に位置する２つのＭＭＡＥ薬剤部分－Ｔｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＨＥＲ２　４Ｄ５　ＨＣ　Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ；重鎖のＦｃ領域に位置する２つのＭＭＡＥ薬剤部分－Ｔｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＨＥＲ２　４Ｄ５　Ｆｃ　Ｓ４００Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ；Ｔｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＨＥＲ２　４Ｄ５　Ｆｃ　Ｓ４００Ｃ；及び、コンジュゲートのためのシステイン改変抗体：Ｔｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＨＥＲ２　４Ｄ５　Ｆｃ　Ｓ４００Ｃ。システイン改変抗体は、米国公開特許２００７／００９２９４０に従って設計され、選択される。

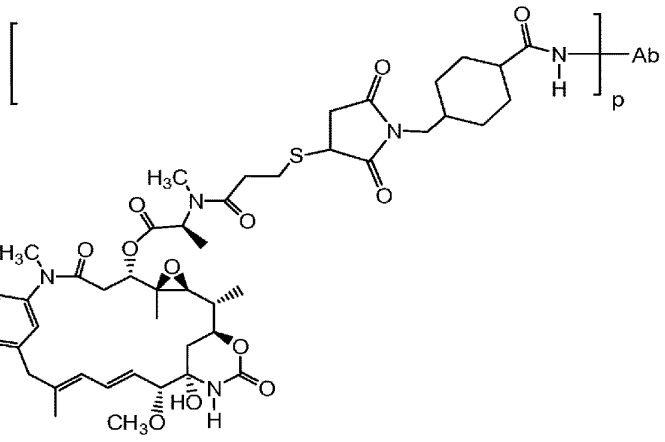
【００７１】

式ＩのＡＤＣの実施態様は、米国公開特許２００５／０２７６８１２に開示されるように、メイタンシノイド薬剤部分(Ｄ)　ＤＭ１、ＤＭ３およびＤＭ４と、ＳＰＰ、ＳＰＤＢおよびＳＭＣＣといったリンカー試薬から形成されるリンカーとを含む。例示的な抗体－薬剤コンジュゲートは、以下の

Ab-SPP-DM1:



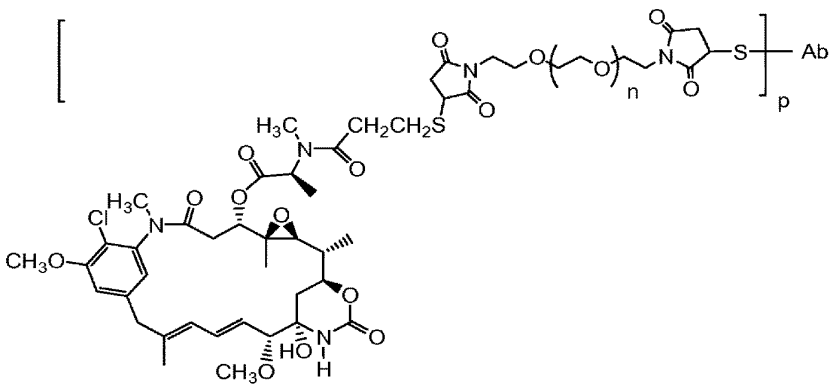
Ab-SMCC-DM1:



を含む。

【００７２】

ＤＭ１がＢＭＰＥＯリンカーを介して抗体のチオール基に結合している例示的な抗体薬剤コンジュゲートは、以下の構造を有する：



ここで、ｎは０、１又は２であり、ｐは１、２、３又は４である。

【００７３】

薬剤ローディング(薬剤負荷、Drug Loading)

薬剤ローディング値は、式Ｉの分子において、抗体当たりの薬剤部分の数であるｐによって表される。式ＩのＡＤＣの組成物には、１からおよそ８の薬剤とコンジュゲートされた抗体の混合物が含まれる。抗体と薬剤－リンカー試薬とのコンジュゲート又は抗体－リンカーと薬剤試薬とのコンジュゲートから生じる抗体－薬剤コンジュゲートの混合物は、コンジュゲート条件に応じて、およそ１からおよそ８の平均薬剤ローディング値を有するものとして特徴付けられる。抗体を薬剤部分にコンジュゲートすることによるＡＤＣの調製により、一又は複数の抗体に結合した薬剤を持つ生成分子の分布が生じ得、この抗体は薬剤部分に結合されておらず、ｐ＝０である。コンジュゲート反応からのＡＤＣの調製において抗体当たりの薬剤の平均数は、本発明の方法、すなわち親和性質量分析及びＥＬＩＳＡアッセイによって特徴付けられうる。ＥＬＩＳＡによって、あるＡＤＣ調製でのｐの平均値が決定されうる(Hamblett et al (2004) Clinical Cancer Res. 10: 7063-7070 ; Sanderson et al (2005) Clinical Cancer Res. 11: 843-852)。しかしながら、ｐ(薬剤)値の分布は、ＥＬＩＳＡの抗体－抗原結合および検出限界によって識別可能でない。また、抗体－薬剤コンジュゲートの検出のためのＥＬＩＳＡアッセイは、薬剤部分が重鎖又は軽鎖断片又は特定のアミノ酸残基といった抗体に付着しているところを決定しない。この重要な分布パラメータは、ＡＤＣ組成物の個々の分子の分離およびそれらの特徴づけと定量化を有する本発明の方法によって決定されてよい。試料の成分の分離は、方法の分離培地工程時、そして、質量分析工程の間に起こる。本発明の方法の分離培地工程の高い選択性により、複合した異質な生物学的試料から、それぞれのＡＤＣ成分の分離と精製が達成される。本発明の方法の質量分析工程の解像度と精度が高いので、分離されるＡＤＣ成分の検出と定量化が達成される。

【００７４】

本発明の方法は、ＡＤＣの抗体当たりの結合した薬剤(ローディング)の量と、重鎖及び軽鎖といった断片上の薬剤部分の分布を決定し、さらに、抗体のサブ断片座又は特定のアミノ酸残基で共有的に付着した薬剤部分を位置づけることができる。

あるＡＤＣでは、ｐは抗体上の付着部位の数によって限定されうる。例えば、付着がシステインチオールである場合、上記の例示的な実施態様のように、抗体はたった１つ又は複数のシステインチオール基を有してもよいし、付着しうるリンカーによってたった１つ又は複数の十分に活性なチオール基を有してもよい。リジンといった反応性の低いアミノ酸残基は、コンジュゲートさせる抗体に多くあるが、反応せず、薬剤部分又は薬剤－リンカー試薬との反応に利用されない。薬剤ローディングが高い、例えばｐ＞５であると、特定の抗体－薬剤コンジュゲートの凝集、難溶性、毒性又は細胞透過性の喪失が起こりうる。

【００７５】

典型的に、理論的な最大よりも少ない薬剤部分がコンジュゲート反応の間に抗体にコンジュゲートされる。抗体は、例えば、薬剤－リンカー中間体又はリンカー試薬と反応しない多くのリジン残基を含みうる。最も反応性の高いリジン基のみがアミン－反応性リンカー試薬と反応しうる。また、最も反応性の高いシステインチオール基のみがチオール－反応性リンカー試薬と反応しうる。一般に、抗体は薬剤部分に結合しうる多くの遊離した反応性のシステインチオール基を含まない。抗体のほとんどのシステインチオール残基はジスルフィド架橋として存在し、部分的ないしは完全に還元な条件下で、ジチオトレイトール(ＤＴＴ)又はトリス(２-カルボキシエチル)ホスフィンヒドロクロライド(ＴＣＥＰ)などの還元剤により還元される。さらに、抗体は、変性又は部分的な変性条件下に曝されるとリジンやシステインなどの反応性の求核基を現しうる。ＡＤＣのローディング(薬剤／抗体比率)は、例えば、(i) 抗体に対して薬剤－リンカー中間体又はリンカー試薬のモル過剰量を限定する、(ii) コンジュゲートの反応時間又は温度を限定する、及び(iii) システインチオール修飾のための還元条件を部分的又は完全に限定することによるなどの、様々なパラメータによって制御されうる。

抗体の一又は複数の求核基が薬剤－リンカー中間体又はリンカー試薬の後に薬剤部分試薬と反応する場合、その結果生じる生成物は、抗体に付着した薬剤部分の分布、例えば１、２、３などとのＡＤＣ化合物の混合物である。ポリマー逆相(ＰＬＲＰ)及び疎水性相互作用(ＨＩＣ)といった液相クロマトグラフィ法は、薬剤ローディング値によって混合物中の化合物を分離しうる。単一の薬剤ローディング値(ｐ)を有するＡＤＣの調製物は単離されうる("Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate", Hamblett, K.J., et al, Abstract No. 624, American Association for Cancer Research; 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; "Controlling the Location of Drug Attachment in Antibody-Drug Conjugates", Alley, S.C., et al, Abstract No. 627, American Association for Cancer Research; 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004)。しかしながら、薬剤部分は抗体上の異なる部位でリンカーにより付着されうるので、これら単一ローディング値のＡＤＣは依然として不均質な混合物であるかもしれない。

【００７６】

抗体薬剤コンジュゲートの投与

本発明の抗体薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)は、治療される状態に適切な任意の手段によって生物学上の供給源と接触させるか又は投与してよい。典型的に、ＡＤＣは、非経口的、すなわち注入、皮下、筋肉内、静脈内、皮内、髄腔内および硬膜外に哺乳動物に投与される。式ＩのＡＤＣと接触、すなわち投与されうる生物源は、(i) 哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル又はヒト；(ii) 哺乳類の組織；及び(iii) 培養細胞を含む。生物学的試料は、１回、または、時限であるか、間欠的であるか、ランダムな間隔で、生物源から採取される。生物学的試料は、(i) 血液、胆汁、尿又は糞便；(ii) 組織抽出物；及び(iii) 細胞培養物、細胞溶解物又は細胞抽出物を含む。

本発明の親和性キャプチャＬＣ－ＭＳ法は、抗体－薬剤コンジュゲート化合物の毒性のメカニズムを決定するために、組織分析法で使用されてよい。

【００７７】

薬学的製剤

本発明の治療上の抗体薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)の薬学的製剤は、典型的に、薬学的に許容可能な非経口用ベヒクルと共に単位用量注入用形態で、非経口的投与、すなわちボーラス、静脈内、腫瘍内注入のために調製される。所望の純度を持つ抗体－薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)は、場合によって、薬学的に許容される希釈剤、担体、賦形剤又は安定化剤と、凍結乾燥又は水溶液の形態に混合される(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))。

許容される希釈剤、担体、賦形剤及び安定化剤は、用いられる用量と濃度で生物源レシピエントに非毒性であり、ホスフェート、シトレート及び他の有機酸等のバッファー；ア

スコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存料(例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３-ペンタノール；及びm-クレゾール)；低分子量(約１０残基未満)のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グアーガムおよびデキストリンを含む、単糖、二糖および他の炭水化物；グルコース、マンノース、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールといった糖質；ＥＤＴＡ等のキレート化剤；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Ｚｎ-タンパク質複合体)；及び／又はＴＷＥＥＮＴＭ、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ^{TM}又はポリエチレングリコール(ＰＥＧ)等の非イオン性界面活性剤を含む。例えば、凍結乾燥した抗ＥｒｂＢ２抗体製剤は国際公開９７／０４８０１に記載されており、出典明記によって本明細書中に特別に援用される。

【００７８】

また活性成分は、例えばコアセルベーション技術あるいは界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メタクリル酸メチル)マイクロカプセルに、コロイド状ドラッグデリバリーシステム(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルション、ナノ-粒子及びナノカプセル)に、あるいはマクロエマルションに捕捉させてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

徐放性調製物を調製してもよい。徐放性調製物の好ましい例は、ＡＤＣを含む疎水性固体ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(２-ヒドロキシエチルメタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第３７７３９１９号)、Ｌ-グルタミン酸とγ エチル-Ｌ-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばＬＵＰＲＯＮ ＤＥＰＯＴ^{TM}(乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なミクロスフィア)、及びポリ-Ｄ-(-)-３-ヒドロキシブチル酸が含まれる。

【００７９】

抗体薬剤コンジュゲートの代謝産物

代謝産物が先行技術に対して新規性及び非自明性を有する限りにおいて、本明細書中に記載のＡＤＣ化合物のインビボ代謝産物も、本発明の権利内である。このような生成物は、投与された化合物の、例えば酸化、還元、加水分解、アミド化、エステル化、酵素切断などから生じうる。したがって、本発明は、代謝産物が生じるために十分な時間、本発明の化合物を哺乳動物と接触させることを含む方法によって生成される新規の自明でない化合物を包含する。

典型的には、代謝産物は、ラット、マウス、モルモット、サルなどの動物又はヒトに検出可能な用量(例えば、およそ０．５ｍｇ／ｋｇ以上)で抗体－薬剤コンジュゲート混合物を投与し、代謝が生じるために十分な時間(典型的にはおよそ３０秒から３０時間)をおいて、尿、血液又は他の生体試料から代謝された生成物を単離することによって同定される。代謝産物の構造は本発明の質量分析法によって決定される。

【００８０】

薬物動態

半減期、クリアランス、曲線下面積（ＡＵＣ）、及び分布容積を含む哺乳動物における薬物動態（ＰＫ）定量のための治療剤の循環量のモニタリングは、安全性／毒性限界及び適切な投薬計画を樹立するために必要である（Welling, P. (1997) Pharmacokinetics Processes, Mathematics, and Applications, 2版, American Chemical Society, Washingt

on, DC）。生物学的利用能は、投与された化合物が投与投薬形態から全身循環に達する度合いであり、通常は投与された用量のパーセントとして表される。ある化合物の半減期は、該化合物のピーク血漿中濃度の５０％が排出又は生体内分解（代謝）によって除去されるのに必要な時間である。該治療指数は、所望される治療活性と所望されない毒性副作用間の選択性を表す。本発明の方法による薬物動態測定値は、抗体及び抗体・薬剤コンジュゲート（ＡＤＣ）の吸収、分布、代謝、及び排出（ＡＤＭＥ）を明らかにするものである。

インビボ投与されると、抗体・薬剤コンジュゲートは、加水分解、薬剤部分切断、抗体変性、グルクロン酸抱合、酸化、又は他の代謝分解事象を被る場合がある。これらの事象を精確に特徴付け、その産物を測定するために、ビーズベースのアフィニティ捕獲及び質量分析法が開発される。

【００８１】

生物学的試料の処理(プロセシング)

式Ｉの抗体・薬剤コンジュゲート（ＡＤＣ）化合物と場合によっては式Ｉの抗体（ここで、ｐは０である）、又は抗体断片又はその代謝産物を、哺乳動物、組織、細胞培養物、血漿又は血清から選択される生物学的供給源に投与し、又はこれと接触させる。血清及び血漿試料からの分析は、その高いプロテオミクスバックグラウンド、つまり多くのタンパク質及び他の分析物のために問題があることは知られている。分、時間、日にわたる所定の時間の後に、式Ｉを有する抗体・薬剤コンジュゲート化合物、又はその断片もしくは代謝産物を含有する生物学的試料を集める。該生物学的試料は、シリンジ又はカニューレで液を抜き出すことを含む任意の手段によって集めることができる。該生物学的試料は、血液又は血液生成物、例えば血清、血漿等、脳脊髄液又は他の体液、例えば唾液、尿、リンパ液、胆汁、糞便、汗、又は呼気でありうる。

処方、固定、遠心分離、単離、消化、血球凝固の誘導又は防止、加水分解、又は精製を含む一般的な手順によって生物学的試料を処理して分析試料を形成する。

生物学的試料の処理は、試料成分の分離を妨げ、又はデータ収集又は解析を不明瞭にしうる不純物を除去し、試料不均一性を低減させるものである。あるいは、又は加えて、プロセシングは、試料の取り扱いを単純化し、分解から保存し、試料容積を最小化し、又は質量分析解析において興味ある試料成分（分析物）を選択する。あるいは、又は加えて、プロセシングは、生物学的試料を、薬物代謝又は薬物動態効果の測定において興味深い代謝産物、断片、又は誘導体に転換する。

【００８２】

捕獲処理がなされた分析試料

式Ｉの抗体・薬剤コンジュゲート（ＡＤＣ）化合物と場合によっては式Ｉの抗体（ここで、ｐは０である）、又は抗体断片又はその代謝産物を、ビーズがＡＤＣの抗体又は薬剤に特異的な固定化抗原を有する免疫親和性ビーズに捕捉せしめる。投与された抗体・薬剤コンジュゲートの抗体に特異的な抗原をビオチン化し、強いビオチン-ストレプトアビジン相互作用（$K_D = 10^{-15}$ Ｍ）によってストレプトアビジン被覆常磁性ビーズに結合させる。図１ａはＥＣＤ捕獲と称される一実施態様を例証している。抗体（ＭＡｂ）及び抗体・薬剤コンジュゲート（ＡＤＣ）は、磁石に接触したストレプトアビジンに結合しているビオチン化ＥＤＣタンパク質のＥＣＤ（細胞外ドメイン）に結合する。図１ｂは、抗体（ＭＡｂ）及び抗体・薬剤コンジュゲート（ＡＤＣ）が、ビーズに共有的に結合しているＥＣＤタンパク質のＥＣＤ（細胞外ドメイン）に結合するＥＣＤ捕獲の他の実施態様を例証する。ビーズはカラム形式に又はウェル中に緩く設けられうる。図２は、抗体・薬剤コンジュゲート（ＡＤＣ）が、磁石に接触したストレプトアビジン被覆常磁性ビーズに結合しているビオチン化抗薬剤モノクローナル抗体（ビオチン-抗薬剤ＭＡｂ）に結合する抗薬剤部分抗体捕獲の他の実施態様を例証する。

免疫親和性ビーズは、多孔性ポリマーモノリスを含み得、捕集リザーバと流体が流れるように連通しているフロースルーチャネルに設けられうる。ビーズは、生物学的供給源からの試料が一端又はオリフィスに導入され、試料が他端又はオリフィスから溶出されるカ

ラム又は漏斗のようなフロースルー容器に収容されてもよい。免疫親和性ビーズは、それぞれが別個の捕集リザーバに連通させられた複数のフロースルー容器に分布せしめられてもよい。容器及びリザーバは、１２×８の行列の９６マイクロタイターウェル形式、又は自動化及び結果の再現性のために２４×１６の行列の３８４マイクロタイターウェル形式に構成されうる。

【００８３】

抗体・薬剤コンジュゲート組成物を投与された哺乳動物（生物学的供給源）からの血漿又は血清試料を、手作業のピペット操作により又は自動化されたロボット分配によってビーズに塗布する。ビーズは、ウェル又は他の容器に設けられ、又は試料が一端又はオリフィスに導入され、洗浄溶出物又は溶出試料が他端又はオリフィスから溶出されるカラム又は他のフロースルー容器に収容されてもよい。ビーズ結合抗原に特異的な試料成分が結合せしめられる。ビーズを洗浄して非特異的タンパク質及び他の非特異的試料成分をすすぐ。結合した抗体はビーズ上で例えばＰＮＧａｓｅＦで脱グリコシル化されうる。結合した試料成分は試料プレート中に溶出され得、分離されたものは容器又はウェルに収容される。溶出した試料はついで手作業のピペット操作により又はロボット移送によって対処され、逆相クロマトグラフィーによって分離され得、分離された試料成分が質量分析計によって分析される。

ストレプトアビジン被覆常磁性ビーズを使用する理論的根拠は、(i)強いストレプトアビジン－ビオチン相互作用（$K_D = 10^{-15}$ Ｍ）、(ii)固定化ストレプトアビジン／ビオチン化分析物が立証された方法であること、(iii)高い結合能（インタクトなタンパク質に対して十分な材料）、(iv)低い非特異的結合、(v)質量分析に適合した溶媒を用いた試料の溶出、(vi)ビーズからの良好な試料回収、及び(vii)使用の容易性及び自動化への受け入れ性である。

例示的な実施態様では、生物学的試料はトリプシン消化で消化されうる。トリプシン消化では、試料はＤＤＴで還元され、ヨード酢酸ナトリウムでＳ－カルボキシメチル化され、ついでトリプシンで消化されうる。消化された試料は、(i)逆相ＨＰＬＣ、例えばＮｕｃｌｅｏｓｉｌ Ｃ１８カラム；(ii)サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）、例えばＴＳＫ３０００ＳＷｘＬカラム；又は(iii)ＴＳＫボロン酸カラムを使用するボロン酸アフィニティクロマトグラフィーによって分析されうる。

【００８４】

試料成分の分離

分析試料を形成するために、生物学的試料を分離溶液に適用して、一を越える試料成分の分離をなさしめることができる。分離方法は、アフィニティ、クロマトグラフィー、及び電気泳動法を含む。アフィニティ法は、アフィニティクロマトグラフィー、吸着、及び固定化アフィニティマトリックスを含む。クロマトグラフィー法は、ＨＰＬＣ、疎水性相互作用（ＨＩＣ）、アニオン交換、カチオン交換、逆相、順相、イオン対逆相、薄層、キャピラリーフロー、及びサイズ排除を含む。電気泳動法は、単一次元、スラブゲル、キャピラリー、ポリアクリルアミド、変性、天然、自由溶液、紙、２次元、等電点電気泳動、及び勾配電位を含む。他の分離方法は、透析、遠心分離、遠心沈降、浮選、沈降、免疫沈降、及びゲル濾過を含む。

分離方法は、限定しないが、溶出時間、疎水性、親水性、泳動時間、割合、速度、クロマトグラフィー保持時間、溶解度、分子容積又はサイズ、正味荷電、荷電状態、イオン電荷、等電点、解離定数（ｐＫａ）、抗体親和性、電気泳動移動度、イオン化ポテンシャル、双極子モーメント、水素結合能、及び気相中におけるイオン移動度を含む一又は複数の物理化学的性質による生物学的試料の成分の分離を行うことができる。

質量分析計入口装置中へのキャピラリーフロー注入による低い流量により、質量検出の感度を高め、例えばインタクトなタンパク質及び抗体・薬剤コンジュゲートのような低濃度分析物及び高分子量種を検出し特徴付けることができる。

【００８５】

分離された試料成分の質量分析

質量分光分析のための抗体・薬剤コンジュゲート試料の調製は、一般に、知られている技術に従って実施されうる。“Modern Protein Chemistry: Practical Aspects”, Howard, G.C.及びBrown, W.E.編(2002) CRC Press, Boca Raton, Flを参照のこと。

本発明の方法は生物学的試料から由来する抗体混合物の分析に適しており、成分を連続的に又はバッチ形式で溶出せしめ、又は質量分析計によって直接検出せしめるアフィニティ又はクロマトグラフィーを含む一又は複数のプロセスにより、混合物の異なった化学成分が、最初に単離され、分離され、又は部分的に分離される。断片化、脱アミド、グリケーション、酸化、部分的配列情報、例えばN末端及びC末端、二量体及び凝集状態を含む抗体の様々な構造的特徴及び性質を、質量分光分析から解明することができる。生物学的試料中の一又は複数の化学成分は、投与される抗体・薬剤コンジュゲートが既知の配列、構造、及び分子量のものであるので、その精確な質量の測定によって高度に特異的な形で特徴付けることができる。

【００８６】

高質量精度、高感度、及び高解像度を可能にする様々な質量分析システムが当該分野で知られており、本発明の方法において用いることができる。かかる質量分析計の質量分析器（マスアナライザー）は、限定しないが、四重極型（Ｑ）、飛行時間型（ＴＯＦ）、イオントラップ、磁場型又はＦＴ－ＩＣＲ又はその組合せを含む。質量分析計のイオン源は、主として試料分子イオン、又は疑似分子イオン、及び所定の特徴付け可能なフラグメントイオンを生じなければならない。かかるイオン源の例は、大気圧イオン化源、例えばエレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）及び大気圧化学イオン化（ＡＰＣＩ）及びマトリックス支援レーザー脱離イオン化（ＭＡＬＤＩ）を含む。ＥＳＩとＭＡＬＤＩは、質量分光分析に対してタンパク質をイオン化するための二種の最も一般的に用いられている方法である。ＥＳＩとＡＰＣＩは、ＬＣ／ＭＳによる小分子の分析のために最も一般的に使用されるイオン源技術である（Lee, M “LC/MS Applications in Drug Development” (2002) J. Wiley & Sons, New York）。

【００８７】

表面増強レーザー脱離イオン化（ＳＥＬＤＩ）は高スループットの質量分析を可能にする表面ベースのイオン化技術の一例である（米国特許第６０２０２０８号）。典型的には、ＳＥＬＤＩはタンパク質と他の生体分子の複雑な混合物を分析するために使用される。ＳＥＬＤＩは、溶液中の例えばタンパク質のような分析物と相互作用する「プロテインチップ」のような化学的に反応性の表面を用いる。かかる表面は分析物と選択的に相互作用し、それらをその上に固定化する。よって、本発明の分析物はチップ上で部分的に精製され、ついで質量分析計で迅速に分析されうる。基体表面上の異なった部位に複数の反応性部分を設けることにより、スループットが増大されうる。

機能的システムでは、質量分析計は関心ある化学種の質量を、その正確な又は計算された質量の２０ｐｐｍ以内まで、典型的にはその正確な又は計算された質量の５ｐｐｍ以下まで精確に測定する。市販の質量分析計は、質量スペクトルシグナル強度又はピーク面積が定量的に代表することを担保するために混合物中の複数の成分について十分なスペクトルを獲得することを可能にする頻度で同時に全質量スペクトルをサンプリングし記録することができる。これはまた全ての質量に対して観察される溶出時間が質量分析器によって変更又は歪められないことを担保し、定量的測定値が大量の一過性シグナルを測定する必要性によって損なわれないことを担保するのに役立つであろう。

【００８８】

エレクトロスプレーイオン化質量分析（ＥＳＩ）

高感度が、増加した分析物イオン化効率のために低流量で達成される（Gale等(1993) Rapid Commun. Mass Spectrom 7:1017）。よって、分レンジ当たりナノリットルの流量で試料含有液のエレクトロスプレー注入を実施することによって、適切な検量後に精確な定量がもたらされ、質量分析と併用される場合、液中に含まれる分析物に対して高感度がもたらされる。高選択性及び感度をもたらし、ＭＳに対する前工程としての精確な定量分析をもたらす小型化され統合されたマイクロカラム及びアフィニティクロマトグラフィー吸

着剤を有するマイクロカラムアレイを含むシステム及び装置が報告されている（米国特許第６８１１６８９号；米国特許第６０２０２０８号；米国特許第６５７９７１９号）。

抗体のような比較的高分子量の化合物の質量は、殆どの質量分析計によって容易に決定される質量電荷比（ｍ／ｚ）（２０００までから３０００までの典型的なｍ／ｚ範囲）で検出されうる。エレクトロスプレーイオン化質量分析ＥＳＩ－ＭＳは、荷電、極性又は塩基性化合物に、また多重に荷電した化合物を優れた検出限界で分析するために特に適している。ＥＳＩはよって大きな生体分子、例えば１５００００又はそれ以上の分子量（ＭＷ）の抗体及び抗体・薬剤コンジュゲートの検出及び特徴付けを可能にする。高分子量イオンを用いると、一連の多重に荷電した分子イオンが典型的には観察される。陽イオンの分子量は、測定されたｍ／ｚ比に電荷数（ｎ）を掛け、カチオン質量（Ｃ＋）にイオン上の電荷数（ｎ）を掛けたものを引くことによって決定される。

【００８９】

ＥＳＩ法は、インターフェースレンズ電位を制御することによってフラグメンテーションの有無を制御することを可能にする。エレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）は、液体分離方法（前工程）並びに質量分光検出法（後工程）と適合性がある（“Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications”, Cole, R.B.編(1997) Wiley, New York）。

ＥＳＩ－ＭＳデータは、多数のスキャンを併せて平均化し、データを平滑化して良好なピーク強度及び形状をもたらすことによって獲得されうる。低分子量化合物では、観察される最も多いピークはしばしば陽イオンモードでは［Ｍ＋Ｈ］＋イオン、陰イオンモードでは［Ｍ－Ｈ］－である。二重及び三重に荷電したイオン並びに二量体がまた観察されうる。二重に荷電した陽イオンは質量（ＭＷ＋２Ｃ＋）÷２に観察され、ここで、ＭＷは分子量であり、Ｃ＋はイオン化陽イオン、例えばH^+、Na^+、又はNH_4^+である。非常に低分子量の化合物を除いて、検出されるイオンは多重に荷電される。ＥＳＩのソフトな（低イオン化電位）条件のため、典型的には分子イオンだけが観察される。ＥＳＩスペクトルは、イオンが有する様々な電荷数のために質量が異なる幾つかの分子イオンピークを有しうる。

【００９０】

試料、例えばＡＤＣ又は他の生体分子の希釈溶液は、ＥＳＩ－ＭＳ分析のための皮下注射針を通してゆっくりとポンプ移送されうる。試料はフロー注入又はＬＣ／ＭＳを介して導入されうる。典型的には、流量は、毎分１マイクロリットル（μｌ）未満から毎分約１ミリリットル（ｍｌ）の範囲である。ＥＳＩは、さもないと蒸発又はイオン化が困難な大きな生体分子に特に適している。針は高電圧に保たれ、針端部の強電場が噴霧された溶液を荷電し、荷電した液滴を生じせしめる。荷電した液滴は水を蒸発させ、小オリフィスを通じて真空チャンバー中に移動する分子イオンを最終的に生じる。溶媒蒸発の過程中に、非共有的に結合した複合体が溶液から気相に移動される。（Hu等(1994)）。インタクトな気相複合体を維持するためには穏やかな脱溶媒和条件が一般的に必要とされる。イオンが完全に脱溶媒和されることを担保するためにオリフィスを加熱してもよい。あるＭＳシステムは向流の加熱ガスを用いる。荷電した液滴は、皮下注射針から放出され、真空チャンバーに入る前に溶媒を蒸発させるにつれて収縮する。熱及びガス流を使用して脱溶媒和を助けてもよい。ＥＳＩ測定に対して必要とされる試料の量は、小さなキャピラリーエレクトロスプレーエミッター、チップの使用により液の流れを減少させることによって低減させることができ、ナノエレクトロスプレーとして知られている方法である。ナノエレクトロスプレー法は１μｌの試料に対して約１０－３０分の間、一定のシグナルを生成しうる。低い流量はイオン効率を増加させ、イオン抑制を低減させることが示されている。ナノエレクトロスプレー法はＭＳ／ＭＳタンパク質研究に頻繁に使用される（Korner等(1996) J. Am Soc. Mass Spectrom 7:150-156；Mann, M及びWilm, M (1996) Anal. Chem 68:1-8）。

【００９１】

タンパク質のＥＳＩは、分子量が増加するにつれて増加する傾向にある電荷数を有する

多重に荷電したイオンを生成する。与えられたイオン種上の電荷数は、例えば(i)一電荷が異なる二つの荷電状態を比較し、連立方程式を解き；(ii)同じ電荷を有するが異なった付加質量を有する種を探し；(iii)分離された同位体クラスターに対して質量電荷比を調べるような方法によって決定することができる。ESI及びESI-MSの方法及びこれらの方法を実施するために必要とされるパラメータは当該分野でよく知られている。エレクトロスプレーイオン化法の穏やかさは、インタクトな抗体コンジュゲートを質量分析法によって直接検出することを可能にする。

【００９２】

一実施態様では、タンパク質、抗体、抗体断片又は抗体コンジュゲート（大きな分子）のＱ１質量スペクトルが、方法の一部として実施される。大きな分子の適切な質のＱ１質量スペクトルを得ることができる。タンパク質外被が移動する可能性があるので、クロマトグラフィーに使用される全ての溶媒が新鮮にされ、スペクトルエンベロープを観察された範囲に位置付けるために溶出溶媒に酸が加えられる。≧１００００００質量単位のタンパク質には、ギ酸のような酸を、溶出溶媒、例えば溶媒Ａ（水）と溶媒Ｂ（アセトニトリル）の双方に約０．１％（容量）で使用することができる。より強い酸、例えばトリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）は、≦１００００００質量単位のタンパク質に対してＡ及びＢ双方の溶媒に対して、０．０５％（容量）ＴＦＡで使用することができる。ギ酸の量が減少すると、インタクトなグリコシル化抗体、トラスツズマブがより多くの電荷を拾い上げ、エンベロープを更に左に、そして観察された範囲のｍ／ｚ（１８００－３０００ｍ／ｚ）にシフトさせる。クラスター分離（ＤＰ）電位が約３０－１２０Ｖから約７０－１９０Ｖまで増加すると、抗体上の電荷が更に尚増加する。よって、印加される電圧、溶媒組成、及びイオン対形成剤は考慮し調節すべき因子である。クラスター分離電位（ＤＰ）を増加（勾配付け）させて最良の電荷イオン範囲を選択するのに十分な分解能を獲得することができる。線形性を、広範囲のｍ／ｚにわたって得ることができる。抗体の脱グリコシル化はインタクトな抗体又は重鎖、断片又はＡＤＣの定量を支援する。グリコシル化はイオン化効率を低下させるのに影響し、よって感度を減少させる。抗体又は抗体断片コンジュゲートを定量する場合、抗体の脱グリコシル化が質量スペクトルの不均一性を低減させ、感度を増大させ、よって分析を単純化しうる。

【００９３】

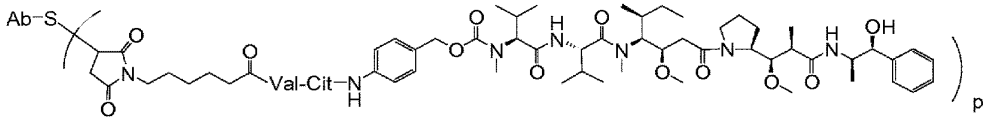
逆重畳積分表を使用して、定量される各種に対して正確な質量電荷比（ｍ／ｚ）を決定する。逆重畳積分ソフトウェアアプリケーション、例えばＡｎａｌｙｓｔ™ＱＳ（Applied Biosystems, Foster City, CA）は市販されており、及び／又は質量分析器と共に提供される。逆重畳積分ソフトウェアは一般に使用者に逆重畳積分質量の表並びにこれらの質量の計算に使用されるｍ／ｚイオンの副表を提供する。

【実施例】

【００９４】

実施例１　血漿および血清中の抗ＭＵＣ１６抗体－薬剤コンジュゲート化合物の分析

以下の構造を有する抗体ＭＵＣ１６抗体－薬剤コンジュゲートである３Ａ５－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ、「抗ＭＵＣ１６　ＡＤＣ」：



（ここで、ｐ(ＤＡＲ)は１、２、３又は４であり、Ｖａｌはバリンであり、Ｃｉｔはシトルリンであり、Ａｂは３Ａ５のシステイン改変したＡ１１８Ｃ重鎖変異体である抗ＭＵＣ１６モノクローナル抗体である）を、血漿および血清試料において分析した。３Ａ５抗体変異体は、正常ヒト組織と比較してヒト卵巣上皮癌(ＥＯＣ)において過剰に発現される細胞表面膜貫通タンパク質であるＭＵＣ１６の細胞外ドメイン(ＥＣＤ)上のエピトープを認

識し、ＭＵＣ１６への結合により内部移行し、リソソームに輸送され、これによってアウリスタチン薬剤部分ＭＭＡＥのＭＵＣ１６陽性腫瘍細胞への標的輸送が達成される(国際公開２００７／００１８５１；２００７年５月８日に出願の米国特許出願６０／９１６６５７「CYSTEINE ENGINEERED ANTI-MUC16 ANTIBODIES AND ANTIBODY DRUG CONJUGATES」)。Ａ118Ｃ(ＥＵ番号付け)変異体は、米国公開特許２００７／００９２９４０に従って、薬剤－リンカー試薬によりその最適化されたチオール反応性について選択した。

【００９５】

抗ＭＵＣ１６　ＡＤＣ(３Ａ５－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ)は、以下の免疫親和性ビーズキャプチャ及び質量分析法によって特付けし、血漿又は血清における異なる薬剤－抗体比率(ＤＡＲ)を有するＡＤＣ試料成分の相対量を測定した。この方法により試験した濃度範囲(５０μｌの試料容量中１．２５～５０μｇ／ｍｌ)において期待するＡＤＣ試料成分が成功裏に同定されたことから、親和性キャプチャＭＳ特徴付けの間に選択的な損失はなかったことが示される。異なる種の血漿又は血清において有意なマトリックス効果は観察されなかった。ラット、カニクイザルおよびヒトの血漿からの結果は、５％ＢＳＡを含むＰＢＳバッファ中の添加した抗ＭＵＣ１６　ＡＤＣ混合物から得た結果と同等であった。また、ラットおよびカニクイザルのマトリックスにおける血漿および血清の試料から同様な結果が得られた。短期のマトリックス凍結／解凍の安定性は、ラット血漿(最高３サイクル)およびカニクイザル血清(最高６サイクル)での抗ＭＵＣ１６　ＡＤＣ(３Ａ５－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ)混合物について確認した。２℃～８℃に維持したオートサンプラー中におよそ１３時間維持した被処理試料は安定であった。

【００９６】

免疫親和性ビーズ／ＭＳ法のアッセイ実行は、異なる薬剤ローディング値、ｐ＝０(ネイキッド抗体)、１(抗体につき１の薬剤)および２(抗体につき２の薬剤)値を有する抗ＭＵＣ１６　ＡＤＣ混合物の相対量を測定することを特徴とする。ネイキッド抗体(ｐ＝０)とＡＤＣ(ｐ＝１および２)の標準物質を組み合わせて、既知組成物の混合物を得た。標準物質混合物は、血漿(ラット、カニクイザルおよびヒト)および血清(例えばラットおよびカニクイザル)に添加し、ストレプトアビジンコート常磁性ビーズに固定したビオチン化ｒｈｕ　ＭＵＣ１６　ＥＣＤによる親和性キャプチャによって回収した。キャプチャした抗ＭＵＣ１６　ＡＤＣ成分を洗浄し、脱グリコシル化し、ビーズから溶出させ、四極子飛行時間型質量分析検出と組み合わせた毛細管流ＬＣによって分析した。抗ＭＵＣ１６　ＡＤＣ成分からのシグナルを含む全イオンクロマトグラム(ＴＩＣ)の代表的な時間ウインドウを選択し、抽出した質量スペクトルを得た。質量スペクトルの逆重畳積分後に、ｐ＝０、１又は２を有する抗ＭＵＣ１６　ＡＤＣ成分のピーク面積を用いて、血漿又は血清中の異なる薬剤ローディング(ｐ)をもつ抗ＭＵＣ１６　ＡＤＣの相対量を算出した。

ビオチン化したヒトＭＵＣ１６　ＥＣＤをストレプトアビジンコートビーズ上へ固定し、それを用いて室温で試験血漿又は血清の試料と共にインキュベートすることによって抗ＭＵＣ１６　ＡＤＣをキャプチャした。例えば、ビーズは、およそ１０－１００ミクロン直径のセファロース(登録商標)ビーズであってもよい。ビーズが常磁性である場合、試料成分の結合の後に、常磁性ビーズが磁石によって適当な状態に保たれ、ビーズに結合した試料成分の分離、単離および洗浄が可能となる。ビーズが常磁性でない場合、ビーズは移動相流量のための出入口を有するカラムで構成されてもよい。試料成分は、例えば高い酸及び有機濃度を有する溶出培地又はバッファにて被処理分析試料として溶出してよく、この溶出した試料は、分離培地に曝すために回収して試料成分を分離させた後に質量分析を行ってもよい。典型的な非特異的洗浄バッファは水溶性であり、およそｐＨ７．４で酢酸ナトリウム及び塩化ナトリウムを含んでいてよい。典型的な抗体試料溶出バッファは水溶性であり、２～４のｐＨで、イソプロパノール、アセトニトリル又は他の有機溶媒のような低分子性アルコールと蟻酸のような酸を含有してよい。溶出の後、固定したＥＣＤビーズは、回収しても、再利用しても、処分してもよい。

【００９７】

あるいは、セファロース(登録商標)ビーズはＮＨＳ(Ｎ-ヒドロキシスクシンイミド)エ

ステルといったアミノ反応性官能基を持ち、ＥＣＤタンパク質と反応(結合)しうる。リジン側鎖といったＥＣＤタンパク質の反応性アミノ基はＮＨＳ基を置き換え、ＥＣＤとビーズとの間に安定なアミド結合を形成する。代表的なカップリングバッファは水溶性であり、中性又は中性に近いｐＨ、例えばｐＨ７～９で、リン酸塩、重炭酸ナトリウムおよび塩化ナトリウムから選択される塩類を含んでもよい。過剰なカップリングしなかった反応性の官能基は、水溶性培地中のエタノールアミンといった低分子量の反応性アミンでおおわれてもよく、中性又は中性に近いｐＨ、例えばｐＨ７～９で、重炭酸ナトリウムおよび塩化ナトリウムから選択される塩類を含んでもよい。

ビーズは、洗浄溶出溶液の出入口を有するカラム形式に構成されてよい。ＮＨＳ－活性化セファロース(登録商標)ビーズの市販される実施態様にはＮＨＳ ＨｉＴｒａｐ ＨＰ１．０ｍｌ親和性カラム(Amersham)がある。

【００９８】

親和性キャプチャの後に、結合した抗ＭＵＣ１６ ＡＤＣ(３Ａ５－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ)を単離し、脱グリコシル化した。後者の工程を用いて、試料の不均一性を低減し、質量スペクトルを単純化した。数回洗浄して非特異的に結合した血漿タンパク質を除去した後、抗ＭＵＣ１６ ＡＤＣ試料成分を、３０％アセトニトリルと１％蟻酸を含む水によって溶出し、逆相キャピラリーＬＣシステムに注入した。試料成分(分析物)は、ターボイオンスプレーによってイオン化し、陽性ＴＯＦ-ＭＳモードで作動する四極子飛行時間型Ｑ-Ｓｔａｒ ＸＬ質量分析機によって検出した。全イオンクロマトグラム(ＴＩＣ)の代表的な時間ウインドウを選択し、質量スペクトルを得た。質量スペクトルを逆重畳積分し、対象の各抗ＭＵＣ１６ ＡＤＣ試料成分についてピーク面積を得た。抗ＭＵＣ１６ ＡＤＣ試料成分ｐ＝０、１および２の相対比を算出した。

【００９９】

以下のアッセイパラメータを評価した：

イオン化効率： 特定のｐ＝０、１および２(それぞれＤＡＲ-０、ＤＡＲ-１およびＤＡＲ-２)を有する抗ＭＵＣ１６ ＡＤＣ(３Ａ５－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ)標準物質を、異なる比率で混合した(例えば３３：３３：３３および３０：６０：１０)。次いで、脱グリコシル化のために混合物を３７℃で終夜インキュベートした。脱グリコシル化混合物をおよそ３０μｇ／ｍＬに希釈し、１０μｌの一定量を分析のためにＬＣ／ＭＳ上に直接注入した。

ＨＢＳ－ＥＰ中３０：６０：１０の比率の、ｐ＝０、１および２(ＤＡＲ-０、ＤＡＲ-１及びＤＡＲ-２)を有する抗ＭＵＣ１６ ＡＤＣ(３Ａ５－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ)試料成分の全イオンクロマトグラムを得て、ＡＤＣシグナルを含む代表的な時間ウインドウを選択した。時間ウインドウはＬＣ条件の変動のために変化しうる。ＡＤＣ試料成分について特徴的な電荷エンベロープを表す対応する質量スペクトルを抽出した。質量スペクトルの逆重畳積分により、対応する逆重畳積分した質量スペクトルを有するピーク面積表を生成した。抗ＭＵＣ１６ ＡＤＣ試料成分の分子質量に基づいて、３つのメインピークは、それぞれおよそ１４４８３４Ｄａ、１４６０３３ＤａおよびＤＡＲ－０、ＤＡＲ－１およびＤＡＲ－２と同定した。内部較正なしで、機器の集団の精度はおよそ±５０Ｄａであった。他のマイナーピークは、主に標準物質のマトリックスバックグラウンド、添加物および／または不均一性によるものであった。それらは結果としてＡＤＣ試料成分の相対量の算出に大きな影響を与えなかったので、その後の比率算出に用いなかった。３つの個々のピーク面積は総ピーク面積として合計し、各々の抗ＭＵＣ１６ ＡＤＣ試料成分の相対的なパーセント比率を算出した。２つの添加混合物のそれぞれについて表１Ａと１Ｂ(下記)にデータをまとめた。各添加組成物について３回試験した。明らかなように、平均精度は７０％～１３０％の範囲内であった。したがって、ＤＡＲ－０、ＤＡＲ－１およびＤＡＲ－２を有する抗ＭＵＣ１６ ＡＤＣ試料成分は、陽性ターボイオンスプレーモードにおけるイオン化効率に有意差がなかったことが結論づけられた。

表１ ＤＡＲ ０、ＤＡＲ １およびＤＡＲ ２の既知組成物について、ＬＣ／ＭＳによって直接測定したＨＢＳ ＥＰバッファ中の抗ＭＵＣ１６ ＡＤＣ(３Ａ５－ＭＣ－ｖｃ－

ＰＡＢ－ＭＭＡＥ)試料成分の相対的な比率

A:

添加 (%)	測定 (%)		
DAR0/DAR1/DAR2	DAR 0	DAR 1	DAR 2
33/33/33	30	38	32
	31	36	33
	31	37	32
平均	31	37	32
SD	0.4	0.8	0.6
RSD (%)	1.1	2.3	1.7
精度 (%)	**93**	**110**	**97**

B:

添加 (%)	測定 (%)		
DAR0/DAR1/DAR2	DAR 0	DAR 1	DAR 2
30/60/10	31	61	8
	31	60	9
	31	61	8
平均	31	61	8
SD	0.1	0.5	0.6
RSD (%)	0.4	0.8	7.4
精度(%)	**103**	**101**	**82**

【０１００】

選択性：　ｒｈｕＭＵＣ１６　ＥＣＤによるＤＭＵＣ４０６４Ａ構成成分の親和性キャプチャの間に選択的な損失がなかったことを確認するために、異なるＤＡＲを有する既知のＤＭＵＣ４０６４Ａ標準物質を様々な濃度でラット血漿に添加し、親和性ＭＳによって分析した。表２に、それぞれ１０：３０：６０、３０：６０：１０および３３：３３：３３のＤＡＲ－０、ＤＡＲ－１およびＤＡＲ－２について測定比率と理論上の添加比率を示す。

表２　親和性ＭＳによって測定したラット血漿における抗ＭＵＣ１６　ＡＤＣ(３Ａ５－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ)試料成分についての測定比率と添加比率

添加比 (%)	測定比 (%)		
DAR 0/DAR 1/DAR 2	DAR 0	DAR 1	DAR 2
10/30/60	11	31	59
	10	30	60
	11	30	59
平均	11	30	59
SD	0.9	0.6	0.6
RSD (%)	8.6	1.9	0.9
平均精度(%)	106	101	99
30/60/10	28	62	9
	30	61	9
	30	60	10
平均	29	61	10
SD	0.8	1.0	0.2
RSD (%)	2.8	1.6	2.1
平均精度(%)	98	102	95
33/33/33	28	34	38
	28	34	38
	28	34	38
平均	28	34	38
SD	0.1	0.4	0.3
RSD (%)	0.5	1.3	0.9
平均精度(%)	84	102	117

平均精度が、異なる組成物でＤＡＲ－０、ＤＡＲ－１およびＤＡＲ－２の３つの抗ＭＵＣ１６　ＡＤＣ試料成分について７０％～１３０％の範囲内であったことから、ＥＣＤ改変親和性ビーズは血漿からの選択的な損失がなくＡＤＣを回収することができ、許容範囲内の精度を示したことが示された。

【０１０１】

異なる種全体のマトリックス効果：　特定のｐ＝０、１および２を有する抗ＭＵＣ１６

ＡＤＣ(３Ａ５－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ)標準物質を、ラット、カニクイザルおよびヒトの血漿又は５％ＢＳＡを有するＰＢＳバッファにおいて３０：６０：１０の比率で添加した。３０μｇ／ｍｌの総ＡＤＣ濃度を用いた。各々の血漿種について３回、ＥＣＤ改変親和性ビーズによって回収し、コントロールとして用いた５％ＢＳＡを有するＰＢＳバッファからの結果と比較した。ＥＣＤ親和性キャプチャおよび抗ＭＵＣ１６ ＡＤＣ試料成分によって試験したブランクのラット、カニクイザルおよびヒトの血漿は、ＴＩＣ(総イオンクロマトグラフィ)によって分析した。典型的なＡＤＣ時間ウィンドウに有意な分析物ピークは観察されなかった。また、抽出したＴＯＦ ＭＳシグナルは逆重畳積分することができないほどに低かったことから、ヒトＭＵＣ１６ ＥＣＤによる親和性キャプチャは相対的にクリーンであり、血漿マトリックスの非特異的なタンパク質の影響をほとんど受けない。

ラット、カニクイザルおよびヒトの血漿に添加した抗ＭＵＣ１６ ＡＤＣ試料成分の代表的なＴＩＣクロマトグラムを、ＰＢＳバッファコントロールと比較した。ＥＣＤ免疫親和性ビーズによってキャプチャされるこれら４つのマトリックスにおける抗ＭＵＣ１６ ＡＤＣ試料成分のクロマトグラフィのパターンは非常に類似していた。代表的なクロマトグラフィの持続時間ウインドウから、３つの種の血漿マトリックスおよびＰＢＳ(バッファ)コントロール間で、同種のＤＡＲ分布パターンが観察された。試料成分は、ＤＡＲ０(＋０、ネイキッド抗体)、ＤＡＲ－１(＋１ Ｄ、１のＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ薬剤リンカーユニット)およびＤＡＲ－２(＋２Ｄ、２のＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ薬剤リンカーユニット)とした。ＤＡＲ－０、ＤＡＲ－１およびＤＡＲ－２構成成分の相対量の詳細な比較を表３に示す。全体の相対的標準偏差(ＲＳＤ)は、試験した４つすべてのマトリックスについて３０％以下で十分であった。したがって、親和性ＭＳ法は、異なる種全体にわたって最小限のマトリックス効果を示した。全体の精度は７０～１３０％の範囲内であった。

表３ 異なる種およびＰＢＳバッファ全体における、様々な血漿中に添加された抗ＭＵＣ１６ ＡＤＣ(３Ａ５－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ)の正確さと精度

DAR 0/DAR 1/DAR 2 (30/60/10)	% DAR 0	% DAR 1	% DAR 2
ラット血漿	31	57	12
	28	60	12
	29	59	12
平均(ラット血漿)	**30**	**59**	**12**
SD (ラット血漿)	**1.5**	**1.6**	**0.1**
カニクイザル血漿	27	59	13
	29	58	13
	29	58	13
平均 (カニクイザル血漿)	**29**	**58**	**13**
SD (カニクイザル血漿)	**1.1**	**0.8**	**0.3**
ヒト血漿	29	59	12
	29	60	11
	29	59	12
平均(ヒト血漿)	**29**	**59**	**12**
SD (ヒト血漿)	**0.1**	**0.7**	**0.6**
PBS w. 5% BSA	29	59	12
	28	59	12
	27	60	13
平均 (PBS)	**28**	**60**	**12**
SD (PBS)	**1.2**	**0.7**	**0.6**
全体の平均 (4マトリックス, n = 12)	29	59	12
全体のSD (n = 12)	1.1	1.0	0.7
全体のRSD (%), n = 12	3.8	1.7	5.5
全体の精度	96	98	122

【０１０２】

血漿と血清の間のマトリックス効果：　特定のｐ＝０、１および２を有する抗ＭＵＣ１６　ＡＤＣ(３Ａ５－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ)標準物質を、ラットとカニクイザルの血漿及び血清に３０：６０：１０の比率で添加した。各ケースにおいて、血漿と血清全体にわたって類似の逆重畳積分された質量スペクトルが観察された。血漿及び血清のマトリックスにおけるＤＡＲ　０、ＤＡＲ　１及びＤＡＲ　２を有する既知の組成物のＤＭＵＣ４０６４Ａ混合物について得られた値を表４に示す。ラットマトリックスにおける全体のＲＳＤが３０％の許容範囲内であることから、ラットの血漿と血清の間でＥＣＤによる親和性キャプチャの間にバイアスがなかったことが示された。同様に、カニクイザルマトリックスにおける全体のＲＳＤは３０％未満であったことから、カニクイザルの血漿と血清の間にバイアスがないことが示された。

表４　ラットおよびカニクイザルの血漿及び血清における、抗ＭＵＣ16 ＡＤＣ(3Ａ5－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ)試料成分の正確な測定

添加比 (%)	測定比 (%)		
DAR 0/DAR 1/DAR 2 (30/60/10)	DAR 0	DAR 1	DAR 2
ラット血漿	31	57	12
	28	60	12
	29	59	12
平均	30	59	12
SD	1.5	1.6	0.1
ラット血清	28	58	13
	25	61	14
	28	59	14
平均	27	59	14
SD	2.1	1.8	0.3
ラットの全体の平均(n = 6)	**28**	**59**	**13**
ラットの全体のSD (n = 6)	**2.2**	**1.6**	**1.1**
ラットの全体のRSD (%) (n = 6)	**7.8**	**2.7**	**8.7**
カニクイザル血漿	27	59	13
	29	58	13
	29	58	13
平均	29	58	13
SD	1.1	0.8	0.3
カニクイザル血清	27	60	13
	30	57	13
	28	60	13
平均	28	59	13
SD	1.5	1.5	0.0
カニクイザルの全体の平均 (n = 6)	**28**	**59**	**13**
カニクイザルの全体のSD (n = 6)	**1.2**	**1.2**	**0.3**
カニクイザルの全体のRSD (%) (n = 6)	**4.3**	**2.0**	**2.3**

【０１０３】

血漿と血清の間の潜在的なマトリックス効果をさらに評価するために、抗ＭＵＣ１６　ＡＤＣ(３Ａ５－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ)を投与したカニクイザルのインビボ試料のサブセットを採取し、免疫親和性ビーズキャプチャと質量分析法を使用して分析した。単一の動物から投与後５分から２２日の間に採取した血漿と対応する血清試料を分析し、結果を比較した(表５)。結果から、カニクイザルの血漿又は対応する血清試料間において、回収した抗ＭＵＣ１６　ＡＤＣ試料成分の相対的なＤＡＲ分布に有意差がなかったことが示される。図９は、３８ｍｇ／ｋｇのＴｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＭＵＣ１６(３Ａ５)　ＨＣＡ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥを投与したカニクイザルの血漿におけるインビボ安定性の逆重畳積分質量分析データの例を示す。平均薬剤ローディングは１．６のＭＭＡＥ／３Ａ５であった。投与したＡＤＣのおよそ３０％は、ＤＡＲ２の脱コンジュゲーションから生成されるものよりＤＡＲ＋１の異なる形態であった。血漿試料は、５分、６

時間、２４時間、７２時間、６日、８日、１５日および２２日の時点に採取し、免疫親和性ＥＣＤビーズ法によってキャプチャした。試料成分は、＋０(ネイキッド抗体)、＋１Ｄ(１のＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ薬剤リンカーユニット)および＋２Ｄ(２のＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ薬剤リンカーユニット)のＤＡＲとした。およそ１４９０００及び１５００００ａｍｕの小さいピークは、不完全に脱グリコシル化された試料成分である。

表５　毒物試験から採取したカニクイザルの血清及び血漿における、抗ＭＵＣ１６　ＡＤＣ(３Ａ５－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ)試料成分の相対的なＤＡＲ分布

Cyno TK 06-1226 グループ5, 動物100415	カニクイザル血清			カニクイザル血漿		
	算出したADC組成 (%)			算出したADC組成 (%)		
時間	DAR 0	DAR 1	DAR 2	DAR 0	DAR 1	DAR 2
5分	0	10	90	0	9	91
6時間	0	21	79	0	20	80
24時間	7	31	62	7	31	62
72時間	14	41	46	15	39	46
6日	20	44	36	19	44	37
8日	21	45	34	21	45	34
15日	31	49	20	30	49	21
22日	41	44	15	42	45	14

【０１０４】

図６は、ＥＣＤ免疫親和性ビーズキャプチャの０、６、２４、４８および９６時間後の時点に採取したＴｈｉｏ　Ｈｕ抗ＭＵＣ１６(３Ａ５)　ＨＣ　Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ(３７℃でインキュベートしたラット血漿中１００μｇ／ｍｌ)の安定性の逆重畳積分質量分析データを示す。試料成分は、＋０(ネイキッド抗体)、＋１Ｄ(１のＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ薬剤リンカーユニット)および＋２Ｄ(２のＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ薬剤リンカーユニット)の薬剤／抗体比率(ＤＡＲ)とした。図７は、ラット血漿中の試料成分ＤＡＲ　＋０、＋１および＋２の経時的なＤＡＲ分布変化を示す。

ＥＣＤ免疫親和性ビーズキャプチャ効率を、ラット血漿中でインキュベートした後に、Ｔｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＭＵＣ１６(３Ａ５)　ＨＣ　Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥの抗薬剤Ｍａｂ免疫親和性ビーズキャプチャと比較された。４つの異なる抗アウリスタチンモノクローナル抗体クローンをビオチン化し、ストレプトアビジンコート常磁性ビーズに固定した(図２)。これらの抗薬剤クローンは、１薬剤をロードしたＡＤＣ(ＤＡＲ＋１)の非効率的なキャプチャを示した。

【０１０５】

実施例２　ＥＣＤ免疫親和性ビーズキャプチャプロトコール

抗ＭＵＣ１６　抗体－薬剤コンジュゲートである３Ａ５－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥを投与したカニクイザルの血清および血漿試料を、以下の工程によって処理した。

１．　試料、コントロール及びブランクのプレート位置を決定する(９６深底ウェルプレート(２ｍｌの正方形上部)：Analytical Sales and Service Inc. カタログ番号59623-23、又は９６ウェルプレート(５００μｌの円形上部)：VWRカタログ番号47743-828)。一般的に、２つのブランクと１つのシステムコントロールを実行の初めに試験し、その後２つのブランクと２つのシステムコントロールを実行の最後に試験する。必要に応じて実行の全体にわたって更なるブランクを試験してよい。試料、コントロール又はブランクに用いるウェルに、後述する添加を行った。

２．　試料、コントロール又はブランクに用いる９６深底ウェル正方形上部プレートの各ウェルに４００μｌのＨＢＳ－ＥＰバッファ(Biacoreカタログ番号BR-1001-88)をピペットで移す。

３．　ストレプトアビジンコートのダイナビーズM-280 (Dynabeads、M280ストレプトアビジン、10mg/mL、カタログ番号110029、Lot番号G74050、BioVeris)を緩やかに撹拌することによって再懸濁する。使用中のＨＢＳ－ＥＰバッファプレートの各ウェルに１００μｌの懸濁したビーズ混合物をピペットで移す。およそ２０秒間、室温で、ＫｉｎｇＦｉｓｈ

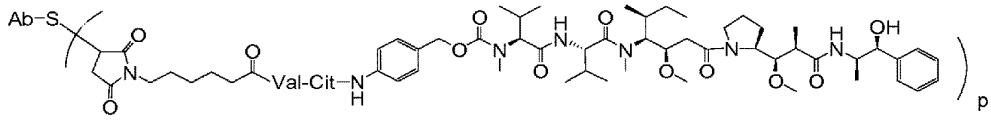
ｅｒ９６の磁気粒子プロセッサ(Thermo Electron Corp.)によって混合する。
４．　４００μＬのＨＢＳ－ＥＰバッファを含む新たな９６深底ウェル正方形上部プレートへビーズを移し、およそ２０秒間、室温で、ＫｉｎｇＦｉｓｈｅｒにより混合する。
５．　新たな９６深底ウェル正方形上部プレートのブランク、試料又はコントロールの各ウェルに、４００μｌのＨＢＳ－ＥＰバッファをピペットで移す。
６．　ＨＢＳ－ＥＰバッファプレートのブランク、試料又はコントロールの各ウェルに、２５μｌのビオチン化抗ＭＵＣ１６-ＥＣＤ(図１ａ)をピペットで移す。
７．　ＨＢＳ－ＥＰバッファとビオチン化した抗ＭＵＣ１６-ＥＣＤを含む９６深底ウェルプレートにビーズを移し、およそ２０秒間穏やかに混ぜる。プレートをアルミニウムシールで被う。
８．　プレートを攪拌機(スピード７に設定)に載せ、およそ１２０分間、室温でインキュベートする。
９．　４００μｌのＨＢＳ－ＥＰバッファを含む９６深底ウェル正方形上部プレートにビーズを移し、ＫｉｎｇＦｉｓｈｅｒを用いて２回洗浄する。
【０１０６】
１０．　陰性の血漿又は血清のプールを用いたアッセイの範囲に、血漿又は血清試料を希釈する。
１１．　９６深底ウェル正方形上部プレートへ４００μｌのＨＢＳ－ＥＰバッファをピペットで移し、次いで、各々希釈した５０μｌの血漿又は血清の試料、コントロール又は又はブランクを適切なウェルに添加する。
１２．　希釈した血漿又は血清の試料にＫｉｎｇＦｉｓｈｅｒを用いてビーズを移す。およそ２０秒間穏やかに混ぜる。プレートをアルミニウムシールテープで被う。
１３．　プレートを攪拌機(速度７)に載せ、およそ１２０分間、室温でインキュベートする。
１４．　５００μｌのＨＢＳ－ＥＰバッファを含む９６深底ウェル正方形上部プレートにビーズを移し、ＫｉｎｇＦｉｓｈｅｒを用いて２回洗浄する。
１５．　ＨＢＳ－ＥＰバッファ、８０ｍＭリン酸塩及びグリコＮ-グリカナーゼ(Prozyme glyko N-glycanase, Cat. No. GKE-5006D)をそれぞれ３００パーツ：３２パーツ：４パーツの比率で混合することによってＨＢＳ－ＥＰ－グリカナーゼバッファを調製する。
１６．　３３６μｌのＨＢＳ－ＥＰ－グリカナーゼバッファを９６深底ウェル正方形上部プレートの各ウェルへピペットで移す。
１７．　ＫｉｎｇＦｉｓｈｅｒを用いてＨＢＳ－ＥＰ－グリカナーゼバッファにビーズを移す。およそ２０秒間穏やかに混合する。プレートをアルミニウムシールテープで被う。
１８．　３７℃及び３００ｒｐｍの撹拌速度に維持するように設定したインキュベーターにプレートを置き、終夜インキュベートする。
１９．　５００μｌのＨＢＳ－ＥＰバッファを含む９６深底ウェル正方形上部プレートにビーズを移し、ＫｉｎｇＦｉｓｈｅｒを用いて２回洗浄する。
【０１０７】
２０．　５００μｌの水を含む９６深底ウェル正方形上部プレートにビーズを移し、ＫｉｎｇＦｉｓｈｅｒを用いて２回洗浄する。
２１．　水中１０％アセトニトリルを５００μｌ含む９６深底ウェル正方形上部プレートにビーズを移し、ＫｉｎｇＦｉｓｈｅｒを用いて１回洗浄する。
２２．　溶出溶媒として、１％の蟻酸を含む３０％アセトニトリル水、５０μｌを、９６深底ウェル正方形上部プレートにピペットで移す。
２３．　ＫｉｎｇＦｉｓｈｅｒを用いて溶出溶媒プレートにビーズを移す。プレートをアルミニウムシールテープで被う。
２４．　速度７に設定した攪拌機にプレートを置き、およそ１５分間振とうする。
２５．　ＫｉｎｇＦｉｓｈｅｒを用いて溶出プレートからビーズを取り除く。
２６．　マルチチャネルピペットを用いて、９６ウェル注入プレート(ＶＷＲ、５００μｌ円形上部)に溶出プレートからの上清を移し、プレートをシリコン封入マットで被う。

２７．　２～８℃に維持するように設定した遠心機にて、３０００ｒｐｍの設定でおよそ５分間遠心分離する。そうして、ＬＣ－ＭＳ上への注入用試料プレートとする。

【０１０８】

実施例３　血漿および血清における抗ＨＥＲ２抗体-薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)化合物の分析

以下の構造：



を有する、システイン改変抗ＨＥＲ２変異体Ｖ２０５ＣおよびＡ１１８Ｃのトラスツズマブ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ(ここで、ｐが１、２、３又は４であり、Ｖａｌはバリンであり、Ｃｉｔはシトルリンであり、Ａｂはトラスツズマブのシステイン改変の、Ａ１１８Ｃ重鎖変異体およびＶ２０５Ｃ軽鎖変異体、抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体である)を血漿試料において分析した。

【０１０９】

図４は、０、８、２４、４８および９６時間の時点で採取したインビボ血漿試料の、免疫親和性ＥＣＤ改変ビーズキャプチャ(図１ａ)及び質量分析特徴付け後の、血漿における軽鎖(Ｔｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＨＥＲ２　４Ｄ５　ＬＣ　Ｖ２０５Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ、１.６４　ＭＭＡＥ／４Ｄ５　Ａｂ)(上)および重鎖(Ｔｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＨＥＲ２　４Ｄ５　ＨＣ　Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ、１.９　ＭＭＡＥ／４Ｄ５　Ａｂ)(下)ＡＤＣ変異体についての、薬剤／抗体比(ＤＡＲ)分布の変化を示す。試料成分は、０(ネイキッド抗体)、１(１のＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ薬剤リンカーユニット)および２(２のＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ薬剤リンカーユニット)のＤＡＲとした。ＤＡＲ分布パターンは、これらＡＤＣについて、軽鎖変異体(ＬＣ　Ｖ２０５Ｃ)が重鎖変異体(ＨＣ　Ａ１１８Ｃ)より安定性が高いことを示す。

重鎖変異体(Ｔｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＨＥＲ２　４Ｄ５　ＨＣ　Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ、１.９ＭＭＡＥ／４Ｄ５　Ａｂ)を、１００μｇ／ｍｌでラット血漿中でインキュベートした。特定の時点で試料を採取し、免疫親和性ＥＣＤビーズキャプチャにて処理した。図５は、０、８、２４、４８および９６時間の時点で採取した試料の逆重畳積分質量分析データを示す。試料成分を、＋０(ネイキッド抗体)、＋１Ｄ(１のＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ薬剤リンカーユニット)および＋２Ｄ(２のＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ薬剤リンカーユニット)のＤＡＲとした。およそ１５１０００ａｍｕの小さいピークは、不完全に脱グリコシル化された試料成分である。

【０１１０】

実施例４　ＥＬＩＳＡと免疫親和性ビーズキャプチャ法の比較

図１０ａは、ＥＣＤタンパク質が抗体又は抗体－薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)への結合のために固体担体上に固定されている総ＥＬＩＳＡアッセイフォーマットを示す。ＡＤＣは、化学発光検出のために$F(ab')_2$ヤギ抗ヒトＦｃ－ＨＲＰに結合する。

図１０ｂは、抗薬剤ＭＡｂが抗体－薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)への結合のために固体担体上に固定されているコンジュゲートＥＬＩＳＡアッセイフォーマットを示す。ＡＤＣは、溶液中のビオチン化ＥＣＤタンパク質に結合する。次いで、複合体は、化学発光検出のためにストレプトアビジン－西洋ワサビペルオキシダーゼ(ＨＲＰ)に結合しうる。

図１１は、Ｔｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＭＵＣ１６（３Ａ５）ＨＣ　Ａ１１８Ｃ-ＭＣ-ｖｃ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥと共にインキュベートし、９６時間まで経時的に分析したラット血漿試料中の、薬剤部分にコンジュゲートした残りの抗体をプロットすることによる、ＥＬＩＳＡ法、及び免疫親和性ビーズキャプチャ／質量分析(ＭＳ)法による試料成分の検出の比較を示す。

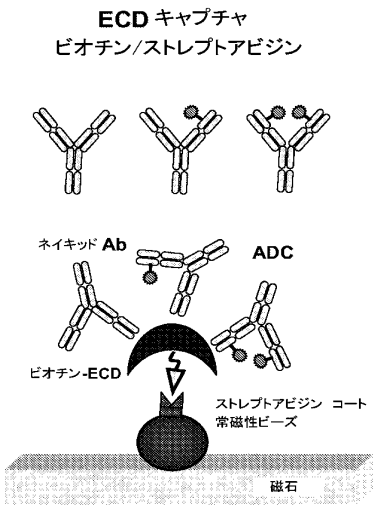
【０１１１】

表６は、ＥＣＤ免疫親和性ビーズによってキャプチャし、質量分析によって分析した、０、６、２４、４８、９６の同じ時点の試料からの、Ｔｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＭＵＣ１６(３Ａ５)　ＨＣ　Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ試料成分の相対量を蓄積する。親和性質量分析およびＥＬＩＳＡからの結果は、抗アウリスタチン抗体がコンジュゲートＴｈｉｏ　Ｈｕ　抗ＭＵＣ１６(３Ａ５)　ＨＣ　Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ試料成分をすべて効率よくキャプチャしたわけではないことを示した。したがって、親和性ＭＳは、コンジュゲートＥＬＩＳＡアッセイを発達させるための最も適切な抗薬剤抗体を選別する補助として用いることができる。

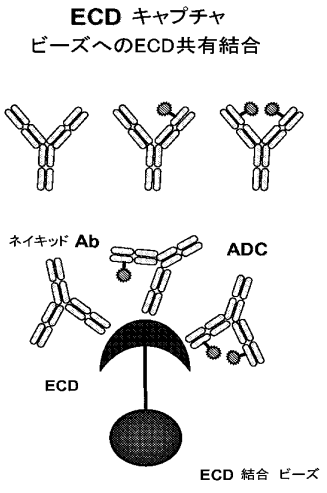
表６　ＥＣＤ免疫親和性ビーズキャプチャ

ECD 免疫親和性ビーズと質量分析検出による試料成分キャプチャ				
時間 (時)	% DAR +2	% DAR +1	% DAR +0 (ﾈｲｷｯﾄﾞ Ab)	% ｺﾝｼﾞｭｹﾞｰﾄ
0	100	0	0	100
6	84	16	0	100
24	48	43	9	91
48	36	49	15	85
96	32	50	18	82

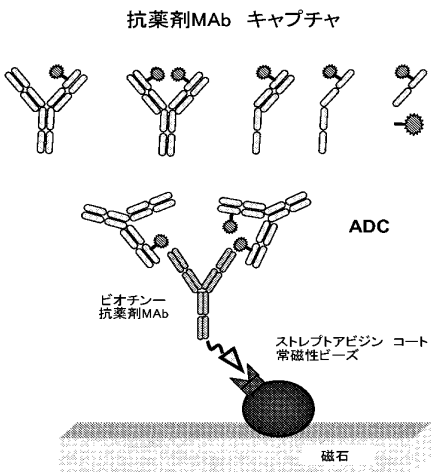
【図１ａ】



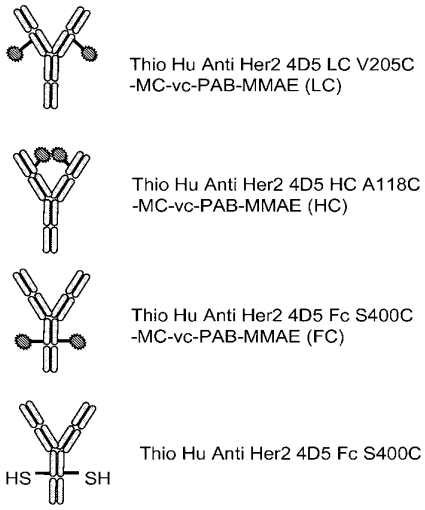
【図１ｂ】



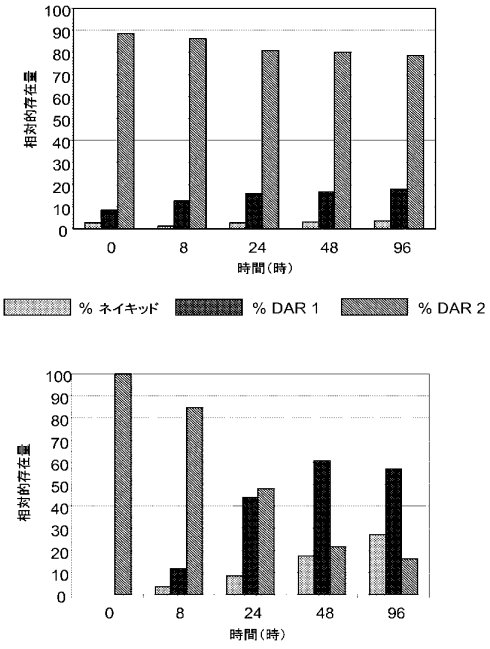
【図２】


抗薬剤MAb キャプチャ
ADC
ビオチン一
抗薬剤MAb
ストレプトアビジン コート
常磁性ビーズ
磁石

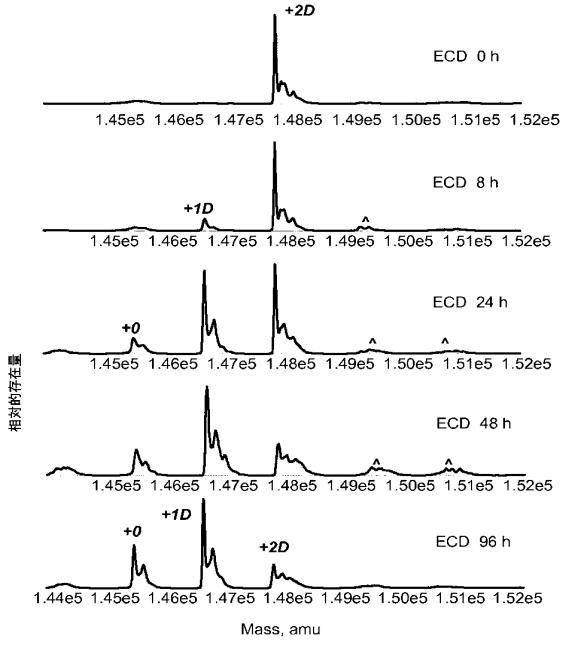
【図３】


Thio Hu Anti Her2 4D5 LC V205C
-MC-vc-PAB-MMAE (LC)
Thio Hu Anti Her2 4D5 HC A118C
-MC-vc-PAB-MMAE (HC)
Thio Hu Anti Her2 4D5 Fc S400C
-MC-vc-PAB-MMAE (FC)
Thio Hu Anti Her2 4D5 Fc S400C
HS
SH

【図４】

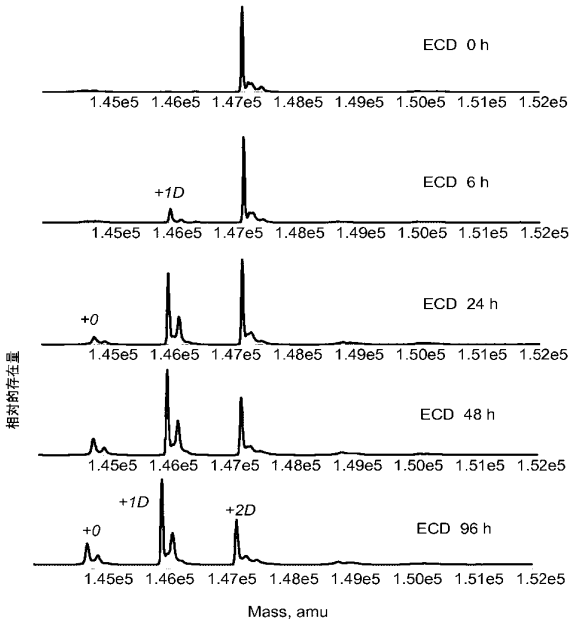

相対的存在量
時間(時)
% ネイキッド
% DAR 1
% DAR 2

【図５】

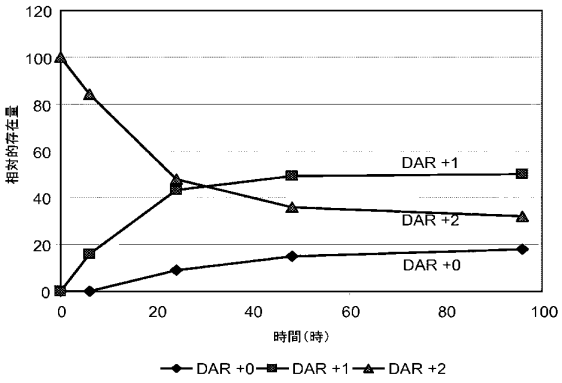

+2D
ECD 0 h
ECD 8 h
+1D
ECD 24 h
+0
ECD 48 h
ECD 96 h
相対的存在量
Mass, amu

OnCusp
Ex. 1002

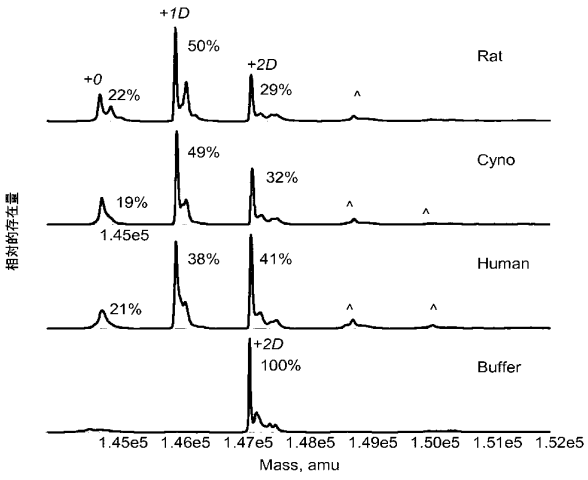
【図６】



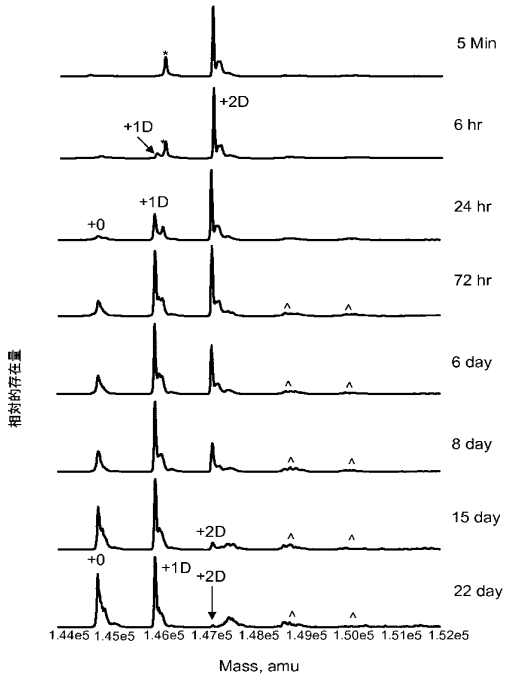
【図７】



【図８】

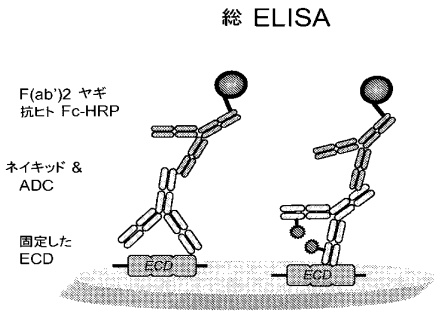


【図９】

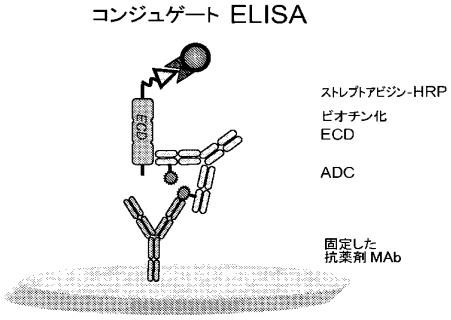


OnCusp
Ex. 1002

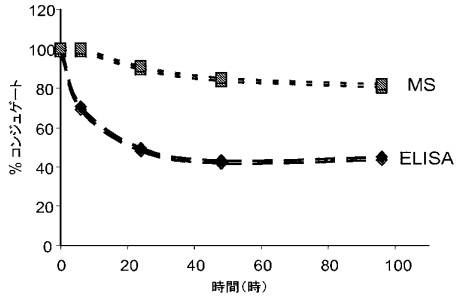
【図１０ａ】



【図１０ｂ】



【図１１】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/043560

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/50

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)
G01N

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 practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/101017 A1 (KADKHODAYAN MIRYAM [US]; MANN EMILY [US]; GENENTECH INC [US]) 27 October 2005 (2005-10-27) the whole document -/--	1-39

[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 document 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
28 August 2009	10/09/2009

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	Hohwy, Morten

3

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/043560

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	XIE H; ET AL: "PHARMACOKINETICS AND BIODISTRIBUTION OF THE ANTITUMOR IMMUNOCONJUGATE, CANTUZUMAB MERTANSINE (HUC242-DM1), AND ITS TWO COMPONENTS IN MICE" JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, AMERICAN SOCIETY FOR PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, US, vol. 308, no. 3, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 1073-1082, XP008040428 ISSN: 0022-3565 page 1074 - page 1076	1-39
Y	SIEGEL; ET AL: "CALICHEAMICIN DERIVATIVES CONJUGATED TO MONOCLONAL ANTIBODIES:DETERMINATION OF LOADING VALUES AND DISTRIBUTIONS BY INFRARED AND UV MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION MASS SPECTROMETRY AND ELECTROSPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US, vol. 69, no. 14, 15 July 1997 (1997-07-15) , pages 2716-2726, XP002128444 ISSN: 0003-2700 page 2717 - page 2719	1-39
Y	FRANCISCO J A; ET AL: "cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity" BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 102, no. 4, 15 August 2003 (2003-08-15), pages 1458-1465, XP002280965 ISSN: 0006-4971 page 1459 - page 1460	1-39

3

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2009/043560

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005101017 A1	27-10-2005	CA 2559870 A1	27-10-2005
		EP 1740954 A1	10-01-2007
		JP 2007532882 T	15-11-2007

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61K	***39/395***	***(2006.01)***	G01N	30/88	E	
G01N	***27/62***	***(2006.01)***	A61K	39/395	C	
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61K	39/395	L	
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	G01N	27/62	V	
			A61P	43/00	105	
			A61P	35/00		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(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,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,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,IS,JP,KE,KG,KM,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,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 サード， オラ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94597， ウォールナット クリーク， プリークネス シーティ．， 315
(72)発明者 スー， キーヤン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002， ベルモント， エッジウッド プレース 26

Fターム(参考) 2G041 CA01 DA03 DA04 DA05 DA09 DA18 EA04 FA10 FA12 GA02 GA03 GA05 GA06 GA08 GA09 HA01 LA08 LA10
2G045 AA40 BB03 CA26 CB01 CB17 DA36 FB03 FB06 FB15
4C085 AA13 AA14 AA23 AA26 CC23 EE01

(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2012-100671
(P2012-100671A)
(43)公開日　平成24年5月31日(2012.5.31)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B065
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4C076
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4C084
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	101	4H045

審査請求 有　請求項の数 16　ＯＬ　外国語出願　（全 446 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-276723 (P2011-276723)
(22)出願日　平成23年12月19日 (2011.12.19)
(62)分割の表示　特願2008-507949 (P2008-507949)の分割
原出願日　平成18年4月18日 (2006.4.18)
(31)優先権主張番号　60/674,342
(32)優先日　平成17年4月22日 (2005.4.22)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　11/406,454
(32)優先日　平成18年4月17日 (2006.4.17)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　500049716
アムジエン・インコーポレーテツド
アメリカ合衆国　シーエー　９１３２０，サウザンド　オークス，ワン　アムジエン　センター　ドライブ
(74)代理人　100062007
弁理士　川口　義雄
(74)代理人　100140523
弁理士　渡邊　千尋
(74)代理人　100103920
弁理士　大崎　勝真
(72)発明者　ジヨン・ケイ・サリバン
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９１３２０、ニユーベリー・パーク、ロテーラ・ストリート・１０８５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】延長された血液半減期を有するトキシンペプチド

(57)【要約】　（修正有）
【課題】インビボでの半減期が極めて短い（約４時間）トキシンペプチドの半減期を延長した医薬組成の提供。
【解決手段】得られた組成物及びその多量体は半減期延長部分であり、トキシンペプチドは半減期延長部分への連結によって、インビボでの半減期が増大する。医薬組成物は、前記組成物と医薬として許容される担体とを含む。組成物をコードするＤＮＡ、該ＤＮＡを含む発現ベクター、及び該発現ベクターを含む宿主細胞も開示される。限定されないが、多発性硬化症、１型糖尿病、疥癬、炎症性腸疾患、接触媒介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、移植拒絶、移植片対宿主病及び狼瘡などの自己免疫疾患を治療する方法、多発性硬化症の症候の再発を予防するか、又は該症候を軽減する方法であり、トキシンペプチドを取り込む組成物は、抱合されていないペプチドと同等の、又はこれよりずっと大きな活性及び／又はイオンチャンネル標的選択性を有する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
式
$(X^1)_a-(F^1)_d-(X^2)_b-(F^2)_e-(X^3)_c$
の組成物及びその多量体。
（式中：
F^1及びF^2は半減期延長部分であり、並びにｄ及びｅは、各々独立に、０又は１であり（但し、ｄ及びｅの少なくとも１つは１である。）；
X^1、X^2及びX^3は、各々独立に、$-(L)_f-P-(L)_g-$であり、並びにｆ及びｇは、各々独立に、０又は１であり；
Ｐは、少なくとも２つのペプチド内ジスルフィド結合を含む、約８０アミノ酸残基長以下のトキシンペプチドであり；
Ｌは、リンカーであり；並びに
ａ、ｂ及びｃは、各々独立に、０又は１である（但し、ａ、ｂ及びｃの少なくとも１つは、１である。）。）
【請求項２】
式$P-(L)_g-F^1$の、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
式$F^1-(L)_f-P$の、請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
式$P-(L)_g-F^1-(L)_f-P$の、請求項１に記載の組成物。
【請求項５】
式$F^1-(L)_f-P-(L)_g-F^2$の、請求項１に記載の組成物。
【請求項６】
式$F^1-(L)_f-P-(L)_g-F^2-(L)_f-P$の、請求項１に記載の組成物。
【請求項７】
式$F^1-F^2-(L)_f-P$の、請求項１に記載の組成物。
【請求項８】
式$P-(L)_g-F^1-F^2$の、請求項１に記載の組成物。
【請求項９】
式$P-(L)_g-F^1-F^2-(L)_f-P$の、請求項１に記載の組成物。
【請求項１０】
F^1若しくはF^2又は両方が、ポリエチレングリコール、エチレングリコールの共重合体、ポリプロピレングリコール、プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリ－１，３－ジオキソラン、ポリ－１，３，６－トリオキサン、エチレン／マレイン酸無水物共重合体、ポリアミノ酸、デキストランｎ－ビニルピロリドン、ポリｎ－ビニルピロリドン、プロピレングリコールホモ重合体、プロピレンオキシドポリマー、エチレンオキシドポリマー、ポリオキシエチレン化されたポリオール、ポリビニルアルコール、直鎖若しくは分岐のグリコシル化された鎖、ポリアセタール、長鎖脂肪酸、長鎖疎水性脂肪族基、免疫グロブリンF_cドメイン若しくはその一部、ＦｃのＣＨ２ドメイン、Ｆｃドメインループ、アルブミン、アルブミン結合タンパク質、トランスサイレチン、チロキシン結合グロブリン若しくは長い血清半減期の血清タンパク質に対して親和性を有し、ペプチドリガンド及び小分子リガンドからなる群から選択されるリガンド又はこれらの要素の何れかの組み合わせである、請求項１に記載の組成物。
【請求項１１】
F^1若しくはF^2又は両方がヒトＩｇＦｃドメイン又はその一部を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１２】
ヒトＩｇＧＦｃドメインがヒトＩｇＧ１Ｆｃドメインを含む、請求項１１に記載の組成物。

【請求項１３】
ヒトＩｇＧＦｃドメインがヒトＩｇＧ２Ｆｃドメインを含む、請求項１１に記載の組成物。
【請求項１４】
F^1及びF^2が異なる半減期延長部分である、請求項１に記載の組成物。
【請求項１５】
F^1若しくはF^2又は両方が、（図３、４、１１Ａ～Ｃ、１２Ａ～Ｃ及び１２Ｅ～Ｆ）に記載されているような配列番号：２、４、７０、７１、７２、７４、７５、７６、１３４０～１３４２及び１３５９～１３６３からなる群から選択される配列を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１６】
F^1若しくはF^2又は両方がヒト血清アルブミンタンパク質ドメインを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１７】
F^1若しくはF^2又は両方がトランスサイレチンタンパク質ドメインを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１８】
F^1若しくはF^2又は両方が生物学的に適切な重合体又は共重合体を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１９】
生物学的に適切な重合体がポリエチレングリコール（ＰＥＧ）である、請求項１８に記載の組成物。
【請求項２０】
ＰＥＧが５ｋＤ及び２０ｋＤのＰＥＧからなる群から選択される、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２１】
F^1がヒトＩｇＧＦｃドメイン又はＨＳＡであり、及びF^2がＰＥＧである、請求項５、６、８又は９の何れか１項に記載の組成物。
【請求項２２】
F^2がヒトＩｇＧＦｃドメイン又はＨＳＡであり、及びF^1がＰＥＧである、請求項５、６、７又は９の何れか１項に記載の組成物。
【請求項２３】
非ＰＥＧF^1若しくは非ＰＥＧF^2に、又はＰに、又はこれらの何れかのあらゆる組み合わせに抱合された１つ又はそれ以上のＰＥＧ部分をさらに含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項２４】
トキシンペプチドがヒトＩｇＧ１Ｆｃドメインループ中に挿入されている、請求項１に記載の組成物。
【請求項２５】
少なくとも１つのＰがＫｖ１．３アンタゴニストペプチドを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項２６】
Ｋｖ１．３アンタゴニストペプチドが、ＳｈＫ、ＨｍＫ、ＭｇＴｘ、ＡｇＴｘ１、ＡｇＴｘ２、ＨｓＴｘ１、ＯＳＫ１、アヌロクトキシン（Ａｎｕｒｏｃｔｏｘｉｎ）、ノキシウストキシン（Ｎｏｘｉｕｓｔｏｘｉｎ）、ホンゴトキシン（Ｈｏｎｇｏｔｏｘｉｎ）、ＨｓＴｘ１、ＣｈＴｘ、チチストキシン（Ｔｉｔｙｓｔｏｘｉｎ）、ＢｇＫ、ＢｍＫＴＸ、ＢｍＴｘ、Ｔｃ３０、Ｔｃ３２、Ｐｉ１、Ｐｉ２及びＰｉ３トキシンペプチド又はこれらの何れかの類縁体からなる群から選択される、請求項２５に記載の組成物。
【請求項２７】
Ｋｖ１．３アンタゴニストペプチドが、表１に記されている配列番号２１、１７、１８

、１９、６１、２３、８５、２５、６２、３０、２７、３６、８６、９、２６、４０、８７及び１３からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項２５に記載の組成物。
【請求項２８】
少なくとも１つのＰがＳｈＫペプチド又はＳｈＫペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項２９】
ＳｈＫペプチド又はＳｈＫペプチド類縁体が、表２に記されている配列番号５、８８～２００、５４８～５６１、８８４～９５０及び１２９５～１３００からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項２８に記載の組成物。
【請求項３０】
少なくとも１つのＰが、ＨｍＫペプチド、ＢｇＫペプチド、ＡｅＫペプチド若しくはＡｓＫＳペプチド又はこれらの何れかのペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項３１】
ＨｍＫペプチド、ＢｇＫペプチド、ＡｅＫペプチド若しくはＡｓＫｓペプチド又はペプチド類縁体が、表３に記されている配列番号６～９、２０１～２４１からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項３０に記載の組成物。
【請求項３２】
少なくとも１つのＰがＭｇＴｘペプチド又はＭｇＴｘペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項３３】
ＭｇＴｘペプチド、ＭｇＴｘペプチド類縁体が、表４に記されている配列番号２８及び２４２～２６０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項３２に記載の組成物。
【請求項３４】
少なくとも１つのＰがＡｇＴｘ２ペプチド又はＡｇＴｘ２ペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項３５】
ＡｇＴｘ２ペプチド又はＡｇＴｘ２ペプチド類縁体が、表５に記されている配列番号２３及び２６１～２７５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項３４に記載の組成物。
【請求項３６】
少なくとも１つのＰがＨｓＴｘ１ペプチド又はＨｓＴｘ１ペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項３７】
ＨｓＴｘ１ペプチド又はＨｓＴｘ１ペプチド類縁体が、表６に記されている配列番号６１及び２７６～２９３からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項３６に記載の組成物。
【請求項３８】
少なくとも１つのＰがＯＳＫ１ペプチド又はＯＳＫ１ペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項３９】
ＯＳＫ１ペプチド又はＯＳＫ１ペプチド類縁体が、表７に記されている配列番号２５、２９４～２９８、５６２～６３６、９８０～１２７４及び１３０３～１３０８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項３８に記載の組成物。
【請求項４０】
少なくとも１つのＰがＰｉ２ペプチド又はＰｉ２ペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項４１】
Ｐｉ２ペプチド又はＰｉ２ペプチド類縁体が、表８に記されている配列番号１７及び２９９～３１５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項４０に記載の組成物

。
【請求項４２】
少なくとも１つのＰがＡｎＴｘペプチド又はＡｎＴｘペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項４３】
ＡｎＴｘペプチド又はＡｎペプチド類縁体が、表９に記されている配列番号６２及び３１６～３１８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項４２に記載の組成物。
【請求項４４】
少なくとも１つのＰがＮＴＸペプチド又はＮＴＸペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項４５】
ＮＴＸペプチド又はＮＴＸペプチド類縁体が、表１０に記されている配列番号３０及び３１９～３２５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項４４に記載の組成物。
【請求項４６】
少なくとも１つのＰがＫＴＸ１ペプチド又はＫＴＸ１ペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項４７】
ＫＴＸ１ペプチド又はＫＴＸ１類縁体が、表１１に記されている配列番号２４及び３２６～３２８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項４６に記載の組成物。
【請求項４８】
少なくとも１つのＰがＩＫＣａ１アンタゴニストペプチドを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項４９】
ＩＫＣａ１アンタゴニストペプチドが、ＭＴｘペプチド、ＣｈＴｘペプチド又はこれらの何れかのペプチド類縁体を含む、請求項４８に記載の組成物。
【請求項５０】
ＭＴｘペプチド、ＣｈＴｘペプチド又はこれらの何れかのペプチド類縁体が、表１２に記されている配列番号２０、３６及び３２９からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項４９に記載の組成物。
【請求項５１】
少なくとも１つのＰがＭＴＸペプチド又はＭＴＸペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項５２】
ＭＴＸペプチド又はＭＴＸペプチド類縁体が、表１３に記されている配列番号２０、３３０～３４３、及び１３０１、１３０２、１３０４～１３０７、１３０９、１３１１、１３１２及び１３１５～１３３６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項５１に記載の組成物。
【請求項５３】
少なくとも１つのＰがＣｈＴＸペプチド又はＣｈＴｘペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項５４】
ＣｈＴｘペプチド又はＣｈＴｘペプチド類縁体が、表１４に記されている配列番号３６、５９、３４４～３４６及び１３６９～１３９０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項５３に記載の組成物。
【請求項５５】
少なくとも１つのＰがＳＫＣａアンタゴニストペプチドを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項５６】

ＳＫＣａアンタゴニストペプチドが、アパミンペプチド、ＳｃｙＴｘペプチド、ＢｍＰ０５ペプチド、Ｐ０５ペプチド、タマピンペプチド、Ｐ０１ペプチド若しくはＴｓＫペプチド又はこれらの何れかのペプチド類縁体を含む、請求項５５に記載の組成物。

【請求項５７】

ＳＫＣａアンタゴニストペプチドが、表１５に記されている配列番号１６、４７、５０～５３及び６８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項５５に記載の組成物。

【請求項５８】

少なくとも１つのＰがアパミンペプチド又はアパミンペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。

【請求項５９】

アパミンペプチド又はアパミンペプチド類縁体が、表１６に記されている配列番号６８及び３４８～３５３からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項５８に記載の組成物。

【請求項６０】

ＳｃｙＴｘペプチド、タマピンペプチド又はペプチド類縁体が、表１７に記されている配列番号５１、５３及び３５４～３５６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項５６に記載の組成物。

【請求項６１】

少なくとも１つのＰがＢＫＣａアンタゴニストペプチドを含む、請求項１に記載の組成物。

【請求項６２】

ＢＫＣａアンタゴニストペプチドが、表１８に記されている配列番号２９、３５、３８～４１からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項６１に記載の組成物。

【請求項６３】

少なくとも１つのＰがＩｂＴｘペプチド、ソロトキシンペプチド、ＢｍＴｘ１ペプチド若しくはＢｕＴｘペプチド又はこれらの何れかのペプチド類縁体を含む、請求項６１に記載の組成物。

【請求項６４】

ＩｂＴｘペプチド、スロトキシンペプチド、ＢｍＴｘ１ペプチド、ＢｕＴｘペプチド又はペプチド類縁体が、表１９に記されている配列番号３８及び３５７～３９８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項６３に記載の組成物。

【請求項６５】

少なくとも１つのＰがマルテントキシンペプチド又はマルテントキシンペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。

【請求項６６】

マルテントキシンペプチド又はマルテントキシンペプチド類縁体が、表２０に記されている配列番号３５及び３９９～４０８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項６５に記載の組成物。

【請求項６７】

少なくとも１つのＰがＮ型カルシウムチャンネル阻害剤ペプチドを含む、請求項１に記載の組成物。

【請求項６８】

Ｎ型カルシウムチャンネル阻害剤ペプチドが、表２１に記されている配列番号６４～６６、３４７、４０９、１３６４～１３６７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項６７に記載の組成物。

【請求項６９】

少なくとも１つのＰがωＭＶＩＩＡペプチド又はωＭＶＩＩＡペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。

【請求項７０】

ωＭＶＩＩＡペプチド又はωＭＶＩＩＡペプチド類縁体が、表２２に記されている配列番号６５及び４１０～４２１からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項６９に記載の組成物。
【請求項７１】
少なくとも１つのＰがＧＶＩＡペプチド又はＧＶＩＡペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項７２】
ＧＶＩＡペプチド又はＧＶＩＡペプチド類縁体が、表２３に記されている配列番号６４及び４２２～４２９からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項７１に記載の組成物。
【請求項７３】
少なくとも１つのＰがＰｔｕ１ペプチド又はＰｔｕ１ペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項７４】
Ｐｔｕ１ペプチド又はＰｔｕ１ペプチド類縁体が、表２４に記されている配列番号６６及び４３０～４３７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項７３に記載の組成物。
【請求項７５】
少なくとも１つのＰがＴ型カルシウムチャンネル、Ｐ２Ｘ又はＴＲＰ阻害剤ペプチドを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項７６】
少なくとも１つのＰがＰｒｏＴｘ１ペプチド又はＰｒｏＴｘ１ペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項７７】
ＰｒｏＴｘ１が、表２５に記されている配列番号５６、４３８～４４５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドである、請求項７６に記載の組成物。
【請求項７８】
少なくとも１つのＰがＢｅＫＭＩペプチド又はＢｅＫＭＩペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項７９】
ＢｅＫＭＩペプチド又はＢｅＫＭＩペプチド類縁体が、表２６に記されている配列番号６３及び４４６～４５８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項７８に記載の組成物。
【請求項８０】
少なくとも１つのＰがナトリウムチャンネル阻害剤ペプチドを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項８１】
ナトリウムチャンネル阻害剤ペプチドが、表２７に記されている配列番号４５９～４６９からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項８０に記載の組成物。
【請求項８２】
少なくとも１つのＰが塩化物チャンネル阻害剤ペプチドを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項８３】
塩化物チャンネル阻害剤ペプチドが、表２８に記されている配列番号６７及び４７０～４９３からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項８２に記載の組成物。
【請求項８４】
少なくとも１つのＰがＫｖ２．１阻害剤ペプチドを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項８５】
Ｋｖ２．１阻害剤ペプチドが、表２９に記されている配列番号４９４～５０６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項８４に記載の組成物。

【請求項８６】
少なくとも１つのＰがＫｖ４．３ペプチド及びＫｖ４．２の阻害剤ペプチドを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項８７】
Ｋｖ４．３及びＫｖ４．２の阻害剤ペプチドが、表３０に記されている配列番号５７及び５０７～５１８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項８６に記載の組成物。
【請求項８８】
少なくとも１つのＰがｎＡＣＨＲチャンネル阻害剤ペプチドを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項８９】
ｎＡＣＨＲチャンネル阻害剤ペプチドが、表３１に記されている配列番号５１９～５４１からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項８８に記載の組成物。
【請求項９０】
少なくとも１つのＰがアガトキシンペプチド又はアガトキシンペプチド類縁体を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項９１】
少なくとも１つのＰが、表３２に記されている配列番号９５９～９７５、１２７５～１２８７及び１３６８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項９２】
請求項１に記載の組成物をコードするＤＮＡ。
【請求項９３】
請求項９２に記載のＤＮＡを含む発現ベクター。
【請求項９４】
請求項９３に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。
【請求項９５】
細胞が真核細胞である、請求項９４に記載の宿主細胞。
【請求項９６】
細胞が哺乳動物細胞である、請求項９４に記載の宿主細胞。
【請求項９７】
細胞がＣＨＯ細胞である、請求項９４に記載の宿主細胞。
【請求項９８】
細胞が原核細胞である、請求項９４に記載の宿主細胞。
【請求項９９】
細胞がＥ．コリ細胞である、請求項９４に記載の宿主細胞。
【請求項１００】
薬理学的に活性な、共有結合されたさらなるペプチドをさらに含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１０１】
さらなるペプチドがF^1又はF^2に結合されている、請求項１００に記載の組成物。
【請求項１０２】
さらなるペプチドがＰに結合されている、請求項１００に記載の組成物。
【請求項１０３】
トキシンペプチドの活性に関してアゴニスト作用を示すペプチド若しくはアンタゴニスト作用を示すペプチド又は標的誘導ペプチドをさらに含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１０４】
表２に記されている配列番号８８、８９、９２、１４８～２００、５４８～５６１、８８４～９４９及び１２９５～１３００からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。

【請求項１０５】
表３に記されている配列番号２０１～２２５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１０６】
表４に記されている配列番号２４２～２４８及び２５０～２６０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１０７】
表５に記されている配列番号２６１～２７５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１０８】
表６に記されている配列番号２７６～２９３からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１０９】
表７に記されている配列番号９８０～１２７４、１３０３及び１３０８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１１０】
表８に記されている配列番号２９９～３１５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１１１】
表９に記されている配列番号３１６～３１８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１１２】
表１０に記されている配列番号３１９のアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１１３】
表１１に記されている配列番号３２７及び３２８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１１４】
表１３に記されている配列番号３３０～３３７、３４１、１３０１、１３０２、１３０４～１３０７、１３０９、１３１１、１３１２及び１３１５～１３３６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１１５】
表１４に記されている配列番号１３６９～１３９０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１１６】
表１６に記されている配列番号３４８～３５３からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１１７】
表１９に記されている配列番号３５７～３６２、３６４～３６８、３７０、３７２～３８５及び３８７～３９８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１１８】
表２０に記されている配列番号３９９～４０８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１１９】
表２２に記されている配列番号４１０～４２１からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１２０】
表２３に記されている配列番号４２２、４２４、４２６及び４２８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。

【請求項１２１】
表２４に記されている配列番号４３０～４３７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１２２】
表２５に記されている配列番号４３８～４４５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１２３】
表２６に記されている配列番号４４７、４４９、４５１、４５３、４５５及び４５７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１２４】
表２８に記されている配列番号４７０～４８２及び４８４～４９３からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１２５】
表２９に記されている配列番号４９５～５０６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１２６】
表３０に記されている配列番号５０７～５１８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むトキシンペプチド類縁体を含む、組成物。
【請求項１２７】
請求項１、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１２４、１２５又は１２６の何れか１項に記載の組成物と、及び医薬として許容される担体とを含む医薬組成物。
【請求項１２８】
多発性硬化症の少なくとも１つの症候を以前に経験した患者に、多発性硬化症の少なくとも１つの症候の再発が予防され、又は多発性硬化症の少なくとも１つの症候が軽減されるように、請求項１、３８、３９、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、１０４、１０９、１１４又は１１５の何れか１項に記載の組成物の予防的有効量を投与することを含む、多発性硬化症の症候の再発を予防又は軽減する方法。
【請求項１２９】
組成物がＫｖ１．３アンタゴニストペプチドを含む、請求項１２８に記載の方法。
【請求項１３０】
組成物が、ＳｈＫペプチド、ＯＳＫ１ペプチド、ＣｈＴｘペプチド若しくはマウロトキシンペプチド又はこれらの何れかのペプチド類縁体を含む、請求項１２８に記載の方法。
【請求項１３１】
多発性硬化症、１型糖尿病、疥癬、炎症性腸疾患、接触媒介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、喘息、アレルギー、再狭窄（ｒｅｓｔｉｎｏｓｉｓ）、全身性硬化症、繊維症、強皮症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、炎症性骨吸収、移植拒絶、移植片対宿主病及び狼瘡からなる群から選択される自己免疫疾患と診断された患者に、前記疾患の少なくとも１つの症候が前記患者において緩和されるように、請求項１、３８、３９、４８、４９、５０、５１、５２，５３、５４、１０４、１０９、１１４又は１１５の何れかに記載の組成物の治療的有効量を投与することを含む、自己免疫疾患を治療する方法。
【請求項１３２】
組成物がＫｖ１．３アンタゴニストペプチド又はＩＫＣａ１アンタゴニストペプチドを含む、請求項１３１に記載の方法。
【請求項１３３】
組成物が、ＳｈＫペプチド、ＯＳＫ１ペプチド、ＣｈＴｘペプチド若しくはマウロトキシンペプチド又はこれらの何れかのペプチド類縁体を含む、請求項１３１に記載の方法。
【請求項１３４】
何れかのｆ又は何れかのｇが１であり、並びにＬが配列番号７９、８４及び６３７～６

５６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドリンカーである、請求項１に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本願は、２００５年４月２２日に出願された米国仮特許出願６０／６７２，３４２号の利益を主張する２００６年４月１７日に出願された米国非仮特許出願（出願番号未定）の利益を主張し、両出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０００２】

本願は、２００６年４月１７日に作製されたＡ－１００６．ＳＴ２５．ｔｘｔというファイル名によって特定され、ファイルサイズが７４４ＫＢであるコンパクトディスク上に含有される全ての主題を、参照により組み込む。

【０００３】

本願を通じて、様々な公報が括弧内に引用される。本発明が属する分野の技術水準をより完全に記載するために、これらの公報の開示内容全体が、参照により、本願に組み込まれる。

【背景技術】

【０００４】

１．発明の分野

本発明は、生物化学の分野に関し、具体的には、治療用ペプチド及び抱合体に関する。

【０００５】

２．関連技術分野の考察

イオンチャンネルは、膜を横切って、小さな無機イオンの交換を可能とする分子の多様な群である。全ての細胞は、機能のためにイオンチャンネルを必要とするが、神経系及び心臓中に存在する興奮性細胞などの興奮性細胞については、特にこのことが当てはまる。イオンチャンネルにより調整された電気信号は、考える脳、拍動する心臓及び収縮する筋肉を調節する。イオンチャンネルは、細胞容積を制御する役割を果たし、多様なシグナル伝達プロセスを調節する。

【０００６】

イオンチャンネルファミリーには、Na^+、K^+及びCa^{2+}陽イオン並びにCl^-陰イオンチャンネルが含まれる。総称すると、イオンチャンネルは、リガンド開口型又は電圧開口型の何れかとして区別される。リガンド開口型チャンネルには、細胞外及び細胞内リガンド開口型チャンネルの両方が含まれる。細胞外リガンド開口型チャンネルには、ニコチン性アセチルコリン受容体（ｎＡＣｈＲ）、セロトニン（５－ヒドロキシトリプタミン、５－ＨＴ）受容体、グリシン及びγ酪酸受容体（ＧＡＢＡ）並びにカイニン酸、α－アミノ－３－ヒドロキシ－５－メチル－４－イソオキサゾールプロピオン酸（ＡＭＰＡ）及びＮ－メチル－Ｄ－アスパラギン酸受容体（ＮＭＤＡ）受容体を含むグルタミン酸活性化チャンネルが含まれる（Ｈａｒｔｅ ａｎｄ Ｏｕｚｏｕｎｉｓ（２００２），ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．５１４：１２９－３４）。細胞内リガンド開口型チャンネルには、環状ヌクレオチド（例えば、ｃＡＭＰ、ｃＧＭＰ）、Ca^{2+}及びＧタンパク質によって活性化されるものが含まれる。（Ｈａｒｔｅ ａｎｄ Ｏｕｚｏｕｎｉｓ（２００２），ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．５１４：１２９－３４）。電圧開口型イオンチャンネルは、ナトリウム、カリウム、カルシウム及び塩化物イオンチャンネルを含む無機イオン種に対するそれらの選択性によって分類される。（Ｈａｒｔｅ ａｎｄ Ｏｕｚｏｕｎｉｓ（２００２），ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．５１４：１２９－３４）。

【０００７】

電圧開口型イオンチャンネルの分類に対する統一された命名法が、最近発表された。（Ｃａｔｔｅｒａｌｌ ｅｔ ａｌ．，（２０００），Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｒｅｖ．５５：５７３－４；Ｇｕｔｍａｎ ｅｔ ａｌ．，（２０００），Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｒｅｖ．５５，５８３－６；Ｃａｔｔｅｒａｌｌ ｅｔ ａｌ．，（２０００） Ｐｈａｒｍ

acol.Rev.55:579-81;Catterall et al.,(2000),Pharmacol.Rev.55:575-8;Hofmann et al.,(2000),Pharmacol.Rev.55:587-9;Clapham et al.,(2000),Pharmacol Rev.55:591-6;Chandy(1991),Nature 352:26;Goldin et al.,(2000),Neuron 28:365-8;Ertel et al.,(2000),Neuron 25:533-5)。

【0008】

K^+チャンネルが、これまでに記載されているイオンチャンネルの最も大きく且つ最も性質決定が行われたファミリーを構成する。カリウムチャンネルは、6回膜貫通(6TM)K^+チャンネル、2TM-2TM/漏洩K^+チャンネル及び2TM/Kir内向き整流性チャンネルという3つの一般的な群に、細分される。(Tang et al.,(2004),Ann.Rev.Physiol.66,131-159)。これらの3つの群は、配列の類似性に基づいたファミリーへと、さらに細分される。(Kv1-6、Kv8-9)、EAG、KQT及びSlo(BKCa)を含む電圧開口型K^+チャンネルは、6TM群のファミリーメンバーである。2TM-2TM群はTWIK、TREK、TASK、TRAAK及びTHIKを含むのに対して、2TM/Kir群はKir1-7からなる。イオンチャンネルのさらなる2つのクラスには、内向き整流性カリウム(IRK)及びATP開口型プリン作動性(P2X)チャンネルが含まれる。(Harte and Ouzounis(2002),FEBS Lett.514:129-34)。

【0009】

様々な生物によって産生されるトキシンペプチドは、イオンチャンネルを標的とするように進化してきた。ヘビ、サソリ、クモ、ハチ、カタツムリ及びイソギンチャクは、イオンチャンネル及び受容体を強力且つ選択的に標的とする小さな生物活性トキシンペプチド又は「トキシン」の豊富な源としての役割を果たすことができる毒を産生する生物の数例である。多くの事例では、これらのトキシンペプチドは、チャンネルの孔に結合し、イオン伝導経路を物理的に遮断することによって、イオンチャンネルの強力なアンタゴニスト又は阻害剤として進化してきた。他の幾つかの事例では、タランチュラのトキシンペプチドの幾つかのように、ペプチドは、孔の外側領域(例えば、電圧センサードメイン)に結合することによってチャンネル機能を拮抗することが見出されている。

【0010】

トキシンペプチドは、通常、約20アミノ酸長と約80アミノ酸長との間であり、2~5個のジスルフィド結合を含有し、極めてコンパクトな構造を形成する(例えば、図10参照)。(例えば、サソリ、イソギンチャク及びイモ貝から)トキシンペプチドが単離され、イオンチャンネルに対するそれらの影響が特徴付けられている。このようなペプチドは、効力及び安定性の重大な問題に対処するために特にきわめて適している構造的骨格の相対的に少数から進化してきたように見受けられる。サソリ及びイモガイのトキシンペプチドの多くは、例えば、10~40個のアミノ酸及び最大5個のジスルフィド結合を含有し、しばしばタンパク分解を受けない極めてコンパクトで、固定された構造(ミクロタンパク質)を形成する。コノトキシン及びサソリトキシンペプチドは、それらのジスルフィド結合及びペプチドの折り畳みに基づいて、多数のスーパーファミリーに分類することが可能である。これらの多くの溶液構造がNMR分光法によって決定されており、それらのコンパクトな構造を示し、それらのファミリー折り畳みの保存を確認している。(例えば、Tudor et al.,Ionisation behaviour and solution properties of the potassium-channel blocker ShK toxin,Eur.J.Biochem.251(1-2):133-41(1998);Pennington et al.,Role of disulfide bonds in the structure and potassium channel blocking activity of ShK toxin,Biochem.38(44):14549-58(1999);

Jaravine et al.,Three-dimensional structure of toxin OSK1 from Orthochirus scrobiculosus scorpion venom,Biochem.36(6):1223-32(1997);del Rio-Portillo et al.,;NMR solution structure of Cn12,a novel peptide from the Mexican scorpion Centruroides noxius with a typical beta-toxin sequence but with alpha-like physiological activity,Eur.J.Biochem.271(12):2504-16(2004);Prochnicka-Chalufour et al.,Solution structure of discrepin,a new K^+-channel blocking peptide from the alpha-KTx15 subfamily,Biochem.45(6):1795-1804(2006))。

【0011】

保存されたジスルフィド構造は、トキシンファミリーのそれぞれの薬理学的活性も反映し得る。(Nicke et al.,(2004),Eur.J.Biochem.271:2305-19,Table 1;Adams(1999),Drug Develop.Res.46:219-34)。例えば、α-コノトキシンは、明瞭に確定された4システイン/2ジスルフィドループ構造を有し(Loughnan,2004)、ニコチン性アセチルコリン受容体を阻害する。これに対して、ω-コノトキシンは、6システイン/3ジスルフィドループコンセンサス構造を有し(Nielsen,2000)、カルシウムチャンネルを遮断する。トキシンの構造的サブセットは、電圧開口型又はカルシウム活性型カリウムチャンネルを阻害するように進化してきた。図9は、ミツバチからカタツムリ及びサソリからヘビに至る、様々な有毒動物によって共有される保存されたジスルフィド構造の限られた数が、イオンチャンネルを標的とすることを示している。図7は、α-サソリトキシンファミリーの並列を示しており、及び広範なカリウムチャンネルを標的とするトキシンを得るために保存された構造的骨格が使用されていることを図示している。

【0012】

特異的イオンチャンネルの強力且つ選択的な遮断のために、トキシンペプチドは、イオンチャンネルの薬理学を調べるためのツールとして、長年にわたって使用されてきた。心臓、筋肉及び脳内に存在するような興奮性細胞及び組織以外では、イオンチャンネルは、免疫細胞などの非興奮性細胞に対しても重要である。従って、Kv1.3及びIKCa1などのカリウムチャンネルは、リンパ球内のカルシウムシグナル伝達経路を間接的に調節するので、とりわけ、これらのチャンネルの阻害による様々な免疫疾患の治療について、トキシンペプチドの潜在的な治療的有用性が検討されてきた[例えば、Kern et al.,ShK toxin compositions and methods of use,米国特許第6,077,680号;Lebrun et al.,Neuropeptides originating in scorpion,米国特許第6,689,749号;Beeton et al.,Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channnels for therapy of autoimmune diseases,Molec.Pharmacol.67(4):1369-81(2005);Mouhat et al.,K^+ channel types targeted by synthetic OSK1,a toxin from Orthochirus scrobiculosus scorpion venom,Biochem.J.385:95-104(2005);Mouhat et al.,Pharmacological profiling of Orthochirus scrobiculosus toxin 1 analogs with a trimmed N-terminal domain

, Molec. Pharmacol. 69 : 354-62 (2006) ; Mouhat et al, Osk1 derivatives, WO 2006/002850 A2 ; B. S. Jensen et al., The Ca^{2+}-activated K+ Channel of Intermediate Conductance: A Molecular Target for Novel Treatments?, Current Drug Targets 2 : 401-422 (2001) ; Rauer et al., Structure-guided Transformation of Charybdotoxin Yields an Analog That Selectively Targets Ca^{2+}-activated over Voltage-gated K^+ Channels, J. Biol. Chem. 275 : 1201-1208 (2000) ; Castle et al., Maurotoxin: A Potent Inhibitor of Intermediate Conductance Ca^{2+}-Activated Potassium Channels, Molecular Pharmacol. 63 : 409-418 (2003) ; Chandy et al, K^+ channels as targets for specific Immunomodulation, Trends in Pharmacol. Sciences 25 : 280-289 (2004) ; Lewis & Garcia, Therapeutic Potential of Venom Peptides, Nat. Rev. Drug Discov. 2 : 790-802 (2003)] 。

【 0013 】

免疫疾患を治療するために、T細胞中のKv1.3及びIKCa1カリウムチャンネル及び主要なカルシウム流入チャンネルの小分子阻害剤であるCRACも開発されているが [A. Schmitz et al., (2005) Molecul. Pharmacol. 68, 1254 ; K. G. Chandy et al., (2004) TIPS 25, 280 ; H. Wulff et al., (2001) J. Biol. Chem. 276, 32040 ; C. Zitt et al., (2004) J. Biol. Chem. 279, 12427] 、これらの標的の幾つかに対して選択性を有する小分子を得ることは困難である。

【 0014 】

リンパ球におけるカルシウム動員は、炎症性応答の活性化において不可欠な経路であることが知られている [M. W. Winslow et al., (2003) Current Opinion Immunol. 15, 299] 。他の細胞に比べて、T細胞は、細胞内カルシウム及びイオンチャンネルの増加したレベル (何れも、直接的及び間接的にこのプロセスを調節する。) に対して特有の感受性を示す。イノシトール三リン酸 (IP3) は、カルシウムシグナル伝達経路を活性化する天然のセカンドメッセンジャーである。IP3は、T細胞受容体 (TCR) のリガンド誘導性活性化後に産生され、その細胞内受容体 (チャンネル) に結合すると、細胞内カルシウム貯蔵の放出を引き起こす。小胞体は、1つの中心的なカルシウム貯蔵を提供する。筋肉小胞体-小胞体カルシウムATPアーゼ (SERCA) の阻害剤であるタプシンガルギンも、細胞内貯蔵の放出及びリンパ球におけるカルシウムシグナル伝達経路の活性化を引き起こす。従って、タプシガルギンは、T細胞におけるカルシウムシグナル伝達経路の特異的な刺激として使用することが可能である。T細胞中の細胞内カルシウム貯蔵の放出は細胞表面上のカルシウムチャンネルの活性化を引き起こすことが知られており、これは細胞外からのカルシウムの流入を引き起こす。T細胞上のこの細胞内容量依存性カルシウムチャンネル (SOCC ; store operated calcium channel) は、「CRAC」 (カルシウム放出活性化チャンネル (calcium release activated channel)) と称され、このチャンネルを通じたカルシウムの持続的流入は、完全なT細胞の活性化にとって不可欠であることが知られている [S. Feske et al., (2005) J. Exp. Med. 202, 651 and N. Venkates

ｈｅｔａｌ．，（２００４）ＰＮＡＳ１０１，８９６９］。長年にわたって、Ｔ細胞内への継続的なカルシウム流入を維持するためには、細胞膜は、カリウムイオンの流出を通じた過分極した状態を保たなければならないと理解されてきた。Ｔ細胞では、電圧開口型カリウムチャンネルＫｖ１．３及びカルシウム活性化カリウムＩＫＣａ１によって、カリウム流出が達成されるＫ．Ｇ．Ｃｈａｎｄｙ ｅｔ ａｌ．，（２００４）ＴＩＰＳ ２５，２８０］。これらのカリウムチャンネルは、従って、ＣＲＡＣを通じたカルシウムの持続的流入を可能とする必要なカリウム流出を可能とすることによって、カルシウムシグナル伝達経路を間接的に調節する。細胞内カルシウムの持続的な増加は、ＮＦＡＴ、ＮＦ-κＢ及びＡＰ-１の活性化をもたらす経路を含む、Ｔ細胞中の様々な経路を活性化する［Ｑｕｉｎｔａｎａ-Ａ（２００５）Ｐｆｌｕｇｅｒｓ Ａｒｃｈ．-Ｅｕｒ．Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．４５０，１］。これらの現象は、細胞サイズ及び膜の構成の変化、細胞表面エフェクター分子の活性化、サイトカイン産生及び増殖など、様々なＴ細胞応答をもたらす。幾つかのカルシウム感知分子は、カルシウムシグナルを伝達し、細胞応答を協調させる。カルモジュリンはカルシウムを結合する１つの分子であるが、他の多くが同定されている（Ｍ．Ｊ．Ｂｅｒｒｉｄｇｅ ｅｔ ａｌ．，（２００３）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．４，５１７）。カルシウム-カルモジュリン依存性ホスファターゼであるカルシニューリンは、細胞内カルシウムが持続的に増加されると活性化され、細胞質ＮＦＡＴを脱リン酸化する。脱リン酸化されたＮＦＡＴは、素早く、核に移動し、Ｔ細胞活性化のための重要な転写因子として広く受け入れられている（Ｆ．Ｍａｃｉａｎ（２００５）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．５，４７２ ａｎｄ Ｎ．Ｖｅｎｋａｔｅｓｈ ｅｔ ａｌ．，（２００４）ＰＮＡＳ １０１，８９６９）。シクロスポリンＡ（Ｎｅｏｒａｌ，Ｓａｎｄｉｍｍｕｎｅ）及びＦＫ５０６（Ｔａｃｒｏｌｉｍｕｓ）などのカルシニューリンの阻害剤は、固形臓器移植後に拒絶をもたらすものなど、重度免疫疾患の治療のための主な支柱のような存在である（Ｉ．Ｍ．Ｇｏｎｚａｌｅｚ-Ｐｉｎｔｏ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．Ｐｒｏｃ．３７，１７１３ ａｎｄ Ｄ．Ｒ．Ｊ．Ｋｕｙｐｅｒｓ（２００５）Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ １８，１４０）。臓器移植、重度関節リウマチ（Ｄ．Ｅ．Ｙｏｃｕｍ ｅｔ ａｌ．，（２０００）Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ３９，１５６）及び重度乾癬（Ｊ．Ｋｏｏ（１９９８）Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｊ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．１３９，８８）の治療について、ネオーラルが承認を受けている。前臨床及び臨床データも提供されており、カルシニューリン阻害剤は、炎症性腸疾患（ＩＢＤ；Ｂａｕｍｇａｒｔ ＤＣ（２００６）Ａｍ．Ｊ．Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．Ｍａｒ ３０；Ｅｐｕｂ出版前）、多発性硬化症（Ａｎｎ．Ｎｅｕｒｏｌ．（１９９０）２７，５９１）及び喘息（Ｓ．Ｒｏｈａｔａｇｉ ｅｔ ａｌ．，（２０００）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４０，１２１１）の治療において有用であり得ることを示唆している。狼瘡は、ヘルパーＴ細胞の活性化を遮断する因子が有用であり得る別の疾患である。Ｔ細胞中のＮＦＡＴを制御する上でのカルシニューリンの重要性に関わらず、カルシニューリンは、他の組織（例えば、腎臓）中にも発現されており、シクロスポリンＡ及びＦＫ５０６は、毒性を基礎とする機序のために、狭い安全域を有する。腎毒性及び高血圧が、シクロスポリン及びＦＫ５０６の有望性を限定してきた共通の副作用である。毒性に関する懸念のために、カルシニューリン阻害剤は、重度免疫疾患のみを治療するために多く使用されている（Ｂｉｓｓｏｎｎｅｔｔｅ-Ｒ ｅｔ ａｌ．，（２００６）Ｊ．Ａｍ．Ａｃａｄ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．５４，４７２）。Ｋｖ１．３阻害剤は、免疫疾患の治療のための、より安全なカルシニューリン阻害剤代替物である。これは、Ｋｖ１．３はＴ細胞中のカルシウムシグナル伝達経路を調節するが、カルシニューリン阻害剤とは異なる機序を通じて調節するようにも作用するからであり、Ｋｖ１．３の発現及び機能に関する証拠は、様々な非リンパ系細胞及び組織中でも機能するカルシニューリンに比べて、Ｋｖ１．３が、Ｔ細胞生物学において、より限定された役割を有することを示している。

【００１５】

免疫細胞中でのカルシウム動員は、炎症の重要な媒介物質であるサイトカインインター

ロイキン２（ＩＬ－２）及びインターフェロンγ（ＩＦＮｇ）の産生も活性化する。ＩＬ－２は、ＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の増殖及び分化から、Ｂ細胞による増殖及び抗体分泌の増強、ＮＫ細胞の活性化に至るまで、様々な生物学的応答を誘導する［Ｓ．Ｌ．Ｇａｆｆｅｎ　＆　Ｋ．Ｄ．Ｌｉｕ（２００４）　Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　２８，１０９］。ＩＬ－２の分泌は、Ｔ細胞活性化後、基迅速に起こり、Ｔ細胞がこのサイトカインの主要な源となっている。活性化後すぐに、高親和性ＩＬ－２受容体（ＩＬ－２Ｒ）がＴ細胞上で上方制御され、ＩＬ－２に応答して増殖する能力をＴ細胞に付与する。Ｔ細胞、ＮＫ細胞、Ｂ細胞及び専門の抗原提示細胞（ＡＰＣ）は全て、活性化時にＩＦＮｇを分泌することが可能である。Ｔ細胞は、養子免疫応答を媒介する上で、ＩＦＮｇ産生の主要な源であるのに対して、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞及びＡＰＣは、感染に対する宿主防御に際する重要な源である可能性がある［Ｋ．Ｓｃｈｒｏｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，（２００４）　Ｊ．Ｌｅｕｋｏｃ．Ｂｉｏｌ．７５，１６３］。当初、マクロファージ活性化因子と称されたＩＦＮｇは、単球、マクロファージ及び樹状細胞による抗原加工及び提示を上方制御する。ＩＦＮｇは、増殖及び分化、ＮＫ細胞活性の増強及びＢ細胞免疫グロブリン産生の制御及びクラスのスイッチングなど、多くの細胞種において、多様な生物活性を媒介する［Ｕ．Ｂｏｅｈｍ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９７）　Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５，７４９］。

【００１６】

ＣＤ４０Ｌは、カルシウム動員後に、活性化されたＴ細胞上に発現される別のサイトカインであり、及びＢ細胞上のその受容体への結合時に、Ｂ細胞の胚中心の形成、Ｂ細胞の分化及び抗体イソタイプのスイッチングを可能とする重大な補助を与える。ＣＤ４０Ｌによって媒介される、Ｂ細胞上のＣＤ４０の活性化は、免疫グロブリン（Ｉｇ）産生Ｂ細胞の深い分化とクローン性増殖を誘導することが可能である［Ｓ．Ｑｕｅｚａｄａ　ｅｔ　ａｌ．，（２００４）　Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２２，３０７］。ＣＤ４０受容体は樹状細胞上にも見出すことが可能であり、ＣＤ４０Ｌシグナル伝達は、樹状細胞活性化及び分化も媒介することが可能である。Ｂ細胞及び樹状細胞の抗原提示能は、ＣＤ４０Ｌ結合によって促進され、養子免疫における本サイトカインの幅広い役割をさらに示している。Ｂ細胞生物学へのＣＤ４０シグナル伝達の不可欠な役割に鑑み、組織中への抗体複合体の沈着、炎症及び臓器の損傷を特徴とする疾患である全身性紅斑性狼瘡（ＳＬＥ）の治療における有用性について、前臨床及び臨床研究でＣＤ４０Ｌに対する中和抗体が調査されている［Ｊ．Ｙａｚｄａｎｙ　ａｎｄ　Ｊ　Ｄａｖｉｓ（２００４）　Ｌｕｐｕｓ　１３，３７７］。

【００１７】

トキシンペプチドの産生は、有毒生物における複雑なプロセスであり、合成においては、さらに複雑なプロセスである。トキシンペプチドの保存されたジスルフィド構造及び効率的な酸化的再折り畳みの必要性のため、トキシンペプチドは合成に対する困難な課題となっている。トキシンペプチドは、イオンチャンネルの高度に選択的な薬理学的阻害剤として、長年にわたって使用されてきたが、トキシンペプチドの合成の高い費用及び再折り畳み並びにインビボでのそれらの短い半減期は、これらのペプチドを治療法として実行する妨げとなってきた。トキシンペプチドそのものを与える努力より、さらにずっと大きな努力が、イオンチャンネルの治療的アンタゴニストとして小分子阻害剤を同定するために費やされてきた。１つの例外は、難治性疼痛の治療に対する、小ωコノトキシンＭＶＩＩＡペプチド（ジコノチド（ジコノチド^{TM}の最近の承認である。しかしながら、ジコノチド^{TM}の合成及び再折り畳み製造方法は、コストが高く、インビボでの半減期が極めて短い（約４時間）小ペプチド産物をもたらすに過ぎない。

【００１８】

イオンチャンネルの阻害剤など（但し、これに限定されない。）の治療剤を製造するための費用効果が高いプロセスは、本発明によって提供される必要物であり、これは、ビヒクルに融合され、又はその他ビヒクルに共有結合されたトキシンを含む。

【先行技術文献】

【特許文献】
【００１９】
【特許文献１】米国特許第６，０７７，６８０号明細書
【特許文献２】米国特許第６，６８９，７４９号明細書
【特許文献３】ＷＯ　２００６／００２８５０　Ａ２
【非特許文献】
【００２０】
【非特許文献１】Ｈａｒｔｅ　ａｎｄ　Ｏｕｚｏｕｎｉｓ（２００２），ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．５１４：１２９－３４
【非特許文献２】Ｃａｔｔｅｒａｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，（２０００），Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｒｅｖ．５５：５７３－４
【非特許文献３】Ｇｕｔｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，（２０００），Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｒｅｖ．５５，５８３－６
【非特許文献４】Ｃａｔｔｅｒａｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，（２０００）　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｒｅｖ．５５：５７９－８１
【非特許文献５】Ｃａｔｔｅｒａｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，（２０００），Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｒｅｖ．５５：５７５－８
【非特許文献６】Ｈｏｆｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，（２０００），Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｒｅｖ．５５：５８７－９
【非特許文献７】Ｃｌａｐｈａｍ　ｅｔ　ａｌ．，（２０００），Ｐｈａｒｍａｃｏｌ　Ｒｅｖ．５５：５９１－６
【非特許文献８】Ｃｈａｎｄｙ（１９９１），Ｎａｔｕｒｅ　３５２：２６
【非特許文献９】Ｇｏｌｄｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，（２０００），Ｎｅｕｒｏｎ　２８：３６５－８
【非特許文献１０】Ｅｒｔｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，（２０００），Ｎｅｕｒｏｎ　２５：５３３－５）
【非特許文献１１】Ｔａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，（２００４），Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．６６，１３１－１５９
【非特許文献１２】Ｔｕｄｏｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｏｎｉｓａｔｉｏｎ　ｂｅｈａｖｉｏｕｒ　ａｎｄ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ　ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　ｐｏｔａｓｓｉｕｍ－ｃｈａｎｎｅｌ　ｂｌｏｃｋｅｒ　ＳｈＫ　ｔｏｘｉｎ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２５１（１－２）：１３３－４１（１９９８）
【非特許文献１３】Ｐｅｎｎｉｎｇｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｒｏｌｅ　ｏｆ　ｄｉｓｕｌｆｉｄｅ　ｂｏｎｄｓ　ｉｎ　ｔｈｅ　ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　ａｎｄ　ｐｏｔａｓｓｉｕｍ　ｃｈａｎｎｅｌ　ｂｌｏｃｋｉｎｇ　ａｃｔｉｖｉｔｙ　ｏｆ　ＳｈＫ　ｔｏｘｉｎ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．３８（４４）：１４５４９－５８（１９９９）
【非特許文献１４】Ｊａｒａｖｉｎｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｈｒｅｅ－ｄｉｍｅｎｓｉｏｎａｌ　ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　ｏｆ　ｔｏｘｉｎ　ＯＳＫ１　ｆｒｏｍ　Ｏｒｔｈｏｃｈｉｒｕｓ　ｓｃｒｏｂｉｃｕｌｏｓｕｓ　ｓｃｏｒｐｉｏｎ　ｖｅｎｏｍ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．３６（６）：１２２３－３２（１９９７）
【非特許文献１５】ｄｅｌ　Ｒｉｏ－Ｐｏｒｔｉｌｌｏ　ｅｔ　ａｌ．，；ＮＭＲ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ　ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　ｏｆ　Ｃｎ１２，ａ　ｎｏｖｅｌ　ｐｅｐｔｉｄｅ　ｆｒｏｍ　ｔｈｅ　Ｍｅｘｉｃａｎ　ｓｃｏｒｐｉｏｎ　Ｃｅｎｔｒｕｒｏｉｄｅｓ　ｎｏｘｉｕｓ　ｗｉｔｈ　ａ　ｔｙｐｉｃａｌ　ｂｅｔａ－ｔｏｘｉｎ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｂｕｔ　ｗｉｔｈ　ａｌｐｈａ－ｌｉｋｅ　ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｉｃａｌ　ａｃｔｉｖｉｔｙ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２７１（１２）：２５０４－１６（２００４）
【非特許文献１６】Ｐｒｏｃｈｎｉｃｋａ－Ｃｈａｌｕｆｏｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｏｌｕｔｉｏｎ　ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　ｏｆ　ｄｉｓｃｒｅｐｉｎ，ａ　ｎｅｗ　Ｋ＋－ｃｈａｎｎｅｌ　ｂｌｏｃｋｉｎｇ　ｐｅｐｔｉｄｅ　ｆｒｏｍ　ｔｈｅ　ａｌｐｈａ－ＫＴｘ１５　ｓｕｂｆａｍｉｌｙ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．４５（６）：１７９５－１８０４（２０

06)
【非特許文献17】Nicke et al.,(2004),Eur.J.Biochem.271:2305-19
【非特許文献18】Adams(1999),Drug Develop.Res.46:219-34
【非特許文献19】Loughnan,2004
【非特許文献20】Nielsen,2000
【非特許文献21】Beeton et al.,Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channnels for therapy of autoimmune diseases,Molec.Pharmacol.67(4):1369-81(2005)
【非特許文献22】Mouhat et al.,K+ channel types targeted by synthetic OSK1,a toxin from Orthochirus scrobiculosus scorpion venom,Biochem.J.385:95-104(2005)
【非特許文献23】Mouhat et al.,Pharmacological profiling of Orthochirus scrobiculosus toxin 1 analogs with a trimmed N-terminal domain,Molec.Pharmacol.69:354-62(2006)
【非特許文献24】B.S.Jensen et al.,The Ca2+-activated K+ Channel of Intermediate Conductance:A Molecular Target for Novel Treatments?,Current Drug Targets 2:401-422(2001)
【非特許文献25】Rauer et al.,Structure-guided Transformation of Charybdotoxin Yields an Analog That Selectively Targets Ca2+-activated over Voltage-gated K+ Channels,J.Biol.Chem.275:1201-1208(2000)
【非特許文献26】Castle et al.,Maurotoxin:A Potent Inhibitor of Intermediate Conductance Ca2+-Activated Potassium Channels,Molecular Pharmacol.63:409-418(2003)
【非特許文献27】Chandy et al,K+ channels as targets for specific Immunomodulation,Trends in Pharmacol.Sciences 25:280-289(2004)
【非特許文献28】Lewis & Garcia,Therapeutic Potential of Venom Peptides,Nat.Rev.Drug Discov.2:790-802(2003)
【非特許文献29】A.Schmitz et al.,(2005) Molecul.Pharmacol.68,1254
【非特許文献30】H.Wulff et al.,(2001) J.Biol.Chem.276,32040
【非特許文献31】C.Zitt et al.,(2004) J.Biol.Chem.279,12427
【非特許文献32】M.W.Winslow et al.,(2003) Current Opinion Immunol.15,299
【非特許文献33】S.Feske et al.,(2005) J.Exp.Med.202,651

【非特許文献３４】Ｎ．Ｖｅｎｋａｔｅｓｈ ｅｔ ａｌ．，（２００４） ＰＮＡＳ １０１，８９６９
【非特許文献３５】Ｑｕｉｎｔａｎａ-Ａ（２００５） Ｐｆｌｕｇｅｒｓ Ａｒｃｈ．-Ｅｕｒ．Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．４５０，１
【非特許文献３６】Ｍ．Ｊ．Ｂｅｒｒｉｄｇｅ ｅｔ ａｌ．，（２００３） Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．４，５１７
【非特許文献３７】Ｆ．Ｍａｃｉａｎ（２００５） Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．５，４７２
【非特許文献３８】Ｉ．Ｍ．Ｇｏｎｚａｌｅｚ-Ｐｉｎｔｏ ｅｔ ａｌ．（２００５） Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．Ｐｒｏｃ．３７，１７１３
【非特許文献３９】Ｄ．Ｒ．Ｊ．Ｋｕｙｐｅｒｓ（２００５） Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ １８，１４０
【非特許文献４０】Ｄ．Ｅ．Ｙｏｃｕｍ ｅｔ ａｌ．，（２０００） Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ３９，１５６
【非特許文献４１】Ｊ．Ｋｏｏ（１９９８） Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｊ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．１３９，８８
【非特許文献４２】Ｂａｕｍｇａｒｔ ＤＣ（２００６） Ａｍ．Ｊ．Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．Ｍａｒ ３０；Ｅｐｕｂ出版前
【非特許文献４３】Ａｎｎ．Ｎｅｕｒｏｌ．（１９９０） ２７，５９１
【非特許文献４４】Ｓ．Ｒｏｈａｔａｇｉ ｅｔ ａｌ．，（２０００） Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４０，１２１１
【非特許文献４５】Ｂｉｓｓｏｎｎｅｔｔｅ-Ｒ ｅｔ ａｌ．，（２００６） Ｊ．Ａｍ．Ａｃａｄ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．５４，４７２
【非特許文献４６】Ｓ．Ｌ．Ｇａｆｆｅｎ ＆ Ｋ．Ｄ．Ｌｉｕ（２００４） Ｃｙｔｏｋｉｎｅ ２８，１０９
【非特許文献４７】Ｋ．Ｓｃｈｒｏｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，（２００４） Ｊ．Ｌｅｕｋｏｃ．Ｂｉｏｌ．７５，１６３
【非特許文献４８】Ｕ．Ｂｏｅｈｍ ｅｔ ａｌ．，（１９９７） Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５，７４９
【非特許文献４９】Ｓ．Ｑｕｅｚａｄａ ｅｔ ａｌ．，（２００４） Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２２，３０７
【非特許文献５０】Ｊ．Ｙａｚｄａｎｙ ａｎｄ Ｊ Ｄａｖｉｓ（２００４） Ｌｕｐｕｓ １３，３７７

【発明の概要】
【００２１】
本発明は、式
$(X^1)_a-(F^1)_d-(X^2)_b-(F^2)_e-(X^3)_c$
の組成物及びその多量体に関する。
（式中：
F^1及びF^2は半減期延長部分であり、並びにｄ及びｅは、各々独立に、０又は１であり（但し、ｄ及びｅの少なくとも１つは１である。）；
X^1、X^2及びX^3は、各々独立に、$-(L)_f-P-(L)_g-$であり、並びにｆ及びｇは、各々独立に、０又は１であり；
Ｐは、少なくとも２つのペプチド内ジスルフィド結合を含む、約８０アミノ酸残基長以下のトキシンペプチドであり；
Ｌは、場合によって存在するリンカーであり（ｆ＝１及び／又はｇ＝１の場合に存在する。）；並びに
ａ、ｂ及びｃは、各々独立に、０又は１である（但し、ａ、ｂ及びｃの少なくとも１つは、１である。）。）
従って、本発明は、慣用的に、ペプチドのＮ末端を左側に記載すると、式：

（ＩＩ）Ｐ-（Ｌ）$_{g}$-Ｆ^{1}（すなわち、ｂ、ｃ及びｅは、０に等しい。）；
（ＩＩＩ）Ｆ^{1}-（Ｌ）$_{f}$-Ｐ（すなわち、ａ、ｃ及びｅは、０に等しい。）；
（ＩＶ）Ｐ-（Ｌ）$_{g}$-Ｆ^{1}-（Ｌ）$_{f}$-Ｐ又は（Ｘ^{1}）$_{a}$-Ｆ^{1}-（Ｘ$_{2}$）$_{b}$（すなわち、ｃ及びｅは、０に等しい。）；
（Ｖ）Ｆ^{1}-（Ｌ）$_{f}$-Ｐ-（Ｌ）$_{g}$-Ｆ^{2}（すなわち、ａ及びｃは、０に等しい。）；
（ＶＩ）Ｆ^{1}-（Ｌ）$_{f}$-Ｐ-（Ｌ）$_{g}$-Ｆ^{2}-（Ｌ）$_{f}$-Ｐすなわち、ａは、０に等しい。）；
（ＶＩＩ）Ｆ^{1}-Ｆ^{2}-（Ｌ）$_{f}$-Ｐ（すなわち、ａ及びｂは、０に等しい。）；
（ＶＩＩＩ）Ｐ-（Ｌ）$_{g}$-Ｆ^{1}-Ｆ^{2}（すなわち、ｂ及びｃは、０に等しい。）；
（ＩＸ）Ｐ-（Ｌ）$_{g}$-Ｆ^{1}-Ｆ^{2}-（Ｌ）$_{f}$-Ｐすなわち、ｂは、０に等しい。）；
及びこれらの何れかのあらゆる多量体など、式１に対する変形を有する分子に関する。式ＩＩ-ＩＸのこのような分子の全てが、構造式Ｉの意味に属する。式Ｉの意味の範疇において、トキシンペプチド（Ｐ）が２以上存在する場合、トキシンペプチド（Ｐ）は、本発明の組成物中に存在する他の何れものトキシンペプチドと独立に同一又は別異であることができ、リンカー部分が存在する場合、リンカー部分（（Ｌ）$_{f}$及び／又は（Ｌ）$_{g}$）は、本発明の組成物中に存在し得る他の何れものリンカーと独立に同一又は別異であることができる。半減期延長部分へのトキシンペプチドの抱合は、トキシンペプチドのＮ末端及び／又はＣ末端を介することが可能であり、又はその一次アミノ酸配列に対して中間であることが可能である（Ｆ^{1}は、連結されるＦ^{2}より、トキシンペプチドのＮ末端により近く連結されている。）。有用な半減期延長部分（Ｆ^{1}又はＦ^{2}）の例には、免疫グロブリンＦｃドメイン、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）又はポリエチレングリコール（ＰＥＧ）が含まれる。本明細書に記載されているこれら及びその他の半減期延長部分は、個別に又は組み合わせて有用である。

【００２２】

本発明は、固有配列を有するＳｈＫ、ＯＳＫ１又はマウロトキシン（ＭＴＸ）ペプチドに比べてより大きなＫｖ１．３又はＩＫＣａ１アンタゴニスト活性及び／又は標的選択性を有する、１つ若しくはそれ以上のアミノ酸残基が固有配列から修飾された、抱合された又は抱合されていない、ＳｈＫ、ＯＳＫ１、ＣｈＴｘ又はマウロトキシンのトキシンペプチド類縁体を含む組成物にも関する。トキシンペプチド類縁体は、

表２に記載されている配列番号８８、８９、９２、１４８～２００、５４８～５６１、８８４～９４９若しくは１２９５～１３００；又は

表７に記載されている配列番号９８０～１２７４、１３０３若しくは１３０８；又は

表１３に記載されている配列番号３３０～３３７、３４１、１３０１、１３０２、１３０４～１３０７、１３０９、１３１１、１３１２及び１３１５～１３３６；又は

表１４に記載されている配列番号３６、５９、３４４-３４６若しくは１３６９～１３９０の何れかから選択されるアミノ酸配列を含む。

【００２３】

本発明は、以下の何れか：

表３に記されている配列番号２０１～２２５；又は

表４に記されている配列番号２４２～２４８若しくは２５０～２６０；又は

表５に記されている配列番号２６１～２７５；又は

表６に記されている配列番号２７６～２９３；又は

表８に記されている配列番号２９９～３１５；又は

表９に記されている配列番号３１６～３１８；又は

表１０に記されている配列番号３１９；又は

表１１に記されている配列番号３２７若しくは３２８；又は

表１３に記されている配列番号３３０～３３７、３４１、１３０１、１３０２、１３０４～１３０７、１３０９、１３１１、１３１２又は１３１５～１３３６；

表１４に記されている配列番号１３６９～１３９０；又は

表１６に記されている配列番号３４８～３５３；又は

表１９に記されている配列番号３５７～３６２、３６４～３６８、３７０、３７２～３８５若しくは３８７～３９８；又は
表２０に記されている配列番号３９９～４０８；又は
表２２に記されている配列番号４１０～４２１；又は
表２３に記されている配列番号４２２、４２４、４２６若しくは４２８；又は
表２４に記されている配列番号４３０～４３７；又は
表２５に記されている配列番号４３８～４４５；又は
表２６に記されている配列番号４４７、４４９、４５１、４５３、４５５若しくは４５７；又は
表２８に記されている配列番号４７０～４８２若しくは４８４～４９３；又は
表２９に記されている配列番号４９５～５０６；又は
表３０に記されている配列番号５０７～５１８；
から選択されるアミノ酸配列を含む他のトキシンペプチド類縁体にも関する。

【００２４】

本発明は、本発明の組成物と、及び医薬として許容される担体とを含む医薬組成物にも関する。

【００２５】

本発明の組成物は、慣用の合成法、組換えＤＮＡ技術又は本分野において周知の、他のあらゆるペプチド及び融合タンパク質調製方法によって調製することが可能である。非ペプチド部分を有する本発明の組成物は、適宜、慣用のペプチド化学反応の他に、慣用の有機化学反応によって合成することが可能である。

【００２６】

治療剤及び／又は予防剤としての主な用途が想定されている。トキシンペプチドを取り込む本発明の組成物は、抱合されていないペプチドと同等の、又はこれよりずっと大きな活性及び／又はイオンチャンネル標的選択性を有することが可能である。

【００２７】

従って、本発明は、多発性硬化症、１型糖尿病、疥癬、炎症性腸疾患、接触媒介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、喘息、アレルギー、再狭窄（ｒｅｓｔｉｎｏｓｉｓ）、全身性硬化症、繊維症、強皮症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、炎症性骨吸収、移植拒絶、移植片対宿主病又は狼瘡などの自己免疫疾患と診断された患者に、前記疾患の少なくとも１つの症候が前記患者において緩和されるように、本発明の組成物（好ましくは、Ｋｖ１．３アンタゴニストペプチド又はＩＫＣａ１アンタゴニストペプチドを含む。）の治療的有効量を投与することを含む、自己免疫疾患を治療する方法を含む。

【００２８】

さらに、本発明は、多発性硬化症の少なくとも１つの症候を以前に経験した患者に、多発性硬化症の少なくとも１つの症候の再発が予防され、又は多発性硬化症の少なくとも１つの症候が軽減されるように、本発明の組成物（好ましくは、Ｋｖ１．３アンタゴニストペプチド又はＩＫＣａ１アンタゴニストペプチドを含む。）の予防的有効量を投与することを含む、多発性硬化症の症候の再発を予防又は軽減する方法に関する。

【００２９】

多くの場合、治療剤として想定されているが、本発明の組成物は、治療剤又は診断剤に対するスクリーニングにおいても有用であり得る。例えば、抗Ｆｃ被覆されたプレートを用いたアッセイにおいてＦｃペプチドを使用することが可能である。Ｆｃなどの半減期延長部分は、不溶性ペプチドを可溶性にし、次いで、多数のアッセイにおいて有用とすることが可能である。

【００３０】

本発明の多数のさらなる態様及び利点が、本発明の図面及び詳細な説明の検討において明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【００３１】

【図１Ａ】ＩｇＧ１抗体から派生し得る幾つかの典型的なＦｃ二量体の模式的構造を示す。図の「Ｆｃ」は、本明細書の「Ｆｃドメイン」の意味内のＦｃ変異体のいずれかを表す。「Ｘ１」及び「Ｘ２」は、後述に定義されるペプチド又はリンカーとペプチドとの組み合わせを表す。特異的二量体は、次のとおりである。　図１Ａ：単一ジスルフィド結合した二量体

【図１Ｂ】ＩｇＧ１抗体から派生し得る幾つかの典型的なＦｃ二量体の模式的構造を示す。図の「Ｆｃ」は、本明細書の「Ｆｃドメイン」の意味内のＦｃ変異体のいずれかを表す。「Ｘ１」及び「Ｘ２」は、後述に定義されるペプチド又はリンカーとペプチドとの組み合わせを表す。特異的二量体は、次のとおりである。　図１Ｂ：二重にジスルフィド結合した二量体

【図１Ｃ】ＩｇＧ１抗体から派生し得る幾つかの典型的なＦｃ二量体の模式的構造を示す。図の「Ｆｃ」は、本明細書の「Ｆｃドメイン」の意味内のＦｃ変異体のいずれかを表す。「Ｘ１」及び「Ｘ２」は、後述に定義されるペプチド又はリンカーとペプチドとの組み合わせを表す。特異的二量体は、次のとおりである。　図１Ｃ：非共有結合二量体

【図１Ｄ】ＩｇＧ１抗体から派生し得る幾つかの典型的なＦｃ二量体の模式的構造を示す。図の「Ｆｃ」は、本明細書の「Ｆｃドメイン」の意味内のＦｃ変異体のいずれかを表す。「Ｘ１」及び「Ｘ２」は、後述に定義されるペプチド又はリンカーとペプチドとの組み合わせを表す。特異的二量体は、次のとおりである。　図１Ｄ：単一ジスルフィド結合した二量体

【図１Ｅ】ＩｇＧ１抗体から派生し得る幾つかの典型的なＦｃ二量体の模式的構造を示す。図の「Ｆｃ」は、本明細書の「Ｆｃドメイン」の意味内のＦｃ変異体のいずれかを表す。「Ｘ１」及び「Ｘ２」は、後述に定義されるペプチド又はリンカーとペプチドとの組み合わせを表す。特異的二量体は、次のとおりである。図１Ｅ：二重にジスルフィド結合した二量体

【図１Ｆ】ＩｇＧ１抗体から派生し得る幾つかの典型的なＦｃ二量体の模式的構造を示す。図の「Ｆｃ」は、本明細書の「Ｆｃドメイン」の意味内のＦｃ変異体のいずれかを表す。「Ｘ１」及び「Ｘ２」は、後述に定義されるペプチド又はリンカーとペプチドとの組み合わせを表す。特異的二量体は、次のとおりである。　図１Ｆ：非共有結合二量体

【図２Ａ】薬理学的に活性のある毒素ペプチドの単一単位を示す本発明の組成物の幾つかの実施形態の模式的構造を示す。図２Ａは、単一鎖分子を示し、前記分子に関するＤＮＡコンストラクトも表し得る。

【図２Ｂ】薬理学的に活性のある毒素ペプチドの単一単位を示す本発明の組成物の幾つかの実施形態の模式的構造を示す。図２Ｂは、リンカー－ペプチド部分が二量体の唯一の鎖のみを表す二量体を示す。

【図２Ｃ】薬理学的に活性のある毒素ペプチドの単一単位を示す本発明の組成物の幾つかの実施形態の模式的構造を示す。図２Ｃは、両鎖上にペプチド部分を有する二量体を示す。図２Ｃの二量体は、図２Ａに示される単一鎖をコードするＤＮＡコンストラクトの発現に際し、特定の宿主細胞において自然発生的に形成する。他の宿主細胞において、細胞は、二量体の形成に好ましい条件下に配置され得るか、又は二量体はインビトロで形成され得る。

【図３】哺乳類発現に最適化し、本発明で使用できるヒトＩｇＧ１　Ｆｃの典型的な核酸配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号１及び２）を示す。

【図４】細菌発現に最適化し、本発明において使用できるヒトＩｇＧ１　Ｆｃの典型的な核酸配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号３及び４）を示す。

【図５Ａ】図５Ａは、哺乳類細胞、細菌又は酵母における発現に最適化したコドンを含有する核酸配列によってコード化できる成熟ＳｈＫペプチド（配列番号５）のアミノ酸配列を示す。

【図５Ｂ】図５Ｂは、ＳｈＫペプチド（配列番号１０）内の６個のシステインによって形成される３つのジスルフィド結合（－Ｓ－Ｓ－）を示す。

【図６Ａ】電位開口型カリウムチャネル阻害剤スチコダクチラヘリアンサス（Ｓｔｉｃｈ

ｏｄａｃｔｙｌａ　ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ）（ＳｈＫ）のイソギンチャク毒素ファミリーの他の密接に関連したメンバーとの配列比較を示す。スチコダクチラヘリアンサスの毒液から単離された３５個のアミノ酸の成熟ＳｈＫ毒素（受入番号Ｐ２９１８７）の配列を、イソギンチャクファミリーの他の密接に関連したメンバーと整列して示す。高度に保存された残基に陰影を付されている共通配列及び推定されるジスルフィド結合を示す。示されるＨｍＫペプチド毒素配列（Ｓｗｉｓｓ-Ｐｒｏｔｅｉｎ受入番号０９７４３６）は、大イソギンチャク（Ｍａｇｎｉｆｉｃｅｎｔ　ｓｅａ　ａｎｅｍｏｎｅ）（ラジアンサスマグニフィカ（Ｒａｄｉａｎｔｈｕｓ　ｍａｇｎｉｆｉｃａ）；センジュイソギンチャク（Ｈｅｔｅｒａｃｔｉｓ　ｍａｇｎｉｆｉｃａ））由来の未熟な前駆体のものであり、推定シグナルペプチドに下線が付されている。成ＨｍＫペプチド毒素は、長さ３５アミノ酸であると推定され、及び４０ないし７４の残基に及ぶ。ＡｅＫは、アクティニアエクイン（Ａｃｔｉｎｉａ　ｅｑｕｉｎｅ）イソギンチャク（受入番号８１８９７）の毒液から単離された成ペプチド毒素である。ｓｅａ　ａｎｅｍｏｎｅ　Ａｎｅｍｏｎｉａ　ｓｕｌｃａｔａ及びＢｕｎｏｄｏｓｏｍａ　ｇｒａｎｕｌｉｆｅｒａの毒液からそれぞれ単離される成ペプチド毒素ＡｓＫＳ（受入番号Ｑ９ＴＷＧ１）及びＢｇＫ（受入番号Ｐ２９１８６）の配列も示す。図６Ａは、イソギンチャクファミリーの毒素の他のメンバーＨｍＫ（配列番号６（成熟ペプチド）、（配列番号５４２、シグナル及び成熟ペプチド部分））、ＡｅＫ（配列番号７）、ＡｓＫｓ（配列番号８）及びＢｇＫ（配列番号９）に対するアミノ酸整列（配列番号１０）を示す。推定ジスルフィド結合を示し、保存された残基を強調する。（ＨｍＫ、配列番号５４３；ＳｈＫ、配列番号１０；ＡｅＫ、配列番号５４４；ＡｓＫＳ、配列番号５４５）。

【図６Ｂ】電位開口型カリウムチャネル阻害剤スチコダクチラヘリアンサス（Ｓｔｉｃｈｏｄａｃｔｙｌａ　ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ）（ＳｈＫ）のイソギンチャク毒素ファミリーの他の密接に関連したメンバーとの配列比較を示す。スチコダクチラヘリアンサスの毒液から単離された３５個のアミノ酸の成熟ＳｈＫ毒素（受入番号Ｐ２９１８７）の配列を、イソギンチャクファミリーの他の密接に関連したメンバーと整列して示す。高度に保存された残基に陰影を付されている共通配列及び推定されるジスルフィド結合を示す。示されるＨｍＫペプチド毒素配列（Ｓｗｉｓｓ-Ｐｒｏｔｅｉｎ受入番号０９７４３６）は、大イソギンチャク（Ｍａｇｎｉｆｉｃｅｎｔ　ｓｅａ　ａｎｅｍｏｎｅ）（ラジアンサスマグニフィカ（Ｒａｄｉａｎｔｈｕｓ　ｍａｇｎｉｆｉｃａ）；センジュイソギンチャク（Ｈｅｔｅｒａｃｔｉｓ　ｍａｇｎｉｆｉｃａ））由来の未熟な前駆体のものであり、推定シグナルペプチドに下線が付されている。成ＨｍＫペプチド毒素は、長さ３５アミノ酸であると推定され、及び４０ないし７４の残基に及ぶ。ＡｅＫは、アクティニアエクイン（Ａｃｔｉｎｉａ　ｅｑｕｉｎｅ）イソギンチャク（受入番号８１８９７）の毒液から単離された成ペプチド毒素である。ｓｅａ　ａｎｅｍｏｎｅ　Ａｎｅｍｏｎｉａ　ｓｕｌｃａｔａ及びＢｕｎｏｄｏｓｏｍａ　ｇｒａｎｕｌｉｆｅｒａの毒液からそれぞれ単離される成ペプチド毒素ＡｓＫＳ（受入番号Ｑ９ＴＷＧ１）及びＢｇＫ（受入番号Ｐ２９１８６）の配列も示す。図６Ｂは、３個のジスルフィド結合（Ｃ１-Ｃ６、Ｃ２-Ｃ４、Ｃ３-Ｃ５）を有するこのファミリーに関するジスルフィド結合マップを示す。

【図７】カリウムチャネル阻害剤のα-サソリ毒素のアミノ酸整列を示す。（ＢｍＫＫ１、配列番号１１；ＢｍＫＫ４、配列番号１２；ＰＢＴｘ１、配列番号１４；Ｔｃ３２、配列番号１３；ＢｍＫＫ６、配列番号１５；Ｐ０１、配列番号１６；Ｐｉ２、配列番号１７；Ｐｉ３、配列番号１８；Ｐｉ４、配列番号１９；ＭＴＸ、配列番号２０；Ｐｉ１、配列番号２１；ＨｓＴｘ１、配列番号６１；ＡｇＴｘ２、配列番号２３；ＫＴＸ１、配列番号２４；ＯＳＫ１、配列番号２５；ＢｍＫＴＸ、配列番号２２；ＨｇＴＸ１、配列番号２７；ＭｇＴｘ、配列番号２８；Ｃ１１Ｔｘ１、配列番号２９；ＮＴＸ、配列番号３０；Ｔｃ３０、配列番号３１；Ｔｓ-ＴＸ-Ｋａ、配列番号３２；ＰＢＴｘ３、配列番号３３；Ｌｇｈ１５-１、配列番号３４；Ｍａｒｔｅｎ　Ｔｘ、配列番号３７；ＣｈＴｘ、配列番号３６；ＣｈＴｘ-Ｌｑ２、配列番号４２；ＩｂＴｘ、配列番号３８；ＳｌｏＴｘ、配列番号３９；ＢｍＴｘ１；配列番号４３；ＢｕＴｘ、配列番号４１；ＡｍｍＴｘ３、配列番号

４４；ＡａＴＸ１、配列番号４５；ＢｍＴＸ３、配列番号４６；Ｔｃ１、配列番号４８；ＯＳＫ２、配列番号４９；ＴｓＫ、配列番号５４；ＣｏＴｘ１、配列番号５５；ＣｏＴｘ２、配列番号８７１；ＢｍＰｏ５、配列番号６０；ＳｃｙＴｘ、配列番号５１；Ｐ０５、配列番号５２；タマピン（Ｔａｍａｐｉｎ）、配列番号５３：及びＴｍＴｘ、配列番号６９１。高度に保存された残基に影を付し、共通配列を列挙する。α－ＫＴｘのサブファミリーを列挙し、それらはＲｏｄｒｉｇｕｅｚ ｄｅ ｌａ Ｖｅｇａ，Ｒ．Ｃ．ｅｔ ａｌ．（２００３）ＴＩＰＳ２４：２２２－２２７に由来する。拮抗すると報告される幾つかのイオンチャネルのリストを列挙する（ＩＫ＝ＩＫＣａ、ＢＫ＝ＢＫＣａ、ＳＫ＝ＳＫＣａ、Ｋｖ＝電位開口型Ｋ＋チャネル）。この整列におけるほとんどのファミリーメンバーが成ペプチド生成物を表すが、幾つものメンバーは、未成熟であるか、前記ペプチドの改変された形態を表し、これらには、ＢｍＫＫ１、ＢｍＫＫ４、ＢｍＫＫ６、ＢｍＫＴＸ、Ｍａｒｔｅｎ Ｔｘ、ＣｈＴｘ、ＣｈＴｘ－Ｌｑ２、ＢｍＴｘ１、ＡａＴｘ１、ＢｍＴＸ３、ＴｓＫ、ＣｏＴｘ１、ＢｍＰ０５が含まれる。

【図８】本発明におけるペプチボディへと変換された毒素ペプチドの整列を示す（Ａｐａｍｉｎ、配列番号６８；ＨａＴｘ１、配列番号４９４；ＰｒｏＴｘ１、配列番号５６；ＰａＴｘ２、配列番号５７；ＳｈＫ［２－３５］、配列番号９２；ＳｈＫ［１－３５］、配列番号５；ＨｍＫ、配列番号６；ＣｈＴｘ（Ｋ３２Ｅ）、配列番号５９；ＣｈＴｘ、配列番号３６；ＩｂＴｘ、配列番号３８；ＯＳＫ１（Ｅ１６Ｋ、Ｋ２０Ｄ）、配列番号２９６；ＯＳＫ１、配列番号２５；ＡｇＴｘ２、配列番号２３；ＫＴＸ１、配列番号２４；ＭｇＴｘ、配列番号２８；ＮＴＸ、配列番号３０；ＭＴＸ、配列番号２０；Ｐｉ２、配列番号１７；ＨｓＴｘ１、配列番号６１；Ａｎｕｒｏｃｔｏｘｉｎ［ＡｎＴｘ］、配列番号６２；ＢｅＫｍ１、配列番号６３；ＳｃｙＴｘ、配列番号５１；ωＧＶＩＡ、配列番号６４；ωＭＶＩＩａ、配列番号６５；Ｐｔｕ１、配列番号６６；及びＣＴＸ、配列番号６７）。毒素の本来の源が、各々におけるシステインの数と同様、示されている。鍵となる標的のイオンチャネルが列挙される。整列は、それらの源及びイオンチャネル標的衝撃に基づいた毒素ペプチドのクラスター形成を示す。

【図９】毒素ファミリー内のジスルフィド配置を示す。各サブファミリーに関するジスルフィドの数及びジスルフィド結合の順序が示される。各ジスルフィド結合カテゴリー内に収まる毒素の部分的なリストを表す。

【図１０】毒素の溶液構造がコンパクトな構造を明示することを示す。イソギンチャク（ＳｈＫ）、サソリ（ＭｇＴｘ、ＭＴＸ、ＨｓＴｘ１）、ウミイモガイ（ｍａｒｉｎｅ ｃｏｎｅ ｓｎａｉｌ）（ｗＧＶＩＡ）及びタランチュラ（ＨａＴｘ１）由来の天然毒素の溶液構造は、２８ないし３９アミノ酸のペプチドが全て、コンパクトな構造を形成することを示す。示される毒素は、３又は４個のジスルフィド結合を有し、図９に示される６個のサブファミリーのうちの４個内に収まる。イソギンチャク（ＳｈＫ）、サソリ（ＭｇＴｘ、ＭＴＸ、ＨｓＴｘ１）、ウミイモガイ（ｗＧＶＩＡ）及びタランチュラ（ＨａＴｘ１）由来の天然毒素の溶液構造は、ＭＭＤＢ Ｅｎｔｒｅｚ３次元構造データベース［Ｊ．Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３１，４７４］及びビューワーを使用する、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄａｔａ Ｂａｎｋ（ＰＤＢ）受入番号１ＲＯＯ（ｍｍｄｂｌｄ：５２４７）、１ＭＴＸ（ｍｍｄｂｌｄ：４０６４）、１ＴＸＭ（ｍｍｄｂｌｄ：６２０１）、１ＱＵＺ（ｍｍｄｂｌｄ：３６９０４）、１ＯＭＺ（ｍｍｄｂｌｄ：１８１６）及び１Ｄ１Ｈ（ｍｍｄｂｌｄ：１４３４４）に由来した。

【図１１Ａ】ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－ｐｅｐの残基５１３１ないし６６６０の核酸配列（配列番号６９及び配列番号１３５８）及びコード化されるアミノ酸配列（配列番号７０、配列番号１３５９及び配列番号１３６０）を示す。Ｆｃドメインの配列（配列番号７１及び７２）は、Ｃ末端の５個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチド－リンカー部分がＦｃドメインのＣ末端にあるペプチボディの生成が可能となる。

【図１１Ｂ】ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－ｐｅｐの残基５１３１ないし６６６０の核酸配列（配列番号６９及び配列番号１３５８）及びコード化されるアミノ酸配列（配列番号７０、配列番号１３５９及び配列番号１３６０）を示す。Ｆｃドメインの配列（配列番号

７１及び７２）は、Ｃ末端の５個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチド－リンカー部分がＦｃドメインのＣ末端にあるペプチボディの生成が可能となる。
【図１１Ｃ】ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－ｐｅｐの残基５１３１ないし６６６０の核酸配列（配列番号６９及び配列番号１３５８）及びコード化されるアミノ酸配列（配列番号７０、配列番号１３５９及び配列番号１３６０）を示す。Ｆｃドメインの配列（配列番号７１及び７２）は、Ｃ末端の５個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチド－リンカー部分がＦｃドメインのＣ末端にあるペプチボディの生成が可能となる。
【図１１Ｄ】ペプチド－リンカー配列で置換されたクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（ｃａｔ；「ＣｍＲ」部位）を有するペプチボディ細菌発現ベクターｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－ｐｅｐの環状図を示す。
【図１２Ａ】ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｐｅｐ－Ｆｃの残基５１３１ないし６３１９の核酸配列（配列番号７３及び配列番号１３６１）及びコード化されるアミノ酸配列（配列番号７４、配列番号１３６２及び配列番号１３６３）を示す。Ｆｃドメインの配列（配列番号７５及び７６）は、Ｎ末端の５個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチド－リンカー部分がＦｃドメインのＮ末端にあるペプチボディの生成が可能となる。
【図１２Ｂ】ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｐｅｐ－Ｆｃの残基５１３１ないし６３１９の核酸配列（配列番号７３及び配列番号１３６１）及びコード化されるアミノ酸配列（配列番号７４、配列番号１３６２及び配列番号１３６３）を示す。Ｆｃドメインの配列（配列番号７５及び７６）は、Ｎ末端の５個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチド－リンカー部分がＦｃドメインのＮ末端にあるペプチボディの生成が可能となる。
【図１２Ｃ】ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｐｅｐ－Ｆｃの残基５１３１ないし６３１９の核酸配列（配列番号７３及び配列番号１３６１）及びコード化されるアミノ酸配列（配列番号７４、配列番号１３６２及び配列番号１３６３）を示す。Ｆｃドメインの配列（配列番号７５及び７６）は、Ｎ末端の５個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチド－リンカー部分がＦｃドメインのＮ末端にあるペプチボディの生成が可能となる。
【図１２Ｄ】ペプチド－リンカー配列で置換されたゼオシン抵抗（ｂｌｅ；「ＺｅｏＲ」）部位を有するペプチボディ細菌発現ベクターの環状図を示す。
【図１２Ｅ】ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｐｅｐ－Ｆｃの核酸配列（配列番号１３３９）及びコード化されるアミノ酸配列（配列番号１３４０、配列番号１３４１及び配列番号１３４２）を示す。Ｆｃドメインの配列（配列番号７５及び７６）は、Ｎ末端の５個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチド－リンカー部分がＦｃドメインのＮ末端にあるペプチボディの生成が可能となる。
【図１２Ｆ】ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｐｅｐ－Ｆｃの核酸配列（配列番号１３３９）及びコード化されるアミノ酸配列（配列番号１３４０、配列番号１３４１及び配列番号１３４２）を示す。Ｆｃドメインの配列（配列番号７５及び７６）は、Ｎ末端の５個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチド－リンカー部分がＦｃドメインのＮ末端にあるペプチボディの生成が可能となる。
【図１３Ａ】図１３Ａは、哺乳類発現ベクターｐＣＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉの環状図である。
【図１３Ｂ】図１３Ｂは、ヒトＩｇＧ１、１０個のアミノ酸のリンカー及びアクチビンＲＩＩｂ遺伝子を含有する哺乳類発現ベクターｐＣＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ－Ｆｃ－２ｘＧ４Ｓ－アクチビンＲＩＩｂの環状図である。
【図１３Ｃ】図１３Ｃは、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］コード化配列を含有するＣＨＯ発現ベクターｐＤＳＲａ２２の環状図である。
【図１４】前述の実施例１の「Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］」として同定される分子のヌクレオチド配列及びコード化されるアミノ酸配列（それぞれ配列番号７７及び７８）を示す。Ｌ１０リンカーアミノ酸配列（配列番号７９）に下線が付されている。
【図１５】前述の実施例２の「Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］」として同定される分子のヌクレオチド配列及びコード化されるアミノ酸配列（それぞれ配列番号８０及び８１）を示す。Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］（図１４）において使用されるのと同一の

Ｌ１０リンカーアミノ酸配列（配列番号７９）に下線が付されている。
【図１６】前述の実施例２の「Ｆｃ－Ｌ２５－ＳｈＫ［２－３５］」として同定される分子のヌクレオチド配列及びコード化されるアミノ酸配列（それぞれ配列番号８２及び８３）を示す。Ｌ２５リンカーアミノ酸配列（配列番号８４）に下線が付されている。
【図１７】前述の実施例３２にも記載される還元的アミノ化によるＳｈＫペプチド（配列番号５及び配列番号１０）のＮ末端ＰＥＧ化に関するスキームを示す。
【図１８】、前述の実施例３４にも記載されるアミド形成を介するＳｈＫペプチド（配列番号５及び配列番号１０）のＮ末端ＰＥＧ化に関するスキームを示す。
【図１９】前述の実施例３３にも記載される官能基選択的オキシム形成によるＳｈＫペプチド（配列番号５及び配列番号１０）のＮ末端ＰＥＧ化に関するスキームを示す。
【図２０】図２０Ａは、２１４ｎｍでの逆相ＨＰＬＣ分析を示し、図２０Ｂは、折りたたまれた「Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫ」（ペプチド２）とも記載される折りたたまれたＳｈＫ［２－３５］のエレクトロスプレー質量分析を示す。
【図２１】Ｎ末端がＰＥＧ化した「Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫ」とも呼ばれるＮ末端がＰＥＧ化されたＳｈｋ［２－３５］の２１４ｎｍでの逆相ＨＰＬＣ分析を示す。
【図２２】図２２Ａは、「ＳｈＫ」とも呼ばれる、折りたたまれたＳｈＫ［１－３５］のエレクトロスプレー質量分析を示す。図２２Ｂは、「ＳｈＫ」とも呼ばれる、折りたたまれたＳｈＫ［１－３５］のエレクトロスプレー質量分析を示す。
【図２３】前述の実施例３１にも記載の還元的アミノ化によるＳｈＫ［２－３５］（「Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫ」又は「ＳｈＫｄ１」とも呼ばれる配列番号９２及び配列番号５８）のＮ末端ＰＥＧ化に関するスキームを示す。
【図２４Ａ】図２４Ａは、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］で一過的に形質移入したＨＥＫ２９３細胞由来の培養上清のウェスタンブロットを示す。レーン１：分子量マーカー、レーン２：１５μＬのＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ、レーン３：１０μＬのＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ、レーン４：５μＬのＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ、レーン５：分子量マーカー、レーン６：ブランク、レーン７：ＤＮＡを含有しない１５μＬの対照、レーン８：ＤＮＡを含有しない１０μＬの対照、レーン９：ＤＮＡを含有しない５μＬの対照、レーン１０：分子量マーカー。
【図２４Ｂ】図２４Ｂは、Ｆｃ－Ｌ－ＳｈＫ［１－３５］で安定して形質移入したチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞のクローン由来の培養上清１５μＬによるウェスタンブロットを示す。レーン１ないし１５を次のとおり負荷した。ブランク、ＢＢ６、分子量マーカー、ＢＢ５、ＢＢ４、ＢＢ３、ＢＢ２、ＢＢ１、ブランク、ＢＤ６、ＢＤ５、分子量マーカー、ＢＤ４、ＢＤ３、ＢＤ２。
【図２５Ａ】図２５Ａは、Ｆｃ－Ｌ－ＳｍＩＩＩＡで一過的に形質移入した２９３Ｔ細胞由来の培養上清を含有する非還元型ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルのウェスタンブロットを示す。
【図２５Ｂ】図２５Ｂは、Ｆｃ－Ｌ－ＳｍＩＩＩＡで一過的に形質移入した２９３Ｔ細胞由来の培養上清を含有する非還元型ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルのウェスタンブロットを示す。
【図２６Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈した、安定して形質移入したＣＨＯ細胞由来の１０μＬの精製されたＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］生成物のスペクトル走査を示す。
【図２６Ｂ】最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷した。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。
【図２６Ｃ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ及びｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍ

Ｌ／分で注入される最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］生成物２０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図２６Ｄ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析するＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］の最終試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。
【図２７Ａ】安定して形質移入したＣＨＯ細胞から精製した最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷した。Ｎｏｖｅｘ Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。
【図２７Ｂ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ及びｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、精製されたＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］５０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図２７Ｃ】安定して形質移入したＣＨＯ細胞から精製したＦｃ－Ｌ５－ＳｈＫ［２－３５］のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。
【図２７Ｄ】安定して形質移入したＣＨＯ細胞から精製したＦｃ－Ｌ２５－ＳｈＫ［２－３５］のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。
【図２７Ｅ】Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］生成物１０μＬのスペクトル走査を示す。
【図２７Ｆ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析したＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］の最終試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。
【図２７Ｇ】Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ５－ＳｈＫ［２－３５］生成物１０μＬのスペクトル走査を示す。
【図２７Ｈ】５０ｍＭのＮａＨ２ＰＯ４、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なＦｃ－Ｌ５－ＳｈＫ［２－３５］生成物５０ｍｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図２７Ｉ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ

ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析したＦｃ－Ｌ５－ＳｈＫ［２－３５］の最終試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【図２７Ｊ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈した生成物２０μＬのスペクトル走査を示す。

【図２７Ｋ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なＦｃ－Ｌ２５－ＳｈＫ［２－３５］生成物５０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図２７Ｌ】、窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析したＦｃ－Ｌ２５－ＳｈＫ［２－３５］の最終試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【図２８Ａ】細菌細胞から精製及び再折りたたみされたＦｃ－Ｌ１０－ＫＴＸ１のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。

【図２８Ｂ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、精製されたＦｃ－Ｌ１０－ＫＴＸ１の４５μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図２８Ｃ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＫＴＸ１生成物２０μＬのスペクトル走査を示す。

【図２８Ｄ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析したＦｃ－Ｌ１０－ＫＴＸ１の最終試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【図２９Ａ】細菌細胞から精製及び再折りたたみされたＦｃ－Ｌ－ＡｇＴｘ２のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。

【図２９Ｂ】細菌細胞から精製及び再折りたたみされたＦｃ－Ｌ１０－ＨａＴｘ１のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範

囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物、精製した材料のスペクトル走査。
【図２９Ｃ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用して、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＡｇＴｘ２生成物２０μＬのスペクトル走査を示す。
【図２９Ｄ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＡｇＴｘ２生成物２０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図２９Ｅ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析したＦｃ－Ｌ１０－ＡｇＴｘ２の最終試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。
【図２９Ｆ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＨａＴｘ１生成物２０μＬのスペクトル走査を示す。
【図２９Ｇ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＨａＴｘ１生成物２０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図２９Ｈ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析したＦｃ－Ｌ１０－ＨａＴｘ１の最終試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。
【図３０Ａ】ＣＨＯ細胞から精製されるＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］が、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じることを示す。
【図３０Ｂ】多様な濃度でのＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］によるカリウム電流遮断の時間経過を示す。ＩＣ５０は、１５±２ｐＭ（ｎ＝４個の細胞）であると概算した。
【図３０Ｃ】（「ＳｈＫ」単独とも呼ばれる）合成ＳｈＫ［１－３５］が、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じることを示す。
【図３０Ｄ】多様な濃度でのＳｈＫ［１－３５］遮断の時間経過を示す。ＳｈＫに関するＩＣ５０は、１２±１ｐＭ（ｎ＝４個の細胞）であると概算した。
【図３１Ａ】図３１Ａは、４９±５ｐＭ（ｎ＝３個の細胞）のＩＣ５０で、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の縫う℃依存的遮断を生じる合成ペプチド類縁体ＳｈＫ［２－３５］を示す。
【図３１Ｂ】図３１Ｂは、１１５±１８ｐＭ（ｎ＝３個の細胞）のＩＣ５０でヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じる、ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］ペプチボディを示す。
【図３１Ｃ】図３１Ｃは、Ｆｃ－Ｌ５－ＳｈＫ［２－３５］ペプチボディが、１００ｐＭ（ｎ＝３個の細胞）のＩＣ５０でヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じることを示す。
【図３２Ａ】図３２Ａは、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じる細菌細胞から精製される

Ｆｃ－Ｌ－ＫＴＸ１ペプチボディを示す。
【図３２Ｂ】図３２Ｂは、多様な濃度でのＦｃ－Ｌ１０－ＫＴＸ１によるカリウム電流遮断の時間経過を示す。
【図３３Ａ】免疫組織化学によって、ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、ヒトＫｖ１．３で安定して形質移入したＨＥＫ２９３細胞を染色する（図３３Ａ）のに対し、形質移入されていないＨＥＫ２９３細胞は、前期ペプチボディで染色されない（図３３Ｂ）ことを示す。
【図３３Ｂ】免疫組織化学によって、ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、ヒトＫｖ１．３で安定して形質移入したＨＥＫ２９３細胞を染色する（図３３Ａ）のに対し、形質移入されていないＨＥＫ２９３細胞は、前期ペプチボディで染色されない（図３３Ｂ）ことを示す。
【図３４Ａ】ヒトＫｖ１．３で安定して形質移入した固定したＨＥＫ２９３細胞を使用する酵素イムノアッセイの結果を示す。図３４Ａは、（本明細書で単純に「Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ」と呼ばれる）ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、反応において用量依存的な亢進を示すのに対し、ＣＨＯ－Ｆｃ対照（「Ｆｃ対照」）は示さないことを示す。
【図３４Ｂ】ヒトＫｖ１．３で安定して形質移入した固定したＨＥＫ２９３細胞を使用する酵素イムノアッセイの結果を示す。図３４Ｂは、（本明細書で「Ｆｃ－ＳｈＫ」と呼ばれる）Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、同様の条件を使用して形質移入されていないＨＥＫ２９３細胞からの反応を誘発しないことを示し、他のネガティブ対照も示す。
【図３５Ａ】ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、ＰＭＡ及びαＣＤ３抗体で刺激されたヒトＰＢＭＣからのＩＬ－２（図３５Ａ）及びＩＦＮγ（図３５Ｂ）の用量依存的阻害を示す。前記ペプチボディは、反応の完全な阻害を呈する新規の薬理学を示すのに対し、合成ＳｈＫ［１－３５］ペプチド単独は、部分的な阻害のみを示す。
【図３５Ｂ】ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、ＰＭＡ及びαＣＤ３抗体で刺激されたヒトＰＢＭＣからのＩＬ－２（図３５Ａ）及びＩＦＮγ（図３５Ｂ）の用量依存的阻害を示す。前記ペプチボディは、反応の完全な阻害を呈する新規の薬理学を示すのに対し、合成ＳｈＫ［１－３５］ペプチド単独は、部分的な阻害のみを示す。
【図３６Ａ】哺乳類由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、ＣＤ３及びＣＤ２８に対する抗体で刺激された２つの正常なドナー由来のヒトＰＢＭＣにおけるＴ細胞増殖（^{3}Ｈ－チミジン組み込み）を阻害することを示す。図３６Ａは、ドナー１の反応を示し、図３６Ｂは、ドナー２の反応を示す。抗ＣＤ３２（ＦｃｇＲＩＩ）遮断抗体によるプレ温置は、ペプチボディに対する感度を変化させなかった。
【図３６Ｂ】哺乳類由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、ＣＤ３及びＣＤ２８に対する抗体で刺激された２つの正常なドナー由来のヒトＰＢＭＣにおけるＴ細胞増殖（^{3}Ｈ－チミジン組み込み）を阻害することを示す。図３６Ａは、ドナー１の反応を示し、図３６Ｂは、ドナー２の反応を示す。抗ＣＤ３２（ＦｃｇＲＩＩ）遮断抗体によるプレ温置は、ペプチボディに対する感度を変化させなかった。
【図３７Ａ】ＣＨＯ由来の精製したＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、αＣＤ３及びαＣＤ２８抗体で刺激したヒトＰＢＭＣからのＩＬ－２（図３７Ａ）及びＩＦＮγ（図３７Ｂ）の生成の用量依存的阻害を生じることを示す。
【図３７Ｂ】ＣＨＯ由来の精製したＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、αＣＤ３及びαＣＤ２８抗体で刺激したヒトＰＢＭＣからのＩＬ－２（図３７Ａ）及びＩＦＮγ（図３７Ｂ）の生成の用量依存的阻害を生じることを示す。
【図３８Ａ】図３８Ａは、ＰＥＧ化されたＳｈｋ［２－３５］合成ペプチドが、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じることを示し、多様な濃度でのカリウム電流遮断の時間経過が

図３８Ｂに示される。
【図３８Ｂ】図３８Ａは、ＰＥＧ化されたＳｈｋ［２－３５］合成ペプチドが、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じることを示し、多様な濃度でのカリウム電流遮断の時間経過が図３８Ｂに示される。
【図３９Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（1-３５）生成物５０μＬのスペクトル走査を示す。
【図３９Ｂ】最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（１－３５）生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。
【図３９Ｃ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（１－３５）生成物５０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図４０Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（２－３５）生成物２０μＬのスペクトル走査を示す。
【図４０Ｂ】最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（２－３５）生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。
【図４０Ｃ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（２－３５）生成物５０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図４０Ｄ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析したＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（２－３５）の最終試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。
【図４１Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬの製剤緩衝液中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１生成物５０μＬのスペクトル走査を示す。
【図４１Ｂ】最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。
【図４１Ｃ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅ

ｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１生成物１２３μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図４１Ｄ】ＬＣＱイオントラップ質量分光光度計へと配向される溶出物の一部を使用してＶｙｄａｃ C_4 カラムを使用する最終的なＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１試料約４μｇの液体クロマトグラフィー-質量スペクトル分析を示す。質量分析計の製造者によって提供されるＢｉｏｗｏｒｋｓソフトウェアを使用して、質量スペクトルをデコンボルートした。

【図４２Ａ】Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号１０４０及び配列番号１０４１）を示す。

【図４２Ｂ】Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号１０４０及び配列番号１０４１）を示す。

【図４３Ａ】Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号１０４２及び配列番号１０４３）を示す。

【図４３Ｂ】Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号１０４２及び配列番号１０４３）を示す。

【図４４Ａ】Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号１０４４及び配列番号１０４５）を示す。

【図４４Ｂ】Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号１０４４及び配列番号１０４５）を示す。

【図４５Ａ】Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号１０４６及び配列番号１０４７）を示す。

【図４５Ｂ】Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号１０４６及び配列番号１０４７）を示す。

【図４６】抗ヒトＦｃ抗体による（トリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥからの）ウェスタンブロットを示す。レーン１ないし６を次のとおり負荷した。Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］１５μＬ、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］１５μＬ、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］１５μＬ、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１の１５μＬ、「ＤＮＡなし」の対照１５μＬ、分子量マーカー。

【図４７】抗ヒトＦｃ抗体による（トリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥからの）ウェスタンブロットを示す。レーン１ないし５を次のとおり負荷した。Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１の２μＬ、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１の５μＬ、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１の１０μＬ、２０ｎｇのヒトＩｇＧ標準物質、分子量マーカー。

【図４８】抗ヒトＦｃ抗体による（トリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥからの）ウェスタンブロットを示す。レーン１ないし１３を次のとおり負荷した。２０ｎｇのヒトＩｇＧ標準物質、Ｄ１、Ｃ３、Ｃ２、Ｂ６、Ｂ５、Ｂ２、Ｂ１、Ａ６、Ａ５、Ａ４、Ａ３、Ａ２（レーン２ないし１３中に負荷したクローン培養上清）。

【図４９Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ-Ｌ１０-ＯｓＫ１生成物５０μＬのスペクトル走査を示す。

【図４９Ｂ】最終的なＦｃ-Ｌ１０-ＯｓＫ１生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。

【図４９Ｃ】５０ｍＭの NaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なＦｃ-Ｌ１０-ＯｓＫ１生成物１４９μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図４９Ｄ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析したＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１の最終試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【図５０Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ）生成物５０μＬのスペクトル走査を示す。

【図５０Ｂ】最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ）生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。

【図５０Ｃ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ）生成物５０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図５０Ｄ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析した最終生成物Ｆｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ）の試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【図５１Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）生成物５０μＬのスペクトル走査を示す。

【図５１Ｂ】最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。

【図５１Ｃ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）生成物５０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図５１Ｄ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析した最終生成物Ｆｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）の試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【図５２Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）生成物５０μＬのスペクトル走査を示す。

【図５２Ｂ】最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。

【図５２Ｃ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）生成物５０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図５２Ｄ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析した最終生成物Ｆｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）の試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【図５３Ａ】アジアサソリのオルトキルススクロビキュロサス（Ｏｒｔｈｏｃｈｉｒｕｓ　ｓｃｒｏｂｉｃｕｌｏｓｕｓ）毒液の３８残基毒素ペプチドである合成Ｏｓｋ１によるヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の阻害を示す。図５３Ａは、合成Ｏｓｋ１毒素ペプチドによってヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。図５３Ｂは、多様な濃度での合成Ｏｓｋ１毒素ペプチド遮断の時間経過を示す。合成Ｏｓｋ１毒素ペプチドに関するＩＣ５０は、３９±１２ｐＭ（ｎ＝４個の細胞）であると概算した。

【図５３Ｂ】アジアサソリのオルトキルススクロビキュロサス（Ｏｒｔｈｏｃｈｉｒｕｓ　ｓｃｒｏｂｉｃｕｌｏｓｕｓ）毒液の３８残基毒素ペプチドである合成Ｏｓｋ１によるヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の阻害を示す。図５３Ａは、合成Ｏｓｋ１毒素ペプチドによってヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。図５３Ｂは、多様な濃度での合成Ｏｓｋ１毒素ペプチド遮断の時間経過を示す。合成Ｏｓｋ１毒素ペプチドに関するＩＣ５０は、３９±１２ｐＭ（ｎ＝４個の細胞）であると概算した。

【図５４Ａ】抗体のＦｃ断片（ＯＳＫ１－ペプチボディ）に対する融合による合成ＯＳＫ１毒素ペプチドの改変が、ヒトＫｖ１．３チャネルに対する阻害活性を保持したことを示す。図５４Ａは、１０個のアミノ酸残基のリンカー鎖長を有するヒトＩｇＧ１　Ｆｃ断片へ結合したＯＳＫ１（Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１）によって、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。融合コンストラクトは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞において安定して発現した。図５４Ｂは、多様な濃度でのＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１遮断の時間経過を示す。Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１に関するＩＣ５０は、合成ＯＳＫ１毒素ペプチドよりも約５倍弱い１９８±３５ｐＭ（ｎ＝６個の細胞）であると概算した。

【図５４Ｂ】抗体のＦｃ断片（ＯＳＫ１－ペプチボディ）に対する融合による合成ＯＳＫ１毒素ペプチドの改変が、ヒトＫｖ１．３チャネルに対する阻害活性を保持したことを示す。図５４Ａは、１０個のアミノ酸残基のリンカー鎖長を有するヒトＩｇＧ１　Ｆｃ断片へ結合したＯＳＫ１（Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１）によって、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。融合コンストラクトは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞において安定して発現した。図５４Ｂは、多様な濃度でのＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１遮断の時間経過を

示す。Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１に関するＩＣ５０は、合成ＯＳＫ１毒素ペプチドよりも約５倍弱い１９８±３５ｐＭ（ｎ＝６個の細胞）であると概算した。
【図５５Ａ】ＯＳＫ１－ペプチボディの単一アミノ酸残基置換がヒトＫｖ１．３チャネルに対する阻害活性を保持したことを示す。図５５Ａは、（Ｎ末端から７番目の位置でのリジンからセリンへの）単一アミノ酸置換（［Ｋ７Ｓ］）を有し、１０個のアミノ酸残基のリンカー鎖長のヒトＩｇＧ１　Ｆｃ断片へ結合したＯＳＫ１－ペプチボディ（Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］）によって、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。融合コンストラクトは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞において安定して発現した。図５５Ｂは、多様な濃度でのＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］によるカリウム電流遮断の時間経過を示す。ＩＣ５０は、合成ＯＳＫ１毒素ペプチドよりも約１０倍弱い３７２±７１ｐＭ（ｎ＝４個の細胞）であると概算した。
【図５５Ｂ】ＯＳＫ１－ペプチボディの単一アミノ酸残基置換がヒトＫｖ１．３チャネルに対する阻害活性を保持したことを示す。図５５Ａは、（Ｎ末端から７番目の位置でのリジンからセリンへの）単一アミノ酸置換（［Ｋ７Ｓ］）を有し、１０個のアミノ酸残基のリンカー鎖長のヒトＩｇＧ１　Ｆｃ断片へ結合したＯＳＫ１－ペプチボディ（Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］）によって、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。融合コンストラクトは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞において安定して発現した。図５５Ｂは、多様な濃度でのＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］によるカリウム電流遮断の時間経過を示す。ＩＣ５０は、合成ＯＳＫ１毒素ペプチドよりも約１０倍弱い３７２±７１ｐＭ（ｎ＝４個の細胞）であると概算した。
【図５６Ａ】ＯＳＫ１－ペプチボディの２つのアミノ酸残基置換がヒトＫｖ１．３チャネルに対する阻害活性を保持したことを示す。図５６Ａは、（Ｎ末端からそれぞれ１６番目及び２０番目の位置でのグルタミン酸からリジンへの及びリジンからアスパラギン酸への）２つのアミノ酸置換（［Ｋ７Ｓ］）を有し、１０個のアミノ酸残基のリンカー鎖長のヒトＩｇＧ１　Ｆｃ断片へ結合したＯＳＫ１－ペプチボディ（Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６ＫＫ２０Ｄ］）によって、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。融合コンストラクトは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞において安定して発現した。図５６Ｂは、多様な濃度でのＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６ＫＫ２０Ｄ］による、カリウム電流遮断の時間経過を示す。ＩＣ５０は、合成ＯＳＫ１毒素ペプチドよりも約６倍弱い２４８±６３ｐＭ（ｎ＝３個の細胞）であると概算した。
【図５６Ｂ】ＯＳＫ１－ペプチボディの２つのアミノ酸残基置換がヒトＫｖ１．３チャネルに対する阻害活性を保持したことを示す。図５６Ａは、（Ｎ末端からそれぞれ１６番目及び２０番目の位置でのグルタミン酸からリジンへの及びリジンからアスパラギン酸への）２つのアミノ酸置換（［Ｋ７Ｓ］）を有し、１０個のアミノ酸残基のリンカー鎖長のヒトＩｇＧ１　Ｆｃ断片へ結合したＯＳＫ１－ペプチボディ（Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６ＫＫ２０Ｄ］）によって、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。融合コンストラクトは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞において安定して発現した。図５６Ｂは、多様な濃度でのＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６ＫＫ２０Ｄ］による、カリウム電流遮断の時間経過を示す。ＩＣ５０は、合成ＯＳＫ１毒素ペプチドよりも約６倍弱い２４８±６３ｐＭ（ｎ＝３個の細胞）であると概算した。
【図５７Ａ】ＯＳＫ１－ペプチボディのアミノ酸残基三重置換が、ヒトＫｖ１．３チャネルに対する阻害活性を保持するが、阻害の有効性は合成ＯＳＫ１毒素ペプチドと比較して有意に低下したことを示す。図５７Ａは、（Ｎ末端からそれぞれ７番目、１６番目及び２０番目の位置でのリジンからセリンへの、グルタミン酸からリジンへの及びリジンからアスパラギン酸への）三重のアミノ酸置換（［Ｋ７ＳＥ１６ＫＫ２０Ｄ］）を有し、１０個のアミノ酸残基のリンカー鎖長のヒトＩｇＧ１　Ｆｃ断片へ結合したＯＳＫ１－ペプチボ

ディ（Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７ＳＥ１６ＫＫ２０Ｄ］）によって、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。融合コンストラクトは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞において安定して発現した。図５７Ｂは、多様な濃度でのＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７ＳＥ１６ＫＫ２０Ｄ］によるカリウム電流遮断の時間経過を示す。ＩＣ５０は、合成ＯＳＫ１毒素ペプチドよりも約２１倍弱い８１２±８４ｐＭ（ｎ＝３個の細胞）であると概算した。

【図５７Ｂ】ＯＳＫ１－ペプチボディのアミノ酸残基三重置換が、ヒトＫｖ１．３チャネルに対する阻害活性を保持するが、阻害の有効性は合成ＯＳＫ１毒素ペプチドと比較して有意に低下したことを示す。図５７Ａは、（Ｎ末端からそれぞれ７番目、１６番目及び２０番目の位置でのリジンからセリンへの、グルタミン酸からリジンへの及びリジンからアスパラギン酸への）三重のアミノ酸置換（［Ｋ７ＳＥ１６ＫＫ２０Ｄ］）を有し、１０個のアミノ酸残基のリンカー鎖長のヒトＩｇＧ１　Ｆｃ断片へ結合したＯＳＫ１－ペプチボディ（Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７ＳＥ１６ＫＫ２０Ｄ］）によって、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。融合コンストラクトは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞において安定して発現した。図５７Ｂは、多様な濃度でのＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７ＳＥ１６ＫＫ２０Ｄ］によるカリウム電流遮断の時間経過を示す。ＩＣ５０は、合成ＯＳＫ１毒素ペプチドよりも約２１倍弱い８１２±８４ｐＭ（ｎ＝３個の細胞）であると概算した。

【図５８Ａ】血清の付与された割合での各標準物質に関する線形回帰式を含有するＳｈＫ（図５８Ａ）に関する標準曲線を示す。

【図５８Ｂ】血清の付与された割合での各標準物質に関する線形回帰式を含有する２０Ｋ　ＰＥＧ－ＳｈＫ［１－３５］（図５８Ｂ）に関する標準曲線を示す。

【図５９】静脈内注射後の２０Ｋ　ＰＥＧ　ＳｈＫ［１－３５］分子に関する、ラットにおける薬物動態学的特性を示す。

【図６０】Ｋｖ１．３阻害剤であるＳｈＫ対２０Ｋ　ＰＥＧ－ＳｈＫ［１－３５］の単一等モル量の静脈内注射を受容するラットの血清試料（５％）中のＫｖ１．３阻害活性を示す。

【図６１】養子移植ＥＡＥモデル実験デザイン（ｎ＝治療群あたり５匹のラット）を示す。１キログラムあたりのマイクログラム（ｍｇ／ｋｇ）における投与値は、ペプチド含有量に基づいている。

【図６２】ＰＥＧ－ＳｈＫによる治療が、養子移植ＥＡＥモデルにおけるラットの疾病を寛解したことを示す。臨床的評価：０＝徴候なし、０．５＝遠位跛行尾部、１．０＝跛行尾部、２．０＝軽度不全対麻痺、運動失調、３．０＝中等度不全対麻痺、３．５＝片後肢麻痺、４．０＝完全後肢麻痺、５．０＝完全後肢麻痺及び失禁、５．５＝四肢麻痺、６．０＝瀕死状態又は死亡であった。５．５ないし６のスコアに到達しているラットを安楽死させた。平均±平均値の標準誤差の値を示す（ｎ＝治療群あたり５匹のラット）

【図６３】ＰＥＧ－ＳｈＫによる治療が、養子移植ＥＡＥモデルにおける体重の低下を予防したことを示す。ラットは、（生存しているラットに関して）第－１、４、６及び８日に体重測定した。平均±平均の標準誤差の値を示す。

【図６４Ａ】ヒト全血におけるタプシガルジン誘発性ＩＬ－２生成が、Ｋｖ１．３チャネル阻害剤であるＳｈＫ［１－３５］及びＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］によって抑制されたことを示すカルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡも前記反応を遮断する。ＢＫＣａチャネル阻害剤であるイベリオトキシン（ＩｂＴｘ）は、有意な活性を示さなかった。２つの個別のドナー由来の全血の反応を図６４Ａ及び図６４Ｂに示す。

【図６４Ｂ】ヒト全血におけるタプシガルジン誘発性ＩＬ－２生成が、Ｋｖ１．３チャネル阻害剤であるＳｈＫ［１－３５］及びＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］によって抑制されたことを示すカルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡも前記反応を遮断する。ＢＫＣａチャネル阻害剤であるイベリオトキシン（ＩｂＴｘ）は、有意な活性を示さな

かった。２つの個別のドナー由来の全血の反応を図６４Ａ及び図６４Ｂに示す。
【図６５Ａ】ヒト全血におけるタプシガルジン誘発性ＩＦＮ－ｇ生成が、Ｋｖ１．３チャネル阻害剤であるＳｈＫ［１－３５］及びＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］によって抑制されたことを示すカルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡも前記反応を遮断する。ＢＫＣａチャネル阻害剤であるイベリオトキシン（ＩｂＴｘ）は、有意な活性を示さなかった。２つの個別のドナー由来の全血の反応を図６５Ａ及び図６５Ｂに示す。
【図６５Ｂ】ヒト全血におけるタプシガルジン誘発性ＩＦＮ－ｇ生成が、Ｋｖ１．３チャネル阻害剤であるＳｈＫ［１－３５］及びＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］によって抑制されたことを示すカルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡも前記反応を遮断する。ＢＫＣａチャネル阻害剤であるイベリオトキシン（ＩｂＴｘ）は、有意な活性を示さなかった。２つの個別のドナー由来の全血の反応を図６５Ａ及び図６５Ｂに示す。
【図６６Ａ】ヒト全血におけるＴ細胞に関するＣＤ４０Ｌのタプシガルジン誘発性上方制御が、Ｋｖ１．３チャネル阻害剤であるＳｈＫ［１－３５］及びＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］（Ｆｃ－ＳｈＫ）によって抑制されたことを示す。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡ（ＣｓＡ）も前記反応を遮断する。図６６Ａは、ＣＤ４＋Ｔ細胞の合計の反応で見る実験の結果を示す。図６６Ｂは、ＣＤ４＋　Ｔ細胞並びにＣＤ４＋ＣＤ４５＋及びＣＤ４＋ＣＤ４５－Ｔ細胞で見た実験の結果を示す。図６６Ｂにおいて、ＢＫＣａチャネル阻害剤イベリオトキシン（ＩｂＴｘ）及びＫｖ１．１チャネル阻害剤デンドロトキシン－Ｋ（ＤＴＸ－Ｋ）は、有意な活性を示さなかった。
【図６６Ｂ】ヒト全血におけるＴ細胞に関するＣＤ４０Ｌのタプシガルジン誘発性上方制御が、Ｋｖ１．３チャネル阻害剤であるＳｈＫ［１－３５］及びＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］（Ｆｃ－ＳｈＫ）によって抑制されたことを示す。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡ（ＣｓＡ）も前記反応を遮断する。図６６Ａは、ＣＤ４＋Ｔ細胞の合計の反応で見る実験の結果を示す。図６６Ｂは、ＣＤ４＋　Ｔ細胞並びにＣＤ４＋ＣＤ４５＋及びＣＤ４＋ＣＤ４５－Ｔ細胞で見た実験の結果を示す。図６６Ｂにおいて、ＢＫＣａチャネル阻害剤イベリオトキシン（ＩｂＴｘ）及びＫｖ１．１チャネル阻害剤デンドロトキシン－Ｋ（ＤＴＸ－Ｋ）は、有意な活性を示さなかった。
【図６７Ａ】ヒト全血におけるＴ細胞に関するＩＬ－２Ｒのタプシガルジン誘発性上方制御が、Ｋｖ１．３チャネル阻害剤であるＳｈＫ［１－３５］及びＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］（Ｆｃ－ＳｈＫ）によって抑制されたことを示す。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡ（ＣｓＡ）も前記反応を遮断する。図６７Ａは、ＣＤ４＋Ｔ細胞の合計の反応で見る実験の結果を示す。図６７Ｂは、ＣＤ４＋　Ｔ細胞並びにＣＤ４＋ＣＤ４５＋Ｔ細胞及びＣＤ４＋ＣＤ４５－Ｔ細胞の合計で見る実験の結果を示す。図６７Ｂにおいて、ＢＫＣａチャネル阻害剤イベリオトキシン（ＩｂＴｘ）及びＫｖ１．１チャネル阻害剤デンドロトキシン－Ｋ（ＤＴＸ－Ｋ）は、有意な活性を示さなかった。
【図６７Ｂ】ヒト全血におけるＴ細胞に関するＩＬ－２Ｒのタプシガルジン誘発性上方制御が、Ｋｖ１．３チャネル阻害剤であるＳｈＫ［１－３５］及びＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］（Ｆｃ－ＳｈＫ）によって抑制されたことを示す。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡ（ＣｓＡ）も前記反応を遮断する。図６７Ａは、ＣＤ４＋Ｔ細胞の合計の反応で見る実験の結果を示す。図６７Ｂは、ＣＤ４＋　Ｔ細胞並びにＣＤ４＋ＣＤ４５＋Ｔ細胞及びＣＤ４＋ＣＤ４５－Ｔ細胞の合計で見る実験の結果を示す。図６７Ｂにおいて、ＢＫＣａチャネル阻害剤イベリオトキシン（ＩｂＴｘ）及びＫｖ１．１チャネル阻害剤デンドロトキシン－Ｋ（ＤＴＸ－Ｋ）は、有意な活性を示さなかった。
【図６８Ａ】ＰＥＧ－Ｓｈｋ精製（図６８Ａ）に関するＳＰセファロースＨＰカラム上でのＰＥＧ－ペプチド精製の陽イオン交換クロマトグラムを示す。
【図６８Ｂ】ＰＥＧ－ＯＳＫ－１精製（図６８Ｂ）に関するＳＰセファロースＨＰカラム上でのＰＥＧ－ペプチド精製の陽イオン交換クロマトグラムを示す。
【図６９Ａ】ＰＥＧ－Ｓｈｋ純度９９％超（図６９Ａ）の純度を示すための、最終的なＰＥＧ－ペプチドプールに関するＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムを示す。
【図６９Ｂ】ＰＥＧ－Ｏｓｋ１純度９７％超（図６９Ｂ）の純度を示すための、最終的な

ＰＥＧ－ペプチドプールに関するＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムを示す。
【図７０】Ｆｃ　Ｎ末端ドメイン（アミノ酸残基１ないし１３９）、ＯｓＫ１（下線を付したアミノ酸残基１４２ないし１７９）及びＦｃ　Ｃ末端ドメイン（アミノ酸残基１８２ないし２７０）の３つの結合したドメインを有する典型的なＦｃループ－Ｌ２－ＯｓＫ１－Ｌ２のアミノ酸配列（配列番号９７６）を示す。
【図７１】Ｆｃ　Ｎ末端ドメイン（アミノ酸残基１ないし１３９）、ＳｈＫ（下線を付したアミノ酸残基１４２ないし１７９）及びＦｃ　Ｃ末端ドメイン（アミノ酸残基１７９ないし２６７）の３つの結合したドメインを有する典型的なＦｃループ－Ｌ２－ＳｈＫ－Ｌ２のアミノ酸配列（配列番号９７７）を示す。
【図７２】Ｆｃ　Ｎ末端ドメイン（アミノ酸残基１ないし１３９）、ＳｈＫ（下線を付したアミノ酸残基１４２ないし１７６）及びＦｃ　Ｃ末端ドメイン（アミノ酸残基１８１ないし２６９）の３つの結合したドメインを有する典型的なＦｃループ－Ｌ２－ＳｈＫ－Ｌ４のアミノ酸配列（配列番号９７８）を示す。
【図７３】Ｆｃ　Ｎ末端ドメイン（アミノ酸残基１ないし１３９）、ＯｓＫ１（下線を付したアミノ酸残基１４４ないし１８１）及びＦｃ　Ｃ末端ドメイン（アミノ酸残基１８４ないし２７２）の３つの結合したドメインを有する典型的なＦｃループ－Ｌ４－ＯｓＫ１－Ｌ２のアミノ酸配列（配列番号９７９）を示す。
【図７４】２０Ｋ　ＰＥＧ化ＳｈＫ［１－３５］が、ＨＥＫ２９３／Ｋｖ１．３細胞に関するホールセルパッチクランプ電気生理学によって測定されるヒトＫｖ１．３の有力な遮断を提供したことを示す。データは、ピーク電流の遮断を表す。
【図７５Ａ】本発明の組成物の幾つかの他の典型的な実施形態の模式的構造を示す。「X^2」及び「X^3」は、本明細書に定義される毒素ペプチド又はリンカー－毒素ペプチドの組み合わせ（すなわち、－（Ｌ）$_f$－Ｐ－（Ｌ）$_g$－）を表す。本明細書に記載されているが、図７５には示されていないように、付加的なＸ１ドメイン及び１つ以上の付加的なＰＥＧ部分も他の実施形態に包含される。本明細書に示される特異的な実施形態は次のとおりである。図７５Ｃ、図７５Ｄ、図７５Ｇ及び図７５Ｈは、単一鎖分子を示し、前記分子に関するＤＮＡコンストラクトも表し得る。　図７５Ａ、図７５Ｂ、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、（位置F^2にある）二重にジスルフィド結合したＦｃ二量体を示し、図７５Ａ及び図７５Ｂは、位置X^3における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示し、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、位置X^2における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示す。
【図７５Ｂ】本発明の組成物の幾つかの他の典型的な実施形態の模式的構造を示す。「X^2」及び「X^3」は、本明細書に定義される毒素ペプチド又はリンカー－毒素ペプチドの組み合わせ（すなわち、－（Ｌ）$_f$－Ｐ－（Ｌ）$_g$－）を表す。本明細書に記載されているが、図７５には示されていないように、付加的なＸ１ドメイン及び１つ以上の付加的なＰＥＧ部分も他の実施形態に包含される。本明細書に示される特異的な実施形態は次のとおりである。図７５Ｃ、図７５Ｄ、図７５Ｇ及び図７５Ｈは、単一鎖分子を示し、前記分子に関するＤＮＡコンストラクトも表し得る。　図７５Ａ、図７５Ｂ、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、（位置F^2にある）二重にジスルフィド結合したＦｃ二量体を示し、図７５Ａ及び図７５Ｂは、位置X^3における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示し、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、位置X^2における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示す。
【図７５Ｃ】本発明の組成物の幾つかの他の典型的な実施形態の模式的構造を示す。「X^2」及び「X^3」は、本明細書に定義される毒素ペプチド又はリンカー－毒素ペプチドの組み合わせ（すなわち、－（Ｌ）$_f$－Ｐ－（Ｌ）$_g$－）を表す。本明細書に記載されているが、図７５には示されていないように、付加的なＸ１ドメイン及び１つ以上の付加的なＰＥＧ部分も他の実施形態に包含される。本明細書に示される特異的な実施形態は次のとおりである。図７５Ｃ、図７５Ｄ、図７５Ｇ及び図７５Ｈは、単一鎖分子を示し、前記分子に関するＤＮＡコンストラクトも表し得る。　図７５Ａ、図７５Ｂ、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、（位置F^2にある）二重にジスルフィド結合したＦｃ二量体を示し、図７５Ａ及

び図７５Ｂは、位置Ｘ^{3}における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示し、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、位置Ｘ^{2}における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示す。

【図７５Ｄ】本発明の組成物の幾つかの他の典型的な実施形態の模式的構造を示す。「Ｘ^{2}」及び「Ｘ^{3}」は、本明細書に定義される毒素ペプチド又はリンカー－毒素ペプチドの組み合わせ（すなわち、－（Ｌ）$_{f}$－Ｐ－（Ｌ）$_{g}$－）を表す。本明細書に記載されているが、図７５には示されていないように、付加的なＸ１ドメイン及び１つ以上の付加的なＰＥＧ部分も他の実施形態に包含される。本明細書に示される特異的な実施形態は次のとおりである。図７５Ｃ、図７５Ｄ、図７５Ｇ及び図７５Ｈは、単一鎖分子を示し、前記分子に関するＤＮＡコンストラクトも表し得る。　図７５Ａ、図７５Ｂ、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、（位置Ｆ^{2}にある）二重にジスルフィド結合したＦｃ二量体を示し、図７５Ａ及び図７５Ｂは、位置Ｘ^{3}における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示し、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、位置Ｘ^{2}における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示す。

【図７５Ｅ】本発明の組成物の幾つかの他の典型的な実施形態の模式的構造を示す。「Ｘ^{2}」及び「Ｘ^{3}」は、本明細書に定義される毒素ペプチド又はリンカー－毒素ペプチドの組み合わせ（すなわち、－（Ｌ）$_{f}$－Ｐ－（Ｌ）$_{g}$－）を表す。本明細書に記載されているが、図７５には示されていないように、付加的なＸ１ドメイン及び１つ以上の付加的なＰＥＧ部分も他の実施形態に包含される。本明細書に示される特異的な実施形態は次のとおりである。図７５Ｃ、図７５Ｄ、図７５Ｇ及び図７５Ｈは、単一鎖分子を示し、前記分子に関するＤＮＡコンストラクトも表し得る。　図７５Ａ、図７５Ｂ、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、（位置Ｆ^{2}にある）二重にジスルフィド結合したＦｃ二量体を示し、図７５Ａ及び図７５Ｂは、位置Ｘ^{3}における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示し、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、位置Ｘ^{2}における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示す。

【図７５Ｆ】本発明の組成物の幾つかの他の典型的な実施形態の模式的構造を示す。「Ｘ^{2}」及び「Ｘ^{3}」は、本明細書に定義される毒素ペプチド又はリンカー－毒素ペプチドの組み合わせ（すなわち、－（Ｌ）$_{f}$－Ｐ－（Ｌ）$_{g}$－）を表す。本明細書に記載されているが、図７５には示されていないように、付加的なＸ１ドメイン及び１つ以上の付加的なＰＥＧ部分も他の実施形態に包含される。本明細書に示される特異的な実施形態は次のとおりである。図７５Ｃ、図７５Ｄ、図７５Ｇ及び図７５Ｈは、単一鎖分子を示し、前記分子に関するＤＮＡコンストラクトも表し得る。　図７５Ａ、図７５Ｂ、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、（位置Ｆ^{2}にある）二重にジスルフィド結合したＦｃ二量体を示し、図７５Ａ及び図７５Ｂは、位置Ｘ^{3}における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示し、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、位置Ｘ^{2}における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示す。

【図７５Ｇ】本発明の組成物の幾つかの他の典型的な実施形態の模式的構造を示す。「Ｘ^{2}」及び「Ｘ^{3}」は、本明細書に定義される毒素ペプチド又はリンカー－毒素ペプチドの組み合わせ（すなわち、－（Ｌ）$_{f}$－Ｐ－（Ｌ）$_{g}$－）を表す。本明細書に記載されているが、図７５には示されていないように、付加的なＸ１ドメイン及び１つ以上の付加的なＰＥＧ部分も他の実施形態に包含される。本明細書に示される特異的な実施形態は次のとおりである。図７５Ｃ、図７５Ｄ、図７５Ｇ及び図７５Ｈは、単一鎖分子を示し、前記分子に関するＤＮＡコンストラクトも表し得る。　図７５Ａ、図７５Ｂ、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、（位置Ｆ^{2}にある）二重にジスルフィド結合したＦｃ二量体を示し、図７５Ａ及び図７５Ｂは、位置Ｘ^{3}における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示し、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、位置Ｘ^{2}における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示す。

【図７５Ｈ】本発明の組成物の幾つかの他の典型的な実施形態の模式的構造を示す。「Ｘ^{2}」及び「Ｘ^{3}」は、本明細書に定義される毒素ペプチド又はリンカー－毒素ペプチドの組み合わせ（すなわち、－（Ｌ）$_{f}$－Ｐ－（Ｌ）$_{g}$－）を表す。本明細書に記載されてい

るが、図７５には示されていないように、付加的なＸ１ドメイン及び１つ以上の付加的なＰＥＧ部分も他の実施形態に包含される。本明細書に示される特異的な実施形態は次のとおりである。図７５Ｃ、図７５Ｄ、図７５Ｇ及び図７５Ｈは、単一鎖分子を示し、前記分子に関するＤＮＡコンストラクトも表し得る。　図７５Ａ、図７５Ｂ、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、（位置$Ｆ^{2}$にある）二重にジスルフィド結合したＦｃ二量体を示し、図７５Ａ及び図７５Ｂは、位置$Ｘ^{3}$における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示し、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、位置$Ｘ^{2}$における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示す。

【図７６Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＳｈＫ［２－３５］－Ｆｃ生成物５０μＬのスペクトル走査を示す。

【図７６Ｂ】最終的なＳｈＫ［２－３５］－Ｆｃ生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２に次のとおり負荷した。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。

【図７６Ｃ】５０ｍＭの$ＮａＨ_{2}ＰＯ_{4}$、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なＳｈＫ［２－３５］－Ｆｃ生成物７０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図７６Ｄ】Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｎｎｉｇａｎ　ＬＣＱイオントラップ質量分光光度計のエレクトロスプレー源へ直接連結されるカラム溶出液を使用して、Ａｇｉｌｅｎｔ１１００ＨＰＣＬを使用する逆相クロマトグラフィーを使用して、最終的なＳｈＫ［２－３５］－Ｆｃ試料のＬＣ－ＭＳ分析を示す。関連するスペクトルを合計し、Ｂｉｏｗｏｒｋｓソフトウェアパッケージを使用して質量データへデコンボルートした。

【図７７Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用して、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したｍｅｔ－ＳｈＫ［１－３５］－Ｆｃ生成物２０μＬのスペクトル走査を示す。

【図７７Ｂ】最終的なｍｅｔ－ＳｈＫ［１－３５］－Ｆｃ生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷した。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。

【図７７Ｃ】５０ｍＭの$ＮａＨ_{2}ＰＯ_{4}$、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なｍｅｔ－ＳｈＫ［１－３５］－Ｆｃ生成物９３μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図７７Ｄ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析した最終的なｍｅｔ－ＳｈＫ［１－３５］－Ｆｃ試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【発明を実施するための形態】

【００３２】

用語の定義

本明細書を通じて使用される用語は、具体的な事例において別段の限定がなければ、以下のとおり定義される。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されている単数形（「ａ」、「ａｎ」及び「ｔｈｅ」）には、文脈から別段の意味であることが明らかである場合を除き、複数表記も含まれる。

【００３３】

「半減期延長部分」（すなわち、式Ｉ中のF^1又はF^2）という用語は、トキシンペプチドの非抱合形態に比べて、インビボタンパク分解によるトキシンペプチドの分解又はトキシンペプチドの活性を減少させる他の化学的修飾を抑制又は軽減し、吸収の速度を増加させるなど（但し、これに限定されない。）、半減期又はその他の薬物動態特性を増加させ、毒性を軽減し、溶解性を向上させ、目的の標的イオンチャンネルに関して、トキシンペプチドの生物学的活性及び／又は標的選択性を増加させ、製造可能性を増加させ、及び／又はトキシンペプチドの免疫原性を低下させる、トキシンペプチドに共有結合又は抱合された、医薬として許容される部分、ドメイン又は「ビヒクル」を表す。

【００３４】

「ＰＥＧ化されたペプチド」とは、ペプチド自体のアミノ酸残基に共有結合されるか、又はペプチドの残基に共有結合されたペプチド若しくは非ペプチドリンカー（芳香族リンカーを含むが、これに限定されない。）に共有結合されたポリエチレングリコール（ＰＥＧ）部分を有するペプチド又はタンパク質を意味する。

【００３５】

「ポリエチレングリコール」又は「ＰＥＧ」とは、カップリング剤あり若しくはなしの、又はカップリング若しくは活性化部分での（例えば、アルデヒド、ヒドロキシスクシンイミジル、ヒドラジド、チオール、トリフラート、トレシラート、アジリジン、オキシラン、オルトピリジル　ジスルフィド、ビニルスルホン、ヨードアセトアミド又はマレイミド部分での誘導体化あり若しくはなしの、ポリアルキレングリコール化合物又はその誘導体を意味する。本発明に従えば、有用なＰＥＧには、実質的に直線の、直鎖ＰＥＧ、分岐ＰＥＧ又は樹状ＰＥＧが含まれる。（例えば、Ｍｅｒｒｉｌｌ，米国特許第５，１７１，２６４号；Ｈａｒｒｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｕｌｔｉａｒｍｅｄ，ｍｏｎｏｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ，ｐｏｌｙｍｅｒ　ｆｏｒ　ｃｏｕｐｌｉｎｇ　ｔｏ　ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ　ａｎｄ　ｓｕｒｆａｃｅｓ，米国特許第５，９３２，４６２号；Ｓｈｅｎ，Ｎ-ｍａｌｅｉｍｉｄｙｌ　ｐｏｌｙｍｅｒ　ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ，米国特許第６，６０２，４９８号を参照）。

【００３６】

「ペプチボディ」という用語は、F^1及び／又はF^2が、免疫グロブリンＦｃドメイン又はF_cのＣＨ２ドメインなどのその一部である式Ｉの分子、又はF^1及びF^2が、それぞれ、トキシンペプチドがF^1及びF^2の間に挿入されたＦｃドメインであるように、トキシンペプチドがヒトＩｇＧ１Ｆｃドメインループ中に挿入された式Ｉの分子を表す（例えば、本明細書の図７０～７３及び実施例４９を参照。）。本発明のペプチボディは、本明細書にさらに記載されているように、Ｆｃドメイン若しくはその一部の何れかにおいて、若しくは本発明の組成物のトキシンペプチド部分において、又は両方においてＰＥＧ化することも可能である。

【００３７】

「固有Ｆｃ」という用語は、単量体形態であれ、又は多量体形態であれ、完全な抗体の消化から得られる非抗原結合断片の配列を含む分子又は配列を表す。固有Ｆｃの元の免疫グロブリン源は、好ましくは、ヒト由来であり、免疫グロブリンの何れでもあり得るが、ＩｇＧ１又はＩｇＧ２が好ましい。固有Ｆｃは、共有（すなわち、ジスルフィド結合）及び非共有会合によって、二量体又は多量体形態へと連結されることが可能な単量体ポリペプチドから構成される。固有Ｆｃ分子の単量体サブユニット間の分子間ジスルフィド結合の数は、クラス（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＥ）又はサブクラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＡ１、ＩｇＧＡ２）に応じて、１から４の範囲である。天然Ｆｃの一例は、ＩｇＧのパパイン消化から得られるジスルフィド結合された二量体である

（Ｅｌｌｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８２），Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１０：４０７１－９参照）。本明細書において使用される「固有Ｆｃ」という用語は、単量体、二量体及び多量体形態の総称である。

【００３８】

「Ｆｃバリアント」という用語は、固有Ｆｃから修飾されているが、サルベージ受容体であるＦｃＲｎに対する結合部位をなお含む分子又は配列を表す。幾つかの公開された特許文献が、典型的なＦｃバリアント及びサルベージ受容体との相互作用を記載している。国際出願ＷＯ ９７／３４６３１（１９７９年９月２５日に公開；ＷＯ９６／３２４７８号、 ２０００年８月１日に付与された米国特許第６，０９６，８９１号に対応、その全体が、参照により、本明細書に組み込まれる；及びＷＯ ０４／１１０４７２号を参照。従って、「Ｆｃバリアント」という用語には、非ヒト固有Ｆｃからヒト化された分子又は配列が含まれる。さらに、除去可能な部位は、本発明の融合分子に対して必要とされない構造的特徴又は生物学的活性を与えるので、固有Ｆｃは、除去可能な部位を含む。従って、「Ｆｃバリアント」という用語は、（１）ジスルフィド結合形成、（２）選択された宿主細胞との非適合性、（３）選択された宿主細胞中で発現された際のＮ末端不均一性、（４）グリコシル化、（５）補体との相互作用、（６）サルベージ受容体以外のＦｃ受容体への結合又は（７）抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）に影響を与えるか、又はこれらに関与する１つ又はそれ以上の固有Ｆｃ部位又は残基を欠如する分子又は配列を含む。Ｆｃバリアントは、以下でさらに詳しく記載されている。

【００３９】

「Ｆｃドメイン」という用語は、上記定義の固有Ｆｃ及びＦｃバリアント分子及び配列を包含する。Ｆｃバリアント及び固有Ｆｃにおけるごとく、「Ｆｃドメイン」という用語には、完全な抗体から消化されたものであれ、又はその他の手段によって産生されたものであれ、単量体又は多量体形態の分子が含まれる。

【００４０】

Ｆｃドメイン又はＦｃドメインを含む分子に対して用いられる「多量体」という用語は、共有的に、非共有的に、又は共有的相互作用及び非共有的相互作用の両者によって会合された２つ又はそれ以上のポリペプチド鎖を有する分子を表す。ＩｇＧ分子は、典型的には、二量体を形成し、ＩｇＭは五量体；ＩｇＤは二量体及びＩｇＡは単量体、二量体、三量体又は四量体を形成する。当業者は、Ｆｃの固有Ｉｇ源の配列若しくは生じた活性を調べることによって、又はこのような固有Ｆｃを誘導体化（以下に定義されている。）することによって、多量体を形成することが可能である。

【００４１】

Ｆｃドメイン又はＦｃドメインを含む分子に対して用いられる「二量体」という用語は、共有的に又は非共有的に会合された２つのポリペプチド鎖を有する分子を表す。従って、本発明の範囲に属する典型的な二量体が、図２に示されている。

【００４２】

「誘導体化する」及び「誘導体」又は「誘導体化された」という用語は、それぞれ、（１）化合物が、環状部分、例えば、化合物内のシステイン残基間の架橋を有する；（２）化合物が架橋され、又は架橋部位を有する、例えば、化合物がシステイン残基を有し、従って、培養若しくはインビボにおいて架橋された二量体を形成する；（３）非ペプチド結合によって、１つ又はそれ以上のペプチド結合が置換されている；（４）Ｎ末端が、－ＮＲＲ^{1}、ＮＲＣ（Ｏ）Ｒ^{1}、－ＮＲＣ（Ｏ）ＯＲ^{1}、－ＮＲＳ（Ｏ）$_{2}$Ｒ^{1}、－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨＲ、スクシンイミド基又は置換された若しくは置換されていないベンジルオキシカルボニル－ＮＨ－（Ｒ及びＲ^{1}及び環置換基は、以下で定義されているとおりである。）；（５）Ｃ末端が－Ｃ（Ｏ）Ｒ^{2}又は－ＮＲ^{3}Ｒ^{4}によって置換されている（Ｒ^{2}、Ｒ^{3}及びＲ^{4}は、以下に定義されているとおりである。）；並びに（６）選択された側鎖又は末端残基と反応することができる因子での処理を通じて、各アミノ酸部分が修飾されている化合物、プロセス及び得られた化合物を含む。誘導体は、さらに、以下に記載されている。

【００４３】
「ペプチド」という用語は、２～約８０アミノ酸残基の分子を表し、約１０～約６０アミノ酸残基の分子が好ましく、約３０～約５０アミノ酸残基の分子が最も好ましい。典型的なペプチドは、あらゆる公知の方法によって無作為に作製され、ペプチドライブラリー（例えば、ファージディスプレイライブラリー）中に担持され、又はタンパク質の消化によって得ることができる。本発明の組成物の何れのペプチド部分、例えば、本明細書に記載されているトキシンペプチド又はペプチドリンカー部分においても、所定の配列のＮ末端又はＣ末端の一方又は両方に、追加のアミノ酸を含めることが可能である。もちろん、これらの追加のアミノ酸残基は、組成物の機能的活性を著しく妨害すべきでない。「トキシンペプチド」には、毒から単離することが可能な薬理学的に活性な天然に存在するペプチドの同じアミノ酸配列を有するペプチドが含まれ、天然に存在するこのような分子の修飾されたペプチド類縁体も含まれる。本発明を実施する上で有用なトキシンペプチドの例は、表１～３２に列記されている。トキシンペプチド（図２における「Ｐ」又は「$Ｐ^{1}$」として示されている均等物）は、例えば、図９に示されているように、少なくとも２つのペプチド内ジスルフィド結合を含む。

【００４４】
従って、本発明は、
ａ）$Ｃ^{1}$－$Ｃ^{3}$及び$Ｃ^{2}$－$Ｃ^{4}$ジスルフィド結合（$Ｃ^{1}$、$Ｃ^{2}$、$Ｃ^{3}$及び$Ｃ^{4}$は、ペプチドのＮ末端が左側に配置された慣用表記のトキシンペプチドの一次配列中にシステイン残基が現れる順序を表しており、アミノ酸配列中の第一及び第三のシステインがジスルフィド結合を形成し、並びに第二及び第四のシステインがジスルフィド結合を形成する。）。このような$Ｃ^{1}$－$Ｃ^{3}$、$Ｃ^{2}$－$Ｃ^{4}$ジスルフィド結合パターンを有するトキシンペプチドの例には、アパミンペプチド、α－コノペプチド、ＰｎｌＡペプチドＰｎｌＢペプチド及びＭＩＩペプチド並びに前記の何れかの類縁体が含まれるが、これらに限定されない。

【００４５】
ｂ）$Ｃ^{1}$－$Ｃ^{6}$、$Ｃ^{2}$－$Ｃ^{4}$及び$Ｃ^{3}$－$Ｃ^{5}$ジスルフィド結合（上述のように、$Ｃ^{1}$、$Ｃ^{2}$、$Ｃ^{3}$、$Ｃ^{4}$、$Ｃ^{5}$及び$Ｃ^{6}$は、ペプチドのＮ末端が左側に配置された慣用表記のトキシンペプチドの一次配列中にシステイン残基が現れる順序を表しており、アミノ酸配列中の第一及び第六のシステインがジスルフィド結合を形成し、第二及び第四のシステインがジスルフィド結合を形成し、並びに第三及び第五のシステインがジスルフィド結合を形成する。）。このような$Ｃ^{1}$－$Ｃ^{6}$、$Ｃ^{2}$－$Ｃ^{4}$、$Ｃ^{3}$－$Ｃ^{5}$ジスルフィド結合パターンを有するトキシンペプチドの例には、ＳｈＫ、ＢｇＫ、ＨｍＫ、ＡｅＫＳ、ＡｓＫ及びＤＴＸ１並びに前記の何れかの類縁体が含まれるが、これらに限定されない。

【００４６】
ｃ）$Ｃ^{1}$－$Ｃ^{4}$、$Ｃ^{2}$－$Ｃ^{5}$及び$Ｃ^{3}$－$Ｃ^{6}$ジスルフィド結合（上記のように、$Ｃ^{1}$、$Ｃ^{2}$、$Ｃ^{3}$、$Ｃ^{4}$、$Ｃ^{5}$及び$Ｃ^{6}$は、ペプチドのＮ末端が左側に配置された慣用表記のトキシンペプチドの一次配列中にシステイン残基が現れる順序を表しており、アミノ酸配列中の第一及び第四のシステインがジスルフィド結合を形成し、第二及び第五のシステインがジスルフィド結合を形成し、並びに第三及び第六のシステインがジスルフィド結合を形成する。）。このような$Ｃ^{1}$－$Ｃ^{4}$、$Ｃ^{2}$－$Ｃ^{5}$、$Ｃ^{3}$－$Ｃ^{6}$ジスルフィド結合パターンを有するトキシンペプチドの例には、ＣｈＴｘ、ＭｇＴｘ、ＯＳＫ１、ＫＴＸ１、ＡｇＴｘ２、Ｐｉ２、Ｐｉ３、ＮＴＸ、ＨｇＴｘ１、ＢｅＫＭ１、ＢｍＫＴＸ、Ｐ０１、ＢｍＫＫ６、Ｔｃ３２、Ｔｃ１、ＢｍＴｘ１、ＢｍＴＸ３、ＩｂＴｘ、Ｐ０５、ＳｃｙＴｘ、ＴｓＫ、ＨａＴｘ１、ＰｒｏＴＸ１、ＰａＴＸ２、Ｒｕ１、ωＧＶＩＡ、ωＭＶＩＩＡ及びＳｍＩＩＩａ並びに前記の何れかの類縁体が含まれるが、これらに限定されない。

【００４７】
ｄ）$Ｃ^{1}$－$Ｃ^{5}$、$Ｃ^{2}$－$Ｃ^{6}$、$Ｃ^{3}$－$Ｃ^{7}$及び$Ｃ^{4}$－$Ｃ^{8}$ジスルフィド結合（$Ｃ^{1}$、$Ｃ^{2}$、$Ｃ^{3}$、$Ｃ^{4}$、$Ｃ^{5}$、$Ｃ^{6}$、$Ｃ^{7}$及び$Ｃ^{8}$は、ペプチドのＮ末端が左側に配置された慣用表記のトキシンペプチド一次配列中にシステイン残基が現れる順序を表しており、アミノ酸配列中の第一及び第五のシステインがジスルフィド結合を形成し、第二及び第六のシ

ステインがジスルフィド結合を形成し、第三及び第七のシステインがジスルフィド結合を形成し、並びに第四及び第八のシステインがジスルフィド結合を形成する。）。このようなC1-C5、C2-C6、C3-C7、C4-C8ジスルフィド結合パターンを有するトキシンペプチドの例には、アニュオロクトキシン（ＡｎＴｘ）、Ｐｉ１、ＨｓＴｘ１、ＭＴＸ（Ｐ１２Ａ，Ｐ２０Ａ）及びＰｉ４ペプチド並びに前記の何れかの類縁体が含まれるが、これらに限定されない。

【００４８】

ｅ）C1-C4、C2-C6、C3-C7及びC5-C8ジスルフィド結合（C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7及びC8は、ペプチドのＮ末端が左側に配置された慣用表記のトキシンペプチドの一次配列中にシステイン残基が現れる順序を表しており、アミノ酸配列中の第一及び第四のシステインがジスルフィド結合を形成し、第二及び第六のシステインがジスルフィド結合を形成し、第三及び第七のシステインがジスルフィド結合を形成し、並びに第五及び第八のシステインがジスルフィド結合を形成する。）。このようなC1-C4、C2-C6、C3-C7、C5-C8ジスルフィド結合パターンを有するトキシンペプチドの例には、クロロトキシン、Ｂｍ-１２ｂ及び何れかの類縁体が含まれるが、これらに限定されない。

【００４９】

ｆ）C1-C5、C2-C6、C3-C4及びC7-C8ジスルフィド結合（C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7及びC8は、ペプチドのＮ末端が左側に配置された慣用表記のトキシンペプチドの一次配列中にシステイン残基が現れる順序を表しており、アミノ酸配列中の第一及び第五のシステインがジスルフィド結合を形成し、第二及び第六のシステインがジスルフィド結合を形成し、第三及び第四のシステインがジスルフィド結合を形成し、並びに第七及び第八のシステインがジスルフィド結合を形成する。）。このようなC1-C5、C2-C6、C3-C4、C7-C8ジスルフィド結合パターンを有するトキシンペプチドの例には、マウロトキシン及びその類縁体が含まれるが、これらに限定されない。

を含む分子に関する。

【００５０】

ペプチド配列を表すために使用される「無作為化された」という用語は、（例えば、ファーディスプレイ法によって選択された）完全に無作為な配列及び天然に存在する分子の１つ又はそれ以上の残基が、天然に存在する分子中の位置に出現しないアミノ酸残基によって置換された配列を表す。ペプチド配列を同定するための典型的な方法には、ファージディスプレイ、Ｅ．コリディスプレイ、リボソームディスプレイ、酵母を基礎としたスクリーニング、ＲＮＡ-ペプチドスクリーニング、化学的スクリーニング、合理的設計、タンパク質構造分析などが含まれる。

【００５１】

「薬理学的に活性な」という用語は、このようにして記載された物質が、医学的パラメータ（例えば、血圧、血液細胞数、コレステロールレベル）又は病状（例えば、癌、自己免疫疾患）に影響を与える活性を有することが決定される。従って、薬理学的に活性なペプチドは、以下に定義されている、アゴニストペプチド又は模倣的ペプチド及びアンタゴニストペプチドを含む。

【００５２】

「模倣的ペプチド」及び「アゴニストペプチド」という用語は、天然に存在するトキシンペプチド分子（例えば、天然に存在するＳｈＫトキシンペプチド）と同等の生物学的活性を有するペプチドを表す。さらに、これらの用語は、天然に存在する分子の効果を強化することによるなど、天然に存在するトキシンペプチド分子の活性を間接的に模倣するペプチドを含む。

【００５３】

「アンタゴニストペプチド」又は「阻害剤ペプチド」という用語は、対象の受容体（イオンチャンネルなど（但し、これに限定されない。））の生物活性を遮断し、若しくは何

らかの方法で妨害するペプチド、又は対象の受容体の公知のアンタゴニスト若しくは阻害剤と同等の生物活性を有するペプチドを表す。

【００５４】

「酸性残基」という用語は、酸性基を含む側鎖を有するＤ型又はＬ型のアミノ酸残基を表す。典型的な酸性残基は、Ｄ及びＥを含む。

【００５５】

「アミド残基」という用語は、酸性基のアミド誘導体を含む側鎖を有するＤ型又はＬ型のアミノ酸を表す。典型的な残基は、Ｎ及びＱを含む。

【００５６】

「芳香族残基」という用語は、芳香族基を含む側鎖を有するＤ型又はＬ型のアミノ酸残基を表す。典型的な芳香族残基は、Ｆ、Ｙ及びＷを含む。

【００５７】

「塩基性残基」という用語は、塩基性基を含む側鎖を有するＤ型又はＬ型のアミノ酸残基を表す。典型的な塩基性残基には、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ‐メチル‐アルギニン、ω‐アミノアルギニン、ω‐メチル‐アルギニン、１‐メチル‐ヒスチジン、３‐メチル‐ヒスチジン及びホモアルギニン（ｈＲ）残基が含まれる。

【００５８】

「親水性残基」という用語は、極性基を含む側鎖を有するＤ型又はＬ型のアミノ酸残基を表す。典型的な親水性残基には、Ｃ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｑ、Ｄ、Ｅ、Ｋ及びシトルリン（Ｃｉｔ）残基が含まれる。

【００５９】

「非官能性残基」という用語は、酸性、塩基性又は芳香族基を欠如する側鎖を有するＤ型又はＬ型のアミノ酸残基を表す。典型的な非官能性アミノ酸残基には、Ｍ、Ｇ、Ａ、Ｖ、Ｉ、Ｌ及びノルロイシン（Ｎｌｅ）が含まれる。

【００６０】

「中性極性残基」という用語は、塩基性、酸性又は極性基を欠如する側鎖を有するＤ型又はＬ型のアミノ酸残基を表す。典型的な中性極性アミノ酸残基には、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｐ、Ｗ、Ｍ及びＦが含まれる。

【００６１】

「極性疎水性残基」という用語は、極性基を含む側鎖を有するＤ型又はＬ型のアミノ酸残基を表す。典型的な極性アミノ酸残基には、Ｔ、Ｇ、Ｓ、Ｙ、Ｃ、Ｑ及びＮが含まれる。

【００６２】

「疎水性残基」という用語は、塩基性又は酸性基を欠如する側鎖を有するＤ型又はＬ型のアミノ酸残基を表す。典型的な疎水性アミノ酸残基には、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｐ、Ｗ、Ｍ、Ｆ、Ｔ、Ｇ、Ｓ、Ｙ、Ｃ、Ｑ及びＮが含まれる。

【００６３】

本発明の組成物の幾つかの有用な実施形態において、固有ＳｈＫ又はＯＳＫ１配列、それらのペプチド類縁体、又は表１～３２の何れかに記載されているアミノ酸配列を有する他の何れかのトキシンペプチドなど（但し、これらに限定されない。）、対象の固有トキシンペプチド配列に比べて、１つ又はそれ以上の様式で、トキシンペプチドのアミノ酸配列が修飾されている。

【００６４】

１つ又はそれ以上の有用な修飾には、公知の化学的技術によって達成される、アミノ酸の付加又は挿入、アミノ酸の欠失、ペプチド末端切断、アミノ酸置換及び／又はアミノ酸残基の化学的誘導体化が含まれ得る。このような修飾は、例えば、強化された効力、選択性及び／又はタンパク分解に対する安定性などを目的として為され得る。当業者は、アラニンスキャニング、公知のトキシンペプチド配列を用いた、アラインメントを介した突然変異導入に基づく合理的設計及び／又は分子モデリングなど、このような増強された特性を有するペプチド類縁体を設計するための技術を知悉している。例えば、ＳｈＫ類縁体は

、ＨｍＫを用いた、アラインメントを介した突然変異導入（例えば、図６参照）及び分子モデリングに部分的に基づいて、本発明のＳｈＫペプチド含有組成物又は本発明のＳｈＫ類縁体含有組成物中のプロテアーゼ切断部位（例えば、Ｋ若しくはＲ残基におけるトリプシン切断部位及び／又はＦ、Ｙ若しくはＷ残基におけるキモトリプシン切断部位）を除去するために設計することが可能である。（例えば、Ｋａｌｍａｎ ｅｔ ａｌ．，ＳｈＫ－Ｄａｐ２２，ａ ｐｏｔｅｎｔ Ｋｖ１．３－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｉｍｍｕｎｏｓｕｐｐｒｅｓｓｉｖｅ ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７３（４９）：３２６９７－７０７（１９９８）；Ｋｅｒｎ ｅｔ ａｌ．，米国特許第６，０７７，６８０号；Ｍｏｕｈａｔ ｅｔ ａｌ．，ＯｓＫ１ ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ，ＷＯ ２００６／００２８５０ Ａ２）参照）。

【００６５】

「プロテアーゼ」という用語は、「ペプチダーゼ」と同義である。プロテアーゼは、タンパク質内の点でペプチド結合を切断するエンドペプチダーゼ、及び、それぞれ、Ｎ末端又はＣ末端の何れから１つ又はそれ以上のアミノ酸を除去するエキソペプチダーゼという酵素の２つの群を含む。「プロテイナーゼ」という用語は、「エンドペプチダーゼ」に対する同義語としても使用される。プロテイナーゼの４つの機構的クラスは、セリンプロテイナーゼ、システインプロテイナーゼ、アスパラギン酸プロテイナーゼ及びメタロプロテイナーゼである。これらの４つの機構的クラスの他に、同定されていない触媒機構のプロテアーゼに対して割り当てられる酵素命名法の部門が存在する。これは、触媒機構が特定されていないことを示している。

【００６６】

切断サブサイト命名法は、Ｓｃｈｅｃｈｔｅｒ とＢｅｒｇｅｒによって作製されたスキームから一般に採用されている（Ｓｃｈｅｃｈｔｅｒ Ｉ．＆ Ｂｅｒｇｅｒ Ａ．，Ｏｎ ｔｈｅ ｓｉｚｅ ｏｆ ｔｈｅ ａｃｔｉｖｅ ｓｉｔｅ ｉｎ ｐｒｏｔｅａｓｅｓ．Ｉ．Ｐａｐａｉｎ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎｄ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎ，２７：１５７（１９６７）；Ｓｃｈｅｃｈｔｅｒ Ｉ．＆ Ｂｅｒｇｅｒ Ａ．，Ｏｎ ｔｈｅ ａｃｔｉｖｅ ｓｉｔｅ ｏｆ ｐｒｏｔｅａｓｅｓ．３．Ｍａｐｐｉｎｇ ｔｈｅ ａｃｔｉｖｅ ｓｉｔｅ ｏｆ ｐａｐａｉｎ；ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ｐｅｐｔｉｄｅｓ ｏｆ ｐａｐａｉｎ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎｄ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎ，３２：８９８（１９６８））。このモデルに従って、切断を経験する基質中のアミノ酸残基は、切断された結合からＮ末端の方向に、Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３、Ｐ４などと表記される。同様に、Ｃ末端方向での残基は、Ｐ１’、Ｐ２’、Ｐ３’、Ｐ４’などと表記される。

【００６７】

当業者は、目的のプロテアーゼ結合部位又はプロテアーゼ切断部位を特定するための様々なツールを知悉している。例えば、Ｓｗｉｓｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ（ＳＩＢ；ｗｗｗ．ｅｘｐａｓｙ．ｏｒｇ／ｔｏｏｌｓ／ｐｅｐｔｉｄｅｃｕｔｔｅｒ）のＥｘＰＡＳｙ（Ｅｘｐｅｒｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｓｙｓｔｅｍ）プロテオミクスサーバを通じて、ＰｅｐｔｉｄｅＣｕｔｔｅｒソフトウェアツールを入手することが可能である。ＰｅｐｔｉｄｅＣｕｔｔｅｒは、ＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴ及び／又はＴｒＥＭＢＬデータベース又はユーザが入力したタンパク質配列から、プロテアーゼ切断部位についてタンパク質配列を検索する。単一のプロテアーゼ及び化学物質、プロテアーゼ及び化学物質の選択又は完全なリストを使用することが可能である。酵素名に従ってアルファベットでグループ化されるか、又は順次、アミノ酸番号に従ってグループ化された切断部位の表という、結果の出力の様々な形態が入手可能である。出力のための第三の選択肢は、切断部位のマップである。マップにマッピングされた配列及び切断部位は、ブロックにグループ化され、そのサイズは、ユーザによって選択されることができる。プロテアーゼ切断部位を決定するための他のツールも公知である。（例えば、Ｔｕｒｋ，Ｂ．ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｔｅｒｍｉｎａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅａｓ

e cleavage site motifs using mixture-based oriented peptide libraries, Nature Biotechnology, 19:661-667(2001); Barrett A.et al., Handbook of proteolytic enzymes, Academic Press(1998))。

【0068】

セリンプロテイナーゼには、キモトリプシン、トリプシン又はエラスターゼ又はカリクレインなどの哺乳動物のプロテアーゼ酵素を含むキモトリプシンファミリーが含まれる。セリンプロテイナーゼは、基質残基と相互作用する様々な酵素サブサイト中のアミノ酸置換に関連する異なる基質特異性を示す。幾つかの酵素は、基質との幅広い相互作用部位を有するが、他の酵素はP1基質残基に限定した特異性を有する。

【0069】

トリプシンは、位置P1のR又はKで優先的に切断する。Keil(1992)によって実施された統計学的研究は、トリプシン切断時における、Arg結合及びLys結合を取り囲む残基(すなわち、それぞれ、位置P2及びP1')の負の影響を記載した。(Keil, B., Specificity of proteolysis, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-NewYork, 335(1992))。位置P1'中のプロリン残基は、通常、トリプシン切断に対して強力な負の影響を発揮する。同様に、P1'中のR及びK並びに位置P2及びP1'における負に帯電した残基は阻害をもたらす。

【0070】

キモトリプシンは、位置P1のW、Y又はFで優先的に切断し(高親和性)、これより低い程度で、位置P1のL、M又はH残基で切断する。(Keil, 1992)。これらの規則に対する例外は、以下のとおりである。Wが位置P1に見出され、M又はPが、同時に位置P1'に見出される場合には、切断は遮断される。さらに、位置P1'におけるプロリン残基は、位置P1に見出されるアミノ酸とは無関係に、切断をほぼ完全に遮断する。M残基が位置P1に見出される場合には、切断は、位置P1'におけるY残基の存在によって遮断される。最後に、Hが位置P1に位置する場合には、D、M又はW残基の存在も、切断を遮断する。

【0071】

膜メタロエンドペプチダーゼ(NEP;中性エンドペプチダーゼ、腎臓刷子縁中性プロテイナーゼ、エンケファリナーゼ、EC3.4.24.11)は、疎水性アミノ酸残基のアミノ側でペプチドを切断する。(Connelly, JC et al., Neutral Endopeptidase 24.11 in Human Neutrophils: Cleavage of Chemotactic Peptide, PNAS, 82(24):8737-8741(1985))。

【0072】

トロンビンは、位置P1のR残基で優先的に切断する。(Keil, 1992)。トロンビンの天然基質は、フィブリノーゲンである。最適な切断部位は、R残基が位置P1に存在し、Glyが位置P2及び位置P1'に存在する場合である。同様に、疎水性アミノ酸残基が位置P4及び位置P3に見出される場合には、位置P2におけるプロリン残基、位置P1におけるR残基並びに位置P1'及び位置P2'における非酸性アミノ酸残基。その天然基質であるフィブリノーゲンに対する極めて重要な残基は、P10中のD残基である。

【0073】

カスパーゼは、保存されたアミノ酸配列を有する活性部位を有し、及びD残基の後ろでペプチドを特異的に切断するシステインプロテアーゼのファミリーである。(Earnshaw WC et al., Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis, Annual Review of Biochem

ｉｓｔｒｙ，６８：３８３－４２４（１９９９））。

【００７４】

Ａｒｇ－Ｃプロテイナーゼは、位置Ｐ１のＲ残基で優先的に切断する。切断の挙動は、位置Ｐ１’の残基によって、穏やかに影響を受けるに過ぎないように見受けられる。（Ｋｅｉｌ，１９９２）。Ａｓｐ－Ｎエンドペプチダーゼは、位置Ｐ１’のＤ残基との結合を特異的に切断する。（Ｋｅｉｌ，１９９２）。

【００７５】

前述の記載は単なる例示に過ぎず、当業者が本発明を実施する際に除去することに関心を抱き得るプロテアーゼ結合及び／又は切断部位に関して、当業者に利用可能な知識を網羅的に取り扱ったものではない。

【００７６】

他の例では、天然に存在するペプチドアミノ酸配列から修飾されるトキシンペプチドアミノ酸配列は、目的の固有トキシンペプチド配列のアミノ酸と比べて、その中に挿入又は置換された少なくとも１つのアミノ酸残基を含み、ここにおいて、挿入又は置換されたアミノ酸残基は、ペプチドがリンカー又は半減期延長部分に抱合される求核的又は求電子的反応性官能基を含む側鎖を有する。本発明に従えば、このような求核的又は求電子的反応性官能基の有用な例には、チオール、一級アミン、セレノ、ヒドラジド、アルデヒド、カルボン酸、ケトン、アミノオキシ、遮蔽された（保護された）アルデヒド又は遮蔽された（保護された）ケト官能基が含まれるが、これらに限定されるものではない。求核的反応性官能基を含む側鎖を有するアミノ酸残基の例には、リジン残基、α，β－ジアミノプロピオン酸残基、α，γ－ジアミノ酪酸残基、オルニチン残基、システイン、ホモシステイン、グルタミン酸残基、アスパラギン酸残基又はセレノシステイン残基が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【００７７】

本明細書においてトキシンペプチドをさらに記載する際には、天然に存在するペプチド及びタンパク質中に一般的に取り込まれる２０の「標準」アミノ酸残基の種類を表すために、一文字略号システムがしばしば適用される（表１Ａ）。このような一文字略号は、意味の上で、三文字略号又は省略されていないアミノ酸名と完全に互換的である。本明細書に使用されている一文字略号システムにおいて、本明細書に別段の記載がなければ、大文字はＬアミノ酸を示し、小文字はＤアミノ酸を示す。例えば、略号「Ｒ」はＬ－アルギニンを表し、略号「ｒ」はＤ－アルギニンを表す。

【００７８】

【表１】

表１Ａ　標準アミノ酸に対する一文字略号。
三文字略号はカッコ内に記載されている。

アラニン（Ａｌａ）	Ａ
グルタミン（Ｇｌｎ）	Ｑ
ロイシン（Ｌｅｕ）	Ｌ
セリン（Ｓｅｒ）	Ｓ
アルギニン（Ａｒｇ）	Ｒ
グルタミン酸（Ｇｌｕ）	Ｅ
リジン（Ｌｙｓ）	Ｋ
スレオニン（Ｔｈｒ）	Ｔ
スパラギン（Ａｓｎ）	Ｎ
グリシン（Ｇｌｙ）	Ｇ
メチオニン（Ｍｅｔ）	Ｍ
トリプトファン（Ｔｒｐ）	Ｗ
アスパラギン酸（Ａｓｐ）	Ｄ
ヒスチジン（Ｈｉｓ）	Ｈ
フェニルアラニン（Ｐｈｅ）	Ｆ
チロシン（Ｔｙｒ）	Ｙ
システイン（Ｃｙｓ）	Ｃ
イソロイシン（Ｉｌｅ）	Ｉ
プロリン（Ｐｒｏ）	Ｐ
バリン（Ｖａｌ）	Ｖ

【００７９】
本明細書において、アミノ酸配列中のアミノ酸置換は、特定の位置におけるアミノ酸残基に対する一文字略号に続き、目的の固有トキシンペプチド配列に対する数字のアミノ酸位置、次いで、これに続く、置換されたアミノ酸残基に対する一文字記号によって典型的に表される。例えば、「Ｔ３０Ｄ」は、仮想の固有トキシンペプチド配列に対して、アミノ酸位置３０におけるアスパラギン酸残基によるスレオニン残基の置換を表す。さらなる例として、「Ｒ１８ｈＲ」又は「Ｒ１８Ｃｉｔ」は、仮想の固有トキシンペプチド配列に対して、それぞれ、アミノ酸位置１８におけるホモアルギニン又はシトルリン残基によるアルギニン残基の置換を表す。本明細書に記載されているあらゆる特定のトキシンペプチド（又はペプチド類縁体）のアミノ酸配列内のアミノ酸位置は、ペプチドアミノ酸配列のＮ末端又はＣ末端を、適宜、固有トキシンペプチド配列のＮ末端又はＣ末端と併置して決定されるように、固有配列に対するその位置とは異なり得る。例えば、このようにして、固有のＳｈＫ（１－３５）（配列番号５）のＣ末端と併置された配列ＳＣＩＤＴＩＰＫＳＲＣＴＡＦＱＣＫＨＳＭＫＹＲＬＳＦＣＲＫＴＣＧＴＣ（ＳｈＫ（２－３５）；配列番号９２）（固有ＳｈＫ配列のＮ末端切断）のアミノ酸位置１は、固有配列におけるアミノ酸位置２に対応し、配列番号９２のアミノ酸位置３４は、固有配列（配列番号５）におけるアミノ酸位置３５に対応する。
【００８０】
本発明のある種の実施形態において、アミノ酸置換は、（ペプチド又はタンパク質中では）天然には稀なアミノ酸残基又は非天然アミノ酸残基を含むことができる非標準アミノ酸残基を包含する。非標準アミノ酸残基は、組換え的に発現する細胞などの生物学的系での合成によるより、むしろ、化学的ペプチド合成によってペプチド中に取り込むことが可能であり、あるいは、当業者は、組換え的に発現している細胞を使用するタンパク質工学

の公知の技術を使用することが可能である。（例えば、Ｌｉｎｋ ｅｔ ａｌ．，Ｎｏｎ－ｃａｎｏｎｉｃａｌ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄｓ ｉｎ ｐｒｏｔｅｉｎ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１４（６）：６０３－６０９（２００３）参照）。「非標準アミノ酸残基」という用語は、天然に存在するタンパク質中に一般的に取り込まれる２０個の標準アミノ酸に属さないＤ又はＬ型のアミノ酸残基、例えば、β－アミノ酸、ホモアミノ酸、環状アミノ酸及び誘導体化された側鎖を有するアミノ酸を表す。例には、（Ｌ型又はＤ型の）：シトルリン（Ｃｉｔ）、ホモシトルリン（ｈＣｉｔ）、Ｎ－メチルシトルリン（ＮＭｅＣｉｔ）、Ｎ－メチルホモシトルリン（ＮＭｅＨｏＣｉｔ）、オルニチン（Ｏｒｎ又はＯ）、Ｎ－メチルオルニチン（ＮＭｅＯｒｎ）、サルコシン（Ｓａｒ）、ホモリジン（ｈＫ 又はＨｌｙｓ）、ホモアルギニン（ｈＲ又はｈＡｒｇ）、ホモグルタミン（ｈＱ）、Ｎ－メチルアルギニン（ＮＭｅＲ）、Ｎ－メチルロイシン（ＮＭｅＬ）、Ｎ－メチルホモリジン（ＮＭｅＨｏＫ）、Ｎ－メチルグルタミン（ＮＭｅＱ）、ノルロイシン（ＮＩｅ）、ノルバリン（Ｎｖａ）、１、２、３、４－テトラヒドロイソキノリン（Ｔｉｃ）、ニトロフェニルアラニン（ｎｉｔｒｏｐｈｅ）、アミノフェニルアラニン（ａｍｉｎｏｐｈｅ）、ベンジルフェニルアラニン（ｂｅｎｚｙｌｐｈｅ）、γ－カルボキシグルタミン酸（γ－ｃａｒｂｏｘｙｇｌｕ）、ヒドロキシプロリン（ｈｙｄｒｏｘｙｐｒｏ）、ｐ－カルボキシル－フェニルアラニン（Ｃｐａ）、α－アミノアジピン酸（Ａａｄ）、アセチルアルギニン（ａｃｅｔｙｌａｒｇ）、α、β－ジアミノプロピオン酸（Ｄｐｒ）、α、γ－ジアミノ酪酸（Ｄａｂ）、ジアミノプロピオン酸（Ｄａｐ）、β－（１－ナフチル）－アラニン（１Ｎａｌ）、β－（２－ナフチル）－アラニン（２Ｎａｌ）、シクロヘキシルアラニン（Ｃｈａ）、４－メチル－フェニルアラニン（ＭｅＰｈｅ）、β，β－ジフェニル－アラニン（ＢｉＰｈＡ）、アミノ酪酸（Ａｂｕ）、４－フェニル－フェニルアラニン（４Ｂｉｐ）、α－アミノ－イソ酪酸（Ａｉｂ）及び本明細書に記載されているこれらの何れかの誘導体化された形態が含まれる。ＵＰＡＣ－ＩＵＢ生物化学の命名法に関する合同委員会（ＪＣＢＮ）によるアミノ酸及びペプチドに対する命名法及び記号表記は、以下の文書：Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．，１９８４，２１９，３４５－３７３；Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１９８４，１３８，９－３７；１９８５，１５２，１；１９９３，２１３，２；Ｉｎｔｅｒｎａｔ．Ｊ．Ｐｅｐｔ．Ｐｒｏｔ．Ｒｅｓ．，１９８４，２４，ｆｏｌｌｏｗｉｎｇ ｐ ８４；Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，１９８５，２６０，１４－４２；Ｐｕｒｅ Ａｐｐｌ．Ｃｈｅｍ．，１９８４，５６，５９５－６２４；Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄｓ ａｎｄ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ，１９８５，１６，３８７－４１０；Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ ａｎｄ Ｒｅｌａｔｅｄ Ｄｏｃｕｍｅｎｔｓ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｐｏｒｔｌａｎｄ Ｐｒｅｓｓ，１９９２，ｐａｇｅｓ ３９－６９］に公表されている。

【００８１】

本明細書に記載されているように、本発明に従って、トキシンペプチド又はペプチドリンカーなどの本発明の組成物のペプチド部分は、１つ又はそれ以上のアミノ酸残基において化学的に誘導体化することも可能である。誘導体化されたアミノ酸残基を含有するペプチドは、公知の有機化学技術によって合成することが可能である。ペプチドという文脈における「化学的誘導体」又は「化学的に誘導体化された」とは、官能的側基の反応によって化学的に誘導体化された１つ又はそれ以上の残基を有する対象ペプチドを表す。このような誘導体化された分子には、例えば、遊離のアミノ基が、アミン塩酸塩、ｐ－トルエンスルホニル基、カルボベンゾオキシ基、ｔ－ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基又はホルミル基を形成するように誘導体化されている分子が含まれる。遊離のカルボキシル基は、塩、メチル及びエチルエステル又はエステル若しくはヒドラジドの他の種類を形成するように誘導体化され得る。遊離の水酸基は、Ｏ－アシル又はＯ－アルキル誘導体を形成するように誘導体化され得る。ヒスチジンのイミダゾール窒素は、Ｎ－ｉｍ－ベンジルヒスチジンを形成するように誘導体化され得る。Ｌ型又はＤ型を問わず、２０個の標準アミノ酸の１つ又はそれ以上の天然に存在するアミノ酸誘導体を含有するペプチドも、

化学的誘導体として含まれる。例えば、４－ヒドロキシプロリンは、プロリンが置換され得；５－ヒドロキシリジンは、リジンが置換され得；３－メチルヒスチジンは、ヒスチジンが置換され得；ホモセリンは、セリンが置換され得；及びオルニチンは、リジンが置換され得る。

【００８２】

本発明の幾つかの実施形態において、目的のトキシンペプチドの塩基性残基（例えば、リジン）は、他の残基（非官能性残基が好ましい。）で置換することが可能である。このような分子は、それを与えた分子より塩基性が低く、その他の点では、それを与えた分子の活性を保持しており、これは安定性及び免疫原性の点で利点をもたらし得る。しかしながら、本発明は、この理論によって限定されるべきではない。

【００８３】

さらに、本発明の組成物が「分子」又は「化合物」として本明細書において表記される場合には、本発明の組成物の生理的に許容される塩も包含される。「生理的に許容される」塩とは、医薬として許容されることが公知であるか、又は後に発見されるすべての塩を意味する。幾つかの例は、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、塩化水素酸塩及び臭化水素酸塩などのハロゲン化水素酸塩、硫酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、グリコール酸塩、グルコン酸塩、コハク酸塩、メシル酸塩、ベシル酸塩及びシュウ酸塩である。

【００８４】

化合物の構造：

総論。組換えタンパク質は、数ある手段のうちとりわけ、半減期延長部分への共有結合を通じて、治療剤として開発されてきた。このような部分には、Ｅｎｂｒｅｌ(Ｒ)（エタネルセプト）で使用されるような、抗体の「Ｆｃ」ドメイン及びＮｅｕｌａｓｔａ(Ｒ)（ペグフィルグラスチム）で使用されるような、生物学的に適切なポリマー（例えば、ポリエチレングリコール又は「ＰＥＧ」）が含まれる。Ｆｅｉｇｅらは、２００３年１２月９日に付与された米国特許第６，６６０，８４３号（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）において、このような半減期延長物質をペプチドとともに使用することを記載した。

【００８５】

本発明者らは、本発明の分子（少なくとも２つのペプチド内ジスルフィド結合を有する、約８０アミノ酸又はそれ以下のペプチド）が、半減期延長部分に共有結合されると、治療的利点を有することを決定した。本発明の分子は、半減期延長部分（F^1及び／又はF^2）に又はペプチド部分（Ｐ）に結合されることが可能な、薬理学的に活性な共有結合されたさらなるペプチド部分をさらに含むことが可能である。２以上の半減期延長部分（F^1及びF^2）を含有する本発明の組成物の実施形態には、F^1及びF^2が同一又は別異の半減期延長部分であるものが含まれる。例（各ドメイン間にリンカーを有するか、又は有しない。）には、図７５に図示されている構造及び以下の実施形態（並びに本明細書及び実施例に記載されているその他のもの）が含まれる。

【００８６】

２０ＫＰＥＧ－トキシンペプチド－Ｆｃドメイン、式[$(F^1)_1$－$(X^2)_1$－$(F^2)_1$]と合致；

２０ＫＰＥＧ－トキシンペプチド－ＦｃＣＨ２ドメイン、式[$(F^1)_1$－$(X^2)_1$－$(F^2)_1$]と合致；

２０ＫＰＥＧ－トキシンペプチド－ＨＳＡドメイン、式[$(F^1)_1$－$(X^2)_1$－$(F^2)_1$]と合致；

２０ＫＰＥＧ－Ｆｃドメイン－トキシンペプチド、式[$(F^1)_1$－$(X^2)_1$－$(X^3)_1$]と合致；

２０ＫＰＥＧ－ＦｃＣＨ２ドメイン－トキシンペプチド、式[$(F^1)_1$－$(F^2)_1$－$(X^3)_1$]と合致；及び

２０ＫＰＥＧ－ＨＳＡ－トキシンペプチド、式[$(F^1)1$－$(X^2)_1$－$(X^3)_1$]と合致。

【００８７】
トキシンペプチド。トキシンペプチド（すなわち、「Ｐ」又は図２において「P^1」として等価に示されている。）のあらゆる数を、本発明とともに使用することが可能である。特に興味深いのは、トキシンペプチドＳｈＫ、ＨｍＫ、ＭｇＴｘ、ＡｇＴｘ２、ＯｓＫ１（「ＯＳＫ１」とも称される。）、アガトキシン及びＨｓＴｘ１並びにこれらの修飾された類縁体並びにこのようなトキシンペプチドの活性を模倣するその他のペプチド）である。本明細書に上述されているように、本発明の組成物中に２以上のトキシンペプチド「Ｐ」が存在すれば、「Ｐ」は、独立に、同じく本発明の組成物中に存在する他の何れのトキシンペプチドと同一又は別異であることが可能である。例えば、式$P-(L)_g-F^1-(L)_f-P$を有する組成物において、両トキシンペプチド「Ｐ」は、ＳｈＫの同じペプチド類縁体、ＳｈＫの異なるペプチド類縁体であり得、又は一方がＳｈＫのペプチド類縁体、及び他方がＯＳＫ１のペプチド類縁体であり得る。
【００８８】
本発明の幾つかの実施形態において、対象となる他のペプチドは、構造式Ｉの分子に対してさらなる特徴を有する分子中で特に有用である。このような分子において、式Ｉの分子は、薬理学的に活性な共有結合されたさらなるペプチドをさらに含み、これは、アゴニストペプチド、アンタゴニストペプチド又は標的誘導ペプチドである。本ペプチドは、F^1又はF^2又はＰに抱合されることが可能である。このようなアゴニストペプチドは、トキシンペプチドに対してアゴニスト作用を示す活性を有するが、トキシンペプチドと同じ機序によってこのような活性を発揮する必要はない。ペプチドアンタゴニストも、本発明の実施形態において有用であり、トキシンペプチドの活性に対して相補的であり得る活性を有するペプチドアンタゴニストが好ましい。分子を特定の細胞種、臓器などに誘導するペプチドなど、標的誘導ペプチドも興味深い。ペプチドのこれらのクラスは、本明細書及びその他の参考文献に引用されている参考文献中に記載されている方法によって発見することが可能である。本発明において使用するためのトキシンペプチドを作製する上で、ファージディスプレイが特に有用である。任意の遺伝子産物の任意の部位に対してペプチドリガンドを同定するために、ランダムペプチドのライブラリーからの親和性選択を使用することが可能である。Ｄｅｄｍａｎ ｅｔ ａｌ．，（１９９３），Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：２３０２５－３０。ファージディスプレイは、細胞表面受容体又は直鎖エピトープを有する何れかのタンパク質としてのこのような対象タンパク質に結合するペプチドを同定するために特に極めて適している。Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，（１９９８），Ｃａｎ．Ｊ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．４４：３１３－２９；Ｋａｙ ｅｔ ａｌ．（１９９８），Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃ．Ｔｏｄａｙ ３：３７０－８を参照されたい。このようなタンパク質は、「Ｈｅｒｚ ｅｔ ａｌ．，（１９９７），Ｊ．Ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｎｄ Ｓｉｇｎａｌ Ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ Ｒｅｓ．１７（５）：６７１－７７６」（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に広く概説されている。このような目的のタンパク質は、本発明において使用するのに適している。
【００８９】
特に好ましいペプチドは、以下の表に見られる。これらのペプチドは、本分野で開示された方法又は本明細書の以下に記載されている方法によって調製することが可能である。一文字アミノ酸略号が使用される。別段の記載差がなければ、各Ｘは、独立に、非官能性残基である。
【００９０】

【表２】

表１－Kv1.3阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
LVKCRGTSDCGRPCQQQTGCPNSKCINRMCKCYGC	Pi1	21
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2	17
TISCTNEKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi3	18
IEAIRCGGSRDCYRPCQKRTGCPNAKCINKTCKCYGCS	Pi4	19
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1	61
GVPINVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	AgTx2	23
GVPINVKCTGSPQCLKPCKDAGMRFGKCINGKCHCTPK	AgTx1	85
GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1	25
ZKECTGPQHCTNFCRKNKCTHGKCMNRKCKCFNCK	Anuroctoxin	62
TIINVKCTSPKQCSKPCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN	NTX	30
TVIDVKCTSPKQCLPPCKAQFGIRAGAKCMNGKCKCYPH	HgTx1	27
QFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx	36
VFINAKCRGSPECLPKCKEAIGKAAGKCMNGKCKCYP	Titystoxin-Ka	86
VCRDWFKETACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK	9
VGINVKCKHSGQCLKPCKDAGMRFGKCINGKCDCTPKG	BmKTX	26
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1	40
VFINVKCRGSKECLPACKAAVGKAAGKCMNGKCKCYP	Tc30	87
TGPQTTCQAAMCEAGCKGLGKSMESCQGDTCKCKA	Tc32	13

【００９１】

【表３】

表２－ShKペプチド及びShK ペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK	5
RSCIDTIPKSRCTAFQSKHSMKYRLSFCRKTSGTC	ShK-S17/S32	88
RSSIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTS	ShK-S3/S35	89
SSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-S1	90
(N-acetylarg) SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-N-acetylarg1	91
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-d1	92
CIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-d2	93
ASCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A1	94
RSCADTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A4	95
RSCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A4/A15	96
RSCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A4/A15/A25	97
RSCIDAIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A6	98
RSCIDTAPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A7	99
RSCIDTIAKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A8	100
RSCIDTIPASRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9	101
RSCIDTIPESRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E9	102
RSCIDTIPQSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q9	103
RSCIDTIPKARCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A10	104
RSCIDTIPKSACTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A11	105
RSCIDTIPKSECTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E11	106
RSCIDTIPKSQCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q11	107
RSCIDTIPKSRCAAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A13	108
RSCIDTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A15	109
RSCIDTIPKSRCTAWQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-W15	110
RSCIDTIPKSRCTAX^{B15}QCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-X15	111
RSCIDTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A15/A25	112
RSCIDTIPKSRCTAFACKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A16	113
RSCIDTIPKSRCTAFECKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E16	114
RSCIDTIPKSRCTAFQCAHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A18	115
RSCIDTIPKSRCTAFQCEHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E18	116
RSCIDTIPKSRCTAFQCKASMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A19	117
RSCIDTIPKSRCTAFQCKKSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-K19	118
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHAMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A20	119
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSAKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A21	120
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSX^{B21}KYRLSFCRKTCGTC	ShK-X21	121
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHS(norleu)KYRLSFCRKTCGTC	ShK-Nle21	122
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A22	123
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMEYRLSFCRKTCGTC	ShK-E22	124
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMRYRLSFCRKTCGTC	ShK-R22	125
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMX^{B22}YRLSFCRKTCGTC	ShK-X22	126
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSM(norleu)YRLSFCRKTCGTC	ShK- Nle22	127
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSM(orn)YRLSFCRKTCGTC	ShK- Orn22	128
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSM(homocit)YRLSFCRKTCGTC	ShK- Homocit22	129
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSM(diaminopropionic)YRLSFCRKTCGTC	ShK- Diamino-propionic22	130
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKARLSFCRKTCGTC	ShK-A23	131
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKSRLSFCRKTCGTC	ShK-S23	132

RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKFRLSFCRKTCGTC	ShK-F23	133
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKX[B23]RLSFCRKTCGTC	ShK-X23	134
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK(nitrophe)RLSFCRKTCGTC	ShK-Nitrophe23	135
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK(aminophe)RLSFCRKTCGTC	ShK-Aminophe23	136
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK(benzylphe)RLSFCRKTCGTC	ShK-Benzylphe23	137
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYALSFCRKTCGTC	ShK-A24	138
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYELSFCRKTCGTC	ShK-E24	139
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A25	140
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLAFCRKTCGTC	ShK-A26	141
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSACRKTCGTC	ShK-A27	142
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSX[B27]CRKTCGTC	ShK-X27	143
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCAKTCGTC	ShK-A29	144
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRATCGTC	ShK-A30	145
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKACGTC	ShK-A31	146
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGAC	ShK-A34	147
SCADTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A4d1	148
SCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A4/A15d1	149
SCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A4/A15/A25 d1	150
SCIDAIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A6 d1	151
SCIDTAPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A7 d1	152
SCIDTIAKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A8 d1	153
SCIDTIPASRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9 d1	154
SCIDTIPESRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E9 d1	155
SCIDTIPQSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q9 d1	156
SCIDTIPKARCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A10 d1	157
SCIDTIPKSACTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A11 d1	158
SCIDTIPKSECTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E11 d1	159
SCIDTIPKSQCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q11 d1	160
SCIDTIPKSRCAAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A13 d1	161
SCIDTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A15 d1	162
SCIDTIPKSRCTAWQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-W15 d1	163
SCIDTIPKSRCTAX[B15]QCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-X15 d1	164
SCIDTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A15/A25 d1	165
SCIDTIPKSRCTAFACKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A16 d1	166
SCIDTIPKSRCTAFECKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E16 d1	167
SCIDTIPKSRCTAFQCAHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A18 d1	168
SCIDTIPKSRCTAFQCEHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E18 d1	169
SCIDTIPKSRCTAFQCKASMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A19 d1	170
SCIDTIPKSRCTAFQCKKSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-K19 d1	171
SCIDTIPKSRCTAFQCKHAMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A20 d1	172
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSAKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A21 d1	173
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSX[B21]KYRLSFCRKTCGTC	ShK-X21 d1	174
SCIDTIPKSRCTAFQCKHS(norleu)KYRLSFCRKTCGTC	ShK-Nle21 d1	175
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A22 d1	176
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMEYRLSFCRKTCGTC	ShK-E22 d1	177
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMRYRLSFCRKTCGTC	ShK-R22 d1	178
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMX[B22]YRLSFCRKTCGTC	ShK-X22 d1	179
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSM(norleu)YRLSFCRKTCGTC	ShK- Nle22 d1	180

SCIDTIPKSRCTAFQCKHSM(orn)YRLSFCRKTCGTC	ShK- Orn22 d1	181
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSM(homocit)YRLSFCRKTCGTC	ShK- Homocit22 d1	182
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSM(diaminopropionic)YRLSFCRKTCGTC	ShK- Diamino-propionic22 d1	183
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKARLSFCRKTCGTC	ShK-A23 d1	184
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKSRLSFCRKTCGTC	ShK-S23 d1	185
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKFRLSFCRKTCGTC	ShK-F23 d1	186
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKX^{s23}RLSFCRKTCGTC	ShK-X23 d1	187
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK(nitrophe)RLSFCRKTCGTC	ShK-Nitrophe23 d1	188
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK(aminophe)RLSFCRKTCGTC	ShK-Aminophe23 d1	189
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK(benzylphe)RLSFCRKTCGTC	ShK-Benzylphe23 d1	190
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYALSFCRKTCGTC	ShK-A24 d1	191
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYELSFCRKTCGTC	ShK-E24 d1	192
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A25 d1	193
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLAFCRKTCGTC	ShK-A26 d1	194
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSACRKTCGTC	ShK-A27 d1	195
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSX^{s27}CRKTCGTC	ShK-X27 d1	196
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCAKTCGTC	ShK-A29 d1	197
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRATCGTC	ShK-A30 d1	198
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKACGTC	ShK-A31 d1	199
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGAC	ShK-A34 d1	200
YSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Y1	548
KSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-K1	549
HSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-H1	550
QSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q1	551
PPRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	PP-ShK	552
MRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	M-ShK	553
GRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	G-ShK	554
YSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-Y1/A22	555
KSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-K1/A22	556
HSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-H1/A22	557
QSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q1/A22	558
PPRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	PP-ShK-A22	559
MRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	M-ShK-A22	560
GRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	G-ShK-A22	561
RSCIDTIPASRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/A22	884
SCIDTIPASRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/A22 d1	885
RSCIDTIPVSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9	886
RSCIDTIPVSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/A22	887
SCIDTIPVSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9 d1	888
SCIDTIPVSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/A22 d1	889
RSCIDTIPESRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-E9/A22	890
SCIDTIPESRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-E9/A22 d1	891
RSCIDTIPKSACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A11/A22	892
SCIDTIPKSACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A11/22 d1	893
RSCIDTIPKSECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-E11/A22	894
SCIDTIPKSECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-E11/A22 d1	895
RSCIDTIPKSRCTDFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-D14	896

RSCIDTIPKSRCTDFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-D14/A22	897
SCIDTIPKSRCTDFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-D14 d1	898
SCIDTIPKSRCTDFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-D14/A22 d1	899
RSCIDTIPKSRCTAAQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A15A/22	900
SCIDTIPKSRCTAAQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A15/A22 d1	901
RSCIDTIPKSRCTAIQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-I15	902
RSCIDTIPKSRCTAIQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-I15/A22	903
SCIDTIPKSRCTAIQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-I15 d1	904
SCIDTIPKSRCTAIQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-I15/A22 d1	905
RSCIDTIPKSRCTAVQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V15	906
RSCIDTIPKSRCTAVQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V15/A22	907
SCIDTIPKSRCTAVQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V15 d1	908
SCIDTIPKSRCTAVQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V15/A22 d1	909
RSCIDTIPKSRCTAFRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-R16	910
RSCIDTIPKSRCTAFRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-R16/A22	911
SCIDTIPKSRCTAFRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-R16 d1	912
SCIDTIPKSRCTAFRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-R16/A22 d1	913
RSCIDTIPKSRCTAFKCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-K16	914
RSCIDTIPKSRCTAFKCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-K16/A22	915
SCIDTIPKSRCTAFKCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-K16 d1	916
SCIDTIPKSRCTAFKCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-K16/A22 d1	917
RSCIDTIPASECTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/E11	918
RSCIDTIPASECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/E11/A22	919
SCIDTIPASECTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/E11 d1	920
SCIDTIPASECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/E11/A22 d1	921
RSCIDTIPVSECTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11	922
RSCIDTIPVSECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/A22	923
SCIDTIPVSECTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11 d1	924
SCIDTIPVSECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/A22 d1	925
RSCIDTIPVSACTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/A11	926
RSCIDTIPVSACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/A11/A22	927
SCIDTIPVSACTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/A11 d1	928
SCIDTIPVSACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/A11/A22 d1	929
RSCIDTIPASACTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/A11	930
RSCIDTIPASACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/A11/A22	931
SCIDTIPASACTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/A11 d1	932
SCIDTIPASACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/A11/A22 d1	933
RSCIDTIPKSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E11/D14/I15/R16	934
RSCIDTIPKSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-E11/D14/I15/R16/A22	935
SCIDTIPKSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E11/D14/I15/R16 d1	936
SCIDTIPKSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-E11/D14/I15//R16 A22 d1	937

RSCIDTIPVSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/D14/I15/R16	938
RSCIDTIPVSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/D14/I15/R16/A22	939
SCIDTIPVSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/D14/I15/R16 d1	940
SCIDTIPVSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/D14/I15/R16/A22 d1	941
RSCIDTIPVSECTDIQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/D14/I15	942
RSCIDTIPVSECTDIQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/D14/I15/A22	943
SCIDTIPVSECTDIQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/D14/I15 d1	944
SCIDTIPVSECTDIQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/D14/I15/A22 d1	945
RTCKDLIPVSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-T2/K4/L6/V9/E11/D14/I15/R16	946
RTCKDLIPVSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-T2/K4/L6/V9/E11/D14/I15/R16/A22	947
TCKDLIPVSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-T2/K4/L6/V9/E11/D14/I15/R16 d1	948
TCKDLIPVSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-T2/K4/L6/V9/E11/D14/I15/R16/A22 d1	949
(L-Phosphotyrosine)-AEEARSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK(L5)	950
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK Q1/A4/A15	1295
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK Q1/A4/A15/A22	1296
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSM(Dap)YRLSFCRKTCGTC	ShK Q1/A4/A15/Dap22	1297
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK Q1/A4/A15/A25	1298
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSMAYRASFCRKTCGTC	ShK Q1/A4/A15/A22/A25	1299
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSM(Dap)YRASFCRKTCGTC	ShK Q1/A4/A15/Dap22/A25	1300

【００９２】

表２に記載されている多くのペプチドは、Ｋｅｍらに対して２０００年６月２０日に付与された米国特許第６，０７７，６８０号（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に記載されているとおりに調製することが可能である。表２の他のペプチドは、本分野で公知の技術によって調製することが可能である。例えば、ＳｈＫ（Ｌ５）（配列番号９５０）は、「Ｂｅｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｅｆｆｅｃｔｏｒ ｍｅｍｏｒｙ Ｔ ｃｅｌｌｓ ｗｉｔｈ ａ ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ｐｅｐｔｉｄｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ｏｆ Ｋｖ１．３ ｃｈａｎｎｅｌｓ ｆｏｒ ｔｈｅｒａｐ

ｙ ｏｆ ａｕｔｏｉｍｍｕｎｅ ｄｉｓｅａｓｅｓ，Ｍｏｌｅｃ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．６７（４）：１３６９-８１（２００５）」（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に記載されているとおりに調製することが可能である。表２及び本明細書を通じて、X^{s15}、X^{s21}、X^{s22}、X^{s23}及びX^{s27}は、各々独立に、非官能性アミノ酸残基を表す。

【００９３】

【表４】

表３－HmK、BgK、AeK及びＡsKSペプチド及びペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
RTCKDLIPVSECTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK	6
ATCKDLIPVSECTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-A1	201
STCKDLIPVSECTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-S1	202
TCKDLIPVSECTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1	203
SCKDLIPVSECTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/S2	204
TCIDLIPVSECTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/I4	205
TCKDTIPVSECTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/T6	206
TCKDLIPKSECTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/K9	207
TCKDLIPVSRCTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/R11	208
TCKDLIPVSECTAIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/A14	209
TCKDLIPVSECTDFRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/F15	210
TCKDLIPVSECTDIQCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/Q16	211
TCKDLIPVSECTDIRCKTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/K18	212
TCKDLIPVSECTDIRCRHSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/H19	213
TCKDLIPVSECTDIRCRTSMKYRLSLCRKTCGSC	HmK-d1/S26	214
TCKDLIPVSECTDIRCRTSMKYRLNFCRKTCGSC	HmK-d1/F27	215
TCKDLIPVSECTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGTC	HmK-d1/T34	216
TCKDLIPVSRCTDIRCRTSMKYRLNFCRKTCGSC	HmK-d1/R11/F27	217
ATCKDLIPVSRCTDIRCRTSMKYRLNFCRKTCGSC	HmK-A1/R11/F27	218
TCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGSC	HmK-d1/Z1	219
TCIDTIPKSRCTAFQCRTSMKYRLNFCRKTCGSC	HmK-d1/Z2	220
TCADLIPASRCTAIACRTSMKYRLNFCRKTCGSC	HmK-d1/Z3	221
TCADLIPASRCTAIACKHSMKYRLNFCRKTCGSC	HmK-d1/Z4	222
TCADLIPASRCTAIACAHSMKYRLNFCRKTCGSC	HmK-d1/Z5	223
RTCKDLIPVSECTDIRCRTSMX^{h22}YRLNLCRKTCGSC	HmK-X22	224
ATCKDLX^{h6}PVSRCTDIRCRTSMKX^{h22}RLNX^{h26}CRKTCGSC	HmK-X6, 22, 26	225

VCRDWFKETACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK	9
ACRDWFKETACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A1	226
VCADWFKETACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A3	227
VCRDAFKETACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A5	228
VCRDWFKATACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A8	229
VCRDWFKEAACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A9	230
VCRDWFKETACAHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A12	231
VCRDWFKETACRHAASLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A15	232
VCRDWFKETACRHAKALGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A16	233
VCRDWFKETACRHAKSAGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A17	234
VCRDWFKETACRHAKSLGNCATSQKYRANCAKTCELC	BgK-A21	235
VCRDWFKETACRHAKSLGNCRASQKYRANCAKTCELC	BgK-A22	236
VCRDWFKETACRHAKSLGNCRTSQKYAANCAKTCELC	BgK-A27	237
VCRDWFKETACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAATCELC	BgK-A32	238
VCRDWFKETACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKACELC	BgK-A33	239
VCRDWFKETACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCALC	BgK-A35	240
VCRDWFKETACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCEAC	BgK-A37	241
GCKDNFSANTCKHVKANNNCGSQKYATNCAKTCGKC	AeK	7
ACKDNFAAATCKHVKENKNCGSQKYATNCAKTCGKC	AsKS	8

【００９４】

表３及び本明細書を通じて、X^{h6}、X^{h22}、X^{h26}は、各々独立に、非官能性残基である。

【００９５】

【表５】

表４－ＭｇＴｘペプチド及びＭｇＴｘ ペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx	28
TIINVACTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-A6	242
TIINVSCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-S6	243
TIINVKCTSPAQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-A11	244
TIINVKCTSPKQCLPPCAAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-A18	245
TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAACMNGKCKCYPH	MgTx-A28	246
TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGACKCYPH	MgTx-A33	247
TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCACYPH	MgTx-A35	248
TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPN	MgTx-H39N	249
TIINVACTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPN	MgTx-A6/H39N	250
TIINVSCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYS	MgTx-S6/38/d39	251
TIITISCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-T4/I5/S6	252
TISCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-d3/T4/I5/S6	253
TISCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCFGR	MgTx-Pi2	254
NVACTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-d3/A6	255
QFTNVSCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYS	MgTx-ChTx	256
QFTDVDCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYQ	MgTx-IbTx	257
IINVSCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-Z1	258
IITISCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-Z2	259
GVIINVSCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-Z3	260

【００９６】

表４に記載されている多くのペプチドは、出願人がＭｅｒｃｋ＆Ｃｏ．，Ｉｎｃ．である、１９９５年２月２日に公開されたＷＯ９５／０３０６５号に記載されているとおりに

調製することが可能である。この出願は、１９９３年７月２２日に出願された米国特許出願０７／０９６，９４２号（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に対応する。

【００９７】

【表６】

表５－AgTx2ペプチド及びAgTx2 ペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
GVPINVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	AgTx2	23
GVPIAVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	AgTx2-A5	261
GVPINVSCTGSPQCIAPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	AgTx2-A16	262
GVPINVSCTGSPQCIKPCADAGMRFGKCMNRKCHCTPK	AgTx2-A19	263
GVPINVSCTGSPQCIKPCKDAGMAFGKCMNRKCHCTPK	AgTx2-A24	264
GVPINVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGACMNRKCHCTPK	AgTx2-A27	265
GVPINVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGKCMNAKCHCTPK	AgTx2-A31	266
GVPINVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGKCMNRACHCTPK	AgTx2-A32	267
GVPINVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPA	AgTx2-A38	268
GVPIAVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPA	AgTx2-A5/A38	269
GVPINVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	AgTx2-G31	270
GVPIIVSCKGSRQCIKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	AgTx2-OSK_z1	271
GVPIIVSCKISRQCIKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	AgTx2-OSK_z2	272
GVPIIVKCKGSRQCIKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	AgTx2-OSK_z3	273
GVPIIVKCKISRQCIKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	AgTx2-OSK_z4	274
GVPIIVKCKISRQCIKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	AgTx2-OSK_z5	275

【００９８】

【表７】

表６－ヘテロミトラス・スピニファー（ＨｓＴｘ１）ペプチド及びＨｓＴｘ１ペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1	61
ASCXTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1-X4	276
ASCATPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1-A4	277
ASCRTPXDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1-X7	278
ASCRTPADCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1-A7	279
ASCRTPKDCADPCXKETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1-X14	280
ASCRTPKDCADPCAKETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1-A14	281
ASCRTPKDCADPCRXETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1-X15	282
ASCRTPKDCADPCRAETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1-A15	283
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGXCMNRKCKCNRC	HsTx1-X23	284
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGACMNRKCKCNRC	HsTx1-A23	285
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNXKCKCNRC	HsTx1-X27	286
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNAKCKCNRC	HsTx1-A27	287
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRXCKCNRC	HsTx1-X28	288
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRACKCNRC	HsTx1-A28	289
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCXCNRC	HsTx1-X30	290
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCACNRC	HsTx1-A30	291
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNXC	HsTx1-X33	292
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNAC	HsTx1-A33	293

【００９９】

表５に記載されているペプチドは、Ｌｅｂｒｕｎらに対して２００４年２月１０日に付

与された米国特許第６，６８９，７４９号（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に記載されているとおりに調製することが可能である。

【０１００】

【表８】

表７－オルトチルス・スクロビキュロサス（ＯＳＫ１）ペプチド及びＯＳＫ１ペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1	25
GVIINVSCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-S7	1303
GVIINVKCKISRQCLKPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-K16	294
GVIINVKCKISRQCLEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-D20	295
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-K16,D20	296
GVIINVSCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-S7,K16,D20	1308
GVIINVKCKISPQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-P12,K16,D20	297
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-K16,D20,Y36	298
Ac-GVIINVKCKISPQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-P12, K16, D20	562
GVIINVKCKISPQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	OSK1-P12,K16, D20-NH_2	563
Ac-GVIINVKCKISPQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-OSK1-P12, K16, D20-NH_2	564
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH_2	OSK1-K16, D20, Y36-NH_2	565
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	Ac-OSK1-K16, D20, Y36	566
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH_2	Ac-OSK1-K16, D20, Y36-NH_2	567
GVIINVKCKISRQCLKPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	OSK1-K16-NH_2	568
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-K16	569
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-OSK1-K16-NH_2	570
Ac-GVIINVKCKISRQCLEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-D20	571
GVIINVKCKISRQCLEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	OSK1-D20-NH_2	572
Ac-GVIINVKCKISRQCLEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK- NH_2	Ac-OSK1-D20-NH_2	573
GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	OSK1-NH_2	574
Ac-GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1	575
Ac-GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-OSK1-NH_2	576
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	OSK1-K16, D20-NH_2	577
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-K16, D20	578
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-OSK1-K16, D20-NH_2	579

VIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Δ1-OSK1	580
Ac-VIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-Δ1-OSK1	581
VIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Δ1-OSK1- NH_2	582
Ac-VIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-Δ1-OSK1-NH_2	583
GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-A34	584
Ac-GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK	Ac-OSK1-A34	585
GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH_2	OSK1-A34-NH_2	586
Ac-GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH_2	Ac-OSK1-A34-NH_2	587
VIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Δ1-OSK1-K16, D20	588
Ac-VIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-Δ1-OSK1-K16, D20	589
VIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Δ1-OSK1-K16, D20-NH_2	590
Ac-VIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-Δ1-OSK1-K16, D20-NH_2	591
NVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	(Δ1-4)-OSK1-K16, D20	592
Ac-NVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-(Δ1-4)-OSK1-K16, D20	593
NVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	(Δ1-4)-OSK1-K16, D20-NH_2	594
Ac-NVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-(Δ1-4)-OSK1-K16, D20-NH_2	595
KCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	(Δ1-6)-OSK1-K16, D20	596
Ac-KCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-(Δ1-6)-OSK1-K16, D20	597
KCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	(Δ1-6)-OSK1-K16, D20-NH_2	598
Ac-KCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-(Δ1-6)-OSK1-K16, D20-NH_2	599
CKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	(Δ1-7)-OSK1-K16, D20	600
Ac-CKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-(Δ1-7)-OSK1-K16, D20	601
CKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	(Δ1-7)-OSK1-K16, D20-NH_2	602
Ac-CKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-(Δ1-7)-OSK1-K16, D20-NH_2	603
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRNGKCMNGKCHCTPK	OSK1-K16, D20, N25	604
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRNGKCMNGKCHCTPK-NH_2	OSK1-K16, D20, N25-NH_2	605
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRNGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-K16, D20, N25	606
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRNGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-OSK1-K16, D20, N25-NH_2	607
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	OSK1-K16, D20, R31	608
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK-NH_2	OSK1-K16, D20, R31-NH_2	609

Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	Ac-OSK1-K16, D20, R31	610
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK-NH_2	Ac-OSK1-K16, D20, R31-NH_2	611
GVIINVKCKISKQCLKPCRDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-K12, K16, R19, D20	612
Ac-GVIINVKCKISKQCLKPCRDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-K12, K16, R19, D20	613
GVIINVKCKISKQCLKPCRDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	OSK1-K12, K16, R19, D20-NH_2	614
Ac-GVIINVKCKISKQCLKPCRDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-OSK1-K12, K16, R19, D20-NH_2	615
TIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Δ1-OSK1-T2, K16, D20	616
Ac-TIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-Δ1-OSK1-T2, K16, D20	617
TIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Δ1-OSK1-T2, K16, D20-NH_2	618
Ac-TIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-Δ1-OSK1-T2, K16, D20-NH_2	619
GVKINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-K3	620
Ac-GVKINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-K3	621
GVKINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	OSK1-K3-NH_2	622
Ac-GVKINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-OSK1-K3-NH_2	623
GVKINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-K3, A34	624
GVKINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-K3, K16, D20	625
GVKINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-K3, K16, D20, A34	626
Ac-GVKINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK	Ac-OSK1-K3, A34	627
GVKINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH_2	OSK1-K3, A34-NH_2	628
Ac-GVKINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH_2	Ac-OSK1-K3, A34-NH_2	629
Ac-GVKINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	Ac-OSK1-K3, K16, D20, A34	630
GVKINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH_2	OSK1-K3, K16, D20, A34-NH_2	631
Ac-GVKINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH_2	Ac-OSK1-K3, K16, D20, A34-NH_2	632
Ac-GVKINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-K3, K16, D20	633
GVKINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	OSK1-K3, K16, D20-NH_2	634
Ac-GVKINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-OSK1-K3, K16, D20-NH_2	635
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCT	Δ36-38-OSK1-K16, D20	636
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-O16,D20	980
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hLys 16,D20	981
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hArg 16,D20	982

GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-Cit 16,D20	983
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hCit 16,D20	984
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-Dpr 16,D20	985
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-Dab 16,D20	986
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-O16,D20,Y36	987
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-hLys 16,D20,Y36	988
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-hArg 16,D20,Y36	989
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-Cit 16,D20,Y36	990
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-hCit 16,D20,Y36	991
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-Dpr 16,D20,Y36	992
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-Dab 16,D20,Y36	993
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACYPK	OSK1-K16,D20,A34,Y36	994
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCGCYPK	OSK1-K16,D20,G34,Y36	995
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACFPK	OSK1-K16,D20,A34,F36	996
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACWPK	OSK1-K16,D20,A34,W36	997
GVIINVKCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCACYPK	OSK1-K16,E20,A34,Y36	998
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-O16,D20,A34	999
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-hLys 16,D20,A34	1000
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-hArg 16,D20,A34	1001
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-Cit 16,D20,A34	1002
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hCit 16,D20,A34	1003
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-Dpr 16,D20,A34	1004
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-Dab 16,D20,A34	1005
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-O16,D20,	1006
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-hLys 16,D20	1007
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-hArg 16,D20	1008
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-Cit 16,D20	1009
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-hCit 16,D20	1010

GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,D20	1011
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-Dab16,D20	1012
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-O16,D20,A34	1013
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-hLys 16,D20,A34	1014
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-hArg 16,D20,A34	1015
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-Cit 16,D20,A34	1016
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-hCit 16,D20,A34	1017
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,D20,A34	1018
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-Dab 16,D20,A34	1019
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCGCYGG	OSK1-K16,D20,G34,Y36,G37,G38	1020
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-O16,D20,Y36,G37,G38	1021
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hLys 16,D20,Y36,G37,G38	1022
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hArg 16,D20,Y36,G37,G38	1023
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-Cit 16,D20,Y36,G37,G38	1024
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hCit 16,D20,Y36,G37,G38	1025
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-Dpr 16,D20,Y36,G37,G38	1026
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-K16,D20,A34,Y36,G37,G38	1027
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-O16,D20,A34,Y36,G37,G38	1028
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-hLys 16,D20,A34,Y36,G37,G38	1029
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-hArg 16,D20,A34,Y36,G37,G38	1030

GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-Cit 16,D20,A34,Y36,G37,G38	1031
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hCit 16,D20,A34,Y3,G37,G38	1032
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-Dpr 16,D20,A34,Y36,G37,G38	1033
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-Dab 16,D20,A34,Y36,G37,G38	1034
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACYG	Δ38, OSK1-K16,D20,A34,Y36,G37	1035
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-O16,D20,G36-38	1036
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-hLys 16,D20,G36-38	1037
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-hArg 16,D20,G36-38	1038
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-Cit 16,D20,G36-38	1039
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-hCit 16,D20,G36-38	1040
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-Dpr 16,D20,G36-38	1041
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACFGG	OSK1-K16,D20,A34,F36,G37,G38	1042
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-O16,D20,A34,G36-38	1043
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-hLys 16,D20,A34,G36-38	1044
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-hArg 16,D20,A34,G36-38	1045
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-Cit 16,D20,A34,G36-38	1046
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-hCit 16,D20,A34,G36-38	1047
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-Dpr 16,D20,A34,G36-38	1048
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-Dab 16,D20,A34,G36-38	1049
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACGG	Δ38, OSK1-K16,D20,A34,G36-37	1050
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACYG	Δ38, OSK1-K16,D20,A35,Y36,G37	1051

GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACGG	Δ38, OSK1-O16,D20,A35,Y36,G37	1052
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hLys 16,E20	1053
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hArg 16,E20	1054
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-Cit 16,E20	1055
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hCit 16,E20	1056
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-Dpr 16,E20	1057
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-Dab 16,E20	1058
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-O16,E20,Y36	1059
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-hLys 16,E20,Y36	1060
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-hArg 16,E20,Y36	1061
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-Cit 16,E20,Y36	1062
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-hCit 16,E20,Y36	1063
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-Dpr 16,E20,Y36	1064
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-Dab 16,E20,Y36	1065
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-O16,E20,A34	1066
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-hLys 16,E20,A34	1067
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-hArg 16,E20,A34	1068
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-Cit 16,E20,A34	1069
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hCit 16,E20,A34	1070
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-Dpr 16,E20,A34	1071
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-Dab 16,E20,A34	1072
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-O16,E20,	1073
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-hLys 16,E20	1074
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-hArg 16,E20	1075
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-Cit 16,E20	1076
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-hCit16,E20	1077
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,E20	1078

GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-O16,E20,A34	1079
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-hLys 16,E20,A34	1080
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-hArg 16,E20,A34	1081
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-Cit 16,E20,A34	1082
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-hCit 16,E20,A34	1083
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,E20,A34	1084
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-Dab 16,E20,A34	1085
GVIINVKCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-K16,E20,Y36,G37,G38	1086
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-O16,E20,Y36,G37,G38	1087
GVIINVKCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCHCYG	Δ38 OSK1-K16,E20,Y36,G37	1088
GVIINVKCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCACYG	Δ38 OSK1-K16,E20,A34, Y36,G37	1089
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hLys 16,E20,Y36,G37,G38	1090
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hArg 16,E20,Y36,G37,G38	1091
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-Cit 16,E20,Y36,G37,G38	1092
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	Δ37-38, OSK1-hCit 16,E20,Y36,G37,G38	1093
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-Dpr 16,E20,Y36,G37,G38	1094
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-Dab 16,E20,Y36,G37,G38	1095
GVIINVKCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCACYG	Δ38, OSK1-K16,E20,A34,Y36,G37	1096
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-O16,E20,A34,Y36,G37,G38	1097

GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-hLys 16,E20,A34,Y36,G37,G38	1098
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-hArg 16,E20,A34,Y36,G37,G38	1099
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-Cit 16,E20,A34,Y36,G37,G38	1100
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hCit 16,E20,A34,Y3,G37,G38	1101
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-Dpr 16,E20,A34,Y36,G37,G38	1102
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-Dab 16,E20,A34,Y36,G37,G38	1103
GVIINVKCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCACFGG	OSK1-K16,D20,A34,F36,G37,G38	1104
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-O16,E20,G36-38	1105
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-hLys 16,E20,G36-38	1106
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-hArg 16,E20,G36-38	1107
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-Cit 16,E20,G36-38	1108
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-hCit 16,E20,G36-38	1109
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-Dpr 16,E20,G36-38	1110
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-O16,E20,A34,G36-38	1111
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-hLys 16,E20,A34,G36-38	1112
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-hArg 16,E20,A34,G36-38	1113
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-Cit 16,E20,A34,G36-38	1114
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTP	OSK1-hCit 16,E20,A34,G36-38	1115
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTP	OSK1-Dpr 16,E20,A34,G36-38	1116
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTP	OSK1-Dab 16,E20,A34,G36-38	1117
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-O16,D20-amide	1118
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-hLys 16,D20-amide	1119

GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-hArg 16,D20-amide	1120
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-Cit 16,D20-amide	1121
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-hCit 16,D20-amide	1122
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-Dpr 16,D20-amide	1123
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-Dab 16,D20	1124
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-O16,D20,Y36-amide	1125
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-hLys 16,D20,Y36-amide	1126
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-hArg 16,D20,Y36-amide	1127
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-Cit 16,D20,Y36-amide	1128
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-hCit 16,D20,Y36-amide	1129
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-Dpr 16,D20,Y36-amide	1130
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-Dab 16,D20,Y36-amide	1131
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-O16,D20,A34-amide	1132
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-hLys 16,D20,A34-amide	1133
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-hArg 16,D20,A34-amide	1134
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-Cit 16,D20,A34-amide	1135
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-hCit 16,D20,A34-amide	1136
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-Dpr 16,D20,A34-amide	1137
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-Dab 16,D20,A34-amide	1138

GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-O16,D20, -amide	1139
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hLys 16,D20-amide	1140
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hArg 16,D20-amide	1141
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-Cit 16,D20-amide	1142
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hCit16,D20-amide	1143
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,D20-amide	1144
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-O16,D20,A34-amide	1145
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-hLys 16,D20,A34-amide	1146
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-hArg 16,D20,A34-amide	1147
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-Cit 16,D20,A34-amide	1148
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hCit16,D20,A34	1149
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,D20,A34-amide	1150
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-Dab 16,D20,A34-amide	1151
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-O16,D20,Y36,G37,G38-amide	1152
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-O16,D20,Y36,G37,G38	1153
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-hLys 16,D20,Y36,G37,G38-amide	1154
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-hArg 16,D20,Y36,G37,G38-amide	1155
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-Cit 16,D20,Y36,G37,G38-amide	1156

GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-hCit16,D20,Y36,G37,G38-amide	1157
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-Dpr16,D20,Y36,G37,G38-amide	1158
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCFGG-NH2	OSK1-K16,D20,F36,G37,G38-amide	1159
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYG-NH2	Δ38-OSK1-K16,D20,Y36,G37-amide	1160
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACYG-NH2	Δ38-OSK1-K16,D20,A34,Y36,G37-amide	1161
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-O16,D20,A34,Y36,G37,G38-amide	1162
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-hLys16,D20,A34,Y36,G37,G38-amide	1163
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-hArg16,D20,A34,Y36,G37,G38-amide	1164
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-Cit16,D20,A34,Y36,G37,G38	1165
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-hCit16,D20,A34,Y3,G37,G38-amide	1166
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-Dpr16,D20,A34,Y36,G37,G38-amide	1167
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-Dab16,D20,A34,Y36,G37,G38-amide	1168
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-K16,D20,A34,Y36,G37,G38-amide	1169
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-O16,D20,G36-38-amide	1170
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-hLys16,D20,G36-38-amide	1171
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-hArg16,D20,G36-38-amide	1172
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-Cit16,D20,G36-38-amide	1173

GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-hCit16,D20,G36-38-amide	1174
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-Dpr 16,D20,G36-38-amide	1175
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-K16,D20,A34,G36-38-amide	1176
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACFGG-NH2	OSK1-O16,D20,A34,F36,G37-38-amide	1177
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-O16,D20,A34,G36-38-amide	1178
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-hLys 16,D20,A34,G36-38-amide	1179
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-hArg 16,D20,A34,G36-38-amide	1180
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-Cit 16,D20,A34,G36-38-amide	1181
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-hCit16,D20,A34,G36-38-amide	1182
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-Dpr 16,D20,A34,G36-38-amide	1183
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-Dab 16,D20,A34,G36-38-amide	1184
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-O16,E20-amide	1185
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-hLys 16,E20-amide	1186
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-hArg 16,E20-amide	1187
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-Cit 16,E20-amide	1188
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-hCit16,E20-amide	1189
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-Dpr 16,E20-amide	1190
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-Dab 16,E20-amide	1191
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-O16,E20,Y36-amide	1192

GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-hLys 16,E20,Y36-amide	1193
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-hArg 16,E20,Y36-amide	1194
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-Cit 16,E20,Y36-amide	1195
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-hCit16,E20,Y36-amide	1196
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,Y36-amide	1197
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-Dab 16,E20,Y36-amide	1198
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-O16,E20,A34-amide	1199
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-hLys 16,E20,A34-amide	1200
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-hArg 16,E20,A34-amide	1201
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-Cit 16,E20,A34-amide	1202
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-hCit16,E20,A34-amide	1203
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,A34-amide	1204
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-Dab 16,E20,A34-amide	1205
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-O16,E20, -amide	1206
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hLys 16,E20-amide	1207
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hArg 16,E20-amide	1208
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-Cit 16,E20-amide	1209
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hCit16,E20-amide	1210

GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,E20-amide	1211
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-O16,E20,A34-amide	1212
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-hLys16,E20,A34-amide	1213
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-hArg16,E20,A34-amide	1214
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-Cit 16,E20,A34-amide	1215
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hCit16,E20,A34-amide	1216
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,E20,A34-amide	1217
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-Dab 16,E20,A34-amide	1218
GVIINVKCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCHCWGG-NH2	OSK1-O16,E20,W36,G37, G38-amide	1219
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-O16,E20,Y36,G37,G38-amide	1220
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-hLys 16,E20,Y36,G37,G38-amide	1221
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-hArg 16,E20,Y36,G37,G38-amide	1222
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-Cit 16,E20,Y36,G37,G38-amide	1223
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-hCit 16,E20,Y36,G37,G38-amide	1224
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,Y36,G37,G38-amide	1225
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,Y36,G37,G38-amide	1226
GVIINVKCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-K16,E20,A34,Y36,G37,G38-amide	1227
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-O16,E20,A34,Y36,G37,G38-amide	1228

GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-hLys 16,E20,A34,Y36,G37,G38-amide	1229
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-hArg 16,E20,A34,Y36,G37,G38-amide	1230
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-Cit 16,E20,A34,Y36,G37,G38-amide	1231
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1- hCit 16,E20,A34,Y3,G37,G38-amide	1232
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,A34,Y36,G37,G38-amide	1233
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-Dab 16,E20,A34,Y36,G37,G38-amide	1234
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-O16,E20,G36-38-amide	1235
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-hLys 16,E20,G36-38-amide	1236
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-hArg 16,E20,G36-38-amide	1237
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-Cit 16,E20,G36-38-amide	1238
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-hCit 16,E20,G36-38-amide	1239
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,G36-38-amide	1240
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-O16,E20,A34,G36-38-amide	1241
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-hLys 16,E20,A34,G36-38-amide	1242
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-hArg 16,E20,A34,G36-38-amide	1243
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-Cit 16,E20,A34,G36-38-amide	1244
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTP-NH2	Δ38 OSK1-hCit 16,E20,A34-amide	1245

GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,A34,G36-38-amide	1246
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-Dab 16,E20,A34,G36-38-amide	1247
GVIINVKCKISRQCLKPCK[Cpa]AGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-K 16,CPA20,A34,Y36, G37,G38-amide	1248
GVIINVKCKISRQCLKPCK[Cpa]AGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-K 16,CPA20,A34,G36-38-amide	1249
GVIINVKCKISRQCLKPCK[Cpa]AGMRFGKCMNGKCACY-NH2	Δ37-38OSK1-K 16,CPA20,A34,Y36 -amide	1250
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	Acetyl-OSK1-K 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38-amide	1251
GVIINVKCKISRQCLKPCK[Aad]AGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-K 16, Aad20,A34,Y36,G37 ,G38-amide	1252
GVIINVKCKISRQCLKPCK[Aad]AGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-K 16, Aad20,Y36,G37,G38 -amide	1253
GVIINVKCKISRQCLKPCK[Aad]AGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-K 16, Aad20,A34,Y36,G37 ,G38	1254
GVIINVKCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-H 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38-amide	1255
GVIINVKCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-H 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38	1256
GVIINVKCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCACY-NH2	Δ37-38-OSK1-H 16,D20,A34,Y36-amide	1257
GVIINVKCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-H 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38-amide	1258
GVIINVKCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-H 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38	1259
GVIINVKCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-H 16,D20,A34,Y36,	1260
GVIINVKCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38 OSK1-H 16,D20,A34,Y36,	1261
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[1Nal]GG-NH2	OSK1-K 16,D20,A34,1Nal36, G37,G38-amide	1262
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[1Nal]PK-NH2	OSK1-K 16,D20,A34,1Nal36 -amide	1263

GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[2Nal]GG-NH2	OSK1-K 16,D20,A34,2Nal36, G37,G38-amide	1264
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[Cha]GG-NH2	OSK1-K 16,D20,A34,Cha36, G37,G38-amide	1265
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[MePhe]GG-NH2	OSK1-K 16,D20,A34, MePhe36,G37,G38 -amide	1266
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[BiPhA]GG-NH2	OSK1-K 16,D20,A34, BiPhA36,G37,G38 -amide	1267
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKC[Aib]CYGG-NH2	OSK1-K 16,D20, Aib34,Y36,G37,G3 8-amide	1268
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKC[Abu]CYGG-NH2	OSK1-K 16,D20, Abu34,Y36,G37,G3 8-amide	1269
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[1Nal]	Δ37-38 OSK1-H 16,D20,A34,1Nal36, -amide	1270
GVIINVKCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[1Nal]GG-NH2	OSK1-H 16,D20,A34, 1Nal36,G37,G38- amide	1271
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[4Bip]-NH2	Δ37-38 OSK1-H 16,D20,A34, 4Bip 36,-amide	1272
GVIINVKCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[4Bip]GG-NH2	OSK1-H 16,D20,A34, 4Bip 36,G37,G38- amide	1273
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-K16,E20,G36-38	1274

【０１０１】

表７に記載されている配列の全ては、そのＮ末端又はＣ末端の何れかにおいて、４～１０個の炭素原子を有し及び０～２個の炭素－炭素二重結合を有する脂肪酸又はω－アミノ脂肪酸などのその誘導体で誘導体化することも可能である。（例えば、Ｍｏｕｈａｔ ｅｔ ａｌ．，ＷＯ ２００６／００２８５０ Ａ２参照。参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）。このような脂肪酸の例には、吉草酸又は（Ｃ末端に対する）ω－アミノ吉草酸が含まれる。

【０１０２】

【表９】

表８－Ｐｉ２ペプチド及びＰｉｐ２ｓペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2	17
TISCTNPXQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-X8	299
TISCTNPAQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-A8	300

TISCTNPKQCYPHCXKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-X15	301
TISCTNPKQCYPHCAKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-A15	302
TISCTNPKQCYPHCKXETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-X16	303
TISCTNPKQCYPHCKAETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-A16	304
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAXCMNRKCKCFGR	Pi2-X24	305
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAACMNRKCKCFGR	Pi2-A24	306
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNXKCKCFGR	Pi2-X28	307
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNAKCKCFGR	Pi2-A28	308
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRXCKCFGR	Pi2-X29	309
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRACKCFGR	Pi2-A29	310
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCXCFGR	Pi2-X31	311
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCACFGR	Pi2-A31	312
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGX	Pi2-X35	313
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGA	Pi2-A35	314
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFG	Pi2-d35	315

【０１０３】
【表１０】

表９－アナウロトキシン（ＡｎＴｘ）ペプチド及びペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
ZKECTGPQHCTNFCRKNKCTHGKCMNRKCKCFNCK	Anuroctoxin (AnTx)	62
KECTGPQHCTNFCRKNKCTHGKCMNRKCKCFNCK	AnTx-d1	316
XECTGPQHCTNFCRKNKCTHGKCMNRKCKCFNCK	AnTx-d1,X2	317
AECTGPQHCTNFCRKNKCTHGKCMNRKCKCFNCK	AnTx-d1,A2	318

【０１０４】
【表１１】

表１０－ノキシウストキシン（ＮＴＸ）ペプチド及びＮＴＸペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
TIINVKCTSPKQCSKPCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN	NTX	30
TIINVACTSPKQCSKPCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN	NTX-A6	319
TIINVKCTSPKQCSKPCKELYGSSRGAKCMNGKCKCYNN	NTX-R25	320
TIINVKCTSSKQCSKPCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN	NTX-S10	321
TIINVKCTSPKQCWKPCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN	NTX-W14	322
TIINVKCTSPKQCSKPCKELYGSSGAKCMNGKCKCYNN	NTX-A25d	323
TIINVKCTSPKQCSKPCKELFGVDRGKCMNGKCKCYNN	NTX-IbTx1	324
TIINVKCTSPKQCWKPCKELFGVDRGKCMNGKCKCYN	NTX-IBTX2	325

【０１０５】
【表１２】

表１１－カリオトキシン（ＫＴＸ１）ペプチド及びＫＴＸ１ペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
GVEINVKCSGSPQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	KTX1	24
VRIPVSCKHSGQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCDCTPK	KTX2	326
GVEINVSCSGSPQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	KTX1-S7	327
GVEINVACSGSPQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	KTX1-A7	328

【０１０６】

OnCusp
Ex. 1002

【表１３】

表１２－ＩＫＣａ１阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX	20
QFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx	36
QFTQESCTASNQCWSICKRLHNTNRGKCMNKKCRCYS	ChTx-Lq2	329

【０１０７】

【表１４】

表１３－マウロトキシン（ＭＴｘ）ペプチド及びＭＴｘペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX	20
VSCAGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A4	330
VSCTGAKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A6	331
VSCTGSADCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A7	332
VSCTGSKDCAAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A10	333
VSCTGSKDCYAPCQKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-Q14	334
VSCTGSKDCYAPCRQQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-Q15	335
VSCTGSKDCYAPCQQQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-Q14,15	336
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYAC	MTX-A33	337
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPYGKCMNRKCKCNRC	MTX-HsTx1	338
VSCTGSKDCYAACRKQTGCANAKCINKSCKCYGC	MTX-A12,20	339
VSCTGSKDCYAPCRKQTGX^{M19}PNAKCINKSCKCYGX^{M34}	MTX-X19, 34	340
VSCTGSKDCYAPCRKQTGSPNAKCINKSCKCYGS	MTX-S19,34	341
VSCTGSADCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A7	342
VVIGQRCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	TsK-MTX	343
VSCRGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-R4	1301
VSCGGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-G4	1302
VSCTTSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-T5	1304
VSCTASKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A5	1305
VSCTGTKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-T6	1306
VSCTGPKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-P6	1307
VSCTGSKDCGAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-G10	1309
VSCTGSKDCYRPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-R11	1311
VSCTGSKDCYDPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-D11	1312
VSCTGSKDCYAPCRKRTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-R16	1315
VSCTGSKDCYAPCRKETGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-E16	1316
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPYAKCINKSCKCYGC	MTX-Y21	1317
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNSKCINKSCKCYGC	MTX-S22	1318
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNGKCINKSCKCYGC	MTX-G22	1319
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINRSCKCYGC	MTX-R27	1320
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKTCKCYGC	MTX-T28	1321
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKMCKCYGC	MTX-M28	1322
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKKCKCYGC	MTX-K28	1323
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCNGC	MTX-N32	1324
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYRC	MTX-R33	1325
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGCS	MTX-S35	1326
SCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-d1	1327
SCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGCS	MTX-S35 d1	1328
VSCTGSKDCYAPCAKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A14	1329

VSCTGSKDCYAPCRAQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A15	1330
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAACINKSCKCYGC	MTX-A23	1331
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINASCKCYGC	MTX-A27	1332
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCACYGC	MTX-A30	1333
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCAGC	MTX-A32	1334
ASCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A1	1335
MSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-M1	1336

【０１０８】

表１３及び本明細書を通じて、X^{m19}及びX^{m34}は、各々独立に、非官能性残基である。

【０１０９】

【表１５】

表１４－カリブドトキシン（ＣｈＴｘ）ペプチド及びＣｈＴｘペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
QFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx	36
QFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKECRCYS	ChTx-E32	59
QFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKDCRCYS	ChTx-D32	344
CTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-d1-d6	345
QFTNVSCTTSKECWSVCQRLFGVDRGKCMGKKCRCYQ	ChTx-IbTx	346
QFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNGKCRCYS	ChTx-G31	1369
QFTNVSCTTSKECLSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-L14	1370
QFTNVSCTTSKECASVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A14	1371
QFTNVSCTTSKECWAVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A15	1372
QFTNVSCTTSKECWPVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-P15	1373
QFTNVSCTTSKECWSACQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A16	1374
QFTNVSCTTSKECWSPCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-P16	1375
QFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSAGKCMNKKCRCYS	ChTx-A25	1376
QFTNVACTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A6	1377
QFTNVKCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-K6	1378
QFTNVSCTTAKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A10	1379
QFTNVSCTTPKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-P10	1380
QFTNVSCTTSKACWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A12	1381
QFTNVSCTTSKQCWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-Q12	1382

AFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A1	1383
TFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-T1	1384
QATNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A2	1385
QITNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-I2	1386
QFANVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A3	1387
QFINVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-I3	1388
TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGTSRGKCMNKKCRCYSP	ChTx-MgTx	1389
TIINVSCTSPKQCLPPCKAQFGTSRGKCMNKKCRCYSP	ChTx-MgTx-b	1390

【０１１０】
【表１６】

表１５－ＳＫＣａ阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
CNCKAPETALCARRCQQHG	Apamin	68
AFCNLRMCQLSCRSLGLLGKCIGDKCECVKH	ScyTx	51
AVCNLKRCQLSCRSLGLLGKCIGDKCECVKHG	BmP05	50
TVCNLRRCQLSCRSLGLLGKCIGVKCECVKH	P05	52
AFCNLRRCELSCRSLGLLGKCIGEECKCVPY	Tamapin	53
VSCEDCPEHCSTQKAQAKCDNDKCVCEPI	P01	16
VVIGQRCYRSPDCYSACKKLVGKATGKCTNGRCDC	TsK	47

【０１１１】
【表１７】

表１６－アパミンペプチド及びペプチド類縁体阻害剤の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
CNCKAPETALCARRCQQHG	Apamin (Ap)	68
CNCXAPETALCARRCQQHG	Ap-X4	348
CNCAAPETALCARRCQQHG	Ap-A4	349
CNCKAPETALCAXRCQQHG	Ap-X13	350
CNCKAPETALCAARCQQHG	Ap-A13	351
CNCKAPETALCARXCQQHG	Ap-X14	352
CNCKAPETALCARACQQHG	Ap-A14	353

【０１１２】

【表１８】

表１７－シラトキシン（ＳｃｙＴｘ）、ＢｍＰ０５、Ｐ０５、タマピン、Ｐ０１ペプチド及びペプチド類縁体阻害剤の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
AFCNLRMCQLSCRSLGLLGKCIGDKCECVKH	ScyTx	51
AFCNLRRCQLSCRSLGLLGKCIGDKCECVKH	ScyTx-R7	354
AFCNLRMCQLSCRSLGLLGKCMGKKCRCVKH	ScyTx-IbTx	355
AFSNLRMCQLSCRSLGLLGKSIGDKCECVKH	ScyTx-C/S	356
AFCNLRRCELSCRSLGLLGKCIGEECKCVPY	Tamapin	53

【０１１３】
【表１９】

表１８－ＢＫＣａ阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKCRCYQ	IbTx	38
TFIDVDCTVSKECWAPCKAAFGVDRGKCMGKKCKCYV	Slotoxin (SloTx)	39
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1	40
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCYTN	BuTx	41
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGKCQNNQCRCY	MartenTx	35
ITINVKCTSPQQCLRPCKDRFGQHAGGKCINGKCKCYP	ClTx1	29

【０１１４】
【表２０】

表１９－ＩｂＴｘ、スロトキシン，ＢｍＴｘ１及びＢｕＴＸ（スロトキシンファミリー）ペプチド及びペプチド類縁体阻害剤の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKCRCYQ	IbTx	38
QFTDVDCSVSXECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKCRCYQ	IbTx-X11	357
QFTDVDCSVSAECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKCRCYQ	IbTx-A11	358
QFTDVDCSVSKECWSVCXDLFGVDRGKCMGKKCRCYQ	IbTx-X18	359
QFTDVDCSVSKECWSVCADLFGVDRGKCMGKKCRCYQ	IbTx-A18	360
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDXGKCMGKKCRCYQ	IbTx-X25	361
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDAGKCMGKKCRCYQ	IbTx-A25	362
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGXCMGKKCRCYQ	IbTx-X27	363
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGACMGKKCRCYQ	IbTx-A27	364
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGXKCRCYQ	IbTx-X31	365
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGAKCRCYQ	IbTx-A31	366
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKXCRCYQ	IbTx-X32	367
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKACRCYQ	IbTx-A32	368
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKCXCYQ	IbTx-X34	369
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKCACYQ	IbTx-A34	370
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1	371
QFTDVXCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1-X6	372
QFTDVACTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1-A6	373
QFTDVKCTGSXQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1-X11	374
QFTDVKCTGSAQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1-A11	375
QFTDVKCTGSKQCWPVCXQMFGKPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1-X18	376
QFTDVKCTGSKQCWPVCAQMFGKPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1-A18	377

QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGXPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1-X23	378
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGAPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1-A23	379
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGXCMNGKCRCYS	BmTx1-X27	380
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGACMNGKCRCYS	BmTx1-A27	381
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGXCRCYS	BmTx1-X32	382
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGARCYS	BmTx1-A32	383
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCXYS	BmTx1-X34	384
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCAYS	BmTx1-A34	385
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCYTN	BuTx	386
WCSTCLDLACGASXCYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCYTN	BuTx-X14	387
WCSTCLDLACGASACYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCYTN	BuTx-A14	388
WCSTCLDLACGASRECYDPCFXFGRAHGKCMNNKCRCYTN	BuTx-X22	389
WCSTCLDLACGASRECYDPCFAGRAHGKCMNNKCRCYTN	BuTx-A22	390
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGXHGKCMNNKCRCYTN	BuTx-X26	391
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGAHGKCMNNKCRCYTN	BuTx-A26	392
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGXMNNKCRCYTN	BuTx-X30	393
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGAMNNKCRCYTN	BuTx-A30	394
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNXRCYTN	BuTx-X35	395
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNARCYTN	BuTx-A35	396
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCXYTN	BuTx-X37	397
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCAYTN	BuTx-A37	398

【０１１５】

【表２１】

表２０－マルテントキシンペプチド及びペプチド類縁体阻害剤の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGKCQNNQCRCY	MartenTx	35
FGLIDVXCFASSECWTACKKVTGSGQGKCQNNQCRCY	MartenTx-X7	399
FGLIDVACFASSECWTACKKVTGSGQGKCQNNQCRCY	MartenTx-A7	400
FGLIDVKCFASSECWTACXKVTGSGQGKCQNNQCRCY	MartenTx-X19	401
FGLIDVKCFASSECWTACAKVTGSGQGKCQNNQCRCY	MartenTx-A19	402
FGLIDVKCFASSECWTACKXVTGSGQGKCQNNQCRCY	MartenTx-X20	403
FGLIDVKCFASSECWTACKAVTGSGQGKCQNNQCRCY	MartenTx-A20	404
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGXCQNNQCRCY	MartenTx-X28	405
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGACQNNQCRCY	MartenTx-A28	406
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGKCQNNQCXCY	MartenTx-X35	407
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGKCQNNQCACY	MartenTx-A35	408

【０１１６】

【表２２】

表２１－Ｎ型Ｃａ$^{2+}$チャンネル阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA	65
CKSPGSSCSPTSYNCCRSCNPYTKRCY	GVIA	64
CKSKGAKCSKLMYDCCTGSCSGTVGRC	CVIA	409
CKLKGQSCRKTSYDCCSGSCGRSGKC	SVIB	347
AEKDCIAPGAPCFGTDKPCCNPRAWCSSYANKCL	Ptu1	66
CKGKGASCRKTMYDCCRGSCRSGRC	CVIB	1364
CKGKGQSCSKLMYDCCTGSCSRRGKC	CVIC	1365
CKSKGAKCSKLMYDCCSGSCSGTVGRC	CVID	1366
CLSXGSSCSXTSYNCCRSCNXYSRKCY	TVIA	1367

【０１１７】

【表２３】

表２２－ωＭＶＩＩＡペプチド及びペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA	65
CXGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA-X2	410
CAGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA-A2	411
CKGXGAKCSRLMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA-X4	412
CKGAGAKCSRLMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA-A4	413
CKGKGAXCSRLMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA-X7	414
CKGKGAACSRLMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA-A7	415
CKGKGAKCSXLMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA-X10	416
CKGKGAKCSALMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA-A10	417
CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCXSGKC	MVIIA-X21	418
CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCASGKC	MVIIA-A21	419
CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSGXC	MVIIA-X24	420
CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSGAC	MVIIA-A24	421

【０１１８】

【表２４】

表２３－ωＧＶＩＡペプチド及びペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
CKSPGSSCSPTSYNCCRSCNPYTKRCY	GVIA	64
CXSPGSSCSPTSYNCCRSCNPYTKRCY	GVIA-X2	422
CASPGSSCSPTSYNCCRSCNPYTKRCY	GVIA-A2	423
CKSPGSSCSPTSYNCCXSCNPYTKRCY	GVIA-X17	424
CKSPGSSCSPTSYNCCASCNPYTKRCY	GVIA-A17	425
CKSPGSSCSPTSYNCCRSCNPYTXRCY	GVIA-X24	426
CKSPGSSCSPTSYNCCRSCNPYTARCY	GVIA-A24	427
CKSPGSSCSPTSYNCCRSCNPYTKXCY	GVIA-X25	428
CKSPGSSCSPTSYNCCRSCNPYTKACY	GVIA-A25	429

【０１１９】

【表２５】

表２４－Ｐｔｕ１ペプチド及びペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
AEKDCIAPGAPCFGTDKPCCNPRAWCSSYANKCL	Ptu1	66
AEXDCIAPGAPCFGTDKPCCNPRAWCSSYANKCL	Ptu1-X3	430
AEADCIAPGAPCFGTDKPCCNPRAWCSSYANKCL	Ptu1-A3	431
AEKDCIAPGAPCFGTDXPCCNPRAWCSSYANKCL	Ptu1-X17	432
AEKDCIAPGAPCFGTDAPCCNPRAWCSSYANKCL	Ptu1-A17	433
AEKDCIAPGAPCFGTDKPCCNPXAWCSSYANKCL	Ptu1-X23	434
AEKDCIAPGAPCFGTDKPCCNPAAWCSSYANKCL	Ptu1-A23	435
AEKDCIAPGAPCFGTDKPCCNPRAWCSSYANXCL	Ptu1-X32	436
AEKDCIAPGAPCFGTDKPCCNPRAWCSSYANACL	Ptu1-A32	437

【０１２０】

【表２６】

表２５－トリキソペルマ・プルリエンス（ＰｒｏＴｘｉ）及びＰｒｏＴｘｉペプチド類縁体及び他のＴ型Ca^{2+}チャンネル阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
ECRYWLGGCSAGQTCCKHLVCSRRHGWCVWDGTFS	ProTx1	56
ECXYWLGGCSAGQTCCKHLVCSRRHGWCVWDGTFS	ProTx1-X3	438
ECAYWLGGCSAGQTCCKHLVCSRRHGWCVWDGTFS	ProTx1-A3	439
ECRYWLGGCSAGQTCCXHLVCSRRHGWCVWDGTFS	ProTx1-X17	440
ECRYWLGGCSAGQTCCAHLVCSRRHGWCVWDGTFS	ProTx1-A17	441
ECRYWLGGCSAGQTCCKHLVCSXRHGWCVWDGTFS	ProTx1-X23	442
ECRYWLGGCSAGQTCCKHLVCSARHGWCVWDGTFS	ProTx1-A23	443
ECRYWLGGCSAGQTCCKHLVCSRXHGWCVWDGTFS	ProTx1-X24	444
ECRYWLGGCSAGQTCCKHLVCSRAHGWCVWDGTFS	ProTx1-A24	445
KIDGYPVDYW NCKRICWYNN KYCNDLCKGL KADSGYCWGW TLSCYCQGLP DNARIKRSGR CRA	Kurtoxin	1276

【０１２１】

【表２７】

表２６－ＢｅＫＭＩＭ電流阻害剤ペプチド及びＢｅＫＭ１ペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
RPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1	63
PTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-d1	446
XPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-X1	447
APTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-A1	448
RPTDIXCSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-X6	449
RPTDIACSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-A6	450
RPTDIKCSESYQCFPVCXSRFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-X18	451
RPTDIKCSESYQCFPVCASRFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-A18	452
RPTDIKCSESYQCFPVCKSXFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-X20	453
RPTDIKCSESYQCFPVCKSAFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-A20	454
RPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGXTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-X23	455
RPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGATNGRCVNGFCDCF	BeKM1-A23	456
RPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGXCVNGFCDCF	BeKM1-X27	457
RPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGACVNGFCDCF	BeKM1-A27	458

【０１２２】

【表２８】

表２７－Ｎａ＋チャンネル阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
QRCCNGRRGCSSRWCRDHSRCC	SmIIIa	459
RDCCTOOKKCKDRQCKOQRCCA	μ-GIIIA	460
RDCCTOORKCKDRRCKOMRCCA	μ-GIIIB	461
ZRLCCGFOKSCRSRQCKOHRCC	μ-PIIIA	462
ZRCCNGRRGCSSRWCRDHSRCC	μ-SmIIIA	463
ACRKKWEYCIVPIIGFIYCCPGLICGPFVCV	μO-MrVIA	464
ACSKKWEYCIVPIIGFIYCCPGLICGPFVCV	μO-MrVIB	465
EACYAOGTFCGIKOGLCCSEFCLPGVCFG	δ-PVIA	466
DGCSSGGTFCGIHOGLCCSEFCFLWCITFID	δ-SVIE	467
WCKQSGEMCNLLDQNCCDGYCIVLVCT	δ-TxVIA	468
VKPCRKEGQLCDPIFQNCCRGWNCVLFCV	δ-GmVIA	469

【０１２３】

【表２９】

表２８－ＣＩ－チャンネル阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR	CTX	67
MCMPCFTTDHQMAXKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR	CTX-X14	470
MCMPCFTTDHQMAAKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR	CTX-A14	471
MCMPCFTTDHQMARXCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR	CTX-X15	472
MCMPCFTTDHQMARACDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR	CTX-A15	473
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGXGRGKCYGPQCLCR	CTX-X23	474
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGAGRGKCYGPQCLCR	CTX-A23	475
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGXGKCYGPQCLCR	CTX-X25	476
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGAGKCYGPQCLCR	CTX-A25	477
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGXCYGPQCLCR	CTX-X27	478
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGACYGPQCLCR	CTX-A27	479
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCX	CTX-X36	480
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCA	CTX-A36	481
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLC	CTX-d36	482
QTDGCGPCFTTDANMARKCRECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b	483
QTDGCGPCFTTDANMAXKCRECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b-X17	484
QTDGCGPCFTTDANMAAKCRECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b-A17	485
QTDGCGPCFTTDANMARXCRECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b-X18	486
QTDGCGPCFTTDANMARACRECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b-A18	487
QTDGCGPCFTTDANMARKCXECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b-X20	488
QTDGCGPCFTTDANMARKCAECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b-A20	489
QTDGCGPCFTTDANMARKCRECCGGNGXCFGPQCLCNRE	Bm-12b-X28	490
QTDGCGPCFTTDANMARKCRECCGGNGACFGPQCLCNRE	Bm-12b-A28	491
QTDGCGPCFTTDANMARKCRECCGGNGKCFGPQCLCNXE	Bm-12b-X38	492
QTDGCGPCFTTDANMARKCRECCGGNGKCFGPQCLCNAE	Bm-12b-A38	493

【０１２４】

【表３０】

表２９－Ｋｖ２．１阻害剤ペプチド配列

配列／構造	省略名称	配列番号
ECRYLFGGCKTTSDCCKHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1	494
ECXYLFGGCKTTSDCCKHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-X3	495
ECAYLFGGCKTTSDCCKHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-A3	496
ECRYLFGGCXTTSDCCKHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-X10	497
ECRYLFGGCATTSDCCKHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-A10	498
ECRYLFGGCKTTSDCCXHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-X17	499
ECRYLFGGCKTTSDCCAHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-A17	500
ECRYLFGGCKTTSDCCKHLGCXFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-X22	501
ECRYLFGGCKTTSDCCKHLGCAFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-A22	502
ECRYLFGGCKTTSDCCKHLGCKFXDKYCAWDFTFS	HaTx1-X24	503
ECRYLFGGCKTTSDCCKHLGCKFADKYCAWDFTFS	HaTx1-A24	504
ECRYLFGGCKTTSDCCKHLGCKFRDXYCAWDFTFS	HaTx1-X26	505
ECRYLFGGCKTTSDCCKHLGCKFRDAYCAWDFTFS	HaTx1-A26	506

【０１２５】

OnCusp
Ex. 1002

【表３１】

表３０－Ｋｖ４．３及びＫｖ４．２阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
YCQKWMWTCDEERKCCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2	57
YCQXWMWTCDEERKCCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2-X4	507
YCQAWMWTCDEERKCCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2-A4	508
YCQKWMWTCDEEXKCCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2-X13	509
YCQKWMWTCDEEAKCCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2-A13	510
YCQKWMWTCDEERXCCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2-X14	511
YCQKWMWTCDEERACCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2-A14	512
YCQKWMWTCDEERKCCEGLVCXLWCKRIINM	PaTx2-X22	513
YCQKWMWTCDEERKCCEGLVCALWCKRIINM	PaTx2-A22	514
YCQKWMWTCDEERKCCEGLVCRLWCXRIINM	PaTx2-X26	515
YCQKWMWTCDEERKCCEGLVCRLWCARIINM	PaTx2-A26	516
YCQKWMWTCDEERKCCEGLVCRLWCKXIINM	PaTx2-X27	517
YCQKWMWTCDEERKCCEGLVCRLWCKAIINM	PaTx2-A27	518

【０１２６】

【表３２】

表３１－ｎＡＣＨＲチャンネル阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
GCCSLPPCAANNPDYC	PnIA	519
GCCSLPPCALNNPDYC	PnIA-L10	520
GCCSLPPCAASNPDYC	PnIA-S11	521
GCCSLPPCALSNPDYC	PnIB	522
GCCSLPPCAASNPDYC	PnIB-A10	523
GCCSLPPCALNNPDYC	PnIB-N11	524
GCCSNPVCHLEHSNLC	MII	525
GRCCHPACGKNYSC	α-MI	526
RD(hydroxypro)CCYHPTCNMSNPQIC	α-EI	527
GCCSYPPCFATNPDC	α-AuIB	528
RDPCCSNPVCTVHNPQIC	α-PIA	529
GCCSDPRCAWRC	α-ImI	530
ACCSDRRCRWRC	α-ImII	531
ECCNPACGRHYSC	α-GI	532
GCCGSY(hydroxypro)NAACH(hydroxypro)CSCKDR(hydroxypro)SYCGQ	αA-PIVA	533
GCCPY(hydroxypro)NAACH(hydroxypro)CGCKVGR(hydroxypro)(hydroxypro)YCDR(hydroxypro)SGG	αA-EIVA	534
H(hydroxypro)(hydroxypro)CCLYGKCRRY(hydroxypro)GCSSASCCQR	ψ-PIIIE	535
GCCSDPRCNMNNPDYC	EpI	536
GCCSHPACAGNNQHIC	GIC	537
IRD(γ-carboxyglu) CCSNPACRVNN(hydroxypro)HVC	GID	538
GGCCSHPACAANNQDYC	AnIB	539
GCCSYPPCFATNSDYC	AuIA	540
GCCSYPPCFATNSGYC	AuIC	541

【０１２７】

【表３３】

表３２－アゲレノプシス・アペルタ（アガトキシン）トキシンペプチド及びペプチド類縁体及びＣａ$^{2+}$チャンネル阻害剤ペプチド

配列／構造	省略名称	配列番号
KKKCIAKDYG RCKWGGTPCC RGRGCICSIM GTNCECKPRL IMEGLGLA	ω-Aga-IVA	959
EDNCIAEDYG KCTWGGTKCC RGRPCRCSMI GTNCECTPRL IMEGLSFA	ω-Aga-IVB	960
SCIDIGGDCD GEKDDCQCCR RNGYCSCYSL FGYLKSGCKC VVGTSAEFQG ICRRKARQCY NSDPDKCESH NKPKRR	ω-Aga-IIIA	961
SCIDIGGDCD GEKDDCQCCR RNGYCSCYSL FGYLKSGCKC VVGTSAEFQG ICRRKARTCY NSDPDKCESH NKPKRR	ω-Aga-IIIA-T58	962
SCIDFGGDCD GEKDDCQCCR SNGYCSCYSL FGYLKSGCKC EVGTSAEFRR ICRRKAKQCY NSDPDKCVSV YKPKRR	ω-Aga-IIIB	963
SCIDFGGDCD GEKDDCQCCR SNGYCSCYNL FGYLKSGCKC EVGTSAEFRR ICRRKAKQCYNSDPDKCVSV YKPKRR	ω-Aga-IIIB-N29	964
SCIDFGGDCD GEKDDCQCCR SNGYCSCYNL FGYLRSGCKC EVGTSAEFRR ICRRKAKQCY NSDPDKCVSV YKPKRR	ω-Aga-IIIB-N29/R35	965
NCIDFGGDCD GEKDDCQCCX RNGYCSCYNL FGYLKRGCKX EVG	ω-Aga-IIIC	966
SCIKIGEDCD GDKDDCQCCR TNGYCSXYXL FGYLKSG	ω-Aga-IIID	967
GCIEIGGDCD GYQEKSYCQC CRNNGFCS	ω-Aga-IIA	968
AKAL PPGSVCDGNE SDCKCYGKWH KCRCPWKWHF TGEGPCTCEK GMKHTCITKL HCPNKAEWGL DW	ω-Aga-IA (major chain)	969
ECVPENGHCR DWYDECCEGF YCSCRQPPKC ICRNNNX	μ-Aga	970
DCVGESQQCA DWAGPHCCDG YYCTCRYFPK CICVNNN	μ-Aga-6	971
ACVGENKQCA DWAGPHCCDG YYCTCRYFPK CICRNNN	μ-Aga-5	972
ACVGENQQCA DWAGPHCCDG YYCTCRYFPK CICRNNN	μ-Aga-4	973
ADCVGDGQRC ADWAGPYCCS GYYCSCRSMP YCRCRSDS	μ-Aga-3	1275
ECATKNKRCA DWAGPWCCDG LYCSCRSYPG CMCRPSS	μ-Aga-2	974
ECVPENGHCR DWYDECCEGF YCSCRQPPKC ICRNNN	μ-Aga-1	975
AELTSCFPVGHECDGDASNCNCCGDDVYCGCGWGRWNCKC KVADQSYAYGICKDKVNCPNRHLWPAKVCKKPCRREC	Tx-1	1277
GCANAYKSCNGPHTCCWGYNGYKKACICSGXNWK	Tx3-3	1278
SCINVGDFCDGKKDCCQCDRDNAFCSCSVIFGYKTNCRCE	Tx3-4	1279
SCINVGDFCDGKKDDCQCCRDNAFCSCSVIFGYKTNCRCE VGTTATSYGICMAKHKCGRQTTCTKPCLSKRCKKNH	ω-PtXIIA	1280
AECLMIGDTSCVPRLGRRCCYGAWCYCDQQLSCRRVGRKR ECGWVEVNCKCGWSWSQRIDDWRADYSCKCPEDQ	Dw13.3	1281
GGCLPHNRFCNALSGPRCCSGLKCKELSIWDSRCL	Agelenin	1282
DCVRFWGKCSQTSDCCPHLACKSKWPRNICVWDGSV	ω-GTx-SIA	1283
GCLEVDYFCG IPFANNGLCC SGNCVFVCTP Q	ω-conotoxin PnVIA	1284
DDDCEPPGNF CGMIKIGPPC CSGWCFFACA	ω-conotoxin PnVIB	1285
VCCGYKLCHP C	Lambda-conotoxin CMrVIA	1286
MRCLPVLIIL LLLTASAPGV VVLPKTEDDV PMSSVYGNGK SILRGILRNG VCCGYKLCHP C	Lambda-conotoxin CMrVIB	1287
KIDGYPVDYW NCKRICWYNN KYCNDLCKGL KADSGYCWGW TLSCYCQGLP DNARIKRSGR CRA	Kurtoxin	1276
CKGKGAPCRKTMYDCCSGSCGRRGKC	MVIIC	1368

【０１２８】
本発明に従えば、分子のトキシンペプチド（Ｐ）部分の少なくとも１つがＫｖ１．３アンタゴニストペプチドを含む分子である。ＳｈＫ、ＨｍＫ、ＭｇＴｘ、ＡｇＴｘ１、ＡｇＴｘ２、ヘテロメトラス・スピニファー（Ｈｅｔｅｒｏｍｅｔｒｕｓ ｓｐｉｎｎｉｆｅｒ）（ＨｓＴｘ１）、ＯＳＫ１、アヌロクトキシン（Ａｎｕｒｏｃｔｏｘｉｎ）（Ａｎｘ）、ノキシウストキシン（Ｎｏｘｉｕｓｔｏｘｉｎ）（ＮＴＸ）、ＫＴＸ１、ホンゴトキシン（Ｈｏｎｇｏｔｏｘｉｎ）、ＣｈＴｘ、チチストキシン（Ｔｉｔｙｓｔｏｘｉｎ）、ＢｇＫ、ＢｍＫＴＸ、ＢｍＴｘ、ＡｅＫ，ＡｅＫＳＴｃ３０、Ｔｃ３２、Ｐｉ１、Ｐｉ２及び／又はＰｉ３トキシンペプチド及びこれらの何れかのペプチド類縁体からなる群から選択されるアミノ酸配列が好ましい。有用なＫｖ１．３アンタゴニストペプチド配列の例には、本明細書の上記表１、表２、表３、表４、表５、表６、表７、表８、表９、表１０及び／又は表１１に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。
【０１２９】
本発明の組成物の他の実施形態は、ＩＫＣａ１アンタゴニストペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）を含む。有用なＩＫＣａ１アンタゴニストペプチドには、マウロトキシン（ＭＴｘ）、ＣｈＴｘペプチド及びこれらの何れかのペプチド類縁体が含まれ、その例には、表１２、表１３及び／又は表１４に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。
【０１３０】
本発明の組成物の他の実施形態は、ＳＫＣａ阻害剤ペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）を含む。有用なＳＫＣａ阻害剤ペプチドには、アパミン、ＳｃｙＴｘ、ＢｍＰ０５、Ｐ０１、Ｐ０５、タマピン、ＴｓＫ及びこれらの何れかのペプチド類縁体が含まれ、その例には、表１５に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。
【０１３１】
本発明の組成物の他の実施形態には、アパミンペプチド及びアパミンのペプチド類縁体である少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表１６に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。
【０１３２】
本発明の組成物の他の実施形態には、シロトキシンファミリーペプチド及びこれらの何れかのペプチド類縁体である少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表１７に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。
【０１３３】
本発明の組成物の他の実施形態には、ＢＫＣａ阻害剤ペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表１８に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。
【０１３４】
本発明の組成物の他の実施形態には、スロトキシンファミリーペプチド及びこれらの何れかのペプチド類縁体である少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表１９に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。
【０１３５】
本発明の組成物の他の実施形態には、マルテントキシンペプチド及びそのペプチド類縁体である少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２０に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。
【０１３６】
本発明の組成物の他の実施形態には、Ｎ型Ca^{2+}チャンネル阻害剤ペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２１に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。
【０１３７】
本発明の組成物の他の実施形態には、ωＭＶＩＩＡペプチド及びそのペプチド類縁体で

ある少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２２に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１３８】

本発明の組成物の他の実施形態には、ωＧＶＩＡペプチド及びそのペプチド類縁体である少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２３に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１３９】

本発明の組成物の他の実施形態には、ＰＴｕ１ペプチド及びそのペプチド類縁体である少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２４に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１４０】

本発明の組成物の他の実施形態には、ＰｒｏＴｘ１ペプチド及びそのペプチド類縁体である少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２５に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１４１】

本発明の組成物の他の実施形態には、ＢｅＫＭ１ペプチド及びそのペプチド類縁体である少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２６に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１４２】

本発明の組成物の他の実施形態には、Na^+チャンネル阻害剤ペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２７に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１４３】

本発明の組成物の他の実施形態には、Cl^-チャンネル阻害剤ペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２８に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１４４】

本発明の組成物の他の実施形態には、Ｋｖ２．１阻害剤ペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２９に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１４５】

本発明の組成物の他の実施形態には、Ｋｖ４．２／Ｋｖ４．３阻害剤ペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表３０に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１４６】

本発明の組成物の他の実施形態には、ｎＡＣＨＲ阻害剤ペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表３１に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１４７】

本発明の組成物の他の実施形態には、アガトキシンペプチド、そのペプチド類縁体又は他のカルシウムチャンネル阻害剤ペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表３２に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１４８】

半減期延長部分。本発明は、Ｎ末端、Ｃ末端又は中間のアミノ酸残基１つの側鎖を通じてペプチドに結合された少なくとも１つの半減期延長部分（式Ｉ中のF^1及び／又はF^2）の存在を含む。複数の半減期延長部分を使用することも可能である（例えば、各末端のＦｃ又は末端のＦｃ及び他の末端若しくは側鎖のＰＥＧ基）。他の実施形態において、（例えば、式$F^1-F^2-(L)_f-P$；$P-(L)_g-F^1-F^2$；又は$P-(L)_g-F^1-F^2-(L)_f-P$に従って）ＦｃドメインをＰＥＧ化することが可能である。

【０１４９】
半減期延長部分は、本発明の組成物はインビボでの腎臓ろ過によるクリアランスを妨げるのに十分な流体力学的サイズを達成するように選択することが可能である。例えば、実質的に直鎖、分岐鎖又は樹状形態のポリマー性高分子である半減期延長部分を選択することが可能である。あるいは、インビボで、本発明の組成物が血清タンパク質に結合して複合体を形成するように、このようにして形成された複合体が実質的な腎臓クリアランスを回避するように、半減期延長部分を選択することが可能である。半減期延長部分は、例えば、脂質、コレステロール基（ステロイドなど）、炭水化物若しくはオリゴ糖、又はサルベージ受容体に結合するあらゆる天然若しくは合成タンパク質、ポリペプチド若しくはペプチドであり得る。

【０１５０】
本発明に従って、使用可能な典型的な半減期延長部分には、免疫グロブリンＦｃドメイン若しくはその一部、又は生物学的に適切な重合体若しくは共重合体、例えば、ポリエチレングリコール又はポリプロピレングリコールなどのポリアルキレングリコール化合物が含まれる。他の適切なポリアルキレングリコール化合物には、以下の種類の帯電したポリマー又は中性ポリマー：デキストラン、ポリリジン、コロミン酸又は他の炭水化物ベースのポリマー、アミノ酸のポリマー及びビオチン誘導体が含まれるが、これらに限定されない。

【０１５１】
本発明において、半減期延長部分の他の例には、エチレングリコールの共重合体、プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリ－１，３－ジオキソラン、ポリ－１，３，６－トリオキサン、エチレン／マレイン酸無水物共重合体、ポリアミノ酸（例えば、ポリリジン）、デキストランｎ－ビニルピロリドン、ポリｎ－ビニルピロリドン、プロピレングリコールホモ重合体、プロピレンオキシド重合体、エチレンオキシド重合体、ポリオキシエチレン化されたポリオール、ポリビニルアルコール、直鎖若しくは分岐グリコシル化された鎖、ポリアセタール、長鎖脂肪酸、長鎖疎水性脂肪族基、免疫グロブリンF_cドメイン若しくはその一部（例えば、Feige et al.，Modified peptides as therapeutic agents，米国特許第６，６６０，８４３号参照）、ＦｃのＣＨ２ドメイン、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ））；例えば、Rosen et al.，Albumin fusion proteins，米国特許第６，９２６，８９８号及びＵＳ２００５／００５４０５１；Bridon et al.，Protection of endogenous therapeutic peptides from peptidase activity through conjugation to blood components，米国特許第６，８８７，４７０号参照）、トランスサイレチン（ＴＴＲ；例えば、Walker et al.，Use of transthyretin peptide/protein fusions to increase the serum half-life of pharmacologically active peptides/proteins，US ２００３／０１９５１５４ Ａ１；２００３／０１９１０５６ Ａ１参照）又はチロキシン結合グロブリン（ＴＢＧ）が含まれる。従って、本発明の組成物の典型的な実施形態には、ＳｈＫ、ＯＳＫ１又はこれらのトキシンペプチドの修飾された類縁体とのＨＳＡ融合物など（但し、これらに限定されない。）ＨＳＡ融合構築物も含まれる。例には、ＨＳＡ－Ｌ１０－ＳｈＫ（２－３５）；ＨＳＡ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（１－３８）；ＨＳＡ－Ｌ１０－ＳｈＫ（２－３５）；及びＨＳＡ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（１－３８）が含まれる。

【０１５２】
本発明において、半減期延長部分の他の実施形態には、温度、ｐＨ及びイオン強度の生理的条件下で長い半減期の血清タンパク質に対して結合親和性を有するペプチドリガンド又は小（有機）分子リガンドが含まれる。例には、アルブミン結合ペプチド若しくは小分子リガンド、トランスサイレチン結合ペプチド若しくは小分子リガンド、チロキシン結合

グロブリン結合ペプチド若しくは小分子リガンド、抗体結合ペプチド若しくは小分子リガンド又は長い半減期の血清タンパク質に対して親和性を有する別のペプチド若しくは小分子が含まれる。（例えば、Ｂｌａｎｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄ ａｎｄ ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ｉｎｃｒｅａｓｉｎｇ ｔｈｅ ｓｅｒｕｍ ｈａｌｆ-ｌｉｆｅ ｏｆ ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌｌｙ ａｃｔｉｖｅ ａｇｅｎｔｓ ｂｙ ｂｉｎｄｉｎｇ ｔｏ ｔｒａｎｓｔｈｙｒｅｔｉｎ-ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ｌｉｇａｎｄｓ，米国特許第５，７１４，１４２号；Ｓａｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｒｕｍ ａｌｂｕｍｉｎ ｂｉｎｄｉｎｇ ｍｏｉｅｔｉｅｓ，ＵＳ ２００３／００６９３９５ Ａ１ ；Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ ａｃｔｉｖｅ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ，米国特許第６，３４２，２２５号を参照）。「長い半減期の血清タンパク質」は、いわゆる「担体タンパク質」（アルブミン、トランスフェリン及びハプトグロビンなど）、フィブリノーゲン及びその他の血液凝固因子、補体成分、免疫グロブリン、酵素阻害剤、アンギオテンシン及びブラジキンなどの物質の前駆体並びにタンパク質の他の多くの種類など、哺乳動物の血漿中に溶解された様々な何百ものタンパク質の１つである。本発明は、本発明に記載されているものなど（但し、これらに限定されない。）、医薬として許容される半減期伸長部分のあらゆる単一種の使用又はＰＥＧ及び免疫グロブリンＦｃドメイン又はＦｃのＣＨ２ドメイン、アルブミン（例えば、ＨＳＡ）、アルブミン結合タンパク質、トランスサイレチン又はＴＢＧなど２つ又はそれ以上の半減期延長部分の組み合わせの使用を包含する。

【０１５３】

本発明の幾つかの実施形態において、Ｆｃドメイン又はその一部（ＦｃのＣＨ２ドメインなど）が、半減期延長部分として使用される。Ｆｃドメインは、トキシンペプチドのＮ末端（例えば、式F^1-（Ｌ）$_f$-Ｐに従って）又はＣ末端（例えば、式Ｐ-（Ｌ）$_g$-F^1に従って）又はＮ末端及びＣ末端の両方に（例えば、式F^1-（Ｌ）$_f$-Ｐ-（Ｌ）$_g$-F^2又はＰ-（Ｌ）$_g$-F^1-（Ｌ）$_f$-Ｐに従って）融合することが可能である。本明細書に記載されているように、Ｆｃドメインとトキシンペプチドの間に、ペプチドリンカー配列を場合によって含めることが可能である。式F^1-（Ｌ）$_f$-Ｐの例には、Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ（Ｋ２２Ａ）[２-３５]；Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ（Ｒ１Ｋ／Ｋ２２Ａ）[１-３５]；Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ（Ｒ１Ｈ／Ｋ２２Ａ）[１-３５]；Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ（Ｒ１Ｑ／Ｋ２２Ａ）[１-３５]；Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ（Ｒ１Ｙ／Ｋ２２Ａ）[１-３５]；Ｆｃ-Ｌ１０-ＰＰ-ＳｈＫ（Ｋ２２Ａ）[１-３５]及び本明細書に記載されている他の全ての実施例が含まれる。式Ｐ-（Ｌ）$_g$-F^1の例には、ＳｈＫ（１-３５）-Ｌ１０-Ｆｃ；ＯｓＫ１（１-３８）-Ｌ１０-Ｆｃ；Ｍｅｔ-ＳｈＫ（１-３５）-Ｌ１０-Ｆｃ；ＳｈＫ（２-３５）-Ｌ１０-Ｆｃ；Ｇｌｙ-ＳｈＫ（１-３５）-Ｌ１０-Ｆｃ；Ｏｓｋ１（１-３８）-Ｌ１０-Ｆｃ；及び本明細書に記載されている他の全ての実施例が含まれる。

【０１５４】

Ｆｃバリアントが、本発明の範囲に属する適切な半減期延長部分である。サルベージ受容体への結合が維持される限り、固有Ｆｃは、本発明において、Ｆｃバリアントを形成するために広く修飾することが可能である。例えば、ＷＯ９７／３４６３１、ＷＯ９６／３２４７８及びＷＯ０４／１１０４７２参照。このようなＦｃバリアントにおいて、本発明の融合分子によって必要とされない構造的特徴又は機能的活性を与える固有Ｆｃの１つ又はそれ以上の部位を除去することが可能である。例えば、残基を置換若しくは欠失させ、部位中に残基を挿入し、又は部位を含有する部分を末端切断させることによって、これらの部位を除去することが可能である。挿入された又は置換された残基は、ペプチド模倣体又はＤアミノ酸などの変化されたアミノ酸であることも可能である。Ｆｃバリアントは、多数の理由のために望ましいことがあり得、これらの幾つかは以下に記載されている。典型的なＦｃバリアントには、以下の分子及び配列が含まれる。

【０１５５】

１．ジスルフィド結合の形成に関与する部位が除去される。このような除去は、本発明

の分子を作製するために使用される宿主細胞中に存在する他のシステイン含有タンパク質との反応を避けることが可能である。この目的のために、Ｎ末端のシステイン含有セグメントは末端切断することが可能であり、又はシステイン残基は欠失されるか、若しくは他のアミノ酸（例えば、アラニル、セリル）で置換することが可能である。特に、配列番号２のＮ末端の２０アミノ酸セグメントを末端切断するか、又は配列番号２の７位及び１０位のシステイン残基を欠失又は除去することが可能である。システイン残基が除去されている場合でさえ、一本鎖Ｆｃドメインは、非共有的に互いに結合された二量体Ｆｃドメインをなお形成することができる。

【０１５６】

２．固有Ｆｃは、選択された宿主細胞とより適合性があるように修飾される。例えば、プロリンイミノペプチダーゼなどの、Ｅ．コリ中の消化酵素によって認識され得る典型的な固有ＦｃのＮ末端に近いＰＡ配列を除去することが可能である。分子が、Ｅ．コリなどの細菌細胞中で組み換え的に発現されている場合には特に、Ｎ末端メチオニン残基を付加することも可能である。配列番号２のＦｃドメイン（図４）は、このようなＦｃバリアントの１つである。

【０１５７】

３．固有ＦｃのＮ末端の一部は、選択された宿主細胞中で発現されたときにＮ末端の不均一性を防ぐために除去される。この目的のために、Ｎ末端の最初の２０アミノ酸残基、特に位置１、２、３、４及び５の残基の何れをも欠失させることが可能である。

【０１５８】

４．１つ又はそれ以上のグリコシル化部位が除去される。典型的にグリコシル化される残基（例えば、アスパラギン）は、細胞溶解応答を付与することが可能である。このような残基は、欠失させるか、又はグリコシル化されない残基（例えば、アラニン）で置換することが可能である。

【０１５９】

５．Ｃ１ｑ結合部位などの補体との相互作用に関与する部位が除去される。例えば、ヒトＩｇＧ１のＥＫＫ配列を欠失又は置換することが可能である。補体の動員は、本発明の分子にとって有利でない場合があり得、このようなＦｃバリアントを用いて回避することが可能である。

【０１６０】

６．サルベージ受容体以外のＦｃ受容体への結合に影響を与える部位が除去される。固有Ｆｃは、本発明の融合分子に対して必要とされないある種の白血球を妨害するための部位を有することがあり、従って、除去され得る。

【０１６１】

７．ＡＤＣＣ部位が除去される。ＡＤＣＣ部位は、本分野において公知である。例えば、ＩｇＧ１中のＡＤＣＣ部位に関して、Ｍｏｌｅｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２９（５）６３３-９（１９９２）を参照。これらの部位も、本発明の融合分子にとって不要であり、従って、除去することが可能である。

【０１６２】

８．固有Ｆｃが非ヒト抗体に由来する場合には、固有Ｆｃはヒト化することが可能である。典型的には、固有Ｆｃをヒト化するために、ヒト固有Ｆｃ中に通常見出される残基で、非ヒト固有Ｆｃ中の選択された残基を置換する。抗体のヒト化のための技術は、本分野において周知である。

【０１６３】

好ましいＦｃバリアントには、以下のものが含まれる。配列番号２では、１５位のロイシンはグルタミン酸で、９９位のグルタミン酸はアラニンで、並びに１０１位及び１０３位のリジンはアラニンで置換されることが可能である。さらに、フェニルアラニン残基は、１つ又はそれ以上のチロシン残基を置換することが可能である。

【０１６４】

別の半減期延長部分は、サルベージ受容体に結合することが可能な、タンパク質、ポリ

ペプチド、ペプチド、抗体、抗体断片又は小分子（例えば、ペプチド模倣化合物）である。例えば、１９９８年４月１４日にＰｒｅｓｔａらに付与された米国特許第５，７３９，２７７号に記載されているような半減期延長部分としてポリペプチドを使用することが可能である。ペプチドは、ＦｃＲｎサルベージ受容体への結合について、ファージディスプレイによって選択することも可能である。このようなサルベージ受容体結合化合物も、「半減期延長部分」の意味の中に含まれ、本発明の範囲に属する。このような半減期延長部分は、（例えば、プロテアーゼによって認識される配列を避けることによって）増加した半減期について選択されるべきであり、及び（例えば、抗体のヒト化で発見されるように、非免疫原性配列を優先することによって）減少した免疫原性について選択されるべきである。

【０１６５】

上述のように、ポリマー半減期延長部分は、F^1及びF^2に対して使用することも可能である。半減期延長部分として有用な化学的部分を付着させるための様々な手段が、現在利用可能である。例えば、「Ｎ-Ｔｅｒｍｉｎａｌｌｙ Ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ａｎｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ」と題された特許協力条約（「ＰＣＴ」）国際公開ＷＯ９６／１１９５３号（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）を参照されたい。このＰＣＴ公報は、とりわけ、タンパク質のＮ末端への、水溶性ポリマーの選択的付着を開示している。

【０１６６】

本発明の組成物の幾つかの実施形態において、ポリマー半減期延長部分は、F^1及び／又はF^2としてのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）であるが、本発明の組成物は、位置F^1及び／又はF^2以外に、トキシンペプチド上の１つ又はそれ以上の部位など、分子中の他の部位に抱合された１つ又はそれ以上のＰＥＧを含むことも可能である。従って、本発明の組成物の幾つかの実施形態は、F^1及び／又はF^2である非ＰＥＧ半減期延長部分に、又はトキシンペプチド（Ｐ）に、又はこれらの何れかのあらゆる組み合わせに抱合された１つ若しくはそれ以上のＰＥＧ部分をさらに含む。例えば、本発明の組成物中のＦｃドメイン又はその一部（F^1及び／又はF^2として）は、還元的アルキル化の方法によって、モノＰＥＧ化され、ジＰＥＧ化され又はその他マルチＰＥＧ化されることが可能である。

【０１６７】

ポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）との、タンパク質及びペプチドの共有的抱合は、治療的タンパク質のインビボ循環半減期を著しく延長させるためのアプローチとして広く認識されている。ＰＥＧ部分は、タンパク質にかなりの流体力学的半径を加えるので、ＰＥＧ化は、主として腎クリアランスを遅延させることによって、この効果を達成する。（Ｚａｌｉｐｓｋｙ，Ｓ．，ｅｔ ａｌ．，Ｕｓｅ ｏｆ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌｉｚｅｄ ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ｓ ｆｏｒ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅｓ．，ｉｎ ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｃａｌ ａｎｄ ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ．，Ｊ．Ｍ．Ｈａｒｒｉｓ，Ｅｄ．，Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ：Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ．，３４７-３７０（１９９２））。タンパク質及びペプチドのＰＥＧ化によってしばしば付与されるさらなる利点には、増加した溶解度、タンパク分解による分解に対する耐性及び治療用ポリペプチドの減少した免疫原性が含まれる。タンパク質ＰＥＧ化の長所は、ＰＥＧ-アデノシンデアミナーゼ（Ａｄａｇｅｎ™／Ｅｎｚｏｎ Ｃｏｒｐ，）、ＰＥＧ-Ｌ-アスパラギナーゼ（Ｏｎｃａｓｐａｒ™／Ｅｎｚｏｎ Ｃｏｒｐ．）、ＰＥＧ-インターフェロンα-２ｂ（ＰＥＧ-Ｉｎｔｒｏｎ™／Ｓｃｈｅｒｉｎｇ／Ｅｎｚｏｎ）、ＰＥＧ-インターフェロンα-２ａ（ＰＥＧＡＳＹＳ™／Ｒｏｃｈｅ）及びＰＥＧ-Ｇ-ＣＳＦ（Ｎｅｕｌａｓｔａ™／Ａｍｇｅｎ）並びに臨床試験中の多数のその他など、幾つかのＰＥＧ化されたタンパク質の商品化によって証明されている。

【０１６８】

要約すると、ＰＥＧ基は、一般に、ＰＥＧ部分上の反応性基（例えば、アルデヒド、アミノ、チオール又はエステル基）を通じた、本発明の化合物上の反応性基（例えば、アルデヒド、アミノ又はエステル基）へのアシル化又は還元的アルキル基を介して、本発明の組成物のペプチド部分へ付着される。

【０１６９】

合成ペプチドのＰＥＧ化のための有用な戦略は、溶液中での抱合体結合を形成することを通じて、ペプチド及びＰＥＧ部分（各々が他のＰＥＧ部分に対して相互に反応性である特別な官能性を有する。）を結合させることからなる。ペプチドは、慣用の固相合成を用いて容易に調製することが可能である（例えば、図５及び６並びに本明細書に添付されている説明文を参照されたい。）。ペプチドは、特異的な部位における適切な官能基で「予め活性化」される。前駆体は、ＰＥＧ部分との反応前に精製され、完全に性質決定される。ペプチドのＰＥＧとの連結は、通常、水相で起こり、逆相分析ＨＰＬＣによって容易にモニターすることが可能である。ＰＥＧ化されたペプチドは、調製用ＨＰＬＣによって容易に精製し、分析用ＨＰＬＣ、アミノ酸分析及びレーザー脱離質量分析法によって性質決定することが可能である。

【０１７０】

ＰＥＧは、市販されている周知の水溶性ポリマーであるか、又は、当技術分野で周知の方法に従い、エチレングリコールの開環重合により調製することができる（Ｓａｎｄｌｅｒ及びＫａｒｏ、Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｖｏｌ．３、１３８－１６１頁）。本願において、「ＰＥＧ」という用語は、サイズ又はＰＥＧの末端への修飾に関わらず、１、２又は多官能型のあらゆるポリエチレングリコール分子を包含するために広く使用され、式：

$$X\text{-}O(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2OH \qquad (X)$$

（ｎは２０～２３００であり、Ｘは、Ｈ又は末端修飾、例えばC_{1-4}アルキルである。）

によって表される。

【０１７１】

幾つかの有用な実施形態において、本発明で使用されるＰＥＧは、一方の末端がヒドロキシ又はメトキシで終わっている（即ち、Ｘは、Ｈ又はCH_3（「メトキシＰＥＧ」）である。）。ＰＥＧの他の末端（式（ＩＩ）では、ＯＨで終結するように示されている。）は、エーテル酸素結合、アミン結合又はアミド結合を介して活性化部分に共有結合することが注目される。化学的構造において使用される場合、「ＰＥＧ」という用語は、示されている水酸基の水素なしの上記式（ＩＩ）を含み、エーテル結合を形成するためにリンカーの遊離炭素原子との反応に利用可能な酸素が残存する。より具体的には、ＰＥＧをペプチドに抱合するために、ペプチドは、「活性化された」形態のＰＥＧと反応されなければならない。活性化されたＰＥＧは、式：

$$(PEG)\text{-}(A) \qquad (X1)$$

（ＰＥＧ（上で定義されている。）は、活性化部分（Ａ）の炭素分子に共有結合して、エーテル結合、アミン結合又はアミド結合を形成し、（Ａ）は、ペプチドのアミノ酸残基上のアミノ、イミノ若しくはチオール基又はペプチドに共有結合されたリンカー部分と反応することが可能な反応性基を含有する。）

によって表すことができる。

【０１７２】

活性化されたＰＥＧの調製及び生物学的に活性なペプチドへのその抱合のための技術は、本分野において周知である。（例えば、米国特許第５，６４３，５７５号、同第５，９１９，４５５号、同第５，９３２，４６２号及び同第５，９９０，２３７号；Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，ＰＥＧｙｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅｓ，ＥＰ ０５７５５４５ Ｂ１；Ｐｅｔｉｔ，Ｓｉｔｅ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｐｒｏｔｅｉｎ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ，米国特許第６，４５１，９８６号及び同第６，５４８，６４４号；Ｓ．Ｈｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）

with reactive endgroups：I．Modification of proteins，J．Bioactive Compatible Polymers，10：145-187（1995）；Y．Lu et al，Pegylated peptides III：Solid-phase synthesis with PEGylating reagents of varying molecular weight：synthesis of multiply PEGylated peptides，Reactive Polymers，22：221-229（1994）；A．M．Felix et al．，PEGylated Peptides IV：Enhanced biological activity of site-directed PEGylated GRF analogs，Int．J．Peptide Protein Res．，46：253-264（1995）；A．M．Felix，Site-specific polyethylene glycol）ylation of peptides，ACS Symposium Series 680（poly（ethylene glycol））：218-238（1997）；Y．Ikeda et al．，Polyethylene glycol derivatives，their modified peptides，methods for producing them and use of the modified peptides，EP 0473084 B1；G．E．Means et al．，Selected techniques for the modification of protein side chains，in：Chemical modification of proteins，Holden Day，Inc．，219（1971）参照。）。

【0173】

ＰＥＧ-アルデヒド又はＰＥＧ-アルデヒド水和物などの活性化されたＰＥＧは、公知の手段によって化学的に合成し、又は商業的な入手源（例えば、Ｓｈｅａｒｗａｔｅｒ Ｐｏｌｙｍｅｒｓ，（Ｈｕｎｔｓｖｉｌｌｅ，Ａｌ）又はＥｎｚｏｎ，Ｉｎｃ．（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．））から取得することができる。

【0174】

本発明における有用な活性化されたＰＥＧの例は、Ｓｈｅａｒｗａｔｅｒ Ｐｏｌｙｍｅｒｓ（Ｈｕｎｔｓｖｉｌｌｅ，ＡＩ）から市販されているＰＥＧ-プロピオンアルデヒドなどのＰＥＧ-アルデヒド化合物（例えば、メトキシＰＥＧ-アルデヒド）である。ＰＥＧ-プロピオンアルデヒドは、式ＰＥＧ-CH_2CH_2ＣＨＯによって表される。（例えば、米国特許第５，２５２，７１４号参照）。有用な活性化されたＰＥＧの他の例は、ＰＥＧアセトアルデヒド水和物及びＰＥＧビスアルデヒド水和物であり、後者は、二機能性に活性化された構造を与える。（例えば、Ｂｅｎｔｌｅｙｅｔ ａｌ．，Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ａｌｄｅｈｙｄｅ ｈｙｄｒａｔｅｓ ａｎｄ ｒｅｌａｔｅｄ ｐｏｌｙｍｅｒｓ ａｎｄ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｍｏｄｉｆｙｉｎｇ ａｍｉｎｅｓ，米国特許第５，９９０，２３７号参照）。

【0175】

本発明のＰＥＧ抱合されたペプチドを作製するための別の有用な活性化されたＰＥＧは、メトキシＰＥＧ-マレイミド（マレイミドモノメトキシＰＥＧなど）などの（但し、これに限定されない。）ＰＥＧ-マレイミド化合物であり、本発明のＰＥＧ抱合されたペプチドを作製するために特に有用である。（例えば、Ｓｈｅｎ，Ｎ-ｍａｌｅｉｍｉｄｙｌ ｐｏｌｙｍｅｒ ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ，米国特許第６，６０２，４９８号；Ｃ．Ｄｅｌｇａｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ ｕｓｅｓ ａｎｄ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｆ ＰＥＧ-ｌｉｎｋｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎｓ．，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒａｐ．Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ，９：２４９-３０４（１９９２）；Ｓ．Ｚａｌｉｐｓｋｙ ｅｔ ａｌ．，Ｕｓｅ ｏｆ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌｉｚｅｄ ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ｓ ｆｏｒ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅｓ，ｉｎ：Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ） ｃｈｅｍｉｓ

try：Biotechnical and biomedical applications（J.M.Harris，Editor，Plenum Press：New York，347-370（1992）；S.Herman et al.，Polyethylene glycol）with reactive endgroups：I.Modification of proteins，J.Bioactive Compatible Polymers，10：145-187（1995）；P.J.Shadle et al.，Conjugation of polymer to colony stimulating factor-1，米国特許第4，847，325号；G.Shaw et al.，Cysteine added variants IL-3 and chemical modifications thereof，米国特許第5，166，322号及びEP 0469074 B1；G.Shaw et al.，Cysteine added variants of EPO and chemical modifications thereof，EP 0668353 A1；G.Shaw et al.，Cysteine added variants G-CSF and chemical modifications thereof，EP 0668354 A1；N.V.Katre et al.，Interleukin-2 muteins and polymer conjugation thereof，米国特許第5，206，344号；R.J.Goodson and N.V.Katre，Site-directed pegylation of recombinant interleukin-2 at its glycosylate site，Biotechnology，8：343-346（1990））。

【0176】

ポリ（エチレングリコール）ビニルスルホンは、チオール化されたアミノ酸残基での、例えば、C残基での抱合によって、本発明のPEG抱合されたペプチドを作製するための別の有用な活性化されたPEGである。（例えば、M.Morpurgo et al.，Preparation and characterization of poly（ethylene glycol）vinyl sulfone，Bioconj.Chem.，7：363-368（1996）；Harris，Functionalization of polyethylene glycol for formation of active sulfone-terminated PEG derivatives for binding to proteins and biologically compatible materials，米国特許第5，446，090号；同第5，739，208号；同第5，900，461号；同第6，610，281号及び同第6，894，025号；and Harris，Water soluble active sulfones of poly（ethylene glycol），WO 95/13312 A1も参照されたい。）。

【0177】

本発明において有用であるPEGの別の活性化された形態は、PEG-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル化合物、例えば、メトキシPEG-N-ヒドロキシスクシンイミジル（NHS）エステルである。

【0178】

PEGのヘテロ二機能的に（heterobifunctionally）活性化された形態も有用である。（例えば、Thompson et al.，PEGylation reagents and biologically active compounds formed therewith，米国特許第6，552，170号を参照されたい。）

典型的には、トキシンペプチド又はトキシンペプチドを含む融合タンパク質は、チオール活性化されたPEG化合物、ジオール活性化されたPEG化合物、PEGヒドラジド化合物、PEG-オキシアミン化合物又はPEG-ブロモアセチル化合物など（但し、これ

らに限定されない。）などの活性化されたＰＥＧ化合物と、公知の化学的技術によって反応される。（例えば、Ｓ．Ｈｅｒｍａｎ，Ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ｗｉｔｈ Ｒｅａｃｔｉｖｅ Ｅｎｄｇｒｏｕｐｓ：Ｉ．Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｊ．Ｂｉｏａｃｔｉｖｅ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｔｉｂｌｅ Ｐｏｌｙｍｅｒｓ，１０：１４５-１８７（１９９５）；Ｓ．Ｚａｌｉｐｓｋｙ，Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅ Ｇｌｙｃｏｌ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｗｉｔｈ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｌｙ Ａｃｔｉｖｅ Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ，１６：１５７-１８２（１９９５）；Ｒ．Ｇｒｅｅｎｗａｌｄ ｅｔ ａｌ．，Ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ ｄｒｕｇｓ ａｎｄ ｐｒｏｄｒｕｇｓ：ａ ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ ｒｅｖｉｅｗ，Ｃｒｉｔｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ，１７：１０１-１６１（２０００）を参照されたい。）。

【０１７９】

Ｎ末端のＰＥＧ化のための方法は、実施例３１～３４、４５及び４７～４８において、本明細書に例示されているが、当業者によって利用可能なＰＥＧ化法を決して限定するものではない。

【０１８０】

実際に所望されるように、ＰＥＧに対するあらゆる分子量、例えば、約１，０００又は２，０００ダルトン（Ｄａ）～約１００，０００Ｄａ（ｎは、２０～２３００）である。）を使用することが可能である。好ましくは、本発明のＰＥＧ抱合されたペプチド中で使用されるＰＥＧの総分子量又は合計分子量は、約３，０００Ｄａ又は５，０００Ｄａから約５０，０００Ｄａ又は６０，０００Ｄａ（合計のｎは、７０～１，４００）、より好ましくは約１０，０００Ｄａ～約４０，０００Ｄａ（合計のｎは、約２３０～約９１０）である。ＰＥＧに対する最も好ましい総質量は、約２０，０００Ｄａ～約３０，０００Ｄａ（合計のｎは、約４５０～約６８０である。）である。ＰＥＧ中の反復単位の数「ｎ」は、ダルトンで記載された分子量に対して近似される。活性化されたリンカー上のＰＥＧの総分子量は、医薬用途に対して適切であることが好ましい。従って、ＰＥＧ分子の総分子量は、約１００，０００Ｄａを超えるべきでない。

【０１８１】

多糖ポリマーは、タンパク質修飾のために使用することができる水溶性ポリマーの別の種類である。デキストランは、主にα１-６結合によって連結されたグルコースの各サブユニットから構成される多糖ポリマーである。デキストラン自体は、多くの分子量範囲で入手可能であり、約１ｋＤ～約７０ｋＤまでの分子量で容易に入手可能である。デキストランは、単独の半減期延長部分として、又は別の半減期延長部分（例えば、Ｆｃ）と組み合わせて、本発明において使用するための適切な水溶性ポリマーである。例えば、ＷＯ９６／１１９５３及びＷＯ９６／０５３０９を参照されたい。治療用免疫グロブリン又は診断用免疫グロブリンに抱合されたデキストランの使用が報告されており、例えば、欧州特許公報０３１５４５６号（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）を参照されたい。本発明における半減期延長部分としてデキストランが使用される場合、約１ｋＤ～約２ｋＤのデキストランが好ましい。

【０１８２】

リンカー。何れの「リンカー」基又は部分（すなわち、式Ｉ-ＩＸ中の「-（Ｌ）$_f$-」又は「-（Ｌ）$_g$-」）も、場合によって使用される。リンカーが存在する場合、リンカーは、主にスペーサーとして働くので、その化学構造は重要でない。本明細書に上述されているように、リンカー部分（-（Ｌ）$_f$-及び／又は-（Ｌ）$_g$-）は、存在するとすれば、本発明の組成物中に存在し得る、他の何れのリンカーとも独立に同一又は別異であることが可能である。例えば、「（Ｌ）$_f$」は、本発明における他の何れの「（Ｌ）$_f$」又は何れの「（Ｌ）$_g$」とも同一の部分又は異なる部分を表すことが可能である。リンカーは、好ましくは、ペプチド結合により連結されたアミノ酸から構成される。したがっ

て、幾つかの実施形態において、リンカーは、ペプチド結合により連結された１～約３０個のアミノ酸から構成され、アミノ酸は、天然に存在する２０個のアミノ酸から選択される。これらのアミノ酸の幾つかは、当業者によって十分に理解されているように、グリコシル化することが可能である。例えば、シアル化部位を構成する有用なリンカー配列は、$X_1X_2NX_4X_5G$（配列番号６３７）であり、X_1、X_2、X_4及びX_5は、各々独立に、任意のアミノ酸残基である。）である。

【０１８３】

幾つかの実施形態において、１～２０個のアミノ酸は、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン及びリジンから選択される。より好ましくは、リンカーは、グリシン及びアラニンなどの、立体的に妨害されないアミノ酸の過半数から構成される。従って、好ましいリンカーには、ポリグリシン（特に、$(Gly)_4$、(Gly_5)）、ポリ（Ｇｌｙ-Ａｌａ）及びポリアラニンが含まれる。他の好ましいリンカーは、本明細書において「Ｌ５」（ＧＧＧＧＳ；配列番号６３８）、「Ｌ１０」（ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ；配列番号７９）、「Ｌ２５」ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ；配列番号８４）として特定されるリンカー、並びに、以下の実施例に使用されている全てのリンカーである。しかしながら、本明細書に記載されているリンカーは、典型的なものであり、本発明の範囲に属するリンカーは、さらに長くすることが可能であり、他の残基を含むことが可能である。

【０１８４】

ペプチドリンカーブ部分（Ｌ）を含む、本発明の組成物の幾つかの実施形態において、酸性残基、例えば、グルタミン酸又はアスパラギン酸残基が、リンカー部分（Ｌ）のアミノ酸配列中に配置される。例には、以下のペプチドリンカー配列が含まれる。

【０１８５】

【化１】

GGEGGG (配列番号： 639);

GGEEEGGG (配列番号： 640);

GEEEG (配列番号： 641);

GEEE (配列番号： 642);

GGDGGG (配列番号： 643);

GGDDDGG (配列番号： 644);

GDDDG (配列番号： 645);

GDDD (配列番号： 646);

GGGGSDDSDEGSDGEDGGGGS (配列番号： 647);

WEWEW (配列番号： 648);

FEFEF (配列番号： 649);

EEEWWW (配列番号： 650);

EEEFFF (配列番号： 651);

WWEEEWW (配列番号： 652); or

FFEEEFF (配列番号： 653).

【０１８６】

他の実施形態においては、リンカーは、リン酸化部位、例えば、$X_1X_2YX_3X_4G$（配列番号６５４）（X_1、X_2、X_3及びX_4は、各々独立に、任意のアミノ酸残基である。）；$X_1X_2SX_3X_4G$（配列番号６５５）（X_1、X_2、X_3及びX_4は、各々独立に、任意のアミノ酸残基である。）；又は$X_1X_2TX_3X_4G$（配列番号６５６）（X_1、X_2、X_3及びX_4は、各々独立に、任意のアミノ酸残基である。）を構成す

る。

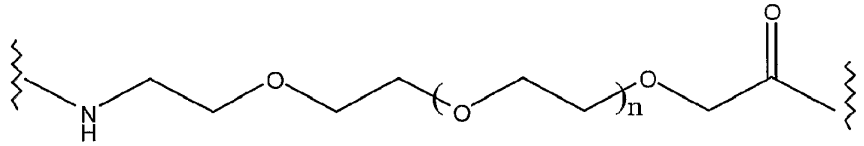
【０１８７】

非ペプチドリンカーも可能である。例えば、－ＮＨ－（ＣＨ$_2$）$_s$－Ｃ（Ｏ）－（式中、ｓ＝２～２０）などのアルキルリンカーを使用することが可能である。これらのアルキルリンカーは、さらに、低級アルキル（例えば、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）低級アシル、ハロゲン（例えば、Ｃｌ、Ｂｒ）、ＣＮ、ＮＨ$_2$、フェニルなどの、立体的に妨害を生じないあらゆる基によって置換することが可能である。典型的な非ペプチドリンカーは、ＰＥＧリンカー、

【０１８８】

【化２】

(XII)



（ｎは、リンカーが１００～５０００ｋＤ、好ましくは１００～５００ｋＤの分子量を有するようになる。）

である。ペプチドリンカーは、上記と同一の様式で誘導体を形成するために改変することが可能である。

【０１８９】

誘導体。本発明者らは、化合物のペプチド及び／又は半減期延長部分の一部を誘導体化することも想定している。このような誘導体は、化合物の溶解度、吸収、生物学的半減期などを改善することが可能である。あるいは、前記部分は、化合物の全ての望ましくない副作用などを削除又は軽減することが可能である。典型的な誘導体には、以下のとおりである化合物が含まれる。

【０１９０】

１．化合物又はそのある部分が環状である。例えば、ペプチド部分は、（例えばリンカー中に）２つ又はそれ以上のＣｙｓ残基を含有するように修飾することが可能であり、これはジスルフィド結合形成によって環状化することができる。

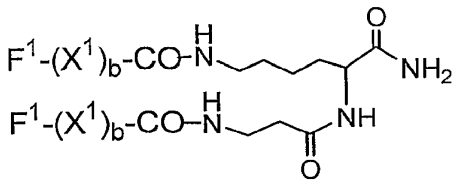
【０１９１】

２．化合物は、架橋されているか、又は分子間を架橋できるようにされる。例えば、ペプチド部分は、１つのＣｙｓ残基を含有し、これにより、リンカー分子と分子間ジスルフィド結合を形成することができるように修飾することが可能である。化合物は、以下に示されている分子におけるように、そのＣ末端を通じて架橋することも可能である。

【０１９２】

【化３】

(XIII)



【０１９３】

３．非ペプチジル連結（結合）が、１つ又はそれ以上のペプチジル［－Ｃ（Ｏ）ＮＲ－］連結を置換する。典型的な非ペプチジル連結は、－ＣＨ$_2$－カルバマート［－ＣＨ$_2$－ＯＣ（Ｏ）ＮＲ－］、ホスホナート結合、－ＣＨ$_2$－スルホンアミド［－ＣＨ$_2$－Ｓ（Ｏ

)$_2$ＮＲ－］、尿素［－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨ－］、－ＣＨ$_2$－二級アミン及びアルキル化されたペプチド［－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^6－（式中、Ｒ^{6}は低級アルキルである。）］である。

【０１９４】

４．Ｎ末端が、化学的に誘導体化されている。典型的には、Ｎ末端は、アシル化され、又は置換されたアミンへと修飾することが可能である。典型的なＮ末端誘導体基には、－ＮＲＲ^1（－ＮＨ$_2$以外）、－ＮＲＣ（Ｏ）Ｒ^1、－ＮＲＣ（Ｏ）ＯＲ^1、－ＮＲＳ（Ｏ）$_2$Ｒ^1、－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨＲ^1、スクシンイミド又はベンジルオキシカルボニル－ＮＨ－（ＣＢＺ－ＮＨ－）（Ｒ及びＲ$_1$は、各々独立に、水素又は低級アルキルであり、フェニル環は、Ｃ$_1$－Ｃ$_4$アルキル、Ｃ$_1$－Ｃ$_4$アルコキシ、クロロ及びブロモからなる群から選択される１～３この置換基で置換されることが可能である。）が含まれる。

【０１９５】

５．遊離のＣ末端が、誘導体化されている。典型的には、Ｃ末端は、エステル化され又はアミド化される。例えば、配列番号５０４～５０８の何れかを有する本発明の化合物のＣ末端に、（ＮＨ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＮＨ$_2$）$_2$を付加するために、本分野で記載されている方法を使用することが可能である。同様に、例えば、配列番号９２４～９５５、９６３～９７２、１００５～１０１３又は１０１８～１０２３の何れかを有する本発明の化合物のＣ末端に、ＮＨ$_2$を付加するために、本分野で記載されている方法を使用することが可能である。典型的なＣ末端誘導体基には、例えば、－Ｃ（Ｏ）Ｒ^2（Ｒ^{2}は、低級アルコキシ又は－ＮＲ^{3}Ｒ^{4}である（Ｒ^{3}及びＲ^{4}は、独立に、水素又はＣ$_1$－Ｃ$_8$アルキル（好ましくは、Ｃ$_1$－Ｃ$_4$アルキル）である。）。）が含まれる。

【０１９６】

６．ジスルフィド結合は、別の、好ましくはより安定な、架橋部分（例えば、アルキレン）と置換される。例えば、Ｂｈａｔｎａｇａｒ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３９：３８１４－９；Ａｌｂｅｒｔｓ ｅｔ ａｌ．（１９９３） Ｔｈｉｒｔｅｅｎｔｈ Ａｍ．Ｐｅｐ．Ｓｙｍｐ．，３５７－９を参照されたい。

【０１９７】

７．１つ又はそれ以上の各アミノ酸残基が修飾される。以下に詳しく記載されているように、様々な誘導体化剤が、選択された側鎖又は末端残基と特異的に反応することが知られている。

【０１９８】

リジン残基及びアミノ末端残基を、コハク酸又は他のカルボキシル酸無水物と反応させることが可能であり、これは、リジン残基の電荷を逆転させる。αアミノ含有残基を誘導体化するための他の適切な試薬には、イミドエステル（メチルピコリンイミダートなど）、ピリドキサルリン酸、ピリドキサール、クロロボロヒドリド、トリニトロベンゼンスルホン酸、Ｏ－メチルイソ尿素、２，４－ペンタンジオン及びグリオキシラートとのトランスアミナーゼ触媒反応が含まれる。

【０１９９】

アルギニル残基は、１個又は数個の慣用の試薬の組み合わせ（フェニルグリオキサール、２，３－ブタンジオン、１，２－シクロヘキサンジオン及びニンヒドリンなど）との反応により修飾することができる。グアニジン官能基のｐＫａが高いため、アルギニン残基の誘導体化の際には、該反応をアルカリ条件中で行う必要がある。さらに、これらの試薬は、リシンの基及びアルギニンのε アミノ基と反応させることができる。

【０２００】

チロシン残基の具体的な修飾は広範に研究されており、特に、芳香族ジアゾニウム化合物又はテトラニトロメタンとの反応によるチロシン残基内へのスペクトル標識の導入に関心がもたれている。最も一般的には、Ｎ－アセチルイミジゾール及びテトラニトロメタンを使用して、それぞれＯ－アセチルチロシル種及び３－ニトロ誘導体が形成される。

【０２０１】

カルボキシル側鎖基（アスパルチル又はグルタミル）は、カルボジイミド（Ｒ′－Ｎ＝Ｃ＝Ｎ－Ｒ′）（１－シクロヘキシル－３－（２－モルホリニル－（４－エチル）カルボ

ジイミド又は１－エチル－３－（４－アゾニア－４，４－ジメチルペンチル）カルボジイミドなど）との反応により選択的に修飾することができる。さらに、アスパルチル及びグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によりアスパラギニル及びグルタミニル残基に変換することができる。

【０２０２】

グルタミン及びアスパラギン残基は、対応するグルタミン酸及びアスパラギン酸残基に脱アミド化することが可能である。あるいは、これらの残基は、穏やかな酸性条件下で脱アミド化され得る。これらの残基のいずれの形態も本発明の範囲内に含まれる。

【０２０３】

システイン残基は、ジスルフィド結合を除去するために、又は、逆に架橋を安定化させるために、アミノ酸残基又は他の部分によって置換することが可能である。例えば、「Ｂｈａｔｎａｇａｒ ｅｔ ａｌ．，（１９９６），Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３９：３８１４－９」を参照されたい。

【０２０４】

二官能性物質での誘導体化は、ペプチド若しくはそれらの官能性誘導体を水溶性支持マトリックスに、又は他の高分子半減期延長部分に架橋するのに有用である。一般に用いられる架橋剤には、例えば、１，１－ビス（ジアゾアセチル）－２－フェニルエタン、グルタルアルデヒド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（例えば、４－アジドサリチル酸とのエステルなど）、ホモ二官能性イミドエステル（３，３’－ジチオビス（スクシンイミジルプロピオナートなどのジスクシンイミジルエステルなど）、及び二官能性マレイミド（ビス－Ｎ－マレイミド－１，８－オクタンなど）が含まれる。メチル－３－[（ｐ－アジドフェニル）ジチオ]プロピオイミダートなどの誘導体化剤は、光の存在下で架橋を形成しうる光活性化可能な中間体を与える。あるいは、反応性の水不溶性マトリックス、例えば、臭化シアンで活性化される炭水化物、及び米国特許第３，９６９，２８７号、第３，６９１，０１６号、第４，１９５，１２８号、第４，２４７，６４２号、第４，２２９，５３７号及び第４，３３０，４４０号に記載の反応性基質が、タンパク質の固定化に使用される。

【０２０５】

炭水化物（オリゴ糖）基は、タンパク質中のグリコシル化部位であることが知られている部位に都合よく結合させることができる。一般には、それらが配列Ａｓｎ－Ｘ－Ｓｅｒ／Ｔｈｒ（式中、Ｘは、プロリン以外の任意のアミノ酸でありうる。）の一部である場合には、Ｏ－結合オリゴ糖はセリン（Ｓｅｒ）又はトレオニン（Ｔｈｒ）残基に、Ｎ結合オリゴ糖はアスパラギン（Ａｓｎ）残基に結合させる。Ｘは、好ましくは、プロリンを除く１９個の天然に存在するアミノ酸の１つである。Ｎ結合及びＯ－結合オリゴ糖ならびに各タイプに見出される糖残基の構造は様々である。それらの両方に一般に存在する糖の１つのタイプは、Ｎ－アセチルノイラミン酸（シアル酸と称される。）である。シアル酸は、通常、Ｎ－結合及びＯ－結合オリゴ糖の両方の末端残基であり、その負電荷のため、グリコシル化化合物に酸性特性を付与する。このような部位を本発明の化合物のリンカー内に含めることが可能であり、該部位は、好ましくは、（例えば、ＣＨＯ、ＢＨＫ、ＣＯＳなどの哺乳動物細胞中での）ポリペプチド化合物の組換え産生中に細胞によりグリコシル化される。しかしながら、このような部位は、当技術分野で公知の合成又は半合成方法により更にグリコシル化することができる。

【０２０６】

他の可能な修飾には、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリン又はトレオニン残基のヒドロキシル基のリン酸化が、Ｃｙｓ中の硫黄原子の酸化、リジン、アルギニン及びヒスチジン側鎖のα－アミノ基のメチル化が含まれる。Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ（Ｗ Ｈ Ｆｒｅｅｍａｎ ＆ Ｃｏ．，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ），ｐｐ．７９－８６（１９８３）を参照されたい。

【０２０７】

本発明の化合物は、ＤＮＡレベルでも変化させることが可能である。化合物の何れの部分のＤＮＡ配列も、選択された宿主細胞とより適合的なコドンへと変化させることが可能である。好ましい宿主細胞であるＥ．コリの場合、最適化されたコドンが本分野において公知である。制限部位を除去するために、又はサイレントな制限部位を含めるためにコドンを置換することが可能であり、これは、選択された宿主細胞中でのＤＮＡのプロセッシングを補助することができる。半減期延長部分、リンカー及びペプチドＤＮＡ配列は、先述の配列の変化の何れをも含むように修飾することが可能である。

【０２０８】

抱合誘導体を調製する方法も想定される。腫瘍細胞は、例えば、腫瘍細胞の正常な対応物には見出されないエピトープを示す。このようなエピトープには、例えば、それらの迅速な増殖から生じる様々な翻訳後修飾が含まれる。従って、本発明の一態様は、

ａ）標的エピトープに特異的に結合する少なくとも１つの無作為化されたペプチドを選択すること、並びに

ｂ）（ｉ）少なくとも１つの半減期延長部分（Ｆｃドメインが好ましい。）、（ｉｉ）選択されたペプチドの少なくとも１つのアミノ酸配列及び（ｉｉｉ）エフェクター分子を含む薬剤を調製すること、

を含む方法である。

【０２０９】

標的エピトープは、好ましくは、腫瘍特異的エピトープ又は病原性生物に対して特異的なエピトープである。エフェクター分子は、上記抱合対の何れでもあり得、好ましくは放射性同位体である。

【０２１０】

製造の方法

本発明は、本発明のポリペプチドを作製する上で有用な核酸、発現ベクター及び宿主細胞にも関する。宿主細胞は、真核細胞とすることが可能であり、哺乳動物細胞が好ましく、ＣＨＯ細胞が最も好ましい。宿主細胞は、原核細胞とすることも可能であり，Ｅ．コリ細胞が最も好ましい。

【０２１１】

本発明の化合物は、概ね、組換えＤＮＡ技術を用いて、形質転換された宿主細胞中で作製することが可能である。これを行うために、ペプチドをコードする組換えＤＮＡ分子が調製される。このようなＤＮＡ分子を調製する方法は、本分野において周知である。例えば、ペプチドをコードする配列は、適切な制限酵素を用いてＤＮＡから切り出すことが可能である。あるいは、ＤＮＡ分子は、ホスホルアミダート法などの化学的合成技術を用いて合成することが可能である。また、これらの技術の組み合わせも使用することが可能である。

【０２１２】

本発明は、適切な宿主中でペプチドを発現することが可能なベクターも含む。ベクターは、適切な発現調節配列に作用可能に連結されたペプチドをコードするＤＮＡ分子を含む。ＤＮＡ分子の前又は後の何れかに、ベクター中にこの作用可能な結合を挿入する方法は、周知である。発現調節配列には、プロモーター、アクチベーター、エンハンサー、オペレーター、リボソーム結合部位、開始シグナル、停止シグナル、キャップシグナル、ポリアデニル化シグナル及び転写又は翻訳の調節に関わる他のシグナルが含まれる。

【０２１３】

その上にＤＮＡ分子を有する生じたベクターは、適切な宿主を形質転換するために使用される。この形質転換は、本分野において周知な方法を用いて実施することが可能である。

【０２１４】

多数の利用可能な、周知の宿主細胞の何れをも、本発明の実施において使用することが可能である。特定の宿主の選択は、本分野によって認知される多数の因子に依存する。これらには、例えば、選択された発現ベクターとの適合性、ＤＮＡ分子によってコードされ

るペプチドの毒性、形質転換の速度、ペプチドの回収の容易さ、発現の特徴、生物学的安全性及び費用が含まれる。全ての宿主が特定のＤＮＡ配列の発現に対して等しく効果的であり得るわけではないことを理解して、これらの因子の釣り合いを決定しなければならない。これらの一般的な指針の中で、有用な微生物宿主には、細菌（Ｅ．コリ種など）、酵母（サッカロミセス種など）及び他の真菌、昆虫、植物、培養中の哺乳動物（ヒトを含む。）細胞又は本分野において公知の他の宿主が含まれる。

【０２１５】

次に、形質転換された宿主は、培養及び精製される。宿主細胞は、所望の化合物が発現されるように慣用の発酵条件下で培養することが可能である。このような発酵条件は、本分野において周知である。最後に、ペプチドは、本分野において周知の方法によって、培養物から精製される。

【０２１６】

化合物は、合成法によって作製することも可能である。固相合成は、小ペプチドを作製する最も費用対効果が優れた方法であるので、各ペプチドを作製する好ましい技術である。例えば、周知の固相合成技術には、保護基、リンカー及び固相支持体の使用、並びに特異的な保護及び脱保護反応条件、リンカー切断条件、スカベンジャーの使用及び固相ペプチド合成の他の態様が含まれる。適切な技術は、本分野において周知である。（例えば、Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ（１９７３），Ｃｈｅｍ．Ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅｓ，ｐｐ．３３５-６１（Ｋａｔｓｏｙａｎｎｉｓ ａｎｄ Ｐａｎａｙｏｔｉｓ ｅｄｓ．）；Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ（１９６３），Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．８５：２１４９；Ｄａｖｉｓ ｅｔａｌ．（１９８５）．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｉｎｔｌ．１０：３９４-４１４；Ｓｔｅｗａｒｔ ａｎｄ Ｙｏｕｎｇ（１９６９），Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ：米国特許第３，９４１，７６３号；Ｆｉｎｎ ｅｔ ａｌ．（１９７６），Ｔｈｅ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ（３ｒｄ ｅｄ．） ２：１０５-２５３；ａｎｄ Ｅｒｉｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，（１９７６），Ｔｈｅ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ（３ｒｄ ｅｄ．） ２：２５７-５２７；“Ｐｒｏｔｅｃｔｉｎｇ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，” ３ｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｔ．Ｗ．Ｇｒｅｅｎｅ ａｎｄ Ｐ．Ｇ．Ｍ．Ｗｕｔｓ，Ｅｄｓ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，１９９９；ＮｏｖａＢｉｏｃｈｅｍ Ｃａｔａｌｏｇ，２０００；“Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ，Ａ Ｕｓｅｒ’ｓ Ｇｕｉｄｅ，” Ｇ．Ａ．Ｇｒａｎｔ，Ｅｄ．，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ＆ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，１９９２；“Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｃｈｅｍｔｅｃｈ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ ＆ Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，” Ｗ．Ｄ．Ｂｅｎｎｅｔ，Ｊ．Ｗ．Ｃｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎ，Ｌ．Ｋ．Ｈａｍａｋｅｒ，Ｍ．Ｌ．Ｐｅｔｅｒｓｏｎ，Ｍ．Ｒ．Ｒｈｏｄｅｓ，ａｎｄ Ｈ．Ｈ．Ｓａｎｅｉｉ，Ｅｄｓ．，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｃｈｅｍｔｅｃｈ，１９９８；“Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，２ｎｄ ｅｄ．，” Ｍ．Ｂｏｄａｎｓｚｋｙ，Ｅｄ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ-Ｖｅｒｌａｇ，１９９３；“Ｔｈｅ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，２ｎｄ ｅｄ．，” Ｍ．Ｂｏｄａｎｓｚｋｙ ａｎｄ Ａ．Ｂｏｄａｎｓｚｋｙ，Ｅｄｓ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ-Ｖｅｒｌａｇ，１９９４；“Ｐｒｏｔｅｃｔｉｎｇ Ｇｒｏｕｐｓ，” Ｐ．Ｊ．Ｋｏｃｉｅｎｓｋｉ，Ｅｄ．，Ｇｅｏｒｇ Ｔｈｉｅｍｅ Ｖｅｒｌａｇ，Ｓｔｕｔｔｇａｒｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ，１９９４；“Ｆｍｏｃ Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，” Ｗ．Ｃ．Ｃｈａｎ ａｎｄ Ｐ．Ｄ，Ｗｈｉｔｅ，Ｅｄｓ．，Ｏｘｆｏｒｄ Ｐｒｅｓｓ，２０００，Ｇ．Ｂ．Ｆｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．，Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ：Ａ Ｕｓｅｒ’ｓ Ｇｕｉｄｅ，１９９０，７７-１８３）。

【０２１７】

本発明の組成物が合成技術又は組換え技術によって調製されるか否かによらず、適宜、適切なタンパク質精製技術を含めることも可能である。本発明の組成物の幾つかの実施形

態において、トキシンペプチド部分及び／又は半減期延長部分又は他の何れかの部分は、定量又は検出を容易にするために、適切な同位体標識（例えば、^{125}Ｉ、^{14}Ｃ、^{13}Ｃ、^{35}Ｓ、^{3}Ｈ、^{2}Ｈ、^{13}Ｎ、^{15}Ｎ、^{18}Ｏ、^{17}Ｏなど）を含むように調製することが可能である。

【０２１８】

誘導体化されたペプチドを含有し、又は非ペプチド基を含有する化合物は、周知の有機化学技術によって合成することが可能である。

【０２１９】

化合物の使用

総論。本発明の化合物は、このような対象タンパク質の固有リガンドのアゴニスト、模倣物又はアンタゴニストとして、対象タンパク質に結合するそれらの能力に起因する薬理学的活性を有する。イオンチャンネルへの公知の関連を有する遺伝病（「チャンネル症（ｃｈａｎｎｅｌｏｐａｔｈｙ）」）は、医薬の様々な分野を包含し、その幾つかには、神経学、腎臓学、筋肉学及び心臓学が含まれる。イオンチャンネルを原因とする遺伝疾患のリストには、以下のものが含まれる。

【０２２０】

・嚢胞性繊維症（Cl^-チャンネル；ＣＦＴＲ）、
・デント病（タンパク質尿及び高カルシウム尿症；Cl^-チャンネル；ＣＬＣＮ５）、
・骨粗鬆症（Cl^-チャンネル；ＣＬＣＮ７）、
・家族性高インシュリン血症（ＳＵＲ１；ＫＣＮＪ１１；Ｋチャンネル）、
・糖尿病（ＫＡＴＰ／ＳＵＲチャンネル）、
・アンデルセン症候群（ＫＣＮＪ２、Ｋｉｒ２．１Ｋチャンネル）、
・バーター症候群（ＫＣＮＪ１；Ｋｉｒ１．１／ＲＯＭＫ；Ｋチャンネル）、
・遺伝性難聴（ＫＣＮＱ４；Ｋチャンネル）、
・遺伝成高血圧（リドル症候群）；ＳＣＮＮ１；上皮Ｎａチャンネル）、
・拡張型心筋症（ＳＵＲ２、Ｋチャンネル）、
・ＱＴ延長症候群又は心不整脈（心臓のカリウム及びナトリウムチャンネル）、
・ティモシー症候群（ＣＡＣＮＡ１Ｃ、Ｃａｖ１．２）、
・筋無力症（ＣＨＲＮＡ、ＣＨＲＮＢ、ＣＮＲＮＥ；ｎＡＣｈＲ）及び他の様々なミオパシー、
・高カリウム性周期性四肢麻痺（Ｎａ及びＫチャンネル）、
・てんかん（Na^+及びK^+チャンネル）、
・方麻痺性偏頭痛（ＣＡＣＮＡ１Ａ、Ｃａｖ２．１Ca^{2+}チャンネル及びＡＴＰ１Ａ２）、
・セントラルコア病（ＲＹＲ１、ＲｙＲ１；Ca^{2+}チャンネル）、及び
・パラミオトニア及びミオトニア（Na^+、Cl^-チャンネル）。

【０２２１】

Ｌ．Ｊ．Ｐｔａｃｅｋ ａｎｄ Ｙ－Ｈ Ｆｕ（２００４），Ａｒｃｈ．Ｎｅｕｒｏｌ．６１：１６６－８；Ｂ．Ａ．Ｎｉｅｍｅｙｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００１），ＥＭＢＯ ｒｅｐｏｒｔｓ ２１：５６８－７３；Ｆ．Ｌｅｈｍａｎｎ－Ｈｏｒｎ ａｎｄ Ｋ．Ｊｕｒｋａｔ－Ｒｏｔｔ（１９９９），Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｒｅｖ．７９：１３１７－７２参照。

先述のリストは遺伝性の疾患に関するが、これらの疾患中に引用されているチャンネルを標的とする分子も、他の起源又は起源が不明な関連疾患を治療する上でも有用であり得る。

【０２２２】

先述の疾患に加えて、イオンチャンネルを以下の治療のための標的として裏付ける証拠も提供されている。

【０２２３】

・鎌型赤血球貧血症（ＩＫＣａ１）－鎌型赤血球貧血症では、赤血球からの水分の喪失

が、ヘモグロビンの重合をもたらし、その後、溶血及び血管の閉塞をもたらす。いわゆるガルドスチャンネル（すなわち、ＩＫＣａ１）を通じたカルシウム流出後に、水分の喪失が起こる。従って、ＩＫＣａ１の遮断は、鎌形赤血球貧血症に対する治療的処置となり得る。

【０２２４】

・緑内障（ＢＫＣａ）-緑内障では、眼内圧が高すぎ、視神経の損傷、異常な眼機能を引き起こし、失明に至る場合もある。ＢＫＣａカリウムチャンネルの遮断は、眼内液の分泌を低下させ、平滑筋収縮を増加させることが可能であり、より低い眼内圧と眼内の神経保護をもたらす可能性がある。

【０２２５】

・多発性硬化症（Ｋｖ、ＫＣａ）、
・乾癬（Ｋｖ、ＫＣａ）、
・関節炎（Ｋｖ、ＫＣａ）、
・喘息（ＫＣａ、Ｋｖ）、
・アレルギー（ＫＣａ、Ｋｖ）、
・ＣＯＰＤ（ＫＣａ、Ｋｖ、Ｃａ）
・アレルギー性鼻炎（ＫＣａ、Ｋｖ）、
・肺繊維症、
・狼瘡（ＩＫＣａ１、Ｋｖ）、
・移植、ＧｖＨＤ（ＫＣａ、Ｋｖ）、
・炎症性骨吸収（ＫＣａ、Ｋｖ）、
・歯周病（ＫＣａ、Ｋｖ）、

・糖尿病、Ｉ型（Ｋｖ）-Ｉ型糖尿病は、異常なグルコース、タンパク質及び脂質代謝を特徴とする自己免疫疾患であり、インシュリン欠乏又は耐性を伴う。本疾患では、Ｋｖ１．３発現Ｔリンパ球が、膵島を攻撃及び破壊し、β細胞の喪失をもたらす。Ｋｖ１．３の遮断は、炎症性サイトカインを減少させる。さらに、Ｋｖ１．３の遮断は、形質膜へのＧＬＵＴ４の転位を促進し、これにより、インシュリン感受性を増加させる。

【０２２６】

・肥満（Ｋｖ）、-Ｋｖ１．３は、エネルギー恒常性の調節及び食事によって誘発される肥満からの保護において重大な役割を果たしているようである。従って、Ｋｖ１．３遮断剤は、代謝速度を増加させることが可能であり、より大きなエネルギー使用及び減少した体重をもたらす。

【０２２７】

・再狭窄（ＫＣａ、Ca^{2+}）、-血管平滑筋細胞の増殖及び遊走は、新生内膜肥厚及び血管の再狭窄をもたらすことが可能である。過剰な新生内膜血管平滑筋細胞増殖には、ＩＫＣａ１の上昇した発現を伴う。従って、ＩＫＣａ１の遮断は、血管形成術後の再狭窄を防ぐための治療的戦略となり得る。

【０２２８】

・虚血（ＫＣａ、Ca^{2+}）-神経又は心虚血、細胞膜の脱分極は、電圧開口型ナトリウム及びカルシウムチャンネルの開口をもたらす。次いで、これにより、カルシウムの過剰負荷が引き起こされ得、これは細胞毒性である。電圧開口型ナトリウム及び／又はカルシウムチャンネルの遮断は、カルシウムの過剰負荷を低減し、細胞保護効果を与えることが可能である。さらに、細胞膜電位の調節及び安定化におけるそれらの重大な役割のために、電圧及びカルシウム活性化されるカリウムチャンネルの調節物質も、カルシウムの過剰負荷を低減し、細胞を保護するように作用することが可能である。

【０２２９】

・腎失禁（ＫＣａ）、腎失禁は、機能亢進した膀胱平滑筋細胞に関連する。カルシウムによって活性化されるカリウムチャンネルは、膀胱平滑筋細胞中で発現され、これらは膜電位を調節し、細胞収縮の力及び頻度を間接的に調節する。従って、カルシウムによって活性化されるカリウムチャンネルの開口剤は、膀胱内の電気的及び収縮活性を弱め、排尿

の刺激の低下をもたらす機構を提供する。

【０２３０】

・骨粗鬆症（Ｋｖ）、

・偏頭痛を含む疼痛（Na_v、ＴＲＰ［一過性受容体電位チャンネル］。Ｐ２Ｘ、Ca^{2+}、Ｎ型電圧開口型カルシウムチャンネルは、脊髄中の侵害受容神経伝達の中心的制御物質である。ジコノチド（Ｎ型カルシウムチャンネルのペプチド遮断剤）は、侵害受容神経伝達を低下させ、ヒトにおける重度の慢性痛の症状の緩和について、世界で広く承認されている。侵害受容特異的Ｎ型カルシウムチャンネルの新規遮断剤は、減少した副作用特性を有する鎮痛剤で改善される。

【０２３１】

・高血圧（Ca^{2+}）、-Ｌ型及びＴ型電圧開口型カルシウムチャンネルは、血管平滑筋細胞中で発現され、ここで、興奮-収縮のカップリング及び細胞の増殖を調節する。特に、Ｔ型カルシウムチャンネルの活性は、高血圧時の新生内膜形成に関連している。Ｌ型及びＴ型カルシウムチャンネルの遮断剤は、カルシウム流入を低下させ、平滑筋細胞の収縮を阻害するので、高血圧の臨床的治療に対して有用である。

【０２３２】

・創傷治癒、細胞遊走は、創傷治癒において中心的な役割を果たしている。細胞内カルシウム勾配は、ケラチン生成細胞及び繊維芽細胞中の細胞遊走機構の重要な制御物質として推定されている。さらに、細胞膜を横切るイオン流動は、細胞容積の変化を伴う。細胞容積を調節することによって、イオンチャンネルは、細胞遊走機構の稼働に必要とされる細胞内環境に寄与する。特に、ＩＫＣａ１は、細胞遊走のために、全般的に必要とされるようである。さらに、Ｋｖ１．３、Ｋｖ３．１、ＮＭＤＡ受容体及びＮ型カルシウムチャンネルは、リンパ球及び神経細胞の遊走と関連する。

【０２３３】

・発作又は卒中、

・アルツハイマー病、

・パーキンソン病（ｎＡＣＨＲ、Ｎａｖ）

双極性疾患（Ｎａｖ、Ｃａｖ）

・癌、多くのカリウムチャンネル遺伝子が増幅され、タンパク質サブユニットが多くの癌性症状において上方制御されている。カリウムチャンネル上方制御のための病態生理学的役割と合致して、カリウムチャンネル遮断剤は、おそらくは、カルシウム流入の阻害及びカルシウム依存性遺伝子発現に対する効果を通じて、子宮癌細胞及び肝細胞癌細胞の増殖を抑制することが示されている。

【０２３４】

・様々な神経系疾患、新血管疾患、代謝疾患及び自己免疫疾患。

【０２３５】

イオンチャンネルのアゴニスト及びアンタゴニストは何れも、治療的な利益を達成することが可能である。治療的な利益は、例えば、Ｋｖ１．３、ＩＫＣａ１、ＳＫＣａ、ＢＫＣａ、Ｎ型又はＴ型Ca^{2+}チャンネルなどを拮抗することから得ることが可能である。これらのチャンネルの小分子及びペプチドアンタゴニストは、インビトロ及びインビボでの有用性を有することが示されている。しかしながら、産生効率及び薬物動態における限界が、イオンチャンネルの阻害剤ペプチドの臨床的な調査を大きく妨げてきた。

【０２３６】

電位開口型カリウムチャンネルＫｖ１．３のペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の組成物は、自己免疫疾患に対する治療的価値を有する免疫抑制剤として有用である。例えば、このような分子は、多発性硬化症、１型糖尿病、疥癬、炎症性腸疾患及び関節リウマチを治療する上で有用である。（例えば、Ｈ．Ｗｕｌｆｆ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１１１，１７０３-１７１３ ａｎｄ Ｈ．Ｒｕｓ ｅｔ ａｌ．（２００５）ＰＮＡＳ １０２，１１０９４-１１０９９；Ｂｅｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｅｆｆｅｃｔｏｒ ｍｅｍｏｒｙ Ｔ ｃｅｌｌ

s with a selective inhibitor peptide of Kv1.3 channnels for therapy of autoimmune diseases, Molec. Pharmacol. 67(4):1369-81(2005);1 Beeton et al.(2006), Kv1.3:therapeutic target for cell-mediated autoimmune disease, electronic preprint at //webfiles.uci.edu/xythoswfs/webui/ 267029.1を参照)。電圧開口型カリウムチャンネルの阻害剤であるKv1.3は、炎症の様々な前臨床動物モデルにおいて調べられてきた。Kv1.3の小分子及びペプチド阻害剤は、オボアルブミン[C.Beeton et al.(2005) Mol.Pharmacol.67,1369]及び破傷風トキソイド[G.C.Koo et al.(1999) Clin.Immunol.197,99]に対する遅延型過敏症応答を遮断することが示されている。皮膚中の炎症を抑制することに加え、阻害剤は、抗体産生も低下させた[G.C.Koo et al.(1997) J.Immunol.158,5120]。Kv1.3アンタゴニストは、多発性硬化症(MS)のラット養子免疫伝達実験自己免疫脳脊髄炎(AT-EAE)モデルにおいて有効性を示した。KV1.3チャンネルは、MS患者から得たミエリン特異的T細胞上に過剰発現されており、MSを治療する上でKv1.3阻害剤が与え得る有用性に対するさらなる裏づけをもたらす。炎症性骨吸収も、歯周病の前臨床養子免疫伝達モデルにおけるKv1.3阻害剤によって抑制された[P.Valverde et al.,(2004) J.Bone Mineral Res.19,155]。本研究では、阻害剤は、細菌の外膜タンパク質(歯肉の炎症を誘発するために使用される細菌の一成分)に対する抗体産生をさらに遮断した。最近、前臨床ラットモデルにおいて、Kv1.3阻害剤の有効性が、プリスタンによって誘発された関節炎及び糖尿病を治療する上で示された[C.Beeton et al.(2006) preprint available at //webfiles.uci.edu/xythoswfs/webui/__xy-267029__1.]。Kv1.3チャンネルは、T細胞及びB細胞の全てのサブセット上に発現されているが、エフェクターメモリーT細胞及びクラスが転換されたメモリーB細胞は、Kv1.3に特に依存している[H.Wulff et al.(2004) J.Immunol.173,776].Gad5/insulin-specific T cells from patients with new onset type 1 diabetes, myelin-specific T cells from MS patients and T cells from the synovium of rheumatoid arthritis patients all overexpress Kv1.3 [C.Beeton et al.(2006) preprint at //webfiles.uci.edu/xythoswfs/webui/__xy-267029__1]。高脂肪食上に配置されたときに、Kv1.3を欠失したマウスの体重増加はより少なく[J.Xu et al.(2003) Human Mol.Genet.12,551]、変化したグルコース利用を示した[J.Xu et al.(2004) Proc.Natl.Acad.Sci.,101,3112]からである。Kv1.3は、肥満及び糖尿病の治療に対しても調査されている。乳癌試料[M.Abdul et al.(2003)Anticancer Res.23,3347]及び前立腺癌細胞株[S.P.Fraser et al.(2003) Pflugers Arch.446,559]も、Kv1.3を発現することが示されており、Kv1.3の遮断は、癌の治療に対して有用であり得る。Kv1.3阻害剤トキシンペプチドが関与する自己免疫疾患を治療する本発明の方法に従って治療することが可能な疾患は、多発性硬化症、1型糖尿病、疥癬、炎症性腸疾患、接触媒介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、喘息、アレルギー、再狭窄、全身性硬化症、繊維症、強皮症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、炎症性骨吸収、移植拒絶、移植片対宿主病並びに全身性紅斑性狼瘡(SLE)及び狼瘡の他の形態が含まれる。

【０２３７】
中間伝導ＩＫＣａ１のカルシウム活性化カリウムを発現する細胞の幾つかには、Ｔ細胞、Ｂ細胞、肥満細胞及び赤血球（ＲＢＣ）が含まれる。ＩＫＣａ１を欠損するマウスから得られたＴ細胞及びＲＢＣは、容積制御の欠損を示す[Ｔ．Ｂｅｇｅｎｉｓｉｃｈ ｅｔ ａｌ．（２００４） Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７９，４７６８１]。前臨床及び臨床試験は、鎌形赤血球貧血症を治療する上でのＩＫＣａ１阻害剤の有用性を示した[Ｊ．Ｗ．Ｓｔａｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００３） Ｂｌｏｏｄ １０１，２４１２；ｗｗｗ．ｉｃａｇｅｎ．ｃｏｍ]。ＩＫＣａ１チャンネルの遮断剤は、ＥＡＥを遮断することも示されており、それらがＭＳの治療において有用性を有し得ることを示唆している[Ｅ．Ｐ．Ｒｅｉｃｈ ｅｔ ａｌ．（２００５） Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３５，１０２７]。肥満細胞からのＩｇＥ媒介性ヒスタミン産生も、ＩＫＣａ１阻害剤によって遮断され[Ｓ．Ｍａｒｋ Ｄｕｆｆｙ ｅｔ ａｌ．（２００４） Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１４，６６]、従って、ＩＫＣａ１阻害剤は、喘息の治療においても有益であり得る。ＩＫＣａ１チャンネルは、活性化されたＴ及びＢリンパ球上で過剰発現されており[Ｈ．Ｗｕｌｆｆ ｅｔ ａｌ．（２００４） Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７３，７７６]、従って、多様な免疫疾患の治療において有用性を示し得る。免疫系以外では、ＩＫＣａ１阻害剤は、血管再狭窄のラットモデルにおいても有効性を示しており、従って、血管形成術後における再狭窄を防ぐための新規治療戦略となり得る[Ｒ．Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００３） Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ １０８，１１１９]。阻害剤は、インビボで内皮細胞増殖及び血管新生を抑制したので、ＩＫＣａ１アンタゴニストは、腫瘍血管新生の治療において有用であるとも考えられる[Ｉ．Ｇｒｇｉｃ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ．Ｔｈｒｏｍｂ．Ｖａｓｃ．Ｂｉｏｌ．２５，７０４]。ＩＫＣａ１チャンネルは、膵臓腫瘍において上方制御されており、阻害剤は、膵臓癌細胞株の増殖を遮断した[Ｈ．Ｊａｇｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００４） Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．６５，６３０]。ＩＫＣａ１アンタゴニストは、外傷性脳傷害によって引き起こされた急性脳損傷を軽減するためのアプローチにもなり得る[Ｆ．Ｍａｕｌｅｒ（２００４）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．２０，１７６１]。ＩＫＣａ１阻害剤で治療可能な疾患には、多発性硬化症、喘息、乾癬、接触媒介性皮膚炎、関節及び乾癬性関節炎、炎症性腸疾患、移植拒絶、移植片対宿主病、狼瘡、再狭窄、膵臓癌、腫瘍血管新生及び外傷性脳傷害が含まれる。

【０２３８】
従って、中間伝導度のカルシウム活性化カリウムチャンネルのペプチドアンタゴニストを取り込む本発明の分子ＩＫＣａは、免疫機能不全、多発性硬化症、１型糖尿病、疥癬、炎症性腸疾患、接触媒介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、喘息、アレルギー、再狭窄、全身性硬化症、繊維症、強皮症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、炎症性骨吸収、移植拒絶、移植片対宿主病及び狼瘡を治療するために使用することが可能である。

【０２３９】
従って、本発明は、多発性硬化症、１型糖尿病、疥癬、炎症性腸疾患、接触媒介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、喘息、アレルギー、再狭窄、全身性硬化症、繊維症、強皮症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、炎症性骨吸収、移植拒絶、移植片対宿主病又は狼瘡などの自己免疫疾患と診断された患者に、前記疾患の少なくとも１つの症候が前記患者において緩和されるように、本発明の組成物の治療的有効量を投与することを含む、自己免疫疾患を治療する方法を含む。「緩和された」とは、当該患者において、対象の症候が完全に消滅され、根絶され、除去され又は予防されているかどうかを問わず、和らげられ、提言され、減弱され、軟化され、軽減され（すなわち、より穏やか又は緩やかにする。）、鎮静され、鎮められ、減衰され、開放され、無化され、又は弱化されることを意味する。

【０２４０】
さらに、本発明は、多発性硬化症の少なくとも１つの症候を以前に経験した患者に、多発性硬化症の少なくとも１つの症候の再発が予防され、又は多発性硬化症の少なくとも１

つの症候が軽減されるように、本発明の組成物の予防的有効量を投与することを含む、多発性硬化症の症候の再発を予防又は軽減する方法に関する。

【０２４１】

自己免疫疾患を治療する本発明の方法及び多発性硬化症の症候の再発を予防又は軽減する方法において使用するのに好ましい本発明の組成物は、Ｐ（式Ｉにおけるように抱合される。）として、ＳｈＫペプチド、ＯＳＫ１ペプチド、ＣｈＴｘペプチド及び／又はマウロトキシン（Ｍｔｘ）ペプチドなどのＫｖ１．３若しくはＩＫＣａ１アンタゴニストペプチド又はこれらの何れかのペプチド類縁体を含む。

【０２４２】

例えば、抱合されたＳｈＫペプチドペプチド又はＳｈＫペプチド類縁体は、以下のものから選択されるアミノ酸配列を含むことが可能である。

【０２４３】

表２に記されている配列番号５、８８～２００、５４８～５６１、８８４～９５０又は１２９５～１３００。

【０２４４】

抱合されたＯＳＫ１ペプチドペプチド又はＯＳＫ１ペプチド類縁体は、以下のものから選択されるアミノ酸配列を含むことが可能である。

【０２４５】

表７に記されている配列番号２５、２９４～２９８、５６２～６３６、９８０～１２７４、

【０２４６】

【化４】

GVIINVSCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK (OSK1-S7)（配列番号：1303), 又は

GVIINVSCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK (OSK1-S7,K16,D20)（配列番号：1308)

【０２４７】

同じく例として、抱合されたＭＴＸペプチド、ＭＴＸペプチド類縁体、ＣｈＴｘペプチド又はＣｈＴｘペプチド類縁体は、以下から選択されるアミノ酸を含むことが可能である。

【０２４８】

表１３に記されている配列番号２０、３３０～３４３、１３０１、１３０２、１３０４～１３０７、１３０９、１３１１、１３１２若しくは１３１５～１３３６；又は表１４に記されている配列番号３６、５９、３４４～３４６若しくは１３６９～１３９０。

【０２４９】

同じくこれらの方法において有用なのは、以下から選択されたアミノ酸配列を含む、抱合された又は抱合されていない、Ｋｖ１．３又はＩＫＣａ１阻害剤トキシンペプチド類縁体である。

【０２５０】

表２に示されている配列番号８８、８９、９２、１４８～２００、５４８～５６１、８８４～９４９若しくは１２９５～１３００；又は表７に示されている配列番号９８０～１２７４；

【０２５１】

【化５】

GVIINVSCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK (OSK1-S7)（配列番号：1303), or GVIINVSCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK (OSK1-S7,K16,D20)（配列番号：1308)

又は、表１３に記されている配列番号３３０～３３７、３４１、１３０１、１３０２、１３０４～１３０７、１３０９、１３１１、１３１２及び１３１５～１３３６。

【０２５２】
これらの本発明の方法に従って、多発性硬化症、１型糖尿病、疥癬、炎症性腸疾患、接触媒介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、喘息、アレルギー、再狭窄、全身性硬化症、繊維症、強皮症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、炎症性骨吸収、移植拒絶、移植片対宿主病若しくは狼瘡など（但し、これらに限定されない。）自己免疫疾患と診断された患者、又は多発性硬化症の少なくとも１つの症候を以前に経験したことがある患者は、自己免疫疾患及びそれらの症候を熟知した、熟練した医療従事者（医師など）によって、十分に認識可能であり、及び／又は診断される。
【０２５３】
例えば、多発性硬化症の症候には、以下のものが含まれ得る。視覚的な症候、視神経炎（かすみ眼、眼痛、色覚の喪失、失明）；複視（複視）；眼振（痙攣性の眼の動き）；眼の測定障害（ｏｃｕｌａｒ　ｄｙｓｍｅｔｒｉａ）（定常的な過少又は過剰な眼の動き）；核間性眼筋麻痺（両眼間の協調の欠如、眼振、複視）；運動及び音の眼内閃光（眼を動かしたとき、又は突然の騒音に応答した閃光）；求心性の瞳孔の異常（異常な瞳孔の応答）など；
運動的症候、不全麻痺、不全単麻痺、不全対麻痺、不全片麻痺、四肢不全麻痺（筋衰弱-部分的な又は穏やかな麻痺）；麻痺、対麻痺、片麻痺、四肢麻痺（ｔｅｔｒａｐｌｅｇｉａ）、四肢麻痺（ｑｕａｄｒａｐｌｅｇｉａ）（麻痺-筋力の完全な喪失又はほぼ完全な喪失）；痙性（剛直、疼痛を引き起こし、罹患した四肢の自由な運動を制限する筋緊張の喪失）；構音障害（不明瞭な発語及び関連する発語上の問題）；筋萎縮（使用の欠如による筋肉の萎縮）；痙攣、こむら返り（筋肉の不随意的収縮）；緊張低下、間代性痙攣（姿勢に伴う問題）；間代性筋痙攣、筋波動症（痙動及び単収縮する筋肉、チック）；下肢静止不能症候群（特に、夜間に厄介な問題となる、不随意的な下肢の運動）；下垂足（歩行時に床に沿って足を引きずる）；反射機能不全（ＭＳＲ、バビンスキー反射、ホフマン反射、チャドック反射）など；
感覚性の症候、知覚異常（部分的な無感覚、刺痛、耳鳴り及び振動感覚）；知覚麻痺（完全な無感覚／感覚の喪失）；神経痛、神経病及び神経性の疼痛（明確な原因のない疼痛、灼熱感、掻痒感及び電気ショック感覚）；レルミッテ症候（頭を動かしているときの電気ショック及び耳鳴り感覚）など；
固有感覚機能不全（身体部分の位置感覚の喪失）；三叉神経痛（顔面痛）；
協調及び平衡の症候、運動失調（協調運動障害）；企図振戦（細かい運動を行うときの震え）；測定障害（恒常的な過少又は過剰な四肢運動）；前庭運動失調（内耳中の異常な平衡機能）；めまい（前庭運動失調に由来する悪心／嘔吐／乗り物酔いに対する感覚）；会話運動失調（協調した会話の困難、吃音）；ジストニア（四肢位置フィードバックの遅延）；反復拮抗運動不全（素早く交互運動（例えば、リズムに合わせて運動する）を行う能力の喪失）など；
腸、膀胱及び性的症候、頻尿、膀胱痙性（尿意逼迫及び失禁）；弛緩性膀胱、排尿筋・括約筋筋失調（排尿困難及び尿閉）；勃起障害（男性及び女性の性的不能）；オルガズム障害（オルガズムに達することができない）；逆行性射精（膀胱内への射精）；冷感症（性的に興奮した状態になることができない）；便秘（低頻度又は不定期な腸運動）；便意逼迫（腸の逼迫）；便失禁（腸失禁）など；
認知症候、うつ病；認知機能障害（短期及び長期記憶障害、健忘症、言葉を思い出す速度の遅延）；認知症；気分変動、情動不安定、多幸感；躁鬱症候群；不安；失語症、不全失語症（会話の理解及び発語の障害）など；並びに
その他の症候、疲労、ウートホフ症候群（熱を伴う症候の重度の増加）；胃食道逆流（胃酸逆流）；味覚及び嗅覚の障害；てんかん発作；嚥下困難、呼吸困難；並びに睡眠障害など。
【０２５４】
上に列記されている多発性硬化症の症候は単なる例示であり、一人の患者によって、又は複合した数人の患者によって経験され、本発明が適用される全ての可能な症候を網羅的

に記載することを意図したものではない。当業者は、各患者によって罹患される自己免疫疾患の様々な臨床症候及び様々な症状を知悉しており、自己免疫疾患を治療し、又は多発性硬化症の症候の再発を予防若しくは軽減する本発明の方法は、これらの症候にも向けられる。

【０２５５】

自己免疫疾患を治療する本発明の方法又は多発性硬化症の症候の再発を予防若しくは軽減する本発明の方法に関与する治療的有効量、予防的有効量及び投薬計画は、患者の年齢、症状、体重、性別及び食事、治療されている症状の重度、投与の時間及び他の臨床的因子など、治療剤の作用を変化させる様々な因子を考慮して、担当医によって決定される。一般的に、一日の量又は投薬計画は、体重キログラム（ｋｇ）当りのビヒクル抱合されたペプチドの約１～約１０，０００マイクログラム（μｇ）の範囲、好ましくは体重キログラム当り約１～約５０００μｇ、最も好ましくは体重キログラム当り約１～約１０００μｇの範囲とすべきである。

【０２５６】

電位開口型カリウムチャンネルＫｖ２．１のペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、ＩＩ型糖尿病を治療するために使用することが可能である。

【０２５７】

Ｍ電流のペプチドアンタゴニスト（例えば、ＢｅＫｍ－１）を取り込んだ本発明の分子はアルツハイマー病を治療するために、及び認知を増強させるために使用することが可能である。

【０２５８】

電位開口型カリウムチャンネルＫｖ４．３のペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、アルツハイマー病を治療するために使用することが可能である。

【０２５９】

小伝導度のカルシウム活性化カリウムチャンネルＳＫＣａのペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、てんかん、記憶、学習、神経精神病、神経性、神経筋肉性及び免疫疾患、統合失調症、躁うつ病、睡眠時無呼吸、神経変性並びに平滑筋疾患を治療するために使用することが可能である。

【０２６０】

Ｎ型カルシウムチャンネルアンタゴニストペプチドを取り込んだ本発明の分子は、疼痛を緩和する上で有用である。このような活性を有するペプチド（例えば、Ｚｉｃｏｎｏｔｉｄｅ^{TM}、ω－コノトキシン－ＭＶＩＩＡ）は、臨床的に有効性が確認されている。

【０２６１】

Ｔ型カルシウムチャンネルアンタゴニストペプチドを取り込んだ本発明の分子は、疼痛を緩和する上で有用である。証拠の複数の系列が合わさって、後根神経節中のＣａｖ３．２の阻害が慢性的疼痛からの緩和をもたらし得ることを示している。Ｔ型カルシウムチャンネルは、ＤＲＧ中の神経細胞のサブセットの細胞体中に極めて高いレベルで見出されている。これらは、ゆっくり移動する刺激を検出するように適合された機械的受容体であると思われ（Ｓｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ ６：７２４－７３０，２００３）、Ｔ型チャンネル活性は、バーストスパイクに必要であると思われる（Ｎｅｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ ２５：８７６６－８７７５，２００５）。ミベフラジル又はエトスキシミドによるＴ型チャンネルの阻害は、神経傷害によって（Ｄｏｇｒｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｐａｉｎ １０５：１５９－１６８，２００３）又は化学療法によって（Ｆｌａｔｔｅｒｓ ａｎｄ Ｂｅｎｎｅｔｔ，Ｐａｉｎ １０９：１５０－１６１，２００４）誘発された、動物中の機械的異痛を回復させる。Ｃａｖ３．２に対するアンチセンスは、動物における疼痛の閾値を増加させるが、Ｃａｖ３．１又はＣａｖ３．３は増加させず、Ｃａｖ３．２に対するアンチセンスは、ＤＲＧ中でのＣａｖ３．２タンパク質の発現を低下させる（Ｂｏｕｒｉｎｅｔ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ ２４：３１５－３２４，２００５）同様に、局所的に注射された還元剤は、疼痛を引き起こし、Ｃａｖ３．２電流を増加させ、酸化剤は疼痛を減少

させ、Ｃａｖ３．２電流を阻害し、末梢に投与された神経ステロイドは鎮痛性であり、ＤＲＧからのＴ型電流を阻害する（Ｔｏｄｏｒｏｖｉｃ ｅｔ ａｌ．，Ｐａｉｎ １０９：３２８－３３９，２００４；Ｐａｔｈｉｒａｔｈｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｐａｉｎ １１４：４２９－４４３，２００５）。従って、ＤＲＧ神経細胞の細胞体中のＣａｖ３．２の阻害は、慢性疼痛状態を伴うこれらの神経細胞の反復的スパイクを阻害することが可能であると考えられている。

【０２６２】

Ｌ型カルシウムチャンネルアンタゴニストペプチドを取り込んだ本発明の分子は、高血圧を治療する上で有用である。このような活性を有する小ペプチド（例えば、ＤＨＰ）は、臨床的に有効性が確認されている。

【０２６３】

Na_v1（TTX_S型）チャンネルのペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、疼痛を緩和するために使用することが可能である。このような活性を有する局所麻酔及び三環系抗鬱剤は、臨床的に有効性が確認されている。本発明のこのような分子は、特に、筋弛緩剤として有用であり得る。

【０２６４】

Na_v1（TTX_R型）チャンネルのペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、神経及び／又は組織傷害から生じる疼痛を緩和するために使用することが可能である。

【０２６５】

膠細胞及び上皮細胞のCa^{2+}活性化塩化物チャンネルのペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、癌及び糖尿病を治療するために使用することが可能である。

【０２６６】

ＮＭＤＡ受容体のペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、疼痛、てんかん、脳及び脊髄の傷害を治療するために使用することが可能である。

【０２６７】

ニコチン性受容体のペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、筋弛緩剤として使用することが可能である。このような分子は、疼痛、胃の運動障害、尿失禁、ニコチン中毒及び気分障害を治療するために使用することが可能である。

【０２６８】

５ＨＴ３受容体のペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、悪心、疼痛及び不安を治療するために使用することが可能である。

【０２６９】

ノルエピネフリン輸送体のペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、疼痛、抗うつ剤、学習、記憶及び尿失禁を治療するために使用することが可能である。

【０２７０】

ニューロテンシン受容体のペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、疼痛を治療するために使用することが可能である。

【０２７１】

治療的用途に加えて、本発明の化合物は、それらの関連する対象タンパク質の機能不全を特徴とする疾病を診断する上で有用であり得る。一実施形態において、生物学的試料中に、活性化されることができる対象タンパク質（例えば、受容体）を検出する方法であり、（ａ）前記試料を、本発明の化合物と接触させる工程と、及び（ｂ）前記化合物による、前記対象タンパク質の活性化を検出する工程とを含む前記方法。生物学的試料には、組織試料、完全な状態の細胞又はそれらの抽出物が含まれる。本発明の化合物は、生物学的試料中における、それらの関連する対象タンパク質の存在を検出するための診断キットの一部として使用することが可能である。このようなキットは、検出を可能とするために付着された標識を有する本発明の化合物を使用する。前記化合物は、正常な又は異常な対象タンパク質を同定するのに有用である。

【０２７２】

本発明の治療法、組成物及び化合物は、疾病の治療において、単独で、又は他の分子と組み合わせて使用することも可能である。

【０２７３】

医薬組成物

総論。本発明は、本発明の組成物と、及び医薬として許容される担体とを含む医薬組成物も提供する。このような医薬組成物は、多様な送達経路、例えば、注射若しくは注入によるなどの血管内送達経路、皮下、筋肉内、腹腔内、硬膜外又は髄腔内送達経路、又は経口、腸内、経肺（例えば、吸入）、鼻内、経粘膜（例えば、舌下投与）、経皮又はその他の送達経路及び／又は本分野において公知の投与の形態によって、患者に投与するように設定することが可能である。本発明の医薬組成物は、液体形態で調製することができ、又は凍結乾燥された形態などの乾燥された粉末形態であり得る。経口又は経腸用途の場合、医薬組成物は、例えば、錠剤、トローチ剤、舐剤、水性若しくは油性懸濁液剤、分散性散剤又は顆粒剤、エマルジョン、硬若しくは軟カプセル剤、シロップ、エリキシル、経腸処方として、設定することが可能である。

【０２７４】

本発明の実施において、「医薬として許容される担体」は、単一で又は組み合わせた、医薬として許容される全ての希釈剤、賦形剤、分散剤、結合剤、充填剤、流動促進剤、抗摩擦剤、圧縮補助、錠剤崩壊剤（崩壊剤）、懸濁剤、潤滑剤、着香剤、着臭剤、甘味剤、浸透若しくは貫通強化物質、防腐剤、界面活性剤、可溶化剤、乳化剤、濃縮剤、アジュバント、色素、コーティング、封入材料及び／又は他の添加物など、医薬組成物を調合する上で有用である、当業者に公知の生理的に耐容される全ての物質である。このような医薬組成物は、様々な緩衝液内容物（例えば、Ｔｒｉｓ-ＨＣｌ、アセタート、ホスファート）、ｐＨ及びイオン強度の希釈剤；界面活性剤及び可溶化剤（例えば、Ｔｗｅｅｎ（Ｒ）８０、Ｐｏｌｙｓｏｒｂａｔｅ８０）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、防腐剤（例えば、Ｔｉｍｅｒｓｏｌ（Ｒ）、ベンジルアルコール）及び増量物質（例えば、ラクトース、マニトール）などの添加物；ポリ乳酸、ポリグリコール酸などのポリマー性化合物の粒状調製物中への、又はリポソーム中への材料の取り込みを含むことが可能である。ヒアルロン酸も使用することが可能であり、これは、循環中の持続時間を促進する効果を有し得る。このような組成物は、本発明のタンパク質及び誘導体の物理的状態、安定性、インビボ放出の速度及びインビボクリアランス速度に影響を与えることが可能である。例えば、「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８ｔｈ Ｅｄ．（１９９０，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ １８０４２）ｐａｇｅｓ １４３５-１７１２」（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）を参照されたい。前記組成物は、液体形態で調製することが可能であり、又は凍結乾燥された形態などの乾燥された粉末とすることが可能である。経皮又は経粘膜製剤のように、埋め込み可能な徐放製剤も有用である。これに加えて（又はこれに代えて）、本発明は、当業者に公知の様々な持続放出若しくは徐放製剤又は微粒子製剤の何れかにおいて、例えば、経肺、鼻内又は皮下送達経路を介して投与されることが可能な徐放微粒子製剤において使用するための組成物を提供する。

【０２７５】

不活性材料を用いて、本発明の組成物を希釈し、又は本発明の医薬組成物の容量を増加させることが可能である。このような希釈剤は、炭水化物、特に、マニトール、α-ラクトース、無水ラクトース、セルロース、スクロース、修飾されたデキストラン及びデンプンを含むことが可能である。ある種の無機塩は、カルシウム三リン酸、炭酸マグネシウム及び塩化ナトリウムなど、充填剤としても使用し得る。幾つかの市販の希釈剤は、Ｆａｓｔ-Ｆｌｏ、Ｅｍｄｅｘ、ＳＴＡ-Ｒｘ １５００、Ｅｍｃｏｍｐｒｅｓｓ及びＡｖｉｃｅｌｌである。

【０２７６】

様々な慣用の濃縮剤が、アルギナート、キサンタンガム又は石油など（これらに限定さ

れない。）、医薬組成物のクリーム、軟膏、坐薬及びゲル構造において有用であり、本発明の医薬組成物のこのような構成においても使用し得る。ポリエチレングリコールモノラウラート、ジメチルスルホキシド、Ｎ－ビニル－２－ピロリドン、Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）－ピロリドン又は３－ヒドロキシ－Ｎ－メチル－２－ピロリドンなどの浸透又は貫通増強物質も使用することが可能である。ヒドロゲルマトリックスを製造するための有用な技術は公知である。（例えば、Ｆｅｉｊｅｎ，Ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂｌｅ ｈｙｄｒｏｇｅｌ ｍａｔｒｉｃｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ ｒｅｌｅａｓｅ ｏｆ ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌｌｙ ａｃｔｉｖｅ ａｇｅｎｔｓ，米国特許第４，９２５，６７７号；Ｓｈａｈ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂｌｅ ｐＨ／ｔｈｅｒｍｏｓｅｎｓｉｔｉｖｅ ｈｙｄｒｏｇｅｌｓ ｆｏｒ ｓｕｓｔａｉｎｅｄ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｌｙ ａｃｔｉｖｅ ａｇｅｎｔｓ，ＷＯ ００／３８６５１ Ａ１）。このような生物分解性ゲルマトリックスは、例えば、タンパク質成分と多糖又はムコポリ多糖成分を架橋した後、送達すべき本発明の組成物を充填することによって形成することが可能である。

【０２７７】

無菌溶液又は懸濁液である本発明の液体医薬組成物は、例えば、筋肉内、髄腔内、硬膜外、血管内（例えば、静脈内又は動脈内）、腹腔内又は皮下注射によって、患者に投与することが可能である。（例えば、Ｇｏｌｄｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｓｕｓｐｅｎｓｉｏｎｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｓｕｓｔａｉｎｅｄ ｒｅｌｅａｓｅ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ，米国特許第６，２４５，７４０号及びＷＯ００／３８６５２Ａ１を参照されたい。）。無菌溶液は、静脈内注入によって投与することも可能である。本発明の組成物は、無菌水、生理的食塩水、緩衝化された生理的食塩水又は他の適切な無菌注射可能溶媒を用いて患者に投与する前に、都合の良い時点で溶解又は懸濁することが可能な無菌固体医薬組成物（凍結乾燥された粉末など）中に含めることが可能である。

【０２７８】

埋め込み可能な徐放製剤も、本発明の医薬組成物の有用な実施形態である。例えば、医薬として許容される担体（体内又はヒト若しくはヒト以外の脊椎動物の皮膚の下に埋め込まれた生物分解性マトリックスである。）は、上記のものと類似のヒドロゲルであり得る。あるいは、医薬として許容される担体は、ポリ－αアミノ酸成分から形成され得る。（Ｓｉｄｍａｎ，Ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂｌｅ，ｉｍｐｌａｎｔａｂｌｅ ｄｒｕｇ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｄｅｖｉｃｅ，ａｎｄ ｐｒｏｃｅｓｓ ｆｏｒ ｐｒｅｐａｒｉｎｇ ａｎｄ ｕｓｉｎｇ ｓａｍｅ，米国特許第４，３５１，３３７号）。薬物の送達用インプラントを作製するための他の技術も公知であり、本発明において有用である。

【０２７９】

粉末形態において、医薬として許容される担体は、細かく分割された固体であり、これは、本発明の組成物を含む細かく分割された活性成分と混合される。例えば、幾つかの実施形態において、医薬組成物が吸入剤として構成されている場合には、粉末形態が有用である。（例えば、Ｚｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄ ｏｆ ｐｒｅｐａｒｉｎｇ ｄｒｙ ｐｏｗｄｅｒ ｉｎｈａｌａｔｉｏｎ ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ，ＷＯ ２００４／０１７９１８；Ｔｒｕｎｋ ｅｔ ａｌ．，Ｓａｌｔｓ ｏｆ ｔｈｅ ＣＧＲＰ ａｎｔａｇｏｎｉｓｔ ＢＩＢＮ４０９６ ａｎｄ ｉｎｈａｌａｂｌｅ ｐｏｗｄｅｒｅｄ ｍｅｄｉｃａｍｅｎｔｓ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｔｈｅｍ，米国特許第６，９００，３１７号を参照されたい。）。

【０２８０】

不活性材料を用いて、本発明の化合物を希釈し、又は本発明の化合物の容量を増加させることが可能である。これらの希釈剤は、炭水化物、特に、マニトール、α－ラクトース、無水ラクトース、セルロース、スクロース、修飾されたデキストラン及びデンプンを含むことが可能である。ある種の無機塩は、カルシウム三リン酸、炭酸マグネシウム及び塩化ナトリウムなど、充填剤としても使用することが可能である。幾つかの市販の希釈剤は、Ｆａｓｔ－Ｆｌｏ™、Ｅｍｄｅｘ™、ＳＴＡ－Ｒｘ™１５００、Ｅｍｃｏｍｐｒ

ｅｓｓ™及びＡｖｉｃｅｌｌ™である。

【０２８１】

固体剤形への医薬組成物の製剤化中に、崩壊剤を含めることが可能である。崩壊剤として使用される材料には、デンプンをベースとした市販の崩壊剤Ｅｘｐｌｏｔａｂ™を含むデンプンが含まれるが、これに限定されない。デンプングリコール酸ナトリウム、Ａｍｂｅｒｌｉｔｅ™、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ウルトラミロペクチン、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、橙皮、酸性カルボキシメチルセルロース、海綿及びベントナイトを使用することが可能である。不溶性陽イオン交換樹脂は、崩壊剤の別の形態である。粉末化されたゴムは、崩壊剤として、及び結合剤として使用することが可能であり、これらは、寒天、Ｋａｒａｙａ又はトラガカントなどの粉末化されたゴムを含むことが可能である。アルギン酸及びそのナトリウム塩は、崩壊剤としても有用である。

【０２８２】

結合剤は、治療剤を一体化させて硬い錠剤を形成するために使用することが可能であり、アラビアゴム、トラガカント、デンプン及びゼラチンなどの天然産物から得られる材料を含む。その他には、メチルセルロース（ＭＣ）、エチルセルロース（ＥＣ）及びカルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）が含まれる。ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）及びヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）は何れも、治療剤を顆粒化するためにアルコール溶液中で使用することが可能である。

【０２８３】

抗摩擦剤は、調合プロセス時の粘着を防ぐために、治療剤の製剤中に含めることが可能である。潤滑剤は、治療剤とダイ壁との間の層として使用することが可能であり、これらには、ステアリン酸のマグネシウム及びカルシウム塩などのステアリン酸、ポリテトラフルオロエチレン（ＰＴＦＥ）、液体パラフィン、植物油及び蝋が含まれ得るが、これらに限定されるものではない。ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウム、様々な分子量のポリエチレングリコール、Ｃａｒｂｏｗａｘ４０００及び６０００などの可溶性潤滑剤も使用することが可能である。

【０２８４】

調合時の薬物の流動特性を改善することができ、及び圧縮時の転位を補助するための流動促進剤を添加し得る。流動促進剤には、デンプン、タルク、焼成シリカ及び水和されたケイアルミン酸が含まれ得る。

【０２８５】

本発明の化合物の水性環境中への溶解を補助するために、界面活性剤を、湿潤剤として添加し得る。界面活性剤には、ラウリル硫酸ナトリウム、スルホコハク酸ジオクチルナトリウム及びスルホン酸ジオクチルナトリウムなどの陰イオン性界面活性剤が含まれ得る。陽イオン性界面活性剤を使用し得、塩化ベンズアルコニウム又は塩化ベンゾエトニウムを含み得る。界面活性剤として製剤中に含めることができる可能性がある非イオン性界面活性剤のリストは、ラウロマクロゴール４００、ポリオキシル４０ステアラート、ポリオキシエチレン硬化ひまし油１０、５０及び６０、モノステアリン酸グリセロール、ポリソルベート４０、６０、６５及び８０、スクロース脂肪酸エステル、メチルセルロース並びにカルボキシメチルセルロースである。これらの界面活性剤は、単独で、又は異なる比率での混合物として、タンパク質又は誘導体の製剤中に存在することができる。

【０２８６】

経口剤形。本発明の組成物の経口剤形も有用である。必要であれば、組成物は、経口送達が有効であるように化学的に修飾することが可能である。一般的に、想定される化学的修飾は、分子自体への少なくとも１つの部分の付着であり、前記部分は、（ａ）タンパク質分解の阻害及び（ｂ）胃又は腸からの血流中への取り込みを可能とする。化合物の全体的な安定性の増加及び体内での循環時間の増加も望まれる。本発明において、共有結合された半減期延長部分として有用な部分も、この目的のために使用することが可能である。このような部分の例には、ＰＥＧ，エチレングリコールとプロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピ

ロリドン及びポリプロリンが含まれる。例えば、「Ａｂｕｃｈｏｗｓｋｉ ａｎｄ Ｄａｖｉｓ（１９８１），Ｓｏｌｕｂｌｅ Ｐｏｌｙｍｅｒ-Ｅｎｚｙｍｅ Ａｄｄｕｃｔｓ，Ｅｎｚｙｍｅｓ ａｓ Ｄｒｕｇｓ（Ｈｏｃｅｎｂｅｒｇ ａｎｄ Ｒｏｂｅｒｔｓ，ｅｄｓ．），Ｗｉｌｅｙ-Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ，ｐｐ ３６７-８３；Ｎｅｗｍａｒｋ，ｅｔ ａｌ．，（１９８２），Ｊ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ，４：１８５-９」を参照されたい。使用され得る他のポリマーは、ポリ-１，３-ジオキソラン及びポリ-１，３，６-チオキソカンである。前記のとおり、医薬的な使用に好ましいのは、ＰＥＧ部分である。

【０２８７】

経口送達剤形の場合、本発明の治療用化合物の吸収を増加させるための担体として、ナトリウムＮ-（８-［２-ヒドロキシベンゾイル］アミノ）カプリラート（ＳＮＡＣ）などの修飾された脂肪族アミノ酸の塩を使用することも可能である。ＳＮＡＣを使用するヘパリン製剤の臨床的効力は、Ｅｍｉｓｐｈｅｒｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓにより行われた第ＩＩ相試験において証明されている。米国特許第５，７９２，４５１号，「Ｏｒａｌ ｄｒｕｇ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎ ａｎｄ ｍｅｔｈｏｄｓ」を参照されたい。

【０２８８】

一実施形態において、医薬として許容される担体は液体とすることが可能であり、医薬組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、シロップ、エリキシル又は圧縮された組成物の形態で調製される。活性成分（例えば、本発明の組成物）は、水、有機溶媒、両者の混合物、又は医薬として許容される油若しくは脂肪などの医薬として許容される液体担体中に溶解し、希釈し又は懸濁することが可能である。液体担体は、界面活性剤及び／又は可溶化剤（例えば、Ｔｗｅｅｎ ８０、Ｐｏｌｙｓｏｒｂａｔｅ８０）、乳化剤、適切なｐＨの緩衝液（例えば、Ｔｒｉｓ-ＨＣｌ、アセタート、ホスファート）、アジュバント、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、防腐剤（例えば、Ｔｈｉｍｅｒｓｏｌ、ベンジルアルコール）、甘味剤、着香剤、懸濁剤、濃縮剤、増量物質（例えば、ラクトース、マンニトール）；着色料、粘度調節物質、安定化物質、電解質、浸透溶質又は浸透圧制御物質などの他の適切な医薬添加物を含有することが可能である。本発明の組成物の取り込みを増強させるために、製剤中に添加物を含めることも可能である。この特性を有する可能性がある添加物は、例えば、脂肪酸オレイン酸、リノール酸及びリノレン酸である。

【０２８９】

有用なのは、上記Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（１９９０）の第８９章（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に一般的に記載されている経口固体剤形である。固体剤形には、錠剤、カプセル、丸薬、トローチ又はドロップ、カプセル又はペレットが含まれる。また、本組成物を調合するために、（例えば、米国特許第４，９２５，６７３号に報告されているプロテイノイド小球体のような）リポソーム封入又はプロテイノイド封入を使用することが可能である。リポソーム封入を使用することが可能であり、様々なポリマーでリポソームを誘導体化することが可能である（例えば、米国特許第５，０１３，５５６号）。治療剤に対して可能な固体剤形の記述は、「Ｍａｒｓｈａｌｌ，Ｋ．，Ｍｏｄｅｒｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ（１９７９），ｅｄｉｔｅｄ ｂｙ Ｇ．Ｓ．Ｂａｎｋｅｒ ａｎｄ Ｃ．Ｔ．Ｒｈｏｄｅｓ，ｉｎ Ｃｈａｐｔｅｒ １０」（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に記載されている。一般に、製剤は、本発明の化合物、及び胃環境に対する保護及び腸内での生物学的に活性な材料の放出を可能とする不活性成分を含む。

【０２９０】

本発明の組成物は、粒径約１ｍｍの顆粒又はペレットの形態の細かい多微粒子状物質として、製剤中に含めることが可能である。カプセル投与用の材料の製剤は、粉末、軽く圧縮されたプラグ又は錠剤でもあり得る。治療剤は、圧縮によって調製することが可能であ

る。
【０２９１】
着色剤及び着香剤は、全て含めることが可能である。例えば、（リポソーム又は小球体封入などによって）タンパク質（又は誘導体）を調合し、次いで、着色剤及び着香剤を含有する冷蔵された飲料などの飲食物内にさらに含有させることが可能である。
【０２９２】
錠剤形態で、活性成分は、適切な割合で、必要な圧縮特性を有する医薬として許容される担体と混合され、所望の形状及びサイズに圧縮される。
【０２９３】
粉末及び錠剤は、好ましくは、活性成分の最大９９％を含有する。適切な固体担体には、例えば、リン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、ラクトース、デキストリン、デンプン、ゼラチン、セルロース、ポリビニルピロリドン、低融点蝋及びイオン交換樹脂が含まれる。
【０２９４】
徐放製剤が望ましい場合があり得る。本発明の組成物は、拡散又は浸出機構の何れか、例えばガムによって放出を可能とする不活性マトリックス中に取り込ませることが可能である。ゆっくり変性するマトリックス、例えば、アルギナート、多糖を、製剤中に取り込ませることも可能である。本発明の組成物の徐放の別の形態は、Ｏｒｏｓ^{TM}治療システム（Ａｌｚａ　Ｃｏｒｐ．）に基づく方法による。すなわち、薬物は、水の浸入を可能とし、浸透圧効果によって、単一の小さな開口部を通じて薬物を押し出すことが可能な半透膜中に封入される。幾つかの腸溶コーティングも、遅延した放出効果を有する。
【０２９５】
製剤化のために、他のコーティングを使用することが可能である。これらには、コーティングパン中に適用可能な様々な糖が含まれる。また、治療剤は、フィルムコーティングされた錠剤として提供されることも可能であり、この場合に使用される物質は、２つのグループに分類される。第１のグループは、非腸溶性物質であり、これらには、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、プロビドン及びポリエチレングリコールが含まれる。第２のグループは、一般にはフタル酸のエステルである腸溶性物質からなる。
【０２９６】
最適なフィルムコーティングを得るために、材料の混合物を使用し得る。フィルムコーティングは、パンコーター内若しくは流動床内で、又は圧縮コーティングにより行なうことができる。
【０２９７】
経肺送達形態。本発明の組成物の経肺送達も有用である。該タンパク質（又は誘導体）は、吸入されて哺乳動物の肺に送達され、肺上皮内層（ｌｕｎｇ　ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ　ｌｉｎｉｎｇ）を越えて血流に入る。（これに関する他の報告には、Ａｄｊｅｉら，Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．７：５６５-５６９（１９９０）；Ａｄｊｅｉら，Ｉｎｔｅｒｎａｔｌ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ　６３：１３５-４４（１９９０）（酢酸ロイプロリド）；Ｂｒａｑｕｅｔ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９），Ｊ．Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．１３（ｓｕｐｐｌ．５）：ｓ．１４３-１４６（エンドセリン-１；Ｈｕｂｂａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９），Ａｎｎａｌｓ　Ｉｎｔ．Ｍｅｄ，３：２０６-１２（α１-アンチトリプシン）；Ｓｍｉｔｈ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９），Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．８４：１１４５-６（α１-プロテイナーゼ）；Ｏｓｗｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ｍａｒｃｈ　１９９０），“Ａｅｒｏｓｏｌｉｚａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，”Ｐｒｏｃ．Ｓｙｍｐ．Ｒｅｓｐ．Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ＩＩ，Ｋｅｙｓｔｏｎｅ，Ｃｏｌｏｒａｄｏ（組換えヒト成長ホルモン）；Ｄｅｂｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８），Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４０：３４８２-８（インターフェロンγ及び腫瘍壊死因子ルファ）及びＰｌａｔｚ　ｅｔ　ａｌ．，米国特

許第５，２８４，６５６号（顆粒球コロニー刺激因子）が含まれる）。

【０２９８】

本発明の実施において有用であるのは、治療用産物の経肺送達用に設計された多種多様な機械装置（例えば、噴霧器、定量吸入器及び粉末吸入器などの、いずれも当業者によく知られたものが含まれるが、これらに限定されるものではない。）である。本発明の実施に適した市販の装置のいくつかの具体例としては、Ｍａｌｌｉｎｃｋｒｏｄｔ，Ｉｎｃ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｉｓｓｏｕｒｉ製のＵｌｔｒａｖｅｎｔ噴霧器、Ｍａｒｑｕｅｓｔ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｅｎｇｌｅｗｏｏｄ，Ｃｏｌｏｒａｄｏ製のＡｃｏｒｎ ＩＩ噴霧器、Ｇｌａｘｏ Ｉｎｃ．，Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｔｒｉａｎｇｌｅ Ｐａｒｋ，Ｎｏｒｔｈ Ｃａｒｏｌｉｎａ製のＶｅｎｔｏｌｉｎ定量吸入器及びＦｉｓｏｎｓ Ｃｏｒｐ．，Ｂｅｄｆｏｒｄ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ製のＳｐｉｎｈａｌｅｒ粉末吸入器が挙げられる。（例えば、Ｈｅｌｇｅｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｈａｌａｔｉｏｎ ｄｅｖｉｃｅ，米国特許第６，８９２，７２８号；ＭｃＤｅｒｍｅｎｔ ｅｔ ａｌ．，Ｄｒｙ ｐｏｗｄｅｒ ｉｎｈａｌｅｒ，ＷＯ ０２／１１８０１ Ａ１；Ｏｈｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｈａｌａｎｔ ｍｅｄｉｃａｔｏｒ，米国特許第６，２７３，０８６号）。

【０２９９】

このような何れの装置においても、本発明の化合物の投薬に適した製剤を使用することが必要である。典型的には、各製剤は、用いる装置のタイプに特有のものであり、治療に有用な希釈剤、佐剤及び／又は担体に加えて適切な噴射物質の使用を伴いうる。

【０３００】

遠位の肺への最も有効な送達のためには、本発明の化合物は、１０μｍ（又はミクロン）未満、最も好ましくは０．５～５μｍの平均粒径を有する粒子形態で調製されるのが最も有利なはずである。

【０３０１】

医薬として許容される担体には、トレハロース、マンニトール、キシリトール、スクロース、ラクトース、ソルビトールなどの炭水化物が含まれる。製剤中で使用する他の成分には、ＤＰＰＣ、ＤＯＰＥ、ＤＳＰＣ及びＤＯＰＣが含まれ得る。天然又は合成界面活性剤を使用することができる。ＰＥＧを使用することができる（これは、該タンパク質又は類縁体の誘導体化におけるその使用と独立して使用することさえ可能である）。シクロデキストランなどのデキストランを使用することができる。胆汁酸塩及び他の関連した増強剤を使用することができる。セルロース及びセルロース誘導体を使用することができる。緩衝液製剤中での使用など、アミノ酸を使用することができる。

【０３０２】

また、リポソーム、マイクロカプセル又は小球体、包接複合体、又は担体の他のタイプの使用も想定される。

【０３０３】

噴霧器（ジェット式又は超音波式のいずれか）と併用するのに適した製剤は、典型的には、溶液１ｍＬ当たり生物学的活性タンパク質約０．１～２５ｍｇの濃度で水に溶解された本発明の化合物を含む。また、該製剤は、緩衝液及び単糖（例えば、タンパク質の安定化及び浸透圧の調節用のもの）を含み得る。エーロゾルの形成において該溶液の噴霧により生じる該タンパク質の界面誘導凝集を抑制又は防止するために、該噴霧製剤は界面活性剤を含有することも可能である。

【０３０４】

定量吸入装置と併用する製剤は、一般に、界面活性剤の補助により噴射剤中に懸濁された本発明の化合物を含有する微細化粉末を含む。該噴射剤は、この目的に用いる任意の慣用物質（クロロフルオロカーボン、ハイドロクロロフルオロカーボン、ハイドロフルオロカーボン、又は炭化水素、トリクロロフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノール、１，１，１，２－テトラフルオロエタンなど、又はそれらの組合せ）とすることが可能である。適切な界面活性剤には、ソルビタントリオレアー

ト及び大豆レシチンが含まれる。オレイン酸も界面活性剤として有用であり得る。（例えば、Backstrom et al., Aerosol drug formulations containing hydrofluoroalkanes and alkyl saccharides, 米国特許第６，９３２，９６２号を参照されたい。）。

【０３０５】

粉末吸入装置からの投薬のための製剤は、本発明の化合物を含有する微細化乾燥粉末を含み、装置からの粉末の分散を促進する量（例えば、製剤の５０～９０重量％）の増量剤（ラクトース、ソルビトール、スクロース、マンニトール、トレハロース又はキシリトールなど）を含むことも可能である。

【０３０６】

経鼻送達形態。本発明において、本発明の組成物及び／又は医薬組成物の鼻内送達も有用であり、鼻内運搬においては、鼻の内部への投与後、該産物の肺内への堆積を要することなく、本発明の組成物及び／又は医薬組成物を直接血流へ通過させることが可能である。鼻内投与に適した製剤には、デキストラン又はシクロデキストランを有する製剤が含まれ、鼻内送達装置は公知である。（例えば、Freezer，Inhaler，米国特許第４，０８３，３６８号を参照）。

【０３０７】

経皮及び経粘膜（例えば、口腔）送達形態。幾つかの実施形態において、本発明の組成物は、医薬として許容される経皮又は経粘膜パッチ又はトローチの一部として構成される。経皮パッチ薬物送達系、例えば、マトリックスタイプの経皮パッチは公知であり、本発明の医薬組成物の幾つかの実施形態を実施するのに有用である。（例えば、Chien et al., Transdermal estrogen/progestin dosage unit, system and process, 米国特許第４，９０６，１６９号及び同第５，０２３，０８４号；Cleary et al., Diffusion matrix for transdermal drug administration and transdermal drug delivery devices including same, 米国特許第４，９１１，９１６号；Teillaud et al., EVA-based transdermal matrix system for the administration of an estrogen and/or a progestogen，米国特許第５，６０５，７０２号；Venkateshwaran et al., Transdermal drug delivery matrix for coadministering estradiol and another steroid，米国特許第５，７８３，２０８号；Ebert et al., Methods for providing testosterone and optionally estrogen replacement therapy to women，米国特許第５，４６０，８２０号）。治療剤の経粘膜送達用の医薬として許容される様々なシステムも本分野において公知であり、本発明の実施と適合性がある。（例えば、Heiber et al., Transmucosal delivery of macromolecular drugs，米国特許第５，３４６，７０１号及び同第５，５１６，５２３号；Longenecker et al., Transmembrane formulations for drug administration, 米国特許第４，９９４，４３９号）。

【０３０８】

本発明の組成物の口腔送達も有用である。口腔送達製剤は、ペプチドとともに使用するために、本分野において公知である。例えば、経口粘膜（例えば、舌下粘膜）を通じた薬物送達用に設計された公知の錠剤又はパッチ系には、薬物を含有する内側層と、胆汁酸塩又はフシジン酸塩（fusidate）などの浸透増強物質と、及びヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、デキ

ストラン、ペクチン、ポリビニルピロリドン、デンプン、ゼラチン又はこの目的に対して有用であることが知られた他のポリマーのあらゆる数などの親水性ポリマーとを含む幾つかの実施形態が含まれる。内側層は、口腔の湿った粘膜組織と接触して、これに粘着するように適合された１つの表面を有することが可能であり、上に存在する非粘着性の不活性層に付着する反対側表面を有することが可能である。場合によって、このような経皮送達系は、内側層がさらなる結合剤、着香剤又は充填剤も含有する二層錠剤の形態であり得る。幾つかの有用な系は、浸透増強物質とともに、非イオン性界面活性剤を使用する。経粘膜送達装置は、クリーム、ゲル若しくは軟膏など遊離形態であり得、又は錠剤、パッチ若しくはトローチなどの明確な形態を含み得る。例えば、本発明の組成物の送達は、例えば、粘着層、裏打ち層、本発明の組成物を含有する貯蔵槽を画する浸透膜、該膜の下に位置する剥離シールディスク、１つ又はそれ以上の熱シール及び除去可能な剥離ライナーの薄層化された複合物を含む経皮送達系を介することが可能である。（例えば、Ｅｂｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｓｙｓｔｅｍ ｗｉｔｈ ａｄｈｅｓｉｖｅ ｏｖｅｒｌａｙ ａｎｄ ｐｅｅｌ ｓｅａｌ ｄｉｓｃ，米国特許第５，６６２，９２５号；Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｖｉｃｅ ｆｏｒ ａｄｍｉｎｉｓｔｅｒｉｎｇ ａｎ ａｃｔｉｖｅ ａｇｅｎｔ ｔｏ ｔｈｅ ｓｋｉｎ ｏｒ ｍｕｃｏｓａ，米国特許第４，８４９，２２４号及び同第４，９８３，３９５号）。これらの例は、利用可能な経粘膜薬物送達技術の単なる例示であり、本発明を限定するものではない。

【０３０９】

投薬量。上記症状の治療方法に関わる投与計画は、薬物の作用を改変する種々の要因（例えば、患者の年齢、状態、体重、性別及び食事、いずれかの感染の重症度、投与時間ならびに他の臨床的要因）を考慮して担当医師により決定される。一般には、１日用量は、本発明の化合物０．１～１０００μｇ／ｋｇ体重、好ましくは０．１～１５０μｇ／ｋｇの範囲とすべきである。

【０３１０】

実施例

上記の組成物は以下の記載に従って調製することができる。これらの実施例は、いかなる場合においても、本願の特許請求の範囲を限定するものと解釈してはならない。

【実施例１】

【０３１１】

Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］の哺乳類動物での発現

Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］は、Ｆｃ－２ｘＬ－ＳｈＫ［１－３５］とも呼ばれ、Ｋｖｌ．３の阻害剤である。リンカー配列及びＫｖｌ．３阻害剤ペプチドＳｈＫ［１－３５］の単量体へインフレームに融合されたヒトＩｇＧ１のＦｃ領域をコードするＤＮＡ配列を後述のように構築した。哺乳類細胞（ＨＥＫ２９３及びチャイニーズハムスター卵巣細胞）からペプチボディ（ｐｅｐｔｉｂｏｄｙ）を発現及び精製するための方法は、本明細書に開示されている。

【０３１２】

ｐｃＤＮＡ３．１（＋）中のＭｌｕＩとＨｉｎｄＩＩＩの間のＣＭＶプロモーターをＣＭＶプロモーター＋イントロン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と置換することによって、発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ（図１３Ａ）を構築した。５’コザック配列、シグナルペプチド及びヒトＦｃリンカー―ＨｉｎｄＩＩＩ－ＮｏｔＩで消化されたｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉの大きな断片とのアクチビンＲＩＩＢ融合タンパク質を含有するＨｉｎｄＩＩＩ－ＮｏｔＩで消化されたＰＣＲ産物をクローニングすることによって、発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ－ｈＦｃ－アクチビンＲＩＩＢ（図１３Ｂ）を作製した。ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ－ｈＦｃ－アクチビンＲＩＩＢ中のヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列を図３に示す。このベクターは、ＢａｍＨＩ部位によって分断されたＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（「Ｌ１０」、配列番号７９）も有し、これにより、以下のオリゴを用いて、最終Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ヌク

レオチド及びアミノ酸配列に対して、ＦｃとＳｈＫ［１－３５］ペプチド（図１４参照）間に１０個アミノ酸のリンカーを形成することが可能となる。

【０３１３】

以下に示されているように、２つの停止コドンを有し、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ制限部位が隣接した、４個のグリシン及び１個のセリンアミノ酸リンカー（本明細書での小文字は、Ｌ型アミノ酸残基のリンカー配列を示す）に連結された完全長ＳｈＫ遺伝子を作製するためのＰＣＲ戦略を使用して、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］発現ベクターを構築した。

【０３１４】

【化６】

```
BamHI
GGATCCGGAGGAGGAGGAAGCCGCAGCTGCATCGACACCATCCCCAAGAGCCGCTGCACCGCCTTCCAG
      g  g  g  g  s  R  S  C  I  D  T  I  P  K  S  R  C  T  A  F  Q

TGCAAGCACAGCATGAAGTACCGCCTGAGCTTCTGCCGCAAGACCTGCGGCACCTGCTAATGAGCGGCCGC//SEQ ID NO:657
C  K  H  S  M  K  Y  R  L  S  F  C  R  K  T  C  G  T  C         NotI
//配列番号：658
```

【０３１５】

以下に記載される配列を有する２つのオリゴを、９４℃－３０秒、５０℃－３０秒、７２℃－１分の３０周期で、Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ（商標）ポリメラーゼ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を使用するＰＣＲ反応で使用した。

【０３１６】

【化７】

```
cat gga tcc gga gga gga gga agc cgc agc tgc atc gac acc atc ccc aag agc
cgc tgc acc gcc ttc cag tgc aag cac  //SEQ ID NO:659

cat gcg gcc gct cat tag cag gtg ccg cag gtc ttg cgg cag aag ctc agg cgg
tac ttc atg ctg tgc ttg cac tgg aag g  //配列番号：660
```

【０３１７】

得られたＰＣＲ産物を１％アガロースゲル上で１５０ｂｐバンドとして分離した。１５０ｂｐのＰＣＲ産物を、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ（Ｒｏｃｈｅ）制限酵素で消化し、ゲル精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）によってアガロースゲル精製した。同時に、ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ－ｈＦｃ－アクチビンＲＩＩＢベクター（図１３Ｂ）を、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ制限酵素で消化し、ゲル精製キットにより、大きな断片を精製した。ゲル精製されたＰＣＲ断片を、精製された大きな断片へ連結し、ＸＬ－１ブルーバクテリア（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）へと形質転換した。形質転換された細菌コロニー由来のＤＮＡを単離し、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ制限酵素消化で消化し、１％アガロースゲル上で分離した。予想されたパターンを生じるＤＮＡを配列決定へ供した。クローンの幾つもの配列の分析は、上述の配列と１００％一致したが、大規模プラスミド精製のために単一のクローンを選択した。Ｆｃ及びリンカー領域を確認するため、ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ中のＦｃ－２ｘＬ－ＳｈＫからのＤＮＡを再配列決定し、配列は、図１４に示される推定されたコード化配列と１００％同一であった。

【０３１８】

ＤＭＥＭ高グルコース（Ｇｉｂｃｏ）、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ、Ｇｉｂｃｏ製）、１× 非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ、Ｇｉｂｃｏ製）を含有する増殖培地中で、ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉタンパク質中のＦｃ－２ｘＬ－ＳｈＫ［１－３５］の一過性形質移入発現において使用されるＨＥＫ－２９３細胞を培養した。Ｆｕｇｅｎｅ６（Ｒｏｃｈｅ）を使用して、フェノール／クロロホルム抽出したｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉプラスミド中のＦｃ－２ｘＬ－ＳｈＫ［１－３５］５．６μｇを、ＨＥＫ－２９３細胞に形質

移入した。細胞を２４時間回復した後、ＤＭＥＭ高グルコース及び１×ＮＥＡＡ培地中に４８時間配置した。Ｃｅｎｔｒｉｐｒｅｐ　ＹＭ-１０フィルター（Ａｍｉｃｏｎ）へ３０ｍＬを流し、さらにＣｅｎｔｒｉｃｏｎ　ＹＭ-１０（Ａｍｉｃｏｎ）フィルターによって濃縮することによって、培養上清を５０倍濃縮した。濃縮した培地の多様な量を自家４×添加液（Ｂ-メルカプトエタノールなし）と混合し、Ｎｏｖｅｘ　Ｘｃｅｌｌ　ＩＩ装置を使用して、ＢｅｎｃｈＭａｒｋ染色済みタンパク質ラダー（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）１０μＬとともに、５×タンク緩衝液（０．１２３トリス塩基、０．９６Ｍグリシン）中、１０１Ｖ／４６ｍＡで２時間、Ｎｏｖｅｘ４ないし２０％トリス-グリシンゲル上で電気泳動した。次に、ゲルをエレクトロブロット緩衝液（３５ｍＭトリス塩基、２０％メタノール、１９２ｍＭグリシン）中に３０分間浸漬した。Ｎｏｖｅｘ製のＰＤＶＦメンブレン（カタログ番号ＬＣ２００２、孔サイズ０．２μｍ）を活性化させるため、前記ＰＶＤＦメンブレンをメタノール中に３０秒浸漬し、脱イオン水ですすぎ、エレクトロブロット緩衝液中に浸漬した。ＸＣｅｌｌ　ＩＩブロットモジュールを使用して、製造者の説明書（Ｎｏｖｅｘ）に従って、ＰＶＤＦメンブレンへ４０ｍＡで２時間、あらかじめ浸漬したゲルをブロットした。次に、まずトリス緩衝塩類溶液ｐＨ７．５（ＴＢＳ）中の５％ミルク（Ｃａｒｎａｔｉｏｎ）中に室温で、ブロットを１時間浸漬し、０．１％トゥイーン２０含有ＴＢＳ（ＴＢＳＴ、Ｓｉｇｍａ）及び１％ミルク緩衝液中で、ＨＲＰ結合抗ヒトＦｃ抗体（Ｚｙｍｅｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｅｓカタログ番号０５-３３２０）の１：５００希釈を、室温で２時間浸漬するために温置した。次に、室温で１回の洗浄につき１５分間、ＴＢＳＴ中で、ブロットを３回洗浄した。製造者の説明書に従ってＡｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　ＢｉｏｔｅｃｈのＥＣＬウェスタンブロット検出試薬を使用して、一次抗体を検出した。ＥＣＬ検出に際し、ウェスタンブロット分析は、非還元型ゲル条件下で、６６ｋＤａの予期されるサイズを表示した（図２４Ａ）。

【０３１９】

ＤＭＥＭ高グルコース、１０％ウシ胎仔血清、１×ヒポキサンチン／チミジン（ＨＴ、Ｇｉｂｃｏ製）、１×ＮＥＡＡを含有するＡＭ１　ＣＨＯｄ増殖培地中で、Ｆｃ-ＬＩ０-ＳｈＫ[１-３５]タンパク質の安定した発現に使用されるＡＭ１ＣＨＯｄ（Ａｍｇｅｎ　Ｐｒｏｐｒｉｅｔａｒｙ）細胞を培養した。Ｆｕｇｅｎｅ６を使用して、ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ-Ｆｃ-ＳｈＫプラスミド６．５μｇもＡＭ１　ＣＨＯｄ細胞へと形質移入した。翌日、形質移入した細胞を２０個の１５ｃｍ皿へと播種し、ＤＭＥＭ高グルコース、１０％ＦＢＳ、１×ＨＴ、１×ＮＥＡＡ、ジェネテシン（Ｇ４１８ｍｉあたり８００μｇ、Ｇｉｂｃｏ製）を使用して１３日間選択した。４８個の生存コロニーを、２つの２４ウェルプレート中に摘出した。増殖させるため、プレートを１週間放置した後、凍結のために複製した。１０％ＦＢＳなしのＡＭ１　ＣＨＯｄ増殖培地へ、各プレートの１セットを４８時間移動させて、培養上清を回収した。安定したＣＨＯクローンを発現させるための培養上清１５μＬを選別するために、同一の抗ヒトＦｃ抗体による検出を使用する一過性ウェスタンブロット分析と同様のウェスタンブロット分析を使用した。４８個の安定したクローンのうち、５０％超は６６ｋＤａの予期されたサイズでＳｈＫを発現した。一次クローンＢＢ６に対するバックアップとして、ＢＢ６、ＢＤ５、ＢＤ６クローンをＢＤ５及びＢＤ６で選択した（図２４Ｂ）。

【０３２０】

ＡＭ１　ＣＨＯｄ増殖培地を使用して、ＢＢ６クローンを、１０個のローラー瓶（Ｃｏｒｎｉｎｇ）へとスケールアップし、顕微鏡下で判断される培養密度まで増殖させた。次に、培地を、５０％ＤＭＥＭ高グルコース並びに１×ＨＴ及び１×ＮＥＡＡ含有５０％ＨａｍのＦ１２（Ｇｉｂｃｏ）を含有する無血清培地と交換し、１週間温置した。培養上清を１週間の温置時点で回収し、０．４５μｍフィルター（Ｃｏｒｎｉｎｇ）でろ過し、凍結した。新鮮な無血清培地を添加し、さらに１週間温置した。培養無血清上清を初回と同様に回収し、凍結した。

【０３２１】

水槽中、室温で、培養上清約４Ｌを解凍した。Ｓａｔｏｒｉｕｓ　Ｓａｒｔｏｃｏｎ

Ｐｏｌｙｓｕｌｆｏｎ１０接線流限外ろ過カセット（０．１ｍ^2）を室温で使用して、培地を約４５０ｍＬまで濃縮した。次に、プレフィルターを有する０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターで保持液（ｒｅｔｅｎｔａｔｅ）をろ過した。次に、７℃、５ｍＬ／分で、５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　ＨｉＴｒａｐタンパク質Ａカラムへ保持液をかけ、二価の陽イオンを有さないダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液（ＰＢＳ）の数カラム容積で前記カラムを洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０にする工程で、試料を溶出した。タンパク質Ａ溶出プール（約９ｍＬ）を、５０ｍＬになるように水で希釈し、Ｓ-緩衝液Ａ（２０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、ｐＨ７．０）中の５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　ＨｉＴｒａｐ　ＳＰ-ＨＰカラムへと、７℃、５ｍＬ／分で負荷した。次に、数カラム容積のＳ-緩衝液Ａで、カラムを洗浄した後、２５％から７５％のＳ-緩衝液Ｂ（２０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）の直線勾配を５ｍＬ／分で使用した後、７℃で１００％のＳ-緩衝液Ｂまでの工程を展開した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした。次に、Ｐａｌｌ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｍａｃｒｏｓｅｐ　１０Ｋ　Ｏｍｅｇａ遠心限外ろ過装置を使用して、プールした材料を約３．４ｍＬまで濃縮した後、Ｃｏｓｔａｒ０．２２μｍ酢酸セルロースシリンジフィルターでろ過した。

【０３２２】

次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ　８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈したろ過済み材料１０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図２６Ａ）。３２，４２０ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び４７，９００Ｍ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が５．４ｍｇ／ｍＬであると決定した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図２６Ｂ）。次に、ＰＢＳ中の試料の１０８倍希釈を使用するＣｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｅｎｄｏｓａｆｅ-ＰＴＳシステム（０．０５ないし５ＥＵ／ｍＬ感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、タンパク質１ｍｇあたり１ＥＵであった。次に、５０ｍＭＮａＨ２ＰＯ４、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物２０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図２６Ｃ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）中に希釈することによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液（１μＬ）を、ＭＡＬＤＩ試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーが装備されたＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ-ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して、外部質量較正を実施し（図２６Ｄ）、精製されたペプチボディの完全性を（実験誤差内で）確認した。その後、生成物を-８０℃で保存した。

【０３２３】

精製されたＦｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ[１-３５]は、電気生理学法によって測定されるように、ヒトＫｖ１．３を強く遮断した（図３０Ａ及び図３０Ｂ）（実施例３６参照）。精製されたＦｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ[１-３５][１-３５]分子は、Ｔ細胞増殖（図３６Ａ及び図３６Ｂ）並びにサイトカインＩＬ-２（図３５Ａ及び図３７Ａ）及びＩＦＮ-ｇ（図３５Ｂ及び図３７Ｂ）の生成も遮断した。

【実施例２】

【０３２４】

Ｆｃ-Ｌ-ＳｈＫ[２-３５]の哺乳類での発現

標準的なＰＣＲ技術を使用して、Ｋｖ１．３阻害剤ペプチドＳｈＫ[２-３５]の単量

体へ、インフレームで融合されたヒトＩｇＧ１のＦｃ領域をコードするＤＮＡ配列を構築した。ＳｈＫ［２－３５］及び前記分子の５、１０又は２５アミノ酸リンカー部分を、ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ中の固有Ｆｃ－２ｘＬ－ＳｈＫ［１－３５］をテンプレートとして使用するＰＣＲ反応において生成させた（実施例１、図１４）。全てのＳｈＫコンストラクトは、以下のアミノ酸配列

【０３２５】

【化８】

SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC
（配列番号：92）

を有するべきであり、配列番号野生型配列の最初のアミノ酸は欠失している。

【０３２６】

「Ｆｃ－１ｘＬ－ＳｈＫ［２－３５］」とも呼ばれるＦｃ－Ｌ５－ＳｈＫ［２－３５］を作製するために使用されるプライマーの配列を以下に示す。

【０３２７】

【化９】

cat gga tcc agc tgc atc gac acc atc// 配列番号：661；
cat gcg gcc gct cat tag c// 配列番号：662；

【０３２８】

「Ｆｃ－２ｘＬ－ＳｈＫ［２－３５］」とも呼ばれるＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］を作製するために使用されるプライマーの配列を以下に示す。

【０３２９】

【化１０】

cat gga tcc gga gga gga gga agc agc tgc a //配列番号：663；
cat gcg gcc gct cat tag cag gtg c //配列番号：664；

【０３３０】

「Ｆｃ－５ｘＬ－ＳｈＫ［２－３５］」とも呼ばれるＦｃ－Ｌ２５－ＳｈＫ［２－３５］を作製するために使用されるプライマーの配列を以下に示す。

【０３３１】

【化１１】

cat gga tcc ggg ggt ggg ggt tct ggg ggt ggg ggt tct gga gga
gga gga agc gga gga gga gga agc agc tgc a//配列番号：665；
cat gcg gcc gct cat tag cag gtg c//配列番号：665；

【０３３２】

ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ（Ｒｏｃｈｅ）制限酵素でＰＣＲ産物を消化し、ゲル精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）によってアガロースゲル精製した。同時に、ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ－ｈＦｃ－アクチビンＲＩＩＢベクターを、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ制限酵素で消化し、ゲル精製キットによって大きな断片を精製した。精製した各ＰＣＲ産物を大きな断片へ連結し、ＸＬ－１ブルーバクテリア中に形質転換した。形質転換された細菌コロニー由来のＤＮＡを単離し、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ制限酵素消化に供し、１％アガロースゲル上で分離した。予想されたパターンを生じるＤＮＡを配列決定へ供した。クローンの幾つもの配列の分析は、上述の配列と１００％一致したが、大規模プラスミド精製のために１つのクローンのみを選択した。Ｆｃ領域及びリンカー領域を確認するために、このクローン由来のＤＮＡを再配列決定し、配列は予想された配列と１００％同一であった。

【０３３３】

ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉベクター中にＦｃ－１ｘＬ－Ｓｈｋ［２－３５］、Ｆｃ－２ｘＬ－Ｓｈｋ及びＦｃ－５ｘＬ－Ｓｈｋ［２－３５］インサートを含有するプラス

ミドを、Ｘｂａ１及びＸｈｏ１（Ｒｏｃｈｅ）制限酵素で消化し、ゲル精製した。ＮｏｔＩ及びＳａｌＩ（Ｒｏｃｈｅ）で消化したｐＤＳＲα－２２（Ａｍｇｅｎ　Ｐｒｏｐｒｉｅｔａｒｙ）発現ベクターへ、前記インサートを個々に連結した。得られたコンストラクトの完全性をＤＮＡ配列決定によって確認した。最終的なプラスミドＤＮＡ発現ベクターコンストラクトは、ｐＤＳＲα－２２－Ｆｃ－１ｘＬ－Ｓｈｋ［２－３５］、ｐＤＳＲα－２２-Ｆｃ－２ｘＬ－Ｓｈｋ［２－３５］（図１３Ｃ及び図１５）及びｐＤＳＲα－２２－Ｆｃ－５ｘＬ－Ｓｈｋ［２－３５］（図１６）であり、それぞれ５、１０及び２５アミノ酸リンカーを含有していた。

【０３３４】

形質移入の２４時間前に、１．２ｅ７　ＡＭ－１／Ｄ　ＣＨＯｄ（Ａｍｇｅｎ　Ｐｒｏｐｒｉｅｔａｒｙ）細胞を、Ｔ－１７５ｃｍの滅菌済み組織培養フラスコ中に播種し、形質移入当日に７０ないし８０％培養密度にした。ＤＭＥＭ高グルコース、５％ＦＢＳ、１×グルタミンＰｅｎ／Ｓｔｒｅｐ（Ｇｉｂｃｏ）、１×ＨＴ、１×ＮＥＡＡ及び１×ピルビン酸ナトリウム（Ｇｉｂｃｏ）を含有するＡＭ－１／Ｄ　ＣＨＯｄ培地中で前記細胞を維持した。翌日、直鎖状にしたｐＤＳＲα２２：Ｆｃ－１ｘＬ－ＳｈＫ［２－３５］、ｐＤＳＲα２２：Ｆｃ－２ｘＬ－ＳｈＫ［２－３５］及びｐＤＳＲα２２：Ｆｃ－５ｘＬ－ＳｈＫ［２－３５］（ＲＤＳ番号２００５００３７６８５、２００５００５３７０９、２００５００７３２９５）の各プラスミド１８μｇを、直鎖状Ｓｅｌｅｘｉｓ　ＭＡＲプラスミド７２μｇ及びｐＰＡＧＯ１（ＲＤＳ２００４２００９８９６）と混合し、５０ｍＬコニカルチューブ中のＯｐｔｉＭＥＭ６ｍＬ中へ希釈し、５分間温置した。ＬＦ２０００（２１０μＬ）をＯｐｔｉＭＥＭ６ｍＬへ添加し、５分間温置した。希釈したＤＮＡ及びＬＦ２０００を互いに混合し、室温で２０分間温置した。その間、細胞をＰＢＳで１回洗浄した後、抗生物質を有さない３０ｍＬのＯｐｔｉＭＥＭを細胞へ添加した。ＯｐｔｉＭＥＭを吸引除去し、ＤＮＡ／ＬＦ２０００混合物１２ｍＬとともに、振とうしている３７℃インキュベーター中で６時間又は一晩、細胞を温置した。形質移入から２４時間後、コロニー選択のために、異なる希釈で、ＡＭ－１／Ｄ　ＣＨＯｄ培地中に細胞を１：５に分割した。形質移入から７２時間後、細胞培地を、ＤＭＥＭ高グルコース、及び１×グルタミンＰｅｎ／Ｓｔｒｅｐ、１×ＮＥＡＡ及び１×ピロリン酸ナトリウム中に１０％透析済みＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）を含有するＤＨＦＲ選択培地と置換し、細胞培地中へタンパク質を発現及び分泌させた。コロニーが、摘み取るのに十分大きくなるまで、選択培地を１週間に２回交換した。ｐＤＳＲａ２２発現ベクターは、形質移入した細胞をヒポキサンチン及びチミジンの不存在下で増殖させるＤＨＦＲ発現カセットを含有する。得られたコロニーの５つのＴ－１７５プールを、ローラー瓶へスケールアップし、無血清条件下で培養した。馴化培地を回収し、１週間置きに交換した。得られた馴化培地３Ｌを、０．４５μｍ酢酸セルロースフィルター（Ｃｏｒｎｉｎｇ，　Ａｃｔｏｎ，　ＭＡ）でろ過し、精製のためにＰｒｏｔｅｉｎ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙに転移させた。バックアップとして、ＤＨＦＲ選択培地上で、１０ないし１４日後に、１０ｃｍプレートから１２個のコロニーを選択し、ＨＲＰ抱合された抗ヒトＩｇＧＦｃをプローブとして使用するウェスタンブロットによって、発現レベルを評価した。異なるリンカー長のＦｃ－Ｌ－ＳｈＫ［２－３５］融合タンパク質の各々の最高レベルを発現する３つの最良のクローンを繁殖させ、将来の使用のために凍結した。

【０３３５】

Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（２－３５）の精製

室温、水槽中で、培養上清約１Ｌを解凍した。５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　ＨｉＴｒａｐタンパク質Ａカラムへ、７℃、５ｍＬ／分で、培地を負荷し、二価の陽イオンを有さないダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液（ＰＢＳ）の数カラム容積で前記カラムを洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０への工程で、試料を溶出した。タンパク質Ａ溶出プール（約８．５ｍＬ）を、３Ｍ酢酸ナトリウム７１μＬと組み合わせた後、５０ｍＬになるように水で希釈した。次に、７℃、５ｍＬ／分で、Ｓ－緩衝液Ａ（２０ｍＭNaH_2PO_4、ｐＨ７．０）中の５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　ＨｉＴｒａｐ　ＳＰ－ＨＰカラムへと、希

釈した材料を負荷した。次に、Ｓ－緩衝液Ａの数カラム容積で、カラムを洗浄した後、０％から７５％までのＳ－緩衝液Ｂ（２０ｍＭＮａＨ２ＰＯ４、１Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）の直線勾配を５ｍＬ／分で使用して展開した後、７℃で１００％Ｓ－緩衝液Ｂにする工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした。次に、プールした材料を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過し、Ｐａｌｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｍａｃｒｏｓｅｐ １０Ｋ Ｏｍｅｇａ遠心限外ろ過装置を使用して、約３．９ｍＬまで濃縮した。次に、室温、２ｍＬ／分で、０．２２μｍ、２５ｍｍのＭｕｓｔａｎｇ Ｅメンブレンを有するＰａｌｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ａｃｒｏｄｉｓｃを用いて、濃縮した材料をろ過した。次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈したろ過済み材料１０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図２７Ｅ）。３０，００８ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３６，９００$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が２．７６ｍｇ／ｍＬであることを決定した。透過液中に材料が認められたため、新しいＭａｃｒｏｓｅｐカートリッジを使用して、透過液に対して濃縮工程を反復した。次に、室温、２ｍＬ／分で、０．２２μｍ、２５ｍｍのＭｕｓｔａｎｇ Ｅメンブレンを有するＰａｌｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ａｃｒｏｄｉｓｃを通して、濃縮された材料の新たなバッチをろ過した。濃縮された材料の両ロットを１つのプールへと組み合わせた。

【０３３６】

次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈した、合わせたプール１０μＬに対して、スペクトル走査を実施した。３０，００８ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３６，９００$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が３．３３ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図２７Ａ）。次に、ＰＢＳ中への試料の６７倍希釈を使用して、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｅｎｄｏｓａｆｅ－ＰＴＳシステム（０．０５ないし５ＥＵ／ｍＬ感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、１ＥＵ／タンパク質ｍｇ未満であった。次に、５０ｍＭＮａH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）に１ｍＬ／分で注入された生成物５０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図２７Ｂ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）中に希釈することによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液（１μＬ）をＭＡＬＤＩ試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して外部質量較正を実施し（図２７Ｆ）、本実験は、ペプチボディの完全性を実験誤差内で確認した。次に、生成物を－８０℃で保存した。

【０３３７】

図３１Ｂは、精製されたＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］がヒトＫｖ１．３電流を強く遮断することを示す（電気生理学的実験を実施例３６に記載されるとおり実施した。）。精製したＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］分子は、ヒト全血中のＩＬ－２（図６４Ａ及び図６４Ｂ）及びＩＦＮ－ｇ（図６５Ａ及び図６５Ｂ）の生成も、Ｔ細胞に関するＣＤ４０Ｌ（図６６Ａ及び図６６Ｂ）及びＩＬ－２Ｒ（図６７Ａ及び図６７Ｂ）の上方制御と同様に遮断した。

【０３３８】

Ｆｃ－Ｌ５－ＳｈＫ（２－３５）の精製

５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ＨｉＴｒａｐタンパク質Ａカラムへ、７℃、５ｍＬ／分で、培養上清約１Ｌを負荷し、二価の陽イオンを有さないダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液（ＰＢＳ）の数カラム容積で前記カラムを洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０への工程で試料を溶出した。タンパク質Ａ溶出プール（約９ｍＬ）を１ＭトリスＨＣｌ、ｐＨ８．５の４５０μＬと組み合わせた後、２Ｍ酢酸２３０μＬと組み合わせ、次に水で５０ｍＬに希釈した。次に、ｐＨ調整した材料を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過し、７℃、５ｍＬ／分でＳ－緩衝液Ａ（２０ｍＭNaH_2PO_4、ｐＨ７．０）中の５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ＨｉＴｒａｐ ＳＰ－ＨＰカラムへ負荷した。次に、Ｓ－緩衝液Ａの数カラム容積でカラムを洗浄した後、０％から７５％までのＳ－緩衝液Ｂ（２０ｍＭNaH_2PO_4、１Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）の直線勾配を５ｍＬ／分で使用して展開した後、７℃で１００％Ｓ－緩衝液Ｂへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした。次に、Ｐａｌｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｍａｃｒｏｓｅｐ １０Ｋ Ｏｍｅｇａ遠心限外ろ過装置を使用して、プールした材料を約５．５ｍＬまで濃縮した。次に、濃縮した材料を室温で２ｍＬ／分で、０．２２μｍ、２５ｍｍのＭｕｓｔａｎｇ Ｅメンブレンを有するＰａｌｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ａｃｒｏｄｉｓｃでろ過した。

【０３３９】

次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈した組み合わせたプール１０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図２７Ｇ）。２９，７５０ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３６，９００$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が４．５９ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図２７Ｃ）。次に、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒｓエンドトキシン特異的緩衝液ＢＧ１２０中に試料を９２倍希釈したものを使用して、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｅｎｄｏｓａｆｅ－ＰＴＳシステム（０．０５ないし-５ＥＵ／ｍＬ感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、１ＥＵ／タンパク質ｍｇ未満であった。次に、５０ｍＭNaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物５０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図２７Ｈ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）へと希釈することによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液（１μＬ）をＭＡＬＤＩ試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して外部質量較正を実施し（図２７Ｉ）、ペプチボディの完全性を実験誤差内で確認した。次に、生成物を－８０℃で保存した。

【０３４０】

図３１Ｃは、精製したＦｃ－Ｌ５－ＳｈＫ［２－３５］が非常に活発で、全細胞パッチクランプ電気生理学的実験によって測定されるように、ヒトＫｖ１．３を遮断することを示す（実施例３６参照）。

【０３４１】

Ｆｃ－Ｌ２５－ＳｈＫ（２－３５）の精製

７℃、５ｍＬ／分で、５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ＨｉＴｒａｐ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａカラムへ、培養上清約１Ｌを負荷し、前記カラムを二価の陽イオンを有さないダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液（ＰＢＳ）の数カラム容積で洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０への工程で試料を溶出した。タンパク質Ａ溶出プール（約９．５ｍＬ）を３Ｍ酢酸ナ

トリウム１１９μＬと組み合わせた後、水で５０ｍＬに希釈した。次に、７℃、５ｍＬ／分でＳ－緩衝液Ａ（２０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、ｐＨ７．０）中の５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ＨｉＴｒａｐ ＳＰ－ＨＰカラムへと、ｐＨ調整した材料を負荷した。次に、カラムをＳ－緩衝液Ａの数カラム容積で洗浄した後、０％から７５％までのＳ－緩衝液Ｂ（２０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、１Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）の直線勾配を５ｍＬ／分で使用して展開した後、７℃で１００％Ｓ－緩衝液Ｂへの工程で溶出した。クロマトグラムからの主要ピークを含有する画分をプールし、０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過した。

【０３４２】

次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈した組み合わせたプール２０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図２７Ｊ）。３１，０１１ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３６，９００Ｍ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が１．４０ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図２７Ｄ）。次に、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒｓエンドトキシン特異的緩衝液ＢＧ１２０中に試料を２８倍希釈したものを使用して、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｅｎｄｏｓａｆｅ－ＰＴＳシステム（０．０５ないし５ＥＵ／ｍＬ感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、１ＥＵ／タンパク質ｍｇ未満であった。次に、５０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）に１ｍＬ／分で注入された生成物５０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図２７Ｋ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ中に希釈する（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）ことによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液（１μＬ）をＭＡＬＤＩ試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して外部質量較正を実施し（図２７Ｌ）、これにより、ペプチボディの完全性を実験誤差内で確認した。次に、生成物を－８０℃で保存した。

【０３４３】

精製したＦｃ－Ｌ２５－ＳｈＫ［２－３５］は、ＨＥＫ２９３／Ｋｖ１．３細胞に関するホールセルパッチクランプ電気生理学によって、約１５０ｐＭのＩＣ$_{50}$でヒトＫｖ１．３を阻害した（実験３６）。

【実施例３】

【０３４４】

Ｆｃ－Ｌ－ＳｈＫ［１－３５］の細菌での発現

細菌のペプチボディ発現ベクター並びにペプチボディのクローニング及び発現に関する手法の記載

細菌発現に使用されるクローニングベクター（実施例３ないし３０）は、（米国特許第２００４／００４４１８８号に元来記載される）ｐＡＭＧ２１に基づいている。ベクターのユニークなＢｓｔＢＩ部位とＮｓｉＩ部位の間でＤＮＡを切り出し、アンピシリンに対する耐性を付与するβ－ラクタマーゼ遺伝子のテンプレート源としてのｐＵＣ１９ＤＮＡとともに、ＰＣＲプライマー

【０３４５】

【化１２】

CCA ACA CAC TTC

GAA AGA CGT TGA TCG GCA C （配列番号：667）及び CAC CCA ACA ATG CAT CCT

TAA AAA AAT TAC GCC C（配列番号：668）

を使用して、β－ラクタマーゼ遺伝子を搭載する適切に消化されたＰＣＲ断片と置換することによって、カナマイシン耐性要素がアンピシリン耐性と置換された点が改変されている。新たなバージョンは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲと呼ばれる。

【０３４６】

１５及び１６を除く、実施例３ないし３０において使用されるクローニングベクターｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐの記載。

【０３４７】

図１１Ａ－Ｃ及び図１１Ｄ（模式図）は、Ｆｃ遺伝子のＣ末端へのペプチド融合のクローニングを可能にするために基本ベクターｐＡＭＧ２１ａｍｐＲへ付加された二本鎖ＤＮＡを示す。前記ＤＮＡは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲベクター中のユニークなＮｄｅｌ部位とＢａｍＨＩ部位の間に導入されている。ＤＮＡのこの完全な領域を図１１ＡないしＣに示す。Ｆｃのコード領域は、ヌクレオチド５１３４から５８１７まで及び、タンパク質配列はＤＮＡ配列の下に表される。この後に、フレーム中にｇｌｙＸ５リンカーが続く（ヌクレオチド５８１８ないし５８３２）。ＢｓｍＢＩ部位（ＧＡＧＡＣＧ）は、ヌクレオチド５８３４ないし５８３９に及ぶ。ＤＮＡ開裂は、上部ＤＮＡ鎖のヌクレオチド５８２８と５８２９の間、及び下部ＤＮＡ鎖のヌクレオチド５８３２と５８３３の間に生じる。本明細書に示されるように、消化によって、４ｂｐの付着末端が作製される。ＢｓｍＢＩ部位には下線を付されている。

【０３４８】

【化１３】

AGGTGG
TCCACCACCA
配列番号：684

TGGTTGAGACG 配列番号：683
ACTCTGC

【０３４９】

第二ＢｓｍＢＩ部位は、ヌクレオチド６６４３ないし６６４８、すなわちＣＧＴＣＴＣに存在する。ＤＮＡ開裂は、上部鎖のヌクレオチド６６５０と６６５１の間、及び下部鎖の６６５４と６６５５の間に生じる。

【０３５０】

【化１４】

CGTCTCT
GCAGAGAATTC
配列番号：686

TAAGGATCCG 配列番号：685
CTAGGC

【０３５１】

２つのＢｓｍＢＩ部位の間に存在するのは、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼを構成的に発現する非必須クロラムフェニコール耐性カセットである（ｃａｔ遺伝子）。ｃａｔタンパク質配列、すなわち

【０３５２】

【化１５】

```
  1  MEKKITGYTT VDISQWHRKE HFEAFQSVAQ CTYNQTVQLD ITAFLKTVKK
 51  NKHKFYPAFI HILARLMNAH PEFRMAMKDG ELVIWDSVHP CYTVFHEQTE
101  TFSSLWSEYH DDFRQFLHIY SQDVACYGEN LAYFPKGFIE NMFFVSANPW
151  VSFTSFDLNV ANMDNFFAPV FTMGKYYTQG DKVLMPLAIQ VHHAVCDGFH
201  VGRMLNELQQ YCDEWQGGA //配列番号：1337
```

は、図１１ＡないしＣに示されており、ヌクレオチド５９５４から６６１０まで及ぶ。（実施例１５及び１６を除く）各実施例における、ペプチドをコードする二本鎖は、ベクターによって表されるものと相補的な付着末端を有する。

【０３５３】

実施例１５及び１６において使用されるクローニングベクターｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ-Ｐｅｐ-Ｆｃに関する記載。

【０３５４】

図１２ＡないしＣ、及び図１２Ｄの模式図は、Ｆｃ遺伝子のＮ末端へのペプチド融合のクローニングを可能にするために、基本ベクターｐＡＭＧ２１ａｍｐＲへ付加された二本鎖ＤＮＡ配列を示す。ＤＮＡは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲベクター中のユニークなＮｄｅ１部位とＢａｍＨＩ部位との間に導入されている。Ｆｃに対するコード領域は、ヌクレオチド５６４０から６３０９まで及び、タンパク質配列はＤＮＡ配列の下に表されている。この後、フレーム中にｇｌｙＸ５リンカーが続く（ヌクレオチド５６１４ないし５６２８）。ＢｓｍＢＩ部位は、ヌクレオチド５１３８ないし５１４３、すなわちＧＡＧＡＣＧに及ぶ。切断は、上部ＤＮＡ鎖のヌクレオチド５１３２と５１３３の間、及び下部ＤＮＡ鎖の５１３６と５１３７の間で生じる。

【０３５５】

示されるように、消化によって４ｂｐの付着末端が作製される。ＢｓｍＢＩ部位は下線を付されている。

【０３５６】

【化１６】

```
AATAACA                    TATGCGAGACG 配列番号：687
TTATTGTATAC                    GCTCTGC
配列番号：688
```

【０３５７】

第二ＢｓｍＢＩ部位は、ヌクレオチド５６０７ないし５６１２、すなわちＣＧＴＣＴＣに存在する。切断は、上部鎖のヌクレオチド５６１３と５６１４の間、及び下部鎖の５６１７と５６１８の間に生じる。

【０３５８】

【化１７】

```
CGTCTCA                    GGTGGTGGT
GCAGAGTCCAC                    CACCA
配列番号：689
```

【０３５９】

ＢｓｍＢＩ部位の間に存在するのは、赤痢菌ｂｌｅタンパク質を構成的に発現する必須で無いゼオシン耐性カセットである。ｂｌｅタンパク質配列、すなわち

【０３６０】

【化１８】

```
  1  MAKLTSAVPV LTARDVAGAV EFWTDRLGFS RDFVEDDFAG VVRDDVTLFI
 51  SAVQDQVVPD NTLAWVWVRG LDELYAEWSE VVSTNFRDAS GPAMTEIGEQ
101  PWGREFALRD PAGNCVHFVA EEQD //配列番号：1338
```

は、図１２Ａないし Ｃにおいてヌクレオチド５２１７から５５８８まで及ぶことが示されている。実施例１５及び１６における、ペプチドをコードする二本鎖は、ベクターによって表されるものと相補的な付着末端を有する。

【０３６１】

実施例５２及び５３において使用されるクローニングベクターｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ-Ｐｅｐ-Ｆｃに関する記載。

【０３６２】

図１２ＥないしＦは、ペプチドの最初の２つのコドンがｍｅｔ-ｇｌｙであるべきＦｃ遺伝子の、Ｎ末端へのペプチド融合のクローニングを可能にするために、基本ベクターｐＡＭＧ２１ａｍｐＲへ付加された二本鎖ＤＮＡ配列を示す。前記ＤＮＡは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲベクター中の独特なＮｄｅｌ部位とＢａｍＨＩ部位との間に導入されている。Ｆｃに対するコード領域は、ヌクレオチド５６３２から６３１２まで及び、タンパク質配列はＤＮＡ配列の下に表されている。この後、フレーム中にｇｌｙＸ５リンカーが続く（ヌクレオチド５６１７ないし５６３１）。ＢｓｍＢＩ部位は、ヌクレオチド５１４１ないし５１４６、すなわちＧＡＧＡＣＧに及ぶ。切断は、上部ＤＮＡ鎖のヌクレオチド５１３５と５１３６の間、及び下部ＤＮＡ鎖の５１３９と５１４０の間で生じる。

【０３６３】

示されるように、消化によって４ｂｐの付着末端が作製される。ＢｓｍＢＩ部位には下線が付されている。

【０３６４】

【化１９】

AATAACATAT　　GGGTCGAGACG 配列番号：1344
配列番号：1343
TTATTGTATACCCA　　GCTCTGC
配列番号：1345

【０３６５】

第二のＢｓｍＢＩ部位は、ヌクレオチド５６０７ないし５６１２、すなわちＣＧＴＣＴＣに存在する。切断は、上部鎖のヌクレオチド５６１３と５６１４との間、及び下部鎖の５６１７と５６１８との間に生じる。

【０３６６】

【化２０】

CGTCTCA　　GGTGGTGGT
GCAGAGTCCAC　　CACCA
配列番号：1346

【０３６７】

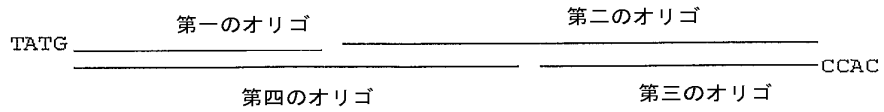
ＢｓｍＢＩ部位の間に存在するのは、赤痢菌ｂｌｅタンパク質を構成的に発現する必須でないゼオシン耐性カセットである。ｂｌｅは、上述のように、ヌクレオチド５２２０から５５９１まで及ぶことが示されている。本明細書で以下の実施例５２及び５３におけるペプチドコード化二本鎖は、ベクターによって表されるものと相補的な付着末端を有する。

【０３６８】

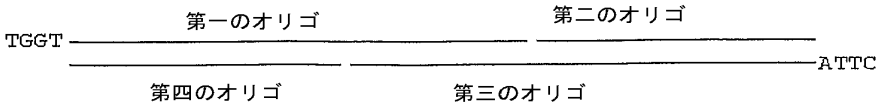
全てが細菌発現用である実施例３ないし３０において、クローニングされたペプチド配列は全て、適切なベクター中に直接連結されたＤＮＡ二本鎖を作製するための、オリゴヌクレオチドのアニーリングから得られる。実施例２０については、２つのオリゴで十分であり、全ての他の実施例には４つが必要である。二本鎖がＦｃのＮ末端において挿入されるべき場合（本明細書の実施例１５、１６、５２及び５３参照）には、デザインは次のとおりであり、順序を示す数は、各実施例におけるオリゴのリストと一致する。

【０３６９】

【化２１】



二重鎖がFcのC末端に挿入される場合（実施例３、４、５、１０、１１，１２、１３及び３０）、デザインは以下のとおりである。

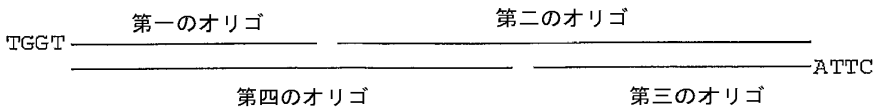


【０３７０】

残りの全ての実施例は、ＦｃのＣ末端において二本鎖が挿入され、次のデザインを利用する。

【０３７１】

【化２２】



【０３７２】

何れのオリゴのリン酸化にも、キナーゼ化（ｋｉｎａｓｉｎｇ）工程は必要ではない。二本鎖が首尾よく挿入されると、必須でない抗生物質耐性カセット（ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｐｅｐ－Ｆｃについてはゼオシン耐性、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐについてはクロラムフェニコール耐性）が置換される。得られた表現型の変化は、組換えクローンを非組換えクローンと識別するのに有用である。

【０３７３】

以下の記載は、本明細書で具体化されている、細菌によって発現された３０個の組換えタンパク質全てのクローニングを実施するための一様な方法を与える。オリゴヌクレオチド及びベクターのセットのみが変動する。これらの仕様は、以下の各実施例に記載されている。

【０３７４】

各実施例に列挙されているオリゴヌクレオチドのアニーリングによって、所定のペプチドに対するコード領域を含有するオリゴヌクレオチド二本鎖を形成した。制限酵素ＢｓｍＢＩで予め消化された適切なベクター０．３μｇとともに１×連結緩衝液を含有する１０μＬの最終容積中に、各オリゴ１０ｐｍｏｌを混合した。混合物を８０℃まで加熱し、０．１℃／秒で室温まで冷却させた。これに、１×連結緩衝液１０μＬ及びＴ４ＤＮＡリガーゼ４００単位を添加した。試料を１４℃で２０分間温置した。６５℃で１０分間加熱することによって、リガーゼを失活させた。次に、制限酵素ＢｓｍＢＩを１０単位添加した後、再形成された全ての親ベクター分子も開裂させるために、５５℃で１時間温置した。化学的に形質転換受容性のあるＥ．コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞５０μＬを添加し、２℃で

２０分間保持した後、４２℃で５秒間熱ショックを付与した。２００μｇ／ｍＬのカルベニシリンを補充したルリアアガープレートへ、全容積を拡散させた。置換可能な抗生物質耐性マーカーに対する耐性の損失に関して、コロニーを検査した。二本鎖インサートの予想されたサイズを確認するため、標準的なＰＣＲ検査を使用し得る。プラスミド調製物を得、組換えインサートをＤＮＡ配列決定によって確認した。配列の確認されたコンストラクトの０．５Ｌ培養物をＴｅｒｒｉｆｉｃ　Ｂｒｏｔｈ中で増殖させ、５０ｎｇ／ｍＬのＮ-（３-オキソ-ヘキサノイル）-ホモセリンラクトンの添加によって、ペプチボディの発現を誘導し、３７℃で４ないし６時間振とうした後、細胞を遠心分離し、細胞ペーストを-２０℃で保存した。

【０３７５】

以下では、各実施例について、クローニングベクター及び各融合タンパク質を構築するために使用されるオリゴヌクレオチドのセットを記載する。ＤＮＡ／タンパク質地図も示されている。

【０３７６】

Ｋｖ１．３のＦｃ-Ｌ-ＳｈＫ[１-３５]阻害剤の細菌での発現

細菌中で、ペプチボディをクローニング及び発現させるための方法は上述されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ-Ｆｃ-Ｐｅｐであり、Ｆｃ-Ｌ-ＳｈＫ[１-３５]の細菌中でのクローニング及び発現のために二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０３７７】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴ：

【０３７８】

【化２３】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCGTTCCTGCATCGACACCAT //配列番号：669；

CCCGAAATCCCGTTGCACCGCTTTCCAGTGCAAACACTCCATGAAATACCGTCTGTCCTTCTGCCGTAAAACC
TGCGGTACCTGC //配列番号：670；

CTTAGCAGGTACCGCAGGTTTTACGGCAGAAGGACAGACGGT //配列番号：671；

ATTTCATGGAGTGTTTGCACTGGAAAGCGGTGCAACGGGATTTCGGGATGGTGTCGATGCAGGAACGGGAACC
ACCACCACCGGA //配列番号：672；

オリゴ二本鎖は、以下に示されている。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCGTTCCTGCATCGACACCATCCCGAAATCCCGTTGCAC
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
   ACCAAGGGCACCACCACCAAGGGCAAGGACGTAGCTGTGGTAGGGCTTTAGGGCAACGTG

    G  S  G  G  G  G  S  R  S  C  I  D  T  I  P  K  S  R  C  T  -

   CGCTTTCCAGTGCAAACACTCCATGAAATACCGTCTGTCCTTCTGCCGTAAAACCTGCGG
61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   GCGAAAGGTCACGTTTGTGAGGTACTTTATGGCAGACAGGAAGACGGCATTTTGGACGCC

    A  F  Q  C  K  H  S  M  K  Y  R  L  S  F  C  R  K  T  C  G  -

   TACCTGC //配列番号：673
121 -------
   ATGGACGATTC //配列番号：675

    T  C  - //配列番号：674
```

【０３７９】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。細菌で発現されたＦｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ（１-３５）の精製は、本明細書の以下の実施例３８でさらに記載されている。

【実施例４】

【０３８０】

Ｆｃ－Ｌ－ＳｈＫ［２－３５］の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＳｈＫ［２－３５］の細菌での発現

細菌中で、ペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＳｈＫ［２－３５］の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０３８１】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０３８２】

【化２４】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCATCGACACCATCCCGAAATCCCGTTGCACCGCTTTCCAGTGCAAACACTCCATGAAA
T //配列番号：676；

ACCGTCTGTCCTTCTGCCGTAAAACCTGCGGTACCTGC //配列番号：677；

CTTAGCAGGTACCGCAGGTTTTACGGCAGAAGGACAGACGGTATTTCATGGAGTGTTTGCACTGGAAAGCGGTGCAACGGGA
//配列番号：678；

TTTCGGGATGGTGTCGATGCAGGAACCACCACCACCGGA //配列番号：679；

オリゴ二本鎖は、以下に示されている。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCATCGACACCATCCCGAAATCCCGTTGCACCGCTTT
 1 ----------+----------+----------+----------+----------+---------- 60
     AGGCCACCACCACCAAGGACGTAGCTGTGGTAGGGCTTTAGGGCAACGTGGCGAAA

    G  S  G  G  G  G  S  C  I  D  T  I  P  K  S  R  C  T  A  F  -

   CCAGTGCAAACACTCCATGAAATACCGTCTGTCCTTCTGCCGTAAAACCTGCGGTACCTG
61 ----------+----------+----------+----------+----------+---------- 120
   GGTCACGTTTGTGAGGTACTTTATGGCAGACAGGAAGACGGCATTTTGGACGCCATGGAC

    Q  C  K  H  S  M  K  Y  R  L  S  F  C  R  K  T  C  G  T  C  - //配列番号：681

   C // 配列番号：680
121 -
   GATTC // 配列番号：682
```

【０３８３】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。細菌で発現するＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（２－３５）の精製は、本明細書の以下の実施例３９に、さらに記載されている。

【実施例５】

【０３８４】

Ｆｃ－Ｌ－ＨｍＫの細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＨｍＫの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＨｍＫの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０３８５】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０３８６】

【化２５】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCGTACCTGCAAAGACCTGAT //配列番号：690；

CCCGGTTTCCGAATGCACCGACATCCGTTGCCGTACCTCCATGAAATACCGTCTGAACCTGTGCCGTAAAACCTGCGGTTCC
TGC 配列番号：692；

CTTAGCAGGAACCGCAGGTTTTACGGCACAGGTTCAGACGGT // 配列番号：693；

4142-94
ATTTCATGGAGGTACGGCAACGGATGTCGGTGCATTCGGAAACCGGGATCAGGTCTTTGCAGGTACGGGAACCAC
CACCACCGGA //配列番号：694

オリゴ二本鎖は、以下に示されている。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCGTACCTGCAAAGACCTGATCCCGGTTTCCGAATGCAC
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     AGGCCACCACCACCAAGGGCATGGACGTTTCTGGACTAGGGCCAAAGGCTTACGTG

     G  S  G  G  G  G  S  R  T  C  K  D  L  I  P  V  S  E  C  T  -

   CGACATCCGTTGCCGTACCTCCATGAAATACCGTCTGAACCTGTGCCGTAAAACCTGCGG
61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   GCTGTAGGCAACGGCATGGAGGTACTTTATGGCAGACTTGGACACGGCATTTTGGACGCC


     D  I  R  C  R  T  S  M  K  Y  R  L  N  L  C  R  K  T  C  G  - // 配列番号：696

   TTCCTGC //配列番号：695
121 -------
   AAGGACGATTC //配列番号：697

     S  C  -
```

【０３８７】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例６】

【０３８８】

Ｆｃ－Ｌ－ＫＴＸ１の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＫＴＸ１の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＫＴＸ１の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０３８９】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０３９０】

【化２６】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGGTGTTGAAATCAACGTTAAATGCT //配列番号：698；

CCGGTTCCCCGCAGTGCCTGAAACCGTGCAAAGACGCTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACCGTAAATGCCACTGCAC
CCCGAAA //配列番号：699；

CTTATTTCGGGGTGCAGTGGCATTTACGGTTCATGCATTTACCGAAA //配列番号：700；

CGCATACCAGCGTCTTTGCACGGTTTCAGGCACTGCGGGGAACCGGAGCATTTAACGTTGATTTCAACACCGGAACCACCAC
CACCGGA //配列番号：701；

オリゴ二本鎖は、以下に示されている。

```
    TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGGTGTTGAAATCAACGTTAAATGCTCCGGTTCCCCGCA
  1 ----------+----------+----------+----------+----------+----------+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGCCACAACTTTAGTTGCAATTTACGAGGCCAAGGGGCGT

     G  S  G  G  G  G  S  G  V  E  I  N  V  K  C  S  G  S  P  Q  -

    GTGCCTGAAACCGTGCAAAGACGCTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACCGTAAATG
 61 ----------+----------+----------+----------+----------+----------+ 120
    CACGGACTTTGGCACGTTTCTGCGACCATACGCAAAGCCATTTACGTACTTGGCATTTAC

     C  L  K  P  C  K  D  A  G  M  R  F  G  K  C  M  N  R  K  C  -

    CCACTGCACCCCGAAA //配列番号：702
121 ----------+------
    GGTGACGTGGGGCTTTATTC  //配列番号：704

     H  C  T  P  K  - //配列番号：703
```

【０３９１】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【０３９２】

細菌中で発現されたＦｃ－Ｌ－ＫＴＸ１の精製及び再折りたたみ

凍結したＥ．コリペースト（２８ｇ）を室温の５０ｍＭトリスＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ８．０の２１ｍＬと組み合わせ、約０．１ｍｇ／ｍＬのニワトリ卵白色リゾチームへ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置（ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｚｅｒ）へ１２，０００ＰＳＩで２回通過させた。次に、細胞可溶化液を４℃、２２，０００ｇで２０分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、ペレットを２００ｍＬの１％デオキシコール酸中に再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで２０分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、ペレットを２００ｍＬの水中に再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで２０分間遠心分離した。次に、ペレット（４．８ｇ）を４８ｍＬの８Ｍグアニジン－ＨＣｌ、５０ｍＭトリスＨＣｌ、ｐＨ８．０中に溶解した。次に、３０μＬの１Ｍジチオスレイトールを前記溶液３ｍＬへ添加し、３７℃で３０分間温置することによって、溶解したペレットを還元した。次に、還元したペレット溶液を室温、１４，０００ｇで５分間遠心分離した後、上清２．５ｍＬを、再折りたたみ緩衝液（２Ｍ尿素、５０ｍＭトリス、１６０ｍＭアルギニン－ＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、１ｍＭシスタミン－ＨＣｌ、４ｍＭシステイン、ｐＨ８．５）２５０ｍＬへ、４℃で激しく撹拌しながら転移させた。次に、撹拌速度を低下させ、４℃で２日間、温置を継続した。次に、０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターで再折りたたみ溶液をろ過し、４℃で３日間保存した。

【０３９３】

次に、保存した再折りたたみ液を水１Ｌで希釈し、１Ｍ H_3PO_4 を使用して、ｐＨを７．５へ調整した。次に、７℃、１０ｍＬ／分でＳ－緩衝液Ａ（２０ｍＭ NaH_2PO_4、ｐＨ７．３）中の１０ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ＨｉＴｒａｐカラムへと、ｐＨ調整した材料を負荷した。次に、カラムをＳ－緩衝液Ａの数カラム容積で洗浄した後、０％から６０％までのＳ－緩衝液Ｂ（２０ｍＭ NaH_2PO_4、１Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ７．３）の直線勾配で溶出した後、７℃、５ｍＬ／分で１００％Ｓ－緩衝液Ｂへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした（４５ｍＬ）。次に、７℃、２ｍＬ／分でＰＢＳ中の１ｍＬのＡｍｅ

ｒｓｈａｍ ｒＰｒｏｔｅｉｎ Ａ ＨｉＴｒａｐカラムへと前記プールを負荷した。次に、カラムをＰＢＳの数カラム容積で洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０で溶出した。溶出ピーク（２．５ｍＬ）へ、６２．５μＬの２Ｍトリス塩基を添加した後、ｐＨ調整した材料を室温、２ｍＬ／分で、０．２２μｍ、２５ｍｍのＭｕｓｔａｎｇ Ｅメンブレンを有するＰａｌｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ａｃｒｏｄｉｓｃでろ過した。

【０３９４】

次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈した組み合わせたプール２０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図２８Ｃ）。３０，５０４ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３５，４１０$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が２．４９ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図２８Ａ）。次に、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒｓエンドトキシン特異的緩衝液ＢＧ１２０中に試料を５０倍希釈したものを使用して、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｅｎｄｏｓａｆｅ-ＰＴＳシステム（０．０５ないし５ＥＵ／ｍＬ感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、１ＥＵ／タンパク質ｍｇ未満であった。次に、５０ｍＭNaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物４５μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図２８Ｂ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）へと希釈することによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液（１μＬ）をＭＡＬＤＩ試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ ＤＥ-ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して外部質量較正を実施し（図２８Ｄ）、本実験は、精製されたペプチボディの完全性を実験誤差内で確認した。次に、生成物を-８０℃で保存した。

【０３９５】

精製したＦｃ-Ｌ-ＫＴＸ１は、電気生理学的手法によって、用量依存的様式でヒトＫｖ１．３電流を遮断した(図３２Ａ及び図３２Ｂ)（方法を実施例３６に記載した。）。

【実施例７】

【０３９６】

Ｆｃ-Ｌ-ＨｓＴｘ１の細菌での発現

Ｆｃ-Ｌ-ＨｓＴ１の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ-Ｆｃ-Ｐｅｐであり、Ｆｃ-Ｌ-ＨｓＴｘ１の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０３９７】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０３９８】

【化２７】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGCTTCCTGCCGTACCCCGAAAGAC //配列番号：705；

TGCGCTGACCCGTGCCGTAAAGAAACCGGTTGCCCGTACGGTAAATGCATGAACCGTAAATGCAAATGCAACC
GTTGC //配列番号：706；

CTTAGCAACGGTTGCATTTGCATTTACGGTTCATGCATTTACCGTACG //配列番号：707；

GGCAACCGGTTTCTTTACGGCACGGGTCAGCGCAGTCTTTCGGGGTACGGCAGGAAGCGGAACCACCACCACC
GGA //配列番号：708；

オリゴ二本鎖は、以下に示されている。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGCTTCCTGCCGTACCCCGAAAGACTGCGCTGACCCGTG
 1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGCGAAGGACGGCATGGGGCTTTCTGACGCGACTGGGCAC
    G  S  G  G  G  G  S  A  S  C  R  T  P  K  D  C  A  D  P  C  -

   CCGTAAAGAAACCGGTTGCCCGTACGGTAAATGCATGAACCGTAAATGCAAATGCAACCG
61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   GGCATTTCTTTGGCCAACGGGCATGCCATTTACGTACTTGGCATTTACGTTTACGTTGGC
    R  K  E  T  G  C  P  Y  G  K  C  M  N  R  K  C  K  C  N  R  -


   TTGC  配列番号：709
121 ----  124
   AACGATTC 配列番号：711

    C   - 配列番号710
```

【０３９９】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例８】

【０４００】

Ｆｃ－Ｌ－ＭｇＴｘの細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＭｇＴｘの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＭｇＴｘの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４０１】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４０２】

【化２８】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCACCATCATCAACGTTAAATGCACCTC //配列番号：712；

CCCGAAACAGTGCCTGCCGCCGTGCAAAGCTCAGTTCGGTCAGTCCGCTGGTGCTAAATGCATGAACGGTAAA
TGCAAATGCTACCCGCAC //配列番号：713；

CTTAGTGCGGGTAGCATTTGCATTTACCGTTCATGCATTTAGCACCAG //配列番号：714；

CGGACTGACCGAACTGAGCTTTGCACGGCGGCAGGCACTGTTTCGGGGAGGTGCATTTAACGTTGATGATGGT
GGAACCACCACCACCGGA //SEQ ID NO:715;

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCACCATCATCAACGTTAAATGCACCTCCCCGAAACAGTG
 1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     AGGCCACCACCACCAAGGTGGTAGTAGTTGCAATTTACGTGGAGGGGCTTTGTCAC

    G  S  G  G  G  G  S  T  I  I  N  V  K  C  T  S  P  K  Q  C  -

   CCTGCCGCCGTGCAAAGCTCAGTTCGGTCAGTCCGCTGGTGCTAAATGCATGAACGGTAA
61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   GGACGGCGGCACGTTTCGAGTCAAGCCAGTCAGGCGACCACGATTTACGTACTTGCCATT

    L  P  P  C  K  A  Q  F  G  Q  S  A  G  A  K  C  M  N  G  K  -

   ATGCAAATGCTACCCGCAC 配列番号：716；
121 ---------+---------
   TACGTTTACGATGGGCGTGATTC 配列番号：718；

    C  K  C  Y  P  H  - 配列番号：717
```

【０４０３】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例９】

【０４０４】

Ｆｃ－Ｌ－ＡｇＴｘ２の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＡｇＴｘ２の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＡｇＴｘ２の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４０５】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４０６】

【化２９】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGGTGTTCCGATCAACGTTTCCTGCACCGGT //配列番号：719；

TCCCCGCAGTGCATCAAACCGTGCAAAGACGCTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACCGTAAATGCCACT
GCACCCCGAAA //配列番号：720；

CTTATTTCGGGGTGCAGTGGCATTTACGGTTCATGCATTTACCGAAACGCATA //配列番号：721；

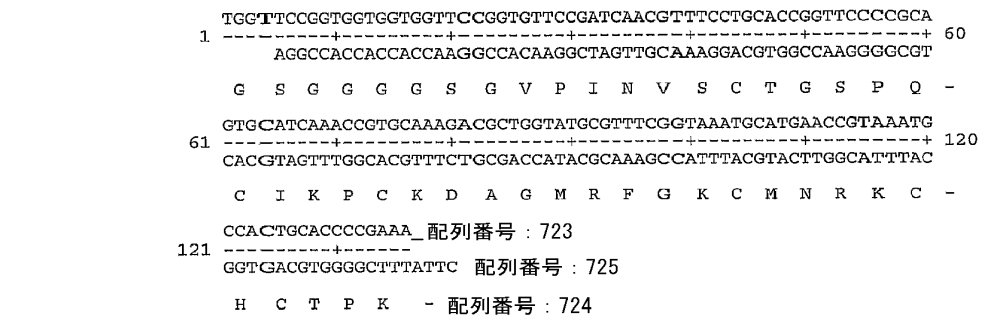
CCAGCGTCTTTGCACGGTTTGATGCACTGCGGGGAACCGGTGCAGGAAACGTTGATCGGAACACCGGAACCAC
CACCACCGGA //配列番号：722；

【０４０７】

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

【０４０８】

【化３０】



【０４０９】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【０４１０】

細菌中で発現したＦｃ－Ｌ－ＡｇＴｘ２の再折りたたみ及び精製

冷凍したＥ．コリペースト（１５ｇ）を、室温の５０ｍＭトリスＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ８．０の１２０ｍＬと合わせ、約０．１ｍｇ／ｍＬのニワトリ卵白色リゾチームへ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置へ、１２，０００ＰＳＩで２回通過させた。次に、４℃、２２，０００ｇで２０分間、細胞可溶化液を遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、１％デオキシコール酸２００ｍＬ中にペレットを再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで２０分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、２００ｍＬの水中にペレットを再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで２０分間遠心分離した。次に、ペレット（４．６ｇ）を４６ｍＬの８Ｍグアニジン　ＨＣｌ、５０ｍＭトリスＨＣｌ、ｐＨ８．０中に溶解した。次に、３０μＬの１Ｍジチオスレイトールを前記溶液３ｍＬへ添加し、３７℃で３０分間温置することによって、溶解したペレットを還元した。次に、還元されたペレット溶液を、室温、１４，０００ｇで５分間遠心分離した後、上清２．５ｍＬを、再折りたたみ緩衝液（２Ｍ尿素、５０ｍＭトリス、１６０ｍＭアルギニンＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、１ｍＭシスタミンＨＣｌ、４ｍＭシステイン、ｐＨ９．５）２５０ｍＬへ、４℃で激しく撹拌しながら転移させた。次に、撹拌速度を低下させ、温置を４℃で２日間続行した。次に、再折りたたみ溶液を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過し、－７０℃で保存した。

【０４１１】

次に、保存した再折りたたみ液を水１Ｌで希釈し、１Ｍ　H_3PO_4を使用して、ｐＨを７．５へ調整した。次に、ｐＨ調整した材料を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過し、７℃、１０ｍＬ／分でで、Ｓ－緩衝液Ａ（２０ｍＭNaH_2PO_4、ｐＨ７．３）中の１０ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　ＳＰ－ＨＰ　ＨｉＴｒａｐカラムへと負荷した。次に、カラムをＳ－緩衝液Ａの数カラム容積で洗浄した後、０％から６０％までのＳ－緩衝液Ｂ（２０ｍＭNaH_2PO_4、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．３）の直線勾配で溶出した後、７℃、５ｍＬ／分で１００％Ｓ－緩衝液Ｂへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした（１５ｍＬ）。次に、７℃、２ｍＬ／分でＰＢＳ中の１ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　ｒＰｒｏｔｅｉｎ　Ａ　ＨｉＴｒａｐカラムへ前記プールを負荷した。次に、カラムを２０ｍＭNaH_2PO_4、ｐＨ６．５、１Ｍ　ＮａＣｌの数カラム容積で洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０で溶出した。溶出ピーク（１．５ｍＬ）へ、１ＭトリスＨＣｌ、ｐＨ８．５を添加した後、ｐＨ調整した材料を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過した。

【０４１２】

次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ　８４５３分光光度計を使用して、７００μＬ

のＰＢＳ中に希釈した組み合わせたプール２０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図２９Ｃ）。３０，４４６ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３５，４１０$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が１．６５ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図２９Ａ）。次に、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒｓエンドトキシン特異的緩衝液ＢＧ１２０中に試料を３３倍希釈したものを使用して、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｅｎｄｏｓａｆｅ-ＰＴＳシステム（０．０５ないし５ＥＵ／ｍＬ感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した。次に、５０ｍＭNaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物２０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図２９Ｄ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ中に希釈する（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）ことによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液（１μＬ）をＭＡＬＤＩ試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ-ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して外部質量較正を実施し（図２９Ｅ）、本実験は、精製されたペプチボディの完全性を実験誤差内で確認した。その後、生成物を-８０℃で保存した。

【実施例１０】

【０４１３】

Ｆｃ-Ｌ-ＯＳＫ１の細菌での発現

Ｆｃ-Ｌ-ＯＳＫ１の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ-Ｆｃ-Ｐｅｐであり、Ｆｃ-Ｌ-ＯＳＫ１の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４１４】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４１５】

【化３１】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGGTGTTATCATCAACGTTAAATGCAAAATCTCCCGTCAGTGCCTGGAACCG
TGCAAAAAAG //配列番号：726；

CTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACGGTAAATGCCACTGCACCCCGAAA //配列番号：727；

CTTATTTCGGGGTGCAGTGGCATTTACCGTTCATGCATTTACCGAAACGCATACCAGCTTTTTTGCACGGTTC
CAGGCACTGA //配列番号：728；

CGGGAGATTTTGCATTTAACGTTGATGATAACACCGGAACCACCACCACCGGA //配列番号：729；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGGTGTTATCATCAACGTTAAATGCAAAATCTCCCGTCA
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     AGGCCACCACCACCAAGGCCACAATAGTAGTTGCAATTTACGTTTTAGAGGGCAGT

    G  S  G  G  G  G  S  G  V  I  I  N  V  K  C  K  I  S  R  Q  -

   GTGCCTGGAACCGTGCAAAAAAGCTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACGGTAAATG
61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   CACGGACCTTGGCACGTTTTTTCGACCATACGCAAAGCCATTTACGTACTTGCCATTTAC

    C  L  E  P  C  K  K  A  G  M  R  F  G  K  C  M  N  G  K  C  -

   CCACTGCACCCCGAAA 配列番号：730
121 ----------+------
   GGTGACGTGGGGCTTTATTC 配列番号：732

    H  C  T  P  K  - 配列番号：731
```

【０４１６】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、これより後の使用のためにペーストを冷凍保存した。Ｅ．コリペーストからのＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１の精製を、以下の本明細書の実施例４０に記載する。

【実施例１１】

【０４１７】

Ｆｃ－Ｌ－ＯＳＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＯＳＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＯＳＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４１８】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４１９】

【化３２】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGGTGTTATCATCAACGTTAAATGCAAAATCTCCCGTCAGTGCCTGAAACCG
TGCAAAGACG //配列番号：733；

CTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACGGTAAATGCCACTGCACCCCGAAA //配列番号：734；

CTTATTTCGGGGTGCAGTGGCATTTACCGTTCATGCATTTACCGAAACGCATACCAGCGTCTTTGCACGGTTT
CAGGCACTGA //配列番号：735；

CGGGAGATTTTGCATTTAACGTTGATGATAACACCGGAACCACCACCACCGGA //配列番号：736；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
  TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGGTGTTATCATCAACGTTAAATGCAAAATCTCCCGTCA
1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     AGGCCACCACCACCAAGGCCACAATAGTAGTTGCAATTTACGTTTTAGAGGGCAGT

   G  S  G  G  G  G  S  G  V  I  I  N  V  K  C  K  I  S  R  Q  -

  GTGCCTGAAACCGTGCAAAGACGCTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACGGTAAATG
61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
  CACGGACTTTGGCACGTTTCTGCGACCATACGCAAAGCCATTTACGTACTTGCCATTTAC

   C  L  K  P  C  K  D  A  G  M  R  F  G  K  C  M  N  G  K  C  -

  CCACTGCACCCCGAAA 配列番号：737
121 ----------+------
  GGTGACGTGGGGCTTTATTC 配列番号：739

   H  C  T  P  K  - 配列番号：738
```

【０４２０】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、これより後の使用のためにペーストを冷凍保存した。

【実施例１２】

【０４２１】

Ｆｃ－Ｌ－アニュロクトキシン（Ａｎｕｒｏｃｔｏｘｉｎ）の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－アニュロクトキシンの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－アニュロクトキシンの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４２２】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４２３】

【化３３】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCAAAGAATGCACCGGTCCGCAGCACTGCACCAACTTCTGCCGTAAAAACAAA
TGCACCCACG //配列番号：740；

GTAAATGCATGAACCGTAAATGCAAATGCTTCAACTGCAAA //配列番号：741；

CTTATTTGCAGTTGAAGCATTTGCATTTACGGTTCATGCATTTACCGTGGGTGCATTTGTTTTTACGGCAGAA
GTTGGTGCAG //配列番号：742；

TGCTGCGGACCGGTGCATTCTTTGGAACCACCACCACCGGA //配列番号：743；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
  TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCAAAGAATGCACCGGTCCGCAGCACTGCACCAACTTCTG
1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     AGGCCACCACCACCAAGGTTTCTTACGTGGCCAGGCGTCGTGACGTGGTTGAAGAC

   G  S  G  G  G  G  S  K  E  C  T  G  P  Q  H  C  T  N  F  C  -
```

```
   CCGTAAAAACAAATGCACCCACGGTAAATGCATGAACCGTAAATGCAAATGCTTCAACTG
61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------- 120
   GGCATTTTTGTTTACGTGGGTGCCATTTACGTACTTGGCATTTACGTTTACGAAGTTGAC

    R  K  N  K  C  T  H  G  K  C  M  N  R  K  C  K  C  F  N  C  -

   CAAA  配列番号：744
121 ----
   GTTTATTC 配列番号：746

    K   -  配列番号：745
```

【０４２４】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例１３】

【０４２５】

Ｆｃ－Ｌ－ノキシウストキシン（Ｎｏｘｉｕｓｔｏｘｉｎ）の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ノキシウストキシン又はＦｃ－Ｌ－ＮＴＸの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記述される。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＮＴＸの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４２６】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４２７】

【化３４】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCACCATCATCAACGTTAAATGCACCTCCCCGAAACAGTGCTCCAAACCGTGC
AAAGAACTGT // 配列番号：747；

ACGGTTCCTCCGCTGGTGCTAAATGCATGAACGGTAAATGCAAATGCTACAACAAC // 配列番号：748；

CTTAGTTGTTGTAGCATTTGCATTTACCGTTCATGCATTTAGCACCAGCGGAGGAACCGTACAGTTCTTTGCA
CGGTTTGGAG // 配列番号：749；

CACTGTTTCGGGGAGGTGCATTTAACGTTCATGATGGTGGAACCACCACCACCGGA // 配列番号：750；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCACCATCATCAACGTTAAATGCACCTCCCCGAAACAGTG
 1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------- 60
     AGGCCACCACCACCAAGGTGGTAGTAGTTGCAATTTACGTGGAGGGGCTTTGTCAC

    G  S  G  G  G  G  S  T  I  I  N  V  K  C  T  S  P  K  Q  C  -

   CTCCAAACCGTGCAAAGAACTGTACGGTTCCTCCGCTGGTGCTAAATGCATGAACGGTAA
61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------- 120
   GAGGTTTGGCACGTTTCTTGACATGCCAAGGAGGCGACCACGATTTACGTACTTGCCATT

    S  K  P  C  K  E  L  Y  G  S  S  A  G  A  K  C  M  N  G  K  -

   ATGCAAATGCTACAACAAC 配列番号：751
121 ----------+---------
   TACGTTTACGATGTTGTTGATTC 配列番号：753

    C  K  C  Y  N  N   -  配列番号：752
```

【０４２８】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例１４】

【０４２９】

Ｆｃ－Ｌ－Ｐｉ２の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－Ｐｉ２の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－Ｐｉ２の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、

以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４３０】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４３１】

【化３５】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCACCATCTCCTGCACCAACCCG //配列番号：754；

AAACAGTGCTACCCGCACTGCAAAAAAGAAACCGGTTACCCGAACGCTAAATGCATGAACCGTAAATGCAAAT
GCTTCGGTCGT //配列番号：755；

CTTAACGACCGAAGCATTTGCATTTACGGTTCATGCATTTAGCG //配列番号：756；

TTCGGGTAACCGGTTTCTTTTTTGCAGTGCGGGTAGCACTGTTTCGGGTTGGTGCAGGAGATGGTGGAACCAC
CACCACCGGA //配列番号：757；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
    TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCACCATCTCCTGCACCAACCCGAAACAGTGCTACCCGCA
 1  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
        AGGCCACCACCACCAAGGTGGTAGAGGACGTGGTTGGGCTTTGTCACGATGGGCGT

     G  S  G  G  G  G  S  T  I  S  C  T  N  P  K  Q  C  Y  P  H  -

    CTGCAAAAAAGAAACCGGTTACCCGAACGCTAAATGCATGAACCGTAAATGCAAATGCTT
61  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
    GACGTTTTTTCTTTGGCCAATGGGCTTGCGATTTACGTACTTGGCATTTACGTTTACGAA

     C  K  K  E  T  G  Y  P  N  A  K  C  M  N  R  K  C  K  C  F  -

    CGGTCGT 配列番号：758
121 -------
    GCCAGCAATTC 配列番号：760

     G  R  - 配列番号：759
```

【０４３２】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例１５】

【０４３３】

ＳｈＫ［１－３５］－Ｌ－Ｆｃの細菌での発現

ＳｈＫ［１－３５］－Ｌ－Ｆｃの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｐｅｐ－Ｆｃであり、ＳｈＫ［１－３５］－Ｌ－Ｆｃの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４３４】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４３５】

【化３６】

TATGCGTTCTTGTATTGATACTATTCCAAAATCTCGTTGTACTGCTTTTCAATGTAAACATTCTATGAAATAT
CGTCTTTCTT //配列番号：761；

TTTGTCGTAAAACTTGTGGTACTTGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT //配列番号：762；

CACCAGAACCACCACCACCAGAACAAGTACCACAAGTTTTACGACAAAAAGAAAGACGATATTTCATAGAATG
TTTACATTGA //配列番号：763

AAAGCAGTACAACGAGATTTTGGAATAGTATCAATACAAGAACG //配列番号：764；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TATGCGTTCTTGTATTGATACTATTCCAAAATCTCGTTGTACTGCTTTTCAATGTAAACA
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     GCAAGAACATAACTATGATAAGGTTTTAGAGCAACATGACGAAAAGTTACATTTGT

    M  R  S  C  I  D  T  I  P  K  S  R  C  T  A  F  Q  C  K  H  -

   TTCTATGAAATATCGTCTTTCTTTTTGTCGTAAAACTTGTGGTACTTGTTCTGGTGGTGG
61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   AAGATACTTTATAGCAGAAAGAAAAACAGCATTTTGAACACCATGAACAAGACCACCACC

    S  M  K  Y  R  L  S  F  C  R  K  T  C  G  T  C  S  G  G  G  -

   TGGTTCT 配列番号：765
121 ------- 127
   ACCAAGACCAC 配列番号：767

    G  S  - 配列番号：766
```

【０４３６】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。ｍｅｔ－ＳｈＫ［１－３５］－Ｆｃの精製は、以下の本明細書の実施例５１に記載されるとおりであった。

【実施例１６】

【０４３７】

ＳｈＫ［２－３５］－Ｌ－Ｆｃの細菌での発現

ＳｈＫ［２－３５］－Ｌ－Ｆｃの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｐｅｐ－Ｆｃであり、ＳｈＫ［２－３５］－Ｌ－Ｆｃの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４３８】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４３９】

【化３７】

TATGTCTTGTATTGATACTATTCCAAAATCTCGTTGTACTGCTTTTCAATGTAAACATTCTATGAAATATCGT
CTTTCTT //配列番号：768；

TTTGTCGTAAAACTTGTGGTACTTGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT //配列番号：769；

CACCAGAACCACCACCACCAGAACAAGTACCACAAGTTTTACGACAAAAAGAAAGACGATATTTCATAGAATG
TTTACATTGA //配列番号：770；

AAAGCAGTACAACGAGATTTTGGAATAGTATCAATACAAGA 配列番号：771；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TATGTCTTGTATTGATACTATTCCAAAATCTCGTTGTACTGCTTTTCAATGTAAACATTC
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     AGAACATAACTATGATAAGGTTTTAGAGCAACATGACGAAAAGTTACATTTGTAAG

    M  S  C  I  D  T  I  P  K  S  R  C  T  A  F  Q  C  K  H  S  -

   TATGAAATATCGTCTTTCTTTTTGTCGTAAAACTTGTGGTACTTGTTCTGGTGGTGGTGG
61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   ATACTTTATAGCAGAAAGAAAAACAGCATTTTGAACACCATGAACAAGACCACCACCACC

    M  K  Y  R  L  S  F  C  R  K  T  C  G  T  C  S  G  G  G  G  -
```

TTCT 配列番号：772
121 ----
AAGACCAC 配列番号：774

S - 配列番号：773

【０４４０】
ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。ＳｈＫ［２－３５］－Ｆｃの精製は、以下の本明細書の実施例５０に記載されるとおりであった。
【実施例１７】
【０４４１】
Ｆｃ－Ｌ－ＣｈＴｘの細菌での発現
Ｆｃ－Ｌ－ＣｈＴｘの細菌での発現
細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＣｈＴｘの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。
【０４４２】
二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。
【０４４３】
【化３８】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCAGTTCACCAACGTT //配列番号：775；

TCCTGCACCACCTCCAAAGAATGCTGGTCCGTTTGCCAGCGTCTGCACAACACCTCCCGTGGTAAATGCATGA
ACAAAAAATGCCGTTGCTACTCC //配列番号：776；

CTTAGGAGTAGCAACGGCATTTTTTGTTCATGCATTTA //配列番号：777；

CCACGGGAGGTGTTGTGCAGACGCTGGCAAACGGACCAGCATTCTTTGGAGGTGGTGCAGGAAACGTTGGTGA
ACTGGGAACCACCACCACCGGA //配列番号：778；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCAGTTCACCAACGTTTCCTGCACCACCTCCAAAGAATG
1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
AGGCCACCACCACCAAGGGTCAAGTGGTTGCAAAGGACGTGGTGGAGGTTTCTTAC

G S G G G G S Q F T N V S C T T S K E C -

CTGGTCCGTTTGCCAGCGTCTGCACAACACCTCCCGTGGTAAATGCATGAACAAAAAATG
61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
GACCAGGCAAACGGTCGCAGACGTGTTGTGGAGGGCACCATTTACGTACTTGTTTTTTAC

W S V C Q R L H N T S R G K C M N K K C -

CCGTTGCTACTCC 配列番号：779
121 ----------+---
GGCAACGATGAGGATTC 配列番号：781

R C Y S - 配列番号：780

【０４４４】
ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。
【実施例１８】
【０４４５】
Ｆｃ－Ｌ－ＭＴＸの細菌での発現
Ｆｃ－Ｌ－ＭＴＸの細菌での発現
細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させるための方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターはｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＭＴＸの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。
【０４４６】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４４７】

【化３９】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGTTTCCTGCACCGGT //配列番号：782；

TCCAAAGACTGCTACGCTCCGTGCCGTAAACAGACCGGTTGCCCGAACGCTAAATGCATCAACAAATCCTGCA
AATGCTACGGTTGC //配列番号：783；

CTTAGCAACCGTAGCATTTGCAGGATTTGTTGATGCAT //配列番号：784；

TTAGCGTTCGGGCAACCGGTCTGTTTACGGCACGGAGCGTAGCAGTCTTTGGAACCGGTGCAGGAAACGGAAC
CACCACCACCGGA //配列番号：785；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGTTTCCTGCACCGGTTCCAAAGACTGCTACGCTCCGTG
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
       AGGCCACCACCACCAAGGCAAAGGACGTGGCCAAGGTTTCTGACGATGCGAGGCAC

    G  S  G  G  G  G  S  V  S  C  T  G  S  K  D  C  Y  A  P  C  -

   CCGTAAACAGACCGGTTGCCCGAACGCTAAATGCATCAACAAATCCTGCAAATGCTACGG
61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   GGCATTTGTCTGGCCAACGGGCTTGCGATTTACGTAGTTTGTTTAGGACGTTTACGATGCC

    R  K  Q  T  G  C  P  N  A  K  C  I  N  K  S  C  K  C  Y  G  -

   TTGC 配列番号：786
121 ----
   AACGATTC 配列番号：788

    C   - 配列番号：787
```

【０４４８】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例１９】

【０４４９】

Ｆｃ－Ｌ－ＣｈＴｘ（Ｋ３２Ｅ）の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＣｈＴｘ（Ｋ３２Ｅ）の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＣｈＴｘ（Ｋ３２Ｅ）の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４５０】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４５１】

【化４０】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCAGTTCACCAACGTTTCCTG //配列番号：789；

CACCACCTCCAAAGAATGCTGGTCCGTTTGCCAGCGTCTGCACAACACCTCCCGTGGTAAATGCATGAACAAA
GAATGCCGTTGCTACTCC //配列番号：790；

CTTAGGAGTAGCAACGGCATTCTTTGTTCATGCATTTACCACG //配列番号：791；

GGAGGTGTTGTGCAGACGCTGGCAAACGGACCAGCATTCTTTGGAGGTGGTGCAGGAAACGTTGGTGAACTGG
GAACCACCACCACCGGA //配列番号：792；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCAGTTCACCAACGTTTCCTGCACCACCTCCAAAGAATG
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     AGGCCACCACCACCAAGGGTCAAGTGGTTGCAAAGGACGTGGTGGAGGTTTCTTAC

    G  S  G  G  G  G  S  Q  F  T  N  V  S  C  T  T  S  K  E  C  -

   CTGGTCCGTTTGCCAGCGTCTGCACAACACCTCCCGTGGTAAATGCATGAACAAAGAATG
61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   GACCAGGCAAACGGTCGCAGACGTGTTGTGGAGGGCACCATTTACGTACTTGTTTCTTAC

    W  S  V  C  Q  R  L  H  N  T  S  R  G  K  C  M  N  K  E  C  -

   CCGTTGCTACTCC 配列番号：793
121 ----------+---
   GGCAACGATGAGGATTC 配列番号：795

    R  C  Y  S  - 配列番号：794
```

【０４５２】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例２０】

【０４５３】

Ｆｃ－Ｌ－アパミン（Ａｐａｍｉｎ）の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－アパミンの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－アパミンの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４５４】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４５５】

【化４１】

```
TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCAACTGCAAAGCTCCGGAAACCGCTCTGTGCGCTCGTCGTTGCCAGCAG
CACGGT //配列番号：796；

CTTAACCGTGCTGCTGGCAACGACGAGCGCACAGAGCGGTTTCCGGAGCTTTGCAGTTGCAGGAACCACCACC
ACCGGA //配列番号：797；
```

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCAACTGCAAAGCTCCGGAAACCGCTCTGTGCGCTCG
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     AGGCCACCACCACCAAGGACGTTGACGTTTCGAGGCCTTTGGCGAGACACGCGAGC

    G  S  G  G  G  G  S  C  N  C  K  A  P  E  T  A  L  C  A  R  -

   TCGTTGCCAGCAGCACGGT 配列番号：798
61 ----------+---------
   AGCAACGGTCGTCGTGCCAATTC 配列番号：800

    R  C  Q  Q  H  G  - 配列番号：799
```

【０４５６】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例２１】

【０４５７】

Ｆｃ－Ｌ－スキラトキシン（Ｓｃｙｌｌａｔｏｘｉｎ）の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－スキラトキシン又はＦｃ－Ｌ－ＳｃｙＴｘの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現する方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＳｃｙＴｘの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４５８】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４５９】

【化４２】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGCTTTCTGCAACCTGCG //配列番号：801；

TATGTGCCAGCTGTCCTGCCGTTCCCTGGGTCTGCTGGGTAAATGCATCGGTGACAAATGCGAATGCGTTAAA
CAC //配列番号：802；

CTTAGTGTTTAACGCATTCGCATTTGTCACCGATGCATTT //配列番号：803；

ACCCAGCAGACCCAGGGAACGGCAGGACAGCTGGCACATACGCAGGTTGCAGAAAGCGGAACCACCACCACCG
GA //配列番号：804；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
  TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGCTTTCTGCAACCTGCGTATGTGCCAGCTGTCCTGCCG
1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGCGAAAGACGTTGGACGCATACACGGTCGACAGGACGGC

   G  S  G  G  G  G  S  A  F  C  N  L  R  M  C  Q  L  S  C  R  -

  TTCCCTGGGTCTGCTGGGTAAATGCATCGGTGACAAATGCGAATGCGTTAAACAC 配列番号：805
61 ----------+---------+---------+---------+---------+-----
  AAGGGACCCAGACGACCCATTTACGTAGCCACTGTTTACGCTTACGCAATTTGTGATTC 配列番号：807

   S  L  G  L  L  G  K  C  I  G  D  K  C  E  C  V  K  H   - 配列番号：806
```

【０４６０】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例２２】

【０４６１】

Ｆｃ－Ｌ－ＩｂＴｘの細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＩｂＴＸの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＩｂＴｘの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４６２】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４６３】

【化４３】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCAGTTCACCGACGTTGACTGCTCCGT //配列番号：808；

TTCCAAAGAATGCTGGTCCGTTTGCAAAGACCTGTTCGGTGTTGACCGTGGTAAATGCATGGGTAAAAAATGC
CGTTGCTACCAG //配列番号：809；

CTTACTGGTAGCAACGGCATTTTTTACCCATGCATTTACCACGGTCAA //配列番号：810；

CACCGAACAGGTCTTTGCAAACGGACCAGCATTCTTTGGAAACGGAGCAGTCAACGTCGGTGAACTGGGAACC
ACCACCACCGGA //配列番号：811；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
  TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCAGTTCACCGACGTTGACTGCTCCGTTTCCAAAGAATG
1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGGTCAAGTGGCTGCAACTGACGAGGCAAAGGTTTCTTAC
```

```
     G  S  G  G  G  G  S  Q  F  T  D  V  D  C  S  V  S  K  E  C  -

    CTGGTCCGTTTGCAAAGACCTGTTCGGTGTTGACCGTGGTAAATGCATGGGTAAAAAATG
 61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
    GACCAGGCAAACGTTTCTGGACAAGCCACAACTGGCACCATTTACGTACCCATTTTTTAC

     W  S  V  C  K  D  L  F  G  V  D  R  G  K  C  M  G  K  K  C  -

    CCGTTGCTACCAG 配列番号：812
121 ----------+---
    GGCAACGATGGTCATTC 配列番号：814

     R  C  Y  Q  - 配列番号：813
```

【０４６４】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例２３】

【０４６５】

Ｆｃ－Ｌ－ＨａＴｘ１の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＨａＴｘ１の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＨａＴｘ１の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４６６】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４６７】

【化４４】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGAATGCCGTTACCTGTTCGGTGGTTG //配列番号：815；

CAAAACCACCTCCGACTGCTGCAAACACCTGGGTTGCAAATTCCGTGACAAATACTGCGCTTGGGACTTCACC
TTCTCC //配列番号：816；

CTTAGGAGAAGGTGAAGTCCCAAGCGCAGTATTTGTCACGGAATTTGC //配列番号：817；

AACCCAGGTGTTTGCAGCAGTCGGAGGTGGTTTTGCAACCACCGAACAGGTAACGGCATTCGGAACCACCACC
ACCGGA //配列番号：818；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
    TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGAATGCCGTTACCTGTTCGGTGGTTGCAAAACCACCTC
  1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
       AGGCCACCACCACCAAGGCTTACGGCAATGGACAAGCCACCAACGTTTTGGTGGAG

     G  S  G  G  G  G  S  E  C  R  Y  L  F  G  G  C  K  T  T  S  -

    CGACTGCTGCAAACACCTGGGTTGCAAATTCCGTGACAAATACTGCGCTTGGGACTTCAC
 61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
    GCTGACGACGTTTGTGGACCCAACGTTTAAGGCACTGTTTATGACGCGAACCCTGAAGTG

     D  C  C  K  H  L  G  C  K  F  R  D  K  Y  C  A  W  D  F  T  -

    CTTCTCC 配列番号：819
121 -------
    GAAGAGGATTC 配列番号：821

     F  S  - 配列番号：820
```

【０４６８】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【０４６９】

細菌中で発現したＦｃ－Ｌ－ＨａＴｘ１の再折りたたみ及び精製

凍結したＥ．コリペースト（１３ｇ）を、室温の５０ｍＭトリスＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ８．０の１００ｍＬと合わせ、約０．１ｍｇ／ｍＬのニワトリ卵白色リゾチームへ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置へ、１２，０００ＰＳＩで２回通過させた。次に、４℃、２２，０００ｇで２０分間、細胞可溶化液を遠心分離した。次

に、組織粉砕機を使用して、２００ｍＬの１％デオキシコール酸中にペレットを再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで２０分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、ペレットを２００ｍＬの水中に再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで２０分間遠心分離した。次に、ペレット（２．６ｇ）を２６ｍＬの８ＭグアニジンHCl、５０ｍＭトリスHCl、ｐＨ８．０中に溶解した。次に、３０μＬの１Ｍジチオスレイトールを前記溶液３ｍＬへ添加し、３７℃で３０分間温置することによって、溶解したペレットを還元した。次に、還元されたペレット溶液を室温、１４，０００ｇで５分間遠心分離した後、上清２．５ｍＬを、再折りたたみ緩衝液（２Ｍ尿素、５０ｍＭトリス、１６０ｍＭアルギニンHCl、５ｍＭＥＤＴＡ、１ｍＭシスタミンHCl、４ｍＭシステイン、ｐＨ８．５）２５０ｍＬへ、４℃で激しく撹拌しながら転移させた。次に、撹拌速度を低下させ、温置を４℃で２日間続行した。次に、再折りたたみ溶液を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過し、－７０℃で保存した。

【０４７０】

次に、保存した再折りたたみ液を解凍した後、水１Ｌで希釈し、１Ｍ H_3PO_4 を使用して、ｐＨを７．５へ調整した。次に、７℃、１０ｍＬ／分でＳ－緩衝液Ａ（２０ｍＭ NaH_2PO_4、ｐＨ７．３）中の１０ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ＳＰ－ＨＰ ＨｉＴｒａｐカラムへと、ｐＨ調整した材料を負荷した。次に、カラムをＳ－緩衝液Ａの数カラム容積で洗浄した後、０％から６０％までのＳ－緩衝液Ｂ（２０ｍＭ NaH_2PO_4、１Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ７．３）の直線勾配で溶出した後、７℃、５ｍＬ／分で１００％Ｓ－緩衝液Ｂへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした（１５ｍＬ）。次に、７℃、２ｍＬ／分でＰＢＳ中の１ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ｒＰｒｏｔｅｉｎ Ａ ＨｉＴｒａｐカラムへと前記プールを負荷した。次に、カラムを２０ｍＭの NaH_2PO_4、ｐＨ６．５、１Ｍ ＮａＣｌの数カラム容積で洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０で溶出した。溶出ピーク（１．４ｍＬ）へ、１ＭトリスHCl、ｐＨ８．５の７０μＬを添加した後、ｐＨ調整した材料を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過した。

【０４７１】

次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈した組み合わせたプール２０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図２９Ｆ）。３０，４６９ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び４３，８９０$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が１．４４ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図２９Ｂ）。次に、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒｓエンドトキシン特異的緩衝液ＢＧ１２０中に試料を３３倍希釈したものを使用して、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｅｎｄｏｓａｆｅ－ＰＴＳシステム（０．０５ないし５ＥＵ／ｍＬ感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、4ＥＵ／タンパク質ｍｇ未満であった。次に、５０ｍＭ NaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物２０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図２９Ｇ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ中に希釈する（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）ことによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液（１μＬ）をＭＡＬＤＩ試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して外部質量較正を実施し（図２９Ｈ）、本実験は、精製されたペプチボディの完全性を実験誤差内で確認した。次に、生成物を－８０℃で保存した。

【実施例２４】
【０４７２】
Ｆｃ－Ｌ－ＰａＴｘ２の細菌での発現
Ｆｃ－Ｌ－ＰａＴｘ２の細菌での発現
細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＰａＴｘ２の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。
【０４７３】
二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。
【０４７４】
【化４５】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTACTGCCAGAAATGGA //配列番号：822；

TGTGGACCTGCGACGAAGAACGTAAATGCTGCGAAGGTCTGGTTTGCCGTCTGTGGTGCAAACGTATCATCAA
CATG //配列番号：823；

CTTACATGTTGATGATACGTTTGCACCACAGACGGCAAA //配列番号：824；

CCAGACCTTCGCAGCATTTACGTTCTTCGTCGCAGGTCCACATCCATTTCTGGCAGTAGGAACCACCACCACC
GGA //配列番号：825；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTACTGCCAGAAATGGATGTGGACCTGCGACGAAGAACG
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
       AGGCCACCACCACCAAGGATGACGGTCTTTACCTACACCTGGACGCTGCTTCTTGC

     G  S  G  G  G  G  S  Y  C  Q  K  W  M  W  T  C  D  E  E  R  -

   TAAATGCTGCGAAGGTCTGGTTTGCCGTCTGTGGTGCAAACGTATCATCAACATG 配列番号：826
61 ----------+---------+---------+---------+---------+-----
   ATTTACGACGCTTCCAGACCAAACGGCAGACACCACGTTTGCATAGTAGTTGTACATTC 配列番号：828

     K  C  C  E  G  L  V  C  R  L  W  C  K  R  I  I  N  M   - 配列番号：827
```

【０４７５】
ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。
【実施例２５】
【０４７６】
Ｆｃ－Ｌ－ｗＧＶＩＡの細菌での発現
Ｆｃ－Ｌ－ｗＧＶＩＡの細菌での発現
細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ｗＧＶＩＡの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。
【０４７７】
二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。
【０４７８】

【化４６】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCAAATCCCCGGGTT //配列番号：829；

CCTCCTGCTCCCCGACCTCCTACAACTGCTGCCGTTCCTGCAACCCGTACACCAAACGTTGCTACGGT
配列番号：830；

CTTAACCGTAGCAACGTTTGGTGTACGGGTTGCAGGAA //配列番号：831；

CGGCAGCAGTTGTAGGAGGTCGGGGAGCAGGAGGAACCCGGGGATTTGCAGGAACCACCACCACCGGA
//配列番号：832；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCAAATCCCCGGGTTCCTCCTGCTCCCCGACCTCCTA
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGACGTTTAGGGGCCCAAGGAGGACGAGGGGCTGGAGGAT

    G  S  G  G  G  G  S  C  K  S  P  G  S  S  C  S  P  T  S  Y  -

   CAACTGCTGCCGTTCCTGCAACCCGTACACCAAACGTTGCTACGGT 配列番号：833
61 ----------+---------+---------+---------+------
   GTTGACGACGGCAAGGACGTTGGGCATGTGGTTTGCAACGATGCCAATTC 配列番号：835

    N  C  C  R  S  C  N  P  Y  T  K  R  C  Y  G  配列番号：834
```

【０４７９】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例２６】

【０４８０】

Ｆｃ－Ｌ－ωＭＶＩＩＡの細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ωＭＶＩＩＡの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ωＭＶＩＩＡの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４８１】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４８２】

【化４７】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCAAAGGTAAA //配列番号：836；

GGTGCTAAATGCTCCCGTCTGATGTACGACTGCTGCACCGGTTCCTGCCGTTCCGGTAAATGCGGT //
配列番号：837；

CTTAACCGCATTTACCGGAACGGCAGGAACCGGT //配列番号：838；

GCAGCAGTCGTACATCAGACGGGAGCATTTAGCACCTTTACCTTTGCAGGAACCACCACCACCGGA //
配列番号：839；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCAAAGGTAAAGGTGCTAAATGCTCCCGTCTGATGTA
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGACGTTTCCATTTCCACGATTTACGAGGGCAGACTACAT

    G  S  G  G  G  G  S  C  K  G  K  G  A  K  C  S  R  L  M  Y  -

   CGACTGCTGCACCGGTTCCTGCCGTTCCGGTAAATGCGGT 配列番号：840
61 ----------+---------+---------+---------+
   GCTGACGACGTGGCCAAGGACGGCAAGGCCATTTACGCCAATTC 配列番号：842

    D  C  C  T  G  S  C  R  S  G  K  C  G   - 配列番号：841
```

【０４８３】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例２７】
【０４８４】
Ｆｃ－Ｌ－Ｐｔｕｌの細菌での発現
Ｆｃ－Ｌ－Ｐｔｕ１の細菌での発現
細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－Ｐｔｕ１の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。
【０４８５】
二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。
【０４８６】
【化４８】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGCTGAAAAAGACTGCATC // 配列番号：843；

GCTCCGGGTGCTCCGTGCTTCGGTACCGACAAACCGTGCTGCAACCCGCGTGCTTGGTGCTCCTCCTACGCTA
ACAAATGCCTG //配列番号：844；

CTTACAGGCATTTGTTAGCGTAGGAGGAGCACCAAGCACG //配列番号：845；

CGGGTTGCAGCACGGTTTGTCGGTACCGAAGCACGGAGCACCCGGAGCGATGCAGTCTTTTTCAGCGGAACCA
CCACCACCGGA //配列番号：846；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGCTGAAAAAGACTGCATCGCTCCGGGTGCTCCGTGCTT
 1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGCGACTTTTTCTGACGTAGCGAGGCCCACGAGGCACGAA

    G   S  G  G  G  G  S  A  E  K  D  C  I  A  P  G  A  P  C  F  -

   CGGTACCGACAAACCGTGCTGCAACCCGCGTGCTTGGTGCTCCTCCTACGCTAACAAATG
61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   GCCATGGCTGTTTGGCACGACGTTGGGCGCACGAACCACGAGGAGGATGCGATTGTTTAC

    G   T  D  K  P  C  C  N  P  R  A  W  C  S  S  Y  A  N  K  C  -

   CCTG 配列番号：847
121 ----
   GGACATTC 配列番号：849

    L   - 配列番号：848
```

【０４８７】
ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。
【実施例２８】
【０４８８】
Ｆｃ－Ｌ－ＰｒｏＴｘ１の細菌での発現
Ｆｃ－Ｌ－ＰｒｏＴｘ１の細菌での発現
細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＰｒｏＴｘ１の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。
【０４８９】
二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。
【０４９０】

【化４９】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGAATGCCGTTACTGGCTGG //配列番号：850；

GTGGTTGCTCCGCTGGTCAGACCTGCTGCAAACACCTGGTTTGCTCCCGTCGTCACGGTTGGTGCGTTTGGGA
CGGTACCTTCTCC //配列番号：851；

CTTAGGAGAAGGTACCGTCCCAAACGCACCAACCGTCACGA //配列番号：852；

CGGGAGCAAACCAGGTGTTTGCAGCAGGTCTGACCAGCGGAGCAACCACCCAGCCAGTAACGGCATTCGGAAC
CACCACCACCGGA //配列番号：853；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
    TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGAATGCCGTTACTGGCTGGGTGGTTGCTCCGCTGGTCA
  1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
       AGGCCACCACCACCAAGGCTTACGGCAATGACCGACCCACCAACGAGGCGACCAGT

     G  S  G  G  G  G  S  E  C  R  Y  W  L  G  G  C  S  A  G  Q  -

    GACCTGCTGCAAACACCTGGTTTGCTCCCGTCGTCACGGTTGGTGCGTTTGGGACGGTAC
 61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
    CTGGACGACGTTTGTGGACCAAACGAGGGCAGCAGTGCCAACCACGCAAACCCTGCCATG

     T  C  C  K  H  L  V  C  S  R  R  H  G  W  C  V  W  D  G  T  -

    CTTCTCC 配列番号：854
121 -------
    GAAGAGGATTC 配列番号：856

     F  S   - 配列番号：855
```

【０４９１】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例２９】

【０４９２】

Ｆｃ－Ｌ－ＢｅＫＭ１の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＢｅＫＭ１の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＢｅＫＭ１の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４９３】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４９４】

【化５０】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCGTCCGACCGACATCAAATG // 配列番号：857；

CTCCGAATCCTACCAGTGCTTCCCGGTTTGCAAATCCCGTTTCGGTAAAACCAACGGTCGTTGCGTTAACGGT
TTCTGCGACTGCTTC //配列番号：858；

CTTAGAAGCAGTCGCAGAAACCGTTAACGCAACGACCGTTGG //配列番号：859；

TTTTACCGAAACGGGATTTGCAAACCGGGAAGCACTGGTAGGATTCGGAGCATTTGATGTCGGTCGGACGGGA
ACCACCACCACCGGA //配列番号：860；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCGTCCGACCGACATCAAATGCTCCGAATCCTACCAGTG
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     AGGCCACCACCACCAAGGGCAGGCTGGCTGTAGTTTACGAGGCTTAGGATGGTCAC

    G  S  G  G  G  G  S  R  P  T  D  I  K  C  S  E  S  Y  Q  C  -

   CTTCCCGGTTTGCAAATCCCGTTTCGGTAAAACCAACGGTCGTTGCGTTAACGGTTTCTG
61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   GAAGGGCCAAACGTTTAGGGCAAAGCCATTTTGGTTGCCAGCAACGCAATTGCCAAAGAC

    F  P  V  C  K  S  R  F  G  K  T  N  G  R  C  V  N  G  F  C  -

   CGACTGCTTC 配列番号：861
121 ----------+
   GCTGACGAAGATTC 配列番号：863

    D  C  F  - 配列番号：862
```

【０４９５】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例３０】

【０４９６】

Ｆｃ－Ｌ－ＣＴＸの細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＣＴＸの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＣＴＸの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４９７】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４９８】

【化５１】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCATGTGCATGCCGTGCTTCAC //配列番号：864；

CACCGACCACCAGATGGCTCGTAAATGCGACGACTGCTGCGGTGGTAAAGGTCGTGGTAAATGCTACGGTCCG
CAGTGCCTGTGCCGT //配列番号：865；

CTTAACGGCACAGGCACTGCGGACCGTAGCATTTACCACGAC //配列番号：866；

CTTTACCACCGCAGCAGTCGTCGCATTTACGAGCCATCTGGTGGTCGGTGGTGAAGCACGGCATGCACATGGA
ACCACCACCACCGGA //配列番号：867；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCATGTGCATGCCGTGCTTCACCACCGACCACCAGATGGC
 1 ----------+----------+----------+----------+----------+----------+ 60
     AGGCCACCACCACCAAGGTACACGTACGGCACGAAGTGGTGGCTGGTGGTCTACCG

    G  S  G  G  G  G  S  M  C  M  P  C  F  T  T  D  H  Q  M  A  -

   TCGTAAATGCGACGACTGCTGCGGTGGTAAAGGTCGTGGTAAATGCTACGGTCCGCAGTG
61 ----------+----------+----------+----------+----------+----------+ 120
   AGCATTTACGCTGCTGACGACGCCACCATTTCCAGCACCATTTACGATGCCAGGCGTCAC

    R  K  C  D  D  C  C  G  G  K  G  R  G  K  C  Y  G  P  Q  C  -

   CCTGTGCCGT 配列番号：868
121 ----------+
   GGACACGGCACCAC 配列番号：870

    L  C  R  - 配列番号：869
```

【０４９９】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例３１】

【０５００】

Ｎ末端がＰＥＧ化されたＤｅｓ-Ａｒｇ１-ＳｈＫ

還元型Ｄｅｓ-Ａｒｇ１-ＳｈＫのペプチド合成

Ｔｅｎｔａｇｅｌ（商標）-Ｓ　ＰＨＢ　Ｆｍｏｃ-Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）樹脂上にて、０．１ｍｍｏｌ当量の樹脂スケールで、ヘキサフルオロリン酸２-（１Ｈ-ベンゾトリアゾール-１-イル）-１，１，３，３-テトラメチルウロニウム（ＨＢＴＵ）／Ｎ-メチルモルフォリン（ＮＭＭ）／Ｎ，Ｎ-ジメチル-ホルムアミド（ＤＭＦ）カップリング化学反応を使用する固相ペプチド合成（ＳＰＰＳ）によって、Ｓｙｍｐｈｏｎｙ（商標）多重ペプチド合成装置上で、段階的な様式で、配列

ＳＣＩＤＴＩＰＫＳＲＣＴＡＦＱＣＫＨＳＭＫＹＲＬＳＦＣＲＫＴＣＧＴＣ

（ペプチド１、配列番号９２）

を有するＤｅｓ-Ａｒｇ１-ＳｈＫを合成した。Ｎ-アルファ-（９-フルオレニルメチルオキシカルボニル）-及び側鎖保護されたアミノ酸は、Ｍｉｄｗｅｓｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄから購入した。Ｆｍｏｃ-Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）-Ｔｅｎｔａｇｅｌ（商標）樹脂は、Ｆｌｕｋａから購入した。以下の側鎖保護戦略、すなわち、Ａｓｐ（Ｏ^{t}Ｂｕ）、Ａｒｇ（Ｐｂｆ）、Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）、Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）、Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）、Ｌｙｓ（Ｎ$^{\varepsilon}$-Ｂｏｃ）、Ｓｅｒ（Ｏ^{t}Ｂｕ）、Ｔｈｒ（Ｏ^{t}Ｂｕ）及びＴｙｒ（Ｏ^{t}Ｂｕ）を使用した。２つのオキサゾリジンジペプチド、すなわちＦｍｏｃ-Ｇｌｙ-Ｔｈｒ（Ψ$^{Ｍｅ，Ｍｅ}$Ｐｒｏ）-ＯＨ及びＦｍｏｃ-Ｌｅｕ-Ｓｅｒ（Ψ$^{Ｍｅ，Ｍｅ}$Ｐｒｏ）-ＯＨを鎖重合に使用し、ＮｏｖａＢｉｏｃｈｅｍから入手し、配列の合成に使用した。保護されたアミノ酸誘導体（２０ｍｍｏｌ）をＤＭＦ中の２０％（ｖ／ｖ）ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）１００ｍＬ中に溶解した。ＤＭＦ中の２０％ＤＭＳＯ中の２０ｍＭＨＢＴＵ、４００ｍＭＮＭＭで、保護されたアミノ酸を活性化し、２０％ＤＭＦ／ＤＭＳＯ中の０．５ｍｍｏｌの保護されたアミノ酸、０．５ｍｍｏｌのＨＢＴＵ、１ｍｍｏｌのＮＭＭで、２５分間、次いで４０分間の２回の処理を使用して、カップリングを実施した。ＤＭＦ中の２０％（ｖ／ｖ）ピペリジンの溶液を使用する、１０分間、次いで１５分間の２回の処理で、Ｆｍｏｃ脱保護反応を実施した。合成の後、次に、樹脂を排水し、ＤＣＭ、ＤＭＦ、ＤＣＭで洗浄した後、真空で乾燥した。ＴＦＡ／ＥＤＴ／ＴＩＳ／H_2O（９２．５：２．５：２．５：２．５（ｖ／ｖ））溶液で、室温で１時間処理することによって、ペプチド-樹脂を脱保護し、樹脂から放出した。次に、揮発性物質を窒素ガス流で除去し、粗ペプチドを冷ジエチルエーテルで２回沈殿させ、遠心分離により回収した。次に、Ｊｕｐｉｔｅｒ　４μｍＰｒｏｔｅｏ（商標）９０Åカラム上での直線勾配（０ないし６０％緩衝液Ｂ、１２分、Ａ：水中の０．１％ＴＦＡ、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ＴＦＡ）を使用するＷａｔｅｒｓ２７９５分析用ＲＰ-ＨＰＬＣシステムで、粗ペプチドを分析した。正確なペプチド生成量を確認するために、ＰＥ-Ｓｃｉｅｘ（商標

）ＡＰＩ電気スプレー質量分析計を使用した。分析用ＲＰ－ＨＰＬＣ分析によって概算されるもの基づいて約７０％純度で、粗ペプチドを１４３ｍｇ収量で入手した。還元型Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫ（ペプチド１）の保持時間（室温）＝５．３１分、算出された分子量＝３９０４．６９１７Ｄａ（平均）、実験的に観察された分子量３９０７．０Ｄａであった。

【０５０１】

Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫの折りたたみ（ジスルフィド結合形成）

ＴＦＡ開裂及びペプチド沈殿の後、ペプチドを折りたたむため、還元型Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫを、空気で酸化した。水中の２０％ＡｃＯＨ（ｖ／ｖ）を使用して、開裂した粗ペプチドを抽出した後、約０．１５ｍｇ／ｍＬの還元型Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫの濃度まで水で希釈し、NH_4OH（２８ないし３０％）を使用してｐＨを約８．０に調整し、室温で３６時間静かに撹拌した。ＬＣ－ＭＳ分析により、折りたたみ工程をモニターした。この後、０ないし４０％の直線勾配の緩衝液Ｂで１２０分間（Ａ＝水中０．１％ＴＦＡ、Ｂ＝アセトニトリル中０．１％ＴＦＡ）１″Ｌｕｎａ　５μｍ　Ｃ１８　１００Å　Ｐｒｏｔｅｏ（商標）カラムを使用する逆相ＨＰＬＣを使用して、折りたたまれたＤｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫペプチドを精製した。折りたたまれた粗Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫペプチドを、約２５％の緩衝液Ｂで（その還元型における溶出時間と比較して）早期に溶出した。分析用ＲＰ－ＨＰＬＣ分析によって概算されるように、９７％超の純度で、折りたたまれたＤｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫ（ペプチド２）を２３．２ｍｇの収量で入手した（図２０）。算出された分子量＝３８９５．７６９３（モノアイソトピック）、実験的に観察された分子量＝３８９６．５Ｄａ（Ｗａｔｅｒｓ　ＬＣＴ　Ｐｒｅｍｉｅｒ　Ｍｉｃｒｏｍａｓｓ　ＭＳ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓで分析）であった。Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫジスルフィドの結合性は、Ｃ１－Ｃ６、Ｃ２－Ｃ４、Ｃ３－Ｃ５であった。

【０５０２】

【化５２】



（ペプチド２、配列番号５８）

【０５０３】

折りたたまれたＤｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫのＮ末端ＰＥＧ化

折りたたまれたＤｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫ（ペプチド２）を、１ｍｇ／ｍＬの濃度で水中に溶解した。５０ｍＭＮａＯＡｃ、ｐＨ４．５中の２Ｍ　ＭｅＯ－ＰＥＧ－アルデヒド、$CH_3O-[CH_2CH_2O]n-CH_2CH_2CHO$（平均分子量２０ｋＤａ）溶液、及び別途の$NaCNBH_3$の１Ｍ溶液を新たに調製した。次に、ペプチド溶液をＭｅＯ－ＰＥＧ－アルデヒド含有溶液へ添加した後、$NaCNBH_3$溶液を添加した。反応化学量論はそれぞれ、ペプチド：ＰＥＧ：ＮａＣＮＢＨ３（１：２：０．０２）であった。反応を４８時間放置し、直線勾配（１６分中６ないし６０％Ｂ、Ａ：水中０．１％ＴＦＡ、Ｂ：水中０．１％ＴＦＡ／９０％ＡＣＮ）で、４０℃でＺｏｒｂａｘ（商標）３００ＳＢ－Ｃ８　５μｍカラムを使用するＡｇｉｌｅｎｔ１１００ＲＰ－ＨＰＬＣシステムで分析した。モノＰＥＧ化された、折りたたまれたＤｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫは、分析用ＲＰ－ＨＰＬＣによって粗生成物の約５８％を構成した。次に、２５カラム容積中の０ないし５０％Ｂの勾配を使用して、４℃、１ｍＬ／分でＡＫＴＡ　ＦＰＬＣシステムにおいてＨｉＴｒａｐ（商標）５ｍＬ　ＳＰ　ＨＰ陽イオン交換カラムを使用して、モノＰＥＧ化されたＤｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫを単離した（緩衝液：Ａ＝２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ４．０、Ｂ＝１Ｍ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ４．０）。（粗生成物に関して記載されるとおり）４ないし２０のトリス－Ｇｌｙ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル及びＲＰ－ＨＰＬＣを使用して、画分を分析した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを１２５Ｖ、３５ｍＡ、５

Ｗで１．５時間使用した。次に、プールした生成物を４℃で、Ａ４Ｓ緩衝液（１０ｍＭＮａＯＡｃ、５％ソルビトール、ｐＨ４．０）１Ｌの３回の交換で透析した。次に、透析した生成物を１０Ｋの微量遠心フィルター中で２ｍＬ容積まで濃縮し、最終生成物を付与するため、０．２μＭシリンジフィルターを使用してろ過滅菌した。Ｎ末端がＰＥＧ化されたＤｅｓ-Ａｔｇ１-ＳｈＫ（ペプチド３）を、分析用ＲＰ-ＨＰＬＣ分析によって８５％純度と概算された１．７ｍｇ収量で単離した（図２３）。

【０５０４】

「ＰＥＧ-ＳｈＫ[２-３５]とも呼ばれる」Ｎ末端がＰＥＧ化されたＤｅｓ-Ａｒｇ１-ＳｈＫは、パッチクランプ電気生理学的実験によって測定されるように（図３６）、ヒトＫｖ１．３を遮断する上で活性があった（図３８Ａ及び図３８Ｂ）。

【実施例３２】

【０５０５】

Ｎ末端がＰＥＧ化されたＳｈｋ

作働する本実施例の実験的手法は、図１７に示される結果に対応する。

【０５０６】

還元型ＳｈＫのペプチド合成

Ｔｅｎｔａｇｅｌ（商標）-Ｓ　ＰＨＢ　Ｆｍｏｃ-Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）樹脂上、０．１ｍｍｏｌ当量の樹脂規模で、ヘキサフルオロリン酸２-（１Ｈ-ベンゾトリアゾール-１-イル）-１，１，３-３-テトラメチルウロニウム（ＨＢＴＵ）／Ｎ-メチルモルフォリン（ＮＭＭ）／Ｎ，Ｎ-ジメチル-ホルムアミド（ＤＭＦ）カップリング化学反応を使用する固相ペプチド合成（ＳＰＰＦ）によるＳｙｍｐｈｏｎｙ（商標）多重ペプチド合成装置での段階的な方法で、アミノ酸配列

ＲＳＣＩＤＴＩＰＫＳＲＣＴＡＦＱＣＫＨＳＭＫＹＲＬＳＦＣＲＫＴＣＧＴＣ

（ペプチド４、配列番号５）

を有するＳｈＫを合成した。Ｎ-アルファ-９-フルオレニルメチルオキシカルボニル及び側鎖保護されたアミノ酸は、Ｍｉｄｗｅｓｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄから購入した。Ｆｍｏｃ-Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）-Ｔｅｎｔａｇｅｌ（商標）樹脂は、Ｆｌｕｋａから購入した。以下の側鎖保護戦略を採用した。すなわち、Ａｓｐ（Ｏ^{t}Ｂｕ）、Ａｒｇ（Ｐｂｆ）、Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）、Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）、Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）、Ｌｙｓ（Ｎ$^{\varepsilon}$-Ｂｏｃ）、Ｓｅｒ（Ｏ^{t}Ｂｕ）、Ｔｈｒ（Ｏ^{t}Ｂｕ）及びＴｙｒ（Ｏ^{t}Ｂｕ）であった。２つのオキサゾリジンジペプチドであるＦｍｏｃ-Ｇｌｙ-Ｔｈｒ（Ψ^{Me,Me}Ｐｒｏ）-ＯＨ及びＦｍｏｃ-Ｌｅｕ-Ｓｅｒ（Ψ^{Me,Me}Ｐｒｏ）-ＯＨを鎖重合に使用し、ＮｏｖａＢｉｏｃｈｅｍから得、配列の合成に使用した。保護されたアミノ酸誘導体（２０ｍｍｏｌ）をＤＭＦ中の２０％（ｖ／ｖ）ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）１００ｍＬ中に溶解した。保護されたアミノ酸をＤＭＦ中の２０％ＤＭＳＯ中の２００ｍＭＨＢＴＵ、４００ｍＭＮＭＭで活性化し、２０％ＤＭＦ／ＤＭＳＯ中の０．５ｍｍｏｌの保護されたアミノ酸、０．５ｍｍｏｌのＨＢＴＵ、１ｍｍｏｌのＮＭＭで２５分間、次いで４０分間の２回の処理を使用して、カップリングを実施した。ＤＭＦ中の２０％（ｖ／ｖ）ピペリジンの溶液を１０分間、次いで１５分間使用する２回の処理で、Ｆｍｏｃ脱保護反応を実施した。合成の後、次に、樹脂を排水し、ＤＣＭ、ＤＭＦ、ＤＣＭで洗浄した後、真空で乾燥した。室温で１時間ＴＦＡ／ＥＤＴ／ＴＩＳ／H_2O（９２．５：２．５：２．５：２．５（ｖ／ｖ））溶液による処理によって、ペプチド-樹脂を脱保護し、樹脂から放出した。次に、揮発性物質を窒素ガス流で除去し、粗ペプチドを冷ジエチルエーテルで２回沈殿させ、遠心分離により回収した。次に、Ｊｕｐｉｔｅｒ　４μｍＰｒｏｔｅｏ（商標）９０Åカラム上での直線勾配（０ないし６０％緩衝液Ｂ、１２分、Ａ：水中の０．１％ＴＦＡ、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ＴＦＡ）を使用するＷａｔｅｒｓ２７９５分析用ＲＰ-ＨＰＬＣシステムで、粗ペプチドを分析した。正確なペプチド生成量を確認するため、ＰＥ-Ｓｃｉｅｘ　ＡＰＩ電気スプレー質量分析計を使用した。分析用ＲＰ-ＨＰＬＣ分析によって約４５％純度と概算される約１７０ｍｇの収量の粗ペプチドを入手した。還元型Ｄｅｓ-Ａｒｇ４-ＳｈＫ（ペプチド１）の保持時間（室温）＝

５．０５４分、算出された分子量＝４０６０．８７９３Ｄａ（平均）、実験的に観察された分子量４０６３．０Ｄａであった。
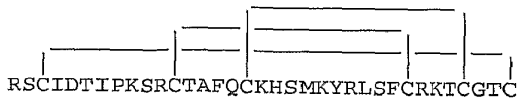
【０５０７】

ＳｈＫの折りたたみ（ジスルフィド結合形成）

ＴＦＡ開裂及びペプチド沈殿の後、ペプチドを折りたたむため、還元型ＳｈＫを空気で酸化した。水中の２０％ＡｃＯＨ（ｖ／ｖ）を使用して、開裂した粗ペプチドを抽出した後、約０．１５ｍｇ／ｍＬの還元型ＳｈＫの濃度まで水で希釈し、NH_4OH（２８ないし３０％）を使用してｐＨを約８．０に調整し、室温で３６時間静かに撹拌した。ＬＣ-ＭＳ分析により、折りたたみ工程をモニターした。この後、０ないし４０％の直線勾配の緩衝液Ｂで１２０分間（Ａ＝水中０．１％ＴＦＡ、Ｂ＝アセトニトリル中０．１％ＴＦＡ）１″Ｌｕｎａ　５μｍ　Ｃ１８　１００Å　Ｐｒｏｔｅｏ（商標）カラムを使用する逆相ＨＰＬＣによって、折りたたまれたＳｈＫペプチドを精製した。折りたたまれた粗ＳｈＫペプチドを、約２５％の緩衝液Ｂで（その還元型における溶出時間と比較して）早期に溶出した。分析用ＲＰ-ＨＰＬＣ分析によって概算されるように、９７％超の純度で、折りたたまれたＳｈＫ（ペプチド５）を２５．５ｍｇの収量で入手した。図６０を参照されたい。算出された分子量＝４０５１．８７６４Ｄａ（モノアイソトピック）、実験的に観察される分子量＝４０５２．５Ｄａ（Ｗａｔｅｒｓ　ＬＣＴ　Ｐｒｅｍｉｅｒ　Ｍｉｃｒｏｍａｓｓ　ＭＳ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓで分析）であった。ＳｈＫジスルフィドの結合性は、Ｃ１-Ｃ６、Ｃ２-Ｃ４、Ｃ３-Ｃ５であった。

【０５０８】

【化５３】



（ペプチド５、配列番号１０）

折りたたまれたＳｈＫのＮ末端のＰＥＧ化　以下のアミノ酸配列を有する折り畳まれたＳｈＫは、

RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC

（配列番号：５）

は、水中に１ｍｇ／ｍＬ濃度で溶解させることができる。５０ｍＭＮａＯＡｃ、ｐＨ４．５中の２Ｍ　ＭｅＯ-ＰＥＧ-アルデヒド、CH_3O-[CH_2CH_2O]ｎ-CH_2CH_2CHO（平均分子量２０ｋＤａ）溶液、及び$NaCNBH_3$の別個の１Ｍ溶液は、新たに調製できる。次に、ペプチド溶液をＭｅＯ-ＰＥＧ-アルデヒド含有溶液へ添加した後、$NaCNBH_3$溶液を添加できる。反応化学量論はそれぞれ、ペプチド：ＰＥＧ：ＮａＣＮＢＨ３（１：２：０．０２）であり得る。反応を４８時間放置し、直線勾配（１６分中６ないし６０％Ｂ、Ａ：水中０．１％ＴＦＡ、Ｂ：水中０．１％ＴＦＡ／９０％ＡＣＮ）で、４０℃でＺｏｒｂａｘ（商標）３００ＳＢ-Ｃ８　５μｍカラムを使用するＡｇｉｌｅｎｔ（商標）１１００ＲＰ-ＨＰＬＣシステムで分析できる。次に、２５カラム容積中の０ないし５０％Ｂの勾配を使用して、４℃、１ｍＬ／分でＡＫＴＡ　ＦＰＬＣシステムにおいて、ＨｉＴｒａｐ（商標）５ｍＬ　ＳＰ　ＨＰ陽イオン交換カラムを使用して、モノＰＥＧ化されたＳｈｋを単離できる（緩衝液：Ａ＝２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ４．０、Ｂ＝１Ｍ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ４．０）。４ないし２０のトリス-Ｇｌｙ　ＳＤＳ-ＰＡＧＥゲル及びＲＰ-ＨＰＬＣを使用して、画分を分析できる。ＳＤＳ-ＰＡＧＥゲルを１２５Ｖ、３５ｍＡ、５Ｗで１．５時間使用できる。次に、プールした生成物を４℃で、Ａ４Ｓ緩衝液（１０ｍＭ酢酸ナトリウム、５％ソルビトール、ｐＨ４．０）１Ｌの３回の交換で透析できる。次に、透析した生成物を１０Ｋの微量遠心フィルター中で２ｍＬ容積まで濃縮し、最終生成物を付与するため、０．２μＭシリンジフィルターを使用してろ過滅菌できる。

【実施例３３】

【０５０９】
オキシム形成によってＮ末端がＰＥＧ化されたＳｈＫ還元型ＳｈＫのペプチド合成
配列
【０５１０】
【化５４】

RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC
（配列番号５）

を有するＳｈＫは、Ｔｅｎｔａｇｅｌ（商標）-Ｓ　ＰＨＢ　Ｆｍｏｃ-Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）樹脂上、０．１ｍｍｏｌ当量の樹脂規模で、ヘキサフルオロリン酸２-（１Ｈ-ベンゾトリアゾール-１-イル）-１，１，３，３-テトラメチルウロニウム（ＨＢＴＵ）／Ｎ-メチルモルフォリン（ＮＭＭ）／Ｎ，Ｎ-ジメチル-ホルムアミド（ＤＭＦ）を使用する固相ペプチド合成（ＳＰＰＳ）によって、Ｓｙｍｐｈｏｎｙ（商標）多重ペプチド合成装置で段階的な様式で合成できる。Ｎ-アルファ-（９-フルオレニルメチルオキシカルボニル）-及び側鎖保護されたアミノ酸は、Ｍｉｄｗｅｓｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄから購入できる。Ｆｍｏｃ-Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）-Ｔｅｎｔａｇｅｌ（商標）樹脂は、Ｆｌｕｋａから購入できる。以下の側鎖保護戦略が採用できる。すなわち、Ａｓｐ（O^{t}Ｂｕ）、Ａｒｇ（Ｐｂｆ）、Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）、Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）、Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）、Ｌｙｓ（N^{ε}-Ｂｏｃ）、Ｓｅｒ（O^{t}Ｂｕ）、Ｔｈｒ（O^{t}Ｂｕ）及びＴｙｒ（O^{t}Ｂｕ）であった。２つのオキサゾリジンジペプチド、すなわちＦｍｏｃ-Ｇｌｙ-Ｔｈｒ（Ψ^{Me,Me}Ｐｒｏ）-ＯＨ及びＦｍｏｃ-Ｌｅｕ-Ｓｅｒ（Ψ^{Me,Me}Ｐｒｏ）-ＯＨは、鎖重合に使用でき、ＮｏｖａＢｉｏｃｈｅｍから入手でき、配列の合成に使用できる。保護されたアミノ酸誘導体（２０ｍｍｏｌ）は、ＤＭＦ中の２０％（ｖ／ｖ）ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）１００ｍＬ中に溶解できる。保護されたアミノ酸は、ＤＭＦ中の２０％ＤＭＳＯ中の２００ｍＭＨＢＴＵ、４００ｍＭＮＭＭで活性化でき、２０％ＤＭＦ／ＤＭＳＯ中の０．５ｍｍｏｌの保護されたアミノ酸、０．５ｍｍｏｌのＨＢＴＵ、１ｍｍｏｌのＮＭＭで２５分間、次いで４０分間の２回の処理を使用して、カップリングを実施できる。ＤＭＦ溶液中の２０％（ｖ／ｖ）ピペリジンを１０分間、次いで１５分間使用する２回の処理で、Ｆｍｏｃ脱保護反応を実施できる。Ｓｈｋペプチドの鎖重合の後、ＤＭＦ中の０．５Ｍ　ＨＢＴＵを４当量のコリジンとともに５分間使用して、Ｂｏｃ-アミノオキシ酢酸（１．２当量）をＮ末端にカップリングできる。合成の後、次に、樹脂を排水し、ＤＣＭ、ＤＭＦ、ＤＣＭで洗浄した後、真空で乾燥できる。室温で１時間、ＴＦＡ／アミノオキシ酢酸／ＴＩＳ／ＥＤＴ／Ｈ２Ｏ（９０：２．５：２．５：２．５）溶液での処理によって、ペプチド-樹脂を脱保護でき、樹脂から放出できる。次に、揮発性物質を窒素ガス流で除去し、粗ペプチドを冷ジエチルエーテルで２回沈殿し、遠心分離により回収できる。次に、Ｊｕｐｉｔｅｒ　４μｍ　Ｐｒｏｔｅｏ（商標）９０Åカラム上での直線勾配（１２分で０ないし６０％緩衝液Ｂ、Ａ：０．１％アミノオキシ酢酸も含有する水中の０．１％ＴＦＡ、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ＴＦＡ）を使用するＷａｔｅｒｓ２７９５分析用ＲＰ-ＨＰＬＣシステムで、アミノオキシ-Ｓｈｋペプチド（ペプチド７）を分析できる。
【０５１１】
逆相ＨＰＬＣ精製
調製用逆相高速液体クロマトグラフィーを、Ｃ１８（５μｍ、２．２ｃｍ×２５ｃｍ）カラムで実施できる。クロマトグラフィー分離は、１５ｍＬ／分で９０分にわたって、典型的には５ないし９５％のＡ中の緩衝液の直線勾配（Ａ＝０．１％ＴＦＡ水溶液、Ｂ＝０．０９％ＴＦＡ及び０．１％アミノオキシ酢酸を含有する９０％ＡＣＮ水溶液）を使用して達成できる。調製用ＨＰＬＣ画分は、ＥＳＭＳ及び光ダイオードアレイ（ＰＤＡ）ＨＰＬＣによって性質決定でき、合わせて、凍結乾燥できる。
【０５１２】

オキシム形成によるＳｈｋのＮ末端のＰＥＧ化

凍結乾燥したアミノオキシＳｈｋ（ペプチド７）は、５０％ＨＰＬＣ緩衝液Ａ／Ｂ（５ｍｇ／ｍＬ）中に溶解でき、ＭｅＯ-ＰＥＧ-アルデヒド、$CH_3O-[CH_2CH_2O]_n-CH_2CH_2CHO$（平均分子量２０ｋＤａ）の２倍モル過剰量へ添加できる。反応を２４時間放置でき、直線勾配（１６分中６ないし６０％Ｂ、Ａ：水中０．１％ＴＦＡ、Ｂ：水中０．１％ＴＦＡ／９０％ＡＣＮ）で、４０℃でＺｏｒｂａｘ（商標）３００ＳＢ-Ｃ８　５μｍカラムを使用するＡｇｉｌｅｎｔ（商標）１１００ＲＰ-ＨＰＬＣシステムで分析できる。モノＰＥＧ化された還元型ＳｈＫは、分析用ＲＰ-ＨＰＬＣによって粗生成物の約５８％を占めた。次に、２５カラム容積中の０ないし５０％Ｂの勾配を使用して、４℃、１ｍＬ／分でＡＫＴＡ　ＦＰＬＣシステムにおいてＨｉＴｒａｐ（商標）５ｍＬ　ＳＰ　ＨＰ陽イオン交換カラムを使用して、モノＰＥＧ化されたＳｈＫを単離できる（緩衝液：Ａ＝２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ４．０、Ｂ＝１Ｍ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ４．０）。４ないし２０のトリス-Ｇｌｙ　ＳＤＳ-ＰＡＧＥゲル及びＲＰ-ＨＰＬＣを使用して、画分を分析できる。ＳＤＳ-ＰＡＧＥゲルを、１２５Ｖ、３５ｍＡ、５Ｗで１．５時間使用できる。次に、プールした生成物を４℃で、Ａ４Ｓ緩衝液（１０ｍＭＮａＯＡｃ、５％ソルビトール、ｐＨ４．０）１Ｌの３回の交換で透析できる。次に、透析した生成物を、１０Ｋの微量遠心フィルター中で２ｍＬ容積まで濃縮でき、最終生成物を付与するため、０．２μＭシリンジフィルターを使用してろ過滅菌できる。

【０５１３】

ＳｈＫの折りたたみ（ジスルフィド結合形成）

モノＰＥＧ化された（オキシム化された）ＳｈＫは、水中の２０％ＡｃＯＨ（ｖ／ｖ）中に溶解でき、次に約０．１５ｍｇペプチドｍＬの濃度まで水で希釈し、NH_4OH（２８ないし３０％）を使用してｐＨを約８．０に調整し、室温で３６時間静かに撹拌することができる。ＬＣ-ＭＳ分析により、折りたたみ工程をモニターすることができる。この後、０ないし４０％の直線勾配の緩衝液Ｂで１２０分間（Ａ＝水中０．１％ＴＦＡ、Ｂ＝アセトニトリル中０．１％ＴＦＡ）１″Ｌｕｎａ　５μｍ　Ｃ１８　１００Å　Ｐｒｏｔｅｏ（商標）カラムを使用する逆相ＨＰＬＣを使用することによって、折りたたまれたモノＰＥＧ化された（オキシム化された）ＳｈＫ（ペプチド９）を精製できる。モノＰＥＧ化された（オキシム化された）ＳｈＫジスルフィドの結合性は、Ｃ１-Ｃ６、Ｃ２-Ｃ４、及びＣ３-Ｃ５であり得る。

【０５１４】

【化５５】



（ペプチド９、配列番号１０）

【実施例３４】

【０５１５】

Ｎ末端がＰＥＧ化されたＳｈＫ（アミド化）

本実施例の実験的手法は、図１８に示される結果に対応する。

【０５１６】

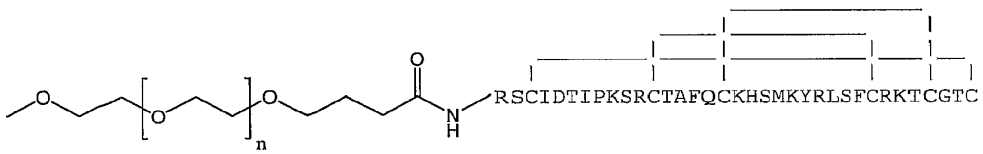
アミド形成によるＳｈｋのＮ末端のＰＥＧ化

Ｓｈｋに対するｍＰＥＧ-ＳＰＡ１．５モル濃度過剰量を使用して、室温で２０ｋＤａ　ＰＥＧプロピオン酸（ｍＰＥＧ-ＳＰＡ；$CH_3O-[CH_2CH_2O]n-CH_2CH_2CO-NHS$）の固体サクシニミジルエステルへ、１００ｍＭビシン、ｐＨ８．０中の折りたたまれたＳｈＫ（ペプチド５）の１０ｍｇ／ｍＬ溶液を添加できる。静かに撹拌した１時間後、混合物を水で２ｍｇ／ｍＬへ希釈でき、ｐＨを希ＨＣｌで４．０へ調整で

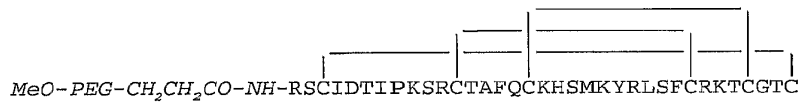
きる。１ｍＬ／分で０．０５Ｍ NaH_2PO_4、０．０５Ｍ Na_2HPO_4、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、０．０１Ｍ NaN_3、ｐＨ６．８で溶出したＳｕｐｅｒｄｅｘ（商標）７５ＨＲ１０／３０カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ）を使用するＳＥＣ ＨＰＬＣによって、モノＰＥＧ化されたＳｈｋ（ペプチド１０）、幾つかのジＰＥＧ化されたＳｈｋ又はトリＰＥＧ化されたＳｈｋ、修飾されていないＳｈｋ及びサクシニミジルエステル加水分解の程度を測定できる。４ないし２０のトリス-Ｇｌｙ ＳＤＳ-ＰＡＧＥゲル及びＲＰ-ＨＰＬＣを使用して、画分を分析できる。ＳＤＳ-ＰＡＧＥゲルを１２５Ｖ、３５ｍＡ、５Ｗで１．５時間使用できる。次に、４℃で、Ａ４Ｓ緩衝液（１０ｍＭＮａＯＡｃ、５％ソルビトール、ｐＨ４．０）１Ｌの３回の交換で、プールした生成物を透析できる。次に、透析したＮ末端ＰＥＧ化（アミド化）ＳｈＫ（ペプチド１０）を、１０Ｋの微量遠心フィルター中で２ｍＬ容積まで濃縮でき、最終生成物を付与するため、０．２μＭシリンジフィルターを使用してろ過滅菌できる。

【０５１７】

【化５６】



PEG 20kDa



（ペプチド１０、配列番号１０）

【実施例３５】

【０５１８】

Ｆｃ-Ｌ-ＳｍＩＩＩＡ

Ｆｃ-ＳｍＩＩＩＡ発現ベクター

部分的リンカー配列及びヒト高頻度コドンでコードされるＳｍＩＩＩＡペプチドを含有する１０４ｂｐのＢａｍＨＩ-ＮｏｔＩ断片を、重複プライマー３６５４-５０及び３６５４-５１を使用するＰＣＲによって重合し、実施例１に記載されているｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ-ｈＦｃ-ＳｍＩＩＩＡを作製するために、７．１ｋｂのＮｏｔＩ-ＢａｍＨＩ主鎖中にクローニングした。

【０５１９】

【化５７】

BamHI
5′GGATCCGGAGGAGGAGGAAGCTGCTGCAACGGCCGCCGCGGCTGCAGCAGCCGCTGG
C C N G R R G C S S R W
TGCCGCGACCACAGCCGCTGCTGCTGAGCGGCCGC3′ //SEQ ID NO:872
C R D H S R C C NotI
配列番号：873

フォワード 5′-3′:
GGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGAAGCTGCTGCAACGGCCGCCGCGGCTGCAGCAGC CGC //
配列番号：874

リバース 5′-3′:
ATTATTGCGGCCGCTCAGCAGCAGCGGCTGTGGTCGCGGCACCAGCGGCTGCTGCAG CCGC
配列番号：875

【０５２０】

最終コンストラクト中のＢａｍＨＩからＮｏｔＩへの断片の配列を、配列決定により確認した。

【０５２１】

Ｆｃ-Ｌ-Ｓｍｌｌａの一過性発現

毒素ペプチドＦｃ融合コンストラクトｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ-ｈＦｃ-ＳｍＩＩＩＡ７．５μｇを、形質移入剤ＦｕＧＥＮＥ６を有する１０ｃｍ組織培養プレート中の２９３-Ｔ細胞に形質移入した。形質移入から２４時間後、培地を無血清培地と交換し、形質移入の５日目に培養上清を回収した。抗ｈＦｃ抗体で標識したウェスタンブロットによって、２９３-Ｔ細胞からのＦｃ-ＳｍＩＩＩＡの一過性発現を分析した（図２５Ａ及び図２５Ｂ）。概算された分子量を有する発現されたタンパク質の単一バンドが、還元型及び非還元型試料の両者において示された。さらに、Ｆｃ-ＳｍＩＩＩＡの一過性発現レベルが、ＥＬＩＳＡによると、７３．４μｇ／ｍＬであることを決定した。

【実施例３６】

【０５２２】

電気生理学実験

細胞培養ヒトＫｖ１．３チャネルを発現する安定な細胞系が、Ｂｉｏｆｏｃｕｓから使用許諾された。５％CO_2環境中、３７℃で、細胞を維持した。培地は、ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、１×非必須アミノ酸、１０％ウシ胎仔血清及び５００μｇ／ｍＬジェネテシンを有するＤＭＥＭを含有する。電気生理学実験の少なくとも２４時間前に、細胞を播種し、３５ｍｍ培養皿上で低集密度で増殖させた。

【０５２３】

パッチクランプによる電気生理学記録

パッチクランプ技術の密封配置を使用することによって、全細胞電流を単一細胞から記録した。１３５ｍＭＮａＣｌ、５ｍＭＫＣｌ、１．８ｍＭ$CaCl_2$、１０ｍＭＨＥＰＥＳ及び５ｍＭグルコースを含有する記録緩衝液を有する培地ですすぎ、交換した後、３５ｍｍ培養皿を記録ステージへと移した。ＮａＯＨで、ｐＨを７．４になるように調整し、モル浸透圧濃度を３００ｍＯｓｍに設定した。平行に配置され、電動ロッド（電動ロッドは、記録されている細胞の上に、ガラス毛細管を直接配置する。）に装着されたガラス毛細管の１つを介して、細胞に、記録緩衝液を連続的に灌流した。記録ピペット溶液は、９０ｍＭＫ-グルコン酸塩、２０ｍＭＫＦ、１０ｍＭＮａＣｌ、１ｍＭ$MgCl_2$-$6H_2O$、１０ｍＭＥＧＴＡ、５ｍＭK_2-ＡＴＰ及び１０ｍＭＨＥＰＥＳを含有した。内部溶液に対するｐＨを、ＫＯＨで７．４に調整し、モル浸透圧濃度を２８０ｍＯｓｍに設定した。実験は室温（２０ないし２２℃）で実施し、Ｍｕｌｔｉｃｌａｍｐ（商標）７００Ａ増幅装置（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ Ｉｎｃ．）を使用して記録した。ピペットの抵抗は、典型的には、２ないし３ＭΩであった。

【０５２４】

Ｋｖ１．３電流に関するタンパク質毒素作用強度測定

ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現するＨＥＫ２９３細胞を、-８０ｍＶ保持電位で電位固定した。-８０ｍＶの保持電位から＋３０ｍＶへの２００ミリ秒長の脱分極工程を付与することによって、外向きのＫｖ１．３電流を活性化し、３ｋＨｚでフィルターにかけた。各脱分極工程は、その後の脱分極工程から１０秒間間隔で分離した。類縁体信号をＤｉｇｉｄａｔａ（商標）１３２２Ａデジタイザー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ）によってデジタル化した後、Ｃｌａｍｐｆｉｔ（商標）９（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ Ｉｎｃ．）を使用するオフライン分析のために、コンピュータディスクに保存した。全ての研究において、漸増濃度のタンパク質毒素の灌流を開始する４分間前に、安定したベースラインＫｖ１．３電流振幅を確立した。タンパク質毒素のその後の濃度の灌流を開始する前に、定常状態の遮断を常に達成した。

【０５２５】

データ解析

対照の百分率（ＰＯＣ）を次式に基づいて算出する。すなわち（タンパク質毒素添加後

のＫｖ１．３電流／対照におけるＫｖ１．３電流）×１００である。IC_{50}値を算出するため、タンパク質毒素の少なくとも５つの濃度（例えば、０．００３、０．０１、０．０３、０．１、０．３、１００ｎＭ）を使用した。ＸＬｆｉｔソフトウェア（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｃｏｒｐ．）の４つのパラメータロジスティック適合を使用して、IC_{50}値及び曲線適合を概算した。IC_{50}値を平均値±ｓ．ｅ．ｍ．（平均の標準誤差）として表す。

【０５２６】

薬物の調製

タンパク質毒素（典型的には１０ないし１００μＭ）を蒸留水中に溶解し、－８０℃で冷凍保存した。タンパク質毒素原液の連続希釈物を、０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する記録緩衝液中へ混合した後、ガラス灌流貯蔵器へと転移させた。電子挟みバルブは、貯蔵器から記録される細胞へのタンパク質毒素の流量を調節した。

【実施例３７】

【０５２７】

免疫生物学及びチャネル結合

ＰＢＭＣのＰＭＡ及び抗ＣＤ３抗体刺激後のＴ細胞サイトカイン生成の阻害。正常ヒトドナーＬｅｕｌｏｐｈｏｒｅｓｉｓパックから、ＰＢＭＣを予め単離し、密度勾配遠心（Ｆｉｃｏｌｌ　Ｈｙｐａｑｕｅ）によって精製し、ＣＰＺ　Ｃｒｙｏｐｒｅｓｅｒｖａｔｉｏｎ　Ｍｅｄｉｕｍ　Ｃｏｍｐｌｅｔｅ（ＩＮＣＥＬＬ，　ＭＣＰＺＦ－１００プラス最終濃度１０％ＤＭＳＯ）中で冷凍保存さした。ＰＢＭＣを解凍し（９５％生存率）、洗浄し、９６ウェル平底組織培養プレート中の１０％ウシ胎仔血清、１００Ｕ／ｍＬペニシリン、１００ｍｇ／ｍＬストレプトマイシン、２ｍＭＬ－グルタミン、１００μＭ非必須アミン酸及び２０μＭ２－ＭＥを補充した培地（ＲＰＭＩ培地１６４０、ＧＩＢＣＯ）中に、2×10^5細胞／ウェルで播種した。２００μＬの最終アッセイ容積中のＰＭＡ／抗ＣＤ３（それぞれ１ｎｇ／ｍＬ及び５０ｎｇ／ｍＬ）で４８時間刺激する前の９０分間、連続希釈した（最終濃度１００ｎＭないし０．００１ｎＭ）ＳｈＫ［１－３５］、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］又はｆｃ対照とともに、細胞をあらかじめ温置した。電気化学発光（ＥＣＬ）を利用することによってＩＬ－２及びＩＦＮｇのタンパク質レベルを測定するため、Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ（ＭＳＤ）ＳＥＣＴＯＲ（商標）Ｉｍａｇｅｒ６０００（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ，　Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｙ，　ＭＤ）を使用して、アッセイ試料の分析を実施した。培養上清（５０μＬ）をＭＳＤ多重スポット９６ウェルプレートへ添加した（各ウェルは、３つの捕捉抗体すなわちＩＬ－２、ＴＮＦ，ＩＦＮγを含有した）。プレートを密封し、スズ箔で包み、プレート振とう器上、室温で２時間温置した。ウェルを２００μＬのＰＢＳＴ（ＢＩＯＴＥＫ、Ｅｌｘ４０５Ａｕｔｏ　Ｐｌａｔｅ　Ｗａｓｈｅｒ）で１回洗浄した。各ウェルに対して、ルテニウム標識した検出抗体（抗体希釈緩衝液中の終濃度１μｇ／ｍＬ、ＩＬ－１、ＴＮＦ、ＩＦＮγ）２０μＬ及び２×ＭＳＤ　Ｒｅａｄ　Ｂｕｆｆｅｒ１３０μＬを添加し、終容積１５０μＬとした。プレートを密封し、スズ箔で包み、プレート振とう器上、室温で１時間温置した。次に、プレートをＳＥＣＴＯＲ（商標）Ｉｍａｇｅｒ６０００で読み取った。図３５Ａ及び３５Ｂは、ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、Ｔ細胞由来のＩＬ－２及びＩＦＮｇ生成を用量依存的な様式で有力に阻害することを示す。固有のＳｈＫ［１－３５］ペプチドと比較して、ペプチボディは、阻害の程度がより大きい（阻害剤の不在下での反応のＰＯＣ＝対照の百分率）。

【０５２８】

ＰＢＭＣのＰＭＡ及び抗ＣＤ３抗体刺激後のＴ細胞サイトカイン生成の阻害

正常ヒトドナーＬｅｕｋｏｐｈｅｒｅｓｉｓパックから、ＰＢＭＣをあらかじめ単離し、密度勾配遠心（Ｆｉｃｏｌｌ　Ｈｙｐａｑｕｅ）により精製し、ＩＮＣＥＬＬ　Ｆｒｅｚｉｎｇ　Ｍｅｄｉｕｍを使用して冷凍保存した。ＰＢＭＣを解凍し（９５％生存率）、洗浄し、（血清交換物ＰＳＧを含有するＲＰＭＩ完全培地中で）2×10^5細胞／ウェルで９６ウェル平底プレートへ播種した。２００ｍＬの最終アッセイ容積でａＣＤ３及び

ａＣＤ２８の添加（それぞれ２．５ｎｇ／ｍＬ及び１００ｎｇ／ｍＬ）の前の１時間、連続希釈した（終濃度１００ｎＭないし０．００３ｎＭ）ＳｈＫ［１－３５］、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］、又はＦｃ対照とともに、細胞をあらかじめ温置した。ＭＳＤ多重スポット９６ウェルプレートへ上清２０ｍＬを添加した（各ウェルは、ＩＬ－２、ＴＮＦα及びＩＦＮｇ捕捉抗体を含有した）。プレートを密封し、プレート振とう器上、室温で１時間温置した。次に、ルテニウム標識した検出抗体（抗体希釈緩衝液中のＩＬ－２、ＴＮＦα及びＩＦＮγの終濃度１μｇ／ｍＬ）２０ｍＬ及び２×ＭＳＤ　Ｒｅａｄ　Ｂｕｆｆｅｒ１１０ｍＬを添加した。プレートを密封し、スズ箔で包み、プレート振とう器上、室温で１時間温置した。次に、プレートをＳＥＣＴＯＲ（商標）Ｉｍａｇｅｒ６０００で読み取った。図３７Ａ及び３７Ｂは、ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、Ｔ細胞由来のＩＬ－２及びＩＦＮｇ生成を用量依存的な様式で有力に阻害することを示す。部分的な阻害のみを示す固有のＳｈＫ［１－３５］ペプチドと比較して、ペプチボディは、炎症性サイトカイン反応をほぼ完全に阻害する。（阻害剤の不在下での反応のＰＯＣ＝対照の百分率）。

【０５２９】

ＰＢＭＣの抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８抗体刺激後のＴ細胞増殖の阻害

正常ヒトドナーＬｅｕｋｏｐｈｅｒｅｓｉｓパックから、ＰＢＭＣをあらかじめ単離し、密度勾配遠心（Ｆｉｃｏｌｌ　Ｈｙｐａｑｕｅ）により精製し、ＣＰＺ　Ｃｒｙｏｐｒｅｓｅｒｖａｔｉｏｎ　Ｍｅｄｉｕｍ　Ｃｏｍｐｌｅｔｅ（ＩＮＣＥＬＬ，ＭＣＰＺＦ－１００プラス終濃度１０％ＤＭＳＯ）を使用して冷凍保存した。ＰＢＭＣを解凍し（９５％生存率）、洗浄し、９６ウェル平底組織培養プレート中の１０％ウシ胎仔血清、１００Ｕ／ｍＬペニシリン、１００ｍｇ／ｍＬストレプトマイシン、２ｍＭＬ－グルタミン、１００μＭ非必須アミン酸及び２０μＭ２－ＭＥを補充した培地（ＲＰＭＩ培地１６４０、ＧＩＢＣＯ）中で２×１０^{5}細胞／ウェルで播種した。抗ヒトＣＤ３２（ＦｃｙＲＩＩ）ブロッキング抗体（製造者の使用説明書ＥＡＳＹ　ＳＥＰ　Ｈｕｍａｎ　Ｂｉｏｔｉｎ　Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ１８５５３番、ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ，　ＢＣに従った。）又はＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（終濃度１００ｎＭないし０．００１ｎＭ）のいずれかとともに、細胞を４５分間予め温置した。次に、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（終濃度１００ｎＭないし０．００１ｎＭ）を、抗ヒトＣＤ３２ブロッキング抗体を含有する細胞へ添加する一方で、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＬを含有する細胞へ培地を添加した。ａＣＤ３／ａＣＤ２８（それぞれ０．２ｎｇ／ｍＬ及び１００ｎｇ／ｍＬ）で４８時間刺激する前のさらなる４５分間に両セットを温置した。最終的なアッセイ容積は２００μＬであった。［３Ｈ］ＴｄＲ（１μＣｉ／ウェル）を添加し、プレートをさらに１６時間温置した。次に、細胞をガラスファイバーフィルターへと回収し、放射能をＢシンチレーションカウンタで測定した。図３６Ａ及び３６Ｂは、ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、Ｔ細胞の増殖を用量依存的な様式で有力に阻害することを示す。抗ＣＤ３２（ＦｃＲ）ブロッキング抗体による前ブロッキングは、Ｔ細胞増殖を阻害するペプチボディの能力にほとんど効果を及ぼさず、ＦｃＲ結合ではなくＫｖ１．３阻害が、観察される阻害に関するメカニズムであることを示唆する（阻害剤の不在下での反応のＰＯＣ＝対照の百分率）。

【０５３０】

ヒトＫｖ１．３を過剰発現するＨＥＫ２９３細胞に対するＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］結合の免疫組織化学分析

ヒトＫｖ１．３を過剰発現するＨＥＫ２９３細胞（ＨＥＫ　Ｋｖ１．３）をＢｉｏＦｏｃｕｓ　ｐｌｃ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫ）から入手し、製造者の推奨に従って維持した。親ＨＥＫ２９３細胞系を対照として使用した。ポリ－Ｄ－リジン２４ウェルプレート（３５－４４１４番、Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ、Ｂｅｄｆｏｒｄ、ＭＡ）上に細胞を播種し、約７０％の集密状態まで増殖させた。培地１ｍＬ／ウェル中に、ＨＥＫＫＶ１．３を、０．５×１０^{5}細胞／ウェルで播種した。ＨＥＫ２９３細胞を、培地１ｍＬ／ウェル中に、１．５×１０^{5}細胞／ウェルの密度で播種した。染色前、細胞増殖培地

を除去し、０．２ｍＬ／ウェルのホルマリン溶液（Ｓｉｇｍａ　ＨＴ５０－１－１ホルマリン溶液、ＰＢＳ／０．５％ＢＳＡで使用前に１：１希釈）を添加し、室温で１０分間温置することによって、細胞をホルマリンで固定した。ＰＢＳ／ＢＳＡ中の５μｇ／ｍＬのＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］０．２ｍＬ／ウェルとともに温置することによって細胞を染色した。Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］を吸引した後、細胞をＰＢＳ／０．５％ＢＳＡで１回洗浄した。検出抗体（ヤギＦ（ａｂ）２抗ヒトＩｇＧフィコエリスリン、Ｓｏｕｔｈｅｍ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ、ＡＬ）をＰＢＳ／０．５％ＢＳＡ中で５μｇ／ｍＬでウェルへ添加し、室温で３０分間温置した。ＰＢＳ／０．５％ＢＳＡで、細胞を１回洗浄し、共焦点顕微鏡（ＬＳＭ５１０Ｍｅｔａ　Ｃｏｎｆｏｃａｌ　Ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｅ、Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ　ＡＧ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して検査した。図３３Ｂは、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、ＨＥＫ２９３細胞を過剰発現するＫｖ１．３に対する結合を保持することを示すが、形質移入されていない細胞に対する結合はほとんど示さず（図３３Ａ）、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、Ｋｖ１．３チャネルを過剰発現する細胞を検出するための試薬として使用できることを示す。活性化されたＴエフェクターメモリ細胞がＫｖ１．３を過剰生成することが報告されている疾病状況において、この試薬は、これらの細胞をターゲットにする上でも、それらの検出においても有用性を見出せる。

【０５３１】

固定されたＨＥＫ２９３細胞に対して結合するＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］を示すＥＬＩＳＡアッセイ

図３４Ａは、Ｋｖ１．３を過剰発現する固定された細胞に対するペプチボディ結合の用量依存的な増加を示し、前記ペプチボディがその標的に対する高親和性結合及び、チャネルを発現する細胞の検出におけるＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］の有用性を示す。多発性硬化症患者において疾病を発症させる抗原特異的Ｔ細胞は、困難なアプローチであるホールセルパッチクランプ電気生理学によって、Ｋｖ１．３を過剰発現することが示されてきた。本ペプチボディ試薬は、患者におけるＫｖ１．３チャネル発現をモニターするための有用かつ簡便なツールであり得、診断適用において有用である。図３４Ａ及び図３４Ｂに示される手法は、以下のとおりである。

【０５３２】

図３４Ａ。Ｋｖ１．３の形質移入されたＨＥＫ２９３細胞に対する無処置のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］の結合を示すため、細胞全体の免疫アッセイを実施した（ＢｉｏＦｏｃｕｓ　ｐｌｃ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫ）。ポリ－Ｄ-リジンでコーティングした９６ウェルプレート（３５－４４６１番、Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ、Ｂｅｄｆｏｒｄ、ＭＡ）において、親ＨＥＫ２９３細胞又はＨＥＫ　Ｋｖ１．３細胞を３×１０^{4}細胞／ウェルで播種した。細胞増殖培地を除去し、０．２ｍＬ／ウェルのホルマリン溶液（Ｓｉｇｍａ　ＨＴ５０－１－１ホルマリン溶液、ＰＢＳ／０．５％ＢＳＡで使用前に１：１希釈）を添加し、室温で２５分間温置した後、ＰＢＳ／０．５％ＢＳＡ１００μＬ／ウェルで１回洗浄することによって、細胞をホルマリンで固定した。ＢＳＡブロッカー（５０－６１－００、ＫＰＬ１０％ＢＳＡ希釈剤／ブロッキング溶液、ＰＢＳで１：１希釈、ＫＰＬ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）０．３ｍＬ／ウェルの添加後、振とうしながら室温で３時間温置することによって、ウェルをブロッキングした。プレートを１×ＫＢ洗浄緩衝液（５０－６３－００、ＫＰＬ）で２回洗浄した。試料を希釈緩衝液（ＰＢＳ／０．５％トゥイーン２０）又は１％雄ルイスラット血清（ＲＡＴＳＲＭ－Ｍ、Ｂｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ　Ｉｎｃ．、Ｈｉｃｋｓｖｉｌｌｅ、ＮＹ）含有希釈緩衝液中に希釈し、ブロッキングされたプレートへ０．１ｍＬ／ウェルを添加し、振とうしながら室温で１時間温置した。プレートを１×ＫＰ洗浄緩衝液で３回洗浄した後、ＰＢＳ／０．１％トゥイーン２０中に１：５０００で希釈したＨＲＰ－ヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ（３１４１６番、Ｐｉｅｒｃｅ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）とともに、振とうしながら室温で１時間温置した。プレートを１×ＫＰ洗浄緩衝液で３回洗浄した後、０．１ｍＬ／ウェルのＴＭＢ基質（５２－００－０１、ＫＰＬ）を添加した。０．１ｍＬ／ウェルの２Ｎ硫酸の添

加により、反応を停止させた。Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ ＳｐｅｃｔｒｏＭａｘ３４０（Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ、ＣＡ）で、４５０ｎｍの吸光度を読み取った。

【０５３３】

図３４Ｂ。細胞全体の免疫アッセイを、以下の改変とともに上述のとおり実施した。ポリ-Ｄ-リジンでコーティングした９６ウェルプレート中で、ＨＥＫ２９３細胞を1×10^5細胞／ウェルで播種し、ＨＥＫ Ｋｖ１．３細胞を６×１０４細胞／ウェルで播種した。Ｆｃ対照を０．０５ｍＬ／ウェルの容積で５００ｎｇ／ｍＬで添加した。ＨＲＰ-ヤギ抗ヒトＩｇＧ Ｆｃ（３１４１６番、Ｐｉｅｒｃｅ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）をＰＢＳ／０．１％トゥイーン２０中に１：１０，０００希釈した。ＡＢＴＳ（５０-６６-００、ＫＰＬ）を基質として使用した。１％ＳＤＳの０．１ｍＬ／ウェルの添加によって反応を停止させた後、４０５ｎｍで吸光度を読み取った。

【実施例３８】

【０５３４】

Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ（1-３５）の精製

Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ[１-３５]の発現は、本明細書の上述の実施例３において記載されているとおりであった。凍結したＥ．コリペースト（１８ｇ）を室温の５０ｍＭトリスＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ８．０の２００ｍＬと組み合わせ、約０．１ｍｇ／ｍＬの二ワトリ卵白色リゾチームへ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置へ、１２，０００ＰＳＩで２回通過させた。次に、細胞可溶化液を、４℃、２２，０００ｇで１５分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、ペレットを１％デオキシコール酸２００ｍＬ中に再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで１５分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、２００ｍＬの水中にペレットを再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで１５分間遠心分離した。次に、３２ｍＬの８ＭグアニジンＨＣｌ、５０ｍＭトリスＨＣｌ、ｐＨ８．０中に、ペレット（３．２ｇ）を溶解した。次に、室温、２７，０００ｇで１５分間、ペレット溶液を遠心分離した後、再折りたたみ緩衝液（３Ｍ尿素、２０％グリセロール、５０ｍＭトリス、１６０ｍＭアルギニンＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、１ｍＭシスタミンＨＣｌ、４ｍＭシステイン、ｐＨ９．５）５００ｍＬへ、４℃で激しく撹拌しながら、上清５ｍＬを移動させた。次に、撹拌速度を低下させ、４℃で２日間、温置を続行した。次に、再折りたたみ溶液を-７０℃で保存した。

【０５３５】

保存した再折りたたみ液を解凍した後、水２Ｌで希釈し、１Ｍ H_3PO_4 を使用して、ｐＨを７．３へ調整した。次に、ｐＨ調整した材料を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過し、７℃、２０ｍＬ／分でＳ-緩衝液Ａ（２０ｍＭ NaH_2PO_4、ｐＨ７．３）中の６０ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ＳＰ-ＦＦ（内径２．６ｃｍ）カラムへと負荷した。次に、カラムをＳ-緩衝液Ａの数カラム容積で洗浄した後、０％から６０％までのＳ-緩衝液Ｂ（２０ｍＭ NaH_2PO_4、１Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ７．３）の直線勾配で溶出した後、７℃、１０ｍＬ／分で１００％Ｓ-緩衝液Ｂへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした。次に、７℃、１ｍＬ／分でＰＢＳ中の１ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ｒＰｒｏｔｅｉｎ Ａ ＨｉＴｒａｐカラムへと前記プールを負荷した。次に、カラムを２０ｍＭの NaH_2PO_4、ｐＨ６．５、１Ｍ ＮａＣｌの数カラム容積で洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０で溶出した。溶出ピークへ、３Ｍ酢酸ナトリウム０．０１２５容積（２５ｍＬ）を添加した。

【０５３６】

次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ８４５３分光光度計を使用して、７００μＬの水中に希釈した組み合わせたプール５０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図４６Ａ）。３０，４１０ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３６，９００$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が２．５６ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ

-ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図４６Ｂ）。次に、５０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９でＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物２０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図４６Ｃ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ中に希釈する（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）ことによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液１ｍＬをＭＡＬＤＩ試料プレート上に点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ ＤＥ-ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。次に、生成物を-８０℃で保存した。

【０５３７】

「Ｆｃ-Ｌ-ＳｈＫ[１-３５]」とも呼ばれる、精製されたＥ．コリ由来のＦｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ[１-３５]によるヒトＫｖ１．３の遮断のためのＩＣ$_{50}$を、（本明細書の以下の実施例５０における）表３５に示す。

【実施例３９】

【０５３８】

細菌で発現したＦｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ（２-３５）の精製

Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ[２-３５]の発現は、本明細書の上述の実施例４において記載されているとおりであった。冷凍したＥ．コリペースト（１６．５ｇ）を室温の５０ｍＭトリスＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ８．０の２００ｍＬと組み合わせ、約０．１ｍｇ／ｍＬのニワトリ卵白色リゾチームへ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置へ１２，０００ＰＳＩで２回通過させた。次に、４℃、２２，０００ｇで１５分間、細胞可溶化液を遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、２００ｍＬの１％デオキシコール酸中にペレットを再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで１５分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、２００ｍＬの水中にペレットを再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで15分間遠心分離した。次に、３９ｍＬの８Ｍグアニジン ＨＣｌ、５０ｍＭトリスＨＣｌ、ｐＨ８．０中に、ペレット（３．９ｇ）を溶解した。次に、室温、２７，０００ｇで１５分間、ペレット溶液を遠心分離した後、再折りたたみ緩衝液（３Ｍ尿素、２０％グリセロール、５０ｍＭトリス、１６０ｍＭアルギニン ＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、１ｍＭシスタミン ＨＣｌ、４ｍＭシステイン、ｐＨ９．５）５００ｍＬへ、４℃で激しく撹拌しながら、上清５ｍＬを移動させた。次に、撹拌速度を低下させ、４℃で２日間、温置を続行した。次に、再折りたたみ溶液を-７０℃で保存した。

【０５３９】

保存した再折りたたみ液を解凍した後、水２Ｌで希釈し、１Ｍ Ｈ$_3$ＰＯ$_4$を使用して、ｐＨを７．３へ調整した。次に、０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターで、ｐＨ調整した材料をろ過し、７℃でＳ-緩衝液Ａ（２０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、ｐＨ７．３中の６０ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ＳＰ-ＦＦ（内径２．６ｃｍ）カラムへ２０ｍＬ／分で負荷した。次に、カラムをＳ-緩衝液Ａの数カラム容積で洗浄した後、０％から６０％までのＳ-緩衝液Ｂ（２０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、１Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ７．３）の直線勾配で溶出した後、７℃、１０ｍＬ／分で１００％Ｓ-緩衝液Ｂへの工程で溶出した。望ましい生成物を含有する画分をプールし、０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過した。次に、７℃、２ｍＬ／分でＰＢＳ中の１ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ｒＰｒｏｔｅｉｎ Ａ ＨｉＴｒａｐカラムへ前記プールを負荷した。次に、カラムを２０ｍＭのＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、ｐＨ６．５、１Ｍ ＮａＣｌの数カラム容積で洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０で溶出した。溶出ピークへ、３Ｍ酢酸ナトリウム０．０１２５容積（１８ｍＬ）を添加し、０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターで試料をろ過した。

【０５４０】

次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ　８４５３分光光度計を使用して、７００μＬの水中に希釈した組み合わせたプール２０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図４０Ａ）。２９，２８２ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３６，９００$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が３．２０ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図４０Ｂ）。次に、５０ｍＭNaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９でＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物５０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図４０Ｃ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ中に希釈する（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）ことによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液１ｍＬをＭＡＬＤＩ試料プレート上に点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ-ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した（図４０Ｄ）。次に、生成物を-８０℃で保存した。

【０５４１】

「Ｆｃ-Ｌ-ＳｈＫ[２-３５]」とも呼ばれる、精製されたＥ．コリ由来のＦｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ[２-３５]によるヒトＫｖ１．３の遮断のためのIC_{50}を、（本明細書の以下の実施例５０における）表３５に示す。

【実施例４０】

【０５４２】

細菌で発現したＦｃ-Ｌ１０-Ｏｓｋ１の精製

冷凍したＥ．コリペースト（１２９ｇ、実施例１０参照）を室温の５０ｍＭトリスＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ７．８の１２９０ｍＬと組み合わせ、約０．１ｍｇ／ｍＬの二ワトリ卵白色リゾチームへ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置へ１２，０００ＰＳＩで２回通過させた。次に、４℃、１７，７００ｇで１５分間、細胞可溶化液を遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、１％デオキシコール酸１２９０ｍＬ中にペレットを再懸濁し、４℃、１７，７００ｇで１５分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、１２９０ｍＬの水中にペレットを再懸濁した後、４℃、１７，７００ｇで１５分間遠心分離した。次に、１６０ｍＬの８Ｍグアニジン　ＨＣｌ、５０ｍＭトリスＨＣｌ、ｐＨ８．０中に、ペレット８ｇ（合計１６．３ｇ）を溶解した。次に、ペレット溶液１００ｍＬを１Ｍ　ＤＴＴ１ｍＬとともに、３７℃で６０分間温置した。再折りたたみ緩衝液（１Ｍ尿素、５０ｍＭトリス、１６０ｍＭアルギニンＨＣｌ、２．５ｍＭＥＤＴＡ、１．２ｍＭシスタミンＨＣｌ、４ｍＭシステイン、ｐＨ１０．５）５０００ｍＬへ、激しく撹拌しながら４℃、２ｍＬ／分で、還元した材料を移した。次に、撹拌速度を低下させ、温置を４℃で３日間続行した。

【０５４３】

酢酸を使用して、再折りたたみ液のｐＨを８．０に調整した。次に、ｐＨ調整した材料を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過し、室内の５０Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａカラム（内径２．６ｃｍ）で、８℃でＱ-緩衝液Ａ（２０ｍＭトリス、ｐＨ８．５）中の５０ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　Ｑセファロース-ＦＦ（内径２．６ｃｍ）カラムへ１０ｍＬ／分で負荷した。負荷した後、Ｑセファロースカラムを回路から除去し、残存するクロマトグラフィーをタンパク質Ａカラムで実施した。カラムをＱ-緩衝液Ａの数カラム容積で洗浄した後、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０への工程を使用して溶出した。望ましい生成物を含有する画分をプールし、Ｓ-緩衝液Ａ（２０ｍＭNaH_2PO_4、ｐＨ７．０）中の５０ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　ＳＰ-セファロースＨＰカラム（内径２．６ｃｍ）へ、８℃、２０ｍＬ／分で即時負荷した。次に、カラムをＳ-緩衝液Ａの

数カラム容積で洗浄した後、５％から６０％までのＳ－緩衝液Ｂ（２０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）の直線勾配の後、１００％Ｓ－緩衝液Ｂへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、画分を分析した。望ましい生成物のバルクを含有する画分をプールした後、８℃、５ｍＬ／分で、ＭＥＰ緩衝液Ａ（２０ｍＭトリス、２００ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ８．０）中の７５ｍＬのＭＥＰ　Ｈｙｐｅｒｃｅｌカラム（内径２．６ｃｍ）へ適用した。５％から５０％までの直線勾配のＭＥＰ緩衝液Ｂ（５０ｍＭクエン酸ナトリウム、ｐＨ４．０）でカラムを溶出した後、１００％ＭＥＰ緩衝液Ｂへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、画分を分析し、望ましい生成物のバルクを含有する画分をプールした。

【０５４４】

次に、１０ｋＤａメンブレンを備えたＰａｌｌ　Ｊｕｍｂｏ－Ｓｅｐを使用して、ＭＥＰプールを約２０ｍＬまで濃縮した後、同一メンブレンを使用して製剤緩衝液（２０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、２００ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ７．０）と緩衝液交換した。次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ　８４５３分光光度計を使用して、７００μＬの製剤緩衝液中に希釈した組み合わせたプール５０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図４１Ａ）。３０，５５８ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３５，７２０Ｍ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$の吸光係数を使用して、材料の濃度が４．１２ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、前記材料の純度を評価した（図４１Ｂ）。次に、５０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９でＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物１２３μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図４１Ｃ）。次に、ＲＰ－ＨＰＬＣカラム（Ｖｙｄａｃ　Ｃ$_4$、１×１５０ｍｍ）を通じて試料約４μｇをクロマトグラフィーにかけることによって、生成物を質量スペクトル分析へ供した。溶媒Ａは、水中の０．１％トリフルオロ酢酸であり、溶媒Ｂは、９０％アセトニトリル、１０％水中の０．１％トリフルオロ酢酸であった。８０μＬ／分の流速で、１０％溶媒Ｂ中でカラムをあらかじめ平衡化した。１０％ないし９０％の溶媒Ｂの直線勾配を３０分かけて使用して、タンパク質を溶出した。溶出液の一部をＬＣＱイオントラップ質量分析計へ配向させた。質量分析計の製造者によって提供されるＢｉｏｗｏｒｋｓソフトウェアを使用して、質量スペクトルの逆重畳を行った（図４１Ｄ）。生成物を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過した後、－８０℃で保存した。

【０５４５】

Ｅ．コリにより発現されたＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１プレップの収量は、細胞ペースト４０ｇから（１２９ｇ×（８ｇ／１６．３ｇ）×（１００ｍＬ／１６０ｍＬ）＝３９．６ｇ、四捨五入により４０ｇ）８１ｍｇであり、純度は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって判断すると、８０％よりも大きく、ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって判断する予想されと二量体として走行しており、質量はＭＳによって判断すると、予想された分子量の範囲内であった。

【０５４６】

精製されたＥ．コリ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１（「Ｆｃ－Ｌ－ＯＳＫ１」とも呼ばれる。）によるヒトＫｖ１．３の遮断に対するＩＣ$_{50}$が、（本明細書の以下の実施例５０中の）表３５に示されている。

【実施例４１】

【０５４７】

哺乳類細胞によって発現されるＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］、及びＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］

Ｋｖ１．３の阻害剤であるＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ

]、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］、及びＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］を、哺乳類細胞中で発現させた。リンカー配列及びＫｖ１．３阻害剤ペプチドＳｈＫ［１－３５］の単量体へ、インフレームで融合されるヒトＩｇＧ１のＦｃ領域をコードするＤＮＡ配列を後述のように構築した。哺乳類細胞（ＨＥＫ２９３及びチャイニーズハムスター卵巣細胞）からペプチボディを発現及び精製するための方法は、本明細書に開示されている。

【０５４８】

Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］及びＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］発現ベクターの構築のために、２つの終止コドンを有する、４つのグリシン及び１つのセリンアミノ酸リンカーへ各々連結され、以下に示されるようにＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ制限部位によって隣接され完全長の遺伝子ＯＳＫ１、ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］、ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］及びＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］を作製させるためにＰＣＲ戦略を採用した。

【０５４９】

以下に示される配列を有するＯＳＫ１、ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］、ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］及び［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］ＯＳＫ１の各々に対する２つのオリゴを、９５℃－３０秒、５５℃－３０秒、７５℃－４５秒で３５サイクル、ＰｆｕＴｕｒｂｏ ＨｏｔＳｔａｒｔ ＤＮＡポリメラーゼ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を使用するＰＣＲ反応において使用した。ＢａｍＨＩ（ｇｇａｔｃｃ）及びＮｏｔＩ（ｇｃｇｇｃｃｇｃ）制限部位に下線が付されている。

【０５５０】

【化５８】

OSK1:

ﾌｫﾜｰﾄﾞﾌﾟﾗｲﾏｰ：cat gga tcc gga gga gga gga agc ggc gtg atc atc aac gtg aag tgc aag atc agc cgc cag tgc ctg gag ccc tgc aag aag gcc g（配列番号：876）；

ﾘﾊﾞｰｽﾌﾟﾗｲﾏｰ：cat gcg gcc gct tac tac ttg ggg gtg cag tgg cac ttg ccg ttc atg cac ttg ccg aag cgc atg ccg gcc ttc ttg cag ggc tcc a（配列番号：877）；

OSK1[K7S]:

ﾌｫﾜｰﾄﾞﾌﾟﾗｲﾏｰ：cat gga tcc gga gga gga gga agc ggc gtg atc atc aac gtg agc tgc aag atc agc cgc cag tgc ctg gag ccc tgc aag aag gcc g（配列番号：878）；

ﾘﾊﾞｰｽﾌﾟﾗｲﾏｰ：cat gcg gcc gct tac tac ttg ggg gtg cag tgg cac ttg ccg ttc atg cac ttg ccg aag cgc atg ccg gcc ttc ttg cag ggc tcc a（配列番号：879）；

OSK1[E16K,K20D]:

ﾌｫﾜｰﾄﾞﾌﾟﾗｲﾏｰ：cat gga tcc gga gga gga gga agc ggc gtg atc atc aac gtg aag tgc aag atc agc cgc cag tgc ctg aag ccc tgc aag gac gcc g（配列番号：880）；

ﾘﾊﾞｰｽﾌﾟﾗｲﾏｰ：cat gcg gcc gct tac tac ttg ggg gtg cag tgg cac ttg ccg ttc atg cac ttg ccg aag cgc atg ccg gcg tcc ttg cag ggc ttc a（配列番号：881）；

OSK1[K7S,E16K,K20D]:

ﾌｫﾜｰﾄﾞﾌﾟﾗｲﾏｰ：cat gga tcc gga gga gga gga agc ggc gtg atc atc aac gtg agc tgc aag atc agc cgc cag tgc ctg aag ccc tgc aag gac gcc g（配列番号：882）；

ﾘﾊﾞｰｽﾌﾟﾗｲﾏｰ：cat gcg gcc gct tac tac ttg ggg gtg cag tgg cac ttg ccg ttc atg cac ttg ccg aag cgc atg ccg gcg tcc ttg cag ggc ttc a（配列番号：883）

【０５５１】

得られたＰＣＲ産物を、４％アガロースゲル上で１５５ｂｐバンドとして分離した。ＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して１５５ｂｐＰＣＲ産物を精製した後、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ（Ｒｏｃｈｅ）制限酵素で消化し、アガロースゲルをゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）によって精製した。同時に、ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ-ｈＦｃ-Ｓｈｋ[２-３５]ベクターをＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ制限酵素で消化し、大きな断片をゲル抽出キットによって精製した。ゲル精製されたＰＣＲ断片を、精製された大きな断片へ連結し、Ｔｏｐ１０Ｆ’（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中に形質転換した。形質転換された細菌コロニー由来のＤＮＡを単離し、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ制限酵素で消化し、２％アガロースゲル上で分離した。予想されたパターンを生じるＤＮＡを配列決定へ供した。クローンの数個の配列の分析は、上述の配列と１００％一致したが、大規模プラスミド精製のために各遺伝子から１つのクローンのみを選択した。Ｆｃ及びリンカー領域を確認するため、ｐＣＭＶｉベクター中のＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ]、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]、及びＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]のＤＮＡを再配列決定し、配列は上述の配列と１００％同一であった。Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ]、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]、及びＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]の配列及び模式図による表示を、図４２ＡないしＢ、図４３ＡないしＢ、図４４ＡないしＢ及び図４５ＡないしＢにそれぞれ示す。

【０５５２】

ｐＣＭＶｉタンパク質中のＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ]、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]及びＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]の一過性形質移入発現において使用されるＨＥＫ-２９３細胞を、ＤＭＥＭ高グルコース（Ｇｉｂｃｏ）、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ、Ｇｉｂｃｏ製）、１× 非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ、Ｇｉｂｃｏ製）及び１× ペニシリン／ストレプトマイシン／グルタミン（Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ／Ｇｌｕ、Ｇｉｂｃｏ製）を含有する増殖培地中で培養した。ＦｕＧＥＮＥ６（Ｒｏｃｈｅ）を使用して、フェノール／クロロホルム抽出されたｐＣＭＶｉプラスミド中のＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ]、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]、及びＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]各５．６μｇを、ＨＥＫ-２９３細胞中に形質移入した。細胞を２４時間回復させた後、ＤＭＥＭ高グルコース、１× ＮＥＡＡ及び１× Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ／Ｇｌｕ培地中に配置した。本明細書の以下の実施例５０に記載のプロトコールを使用して、これらの形質移入されたＨＥＫ-２９３細胞によって、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ]、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]及びＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]を培養上清から精製した。

【０５５３】

培養上清１５μＬを自家４× 負荷緩衝液（β-メルカプトエタノールなし）と混合し、Ｎｏｖｅｘ　Ｘｃｅｌｌ　ＩＩ装置を使用して、ＢｅｎｃｈＭａｒｋ染色済みタンパク質ラダー（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）２０μＬとともに５× ランニング溶液（２５ｍＭトリス塩基、１９２ｍＭグリシン、３．５ｍＭＳＤＳ）中で１０１Ｖ／４６ｍＡで２時間、Ｎｏｖｅｘ４ないし２０％トリス-グリシンゲル上で電気泳動した。次に、エレクトロブロット緩衝液（２５ｍＭトリス塩基、１９２ｍＭグリシン、２０％メタノール）中に、ゲルを

５分間浸漬した。エレクトロブロット緩衝液中に、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製ニトロセルロースメンブレン（カタログ番号ＬＣ２００、孔サイズ０．２μｍ）を浸漬した。製造者の説明書（Ｂｉｏ-Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）に従って、Ｍｉｎｉ　Ｔｒａｎｓ-Ｂｌｏｔ　Ｃｅｌｌモジュールを使用して、あらかじめ浸漬されたゲルを、ＰＶＤＦメンブレンへ３００ｍＡで２時間ブロットした。０．１％トゥイーン２０含有トリス緩衝塩類溶液、ｐＨ７．５（ＴＢＳＴ）中でブロットをすすいだ。次に、まずＴＢＳＴ中の５％ミルク（Ｃａｒｎａｔｉｏｎ）中に、室温で１時間、ブロットを浸漬した後、１回の洗浄につき１０分間で３回、ＴＢＳＴ中で洗浄した。次に、５％ミルク緩衝液を加えたＴＢＳＴ中のＨＲＰの結合したヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃγ）抗体（Ｐｉｅｒｅｃｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙカタログ番号３１４１３）の１：１０００希釈とともに、室温で１時間振とうしながら温置した。次に、室温で１回の洗浄につき１５分間、ＴＢＳＴ中で３回、ブロットを洗浄した。製造者の説明書に従ってＡｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　ＢｉｏｔｅｃｈのＥＣＬウェスタンブロット検出試薬を使用して、一次抗体を検出した。ＥＣＬ検出に際し、ウェスタンブロット分析は、非還元型ゲル条件下で６６ｋＤａの予想されたサイズを表示した（図４６）。

【０５５４】

ｐＣＭＶｉベクター中のＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ]、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]及びＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]インサートを含有するプラスミドを、ＸｂａＩ及びＮｏｔＩ（Ｒｏｃｈｅ）制限酵素で消化し、ゲル精製した。ＳｐｅＩ及びＮｏｔＩ及びＳａｌＩ（Ｒｏｃｈｅ）で消化したｐＤＳＲα-２４（Ａｍｇｅｎ　Ｐｒｏｐｒｉｅｔａｒｙ）発現ベクターへ、前記インサートを個々に連結した。得られるコンストラクトの完全性をＤＮＡ配列決定によって確認した。クローンの数個の配列の分析は、上述の配列と１００％の一致を与えたが、大規模プラスミド精製のために１つのクローンのみを選択した。

【０５５５】

Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１タンパク質の安定した発現において使用されるＡＭ１　ＣＨＯｄ-（Ａｍｇｅｎ　Ｐｒｏｐｒｉｅｔａｒｙ）細胞を、ＤＭＥＭ高グルコース、１０％ウシ胎仔血清、１×ヒポキサンチン／チミジン（ＨＴ、Ｇｉｂｃｏ製）、１×ＮＥＡＡ及び１×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ／Ｇｌｕを含有するＡＭ１　ＣＨＯｄ増殖培地中で、Ｆｃ-ＬＩ０-ＳｈＫ[１-３５]タンパク質の安定した発現に使用されるＡＭ１ＣＨＯｄ（Ａｍｇｅｎ　Ｐｒｏｐｒｉｅｔａｒｙ）細胞を培養した。ＦｕＧｅｎｅ６を使用して、ｐＤＳＲα-２４-Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１プラスミド５．６μｇをＡＭ１　ＣＨＯｄ-細胞に形質移入した。形質移入から２４時間後、ＤＨＦＲ選択培地（ＤＭＥＭ高グルコースプラス１０％透析済みウシ胎仔血清（ｄＦＢＳ）、１×ＮＥＡＡ及び１×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ／Ｇｌｕ）中へ、細胞を１：１１で分割し、コロニー選択の場合には１：５０で分割した。ＤＨＦＲ選択培地中で１３日間、細胞選択した。得られたコロニーの１０個の１０ｃｍ^{2}プールを１０個のＴ-１７５フラスコへ展開した後、１０個のローラー瓶にスケールアップし、ＡＭ１　ＣＨＯｄ産生培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２（１：１）、１×ＮＥＡＡ、１×ピルビン酸ナトリウム（ピルビン酸Ｎａ）、１×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ／Ｇｌｕ及び１．５％ＤＭＳＯ）のもとで培養した。馴化培地を回収し、１週間置きに交換した。得られた馴化培地６Ｌを０．４５μｍ酢酸セルロースフィルター（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ａｃｔｏｎ、ＭＡ）でろ過し、図４７に示されるようにＳＤＳ-ＰＡＧＥ分析によって特徴付けた。次に、精製のために、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙに移した。

【０５５６】

ＤＨＦＲ選択培地上で１３日後に、１２個のコロニーを選択し、１個の２４ウェルプレートへと摘出した。前記プレートを１週間増殖させた後、ＡＭ１ＣＨＯｄ産生培地へ、４８ないし７２時間移し、培養上清を回収した。培養上清５μＬをスクリーニングするため、同一のＨＲＰ結合型ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃγ）抗体によって検出する一過性ウェスタンブロット分析と同様のウェスタンブロッティングによって、発現レベルを評価した。１２個の全ての安定したクローンは、６６ｋＤａの予想されたサイズでの発現を示した。２

つのクローン、Ａ３及びＣ２を選択し、一次クローンＣ２に対するバックアップとしてのＡ３とともに凍結するため、Ｔ１７５フラスコへ展開した（図４８）。

【０５５７】

選択培地を使用して、Ｃ２クローンを１５個のローラー瓶（Ｃｏｒｎｉｎｇ）へスケールアップし、集密状態まで増殖させた。次に、培地を産生培地と交換し、１週間温置させた。馴化培地を採集し、１週間置きに交換した。０．４５μｍ酢酸セルロースフィルター（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ａｇｔｏｎ、ＭＡ）で、得られた培養上清１５Ｌをろ過し、ＳＤＳ-ＰＡＧＥ分析によって特徴付けた（データ非表示）。以下の本明細書の実施例４２に記載されているとおり、さらなる精製を行った。

【実施例４２】

【０５５８】

哺乳類細胞によって発現されたＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１（Ｋ７Ｓ）、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）及びＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１（Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）の精製

Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１の精製

ＣＨＯ（ＡＭ１ ＣＨＯｄ-）細胞培養上清約６Ｌ（上述の実施例４１参照）を、３５ｍＬのモノクローナル抗体選択カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）へ、７℃、１０ｍＬ／分で負荷し、二価の陽イオンを有さないダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液（ＰＢＳ）の数カラム容積で前記カラムを洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０にする工程で試料を溶出した。Ｓ-緩衝液Ａ（２０ｍＭＮａＨ２ＰＯ４、ｐＨ７．０）中の室内の６５ｍＬのＳＰ-ＨＰカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）へ、７℃、１０ｍＬ／分で、モノクローナル抗体選択溶出液を直接負荷した。モノクローナル抗体選択カラムをはずした後、数カラム容積のＳ-緩衝液Ａで、ＳＰ-ＨＰカラムを洗浄した後、５％から６０％までのＳ-緩衝液Ｂ（２０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、１Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）の直線勾配を１０ｍＬ／分で使用して展開した後、７℃で１００％Ｓ-緩衝液Ｂへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした。次に、Ｐａｌｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｊｕｍｂｏｓｅｐ １０Ｋ Ｏｍｅｇａ遠心限外ろ過装置を使用して、プールした材料を約２０ｍＬに濃縮した。次に、２０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、ｐＨ７．０の２０ｍＬで希釈することによって、濃縮した材料を緩衝液交換し、Ｊｕｍｂｏｓｅｐ １０Ｋ Ｏｍｅｇａフィルターを使用して２０ｍＬに再濃縮した。次に、２０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、２００ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ７．０の２０ｍＬで材料を希釈した後、２２ｍＬに再濃縮した。次に、緩衝液交換した材料を、室温、１ｍＬ／分で、０．２２μｍ、２５ｍｍのＭｕｓｔａｎｇ Ｅメンブレンを有するＰａｌｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ａｃｒｏｄｉｓｃでろ過した。次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈したろ過済み材料50μＬに対して、スペクトルの走査を実施した（図４９Ａ、黒のトレース）。３０，３７１ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３５，４１０$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が４．９６ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図４９Ｂ）。次に、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒｓエンドトキシン特異的緩衝液中に試料を３０倍希釈したものを使用して、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｅｎｄｏｓａｆｅ-ＰＴＳシステム（０．０５ないし５ＥＵ／ｍＬ感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、１．８ＥＵ／タンパク質ｍｇであった。次に、５０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９でＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ、１ｍＬ／分で注入された生成物１４９μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図４９Ｃ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）へと希釈することによ

って、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液１ｍＬをＭＡＬＤＩ試料プレート上に点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ-ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した（図４９Ｄ）。次に、生成物を-８０℃で保存した。

【０５５９】

哺乳類Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１プレップに関する収量は、６Ｌから１１５ｍｇであり、純度は、ＳＤＳ-ＰＡＧＥによる判断によれば９０％超であり、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１は、ＳＥＣ-ＨＰＬＣによる判断によれば予想された二量体として測定され、質量は、ＭＳによる判断によれば予想された範囲であった。

【０５６０】

ヒトＫｖ１．３及びヒトＫｖ１．１を遮断する上での精製されたＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１の活性を、本明細書の以下の実施例４３に記載する。

【０５６１】

Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１（Ｋ７Ｓ）、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）及びＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１（Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）の精製

形質移入されたＨＥＫ-２９３による培養上清約５００ｍＬ（上述の実施例４１参照）を、モノクローナル抗体選択樹脂（１．５ｍＬ）（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）の６５％スラリー及び５００μＬの２０％NaN_3と合わせた。次に、スラリーを４℃で３日間静かに撹拌した後、ブレーキを使用せずに４℃、１０００ｇで５分間遠心分離した。次に、上清の大部分を吸引し、ペレット中に残存するスラリーを１４ｍＬのコニカルチューブへ転移させ、二価の陽イオンを含まないダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液（ＰＢＳ）１２ｍＬと組み合わせた。低ブレーキを使用しながら、前記スラリーを４℃、２０００ｇで１分間遠心分離し、上清を吸引した。ＰＢＳ洗浄周期をさらに３回反復した。次に、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０の１ｍＬを添加し、室温で静かに５分間撹拌することによって、結合されたタンパク質を溶出した。次に、低ブレーキを使用しながら、前記スラリーを４℃、２０００ｇで１分間遠心分離し、上清を第一溶出液として吸引した。溶出周期をさらに２回反復し、３つの全上清を合わせて単一プールとした。ｐＨを上昇させるために、酢酸ナトリウム（３Ｍ溶液３７．５μＬ）を溶出プールへ添加した後、１０ｋＤａ　ＳｌｉｄｅＡｌｙｚｅｒ（Ｐｉｅｒｃｅ）を使用して、１０ｍＭ酢酸、５％ソルビトール、ｐＨ５．０に対して室温で２時間透析した。透析緩衝液を交換し、透析を４℃で一晩続行した。次に、０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターシリンジフィルターで、透析した材料をろ過した。次に、３０，３３０の算出された分子量及び３５，４１０$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が１．２７ｍｇ／ｍＬであると測定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図５０Ｂ）。次に、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒｓエンドトキシン特異的緩衝液中に試料を２５倍希釈したものを使用して、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｅｎｄｏｓａｆｅ-ＰＴＳシステム（０．０５ないし５ＥＵ／ｍＬ感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、１ＥＵ／タンパク質ｍｇ未満であった。次に、５０ｍＭNaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９でＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物５０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図５０Ｃ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）中に希釈することによって、生成物を質量スペクトル分析へ供した。得られた溶液１ｍＬをＭＡＬＤＩ試料プレート上に点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ-ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶ

の加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した（図５０Ｄ）。次に、生成物を－８０℃で保存した。

【０５６２】

図５１ＡないしＤは、以下の点を除いて、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ）分子に関するものと同一プロトコールを使用して実施した、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）に対する精製及び分析からの結果を示す。３０，３５７ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３５，４１０の算出された吸光係数を使用して、濃度は１．５９ｍｇ／ｍＬであることが明らかとなった。発熱物質レベルは、３２倍希釈を使用して、１ＥＵ／ｍｇ未満であることが明らかとなった。

【０５６３】

図５２ＡないしＤは、以下の点を除いて、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ）分子（上述）に関するものと同一プロトコールを使用して実施した、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）に対する精製及び分析からの結果を示す。３０，３１６ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３５，４１０の算出された吸光係数を使用して、濃度は０．８１ｍｇ／ｍＬであることが明らかとなった。発熱物質レベルは、１６倍希釈を使用して、１ＥＵ／ｍｇ未満であることが明らかとなった。

【０５６４】

ヒトＫｖ１．３及びヒトＫｖ１．１を遮断する上での精製されたＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］及びＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］の活性を、本明細書の以下の実施例４３に記載する。

【実施例４３】

【０５６５】

ＯＳＫ１及びＯＳＫ１ペプチボディ類縁体の電気生理学

カリウムチャネルファミリーのサブタイプであるヒトＫｖ１．１及びＫｖ１．３チャネルに及ぼす影響を評価するために、アジアサソリであるオルトキルススクロビキュロサス（Ｏｒｔｈｏｃｈｉｒｕｓ　Ｓｃｒｏｂｉｃｕｌｏｓｕｓ）の毒液の３８残基ペプチド毒素（ＯＳＫ１）を合成した（実施例４１参照）。ＨＥＫ２９３細胞発現系及び電気生理学の使用によって、ヒトＫｖ１．１及びＫｖ１．３チャネルを阻害する上での合成ＯＳＫ１の有効性及び選択性を評価した（図５３）。安定して発現したＫｖ１．３チャネルのホールセルパッチクランプ記録によって、合成ＯＳＫ１ペプチドは、Ｋｖ１．１と比較したとき、ヒトＫｖ１．３を阻害する上でより有力であることが明らかとなった（表３３）。

【０５６６】

ＯＳＫ１ペプチボディを作製するための、抗体へのＯＳＫ１ペプチド毒素の融合

血漿半減期を改善し、ＯＳＫ１ペプチド毒素が中枢神経系を貫通するのを防止するため、本明細書の実施例４１に記載されるとおり、１０個のアミノ酸残基のリンカー鎖長を介して、ヒト抗体ＩｇＧ１のＦｃ断片へＯＳＫ１ペプチド毒素を融合した。この融合によって、合成ＯＳＫ１ペプチドと比較すると、Ｋｖ１．３の有効性は５倍まで低下した。しかしながら、合成ペプチド単独のもの（４倍、表３３及び図５４）と比較すると、ＯＳＫ１のＫｖ１．１に対する選択性は２１０倍まで有意に改善した。

【０５６７】

ＯＳＫ１ペプチボディ（Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１）の修飾

ＯＳＫ１は、集合的にα－ＫＴｘ３と呼ばれるサソリ毒素の他のメンバーと６０ないし８０％の配列相同性を共有する。ＯＳＫ１及びα－ＫＴｘ３ファミリーの他のメンバーの配列アラインメントによって、位置１２、１６、２０及び３６における４つの異なる構造的な差異が明らかとなった。ＯＳＫ１のこれらの構造的な差異は、他のカリウムチャネルに対するそれらの多様な活性において重要な役割を果たしているものと推測され、これは、α－ＫＴｘ３ファミリーの他のメンバーでは観察されない。従って、Ｋｖ１．２とのヘ

テロ四量体として、主に中枢神経系中に見出されるＫｖ１．１などの他のカリウムチャネルに対する選択性に及ぼす影響を評価するために、位置１６及び２０に存在する２つのアミノ酸残基を、ＯＳＫ１配列内のより保存されたアミノ酸残基へと回復させた。それぞれ保存されたリジン及びアスパラギン酸残基を、位置１６のグルタミン酸、及び位置２０のリジンと置換することによって（すなわち、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］）、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１の効力と比較したとき、効力に有意な変化は観察されなかった（１．３倍差、図５６及び表３３）。しかしながら、この二重変異によって、Ｋｖ１．１に対する遮断活性が排除された。Ｋｖ１．１／Ｋｖ１．３の選択性の比は４０３倍であり、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１に関する選択比（２１０倍）に比べて有意に向上した。位置７のリジンからセリンへの単一アミノ酸突然変異（Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］）は、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１の有効性及び選択性と比較すると、有効性及び選択性が、それぞれ２倍及び１．３倍までわずかに変化した（図５５及び表３３）。Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］を作製させるために、３つの残基全てを突然変異させると、有効性が著しく低下した（図５７及び表３３）。

【０５６８】

表３３の結果によって示されるように、ヒト抗体ＩｇＧ１のＦｃ断片へＯＳＫ１ペプチド毒素を融合させることによって、Ｋｖ１．１に対する選択性が劇的に改善されたが、Ｋｖ１．３に対する標的有効性は低下した。２つの重要な位置にある２残基がα－ＫＴｘ３ファミリーの他のメンバーで見られる保存された残基へ回復されると、Ｋｖ１．１に対する選択性をさらに改善した。

【０５６９】

【表３４】

表３３は、ｈＫｖ１．３及びｈＫｖ１．１チャネルに対するＯＳＫ１及びＯＳＫ１類縁体のＩＣ５０値の要約を示している。全ての類縁体は、ｈＫｖ１．３に対する有効性に基づいて順位付けされる。全てのＯＳＫ１類縁体に関するｈＫｖ１．１／ｈＫｖ１．３の選択性の比も表に示される。

化合物	hKv1.3:IC_{50} [pM]	hKv1.1:IC_{50} [pM]	hKv1.1/hKv1.3
合成OSK1	39	160	4
Fc-L10-OSK1	198	41600	210
Fc-L10-OSK1[E16K, K20D]	248	100000	403
Fc-L10-OSK1[K7S]	372	100000	269
Fc-L10-OSK1[K7S, E16K, K20D]	812	10000	12

【実施例４４】

【０５７０】

ラットにおけるＰＥＧ－ＳｈＫ［１－３５］分子の薬物動態学的研究

約２４ｋＤａの２０Ｋ　ＰＥＧ－ＳｈＫ［１－３５］分子及び約４ｋＤａの小固有ＳｈＫペプチドの静脈内（ＩＶ）薬物動態学的特性を、スプラーグドーリー系ラットで測定した。固有ＳｈＫペプチド及び新規の本発明の２０Ｋ　ＰＥＧ－ＳｈＫ［１－３５］分子に関するＩＶ用量は、１ｍｇ／ｋｇであった。この用量は、これら２つの分子の等しいモル量を表した。ラットの平均体重は約０．３ｋｇであり、用量及び分子に関して各２匹のラットを使用した。ＩＶ注射後の多様な時点で採血し、血清約０．１ｍＬを回収した。分析時まで、血清試料を－８０℃で冷凍保存した。

【０５７１】

電気生理学のためのアッセイプレート調製

薬物動態学的研究由来の２０Ｋ　ＰＥＧ－ＳｈＫ［１－３５］分子又は固有ＳｈＫペプ

チドを含有するラット血清試料を凍結した。実験前に、各試料を室温で解凍し、一定分量（７０ないし８０μＬ）を９６ウェルポリプロピレンプレート中の１ウェルへ転移させた。アッセイプレートを調製するため、検査溶液を付与するために、薬物動態学的血清試料から何回も希釈した。薬物動態学的研究由来の血清試料を、１０％リン酸緩衝塩類溶液（ＰＢＳ、Ca^{2+}及びMg^{2+}含有）へと希釈した。薬物動態学的研究から得られた血清試料中の新規の本発明の２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ[１-３５]分子の量を測定する場合、検査溶液中の血清最終濃度は、９０％、３０％、１０％、３．３％及び１．１％であった。精製された２０Ｋ　ＰＥＧ-Ｓｈｋ[１-３５]標準阻害曲線も、Ａｓｓａｙ　Ｐｌａｔｅ中に調製した。これを実施するため、精製された２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ[１-３５]分子（標準物質）の８点連続希釈液を、９０％、３０％、１０％、３．３％又は１．１％のラット血清に調製し、標準物質の最終濃度は、５０、１６．７、５．５、１．８５、０．６２、０．２１、０．０６８及び０．０２３ｎＭであった。

【０５７２】

電気生理学のための細胞調製

電位により活性化されるK^+チャネルであるＫｖ１．３を安定的に発現するＣＨＯ細胞を、実験の２日前に、Ｔ-１７５組織培養フラスコ中に（5×10^6個の密度で）播種し、約９５％の集密状態まで生育させた。実験の直前に、ＰＢＳで細胞を洗浄した後、トリプシン（０．２５％）及びベルセン（１：５０００）の２ｍＬ混合物（１：１容積比）を使用して、３７℃で（３分間）剥離させた。その後、フラスコ中で、１０％ＦＢＳ、１×ＮＥＡＡ及Ｇ４１８の７５０μｇ／ｍＬを有する組織培地（Ｇｌｕｔａｍａｘ含有ＨＡＭのＦ-１２、ＩｎＶｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号３１７６５）１０ｍＬ中に細胞を再懸濁し、約１０００ｒｐｍで１．５分間遠心分離した。得られた細胞ペレットを、ＰＢＳ中に、３ないし5×10^6細胞／ｍＬで再懸濁した。

【０５７３】

ＩｏｎＷｏｒｋｓ電気生理学及びデータ分析

ＣＨＯ-Ｋｖ１．３細胞中のK^+電流を阻害するための血清中の検査溶液又は標準物質の能力を、自動電気生理学システムＩｏｎＷｏｒｋｓ　Ｑｕａｔｔｒｏを使用して研究した。細胞を再懸濁し、Ａｓｓａｙ　Ｐｌａｔｅ、Ｐｏｐｕｌａｔｉｏｎ　Ｐａｔｃｈ　Ｃｌａｍｐ（ＰＰＣ）ＰａｔｃｈＰｌａｔｅ並びに適切な細胞内緩衝液（９０ｍＭグルコン酸Ｋ、２０ｍＭＫＦ、２ｍＭＮａＣｌ、１ｍＭＭｇＣｌ２、１０ｍＭＥＧＴＡ、１０ｍＭＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．３５）及び細胞外緩衝液（Ca^{2+}及びMg^{2+}含有ＰＢＳ）をＩｏｎＷｏｒｋｓ　Ｑｕａｔｔｒｏに配置した。アンフォテリシンベースの穿孔パッチクランプ法を使用して、ＣＨＯ-Ｋｖ１．３細胞からの電気生理学記録を実施した。ＩｏｎＷｏｒｋｓ　Ｑｕａｔｔｒｏの電位クランプ回路素子を使用して、細胞を-８０ｍＶの膜電位に保持し、＋３０ｍＶへ４００ミリ秒、膜電位を停止させることによって電位活性型K^+電流を惹起させた。対照条件下、すなわち、実験開始時阻害剤の不存在下で、及び検査溶液又は標準物質の存在下での１０分間の温置の後に、K^+電流を惹起させた。４３０ミリ秒と４４０ミリ秒との間に、平均Ｋ＋電流振幅を測定し、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌスプレッドシートへ、データを転送した。検査溶液又は標準物質の各濃度の存在下でのK^+電流の振幅を、同一ウェル中の対照条件下でのK^+電流の百分率として表した。

【０５７４】

ラット血清の多様なレベルの各標準物質に対して標準物質阻害曲線を作製し、対照の電流百分率（ＰＯＣ）対ｎＭ濃度の対数として表した。対照の百分率（ＰＯＣ）は、阻害と逆相関しており、ここで、１００ＰＯＣは阻害が全く存在せず、０ＰＯＣは１００％阻害である。検査溶液内での薬物濃度の算出を可能にする方程式を導くために、前記曲線の選択された領域にわたる線形回帰を使用した。検査溶液中の薬物の濃度を算出するため、標準曲線の線形部分内の電流値のみを使用した。血清の所定レベルでの対応する標準曲線を、薬物レベルを算出するときの検査溶液の血清の同一レベルと常に比較した。ＳｈＫ及び２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ[１-３５]に対する標準曲線が、それぞれ図５８Ａ及び図５８Ｂに示されており、各図は、血清の所定の百分率での各標準物質に対する線形回帰方程式

を含んでいる。２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ[１-３５]標準曲線については、標準曲線の線形部分は２０ＰＯＣから７０ＰＯＣまでであり、検査溶液内での薬物濃度を算出するため、この範囲内に収まる検査溶液から得られた電流値のみを使用した。

【０５７５】

静脈内注射後における、本発明の新規２０Ｋ　ＰＥＧ　ＳｈＫ[１-３５]分子の薬物動態学的特性を図５９に示す。この曲線から、前記分子の終末半減期（$t_{1/2}$ｂ）は、６時間と１２時間の間の長さであると推定される。４８時間を超えると、薬物のレベルは、標準曲線の線形範囲の外側に収まり、算出されない。本発明の新規２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ[１-３５]分子の算出された6ないし１２時間の半減期は、Ｃ．Ｂｅｅｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．[Ｃ．Ｂｅｅｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．９８，１３９４２-１３９４７]によって以前に報告された固有のＳｈＫ分子の約０．３３時間（又は２０分）の半減期よりも実質的に長く、これは治療用分子の望ましい特徴である。ＳｈＫ対２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ[１-３５]の等モルの静脈内注射後のＫｖ１．３阻害剤の相対的なレベルの比較を、図６０に示す。５％血清検査溶液を検討する前記図から明らかなように、２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ[１-３５]分子は、２４時間超の間、Ｋｖ１．３電流の有意な抑制（７０ＰＯＣ未満）を示したのに対し、固有なＳｈＫペプチドは、最初の１時間にＫｖ１．３電流の阻害の有意なレベルを示したに過ぎず、１時間を超えると有意な遮断を示さなかった。本データは、自己免疫疾患の治療用治療薬としての２０Ｋ　ＰＥＧ　ＳｈＫ[１-３５]の望ましい特徴を再び示している。

【実施例４５】

【０５７６】

ＰＥＧ化された毒素ペプチドは、動物モデルにおいて重度の自己免疫性脳脊髄炎を抑制した

Ｋｖ１．３の２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ阻害剤は、ラットにおける重度の自己免疫性能脊髄炎を抑制する上で改善された有効性を示す。以前に記載された多発性硬化症の適応性転移型実験的自己免疫性脳脊髄炎（ＡＴ-ＥＡＥ）モデル[Ｃ．Ｂｅｅｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６６，９３６]を使用して、本発明者は、本発明の新規２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ分子のインビボでの活性を検討し、その有効性をＳｈＫ毒素ペプチド単独の有効性と比較した。研究デザインを図６１に図示する。本インビボ研究からの結果を図６２及び図６３に示す。第１日から第３日まで１０μｇ／ｋｇで毎日皮下送達される２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ分子は、疾病の重度を有意に低下させ、生存性を亢進したのに対し、小さなＳｈＫペプチドの等モル投与量（１０μｇ／ｋｇ）で処理した動物は、重度の疾病を発症し、死亡した。

【０５７７】

３５個のアミノ酸の毒素ペプチドＳｈＫ（スティコダクチラ・ヘリアンサス（Ｓｔｉｃｈｏｄａｃｔｙｌａ　ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ）神経毒）をＢａｃｈｅｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅから購入し、Ｋｖ１．３を有力に遮断するために電気生理学によって確認した（本明細書の実施例３６参照）。２０Ｋ　ＰＥＧ　ＳｈＫ分子の合成、ＰＥＧ化、精製は、本明細書に上記されている。ミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）に特異的な脳骨髄性ＣＤ４＋ラットＴ細胞系ＰＡＳは、Ｅｖｅｌｙｎｅ　Ｂｅｒａｕｄ博士から入手した。インビトロでの前記細胞の維持及びＡＴ-ＥＡＥモデルにおけるそれらの使用は、以前に記載されている[Ｃ．Ｂｅｅｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）ＰＮＡＳ　９８，１３９４２]。抗原刺激又はＭＢＰ及び照射された胸腺細胞（２日）による活性化のラウンドを交互に行い、Ｔ細胞成長因子による伝播（５日）によって、ＰＡＳ　Ｔ細胞をインビトロで維持した。ＰＡＳ　Ｔ細胞（3×10^5／ｍＬ）は、前記細胞を、１０μｇ／ｍＬのＭＢＰ及び15×10^6／ｍＬの同系の照射された（３５００ラド）胸腺細胞とともに温置することを包含した。インビトロでの活性化から２日後に、１０ないし15×10^6個の生存可能なＰＡＳ　Ｔ細胞を、6ないし１２週齢の雌のルイスラット（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）の尾静脈に注射した。媒体（ＰＢＳ中２％ルイスラット血清）、２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ又はＳｈＫの毎日の皮下注射を第-１日から第３日ま

で付与し（図６１）、第－１日は、ＰＡＳ　Ｔ細胞の注射（第０日）の１日前を表す。媒体で処理されたラットでは、一過性のＥＡＥが、ＰＡＳ　Ｔ細胞の注射後４ないし５日目に発症した（図６２）。阻害剤のレベルの分析のため、第４日目に眼窩後部の出血により、第８日に心臓穿刺により、血清を回収した。第－１、４、６及び８日目にラットの体重を測定した。細胞転移当日（第０日）から第３日まで１日に１回、第４日から第８日まで１日に２回、動物を盲検した。各肢及び尾部の不全麻痺の程度の全体的なスコアとして、臨床徴候を評価した。臨床的なスコア化は、０＝徴候なし、０．５＝遠位跛行尾部、１．０＝跛行尾部、２．０＝軽度不全対麻痺、運動失調、３．０＝中等度不全対麻痺、３．５＝片後肢麻痺、４．０＝完全後肢麻痺、５．０＝完全後肢麻痺及び失禁、５．５＝四肢麻痺、６．０＝瀕死状態又は死亡であった。５．５のスコアに到達しているラットを安楽死させた。

【０５７８】

ＥＡＥの開始前のＫｖ１．３遮断薬ＰＥＧ－ＳｈＫによるラットの処理は、疾病の惹起を遅延させ、疾病の進行を阻害し、用量依存的様式で死亡を予防した（図６２）。１０μｇ／ｋｇのＰＥＧ－ＳｈＫ又は１００μｇ／ｋｇのＰＥＧ－ＳｈＫで処理されたラットにおける第４．５日と比較して、媒体単独、１０μｇ／ｋｇのＳｈＫ又はＰＥＧ－ＳｈＫ１μｇ／ｋｇで処理したラットにおける疾病の惹起を第４日で観察した。さらに、媒体単独、１０μｇ／ｋｇのＳｈＫ又はＰＥＧ－ＳｈＫ１μｇ／ｋｇで処理したラットは全て、５．５以上のＥＡＥスコアで研究を終了するまで重度の疾病を発展させた。対照的に、１０μｇ／ｋｇのＰＥＧ－ＳｈＫ又は１００μｇ／ｋｇのＰＥＧ－ＳｈＫで処理したラットは、２未満の臨床重度スコア平均のピークに到達し、１匹を除く全部のラットが研究の終了時まで生存した。さらに、本発明者は、ラットの体重が疾病の重度と相関することを発見した（図６３）。媒体単独、１０μｇ／ｋｇのＳｈＫ又はＰＥＧ－ＳｈＫ１μｇ／ｋｇで処理したラットは全部、それぞれ３１ｇ、３０ｇ及び３０ｇの平均を喪失したのに対して、１０μｇ／ｋｇのＰＥＧ－ＳｈＫ又は１００μｇ／ｋｇのＰＥＧ－ＳｈＫで処理したラットは、それぞれ１８ｇ及び１１ｇを喪失した。後者の２群中のラットは、研究の終了時までに回復の徴候である体重の増加を表した。１０μｇ／ｋｇのＳｈＫ及び１０μｇ／ｋｇのＰＥＧ－ＳｈＫで処理したラットは、ＳｈＫペプチドのモル当量を受容したことに留意すべきである。非結合型ＳｈＫに対してＰＥＧ－ＳｈＫ分子の有意により大きな有効性は、ＰＥＧ－ＳｈＫ分子のより大きな安定性及びインビボでの長期間の半減期によるものであるらしい（実施例４４参照）。

【実施例４６】

【０５７９】

Ｋｖ１．３アンタゴニストペプチドを包含する組成物は、ヒト全血において炎症を遮断する

ＩＬ－２及びＩＦＮ－ｇの分泌に及ぼすＫｖ１．３阻害剤の影響を検討するためのエクスビボアッセイ

健常で、投薬を受けていないドナーから、ヘパリンバキュテナー（ｖａｃｕｔａｉｎｅｒ）中にヒト全血を取得した。ＤＭＥＭ完全培地は、０．１％ヒトアルブミン（Ｂａｙｅｒ６８４７１番）、５５μＭ２－メルカプトエタノール（Ｇｉｂｃｏ）及び１×Ｐｅｎ－Ｓｔｒｅｐ－Ｇｌｎ（ＰＳＧ、Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号１０３７８－０１６）を含有する（Ｌ－グルタミン及び２５ｍＭＨｅｐｅｓ緩衝液を有する）イスコブＤＭＥＭであった。タプシガルジンは、Ａｌｏｍｏｎｅ　Ｌａｂｓ（Ｉｓｒａｅｌ）から入手した。カルシウム動員のための４×タプシガルジンの刺激を与えるために、１００％ＤＭＥＭ中のタプシガルジンの１０ｍＭストック溶液をＤＭＥＭ完全培地で４０μＭ、４×溶液に希釈した。Ｋｖ１．３阻害剤であるペプチドＳｈＫ（スティコダシトラ・ヘリアンサス（Ｓｔｉｃｈｏｄａｃｙｔｌａ　ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ）毒素、カタログ番号Ｈ２３５８）及びＢＫＣａ１阻害剤であるペプチドＩｂＴｘ（イベリオトキシン、カタログ番号Ｈ９９４０）はＢａｃｈｅｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから購入し、Ｋｖ１．１阻害剤であるペプチドＤＴＸ－ｋ（デンドロトキシン－Ｋ）はＡｌｏｍｏｎｅ　Ｌａｂｓ（Ｉｓｒａｅｌ）製であ

った。Ｋｖ１．３のＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］ペプチド阻害剤は、実施例４及び実施例３９で本明細書に記載されているとおりに入手した。カルシウム阻害剤であるシクロスポリンＡをＡｍｇｅｎ試料バンクから入手したが、多様な売主からも市販されている。阻害剤の１０個の３倍連続希釈を、４倍濃度の最終濃度で、ＤＭＥＭ完全培地中に調製し、９６ウェルＦａｌｃｏｎ３０７５平底マイクロタイタープレートのウェルに各々５０μＬを添加した。マイクロタイタープレートの列１ないし５及び７ないし１１は阻害剤を含有した（各行は個別の阻害剤の希釈の連続を有した）のに対し、列６中の８個のウェルには、ＤＭＥＭ完全培地単独５０μＬを添加し、列１２の８ウェルには、ＤＭＥＭ完全培地単独１００μＬを添加した。実験を開始するために、マイクロタイタープレートの各ウェルへ、全血１００μＬを添加した。次に、プレートを３７℃、５％CO_2で１時間温置した。１時間後、プレートを取り外し、８ウェルであった列１２を除き、４倍濃度のタプシガルジン刺激（４０μＭ）５０μＬを、プレートの全ウェルへ添加した。３７℃、５％CO_2に、プレートを４８時間再配置した。全血中に分泌されたＩＬ－２及びＩＦＮ－ｇの量を測定するため、９６ウェルプレートの各ウェルからの上清（培養上清）１００μＬを保存プレートに移した。サイトカイン産生のＭＳＤ電気化学発光分析のため、ＭＳＤ Ｍｕｌｔｉ－Ｓｐｏｔ Ｃｕｓｔｏｍ Ｃｏａｔｅｄプレート（ｗｗｗ．ｍｅｓｏ－ｓｃａｌｅ．ｃｏｍ）へ、上清（馴化培地）２０μＬを添加した。これらのプレート上の作業電極を、４つの捕捉抗体（ｈＩＬ－５、ｈＩＬ－２、ｈＩＦＮｇ及びｈＩＬ－４）であらかじめコーティングした。馴化培地２０μＬをＭＳＤプレートへ添加した後、検出抗体及びＰ４緩衝液の混合物１５０μＬを各ウェルへ添加した。１５０μＬ混合物は、各１μｇ／ｍＬの４つの検出抗体（ｈＩＬ－５、ｈＩＬ－２、ｈＩＦＮｇ及びｈＩＬ－４）２０μL及び２× Ｐ４緩衝液１３０μＬを含有した。プレートを覆い、振とうプラットフォーム上に一晩（暗所に）配置した。翌朝、ＭＳＤ Ｓｅｃｔｏｒ Ｉｍａｇｅｒで、プレートを読み取った。各プレートの列６中の８ウェルには、タプシガルジン刺激のみのみが与えられ、阻害剤が与えられなかったので、プレートに対して「高い」値を算出するために、ここでは、平均ＭＳＤ反応を使用した。プレートに対して算出された「低い」値は、タプシガルジン刺激及び阻害剤を含有しない列１２の８ウェルから得られた平均ＭＳＤ反応から求められた。対照の百分率（ＰＯＣ）は、刺激されていない対照と刺激された対照に対する反応の測定結果であり、１００ＰＯＣは、タプシガルジン刺激単独の平均反応又は「高い」値と等しい。それ故、１００ＰＯＣは、反応の０％阻害を表す。対照的に、０ＰＯＣは、反応の１００％阻害を表し、刺激が付与されない反応又は「低」値と等価である。対照の百分率（ＰＯＣ）を算出するため、次式：［（ウェルのＭＳＤ反応）－（「低い値」）］／［（「高い値」）－（「低い値」）］× １００を使用する。カーブフィッティングの後、全血中の分子の有効性を阻害曲線（ＩＣ）から算出し、ＩＣ５０は標準的なカーブフィッティングソフトウェアを使用して求めた。本発明者らは、ここに、高処理量のＭＳＤ電気化学発光アッセイを用いたサイトカイン産生の測定を記載しているが、当業者は、サイトカイン産生を測定するために、より小さな処理量のＥＬＩＳＡアッセイを等しく適用できることに容易に想到する。

【０５８０】

Ｋｖ１．３がＣＤ４０Ｌ及びＩＬ－２Ｒの細胞表面活性化を遮断することを示す生体外アッセイ

健常で、投薬を受けていないドナーから、ヘパリンバキュテナー中に、ヒト全血を入手した。ＤＭＥＭ完全培地は、０．１％ヒトアルブミン（Ｂａｙｅｒ６８４７１番）、５５μＭ２－メルカプトエタノール（Ｇｉｂｃｏ）及び1× Ｐｅｎ－Ｓｔｒｅｐ－Ｇｌｎ（ＰＳＧ、Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号１０３７８－０１６）を含有する（Ｌ－グルタミン及び２５ｍＭＨｅｐｅｓ緩衝液を有する）イスコブＤＭＥＭであった。タプシガルジンは、Ａｌｏｍｏｎｅ Ｌａｂｓ（Ｉｓｒａｅｌ）より入手した。カルシウム動員のための４× タプシガルジンの刺激を与えるために、１００％ＤＭＥＭ中のタプシガルジンの１０ｍＭストック溶液をＤＭＥＭ完全培地で４０μＭ、４× 溶液に希釈した。Ｋｖ１．３阻害剤であるペプチドＳｈＫ（スティコダシトラ・ヘリアンサス毒素、カタログ番号Ｈ２３５８）及

びＢＫＣａ１阻害剤であるペプチドＩｂＴｘ（イベリオトキシン、カタログ番号Ｈ９９４０）は、Ｂａｃｈｅｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから購入し、Ｋｖ１．１阻害剤であるペプチドＤＴＸ－ｋ（デンドロトキシン－Ｋ）はＡｌｏｍｏｎｅ Ｌａｂｓ（Ｉｓｒａｅｌ）製であった。Ｋｖ１．３のＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］ペプチボディ阻害剤を、実施例４及び実施例３９に記載されているとおりに入手した。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡはＡｍｇｅｎ試料バンクから入手したが、多様な売主から市販されている。イオンチャネル阻害剤であるＳｈＫ、ＩｂＴｘ又はＤＴＫ－ｋを、ＤＭＥＭ完全培地中に、望ましい最終濃度の４×となるように希釈した（終濃度＝５０又は１００ｎＭ）。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡも、ＤＭＥＭ完全培地中に、４×最終濃度となるように希釈した（最終濃度＝１０μＭ）。９６ウェルＦａｌｃｏｎ３０７５平底マイクロタイタープレートの適切なウェルへ、ＤＭＥＭ完全培地又は４×阻害剤溶液のいずれか５０μＬを添加した。次に、ヒト全血１００μＬを添加し、プレートを、３７℃、５％CO_2で１時間温置した。１時間後、プレートを取り外し、阻害剤を含有するプレートの全ウェルへ、４×タプシガルジン刺激（４０μＭ）５０μＬを添加した。阻害剤を含有しないが、ＤＭＥＭ完全培地のみを含有する幾つかのウェルにタプシガルジンも添加したのに対し、ＤＭＥＭ完全培地のみを有する他のウェルには、ＤＭＥＭ完全培地をさらに５０μＬ添加した。阻害剤及びタプシガルジン刺激を有しないウェルは、処理されていない「低」対照を相当した。阻害剤を有しないが、タプシガルジン刺激を与えられたウェルは、最大刺激のための対照又は「高」対照に相当した。プレートを、３７℃、５％CO_2に２４時間再配置した。２４時間後、プレートを取り出し、ウェルをＦＡＣＳ分析のために処理した。細胞をウェルから摘出し、染色緩衝液（熱失活済みの２％ウシ胎仔血清を含有するリン酸緩衝塩類溶液）中で洗浄した。製造者の指示に従って、１．５％ホルムアルデヒド（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を含有するＢＤ ＦＡＣＳ Ｌｙｓｉｎｇ Ｓｏｌｕｔｉｏｎを使用して、赤血球細胞を溶解した。チューブあたり染色緩衝液１００μＬあたり１００万個の細胞の濃度で細胞を分配した。まず、ビオチン標識した抗ヒトＣＤ４の１μＬで、細胞を染色し、洗浄した後、１μＬのストレプトアビジン－ＡＰＣ、ＦＩＴＣ標識した抗ヒトＣＤ４５ＲＡ、及びフィコエリトリン（ＰＥ）標識した抗ヒトＣＤ２５（ＩＬ－２Ｒａ）又はＰＥ標識した抗ヒトＣＤ４０Ｌで同時に染色した。抗体添加工程の間に、細胞を染色緩衝液で洗浄した。全ての抗体は、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）から入手した。各試料に対して、２万ないし５万の生存事象を、Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ＦＡＣＳＣａｌｉｂｅｒ（Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ、ＣＡ）フローサイトメーターで回収し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェア（Ｔｒｅｅ Ｓｔａｒ Ｉｎｃ．、Ｓａｎ Ｃａｒｌｏｓ、ＣＡ）を使用して分析した。前方向及び側部の散乱特性に基づいて、死滅した細胞、単球及び顆粒球を分析から排除した。

【０５８１】

図６４及び図６７は、ＣＤ４＋Ｔ細胞に及ぼすＩＬ－２Ｒの活性を抑制したことに加え、Ｋｖ１．３阻害剤であるＳｈＫ及びＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］がヒト全血中のＩＬ－２分泌を有効に遮断したことを示す。Ｋｖ１．３阻害剤であるＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］は、ＩＣ５０によって反映されるように、シクロスポリンＡよりもヒト全血中のＩＬ－２生成を遮断する上で２００倍超有力であった（図６４）図６５は、Ｋｖ１．３阻害剤が、ヒト全血中のＩＦＮｇの分泌も有力に遮断したことを示し、図６６は、Ｔ細胞に及ぼすＣＤ４０Ｌの上方制御をさらに遮断したことを示す。図６４ないし６７中のデータは、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］分子が３７℃で４８時間まで全血中で安定であり、炎症反応の強力な遮断を提供したことを示す。Ｋｖ１．３を標的にし、延長された半減期を有する毒素ペプチド治療薬が、インビボで、長期にわたって、これらの反応の持続的遮断を与えるために探索される。これに対して、Ｋｖ１．３阻害剤であるペプチドＳｈＫは、全血中で強力な遮断を示した事実にもかかわらず、ＳｈＫペプチドはインビトロで半減期が短く（約２０分）（Ｃ．Ｂｅｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９８，１３９４２）、それ故、長時間の遮断を提供で

きない。全血は、動物における反応を予測するための生理的に適切なアッセイに相当する。ここに記載されている全血アッセイは、患者の投与後の標的適用範囲及び薬物暴露を測定するための薬力学的（ＰＤ）アッセイとしても使用できる。これらのヒト全血データは、多発性硬化症、１型糖尿病、乾癬、炎症性腸疾患、接触仲介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、喘息、アレルギー、再狭窄、全身性強皮症、線維症、皮膚硬化症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、炎症性骨吸収、移植片拒絶反応、移植片対宿主病及び狼瘡などの、多様な免疫疾患の治療のための、本発明の組成物の治療的有用性を裏付ける。

【実施例４７】

【０５８２】

ＰＥＧ化したペプチボディ

実施例を通じて、本発明のＰＥＧ化したペプチボディを以下の方法によって作製した。ＣＨＯにより発現された、１９．２ｍＬのＡ５Ｓ、２０ｍＭのＮａＢＨ$_3$ＣＮ、ｐＨ５中のＦｃＬ１０-ＯｓＫ１（１９．２ｍｇ、分子量３０，３７１Ｄａ、０．６３μｍｏｌ）を、３８ｍｇのＰＥＧアルデヒド（分子量２０ｋＤａ、３×、ロット１０４０８６）で処理した。密閉した反応混合物を冷温室で一晩撹拌した。Ｓｕｐｅｒｒｏｓｅ　６　ＨＲ　１０／３０カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）を使用して、０．４ｍＬ／分で０．０５Ｍリン酸塩緩衝液、０．５Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０で溶出したＳＥＣ　ＨＰＬＣにより、反応の経過中のタンパク質修飾度をモニターした。反応混合物をＡ５Ｓ、ｐＨ５で一晩透析した。次に、透析した材料をＡ５Ｓ、ｐＨ５中のＳＰ　ＨＰ　ＦＰＬＣカラム（１６／１０）へ負荷し、１Ｍ　ＮａＣｌ勾配で溶出した。回収した画分をＳＥＣ　ＨＰＬＣにより分析し、３つのプール中にプールし、ＤＰＢＳ中へと交換し、濃縮し、官能基検査に供した（表３４）。

【０５８３】

別の実施例において、１６．５ｍＬのＡ５Ｓ、２０ｍＭのＮａＢＨ$_3$ＣＮ、ｐＨ５中のＦｃＬ１０-ＳｈＫ１（１６．５ｍｇ、分子量３０，０６５Ｄａ、０．５５μｍｏｌ）を４４ｍｇのＰＥＧアルデヒド（分子量２０ｋＤａ、４×、ロット１０４０８６）で処理した。密閉した反応混合物を冷温室で一晩撹拌した。Ｓｕｐｅｒｒｏｓｅ　６　ＨＲ　１０／３０カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）を使用して、０．４ｍＬ／分で０．０５Ｍリン酸塩緩衝液、０．５Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０で溶出したＳＥＣ　ＨＰＬＣにより、反応の経過中のタンパク質修飾度をモニターした。反応混合物をＡ５Ｓ、ｐＨ５で一晩透析した。透析した材料をＡ５Ｓ、ｐＨ５中のＳＰ　ＨＰ　ＦＰＬＣカラム（１６／１０）へ負荷し、１Ｍ　ＮａＣｌ勾配で溶出した。回収した画分をＳＥＣ　ＨＰＬＣにより分析し、３つのプール中にプールし、ＤＰＢＳ中へと交換し、濃縮し、官能基検査に供した（表３４）。

【０５８４】

表３４中のデータは、Ｋｖ１．３阻害剤としてのＰＥＧ化されたペプチボディ分子の有効性を示す。

【０５８５】

【表３５】

表３４は、本明細書で上述した実施例３６に記載されているように、ＨＥＫ２９３によるホールセルパッチクランプ電気生理学によって行われたＩＣ５０の測定結果を示す。持続的ＩＣ５０は、－８０ｍＶから＋３０ｍＶへの電位勾配の４００ミリ秒後における電流から求められた。２番プールの試料は、ジＰＥＧ化されたペプチボディを含み、３番プールの試料は、モノＰＥＧ化されたペプチボディを含んだ。

PEG化されたペプチボディ	プール番号	持続したIC50 (nM)
PEG-Fc-L10-SHK(2-35)	3	0.175 (n=4)
PEG-Fc-L10-SHK(2-35)	2	0.158 (n=4)
PEG-Fc-L10-OSK1	3	0.256 (n=3)
PEG-Fc-L10-OSK1	2	0.332 (n=3)

【実施例４８】

【０５８６】

ＰＥＧ化された毒素ペプチド

ＳｈＫ及びＯｓｋ－１のＰＥＧ化、精製及び分析

合成ＳｈＫ又はＯＳＫ１－１毒素ペプチドのＮ末端での還元的アルキル化によって、ペプチドを選択的にＰＥＧ化した。２０ｍＭシアノ水素化ホウ素ナトリウム及び２０ｋＤａのモノメトキシ－ＰＥＧ－アルデヒド（Ｎｅｋｔａｒ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ、Ｈｕｎｔｓｖｉｌｌｅ、ＡＬ）の２モル過剰量を含有する５０ｍＭNaH_2PO_4、ｐＨ４．５反応緩衝液中の２ｍｇ／ｍＬで、Ｓｈｋ又はＯＳＫ－１のいずれかの毒素ペプチドを使用して、結合を達成した。結合反応物を室温で一晩撹拌し、その進行をＲＰ－ＨＰＬＣによってモニターした。完了した反応を、２０ｍＭＮａＯＡｃ、ｐＨ４による４倍希釈により停止し、ｐＨ３．５に調整し、４℃に冷却した。次に、４℃で、ＳＰセファロースＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）を使用して、２０ｍＭＮａＯＡｃ、ｐＨ４．０中の直線的な０ないし１ＭのＮａＣｌ勾配で溶出して、ＰＥＧ－ペプチドをクロマトグラフィー精製した（図６８Ａ及び図６８Ｂ）。溶出したピーク画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びＲＰ－ＨＰＬＣにより分析し、プールしたものを測定したところ、純度９７％超であった。観察される主な夾雑物質は、ジＰＥＧ化した毒素ペプチド及び修飾されていない毒素ペプチドであった。３ｋＤａ　ＭＷＣＯ膜に対する遠心ろ過によって、選択されたプールを２ないし５ｍｇ／ｍＬに濃縮し、５％ソルビトールを有する１０ｍＭＮａＯＡｃ、ｐＨ４中へと透析した。次に、透析したプールを０．２ミクロンフィルターでろ過滅菌し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びＲＰ－ＨＰＬＣによって純度が９７％超であることを決定した（図６９Ａ及び図６９Ｂ）。０．１％ＴＦＡ／H_2O中のＺｏｒｂａｘ５μｍ　３００ＳＢ－Ｃ８　４．６×５０ｍｍカラム（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ）を１ｍＬ／分で稼動させ、カラム温度を４０℃に維持したＡｇｉｌｅｎｔ１１００モデルＨＰＬＣで、逆相ＨＰＬＣを実施した。ＰＥＧ－ペプチドの試料（２０μｇ）を注入し、直線的な６ないし６０％勾配中に溶出する間、２１５ｎｍ及び２８０ｎｍの波長でモニターした。

【０５８７】

ホールセルパッチクランプによって実施される電気生理学的実験（実施例３６参照）は、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現するＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断において、ＰＥＧ－ＯＳＫ１は１．２８５ｎＭの、ＰＥＧ－ＳｈＫ［１－３５］は０．１６９ｎＭのピークＩＣ５０を生じた（図７４）。「２０ＫのＰＥＧ－ＳｈＫ［１－３５］」及び「ＰＥＧ－ＳｈＫ」とも呼ばれる精製されたＰＥＧ－ＳｈＫ［１－３５］分子は、小さなＳｈＫペプチドよりもインビボでの半減期が非常に長

かった（図５９及び図６０）。ＰＥＧ－ＳｈＫ［１－３５］はラットにおいて重度の自己免疫性脳脊髄炎を抑制し（実施例４５、図６１ないし６３）、小さな固有のＳｈＫペプチドよりも大きな有効性を示した。

【実施例４９】

【０５８８】

ＳｈＫ及びＯＳＫ１毒素ペプチドのＦｃループ挿入

図７０、図７１、図７２及び図７３に例示されているように、Ｇｅｇｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｆｃ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ、ＷＯ２００６／０３６８３４ Ａ２［ＰＣＴ／ＵＳ２００５／０３４２７３］中の実施例１に公開されている方法に従って、配列$D_{137}E_{138}L_{139}T_{140}K_{141}$として定義されるヒトＩｇＧ１Ｆｃ－ループドメイン中にジスルフィドにより抑制される毒素ペプチドを挿入した。３つの連結されたドメインを有する典型的なＦｃループ－Ｌ２－ＯｓＫ１－Ｌ２、Ｆｃループ－Ｌ２－ＳｈＫ－Ｌ２、Ｆｃループ－Ｌ２－ＳｈＫ－Ｌ４及びＦｃループ－Ｌ４－ＯｓＫ１－Ｌ２を調製した。これらを回収、精製し、官能基検査へ供した。

【０５８９】

これらの実施例に関するペプチド挿入は、Ｆｃ残基Leu_{139}とThr_{140}との間であり、挿入されたペプチドのいずれかの側に隣接するリンカーとして２ないし４個のＧｌｙ残基を包含した。しかしながら、本分野で公知のように、例えばＧｅｇｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｆｃ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ，ＷＯ２００６／０３６８３４ Ａ２［ＰＣＴ／ＵＳ２００５／０３４２７３］の実施例１３に記載されるとおり、ヒトＩｇＧ１ Ｆｃ配列に関する代替的な挿入部位又は異なるリンカーも、本発明の実施においても有用である。

【実施例５０】

【０５９０】

Ｅ．コリからのＳｈＫ（２－３５）－Ｌ－Ｆｃの精製

本明細書の上述の実施例１６に記載されるように入手された冷凍したＥ．コリペースト（１１７ｇ）を、室温の５０ｍＭトリスＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ７．５の１２００ｍＬと組み合わせ、約０．１ｍｇ／ｍＬのニワトリ卵白色リゾチームへ添加した。冷却した懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置に１２，０００ＰＳＩで２回通過させた。次に、４℃、１７，７００ｇで３０分間、細胞可溶化液を遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、ペレットを１％デオキシコール酸１２００ｍＬ中に再懸濁した後、４℃、１７，７００ｇで３０分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、ペレットを１２００ｍＬの水中に再懸濁した後、４℃、１７，７００ｇで３０分間遠心分離した。次に、ペレット６．４ｇ（合計１４．２ｇ）を１２８ｍＬの８Ｍグアニジン ＨＣｌ、５０ｍＭトリスＨＣｌ、ｐＨ８．０中に溶解した。次に、ペレット溶液を１ＭのＤＴＴ０．６７ｍＬとともに、３７℃で６０分間温置した。還元した材料を４℃、２ｍＬ／分で再折りたたみ緩衝液（３Ｍ尿素、５０ｍＭトリス、１６０ｍＭアルギニンＨＣｌ、２．５ｍＭＥＤＴＡ、２．５ｍＭシスタミンＨＣｌ、４ｍＭシステイン、ｐＨ９．５）５５００ｍＬへと、激しく撹拌しながら移した。次に、撹拌速度を低下させ、温置を４℃で３日間続行した。

【０５９１】

再折りたたみ液を水５．５Ｌで希釈し、酢酸を使用してｐＨを８．０に調整した後、溶液を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過し、室内の３５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ Ｍａｂ Ｓｅｌｅｃｔカラム（内径２．６ｃｍ）で、８℃でＱ－緩衝液Ａ（２０ｍＭトリス、ｐＨ８．５）中の３５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ Ｑセファロース－ＦＦ（内径２．６ｃｍ）カラムへ１０ｍＬ／分で負荷した。負荷した後、Ｑセファロースカラムを回路から除去し、残存するクロマトグラフィーをＭａｂ Ｓｅｌｅｃｔカラムで実施した。カラムをＱ－緩衝液Ａの数カラム容積で洗浄した後、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０への工程を使用して溶出した。望ましい生成物を含有する画分を８℃でＳ－緩衝液Ａ（１０ｍＭNaH_2PO_4、ｐＨ７．０）中の５．０ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ＳＰ－セファロースＨＰカラムへ５．０ｍＬ／分で直ちに負荷した。次に、クーマシーブリリアントブルー

染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、画分を分析した。望ましい生成物のバルクを含有する画分をプールした後、８℃でＭＥＰ緩衝液Ａ（２０ｍＭトリス、２００ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ８．０）中の５０ｍＬのＭＥＰ Ｈｙｐｅｒｃｅ１カラム（内径２．６ｃｍ）へ１０ｍＬ／分で適用した。５％ないし５０％の直線勾配のＭＥＰ緩衝液（５０ｍＭクエン酸ナトリウム、ｐＨ４．０）で、カラムを溶出した後、１００％ＭＥＰ緩衝液Ｂへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して画分を分析し、望ましい生成物のバルクを含有する画分をプールした。

【０５９２】

次に、１０ｋＤａメンブレンを有するＰａｌｌ Ｊｕｍｂｏ-Ｓｅｐを使用して、ＭＥＰプールを約１０ｍＬに濃縮した。次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈した組み合わせたプール５０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図７６Ａ）。次に、３０，２５３の算出された分子量及び３６，９００$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、材料の濃度が３．７ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、材料の純度を評価した（図７６Ｂ）。次に、５０ｍＭNaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物７０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図７６Ｃ）。次に、ＲＰ-ＨＰＬＣカラム（Ｖｙｄａｃ C_4、１×１５０ｍｍ）を通じて、試料約４μｇをクロマトグラフィーにかけることによって、生成物を質量スペクトル分析へ供した。溶媒Ａは、水中の０．１％トリフルオロ酢酸であり、溶媒Ｂは、９０％アセトニトリル、１０％水中の０．１％トリフルオロ酢酸であった。８０μＬ／分の流速で、１０％溶媒Ｂ中でカラムをあらかじめ平衡化した。質量分析計の製造者によって提供されるＢｉｏｗｏｒｋｓソフトウェアを使用して、質量スペクトルの逆重畳を行った（図７６Ｄ）。生成物を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過した後、-８０℃で保存した。

【０５９３】

表３５では、Ｅ．コリ由来の精製されたＳｈＫ[２-３５]-Ｌ-Ｆｃに関するＩＣ５０データを、本発明の組成物の他の幾つかの実施形態と比較する。

【０５９４】

【表３６】

表３５　Ｎ末端又はＣ末端のいずれかにＦｃを含有するＥ．コリ由来の組換えＦｃ－Ｌ－ＳｈＫ［１－３５］、Ｆｃ－Ｌ－ＳｈＫ［２－３５］、Ｆｃ－Ｌ－ＯＳＫ１、Ｓｈｋ［１－３５］－Ｌ－Ｆｃ及びＳｈＫ［２－３５］－Ｌ－Ｆｃペプチボディは、ヒトＫｖ１．３の強力な遮断を示す。ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］Ｒ１Ｑ突然変異体の活性も示す。実施例３６に記載されている方法によって、ＨＥＫ２９３／Ｋｖ１．３細胞を使用して、ホールセルパッチクランプ電気生理学（ＷＣＶＣ）を実施し、示されるＩＣ５０は、３個以上の細胞由来の用量－反応曲線からの平均である。実施例４４に記載されている方法によるＩｏｎＷｏｒｋｓ（商標）（ＩＷＱ）平面型パッチクランプ電気生理学は、ＣＨＯ／Ｋｖ１．３細胞に対するものであり、平均ＩＣ５０が示されている。表記された実施例に記載されている方法によって、本発明の分子を取得した。すなわち、Ｅ．コリ由来のＦｃ－Ｌ－ＳｈＫ［１－３５］（実施例３及び実施例３８）、Ｅ．コリ由来のＦｃ－Ｌ－ＳｈＫ［２－３５］（実施例４及び実施例３９）、Ｅ．コリＦｃ－Ｌ－ＯＳＫ１（実施例１０及び実施例４０）、ＳｈＫ［１－３５］－Ｌ－Ｆｃ（実施例１５及び実施例５１）及びＳｈＫ［２－３５］－Ｌ－Ｆｃ（実施例１６及び本実施例５０）であった。ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］に関して記載されている方法と同様の方法を使用して、ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］Ｒ１Ｑ分子を作製した。

分子	WCVCによるKv1.3 IC_{50} (nM)	IWQによるKv1.3 IC_{50} (nM)
E.コリ由来のFc-L-ShK[1-35]	1.4	
E.コリ由来のFc-L-ShK[2-35]	1.3	2.8
E.コリ由来のFc-L-OSK1	3.2	
E.コリ由来のShk[1-35]-L-Fc		2.4
E.コリ由来のShK[2-35]-L-Fc		4.9
CHO由来のFc-L10-ShK[1-35]R1Q		2.2

【実施例５１】

【０５９５】

Ｅ．コリからのＳｈＫ（１－３５）－Ｌ－Ｆｃの精製

本明細書の上述の実施例１５に記載されているように入手された、冷凍したＥ．コリペースト（６５ｇ）を、室温の５０ｍＭトリスＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ７．５の６６０ｍＬと合わせて、約０．１ｍｇ／ｍＬのニワトリ卵白色リゾチームへ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置へ、１２，０００ＰＳＩで２回通過させた。次に、４℃、１７，７００ｇで３０分間、細胞可溶化液を遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、６６０ｍＬの１％デオキシコール酸中にペレットを再懸濁した後、４℃、１７，７００ｇで３０分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、６６０ｍＬの水中にペレットを再懸濁した後、４℃、１７，７００ｇで３０分間遠心分離した。次に、ペレット１３ｇを１３０ｍＬの８Ｍグアニジン ＨＣｌ、５０ｍＭトリスＨＣｌ、ｐＨ８．０中に溶解した。次に、１ＭのＤＴＴ０．１ｍＬとともに、ペレット溶液１０ｍＬを、３７℃で６０分間温置した。４℃、２ｍＬ／分で、激しく撹拌しながら、再折りたたみ緩衝液（２Ｍ尿素、５０ｍＭトリス、１６０ｍＭアルギニンＨＣｌ、２．５ｍＭＥＤＴＡ、２．５ｍＭシスタミンＨＣｌ、４ｍＭシステイン、ｐＨ８．５）１０００ｍＬへと、還元した材料を移した。次に、撹拌速度を低下させ、４℃で３日間、温置を続行した。

【０５９６】
再折りたたみ液を水1Ｌで希釈し、０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過した後、室内の３５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　Ｍａｂ　Ｓｅｌｅｃｔカラム（内径２．６ｃｍ）で、８℃でＱ－緩衝液Ａ（２０ｍＭトリス、ｐＨ８．５）中の３５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　Ｑセファロース－ＦＦ（内径２．６ｃｍ）カラムへ１０ｍＬ／分で負荷した。負荷した後、Ｑセファロースカラムを回路から除去し、残存するクロマトグラフィーをＭａｂ　Ｓｅｌｅｃｔカラムで実施した。Ｑ－緩衝液Ａの数カラム容積でカラムを洗浄した後、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０への工程を使用して溶出した。望ましい生成物を含有する画分を８℃、５．０ｍＬ／分で、Ｓ－緩衝液Ａ（２０ｍＭNaH_2PO_4、ｐＨ７．０）中の５．０ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　ＳＰ－セファロースＨＰカラムへと直ちに負荷した。次に、カラムをＳ－緩衝液Ａの数カラム容積で洗浄した後、５％から６０％までのＳ－緩衝液Ｂ（２０ｍＭNaH_2PO_4、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）の直線勾配の後、１００％Ｓ－緩衝液Ｂに至る工程を実施した。クーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、画分を分析した。望ましい生成物のバルクを含有する画分をプールした。

【０５９７】
次に、１０ｋＤａメンブレンを有するＰａｌｌ　Ｊｕｍｂｏ－Ｓｅｐを使用して、Ｓ－プールを約１０ｍＬに濃縮した。次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ　８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈した組み合わせたプール２０μＬに関して、スペクトル走査を実施した（図７７Ａ）。次に、３０，４０９ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３６，９００$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、材料の濃度が３．１ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、材料の純度を評価した（図７７Ｂ）。次に、２８０ｎｍでの吸光度を観察する、５０ｍＭNaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物９３μｇに関して、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図７７Ｃ）。次に、ＭＡＬＤＩ質量分析法による質量スペクトル分析へ、前記生成物を供した。試料プレート上で、ＭＡＬＤＩマトリクスシナピン酸とともに、試料の一定分量を点状滴下した。スペクトルを回収するために、窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分析計を使用した。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た（図７７Ｄ）。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【０５９８】
「ＳｈＫ［１－３５］－Ｌ－Ｆｃ」とも呼ばれる、Ｅ．コリ由来の精製されたＭｅｔ－ＳｈＫ（１－３５）－ＦｃによるヒトＫｖ１．３の遮断のためのIC_{50}が、本明細書の上述の表３５に示されている。

【実施例５２】

【０５９９】
Ｋｖ１．３のＯｓＫ１－Ｌ－Ｆｃ阻害剤の細菌での発現
細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されているとおりであった。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｇＲ－ｐｅｐ－Ｆｃであり、ＯｓＫ１－Ｌ－Ｆｃの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０６００】
二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０６０１】

【化５９】

GGGTGTTATCATCAACGTTAAATGCAAAATCTCCCGTCAGTGCCTGGAACCGTGCAAAAAAGCTGGTATGCGT
//配列番号：1347；

TTCGGTAAATGCATGAACGGTAAATGCCACTGCACCCCGAAATCTGGTGGTGGTGGTTCT //
配列番号：1348；

CACCAGAACCACCACCACCACCAGATTTCGGGGTGCAGTGGCATTTACCGTTCATGCATTTACCGAAACGCAT
//配列番号：1349；

ACCAGCTTTTTTGCACGGTTCCAGGCACTGACGGGAGATTTTGCATTTAACGTTGATGATAAC //
配列番号：1310

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
    GGGTGTTATCATCAACGTTAAATGCAAAATCTCCCGTCAGTGCCTGGAACCGTGCAAAAA
  1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
       CAATAGTAGTTGCAATTTACGTTTTAGAGGGCAGTCACGGACCTTGGCACGTTTTT

     G  V  I  I  N  V  K  C  K  I  S  R  Q  C  L  E  P  C  K  K  -

    AGCTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACGGTAAATGCCACTGCACCCCGAAATCTGG
 61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
    TCGACCATACGCAAAGCCATTTACGTACTTGCCATTTACGGTGACGTGGGGCTTTAGACC

     A  G  M  R  F  G  K  C  M  N  G  K  C  H  C  T  P  K  S  G  -

    TGGTGGTGGTTCT   //配列番号：1350
121 ----------+------- 137
    ACCACCACCAAGACCAC      //配列番号：1352

     G  G  G  S  G   -  //配列番号：1351
```

【０６０２】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例５３】

【０６０３】

Ｋｖ１．３のＧｌｙ－ＳｈＫ（１－３５）－Ｌ－Ｆｃ阻害剤の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されているとおりであった。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｇＲ－ｐｅｐ－Ｆｃであり、Ｇｌｙ－ＳｈＫ（１－３５）－Ｌ－Ｆｃの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０６０４】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０６０５】

【化６０】

GGGTCGTTCTTGTATTGATACTATTCCAAAATCTCGTTGTACTGCTTTTCAATGTAAACATTCTA
TGAAATATCGTCTTTCTT // 配列番号：1313；

TTTGTCGTAAAACTTGTGGTACTTGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT // 配列番号：1314；

CACCAGAACCACCACCACCAGAACAAGTACCACAAGTTTTACGACAAAAAGAAAGACGATATTT
CATAGAATGTTTACATTGA // 配列番号：1353

AAAGCAGTACAACGAGATTTTGGAATAGTATCAATACAAGAACG // 配列番号：1354

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   GGGTCGTTCTTGTATTGATACTATTCCAAAATCTCGTTGTACTGCTTTTCAATGTAAACA
 1 ----------+----------+----------+----------+----------+---------- 60
     GCAAGAACATAACTATGATAAGGTTTTAGAGCAACATGACGAAAAGTTACATTTGT

    G  R  S  C  I  D  T  I  P  K  S  R  C  T  A  F  Q  C  K  H  -

   TTCTATGAAATATCGTCTTTCTTTTTGTCGTAAAACTTGTGGTACTTGTTCTGGTGGTGG
61 ----------+----------+----------+----------+----------+---------- 120
   AAGATACTTTATAGCAGAAAGAAAAACAGCATTTTGAACACCATGAACAAGACCACCACC

    S  M  K  Y  R  L  S  F  C  R  K  T  C  G  T  C  S  G  G  G  -

   TGGTTCT    //配列番号：1355
121 ----------+- 131
   ACCAAGACCAC   // 配列番号：1357

    G  S  G   -   //配列番号：1356
```

【０６０６】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【０６０７】

略語

本明細書を通じて使用される略語は、特異的な事情において別段の定義がなければ、以下に定義されるとおりである。

【０６０８】

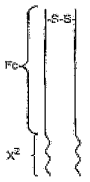
Ａｃ	（アセチル化残基を指すのに使用される）アセチル
ＡｃＢｐａ	アセチル化ｐ－ベンゾイル－Ｌ－フェニルアラニン
ＡＤＣＣ	抗体依存的な細胞傷害性
Ａｉｂ	アミノイソブチル酸
ｂＡ	β－アラニン
Ｂｐａ	ｐ－ベンゾイル－Ｌ－フェニルアラニン
ＢｒＡｃ	ブロモアセチル（$BrCH_2C(O)$）
ＢＳＡ	ウシ血清アルブミン
Ｂｚｌ	ベンジル
Ｃａｐ	カプロン酸
ＣＯＰＤ	慢性閉塞性肺疾患
ＣＴＬ	細胞傷害性Ｔリンパ球
ＤＣＣ	ジシクロヘキシルカルボジイミド
Ｄｄｅ	１－（４，４－ジメチル－２，６－ジオキソ－シクロヘキシリデン）エチル
ＥＳＩ－ＭＳ	電子スプレーイオン化質量分析法
Ｆｍｏｃ	フルオレニルメトキシカルボニル
ＨＯＢｔ	１－ヒドロキシベンゾトリアゾール
ＨＰＬＣ	高速液体クロマトグラフィー

ＨＳＬ	ホモセリンラクトン
ＩＢ	封入体
ＫＣａ	（ＩＬＣａ、ＢＫＣａ、ＳＫＣａを含む）カルシウム活性化カリウムチャネル
Ｋｖ	電位開口型カリウムチャネル
Ｌａｕ	ラウリン酸
ＬＰＳ	リポ多糖
ＬＹＭＰＨ	リンパ球
ＭＡＬＤＩ－ＭＳ	マトリクス介助レーザーデソープションイオン化質量分析法
Ｍｅ	メチル
ＭｅＯ	メトキシ
ＭＨＣ	主要組織適合遺伝子複合体
ＭＭＰ	マトリクスメタロプロテアーゼ
１－Ｎａｐ	１－ナフチルアラニン
ＮＥＵＴ	好中球
Ｎｌｅ	ノルロイシン
ＮＭＰ	Ｎ－メチル－２－ピロリジノン
ＰＡＧＥ	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
ＰＢＭＣ	末梢血単核細胞
ＰＢＳ	リン酸緩衝塩類溶液
Ｐｂｆ	２，２，４，６，７－ペンダメチルジヒドロベンゾフラン－５－スルホニル
ＰＣＲ	ポリメラーゼ連鎖反応
Ｐｅｃ	ピペコリン酸
ＰＥＧ	ポリ（エチレングリコール）
ｐＧｌｕ	ピログルタミン酸
Ｐｉｃ	ピコリン酸
ｐＹ	ホスホチロシン
ＲＢＳ	リボソーム結合部位
ＲＴ	室温（２５℃）
Ｓａｒ	サルコシン
ＳＤＳ	ドデシル硫酸ナトリウム
ＳＴＫ	セリン－トレオニンキナーゼ
ｔ－Ｂｏｃ	ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル
ｔＢｕ	ｔｅｒｔ－ブチル
ＴＨＦ	胸腺体液性因子
Ｔｒｔ	トリチル

OnCusp
Ex. 1002

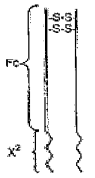
【図１Ａ】

FIG. 1A



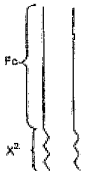
【図１Ｂ】

FIG. 1B



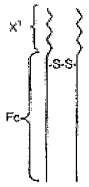
【図１Ｃ】

FIG. 1C



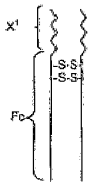
【図１Ｄ】

FIG. 1D



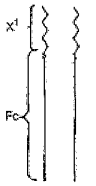
【図１Ｅ】

FIG. IE



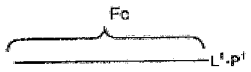
【図１Ｆ】

FIG. 1F



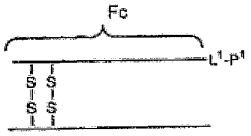
【図２Ａ】

FIG. 2A



【図２Ｂ】

FIG. 2B



【図２Ｃ】

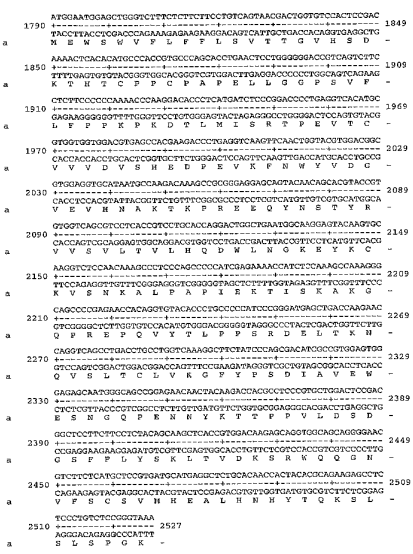
FIG. 2C



OnCusp
Ex. 1002

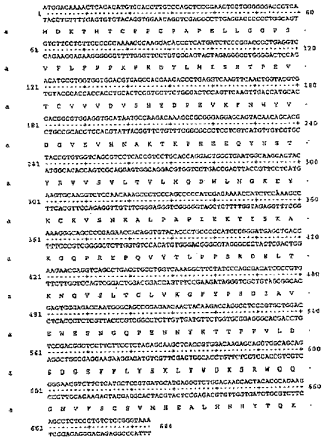
【図３】

FIG. 3



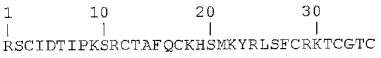
【図４】

FIG. 4



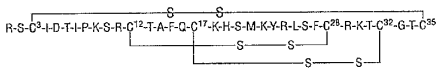
【図５Ａ】

FIG. 5A



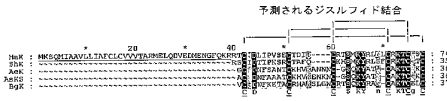
【図５Ｂ】

FIG. 5B



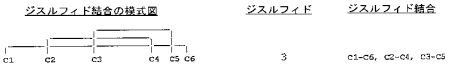
【図６Ａ】

FIG. 6A



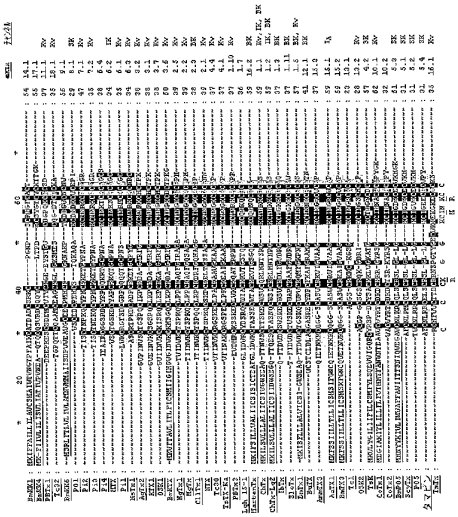
【図６Ｂ】

FIG. 6B



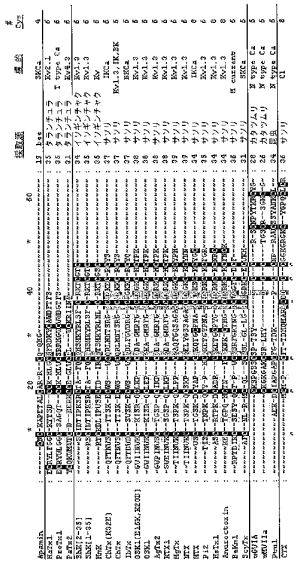
【図７】

FIG. 7



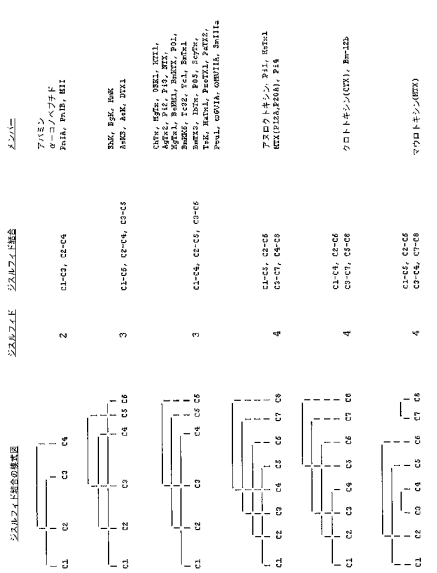
【図８】

FIG. 8



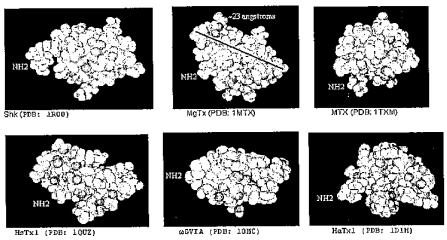
【図９】

FIG. 9



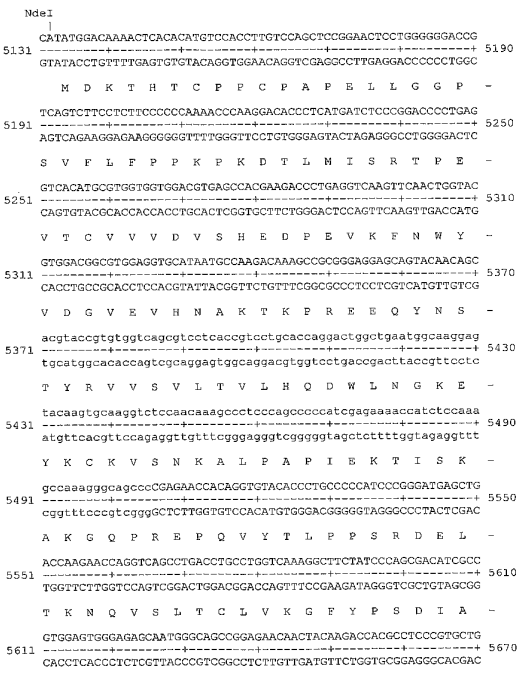
【図１０】

FIG. 10



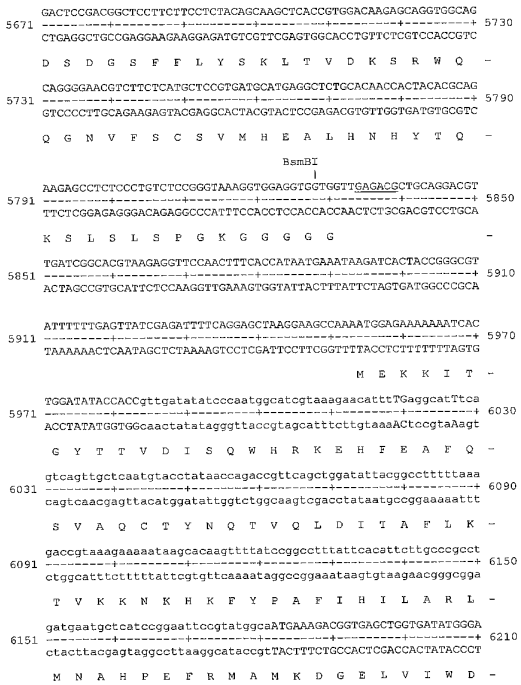
【図１１Ａ】

FIG. 11A



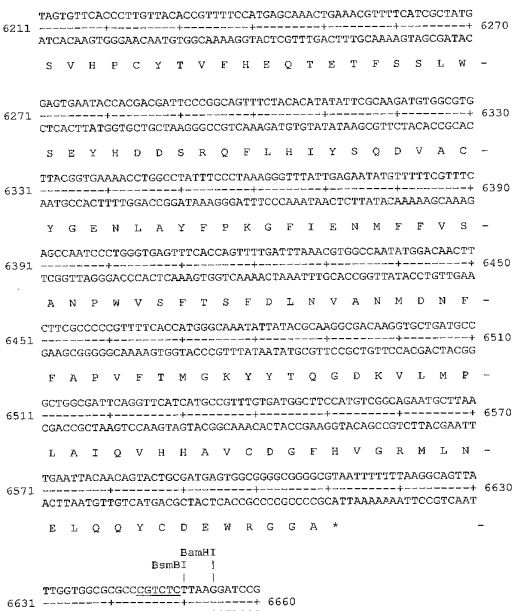
【図１１Ｂ】

FIG. 11B



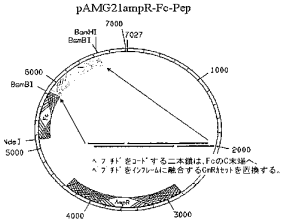
【図１１Ｃ】

FIG. 11C



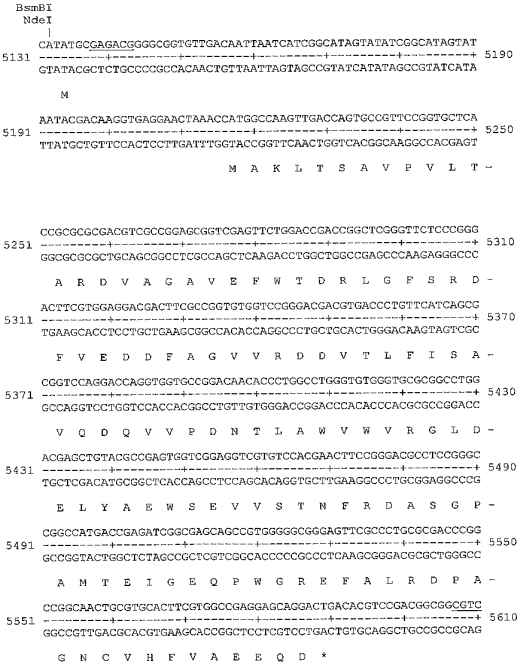
【図１１Ｄ】

FIG. 11D



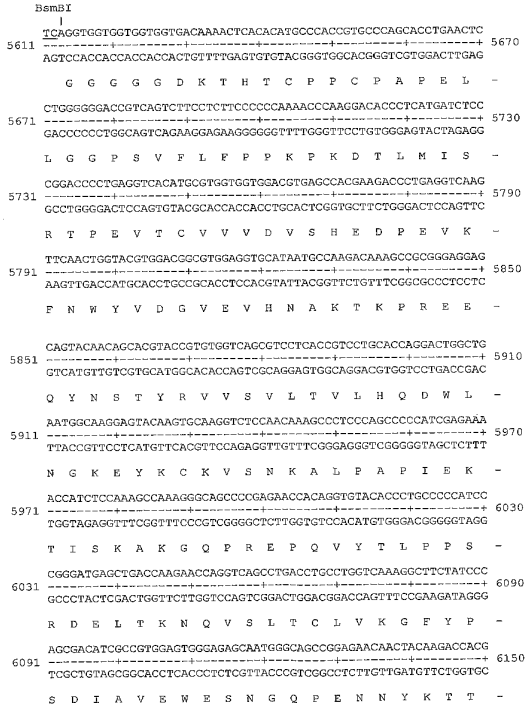
【図１２Ａ】

FIG. 12A



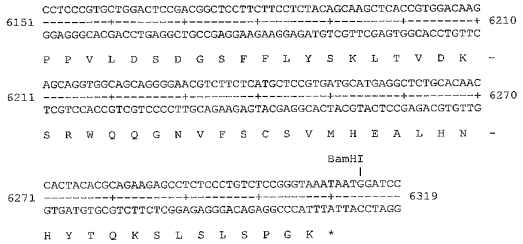
【図１２Ｂ】

FIG. 12B



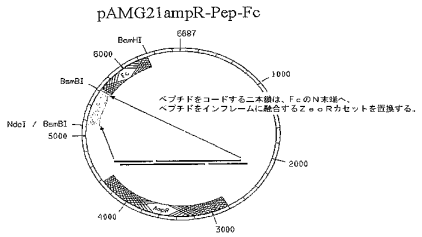
【図１２Ｃ】

FIG. 12C



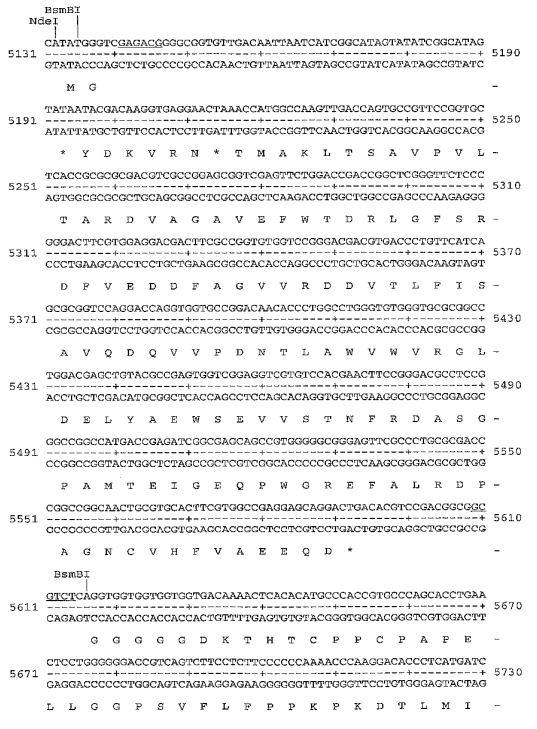
【図１２Ｄ】

FIG. 12D



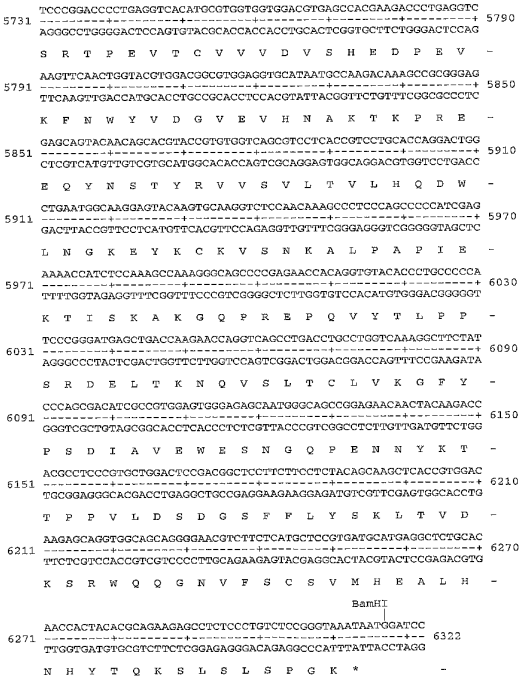
【図１２Ｅ】

FIG. 12E



【図１２Ｆ】

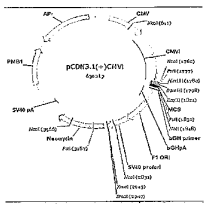
FIG. 12F



OnCusp
Ex. 1002

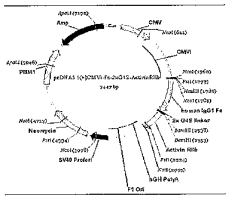
【図１３Ａ】

FIG. 13A



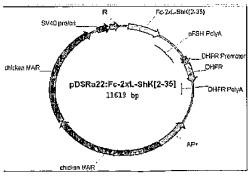
【図１３Ｂ】

FIG. 13B



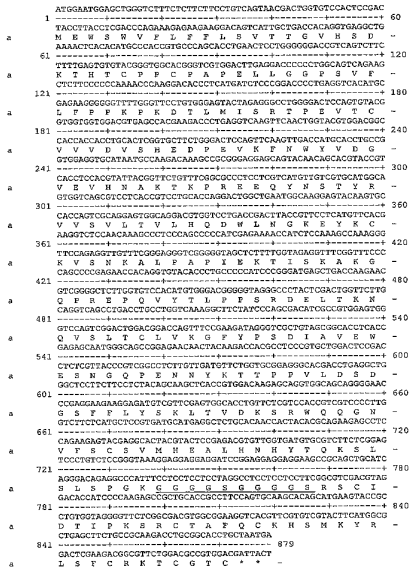
【図１３Ｃ】

FIG. 13C



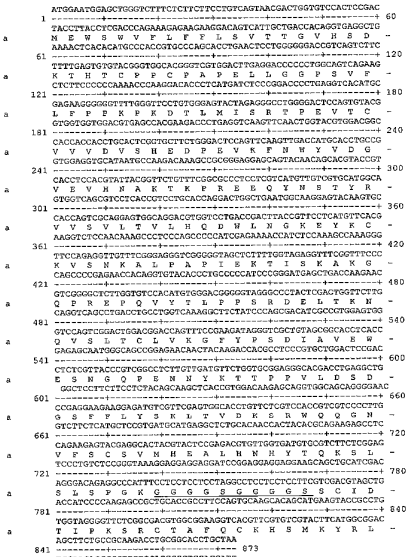
【図１４】

FIG. 14



【図１５】

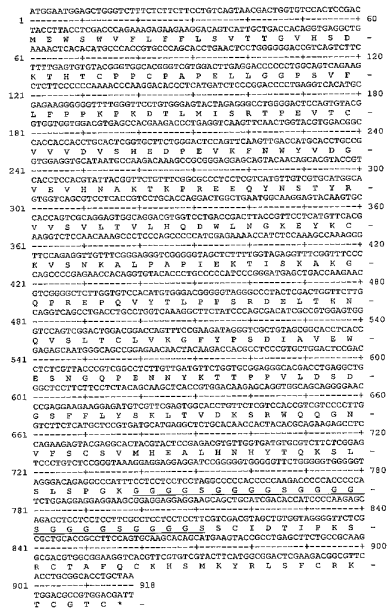
FIG. 15



OnCusp
Ex. 1002

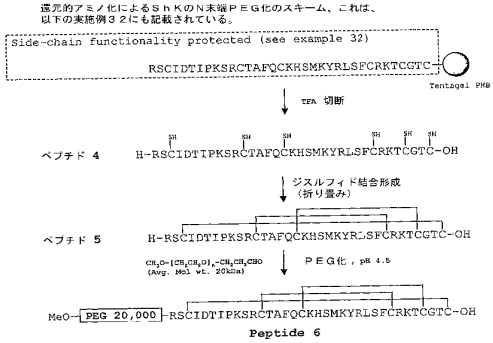
【図１６】

FIG. 16



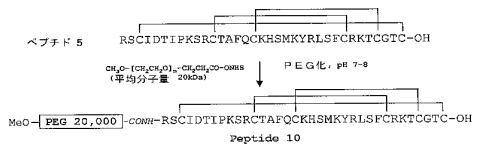
【図１７】

FIG. 17



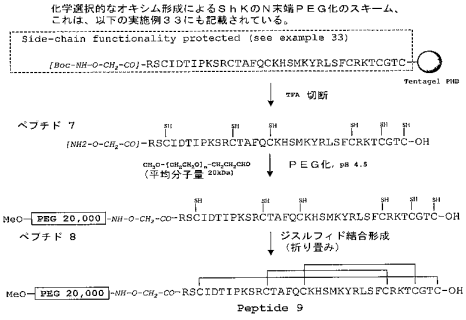
【図１８】

FIG. 18



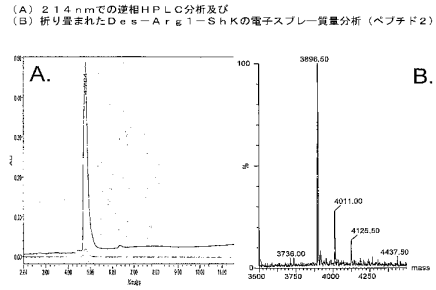
【図１９】

FIG. 19



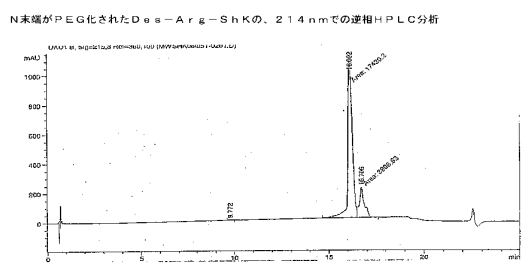
【図２０】

FIG. 20



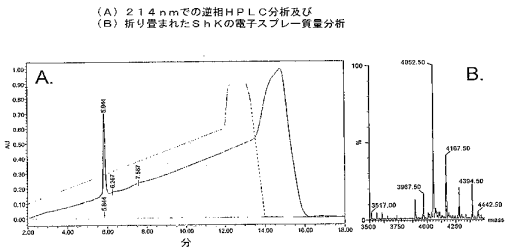
【図２１】

FIG. 21



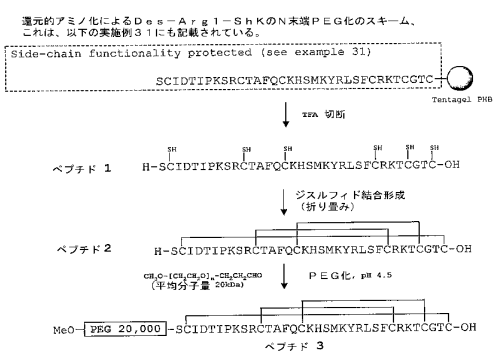
【図２２】

FIG. 22



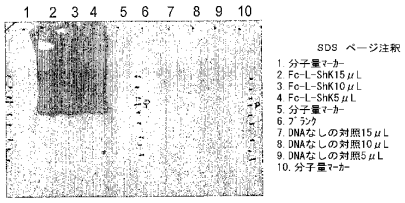
【図２３】

FIG. 23



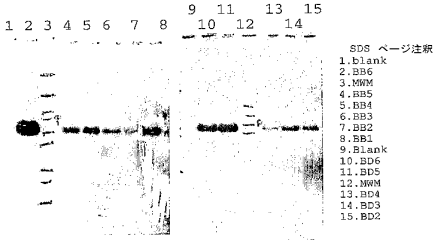
【図２４Ａ】

FIG. 24A



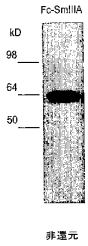
【図２４Ｂ】

FIG. 24B



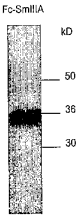
【図２５Ａ】

FIG. 25A



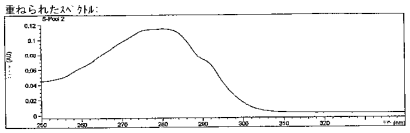
【図２５Ｂ】

FIG. 25B



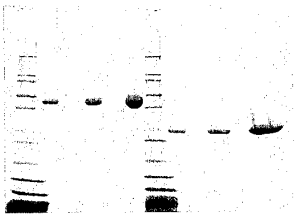
【図２６Ａ】

FIG. 26A



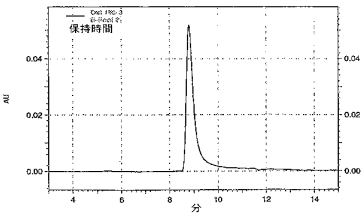
【図２６Ｂ】

FIG. 26B



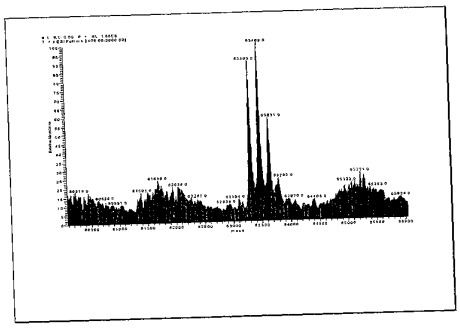
【図２６Ｃ】

FIG. 26C



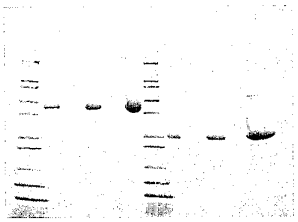
【図２６Ｄ】

Figure 26D



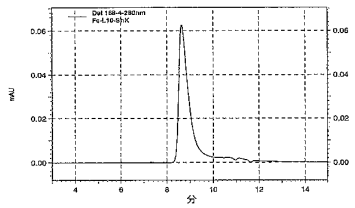
【図２７Ａ】

FIG. 27A



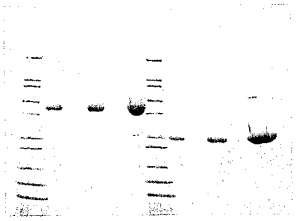
【図２７Ｂ】

FIG. 27B



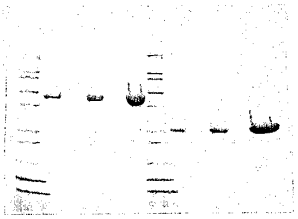
【図２７Ｃ】

FIG. 27C



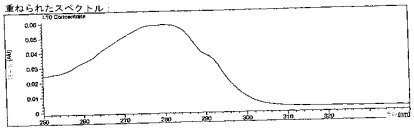
【図２７Ｄ】

FIG. 27D



【図２７Ｅ】

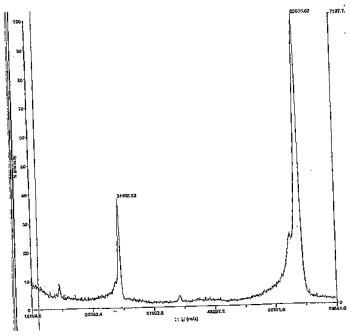
Figure 27E



OnCusp
Ex. 1002

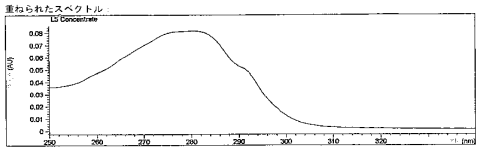
【図２７Ｆ】

Figure 27F



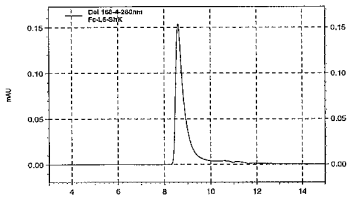
【図２７Ｇ】

Figure 27G



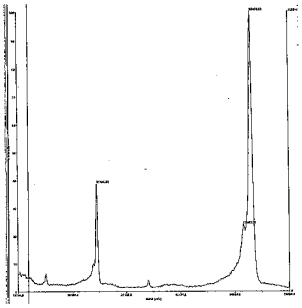
【図２７Ｈ】

Figure 27H



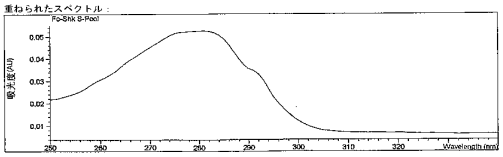
【図２７Ｉ】

Figure 27I



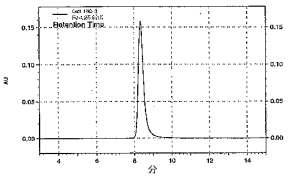
【図２７Ｊ】

Figure 27J



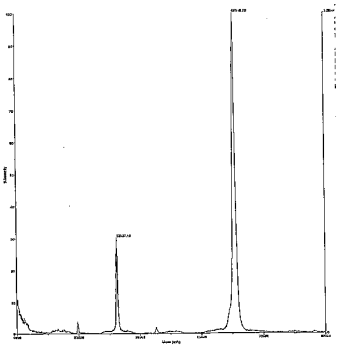
【図２７Ｋ】

Figure 27K



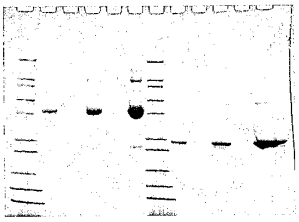
【図２７Ｌ】

Figure 27L



【図２８Ａ】

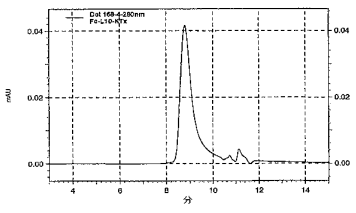
FIG. 28A



OnCusp
Ex. 1002

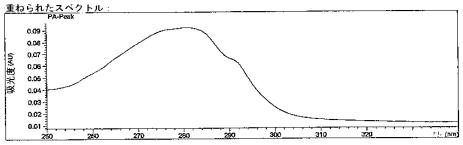
【図２８Ｂ】

FIG. 28B



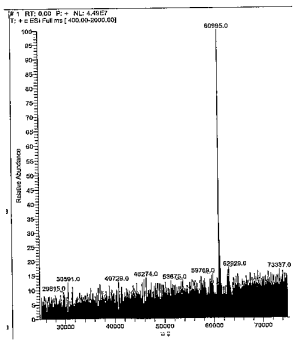
【図２８Ｃ】

Figure 28C



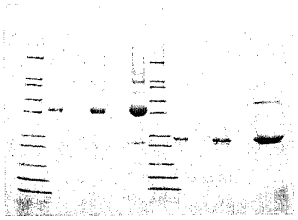
【図２８Ｄ】

Figure 28D



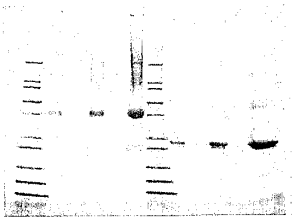
【図２９Ａ】

FIG. 29A



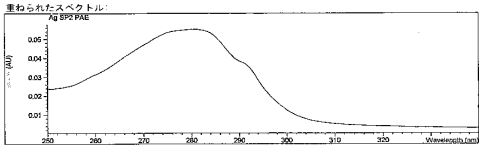
【図２９Ｂ】

FIG. 29B



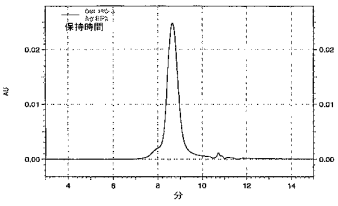
【図２９Ｃ】

FIG. 29C



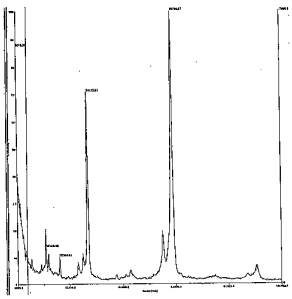
【図２９Ｄ】

FIG. 29D



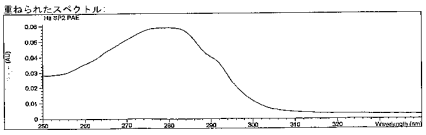
【図２９Ｅ】

FIG. 29E



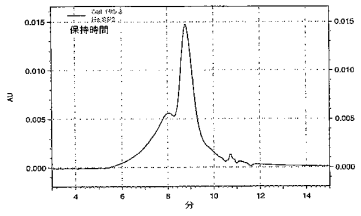
【図２９Ｆ】

FIG. 29F



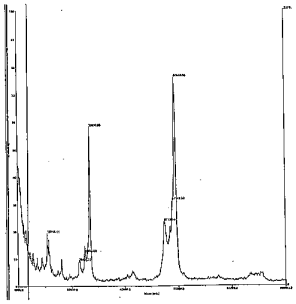
【図２９Ｇ】

FIG. 29G



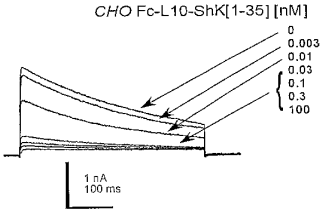
【図２９Ｈ】

FIG. 29H



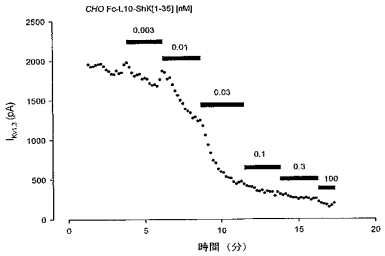
【図３０Ａ】

FIG. 30A



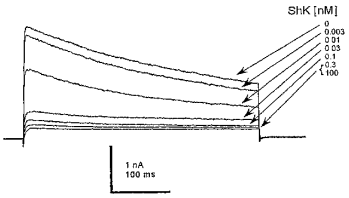
【図３０Ｂ】

FIG. 30B



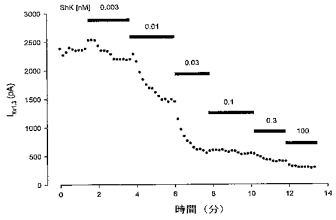
【図３０Ｃ】

FIG. 30C



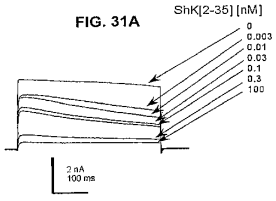
【図３０Ｄ】

FIG. 30D



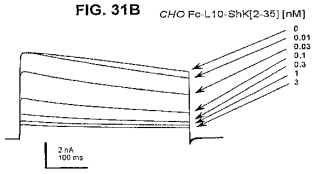
【図３１Ａ】

FIG. 31A



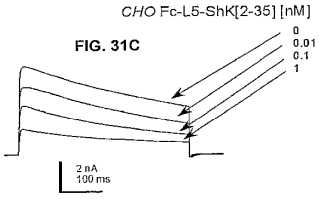
【図３１Ｂ】

FIG. 31B



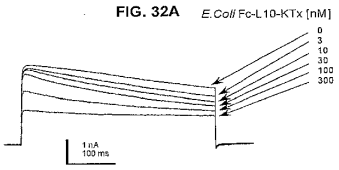
【図３１Ｃ】

FIG. 31C



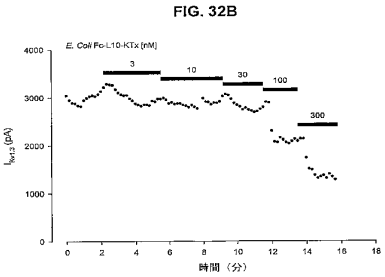
【図３２Ａ】

FIG. 32A



【図３２Ｂ】

FIG. 32B



【図３３Ａ】

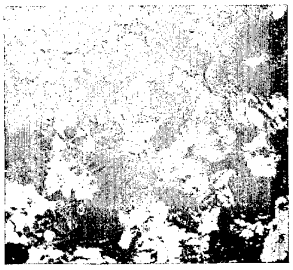
FIG. 33A



HEK 293 非形質移入細胞

【図３３Ｂ】

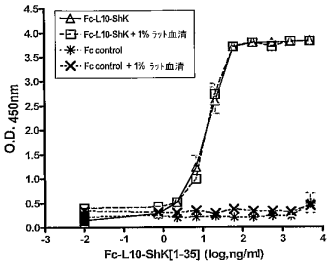
FIG. 33B



HEK 293/hKv1.3 形質移入細胞

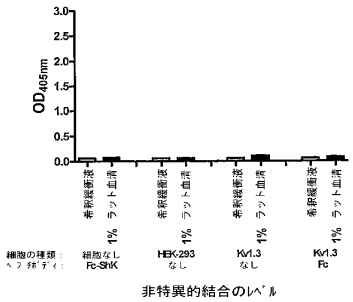
【図３４Ａ】

FIG. 34A



【図３４Ｂ】

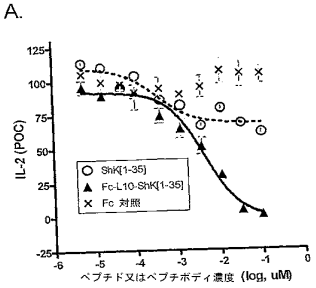
FIG. 34B



非特異的結合のレベル

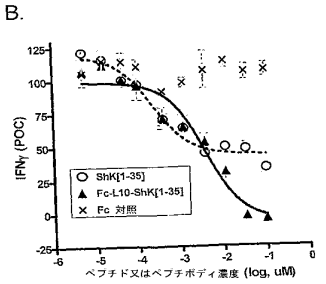
【図３５Ａ】

FIG. 35A



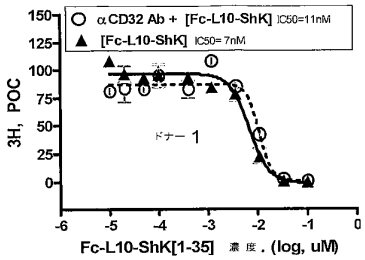
【図３５Ｂ】

FIG. 35B



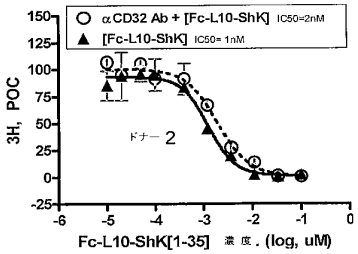
【図３６Ａ】

FIG. 36A



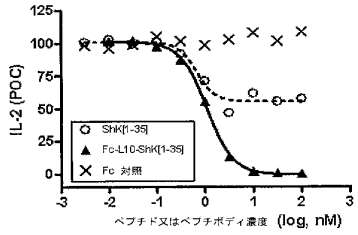
【図３６Ｂ】

FIG. 36B



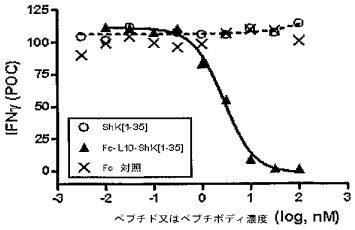
【図３７Ａ】

FIG. 37A



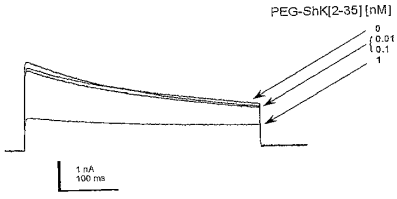
【図３７Ｂ】

FIG. 37B



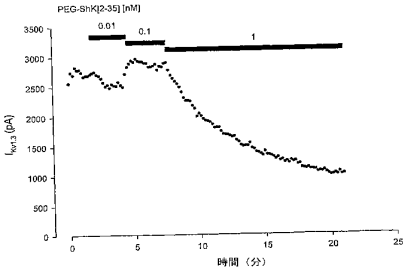
【図３８Ａ】

FIG. 38A



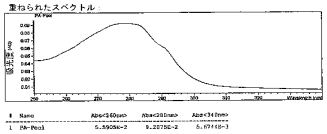
【図３８Ｂ】

FIG. 38B



【図３９Ａ】

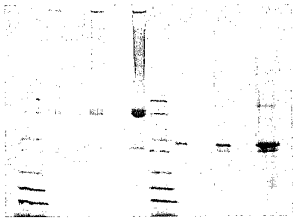
Figure 39A



OnCusp
Ex. 1002

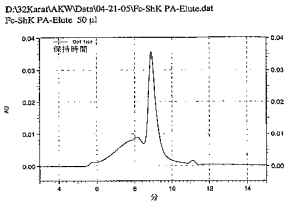
【図３９Ｂ】

Figure 39B



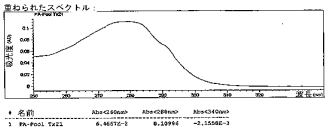
【図３９Ｃ】

Figure 39C



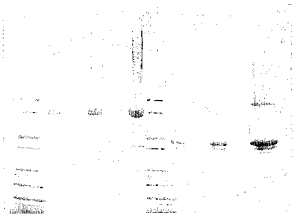
【図４０Ａ】

Figure 40A



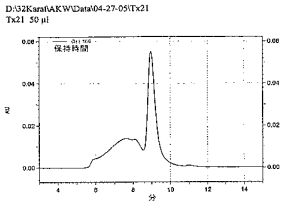
【図４０Ｂ】

Figure 40B



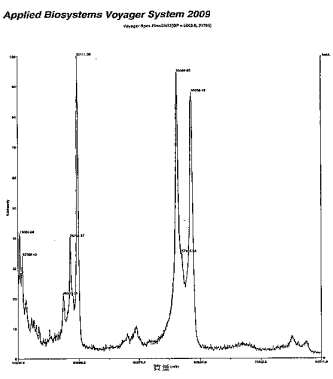
【図４０Ｃ】

Figure 40C



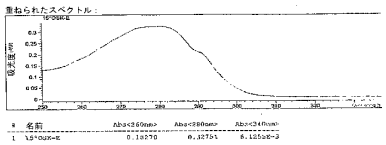
【図４０Ｄ】

Figure 40D



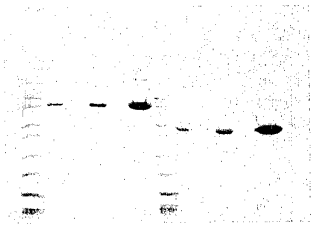
【図４１Ａ】

Figure 41A



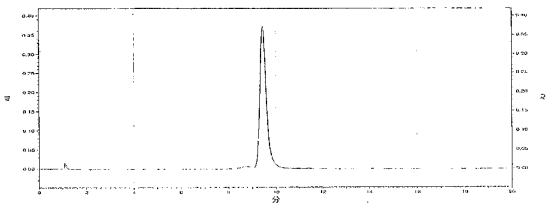
【図４１Ｂ】

Figure 41B



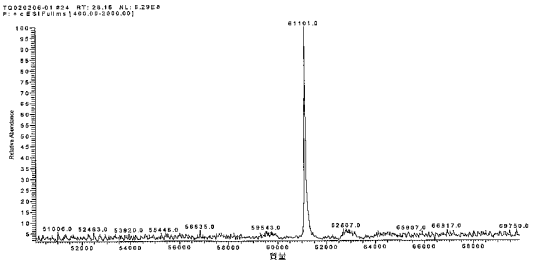
【図４１Ｃ】

Figure 41C



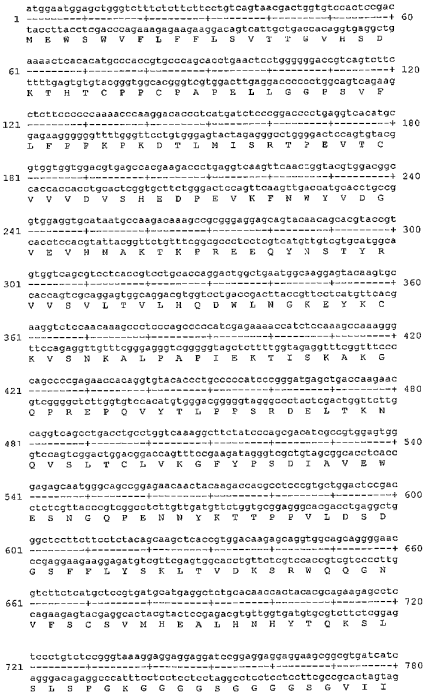
【図４１Ｄ】

Figure 41D



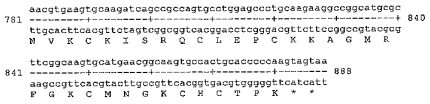
【図４２Ａ】

Fig. 42A



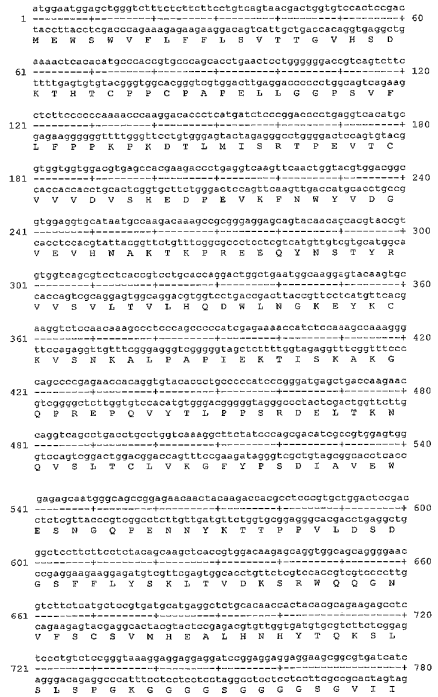
【図４２Ｂ】

Fig. 42B



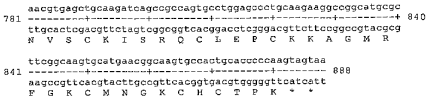
【図４３Ａ】

Fig. 43A



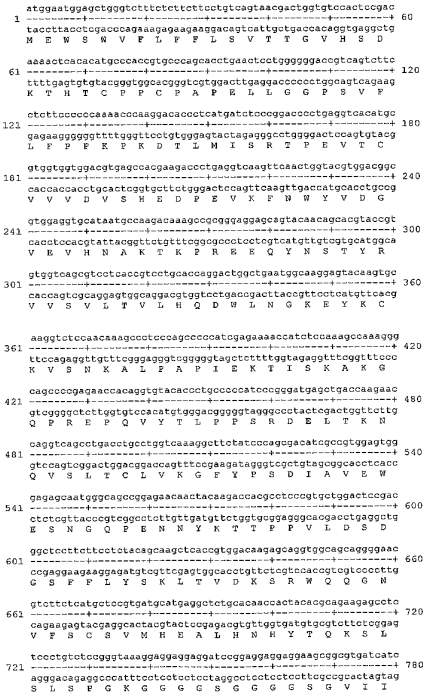
【図４３Ｂ】

Fig. 43B



【図４４Ａ】

Fig. 44A



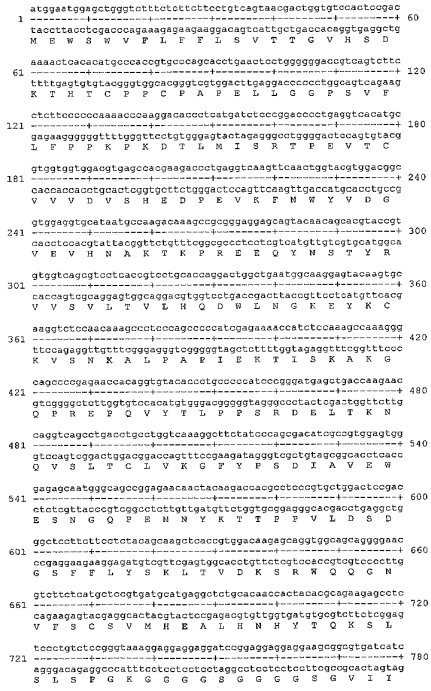
【図４４Ｂ】

Fig. 44B



【図４５Ａ】

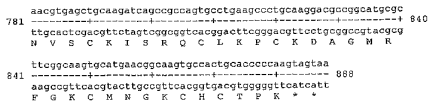
Fig. 45A



OnCusp
Ex. 1002

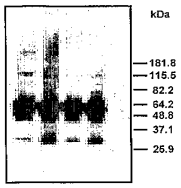
【図４５Ｂ】

Fig. 45B



【図４６】

Fig. 46



【図４７】

Fig. 47



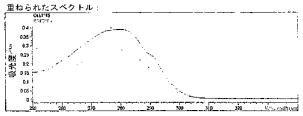
【図４８】

Fig. 48



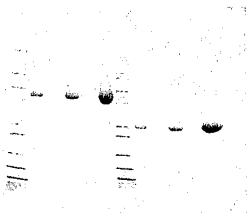
【図４９Ａ】

Figure 49A



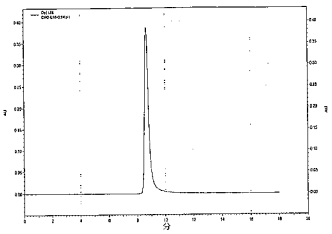
【図４９Ｂ】

Figure 49B



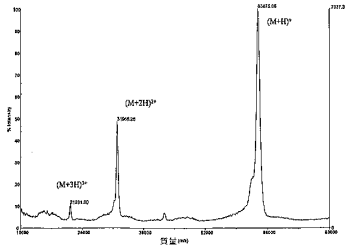
【図４９Ｃ】

Figure 49C



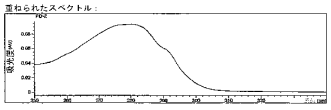
【図４９Ｄ】

Figure 49D



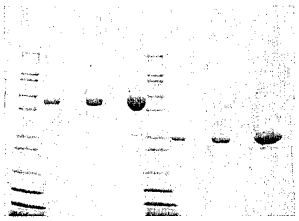
【図５０Ａ】

Figure 50A



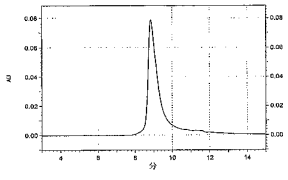
【図５０Ｂ】

Figure 50B



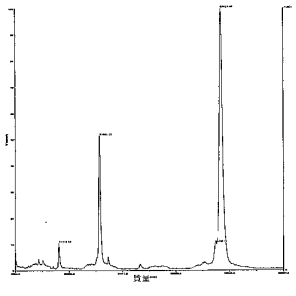
【図５０Ｃ】

Figure 50C



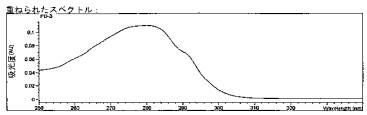
【図５０Ｄ】

Figure 50D



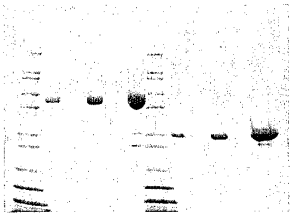
【図５１Ａ】

Figure 51A



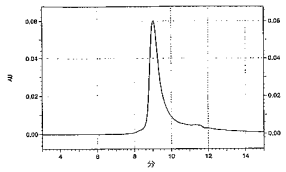
【図５１Ｂ】

Figure 51B



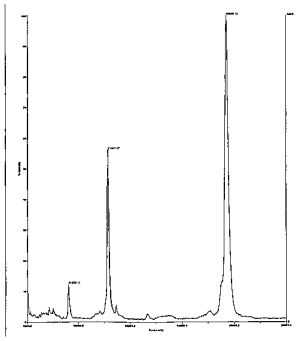
【図５１Ｃ】

Figure 51C



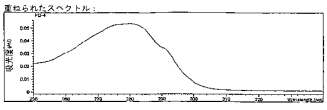
【図５１Ｄ】

Figure 51D



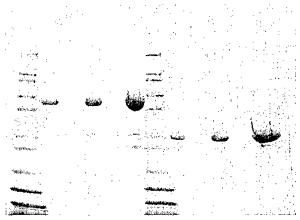
【図５２Ａ】

Figure 52A



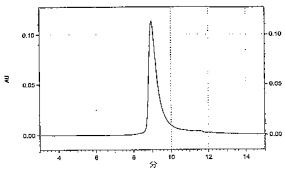
【図５２Ｂ】

Figure 52B



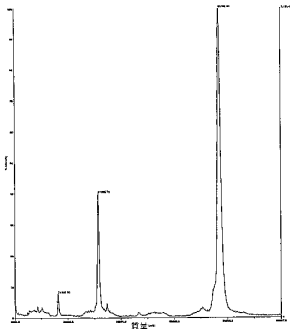
【図５２Ｃ】

Figure 52C



【図５２Ｄ】

Figure 52D



【図５３Ａ】

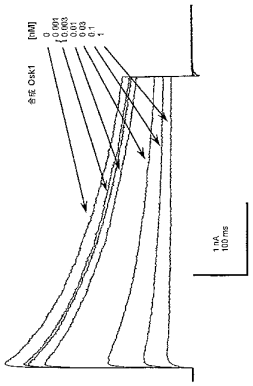


Fig. 53A

【図５３Ｂ】

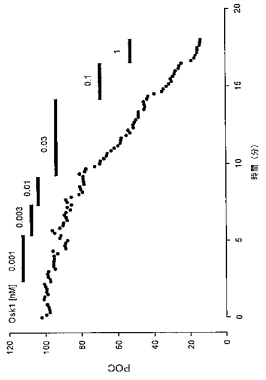


Fig. 53B

【図５４Ａ】

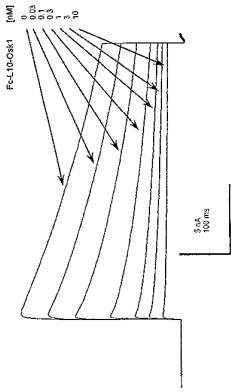


Fig. 54A

【図５４Ｂ】

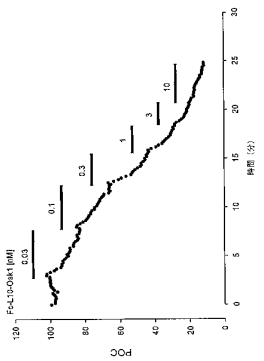


Fig. 54B

【図５５Ａ】

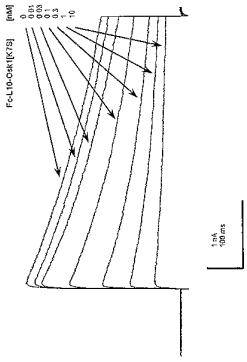


Fig. 55A

【図５５Ｂ】

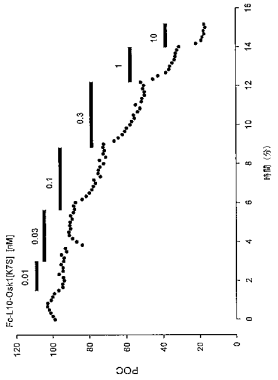


Fig. 55B

【図５６Ａ】

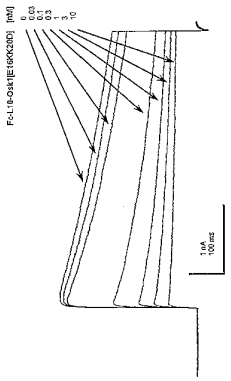


Fig. 56A

【図５６Ｂ】

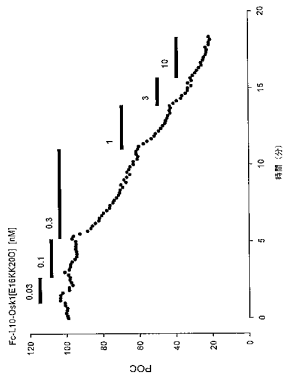


Fig. 56B

【図５７Ａ】

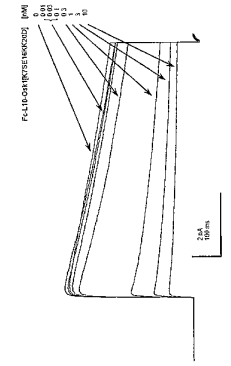


Fig. 57A

【図５７Ｂ】

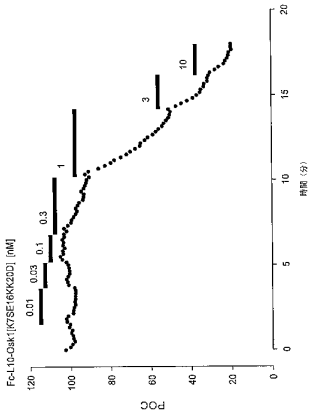
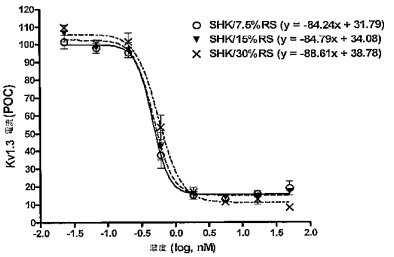


Fig. 57B

【図５８Ａ】

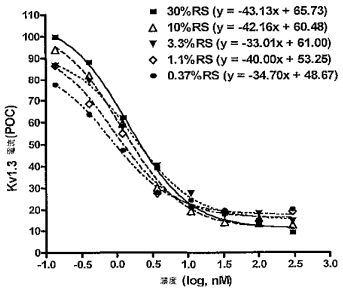
Fig. 58A



OnCusp
Ex. 1002

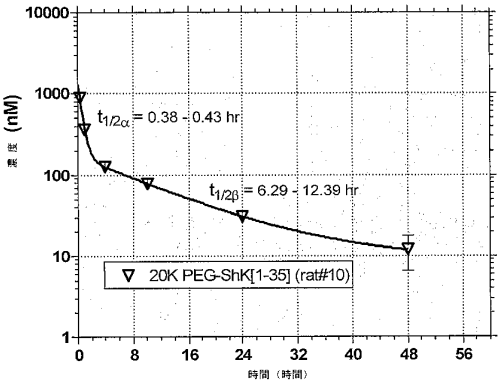
【図５８Ｂ】

Fig. 58B



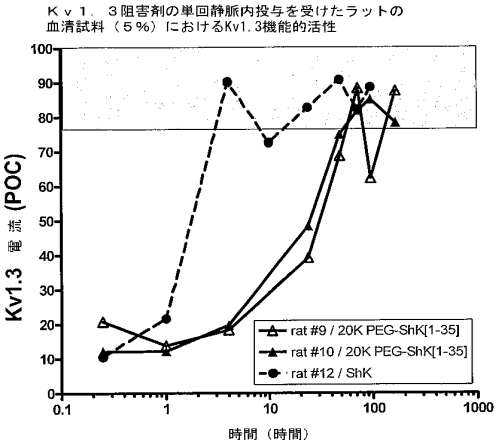
【図５９】

Fig. 59



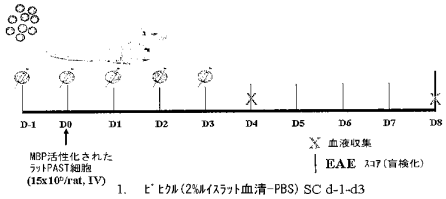
【図６０】

Fig. 60



【図６１】

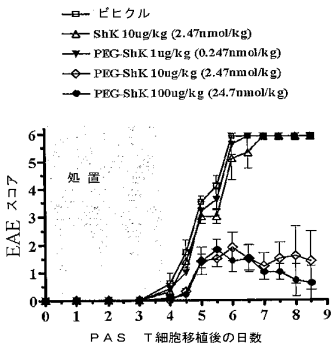
FIG. 61



1. ﾋﾞﾋｸﾙ(2%ﾙｲｽﾗｯﾄ血清-PBS) SC d-1-d3
2. ShK 10μg/kg (2.47nmoles/kg) SC d-1-d3
3. PEG-ShK 1μg/kg (0.247nmole/kg) SC d-1-d3
4. PEG-ShK 10μg/kg (2.47nmoles/kg) SC d-1-d3
5. PEG-ShK 100μg/kg (24.7nmoles/kg) SC d-1-d3

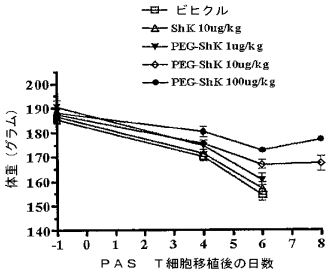
【図６２】

FIG. 62



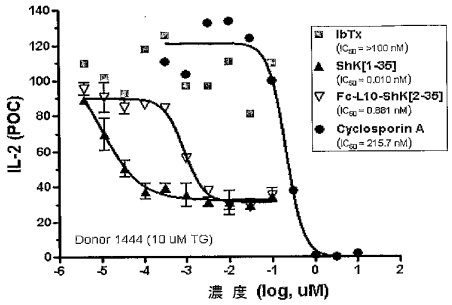
【図６３】

FIG. 63



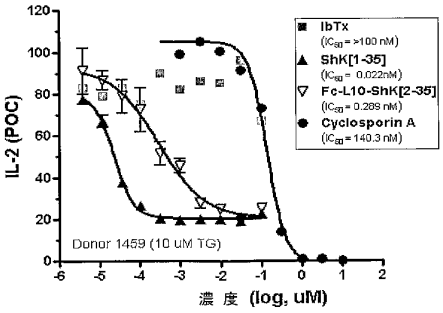
【図６４Ａ】

Fig. 64A



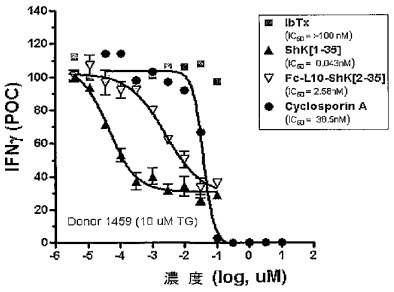
【図６４Ｂ】

Fig. 64B



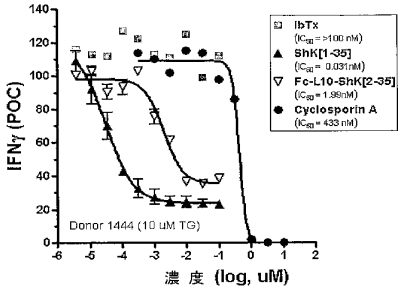
【図６５Ｂ】

Fig. 65B



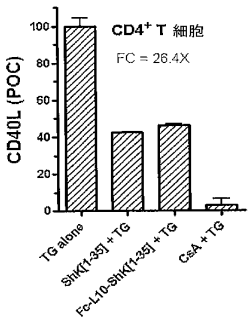
【図６５Ａ】

Fig. 65A



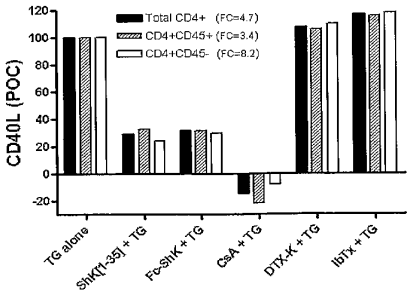
【図６６Ａ】

Fig. 66A



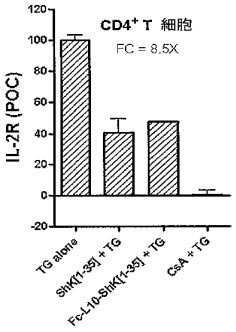
【図６６Ｂ】

Fig. 66B



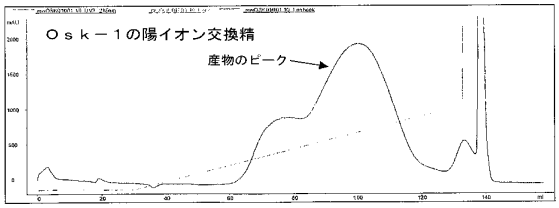
【図６７Ａ】

Fig. 67A



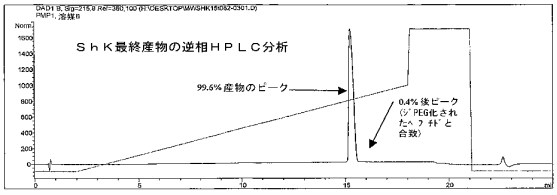
【図６８Ｂ】

FIG. 68B



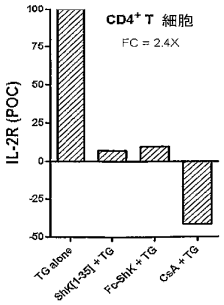
【図６９Ａ】

FIG. 69A



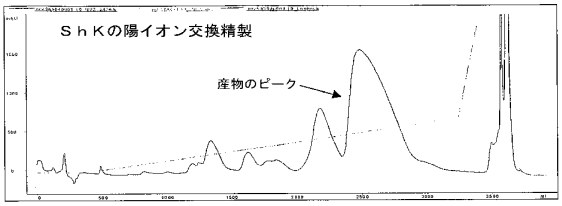
【図７７Ｂ】

Fig. 67B



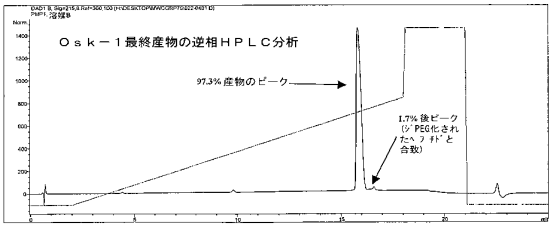
【図６８Ａ】

FIG. 68A



【図６９Ｂ】

FIG. 69B



【図７０】

FIG. 70

```
1   mdkthtcppc papellggps vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe
51  dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst yrvvsvltvl hqdwlngkey
101 kckvsnkalp apiektiska kgqprepqvy tlppsrdelg qqviinvkck
151 isrqclepck kaqmrfgkcm ngkchctpkg qtknqvsltc lvkgfypsdi
201 avewesngqp ennykttppv ldsdgsffly skltvdksrw qqgnvfscsv
251 mhealhnhyt qkslslspgk
```

【図７１】

FIG. 71

```
1   mdkthtcppc papellggps vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe
51  dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst yrvvsvltvl hqdwlngkey
101 kckvsnkalp apiektiska kgqprepqvy tlppsrdelg qrscidtipk
151 srctafqckh smkyrlsfcr ktcgtcggtk nqvsltclvk gfypsdiave
201 wesngqpenn ykttppvlds dgsfflyskl tvdksrwqqg nvfscsvmhe
251 alhnhytqks lslspgk
```

【図７２】

FIG. 72

```
1   mdkthtcppc papellggps vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe
51  dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst yrvvsvltvl hqdwlngkey
101 kckvsnkalp apiektiska kgqprepqvy tlppsrdelg grscidtipk
151 srctafqckh smkyrlsfcr ktcgtcgggg tknqvsltcl vkgfypsdia
201 vewesngqpe nnykttppvl dsdgsfflys kltvdksrwq qgnvfscsvm
251 healhnhytq kslslspgk
```

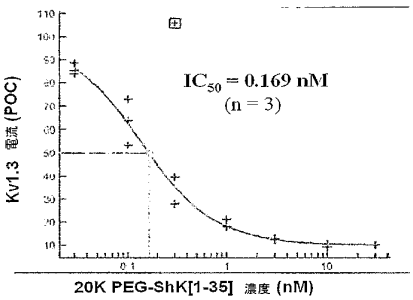
【図７３】

FIG. 73

```
1   mdkthtcppc papellggps vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe
51  dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst yrvvsvltvl hqdwlngkey
101 kckvsnkalp apiektiska kgqprepqvy tlppsrdelg qgggviinvk
151 ckisrgclep ckkagmrfgk cmngkchctp kggtknqvsl tclvkgfyps
201 diavewesng qpennykttp pvldsdgsff lyskltvdks rwqqgnvfsc
251 svmhealhnh ytqkslslsp gk
```

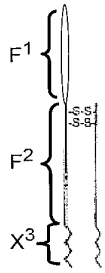
【図７４】

FIG. 74



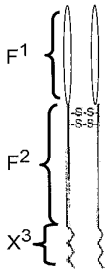
【図７５Ａ】

FIG. 75A



【図７５Ｂ】

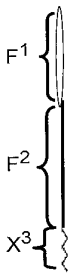
FIG. 75B



OnCusp
Ex. 1002

【図７５Ｃ】

FIG. 75C



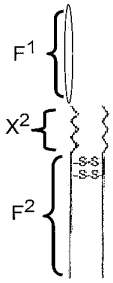
【図７５Ｄ】

FIG. 75D



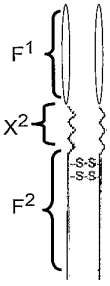
【図７５Ｅ】

FIG. 75E



【図７５Ｆ】

FIG. 75F



【図７５Ｇ】

FIG. 75G



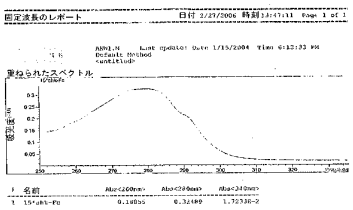
【図７５Ｈ】

FIG. 75H



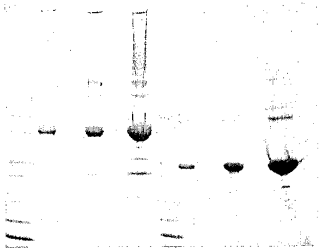
【図７６Ａ】

FIG. 76A



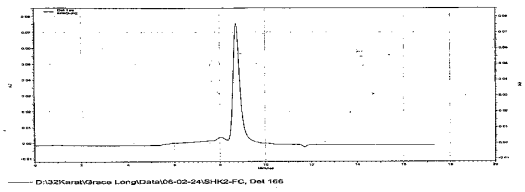
【図７６Ｂ】

FIG. 76B



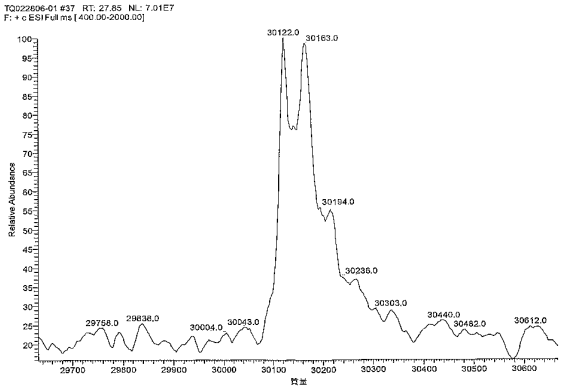
【図７６Ｃ】

FIG. 76C



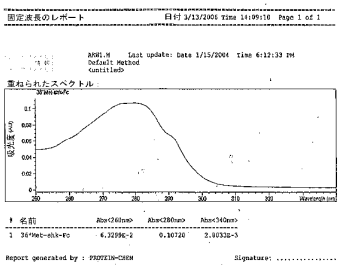
【図７６Ｄ】

FIG. 76D



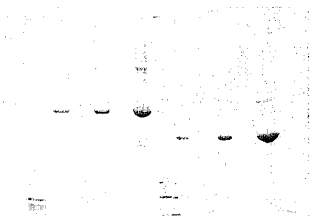
【図７７Ａ】

FIG. 77A



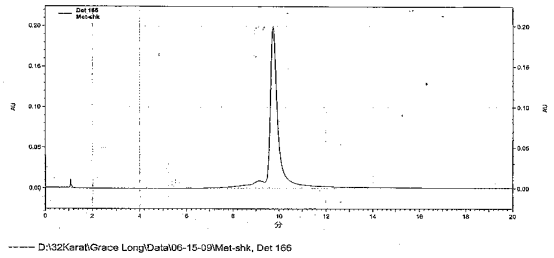
【図７７Ｂ】

FIG. 77B



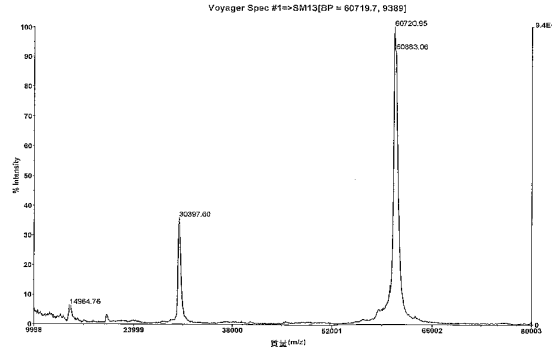
【図７７Ｃ】

FIG. 77C



【図７７Ｄ】

FIG. 77D



【配列表】
2012100671000001. app
【手続補正書】
【提出日】平成24年1月17日(2012. 1. 17)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本願は、２００５年４月２２日に出願された米国仮特許出願６０／６７２，３４２号の利益を主張する２００６年４月１７日に出願された米国非仮特許出願（出願番号未定）の利益を主張し、両出願は、参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
本願は、２００６年４月１７日に作製されたＡ－１００６．ＳＴ２５．ｔｘｔというファイル名によって特定され、ファイルサイズが７４４ＫＢであるコンパクトディスク上に含有される全ての主題を、参照により組み込む。
【０００３】
本願を通じて、様々な公報が括弧内に引用される。本発明が属する分野の技術水準をより完全に記載するために、これらの公報の開示内容全体が、参照により、本願に組み込まれる。
【背景技術】
【０００４】
１．発明の分野
本発明は、生物化学の分野に関し、具体的には、治療用ペプチド及び抱合体に関する。
【０００５】
２．関連技術分野の考察
イオンチャンネルは、膜を横切って、小さな無機イオンの交換を可能とする分子の多様な群である。全ての細胞は、機能のためにイオンチャンネルを必要とするが、神経系及び心臓中に存在する興奮性細胞などの興奮性細胞については、特にこのことが当てはまる。イオンチャンネルにより調整された電気信号は、考える脳、拍動する心臓及び収縮する筋肉を調節する。イオンチャンネルは、細胞容積を制御する役割を果たし、多様なシグナル伝達プロセスを調節する。
【０００６】
イオンチャンネルファミリーには、Na^+、K^+及びCa^{2+}陽イオン並びにCl^-陰イオンチャンネルが含まれる。総称すると、イオンチャンネルは、リガンド開口型又は電圧開口型の何れかとして区別される。リガンド開口型チャンネルには、細胞外及び細胞内リガンド開口型チャンネルの両方が含まれる。細胞外リガンド開口型チャンネルには、ニコチン性アセチルコリン受容体（ｎＡＣｈＲ）、セロトニン（５－ヒドロキシトリプタミン、５－ＨＴ）受容体、グリシン及びγ酪酸受容体（ＧＡＢＡ）並びにカイニン酸、α－アミノ－３－ヒドロキシ－５－メチル－４－イソオキサゾールプロピオン酸（ＡＭＰＡ）及びＮ－メチル－Ｄ－アスパラギン酸受容体（ＮＭＤＡ）受容体を含むグルタミン酸活性化チャンネルが含まれる（Ｈａｒｔｅ ａｎｄ Ｏｕｚｏｕｎｉｓ（２００２），ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．５１４：１２９－３４）。細胞内リガンド開口型チャンネルには、環状ヌクレオチド（例えば、ｃＡＭＰ、ｃＧＭＰ）、Ca^{2+}及びＧタンパク質によって活性化されるものが含まれる。（Ｈａｒｔｅ ａｎｄ Ｏｕｚｏｕｎｉｓ（２００２），ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．５１４：１２９－３４）。電圧開口型イオンチャンネルは、ナトリウム、カリウム、カルシウム及び塩化物イオンチャンネルを含む無機イオン種に対するそれらの

選択性によって分類される。（Harte and Ouzounis（２００２），FEBS Lett．５１４：１２９-３４）。

【０００７】

電圧開口型イオンチャンネルの分類に対する統一された命名法が、最近発表された。（Catterall et al.，（２０００），Pharmacol．Rev．５５：５７３-４；Gutman et al.，（２０００），Pharmacol．Rev．５５，５８３-６；Catterall et al.，（２０００）Pharmacol．Rev．５５：５７９-８１；Catterall et al.，（２０００），Pharmacol．Rev．５５：５７５-８；Hofmann et al.，（２０００），Pharmacol．Rev．５５：５８７-９；Clapham et al.，（２０００），Pharmacol Rev．５５：５９１-６；Chandy（１９９１），Nature ３５２：２６；Goldin et al.，（２０００），Neuron ２８：３６５-８；Ertel et al.，（２０００），Neuron ２５：５３３-５）。

【０００８】

K^+チャンネルが、これまでに記載されているイオンチャンネルの最も大きく且つ最も性質決定が行われたファミリーを構成する。カリウムチャンネルは、６回膜貫通（６ＴＭ）K^+チャンネル、２ＴＭ-２ＴＭ／漏洩K^+チャンネル及び２ＴＭ／Ｋｉｒ内向き整流性チャンネルという３つの一般的な群に、細分される。（Tang et al.，（２００４），Ann．Rev．Physiol．６６，１３１-１５９）。これらの３つの群は、配列の類似性に基づいたファミリーへと、さらに細分される。（Ｋｖ１-６、Ｋｖ８-９）、ＥＡＧ、ＫＱＴ及びＳｌｏ（ＢＫＣａ）を含む電圧開口型K^+チャンネルは、６ＴＭ群のファミリーメンバーである。２ＴＭ-２ＴＭ群はＴＷＩＫ、ＴＲＥＫ、ＴＡＳＫ、ＴＲＡＡＫ及びＴＨＩＫを含むのに対して、２ＴＭ／Ｋｉｒ群はＫｉｒ１-７からなる。イオンチャンネルのさらなる２つのクラスには、内向き整流性カリウム（ＩＲＫ）及びＡＴＰ開口型プリン作動性（Ｐ２Ｘ）チャンネルが含まれる。（Harte and Ouzounis（２００２），FEBS Lett．５１４：１２９-３４）。

【０００９】

様々な生物によって産生されるトキシンペプチドは、イオンチャンネルを標的とするように進化してきた。ヘビ、サソリ、クモ、ハチ、カタツムリ及びイソギンチャクは、イオンチャンネル及び受容体を強力且つ選択的に標的とする小さな生物活性トキシンペプチド又は「トキシン」の豊富な源としての役割を果たすことができる毒を産生する生物の数例である。多くの事例では、これらのトキシンペプチドは、チャンネルの孔に結合し、イオン伝導経路を物理的に遮断することによって、イオンチャンネルの強力なアンタゴニスト又は阻害剤として進化してきた。他の幾つかの事例では、タランチュラのトキシンペプチドの幾つかのように、ペプチドは、孔の外側領域（例えば、電圧センサードメイン）に結合することによってチャンネル機能を拮抗することが見出されている。

【００１０】

トキシンペプチドは、通常、約２０アミノ酸長と約８０アミノ酸長との間であり、２~５個のジスルフィド結合を含有し、極めてコンパクトな構造を形成する（例えば、図１０参照）。（例えば、サソリ、イソギンチャク及びイモ貝から）トキシンペプチドが単離され、イオンチャンネルに対するそれらの影響が特徴付けられている。このようなペプチドは、効力及び安定性の重大な問題に対処するために特にきわめて適している構造的骨格の相対的に少数から進化してきたように見受けられる。サソリ及びイモガイのトキシンペプチドの多くは、例えば、１０~４０個のアミノ酸及び最大５個のジスルフィド結合を含有し、しばしばタンパク分解を受けない極めてコンパクトで、固定された構造（ミクロタンパク質）を形成する。コノトキシン及びサソリトキシンペプチドは、それらのジスルフィド結合及びペプチドの折り畳みに基づいて、多数のスーパーファミリーに分類することが可能である。これらの多くの溶液構造がＮＭＲ分光法によって決定されており、それらのコンパクトな構造を示し、それらのファミリー折り畳みの保存を確認している。（例えば

、Tudor et al.,Ionisation behaviour and solution properties of the potassium-channel blocker ShK toxin,Eur.J.Biochem.251(1-2):133-41(1998);Pennington et al.,Role of disulfide bonds in the structure and potassium channel blocking activity of ShK toxin,Biochem.38(44):14549-58(1999);Jaravine et al.,Three-dimensional structure of toxin OSK1 from Orthochirus scrobiculosus scorpion venom,Biochem.36(6):1223-32(1997);del Rio-Portillo et al.,;NMR solution structure of Cn12,a novel peptide from the Mexican scorpion Centruroides noxius with a typical beta-toxin sequence but with alpha-like physiological activity,Eur.J.Biochem.271(12):2504-16(2004);Prochnicka-Chalufour et al.,Solution structure of discrepin,a new K^+-channel blocking peptide from the alpha-KTx15 subfamily,Biochem.45(6):1795-1804(2006))。

【0011】

保存されたジスルフィド構造は、トキシンファミリーのそれぞれの薬理学的活性も反映し得る。(Nicke et al.,(2004),Eur.J.Biochem.271:2305-19,Table 1;Adams(1999),Drug Develop.Res.46:219-34)。例えば、α-コノトキシンは、明瞭に確定された4システイン/2ジスルフィドループ構造を有し(Loughnan,2004)、ニコチン性アセチルコリン受容体を阻害する。これに対して、ω-コノトキシンは、6システイン/3ジスルフィドループコンセンサス構造を有し(Nielsen,2000)、カルシウムチャンネルを遮断する。トキシンの構造的サブセットは、電圧開口型又はカルシウム活性型カリウムチャンネルを阻害するように進化してきた。図9は、ミツバチからカタツムリ及びサソリからヘビに至る、様々な有毒動物によって共有される保存されたジスルフィド構造の限られた数が、イオンチャンネルを標的とすることを示している。図7A-Bは、α-サソリトキシンファミリーの並列を示しており、及び広範なカリウムチャンネルを標的とするトキシンを得るために保存された構造的骨格が使用されていることを図示している。

【0012】

特異的イオンチャンネルの強力且つ選択的な遮断のために、トキシンペプチドは、イオンチャンネルの薬理学を調べるためのツールとして、長年にわたって使用されてきた。心臓、筋肉及び脳内に存在するような興奮性細胞及び組織以外では、イオンチャンネルは、免疫細胞などの非興奮性細胞に対しても重要である。従って、Kv1.3及びIKCa1などのカリウムチャンネルは、リンパ球内のカルシウムシグナル伝達経路を間接的に調節するので、とりわけ、これらのチャンネルの阻害による様々な免疫疾患の治療について、トキシンペプチドの潜在的な治療的有用性が検討されてきた[例えば、Kern et al.,ShK toxin compositions and methods of use,米国特許第6,077,680号;Lebrun et al.,Neuropeptides originating in scorpion,米国特許第6,689,749号;Beeton et al.,Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channnels for therapy of autoimmune diseases,Molec.Pharmac

ol.67(4):1369-81(2005);Mouhat et al.,K+ channel types targeted by synthetic OSK1, a toxin from Orthochirus scrobiculosus scorpion venom,Biochem.J.385:95-104(2005);Mouhat et al.,Pharmacological profiling of Orthochirus scrobiculosus toxin 1 analogs with a trimmed N-terminal domain,Molec.Pharmacol.69:354-62(2006);Mouhat et al,OsK1 derivatives,WO 2006/002850 A2;B.S.Jensen et al.,The Ca2+-activated K+ Channel of Intermediate Conductance:A Molecular Target for Novel Treatments?,Current Drug Targets 2:401-422(2001);Rauer et al.,Structure-guided Transformation of Charybdotoxin Yields an Analog That Selectively Targets Ca2+-activated over Voltage-gated K+ Channels,J.Biol.Chem.275:1201-1208(2000);Castle et al.,Maurotoxin:A Potent Inhibitor of Intermediate Conductance Ca2+-Activated Potassium Channels,Molecular Pharmacol.63:409-418(2003);Chandy et al,K+ channels as targets for specific Immunomodulation,Trends in Pharmacol.Sciences 25:280-289(2004);Lewis & Garcia,Therapeutic Potential of Venom Peptides,Nat.Rev.Drug Discov.2:790-802(2003)]。

【0013】

免疫疾患を治療するために、T細胞中のKv1.3及びIKCa1カリウムチャンネル及び主要なカルシウム流入チャンネルの小分子阻害剤であるCRACも開発されているが[A.Schmitz et al.,(2005) Molecul.Pharmacol.68,1254;K.G.Chandy et al.,(2004) TIPS 25,280;H.Wulff et al.,(2001) J.Biol.Chem.276,32040;C.Zitt et al.,(2004) J.Biol.Chem.279,12427]、これらの標的の幾つかに対して選択性を有する小分子を得ることは困難である。

【0014】

リンパ球におけるカルシウム動員は、炎症性応答の活性化において不可欠な経路であることが知られている[M.W.Winslow et al.,(2003) Current Opinion Immunol.15,299]。他の細胞に比べて、T細胞は、細胞内カルシウム及びイオンチャンネルの増加したレベル(何れも、直接的及び間接的にこのプロセスを調節する。)に対して特有の感受性を示す。イノシトール三リン酸(IP3)は、カルシウムシグナル伝達経路を活性化する天然のセカンドメッセンジャーである。IP3は、T細胞受容体(TCR)のリガンド誘導性活性化後に産生され、その細胞内受容体(チャンネル)に結合すると、細胞内カルシウム貯蔵の放出を引き起こす。小胞体は、1つの中心的なカルシウム貯蔵を提供する。筋肉小胞体-小胞体カルシウムATPアーゼ(SERCA)の阻害剤であるタプシンガルギンも、細胞内貯蔵の放出及びリンパ球におけるカルシウムシグナル伝達経路の活性化を引き起こす。従って、タプシガルギンは、T細胞におけるカルシウムシグナル伝達経路の特異的な刺激として使用することが可能である。T細胞中の細胞内カルシウム貯蔵の放出は細胞表面上のカルシウムチャンネ

ルの活性化を引き起こすことが知られており、これは細胞外からのカルシウムの流入を引き起こす。Ｔ細胞上のこの細胞内容量依存性カルシウムチャンネル（ＳＯＣＣ；ｓｔｏｒｅ ｏｐｅｒａｔｅｄ ｃａｌｃｉｕｍ ｃｈａｎｎｅｌ）は、「ＣＲＡＣ」（カルシウム放出活性化チャンネル（ｃａｌｃｉｕｍ ｒｅｌｅａｓｅ ａｃｔｉｖａｔｅｄ ｃｈａｎｎｅｌ））と称され、このチャンネルを通じたカルシウムの持続的流入は、完全なＴ細胞の活性化にとって不可欠であることが知られている［Ｓ．Ｆｅｓｋｅ ｅｔ ａｌ．，（２００５） Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．２０２，６５１ ａｎｄ Ｎ．Ｖｅｎｋａｔｅｓｈ ｅｔ ａｌ．，（２００４） ＰＮＡＳ １０１，８９６９］。長年にわたって、Ｔ細胞内への継続的なカルシウム流入を維持するためには、細胞膜は、カリウムイオンの流出を通じた過分極した状態を保たなければならないと理解されてきた。Ｔ細胞では、電圧開口型カリウムチャンネルＫｖ１．３及びカルシウム活性化カリウムＩＫＣａ１によって、カリウム流出が達成される［Ｋ．Ｇ．Ｃｈａｎｄｙ ｅｔ ａｌ．，（２００４） ＴＩＰＳ ２５，２８０］。これらのカリウムチャンネルは、従って、ＣＲＡＣを通じたカルシウムの持続的流入を可能とする必要なカリウム流出を可能とすることによって、カルシウムシグナル伝達経路を間接的に調節する。細胞内カルシウムの持続的な増加は、ＮＦＡＴ、ＮＦ-κＢ及びＡＰ-１の活性化をもたらす経路を含む、Ｔ細胞中の様々な経路を活性化する［Ｑｕｉｎｔａｎａ-Ａ（２００５） Ｐｆｌｕｇｅｒｓ Ａｒｃｈ．-Ｅｕｒ．Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．４５０，１］。これらの現象は、細胞サイズ及び膜の構成の変化、細胞表面エフェクター分子の活性化、サイトカイン産生及び増殖など、様々なＴ細胞応答をもたらす。幾つかのカルシウム感知分子は、カルシウムシグナルを伝達し、細胞応答を協調させる。カルモジュリンはカルシウムを結合する１つの分子であるが、他の多くが同定されている（Ｍ．Ｊ．Ｂｅｒｒｉｄｇｅ ｅｔ ａｌ．，（２００３） Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．４，５１７）。カルシウム-カルモジュリン依存性ホスファターゼであるカルシニューリンは、細胞内カルシウムが持続的に増加されると活性化され、細胞質ＮＦＡＴを脱リン酸化する。脱リン酸化されたＮＦＡＴは、素早く、核に移動し、Ｔ細胞活性化のための重要な転写因子として広く受け入れられている（Ｆ．Ｍａｃｉａｎ（２００５） Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．５，４７２ ａｎｄ Ｎ．Ｖｅｎｋａｔｅｓｈ ｅｔ ａｌ．，（２００４） ＰＮＡＳ １０１，８９６９）。シクロスポリンＡ（Ｎｅｏｒａｌ，Ｓａｎｄｉｍｍｕｎｅ）及びＦＫ５０６（Ｔａｃｒｏｌｉｍｕｓ）などのカルシニューリンの阻害剤は、固形臓器移植後に拒絶をもたらすものなど、重度免疫疾患の治療のための主な支柱のような存在である（Ｉ．Ｍ．Ｇｏｎｚａｌｅｚ-Ｐｉｎｔｏ ｅｔ ａｌ．（２００５） Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．Ｐｒｏｃ．３７，１７１３ ａｎｄ Ｄ．Ｒ．Ｊ．Ｋｕｙｐｅｒｓ（２００５） Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ １８，１４０）。臓器移植、重度関節リウマチ（Ｄ．Ｅ．Ｙｏｃｕｍ ｅｔ ａｌ．，（２０００） Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ３９，１５６）及び重度乾癬（Ｊ．Ｋｏｏ（１９９８） Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｊ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．１３９，８８）の治療について、ネオーラルが承認を受けている。前臨床及び臨床データも提供されており、カルシニューリン阻害剤は、炎症性腸疾患（ＩＢＤ；Ｂａｕｍｇａｒｔ ＤＣ（２００６） Ａｍ．Ｊ．Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．Ｍａｒ ３０；Ｅｐｕｂ出版前）、多発性硬化症（Ａｎｎ．Ｎｅｕｒｏｌ．（１９９０） ２７，５９１）及び喘息（Ｓ．Ｒｏｈａｔａｇｉ ｅｔ ａｌ．，（２０００） Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４０，１２１１）の治療において有用であり得ることを示唆している。狼瘡は、ヘルパーＴ細胞の活性化を遮断する因子が有用であり得る別の疾患である。Ｔ細胞中のＮＦＡＴを制御する上でのカルシニューリンの重要性に関わらず、カルシニューリンは、他の組織（例えば、腎臓）中にも発現されており、シクロスポリンＡ及びＦＫ５０６は、毒性を基礎とする機序のために、狭い安全域を有する。腎毒性及び高血圧が、シクロスポリン及びＦＫ５０６の有望性を限定してきた共通の副作用である。毒性に関する懸念のために、カルシニューリン阻害剤は、重度免疫疾患のみを治療するために多く使用されている（Ｂｉｓｓｏｎｎｅｔｔｅ-Ｒ ｅｔ ａｌ．，（２００６） Ｊ．Ａｍ．Ａｃａｄ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．５４，４７２）。Ｋｖ１．３阻害剤は、免疫疾患の治療のための、より安全なカ

ルシニューリン阻害剤代替物である。これは、Ｋｖ１．３はＴ細胞中のカルシウムシグナル伝達経路を調節するが、カルシニューリン阻害剤とは異なる機序を通じて調節するようにも作用するからであり、Ｋｖ１．３の発現及び機能に関する証拠は、様々な非リンパ系細胞及び組織中でも機能するカルシニューリンに比べて、Ｋｖ１．３が、Ｔ細胞生物学において、より限定された役割を有することを示している。

【００１５】

免疫細胞中でのカルシウム動員は、炎症の重要な媒介物質であるサイトカインインターロイキン２（ＩＬ－２）及びインターフェロンγ（ＩＦＮｇ）の産生も活性化する。ＩＬ－２は、ＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の増殖及び分化から、Ｂ細胞による増殖及び抗体分泌の増強、ＮＫ細胞の活性化に至るまで、様々な生物学的応答を誘導する［Ｓ．Ｌ．Ｇａｆｆｅｎ　＆　Ｋ．Ｄ．Ｌｉｕ（２００４）　Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　２８，１０９］。ＩＬ－２の分泌は、Ｔ細胞活性化後、基迅速に起こり、Ｔ細胞がこのサイトカインの主要な源となっている。活性化後すぐに、高親和性ＩＬ－２受容体（ＩＬ－２Ｒ）がＴ細胞上で上方制御され、ＩＬ－２に応答して増殖する能力をＴ細胞に付与する。Ｔ細胞、ＮＫ細胞、Ｂ細胞及び専門の抗原提示細胞（ＡＰＣ）は全て、活性化時にＩＦＮｇを分泌することが可能である。Ｔ細胞は、養子免疫応答を媒介する上で、ＩＦＮｇ産生の主要な源であるのに対して、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞及びＡＰＣは、感染に対する宿主防御に際する重要な源である可能性がある［Ｋ．Ｓｃｈｒｏｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，（２００４）　Ｊ．Ｌｅｕｋｏｃ．Ｂｉｏｌ．７５，１６３］。当初、マクロファージ活性化因子と称されたＩＦＮｇは、単球、マクロファージ及び樹状細胞による抗原加工及び提示を上方制御する。ＩＦＮｇは、増殖及び分化、ＮＫ細胞活性の増強及びＢ細胞免疫グロブリン産生の制御及びクラスのスイッチングなど、多くの細胞種において、多様な生物活性を媒介する［Ｕ．Ｂｏｅｈｍ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９７）　Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５，７４９］。

【００１６】

ＣＤ４０Ｌは、カルシウム動員後に、活性化されたＴ細胞上に発現される別のサイトカインであり、及びＢ細胞上のその受容体への結合時に、Ｂ細胞の胚中心の形成、Ｂ細胞の分化及び抗体イソタイプのスイッチングを可能とする重大な補助を与える。ＣＤ４０Ｌによって媒介される、Ｂ細胞上のＣＤ４０の活性化は、免疫グロブリン（Ｉｇ）産生Ｂ細胞の深い分化とクローン性増殖を誘導することが可能である［Ｓ．Ｑｕｅｚａｄａ　ｅｔ　ａｌ．，（２００４）　Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２２，３０７］。ＣＤ４０受容体は樹状細胞上にも見出すことが可能であり、ＣＤ４０Ｌシグナル伝達は、樹状細胞活性化及び分化も媒介することが可能である。Ｂ細胞及び樹状細胞の抗原提示能は、ＣＤ４０Ｌ結合によって促進され、養子免疫における本サイトカインの幅広い役割をさらに示している。Ｂ細胞生物学へのＣＤ４０シグナル伝達の不可欠な役割に鑑み、組織中への抗体複合体の沈着、炎症及び臓器の損傷を特徴とする疾患である全身性紅斑性狼瘡（ＳＬＥ）の治療における有用性について、前臨床及び臨床研究でＣＤ４０Ｌに対する中和抗体が調査されている［Ｊ．Ｙａｚｄａｎｙ　ａｎｄ　Ｊ　Ｄａｖｉｓ（２００４）　Ｌｕｐｕｓ　１３，３７７］。

【００１７】

トキシンペプチドの産生は、有毒生物における複雑なプロセスであり、合成においては、さらに複雑なプロセスである。トキシンペプチドの保存されたジスルフィド構造及び効率的な酸化的再折り畳みの必要性のため、トキシンペプチドは合成に対する困難な課題となっている。トキシンペプチドは、イオンチャンネルの高度に選択的な薬理学的阻害剤として、長年にわたって使用されてきたが、トキシンペプチドの合成の高い費用及び再折り畳み並びにインビボでのそれらの短い半減期は、これらのペプチドを治療法として実行する妨げとなってきた。トキシンペプチドそのものを与える努力より、さらにずっと大きな努力が、イオンチャンネルの治療的アンタゴニストとして小分子阻害剤を同定するために費やされてきた。１つの例外は、難治性疼痛の治療に対する、小ωコノトキシンＭＶＩＩＡペプチド（ジコノチド（ジコノチド^{TM}の最近の承認である。しかしながら、ジコノチ

ドTMの合成及び再折り畳み製造方法は、コストが高く、インビボでの半減期が極めて短い（約４時間）小ペプチド産物をもたらすに過ぎない。

【００１８】

イオンチャンネルの阻害剤など（但し、これに限定されない。）の治療剤を製造するための費用効果が高いプロセスは、本発明によって提供される必要物であり、これは、ビヒクルに融合され、又はその他ビヒクルに共有結合されたトキシンを含む。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１９】

【特許文献１】米国特許第６，０７７，６８０号明細書
【特許文献２】米国特許第６，６８９，７４９号明細書
【特許文献３】国際公開第２００６／００２８５０号

【非特許文献】

【００２０】

【非特許文献１】Harte and Ouzounis（２００２），FEBS Lett．５１４：１２９-３４
【非特許文献２】Catterall et al.，（２０００），Pharmacol．Rev．５５：５７３-４
【非特許文献３】Gutman et al.，（２０００），Pharmacol．Rev．５５，５８３-６
【非特許文献４】Catterall et al.，（２０００） Pharmacol．Rev．５５：５７９-８１
【非特許文献５】Catterall et al.，（２０００），Pharmacol．Rev．５５：５７５-８
【非特許文献６】Hofmann et al.，（２０００），Pharmacol．Rev．５５：５８７-９
【非特許文献７】Clapham et al.，（２０００），Pharmacol Rev．５５：５９１-６
【非特許文献８】Chandy（１９９１），Nature ３５２：２６
【非特許文献９】Goldin et al.，（２０００），Neuron ２８：３６５-８
【非特許文献１０】Ertel et al.，（２０００），Neuron ２５：５３３-５）
【非特許文献１１】Tang et al.，（２００４），Ann．Rev．Physiol．６６，１３１-１５９
【非特許文献１２】Tudor et al.，lonisation behaviour and solution properties of the potassium-channel blocker ShK toxin，Eur．J．Biochem．２５１（１-２）：１３３-４１（１９９８）
【非特許文献１３】Pennington et al.，Role of disulfide bonds in the structure and potassium channel blocking activity of ShK toxin，Biochem．３８（４４）：１４５４９-５８（１９９９）
【非特許文献１４】Jaravine et al.，Three-dimensional structure of toxin OSK１ from Orthochirus scrobiculosus scorpion venom，Biochem．３６（６）：１２２３-３２（１９９７）
【非特許文献１５】del Rio-Portillo et al.，；NMR solution structure of Cn１２，a novel peptide from the Mexican scorpion Centruroides

noxius with a typical beta-toxin sequence but with alpha-like physiological activity, Eur. J. Biochem. 271(12):2504-16(2004)
【非特許文献16】Prochnicka-Chalufour et al., Solution structure of discrepin, a new K+-channel blocking peptide from the alpha-KTx15 subfamily, Biochem. 45(6):1795-1804(2006)
【非特許文献17】Nicke et al., (2004), Eur. J. Biochem. 271 :2305-19
【非特許文献18】Adams(1999), Drug Develop. Res. 46:219-34
【非特許文献19】Loughnan, 2004
【非特許文献20】Nielsen, 2000
【非特許文献21】Beeton et al., Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channnels for therapy of autoimmune diseases, Molec. Pharmacol. 67(4):1369-81(2005)
【非特許文献22】Mouhat et al., K+ channel types targeted by synthetic OSK1, a toxin from Orthochirus scrobiculosus scorpion venom, Biochem. J. 385:95-104(2005)
【非特許文献23】Mouhat et al., Pharmacological profiling of Orthochirus scrobiculosus toxin 1 analogs with a trimmed N-terminal domain, Molec. Pharmacol. 69:354-62(2006)
【非特許文献24】B. S. Jensen et al., The Ca2+-activated K+ Channel of Intermediate Conductance: A Molecular Target for Novel Treatments?, Current Drug Targets 2:401-422(2001)
【非特許文献25】Rauer et al., Structure-guided Transformation of Charybdotoxin Yields an Analog That Selectively Targets Ca2+-activated over Voltage-gated K+ Channels, J. Biol. Chem. 275:1201-1208(2000)
【非特許文献26】Castle et al., Maurotoxin: A Potent Inhibitor of Intermediate Conductance Ca2+-Activated Potassium Channels, Molecular Pharmacol. 63:409-418(2003)
【非特許文献27】Chandy et al, K+ channels as targets for specific Immunomodulation, Trends in Pharmacol. Sciences 25:280-289(2004)
【非特許文献28】Lewis & Garcia, Therapeutic Potential of Venom Peptides, Nat. Rev. Drug Discov. 2:790-802(2003)
【非特許文献29】A. Schmitz et al., (2005) Molecul. Pharmacol. 68, 1254
【非特許文献30】H. Wulff et al., (2001) J. Biol. Ch

em.276,32040
【非特許文献31】C.Zitt et al.,(2004) J.Biol.Chem.279,12427
【非特許文献32】M.W.Winslow et al.,(2003) Current Opinion Immunol.15,299
【非特許文献33】S.Feske et al.,(2005) J.Exp.Med.202,651
【非特許文献34】N.Venkatesh et al.,(2004) PNAS 101,8969
【非特許文献35】Quintana-A(2005) Pflugers Arch.-Eur.J.Physiol.450,1
【非特許文献36】M.J.Berridge et al.,(2003) Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.4,517
【非特許文献37】F.Macian(2005) Nat.Rev.Immunol.5,472
【非特許文献38】I.M.Gonzalez-Pinto et al.(2005) Transplant.Proc.37,1713
【非特許文献39】D.R.J.Kuypers(2005) Transplant International 18,140
【非特許文献40】D.E.Yocum et al.,(2000) Rheumatol39,156
【非特許文献41】J.Koo(1998) British J.Dermatol.139,88
【非特許文献42】Baumgart DC(2006) Am.J.Gastroenterol.Mar 30;Epub出版前
【非特許文献43】Ann.Neurol.(1990) 27,591
【非特許文献44】S.Rohatagi et al.,(2000) J.Clin.Pharmacol.40,1211
【非特許文献45】Bissonnette-R et al.,(2006) J.Am.Acad.Dermatol.54,472
【非特許文献46】S.L.Gaffen & K.D.Liu(2004) Cytokine 28,109
【非特許文献47】K.Schroder et al.,(2004) J.Leukoc.Biol.75,163
【非特許文献48】U.Boehm et al.,(1997) Annu.Rev.Immunol.15,749
【非特許文献49】S.Quezada et al.,(2004) Annu.Rev.Immunol.22,307
【非特許文献50】J.Yazdany and J Davis(2004) Lupus 13,377

【発明の概要】

【0021】

本発明は、式

$(X^1)_a-(F^1)_d-(X^2)_b-(F^2)_e-(X^3)_c$

の組成物及びその多量体に関する。

（式中：

F^1及びF^2は半減期延長部分であり、並びにd及びeは、各々独立に、0又は1であり（但し、d及びeの少なくとも1つは1である。）；

X^1、X^2及びX^3は、各々独立に、$-(L)_f-P-(L)_g-$であり、並びにf及びgは、各々独立に、0又は1であり；

Ｐは、少なくとも２つのペプチド内ジスルフィド結合を含む、約８０アミノ酸残基長以下のトキシンペプチドであり；
Ｌは、場合によって存在するリンカーであり（ｆ＝１及び／又はｇ＝１の場合に存在する。）；並びに
ａ、ｂ及びｃは、各々独立に、０又は１である（但し、ａ、ｂ及びｃの少なくとも１つは、１である。）。）
従って、本発明は、慣用的に、ペプチドのＮ末端を左側に記載すると、式：
（ＩＩ）Ｐ－（Ｌ）$_{g}$－Ｆ^{1}（すなわち、ｂ、ｃ及びｅは、０に等しい。）；
（ＩＩＩ）Ｆ^{1}－（Ｌ）$_{f}$－Ｐ（すなわち、ａ、ｃ及びｅは、０に等しい。）；
（ＩＶ）Ｐ－（Ｌ）$_{g}$－Ｆ^{1}－（Ｌ）$_{f}$－Ｐ又は（Ｘ^{1}）$_{a}$－Ｆ^{1}－（Ｘ$_{2}$）$_{b}$（すなわち、ｃ及びｅは、０に等しい。）；
（Ｖ）Ｆ^{1}－（Ｌ）$_{f}$－Ｐ－（Ｌ）$_{g}$－Ｆ^{2}（すなわち、ａ及びｃは、０に等しい。）；
（ＶＩ）Ｆ^{1}－（Ｌ）$_{f}$－Ｐ－（Ｌ）$_{g}$－Ｆ^{2}－（Ｌ）$_{f}$－Ｐすなわち、ａは、０に等しい。）；
（ＶＩＩ）Ｆ^{1}－Ｆ^{2}－（Ｌ）$_{f}$－Ｐ（すなわち、ａ及びｂは、０に等しい。）；
（ＶＩＩＩ）Ｐ－（Ｌ）$_{g}$－Ｆ^{1}－Ｆ^{2}（すなわち、ｂ及びｃは、０に等しい。）；
（ＩＸ）Ｐ－（Ｌ）$_{g}$－Ｆ^{1}－Ｆ^{2}－（Ｌ）$_{f}$－Ｐすなわち、ｂは、０に等しい。）；
及びこれらの何れかのあらゆる多量体など、式１に対する変形を有する分子に関する。式ＩＩ－ＩＸのこのような分子の全てが、構造式Ｉの意味に属する。式Ｉの意味の範疇において、トキシンペプチド（Ｐ）が２以上存在する場合、トキシンペプチド（Ｐ）は、本発明の組成物中に存在する他の何れものトキシンペプチドと独立に同一又は別異であることができ、リンカー部分が存在する場合、リンカー部分（（Ｌ）$_{f}$及び／又は（Ｌ）$_{g}$）は、本発明の組成物中に存在し得る他の何れものリンカーと独立に同一又は別異であることができる。半減期延長部分へのトキシンペプチドの抱合は、トキシンペプチドのＮ末端及び／又はＣ末端を介することが可能であり、又はその一次アミノ酸配列に対して中間であることが可能である（Ｆ^{1}は、連結されるＦ^{2}より、トキシンペプチドのＮ末端により近く連結されている。）。有用な半減期延長部分（Ｆ^{1}又はＦ^{2}）の例には、免疫グロブリンＦｃドメイン、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）又はポリエチレングリコール（ＰＥＧ）が含まれる。本明細書に記載されているこれら及びその他の半減期延長部分は、個別に又は組み合わせて有用である。
【００２２】
本発明は、固有配列を有するＳｈＫ、ＯＳＫ１又はマウロトキシン（ＭＴＸ）ペプチドに比べてより大きなＫｖ１．３又はＩＫＣａ１アンタゴニスト活性及び／又は標的選択性を有する、１つ若しくはそれ以上のアミノ酸残基が固有配列から修飾された、抱合された又は抱合されていない、ＳｈＫ、ＯＳＫ１、ＣｈＴｘ又はマウロトキシンのトキシンペプチド類縁体を含む組成物にも関する。トキシンペプチド類縁体は、
表２に記載されている配列番号８８、８９、９２、１４８～２００、５４８～５６１、８８４～９４９若しくは１２９５～１３００；又は
表７に記載されている配列番号９８０～１２７４、１３０３若しくは１３０８；又は
表１３に記載されている配列番号３３０～３３７、３４１、１３０１、１３０２、１３０４～１３０７、１３０９、１３１１、１３１２及び１３１５～１３３６；又は
表１４に記載されている配列番号３６、５９、３４４－３４６若しくは１３６９～１３９０の何れかから選択されるアミノ酸配列を含む。
【００２３】
本発明は、以下の何れか：
表３に記されている配列番号２０１～２２５；又は
表４に記されている配列番号２４２～２４８若しくは２５０～２６０；又は
表５に記されている配列番号２６１～２７５；又は
表６に記されている配列番号２７６～２９３；又は
表８に記されている配列番号２９９～３１５；又は

表９に記されている配列番号３１６～３１８；又は
表１０に記されている配列番号３１９；又は
表１１に記されている配列番号３２７若しくは３２８；又は
表１３に記されている配列番号３３０～３３７、３４１、１３０１、１３０２、１３０４～１３０７、１３０９、１３１１、１３１２又は１３１５～１３３６；
表１４に記されている配列番号１３６９～１３９０；又は
表１６に記されている配列番号３４８～３５３；又は
表１９に記されている配列番号３５７～３６２、３６４～３６８、３７０、３７２～３８５若しくは３８７～３９８；又は
表２０に記されている配列番号３９９～４０８；又は
表２２に記されている配列番号４１０～４２１；又は
表２３に記されている配列番号４２２、４２４、４２６若しくは４２８；又は
表２４に記されている配列番号４３０～４３７；又は
表２５に記されている配列番号４３８～４４５；又は
表２６に記されている配列番号４４７、４４９、４５１、４５３、４５５若しくは４５７；又は
表２８に記されている配列番号４７０～４８２若しくは４８４～４９３；又は
表２９に記されている配列番号４９５～５０６；又は
表３０に記されている配列番号５０７～５１８；
から選択されるアミノ酸配列を含む他のトキシンペプチド類縁体にも関する。

【００２４】

本発明は、本発明の組成物と、及び医薬として許容される担体とを含む医薬組成物にも関する。

【００２５】

本発明の組成物は、慣用の合成法、組換えＤＮＡ技術又は本分野において周知の、他のあらゆるペプチド及び融合タンパク質調製方法によって調製することが可能である。非ペプチド部分を有する本発明の組成物は、適宜、慣用のペプチド化学反応の他に、慣用の有機化学反応によって合成することが可能である。

【００２６】

治療剤及び／又は予防剤としての主な用途が想定されている。トキシンペプチドを取り込む本発明の組成物は、抱合されていないペプチドと同等の、又はこれよりずっと大きな活性及び／又はイオンチャンネル標的選択性を有することが可能である。

【００２７】

従って、本発明は、多発性硬化症、１型糖尿病、疥癬、炎症性腸疾患、接触媒介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、喘息、アレルギー、再狭窄（ｒｅｓｔｉｎｏｓｉｓ）、全身性硬化症、繊維症、強皮症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、炎症性骨吸収、移植拒絶、移植片対宿主病又は狼瘡などの自己免疫疾患と診断された患者に、前記疾患の少なくとも１つの症候が前記患者において緩和されるように、本発明の組成物（好ましくは、Ｋｖ１．３アンタゴニストペプチド又はＩＫＣａ１アンタゴニストペプチドを含む。）の治療的有効量を投与することを含む、自己免疫疾患を治療する方法を含む。

【００２８】

さらに、本発明は、多発性硬化症の少なくとも１つの症候を以前に経験した患者に、多発性硬化症の少なくとも１つの症候の再発が予防され、又は多発性硬化症の少なくとも１つの症候が軽減されるように、本発明の組成物（好ましくは、Ｋｖ１．３アンタゴニストペプチド又はＩＫＣａ１アンタゴニストペプチドを含む。）の予防的有効量を投与することを含む、多発性硬化症の症候の再発を予防又は軽減する方法に関する。

【００２９】

多くの場合、治療剤として想定されているが、本発明の組成物は、治療剤又は診断剤に対するスクリーニングにおいても有用であり得る。例えば、抗Ｆｃ被覆されたプレートを用いたアッセイにおいてＦｃペプチドを使用することが可能である。Ｆｃなどの半減期延

長部分は、不溶性ペプチドを可溶性にし、次いで、多数のアッセイにおいて有用とすることが可能である。

【００３０】

本発明の多数のさらなる態様及び利点が、本発明の図面及び詳細な説明の検討において明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【００３１】

【図１Ａ】ＩｇＧ１抗体から派生し得る幾つかの典型的なＦｃ二量体の模式的構造を示す。図の「Ｆｃ」は、本明細書の「ＦｃドメインＦｃ」の意味内のＦｃ変異体のいずれかを表す。「Ｘ１」及び「Ｘ２」は、後述に定義されるペプチド又はリンカーとペプチドとの組み合わせを表す。特異的二量体は、次のとおりである。　図１Ａ：単一ジスルフィド結合した二量体

【図１Ｂ】ＩｇＧ１抗体から派生し得る幾つかの典型的なＦｃ二量体の模式的構造を示す。図の「Ｆｃ」は、本明細書の「ＦｃドメインＦｃ」の意味内のＦｃ変異体のいずれかを表す。「Ｘ１」及び「Ｘ２」は、後述に定義されるペプチド又はリンカーとペプチドとの組み合わせを表す。特異的二量体は、次のとおりである。　図１Ｂ：二重にジスルフィド結合した二量体

【図１Ｃ】ＩｇＧ１抗体から派生し得る幾つかの典型的なＦｃ二量体の模式的構造を示す。図の「Ｆｃ」は、本明細書の「ＦｃドメインＦｃ」の意味内のＦｃ変異体のいずれかを表す。「Ｘ１」及び「Ｘ２」は、後述に定義されるペプチド又はリンカーとペプチドとの組み合わせを表す。特異的二量体は、次のとおりである。　図１Ｃ：非共有結合二量体

【図１Ｄ】ＩｇＧ１抗体から派生し得る幾つかの典型的なＦｃ二量体の模式的構造を示す。図の「Ｆｃ」は、本明細書の「ＦｃドメインＦｃ」の意味内のＦｃ変異体のいずれかを表す。「Ｘ１」及び「Ｘ２」は、後述に定義されるペプチド又はリンカーとペプチドとの組み合わせを表す。特異的二量体は、次のとおりである。　図１Ｄ：単一ジスルフィド結合した二量体

【図１Ｅ】ＩｇＧ１抗体から派生し得る幾つかの典型的なＦｃ二量体の模式的構造を示す。図の「Ｆｃ」は、本明細書の「ＦｃドメインＦｃ」の意味内のＦｃ変異体のいずれかを表す。「Ｘ１」及び「Ｘ２」は、後述に定義されるペプチド又はリンカーとペプチドとの組み合わせを表す。特異的二量体は、次のとおりである。　図１Ｅ：二重にジスルフィド結合した二量体

【図１Ｆ】ＩｇＧ１抗体から派生し得る幾つかの典型的なＦｃ二量体の模式的構造を示す。図の「Ｆｃ」は、本明細書の「ＦｃドメインＦｃ」の意味内のＦｃ変異体のいずれかを表す。「Ｘ１」及び「Ｘ２」は、後述に定義されるペプチド又はリンカーとペプチドとの組み合わせを表す。特異的二量体は、次のとおりである。　図１Ｆ：非共有結合二量体

【図２Ａ】薬理学的に活性のある毒素ペプチドの単一単位を示す本発明の組成物の幾つかの実施形態の模式的構造を示す。図２Ａは、単一鎖分子を示し、前記分子に関するＤＮＡコンストラクトも表し得る。

【図２Ｂ】薬理学的に活性のある毒素ペプチドの単一単位を示す本発明の組成物の幾つかの実施形態の模式的構造を示す。図２Ｂは、リンカー‐ペプチド部分が二量体の唯一の鎖のみを表す二量体を示す。

【図２Ｃ】薬理学的に活性のある毒素ペプチドの単一単位を示す本発明の組成物の幾つかの実施形態の模式的構造を示す。図２Ｃは、両鎖上にペプチド部分を有する二量体を示す。図２Ｃの二量体は、図２Ａに示される単一鎖をコードするＤＮＡコンストラクトの発現に際し、特定の宿主細胞において自然発生的に形成する。他の宿主細胞において、細胞は、二量体の形成に好ましい条件下に配置され得るか、又は二量体はインビトロで形成され得る。

【図３Ａ】哺乳類発現に最適化し、本発明で使用できるヒトＩｇＧ１　Ｆｃの典型的な核酸配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号１及び２）を示す。

【図３Ｂ】哺乳類発現に最適化し、本発明で使用できるヒトＩｇＧ１　Ｆｃの典型的な核

酸配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号１及び２）を示す。
【図４Ａ】細菌発現に最適化し、本発明において使用できるヒトＩｇＧ１　Ｆｃの典型的な核酸配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号３及び４）を示す。
【図４Ｂ】細菌発現に最適化し、本発明において使用できるヒトＩｇＧ１　Ｆｃの典型的な核酸配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号３及び４）を示す。
【図５Ａ】図５Ａは、哺乳類細胞、細菌又は酵母における発現に最適化したコドンを含有する核酸配列によってコード化できる成熟ＳｈＫペプチド（配列番号５）のアミノ酸配列を示す。
【図５Ｂ】図５Ｂは、ＳｈＫペプチド（配列番号１０）内の６個のシステインによって形成される３つのジスルフィド結合（－Ｓ－Ｓ－）を示す。
【図６Ａ】電位開口型カリウムチャネル阻害剤スチコダクチラヘリアンサス（Ｓｔｉｃｈｏｄａｃｔｙｌａ　ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ）（ＳｈＫ）のイソギンチャク毒素ファミリーの他の密接に関連したメンバーとの配列比較を示す。スチコダクチラヘリアンサスの毒液から単離された３５個のアミノ酸の成熟ＳｈＫ毒素（受入番号Ｐ２９１８７）の配列を、イソギンチャクファミリーの他の密接に関連したメンバーと整列して示す。高度に保存された残基に陰影を付されている共通配列及び推定されるジスルフィド結合を示す。示されるＨｍＫペプチド毒素配列（Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔｅｉｎ受入番号０９７４３６）は、大イソギンチャク（Ｍａｇｎｉｆｉｃｅｎｔ　ｓｅａ　ａｎｅｍｏｎｅ）（ラジアンサスマグニフィカ（Ｒａｄｉａｎｔｈｕｓ　ｍａｇｎｉｆｉｃａ）；センジュイソギンチャク（Ｈｅｔｅｒａｃｔｉｓ　ｍａｇｎｉｆｉｃａ））由来の未熟な前駆体のものであり、推定シグナルペプチドに下線が付されている。成ＨｍＫペプチド毒素は、長さ３５アミノ酸であると推定され、及び４０ないし７４の残基に及ぶ。ＡｅＫは、アクティニアエクイン（Ａｃｔｉｎｉａ　ｅｑｕｉｎｅ）イソギンチャク（受入番号８１８９７）の毒液から単離された成ペプチド毒素である。ｓｅａ　ａｎｅｍｏｎｅ　Ａｎｅｍｏｎｉａ　ｓｕｌｃａｔａ及びＢｕｎｏｄｏｓｏｍａ　ｇｒａｎｕｌｉｆｅｒａの毒液からそれぞれ単離される成ペプチド毒素ＡｓＫＳ（受入番号Ｑ９ＴＷＧ１）及びＢｇＫ（受入番号Ｐ２９１８６）の配列も示す。図６Ａは、イソギンチャクファミリーの毒素の他のメンバーＨｍＫ（配列番号６（成熟ペプチド）、（配列番号５４２、シグナル及び成熟ペプチド部分））、ＡｅＫ（配列番号７）、ＡｓＫｓ（配列番号８）及びＢｇＫ（配列番号９）に対するアミノ酸整列（配列番号１０）を示す。推定ジスルフィド結合を示し、保存された残基を強調する。（ＨｍＫ、配列番号５４３；ＳｈＫ、配列番号１０；ＡｅＫ、配列番号５４４；ＡｓＫＳ、配列番号５４５）。
【図６Ｂ】電位開口型カリウムチャネル阻害剤スチコダクチラヘリアンサス（Ｓｔｉｃｈｏｄａｃｔｙｌａ　ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ）（ＳｈＫ）のイソギンチャク毒素ファミリーの他の密接に関連したメンバーとの配列比較を示す。スチコダクチラヘリアンサスの毒液から単離された３５個のアミノ酸の成熟ＳｈＫ毒素（受入番号Ｐ２９１８７）の配列を、イソギンチャクファミリーの他の密接に関連したメンバーと整列して示す。高度に保存された残基に陰影を付されている共通配列及び推定されるジスルフィド結合を示す。示されるＨｍＫペプチド毒素配列（Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔｅｉｎ受入番号０９７４３６）は、大イソギンチャク（Ｍａｇｎｉｆｉｃｅｎｔ　ｓｅａ　ａｎｅｍｏｎｅ）（ラジアンサスマグニフィカ（Ｒａｄｉａｎｔｈｕｓ　ｍａｇｎｉｆｉｃａ）；センジュイソギンチャク（Ｈｅｔｅｒａｃｔｉｓ　ｍａｇｎｉｆｉｃａ））由来の未熟な前駆体のものであり、推定シグナルペプチドに下線が付されている。成ＨｍＫペプチド毒素は、長さ３５アミノ酸であると推定され、及び４０ないし７４の残基に及ぶ。ＡｅＫは、アクティニアエクイン（Ａｃｔｉｎｉａ　ｅｑｕｉｎｅ）イソギンチャク（受入番号８１８９７）の毒液から単離された成ペプチド毒素である。ｓｅａ　ａｎｅｍｏｎｅ　Ａｎｅｍｏｎｉａ　ｓｕｌｃａｔａ及びＢｕｎｏｄｏｓｏｍａ　ｇｒａｎｕｌｉｆｅｒａの毒液からそれぞれ単離される成ペプチド毒素ＡｓＫＳ（受入番号Ｑ９ＴＷＧ１）及びＢｇＫ（受入番号Ｐ２９１８６）の配列も示す。図６Ｂは、３個のジスルフィド結合（Ｃ１－Ｃ６、Ｃ２－Ｃ４、Ｃ３－Ｃ５）を有するこのファミリーに関するジスルフィド結合マップを示す。

【図７Ａ】カリウムチャネル阻害剤のα－サソリ毒素のアミノ酸整列を示す。（ＢｍＫＫ１、配列番号１１；ＢｍＫＫ４、配列番号１２；ＰＢＴｘ１、配列番号１４；Ｔｃ３２、配列番号１３；ＢｍＫＫ６、配列番号１５；Ｐ０１、配列番号１６；Ｐｉ２、配列番号１７；Ｐｉ３、配列番号１８；Ｐｉ４、配列番号１９；ＭＴＸ、配列番号２０；Ｐｉ１、配列番号２１；ＨｓＴｘ１、配列番号６１；ＡｇＴｘ２、配列番号２３；ＫＴＸ１、配列番号２４；ＯＳＫ１、配列番号２５；ＢｍＫＴＸ、配列番号２２；ＨｇＴＸ１、配列番号２７；ＭｇＴｘ、配列番号２８；Ｃ１１Ｔｘ１、配列番号２９；ＮＴＸ、配列番号３０；Ｔｃ３０、配列番号３１；Ｔｓ－ＴＸ－Ｋａ、配列番号３２；ＰＢＴｘ３、配列番号３３；Ｌｇｈ１５－１、配列番号３４；Ｍａｒｔｅｎ　Ｔｘ、配列番号３７；ＣｈＴｘ、配列番号３６；ＣｈＴｘ－Ｌｑ２、配列番号４２；ＩｂＴｘ、配列番号３８；ＳｌｏＴｘ、配列番号３９；ＢｍＴｘ１；配列番号４３；ＢｕＴｘ、配列番号４１；ＡｍｍＴｘ３、配列番号４４；ＡａＴＸ１、配列番号４５；ＢｍＴＸ３、配列番号４６；Ｔｃ１、配列番号４８；ＯＳＫ２、配列番号４９；ＴｓＫ、配列番号５４；ＣｏＴｘ１、配列番号５５；ＣｏＴｘ２、配列番号８７１；ＢｍＰｏ５、配列番号６０；ＳｃｙＴｘ、配列番号５１；Ｐ０５、配列番号５２；タマピン（Ｔａｍａｐｉｎ）、配列番号５３：及びＴｍＴｘ、配列番号６９１。高度に保存された残基に影を付し、共通配列を列挙する。α－ＫＴｘのサブファミリーを列挙し、それらはＲｏｄｒｉｇｕｅｚ　ｄｅ　ｌａ　Ｖｅｇａ，　Ｒ．Ｃ．ｅｔ　ａｌ．（２００３）ＴＩＰＳ２４：２２２－２２７に由来する。拮抗すると報告される幾つかのイオンチャネルのリストを列挙する（ＩＫ＝ＩＫＣａ、ＢＫ＝ＢＫＣａ、ＳＫ＝ＳＫＣａ、Ｋｖ＝電位開口型Ｋ＋チャネル）。この整列におけるほとんどのファミリーメンバーが成ペプチド生成物を表すが、幾つものメンバーは、未成熟であるか、前記ペプチドの改変された形態を表し、これらには、ＢｍＫＫ１、ＢｍＫＫ４、ＢｍＫＫ６、ＢｍＫＴＸ、Ｍａｒｔｅｎ　Ｔｘ、ＣｈＴｘ、ＣｈＴｘ－Ｌｑ２、ＢｍＴｘ１、ＡａＴｘ１、ＢｍＴＸ３、ＴｓＫ、ＣｏＴｘ１、ＢｍＰ０５が含まれる。

【図７Ｂ】カリウムチャネル阻害剤のα－サソリ毒素のアミノ酸整列を示す。（ＢｍＫＫ１、配列番号１１；ＢｍＫＫ４、配列番号１２；ＰＢＴｘ１、配列番号１４；Ｔｃ３２、配列番号１３；ＢｍＫＫ６、配列番号１５；Ｐ０１、配列番号１６；Ｐｉ２、配列番号１７；Ｐｉ３、配列番号１８；Ｐｉ４、配列番号１９；ＭＴＸ、配列番号２０；Ｐｉ１、配列番号２１；ＨｓＴｘ１、配列番号６１；ＡｇＴｘ２、配列番号２３；ＫＴＸ１、配列番号２４；ＯＳＫ１、配列番号２５；ＢｍＫＴＸ、配列番号２２；ＨｇＴＸ１、配列番号２７；ＭｇＴｘ、配列番号２８；Ｃ１１Ｔｘ１、配列番号２９；ＮＴＸ、配列番号３０；Ｔｃ３０、配列番号３１；Ｔｓ－ＴＸ－Ｋａ、配列番号３２；ＰＢＴｘ３、配列番号３３；Ｌｇｈ１５－１、配列番号３４；Ｍａｒｔｅｎ　Ｔｘ、配列番号３７；ＣｈＴｘ、配列番号３６；ＣｈＴｘ－Ｌｑ２、配列番号４２；ＩｂＴｘ、配列番号３８；ＳｌｏＴｘ、配列番号３９；ＢｍＴｘ１；配列番号４３；ＢｕＴｘ、配列番号４１；ＡｍｍＴｘ３、配列番号４４；ＡａＴＸ１、配列番号４５；ＢｍＴＸ３、配列番号４６；Ｔｃ１、配列番号４８；ＯＳＫ２、配列番号４９；ＴｓＫ、配列番号５４；ＣｏＴｘ１、配列番号５５；ＣｏＴｘ２、配列番号８７１；ＢｍＰｏ５、配列番号６０；ＳｃｙＴｘ、配列番号５１；Ｐ０５、配列番号５２；タマピン（Ｔａｍａｐｉｎ）、配列番号５３：及びＴｍＴｘ、配列番号６９１。高度に保存された残基に影を付し、共通配列を列挙する。α－ＫＴｘのサブファミリーを列挙し、それらはＲｏｄｒｉｇｕｅｚ　ｄｅ　ｌａ　Ｖｅｇａ，　Ｒ．Ｃ．ｅｔ　ａｌ．（２００３）ＴＩＰＳ２４：２２２－２２７に由来する。拮抗すると報告される幾つかのイオンチャネルのリストを列挙する（ＩＫ＝ＩＫＣａ、ＢＫ＝ＢＫＣａ、ＳＫ＝ＳＫＣａ、Ｋｖ＝電位開口型Ｋ＋チャネル）。この整列におけるほとんどのファミリーメンバーが成ペプチド生成物を表すが、幾つものメンバーは、未成熟であるか、前記ペプチドの改変された形態を表し、これらには、ＢｍＫＫ１、ＢｍＫＫ４、ＢｍＫＫ６、ＢｍＫＴＸ、Ｍａｒｔｅｎ　Ｔｘ、ＣｈＴｘ、ＣｈＴｘ－Ｌｑ２、ＢｍＴｘ１、ＡａＴｘ１、ＢｍＴＸ３、ＴｓＫ、ＣｏＴｘ１、ＢｍＰ０５が含まれる。

【図８】本発明におけるペプチボディへと変換された毒素ペプチドの整列を示す（Ａｐａｍｉｎ、配列番号６８；ＨａＴｘ１、配列番号４９４；ＰｒｏＴｘ１、配列番号５６；Ｐ

ａＴｘ２、配列番号５７；ＳｈＫ［２－３５］、配列番号９２；ＳｈＫ［１－３５］、配列番号５；ＨｍＫ、配列番号６；ＣｈＴｘ（Ｋ３２Ｅ）、配列番号５９；ＣｈＴｘ、配列番号３６；ＩｂＴｘ、配列番号３８；ＯＳＫ１（Ｅ１６Ｋ、Ｋ２０Ｄ）、配列番号２９６；ＯＳＫ１、配列番号２５；ＡｇＴｘ２、配列番号２３；ＫＴＸ１、配列番号２４；ＭｇＴｘ、配列番号２８；ＮＴＸ、配列番号３０；ＭＴＸ、配列番号２０；Ｐｉ２、配列番号１７；ＨｓＴｘ１、配列番号６１；Ａｎｕｒｏｃｔｏｘｉｎ［ＡｎＴｘ］、配列番号６２；ＢｅＫｍ１、配列番号６３；ＳｃｙＴｘ、配列番号５１；ωＧＶＩＡ、配列番号６４；ωＭＶＩＩａ、配列番号６５；Ｐｔｕ１、配列番号６６；及びＣＴＸ、配列番号６７）。毒素の本来の源が、各々におけるシステインの数と同様、示されている。鍵となる標的のイオンチャネルが列挙される。整列は、それらの源及びイオンチャネル標的衝撃に基づいた毒素ペプチドのクラスター形成を示す。

【図９】毒素ファミリー内のジスルフィド配置を示す。各サブファミリーに関するジスルフィドの数及びジスルフィド結合の順序が示される。各ジスルフィド結合カテゴリー内に収まる毒素の部分的なリストを表す。

【図１０】毒素の溶液構造がコンパクトな構造を明示することを示す。　イソギンチャク（ＳｈＫ）、サソリ（ＭｇＴｘ、ＭＴＸ、ＨｓＴｘ１）、ウミイモガイ（ｍａｒｉｎｅ　ｃｏｎｅ　ｓｎａｉｌ）（ｗＧＶＩＡ）及びタランチュラ（ＨａＴｘ１）由来の天然毒素の溶液構造は、２８ないし３９アミノ酸のペプチドが全て、コンパクトな構造を形成することを示す。示される毒素は、３又は４個のジスルフィド結合を有し、図９に示される６個のサブファミリーのうちの４個内に収まる。イソギンチャク（ＳｈＫ）、サソリ（ＭｇＴｘ、ＭＴＸ、ＨｓＴｘ１）、ウミイモガイ（ｗＧＶＩＡ）及びタランチュラ（ＨａＴｘ１）由来の天然毒素の溶液構造は、ＭＭＤＢ　Ｅｎｔｒｅｚ３次元構造データベース［Ｊ．Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．３１，４７４］及びビューワーを使用する、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａ　Ｂａｎｋ（ＰＤＢ）受入番号１ＲＯＯ（ｍｍｄｂｌｄ：５２４７）、１ＭＴＸ（ｍｍｄｂｌｄ：４０６４）、１ＴＸＭ（ｍｍｄｂｌｄ：６２０１）、１ＱＵＺ（ｍｍｄｂｌｄ：３６９０４）、１ＯＭＺ（ｍｍｄｂｌｄ：１８１６）及び１Ｄ１Ｈ（ｍｍｄｂｌｄ：１４３４４）に由来した。

【図１１Ａ】ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－ｐｅｐの残基５１３１ないし６６６０の核酸配列（配列番号６９及び配列番号１３５８）及びコード化されるアミノ酸配列（配列番号７０、配列番号１３５９及び配列番号１３６０）を示す。Ｆｃドメインの配列（配列番号７１及び７２）は、Ｃ末端の５個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチド－リンカー部分がＦｃドメインのＣ末端にあるペプチボディの生成が可能となる。

【図１１Ｂ】ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－ｐｅｐの残基５１３１ないし６６６０の核酸配列（配列番号６９及び配列番号１３５８）及びコード化されるアミノ酸配列（配列番号７０、配列番号１３５９及び配列番号１３６０）を示す。Ｆｃドメインの配列（配列番号７１及び７２）は、Ｃ末端の５個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチド－リンカー部分がＦｃドメインのＣ末端にあるペプチボディの生成が可能となる。

【図１１Ｃ】ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－ｐｅｐの残基５１３１ないし６６６０の核酸配列（配列番号６９及び配列番号１３５８）及びコード化されるアミノ酸配列（配列番号７０、配列番号１３５９及び配列番号１３６０）を示す。Ｆｃドメインの配列（配列番号７１及び７２）は、Ｃ末端の５個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチド－リンカー部分がＦｃドメインのＣ末端にあるペプチボディの生成が可能となる。

【図１１Ｄ】ペプチド－リンカー配列で置換されたクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（ｃａｔ；「ＣｍＲ」部位）を有するペプチボディ細菌発現ベクターｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－ｐｅｐの環状図を示す。

【図１２Ａ】ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｐｅｐ－Ｆｃの残基５１３１ないし６３１９の核酸配列（配列番号７３及び配列番号１３６１）及びコード化されるアミノ酸配列（配列番号７４、配列番号１３６２及び配列番号１３６３）を示す。Ｆｃドメインの配列（配列番号７５及び７６）は、Ｎ末端の５個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチド－リンカー部分がＦｃドメインのＮ末端にあるペプチボディの生成が可能となる。

【図１２Ｂ】ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｐｅｐ－Ｆｃの残基５１３１ないし６３１９の核酸配列（配列番号７３及び配列番号１３６１）及びコード化されるアミノ酸配列（配列番号７４、配列番号１３６２及び配列番号１３６３）を示す。Ｆｃドメインの配列（配列番号７５及び７６）は、Ｎ末端の５個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチド－リンカー部分がＦｃドメインのＮ末端にあるペプチボディの生成が可能となる。
【図１２Ｃ】ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｐｅｐ－Ｆｃの残基５１３１ないし６３１９の核酸配列（配列番号７３及び配列番号１３６１）及びコード化されるアミノ酸配列（配列番号７４、配列番号１３６２及び配列番号１３６３）を示す。Ｆｃドメインの配列（配列番号７５及び７６）は、Ｎ末端の５個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチド－リンカー部分がＦｃドメインのＮ末端にあるペプチボディの生成が可能となる。
【図１２Ｄ】ペプチド－リンカー配列で置換されたゼオシン抵抗（ｂｌｅ；「ＺｅｏＲ」）部位を有するペプチボディ細菌発現ベクターの環状図を示す。
【図１２Ｅ】ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｐｅｐ－Ｆｃの核酸配列（配列番号１３３９）及びコード化されるアミノ酸配列（配列番号１３４０、配列番号１３４１及び配列番号１３４２）を示す。Ｆｃドメインの配列（配列番号７５及び７６）は、Ｎ末端の５個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチド－リンカー部分がＦｃドメインのＮ末端にあるペプチボディの生成が可能となる。
【図１２Ｆ】ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｐｅｐ－Ｆｃの核酸配列（配列番号１３３９）及びコード化されるアミノ酸配列（配列番号１３４０、配列番号１３４１及び配列番号１３４２）を示す。Ｆｃドメインの配列（配列番号７５及び７６）は、Ｎ末端の５個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチド－リンカー部分がＦｃドメインのＮ末端にあるペプチボディの生成が可能となる。
【図１２Ｇ】ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｐｅｐ－Ｆｃの核酸配列（配列番号１３３９）及びコード化されるアミノ酸配列（配列番号１３４０、配列番号１３４１及び配列番号１３４２）を示す。Ｆｃドメインの配列（配列番号７５及び７６）は、Ｎ末端の５個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチド－リンカー部分がＦｃドメインのＮ末端にあるペプチボディの生成が可能となる。
【図１３Ａ】哺乳類発現ベクターｐＣＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉの環状図である。
【図１３Ｂ】ヒトＩｇＧ１、１０個のアミノ酸のリンカー及びアクチビンＲＩＩｂ遺伝子を含有する哺乳類発現ベクターｐＣＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ－Ｆｃ－２ｘＧ４Ｓ－アクチビンＲＩＩｂの環状図である。
【図１３Ｃ】Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］コード化配列を含有するＣＨＯ発現ベクターｐＤＳＲａ２２の環状図である。
【図１４Ａ】前述の実施例１の「Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］」として同定される分子のヌクレオチド配列及びコード化されるアミノ酸配列（それぞれ配列番号７７及び７８）を示す。Ｌ１０リンカーアミノ酸配列（配列番号７９）に下線が付されている。
【図１４Ｂ】前述の実施例１の「Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］」として同定される分子のヌクレオチド配列及びコード化されるアミノ酸配列（それぞれ配列番号７７及び７８）を示す。Ｌ１０リンカーアミノ酸配列（配列番号７９）に下線が付されている。
【図１５Ａ】前述の実施例２の「Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］」として同定される分子のヌクレオチド配列及びコード化されるアミノ酸配列（それぞれ配列番号８０及び８１）を示す。Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］（図１４）において使用されるのと同一のＬ１０リンカーアミノ酸配列（配列番号７９）に下線が付されている。
【図１５Ｂ】前述の実施例２の「Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］」として同定される分子のヌクレオチド配列及びコード化されるアミノ酸配列（それぞれ配列番号８０及び８１）を示す。Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］（図１４）において使用されるのと同一のＬ１０リンカーアミノ酸配列（配列番号７９）に下線が付されている。
【図１６Ａ】前述の実施例２の「Ｆｃ－Ｌ２５－ＳｈＫ［２－３５］」として同定される分子のヌクレオチド配列及びコード化されるアミノ酸配列（それぞれ配列番号８２及び８３）を示す。Ｌ２５リンカーアミノ酸配列（配列番号８４）に下線が付されている。

【図１６Ｂ】前述の実施例２の「Ｆｃ－Ｌ２５－ＳｈＫ［２－３５］」として同定される分子のヌクレオチド配列及びコード化されるアミノ酸配列（それぞれ配列番号８２及び８３）を示す。Ｌ２５リンカーアミノ酸配列（配列番号８４）に下線が付されている。
【図１７】前述の実施例３２にも記載される還元的アミノ化によるＳｈＫペプチド（配列番号５及び配列番号１０）のＮ末端ＰＥＧ化に関するスキームを示す。
【図１８】前述の実施例３４にも記載されるアミド形成を介するＳｈＫペプチド（配列番号５及び配列番号１０）のＮ末端ＰＥＧ化に関するスキームを示す。
【図１９】前述の実施例３３にも記載される官能基選択的オキシム形成によるＳｈＫペプチド（配列番号５及び配列番号１０）のＮ末端ＰＥＧ化に関するスキームを示す。
【図２０Ａ】図２０Ａは、折りたたまれた「Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫ」（ペプチド２）とも記載される折りたたまれたＳｈＫ［２－３５］の２１４ｎｍでの逆相ＨＰＬＣ分析を示す。
【図２０Ｂ】図２０Ｂは、折りたたまれた「Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫ」（ペプチド２）とも記載される折りたたまれたＳｈＫ［２－３５］のエレクトロスプレー質量分析を示す。
【図２１】Ｎ末端がＰＥＧ化した「Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫ」とも呼ばれるＮ末端がＰＥＧ化されたＳｈｋ［２－３５］の２１４ｎｍでの逆相ＨＰＬＣ分析を示す。
【図２２Ａ】図２２Ａは、「ＳｈＫ」とも呼ばれる、折りたたまれたＳｈＫ［１－３５］のエレクトロスプレー質量分析を示す。
【図２２Ｂ】図２２Ｂは、「ＳｈＫ」とも呼ばれる、折りたたまれたＳｈＫ［１－３５］のエレクトロスプレー質量分析を示す。
【図２３】前述の実施例３１にも記載の還元的アミノ化によるＳｈＫ［２－３５］（「Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫ」又は「ＳｈＫｄ１」とも呼ばれる配列番号９２及び配列番号５８）のＮ末端ＰＥＧ化に関するスキームを示す。
【図２４Ａ】図２４Ａは、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］で一過的に形質移入したＨＥＫ２９３細胞由来の培養上清のウェスタンブロットを示す。レーン１：分子量マーカー、レーン２：１５μＬのＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ、レーン３：１０μＬのＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ、レーン４：５μＬのＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ、レーン５：分子量マーカー、レーン６：ブランク、レーン７：ＤＮＡを含有しない１５μＬの対照、レーン８：ＤＮＡを含有しない１０μＬの対照、レーン９：ＤＮＡを含有しない５μＬの対照、レーン１０：分子量マーカー。
【図２４Ｂ】図２４Ｂは、Ｆｃ－Ｌ－ＳｈＫ［１－３５］で安定して形質移入したチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞のクローン由来の培養上清１５μＬによるウェスタンブロットを示す。レーン１ないし１５を次のとおり負荷した。ブランク、ＢＢ６、分子量マーカー、ＢＢ５、ＢＢ４、ＢＢ３、ＢＢ２、ＢＢ１、ブランク、ＢＤ６、ＢＤ５、分子量マーカー、ＢＤ４、ＢＤ３、ＢＤ２。
【図２５Ａ】図２５Ａは、Ｆｃ－Ｌ－ＳｍＩＩＩＡで一過的に形質移入した２９３Ｔ細胞由来の培養上清を含有する非還元型ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルのウェスタンブロットを示す。
【図２５Ｂ】図２５Ｂは、Ｆｃ－Ｌ－ＳｍＩＩＩＡで一過的に形質移入した２９３Ｔ細胞由来の培養上清を含有する非還元型ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルのウェスタンブロットを示す。
【図２６Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈した、安定して形質移入したＣＨＯ細胞由来の１０μＬの精製されたＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］生成物のスペクトル走査を示す。
【図２６Ｂ】最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷した。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇ

の還元型生成物。
【図２６Ｃ】５０ｍＭのＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、２５０ｍＭのＮａＣｌ及びｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］生成物２０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図２６Ｄ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析するＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］の最終試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。
【図２７Ａ】安定して形質移入したＣＨＯ細胞から精製した最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷した。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。
【図２７Ｂ】５０ｍＭのＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、２５０ｍＭのＮａＣｌ及びｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、精製されたＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］５０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図２７Ｃ】安定して形質移入したＣＨＯ細胞から精製したＦｃ－Ｌ５－ＳｈＫ［２－３５］のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。
【図２７Ｄ】安定して形質移入したＣＨＯ細胞から精製したＦｃ－Ｌ２５－ＳｈＫ［２－３５］のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。
【図２７Ｅ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］生成物１０μＬのスペクトル走査を示す。
【図２７Ｆ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析したＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］の最終試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。
【図２７Ｇ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ５－ＳｈＫ［２－３５］生成物１０μＬのスペクトル走査を示す。
【図２７Ｈ】５０ｍＭのＮａＨ２ＰＯ４、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ

／分で注入される、最終的なＦｃ－Ｌ５－ＳｈＫ［２－３５］生成物５０ｍｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図２７Ｉ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析したＦｃ－Ｌ５－ＳｈＫ［２－３５］の最終試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。
【図２７Ｊ】Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈した生成物２０μＬのスペクトル走査を示す。
【図２７Ｋ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なＦｃ－Ｌ２５－ＳｈＫ［２－３５］生成物５０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図２７Ｌ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析したＦｃ－Ｌ２５－ＳｈＫ［２－３５］の最終試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。
【図２８Ａ】細菌細胞から精製及び再折りたたみされたＦｃ－Ｌ１０－ＫＴＸ１のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。
【図２８Ｂ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、精製されたＦｃ－Ｌ１０－ＫＴＸ１の４５μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図２８Ｃ】Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＫＴＸ１生成物２０μＬのスペクトル走査を示す。
【図２８Ｄ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析したＦｃ－Ｌ１０－ＫＴＸ１の最終試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。
【図２９Ａ】細菌細胞から精製及び再折りたたみされたＦｃ－Ｌ－ＡｇＴｘ２のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。
【図２９Ｂ】細菌細胞から精製及び再折りたたみされたＦｃ－Ｌ１０－ＨａＴｘ１のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを

示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物、精製した材料のスペクトル走査。

【図２９Ｃ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用して、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＡｇＴｘ２生成物２０μＬのスペクトル走査を示す。

【図２９Ｄ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＡｇＴｘ２生成物２０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図２９Ｅ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析したＦｃ－Ｌ１０－ＡｇＴｘ２の最終試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【図２９Ｆ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＨａＴｘ１生成物２０μＬのスペクトル走査を示す。

【図２９Ｇ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＨａＴｘ１生成物２０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図２９Ｈ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析したＦｃ－Ｌ１０－ＨａＴｘ１の最終試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【図３０Ａ】ＣＨＯ細胞から精製されるＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］が、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じることを示す。

【図３０Ｂ】多様な濃度でのＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］によるカリウム電流遮断の時間経過を示す。ＩＣ５０は、１５±２ｐＭ（ｎ＝４個の細胞）であると概算した。

【図３０Ｃ】（「ＳｈＫ」単独とも呼ばれる）合成ＳｈＫ［１－３５］が、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じることを示す。

【図３０Ｄ】多様な濃度でのＳｈＫ［１－３５］遮断の時間経過を示す。ＳｈＫに関するＩＣ５０は、１２±１ｐＭ（ｎ＝４個の細胞）であると概算した。

【図３１Ａ】図３１Ａは、４９±５ｐＭ（ｎ＝３個の細胞）のＩＣ５０で、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の縫う℃依存的遮断を生じる合成ペプチド類縁体ＳｈＫ［２－３５］を示す。

【図３１Ｂ】図３１Ｂは、１１５±１８ｐＭ（ｎ＝３個の細胞）のＩＣ５０でヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じる、ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］ペプチボディを示す。

【図３１Ｃ】図３１Ｃは、Ｆｃ－Ｌ５－ＳｈＫ［２－３５］ペプチボディが、１００ｐＭ（ｎ＝３個の細胞）のＩＣ５０でヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２

９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じることを示す。
【図３２Ａ】図３２Ａは、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じる細菌細胞から精製されるＦｃ－Ｌ－ＫＴＸ１ペプチボディを示す。
【図３２Ｂ】図３２Ｂは、多様な濃度でのＦｃ－Ｌ１０－ＫＴＸ１によるカリウム電流遮断の時間経過を示す。
【図３３Ａ】免疫組織化学によって、ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、ヒトＫｖ１．３で安定して形質移入したＨＥＫ２９３細胞を染色する（図３３Ａ）のに対し、形質移入されていないＨＥＫ２９３細胞は、前期ペプチボディで染色されない（図３３Ｂ）ことを示す。
【図３３Ｂ】免疫組織化学によって、ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、ヒトＫｖ１．３で安定して形質移入したＨＥＫ２９３細胞を染色する（図３３Ａ）のに対し、形質移入されていないＨＥＫ２９３細胞は、前期ペプチボディで染色されない（図３３Ｂ）ことを示す。
【図３４Ａ】ヒトＫｖ１．３で安定して形質移入した固定したＨＥＫ２９３細胞を使用する酵素イムノアッセイの結果を示す。図３４Ａは、（本明細書で単純に「Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ」と呼ばれる）ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、反応において用量依存的な亢進を示すのに対し、ＣＨＯ－Ｆｃ対照（「Ｆｃ対照」）は示さないことを示す。
【図３４Ｂ】ヒトＫｖ１．３で安定して形質移入した固定したＨＥＫ２９３細胞を使用する酵素イムノアッセイの結果を示す。図３４Ｂは、（本明細書で「Ｆｃ－ＳｈＫ」と呼ばれる）Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、同様の条件を使用して形質移入されていないＨＥＫ２９３細胞からの反応を誘発しないことを示し、他のネガティブ対照も示す。
【図３５Ａ】ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、ＰＭＡ及びαＣＤ３抗体で刺激されたヒトＰＢＭＣからのＩＬ－２（図３５Ａ）及びＩＦＮγ（図３５Ｂ）の用量依存的阻害を示す。前記ペプチボディは、反応の完全な阻害を呈する新規の薬理学を示すのに対し、合成ＳｈＫ［１－３５］ペプチド単独は、部分的な阻害のみを示す。
【図３５Ｂ】ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、ＰＭＡ及びαＣＤ３抗体で刺激されたヒトＰＢＭＣからのＩＬ－２（図３５Ａ）及びＩＦＮγ（図３５Ｂ）の用量依存的阻害を示す。前記ペプチボディは、反応の完全な阻害を呈する新規の薬理学を示すのに対し、合成ＳｈＫ［１－３５］ペプチド単独は、部分的な阻害のみを示す。
【図３６Ａ】哺乳類由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、ＣＤ３及びＣＤ２８に対する抗体で刺激された２つの正常なドナー由来のヒトＰＢＭＣにおけるＴ細胞増殖（^{3}Ｈ－チミジン組み込み）を阻害することを示す。図３６Ａは、ドナー１の反応を示し、図３６Ｂは、ドナー２の反応を示す。抗ＣＤ３２（ＦｃｇＲＩＩ）遮断抗体によるプレ温置は、ペプチボディに対する感度を変化させなかった。
【図３６Ｂ】哺乳類由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、ＣＤ３及びＣＤ２８に対する抗体で刺激された２つの正常なドナー由来のヒトＰＢＭＣにおけるＴ細胞増殖（^{3}Ｈ－チミジン組み込み）を阻害することを示す。図３６Ａは、ドナー１の反応を示し、図３６Ｂは、ドナー２の反応を示す。抗ＣＤ３２（ＦｃｇＲＩＩ）遮断抗体によるプレ温置は、ペプチボディに対する感度を変化させなかった。
【図３７Ａ】ＣＨＯ由来の精製したＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、αＣＤ３及びαＣＤ２８抗体で刺激したヒトＰＢＭＣからのＩＬ－２（図３７Ａ）及びＩＦＮγ（図３７Ｂ）の生成の用量依存的阻害を生じることを示す。
【図３７Ｂ】ＣＨＯ由来の精製したＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、αＣＤ３及びαＣＤ２８抗体で刺激したヒトＰＢＭＣからのＩＬ－２（図３７Ａ）及びＩＦＮγ（図３７Ｂ）の生成の用量依存的阻害を生じることを示す。

【図３８Ａ】図３８Ａは、ＰＥＧ化されたＳｈｋ［２－３５］合成ペプチドが、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じることを示し、多様な濃度でのカリウム電流遮断の時間経過が図３８Ｂに示される。
【図３８Ｂ】図３８Ａは、ＰＥＧ化されたＳｈｋ［２－３５］合成ペプチドが、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じることを示し、多様な濃度でのカリウム電流遮断の時間経過が図３８Ｂに示される。
【図３９Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（1-３５）生成物５０μＬのスペクトル走査を示す。
【図３９Ｂ】最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（１－３５）生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。
【図３９Ｃ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（１－３５）生成物５０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図４０Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（２－３５）生成物２０μＬのスペクトル走査を示す。
【図４０Ｂ】最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（２－３５）生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。
【図４０Ｃ】５０ｍＭのＮａＨ２ＰＯ４、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（２－３５）生成物５０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図４０Ｄ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析したＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（２－３５）の最終試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。
【図４１Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬの製剤緩衝液中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１生成物５０μＬのスペクトル走査を示す。
【図４１Ｂ】最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０

．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。
【図４１Ｃ】５０ｍＭのＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１生成物１２３μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図４１Ｄ】ＬＣＱイオントラップ質量分光光度計へと配向される溶出物の一部を使用してＶｙｄａｃ　Ｃ$_4$カラムを使用する最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１試料約４μｇの液体クロマトグラフィー－質量スペクトル分析を示す。質量分析計の製造者によって提供されるＢｉｏｗｏｒｋｓソフトウェアを使用して、質量スペクトルをデコンボルートした。
【図４２Ａ】Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号１０４０及び配列番号１０４１）を示す。
【図４２Ｂ】Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号１０４０及び配列番号１０４１）を示す。
【図４３Ａ】Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号１０４２及び配列番号１０４３）を示す。
【図４３Ｂ】Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号１０４２及び配列番号１０４３）を示す。
【図４４Ａ】Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号１０４４及び配列番号１０４５）を示す。
【図４４Ｂ】Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号１０４４及び配列番号１０４５）を示す。
【図４５Ａ】Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号１０４６及び配列番号１０４７）を示す。
【図４５Ｂ】Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（それぞれ配列番号１０４６及び配列番号１０４７）を示す。
【図４６】抗ヒトＦｃ抗体による（トリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥからの）ウェスタンブロットを示す。レーン１ないし６を次のとおり負荷した。Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］１５μＬ、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］１５μＬ、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］１５μＬ、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１の１５μＬ、「ＤＮＡなし」の対照１５μＬ、分子量マーカー。
【図４７】抗ヒトＦｃ抗体による（トリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥからの）ウェスタンブロットを示す。レーン１ないし５を次のとおり負荷した。Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１の２μＬ、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１の５μＬ、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１の１０μＬ、２０ｎｇのヒトＩｇＧ標準物質、分子量マーカー。
【図４８】抗ヒトＦｃ抗体による（トリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥからの）ウェスタンブロットを示す。レーン１ないし１３を次のとおり負荷した。２０ｎｇのヒトＩｇＧ標準物質、Ｄ１、Ｃ３、Ｃ２、Ｂ６、Ｂ５、Ｂ２、Ｂ１、Ａ６、Ａ５、Ａ４、Ａ３、Ａ２（レーン２ないし１３中に負荷したクローン培養上清）。
【図４９Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１生成物５０μＬのスペクトル走査を示す。
【図４９Ｂ】最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。
【図４９Ｃ】５０ｍＭのＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅ

ｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１生成物１４９μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図４９Ｄ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析したＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１の最終試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【図５０Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ）生成物５０μＬのスペクトル走査を示す。

【図５０Ｂ】最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ）生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。

【図５０Ｃ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ）生成物５０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図５０Ｄ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析した最終生成物Ｆｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ）の試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【図５１Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）生成物５０μＬのスペクトル走査を示す。

【図５１Ｂ】最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。

【図５１Ｃ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）生成物５０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図５１Ｄ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析した最終生成物Ｆｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）の試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【図５２Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のク

ォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）生成物５０μＬのスペクトル走査を示す。

【図５２Ｂ】最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷する。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。

【図５２Ｃ】５０ｍＭのNaH_2PO_4、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される最終的なＦｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）生成物５０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図５２Ｄ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析した最終生成物Ｆｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）の試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【図５３Ａ】アジアサソリのオルトキルススクロビキュロサス（Ｏｒｔｈｏｃｈｉｒｕｓ　ｓｃｒｏｂｉｃｕｌｏｓｕｓ）毒液の３８残基毒素ペプチドである合成Ｏｓｋ１によるヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の阻害を示す。図５３Ａは、合成Ｏｓｋ１毒素ペプチドによってヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。図５３Ｂは、多様な濃度での合成Ｏｓｋ１毒素ペプチド遮断の時間経過を示す。合成Ｏｓｋ１毒素ペプチドに関するＩＣ５０は、３９±１２ｐＭ（ｎ＝４個の細胞）であると概算した。

【図５３Ｂ】アジアサソリのオルトキルススクロビキュロサス（Ｏｒｔｈｏｃｈｉｒｕｓ　ｓｃｒｏｂｉｃｕｌｏｓｕｓ）毒液の３８残基毒素ペプチドである合成Ｏｓｋ１によるヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の阻害を示す。図５３Ａは、合成Ｏｓｋ１毒素ペプチドによってヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。図５３Ｂは、多様な濃度での合成Ｏｓｋ１毒素ペプチド遮断の時間経過を示す。合成Ｏｓｋ１毒素ペプチドに関するＩＣ５０は、３９±１２ｐＭ（ｎ＝４個の細胞）であると概算した。

【図５４Ａ】抗体のＦｃ断片（ＯＳＫ１－ペプチボディ）に対する融合による合成ＯＳＫ１毒素ペプチドの改変が、ヒトＫｖ１．３チャネルに対する阻害活性を保持したことを示す。図５４Ａは、１０個のアミノ酸残基のリンカー鎖長を有するヒトＩｇＧ１　Ｆｃ断片へ結合したＯＳＫ１（Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１）によって、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。融合コンストラクトは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞において安定して発現した。図５４Ｂは、多様な濃度でのＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１遮断の時間経過を示す。Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１に関するＩＣ５０は、合成ＯＳＫ１毒素ペプチドよりも約５倍弱い１９８±３５ｐＭ（ｎ＝６個の細胞）であると概算した。

【図５４Ｂ】抗体のＦｃ断片（ＯＳＫ１－ペプチボディ）に対する融合による合成ＯＳＫ１毒素ペプチドの改変が、ヒトＫｖ１．３チャネルに対する阻害活性を保持したことを示す。図５４Ａは、１０個のアミノ酸残基のリンカー鎖長を有するヒトＩｇＧ１　Ｆｃ断片へ結合したＯＳＫ１（Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１）によって、ヒトＫｖ１．３チャネルを安

定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。融合コンストラクトは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞において安定して発現した。図５４Ｂは、多様な濃度でのＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１遮断の時間経過を示す。Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１に関するＩＣ５０は、合成ＯＳＫ１毒素ペプチドよりも約５倍弱い１９８±３５ｐＭ（ｎ＝６個の細胞）であると概算した。

【図５５Ａ】ＯＳＫ１－ペプチボディの単一アミノ酸残基置換がヒトＫｖ１．３チャネルに対する阻害活性を保持したことを示す。図５５Ａは、（Ｎ末端から７番目の位置でのリジンからセリンへの）単一アミノ酸置換（［Ｋ７Ｓ］）を有し、１０個のアミノ酸残基のリンカー鎖長のヒトＩｇＧ１　Ｆｃ断片へ結合したＯＳＫ１－ペプチボディ（Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］）によって、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。融合コンストラクトは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞において安定して発現した。図５５Ｂは、多様な濃度でのＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］によるカリウム電流遮断の時間経過を示す。ＩＣ５０は、合成ＯＳＫ１毒素ペプチドよりも約１０倍弱い３７２±７１ｐＭ（ｎ＝４個の細胞）であると概算した。

【図５５Ｂ】ＯＳＫ１－ペプチボディの単一アミノ酸残基置換がヒトＫｖ１．３チャネルに対する阻害活性を保持したことを示す。図５５Ａは、（Ｎ末端から７番目の位置でのリジンからセリンへの）単一アミノ酸置換（［Ｋ７Ｓ］）を有し、１０個のアミノ酸残基のリンカー鎖長のヒトＩｇＧ１　Ｆｃ断片へ結合したＯＳＫ１－ペプチボディ（Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］）によって、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。融合コンストラクトは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞において安定して発現した。図５５Ｂは、多様な濃度でのＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］によるカリウム電流遮断の時間経過を示す。ＩＣ５０は、合成ＯＳＫ１毒素ペプチドよりも約１０倍弱い３７２±７１ｐＭ（ｎ＝４個の細胞）であると概算した。

【図５６Ａ】ＯＳＫ１－ペプチボディの２つのアミノ酸残基置換がヒトＫｖ１．３チャネルに対する阻害活性を保持したことを示す。図５６Ａは、（Ｎ末端からそれぞれ１６番目及び２０番目の位置でのグルタミン酸からリジンへの及びリジンからアスパラギン酸への）２つのアミノ酸置換（［Ｋ７Ｓ］）を有し、１０個のアミノ酸残基のリンカー鎖長のヒトＩｇＧ１　Ｆｃ断片へ結合したＯＳＫ１－ペプチボディ（Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６ＫＫ２０Ｄ］）によって、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。融合コンストラクトは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞において安定して発現した。図５６Ｂは、多様な濃度でのＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６ＫＫ２０Ｄ］による、カリウム電流遮断の時間経過を示す。ＩＣ５０は、合成ＯＳＫ１毒素ペプチドよりも約６倍弱い２４８±６３ｐＭ（ｎ＝３個の細胞）であると概算した。

【図５６Ｂ】ＯＳＫ１－ペプチボディの２つのアミノ酸残基置換がヒトＫｖ１．３チャネルに対する阻害活性を保持したことを示す。図５６Ａは、（Ｎ末端からそれぞれ１６番目及び２０番目の位置でのグルタミン酸からリジンへの及びリジンからアスパラギン酸への）２つのアミノ酸置換（［Ｋ７Ｓ］）を有し、１０個のアミノ酸残基のリンカー鎖長のヒトＩｇＧ１　Ｆｃ断片へ結合したＯＳＫ１－ペプチボディ（Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６ＫＫ２０Ｄ］）によって、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。融合コンストラクトは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞において安定して発現した。図５６Ｂは、多様な濃度でのＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６ＫＫ２０Ｄ］による、カリウム電流遮断の時間経過を示す。ＩＣ５０は、合成ＯＳＫ１毒素ペプチドよりも約６倍弱い２４８±６３ｐＭ（ｎ＝３個の細胞）であると概算した。

【図５７Ａ】ＯＳＫ１－ペプチボディのアミノ酸残基三重置換が、ヒトＫｖ１．３チャネルに対する阻害活性を保持するが、阻害の有効性は合成ＯＳＫ１毒素ペプチドと比較して有意に低下したことを示す。図５７Ａは、（Ｎ末端からそれぞれ７番目、１６番目及び２

０番目の位置でのリジンからセリンへの、グルタミン酸からリジンへの及びリジンからアスパラギン酸への）三重のアミノ酸置換（［Ｋ７ＳＥ１６ＫＫ２０Ｄ］）を有し、１０個のアミノ酸残基のリンカー鎖長のヒトＩｇＧ１　Ｆｃ断片へ結合したＯＳＫ１-ペプチボディ（Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１［Ｋ７ＳＥ１６ＫＫ２０Ｄ］）によって、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。融合コンストラクトは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞において安定して発現した。図５７Ｂは、多様な濃度でのＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１［Ｋ７ＳＥ１６ＫＫ２０Ｄ］によるカリウム電流遮断の時間経過を示す。ＩＣ５０は、合成ＯＳＫ１毒素ペプチドよりも約２１倍弱い８１２±８４ｐＭ（ｎ＝３個の細胞）であると概算した。

【図５７Ｂ】ＯＳＫ１-ペプチボディのアミノ酸残基三重置換が、ヒトＫｖ１．３チャネルに対する阻害活性を保持するが、阻害の有効性は合成ＯＳＫ１毒素ペプチドと比較して有意に低下したことを示す。図５７Ａは、（Ｎ末端からそれぞれ７番目、１６番目及び２０番目の位置でのリジンからセリンへの、グルタミン酸からリジンへの及びリジンからアスパラギン酸への）三重のアミノ酸置換（［Ｋ７ＳＥ１６ＫＫ２０Ｄ］）を有し、１０個のアミノ酸残基のリンカー鎖長のヒトＩｇＧ１　Ｆｃ断片へ結合したＯＳＫ１-ペプチボディ（Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１［Ｋ７ＳＥ１６ＫＫ２０Ｄ］）によって、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現させるＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。融合コンストラクトは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞において安定して発現した。図５７Ｂは、多様な濃度でのＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１［Ｋ７ＳＥ１６ＫＫ２０Ｄ］によるカリウム電流遮断の時間経過を示す。ＩＣ５０は、合成ＯＳＫ１毒素ペプチドよりも約２１倍弱い８１２±８４ｐＭ（ｎ＝３個の細胞）であると概算した。

【図５８Ａ】血清の付与された割合での各標準物質に関する線形回帰式を含有するＳｈＫ（図５８Ａ）に関する標準曲線を示す。

【図５８Ｂ】血清の付与された割合での各標準物質に関する線形回帰式を含有する２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ［１-３５］（図５８Ｂ）に関する標準曲線を示す。

【図５９】静脈内注射後の２０Ｋ　ＰＥＧ　ＳｈＫ［１-３５］分子に関する、ラットにおける薬物動態学的特性を示す。

【図６０】Ｋｖ１．３阻害剤であるＳｈＫ対２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ［１-３５］の単一等モル量の静脈内注射を受容するラットの血清試料（５％）中のＫｖ１．３阻害活性を示す。

【図６１】養子移植ＥＡＥモデル実験デザイン（ｎ＝治療群あたり５匹のラット）を示す。１キログラムあたりのマイクログラム（ｍｇ／ｋｇ）における投与値は、ペプチド含有量に基づいている。

【図６２】ＰＥＧ-ＳｈＫによる治療が、養子移植ＥＡＥモデルにおけるラットの疾病を寛解したことを示す。臨床的評価：０＝徴候なし、０．５＝遠位跛行尾部、１．０＝跛行尾部、２．０＝軽度不全対麻痺、運動失調、３．０＝中等度不全対麻痺、３．５＝片後肢麻痺、４．０＝完全後肢麻痺、５．０＝完全後肢麻痺及び失禁、５．５＝四肢麻痺、６．０＝瀕死状態又は死亡であった。５．５ないし６のスコアに到達しているラットを安楽死させた。平均±平均値の標準誤差の値を示す（ｎ＝治療群あたり５匹のラット）

【図６３】ＰＥＧ-ＳｈＫによる治療が、養子移植ＥＡＥモデルにおける体重の低下を予防したことを示す。ラットは、（生存しているラットに関して）第-１、４、６及び８日に体重測定した。平均±平均の標準誤差の値を示す。

【図６４Ａ】ヒト全血におけるタプシガルジン誘発性ＩＬ-２生成が、Ｋｖ１．３チャネル阻害剤であるＳｈＫ［１-３５］及びＦｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ［２-３５］によって抑制されたことを示すカルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡも前記反応を遮断する。ＢＫＣａチャネル阻害剤であるイベリオトキシン（ＩｂＴｘ）は、有意な活性を示さなかった。２つの個別のドナー由来の全血の反応を図６４Ａ及び図６４Ｂに示す。

【図６４Ｂ】ヒト全血におけるタプシガルジン誘発性ＩＬ-２生成が、Ｋｖ１．３チャネ

ル阻害剤であるＳｈＫ［１－３５］及びＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］によって抑制されたことを示すカルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡも前記反応を遮断する。ＢＫＣａチャネル阻害剤であるイベリオトキシン（ＩｂＴｘ）は、有意な活性を示さなかった。２つの個別のドナー由来の全血の反応を図６４Ａ及び図６４Ｂに示す。

【図６５Ａ】ヒト全血におけるタプシガルジン誘発性ＩＦＮ－ｇ生成が、Ｋｖ１．３チャネル阻害剤であるＳｈＫ［１－３５］及びＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］によって抑制されたことを示すカルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡも前記反応を遮断する。ＢＫＣａチャネル阻害剤であるイベリオトキシン（ＩｂＴｘ）は、有意な活性を示さなかった。２つの個別のドナー由来の全血の反応を図６５Ａ及び図６５Ｂに示す。

【図６５Ｂ】ヒト全血におけるタプシガルジン誘発性ＩＦＮ－ｇ生成が、Ｋｖ１．３チャネル阻害剤であるＳｈＫ［１－３５］及びＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］によって抑制されたことを示すカルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡも前記反応を遮断する。ＢＫＣａチャネル阻害剤であるイベリオトキシン（ＩｂＴｘ）は、有意な活性を示さなかった。２つの個別のドナー由来の全血の反応を図６５Ａ及び図６５Ｂに示す。

【図６６Ａ】ヒト全血におけるＴ細胞に関するＣＤ４０Ｌのタプシガルジン誘発性上方制御が、Ｋｖ１．３チャネル阻害剤であるＳｈＫ［１－３５］及びＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］（Ｆｃ－ＳｈＫ）によって抑制されたことを示す。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡ（ＣｓＡ）も前記反応を遮断する。図６６Ａは、ＣＤ４＋Ｔ細胞の合計の反応で見る実験の結果を示す。図６６Ｂは、ＣＤ４＋　Ｔ細胞並びにＣＤ４＋ＣＤ４５＋及びＣＤ４＋ＣＤ４５－Ｔ細胞で見た実験の結果を示す。図６６Ｂにおいて、ＢＫＣａチャネル阻害剤イベリオトキシン（ＩｂＴｘ）及びＫｖ１．１チャネル阻害剤デンドロトキシン－Ｋ（ＤＴＸ－Ｋ）は、有意な活性を示さなかった。

【図６６Ｂ】ヒト全血におけるＴ細胞に関するＣＤ４０Ｌのタプシガルジン誘発性上方制御が、Ｋｖ１．３チャネル阻害剤であるＳｈＫ［１－３５］及びＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］（Ｆｃ－ＳｈＫ）によって抑制されたことを示す。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡ（ＣｓＡ）も前記反応を遮断する。図６６Ａは、ＣＤ４＋Ｔ細胞の合計の反応で見る実験の結果を示す。図６６Ｂは、ＣＤ４＋　Ｔ細胞並びにＣＤ４＋ＣＤ４５＋及びＣＤ４＋ＣＤ４５－Ｔ細胞で見た実験の結果を示す。図６６Ｂにおいて、ＢＫＣａチャネル阻害剤イベリオトキシン（ＩｂＴｘ）及びＫｖ１．１チャネル阻害剤デンドロトキシン－Ｋ（ＤＴＸ－Ｋ）は、有意な活性を示さなかった。

【図６７Ａ】ヒト全血におけるＴ細胞に関するＩＬ－２Ｒのタプシガルジン誘発性上方制御が、Ｋｖ１．３チャネル阻害剤であるＳｈＫ［１－３５］及びＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］（Ｆｃ－ＳｈＫ）によって抑制されたことを示す。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡ（ＣｓＡ）も前記反応を遮断する。　図６７Ａは、ＣＤ４＋Ｔ細胞の合計の反応で見る実験の結果を示す。　図６７Ｂは、ＣＤ４＋　Ｔ細胞並びにＣＤ４＋ＣＤ４５＋Ｔ細胞及びＣＤ４＋ＣＤ４５－Ｔ細胞の合計で見る実験の結果を示す。図６７Ｂにおいて、ＢＫＣａチャネル阻害剤イベリオトキシン（ＩｂＴｘ）及びＫｖ１．１チャネル阻害剤デンドロトキシン－Ｋ（ＤＴＸ－Ｋ）は、有意な活性を示さなかった。

【図６７Ｂ】ヒト全血におけるＴ細胞に関するＩＬ－２Ｒのタプシガルジン誘発性上方制御が、Ｋｖ１．３チャネル阻害剤であるＳｈＫ［１－３５］及びＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］（Ｆｃ－ＳｈＫ）によって抑制されたことを示す。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡ（ＣｓＡ）も前記反応を遮断する。　図６７Ａは、ＣＤ４＋Ｔ細胞の合計の反応で見る実験の結果を示す。　図６７Ｂは、ＣＤ４＋　Ｔ細胞並びにＣＤ４＋ＣＤ４５＋Ｔ細胞及びＣＤ４＋ＣＤ４５－Ｔ細胞の合計で見る実験の結果を示す。図６７Ｂにおいて、ＢＫＣａチャネル阻害剤イベリオトキシン（ＩｂＴｘ）及びＫｖ１．１チャネル阻害剤デンドロトキシン－Ｋ（ＤＴＸ－Ｋ）は、有意な活性を示さなかった。

【図６８Ａ】ＰＥＧ－Ｓｈｋ精製（図６８Ａ）に関するＳＰセファロースＨＰカラム上でのＰＥＧ－ペプチド精製の陽イオン交換クロマトグラムを示す。

【図６８Ｂ】ＰＥＧ－ＯＳＫ－１精製（図６８Ｂ）に関するＳＰセファロースＨＰカラム上でのＰＥＧ－ペプチド精製の陽イオン交換クロマトグラムを示す。

【図６９Ａ】ＰＥＧ－Ｓｈｋ純度９９％超（図６９Ａ）の純度を示すための、最終的なＰＥＧ－ペプチドプールに関するＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムを示す。
【図６９Ｂ】ＰＥＧ－Ｏｓｋ１純度９７％超（図６９Ｂ）の純度を示すための、最終的なＰＥＧ－ペプチドプールに関するＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムを示す。
【図７０】Ｆｃ　Ｎ末端ドメイン（アミノ酸残基１ないし１３９）、ＯｓＫ１（下線を付したアミノ酸残基１４２ないし１７９）及びＦｃ　Ｃ末端ドメイン（アミノ酸残基１８２ないし２７０）の３つの結合したドメインを有する典型的なＦｃループ－Ｌ２－ＯｓＫ１－Ｌ２のアミノ酸配列（配列番号９７６）を示す。
【図７１】Ｆｃ　Ｎ末端ドメイン（アミノ酸残基１ないし１３９）、ＳｈＫ（下線を付したアミノ酸残基１４２ないし１７９）及びＦｃ　Ｃ末端ドメイン（アミノ酸残基１７９ないし２６７）の３つの結合したドメインを有する典型的なＦｃループ－Ｌ２－ＳｈＫ－Ｌ２のアミノ酸配列（配列番号９７７）を示す。
【図７２】Ｆｃ　Ｎ末端ドメイン（アミノ酸残基１ないし１３９）、ＳｈＫ（下線を付したアミノ酸残基１４２ないし１７６）及びＦｃ　Ｃ末端ドメイン（アミノ酸残基１８１ないし２６９）の３つの結合したドメインを有する典型的なＦｃループ－Ｌ２－ＳｈＫ－Ｌ４のアミノ酸配列（配列番号９７８）を示す。
【図７３】Ｆｃ　Ｎ末端ドメイン（アミノ酸残基１ないし１３９）、ＯｓＫ１（下線を付したアミノ酸残基１４４ないし１８１）及びＦｃ　Ｃ末端ドメイン（アミノ酸残基１８４ないし２７２）の３つの結合したドメインを有する典型的なＦｃループ－Ｌ４－ＯｓＫ１－Ｌ２のアミノ酸配列（配列番号９７９）を示す。
【図７４】２０Ｋ　ＰＥＧ化ＳｈＫ［１－３５］が、ＨＥＫ２９３／Ｋｖ１．３細胞に関するホールセルパッチクランプ電気生理学によって測定されるヒトＫｖ１．３の有力な遮断を提供したことを示す。データは、ピーク電流の遮断を表す。
【図７５Ａ】本発明の組成物の幾つかの他の典型的な実施形態の模式的構造を示す。「X^2」及び「X^3」は、本明細書に定義される毒素ペプチド又はリンカー－毒素ペプチドの組み合わせ（すなわち、－（Ｌ）$_f$－Ｐ－（Ｌ）$_g$－）を表す。本明細書に記載されているが、図７５には示されていないように、付加的なX^1ドメイン及び１つ以上の付加的なＰＥＧ部分も他の実施形態に包含される。本明細書に示される特異的な実施形態は次のとおりである。　図７５Ｃ、図７５Ｄ、図７５Ｇ及び図７５Ｈは、単一鎖分子を示し、前記分子に関するＤＮＡコンストラクトも表し得る。　図７５Ａ、図７５Ｂ、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、（位置F^2にある）二重にジスルフィド結合したＦｃ二量体を示し、図７５Ａ及び図７５Ｂは、位置X^3における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示し、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、位置X^2における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示す。
【図７５Ｂ】本発明の組成物の幾つかの他の典型的な実施形態の模式的構造を示す。「X^2」及び「X^3」は、本明細書に定義される毒素ペプチド又はリンカー－毒素ペプチドの組み合わせ（すなわち、－（Ｌ）$_f$－Ｐ－（Ｌ）$_g$－）を表す。本明細書に記載されているが、図７５には示されていないように、付加的なX^1ドメイン及び１つ以上の付加的なＰＥＧ部分も他の実施形態に包含される。本明細書に示される特異的な実施形態は次のとおりである。　図７５Ｃ、図７５Ｄ、図７５Ｇ及び図７５Ｈは、単一鎖分子を示し、前記分子に関するＤＮＡコンストラクトも表し得る。　図７５Ａ、図７５Ｂ、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、（位置F^2にある）二重にジスルフィド結合したＦｃ二量体を示し、図７５Ａ及び図７５Ｂは、位置X^3における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示し、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、位置X^2における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示す。
【図７５Ｃ】本発明の組成物の幾つかの他の典型的な実施形態の模式的構造を示す。「X^2」及び「X^3」は、本明細書に定義される毒素ペプチド又はリンカー－毒素ペプチドの組み合わせ（すなわち、－（Ｌ）$_f$－Ｐ－（Ｌ）$_g$－）を表す。本明細書に記載されているが、図７５には示されていないように、付加的なX^1ドメイン及び１つ以上の付加的なＰＥＧ部分も他の実施形態に包含される。本明細書に示される特異的な実施形態は次のと

おりである。　図７５Ｃ、図７５Ｄ、図７５Ｇ及び図７５Ｈは、単一鎖分子を示し、前記分子に関するＤＮＡコンストラクトも表し得る。　図７５Ａ、図７５Ｂ、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、（位置$Ｆ^{2}$にある）二重にジスルフィド結合したＦｃ二量体を示し、図７５Ａ及び図７５Ｂは、位置$Ｘ^{3}$における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示し、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、位置$Ｘ^{2}$における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示す。

【図７５Ｄ】本発明の組成物の幾つかの他の典型的な実施形態の模式的構造を示す。「$Ｘ^{2}$」及び「$Ｘ^{3}$」は、本明細書に定義される毒素ペプチド又はリンカー－毒素ペプチドの組み合わせ（すなわち、－（Ｌ）$_{f}$－Ｐ－（Ｌ）$_{g}$－）を表す。本明細書に記載されているが、図７５には示されていないように、付加的な$Ｘ^{1}$ドメイン及び１つ以上の付加的なＰＥＧ部分も他の実施形態に包含される。本明細書に示される特異的な実施形態は次のとおりである。　図７５Ｃ、図７５Ｄ、図７５Ｇ及び図７５Ｈは、単一鎖分子を示し、前記分子に関するＤＮＡコンストラクトも表し得る。　図７５Ａ、図７５Ｂ、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、（位置$Ｆ^{2}$にある）二重にジスルフィド結合したＦｃ二量体を示し、図７５Ａ及び図７５Ｂは、位置$Ｘ^{3}$における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示し、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、位置$Ｘ^{2}$における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示す。

【図７５Ｅ】本発明の組成物の幾つかの他の典型的な実施形態の模式的構造を示す。「$Ｘ^{2}$」及び「$Ｘ^{3}$」は、本明細書に定義される毒素ペプチド又はリンカー－毒素ペプチドの組み合わせ（すなわち、－（Ｌ）$_{f}$－Ｐ－（Ｌ）$_{g}$－）を表す。本明細書に記載されているが、図７５には示されていないように、付加的な$Ｘ^{1}$ドメイン及び１つ以上の付加的なＰＥＧ部分も他の実施形態に包含される。本明細書に示される特異的な実施形態は次のとおりである。　図７５Ｃ、図７５Ｄ、図７５Ｇ及び図７５Ｈは、単一鎖分子を示し、前記分子に関するＤＮＡコンストラクトも表し得る。　図７５Ａ、図７５Ｂ、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、（位置$Ｆ^{2}$にある）二重にジスルフィド結合したＦｃ二量体を示し、図７５Ａ及び図７５Ｂは、位置$Ｘ^{3}$における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示し、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、位置$Ｘ^{2}$における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示す。

【図７５Ｆ】本発明の組成物の幾つかの他の典型的な実施形態の模式的構造を示す。「$Ｘ^{2}$」及び「$Ｘ^{3}$」は、本明細書に定義される毒素ペプチド又はリンカー－毒素ペプチドの組み合わせ（すなわち、－（Ｌ）$_{f}$－Ｐ－（Ｌ）$_{g}$－）を表す。本明細書に記載されているが、図７５には示されていないように、付加的な$Ｘ^{1}$ドメイン及び１つ以上の付加的なＰＥＧ部分も他の実施形態に包含される。本明細書に示される特異的な実施形態は次のとおりである。　図７５Ｃ、図７５Ｄ、図７５Ｇ及び図７５Ｈは、単一鎖分子を示し、前記分子に関するＤＮＡコンストラクトも表し得る。　図７５Ａ、図７５Ｂ、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、（位置$Ｆ^{2}$にある）二重にジスルフィド結合したＦｃ二量体を示し、図７５Ａ及び図７５Ｂは、位置$Ｘ^{3}$における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示し、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、位置$Ｘ^{2}$における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示す。

【図７５Ｇ】本発明の組成物の幾つかの他の典型的な実施形態の模式的構造を示す。「$Ｘ^{2}$」及び「$Ｘ^{3}$」は、本明細書に定義される毒素ペプチド又はリンカー－毒素ペプチドの組み合わせ（すなわち、－（Ｌ）$_{f}$－Ｐ－（Ｌ）$_{g}$－）を表す。本明細書に記載されているが、図７５には示されていないように、付加的な$Ｘ^{1}$ドメイン及び１つ以上の付加的なＰＥＧ部分も他の実施形態に包含される。本明細書に示される特異的な実施形態は次のとおりである。　図７５Ｃ、図７５Ｄ、図７５Ｇ及び図７５Ｈは、単一鎖分子を示し、前記分子に関するＤＮＡコンストラクトも表し得る。　図７５Ａ、図７５Ｂ、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、（位置$Ｆ^{2}$にある）二重にジスルフィド結合したＦｃ二量体を示し、図７５Ａ及び図７５Ｂは、位置$Ｘ^{3}$における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示し、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、位置$Ｘ^{2}$における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示す。

【図７５Ｈ】本発明の組成物の幾つかの他の典型的な実施形態の模式的構造を示す。「Ｘ^{2}」及び「Ｘ^{3}」は、本明細書に定義される毒素ペプチド又はリンカー－毒素ペプチドの組み合わせ（すなわち、－（Ｌ）$_{f}$－Ｐ－（Ｌ）$_{g}$－）を表す。本明細書に記載されているが、図７５には示されていないように、付加的なＸ^{1}ドメイン及び１つ以上の付加的なＰＥＧ部分も他の実施形態に包含される。本明細書に示される特異的な実施形態は次のとおりである。　図７５Ｃ、図７５Ｄ、図７５Ｇ及び図７５Ｈは、単一鎖分子を示し、前記分子に関するＤＮＡコンストラクトも表し得る。　図７５Ａ、図７５Ｂ、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、（位置Ｆ^{2}にある）二重にジスルフィド結合したＦｃ二量体を示し、図７５Ａ及び図７５Ｂは、位置Ｘ^{3}における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示し、図７５Ｅ及び図７５Ｆは、位置Ｘ^{2}における両鎖上の毒素ペプチド部分を有する二量体を示す。

【図７６Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用する、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したＳｈＫ［２－３５］－Ｆｃ生成物５０μＬのスペクトル走査を示す。

【図７６Ｂ】最終的なＳｈＫ［２－３５］－Ｆｃ生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２に次のとおり負荷した。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。

【図７６Ｃ】５０ｍＭのＮａＨ$_{2}$ＰＯ$_{4}$、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なＳｈＫ［２－３５］－Ｆｃ生成物７０μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図７６Ｄ】Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｎｎｉｇａｎ　ＬＣＱイオントラップ質量分光光度計のエレクトロスプレー源へ直接連結されるカラム溶出液を使用して、Ａｇｉｌｅｎｔ１１００ＨＰＣＬを使用する逆相クロマトグラフィーを使用して、最終的なＳｈＫ［２－３５］－Ｆｃ試料のＬＣ－ＭＳ分析を示す。関連するスペクトルを合計し、Ｂｉｏｗｏｒｋｓソフトウェアパッケージを使用して質量データへデコンボルートした。

【図７７Ａ】Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ８４５３分光光度計及び１ｃｍ経路長のクォーツキュベットを使用して、７００μＬのＰＢＳ（空の緩衝液）中に希釈したｍｅｔ－ＳｈＫ［１－３５］－Ｆｃ生成物２０μＬのスペクトル走査を示す。

【図７７Ｂ】最終的なｍｅｔ－ＳｈＫ［１－３５］－Ｆｃ生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１ないし１２を次のとおり負荷した。Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの非還元型生成物、ブランク、２．０μｇの非還元型生成物、ブランク、１０μｇの非還元型生成物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２の広範な範囲のタンパク質標準物質、０．５μｇの還元型生成物、ブランク、２．０μｇの還元型生成物、ブランク及び１０μｇの還元型生成物。

【図７７Ｃ】５０ｍＭのＮａＨ$_{2}$ＰＯ$_{4}$、２５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ１ｍＬ／分で注入される、最終的なｍｅｔ－ＳｈＫ［１－３５］－Ｆｃ生成物９３μｇに関する、２８０ｎｍで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図７７Ｄ】窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分光光度計を使用して分析した最終的なｍｅｔ－ＳｈＫ［１－３５］－Ｆｃ試料のＭＡＬＤＩ質量スペクトル分析を示す。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【発明を実施するための形態】
【００３２】
用語の定義
本明細書を通じて使用される用語は、具体的な事例において別段の限定がなければ、以下のとおり定義される。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されている単数形（「ａ」、「ａｎ」及び「ｔｈｅ」）には、文脈から別段の意味であることが明らかである場合を除き、複数表記も含まれる。
【００３３】
「半減期延長部分」（すなわち、式Ｉ中のＦ[1]又はＦ[2]）という用語は、トキシンペプチドの非抱合形態に比べて、インビボタンパク分解によるトキシンペプチドの分解又はトキシンペプチドの活性を減少させる他の化学的修飾を抑制又は軽減し、吸収の速度を増加させるなど（但し、これに限定されない。）、半減期又はその他の薬物動態特性を増加させ、毒性を軽減し、溶解性を向上させ、目的の標的イオンチャンネルに関して、トキシンペプチドの生物学的活性及び／又は標的選択性を増加させ、製造可能性を増加させ、及び／又はトキシンペプチドの免疫原性を低下させる、トキシンペプチドに共有結合又は抱合された、医薬として許容される部分、ドメイン又は「ビヒクル」を表す。
【００３４】
「ＰＥＧ化されたペプチド」とは、ペプチド自体のアミノ酸残基に共有結合されるか、又はペプチドの残基に共有結合されたペプチド若しくは非ペプチドリンカー（芳香族リンカーを含むが、これに限定されない。）に共有結合されたポリエチレングリコール（ＰＥＧ）部分を有するペプチド又はタンパク質を意味する。
【００３５】
「ポリエチレングリコール」又は「ＰＥＧ」とは、カップリング剤あり若しくはなしの、又はカップリング若しくは活性化部分での（例えば、アルデヒド、ヒドロキシスクシンイミジル、ヒドラジド、チオール、トリフラート、トレシラート、アジリジン、オキシラン、オルトピリジル　ジスルフィド、ビニルスルホン、ヨードアセトアミド又はマレイミド部分での誘導体化あり若しくはなしの、ポリアルキレングリコール化合物又はその誘導体を意味する。本発明に従えば、有用なＰＥＧには、実質的に直線の、直鎖ＰＥＧ、分岐ＰＥＧ又は樹状ＰＥＧが含まれる。（例えば、Ｍｅｒｒｉｌｌ，米国特許第５，１７１，２６４号；Ｈａｒｒｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｕｌｔｉａｒｍｅｄ，ｍｏｎｏｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ，ｐｏｌｙｍｅｒ　ｆｏｒ　ｃｏｕｐｌｉｎｇ　ｔｏ　ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ　ａｎｄ　ｓｕｒｆａｃｅｓ，米国特許第５，９３２，４６２号；Ｓｈｅｎ，Ｎ-ｍａｌｅｉｍｉｄｙｌ　ｐｏｌｙｍｅｒ　ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ，米国特許第６，６０２，４９８号を参照）。
【００３６】
「ペプチボディ」という用語は、Ｆ[1]及び／又はＦ[2]が、免疫グロブリンＦｃドメイン又はＦ[c]のＣＨ２ドメインなどのその一部である式Ｉの分子、又はＦ[1]及びＦ[2]が、それぞれ、トキシンペプチドがＦ[1]及びＦ[2]の間に挿入されたＦｃドメインであるように、トキシンペプチドがヒトＩｇＧ１Ｆｃドメインループ中に挿入された式Ｉの分子を表す（例えば、本明細書の図７０～７３及び実施例４９を参照。）。本発明のペプチボディは、本明細書にさらに記載されているように、Ｆｃドメイン若しくはその一部の何れかにおいて、若しくは本発明の組成物のトキシンペプチド部分において、又は両方においてＰＥＧ化することも可能である。
【００３７】
「固有Ｆｃ」という用語は、単量体形態であれ、又は多量体形態であれ、完全な抗体の消化から得られる非抗原結合断片の配列を含む分子又は配列を表す。固有Ｆｃの元の免疫グロブリン源は、好ましくは、ヒト由来であり、免疫グロブリンの何れでもあり得るが、ＩｇＧ１又はＩｇＧ２が好ましい。固有Ｆｃは、共有（すなわち、ジスルフィド結合）及び非共有会合によって、二量体又は多量体形態へと連結されることが可能な単量体ポリペプチドから構成される。固有Ｆｃ分子の単量体サブユニット間の分子間ジスルフィド結合

の数は、クラス（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＥ）又はサブクラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＡ１、ＩｇＧＡ２）に応じて、１から４の範囲である。天然Ｆｃの一例は、ＩｇＧのパパイン消化から得られるジスルフィド結合された二量体である（Ｅｌｌｉｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８２），Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１０：４０７１－９参照）。本明細書において使用される「固有Ｆｃ」という用語は、単量体、二量体及び多量体形態の総称である。

【００３８】

「Ｆｃバリアント」という用語は、固有Ｆｃから修飾されているが、サルベージ受容体であるＦｃＲｎに対する結合部位をなお含む分子又は配列を表す。幾つかの公開された特許文献が、典型的なＦｃバリアント及びサルベージ受容体との相互作用を記載している。国際出願ＷＯ　９７／３４６３１（１９７９年９月２５日に公開；ＷＯ９６／３２４７８号、　２０００年８月１日に付与された米国特許第６，０９６，８９１号に対応、その全体が、参照により、本明細書に組み込まれる；及びＷＯ　０４／１１０４７２号を参照。従って、「Ｆｃバリアント」という用語には、非ヒト固有Ｆｃからヒト化された分子又は配列が含まれる。さらに、除去可能な部位は、本発明の融合分子に対して必要とされない構造的特徴又は生物学的活性を与えるので、固有Ｆｃは、除去可能な部位を含む。従って、「Ｆｃバリアント」という用語は、（１）ジスルフィド結合形成、（２）選択された宿主細胞との非適合性、（３）選択された宿主細胞中で発現された際のＮ末端不均一性、（４）グリコシル化、（５）補体との相互作用、（６）サルベージ受容体以外のＦｃ受容体への結合又は（７）抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）に影響を与えるか、又はこれらに関与する１つ又はそれ以上の固有Ｆｃ部位又は残基を欠如する分子又は配列を含む。Ｆｃバリアントは、以下でさらに詳しく記載されている。

【００３９】

「Ｆｃドメイン」という用語は、上記定義の固有Ｆｃ及びＦｃバリアント分子及び配列を包含する。Ｆｃバリアント及び固有Ｆｃにおけるごとく、「Ｆｃドメイン」という用語には、完全な抗体から消化されたものであれ、又はその他の手段によって産生されたものであれ、単量体又は多量体形態の分子が含まれる。

【００４０】

Ｆｃドメイン又はＦｃドメインを含む分子に対して用いられる「多量体」という用語は、共有的に、非共有的に、又は共有的相互作用及び非共有的相互作用の両者によって会合された２つ又はそれ以上のポリペプチド鎖を有する分子を表す。ＩｇＧ分子は、典型的には、二量体を形成し、ＩｇＭは五量体；ＩｇＤは二量体及びＩｇＡは単量体、二量体、三量体又は四量体を形成する。当業者は、Ｆｃの固有Ｉｇ源の配列若しくは生じた活性を調べることによって、又はこのような固有Ｆｃを誘導体化（以下に定義されている。）することによって、多量体を形成することが可能である。

【００４１】

Ｆｃドメイン又はＦｃドメインを含む分子に対して用いられる「二量体」という用語は、共有的に又は非共有的に会合された２つのポリペプチド鎖を有する分子を表す。従って、本発明の範囲に属する典型的な二量体が、図２に示されている。

【００４２】

「誘導体化する」及び「誘導体」又は「誘導体化された」という用語は、それぞれ、（１）化合物が、環状部分、例えば、化合物内のシステイン残基間の架橋を有する；（２）化合物が架橋され、又は架橋部位を有する、例えば、化合物がシステイン残基を有し、従って、培養若しくはインビボにおいて架橋された二量体を形成する；（３）非ペプチド結合によって、１つ又はそれ以上のペプチド結合が置換されている；（４）Ｎ末端が、－ＮＲＲ^{1}、ＮＲＣ（Ｏ）Ｒ^{1}、－ＮＲＣ（Ｏ）ＯＲ^{1}、－ＮＲＳ（Ｏ）$_{2}$Ｒ^{1}、－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨＲ、スクシンイミド基又は置換された若しくは置換されていないベンジルオキシカルボニル－ＮＨ－（Ｒ及びＲ^{1}及び環置換基は、以下で定義されているとおりである。）；（５）Ｃ末端が－Ｃ（Ｏ）Ｒ^{2}又は－ＮＲ^{3}Ｒ^{4}によって置換されている（Ｒ^{2}、Ｒ^{3}及びＲ^{4}は、以下に定義されているとおりである。）；並びに（６）選択された側鎖又

は末端残基と反応することができる因子での処理を通じて、各アミノ酸部分が修飾されている化合物、プロセス及び得られた化合物を含む。誘導体は、さらに、以下に記載されている。

【００４３】

「ペプチド」という用語は、２～約８０アミノ酸残基の分子を表し、約１０～約６０アミノ酸残基の分子が好ましく、約３０～約５０アミノ酸残基の分子が最も好ましい。典型的なペプチドは、あらゆる公知の方法によって無作為に作製され、ペプチドライブラリー（例えば、ファージディスプレイライブラリー）中に担持され、又はタンパク質の消化によって得ることができる。本発明の組成物の何れのペプチド部分、例えば、本明細書に記載されているトキシンペプチド又はペプチドリンカー部分においても、所定の配列のＮ末端又はＣ末端の一方又は両方に、追加のアミノ酸を含めることが可能である。もちろん、これらの追加のアミノ酸残基は、組成物の機能的活性を著しく妨害すべきでない。「トキシンペプチド」には、毒から単離することが可能な薬理学的に活性な天然に存在するペプチドの同じアミノ酸配列を有するペプチドが含まれ、天然に存在するこのような分子の修飾されたペプチド類縁体も含まれる。本発明を実施する上で有用なトキシンペプチドの例は、表１～３２に列記されている。トキシンペプチド（図２における「Ｐ」又は「$Ｐ^{1}$」として示されている均等物）は、例えば、図９に示されているように、少なくとも２つのペプチド内ジスルフィド結合を含む。

【００４４】

従って、本発明は、

ａ）$Ｃ^{1}$－$Ｃ^{3}$及び$Ｃ^{2}$－$Ｃ^{4}$ジスルフィド結合（$Ｃ^{1}$、$Ｃ^{2}$、$Ｃ^{3}$及び$Ｃ^{4}$は、ペプチドのＮ末端が左側に配置された慣用表記のトキシンペプチドの一次配列中にシステイン残基が現れる順序を表しており、アミノ酸配列中の第一及び第三のシステインがジスルフィド結合を形成し、並びに第二及び第四のシステインがジスルフィド結合を形成する。）。このような$Ｃ^{1}$－$Ｃ^{3}$、$Ｃ^{2}$－$Ｃ^{4}$ジスルフィド結合パターンを有するトキシンペプチドの例には、アパミンペプチド、α－コノペプチド、ＰｎｌＡペプチドＰｎｌＢペプチド及びＭＩＩペプチド並びに前記の何れかの類縁体が含まれるが、これらに限定されない。

【００４５】

ｂ）$Ｃ^{1}$－$Ｃ^{6}$、$Ｃ^{2}$－$Ｃ^{4}$及び$Ｃ^{3}$－$Ｃ^{5}$ジスルフィド結合（上述のように、$Ｃ^{1}$、$Ｃ^{2}$、$Ｃ^{3}$、$Ｃ^{4}$、$Ｃ^{5}$及び$Ｃ^{6}$は、ペプチドのＮ末端が左側に配置された慣用表記のトキシンペプチドの一次配列中にシステイン残基が現れる順序を表しており、アミノ酸配列中の第一及び第六のシステインがジスルフィド結合を形成し、第二及び第四のシステインがジスルフィド結合を形成し、並びに第三及び第五のシステインがジスルフィド結合を形成する。）。このような$Ｃ^{1}$－$Ｃ^{6}$、$Ｃ^{2}$－$Ｃ^{4}$、$Ｃ^{3}$－$Ｃ^{5}$ジスルフィド結合パターンを有するトキシンペプチドの例には、ＳｈＫ、ＢｇＫ、ＨｍＫ、ＡｅＫＳ、ＡｓＫ及びＤＴＸ１並びに前記の何れかの類縁体が含まれるが、これらに限定されない。

【００４６】

ｃ）$Ｃ^{1}$－$Ｃ^{4}$、$Ｃ^{2}$－$Ｃ^{5}$及び$Ｃ^{3}$－$Ｃ^{6}$ジスルフィド結合（上記のように、$Ｃ^{1}$、$Ｃ^{2}$、$Ｃ^{3}$、$Ｃ^{4}$、$Ｃ^{5}$及び$Ｃ^{6}$は、ペプチドのＮ末端が左側に配置された慣用表記のトキシンペプチドの一次配列中にシステイン残基が現れる順序を表しており、アミノ酸配列中の第一及び第四のシステインがジスルフィド結合を形成し、第二及び第五のシステインがジスルフィド結合を形成し、並びに第三及び第六のシステインがジスルフィド結合を形成する。）。このような$Ｃ^{1}$－$Ｃ^{4}$、$Ｃ^{2}$－$Ｃ^{5}$、$Ｃ^{3}$－$Ｃ^{6}$ジスルフィド結合パターンを有するトキシンペプチドの例には、ＣｈＴｘ、ＭｇＴｘ、ＯＳＫ１、ＫＴＸ１、ＡｇＴｘ２、Ｐｉ２、Ｐｉ３、ＮＴＸ、ＨｇＴｘ１、ＢｅＫＭ１、ＢｍＫＴＸ、Ｐ０１、ＢｍＫＫ６、Ｔｃ３２、Ｔｃ１、ＢｍＴｘ１、ＢｍＴＸ３、ＩｂＴｘ、Ｐ０５、ＳｃｙＴｘ、ＴｓＫ、ＨａＴｘ１、ＰｒｏＴＸ１、ＰａＴＸ２、Ｒｕ１、ωＧＶＩＡ、ωＭＶＩＩＡ及びＳｍＩＩＩａ並びに前記の何れかの類縁体が含まれるが、これらに限定されない。

【００４７】

ｄ）$Ｃ^{1}$－$Ｃ^{5}$、$Ｃ^{2}$－$Ｃ^{6}$、$Ｃ^{3}$－$Ｃ^{7}$及び$Ｃ^{4}$－$Ｃ^{8}$ジスルフィド結合（$Ｃ^{1}$、Ｃ

^{2}、C^{3}、C^{4}、C^{5}、C^{6}、C^{7}及びC^{8}は、ペプチドのＮ末端が左側に配置された慣用表記のトキシンペプチド一次配列中にシステイン残基が現れる順序を表しており、アミノ酸配列中の第一及び第五のシステインがジスルフィド結合を形成し、第二及び第六のシステインがジスルフィド結合を形成し、第三及び第七のシステインがジスルフィド結合を形成し、並びに第四及び第八のシステインがジスルフィド結合を形成する。）。このようなC^{1}－C^{5}、C^{2}－C^{6}、C^{3}－C^{7}、C^{4}－C^{8}ジスルフィド結合パターンを有するトキシンペプチドの例には、アニュオロクトキシン（ＡｎＴｘ）、Ｐｉ１、ＨｓＴｘ１、ＭＴＸ（Ｐ１２Ａ，Ｐ２０Ａ）及びＰｉ４ペプチド並びに前記の何れかの類縁体が含まれるが、これらに限定されない。

【００４８】

ｅ）C^{1}－C^{4}、C^{2}－C^{6}、C^{3}－C^{7}及びC^{5}－C^{8}ジスルフィド結合（C^{1}、C^{2}、C^{3}、C^{4}、C^{5}、C^{6}、C^{7}及びC^{8}は、ペプチドのＮ末端が左側に配置された慣用表記のトキシンペプチドの一次配列中にシステイン残基が現れる順序を表しており、アミノ酸配列中の第一及び第四のシステインがジスルフィド結合を形成し、第二及び第六のシステインがジスルフィド結合を形成し、第三及び第七のシステインがジスルフィド結合を形成し、並びに第五及び第八のシステインがジスルフィド結合を形成する。）。このようなC^{1}－C^{4}、C^{2}－C^{6}、C^{3}－C^{7}、C^{5}－C^{8}ジスルフィド結合パターンを有するトキシンペプチドの例には、クロロトキシン、Ｂｍ－１２ｂ及び何れかの類縁体が含まれるが、これらに限定されない。

【００４９】

ｆ）C^{1}－C^{5}、C^{2}－C^{6}、C^{3}－C^{4}及びC^{7}－C^{8}ジスルフィド結合（C^{1}、C^{2}、C^{3}、C^{4}、C^{5}、C^{6}、C^{7}及びC^{8}は、ペプチドのＮ末端が左側に配置された慣用表記のトキシンペプチドの一次配列中にシステイン残基が現れる順序を表しており、アミノ酸配列中の第一及び第五のシステインがジスルフィド結合を形成し、第二及び第六のシステインがジスルフィド結合を形成し、第三及び第四のシステインがジスルフィド結合を形成し、並びに第七及び第八のシステインがジスルフィド結合を形成する。）。このようなC^{1}－C^{5}、C^{2}－C^{6}、C^{3}－C^{4}、C^{7}－C^{8}ジスルフィド結合パターンを有するトキシンペプチドの例には、マウロトキシン及びその類縁体が含まれるが、これらに限定されない。

を含む分子に関する。

【００５０】

ペプチド配列を表すために使用される「無作為化された」という用語は、（例えば、ファーディスプレイ法によって選択された）完全に無作為な配列及び天然に存在する分子の１つ又はそれ以上の残基が、天然に存在する分子中の位置に出現しないアミノ酸残基によって置換された配列を表す。ペプチド配列を同定するための典型的な方法には、ファージディスプレイ、Ｅ．コリディスプレイ、リボソームディスプレイ、酵母を基礎としたスクリーニング、ＲＮＡ－ペプチドスクリーニング、化学的スクリーニング、合理的設計、タンパク質構造分析などが含まれる。

【００５１】

「薬理学的に活性な」という用語は、このようにして記載された物質が、医学的パラメータ（例えば、血圧、血液細胞数、コレステロールレベル）又は病状（例えば、癌、自己免疫疾患）に影響を与える活性を有することが決定される。従って、薬理学的に活性なペプチドは、以下に定義されている、アゴニストペプチド又は模倣的ペプチド及びアンタゴニストペプチドを含む。

【００５２】

「模倣的ペプチド」及び「アゴニストペプチド」という用語は、天然に存在するトキシンペプチド分子（例えば、天然に存在するＳｈＫトキシンペプチド）と同等の生物学的活性を有するペプチドを表す。さらに、これらの用語は、天然に存在する分子の効果を強化することによるなど、天然に存在するトキシンペプチド分子の活性を間接的に模倣するペプチドを含む。

【００５３】
「アンタゴニストペプチド」又は「阻害剤ペプチド」という用語は、対象の受容体（イオンチャンネルなど（但し、これに限定されない。））の生物活性を遮断し、若しくは何らかの方法で妨害するペプチド、又は対象の受容体の公知のアンタゴニスト若しくは阻害剤と同等の生物活性を有するペプチドを表す。
【００５４】
「酸性残基」という用語は、酸性基を含む側鎖を有するＤ型又はＬ型のアミノ酸残基を表す。典型的な酸性残基は、Ｄ及びＥを含む。
【００５５】
「アミド残基」という用語は、酸性基のアミド誘導体を含む側鎖を有するＤ型又はＬ型のアミノ酸を表す。典型的な残基は、Ｎ及びＱを含む。
【００５６】
「芳香族残基」という用語は、芳香族基を含む側鎖を有するＤ型又はＬ型のアミノ酸残基を表す。典型的な芳香族残基は、Ｆ、Ｙ及びＷを含む。
【００５７】
「塩基性残基」という用語は、塩基性基を含む側鎖を有するＤ型又はＬ型のアミノ酸残基を表す。典型的な塩基性残基には、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ‐メチル‐アルギニン、ω‐アミノアルギニン、ω‐メチル‐アルギニン、１‐メチル‐ヒスチジン、３‐メチル‐ヒスチジン及びホモアルギニン（ｈＲ）残基が含まれる。
【００５８】
「親水性残基」という用語は、極性基を含む側鎖を有するＤ型又はＬ型のアミノ酸残基を表す。典型的な親水性残基には、Ｃ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｑ、Ｄ、Ｅ、Ｋ及びシトルリン（Ｃｉｔ）残基が含まれる。
【００５９】
「非官能性残基」という用語は、酸性、塩基性又は芳香族基を欠如する側鎖を有するＤ型又はＬ型のアミノ酸残基を表す。典型的な非官能性アミノ酸残基には、Ｍ、Ｇ、Ａ、Ｖ、Ｉ、Ｌ及びノルロイシン（Ｎｌｅ）が含まれる。
【００６０】
「中性極性残基」という用語は、塩基性、酸性又は極性基を欠如する側鎖を有するＤ型又はＬ型のアミノ酸残基を表す。典型的な中性極性アミノ酸残基には、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｐ、Ｗ、Ｍ及びＦが含まれる。
【００６１】
「極性疎水性残基」という用語は、極性基を含む側鎖を有するＤ型又はＬ型のアミノ酸残基を表す。典型的な極性アミノ酸残基には、Ｔ、Ｇ、Ｓ、Ｙ、Ｃ、Ｑ及びＮが含まれる。
【００６２】
「疎水性残基」という用語は、塩基性又は酸性基を欠如する側鎖を有するＤ型又はＬ型のアミノ酸残基を表す。典型的な疎水性アミノ酸残基には、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｐ、Ｗ、Ｍ、Ｆ、Ｔ、Ｇ、Ｓ、Ｙ、Ｃ、Ｑ及びＮが含まれる。
【００６３】
本発明の組成物の幾つかの有用な実施形態において、固有ＳｈＫ又はＯＳＫ１配列、それらのペプチド類縁体、又は表１～３２の何れかに記載されているアミノ酸配列を有する他の何れかのトキシンペプチドなど（但し、これらに限定されない。）、対象の固有トキシンペプチド配列に比べて、１つ又はそれ以上の様式で、トキシンペプチドのアミノ酸配列が修飾されている。
【００６４】
１つ又はそれ以上の有用な修飾には、公知の化学的技術によって達成される、アミノ酸の付加又は挿入、アミノ酸の欠失、ペプチド末端切断、アミノ酸置換及び／又はアミノ酸残基の化学的誘導体化が含まれ得る。このような修飾は、例えば、強化された効力、選択性及び／又はタンパク分解に対する安定性などを目的として為され得る。当業者は、アラ

ニンスキャニング、公知のトキシンペプチド配列を用いた、アラインメントを介した突然変異導入に基づく合理的設計及び／又は分子モデリングなど、このような増強された特性を有するペプチド類縁体を設計するための技術を知悉している。例えば、ＳｈＫ類縁体は、ＨｍＫを用いた、アラインメントを介した突然変異導入（例えば、図６参照）及び分子モデリングに部分的に基づいて、本発明のＳｈＫペプチド含有組成物又は本発明のＳｈＫ類縁体含有組成物中のプロテアーゼ切断部位（例えば、Ｋ若しくはＲ残基におけるトリプシン切断部位及び／又はＦ、Ｙ若しくはＷ残基におけるキモトリプシン切断部位）を除去するために設計することが可能である。（例えば、Ｋａｌｍａｎ ｅｔ ａｌ．，ＳｈＫ-Ｄａｐ２２，ａ ｐｏｔｅｎｔ Ｋｖ１．３-ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｉｍｍｕｎｏｓｕｐｐｒｅｓｓｉｖｅ ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７３（４９）：３２６９７-７０７（１９９８）；Ｋｅｒｎ ｅｔ ａｌ．，米国特許第６，０７７，６８０号；Ｍｏｕｈａｔ ｅｔ ａｌ．，ＯｓＫ１ ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ，ＷＯ ２００６／００２８５０ Ａ２）参照）。

【００６５】

「プロテアーゼ」という用語は、「ペプチダーゼ」と同義である。プロテアーゼは、タンパク質内の点でペプチド結合を切断するエンドペプチダーゼ、及び、それぞれ、Ｎ末端又はＣ末端の何れから１つ又はそれ以上のアミノ酸を除去するエキソペプチダーゼという酵素の２つの群を含む。「プロテイナーゼ」という用語は、「エンドペプチダーゼ」に対する同義語としても使用される。プロテイナーゼの４つの機構的クラスは、セリンプロテイナーゼ、システインプロテイナーゼ、アスパラギン酸プロテイナーゼ及びメタロプロテイナーゼである。これらの４つの機構的クラスの他に、同定されていない触媒機構のプロテアーゼに対して割り当てられる酵素命名法の部門が存在する。これは、触媒機構が特定されていないことを示している。

【００６６】

切断サブサイト命名法は、Ｓｃｈｅｃｈｔｅｒ とＢｅｒｇｅｒによって作製されたスキームから一般に採用されている（Ｓｃｈｅｃｈｔｅｒ Ｉ．& Ｂｅｒｇｅｒ Ａ．，Ｏｎ ｔｈｅ ｓｉｚｅ ｏｆ ｔｈｅ ａｃｔｉｖｅ ｓｉｔｅ ｉｎ ｐｒｏｔｅａｓｅｓ．Ｉ．Ｐａｐａｉｎ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎｄ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎ，２７：１５７（１９６７）；Ｓｃｈｅｃｈｔｅｒ Ｉ．& Ｂｅｒｇｅｒ Ａ．，Ｏｎ ｔｈｅ ａｃｔｉｖｅ ｓｉｔｅ ｏｆ ｐｒｏｔｅａｓｅｓ．３．Ｍａｐｐｉｎｇ ｔｈｅ ａｃｔｉｖｅ ｓｉｔｅ ｏｆ ｐａｐａｉｎ；ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ｐｅｐｔｉｄｅｓ ｏｆ ｐａｐａｉｎ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎｄ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎ，３２：８９８（１９６８））。このモデルに従って、切断を経験する基質中のアミノ酸残基は、切断された結合からＮ末端の方向に、Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３、Ｐ４などと表記される。同様に、Ｃ末端方向での残基は、Ｐ１’、Ｐ２’、Ｐ３’、Ｐ４’などと表記される。

【００６７】

当業者は、目的のプロテアーゼ結合部位又はプロテアーゼ切断部位を特定するための様々なツールを知悉している。例えば、Ｓｗｉｓｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ（ＳＩＢ；ｗｗｗ．ｅｘｐａｓｙ．ｏｒｇ／ｔｏｏｌｓ／ｐｅｐｔｉｄｅｃｕｔｔｅｒ）のＥｘＰＡＳｙ（Ｅｘｐｅｒｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｓｙｓｔｅｍ）プロテオミクスサーバを通じて、ＰｅｐｔｉｄｅＣｕｔｔｅｒソフトウェアツールを入手することが可能である。ＰｅｐｔｉｄｅＣｕｔｔｅｒは、ＳＷＩＳＳ-ＰＲＯＴ及び／又はＴｒＥＭＢＬデータベース又はユーザが入力したタンパク質配列から、プロテアーゼ切断部位についてタンパク質配列を検索する。単一のプロテアーゼ及び化学物質、プロテアーゼ及び化学物質の選択又は完全なリストを使用することが可能である。酵素名に従ってアルファベットでグループ化されるか、又は順次、アミノ酸番号に従ってグループ化された切断部位の表という、結果の出力の様々な形態が入手可能である。出力のための第三の選択肢は、切断部位のマップである。マップにマッピングされた配列

及び切断部位は、ブロックにグループ化され、そのサイズは、ユーザによって選択されることができる。プロテアーゼ切断部位を決定するための他のツールも公知である。（例えば、Ｔｕｒｋ，Ｂ．ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｔｅｒｍｉｎａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅａｓｅ ｃｌｅａｖａｇｅ ｓｉｔｅ ｍｏｔｉｆｓ ｕｓｉｎｇ ｍｉｘｔｕｒｅ-ｂａｓｅｄ ｏｒｉｅｎｔｅｄ ｐｅｐｔｉｄｅ ｌｉｂｒａｒｉｅｓ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１９：６６１-６６７（２００１）；Ｂａｒｒｅｔｔ Ａ．ｅｔ ａｌ．，Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ ｐｒｏｔｅｏｌｙｔｉｃ ｅｎｚｙｍｅｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９８））。

【００６８】

セリンプロテイナーゼには、キモトリプシン、トリプシン又はエラスターゼ又はカリクレインなどの哺乳動物のプロテアーゼ酵素を含むキモトリプシンファミリーが含まれる。セリンプロテイナーゼは、基質残基と相互作用する様々な酵素サブサイト中のアミノ酸置換に関連する異なる基質特異性を示す。幾つかの酵素は、基質との幅広い相互作用部位を有するが、他の酵素はＰ１基質残基に限定した特異性を有する。

【００６９】

トリプシンは、位置Ｐ１のＲ又はＫで優先的に切断する。Ｋｅｉｌ（１９９２）によって実施された統計学的研究は、トリプシン切断時における、Ａｒｇ結合及びＬｙｓ結合を取り囲む残基（すなわち、それぞれ、位置Ｐ２及びＰ１’）の負の影響を記載した。（Ｋｅｉｌ，Ｂ．，Ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ ｏｆ ｐｒｏｔｅｏｌｙｓｉｓ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ-Ｖｅｒｌａｇ Ｂｅｒｌｉｎ-Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ-ＮｅｗＹｏｒｋ，３３５（１９９２））。位置Ｐ１’中のプロリン残基は、通常、トリプシン切断に対して強力な負の影響を発揮する。同様に、Ｐ１’中のＲ及びＫ並びに位置Ｐ２及びＰ１’における負に帯電した残基は阻害をもたらす。

【００７０】

キモトリプシンは、位置Ｐ１のＷ、Ｙ又はＦで優先的に切断し（高親和性）、これより低い程度で、位置Ｐ１のＬ、Ｍ又はＨ残基で切断する。（Ｋｅｉｌ，１９９２）。これらの規則に対する例外は、以下のとおりである。Ｗが位置Ｐ１に見出され、Ｍ又はＰが、同時に位置Ｐ１’に見出される場合には、切断は遮断される。さらに、位置Ｐ１’におけるプロリン残基は、位置Ｐ１に見出されるアミノ酸とは無関係に、切断をほぼ完全に遮断する。Ｍ残基が位置Ｐ１に見出される場合には、切断は、位置Ｐ１’におけるＹ残基の存在によって遮断される。最後に、Ｈが位置Ｐ１に位置する場合には、Ｄ、Ｍ又はＷ残基の存在も、切断を遮断する。

【００７１】

膜メタロエンドペプチダーゼ（ＮＥＰ；中性エンドペプチダーゼ、腎臓刷子縁中性プロテイナーゼ、エンケファリナーゼ、ＥＣ３．４．２４．１１）は、疎水性アミノ酸残基のアミノ側でペプチドを切断する。（Ｃｏｎｎｅｌｌｙ，ＪＣ ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｕｔｒａｌ Ｅｎｄｏｐｅｐｔｉｄａｓｅ ２４．１１ ｉｎ Ｈｕｍａｎ Ｎｅｕｔｒｏｐｈｉｌｓ：Ｃｌｅａｖａｇｅ ｏｆ Ｃｈｅｍｏｔａｃｔｉｃ Ｐｅｐｔｉｄｅ，ＰＮＡＳ，８２（２４）：８７３７-８７４１（１９８５））。

【００７２】

トロンビンは、位置Ｐ１のＲ残基で優先的に切断する。（Ｋｅｉｌ，１９９２）。トロンビンの天然基質は、フィブリノーゲンである。最適な切断部位は、Ｒ残基が位置Ｐ１に存在し、Ｇｌｙが位置Ｐ２及び位置Ｐ１’に存在する場合である。同様に、疎水性アミノ酸残基が位置Ｐ４及び位置Ｐ３に見出される場合には、位置Ｐ２におけるプロリン残基、位置Ｐ１におけるＲ残基並びに位置Ｐ１’及び位置Ｐ２’における非酸性アミノ酸残基。その天然基質であるフィブリノーゲンに対する極めて重要な残基は、Ｐ１０中のＤ残基である。

【００７３】

カスパーゼは、保存されたアミノ酸配列を有する活性部位を有し、及びＤ残基の後ろでペプチドを特異的に切断するシステインプロテアーゼのファミリーである。（Ｅａｒｎｓ

haw WC et al.,Mammalian caspases:Structure,activation,substrates,and functions during apoptosis,Annual Review of Biochemistry,68:383-424(1999))。

【００７４】

Ａｒｇ-Ｃプロテイナーゼは、位置Ｐ１のＲ残基で優先的に切断する。切断の挙動は、位置Ｐ１’の残基によって、穏やかに影響を受けるに過ぎないように見受けられる。（Ｋｅｉｌ，１９９２）。Ａｓｐ-Ｎエンドペプチダーゼは、位置Ｐ１’のＤ残基との結合を特異的に切断する。（Ｋｅｉｌ，１９９２）。

【００７５】

前述の記載は単なる例示に過ぎず、当業者が本発明を実施する際に除去することに関心を抱き得るプロテアーゼ結合及び／又は切断部位に関して、当業者に利用可能な知識を網羅的に取り扱ったものではない。

【００７６】

他の例では、天然に存在するペプチドアミノ酸配列から修飾されるトキシンペプチドアミノ酸配列は、目的の固有トキシンペプチド配列のアミノ酸と比べて、その中に挿入又は置換された少なくとも１つのアミノ酸残基を含み、ここにおいて、挿入又は置換されたアミノ酸残基は、ペプチドがリンカー又は半減期延長部分に抱合される求核的又は求電子的反応性官能基を含む側鎖を有する。本発明に従えば、このような求核的又は求電子的反応性官能基の有用な例には、チオール、一級アミン、セレノ、ヒドラジド、アルデヒド、カルボン酸、ケトン、アミノオキシ、遮蔽された（保護された）アルデヒド又は遮蔽された（保護された）ケト官能基が含まれるが、これらに限定されるものではない。求核的反応性官能基を含む側鎖を有するアミノ酸残基の例には、リジン残基、α，β-ジアミノプロピオン酸残基、α，γ-ジアミノ酪酸残基、オルニチン残基、システイン、ホモシステイン、グルタミン酸残基、アスパラギン酸残基又はセレノシステイン残基が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【００７７】

本明細書においてトキシンペプチドをさらに記載する際には、天然に存在するペプチド及びタンパク質中に一般的に取り込まれる２０の「標準」アミノ酸残基の種類を表すために、一文字略号システムがしばしば適用される（表１Ａ）。このような一文字略号は、意味の上で、三文字略号又は省略されていないアミノ酸名と完全に互換的である。本明細書に使用されている一文字略号システムにおいて、本明細書に別段の記載がなければ、大文字はＬアミノ酸を示し、小文字はＤアミノ酸を示す。例えば、略号「Ｒ」はＬ-アルギニンを表し、略号「ｒ」はＤ-アルギニンを表す。

【００７８】

【表１】

表１Ａ　標準アミノ酸に対する一文字略号。
三文字略号はカッコ内に記載されている。

アラニン（Ａｌａ）	Ａ
グルタミン（Ｇｌｎ）	Ｑ
ロイシン（Ｌｅｕ）	Ｌ
セリン（Ｓｅｒ）	Ｓ
アルギニン（Ａｒｇ）	Ｒ
グルタミン酸（Ｇｌｕ）	Ｅ
リジン（Ｌｙｓ）	Ｋ
スレオニン（Ｔｈｒ）	Ｔ
スパラギン（Ａｓｎ）	Ｎ
グリシン（Ｇｌｙ）	Ｇ
メチオニン（Ｍｅｔ）	Ｍ
トリプトファン（Ｔｒｐ）	Ｗ
アスパラギン酸（Ａｓｐ）	Ｄ
ヒスチジン（Ｈｉｓ）	Ｈ
フェニルアラニン（Ｐｈｅ）	Ｆ
チロシン（Ｔｙｒ）	Ｙ
システイン（Ｃｙｓ）	Ｃ
イソロイシン（Ｉｌｅ）	Ｉ
プロリン（Ｐｒｏ）	Ｐ
バリン（Ｖａｌ）	Ｖ

【００７９】
本明細書において、アミノ酸配列中のアミノ酸置換は、特定の位置におけるアミノ酸残基に対する一文字略号に続き、目的の固有トキシンペプチド配列に対する数字のアミノ酸位置、次いで、これに続く、置換されたアミノ酸残基に対する一文字記号によって典型的に表される。例えば、「Ｔ３０Ｄ」は、仮想の固有トキシンペプチド配列に対して、アミノ酸位置３０におけるアスパラギン酸残基によるスレオニン残基の置換を表す。さらなる例として、「Ｒ１８ｈＲ」又は「Ｒ１８Ｃｉｔ」は、仮想の固有トキシンペプチド配列に対して、それぞれ、アミノ酸位置１８におけるホモアルギニン又はシトルリン残基によるアルギニン残基の置換を表す。本明細書に記載されているあらゆる特定のトキシンペプチド（又はペプチド類縁体）のアミノ酸配列内のアミノ酸位置は、ペプチドアミノ酸配列のＮ末端又はＣ末端を、適宜、固有トキシンペプチド配列のＮ末端又はＣ末端と併置して決定されるように、固有配列に対するその位置とは異なり得る。例えば、このようにして、固有のＳｈＫ（１－３５）（配列番号５）のＣ末端と併置された配列ＳＣＩＤＴＩＰＫＳＲＣＴＡＦＱＣＫＨＳＭＫＹＲＬＳＦＣＲＫＴＣＧＴＣ（ＳｈＫ（２－３５）；配列番号９２）（固有ＳｈＫ配列のＮ末端切断）のアミノ酸位置１は、固有配列におけるアミノ酸位置２に対応し、配列番号９２のアミノ酸位置３４は、固有配列（配列番号５）におけるアミノ酸位置３５に対応する。
【００８０】
本発明のある種の実施形態において、アミノ酸置換は、（ペプチド又はタンパク質中では）天然には稀なアミノ酸残基又は非天然アミノ酸残基を含むことができる非標準アミノ酸残基を包含する。非標準アミノ酸残基は、組換え的に発現する細胞などの生物学的系での合成によるより、むしろ、化学的ペプチド合成によってペプチド中に取り込むことが可能であり、あるいは、当業者は、組換え的に発現している細胞を使用するタンパク質工学

の公知の技術を使用することが可能である。（例えば、Ｌｉｎｋ ｅｔ ａｌ．，Ｎｏｎ－ｃａｎｏｎｉｃａｌ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄｓ ｉｎ ｐｒｏｔｅｉｎ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１４（６）：６０３－６０９（２００３）参照）。「非標準アミノ酸残基」という用語は、天然に存在するタンパク質中に一般的に取り込まれる２０個の標準アミノ酸に属さないＤ又はＬ型のアミノ酸残基、例えば、β－アミノ酸、ホモアミノ酸、環状アミノ酸及び誘導体化された側鎖を有するアミノ酸を表す。例には、（Ｌ型又はＤ型の）：シトルリン（Ｃｉｔ）、ホモシトルリン（ｈＣｉｔ）、Ｎ－メチルシトルリン（ＮＭｅＣｉｔ）、Ｎ－メチルホモシトルリン（ＮＭｅＨｏＣｉｔ）、オルニチン（Ｏｒｎ又はＯ）、Ｎ－メチルオルニチン（ＮＭｅＯｒｎ）、サルコシン（Ｓａｒ）、ホモリジン（ｈＫ 又はＨｌｙｓ）、ホモアルギニン（ｈＲ又はｈＡｒｇ）、ホモグルタミン（ｈＱ）、Ｎ－メチルアルギニン（ＮＭｅＲ）、Ｎ－メチルロイシン（ＮＭｅＬ）、Ｎ－メチルホモリジン（ＮＭｅＨｏＫ）、Ｎ－メチルグルタミン（ＮＭｅＱ）、ノルロイシン（ＮＩｅ）、ノルバリン（Ｎｖａ）、１、２、３、４－テトラヒドロイソキノリン（Ｔｉｃ）、ニトロフェニルアラニン（ｎｉｔｒｏｐｈｅ）、アミノフェニルアラニン（ａｍｉｎｏｐｈｅ）、ベンジルフェニルアラニン（ｂｅｎｚｙｌｐｈｅ）、γ－カルボキシグルタミン酸（γ－ｃａｒｂｏｘｙｇｌｕ）、ヒドロキシプロリン（ｈｙｄｒｏｘｙｐｒｏ）、ｐ－カルボキシル－フェニルアラニン（Ｃｐａ）、α－アミノアジピン酸（Ａａｄ）、アセチルアルギニン（ａｃｅｔｙｌａｒｇ）、α、β－ジアミノプロピオン酸（Ｄｐｒ）、α、γ－ジアミノ酪酸（Ｄａｂ）、ジアミノプロピオン酸（Ｄａｐ）、β－（１－ナフチル）－アラニン（１Ｎａｌ）、β－（２－ナフチル）－アラニン（２Ｎａｌ）、シクロヘキシルアラニン（Ｃｈａ）、４－メチル－フェニルアラニン（ＭｅＰｈｅ）、β，β－ジフェニル－アラニン（ＢｉＰｈＡ）、アミノ酪酸（Ａｂｕ）、４－フェニル－フェニルアラニン（４Ｂｉｐ）、α－アミノ－イソ酪酸（Ａｉｂ）及び本明細書に記載されているこれらの何れかの誘導体化された形態が含まれる。ＵＰＡＣ－ＩＵＢ生物化学の命名法に関する合同委員会（ＪＣＢＮ）によるアミノ酸及びペプチドに対する命名法及び記号表記は、以下の文書：Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．，１９８４，２１９，３４５－３７３；Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１９８４，１３８，９－３７；１９８５，１５２，１；１９９３，２１３，２；Ｉｎｔｅｒｎａｔ．Ｊ．Ｐｅｐｔ．Ｐｒｏｔ．Ｒｅｓ．，１９８４，２４，ｆｏｌｌｏｗｉｎｇ ｐ ８４；Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，１９８５，２６０，１４－４２；Ｐｕｒｅ Ａｐｐｌ．Ｃｈｅｍ．，１９８４，５６，５９５－６２４；Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄｓ ａｎｄ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ，１９８５，１６，３８７－４１０；Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ ａｎｄ Ｒｅｌａｔｅｄ Ｄｏｃｕｍｅｎｔｓ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｐｏｒｔｌａｎｄ Ｐｒｅｓｓ，１９９２，ｐａｇｅｓ ３９－６９］に公表されている。

【００８１】

本明細書に記載されているように、本発明に従って、トキシンペプチド又はペプチドリンカーなどの本発明の組成物のペプチド部分は、１つ又はそれ以上のアミノ酸残基において化学的に誘導体化することも可能である。誘導体化されたアミノ酸残基を含有するペプチドは、公知の有機化学技術によって合成することが可能である。ペプチドという文脈における「化学的誘導体」又は「化学的に誘導体化された」とは、官能的側基の反応によって化学的に誘導体化された１つ又はそれ以上の残基を有する対象ペプチドを表す。このような誘導体化された分子には、例えば、遊離のアミノ基が、アミン塩酸塩、ｐ－トルエンスルホニル基、カルボベンゾオキシ基、ｔ－ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基又はホルミル基を形成するように誘導体化されている分子が含まれる。遊離のカルボキシル基は、塩、メチル及びエチルエステル又はエステル若しくはヒドラジドの他の種類を形成するように誘導体化され得る。遊離の水酸基は、Ｏ－アシル又はＯ－アルキル誘導体を形成するように誘導体化され得る。ヒスチジンのイミダゾール窒素は、Ｎ－ｉｍ－ベンジルヒスチジンを形成するように誘導体化され得る。Ｌ型又はＤ型を問わず、２０個の標準アミノ酸の１つ又はそれ以上の天然に存在するアミノ酸誘導体を含有するペプチドも、

化学的誘導体として含まれる。例えば、４－ヒドロキシプロリンは、プロリンが置換され得；５－ヒドロキシリジンは、リジンが置換され得；３－メチルヒスチジンは、ヒスチジンが置換され得；ホモセリンは、セリンが置換され得；及びオルニチンは、リジンが置換され得る。

【００８２】

本発明の幾つかの実施形態において、目的のトキシンペプチドの塩基性残基（例えば、リジン）は、他の残基（非官能性残基が好ましい。）で置換することが可能である。このような分子は、それを与えた分子より塩基性が低く、その他の点では、それを与えた分子の活性を保持しており、これは安定性及び免疫原性の点で利点をもたらし得る。しかしながら、本発明は、この理論によって限定されるべきではない。

【００８３】

さらに、本発明の組成物が「分子」又は「化合物」として本明細書において表記される場合には、本発明の組成物の生理的に許容される塩も包含される。「生理的に許容される」塩とは、医薬として許容されることが公知であるか、又は後に発見されるすべての塩を意味する。幾つかの例は、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、塩化水素酸塩及び臭化水素酸塩などのハロゲン化水素酸塩、硫酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、グリコール酸塩、グルコン酸塩、コハク酸塩、メシル酸塩、ベシル酸塩及びシュウ酸塩である。

【００８４】

化合物の構造：

総論。組換えタンパク質は、数ある手段のうちとりわけ、半減期延長部分への共有結合を通じて、治療剤として開発されてきた。このような部分には、Ｅｎｂｒｅｌ(Ｒ)（エタネルセプト）で使用されるような、抗体の「Ｆｃ」ドメイン及びＮｅｕｌａｓｔａ(Ｒ)（ペグフィルグラスチム）で使用されるような、生物学的に適切なポリマー（例えば、ポリエチレングリコール又は「ＰＥＧ」）が含まれる。Ｆｅｉｇｅらは、２００３年１２月９日に付与された米国特許第６，６６０，８４３号（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）において、このような半減期延長物質をペプチドとともに使用することを記載した。

【００８５】

本発明者らは、本発明の分子（少なくとも２つのペプチド内ジスルフィド結合を有する、約８０アミノ酸又はそれ以下のペプチド）が、半減期延長部分に共有結合されると、治療的利点を有することを決定した。本発明の分子は、半減期延長部分（F^1及び／又はF^2）に又はペプチド部分（Ｐ）に結合されることが可能な、薬理学的に活性な共有結合されたさらなるペプチド部分をさらに含むことが可能である。２以上の半減期延長部分（F^1及びF^2）を含有する本発明の組成物の実施形態には、F^1及びF^2が同一又は別異の半減期延長部分であるものが含まれる。例（各ドメイン間にリンカーを有するか、又は有しない。）には、図７５に図示されている構造及び以下の実施形態（並びに本明細書及び実施例に記載されているその他のもの）が含まれる。

【００８６】

２０ＫＰＥＧ－トキシンペプチド－Ｆｃドメイン、式[$(F^1)_1$-$(X^2)_1$-$(F^2)_1$]と合致；

２０ＫＰＥＧ－トキシンペプチド－ＦｃＣＨ２ドメイン、式[$(F^1)_1$-$(X^2)_1$-$(F^2)_1$]と合致；

２０ＫＰＥＧ－トキシンペプチド－ＨＳＡドメイン、式[$(F^1)_1$-$(X^2)_1$-$(F^2)_1$]と合致；

２０ＫＰＥＧ－Ｆｃドメイン－トキシンペプチド、式[$(F^1)_1$-$(X^2)_1$-$(X^3)_1$]と合致；

２０ＫＰＥＧ－ＦｃＣＨ２ドメイン－トキシンペプチド、式[$(F^1)_1$-$(F^2)_1$-$(X^3)_1$]と合致；及び

２０ＫＰＥＧ－ＨＳＡ－トキシンペプチド、式[$(F^1)1$-$(X^2)_1$-$(X^3)_1$]と合致。

【００８７】
トキシンペプチド。トキシンペプチド（すなわち、「Ｐ」又は図２において「P^1」として等価に示されている。）のあらゆる数を、本発明とともに使用することが可能である。特に興味深いのは、トキシンペプチドＳｈＫ、ＨｍＫ、ＭｇＴｘ、ＡｇＴｘ２、ＯｓＫ１（「ＯＳＫ１」とも称される。）、アガトキシン及びＨｓＴｘ１並びにこれらの修飾された類縁体並びにこのようなトキシンペプチドの活性を模倣するその他のペプチド）である。本明細書に上述されているように、本発明の組成物中に２以上のトキシンペプチド「Ｐ」が存在すれば、「Ｐ」は、独立に、同じく本発明の組成物中に存在する他の何れのトキシンペプチドと同一又は別異であることが可能である。例えば、式$P-(L)_g-F^1-(L)_f-P$を有する組成物において、両トキシンペプチド「Ｐ」は、ＳｈＫの同じペプチド類縁体、ＳｈＫの異なるペプチド類縁体であり得、又は一方がＳｈＫのペプチド類縁体、及び他方がＯＳＫ１のペプチド類縁体であり得る。
【００８８】
本発明の幾つかの実施形態において、対象となる他のペプチドは、構造式Ｉの分子に対してさらなる特徴を有する分子中で特に有用である。このような分子において、式Ｉの分子は、薬理学的に活性な共有結合されたさらなるペプチドをさらに含み、これは、アゴニストペプチド、アンタゴニストペプチド又は標的誘導ペプチドである。本ペプチドは、F^1又はF^2又はＰに抱合されることが可能である。このようなアゴニストペプチドは、トキシンペプチドに対してアゴニスト作用を示す活性を有するが、トキシンペプチドと同じ機序によってこのような活性を発揮する必要はない。ペプチドアンタゴニストも、本発明の実施形態において有用であり、トキシンペプチドの活性に対して相補的であり得る活性を有するペプチドアンタゴニストが好ましい。分子を特定の細胞種、臓器などに誘導するペプチドなど、標的誘導ペプチドも興味深い。ペプチドのこれらのクラスは、本明細書及びその他の参考文献に引用されている参考文献中に記載されている方法によって発見することが可能である。本発明において使用するためのトキシンペプチドを作製する上で、ファージディスプレイが特に有用である。任意の遺伝子産物の任意の部位に対してペプチドリガンドを同定するために、ランダムペプチドのライブラリーからの親和性選択を使用することが可能である。Ｄｅｄｍａｎ ｅｔ ａｌ．，（１９９３），Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：２３０２５－３０。ファージディスプレイは、細胞表面受容体又は直鎖エピトープを有する何れかのタンパク質としてのこのような対象タンパク質に結合するペプチドを同定するために特に極めて適している。Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，（１９９８），Ｃａｎ．Ｊ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．４４：３１３－２９；Ｋａｙ ｅｔ ａｌ．（１９９８），Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃ．Ｔｏｄａｙ ３：３７０－８を参照されたい。このようなタンパク質は、「Ｈｅｒｚ ｅｔ ａｌ．，（１９９７），Ｊ．Ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｎｄ Ｓｉｇｎａｌ Ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ Ｒｅｓ．１７（５）：６７１－７７６」（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に広く概説されている。このような目的のタンパク質は、本発明において使用するのに適している。
【００８９】
特に好ましいペプチドは、以下の表に見られる。これらのペプチドは、本分野で開示された方法又は本明細書の以下に記載されている方法によって調製することが可能である。一文字アミノ酸略号が使用される。別段の記載差がなければ、各Ｘは、独立に、非官能性残基である。
【００９０】

【表２】

表１－Kv1.3阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
LVKCRGTSDCGRPCQQQTGCPNSKCINRMCKCYGC	Pi1	21
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2	17
TISCTNEKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi3	18
IEAIRCGGSRDCYRPCQKRTGCPNAKCINKTCKCYGCS	Pi4	19
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1	61
GVPINVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	AgTx2	23
GVPINVKCTGSPQCLKPCKDAGMRFGKCINGKCHCTPK	AgTx1	85
GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1	25
ZKECTGPQHCTNFCRKNKCTHGKCMNRKCKCFNCK	Anuroctoxin	62
TIINVKCTSPKQCSKPCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN	NTX	30
TVIDVKCTSPKQCLPPCKAQFGIRAGAKCMNGKCKCYPH	HgTx1	27
QFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx	36
VFINAKCRGSPECLPKCKEAIGKAAGKCMNGKCKCYP	Titystoxin-Ka	86
VCRDWFKETACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK	9
VGINVKCKHSGQCLKPCKDAGMRFGKCINGKCDCTPKG	BmKTX	26
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1	40
VFINVKCRGSKECLPACKAAVGKAAGKCMNGKCKCYP	Tc30	87
TGPQTTCQAAMCEAGCKGLGKSMESCQGDTCKCKA	Tc32	13

【００９１】

【表３】

表２－ShKペプチド及びShK ペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK	5
RSCIDTIPKSRCTAFQSKHSMKYRLSFCRKTSGTC	ShK-S17/S32	88
RSSIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTS	ShK-S3/S35	89
SSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-S1	90
(N-acetylarg) SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-N-acetylarg1	91
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-d1	92
CIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-d2	93
ASCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A1	94
RSCADTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A4	95
RSCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A4/A15	96
RSCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A4/A15/A25	97
RSCIDAIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A6	98
RSCIDTAPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A7	99
RSCIDTIAKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A8	100
RSCIDTIPASRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9	101
RSCIDTIPESRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E9	102
RSCIDTIPQSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q9	103
RSCIDTIPKARCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A10	104
RSCIDTIPKSACTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A11	105
RSCIDTIPKSECTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E11	106
RSCIDTIPKSQCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q11	107
RSCIDTIPKSRCAAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A13	108
RSCIDTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A15	109
RSCIDTIPKSRCTAWQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-W15	110
RSCIDTIPKSRCTAX^{815}QCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-X15	111
RSCIDTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A15/A25	112
RSCIDTIPKSRCTAFACKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A16	113
RSCIDTIPKSRCTAFECKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E16	114
RSCIDTIPKSRCTAFQCAHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A18	115
RSCIDTIPKSRCTAFQCEHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E18	116
RSCIDTIPKSRCTAFQCKASMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A19	117
RSCIDTIPKSRCTAFQCKKSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-K19	118
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHAMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A20	119
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSAKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A21	120
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSX^{821}KYRLSFCRKTCGTC	ShK-X21	121
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHS(norleu)KYRLSFCRKTCGTC	ShK-Nle21	122
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A22	123
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMEYRLSFCRKTCGTC	ShK-E22	124
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMRYRLSFCRKTCGTC	ShK-R22	125
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMX^{822}YRLSFCRKTCGTC	ShK-X22	126
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSM(norleu)YRLSFCRKTCGTC	ShK- Nle22	127
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSM(orn)YRLSFCRKTCGTC	ShK- Orn22	128
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSM(homocit)YRLSFCRKTCGTC	ShK- Homocit22	129
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSM(diaminopropionic)YRLSFCRKTCGTC	ShK- Diamino-propionic22	130
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKARLSFCRKTCGTC	ShK-A23	131
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKSRLSFCRKTCGTC	ShK-S23	132

RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKFRLSFCRKTCGTC	ShK-F23	133
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKX[823]RLSFCRKTCGTC	ShK-X23	134
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK(nitrophe)RLSFCRKTCGTC	ShK-Nitrophe23	135
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK(aminophe)RLSFCRKTCGTC	ShK-Aminophe23	136
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK(benzylphe)RLSFCRKTCGTC	ShK-Benzylphe23	137
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYALSFCRKTCGTC	ShK-A24	138
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYELSFCRKTCGTC	ShK-E24	139
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A25	140
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLAFCRKTCGTC	ShK-A26	141
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSACRKTCGTC	ShK-A27	142
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSX[827]CRKTCGTC	ShK-X27	143
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCAKTCGTC	ShK-A29	144
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRATCGTC	ShK-A30	145
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKACGTC	ShK-A31	146
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGAC	ShK-A34	147
SCADTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A4d1	148
SCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A4/A15d1	149
SCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A4/A15/A25 d1	150
SCIDAIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A6 d1	151
SCIDTAPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A7 d1	152
SCIDTIAKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A8 d1	153
SCIDTIPASRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9 d1	154
SCIDTIPESRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E9 d1	155
SCIDTIPQSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q9 d1	156
SCIDTIPKARCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A10 d1	157
SCIDTIPKSACTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A11 d1	158
SCIDTIPKSECTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E11 d1	159
SCIDTIPKSQCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q11 d1	160
SCIDTIPKSRCAAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A13 d1	161
SCIDTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A15 d1	162
SCIDTIPKSRCTAWQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-W15 d1	163
SCIDTIPKSRCTAX[815]QCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-X15 d1	164
SCIDTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A15/A25 d1	165
SCIDTIPKSRCTAFACKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A16 d1	166
SCIDTIPKSRCTAFECKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E16 d1	167
SCIDTIPKSRCTAFQCAHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A18 d1	168
SCIDTIPKSRCTAFQCEHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E18 d1	169
SCIDTIPKSRCTAFQCKASMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A19 d1	170
SCIDTIPKSRCTAFQCKKSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-K19 d1	171
SCIDTIPKSRCTAFQCKHAMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A20 d1	172
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSAKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A21 d1	173
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSX[821]KYRLSFCRKTCGTC	ShK-X21 d1	174
SCIDTIPKSRCTAFQCKHS(norleu)KYRLSFCRKTCGTC	ShK-Nle21 d1	175
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A22 d1	176
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMEYRLSFCRKTCGTC	ShK-E22 d1	177
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMRYRLSFCRKTCGTC	ShK-R22 d1	178
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMX[822]YRLSFCRKTCGTC	ShK-X22 d1	179
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSM(norleu)YRLSFCRKTCGTC	ShK- Nle22 d1	180

SCIDTIPKSRCTAFQCKHSM(orn)YRLSFCRKTCGTC	ShK- Orn22 d1	181
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSM(homocit)YRLSFCRKTCGTC	ShK- Homocit22 d1	182
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSM(diaminopropionic)YRLSFCRKTCGTC	ShK- Diamino-propionic22 d1	183
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKARLSFCRKTCGTC	ShK-A23 d1	184
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKSRLSFCRKTCGTC	ShK-S23 d1	185
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKFRLSFCRKTCGTC	ShK-F23 d1	186
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKX^{823}RLSFCRKTCGTC	ShK-X23 d1	187
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK(nitrophe)RLSFCRKTCGTC	ShK-Nitrophe23 d1	188
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK(aminophe)RLSFCRKTCGTC	ShK-Aminophe23 d1	189
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK(benzylphe)RLSFCRKTCGTC	ShK-Benzylphe23 d1	190
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYALSFCRKTCGTC	ShK-A24 d1	191
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYELSFCRKTCGTC	ShK-E24 d1	192
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A25 d1	193
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLAFCRKTCGTC	ShK-A26 d1	194
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSACRKTCGTC	ShK-A27 d1	195
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSX^{827}CRKTCGTC	ShK-X27 d1	196
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCAKTCGTC	ShK-A29 d1	197
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRATCGTC	ShK-A30 d1	198
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKACGTC	ShK-A31 d1	199
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGAC	ShK-A34 d1	200
YSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Y1	548
KSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-K1	549
HSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-H1	550
QSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q1	551
PPRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	PP-ShK	552
MRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	M-ShK	553
GRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	G-ShK	554
YSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-Y1/A22	555
KSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-K1/A22	556
HSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-H1/A22	557
QSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q1/A22	558
PPRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	PP-ShK-A22	559
MRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	M-ShK-A22	560
GRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	G-ShK-A22	561
RSCIDTIPASRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/A22	884
SCIDTIPASRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/A22 d1	885
RSCIDTIPVSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9	886
RSCIDTIPVSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/A22	887
SCIDTIPVSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9 d1	888
SCIDTIPVSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/A22 d1	889
RSCIDTIPESRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-E9/A22	890
SCIDTIPESRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-E9/A22 d1	891
RSCIDTIPKSACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A11/A22	892
SCIDTIPKSACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A11/22 d1	893
RSCIDTIPKSECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-E11/A22	894
SCIDTIPKSECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-E11/A22 d1	895
RSCIDTIPKSRCTDFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-D14	896

RSCIDTIPKSRCTDFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-D14/A22	897
SCIDTIPKSRCTDFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-D14 d1	898
SCIDTIPKSRCTDFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-D14/A22 d1	899
RSCIDTIPKSRCTAAQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A15A/22	900
SCIDTIPKSRCTAAQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A15/A22 d1	901
RSCIDTIPKSRCTAIQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-I15	902
RSCIDTIPKSRCTAIQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-I15/A22	903
SCIDTIPKSRCTAIQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-I15 d1	904
SCIDTIPKSRCTAIQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-I15/A22 d1	905
RSCIDTIPKSRCTAVQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V15	906
RSCIDTIPKSRCTAVQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V15/A22	907
SCIDTIPKSRCTAVQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V15 d1	908
SCIDTIPKSRCTAVQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V15/A22 d1	909
RSCIDTIPKSRCTAFRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-R16	910
RSCIDTIPKSRCTAFRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-R16/A22	911
SCIDTIPKSRCTAFRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-R16 d1	912
SCIDTIPKSRCTAFRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-R16/A22 d1	913
RSCIDTIPKSRCTAFKCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-K16	914
RSCIDTIPKSRCTAFKCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-K16/A22	915
SCIDTIPKSRCTAFKCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-K16 d1	916
SCIDTIPKSRCTAFKCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-K16/A22 d1	917
RSCIDTIPASECTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/E11	918
RSCIDTIPASECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/E11/A22	919
SCIDTIPASECTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/E11 d1	920
SCIDTIPASECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/E11/A22 d1	921
RSCIDTIPVSECTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11	922
RSCIDTIPVSECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/A22	923
SCIDTIPVSECTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11 d1	924
SCIDTIPVSECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/A22 d1	925
RSCIDTIPVSACTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/A11	926
RSCIDTIPVSACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/A11/A22	927
SCIDTIPVSACTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/A11 d1	928
SCIDTIPVSACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/A11/A22 d1	929
RSCIDTIPASACTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/A11	930
RSCIDTIPASACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/A11/A22	931
SCIDTIPASACTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/A11 d1	932
SCIDTIPASACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/A11/A22 d1	933
RSCIDTIPKSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E11/D14/I15/R16	934
RSCIDTIPKSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-E11/D14/I15/R16/A22	935
SCIDTIPKSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E11/D14/I15/R16 d1	936
SCIDTIPKSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-E11/D14/I15//R16 A22 d1	937

RSCIDTIPVSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/D14/I15/R16	938
RSCIDTIPVSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/D14/I15/R16/A22	939
SCIDTIPVSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/D14/I15/R16 d1	940
SCIDTIPVSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/D14/I15/R16/A22 d1	941
RSCIDTIPVSECTDIQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/D14/I15	942
RSCIDTIPVSECTDIQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/D14/I15/A22	943
SCIDTIPVSECTDIQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/D14/I15 d1	944
SCIDTIPVSECTDIQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/D14/I15/A22 d1	945
RTCKDLIPVSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-T2/K4/L6/V9/E11/D14/I15/R16	946
RTCKDLIPVSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-T2/K4/L6/V9/E11/D14/I15/R16/A22	947
TCKDLIPVSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-T2/K4/L6/V9/E11/D14/I15/R16 d1	948
TCKDLIPVSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-T2/K4/L6/V9/E11/D14/I15/R16/A22 d1	949
(L-Phosphotyrosine)-AEEARSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK(L5)	950
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK Q1/A4/A15	1295
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK Q1/A4/A15/A22	1296
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSM(Dap)YRLSFCRKTCGTC	ShK Q1/A4/A15/Dap22	1297
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK Q1/A4/A15/A25	1298
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSMAYRASFCRKTCGTC	ShK Q1/A4/A15/A22/A25	1299
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSM(Dap)YRASFCRKTCGTC	ShK Q1/A4/A15/Dap22/A25	1300

【００９２】

表２に記載されている多くのペプチドは、Ｋｅｍらに対して２０００年６月２０日に付与された米国特許第６，０７７，６８０号（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に記載されているとおりに調製することが可能である。表２の他のペプチドは、本分野で公知の技術によって調製することが可能である。例えば、ＳｈＫ（Ｌ５）（配列番号９５０）は、「Ｂｅｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｅｆｆｅｃｔｏｒ ｍｅｍｏｒｙ Ｔ ｃｅｌｌｓ ｗｉｔｈ ａ ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ｐｅｐｔｉｄｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ｏｆ Ｋｖ１．３ ｃｈａｎｎｅｌｓ ｆｏｒ ｔｈｅｒａｐ

ｙ ｏ ｆ ａｕｔｏｉｍｍｕｎｅ ｄｉｓｅａｓｅｓ，Ｍｏｌｅｃ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．６７（４）：１３６９-８１（２００５）」（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に記載されているとおりに調製することが可能である。表２及び本明細書を通じて、X^{s15}、X^{s21}、X^{s22}、X^{s23}及びX^{s27}は、各々独立に、非官能性アミノ酸残基を表す。

【００９３】

【表４】

表３－HmK、BgK、AeK及びＡｓKSペプチド及びペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
RTCKDLIPVSECTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK	6
ATCKDLIPVSECTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-A1	201
STCKDLIPVSECTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-S1	202
TCKDLIPVSECTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1	203
SCKDLIPVSECTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/S2	204
TCIDLIPVSECTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/I4	205
TCKDTIPVSECTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/T6	206
TCKDLIPKSECTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/K9	207
TCKDLIPVSRCTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/R11	208
TCKDLIPVSECTAIRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/A14	209
TCKDLIPVSECTDFRCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/F15	210
TCKDLIPVSECTDIQCRTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/Q16	211
TCKDLIPVSECTDIRCKTSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/K18	212
TCKDLIPVSECTDIRCRHSMKYRLNLCRKTCGSC	HmK-d1/H19	213
TCKDLIPVSECTDIRCRTSMKYRLSLCRKTCGSC	HmK-d1/S26	214
TCKDLIPVSECTDIRCRTSMKYRLNFCRKTCGSC	HmK-d1/F27	215
TCKDLIPVSECTDIRCRTSMKYRLNLCRKTCGTC	HmK-d1/T34	216
TCKDLIPVSRCTDIRCRTSMKYRLNFCRKTCGSC	HmK-d1/R11/F27	217
ATCKDLIPVSRCTDIRCRTSMKYRLNFCRKTCGSC	HmK-A1/R11/F27	218
TCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGSC	HmK-d1/Z1	219
TCIDTIPKSRCTAFQCRTSMKYRLNFCRKTCGSC	HmK-d1/Z2	220
TCADLIPASRCTAIACRTSMKYRLNFCRKTCGSC	HmK-d1/Z3	221
TCADLIPASRCTAIACKHSMKYRLNFCRKTCGSC	HmK-d1/Z4	222
TCADLIPASRCTAIACAHSMKYRLNFCRKTCGSC	HmK-d1/Z5	223
RTCKDLIPVSECTDIRCRTSMX^{h22}YRLNLCRKTCGSC	HmK-X22	224
ATCKDLX^{h6}PVSRCTDIRCRTSMKX^{h22}RLNX^{h26}CRKTCGSC	HmK-X6, 22, 26	225

VCRDWFKETACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK	9
ACRDWFKETACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A1	226
VCADWFKETACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A3	227
VCRDAFKETACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A5	228
VCRDWFKATACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A8	229
VCRDWFKEAACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A9	230
VCRDWFKETACAHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A12	231
VCRDWFKETACRHAASLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A15	232
VCRDWFKETACRHAKALGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A16	233
VCRDWFKETACRHAKSAGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A17	234
VCRDWFKETACRHAKSLGNCATSQKYRANCAKTCELC	BgK-A21	235
VCRDWFKETACRHAKSLGNCRASQKYRANCAKTCELC	BgK-A22	236
VCRDWFKETACRHAKSLGNCRTSQKYAANCAKTCELC	BgK-A27	237
VCRDWFKETACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAATCELC	BgK-A32	238
VCRDWFKETACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKACELC	BgK-A33	239
VCRDWFKETACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCALC	BgK-A35	240
VCRDWFKETACRHAKSLGNCRTSQKYRANCAKTCEAC	BgK-A37	241
GCKDNFSANTCKHVKANNNCGSQKYATNCAKTCGKC	AeK	7
ACKDNFAAATCKHVKENKNCGSQKYATNCAKTCGKC	AsKS	8

【００９４】

表３及び本明細書を通じて、X^{h6}、X^{h22}、X^{h26}は、各々独立に、非官能性残基である。

【００９５】

【表５】

表４－ＭｇＴｘペプチド及びＭｇＴｘ ペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx	28
TIINVACTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-A6	242
TIINVSCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-S6	243
TIINVKCTSPAQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-A11	244
TIINVKCTSPKQCLPPCAAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-A18	245
TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAACMNGKCKCYPH	MgTx-A28	246
TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGACKCYPH	MgTx-A33	247
TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCACYPH	MgTx-A35	248
TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPN	MgTx-H39N	249
TIINVACTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPN	MgTx-A6/H39N	250
TIINVSCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYS	MgTx-S6/38/d39	251
TIITISCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-T4/I5/S6	252
TISCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-d3/T4/I5/S6	253
TISCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCFGR	MgTx-Pi2	254
NVACTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-d3/A6	255
QFTNVSCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYS	MgTx-ChTx	256
QFTDVDCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYQ	MgTx-IbTx	257
IINVSCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-Z1	258
IITISCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-Z2	259
GVIINVSCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx-Z3	260

【００９６】

表４に記載されている多くのペプチドは、出願人がＭｅｒｃｋ＆Ｃｏ．，Ｉｎｃ．である、１９９５年２月２日に公開されたＷＯ９５／０３０６５号に記載されているとおりに

調製することが可能である。この出願は、１９９３年７月２２日に出願された米国特許出願０７／０９６，９４２号（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に対応する。

【００９７】

【表６】

表５－AgTx2ペプチド及びAgTx2 ペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
GVPINVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	AgTx2	23
GVPIAVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	AgTx2-A5	261
GVPINVSCTGSPQCIAPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	AgTx2-A16	262
GVPINVSCTGSPQCIKPCADAGMRFGKCMNRKCHCTPK	AgTx2-A19	263
GVPINVSCTGSPQCIKPCKDAGMAFGKCMNRKCHCTPK	AgTx2-A24	264
GVPINVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGACMNRKCHCTPK	AgTx2-A27	265
GVPINVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGKCMNAKCHCTPK	AgTx2-A31	266
GVPINVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGKCMNRACHCTPK	AgTx2-A32	267
GVPINVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPA	AgTx2-A38	268
GVPIAVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPA	AgTx2-A5/A38	269
GVPINVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	AgTx2-G31	270
GVPIIVSCKGSRQCIKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	AgTx2-OSK_z1	271
GVPIIVSCKISRQCIKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	AgTx2-OSK_z2	272
GVPIIVKCKGSRQCIKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	AgTx2-OSK_z3	273
GVPIIVKCKISRQCIKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	AgTx2-OSK_z4	274
GVPIIVKCKISRQCIKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	AgTx2-OSK_z5	275

【００９８】

【表７】

表６－ヘテロミトラス・スピニファー（ＨｓＴｘ１）ペプチド及びＨｓＴｘ１ペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1	61
ASCXTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1-X4	276
ASCATPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1-A4	277
ASCRTPXDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1-X7	278
ASCRTPADCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1-A7	279
ASCRTPKDCADPCXKETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1-X14	280
ASCRTPKDCADPCAKETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1-A14	281
ASCRTPKDCADPCRXETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1-X15	282
ASCRTPKDCADPCRAETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1-A15	283
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGXCMNRKCKCNRC	HsTx1-X23	284
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGACMNRKCKCNRC	HsTx1-A23	285
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNXKCKCNRC	HsTx1-X27	286
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNAKCKCNRC	HsTx1-A27	287
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRXCKCNRC	HsTx1-X28	288
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRACKCNRC	HsTx1-A28	289
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCXCNRC	HsTx1-X30	290
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCACNRC	HsTx1-A30	291
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNXC	HsTx1-X33	292
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNAC	HsTx1-A33	293

【００９９】

表５に記載されているペプチドは、Ｌｅｂｒｕｎらに対して２００４年２月１０日に付

与された米国特許第６，６８９，７４９号（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に記載されているとおりに調製することが可能である。

【０１００】

【表８】

表７－オルトチルス・スクロビキュロサス（ＯＳＫ１）ペプチド及びＯＳＫ１ペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1	25
GVIINVSCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-S7	1303
GVIINVKCKISRQCLKPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-K16	294
GVIINVKCKISRQCLEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-D20	295
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-K16,D20	296
GVIINVSCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-S7,K16,D20	1308
GVIINVKCKISPQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-P12,K16,D20	297
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-K16,D20,Y36	298
Ac-GVIINVKCKISPQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-P12, K16, D20	562
GVIINVKCKISPQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	OSK1-P12,K16, D20-NH_2	563
Ac-GVIINVKCKISPQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-OSK1-P12, K16, D20-NH_2	564
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH_2	OSK1-K16, D20, Y36-NH_2	565
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	Ac-OSK1-K16, D20, Y36	566
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH_2	Ac-OSK1-K16, D20, Y36-NH_2	567
GVIINVKCKISRQCLKPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	OSK1-K16-NH_2	568
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-K16	569
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-OSK1-K16-NH_2	570
Ac-GVIINVKCKISRQCLEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-D20	571
GVIINVKCKISRQCLEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	OSK1-D20-NH_2	572
Ac-GVIINVKCKISRQCLEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK- NH_2	Ac-OSK1-D20-NH_2	573
GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	OSK1-NH_2	574
Ac-GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1	575
Ac-GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-OSK1-NH_2	576
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	OSK1-K16, D20-NH_2	577
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-K16, D20	578
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-OSK1-K16, D20-NH_2	579

VIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Δ1-OSK1	580
Ac-VIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-Δ1-OSK1	581
VIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Δ1-OSK1- NH_2	582
Ac-VIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-Δ1-OSK1-NH_2	583
GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-A34	584
Ac-GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK	Ac-OSK1-A34	585
GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH_2	OSK1-A34-NH_2	586
Ac-GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH_2	Ac-OSK1-A34-NH_2	587
VIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Δ1-OSK1-K16, D20	588
Ac-VIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-Δ1-OSK1-K16, D20	589
VIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Δ1-OSK1-K16, D20-NH_2	590
Ac-VIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-Δ1-OSK1-K16, D20-NH_2	591
NVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	(Δ1-4)-OSK1-K16, D20	592
Ac-NVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-(Δ1-4)-OSK1-K16, D20	593
NVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	(Δ1-4)-OSK1-K16, D20-NH_2	594
Ac-NVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-(Δ1-4)-OSK1-K16, D20-NH_2	595
KCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	(Δ1-6)-OSK1-K16, D20	596
Ac-KCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-(Δ1-6)-OSK1-K16, D20	597
KCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	(Δ1-6)-OSK1-K16, D20-NH_2	598
Ac-KCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-(Δ1-6)-OSK1-K16, D20-NH_2	599
CKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	(Δ1-7)-OSK1-K16, D20	600
Ac-CKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-(Δ1-7)-OSK1-K16, D20	601
CKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	(Δ1-7)-OSK1-K16, D20-NH_2	602
Ac-CKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-(Δ1-7)-OSK1-K16, D20-NH_2	603
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRNGKCMNGKCHCTPK	OSK1-K16, D20, N25	604
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRNGKCMNGKCHCTPK-NH_2	OSK1-K16, D20, N25-NH_2	605
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRNGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-K16, D20, N25	606
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRNGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-OSK1-K16, D20, N25-NH_2	607
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	OSK1-K16, D20, R31	608
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK-NH_2	OSK1-K16, D20, R31-NH_2	609

Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	Ac-OSK1-K16, D20, R31	610
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK-NH_2	Ac-OSK1-K16, D20, R31-NH_2	611
GVIINVKCKISKQCLKPCRDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-K12, K16, R19, D20	612
Ac-GVIINVKCKISKQCLKPCRDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-K12, K16, R19, D20	613
GVIINVKCKISKQCLKPCRDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	OSK1-K12, K16, R19, D20-NH_2	614
Ac-GVIINVKCKISKQCLKPCRDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-OSK1-K12, K16, R19, D20-NH_2	615
TIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Δ1-OSK1-T2, K16, D20	616
Ac-TIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-Δ1-OSK1-T2, K16, D20	617
TIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Δ1-OSK1-T2, K16, D20-NH_2	618
Ac-TIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-Δ1-OSK1-T2, K16, D20-NH_2	619
GVKINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-K3	620
Ac-GVKINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-K3	621
GVKINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	OSK1-K3-NH_2	622
Ac-GVKINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-OSK1-K3-NH_2	623
GVKINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-K3, A34	624
GVKINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-K3, K16, D20	625
GVKINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-K3, K16, D20, A34	626
Ac-GVKINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK	Ac-OSK1-K3, A34	627
GVKINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH_2	OSK1-K3, A34-NH_2	628
Ac-GVKINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH_2	Ac-OSK1-K3, A34-NH_2	629
Ac-GVKINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	Ac-OSK1-K3, K16, D20, A34	630
GVKINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH_2	OSK1-K3, K16, D20, A34-NH_2	631
Ac-GVKINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH_2	Ac-OSK1-K3, K16, D20, A34-NH_2	632
Ac-GVKINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-K3, K16, D20	633
GVKINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	OSK1-K3, K16, D20-NH_2	634
Ac-GVKINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH_2	Ac-OSK1-K3, K16, D20-NH_2	635
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCT	Δ36-38-OSK1-K16, D20	636
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-O16,D20	980
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hLys 16,D20	981
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hArg 16,D20	982

GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-Cit 16,D20	983
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hCit 16,D20	984
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-Dpr 16,D20	985
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-Dab 16,D20	986
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-O16,D20,Y36	987
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-hLys 16,D20,Y36	988
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-hArg 16,D20,Y36	989
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-Cit 16,D20,Y36	990
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-hCit 16,D20,Y36	991
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-Dpr 16,D20,Y36	992
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-Dab 16,D20,Y36	993
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACYPK	OSK1-K16,D20,A34,Y36	994
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCGCYPK	OSK1-K16,D20,G34,Y36	995
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACFPK	OSK1-K16,D20,A34,F36	996
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACWPK	OSK1-K16,D20,A34,W36	997
GVIINVKCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCACYPK	OSK1-K16,E20,A34,Y36	998
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-O16,D20,A34	999
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-hLys 16,D20,A34	1000
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-hArg 16,D20,A34	1001
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-Cit 16,D20,A34	1002
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hCit 16,D20,A34	1003
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-Dpr 16,D20,A34	1004
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-Dab 16,D20,A34	1005
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-O16,D20,	1006
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-hLys 16,D20	1007
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-hArg 16,D20	1008
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-Cit 16,D20	1009
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-hCit 16,D20	1010

GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,D20	1011
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-Dab16,D20	1012
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-O16,D20,A34	1013
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-hLys 16,D20,A34	1014
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-hArg 16,D20,A34	1015
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-Cit 16,D20,A34	1016
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-hCit 16,D20,A34	1017
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,D20,A34	1018
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-Dab 16,D20,A34	1019
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCGCYGG	OSK1-K16,D20,G34,Y36,G37,G38	1020
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-O16,D20,Y36,G37,G38	1021
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hLys 16,D20,Y36,G37,G38	1022
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hArg 16,D20,Y36,G37,G38	1023
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-Cit 16,D20,Y36,G37,G38	1024
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hCit 16,D20,Y36,G37,G38	1025
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-Dpr 16,D20,Y36,G37,G38	1026
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-K16,D20,A34,Y36,G37,G38	1027
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-O16,D20,A34,Y36,G37,G38	1028
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-hLys 16,D20,A34,Y36,G37,G38	1029
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-hArg 16,D20,A34,Y36,G37,G38	1030

GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-Cit 16,D20,A34,Y36,G37,G38	1031
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hCit 16,D20,A34,Y3,G37,G38	1032
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-Dpr 16,D20,A34,Y36,G37,G38	1033
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-Dab 16,D20,A34,Y36,G37,G38	1034
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACYG	Δ38, OSK1-K16,D20,A34,Y36,G37	1035
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-O16,D20,G36-38	1036
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-hLys 16,D20,G36-38	1037
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-hArg 16,D20,G36-38	1038
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-Cit 16,D20,G36-38	1039
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-hCit 16,D20,G36-38	1040
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-Dpr 16,D20,G36-38	1041
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACFGG	OSK1-K16,D20,A34,F36,G37,G38	1042
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-O16,D20,A34,G36-38	1043
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-hLys 16,D20,A34,G36-38	1044
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-hArg 16,D20,A34,G36-38	1045
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-Cit 16,D20,A34,G36-38	1046
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-hCit 16,D20,A34,G36-38	1047
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-Dpr 16,D20,A34,G36-38	1048
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-Dab 16,D20,A34,G36-38	1049
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACGG	Δ38, OSK1-K16,D20,A34,G36-37	1050
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACYG	Δ38, OSK1-K16,D20,A35,Y36,G37	1051

GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACGG	Δ38, OSK1-O16,D20,A35,Y36,G37	1052
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hLys 16,E20	1053
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hArg 16,E20	1054
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-Cit 16,E20	1055
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hCit 16,E20	1056
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-Dpr 16,E20	1057
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-Dab 16,E20	1058
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-O16,E20,Y36	1059
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-hLys 16,E20,Y36	1060
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-hArg 16,E20,Y36	1061
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-Cit 16,E20,Y36	1062
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-hCit 16,E20,Y36	1063
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-Dpr 16,E20,Y36	1064
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-Dab 16,E20,Y36	1065
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-O16,E20,A34	1066
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-hLys 16,E20,A34	1067
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-hArg 16,E20,A34	1068
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-Cit 16,E20,A34	1069
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hCit 16,E20,A34	1070
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-Dpr 16,E20,A34	1071
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-Dab 16,E20,A34	1072
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-O16,E20,	1073
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-hLys 16,E20	1074
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-hArg 16,E20	1075
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-Cit 16,E20	1076
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-hCit16,E20	1077
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,E20	1078

GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-O16,E20,A34	1079
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-hLys 16,E20,A34	1080
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-hArg 16,E20,A34	1081
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-Cit 16,E20,A34	1082
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-hCit 16,E20,A34	1083
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,E20,A34	1084
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-Dab 16,E20,A34	1085
GVIINVKCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-K16,E20,Y36,G37,G38	1086
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-O16,E20,Y36,G37,G38	1087
GVIINVKCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCHCYG	Δ38 OSK1-K16,E20,Y36,G37	1088
GVIINVKCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCACYG	Δ38 OSK1-K16,E20,A34, Y36,G37	1089
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hLys 16,E20,Y36,G37,G38	1090
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hArg 16,E20,Y36,G37,G38	1091
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-Cit 16,E20,Y36,G37,G38	1092
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	Δ37-38, OSK1-hCit 16,E20,Y36,G37,G38	1093
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-Dpr 16,E20,Y36,G37,G38	1094
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-Dab 16,E20,Y36,G37,G38	1095
GVIINVKCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCACYG	Δ38, OSK1-K16,E20,A34,Y36,G37	1096
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-O16,E20,A34,Y36,G37,G38	1097

GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-hLys 16,E20,A34,Y36,G37,G38	1098
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-hArg 16,E20,A34,Y36,G37,G38	1099
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-Cit 16,E20,A34,Y36,G37,G38	1100
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hCit 16,E20,A34,Y3,G37,G38	1101
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-Dpr 16,E20,A34,Y36,G37,G38	1102
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-Dab 16,E20,A34,Y36,G37,G38	1103
GVIINVKCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCACFGG	OSK1-K16,D20,A34,F36,G37,G38	1104
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-O16,E20,G36-38	1105
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-hLys 16,E20,G36-38	1106
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-hArg 16,E20,G36-38	1107
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-Cit 16,E20,G36-38	1108
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-hCit 16,E20,G36-38	1109
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-Dpr 16,E20,G36-38	1110
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-O16,E20,A34,G36-38	1111
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-hLys 16,E20,A34,G36-38	1112
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-hArg 16,E20,A34,G36-38	1113
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-Cit 16,E20,A34,G36-38	1114
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTP	OSK1-hCit 16,E20,A34,G36-38	1115
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTP	OSK1-Dpr 16,E20,A34,G36-38	1116
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTP	OSK1-Dab 16,E20,A34,G36-38	1117
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-O16,D20-amide	1118
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-hLys 16,D20-amide	1119

GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-hArg 16,D20-amide	1120
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-Cit 16,D20-amide	1121
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-hCit 16,D20-amide	1122
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-Dpr 16,D20-amide	1123
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-Dab 16,D20	1124
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-O16,D20,Y36-amide	1125
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-hLys 16,D20,Y36-amide	1126
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-hArg 16,D20,Y36-amide	1127
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-Cit 16,D20,Y36-amide	1128
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-hCit 16,D20,Y36-amide	1129
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-Dpr 16,D20,Y36-amide	1130
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-Dab 16,D20,Y36-amide	1131
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-O16,D20,A34-amide	1132
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-hLys 16,D20,A34-amide	1133
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-hArg 16,D20,A34-amide	1134
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-Cit 16,D20,A34-amide	1135
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-hCit 16,D20,A34-amide	1136
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-Dpr 16,D20,A34-amide	1137
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-Dab 16,D20,A34-amide	1138

GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-O16,D20, -amide	1139
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hLys 16,D20-amide	1140
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hArg 16,D20-amide	1141
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-Cit 16,D20-amide	1142
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hCit16,D20-amide	1143
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,D20-amide	1144
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-O16,D20,A34-amide	1145
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-hLys 16,D20,A34-amide	1146
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-hArg 16,D20,A34-amide	1147
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-Cit 16,D20,A34-amide	1148
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hCit16,D20,A34	1149
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,D20,A34-amide	1150
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-Dab 16,D20,A34-amide	1151
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-O16,D20,Y36,G37,G38-amide	1152
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-O16,D20,Y36,G37,G38	1153
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-hLys 16,D20,Y36,G37,G38-amide	1154
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-hArg 16,D20,Y36,G37,G38-amide	1155
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-Cit 16,D20,Y36,G37,G38-amide	1156

GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-hCit16,D20,Y36,G37,G38-amide	1157
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-Dpr16,D20,Y36,G37,G38-amide	1158
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCFGG-NH2	OSK1-K16,D20,F36,G37,G38-amide	1159
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYG-NH2	Δ38-OSK1-K16,D20,Y36,G37-amide	1160
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACYG-NH2	Δ38-OSK1-K16,D20,A34,Y36,G37-amide	1161
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-O16,D20,A34,Y36,G37,G38-amide	1162
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-hLys16,D20,A34,Y36,G37,G38-amide	1163
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-hArg16,D20,A34,Y36,G37,G38-amide	1164
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-Cit16,D20,A34,Y36,G37,G38	1165
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-hCit16,D20,A34,Y3,G37,G38-amide	1166
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-Dpr16,D20,A34,Y36,G37,G38-amide	1167
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-Dab16,D20,A34,Y36,G37,G38-amide	1168
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-K16,D20,A34,Y36,G37,G38-amide	1169
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-O16,D20,G36-38-amide	1170
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-hLys16,D20,G36-38-amide	1171
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-hArg16,D20,G36-38-amide	1172
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-Cit16,D20,G36-38-amide	1173

GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-hCit16,D20,G36-38-amide	1174
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-Dpr 16,D20,G36-38-amide	1175
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-K16,D20,A34,G36-38-amide	1176
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACFGG-NH2	OSK1-O16,D20,A34,F36,G37-38-amide	1177
GVIINVKCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-O16,D20,A34,G36-38-amide	1178
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-hLys 16,D20,A34,G36-38-amide	1179
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-hArg 16,D20,A34,G36-38-amide	1180
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-Cit 16,D20,A34,G36-38-amide	1181
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-hCit16,D20,A34,G36-38-amide	1182
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-Dpr 16,D20,A34,G36-38-amide	1183
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-Dab 16,D20,A34,G36-38-amide	1184
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-O16,E20-amide	1185
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-hLys 16,E20-amide	1186
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-hArg 16,E20-amide	1187
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-Cit 16,E20-amide	1188
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-hCit16,E20-amide	1189
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-Dpr 16,E20-amide	1190
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-Dab 16,E20-amide	1191
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-O16,E20,Y36-amide	1192

GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-hLys 16,E20,Y36-amide	1193
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-hArg 16,E20,Y36-amide	1194
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-Cit 16,E20,Y36-amide	1195
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-hCit16,E20,Y36-amide	1196
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,Y36-amide	1197
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-Dab 16,E20,Y36-amide	1198
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-O16,E20,A34-amide	1199
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-hLys 16,E20,A34-amide	1200
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-hArg 16,E20,A34-amide	1201
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-Cit 16,E20,A34-amide	1202
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-hCit16,E20,A34-amide	1203
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,A34-amide	1204
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-Dab 16,E20,A34-amide	1205
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-O16,E20, -amide	1206
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hLys 16,E20-amide	1207
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hArg 16,E20-amide	1208
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-Cit 16,E20-amide	1209
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hCit16,E20-amide	1210

GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,E20-amide	1211
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-O16,E20,A34-amide	1212
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-hLys16,E20,A34-amide	1213
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-hArg16,E20,A34-amide	1214
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-Cit 16,E20,A34-amide	1215
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hCit16,E20,A34-amide	1216
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,E20,A34-amide	1217
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-Dab 16,E20,A34-amide	1218
GVIINVKCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCHCWGG-NH2	OSK1-O16,E20,W36,G37, G38-amide	1219
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-O16,E20,Y36,G37,G38-amide	1220
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-hLys 16,E20,Y36,G37,G38-amide	1221
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-hArg 16,E20,Y36,G37,G38-amide	1222
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-Cit 16,E20,Y36,G37,G38-amide	1223
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-hCit 16,E20,Y36,G37,G38-amide	1224
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,Y36,G37,G38-amide	1225
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,Y36,G37,G38-amide	1226
GVIINVKCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-K16,E20,A34,Y36,G37,G38-amide	1227
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-O16,E20,A34,Y36,G37,G38-amide	1228

GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-hLys 16,E20,A34,Y36,G37,G38-amide	1229
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-hArg 16,E20,A34,Y36,G37,G38-amide	1230
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-Cit 16,E20,A34,Y36,G37,G38-amide	1231
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1- hCit 16,E20,A34,Y3,G37,G38-amide	1232
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,A34,Y36,G37,G38-amide	1233
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-Dab 16,E20,A34,Y36,G37,G38-amide	1234
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-O16,E20,G36-38-amide	1235
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-hLys 16,E20,G36-38-amide	1236
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-hArg 16,E20,G36-38-amide	1237
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-Cit 16,E20,G36-38-amide	1238
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-hCit 16,E20,G36-38-amide	1239
GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,G36-38-amide	1240
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-O16,E20,A34,G36-38-amide	1241
GVIINVKCKISRQCL[hLys]PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-hLys 16,E20,A34,G36-38-amide	1242
GVIINVKCKISRQCL[hArg]PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-hArg 16,E20,A34,G36-38-amide	1243
GVIINVKCKISRQCL[Cit]PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-Cit 16,E20,A34,G36-38-amide	1244
GVIINVKCKISRQCL[hCit]PCKEAGMRFGKCMNGKCACTP-NH2	Δ38 OSK1-hCit 16,E20,A34-amide	1245

GVIINVKCKISRQCL[Dpr]PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,A34,G36-38-amide	1246
GVIINVKCKISRQCL[Dab]PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-Dab 16,E20,A34,G36-38-amide	1247
GVIINVKCKISRQCLKPCK[Cpa]AGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-K 16,CPA20,A34,Y36, G37,G38-amide	1248
GVIINVKCKISRQCLKPCK[Cpa]AGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-K 16,CPA20,A34,G36-38-amide	1249
GVIINVKCKISRQCLKPCK[Cpa]AGMRFGKCMNGKCACY-NH2	Δ37-38OSK1-K 16,CPA20,A34,Y36 -amide	1250
Ac-GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	Acetyl-OSK1-K 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38-amide	1251
GVIINVKCKISRQCLKPCK[Aad]AGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-K 16, Aad20,A34,Y36,G37 ,G38-amide	1252
GVIINVKCKISRQCLKPCK[Aad]AGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-K 16, Aad20,Y36,G37,G38 -amide	1253
GVIINVKCKISRQCLKPCK[Aad]AGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-K 16, Aad20,A34,Y36,G37 ,G38	1254
GVIINVKCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-H 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38-amide	1255
GVIINVKCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-H 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38	1256
GVIINVKCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCACY-NH2	Δ37--38-OSK1-H 16,D20,A34,Y36-amide	1257
GVIINVKCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-H 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38-amide	1258
GVIINVKCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-H 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38	1259
GVIINVKCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-H 16,D20,A34,Y36,	1260
GVIINVKCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38 OSK1-H 16,D20,A34,Y36,	1261
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[1Nal]GG-NH2	OSK1-K 16,D20,A34,1Nal36, G37,G38-amide	1262
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[1Nal]PK-NH2	OSK1-K 16,D20,A34,1Nal36 -amide	1263

GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[2Nal]GG-NH2	OSK1-K 16,D20,A34,2Nal36, G37,G38-amide	1264
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[Cha]GG-NH2	OSK1-K 16,D20,A34,Cha36, G37,G38-amide	1265
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[MePhe]GG-NH2	OSK1-K 16,D20,A34, MePhe36,G37,G38 -amide	1266
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[BiPhA]GG-NH2	OSK1-K 16,D20,A34, BiPhA36,G37,G38 -amide	1267
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKC[Aib]CYGG-NH2	OSK1-K 16,D20, Aib34,Y36,G37,G3 8-amide	1268
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKC[Abu]CYGG-NH2	OSK1-K 16,D20, Abu34,Y36,G37,G3 8-amide	1269
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[1Nal]	Δ37-38 OSK1-H 16,D20,A34,1Nal36, -amide	1270
GVIINVKCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[1Nal]GG-NH2	OSK1-H 16,D20,A34, 1Nal36,G37,G38- amide	1271
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[4Bip]-NH2	Δ37-38 OSK1-H 16,D20,A34, 4Bip 36,-amide	1272
GVIINVKCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[4Bip]GG-NH2	OSK1-H 16,D20,A34, 4Bip 36,G37,G38- amide	1273
GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-K16,E20,G36-38	1274

【０１０１】

表７に記載されている配列の全ては、そのＮ末端又はＣ末端の何れかにおいて、４～１０個の炭素原子を有し及び０～２個の炭素-炭素二重結合を有する脂肪酸又はω-アミノ脂肪酸などのその誘導体で誘導体化することも可能である。（例えば、Ｍｏｕｈａｔ ｅｔ ａｌ．，ＷＯ ２００６／００２８５０ Ａ２参照。参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）。このような脂肪酸の例には、吉草酸又は（Ｃ末端に対する）ω-アミノ吉草酸が含まれる。

【０１０２】

【表９】

表８－Ｐｉ２ペプチド及びＰｉｐ２ｓペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2	17
TISCTNPXQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-X8	299
TISCTNPAQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-A8	300

TISCTNPKQCYPHCXKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-X15	301
TISCTNPKQCYPHCAKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-A15	302
TISCTNPKQCYPHCKXETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-X16	303
TISCTNPKQCYPHCKAETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-A16	304
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAXCMNRKCKCFGR	Pi2-X24	305
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAACMNRKCKCFGR	Pi2-A24	306
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNXKCKCFGR	Pi2-X28	307
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNAKCKCFGR	Pi2-A28	308
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRXCKCFGR	Pi2-X29	309
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRACKCFGR	Pi2-A29	310
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCXCFGR	Pi2-X31	311
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCACFGR	Pi2-A31	312
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGX	Pi2-X35	313
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGA	Pi2-A35	314
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFG	Pi2-d35	315

【０１０３】
【表１０】

表９－アナウロトキシン（ＡｎＴｘ）ペプチド及びペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
ZKECTGPQHCTNFCRKNKCTHGKCMNRKCKCFNCK	Anuroctoxin (AnTx)	62
KECTGPQHCTNFCRKNKCTHGKCMNRKCKCFNCK	AnTx-d1	316
XECTGPQHCTNFCRKNKCTHGKCMNRKCKCFNCK	AnTx-d1,X2	317
AECTGPQHCTNFCRKNKCTHGKCMNRKCKCFNCK	AnTx-d1,A2	318

【０１０４】
【表１１】

表１０－ノキシウストキシン（ＮＴＸ）ペプチド及びＮＴＸペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
TIINVKCTSPKQCSKPCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN	NTX	30
TIINVACTSPKQCSKPCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN	NTX-A6	319
TIINVKCTSPKQCSKPCKELYGSSRGAKCMNGKCKCYNN	NTX-R25	320
TIINVKCTSSKQCSKPCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN	NTX-S10	321
TIINVKCTSPKQCWKPCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN	NTX-W14	322
TIINVKCTSPKQCSKPCKELYGSSGAKCMNGKCKCYNN	NTX-A25d	323
TIINVKCTSPKQCSKPCKELFGVDRGKCMNGKCKCYNN	NTX-IbTx1	324
TIINVKCTSPKQCWKPCKELFGVDRGKCMNGKCKCYN	NTX-IBTX2	325

【０１０５】
【表１２】

表１１－カリオトキシン（ＫＴＸ１）ペプチド及びＫＴＸ１ペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
GVEINVKCSGSPQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	KTX1	24
VRIPVSCKHSGQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCDCTPK	KTX2	326
GVEINVSCSGSPQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	KTX1-S7	327
GVEINVACSGSPQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	KTX1-A7	328

【０１０６】

【表１３】

表１２－ＩＫＣａ１阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX	20
QFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx	36
QFTQESCTASNQCWSICKRLHNTNRGKCMNKKCRCYS	ChTx-Lq2	329

【０１０７】
【表１４】

表１３－マウロトキシン（ＭＴｘ）ペプチド及びＭＴｘペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX	20
VSCAGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A4	330
VSCTGAKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A6	331
VSCTGSADCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A7	332
VSCTGSKDCAAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A10	333
VSCTGSKDCYAPCQKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-Q14	334
VSCTGSKDCYAPCRQQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-Q15	335
VSCTGSKDCYAPCQQQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-Q14,15	336
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYAC	MTX-A33	337
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPYGKCMNRKCKCNRC	MTX-HsTx1	338
VSCTGSKDCYAACRKQTGCANAKCINKSCKCYGC	MTX-A12,20	339
VSCTGSKDCYAPCRKQTGX^{M19}PNAKCINKSCKCYGX^{M34}	MTX-X19, 34	340
VSCTGSKDCYAPCRKQTGSPNAKCINKSCKCYGS	MTX-S19,34	341
VSCTGSADCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A7	342
VVIGQRCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	TsK-MTX	343
VSCRGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-R4	1301
VSCGGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-G4	1302
VSCTTSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-T5	1304
VSCTASKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A5	1305
VSCTGTKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-T6	1306
VSCTGPKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-P6	1307
VSCTGSKDCGAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-G10	1309
VSCTGSKDCYRPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-R11	1311
VSCTGSKDCYDPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-D11	1312
VSCTGSKDCYAPCRKRTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-R16	1315
VSCTGSKDCYAPCRKETGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-E16	1316
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPYAKCINKSCKCYGC	MTX-Y21	1317
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNSKCINKSCKCYGC	MTX-S22	1318
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNGKCINKSCKCYGC	MTX-G22	1319
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINRSCKCYGC	MTX-R27	1320
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKTCKCYGC	MTX-T28	1321
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKMCKCYGC	MTX-M28	1322
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKKCKCYGC	MTX-K28	1323
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCNGC	MTX-N32	1324
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYRC	MTX-R33	1325
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGCS	MTX-S35	1326
SCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-d1	1327
SCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGCS	MTX-S35 d1	1328
VSCTGSKDCYAPCAKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A14	1329

VSCTGSKDCYAPCRAQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A15	1330
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAACINKSCKCYGC	MTX-A23	1331
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINASCKCYGC	MTX-A27	1332
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCACYGC	MTX-A30	1333
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCAGC	MTX-A32	1334
ASCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A1	1335
MSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-M1	1336

【０１０８】
表１３及び本明細書を通じて、X^{m19}及びX^{m34}は、各々独立に、非官能性残基である。
【０１０９】
【表１５】
表１４－カリブドトキシン（ＣｈＴｘ）ペプチド及びＣｈＴｘペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
QFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx	36
QFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKECRCYS	ChTx-E32	59
QFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKDCRCYS	ChTx-D32	344
CTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-d1-d6	345
QFTNVSCTTSKECWSVCQRLFGVDRGKCMGKKCRCYQ	ChTx-IbTx	346
QFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNGKCRCYS	ChTx-G31	1369
QFTNVSCTTSKECLSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-L14	1370
QFTNVSCTTSKECASVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A14	1371
QFTNVSCTTSKECWAVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A15	1372
QFTNVSCTTSKECWPVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-P15	1373
QFTNVSCTTSKECWSACQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A16	1374
QFTNVSCTTSKECWSPCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-P16	1375
QFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSAGKCMNKKCRCYS	ChTx-A25	1376
QFTNVACTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A6	1377
QFTNVKCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-K6	1378
QFTNVSCTTAKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A10	1379
QFTNVSCTTPKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-P10	1380
QFTNVSCTTSKACWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A12	1381
QFTNVSCTTSKQCWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-Q12	1382

AFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A1	1383
TFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-T1	1384
QATNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A2	1385
QITNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-I2	1386
QFANVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A3	1387
QFINVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-I3	1388
TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGTSRGKCMNKKCRCYSP	ChTx-MgTx	1389
TIINVSCTSPKQCLPPCKAQFGTSRGKCMNKKCRCYSP	ChTx-MgTx-b	1390

【０１１０】
【表１６】

表１５－ＳＫＣａ阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
CNCKAPETALCARRCQQHG	Apamin	68
AFCNLRMCQLSCRSLGLLGKCIGDKCECVKH	ScyTx	51
AVCNLKRCQLSCRSLGLLGKCIGDKCECVKHG	BmP05	50
TVCNLRRCQLSCRSLGLLGKCIGVKCECVKH	P05	52
AFCNLRRCELSCRSLGLLGKCIGEECKCVPY	Tamapin	53
VSCEDCPEHCSTQKAQAKCDNDKCVCEPI	P01	16
VVIGQRCYRSPDCYSACKKLVGKATGKCTNGRCDC	TsK	47

【０１１１】
【表１７】

表１６－アパミンペプチド及びペプチド類縁体阻害剤の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
CNCKAPETALCARRCQQHG	Apamin (Ap)	68
CNCXAPETALCARRCQQHG	Ap-X4	348
CNCAAPETALCARRCQQHG	Ap-A4	349
CNCKAPETALCAXRCQQHG	Ap-X13	350
CNCKAPETALCAARCQQHG	Ap-A13	351
CNCKAPETALCARXCQQHG	Ap-X14	352
CNCKAPETALCARACQQHG	Ap-A14	353

【０１１２】

【表１８】

表１７－シラトキシン（ＳｃｙＴｘ）、ＢｍＰ０５、Ｐ０５、タマピン、Ｐ０１ペプチド及びペプチド類縁体阻害剤の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
AFCNLRMCQLSCRSLGLLGKCIGDKCECVKH	ScyTx	51
AFCNLRRCQLSCRSLGLLGKCIGDKCECVKH	ScyTx-R7	354
AFCNLRMCQLSCRSLGLLGKCMGKKCRCVKH	ScyTx-IbTx	355
AFSNLRMCQLSCRSLGLLGKSIGDKCECVKH	ScyTx-C/S	356
AFCNLRRCELSCRSLGLLGKCIGEECKCVPY	Tamapin	53

【０１１３】
【表１９】

表１８－ＢＫＣａ阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKCRCYQ	IbTx	38
TFIDVDCTVSKECWAPCKAAFGVDRGKCMGKKCKCYV	Slotoxin (SloTx)	39
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1	40
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCYTN	BuTx	41
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGKCQNNQCRCY	MartenTx	35
ITINVKCTSPQQCLRPCKDRFGQHAGGKCINGKCKCYP	ClTx1	29

【０１１４】
【表２０】

表１９－ＩｂＴｘ、スロトキシン，ＢｍＴｘ１及びＢｕＴＸ（スロトキシンファミリー）ペプチド及びペプチド類縁体阻害剤の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKCRCYQ	IbTx	38
QFTDVDCSVSXECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKCRCYQ	IbTx-X11	357
QFTDVDCSVSAECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKCRCYQ	IbTx-A11	358
QFTDVDCSVSKECWSVCXDLFGVDRGKCMGKKCRCYQ	IbTx-X18	359
QFTDVDCSVSKECWSVCADLFGVDRGKCMGKKCRCYQ	IbTx-A18	360
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDXGKCMGKKCRCYQ	IbTx-X25	361
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDAGKCMGKKCRCYQ	IbTx-A25	362
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGXCMGKKCRCYQ	IbTx-X27	363
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGACMGKKCRCYQ	IbTx-A27	364
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGXKCRCYQ	IbTx-X31	365
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGAKCRCYQ	IbTx-A31	366
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKXCRCYQ	IbTx-X32	367
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKACRCYQ	IbTx-A32	368
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKCXCYQ	IbTx-X34	369
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKCACYQ	IbTx-A34	370
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1	371
QFTDVXCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1-X6	372
QFTDVACTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1-A6	373
QFTDVKCTGSXQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1-X11	374
QFTDVKCTGSAQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1-A11	375
QFTDVKCTGSKQCWPVCXQMFGKPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1-X18	376
QFTDVKCTGSKQCWPVCAQMFGKPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1-A18	377

QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGXPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1-X23	378
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGAPNGKCMNGKCRCYS	BmTx1-A23	379
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGXCMNGKCRCYS	BmTx1-X27	380
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGACMNGKCRCYS	BmTx1-A27	381
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGXCRCYS	BmTx1-X32	382
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGARCYS	BmTx1-A32	383
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCXYS	BmTx1-X34	384
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCAYS	BmTx1-A34	385
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCYTN	BuTx	386
WCSTCLDLACGASXCYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCYTN	BuTx-X14	387
WCSTCLDLACGASACYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCYTN	BuTx-A14	388
WCSTCLDLACGASRECYDPCFXFGRAHGKCMNNKCRCYTN	BuTx-X22	389
WCSTCLDLACGASRECYDPCFAGRAHGKCMNNKCRCYTN	BuTx-A22	390
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGXHGKCMNNKCRCYTN	BuTx-X26	391
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGAHGKCMNNKCRCYTN	BuTx-A26	392
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGXMNNKCRCYTN	BuTx-X30	393
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGAMNNKCRCYTN	BuTx-A30	394
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNXRCYTN	BuTx-X35	395
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNARCYTN	BuTx-A35	396
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCXYTN	BuTx-X37	397
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCAYTN	BuTx-A37	398

【０１１５】
【表２１】

表２０－マルテントキシンペプチド及びペプチド類縁体阻害剤の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGKCQNNQCRCY	MartenTx	35
FGLIDVXCFASSECWTACKKVTGSGQGKCQNNQCRCY	MartenTx-X7	399
FGLIDVACFASSECWTACKKVTGSGQGKCQNNQCRCY	MartenTx-A7	400
FGLIDVKCFASSECWTACXKVTGSGQGKCQNNQCRCY	MartenTx-X19	401
FGLIDVKCFASSECWTACAKVTGSGQGKCQNNQCRCY	MartenTx-A19	402
FGLIDVKCFASSECWTACKXVTGSGQGKCQNNQCRCY	MartenTx-X20	403
FGLIDVKCFASSECWTACKAVTGSGQGKCQNNQCRCY	MartenTx-A20	404
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGXCQNNQCRCY	MartenTx-X28	405
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGACQNNQCRCY	MartenTx-A28	406
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGKCQNNQCXCY	MartenTx-X35	407
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGKCQNNQCACY	MartenTx-A35	408

【０１１６】
【表２２】

表２１－Ｎ型Ｃａ$^{2+}$チャンネル阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA	65
CKSPGSSCSPTSYNCCRSCNPYTKRCY	GVIA	64
CKSKGAKCSKLMYDCCTGSCSGTVGRC	CVIA	409
CKLKGQSCRKTSYDCCSGSCGRSGKC	SVIB	347
AEKDCIAPGAPCFGTDKPCCNPRAWCSSYANKCL	Ptu1	66
CKGKGASCRKTMYDCCRGSCRSGRC	CVIB	1364
CKGKGQSCSKLMYDCCTGSCSRRGKC	CVIC	1365
CKSKGAKCSKLMYDCCSGSCSGTVGRC	CVID	1366
CLSXGSSCSXTSYNCCRSCNXYSRKCY	TVIA	1367

【０１１７】

【表２３】

表２２－ωＭＶＩＩＡペプチド及びペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA	65
CXGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA-X2	410
CAGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA-A2	411
CKGXGAKCSRLMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA-X4	412
CKGAGAKCSRLMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA-A4	413
CKGKGAXCSRLMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA-X7	414
CKGKGAACSRLMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA-A7	415
CKGKGAKCSXLMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA-X10	416
CKGKGAKCSALMYDCCTGSCRSGKC	MVIIA-A10	417
CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCXSGKC	MVIIA-X21	418
CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCASGKC	MVIIA-A21	419
CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSGXC	MVIIA-X24	420
CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSGAC	MVIIA-A24	421

【０１１８】

【表２４】

表２３－ωＧＶＩＡペプチド及びペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
CKSPGSSCSPTSYNCCRSCNPYTKRCY	GVIA	64
CXSPGSSCSPTSYNCCRSCNPYTKRCY	GVIA-X2	422
CASPGSSCSPTSYNCCRSCNPYTKRCY	GVIA-A2	423
CKSPGSSCSPTSYNCCXSCNPYTKRCY	GVIA-X17	424
CKSPGSSCSPTSYNCCASCNPYTKRCY	GVIA-A17	425
CKSPGSSCSPTSYNCCRSCNPYTXRCY	GVIA-X24	426
CKSPGSSCSPTSYNCCRSCNPYTARCY	GVIA-A24	427
CKSPGSSCSPTSYNCCRSCNPYTKXCY	GVIA-X25	428
CKSPGSSCSPTSYNCCRSCNPYTKACY	GVIA-A25	429

【０１１９】

【表２５】

表２４－Ｐｔｕ１ペプチド及びペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
AEKDCIAPGAPCFGTDKPCCNPRAWCSSYANKCL	Ptu1	66
AEXDCIAPGAPCFGTDKPCCNPRAWCSSYANKCL	Ptu1-X3	430
AEADCIAPGAPCFGTDKPCCNPRAWCSSYANKCL	Ptu1-A3	431
AEKDCIAPGAPCFGTDXPCCNPRAWCSSYANKCL	Ptu1-X17	432
AEKDCIAPGAPCFGTDAPCCNPRAWCSSYANKCL	Ptu1-A17	433
AEKDCIAPGAPCFGTDKPCCNPXAWCSSYANKCL	Ptu1-X23	434
AEKDCIAPGAPCFGTDKPCCNPAAWCSSYANKCL	Ptu1-A23	435
AEKDCIAPGAPCFGTDKPCCNPRAWCSSYANXCL	Ptu1-X32	436
AEKDCIAPGAPCFGTDKPCCNPRAWCSSYANACL	Ptu1-A32	437

【０１２０】

【表２６】

表２５－トリキソペルマ・プルリエンス（ＰｒｏＴｘｉ）及びＰｒｏＴｘｉペプチド類縁体及び他のＴ型Ca^{2+}チャンネル阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
ECRYWLGGCSAGQTCCKHLVCSRRHGWCVWDGTFS	ProTx1	56
ECXYWLGGCSAGQTCCKHLVCSRRHGWCVWDGTFS	ProTx1-X3	438
ECAYWLGGCSAGQTCCKHLVCSRRHGWCVWDGTFS	ProTx1-A3	439
ECRYWLGGCSAGQTCCXHLVCSRRHGWCVWDGTFS	ProTx1-X17	440
ECRYWLGGCSAGQTCCAHLVCSRRHGWCVWDGTFS	ProTx1-A17	441
ECRYWLGGCSAGQTCCKHLVCSXRHGWCVWDGTFS	ProTx1-X23	442
ECRYWLGGCSAGQTCCKHLVCSARHGWCVWDGTFS	ProTx1-A23	443
ECRYWLGGCSAGQTCCKHLVCSRXHGWCVWDGTFS	ProTx1-X24	444
ECRYWLGGCSAGQTCCKHLVCSRAHGWCVWDGTFS	ProTx1-A24	445
KIDGYPVDYW NCKRICWYNN KYCNDLCKGL KADSGYCWGW TLSCYCQGLP DNARIKRSGR CRA	Kurtoxin	1276

【０１２１】

【表２７】

表２６－ＢｅＫＭＩＭ電流阻害剤ペプチド及びＢｅＫＭ１ペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
RPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1	63
PTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-d1	446
XPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-X1	447
APTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-A1	448
RPTDIXCSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-X6	449
RPTDIACSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-A6	450
RPTDIKCSESYQCFPVCXSRFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-X18	451
RPTDIKCSESYQCFPVCASRFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-A18	452
RPTDIKCSESYQCFPVCKSXFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-X20	453
RPTDIKCSESYQCFPVCKSAFGKTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-A20	454
RPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGXTNGRCVNGFCDCF	BeKM1-X23	455
RPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGATNGRCVNGFCDCF	BeKM1-A23	456
RPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGXCVNGFCDCF	BeKM1-X27	457
RPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGACVNGFCDCF	BeKM1-A27	458

【０１２２】

【表２８】

表２７－Ｎａ＋チャンネル阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
QRCCNGRRGCSSRWCRDHSRCC	SmIIIa	459
RDCCTOOKKCKDRQCKOQRCCA	μ-GIIIA	460
RDCCTOORKCKDRRCKOMRCCA	μ-GIIIB	461
ZRLCCGFOKSCRSRQCKOHRCC	μ-PIIIA	462
ZRCCNGRRGCSSRWCRDHSRCC	μ-SmIIIA	463
ACRKKWEYCIVPIIGFIYCCPGLICGPFVCV	μO-MrVIA	464
ACSKKWEYCIVPIIGFIYCCPGLICGPFVCV	μO-MrVIB	465
EACYAOGTFCGIKOGLCCSEFCLPGVCFG	δ-PVIA	466
DGCSSGGTFCGIHOGLCCSEFCFLWCITFID	δ-SVIE	467
WCKQSGEMCNLLDQNCCDGYCIVLVCT	δ-TxVIA	468
VKPCRKEGQLCDPIFQNCCRGWNCVLFCV	δ-GmVIA	469

【０１２３】

【表２９】

表２８－ＣＩ－チャンネル阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR	CTX	67
MCMPCFTTDHQMAXKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR	CTX-X14	470
MCMPCFTTDHQMAAKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR	CTX-A14	471
MCMPCFTTDHQMARXCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR	CTX-X15	472
MCMPCFTTDHQMARACDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR	CTX-A15	473
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGXGRGKCYGPQCLCR	CTX-X23	474
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGAGRGKCYGPQCLCR	CTX-A23	475
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGXGKCYGPQCLCR	CTX-X25	476
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGAGKCYGPQCLCR	CTX-A25	477
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGXCYGPQCLCR	CTX-X27	478
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGACYGPQCLCR	CTX-A27	479
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCX	CTX-X36	480
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCA	CTX-A36	481
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLC	CTX-d36	482
QTDGCGPCFTTDANMARKCRECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b	483
QTDGCGPCFTTDANMAXKCRECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b-X17	484
QTDGCGPCFTTDANMAAKCRECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b-A17	485
QTDGCGPCFTTDANMARXCRECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b-X18	486
QTDGCGPCFTTDANMARACRECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b-A18	487
QTDGCGPCFTTDANMARKCXECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b-X20	488
QTDGCGPCFTTDANMARKCAECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b-A20	489
QTDGCGPCFTTDANMARKCRECCGGNGXCFGPQCLCNRE	Bm-12b-X28	490
QTDGCGPCFTTDANMARKCRECCGGNGACFGPQCLCNRE	Bm-12b-A28	491
QTDGCGPCFTTDANMARKCRECCGGNGKCFGPQCLCNXE	Bm-12b-X38	492
QTDGCGPCFTTDANMARKCRECCGGNGKCFGPQCLCNAE	Bm-12b-A38	493

【０１２４】

【表３０】

表２９－Ｋｖ２．１阻害剤ペプチド配列

配列／構造	省略名称	配列番号
ECRYLFGGCKTTSDCCKHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1	494
ECXYLFGGCKTTSDCCKHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-X3	495
ECAYLFGGCKTTSDCCKHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-A3	496
ECRYLFGGCXTTSDCCKHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-X10	497
ECRYLFGGCATTSDCCKHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-A10	498
ECRYLFGGCKTTSDCCXHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-X17	499
ECRYLFGGCKTTSDCCAHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-A17	500
ECRYLFGGCKTTSDCCKHLGCXFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-X22	501
ECRYLFGGCKTTSDCCKHLGCAFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-A22	502
ECRYLFGGCKTTSDCCKHLGCKFXDKYCAWDFTFS	HaTx1-X24	503
ECRYLFGGCKTTSDCCKHLGCKFADKYCAWDFTFS	HaTx1-A24	504
ECRYLFGGCKTTSDCCKHLGCKFRDXYCAWDFTFS	HaTx1-X26	505
ECRYLFGGCKTTSDCCKHLGCKFRDAYCAWDFTFS	HaTx1-A26	506

【０１２５】

【表３１】

表３０－Ｋｖ４．３及びＫｖ４．２阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
YCQKWMWTCDEERKCCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2	57
YCQXWMWTCDEERKCCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2-X4	507
YCQAWMWTCDEERKCCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2-A4	508
YCQKWMWTCDEEXKCCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2-X13	509
YCQKWMWTCDEEAKCCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2-A13	510
YCQKWMWTCDEERXCCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2-X14	511
YCQKWMWTCDEERACCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2-A14	512
YCQKWMWTCDEERKCCEGLVCXLWCKRIINM	PaTx2-X22	513
YCQKWMWTCDEERKCCEGLVCALWCKRIINM	PaTx2-A22	514
YCQKWMWTCDEERKCCEGLVCRLWCXRIINM	PaTx2-X26	515
YCQKWMWTCDEERKCCEGLVCRLWCARIINM	PaTx2-A26	516
YCQKWMWTCDEERKCCEGLVCRLWCKXIINM	PaTx2-X27	517
YCQKWMWTCDEERKCCEGLVCRLWCKAIINM	PaTx2-A27	518

【０１２６】
【表３２】

表３１－ｎＡＣＨＲチャンネル阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
GCCSLPPCAANNPDYC	PnIA	519
GCCSLPPCALNNPDYC	PnIA-L10	520
GCCSLPPCAASNPDYC	PnIA-S11	521
GCCSLPPCALSNPDYC	PnIB	522
GCCSLPPCAASNPDYC	PnIB-A10	523
GCCSLPPCALNNPDYC	PnIB-N11	524
GCCSNPVCHLEHSNLC	MII	525
GRCCHPACGKNYSC	α-MI	526
RD(hydroxypro)CCYHPTCNMSNPQIC	α-EI	527
GCCSYPPCFATNPDC	α-AulB	528
RDPCCSNPVCTVHNPQIC	α-PIA	529
GCCSDPRCAWRC	α-ImI	530
ACCSDRRCRWRC	α-ImII	531
ECCNPACGRHYSC	α-GI	532
GCCGSY(hydroxypro)NAACH(hydroxypro)CSCKDR(hydroxypro)SYCGQ	αA-PIVA	533
GCCPY(hydroxypro)NAACH(hydroxypro)CGCKVGR(hydroxypro)(hydroxypro)YCDR(hydroxypro)SGG	αA-EIVA	534
H(hydroxypro)(hydroxypro)CCLYGKCRRY(hydroxypro)GCSSASCCQR	ψ-PIIIE	535
GCCSDPRCNMNNPDYC	EpI	536
GCCSHPACAGNNQHIC	GIC	537
IRD(γ-carboxyglu) CCSNPACRVNN(hydroxypro)HVC	GID	538
GGCCSHPACAANNQDYC	AnIB	539
GCCSYPPCFATNSDYC	AuIA	540
GCCSYPPCFATNSGYC	AuIC	541

【０１２７】

【表３３】

表３２－アゲレノプシス・アペルタ（アガトキシン）トキシンペプチド及びペプチド類縁体及びＣａ$^{2+}$チャンネル阻害剤ペプチド

配列／構造	省略名称	配列番号
KKKCIAKDYG RCKWGGTPCC RGRGCICSIM GTNCECKPRL IMEGLGLA	ω-Aga-IVA	959
EDNCIAEDYG KCTWGGTKCC RGRPCRCSMI GTNCECTPRL IMEGLSFA	ω-Aga-IVB	960
SCIDIGGDCD GEKDDCQCCR RNGYCSCYSL FGYLKSGCKC VVGTSAEFQG ICRRKARQCY NSDPDKCESH NKPKRR	ω-Aga-IIIA	961
SCIDIGGDCD GEKDDCQCCR RNGYCSCYSL FGYLKSGCKC VVGTSAEFQG ICRRKARTCY NSDPDKCESH NKPKRR	ω-Aga-IIIA-T58	962
SCIDFGGDCD GEKDDCQCCR SNGYCSCYSL FGYLKSGCKC EVGTSAEFRR ICRRKAKQCY NSDPDKCVSV YKPKRR	ω-Aga-IIIB	963
SCIDFGGDCD GEKDDCQCCR SNGYCSCYNL FGYLKSGCKC EVGTSAEFRR ICRRKAKQCYNSDPDKCVSV YKPKRR	ω-Aga-IIIB-N29	964
SCIDFGGDCD GEKDDCQCCR SNGYCSCYNL FGYLRSGCKC EVGTSAEFRR ICRRKAKQCY NSDPDKCVSV YKPKRR	ω-Aga-IIIB-N29/R35	965
NCIDFGGDCD GEKDDCQCCX RNGYCSCYNL FGYLKRGCKX EVG	ω-Aga-IIIC	966
SCIKIGEDCD GDKDDCQCCR TNGYCSXYXL FGYLKSG	ω-Aga-IIID	967
GCIEIGGDCD GYQEKSYCQC CRNNGFCS	ω-Aga-IIA	968
AKAL PPGSVCDGNE SDCKCYGKWH KCRCPWKWHF TGEGPCTCEK GMKHTCITKL HCPNKAEWGL DW	ω-Aga-IA (major chain)	969
ECVPENGHCR DWYDECCEGF YCSCRQPPKC ICRNNNX	μ-Aga	970
DCVGESQQCA DWAGPHCCDG YYCTCRYFPK CICVNNN	μ-Aga-6	971
ACVGENKQCA DWAGPHCCDG YYCTCRYFPK CICRNNN	μ-Aga-5	972
ACVGENQQCA DWAGPHCCDG YYCTCRYFPK CICRNNN	μ-Aga-4	973
ADCVGDGQRC ADWAGPYCCS GYYCSCRSMP YCRCRSDS	μ-Aga-3	1275
ECATKNKRCA DWAGPWCCDG LYCSCRSYPG CMCRPSS	μ-Aga-2	974
ECVPENGHCR DWYDECCEGF YCSCRQPPKC ICRNNN	μ-Aga-1	975
AELTSCFPVGHECDGDASNCNCCGDDVYCGCGWGRWNCKC KVADQSYAYGICKDKVNCPNRHLWPAKVCKKPCRREC	Tx-1	1277
GCANAYKSCNGPHTCCWGYNGYKKACICSGXNWK	Tx3-3	1278
SCINVGDFCDGKKDCCQCDRDNAFCSCSVIFGYKTNCRCE	Tx3-4	1279
SCINVGDFCDGKKDDCQCCRDNAFCSCSVIFGYKTNCRCE VGTTATSYGICMAKHKCGRQTTCTKPCLSKRCKKNH	ω-PtXIIA	1280
AECLMIGDTSCVPRLGRRCCYGAWCYCDQQLSCRRVGRKR ECGWVEVNCKCGWSWSQRIDDWRADYSCKCPEDQ	Dw13.3	1281
GGCLPHNRFCNALSGPRCCSGLKCKELSIWDSRCL	Agelenin	1282
DCVRFWGKCSQTSDCCPHLACKSKWPRNICVWDGSV	ω-GTx-SIA	1283
GCLEVDYFCG IPFANNGLCC SGNCVFVCTP Q	ω-conotoxin PnVIA	1284
DDDCEPPGNF CGMIKIGPPC CSGWCFFACA	ω-conotoxin PnVIB	1285
VCCGYKLCHP C	Lambda-conotoxin CMrVIA	1286
MRCLPVLIIL LLLTASAPGV VVLPKTEDDV PMSSVYGNGK SILRGILRNG VCCGYKLCHP C	Lambda-conotoxin CMrVIB	1287
KIDGYPVDYW NCKRICWYNN KYCNDLCKGL KADSGYCWGW TLSCYCQGLP DNARIKRSGR CRA	Kurtoxin	1276
CKGKGAPCRKTMYDCCSGSCGRRGKC	MVIIC	1368

【０１２８】
本発明に従えば、分子のトキシンペプチド（Ｐ）部分の少なくとも１つがＫｖ１．３アンタゴニストペプチドを含む分子である。ＳｈＫ、ＨｍＫ、ＭｇＴｘ、ＡｇＴｘ１、ＡｇＴｘ２、ヘテロメトラス・スピニファー（Ｈｅｔｅｒｏｍｅｔｒｕｓ ｓｐｉｎｎｉｆｅｒ）（ＨｓＴｘ１）、ＯＳＫ１、アヌロクトキシン（Ａｎｕｒｏｃｔｏｘｉｎ）（Ａｎｘ）、ノキシウストキシン（Ｎｏｘｉｕｓｔｏｘｉｎ）（ＮＴＸ）、ＫＴＸ１、ホンゴトキシン（Ｈｏｎｇｏｔｏｘｉｎ）、ＣｈＴｘ、チチストキシン（Ｔｉｔｙｓｔｏｘｉｎ）、ＢｇＫ、ＢｍＫＴＸ、ＢｍＴｘ、ＡｅＫ，ＡｅＫＳＴｃ３０、Ｔｃ３２、Ｐｉ１、Ｐｉ２及び／又はＰｉ３トキシンペプチド及びこれらの何れかのペプチド類縁体からなる群から選択されるアミノ酸配列が好ましい。有用なＫｖ１．３アンタゴニストペプチド配列の例には、本明細書の上記表１、表２、表３、表４、表５、表６、表７、表８、表９、表１０及び／又は表１１に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。
【０１２９】
本発明の組成物の他の実施形態は、ＩＫＣａ１アンタゴニストペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）を含む。有用なＩＫＣａ１アンタゴニストペプチドには、マウロトキシン（ＭＴｘ）、ＣｈＴｘペプチド及びこれらの何れかのペプチド類縁体が含まれ、その例には、表１２、表１３及び／又は表１４に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。
【０１３０】
本発明の組成物の他の実施形態は、ＳＫＣａ阻害剤ペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）を含む。有用なＳＫＣａ阻害剤ペプチドには、アパミン、ＳｃｙＴｘ、ＢｍＰ０５、Ｐ０１、Ｐ０５、タマピン、ＴｓＫ及びこれらの何れかのペプチド類縁体が含まれ、その例には、表１５に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。
【０１３１】
本発明の組成物の他の実施形態には、アパミンペプチド及びアパミンのペプチド類縁体である少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表１６に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。
【０１３２】
本発明の組成物の他の実施形態には、シロトキシンファミリーペプチド及びこれらの何れかのペプチド類縁体である少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表１７に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。
【０１３３】
本発明の組成物の他の実施形態には、ＢＫＣａ阻害剤ペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表１８に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。
【０１３４】
本発明の組成物の他の実施形態には、スロトキシンファミリーペプチド及びこれらの何れかのペプチド類縁体である少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表１９に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。
【０１３５】
本発明の組成物の他の実施形態には、マルテントキシンペプチド及びそのペプチド類縁体である少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２０に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。
【０１３６】
本発明の組成物の他の実施形態には、Ｎ型Ca^{2+}チャンネル阻害剤ペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２１に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。
【０１３７】
本発明の組成物の他の実施形態には、ωＭＶＩＩＡペプチド及びそのペプチド類縁体で

ある少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２２に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１３８】

本発明の組成物の他の実施形態には、ωＧＶＩＡペプチド及びそのペプチド類縁体である少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２３に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１３９】

本発明の組成物の他の実施形態には、ＰＴｕ１ペプチド及びそのペプチド類縁体である少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２４に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１４０】

本発明の組成物の他の実施形態には、ＰｒｏＴｘ１ペプチド及びそのペプチド類縁体である少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２５に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１４１】

本発明の組成物の他の実施形態には、ＢｅＫＭ１ペプチド及びそのペプチド類縁体である少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２６に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１４２】

本発明の組成物の他の実施形態には、Na^+チャンネル阻害剤ペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２７に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１４３】

本発明の組成物の他の実施形態には、Cl^-チャンネル阻害剤ペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２８に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１４４】

本発明の組成物の他の実施形態には、Ｋｖ２．１阻害剤ペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表２９に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１４５】

本発明の組成物の他の実施形態には、Ｋｖ４．２／Ｋｖ４．３阻害剤ペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表３０に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１４６】

本発明の組成物の他の実施形態には、ｎＡＣＨＲ阻害剤ペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表３１に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１４７】

本発明の組成物の他の実施形態には、アガトキシンペプチド、そのペプチド類縁体又は他のカルシウムチャンネル阻害剤ペプチドである少なくとも１つのトキシンペプチド（Ｐ）が含まれ、その例には、表３２に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【０１４８】

半減期延長部分。本発明は、Ｎ末端、Ｃ末端又は中間のアミノ酸残基１つの側鎖を通じてペプチドに結合された少なくとも１つの半減期延長部分（式Ｉ中のF^1及び／又はF^2）の存在を含む。複数の半減期延長部分を使用することも可能である（例えば、各末端のＦｃ又は末端のＦｃ及び他の末端若しくは側鎖のＰＥＧ基）。他の実施形態において、（例えば、式$F^1-F^2-(L)_f-P$；$P-(L)_g-F^1-F^2$；又は$P-(L)_g-F^1-F^2-(L)_f-P$に従って）ＦｃドメインをＰＥＧ化することが可能である。

【０１４９】
半減期延長部分は、本発明の組成物はインビボでの腎臓ろ過によるクリアランスを妨げるのに十分な流体力学的サイズを達成するように選択することが可能である。例えば、実質的に直鎖、分岐鎖又は樹状形態のポリマー性高分子である半減期延長部分を選択することが可能である。あるいは、インビボで、本発明の組成物が血清タンパク質に結合して複合体を形成するように、このようにして形成された複合体が実質的な腎臓クリアランスを回避するように、半減期延長部分を選択することが可能である。半減期延長部分は、例えば、脂質、コレステロール基（ステロイドなど）、炭水化物若しくはオリゴ糖、又はサルベージ受容体に結合するあらゆる天然若しくは合成タンパク質、ポリペプチド若しくはペプチドであり得る。
【０１５０】
本発明に従って、使用可能な典型的な半減期延長部分には、免疫グロブリンＦｃドメイン若しくはその一部、又は生物学的に適切な重合体若しくは共重合体、例えば、ポリエチレングリコール又はポリプロピレングリコールなどのポリアルキレングリコール化合物が含まれる。他の適切なポリアルキレングリコール化合物には、以下の種類の帯電したポリマー又は中性ポリマー：デキストラン、ポリリジン、コロミン酸又は他の炭水化物ベースのポリマー、アミノ酸のポリマー及びビオチン誘導体が含まれるが、これらに限定されない。
【０１５１】
本発明において、半減期延長部分の他の例には、エチレングリコールの共重合体、プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリ-１，３-ジオキソラン、ポリ-１，３，６-トリオキサン、エチレン／マレイン酸無水物共重合体、ポリアミノ酸（例えば、ポリリジン）、デキストランｎ-ビニルピロリドン、ポリｎ-ビニルピロリドン、プロピレングリコールホモ重合体、プロピレンオキシド重合体、エチレンオキシド重合体、ポリオキシエチレン化されたポリオール、ポリビニルアルコール、直鎖若しくは分岐グリコシル化された鎖、ポリアセタール、長鎖脂肪酸、長鎖疎水性脂肪族基、免疫グロブリンF_cドメイン若しくはその一部（例えば、Feige et al.，Modified peptides as therapeutic agents，米国特許第６，６６０，８４３号参照）、ＦｃのＣＨ２ドメイン、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ））；例えば、Rosen et al.，Albumin fusion proteins，米国特許第６，９２６，８９８号及びＵＳ２００５／００５４０５１；Bridon et al.，Protection of endogenous therapeutic peptides from peptidase activity through conjugation to blood components，米国特許第６，８８７，４７０号参照）、トランスサイレチン（ＴＴＲ；例えば、Walker et al.，Use of transthyretin peptide/protein fusions to increase the serum half-life of pharmacologically active peptides/proteins，ＵＳ ２００３／０１９５１５４ Ａ１；２００３／０１９１０５６ Ａ１参照）又はチロキシン結合グロブリン（ＴＢＧ）が含まれる。従って、本発明の組成物の典型的な実施形態には、ＳｈＫ、ＯＳＫ１又はこれらのトキシンペプチドの修飾された類縁体とのＨＳＡ融合物など（但し、これらに限定されない。）ＨＳＡ融合構築物も含まれる。例には、ＨＳＡ-Ｌ１０-ＳｈＫ（２-３５）；ＨＳＡ-Ｌ１０-ＯｓＫ１（１-３８）；ＨＳＡ-Ｌ１０-ＳｈＫ（２-３５）；及びＨＳＡ-Ｌ１０-ＯｓＫ１（１-３８）が含まれる。
【０１５２】
本発明において、半減期延長部分の他の実施形態には、温度、ｐＨ及びイオン強度の生理的条件下で長い半減期の血清タンパク質に対して結合親和性を有するペプチドリガンド又は小（有機）分子リガンドが含まれる。例には、アルブミン結合ペプチド若しくは小分子リガンド、トランスサイレチン結合ペプチド若しくは小分子リガンド、チロキシン結合