

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6847828号
(P6847828)

(45) 発行日 令和3年3月24日(2021.3.24)

(24) 登録日 令和3年3月5日(2021.3.5)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/12	(2006.01)
C 12 N 1/15	(2006.01)
C 12 N 1/19	(2006.01)
C 12 N 1/21	(2006.01)
C 12 N 5/10	(2006.01)
C 12 N	15/12
C 12 N	1/15
C 12 N	1/19
C 12 N	1/21
C 12 N	5/10

請求項の数 18 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-508102 (P2017-508102)
(86) (22) 出願日	平成27年8月14日 (2015.8.14)
(65) 公表番号	特表2017-525357 (P2017-525357A)
(43) 公表日	平成29年9月7日 (2017.9.7)
(86) 國際出願番号	PCT/AU2015/000487
(87) 國際公開番号	W02016/023072
(87) 國際公開日	平成28年2月18日 (2016.2.18)
審査請求日	平成30年8月6日 (2018.8.6)
(31) 優先権主張番号	2014903189
(32) 優先日	平成26年8月15日 (2014.8.15)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	オーストラリア (AU)

前置審査

(73) 特許権者	501249191 モナッシュ ユニバーシティ オーストラリア国 3800 ビクトリア 州, ク莱頓, ウエリントン ロード
(73) 特許権者	502155345 ラトローブ ユニバーシティ オーストラリア国、ビクトリア州 308 3、バンデウーラ、ブレンティ ロード

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規なカリウムチャネルブロッカー及び自己免疫疾患の治療におけるそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

スチコダクチラ・ヘリアンサス毒素 S h K のアナログであって、S h K 毒素ポリペプチドと、E W S S (配列番号 2)、E W S T (配列番号 6)、E W T T (配列番号 7)及びE W T S (配列番号 8)からなる群から選択される N 末端伸長とを含む、前記アナログ。

【請求項 2】

S h K 毒素ポリペプチドが、R S C I D T I P K S R C T A F Q C K H S M K Y R L S F C R K T C G T C (配列番号 4)に対応するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のアナログ。

【請求項 3】

S h K 毒素ポリペプチドが、M e t 2 1 の置換を含むバリアントアミノ酸配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載のアナログ。

【請求項 4】

N 末端伸長が E W S S (配列番号 2)である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のアナログ。

【請求項 5】

C y s 3 ~ C y s 3 5 、 C y s 1 2 ~ C y s 2 8 及び C y s 1 7 ~ C y s 3 2 の間にジスルフィド架橋を有するポリペプチドである、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のアナログ。

【請求項 6】

10

20

さらに細胞透過性ペプチドを含む、請求項 1～5 のいずれかに記載のアナログ。

【請求項 7】

請求項 1～6 のいずれかに記載のアナログを含む、対象における T リンパ球又はクラススイッチされた B 細胞の増殖の阻害剤であって、任意で薬学的に許容される担体と組み合わせて投与される、前記阻害剤。

【請求項 8】

請求項 1～6 のいずれかに記載のアナログを含む、対象における自己免疫疾患の治療剤であって、任意で薬学的に許容される担体と組み合わせて投与される、前記治療剤。

【請求項 9】

治療される自己免疫疾患が、 T_{EM} 細胞によって媒介される自己免疫疾患である、請求項 8 に記載の治療剤。

【請求項 10】

自己免疫疾患の治療のための医薬品の調製における、請求項 1～6 のいずれかに記載のアナログの使用。

【請求項 11】

治療される自己免疫疾患が、 T_{EM} 細胞によって媒介される自己免疫疾患である、請求項 10 に記載の使用。

【請求項 12】

請求項 1～6 のいずれかに記載のアナログを含む、対象におけるがんの治療剤であって、任意で薬学的に許容される担体と組み合わせて投与される、前記治療剤。

【請求項 13】

がんが固形腫瘍、白血病又はリンパ腫である、請求項 12 に記載の治療剤。

【請求項 14】

がんの治療のための医薬品の調製における、請求項 1～6 のいずれかに記載のアナログの使用。

【請求項 15】

がんが固形腫瘍、白血病又はリンパ腫である、請求項 14 に記載の使用。

【請求項 16】

請求項 1～6 のいずれかに記載のアナログをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子。

【請求項 17】

請求項 16 に記載のポリヌクレオチド分子を含むクローニング又は発現ベクター。

【請求項 18】

請求項 16 に記載のポリヌクレオチド分子又は請求項 17 に記載のクローニング若しくは発現ベクターを含む宿主細胞であって、培養中にアナログを発現することができる、前記宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、イソギンチャクペプチドであるスチコダクチラ・ヘリアンサス (Stichodactyla helianthus) 毒素 ShK の新規なアナログ、及び例えば自己免疫疾患を治療するための治療剤としてのそれらの使用に関する。

【0002】

優先権書類

本出願は、2014年8月15日に出願された表題「新規なカリウムチャネルブロッカー」のオーストラリア特許仮出願第 2014903189 号の優先権を主張し、その内容の全体を参照により本明細書に組み込む。

【0003】

参照による組込

以下の特許明細書を以下の説明において参照する：

10

20

30

40

50

表題「Kv1.3の選択的で強力なペプチド阻害剤」の国際公開第2010/108154号パンフレットの国際特許明細書。この特許明細書の内容は、全体を参照により本明細書に組み込む。

【背景技術】

【0004】

ほぼ70の異なる自己免疫疾患が知られており、世界中で数百万の人々が患っている。これには、体内の様々な器官、例えば、関節（例えば、関節リウマチ；RA, rheumatoid arthritis）、心臓、肺（例えば、喘息）、中枢神経系（CNS, central nervous system）（例えば、多発性硬化症；MS, multiple sclerosis）、内分泌器官（例えば、1型糖尿病；T1DM, type-1 diabetes mellitus）及び皮膚（例えば、乾癬）が関与する。
典型的には、少なくとも一部には自己反応性Tリンパ球（T細胞）によって引き起こされる組織破壊が特徴である。T細胞は繰り返し抗原刺激を受けると、最終分化型（terminal ly-differentiated）エフェクターメモリーT（T_{EM}）細胞に分化し（Sallusto F et al., Annu Rev Immunol 22:745-763 (2004)）、これらの細胞は、電位依存性カリウムチャネルKv1.3の発現が高いこと（活性化後）並びにこれらの細胞の表面上にはケモカイン受容体CCR7及びホスファターゼCD45RAのいずれも存在しないことが特徴である（Wulff H et al., J Clin Invest 111:1703-1713 (2003)）。前述の自己免疫疾患において、RA（滑膜T細胞）、MS（ミエリン抗原に特異的）、T1DM（GAD65抗原に特異的）、喘息（誘発喀痰中T細胞）及び乾癬の患者における疾患関連T細胞は全てT_{EM}細胞である（Wulff H et al., J Clin Invest 111:1703-1713 (2003)；Beeton C et al., Proc Natl Acad Sci USA 103:17414-17419 (2006)；Fasth A et al., Scand J Immunol 60:199-208 (2004)；Friedrich M et al., Arch Dermatol Res 292:519-521 (2000)；Koshy S et al., J Biol Chem 289:12623-12632 (2014)；Lovett-Racke AE et al., J Clin Invest 101:725-730 (1998)；及びViglietta V et al., J Clin Invest 109:1511-1511 (2002)）。さらに、B細胞は、抗原刺激の反復によって、クラススイッチされたB細胞に分化し、MS（Corcione A et al., Proc Natl Acad Sci USA 101:11064-11069 (2004)）及びその他の自己免疫疾患にも関係し、これらの細胞はRA、MS及びT1DMにおいて直接的な組織損傷を引き起こすIgG自己抗体の主要な原料である（Berger T et al., New Engl J Med 349:139-145 (2003)；O'Connor KC et al., J Clin Immunol 21:81-92 (2001)；Atkinson MA et al., Lancet 358:766 (2001)及びDorner T et al., Curr Opin Rheumatol 15:246-252 (2003)）。T_{EM}細胞と同様に、クラススイッチされたB細胞は活性化によってKv1.3カリウムチャネルを上方制御し、Kv1.3を阻害することによってこれらの増殖は抑制することができる（Wulff H et al., J Clin Invest 111:1703-1713 (2003)及びWulff H et al., J Immunol 173:776-786 (2004)）。他方で、CCR7⁺ナイーブセントラルメモリー（T_{CM}）細胞は、活性化によってKCa3.1チャネルを上方制御するのでKv1.3の阻害に対して感受性が低く（Wulff H et al., J Clin Invest 111:1703-1713 (2003)）、Kv1.3ブロック剤に対してもやはり感受性ではないナイーブIgD⁺CD27⁺メモリーB細胞と同様である（Wulff H et al., J Clin Invest 111:1703-1713 (2003)）。結果として、Kv1.3の選択的ブロック剤は、全身性免疫抑制（generalised immunosuppression）を誘導することなく自己免疫疾患の重症度を低下させることが期待される（Beeton C et al., Inflamm Allergy Drug Targets 10:313-321 (2011)及びChi V et al., Toxicon 59:529-546 (2012)）。近年、Kv1.3チャネルをブロックすると、さらに治療の見込みがあることも示された。例えば、Kv1.3をShK、サソリ毒素マルガトキシン（MgTX, scorpion toxin margatoxin）及びカリブドトキシン（ChTX, charybdotoxin）などのペプチドでブロックすると、CD8⁺細胞傷害性エフェクターメモリーT細胞の増殖及び神経細胞に毒性のあるグランザイムB（GrB, granzyme B）の分泌を妨害する（Hu LN et al., Plos One 8 (2013)）。これらの発見は、Kv1.3が免疫調節の魅力的な治療標的であるだけでなく、ニューロン保護において重要な役割も担うことを示唆している。

【0005】

10

20

30

40

50

Kv1.3チャネルの最も強力な阻害剤の1つは、Kv1.3を11pMのIC₅₀でブロックするイソギンチャクペプチドShKである(Kalman K et al., J Biol Chem 273:32697-32707 (1998))。ShKは、3個のジスルフィド架橋によって安定化された、アミノ酸14~19及び21~24を含む2つの短いヘリックスからなる35残基のポリペプチドである(Tudor JE et al., Nat Struct Biol 3:317-320 (1996))。ShKは、Kv1.3チャネルテトラマーの4つのサブユニット全てと相互作用して、Lys22がチャネルのポアを閉塞する(Kalman K et al., J Biol Chem 273:32697-32707 (1998))。ShKは、T_{EM}細胞の増殖を抑制し、MSの2つの動物モデル(すなわち、慢性再発-寛解実験的自己免疫性脳脊髄炎(CR-EAE, chronic relapse-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis)及び実験的自己免疫性脳脊髄炎の養子移植(at-EAE, adoptive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis)(Beeton C et al., Proc Natl Acad Sci USA 103:17414-17419 (2006)))、RAのプリスタン誘導性関節炎(PIA, pristane-induced arthritis)モデル並びに喘息及び乾癬の動物モデル(Koshy S et al., J Biol Chem 289:12623-12632 (2014)及びGilhar A et al., J Invest Dermatol 131:118-124 (2011))の症状を改善することが示された。しかし、ShKは治療上高い潜在能力を持っているが、残念なことに、CNS及び心臓に見いだされるごく近縁のKv1チャネルサブタイプ、Kv1.1にも結合する(Kd = 16pM)(Gutman GA et al., Pharmacol Rev 57:473-508 (2005))。Kv1.1欠損マウスはてんかん活性を伴う心機能不全を表すことが示されたので(Glasscock E et al., J Neurosci 30:5167-5175 (2010))、血液脳関門(BBB, blood-brain barrier)が破壊されているか、又は損なわれていて外来性ペプチド及びタンパク質がCNSに入り込むことができる(Bennett J et al., J Neuroimmunol 229:180-191 (2010))MSの患者において特に、心臓及び神経における毒性の可能性を回避するために、Kv1.3選択性のアナログを開発する必要がある。

【0006】

Kv1.3選択性が高いShKのいくつかのアナログが合成されたことがある。しかし、これら従来のアナログの多くは、非天然(すなわち、非標準)アミノ酸によるアミノ酸置換及び/又はN末端への非タンパク質伸長を含んでいた(Kalman K et al., J Biol Chem 273:32697-32707 (1998); Beeton C et al., J Biol Chem 278:9928-9937 (2003)及びPennington MW et al., Mol Pharmacol 75:762-773 (2009))。ShK-186としても知られるこのような1つのShKアナログは、最近一連の自己免疫疾患の治療のための臨床試験に入った。このアナログは、N末端ホスホチロシン(pTyr)及びC末端アミドを含有し、後者はカルボキシペプチダーゼ分解を回避するために導入され、結合親和性に影響を及ぼさなかった(Tarcha EJ et al., J Pharmacol Exp Ther 342:642-653 (2012))。しかし、ShK-186は、インビボで迅速に脱リン酸化され(Tarcha EJ et al., J Pharmacol Exp Ther 342:642-653 (2012))、さらに、力価の低い抗ShK-186抗体の産生を誘導するので(Beeton C et al., J Biol Chem 278:9928-9937 (2003))、あまり満足の行くものではない。ShK-192としても知られている別のShKアナログは、メチオニン(Met21)がノルロイシン(Nle)によって置換されて酸化的代謝の能力が低下していること、及び、リン酸部分が非加水分解性ホスホノ基によって置き換わっていることがShK-186とは異なっている。ShK-192は、Kv1.3チャネルに対する結合親和性がわずかに低いが、Kv1.1に対するよりも著しく高い選択性レベルを示すことが見いだされており、ShK-192の末端の負に荷電したホスホノ基がチャネルの細胞外面に結合し、Kv1.3のLys411の側鎖アンモニウム基と塩架橋を形成することが予測される(Pennington MW et al., Mol Pharmacol 75:762-773 (2009))。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Sallusto F et al., Annu Rev Immunol 22:745-763 (2004)

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 2】Wulff H et al., J Clin Invest 111:1703-1713 (2003)
- 【非特許文献 3】Beeton C et al., Proc Natl Acad Sci USA 103:17414-17419 (2006)
- 【非特許文献 4】Fasth A et al., Scand J Immunol 60:199-208 (2004)
- 【非特許文献 5】Friedrich M et al., Arch Dermatol Res 292:519-521 (2000)
- 【非特許文献 6】Koshy S et al., J Biol Chem 289:12623-12632 (2014)
- 【非特許文献 7】Lovett-Racke AE et al., J Clin Invest 101:725-730 (1998)
- 【非特許文献 8】Viglietta V et al., J Clin Invest 109:1511-1511 (2002)
- 【非特許文献 9】Corcione A et al., Proc Natl Acad Sci USA 101:11064-11069 (2004)
- 【非特許文献 10】Berger T et al., New Engl J Med 349:139-145 (2003)
- 【非特許文献 11】O'Connor KC et al., J Clin Immunol 21:81-92 (2001) 10
- 【非特許文献 12】Atkinson MA et al., Lancet 358:766 (2001)
- 【非特許文献 13】Dorner T et al., Curr Opin Rheumatol 15:246-252 (2003)
- 【非特許文献 14】Wulff H et al., J Immunol 173:776-786 (2004)
- 【非特許文献 15】Beeton C et al., Inflamm Allergy Drug Targets 10:313-321 (2011)
-)
- 【非特許文献 16】Chi V et al., Toxicon 59:529-546 (2012)
- 【非特許文献 17】Hu LN et al., Plos One 8 (2013)
- 【非特許文献 18】Kalman K et al., J Biol Chem 273:32697-32707 (1998)
- 【非特許文献 19】Tudor JE et al., Nat Struct Biol 3:317-320 (1996)
- 【非特許文献 20】Gilhar A et al., J Invest Dermatol 131:118-124 (2011) 20
- 【非特許文献 21】Gutman GA et al., Pharmacol Rev 57:473-508 (2005)
- 【非特許文献 22】Glasscock E et al., J Neurosci 30:5167-5175 (2010)
- 【非特許文献 23】Bennett J et al., J Neuroimmunol 229:180-191 (2010)
- 【非特許文献 24】Beeton C et al., J Biol Chem 278:9928-9937 (2003)
- 【非特許文献 25】Pennington MW et al., Mol Pharmacol 75:762-773 (2009)
- 【非特許文献 26】Tarcha EJ et al., J Pharmacol Exp Ther 342:642-653 (2012)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明につながる研究では、Kv1.1チャネルよりもKv1.3チャネルに対する選択性を高めるために、出願人等は計算手法を使用してShK毒素に有望な修飾を調べた。調べた修飾には、テトラペプチド配列ESSS(配列番号1)によるShKのN末端伸長が含まれ、これはこの伸長がShK-192アナログのホスホノ部分を模倣することができるという仮説に基づいている。その後、分子動力学(MD, Molecular dynamics)シミュレーションによってテトラペプチドの3位のトリプトファン(Trp)はKv1.3のPro377との安定した相互作用の形成に有利であることが示されたので、EWSS(配列番号2)のN末端伸長を含むShKアナログも調べた。したがって、新規なN末端テトラペプチド伸長を有するShKアナログを設計し、产生し、電気生理学の結果によって、アナログ[EWSS]ShKはKv1.3に対して34pMのIC₅₀で効力を保持していることが示されたが、Kv1.1チャネルと比べたKv1.3チャネルに対する選択性(selectivity for Kv1.3 channels over Kv1.1 channels)が著しく高いレベルであることが示された。これらの結果は、[EWSS]ShKアナログ及び関連するアナログが、例えば、自己免疫疾患を治療するための治療剤としての使用に適し得ることを示している。 30

【課題を解決するための手段】

【0009】

したがって、第1の態様では、本発明は、スチコダクチラ・ヘリアンサス毒素ShKのアナログであって、ShK毒素ポリペプチドと、式(I):
(I) a-X⁻⁴X⁻³X⁻²X⁻¹-b(配列番号3)
[式中、X⁻⁴はD、E若しくはその他の負に荷電したアミノ酸又はそれらの誘導体であ 40 50

り、

X^-^3 は E、 I、 L、 S、 V、 W 又はトリプトファン誘導体であり、

X^-^2 は任意のアミノ酸であり、

X^-^1 は任意のアミノ酸であり、

a は存在しないか、又は第 1 の付加部分 (additional moiety) であり、

b は存在しないか、又は第 2 の付加部分 (additional moiety) である]

によるアミノ酸配列を含む N 末端伸長 (N-terminal extension) とを含む、前記アナログを提供する。

【0010】

したがって、 ShK アナログは式 (II) :

(II) a - $X^-^4 X^-^3 X^-^2 X^-^1 - b - [ShK \text{ 毒素ポリペプチド }]$

の通りであってもよい。

【0011】

好ましくは、 X^-^4 は E であり、 X^-^3 は W であり、 X^-^2 及び X^-^1 は S 及び T から独立して選択される。

【0012】

第 2 の態様では、本発明は、対象における T リンパ球又はクラススイッチされた B 細胞の増殖の阻害方法であって、前記対象に、第 1 の態様のアナログの有効量を、任意で薬学的に許容される担体と組み合わせて投与することを含む、前記方法を提供する。

【0013】

さらに、第 3 の態様では、本発明は、対象における自己免疫疾患の治療方法であって、前記対象に、第 1 の態様のアナログの有効量を、任意で薬学的に許容される担体と組み合わせて投与することを含む、前記方法を提供する。

【0014】

第 4 の態様では、本発明は、自己免疫疾患、好ましくは RA 及び MS などの T_{EM} 細胞によって媒介される自己免疫疾患の治療における第 1 の態様のアナログの使用を提供する。

【0015】

さらに、第 5 の態様では、本発明は、自己免疫疾患、好ましくは RA 及び MS などの T_{EM} 細胞によって媒介される自己免疫疾患の治療のための医薬品の調製における第 1 の態様のアナログの使用を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図 1】 Kv1.3 との複合体における ShK アナログのホモジーモデリングを示した図である： (A) 膜平面に対して垂直に見たときの Kv1.3 を有する複合体における ShK - 192 を示し、チャネルはリボンで表し ShK アナログは透過性の面で表す。 Kv1.1 と Kv1.3 との間で異なるチャネル表面上のアミノ酸の側鎖原子を球として例示する； (B) ShK アナログの N 末端 Glu とチャネルの Lys411 との間の MODELLER エネルギー及び分離の比較を示す。 ShK の 1 個 (濃い三角、 E)、 2 個 (四角、 ES)、 3 個 (ひし形、 ESS) 及び 4 個 (薄い三角、 ESSS) のアミノ酸残基の伸長。 (C) Kv1.3 との複合体における本発明によるアナログ、すなわち [ESSS] ShK の相同性モデルを示す。チャネルの Pro377 及び Lys411 の側鎖原子は球として表す。 4 - アミノ酸残基伸長、 ESSS (配列番号 1) の側鎖原子は球として表す。 (D) Kv1.3 との複合体における本発明によるさらなるアナログ、この場合 [EWSS] ShK の相同性モデルを示す。チャネルの Pro377 及び Lys411 の側鎖原子を強調する。 4 - アミノ酸残基伸長、 EWSS (配列番号 2) の最初の 2 つの残基 (EW) の側鎖原子は球として表す。

【図 2】 Kv1.1 及び Kv1.3 カリウムチャネルのそれぞれの膜貫通領域の配列アライメントを示した図である。注釈は 2 つの配列の間の配列保存を強調する (アスタリスク = 保存されている)。 2 つの配列の間で異なる表面露出残基は灰色で強調し、選択フィル

10

20

30

40

50

ター内の残基は四角で囲い、ヘリックスには下線を引く。

【図3】本発明によるN末端伸長S h Kアナログの選択性を示す結果を示した図である。(A) Kv1.3及びKv1.1チャネル電流に対する[ESSS]S h K(上)、[E E S S]S h K(中央)及び[EWSS]S h K(下)の効果。(B)mKv1.3又はmKv1.1で安定してトランスフェクトしたL929線維芽細胞に対してそれぞれホールセルパッチクランプ法によって測定し(Grimmer S et al., Mol Pharmacol 45:1227-1234 (1994))、ヒルの式に当てはめた(濃度当たりN=3細胞)[ESSS]S h K((白丸)点線)、[E E S S]S h K((黒四角)実線)、[EWSS]S h K((黒丸)実線)及びS h K((白四角)点線)のKv1.3又はKv1.1チャネル電流に対する効果。左のパネルは、ホールセルのKv1.3の電流を示し、右のパネルはホールセルのKv1.1の電流を示す。データは平均±s.e.m.として表す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

天然又は「野生型」(WT, wild-type)S h Kポリペプチドのアミノ酸配列は以下の通りである:

R S C I D T I P K S R C T A F Q C K H S M K Y R L S F C R K T C G T C (配列番号4)。

【0018】

S h Kポリペプチドの構造は、Cys3~Cys35、Cys12~Cys28及びCys17~Cys32の間の3個のジスルフィド架橋によって安定化した、アミノ酸14~19及び21~24を含む2つの短いヘリックスからなる(Tudor JE et al., Nat Struct Biol 3:317-320 (1996))。S h Kは、イオン透過経路の外口の狭い「前庭」と相互作用して4つのサブユニット全てに結合することによってKv1.3カリウムチャネルをブロックする(Lanigan MD et al., Biochemistry 41(40):11963-11971 (2002))。この位置では、S h KポリペプチドのLys22残基が「瓶のコルク栓」のようにチャネルのポアを塞ぐと考えられる(Kalman K et al., J Biol Chem 273:32697-32707 (1998); Lanigan MD et al., Biochemistry 41(40):11963-11971 (2002))。

【0019】

新規なN末端テトラペプチド伸長を有するS h Kアナログを設計し、組換え又は化学合成によって産生した。これらのアナログはS h K活性を保持している(すなわち、Kv1.3をブロックすることができる)が、Kv1.3チャネルに対して(すなわち、Kv1.1チャネルと比べて)非常に高いレベルの選択性も有し得ることが発見された。したがって、S h Kアナログは、全身性免疫抑制並びに標的外チャネル、特にKv1.1の阻害による心臓及び神経における毒性の可能性を回避しながら、自己免疫疾患の治療のための治療剤としての大きな可能性をもたらす。

【0020】

したがって、第1の態様では、本発明は、スチコダクチラ・ヘリアンサス毒素S h Kのアナログであって、S h K毒素ポリペプチドと、式(I):

(I) a-X-⁴X-³X-²X-¹-b (配列番号3)

[式中、X-⁴はD、E若しくはその他の負に荷電したアミノ酸又はそれらの誘導体であり、

X-³はE、I、L、S、V、W又はトリプトファン誘導体であり、

X-²は任意のアミノ酸であり、

X-¹は任意のアミノ酸であり、

aは存在しないか、又は第1の付加部分であり、

bは存在しないか、又は第2の付加部分である]

によるアミノ酸配列を含むN末端伸長とを含む、アナログを提供する。

【0021】

したがって、S h Kアナログは式(II):

(II) a-X-⁴X-³X-²X-¹-b-[S h K毒素ポリペプチド]

10

20

30

40

50

の通りであってもよい。

【0022】

S h K 毒素ポリペプチドは、配列番号4として上記で示したものに対応するアミノ酸配列を含んでいてもよい。しかし、当業者であれば、S h K 毒素ポリペプチドはまた、好ましくは、ペプチドの機能を実質的に変化させない（例えば、変動があっても、ペプチドがカリウムチャネルKv1.3に結合し、その活性化をロックする能力を維持する）1又は2以上の小さな配列変動を含んでいてもよい配列番号4のバリエントアミノ酸配列を含むポリペプチドであってもよいことを理解していると予想される。このような変動は、G、A、V、I、L、M；D、E；N、Q；S、T；K、R、H；F、Y、W、H及びP、N - アルキルアミノ酸などの1又は2以上の保存されたアミノ酸置換を含んでいてもよい。他の置換は、1又は2以上のL - アミノ酸のD - アミノ酸による置換を含んでいてもよい。好ましくは、任意のアミノ酸置換には、遺伝子コードによってコードされる20個（20）の標準的アミノ酸（すなわち、標準アミノ酸）から選択されるアミノ酸による置換が含まれる。しかし、例えば、ある種のN - アルキルアミノ酸（例えば、N - メチルグリシン（サルコシン）及びN - メチルアラニン）並びに2 - アミノ酪酸（Abu）、ナフチルアラニン（Nal）、アミノイソ酪酸、3 - アミノアジピン酸（Ad）、オルニチン、シトルリン、アミノオキシセリン、ホモアルギニン、ノルロイシン（Nle）、アミノスペリン酸並びに - 2 - 及び - 3 - ナフチルアラニン、環置換フェニルアラニン（Phe）誘導体（例えば、2、3、4、5、6 - ペンタフルオロ - フェニルアラニン、4 - クロロ - フェニルアラニン、メチル - フェニルアラニン及びホスホノ - フェニルアラニン）、ホスホチロシン（pTyr）、セレノシステイン及びセレノメチオニンなどの他のアミノ酸などの非標準アミノ酸によるアミノ酸置換も考えられる。存在してもよいその他の配列変動には、1又は2以上のアミノ酸欠失又は付加（例えば、挿入）が含まれる。例えば、C末端配列に行うことができる他の付加は、様々な付加機能又は特性、例えば、生物学的利用率、タンパク質回収若しくは発現（例えば、融合相手）の改善を付与することができる1個のアミノ酸（例えば、Ala）、短いアミノ酸配列（例えば、2 ~ 10個の長さのアミノ酸）又は長いアミノ酸配列（例えば、11個以上のアミノ酸）の付加を含むことができるが、典型的には、アミノ酸配列付加によつてもたらされるポリペプチドの全長は、約75個以下のアミノ酸、より好ましくは約50個以下のアミノ酸である。C末端配列に行うことができる付加の好ましい1例は、細胞透過性ペプチド（CPP, cell-penetrating peptide）の付加である。CPPは、ペプチド又はポリペプチドなどの分子カーゴ（molecular cargo）の細胞取込を促進することができる短いペプチドである。したがって、CPPを本発明のS h K アナログと共に使用すると、S h K アナログを細胞の細胞質に送達することができ、そこでミトコンドリアのKv1.3チャネル（mitoKv1.3）をロックするように作用することができる。ミトコンドリアKv1.3チャネルは、アポトーシス促進性Bax及びBakタンパク質（チャネルのポアに直接結合して「毒素様機構」でチャネルを阻害することによってmitoKv1.3を阻害する；Leanza L et al., Cell Calcium 58:131-138 (2015)）の標的となることによつて細胞死に直接関与することが示された。したがって、本発明のS h K アナログなどのミトコンドリアKv1.3チャネルを阻害する化合物（例えば、クロファジミン；Leanza L et al., Leukemia 27:1782-1785 (2013)）は、がん並びにその他の増殖性疾患及び障害を治療するための治療剤として使用するために適していることがある。本発明のS h K アナログと共に使用するのに適したCPPは当業者には周知で、例えば、HIV-1 Tat由来CPP（アミノ酸48 ~ 60；Wagstaff KM and DA Jans, Curr Med Chem 13(12):1371-1387 (2006)）及びその9アミノ酸形質導入ドメイン断片（Ruben S et al., J Virol 63:1-8 (1989)及びFawell S et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:664-668 (1994)）、HIV-1 Revタンパク質由来CPP（アミノ酸34 ~ 50）及びドロソフィラ・アンテナペディア（Drosophila Antennapedia）由来CPP（アミノ酸43 ~ 58）が含まれる。

【0023】

10

20

30

40

50

本発明のアナログにおいて使用することができる特定の ShK バリアントポリペプチドは、Met21 残基の N1e による置換を含むものである。この置換は、ShK アナログ、ShK-192 において見いだされる。あるいは、Met21 は、例えば、Ala、Val、Ile 及び Leu のいずれか 1 つで置換されていてもよい。このような置換は、ShK ポリペプチドのこの位置の酸化に対する安定化効果を付与することができる。

【0024】

本発明のアナログにおいて使用することができるその他の特定の ShK バリアントポリペプチドは、全内容を本明細書に参照として組み込んだ国際公開第 2010/108154 号パンフレットの国際特許明細書に記載されている。これらの中で、Ser2 の G1u による置換；Ile4 の Lys、G1u 又は Ala による置換；Ser10 の Arg 又は G1u による置換；Phe15 の Ala による置換；Lys30 の Arg 又は G1u による置換；Thr31 の Nal による置換及び Thr34 の Nal による置換を含む ShK ポリペプチドが記載されている。これらの置換は全て、Kv1.3 の ShK ポリペプチド阻害を改善すること（すなわち、WT-ShK ポリペプチドに対して）が見いだされた。以下のアミノ酸置換を含むその他の ShK ポリペプチドは、Kv1.3 阻害活性を実質的に変化させることなく Kv1.3 に対する選択性の改善を示すこと（すなわち、WT-ShK ポリペプチドに対して）が見いだされた：Ile7 の Lys による置換；Ser10 の Ala による置換；Gln16 の Lys 又は Nal による置換；Ser20 の Lys 又は Arg による置換；Lys22 の Ala による置換；Tyr23 の Ala による置換；Ser26 の Nal による置換；Phe27 の Nal による置換及び Arg29 の Lys 又は Nal による置換。したがって、本発明のアナログにおいて使用することができる ShK バリアントポリペプチドは、例えば、以下のアミノ酸配列の 1 つからなるポリペプチドから選択することができる。

R S C I D T K P K S R C T A F Q C K H S M K Y R L S F C R K T C G T C (配列番号 11)

R S C I D T I P K A R C T A F Q C K H S M K Y R L S F C R K T C G T C (配列番号 12)

R S C I D T I P K S R C T A F K C K H S M K Y R L S F C R K T C G T C (配列番号 13)

R S C I D T I P K S R C T A F Q C K H K M K Y R L S F C R K T C G T C (配列番号 14)

R S C I D T I P K S R C T A F Q C K H R M K Y R L S F C R K T C G T C (配列番号 15)

R S C I D T I P K S R C T A F Q C K H S M A Y R L S F C R K T C G T C (配列番号 16)

R S C I D T I P K S R C T A F Q C K H S M K A R L S F C R K T C G T C (配列番号 17)

R S C I D T I P K S R C T A F Q C K H S M K Y R L S F C K K T C G T C (配列番号 18)

【0025】

X⁻⁴ は、D、E 若しくはその他の負に荷電したアミノ酸又は Kv1.3 チャネルの Lys411 の側鎖アンモニウム基と塩架橋を形成することができるこれらの誘導体（例えば、-カルボキシグルタミン酸などのグルタミン酸誘導体及び 2-アミノヘキサン二酸（2-アミノアジピン酸としても知られている））である。

【0026】

式(I)のアミノ酸配列のいくつかの好ましい実施形態では、X⁻⁴ は E である。

【0027】

X⁻³ は、E、I、L、S、V、W 又はトリプトファン誘導体（例えば、蛍光アザトリプトファン）であるが、より好ましくは E、S、W 又はトリプトファン誘導体から選択される。

10

20

30

40

50

【0028】

式(I)のアミノ酸配列のいくつかの好ましい実施形態では、X⁻³はWである。

【0029】

X⁻²及びX⁻¹は、いかなるアミノ酸であってもよく、同じであっても異なっていてもよい。好ましくは、それぞれ20個(20)標準アミノ酸、より好ましくは、S及びTから独立して選択される。しかし、X⁻²及びX⁻¹の1つ又は両方は、段落[0022]で前述したものなどの非標準アミノ酸であってもよい。2位及び1位に存在することができる好ましい非標準アミノ酸には、例えば、セリン(例えば、アミノオキシセリン)及びトレオニン(例えば、-ヒドロキシノルバリン(Hnv))の誘導体又はアナログなどの20個(20)の標準アミノ酸の誘導体が含まれる。

10

【0030】

式(I)のアミノ酸配列のいくつかの好ましい実施形態では、X⁻²はSである。

【0031】

式(I)のアミノ酸配列のいくつかの好ましい実施形態では、X⁻¹はSである。

【0032】

いくつかの好ましい実施形態では、a及びbはいずれも存在しない。

【0033】

aが存在する場合、aは、アミノ酸(例えば、任意の標準又は非標準アミノ酸)、短いアミノ酸配列(例えば、2~30個、好ましくは2~15個の長さのアミノ酸)、又はその他の化学基などの部分から選択することができる。したがって、付加部分aは、フルオレセインイソチオシアネート(5-FITC)、5-カルボキシフルオレセイン(5-Fam)、5-(及び-6)-カルボキシテトラメチルローダミン](5,6-TAMRA)、Alexa Fluor(登録商標)色素(Life Technologies Corporation社、Carlsbad、CA、United States of America)、シアニン色素、近赤外線色素、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-テトラ酢酸(DOTA)、2-(4,7-ビス(2-(tert-ブトキシ)-2-オキソエチル)-1,4,7-トリアゾナン-1-イル)酢酸(NOTA)、ジエチレントリアミンペント酢酸(DPTA)などのバイオケミカルタグ(biochemical tag)若しくはキレート剤などの機能部分、又は、例えば、このようなバイオケミカルタグ若しくはキレート剤を結合するための-アラニン、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸(「ミニ-P EG(商標)」)及び11-アミノ-3,6,9-トリオキサウンデカン酸(「ミニ-P EG3(商標)」)などのN末端へのスペーサー/リンカー部分であってもよい。いくつかの好ましい実施形態では、aはアミノ酸であり(この場合、aはX⁻⁵と見なすことができ、X⁻⁵は任意のアミノ酸である)、好ましくはAla、Gly、Ser及びThrからなる群から選択する。aが存在するいくつかの特に好ましい実施形態では、aはSerである。また、いくつかの実施形態では、aは段落[0022]で前述したものなどの細胞透過性ペプチド(CPP)を含んでいてもよい。

20

【0034】

bが存在する場合、bは、アミノ酸(例えば、任意の標準又は非標準アミノ酸)、短いアミノ酸配列(例えば、2~5個の長さのアミノ酸)、又はその他の化学基などの部分から選択することができる。したがって、付加部分bは、(式(I)の)N末端伸長をShK毒素ポリペプチドに結合するためのスペーサー/リンカー基などの機能部分であってもよい。いくつかの実施形態では、bはAla及びGlyから選択されるアミノ酸である。

30

【0035】

ShKアナログに含めるために適したN末端伸長の例には、ESSS(配列番号1)、EWSS(配列番号2)、EESS(配列番号5)、EWST(配列番号6)、EWTT(配列番号7)、EWTS(配列番号8)及びSEWSS(配列番号9)が含まれる。

40

【0036】

上記にもかかわらず、本発明のShKアナログはさらに又は代わりに、翻訳後プロセシングなどの天然の方法によって、又は当業者に周知のもの(例えば、ペグ化)などの化学

50

修飾技術によって修飾したアミノ酸配列を含んでいてもよい。このような修飾は、例えば、ペプチド骨格内、アミノ酸側鎖及び/又はC末端を含むアナログのどの場所でも行うことができる。同じ種類の修飾がアナログ内のいくつかの部位に同じ又は様々な程度で存在していてもよいことも理解されよう。化学修飾の好ましい1例は、C末端アミド化である。したがって、本発明のアナログは、好ましくはC末端にアミド基を有していてもよい。ペプチドのC末端のアミド化（例えば、-アミド化）の方法は当業者には周知で、例えば、Kim K-H et al. (Kim K-H et al., Biotechnol Bioprocess Eng 6:244-251 (2001))によって記載された方法が含まれる。C末端アミドによって、アナログのカルボキシペプチダーゼ分解を回避することができる。

【0037】

10

好ましくは、アナログは、WT ShKポリペプチドと同じパターンのジスルフィド架橋（すなわち、Cys3～Cys35、Cys12～Cys28及びCys17～Cys32）を示すか、そうでなければ配列番号4として示したアミノ酸配列の3/35、12/28及び17/32に対応する位置のシステイン残基間に3個のジスルフィド架橋を有するポリペプチドである。したがって、アナログが配列番号4のバリアントアミノ酸配列を含むポリペプチド（すなわち、前述の1又は2以上の小さな変動を含むアミノ酸配列）の場合、好ましくは、アナログはWT ShKポリペプチドと同じパターンのジスルフィド架橋を示す（又は、そうでなければ、アミノ酸配列内に変動が存在するにもかかわらず、配列番号4で示したアミノ酸配列の3/35、12/28及び17/32に対応する位置のシステイン残基間に3個のジスルフィド架橋を有する）と理解されたい。さらに、このようなアナログはまた、好ましくは、WT ShKポリペプチドと実質的に同じ立体配置で2つの短いヘリックスを示す。

20

【0038】

好ましくは、アナログはアミノ酸配列：

EWSSRSCLDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC
(配列番号10)

からなるポリペプチドである。

【0039】

30

3位にTrp残基を含むN末端伸長EWSS（配列番号2）を含むアナログは、Trpを欠如しているWT ShKポリペプチドと比較していくつかの利点をもたらす。すなわち、Trp残基は、蛍光アザトリプトファン（例えば、(4-アザ)Trp又は(5-アザ)Trp（Leptien S et al., Proc Natl Acad Sci USA 105:16095-16100 (2008)）又は最近開発された(2,7-アザ)Trp（Shen JY et al., Nat Commun 4:2611 (2013)）などのトリプトファン誘導体で置換することができ、これらは組換え技術を使用してポリペプチドに組み込むことができる。アザトリプトファンを含むShKアナログは、例えば、ポリペプチド送達のバイオアッセイのための光学プローブとして、又は神経若しくはがん組織におけるKv1.3チャネル分布を調べるために、使用することができる。

【0040】

本発明のアナログは、当業者に周知の合成又は組換え技術を使用して産生することができる。

40

【0041】

好ましくは、アナログは単離された形態で提供する。

【0042】

当業者には、Kv1.3チャネルブロッカーはTリンパ球の増殖の強力な阻害剤であることは公知である。Kv1.3チャネルブロッカーが、心臓及び神経における毒性を回避しながら、T_{EM}細胞によって媒介される自己免疫疾患、例えば、関節リウマチ（RA）及び多発性硬化症（MS）の治療のためにかなり有望であることも知られている。さらに、当業者には、Kv1.3選択性を示すアナログが、その他の免疫細胞サブセットを損なうことなく、それによって、（重篤な感染又は悪性腫瘍を引き起こし得る）全身性免疫抑制を回避して、疾患関連T細胞及びクラススイッチされたB細胞を標的化することができ

50

ることは認識されている。したがって、本発明のアナログは、自己免疫疾患の治療及び／又はTリンパ球又はクラススイッチされたB細胞の増殖の阻害のための治療方法の開発のために適することができる。

【0043】

したがって、第2の態様では、本発明は、対象におけるTリンパ球又はクラススイッチされたB細胞の増殖の阻害方法であって、前記対象に、第1の態様のアナログの有効量を、任意で薬学的に許容される担体と組み合わせて投与することを含む、前記方法を提供する。

【0044】

さらに、第3の態様では、本発明は、対象における自己免疫疾患の治療方法であって、前記対象に、第1の態様のアナログの有効量を、任意で薬学的に許容される担体と組み合わせて投与することを含む、前記方法を提供する。 10

【0045】

第3の態様の方法によって治療される自己免疫疾患は、好ましくはT_{EM}細胞によって媒介される自己免疫疾患である。このような疾患の例には、RA、喘息、MS、T1DM及び乾癬が含まれる。第3の態様の方法によって治療することができるその他の自己免疫疾患には、潰瘍性大腸炎が含まれる (Koch Hansen L et al., J Crohns Colitis 8(11):1378-91 (2014))。

【0046】

治療する対象は典型的にはヒトである。しかし、本発明はまた、例えば、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ及びウマ）、エキゾチックアニマル（例えば、トラ、ライオン、ゾウなど）及び伴侶動物（イヌ及びネコなど）などの非ヒト対象に適用することができる。 20

【0047】

アナログは、対象に投与すると前記アナログの有効量が対象に送達されることが確実である方法又は医薬品で投与、適合及び／又は製剤化することが好ましい。したがって、アナログは、例えば、経口、頬側(buccal)、経鼻、皮下、筋肉内、吸入及び静脈内投与用の医薬組成物などの任意の適切な医薬品に製剤化することができる。典型的には、このような医薬組成物は、治療効果を実現するために有効な、したがって、1日につき体重1kg当たりアナログ約0.01～約100μg、より好ましくは1日につき体重1kg当たりアナログ0.05～25μgを提供することができる量で対象に投与する。適切な医薬組成物は、最も効果的な結果を実現するために必要ならば、1日につき単回の投与、1日につき複数回の投与、又は制御放出若しくは持続性放出を目的としてもよい。しかし、上記にもかかわらず、当業者であれば、アナログの投与量及び任意の特定の対象のための投与頻度は変更可能で、アナログの活性、アナログの代謝安定性及び作用時間、年齢、体重、性別、投与形態及び投与時間、アナログの排泄速度、治療される自己免疫疾患の重症度を含む様々な要素によって左右されることを理解しているだろう。適切な医薬組成物は、吸入投与（エアロゾルの形態など）、経口投与（錠剤、カプセル、顆粒又は散剤の形態など）、経鼻投与（例えば、スプレー又は吸入可能な粉末の形態など）又は非経口投与（皮下、静脈内又は筋肉内注射若しくは注入など）のために製剤化することができる。 30

【0048】

第4の態様では、本発明は、自己免疫疾患、好ましくはRA及びMSのようなT_{EM}細胞によって媒介される自己免疫疾患の治療における第1の態様のアナログの使用を提供する。

【0049】

さらに、第5の態様では、本発明は、自己免疫疾患、好ましくはRA及びMSなどのT_{EM}細胞によって媒介される自己免疫疾患の治療のための医薬品の調製における第1の態様のアナログの使用を提供する。

【0050】

前述のように、本発明のアナログは、当業者に周知の組換え技術を使用して產生することができる。したがって、本発明のさらなる態様では、本発明は、第1の態様のアナログ 50

、好ましくは、配列番号10で示したアミノ酸配列を含むか又はこれからなるものをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子（好ましくは、単離された形態）を提供する。さらなる態様では、本発明はこのようなポリヌクレオチド分子を含むクローニング又は発現ベクターを提供する。さらに、よりさらなる態様では、本発明は、ポリヌクレオチド分子又はクローニング若しくは発現ベクターを含む宿主細胞（例えば、原核若しくは真核細胞）であって、例えば、培養中アナログを発現することができる、前記宿主細胞を提供する。

【0051】

上記にもかかわらず、本発明のアナログは、自己免疫疾患以外の疾患及びその他の症状、例えば、肥満（Tucker K et al., *Int J Obes (Lond)* 32(8):1222-1232 (2008) 及び Xu J et al., *Hum Mol Genet* 12(5):551-559 (2003) ）、2型糖尿病（T2DM）（Xu J et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 101(9):3112-3117 (2004) ）、歯周病における骨吸収（Valverde P et al., *J Dent Res* 84(6):488-499 (2005) ）及びがん（例えば、固形腫瘍、白血病及びリンパ腫）（Leanza L et al., *Cell Calcium* 58:131-138 (2015) ）の治療のための治療方法の開発のために適することがある。ShKアナログのこのような使用は、本発明の範囲内に含まれることを理解されたい。

【0052】

上記で示したように、がん及びその他の増殖性疾患又は障害の治療のために、本発明のShKアナログは細胞の細胞質に送達し、そこでミトコンドリアのKv1.3チャネル（mitoKv1.3）をブロックするように作用することができるよう適合させることができる。これは、細胞透過性ペプチド（CPP）をShKアナログのアミノ酸配列（好ましくはC末端）又はN末端伸長（すなわち、式IのaにCPPを含めることができる）に添加することによって実現することができる。しかし、低分子担体（SMOC, small molecule carrier; Okuyama M et al., *Nat Methods* 4(2):153-159 (2007) ）としても知られているCPPの結合した低分子模倣体の使用、「クリックケミストリー」（例えば、Sharpless KB and R Manetsch, 2006、Kolb HC et al., *Agnew Chem Int Ed Engl* 40:2004-2021 (2001) 及びTornoe CW et al., *J Org Chem* 67:3057-3064 (2002) によって記載された方法のいずれかを使用する）を使用するCPPのShKアナログへの結合、及びCPPのShKアナログへの非共有結合（例えば、Pep-1として知られているCPPに関するMorris MC et al., *Nat Biotechnol* 19:1173-1176 (2001) に記載された方法を使用する）を含むその他の取り組みもまた適している。さらに、又は代わりに、ShKアナログは細胞の細胞質に送達するために製剤化することができ、例えば、ShKアナログはリポソーム調製物（特に、「エンドソーム脱出」のためのpH感受性リポソームを含む調製物；Torchilin VP et al., *J Liposome Res* 3:201-255 (1993) ）として製剤化することができる。

【0053】

本発明は、以下の非限定的実施例及び添付の図面によって以下にさらに説明する。

【実施例1】

【0054】

イソギンチャク毒素ShKアナログの設計及び評価

材料及び方法

分子モデリング-Kv1.3に結合したShKの誘導体の複合体のモデリングは、既に開発されたマウスKv1.3（mKv1.3）に結合したShK-192のモデル（Pennington MW et al., *Mol Pharmacol* 75:762-773 (2009) ）から開始した。このモデルは、鋳型としてストレプトマイセス・リビダンス（*Streptomyces lividans*）のK⁺チャネル（KcsA、PDBid 1BL8）のX線結晶構造を使用し、これにShK-192のモデルをドッキングさせた。ShKへのN末端伸長のループモデリングは、MODELLERプログラム（Eswar N et al., *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 5, Unit 5.6* (2006) ）を使用して実施した。各複合体について、25の初期モデルを作製し、これらのモデルそれぞれについて、25のループモデル（N末端伸長残基のみからなる）を考案し、全部で

10

20

30

40

50

625のモデルをそれぞれの長さのN末端伸長について作製した。

【0055】

[E S S S] S h K、[E E S S] S h K、[E I S S] S h K、[E L S S] S h K、[E V S S] S h K及び[E W S S] S h Kと、m K v 1.3との複合体のMDシミュレーションは、YASARAプログラム (Yet Another Scientific Artificial Reality Application、www.yasara.org: YASARA Biosciences GmbH社、Vienna、Austria) を使用して実施した；(チャネルとの複合体における) [E S S S] S h KのS e r - 3はそれぞれG 1 u、I 1 e、L e u、V a l又はT r pに変異させた。複合体はホスファチジル-エタノールアミンのみからなる膜に埋め込まれ、膜面の溶質よりも約15 広がり、水は膜に垂直に溶質よりも約10 伸長している。境界条件は、周期境界条件に設定した。残基は、p H 7.4で予測された状態に応じてイオン化した。ナトリウム及び塩素イオンは水分子と置き換わって、最終イオン濃度0.9%を達成した。MDシミュレーションはさらに、[G E W S S] S h K及び[S E W S S] S h Kで実施した。

【0056】

標準AMBER03力場パラメーター (Duan Y et al., J Comput Chem 24:1999-2012 (2003)) を適用して非結合相互作用全てについて7.86 のカットオフを用い、一方長距離クーロン相互作用は、パーティクルメッシュエワルドのアルゴリズムを用いて計算した。分子内力について1.25 fs、分子間力について2.5 fsの短い時間刻みの使用を必要とする拘束は適用しなかった。シミュレーションは全て、温度298 Kで実施し、全圧は1バールで維持した。初期に250 ps持続する拘束平衡シミュレーションを適用して、溶媒の干渉を受けずに脂質を溶質周囲に閉じ込めた。この後に拘束をかけないMDシミュレーションを1.0 ns行った。

【0057】

N末端伸長S h Kアナログの合成 - [E E S S] S h K及び[E S S S] S h Kは、Pr eludeペプチド合成機で標準F m o c - t B u方法を使用して合成した。基本のポリペプチドS h Kは、R i n kアミド樹脂 (Peptides International, Inc社、Louisville、KY、United States of America) から合成を開始した。カップリングは全て、ジイソプロピルカルボジイミド及び6 - クロロ - ヒドロキシベンゾトリアゾールで媒介した。35個のアミノ酸S h K配列の合成が完了した後、樹脂を等分し、E S S S (配列番号1)又はE E S S (配列番号5)のN末端伸長を2つに分けた部分 (aliquots) に添加した。ペプチド直鎖を固相構築した後、ポリペプチドを固相支持体から切断し、同時に試薬Kを使用して室温 (R T, room temperature) で2時間脱保護した。粗ポリペプチドを氷冷ジエチルエーテル中に沈殿させ、徹底的に洗浄して切断混合物から陽イオン捕捉体を除去し、50 %酢酸水溶液に溶解し、水で希釈した後N H ₄ O Hでp Hを8.0に調整した。

【0058】

ジスルフィド結合形成は、還元及び酸化したグルタチオンでS h Kのために以前に使用したプロトコールに従って (Rauer H et al., J Biol Chem 274:21885-21892 (1999)) 促進した。折り畳みの進行は、Phenomenex Luna C18カラムを使用したR P - H P L C (Phenomenex Inc.社、Torrance、CA、United States of America) によってアセトニトリル対T F A 0.05%を含有するH ₂ Oの10~70%の勾配を用いて35分かけて追跡した。3個のジスルフィド結合の折り畳みはまた、E S I - M Sによる測定によって粗材料から6質量単位が失われることによって確認した。

【0059】

[E W S S] S h Kの発現及び精製 - [E W S S] S h Kは、以前に記載されたように発現させ精製した (Chang SC et al., Toxicon 60:840-850 (2012))。簡単に説明すると、[E W S S] S h Kは、B L 2 1 (D E 3) 大腸菌 (E.coli) 細胞において封入体を形成するチオレドキシン融合タンパク質として発現させた。これらを可溶化し、インピトロで再度折り畳み、エンテロキナーゼで切断して、R P - H P L Cによって均一になるまで精製し、その後凍結乾燥した。

【0060】

10

20

30

40

50

電気生理学的分析 - R T でホールセル型標準パッチクランプ技術を使用して細胞を研究した。パッチ溶液は (mMで) N a C l 1 6 0 、 K C l 4 . 5 、 C a C l 2 2 、 M g C l 2 1 、 H E P E S 1 0 を含有し、p H 7 . 2 、 3 0 0 m O s m であった。パッチペッテは (mMで) K F 1 4 5 、 H E P E S 1 0 、 E G T A 1 0 及び M g C l 2 2 を含有するp H 7 . 2 、 2 9 0 m O s m の溶液を充填し、抵抗を 2 ~ 4 M とした。K v 電流は、保持電位 - 8 0 m V ~ 4 0 m V までの 2 0 0 m s 脱分極パルスを 3 0 秒毎に反復適用することによって惹起した。ポートアパッチパッチクランプ系 (Nanion Technologies GmbH社、Munich、Germany) 及び N P C - 1 チップも 2 ~ 3 . 5 M の抵抗で併用した。K v プロッカの I C 5 0 値は、4 0 m V で測定したピーク電流の低下にヒルの式を当てはめることによって計算した。

10

【 0 0 6 1 】

結果

S h K の N 末端伸長のモデリング - K v 1 . 3 に結合した S h K - 1 9 2 のモデルにおいて、N 末端の負に荷電したホスホノ基は、K v 1 . 3 チャネルの L y s 4 1 1 の側鎖アンモニウム基と塩架橋を形成することが予測された。ホスホノ基は、チャネルに対するこのアナログの高い親和性おそらく関与するが、免疫原になりやすい可能性も示され、その產生及びペプチドへの結合には化学合成が必要で、これらの問題はホスホノ基の代わりに標準アミノ酸を使用することによって克服することができるという仮説がたてられた。S h K - 1 9 2 との複合体における K v 1 . 3 の相同性モデルにおいて (図 1 A) 、ホスホノ基は W T S h K 毒素 N 末端から約 8 のところにあり、これは N 末端と完全に伸長した G l u 残基のカルボキシレートとの間の距離 (約 4 . 7) のほぼ 2 倍であることが見いだされた。したがって、必要な距離に届き、チャネルへの親和性を維持するために、ホスホノ基とそのリンカーの置き換えに 2 個以上のアミノ酸がおそらく必要であることが考えられた。

20

【 0 0 6 2 】

したがって、ホスホノ基及びリンカーを有する S h K - 1 9 2 アナログの N 末端 G l u が 0 、 1 若しくは 2 個の介在性 S e r 残基で置き換えられた相同性モデルは、MODELLER プログラムを使用して作製し、S e r アミノ酸は溶解性を維持し、S h K - 1 9 2 におけるミニ - P E G スペーサーの特性をほぼ模倣するのを助けるために選択された。G l u が W T S h K 毒素 N 末端に直接付加されたモデルは、G l u - 1 のカルボキシレートがチャネルの L y s 4 1 1 の側鎖アンモニウムとの塩架橋を形成することができるように作製することができた。しかし、これらのモデルは塩架橋が存在しないその他のモデルとエネルギー的に区別することはできなかった (図 1 B) 。同様に、1 個又は 2 個の介在性 S e r 残基があると、必要な塩架橋を備えたモデルを作製することはできたが、またこれらのモデルは塩架橋が存在しないモデルよりもエネルギーがあまり低くなかった。3 個の介在性 S e r アミノ酸があると、E S S S (配列番号 1) 伸長が生じ、N 末端 G l u カルボキシレートとチャネルの L y s 4 1 1 のアンモニウムの間に必要な相互作用を有する低エネルギーモデルを得ることができた。 [E S S S] S h K の最低エネルギーモデルにおいて (図 1 C) 、 G l u - 4 と K v 1 . 3 の L y s 4 1 1 の間の塩架橋とは異なり、チャネルの伸長の唯一のその他の相互作用は S e r - 3 の側鎖と P r o 3 7 7 である ; その他の S e r 伸長残基 (1 及び 2 の位置) は溶媒中に突き出す。

30

【 0 0 6 3 】

構造 - 活性の関係及び [E W S S] S h K のモデリング - K v 1 . 3 選択的 S h K アナログの設計は、K v 1 . 3 と K v 1 . 1 チャネルとの間のアミノ酸配列変動を利用した (図 2) 。 2 つのチャネルの相同性は高く、それらの間で違うのは表面に露出した 7 個の残基のみで、これらの違いのほとんどは類似のタイプの残基の間、例えば、K v 1 . 3 の A s p 3 7 5 と K v 1 . 1 の G l u 3 7 5 (D 3 7 5 E) である。その他の違いは、これらの D 3 7 6 E 、 P 3 7 7 A 、 S 3 7 8 E 、 G 3 8 0 H 、 N 3 8 2 S 及び H 4 0 4 Y (図 1 A) で、最初の 4 つの残基は S 5 とポアヘリックス (pore helices) の間のタレット (turret) にあり、一方 H 4 0 4 はポアと S 6 ヘリックスを連結するループ内にある。さらに

40

50

、マウス及びヒト Kv1.3 は非常に類似していて、マウスとヒトの間の表面露出残基の唯一の違いは、S378T 及び N382S であり；マウス及びヒト Kv1.1 の配列は膜貫通領域及び選択的フィルター領域では同一である。

【0064】

Kv1.3 と Kv1.1 の間の 7 個の表面残基の違いのうち、Kv1.3 の Pro377 のみが複合体のモデルにおいて [ESSS] ShK の N 末端伸長の Ser-3 と接触する。この位置で置換した Ile、Leu 及び Val の疎水性側鎖は全て、この Pro 残基の側鎖と有利に相互作用することが予測された (Liwo A et al., J Comput Chem 18:849-873 (1997)) が、Ala (Kv1.3 の Pro377 に対応する Kv1.1 における残基) に対する Pro の結合親和性は状況次第のようである (すなわち、側鎖が溶媒に露出しているか、又はタンパク質の内側に埋め込まれているかに左右される)。しかし、3 位で置換された Trp の側鎖は、その環境とは独立して Ala よりも Pro の側鎖と強く結合することが予測された。重要な点は、Trp は Pro と Ala との間を最も良く区別することが予測され (すなわち、20 個の標準タンパク質アミノ酸の全ての最も大きな結合エネルギー差を示す)、したがって、Kv1.3 と Kv1.1 を最もよく区別すると予想される。

【0065】

これらの所見に基づいて、[ESSS] ShK アナログの Ser-3 を Trp と置換し、得られたモデルに MD シミュレーションを行った。MD の 1.0 ns 後の最終モデルを図 1D に表す。[EWSS] ShK アナログの Trp-3 の側鎖は、Kv1.3 チャネルの Pro377 の側鎖と相互作用し、と同時に Glu-4 カルボキシレートと Lys411 との相互作用を維持することが予測された。このアナログの Ser-1 の側鎖ヒドロキシルはまた、隣接するチャネルモノマーの Asp433 (Kv1.3 と Kv1.1 の間で保存された残基) のカルボキシレートと水素結合を形成し、さらに複合体を安定化することが予測された。

【0066】

ShK 誘導体 [ESSS] ShK、[EISS] ShK、[ELSS] ShK 及び [EVSS] ShK の MD シミュレーションによって、Ser-3、Ile-3、Leu-3 及び Val-3 それぞれの側鎖が Pro377 のアルカン側鎖と安定した相互作用を形成しないことが示され (すなわち、Pro377 を含有するループはシミュレーション中、伸長から遠ざかった)、大きな側鎖基 (Trp 中のインドール基など) がこの距離を結ぶために必要であることが示唆された。しかし、Glu-4 のカルボキシレートと Kv1.3 の Lys411 の間の塩架橋は、シミュレーション全てにおいて維持された。

【0067】

Kv1.3 との複合体において、Ser-3 を Glu で置き換えた [EESS] ShK アナログのさらなる MD シミュレーションでは、Pro377 との最初の結合からまた切り離された Glu-3 が生じたが、アナログの Glu-4 のカルボキシレートと Kv1.3 の Lys411 との間の塩架橋はまた、インバリアントチャネル残基 Val406 及び Thr407 のアルカン側鎖に Glu-3 の側鎖のアルカン面を詰め込んで維持することができる。

【0068】

[GEWSS] ShK アナログの MD シミュレーションにおいて、Glu-4 のカルボキシレートと Lys411 のアンモニウムとの間の相互作用が喪失すると、付随して Trp-3 と Pro377 との間の相互作用の喪失が生じることが見いだされたが、[SEWSS] ShK と Kv1.3 のドッキングのモデリングによってこのアナログが Glu-4 のカルボキシレートと Kv1.3 の Lys411 との間の塩架橋を維持しており、Trp-3 残基を Pro377 の側部の Kv1.3 チャネルの結合部位に「ぴったり」寄り添わせることが示された。したがって、ペントペプチド N 末端伸長を含む ShK アナログ、特に [SEWSS] ShK アナログは、効果的な Kv1.3 チャネルプロッカーとしてかなり有望であることが示された。

10

20

30

40

50

【0069】

[E S S S] S h K 及び [E E S S] S h K の合成 - これらのポリペプチドは、標準 F m o c - t B u 固相ペプチド合成を使用して構築した。その他多くの S h K アナログのためにうまく使用されたことがあるグルタチオン媒介酸化的折り畳み条件を使用して粗生成物を酸化した。ポリペプチドは迅速に折り畳まれ、R P - H P L C によって主要なピークが先に溶出し、その後に誤って折り畳まれた副生成物種が溶出する典型的なパターンが生じた。[E S S S] S h K 及び [E E S S] S h K は、調製 R P - H P L C によって均一になるまで精製した。各ポリペプチドは E S I - M S によって正確な質量を有し（データは示さず）、3 個のジスルフィド結合が形成されたことが示された。収率は、ポリペプチドそれぞれに対する開始樹脂の量をベースにした理論収率の約 16 % であった。 10

【0070】

[E W S S] S h K の発現及び精製 - 可溶化した H i s タグ融合タンパク質を変性させ、前述のように N T A カラムにローディングし (Chang SC et al., Toxicon 60:840-850 (2012))、結合したタンパク質は変性剤を徐々に除去することによって再度折り畳んだ。次に溶出した融合タンパク質をエンテロキナーゼで切断して、R P - H P L C によって均一になるまで精製した。分析 R P - H P L C によって、精製した S h K アナログは本質的に均一であることが示された。[E W S S] S h K の高分解能エレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析 (E S I - T O F, electrospray ionisation time-of-flight mass spectrometry) によって、平均質量 4544 Da が生じ、この値は 6 個のシステイン全てが 3 個の天然のジスルフィド結合に関与している [E W S S] S h K アナログの理論的質量 4544 Da と一致した (Pohl J et al., 1995)。[E W S S] S h K の収率は約 2 mg / L であった。 20

【0071】

K⁺ チャネルブロッキング活性 - よく確立されたホールセルパッチクランプ電気生理学アッセイを実施して、[E S S S] S h K、[E E S S] S h K 並びに [E W S S] S h K アナログの K_v1.3 及び K_v1.1 チャネルに対する効力及び選択性を測定した（図 3 A）。[E S S S] S h K は、K_v1.3 を I_C₅₀ = 657 ± 79 pM で阻害し、K_v1.1 に対しては I_C₅₀ = 1327 ± 386 pM の低い親和性を示し、K_v1.1 と比べて K_v1.3 に対して 2 倍の選択性となった。[E E S S] S h K は K_v1.3 に対して [E S S S] S h K よりも少し高い親和性を表し、I_C₅₀ は 404 ± 58 pM で、K_v1.1 に対する I_C₅₀ は 830 ± 116 pM であった。[E E S S] S h K は、[E S S S] S h K と比較して、K_v1.1 も K_v1.3 に対して 1.6 倍高い親和性を有することが見いだされ（表 1、図 3 B）、また、K_v1.1 と比べた K_v1.3 に対する選択性も 2 倍であった。このように、両アナログの K⁺ チャネルに対する親和性は低下しており、K_v1.1 と比べた K_v1.3 に対する選択性は比較的低いレベルを示した。それが意味することは、S e r - 3 も G l u - 3 も、K_v1.3 の P r o 377 と K_v1.1 の対応する A l a とをあまり区別することはできないということである。しかし、組換え [E W S S] S h K は K_v1.3 に対して高い親和性を示し、m K_v1.3 に対する I_C₅₀ は 34 ± 8 pM であったが、K_v1.1 チャネルに対する親和性は著しく低下していた (I_C₅₀ = 5371 ± 912 pM)（表 1）。したがって、[E W S S] S h K アナログは K_v1.3 に対して S h K - 192 と類似の選択性レベルを示すが、親和性は 4 倍高かった。 30

【0072】

【表1】

表1 ShKアナログの結合親和性(IC_{50} 、pM)

	Kv1.3	Kv1.1	選択性
ShK* ¹	11(2)	18 (3)	1.6
ShK-186* ²	71(4)	6900 (500)	97
ShK-192* ²	140(19)	22000 (3000)	157
[ESSS]ShK	657(79)	1327 (386)	2.1
[EESS]ShK	404 (58)	830 (116)	2.1
[EWSS]ShK	34 (8)	5371 (912)	158

括弧内の数は平均の標準誤差である。

*¹ Kalman K et al., J Biol Chem 273:32697-32707 (1998)*² Pennington MW et al., Mol Pharmacol 75:762-773 (2009)

【0073】

考察

標準アミノ酸のみからなるN末端伸長を有する新規なShKアナログを調べた。これらのアナログのいくつかは、Kv1.1チャネルよりもKv1.3チャネルに対して選択性を示し、最も顕著なものはN末端のEWSS（配列番号2）テトラペプチド伸長を有するアナログである。この[EWSS]ShKアナログは、Kv1.1に対してごく弱い阻害を示すが、Kv1.3チャネルに対して高い効力を維持していた（ IC_{50} 33 ± 7 pM）。モデリング研究によって、EWSS（配列番号2）テトラペプチド伸長は、アナログShK-192におけるホスホノ部分と親水性リンカーについて予測されたKv1.3チャネルとの相互作用を模倣することができることが示唆された。テトラペプチド伸長はまた、ホスファターゼによる加水分解を受けにくい。本発明によるShKアナログは、当業者に周知の合成又は組換え技術を使用して産生することができる。これらは、全身性免疫抑制並びに標的外チャネル、特にKv1.1の阻害による心臓及び神経における毒性の可能性を回避しながら、自己免疫疾患の治療のための治療剤の基礎として大きな可能性を提供する。

【0074】

本明細書及び以下の特許請求の範囲を通じて、文脈上別段の解釈が必要でない限り、語句「含む（comprise）」及び「含む（include）」並びに「含んでいる（comprising）」及び「含んでいる（including）」などの変化形は、記述されたもの又はものの群を含むが、その他のいかなるもの又はものの群も排除しないことを意味するものと理解されたい。

【0075】

本明細書におけるいかなる先行技術の参照も、このような先行技術が共通の一般的知識

10

20

30

40

50

の一部を形成することを承認するいかなる形態の示唆であるとも捉えられるものではなく、捉えられるべきではない。

【 0 0 7 6 】

当業者であれば、本発明は記載した特定の適用にその使用を制限しないことを理解していると予想される。本明細書で記載又は示した特定の要素及び／又は特徴に関して、本発明はその好ましい実施形態に制限されない。本発明は、開示した実施形態又は実施形態類に限定されないが、以下の特許請求の範囲によって記載し定義した本発明の範囲を逸脱することなく、数多くの再構成、改変及び置換が可能であることが理解されると予想される。

【 0 0 7 7 】

(参考文献)

- Atkinson MA et al., Lancet 358:766 (2001) 10
- Beeton C et al., J Biol Chem 278:9928-9937 (2003)
- Beeton C et al., Proc Natl Acad Sci USA 103:17414-17419 (2006)
- Beeton C et al., Inflamm Allergy Drug Targets 10:313-321 (2011)
- Bennett J et al., J Neuroimmunol 229:180-191 (2010)
- Berger T et al., New Engl J Med 349:139-145 (2003)
- Chang SC et al., Toxicol 60:840-850 (2012)
- Chi V et al., Toxicol 59:529-546 (2012)
- Corcione A et al., Proc Natl Acad Sci USA 101:11064-11069 (2004) 20
- Dorner T et al., Curr Opin Rheumatol 15:246-252 (2003)
- Duan Y et al., J Comput Chem 24:1999-2012 (2003)
- Eswar N et al., Curr Protoc Bioinformatics Chapter 5, Unit 5 6 (2006)
- Fasth A et al., Scand J Immunol 60:199-208 (2004)
- Fawell S et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:664-668 (1994)
- Friedrich M et al., Arch Dermatol Res 292:519-521 (2000)
- Gilhar A et al., J Invest Dermatol 131:118-124 (2011)
- Glasscock E et al., J Neurosci 30:5167-5175 (2010)
- Grimmer S et al., Mol Pharmacol 45:1227-1234 (1994)
- Gutman GA et al., Pharmacol Rev 57:473-508 (2005) 30
- Hu LN et al., Plos One 8 (2013)
- Kalman K et al., J Biol Chem 273:32697-32707 (1998)
- Kim K-H et al., Biotechnol Bioprocess Eng 6:244-251 (2001)
- Koch Hansen L et al., J Crohns Colitis 8(11):1378-91 (2014)
- Kolb HC et al., Agnew Chem Int Ed Engl 40:2004-2021 (2001)
- Koshy S et al., J Biol Chem 289:12623-12632 (2014)
- Leanza L et al., Leukemia 27:1782-1785 (2013)
- Leanza L et al., Cell Calcium 58:131-138 (2015)
- Lepthien S et al., Proc Natl Acad Sci USA 105:16095-16100 (2008)
- Lanigan MD et al., Biochemistry 41(40):11963-11971 (2002) 40
- Liwo A et al., J Comput Chem 18:849-873 (1997)
- Lovett-Racke AE et al., J Clin Invest 101:725-730 (1998)
- Morris MC et al., Nat Biotechnol 19:1173-1176 (2001)
- O' Connor KC et al., J Clin Immunol 21:81-92 (2001)
- Okuyama M et al., Nat Methods 4(2):153-159 (2007)
- Pennington MW et al., Mol Pharmacol 75:762-773 (2009)
- Rauer H et al., J Biol Chem 274:21885-21892 (1999)
- Ruben S et al., J Virol 63:1-8 (1989)
- Sallusto F et al., Annu Rev Immunol 22:745-763 (2004)
- Sharpless KB and R Manetsch, Expert Opin Drug Discov 7:489-501 (2012) 50

- Shen JY et al., *Nat Commun* 4:2611 (2013)
Tarcha EJ et al., *J Pharmacol Exp Ther* 342:642-653 (2012)
Torchilin VP et al., *J Liposome Res* 3:201-255 (1993)
Tor noe CW et al., *J Org Chem* 67:3057-3064 (2002)
Tucker K et al., *Int J Obes (Lond)* 32(8):1222-1232 (2008)
Tudor JE et al., *Nat Struct Biol* 3:317-320 (1996)
Valverde P et al., *J Dent Res* 84(6):488-499 (2005)
Viglietta V et al., *J Clin Invest* 109:1511-1511 (2002)
Wagstaff KM and DA Jans, *Curr Med Chem* 13(12):1371-1387 (2006)
Wulff H et al., *J Clin Invest* 111:1703-1713 (2003)
Wulff H et al., *J Immunol* 173:776-786 (2004)
Xu J et al., *Hum Mol Genet* 12(5):551-559 (2003)
Xu J et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 101(9):3112-3117 (2004)

10

【 図 1 】

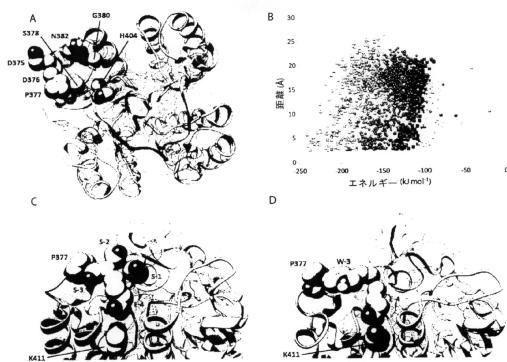


Figure 1

【 図 2 】



Figure 2

【図3】

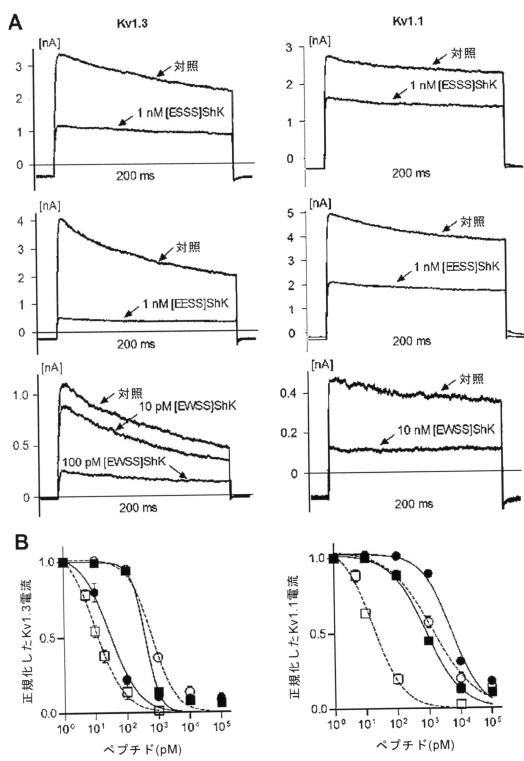


Figure 3

【配列表】

0006847828000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00
C 0 7 K	14/435 (2006.01)	C 0 7 K 14/435
C 0 7 K	7/06 (2006.01)	C 0 7 K 7/06
C 0 7 K	14/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/00
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17
A 6 1 K	35/614 (2015.01)	A 6 1 K 35/614
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02

(73)特許権者 517041936

ペプタイズ インターナショナル, インク.

P E P T I D E S I N T E R N A T I O N A L , I N C .

アメリカ国 ケンタッキー40299 ルイスヴィル エレクトロンドライブ11621

(73)特許権者 391058060

ベイラー カレッジ オブ メディスン

B A Y L O R C O L L E G E O F M E D I C I N E

アメリカ合衆国, テキサス 77030, ヒューストン, ワン ベイラー プラザ (番地なし)

(74)代理人 100107984

弁理士 廣田 雅紀

(74)代理人 100182305

弁理士 廣田 鉄平

(74)代理人 100102255

弁理士 小澤 誠次

(74)代理人 100096482

弁理士 東海 裕作

(74)代理人 100113860

弁理士 松橋 泰典

(74)代理人 100131093

弁理士 堀内 真

(74)代理人 100150902

弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391

弁理士 園元 修一

(74)代理人 100198074

弁理士 山村 昭裕

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100221958

弁理士 篠田 真希恵

(72)発明者 ノートン レイモンド エス

オーストラリア国 ヴィクトリア3084 ロザンナ セントジェームスロード1 / 41

(72)発明者 チャン シー チエ

シンガポール国 シンガポール670422 #02-515 ファジャールロードブロック42

(72)発明者 ペニントン マイケル ダブリュー

アメリカ国 ケンタッキー 40065 シエルビーヴィル マウントエデンロード 2850

(72)発明者 ピートン クリストイン

アメリカ国 テキサス 77584 ペアランド ラスティングクリークドライブ 2603

(72)発明者 スミス ブライアン ジェイ.

オーストラリア国 ヴィクトリア 3429 サンベリー キャサリンコート 6

審査官 三原 健治

(56)参考文献 特表2014-517005 (JP, A)

国際公開第2014/116937 (WO, A1)

特表2010-528988 (JP, A)

特表2008-515917 (JP, A)

米国特許第08734796 (US, B1)

Yoshikazu Y. et al., Screening and cDNA Cloning of Kv1 Potassium Channel Toxins in Sea Anemones, Marine Drugs, 2010年12月 2日, Vol.8, 2893-2905

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N

JST Plus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

Caplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)