(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2017-519039
(P2017-519039A)
(43)公表日　平成29年7月13日(2017.7.13)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 39/106	***(2006.01)***	A61K	39/106	ZNA	4B065
C12N 15/09	***(2006.01)***	C12N	15/00	A	4C076
C12N 1/15	***(2006.01)***	C12N	1/15		4C084
C12N 1/19	***(2006.01)***	C12N	1/19		4C085
C12N 1/21	***(2006.01)***	C12N	1/21		4C087

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 101 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-511547 (P2017-511547)
(86)(22)出願日　平成27年5月7日 (2015.5.7)
(85)翻訳文提出日　平成28年12月21日 (2016.12.21)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/029795
(87)国際公開番号　WO2015/171965
(87)国際公開日　平成27年11月12日 (2015.11.12)
(31)優先権主張番号　61/990,054
(32)優先日　平成26年5月7日 (2014.5.7)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　516331214
アプライド　モルキュラー　トランスポート　リミテッド　ライアビリティー　カンパニー
ＡＰＰＬＩＥＤ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＴＲＡＮＳＰＯＲＴ　ＬＬＣ
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　９４０８０，サウスサンフランシスコ，オイスターポイントブールヴァール　３２９，スイート　３００
(74)代理人　110001302
特許業務法人北青山インターナショナル

最終頁に続く

(54)【発明の名称】生物活性カーゴの経口送達のためのコリックス毒素由来融合分子

(57)【要約】
本開示は、非天然融合分子および１つ以上の薬理学的に許容されるキャリアを含み、対象への経口送達のために製剤され、例えば、炎症性疾患、自己免疫性疾患、癌、代謝障害、および発育不全障害の治療のための改善された有効な治療法を提供するように設計された医薬組成物に関する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
非天然融合分子、および１つ以上の薬理学的に許容されるキャリアを含み、対象への経口送達のために製剤され、ここで、前記融合分子は、生物活性カーゴとカップリングされた修飾コリックス毒素を含み、ここで、前記コリックス毒素は、コリックス毒素ドメインＩｂ内のアミノ酸残基で切断されており、およびここで、前記融合分子は、前記生物活性カーゴに対する受容体を活性化する能力、または触媒活性物質の触媒プロセスを可能とする能力を有する医薬組成物。
【請求項２】
前記切断型コリックス毒素が、配列番号４２、配列番号４３、配列番号４４、配列番号４５、配列番号４６、配列番号４７、配列番号：４８、配列番号４９、配列番号５０、配列番号５１、配列番号５２、配列番号５３、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７、配列番号５８、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、配列番号７０、配列番号７１、配列番号７２、配列番号７３、配列番号７４、配列番号７５、配列番号７６、配列番号７７、配列番号７８、配列番号７９、または配列番号８０に示されるアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項３】
非天然融合分子、および１つ以上の薬理学的に許容されるキャリアを含み、対象への経口送達のために製剤され、ここで、前記融合分子は、生物活性カーゴとカップリングされた修飾コリックス毒素を含み、ここで、前記コリックス毒素は、コリックス毒素ドメインＩＩ内のアミノ酸残基$Ａｌａ^{３８６}$ではないアミノ酸残基で切断されており、およびここで、前記融合分子は、前記生物活性カーゴに対する受容体を活性化する能力、または触媒活性物質の触媒プロセスを可能とする能力を有する医薬組成物。
【請求項４】
前記切断型コリックス毒素が、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３１、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、または配列番号４１に示されるアミノ酸配列を含む、請求項３に記載の医薬組成物。
【請求項５】
前記生物活性カーゴが、高分子、小分子、ペプチド、ポリペプチド、核酸、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、アンチセンス分子、抗体、ＤＮＡ、プラスミド、ワクチン、ポリマーナノ粒子、または触媒活性物質である、請求項１～４のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項６】
前記生物活性カーゴが、ポリペプチドである、請求項５に記載の医薬組成物。
【請求項７】
前記ポリペプチドが、ＧＩ管における炎症の修飾因子である、請求項６に記載の医薬組成物。
【請求項８】
前記ＧＩ管における炎症の修飾因子が、インターロイキン‐１０（配列番号８２）、インターロイキン‐１９（配列番号８３）、インターロイキン‐２０（配列番号８４）、インターロイキン‐２２（配列番号８５）、インターロイキン‐２４（配列番号８６）、またはインターロイキン‐２６（配列番号８７）である、請求項７に記載の医薬組成物。
【請求項９】
前記ＧＩ管における炎症の修飾因子が、インターロイキン‐１０（配列番号８２）であ

る、請求項８に記載の医薬組成物。
【請求項１０】
前記生物活性カーゴが、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）阻害剤である、請求項５に記載の医薬組成物。
【請求項１１】
前記ＴＮＦ阻害剤が、配列番号８８に示される重鎖可変領域アミノ酸配列および配列番号８９に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む抗体である、請求項１０に記載の医薬組成物。
【請求項１２】
前記ＴＮＦ阻害剤が、配列番号９０に示される重鎖可変領域アミノ酸配列および配列番号９１に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む抗体である、請求項１０に記載の医薬組成物。
【請求項１３】
前記ＴＮＦＳＦ阻害剤が、可溶性ＴＮＦＳＦ受容体融合タンパク質である、請求項１０に記載の医薬組成物。
【請求項１４】
前記可溶性ＴＮＦＳＦ受容体融合タンパク質が、配列番号９２に示されるアミノ酸配列を含む、請求項１３に記載の医薬組成物。
【請求項１５】
前記生物活性カーゴが、血糖降下剤である、請求項５に記載の医薬組成物。
【請求項１６】
前記血糖降下剤が、ＧＬＰ‐１アゴニストペプチド（配列番号９３）またはＧＬＰ‐１アゴニストペプチド（配列番号９４）である、請求項１５に記載の医薬組成物。
【請求項１７】
前記生物活性カーゴが、成長ホルモンである、請求項５に記載の医薬組成物。
【請求項１８】
前記成長ホルモンが、ヒト成長ホルモン（もしくはそのバリアント）、成長ホルモン２、または成長ホルモン放出ホルモンである、請求項１７に記載の医薬組成物。
【請求項１９】
前記ヒト成長ホルモンが、配列番号９５に示されるアミノ酸配列を含む、請求項１８に記載の医薬組成物。
【請求項２０】
非天然融合分子、および１つ以上の薬理学的に許容されるキャリアを含み、対象への経口送達のために製剤され、ここで、前記融合分子は、生物活性カーゴとカップリングされた修飾コリックス毒素を含み、ここで、前記コリックス毒素は、コリックス毒素ドメインＩｂ内のアミノ酸残基で切断されており、およびここで、前記生物活性カーゴは、ヒアルロニダーゼ、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベーター、ウロキナーゼ、またはＰＧＥ‐アデノシンデアミナーゼから選択される酵素である医薬組成物。
【請求項２１】
非天然融合分子、および１つ以上の薬理学的に許容されるキャリアを含み、対象への経口送達のために製剤され、ここで、前記融合分子は、生物活性カーゴとカップリングされた修飾コリックス毒素を含み、ここで、前記コリックス毒素は、コリックス毒素ドメインＩＩ内のアミノ酸残基で切断されており、およびここで、前記生物活性カーゴは、ヒアルロニダーゼ、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベーター、ウロキナーゼ、またはＰＧＥ‐アデノシンデアミナーゼから選択される酵素である医薬組成物。
【請求項２２】
前記修飾コリックス毒素が、前記生物活性カーゴと直接カップリングされている、請求項１～２１のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項２３】
前記生物活性カーゴが、前記修飾コリックス毒素のＣ末端と直接カップリングされてい

る、請求項２２に記載の医薬組成物。
【請求項２４】
前記修飾コリックス毒素が、前記生物活性カーゴと化学的にカップリングされている、請求項１～２２のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項２５】
前記修飾コリックス毒素が、非開裂性リンカーによって前記生物活性カーゴとカップリングされており、前記修飾コリックスが、マクロファージ、抗原提示細胞、および樹状細胞などの免疫系の細胞を含む特定の細胞に、前記カーゴをターゲティングする、請求項１～２２のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項２６】
前記非開裂性リンカーが、配列番号９６、配列番号９７、配列番号９８、または配列番号９９のアミノ酸配列を含む、請求項２５に記載の医薬組成物。
【請求項２７】
前記修飾コリックス毒素が、開裂性リンカーによって前記生物活性カーゴとカップリングされている、請求項１～２２のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項２８】
前記リンカーが、前記対象の極性化上皮細胞の側底面に存在する酵素によって開裂可能である、請求項２７に記載の医薬組成物。
【請求項２９】
前記開裂性リンカーが、配列番号１００、配列番号１０１、配列番号１０２、配列番号１０３、配列番号１０４、配列番号１０５、配列番号１０６、または配列番号１０７のアミノ酸配列を含む、請求項２８に記載の医薬組成物。
【請求項３０】
前記リンカーが、前記対象の血漿中に存在する酵素によって開裂可能である、請求項２７に記載の医薬組成物。
【請求項３１】
前記開裂性リンカーが、配列番号１０８、配列番号１０９、配列番号１１０、配列番号１１１、配列番号１１２、配列番号１１３、配列番号１１４、配列番号１１５、配列番号１１６、配列番号１１７、配列番号１１８、配列番号１１９、または配列番号１２０のアミノ酸配列を含む、請求項３０に記載の医薬組成物。
【請求項３２】
前記リンカーが、タバコエッチウィルスのプロテアーゼによって開裂可能である、請求項２７に記載の医薬組成物。
【請求項３３】
前記開裂性リンカーが、配列番号１２１のアミノ酸配列を含む、請求項３２に記載の医薬組成物。
【請求項３４】
前記融合分子が、配列番号１１４に示されるアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項３５】
前記融合分子が、配列番号１１５に示されるアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項３６】
請求項１～３５のいずれか一項に記載の医薬組成物を対象に経口投与することを含む、前記対象における炎症性疾患を治療する方法。
【請求項３７】
前記炎症性疾患が、炎症性腸疾患、乾癬、または細菌性敗血症から選択される、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記炎症性腸疾患が、クローン病、潰瘍性大腸炎、コラーゲン形成大腸炎、リンパ球性

大腸炎、虚血性大腸炎、便流変更性大腸炎、ベーチェット症候群、または非定型的大腸炎から選択される、請求項３７に記載の方法。

【請求項３９】

請求項１～３５のいずれか一項に記載の医薬組成物を対象に経口投与することを含む、前記対象における自己免疫性疾患を治療する方法。

【請求項４０】

前記自己免疫性疾患が、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、尋常性天疱瘡、重症筋無力症、溶血性貧血、血小板減少性紫斑病、グレーブス病、シェーグレン病、皮膚筋炎、橋本病、多発性筋炎、炎症性腸疾患、多発性硬化症（ＭＳ）、真性糖尿病、関節リウマチ、または強皮症から選択される、請求項３９に記載の方法。

【請求項４１】

請求項１～３５のいずれか一項に記載の医薬組成物を対象に経口投与することを含む、前記対象における癌を治療する方法。

【請求項４２】

前記癌が、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、有毛細胞白血病、急性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、膀胱、腎臓　卵巣、頚部、乳房、肺、上咽頭の癌腫、悪性黒色腫、ならびにリツキシマブ抵抗性ＮＨＬ、および白血病から選択される、請求項４１に記載の方法。

【請求項４３】

炎症性疾患の治療、予防、および／または防止を、それを必要とする対象において行うための医薬の作製における請求項１～３５のいずれか一項に記載の非天然融合分子の使用。

【請求項４４】

自己免疫性疾患の治療、予防、および／または防止を、それを必要とする対象において行うための医薬の作製における請求項１～３５のいずれか一項に記載の非天然融合分子の使用。

【請求項４５】

癌の治療、予防、および／または防止を、それを必要とする対象において行うための医薬の作製における請求項１～３５のいずれか一項に記載の非天然融合分子の使用。

【請求項４６】

請求項１～３５のいずれか一項に記載の医薬組成物を対象に経口投与することを含む、前記対象における代謝障害を治療する方法。

【請求項４７】

前記代謝障害が、糖尿病、肥満症、肥満症に起因する糖尿病、高血糖症、脂質代謝異常、高トリグリセリド血症、内臓脂肪症候群、インスリン抵抗性、耐糖能障害（ＩＧＴ）、糖尿病性脂質代謝異常、または高脂血症から選択される、請求項４６に記載の方法。

【請求項４８】

請求項１～３５のいずれか一項に記載の医薬組成物を対象に経口投与することを含む、前記対象における脂肪性肝疾患を治療する方法。

【請求項４９】

前記脂肪性肝疾患が、非アルコール性脂肪性肝疾患（ＮＡＦＬＤ）、非アルコール性脂肪性肝炎（ＮＡＳＨ））、胃腸疾患、または神経変性疾患から選択される、請求項４８に記載の方法。

【請求項５０】

代謝障害の治療、予防、および／または防止を、それを必要とする対象において行うための医薬の作製における請求項１～３５のいずれか一項に記載の非天然融合分子の使用。

【請求項５１】

脂肪性肝疾患の治療、予防、および／または防止を、それを必要とする対象において行うための医薬の作製における請求項１～３５のいずれか一項に記載の非天然融合分子の使用。

【請求項５２】
請求項１～３５のいずれか一項に記載の医薬組成物を対象に経口投与することを含む、前記対象における成長ホルモン（ＧＨ）不全成長障害を治療する方法。
【請求項５３】
前記ＧＨ不全成長障害が、成長ホルモン欠乏症（ＧＨＤ）、ターナー症候群（ＴＳ）、ヌーナン症候群、プラダー・ウィリ症候群、低身長ホメオボックス含有遺伝子（ＳＨＯＸ）欠損症、慢性腎不全、および特発性低身長短腸症候群、稀な下垂体腫瘍またはその治療に起因するＧＨ欠乏症、ならびにＨＩＶ／ＡＩＤＳに伴う筋消耗性疾患から選択される、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
ＧＨ不全成長障害の治療、予防、および／または防止を、それを必要とする対象において行うための医薬の作製における請求項１～３５のいずれか一項に記載の非天然融合分子の使用。
【請求項５５】
請求項１～３５のいずれか一項に記載の融合分子をコードするポリヌクレオチド。
【請求項５６】
請求項５５に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項５７】
融合分子を発現する請求項５６に記載のベクターを含む宿主細胞。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連特許出願
本出願は、その全内容が参照により本明細書に援用される２０１４年５月７日に出願された米国特許仮出願第６１／９９０，０５４号の利益を主張するものである。
【背景技術】
【０００２】
生物活性ポリペプチド（アミノ酸残基から構成されるポリマーを意味する；典型的には、タンパク質またはペプチドとしても定義される）の経口送達は、長年にわたって医薬品産業における目標であり続けている。残念なことに、胃腸（ＧＩ）管の非常に数多くに物理的、生理学的、および生物学的バリアは、アミノ酸およびジもしくはトリペプチドトランスポーターを通して吸収されるのに充分に分解可能となるまでタンパク質およびペプチドの取り込みを阻害するように、ならびに／または管腔側でのエンドソーム取り込みの後に破壊性のリソソームコンパートメントへとタンパク質およびペプチドを細胞内輸送するように設計されている。このため、例えば小分子で達成可能であるものに類似の方法での腸からのポリペプチド取り込みの実効性は限定的であり、ほとんどのポリペプチドおよびタンパク質において、低い経口バイオアベイラビリティは、継続的に問題となっている。
【０００３】
癌、炎症性疾患、免疫性疾患、発育不全障害などの疾患の治療のための種々の生物活性ポリペプチドを評価する臨床研究から、いくつかの有望な結果が得られており、いくつかのＤＮＡベースの治療法が、そのような使用のためのＦＤＡ承認を得てはいるが、これらの治療法は、その最適な潜在能にまで実際に到達することは多くの場合できておらず、それは、最適な治療有効用量の送達を阻止する短い生物学的半減期、および／または治療有効用量で見られる有害な副作用および毒性などの固有の制限に起因して、全体としての有効性が不充分または不完全である場合が多いからである。さらに、多くのそのような治療剤は、複数の投与レジメンを必要としており、このことによって、静脈内注射、または頻繁な皮下注射による連続的な投与が必要となり、これらは、患者および治療奉仕者にとって負担である。
【０００４】
有望な生物活性ポリペプチドの評価に向けた将来的な臨床研究は、新しい方法、および

／またはそのようなポリペプチドをヒト対象に経口投与するために用いられ得る医薬組成物から恩恵を受けることができるであろう。

【発明の概要】

【０００５】

本開示は、新規な非天然融合分子、および１つ以上の薬理学的に許容されるキャリアを含み、経口送達のために製剤され、例えば、炎症性疾患および／または自己免疫性疾患および／または癌の治療のための改善された有効な治療法を提供するように設計された医薬組成物に関する。

【０００６】

本開示は、生物活性カーゴとカップリングされた修飾コリックス毒素を含んでいる融合分子を含む医薬組成物の経口送達が、中でも、以下の利点を提供するという発明者らによる独特の見識に一部基づいている：ａ）修飾コリックス毒素が、リンカーを用いずに、または非開裂性リンカーを用いて生物活性カーゴとカップリングされる実施形態では、その（１もしくは複数の）受容体による、例えば生物活性カーゴの受容体も発現する免疫細胞の表面での修飾コリックス毒素のアンカー効果が、ターゲット細胞表面での生物活性カーゴのより高い露出を可能とし、コリックス受容体および生物活性カーゴ受容体の両方と結合することによる相乗効果を提供することができること；ｂ）修飾コリックス毒素が、上皮細胞の側底膜に存在する酵素、または対象の血漿中に存在する酵素によって開裂可能であるリンカーを用いて生物活性カーゴとカップリングされる実施形態では、そのような開裂が、上皮膜を通してのトランスサイトーシスの直後に、融合分子の残りの部分からの生物活性カーゴの放出を可能とすること、ｃ）生物活性カーゴの粘膜下ＧＩ腔（submucosal-GI space）および肝門脈系への直接送達により、カーゴが非経口経路によって投与された場合に見られる全身毒性を低減可能であり、さらには非経口またはＧＩ経路を介してのターゲティングが困難であった粘膜下の生物学的ターゲットへの到達が可能となること；ｄ）ＧＩ上皮を通して輸送された後、本開示の融合分子が、血清中での長期間の半減期を示すこと、すなわち、融合分子の生物活性カーゴが、その非融合状態である生物活性カーゴと比較して長期間の血清中半減期を示すこと；ｅ）融合分子の経口投与により、対象の血漿中で見られるよりも高い有効濃度の生物活性カーゴを対象の肝臓へ送達することができること；ならびにｆ）対象の皮膚に刺す針を用いることなく、対象へ生物活性カーゴを送達可能であり、従って、患者／治療奉仕者の利便性およびコンプライアンスを向上させることに加えて、それに付随する痛みまたは考え得る合併症を回避することで、そのような対象のクオリティオブライフを改善すること。

【０００７】

従って、１つの態様では、本開示は、非天然融合分子、および１つ以上の薬理学的に許容されるキャリアを含み、経口送達のために製剤された医薬組成物に関し、ここで、融合分子は、対象へ送達されるべき生物活性カーゴとカップリングされた修飾コリックス毒素を含み、ここで、このコリックス毒素は、無毒性である。

【０００８】

１つの態様では、本開示は、非天然融合分子、および１つ以上の薬理学的に許容されるキャリアを含み、経口送達のために製剤された医薬組成物に関し、ここで、融合分子は、対象へ送達されるべき生物活性カーゴとカップリングされた修飾コリックス毒素を含み、ここで、このコリックス毒素は、無毒性であり、およびここで、融合分子は、生物活性カーゴに対する受容体を活性化する能力、または触媒活性物質の触媒プロセスを可能とする能力を有する。

【０００９】

様々な実施形態では、医薬組成物の融合分子は、コリックス毒素ドメインＩＩ内のアミノ酸残基で切断された修飾コリックス毒素を含む。様々な実施形態では、融合分子は、例えば、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２

０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３１、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、または配列番号４１に示されるアミノ酸配列を有する切断型コリックス毒素を含む。

【００１０】

様々な実施形態では、医薬組成物の融合分子は、コリックス毒素ドメインＩｂ内のアミノ酸残基で切断された修飾コリックス毒素を含む。様々な実施形態では、融合分子は、例えば、配列番号４２、配列番号４３、配列番号４４、配列番号４５、配列番号４６、配列番号４７、配列番号：４８、配列番号４９、配列番号５０、配列番号５１、配列番号５２、配列番号５３、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７、配列番号５８、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、配列番号７０、配列番号７１、配列番号７２、配列番号７３、配列番号７４、配列番号７５、配列番号７６、配列番号７７、配列番号７８、配列番号７９、または配列番号８０に示されるアミノ酸配列を有する切断型コリックス毒素を含む。

【００１１】

様々な実施形態では、医薬組成物の融合分子は、ドメインＩＩＩが切断されたか、または変異された修飾コリックス毒素を含む。様々な実施形態では、融合分子は、配列番号８１に示されるアミノ酸配列を有する変異型コリックス毒素を含み、ここで、配列番号１のアミノ酸残基Ｅ５８１が欠失されている（本明細書にて、「コリックスΔＥ５８１」と称される）。

【００１２】

様々な実施形態では、医薬組成物の融合分子は、ドメインＩａが変異された修飾コリックス毒素を含む。

【００１３】

様々な実施形態では、生物活性カーゴは、例えば、高分子、小分子、ペプチド、ポリペプチド、核酸、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、アンチセンス分子、抗体、ＤＮＡ、プラスミド、ワクチン、ポリマーナノ粒子、または触媒活性物質から選択される。

【００１４】

様々な実施形態では、生物活性カーゴは、ヒアルロニダーゼ、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベーター、ウロキナーゼ、またはＰＧＥ‐アデノシンデアミナーゼから選択される酵素である。

【００１５】

様々な実施形態では、生物活性カーゴは、例えば、インターロイキン‐１０、インターロイキン‐１９、インターロイキン‐２０、インターロイキン‐２２、インターロイキン‐２４、またはインターロイキン‐２６から選択される、ＧＩ管における炎症の修飾因子であるポリペプチドである。様々な実施形態では、生物活性ポリペプチドは、配列番号８２に示されるアミノ酸配列を有するインターロイキン‐１０である。様々な実施形態では、生物活性ポリペプチドは、配列番号８３に示されるアミノ酸配列を有するインターロイキン‐１９である。様々な実施形態では、生物活性ポリペプチドは、配列番号８４に示されるアミノ酸配列を有するインターロイキン‐２０である。様々な実施形態では、生物活性ポリペプチドは、配列番号８５に示されるアミノ酸配列を有するインターロイキン‐２２である。様々な実施形態では、生物活性ポリペプチドは、配列番号８６に示されるアミノ酸配列を有するインターロイキン‐２４である。様々な実施形態では、生物活性ポリペプチドは、配列番号８７に示されるアミノ酸配列を有するインターロイキン‐２６である。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、小分子であるＧＩ管における炎症の修飾因子である。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、アンチセンスまたはｓｉＲＮＡ分子であるＧＩ管における炎症の修飾因子である。

【００１６】
様々な実施形態では、生物活性カーゴは、抗体もしくはその断片であるＴＮＦＳＦ阻害剤、または抗体もしくはその断片を含む人工コンストラクト、または抗体もしくはその断片のその抗原への結合を模倣するように設計された人工コンストラクトである。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、可溶性ＴＮＦＳＦ受容体融合タンパク質であるＴＮＦＳＦ阻害剤である。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、小分子であるＴＮＦＳＦ阻害剤である。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、アンチセンスまたはｓｉＲＮＡ分子であるＴＮＦＳＦ阻害剤である。
【００１７】
様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号８８に示される重鎖可変領域アミノ酸配列、および配列番号８９に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む抗体である。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号９０に示される重鎖可変領域アミノ酸配列、および配列番号９１に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む抗体である。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号９２に示されるアミノ酸配列を含む可溶性ＴＮＦＳＦ受容体融合タンパク質二量体である。
【００１８】
１つの態様では、本開示は、新規な非天然融合分子および１つ以上の薬理学的に許容されるキャリアを含み、経口送達のために製剤され、１型糖尿病および２型糖尿病を例とする代謝障害の治療のための改善された有効な治療法を提供するように設計された医薬組成物に関する。生物活性ポリペプチド（アミノ酸残基から構成されるポリマーを意味する；典型的には、タンパク質またはペプチドとしても定義される）の経口送達は、長年にわたって医薬品産業における目標であり続けている。残念なことに、胃腸（ＧＩ）管の非常に数多くに物理的、生理学的、および生物学的バリアは、アミノ酸およびジもしくはトリペプチドトランスポーターを通して吸収されるのに充分に分解可能となるまでタンパク質およびペプチドの取り込みを阻害するように、ならびに／または管腔側でのエンドソーム取り込みの後に破壊性のリソソームコンパートメントへとタンパク質およびペプチドを細胞内輸送するように設計されている。このため、例えば小分子で達成可能であるものに類似の方法での腸からのポリペプチド取り込みの実効性は限定的であり、ほとんどのポリペプチドおよびタンパク質において、低い経口バイオアベイラビリティは、継続的に問題となっている。
【００１９】
様々な実施形態では、本開示は、非天然融合分子および１つ以上の薬理学的に許容されるキャリアを含み、経口送達のために製剤された医薬組成物に関し、ここで、融合分子は、対象へ送達されるべき血糖降下剤とカップリングされた修飾コリックス毒素を含む。
【００２０】
様々な実施形態では、本開示は、血糖降下剤とカップリングされた修飾コリックス毒素を含んでいる融合分子を含む医薬組成物の経口送達が、中でも、以下の利点を提供し得るということに一部基づいている：ａ）修飾コリックス毒素がリンカーを用いずに血糖降下剤とカップリングされる実施形態では、その（１もしくは複数の）受容体による、血糖降下剤の受容体も発現する細胞の表面での修飾コリックス毒素のアンカー効果が、ターゲット細胞表面での血糖降下剤のより高い露出を可能とすること；ｂ）修飾コリックス毒素が、上皮細胞の側底膜に存在する酵素、または対象の血漿中に存在する酵素によって開裂可能であるリンカーを用いて血糖降下剤とカップリングされる実施形態では、そのような開裂が、上皮膜を通してのトランスサイトーシスの直後に、融合分子の残りの部分からの血糖降下剤の放出を可能とすること、ｃ）血糖降下剤の粘膜下ＧＩ腔および肝門脈系への直接送達により、血糖降下剤が非経口経路によって投与された場合に見られる全身毒性を低減可能であり、さらには非経口またはＧＩ経路を介してのターゲティングが困難であった粘膜下の生物学的ターゲットへの到達が可能となること；ｄ）血糖降下剤の粘膜下ＧＩ腔および肝門脈系への直接送達により、インスリン注射の頻度の低減を含む投与レジメンの改善を提供可能であること；ならびにｅ）対象の皮膚に刺す針を用いることなく、対象へ

血糖降下剤を送達可能であり、従って、それに付随する痛みまたは考え得る合併症を回避することで、そのような対象のクオリティオブライフが改善されること。

【００２１】

様々な実施形態では、血糖降下剤は、例えば、高分子、小分子、ペプチド、ポリペプチド、核酸、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、アンチセンス分子、抗体、ＤＮＡ、プラスミド、ワクチン、ポリマーナノ粒子、または触媒活性物質から選択される。様々な実施形態では、血糖降下剤は、インクレチン、またはインクレチンミメティックである。様々な実施形態では、血糖降下剤は、ＧＬＰ‐１である。様々な実施形態では、血糖降下剤は、ＧＬＰ‐１アゴニストである。様々な実施形態では、血糖降下剤は、エキセンディンである。様々な実施形態では、血糖降下剤は、グルコース抑制タンパク質受容体（glucose inhibitory protein receptor）（ＧＩＰＲ）アゴニストである。

【００２２】

様々な実施形態では、血糖降下剤は、ペプチドであるＧＬＰ‐１アゴニストである。様々な実施形態では、血糖降下剤は、小分子であるＧＬＰ‐１アゴニストである。様々な実施形態では、血糖降下剤は、アンチセンスまたはｓｉＲＮＡ分子であるＧＬＰ‐１アゴニストである。様々な実施形態では、血糖降下剤は、抗体もしくはその断片、または抗体もしくはその断片を含む人工コンストラクト、または抗体もしくはその断片のその抗原への結合を模倣するように設計された人工コンストラクトであるＧＬＰ‐１アゴニストである。

【００２３】

様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号９３に示されるアミノ酸配列を含むＧＬＰ‐１アゴニストペプチドである血糖降下剤である。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号９４に示されるアミノ酸配列を含むＧＬＰ‐１アゴニストペプチドである血糖降下剤である。

【００２４】

１つの態様では、本開示は、新規な非天然融合分子および１つ以上の薬理学的に許容されるキャリアを含み、経口送達のために製剤され、発育不全障害および類似の障害の治療のための改善された有効な治療法を提供するように設計された医薬組成物に関する。

【００２５】

様々な実施形態では、本開示は、非天然融合分子および１つ以上の薬理学的に許容されるキャリアを含み、経口送達のために製剤された医薬組成物に関し、ここで、融合分子は、対象に送達されるべき成長ホルモン（ＧＨ）とカップリングされた修飾コリックス毒素を含む。

【００２６】

様々な実施形態では、本開示は、成長ホルモンとカップリングされた修飾コリックス毒素を含んでいる融合分子を含む医薬組成物の経口送達が、中でも、以下の利点を提供するという発明者らによる独特の見識に一部基づいている：ａ）修飾コリックス毒素が、上皮細胞の側底膜に存在する酵素、または対象の血漿中に存在する酵素によって開裂可能であるリンカーを用いて成長ホルモンとカップリングされる実施形態では、そのような開裂が、上皮膜を通してのトランスサイトーシスの直後に、融合分子の残りの部分からの成長ホルモンの放出を可能とすること；ｂ）成長ホルモンの粘膜下ＧＩ腔および肝門脈系への直接送達により、成長ホルモンが非経口経路によって投与された場合に見られる全身毒性を低減可能であり、さらには非経口またはＧＩ経路を介してのターゲティングが困難であった粘膜下の生物学的ターゲットへの到達が可能となること（例：皮下（ｓｃ）注射を介する全身送達と比較して、より効率的にＩＧＦ‐１が誘導される）；ｃ）成長ホルモンの粘膜下ＧＩ腔および肝門脈系への直接送達により、投与レジメンの改善を提供可能であること；ｄ）経口送達によって、成長している小児に見られる血清レベルとより一致している成長ホルモンの肝臓に対する短いパルスが得られ、このパルスプロファイルは、ｓｃ注射によっては得られないこと；ならびにｅ）対象の皮膚に刺す針を用いることなく、対象へ成長ホルモンを送達可能であり、従って、患者／治療奉仕者の利便性およびコンプライア

ンスを向上させることに加えて、それに付随する痛みまたは考え得る合併症を回避することで、そのような対象のクオリティオブライフを改善すること。

【００２７】

様々な実施形態では、成長ホルモンは、例えば、高分子、小分子、ペプチド、ポリペプチド、核酸、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、アンチセンス分子、抗体、ＤＮＡ、プラスミド、ワクチン、ポリマーナノ粒子、または触媒活性物質から選択される。様々な実施形態では、成長ホルモンは、ヒト成長ホルモン（またはそのバリアント）、成長ホルモン２、または成長ホルモン放出ホルモンである。様々な実施形態では、成長ホルモンは、配列番号９５に示されるアミノ酸配列を含むヒト成長ホルモン（ソマトトロピン）である。

【００２８】

様々な実施形態では、融合分子は、生物活性カーゴと直接カップリングされた修飾コリックス毒素を含む。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、コリックス毒素のＣ末端と直接カップリングされている。

【００２９】

様々な実施形態では、融合分子は、生物活性カーゴと化学的にカップリングされた修飾コリックス毒素を含む。

【００３０】

様々な実施形態では、融合分子は、非開裂性リンカーによって生物活性カーゴとカップリングされたコリックス毒素を含む。様々な実施形態では、非開裂性リンカーは、例えば、配列番号９６、配列番号９７、配列番号９８、または配列番号９９のアミノ酸配列を含む。

【００３１】

様々な実施形態では、融合分子は、開裂性リンカーによって生物活性カーゴとカップリングされたコリックス毒素を含む。様々な実施形態では、リンカーは、対象の極性化上皮細胞の側底膜に存在する酵素によって開裂可能である。様々な実施形態では、リンカーは、前記対象の血漿中に存在する酵素によって開裂可能である。様々な実施形態では、開裂性リンカーは、例えば、配列番号１００、配列番号１０１、配列番号１０２、配列番号１０３、配列番号１０４、配列番号１０５、配列番号１０６、配列番号１０７、配列番号１０８、配列番号１０９、配列番号１１０、配列番号１１１、配列番号１１２、配列番号１１３、配列番号１１４、配列番号１１５、配列番号１１６、配列番号１１７、配列番号１１８、配列番号１１９、または配列番号１２０のアミノ酸配列を含む。

【００３２】

様々な実施形態では、融合分子は、開裂性リンカーによって生物活性カーゴとカップリングされたコリックス毒素を含み、ここで、開裂性リンカーは、タバコエッチウィルス（tobacco etch virus）（ＴＥＶ）プロテアーゼの基質であることが知られているアミノ酸配列を含む。様々な実施形態では、開裂性リンカーは、例えば、配列番号１２１のアミノ酸配列を含む。

【００３３】

様々な実施形態では、融合分子は、配列番号１２２に示されるアミノ酸配列を含む（これは、コリックス^{415}－ＴＥＶ－ＩＬ‐１０）。

【００３４】

様々な実施形態では、融合分子は、配列番号１２３に示されるアミノ酸配列を含む（これは、コリックス^{415}－（G_4S）$_3$－ＩＬ‐１０）。

【００３５】

別の態様では、本開示は、対象における炎症性疾患を治療する方法を提供し、本開示の医薬組成物を対象に経口投与することを含む。様々な実施形態では、炎症性疾患は、炎症性腸疾患、乾癬、または細菌性敗血症から選択される。様々な実施形態では、炎症性腸疾患は、クローン病、潰瘍性大腸炎、コラーゲン形成大腸炎、リンパ球性大腸炎、虚血性大腸炎、便流変更性大腸炎、ベーチェット症候群、または非定型的大腸炎である。

【００３６】
別の態様では、本開示は、対象における自己免疫性疾患を治療する方法を提供し、本開示の医薬組成物を、対象に経口投与することを含む。様々な実施形態では、自己免疫性疾患は、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、尋常性天疱瘡、重症筋無力症、溶血性貧血、血小板減少性紫斑病、グレーブス病、シェーグレン病、皮膚筋炎、橋本病、多発性筋炎、炎症性腸疾患、多発性硬化症（ＭＳ）、真性糖尿病、関節リウマチ、または強皮症である。
【００３７】
別の態様では、本開示は、対象における癌を治療する方法を提供し、本開示の医薬組成物を対象に経口投与することを含む。様々な実施形態では、治療されるべき癌としては、これらに限定されないが、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、有毛細胞白血病、急性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、膀胱、腎臓　卵巣、頚部、乳房、肺、上咽頭の癌腫、悪性黒色腫、ならびにリツキシマブ抵抗性ＮＨＬ、および白血病が挙げられる。
【００３８】
別の態様では、本開示は、代謝障害を有する対象を治療する方法を提供し、前記方法は、前記障害を治療するのに充分な量で本開示の融合分子を経口投与することを含み、ここで、前記代謝障害は、糖尿病、肥満症、肥満症に起因する糖尿病、高血糖症、脂質代謝異常、高トリグリセリド血症、内臓脂肪症候群、インスリン抵抗性、耐糖能障害（ＩＧＴ）、糖尿病性脂質代謝異常、または高脂血症である。
【００３９】
別の態様では、本開示は、脂肪性肝疾患（例：非アルコール性脂肪性肝疾患（ＮＡＦＬＤ）；非アルコール性脂肪性肝炎（ＮＡＳＨ））、胃腸疾患、または神経変性疾患を有する対象を治療する方法を提供し、前記方法は、前記疾患を治療するのに充分な量で本開示の融合分子を経口投与することを含む。
【００４０】
別の態様では、本開示は、ＧＨ不全成長障害を有する対象を治療する方法を提供し、前記方法は、前記障害を治療するのに充分な量で本開示の融合分子を経口投与することを含み、ここで、前記障害は、成長ホルモン欠乏症（ＧＨＤ）、ターナー症候群（ＴＳ）、ヌーナン症候群、プラダー・ウィリ症候群、低身長ホメオボックス含有遺伝子（ＳＨＯＸ）欠損症（short stature homeobox-containing gene (SHOX) deficiency）、慢性腎不全、および特発性低身長短腸症候群、稀な下垂体腫瘍またはその治療に起因するＧＨ欠乏症、ならびにＨＩＶ／ＡＩＤＳに伴う筋消耗性疾患である。
【００４１】
別の態様では、本開示は、炎症性疾患の治療、予防、および／または防止を、それを必要とする対象において行うための医薬の作製における本発明の非天然融合分子の使用に関する。
【００４２】
別の態様では、本開示は、自己免疫性疾患の治療、予防、および／または防止を、それを必要とする対象において行うための医薬の作製における本発明の非天然融合分子の使用に関する。
【００４３】
別の態様では、本開示は、癌の治療、予防、および／または防止を、それを必要とする対象において行うための医薬の作製における本発明の非天然融合分子の使用に関する。
【００４４】
別の態様では、本開示は、代謝障害の治療、予防、および／または防止を、それを必要とする対象において行うための医薬の作製における本発明の非天然融合分子の使用に関する。
【００４５】
別の態様では、本開示は、脂肪性肝疾患の治療、予防、および／または防止を、それを

必要とする対象において行うための医薬の作製における本発明の非天然融合分子の使用に関する。

【００４６】

別の態様では、本開示は、ＧＨ不全成長障害の治療、予防、および／または防止を、それを必要とする対象において行うための医薬の作製における本発明の非天然融合分子の使用に関する。

【００４７】

他の態様では、本開示は、本開示の非天然修飾コリックス毒素－生物活性カーゴ融合分子をコードするポリヌクレオチド；本開示の非天然修飾コリックス毒素－生物活性カーゴ融合分子をコードするポリヌクレオチドを含むベクターであって、所望に応じて、そのベクターで形質転換された宿主細胞によって認識される制御配列と操作可能に連結されてよい、ベクター；本開示の非天然修飾コリックス毒素－生物活性カーゴ融合分子をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む宿主細胞；本開示の非天然修飾コリックス毒素－生物活性カーゴ融合分子をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む宿主細胞を、ポリヌクレオチドが発現されるように培養すること、および所望に応じて行われてよい宿主細胞培地から非天然修飾コリックス毒素－生物活性カーゴ融合分子を回収することを含む、本開示の非天然修飾コリックス毒素－生物活性カーゴ融合分子を作製するためのプロセスを提供する。

【図面の簡単な説明】

【００４８】

【図１】図１は、本明細書にて評価される２つの代表的なコリックス毒素－ＩＬ‐１０融合分子の遺伝子的構造を示す。ヒトＩＬ‐１０単量体配列のＮ末端が、安定な非開裂性リンカー配列（$(G_4S)_3$）またはタバコエッチウィルス（ＴＥＶ）プロテアーゼに対する既知の基質であるリンカー配列を用いて、修飾コリックス毒素（コリックス^{415}）のＣ末端と遺伝子的に結合された。各コンストラクトは、Ｎ末端メチオニン（Ｍ）も含有する。

【図２】図２は、ＩＬ‐１０の二量体化によって推進されるリフォールディング後の代表的な「二量体コリックス毒素－ＩＬ‐１０」融合分子のリボン図である。コリックス毒素の最初の４１５のアミノ酸（配列番号１）が、１６アミノ酸リンカー（図示せず）を介して接続されて、ヒトＩＬ‐１０配列と接続される。ＩＬ‐１０の二量体化が、図示した紫色コリックス^{415}／青色ｈＩＬ‐１０および橙色コリックス^{415}／緑色の構造をもたらすものと想定される。

【図３】図３は、封入体（inclusion bodies）からの誘導および発現後のコリックス^{415}－ＴＥＶ－ＩＬ‐１０（「Ｃ」として示される）およびコリックス^{415}－$(G_4S)_3$－ＩＬ‐１０（「Ｎ」として示される）のクーマシー染色後ＳＤＳ　ＰＡＧＥである。発現された融合分子は、それぞれ、算出分子量の６６３８０．７８および６５９５８．２５ダルトンと同等である約６６ｋＤａの予測された分子サイズを示す。ＳｅｅＢｌｕｅ（登録商標）Ｐｌｕｓ２染色済みＭＷ標準を示す。

【図４】図４は、本開示の代表的なコリックス毒素－ＩＬ‐１０融合分子を２種類の濃度で用いて処理したマウスマクロファージ由来Ｊ７７４．２細胞株を用いたフローサイトメトリーアッセイの結果を示す棒グラフである。増殖％は、処理の４８時間後に測定した。値は、ｎ＝４　±標準偏差を表す。データから、「二量体コリックス^{415}－$(G_4S)_3$－ＩＬ‐１０」融合分子が、生物活性ＩＬ‐１０を示すことが分かる。

【図５】図５は、二量体コリックス^{415}－$(G_4S)_3$－ＩＬ‐１０融合分子を、Ｃａｃｏ‐２細胞単層のバリア性に対する影響について生体外で試験したアッセイの結果を示す線グラフである。フルオレセイン標識７０ｋＤａデキストランおよび様々な濃度の二量体コリックス^{415}－$(G_4S)_3$－ＩＬ‐１０融合分子を、これらの単層の頂端膜側に添加し、１５０μＬ体積分を補充しながら回収することにより、側底コンパートメントで検出される蛍光の累積量を経時でモニタリングした。累積側底デキストランレベル（ｐｍｏｌ）を、時間に対してプロットしている。各線グラフは、０、１５、３０、４５、６０

、９０、１２０、１８０、および２４０分で測定された側底蛍光値の平均（ｎ＝４）を表す。
【図６】図６は、二量体コリックス^{415}－（G_4S）$_3$－ＩＬ‐１０融合分子を、Ｃａｃｏ‐２細胞単層のバリア性に対する影響について生体外で試験したアッセイの結果を示す線グラフである。フルオレセイン標識７０ｋＤａデキストランおよび様々な濃度の二量体コリックス^{415}－（G_4S）$_3$－ＩＬ‐１０融合分子を、これらの単層の頂端膜側に添加し、側底コンパートメントで検出される蛍光の累積量を経時でモニタリングした。
【図７】図７Ａおよび７Ｂは、二量体コリックス^{415}－（G_4S）$_3$－ＩＬ‐１０融合分子が、Ｃａｃｏ‐２細胞単層を通って移動する能力を評価するＥＬＩＳＡアッセイの結果を示す線グラフである。凡例に示す種々の濃度で頂端側に添加した後に側底コンパートメントに到達する二量体コリックス^{415}－（G_4S）$_3$－ＩＬ‐１０融合分子の経時での累積量。各線グラフは、０、１５、３０、４５、６０、９０、１２０、１８０、および２４０分で測定された側底ＩＬ‐１０レベルの平均（ｎ＝４）を表す。経時で輸送された累積ＩＬ‐１０を、６Ａは８０００ｆｍｏｌ　ＩＬ‐１０まで拡大した範囲、６Ｂは１０００ｆｍｏｌ　ＩＬ‐１０の範囲にわたってグラフ化した。
【発明を実施するための形態】
【００４９】
特に本明細書で定めのない限り、本開示に関連して用いられる科学的および技術的用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。さらに、文脈から必要とされる場合でない限り、単数形の用語は、複数を含むものとし、複数形の用語は、単数を含むものとする。一般的に、本明細書で述べる細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、ならびにタンパク質および核酸の化学、ならびにハイブリダイゼーションに関連して用いられる専門用語、ならびにそれらの技術は、本技術分野にて一般的に用いられ、公知のものである。本開示の方法および技術は、一般的には、特に断りのない限り、本技術分野にて公知の従来の方法に従って、ならびに本明細書全体にわたって引用され、考察される様々な一般的およびより専門的な参考文献に記載のように実施される。例えば、参照により本明細書に援用されるSambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)およびAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992)およびHarlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)を参照されたい。酵素反応および精製技術は、本技術分野にて一般的に達成されるように、または本明細書で述べるように、製造元の仕様に従って実施される。本明細書で述べる分析化学、合成有機化学、ならびに医薬品および製薬化学に関連して用いられる専門用語、ならびにこれらの実験手順および技術は、本技術分野にて一般的に用いられ、公知のものである。化学合成、化学分析、医薬品の作製、製剤、および送達、ならびに患者の治療には、標準的な技術が用いられる。
【００５０】
定義
「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」の用語は、アミノ酸残基のポリマーを意味するために、本明細書にて交換可能に用いられる。様々な実施形態では、「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」は、アルファ炭素がペプチド結合を介して連結されたアミノ酸鎖である。従って、鎖の一方の端部にある末端アミノ酸（アミノ末端）は、遊離アミノ基を有し、鎖の他方の端部にある末端アミノ酸（カルボキシ末端）は、遊離のカルボキシル基を有する。本明細書で用いられる場合、「アミノ末端」（Ｎ末端と略される）の用語は、ペプチドのアミノ末端にあるアミノ酸上の遊離α‐アミノ基、またはペプチド内のその他のいずれかの位置にあるアミノ酸のα‐アミノ基（ペプチド結合に関与している場合はイミノ基）を意味する。同様に、「カルボキシ末端」の用語は、ペプチドのカルボキシ末端上の遊離カルボキシル基、またはペプチド内のその他のいずれかの位置にあるアミノ酸のカルボキシル基を意味する。ペプチドはまた、本質的にい

ずれのポリアミノ酸をも含み、これらに限定されないが、アミド結合ではなくエーテルによって結合されたアミノ酸などのペプチドミメティックが挙げられる。

【００５１】

本開示のポリペプチドは、いかなる方法で、ならびに（１）タンパク質分解に対する感受性を低減するため、（２）酸化に対する感受性を低減するため、（３）タンパク質複合体を形成するための結合親和性を変化させるため、（４）結合親和性を変化させるため、および（５）その他の物理化学的もしくは機能的特性を付与または修飾するためを例とするいかなる理由で修飾されたポリペプチドをも含む。例えば、単一または複数のアミノ酸置換（例：保存的アミノ酸置換）が、天然配列に行われてよい（例：分子間接触を形成する（１もしくは複数の）ドメインの外側にあるポリペプチドの部分において）。「保存的アミノ酸置換」とは、機能的に類似するアミノ酸による、ポリペプチド中のアミノ酸の置換を意味する。以下の６つのグループの各々が、互いに対して保存的置換であるアミノ酸を含有する。

１）アラニン（Ａ）、セリン（Ｓ），およびスレオニン（Ｔ）
２）アスパラギン酸（Ｄ）およびグルタミン酸（Ｅ）
３）アスパラギン（Ｎ）およびグルタミン（Ｑ）
４）アルギニン（Ｒ）およびリジン（Ｋ）
５）イソロイシン（Ｉ）、ロイシン（Ｌ）、メチオニン（Ｍ）、およびバリン（Ｖ）
６）フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）、およびトリプトファン（Ｗ）

【００５２】

「非保存的アミノ酸置換」とは、これらのクラスのうちの１つのメンバーと、別のクラスからのメンバーとの置換を意味する。そのような変更を行う場合、様々な実施形態によると、アミノ酸の疎水性親水性指標が考慮されてよい。各々のアミノ酸には、その疎水性および荷電特性に基づいて疎水性親水性指標が割り当てられている。それらは、イソロイシン（＋４．５）；バリン（＋４．２）；ロイシン（＋３．８）；フェニルアラニン（＋２．８）；システイン／シスチン（＋２．５）；メチオニン（＋１．９）；アラニン（＋１．８）；グリシン（－０．４）；スレオニン（－０．７）；セリン（－０．８）；トリプトファン（－０．９）；チロシン（－１．３）；プロリン（－１．６）；ヒスチジン（－３．２）；グルタメート（－３．５）；グルタミン（－３．５）；アスパルテート（－３．５）；アスパラギン（－３．５）；リジン（－３．９）；およびアルギニン（－４．５）である。

【００５３】

タンパク質に相互に作用する生物学的機能を付与する場合における疎水性親水性アミノ酸指標の重要性は、本技術分野にて理解される（例えば、Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-131参照）。特定のアミノ酸が、類似の疎水性親水性指標またはスコアを有する他のアミノ酸に対して置換され、それでも、類似の生物活性を維持し得ることは知られている。疎水性親水性指標に基づいた変更を行う場合、様々な実施形態では、疎水性親水性指標が±２以内であるアミノ酸の置換が含まれる。様々な実施形態では、±１以内の置換が含まれ、様々な実施形態では、±０．５以内の置換が含まれる。

【００５４】

また、類似アミノ酸の置換は、特に、それによって作製される生物学的機能性タンパク質またはペプチドが、本明細書で開示されるように、免疫学的実施形態での使用を意図するものである場合に、親水性に基づいて効果的に行うことが可能であることも理解される。様々な実施形態では、その隣接するアミノ酸の親水性によって決定されるタンパク質の最大局所的平均親水性は、その免疫原性および抗原性、すなわち、タンパク質の生物学的特性と相関している。

【００５５】

以下の親水性値が、これらのアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（＋３．０）；リジン（＋３．０）；アスパルテート（＋３．０．＋－．１）；グルタメート（＋３．０．＋－．１）；セリン（＋０．３）；アスパラギン（＋０．２）；グルタミン（＋

０．２）；グリシン（０）；スレオニン（－０．４）；プロリン（－０．５．＋－．１）；アラニン（－０．５）；ヒスチジン（－０．５）；システイン（－１．０）；メチオニン（－１．３）；バリン（－１．５）；ロイシン（－１．８）；イソロイシン（－１．８）；チロシン（－２．３）；フェニルアラニン（－２．５）、およびトリプトファン（－３．４）。類似の親水性値に基づいて変更を行う場合、様々な実施形態では、親水性値が±２以内であるアミノ酸の置換が含まれ、様々な実施形態では、±１以内の置換が含まれ、様々な実施形態では、±０．５以内の置換が含まれる。

【００５６】

代表的なアミノ酸置換を表１に示す。

【００５７】

表1

アミノ酸置換

元の残基	代表的な置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ酪酸 Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

【００５８】
当業者であれば、公知の技術を用いて、本明細書で示されるポリペプチドの適切なバリアントを決定することができる。様々な実施形態では、当業者であれば、活性にとって重要ではないと考えられている領域をターゲットとすることによって、活性を破壊することなく変更することのできる分子の適切な領域を識別することができる。他の実施形態では、当業者であれば、類似のポリペプチド間で保存されるそれらの分子の残基および部分を識別することができる。さらなる実施形態では、生物活性または構造にとって重要であり得る領域であっても、生物活性を破壊することなく、またはポリペプチド構造に有害な影響を与えることなく、保存的アミノ酸置換が施され得る。

【００５９】
加えて、当業者であれば、類似のポリペプチド中において活性または構造にとって重要である残基を識別する構造‐機能研究を調査することができる。そのような比較を考慮すると、当業者であれば、類似のポリペプチドにおける活性または構造にとって重要であるアミノ酸残基に相当するポリペプチド中のアミノ酸残基の重要性を予測することができる。当業者であれば、そのような予測された重要なアミノ酸残基に対して、化学的に類似するアミノ酸置換を選択することができる。

【００６０】
また、当業者であれば、三次元構造およびアミノ酸配列を、類似のポリペプチドにおけるその構造に関連して分析することもできる。そのような情報を考慮すると、当業者であれば、その三次元構造に関して、ポリペプチドのアミノ酸残基のアラインメントを予測することができる。様々な実施形態では、当業者であれば、ポリペプチドの表面にあることが予測されるアミノ酸残基に対して本質的な変更を行わないことを選択することができ、それは、そのような残基が、他の分子との重要な相互作用に関与し得るからである。さらに、当業者であれば、各々の所望されるアミノ酸残基において単一のアミノ酸置換を含有する試験バリアントを作製することができる。このバリアントは、続いて、当業者に公知の活性アッセイを用いてスクリーニングすることができる。そのようなバリアントを用いて、適切なバリアントに関する情報を収集することが可能である。例えば、特定のアミノ酸残基に対する変更が、活性の破壊、活性の望ましくない低下、または適切ではない活性という結果をもたらすことが見出された場合、そのような変更を有するバリアントを避けることができる。言い換えると、そのような通常の手順の実験から収集された情報に基づいて、当業者であれば、単独で、または他の変異と組み合わせて、それ以上の置換が回避されるべきであるアミノ酸を容易に決定することができる。

【００６１】
本明細書で用いられる場合、「ポリペプチド断片」および「切断型ポリペプチド」の用語は、対応する完全長タンパク質と比較して、アミノ末端および／またはカルボキシ末端欠失を有するポリペプチドを意味する。様々な実施形態では、断片は、例えば、少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも２５、少なくとも５０、少なくとも１００、少なくとも１５０、少なくとも２００、少なくとも２５０、少なくとも３００、少なくとも３５０、少なくとも４００、少なくとも４５０、少なくとも５００、少なくとも６００、少なくとも７００、少なくとも８００、少なくとも９００、または少なくとも１０００アミノ酸の長さであってよい。様々な実施形態では、断片は、例えば、最大で１０００、最大で９００、最大で８００、最大で７００、最大で６００、最大で５００、最大で４５０、最大で４００、最大で３５０、最大で３００、最大で２５０、最大で２００、最大で１５０、最大で１００、最大で５０、最大で２５、最大で１０、または最大で５アミノ酸の長さであってもよい。断片はさらに、その一方または両方の端部に、１つ以上の追加のアミノ酸を含んでよく、例えば、異なる天然タンパク質からのアミノ酸の配列（例：Ｆｃまたはロイシンジッパードメイン）、または人工アミノ酸配列（例：人工リンカー配列）である。

【００６２】
本明細書で用いられる場合、「ポリペプチドバリアント」および「ポリペプチド変異体」の用語は、別のポリペプチド配列と比較して、アミノ酸配列に対して１つ以上のアミノ

酸残基の挿入、欠失、および／または置換が行われているアミノ酸配列を含むポリペプチドを意味する。様々な実施形態では、挿入、欠失、または置換されるべきアミノ酸残基の数は、例えば、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも２５、少なくとも５０、少なくとも７５、少なくとも１００、少なくとも１２５、少なくとも１５０、少なくとも１７５、少なくとも２００、少なくとも２２５、少なくとも２５０、少なくとも２７５、少なくとも３００、少なくとも３５０、少なくとも４００、少なくとも４５０、少なくとも５００アミノ酸の長さであってよい。本開示のバリアントは、融合タンパク質を含む。

【００６３】

ポリペプチドの「誘導体」は、例えばポリエチレングリコール、アルブミン（例：ヒト血清アルブミン）などの別の化学部分との結合、リン酸化、およびグリコシル化を例とする化学的な修飾が行われたポリペプチドである。

【００６４】

「％配列同一性」の用語は、本明細書において、「％同一性」の用語と交換可能に用いられ、配列アラインメントプログラムを用いてアラインメントされた場合の、２つ以上のペプチド配列間のアミノ酸配列同一性のレベル、または２つ以上のヌクレオチド配列間のヌクレオチド配列同一性のレベルを意味する。例えば、本明細書で用いられる場合、８０％同一性は、定められたアルゴリズムによって特定された８０％配列同一性と同じことを意味し、ある配列が、別の長さの別の配列に対して少なくとも８０％同一であることを意味する。様々な実施形態では、％同一性は、例えば、ある配列に対して、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または少なくとも９９％もしくはそれ以上の配列同一性から選択される。様々な実施形態では、％同一性は、例えば、約６０％から約７０％、約７０％から約８０％、約８０％から約８５％、約８５％から約９０％、約９０％から約９５％、または約９５％から約９９％の範囲である。

【００６５】

「％配列相同性」の用語は、本明細書において、「％相同性」の用語と交換可能に用いられ、配列アラインメントプログラムを用いてアラインメントされた場合の、２つ以上のペプチド配列間のアミノ酸配列相同性のレベル、または２つ以上のヌクレオチド配列間のヌクレオチド配列相同性のレベルを意味する。例えば、本明細書で用いられる場合、８０％相同性は、定められたアルゴリズムによって特定された８０％配列相同性と同じことを意味し、従って、ある配列の相同体は、そのある配列の長さ全体にわたって８０％を超える配列相同性を有する。様々な実施形態では、％相同性は、例えば、ある配列に対して、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または少なくとも９９％もしくはそれ以上の配列相同性から選択される。様々な実施形態では、％相同性は、例えば、約６０％から約７０％、約７０％から約８０％、約８０％から約８５％、約８５％から約９０％、約９０％から約９５％、または約９５％から約９９％の範囲である。

【００６６】

２つの配列間の同一性を特定するために用いられてよい代表的なコンピュータープログラムとしては、これらに限定されないが、ＮＣＢＩウェブサイトにおいてインターネット上で公開されているＢＬＡＳＴプログラムのスイート、例えば、ＢＬＡＳＴＮ、ＢＬＡＳＴＸおよびＴＢＬＡＳＴＸ、ＢＬＡＳＴＰおよびＴＢＬＡＳＴＮが挙げられる。Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-10（公開されているデフォルト設定、すなわち、ｗ＝４、ｔ＝１７を特に参照）およびAltschul et al., 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402も参照されたい。配列検索は、典型的には、あるアミノ酸配列を、ＧｅｎＢａｎｋタンパク質配列およびその他の公開データベースのアミノ酸配列と比較して評価する場合は、ＢＬＡＳＴＰプログラムを用いて行われる。ＢＬＡＳＴＸプログラムは、ＧｅｎＢａｎｋタンパク質配列およびその他の公開データベースのアミノ酸配列に対してすべてのリーディングフレームにおいて翻訳された核酸配列を検索する場合に好ましい。ＢＬ

ＡＳＴＰおよびＢＬＡＳＴＸはいずれも、オープンギャップペナルティ１１．０および伸長ギャップペナルティ（extended gap penalty）１．０のデフォルトパラメータを用いて作動され、ＢＬＯＳＵＭ‐６２マトリックスを用いる。上記文献を参照されたい。

【００６７】

パーセント配列同一性の算出に加えて、ＢＬＡＳＴアリゴリズムは、２つの配列間の類似性の統計分析も行う（例えば、Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 90:5873-5787 (1993)参照）。ＢＬＡＳＴアルゴリズムによって提供される類似性の１つの尺度は、最小総和確率（smallest sum probability）（Ｐ（Ｎ））であり、これは、２つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の一致が偶然発生する確率を示すものである。例えば、試験核酸を参照核酸と比較した場合の最小総和確率が、例えば、０．１以下、０．０１以下、または０．００１以下である場合、核酸は参照配列に類似していると見なされる。

【００６８】

「ポリヌクレオチド」は、ヌクレオチド単位から構成されるポリマーを意味する。ポリヌクレオチドは、デオキシリボ核酸（「ＤＮＡ」）およびリボ核酸（「ＲＮＡ」）などの天然の核酸、ならびに核酸類似体を含む。核酸類似体は、非天然塩基、天然のリン酸ジエステル結合以外で他のヌクレオチドとの連結に関与するヌクレオチドを含む核酸類似体、またはリン酸ジエステル結合以外の連結を通して結合された塩基を含む核酸類似体を含む。従って、ヌクレオチド類似体としては、これらに限定されないが、例えば、チオリン酸、ジチオリン酸、リン酸トリエステル、ホスホロアミド酸、ボラノリン酸、メチルホスホン酸、キラルメチルメチルホスホン酸、２‐Ｏ‐メチルリボヌクレオチド、ペプチド‐核酸（ＰＮＡ）などが挙げられる。そのようなポリヌクレオチドは、例えば自動ＤＮＡ合成装置を用いて合成することができる。「核酸」の用語は、典型的には、長鎖ポリヌクレオチドを意味する。「オリゴヌクレオチド」の用語は、典型的には、短鎖ポリヌクレオチドを意味し、一般的には、約５０ヌクレオチド以下である。ヌクレオチド配列がＤＮＡ配列（すなわち、Ａ、Ｔ、Ｇ、Ｃ）によって表される場合、これは、「Ｔ」を「Ｕ」で置き換えたＲＮＡ配列（すなわち、Ａ、Ｕ、Ｇ、Ｃ）も含むことは理解される。

【００６９】

本明細書でのポリヌクレオチド配列の記述には、従来の表記が用いられ：一本鎖ポリヌクレオチド配列の左側末端が、５’末端であり；二本鎖ポリヌクレオチド配列の左側方向が、５’方向と称される。新生ＲＮＡ転写物へのヌクレオチドの５’から３’付加の方向は、転写方向と称される。ｍＲＮＡと同じ配列を有するＤＮＡ鎖は、「コード鎖」と称され；そのＤＮＡから転写されたｍＲＮＡと同じ配列を有するＤＮＡ鎖上にあって、５’末端からＲＮＡ転写物の５’末端までに位置する配列は、「上流配列」と称され；ＲＮＡと同じ配列を有するＤＮＡ鎖上にあって、３’末端からコードＲＮＡ転写物の３’末端までに存在する配列は、「下流配列」と称される。

【００７０】

「相補的」は、２つのポリヌクレオチドの相互作用する表面の位相的適合性またはそれらが一緒に対を成すことを意味する。従って、このような２つの分子は、相補的であると記載することができ、さらには、接触表面特性は、互いに相補的である。第一のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、第二のポリヌクレオチドのポリヌクレオチド結合パートナーのヌクレオチド配列と実質的に同一である場合、または第一のポリヌクレオチドが、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で第二のポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができる場合、第一のポリヌクレオチドは、第二のポリヌクレオチドに対して相補的である。

【００７１】

「特異的にハイブリダイズする」または「特異的ハイブリダイゼーション」または「選択的にハイブリダイズする」とは、特定のヌクレオチド配列に対して、その配列が複雑な（例：全細胞）ＤＮＡまたはＲＮＡ混合物中に存在する場合に、ストリンジェントな条件下で核酸分子を優先的に結合、二本鎖化、またはハイブリダイズすることを意味する。「

ストリンジェントな条件」の用語は、プローブが、そのターゲット配列に対して優先的にハイブリダイズし、その他の配列に対しては、より少ない度合いでハイブリダイズするか、またはまったくハイブリダイズしない条件を意味する。サザンおよびノーザンハイブリダイゼーションなどの核酸ハイブリダイゼーション実験の状況における「ストリンジェントなハイブリダイゼーション」および「ストリンジェントなハイブリダイゼーション洗浄条件」は、配列に依存し、異なる環境パラメータ下では異なる。核酸のハイブリダイゼーションに関する詳細なガイドは、Tijssen, 1993, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes, part I, chapter 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, N.Y.；Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 3.sup.rd ed., NY；およびAusubel et al., eds., Current Edition, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NYに見出すことができる。

【００７２】

一般的に、高ストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は、定められたイオン強度およびｐＨでの特定の配列に対する熱融解点（Ｔｍ）よりも約５℃低くなるように選択される。Ｔｍは、ターゲット配列の５０％が完全一致プローブとハイブリダイズする温度（定められたイオン強度およびｐＨ下）である。非常にストリンジェントな条件は、特定のプローブに対するＴｍと等しくなるように選択される。サザンまたはノーザンブロットにおけるフィルター上での約１００超の相補的残基を有する相補的核酸のハイブリダイゼーションに対するストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例は、４２℃での１ｍｇのヘパリンを含む５０％ホルマリンであり、ハイブリダイゼーションは、一晩行われる。高ストリンジェントな洗浄条件の例は、７２℃で約１５分間の０．１５ＭＮａＣｌである。ストリンジェントな洗浄条件の例は、６５℃で１５分間の０．２×ＳＳＣ洗浄である。ＳＳＣバッファーの説明については、Sambrook et al.を参照されたい。高ストリンジェンシー洗浄は、バックグラウンドプローブシグナルを除去するための低ストリンジェンシー洗浄の後に行われてよい。例えば約１００ヌクレオチド超の二重鎖に対する代表的な中ストリンジェンシー洗浄は、４５℃で１５分間の１×ＳＳＣである。例えば約１００ヌクレオチド超の二重鎖に対する代表的な低ストリンジェンシー洗浄は、４０℃で１５分間の４～６×ＳＳＣである。一般的に、特定のハイブリダイゼーションアッセイにおいて、非関連プローブで見られるよりも２×（もしくはそれ以上）大きいシグナル対ノイズ比が、特異的ハイブリダイゼーションの検出の指標である。

【００７３】

「プライマー」は、指定されたポリヌクレオチドテンプレートと特異的にハイブリダイズして、相補的ポリヌクレオチドの合成の開始点を与えることができるポリヌクレオチドを意味する。そのような合成は、ポリヌクレオチドプライマーが、合成を誘導する条件下に置かれた場合に、すなわち、ヌクレオチド、相補的ポリヌクレオチドテンプレート、およびＤＮＡポリメラーゼなどの重合のための剤の存在下で発生する。プライマーは、典型的には、一本鎖であるが、二本鎖であってもよい。プライマーは、典型的には、デオキシリボ核酸であるが、広範な様々な合成および天然のプライマーが、多くの用途において有用である。プライマーは、それがハイブリダイズして合成の開始部位として働くように設計されたテンプレートに対して相補的であるが、テンプレートの正確な配列を反映している必要はない。そのような場合、テンプレートに対するプライマーの特異的ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに依存する。プライマーは、例えば、発色性、放射性、または蛍光性部分で標識されて、検出可能部分として用いられてよい。

【００７４】

「プローブ」は、ポリヌクレオチドに関して用いられる場合、別のポリヌクレオチドの指定された配列と特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドを意味する。プローブは、ターゲット相補的ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするが、テ

ンプレートの正確な相補的配列を反映している必要はない。そのような場合、ターゲットに対するプローブの特異的ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに依存する。プローブは、例えば、発色性、放射性、または蛍光性部分で標識されて、検出可能部分として用いられてよい。プローブが相補的ポリヌクレオチドの合成の開始点を与える場合では、プローブは、プライマーでもあってよい。

【００７５】

「ベクター」は、それと連結された別の核酸を細胞中へ導入するために用いることができるポリヌクレオチドである。ベクターの１つのタイプは、「プラスミド」であり、これは、追加の核酸セグメントを連結することができる直鎖状または環状の二本鎖ＤＮＡ分子を意味する。別のタイプのベクターは、ウィルスベクターであり（例：複製欠損レトロウィルス、アデノウィルス、およびアデノ随伴ウィルス）、この場合、追加のＤＮＡセグメントを、ウィルスゲノム中に導入することができる。特定のベクターは、それが導入された宿主細胞中で自律増殖することができる（例：細菌複製起点を含む細菌ベクター、およびエピソーム哺乳類ベクター）。他のベクター（例：非エピソーム哺乳類ベクター）は、宿主細胞中への導入後、宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、それによって、宿主ゲノムと共に複製される。「発現ベクター」は、選択されたポリヌクレオチドの発現を指向することができるベクターのタイプである。

【００７６】

「制御配列」は、それが操作可能に連結された核酸の発現に影響を与える（例：発現のレベル、タイミング、または位置）核酸である。制御配列は、例えば、制御を受ける核酸に対して直接その影響を及ぼしてよく、または１つ以上の他の分子（例：制御配列および／または核酸に結合したポリペプチド）の作用を通してであってもよい。制御配列の例としては、プロモーター、エンハンサー、およびその他の発現制御要素（例：ポリアデニル化シグナル）が挙げられる。制御配列のさらなる例は、例えば、Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif.およびBaron et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23:3605-06に記載されている。ヌクレオチド配列は、制御配列がそのヌクレオチド配列の発現に影響を与える場合（例：発現のレベル、タイミング、または位置）、制御配列と「操作可能に連結」されている。

【００７７】

「宿主細胞」は、本開示のポリヌクレオチドの発現に用いることができる細胞である。宿主細胞は、原核生物、例えば大腸菌であってよく、またはそれは、真核生物、例えば単細胞真核生物（例：イーストまたはその他の真菌）、植物細胞（例：タバコまたはトマト植物細胞）、動物細胞（例：ヒト細胞、サル細胞、ハムスター細胞、ラット細胞、マウス細胞、または昆虫細胞）、またはハイブリドーマであってよい。典型的には、宿主細胞は、後に宿主細胞中で発現することができるポリペプチドコード核酸によって形質転換またはトランスフェクトすることができる培養細胞である。「組換え宿主細胞」の語句は、発現されることになる核酸によって形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞を示すために用いられてよい。宿主細胞はまた、核酸を含んでいるが、制御配列が、それが核酸と操作可能に連結されるように宿主細胞中へ導入されない限り、所望されるレベルでそれを発現しない細胞であってもよい。宿主細胞の用語は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の後代または潜在的後代も意味することは理解される。例えば変異または環境の影響に起因して、特定の修飾が後に続く世代に発生し得ることから、そのような後代は、実際には親細胞と同一ではない可能性があるが、それでも、本明細書で用いられる場合、その用語の範囲内に含まれる。

【００７８】

「単離された分子」（ここで、分子とは、例えば、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドである）の用語は、その起源または誘導源のために、（１）その自然の状態においてそれに随伴する天然付随成分を伴わない分子、（２）同じ種からのその他の分子を実質的に含まない分子、（３）異なる種からの細胞によって発現された分子、または（４）自然に存在しない分子である。従って、化学合成された分子、またはそれが天然に由来する細胞

とは異なる細胞系で発現された分子は、その天然付随成分から「単離」されることになる。分子はまた、本技術分野にて公知の精製技術を用いた単離によって、天然付随成分を実質的に含まない状態とされてもよい。分子の純度または均一性は、本技術分野にて公知のいくつかの手段によって分析されてよい。例えば、ポリペプチドサンプルの純度は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用い、そのゲルを染色して、本技術分野にて公知の技術を用いてポリペプチドを可視化することによって分析されてよい。特定の目的の場合、ＨＰＬＣ、または精製のための本技術分野にて公知のその他の手段を用いることにより、より高い分解能が提供されてよい。

【００７９】

タンパク質またはポリペプチドは、サンプルの少なくとも約６０％から７５％がポリペプチドの単一種を示す場合、「実質的に純粋」、「実質的に均一」、または「実質的に精製された状態」である。ポリペプチドまたはタンパク質は、単量体または多量体であってよい。実質的に純粋なポリペプチドまたはタンパク質は、典型的には、タンパク質サンプルの約５０重量／重量％、６０重量／重量％、７０重量／重量％、８０重量／重量％、または９０重量／重量％を、より通常の場合は、約９５％を構成し、例えば、９９％を超えて純粋である。タンパク質の純度または均一性は、本技術分野にて公知のいくつかの手段によって示されてよく、タンパク質サンプルのポリアクリルアミドゲル電気泳動、およびそれに続く本技術分野にて公知の染料を用いたゲルの染色による単一ポリペプチドバンドの可視化などである。特定の目的の場合、ＨＰＬＣ、または精製のための本技術分野にて公知のその他の手段を用いることにより、より高い分解能が提供されてよい。

【００８０】

「リンカー」は、共有結合、またはイオン、ファンデルワールス、もしくは水素結合を介して２つの他の分子を繋ぐ分子を意味し、例えば、５’末端で１つの相補的配列と、３’末端で別の相補的配列とハイブリダイズし、それによって、２つの非相補的配列を繋ぐ核酸分子である。「開裂性リンカー」は、分解またはそうでなければ切断されることで、その開裂性リンカーによって接続されている２つの成分を分離することのできるリンカーを意味する。開裂性リンカーは、一般的に、酵素によって、典型的には、ペプチダーゼ、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、リパーゼなどによって開裂される。開裂性リンカーはまた、例えば、特定の酵素活性、温度、ｐＨ、塩濃度などの変化などの環境要因によっても、極性化上皮膜を通しての融合分子のトランスサイトーシスに続いて環境にそのような変化が存在する場合、開裂され得る。

【００８１】

「医薬組成物」は、動物における医薬用途に適する組成物を意味する。医薬組成物は、薬理学的有効量の活性剤および薬理学的に許容されるキャリアを含む。「薬理学的有効量」は、意図する薬理学的結果を発生させるのに有効である剤の量を意味する。

【００８２】

「薬理学的に許容されるキャリア」は、標準的な医薬キャリア、媒体、バッファー、および賦形剤のいずれをも意味し、リン酸緩衝生理食塩水溶液、デキストロースの５％水溶液、および油／水または水／油型エマルジョンなどのエマルジョン、ならびに様々な種類の湿潤剤および／または補助剤などである。適切な医薬キャリアおよび製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Ed. 2005, Mack Publishing Co, Eastonに記載されている。「薬理学的に許容される塩」は、医薬用途のための配合物に製剤することができる塩であり、例えば、金属塩（ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなど）、およびアンモニアまたは有機アミンの塩が挙げられる。

【００８３】

「治療する」、「治療している」、および「治療」の用語は、生物学的障害および／もしくはそれに付随する症状のうちの少なくとも１つを軽減または抑制する方法を意味する。本明細書で用いられる場合、疾患、障害、または病状を「軽減」することは、疾患、障害、もしくは病状の症状の重篤度および／または発症頻度を低減することを意味する。さらに、本明細書にて「治療」に言及する場合、治癒的、緩和的、および予防的治療への言

及を含む。

【００８４】

修飾コリックス毒素ポリペプチド

本明細書で用いられる場合、成熟コリックス毒素（Jorgensen, R. et al., J Biol Chem 283(16):10671-10678 (2008)）は、７０．７ｋＤ、６３４残基のタンパク質であり、その配列は、配列番号１に示される：

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDK
GESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGE
DSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPS
VSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYET
VAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDD
LSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQV
LTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESR
SGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI
APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRV
YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIH
AVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK（配列番号１）

【００８５】

様々な実施形態では、コリックス毒素は、配列番号１の配列との、例えば少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９９％の観察された相同性を共有するアミノ酸配列を有する。

【００８６】

成熟コリックス毒素をコードする代表的な核酸は、配列番号２に示される：

ATGGTCGAAGAAGCTTTAAACATCTTTGATGAATGCCGTTCGCCATGTTCGTTGACCCCGGA
ACCGGGTAAGCCGATTCAATCAAAACTGTCTATCCCTAGTGATGTTGTTCTGGATGAAGGTG
TTCTGTATTACTCGATGACGATTAATGATGAGCAGAATGATATTAAGGATGAGGACAAAGGC
GAGTCCATTATCACTATTGGTGAATTTGCCACAGTACGCGCGACTAGACATTATGTTAATCAA
GATGCGCCTTTTGGTGTCATCCATTTAGATATTACGACAGAAAATGGTACAAAAACGTACTCT
TATAACCGCAAAGAGGGTGAATTTGCAATCAATTGGTTAGTGCCTATTGGTGAAGATTCTCCT
GCAAGCATCAAAATCTCCGTTGATGAGCTCGATCAGCAACGCAATATCATCGAGGTGCCTAA
ACTGTATAGTATTGATCTCGATAACCAAACGTTAGAGCAGTGGAAAACCCAAGGTAATGTTTC
TTTTTCGGTAACGCGTCCTGAACATAATATCGCTATCTCTTGGCCAAGCGTGAGTTACAAAG
CAGCGCAGAAAGAGGGTTCACGCCATAAGCGTTGGGCTCATTGGCATACAGGCTTAGCACT
GTGTTGGCTTGTGCCAATGGATGCTATCTATAACTATATCACCCAGCAAAATTGTACTTTAGG
GGATAATTGGTTTGGTGGCTCTTATGAGACTGTTGCAGGCACTCCGAAGGTGATTACGGTTA
AGCAAGGGATTGAACAAAAGCCAGTTGAGCAGCGCATCCATTTCTCCAAGGGGAATGCGAT
GAGCGCACTTGCTGCTCATCGCGTCTGTGGTGTGCCATTAGAAACTTTGGCGCGCAGTCGC
AAACCTCGTGATCTGACGGATGATTTATCATGTGCCTATCAAGCGCAGAATATCGTGAGTTTA
TTTGTCGCGACGCGTATCCTGTTCTCTCATCTGGATAGCGTATTTACTCTGAATCTTGACGAA
CAAGAACCAGAGGTGGCTGAACGTCTAAGTGATCTTCGCCGTATCAATGAAAATAACCCGG
GCATGGTTACACAGGTTTTAACCGTTGCTCGTCAGATCTATAACGATTATGTCACTCACCATC
CGGGCTTAACTCCTGAGCAAACCAGTGCGGGTGCACAAGCTGCCGATATCCTCTCTTTATTT
TGCCCAGATGCTGATAAGTCTTGTGTGGCTTCAAACAACGATCAAGCCAATATCAACATCGA
GTCTCGTTCTGGCCGTTCATATTTGCCTGAAAACCGTGCGGTAATCACCCCTCAAGGCGTCA
CAAATTGGACTTACCAGGAACTCGAAGCAACACATCAAGCTCTGACTCGTGAGGGTTATGTG
TTCGTGGGTTACCATGGTACGAATCATGTCGCTGCGCAAACCATCGTGAATCGCATTGCCCC
TGTTCCGCGCGGCAACAACACTGAAAACGAGGAAAAGTGGGGCGGGTTATATGTTGCAACT
CACGCTGAAGTTGCCCATGGTTATGCTCGCATCAAAGAAGGGACAGGGGAGTATGGCCTTC
CGACCCGTGCTGAGCGCGACGCTCGTGGGGTAATGCTGCGCGTGTATATCCCTCGTGCTTC

ATTAGAACGTTTTTATCGCACGAATACACCTTTGGAAAATGCTGAGGAGCATATCACGCAAGT
GATTGGTCATTCTTTGCCATTACGCAATGAAGCATTTACTGGTCCAGAAAGTGCGGGCGGGG
AAGACGAAACTGTCATTGGCTGGGATATGGCGATTCATGCAGTTGCGATCCCTTCGACTATC
CCAGGGAACGCTTACGAAGAATTGGCGATTGATGAGGAGGCTGTTGCAAAAGAGCAATCGA
TTAGCACAAAACCACCTTATAAAGAGCGCAAAGATGAACTTAAG（配列番号２）

【００８７】

様々な実施形態では、コリックス毒素は、配列番号２の配列との、例えば少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９９％の観察された相同性を共有する核酸配列を含有する。

【００８８】

様々な実施形態では、融合分子の作製に用いられる修飾コリックス毒素は、切断型コリックス毒素であり、ここで、融合分子は、生物活性カーゴに対する受容体を活性化する能力を有する。本明細書で述べるように、切断型コリックス毒素は、切断型コリックス毒素を含むアミノ酸残基を参照することによって識別され、例えば、配列番号１のアミノ酸残基１～３８６から成る切断型コリックス毒素は、コリックス^{３８６}として識別されることになる。

【００８９】

様々な実施形態では、融合分子の作製に用いられる修飾コリックス毒素は、変異型コリックス毒素である。本明細書で述べるように、変異がアミノ酸残基の欠失を含む変異型コリックス毒素は、欠失されたアミノ酸残基を参照することによって識別され、例えば、配列番号１のアミノ酸Ｅ５８１が欠失された変異型コリックス毒素は、「コリックスΔＥ５８１」として識別されることになる。変異がアミノ酸残基の置換を含む変異型コリックス毒素は、具体的アミノ酸残基における特定のアミノ酸置換を参照することによって識別される。従って、例えば、「Ｓ３０Ａ」の用語は、配列番号１の３０番目の位置にある「Ｓ」（セリン、標準的な１文字表記）残基が、「Ａ」（アラニン、標準的な１文字表記）で置換されたことを示しており、その残基が切断型コリックス毒素に現れる場合であっても、この修飾毒素は、「コリックス^{Ｓ３０Ａ}」として識別されることになる。

【００９０】

コリックス毒素ドメインＩａ（配列番号１のアミノ酸１～２６５）は、細胞表面受容体のためのリガンドとして機能し、融合分子の細胞との結合を媒介する「受容体結合ドメイン」であり、例えば、ドメインＩａは、上皮細胞の頂端膜上に存在する細胞表面受容体と、融合分子のエンドサイトーシスを可能とするのに充分な親和性で結合する。ドメイン１ａは、上皮細胞の頂端膜上に存在することが当業者に公知であるいかなる受容体とも、制限なく結合することができる。例えば、受容体結合ドメインは、α２－ＭＲと結合することができる。融合分子の細胞との結合を媒介する能力を実質的に除去しない限りにおいて、保存的または非保存的置換が、ドメインＩａのアミノ酸配列に行われてよい。様々な実施形態では、融合分子は、変異されたドメインＩａを含んでいるコリックス毒素を含む。

【００９１】

様々な実施形態では、ドメインＩａは、抗原提示細胞（ＡＰＣ）受容体結合ドメインを含む。様々な実施形態では、ＡＰＣ受容体結合ドメインは、コリックスドメインＩａの、またはＡＰＣ上の細胞表面受容体と結合するのに充分であるコリックスドメインＩａの一部分の細胞認識ドメインである。

【００９２】

様々な実施形態では、ＡＰＣ受容体結合ドメインは、樹状細胞またはその他のＡＰＣ上に存在するとして識別される受容体と結合する。ＡＰＣ上にある細胞表面受容体の例としては、これらに限定されないが、ＤＥＣ－２０５（ＣＤ２０５）、ＣＤ２０７、ＣＤ２０９、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ３６、ＣＤ１４、ＣＤ５０、ＣＤ５４、ＣＤ５８、ＣＤ６８、ＣＤ８０、ＣＤ８３、ＣＤ８６、ＣＤ１０２、ＣＤ３、ＣＤ１４、ＣＤ１９、Ｃｌｅｃ９ａ、ＣＭＦＲ－４４、デクチン－１、デクチン－２、ＦＬＴ３、Ｈ

ＬＡ‐ＤＲ、ＬＯＸ‐１、ＭＨＣ　ＩＩ、ＢＤＣＡ‐１、ＤＣ‐ＳＩＧＮ、Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）‐２、‐３、‐４、および‐７、ならびにα２‐マクログロブリン受容体（「α２‐ＭＲ」）が挙げられ得る。様々な実施形態では、ＡＰＣ受容体結合ドメインは、α２‐ＭＲである。

【００９３】

コリックス毒素ドメインＩＩ（配列番号１のアミノ酸２６６～３８６）は、粘膜の頂端膜側に接する管腔から粘膜の側底側へのトランスサイトーシスを媒介する「トランスサイトーシスドメイン」である。本明細書で言及される場合、「トランスサイトーシス」は、極性化上皮細胞を通しての融合分子の輸送を意味する。そのような輸送により、極性化上皮細胞の側底膜からの生物活性カーゴの放出が可能となる。本開示の融合分子は、ドメインＩＩの全アミノ酸配列を含んでいる修飾コリックス毒素を含んでよく、またはトランスサイトーシス活性が実質的に除去されない限りにおいて、ドメインＩＩの一部分を含んでいてもよい。さらに、トランスサイトーシス活性が実質的に除去されない限りにおいて、トランスサイトーシスドメインのアミノ酸配列に対して、保存的または非保存的置換が行われてもよい。トランスサイトーシスドメインがトランスサイトーシス活性を有するかどうかを特定するために当業者によって通常の手順として用いられてよい代表的なアッセイは、本明細書に記載される。本明細書で用いられる場合、トランスサイトーシス活性は、活性が、例えば、ドメインＩＩの全アミノ酸配列を含む修飾コリックス毒素と比較して、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または少なくとも９９％である限りにおいて、実質的に除去されていない。

【００９４】

様々な実施形態では、非天然融合分子は、コリックス毒素ドメインＩＩ内のアミノ酸残基で切断された修飾コリックス毒素を含み、ここで、融合分子は、生物活性カーゴに対する受容体を活性化させる能力を有する。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{386}（配列番号３）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{385}（配列番号４）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{384}（配列番号５）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{383}（配列番号６）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{382}（配列番号７）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{381}（配列番号８）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{380}（配列番号９）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{379}（配列番号１０）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{378}（配列番号１１）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{377}（配列番号１２）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{376}（配列番号１３）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{375}（配列番号１４）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{374}（配列番号１５）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{373}（配列番号１６）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{372}（配列番号１７）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{371}（配列番号１８）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{370}（配列番号１９）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{369}（配列番号２０）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{368}（配列番号２１）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{367}（配列番号２２）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{366}（配列番号２３）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{365}（配列番号２４）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{364}（配列番号２５）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{363}（配列番号２６）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は

、コリックス^{362}（配列番号２７）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{361}（配列番号２８）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{360}（配列番号２９）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{359}（配列番号３０）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{358}（配列番号３１）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{357}（配列番号３２）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{356}（配列番号３３）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{355}（配列番号３４）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{354}（配列番号３５）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{353}（配列番号３６）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{352}（配列番号３７）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{351}（配列番号３８）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{350}（配列番号３９）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{349}（配列番号４０）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{348}（配列番号４１）である。

【００９５】

コリックス毒素ドメインＩｂ（配列番号１のアミノ酸３８７～４２５）は、細胞結合、トランスロケーション、ＥＲ残留、またはＡＤＰリボシル化活性を含むコリックスの公知のいずれの活性に対しても必須ではない。様々な実施形態では、非天然融合分子は、コリックス毒素ドメインＩｂ内のアミノ酸残基で切断された修飾コリックス毒素を含み、ここで、融合分子は、生物活性カーゴに対する受容体を活性化させる能力を有する。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{425}（配列番号４２）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{424}（配列番号４３）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{423}（配列番号４４）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{422}（配列番号４５）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{421}（配列番号４６）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{420}（配列番号４７）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{419}（配列番号４８）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{418}（配列番号４９）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{417}（配列番号５０）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{416}（配列番号５１）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{415}（配列番号５２）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{414}（配列番号５３）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{413}（配列番号５４）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{412}（配列番号５５）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{411}（配列番号５６）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{410}（配列番号５７）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{409}（配列番号５８）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{408}（配列番号５９）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{407}（配列番号６０）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{406}（配列番号６１）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{405}（配列番号６２）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{404}（配列番号６３）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{403}（配列番号６４）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{402}（配列番号６５）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{401}（配列番号６６）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{400}（配列番号６７）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{399}（配

列番号６８）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{398}（配列番号６９）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{397}（配列番号７０）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{396}（配列番号７１）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{395}（配列番号７２）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{394}（配列番号７３）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{393}（配列番号７４）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{392}（配列番号７５）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{391}（配列番号７６）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{390}（配列番号７７）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{389}（配列番号７８）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{388}（配列番号７９）である。１つの実施形態では、切断型コリックス毒素は、コリックス^{387}（配列番号８０）である。

【００９６】

コリックス毒素ドメインＩＩＩ（配列番号１のアミノ酸４２６～６３４）は、細胞傷害性を担っており、小胞体残留配列を含む。ドメインＩＩＩは、タンパク質合成を不活性化する伸長因子２（「ＥＦ２」）のＡＤＰリボシル化を媒介する。「内在性ＡＤＰリボシル化活性を持たない」コリックス、または「解毒されたコリックス」は、コリックスドメインＩＩＩを含まないか、またはその分子を解毒するような方法でドメインＩＩＩ内が修飾された本明細書で述べるいかなるコリックス（修飾バリアントを含む）をも意味する。例えば、配列番号１の５８１番目の位置にあるアミノ酸におけるグルタミン酸（Ｇｌｕ）残基の欠失が、この分子を解毒する。この解毒されたコリックスは、「コリックスΔＥ５８１」と称される。様々な実施形態では、ＥＲ残留シグナル以外のコリックスドメインＩＩＩの部分は、別のアミノ酸配列によって置き換えられてよい。このアミノ酸配列自体は、非免疫原性、僅かに免疫原性、または高い免疫原性であってよい。高い免疫原性のＥＲ残留ドメインが、液性免疫応答を引き起こす場合の使用において好ましい。例えば、コリックスドメインＩＩＩ自体は、高い免疫原性であり、強い液性免疫応答が所望される場合の融合分子に用いられてよい。

【００９７】

本明細書で用いられる場合、「解毒されたコリックス配列」は、完全長配列、または完全長配列の（１もしくは複数の）部分であってよい。一般的に、解毒されたコリックス配列は、解毒されたコリックスの特定の生物活性を持つ１つ以上のドメイン、またはドメインの部分を有し、細胞認識ドメイン、トランスロケーションドメイン、または小胞体残留ドメインなどである。例えば、解毒されたコリックス配列は、ドメインＩＩおよび解毒されたドメインＩＩＩのみを含んでよい。別の例では、解毒されたコリックス配列は、ドメインＩａ、ドメインＩＩ、および解毒されたドメインＩＩＩのみを含んでよい。別の例では、解毒されたコリックス配列は、ドメインＩａ、Ｉｂ、ＩＩ、および解毒されたＩＩＩのすべてを含んでよい。従って、解毒されたコリックス配列は、自然コリックスの連続配列であってよく、またはそれは、ＡＤＰリボシル化活性を持たない自然コリックスの非連続サブ配列から構成されていてもよい。本開示の１つの実施形態では、非天然融合分子は、配列番号８１に示されるアミノ酸配列を有する、本明細書にてコリックス毒素ΔＥ５８１と称される変異型の修飾コリックス毒素を含む。

【００９８】

生物活性カーゴ

修飾コリックス毒素ポリペプチドに加えて、本開示の融合分子は、さらに、対象へ送達するための生物活性カーゴを含む。本明細書で用いられる場合、「生物活性カーゴ」としては、これらに限定されないが；高分子、小分子、ペプチド、ポリペプチド、核酸、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、アンチセンス分子、抗体、ＤＮＡ、プラスミド、ワクチン、ポリマーナノ粒子、または触媒活性物質が挙げられる。

【００９９】

様々な実施形態では、生物活性カーゴは、対象の血流中に導入された場合に望ましい生物活性を実行することができる高分子である。例えば、生物活性カーゴは、受容体結合活性、酵素活性、メッセンジャー活性（すなわち、ホルモン、サイトカイン、神経伝達物質、またはその他のシグナル伝達分子として作用する）、発光もしくはその他の検出可能活性、もしくは制御活性、またはこれらのいずれかの組み合わせを有し得る。特定の診断実施形態では、生物活性カーゴは、インジウムおよびテクネチウムが挙げられるがこれらに限定されない薬理学的に許容されるガンマ放射性部分、磁性粒子、空気またはバリウムなどの放射線不透過性物質、および蛍光性化合物と結合されていてよいか、またはそれ自体であってよい。

【０１００】

様々な実施形態では、融合分子の生物活性カーゴは、対象の血液以外の対象の生物学的コンパートメントでその効果を発揮することができる。例えば、様々な実施形態では、生物活性カーゴは、リンパ系でその効果を発揮することができる。他の実施形態では、生物活性カーゴは、器官または組織、例えば、対象の肝臓、心臓、肺、膵臓、腎臓、脳、骨髄などでその効果を発揮することができる。そのような実施形態では、生物活性カーゴは、血液、リンパ液、もしくはその他の生体液中に検出可能な濃度で存在しても、または存在しなくてもよく、しかしそれでも、生物学的効果を発揮するのに充分な濃度で、作用部位に蓄積されてよい。

【０１０１】

様々な実施形態では、生物活性カーゴは、２つ以上のポリペプチドサブユニットを含むタンパク質である。例えば、タンパク質は、二量体、三量体、またはそれより多い多量体であってよい。様々な実施形態では、タンパク質の２つ以上のサブユニットは、例えばジスルフィド結合などの共有結合で接続されていてよい。他の実施形態では、タンパク質のサブユニットは、非共有結合の相互作用によって互いに保持されていてよい。当業者であれば、そのようなタンパク質を通常の手順で識別し、例えばイムノアッセイを用いて、サブユニットが適切に会合されているかどうかを特定することができる。

【０１０２】

様々な実施形態では、送達されるべき生物活性カーゴは、例えば、サイトカインおよびサイトカイン受容体から選択され、インターロイキン‐１（ＩＬ‐１）、ＩＬ‐２、ＩＬ‐３、ＩＬ‐４、ＩＬ‐５、ＩＬ‐６、ＩＬ‐７、ＩＬ‐８、ＩＬ‐９、ＩＬ‐１０、ＩＬ‐１１、ＩＬ‐１２、ＩＬ‐１３、ＩＬ‐１４、ＩＬ‐１５、ＩＬ‐１６、ＩＬ‐１７、ＩＬ‐１８、ＩＬ‐１９、ＩＬ‐２０、ＩＬ‐２１、ＩＬ‐２２、ＩＬ‐２３、ＩＬ‐２４、ＩＬ‐２５、ＩＬ‐２６、ＩＬ‐２７、ＩＬ‐２８、ＩＬ‐２９、ＩＬ‐３０、リンホカイン抑制因子、マクロファージコロニー刺激因子、血小板由来成長因子、幹細胞因子、腫瘍成長因子‐β、腫瘍壊死因子、リンホトキシン、Ｆａｓ、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターフェロン‐α、インターフェロン‐β、インターフェロン‐γ、エリスロポエチン、アンジオゲニン、肝細胞成長因子、線維芽細胞成長因子、ケラチノサイト成長因子、神経成長因子、腫瘍成長因子‐α、トロンボポエチン、甲状腺刺激因子、甲状腺放出ホルモン、ニューロトロフィン、上皮成長因子、ＶＥＧＦ、繊毛様神経栄養因子、ＬＤＬ、ソマトメジン、インスリン成長因子、インスリン様成長因子ＩおよびＩＩなどの成長因子ならびにタンパク質ホルモン、ＥＮＡ‐７８、ＥＬＣ、ＧＲＯ‐α、ＧＲＯ‐β、ＧＲＯ‐γ、ＨＲＧ、ＬＥＦ、ＩＰ‐１０、ＭＣＰ‐１、ＭＣＰ‐２、ＭＣＰ‐３、ＭＣＰ‐４、ＭＩＰ‐１‐α、ＭＩＰ‐１‐β、ＭＧ、ＭＤＣ、ＮＴ‐３、ＮＴ‐４、ＳＣＦ、ＬＩＦ、レプチン、ＲＡＮＴＥＳ、リンホタクチン、エオタキシン‐１、エオタキシン‐２、ＴＡＲＣ、ＴＥＣＫ、ＷＡＰ‐１、ＷＡＰ‐２、ＧＣＰ‐１、ＧＣＰ‐２などのケモカイン；α‐ケモカイン受容体、例えばＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸＣＲ４、ＣＸＣＲ５、ＣＸＣＲ６、ＣＸＣＲ７；およびβ‐ケモカイン受容体、例えば、ＣＣＲ１、ＣＣＲ２、ＣＣＲ３、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＣＲ６、ＣＣＲ７などである。

【０１０３】

本開示に従って送達することのできる生物活性カーゴのその他の例としては、これらに限定されないが、抗悪性腫瘍化合物、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプゾトシン（strepzotocin）を例とするニトロソ尿素；プロカルバジン、ダカルバジンを例とするメチルヒドラジン；糖質コルチコイド、エストロゲン、プロゲスチン、アンドロゲン、テトラヒドロデスオキシカリコステロン（tetrahydrodesoxycaricosterone）を例とするステロイドホルモンなど；免疫活性化合物、ピリメタミン、トリメトプテリン（trimethopterin）、ペニシラミン、シクロスポリン、アザチオプリンを例とする免疫抑制剤；およびレバミソール、ジエチルジチオカルバメート、エンケファリン、エンドルフィンを例とする免疫賦活剤など；抗菌化合物、β‐ラクタム、ペニシリン、セファロスポリン、カルバペニムス（carbapenims）およびモノバクタム、β‐ラクタマーゼ阻害剤、アミノ配糖体、マクロライド、テトラサイクリン（tetracyclins）、スペクチノマイシンを例とする抗生物質；抗マラリア剤、抗アメーバ剤；抗原虫剤；アンホテリシンβを例とする抗真菌剤、アシクロビル、イドクスウリジン、リバビリン、トリフルリジン、ビダルビン（vidarbine）、ガンシクロビル（gancyclovir）を例とする抗ウィルス剤；抗寄生虫剤；駆虫剤（antihalmintics）など；放射性医薬品；胃腸薬：血液系作用化合物；免疫グロブリン；血友病因子、第ＩＸ因子複合体を例とする血液凝固タンパク質；ジクマロール、ヘパリンＮａを例とする抗凝固剤；トラネキサム酸を例とするフィブロリシン阻害剤（fibrolysin inhibitors）；心血管治療薬；末梢性抗アドレナリン薬；メチルドパ、メチルドパＨＣｌを例とする中枢作用性降圧薬；ジアゾキシド、ヒドララジンＨＣｌを例とする降圧性直接血管拡張剤；レニン・アンジオテンシンに影響を与える薬物；フェントラミンを例とする抹消血管拡張剤；抗狭心症薬；強心配糖体；アムリノン、ミルリノン、エノキシモン、フェノキシモン（fenoximone）、イマゾダン（imazodan）、スルマゾールを例とする強心性血管拡張剤；抗リズム障害剤（antidysrhythmics）；カルシウム流入遮断剤；ラニチジン、ボセンタン、レズリンを例とする血中脂質に影響を与える薬物；呼吸系薬物；アルブテロール、ビトルテロールメシレート、ドブタミンＨＣｌ、ドパミンＨＣｌ、エフェドリンＳｏ、エピネフリン、フェンフルラミンＨＣｌ、イソプロテレノールＨＣｌ、メトキサミンＨＣｌ、ノルエピネフリン酒石酸水素塩、フェニレフリンＨＣｌ、リトドリンＨＣｌを例とする交感神経刺激薬；アセチルコリンＣｌを例とするコリン作用薬；エドロホニウムＣｌを例とする抗コリンエステラーゼ薬；コリンエステラーゼ再賦活薬；アセブトロールＨＣｌ、アテノロール、エスモロールＨＣｌ、ラベタロールＨＣｌ、メトプロロール、ナドロール、フェントラミンメシレート、プロプラノロールＨＣｌを例とするアドレナリン作動性遮断薬；臭化メチルアニソトロピン、アトロピンSO_4、クリニジウムＢｒ（clinidium Br）、グリコピロレート、イプラトロピウムＢｒ、スコポラミンＨＢｒを例とする抗ムスカリン薬；神経筋遮断薬；アトラクリウムベシレート、ヘキサフルオレニウムＢｒ（hexafluorenium Br）、ヨウ化メトクリン、スクシニルコリンＣｌ、ツボクラリンＣｌ，ベクロニウムＢｒを例とする脱分極性薬（depolarizing drugs）；バクロフェンを例とする中枢作用性筋弛緩剤；アセチルコリン、アデノシン、アデノシン三リン酸を例とする神経伝達物質および神経伝達作用薬；興奮性アミノ酸、ＧＡＢＡ、グリシンを例とするアミノ酸神経伝達物質；ドパミン、エピネフリン、ヒスタミン、ノルエピネフリン、オクトパミン、セロトニン、チラミンを例とする生体アミン神経伝達物質；神経ペプチド、一酸化窒素、K^+チャネル毒素；アマルチジンＨＣｌ（amaltidine HCl）、ベンズトロピンメシレート、カルビドパを例とする抗パーキンソン病薬；ジクロフェナミド、メタゾラミド、ベンドロフルメチアジド、ポリチアジドを例とする利尿薬；カルボプロスト　トロメタミンメシレート、メチセルジドマレエートを例とする抗片頭痛薬が挙げられる。

【０１０４】

本開示に従って送達することのできる生物活性カーゴのさらにその他の例としては、これらに限定されないが、絨毛性ゴナドトロピン、コシントロピン、メノトロピン、ソマトトロピン、イオルチコトロピン（iorticotropin）、プロチレリン、チロトロピン、バソプレッシン、リプレッシンを例とする下垂体ホルモン；ベクロメタゾンジプロピオネート、ベタメタゾン、デキサルネタゾン（dexarnethasone）、トリアムシノロンを例とする副

腎性ホルモン；グルカゴン、インスリンを例とする膵臓ホルモン；ジヒドロキステロール（dihydrochysterol）を例とする副甲状腺ホルモン；カルシトニンエチドロネート二ナトリウム、レボチロキシンＮａ、リオチロニンＮａ、リオトリックス、チログロブリン、テリパラチドアセテートを例とする甲状腺ホルモン；抗甲状腺薬；エストロゲンホルモン；プロゲスチンおよびアンタゴニスト；ホルモン性避妊薬；精巣ホルモン；コレシストキニン、エンテログリカン（enteroglycan）、ガラニン、胃抑制ポリペプチド、上皮成長因子‐ウロガストロン、胃抑制ポリペプチド、ガストリン放出ペプチド、ガストリン、ペンタガストリン、テトラガストリン、モチリン、ペプチドＹＹ、セクレチン、血管作用性小腸ペプチド、またはシンカリドを例とする胃腸ホルモンなどのホルモンが挙げられる。

【０１０５】

本開示に従って送達することのできる生物活性カーゴのさらにその他の例としては、これらに限定されないが、ヒアルロニダーゼ、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノーゲン活性化因子、ウロキナーゼ、ＰＧＥ‐アデノシンデアミナーゼなどの酵素；ドロペリドール、エトミデート、フェタニルシトレート（fetanyl citrate）／ドロペリドール、ヘキソバルビタール、ケタミンＨＣｌ、メトヘキシタールＮａ、チアミラールＮａ、チオペンタールＮａなどの静脈麻酔薬；カルバマゼピン、クロナゼパム、ジバルプロエクスＮａ、エトスクシミド、メフェニロイン（mephenyloin）、パラメタジオン、フェニロイン（phenyloin）、プリミドンを例とする抗てんかん薬が挙げられる。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、ヒアルロニダーゼ、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノーゲン活性化因子、ウロキナーゼ、ＰＧＥ‐アデノシンデアミナーゼから選択される酵素である。

【０１０６】

本開示に従って送達することのできる生物活性カーゴのなおその他の例としては、これらに限定されないが、白血病、リンパ腫、癌腫、肉腫、骨髄腫などを含む様々な種類のヒトの癌に対して有効である化学療法剤または抗腫瘍剤などの化学療法薬が挙げられ、例えば、ドキソルビシン、マイトマイシン、シスプラチン、ダウノルビシン、ブレオマイシン、アクチノマイシンＤ、およびネオカルチノスタチンなどである。

【０１０７】

炎症の修飾因子（インターロイキン‐１０および関連するサイトカイン）

インターロイキン‐１０（ＩＬ‐１０）は、多くの細胞集団によって産生される重要な免疫調節性サイトカインであり、その主たる生物学的機能は、炎症応答の制限および停止、ならびにＴ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞、抗原提示細胞、マスト細胞、および顆粒球などのいくつかの免疫細胞の分化ならびに増殖の制御であると思われる。より最近データから、ＩＬ‐１０は、炎症が限定的である感染性および非感染性粒子の除去を助ける免疫賦活性も媒介することが示唆されている；Asadullah et al., Pharmacol Rev, 55:241-269, 2003。さらに、数多くの研究から、炎症性、悪性、および自己免疫性疾患においてＩＬ‐１０が大きな影響を及ぼすことが示唆されており、ＩＬ‐１０の過剰発現が、黒色腫、基底細胞癌および扁平上皮癌、ならびにいくつかのリンパ腫などの特定の腫瘍で見出された；同著。ＩＬ‐１０と構造的に関連する５種類の新しいヒト分子、ＩＬ‐１９（Gallagher et al., Genes Immun., 1:442-450, 2000）、ＩＬ‐２０（Blumberg et al., Cell, 104:9-19, 2001）、ＩＬ‐２２（Dumoutier et al., Genes Immun., 1:488-494, 2000）、ＩＬ‐２４（Jiang et al., Oncogene, 11:2477-2486, 1995）、およびＩＬ‐２６（Knappe et al., J. Virol., 74:3881-3887, 2000）が発見されており、データから、免疫細胞が、新しいＩＬ‐１０ファミリーメンバーの主要源であることが示唆される；Wolk et al., J. Immunol., 168:5397-5402, 2002。

【０１０８】

実験モデルでのいくつかの炎症性疾患過程において、ＩＬ‐１０の送達からある程度の有望な結果は得られたが、炎症性および／または免疫性障害の治療のための治療剤としてのＩＬ‐１０を評価するいくつかの臨床試験では、多くのデータが相反しており、依然としてあまり期待に沿うものではない；Asadullah et al., Pharmacol Rev, 55:241-269, 2003。全体として、データから、ＩＬ‐１０は、安全であり、一般的に良好な耐容性を有

するが、標準的な用量で全身投与した後の腸管でのＩＬ‐１０の最終的な局所濃度が低過ぎるため、不充分な効果しか得られない。同著。残念ながら、副作用（例：貧血、頭痛）のために、用量を充分に増加することは制限され、クローン病を例とするいくつかの適応症では、全身投与されるＩＬ‐１０の用量を高めることは、有用ではなく、むしろ有害となり得ることが懸念される；Herfarth et al, Gut, 50(2): 146-147, 2002。

【０１０９】

様々な実施形態では、生物活性カーゴは、例えばインターロイキン‐１０、インターロイキン‐１９、インターロイキン‐２０、インターロイキン‐２２、インターロイキン‐２４、またはインターロイキン‐２６から選択されるＧＩ管における炎症の修飾因子であることが特定されているポリペプチドである。

【０１１０】

インターロイキン‐１０（ＩＬ‐１０）は、２型ヘルパーＴ細胞の産物として最初に識別され、後に、Ｂ細胞およびマクロファージを含むその他の細胞型によって産生されることが示された（Moore et al., Annu Rev Immunol, 19:683-765, 2001）。それはまた、γ‐インターフェロン、ＩＬ‐２、および腫瘍壊死因子‐α（ＴＮＦ‐α）など、１型ヘルパーＴ細胞から産生されるいくつかのサイトカインの合成も阻害する（Fiorentino et al., J Immunol, 146:3444-3451, 1991）。細胞媒介免疫応答修飾因子を阻害し、抗原提示細胞依存性Ｔ細胞応答を抑制するＩＬ‐１０の能力は、ＩＬ‐１０が免疫抑制性を有することを示している。このサイトカインはまた、ＩＬ‐１、ＩＬ‐６、ＩＬ‐８、顆粒球‐マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ‐ＣＳＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ‐ＣＳＦ）、およびＴＮＦ‐αなど、単球／マクロファージのその他のサイトカインの産生も阻害する。

【０１１１】

ＩＬ‐１０タンパク質は、機能性二量体を形成し、それは、その２つの単量体サブユニットを接続している非共有結合相互作用の分断によって生物学的に不活性となる。Ｎ末端は、ＩＬ‐１０受容体活性化に直接関与していないと思われる。従って、本開示の１つの態様では、融合分子は、ＩＬ‐１０タンパク質のＮ末端を通しての、開裂性リンカーを用いた修飾コリックス毒素のＣ末端との結合を介して構築される。そのような構築により、ＩＬ‐１０相互作用の結果として、溶液二量体（solution dimer）が得られ得る。

【０１１２】

様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号８２：

MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQM
KDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENL
KTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKI
RN（配列番号８２）

に示されるアミノ酸配列を有するヒトインターロイキン‐１０、またはその断片もしくはバリアントである。

【０１１３】

様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号８２の配列との、例えば少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９９％の観察された相同性を共有するアミノ酸配列を含有する。

【０１１４】

ＩＬ‐１９は、ＩＬ‐１０サイトカインサブファミリーに属するサイトカインである。このサイトカインは、単球中で優先的に発現されることが見出されている。これは、ＩＬ‐２０受容体複合体と結合して、シグナル伝達性転写因子３（ＳＴＡＴ３）の活性化を誘導することができる（Yamamoto-Furusho JK, et al. Hum Immunol, 72(11):1029-32, 2011）。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号８３：

MKLQCVSLWLLGTILILCSVDNHGLRRCLISTDMHHIEESFQEIKRAIQAKDTFPNVTILST
LETLQIIKPLDVCCVTKNLLAFYVDRVFKDHQEPNPKILRKISSIANSFLYMQKTLRQCQE

QRQCHCRQEATNATRVI HDNYDQLEVHAAAIKSLGELDVFLAWINKNHEVMSSA
（配列番号８３）
に示されるアミノ酸配列を有するヒトインターロイキン‐１９、またはその断片もしくはバリアントである。
【０１１５】
様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号８３の配列との、例えば少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９９％の観察された相同性を共有するアミノ酸配列を含有する。
【０１１６】
ＩＬ‐２０は、インターロイキン１０（ＩＬ‐１０）と構造的に関連するサイトカインである。このサイトカインは、ケラチノサイトにおいて、シグナル伝達性転写因子３（ＳＴＡＴ３）を通してそのシグナルを伝達することが示されている。このサイトカインに対する特異的受容体は、皮膚で発現され、乾癬皮膚で劇的に上方制御されることが見出されており、このことは、表皮機能および乾癬におけるこのタンパク質の役割を示唆している（Yamamoto-Furusho JK, et al. Immunol Lett, 149(1-2):50-3 2013）。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号８４：
MKASSLAFSLLSAAFYLLWTPSTGLKTLNLGSCVIATNLQEIRNGFSEIRGSVQAKDGNI
DIRILRRTESLQDTKPANRCCLLRHLLRLYLDRVFKNYQTPDHYTLRKISSLANSFLTIKK
DLRLCHAHMTCHCGEEAMK KYSQILSHFEKLEPQAAVVKALGELDILLQWMEETE
（配列番号８４）
に示されるアミノ酸配列を有するヒトインターロイキン‐２０、またはその断片もしくはバリアントである。
【０１１７】
様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号８４の配列との、例えば少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９９％の観察された相同性を共有するアミノ酸配列を含有する。
【０１１８】
ＩＬ‐２２は、インターロイキン１０（ＩＬ‐１０）と構造的に関連するサイトカインである。ＩＬ‐２２分泌ＣＤ４（＋）Ｔ（Ｔｈ２２）細胞およびＩＬ‐２２は、自己免疫性疾患の病態形成に関与しており、ＮＭＯおよびＭＳの病態形成において重要な役割を果たし得る（Xu et al., J Neuroimmunol., Aug 15;261(1-2):87-91, 2013）。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号８５：
MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLALLVQGGAAAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFML
AKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQE
VVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNA
CI（配列番号８５）
に示されるアミノ酸配列を有するヒトインターロイキン‐２２、またはその断片もしくはバリアントである。
【０１１９】
様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号８５の配列との、例えば少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９９％の観察された相同性を共有するアミノ酸配列を含有する。
【０１２０】
ＩＬ‐２４は、インターロイキン１０（ＩＬ‐１０）と構造的に関連するサイトカインであり、様々な癌細胞において選択的にアポトーシスを誘導することができる。この遺伝子の過剰発現は、いくつかのＧＡＤＤファミリー遺伝子の発現の上昇に繋がり、このことが、アポトーシスの誘導と相関している。ママイトジェン活性化プロテインキナーゼ１４

（ＭＡＰＫ７／Ｐ３８）のリン酸化、および熱ショック２７ｋＤａタンパク質１（ＨＳＰＢ２／ＨＳＰ２７）が、黒色腫細胞ではこの遺伝子によって誘導されるが、正常不死メラノサイトでは誘導されないことが見出されている（Lin BW, et al., J Korean Med Sci, 28(6):833-9, 2013）。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号８６：

MNFQQRLQSLWTLASRPFCPPLLATASQMQMVVLPCLGFTLLLWSQVSGAQGQEFHF
GPCQVKGVVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNITSARLLQQEVLQNVSDAESCYLVHTLL
EFYLKTVFKNYHNRTVEVRTLKSFSTLANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLF
RRAFKQLDVEAALTKALGEVDILLTWMQKFYKL（配列番号８６）

に示されるアミノ酸配列を有するヒトインターロイキン‐２４、またはその断片もしくはバリアントである。

【０１２１】

様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号８６の配列との、例えば少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９９％の観察された相同性を共有するアミノ酸配列を含有する。

【０１２２】

ＩＬ‐２６は、特異的にヘルペスウイルスサイミリ形質転換Ｔ細胞中での過剰発現によって識別された。このコードされたタンパク質は、サイトカインのＩＬ‐１０ファミリーのメンバーである。これは、分泌タンパク質であり、ホモ二量体として機能することができる。このタンパク質は、ヘルペスウイルスサイミリによる感染後に形質転換されたＴ細胞の表現型に寄与すると考えられる（Corvaisier M, et al. PLoS Biol, 10(9):e1001395, 2012）。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号８７：

MLVNFILRCGLLLVTLSLAIAKHKQSSFTKSCYPRGTLSQAVDALYIKAAWLKATIPEDRI
KNIRLLKKKTKKQFMKNCQFQEQLLSFFMEDVFGQLQLQGCKKIRFVEDFHSLRQKLS
HCISCASSAREMKSITRMKRIFYRIGNKGIYKAISELDILLSWIKKLLESSQ
（配列番号８７）

に示されるアミノ酸配列を有するヒトインターロイキン‐２６、またはその断片もしくはバリアントである。

【０１２３】

様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号８７の配列との、例えば少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９９％の観察された相同性を共有するアミノ酸配列を含有する。

【０１２４】

重要なことには、開裂性リンカーを持たない非天然融合分子は、例えばＩＬ‐１０に対する受容体も発現する（しかし、非常により少ない量で）免疫細胞の表面での修飾コリックス毒素の（１もしくは複数の）その受容体によるアンカー効果によって、ターゲット細胞の表面でのＩＬ‐１０のより高い露出を可能とすることができ、コリックスのその受容体との結合およびＩＬ‐１０のＩＬ‐１０Ｒとの結合を介する相乗効果を得ることができるという点で有利であり得る。

【０１２５】

腫瘍壊死因子スーパーファミリー

腫瘍壊死因子は、対応する受容体のスーパーファミリー（以降「ＴＮＦＳＦＲ」）と相互作用する増殖能の高いサイトカインのスーパーファミリー（以降「ＴＮＦＳＦ」）である。約２５年前に腫瘍壊死因子‐アルファ（「ＴＮＦ‐α」）が発見されて以来、ＴＮＦＳＦは、３０を超える受容体を通してシグナル伝達する２０を超えるメンバーから成る関連するタンパク質の大きいファミリーとなった（例えば、“Therapeutic Targets of the TNF Superfamily”, edited by Iqbal S. Grewal, Landes Bioscience/Springer Science+Business Media, LLC dual imprint / Springer series: Advances in Experimental Medicine and Biology, 2009を参照）。ＴＮＦＳＦのメンバーは、広く組織中に分布して

おり、ＴＮＦＳＦリガンド‐受容体相互作用は、活性化、増殖、分化、およびアポトーシスを含む造血から多面細胞応答（pleiotropic cellular responses）までの数多くの生物学的プロセスに関与している。ＴＮＦＳＦリガンド‐受容体相互作用は、腫瘍発生、移植片拒絶、敗血症性ショック、ウィルス複製、骨吸収、および自己免疫とも関連付けられている。特定の応答は、シグナル伝達する受容体、細胞型、および細胞が同時に受けるシグナルに依存する。

【０１２６】

ＴＮＦＳＦメンバーの多くが腫瘍細胞で発現されることから、これらの分子をターゲットとする抗体ベースの治療法が開発中であり、いくつかについては、現在臨床試験が行われている（例：肉腫および黒色腫の治療においてヒトに使用するためのＴＮＦ‐α）（Eggermont et al., Lancet Oncol, 4:429-437, 2003；Lans et al., Clin Cancer Res, 7:784-790, 2001）。加えて、これらの分子の多くは、抗体薬物複合体（例：ＣＤ３０およびＣＤ７０）のターゲットとして、または放射免疫療法用（例：ＢＬｙＳ受容体　ＴＡＣＩおよびＢＲ３）としても開発が行われつつある（Buchsbaum et al., J Nucl Med, 44:434-436, 2003）。

【０１２７】

同様に、いくつかのＴＮＦＳＦメンバーは、病原体に対する防御、炎症応答、および自己免疫性などの自然および適応免疫応答の両方に関連付けられていることから、自己免疫性およびその他の炎症性疾患の治療のためにＴＮＦＳＦ受容体およびリガンドの多くをターゲットとする手法が開発されつつある。実際、ヒト化／ヒトモノクローナル抗体（例：インフリキシマブ（ＲＥＭＩＣＡＤＥ（登録商標））またはアダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ（登録商標））またはＩｇＧおよび可溶性ＴＮＦＳＦ受容体の組み換え融合タンパク質（例：エタネルセプト（ＥＮＢＲＥＬ（登録商標））を含むいくつかの生物学的ＴＮＦ遮断治療剤（以降「ＴＮＦ阻害剤」）が開発され、現在、クローン病および関節リウマチに伴う炎症を抑制するためにヒトに用いられている（Mitoma et al., Arthritis Rheum, 58:1248-1257, 2008；Shealy et al., Handb Exp Pharmacol, 181:101-129, 2008）。従って、そのような剤を、腸管粘膜および肺粘膜を含むがこれらに限定されない部位に局所的に送達することができれば、有効性および安全性におけるさらなる有益性が得られることになる。

【０１２８】

これらの様々なＴＮＦ阻害剤は、ヒトでの治療用として承認され、ヒト患者において良好に用いられているが、これらのＴＮＦ阻害剤に伴ういくつかの毒性は依然として存在しており、例えば、肝毒性、血栓塞栓性合併症、ならびに結核およびリンパ腫の発症リスクの上昇である（Gardam et al., Lancet Infect Dis, 3:148-155, 2003）。さらに、疾患の進行の停止には有効であるが、これらの剤は、非常に高価であり、一般的には静脈内もしくは皮下投与され、疾患を治癒するものではない。ＴＮＦＳＦメンバーのシグナル伝達の継続的な研究が、組織特異的介入の手法を開発するためには必要であり、これは、副作用のより少ないターゲット療法を可能とし得るものである。

【０１２９】

様々な実施形態では、生物活性カーゴは、単離された抗体または抗体断片であるＴＮＦ阻害剤である。本発明のコンストラクトおよび方法に有用である単離された抗体および抗体断片としては、限定されないが、モノクローナルＡｂ（ｍＡｂ）、ポリクローナルＡｂ、Ａｂ断片（例：Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、Ｆｃなど）、キメラＡｂ、ミニＡｂもしくはドメインＡｂ（ｄＡｂ）、二重特異性Ａｂ、二特異性Ａｂ、ヘテロ接合体Ａｂ、一本鎖Ａｂ（ＳＣＡ）、一本鎖可変領域断片（ＳｃＦｖ）、１つのＡｂ部分もしくは複数のＡｂ部分を含む融合タンパク質、ヒト化Ａｂ、完全ヒトＡｂ、および必要とされる特異性の抗原認識部位を含む免疫グロブリン（Ｉｇ）分子のその他のいずれかの修飾された構成が挙げられる。

【０１３０】

抗ＴＮＦ‐α抗体.　ＦＤＡ承認抗ＴＮＦ‐α抗体、アダリムマブ（Ａｂｂｖｉｅ　Ｈ

ＵＭＩＲＡ（登録商標）；ＤｒｕｇＢａｎｋ　ＤＢ　００００５１）が、ヒトでの治療に用いられている。本発明の様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号８８：
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGK
GLEWVSAITWNSGHIDYADSVERGFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
（配列番号８８）
に示される重鎖可変領域配列、および配列番号８９：
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAA
STLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC（配列番号８９）
に示される軽鎖可変領域配列を含むヒト抗体もしくは抗原結合断片、またはその抗原結合もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片である。

【０１３１】

様々な実施形態では、本発明は、重鎖および軽鎖を含む抗体を提供し、ここで、重鎖は、重鎖可変領域を含み、およびここで重鎖可変領域は、配列番号８８に示されるアミノ酸配列に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列を含み；ならびにここで、軽鎖は、軽鎖可変領域を含み、およびここで軽鎖可変領域は、配列番号８９のいずれに示されるアミノ酸配列に対しても、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列を含み；ここで、抗体は、ヒトＴＮＦ‐αと特異的に結合する。

【０１３２】

ＦＤＡ承認抗ＴＮＦ‐α抗体、インフリキシマブ（Ｃｅｎｔｏｃｏｒ　ＲＥＭＩＣＡＤＥ（登録商標）；ＤｒｕｇＢａｎｋ　ＤＢ　００００６５）が、ヒトの治療に用いられている。本発明の様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号９０：
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQA
PGKGLEWVAIISFDGSNKSSADSVKGRFTUSRRNSKNALFLQM
NSLRAEDTAVFYCARDRGVSAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
（配列番号９０）
に示される重鎖可変領域配列、および配列番号９１：
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA
PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTRFTLTISSLEPEDFAVYYC
QQRSNWPPFTFGPGTKVDIL（配列番号９１）
に示される軽鎖可変領域配列を含むヒト抗体もしくは抗原結合断片、またはその抗原結合もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片である。

【０１３３】

様々な実施形態では、本発明は、重鎖および軽鎖を含む抗体を提供し、ここで、重鎖は、重鎖可変領域を含み、およびここで重鎖可変領域は、配列番号９０に示されるアミノ酸配列に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列を含み；ならびにここで、軽鎖は、軽鎖可変領域を含み、およびここで軽鎖可変領域は、配列番号９１のいずれに示されるアミノ酸配列に対しても、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９

９％の同一性を有する配列を含み；ここで、抗体は、ヒトＴＮＦ－αと特異的に結合する。

【０１３４】

いくつかの他のＴＮＦＳＦリガンドまたはＴＮＦＳＦＲに対する抗体が、文献に報告され、様々な炎症性疾患、自己免疫性疾患、および癌の治療または予防における治療薬候補として評価されている。指定のＴＮＦＳＦポリペプチドまたはＴＮＦＳＦＲに対する抗体のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、公開データベースから容易に入手可能である。そのような抗体、さらには追加のＴＮＦ阻害剤の包括的なレビューは、そのようなＴＮＦ阻害剤を教示する目的でその全内容が参照により本明細書に援用される“Therapeutic Targets of the TNF Superfamily”, edited by Iqbal S. Grewal, Landes Bioscience/Springer Science+Business Media, LLC dual imprint / Springer series: Advances in Experimental Medicine and Biology, 2009に提供される。

【０１３５】

様々な実施形態では、生物活性カーゴは、可溶性受容体または可溶性コリガンドを含むＴＮＦＳＦ阻害剤である。「可溶性受容体」、「可溶性サイトカイン受容体」（ＳＣＲ）、および「イムノアドヘシン」の用語は、交換可能に用いられ、ＴＮＦＳＦメンバーの受容体を例とする受容体の細胞外ドメイン、およびＩｇ配列を含む可溶性キメラ分子を意味し、これは、受容体の結合特異性を維持し、ＴＮＦＳＦメンバーと結合することができる。様々な実施形態では、ＴＮＦＳＦＳＣＲは、ＴＮＦＳＦメンバーと結合することができるＴＮＦＳＦメンバー細胞外ドメインからのＴＮＦＳＦＲアミノ酸配列（またはその一部分）（ある実施形態では、ＴＮＦＳＦＲの結合特異性を実質的に維持するアミノ酸配列）およびＩｇ配列の融合物を含む。２つの別個の種類のＴＮＦＳＦＲ：Ｉ型　ＴＮＦＳＦＲ（ＴＮＦＳＦＲ　Ｉ）およびＩＩ型　ＴＮＦＳＦＲ（ＴＮＦＳＦＲ　ＩＩ）が存在することが知られている。様々な実施形態では、ＴＮＦＳＦ受容体は、ヒトＴＮＦＳＦ受容体配列であり、融合物は、Ｉｇ定常ドメイン配列との融合物である。他の実施形態では、Ｉｇ定常ドメイン配列は、Ｉｇ重鎖定常ドメイン配列である。他の実施形態では、２つのＴＮＦ受容体－Ｉｇ重鎖融合物の会合（例：（１もしくは複数の）ジスルフィド結合による共有結合を介して）の結果として、ホモ二量体Ｉｇ様構造が得られる。

【０１３６】

本発明において有用である市販の可溶性受容体の例は、ＥＮＢＲＥＬ（登録商標）（エタネルセプト）である。ＥＮＢＲＥＬ（登録商標）は、ヒトＩｇＧ１のＦｃ部分と連結されたヒト７５キロダルトン（ｐ７５）腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）の細胞外リガンド結合部分から成っている組換えヒトＴＮＦＲ－ｐ７５－Ｆｃ二量体融合タンパク質から成る。エタネルセプトのＦｃ成分は、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメイン、およびヒンジ領域を含有するが、ＩｇＧ１のＣＨ１ドメインは含有しない。エタネルセプトは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）哺乳類細胞発現系における組換えＤＮＡ技術によって作製される。それは、９３４のアミノ酸から成る。この産物は、ヒトＴＮＦＲ－ｐ７５の可溶性部分のＤＮＡをＩｇＧのＦｃ部分と共にコードすることによって作製される。本発明の様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号９２：

LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTS
DTVCDSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSSDQVETQACTREQNRICTCRPG
WYCALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTSS
TDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQ
HTQPTPEPSTAPSTSFLLPMGPSPPAEGSTGDEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK（配列番号９２）

に示される配列を含む二量体融合タンパク質、またはその断片もしくはバリアントである

ＴＮＦ阻害剤である。

【０１３７】

様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号９２の配列に対する少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９９％の同一性の観察された相同性を共有するアミノ酸配列を含有する。

【０１３８】

ＴＮＦ阻害剤が誘導され、本発明のコンストラクトおよび方法における生物活性カーゴとして用いられる適切なＴＮＦＳＦリガンドおよびＴＮＦＳＦＲの説明のためであるが限定するものではないリストを表２に示す。

【０１３９】

表2

TNFSF リガンド	RefSeq（タンパク質）
腫瘍壊死因子 -α ("TNF-α")	NP_000585.2
リンホトキシン-α ("LT-α")	NP_ 000586.2
リンホトキシン -β ("LT-β")	NP_002332.1
CD30 リガンド	NP_ 001235.1
CD40 リガンド	NP_000065.1
CD70 リガンド	NP_001243.1
OX40 リガンド	NP_001284491.1
41BB リガンド	NP_ 001552.2
Apo1 リガンド (またはFasL またはCD95L)	NP_ 000630.1
Apo2 リガンド (またはTRAIL, AIM-1またはAGP-1)	NP_ 001177871.1
Apo3 リガンド (またはTWEAK)	NP_003800.1
APRIL	NP_ 001185551.1
LIGHT	NP_ 003798.2
OPG リガンド (またはRANK リガンド)	NP_ 003692.1
BlyS (またはTHANK)	NP_ 001139117.1
BCMA	NP_ 001183.2
TACI	NP_ 036584.1
TNFSFRs	
TNFR1	NP_001056.1
TNFR2	NP_001057.1
リンホトキシン-βR	NP_001257916.1
CD40	NP_001241.1
CD95 (またはFAS またはAPO-1)	NP_000034.1
OPG	NP_ 002537.3
RANK	NP_ 001257878.1
CD30	NP_001234.3
CD27	NP_001233.1
OX40 (またはCD134)	NP_003318.1
41BB	NP_ 001552.2

表2は次頁につづく

NGFR	NP_002498.1
BCMA	NP_001183.2
TAC1	NP_036584.1
EDA2R	NP_001186616.1
TROY	NP_001191387.1
DR6	NP_055267.1
DR5 (またはTRAILR2)	NP_003833.4
DR4	NP_003835.3
DR3	NP_001034753.1
HVEM	NP_001284534.1
LTβR	NP_001257916.1
GITR	NP_004186.1
DcR3	NP_003814
Fn14 (またはTWEAKR)	NP_057723.1
BAFF	NP_443177.1

【０１４０】
血糖降下剤
様々な実施形態では、生物活性カーゴは、血糖降下剤である。様々な実施形態では、血糖降下剤は、約５、約６、約７、約８、約９、約１０、約１１、約１２、約１３、約１４、約１５、約１６、約１７、約１８、約１９、約２０、約２５、約３０、約３５、約４０、約４５、約５０、約５５、約６０、約６５、約７０、約７５、約８０、約８５、約９０、約９５、約１００、約１５０、約２００、約２５０、約３００、約４００、約５００、約６００、約７００、約８００、約９００、または約１０００のアミノ酸を含むペプチドである。
【０１４１】
本開示の融合分子における血糖降下剤として用いられるべき、または血糖降下剤として用いられることが考慮される血糖降下剤が誘導され得る適切な糖代謝関連タンパク質の説明のためであるが限定するものではないリストを表３に示す。
【０１４２】

表３

糖代謝関連タンパク質	RefSeq (NCBI/Uniprot)
グルカゴンプロタンパク質	NP_002045.1
グルカゴンペプチド	NP_002045.1 (aa 53-81)
グルカゴン様ペプチド1	NP_002045.1 (aa 98-128)
グルカゴン様ペプチド2	NP_002045.1 (aa 146-178)
グリセンチン	P01275 (aa 21-89)
グリセンチン関連ポリペプチド	P01275 (aa 21-50)
胃抑制ポリペプチド前タンパク質	NP_004114.1
胃抑制ポリペプチド	NP_004114.1 (aa 52-93)
ジペプチジルペプチダーゼ4	P27487
グルコース輸送体メンバー4	NP_001033.1
プレプログルカゴン	AAA52567.1
インスリン受容体基質1	NP_005535.1
インスリン	P01308
アポリポタンパク質 A-II	P02652
溶質輸送体ファミリー2、促進グルコース輸送体メンバー1	P11166
グリコーゲンシンターゼ1	P13807
グリコーゲンシンターゼ2	P54840
チロシンタンパク質ホスファターゼ非受容体型1	P18031
RAC-アルファ セリンスレオニンタンパク質キナーゼ	P31749
ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマ	P37231
ヘキソキナーゼ3	P52790
ホスファチジルイノシトール-3,4,5-トリリン酸3-ホスファターゼおよび二重特異性タンパク質	P60484
ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ1	Q15118
カルシウム結合およびコイルドコイルドメイン含有タンパク質1	Q9P1Z2
Max様タンパク質X	Q9UH92
フルクトースニリン酸アルドラーゼA	P04075
グルカゴン様ペプチド1受容体	P43220
グルカゴン様ペプチド2受容体	O95838
胃抑制ポリペプチド受容体	P48546
インスリン様成長因子1受容体	P08069.1
インスリン様成長因子2受容体	P11717.3
インスリン受容体	P06213
GLP-1 アゴニスト-エキセナチド	DB01276
GLP-1 アゴニスト-リラグルチド	DB06655

【０１４３】

グルカゴン前駆体プレプログルカゴンの組織特異的翻訳後プロセッシングによって腸管Ｌ細胞で合成されるプログルカゴンインクレチンファミリーのメンバーであるグルカン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）は、食欲および満腹の制御と関連付けられる強力な血糖降下剤

である。ＧＬＰ‐１は、ＧＬＰ‐１受容体（ＧＬＰ‐１Ｒ）を通して作用し、それは、脳、膵臓、腸、肺、胃、および腎臓を含む組織中に広く分布されている。ＧＬＰ‐１の効果は、周囲のグルコース濃度に応じて、インスリン分泌性およびインスリン様の両方であると考えられる。膵臓からのインスリン分泌の増加、アルファ細胞およびベータ細胞の両方におけるインスリン感受性の増加、ならびに膵臓からのグルカゴン分泌の減少を行うその能力のために、ＧＬＰ‐１およびその類似体は、糖尿病のための治療戦略として非常に関心を集めてきた。

【０１４４】

いくつかの臨床試験により、進行中のインスリン療法と合わせてＧＬＰ‐１アゴニストを添加する研究が行われ、いくつかのＧＬＰ‐１アゴニストが、Ｔ２Ｄの治療用として承認されており、例えば、エキセナチド（商品名Ｂｙｅｔｔａ（登録商標）、アミリン（Amylin）／アストラゼネカ（Astrazeneca））；リラグルチド（商品名Ｖｉｃｔｏｚａ（登録商標）、ノボノルディスク社（Novo Nordisk A/S））；リキシセナチド（商品名Ｌｙｘｕｍｉａ（登録商標）、サノフィ（Sanofi））；アルビグルチド（商品名Ｔａｎｚｅｕｍ（登録商標）、グラクソスミスクライン（GlaxoSmithKline））；デュラグルチド（商品名Ｔｒｕｌｉｃｉｔｙ（登録商標）、エリリリー（Eli Lilly））が挙げられる。有効性が証明された一方で、ＧＬＰ‐１アゴニストの臨床使用に伴う主たる欠点は、生物学的半減期が短いことであり、このため、静脈内、または頻繁な皮下注射による連続的な投与が必要となり、現在までに承認されているＧＬＰ‐１薬物はすべて、１日２回または週１回のペースで皮下投与される。さらに、これらのＧＬＰ‐１アゴニストの使用に伴う安全性の懸念も存在し、すなわち、膵臓炎および膵臓腫瘍、低血糖、ならびに腎機能障害である。報告されているその他の副作用としては、胃腸障害が挙げられ、消化不良、食欲不振、悪心、嘔吐、腹痛、下痢、眩暈、頭痛、および緊張不安感（feeling jittery）などである。このため、より長時間持続する天然ＧＬＰ‐１の類似体の作製、ならびにＴ２Ｄ患者に対する注射頻度を減少させるための持続放出およびその他の関連技術の開発に向けた幅広い研究が続けられている。

【０１４５】

様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号９３：
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS（配列番号９３）
に示されるアミノ酸配列を有するＧＬＰ‐１アゴニスト、またはその断片もしくはバリアントである。

【０１４６】

様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号９３の配列との、例えば少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９９％の観察された相同性を共有するアミノ酸配列を含有する。

【０１４７】

様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号９４：
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEEFIIAWLVKGRG（配列番号９４）
に示されるアミノ酸配列を有するＧＬＰ‐１アゴニスト、またはその断片もしくはバリアントである。

【０１４８】

様々な実施形態では、生物活性カーゴは、配列番号９４の配列との、例えば少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９９％の観察された相同性を共有するアミノ酸配列を含有する。

【０１４９】

ヒト成長ホルモン

成長ホルモン（ＧＨ）（ソマトロピンまたはソマトトロピンとしても知られる）は、人体における支配的なホルモンであり、内分泌系によって合成、分泌される。このホルモン

は、身体の様々な器官にある細胞の成長および複製といった必須機能を制御する。ＧＨの必須機能のいくつかとしては、筋肉成長の制御、骨のミネラル化および強度の向上、脂肪沈着の低減、ならびに良好なエネルギーレベルの維持が挙げられる。成長ホルモンの産生および分泌は、成長ホルモン放出ホルモン（ＧＨＲＨ）によって制御され、それは、視床下部によって分泌される。ＧＨＲＨは、下垂体を刺激してＧＨを産生させ、それは、血流中に直接放出される。続いてＧＨは、肝臓を刺激してインスリン様成長因子（ＩＧＦ‐１）を産生し、これが、コンドロサイト（軟骨細胞）の増殖を刺激し、筋芽細胞の分化を促進し、およびタンパク質合成を高め、次にこのことが、他の筋肉および組織細胞の成長を補助する。

【０１５０】

米国では、合成によって作製されたヒト成長ホルモン（ＨＧＨ）が、成長ホルモン欠乏症（ＧＨＤ）に起因する低身長、ターナー症候群（ＴＳ）、ヌーナン症候群、プラダー・ウィリ症候群、低身長ホメオボックス含有遺伝子（ＳＨＯＸ）欠損症、慢性腎不全、特発性低身長、および小児の胎内発育遅延を治療するために、小児集団に用いられてきた。成人では、ＨＧＨは、短腸症候群、重篤な腸疾患または小腸の大部分の外科切除に起因して栄養が適切に吸収されない状態、稀な下垂体腫瘍またはその治療に起因するＧＨ欠乏症、およびＨＩＶ／ＡＩＤＳに伴う筋消耗性疾患の治療に用いられてきた。

【０１５１】

成長ホルモン欠乏症（ＧＨＤ）は、脳の基部に位置していくつかのホルモンの産生を担っている小さな腺である下垂体前葉からの成長ホルモン（ＧＨ）の不適切な分泌を特徴とする異なる病態の群を含む稀な障害である。ＧＨＤは、単独で、またはその他の下垂体ホルモン欠乏症と組み合わせて発生し得る。ＧＨＤは、出生時から存在する場合もあり（先天性）、または外傷、浸潤、腫瘍、または放射性療法の結果として後天的に獲得される場合もある。原因が未知である第三のカテゴリーも存在する（特発性）。小児期発症ＧＨＤは、先天性、後天性、または特発性の３つすべてがあり得る。それは、小児の暦年に対して不充分である四肢の骨の伸長の遅延に反映される発育遅延、低身長、成熟遅延をもたらす。成人発症ＧＨＤは、下垂体腫瘍または脳の外傷から獲得される場合が最も多いが、特発性もあり得る。それは、エネルギーレベルの低下、身体組成の変化、骨粗鬆症（骨のミネラル密度の減少）、筋力低下、ＬＤＬまたはコレステロールレベルの上昇などの脂質異常、インスリン抵抗性、および心機能障害を含む数多くの不定の症状を特徴とする。成人ＧＨＤは、毎年１０万人に１人が発症すると推計されているが、小児期発症ＧＨＤ患者を考慮すると、その発症率は、１０万人の集団あたりおよそ２人のケースである。そのケースの約１５～２０％は、小児ＧＨＤの成人への移行を表している（Stochholm K et al., Eur J Endocrinol., 155:61-71, 2006）。

【０１５２】

ターナー（またはウルリッヒ‐ターナー）症候群（ＴＳ）は、全Ｘ染色体が存在しないこと、またはその染色体内の欠失を特徴とし、女性の発育に影響を与える染色体異常である。ターナー症候群の最も一般的な特徴は低身長であり、それは５歳頃までに明らかとなる。この病状は、全世界で２５００人の新生女児に約１人の割合で発生するが、出産日まで生存しない妊娠（流産および死産）の中ではこれよりも非常に多く発生している。染色体の病状であることから、ターナー症候群を完治する方法は存在しない。

【０１５３】

組換えＤＮＡ由来ヒト成長ホルモンは、特にＧＨＤおよびＴＳの治療のために承認された唯一の薬物である。２００５年時点で米国で入手可能である様々な組換えヒト成長ホルモン（注射用のソマトロピン［ｒＤＮＡ由来］とも称される）（およびその製造業者）としては、ＮＵＴＲＯＰＩＮ（登録商標）（ジーンテック（Genentech））、ＨＵＭＡＴＲＯＰＥ（登録商標）（リリー（Lilly））、ＧＥＮＯＴＲＯＰＩＮ（登録商標）（ファイザー（Pfizer））、ＮＯＲＤＩＴＲＯＰＩＮ（登録商標）（ノボ（Novo））、およびＳＡＩＺＥＮ（登録商標）（メルクセロノ（Merck Serono））が含まれた。２００６年、米国食品医薬品局（ＦＤＡ）は、ＯＭＮＩＴＲＯＰＥ（登録商標）（サンドス（Sandoz））と

称するｒＨＧＨのバージョンを承認した。徐放型のヒト成長ホルモン、ＮＵＴＲＯＰＩＮ　ＤＥＰＯＴ（登録商標）（ジーンテック／アルケルメス（Alkermes））が、１９９９年にＦＤＡによって承認され、注射回数を減少させることができたが（毎日ではなく、２または４週間に１回）、２００４年、経済的理由により、ジーンテック／アルケルメスによるこの製品の生産は中止となった。承認されたさらなる組換えＨＧＨ品としては、短腸症候群用のＳＥＲＯＳＴＩＭ（登録商標）（ＥＭＤセロノ）、ＴＥＶ‐ＴＲＯＰＩＮ（登録商標）（テバ（Teva））、およびＺＯＲＢＩＴＩＶＥ（登録商標）（メルクセロノ）が挙げられる。

【０１５４】

ＧＨＤなどの成長障害の管理のための最も効果的で自然であり、信頼性の高い治療オプションであることが証明されたものの、これらの注射用ｒＨＧＨは、いくつかの著しい欠点を有しており、それらとしては、例えば、１）長期間にわたる使用および高用量に伴う、重篤で不可逆的な合併症であり、例えば、糖尿病、心血管障害、および結腸癌発症の可能性が挙げられる。その他の一般的な副作用としては：関節痛、全身性浮腫、重篤頭痛、低血糖、手首痛（手根管症候群）、アテローム動脈硬化症を発症する可能性を高める血中のＬＤＬレベルの上昇などが挙げられる。２）ＨＧＨ注射は、店頭で購入できないが、しかしながら、ＦＤＡの柔軟性のない基準のために、ブラックマーケットがはびこっている。医師の処方箋なしにＨＧＨ注射液を購入することは、法律違反と見なされ、懲役および罰金によって法の下に罰せられる。そして３）治療のコストが膨大である。製薬会社によって異なるが、ＨＧＨ注射による１ヶ月間の治療のコストは、典型的には、８００ドルから３０００ドルの間の範囲である。４つ目としては、ｒＨＧＨを用いる従来の方法は、典型的には、ＨＧＨが皮下注射を介して投与される複数回投与レジメンを含む。そのような方法に伴う不便さ、痛み、および社会的烙印は、著しいものとなり得る。成長ホルモン欠乏症（ＧＨＤ），ターナー症候群（ＴＳ）、および関連する障害に起因する低身長をこのような侵襲性の高い反復療法によって治療するために小児集団を管理することは、特に困難であり得る。

【０１５５】

完全長ヒトＨＧＨは、１９１のアミノ酸から成る。分子生物学的技術を用いて作製されるＨＧＨは、天然ＨＧＨと同一のアミノ酸配列を有していてよい。別の選択肢として、用いられるＨＧＨは、自然ホルモンに対してアミノ酸配列に１つ以上の変異を含むＨＧＨ類似体であってもよい。これらのアミノ酸変異は、生物活性の向上、またはその他のいくつかの生物学的もしくはロジスティックな利点を提供し得る。様々な実施形態では、組換えＨＧＨは、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号Ｐ０１２４１に示されるアミノ酸配列を含む。ＨＧＨアミノ酸配列（Ｐ０１２４１の２６ａａシグナル配列を除く）を、配列番号９５に示す：

FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFS
ESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNV
YDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLL
YCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF（配列番号９５）

【０１５６】

本開示のＨＧＨは、配列番号９５の配列を有するいずれの源からのＨＧＨも意味し、いずれの源から、または固相合成を用いることを例とする化学合成から得られた単離、精製、および／または組換えＨＧＨも含む。また、自然ＨＧＨの保存的アミノ酸置換も本発明に含まれる。例えば、タンパク質またはペプチドの一次配列を変化させるが、通常はその機能は変化させない保存的なアミノ酸の変更が行われてよい。保存的アミノ酸置換は、典型的には、以下の群の中での置換を含む：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、スレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。様々な実施形態では、ＨＧＨは、配列番号９５の配列との、例えば少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９９％の観察された相同性を共有するアミ

ノ酸配列を有する。

【０１５７】

様々な実施形態では、本開示の融合分子での使用が考慮されるＨＧＨは、本技術分野にて幅広く報告されてきたヒト成長ホルモンバリアントおよび変異体を含む（例えば、そのような成長ホルモンのバリアントおよび変異体を提供する特定の目的のために各々その全内容が参照により本明細書に援用される米国特許第８，６３７，６４６号（Wells et al.）およびそこに引用されている参考文献、ならびに米国特許出願第２０１１０１３０３３１号（Guyon et al.）参照）。

【０１５８】

様々な実施形態では、本開示の融合分子での使用が考慮されるＨＧＨは、例えば、ＮＵＴＲＯＰＩＮ（登録商標）（ジーンテック）、ＨＵＭＡＴＲＯＰＥ（登録商標）（リリー）、ＧＥＮＯＴＲＯＰＩＮ（登録商標）（ファイザー）、ＮＯＲＤＩＴＲＯＰＩＮ（登録商標）（ノボ）、ＳＡＩＺＥＮ（登録商標）（メルクセロノ）、ＯＭＮＩＴＲＯＰＥ（登録商標）（サンドス）、ＳＥＲＯＳＴＩＭ（登録商標）（ＥＭＤセロノ）、ＴＥＶ‐ＴＲＯＰＩＮ（登録商標）（テバ）、およびＺＯＲＢＩＴＩＶＥ（登録商標）（メルクセロノ）が挙げられる。

【０１５９】

本開示の融合分子における成長ホルモンとして用いられるべき、または成長ホルモンとして用いられることが考慮される成長ホルモンが誘導され得る適切な成長ホルモンタンパク質の説明のためであるが限定するものではないリストを表４に示す。

【０１６０】

表4

成長ホルモン関連タンパク質	RefSeq (NCBI/Uniprot)
ソマトトロピン	P01241
合成ヒト成長ホルモン	AAA72260.1
合成ヒト成長ホルモン　一部分	CAA01435
合成ヒト成長ホルモン　一部分	CAA00380
ヒト成長ホルモン2	P01242
ソマトリベリン	P01286.1
食欲調節ホルモン	Q9UBU3
レプチン	P41159
成長ホルモン受容体タンパク質	
成長ホルモン受容体	P10912
成長ホルモン放出ホルモン受容体	Q02643
成長ホルモン分泌促進因子受容体	Q92847
成長ホルモン放出ホルモン受容体形態ａ	P78470
成長ホルモン受容体	E9PCN7

【０１６１】

生物活性カーゴの結合のための挿入部位

融合分子の生物活性カーゴは、当業者に公知の限定されないいずれの方法によって融合分子の残りの部分と結合されてもよい。生物活性カーゴは、修飾コリックス毒素の細胞結合またはトランスサイトーシス活性を阻害することのない融合分子のいずれの部分に導入

されてもよい。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、修飾コリックス毒素のＮ末端またはＣ末端に直接カップリングされる。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、修飾コリックス毒素のアミノ酸の側鎖と接続されてよい。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、非開裂性ペプチドリンカーによって修飾コリックス毒素とカップリングされる。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、開裂性リンカーによって修飾コリックス毒素とカップリングされ、それによって、（１もしくは複数の）開裂性リンカーでの開裂により、融合分子の残りの部分から生物活性カーゴが分離される。様々な実施形態では、生物活性カーゴは、開裂性リンカーの開裂後もポリペプチドに結合した状態が維持される短鎖リーダーペプチドも含んでよいポリペプチドである。例えば、生物活性カーゴは、１アミノ酸超、５アミノ酸超、１０アミノ酸超、１５アミノ酸超、２０アミノ酸超、２５アミノ酸超、３０アミノ酸超、５０アミノ酸超、または１００アミノ酸超の短鎖リーダーペプチドを含んでよい。ある場合では、生物活性カーゴは、１００アミノ酸未満、５０アミノ酸未満、３０アミノ酸未満、２５アミノ酸未満、２０アミノ酸未満、１５アミノ酸未満、１０アミノ酸未満、または５アミノ酸未満の短鎖リーダーペプチドを含んでよい。ある場合では、生物活性カーゴは、１～１００アミノ酸、５～１０アミノ酸、１０から５０アミノ酸、または２０から８０アミノ酸の短鎖リーダーペプチドを含んでよい。自然のコリックス毒素では、ドメインＩｂループは、アミノ酸３８７から４２５までにわたり、構造的には、３９５番目および４０２番目の位置にある２つのシステイン間のジスルフィド結合を特徴とする。コリックス毒素のこのドメインＩｂ部分は、細胞結合、トランスロケーション、ＥＲ残留、またはＡＤＰリボシル化活性を含むコリックス毒素の公知のいずれの活性に対しても必須ではない。従って、ドメインＩｂは、完全に欠失されてよく、または生物活性カーゴを含有するように修飾されてもよい。従って、様々な実施形態では、生物活性カーゴは、コリックス毒素ドメインＩｂに挿入されてよい。所望される場合、生物活性カーゴは、３９５番目および４０２番目の位置にある架橋されていないシステイン間のコリックス毒素ドメインＩｂに挿入されてよい。これは、これらのシステイン間のジスルフィド結合を還元すること、一方もしくは両方のシステインをＩｂドメインから完全に欠失させること、一方もしくは両方のシステインを、セリンを例とする他の残基へ変異させること、またはその他の類似の技術によって達成することができる。別の選択肢として、生物活性カーゴは、３９５番目および４０２番目の位置にあるシステイン間のドメインＩｂループに挿入されてもよい。そのような実施形態では、これらのシステイン間のジスルフィド結合を用いて、生物活性カーゴドメインを拘束することができる。

【０１６２】

生物活性カーゴが融合分子の別の部分と一緒に融合タンパク質として発現される実施形態では、生物活性カーゴは、当業者に公知の限定されないいずれの方法によって融合分子中に挿入されてもよい。例えば、生物活性カーゴに対応するアミノ酸が、自然アミノ酸配列の欠失を伴って、または伴わずに、融合分子中に直接挿入されてよい。様々な実施形態では、コリックス毒素のＩｂドメインのすべて、または一部分が欠失されて、生物活性カーゴで置き換えられてよい。様々な実施形態では、Ｉｂループのシステイン残基が、生物活性カーゴが非拘束状態で維持されるように欠失される。他の実施形態では、Ｉｂループのシステイン残基がジスルフィド結合で連結されて、生物活性カーゴを拘束する。

【０１６３】

生物活性カーゴが融合分子の残りの部分と一緒に融合タンパク質として発現されない実施形態では、生物活性カーゴは、当業者に公知の限定されない適切ないずれの方法によって融合分子の残りの部分と接続されてもよい。より具体的には、受容体結合ドメインを分子の残りの部分と接続するための上述した代表的な方法は、生物活性カーゴの分子の残りの部分との接続に同等に適用可能である。

【０１６４】

融合タンパク質の作製

様々な実施形態では、非天然融合分子は、組換えＤＮＡ法を用いて合成される。一般的には、これは、融合分子をコードするＤＮＡ配列の作製、特定のプロモーターの支配下の

発現カセット中へのこのＤＮＡの配置、ホスト中での分子の発現、発現された分子の単離、および必要に応じて、分子の再生を含む。

【０１６５】

本明細書で述べる融合分子（例：コリックス^{415}－ＩＬ‐１０）をコードするＤＮＡは、例えば、適切な配列のクローニングおよび制限処理、またはNarang et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 90-99のリン酸トリエステル法；Brown et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 109-151のリン酸ジエステル法；Beaucage et al. (1981) Tetra. Lett., 22: 1859-1862)のジエチルホスホラミダイト法；米国特許第４，４５８，０６６号の固体支持法（solid support method）などの方法による直接化学合成を含む適切ないかなる方法によって作製されてもよい。

【０１６６】

化学合成では、一本鎖オリゴヌクレオチドが作製される。これは、相補配列によるハイブリダイゼーションによって、またはこの一本鎖をテンプレートとして用いたＤＮＡポリメラーゼによる重合によって二本鎖ＤＮＡに変換することができる。当業者であれば、ＤＮＡの化学合成は、約１００塩基の配列に限定されるが、短い配列のライゲーションによってより長い配列を得ることができることは認識される。

【０１６７】

別の選択肢として、サブ配列がクローニングされ、適切なサブ配列が、適切な制限酵素を用いて開裂されてもよい。次に、これらの断片のライゲーションによって、所望されるＤＮＡ配列を作製することができる。

【０１６８】

様々な実施形態では、本開示の融合分子をコードするＤＮＡは、ポリメラーゼ連鎖反応法（ＰＣＲ）などのＤＮＡ増幅法を用いてクローニングされてよい。従って、例えば、ＩＬ‐１０のための遺伝子は、例えばＮｄｅＩのための制限部位を含有するセンスプライマー、およびＨｉｎｄ　ＩＩＩのための制限部位を含有するアンチセンスプライマーを用いてＰＣＲ増幅される。これによって、成熟ＩＬ‐１０配列をコードし、末端制限部位を有する核酸を作製することができる。「相補的」制限部位を有する修飾コリックス毒素を同様にクローニングし、次に、ＩＬ‐１０および／またはＩＬ‐１０に結合したリンカーにライゲーションすることができる。核酸配列のライゲーションおよびベクターへの挿入により、修飾コリックス毒素に繋げられたＩＬ‐１０をコードするベクターが作製される。

【０１６９】

非開裂性リンカー

様々な実施形態では、修飾コリックス毒素および生物活性カーゴは、１つ以上のアミノ酸（例：２５アミノ酸まで）から成るペプチドスペーサーによって分離されていてよい。一般的に、スペーサーは、タンパク質を繋げること、またはそれらの間の何らかの最小距離もしくはその他の空間的関係を保持することを除いては、特異的な生物活性を有しない。しかし、様々な実施形態では、スペーサーの成分アミノ酸は、フォールディング、正味の電荷、または疎水性などの分子のある特性に影響を与えるように選択されてよい。

【０１７０】

様々な実施形態では、リンカーは、コリックス毒素および生物活性カーゴの両方に対して共有結合を形成することができる。適切なリンカーは、当業者に公知であり、これらに限定されないが、直鎖状もしくは分岐鎖状炭素リンカー、ヘテロ環式炭素リンカー、またはペプチドリンカーが挙げられる。様々な実施形態では、（１もしくは複数の）リンカーは、コリックス毒素および／または生物活性カーゴの成分アミノ酸と、その側鎖基を通して（例：システインへのジスルフィド結合を通して）繋げられてよい。様々な実施形態では、リンカーは、コリックス毒素および／または生物活性カーゴの末端アミノ酸のアルファ炭素アミノ基および／またはカルボキシル基に繋げられる。

【０１７１】

コリックス毒素上の基と反応性である１つの官能基および生物活性カーゴと反応性である別の基を有する二官能リンカーを用いて、所望される複合体が形成されてよい。別の選

択肢として、誘導体化は、ターゲット部分の化学処理を含んでよい。例えば、抗体または抗体断片などのポリペプチド上に遊離スルフヒドリル基を生成させる手順が知られている（米国特許第４，６５９，８３９号参照）。

【０１７２】

放射性核種金属キレート、毒素、および薬物を含む様々な化合物を抗体などのタンパク質に結合させるための多くの手順およびリンカー分子が知られている。例えば、欧州特許出願第１８８，２５６号；米国特許第４，６７１，９５８号、同第４，６５９，８３９号、同第４，４１４，１４８号、同第４，６９９，７８４号；同第４，６８０，３３８号；同第４，５６９，７８９号；および同第４，５８９，０７１号；ならびにBorlinghaus et al. (1987) Cancer Res. 47: 4071-4075を参照されたい。

【０１７３】

様々な実施形態では、対象に送達されるべき生物活性カーゴは、例えばアミノ酸配列ＧＧＧＧＳ（配列番号９６）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号９７）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号９８）、またはＧＧＧＧＳＧＧＧ（配列番号９９）を含む１つ以上の非開裂性ペプチドリンカーを用いて修飾コリックス毒素とカップリングされ、ここで、修飾コリックス毒素は、マクロファージ、抗原提示細胞、および樹状細胞などの免疫系の細胞を含むがこれらに限定されない特定の細胞に、前記生物活性カーゴをターゲティングする。

【０１７４】

開裂性リンカー

様々な実施形態では、対象に送達されるべき生物活性カーゴは、１つ以上の開裂性リンカーを用いて修飾コリックス毒素とカップリングされる。融合分子に存在する開裂性リンカーの数は、少なくとも部分的に、修飾コリックス毒素に対する生物活性カーゴの位置、および生物活性カーゴの性質に依存する。生物活性カーゴが、単一リンカーでの開裂によって融合分子の残りの部分から分離可能である場合、融合分子は、単一開裂性リンカーを含んでよい。さらに、生物活性カーゴが、例えば、二量体またはその他の多量体である場合、生物活性カーゴの各サブユニットは、融合分子の残りの部分から、および／または生物活性カーゴの他のサブユニットから、開裂性リンカーの開裂によって分離可能である。

【０１７５】

様々な実施形態では、開裂性リンカーは、上皮細胞の側底膜またはその近傍に存在する開裂酵素によって開裂可能である。そのような酵素によって開裂されるように開裂性リンカーを選択することにより、生物活性カーゴは、粘膜を通してのトランスサイトーシス、および上皮細胞から膜の側底側の細胞マトリックス中に放出された後に、融合分子の残りの部分から遊離可能である。さらに、上皮細胞の内部に存在する開裂酵素を用いることも可能であり、それによって、開裂性リンカーは、融合分子および生物活性カーゴがその細胞の側底膜から放出される結果となる極性化上皮細胞中の輸送経路に融合分子が入る前に開裂酵素が融合分子を開裂しない限りにおいて、側底膜からの融合分子の放出の前に開裂される。

【０１７６】

様々な実施形態では、極性化上皮細胞の側底膜に存在する酵素は、例えば、カテプシンＧＩ、キモトリプシンＩ、エラスターゼＩ、サブチリシンＡＩ、サブチリシンＡＩＩ、トロンビンＩ、またはウロキナーゼＩから選択される。表５は、これらの酵素を、特定のペプチダーゼによって認識され、開裂されるアミノ酸配列と共に示す。

【０１７７】

表５

側底粘膜近傍またはトランスサイトーシス経路の
後半の局面に存在するペプチダーゼ

ペプチターゼ	開裂されるアミノ酸配列
カテプシン GI	AAPF (配列番号 : 100)
キモトリプシン I	GGF (配列番号 : 101)
エラスターゼ I	AAPV (配列番号 : 102)
サブチリシン AI	GGL (配列番号 : 103)
サブチリシン AII	AAL (配列番号 : 104)
トロンビン I	FVR (配列番号 : 105)
ウロキナーゼ I	VGR (配列番号 : 106)
フューリン	RKPR (配列番号 : 107)

【０１７８】

様々な実施形態では、開裂性リンカーは、送達コンストラクトの残りの部分よりも高い開裂の傾向を示す。当業者であれば分かるように、多くのペプチドおよびポリペプチド配列は、ペプチダーゼおよびプロテアーゼによって開裂可能である。様々な実施形態では、開裂性リンカーは、送達コンストラクトの投与の過程で、送達コンストラクトに存在する他のアミノ酸配列に対して優先的に開裂されるように選択される。様々な実施形態では、受容体結合ドメインは、送達コンストラクトの対象の血流への送達後、実質的に（例：約９９％、約９５％、約９０％、約８５％、約８０％、または約７５％）無傷である。様々な実施形態では、トランスロケーションドメインは、送達コンストラクトの対象の血流への送達後、実質的に（例：約９９％、約９５％、約９０％、約８５％、約８０％、または約７５％）無傷である。様々な実施形態では、高分子は、送達コンストラクトの対象の血流への送達後、実質的に（例：約９９％、約９５％、約９０％、約８５％、約８０％、または約７５％）無傷である。様々な実施形態では、開裂性リンカーは、送達コンストラクトの対象の血流への送達後、実質的に（例：約９９％、約９５％、約９０％、約８５％、約８０％、または約７５％）開裂される。

【０１７９】

他の実施形態では、開裂性リンカーは、対象の血漿中に見出される開裂酵素によって開裂される。開裂性リンカーの開裂には、対象の血漿中存在することが当業者によって公知であるいずれの開裂酵素が用いられてもよい。開裂性リンカーの開裂のためのそのような酵素の使用は、極性化上皮細胞の側底膜近傍で見出される開裂酵素の使用よりは好ましくなく、それは、側底膜近傍の方が効率的な開裂が行われるものと考えられるからである。しかし、血漿酵素によって媒介される開裂が、充分な割合の送達コンストラクトを開裂して有害作用を回避することを可能とするのに充分に効率的であると当業者が判断する場合は、そのような血漿開裂酵素が、送達コンストラクトの開裂に用いられてよい。従って、様々な実施形態では、開裂性リンカーは、カスパーゼ１、カスパーゼ３、プロタンパク質転換酵素１、プロタンパク質転換酵素２、プロタンパク質転換酵素４、プロタンパク質転換酵素４　ＰＡＣＥ４、プロリルオリゴペプチダーゼ、エンドセリン開裂酵素、ジペプチジルペプチダーゼＩＶ、シグナルペプチダーゼ、ネプリライシン、レニン、およびエステラーゼから成る群より選択される酵素によって開裂されてよい（例えば、その全内容が参照により本明細書に援用される米国特許第６，６７３，５７４号参照）。表６は、これらの酵素を、特定のペプチダーゼによって認識される（１もしくは複数の）アミノ酸配列と共に示す。ペプチダーゼは、星印で識別されるアミノ酸のＮ末端側で、これらの配列を含むペプチドを開裂する。

【０１８０】

表６

血漿ペプチダーゼ

ペプチダーゼ	開裂されるアミノ酸配列
カスパーゼ -1	Tyr-Val-Ala-Asp-Xaa* (配列番号 : 108)
カスパーゼ -3	Asp-Xaa-Xaa-Asp-Xaa* (配列番号 : 109)
プロタンパク質転換酵素 1	Arg-(Xaa)$_n$-Arg-Xaa*; n = 0, 2, 4 または６ (配列番号 : 110)
プロタンパク質転換酵素 2	Lys-(Xaa)$_n$-Arg-Xaa*; n = 0, 2, 4, または６ (配列番号 : 111)
プロタンパク質転換酵素 4	Glu-Arg-Thr-Lys-Arg-Xaa* (配列番号 : 112)
プロタンパク質転換酵素 4 PACE 4	Arg-Val-Arg-Arg-Xaa* (配列番号 : 113) Decanoyl-Arg-Val-Arg-Arg-Xaa* (配列番号 : 114)
ジペプチジルペプチダーゼIVと 組み合わせたプロリルオリゴペプチダーゼ、 エンドセリン開裂酵素	Pro-Xaa*-Trp-Val-Pro-Xaa (配列番号 : 115)
シグナルペプチダーゼ	Trp-Val*-Ala-Xaa (配列番号 : 116)
ジペプチジルペプチダーゼIVと 組み合わせたネプリライシン	Xaa-Phe*-Xaa-Xaa (配列番号 : 117) Xaa-Tyr*-Xaa-Xaa (配列番号 : 118) Xaa-Trp*-Xaa-Xaa (配列番号 : 119)
ジペプチジルペプチダーゼIVと 組み合わせたレニン	Asp-Arg-Tyr-Ile-Pro-Phe-His-Leu*-Leu (Val, AlaまたはPro)-Tyr-(Ser, Pro, またはAla) (配列番号 : 120)

【０１８１】

従って、様々な実施形態では、開裂性リンカーは、上皮細胞の側底膜に存在する酵素によって開裂可能であることが当業者に公知であるいずれの開裂性リンカーであってもよい。様々な実施形態では、開裂性リンカーは、ペプチドを含む。他の実施形態では、開裂性リンカーは、ＲＮＡまたはＤＮＡなどの核酸を含む。さらの他の実施形態では、開裂性リンカーは、ジッサカリドまたはトリサッカリドなどの炭水化物を含む。

【０１８２】

別の選択肢として、様々な実施形態では、開裂性リンカーは、送達コンストラクトが投与される対象の血漿中に存在する酵素によって開裂可能であることが当業者に公知である

いずれの開裂性リンカーであってもよい。様々な実施形態では、開裂性リンカーは、ペプチドを含む。他の実施形態では、開裂性リンカーは、ＲＮＡまたはＤＮＡなどの核酸を含む。さらの他の実施形態では、開裂性リンカーは、ジッサカリドまたはトリサッカリドなどの炭水化物を含む。

【０１８３】

様々な実施形態では、ペプチダーゼは、側底側（側底とも称される）において、非常により高い（例：頂端側と比較して１００％、２００％、またはそれよりも高い活性の上昇）活性の上昇を示す。従って、様々な実施形態では、開裂性リンカーは、膜の頂端側よりも膜の側底側において５０％高い活性を示す酵素によって開裂可能である。様々な実施形態では、開裂性リンカーは、膜の頂端側よりも膜の側底側において１００％高い活性を示す酵素によって開裂可能である。様々な実施形態では、開裂性リンカーは、膜の頂端側よりも膜の側底側において２００％高い活性を示す酵素によって開裂可能である。様々な実施形態では、開裂性リンカーは、膜の頂端側よりも膜の側底側において５００％高い活性を示す酵素によって開裂可能である。様々な実施形態では、開裂性リンカーは、膜の頂端側よりも膜の側底側において１０００％高い活性を示す酵素によって開裂可能である。

【０１８４】

様々な実施形態では、融合分子は、例えば、配列番号１００、配列番号１０１、配列番号１０２、配列番号１０３、配列番号１０４、配列番号１０５、配列番号１０６、または配列番号１０７から選択されるアミノ酸配列を有する開裂性リンカーを含み、極性化上皮細胞の頂端側で示すよりも高い活性を極性化上皮細胞の側底側で示す酵素によって開裂可能であり、および／または極性化上皮細胞の頂端側で示すよりも高い活性を血漿中で示す酵素によって開裂可能である。

【０１８５】

様々な実施形態では、開裂性リンカーは、融合分子の環境の変化に続いて開裂される開裂性リンカーであってよい。例えば、開裂性リンカーは、ｐＨ感受性であり、融合分子が極性化上皮細胞の側底膜から放出された際に受けるｐＨの変化によって開裂される開裂性リンカーであってよい。例えば、腸管腔は強いアルカリ性である一方で、血漿は本質的に中性である。従って、開裂性リンカーは、アルカリ性から中性ｐＨへのシフトによって開裂される部分であってよい。開裂性リンカーを開裂する融合分子の環境の変化は、融合分子が極性化上皮細胞の側底膜から放出された際に受ける、当業者に公知の限定されないいずれの環境変化であってもよい。

【０１８６】

様々な実施形態では、開裂性リンカーは、対象の血漿中に見出される開裂酵素によって開裂される。開裂性リンカーの開裂には、対象の血漿中に存在することが当業者に公知であるいずれの開裂酵素が用いられてもよい。従って、様々な実施形態では、開裂性リンカーは、例えば、配列番号１０８、配列番号１０９、配列番号１１０、配列番号１１１、配列番号１１２、配列番号１１３、配列番号１１４、配列番号１１５、配列番号１１６、配列番号１１７、配列番号１１８、配列番号１１９、または配列番号１２０から選択される酵素によって開裂されてよい。

【０１８７】

様々な実施形態では、開裂性リンカーは、タバコエッチウィルス（ＴＥＶ）プロテアーゼの既知基質であるアミノ酸配列を含有するリンカーである。従って、様々な実施形態では、開裂性リンカーは、例えばＧＧＧＧＳＧＧＧＥＮＬＹＦＱＳ（配列番号１２１）に示されるアミノ酸配列を含む。

【０１８８】

カーゴの修飾コリックス毒素との化学的結合

様々な実施形態では、対象に送達されるべき生物活性カーゴは、修飾コリックス毒素と化学的に結合される。分子を化学的に結合する手段は、当業者に公知である。

【０１８９】

２つの分子を結合させるための手順は、剤の化学構造に応じて様々である。ポリペプチ

ドは、典型的には、他方のペプチド上、またはこれらの分子をそれに繋げるためのリンカー上にある適切な官能基との反応に利用可能であるカルボン酸（ＣＯＯＨ）または遊離アミン（－NH_2）基を例とする様々な官能基を含有する。

【０１９０】

別の選択肢として、抗体および／または生物活性カーゴは、追加の反応性官能基の露出または結合のために誘導体化されてもよい。誘導体化は、イリノイ州ロックフォードのピアースケミカルカンパニー（Pierce Chemical Company）から入手可能であるものなどのいくつかのリンカー分子のうちのいずれの結合を含んでもよい。

【０１９１】

様々な実施形態では、単離された修飾コリックス毒素は、細菌発酵によって作製され、確立された方法によって精製される。精製された修飾コリックス毒素は、次に、このタンパク質のＣ末端近傍に位置する遊離スルフヒドリル残基を通しての直接化学カップリングを可能とするために、そのＣ末端で修飾される。Ｃ末端修飾は、タバコエッチウィルス（ＴＥＶ）からの高選択性プロテアーゼのためのコンセンサス開裂配列を有するシステイン拘束ループ（cysteine-constrained loop）、第二のシステイン、およびヘキサヒスチジン（His_6）タグを含む。第二のＣｙｓは、最終的にカップリングに用いられるＣｙｓとのジスルフィド架橋を形成するために含められる。His_6配列をタンパク質に付加することは、精製を簡便化し、ＴＥＶ開裂配列は、穏和な還元の後に末端Ｃｙｓ残基を選択的に除去するための機構を提供する。ｎｔコリックスコンストラクトの発現および単離後のＴＥＶ開裂および０．１ｍＭ　ジチオテイトール（dithiotheitol）による穏和な還元により、カーゴ結合の一般的機構としてのマレイミドをベースとする反応を介して、生物活性カーゴの直接化学カップリングが可能となる。ＴＥＶプロテアーゼ開裂、還元、および遊離スルフヒドリルによるマレイミド反応を通してのカーゴカップリングの後、第二のNi^{2+}カラムクロマトグラフィ工程により、遊離されたＣ末端配列の除去が達成された。

【０１９２】

様々な実施形態では、融合分子は、修飾コリックス毒素を用いて共有結合によって修飾された粒子を含み、生物活性カーゴは、粒子に一体化されている。様々な実施形態では、粒子は、約１５０ｎｍ未満、約１００ｎｍ未満、または約５０ｎｍ未満の直径であってよい。

【０１９３】

様々な実施形態では、融合分子は、修飾コリックス毒素と非共有結合によってカップリングされた生物活性カーゴを含む。この融合分子は、例えば、ＩＬ‐１０受容体の表面要素など、非共有結合によって会合されたＩＬ‐１０を、上皮を通して輸送することが可能である（その全内容が参照により本明細書に援用されるJosephson, K., Logsdon, N.J., Walter, M.R., Immunity 15: 35-46, 2001）。

【０１９４】

医薬組成物および送達方法

本開示の医薬組成物は、ヒト対象への投与のための組成物に関する。医薬組成物は、本明細書で挙げる非天然融合分子を、単独で、または組み合わせて含む。医薬組成物は、非天然融合分子の特性を変化させることができる、例えば、その機能を安定化、調節、および／または活性化することができる追加の分子を含んでよい。組成物は、例えば、固体または液体の形態であってよく、とりわけ、粉末、錠剤、溶液、またはエアロゾルの形態であってよい。本開示の医薬組成物は、所望に応じて、および追加として、薬理学的に許容されるキャリアを含んでよい。「薬理学的に許容されるキャリア」は、無毒性の固体、半固体、または液体の充填剤、希釈剤、カプセル化剤、ならびに標準的な医薬キャリア、媒体、緩衝剤、および賦形剤のいずれをも意味し、リン酸緩衝生理食塩水溶液、５％デキストロース水溶液、ならびに油／水型または水／油型エマルジョンなどのエマルジョン、ならびに様々な種類の湿潤剤および／または補助剤などである。

【０１９５】

医薬組成物は、一般的に、融合分子に対して意図される即時使用に適するように製剤される。例えば、融合分子が直ちに投与される予定にない場合、融合分子は、保存に適する組成物として製剤されてよい。１つのそのような組成物としては、適切な安定化剤を一緒に含む融合分子の凍結乾燥製剤である。別の選択肢として、融合分子組成物は、１つ以上の適切な安定化剤を含む溶液として、保存用に製剤されてもよい。当業者に公知のそのようないずれの安定化剤も、限定されずに用いられてよい。例えば、凍結乾燥製剤に適する安定化剤としては、これらに限定されないが、糖、塩、界面活性剤、タンパク質、カオトロピック剤、脂質、およびアミノ酸が挙げられる。液体製剤に適する安定化剤としては、これらに限定されないが、糖、塩、界面活性剤、タンパク質、カオトロピック剤、脂質、およびアミノ酸が挙げられる。組成物に用いられてよい具体的な安定化剤としては、これらに限定されないが、トレハロース、血清アルブミン、ホスファチジルコリン、レシチン、およびアルギニンが挙げられる。融合分子の凍結乾燥または液体製剤を安定化させるためのその他の化合物、組成物、および方法は、例えば、米国特許第６，５７３，２３７号、同第６，５２５，１０２号、同第６，３９１，２９６号、同第６，２５５，２８４号、同第６，１３３，２２９号、同第６，００７，７９１号、同第５，９９７，８５６号、および同第５，９１７，０２１号に見出すことができる。

【０１９６】

様々な実施形態では、本開示の医薬組成物は、経口送達用に製剤される。経口送達用に製剤された医薬組成物は、胃腸（ＧＩ）上皮を通してのトランスサイトーシスを媒介する修飾コリックス毒素の能力を利用するものである。このような医薬組成物の経口投与は、腸管粘膜を例とする消化粘膜の極性化上皮細胞を通しての融合分子の吸収、およびそれに続く粘膜の側底側での生物活性カーゴの放出をもたらすものと期待される。様々な実施形態では、上皮細胞は、鼻上皮細胞、口上皮細胞、腸上皮細胞、直腸上皮細胞、膣上皮細胞、および肺上皮細胞から成る群より選択される。本開示の医薬組成物は、ＧＩ上皮を通しての融合タンパク質の輸送を促進するために、トランスサイトーシス促進剤（transcytosis enhancer）の添加を含んでよい。そのような促進剤は、本技術分野にて公知である。各々についてその全内容が参照により本明細書に援用されるXia et al., (2000) J. Pharmacol. Experiment. Therap., 295:594-600；およびXia et al. (2001) Pharmaceutical Res., 18(2):191-195を参照されたい。

【０１９７】

ＧＩ上皮を通して輸送されると、本開示の融合分子は、血清中において長期間の半減期を示すことが、すなわち、融合分子の生物活性カーゴは、その非融合状態の生物活性カーゴと比較して長期間の血清中半減期を示すことが期待される。このため、本開示の医薬組成物の経口製剤は、ＧＩ上皮への輸送および胃での融合分子の保護に適するように作製される。そのような製剤は、キャリアおよび分散剤成分を含んでよく、エアロゾル（経口または経肺送達用）、シロップ、エリキシール、咀嚼錠を含む錠剤、硬質または軟質カプセル、トローチ、ロゼンジ、水性または油性懸濁液、エマルジョン、カシェ剤またはペレット、顆粒、および分散性粉末を含む適切ないかなる形態であってもよい。様々な実施形態では、医薬組成物は、正確な用量の簡便な経口投与に適している固体剤形、例えば錠剤、カプセルなどで用いられる。

【０１９８】

様々な実施形態では、経口製剤は、融合分子、および胃の中にある間の融合分子を保護することができる１つ以上の化合物を含む。例えば、保護化合物は、融合分子の酸および／または酵素による加水分解を防止することができるべきである。様々な実施形態では、経口製剤は、融合分子、および胃から小腸へのコンストラクトの輸送を促進することができる１つ以上の化合物を含む。様々な実施形態では、融合分子を胃の中での分解から保護することができる１つ以上の化合物は、胃から小腸へのコンストラクトの輸送を促進することもできる。例えば、炭酸水素ナトリウムを含めることは、Mrsny et al., Vaccine 17:1425-1433, 1999に記載されるように、胃内に送達された物質の胃から十二指腸への迅速な移動を促進するのに有用であり得る。融合分子が胃を通過して小腸の極性化上皮膜と接

触することができるように組成物を製剤するためのその他の方法としては、これらに限定されないが、DeYoung, Int J Pancreatol, 5 Suppl:31-6, 1989に記載されるような腸溶コーティング技術、ならびに米国特許第６，６１３，３３２号、同第６，１７４，５２９号、同第６，０８６，９１８号、同第５，９２２，６８０号、および同第５，８０７，８３２号に提供される方法が挙げられ、各文献は、その全内容について参照により本明細書に援用される。

【０１９９】

経口使用を意図する医薬組成物は、医薬組成物の製造のための当業者に公知のいずれの方法に従って作製されてもよく、そのような組成物は、薬理学的に洗練された味の良い製剤を得る目的で、甘味剤から成る群より選択される１つ以上の剤を含有してよい。例えば、経口送達可能錠剤を作製するためには、融合分子は、少なくとも１つの医薬賦形剤と混合され、公知の方法に従ってこの固体製剤が圧縮されて、胃腸管へ送達するための錠剤が形成される。錠剤組成物は、典型的には、サッカリドもしくはセルロースキャリア、デンプンペーストもしくはメチルセルロースなどのバインダー、充填剤、崩壊剤、または医療製剤の製造に典型的に通常用いられるその他の添加剤を例とする添加剤と共に製剤される。経口送達可能カプセルを作製するためには、ＤＨＥＡは、少なくとも１つの医薬賦形剤と混合され、この固体製剤が、胃腸管への送達に適するカプセル容器中に入れられる。融合分子を含む組成物は、参照により本明細書に援用されるRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. 1990（マックパブリッシング社（Mack Publishing Co.）ペンシルベニア州、イーストン、１８０４２）のチャプター８９に概略的に記載されるように作製されてよい。

【０２００】

様々な実施形態では、医薬組成物は、錠剤の製造に適する無毒性の薬理学的に許容される賦形剤との混合物として融合分子を含有する経口送達可能錠剤として製剤される。このような賦形剤は、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウム、またはリン酸ナトリウムなどの不活性希釈剤、トウモロコシデンプン、ゼラチン、またはアラビアガムを例とする造粒および崩壊剤、ならびにステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、またはタルクを例とする滑沢剤であってよい。錠剤は、未コーティングであってよく、または胃腸管での崩壊および吸収を遅延し、それによってより長時間にわたる持続的な作用を提供するために、公知の技術を用いてコーティングされてもよい。例えば、グリセリルモノステアレートまたはグリセリルジステアレートなどの時間遅延剤（time delay material）が、単独で、またはワックスと共に用いられてよい。

【０２０１】

様々な実施形態では、医薬組成物は、硬質ゼラチンカプセルとして製剤され、この場合、融合分子は、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、もしくはカオリンを例とする不活性固体希釈剤と混合され、または軟質ゼラチンカプセルとして製剤され、この場合は、融合分子は、ラッカセイ油、ピーナッツ油、液体パラフィン、もしくはオリーブ油を例とする水性または油性媒体と混合される。

【０２０２】

様々な実施形態では、水性懸濁液が、水性懸濁液の製造に適する賦形剤との混合物として融合分子を含有してよい。そのような賦形剤は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントガム、およびアラビアガムを例とする懸濁剤であり；分散剤または湿潤剤は、レシチンを例とする天然リン脂質、もしくはアルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物、例えばポリオキシエチレンステアレート、もしくはエチレンオキシドと長鎖脂肪アルコールとの縮合生成物、例えばヘプタデシルエチルオキシセタノール、もしくはポリオキシエチレンソルビトールモノオレエートなどのエチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトールから誘導される部分エステルとの縮合生成物、もしくはエチレンオキシドと脂肪酸および無水ヘキシトールから誘導される部分エステルとの縮合生成物、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートであってよい。水性懸濁液は、

ｐ‐ヒドロキシ安息香酸エチルまたはｎ‐プロピルを例とする１つ以上の保存剤、１つ以上の着色剤、１つ以上の香味剤、およびスクロースまたはサッカリンなどの１つ以上の甘味剤も含有してよい。

【０２０３】

様々な実施形態では、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油、もしくはココナッツ油を例とする植物油、または液体パラフィンなどの鉱油に融合分子を懸濁することにより、油性懸濁液が製剤されてよい。油性懸濁液は、蜜蝋、硬質パラフィン、またはセチルアルコールを例とする増粘剤を含有してよい。味の良い経口製剤を得るために、上記で示したような甘味剤および香味剤が添加されてよい。このような組成物は、アスコルビン酸などの酸化防止剤を添加することによって保存されてよい。

【０２０４】

様々な実施形態では、医薬組成物は、水中油型エマルジョンの形態であってよい。油相は、植物油、例えばオリーブ油もしくはラッカセイ油、または鉱油、例えばアカシアガムもしくはトラガカントガム、天然リン脂質、例えばダイズレシチン、ならびに脂肪酸および無水ヘキシトールから誘導されるエステルもしくは部分エステル、例えばソルビタンモノオレエート、ならびに同じ部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートであってよい。エマルジョンは、甘味および香味剤も含有してよい。

【０２０５】

医薬組成物が錠剤またはカプセルの形態である様々な実施形態では、錠剤またはカプセルは、生物活性カーゴを胃での酵素作用から保護するために、および対象に吸収されて有効な応答を発生させるための充分な生物活性カーゴが存在することを確保するために、コーティングまたはカプセル化される。そのようなコーティングまたはカプセル化の方法としては、例えば、薬物キャリアとしての疎水性バックボーンおよび親水性側鎖を有するポリマーを含むナノ粒子でのカプセル化、マイクロ粒子でのカプセル化、エマルジョン中のリポソームへの挿入、ならびに他の分子との結合が挙げられる。ナノ粒子の例としては、キトサンおよびＣａｒｂｏｐｏｌでコーティングされた粘膜付着性ナノ粒子（Takeuchi et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 47(1):39-54, 2001）、ならびにポリ（２‐スルホブチル‐ビニルアルコール）およびポリ（Ｄ, Ｌ‐乳酸‐コ‐グリコール酸）の荷電ポリエステルの組み合わせを含有するナノ粒子（Jung et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 50(1):147-160, 2000）が挙げられる。

【０２０６】

生物活性カーゴを層ごとに放出し、それによって胃腸管を移動中に所定の時間枠にわたって生物活性カーゴを放出するカプセル化またはコーティングされた錠剤が用いられてよい。加えて、生物活性カーゴを含む錠剤が、より大きい錠剤中に配置されてもよく、それによって、温度、化学的剤（例：溶媒）、ｐＨ、および水分などの環境およびプロセッシング条件から内部錠剤が保護される。外部錠剤およびコーティングは、さらに、胃環境中で生物活性カーゴを保護するようにも働く。

【０２０７】

様々な実施形態では、医薬組成物は、ポリエステルミクロスフィア、ゼインミクロスフィア、プロテイノイドミクロスフィア、ポリシアノアクリレートミクロスフィア、および脂質に基づく系を用いて、経口送達用に製剤されてよい（例えば、DiBase and Morrel, Oral Delivery of Microencapsulated Proteins, in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), pages 255-288 (Plenum Press 1997)を参照）。

【０２０８】

表面活性剤または界面活性剤は、粘膜またはライニング（lining）を通してのポリペプチドの吸収を促進する。有用な表面活性剤または界面活性剤としては、脂肪酸およびその塩、胆汁酸塩、リン脂質、またはアルキルサッカリドが挙げられる。脂肪酸およびその塩の例としては、カプリレート（C_8）、カプレート（C_{10}）、ラウレート（C_{12}）、およびミリステート（C_{14}）のナトリウム、カリウム、およびリジン塩が挙げられる。

胆汁酸塩の例としては、コール酸、ケノデオキシコール酸、グリココール酸、タウロコール酸、グリコケノデオキシコール酸、タウロケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、グリコデオキシコール酸、タウロデオキシコール酸、リトコール酸、およびウルソデオキシコール酸が挙げられる。リン脂質の例としては、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルグリセロール、リゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルイノシトール、およびリゾホスファチジルセリンなどの一本鎖リン脂質；またはジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルグリセロール、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、ジアシルホスファチジルイノシトール、およびジアシルホスファチジルセリンなどの二本鎖リン脂質が挙げられる。アルキルサッカリドの例としては、デシルグルコシドおよびドデシルマルトシドなどのアルキルグルコシドまたはアルキルマルトシドが挙げられる。

【０２０９】

別の態様では、本開示は、本開示の医薬組成物を経口投与する方法に関する。特定のいかなる理論または作用機構に束縛されるものではないが、融合分子の経口投与の結果、腸粘膜を例とする消化粘膜の極性化上皮細胞を通して融合分子が吸収され、続いて融合分子は開裂され、粘膜の側底で生物活性カーゴが放出されるものと考えられる。従って、生物活性カーゴが、例えばその同族受容体と結合するＩＬ‐１０によって媒介される活性などの肝臓での生物活性を発揮する場合、生物活性カーゴは、対象で観察される血漿中濃度に基づいて予測される効果を超える効果を発揮する、すなわち、融合分子の経口投与は、対象の血漿中で観察されるよりも高い有効濃度の送達された生物活性カーゴを対象の肝臓へ送達することができるものと考えられる。

【０２１０】

別の態様では、本開示は、本開示の医薬組成物を経口投与する方法に関する。そのような方法は、これに限定されないが、患者または治療奉仕者が組成物を経口投与する工程を含んでよい。そのような投与工程は、融合分子、疾患もしくは患者の病状、または個々の患者に応じて、１日あたり１回または２回などの間隔での投与を含んでよい。そのような方法はまた、個々の融合分子の様々な用量での投与も含む。例えば、医薬組成物の初期用量は、血糖レベルの低下などの所望される効果を誘導するためにより高くてよい。その後、続いての用量は、所望される効果が達成されると、減少されてよい。投与プロトコルのこのような変更または改変は、担当医または医療従事者によって行われてよい。

【０２１１】

このような医薬組成物は、適切な用量で対象に投与されてよい。投与レジメンは、担当医および臨床因子によって決定される。医療技術分野において公知であるように、任意の患者に対する用量は、患者の大きさ、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与の時間および経路、一般的健康状態、ならびに同時に投与される他の薬物を含む多くの因子に依存する。ある状況における治療有効量は、通常の手順の実験によって容易に決定され、通常の臨床医または医師の技術および判断の範囲内である。当業者にとって、個人に投与される医薬組成物の有効量が、とりわけ、生物活性カーゴの性質に依存することは公知である。変化を観察するのに必要となる治療の長さ、および治療後に応答が発生するまでの間隔は、所望される効果に応じて様々である。特定の量は、当業者に公知の従来の試験によって決定されてよい。

【０２１２】

生物活性カーゴの量は、特定の活性剤の目的を達成するのに有効である量である。組成物中の量は、典型的には、薬理学的に、生物学的に、治療的に、または化学的に有効な量である。しかし、この量は、組成物がカプセル、錠剤、または液体などの単位剤形で用いられる場合、薬理学的に、生物学的に、治療的に、または化学的に有効な量よりも少なくてよく、それは、単位剤形が、キャリア／生物学的もしくは化学的活性剤組成物を複数含有するか、または分割された薬理学的に、生物学的に、治療的に、または化学的に有効な量を含有する場合があるからである。この場合、総有効量は、合計で薬理学的に、生物学的に、治療的に、または化学的に活性な量の生物活性カーゴを含有する単位の累積として

投与されてよい。

【０２１３】

様々な実施形態では、対象に投与される融合分子の量は、最大で０．００１ｐｇ、最大で１ｐｇ、最大で２ｐｇ、最大で３ｐｇ、最大で４ｐｇ、最大で５ｐｇ、最大で１０ｐｇ、最大で５０ｐｇ、最大で１００ｐｇ、最大で１μｇ、最大で２μｇ、最大で３μｇ、最大で４μｇ、最大で５μｇ、最大で１０μｇ、最大で５０μｇ、最大で１００μｇ、最大で１ｍｇ、最大で２ｍｇ、最大で３ｍｇ、最大で４ｍｇ、最大で５ｍｇ、最大で１０ｍｇ、最大で５０ｍｇ、最大で１００ｍｇ、または最大で１ｇである。

【０２１４】

様々な実施形態では、対象に投与される融合分子の量は、少なくとも０．００１ｐｇ、少なくとも１ｐｇ、少なくとも２ｐｇ、少なくとも３ｐｇ、少なくとも４ｐｇ、少なくとも５ｐｇ、少なくとも１０ｐｇ、少なくとも５０ｐｇ、少なくとも１００ｐｇ、少なくとも１μｇ、少なくとも２μｇ、少なくとも３μｇ、少なくとも４μｇ、少なくとも５μｇ、少なくとも１０μｇ、少なくとも５０μｇ、少なくとも１００μｇ、少なくとも１ｍｇ、少なくとも２ｍｇ、少なくとも３ｍｇ、少なくとも４ｍｇ、少なくとも５ｍｇ、少なくとも１０ｍｇ、少なくとも５０ｍｇ、少なくとも１００ｍｇ、または少なくとも１ｇである。

【０２１５】

様々な実施形態では、対象に投与される融合分子の量は、０．００１ｐｇから約１ｇ、１ｐｇから１０ｐｇ、５０ｐｇから１００ｐｇ、１μｇから５μｇ、１０μｇから２０μｇ、１０μｇから５００ｍｇ、１０μｇから１００ｍｇ、１０μｇから１０００μｇ、１０μｇから２５０μｇ、１０μｇから１００μｇ、１０μｇから５０μｇ、１ｍｇから５ｍｇ、または１０ｍｇから１００ｍｇである。

【０２１６】

投与される融合分子を含む組成物の体積は、一般的に、融合分子の濃度および組成物の製剤に依存する。様々な実施形態では、融合分子組成物の単位用量は、０．００１μｌから１ｍｌ、１μｌから１００μｌ、５０μｌから５００μｌ、０．０１ｍｌから１ｍｌ、１ｍｌから１００ｍｌ、０．０５ｍｌから１ｍｌである。例えば、融合分子組成物の単位用量は、約０．５ｍｌであってよい。

【０２１７】

ある実施形態では、融合分子組成物の単位用量は、最大で約０．００１μｌ、最大で１μｌ、最大で１０μｌ、最大で５０μｌ、最大で２００μｌ、最大で０．０１ｍｌ、最大で０．０５ｍｌ、最大で０．１ｍｌ、最大で０．２ｍｌ、最大で０．５ｍｌ、または最大で１ｍｌである。

【０２１８】

いくつかでは、融合分子組成物の単位用量は、少なくとも０．００１μｌ、少なくとも１μｌ、少なくとも１０μｌ、少なくとも５０μｌ、少なくとも２００μｌ、少なくとも０．０１ｍｌ、少なくとも０．０５ｍｌ、少なくとも０．１ｍｌ、少なくとも０．２ｍｌ、少なくとも０．５ｍｌ、または少なくとも１ｍｌである。

【０２１９】

融合分子組成物は、１から５０用量分（例：０．５ｍｌから２５ｍｌ）、より通常の場合、１から１０用量分（例：０．５ｍｌから５ｍｌ）を含有する剤形として作製されてよい。

【０２２０】

本開示の融合分子組成物は、１回投与または複数回投与で投与されてよい。１回の投与に続いて、約１から約６時間、約６から約１２時間、約１２から約２４時間、約１日から約３日間、約１日から約１週間、約１週間から約２週間、約２週間から約１ヶ月間、約４から約８週間、約１から約３か月間、または約１から約６か月間の間隔で１回以上の投与が行われてよい。

【０２２１】

様々な実施形態では、融合分子を含む医薬組成物は、必須ではないが、症状を寛解させるための有効量で毎日投与されてよい。一般的に、合計１日用量は、１日あたり少なくとも約０．００１ｐｇ、少なくとも約０．１ｍｇ、少なくとも約１ｍｇ、少なくとも約１０ｍｇ、少なくとも約５０ｍｇ、少なくとも約１００ｍｇ、少なくとも約１５０ｍｇ、少なくとも約２００ｍｇ、少なくとも約２５０ｍｇ、少なくとも約３００ｍｇ、少なくとも約３５０ｍｇ、少なくとも約４００ｍｇ、少なくとも約４５０ｍｇ、少なくとも約５００ｍｇ、または１日あたり少なくとも約１０００ｍｇの量で投与されてよい。例えば、用量は、４つのカプセルまたは錠剤が各々５０ｍｇの融合分子を含有するようにカプセルまたは錠剤として経口投与用に製剤されてよい。経口送達用のカプセルまたは錠剤は、都合良くは、１日あたり２００ｍｇまたはそれ以上を例とする全１日経口用量までを含有する。

【０２２２】

様々な実施形態では、融合分子を含む医薬組成物は、必須ではないが、症状を寛解させるための有効量で毎日投与されてよい。一般的に、合計１日用量は、１日あたり最大で５０ｍｇ、１日あたり最大で１００ｍｇ、１日あたり最大で１５０ｍｇ、１日あたり最大で２００ｍｇ、１日あたり最大で２５０ｍｇ、１日あたり最大で３００ｍｇ、１日あたり最大で３５０ｍｇ、１日あたり最大で４００ｍｇ、１日あたり最大で４５０ｍｇ、１日あたり最大で５００ｍｇ、または１日あたり最大で１０００ｍｇの量で投与されてよい。

【０２２３】

本明細書で用いられる場合、本開示の融合分子および１つ以上のその他の治療剤に関する「共投与」、「共投与される」、および「組み合わせて」の用語は、以下を意味することを意図し、以下を意味し、および以下を含む：本開示の融合分子および（１もしくは複数の）治療剤のそのような組み合わせの、治療を必要とする患者への同時投与であり、この場合、そのような成分は、前記患者に対して実質的に同時に前記成分を放出する単一剤形として一緒に製剤される；本開示の融合分子および（１もしくは複数の）治療剤のそのような組み合わせの、治療を必要とする患者への実質的同時投与であり、この場合、そのような成分は、前記患者によって実質的に同時に服用される別々の剤形として互いに分かれて製剤され、ここで、前記成分は、前記患者に対して実質的に同時に放出される；本開示の融合分子および（１もしくは複数の）治療剤のそのような組み合わせの、治療を必要とする患者への逐次投与であり、この場合、そのような成分は、前記患者によって、各投与間に相当な時間間隔を空けた連続する時間に服用される別々の剤形として互いに分かれて製剤され、ここで、前記成分は、前記患者に対して実質的に異なる時間に放出される；ならびに、本開示の融合分子および（１もしくは複数の）治療剤のそのような組み合わせの、治療を必要とする患者への逐次投与であり、この場合、そのような成分は、前記成分を制御された形で放出する単一剤形として一緒に製剤され、ここで、それらは、前記患者に対して、同じおよび／もしくは異なる時間での同時である、連続的である、ならびに／または重なり合う形で放出され、ここで、各部分は、同じまたは異なる経路で投与されてよい。

【０２２４】

様々な実施形態では、融合分子を含む医薬組成物は、第二の成分と共投与されてよく、ここで、第二の成分は、ＧＭ‐１（モノシアロテトラヘキソシルガングリオシド）受容体と結合することができるホルモン、毒素、または生理活性剤である（Hakomori, Advances in Exp. Medicine and Biology, 174:333-339, 1984）。様々な実施形態では、第二の成分は、ＳＶ４０ウィルス、ポリオーマウィルス、またはコレラ毒素もしくは緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）からの外毒素Ａ（ＰＥ）などの毒素である。

【０２２５】

本明細書で用いられる場合、「コレラ毒素」または「ＣＴ」の用語は、コレラ菌（Vibrio cholerae）の名前を冠した毒性作用物質を意味し、これは、急性の命にかかわる大量の水様性下痢を引き起こし得る。ＣＴは、上皮の頂端膜側で細胞表面G_{M1}ガングリオシド構造と結合するＢサブユニットの五量体と共に組織化された単一のＡサブユニットから構成されるタンパク質複合体である。ＣＴは、ＣＴＸｆまたはＣＴＸφと称される溶原性

バクテリオファージのバリアントを持つコレラ菌の毒性菌株との遺伝子水平伝播の後、コレラ菌から分泌される。しかし、最近のコレラの大流行から、いくつかの血清型（非Ｏ１、非Ｏ１３９）の菌株は、ＣＴを発現せず、他の毒性因子を用いていることが示唆されている。非Ｏ１、非Ｏ１３９の環境および臨床データの詳細な分析から、ＰＥとのある程度の類似性を有する新規な推定上の分泌外毒素の存在が示唆された。ＣＴの配列は知られており、報告されている（Mekalanos J. J. et al Nature 306, page 551 (1983)）。

【０２２６】

本明細書で用いられる場合、「緑膿菌からの外毒素Ａ」、「シュードモナス外毒素Ａ」、または「ＰＥ」の用語は、緑膿菌によって分泌される極めて活性な単量体タンパク質（分子量６６ｋＤ）を意味し、これは、真核細胞でのタンパク質合成を阻害する。ＰＥの６１３残基配列は、本技術分野にて公知であり、例えば米国特許第５，６０２，０９５号に記載されている。ドメインＩａ（アミノ酸１～２５２）が、細胞結合を媒介する。ドメインＩＩ（アミノ酸２５３～３６４）は、サイトゾルへのトランスロケーションを担い、ドメインＩＩＩ（アミノ酸４００～６１３）は、伸長因子２のＡＤＰリボシル化を媒介する。ドメインＩｂ（アミノ酸３６５～３９９）の機能は、依然として明らかにされていないが、その大部分、アミノ酸３６５～３８０を、細胞傷害性を失うことなく欠失させることができることは知られている。Siegall et al., J Biol Chem, 264:14256-61 (1989)を参照されたい。

【０２２７】

ＰＥの特定の細胞傷害性断片は、本技術分野にて公知であり、断片の分子量によって参照される場合が多く、それは、ＰＥ断片の特定の組成を当業者に示すものである。例えば、ＰＥ４０は、研究され、免疫毒素の毒性部分として用いられた最初の断片であった。この用語は、非特異的結合を担うドメインであるドメインＩａであるＰＥの切断型を示す。例えば、Pai et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 88:3358-3362 (1991)；およびKondo et al., J. Biol. Chem., 263:9470-9475 (1988)を参照されたい。しかし、非特異的結合の除去は、ドメインＩａの特定の残基の変異によっても達成することができる。例えば、米国特許第５，５１２，６５８号には、ドメインＩａは存在するが、第５７、２４６、２４７、および２４９番目の位置にあるドメインＩａの塩基性残基が酸性残基（グルタミン酸または「Ｅ」）に置き換えられた変異型ＰＥが、大きく低減された非特異的細胞傷害性を示すことが開示されている。このＰＥの変異体は、「ＰＥ４Ｅ」と称される場合がある。

【０２２８】

様々な実施形態では、併用療法は、単離された融合分子組成物および第二の剤の組成物を、同じ医薬組成物または別々の医薬組成物のいずれかで同時に投与することを含む。様々な実施形態では、単離された融合分子組成物および第二の剤の組成物は、逐次に投与され、すなわち、単離された融合分子組成物が、第二の剤の組成物の投与の前または後のいずれかに投与される。

【０２２９】

様々な実施形態では、単離された融合分子組成物および第二の剤の組成物の投与は、同時であり、すなわち、単離された融合分子組成物および第二の剤の組成物の投与期間が互いに重なり合っている。

【０２３０】

様々な実施形態では、単離された融合分子組成物および第二の剤の組成物の投与は、同時ではない。例えば、様々な実施形態では、単離された融合分子組成物の投与は、第二の剤の組成物が投与される前に終了される。様々な実施形態では、第二の剤の組成物の投与は、単離された融合分子組成物が投与される前に終了される。様々な実施形態では、本発明の融合分子の投与は、単独であっても、または治療剤との組み合わせであっても、食事と共に行われてよく、例えば、食前、食事中、または食後である。

【０２３１】

ある実施形態では、本発明の融合分子の投与は、単独であっても、または治療剤との組

み合わせであっても、食前に行われてよい。様々な実施形態では、本発明の融合分子は、単独であっても、または治療剤との組み合わせであっても、食事の１２時間超前、１１時間超前、１０時間超前、９時間超前、８時間超前、７時間超前、６時間超前、５時間超前、４時間超前、３時間超前、２時間超前、１時間超前、５０分超前、４０分超前、３０分超前、２０分超前、１０分超前、５分超前、または１分超前に投与されてよい。様々な実施形態では、本発明の融合分子は、単独であっても、または治療剤との組み合わせであっても、食事の１２時間未満前、１１時間未満前、１０時間未満前、９時間未満前、８時間未満前、７時間未満前、６時間未満前、５時間未満前、４時間未満前、３時間未満前、２時間未満前、１時間未満前、５０分未満前、４０分未満前、３０分未満前、２０分未満前、１０分未満前、５分未満前、または１分未満前に投与されてよい。様々な実施形態では、本発明の融合分子は、単独であっても、または治療剤との組み合わせであっても、食事の約１分から約１０分前、約５分から約３０分前、約２０分から約６０分前、約１時間から約３時間前、約２時間から約１０時間前、または約５時間から約１２時間前に投与されてよい。

【０２３２】

ある実施形態では、本発明の融合分子の投与は、単独であっても、または治療剤との組み合わせであっても、食後に行われてよい。様々な実施形態では、本発明の融合分子は、単独であっても、または治療剤との組み合わせであっても、食事の１２時間超後、１１時間超後、１０時間超後、９時間超後、８時間超後、７時間超後、６時間超後、５時間超後、４時間超後、３時間超後、２時間超後、１時間超後、５０分超後、４０分超後、３０分超後、２０分超後、１０分超後、５分超後、または１分超後に投与されてよい。ある実施形態では、本発明の融合分子は、単独であっても、または治療剤との組み合わせであっても、食事の１２時間未満後、１１時間未満後、１０時間未満後、９時間未満後、８時間未満後、７時間未満後、６時間未満後、５時間未満後、４時間未満後、３時間未満後、２時間未満後、１時間未満後、５０分未満後、４０分未満後、３０分未満後、２０分未満後、１０分未満後、５分未満後、または１分未満後に投与されてよい。様々な実施形態では、本発明の融合分子は、単独であっても、または治療剤との組み合わせであっても、食事の１２時間未満前、１１時間未満前、１０時間未満前、９時間未満前、８時間未満前、７時間未満前、６時間未満前、５時間未満前、４時間未満前、３時間未満前、２時間未満前、１時間未満前、５０分未満前、４０分未満前、３０分未満前、２０分未満前、１０分未満前、５分未満前、または１分未満前に投与されてよい。様々な実施形態では、本発明の融合分子は、単独であっても、または治療剤との組み合わせであっても、食事の約１分から約１０分後、約５分から約３０分後、約２０分から約６０分後、約１時間から約３時間後、約２時間から約１０時間後、または約５時間から約１２時間後に投与されてよい。

【０２３３】

使用の方法

別の態様では、経口送達用に製剤された医薬組成物は、特に経口製剤および送達の対象となる特定の種類の疾患または医学的病状の治療に用いられる。そのような種類の疾患または病状としては、例えば、ウィルス性疾患または感染、癌、代謝疾患、肥満症、自己免疫性疾患、炎症性疾患、アレルギー、移植片対宿主病、全身性微生物感染、貧血症、心血管疾患、精神病、遺伝性疾患、神経変性疾患、造血細胞の障害、内分泌系または生殖系の疾患、胃腸疾患が挙げられる。多くの慢性疾患において、本開示の融合分子の経口製剤は、注射剤治療または薬物プロトコルに頼ることなく、在宅での経口投与を介する長期的な患者ケアおよび治療法が可能となることから、特に有用である。

【０２３４】

本開示の様々な実施形態では、本開示の融合分子を含む医薬組成物は、炎症性疾患の治療および／または予防での使用のために提供される。「炎症性疾患」は、急性または慢性の炎症を伴うすべての疾患を含む。急性炎症は、有害な刺激に対する身体の初期応答であり、血漿および白血球（例えば、顆粒球など）の血液から損傷組織への移動の増加に起因する。いくつかの生化学的イベントが、炎症性応答を広げ、成熟させ、局所血管系、免疫

系、および損傷組織中の様々な細胞が関与している。長期間にわたる炎症は、慢性炎症と称され、これは、炎症部位に存在する細胞型の進行的なシフトをもたらし、炎症プロセスから同時に発生する組織の破壊および治癒を特徴とする。炎症性疾患は、例えば、熱傷、化学的刺激物質、凍傷、毒素、病原体による感染、身体的損傷、過敏症に起因する免疫反応、電離放射線、または例えば裂片、ちり、および細片などの異物によって引き起こされ得る。炎症性疾患の例は、本技術分野にて公知である。

【０２３５】

様々な実施形態では、炎症性疾患は、炎症性腸疾患、乾癬、および細菌性敗血症から成る群より選択される。「炎症性腸疾患」の用語は、本明細書で用いられる場合、例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎、コラーゲン形成大腸炎、リンパ球性大腸炎、虚血性大腸炎、便流変更性大腸炎、ベーチェット症候群、および非定型的大腸炎を含む結腸および小腸の炎症性病状の群を意味する。

【０２３６】

「クローン病」は、本開示によると、Ｔヘルパー細胞１型（Ｔｈ１）炎症性腸疾患であり、これは、インターロイキン‐１２、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）、およびインターフェロン‐γの産生の増加を含む免疫応答パターンを有し（Romagnani. Inflamm Bowel Dis 1999; 5:285-94）、ならびにそれに罹患した患者の生活様式に破壊的な影響を与え得る。クローン病の一般的な症状としては、下痢、筋痙攣、腹部痛、発熱、およびさらには直腸出血が挙げられる。クローン病およびそれに伴う合併症の結果として、多くの場合、２回以上であることが多い外科手術が患者に必要となる。クローン病を完治する方法は分かっておらず、長期的な効果的治療オプションは限られている。治療の目標は、炎症の制御、栄養障害の是正、ならびに腹部痛、下痢、および直腸出血のような症状の緩和である。治療は、患者が再発を経験する回数を低下させることによって疾患を制御する手助けとなり得るが、完治する方法は存在しない。治療は、薬物、栄養補助剤、外科手術、またはこれらのオプションの組み合わせを含み得る。治療のために投与されてよい一般的治療剤としては、スルファサラジンを含む抗炎症薬、プレドニゾンを含むコルチゾンまたはステロイド、６‐メルカプトプリンまたはアザチオプリンなどの免疫系抑制剤、および抗生物質が挙げられる。

【０２３７】

「乾癬」は、本開示によると、皮膚および関節が冒される疾患である。それは、一般的には、皮膚上に現れる赤い鱗状のパッチを引き起こす。乾癬によって引き起こされる鱗状パッチは、乾癬プラークと称され、炎症および過剰な皮膚産生の領域である。皮膚は、これらの部位に急速に蓄積し、銀白色の外観を呈する。プラークは、肘および膝の皮膚に発生することが多いが、頭皮および陰部を含むいずれの領域も冒され得る。乾癬は、免疫の媒介によるものであり、感染性ではないと考えられている。この障害は、小さい局所的なパッチから全身を覆う場合まで重篤度が様々である慢性の再発性病状である。手の爪および足指爪が冒されることが多く（乾癬性爪ジストロフィ（psoriatic nail dystrophy））、単独所見として見られ得る。乾癬はまた、関節の炎症を引き起こす場合もあり、これは、乾癬性関節炎として知られる。乾癬の患者の１０から１５パーセントは、乾癬性関節炎を有する。

【０２３８】

「細菌性敗血症」の用語は、本明細書で用いられる場合、血流中における細菌の循環に起因する命にかかわる病状を意味する。敗血症は、炎症性サイトカインの全身での産生をもたらし、それが組織損傷を、最終的には微小循環不全による敗血症性ショックを引き起こす。

【０２３９】

本開示の別の態様は、自己免疫性疾患の治療、予防、および／または防止のための方法に関し、その方法は、薬理学的に許容されるキャリア中の治療有効量（単独療法として、または併用療法レジメンのいずれかで）の本明細書で述べる融合分子を前記患者に投与することを含む。

【０２４０】
本開示に関する場合、自己免疫性疾患は、個人自身の組織または共分離物（co-segregate）から発生し、それに対して向けられる疾患もしくは障害、またはその症状発現、またはそれに起因する病状である。様々な実施形態では、自己免疫性疾患は、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、尋常性天疱瘡、重症筋無力症、溶血性貧血、血小板減少性紫斑病、グレーブス病、シェーグレン病、皮膚筋炎、橋本病、多発性筋炎、炎症性腸疾患、多発性硬化症（ＭＳ）、真性糖尿病、関節リウマチ、および強皮症から成る群より選択される。
【０２４１】
本開示によると、「関節リウマチ」は、身体の免疫系に骨関節を攻撃させることを引き起こす自己免疫性障害である（Muller B et al., Springer Semin Immunopathol., 20:181-96, 1998）。関節リウマチは、慢性の全身炎症性障害であり、多くの組織および器官を冒し得るが、主として滑膜関節を攻撃する。このプロセスは、滑膜細胞の肥大化に続く滑膜の炎症性応答（滑膜炎）、過剰な滑液、および滑膜におけるパンヌスの形成を発生させる。この疾患プロセスの病態は、多くの場合、関節軟骨の破壊および関節の強直をもたらす。関節リウマチはまた、肺、心膜、胸膜、および強膜にびまん性炎症を、さらには、最も一般的には皮膚の下にある皮下組織に結節性病変を発生させる場合もある。
【０２４２】
本開示の様々な実施形態では、薬理学的に許容されるキャリア中の治療有効量（単独療法として、または併用療法レジメンのいずれかで）の本明細書で述べる融合分子を前記患者に投与することを含む癌の治療、予防、および／または防止に用いるための本開示の融合分子を含む医薬組成物が提供される。治療されるべき癌としては、これらに限定されないが、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、有毛細胞白血病、急性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、膵臓、結腸、胃腸、前立腺、膀胱、腎臓　卵巣、頚部、乳房、肺、上咽頭の癌腫、悪性黒色腫、ならびにリツキシマブ抵抗性ＮＨＬ、および白血病が挙げられる。
【０２４３】
様々な実施形態では、本明細書で述べる融合分子の治療有効量は、１つ以上のその他の治療剤と組み合わせて投与される。そのような治療剤は、炎症性疾患、自己免疫性疾患、または癌などの本明細書で述べる特定の疾患状態に対する標準的な治療として許容され得る。考慮される代表的な治療剤としては、これらに限定されないが、サイトカイン、成長因子、ステロイド、ＮＳＡＩＤ、ＤＭＡＲＤ、抗炎症剤、化学療法剤、放射線療法剤、またはその他の活性および補助剤が挙げられる。
【０２４４】
様々な実施形態では、本開示は、代謝障害を有する対象を治療する方法を提供し、前記方法は、前記障害の治療に充分な量で本開示の融合分子を経口投与することを含み、ここで、前記代謝障害は、糖尿病、肥満症、肥満症に起因する糖尿病、高血糖症、脂質代謝異常、高トリグリセリド血症、内臓脂肪症候群、インスリン抵抗性、耐糖能障害（ＩＧＴ）、糖尿病性脂質代謝異常、または高脂血症である。
【０２４５】
別の態様では、本開示は、脂肪性肝疾患（例：非アルコール性脂肪性肝疾患（ＮＡＦＬＤ）；非アルコール性脂肪性肝炎（ＮＡＳＨ））、胃腸疾患、または神経変性疾患を有する対象を治療する方法を提供し、前記方法は、前記疾患を治療するのに充分な量で本開示の融合分子を経口投与することを含む。
【０２４６】
別の態様では、本開示は、ＧＨ不全成長障害の治療、予防、および／または防止を、それを必要とする対象において行うための医薬の作製のための本開示の非天然融合分子の使用に関する。
【０２４７】
別の態様では、本開示は、ＧＨ不全成長障害を有する対象を治療する方法を提供し、前記方法は、前記障害を治療するのに充分な量で本開示の融合分子を経口投与することを含

み、ここで、前記障害は、成長ホルモン欠乏症（ＧＨＤ）、ターナー症候群（ＴＳ）、ヌーナン症候群、プラダー・ウィリ症候群、低身長ホメオボックス含有遺伝子（ＳＨＯＸ）欠損症、慢性腎不全、および特発性低身長短腸症候群、稀な下垂体腫瘍またはその治療に起因するＧＨ欠乏症、ならびにＨＩＶ／ＡＩＤＳに伴う筋消耗性疾患である。

【０２４８】

融合分子をコードするポリヌクレオチド

別の態様では、本開示は、非天然融合分子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を提供する。このようなポリヌクレオチドは、例えば、融合分子の作製に有用である。なお別の態様では、本開示は、修飾コリックス毒素をコードする組換えポリヌクレオチド配列、および生物活性カーゴをコードするポリヌクレオチド配列のためのポリリンカー挿入部位を含む発現系を提供する。ポリリンカー挿入部位は、ポリリンカー挿入が修飾コリックス毒素の受容体結合ドメインまたはトランスサイトーシスドメインを破壊しない限りにおいて、ポリヌクレオチド配列のいずれの部位に存在してもよい。様々な実施形態では、発現系は、開裂性リンカーをコードするポリヌクレオチド配列を含んでよく、それによって、開裂性リンカーでの開裂が、ポリリンカー挿入部位に挿入された核酸によってコードされた生物活性カーゴを、コードされた融合分子の残りの部分から分離する。従って、コードされたコンストラクトの末端にポリリンカー挿入部位が存在する実施形態では、ポリヌクレオチドは、ポリリンカー挿入部位とポリヌクレオチドの残りの部分との間に、開裂性リンカーをコードする１つのヌクレオチド配列を含む。コードされたコンストラクトの末端にポリリンカー挿入部位が存在しない実施形態では、ポリリンカー挿入部位は、各々が開裂性リンカーをコードするヌクレオチド配列と隣接していてよい。

【０２４９】

本開示の融合分子に有用である修飾コリックス毒素をコードするポリヌクレオチドを作製するために用いられてよい様々な生体外法としては、これらに限定されないが、逆転写、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、転写増幅法（ＴＡＳ）、自家持続配列複製法（３ＳＲ）、およびＱＰレプリカーゼ増幅法（ＱＢ）が挙げられる。組換え核酸の構築に有用であることが当業者に公知であるそのようないずれの技術が用いられてもよい。例えば、タンパク質またはその一部分をコードするポリヌクレオチドは、修飾コリックス毒素のＤＮＡ配列、または例えば受容体結合ドメインをコードするヌクレオチドに基づくプライマーを用いたｃＤＮＡのポリメラーゼ連鎖反応によって単離されてよい。

【０２５０】

このようなクローン化および生体外増幅の方法を用いるためのガイドは、例えば、米国特許第４，６８３，１９５号；Mullis et al., 1987, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263；およびErlich, ed., 1989, PCR Technology, Stockton Press, NYに記載されている。融合分子またはその一部分をコードするポリヌクレオチドはまた、ストリンジェント、中ストリンジェント、または高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下、所望されるポリヌクレオチドの配列から選択されるプローブを用いたゲノムまたはｃＤＮＡライブラリーのスクリーニングによって単離されてもよい。

【０２５１】

本開示の融合分子をコードする核酸の構築は、生物活性カーゴをコードする核酸のために挿入部位をコンストラクトに導入することによって容易とすることができる。様々な実施形態では、生物活性カーゴのための挿入部位は、修飾コリックス毒素のドメインＩｂのシステイン残基をコードするヌクレオチドの間に導入されてよい。他の実施形態では、挿入部位は、コードされる機能性ドメインを挿入が破壊しない限りにおいて、コンストラクトをコードする核酸のいずれの部位に導入されてもよい。様々な実施形態では、挿入部位は、ＥＲ残留ドメイン中に存在してよい。

【０２５２】

さらに、ポリヌクレオチドは、コードされた融合分子のアミノ末端において分泌配列をコードしてもよい。そのようなコンストラクトは、免疫原の単離を簡便化することから、

哺乳類細胞中での融合分子の作製に有用である。

【０２５３】

さらに、本開示のポリヌクレオチドは、融合分子をコードするポリヌクレオチドの誘導体形態も包含する。そのような誘導体は、当業者に公知のいずれの方法によっても、限定されることなく作製されてよい。例えば、誘導体は、１、２、３、５、１０、もしくはそれ以上のヌクレオチドの置換、挿入、または欠失を含む融合分子をコードするポリヌクレオチドの部位特異的変異誘発によって作製されてよい。別の選択肢として、誘導体は、ランダム変異誘発によって作製されてもよい。核酸をランダムに変異誘発するための１つの方法は、０．１ｍＭ　$MnCl_2$および不均衡なヌクレオチド濃度の存在下でのＰＣＲ反応で核酸を増幅することを含む。このような条件は、ＰＣＲ反応に用いられるポリメラーゼの誤った取り込み率を増加させ、増幅された核酸のランダム変異誘発がもたらされる結果となる。

【０２５４】

従って、様々な実施形態では、本開示は、融合分子をコードするポリヌクレオチドを提供する。融合分子は、修飾コリックス毒素および対象に送達されるべき生物活性カーゴを含み、所望に応じて、非開裂性または開裂性リンカーを含んでよい。開裂性リンカーでの開裂によって、生物活性カーゴを融合分子の残りの部分から分離することができる。開裂性リンカーは、対象の極性化上皮細胞の側底膜に存在する、または対象の血漿中に存在する酵素によって開裂可能である。

【０２５５】

様々な実施形態では、ポリヌクレオチドは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下にて、本開示のいずれのポリヌクレオチドともハイブリダイズする。さらなる実施形態では、ポリヌクレオチドは、ストリンジェントな条件下にて、本開示のいずれの融合分子をコードする核酸ともハイブリダイズする。

【０２５６】

さらに別の態様では、本開示は、融合分子を発現するための発現ベクターを提供する。一般的に、発現ベクターは、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と操作可能に連結された発現制御配列を含む組換えポリヌクレオチド分子である。発現ベクターは、適切なプロモーター、複製配列、選択可能マーカーなどを含めることにより、原核生物または真核生物中で機能して安定な転写およびトランスロケーションまたはｍＲＮＡが得られるように容易に適合させることができる。発現ベクターの構築および発現ベクターを含む遺伝子の細胞中での発現の技術は、本技術分野にて公知である。例えば、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning--A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.およびAusubel et al., eds., Current Edition, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NYを参照されたい。

【０２５７】

発現ベクターでの使用に有用であるプロモーターとしては、これらに限定されないが、メタロチオネインプロモーター、構成的アデノウィルス主要後期プロモーター（constitutive adenovirus major late promoter）、デキサメタゾン誘導性ＭＭＴＶプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＭＲＰ　ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーター、構成的ＭＰＳＶプロモーター、テトラサイクリン誘導性ＣＭＶプロモーター（ヒト前初期ＣＭＶプロモーターなど）、および構成的ＣＭＶプロモーターが挙げられる。

【０２５８】

発現ベクターは、融合分子が発現される細胞と適合する発現および複製シグナルを含有するべきである。融合分子の発現に有用である発現ベクターとしては、レトロウィルス、アデノウィルス、およびアデノ関連ウィルスなどのウィルスベクター、プラスミドベクター、コスミドなどが挙げられる。ウィルスおよびプラスミドベクターは、発現ベクターを哺乳類細胞中へトランスフェクトする場合に好ましい。例えば、発現ベクターｐｃＤＮＡ１（インビトロジェン（Invitrogen）、カリフォルニア州、サンディエゴ）は、発現制御

配列がＣＭＶプロモーターを含んでおり、そのような細胞中への良好なトランスフェクションおよび発現率を提供する。

【０２５９】

融合分子の発現のための細胞中への発現ベクターの導入は、当業者に公知のいずれの方法によっても、限定されることなく行われてよい。そのような方法としては、これらに限定されないが、例えば、細胞による溶液からの分子の直接取り込み；例えばリポソームまたはイムノリポソームを用いたリポフェクションによる促進された取り込み；粒子媒介トランスフェクション（particle-mediated transfection）などが挙げられる。例えば、米国特許第５，２７２，０６５号；Goeddel et al., eds, 1990, Methods in Enzymology, vol. 185, Academic Press, Inc., CA；Krieger, 1990, Gene Transfer and Expression--A Laboratory Manual, Stockton Press, NY；Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning--A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY；およびAusubel et al., eds., Current Edition, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NYを参照されたい。

【０２６０】

発現ベクターは、融合分子の単離を簡便化する精製部分も含有してよい。例えば、６つのヒスチジン残基を例とするポリヒスチジン部分が、タンパク質のアミノ末端に組み込まれてよい。ポリヒスチジン部分により、ニッケル‐キレートクロマトグラフィによる単一工程でのタンパク質の都合の良い単離が可能となる。様々な実施形態では、精製部分は、精製後に、融合分子の残りの部分から開裂されてよい。他の実施形態では、この部分は、融合分子の機能性ドメインの機能に干渉せず、従って、開裂される必要はない。

【０２６１】

なお別の態様では、本開示は、融合分子またはその一部分を発現するための発現ベクターを含む細胞を提供する。細胞は、タンパク質の精製を容易とするために、融合分子を高濃度で発現するその能力について選択される。様々な実施形態では、細胞は、大腸菌（E. coli）を例とする原核細胞である。例で述べるように、融合分子は、大腸菌で発現された場合、適切にフォールディングされ、適切なジスルフィド結合を含む。

【０２６２】

他の実施形態では、細胞は、真核細胞である。有用な真核細胞としては、酵母菌および哺乳類細胞が挙げられる。組換えポリペプチドの発現に有用であることが当業者に公知であるいずれの哺乳類細胞も、限定されることなく融合分子の発現に用いられてよい。例えば、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞が、融合分子の発現に用いられてよい。

【０２６３】

本開示の融合分子は、以下で述べるように、組換えによって作製されてよい。しかし、融合分子はまた、当業者に公知の方法を用いた化学合成によって作製されてもよい。

【０２６４】

本開示の融合分子の発現および精製のための方法は、以下の例に広く記載される。一般的に、方法は、融合分子をコードする発現ベクターを、ベクターから融合分子を発現させることができる細胞へ導入することに依存する。次に、融合分子は、対象への投与のために精製されてよい。

【０２６５】

トランスサイトーシス試験

トランスサイトーシスドメインの機能は、上皮膜を透過する融合分子の能力の関数として試験することができる。トランスサイトーシスは最初に細胞と結合することが必要であることから、このようなアッセイは、細胞認識ドメインの機能の評価にも用いることができる。

【０２６６】

融合分子のトランスサイトーシス活性は、当業者に公知のいずれの方法によっても、限定されることなく試験されてよい。様々な実施形態では、トランスサイトーシス活性は、融合分子の、それが結合した非極性化細胞に進入する能力を評価することによって試験さ

れてよい。いかなる特定の理論または作用機構にも束縛されるものではないが、トランスサイトーシスドメインが極性化上皮細胞を透過することを可能とするものと同じ特性が、トランスサイトーシスドメインを有する分子の非極性化細胞への進入も可能とするものと考えられる。従って、融合分子の細胞へ進入する能力は、例えば、細胞の内部におけるコンストラクトの物理的な存在を検出することによって評価されてよい。例えば、融合分子は、例えば蛍光マーカーで標識され、融合分子が細胞と接触されてよい。次に、細胞は洗浄されて、細胞に進入しなかったいずれの融合分子も除去され、残った標識の量が特定されてよい。このトラクション（traction）で標識を検出することは、融合分子が細胞に進入したことを示す。

【０２６７】

他の実施形態では、融合分子のトランスサイトーシスの能力は、極性化上皮細胞を透過する融合分子の能力を評価することによって試験されてよい。例えば、融合分子は、例えば蛍光マーカーで標識され、上皮細胞の層の頂端膜と接触されてよい。上皮細胞によって形成された膜の側底側で蛍光が検出されることは、トランスサイトーシスドメインが適切に機能していることを示す。

【０２６８】

開裂性リンカー開裂試験

開裂性リンカーの機能は、一般的に、開裂アッセイで試験されてよい。開裂性リンカーの試験には、当業者に公知の適切ないずれの開裂アッセイも、限定されることなく用いられてよい。細胞アッセイおよび無細胞アッセイの両方が、開裂性リンカーを開裂する酵素の能力の試験に用いられてよい。

【０２６９】

開裂性リンカーの開裂を試験するための代表的な無細胞アッセイは、極性化上皮細胞の抽出物を作製すること、および開裂性リンカーを有する標識化融合分子を膜結合型酵素（membrane-associated enzymes）に対応する抽出物の画分と接触させることを含む。そのようなアッセイでは、標識は、送達されるべき生物活性カーゴ、または融合分子の残りの部分のいずれと結合されていてもよい。これらの中でも、酵素は、上述したように、極性化上皮細胞の側底膜近傍で見出される開裂酵素である。開裂の検出は、例えば、融合分子を、例えば抗体と結合させ、未結合分子を洗い流すことによって行われてよい。標識が送達されるべき生物活性カーゴと結合されている場合、抗体と結合された分子上には、標識は、ほとんど、またはまったく観察されないはずである。別の選択肢として、このアッセイで用いられる結合剤は、生物活性カーゴに対して特異的であってよく、コンストラクトの残りの部分が標識化されてよい。いずれの場合でも、開裂を評価することができる。

【０２７０】

開裂は、集められて膜とされた極性化上皮細胞による開裂を試験する細胞アッセイを用いて試験されてもよい。例えば、標識化された融合分子または開裂性リンカーを含む融合分子の一部分が、例えばＣｏｃｏ‐２細胞などの適切な上皮細胞の単層の頂端側または側底側のいずれかと、リンカーの開裂を可能とする条件下で接触されてよい。開裂の検出は、融合分子またはその一部分と特異的に結合する試薬を用いて標識の存在または非存在を検出することによって行われてよい。例えば、融合分子に対して特異的である抗体が、抗体に結合された融合分子の部分に対して開裂性リンカーの遠位に標識を含む融合分子との結合に用いられてよい。この場合、開裂は、抗体に結合された分子上の標識の存在を検出することによって評価されてよい。開裂が発生していた場合、抗体と結合した分子上に、標識は、ほとんど、またはまったく観察されないはずである。そのような実験を行うことにより、頂端膜よりも側底膜で優先的に開裂を起こす酵素を識別することができ、さらに、そのような酵素が融合分子中の開裂性リンカーを開裂する能力を確認することもできる。

【０２７１】

さらに、開裂は、米国特許第６，７５９，２０７号に記載のように、蛍光レポーターアッセイを用いて試験されてもよい。簡潔に述べると、そのようなアッセイでは、蛍光レポ

ーターは、適切な上皮細胞の単層の側底側に、開裂酵素がレポーターを開裂することができる条件下で接触される。レポーターの開裂によって、蛍光レポーターの構造が変化し、非蛍光構成から蛍光構成へと変化する。観察された蛍光の量が、側底膜に存在する開裂酵素の活性を示す。

【０２７２】

さらに、開裂は、米国特許第６，５９２，８４７号に記載のように、分子内消光分子プローブを用いて試験されてもよい。そのようなプローブは、一般的に、適切な波長の光で励起されるとフォトンを発する蛍光部分、および蛍光部分に近接している場合はそのようなフォトンを吸収する消光部分を含む。プローブの開裂が、消光部分を蛍光部分から分離し、それによって、蛍光が検出可能となり、そのことによって、開裂が発生したことが示される。従って、そのようなプローブを用いることにより、適切な上皮細胞の単層の側底側を、開裂酵素がプローブを開裂することができる条件下でプローブと接触させることで、特定の開裂酵素による開裂を識別し、評価することができる。観察された蛍光の量が、試験された開裂酵素の活性を示す。

【０２７３】

代表的なコリックス毒素－生物活性カーゴ融合分子

本開示の実施形態は、これらに限定されないが、表７に示す融合分子を含む。

【０２７４】

表7

修飾コリックス毒素 (配列番号)	開裂性リンカー (配列番号)	生物活性カーゴ (配列番号)
配列番号: 3	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 4	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 5	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 6	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 7	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 8	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95

表7は次頁につづく

配列番号: 9	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 10	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 11	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 12	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 13	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 14	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 15	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 16	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 17	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 18	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 19	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 20	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 21	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 22	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 23	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 24	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 25	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 26	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 27	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 28	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 29	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 30	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 31	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 32	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 33	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 34	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 35	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 36	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 37	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95
配列番号: 38	配列番号 : 96 – 121 リンカーなし	配列番号: 82 - 95

表7は次頁につづく

配列番号：39	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：40	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：41	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：42	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：43	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：44	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：45	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：46	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：47	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：48	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：49	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：50	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：51	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：52	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：53	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：54	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：55	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：56	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：57	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：58	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：59	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：60	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：61	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：62	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：63	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：64	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：65	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：66	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：67	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：68	配列番号：96 – 121 リンカーなし	配列番号：82 - 95

表7は次頁につづく

配列番号：69	配列番号：96－121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：70	配列番号：96－121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：71	配列番号：96－121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：72	配列番号：96－121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：73	配列番号：96－121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：74	配列番号：96－121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：75	配列番号：96－121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：76	配列番号：96－121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：77	配列番号：96－121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：78	配列番号：96－121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：79	配列番号：96－121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：80	配列番号：96－121 リンカーなし	配列番号：82 - 95
配列番号：81	配列番号：96－121 リンカーなし	配列番号：82 - 95

【０２７５】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号８０のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素および配列番号８２のアミノ酸配列を有する生物活性カーゴを含む。
【０２７６】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号７０のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素および配列番号８２のアミノ酸配列を有する生物活性カーゴを含む。
【０２７７】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号４２のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素および配列番号８２のアミノ酸配列を有する生物活性カーゴを含む。
【０２７８】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号１１４に示されるアミノ酸配列を含む。
【０２７９】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号１１５に示されるアミノ酸配列を含む。
【０２８０】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号５２のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素、ならびに配列番号８８のアミノ酸配列を有する重鎖可変部および配列番号８９のアミノ酸配列を有する軽鎖可変部を含む抗体である生物活性カーゴを含む。
【０２８１】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号５２のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素、ならびに配列番号９０のアミノ酸配列を有する重鎖可変部および配列番号９１のアミノ酸配列を有する軽鎖可変部を含む抗体である生物活性カーゴを含む。
【０２８２】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号５２のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素および配列番号９２のアミノ酸配列を有する生物活性カーゴを含む。
【０２８３】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号５２のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素および配列番号９３のアミノ酸配列を有する生物活性カーゴを含む。
【０２８４】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号５２のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素および配列番号９４のアミノ酸配列を有する生物活性カーゴを含む。

【０２８５】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号５２のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素および配列番号９５のアミノ酸配列を有する生物活性カーゴを含む。
【０２８６】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号８０のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素、ならびに配列番号８８のアミノ酸配列を有する重鎖可変部および配列番号８９のアミノ酸配列を有する軽鎖可変部を含む抗体である生物活性カーゴを含む。
【０２８７】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号８０のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素、ならびに配列番号９０のアミノ酸配列を有する重鎖可変部および配列番号９１のアミノ酸配列を有する軽鎖可変部を含む抗体である生物活性カーゴを含む。
【０２８８】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号８０のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素および配列番号９２のアミノ酸配列を有する生物活性カーゴを含む。
【０２８９】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号８０のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素および配列番号９３のアミノ酸配列を有する生物活性カーゴを含む。
【０２９０】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号８０のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素および配列番号９４のアミノ酸配列を有する生物活性カーゴを含む。様々な実施形態では、融合分子は、配列番号８０のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素および配列番号９５のアミノ酸配列を有する生物活性カーゴを含む。
【０２９１】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号７０のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素、ならびに配列番号８８のアミノ酸配列を有する重鎖可変部および配列番号８９のアミノ酸配列を有する軽鎖可変部を含む抗体である生物活性カーゴを含む。
【０２９２】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号７０のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素、ならびに配列番号９０のアミノ酸配列を有する重鎖可変部および配列番号９１のアミノ酸配列を有する軽鎖可変部を含む抗体である生物活性カーゴを含む。
【０２９３】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号７０のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素および配列番号９２のアミノ酸配列を有する生物活性カーゴを含む。
【０２９４】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号７０のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素および配列番号９３のアミノ酸配列を有する生物活性カーゴを含む。
【０２９５】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号７０のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素および配列番号９４のアミノ酸配列を有する生物活性カーゴを含む。
【０２９６】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号７０のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素および配列番号９５のアミノ酸配列を有する生物活性カーゴを含む。
【０２９７】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号４２のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素、ならびに配列番号８８のアミノ酸配列を有する重鎖可変部および配列番号８９のアミノ酸配列を有する軽鎖可変部を含む抗体である生物活性カーゴを含む。
【０２９８】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号４２のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素、ならびに配列番号９０のアミノ酸配列を有する重鎖可変部および配列番号９１のアミノ酸配列を有する軽鎖可変部を含む抗体である生物活性カーゴを含む。

【０２９９】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号４２のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素および配列番号９２のアミノ酸配列を有する生物活性カーゴを含む。
【０３００】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号４２のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素および配列番号９３のアミノ酸配列を有する生物活性カーゴを含む。
【０３０１】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号４２のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素および配列番号９４のアミノ酸配列を有する生物活性カーゴを含む。
【０３０２】
様々な実施形態では、融合分子は、配列番号４２のアミノ酸配列を有する修飾コリックス毒素および配列番号９５のアミノ酸配列を有する生物活性カーゴを含む。
【０３０３】
以下の例は、単に本開示を説明するものであり、いかなる形であっても、本開示を限定することを意図するものではない。
【実施例】
【０３０４】
例１
この例では、修飾コリックス毒素配列、開裂性リンカー配列、および生物活性カーゴを含む単一アミノ酸配列としての非天然融合分子の作製について全般的に記載する。
【０３０５】
インターロイキン‐１０（配列番号８２）、インターロイキン‐１９（配列番号８３）、インターロイキン‐２０（配列番号８４）、インターロイキン‐２２（配列番号８５）、インターロイキン‐２４（配列番号８６）、またはインターロイキン‐２６（配列番号８７）のポリペプチドを送達するための７つの代表的な融合分子発現ベクターを、以下で全般的に述べるように構築する。まず、ポリペプチド遺伝子をＰＣＲによって増幅し、ＰＣＲ産物の２つの末端に、制限酵素対のＮｄｅＩおよびＥｃｏＲＩ、ＰｓｔＩおよびＰｓｔＩ、ＡｇｅＩおよびＥｃｏＲＩ、またはＰｓｔＩおよびＥｃｏＲＩの部位を組込む。制限酵素消化の後、このＰＣＲ産物を、細胞発現のために適切なプラスミド中にクローン化し、これを対応する制限酵素対で消化する。得られるコンストラクトは、配列番号１のアミノ酸１～３８６をコードするアミノ酸配列を含む修飾コリックス毒素（コリックス^{386}）および対応するポリペプチドを含み、さらには、精製を容易とするために、ポリペプチドのＮ末端に６‐Ｈｉｓモチーフでタグ付けされている。最終プラスミドは、制限酵素消化およびＤＮＡ配列比較によって確認する。
【０３０６】
さらに、コリックス^{415}（配列番号５２）、配列番号１２１に示されるアミノ酸配列を有する開裂性リンカー配列、および配列番号８２のアミノ酸残基２０～１７８から成るＩＬ‐１０ポリペプチドである生物活性カーゴを含む非天然融合分子（この融合分子は、「コリックス^{415}－ＴＥＶ－ＩＬ‐１０」と称する、図１参照（配列番号１２２））、ならびにコリックス^{415}（配列番号５２）、配列番号９８に示されるアミノ酸配列を有する非開裂性リンカー配列、および配列番号８２のアミノ酸残基２０～１７８から成るＩＬ‐１０ポリペプチドである生物活性カーゴを含む非天然融合分子（この融合分子は、「コリックス^{415}－（G_4S）$_3$－ＩＬ‐１０」と称する、図１参照（配列番号１２３））も作製した。
【０３０７】
非開裂性または開裂性リンカーを含む発現ベクターは、適切なアミノ酸配列をコードする配列を導入することで構築する。これを行うために、適切な制限部位および所望されるリンカーのアミノ酸配列に対して相補的である配列をコードするオリゴヌクレオチドを合成し、次に、上記で述べたように作製した発現ベクターの修飾コリックス配列とポリペプチド配列との間にライゲーションする。

【０３０８】
様々な実施形態では、融合分子は、以下のように発現させる。大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）ｐＬｙｓＳコンピテント細胞（ノバジェン（Novagen）、ウィスコンシン州、マジソン）を、適切なプラスミドの存在下、標準的なヒートショック法を用いて形質転換して融合分子発現細胞を作製し、アンピシリン含有培地上で選択し、単離し、抗生物質を含むルリア・ベルターニ培地（Ｄｉｆｃｏ；ベクトンディキンソン（Becton Dickinson）、ニュージャージー州、フランクリン）で成長させ、次に、ＯＤ０．６で１ｍＭ イソプロピル‐Ｄ‐チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を添加することによってタンパク質発現を誘導する。ＩＰＴＧ誘導の２時間後、５０００ｒｐｍ、１０分間の遠心分離によって細胞を回収する。細胞溶解後に封入体を単離し、タンパク質を、１００ｍＭ Ｔｒｉｓ‐ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、２ｍＭ ＥＤＴＡ、６Ｍ グアニジンＨＣｌ、および６５ｍＭ ジチオスレイトールを含有する緩衝液中で可溶化させる。可溶化した融合分子を、０．１Ｍ Ｔｒｉｓ、ｐＨ＝７．４、５００ｍＭ Ｌ‐アルギニン、０．９ｍＭ ＧＳＳＧ、２ｍＭ ＥＤＴＡの存在下でリフォールディングさせる。リフォールディングしたタンパク質を、Ｑセファロースイオン交換およびＳｕｐｅｒｄｅｘ ２００ゲルろ過クロマトグラフィ（アメルシャムバイオサイエンス社（Amersham Biosciences, Inc.）、スウェーデン）によって精製する。タンパク質の純度は、ＳＤＳ‐ＰＡＧＥおよび分析用ＨＰＬＣ（アジレント社（Agilent, Inc.）、カリフォルニア州、パロアルト）によって評価する。

【０３０９】
図２は、ＩＬ‐１０の二量体化によって推進されるリフォールディング後の代表的な融合分子、例えばコリックス^{415}－ＴＥＶ－ＩＬ‐１０のリボン図である。ＩＬ‐１０の二量体化が、示される紫色コリックス^{415}／青色ｈＩＬ‐１０および橙色コリックス^{415}／緑色の構造をもたらすものと想定される。

【０３１０】
コリックス^{415}－ＴＥＶ－ＩＬ‐１０およびコリックス^{415}－$(G_4S)_3$－ＩＬ‐１０を評価し、これらの予測された分子サイズに関して、適切なフォールディングを確認した。誘導後、発現されたタンパク質を封入体から回収した。封入体中でのコリックス^{415}－ＴＥＶ－ＩＬ‐１０（ゲル上で「Ｃ」と示した）の発現およびコリックス^{415}－$(G_4S)_3$－ＩＬ‐１０（ゲル上で「Ｎ」と示した）の発現の度合いは、約６６ｋＤａの見かけ分子量を示し、これは、それぞれ６６３８０．７８および６５９５８．２５ダルトンの算出質量と同等であった。図３を参照されたい。ＴＥＶリンカー（Ｃｓ）および非ＴＥＶリンカー（Ｎｓ）に対して、封入体取り出し後の上澄培地中にこれらのタンパク質が存在しないことは、キメラ誘導の度合いおよび特異性を実証するものであることが示される。ＳｅｅＢｌｕｅ（登録商標）Ｐｌｕｓ２染色済みＭＷ標準を示す。

【０３１１】
例２
この例では、生物活性カーゴを無傷の上皮を通して運搬するその能力に関して、融合分子の適切なフォールディングを確認するための生体外法について記載する。

【０３１２】
Ｊ７７４マウスマクロファージ細胞株を、ＩＬ‐１０応答性細胞株として用いてよい（O'Farrell AM, et al., EMBO J, 17(4):1006-18, 1998）。ＩＬ‐１０は、その最適活性のために必要とされる二量体を自然に形成する。大腸菌によって発現されたコリックス^{415}－$(G_4S)_3$－ＩＬ‐１０を封入体から回収し、ジスルフィドシャッフリング交換バッファー系（disulphide shuffle exchange buffer system）を用いてフォールディングした。得られた物質をイオン交換および分子ふるいクロマトグラフィによって精製し、２つのコリックス^{415}分子と結合したＩＬ‐１０二量体（以降「二量体コリックス^{415}－ＩＬ‐１０」融合分子と称する）の予測されたサイズである約１３０ｋＤａのタンパク質が単離される結果となった。この製剤は、ＳＤＳ ＰＡＧＥに基づいて、約８５～９０％のタンパク質純度を有していた。Ｊ７７４．２細胞株の培養物を、２５ｎＭおよび２５０ｎＭの濃度の二量体コリックス^{415}－ＩＬ‐１０融合分子で４８時間処理した。未

処理の対応する細胞と比較して、二量体コリックス^{415}－ＩＬ‐１０融合分子は、生／死細胞のフローサイトメトリーで評価した場合、用量依存的な細胞数の減少を示した（図４参照）。値は、ｎ＝４±標準偏差を表す。

【０３１３】

別の選択肢として、頂端から側底へのトランスサイトーシスのために用いられる細胞単層の側底コンパートメント（basal compartment）にＩＬ‐１０応答性細胞を共培養することも可能である（Rubas W, et al., Pharm Res. 13(1):23-6, 1996）。

【０３１４】

例３

この例では、二量体コリックス^{415}－（G_4S）$_3$－ＩＬ‐１０融合分子を、Ｃａｃｏ‐２細胞単層のバリア特性に対するその効果について生体外で評価した。側底コンパートメントからの培地を含むＣａｃｏ‐２細胞（ヒト結腸癌由来細胞株）を、数時間にわたって定期的にサンプリングする（Rubas W, et al., J Pharm Sci., 85(2):165-9, 1996）。Ｃａｃｏ‐２（ＡＴＣＣ　ＨＴＢ‐３７（商標））細胞を、完全培地：１０％　ウシ胎仔血清、２．５ｍＭ　グルタミン、１００Ｕ　ペニシリン／ｍｌ、および１００μｇ　ストレプトマイシン／ｍｌを添加したダルベッコ変法イーグル培地Ｆ１２（ＤＭＥＭ　Ｆ１２）（ギブコＢＲＬ（Gibco BRL）、ニューヨーク州、グランドアイランド）中、５％　CO_2、３７℃で維持する。２から３日ごとにこの培地（指定した完全培地）を細胞に供給し、５から７日ごとに継代培養する。アッセイでは、２４または９６ウェルプレートに細胞を播種し、コンフルエントまで成長させる。

【０３１５】

これらの研究に用いた確立されたＣａｃｏ‐２単層は、チョップスティック型（chopstick）Ｍｉｌｌｉｃｅｌｌ‐ＥＲＳ（登録商標）電圧計（ミリポア（Millipore））を用いて測定した場合、約４５０～６００Ω・ｃｍ^2（平均５７９Ω・ｃｍ^2）の経上皮電気抵抗（ＴＥＲ）値を有していた。フルオレセイン標識７０ｋＤａデキストランおよび種々の濃度（４．７ｎＭ、２３．６ｎＭ、および２３６ｎＭ）の二量体コリックス^{415}－（G_4S）$_3$－ＩＬ‐１０融合分子を、これらの単層の頂端膜側に添加し、１５０μＬ体積分を補充しながら回収することにより、側底コンパートメントで検出される蛍光の累積量を経時でモニタリングした。図５および図６に示されるように、フィルター支持体上にＣａｃｏ‐２細胞が存在しない場合、デキストランは、頂端から側底コンパートメントへ迅速に移動した。比較すると、Ｃａｃｏ‐２単層を通しての７０ｋＤａデキストランの輸送の度合いは、非常に低く、種々の二量体コリックス^{415}－ＩＬ‐１０融合分子は、Ｃａｃｏ‐２単層を通しての７０ｋＤａデキストランの輸送の度合いに、何らの用量依存的効果も有することがなく、二量体コリックス^{415}－ＩＬ‐１０融合分子に暴露されなかったＣａｃｏ‐２単層で得られた結果と大きな違いはなかった。二量体コリックス^{415}－（G_4S）$_3$－ＩＬ‐１０融合分子は、Ｃａｃｏ‐２細胞単層のバリア特性に対して生体外で明らかな影響を与えない。

【０３１６】

例４

この例では、ＥＬＩＳＡアッセイを行って、二量体コリックス^{415}－（G_4S）$_3$－ＩＬ‐１０融合分子がＣａｃｏ‐２細胞単層を通って移動する能力を評価する。Ａ５４９（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ‐１８５（商標））、Ｌ９２９（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ‐２１４８（商標））、およびＣａｃｏ‐２（ＡＴＣＣ　ＨＴＢ‐３７（商標））細胞を、完全培地：１０％　ウシ胎仔血清、２．５ｍＭ　グルタミン、１００Ｕ　ペニシリン／ｍｌ、および１００μｇ　ストレプトマイシン／ｍｌを添加したダルベッコ変法イーグル培地Ｆ１２（ＤＭＥＭ　Ｆ１２）（ギブコＢＲＬ、ニューヨーク州、グランドアイランド）中、５％　CO_2、３７℃で維持する。２から３日ごとにこの培地（指定した完全培地）を細胞に供給し、５から７日ごとに継代培養する。アッセイでは、２４または９６ウェルプレートに細胞を播種し、コンフルエントまで成長させる。

【０３１７】

Ｃａｃｏ‐２細胞を、コラーゲンコーティングした０．４μｍポアサイズポリカーボネート膜トランズウェルサポート（transwell supports）（コーニング‐コスター（Corning-Costar）、マサチューセッツ州、ケンブリッジ）上でコンフルエントな単層として成長させ、チョップスティック型Ｍｉｌｌｉｃｅｌｌ‐ＥＲＳ（登録商標）電圧計（ミリポア）を用いて測定した場合の＞２５０Ω・ｃｍ２の経上皮電気抵抗（ＴＥＲ）が得られた１８～２５日後に用いる。二量体コリックス^{415}－（Ｇ$_4$Ｓ）$_3$－ＩＬ‐１０融合分子のこれらの単層を通した頂端から側底への（Ａ→Ｂ）輸送を、３７℃で４．７ｎＭ、２３．６ｎＭ、および２３６ｎＭを適用した４時間後に輸送されたタンパク質の量を測定することによって特定する。ＴＥＲ測定値および１０ｋＤａ蛍光デキストランの度合い（ＨＰＬＣ分子ふるいプロトコルを用いて測定）を用いて、研究の過程での単層バリア特性を評価する。コリックス輸送の度合いは、細胞を用いた細胞傷害性アッセイにおいて、回収した培地の滴定によって特定する。輸送された二量体コリックス^{415}－（Ｇ$_4$Ｓ）$_3$－ＩＬ‐１０融合分子は、捕捉のために抗ＩＬ‐１０抗体を、検出のためにコリックスに対するポリクローナル血清を用いた酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）によって測定する。図７（ＡおよびＢ）に示されるように、二量体コリックス^{415}－（Ｇ$_4$Ｓ）$_3$－ＩＬ‐１０融合分子は、Ｃａｃｏ‐２細胞単層を通って移動している。

【０３１８】

例５

この例では、開裂性配列を持たない非天然融合分子の作製について記載する。これらの融合分子は、粘膜下／ＧＩ腔を特異的にターゲティングし、生物活性カーゴの作用をその腔に限定するように設計されている。

【０３１９】

コリックス毒素の無毒性変異体、コリックス毒素ΔＥ５８１（配列番号８１）をコードするプラスミドコンストラクトを作製する。タンパク質発現は、大腸菌ＤＨ５α細胞（インビトロジェン、カリフォルニア州、カールスバッド）を用い、適切なプラスミドを用いたヒートショック（４２℃で１分間）による形質転換の後に行う。抗生物質含有培地上で選択された形質転換細胞を単離し、ルリア・ベルターニ培地（Ｄｉｆｃｏ）で成長させる。タンパク質発現は、１ｍＭ　イソプロピル‐Ｄ‐チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を添加することによって誘導する。ＩＰＴＧ誘導の２時間後、４℃、５０００ｘｇで１０分間の遠心分離によって細胞を回収する。細胞溶解後に封入体を単離し、タンパク質を、６Ｍ　グアニジンＨＣｌおよび２ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）プラス６５ｍＭ　ジチオスレイトールで可溶化させる。リフォールディングおよび精製の後、タンパク質を、Ca^{2+}およびMg^{2+}を含まないＰＢＳ（ｐＨ７．４）中の約５ｍｌ／ｍｌにて、－８０℃で保存する。これらの研究に用いるタンパク質はすべて、分子ふるいクロマトグラフィに基づいて、純度＞９０％であることを確認する。

【０３２０】

次に、コリックス毒素ΔＥ５８１タンパク質を、タンパク質のＣ末端近傍に位置する遊離スルフヒドリル残基を通しての直接化学カップリングを可能とするために、そのＣ末端で修飾する。このＣ末端修飾は、タバコエッチウィルス（ＴＥＶ）からの高選択性プロテアーゼのためのコンセンサス開裂配列を有するシステイン拘束ループ、第二のシステイン、およびヘキサヒスチジン（Ｈｉｓ$_6$）タグを含む。第二のＣｙｓは、最終的にカップリングに用いられるＣｙｓとのジスルフィド架橋を形成するために含める。Ｈｉｓ$_6$配列をタンパク質に付加することは、精製を簡便化し、ＴＥＶ開裂配列は、穏和な還元の後に末端Ｃｙｓ残基を選択的に除去するための機構を提供する。ｎｔコリックスコンストラクトの発現および単離後のＴＥＶ開裂および０．１ｍＭ　ジチオテイトールによる穏和な還元により、カーゴ結合の一般的機構としてのマレイミドをベースとする反応を介して、生物活性カーゴの直接化学カップリングが可能となる。ＴＥＶプロテアーゼ開裂、還元、および遊離スルフヒドリルによるマレイミド反応を通してのカーゴカップリングの後、第二のNi^{2+}カラムクロマトグラフィ工程により、遊離されたＣ末端配列の除去を行った。

【０３２１】

例６

コリックス毒素ΔＥ５８１－カーゴの経上皮輸送を、Ｃａｃｏ－２単層を用いて生体外で評価する。Ｃａｃｏ－２細胞（継代数２５～３５）を、既に報告されているように、コンフルエントな単層まで成長させる；Rubas, W. et al., Pharm Res, 10:113-118 (1993)。簡潔に述べると、細胞を、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１０％　ウシ胎仔血清、および１００単位のペニシリン／ストレプトマイシンで高濃度化したＤＭＥＭ／高成長培地中、５％　CO_2および湿度９０％の雰囲気下、３７℃で維持する。細胞を、１：３の分割比で、７５ｃｍ^2　フラスコ中にて毎週継代培養し、予備湿潤およびコラーゲンコーティングしたコーニングコスター（マサチューセッツ州、ケンブリッジ）製の透過性（０．４μｍポアサイズ）ポリカーボネート（Ｔｒａｎｓｗｅｌｌ（商標））フィルターサポート上に、６３０００細胞／ｃｍ^{2}の密度で播種する。成長培地を、１日おきに交換する。電圧抵抗計（ワールドプレシジョンインスツルメンツ（World Precision Instruments）、フロリダ州、サラソタ）を用いて特定される著しい経上皮電気抵抗（ＴＥＥＲ）の取得によって判断される播種の２０～２６日後のコンフルエントな単層を用いる。

【０３２２】

頂端（Ａｐ）から側底（Ｂｌ）およびＢｌからＡｐ方向の経上皮輸送フラックス速度を、Ｃａｃｏ－２細胞の極性化単層を用いて生体外で測定して、それぞれ、粘膜から漿膜および漿膜から粘膜のフラックスイベントについて記載する。輸送研究を開始する直前に、各フィルターの経上皮電気抵抗（ＴＥＥＲ）を測定し、ＴＥＥＲの読み取りが＜２００Ω・ｃｍ2である単層は研究から除外する。ＡｐおよびＢｌの培地を、含まれている単層から取り除き、これらの表面を、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で１回洗浄する。次に、一式の単層に、１０μｇ　コリックス毒素ΔＥ５８１－カーゴおよび１０μｇ　ＴＲＩＴＣ－デキストラン、または１０μｇ　ＢＳＡ－カーゴおよび１０μｇ　ＴＲＩＴＣ－デキストランのＡｐ（供与側）適用を施す。次に、受け側（Ｂｌ）コンパートメントには、５００μＬ　ＰＢＳを与え、この輸送研究のT_0を設定する。供与側および受け側の両方のコンパートメントを、３７℃で４時間のインキュベーション後にサンプリングし、単層を通して輸送された物質の量、および頂端膜側に残された量をそれぞれ特定する。

【０３２３】

例７

この例では、そのＣ末端でＩＬ－１０ポリペプチドと直接融合した配列番号１のアミノ酸１～４１５をコードする配列を含む修飾コリックス毒素を含む融合分子（「コリックス^{415}－ＩＬ－１０融合分子」と称する）の大腸菌での作製および発現について記載する。タンパク質発現は、大腸菌ＤＨ５α細胞（インビトロジェン、カリフォルニア州、カールスバッド）を用い、適切なプラスミドを用いたヒートショック（４２℃で１分間）による形質転換の後に行う。抗生物質含有培地上で選択された形質転換細胞を単離し、ルリア・ベルターニ培地（Ｄｉｆｃｏ）で成長させる。タンパク質発現は、１ｍＭ　イソプロピル－Ｄ－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を添加することによって誘導する。ＩＰＴＧ誘導の２時間後、４℃、５０００ｘｇで１０分間の遠心分離によって細胞を回収する。細胞溶解後に封入体を単離し、タンパク質を、６Ｍ　グアニジンＨＣｌおよび２ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）プラス６５ｍＭ　ジチオスレイトールで可溶化させる。リフォールディングおよび精製の後、タンパク質を、Ca^{2+}およびMg^{2+}を含まないＰＢＳ（ｐＨ７．４）中の約５ｍｌ／ｍｌにて、－８０℃で保存する。これらの研究に用いるタンパク質はすべて、分子ふるいクロマトグラフィに基づいて、純度＞９０％であることを確認した。

【０３２４】

４６８／５０８ｎｍの励起／発光特性を有する赤色蛍光染料を共有結合で一体化されて含有し、アルデヒド表面官能基を有するポリスチレンビーズ（直径１０ｎｍ）（ＸＰＲ－５８２）を、デュークサイエンティフィック（Duke Scientific）（カリフォルニア州、パロアルト）から入手する。１００μｌのＸＰＲ－５８２ビーズ（固形分２％）を、およそ２．５ナノモルのＩＬ－１０またはコリックス^{415}－ＩＬ－１０融合分子と、最終体

積２００μｌの中性（ｐＨ７．０）リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中で混合する。室温で２時間緩やかに振とうした後、ＰＢＳ中のウシ血清アルブミン（ＢＳＡ；シグマ（Sigma）、ミズーリ州、セントルイス）の２ｍｇ／ｍｌ溶液を２０μｌ添加する。次に、製剤を、ＰＢＳによる希釈およびミリポア（マサチューセッツ州、ベッドフォード）製の１００００分子量カットオフのＭｉｃｒｏｃｏｎフィルター装置を用いた濃縮の３サイクルによって透析する。コーティングビーズの最終製剤は、固形分１％であった。

【０３２５】

例８

この例では、配列番号５２の修飾コリックス毒素配列（コリックス^{415}）、開裂性リンカー配列（配列番号１２１）または非開裂性リンカー（配列番号９８）、およびＴＮＦＳＦ阻害剤である生物活性カーゴを含む非天然単離融合分子を、例１に記載のように作製し、上記の例に記載のように評価して、適切なフォールディング、適切なサイズを確認する。

【０３２６】

６つの代表的融合分子発現ベクター（各リンカーについて３つ）を作製し、１）配列番号８８および８９の重鎖可変領域および軽鎖可変領域配列を含む抗体であるＴＮＦ阻害剤；２）配列番号９０および９１の重鎖可変領域および軽鎖可変領域配列を含む抗体であるＴＮＦ阻害剤；ならびに３）配列番号９２の配列を含むＩｇＧのＦｃ部分を有する可溶性ヒトＴＮＦＲ‐ｐ７５の二量体であるＴＮＦＳＦ阻害剤から選択されるＴＮＦＳＦ阻害剤を、融合分子が上皮細胞を通して頂端から側底へ輸送する能力について試験した。

【０３２７】

例９

この例では、配列番号５２の修飾コリックス毒素配列（コリックス^{415}）、開裂性リンカー配列（配列番号１２１）または非開裂性リンカー（配列番号９８）、および血糖降下剤である生物活性カーゴを含む非天然単離融合分子を、例１に記載のように作製し、上記の例に記載のように評価して、適切なフォールディング、適切なサイズを確認する。

【０３２８】

４つの代表的融合分子発現ベクター（各リンカーについて２つ）を作製し、１）配列番号９３の配列を含むＧＬＰ‐１アゴニストおよび２）配列番号９４の配列を含むＧＬＰ‐１アゴニストから選択される血糖降下剤を、融合分子が上皮細胞を通して頂端から側底へ輸送する能力について試験した。

【０３２９】

例１０

この例では、配列番号５２の修飾コリックス毒素配列（コリックス^{415}）、開裂性リンカー配列（配列番号１２１）または非開裂性リンカー（配列番号９８）、およびヒト成長ホルモンである生物活性カーゴを含む非天然単離融合分子を、例１に記載のように作製し、上記の例に記載のように評価して、適切なフォールディング、適切なサイズを確認する。

【０３３０】

２つの代表的融合分子発現ベクター（各リンカーについて１つ）を作製し、１）配列番号９５の配列を含むヒト成長ホルモンを、融合分子が上皮細胞を通して頂端から側底へ輸送する能力について試験した。

【０３３１】

例１１

この例では、例１で作製した融合分子の代表的な生物活性カーゴの組織における組織学的検出について記載する。融合分子の投与後、動物をCO_2窒息によって安楽死させ、心臓穿刺によって失血させた。特定の組織（リンパ節、気管、脳、脾臓　肝臓、ＧＩ管）を取り出し、ＰＢＳで少しリンスしていかなる残留血液をも除去し、ＯＣＴで凍結する。セクション（５ミクロン厚）をスライド上に載せる。スライドをアセトン中で１０分間固定し、ＰＢＳでリンスする。スライドを、３％　ペルオキシダーゼと共に５分間インキュベ

ートする。次に、スライドを、タンパク質でさらに５分間ブロックする。反応性生物活性カーゴに対する一次抗体を、１：１００の希釈率で３０分間スライド上でインキュベートし、続いてＰＢＳ洗浄を行う。次に、ビオチン標識二次抗体を、およそ１５分間インキュベートし、続いてＰＢＳ洗浄を行う。ストレプトアビジンＨＲＰ標識を、スライド上で１５分間インキュベートし、続いてＰＢＳ洗浄を行う。ＨＲＰクロマゲン（HRP Chromagen）を５分間適用し、続いて蒸留H_2O中で複数回リンスする。最後に、スライドをヘマトキシリンで１分間対比染色し、カバーグラスを掛け、生物活性カーゴの存在を調べる。

【０３３２】

本開示の融合分子は、対象への高分子の局所的または全身送達において、従来の技術と比較していくつかの利点を提供する。そのような利点の中で最も重要なことは、対象の皮膚に刺す針を用いることなく、対象へ生物活性カーゴを送達することができることである。多くの対象は、一定の用量の高分子を繰り返し必要とする。例えば、糖尿病患者には、血糖濃度を制御するために、１日に複数回のインスリン注射が必要である。そのような対象のクオリティオブライフは、高分子の送達を、注射を行うことなく達成することができれば、それに付随する痛みまたは考え得る合併症を回避することで大きく改善されることになる。

【０３３３】

加えて、生物活性カーゴと融合分子の残りの部分とのカップリングを、上皮細胞の側底膜に存在する酵素によって開裂されるリンカーを用いて行うことにより、生物活性カーゴの融合分子からの遊離および融合分子の残りの部分からの放出を、上皮膜を通したトランスサイトーシスの直後に発生させることが可能となる。そのような遊離は、生物活性カーゴに対する免疫応答の誘導の可能性を低下させる。また、それによって、生物活性カーゴは、融合分子の残りの部分が存在しない状態でそのターゲットと相互作用することも可能となる。

【０３３４】

加えて、開裂性リンカーを持たない非天然融合分子も、その（１もしくは複数の）受容体による、例えば生物活性カーゴの受容体も発現する（しかし、非常により少ない量で）免疫細胞の表面での修飾コリックス毒素のアンカー効果が、ターゲット細胞表面での生物活性カーゴのより高い露出を可能とし、コリックスのその受容体との結合、および例えばＩＬ‐１０のＩＬ‐１０Ｒとの結合を介する相乗効果を提供することができるという点で有利であり得る。

【０３３５】

さらに、ＧＩ上皮を通して輸送されると、本開示の融合分子は、血清中において長期間の半減期を示し、すなわち、融合分子の生物活性カーゴは、その非融合状態の生物活性カーゴと比較して長期間の血清中半減期を示し、融合分子の経口投与により、対象の血漿中で見られるよりも高い有効濃度の生物活性カーゴを対象の肝臓へ送達することができる。

【０３３６】

さらに、融合分子の実施形態は、組換え系において構築し、発現することができる。組換え技術により、適切ないずれの生物活性カーゴについても、その導入のために設計される挿入部位を有する融合分子を作製することができる。そのような挿入部位により、当業者であれば、新しい生物活性カーゴの送達のための融合分子を、そのような必要性が生じれば、迅速に、および容易に作製することができる。

【０３３７】

本明細書で開示され、請求される物品および方法はすべて、本開示に照らして、過度な実験を行うことなく作製および実行することができる。本開示の物品および方法を、実施形態の観点から記載してきたが、当業者であれば、本開示の趣旨および範囲から逸脱することなく、その物品および方法に変型例が適用されてよいことは明らかであろう。当業者にとって明らかであるそのような変型例および均等物はすべて、現存するかまたは以降で開発されるものであるかに関わらず、添付の請求項によって定められる本開示の趣旨および範囲に含まれるものと考えられる。本明細書中で言及されるすべての特許、特許出願、

および刊行物は、本開示が属する技術分野の当業者のレベルを示す。すべての特許、特許出願、および刊行物は、あらゆる点で、ならびに各個々の刊行物がありとあらゆる点でその全内容について参照により援用されると具体的におよび個別に示されている場合と同じ程度で、その全内容が参照により本明細書に援用される。本明細書に実例として記載される開示事項は、適切には、本明細書で具体的に開示されない（１もしくは複数の）いずれの要素が存在しない状態でも、実践されてよい。従って、例えば、本明細書のいずれの場合でも、「含んでいる」、「本質的に成っている」、および「成っている」の用語のいずれも、他の２つの用語のいずれかと交換されてよい。用いられてきた用語及び表現は、限定ではなく記述の用語として用いられており、そのような用語および表現の使用において、示され、記載される特徴のいずれの均等物およびその一部分をも除外することを意図するものではなく、請求される本開示の範囲内で様々な変更が可能であることは認識される。従って、本開示を、実施形態および所望に応じて存在してよい特徴によって具体的に開示してきたが、本明細書で開示される概念の変更および変型例が当業者によって用いられてよいこと、ならびにそのような変更および変型例が、添付の請求項によって定められる本開示の範囲内に含まれると見なされることは理解されるべきである。

【０３３８】

配列表フリーテキスト

添付の配列表に挙げるアミノ酸配列は、米国特許法施行規則第１．８２２条の定めに従い、アミノ酸に対する標準的な３文字表記を用いて示される。

【０３３９】

配列番号１は、成熟コレラ菌コリックス毒素の６３４アミノ酸配列である。

配列番号２は、６３４アミノ酸配列成熟コレラ菌コリックス毒素をコードする核酸配列である。

配列番号３～８０は、配列番号１に示される成熟コリックス毒素配列から誘導される様々な切断型コリックス毒素のアミノ酸配列である。

配列番号８１は、配列番号１のアミノ酸残基Ｅ５８１が欠失された成熟コリックス毒素のアミノ酸配列である。

配列番号８２は、ヒトインターロイキン‐１０（ＩＬ‐１０）のアミノ酸配列である。

配列番号８３は、ヒトインターロイキン‐１９（ＩＬ‐１９）のアミノ酸配列である。

配列番号８４は、ヒトインターロイキン‐２０（ＩＬ‐２０）のアミノ酸配列である。

配列番号８５は、ヒトインターロイキン‐２２（ＩＬ‐２２）のアミノ酸配列である。

配列番号８６は、ヒトインターロイキン‐２４（ＩＬ‐２４）のアミノ酸配列である。

配列番号８７は、ヒトインターロイキン‐２６（ＩＬ‐２６）のアミノ酸配列である。

配列番号８８　－　抗ＴＮＦアルファ抗体の重鎖可変領域配列

配列番号８９　－　抗ＴＮＦアルファ抗体の軽鎖可変領域配列

配列番号９０　－　抗ＴＮＦアルファ抗体の重鎖可変領域配列

配列番号９１　－　抗ＴＮＦアルファ抗体の軽鎖可変領域配列

配列番号９２　－　ヒトＴＮＦＲ‐ｐ７５‐Ｆｃ二量体融合タンパク質のアミノ酸配列

配列番号９３　－　ＧＬＰ‐１アゴニストペプチドアミノ酸配列（エキセナチド）

配列番号９４　－　ＧＬＰ‐１アゴニストペプチドアミノ酸配列（リラグルチド）

配列番号９５　－　ヒト成長ホルモンのアミノ酸配列（ソマトトロピン）

配列番号９６～１２１は、様々なペプチドリンカーのアミノ酸配列である。

配列番号１２２は、コリックス^{415}－ＴＥＶ－ＩＬ‐１０融合分子のアミノ酸配列である。

配列番号１２３は、コリックス^{415}－$(G_4S)_3$－ＩＬ‐１０融合分子のアミノ酸配列である。

【０３４０】

配列表

配列番号１　－　成熟コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV

NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRG
NNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG
HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK

配列番号２　－　成熟コレラ菌コリックス毒素をコードする核酸配列

ATGGTCGAAGAAGCTTTAAACATCTTTGATGAATGCCGTTCGCCATGTTCGTTGACCCCGGAACCGGGTAAGCCGATTCA
ATCAAAACTGTCTATCCCTAGTGATGTTGTTCTGGATGAAGGTGTTCTGTATTACTCGATGACGATTAATGATGAGCAGA
ATGATATTAAGGATGAGGACAAAGGCGAGTCCATTATCACTATTGGTGAATTTGCCACAGTACGCGCGACTAGACATTAT
GTTAATCAAGATGCGCCTTTTGGTGTCATCCATTTAGATATTACGACAGAAAATGGTACAAAAACGTACTCTTATAACCG
CAAAGAGGGTGAATTTGCAATCAATTGGTTAGTGCCTATTGGTGAAGATTCTCCTGCAAGCATCAAAATCTCCGTTGATG
AGCTCGATCAGCAACGCAATATCATCGAGGTGCCTAAACTGTATAGTATTGATCTCGATAACCAAACGTTAGAGCAGTGG
AAAACCCAAGGTAATGTTTCTTTTTCGGTAACGCGTCCTGAACATAATATCGCTATCTCTTGGCCAAGCGTGAGTTACAA
AGCAGCGCAGAAAGAGGGTTCACGCCATAAGCGTTGGGCTCATTGGCATACAGGCTTAGCACTGTGTTGGCTTGTGCCAA
TGGATGCTATCTATAACTATATCACCCAGCAAAATTGTACTTTAGGGGATAATTGGTTTGGTGGCTCTTATGAGACTGTT
GCAGGCACTCCGAAGGTGATTACGGTTAAGCAAGGGATTGAACAAAAGCCAGTTGAGCAGCGCATCCATTTCTCCAAGGG
GAATGCGATGAGCGCACTTGCTGCTCATCGCGTCTGTGGTGTGCCATTAGAAACTTTGGCGCGCAGTCGCAAACCTCGTG
ATCTGACGGATGATTTATCATGTGCCTATCAAGCGCAGAATATCGTGAGTTTATTTGTCGCGACGCGTATCCTGTTCTCT
CATCTGGATAGCGTATTTACTCTGAATCTTGACGAACAAGAACCAGAGGTGGCTGAACGTCTAAGTGATCTTCGCCGTAT
CAATGAAAATAACCCGGGCATGGTTACACAGGTTTTAACCGTTGCTCGTCAGATCTATAACGATTATGTCACTCACCATC
CGGGCTTAACTCCTGAGCAAACCAGTGCGGGTGCACAAGCTGCCGATATCCTCTCTTTATTTTGCCCAGATGCTGATAAG
TCTTGTGTGGCTTCAAACAACGATCAAGCCAATATCAACATCGAGTCTCGTTCTGGCCGTTCATATTTGCCTGAAAACCG
TGCGGTAATCACCCCTCAAGGCGTCACAAATTGGACTTACCAGGAACTCGAAGCAACACATCAAGCTCTGACTCGTGAGG
GTTATGTGTTCGTGGGTTACCATGGTACGAATCATGTCGCTGCGCAAACCATCGTGAATCGCATTGCCCCTGTTCCGCGC
GGCAACAACACTGAAAACGAGGAAAAGTGGGGCGGGTTATATGTTGCAACTCACGCTGAAGTTGCCCATGGTTATGCTCG
CATCAAAGAAGGGACAGGGGAGTATGGCCTTCCGACCCGTGCTGAGCGCGACGCTCGTGGGGTAATGCTGCGCGTGTATA
TCCCTCGTGCTTCATTAGAACGTTTTTATCGCACGAATACACCTTTGGAAAATGCTGAGGAGCATATCACGCAAGTGATT
GGTCATTCTTTGCCATTACGCAATGAAGCATTTACTGGTCCAGAAAGTGCGGGCGGGGAAGACGAAACTGTCATTGGCTG
GGATATGGCGATTCATGCAGTTGCGATCCCTTCGACTATCCCAGGGAACGCTTACGAAGAATTGGCGATTGATGAGGAGG
CTGTTGCAAAAGAGCAATCGATTAGCACAAAACCACCTTATAAAGAGCGCAAAGATGAACTTAAG

配列番号３　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{386}

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA

配列番号４　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{385}

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ

配列番号５　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{384}

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA

配列番号６　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{383}
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAG
配列番号７　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{382}
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSA
配列番号８　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{381}
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTS
配列番号９　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{380}
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQT
配列番号１０　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{379}
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQ
配列番号１１　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{378}
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE
配列番号１２　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{377}
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTP
配列番号１３　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{376}
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLT
配列番号１４　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{375}
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV

NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGL

配列番号１５　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{374}

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPG

配列番号１６　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{373}

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP

配列番号１７　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{372}

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHH

配列番号１８　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{371}

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH

配列番号１９　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{370}

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT

配列番号２０　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{369}

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYV

配列番号２１　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{368}

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDY

配列番号２２　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{367}

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA

GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYND

配列番号２３　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３６６

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYN

配列番号２４　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３６５

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIY

配列番号２５　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３６４

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQI

配列番号２６　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３６３

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQ

配列番号２７　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３６２

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVAR

配列番号２８　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３６１

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVA

配列番号２９　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３６０

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTV

配列番号３０　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３５９

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLT

配列番号３１　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３５８
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVL
配列番号３２　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３５７
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQV
配列番号３３　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３５６
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQ
配列番号３４　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３５５
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVT
配列番号３５　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３５４
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMV
配列番号３６　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３５３
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGM
配列番号３７　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３５２
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPG
配列番号３８　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３５１
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNP
配列番号３９　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３５０
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV

NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENN

配列番号４０　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{349}

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINEN

配列番号４１　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{348}

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINE

配列番号４２　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{425}

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNNDQANINIESRSGRSYLPEN

配列番号４３　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{424}

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNNDQANINIESRSGRSYLPE

配列番号４４　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{423}

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNNDQANINIESRSGRSYLP

配列番号４５　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{422}

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNNDQANINIESRSGRSYL

配列番号４６　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス^{421}

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS

CVASNNDQANINIESRSGRSY
配列番号４７　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４２０
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNNDQANINIESRSGRS
配列番号４８　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４１９
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNNDQANINIESRSGR
配列番号４９　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４１８
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNNDQANINIESRSG
配列番号５０　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４１７
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNNDQANINIESRS
配列番号５１　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４１６
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNNDQANINIESR
配列番号５２　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４１５
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNNDQANINIES
配列番号５３　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４１４
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNNDQANINIE

配列番号５４　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４１３
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNNDQANINI
配列番号５５　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４１２
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNNDQANIN
配列番号５６　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４１１
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNNDQANI
配列番号５７　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４１０
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNNDQAN
配列番号５８　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４０９
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNNDQA
配列番号５９　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４０８
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNNDQ
配列番号６０　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４０７
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNND
配列番号６１　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４０６

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNN

配列番号６２　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４０５

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASN

配列番号６３　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４０４

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVAS

配列番号６４　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４０３

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVA

配列番号６５　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４０２

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CV

配列番号６６　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４０１

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
C

配列番号６７　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス４００

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS

配列番号６８　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３９９

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK

TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK
配列番号６９　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３９８
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDAD
配列番号７０　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３９７
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDA
配列番号７１　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３９６
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPD
配列番号７２　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３９５
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCP
配列番号７３　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３９４
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFC
配列番号７４　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３９３
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLF
配列番号７５　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３９２
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSL
配列番号７６　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３９１
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH

LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS
配列番号７７　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３９０
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADIL
配列番号７８　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３８９
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADI
配列番号７９　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３８８
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAAD
配列番号８０　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックス３８７
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAA
配列番号８１　－　修飾コレラ菌コリックス毒素アミノ酸配列コリックスΔ５８１
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA
GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH
LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS
CVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRG
NNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG
HSLPLRNEAFTGPESAGGEDTVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
配列番号８２　－　ヒトインターロイキン‐１０アミノ酸配列
MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGC
QALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSE
FDIFINYIEAYMTMKIRN
配列番号８３　－　ヒトインターロイキン‐１９アミノ酸配列
MKLQCVSLWLLGTILILCSVDNHGLRRCLISTDMHHIEESFQEIKRAIQAKDTFPNVTILSTLETLQIIKPLDVCCVTKN
LLAFYVDRVFKDHQEPNPKILRKISSIANSFLYMQKTLRQCQEQRQCHCRQEATNATRVI HDNYDQLEVHAAAIKSLGE
LDVFLAWINKNHEVMSSA
配列番号８４　－　ヒトインターロイキン‐２０アミノ酸配列
MKASSLAFSLLSAAFYLLWTPSTGLKTLNLGSCVIATNLQEIRNGFSEIRGSVQAKDGNIDIRILRRTESLQDTKPANRC
CLLRHLLRLYLDRVFKNYQTPDHYTLRKISSLANSFLTIKKDLRLCHAHMTCHCGEEAMK KYSQILSHFEKLEPQAAVV
KALGELDILLQWMEETE
配列番号８５　－　ヒトインターロイキン‐２２アミノ酸配列
MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLALLVQGGAAAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLF
HGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGE
IKAIGELDLLFMSLRNACI

配列番号８６　－　ヒトインターロイキン‐２４アミノ酸配列
MNFQQRLQSLWTLASRPFCPPLLATASQMQMVVLPCLGFTLLLWSQVSGAQGQEFHFGPCQVKGVVPQKLWEAFWAVKDT
MQAQDNITSARLLQQEVLQNVSDAESCYLVHTLLEFYLKTVFKNYHNRTVEVRTLKSFSTLANNFVLIVSQLQPSQENEM
FSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEAALTKALGEVDILLTWMQKFYKL
配列番号８７　－　ヒトインターロイキン‐２６アミノ酸配列
MLVNFILRCGLLLVTLSLAIAKHKQSSFTKSCYPRGTLSQAVDALYIKAAWLKATIPEDRIKNIRLLKKKTKKQFMKNCQ
FQEQLLSFFMEDVFGQLQLQGCKKIRFVEDFHSLRQKLSHCISCASSAREMKSITRMKRIFYRIGNKGIYKAISELDILL
SWIKKLLESSQ
配列番号８８　－　抗ＴＮＦアルファ抗体の重鎖可変領域配列
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVERGFTISRDNAKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
配列番号８９　－　抗ＴＮＦアルファ抗体の軽鎖可変領域配列
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号９０　－　抗ＴＮＦアルファ抗体の重鎖可変領域配列
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAIISFDGSNKSSADSVKGRFTYSRRNSKNALF
LQMNSLRAEDTAVFYCARDRGVSAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
配列番号９１　－　抗ＴＮＦアルファ抗体の軽鎖可変領域配列
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTRFTLTISSLEP
EDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIL
配列番号９２　－　ヒトＴＮＦＲ‐ｐ７５‐Ｆｃ二量体融合タンパク質のアミノ酸配列
LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSS
DQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPH
QICNVVAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLLPMGPSPPAEGSTGDEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号９３　－　ＧＬＰ‐１アゴニストペプチドアミノ酸配列（エキセナチド）
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
配列番号９４　－　ＧＬＰ‐１アゴニストペプチドアミノ酸配列（リラグルチド）
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEEFIIAWLVKGRG
配列番号９５　－　ヒト成長ホルモンのアミノ酸配列（ソマトトロピン）
FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISL
LLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNY
GLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
配列番号９６　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
GGGGS
配列番号９７　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
GGGGSGGGGS
配列番号９８　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
GGGGSGGGGSGGGGS
配列番号９９　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
GGGGSGGG
配列番号１００　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
AAPF
配列番号１０１　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
GGF
配列番号１０２　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列

AAPV
配列番号１０３　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
GGL
配列番号１０４　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
AAL
配列番号１０５　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
FVR
配列番号１０６　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
VGR
配列番号１０７　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
RKPR
配列番号１０８　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
Ｙ Ｖ Ａ Ｄ Xaa　　Xaa＝任意のアミノ酸
配列番号１０９　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
Ｄ Xaa Xaa Ｄ Xaa　　Xaa＝任意のアミノ酸
配列番号１１０　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
Ｒ $(Xaa)_n$ Ｒ Xaa　　Xaa＝任意のアミノ酸　ｎ＝０、２、４、または６
配列番号１１１　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
Ｋ $(Xaa)_n$ Ｒ Xaa　　Xaa＝任意のアミノ酸　ｎ＝０、２、４、または６
配列番号１１２　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
Ｅ Ｒ Ｔ Ｋ Ｒ Xaa　　Xaa＝任意のアミノ酸
配列番号１１３　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
Ｒ Ｖ Ｒ Ｒ Xaa　　Xaa＝任意のアミノ酸
配列番号１１４　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
デカノイル-Ｒ Ｖ Ｒ Ｒ Xaa　　Xaa＝任意のアミノ酸
配列番号１１５　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
Ｐ Xaa Ｗ Ｖ Ｐ Xaa　　Xaa＝任意のアミノ酸
配列番号１１６　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
Ｗ Ｖ Ａ Xaa　　Xaa＝任意のアミノ酸
配列番号１１７　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
Xaa Ｆ Xaa Xaa　　Xaa＝任意のアミノ酸
配列番号１１８　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
Xaa Ｙ Xaa Xaa　　Xaa＝任意のアミノ酸　ｎ＝０、２、４、または６
配列番号１１９　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
Xaa Ｗ Xaa Xaa　　Xaa＝任意のアミノ酸　ｎ＝０、２、４、または６
配列番号１２０　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
(Ｖ、Ａ、またはＰ)-Ｙ-(Ｓ、Ｐ、またはＡ)と組み合わせたＤ Ｒ Ｗ Ｉ Ｐ Ｆ Ｈ Ｌ Ｌ
配列番号１２１　－　ペプチドリンカーのアミノ酸配列
GGGGSGGGENLYFQS
配列番号１２２　－　コリックス^{415}－ＴＥＶ－ＩＬ‐１０融合分子のアミノ酸配列
MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDED KGESIITIGEFATVRATRH
YVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFNRKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYET
VAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYNAQQIVSLFLATRILF
THIDSIFTLNLDGQEPEVAERLDDLRRINENNPGMVIQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDAD
KSCVASNSDQANINIESGGGGSGGGENLYFQSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLK
ESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQA ENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAF
NKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
配列番号１２３　－　コリックス^{415}－（G_4S）$_3$－ＩＬ‐１０融合分子のアミノ酸配列

MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDED KGESIITIGEFATVRATRH
YVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFNRKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYET
VAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYNAQQIVSLFLATRILF
THIDSIFTLNLDGQEPEVAERLDDLRRINENNPGMVIQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDAD
KSCVASNSDQANINIESGGGGSGGGGSGGGGSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLK
ESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQA ENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAF
NKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

【図１】

コリックス^{415}-TEV-IL-10 融合分子

```
MVEEALNIFD ECRSPCSLTP EPGKPIQSKL SIPGDVVLDE GVLYYSMTIN DEQNDIKDED KGESIITIGE
FATVRATRHY VSQDAPFGVI NLDITTENGT KTYSFNRKES EFAINWLVPI GEDSPASIKI SIDELDQQRN
IIEVPKLYSI DLDNQTLEQW KTQGNVSFSV TRPEHNIAIS WPSVSYKAAQ KEGSRHKRWA HWHTGLALCW
LVPIDAIYNY ITQQNCTLGD NWFGGSYETV AGTPKAITVK QGIEQKPVEQ RIHFSKKNAM EALAAHRVCG
VPLETLARSR KPRDLPDDLS CAYNAQQIVS LFLATRILFT HIDSIFTLNL DGQEPEVAER LDDLRRINEN
NPGMVIQVLT VARQIYNDYV THHPGLTPEQ TSAGAQAADI LSLFCPDADK SCVASNSDQA NINIESGGGG
SGGGENLYFQ SPGQGTQSEN SCTHFPGNLP NMLRDLRDAF SRVKTFFQMK DQLDNLLLKE SLLEDFKGYL
GCQALSEMIQ FYLEEVMPQA ENQDPDIKAH VNSLGENLKT LRLRLRRCHR FLPCENKSKA VEQVKNAFNK
LQEKGIYKAM SEFDIFINYI EAYMTMKIRN (配列番号：122)
```

コリックス^{415}-$(G_4S)_3$-IL-10 融合分子

```
MVEEALNIFD ECRSPCSLTP EPGKPIQSKL SIPGDVVLDE GVLYYSMTIN DEQNDIKDED KGESIITIGE
FATVRATRHY VSQDAPFGVI NLDITTENGT KTYSFNRKES EFAINWLVPI GEDSPASIKI SIDELDQQRN
IIEVPKLYSI DLDNQTLEQW KTQGNVSFSV TRPEHNIAIS WPSVSYKAAQ KEGSRHKRWA HWHTGLALCW
LVPIDAIYNY ITQQNCTLGD NWFGGSYETV AGTPKAITVK QGIEQKPVEQ RIHFSKKNAM EALAAHRVCG
VPLETLARSR KPRDLPDDLS CAYNAQQIVS LFLATRILFT HIDSIFTLNL DGQEPEVAER LDDLRRINEN
NPGMVIQVLT VARQIYNDYV THHPGLTPEQ TSAGAQAADI LSLFCPDADK SCVASNSDQA NINIESGGGG
SGGGGSGGGG SPGQGTQSEN SCTHFPGNLP NMLRDLRDAF SRVKTFFQMK DQLDNLLLKE SLLEDFKGYL
GCQALSEMIQ FYLEEVMPQA ENQDPDIKAH VNSLGENLKT LRLRLRRCHR FLPCENKSKA VEQVKNAFNK
LQEKGIYKAM SEFDIFINYI EAYMTMKIRN (配列番号：123)
```

FIG. 1

【図２】



FIG. 2

【図３】

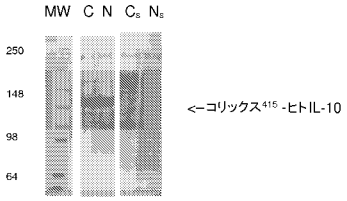


FIG. 3

【図４】

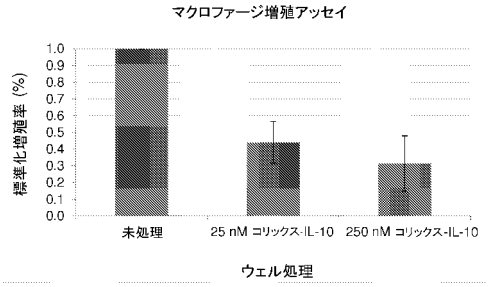


FIG. 4

【図５】

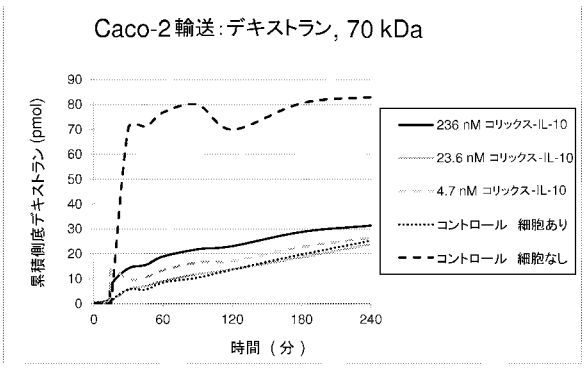


FIG. 5

【図６】

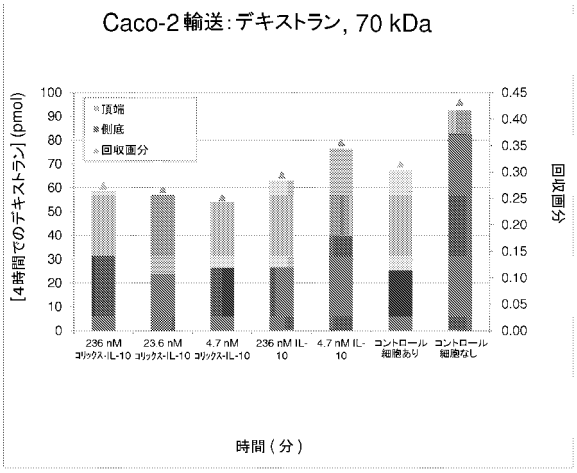
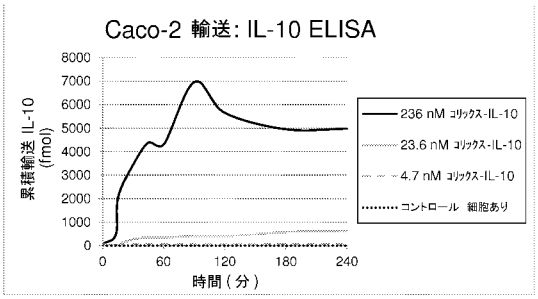


FIG. 6

【図７】

A



B

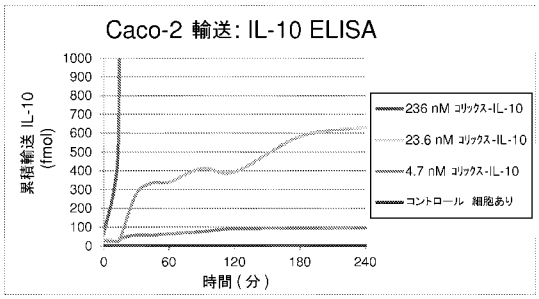


FIG. 7

【配列表】

2017519039000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/29795

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 47/48, A61P 1/00, A61P 1/04 (2015.01)
CPC - A61K 47/48261, C07K 2319/33
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)
IPC(8) - A61K 47/48, A61P 1/00, A61P 1/04 (2015.01)
CPC - A61K 47/48261, C07K 2319/33

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 514/1.1
(keyword limited; terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatBase, Google Patents, Google Scholar
Search terms: Cholix toxin, Cholix, fused, fusion, chimeric, cargo, delivery, carrier, inflammation, gastrointestinal, gastro-intestinal, GI, intestinal, receptor, truncated, shortened, receptor, interleukin 10, interleukin-10, IL10, IL-10, hyaluronidase, streptokinase, tissue plasmin

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2013/0172229 A1 (MRSNY et al.) 04 July 2013 (04.07.2013) para [0017], [0027], [0036], [0047], [0049]	1-2, (5-9)/(1-2), 34
Y	US 2011/0250199 A1 (FITZGERALD et al.) 13 October 2011 (13.10.2011) para [0002], [0166], [0271], [0300]; SEQ ID NO: 31	1-2, (5-9)/(1-2), 34
Y	US 2003/0186386 A1 (HANSEN et al.) 02 October 2003 (02.10.2003) para [0006], [0015]; SEQ ID NO: 1	(8-9)/(1-2)
Y	US 2009/0148401 A1 (MRSNY) 11 June 2009 (11.06.2009) abstract; para [0007], [0011], [0169]; SEQ ID NO: 17	34

☐ 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
16 October 2015 (16.10.2015)	13 NOV 2015
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. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/29795

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 22-33 and 36-57
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-----please see extra sheet-----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-2, 5-9 (in part), and 34, limited to SEQ ID NOs: 42, 82, and 114

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/29795

Continuation of: Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1-21 and 34-35, drawn to a pharmaceutical composition comprising a fusion molecule comprising a modified Cholixin toxin and a biologically active cargo, wherein the fusion molecule has the ability to activate the receptor for the biologically active cargo, or to enable the catalytic process of a catalytically-active material. The pharmaceutical composition will be searched to the extent that the fusion molecule encompasses:
- a modified Cholixin toxin truncated within Cholix toxin domain Ib, comprising the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 42 (claims 1, 2); and
- a biologically active cargo comprising a polypeptide moldulator of inflammation in the GI tract, which is interleukin-10 (SEQ ID NO: 82) (claims 5-9); and
- a cleavable linker set forth in SEQ ID NO: 114 (claim 34).
It is believed that claims 1-2, 5-9 (in part), and 34, limited to SEQ ID NOs: 42, 82, and 114, encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a fusion molecule comprising a modified Cholixin toxin sequence of SEQ ID NO: 42 and an interleukin-10 sequence of SEQ ID NO: 82. Additional fusion molecules comprising other combinations of modified Cholixin toxin, biologically active cargo, and (in some embodiments) a cleavable linker will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims and sequences for Cholixin toxin, biologically active cargo, and cleavable linker that encompass any additionally elected fusion molecule(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a pharmaceutical composition comprising a fusion molecule that comprises: a modified Cholixin toxin that is truncated at an amino acid residue within Cholix toxin domain II having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4; and a biologically active cargo comprising a polypeptide modulator of inflammation in the GI tract, which is interleukin-19 (SEQ ID NO: 83), i.e. claims 3-4 and 5-8 (in part).

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

The technical feature of each of the inventions listed as Group I+ is the specific fusion molecules comprising sequences for Cholixin toxin, biologically active cargo, and (in some embodiments) a cleavable linker, recited therein. Each invention requires a fusion molecules not required by any of the other inventions

Common Technical Features

The feature shared by Groups I+ is a pharmaceutical composition comprising a non-naturally occurring fusion molecule and one or more pharmaceutically acceptable carriers, formulated for oral delivery to a subject, wherein the fusion molecule comprises a modified Cholix toxin coupled to a biologically active cargo, wherein the Cholix toxin is truncated at an amino acid residue within Cholix toxin domain Ib (claims 1 and 20).

Another feature shared by Groups I+ is a pharmaceutical composition comprising a non-naturally occurring fusion molecule and one or more pharmaceutically acceptable carriers, formulated for oral delivery to a subject, wherein the fusion molecule comprises a modified Cholix toxin coupled to a biologically active cargo, wherein the Cholix toxin is truncated at an amino acid residue within Cholix toxin domain II that is not amino acid residue Ala386 (claims 3 and 21).

Another feature shared by Groups I+ is wherein the fusion molecule has the ability to activate the receptor for the biologically active cargo, or to enable the catalytic process of a catalytically-active material (claims 1 and 3).

Another feature shared by Groups I+ is wherein the biologically active cargo is a macromolecule, small molecule, peptide, polypeptide, nucleic acid, mRNA, miRNA, shRNA, siRNA, antisense molecule, antibody, DNA, plasmid, vaccine, polymer nanoparticle, or catalytically -active material (claim 5).

-----please see continuation on next extra sheet-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/29795

Continuation of: Box No. III Observations where unity of invention is lacking

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by US 2013/0172229 A1 to Mrsny et al. (hereinafter 'Mrsny') in view of US 2011/0250199 A1 to Fitzgerald et al. (hereinafter 'Fitzgerald').

Mrsny discloses a pharmaceutical composition comprising a non-naturally occurring fusion molecule and one or more pharmaceutically acceptable carriers (para [0047] "The pharmaceutical compositions of the present invention comprise a genetic fusion or chemical construct of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier"), formulated for oral delivery to a subject (para [0049] "the delivery constructs of the invention can be orally administered"), wherein the fusion molecule comprises a modified Cholix toxin coupled to a biologically active cargo (para [0017] "isolated delivery constructs (e.g., genetic fusions or chemical constructs) comprising a transporter domain (e.g., a Cholix-derived polypeptide sequence) and a cargo ... such cargo may include one, or any of: proteins, peptides, small molecules, siRNA, PNA, miRNA, DNA, plasmid, and antisense").

Mrsny does not teach wherein the Cholix toxin is truncated at an amino acid residue within Cholix toxin domain Ib. However, Fitzgerald discloses a Cholix toxin truncated at an amino acid residue within Cholix toxin domain Ib (para [0166] "A CT [Cholix toxin] underlying the present invention comprises or consists of a truncated version of CT ... For example, it is anticipated that some or all of CT domain Ib can be deleted"). Fitzgerald further teaches that a fusion protein comprising the cholix toxin can be used to treat disease (para [0002] "The present invention relates generally to toxins, and targeted toxins, more specifically to antibody-toxin fusion proteins, referred to as immunotoxins. Toxins and targeted toxins comprise cholix toxin (CT)"; para [0300] "Among various uses of the targeted toxins of the present invention are included a variety of disease conditions caused by specific human cells that may be eliminated by the toxic action of the fusion protein") and can be formulated as a pharmaceutical composition for oral administration (para [0271]). Thus, one of ordinary skill in the art would have found it obvious that the pharmaceutical composition for oral delivery comprising a Cholix toxin, as taught by Mrsny, can comprise the truncated Cholix toxin of Fitzgerald.

Mrsny also discloses a pharmaceutical composition comprising a non-naturally occurring fusion molecule and one or more pharmaceutically acceptable carriers (para [0047]), formulated for oral delivery to a subject (para [0049]), wherein the fusion molecule comprises a modified Cholix toxin coupled to a biologically active cargo (para [0017]).

Mrsny does not teach wherein the Cholix toxin is truncated at an amino acid residue within Cholix toxin domain II that is not amino acid residue Ala386. However, Fitzgerald suggests a Cholix toxin that is truncated at an amino acid residue within domain II that is not amino acid residue Ala386. Fitzgerald teaches that domain II of Cholix toxin (CT) is located at amino acid residues 270-386 of the mature toxin (para [0093] "Domain II (amino acid residues 270-386, as shown in FIG. 9C and in SEQ ID NO:31)") and further teaches that the Cholix toxin can be truncated at an amino acid residue within Cholix toxin domain II that is not amino acid residue Ala386 (para [0166] "A CT underlying the present invention comprises or consists of a truncated version of CT ... Given the similarity of CT and PE (see FIG. 9B), it is expected that additional variants of CT, such as a ... CT35 variant, can be made that correspond to variants of PE as described in the preceding section"; para [0155] ""PE35" is a 35 kD carboxyl-terminal fragment of PE in which amino acid residues 1-279 have deleted and the molecule commences with a methionine at position 280 followed by amino acids 281-364 and 381-613 of native PE"; the Cholix toxin CT35 variant that corresponds to PE35 would be truncated at amino acid residue 280 which is located within domain II of the Cholix toxin). Fitzgerald further teaches that a fusion protein comprising the cholix toxin can be used to treat disease (para [0002] "The present invention relates generally to toxins, and targeted toxins, more specifically to antibody-toxin fusion proteins, referred to as immunotoxins. Toxins and targeted toxins comprise cholix toxin (CT)"; para [0300] "Among various uses of the targeted toxins of the present invention are included a variety of disease conditions caused by specific human cells that may be eliminated by the toxic action of the fusion protein") and can be formulated as a pharmaceutical composition for oral administration (para [0271]). Thus, one of ordinary skill in the art would have found it obvious that the pharmaceutical composition for oral delivery comprising a Cholix toxin, as taught by Mrsny, can comprise the truncated Cholix toxin of Fitzgerald.

Mrsny further discloses wherein the fusion molecule has the ability to activate the receptor for the biologically active cargo, or to enable the catalytic process of a catalytically-active material (para [0036] "The receptor binding domain can be any receptor binding domain known to one of skill in the art without limitation to bind to a cell surface receptor that is present on the apical membrane of an epithelial cell. Preferably, the receptor binding domain binds specifically to the cell surface receptor. The receptor binding domain should bind to the cell surface receptor with sufficient affinity to allow endocytosis of the delivery construct").

Mrsny further discloses [claim 5] wherein the biologically active cargo is a macromolecule, small molecule, peptide, polypeptide, nucleic acid, mRNA, miRNA, shRNA, siRNA, antisense molecule, antibody, DNA, plasmid, vaccine, polymer nanoparticle, or catalytically-active material (para [0017] "such cargo may include one, or any of: proteins, peptides, small molecules, siRNA, PNA, miRNA, DNA, plasmid, and antisense"; para [0036] "A "cargo" as used herein includes, but is not limited to: macromolecules, small molecules, siRNA, PNA, miRNA, DNA, plasmid and antisense molecules").

-----please see continuation on next extra sheet-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/29795

Continuation of: Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Another feature shared by Groups I+ is the pharmaceutical composition comprising a non-naturally occurring fusion molecule, as previously discussed above, wherein the biologically active cargo is an enzyme selected from hyaluronidase, streptokinase, tissue plasminogen activator, urokinase, or PGE-adenosine deaminase (claims 20 and 21).

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by Mrsny in view of Fitzgerald and further in view of US 2008/0317761 A1 to Cines et al. (hereinafter 'Cines').

The combination of Mrsny and Fitzgerald discloses the pharmaceutical composition comprising a non-naturally occurring fusion molecule, as previously discussed (see discussion above), but does not teach, wherein the biologically active cargo is an enzyme selected from hyaluronidase, streptokinase, tissue plasminogen activator, urokinase, or PGE-adenosine deaminase. Cines discloses pharmaceutical compositions comprising biologically active cargo linked to a transport moiety (abstract "A pharmaceutical composition comprises a therapeutic peptide or protein, a transport moiety capable of transporting said first peptide or protein into a hematopoietic cell differentiated from a common myeloid progenitor, and a linker between said first protein and said transport moiety"), wherein the biologically active cargo is an enzyme selected from tissue plasminogen activator and urokinase (para [0039] "Depending upon the use for which the composition is constructed, the therapeutic peptide/protein is any peptide, polypeptide or protein useful for the treatment of a disorder or reduction or prevention of a symptom in which cells of the hematopoietic system are involved. ... such peptides/proteins include fibrinolytic proteins, including without limitation, urokinase-type plasminogen activator (u-PA), and tissue plasminogen activator (tpA)"). Since Cines teaches that tissue plasminogen activator and urokinase can be the biologically active cargo in a fusion protein comprising a biologically active cargo linked to a transport moiety, and Mrsny and Fitzgerald teaches a fusion protein comprising a biologically active cargo linked to a transport moiety, one of ordinary skill in the art would have found it obvious that the biologically active cargo in the fusion protein of Mrsny and Fizgerald can be the tissue plasminogen activator and urokinase of Cines.

Group I+ therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10		4H045
A61K	*35/74*	*(2015.01)*	A61K	35/74	D	
A61P	*1/00*	*(2006.01)*	A61P	1/00		
A61P	*1/04*	*(2006.01)*	A61P	1/04		
A61P	*17/06*	*(2006.01)*	A61P	17/06		
A61P	*29/00*	*(2006.01)*	A61P	29/00		
A61P	*3/10*	*(2006.01)*	A61P	3/10		
A61P	*19/02*	*(2006.01)*	A61P	19/02		
A61P	*17/00*	*(2006.01)*	A61P	29/00	101	
A61P	*25/00*	*(2006.01)*	A61P	17/00		
A61P	*21/00*	*(2006.01)*	A61P	25/00		
A61P	*7/00*	*(2006.01)*	A61P	21/00		
A61P	*7/06*	*(2006.01)*	A61P	7/00		
A61P	*37/06*	*(2006.01)*	A61P	7/06		
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61P	37/06		
A61P	*35/02*	*(2006.01)*	A61P	35/00		
A61P	*3/04*	*(2006.01)*	A61P	35/02		
A61P	*3/06*	*(2006.01)*	A61P	3/04		
A61P	*1/16*	*(2006.01)*	A61P	3/06		
A61P	*3/00*	*(2006.01)*	A61P	1/16		
A61P	*25/28*	*(2006.01)*	A61P	3/00		
A61P	*5/00*	*(2006.01)*	A61P	25/28		
A61P	*5/06*	*(2006.01)*	A61P	5/00		
A61P	*5/08*	*(2006.01)*	A61P	5/06		
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	5/08		
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61P	43/00	111	
A61K	*38/02*	*(2006.01)*	A61K	39/395	D	
A61K	*38/20*	*(2006.01)*	A61K	39/395	N	
A61K	*38/22*	*(2006.01)*	A61K	38/02		
A61K	*38/27*	*(2006.01)*	A61K	38/20		
A61K	*38/46*	*(2006.01)*	A61K	38/22		
A61K	*38/45*	*(2006.01)*	A61K	38/27		
A61K	*47/50*	*(2017.01)*	A61K	38/46		
A61K	*47/42*	*(2017.01)*	A61K	38/45		
A61P	*5/14*	*(2006.01)*	A61K	47/48		
A61P	*7/04*	*(2006.01)*	A61K	47/42		
A61P	*21/04*	*(2006.01)*	A61P	5/14		
A61P	*31/04*	*(2006.01)*	A61P	7/04		
C07K	*14/28*	*(2006.01)*	A61P	21/04		
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	A61P	31/04		
C07K	*14/54*	*(2006.01)*	C07K	14/28		
			C07K	19/00		
			C07K	14/54		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,

BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者　ミルスニー，ランダル，ジェイ．
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　９４０２２，ロスアルトスヒルズ，ブエナヴィスタドライヴ　１１６２０
(72)発明者　マウッド，タヒル
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　９４０１０，バーリンゲーム，バルボアアヴェニュー　１３２４

Ｆターム(参考) 4B065 AA26X AB01 BA01 CA24 CA44
4C076 AA12 AA17 AA24 AA29 AA36 AA53 AA95 BB01 CC01 CC04
CC07 CC14 CC16 CC18 CC20 CC21 CC27 CC30 CC32 EE41
EE59 FF04 FF61
4C084 AA01 AA02 AA19 BA44 DA12 DA25 DB22 DB35 DC02 DC21
DC22 DC25 MA02 MA05 MA13 MA17 MA22 MA35 MA37 MA43
MA52 NA11 NA13 NA14 ZA021 ZA022 ZA151 ZA152 ZA511 ZA512
ZA531 ZA532 ZA551 ZA552 ZA661 ZA662 ZA681 ZA682 ZA701 ZA702
ZA751 ZA752 ZA891 ZA892 ZA941 ZA942 ZA961 ZA962 ZB081 ZB082
ZB111 ZB112 ZB151 ZB152 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZB351 ZB352
ZC041 ZC042 ZC061 ZC062 ZC201 ZC202 ZC331 ZC332 ZC351 ZC352
ZC411 ZC412 ZC421 ZC422
4C085 AA03 AA13 AA14 AA21 BA20 BB17 CC01 CC07 DD52 DD62
EE01 EE03 EE05 GG08
4C087 AA01 AA02 BC43 CA11 CA12 MA02 MA05 MA13 MA17 MA22
MA35 MA37 MA43 MA52 NA11 NA13 NA14 ZA02 ZA15 ZA51
ZA53 ZA55 ZA66 ZA68 ZA70 ZA75 ZA89 ZA94 ZB08 ZB11
ZB15 ZB26 ZB27 ZB35 ZC04 ZC06 ZC20 ZC33 ZC35 ZC41
ZC42
4H045 AA10 AA30 BA10 BA13 BA14 BA15 BA18 BA19 BA41 CA11
DA83 EA20 FA74