

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5087536号
(P5087536)

(45) 発行日 平成24年12月5日 (2012. 12. 5)

(24) 登録日 平成24年9月14日 (2012. 9. 14)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 19/00 (2006. 01)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C O 7 K 19/00 Z N A
C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21

請求項の数 29 (全 214 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-507949 (P2008-507949)
(86) (22) 出願日 平成18年4月18日 (2006. 4. 18)
(65) 公表番号 特表2008-538506 (P2008-538506A)
(43) 公表日 平成20年10月30日 (2008. 10. 30)
(86) 国際出願番号 PCT/US2006/015199
(87) 国際公開番号 W02006/116156
(87) 国際公開日 平成18年11月2日 (2006. 11. 2)
審査請求日 平成21年4月15日 (2009. 4. 15)
(31) 優先権主張番号 60/674, 342
(32) 優先日 平成17年4月22日 (2005. 4. 22)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 11/406, 454
(32) 優先日 平成18年4月17日 (2006. 4. 17)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500049716
アムジェン・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国 シーエー 9 1 3 2 0,
サウザンド オークス, ワン アムジェン
センター ドライブ
(74) 代理人 100062007
弁理士 川口 義雄
(74) 代理人 100114188
弁理士 小野 誠
(74) 代理人 100140523
弁理士 渡邊 千尋
(74) 代理人 100119253
弁理士 金山 賢教
(74) 代理人 100103920
弁理士 大崎 勝真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 延長された血液半減期を有するトキシンペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式：

$(X^1)_a - (F^1)_d - (X^2)_b - (F^2)_e - (X^3)_c$

で表される組成物又はその多量体、

[式中：

F^1 及び F^2 は、

(i) ヒト IgG の Fc ドメイン又はその CH2 ドメイン、

(ii) 1, 000 Da ~ 100, 000 Da の分子量のポリエチレングリコール (PEG)、

(iii) トランスサイレチンタンパク質ドメイン、及び

(iv) ヒト血清アルブミン (HSA) タンパク質ドメイン

から選択された部分であり；

d 及び e は、各々独立に、0 又は 1 であり（但し、d 及び e の少なくとも 1 つは 1 である）；

X^1 、 X^2 及び X^3 は、各々独立に、 $-(L)_f - P - (L)_g -$ であり、並びに f 及び g は、各々独立に、0 又は 1 であり；

P は、少なくとも 2 つのペプチド内ジスルフィド結合を含む、配列番号 914、配列番号 915、配列番号 916 又は配列番号 917 のアミノ酸配列を含む 80 アミノ酸残基長以下の ShK ペプチド類縁体であり；

Lは、リンカーであり；並びに

a、b及びcは、各々独立に、0又は1である（但し、a、b及びcの少なくとも1つは、1である）]、或いはその生理的に許容される塩。

【請求項2】

$P - (L)_g - F^1$ 、
 $F^1 - (L)_f - P$ 、
 $P - (L)_g - F^1 - (L)_f - P$ 、
 $F^1 - (L)_f - P - (L)_g - F^2$ 、
 $F^1 - (L)_f - P - (L)_g - F^2 - (L)_f - P$ 、
 $F^1 - F^2 - (L)_f - P$ 、
 $P - (L)_g - F^1 - F^2$ 、及び
 $P - (L)_g - F^1 - F^2 - (L)_f - P$ 、

から選択される式で表される、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

F^1 若しくは F^2 又は両方がヒトIgFcドメイン又はそのCH2ドメインを含む請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

ヒトIgGFcドメインがヒトIgG1Fcドメインを含む請求項3に記載の組成物。

【請求項5】

ヒトIgGFcドメインがヒトIgG2Fcドメインを含む請求項3に記載の組成物。

【請求項6】

F^1 及び F^2 が異なる請求項1に記載の組成物。

【請求項7】

F^1 若しくは F^2 又は両方が、配列番号：2、4、70、72、74、76、1340～1342、1359、1360、1362及び1363からなる群から選択される配列を含む請求項1に記載の組成物。

【請求項8】

F^1 若しくは F^2 又は両方が、ヒト血清アルブミンタンパク質ドメイン又はトランスサイレチンタンパク質ドメインを含む請求項1に記載の組成物。

【請求項9】

F^1 若しくは F^2 又は両方が、1, 000Da～100, 000Daの分子量のポリエチレングリコール（PEG）である請求項1に記載の組成物。

【請求項10】

PEGが5kD及び20kDのPEGからなる群から選択される請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

$F^1 - (L)_f - P - (L)_g - F^2$ 、
 $F^1 - (L)_f - P - (L)_g - F^2 - (L)_f - P$ 、
 $P - (L)_g - F^1 - F^2$ 、および
 $P - (L)_g - F^1 - F^2 - (L)_f - P$ （ここで、 F^1 がヒトIgGFcドメイン又はHSAであり、及び F^2 がPEGである）から選択される式で表される、又は
 $F^1 - (L)_f - P - (L)_g - F^2$ 、
 $F^1 - (L)_f - P - (L)_g - F^2 - (L)_f - P$ 、
 $F^1 - F^2 - (L)_f - P$ 、及び
 $P - (L)_g - F^1 - F^2 - (L)_f - P$ （ここで、 F^2 がヒトIgGFcドメイン又はHSAであり、及び F^1 がPEGである）から選択される式で表される請求項1に記載の組成物。

【請求項12】

非PEG F^1 若しくは非PEG F^2 に、又はPに、又はこれらの何れかのあらゆる組み合わせに抱合された1つ以上のPEG部分をさらに含む請求項1に記載の組成物。

【請求項 13】

トキシンペプチドがヒト IgG1Fcドメインループ中に挿入されている請求項1に記載の組成物。

【請求項 14】

F¹ 及び F² が (i)、(iii) 及び (iv) から選択される請求項1に記載の組成物をコードする DNA。

【請求項 15】

請求項14に記載のDNAを含む発現ベクター。

【請求項 16】

請求項15に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

10

【請求項 17】

細胞が真核細胞である請求項16に記載の宿主細胞。

【請求項 18】

細胞が哺乳動物細胞である請求項16に記載の宿主細胞。

【請求項 19】

細胞がCHO細胞である請求項16に記載の宿主細胞。

【請求項 20】

細胞が原核細胞である請求項16に記載の宿主細胞。

【請求項 21】

細胞がE. コリ細胞である請求項16に記載の宿主細胞。

20

【請求項 22】

請求項1に記載の組成物と、医薬として許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項 23】

患者において、多発性硬化症の症状の再発を予防する又は軽減するための医薬の調製における組成物の使用であって、前記組成物が、請求項1に記載の組成物から選択される、前記使用。

【請求項 24】

患者における、多発性硬化症、1型糖尿病、疥癬、炎症性腸疾患、接触媒介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、喘息、アレルギー、再狭窄 (restenosis)、全身性硬化症、繊維症、強皮症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、炎症性骨吸収、移植拒絶、移植片対宿主病及び狼瘡からなる群から選択される自己免疫疾患を治療するための医薬の調製における組成物の使用であって、治療的有效量の前記組成物により前記疾患の少なくとも1つの症状が前記患者において緩和され、前記組成物が、請求項1に記載の組成物から選択される、前記使用。

30

【請求項 25】

任意の f 又は任意の g が 1 であり、L が配列番号：79、84 及び 637～656 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドリinkerである、請求項1に記載の組成物。

【請求項 26】

配列番号 914 のアミノ酸配列を含む ShK ペプチド類縁体を含む請求項1に記載の組成物。

40

【請求項 27】

配列番号 915 のアミノ酸配列を含む ShK ペプチド類縁体を含む請求項1に記載の組成物。

【請求項 28】

配列番号 916 のアミノ酸配列を含む ShK ペプチド類縁体を含む請求項1に記載の組成物。

【請求項 29】

配列番号 917 のアミノ酸配列を含む ShK ペプチド類縁体を含む請求項1に記載の組成物。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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

【0002】

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

10

【0003】

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

【背景技術】

【0004】

1. 発明の分野

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

【0005】

2. 関連技術分野の考察

20

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

【0006】

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

30

40

【0007】

電圧開口型イオンチャンネルの分類に対する統一された命名法が、最近発表された。（Catterall et al.，（2000），Pharmacol. Rev. 55：573-4；Gutman et al.，（2000），Pharmacol. Rev. 55，583-6；Catterall et al.，（2000）Pharmacol. Rev. 55：579-81；Catterall et al.，（2000），Pharmacol. Rev. 55：575-8；Hofmann et al.

50

, (2000), *Pharmacol. Rev.* 55:587-9; Clapham et al., (2000), *Pharmacol. Rev.* 55:591-6; Chandry (1991), *Nature* 352:26; Goldin et al., (2000), *Neuron* 28:365-8; Ertel et al., (2000), *Neuron* 25:533-5)。

【0008】

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

【0009】

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

【0010】

トキシンペプチドは、通常、約20アミノ酸長と約80アミノ酸長との間であり、2〜5個のジスルフィド結合を含有し、極めてコンパクトな構造を形成する(例えば、図10参照)。(例えば、サソリ、イソギンチャク及びイモ貝から)トキシンペプチドが単離され、イオンチャンネルに対するそれらの影響が特徴付けられている。このようなペプチドは、効力及び安定性の重大な問題に対処するために特にきわめて適している構造的骨格の相対的に少数から進化してきたように見受けられる。サソリ及びイモガイのトキシンペプチドの多くは、例えば、10〜40個のアミノ酸及び最大5個のジスルフィド結合を含有し、しばしばタンパク分解を受けない極めてコンパクトで、固定された構造(ミクロタンパク質)を形成する。コノトキシン及びサソリトキシンペプチドは、それらのジスルフィド結合及びペプチドの折り畳みに基づいて、多数のスーパーファミリーに分類することが可能である。これらの多くの溶液構造がNMR分光法によって決定されており、それらのコンパクトな構造を示し、それらのファミリー折り畳みの保存を確認している。(例えば、Tudor et al., *Ionisation behaviour and solution properties of the potassium-channel blocker ShK toxin*, *Eur. J. Biochem.* 251(1-2):133-41(1998); Pennington et al., *Role of disulfide bonds in the structure and potassium channel blocking activity of ShK toxin*, *Biochem.* 38(44):14549-58(1999); Jaravine et al., *Three-dimensional structure of toxin OSK1 from Orthochirus scrob*

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

10

【0011】

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

20

【0012】

特異的イオンチャンネルの強力且つ選択的な遮断のために、トキシンペプチドは、イオンチャンネルの薬理学を調べるためのツールとして、長年にわたって使用されてきた。心臓、筋肉及び脳内に存在するような興奮性細胞及び組織以外では、イオンチャンネルは、免疫細胞などの非興奮性細胞に対しても重要である。従って、Kv1.3及びIKCa1などのカリウムチャンネルは、リンパ球内のカルシウムシグナル伝達経路を間接的に調節するので、とりわけ、これらのチャンネルの阻害による様々な免疫疾患の治療について、トキシンペプチドの潜在的な治療的有用性が検討されてきた[例えば、Kern et al., ShK toxin compositions and methods of use, 米国特許第6,077,680号; Lebrun et al., Neuropeptides originating in scorpion, 米国特許第6,689,749号; Beeton et al., Targeting effect or memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases, Molec. Pharmacol. 67 (4) : 1369-81 (2005); Mouhat et al., K⁺ channel types targeted by synthetic OSK1, a toxin from Orthochirus scrobiculosus scorpion venom, Biochem. J. 385 : 95-104 (2005); Mouhat et al., Pharmacological profiling of Orthochirus scrobiculosus toxin 1 analogs with a trimmed N-terminal domain, Molec. Pharmacol. 69 : 354-62 (2006); Mouhat et al., OSK1 derivatives, WO 2006/002850 A2

30

40

50

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

10

【0013】

免疫疾患を治療するために、T細胞中の $\text{Kv}1.3$ 及び IKCa1 カリウムチャンネル及び主要なカルシウム流入チャンネルの小分子阻害剤であるCRACも開発されているが [A. Schmitz et al., (2005) Molecul. Pharmacol. 68, 1254; K. G. Chandy et al., (2004) TIPS 25, 280; H. Wulff et al., (2001) J. Biol. Chem. 276, 32040; C. Zitt et al., (2004) J. Biol. Chem. 279, 12427]、これらの標的の幾つかに対して選択性を有する小分子を得ることは困難である。

20

【0014】

リンパ球におけるカルシウム動員は、炎症性応答の活性化において不可欠な経路であることが知られている [M. W. Winslow et al., (2003) Current Opinion Immunol. 15, 299]。他の細胞に比べて、T細胞は、細胞内カルシウム及びイオンチャンネルの増加したレベル（何れも、直接的及び間接的にこのプロセスを調節する。）に対して特有の感受性を示す。イノシトール三リン酸（ IP3 ）は、カルシウムシグナル伝達経路を活性化する天然のセカンドメッセンジャーである。 IP3 は、T細胞受容体（TCR）のリガンド誘導性活性化後に産生され、その細胞内受容体（チャンネル）に結合すると、細胞内カルシウム貯蔵の放出を引き起こす。小胞体は、1つの中心的なカルシウム貯蔵を提供する。筋肉小胞体—小胞体カルシウムATPアーゼ（SERCA）の阻害剤であるタプシナルギンも、細胞内貯蔵の放出及びリンパ球におけるカルシウムシグナル伝達経路の活性化を引き起こす。従って、タプシナルギンは、T細胞におけるカルシウムシグナル伝達経路の特異的な刺激として使用することが可能である。T細胞中の細胞内カルシウム貯蔵の放出は細胞表面上のカルシウムチャンネルの活性化を引き起こすことが知られており、これは細胞外からのカルシウムの流入を引き起こす。T細胞上のこの細胞内容量依存性カルシウムチャンネル（SOCC; store operated calcium channel）は、「CRAC」（カルシウム放出活性化チャンネル（calcium release activated channel））と称され、このチャンネルを通じたカルシウムの持続的流入は、完全なT細胞の活性化にとって不可欠であることが知られている [S. Feske et al., (2005) J. Exp. Med. 202, 651 and N. Venkatesh et al., (2004) PNAS 101, 8969]。長年にわたって、T細胞内への継続的なカルシウム流入を維持するためには、細胞膜は、カリウムイオンの流

30

40

50

出を通じた過分極した状態を保たなければならないと理解されてきた。T細胞では、電圧開口型カリウムチャンネルKv1.3及びカルシウム活性化カリウムIKCa1によって、カリウム流出が達成されるK. G. Chandy et al., (2004) TIPS 25, 280]。これらのカリウムチャンネルは、従って、CRACを通じたカルシウムの持続的流入を可能とする必要なカリウム流出を可能とすることによって、カルシウムシグナル伝達経路を間接的に調節する。細胞内カルシウムの持続的な増加は、NFAT、NF- κ B及びAP-1の活性化をもたらす経路を含む、T細胞中の様々な経路を活性化する[Quintana-A (2005) Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol. 450, 1]。これらの現象は、細胞サイズ及び膜の構成の変化、細胞表面エフェクター分子の活性化、サイトカイン産生及び増殖など、様々なT細胞応答をもたらす。幾つかのカルシウム感知分子は、カルシウムシグナルを伝達し、細胞応答を協調させる。カルモジュリンはカルシウムを結合する1つの分子であるが、他の多くが同定されている(M. J. Berridge et al., (2003) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 4, 517)。カルシウム-カルモジュリン依存性ホスファターゼであるカルシニューリンは、細胞内カルシウムが持続的に増加されると活性化され、細胞質NFATを脱リン酸化する。脱リン酸化されたNFATは、素早く、核に移動し、T細胞活性化のための重要な転写因子として広く受け入れられている(F. Macian (2005) Nat. Rev. Immunol. 5, 472 and N. Venkatesh et al., (2004) PNAS 101, 8969)。シクロスポリンA(Neoral, Sandimmune)及びFK506(Tacrolimus)などのカルシニューリンの阻害剤は、固形臓器移植後に拒絶をもたらすものなど、重度免疫疾患の治療のための主な支柱のような存在である(I. M. Gonzalez-Pinto et al. (2005) Transplant. Proc. 37, 1713 and D. R. J. Kuypers (2005) Transplant International 18, 140)。臓器移植、重度関節リウマチ(D. E. Yocum et al., (2000) Rheumatol 39, 156)及び重度乾癬(J. Koo (1998) British J. Dermatol. 139, 88)の治療について、ネオールが承認を受けている。前臨床及び臨床データも提供されており、カルシニューリン阻害剤は、炎症性腸疾患(IBD; Baumgart DC (2006) Am. J. Gastroenterol. Mar 30; Epub出版前)、多発性硬化症(Ann. Neurol. (1990) 27, 591)及び喘息(S. Rohatagi et al., (2000) J. Clin. Pharmacol. 40, 1211)の治療において有用であり得ることを示唆している。狼瘡は、ヘルパーT細胞の活性化を遮断する因子が有用であり得る別の疾患である。T細胞中のNFATを制御する上でのカルシニューリンの重要性に関わらず、カルシニューリンは、他の組織(例えば、腎臓)中にも発現されており、シクロスポリンA及びFK506は、毒性を基礎とする機序のために、狭い安全域を有する。腎毒性及び高血圧が、シクロスポリン及びFK506の有望性を限定してきた共通の副作用である。毒性に関する懸念のために、カルシニューリン阻害剤は、重度免疫疾患のみを治療するために多く使用されている(Bissonnette-R et al., (2006) J. Am. Acad. Dermatol. 54, 472)。Kv1.3阻害剤は、免疫疾患の治療のための、より安全なカルシニューリン阻害剤代替物である。これは、Kv1.3はT細胞中のカルシウムシグナル伝達経路を調節するが、カルシニューリン阻害剤とは異なる機序を通じて調節するようにも作用するからであり、Kv1.3の発現及び機能に関する証拠は、様々な非リンパ系細胞及び組織中でも機能するカルシニューリンに比べて、Kv1.3が、T細胞生物学において、より限定された役割を有することを示している。

【0015】

免疫細胞中でのカルシウム動員は、炎症の重要な媒介物質であるサイトカインインターロイキン2(IL-2)及びインターフェロン γ (IFN γ)の産生も活性化する。IL-2は、CD4⁺及びCD8⁺T細胞の増殖及び分化から、B細胞による増殖及び抗体分

10

20

30

40

50

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

10

【0016】

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

20

30

【0017】

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

40

【0018】

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

【発明の開示】**【0019】**

本発明は、式

50

$(X^1)_a - (F^1)_d - (X^2)_b - (F^2)_e - (X^3)_c$
 の組成物及びその多量体に関する。

(式中：

F^1 及び F^2 は半減期延長部分であり、並びに d 及び e は、各々独立に、0 又は 1 であり (但し、 d 及び e の少なくとも 1 つは 1 である。)；

X^1 、 X^2 及び X^3 は、各々独立に、 $-(L)_f - P - (L)_g -$ であり、並びに f 及び g は、各々独立に、0 又は 1 であり；

P は、少なくとも 2 つのペプチド内ジスルフィド結合を含む、約 80 アミノ酸残基長以下のトキシンペプチドであり；

L は、場合によって存在するリンカーであり ($f = 1$ 及び／又は $g = 1$ の場合に存在する。)；並びに

a 、 b 及び c は、各々独立に、0 又は 1 である (但し、 a 、 b 及び c の少なくとも 1 つは、1 である。))。

従って、本発明は、慣用的に、ペプチドの N 末端を左側に記載すると、式：

(I I) $P - (L)_g - F^1$ (すなわち、 b 、 c 及び e は、0 に等しい。)；

(I I I) $F^1 - (L)_f - P$ (すなわち、 a 、 c 及び e は、0 に等しい。)；

(I V) $P - (L)_g - F^1 - (L)_f - P$ 又は $(X^1)_a - F^1 - (X^2)_b$ (すなわち、 c 及び e は、0 に等しい。)；

(V) $F^1 - (L)_f - P - (L)_g - F^2$ (すなわち、 a 及び c は、0 に等しい。)；

(V I) $F^1 - (L)_f - P - (L)_g - F^2 - (L)_f - P$ すなわち、 a は、0 に等しい。)；

(V I I) $F^1 - F^2 - (L)_f - P$ (すなわち、 a 及び b は、0 に等しい。)；

(V I I I) $P - (L)_g - F^1 - F^2$ (すなわち、 b 及び c は、0 に等しい。)；

(I X) $P - (L)_g - F^1 - F^2 - (L)_f - P$ すなわち、 b は、0 に等しい。)；

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

【0020】

本発明は、固有配列を有する ShK、OSK1 又はマウロトキシン (MTX) ペプチドに比べてより大きな K ν 1.3 又は IKCa1 アンタゴニスト活性及び／又は標的選択性を有する、1 つ若しくはそれ以上のアミノ酸残基が固有配列から修飾された、抱合された又は抱合されていない、ShK、OSK1、ChTx 又はマウロトキシンのトキシンペプチド類縁体を含む組成物にも関する。トキシンペプチド類縁体は、

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

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

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

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

【0021】

本発明は、以下の何れか：

表3に記されている配列番号201～225；又は

表4に記されている配列番号242～248若しくは250～260；又は

表5に記されている配列番号261～275；又は

表6に記されている配列番号276～293；又は

表8に記されている配列番号299～315；又は

表9に記されている配列番号316～318；又は

表10に記されている配列番号319；又は

表11に記されている配列番号327若しくは328；又は

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

表14に記されている配列番号1369～1390；又は

表16に記されている配列番号348～353；又は

表19に記されている配列番号357～362、364～368、370、372～385若しくは387～398；又は

表20に記されている配列番号399～408；又は

表22に記されている配列番号410～421；又は

表23に記されている配列番号422、424、426若しくは428；又は

表24に記されている配列番号430～437；又は

表25に記されている配列番号438～445；又は

表26に記されている配列番号447、449、451、453、455若しくは457；又は

表28に記されている配列番号470～482若しくは484～493；又は

表29に記されている配列番号495～506；又は

表30に記されている配列番号507～518；

から選択されるアミノ酸配列を含む他のトキシンペプチド類縁体にも関する。

【0022】

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

【0023】

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

【0024】

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

【0025】

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

【0026】

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

10

20

30

40

50

つの症候が軽減されるように、本発明の組成物（好ましくは、K v 1 . 3 アンタゴニストペプチド又は I K C a 1 アンタゴニストペプチドを含む。）の予防的有効量を投与することを含む、多発性硬化症の症候の再発を予防又は軽減する方法に関する。

【0027】

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

【0028】

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

【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

用語の定義

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

【0030】

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

【0031】

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

【0032】

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

【0033】

「ペプチボディ」という用語は、 F^1 及び／又は F^2 が、免疫グロブリン F c ドメイン又は F_c の CH2 ドメインなどのその一部である式 I の分子、又は F^1 及び F^2 が、それぞれ、トキシンペプチドが F^1 及び F^2 の間に挿入された F c ドメインであるように、ト

10

20

30

40

50

キシンペプチドがヒト I g G 1 F c ドメインループ中に挿入された式 I の分子を表す（例えば、本明細書の図 70～73 及び実施例 49 を参照。）。本発明のペプチボディは、本明細書にさらに記載されているように、F c ドメイン若しくはその一部の何れかにおいて、若しくは本発明の組成物のトキシンペプチド部分において、又は両方において P E G 化することも可能である。

【0034】

「固有 F c」という用語は、単量体形態であれ、又は多量体形態であれ、完全な抗体の消化から得られる非抗原結合断片の配列を含む分子又は配列を表す。固有 F c の元の免疫グロブリン源は、好ましくは、ヒト由来であり、免疫グロブリンの何れでもあり得るが、I g G 1 又は I g G 2 が好ましい。固有 F c は、共有（すなわち、ジスルフィド結合）及び非共有会合によって、二量体又は多量体形態へと連結されることが可能な単量体ポリペプチドから構成される。固有 F c 分子の単量体サブユニット間の分子間ジスルフィド結合の数は、クラス（例えば、I g G、I g A、I g E）又はサブクラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g A 1、I g G A 2）に応じて、1 から 4 の範囲である。天然 F c の一例は、I g G のパペイン消化から得られるジスルフィド結合された二量体である（E l l i s o n e t a l . (1982), N u c l e i c A c i d s R e s . 10 : 4071-9 参照）。本明細書において使用される「固有 F c」という用語は、単量体、二量体及び多量体形態の総称である。

【0035】

「F c バリエーション」という用語は、固有 F c から修飾されているが、サルベージ受容体である F c R n に対する結合部位をなお含む分子又は配列を表す。幾つかの公開された特許文献が、典型的な F c バリエーション及びサルベージ受容体との相互作用を記載している。国際出願 W O 97/34631（1979年9月25日に公開；W O 96/32478号、2000年8月1日に付与された米国特許第6,096,891号に対応、その全体が、参照により、本明細書に組み込まれる；及び W O 04/110472号を参照。従って、「F c バリエーション」という用語には、非ヒト固有 F c からヒト化された分子又は配列が含まれる。さらに、除去可能な部位は、本発明の融合分子に対して必要とされない構造的特徴又は生物学的活性を与えるので、固有 F c は、除去可能な部位を含む。従って、「F c バリエーション」という用語は、（1）ジスルフィド結合形成、（2）選択された宿主細胞との非適合性、（3）選択された宿主細胞中で発現された際の N 末端不均一性、（4）グリコシル化、（5）補体との相互作用、（6）サルベージ受容体以外の F c 受容体への結合又は（7）抗体依存性細胞傷害（A D C C）に影響を与えるか、又はこれらに關与する1つ又はそれ以上の固有 F c 部位又は残基を欠如する分子又は配列を含む。F c バリエーションは、以下でさらに詳しく記載されている。

【0036】

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

【0037】

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

【0038】

F c ドメイン又は F c ドメインを含む分子に対して用いられる「二量体」という用語は、共有的に又は非共有的に会合された2つのポリペプチド鎖を有する分子を表す。従って

、本発明の範囲に属する典型的な二量体が、図2に示されている。

【0039】

「誘導体化する」及び「誘導体」又は「誘導体化された」という用語は、それぞれ、(1)化合物が、環状部分、例えば、化合物内のシステイン残基間の架橋を有する；(2)化合物が架橋され、又は架橋部位を有する、例えば、化合物がシステイン残基を有し、従って、培養若しくはインビボにおいて架橋された二量体を形成する；(3)非ペプチド結合によって、1つ又はそれ以上のペプチド結合が置換されている；(4)N末端が、 $-NRR^1$ 、 $-NRC(O)R^1$ 、 $-NRC(O)OR^1$ 、 $-NRS(O)_2R^1$ 、 $-NHC(O)NHR$ 、スクシンイミド基又は置換された若しくは置換されていないベンジルオキシカルボニル $-NH-$ (R 及び R^1 及び環置換基は、以下で定義されているとおりである。)；(5)C末端が $-C(O)R^2$ 又は $-NRR^3R^4$ によって置換されている(R^2 、 R^3 及び R^4 は、以下に定義されているとおりである。)；並びに(6)選択された側鎖又は末端残基と反応することができる因子での処理を通じて、各アミノ酸部分が修飾されている化合物、プロセス及び得られた化合物を含む。誘導体は、さらに、以下に記載されている。

10

【0040】

「ペプチド」という用語は、2～約80アミノ酸残基の分子を表し、約10～約60アミノ酸残基の分子が好ましく、約30～約50アミノ酸残基の分子が最も好ましい。典型的なペプチドは、あらゆる公知の方法によって無作為に作製され、ペプチドライブラリー(例えば、ファージディスプレイライブラリー)中に担持され、又はタンパク質の消化によって得ることができる。本発明の組成物の何れのペプチド部分、例えば、本明細書に記載されているトキシンペプチド又はペプチドリinker部分においても、所定の配列のN末端又はC末端の一方又は両方に、追加のアミノ酸を含めることが可能である。もちろん、これらの追加のアミノ酸残基は、組成物の機能的活性を著しく妨害すべきでない。「トキシンペプチド」には、毒から単離することが可能な薬理的に活性な天然に存在するペプチドの同じアミノ酸配列を有するペプチドが含まれ、天然に存在するこのような分子の修飾されたペプチド類縁体も含まれる。本発明を実施する上で有用なトキシンペプチドの例は、表1～32に列記されている。トキシンペプチド(図2における「P」又は「P¹」として示されている均等物)は、例えば、図9に示されているように、少なくとも2つのペプチド内ジスルフィド結合を含む。

20

30

【0041】

従って、本発明は、

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

【0042】

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

40

【0043】

c) C^1-C^4 、 C^2-C^5 及び C^3-C^6 ジスルフィド結合(上記のように、 C^1 、

50

C²、C³、C⁴、C⁵及びC⁶は、ペプチドのN末端が左側に配置された慣用表記のトキシンペプチドの一次配列中にシステイン残基が現れる順序を表しており、アミノ酸配列中の第一及び第四のシステインがジスルフィド結合を形成し、第二及び第五のシステインがジスルフィド結合を形成し、並びに第三及び第六のシステインがジスルフィド結合を形成する。)。このようなC¹—C⁴、C²—C⁵、C³—C⁶ジスルフィド結合パターンを有するトキシンペプチドの例には、ChTx、MgTx、OSK1、KTX1、AgTx2、Pi2、Pi3、NTX、HgTx1、BeKM1、BmKTX、P01、BmKK6、Tc32、Tc1、BmTx1、BmTX3、IbTx、P05、ScyTx、TsK、HaTx1、ProTX1、PaTX2、Ru1、ωGVIA、ωMVIIA及びSmIIIA並びに前記の何れかの類縁体が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0044】

d) C¹—C⁵、C²—C⁶、C³—C⁷及びC⁴—C⁸ジスルフィド結合(C¹、C²、C³、C⁴、C⁵、C⁶、C⁷及びC⁸は、ペプチドのN末端が左側に配置された慣用表記のトキシンペプチド一次配列中にシステイン残基が現れる順序を表しており、アミノ酸配列中の第一及び第五のシステインがジスルフィド結合を形成し、第二及び第六のシステインがジスルフィド結合を形成し、第三及び第七のシステインがジスルフィド結合を形成し、並びに第四及び第八のシステインがジスルフィド結合を形成する。)。このようなC¹—C⁵、C²—C⁶、C³—C⁷、C⁴—C⁸ジスルフィド結合パターンを有するトキシンペプチドの例には、アニュオロクトキシン(AnTx)、Pi1、HsTx1、MTX(P12A、P20A)及びPi4ペプチド並びに前記の何れかの類縁体が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0045】

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

30

【0046】

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

40

を含む分子に関する。

【0047】

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

50

【0048】

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

【0049】

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

10

【0050】

「アンタゴニストペプチド」又は「阻害剤ペプチド」という用語は、対象の受容体（イオンチャンネルなど（但し、これに限定されない。））の生物活性を遮断し、若しくは何らかの方法で妨害するペプチド、又は対象の受容体の公知のアンタゴニスト若しくは阻害剤と同等の生物活性を有するペプチドを表す。

【0051】

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

20

【0052】

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

【0053】

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

【0054】

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

30

【0055】

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

【0056】

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

【0057】

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

40

【0058】

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

【0059】

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

50

、F、T、G、S、Y、C、Q及びNが含まれる。

【0060】

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

【0061】

1つ又はそれ以上の有用な修飾には、公知の化学的技術によって達成される、アミノ酸の付加又は挿入、アミノ酸の欠失、ペプチド末端切断、アミノ酸置換及び／又はアミノ酸残基の化学的誘導体化が含まれ得る。このような修飾は、例えば、強化された効力、選択性及び／又はタンパク分解に対する安定性などを目的として為され得る。当業者は、アラニンスキャニング、公知のトキシンペプチド配列を用いた、アラインメントを介した突然変異導入に基づく合理的設計及び／又は分子モデリングなど、このような増強された特性を有するペプチド類縁体を設計するための技術を知悉している。例えば、ShK類縁体は、HmKを用いた、アラインメントを介した突然変異導入（例えば、図6参照）及び分子モデリングに部分的に基づいて、本発明のShKペプチド含有組成物又は本発明のShK類縁体含有組成物中のプロテアーゼ切断部位（例えば、K若しくはR残基におけるトリプシン切断部位及び／又はF、Y若しくはW残基におけるキモトリプシン切断部位）を除去するために設計することが可能である。（例えば、Kalman et al., ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide, J. Biol. Chem. 273(49):32697-707(1998); Kern et al., 米国特許第6,077,680号; Mouhat et al., OSK1 derivatives, WO 2006/002850 A2) 参照）。

【0062】

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

【0063】

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

【0064】

当業者は、目的のプロテアーゼ結合部位又はプロテアーゼ切断部位を特定するための様々なツールを知悉している。例えば、Swiss Institute of Bioinformatics (SIB; www.expasy.org/tools/peptidecutter) の ExPASy (Expert Protein Analysis System) プロテオミクスサーバを通じて、PeptideCutterソフトウェアツールを入手することが可能である。PeptideCutterは、SWISS-PROT及び/又はTrEMBLデータベース又はユーザが入力したタンパク質配列から、プロテアーゼ切断部位についてタンパク質配列を検索する。単一のプロテアーゼ及び化学物質、プロテアーゼ及び化学物質の選択又は完全なリストを使用することが可能である。酵素名に従ってアルファベットでグループ化されるか、又は順次、アミノ酸番号に従ってグループ化された切断部位の表という、結果の出力の様々な形態が入手可能である。出力のための第三の選択肢は、切断部位のマップである。マップにマッピングされた配列及び切断部位は、ブロックにグループ化され、そのサイズは、ユーザによって選択されることができる。プロテアーゼ切断部位を決定するための他のツールも公知である。(例えば、Turk, B. et al., Determination of protease cleavage site motifs using mixture-based oriented peptide libraries, Nature Biotechnology, 19:661-667 (2001); Barrett A. et al., Handbook of proteolytic enzymes, Academic Press (1998))。

10

20

【0065】

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

【0066】

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

30

【0067】

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

40

【0068】

膜メタロエンドペプチダーゼ(NEP; 中性エンドペプチダーゼ、腎臓刷子縁中性プロテイナーゼ、エンケファリナーゼ、EC 3.4.24.11)は、疎水性アミノ酸残基のアミノ側でペプチドを切断する。(Connolly, J C et al., Neutral Endopeptidase 24.11 in Human Neutrophils: Cleavage of Chemotactic Peptide, PNAS

50

， 8 2 (2 4) : 8 7 3 7 - 8 7 4 1 (1 9 8 5)) 。

【 0 0 6 9 】

トロンピンは、位置 P 1 の R 残基で優先的に切断する。(Keil, 1992)。トロンピンの天然基質は、フィブリノーゲンである。最適な切断部位は、R 残基が位置 P 1 に存在し、Gly が位置 P 2 及び位置 P 1 ' に存在する場合である。同様に、疎水性アミノ酸残基が位置 P 4 及び位置 P 3 に見出される場合には、位置 P 2 におけるプロリン残基、位置 P 1 における R 残基並びに位置 P 1 ' 及び位置 P 2 ' における非酸性アミノ酸残基。その天然基質であるフィブリノーゲンに対する極めて重要な残基は、P 10 中の D 残基である。

【 0 0 7 0 】

カスパーゼは、保存されたアミノ酸配列を有する活性部位を有し、及び D 残基の後ろでペプチドを特異的に切断するシステインプロテアーゼのファミリーである。(Earnshaw WC et al., Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis, Annual Review of Biochemistry, 68: 383-424 (1999))。

【 0 0 7 1 】

Arg-C プロテイナーゼは、位置 P 1 の R 残基で優先的に切断する。切断の挙動は、位置 P 1 ' の残基によって、穏やかに影響を受けるに過ぎないように見受けられる。(Keil, 1992)。Asp-N エンドペプチダーゼは、位置 P 1 ' の D 残基との結合を特異的に切断する。(Keil, 1992)。

【 0 0 7 2 】

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

【 0 0 7 3 】

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

【 0 0 7 4 】

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

【 0 0 7 5 】

【表 1】

表 1 A 標準アミノ酸に対する一文字略号。

三文字略号はカッコ内に記載されている。

アラニン (A l a)	A
グルタミン (G l n)	Q
ロイシン (L e u)	L
セリン (S e r)	S
アルギニン (A r g)	R
グルタミン酸 (G l u)	E
リジン (L y s)	K
スレオニン (T h r)	T
スパラギン (A s n)	N
グリシン (G l y)	G
メチオニン (M e t)	M
トリプトファン (T r p)	W
アスパラギン酸 (A s p)	D
ヒスチジン (H i s)	H
フェニルアラニン (P h e)	F
チロシン (T y r)	Y
システイン (C y s)	C
イソロイシン (I l e)	I
プロリン (P r o)	P
バリン (V a l)	V

10

20

【0076】

本明細書において、アミノ酸配列中のアミノ酸置換は、特定の位置におけるアミノ酸残基に対する一文字略号に続き、目的の固有トキシンペプチド配列に対する数字のアミノ酸位置、次いで、これに続く、置換されたアミノ酸残基に対する一文字記号によって典型的に表される。例えば、「T30D」は、仮想の固有トキシンペプチド配列に対して、アミノ酸位置30におけるアスパラギン酸残基によるスレオニン残基の置換を表す。さらなる例として、「R18hR」又は「R18Cit」は、仮想の固有トキシンペプチド配列に対して、それぞれ、アミノ酸位置18におけるホモアルギニン又はシトルリン残基によるアルギニン残基の置換を表す。本明細書に記載されているあらゆる特定のトキシンペプチド（又はペプチド類縁体）のアミノ酸配列内のアミノ酸位置は、ペプチドアミノ酸配列のN末端又はC末端を、適宜、固有トキシンペプチド配列のN末端又はC末端と併置して決定されるように、固有配列に対するその位置とは異なり得る。例えば、このようにして、固有のShK（1-35）（配列番号5）のC末端と併置された配列SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC（ShK（2-35）；配列番号92）（固有ShK配列のN末端切断）のアミノ酸位置1は、固有配列におけるアミノ酸位置2に対応し、配列番号92のアミノ酸位置34は、固有配列（配列番号5）におけるアミノ酸位置35に対応する。

30

40

【0077】

本発明のある種の実施形態において、アミノ酸置換は、（ペプチド又はタンパク質中では）天然には稀なアミノ酸残基又は非天然アミノ酸残基を含むことができる非標準アミノ酸残基を包含する。非標準アミノ酸残基は、組換え的に発現する細胞などの生物学的系での合成によるより、むしろ、化学的ペプチド合成によってペプチド中に取り込むことが可能であり、あるいは、当業者は、組換え的に発現している細胞を使用するタンパク質工学の公知の技術を使用することが可能である。（例えば、Link et al., Non

50

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

【0078】

本明細書に記載されているように、本発明に従って、トキシンペプチド又はペプチドリンカーなどの本発明の組成物のペプチド部分は、1つ又はそれ以上のアミノ酸残基において化学的に誘導体化することも可能である。誘導体化されたアミノ酸残基を含有するペプチドは、公知の有機化学技術によって合成することが可能である。ペプチドという文脈における「化学的誘導体」又は「化学的に誘導体化された」とは、官能的側基の反応によって化学的に誘導体化された1つ又はそれ以上の残基を有する対象ペプチドを表す。このような誘導体化された分子には、例えば、遊離のアミノ基が、アミン塩酸塩、p-トルエンスルホニル基、カルボベンゾオキシ基、t-ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基又はホルミル基を形成するように誘導体化されている分子が含まれる。遊離のカルボキシル基は、塩、メチル及びエチルエステル又はエステル若しくはヒドラジドの他の種類を形成するように誘導体化され得る。遊離の水酸基は、O-アシル又はO-アルキル誘導体を形成するように誘導体化され得る。ヒスチジンのイミダゾール窒素は、N-im-ベンジルヒスチジンを形成するように誘導体化され得る。L型又はD型を問わず、20個の標準アミノ酸の1つ又はそれ以上の天然に存在するアミノ酸誘導体を含有するペプチドも、化学的誘導体として含まれる。例えば、4-ヒドロキシプロリンは、プロリンが置換され

得；5-ヒドロキシリジンは、リジンが置換され得；3-メチルヒスチジンは、ヒスチジンが置換され得；ホモセリンは、セリンが置換され得；及びオルニチンは、リジンが置換され得る。

【0079】

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

【0080】

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

【0081】

化合物の構造：

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

【0082】

本発明者らは、本発明の分子（少なくとも2つのペプチド内ジスルフィド結合を有する、約80アミノ酸又はそれ以下のペプチド）が、半減期延長部分に共有結合されると、治療的利点を有することを決定した。本発明の分子は、半減期延長部分（F¹及び／又はF²）に又はペプチド部分（P）に結合されることが可能な、薬理学的に活性な共有結合されたさらなるペプチド部分をさらに含むことが可能である。2以上の半減期延長部分（F¹及びF²）を含有する本発明の組成物の実施形態には、F¹及びF²が同一又は別異の半減期延長部分であるものが含まれる。例（各ドメイン間にリンカーを有するか、又は有しない。）には、図75に図示されている構造及び以下の実施形態（並びに本明細書及び実施例に記載されているその他のもの）が含まれる。

【0083】

20KPEG-トキシンペプチド-Fcドメイン、式[(F¹)₁-(X²)₁-(F²)₁]と合致；

20KPEG-トキシンペプチド-FcCH₂ドメイン、式[(F¹)₁-(X²)₁-(F²)₁]と合致；

20KPEG-トキシンペプチド-HSAドメイン、式[(F¹)₁-(X²)₁-(F²)₁]と合致；

20KPEG-Fcドメイン-トキシンペプチド、式[(F¹)₁-(X²)₁-(X³)₁]と合致；

20KPEG-FcCH₂ドメイン-トキシンペプチド、式[(F¹)₁-(F²)₁-(X³)₁]と合致；及び

20KPEG-HSA-トキシンペプチド、式[(F¹)₁-(X²)₁-(X³)₁]と合致。

【0084】

トキシンペプチド。トキシンペプチド（すなわち、「P」又は図2において「P¹」として等価に示されている。）のあらゆる数を、本発明とともに使用することが可能である。特に興味深いのは、トキシンペプチド Sh K、Hm K、Mg T x、Ag T x 2、O s K 1（「O S K 1」とも称される。）、アガトキシン及びH s T x 1並びにこれらの修飾された類縁体並びにこのようなトキシンペプチドの活性を模倣するその他のペプチド）である。本明細書に上述されているように、本発明の組成物中に2以上のトキシンペプチド「P」が存在すれば、「P」は、独立に、同じく本発明の組成物中に存在する他の何れのトキシンペプチドと同一又は別異であることが可能である。例えば、式 $P - (L)_g - F^1 - (L)_f - P$ を有する組成物において、両トキシンペプチド「P」は、Sh Kの同じペプチド類縁体、Sh Kの異なるペプチド類縁体であり得、又は一方がSh Kのペプチド類縁体、及び他方がO S K 1のペプチド類縁体であり得る。

10

【0085】

本発明の幾つかの実施形態において、対象となる他のペプチドは、構造式Iの分子に対してさらなる特徴を有する分子中で特に有用である。このような分子において、式Iの分子は、薬理的に活性な共有結合されたさらなるペプチドをさらに含み、これは、アゴニストペプチド、アンタゴニストペプチド又は標的誘導ペプチドである。本ペプチドは、F¹又はF²又はPに抱合されることが可能である。このようなアゴニストペプチドは、トキシンペプチドに対してアゴニスト作用を示す活性を有するが、トキシンペプチドと同じ機序によってこのような活性を発揮する必要はない。ペプチドアンタゴニストも、本発明の実施形態において有用であり、トキシンペプチドの活性に対して相補的であり得る活性を有するペプチドアンタゴニストが好ましい。分子を特定の細胞種、臓器などに誘導するペプチドなど、標的誘導ペプチドも興味深い。ペプチドのこれらのクラスは、本明細書及びその他の参考文献に引用されている参考文献中に記載されている方法によって発見することが可能である。本発明において使用するためのトキシンペプチドを作製する上で、ファージディスプレイが特に有用である。任意の遺伝子産物の任意の部位に対してペプチドリガンドを同定するために、ランダムペプチドのライブラリーからの親和性選択を使用することが可能である。Dedman et al., (1993), J. Biol. Chem. 268:23025-30。ファージディスプレイは、細胞表面受容体又は直鎖エピトープを有する何れかのタンパク質としてのこのような対象タンパク質に結合するペプチドを同定するために特に極めて適している。Wilson et al., (1998), Can. J. Microbiol. 44:313-29; Kay et al. (1998), Drug Disc. Today 3:370-8を参照されたい。このようなタンパク質は、「Herz et al., (1997), J. Receptor and Signal Transduction Res. 17(5):671-776」（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に広く概説されている。このような目的のタンパク質は、本発明において使用するのに適している。

20

30

【0086】

特に好ましいペプチドは、以下の表に見られる。これらのペプチドは、本分野で開示された方法又は本明細書の以下に記載されている方法によって調製することが可能である。一文字アミノ酸略号が使用される。別段の記載差がなければ、各Xは、独立に、非官能性残基である。

40

【0087】

【表 2】

表 1 -Kv1.3阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
LVKCRGTSDCGRPCQQQTGCPNSKCINRMCKCYGC	Pi1	21
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2	17
TISCTNEKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi3	18
IEAIRCGGSRDCYRPCQKRTGCPNAKCINKTCKCYGCS	Pi4	19
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1	61
GVPINVSTGSPQCIKPKCDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	AgTx2	23
GVPINVKCTGSPQCLKPKCDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	AgTx1	85
GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1	25
ZKECTGPQHCTNFCRKNKCTHGKCMNRKCKCFNCK	Anuroctoxin	62
TIINVKCTSPKQCSKPKCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN	NTX	30
TVIDVKCTSPKQCLPPCKAQFGIRAGAKCMNGKCKCYPH	HgTx1	27
QFTNVSCCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx	36
VFINAKCRGSPECLPKCKEAIGKAAGKCMNGKCKCYP	Titystoxin-Ka	86
VCRDWFKETACRHAASLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK	9
VGINVKCKHSGQCLKPKCDAGMRFGKCMNGKCDCTPKG	BmKTX	26
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFVKPNGKCMNGKCKRCYS	BmTx1	40
VFINVKCRGSKECLPACKAAGKAAGKCMNGKCKCYP	Tc30	87
TGPQTTCQAAMCEAGCKGLGKSMESCQGDTCCKKA	Tc32	13

10

【0088】

20

【表 3】

表 2 - ShKペプチド及びShK ペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK	5
RSCIDTIPKSRCTAFQSKHSMKYRLSFCRKTSGTC	ShK-S17/S32	88
RSSIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTS	ShK-S3/S35	89
SSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-S1	90
(N-acetylarg) SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-N-acetylarg1	91
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-d1	92
CIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-d2	93
ASCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A1	94
RSCADTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A4	95
RSCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A4/A15	96
RSCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTGTC	ShK-A4/A15/A25	97
RSCIDAIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A6	98
RSCIDTAPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A7	99
RSCIDTIAKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A8	100
RSCIDTIPASRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A9	101
RSCIDTIPESRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-E9	102
RSCIDTIPQSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-Q9	103
RSCIDTIPKARCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A10	104
RSCIDTIPKSACTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A11	105
RSCIDTIPKSECTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-E11	106
RSCIDTIPKSQCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-Q11	107
RSCIDTIPKSRCAAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A13	108
RSCIDTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A15	109
RSCIDTIPKSRCTAWQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-W15	110
RSCIDTIPKSRCTAX ⁸¹⁵ QCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-X15	111
RSCIDTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTGTC	ShK-A15/A25	112
RSCIDTIPKSRCTAFACKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A16	113
RSCIDTIPKSRCTAFECKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-E16	114
RSCIDTIPKSRCTAFQCAHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A18	115
RSCIDTIPKSRCTAFQCEHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-E18	116
RSCIDTIPKSRCTAFQCKASMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A19	117
RSCIDTIPKSRCTAFQCKKSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-K19	118
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHAMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A20	119
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSAKYRLSFCRKTGTC	ShK-A21	120
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSX ⁸²¹ KYRLSFCRKTGTC	ShK-X21	121
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHS (norleu) KYRLSFCRKTGTC	ShK-Nle21	122
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-A22	123
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMYRLSFCRKTGTC	ShK-E22	124
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMRYRLSFCRKTGTC	ShK-R22	125
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMX ⁸²² YRLSFCRKTGTC	ShK-X22	126
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSM (norleu) YRLSFCRKTGTC	ShK-Nle22	127
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSM (orn) YRLSFCRKTGTC	ShK-Om22	128
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSM (homocit) YRLSFCRKTGTC	ShK-Homocit22	129
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSM (diaminopropionic) YRLSFCRKTGTC	ShK-Diamino-propionic22	130
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKARLSFCRKTGTC	ShK-A23	131
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKSRLSFCRKTGTC	ShK-S23	132

10

20

30

40

RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKFRLSFCRKTCGTC	ShK-F23	133
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK ⁸²³ RLSFCRKTCGTC	ShK-X23	134
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK (nitrophe) RLSFCRKTCGT C	ShK-Nitrophe23	135
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK (aminophe) RLSFCRKTCGT C	ShK-Aminophe23	136
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK (benzylphe) RLSFCRKTCG TC	ShK-Benzylphe23	137
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYALSFCRKTCGTC	ShK-A24	138
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYELSFRCRKTCGTC	ShK-E24	139
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A25	140
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLAFCRKTCGTC	ShK-A26	141
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSACRKTCGTC	ShK-A27	142
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSX ⁸²⁷ CRKTCGTC	ShK-X27	143
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCAKTCGTC	ShK-A29	144
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFRCRATCGTC	ShK-A30	145
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFRCRKACGTC	ShK-A31	146
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFRCRKTCGAC	ShK-A34	147
SCADTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-A4d1	148
SCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-A4/A15d1	149
SCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A4/A15/A25 d1	150
SCIDAIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-A6 d1	151
SCIDTAPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-A7 d1	152
SCIDTIAPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-A8 d1	153
SCIDTIPASRCTAFQCKHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-A9 d1	154
SCIDTIPESRCTAFQCKHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-E9 d1	155
SCIDTIPQSRCTAFQCKHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-Q9 d1	156
SCIDTIPKARCTAFQCKHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-A10 d1	157
SCIDTIPKSACTAFQCKHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-A11 d1	158
SCIDTIPKSECTAFQCKHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-E11 d1	159
SCIDTIPKSQCTAFQCKHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-Q11 d1	160
SCIDTIPKSRCAAFQCKHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-A13 d1	161
SCIDTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-A15 d1	162
SCIDTIPKSRCTAWQCKHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-W15 d1	163
SCIDTIPKSRCTAX ⁸¹⁹ QCKHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-X15 d1	164
SCIDTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A15/A25 d1	165
SCIDTIPKSRCTAFACKHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-A16 d1	166
SCIDTIPKSRCTAFECKHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-E16 d1	167
SCIDTIPKSRCTAFQCAHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-A18 d1	168
SCIDTIPKSRCTAFQCEHSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-E18 d1	169
SCIDTIPKSRCTAFQCKASMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-A19 d1	170
SCIDTIPKSRCTAFQCKKSMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-K19 d1	171
SCIDTIPKSRCTAFQCKHAMKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-A20 d1	172
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSAKYRLSFRCRKTCGTC	ShK-A21 d1	173
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSX ⁸²¹ KYRLSFRCRKTCGTC	ShK-X21 d1	174
SCIDTIPKSRCTAFQCKHS (norleu) KYRLSFRCRKTCGTC	ShK-Nle21 d1	175
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFRCRKTCGTC	ShK-A22 d1	176
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMYRLSFRCRKTCGTC	ShK-E22 d1	177
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMRYRLSFRCRKTCGTC	ShK-R22 d1	178
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMX ⁸²² YRLSFRCRKTCGTC	ShK-X22 d1	179
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSM (norleu) YRLSFRCRKTCGTC	ShK-Nle22 d1	180

10

20

30

40

SCIDTIPKSRCTAFQCKHSM(orn)YRLSFCRKTGTC	ShK- Orn22 d1	181
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSM(homocit)YRLSFCRKTGTC	ShK- Homocit22 d1	182
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSM(diaminopropionic)YRLSFCRKTGTC	ShK- Diamino-propionic22 d1	183
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKARLSFCRKTGTC	ShK-A23 d1	184
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKSRLSFCRKTGTC	ShK-S23 d1	185
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKFRLSFCRKTGTC	ShK-F23 d1	186
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKX ⁵²³ RLSFCRKTGTC	ShK-X23 d1	187
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK(nitrophe)RLSFCRKTGTC	ShK-Nitrophe23 d1	188
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK(aminophe)RLSFCRKTGTC	ShK-Aminophe23 d1	189
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK(benzylphe)RLSFCRKTGTC	ShK-Benzylphe23 d1	190
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYALSFCRKTGTC	ShK-A24 d1	191
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYELSFRCRKTGTC	ShK-E24 d1	192
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRASFCRKTGTC	ShK-A25 d1	193
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLAFCRKTGTC	ShK-A26 d1	194
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSACRKTGTC	ShK-A27 d1	195
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSX ⁵²⁷ CRKTGTC	ShK-X27 d1	196
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A29 d1	197
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRATGTC	ShK-A30 d1	198
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKACGTC	ShK-A31 d1	199
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGAC	ShK-A34 d1	200
YSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-Y1	548
KSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-K1	549
HSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-H1	550
QSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-Q1	551
PPRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	PP-ShK	552
MRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	M-ShK	553
GRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	G-ShK	554
YSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-Y1/A22	555
KSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-K1/A22	556
HSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-H1/A22	557
QSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-Q1/A22	558
PPRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	PP-ShK-A22	559
MRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	M-ShK-A22	560
GRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	G-ShK-A22	561
RSCIDTIPASRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-A9/A22	884
SCIDTIPASRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-A9/A22 d1	885
RSCIDTIPVSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-V9	886
RSCIDTIPVSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-V9/A22	887
SCIDTIPVSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-V9 d1	888
SCIDTIPVSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-V9/A22 d1	889
RSCIDTIPESRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-E9/A22	890
SCIDTIPESRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-E9/A22 d1	891
RSCIDTIPKSACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-A11/A22	892
SCIDTIPKSACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-A11/22 d1	893
RSCIDTIPKSECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-E11/A22	894
SCIDTIPKSECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-E11/A22 d1	895
RSCIDTIPKSRCTDFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-D14	896

10

20

30

40

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

10

20

30

40

RSCIDTIPVSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK- V9/E11/D14/I15/ R16	938
RSCIDTIPVSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK- V9/E11/D14/I15/ R16/A22	939
SCIDTIPVSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK- V9/E11/D14/I15/ R16 d1	940
SCIDTIPVSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK- V9/E11/D14/I15/ R16/A22 d1	941
RSCIDTIPVSECTDIQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK- V9/E11/D14/I15	942
RSCIDTIPVSECTDIQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK- V9/E11/D14/I15/A 22	943
SCIDTIPVSECTDIQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK- V9/E11/D14/I15 d1	944
SCIDTIPVSECTDIQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK- V9/E11/D14/I15/A 22 d1	945
RTCKDLIPVSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK- T2/K4/L6/V9/E11/ D14/I15/R16	946
RTCKDLIPVSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK- T2/K4/L6/V9/E11/ D14/I15/R16/A22	947
TCKDLIPVSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK- T2/K4/L6/V9/E11/ D14/I15/R16 d1	948
TCKDLIPVSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK- T2/K4/L6/V9/E11/ D14/I15/R16/A22 d1	949
(L-Phosphotyrosine) - AEEARSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK(L5)	950
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK Q1/A4/A15	1295
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK Q1/A4/A15/A22	1296
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSM (Dap) YRLSFCRKTCGTC	ShK Q1/A4/A15/Dap2 2	1297
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK Q1/A4/A15/A25	1298
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSMAYRASFCRKTCGTC	ShK Q1/A4/A15/A22/A 25	1299
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSM (Dap) YRASFCRKTCGTC	ShK Q1/A4/A15/Dap2 2/A25	1300

【 0 0 8 9 】

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

10

20

30

40

50

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

【0090】

【表4】

表3—HmK、BgK、AeK及びAsKSペプチド及びペプチド類縁体の配列

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

VCRDWFKETACRHAASLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK	9
ACRDWFKETACRHAASLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A1	226
VCADWFKETACRHAASLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A3	227
VCRDAFKETACRHAASLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A5	228
VCRDWFKATACRHAASLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A8	229
VCRDWFKEAACRHAASLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A9	230
VCRDWFKETACAHASLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A12	231
VCRDWFKETACRHAASLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A15	232
VCRDWFKETACRHAASLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A16	233
VCRDWFKETACRHAASAGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A17	234
VCRDWFKETACRHAASLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A21	235
VCRDWFKETACRHAASLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A22	236
VCRDWFKETACRHAASLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A27	237
VCRDWFKETACRHAASLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A32	238
VCRDWFKETACRHAASLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A33	239
VCRDWFKETACRHAASLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A35	240
VCRDWFKETACRHAASLGNCRTSQKYRANCAKTCELC	BgK-A37	241
GCKDNFSANTCKHVKANNNCGSQKYATNCAKTCELC	AeK	7
ACKDNFAAATCKHVKENKNCGSQKYATNCAKTCELC	AsKS	8

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

【0091】

【表 5】

表 4—MgTx ペプチド及びMgTx ペプチド類縁体の配列

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

【0092】

表 4 に記載されている多くのペプチドは、出願人が Merck & Co., Inc. である、1995 年 2 月 2 日に公開された WO 95/03065 号に記載されているとおりに調製することが可能である。この出願は、1993 年 7 月 22 日に提出された米国特許出

願 07/096, 942 号 (参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。) に対応する。

【0093】

【表 6】

表 5 - AgTx2 ペプチド及び AgTx2 ペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
GVPINVSCTGSPQCIKPKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	AgTx2	23
GVPIAVSCTGSPQCIKPKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	AgTx2-A5	261
GVPINVSCTGSPQCIAPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	AgTx2-A16	262
GVPINVSCTGSPQCIKPKCADAGMRFGKCMNRKCHCTPK	AgTx2-A19	263
GVPINVSCTGSPQCIKPKDAGMAFGKCMNRKCHCTPK	AgTx2-A24	264
GVPINVSCTGSPQCIKPKDAGMRFGACMNRKCHCTPK	AgTx2-A27	265
GVPINVSCTGSPQCIKPKDAGMRFGKCMNAKCHCTPK	AgTx2-A31	266
GVPINVSCTGSPQCIKPKDAGMRFGKCMNRACHCTPK	AgTx2-A32	267
GVPINVSCTGSPQCIKPKDAGMRFGKCMNRKCHCTPA	AgTx2-A38	268
GVPIAVSCTGSPQCIKPKDAGMRFGKCMNRKCHCTPA	AgTx2-A5/A38	269
GVPINVSCTGSPQCIKPKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	AgTx2-G31	270
GVPIIVSCKGSRQCIKPKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	AgTx2-OSK_z1	271
GVPIIVSCKISRQCIKPKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	AgTx2-OSK_z2	272
GVPIIVKCKGSRQCIKPKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	AgTx2-OSK_z3	273
GVPIIVKCKISRQCIKPKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	AgTx2-OSK_z4	274
GVPIIVKCKISRQCIKPKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	AgTx2-OSK_z5	275

【0094】

【表 7】

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

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

【0095】

表 5 に記載されているペプチドは、Lebrun らに対して 2004 年 2 月 10 日に付与された米国特許第 6,689,749 号 (参照により、その全体が本明細書に組み込ま

10

20

30

40

50

れる。)に記載されているとおりに調製することが可能である。

【0096】

【表8】

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

配列／構造	省略名称	配列番号
GVIINVCKKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1	25
GVIINVSKKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-S7	1303
GVIINVCKKISRQCLKPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-K16	294
GVIINVCKKISRQCLEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-D20	295
GVIINVCKKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-K16,D20	296
GVIINVSKKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-S7,K16,D20	1308
GVIINVCKKISPQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-P12,K16,D20	297
GVIINVCKKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-K16,D20,Y36	298
Ac-GVIINVCKKISPQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-P12, K16, D20	562
GVIINVCKKISPQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	OSK1-P12,K16, D20-NH ₂	563
Ac-GVIINVCKKISPQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	Ac-OSK1-P12, K16, D20-NH ₂	564
GVIINVCKKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH ₂	OSK1-K16, D20, Y36-NH ₂	565
Ac-GVIINVCKKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	Ac-OSK1-K16, D20, Y36	566
Ac-GVIINVCKKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH ₂	Ac-OSK1-K16, D20, Y36-NH ₂	567
GVIINVCKKISRQCLKPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	OSK1-K16-NH ₂	568
Ac-GVIINVCKKISRQCLKPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-K16	569
Ac-GVIINVCKKISRQCLKPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	Ac-OSK1-K16-NH ₂	570
Ac-GVIINVCKKISRQCLEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-D20	571
GVIINVCKKISRQCLEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	OSK1-D20-NH ₂	572
Ac-GVIINVCKKISRQCLEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	Ac-OSK1-D20-NH ₂	573
GVIINVCKKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	OSK1-NH ₂	574
Ac-GVIINVCKKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1	575
Ac-GVIINVCKKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	Ac-OSK1-NH ₂	576
GVIINVCKKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	OSK1-K16, D20-NH ₂	577
Ac-GVIINVCKKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-K16, D20	578
Ac-GVIINVCKKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	Ac-OSK1-K16, D20-NH ₂	579

10

20

30

VIINVCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	$\Delta 1$ -OSK1	580
Ac-VIINVCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac- $\Delta 1$ -OSK1	581
VIINVCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	$\Delta 1$ -OSK1-NH ₂	582
Ac-VIINVCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	Ac- $\Delta 1$ -OSK1-NH ₂	583
GVIINVCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-A34	584
Ac-GVIINVCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK	Ac-OSK1-A34	585
GVIINVCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH ₂	OSK1-A34-NH ₂	586
Ac-GVIINVCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH ₂	Ac-OSK1-A34-NH ₂	587
VIINVCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	$\Delta 1$ -OSK1-K16, D20	588
Ac-VIINVCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac- $\Delta 1$ -OSK1-K16, D20	589
VIINVCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	$\Delta 1$ -OSK1-K16, D20-NH ₂	590
Ac-VIINVCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	Ac- $\Delta 1$ -OSK1-K16, D20-NH ₂	591
NVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	($\Delta 1$ -4)-OSK1-K16, D20	592
Ac-NVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-($\Delta 1$ -4)-OSK1-K16, D20	593
NVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	($\Delta 1$ -4)-OSK1-K16, D20-NH ₂	594
Ac-NVKCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	Ac-($\Delta 1$ -4)-OSK1-K16, D20-NH ₂	595
KCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	($\Delta 1$ -6)-OSK1-K16, D20	596
Ac-KCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-($\Delta 1$ -6)-OSK1-K16, D20	597
KCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	($\Delta 1$ -6)-OSK1-K16, D20-NH ₂	598
Ac-KCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	Ac-($\Delta 1$ -6)-OSK1-K16, D20-NH ₂	599
CKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	($\Delta 1$ -7)-OSK1-K16, D20	600
Ac-CKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-($\Delta 1$ -7)-OSK1-K16, D20	601
CKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	($\Delta 1$ -7)-OSK1-K16, D20-NH ₂	602
Ac-CKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	Ac-($\Delta 1$ -7)-OSK1-K16, D20-NH ₂	603
GVIINVCKISRQCLKPCKDAGMRNGKCMNGKCHCTPK	OSK1-K16, D20, N25	604
GVIINVCKISRQCLKPCKDAGMRNGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	OSK1-K16, D20, N25-NH ₂	605
Ac-GVIINVCKISRQCLKPCKDAGMRNGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-K16, D20, N25	606
Ac-GVIINVCKISRQCLKPCKDAGMRNGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	Ac-OSK1-K16, D20, N25-NH ₂	607
GVIINVCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	OSK1-K16, D20, R31	608
GVIINVCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK-NH ₂	OSK1-K16, D20, R31-NH ₂	609

10

20

30

40

Ac-GVIINVCKISRQCLKPKCDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	Ac-OSK1-K16, D20, R31	610
Ac-GVIINVCKISRQCLKPKCDAGMRFGKCMNRKCHCTPK-NH ₂	Ac-OSK1-K16, D20, R31-NH ₂	611
GVIINVCKISKQCLKPCRDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-K12, K16, R19, D20	612
Ac-GVIINVCKISKQCLKPCRDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-K12, K16, R19, D20	613
GVIINVCKISKQCLKPCRDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	OSK1-K12, K16, R19, D20-NH ₂	614
Ac-GVIINVCKISKQCLKPCRDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	Ac-OSK1-K12, K16, R19, D20-NH ₂	615
TIINVCKISRQCLKPKCDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Δ1-OSK1-T2, K16, D20	616
Ac-TIINVCKISRQCLKPKCDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-Δ1-OSK1-T2, K16, D20	617
TIINVCKISRQCLKPKCDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	Δ1-OSK1-T2, K16, D20-NH ₂	618
Ac-TIINVCKISRQCLKPKCDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	Ac-Δ1-OSK1-T2, K16, D20-NH ₂	619
GVKINVCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-K3	620
Ac-GVKINVCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-K3	621
GVKINVCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	OSK1-K3-NH ₂	622
Ac-GVKINVCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	Ac-OSK1-K3-NH ₂	623
GVKINVCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-K3, A34	624
GVKINVCKISRQCLKPKCDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-K3, K16, D20	625
GVKINVCKISRQCLKPKCDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-K3, K16, D20, A34	626
Ac-GVKINVCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK	Ac-OSK1-K3, A34	627
GVKINVCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH ₂	OSK1-K3, A34-NH ₂	628
Ac-GVKINVCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH ₂	Ac-OSK1-K3, A34- NH ₂	629
Ac-GVKINVCKISRQCLKPKCDAGMRFGKCMNGKCACTPK	Ac-OSK1-K3, K16, D20, A34	630
GVKINVCKISRQCLKPKCDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH ₂	OSK1-K3, K16, D20, A34-NH ₂	631
Ac-GVKINVCKISRQCLKPKCDAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH ₂	Ac-OSK1-K3, K16, D20, A34-NH ₂	632
Ac-GVKINVCKISRQCLKPKCDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	Ac-OSK1-K3, K16, D20	633
GVKINVCKISRQCLKPKCDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	OSK1-K3, K16, D20- NH ₂	634
Ac-GVKINVCKISRQCLKPKCDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH ₂	Ac-OSK1-K3, K16, D20-NH ₂	635
GVIINVCKISRQCLKPKCDAGMRFGKCMNGKCHCT	Δ36-38-OSK1-K16, D20	636
GVIINVCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-O16,D20	980
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hLys 16,D20	981
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hArg 16,D20	982

10

20

30

40

GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-Cit 16,D20	983
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hCit 16,D20	984
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-Dpr 16,D20	985
GVIINVCKISRQCL[Dab] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-Dab 16,D20	986
GVIINVCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-O16,D20,Y36	987
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-hLys 16,D20,Y36	988
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-hArg 16,D20,Y36	989
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-Cit 16,D20,Y36	990
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-hCit 16,D20,Y36	991
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-Dpr 16,D20,Y36	992
GVIINVCKISRQCL[Dab] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-Dab 16,D20,Y36	993
GVIINVCKISRQCLKPKCKDAGMRFGKCMNGKCACYPK	OSK1- K16,D20,A34,Y36	994
GVIINVCKISRQCLKPKCKDAGMRFGKCMNGKCGCYPK	OSK1- K16,D20,G34,Y36	995
GVIINVCKISRQCLKPKCKDAGMRFGKCMNGKCACFPK	OSK1- K16,D20,A34,F36	996
GVIINVCKISRQCLKPKCKDAGMRFGKCMNGKCACWPK	OSK1- K16,D20,A34,W36	997
GVIINVCKISRQCLKPKCKEAGMRFGKCMNGKCACYPK	OSK1- K16,E20,A34,Y36	998
GVIINVCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-O16,D20,A34	999
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-hLys 16,D20,A34	1000
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-hArg 16,D20,A34	1001
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-Cit 16,D20,A34	1002
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hCit 16,D20,A34	1003
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-Dpr 16,D20,A34	1004
GVIINVCKISRQCL[Dab] PCKDAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-Dab 16,D20,A34	1005
GVIINVCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1- O16,D20,	1006
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1- hLys 16,D20	1007
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1- hArg 16,D20	1008
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-Cit 16,D20	1009
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1- hCit 16,D20	1010

10

20

30

40

GVIINVCKISRQCL [Dpr] PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,D20	1011
GVIINVCKISRQCL [Dab] PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1- Dab16,D20	1012
GVIINVCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1- O16,D20,A34	1013
GVIINVCKISRQCL [hLys] PCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1- hLys 16,D20,A34	1014
GVIINVCKISRQCL [hArg] PCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1- hArg 16,D20,A34	1015
GVIINVCKISRQCL [Cit] PCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-Cit 16,D20,A34	1016
GVIINVCKISRQCL [hCit] PCKDAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1- hCit 16,D20,A34	1017
GVIINVCKISRQCL [Dpr] PCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,D20,A34	1018
GVIINVCKISRQCL [Dab] PCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-Dab 16,D20,A34	1019
GVIINVCKISRQCLKPKCKDAGMRFGKCMNGKCGCYGG	OSK1- K16,D20,G34,Y36,G 37,G38	1020
GVIINVCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1- O16,D20,Y36,G37,G 38	1021
GVIINVCKISRQCL [hLys] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hLys 16,D20,Y36,G37,G3 8	1022
GVIINVCKISRQCL [hArg] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hArg 16,D20,Y36,G37,G3 8	1023
GVIINVCKISRQCL [Cit] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-Cit 16,D20,Y36,G37,G3 8	1024
GVIINVCKISRQCL [hCit] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hCit 16,D20,Y36,G37,G3 8	1025
GVIINVCKISRQCL [Dpr] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-Dpr 16,D20,Y36,G37,G3 8	1026
GVIINVCKISRQCLKPKCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1- K16,D20,A34,Y36,G 37,G38	1027
GVIINVCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1- O16,D20,A34,Y36,G 37,G38	1028
GVIINVCKISRQCL [hLys] PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-hLys 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38	1029
GVIINVCKISRQCL [hArg] PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-hArg 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38	1030

10

20

30

40

GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-Cit 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38	1031
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hCit 16,D20,A34,Y3,G37, G38	1032
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-Dpr 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38	1033
GVIINVCKISRQCL[Dab] PCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-Dab 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38	1034
GVIINVCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACYG	Δ38, OSK1- K16,D20,A34,Y36,G 37	1035
GVIINVCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1- O16,D20,G36-38	1036
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-hLys 16,D20,G36-38	1037
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-hArg 16,D20,G36-38	1038
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-Cit 16,D20,G36-38	1039
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-hCit 16,D20,G36-38	1040
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-Dpr 16,D20,G36-38	1041
GVIINVCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACFGG	OSK1- K16,D20,A34,F36,G 37,G38	1042
GVIINVCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1- O16,D20,A34,G36- 38	1043
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-hLys 16,D20,A34,G36-38	1044
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-hArg 16,D20,A34,G36-38	1045
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-Cit 16,D20,A34,G36-38	1046
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-hCit 16,D20,A34,G36-38	1047
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-Dpr 16,D20,A34,G36-38	1048
GVIINVCKISRQCL[Dab] PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-Dab 16,D20,A34,G36-38	1049
GVIINVCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACGG	Δ38, OSK1- K16,D20,A34,G36- 37	1050
GVIINVCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACYG	Δ38, OSK1- K16,D20,A35,Y36,G 37	1051

10

20

30

40

GVIINVCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACGG	Δ 38, OSK1-O16,D20,A35,Y36,G37	1052
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hLys 16,E20	1053
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hArg 16,E20	1054
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-Cit 16,E20	1055
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hCit 16,E20	1056
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-Dpr 16,E20	1057
GVIINVCKISRQCL[Dab] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-Dab 16,E20	1058
GVIINVCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-O16,E20,Y36	1059
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-hLys 16,E20,Y36	1060
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-hArg 16,E20,Y36	1061
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-Cit 16,E20,Y36	1062
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-hCit 16,E20,Y36	1063
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-Dpr 16,E20,Y36	1064
GVIINVCKISRQCL[Dab] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-Dab 16,E20,Y36	1065
GVIINVCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-O16,E20,A34	1066
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-hLys 16,E20,A34	1067
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-hArg 16,E20,A34	1068
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-Cit 16,E20,A34	1069
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1-hCit 16,E20,A34	1070
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-Dpr 16,E20,A34	1071
GVIINVCKISRQCL[Dab] PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK	OSK1-Dab 16,E20,A34	1072
GVIINVCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ 36-38, OSK1-O16,E20,	1073
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ 36-38, OSK1-hLys 16,E20	1074
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ 36-38, OSK1-hArg 16,E20	1075
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ 36-38, OSK1-Cit 16,E20	1076
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ 36-38, OSK1-hCit 16,E20	1077
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ 36-38, OSK1-Dpr 16,E20	1078

10

20

30

40

GVIINVCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-O16,E20,A34	1079
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKEAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-hLys 16,E20,A34	1080
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKEAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-hArg 16,E20,A34	1081
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKEAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-Cit 16,E20,A34	1082
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHC	Δ36-38, OSK1-hCit 16,E20,A34	1083
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKEAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,E20,A34	1084
GVIINVCKISRQCL[Dab] PCKEAGMRFGKCMNGKCAC	Δ36-38, OSK1-Dab 16,E20,A34	1085
GVIINVCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-K16,E20,Y36,G37,G38	1086
GVIINVCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-O16,E20,Y36,G37,G38	1087
GVIINVCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCHCYG	Δ38 OSK1-K16,E20,Y36,G37	1088
GVIINVCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCACYG	Δ38 OSK1-K16,E20,A34,Y36,G37	1089
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hLys 16,E20,Y36,G37,G38	1090
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hArg 16,E20,Y36,G37,G38	1091
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-Cit 16,E20,Y36,G37,G38	1092
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	Δ37-38, OSK1-hCit 16,E20,Y36,G37,G38	1093
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-Dpr 16,E20,Y36,G37,G38	1094
GVIINVCKISRQCL[Dab] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-Dab 16,E20,Y36,G37,G38	1095
GVIINVCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCACYG	Δ38, OSK1-K16,E20,A34,Y36,G37	1096
GVIINVCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-O16,E20,A34,Y36,G37,G38	1097

10

20

30

40

GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-hLys 16,E20,A34,Y36,G3 7,G38	1098
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-hArg 16,E20,A34,Y36,G3 7,G38	1099
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-Cit 16,E20,A34,Y36,G3 7,G38	1100
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-hCit 16,E20,A34,Y3,G37, G38	1101
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-Dpr 16,E20,A34,Y36,G3 7,G38	1102
GVIINVCKISRQCL[Dab] PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-Dab 16,E20,A34,Y36,G3 7,G38	1103
GVIINVCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCACFG	OSK1- K16,D20,A34,F36,G 37,G38	1104
GVIINVCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1- O16,E20,G36-38	1105
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-hLys 16,E20,G36-38	1106
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-hArg 16,E20,G36-38	1107
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-Cit 16,E20,G36-38	1108
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-hCit 16,E20,G36-38	1109
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-Dpr 16,E20,G36-38	1110
GVIINVCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1- O16,E20,A34,G36- 38	1111
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-hLys 16,E20,A34,G36-38	1112
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-hArg 16,E20,A34,G36-38	1113
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG	OSK1-Cit 16,E20,A34,G36-38	1114
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKEAGMRFGKCMNGKCACTP	OSK1-hCit 16,E20,A34,G36-38	1115
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKEAGMRFGKCMNGKCACTP	OSK1-Dpr 16,E20,A34,G36-38	1116
GVIINVCKISRQCL[Dab] PCKEAGMRFGKCMNGKCACTP	OSK1-Dab 16,E20,A34,G36-38	1117
GVIINVCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-O16,D20- amide	1118
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-hLys 16,D20-amide	1119

10

20

30

40

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

10

20

30

40

GVIINVCKISRQCLPCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-O16,D20, -amide	1139
GVIINVCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hLys 16,D20-amide	1140
GVIINVCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hArg 16,D20-amide	1141
GVIINVCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-Cit 16,D20-amide	1142
GVIINVCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hCit 16,D20-amide	1143
GVIINVCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,D20-amide	1144
GVIINVCKISRQCLPCKDAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-O16,D20,A34-amide	1145
GVIINVCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-hLys 16,D20,A34-amide	1146
GVIINVCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-hArg 16,D20,A34-amide	1147
GVIINVCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-Cit 16,D20,A34-amide	1148
GVIINVCKISRQCL[hCit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-hCit 16,D20,A34	1149
GVIINVCKISRQCL[Dpr]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,D20,A34-amide	1150
GVIINVCKISRQCL[Dab]PCKDAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-Dab 16,D20,A34-amide	1151
GVIINVCKISRQCLKPKCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-O16,D20,Y36,G37,G38-amide	1152
GVIINVCKISRQCLPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-O16,D20,Y36,G37,G38	1153
GVIINVCKISRQCL[hLys]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-hLys 16,D20,Y36,G37,G38-amide	1154
GVIINVCKISRQCL[hArg]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-hArg 16,D20,Y36,G37,G38-amide	1155
GVIINVCKISRQCL[Cit]PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-Cit 16,D20,Y36,G37,G38-amide	1156

10

20

30

40

GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-hCit16,D20,Y36,G37,G38-amide	1157
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-Dpr16,D20,Y36,G37,G38-amide	1158
GVIINVCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCFGG-NH2	OSK1-K16,D20,F36,G37,G38-amide	1159
GVIINVCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYG-NH2	Δ 38-OSK1-K16,D20,Y36,G37-amide	1160
GVIINVCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCA CYG-NH2	Δ 38-OSK1-K16,D20,A34,Y36,G37-amide	1161
GVIINVCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCA CYGG-NH2	OSK1-O16,D20,A34,Y36,G37,G38-amide	1162
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKDAGMRFGKCMNGKCA CYGG-NH2	OSK1-hLys16,D20,A34,Y36,G37,G38-amide	1163
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKDAGMRFGKCMNGKCA CYGG-NH2	OSK1-hArg16,D20,A34,Y36,G37,G38-amide	1164
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKDAGMRFGKCMNGKCA CYGG-NH2	OSK1-Cit16,D20,A34,Y36,G37,G38	1165
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKDAGMRFGKCMNGKCA CYGG-NH2	OSK1-hCit16,D20,A34,Y3,G37,G38-amide	1166
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKDAGMRFGKCMNGKCA CYGG-NH2	OSK1-Dpr16,D20,A34,Y36,G37,G38-amide	1167
GVIINVCKISRQCL[Dab] PCKDAGMRFGKCMNGKCA CYGG-NH2	OSK1-Dab16,D20,A34,Y36,G37,G38-amide	1168
GVIINVCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCA CYGG-NH2	OSK1-K16,D20,A34,Y36,G37,G38-amide	1169
GVIINVCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-O16,D20,G36-38-amide	1170
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-hLys16,D20,G36-38-amide	1171
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-hArg16,D20,G36-38-amide	1172
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-Cit16,D20,G36-38-amide	1173

10

20

30

40

GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-hCit16,D20,G36-38-amide	1174
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-Dpr16,D20,G36-38-amide	1175
GVIINVCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-K16,D20,A34,G36-38-amide	1176
GVIINVCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACFGG-NH2	OSK1-O16,D20,A34,F36,G37-38-amide	1177
GVIINVCKISRQCLOPCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-O16,D20,A34,G36-38-amide	1178
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-hLys16,D20,A34,G36-38-amide	1179
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-hArg16,D20,A34,G36-38-amide	1180
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-Cit16,D20,A34,G36-38-amide	1181
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-hCit16,D20,A34,G36-38-amide	1182
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-Dpr16,D20,A34,G36-38-amide	1183
GVIINVCKISRQCL[Dab] PCKDAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-Dab16,D20,A34,G36-38-amide	1184
GVIINVCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-O16,E20-amide	1185
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-hLys16,E20-amide	1186
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-hArg16,E20-amide	1187
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-Cit16,E20-amide	1188
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-hCit16,E20-amide	1189
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-Dpr16,E20-amide	1190
GVIINVCKISRQCL[Dab] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCTPK-NH2	OSK1-Dab16,E20-amide	1191
GVIINVCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-O16,E20,Y36-amide	1192

10

20

30

40

GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-hLys 16,E20,Y36- amide	1193
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-hArg 16,E20,Y36- amide	1194
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-Cit 16,E20,Y36- amide	1195
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1- hCit16,E20,Y36- amide	1196
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,Y36- amide	1197
GVIINVCKISRQCL[Dab] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYPK-NH2	OSK1-Dab 16,E20,Y36- amide	1198
GVIINVCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1- O16,E20,A34- amide	1199
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-hLys 16,E20,A34- amide	1200
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-hArg 16,E20,A34- amide	1201
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-Cit 16,E20,A34- amide	1202
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1- hCit16,E20,A34- amide	1203
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,A34- amide	1204
GVIINVCKISRQCL[Dab] PCKEAGMRFGKCMNGKCACTPK-NH2	OSK1-Dab 16,E20,A34- amide	1205
GVIINVCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ 36-38, OSK1- O16,E20, - amide	1206
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ 36-38, OSK1- hLys 16,E20- amide	1207
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ 36-38, OSK1- hArg 16,E20- amide	1208
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ 36-38, OSK1-Cit 16,E20- amide	1209
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ 36-38, OSK1- hCit16,E20- amide	1210

10

20

30

40

GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,E20-amide	1211
GVIINVCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1- O16,E20,A34- amide	1212
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKEAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1- hLys16,E20,A34- amide	1213
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKEAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1- hArg16,E20,A34- amide	1214
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKEAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-Cit 16,E20,A34- amide	1215
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHC-NH2	Δ36-38, OSK1- hCit16,E20,A34- amide	1216
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKEAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-Dpr 16,E20,A34- amide	1217
GVIINVCKISRQCL[Dab] PCKEAGMRFGKCMNGKCAC-NH2	Δ36-38, OSK1-Dab 16,E20,A34- amide	1218
GVIINVCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCHCWGG-NH2	OSK1- O16,E20,W36,G37, G38-amide	1219
GVIINVCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1- O16,E20,Y36,G37,G 38-amide	1220
GVIINVCKISRQCL[hLys] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG- NH2	OSK1-hLys 16,E20,Y36,G37,G3 8-amide	1221
GVIINVCKISRQCL[hArg] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG- NH2	OSK1-hArg 16,E20,Y36,G37,G3 8-amide	1222
GVIINVCKISRQCL[Cit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-Cit 16,E20,Y36,G37,G3 8-amide	1223
GVIINVCKISRQCL[hCit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG- NH2	OSK1-hCit 16,E20,Y36,G37,G3 8-amide	1224
GVIINVCKISRQCL[Dpr] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,Y36,G37,G3 8-amide	1225
GVIINVCKISRQCL[Dab] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,Y36,G37,G3 8-amide	1226
GVIINVCKISRQCLKPCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1- K16,E20,A34,Y36,G 37,G38-amide	1227
GVIINVCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1- O16,E20,A34,Y36,G 37,G38-amide	1228

10

20

30

40

GVIINVKCKISRQCL[hLys] PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-hLys 16,E20,A34,Y36,G3 7,G38-amide	1229
GVIINVKCKISRQCL[hArg] PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-hArg 16,E20,A34,Y36,G3 7,G38-amide	1230
GVIINVKCKISRQCL[Cit] PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-Cit 16,E20,A34,Y36,G3 7,G38-amide	1231
GVIINVKCKISRQCL[hCit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-hCit 16,E20,A34,Y3,G37, G38-amide	1232
GVIINVKCKISRQCL[Dpr] PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,A34,Y36,G3 7,G38-amide	1233
GVIINVKCKISRQCL[Dab] PCKEAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-Dab 16,E20,A34,Y36,G3 7,G38-amide	1234
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1- O16,E20,G36-38- amide	1235
GVIINVKCKISRQCL[hLys] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-hLys 16,E20,G36-38- amide	1236
GVIINVKCKISRQCL[hArg] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-hArg 16,E20,G36-38- amide	1237
GVIINVKCKISRQCL[Cit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-Cit 16,E20,G36-38- amide	1238
GVIINVKCKISRQCL[hCit] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-hCit 16,E20,G36-38- amide	1239
GVIINVKCKISRQCL[Dpr] PCKEAGMRFGKCMNGKCHCGGG-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,G36-38- amide	1240
GVIINVKCKISRQCLOPCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1- O16,E20,A34,G36- 38-amide	1241
GVIINVKCKISRQCL[hLys] PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-hLys 16,E20,A34,G36- 38-amide	1242
GVIINVKCKISRQCL[hArg] PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-hArg 16,E20,A34,G36- 38-amide	1243
GVIINVKCKISRQCL[Cit] PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-Cit 16,E20,A34,G36- 38-amide	1244
GVIINVKCKISRQCL[hCit] PCKEAGMRFGKCMNGKCACTP-NH2	Δ38 OSK1-hCit 16,E20,A34- amide	1245

10

20

30

40

GVIINVCKISRQCL [Dpr] PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-Dpr 16,E20,A34,G36- 38-amide	1246
GVIINVCKISRQCL [Dab] PCKEAGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-Dab 16,E20,A34,G36- 38-amide	1247
GVIINVCKISRQCLKPCK [Cpa] AGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-K 16,CPA20,A34,Y36, G37,G38-amide	1248
GVIINVCKISRQCLKPCK [Cpa] AGMRFGKCMNGKCACGGG-NH2	OSK1-K 16,CPA20,A34,G36- 38-amide	1249
GVIINVCKISRQCLKPCK [Cpa] AGMRFGKCMNGKCACY-NH2	Δ 37-38OSK1-K 16,CPA20,A34,Y36 -amide	1250
Ac-GVIINVCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	Acetyl-OSK1-K 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38-amide	1251
GVIINVCKISRQCLKPCK [Aad] AGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-K 16, Aad20,A34,Y36,G37 ,G38-amide	1252
GVIINVCKISRQCLKPCK [Aad] AGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-K 16, Aad20,Y36,G37,G38 -amide	1253
GVIINVCKISRQCLKPCK [Aad] AGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-K 16, Aad20,A34,Y36,G37 ,G38	1254
GVIINVCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG-NH2	OSK1-H 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38-amide	1255
GVIINVCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCACYGG	OSK1-H 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38	1256
GVIINVCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCACY-NH2	Δ 37-38-OSK1-H 16,D20,A34,Y36- amide	1257
GVIINVCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG-NH2	OSK1-H 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38-amide	1258
GVIINVCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYGG	OSK1-H 16,D20,A34,Y36,G3 7,G38	1259
GVIINVCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCHCYPK	OSK1-H 16,D20,A34,Y36,	1260
GVIINVCKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCAC	Δ 36-38 OSK1-H 16,D20,A34,Y36,	1261
GVIINVCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC [1Na1] GG-NH2	OSK1-K 16,D20,A34,1Na136, G37,G38-amide	1262
GVIINVCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC [1Na1] PK-NH2	OSK1-K 16,D20,A34,1Na136 -amide	1263

10

20

30

40

GVIINVCKKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[2Nal]GG-NH2	OSK1-K 16,D20,A34,2Nal36, G37,G38-amide	1264
GVIINVCKKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[Cha]GG-NH2	OSK1-K 16,D20,A34,Cha36, G37,G38-amide	1265
GVIINVCKKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[MePhe]GG-NH2	OSK1-K 16,D20,A34, MePhe36,G37,G38 -amide	1266
GVIINVCKKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[BiPhA]GG-NH2	OSK1-K 16,D20,A34, BiPhA36,G37,G38 -amide	1267
GVIINVCKKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKC[Aib]CYGG-NH2	OSK1-K 16,D20, Aib34,Y36,G37,G3 8-amide	1268
GVIINVCKKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKC[Abu]CYGG-NH2	OSK1-K 16,D20, Abu34,Y36,G37,G3 8-amide	1269
GVIINVCKKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[1Nal]	Δ 37-38 OSK1-H 16,D20,A34,1Nal36, -amide	1270
GVIINVCKKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[1Nal]GG-NH2	OSK1-H 16,D20,A34, 1Nal36,G37,G38- amide	1271
GVIINVCKKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[4Bip]-NH2	Δ 37-38 OSK1-H 16,D20,A34, 4Bip 36,-amide	1272
GVIINVCKKISRQCLHPCKDAGMRFGKCMNGKCAC[4Bip]GG-NH2	OSK1-H 16,D20,A34, 4Bip 36,G37,G38- amide	1273
GVIINVCKKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCGGG	OSK1-K16,E20,G36- 38	1274

【0097】

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

【0098】

【表9】

表8-Pi2ペプチド及びPi2sペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
TISCTNPKQCYPHCKKETGYFNAKCMNRKCKCFGR	Pi2	17
TISCTNPKQCYPHCKKETGYFNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-X8	299
TISCTNPAQCYPHCKKETGYFNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-A8	300

TISCTNPKQCYPHCKXKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-X15	301
TISCTNPKQCYPHCAKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-A15	302
TISCTNPKQCYPHCKXKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-X16	303
TISCTNPKQCYPHCKAETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-A16	304
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-X24	305
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-A24	306
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-X28	307
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-A28	308
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-X29	309
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-A29	310
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-X31	311
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2-A31	312
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGX	Pi2-X35	313
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGA	Pi2-A35	314
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFG	Pi2-d35	315

【0099】

【表10】

表9ーアナウロトキシシ (AnTx) ペプチド及びペプチド類縁体の配列

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

【0100】

【表11】

表10ーノキシウストキシシ (NTX) ペプチド及びNTXペプチド類縁体の配列

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

【0101】

【表12】

表11ーカリオトキシシ (KTX1) ペプチド及びKTX1ペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
GVEINVKCSGSPQCLKPKCDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	KTX1	24
VRIPVSCKHSGQCLKPKCDAGMRFGKCMNGKCDCTPK	KTX2	326
GVEINVSCSGSPQCLKPKCDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	KTX1-S7	327
GVEINVACSGSPQCLKPKCDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	KTX1-A7	328

【0102】

【表 1 3】

表 1 2 - I K C a 1 阻害剤ペプチドの配列

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

【0 1 0 3】

10

【表 1 4】

表 1 3 - マウロトキシシン (MTx) ペプチド及びMTxペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX	20
VSCAGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A4	330
VSCTGAKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A6	331
VSCTGSADCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A7	332
VSCTGSKDCAAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A10	333
VSCTGSKDCYAPCQKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-Q14	334
VSCTGSKDCYAPCRQQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-Q15	335
VSCTGSKDCYAPCQQQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-Q14,15	336
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYAC	MTX-A33	337
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPYGKCMNRKCKCNRC	MTX-HsTx1	338
VSCTGSKDCYAAARCKQTGCANAKCINKSCKCYGC	MTX-A12,20	339
VSCTGSKDCYAPCRKQTGX ^{M13} PNACINKSCKCYGX ^{M34}	MTX-X19, 34	340
VSCTGSKDCYAPCRKQTGSPNAKCINKSCKCYGS	MTX-S19,34	341
VSCTGSADCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A7	342
VVIGQRCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	TsK-MTX	343
VSCRGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-R4	1301
VSCGSGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-G4	1302
VSCTTSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-T5	1304
VSCTASKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A5	1305
VSCTGTKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-T6	1306
VSCTGPKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-P6	1307
VSCTGSKDCGAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-G10	1309
VSCTGSKDCYRPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-R11	1311
VSCTGSKDCYDPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-D11	1312
VSCTGSKDCYAPCRKRTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-R16	1315
VSCTGSKDCYAPCRKETGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-E16	1316
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPYAKCINKSCKCYGC	MTX-Y21	1317
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNSKCINKSCKCYGC	MTX-S22	1318
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNGKCINKSCKCYGC	MTX-G22	1319
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINRSCKCYGC	MTX-R27	1320
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKTCKCYGC	MTX-T28	1321
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKMCKCYGC	MTX-M28	1322
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKKCKCYGC	MTX-K28	1323
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKKNGC	MTX-N32	1324
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYRC	MTX-R33	1325
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGCS	MTX-S35	1326
SCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-d1	1327
SCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGCS	MTX-S35 d1	1328
VSCTGSKDCYAPCAKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTX-A14	1329

20

30

40

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

【0104】

表13及び本明細書を通じて、 X^{m19} 及び X^{m34} は、各々独立に、非官能性残基である。 10

【0105】

【表15】

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

配列／構造	省略名称	配列番号
QFTNVSCCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx	36
QFTNVSCCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKECRCYS	ChTx-E32	59
QFTNVSCCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKDCRCYS	ChTx-D32	344
CTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-d1-d6	345
QFTNVSCCTTSKECWSVCQRLFGVDRGKCMGKKCRCYQ	ChTx-lbTx	346
QFTNVSCCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNGKRCRCYS	ChTx-G31	1369
QFTNVSCCTTSKECLVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-L14	1370
QFTNVSCCTTSKECASVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A14	1371
QFTNVSCCTTSKECWAVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A15	1372
QFTNVSCCTTSKECWVVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-P15	1373
QFTNVSCCTTSKECWSACQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A16	1374
QFTNVSCCTTSKECWSPCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-P16	1375
QFTNVSCCTTSKECWSVCQRLHNTSAGKCMNKKCRCYS	ChTx-A25	1376
QFTNVACTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A6	1377
QFTNVKCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-K6	1378
QFTNVSCCTAKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A10	1379
QFTNVSCCTTPKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-P10	1380
QFTNVSCCTTSKACWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A12	1381
QFTNVSCCTTSKQCWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-Q12	1382

20

30

40

AFTNVSCCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A1	1383
TFTNVSCCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-T1	1384
QATNVSCCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A2	1385
QITNVSCCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-I2	1386
QFANVSCCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-A3	1387
QFINVSCCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	ChTx-I3	1388
TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGTSRGKCMNKKCRCYSP	ChTx-MgTx	1389
TIINVSCCTSPKQCLPPCKAQFGTSRGKCMNKKCRCYSP	ChTx-MgTx-b	1390

10

【0106】

【表16】

20

表15-SKCα阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
CNCKAPETALCARRCQQHG	Apamin	68
AFCNLRLMCQLSCRSLLGKLCIGDKCECVKH	ScyTx	51
AVCNLKRCLSCRSLLGKLCIGDKCECVKHG	BmP05	50
TVCNLRLRCQLSCRSLLGKLCIGVKCECVKH	P05	52
AFCNLRLRCELSCRSLLGKLCIGEECKCVPY	Tamapin	53
VSCEDCPEHCSTQKAQAKCDNDKCVCEPI	P01	16
VVIGQRCYRSPDCYSACKLVGKATGKCTNGRCDC	TsK	47

30

【0107】

【表17】

表16-アパミンペプチド及びペプチド類縁体阻害剤の配列

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

40

【0108】

【表 18】

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

配列／構造	省略名称	配列番号
AFCNLRLMCQLSCRSLLGLLGKCIQDKCECVKH	ScyTx	51
AFCNLRLRCQLSCRSLLGLLGKCIQDKCECVKH	ScyTx-R7	354
AFCNLRLMCQLSCRSLLGLLGKCMGKKRCVKH	ScyTx-lbTx	355
AFSNLRLMCQLSCRSLLGLLGKSIQDKCECVKH	ScyTx-C/S	356
AFCNLRLRCELSCRSLLGLLGKCIQEECKCVPY	Tamapin	53

10

【0109】

【表 19】

表 18—BKCa阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKRCYQ	lbTx	38
TFIDVDCTVSKECWAPCKAAFGVDRGKCMGKKCKCYV	Slotoxin (SloTx)	39
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFQKPNGKCMNGKRCYS	BmTx1	40
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKRCYTN	BuTx	41
FGLIDVKCFASSECWTAACKKVTGSGQKQNNQRCY	MartenTx	35
ITINVKCTSPQQLRPFCKDRFGQHAGGKINGKCKCYP	CllTx1	29

20

【0110】

【表 20】

表 19—IbTx、スロトキシシ、BmTx1及びBuTx (スロトキシシ
ファミリー) ペプチド及びペプチド類縁体阻害剤の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKRCYQ	lbTx	38
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKRCYQ	lbTx-X11	357
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKRCYQ	lbTx-A11	358
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKRCYQ	lbTx-X18	359
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKRCYQ	lbTx-A18	360
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDXGKCMGKKRCYQ	lbTx-X25	361
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDAGKCMGKKRCYQ	lbTx-A25	362
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGXCMGKKRCYQ	lbTx-X27	363
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGACMGKKRCYQ	lbTx-A27	364
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGXKRCYQ	lbTx-X31	365
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGAKRCYQ	lbTx-A31	366
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGXKRCYQ	lbTx-X32	367
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGAKRCYQ	lbTx-A32	368
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKXCXYQ	lbTx-X34	369
QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKCACYQ	lbTx-A34	370
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFQKPNGKCMNGKRCYS	BmTx1	371
QFTDVXCTGSKQCWPVCKQMFQKPNGKCMNGKRCYS	BmTx1-X6	372
QFTDVACTGSKQCWPVCKQMFQKPNGKCMNGKRCYS	BmTx1-A6	373
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFQKPNGKCMNGKRCYS	BmTx1-X11	374
QFTDVKCTGSAQCWPVCKQMFQKPNGKCMNGKRCYS	BmTx1-A11	375
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFQKPNGKCMNGKRCYS	BmTx1-X18	376
QFTDVKCTGSKQCWPVCAQMFQKPNGKCMNGKRCYS	BmTx1-A18	377

30

40

50

QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGXPNGKCMNGKCRYS	BmTx1-X23	378
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGAPNGKCMNGKCRYS	BmTx1-A23	379
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRYS	BmTx1-X27	380
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGACMNGKCRYS	BmTx1-A27	381
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRYS	BmTx1-X32	382
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRYS	BmTx1-A32	383
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRYS	BmTx1-X34	384
QFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRYS	BmTx1-A34	385
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCTN	BuTx	386
WCSTCLDLACGASXCYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCTN	BuTx-X14	387
WCSTCLDLACGASACYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCTN	BuTx-A14	388
WCSTCLDLACGASRECYDPCFXFGRAHGKCMNNKCRCTN	BuTx-X22	389
WCSTCLDLACGASRECYDPCFAGRAHGKCMNNKCRCTN	BuTx-A22	390
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGXHGKCMNNKCRCTN	BuTx-X26	391
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGAHGKCMNNKCRCTN	BuTx-A26	392
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCTN	BuTx-X30	393
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCTN	BuTx-A30	394
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCTN	BuTx-X35	395
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCTN	BuTx-A35	396
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCTN	BuTx-X37	397
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCTN	BuTx-A37	398

【0111】

【表21】

表20—マルテントキシンペプチド及びペプチド類縁体阻害剤の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGKQNNQCRCY	MartenTx	35
FGLIDVXCFASSECWTACKKVTGSGQGKQNNQCRCY	MartenTx-X7	399
FGLIDVACFASSECWTACKKVTGSGQGKQNNQCRCY	MartenTx-A7	400
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGKQNNQCRCY	MartenTx-X19	401
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGKQNNQCRCY	MartenTx-A19	402
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGKQNNQCRCY	MartenTx-X20	403
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGKQNNQCRCY	MartenTx-A20	404
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGKQNNQCRCY	MartenTx-X28	405
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGKQNNQCRCY	MartenTx-A28	406
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGKQNNQCRCY	MartenTx-X35	407
FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQGKQNNQCRCY	MartenTx-A35	408

【0112】

【表22】

表21—N型Ca²⁺チャンネル阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSRGK	MVIIA	65
CKSPGSSCSPTSYNCCRSCNPNYTKRCY	GVIA	64
CKSKGAKCSKLMYDCCTGSCSGTVGRC	CVIA	409
CKLKGQSCRKTSYDCCSGSCGRSGK	SVIB	347
AEKDCAIPGAPCFGTDPCCNPRAWCSSYANKCL	Plu1	66
CKGKGASCRKTMIDCCRGSCRSRGK	CVIB	1364
CKGKGQSCSKLMYDCCTGSCSRRGK	CVIC	1365
CKSKGAKCSKLMYDCCSGSCSGTVGRC	CVID	1366
CLXGSSCSXTSYNCCRSCNXYSRKCY	TVIA	1367

【0113】

【表 2 3】

表 2 2 - ω M V I I A ペプチド及びペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSKGK	MVIIA	65
CXGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSKGK	MVIIA-X2	410
CAGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSKGK	MVIIA-A2	411
CKGXGAKCSRLMYDCCTGSCRSKGK	MVIIA-X4	412
CKGAGAKCSRLMYDCCTGSCRSKGK	MVIIA-A4	413
CKGKGAXCSRLMYDCCTGSCRSKGK	MVIIA-X7	414
CKGKGAACSRLMYDCCTGSCRSKGK	MVIIA-A7	415
CKGKGAKCSXLMYDCCTGSCRSKGK	MVIIA-X10	416
CKGKGAKCSALMYDCCTGSCRSKGK	MVIIA-A10	417
CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCXSGKC	MVIIA-X21	418
CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCASGKC	MVIIA-A21	419
CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSXGK	MVIIA-X24	420
CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSKAC	MVIIA-A24	421

10

【0 1 1 4】

【表 2 4】

表 2 3 - ω G V I A ペプチド及びペプチド類縁体の配列

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

20

30

【0 1 1 5】

【表 2 5】

表 2 4 - P t u 1 ペプチド及びペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
AEKDCIAPGAPCFGTDPCCNPRAWCSYANKCL	Ptu1	66
AEXDCIAPGAPCFGTDPCCNPRAWCSYANKCL	Ptu1-X3	430
AEADCIAPGAPCFGTDPCCNPRAWCSYANKCL	Ptu1-A3	431
AEKDCIAPGAPCFGTDPCCNPRAWCSYANKCL	Ptu1-X17	432
AEKDCIAPGAPCFGTDPCCNPRAWCSYANKCL	Ptu1-A17	433
AEKDCIAPGAPCFGTDPCCNPXAWCSYANKCL	Ptu1-X23	434
AEKDCIAPGAPCFGTDPCCNPAAWCSYANKCL	Ptu1-A23	435
AEKDCIAPGAPCFGTDPCCNPRAWCSYANKCL	Ptu1-X32	436
AEKDCIAPGAPCFGTDPCCNPRAWCSYANACL	Ptu1-A32	437

40

【0 1 1 6】

【表 2 6】

表 2 5 トリキソペルマ・プルリエンス (ProTx i) 及び ProTx i
ペプチド類縁体及び他の T 型 Ca²⁺ チャンネル阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
ECRYWLGGCSAGQTCCCKHLVCSRRHGWCVWDGTFS	ProTx1	56
ECXYWLGGCSAGQTCCCKHLVCSRRHGWCVWDGTFS	ProTx1-X3	438
ECAYWLGGCSAGQTCCCKHLVCSRRHGWCVWDGTFS	ProTx1-A3	439
ECRYWLGGCSAGQTCCXHLVCSRRHGWCVWDGTFS	ProTx1-X17	440
ECRYWLGGCSAGQTCCAHLVCSRRHGWCVWDGTFS	ProTx1-A17	441
ECRYWLGGCSAGQTCCCKHLVCSRXHGWCVWDGTFS	ProTx1-X23	442
ECRYWLGGCSAGQTCCCKHLVCSARHGWCVWDGTFS	ProTx1-A23	443
ECRYWLGGCSAGQTCCCKHLVCSRXHGWCVWDGTFS	ProTx1-X24	444
ECRYWLGGCSAGQTCCCKHLVCSRAHGWCVWDGTFS	ProTx1-A24	445
KIDGYPVDYW NCKRICWYNN KYCNDLCKGL KADSGYCWGW TLSCYCQLP DNARIKRSR CRA	Kurt toxin	1276

10

【0 1 1 7】

【表 2 7】

表 2 6 - BeKMIM 電流阻害剤ペプチド及び BeKM1 ペプチド類縁体の配列

配列／構造	省略名称	配列番号
RPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCE	BeKM1	63
PTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCE	BeKM1-d1	446
XPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCE	BeKM1-X1	447
APTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCE	BeKM1-A1	448
RPTDIXCSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCE	BeKM1-X6	449
RPTDIACSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCE	BeKM1-A6	450
RPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCE	BeKM1-X18	451
RPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCDCE	BeKM1-A18	452
RPTDIKCSESYQCFPVCKSXFGKTNGRCVNGFCDCE	BeKM1-X20	453
RPTDIKCSESYQCFPVCKSAFGKTNGRCVNGFCDCE	BeKM1-A20	454
RPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGXTNGRCVNGFCDCE	BeKM1-X23	455
RPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGATNGRCVNGFCDCE	BeKM1-A23	456
RPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGXCVNGFCDCE	BeKM1-X27	457
RPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKTNGACVNGFCDCE	BeKM1-A27	458

20

30

【0 1 1 8】

【表 2 8】

表 2 7 - Na⁺ チャンネル阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
QRCCNGRRGCSRRWCRDHSRCC	SmIIa	459
RDCCTOOKKCKDRQCKOQRCCA	μ-GIIA	460
RDCCTOORKCKDRRCKOMRCCA	μ-GIIB	461
ZRLCCGFOKSCRSRQCKOHRCC	μ-PIIA	462
ZRCCNGRRGCSRRWCRDHSRCC	μ-SmIIA	463
ACRKKWEYCIIVPIIGFIYCCPGLICGPFVCV	μO-MrVIA	464
ACSKKWEYCIIVPIIGFIYCCPGLICGPFVCV	μO-MrVIB	465
EACYAOGTFGCIKOGLCCEFCFLPGVCFG	δ-PVIA	466
DGCSSGGTFGCIHOGLCCEFCFLWCITFID	δ-SVIE	467
WCKQSGEMCNLLDQNCDDGYCIVLVCT	δ-TxVIA	468
VKPCRKEGQLCDPIFQNCGRWNCVLFVCV	δ-GmVIA	469

40

【0 1 1 9】

50

【表 29】

表 28 - C I - チャンネル阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
MCMPCF ^{TT} TDHQM ^{ARK} CDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR	CTX	67
MCMPCF ^{TT} TDHQM ^{AXK} CDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR	CTX-X14	470
MCMPCF ^{TT} TDHQM ^{AAK} CDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR	CTX-A14	471
MCMPCF ^{TT} TDHQM ^{ARX} CDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR	CTX-X15	472
MCMPCF ^{TT} TDHQM ^{ARAC} CDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR	CTX-A15	473
MCMPCF ^{TT} TDHQM ^{ARK} CDDCCGGXGRGKCYGPQCLCR	CTX-X23	474
MCMPCF ^{TT} TDHQM ^{ARK} CDDCCGGAGRGKCYGPQCLCR	CTX-A23	475
MCMPCF ^{TT} TDHQM ^{ARK} CDDCCGGKXGRGKCYGPQCLCR	CTX-X25	476
MCMPCF ^{TT} TDHQM ^{ARK} CDDCCGGKAGRGKCYGPQCLCR	CTX-A25	477
MCMPCF ^{TT} TDHQM ^{ARK} CDDCCGGKGRGXCYGPQCLCR	CTX-X27	478
MCMPCF ^{TT} TDHQM ^{ARK} CDDCCGGKGRGACYGPQCLCR	CTX-A27	479
MCMPCF ^{TT} TDHQM ^{ARK} CDDCCGGKGRGKCYGPQCLCX	CTX-X36	480
MCMPCF ^{TT} TDHQM ^{ARK} CDDCCGGKGRGKCYGPQCLCA	CTX-A36	481
MCMPCF ^{TT} TDHQM ^{ARK} CDDCCGGKGRGKCYGPQCLC	CTX-d36	482
QTDGCGPCF ^{TT} DANMARKCRECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b	483
QTDGCGPCF ^{TT} DANMAXKRECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b-X17	484
QTDGCGPCF ^{TT} DANMAAKRECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b-A17	485
QTDGCGPCF ^{TT} DANMARXCRECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b-X18	486
QTDGCGPCF ^{TT} DANMARACRECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b-A18	487
QTDGCGPCF ^{TT} DANMARKCXECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b-X20	488
QTDGCGPCF ^{TT} DANMARKCAECCGGNGKCFGPQCLCNRE	Bm-12b-A20	489
QTDGCGPCF ^{TT} DANMARKCRECCGGNGXCFGPQCLCNRE	Bm-12b-X28	490
QTDGCGPCF ^{TT} DANMARKCRECCGGNGACFGPQCLCNRE	Bm-12b-A28	491
QTDGCGPCF ^{TT} DANMARKCRECCGGNGKCFGPQCLCNXE	Bm-12b-X38	492
QTDGCGPCF ^{TT} DANMARKCRECCGGNGKCFGPQCLCNAE	Bm-12b-A38	493

【0120】

【表 30】

表 29 - K v 2. 1 阻害剤ペプチド配列

配列／構造	省略名称	配列番号
ECRYLFGGCK ^{TT} SDCKHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1	494
ECXYLFGGCK ^{TT} SDCKHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-X3	495
ECAYLFGGCK ^{TT} SDCKHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-A3	496
ECRYLFGGCK ^{TT} SDCKHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-X10	497
ECRYLFGGCK ^{TT} SDCKHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-A10	498
ECRYLFGGCK ^{TT} SDCCXHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-X17	499
ECRYLFGGCK ^{TT} SDCCAHLGCKFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-A17	500
ECRYLFGGCK ^{TT} SDCKHLGCKXFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-X22	501
ECRYLFGGCK ^{TT} SDCKHLGCAFRDKYCAWDFTFS	HaTx1-A22	502
ECRYLFGGCK ^{TT} SDCKHLGCKFXDKYCAWDFTFS	HaTx1-X24	503
ECRYLFGGCK ^{TT} SDCKHLGCKFADKYCAWDFTFS	HaTx1-A24	504
ECRYLFGGCK ^{TT} SDCKHLGCKFRDXCAWDFTFS	HaTx1-X26	505
ECRYLFGGCK ^{TT} SDCKHLGCKFRDAYCAWDFTFS	HaTx1-A26	506

【0121】

【表 3 1】

表 3 0 - K v 4. 3 及び K v 4. 2 阻害剤ペプチドの配列

配列／構造	省略名称	配列番号
YCQKMMWTCDEERKCCCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2	57
YCQXMMWTCDEERKCCCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2-X4	507
YCQAWMMWTCDEERKCCCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2-A4	508
YCQKMMWTCDEEEXKCCCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2-X13	509
YCQKMMWTCDEEAKCCCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2-A13	510
YCQKMMWTCDEERXCCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2-X14	511
YCQKMMWTCDEERACCEGLVCRLWCKRIINM	PaTx2-A14	512
YCQKMMWTCDEERKCCCEGLVCXLWCKRIINM	PaTx2-X22	513
YCQKMMWTCDEERKCCCEGLVCALWCKRIINM	PaTx2-A22	514
YCQKMMWTCDEERKCCCEGLVCRLWCXRIINM	PaTx2-X26	515
YCQKMMWTCDEERKCCCEGLVCRLWCARIINM	PaTx2-A26	516
YCQKMMWTCDEERKCCCEGLVCRLWCKXIINM	PaTx2-X27	517
YCQKMMWTCDEERKCCCEGLVCRLWCKAIINM	PaTx2-A27	518

10

【0 1 2 2】

【表 3 2】

表 3 1 - n A C H R チャンネル阻害剤ペプチドの配列

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

20

30

40

【0 1 2 3】

【表 3 3】

表 3 2 - アゲレノプシス・アペルタ (アガトキシン) トキシンペプチド及びペプチド類
縁体及び Ca^{2+} チャンネル阻害剤ペプチド

配列／構造	省略名称	配列番号
KKKCIADYGRCKWGGTPCC RGRGCICSIM GTNCECKPRL IMEGLGLA	ω -Aga-IVA	959
EDNCIAEDYGRCKWGGTKCC RGRPCRCSMI GTNCECTPRL IMEGLSFA	ω -Aga-IVB	960
SCIDIGGDCD GEKDDCQCCR RNYCSCYSL FGYLKSGCKC VVGTSAEFQG ICRRKARQCY NSDPDKCESH NKPKRR	ω -Aga-III A	961
SCIDIGGDCD GEKDDCQCCR RNYCSCYSL FGYLKSGCKC VVGTSAEFQG ICRRKARTCY NSDPDKCESH NKPKRR	ω -Aga-III A- T58	962
SCIDFGGDCD GEKDDCQCCR SNGYCSCYSL FGYLKSGCKC EVGTSAEFRR ICRRKAKQCY NSDPDKCVSV YKPKRR	ω -Aga-III B	963
SCIDFGGDCD GEKDDCQCCR SNGYCSCYNL FGYLKSGCKC EVGTSAEFRR ICRRKAKQCYNSDPDKCVSV YKPKRR	ω -Aga-III B- N29	964
SCIDFGGDCD GEKDDCQCCR SNGYCSCYNL FGYLRSCKC EVGTSAEFRR ICRRKAKQCY NSDPDKCVSV YKPKRR	ω -Aga-III B- N29/R35	965
NCIDFGGDCD GEKDDCQCCX RNYCSCYNL FGYLKRGCKX EVG	ω -Aga-III C	966
SCIKIGEDCD GDKDDCQCCR TNGYCSXYXL FGYLKSG GCIEIGGDCD GYQESYQC CRNNGFCS	ω -Aga-III D ω -Aga-II A	967 968
AKAL PPGSVCDGNE SDCKCYGKWH KCRCPWKWHF TGEGPCTCEK GMKHTCITKL HCPNKAEWGL DW	ω -Aga-IA (major chain)	969
ECVPENGHCR DWYDECCEGF YCSCRQPPKC ICRNNX	μ -Aga	970
DCVGESQCCA DWAGPHCCDG YYCTCRYFPK CICVNNN	μ -Aga-6	971
ACVGENKQCA DWAGPHCCDG YYCTCRYFPK CICRNNN	μ -Aga-5	972
ACVGENQCCA DWAGPHCCDG YYCTCRYFPK CICRNNN	μ -Aga-4	973
ADCVGDGQRC ADWAGPYCCS GYYCSCRMP YCRCRSDS	μ -Aga-3	1275
ECATKNKRC DWAGPWCCDG LYCSCRSPG CMCRPSS	μ -Aga-2	974
ECVPENGHCR DWYDECCEGF YCSCRQPPKC ICRNNN	μ -Aga-1	975
AELTSCFPVGHEDGDASNCNCCGDDVYCGCGWGRWNCKC KVADQSYAYGICKDKVNCNPNRHLWPAKVCKKPCRREC	Tx-1	1277
GCANAYKSCNGPHTCCWGYNGYKKACICSGXNWK	Tx3-3	1278
SCINVGDFCDGKDDCCQCDRDNACSCSVIFGYKTNCRC	Tx3-4	1279
SCINVGDFCDGKDDCCQCDRDNACSCSVIFGYKTNCRC VGTTATSYGICMAKHKCGRQTCTKPLSKRCKKNH	ω -PtXII A	1280
AECLMIGDTSCVPRLRRCYGAWCYDQQLSCRRVGRKR ECGWVEVNCKGWSWSQRIDDWRADYSCKCPEDQ	Dw13.3	1281
GGCLPHNRFNCALSGPRCCSGLKCKELSIWDSRCL	Agelenin	1282
DCVRFWKGCSQTSDCPHLACKSKWPRNICVWDGSV	ω -GTx-SIA	1283
GCLEVDYFCG IPFANGLCC SGNCVFVCTP Q	ω -conotoxin PnVIA	1284
DDDCEPPGNF CGMIKIGPPC CSGWCFFACA	ω -conotoxin PnVIB	1285
VCCGYKLCHP C	Lambda- conotoxin CMrVIA	1286

MRLPVLIIIL LLLTASAPGV VVLPKTEDDV PMSSVYGNGK SILRGILRNG VCCGYKLCHP C	Lambda- conotoxin CMrVIB	1287
KIDGYPVDYW NCKRICWYNN KYCNDLCKGL KADSGYCWW TLSCYCOGLP DNARIKRSGR CRA	Kurt toxin	1276
CKGKGAPCRKTMDCSGSGRGRGK	MVIIC	1368

【0124】

本発明に従えば、分子のトキシンペプチド（P）部分の少なくとも1つがKv1、3アンタゴニストペプチドを含む分子である。ShK、HmK、MgTx、AgTx1、AgTx2、ヘテロメトラス・スピニファー（Heterometrus spinifer）（HsTx1）、OSK1、アヌロクトキシン（Anuroctoxin）（Anx）、ノキシウストキシン（Noxiustoxin）（NTX）、KTX1、ホンゴトキシン（Hongotoxin）、ChTx、チチストキシン（Titystoxin）、BgK、BmKTX、BmTx、AeK、AeKSTc30、Tc32、Pi1、Pi2及び／又はPi3トキシンペプチド及びこれらの何れかのペプチド類縁体からなる群から選択されるアミノ酸配列が好ましい。有用なKv1、3アンタゴニストペプチド配列の例には、本明細書の上記表1、表2、表3、表4、表5、表6、表7、表8、表9、表10及び／又は表11に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

10

【0125】

本発明の組成物の他の実施形態は、IKCa1アンタゴニストペプチドである少なくとも1つのトキシンペプチド（P）を含む。有用なIKCa1アンタゴニストペプチドには、マウロトキシン（MTx）、ChTxペプチド及びこれらの何れかのペプチド類縁体が含まれ、その例には、表12、表13及び／又は表14に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【0126】

本発明の組成物の他の実施形態は、SKCa阻害剤ペプチドである少なくとも1つのトキシンペプチド（P）を含む。有用なSKCa阻害剤ペプチドには、アパミン、ScyTx、BmP05、P01、P05、タマピン、TsK及びこれらの何れかのペプチド類縁体が含まれ、その例には、表15に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

20

【0127】

本発明の組成物の他の実施形態には、アパミンペプチド及びアパミンのペプチド類縁体である少なくとも1つのトキシンペプチド（P）が含まれ、その例には、表16に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【0128】

本発明の組成物の他の実施形態には、シロトキシンファミリーペプチド及びこれらの何れかのペプチド類縁体である少なくとも1つのトキシンペプチド（P）が含まれ、その例には、表17に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

30

【0129】

本発明の組成物の他の実施形態には、BKCa阻害剤ペプチドである少なくとも1つのトキシンペプチド（P）が含まれ、その例には、表18に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【0130】

本発明の組成物の他の実施形態には、スロトキシンファミリーペプチド及びこれらの何れかのペプチド類縁体である少なくとも1つのトキシンペプチド（P）が含まれ、その例には、表19に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

40

【0131】

本発明の組成物の他の実施形態には、マルテントキシンペプチド及びそのペプチド類縁体である少なくとも1つのトキシンペプチド（P）が含まれ、その例には、表20に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【0132】

本発明の組成物の他の実施形態には、N型Ca²⁺チャンネル阻害剤ペプチドである少なくとも1つのトキシンペプチド（P）が含まれ、その例には、表21に記載されている何れかのアミノ酸配列を有するものが含まれる。

【0133】

本発明の組成物の他の実施形態には、ωMVIIAペプチド及びそのペプチド類縁体で

50

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

【0134】

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

【0135】

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

10

【0136】

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

【0137】

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

【0138】

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

20

【0139】

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

【0140】

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

30

【0141】

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

【0142】

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

【0143】

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

40

【0144】

半減期延長部分。本発明は、N末端、C末端又は中間のアミノ酸残基1つの側鎖を通じてペプチドに結合された少なくとも1つの半減期延長部分（式I中のF¹及び／又はF²）の存在を含む。複数の半減期延長部分を使用することも可能である（例えば、各末端のFc又は末端のFc及び他の末端若しくは側鎖のPEG基）。他の実施形態において、（例えば、式F¹-F²-(L)_f-P；P-(L)_g-F¹-F²；又はP-(L)_g-F¹-F²-(L)_f-Pに従って）FcドメインをPEG化することが可能である。

50

【0145】

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

10

【0146】

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

【0147】

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

20

30

40

【0148】

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

50

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

【0149】

本発明の幾つかの実施形態において、Fcドメイン又はその一部(FcのCH₂ドメインなど)が、半減期延長部分として使用される。Fcドメインは、トキシンペプチドのN末端(例えば、式F¹-(L)_f-Pに従って)又はC末端(例えば、式P-(L)_g-F¹に従って)又はN末端及びC末端の両方に(例えば、式F¹-(L)_f-P-(L)_g-F²又はP-(L)_g-F¹-(L)_f-Pに従って)融合することが可能である。本明細書に記載されているように、Fcドメインとトキシンペプチドの間に、ペプチドリンカー配列を場合によって含めることが可能である。式F¹-(L)_f-Pの例には、Fc-L10-ShK(K22A)[2-35]; Fc-L10-ShK(R1K/K22A)[1-35]; Fc-L10-ShK(R1H/K22A)[1-35]; Fc-L10-ShK(R1Q/K22A)[1-35]; Fc-L10-ShK(R1Y/K22A)[1-35]; Fc-L10-PP-ShK(K22A)[1-35]及び本明細書に記載されている他の全ての実施例が含まれる。式P-(L)_g-F¹の例には、ShK(1-35)-L10-Fc; OsK1(1-38)-L10-Fc; Met-ShK(1-35)-L10-Fc; ShK(2-35)-L10-Fc; Gly-ShK(1-35)-L10-Fc; OsK1(1-38)-L10-Fc; 及び本明細書に記載されている他の全ての実施例が含まれる。

【0150】

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

【0151】

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

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

【0152】

2. 固有Fcは、選択された宿主細胞とより適合性があるように修飾される。例えば、10
プロリンイミノペプチダーゼなどの、E. コリ中の消化酵素によって認識され得る典型的な固有FcのN末端に近いPA配列を除去することが可能である。分子が、E. コリなどの細菌細胞中で組み換え的に発現されている場合には特に、N末端メチオニン残基を付加することも可能である。配列番号2のFcドメイン（図4 A-B）は、このようなFcバリエーションの1つである。

【0153】

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

【0154】

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

【0155】

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

【0156】

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

【0157】

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

【0158】

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

【0159】

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

【0160】

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

10

20

30

40

50

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

10

【0161】

上述のように、ポリマー半減期延長部分は、F¹及びF²に対して使用することも可能である。半減期延長部分として有用な化学的部分を付着させるための様々な手段が、現在利用可能である。例えば、「N-Terminally Chemically Modified Protein Compositions and Methods」と題された特許協力条約（「PCT」）国際公開WO96/11953号（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）を参照されたい。このPCT公報は、とりわけ、タンパク質のN末端への、水溶性ポリマーの選択的付着を開示している。

【0162】

本発明の組成物の幾つかの実施形態において、ポリマー半減期延長部分は、F¹及び／又はF²としてのポリエチレングリコール（PEG）であるが、本発明の組成物は、位置F¹及び／又はF²以外に、トキシンペプチド上の1つ又はそれ以上の部位など、分子中の他の部位に抱合された1つ又はそれ以上のPEGを含むことも可能である。従って、本発明の組成物の幾つかの実施形態は、F¹及び／又はF²である非PEG半減期延長部分に、又はトキシンペプチド（P）に、又はこれらの何れかのあらゆる組み合わせに抱合された1つ若しくはそれ以上のPEG部分をさらに含む。例えば、本発明の組成物中のFcドメイン又はその一部（F¹及び／又はF²として）は、還元的アルキル化の方法によって、モノPEG化され、ジPEG化され又はその他マルチPEG化されることが可能である。

20

【0163】

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

30

40

【0164】

50

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

【0165】

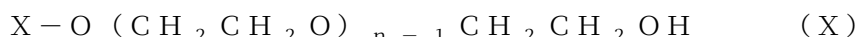
合成ペプチドのPEG化のための有用な戦略は、溶液中での抱合体結合を形成することを通じて、ペプチド及びPEG部分（各々が他のPEG部分に対して相互に反応性である特別な官能性を有する。）を結合させることからなる。ペプチドは、慣用の固相合成を用いて容易に調製することが可能である（例えば、図5及び6並びに本明細書に添付されている説明文を参照されたい。）。ペプチドは、特異的な部位における適切な官能基で「予め活性化」される。前駆体は、PEG部分との反応前に精製され、完全に性質決定される。ペプチドのPEGとの連結は、通常、水相で起こり、逆相分析HPLCによって容易にモニターすることが可能である。PEG化され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

10

【0166】

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

20



(nは20~2300であり、Xは、H又は末端修飾、例えばC₁₋₄アルキルである。)
によって表される。

【0167】

幾つかの有用な実施形態において、本発明で使用されるPEGは、一方の末端がヒドロキシ又はメトキシで終わっている（即ち、Xは、H又はCH₃（「メトキシPEG」）である。）。PEGの他の末端（式(II)では、OHで終結するように示されている。）は、エーテル酸素結合、アミン結合又はアミド結合を介して活性化部分に共有結合することが注目される。化学的構造において使用される場合、「PEG」という用語は、示されている水酸基の水素なしの上記式(II)を含み、エーテル結合を形成するためにリンカーの遊離炭素原子との反応に利用可能な酸素が残存する。より具体的には、PEGをペプチドに抱合するために、ペプチドは、「活性化された」形態のPEGと反応されなければならない。活性化されたPEGは、式：

30



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

40

【0168】

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

50

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

【0169】

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

【0170】

本発明における有用な活性化されたPEGの例は、Shearwater Polymers (Huntsville, Al) から市販されているPEG-プロピオンアルデヒドなどのPEG-アルデヒド化合物（例えば、メトキシPEG-アルデヒド）である。PEG-プロピオンアルデヒドは、式 $\text{PEG}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ によって表される。（例えば、米国特許第5, 252, 714号参照）。有用な活性化されたPEGの他の例は、PEGアセトアルデヒド水和物及びPEGビスアルデヒド水和物であり、後者は、二機能性に活性化された構造を与える。（例えば、Bentley et al., Polyethylene glycol aldehyde hydrates and related polymers and applications in modifying amines, 米国特許第5, 990, 237号参照）。

【0171】

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

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

【0172】

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

【0173】

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

【0174】

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

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

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

10

【0175】

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

【0176】

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

20

【0177】

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

30

40

【0178】

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

50

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

【0179】

幾つかの実施形態において、1～20個のアミノ酸は、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン及びリジンから選択される。より好ましくは、リンカーは、グリシン及びアラニンなどの、立体的に妨害されないアミノ酸の過半数から構成される。従って、好ましいリンカーには、ポリグリシン(特に、 $(Gly)_4$ 、 $(Gly)_5$)、ポリ $(Gly-Ala)$ 及びポリアラニンが含まれる。他の好ましいリンカーは、本明細書において「L5」($GGGGS$; 配列番号638)、「L10」($GGGGS GGGGS$; 配列番号79)、「L25」($GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS$; 配列番号84)として特定されるリンカー、並びに、以下の実施例に使用されている全てのリンカーである。しかしながら、本明細書に記載されているリンカーは、典型的なものであり、本発明の範囲に属するリンカーは、さらに長くすることが可能であり、他の残基を含むことが可能である。

【0180】

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

【0181】

【化1】

GGEGGG (配列番号: 639);
 GGE EEGGG (配列番号: 640);
 GEEEG (配列番号: 641);
 GEEE (配列番号: 642);
 GGDGGG (配列番号: 643);
 GGDDGG (配列番号: 644);
 GDDGG (配列番号: 645);
 GDDD (配列番号: 646);
 GGGGSDDSDGSDGEGGGGS (配列番号: 647);
 WEWEW (配列番号: 648);
 FEFEF (配列番号: 649);
 EEEWWW (配列番号: 650);
 EEEFFF (配列番号: 651);
 WWEEWW (配列番号: 652); or
 FFEEFFF (配列番号: 653).

【0182】

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

る。

【0183】

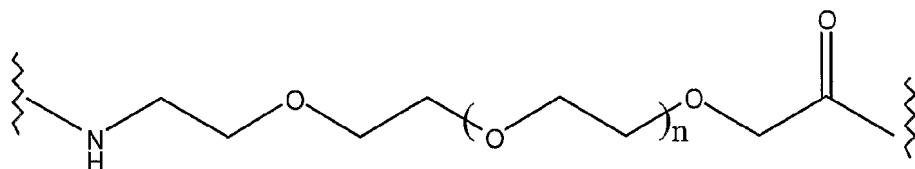
非ペプチドリinkerも可能である。例えば、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_s-\text{C}(\text{O})-$ （式中、 $s=2\sim 20$ ）などのアルキルリンカーを使用することが可能である。これらのアルキルリンカーは、さらに、低級アルキル（例えば、 C_1-C_6 ）低級アシル、ハロゲン（例えば、 Cl 、 Br ）、 CN 、 NH_2 、フェニルなどの、立体的に妨害を生じないあらゆる基によって置換することが可能である。典型的な非ペプチドリinkerは、PEGリンカー

【0184】

【化2】

10

(XII)



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

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

20

【0185】

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

【0186】

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

30

【0187】

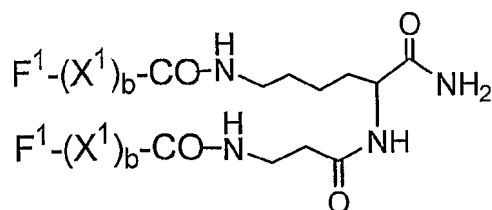
2. 化合物は、架橋されているか、又は分子間を架橋できるようにされる。例えば、ペプチド部分は、1つのCys残基を含有し、これにより、リンカー分子と分子間ジスルフィド結合を形成することができるよう修飾することが可能である。化合物は、以下に示されている分子におけるように、そのC末端を通じて架橋することも可能である。

【0188】

【化3】

(XIII)

40



【0189】

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

50

)₂NR-]、尿素[-NH-C(=O)-NH-]、-CH₂-二級アミン及びアルキル化されたペプチド[-C(=O)-NR⁶- (式中、R⁶は低級アルキルである。)]である。

【0190】

4. N末端が、化学的に誘導体化されている。典型的には、N末端は、アシル化され、又は置換されたアミンへと修飾することが可能である。典型的なN末端誘導体基には、-NRR¹ (-NH₂以外)、-NRC(=O)R¹、-NRC(=O)OR¹、-NRS(O)₂R¹、-NHC(=O)NHR¹、スクシンイミド又はベンジルオキシカルボニル-NH-(CBZ-NH-) (R及びR₁は、各々独立に、水素又は低級アルキルであり、フェニル環は、C₁-C₄アルキル、C₁-C₄アルコキシ、クロロ及びブromoからなる群から選択される1~3この置換基で置換されることが可能である。)が含まれる。

10

【0191】

5. 遊離のC末端が、誘導体化されている。典型的には、C末端は、エステル化され又はアミド化される。例えば、配列番号504~508の何れかを有する本発明の化合物のC末端に、(NH-CH₂-CH₂-NH₂)₂を付加するために、本分野で記載されている方法を使用することが可能である。同様に、例えば、配列番号924~955、963~972、1005~1013又は1018~1023の何れかを有する本発明の化合物のC末端に、NH₂を付加するために、本分野で記載されている方法を使用することが可能である。典型的なC末端誘導体基には、例えば、-C(=O)R² (R²は、低級アルコキシ又は-NR³R⁴である (R³及びR⁴は、独立に、水素又はC₁-C₈アルキル (好ましくは、C₁-C₄アルキル) である。))が含まれる。

20

【0192】

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

【0193】

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

【0194】

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

30

【0195】

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

40

【0196】

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

【0197】

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

50

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

【0198】

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

【0199】

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

【0200】

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

【0201】

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

【0202】

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

【0203】

10

20

30

40

50

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

【0204】

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

10

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

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

【0205】

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

20

【0206】

製造の方法

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

【0207】

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

30

【0208】

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

40

アデニル化シグナル及び転写又は翻訳の調節に関わる他のシグナルが含まれる。

【0209】

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

【0210】

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

50

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

【0211】

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

【0212】

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

【0213】

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

10

20

30

40

50

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

【0214】

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

【0215】

化合物の使用

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

【0216】

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

【0217】

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

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

【0218】

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

【0219】

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

が、ヘモグロビンの重合をもたらし、その後、溶血及び血管の閉塞をもたらす。いわゆるガルドスチャンネル（すなわち、I K C a 1）を通じたカルシウム流出後に、水分の喪失が起こる。従って、I K C a 1の遮断は、鎌形赤血球貧血症に対する治療的処置となり得る。

【0220】

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

【0221】

- ・多発性硬化症（K v、K C a）、
- ・乾癬（K v、K C a）、
- ・関節炎（K v、K C a）、
- ・喘息（K C a、K v）、
- ・アレルギー（K C a、K v）、
- ・COPD（K C a、K v、C a）
- ・アレルギー性鼻炎（K C a、K v）、
- ・肺繊維症、
- ・狼瘡（I K C a 1、K v）、
- ・移植、G v H D（K C a、K v）、
- ・炎症性骨吸収（K C a、K v）、
- ・歯周病（K C a、K v）、

・糖尿病、I型（K v）－I型糖尿病は、異常なグルコース、タンパク質及び脂質代謝を特徴とする自己免疫疾患であり、インシュリン欠乏又は耐性を伴う。本疾患では、K v 1.3発現Tリンパ球が、膵島を攻撃及び破壊し、β細胞の喪失をもたらす。K v 1.3の遮断は、炎症性サイトカインを減少させる。さらに、K v 1.3の遮断は、形質膜へのG L U T 4の転位を促進し、これにより、インシュリン感受性を増加させる。

【0222】

・肥満（K v）、－K v 1.3は、エネルギー恒常性の調節及び食事によって誘発される肥満からの保護において重大な役割を果たしているようである。従って、K v 1.3遮断剤は、代謝速度を増加させることが可能であり、より大きなエネルギー使用及び減少した体重をもたらす。

【0223】

・再狭窄（K C a、C a²⁺）、－血管平滑筋細胞の増殖及び遊走は、新生内膜肥厚及び血管の再狭窄をもたらすことが可能である。過剰な新生内膜血管平滑筋細胞増殖には、I K C a 1の上昇した発現を伴う。従って、I K C a 1の遮断は、血管形成術後の再狭窄を防ぐための治療的戦略となり得る。

【0224】

・虚血（K C a、C a²⁺）－神経又は心虚血、細胞膜の脱分極は、電圧開口型ナトリウム及びカルシウムチャンネルの開口をもたらす。次いで、これにより、カルシウムの過剰負荷が引き起こされ得、これは細胞毒性である。電圧開口型ナトリウム及び／又はカルシウムチャンネルの遮断は、カルシウムの過剰負荷を低減し、細胞保護効果を与えることが可能である。さらに、細胞膜電位の調節及び安定化におけるそれらの重大な役割のために、電圧及びカルシウム活性化されるカリウムチャンネルの調節物質も、カルシウムの過剰負荷を低減し、細胞を保護するように作用することが可能である。

【0225】

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

10

20

30

40

50

の刺激の低下をもたらす機構を提供する。

【0226】

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

【0227】

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

【0228】

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

【0229】

- ・発作又は卒中、
- ・アルツハイマー病、
- ・パーキンソン病 ($nACHR$ 、 Na_v)

双極性疾患 (Na_v 、 Ca_v)

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

【0230】

- ・様々な神経系疾患、新血管疾患、代謝疾患及び自己免疫疾患。

【0231】

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

【0232】

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

10

20

30

40

50

s with a selective inhibitor peptide of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases, *Molec. Pharmacol.* 67 (4):1369-81 (2005); 1 Beeton et al. (2006), Kv1.3: therapeutic target for cell-mediated autoimmune disease, electronic preprint at //webfiles.uci.edu/xythoswfs/webui/_xy-2670029_1を参照)。電圧開口型カリウムチャンネルの阻害剤であるKv1.3は、炎症の様々な前臨床動物モデルにおいて調べられてきた。Kv1.3の小分子及びペプチド阻害剤は、オボアルブミン [C. Beeton et al. (2005) *Mol. Pharmacol.* 67, 1369] 及び破傷風トキソイド [G. C. Koo et al. (1999) *Clin. Immunol.* 197, 99] に対する遅延型過敏症応答を遮断することが示されている。皮膚中の炎症を抑制することに加え、阻害剤は、抗体産生も低下させた [G. C. Koo et al. (1997) *J. Immunol.* 158, 5120]。Kv1.3アンタゴニストは、多発性硬化症 (MS) のラット養子免疫伝達実験自己免疫脳脊髄炎 (A T-E A E) モデルにおいて有効性を示した。KV1.3チャンネルは、MS患者から得たミエリン特異的T細胞上に過剰発現されており、MSを治療する上でKv1.3阻害剤が与え得る有用性に対するさらなる裏づけをもたらす。炎症性骨吸収も、歯周病の前臨床養子免疫伝達モデルにおけるKv1.3阻害剤によって抑制された [P. Valverde et al., (2004) *J. Bone Mineral Res.* 19, 155]。本研究では、阻害剤は、細菌の外膜タンパク質 (歯肉の炎症を誘発するために使用される細菌の一成分) に対する抗体産生をさらに遮断した。最近、前臨床ラットモデルにおいて、Kv1.3阻害剤の有効性が、プリスタンによって誘発された関節炎及び糖尿病を治療する上で示された [C. Beeton et al. (2006) preprint available at //webfiles.uci.edu/xythoswfs/webui/_xy-2670029_1.]。Kv1.3チャンネルは、T細胞及びB細胞の全てのサブセット上に発現されているが、エフェクターメモリーT細胞及びクラスが転換されたメモリーB細胞は、Kv1.3に特に依存している [H. Wulff et al. (2004) *J. Immunol.* 173, 776]。Gad5/insulin-specific T cells from patients with new onset type 1 diabetes, myelin-specific T cells from MS patients and T cells from the synovium of rheumatoid arthritis patients all overexpress Kv1.3 [C. Beeton et al. (2006) preprint at //webfiles.uci.edu/xythoswfs/webui/_xy-2670029_1]。高脂肪食上に配置されたときに、Kv1.3を欠失したマウスの体重増加はより少なく [J. Xu et al. (2003) *Human Mol. Genet.* 12, 551]、変化したグルコース利用を示した [J. Xu et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101, 3112] からである。Kv1.3は、肥満及び糖尿病の治療に対しても調査されている。乳癌試料 [M. Abdul et al. (2003) *Anticancer Res.* 23, 3347] 及び前立腺癌細胞株 [S. P. Fraser et al. (2003) *Pflugers Arch.* 446, 559] も、Kv1.3を発現することが示されており、Kv1.3の遮断は、癌の治療に対して有用であり得る。Kv1.3阻害剤トキシンペプチドが関与する自己免疫疾患を治療する本発明の方法に従って治療することが可能な疾患は、多発性硬化症、1型糖尿病、疥癬、炎症性腸疾患、接触媒介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、喘息、アレルギー、再狭窄、全身性硬化症、繊維症、強皮症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、炎症性骨吸収、移植拒絶、移植片対宿主病並びに全身性紅斑性狼瘡 (S L E) 及び狼瘡の他の形態が含まれる。

10

20

30

40

50

【0233】

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

【0234】

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

【0235】

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

【0236】

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

10

20

30

40

50

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

【0237】

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

【0238】

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

10

【0239】

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

【0240】

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

【0241】

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

20

【0242】

【化4】

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

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

【0243】

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

【0244】

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

30

【0245】

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

【0246】

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

40

【0247】

【化5】

GVIINVSKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK (OSK1-

S7) (配列番号：1303), or GVIINVSKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK (OSK1-

S7,K16,D20) (配列番号：1308)

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

50

【0248】

これらの本発明の方法に従って、多発性硬化症、1型糖尿病、疥癬、炎症性腸疾患、接触媒介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、喘息、アレルギー、再狭窄、全身性硬化症、繊維症、強皮症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、炎症性骨吸収、移植拒絶、移植片対宿主病若しくは狼瘡など（但し、これらに限定されない。）自己免疫疾患と診断された患者、又は多発性硬化症の少なくとも1つの症候を以前に経験したことがある患者は、自己免疫疾患及びそれらの症候を熟知した、熟練した医療従事者（医師など）によって、十分に認識可能であり、及び／又は診断される。

【0249】

例えば、多発性硬化症の症候には、以下のものが含まれ得る。視覚的な症候、視神経炎（かすみ眼、眼痛、色覚の喪失、失明）；複視（複視）；眼振（痙攣性の眼の動き）；眼の測定障害（ocular dysmetria）（定常的な過少又は過剰な眼の動き）；核間性眼筋麻痺（両眼間の協調の欠如、眼振、複視）；運動及び音の眼内閃光（眼を動かしたとき、又は突然の騒音に応答した閃光）；求心性の瞳孔の異常（異常な瞳孔の応答）など；

運動的症候、不全麻痺、不全単麻痺、不全対麻痺、不全片麻痺、四肢不全麻痺（筋衰弱一部分的な又は穏やかな麻痺）；麻痺、対麻痺、片麻痺、四肢麻痺（tetraplegia）、四肢麻痺（quadraplegia）（麻痺一筋力の完全な喪失又はほぼ完全な喪失）；痙性（剛直、疼痛を引き起こし、罹患した四肢の自由な運動を制限する筋緊張の喪失）；構音障害（不明瞭な発語及び関連する発語上の問題）；筋萎縮（使用の欠如による筋肉の萎縮）；痙攣、こむら返り（筋肉の不随意的収縮）；緊張低下、間代性痙攣（姿勢に伴う問題）；間代性筋痙攣、筋波動症（痙攣及び単収縮する筋肉、チック）；下肢静止不能症候群（特に、夜間に厄介な問題となる、不随意的な下肢の運動）；下垂足（歩行時に床に沿って足を引きずる）；反射機能不全（MSR、バビンスキー反射、ホフマン反射、チャドック反射）など；

感覚性の症候、知覚異常（部分的な無感覚、刺痛、耳鳴り及び振動感覚）；知覚麻痺（完全な無感覚／感覚の喪失）；神経痛、神経病及び神経性の疼痛（明確な原因のない疼痛、灼熱感、搔痒感及び電気ショック感覚）；レルミッテ症候（頭を動かしているときの電気ショック及び耳鳴り感覚）など；

固有感覚機能不全（身体部分の位置感覚の喪失）；三叉神経痛（顔面痛）；

協調及び平衡の症候、運動失調（協調運動障害）；企图振戦（細かい運動を行うときの震え）；測定障害（恒常的な過少又は過剰な四肢運動）；前庭運動失調（内耳中の異常な平衡機能）；めまい（前庭運動失調に由来する悪心／嘔吐／乗り物酔いに対する感覚）；会話運動失調（協調した会話の困難、吃音）；ジストニア（四肢位置フィードバックの遅延）；反復拮抗運動不全（素早く交互運動（例えば、リズムに合わせて運動する）を行う能力の喪失）など；

腸、膀胱及び性的症候、頻尿、膀胱痙性（尿意逼迫及び失禁）；弛緩性膀胱、排尿筋・括約筋失調（排尿困難及び尿閉）；勃起障害（男性及び女性の性的不能）；オルガズム障害（オルガズムに達することができない）；逆行性射精（膀胱内への射精）；冷感症（性的に興奮した状態になることができない）；便秘（低頻度又は不定期的な腸運動）；便意逼迫（腸の逼迫）；便失禁（腸失禁）など；

認知症候、うつ病；認知機能障害（短期及び長期記憶障害、健忘症、言葉を思い出す速度の遅延）；認知症；気分変動、情動不安定、多幸感；躁鬱症候群；不安；失語症、不全失語症（会話の理解及び発語の障害）など；並びに

その他の症候、疲労、ウートホフ症候群（熱を伴う症候の重度の増加）；胃食道逆流（胃酸逆流）；味覚及び嗅覚の障害；てんかん発作；嚥下困難、呼吸困難；並びに睡眠障害など。

【0250】

上に列記されている多発性硬化症の症候は単なる例示であり、一人の患者によって、又は複合した数人の患者によって経験され、本発明が適用される全ての可能な症候を網羅的

10

20

30

40

50

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

【0251】

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

10

【0252】

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

【0253】

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

20

【0254】

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

【0255】

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

【0256】

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

30

【0257】

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

40

50

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

【0258】

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

10

【0259】

Nav1(TTX_s型)チャンネルのペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、疼痛を緩和するために使用することが可能である。このような活性を有する局所麻酔及び三環系抗鬱剤は、臨床的に有効性が確認されている。本発明のこのような分子は、特に、筋弛緩剤として有用であり得る。

【0260】

Nav1(TTX_R型)チャンネルのペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、神経及び/又は組織傷害から生じる疼痛を緩和するために使用することが可能である。

【0261】

膠細胞及び上皮細胞のCa²⁺活性化塩化物チャンネルのペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、癌及び糖尿病を治療するために使用することが可能である。

20

【0262】

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

【0263】

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

【0264】

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

30

【0265】

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

【0266】

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

【0267】

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

40

【0268】

50

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

【0269】

医薬組成物

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

【0270】

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

【0271】

不活性材料を用いて、本発明の組成物を希釈し、又は本発明の医薬組成物の容量を増加させることが可能である。このような希釈剤は、炭水化物、特に、マニトール、 α -ラクトース、無水ラクトース、セルロース、スクロース、修飾されたデキストラン及びデンプンを含むことが可能である。ある種の無機塩は、カルシウム三リン酸、炭酸マグネシウム及び塩化ナトリウムなど、充填剤としても使用し得る。幾つかの市販の希釈剤は、Fast-Flow、Emdex、STA-Rx 1500、Emcompress及びAvicel 11である。

【0272】

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

10

20

30

40

50

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

10

【0273】

無菌溶液又は懸濁液である本発明の液体医薬組成物は、例えば、筋肉内、髄腔内、硬膜外、血管内(例えば、静脈内又は動脈内)、腹腔内又は皮下注射によって、患者に投与することが可能である。(例えば、Goldenberg et al., Suspensions for the sustained release of proteins, 米国特許第6,245,740号及びWO 00/38652 A1を参照されたい。)。無菌溶液は、静脈内注入によって投与することも可能である。本発明の組成物は、無菌水、生理的食塩水、緩衝化された生理的食塩水又は他の適切な無菌注射可能溶媒を用いて患者に投与する前に、都合の良い時点で溶解又は懸濁することが可能な無菌固体医薬組成物(凍結乾燥された粉末など)中に含めることが可能である。

20

【0274】

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

30

【0275】

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

40

【0276】

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

50

essTM及びAvicellTMである。

【0277】

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

10

【0278】

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

【0279】

抗摩擦剤は、調合プロセス時の粘着を防ぐために、治療剤の製剤中に含めることが可能である。潤滑剤は、治療剤とダイ壁との間の層として使用することが可能であり、これらには、ステアリン酸のマグネシウム及びカルシウム塩などのステアリン酸、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、液体パラフィン、植物油及び蠟が含まれ得るが、これらに限定されるものではない。ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウム、様々な分子量のポリエチレングリコール、Carbowax 4000及び6000などの可溶性潤滑剤も使用することが可能である。

20

【0280】

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

30

【0281】

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

40

【0282】

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

50

ロリドン及びポリプロリンが含まれる。例えば、「Abuchowski and Davis (1981), Soluble Polymer-Enzyme Adducts, Enzymes as Drugs (Hocenberg and Roberts, eds.), Wiley-Interscience, New York, NY, pp 367-83; Newmark, et al., (1982), J.

Appl. Biochem, 4:185-9」を参照されたい。使用され得る他のポリマーは、ポリ-1, 3-ジオキソラン及びポリ-1, 3, 6-チオキソカンである。前記のとおり、医薬的な使用に好ましいのは、PEG部分である。

【0283】

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

【0284】

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

【0285】

有用なのは、上記Remington's Pharmaceutical Sciences (1990)の第89章(参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。)に一般的に記載されている経口固体剤形である。固体剤形には、錠剤、カプセル、丸薬、トローチ又はドロップ、カプセル又はペレットが含まれる。また、本組成物を調合するために、(例えば、米国特許第4,925,673号に報告されているプロテイノイド小球体のような)リポソーム封入又はプロテイノイド封入を使用することが可能である。リポソーム封入を使用することが可能であり、様々なポリマーでリポソームを誘導体化することが可能である(例えば、米国特許第5,013,556号)。治療剤に対して可能な固体剤形の記述は、「Marshall, K., Modern Pharmaceutics (1979), edited by G. S. Banker and C.

T. Rhodes, in Chapter 10」(参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。)に記載されている。一般に、製剤は、本発明の化合物、及び胃環境に対する保護及び腸内での生物学的に活性な材料の放出を可能とする不活性成分を含む。

【0286】

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

る。

【0287】

着色剤及び着香剤は、全て含めることが可能である。例えば、（リポソーム又は小球体封入などによって）タンパク質（又は誘導体）を調合し、次いで、着色剤及び着香剤を含有する冷蔵された飲料などの飲食物内にさらに含有させることが可能である。

【0288】

錠剤形態で、活性成分は、適切な割合で、必要な圧縮特性を有する医薬として許容される担体と混合され、所望の形状及びサイズに圧縮される。

【0289】

粉末及び錠剤は、好ましくは、活性成分の最大99%を含有する。適切な固体担体には、例えば、リン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、ラクトース、デキストリン、デンプン、ゼラチン、セルロース、ポリビニルピロリドン、低融点蠟及びイオン交換樹脂が含まれる。

【0290】

徐放製剤が望ましい場合があり得る。本発明の組成物は、拡散又は浸出機構の何れか、例えばガムによって放出を可能とする不活性マトリックス中に取り込ませることが可能である。ゆっくり変性するマトリックス、例えば、アルギナート、多糖を、製剤中に取り込ませることも可能である。本発明の組成物の徐放の別の形態は、OrosTM治療システム（Alza Corp.）に基づく方法による。すなわち、薬物は、水の浸入を可能とし、浸透圧効果によって、単一の小さな開口部を通じて薬物を押し出すことが可能な半透膜中に封入される。幾つかの腸溶コーティングも、遅延した放出効果を有する。

【0291】

製剤化のために、他のコーティングを使用することが可能である。これらには、コーティングパン中に適用可能な様々な糖が含まれる。また、治療剤は、フィルムコーティングされた錠剤として提供されることも可能であり、この場合に使用される物質は、2つのグループに分類される。第1のグループは、非腸溶性物質であり、これらには、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、プロビドン及びポリエチレングリコールが含まれる。第2のグループは、一般にはフタル酸のエステルである腸溶性物質からなる。

【0292】

最適なフィルムコーティングを得るために、材料の混合物を使用し得る。フィルムコーティングは、パンコーター内若しくは流動床内で、又は圧縮コーティングにより行なうことができる。

【0293】

経肺送達形態。本発明の組成物の経肺送達も有用である。該タンパク質（又は誘導体）は、吸入されて哺乳動物の肺に送達され、肺上皮内層（lung epithelial lining）を越えて血流に入る。（これに関する他の報告には、Adjeiら, Pharm. Res. 7:565-569 (1990); Adjeiら, Internatl. J. Pharmaceutics 63:135-44 (1990)（酢酸ロイプロリド）; Braquet et al. (1989), J. Cardiovasc. Pharmacol. 13 (suppl. 5): s. 143-146（エンドセリン-1; Hubbard et al. (1989), Annals Int. Med., 3: 206-12（ α 1-アンチトリプシン）; Smith et al. (1989), J. Clin. Invest. 84:1145-6（ α 1-プロテインナーゼ）; Oswein et al. (March 1990), "Aerosolization of Proteins," Proc. Symp. Resp. Drug Delivery II, Keystone, Colorado（組換えヒト成長ホルモン）; Debs et al. (1988), J. Immunol. 140:3482-8（インターフェロン γ 及び腫瘍壊死因子ルファ）及びPlatz et al., 米国特

10

20

30

40

50

許第5, 284, 656号(顆粒球コロニー刺激因子)が含まれる)。

【0294】

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

10

【0295】

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

20

【0296】

遠位の肺への最も有効な送達のためには、本発明の化合物は、 $10\text{ }\mu\text{m}$ (又はミクロン)未満、最も好ましくは $0.5\sim 5\text{ }\mu\text{m}$ の平均粒径を有する粒子形態で調製されるのが最も有利なはずである。

【0297】

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

30

【0298】

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

【0299】

噴霧器(ジェット式又は超音波式のいずれか)と併用するのに適した製剤は、典型的には、溶液 1 mL 当たり生物学的活性タンパク質約 $0.1\sim 25\text{ mg}$ の濃度で水に溶解された本発明の化合物を含む。また、該製剤は、緩衝液及び単糖(例えば、タンパク質の安定化及び浸透圧の調節用のもの)を含み得る。エーロゾルの形成において該溶液の噴霧により生じる該タンパク質の界面誘導凝集を抑制又は防止するために、該噴霧製剤は界面活性剤を含有することも可能である。

40

【0300】

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

50

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

【0301】

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

10

【0302】

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

【0303】

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

20

30

40

【0304】

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

50

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

10

【0305】

20

投薬量。上記症状の治療方法に関わる投与計画は、薬物の作用を改変する種々の要因(例えば、患者の年齢、状態、体重、性別及び食事、いずれかの感染の重症度、投与時間ならびに他の臨床的要因)を考慮して担当医師により決定される。一般には、1日用量は、本発明の化合物0.1~1000 µg/kg体重、好ましくは0.1~150 µg/kgの範囲とすべきである。

【0306】

実施例

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

【実施例1】

30

【0307】

Fc-L10-ShK[1-35]の哺乳類動物での発現

Fc-L10-ShK[1-35]は、Fc-2xL-ShK[1-35]とも呼ばれ、Kv1.3の阻害剤である。リンカー配列及びKv1.3阻害剤ペプチドShK[1-35]の単量体ヘインフレームに融合されたヒトIgG1のFc領域をコードするDNA配列を後述のように構築した。哺乳類細胞(HEK293及びチャイニーズハムスター卵巣細胞)からペプチドボディ(peptibody)を発現及び精製するための方法は、本明細書に開示されている。

【0308】

p cDNA3.1(+)中のMluIとHindIIIの間のCMVプロモーターをCMVプロモーター+イントロン(Invitrogen)と置換することによって、発現ベクターp cDNA3.1(+)CMVi(図13A)を構築した。5'コザック配列、シグナルペプチド及びヒトFcリンカー-HindIII-NotIで消化されたp cDNA3.1(+)CMViの大きな断片とのアクチビンRIIB融合タンパク質を含有するHindIII-NotIで消化されたPCR産物をクローニングすることによって、発現ベクターp cDNA3.1(+)CMVi-hFc-アクチビンRIIB(図13B)を作製した。p cDNA3.1(+)CMVi-hFc-アクチビンRIIB中のヒトIgG1 Fc領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列を図3A-Bに示す。このベクターは、BamHI部位によって分断されたGGGSGGGGS(「L10」、配列番号79)も有し、これにより、以下のオリゴを用いて、最終Fc-L10-ShK[1-35

40

50

〕ヌクレオチド及びアミノ酸配列（図14 A-B並びに配列番号77及び配列番号78）に対して、FcとShK [1-35] ペプチド（図14 A-B参照）間に10個アミノ酸のリンカーを形成することが可能となる。

【0309】

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

【0310】

【化6】

BamHI

GGATCCGAGGAGGAGGAAGCCGACGCTGCATCGACACCATCCCCAAGAGCCGCTGCACCGCCTTCCAG

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

TGCAAGCACAGCATGAAGTACCGCCTGAGCTTCTGCCGCAAGACCTGCGGCACCTGCTAATGAGCGGCCGC//SEQ ID NO:657

C K H S M K Y R L S F C R K T C G T C NotI

// 配列番号 : 658

【0311】

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

【0312】

【化7】

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

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

【0313】

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

【0314】

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

10

20

30

40

50

スミド中のFc-2xL-ShK [1-35] 5.6 µgを、HEK-293細胞に形質移入した。細胞を24時間回復した後、DMEM高グルコース及び1×NEAA培地中に48時間配置した。Centriprep YM-10フィルター (Amicon) へ30mLを流し、さらにCentricon YM-10 (Amicon) フィルターによって濃縮することによって、培養上清を50倍濃縮した。濃縮した培地の多様な量を自家4×添加液 (B-メルカプトエタノールなし) と混合し、Novex Xcell II装置を使用して、BenchMark染色済みタンパク質ラダー (Invitrogen) 10 µLとともに、5×タンク緩衝液 (0.123Mトリス塩基、0.96Mグリシン) 中、101V/46mAで2時間、Novex 4ないし20%トリス-グリシンゲル上で電気泳動した。次に、ゲルをエレクトロブロット緩衝液 (35mMトリス塩基、20%メタノール、192mMグリシン) 中に30分間浸漬した。Novex製のPDVFメンブレン (カタログ番号LC2002、孔サイズ0.2 µm) を活性化させるため、前記PDVFメンブレンをメタノール中に30秒浸漬し、脱イオン水ですすぎ、エレクトロブロット緩衝液中に浸漬した。XCell IIブロットモジュールを使用して、製造者の説明書 (Novex) に従って、PDVFメンブレンへ40mAで2時間、あらかじめ浸漬したゲルをブロットした。次に、まずトリス緩衝塩類溶液pH7.5 (TBS) 中の5%ミルク (Carnation) 中に室温で、ブロットを1時間浸漬し、0.1%トゥイーン20含有TBS (TBST, Sigma) 及び1%ミルク緩衝液中で、HRP結合抗ヒトFc抗体 (Zymed Laboratoriesカタログ番号05-3320) の1:500希釈を、室温で2時間浸漬するために温置した。次に、室温で1回の洗浄につき15分間、TBST中で、ブロットを3回洗浄した。製造者の説明書に従ってAmersham Pharmacia BiotechのECLウェスタンブロット検出試薬を使用して、一次抗体を検出した。ECL検出に際し、ウェスタンブロット分析は、非還元型ゲル条件下で、66kDaの予期されるサイズを表示した (図24A)。

【0315】

DMEM高グルコース、10%ウシ胎仔血清、1×ヒポキサンチン/チミジン (HT, Gibco製)、1×NEAAを含有するAM1 CHOd増殖培地中で、Fc-LI0-ShK [1-35] タンパク質の安定した発現に使用されるAM1 CHOd (Amgen Proprietary) 細胞を培養した。Fugene6を使用して、pcDNA3.1 (+) CMV-Fc-ShKプラスミド6.5 µgもAM1 CHOd細胞へと形質移入した。翌日、形質移入した細胞を20個の15cm皿へと播種し、DMEM高グルコース、10%FBS、1×HT、1×NEAA、ジェネテシン (G418miあたり800 µg, Gibco製) を使用して13日間選択した。48個の生存コロニーを、2つの24ウェルプレート中に摘出した。増殖させるため、プレートを1週間放置した後、凍結のために複製した。10%FBSなしのAM1 CHOd増殖培地へ、各プレートの1セットを48時間移動させて、培養上清を回収した。安定したCHOクローンを発現させるための培養上清15 µLを選別するために、同一の抗ヒトFc抗体による検出を使用する一過性ウェスタンブロット分析と同様のウェスタンブロット分析を使用した。48個の安定したクローンのうち、50%超は66kDaの予期されたサイズでShKを発現した。一次クローンBB6に対するバックアップとして、BB6、BD5、BD6クローンをBD5及びBD6で選択した (図24B)。

【0316】

AM1 CHOd増殖培地を使用して、BB6クローンを、10個のローラー瓶 (Corning) へとスケールアップし、顕微鏡下で判断される培養密度まで増殖させた。次に、培地を、50%DMEM高グルコース並びに1×HT及び1×NEAA含有50%HamのF12 (Gibco) を含有する無血清培地と交換し、1週間温置した。培養上清を1週間の温置時点で回収し、0.45 µmフィルター (Corning) でろ過し、凍結した。新鮮な無血清培地を添加し、さらに1週間温置した。培養無血清上清を初回と同様に回収し、凍結した。

【0317】

10

20

30

40

50

水槽中、室温で、培養上清約4 Lを解凍した。Satorius Sartocor Polysulfon 10 接線流限外ろ過カセット (0.1 m^2) を室温で使用して、培地を約450 mLまで濃縮した。次に、プレフィルターを有する $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 酢酸セルロースフィルターで保持液 (retentate) をろ過した。次に、 7°C 、 $5\text{ mL}/\text{分}$ で、 5 mL のAmersham HiTrap タンパク質Aカラムへ保持液をかけ、二価の陽イオンを有さないダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液 (PBS) の数カラム容積で前記カラムを洗浄し、 100 mM グリシン、 $\text{pH } 3.0$ にする工程で、試料を溶出した。タンパク質A溶出プール (約 9 mL) を、 50 mL になるように水で希釈し、S-緩衝液A ($20\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{pH } 7.0$) 中の 5 mL のAmersham HiTrap SP-HPカラムへと、 7°C 、 $5\text{ mL}/\text{分}$ で負荷した。次に、数カラム容積のS-緩衝液Aで、カラムを洗浄した後、 25% から 75% のS-緩衝液B ($20\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ 、 1 M NaCl 、 $\text{pH } 7.0$) の直線勾配を $5\text{ mL}/\text{分}$ で使用した後、 7°C で 100% のS-緩衝液Bまでの工程を展開した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス-グリシン4ないし 20% SDS-PAGEを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした。次に、Pall Life Sciences Macrosep 10K Omega遠心限外ろ過装置を使用して、プールした材料を約 3.4 mL まで濃縮した後、Costar $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 酢酸セルロースシリジフィルターでろ過した。

【0318】

次に、Hewlett Packard 8453分光光度計を使用して、 $700\text{ }\mu\text{L}$ のPBS中に希釈したろ過済み材料 $10\text{ }\mu\text{L}$ に対して、スペクトル走査を実施した (図26A)。 $32,420\text{ g/mol}$ の算出された分子量及び $47,900\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が 5.4 mg/mL であると決定した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス-グリシン4ないし 20% SDS-PAGEを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した (図26B)。次に、PBS中の試料の 108 倍希釈を使用するCharles River Laboratories Endosafe-PTSシステム (0.05 ないし 5 EU/mL 感度)を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、タンパク質 1 mg あたり 1 EU であった。次に、 $50\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ 、 250 mM NaCl 、 $\text{pH } 6.9$ 中のPhenomenex BioSep SEC3000カラム ($7.8 \times 300\text{ mm}$) へと $1\text{ mL}/\text{分}$ で注入された生成物 $20\text{ }\mu\text{g}$ に対して、 280 nm での吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した (図26C)。次に、試料 $1\text{ }\mu\text{L}$ をシナピン酸 $10\text{ }\mu\text{L}$ (0.05% トリフルオロ酢酸、 50% アセトニトリル中 10 mg/mL) 中に希釈することによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液 ($1\text{ }\mu\text{L}$) を、MALDI試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーが装備されたVoyager DE-RP飛行時間質量分析装置を使用して分析した (337 nm 、 3 ナノ秒 パルス)。 25 kV の加速電位で陽イオン/直線モードを使用した。約 200 のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して、外部質量較正を実施し (図26D)、精製されたペプチボディの完全性を (実験誤差内で) 確認した。その後、生成物を -80°C で保存した。

【0319】

精製されたFc-L10-ShK [1-35] は、電気生理学法によって測定されるように、ヒトKv1.3を強く遮断した (図30A及び図30B) (実施例36参照)。精製されたFc-L10-ShK [1-35] 分子は、T細胞増殖 (図36A及び図36B) 並びにサイトカインIL-2 (図35A及び図37A) 及びIFN- γ (図35B及び図37B) の生成も遮断した。

【実施例2】

【0320】

Fc-L-ShK [2-35] の哺乳類での発現

標準的なPCR技術を使用して、Kv1.3阻害剤ペプチドShK[2-35]の単量体へ、インフレームで融合されたヒトIgG1のFc領域をコードするDNA配列を構築した。ShK[2-35]及び前記分子の5、10又は25アミノ酸リンカー部分を、pcDNA3.1(+)CMV i中の固有Fc-2xL-ShK[1-35]をテンプレートとして使用するPCR反応において生成させた(実施例1、図14A-B)。全てのShKコンストラクトは、以下のアミノ酸配列

【0321】

【化8】

SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC

(配列番号:92)

10

を有するべきであり、配列番号野生型配列の最初のアミノ酸は欠失している。

【0322】

「Fc-1xL-ShK[2-35]」とも呼ばれるFc-L5-ShK[2-35]を作製するために使用されるプライマーの配列を以下に示す。

【0323】

【化9】

cat gga tcc agc tgc atc gac acc atc//配列番号:661;

cat gcg gcc gct cat tag c//配列番号:662;

20

【0324】

「Fc-2xL-ShK[2-35]」とも呼ばれるFc-L10-ShK[2-35]を作製するために使用されるプライマーの配列を以下に示す。

【0325】

【化10】

cat gga tcc gga gga gga gga agc agc tgc a //配列番号:663;

cat gcg gcc gct cat tag cag gtg c //配列番号:664;

【0326】

「Fc-5xL-ShK[2-35]」とも呼ばれるFc-L25-ShK[2-35]を作製するために使用されるプライマーの配列を以下に示す。

30

【0327】

【化11】

cat gga tcc ggg ggt ggg ggt tct ggg ggt ggg ggt tct gga gga

gga gga agc gga gga gga gga agc agc tgc a//配列番号:665;

cat gcg gcc gct cat tag cag gtg c//配列番号:665;

【0328】

BamHI及びNotI(Roche)制限酵素でPCR産物を消化し、ゲル精製キット(Qiagen)によってアガロースゲル精製した。同時に、pcDNA3.1(+)CMV i-hFc-アクチビンRIIBベクターを、BamHI及びNotI制限酵素で消化し、ゲル精製キットによって大きな断片を精製した。精製した各PCR産物を大きな断片へ連結し、XL-1ブルーバクテリア中に形質転換した。形質転換された細菌コロニー由来のDNAを単離し、BamHI及びNotI制限酵素消化に供し、1%アガロースゲル上で分離した。予想されたパターンを生じるDNAを配列決定へ供した。クローンの幾つもの配列の分析は、上述の配列と100%一致したが、大規模プラスミド精製のために1つのクローンのみを選択した。Fc領域及びリンカー領域を確認するために、このクローン由来のDNAを再配列決定し、配列は予想された配列と100%同一であった。

40

【0329】

pcDNA3.1(+)CMV iベクター中にFc-1xL-Shk[2-35]、F

50

c-2xL-Shk及びFc-5xL-Shk [2-35] インサートを含有するプラスミドを、Xba1及びXho1 (Roche) 制限酵素で消化し、ゲル精製した。NotI及びSalI (Roche) で消化したpDSRa-22 (Amgen Proprietary) 発現ベクターへ、前記インサートを個々に連結した。得られたコンストラクトの完全性をDNA配列決定によって確認した。最終的なプラスミドDNA発現ベクターコンストラクトは、pDSRa-22-Fc-1xL-Shk [2-35]、pDSRa-22-Fc-2xL-Shk [2-35] (図13C及び図15A-B) 及びpDSRa-22-Fc-5xL-Shk [2-35] (図16A-B) であり、それぞれ5、10及び25アミノ酸リンカーを含有していた。

【0330】

形質移入の24時間前に、1.2e7 AM-1/D CHOd (Amgen Proprietary) 細胞を、T-175cmの滅菌済み組織培養フラスコ中に播種し、形質移入当日に70ないし80%培養密度にした。DMEM高グルコース、5%FBS、1×グルタミンPen/Strep (Gibco)、1×HT、1×NEAA及び1×ピロリン酸ナトリウム (Gibco) を含有するAM-1/D CHOd培地中で前記細胞を維持した。翌日、直鎖状にしたpDSRa22:Fc-1xL-ShK [2-35]、pDSRa22:Fc-2xL-ShK [2-35] 及びpDSRa22:Fc-5xL-ShK [2-35] (RDS番号20050037685、20050053709、20050073295) の各プラスミド18µgを、直鎖状Selexis MARプラスミド72µg及びpPAGO1 (RDS20042009896) と混合し、50mL コニカルチューブ中のOptiMEM6mL中へ希釈し、5分間温置した。LF2000 (210µL) をOptiMEM6mLへ添加し、5分間温置した。希釈したDNA及びLF2000を互いに混合し、室温で20分間温置した。その間、細胞をPBSで1回洗浄した後、抗生物質を有さない30mLのOptiMEMを細胞へ添加した。OptiMEMを吸引除去し、DNA/LF2000混合物12mLとともに、振とうしている37℃インキュベーター中で6時間又は一晩、細胞を温置した。形質移入から24時間後、コロニー選択のために、異なる希釈で、AM-1/D CHOd培地中に細胞を1:5に分割した。形質移入から72時間後、細胞培地を、DMEM高グルコース、及び1×グルタミンPen/Strep、1×NEAA及び1×ピロリン酸ナトリウム中に10%透析済みFBS (Gibco) を含有するDHFR選択培地と置換し、細胞培地中へタンパク質を発現及び分泌させた。コロニーが、摘み取るのに十分大きくなるまで、選択培地を1週間に2回交換した。pDSRa22発現ベクターは、形質移入した細胞をヒポキサンチン及びチミジンの不存在下で増殖させるDHFR発現カセットを含有する。得られたコロニーの5つのT-175プールを、ローラー瓶ヘスケールアップし、無血清条件下で培養した。馴化培地を回収し、1週間置きに交換した。得られた馴化培地3Lを、0.45µm酢酸セルロースフィルター (Corning, Acton, MA) でろ過し、精製のためにProtein Chemistryに転移させた。バックアップとして、DHFR選択培地上で、10ないし14日後に、10cmプレートから12個のコロニーを選択し、HRP抱合された抗ヒトIgGFcをプローブとして使用するウェスタンブロットによって、発現レベルを評価した。異なるリンカー長のFc-L-ShK [2-35] 融合タンパク質の各々の最高レベルを発現する3つの最良のクローンを繁殖させ、将来の使用のために凍結した。

【0331】

Fc-L10-ShK (2-35) の精製

室温、水槽中で、培養上清約1Lを解凍した。5mLのAmersham HiTrap タンパク質Aカラムへ、7℃、5mL/分で、培地を負荷し、二価の陽イオンを有さないダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液 (PBS) の数カラム容積で前記カラムを洗浄し、100mMグリシン、pH3.0への工程で、試料を溶出した。タンパク質A溶出プール (約8.5mL) を、3M酢酸ナトリウム71µLと組み合わせた後、50mLになるように水で希釈した。次に、7℃、5mL/分で、S-緩衝液A (20mMNaH₂PO₄、

pH 7.0) 中の 5 mL の Amersham HiTrap SP-HP カラムへと、希釈した材料を負荷した。次に、S-緩衝液 A の数カラム容積で、カラムを洗浄した後、0% から 75% までの S-緩衝液 B (20 mM NaH₂PO₄、1 M NaCl、pH 7.0) の直線勾配を 5 mL/分 で使用して展開した後、7℃ で 100% S-緩衝液 B にする工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス-グリシン 4 ないし 20% SDS-PAGE を使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした。次に、プールした材料を 0.22 μm 酢酸セルロースフィルターでろ過し、Pall Life Sciences Macrosep 10K Omega 遠心限外ろ過装置を使用して、約 3.9 mL まで濃縮した。次に、室温、2 mL/分 で、0.22 μm、25 mm の Mustang E メンブレンを有する Pall Life Sciences Acrodisc を用いて、濃縮した材料をろ過した。次に、Hewlett Packard 8453 分光光度計を使用して、700 μL の PBS 中に希釈したろ過済み材料 10 μL に対して、スペクトル走査を実施した (図 27E)。30,008 g/mol の算出された分子量及び 36,900 M⁻¹ cm⁻¹ の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が 2.76 mg/mL であることを決定した。透過液中に材料が認められたため、新しい Macrosep カートリッジを使用して、透過液に対して濃縮工程を反復した。次に、室温、2 mL/分 で、0.22 μm、25 mm の Mustang E メンブレンを有する Pall Life Sciences Acrodisc を通して、濃縮された材料の新たなバッチをろ過した。濃縮された材料の両ロットを 1 つのプールへと組み合わせた。

【0332】

次に、Hewlett Packard 8453 分光光度計を使用して、700 μL の PBS 中に希釈した、合わせたプール 10 μL に対して、スペクトル走査を実施した。30,008 g/mol の算出された分子量及び 36,900 M⁻¹ cm⁻¹ の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が 3.33 mg/mL であることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン 4 ないし 20% SDS-PAGE を使用して、ろ過済み材料の純度を評価した (図 27A)。次に、PBS 中への試料の 67 倍希釈を使用して、Charles River Laboratories Endosafe-PTS システム (0.05 ないし 5 EU/mL 感度) を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、1 EU/タンパク質 mg 未満であった。次に、50 mM NaH₂PO₄、250 mM NaCl、pH 6.9 中の Phenomenex BioSep SEC3000 カラム (7.8 × 300 mm) に 1 mL/分 で注入された生成物 50 μg に対して、280 nm での吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した (図 27B)。次に、試料 1 μL をシナピン酸 10 μL (0.05% トリフルオロ酢酸、50% アセトニトリル中 10 mg/mL) 中に希釈することによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液 (1 μL) を MALDI 試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備された Voyager DE-RP 飛行時間質量分析装置を使用して分析した (337 nm、3 ナノ秒パルス)。25 kV の加速電位で陽イオン/直線モードを使用した。約 200 のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して外部質量較正を実施し (図 27F)、本実験は、ペプチボディの完全性を実験誤差内で確認した。次に、生成物を -80℃ で保存した。

【0333】

図 31B は、精製された Fc-L10-ShK [2-35] が ヒト Kv1.3 電流を強く遮断することを示す (電気生理学的実験を実施例 36 に記載されるとおり実施した。)。精製した Fc-L10-ShK [2-35] 分子は、ヒト全血中の IL-2 (図 64A 及び図 64B) 及び IFN-γ (図 65A 及び図 65B) の生成も、T 細胞に関する CD40L (図 66A 及び図 66B) 及び IL-2R (図 67A 及び図 67B) の上方制御と同様に遮断した。

【0334】

10

20

30

40

50

Fc-L5-ShK (2-35) の精製

5 mLのAmersham HiTrapタンパク質Aカラムへ、7℃、5 mL/分で、培養上清約1 Lを負荷し、二価の陽イオンを有さないダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液 (PBS) の数カラム容積で前記カラムを洗浄し、100 mMグリシン、pH 3.0への工程で試料を溶出した。タンパク質A溶出プール (約9 mL) を1 MトリスHCl、pH 8.5の450 μ Lと組み合わせた後、2 M酢酸230 μ Lと組み合わせ、次に水で50 mLに希釈した。次に、pH調整した材料を0.22 μ m酢酸セルロースフィルターでろ過し、7℃、5 mL/分でS-緩衝液A (20 mMNaH₂PO₄、pH 7.0) 中の5 mLのAmersham HiTrap SP-HPカラムへ負荷した。次に、S-緩衝液Aの数カラム容積でカラムを洗浄した後、0%から75%までのS-緩衝液B (20 mMNaH₂PO₄、1 M NaCl、pH 7.0) の直線勾配を5 mL/分で使用して展開した後、7℃で100% S-緩衝液Bへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス-グリシン4ないし20% SDS-PAGEを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした。次に、Pall Life Sciences Macrosep 10K Omega遠心限外ろ過装置を使用して、プールした材料を約5.5 mLまで濃縮した。次に、濃縮した材料を室温で2 mL/分で、0.22 μ m、25 mmのMustang Eメンブレンを有するPall Life Sciences Acrodiscでろ過した。

10

【0335】

次に、Hewlett Packard 8453分光光度計を使用して、700 μ LのPBS中に希釈した組み合わせたプール10 μ Lに対して、スペクトル走査を実施した (図27G)。29,750 g/molの算出された分子量及び36,900 M⁻¹ cm⁻¹の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が4.59 mg/mLであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン4ないし20% SDS-PAGEを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した (図27C)。次に、Charles Riversエンドトキシン特異的緩衝液BG120中に試料を92倍希釈したものを使用して、Charles River Laboratories Endosafe-PTSシステム (0.05ないし5 EU/mL感度) を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、1 EU/タンパク質mg未満であった。次に、50 mMNaH₂PO₄、250 mMNaCl、pH 6.9中のPhenomenex BioSep SEC3000カラム (7.8×300 mm) へと1 mL/分で注入された生成物50 μ gに対して、280 nmでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した (図27H)。次に、試料1 μ Lをシナピン酸10 μ L (0.05%トリフルオロ酢酸、50%アセトニトリル中10 mg/mL) へと希釈することによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液 (1 μ L) をMALDI試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたVoyager DE-RP飛行時間質量分析装置を使用して分析した (337 nm、3ナノ秒パルス)。25 kVの加速電位で陽イオン/直線モードを使用した。約200のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して外部質量較正を実施し (図27I)、ペプチボディの完全性を実験誤差内で確認した。次に、生成物を-80℃で保存した。

20

30

40

【0336】

図31Cは、精製したFc-L5-ShK [2-35] が非常に活発で、全細胞パッチクランプ電気生理学の実験によって測定されるように、ヒトKv1.3を遮断することを示す (実施例36参照)。

【0337】

Fc-L25-ShK (2-35) の精製

7℃、5 mL/分で、5 mLのAmersham HiTrap Protein Aカラムへ、培養上清約1 Lを負荷し、前記カラムを二価の陽イオンを有さないダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液 (PBS) の数カラム容積で洗浄し、100 mMグリシン、pH 3

50

． 0 への工程で試料を溶出した。タンパク質 A 溶出プール（約 9. 5 mL）を 3 M 酢酸ナトリウム 119 μ L と組み合わせた後、水で 50 mL に希釈した。次に、7 $^{\circ}$ C、5 mL / 分で S-緩衝液 A（20 mM NaH₂PO₄、pH 7. 0）中の 5 mL の Amersham HiTrap SP-HP カラムへと、pH 調整した材料を負荷した。次に、カラムを S-緩衝液 A の数カラム容積で洗浄した後、0 % から 75 % までの S-緩衝液 B（20 mM NaH₂PO₄、1 M NaCl、pH 7. 0）の直線勾配を 5 mL / 分で使用して展開した後、7 $^{\circ}$ C で 100 % S-緩衝液 B への工程で溶出した。クロマトグラムからの主要ピークを含有する画分をプールし、0. 22 μ m 酢酸セルロースフィルターでろ過した。

【0338】

次に、Hewlett Packard 8453 分光光度計を使用して、700 μ L の PBS 中に希釈した組み合わせたプール 20 μ L に対して、スペクトル走査を実施した（図 27 J）。31, 011 g/mol の算出された分子量及び 36, 900 M⁻¹ cm⁻¹ の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が 1. 40 mg/mL であることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン 4 ないし 20 % SDS-PAGE を使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図 27 D）。次に、Charles Rivers エンドトキシン特異的緩衝液 BG120 中に試料を 28 倍希釈したものを使用して、Charles River Laboratories Endosafe-PTS システム（0. 05 ないし 5 EU/mL 感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、1 EU / タンパク質 mg 未満であった。次に、50 mM NaH₂PO₄、250 mM NaCl、pH 6. 9 中の Phenomenex BioSep SEC3000 カラム（7. 8 $\times$ 300 mm）に 1 mL / 分で注入された生成物 50 μ g に対して、280 nm での吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図 27 K）。次に、試料 1 μ L をシナピン酸 10 μ L 中に希釈する（0. 05 % トリフルオロ酢酸、50 % アセトニトリル中 10 mg/mL）ことによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液（1 μ L）を MALDI 試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備された Voyager DE-EP 飛行時間質量分析装置を使用して分析した（337 nm、3 ナノ秒パルス）。25 kV の加速電位で陽イオン / 直線モードを使用した。約 200 のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して外部質量較正を実施し（図 27 L）、これにより、ペプチボディの完全性を実験誤差内で確認した。次に、生成物を -80 $^{\circ}$ C で保存した。

【0339】

精製した Fc-L25-ShK [2-35] は、HEK293/Kv1. 3 細胞に関するホールセルパッチクランプ電気生理学によって、約 150 pM の IC₅₀ でヒト Kv1. 3 を阻害した（実験 36）。

【実施例 3】

【0340】

Fc-L-ShK [1-35] の細菌での発現

細菌のペプチボディ発現ベクター並びにペプチボディのクローニング及び発現に関する手法の記載

細菌発現に使用されるクローニングベクター（実施例 3 ないし 30）は、（米国特許第 2004 / 0044188 号に元来記載される）pAMG21 に基づいている。ベクターのユニークな BstBI 部位と NsiI 部位の間で DNA を切り出し、アンピシリンに対する耐性を付与する β -ラクタマーゼ遺伝子のテンプレート源としての pUC19 DNA とともに、PCR プライマー

【0341】

【化 1 2】

CCA ACA CAC TTC

GAA AGA CGT TGA TCG GCA C (配列番号 : 667) 及び CAC CCA ACA ATG CAT CCT

TAA AAA AAT TAC GCC C (配列番号 : 668)

を使用して、 β -ラクタマーゼ遺伝子を搭載する適切に消化されたPCR断片と置換することによって、カナマイシン耐性要素がアンピシリン耐性と置換された点が改変されている。新たなバージョンは、pAMG21ampRと呼ばれる。

【0342】

10

15及び16を除く、実施例3ないし30において使用されるクローニングベクターpAMG21ampR-Fc-Pepの記載。

【0343】

図11A-C及び図11D(模式図)は、Fc遺伝子のC末端へのペプチド融合のクローニングを可能にするために基本ベクターpAMG21ampRへ付加された二本鎖DNAを示す。前記DNAは、pAMG21ampRベクター中のユニークなNdeI部位とBamHI部位の間に導入されている。DNAのこの完全な領域を図11AないしCに示す。Fcのコード領域は、ヌクレオチド5134から5817まで及び、タンパク質配列はDNA配列の下に表される。この後に、フレーム中にglyX5リンカーが続く(ヌクレオチド5818ないし5832)。BsmBI部位(GAGACG)は、ヌクレオチド5834ないし5839に及ぶ。DNA開裂は、上部DNA鎖のヌクレオチド5828と5829の間、及び下部DNA鎖のヌクレオチド5832と5833の間に生じる。本明細書に示されるように、消化によって、4bpの付着末端が作製される。BsmBI部位には下線を付されている。

20

【0344】

【化 1 3】

AGGTGG
TCCACCACCA
配列番号 : 684

TGGTTGAGACG 配列番号 : 683
ACTCTGC

【0345】

30

第二BsmBI部位は、ヌクレオチド6643ないし6648、すなわちCGTCTCに存在する。DNA開裂は、上部鎖のヌクレオチド6650と6651の間、及び下部鎖の6654と6655の間に生じる。

【0346】

【化 1 4】

CGTCTCT
GCAGAGAATTC
配列番号 : 686

TAAGGATCCG 配列番号 : 685
CTAGGC

【0347】

40

2つのBsmBI部位の間に存在するのは、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼを構成的に発現する非必須クロラムフェニコール耐性カセットである(catt遺伝子)。cattタンパク質配列、すなわち

【0348】

【化 1 5】

1 MEKKITGYTT VDISQWHRKE HFEAFQSV AQ CTYNQTVQLD ITAFLKTVKK
 51 NKHKFYPAFI HILARLMNAH PEFRMAMKDG ELVIWDSVHP CYTVFHEQTE
 101 TFSSWLSEYH DDFRQFLHIY SQDVACYGEN LAYFPKGFIE NMFFVSANPW
 151 VSFTSFDLNV ANMDNFFAPV FTMGKYTTQG DKVLMPLAIQ VHHA VCDGFH
 201 VGRMLNELQQ YCDEWQGGA // 配列番号 : 1337

は、図 1 1 A ないし C に示されており、ヌクレオチド 5 9 5 4 から 6 6 1 0 まで及ぶ。（実施例 1 5 及び 1 6 を除く）各実施例における、ペプチドをコードする二本鎖は、ベクターによって表されるものと相補的な付着末端を有する。

10

【0 3 4 9】

実施例 1 5 及び 1 6 において使用されるクローニングベクター p A M G 2 1 a m p R - P e p - F c に関する記載。

【0 3 5 0】

図 1 2 A ないし C、及び図 1 2 D の模式図は、F c 遺伝子の N 末端へのペプチド融合のクローニングを可能にするために、基本ベクター p A M G 2 1 a m p R へ付加された二本鎖 DNA 配列を示す。DNA は、p A M G 2 1 a m p R ベクター中のユニークな N d e l 部位と B a m H I 部位との間に導入されている。F c に対するコード領域は、ヌクレオチド 5 6 4 0 から 6 3 0 9 まで及び、タンパク質配列は DNA 配列の下に表されている。この後、フレーム中に g l y X 5 リンカーが続く（ヌクレオチド 5 6 1 4 ないし 5 6 2 8）。B s m B I 部位は、ヌクレオチド 5 1 3 8 ないし 5 1 4 3、すなわち G A G A C G に及ぶ。切断は、上部 DNA 鎖のヌクレオチド 5 1 3 2 と 5 1 3 3 の間、及び下部 DNA 鎖の 5 1 3 6 と 5 1 3 7 の間で生じる。

20

【0 3 5 1】

示されるように、消化によって 4 b p の付着末端が作製される。B s m B I 部位は下線を付されている。

【0 3 5 2】

【化 1 6】

30

AATAACA
 TTATGTATAC
 配列番号 : 688

TATGCGAGACG 配列番号 : 687
GCTCTGC

【0 3 5 3】

第二 B s m B I 部位は、ヌクレオチド 5 6 0 7 ないし 5 6 1 2、すなわち C G T C T C に存在する。切断は、上部鎖のヌクレオチド 5 6 1 3 と 5 6 1 4 の間、及び下部鎖の 5 6 1 7 と 5 6 1 8 の間に生じる。

【0 3 5 4】

【化 1 7】

40

CGTCTCA
GCAGAGTCCAC
 配列番号 : 689

GGTGGTGGT
 CACCA

【0 3 5 5】

B s m B I 部位の間に存在するのは、赤痢菌 b l e タンパク質を構成的に発現する必須で無いゼオシン耐性カセットである。b l e タンパク質配列、すなわち

【0 3 5 6】

【化 1 8】

1 MAKLTSAVPV LTARDVAGAV EFWTDRLGFS RDFVEDDFAG VVRDDVTLEFI
 51 SAVQDQVVPD NTLAWVWVRG LDELYAEWSE VVSTNFRDAS GPAMTEIGEIQ
 101 PWGREFALRD PAGNCVHFVA EEQD // 配列番号 : 1338

は、図 1 2 A ないし C においてヌクレオチド 5 2 1 7 から 5 5 8 8 まで及ぶことが示されている。実施例 1 5 及び 1 6 における、ペプチドをコードする二本鎖は、ベクターによって表されるものと相補的な付着末端を有する。

【0 3 5 7】

実施例 5 2 及び 5 3 において使用されるクローニングベクター p A M G 2 1 a m p R - P e p - F c に関する記載。

【0 3 5 8】

図 1 2 E ないし G は、ペプチドの最初の 2 つのコドンが m e t - g l y であるべき F c 遺伝子の、N 末端へのペプチド融合のクローニングを可能にするために、基本ベクター p A M G 2 1 a m p R へ付加された二本鎖 DNA 配列を示す。前記 DNA は、p A M G 2 1 a m p R ベクター中の独特な N d e l 部位と B a m H I 部位との間に導入されている。F c に対するコード領域は、ヌクレオチド 5 6 3 2 から 6 3 1 2 まで及び、タンパク質配列は DNA 配列の下に表されている。この後、フレーム中に g l y X 5 リンカーが続く（ヌクレオチド 5 6 1 7 ないし 5 6 3 1）。B s m B I 部位は、ヌクレオチド 5 1 4 1 ないし 5 1 4 6、すなわち G A G A C G に及ぶ。切断は、上部 DNA 鎖のヌクレオチド 5 1 3 5 と 5 1 3 6 の間、及び下部 DNA 鎖の 5 1 3 9 と 5 1 4 0 の間で生じる。

【0 3 5 9】

示されるように、消化によって 4 b p の付着末端が作製される。B s m B I 部位には下線が付されている。

【0 3 6 0】

【化 1 9】

AATAACATAT GGGTCGAGACG 配列番号 : 1344
 配列番号 : 1343
 TTATTGTATACCCA GCTCTGC
 配列番号 : 1345

【0 3 6 1】

第二の B s m B I 部位は、ヌクレオチド 5 6 0 7 ないし 5 6 1 2、すなわち C G T C T C に存在する。切断は、上部鎖のヌクレオチド 5 6 1 3 と 5 6 1 4 との間、及び下部鎖の 5 6 1 7 と 5 6 1 8 との間に生じる。

【0 3 6 2】

【化 2 0】

CGTCTCA GGTGGTGGT
 GCAGAGTCCAC CACCA
 配列番号 : 1346

【0 3 6 3】

B s m B I 部位の間に存在するのは、赤痢菌 b l e タンパク質を構成的に発現する必須でないゼオシン耐性カセットである。b l e は、上述のように、ヌクレオチド 5 2 2 0 から 5 5 9 1 まで及ぶことが示されている。本明細書で以下の実施例 5 2 及び 5 3 におけるペプチドコード化二本鎖は、ベクターによって表されるものと相補的な付着末端を有する。

【0 3 6 4】

全てが細菌発現用である実施例 3 ないし 30 において、クローニングされたペプチド配列は全て、適切なベクター中に直接連結された DNA 二本鎖を作製するための、オリゴヌクレオチドのアニーリングから得られる。実施例 20 については、2 つのオリゴで十分であり、全ての他の実施例には 4 つが必要である。二本鎖が Fc の N 末端において挿入されるべき場合（本明細書の実施例 15、16、52 及び 53 参照）には、デザインは次のとおりであり、順序を示す数は、各実施例におけるオリゴのリストと一致する。

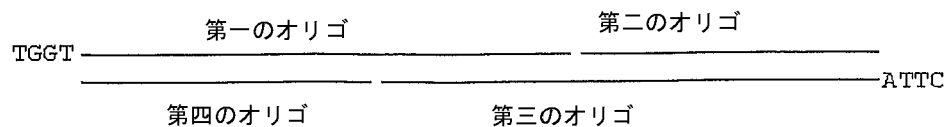
【0365】

【化 21】



10

二本鎖が Fc の C 末端に挿入される場合（実施例 3、4、5、10、11、12、13 及び 30）、デザインは以下のとおりである。



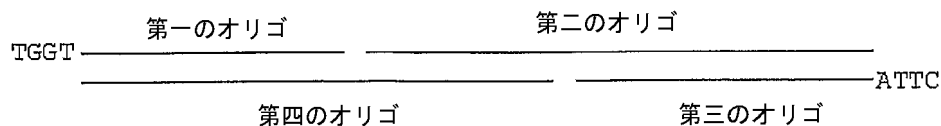
20

【0366】

残りの全ての実施例は、Fc の C 末端において二本鎖が挿入され、次のデザインを利用する。

【0367】

【化 22】



【0368】

何れのオリゴのリン酸化にも、キナーゼ化 (k i n a s i n g) 工程は必要ではない。二本鎖が首尾よく挿入されると、必須でない抗生物質耐性カセット (p A M G 2 1 a m p R - P e p - F c) についてはゼオシン耐性、p A M G 2 1 a m p R - F c - P e p についてはクロラムフェニコール耐性) が置換される。得られた表現型の変化は、組換えクローンを非組換えクローンと識別するのに有用である。

【0369】

以下の記載は、本明細書で具体化されている、細菌によって発現された 30 個の組換えタンパク質全てのクローニングを実施するための一様な方法を与える。オリゴヌクレオチド及びベクターのセットのみが変動する。これらの仕様は、以下の各実施例に記載されている。

【0370】

各実施例に列挙されているオリゴヌクレオチドのアニーリングによって、所定のペプチドに対するコード領域を含有するオリゴヌクレオチド二本鎖を形成した。制限酵素 B s m B I で予め消化された適切なベクター 0.3 μg とともに 1 × 連結緩衝液を含有する 10 μL の最終容積中に、各オリゴ 10 p m o l を混合した。混合物を 80 °C まで加熱し、0.1 °C / 秒で室温まで冷却させた。これに、1 × 連結緩衝液 10 μL 及び T 4 D N A リガーゼ 400 単位を添加した。試料を 14 °C で 20 分間温置した。65 °C で 10 分間加熱することによって、リガーゼを失活させた。次に、制限酵素 B s m B I を 10 単位添加した後、再形成された全ての親ベクター分子も開裂させるために、55 °C で 1 時間温置した。化学的に形質転換受容性のある E. コリ (E. c o l i) 細胞 50 μL を添加し、2 °C で

30

40

50

20 分間保持した後、42℃で5秒間熱ショックを付与した。200 μg/mLのカルベニシリンを補充したルリアアガープレートへ、全容積を拡散させた。置換可能な抗生物質耐性マーカーに対する耐性の損失に関して、コロニーを検査した。二本鎖インサートの予想されたサイズを確認するため、標準的なPCR検査を使用し得る。プラスミド調製物を得、組換えインサートをDNA配列決定によって確認した。配列の確認されたコンストラクトの0.5 L培養物をTerrific Broth中で増殖させ、50 ng/mLのN-(3-オキソヘキサノイル)-ホモセリンラク톤の添加によって、ペプチボディの発現を誘導し、37℃で4ないし6時間振とうした後、細胞を遠心分離し、細胞ペーストを-20℃で保存した。

【0371】

10

以下では、各実施例について、クローニングベクター及び各融合タンパク質を構築するために使用されるオリゴヌクレオチドのセットを記載する。DNA/タンパク質地図も示されている。

【0372】

Kv1.3のFc-L-ShK [1-35] 阻害剤の細菌での発現

細菌中で、ペプチボディをクローニング及び発現させるための方法は上述されている。使用されるベクターは、pAMG21ampR-Fc-Pepであり、Fc-L-ShK [1-35] の細菌中でのクローニング及び発現のために二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0373】

20

二本鎖を形成するために使用されるオリゴ：

【0374】

【化23】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCATCGACACCAT // 配列番号：669；

CCCGAAATCCCGTTGCACCGCTTCCAGTGCAAACACTCCATGAAATACCGTCTGTCTTCTGCCGTAAAACC
TGCGGTACCTGC // 配列番号：670；

CTTAGCAGGTACCGCAGGTTTACGGCAGAAGGACAGACGGT // 配列番号：671；

30

ATTTCATGGAGTGTTCGACTGGAAAGCGGTGCAACGGGATTCGGGATGGTGTGATGCAGGAACGGGAACC
ACCACCACCGGA // 配列番号：672；

オリゴ二本鎖は、以下に示されている。

```

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCATCGACACCATCCCGAAATCCCGTTGCAC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
   AGGCCACCACCACCAAGGCAAGGACGTAGCTGTGGTAGGGCTTTAGGGCAACGTG

   G S G G G G S R S C I D T I P K S R C T -

CGCTTTCAGTGCAAACACTCCATGAAATACCGTCTGTCTTCTGCCGTAAAACCTGCGG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
   GCGAAAGGTCACGTTTGTGAGGTACTTTATGGCAGACAGGAAGACGGCATTCTGGACGCC

   A F Q C K H S M K Y R L S F C R K T C G -

TACCTGC // 配列番号：673
121 -----
   ATGGACGATTC // 配列番号：675

   T C - // 配列番号：674

```

40

【0375】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例3に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。細菌で発現されたFc-L10-ShK (1-35) の精製は、本明細書の以下の実施例38でさらに記載されている。

【実施例4】

【0376】

50

F c - L - S h K [2 - 3 5] の細菌での発現

【 0 3 7 7 】

【 0 3 7 8 】

【化 2 4】

T // 配列番号 : 676 ;

// 配列番号 : 678 :

オリゴ二本鎖は、以下に示されている。

1 TGGTTC CGGTGGTGGTGGTT CCTGCATCGACACCATCCCGAAATCCCGTTGCACCGCTTT 60
 AGGCCACCACCACCAAGGACGTAGCTGTGGTAGGGCTTTAGGGCAACGTGGCGAAA
 G S G G G G S C I D T I P K S R C T A F -
 61 CCAGTGC AAACACTCCATGAAATACCGTCTGTCTTCTGCCGTAAACCTGCGGTACCTG 120
 GGTCA CGTTGTGAGGTACTTTATGGCAGACAGGAAGACGGCATTTTGGACGCCATGGAC
 Q C K H S M K Y R L S F C R K T C G T C - // 配列番号 : 681
 C // 配列番号 : 680
 121 -
 GATTC // 配列番号 : 682

【 0 3 7 9 】

【实施例 5】

【 0 3 8 0 】

F c - L -

F c - L - H m K の細菌での発現

F c - L - Hm K の細菌での発現

【 0 3 8 1 】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【 0 3 8 2 】

【化 2 5】

TGGTTCGCGTGGTGGTGGTTCCTGCAAGACCTGAT //配列番号 : 690 ;
 CCCGGTTTCCGAATGCACCGACATCCGTTGCCGTACCTCCATGAAATACCGTCTGAACCTGTGCCGTAAACCTGCGGTTCC
 TGC 配列番号 : 692 ;
 CTTAGCAGGAACCGCAGGTTTTACGGCACAGGTTGAGACGGT // 配列番号 : 693 ;
 4142-94
 ATTTTCATGGAGGTACGGCAACGGATGTCGGTGCATTTCGGAAACCGGGATCAGGTCTTTGCAGGTACGGGAACCAC
 CACCACCGGA //配列番号 : 694

オリゴ二本鎖は、以下に示されている。

1 TGGTTCGCGTGGTGGTGGTTCCTGCAAGACCTGATCCCGGTTTCCGAATGCAC 10
 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
 AGGCCACCAACCAAGGGCATGGACGTTTCTGGACTAGGGCCAAAGGCTTACGTG
 G S G G G S R T C K D L I P V S E C T -
 CGACATCCGTTGCCGTACCTCCATGAAATACCGTCTGAACCTGTGCCGTAAACCTGCGG
 61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
 GCTGTAGGCAACGGCATGGAGGTACTTTATGGCAGACTTGGACACGGCATTTTGGACGCC
 D I R C R T S M K Y R L N L C R K T C G - // 配列番号 : 696
 TTCCTGC // 配列番号 : 695
 121 -----
 AAGGACGATTC // 配列番号 : 697
 S C - 20

【0383】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例3に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例6】

【0384】

F c - L - K T X 1 の細菌での発現

F c - L - K T X 1 の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例3に記載されている。使用されるベクターは、pAMG21ampR-Fc-Pepであり、Fc-L-KTX1の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0385】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0386】

30

r sham r Protein A HiTrapカラムへと前記プールを負荷した。次に、カラムをPBSの数カラム容積で洗浄し、100mMグリシン、pH3.0で溶出した。溶出ピーク(2.5mL)へ、62.5μLの2Mトリス塩基を添加した後、pH調整した材料を室温、2mL/分で、0.22μm、25mmのMustang Eメンブレンを有するPall Life Sciences Acrodiscでろ過した。

【0390】

次に、Hewlett Packard 8453分光光度計を使用して、700μLのPBS中に希釈した組み合わせたプール20μLに対して、スペクトル走査を実施した(図28C)。30,504g/molの算出された分子量及び35,410M⁻¹cm⁻¹の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が2.49mg/mLであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン4ないし20%SDS-PAGEを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した(図28A)。次に、Charles Riversエンドトキシン特異的緩衝液BG120中に試料を50倍希釈したものを使用して、Charles River Laboratories Endosafe-PTSシステム(0.05ないし5EU/mL感度)を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、1EU/タンパク質mg未満であった。次に、50mMNaH₂PO₄、250mMNaCl、pH6.9中のPhenomenex BioSep SEC3000カラム(7.8×300mm)へと1mL/分で注入された生成物45μgに対して、280nmでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した(図28B)。次に、試料1μLをシナピン酸10μL(0.05%トリフルオロ酢酸、50%アセトニトリル中10mg/mL)へと希釈することによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液(1μL)をMALDI試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたVoyager DE-RP飛行時間質量分析装置を使用して分析した(337nm、3ナノ秒パルス)。25kVの加速電位で陽イオン/直線モードを使用した。約200のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して外部質量較正を実施し(図28D)、本実験は、精製されたペプチボディの完全性を実験誤差内で確認した。次に、生成物を-80℃で保存した。

【0391】

精製したFc-L-KTX1は、電気生理学的手法によって、用量依存的様式でヒトKv1.3電流を遮断した(図32A及び図32B)(方法を実施例36に記載した。)

【実施例7】

【0392】

Fc-L-HsTx1の細菌での発現

Fc-L-HsTx1の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例3に記載されている。使用されるベクターは、pAMG21ampR-Fc-Pepであり、Fc-L-HsTx1の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖(以下参照)を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0393】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0394】

【化 2 7】

TGGTTCGCGTGGTGGTGGTTCGCTTCCTGCCGTACCCGAAAGAC // 配列番号 : 705 ;

TGCGCTGACCCGTGCCGTAAAGAAACCGGTTGCCCGTACGGTAAATGCATGAACCGTAAATGCAAATGCAACC
GTTGC // 配列番号 : 706 ;

CTTAGCAACGGTTGCATTTGCATTTACGGTTCATGCATTTACCGTACG // 配列番号 : 707 ;

GGCAACCGGTTTCTTTACGGCACGGGTCAGCGAGTCTTTTCGGGGTACGGCAGGAAGCGGAACCACCACCACC

GGA // 配列番号 : 708 ;

オリゴ二本鎖は、以下に示されている。

```

      TGGTTCGCGTGGTGGTGGTTCGCTTCCTGCCGTACCCGAAAGACTGCGCTGACCCGTG
1  -----+-----+-----+-----+-----+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGCGAAGGACGGCATGGGGCTTCTGACGCGACTGGGCAC
      G S G G G G S A S C R T P K D C A D P C -
      CCGTAAAGAAACCGGTTGCCCGTACGGTAAATGCATGAACCGTAAATGCAAATGCAACCG
61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
      GGCAATTTCCTTGGCCAACGGGCATGCCATTTACGTACTTGGCATTACGTTTACGTTGGC
      R K E T G C P Y G K C M N R K C K C N R -

```

10

TTGC 配列番号 : 709
121 ---- 124
AACGATTC 配列番号 : 711

C - 配列番号710

【0 3 9 5】

20

ペプチボディの細菌での発現は、実施例 3 に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例 8】

【0 3 9 6】

F c - L - M g T x の細菌での発現

F c - L - M g T x の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例 3 に記載されている。使用されるベクターは、p A M G 2 1 a m p R - F c - P e p であり、F c - L - M g T x の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

30

【0 3 9 7】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0 3 9 8】

【化 2 8】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCACCATCATCAACGTTAAATGCACCTC // 配列番号 : 712 ;
 CCCGAAACAGTGCCTGCCGCCGTGCAAAGCTCAGTTCGGTCACTCCGCTGGTGCTAAATGCATGAACGGTAAA
 TGCAAATGCTACCCGCAC // 配列番号 : 713 ;
 CTTAGTGCGGGTAGCATTTGCATTTACCGTTCATGCATTTAGCACCAG // 配列番号 : 714 ;
 CGGACTGACCGAACTGAGCTTTGCACGGCGGCAGGCACGTGTTTCGGGGAGGTGCATTTAACGTTGATGATGGT
 GGAACCACCACCACCGGA // SEQ ID NO:715 ;

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

1 TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCACCATCATCAACGTTAAATGCACCTCCCGAAACAGTG
 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
 AGGCCACCACCACCAAGTGGTAGTAGTTGCAATTACGTGGAGGGGCTTTGTAC
 G S G G G G S T I I N V K C T S P K Q C -
 CCTGCCGCCGTGCAAAGCTCAGTTTCGGTCAGTCCGCTGGTGCCTAAATGCATGAACGGTAA
 61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
 GGACGGCGGCACGTTTCGAGTCAAGCCAGTCAGGCAGCACGATTACGTACTTGCCATT
 L P P C K A Q F G Q S A G A K C M N G K -
 ATGCAAATGCTACCCGCAC 配列番号 : 716 ;
 121 -----+-----
 TACGTTTACGATGGGCGTGATTC 配列番号 : 718 ;
 C K C Y P H - 配列番号 : 717

10

20

【0 3 9 9】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例 3 に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例 9】

【0 4 0 0】

F c - L - A g T x 2 の細菌での発現

F c - L - A g T x 2 の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例 3 に記載されている。使用されるベクターは、p A M G 2 1 a m p R - F c - P e p であり、F c - L - A g T x 2 の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

30

【0 4 0 1】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0 4 0 2】

【化 2 9】

TGGTTCCGCTGGTGGTGGTTCCGGTGTCCGATCAACGTTTCCTGCACCGGT // 配列番号 : 719 ;
 TCCCCGCACTGCATCAAACCGTGCAAAGACGCTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACCGTAAATGCCACT
 GCACCCCGAAA // 配列番号 : 720 ;
 CTTATTTTCGGGGTGCAGTGGCATTTACGGTTCATGCATTTACCGAAACGCATA // 配列番号 : 721 ;
 CCAGCGTCTTTGCACGGTTTGATGCACTGCGGGGAACCGGTGCAGGAAACGTTGATCGGAACACCGGAACCCAC
 CACCACCGGA // 配列番号 : 722 ;

40

【0 4 0 3】

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

【0 4 0 4】

【化 3 0】

```

      TGGTTCGGGTGGTGGTGGTTCGGGTTCGGATCAACGTTTCCTGCACCGGTTCCTCCGCA
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGCCACAAGGCTAGTTGCAAAGGACGTGGCCAAGGGGCGT

      G S G G G G S G V P I N V S C T G S P Q -

      GTGCATCAAACCGTGCAAAGACGCTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACCGTAAATG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      CACGTAGTTTGGCACGTTTCTGCGACCATACGCAAAGCCATTTACGTACTTGGCATTTTAC

      C I K P C K D A G M R F G K C M N R K C -

      CCACCTGCACCCCGAAA_配列番号：723
121 -----+-----
      GGTGACGTGGGGCTTTATTC 配列番号：725

      H C T P K - 配列番号：724

```

10

【0 4 0 5】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例 3 に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【0 4 0 6】

細菌中で発現した F c - L - A g T x 2 の再折りたたみ及び精製

冷凍した E. コリペースト (15 g) を、室温の 50 mM トリス HCl、5 mM EDTA、pH 8.0 の 120 mL と合わせ、約 0.1 mg/mL のニワトリ卵白色リゾチームへ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置へ、12,000 PSI で 2 回通過させた。次に、4℃、22,000 g で 20 分間、細胞可溶化液を遠心分離した。次に、組織粉碎機を使用して、1%デオキシコール酸 200 mL 中にペレットを再懸濁した後、4℃、22,000 g で 20 分間遠心分離した。次に、組織粉碎機を使用して、200 mL の水中にペレットを再懸濁した後、4℃、22,000 g で 20 分間遠心分離した。次に、ペレット (4.6 g) を 46 mL の 8 M グアニジン HCl、50 mM トリス HCl、pH 8.0 中に溶解した。次に、30 μL の 1 M ジチオスレイトールを前記溶液 3 mL へ添加し、37℃で 30 分間温置することによって、溶解したペレットを還元した。次に、還元されたペレット溶液を、室温、14,000 g で 5 分間遠心分離した後、上清 2.5 mL を、再折りたたみ緩衝液 (2 M 尿素、50 mM トリス、160 mM アルギニン HCl、5 mM EDTA、1 mM シスタミン HCl、4 mM システイン、pH 9.5) 250 mL へ、4℃で激しく攪拌しながら転移させた。次に、攪拌速度を低下させ、温置を 4℃で 2 日間続行した。次に、再折りたたみ溶液を 0.22 μm 酢酸セルロースフィルターでろ過し、-70℃で保存した。

20

30

【0 4 0 7】

次に、保存した再折りたたみ液を水 1 L で希釈し、1 M H₃PO₄ を使用して、pH を 7.5 へ調整した。次に、pH 調整した材料を 0.22 μm 酢酸セルロースフィルターでろ過し、7℃、10 mL/分で、S-緩衝液 A (20 mM NaH₂PO₄、pH 7.3) 中の 10 mL の Amersham SP-HP HiTrap カラムへと負荷した。次に、カラムを S-緩衝液 A の数カラム容積で洗浄した後、0% から 60% までの S-緩衝液 B (20 mM NaH₂PO₄、1 M NaCl、pH 7.3) の直線勾配で溶出した後、7℃、5 mL/分で 100% S-緩衝液 B への工程で溶出した。次に、クーマシーブリアントブルーで染色したトリス-グリシン 4 ないし 20% SDS-PAGE を使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした (15 mL)。次に、7℃、2 mL/分で PBS 中の 1 mL の Amersham rProtein A HiTrap カラムへ前記プールを負荷した。次に、カラムを 20 mM NaH₂PO₄、pH 6.5、1 M NaCl の数カラム容積で洗浄し、100 mM グリシン、pH 3.0 で溶出した。溶出ピーク (1.5 mL) へ、1 M トリス HCl、pH 8.5 を添加した後、pH 調整した材料を 0.22 μm 酢酸セルロースフィルターでろ過した。

40

【0 4 0 8】

次に、Hewlett Packard 8453 分光光度計を使用して、700 μL

50

のPBS中に希釈した組み合わせたプール20 μL に対して、スペクトル走査を実施した(図29C)。30, 446 g/mol の算出された分子量及び35, 410 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が1.65 mg/mL であることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリスーグリシン4ないし20%SDS-PAGEを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した(図29A)。次に、Charles Riversエンドトキシン特異的緩衝液BG120中に試料を33倍希釈したものを使用して、Charles River Laboratories Endosafe-PTSシステム(0.05ないし5 EU/ mL 感度)を使用して、エンドトキシンレベルを測定した。次に、50 mM NaH_2PO_4 、250 mM NaCl 、pH 6.9中のPhenomenex BioSep SEC3000カラム(7.8 $\times$ 300 mm)へと1 $\text{mL}/\text{分}$ で注入された生成物20 μg に対して、280 nm での吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した(図29D)。次に、試料1 μL をシナピン酸10 μL 中に希釈する(0.05%トリフルオロ酢酸、50%アセトニトリル中10 mg/mL)ことによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液(1 μL)をMALDI試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたVoyager DE-RP飛行時間質量分析装置を使用して分析した(337 nm 、3ナノ秒パルス)。25 kV の加速電位で陽イオン/直線モードを使用した。約200のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して外部質量較正を実施し(図29E)、本実験は、精製されたペプチボディの完全性を実験誤差内で確認した。その後、生成物を-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

10

20

【実施例10】**【0409】**

Fc-L-OSK1の細菌での発現

Fc-L-OSK1の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例3に記載されている。使用されるベクターは、pAMG21 amp^r Fc-Pepであり、Fc-L-OSK1の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖(以下参照)を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0410】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0411】

30

【化 3 1】

TGGTTCGGGTGGTGGTGGTTCGGGTGTTATCATCAACGTTAAATGCAAAATCTCCCGTCAGTGCCTGGAACCG
TGCAAAAAG // 配列番号 : 726 ;

CTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACGGTAAATGCCACTGCACCCCGAAA // 配列番号 : 727 ;

CTTATTTCTGGGGTGCAGTGGCATTTACCGTTCATGCATTTACCGAAACGCATACCAGCTTTTTGACGGGTT
CAGGCACTGA // 配列番号 : 728 ;

CGGGAGATTTTGCATTTAACGTTGATGATAACACCGGAACCAACCACCGGA // 配列番号 : 729 ;

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```

1  TGGTTCGGGTGGTGGTGGTTCGGGTGTTATCATCAACGTTAAATGCAAAATCTCCCGTCA
   +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AGGCCACCACCACCAAGGCCACAATAGTAGTTGCAATTTACGTTTTAGAGGGCAGT
   60
   G S G G G S G V I I N V K C K I S R Q -
   GTGCCCTGGAACCGTGCAAAAAGCTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACGGTAAATG
61 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CACGGACCTTGGCACGTTTTTTCGACCATACGCAAAGCCATTTACGTACTTGCCATTTAC
   120
   C L E P C K K A G M R F G K C M N G K C -
   CCACTGCACCCCGAAA 配列番号 : 730
121 +-----+-----+
   GGTGACGTGGGGCTTTATTC 配列番号 : 732
   H C T P K - 配列番号 : 731

```

10

20

【0 4 1 2】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例 3 に記載されているとおりであり、これより後の使用のためにペーストを冷凍保存した。E. コリペーストからの F c - L 1 0 - O S K 1 の精製を、以下の本明細書の実施例 4 0 に記載する。

【実施例 1 1】

【0 4 1 3】

F c - L - O S K 1 (E 1 6 K , K 2 0 D) の細菌での発現

F c - L - O S K 1 (E 1 6 K , K 2 0 D) の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例 3 に記載されている。使用されるベクターは、p A M G 2 1 a m p R - F c - P e p であり、F c - L - O S K 1 (E 1 6 K , K 2 0 D) の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

30

【0 4 1 4】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0 4 1 5】

【化 3 2】

TGGTTCGGTGGTGGTGGTTCGGTGTATCATCAACGTTAAATGCAAAATCTCCCGTCAGTGCCTGAAACCG
TGCAAAGACG // 配列番号 : 733 ;

CTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACGGTAAATGCCACTGCACCCGAAA // 配列番号 : 734 ;

CTTATTTGCGGGTGCAGTGGCATTTACCGTTCATGCATTTACCGAAACGCATACCAGCGTCTTTGCACGGTTT
CAGGCACTGA // 配列番号 : 735 ;

CGGGAGATTTTGCATTTAACGTTGATGATAACACCGGAACCACCACCACCGGA // 配列番号 : 736 ;

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

10

```

TGGTTCGGTGGTGGTGGTTCGGTGTATCATCAACGTTAAATGCAAAATCTCCCGTCA
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
   AGGCCACCACCACCAAGGCCACAATAGTAGTTGCAATTTACGTTTACGAGGGCAGT

   G S G G G G S G V I I N V K C K I S R Q -

GTGCCCTGAAACCGTGGTGGTGGTTCGGTGTATCATCAACGGTAAATGCATGAACGGTAAATG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
   CACGGACTTTGGCAGTTTCTGCGACCATACGCAAGCCATTTACGTAAGTGGCATTATC

   C L K P C K D A G M R F G K C M N G K C -

CCACTGCACCCGAAA 配列番号 : 737
121 -----+-----
   GGTGACGTGGGGCTTTATTC 配列番号 : 739

   H C T P K - 配列番号 : 738

```

20

【0 4 1 6】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例 3 に記載されているとおりであり、これより後の使用のためにペーストを冷凍保存した。

【実施例 1 2】

【0 4 1 7】

F c - L - アニュロクトキシン (Anuroctoxin) の細菌での発現

F c - L - アニュロクトキシンの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例 3 に記載されている。使用されるベクターは、pAMG21ampR-Fc-Pepであり、Fc-L-アニュロクトキシンの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

30

【0 4 1 8】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0 4 1 9】

【化 3 3】

TGGTTCGGTGGTGGTGGTTCCAAAGAATGCACCGGTCCGCAGCACTGCACCAACTTCTGCCGTAAAAACAAA
TGCACCCACG // 配列番号 : 740 ;

GTAAATGCATGAACCGTAAATGCAATGCTTCAACTGCAAA // 配列番号 : 741 ;

CTTATTTGCAGTTGAAGCATTTGCATTTACGGTTCATGCATTTACCGTGGGTGCATTTGTTTTTACGGCAGAA
GTTGGTGCAG // 配列番号 : 742 ;

TGCTGCGGACCGGTGCATTCTTTGGAACCACCACCACCGGA // 配列番号 : 743 ;

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

10

```

TGGTTCGGTGGTGGTGGTTCCAAAGAATGCACCGGTCCGCAGCACTGCACCAACTTCTG
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
   AGGCCACCACCACCAAGGTTTCTTACGTGGCCAGGCGTCGTGACGTGGTTGAAGAC

   G S G G G G S K E C T G P Q H C T N F C -

```

40

```

CCGTAAAAACAAATGCACCCACGGTAAATGCATGAACCGTAAATGCAAAATGCTTCAACTG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
GGCATTTTGTGTTACGTGGGTGCCATTTACGTACTTGGCATTTACGTTTACGAAGTTGAC

R K N K C T H G K C M N R K C K C F N C -

CAAA 配列番号：744
121 ----
GTTTATTC 配列番号：746

K - 配列番号：745

```

【0420】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例3に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

10

【実施例13】

【0421】

Fc-L-ノキシウストキシン (Noxiustoxin) の細菌での発現

Fc-L-ノキシウストキシン又はFc-L-NTXの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例3に記述される。使用されるベクターは、pAMG21ampR-Fc-Pepであり、Fc-L-NTXの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0422】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

20

【0423】

【化34】

```

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCACCATCATCAACGTTAAATGCACCTCCCGAAACAGTGCTCCAAACCGTGC
AAAGAACTGT // 配列番号：747；

ACGGTTCCTCCGCTGGTGCTAAATGCATGAACGGTAAATGCAAAATGCTACAACAAC // 配列番号：748；

CTTAGTTGTTGTAGCATTTGCATTTACCGTTTCATGCATTTAGCACCAGCGGAGGAACCGTACAGTTCTTTGCA
CGGTTTGAG // 配列番号：749；

CACTGTTTCGGGGAGGTGCATTTAACCTTGATGATGGTGGAACCACCACCACCGGA // 配列番号：750；

```

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

30

```

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCACCATCATCAACGTTAAATGCACCTCCCGAAACAGTG
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
AGGCCACCACCACCAAGGTGGTAGTAGTTGCAATTTACGTGGAGGGGCTTTGTTCAC

G S G G G G S T I I N V K C T S P K Q C -

CTCCAAACCGTGCAGAAAGAACTGTACGGTTCCCTCCGCTGGTGCTAAATGCATGAACGGTAA
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
GAGGTTTGGCAGTTTCTTGACATGCCAAGGAGGCGACCACGATTTACGTACTTGCCATT

S K P C K E L Y G S S A G A K C M N G K -

ATGCAAAATGCTACAACAAC 配列番号：751
121 -----+-----
TACGTTTACGATGTTGTTGATTC 配列番号：753

C K C Y N N - 配列番号：752

```

40

【0424】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例3に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例14】

【0425】

Fc-L-Pi2の細菌での発現

Fc-L-Pi2の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例3に記載されている。使用されるベクターは、pAMG21ampR-Fc-Pepであり、Fc-L-Pi2の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、

50

以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0426】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0427】

【化35】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCACCATCTCCTGCACCAACCCG // 配列番号 : 754 ;
 AAACAGTGCTACCCGCACTGCAAAAAAGAAACCGGTTACCCGAACGCTAAATGCATGAACCGTAAATGCAAAT
 GCTTCGGTTCGT // 配列番号 : 755 ;
 CTTAACGACCGAAGCATTTGCATTTACGGTTCATGCATTTAGCG // 配列番号 : 756 ;
 TTCGGGTAACCGGTTTCTTTTTTGCAGTGCGGGTAGCACTGTTTCGGGTTGGTGCAGGAGATGGTGGAACCAC
 CACCACCGGA // 配列番号 : 757 ;

10

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

1 TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCACCATCTCCTGCACCAACCCGAAACAGTGCTACCCGCA 60
 AGGCCACCACCACCAAGGTGGTAGAGGACGTGGTTGGGCTTTGTCACGATGGGCGT
 G S G G G G S T I S C T N P K Q C Y P H -
 61 CTGCAAAAAAGAAACCGGTTACCCGAACGCTAAATGCATGAACCGTAAATGCAAATGCTT 120
 GACGTTTTTTCTTTGGCCAATGGGCTTGCATTTACGTACTTGGCATTACGTTTACGAA
 C K K E T G Y P N A K C M N R K C K C F -
 CGGTCGT 配列番号 : 758
 121 GCCAGCAATTC 配列番号 : 760
 G R - 配列番号 : 759

20

【0428】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例3に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例15】

【0429】

ShK [1-35] - L - Fc の細菌での発現

ShK [1-35] - L - Fc の細菌での発現

30

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例3に記載されている。使用されるベクターは、pAMG21ampR-Pep-Fcであり、ShK [1-35] - L - Fc の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0430】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0431】

【化36】

TATGCGTTCTTGTATTGATACTATTCCAAAATCTCGTTGTACTGCTTTTCAATGTAAACATTCTATGAAATAT
 CGTCTTTCTT // 配列番号 : 761 ;
 TTTGTCGTAAAACTTGTGGTACTTGTCTCGTGGTGGTGGTCT // 配列番号 : 762 ;

40

CACCAGAAACCAACCACCACAGAAACAAGTACCACAAGTTT⁺TACGACAAAAAGAAAGACGATATTTCATAGAATG
TTTACATTGA // 配列番号 : 763

AAAGCAGTACAACGAGATTTTGG AATAGTATCAATACAAGAACG // 配列番号 : 764 :

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```

1  TATGCGTTCCTGTATTGATACTATTCCAAAATCTCGTTGTACTGCTTTTCAATGTAACA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      GCAAGAACATAACTATGATAAGGTTTTAGAGCAACATGACGAAAAGTTACATTTGT
      M R S C I D T I P K S R C T A F Q C K H -
61 TTCTATGAAATATCGTCTTCTCTTTTGTCTGTAACACTTGTGGTACTTGTCTCGGTGGTGG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      AAGATACTTTTATAGCAGAAAGAAAAACAGCATTTTGAAACACCATGAACAAGACCACCAC
      S M K Y R L S F C R K T C G T C S G G G -
      TGGTTTCT 配列番号：765
121 ----- 127
      ACCAAGACCAC 配列番号：767
      G S - 配列番号：766

```

【 0 4 3 2 】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例 3 に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。met-ShK [1-35]-Fc の精製は、以下の本明細書の実施例 51 に記載されるとおりであった。

【实施例 16】

【 0 4 3 3 】

ShK [2-35] - L - Fc の細菌での発現

ShK [2-35] - L - Fc の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例 3 に記載されている。使用されるベクターは、pAMG21ampR-Pep-Fcであり、ShK[2-35]-L-Fcの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【 0 4 3 4 】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【 0 4 3 5 】

【化 3 7】

TATGCTTGTATTGATACATTCCAAATCTCGTTGTACTGCTTTTCAATGTAAACATTCTATGAAATATCGT
CTTTCTT // 配列番号: 768:

TTTGTCGTAAACTTGTGGTACTTGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT // 配列番号 : 769 ;

CACCAGAAACCACCACCACAGAAACAAGTACCACAAGTTTTACGACAAAAAGAAAGACGATATTTCATAGAATG
TTTACATTTGA // 配列番号 : 770 ;

AAAGCAGTACAACGAGATTTTGG AATAGTATCAATACAAGA 配列番号 : 771 ;

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

1 TATGTCCTGTATTGATACTATTCCAAAATCTCGTTGTACTGCTTTTCAATGTAACATTC
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 AGAACATAACTATGATAAGGTTTATAGAGCAACATGACGAAAAGTTACATTTGTAAG
 M S C I D T I P K S R C T A F Q C K H S -
 61 TATGAAATATCGTCTTTCTTTTGTGTCGTAAACTTGTGGTACTTGTCTCGTGGTGGTGGTGG
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 ATACTTTTATAGCAGAAAGAAAAACAGCATTTTGAACACCATGAACAAGACCACCACCACC
 M K Y R L S F C R K T C G T C S G G G G -

10

20

30

40

TTCT 配列番号 : 772
 121 -----
 AAGACCCAC 配列番号 : 774
 S - 配列番号 : 773

【0436】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例3に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。ShK[2-35]-Fcの精製は、以下の本明細書の実施例50に記載されたとおりであった。

【実施例17】

【0437】

Fc-L-ChTxの細菌での発現

Fc-L-ChTxの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例3に記載されている。使用されるベクターは、pAMG21ampR-Fc-Pepであり、Fc-L-ChTxの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0438】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0439】

【化38】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCAGTTCACCAACGTT // 配列番号 : 775 ;
 TCCTGCACCCACCTCCAAAGAATGCTGGTCCGTTTGCCAGCGTCTGCACAACACCTCCCGTGGTAAATGCATGA
 ACAAAAAATGCCGTTGCTACTCC // 配列番号 : 776 ;
 CTTAGGAGTAGCAACGGCATTTTTGTTCATGCATTTA // 配列番号 : 777 ;
 CCACGGGAGGTGTTGTGCAGACGCTGGCAAACGGACCAGCATTTCTTGGAGGTGGTGCAGGAAACGTTGGTGA
 ACTGGGAACCAACCACCGGA // 配列番号 : 778 ;

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

1 TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCAGTTCACCAACGTTTCTGCACCCACCTCCAAAGAATG 60
 AGGCCACCACCACCAAGGGTCAAGTGGTTGCAAAGGACGTGGTGGAGGTTTCTTAC
 G S G G G G S Q F T N V S C T T S K E C -
 61 CTGGTCCGTTTGCCAGCGTCTGCACAACACCTCCCGTGGTAAATGCATGAACAAAAATG 120
 GACCAGGCAAACGGTGCAGACGCTGTTGTGGAGGGCACCATTACGTACTGTTTITAC
 W S V C Q R L H N T S R G K C M N K K C -
 CCGTTGCTACTCC 配列番号 : 779
 121 -----
 GGCAACGATGAGGATTC 配列番号 : 781
 R C Y S - 配列番号 : 780

【0440】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例3に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例18】

【0441】

Fc-L-MTXの細菌での発現

Fc-L-MTXの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させるための方法は、実施例3に記載されている。使用されるベクターはpAMG21ampR-Fc-Pepであり、Fc-L-MTXの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0442】

10

20

30

40

50

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0443】

【化39】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCGGTTTCCTGCACCGGT // 配列番号：782；

TCCAAAGACTGCTACGCTCCGTGCCGTAAACAGACCGGTTGCCCGAACGCTAAATGCATCAACAAATCCTGCA
AATGCTACGGTTGC // 配列番号：783；

CTTAGCAACCGTAGCATTTGCAGGATTTGTTGATGCAT // 配列番号：784；

TTAGCGTTCGGGCAACCGGTCTGTTTACGGCACGGAGCGTAGCAGTCTTTGGAACCGGTGCAGGAAACGGAAC
CACCACCACCGGA // 配列番号：785；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```

      TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCGGTTTCCTGCACCGGTTCCTAAAGACTGCTACGCTCCGTG
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGCAAGGACGTGGCCAAGGTTTCTGACGATGCGAGGCAC

      G S G G G G S V S C T G S K D C Y A P C -
      CCGTAAACAGACCGGTTGCCCGAACGCTAAATGCATCAACAAATCCTGCAATGCTACGG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      GGCAATTGTCTGGCCAACGGGCTTGCGATTACGTAGTTGTTTAGGACGTTTACGATGCC

      R K Q T G C P N A K C I N K S C K C Y G -
      TTGC 配列番号：786
121 -----
      AACGATTC 配列番号：788

      C - 配列番号：787

```

【0444】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例3に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例19】

【0445】

Fc-L-C hTx (K32E) の細菌での発現

Fc-L-C hTx (K32E) の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例3に記載されている。使用されるベクターは、pAMG21ampR-Fc-Pepであり、Fc-L-C hTx (K32E) の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0446】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0447】

【化40】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCAGTTACCAACGTTTCCTG // 配列番号：789；

CACCACC'TCCAAAGAATGCTGGTCCGTTTGCCAGCGTCTGCACAACACCTCCCGTGGTAAATGCATGAACAAA
GAATGCCGTTGCTACTCC // 配列番号：790；

CTTAGGAGTAGCAACGGCATTCTTTGTTTCATGCATTTACCACG // 配列番号：791；

GGAGGTGTTGTGCAGACGCTGGCAAACGGACAGCATTTCTTTGGAGGTGGTGCAGGAAACGTTGGTGAACGG
GAACCACCACCGGA // 配列番号：792；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```

      TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTCAGTTACCAACGTTTCC'TGCACCACCTCCAAAGAATG
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGCTCAAGTGGTTGCAAAGGACCTGGTGGAGGTTTCTTAC

      G S G G G G S Q F T N V S C T T S K E C -
      CTGGTCCGTTTGCCAGCGTCTGCACAACACCTCCCGTGGTAAATGCATGAACAAAGAATG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      GACCAAGCAAACGGTCGCAGACGTGTTCTGGAGGGCACCATTACGTACTTGTTCCTTAC

      W S V C Q R L H N T S R G K C M N K E C -
      CCGTTGCTACTCC 配列番号 : 793
121 -----+-----
      GGCAACGATGAGGATTC 配列番号 : 795

      R C Y S - 配列番号 : 794

```

10

【0448】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例3に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例20】

【0449】

Fc-L-アパミン (Apamin) の細菌での発現

Fc-L-アパミンの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例3に記載されている。使用されるベクターは、pAMG21ampR-Fc-Pepであり、Fc-L-アパミンの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

20

【0450】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0451】

【化41】

```

      TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCAACTGCAAAGCTCCGGAAACCGCTCTGTGCGCTCGTCGTTGCCAGCAG
      CACGGT // 配列番号 : 796 ;

      CTTAACCGTGCTGCTGGCAACGACGAGCGCACAGAGCGGTTTCCGGAGCTTTGCAGTTGCAGGAACCAACCACC
      ACCGGA // 配列番号 : 797 ;

```

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

30

```

      TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCAACTGCAAAGCTCCGGAAACCGCTCTGTGCGCTCG
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGACGTTGACGTTTCGAGGCCTTTGGCGAGACACGCGAGC

      G S G G G G S C N C K A P E T A L C A R -
      TCGTTGCCAGCAGCACGGT 配列番号 : 798
61 -----+-----
      AGCAACGGTCGTCGTGCCAATTC 配列番号 : 800

      R C Q Q H G - 配列番号 : 799

```

【0452】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例3に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

40

【実施例21】

【0453】

Fc-L-スキラトキシシン (Scyllatoxin) の細菌での発現

Fc-L-スキラトキシシン又はFc-L-ScyTxの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現する方法は、実施例3に記載されている。使用されるベクターは、pAMG21ampR-Fc-Pepであり、Fc-L-ScyTxの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0454】

50

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0455】

【化42】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCGCTTTCTGCAACCTGCG // 配列番号：801；
 TATGTGCCAGCTGTCTGCGTTCCCTGGGTCTGCTGGGTAAATGCATCGGTGACAAATGCGAATGCGTTAAACAC // 配列番号：802；
 CTTAGTGTTTAACGCATTTCGCATTTGTACCCGATGCATTT // 配列番号：803；
 ACCCAGCAGACCCAGGGAACGGCAGGACAGCTGGCACATACGCAGGTTGCAGAAAGCGGAACCACCACCACCGGA // 配列番号：804；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCGCTTTCTGCAACCTGCGTATGTGCCAGCTGTCTGCGG
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 AGGCCACCACCACCAAGGCGAAAGACGTTGGACGCATACACGGTCGACAGGACGGC
 G S G G G G S A F C N L R M C Q L S C R -
 TTCCCTGGGTCTGCTGGGTAAATGCATCGGTGACAAATGCGAATGCGTTAAACAC 配列番号：805
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAGGGACCCAGACGACCATTTACGTAGCCACTGTTTACGCTTACGCAATTTGTGATTC 配列番号：807
 S L G L L G K C I G D K C E C V K H - 配列番号：806

【0456】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例3に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例22】

【0457】

Fc-L-IbTxの細菌での発現

Fc-L-IbTXの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例3に記載されている。使用されるベクターは、pAMG21ampR-Fc-Pepであり、Fc-L-IbTxの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0458】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0459】

【化43】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCAGTTACCGACGTTGACTGCTCCGT // 配列番号：808；
 TTCCAAAGAATGCTGGTCCGTTTGCAAAGACCTGTTCCGGTGTGACCGTGGTAAATGCATGGGTAAAAAATGCGTTGCTACCAG // 配列番号：809；
 CTTACTGGTAGCAACGGCATTTTACCCATGCATTTACACGGTCAA // 配列番号：810；
 CACCGAACAGGTCTTTGCAAACGGACGACATTTCTTTGGAAACGGAGCAGTCAACGTCGGTGAACCTGGGAACCAACACCAACCGGA // 配列番号：811；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCAGTTACCGACGTTGACTGCTCCGTTTCCAAAGAATG
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 AGGCCACCACCACCAAGGTCAAGTGGCTGCAACTGACGAGGCAAGGTTCTTAC

```

      G S G G G G S Q F T D V D C S V S K E C -
61 CTGGTCCGTTTGCAAAGACCTGTTCCGGTGTGACCGTGGTAAATGCATGGGTAAAAAATG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      GACCAGGCAAACGTTTCTGGACAAGCCACAACCTGGCACCATTACGTACCCATTTTTCAC

      W S V C K D L F G V D R G K C M G K K C -
121 CCGTTGCTACCAG 配列番号 : 812
-----+-----
      GGCAACGATGGTCATTC 配列番号 : 814

      R C Y Q - 配列番号 : 813

```

【0460】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例3に記載されているとおりであり、ペーストを
冷凍保存した。

10

【実施例23】

【0461】

Fc-L-HaTx1の細菌での発現

Fc-L-HaTx1の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例3に記載されてい
る。使用されるベクターは、pAMG21ampR-Fc-Pepであり、Fc-L-H
aTx1の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するため
に、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0462】

20

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0463】

【化44】

```

TGGTTCGCGTGGTGGTGGTTCGGAATGCCGTTACCTGTTCCGGTGGTTG // 配列番号 : 815 ;

CAAAACCACTCCGACTGCTGCAAAACACCTGGGTTGCAAATCCGTGACAAATACTGCGCTTGGGACTTCACC
TTCTCC // 配列番号 : 816 ;

CTTAGGAGAAGGTGAAGTCCCAAGCGCAGTATTTGTCACGGAATTGC // 配列番号 : 817 ;

AACCCAGGTGTTTGCAGCAGTCGAGGTGGTTTTCGAACCACCGAACAGGTAACGGCATTCGGAACCACCACC
ACCGGA // 配列番号 : 818 ;

```

30

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```

      TGGTTCGCGTGGTGGTGGTTCGGAATGCCGTTACCTGTTCCGGTGGTTGCAAAACCACTC
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGCTTACGGCAATGGACAAGCCACCAACGTTTGGTGGAG

      G S G G G G S E C R Y L F G G C K T T S -

      CGACTGCTGCAAAACACCTGGGTTGCAAATCCGTGACAAATACTGCGCTTGGGACTTCAC
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      GCTGACGACGTTTGTGGACCAACGTTTAAGGCACTGTTATGACGCGAACCCCTGAAGTG

      D C C K H L G C K F R D K Y C A W D F T -

121 CTTCTCC 配列番号 : 819
-----
      GAAGAGGATTC 配列番号 : 821

      F S - 配列番号 : 820

```

40

【0464】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例3に記載されているとおりであり、ペーストを
冷凍保存した。

【0465】

細菌中で発現したFc-L-HaTx1の再折りたたみ及び精製

凍結したE. コリペースト（13g）を、室温の50mMトリスHCl、5mMEDTA、pH8.0の100mLと合わせ、約0.1mg/mLのニワトリ卵白色リゾチーム
へ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置へ、12,000PSIで2回
通過させた。次に、4℃、22,000gで20分間、細胞可溶化液を遠心分離した。次

50

に、組織粉碎機を使用して、200 mLの1%デオキシコール酸中にペレットを再懸濁した後、4℃、22,000 gで20分間遠心分離した。次に、組織粉碎機を使用して、ペレットを200 mLの水中に再懸濁した後、4℃、22,000 gで20分間遠心分離した。次に、ペレット(2.6 g)を26 mLの8 MグアニジンHCl、50 mMトリスHCl、pH 8.0中に溶解した。次に、30 µLの1 Mジチオスレイトールを前記溶液3 mLへ添加し、37℃で30分間温置することによって、溶解したペレットを還元した。次に、還元されたペレット溶液を室温、14,000 gで5分間遠心分離した後、上清2.5 mLを、再折りたたみ緩衝液(2 M尿素、50 mMトリス、160 mMアルギニンHCl、5 mM EDTA、1 mMシスタミンHCl、4 mMシステイン、pH 8.5) 250 mLへ、4℃で激しく攪拌しながら転移させた。次に、攪拌速度を低下させ、温置を4℃で2日間続行した。次に、再折りたたみ溶液を0.22 µm酢酸セルロースフィルターでろ過し、-70℃で保存した。

【0466】

次に、保存した再折りたたみ液を解凍した後、水1 Lで希釈し、1 M H_3PO_4 を使用して、pHを7.5へ調整した。次に、7℃、10 mL/分でS-緩衝液A(20 mM NaH_2PO_4 、pH 7.3)中の10 mLのAmersham SP-HP HiTrapカラムへと、pH調整した材料を負荷した。次に、カラムをS-緩衝液Aの数カラム容積で洗浄した後、0%から60%までのS-緩衝液B(20 mM NaH_2PO_4 、1 M NaCl 、pH 7.3)の直線勾配で溶出した後、7℃、5 mL/分で100% S-緩衝液Bへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリスグリシン4ないし20% SDS-PAGEを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした(15 mL)。次に、7℃、2 mL/分でPBS中の1 mLのAmersham rProtein A HiTrapカラムへと前記プールを負荷した。次に、カラムを20 mMの NaH_2PO_4 、pH 6.5、1 M NaCl の数カラム容積で洗浄し、100 mMグリシン、pH 3.0で溶出した。溶出ピーク(1.4 mL)へ、1 MトリスHCl、pH 8.5の70 µLを添加した後、pH調整した材料を0.22 µm酢酸セルロースフィルターでろ過した。

【0467】

次に、Hewlett Packard 8453分光光度計を使用して、700 µLのPBS中に希釈した組み合わせたプール20 µLに対して、スペクトル走査を実施した(図29F)。30,469 g/molの算出された分子量及び43,890 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が1.44 mg/mLであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリスグリシン4ないし20% SDS-PAGEを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した(図29B)。次に、Charles Riversエンドトキシン特異的緩衝液BG120中に試料を33倍希釈したものを使用して、Charles River Laboratories Endosafe-PTSシステム(0.05ないし5 EU/mL感度)を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、4 EU/タンパク質mg未満であった。次に、50 mM NaH_2PO_4 、250 mM NaCl 、pH 6.9中のPhenomenex BioSep SEC3000カラム(7.8×300 mm)へと1 mL/分で注入された生成物20 µgに対して、280 nmでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した(図29G)。次に、試料1 µLをシナピン酸10 µL中に希釈する(0.05%トリフルオロ酢酸、50%アセトニトリル中10 mg/mL)ことによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液(1 µL)をMALDI試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたVoyager DE-RP飛行時間質量分析装置を使用して分析した(337 nm、3ナノ秒パルス)。25 kVの加速電位で陽イオン/直線モードを使用した。約200のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して外部質量較正を実施し(図29H)、本実験は、精製されたペプチボディの完全性を実験誤差内で確認した。次に、生成物を-80℃で保存した。

【実施例 2 4】

【0 4 6 8】

F c - L - P a T x 2 の細菌での発現

F c - L - P a T x 2 の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例 3 に記載されている。使用されるベクターは、p A M G 2 1 a m p R - F c - P e p であり、F c - L - P a T x 2 の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0 4 6 9】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

10

【0 4 7 0】

【化 4 5】

TGGTTC CGGTGGTGGTGGTTCCTACTGCCAGAAATGGA // 配列番号 : 822 ;

TGTGGACCTGCGACGAAGAACGTAAATGCTGCGAAGGTCTGGTTTGCCGTCTGTGGTGCAAACGTATCATCAACATG // 配列番号 : 823 ;

CTTACATGTTGATGATACGTTTGACCCACAGACGGCAAA // 配列番号 : 824 ;

CCAGACCTTCGACGATTTACGTTCTTCGTCGCAGGTCCACATCCATTTCTGGCAGTAGGAACCAACCACCACCACCGGA // 配列番号 : 825 ;

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

20

```

TGGTTC CGGTGGTGGTGGTTCCTACTGCCAGAAATGGATGTGGACCTGCGACGAAGAACG
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
   AGGCCACCACCACCAAGGATGACGGTCTTTACCTACACCTGGACGCTGCTTCTTGC

   G   S   G   G   G   G   S   Y   C   Q   K   W   M   W   T   C   D   E   E   R   -

TAAATGCTGCGAAGGTCTGGTTTGCCGTCTGTGGTGCAAACGTATCATCAACATG 配列番号 : 826
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   ATTTACGACGCTTCCAGACCAAACGGCAGACACCACGTTTGCATAGTAGTTGTACATTC 配列番号 : 828

   K   C   C   E   G   L   V   C   R   L   W   C   K   R   I   I   N   M   - 配列番号 : 827

```

【0 4 7 1】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例 3 に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

30

【実施例 2 5】

【0 4 7 2】

F c - L - w G V I A の細菌での発現

F c - L - w G V I A の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例 3 に記載されている。使用されるベクターは、p A M G 2 1 a m p R - F c - P e p であり、F c - L - w G V I A の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0 4 7 3】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

40

【0 4 7 4】

【化 4 6】

TGGTTCGGTGGTGGTGGTTCCTGCAAATCCCCGGGTT // 配列番号 : 829 ;
 CCTCCTGCTCCCCGACCTCCTACAACTGCTGCCGTTCTGCAACCCGTACACCAAACGTTGCTACGGT
 配列番号 : 830 ;
 CTTAACCGTAGCAACGTTTGGTGTAACGGGTGTCAGGAA // 配列番号 : 831 ;
 CGGCAGCAGTTGTAGGAGGTGCGGGAGCAGGAGGAACCCGGGGATTGTCAGGAACACCACCACCGGA
 // 配列番号 : 832 ;

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

1 TGGTTCGGTGGTGGTGGTTCCTGCAAATCCCCGGGTTCTCCTGCTCCCCGACCTCCTA 60
 AGGCCACCACCACCAAGGACGTTTAGGGGCCAAGGAGGACGAGGGGCTGGAGGAT
 G S G G G G S C K S P G S S C S P T S Y -
 CAAC TGCTGCCGTTCTGCAACCCGTACACCAAACGTTGCTACGGT 配列番号 : 833
 61 GTTGACGACGGCAAGGACGTTGGGCATGTGGTTTGCAACGATGCCAATTC 配列番号 : 835
 N C C R S C N P Y T K R C Y G 配列番号 : 834

10

【0 4 7 5】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例 3 に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例 2 6】

20

【0 4 7 6】

F c - L - ω M V I I A の細菌での発現

F c - L - ω M V I I A の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例 3 に記載されている。使用されるベクターは、p A M G 2 1 a m p R - F c - P e p であり、F c - L - ω M V I I A の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0 4 7 7】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0 4 7 8】

30

【化 4 7】

TGGTTCGGTGGTGGTGGTTCCTGCAAAGGTAAA // 配列番号 : 836 ;
 GGTGCTAAATGCTCCCGTCTGATGTACGACTGCTGCACCGGTTCTGCCGTTCCGGTAAATGCGGT //
 配列番号 : 837 ;
 CTTAACCGCATTTACCGGAACGGCAGGAACCGGT // 配列番号 : 838 ;
 GCAGCAGTCTGATACATCAGACGGGAGCATTAGCACCTTTACCTTTGCAGGAACACCACCACCGGA //
 配列番号 : 839 ;

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

1 TGGTTCGGTGGTGGTGGTTCCTGCAAAGGTAAAGGTGCTAAATGCTCCCGTCTGATGTA 60
 AGGCCACCACCACCAAGGACGTTTCCATTTCCACGATTTACGAGGGCAGACTACAT
 G S G G G G S C K G K G A K C S R L M Y -
 CGACTGCTGCACCGGTTCTGCCGTTCCGGTAAATGCGGT 配列番号 : 840
 61 GCTGACGACGTGGCCAAGGACGGCAAGGCCATTTACGCCAATTC 配列番号 : 842
 D C C T G S C R S G K C G - 配列番号 : 841

40

【0 4 7 9】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例 3 に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

50

【実施例 27】

【0480】

F c - L - P t u l の細菌での発現

F c - L - P t u l の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例 3 に記載されている。使用されるベクターは、p A M G 2 1 a m p R - F c - P e p であり、F c - L - P t u l の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0481】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

10

【0482】

【化 48】

TGTTCCGGTGGTGGTGGTTCGCTGAAAAAGACTGCATC // 配列番号 : 843 ;

GCTCCGGGTGCTCCGTGCTTCGGTACCGACAAACCGTGCTGCAACCCGCGTGCTTGGTGCTCCTCCTACGCTA
ACAAATGCCTG // 配列番号 : 844 ;

CTTACAGGCATTTGTAGCGTAGGAGGAGCACCAAGCACG // 配列番号 : 845 ;

CGGGTTGCAGCACGGTTTGTTCGGTACCGAAGCACGGAGCACCCGGAGCGATGCAGTCTTTTTCAGCGGAACCA
CCACCACCGGA // 配列番号 : 846 ;

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

20

```

TGTTCCGGTGGTGGTGGTTCGCTGAAAAAGACTGCATCCTCCGGGTGCTCCGTGCTT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGCGACTTTTCTGACGTAGCGAGGCCACGAGGCACGAA

      G   S   G   G   G   G   S   A   E   K   D   C   I   A   P   G   A   P   C   F   -

CGGTACCGACAAACCGTGCTGCAACCCGCGTGCTTGGTGCTCCTCCTACGCTAACAAATG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      GCCATGGCTGTTTGGCACGACGTTGGGCGCACGAACACGAGGAGGATGCGATTGTTTAC

      G   T   D   K   P   C   C   N   P   R   A   W   C   S   S   Y   A   N   K   C   -

      CCTG 配列番号 : 847
121 -----

      GGACATTC 配列番号 : 849

      L   - 配列番号 : 848

```

30

【0483】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例 3 に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例 28】

【0484】

F c - L - P r o T x 1 の細菌での発現

F c - L - P r o T x 1 の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例 3 に記載されている。使用されるベクターは、p A M G 2 1 a m p R - F c - P e p であり、F c - L - P r o T x 1 の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

40

【0485】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0486】

TGGTTCCGGTGGTGGTTCCGAATGCCGTTACTGGCTGG // 配列番号：850；

GTGGTTGCTCCGCTGGTCAGACCTGCTGCAAACACCTGGTTTGCTCCCGTCGTACGGTTGGTGCGTTTGGGA
CGGTACCTTCTCC // 配列番号：851；

CTTAGGAGAAGGTACCGTCCCAAACGCACCAACCGTGACGA // 配列番号：852；

CGGGAGCAAAACCAGGTGTTTGCAAGCAGGTCTGACCAGCGGAGCAACCACCCAGCCAGTAACGGCATTGCGAAC
CAACCACCACCGGA // 配列番号：853；

10

20

30

【 0 4 9 0 】

【化 5 0】

TGGTTCGGTGGTGGTGGTTCCTCGTCCGACCGACATCAAATG // 配列番号 : 857 ;
 CTCCGAATCCTACCACTGCTTCCCGGTTTGCAAATCCCGTTTCGGTAAAACCAACGGTCGTTGCGTTAACGGT
 TTCTGCGACTGCTTC // 配列番号 : 858 ;
 CTTAGAAGCAGTCGCGAAACCGTTAACGCAACGACCGTTGG // 配列番号 : 859 ;
 TTTTACCGAAACGGGATTGCAAACCGGGAAGCACTGGTAGGATTCGGAGCATTTGATGTCGGTCGGACGGGA
 ACCACCAACACCGGA // 配列番号 : 860 ;

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

10
 1 TGGTTCGGTGGTGGTGGTTCCTCGTCCGACCGACATCAAATGCTCCGAATCCTACCACTG
 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
 AGGCCACCAACCAAGGCGAGGCTGGCTGTAGTTTACGAGGCTTAGGATGGTCAC
 G S G G G S R P T D I K C S E S Y Q C -
 CTTCCTCGGTTTGCAAATCCCGTTTCGGTAAAACCAACGGTCGTTGCGTTAACGGTTTCTG
 61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
 GAAGGGCCAAACGTTTAGGGCAAAGCCATTTTGGTTGCCAGCAACGCAATTGCCAAAGAC
 F P V C K S R F G K T N G R C V N G F C -
 CGACTGCTTC 配列番号 : 861
 121 -----+
 GCTGACGAAGATTC 配列番号 : 863
 D C F - 配列番号 : 862
 20

【0 4 9 1】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例 3 に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例 3 0】

【0 4 9 2】

F c - L - C T X の細菌での発現

F c - L - C T X の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例 3 に記載されている。使用されるベクターは、p A M G 2 1 a m p R - F c - P e p であり、F c - L - C T X の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、
 以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0 4 9 3】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0 4 9 4】

【化 5 1】

TGGTTCCTCGTGGTGGTGGTTCATGTGCATGCCGTGCTTCAC // 配列番号 : 864 ;
 CACCGACCAACAGATGGCTCGTAAATGCGACGACTGCTGCGGTGGTAAAGGTCGTGGTAAATGCTACGGTCCG
 CAGTGCCGTGTGCCGT // 配列番号 : 865 ;
 CTTAACGGCACAGGCACTGCGGACCGTAGCATTTACCACGAC // 配列番号 : 866 ;
 CTTTACCACCGCAGTCGTCGATTTACGAGCCATCTGGTGGTGGTGAAGCACGGCATGCACATGGA
 ACCACCACACCGGA // 配列番号 : 867 ;
 40

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```

      TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCATGTGCATGCCGTGCTTCACCACCGACCACCAGATGGC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGTACACGTACGGCACGAAGTGGTGGCTGGTGGTCTACCG

      G S G G G G S M C M P C F T T D H Q M A -

      TCGTAAATGCGACGACTGCTGCGGTGGTAAAGGTCGTGGTAAATGCTACGGTCCGCAGTG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      AGCATTACGCTGCTGACGACGCCACCATTTCAGCACCATTACGATGCCAGGCGTCAC

      R K C D D C C G G K G R G K C Y G P Q C -

      CCTGTGCCGT 配列番号：868
121 -----+
      GGACACGGCACCAC 配列番号：870

      L C R - 配列番号：869

```

10

【0495】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例3に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例31】

【0496】

N末端がPEG化されたDes-Arg1-ShK

還元型Des-Arg1-ShKのペプチド合成

Tentagel (商標) - S PHB Fmoc-Cys (Trt) 樹脂上にて、0.1 mmol 当量の樹脂スケールで、ヘキサフルオロリン酸 2 - (1H-ベンゾトリアゾール-1-イル) - 1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウム (HBTU) / N-メチルモルフォリン (NMM) / N, N-ジメチルホルムアミド (DMF) カップリング化学反応を使用する固相ペプチド合成 (SPPS) によって、Symphony (商標) 多重ペプチド合成装置上で、段階的な様式で、配列

20

SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC

(ペプチド1、配列番号92)

を有するDes-Arg1-ShKを合成した。N-アルファー (9-フルオレニルメチルオキシカルボニル) - 及び側鎖保護されたアミノ酸は、Midwest Biotec h Incorporatedから購入した。Fmoc-Cys (Trt) - Tentagel (商標) 樹脂は、Flukaから購入した。以下の側鎖保護戦略、すなわち、As p (O^tBu)、Arg (Pbf)、Cys (Trt)、Gln (Trt)、His (Trt)、Lys (N^ε-Boc)、Ser (O^tBu)、Thr (O^tBu) 及びTyr (O^tBu) を使用した。2つのオキサゾリジンペプチド、すなわちFmoc-Gly - Thr (Ψ^{Me}, MePro) - OH及びFmoc-Leu-Ser (Ψ^{Me}, MePro) - OHを鎖重合に使用し、NovaBiochemから入手し、配列の合成に使用した。保護されたアミノ酸誘導体 (20 mmol) をDMF中の20% (v/v) ジメチルスルホキシド (DMSO) 100 mL中に溶解した。DMF中の20% DMSO中の20 mM HBTU、400 mM NMMで、保護されたアミノ酸を活性化し、20% DMF / DMSO中の0.5 mmolの保護されたアミノ酸、0.5 mmolのHBTU、1 mmolのNMMで、25分間、次いで40分間の2回の処理を使用して、カップリングを実施した。DMF中の20% (v/v) ピペリジンの溶液を使用する、10分間、次いで15分間の2回の処理で、Fmoc脱保護反応を実施した。合成の後、次に、樹脂を排水し、DCM、DMF、DCMで洗浄した後、真空中で乾燥した。TFA / EDT / TIS / H₂O (92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 (v/v)) 溶液で、室温で1時間処理することによって、ペプチド-樹脂を脱保護し、樹脂から放出した。次に、揮発性物質を窒素ガス流で除去し、粗ペプチドを冷ジエチルエーテルで2回沈殿させ、遠心分離により回収した。次に、Jupiter 4 μm Proteo (商標) 90 Åカラム上での直線勾配 (0ないし60%緩衝液B、12分、A:水中の0.1% TFA、B:アセトニトリル中の0.1% TFA) を使用するWaters 2795分析用RP-HPLCシステムで、粗ペプチドを分析した。正確なペプチド生成量を確認するために、PE-Sciex (商標

30

40

50

）API電気スプレー質量分析計を使用した。分析用RP-HPLC分析によって概算されるものに基づいて約70%純度で、粗ペプチドを143mg収量で入手した。還元型Des-Arg1-ShK（ペプチド1）の保持時間（室温）=5.31分、算出された分子量=3904.6917Da（平均）、実験的に観察された分子量3907.0Daであった。

【0497】

Des-Arg1-ShKの折りたたみ（ジスルフィド結合形成）

TFA開裂及びペプチド沈殿の後、ペプチドを折りたたむため、還元型Des-Arg1-ShKを、空気で酸化した。水中の20%AcOH（v/v）を使用して、開裂した粗ペプチドを抽出した後、約0.15mg/mLの還元型Des-Arg1-ShKの濃度まで水で希釈し、NH₄OH（28ないし30%）を使用してpHを約8.0に調整し、室温で36時間静かに攪拌した。LC-MS分析により、折りたたみ工程をモニターした。この後、0ないし40%の直線勾配の緩衝液Bで120分間（A=水中0.1%TFA、B=アセトニトリル中0.1%TFA）1" Luna 5µm C18 100Å Proteo（商標）カラムを使用する逆相HPLCを使用して、折りたたまれたDes-Arg1-ShKペプチドを精製した。折りたたまれた粗Des-Arg1-ShKペプチドを、約25%の緩衝液Bで（その還元型における溶出時間と比較して）早期に溶出した。分析用RP-HPLC分析によって概算されるように、97%超の純度で、折りたたまれたDes-Arg1-ShK（ペプチド2）を23.2mgの収量で入手した（図20）。算出された分子量=3895.7693（モノアイソトピック）、実験的に観察された分子量=3896.5Da（Waters LCT Premier Micro mass MS Technologiesで分析）であった。Des-Arg1-ShKジスルフィドの結合性は、C1-C6、C2-C4、C3-C5であった。

【0498】

【化52】



（ペプチド2、配列番号58）

【0499】

折りたたまれたDes-Arg1-ShKのN末端PEG化

折りたたまれたDes-Arg1-ShK（ペプチド2）を、1mg/mLの濃度で水中に溶解した。50mMNaOAc、pH4.5中の2M MeO-PEG-アルデヒド、CH₃O-[CH₂CH₂O]_n-CH₂CH₂CHO（平均分子量20kDa）溶液、及び別途のNaCNBH₃の1M溶液を新たに調製した。次に、ペプチド溶液をMeO-PEG-アルデヒド含有溶液へ添加した後、NaCNBH₃溶液を添加した。反応化学量論はそれぞれ、ペプチド：PEG：NaCNBH₃（1：2：0.02）であった。反応を48時間放置し、直線勾配（16分中6ないし60%B、A：水中0.1%TFA、B：水中0.1%TFA/90%ACN）で、40℃でZorbax（商標）300SB-C8 5µmカラムを使用するAgilent1100RP-HPLCシステムで分析した。モノPEG化された、折りたたまれたDes-Arg1-ShKは、分析用RP-HPLCによって粗生成物の約58%を構成した。次に、25カラム容積中の0ないし50%Bの勾配を使用して、4℃、1mL/分でAKTA FPLCシステムにおいてHiTrap（商標）5mL SP HP陽イオン交換カラムを使用して、モノPEG化されたDes-Arg1-ShKを単離した（緩衝液：A=20mM酢酸ナトリウム、pH4.0、B=1M NaCl、20mM酢酸ナトリウム、pH4.0）。（粗生成物に関して記載されるとおり）4ないし20のトリス-Gly SDS-PAGEゲル及びRP-HPLCを使用して、画分を分析した。SDS-PAGEゲルを125V、35mA、5

Wで1.5時間使用した。次に、プールした生成物を4℃で、A4S緩衝液(10mM NaOAc、5%ソルビトール、pH4.0)1Lの3回の交換で透析した。次に、透析した生成物を10Kの微量遠心フィルター中で2mL容積まで濃縮し、最終生成物を付与するため、0.2μMシリンジフィルターを使用してろ過滅菌した。N末端がPEG化されたDes-Arg1-ShK(ペプチド3)を、分析用RP-HPLC分析によって85%純度と概算された1.7mg収量で単離した(図23)。

【0500】

「PEG-ShK[2-35]とも呼ばれる」N末端がPEG化されたDes-Arg1-ShKは、パッチクランプ電気生理学的実験によって測定されるように(図36)、ヒトKv1.3を遮断する上で活性があった(図38A及び図38B)。

10

【実施例32】

【0501】

N末端がPEG化されたShk

作働する本実施例の実験的手法は、図17に示される結果に対応する。

【0502】

還元型ShKのペプチド合成

Tentagel(商標)-S-PHB-Fmoc-Cys(Trt)樹脂上、0.1mmol当量の樹脂規模で、ヘキサフルオロリン酸2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム(HBTU)/N-メチルモルフォリン(NMM)/N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)カップリング化学反応を使用する固相ペプチド合成(SPPF)によるSymphony(商標)多重ペプチド合成装置での段階的な方法で、アミノ酸配列

20

RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC

(ペプチド4、配列番号5)

を有するShKを合成した。N-アルファ-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル及び側鎖保護されたアミノ酸は、Midwest Biotech Incorporatedから購入した。Fmoc-Cys(Trt)-Tentagel(商標)樹脂は、Flukaから購入した。以下の側鎖保護戦略を採用した。すなわち、Asp(O^tBu)、Arg(Pbf)、Cys(Trt)、Gln(Trt)、His(Trt)、Lys(N^ε-Boc)、Ser(O^tBu)、Thr(O^tBu)及びTyr(O^tBu)であった。2つのオキサゾリジンペプチドであるFmoc-Gly-Thr(Ψ^{Me}, Me^ePro)-OH及びFmoc-Leu-Ser(Ψ^{Me}, Me^ePro)-OHを鎖重合に使用し、NovaBiochemから得、配列の合成に使用した。保護されたアミノ酸誘導体(20mmol)をDMF中の20%(v/v)ジメチルスルホキシド(DMSO)100mL中に溶解した。保護されたアミノ酸をDMF中の20%DMSO中の200mMHBTU、400mMNMMで活性化し、20%DMF/DMSO中の0.5mmolの保護されたアミノ酸、0.5mmolのHBTU、1mmolのNMMで25分間、次いで40分間の2回の処理を使用して、カップリングを実施した。DMF中の20%(v/v)ピペリジンの溶液を10分間、次いで15分間使用する2回の処理で、Fmoc脱保護反応を実施した。合成の後、次に、樹脂を排水し、DCM、DMF、DCMで洗浄した後、真空で乾燥した。室温で1時間TFA/EDT/TIS/H₂O(92.5:2.5:2.5:2.5(v/v))溶液による処理によって、ペプチド-樹脂を脱保護し、樹脂から放出した。次に、揮発性物質を窒素ガス流で除去し、粗ペプチドを冷ジエチルエーテルで2回沈殿させ、遠心分離により回収した。次に、Jupiter 4μmProteo(商標)90Åカラム上での直線勾配(0ないし60%緩衝液B、12分、A:水中の0.1%TFA、B:アセトニトリル中の0.1%TFA)を使用するWaters 2795分析用RP-HPLCシステムで、粗ペプチドを分析した。正確なペプチド生成量を確認するため、PE-Sciex API電気スプレー質量分析計を使用した。分析用RP-HPLC分析によって約45%純度と概算される約170mgの収量の粗ペプチドを入手した。還元型Des-Arg4-ShK(ペプチド1)の保持時間(室温)=

30

40

50

5.054分、算出された分子量＝4060.8793Da（平均）、実験的に観察された分子量4063.0Daであった。

【0503】

ShKの折りたたみ（ジスルフィド結合形成）

TFA開裂及びペプチド沈殿の後、ペプチドを折りたたむため、還元型ShKを空気で酸化した。水中の20%AcOH（v/v）を使用して、開裂した粗ペプチドを抽出した後、約0.15mg/mLの還元型ShKの濃度まで水で希釈し、NH₄OH（28ないし30%）を使用してpHを約8.0に調整し、室温で36時間静かに攪拌した。LC-MS分析により、折りたたみ工程をモニターした。この後、0ないし40%の直線勾配の緩衝液Bで120分間（A＝水中0.1%TFA、B＝アセトニトリル中0.1%TFA）1" Luna 5μm C18 100Å Proteo（商標）カラムを使用する逆相HPLCによって、折りたたまれたShKペプチドを精製した。折りたたまれた粗ShKペプチドを、約25%の緩衝液Bで（その還元型における溶出時間と比較して）早期に溶出した。分析用RP-HPLC分析によって概算されるように、97%超の純度で、折りたたまれたShK（ペプチド5）を25.5mgの収量で入手した。図60を参照されたい。算出された分子量＝4051.8764Da（モノアイソトピック）、実験的に観察される分子量＝4052.5Da（Waters LCT Premier Micro mass MS Technologiesで分析）であった。ShKジスルフィドの結合性は、C1-C6、C2-C4、C3-C5であった。

【0504】

【化53】



（ペプチド5、配列番号10）

折りたたまれたShKのN末端のPEG化 以下のアミノ酸配列を有する折り畳まれたShKは、

RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC

（配列番号：5）

は、水中に1mg/mL濃度で溶解させることができる。50mMNaOAc、pH4.5中の2M MeO-PEG-アルデヒド、CH₃O-[CH₂CH₂O]_n-CH₂CH₂CHO（平均分子量20kDa）溶液、及びNaCNBH₃の別個の1M溶液は、新たに調製できる。次に、ペプチド溶液をMeO-PEG-アルデヒド含有溶液へ添加した後、NaCNBH₃溶液を添加できる。反応化学量論はそれぞれ、ペプチド：PEG：NaCNBH₃（1：2：0.02）であり得る。反応を48時間放置し、直線勾配（16分中6ないし60%B、A：水中0.1%TFA、B：水中0.1%TFA／90%ACN）で、40℃でZorbax（商標）300SB-C8 5μmカラムを使用するAgilent（商標）1100RP-HPLCシステムで分析できる。次に、25カラム容積中の0ないし50%Bの勾配を使用して、4℃、1mL／分でAKTA FPLCシステムにおいて、HiTrap（商標）5mL SP HP陽イオン交換カラムを使用して、モノPEG化されたShkを単離できる（緩衝液：A＝20mM酢酸ナトリウム、pH4.0、B＝1M NaCl、20mM酢酸ナトリウム、pH4.0）。4ないし20のトリス-Gly SDS-PAGEゲル及びRP-HPLCを使用して、画分を分析できる。SDS-PAGEゲルを125V、35mA、5Wで1.5時間使用できる。次に、プールした生成物を4℃で、A4S緩衝液（10mM酢酸ナトリウム、5%ソルビトール、pH4.0）1Lの3回の交換で透析できる。次に、透析した生成物を10Kの微量遠心フィルター中で2mL容積まで濃縮し、最終生成物を付与するため、0.2μMシリンジフィルターを使用してろ過滅菌できる。

【実施例33】

【0505】

オキシム形成によってN末端がPEG化されたShK

還元型ShKのペプチド合成

配列

【0506】

【化54】

RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC

(配列番号5)

を有するShKは、Tentagel (商標) -S PHB Fmoc-Cys (Trt) 10
(樹脂上、0.1mmol当量の樹脂規模で、ヘキサフルオロリン酸2-(1H-ベンゾ
トリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-тетраметилурониум (HBTU)/N-
метилморфолин (NMM)/N,N-ジметил-ホルムアミド (DMF) を使用す
る固相ペプチド合成 (SPPS) によって、Symphony (商標) 多重ペプチド合成
装置で段階的な様式で合成できる。N-アルファー (9-フルオレニルメチルオキシカル
ボニル) -及び側鎖保護されたアミノ酸は、Midwest Biotech Incor
poratedから購入できる。Fmoc-Cys (Trt)-Tentagel (商
標) 樹脂は、Flukaから購入できる。以下の側鎖保護戦略が採用できる。すなわち、
Asp (O^tBu)、Arg (Pbf)、Cys (Trt)、Gln (Trt)、His
(Trt)、Lys (N^ε-Boc)、Ser (O^tBu)、Thr (O^tBu) 及びT 20
yr (O^tBu) であった。2つのオキサゾリジンペプチド、すなわちFmoc-Gly-
Thr (Ψ^{Me}, MePro)-OH及びFmoc-Leu-Ser (Ψ^{Me}, Me
Pro)-OHは、鎖重合に使用でき、NovaBiochemから入手でき、配列の合
成に使用できる。保護されたアミノ酸誘導体 (20mmol) は、DMF中の20% (v
/v) ジメチルスルホキシド (DMSO) 100mL中に溶解できる。保護されたアミノ
酸は、DMF中の20% DMSO中の200mMHBTU、400mMNMMで活性化で
き、20% DMF/DMSO中の0.5mmolの保護されたアミノ酸、0.5mmol
のHBTU、1mmolのNMMで25分間、次いで40分間の2回の処理を使用して、
カップリングを実施できる。DMF溶液中の20% (v/v) ピペリジンを10分間、次
いで15分間使用する2回の処理で、Fmoc脱保護反応を実施できる。Shkペプチド 30
の鎖重合の後、DMF中の0.5M HBTUを4当量のコリジンとともに5分間使用し
て、Boc-アミノオキシ酢酸 (1.2当量) をN末端にカップリングできる。合成の後
、次に、樹脂を排水し、DCM、DMF、DCMで洗浄した後、真空中で乾燥できる。室温
で1時間、TFA/アミノオキシ酢酸/TIS/EDT/H₂O (90:2.5:2.5
:2.5:2.5) 溶液での処理によって、ペプチド-樹脂を脱保護でき、樹脂から放出
できる。次に、揮発性物質を窒素ガス流で除去し、粗ペプチドを冷ジエチルエーテルで2
回沈殿し、遠心分離により回収できる。次に、Jupiter 4µm Proteo (商
標) 90Åカラム上での直線勾配 (12分で0ないし60%緩衝液B、A:0.1%ア
ミノオキシ酢酸も含有する水中の0.1%TFA、B:アセトニトリル中の0.1%TF
A) を使用するWaters 2795分析用RP-HPLCシステムで、アミノオキシ- 40
Shkペプチド (ペプチド7) を分析できる。

【0507】

逆相HPLC精製

調製用逆相高速液体クロマトグラフィーを、C18 (5µm、2.2cm×25cm)
カラムで実施できる。クロマトグラフィー分離は、15mL/分で90分にわたって、典
型的には5ないし95%のA中の緩衝液の直線勾配 (A=0.1%TFA水溶液、B=0
.09%TFA及び0.1%アミノオキシ酢酸を含有する90%ACN水溶液) を使用し
て達成できる。調製用HPLC画分は、ESMS及び光ダイオードアレイ (PDA) HP
LCによって性質決定でき、合わせて、凍結乾燥できる。

【0508】

オキシム形成による Shk の N 末端の PEG 化

凍結乾燥したアミノオキシ Shk (ペプチド 7) は、50% HPLC 緩衝液 A/B (5 mg/mL) 中に溶解でき、MeO-PEG-アルデヒド、 $\text{CH}_3\text{O}-[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ (平均分子量 20 kDa) の 2 倍モル過剰量へ添加できる。反応を 24 時間放置でき、直線勾配 (16 分中 6 ないし 60% B、A: 水中 0.1% TFA、B: 水中 0.1% TFA/90% ACN) で、40℃ で Zorbax (商標) 300SB-C8 5 μm カラムを使用する Agilent (商標) 1100RP-HPLC システムで分析できる。モノ PEG 化された還元型 Shk は、分析用 RP-HPLC によって粗生成物の約 58% を占めた。次に、25 カラム容積中の 0 ないし 50% B の勾配を使用して、4℃、1 mL/分 で AKTA FPLC システムにおいて HiTrap (商標) 5 mL SP HP 陽イオン交換カラムを使用して、モノ PEG 化された Shk を単離できる (緩衝液: A = 20 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0、B = 1 M NaCl、20 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0)。4 ないし 20 の トリス-Gly SDS-PAGE ゲル及び RP-HPLC を使用して、画分を分析できる。SDS-PAGE ゲルを、125 V、35 mA、5 W で 1.5 時間使用できる。次に、プールの生成物を 4℃ で、A4S 緩衝液 (10 mM NaOAc、5% ソルビトール、pH 4.0) 1 L の 3 回の交換で透析できる。次に、透析した生成物を、10 K の微量遠心フィルター中で 2 mL 容積まで濃縮でき、最終生成物を付与するため、0.2 μM シリンジフィルターを使用してろ過滅菌できる。

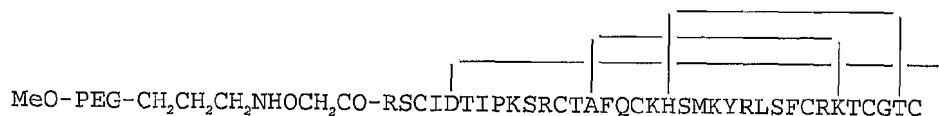
【0509】

Shk の折りたたみ (ジスルフィド結合形成)

モノ PEG 化された (オキシム化された) Shk は、水中の 20% AcOH (v/v) 中に溶解でき、次に約 0.15 mg ペプチド/mL の濃度まで水で希釈し、 NH_4OH (28 ないし 30%) を使用して pH を約 8.0 に調整し、室温で 36 時間静かに攪拌することができる。LC-MS 分析により、折りたたみ工程をモニターすることができる。この後、0 ないし 40% の直線勾配の緩衝液 B で 120 分間 (A = 水中 0.1% TFA、B = アセトニトリル中 0.1% TFA) 1" Luna 5 μm C18 100 Å Proteo (商標) カラムを使用する逆相 HPLC を使用することによって、折りたたまれたモノ PEG 化された (オキシム化された) Shk (ペプチド 9) を精製できる。モノ PEG 化された (オキシム化された) Shk ジスルフィドの結合性は、C1-C6、C2-C4、及び C3-C5 であり得る。

【0510】

【化 55】



(ペプチド 9、配列番号 10)

【実施例 34】

【0511】

N 末端が PEG 化された Shk (アミド化)

本実施例の実験的手法は、図 18 に示される結果に対応する。

【0512】

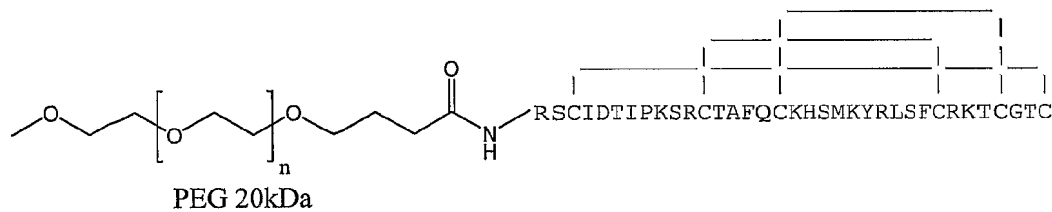
アミド形成による Shk の N 末端の PEG 化

Shk に対する mPEG-SPA 1.5 モル濃度過剰量を使用して、室温で 20 kDa PEG プロピオン酸 (mPEG-SPA; $\text{CH}_3\text{O}-[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-\text{NH}_2$) の固体サクシニミジルエステルへ、100 mM ビシン、pH 8.0 中の折りたたまれた Shk (ペプチド 5) の 10 mg/mL 溶液を添加できる。静かに攪拌した 1 時間後、混合物を水で 2 mg/mL へ希釈でき、pH を希 HCl で 4.0 へ調整で

きる。1 mL/分で0.05 M NaH_2PO_4 、0.05 M Na_2HPO_4 、0.15 M NaCl 、0.01 M NaN_3 、pH 6.8で溶出したSuperdex（商標）75HR10/30カラム（Amersham）を使用するSEC HPLCによって、モノPEG化されたShk（ペプチド10）、幾つかのジPEG化されたShk又はトリPEG化されたShk、修飾されていないShk及びサクシニミジルエステル加水分解の程度を測定できる。4ないし20のトリス-Gly SDS-PAGEゲル及びRP-HPLCを使用して、画分を分析できる。SDS-PAGEゲルを125 V、35 mA、5 Wで1.5時間使用できる。次に、4℃で、A4S緩衝液（10 mM NaOAc 、5%ソルビトール、pH 4.0）1 Lの3回の交換で、プールした生成物を透析できる。次に、透析したN末端PEG化（アミド化）ShK（ペプチド10）を、10 Kの微量遠心フィルター中で2 mL容積まで濃縮でき、最終生成物を付与するため、0.2 μM シリンジフィルターを使用してろ過滅菌できる。

【0513】

【化56】



【実施例35】

【0514】

Fc-L-SmIIIA

Fc-SmIIIA発現ベクター

部分的リンカー配列及びヒト高頻度コドンでコードされるSmIIIAペプチドを含有する104bpのBamHI-NotI断片を、重複プライマー3654-50及び3654-51を使用するPCRによって重合し、実施例1に記載されているpcDNA3.1(+)-CMV-hFc-SmIIIAを作製するために、7.1kbのNotI-BamHI主鎖中にクローニングした。

【0515】

【化57】

BamHI
 5' GGATCCGGAGGAGGAGGAAGCTGCTGCAACGGCCGCGGCTGCAGCAGCCGCTGG
 C C N G R R G C S S R W
 TGCCGCGACACAGCCGCTGCTGCTGAGCGGCCGC3' //SEQ ID NO:872
 C R D H S R C C NotI
 配列番号: 873

フォワード 5'-3':
 GGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGAAGCTGCTGCAACGGCCGCGGCTGCAGCAGC CGC //
 配列番号: 874

リバース 5'-3':
 ATTATTGCGGCCGCTCAGCAGCAGCGGCTGTGGTCGCGGCACCAGCGGCTGCTGCAG CCGC
 配列番号: 875

【0516】

10

20

30

40

50

最終コンストラクト中のBamHIからNotIへの断片の配列を、配列決定により確認した。

【0517】

Fc-L-Sm111aの一過性発現

毒素ペプチドFc融合コンストラクトpCDNA3.1(+)CMV_hFc-Sm111A7.5μgを、形質移入剤FuGENE6を有する10cm組織培養プレート中の293-T細胞に形質移入した。形質移入から24時間後、培地を無血清培地と交換し、形質移入の5日目に培養上清を回収した。抗hFc抗体で標識したウェスタンブロットによって、293-T細胞からのFc-Sm111Aの一過性発現を分析した(図25A及び図25B)。概算された分子量を有する発現されたタンパク質の単一バンドが、還元型及び非還元型試料の両者において示された。さらに、Fc-Sm111Aの一過性発現レベルが、ELISAによると、73.4μg/mLであることを決定した。

10

【実施例36】

【0518】

電気生理学実験

細胞培養ヒトKv1.3チャネルを発現する安定な細胞系が、Biofocusから使用許諾された。5%CO₂環境中、37℃で、細胞を維持した。培地は、GlutaMax(商標)(Invitrogen)、1×非必須アミノ酸、10%ウシ胎仔血清及び500μg/mLジェネテシンを有するDMEMを含有する。電気生理学実験の少なくとも24時間前に、細胞を播種し、35mm培養皿上で低集密度で増殖させた。

20

【0519】

パッチクランプによる電気生理学記録

パッチクランプ技術の密封配置を使用することによって、全細胞電流を単一細胞から記録した。135mMNaCl、5mMKCl、1.8mMCaCl₂、10mMHEPES及び5mMグルコースを含有する記録緩衝液を有する培地ですすぎ、交換した後、35mm培養皿を記録ステージへと移した。NaOHで、pHを7.4になるように調整し、モル浸透圧濃度を300mOsmに設定した。平行に配置され、電動ロッド(電動ロッドは、記録されている細胞の上に、ガラス毛细管を直接配置する。)に装着されたガラス毛细管の1つを介して、細胞に、記録緩衝液を連続的に灌流した。記録ピペット溶液は、90mMK-グルコン酸塩、20mMKF、10mMNaCl、1mMMgCl₂・6H₂O、10mMEGTA、5mMK₂-ATP及び10mMHEPESを含有した。内部溶液に対するpHを、KOHで7.4に調整し、モル浸透圧濃度を280mOsmに設定した。実験は室温(20ないし22℃)で実施し、Multiclamp(商標)700A増幅装置(Molecular Devices Inc.)を使用して記録した。ピペットの抵抗は、典型的には、2ないし3MΩであった。

30

【0520】

Kv1.3電流に関するタンパク質毒素作用強度測定

ヒトKv1.3チャネルを安定して発現するHEK293細胞を、-80mV保持電位で電位固定した。-80mVの保持電位から+30mVへの200ミリ秒長の脱分極工程を付与することによって、外向きのKv1.3電流を活性化し、3kHzでフィルターにかけた。各脱分極工程は、その後の脱分極工程から10秒間隔で分離した。類縁体信号をDigidata(商標)1322Aデジタイザー(Molecular Devices)によってデジタル化した後、Clampfit(商標)9(Molecular Devices Inc.)を使用するオフライン分析のために、コンピュータディスクに保存した。全ての研究において、漸増濃度のタンパク質毒素の灌流を開始する4分間前に、安定したベースラインKv1.3電流振幅を確立した。タンパク質毒素のその後の濃度の灌流を開始する前に、定常状態の遮断を常に達成した。

40

【0521】

データ解析

対照の百分率(POC)を次式に基づいて算出する。すなわち(タンパク質毒素添加後

50

の $K_v 1.3$ 電流／対照における $K_v 1.3$ 電流) $\times 100$ である。 IC_{50} 値を算出するため、タンパク質毒素の少なくとも5つの濃度(例えば、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、100 nM)を使用した。XLfitソフトウェア(Microsoft Corp.)の4つのパラメータロジスティック適合を使用して、 IC_{50} 値及び曲線適合を概算した。 IC_{50} 値を平均値 $\pm$ s. e. m. (平均の標準誤差)として表す。

【0522】

薬物の調製

タンパク質毒素(典型的には10ないし100 μ M)を蒸留水中に溶解し、 -80°C で冷凍保存した。タンパク質毒素原液の連続希釈物を、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含有する記録緩衝液中へ混合した後、ガラス灌流貯蔵器へと転移させた。電子挟みバルブは、貯蔵器から記録される細胞へのタンパク質毒素の流量を調節した。

【実施例37】

【0523】

免疫生物学及びチャネル結合

PBMCのPMA及び抗CD3抗体刺激後のT細胞サイトカイン生成の阻害。正常ヒトドナーLeulophoresisパックから、PBMCを予め単離し、密度勾配遠心(Ficoll Hypaque)によって精製し、CPZ Cryopreservation Medium Complete(INCELL, MCPZF-100プラス最終濃度10%DMSO)中で冷凍保存させた。PBMCを解凍し(95%生存率)、洗浄し、96ウェル平底組織培養プレート中の10%ウシ胎仔血清、100 U/mLペニシリン、100 mg/mLストレプトマイシン、2 mL-グルタミン、100 μ M非必須アミン酸及び20 μ M 2-MEを補充した培地(RPMI培地1640、GIBCO)中に、 2×10^5 細胞/ウェルで播種した。200 μ Lの最終アッセイ容積中のPMA/抗CD3(それぞれ1 ng/mL及び50 ng/mL)で48時間刺激する前の90分間、連続希釈した(最終濃度100 nMないし0.001 nM)ShK[1-35]、Fc-L10-ShK[1-35]又はfc対照とともに、細胞をあらかじめ温置した。電気化学発光(ECL)を利用することによってIL-2及びIFN γ のタンパク質レベルを測定するため、Meso Scale Discovery(MSD)SECTOR(商標)Imager 6000(Meso Scale Discovery, Gaithersbury, MD)を使用して、アッセイ試料の分析を実施した。培養上清(50 μ L)をMSD多重スポット96ウェルプレートへ添加した(各ウェルは、3つの捕捉抗体すなわちIL-2、TNF, IFN γ を含有した)。プレートを密封し、スズ箔で包み、プレート振とう器上、室温で2時間温置した。ウェルを200 μ LのPBST(BIOTEK, Elx405 Auto Plate Washer)で1回洗浄した。各ウェルに対して、ルテニウム標識した検出抗体(抗体希釈緩衝液中の終濃度1 μ g/mL、IL-1、TNF、IFN γ)20 μ L及び2 $\times$ MSD Read Buffer 130 μ Lを添加し、終容積150 μ Lとした。プレートを密封し、スズ箔で包み、プレート振とう器上、室温で1時間温置した。次に、プレートをSECTOR(商標)Imager 6000で読み取った。図35A及び35Bは、CHO由来のFc-L10-ShK[1-35]ペプチボディが、T細胞由来のIL-2及びIFN γ 生成を用量依存的な様式で有力に阻害することを示す。固有のShK[1-35]ペプチドと比較して、ペプチボディは、阻害の程度がより大きい(阻害剤の不在下での反応のPOC=対照の百分率)。

【0524】

PBMCのPMA及び抗CD3抗体刺激後のT細胞サイトカイン生成の阻害

正常ヒトドナーLeukophoresisパックから、PBMCをあらかじめ単離し、密度勾配遠心(Ficoll Hypaque)により精製し、INCELL Freezing Mediumを使用して冷凍保存した。PBMCを解凍し(95%生存率)、洗浄し、(血清交換物PSGを含有するRPMI完全培地中で) 2×10^5 細胞/ウェルで96ウェル平底プレートへ播種した。200 μ Lの最終アッセイ容積でaCD3及び

aCD28の添加（それぞれ2.5 ng/mL及び100 ng/mL）の前の1時間、連続希釈した（終濃度100 nMないし0.003 nM）ShK [1-35]、Fc-L10-ShK [1-35]、又はFc対照とともに、細胞をあらかじめ温置した。MSD多重スポット96ウェルプレートへ上清20 mLを添加した（各ウェルは、IL-2、TNFα及びIFNγ捕捉抗体を含有した）。プレートを密封し、プレート振とう器上、室温で1時間温置した。次に、ルテニウム標識した検出抗体（抗体希釈緩衝液中のIL-2、TNFα及びIFNγの終濃度1 µg/mL）20 mL及び2×MSD Read Buffer 110 mLを添加した。プレートを密封し、スズ箔で包み、プレート振とう器上、室温で1時間温置した。次に、プレートをSECTOR（商標）Imager 6000で読み取った。図37A及び37Bは、CHO由来のFc-L10-ShK [1-35] ペプチボディが、T細胞由来のIL-2及びIFNγ生成を用量依存的な様式で有力に阻害することを示す。部分的な阻害のみを示す固有のShK [1-35] ペプチドと比較して、ペプチボディは、炎症性サイトカイン反応をほぼ完全に阻害する。（阻害剤の不在下での反応のPOC＝対照の百分率）。

【0525】

PBMCの抗CD3及び抗CD28抗体刺激後のT細胞増殖の阻害

正常ヒトドナーLeukopheresisパックから、PBMCをあらかじめ単離し、密度勾配遠心（Ficoll Hypaque）により精製し、CPZ Cryopreservation Medium Complete（INCELL, MCPZF-100プラス終濃度10% DMSO）を使用して冷凍保存した。PBMCを解凍し（95%生存率）、洗浄し、96ウェル平底組織培養プレート中の10%ウシ胎仔血清、100 U/mLペニシリン、100 mg/mLストレプトマイシン、2 mM L-グルタミン、100 µM非必須アミノ酸及び20 µM 2-MEを補充した培地（RPMI培地1640、GIBCO）中で 2×10^5 細胞/ウェルで播種した。抗ヒトCD32（FcγRII）ブロッキング抗体（製造者の使用説明書EASY SEP Human Biotin Selection Kit 18553番、StemCell Technologies Vancouver, BCに従った。）又はFc-L10-ShK（終濃度100 nMないし0.001 nM）のいずれかとともに、細胞を45分間予め温置した。次に、Fc-L10-ShK（終濃度100 nMないし0.001 nM）を、抗ヒトCD32ブロッキング抗体を含有する細胞へ添加する一方で、Fc-L10-ShLを含有する細胞へ培地を添加した。aCD3/aCD28（それぞれ0.2 ng/mL及び100 ng/mL）で48時間刺激する前のさらなる45分間に両セットを温置した。最終的なアッセイ容積は200 µLであった。[3H]TdR（1 µCi/ウェル）を添加し、プレートをさらに16時間温置した。次に、細胞をガラスファイバーフィルターへと回収し、放射能をBシンチレーションカウンタで測定した。図36A及び36Bは、CHO由来のFc-L10-ShK [1-35] ペプチボディが、T細胞の増殖を用量依存的な様式で有力に阻害することを示す。抗CD32（FcR）ブロッキング抗体による前ブロッキングは、T細胞増殖を阻害するペプチボディの能力にほとんど効果を及ぼさず、FcR結合ではなくKv1.3阻害が、観察される阻害に関するメカニズムであることを示唆する（阻害剤の不在下での反応のPOC＝対照の百分率）。

【0526】

ヒトKv1.3を過剰発現するHEK293細胞に対するFc-L10-ShK [1-35] 結合の免疫組織化学分析

ヒトKv1.3を過剰発現するHEK293細胞（HEK Kv1.3）をBioFocus plc（Cambridge, UK）から入手し、製造者の推奨に従って維持した。親HEK293細胞系を対照として使用した。ポリ-D-リジン24ウェルプレート（35-4414番、Becton-Dickinson, Bedford, MA）上に細胞を播種し、約70%の集密状態まで増殖させた。培地1 mL/ウェル中に、HEK Kv1.3を、 0.5×10^5 細胞/ウェルで播種した。HEK293細胞を、培地1 mL/ウェル中に、 1.5×10^5 細胞/ウェルの密度で播種した。染色前、細胞増殖培地

10

20

30

40

50

を除去し、0.2 mL/ウェルのホルマリン溶液 (Sigma HT50-1-1 ホルマリン溶液、PBS/0.5% BSAで使用前に1:1希釈) を添加し、室温で10分間温置することによって、細胞をホルマリンで固定した。PBS/BSA中の5 µg/mLのFc-L10-ShK [1-35] 0.2 mL/ウェルとともに温置することによって細胞を染色した。Fc-L10-ShK [1-35] を吸引した後、細胞をPBS/0.5% BSAで1回洗浄した。検出抗体 (ヤギF(ab)2抗ヒトIgGフィコエリスリン、Southern Biotech Associates, Birmingham, AL) をPBS/0.5% BSA中で5 µg/mLでウェルへ添加し、室温で30分間温置した。PBS/0.5% BSAで、細胞を1回洗浄し、共焦点顕微鏡 (LSM510 Meta Confocal Microscope, Carl Zeiss AG, Germany) を使用して検査した。図33Bは、Fc-L10-ShK [1-35] ペプチボディが、HEK293細胞を過剰発現するKv1.3に対する結合を保持することを示すが、形質移入されていない細胞に対する結合はほとんど示さず (図33A)、Fc-L10-ShK [1-35] ペプチボディが、Kv1.3チャネルを過剰発現する細胞を検出するための試薬として使用できることを示す。活性化されたTエフェクターメモリ細胞がKv1.3を過剰生成することが報告されている疾病状況において、この試薬は、これらの細胞をターゲットにする上でも、それらの検出においても有用性を見出せる。

【0527】

固定されたHEK293細胞に対して結合するFc-L10-ShK [1-35] を示すELISAアッセイ

図34Aは、Kv1.3を過剰発現する固定された細胞に対するペプチボディ結合の用量依存的な増加を示し、前記ペプチボディがその標的に対する高親和性結合及び、チャネルを発現する細胞の検出におけるFc-L10-ShK [1-35] の有用性を示す。多発性硬化症患者において疾病を発症させる抗原特異的T細胞は、困難なアプローチであるホールセルパッチクランプ電気生理学によって、Kv1.3を過剰発現することが示されてきた。本ペプチボディ試薬は、患者におけるKv1.3チャネル発現をモニターするための有用かつ簡便なツールであり得、診断適用において有用である。図34A及び図34Bに示される手法は、以下のとおりである。

【0528】

図34A。Kv1.3の形質移入されたHEK293細胞に対する無処置のFc-L10-ShK [1-35] の結合を示すため、細胞全体の免疫アッセイを実施した (Bio Focus plc, Cambridge, UK)。ポリ-D-リジンでコーティングした96ウェルプレート (35-4461番、Becton-Dickinson, Bedford, MA) において、親HEK293細胞又はHEK Kv1.3細胞を 3×10^4 細胞/ウェルで播種した。細胞増殖培地を除去し、0.2 mL/ウェルのホルマリン溶液 (Sigma HT50-1-1 ホルマリン溶液、PBS/0.5% BSAで使用前に1:1希釈) を添加し、室温で25分間温置した後、PBS/0.5% BSA 100 µL/ウェルで1回洗浄することによって、細胞をホルマリンで固定した。BSAブロッカー (50-61-00、KPL 10% BSA希釈剤/ブロッキング溶液、PBSで1:1希釈、KPL, Gaithersburg, MD) 0.3 mL/ウェルの添加後、振とうしながら室温で3時間温置することによって、ウェルをブロッキングした。プレートを1×KB洗浄緩衝液 (50-63-00、KPL) で2回洗浄した。試料を希釈緩衝液 (PBS/0.5% トゥイーン20) 又は1% 雄ルイスラット血清 (RATSRM-M, Bio Reclamation Inc., Hicksville, NY) 含有希釈緩衝液中に希釈し、ブロッキングされたプレートへ0.1 mL/ウェルを添加し、振とうしながら室温で1時間温置した。プレートを1×KP洗浄緩衝液で3回洗浄した後、PBS/0.1% トゥイーン20中に1:5000で希釈したHRP-ヤギ抗ヒトIgG Fc (31416番、Pierce, Rockford, IL) とともに、振とうしながら室温で1時間温置した。プレートを1×KP洗浄緩衝液で3回洗浄した後、0.1 mL/ウェルのTMB基質 (52-00-01、KPL) を添加した。0.1 mL/ウェルの2N硫酸の添

加により、反応を停止させた。Molecular Devices Spectromax 340 (Sunnyvale, CA) で、450 nm の吸光度を読み取った。

【0529】

図34B。細胞全体の免疫アッセイを、以下の改変とともに上述のとおり実施した。ポリ-D-リジンでコーティングした96ウェルプレート中で、HEK293細胞を 1×10^5 細胞/ウェルで播種し、HEK Kv1.3細胞を 6×10^4 細胞/ウェルで播種した。Fc対照を0.05 mL/ウェルの容積で500 ng/mLで添加した。HRP-ヤギ抗ヒトIgG Fc (31416番、Pierce、Rockford、IL)をPBS/0.1% トゥイーン20中に1:10,000希釈した。ABTS (50-66-00、KPL)を基質として使用した。1% SDSの0.1 mL/ウェルの添加によって反応を停止させた後、405 nmで吸光度を読み取った。

10

【実施例38】

【0530】

Fc-L10-ShK (1-35) の精製

Fc-L10-ShK [1-35] の発現は、本明細書の上述の実施例3において記載されているとおりであった。凍結したE. コリペースト (18 g) を室温の50 mM トリスHCl、5 mM EDTA、pH 8.0の200 mLと組み合わせ、約0.1 mg/mLのニワトリ卵白色リゾチームへ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置へ、12,000 PSIで2回通過させた。次に、細胞可溶化液を、4℃、22,000 gで15分間遠心分離した。次に、組織粉碎機を使用して、ペレットを1%デオキシコール酸200 mL中に再懸濁した後、4℃、22,000 gで15分間遠心分離した。次に、組織粉碎機を使用して、200 mLの水中にペレットを再懸濁した後、4℃、22,000 gで15分間遠心分離した。次に、32 mLの8 M グアニジンHCl、50 mM トリスHCl、pH 8.0中に、ペレット (3.2 g) を溶解した。次に、室温、27,000 gで15分間、ペレット溶液を遠心分離した後、再折りたたみ緩衝液 (3 M 尿素、20% グリセロール、50 mM トリス、160 mM アルギニンHCl、5 mM EDTA、1 mM シスタミンHCl、4 mM システイン、pH 9.5) 500 mLへ、4℃で激しく攪拌しながら、上清5 mLを移動させた。次に、攪拌速度を低下させ、4℃で2日間、温置を続行した。次に、再折りたたみ溶液を-70℃で保存した。

20

【0531】

保存した再折りたたみ液を解凍した後、水2 Lで希釈し、1 M H_3PO_4 を使用して、pHを7.3へ調整した。次に、pH調整した材料を0.22 μm 酢酸セルロースフィルターでろ過し、7℃、20 mL/分でS-緩衝液A (20 mM NaH_2PO_4 、pH 7.3) 中の60 mLのAmersham SP-FF (内径2.6 cm) カラムへと負荷した。次に、カラムをS-緩衝液Aの数カラム容積で洗浄した後、0%から60%までのS-緩衝液B (20 mM NaH_2PO_4 、1 M NaCl、pH 7.3) の直線勾配で溶出した後、7℃、10 mL/分で100% S-緩衝液Bへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス-グリシン4ないし20% SDS-PAGEを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした。次に、7℃、1 mL/分でPBS中の1 mLのAmersham rProtein A HiTrapカラムへと前記プールを負荷した。次に、カラムを20 mMの NaH_2PO_4 、pH 6.5、1 M NaClの数カラム容積で洗浄し、100 mM グリシン、pH 3.0で溶出した。溶出ピークへ、3 M 酢酸ナトリウム0.0125容積 (25 mL) を添加した。

30

40

【0532】

次に、Hewlett Packard 8453分光光度計を使用して、700 μL の水中に希釈した組み合わせたプール50 μL に対して、スペクトル走査を実施した (図46A)。30,410 g/molの算出された分子量及び36,900 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が2.56 mg/mLであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン4ないし20% SDS

50

ーPAGEを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した(図46B)。次に、50mM NaH_2PO_4 、250mM NaCl 、pH6.9でPhenomenex BioSep SEC3000カラム(7.8×300mm)へと1mL/分で注入された生成物20μgに対して、280nmでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した(図46C)。次に、試料1μLをシナピン酸10μL中に希釈する(0.05%トリフルオロ酢酸、50%アセトニトリル中10mg/mL)ことによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液1mLをMALDI試料プレート上に点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたVoyager DE-EP飛行時間質量分析装置を使用して分析した(337nm、3ナノ秒パルス)。25kVの加速電位で陽イオン/直線モードを使用した。約200のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。次に、生成物を-80℃で保存した。

10

【0533】

「Fc-L-ShK[1-35]」とも呼ばれる、精製されたE. コリ由来のFc-L10-ShK[1-35]によるヒトKv1.3の遮断のためのIC₅₀を、(本明細書の以下の実施例50における)表35に示す。

【実施例39】

【0534】

細菌で発現したFc-L10-ShK(2-35)の精製

20

Fc-L10-ShK[2-35]の発現は、本明細書の上述の実施例4において記載されているとおりであった。冷凍したE. コリペースト(16.5g)を室温の50mM トリスHCl、5mMEDTA、pH8.0の200mLと組み合わせ、約0.1mg/mLのニワトリ卵白色リゾチームへ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置へ12,000PSIで2回通過させた。次に、4℃、22,000gで15分間、細胞可溶化液を遠心分離した。次に、組織粉碎機を使用して、200mLの1%デオキシコール酸中にペレットを再懸濁した後、4℃、22,000gで15分間遠心分離した。次に、組織粉碎機を使用して、200mLの水中にペレットを再懸濁した後、4℃、22,000gで15分間遠心分離した。次に、39mLの8MグアニジンHCl、50mM トリスHCl、pH8.0中に、ペレット(3.9g)を溶解した。次に、室温、27,000gで15分間、ペレット溶液を遠心分離した後、再折りたたみ緩衝液(3M尿素、20%グリセロール、50mM トリス、160mM アルギニンHCl、5mMEDTA、1mM シスタミンHCl、4mM システイン、pH9.5)500mLへ、4℃で激しく攪拌しながら、上清5mLを移動させた。次に、攪拌速度を低下させ、4℃で2日間、温置を続行した。次に、再折りたたみ溶液を-70℃で保存した。

30

【0535】

保存した再折りたたみ液を解凍した後、水2Lで希釈し、1M H_3PO_4 を使用して、pHを7.3へ調整した。次に、0.22μm酢酸セルロースフィルターで、pH調整した材料をろ過し、7℃でS-緩衝液A(20mM NaH_2PO_4 、pH7.3中の60mLのAmersham SP-FF(内径2.6cm)カラムへ20mL/分で負荷した。次に、カラムをS-緩衝液Aの数カラム容積で洗浄した後、0%から60%までのS-緩衝液B(20mM NaH_2PO_4 、1M NaCl 、pH7.3)の直線勾配で溶出した後、7℃、10mL/分で100%S-緩衝液Bへの工程で溶出した。望ましい生成物を含む画分をプールし、0.22μm酢酸セルロースフィルターでろ過した。次に、7℃、2mL/分でPBS中の1mLのAmersham rProtein A HiTrapカラムへ前記プールを負荷した。次に、カラムを20mMの NaH_2PO_4 、pH6.5、1M NaCl の数カラム容積で洗浄し、100mMグリシン、pH3.0で溶出した。溶出ピークへ、3M酢酸ナトリウム0.0125容積(18mL)を添加し、0.22μm酢酸セルロースフィルターで試料をろ過した。

40

【0536】

50

次に、Hewlett Packard 8453分光光度計を使用して、700 μ Lの水中に希釈した組み合わせたプール20 μ Lに対して、スペクトル走査を実施した（図40A）。29, 282 g/molの算出された分子量及び36, 900 $M^{-1} cm^{-1}$ の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が3.20 mg/mLであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス・グリシン4ないし20% SDS-PAGEを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図40B）。次に、50 mM NaH_2PO_4 、250 mM $NaCl$ 、pH 6.9でPhenomenex BioSep SEC3000カラム（7.8 $\times$ 300 mm）へと1 mL/分で注入された生成物50 μ gに対して、280 nmでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図40C）。次に、試料1 μ Lをシナピン酸10 μ L中に希釈する（0.05%トリフルオロ酢酸、50%アセトニトリル中10 mg/mL）ことによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液1 mLをMALDI試料プレート上に点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたVoyager DE-EP飛行時間質量分析装置を使用して分析した（337 nm、3ナノ秒パルス）。25 kVの加速電位で陽イオン/直線モードを使用した。約200のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した（図40D）。次に、生成物を-80 $^{\circ}C$ で保存した。

【0537】

「Fc-L-ShK [2-35]」とも呼ばれる、精製されたE. コリ由来のFc-L10-ShK [2-35]によるヒトKv1.3の遮断のためのIC₅₀を、（本明細書の以下の実施例50における）表35に示す。

【実施例40】

【0538】

細菌で発現したFc-L10-OSK1の精製

冷凍したE. コリペースト（129 g、実施例10参照）を室温の50 mM トリスHCl、5 mM EDTA、pH 7.8の1290 mLと組み合わせ、約0.1 mg/mLのニワトリ卵白色リゾチームへ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置へ12,000 PSIで2回通過させた。次に、4 $^{\circ}C$ 、17, 700 gで15分間、細胞可溶化液を遠心分離した。次に、組織粉碎機を使用して、1%デオキシコール酸1290 mL中にペレットを再懸濁し、4 $^{\circ}C$ 、17, 700 gで15分間遠心分離した。次に、組織粉碎機を使用して、1290 mLの水中にペレットを再懸濁した後、4 $^{\circ}C$ 、17, 700 gで15分間遠心分離した。次に、160 mLの8 M グアニジンHCl、50 mM トリスHCl、pH 8.0中に、ペレット8 g（合計16.3 g）を溶解した。次に、ペレット溶液100 mLを1 M DTT 1 mLとともに、37 $^{\circ}C$ で60分間温置した。再折りたたみ緩衝液（1 M 尿素、50 mM トリス、160 mM アルギニンHCl、2.5 mM EDTA、1.2 mM シスタミンHCl、4 mM システイン、pH 10.5）5000 mLへ、激しく攪拌しながら4 $^{\circ}C$ 、2 mL/分で、還元した材料を移した。次に、攪拌速度を低下させ、温置を4 $^{\circ}C$ で3日間続行した。

【0539】

酢酸を使用して、再折りたたみ液のpHを8.0に調整した。次に、pH調整した材料を0.22 μ m酢酸セルロースフィルターでろ過し、室内の50 Åmer sham Protein Aカラム（内径2.6 cm）で、8 $^{\circ}C$ でQ-緩衝液A（20 mM トリス、pH 8.5）中の50 mLのÅmer sham Qセファロース-FF（内径2.6 cm）カラムへ10 mL/分で負荷した。負荷した後、Qセファロースカラムを回路から除去し、残存するクロマトグラフィーをタンパク質Aカラムで実施した。カラムをQ-緩衝液Aの数カラム容積で洗浄した後、100 mM グリシン、pH 3.0への工程を使用して溶出した。望ましい生成物を含む画分をプールし、S-緩衝液A（20 mM NaH_2PO_4 、pH 7.0）中の50 mLのÅmer sham SP-セファロースHPカラム（内径2.6 cm）へ、8 $^{\circ}C$ 、20 mL/分で即時負荷した。次に、カラムをS-緩衝液Aの

数カラム容積で洗浄した後、5%から60%までのS-緩衝液B(20mMNaH₂PO₄、1MNaCl、pH7.0)の直線勾配の後、100%S-緩衝液Bへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン4ないし20%SDS-PAGEを使用して、画分を分析した。望ましい生成物のバルクを含有する画分をプールした後、8℃、5mL/分で、MEP緩衝液A(20mMトリス、200mMNaCl、pH8.0)中の75mLのMEP Hypercelカラム(内径2.6cm)へ適用した。5%から50%までの直線勾配のMEP緩衝液B(50mMクエン酸ナトリウム、pH4.0)でカラムを溶出した後、100%MEP緩衝液Bへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン4ないし20%SDS-PAGEを使用して、画分を分析し、望ましい生成物のバルクを含有する画分をプ

10

【0540】

次に、10kDaメンブレンを備えたPall Jumbo-Sepを使用して、MEPプールを約20mLまで濃縮した後、同一メンブレンを使用して製剤緩衝液(20mMNaH₂PO₄、200mMNaCl、pH7.0)と緩衝液交換した。次に、Hewlett Packard 8453分光光度計を使用して、700μLの製剤緩衝液中に希釈した組み合わせたプール50μLに対して、スペクトル走査を実施した(図41A)。30, 558g/molの算出された分子量及び35, 720M⁻¹cm⁻¹の吸光係数を使用して、材料の濃度が4.12mg/mLであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン4ないし20%SDS-PAGEを使用して、前記材料の純度を評価した(図41B)。次に、50mMNaH₂PO₄、250mMNaCl、pH6.9でPhenomenex BioSep SEC3000カラム(7.8×300mm)へと1mL/分で注入された生成物123μgに対して、280nmでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した(図41C)。次に、RP-HPLCカラム(Vydac C₄、1×150mm)を通じて試料約4μgをクロマトグラフィーにかけることによって、生成物を質量スペクトル分析へ供した。溶媒Aは、水中の0.1%トリフルオロ酢酸であり、溶媒Bは、90%アセトニトリル、10%水中の0.1%トリフルオロ酢酸であった。80μL/分の流速で、10%溶媒B中でカラムをあらかじめ平衡化した。10%ないし90%の溶媒Bの直線勾配を30分かけて使用して、タンパク質を溶出した。溶出液の一部をLCQイオントラップ質量分析計へ配向させた。質量分析計の製造者によって提供されるBioWorksソフトウェアを使用して、質量スペクトルの逆重畳を行った(図41D)。生成物を0.22μm酢酸セルロースフィルターでろ過した後、-80℃で保存した。

20

30

【0541】

E. コリにより発現されたFc-L10-OSK1プレップの収量は、細胞ペースト40gから(129g×(8g/16.3g)×(100mL/160mL)=39.6g、四捨五入により40g)81mgであり、純度は、SDS-PAGEによって判断すると、80%よりも大きく、SEC-HPLCによって判断する予想されと二量体として走行しており、質量はMSによって判断すると、予想された分子量の範囲内であった。

40

【0542】

精製されたE. コリ由来のFc-L10-OSK1(「Fc-L-OSK1」とも呼ばれる。)によるヒトKv1.3の遮断に対するIC₅₀が、(本明細書の以下の実施例50中の)表35に示されている。

【実施例41】

【0543】

哺乳類細胞によって発現されるFc-L10-OSK1、Fc-L10-OSK1[K7S]、Fc-L10-OSK1[E16K, K20D]、及びFc-L10-OSK1[K7S, E16K, K20D]

Kv1.3の阻害剤であるFc-L10-OSK1、Fc-L10-OSK1[K7S

50

〕、Fc-L10-OSK1 [E16K, K20D]、及びFc-L10-OSK1 [K7S, E16K, K20D]を、哺乳類細胞中で発現させた。リンカー配列及びKv1.3阻害剤ペプチドShK [I-35]の単量体へ、インフレーションで融合されるヒトIgG1のFc領域をコードするDNA配列を後述のように構築した。哺乳類細胞 (HEK293及びチャイニーズハムスター卵巣細胞) からペプチドを産生及び精製するための方法は、本明細書に開示されている。

【0544】

Fc-L10-OSK1、Fc-L10-OSK1 [K7S]、Fc-L10-OSK1 [E16K, K20D] 及びFc-L10-OSK1 [K7S, E16K, K20D] 発現ベクターの構築のために、2つの終止コドンを含む、4つのグリシン及び1つのセリンアミノ酸リンカーへ各々連結され、以下に示されるようにBamHI及びNotI制限部位によって隣接され完全長の遺伝子OSK1、OSK1 [K7S]、OSK1 [E16K, K20D] 及びOSK1 [K7S, E16K, K20D] を作製させるためにPCR戦略を採用した。

10

【0545】

以下に示される配列を含むOSK1、OSK1 [K7S]、OSK1 [E16K, K20D] 及び [K7S, E16K, K20D] OSK1の各々に対する2つのオリゴを、95℃-30秒、55℃-30秒、75℃-45秒で35サイクル、PfuTurbo HotStart DNAポリメラーゼ (Stratagene) を使用するPCR反応において使用した。BamHI (ggatcc) 及びNotI (cgccg) 制限部位に下線が付されている。

20

【0546】

【化58】

OSK1:

フォワードプライマー : cat gga tcc gga gga gga gga agc ggc gtg atc atc aac gtg aag tgc aag atc agc cgc
cag tgc ctg gag ccc tgc aag aag gcc g (配列番号 : 876) ;

リバースプライマー : cat gcg gcc gct tac tac ttg ggg gtg cag tgg cac ttg ccg ttc atg cac ttg ccg aag cgc
atg ccg gcc ttc ttg cag ggc tcc a (配列番号 : 877) ;

30

OSK1[K7S]:

フォワードプライマー : cat gga tcc gga gga gga gga agc ggc gtg atc atc aac gtg agc tgc aag atc agc cgc
cag tgc ctg gag ccc tgc aag aag gcc g (配列番号 : 878) ;

リバースプライマー : cat gcg gcc gct tac tac ttg ggg gtg cag tgg cac ttg ccg ttc atg cac ttg ccg aag cgc
atg ccg gcc ttc ttg cag ggc tcc a (配列番号 : 879) ;

40

OSK1[E16K,K20D]:

フォワードプライマー : cat gga tcc gga gga gga gga agc ggc gtg atc atc aac gtg aag tgc aag atc agc cgc
cag tgc ctg aag ccc tgc aag gac gcc g (配列番号 : 880) ;

リバースプライマー : cat gcg gcc gct tac tac ttg ggg gtg cag tgg cac ttg ccg ttc atg cac ttg ccg aag cgc
atg ccg gcc ttc ttg cag ggc ttc a (配列番号 : 881) ;

50

OSK1[K7S,E16K,K20D]:

フォワードプライマー: cat gga tcc gga gga gga gga agc ggc gtg atc atc aac gtg agc tgc aag atc agc cgc
cag tgc ctg aag ccc tgc aag gac gcc g (配列番号: 882) ;

リバースプライマー: cat gcg gcc gct tac tac ttg ggg gtg cag tgg cac ttg ccg ttc atg cac ttg ccg aag cgc

atg ccg gcg tcc ttg cag ggc ttc a (配列番号: 883)

【0547】

得られたPCR産物を、4%アガロースゲル上で155bpバンドとして分離した。PCR精製キット(Qiagen)を使用して155bpPCR産物を精製した後、BamHI及びNotI(Roche)制限酵素で消化し、アガロースゲルをゲル抽出キット(Qiagen)によって精製した。同時に、pCDNA3.1(+)-CMV-*hFcsk* [2-35]ベクターをBamHI及びNotI制限酵素で消化し、大きな断片をゲル抽出キットによって精製した。ゲル精製されたPCR断片を、精製された大きな断片へ連結し、Top10F'(Invitrogen)中に形質転換した。形質転換された細菌コロニー由来のDNAを単離し、BamHI及びNotI制限酵素で消化し、2%アガロースゲル上で分離した。予想されたパターンを生じるDNAを配列決定へ供した。クローンの数個の配列の分析は、上述の配列と100%一致したが、大規模プラスミド精製のために各遺伝子から1つのクローンのみを選択した。Fc及びリンカー領域を確認するため、pCMVベクター中のFc-L10-OSK1、Fc-L10-OSK1 [K7S]、Fc-L10-OSK1 [E16K, K20D]、及びFc-L10-OSK1 [K7S, E16K, K20D]のDNAを再配列決定し、配列は上述の配列と100%同一であった。Fc-L10-OSK1、Fc-L10-OSK1 [K7S]、Fc-L10-OSK1 [E16K, K20D]、及びFc-L10-OSK1 [K7S, E16K, K20D]の配列及び模式図による表示を、図42AないしB、図43AないしB、図44AないしB及び図45AないしBにそれぞれ示す。

【0548】

pCMVタンパク質中のFc-L10-OSK1、Fc-L10-OSK1 [K7S]、Fc-L10-OSK1 [E16K, K20D]及びFc-L10-OSK1 [K7S, E16K, K20D]の一過性形質移入発現において使用されるHEK-293細胞を、DMEM高グルコース(Gibco)、10%ウシ胎仔血清(FBS、Gibco製)、1×非必須アミノ酸(NEAA、Gibco製)及び1×ペニシリン/ストレプトマイシン/グルタミン(Pen/Strep/Glu、Gibco製)を含有する増殖培地中で培養した。FuGENE6(Roche)を使用して、フェノール/クロロホルム抽出されたpCMVプラスミド中のFc-L10-OSK1、Fc-L10-OSK1 [K7S]、Fc-L10-OSK1 [E16K, K20D]、及びFc-L10-OSK1 [K7S, E16K, K20D]各5.6µgを、HEK-293細胞中に形質移入した。細胞を24時間回復させた後、DMEM高グルコース、1×NEAA及び1×Pen/Strep/Glu培地中に配置した。本明細書の以下の実施例50に記載のプロトコールを使用して、これらの形質移入されたHEK-293細胞によって、Fc-L10-OSK1 [K7S]、Fc-L10-OSK1 [E16K, K20D]及びFc-L10-OSK1 [K7S, E16K, K20D]を培養上清から精製した。

【0549】

培養上清15µLを自家4×負荷緩衝液(β-メルカプトエタノールなし)と混合し、Novex Xcell II装置を使用して、BenchMark染色済みタンパク質ラダー(Invitrogen)20µLとともに5×ランニング溶液(25mMトリス塩基、192mMグリシン、3.5mM SDS)中で101V/46mAで2時間、Novex 4ないし20%トリス-グリシンゲル上で電気泳動した。次に、エレクトロブロット緩衝液(25mMトリス塩基、192mMグリシン、20%メタノール)中に、ゲルを

10

20

30

40

50

5分間浸漬した。エレクトロブロット緩衝液中に、Invitrogen製ニトロセルロースメンブレン（カタログ番号LC200、孔サイズ0.2 μm ）を浸漬した。製造者の説明書（Bio-Rad Laboratories）に従って、Mini Trans-Blot Cellモジュールを使用して、あらかじめ浸漬されたゲルを、PVDFメンブレンへ300mAで2時間ブロットした。0.1%トウイーン20含有トリス緩衝塩類溶液、pH7.5（TBST）中でブロットをすすいだ。次に、まずTBST中の5%ミルク（Carnation）中に、室温で1時間、ブロットを浸漬した後、1回の洗浄につき10分間で3回、TBST中で洗浄した。次に、5%ミルク緩衝液を加えたTBST中のHRPの結合したヤギ抗ヒトIgG（Fc γ ）抗体（Pierce Biotechnologyカタログ番号31413）の1:1000希釈とともに、室温で1時間振とうしながら温置した。次に、室温で1回の洗浄につき15分間、TBST中で3回、ブロットを洗浄した。製造者の説明書に従ってAmersham Pharmacia BiotechのECLウェスタンブロット検出試薬を使用して、一次抗体を検出した。ECL検出に際し、ウェスタンブロット分析は、非還元型ゲル条件下で66kDaの予想されたサイズを表示した（図46）。

【0550】

pCMViベクター中のFc-L10-OSK1、Fc-L10-OSK1 [K7S]、Fc-L10-OSK1 [E16K, K20D] 及びFc-L10-OSK1 [K7S, E16K, K20D] インサートを含むプラスミドを、XbaI及びNotI（Roche）制限酵素で消化し、ゲル精製した。SpeI及びNotI及びSalI（Roche）で消化したpDSR α -24（Amgen Proprietary）発現ベクターへ、前記インサートを個々に連結した。得られるコンストラクトの完全性をDNA配列決定によって確認した。クロンの数個の配列の分析は、上述の配列と100%の一致を与えたが、大規模プラスミド精製のために1つのクロンのみを選択した。

【0551】

Fc-L10-OSK1タンパク質の安定した発現において使用されるAM1 CHOd（Amgen Proprietary）細胞を、DMEM高グルコース、10%ウシ胎仔血清、1 $\times$ ヒポキサンチン/チミジン（HT、Gibco製）、1 $\times$ NEAA及び1 $\times$ Pen/Strep/Gluを含むAM1 CHOd増殖培地中で、Fc-L10-ShK [1-35] タンパク質の安定した発現に使用されるAM1 CHOd（Amgen Proprietary）細胞を培養した。FuGene6を使用して、pDSR α -24-Fc-L10-OSK1プラスミド5.6 μg をAM1 CHOd細胞に形質移入した。形質移入から24時間後、DHFR選択培地（DMEM高グルコースプラス10%透析済みウシ胎仔血清（dFBS）、1 $\times$ NEAA及び1 $\times$ Pen/Strep/Glu）中へ、細胞を1:11で分割し、コロニー選択の場合には1:50で分割した。DHFR選択培地中で13日間、細胞選択した。得られたコロニーの10個の10 cm^2 プールを10個のT-175フラスコへ展開した後、10個のローラー瓶にスケールアップし、AM1 CHOd産生培地（DMEM/F12（1:1）、1 $\times$ NEAA、1 $\times$ ピルビン酸ナトリウム（ピルビン酸Na）、1 $\times$ Pen/Strep/Glu及び1.5% DMSO）のもとで培養した。馴化培地を回収し、1週間置きに交換した。得られた馴化培地6Lを0.45 μm 酢酸セルロースフィルター（Corning、Acton、MA）でろ過し、図47に示されるようにSDS-PAGE分析によって特徴付けた。次に、精製のために、Protein Chemistryに移した。

【0552】

DHFR選択培地上で13日後に、12個のコロニーを選択し、1個の24ウェルプレートへと摘出した。前記プレートを1週間増殖させた後、AM1 CHOd産生培地へ、48ないし72時間移し、培養上清を回収した。培養上清5 μL をスクリーニングするため、同一のHRP結合型ヤギ抗ヒトIgG（Fc γ ）抗体によって検出する一過性ウェスタンブロット分析と同様のウェスタンブロッティングによって、発現レベルを評価した。12個の全ての安定したクロンは、66kDaの予想されたサイズでの発現を示した。2

10

20

30

40

50

つのクローン、A 3 及び C 2 を選択し、一次クローン C 2 に対するバックアップとしての A 3 とともに凍結するため、T 1 7 5 フラスコへ展開した（図 4 8）。

【0 5 5 3】

選択培地を使用して、C 2 クローンを 1 5 個のローラー瓶（C o r n i n g）へスケールアップし、集密状態まで増殖させた。次に、培地を産生培地と交換し、1 週間温置させた。馴化培地を採集し、1 週間置きに交換した。0. 4 5 μ m 酢酸セルロースフィルター（C o r n i n g、A g t o n、MA）で、得られた培養上清 1 5 L をろ過し、S D S - P A G E 分析によって特徴付けた（データ非表示）。以下の本明細書の実施例 4 2 に記載されているとおり、さらなる精製を行った。

【実施例 4 2】

【0 5 5 4】

哺乳類細胞によって発現された F c - L 1 0 - O S K 1、F c - L 1 0 - O S K 1（K 7 S）、F c - L 1 0 - O S K 1（E 1 6 K、K 2 0 D）及び F c - L 1 0 - O S K 1（K 7 S、E 1 6 K、K 2 0 D）の精製

F c - L 1 0 - O S K 1 の精製

CHO（AM1 CHO d-）細胞培養上清約 6 L（上述の実施例 4 1 参照）を、3 5 mL のモノクローナル抗体選択カラム（G E H e a l t h c a r e）へ、7 $^{\circ}$ C、1 0 mL / 分で負荷し、二価の陽イオンを有さないダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液（P B S）の数カラム容積で前記カラムを洗浄し、1 0 0 mM グリシン、pH 3. 0 にする工程で試料を溶出した。S - 緩衝液 A（2 0 mM N a H ₂ P O ₄、pH 7. 0）中の室内の 6 5 m L の S P - H P カラム（G E H e a l t h c a r e）へ、7 $^{\circ}$ C、1 0 mL / 分で、モノクローナル抗体選択溶出液を直接負荷した。モノクローナル抗体選択カラムをはずした後、数カラム容積の S - 緩衝液 A で、S P - H P カラムを洗浄した後、5 % から 6 0 % までの S - 緩衝液 B（2 0 mM N a H ₂ P O ₄、1 M N a C l、pH 7. 0）の直線勾配を 1 0 mL / 分で使用して展開した後、7 $^{\circ}$ C で 1 0 0 % S - 緩衝液 B への工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス-グリシン 4 ないし 2 0 % S D S - P A G E を使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした。次に、P a l l L i f e S c i e n c e s J u m b o s e p

1 0 K O m e g a 遠心限外ろ過装置を使用して、プールした材料を約 2 0 mL に濃縮した。次に、2 0 mM N a H ₂ P O ₄、pH 7. 0 の 2 0 mL で希釈することによって、濃縮した材料を緩衝液交換し、J u m b o s e p 1 0 K O m e g a フィルターを使用して 2 0 mL に再濃縮した。次に、2 0 mM N a H ₂ P O ₄、2 0 0 mM N a C l、pH 7. 0 の 2 0 mL で材料を希釈した後、2 2 mL に再濃縮した。次に、緩衝液交換した材料を、室温、1 mL / 分で、0. 2 2 μ m、2 5 mm の M u s t a n g E メンブレンを有する P a l l L i f e S c i e n c e s A c r o d i s c でろ過した。次に、H e w l e t t P a c k a r d 8 4 5 3 分光光度計を使用して、7 0 0 μ L の P B S 中に希釈したろ過済み材料 5 0 μ L に対して、スペクトルの走査を実施した（図 4 9 A、黒のトレース）。3 0, 3 7 1 g / m o l の算出された分子量及び 3 5, 4 1 0 M⁻¹ c m⁻¹ の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が 4. 9 6 m g / m L であることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン 4 ないし 2 0 % S D S - P A G E を使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図 4 9 B）。次に、C h a r l e s R i v e r s エンドトキシン特異的緩衝液中に試料を 3 0 倍希釈したものを使用して、C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s E n d o s a f e - P T S システム（0. 0 5 ないし 5 E U / m L 感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、1. 8 E U / タンパク質 m g であった。次に、5 0 mM N a H ₂ P O ₄、2 5 0 mM N a C l、pH 6. 9 で P h e n o m e n e x B i o S e p S E C 3 0 0 0 カラム（7. 8 $\times$ 3 0 0 mm）へ、1 mL / 分で注入された生成物 1 4 9 μ g に対して、2 8 0 nm での吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図 4 9 C）。次に、試料 1 μ L をシナピン酸 1 0 μ L（0. 0 5 % トリフルオロ酢酸、5 0 % アセトニトリル中 1 0 m g / m L）へと希釈することによ

10

20

30

40

50

って、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液1 mLをMALDI試料プレート上に点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたVoyager DE-RP飛行時間質量分析装置を使用して分析した(337 nm、3ナノ秒パルス)。25 kVの加速電位で陽イオン/直線モードを使用した。約200のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した(図49D)。次に、生成物を-80℃で保存した。

【0555】

哺乳類Fc-L10-OSK1プレップに関する収量は、6 Lから115 mgであり、純度は、SDS-PAGEによる判断によれば90%超であり、Fc-L10-OSK1は、SEC-HPLCによる判断によれば予想された二量体として測定され、質量は、MSによる判断によれば予想された範囲であった。

【0556】

ヒトKv1.3及びヒトKv1.1を遮断する上での精製されたFc-L10-OSK1の活性を、本明細書の以下の実施例43に記載する。

【0557】

Fc-L10-OSK1(K7S)、Fc-L10-OSK1(E16K, K20D)及びFc-L10-OSK1(K7S, E16K, K20D)の精製

形質移入されたHEK-293による培養上清約500 mL(上述の実施例41参照)を、モノクローナル抗体選択樹脂(1.5 mL)(GE Healthcare)の65%スラリー及び500 µLの20%NaN₃と合わせた。次に、スラリーを4℃で3日間静かに攪拌した後、ブレーキを使用せずに4℃、1000 gで5分間遠心分離した。次に、上清の大部分を吸引し、ペレット中に残存するスラリーを14 mLのコニカルチューブへ転移させ、二価の陽イオンを含まないダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液(PBS)12 mLと組み合わせた。低ブレーキを使用しながら、前記スラリーを4℃、2000 gで1分間遠心分離し、上清を吸引した。PBS洗浄周期をさらに3回反復した。次に、100 mMグリシン、pH 3.0の1 mLを添加し、室温で静かに5分間攪拌することによって、結合されたタンパク質を溶出した。次に、低ブレーキを使用しながら、前記スラリーを4℃、2000 gで1分間遠心分離し、上清を第一溶出液として吸引した。溶出周期をさらに2回反復し、3つの全上清を合わせて単一プールとした。pHを上昇させるために、酢酸ナトリウム(3 M溶液37.5 µL)を溶出プールへ添加した後、10 kDa Slide Analyzer(Pierce)を使用して、10 mM酢酸、5%ソルビトール、pH 5.0に対して室温で2時間透析した。透析緩衝液を交換し、透析を4℃で一晩続行した。次に、0.22 µm酢酸セルロースフィルターシリンジフィルターで、透析した材料をろ過した。次に、30, 330の算出された分子量及び35, 410 M⁻¹ cm⁻¹の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が1.27 mg/mLであると測定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン4ないし20%SDS-PAGEを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した(図50B)。次に、Charles Riversエンドトキシン特異的緩衝液中に試料を25倍希釈したものを使用して、Charles River Laboratories Endosafe-PTSシステム(0.05ないし5 EU/mL感度)を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、1 EU/タンパク質mg未満であった。次に、50 mM NaH₂PO₄、250 mM NaCl、pH 6.9でPhenomenex BioSep SEC3000カラム(7.8×300 mm)へと1 mL/分で注入された生成物50 µgに対して、280 nmでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した(図50C)。次に、試料1 µLをシナピン酸10 µL(0.05%トリフルオロ酢酸、50%アセトニトリル中10 mg/mL)中に希釈することによって、生成物を質量スペクトル分析へ供した。得られた溶液1 mLをMALDI試料プレート上に点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたVoyager DE-RP飛行時間質量分析装置を使用して分析した(337 nm、3ナノ秒パルス)。25 kV

10

20

30

40

50

の加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約200のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した（図50D）。次に、生成物を−80℃で保存した。

【0558】

図51AないしDは、以下の点を除いて、Fc-L10-OSK1（K7S）分子に関するものと同一プロトコルを使用して実施した、Fc-L10-OSK1（E16K, K20D）に対する精製及び分析からの結果を示す。30, 357 g/molの算出された分子量及び35, 410の算出された吸光係数を使用して、濃度は1.59 mg/mLであることが明らかとなった。発熱物質レベルは、32倍希釈を使用して、1 EU/mg未満であることが明らかとなった。

10

【0559】

図52AないしDは、以下の点を除いて、Fc-L10-OSK1（K7S）分子（上述）に関するものと同一プロトコルを使用して実施した、Fc-L10-OSK1（K7S, E16K, K20D）に対する精製及び分析からの結果を示す。30, 316 g/molの算出された分子量及び35, 410の算出された吸光係数を使用して、濃度は0.81 mg/mLであることが明らかとなった。発熱物質レベルは、16倍希釈を使用して、1 EU/mg未満であることが明らかとなった。

【0560】

ヒトKv1.3及びヒトKv1.1を遮断する上での精製されたFc-L10-OSK1 [K7S]、Fc-L10-OSK1 [E16K, K20D] 及びFc-L10-OSK1 [K7S, E16K, K20D] の活性を、本明細書の以下の実施例43に記載する。

20

【実施例43】

【0561】

OSK1及びOSK1ペプチボディ類縁体の電気生理学

カリウムチャネルファミリーのサブタイプであるヒトKv1.1及びKv1.3チャネルに及ぼす影響を評価するために、アジアサソリであるオルトキルススクロビキュロサス（*Orthochirus scrobiculosus*）の毒液の38残基ペプチド毒素（OSK1）を合成した（実施例41参照）。HEK293細胞発現系及び電気生理学の使用によって、ヒトKv1.1及びKv1.3チャネルを阻害する上での合成OSK1の有効性及び選択性を評価した（図53）。安定して発現したKv1.3チャネルのホールセルパッチクランプ記録によって、合成OSK1ペプチドは、Kv1.1と比較したとき、ヒトKv1.3を阻害する上でより有力であることが明らかとなった（表33）。

30

【0562】

OSK1ペプチボディを作製するための、抗体へのOSK1ペプチド毒素の融合

血漿半減期を改善し、OSK1ペプチド毒素が中枢神経系を貫通するのを防止するため、本明細書の実施例41に記載されるとおり、10個のアミノ酸残基のリンカー鎖長を介して、ヒト抗体IgG1のFc断片へOSK1ペプチド毒素を融合した。この融合によって、合成OSK1ペプチドと比較すると、Kv1.3の有効性は5倍まで低下した。しかしながら、合成ペプチド単独のもの（4倍、表33及び図54）と比較すると、OSK1のKv1.1に対する選択性は210倍まで有意に改善した。

40

【0563】

OSK1ペプチボディ（Fc-L10-OSK1）の修飾

OSK1は、集合的にα-KTx3と呼ばれるサソリ毒素の他のメンバーと60ないし80%の配列相同性を共有する。OSK1及びα-KTx3ファミリーの他のメンバーの配列アラインメントによって、位置12、16、20及び36における4つの異なる構造的な差異が明らかとなった。OSK1のこれらの構造的な差異は、他のカリウムチャネルに対するそれらの多様な活性において重要な役割を果たしているものと推測され、これは、α-KTx3ファミリーの他のメンバーでは観察されない。従って、Kv1.2とのへ

50

テロ四量体として、主に中枢神経系中に見出されるKv1.1などの他のカリウムチャネルに対する選択性に及ぼす影響を評価するために、位置16及び20に存在する2つのアミノ酸残基を、OSK1配列内のより保存されたアミノ酸残基へと回復させた。それぞれ保存されたリジン及びアスパラギン酸残基を、位置16のグルタミン酸、及び位置20のリジンと置換することによって（すなわち、Fc-L10-OSK1 [E16K, K20D]）、Fc-L10-OSK1の効力と比較したとき、効力に有意な変化は観察されなかった（1.3倍差、図56及び表33）。しかしながら、この二重変異によって、Kv1.1に対する遮断活性が排除された。Kv1.1/Kv1.3の選択性の比は403倍であり、Fc-L10-OSK1に関する選択比（210倍）に比べて有意に向上した。位置7のリジンからセリンへの単一アミノ酸突然変異（Fc-L10-OSK1 [K7S]）は、Fc-L10-OSK1の有効性及び選択性と比較すると、有効性及び選択性が、それぞれ2倍及び1.3倍までわずかに変化した（図55及び表33）。Fc-L10-OSK1 [K7S, E16K, K20D]を作製させるために、3つの残基全てを突然変異させると、有効性が著しく低下した（図57及び表33）。

【0564】

表33の結果によって示されるように、ヒト抗体IgG1のFc断片へOSK1ペプチド毒素を融合させることによって、Kv1.1に対する選択性が劇的に改善されたが、Kv1.3に対する標的有効性は低下した。2つの重要な位置にある2残基が α -KTx3ファミリーの他のメンバーで見られる保存された残基へ回復されると、Kv1.1に対する選択性をさらに改善した。

【0565】

【表34】

表33は、hKv1.3及びhKv1.1チャネルに対するOSK1及びOSK1類縁体のIC₅₀値の要約を示している。全ての類縁体は、hKv1.3に対する有効性に基づいて順位付けされる。全てのOSK1類縁体に関するhKv1.1/hKv1.3の選択性の比も表に示される。

化合物	hKv1.3:IC ₅₀ [pM]	hKv1.1:IC ₅₀ [pM]	hKv1.1/hKv1.3
合成 OSK1	39	160	4
Fc-L10-OSK1	198	41600	210
Fc-L10-OSK1 [E16K, K20D]	248	100000	403
Fc-L10-OSK1 [K7S]	372	100000	269
Fc-L10-OSK1 [K7S, E16K, K20D]	812	10000	12

【実施例44】

【0566】

ラットにおけるPEG-ShK [1-35] 分子の薬物動態学的研究

約24kDaの20K-PEG-ShK [1-35] 分子及び約4kDaの小固有ShKペプチドの静脈内（IV）薬物動態学的特性を、スプラグドロー系ラットで測定した。固有ShKペプチド及び新規の本発明の20K-PEG-ShK [1-35] 分子に関するIV用量は、1mg/kgであった。この用量は、これら2つの分子の等しいモル量を表した。ラットの平均体重は約0.3kgであり、用量及び分子に関して各2匹のラットを使用した。IV注射後の多様な時点で採血し、血清約0.1mLを回収した。分析時まで、血清試料を-80℃で冷凍保存した。

【0567】

電気生理学のためのアッセイプレート調製

薬物動態学的研究由来の20K-PEG-ShK [1-35] 分子又は固有ShKペプ

チドを含有するラット血清試料を凍結した。実験前に、各試料を室温で解凍し、一定分量（70ないし80 μ L）を96ウェルポリプロピレンプレート中の1ウェルへ転移させた。アッセイプレートを調製するため、検査溶液を付与するために、薬物動態学的血清試料から何回も希釈した。薬物動態学的研究由来の血清試料を、10%リン酸緩衝塩類溶液（PBS、 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} 含有）へと希釈した。薬物動態学的研究から得られた血清試料中の新規の本発明の20K PEG-ShK [1-35] 分子の量を測定する場合、検査溶液中の血清最終濃度は、90%、30%、10%、3.3%及び1.1%であった。精製された20K PEG-ShK [1-35] 標準阻害曲線も、Assay Plate中に調製した。これを実施するため、精製された20K PEG-ShK [1-35] 分子（標準物質）の8点連続希釈液を、90%、30%、10%、3.3%又は1.1%のラット血清に調製し、標準物質の最終濃度は、50、16.7、5.5、1.85、0.62、0.21、0.068及び0.023 nMであった。

10

【0568】

電気生理学のための細胞調製

電位により活性化される K^+ チャネルであるKv1.3を安定的に発現するCHO細胞を、実験の2日前に、T-175組織培養フラスコ中に（ 5×10^6 個の密度で）播種し、約95%の集密状態まで生育させた。実験の直前に、PBSで細胞を洗浄した後、トリプシン（0.25%）及びベルセン（1:5000）の2mL混合物（1:1容積比）を使用して、37℃で（3分間）剥離させた。その後、フラスコ中で、10%FBS、 $1 \times \text{NEAA}$ 及G418の750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を有する組織培地（Glutamax含有HAMのF-12、Invitrogen、カタログ番号31765）10mL中に細胞を再懸濁し、約1000 rpmで1.5分間遠心分離した。得られた細胞ペレットを、PBS中に、3ないし 5×10^6 細胞/mLで再懸濁した。

20

IonWorks 電気生理学及びデータ分析

CHO-Kv1.3細胞中の K^+ 電流を阻害するための血清中の検査溶液又は標準物質の能力を、自動電気生理学システムIonWorks Quattroを使用して研究した。細胞を再懸濁し、Assay Plate、Population Patch Clamp（PPC）Patch Plate並びに適切な細胞内緩衝液（90mMグルコン酸K、20mMKF、2mMNaCl、1mMMgCl₂、10mMEGTA、10mMHEPES、pH7.35）及び細胞外緩衝液（ Ca^{2+} 及び Mg^{2+} 含有PBS）をIonWorks Quattroに配置した。アンフォテリシンベースの穿孔パッチクランプ法を使用して、CHO-Kv1.3細胞からの電気生理学記録を実施した。IonWorks Quattroの電位クランプ回路素子を使用して、細胞を-80mVの膜電位に保持し、+30mVへ400ミリ秒、膜電位を停止させることによって電位活性型 K^+ 電流を惹起させた。対照条件下、すなわち、実験開始時阻害剤の不存在下で、及び検査溶液又は標準物質の存在下での10分間の温置の後に、 K^+ 電流を惹起させた。430ミリ秒と440ミリ秒との間に、平均 K^+ 電流振幅を測定し、Microsoft Excelスプレッドシートへ、データを転送した。検査溶液又は標準物質の各濃度の存在下での K^+ 電流の振幅を、同一ウェル中の対照条件下での K^+ 電流の百分率として表した。

30

【0569】

ラット血清の多様なレベルの各標準物質に対して標準物質阻害曲線を作製し、対照の電流百分率（POC）対nM濃度の対数として表した。対照の百分率（POC）は、阻害と逆相関しており、ここで、100POCは阻害が全く存在せず、0POCは100%阻害である。検査溶液内での薬物濃度の算出を可能にする方程式を導くために、前記曲線の選択された領域にわたる線形回帰を使用した。検査溶液中の薬物の濃度を算出するため、標準曲線の線形部分内の電流値のみを使用した。血清の所定レベルでの対応する標準曲線を、薬物レベルを算出するときの検査溶液の血清の同一レベルと常に比較した。ShK及び20K PEG-ShK [1-35] に対する標準曲線が、それぞれ図58A及び図58Bに示されており、各図は、血清の所定の百分率での各標準物質に対する線形回帰方程式を含んでいる。20K PEG-ShK [1-35] 標準曲線については、標準曲線の線

40

50

形部分は20POCから70POCまでであり、検査溶液内での薬物濃度を算出するため、この範囲内に収まる検査溶液から得られた電流値のみを使用した。

【0570】

静脈内注射後における、本発明の新規20K PEG ShK [1-35] 分子の薬物動態学的特性を図59に示す。この曲線から、前記分子の終末半減期 ($t_{1/2b}$) は、6時間と12時間の間の長さであると推定される。48時間を超えると、薬物のレベルは、標準曲線の線形範囲の外側に収まり、算出されない。本発明の新規20K PEG-ShK [1-35] 分子の算出された6ないし12時間の半減期は、C. Beeton et al. [C. Beeton et al. (2001) Proc. Natl Acad. Sci. 98, 13942-13947] によって以前に報告された固有のShK分子の約0.33時間 (又は20分) の半減期よりも実質的に長く、これは治療用分子の望ましい特徴である。ShK対20K PEG-ShK [1-35] の等モルの静脈内注射後のKv1.3阻害剤の相対的なレベルの比較を、図60に示す。5%血清検査溶液を検討する前記図から明らかなように、20K PEG-ShK [1-35] 分子は、24時間超の間、Kv1.3電流の有意な抑制 (70POC未満) を示したのに対し、固有なShKペプチドは、最初の1時間にKv1.3電流の阻害の有意なレベルを示したに過ぎず、1時間を超えると有意な遮断を示さなかった。本データは、自己免疫疾患の治療用治療薬としての20K PEG ShK [1-35] の望ましい特徴を再び示している。

【実施例45】

【0571】

PEG化された毒素ペプチドは、動物モデルにおいて重度の自己免疫性脳脊髄炎を抑制した

Kv1.3の20K PEG-ShK阻害剤は、ラットにおける重度の自己免疫性脳脊髄炎を抑制する上で改善された有効性を示す。以前に記載された多発性硬化症の適応性転移型実験的自己免疫性脳脊髄炎 (A T-E A E) モデル [C. Beeton et al. (2001) J. Immunol. 166, 936] を使用して、本発明者は、本発明の新規20K PEG-ShK分子のインビボでの活性を検討し、その有効性をShK毒素ペプチド単独の有効性と比較した。研究デザインを図61に図示する。本インビボ研究からの結果を図62及び図63に示す。第1日から第3日まで10 μ g/kgで毎日皮下送達される20K PEG-ShK分子は、疾病の重度を有意に低下させ、生存性を亢進したのに対し、小さなShKペプチドの等モル投与量 (10 μ g/kg) で処理した動物は、重度の疾病を発症し、死亡した。

【0572】

35個のアミノ酸の毒素ペプチドShK (スティコダクチラ・ヘリアンサス (Stichodactyla helianthus) 神経毒) をBachem Bioscienceから購入し、Kv1.3を有力に遮断するために電気生理学によって確認した (本明細書の実施例36参照)。20K PEG ShK分子の合成、PEG化、精製は、本明細書に上記されている。ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) に特異的な脳髄性CD4+ラットT細胞系PASは、Evelyn Beraud博士から入手した。インビトロでの前記細胞の維持及びA T-E A Eモデルにおけるそれらの使用は、以前に記載されている [C. Beeton et al. (2001) PNAS 98, 13942]。抗原刺激又はMBP及び照射された胸腺細胞 (2日) による活性化のラウンドを交互に行い、T細胞成長因子による伝播 (5日) によって、PAS T細胞をインビトロで維持した。PAS T細胞 (3×10^5 /mL) は、前記細胞を、10 μ g/mLのMBP及び 1.5×10^6 /mLの同系の照射された (3500ラド) 胸腺細胞とともに温置することを包含した。インビトロでの活性化から2日後に、10ないし 1.5×10^6 個の生存可能なPAS T細胞を、6ないし12週齢の雌のルイスラット (Charles River Laboratories) の尾静脈に注射した。媒体 (PBS中2%ルイスラット血清)、20K PEG-ShK又はShKの毎日の皮下注射を第1日から第3日まで付与し (図61)、第1日は、PAS T細胞の注射 (第0日) の1日前を表す。媒

体で処理されたラットでは、一過性のEAEが、PAS T細胞の注射後4ないし5日目に発症した(図62)。障害剤のレベルの分析のため、第4日目に眼窩後部の出血により、第8日に心臓穿刺により、血清を回収した。第1、4、6及び8日目にラットの体重を測定した。細胞転移当日(第0日)から第3日まで1日に1回、第4日から第8日まで1日に2回、動物を盲検した。各肢及び尾部の不全麻痺の程度の全体的なスコアとして、臨床徴候を評価した。臨床的なスコア化は、0=徴候なし、0.5=遠位跛行尾部、1.0=跛行尾部、2.0=軽度不全対麻痺、運動失調、3.0=中等度不全対麻痺、3.5=片後肢麻痺、4.0=完全後肢麻痺、5.0=完全後肢麻痺及び失禁、5.5=四肢麻痺、6.0=瀕死状態又は死亡であった。5.5のスコアに到達しているラットを安楽死させた。

10

【0573】

EAEの開始前のKv1.3遮断薬PEG-ShKによるラットの処理は、疾病の惹起を遅延させ、疾病の進行を阻害し、用量依存的様式で死亡を予防した(図62)。10 µg/kgのPEG-ShK又は100 µg/kgのPEG-ShKで処理されたラットにおける第4.5日と比較して、媒体単独、10 µg/kgのShK又はPEG-ShK 1 µg/kgで処理したラットにおける疾病の惹起を第4日で観察した。さらに、媒体単独、10 µg/kgのShK又はPEG-ShK 1 µg/kgで処理したラットは全て、5.5以上のEAEスコアで研究を終了するまで重度の疾病を発展させた。対照的に、10 µg/kgのPEG-ShK又は100 µg/kgのPEG-ShKで処理したラットは、2未満の臨床重度スコア平均のピークに到達し、1匹を除く全部のラットが研究の終了時まで生存した。さらに、本発明者は、ラットの体重が疾病の重度と相関することを発見した(図63)。媒体単独、10 µg/kgのShK又はPEG-ShK 1 µg/kgで処理したラットは全部、それぞれ31 g、30 g及び30 gの平均を喪失したのに対して、10 µg/kgのPEG-ShK又は100 µg/kgのPEG-ShKで処理したラットは、それぞれ18 g及び11 gを喪失した。後者の2群中のラットは、研究の終了時までに回復の徴候である体重の増加を表した。10 µg/kgのShK及び10 µg/kgのPEG-ShKで処理したラットは、ShKペプチドのモル当量を受容したことに留意すべきである。非結合型ShKに対してPEG-ShK分子の有意により大きな有効性は、PEG-ShK分子のより大きな安定性及びインビボでの長期間の半減期によるものであるらしい(実施例44参照)。

20

30

【実施例46】

【0574】

Kv1.3アンタゴニストペプチドを包含する組成物は、ヒト全血において炎症を遮断する

IL-2及びIFN-γの分泌に及ぼすKv1.3障害剤の影響を検討するためのエキスピボアッセイ

健常で、投薬を受けていないドナーから、ヘパリンパキュテナー(vacutainer)中にヒト全血を取得した。DMEM完全培地は、0.1%ヒトアルブミン(Bayer 68471番)、55 µM 2-メルカプトエタノール(Gibco)及び1×Pen-Strep-Gln(PSG, Gibco、カタログ番号10378-016)を含有する(L-グルタミン及び25 mM HEPES緩衝液を有する)イスコブDMEMであった。タブシガルジンは、Alomone Labs (Israel)から入手した。カルシウム動員のための4×タブシガルジンの刺激を与えるために、100% DMEM中のタブシガルジンの10 mMストック溶液をDMEM完全培地で40 µM、4×溶液に希釈した。Kv1.3障害剤であるペプチドShK(スティコダシトラ・ヘリアンサス(Stichodactyla helianthus)毒素、カタログ番号H2358)及びBKCa1障害剤であるペプチドIbTx(イベリオトキシン、カタログ番号H9940)はBachem Biosciencesから購入し、Kv1.1障害剤であるペプチドDTX-k(デンドロトキシン-K)はAlomone Labs (Israel)製であった。Kv1.3のCHO由来のFc-L10-ShK[2-35]ペプチド障害剤は、

40

50

実施例4及び実施例39で本明細書に記載されているとおりに入手した。カルシウム阻害剤であるシクロスポリンAをAmgen試料バンクから入手したが、多様な売主からも市販されている。阻害剤の10個の3倍連続希釈を、4倍濃度の最終濃度で、DMEM完全培地中に調製し、96ウェルFalcon3075平底マイクロタイタープレートのウェルに各々50 μ Lを添加した。マイクロタイタープレートの列1ないし5及び7ないし11は阻害剤を含有した（各行は個別の阻害剤の希釈の連続を有した）のに対し、列6中の8個のウェルには、DMEM完全培地単独50 μ Lを添加し、列12の8ウェルには、DMEM完全培地単独100 μ Lを添加した。実験を開始するために、マイクロタイタープレートの各ウェルへ、全血100 μ Lを添加した。次に、プレートを37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で1時間温置した。1時間後、プレートを取り外し、8ウェルであった列12を除き、4倍濃度のタブシガルジン刺激（40 μ M）50 μ Lを、プレートの全ウェルへ添加した。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂に、プレートを48時間再配置した。全血中に分泌されたIL-2及びIFN- γ の量を測定するため、96ウェルプレートの各ウェルからの上清（培養上清）100 μ Lを保存プレートに移した。サイトカイン産生のMSD電気化学発光分析のため、MSD Multi-Spot Custom Coatedプレート（www.meso-scale.com）へ、上清（馴化培地）20 μ Lを添加した。これらのプレート上の作業電極を、4つの捕捉抗体（hIL-5、hIL-2、hIFN γ 及びhIL-4）であらかじめコーティングした。馴化培地20 μ LをMSDプレートへ添加した後、検出抗体及びP4緩衝液の混合物150 μ Lを各ウェルへ添加した。150 μ L混合物は、各1 μ g/mLの4つの検出抗体（hIL-5、hIL-2、hIFN γ 及びhIL-4）20 μ L及び2 $\times$ P4緩衝液130 μ Lを含有した。プレートを覆い、振とうプラットフォーム上に一晚（暗所に）配置した。翌朝、MSD Sector Imagerで、プレートを読み取った。各プレートの列6中の8ウェルには、タブシガルジン刺激のみのみが与えられ、阻害剤が与えられなかったので、プレートに対して「高い」値を算出するために、ここでは、平均MSD反応を使用した。プレートに対して算出された「低い」値は、タブシガルジン刺激及び阻害剤を含有しない列12の8ウェルから得られた平均MSD反応から求められた。対照の百分率（POC）は、刺激されていない対照と刺激された対照に対する反応の測定結果であり、100POCは、タブシガルジン刺激単独の平均反応又は「高い」値と等しい。それ故、100POCは、反応の0%阻害を表す。対照的に、0POCは、反応の100%阻害を表し、刺激が付与されない反応又は「低い」値と等価である。対照の百分率（POC）を算出するため、次式：〔（ウェルのMSD反応）-（「低い値」）〕／〔（「高い値」）-（「低い値」）〕 $\times$ 100を使用する。カーブフィッティングの後、全血中の分子の有効性を阻害曲線（IC）から算出し、IC50は標準的なカーブフィッティングソフトウェアを使用して求めた。本発明者らは、ここに、高処理量のMSD電気化学発光アッセイを用いたサイトカイン産生の測定を記載しているが、当業者は、サイトカイン産生を測定するために、より小さな処理量のELISAアッセイを等しく適用できることに容易に想到する。

【0575】

Kv1.3がCD40L及びIL-2Rの細胞表面活性化を遮断することを示す生体外アッセイ

健常で、投薬を受けていないドナーから、ヘパリンバキュテナー中に、ヒト全血を入手した。DMEM完全培地は、0.1%ヒトアルブミン（Bayer68471番）、55 μ M2-メルカプトエタノール（Gibco）及び1 $\times$ Pen-Strep-Gln（PSG、Gibco、カタログ番号10378-016）を含有する（L-グルタミン及び25mMHepes緩衝液を有する）イスコブDMEMであった。タブシガルジンは、Alomone Labs（Israel）より入手した。カルシウム動員のための4 $\times$ タブシガルジンの刺激を与えるために、100%DMEM中のタブシガルジンの10mMストック溶液をDMEM完全培地で40 μ M、4 $\times$ 溶液に希釈した。Kv1.3阻害剤であるペプチドShK（スティコダシトラ・ヘリアンサス毒素、カタログ番号H2358）及びBKCa1阻害剤であるペプチドIbTx（イベリオトキシン、カタログ番号H994

0) は、B a c h e m B i o s c i e n c e s から購入し、K v 1. 1 阻害剤であるペプチドDTX-k (デンドロトキシン-K) はA l o m o n e L a b s (I s r a e l) 製であった。K v 1. 3 のC H O由来のF c-L 1 0-S h K [2-3 5] ペプチボディ阻害剤を、実施例4 及び実施例3 9 に記載されているとおりに入手した。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンA はA m g e n 試料バンクから入手したが、多様な売主から市販されている。イオンチャネル阻害剤であるS h K、I b T x 又はD T K-k を、D M E M 完全培地中に、望ましい最終濃度の4 ×となるように希釈した(終濃度= 5 0 又は1 0 0 n M) 。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンA も、D M E M 完全培地中に、4 ×最終濃度となるように希釈した(最終濃度= 1 0 μ M) 。9 6 ウェルF a l c o n 3 0 7 5 平底マイクロタイタープレートの適切なウェルへ、D M E M 完全培地又は4 ×阻害剤溶液のいずれか5 0 μ L を添加した。次に、ヒト全血1 0 0 μ L を添加し、プレートを、3 7 °C、5 % C O ₂ で1 時間温置した。1 時間後、プレートを取り外し、阻害剤を含有するプレートの全ウェルへ、4 ×タプシガルジン刺激(4 0 μ M) 5 0 μ L を添加した。阻害剤を含有しないが、D M E M 完全培地のみを含有する幾つかのウェルにタプシガルジンも添加したのに対し、D M E M 完全培地のみを有する他のウェルには、D M E M 完全培地をさらに5 0 μ L 添加した。阻害剤及びタプシガルジン刺激を有しないウェルは、処理されていない「低」対照を相当した。阻害剤を有しないが、タプシガルジン刺激を与えられたウェルは、最大刺激のための対照又は「高」対照に相当した。プレートを、3 7 °C、5 % C O ₂ に2 4 時間再配置した。2 4 時間後、プレートを取り出し、ウェルをF A C S 分析のために処理した。細胞をウェルから摘出し、染色緩衝液(熱失活済みの2 % ウシ胎仔血清を含有するリン酸緩衝塩類溶液) 中で洗浄した。製造者の指示に従って、1 . 5 % ホルムアルデヒド(B D B i o s c i e n c e s) を含有するB D F A C S L y s i n g S o l u t i o n を使用して、赤血球細胞を溶解した。チューブあたり染色緩衝液1 0 0 μ L あたり1 0 0 万個の細胞の濃度で細胞を分配した。まず、ビオチン標識した抗ヒトC D 4 の1 μ L で、細胞を染色し、洗浄した後、1 μ L のストレプトアビジン- A P C、F I T C 標識した抗ヒトC D 4 5 R A、及びフィコエリトリン(P E) 標識した抗ヒトC D 2 5 (I L- 2 R a) 又はP E 標識した抗ヒトC D 4 0 L で同時に染色した。抗体添加工程の間に、細胞を染色緩衝液で洗浄した。全ての抗体は、B D B i o s c i e n c e s (S a n D i e g o、C A) から入手した。各試料に対して、2 万ないし5 万の生存事象を、B e c t o n D i c k i n s o n F A C S C a l i b e r (M o u n t a i n V i e w、C A) フローサイトメーターで回収し、F l o w J o ソフトウェア(T r e e S t a r I n c.、S a n C a r l o s、C A) を使用して分析した。前方向及び側部の散乱特性に基づいて、死滅した細胞、単球及び顆粒球を分析から排除した。

【0576】

図6 4 及び図6 7 は、C D 4 + T 細胞に及ぼすI L- 2 R の活性を抑制したことに加え、K v 1. 3 阻害剤であるS h K 及びF c-L 1 0-S h K [2-3 5] がヒト全血中のI L- 2 分泌を有効に遮断したことを示す。K v 1. 3 阻害剤であるF c-L 1 0-S h K [2-3 5] は、I C 5 0 によって反映されるように、シクロスポリンA よりもヒト全血中のI L- 2 生成を遮断する上で2 0 0 倍超有力であった(図6 4) 図6 5 は、K v 1 . 3 阻害剤が、ヒト全血中のI F N γ の分泌も有力に遮断したことを示し、図6 6 は、T 細胞に及ぼすC D 4 0 L の上方制御をさらに遮断したことを示す。図6 4 ないし6 7 中のデータは、F c-L 1 0-S h K [2-3 5] 分子が3 7 °C で4 8 時間まで全血中で安定であり、炎症反応の強力な遮断を提供したことを示す。K v 1. 3 を標的にし、延長された半減期を有する毒素ペプチド治療薬が、インビボで、長期にわたって、これらの反応の持続的遮断を与えるために探索される。これに対して、K v 1. 3 阻害剤であるペプチドS h K は、全血中で強力な遮断を示した事実にもかかわらず、S h K ペプチドはインビトロで半減期が短く(約2 0 分) (C . B e e t o n e t a l . (2 0 0 1) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 9 8 , 1 3 9 4 2)、それ故、長時間の遮断を提供できない。全血は、動物における反応を予測するための生理的に適切なアッセイに相当する

。ここに記載されている全血アッセイは、患者の投与後の標的適用範囲及び薬物暴露を測定するための薬力学的（PD）アッセイとしても使用できる。これらのヒト全血データは、多発性硬化症、1型糖尿病、乾癬、炎症性腸疾患、接触仲介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、喘息、アレルギー、再狭窄、全身性強皮症、線維症、皮膚硬化症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、炎症性骨吸収、移植片拒絶反応、移植片対宿主病及び狼瘡などの、多様な免疫疾患の治療のための、本発明の組成物の治療的有用性を裏付ける。

【実施例47】

【0577】

PEG化したペプチボディ

実施例を通じて、本発明のPEG化したペプチボディを以下の方法によって作製した。CHOにより発現された、19.2mLのA5S、20mMのNaBH₃CN、pH5中のFcL10-OsK1（19.2mg、分子量30,371Da、0.63μmol）を、38mgのPEGアルデヒド（分子量20kDa、3×、ロット104086）で処理した。密閉した反応混合物を冷温室で一晩攪拌した。Superrose 6 HR 10/30カラム（Amersham Pharmacia Biotech）を使用して、0.4mL/分で0.05Mリン酸塩緩衝液、0.5M NaCl、pH7.0で溶出したSEC HPLCにより、反応の経過中のタンパク質修飾度をモニターした。反応混合物をA5S、pH5で一晩透析した。次に、透析した材料をA5S、pH5中のSP HP FPLCカラム（16/10）へ負荷し、1M NaCl勾配で溶出した。回収した画分をSEC HPLCにより分析し、3つのプール中にプールし、DPBS中へと交換し、濃縮し、官能基検査に供した（表34）。10 20

【0578】

別の実施例において、16.5mLのA5S、20mMのNaBH₃CN、pH5中のFcL10-ShK1（16.5mg、分子量30,065Da、0.55μmol）を44mgのPEGアルデヒド（分子量20kDa、4×、ロット104086）で処理した。密閉した反応混合物を冷温室で一晩攪拌した。Superrose 6 HR 10/30カラム（Amersham Pharmacia Biotech）を使用して、0.4mL/分で0.05Mリン酸塩緩衝液、0.5M NaCl、pH7.0で溶出したSEC HPLCにより、反応の経過中のタンパク質修飾度をモニターした。反応混合物をA5S、pH5で一晩透析した。透析した材料をA5S、pH5中のSP HP FPLCカラム（16/10）へ負荷し、1M NaCl勾配で溶出した。回収した画分をSEC HPLCにより分析し、3つのプール中にプールし、DPBS中へと交換し、濃縮し、官能基検査に供した（表34）。30

【0579】

表34中のデータは、Kv1.3阻害剤としてのPEG化されたペプチボディ分子の有効性を示す。

【0580】

【表 3 5】

表 3 4 は、本明細書で上述した実施例 3 6 に記載されているように、HEK 2 9 3 によるホールセルパッチクランプ電気生理学によって行われた IC 5 0 の測定結果を示す。持続的 IC 5 0 は、 -80 mV から $+30\text{ mV}$ への電位勾配の 4 0 0 ミリ秒後における電流から求められた。2 番プールの試料は、ジ PEG 化されたペプチボディを含み、3 番プールの試料は、モノ PEG 化されたペプチボディを含んだ。

PEG 化されたペプチボディ	プール番号	持続した IC50 (nM)
PEG-Fc-L10-SHK (2-35)	3	0.175 (n=4)
PEG-Fc-L10-SHK (2-35)	2	0.158 (n=4)
PEG-Fc-L10-OSK1	3	0.256 (n=3)
PEG-Fc-L10-OSK1	2	0.332 (n=3)

10

【実施例 4 8】

【0 5 8 1】

PEG 化された毒素ペプチド

ShK 及び Osk-1 の PEG 化、精製及び分析

20

合成 ShK 又は OSK1-1 毒素ペプチドの N 末端での還元的アルキル化によって、ペプチドを選択的に PEG 化した。20 mM シアノ水素化ホウ素ナトリウム及び 20 kDa のモノメトキシ-PEG-アルデヒド (Nektar Therapeutics, Huntsville, AL) の 2 モル過剰量を含む 50 mM NaH_2PO_4 、pH 4.5 反応緩衝液中の 2 mg/mL で、ShK 又は OSK-1 のいずれかの毒素ペプチドを使用して、結合を達成した。結合反応物を室温で一晩攪拌し、その進行を RP-HPLC によってモニターした。完了した反応を、20 mM NaOAc 、pH 4 による 4 倍希釈により停止し、pH 3.5 に調整し、4 °C に冷却した。次に、4 °C で、SP セファロース HP カラム (GE Healthcare, Piscataway, NJ) を使用して、20 mM NaOAc 、pH 4.0 中の直線的な 0 ないし 1 M の NaCl 勾配で溶出して、PEG-ペプチドをクロマトグラフィー精製した (図 6 8 A 及び図 6 8 B)。溶出したピーク画分を SDS-PAGE 及び RP-HPLC により分析し、プールしたものを測定したところ、純度 97 % 超であった。観察される主な夾雑物質は、ジ PEG 化した毒素ペプチド及び修飾されていない毒素ペプチドであった。3 kDa MWCO 膜に対する遠心ろ過によって、選択されたプールを 2 ないし 5 mg/mL に濃縮し、5 % ソルビトールを有する 10 mM NaOAc 、pH 4 中へと透析した。次に、透析したプールを 0.2 ミクロンフィルターでろ過滅菌し、SDS-PAGE 及び RP-HPLC によって純度が 97 % 超であることを決定した (図 6 9 A 及び図 6 9 B)。0.1 % TFA/ H_2O 中の Zorbax 5 μm 300 SB-C8 4.6 $\times$ 50 mm カラム (Phenomenex) を 1 mL/分で稼動させ、カラム温度を 40 °C に維持した Agilent 1100 モデル HPLC で、逆相 HPLC を実施した。PEG-ペプチドの試料 (20 μg) を注入し、直線的な 6 ないし 60 % 勾配中に溶出する間、215 nm 及び 280 nm の波長でモニターした。

30

40

【0 5 8 2】

ホールセルパッチクランプによって実施される電気生理学的実験 (実施例 3 6 参照) は、ヒト Kv1.3 チャネルを安定して発現する HEK 2 9 3 細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断において、PEG-OSK1 は 1.285 nM の、PEG-ShK [1-35] は 0.169 nM のピーク IC50 を生じた (図 7 4)。「20 K の PEG-ShK [1-35]」及び「PEG-ShK」とも呼ばれる精製された PEG-ShK [1-35] 分子は、小さな ShK ペプチドよりもインビボでの半減期が非常に長

50

かった（図59及び図60）。PEG-S h K [1-35] はラットにおいて重度の自己免疫性脳脊髄炎を抑制し（実施例45、図61ないし63）、小さな固有のS h Kペプチドよりも大きな有効性を示した。

【実施例49】

【0583】

S h K及びO S K 1 毒素ペプチドのF c ループ挿入

図70、図71、図72及び図73に例示されているように、G e g g e t a l . , M o d i f i e d F c m o l e c u l e s , W O 2 0 0 6 / 0 3 6 8 3 4 A 2 [P C T / U S 2 0 0 5 / 0 3 4 2 7 3] 中の実施例1に公開されている方法に従って、配列D₁₃₇E₁₃₈L₁₃₉T₁₄₀K₁₄₁として定義されるヒトI g G 1 F c-ループドメイン中にジスルフィドにより抑制される毒素ペプチドを挿入した。3つの連結されたドメインを有する典型的なF c ループ-L 2-O s K 1-L 2、F c ループ-L 2-S h K-L 2、F c ループ-L 2-S h K-L 4及びF c ループ-L 4-O s K 1-L 2を調製した。これらを回収、精製し、官能基検査へ供した。

【0584】

これらの実施例に関するペプチド挿入は、F c 残基L e u₁₃₉とT h r₁₄₀との間であり、挿入されたペプチドのいずれかの側に隣接するリンカーとして2ないし4個のG l y 残基を包含した。しかしながら、本分野で公知のように、例えばG e g g e t a l . , M o d i f i e d F c m o l e c u l e s , W O 2 0 0 6 / 0 3 6 8 3 4 A 2 [P C T / U S 2 0 0 5 / 0 3 4 2 7 3] の実施例13に記載されるとおり、ヒトI g G 1 F c 配列に関する代替的な挿入部位又は異なるリンカーも、本発明の実施においても有用である。

【実施例50】

【0585】

E . コリからのS h K (2 - 3 5) - L - F c の精製

本明細書の上述の実施例16に記載されるように入手された冷凍したE . コリペースト（117g）を、室温の50mMトリスH C l、5mM E D T A、p H 7 . 5の1200mLと組み合わせ、約0 . 1mg/mLのニワトリ卵白色リゾチームへ添加した。冷却した懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置に12, 000 P S Iで2回通過させた。次に、4℃、17, 700gで30分間、細胞可溶化液を遠心分離した。次に、組織粉碎機を使用して、ペレットを1%デオキシコール酸1200mL中に再懸濁した後、4℃、17, 700gで30分間遠心分離した。次に、組織粉碎機を使用して、ペレットを1200mLの水中に再懸濁した後、4℃、17, 700gで30分間遠心分離した。次に、ペレット6 . 4g（合計14 . 2g）を128mLの8MグアニジンH C l、50mMトリスH C l、p H 8 . 0中に溶解した。次に、ペレット溶液を1MのD T T 0 . 67mLとともに、37℃で60分間温置した。還元した材料を4℃、2mL/分で再折りたたみ緩衝液（3M尿素、50mMトリス、160mMアルギニンH C l、2 . 5mM E D T A、2 . 5mMシスタミンH C l、4mMシステイン、p H 9 . 5）5500mLへと、激しく攪拌しながら移した。次に、攪拌速度を低下させ、温置を4℃で3日間続行した。

【0586】

再折りたたみ液を水5 . 5Lで希釈し、酢酸を使用してp Hを8 . 0に調整した後、溶液を0 . 22µm酢酸セルロースフィルターでろ過し、室内の35mLのA m e r s h a m M a b S e l e c t カラム（内径2 . 6cm）で、8℃でQ-緩衝液A（20mMトリス、p H 8 . 5）中の35mLのA m e r s h a m Qセファロース-FF（内径2 . 6cm）カラムへ10mL/分で負荷した。負荷した後、Qセファロースカラムを回路から除去し、残存するクロマトグラフィーをM a b S e l e c t カラムで実施した。カラムをQ-緩衝液Aの数カラム容積で洗浄した後、100mMグリシン、p H 3 . 0への工程を使用して溶出した。望ましい生成物を含有する画分を8℃でS-緩衝液A（10mM N a H₂ P O₄、p H 7 . 0）中の5 . 0mLのA m e r s h a m S P-セファロースHPカラムへ5 . 0mL/分で直ちに負荷した。次に、クーマシーブリリアントブルー

染色したトリスーグリシン4ないし20%SDS-PAGEを使用して、画分を分析した。望ましい生成物のバルクを含有する画分をプールした後、8℃でMEP緩衝液A（20mMトリス、200mMNaCl、pH8.0）中の50mLのMEP Hypercelカラム（内径2.6cm）へ10mL/分で適用した。5%ないし50%の直線勾配のMEP緩衝液（50mMクエン酸ナトリウム、pH4.0）で、カラムを溶出した後、100%MEP緩衝液Bへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリスーグリシン4ないし20%SDS-PAGEを使用して画分を分析し、望ましい生成物のバルクを含有する画分をプールした。

【0587】

次に、10kDaメンブレンを有するPall Jumbo-Sepを使用して、MEPプールを約10mLに濃縮した。次に、Hewlett Packard 8453分光光度計を使用して、700μLのPBS中に希釈した組み合わせたプール50μLに対して、スペクトル走査を実施した（図76A）。次に、30, 253の算出された分子量及び36, 900M⁻¹cm⁻¹の吸光係数を使用して、材料の濃度が3.7mg/mLであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリスーグリシン4ないし20%SDS-PAGEを使用して、材料の純度を評価した（図76B）。次に、50mMNaH₂PO₄、250mMNaCl、pH6.9中のPhenomenex BioSep SEC3000カラム（7.8×300mm）へと1mL/分で注入された生成物70μgに対して、280nmでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図76C）。次に、RP-HPLCカラム（Vydac C₄、1×150mm）を通じて、試料約4μgをクロマトグラフィーにかけることによって、生成物を質量スペクトル分析へ供した。溶媒Aは、水中の0.1%トリフルオロ酢酸であり、溶媒Bは、90%アセトニトリル、10%水中の0.1%トリフルオロ酢酸であった。80μL/分の流速で、10%溶媒B中でカラムをあらかじめ平衡化した。質量分析計の製造者によって提供されるBioWorksソフトウェアを使用して、質量スペクトルの逆重畳を行った（図76D）。生成物を0.22μm酢酸セルロースフィルターでろ過した後、-80℃で保存した。

【0588】

表35では、E. コリ由来の精製されたShK[2-35]-L-Fcに関するIC50データを、本発明の組成物の他の幾つかの実施形態と比較する。

【0589】

10

20

30

【表 3 6】

表 3 5 N末端又はC末端のいずれかにFcを含有するE. コリ由来の組換えFc-L-ShK [1-35]、Fc-L-ShK [2-35]、Fc-L-OSK1、Shk [1-35]-L-Fc及びShk [2-35]-L-Fcペプチドは、ヒトKv 1. 3の強力な遮断を示す。CHO由来のFc-L10-ShK [1-35] R1Q突然変異体の活性も示す。実施例 3 6に記載されている方法によって、HEK 2 9 3/Kv 1. 3細胞を使用して、ホールセルパッチクランプ電気生理学(WCVC)を実施し、示されるIC50は、3個以上の細胞由来の用量-反応曲線からの平均である。実施例 4 4に記載されている方法によるIonWorks (商標) (IWQ) 平面型パッチクランプ電気生理学は、CHO/Kv 1. 3細胞に対するものであり、平均IC50が示されている。表記された実施例に記載されている方法によって、本発明の分子を取得した。すなわち、E. コリ由来のFc-L-ShK [1-35] (実施例 3 及び実施例 3 8)、E. コリ由来のFc-L-ShK [2-35] (実施例 4 及び実施例 3 9)、E. コリFc-L-OSK1 (実施例 1 0 及び実施例 4 0)、ShK [1-35]-L-Fc (実施例 1 5 及び実施例 5 1) 及びShk [2-35]-L-Fc (実施例 1 6 及び本実施例 5 0) であった。CHO由来のFc-L10-ShK [1-35] に関して記載されている方法と同様の方法を使用して、CHO由来のFc-L10-ShK [1-35] R1Q分子を作製した。

分子	WCVCによる Kv1.3 IC ₅₀ (nM)	IWQによる Kv1.3 IC ₅₀ (nM)
E. コリ由来の Fc-L-ShK[1-35]	1.4	
E. コリ由来の Fc-L-ShK[2-35]	1.3	2.8
E. コリ由来の Fc-L-OSK1	3.2	
E. コリ由来の Shk[1-35]-L-Fc		2.4
E. コリ由来の Shk[2-35]-L-Fc		4.9
CHO 由来の Fc-L10-ShK[1-35]R1Q		2.2

【実施例 5 1】

【0 5 9 0】

E. コリからの ShK (1-35) -L-Fc の精製

本明細書の上述の実施例 1 5 に記載されているように入手された、冷凍した E. コリペースト (65 g) を、室温の 50 mM トリス HCl、5 mM EDTA、pH 7. 5 の 660 mL と合わせて、約 0. 1 mg/mL のニワトリ卵白色リゾチームへ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置へ、12, 000 PSI で 2 回通過させた。次に、4℃、17, 700 g で 30 分間、細胞可溶化液を遠心分離した。次に、組織粉碎機を使用して、660 mL の 1% デオキシコール酸中にペレットを再懸濁した後、4℃、17, 700 g で 30 分間遠心分離した。次に、組織粉碎機を使用して、660 mL の水中にペレットを再懸濁した後、4℃、17, 700 g で 30 分間遠心分離した。次に、ペレット 13 g を 130 mL の 8 M グアニジン HCl、50 mM トリス HCl、pH 8. 0 中に溶解した。次に、1 M の DTT 0. 1 mL とともに、ペレット溶液 10 mL を、37℃ で 60 分間温置した。4℃、2 mL/分 で、激しく攪拌しながら、再折りたたみ緩衝液 (2 M 尿素、50 mM トリス、160 mM アルギニン HCl、2. 5 mM EDTA、2. 5 mM シスタミン HCl、4 mM システイン、pH 8. 5) 1000 mL へと、還元した材料を移した。次に、攪拌速度を低下させ、4℃ で 3 日間、温置を続行した。

【0 5 9 1】

再折りたたみ液を水1Lで希釈し、0.22 μ m酢酸セルロースフィルターでろ過した後、室内の35mLのAmersham Mab Selectカラム（内径2.6cm）で、8℃でQ-緩衝液A（20mMトリス、pH8.5）中の35mLのAmersham QセファロースFF（内径2.6cm）カラムへ10mL/分で負荷した。負荷した後、Qセファロースカラムを回路から除去し、残存するクロマトグラフィーをMab Selectカラムで実施した。Q-緩衝液Aの数カラム容積でカラムを洗浄した後、100mMグリシン、pH3.0への工程を使用して溶出した。望ましい生成物を含有する画分を8℃、5.0mL/分で、S-緩衝液A（20mMNaH₂PO₄、pH7.0）中の5.0mLのAmersham SP-セファロースHPカラムへと直ちに負荷した。次に、カラムをS-緩衝液Aの数カラム容積で洗浄した後、5%から60%までのS-緩衝液B（20mMNaH₂PO₄、1M NaCl、pH7.0）の直線勾配の後、100%S-緩衝液Bに至る工程を実施した。クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン4ないし20%SDS-PAGEを使用して、画分を分析した。望ましい生成物のバルクを含有する画分をプールした。

10

【0592】

次に、10kDaメンブレンを有するPall Jumbo-Sepを使用して、S-プールを約10mLに濃縮した。次に、Hewlett Packard 8453分光光度計を使用して、700 μ LのPBS中に希釈した組み合わせたプール20 μ Lに関して、スペクトル走査を実施した（図77A）。次に、30,409 g/molの算出された分子量及び36,900 M⁻¹cm⁻¹の吸光係数を使用して、材料の濃度が3.1 mg/mLであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン4ないし20%SDS-PAGEを使用して、材料の純度を評価した（図77B）。次に、280nmでの吸光度を観察する、50mMNaH₂PO₄、250mMNaCl、pH6.9中のPhenomenex BioSep SEC3000カラム（7.8×300mm）へと1mL/分で注入された生成物93 μ gに関して、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図77C）。次に、MALDI質量分析法による質量スペクトル分析へ、前記生成物を供した。試料プレート上で、MALDIマトリクスシナピン酸とともに、試料の一定分量を点状滴下した。スペクトルを回収するために、窒素レーザー（337nm、3ナノ秒パルス）を装備したVoyager DE-RP飛行時間質量分析計を使用した。25kVの加速電位で陽イオン/直線モードを使用した。約200のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た（図77D）。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量校正を達成した。

20

30

【0593】

「ShK [1-35]-L-Fc」とも呼ばれる、E. コリ由来の精製されたMet-ShK (1-35)-FcによるヒトKv1.3の遮断のためのIC₅₀が、本明細書の上述の表35に示されている。

【実施例52】

【0594】

Kv1.3のOsK1-L-Fc阻害剤の細菌での発現

40

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例3に記載されているとおりであった。使用されるベクターは、pAMG21amgR-pep-Fcであり、OsK1-L-Fcの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0595】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0596】

【0597】

【化 5 9】

GGGTGTTATCATCAACGTTAAATGCAAAATCTCCCGTCAGTGCCTGGAACCGTGCAAAAAGCTGGTATGCGT

// 配列番号 : 1347 ;

TTTCGGTAAATGCATGAACGGTAAATGCCACTGCACCCCGAAATCTGGTGGTGGTGGTTCT //

配列番号 : 1348 ;

CACCAGAACCACCACCACCAGATTTTCGGGGTGCAGTGGCATTTACCGTTCATGCATTTACCGAAACGCAT

// 配列番号 : 1349 ;

ACCAGCTTTTTTGCACGGTCCAGGCACTGACGGGAGATTTTGCATTTAACGTTGATGATAAC //

配列番号 : 1310

10

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```

      GGGTGTATCATCAACGTTAAATGCAAAATCTCCCGTCAGTGCCTGGAACCGTGCAAAA
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      CAATAGTAGTTGCAATTTACGTTTGTAGAGGGCAGTCACGGACCTTGGCACGTTTTT

      G  V  I  I  N  V  K  C  K  I  S  R  Q  C  L  E  P  C  K  K  -

      AGCTGGTATGCGTTTTCGGTAAATGCATGAACGGTAAATGCCACTGCACCCCGAAATCTGG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      TCGACCATACGCAAAGCCAATTACGTACTTGCCAATTACGGTGACGTGGGGCTTTAGACC

      A  G  M  R  F  G  K  C  M  N  G  K  C  H  C  T  P  K  S  G  -

      TGGTGGTGGTTCT      // 配列番号 : 1350
121 -----+----- 137
      ACCACCACCAAGACCAC      // 配列番号 : 1352

      G  G  G  S  G  -      // 配列番号 : 1351

```

20

【0598】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例 3 に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例 53】

【0599】

30

Kv1. 3 の Gly-S hK (1-35) - L-Fc 阻害剤の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例 3 に記載されているとおりであった。使用されるベクターは、pAMG21amgR-pep-Fc であり、Gly-S hK (1-35) - L-Fc の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖 (以下参照) を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【0600】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【0601】

【化 6 0】

GGGTCGTTCTTGTATTGATACTATTCCAAAATCTCGTTGTAAGTCTTTTCAATGTAAACATTCTA
TGAAATATCGTCTTTCTT // 配列番号 : 1313 ;

TTTGTGCTAAACTTGTGGTACTTGTCTGGTGGTGGTGGTCT // 配列番号 : 1314 ;

CACCAGAACCACCACCACCAGAACAAGTACCACAAGTTTTACGACAAAAGAAAGACGATATTT
CATAGAATGTTTACATTGA // 配列番号 : 1353

AAAGCAGTACAACGAGATTTTGAATAGTATCAATACAAGAACG // 配列番号 : 1354

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

GGGTCGTTCTTGTATTGATACTATTCCAAAATCTCGTTGTAAGTCTTTTCAATGTAAACA
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
GCAAGAACATAACTATGATAAGGTTTTAGAGCAACATGACGAAAAGTTACATTTGT
G R S C I D T I P K S R C T A F Q C K H -
TTCTATGAAATATCGTCTTTCTTTTGTGCTAAACTTGTGGTACTTGTCTGGTGGTGG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
AAGATACTTTATAGCAGAAAGAAAACAGCATTTTGAACACCATGAACAAGACCACCACC
S M K Y R L S F C R K T C G T C S G G G -
TGGTTCTT // 配列番号 : 1355
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 131
ACCAAGACCAC // 配列番号 : 1357
G S G - // 配列番号 : 1356

【0 6 0 2】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例 3 に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【0 6 0 3】

略語

本明細書を通じて使用される略語は、特異的な事情において別段の定義がなければ、以下に定義されるとおりである。

【0 6 0 4】

A c	(アセチル化残基を指すのに使用される) アセチル	
A c B p a	アセチル化 p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン	
A D C C	抗体依存的な細胞傷害性	
A i b	アミノイソブチル酸	
b A	β-アラニン	
B p a	p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン	
B r A c	ブロモアセチル (BrCH ₂ C(O))	
B S A	ウシ血清アルブミン	
B z l	ベンジル	40
C a p	カプロン酸	
C O P D	慢性閉塞性肺疾患	
C T L	細胞傷害性 T リンパ球	
D C C	ジシクロヘキシルカルボジイミド	
D d e	1-(4, 4-ジメチル-2, 6-ジオキソ-シクロヘキシリデ	
ン) エチル		
E S I-M S	電子スプレーイオン化質量分析法	
F m o c	フルオレニルメトキシカルボニル	
H O B t	1-ヒドロキシベンゾトリアゾール	
H P L C	高速液体クロマトグラフィー	50

H S L	ホモセリンラクトン	
I B	封入体	
K C a	(I L C a、B K C a、S K C aを含む) カルシウム活性化カリ	
ウムチャネル		
K v	電位開口型カリウムチャネル	
L a u	ラウリン酸	
L P S	リポ多糖	
L Y M P H	リンパ球	
M A L D I - M S	マトリクス介助レーザーデソープションイオン化質量分析法	
M e	メチル	10
M e O	メトキシ	
M H C	主要組織適合遺伝子複合体	
M M P	マトリクスメタロプロテアーゼ	
1 - N a p	1 - ナフチルアラニン	
N E U T	好中球	
N l e	ノルロイシン	
N M P	N - メチルー 2 - ピロリジノン	
P A G E	ポリアクリルアミドゲル電気泳動	
P B M C	末梢血単核細胞	
P B S	リン酸緩衝塩類溶液	20
P b f	2, 2, 4, 6, 7 - ペンダメチルジヒドロベンゾフラン - 5 -	
スルホニル		
P C R	ポリメラーゼ連鎖反応	
P e c	ピペコリン酸	
P E G	ポリ (エチレングリコール)	
p G l u	ピログルタミン酸	
P i c	ピコリン酸	
p Y	ホスホチロシン	
R B S	リボソーム結合部位	
R T	室温 (2 5 °C)	30
S a r	サルコシン	
S D S	ドデシル硫酸ナトリウム	
S T K	セリントレオニンキナーゼ	
t - B o c	t e r t - ブトキシカルボニル	
t B u	t e r t - ブチル	
T H F	胸腺体液性因子	
T r t	トリチル	

【図面の簡単な説明】

【0605】

【図1】 I g G 1 抗体から派生し得る幾つかの典型的な F c 二量体の模式的構造を示す。 40
 図の「F c」は、本明細書の「F c ドメイン」の意味内の F c 変異体のいずれかを表す。
 「X 1」及び「X 2」は、後述に定義されるペプチド又はリンカーとペプチドとの組み合わせを表す。特異的二量体は、次のとおりである。 図 1 A 及び図 1 D：単一ジスルフィド結合した二量体 図 1 B 及び図 1 E：二重にジスルフィド結合した二量体 図 1 C 及び図 1 F：非共有結合二量体

【図2】薬理学的に活性のある毒素ペプチドの単一単位を示す本発明の組成物の幾つかの実施形態の模式的構造を示す。図 2 A は、単一鎖分子を示し、前記分子に関する D N A コンストラクトも表し得る。図 2 B は、リンカーペプチド部分が二量体の唯一の鎖のみを表す二量体を示す。図 2 C は、両鎖上にペプチド部分を有する二量体を示す。図 2 C の二量体は、図 2 A に示される単一鎖をコードする D N A コンストラクトの発現に際し、特定 50

の宿主細胞において自然発生的に形成する。他の宿主細胞において、細胞は、二量体の形成に好ましい条件下に配置され得るか、又は二量体はインビトロで形成され得る。

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

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

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

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

【図5】図5Aは、哺乳類細胞、細菌又は酵母における発現に最適化したコドンを含む核酸配列によってコード化できる成熟ShKペプチド（配列番号5）のアミノ酸配列を示す。図5Bは、ShKペプチド（配列番号10）内の6個のシステインによって形成される3つのジスルフィド結合（-S-S-）を示す。

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

（HmK、配列番号543；ShK、配列番号10；AeK、配列番号544；AsKS、配列番号545）。図6Bは、3個のジスルフィド結合（C1-C6、C2-C4、C3-C5）を有するこのファミリーに関するジスルフィド結合マップを示す。

【図7A】カリウムチャネル阻害剤のα-サソリ毒素のアミノ酸整列を示す。（BmKK1、配列番号11；BmKK4、配列番号12；PBTx1、配列番号14；Tc32、配列番号13；BmKK6、配列番号15；P01、配列番号16；Pi2、配列番号17；Pi3、配列番号18；Pi4、配列番号19；MTX、配列番号20；Pi1、配列番号21；HsTx1、配列番号61；AgTx2、配列番号23；KTx1、配列番号24；OSK1、配列番号25；BmKTx、配列番号22；HgTx1、配列番号27；MgTx、配列番号28；C11Tx1、配列番号29；NTX、配列番号30；Tc30、配列番号31；Ts-TX-Ka、配列番号32；PBTx3、配列番号33；Lgh15-1、配列番号34；MarténTx、配列番号37；ChTx、配列番号36；ChTx-Lq2、配列番号42；IbTx、配列番号38；SloTx、配列番号39；BmTx1、配列番号43；BuTx、配列番号41；AmmTx3、配列番号44；AaTx1、配列番号45；BmTx3、配列番号46；Tc1、配列番号48；OSK2、配列番号49；TsK、配列番号54；CoTx1、配列番号55；CoT

10

20

30

40

50

x 2、配列番号 871；BmPo5、配列番号 60；ScyTx、配列番号 51；P05、配列番号 52；タマピン (Tamapin)、配列番号 53；及び TmTx、配列番号 691。高度に保存された残基に影を付し、共通配列を列挙する。 α -KTx のサブファミリーを列挙し、それらは Rodriguez de la Vega, R. C. et al. (2003) TIPS 24: 222-227 に由来する。拮抗すると報告される幾つかのイオンチャネルのリストを列挙する (IK=IKCa、BK=BKCa、SK=SKCa、Kv=電位開口型 K+チャネル)。この整列におけるほとんどのファミリーメンバーが成ペプチド生成物を表すが、幾つものメンバーは、未成熟であるか、前記ペプチドの改変された形態を表し、これらには、BmKK1、BmKK4、BmKK6、BmKTX、Martén Tx、ChTx、ChTx-Lq2、BmTx1、AaTx1、BmTX3、TsK、CoTx1、BmP05 が含まれる。

10

【図 7 B】カリウムチャネル阻害剤の α -サソリ毒素のアミノ酸整列を示す。(BmKK1、配列番号 11；BmKK4、配列番号 12；PBTx1、配列番号 14；Tc32、配列番号 13；BmKK6、配列番号 15；P01、配列番号 16；Pi2、配列番号 17；Pi3、配列番号 18；Pi4、配列番号 19；MTX、配列番号 20；Pi1、配列番号 21；HsTx1、配列番号 61；AgTx2、配列番号 23；KTX1、配列番号 24；OSK1、配列番号 25；BmKTX、配列番号 22；HgTX1、配列番号 27；MgTx、配列番号 28；Cl1Tx1、配列番号 29；NTX、配列番号 30；Tc30、配列番号 31；Ts-TX-Ka、配列番号 32；PBTx3、配列番号 33；Lgh15-1、配列番号 34；Martén Tx、配列番号 37；ChTx、配列番号 36；ChTx-Lq2、配列番号 42；IbTx、配列番号 38；SloTx、配列番号 39；BmTx1、配列番号 43；BuTx、配列番号 41；AmmTx3、配列番号 44；AaTX1、配列番号 45；BmTX3、配列番号 46；Tc1、配列番号 48；OSK2、配列番号 49；TsK、配列番号 54；CoTx1、配列番号 55；CoTx2、配列番号 871；BmPo5、配列番号 60；ScyTx、配列番号 51；P05、配列番号 52；タマピン (Tamapin)、配列番号 53；及び TmTx、配列番号 691。高度に保存された残基に影を付し、共通配列を列挙する。 α -KTx のサブファミリーを列挙し、それらは Rodriguez de la Vega, R. C. et al. (2003) TIPS 24: 222-227 に由来する。拮抗すると報告される幾つかのイオンチャネルのリストを列挙する (IK=IKCa、BK=BKCa、SK=SKCa、Kv=電位開口型 K+チャネル)。この整列におけるほとんどのファミリーメンバーが成ペプチド生成物を表すが、幾つものメンバーは、未成熟であるか、前記ペプチドの改変された形態を表し、これらには、BmKK1、BmKK4、BmKK6、BmKTX、Martén Tx、ChTx、ChTx-Lq2、BmTx1、AaTx1、BmTX3、TsK、CoTx1、BmP05 が含まれる。

20

30

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

40

【図 9】毒素ファミリー内のジスルフィド配置を示す。各サブファミリーに関するジスルフィドの数及びジスルフィド結合の順序が示される。各ジスルフィド結合カテゴリー内に

50

収まる毒素の部分的なリストを表す。

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

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

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

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

【図11D】ペプチドリンカー配列で置換されたクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (cat; 「CmR」部位) を有するペプチボディ細菌発現ベクター pAMG21ampR-Fc-pepの環状図を示す。

【図12A】pAMG21ampR-Pep-Fcの残基5131ないし6319の核酸配列 (配列番号73及び配列番号1361) 及びコード化されるアミノ酸配列 (配列番号74、配列番号1362及び配列番号1363) を示す。Fcドメインの配列 (配列番号75及び76) は、N末端の5個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチドリンカー部分がFcドメインのN末端にあるペプチボディの生成が可能となる。

【図12B】pAMG21ampR-Pep-Fcの残基5131ないし6319の核酸配列 (配列番号73及び配列番号1361) 及びコード化されるアミノ酸配列 (配列番号74、配列番号1362及び配列番号1363) を示す。Fcドメインの配列 (配列番号75及び76) は、N末端の5個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチドリンカー部分がFcドメインのN末端にあるペプチボディの生成が可能となる。

【図12C】pAMG21ampR-Pep-Fcの残基5131ないし6319の核酸配列 (配列番号73及び配列番号1361) 及びコード化されるアミノ酸配列 (配列番号74、配列番号1362及び配列番号1363) を示す。Fcドメインの配列 (配列番号75及び76) は、N末端の5個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチドリンカー部分がFcドメインのN末端にあるペプチボディの生成が可能となる。

【図12D】ペプチドリンカー配列で置換されたゼオシン抵抗 (ble; 「ZeoR」) 部位を有するペプチボディ細菌発現ベクターの環状図を示す。

【図12E】pAMG21ampR-Pep-Fcの核酸配列 (配列番号1339) 及び

10

20

30

40

50

コード化されるアミノ酸配列（配列番号1340、配列番号1341及び配列番号1342）を示す。Fcドメインの配列（配列番号75及び76）は、N末端の5個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチドリンカー部分がFcドメインのN末端にあるペプチボディの生成が可能となる。

【図12F】pAMG21ampR-Pep-Fcの核酸配列（配列番号1339）及びコード化されるアミノ酸配列（配列番号1340、配列番号1341及び配列番号1342）を示す。Fcドメインの配列（配列番号75及び76）は、N末端の5個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチドリンカー部分がFcドメインのN末端にあるペプチボディの生成が可能となる。

【図12G】pAMG21ampR-Pep-Fcの核酸配列（配列番号1339）及びコード化されるアミノ酸配列（配列番号1340、配列番号1341及び配列番号1342）を示す。Fcドメインの配列（配列番号75及び76）は、N末端の5個のグリシン残基を除外する。このベクターによって、ペプチドリンカー部分がFcドメインのN末端にあるペプチボディの生成が可能となる。

【図13A】哺乳類発現ベクターpCDNA3.1(+)CMViの環状図である。

【図13B】ヒトIgG1、10個のアミノ酸のリンカー及びアクチビンRIIb遺伝子を含む哺乳類発現ベクターpCDNA3.1(+)CMVi-Fc-2xG4S-アクチビンRIIbの環状図である。

【図13C】Fc-L10-ShK[2-35]コード化配列を含むCHO発現ベクターpDSRa22の環状図である。

【図14A】前述の実施例1の「Fc-L10-ShK[1-35]」として同定される分子のヌクレオチド配列及びコード化されるアミノ酸配列（それぞれ配列番号77及び78）を示す。L10リンカーアミノ酸配列（配列番号79）に下線が付されている。

【図14B】前述の実施例1の「Fc-L10-ShK[1-35]」として同定される分子のヌクレオチド配列及びコード化されるアミノ酸配列（それぞれ配列番号77及び78）を示す。L10リンカーアミノ酸配列（配列番号79）に下線が付されている。

【図15A】前述の実施例2の「Fc-L10-ShK[2-35]」として同定される分子のヌクレオチド配列及びコード化されるアミノ酸配列（それぞれ配列番号80及び81）を示す。Fc-L10-ShK[1-35]（図14）において使用されるのと同じL10リンカーアミノ酸配列（配列番号79）に下線が付されている。

【図15B】前述の実施例2の「Fc-L10-ShK[2-35]」として同定される分子のヌクレオチド配列及びコード化されるアミノ酸配列（それぞれ配列番号80及び81）を示す。Fc-L10-ShK[1-35]（図14）において使用されるのと同じL10リンカーアミノ酸配列（配列番号79）に下線が付されている。

【図16A】前述の実施例2の「Fc-L25-ShK[2-35]」として同定される分子のヌクレオチド配列及びコード化されるアミノ酸配列（それぞれ配列番号82及び83）を示す。L25リンカーアミノ酸配列（配列番号84）に下線が付されている。

【図16B】前述の実施例2の「Fc-L25-ShK[2-35]」として同定される分子のヌクレオチド配列及びコード化されるアミノ酸配列（それぞれ配列番号82及び83）を示す。L25リンカーアミノ酸配列（配列番号84）に下線が付されている。

【図17】前述の実施例32にも記載される還元的アミノ化によるShKペプチド（配列番号5及び配列番号10）のN末端PEG化に関するスキームを示す。

【図18】前述の実施例34にも記載されるアミド形成を介するShKペプチド（配列番号5及び配列番号10）のN末端PEG化に関するスキームを示す。

【図19】前述の実施例33にも記載される官能基選択的オキシム形成によるShKペプチド（配列番号5及び配列番号10）のN末端PEG化に関するスキームを示す。

【図20】図20Aは、214nmでの逆相HPLC分析を示し、図20Bは、折りたたまれた「Des-Arg1-ShK」（ペプチド2）とも記載される折りたたまれたShK[2-35]のエレクトロスプレー質量分析を示す。

【図21】N末端がPEG化した「Des-Arg1-ShK」とも呼ばれるN末端がP

10

20

30

40

50

EG化されたShk [2-35] の214nmでの逆相HPLC分析を示す。

【図22】図22Aは、「ShK」とも呼ばれる、折りたたまれたShK [1-35] のエレクトロスプレー質量分析を示す。図22Bは、「ShK」とも呼ばれる、折りたたまれたShK [1-35] のエレクトロスプレー質量分析を示す。

【図23】前述の実施例31にも記載の還元的アミノ化によるShK [2-35] (「Des-Arg1-ShK」又は「ShKd1」とも呼ばれる配列番号92及び配列番号58) のN末端PEG化に関するスキームを示す。

【図24】図24Aは、Fc-L10-ShK [1-35] で一過的に形質移入したHEK293細胞由来の培養上清のウェスタンブロットを示す。レーン1：分子量マーカー、レーン2：15μLのFc-L10-ShK、レーン3：10μLのFc-L10-ShK、レーン4：5μLのFc-L10-ShK、レーン5：分子量マーカー、レーン6：ブランク、レーン7：DNAを含有しない15μLの対照、レーン8：DNAを含有しない10μLの対照、レーン9：DNAを含有しない5μLの対照、レーン10：分子量マーカー。図24Bは、Fc-L-ShK [1-35] で安定して形質移入したチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞のクローン由来の培養上清15μLによるウェスタンブロットを示す。レーン1ないし15を次のとおり負荷した。ブランク、BB6、分子量マーカー、BB5、BB4、BB3、BB2、BB1、ブランク、BD6、BD5、分子量マーカー、BD4、BD3、BD2。

【図25】図25Aは、Fc-L-SmIIIAで一過的に形質移入した293T細胞由来の培養上清を含有する非還元型SDS-PAGEゲルのウェスタンブロットを示す。図25Bは、Fc-L-SmIIIAで一過的に形質移入した293T細胞由来の培養上清を含有する非還元型SDS-PAGEゲルのウェスタンブロットを示す。

【図26A】Hewlett Packard 8453分光光度計及び1cm経路長のクォーツキュベットを使用する、700μLのPBS (空の緩衝液) 中に希釈した、安定して形質移入したCHO細胞由来の10μLの精製されたFc-L10-ShK [1-35] 生成物のスペクトル走査を示す。

【図26B】最終的なFc-L10-ShK [1-35] 生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン4ないし20% SDS-PAGEを示す。レーン1ないし12を次のとおり負荷した。Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5μgの非還元型生成物、ブランク、2.0μgの非還元型生成物、10μgの非還元型生成物、Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5μgの還元型生成物、ブランク、2.0μgの還元型生成物、ブランク及び10μgの還元型生成物。

【図26C】50mMのNaH₂PO₄、250mMのNaCl及びpH6.9中のPhenomenex BioSep SEC3000カラム (7.8×300mm) へ1mL/分で注入される最終的なFc-L10-ShK [1-35] 生成物20μgに関する、280nmで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図26D】窒素レーザー (337nm、3ナノ秒パルス) を装備したVoyager DE-RP飛行時間質量分光光度計を使用して分析するFc-L10-ShK [1-35] の最終試料のMALDI質量スペクトル分析を示す。25kVの加速電位で陽イオン/直線モードを使用した。約200のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【図27A】安定して形質移入したCHO細胞から精製した最終的なFc-L10-ShK [2-35] 生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン4ないし20% SDS-PAGEを示す。レーン1ないし12を次のとおり負荷した。Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5μgの非還元型生成物、ブランク、2.0μgの非還元型生成物、ブランク、10μgの非還元型生成物、Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5μgの還元型生成物、ブランク、2.0μgの還元型生成物、ブランク及び10μgの還元型生成物。

【図27B】50mMの NaH_2PO_4 、250mMの NaCl 及びpH6.9中のPhenomenex BioSep SEC3000カラム(7.8×300mm)へ1mL/分で注入される、精製されたFc-L10-ShK[2-35] 50µgに関する、280nmで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図27C】安定して形質移入したCHO細胞から精製したFc-L5-ShK[2-35]のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス・グリシン4ないし20%SDS-PAGEを示す。レーン1ないし12を次のとおり負荷する。Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5µgの非還元型生成物、ブランク、2.0µgの非還元型生成物、ブランク、10µgの非還元型生成物、Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5µgの還元型生成物、ブランク、2.0µgの還元型生成物、ブランク及び10µgの還元型生成物。

10

【図27D】安定して形質移入したCHO細胞から精製したFc-L25-ShK[2-35]のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス・グリシン4ないし20%SDS-PAGEを示す。レーン1ないし12を次のとおり負荷する。Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5µgの非還元型生成物、ブランク、2.0µgの非還元型生成物、ブランク、10µgの非還元型生成物、Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5µgの還元型生成物、ブランク、2.0µgの還元型生成物、ブランク及び10µgの還元型生成物。

【図27E】Hewlett Packard 8453分光光度計及び1cm経路長のクォーツキュベットを使用する、700µLのPBS(空の緩衝液)中に希釈したFc-L10-ShK[2-35]生成物10µLのスペクトル走査を示す。

20

【図27F】窒素レーザー(337nm、3ナノ秒パルス)を装備したVoyager DE-RP飛行時間質量分光光度計を使用して分析したFc-L10-ShK[2-35]の最終試料のMALDI質量スペクトル分析を示す。25kVの加速電位で陽イオン/直線モードを使用した。約200のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【図27G】Hewlett Packard 8453分光光度計及び1cm経路長のクォーツキュベットを使用する、700µLのPBS(空の緩衝液)中に希釈したFc-L5-ShK[2-35]生成物10µLのスペクトル走査を示す。

30

【図27H】50mMの NaH_2PO_4 、250mMの NaCl 、pH6.9中のPhenomenex BioSep SEC3000カラム(7.8×300mm)へ1mL/分で注入される、最終的なFc-L5-ShK[2-35]生成物50mgに関する、280nmで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図27I】窒素レーザー(337nm、3ナノ秒パルス)を装備したVoyager DE-RP飛行時間質量分光光度計を使用して分析したFc-L5-ShK[2-35]の最終試料のMALDI質量スペクトル分析を示す。25kVの加速電位で陽イオン/直線モードを使用した。約200のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

40

【図27J】Hewlett Packard 8453分光光度計及び1cm経路長のクォーツキュベットを使用する、700µLのPBS(空の緩衝液)中に希釈した生成物20µLのスペクトル走査を示す。

【図27K】50mMの NaH_2PO_4 、250mMの NaCl 、pH6.9中のPhenomenex BioSep SEC3000カラム(7.8×300mm)へ1mL/分で注入される、最終的なFc-L25-ShK[2-35]生成物50µgに関する、280nmで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図27L】窒素レーザー(337nm、3ナノ秒パルス)を装備したVoyager DE-RP飛行時間質量分光光度計を使用して分析したFc-L25-ShK[2-35]の最終試料のMALDI質量スペクトル分析を示す。25kVの加速電位で陽イオン/

50

直線モードを使用した。約200のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【図28A】細菌細胞から精製及び再折りたたみされたFc-L10-KTX1のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス・グリシン4ないし20%SDS-PAGEを示す。レーン1ないし12を次のとおり負荷する。Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5µgの非還元型生成物、ブランク、2.0µgの非還元型生成物、ブランク、10µgの非還元型生成物、Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5µgの還元型生成物、ブランク、2.0µgの還元型生成物、ブランク及び10µgの還元型生成物。

10

【図28B】50mMの NaH_2PO_4 、250mMの NaCl 、pH6.9中のPhenomenex BioSep SEC3000カラム(7.8×300mm)へ1mL/分で注入される、精製されたFc-L10-KTX1の45µgに関する、280nmで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

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

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

20

【図29A】細菌細胞から精製及び再折りたたみされたFc-L-AgTx2のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス・グリシン4ないし20%SDS-PAGEを示す。レーン1ないし12を次のとおり負荷する。Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5µgの非還元型生成物、ブランク、2.0µgの非還元型生成物、ブランク、10µgの非還元型生成物、Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5µgの還元型生成物、ブランク、2.0µgの還元型生成物、ブランク及び10µgの還元型生成物。

30

【図29B】細菌細胞から精製及び再折りたたみされたFc-L10-HaTx1のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス・グリシン4ないし20%SDS-PAGEを示す。レーン1ないし12を次のとおり負荷する。Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5µgの非還元型生成物、ブランク、2.0µgの非還元型生成物、ブランク、10µgの非還元型生成物、Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5µgの還元型生成物、ブランク、2.0µgの還元型生成物、ブランク及び10µgの還元型生成物、精製した材料のスペクトル走査。

【図29C】Hewlett Packard8453分光光度計及び1cm経路長のクォーツキュベットを使用して、700µLのPBS(空の緩衝液)中に希釈したFc-L10-AgTx2生成物20µLのスペクトル走査を示す。

40

【図29D】50mMの NaH_2PO_4 、250mMの NaCl 、pH6.9中のPhenomenex BioSep SEC3000カラム(7.8×300mm)へ1mL/分で注入される、最終的なFc-L10-AgTx2生成物20µgに関する、280nmで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図29E】窒素レーザー(337nm、3ナノ秒パルス)を装備したVoyager DE-RP飛行時間質量分光光度計を使用して分析したFc-L10-AgTx2の最終試料のMALDI質量スペクトル分析を示す。25kVの加速電位で陽イオン/直線モードを使用した。約200のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

50

【図29F】Hewlett Packard 8453分光光度計及び1 cm経路長のクォーツキュベットを使用する、700 μ LのPBS（空の緩衝液）中に希釈したFc-L10-HaTx1生成物20 μ Lのスペクトル走査を示す。

【図29G】50 mMの NaH_2PO_4 、250 mMの NaCl 、pH 6.9中のPhenomenex BioSep SEC3000カラム（7.8 $\times$ 300 mm）へ1 mL/分で注入される、最終的なFc-L10-HaTx1生成物20 μ gに関する、280 nmで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図29H】窒素レーザー（337 nm、3ナノ秒パルス）を装備したVoyager DE-RP飛行時間質量分光光度計を使用して分析したFc-L10-HaTx1の最終試料のMALDI質量スペクトル分析を示す。25 kVの加速電位で陽イオン/直線モードを使用した。約200のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

10

【図30A】CHO細胞から精製されるFc-L10-ShK [1-35]が、ヒトKv1.3チャンネルを安定して発現させるHEK293細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じることを示す。

【図30B】多様な濃度でのFc-L10-ShK [1-35]によるカリウム電流遮断の時間経過を示す。IC50は、 15 ± 2 pM（ $n = 4$ 個の細胞）であると概算した。

【図30C】（「ShK」単独とも呼ばれる）合成ShK [1-35]が、ヒトKv1.3チャンネルを安定して発現させるHEK293細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じることを示す。

20

【図30D】多様な濃度でのShK [1-35]遮断の時間経過を示す。ShKに関するIC50は、 12 ± 1 pM（ $n = 4$ 個の細胞）であると概算した。

【図31】図31Aは、 49 ± 5 pM（ $n = 3$ 個の細胞）のIC50で、ヒトKv1.3チャンネルを安定して発現させるHEK293細胞から記録される外向きカリウム電流の縫う $^{\circ}\text{C}$ 依存的遮断を生じる合成ペプチド類縁体ShK [2-35]を示す。図31Bは、 115 ± 18 pM（ $n = 3$ 個の細胞）のIC50でヒトKv1.3チャンネルを安定して発現させるHEK293細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じる、CHO由来のFc-L10-ShK [2-35]ペプチボディを示す。図31Cは、Fc-L5-ShK [2-35]ペプチボディが、100 pM（ $n = 3$ 個の細胞）のIC50でヒトKv1.3チャンネルを安定して発現させるHEK293細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じることを示す。

30

【図32】図32Aは、ヒトKv1.3チャンネルを安定して発現させるHEK293細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じる細菌細胞から精製されるFc-L-KTX1ペプチボディを示す。図32Bは、多様な濃度でのFc-L10-KTX1によるカリウム電流遮断の時間経過を示す。

【図33】免疫組織化学によって、CHO由来のFc-L10-ShK [1-35]ペプチボディが、ヒトKv1.3で安定して形質移入したHEK293細胞を染色する（図33A）のに対し、形質移入されていないHEK293細胞は、前期ペプチボディで染色されない（図33B）ことを示す。

40

【図34】ヒトKv1.3で安定して形質移入した固定したHEK293細胞を使用する酵素免疫アッセイの結果を示す。図34Aは、（本明細書で単純に「Fc-L10-ShK」と呼ばれる）CHO由来のFc-L10-ShK [1-35]ペプチボディが、反応において用量依存的な亢進を示すのに対し、CHO-Fc対照（「Fc対照」）は示さないことを示す。図34Bは、（本明細書で「Fc-ShK」と呼ばれる）Fc-L10-ShK [1-35]ペプチボディが、同様の条件を使用して形質移入されていないHEK293細胞からの反応を誘発しないことを示し、他のネガティブ対照も示す。

【図35】CHO由来のFc-L10-ShK [1-35]ペプチボディが、PMA及び α CD3抗体で刺激されたヒトPBMCからのIL-2（図35A）及びIFN γ （図35B）の用量依存的阻害を示す。前記ペプチボディは、反応の完全な阻害を呈する新規の

50

薬理学を示すのに対し、合成 ShK [1-35] ペプチド単独は、部分的な阻害のみを示す。

【図36】哺乳類由来のFc-L10-ShK [1-35] ペプチボディが、CD3及びCD28に対する抗体で刺激された2つの正常なドナー由来のヒトPBMCにおけるT細胞増殖（³H-チミジン組み込み）を阻害することを示す。図36Aは、ドナー1の反応を示し、図36Bは、ドナー2の反応を示す。抗CD32（FcγRII）遮断抗体によるプレ温置は、ペプチボディに対する感度を変化させなかった。

【図37】CHO由来の精製したFc-L10-ShK [1-35] ペプチボディが、αCD3及びαCD28抗体で刺激したヒトPBMCからのIL-2（図37A）及びIFNγ（図37B）の生成の用量依存的阻害を生じることを示す。

10

【図38】図38Aは、PEG化されたShk [2-35] 合成ペプチドが、ヒトKv1.3チャンネルを安定して発現させるHEK293細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を生じることを示し、多様な濃度でのカリウム電流遮断の時間経過が図38Bに示される。

【図39A】Hewlett Packard 8453分光光度計及び1cm経路長のクォーツキュベットを使用する、700μLのPBS（空の緩衝液）中に希釈したFc-L10-ShK（1-35）生成物50μLのスペクトル走査を示す。

【図39B】最終的なFc-L10-ShK（1-35）生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン4ないし20%SDS-PAGEを示す。レーン1ないし12を次のとおり負荷する。Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5μgの非還元型生成物、ブランク、2.0μgの非還元型生成物、ブランク、10μgの非還元型生成物、Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5μgの還元型生成物、ブランク、2.0μgの還元型生成物、ブランク及び10μgの還元型生成物。

20

【図39C】50mMのNaH₂PO₄、250mMのNaCl、pH6.9中のPhenomenex BioSep SEC3000カラム（7.8×300mm）へ1mL／分で注入される、最終的なFc-L10-ShK（1-35）生成物50μgに関する、280nmで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図40A】Hewlett Packard 8453分光光度計及び1cm経路長のクォーツキュベットを使用する、700μLのPBS（空の緩衝液）中に希釈したFc-L10-ShK（2-35）生成物20μLのスペクトル走査を示す。

30

【図40B】最終的なFc-L10-ShK（2-35）生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン4ないし20%SDS-PAGEを示す。レーン1ないし12を次のとおり負荷する。Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5μgの非還元型生成物、ブランク、2.0μgの非還元型生成物、ブランク、10μgの非還元型生成物、Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5μgの還元型生成物、ブランク、2.0μgの還元型生成物、ブランク及び10μgの還元型生成物。

【図40C】50mMのNaH₂PO₄、250mMのNaCl、pH6.9中のPhenomenex BioSep SEC3000カラム（7.8×300mm）へ1mL／分で注入される最終的なFc-L10-ShK（2-35）生成物50μgに関する、280nmで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

40

【図40D】窒素レーザー（337nm、3ナノ秒パルス）を装備したVoyager DE-RP飛行時間質量分光光度計を使用して分析したFc-L10-ShK（2-35）の最終試料のMALDI質量スペクトル分析を示す。25kVの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約200のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【図41A】Hewlett Packard 8453分光光度計及び1cm経路長のクォーツキュベットを使用する、700μLの製剤緩衝液中に希釈したFc-L10-OS

50

K1生成物50 μ Lのスペクトル走査を示す。

【図41B】最終的なFc-L10-OSK1生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス・グリシン4ないし20%SDS-PAGEを示す。レーン1ないし12を次のとおり負荷する。Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5 μ gの還元型生成物、ブランク、2.0 μ gの還元型生成物、ブランク、10 μ gの還元型生成物、Novex Mark12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5 μ gの還元型生成物、ブランク、2.0 μ gの還元型生成物、ブランク及び10 μ gの還元型生成物。

【図41C】50mMのNaH₂PO₄、250mMのNaCl、pH6.9中のPhenomenex BioSep SEC3000カラム(7.8 $\times$ 300mm)へ1mL/分で注入される、最終的なFc-L10-OSK1生成物123 μ gに関する、280nmで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図41D】LCQイオントラップ質量分光光度計へと配向される溶出物の一部を使用してVydac C₄カラムを使用する最終的なFc-L10-OSK1試料約4 μ gの液体クロマトグラフィー質量スペクトル分析を示す。質量分析計の製造者によって提供されるBioWorksソフトウェアを使用して、質量スペクトルをデコンボルトした。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

【図49A】Hewlett Packard8453分光光度計及び1cm経路長のクォーツキュベットを使用する、700 μ LのPBS(空の緩衝液)中に希釈したFc-L10-OSK1生成物50 μ Lのスペクトル走査を示す。

【図49B】最終的なFc-L10-OSK1生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス・グリシン4ないし20%SDS-PAGEを示す。レーン1ないし12を

10

20

30

40

50

次のとおり負荷する。Novex Mark 12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5 µgの還元型生成物、ブランク、2.0 µgの還元型生成物、ブランク、10 µgの還元型生成物、Novex Mark 12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5 µgの還元型生成物、ブランク、2.0 µgの還元型生成物、ブランク及び10 µgの還元型生成物。

【図49C】50 mMの NaH_2PO_4 、250 mMの NaCl 、pH 6.9中のPhenomenex BioSep SEC 3000カラム(7.8×300 mm)へ1 mL/分で注入される、最終的なFc-L10-OSK1生成物149 µgに関する、280 nmで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図49D】窒素レーザー(337 nm、3ナノ秒パルス)を装備したVoyager DE-RP飛行時間質量分光光度計を使用して分析したFc-L10-OSK1の最終試料のMALDI質量スペクトル分析を示す。25 kVの加速電位で陽イオン/直線モードを使用した。約200のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

10

【図50A】Hewlett Packard 8453分光光度計及び1 cm経路長のクォーツキュベットを使用する、700 µLのPBS(空の緩衝液)中に希釈したFc-L10-OSK1(K7S)生成物50 µLのスペクトル走査を示す。

【図50B】最終的なFc-L10-OSK1(K7S)生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス・グリシン4ないし20% SDS-PAGEを示す。レーン1ないし12を次のとおり負荷する。Novex Mark 12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5 µgの還元型生成物、ブランク、2.0 µgの還元型生成物、ブランク、10 µgの還元型生成物、Novex Mark 12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5 µgの還元型生成物、ブランク、2.0 µgの還元型生成物、ブランク及び10 µgの還元型生成物。

20

【図50C】50 mMの NaH_2PO_4 、250 mMの NaCl 、pH 6.9中のPhenomenex BioSep SEC 3000カラム(7.8×300 mm)へ1 mL/分で注入される、最終的なFc-L10-OSK1(K7S)生成物50 µgに関する、280 nmで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図50D】窒素レーザー(337 nm、3ナノ秒パルス)を装備したVoyager DE-RP飛行時間質量分光光度計を使用して分析した最終生成物Fc-L10-OSK1(K7S)の試料のMALDI質量スペクトル分析を示す。25 kVの加速電位で陽イオン/直線モードを使用した。約200のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

30

【図51A】Hewlett Packard 8453分光光度計及び1 cm経路長のクォーツキュベットを使用する、700 µLのPBS(空の緩衝液)中に希釈したFc-L10-OSK1(E16K, K20D)生成物50 µLのスペクトル走査を示す。

【図51B】最終的なFc-L10-OSK1(E16K, K20D)生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス・グリシン4ないし20% SDS-PAGEを示す。レーン1ないし12を次のとおり負荷する。Novex Mark 12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5 µgの還元型生成物、ブランク、2.0 µgの還元型生成物、ブランク、10 µgの還元型生成物、Novex Mark 12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5 µgの還元型生成物、ブランク、2.0 µgの還元型生成物、ブランク及び10 µgの還元型生成物。

40

【図51C】50 mMの NaH_2PO_4 、250 mMの NaCl 、pH 6.9中のPhenomenex BioSep SEC 3000カラム(7.8×300 mm)へ1 mL/分で注入される、最終的なFc-L10-OSK1(E16K, K20D)生成物50 µgに関する、280 nmで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図51D】窒素レーザー(337 nm、3ナノ秒パルス)を装備したVoyager

50

D E - R P 飛行時間質量分光光度計を使用して分析した最終生成物 F c - L 1 0 - O s K 1 (E 1 6 K , K 2 0 D) の試料の M A L D I 質量スペクトル分析を示す。25 k V の加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約 200 のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【図 5 2 A】H e w l e t t P a c k a r d 8 4 5 3 分光光度計及び 1 c m 経路長のクォーツキュベットを使用する、700 μ L の P B S (空の緩衝液) 中に希釈した F c - L 1 0 - O s K 1 (K 7 S , E 1 6 K , K 2 0 D) 生成物 50 μ L のスペクトル走査を示す。

【図 5 2 B】最終的な F c - L 1 0 - O s K 1 (K 7 S , E 1 6 K , K 2 0 D) 生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリスーグリシン 4 ないし 20 % S D S - P A G E を示す。レーン 1 ないし 12 を次のとおり負荷する。N o v e x M a r k 12 の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5 μ g の非還元型生成物、ブランク、2.0 μ g の非還元型生成物、ブランク、10 μ g の非還元型生成物、N o v e x M a r k 12 の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5 μ g の還元型生成物、ブランク、2.0 μ g の還元型生成物、ブランク及び 10 μ g の還元型生成物。

【図 5 2 C】50 m M の N a H ₂ P O ₄、250 m M の N a C l、p H 6.9 中の P h e n o m e n e x B i o S e p S E C 3000 カラム (7.8 $\times$ 300 m m) へ 1 m L / 分で注入される最終的な F c - L 1 0 - O s K 1 (K 7 S , E 1 6 K , K 2 0 D) 生成物 50 μ g に関する、280 n m で吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図 5 2 D】窒素レーザー (337 n m、3 ナノ秒パルス) を装備した V o y a g e r D E - R P 飛行時間質量分光光度計を使用して分析した最終生成物 F c - L 1 0 - O s K 1 (K 7 S , E 1 6 K , K 2 0 D) の試料の M A L D I 質量スペクトル分析を示す。25 k V の加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約 200 のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。

【図 5 3】アジアサソリのオルトキルススクロビキュロサス (O r t h o c h i r u s s c r o b i c u l o s u s) 毒液の 38 残基毒素ペプチドである合成 O s k 1 によるヒト K v 1.3 チャネルを安定して発現させる H E K 293 細胞から記録される外向きカリウム電流の阻害を示す。図 5 3 A は、合成 O s k 1 毒素ペプチドによってヒト K v 1.3 チャネルを安定して発現させる H E K 293 細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。図 5 3 B は、多様な濃度での合成 O s k 1 毒素ペプチド遮断の時間経過を示す。合成 O s k 1 毒素ペプチドに関する I C 50 は、39 $\pm$ 12 p M (n = 4 個の細胞) であると概算した。

【図 5 4】抗体の F c 断片 (O S K 1 - ペプチボディ) に対する融合による合成 O S K 1 毒素ペプチドの改変が、ヒト K v 1.3 チャネルに対する阻害活性を保持したことを示す。図 5 4 A は、10 個のアミノ酸残基のリンカー鎖長を有するヒト I g G 1 F c 断片へ結合した O S K 1 (F c - L 1 0 - O S K 1) によって、ヒト K v 1.3 チャネルを安定して発現させる H E K 293 細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。融合コンストラクトは、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞において安定して発現した。図 5 4 B は、多様な濃度での F c - L 1 0 - O S K 1 遮断の時間経過を示す。F c - L 1 0 - O S K 1 に関する I C 50 は、合成 O S K 1 毒素ペプチドよりも約 5 倍弱い 198 $\pm$ 35 p M (n = 6 個の細胞) であると概算した。

【図 5 5】O S K 1 - ペプチボディの単一アミノ酸残基置換がヒト K v 1.3 チャネルに対する阻害活性を保持したことを示す。図 5 5 A は、(N 末端から 7 番目の位置でのリジンからセリンへの) 単一アミノ酸置換 ([K 7 S]) を有し、10 個のアミノ酸残基のリンカー鎖長のヒト I g G 1 F c 断片へ結合した O S K 1 - ペプチボディ (F c - L 1 0 - O S K 1 [K 7 S]) によって、ヒト K v 1.3 チャネルを安定して発現させる H E K 293 細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断を示す。融合コンストラ

10

20

30

40

50

クトは、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞において安定して発現した。図55Bは、多様な濃度でのFc-L10-OSK1 [K7S] によるカリウム電流遮断の時間経過を示す。IC50は、合成OSK1毒素ペプチドよりも約10倍弱い 372 ± 71 pM（n=4個の細胞）であると概算した。

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

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

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

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

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

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

【図62】PEG-ShKによる治療が、養子移植EAEモデルにおけるラットの疾病を寛解したことを示す。臨床的評価：0=徴候なし、0.5=遠位跛行尾部、1.0=跛行尾部、2.0=軽度不全対麻痺、運動失調、3.0=中等度不全対麻痺、3.5=片後肢麻痺、4.0=完全後肢麻痺、5.0=完全後肢麻痺及び失禁、5.5=四肢麻痺、6.0=瀕死状態又は死亡であった。5.5ないし6のスコアに到達しているラットを安楽死させた。平均±平均値の標準誤差の値を示す（n=治療群あたり5匹のラット）

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

【図64】ヒト全血におけるタプシガルジン誘発性IL-2生成が、Kv1.3チャンネル阻害剤であるShK [1-35] 及びFc-L10-ShK [2-35] によって抑制さ

10

20

30

40

50

れたことを示すカルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンAも前記反応を遮断する。BKCaチャンネル阻害剤であるイベリオトキシン(IbTx)は、有意な活性を示さなかった。2つの個別のドナー由来の全血の反応を図64A及び図64Bに示す。

【図65】ヒト全血におけるタプシガルジン誘発性IFN- γ 生成が、Kv1.3チャンネル阻害剤であるShK[1-35]及びFc-L10-ShK[2-35]によって抑制されたことを示すカルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンAも前記反応を遮断する。BKCaチャンネル阻害剤であるイベリオトキシン(IbTx)は、有意な活性を示さなかった。2つの個別のドナー由来の全血の反応を図65A及び図65Bに示す。

【図66】ヒト全血におけるT細胞に関するCD40Lのタプシガルジン誘発性上方制御が、Kv1.3チャンネル阻害剤であるShK[1-35]及びFc-L10-ShK[1-35](Fc-ShK)によって抑制されたことを示す。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンA(CsA)も前記反応を遮断する。図66Aは、CD4+T細胞の合計の反応で見る実験の結果を示す。図66Bは、CD4+T細胞並びにCD4+CD45+及びCD4+CD45-T細胞で見た実験の結果を示す。図66Bにおいて、BKCaチャンネル阻害剤イベリオトキシン(IbTx)及びKv1.1チャンネル阻害剤デンドロトキシン-K(DTX-K)は、有意な活性を示さなかった。

【図67】ヒト全血におけるT細胞に関するIL-2Rのタプシガルジン誘発性上方制御が、Kv1.3チャンネル阻害剤であるShK[1-35]及びFc-L10-ShK[1-35](Fc-ShK)によって抑制されたことを示す。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンA(CsA)も前記反応を遮断する。図67Aは、CD4+T細胞の合計の反応で見る実験の結果を示す。図67Bは、CD4+T細胞並びにCD4+CD45+T細胞及びCD4+CD45-T細胞の合計で見る実験の結果を示す。図67Bにおいて、BKCaチャンネル阻害剤イベリオトキシン(IbTx)及びKv1.1チャンネル阻害剤デンドロトキシン-K(DTX-K)は、有意な活性を示さなかった。

【図68】PEG-Shk精製(図68A)及びPEG-OSK-1精製(図68B)に関するSPセファロースHPカラム上でのPEG-ペプチド精製の陽イオン交換クロマトグラムを示す。

【図69】PEG-Shk純度99%超(図69A)及びPEG-OSK1純度97%超(図69B)の純度を示すための、最終的なPEG-ペプチドプールに関するRP-HP LCクロマトグラムを示す。

【図70】Fc-N末端ドメイン(アミノ酸残基1ないし139)、OSK1(下線を付したアミノ酸残基142ないし179)及びFc-C末端ドメイン(アミノ酸残基182ないし270)の3つの結合したドメインを有する典型的なFcループ-L2-OSK1-L2のアミノ酸配列(配列番号976)を示す。

【図71】Fc-N末端ドメイン(アミノ酸残基1ないし139)、ShK(下線を付したアミノ酸残基142ないし179)及びFc-C末端ドメイン(アミノ酸残基179ないし267)の3つの結合したドメインを有する典型的なFcループ-L2-ShK-L2のアミノ酸配列(配列番号977)を示す。

【図72】Fc-N末端ドメイン(アミノ酸残基1ないし139)、ShK(下線を付したアミノ酸残基142ないし176)及びFc-C末端ドメイン(アミノ酸残基181ないし269)の3つの結合したドメインを有する典型的なFcループ-L2-ShK-L4のアミノ酸配列(配列番号978)を示す。

【図73】Fc-N末端ドメイン(アミノ酸残基1ないし139)、OSK1(下線を付したアミノ酸残基144ないし181)及びFc-C末端ドメイン(アミノ酸残基184ないし272)の3つの結合したドメインを有する典型的なFcループ-L4-OSK1-L2のアミノ酸配列(配列番号979)を示す。

【図74】20K PEG化ShK[1-35]が、HEK293/Kv1.3細胞に関するホールセルパッチクランプ電気生理学によって測定されるヒトKv1.3の有力な遮断を提供したことを示す。データは、ピーク電流の遮断を表す。

【図75】本発明の組成物の幾つかの他の典型的な実施形態の模式的構造を示す。「X²

10

20

30

40

50

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

10

【図76A】Hewlett Packard 8453分光光度計及び1cm経路長のクォーツキュベットを使用する、700 μ LのPBS（空の緩衝液）中に希釈したShK [2-35]-Fc生成物50 μ Lのスペクトル走査を示す。

【図76B】最終的なShK [2-35]-Fc生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン4ないし20% SDS-PAGEを示す。レーン1ないし12に次のとおり負荷した。Novex Mark 12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5 μ gの非還元型生成物、ブランク、2.0 μ gの非還元型生成物、ブランク、10 μ gの非還元型生成物、Novex Mark 12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5 μ gの還元型生成物、ブランク、2.0 μ gの還元型生成物、ブランク及び10 μ gの還元型生成物。

20

【図76C】50mMの NaH_2PO_4 、250mMのNaCl、pH6.9中のPhenomenex BioSep SEC3000カラム（7.8 $\times$ 300mm）へ1mL/分で注入される、最終的なShK [2-35]-Fc生成物70 μ gに関する、280nmで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図76D】Thermo Finnigan LCQイオントラップ質量分光光度計のエレクトロスプレー源へ直接連結されるカラム溶出液を使用して、Agilent 1100 HPLCを使用する逆相クロマトグラフィーを使用して、最終的なShK [2-35]-Fc試料のLC-MS分析を示す。関連するスペクトルを合計し、BioWorksソフトウェアパッケージを使用して質量データヘデコンボルトした。

【図77A】Hewlett Packard 8453分光光度計及び1cm経路長のクォーツキュベットを使用して、700 μ LのPBS（空の緩衝液）中に希釈したmet-ShK [1-35]-Fc生成物20 μ Lのスペクトル走査を示す。

30

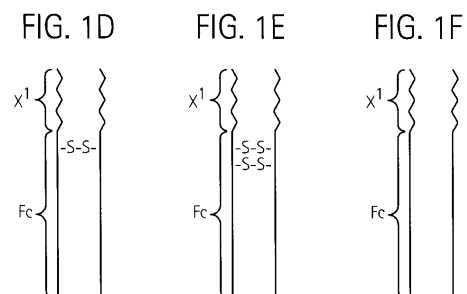
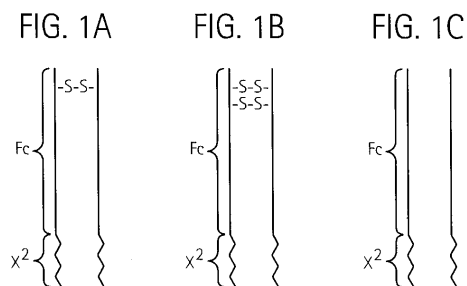
【図77B】最終的なmet-ShK [1-35]-Fc生成物のクーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン4ないし20% SDS-PAGEを示す。レーン1ないし12を次のとおり負荷した。Novex Mark 12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5 μ gの非還元型生成物、ブランク、2.0 μ gの非還元型生成物、ブランク、10 μ gの非還元型生成物、Novex Mark 12の広範な範囲のタンパク質標準物質、0.5 μ gの還元型生成物、ブランク、2.0 μ gの還元型生成物、ブランク及び10 μ gの還元型生成物。

【図77C】50mMの NaH_2PO_4 、250mMのNaCl、pH6.9中のPhenomenex BioSep SEC3000カラム（7.8 $\times$ 300mm）へ1mL/分で注入される、最終的なmet-ShK [1-35]-Fc生成物93 μ gに関する、280nmで吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

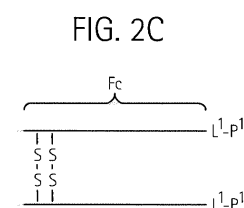
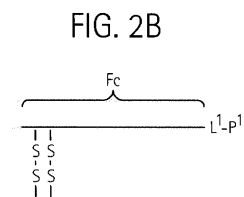
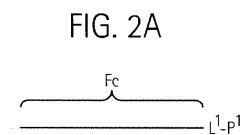
40

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

【図 1】



【図 2】



【図 3 A】

FIG. 3A

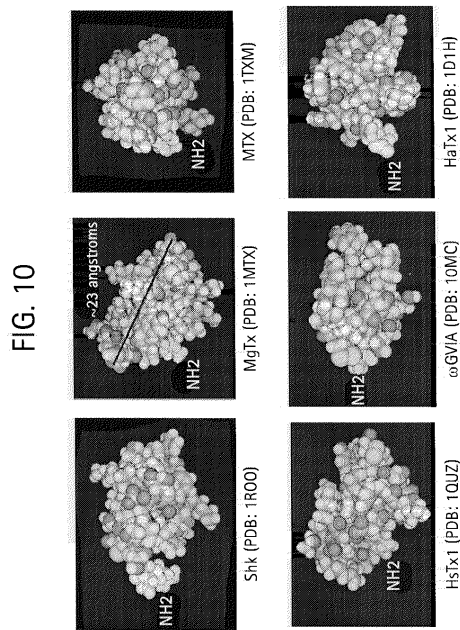
	ATGGAATGGAGCGGGCTCTTCTCTTCTCTCGTCAGTACGACCTGGTGCCATCCGAC	
1790		1849
a	TACCTTACCTCGACCCAGGAAGAGAAGAGCAGTCATTGTCACCAAGGTGAGGCTG M E W S W V F L S V T T G V H S D -	
	AAACTACACATGCCACCCTGCCAGCAGCTGACTCTGGGGGAGCAGCTCAGTCTTC	
1850		1909
a	TTTGTAGTGTACGGGTGGCAGGGCTGTGGACTTGAAGACCCCTGGCAGCAGAAG K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F -	
	CTCTTCCGCCAAAACCAAGGACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGC	
1910		1969
a	GAGAGAGGGGGTTTGGGTTCCTGGGAGTACAGAGGCCCTGGGAGCTCCAGTGTACG L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C -	
	GTGGTGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGTAAGTGGAGGC	
1970		2029
a	CACCACACCTGCACCTGGTGTCTTGGGAAGTCAAGTCAAGTGAACATGCACTGCCG V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G -	
	GTGGAGGTGCATATGCCAAGACAAGCCCGGGAGGAGCAGTACACAGCAGTACCGT	
2030		2089
a	CACCTCCAGTATTACGGTTCTGTCTTGGCGCCCTCTCTGTGATGTGTGGTGCAGGCA V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R -	
	GTGGTCAGGTCCTCACGTCCTGCACCAAGACTGCGTGAATGCCAAGAGTACAAGTGC	
2090		2149
a	CACCAGTCGAGGAGTGGAGGAGCGTGTGCTTGACGACTTACGCTTCTCATGTTACAG V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C -	
	AAGGTCCTCAACAAGCCCTCCGAGCCCATCGAGAAACCATCTCCAAGGCAAAAGG	
2150		2209
a	TTCCAGAGGATGTGTTCCGGAGGGTCGGGGTAGCTTTTGGTAGAGGTTCCGGTTCCTC K V S N K L L P A P I E K T I S K A K G -	
	CAGCCCCGAGAACAAGGTGTACACCTCGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAGAAC	
2210		2269
a	GTCCGGGCTCTTGCTGTCCATCTGGGACGGGGTAGGGCCCTACTCGACTGTTCTTG Q P R E P P Q V Y T L L P S R D E L T K -	
	CAGTCAGGCTGACCTGCTGTGCAAGGCTTCTATCCGAGCAGCATGCCCTGGAGTGG	
2270		2329
a	GTCCAGTCGCACTGGACGGACAGTTCCTCGAAGATAGGTCGCTGTAGCGGCACCTCACC Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W -	
	GAGAGCAATGGGCGAGCCGAGACAACATACAAGACCAGCCCTCCCGTGTGGATCCGAC	
2330		2389
a	CTCTCTGTTACCCGTGGCCCTCTGTTGATGTTCTGGTGGGAGGGCAGCACTGAGCTG E S N G Q P E N N Y K T T C P P V L D S D -	

【図 3 B】

FIG. 3B

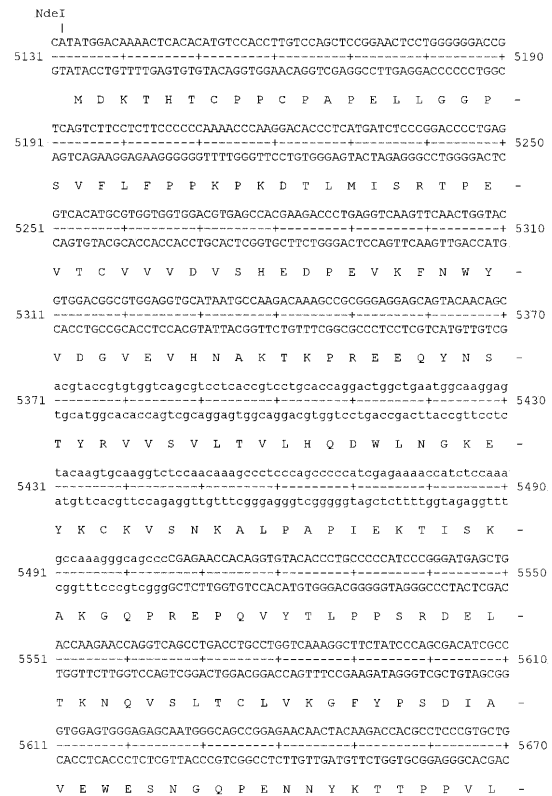
2390 GGTCCTCTTCTCCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGACAGGTGGCAGAGGGGAAC
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 a CCGAGGAGAGAGAGATGTCGTCTGATGGCACTGTTCTCGCTCCACCGTCGTCCCTTG 2449
 G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N -
 2450 GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCCTC
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 a CAGAGAGATCAGGCCACTGACTACTCGAGACGCTGTTGGTAGTGTGCTGTCTCCGGAG 2509
 V F S C S V M H E A L H N H G T Q K S L -
 2510 TCCCTGTCTCCGGGTA
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 a AGGGACAGAGGCCATT 2527
 S L S P G C K -

【図 10】



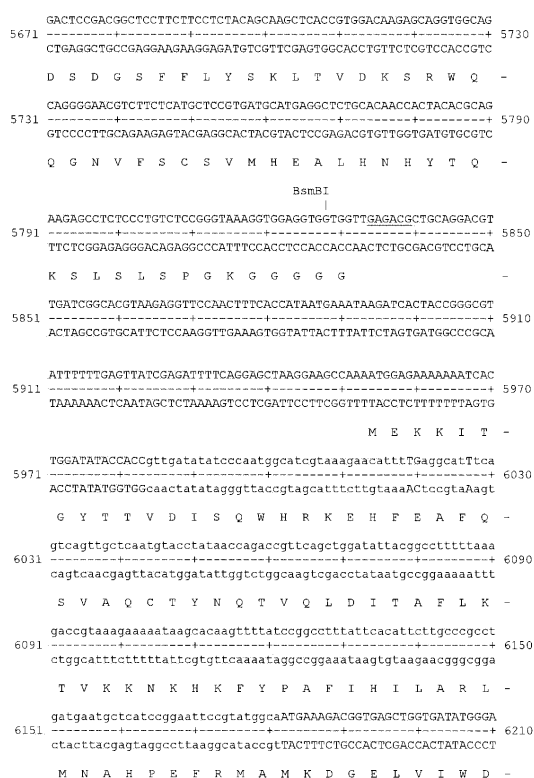
【図 1 1 A】

FIG. 11A



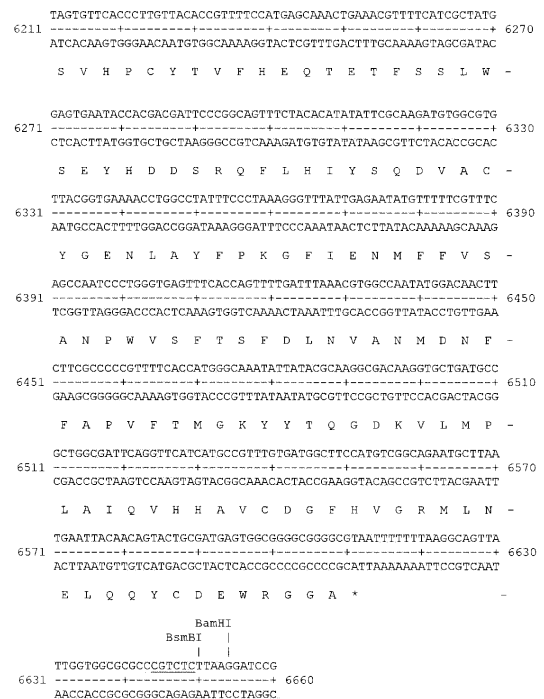
【図 1 1 B】

FIG. 11B

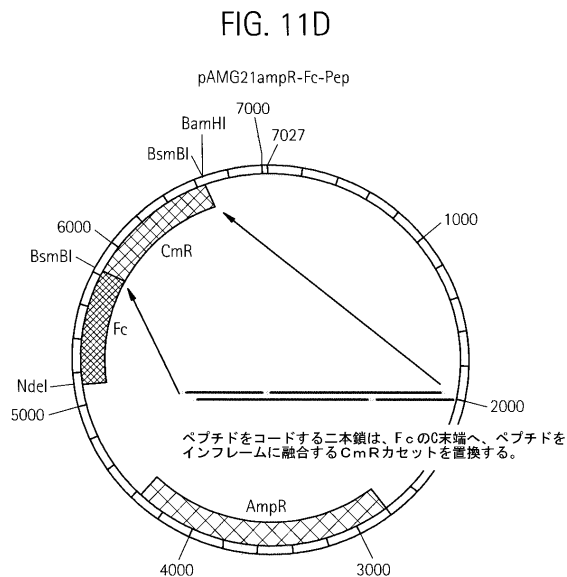


【图 1 1 C】

FIG. 11C



【図 1 1 D】



【図 1 2 A】

FIG. 12A

BanBI
NdeI

5131 CATATCGGACGACGGGGCGTGGTGTGACAATTAAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTAT
5190 GTATACGCTCTGCCCGGCACAACCTGTTAATTAGTAGCGGTATCATATAGCCGTATCATA

M

5191 AATACGACAAGGTGAGGAARCTAAACATGGCCCAAGTGACCAGTGGCGTTCCTGGTGCTCA
5250 TTATGCTGTTCCACTCCTTGATTGGTACCGGTTCAACTGGTCAAGGCCAAGGCCACGAGT

M A K L T S A V P V L T -

5251 CGCGCGCGACGTCGCGCGAGCGGTCTGAGTCTCGGACGACCGGCTCGGGTCTCCCGGG
5310 GGCAGCGGCTCGACGGGCTCGCCACGCTCAAGCACTGGCTGGCGGAGGCCCAAGAGGGCCC

A R D V A G A V E F W T D R L G F S R D -

5311 ACTTCTGTGGAGAGCACTTCGCGGGTGTGGTGTGGGACGACGCTGACCCGTGTCATCAGCG
5370 TGAAGCACCTCTCTCTCAAGCGGCGACACAGCGCCCTGCTGCACCTGGGACAAGTAGTCTGC

F V E D D F A G V G V R D D V T L F I S A -

5371 CGGTCCAGGACCAAGTGGTGGCGGACAACACCCTGGCCCTGGGTGTGGTGCAGCGGCTGG
5430 GCGAGTGCTGTGTCACCAACGGCTGTGTGGGACCGGACCTCACCCACGCGCGCGGACC

V Q D Q V V P D N T L A W V W V R G L D -

5431 ACGAGCTGTACGCCGAGTGGTCGGAGGTCGTGTCCACGAACCTCGGGACGGCTCCGGGC
5490 TGCTCGACATCGCGCTCACAGCCTCCAGCATAGTGCTTGAAGGCCCTCGGAGGCCCTG

E L Y A E W S E V V S T N F R D A S G P -

5491 CGGCCATGACCCAGATCGGCGAGCAGCGCTGGGGGGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCGG
5550 GCCGGTACTGGCTCTAGCCGCTCTGTGGGCAACCCCCGCTCTAAGCGGGACGGCGTGGGG

A M T E I G E Q P W G R E F A L R D P A -

5551 CGGCAACTGCGTGCACCTCTGTGGCGGAGGACGAGGACTGACAGCTGACAGCGCGCGTCT
5610 GGCGGTGAGCGACGTGAAGCACCAGGCTCCTCTGCTGACTGTGACGGTGC CGCGCGAG

G N C V H F V A E E Q D *

【図 1 2 B】

FIG. 12B

BsmBI

5611 TCAGGTGGTGGTGGTGGTGACAAACTCACACATGCCCCCGTGCCACGACCTGAATC
AGTCCACCACCACCACCACCTGTTTTGAGTGTGACGGGTGGCAGGGTGGTGGACTTGAG 5670

G G G G G D K T H T C P P C P A P E L -

5671 CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCTCATGATCTCC
GACCCCCCTGGCAGTCAGAAAGGAAGGGGGTTTTGGGTCTCTGGGAGTACTAGAGG 5730

L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S -

5731 CGGACCCTGGAGTGCATGCTGGTGGTGACGTGAGCCACGAGACCCCTGAGGTCAAG
GCTCTGGGAGCTCCAGTGTACGCACCACCACCTGCACCTGGTGCTCTGGGAGTCCAGTTC 5790

R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K -

5791 TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATATGCGCAAGACAAGCCGGGGAGGAG
AAGTTGACCATGACCTGCGCGACCTCCAGCTATTACGGTTCGTTTCGGCGCCCTCCTC 5850

F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E -

5851 CAGTACAACGACGCTACCGTGGTGCAGGCTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTG
GTCATGTTGCTGTCATGGCACCAAGTCGCAAGGATGGCAGGACGTGGTCTTGACCCGAC 5910

Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L -

5911 AATGGCRAAGGAGTCAAGTGCAGGCTTCCAAACAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAA
TTACCGTCTCTCATGTTACAGTTCGAGAGTTGTTTGGGAGGGGTGGGGGTAGCTCTTT 5970

N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K -

5971 ACCATCTCAAAGCAAGAGGGCAGCCCGAGAACCAACAGGTGTACACCTGCCCCCATCC
TGGTAGAGGTTTGGTTTCCGCTCGGGGCTCTTGGTGTCCACATGTGGAGCGGGGTAGG 6030

T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S -

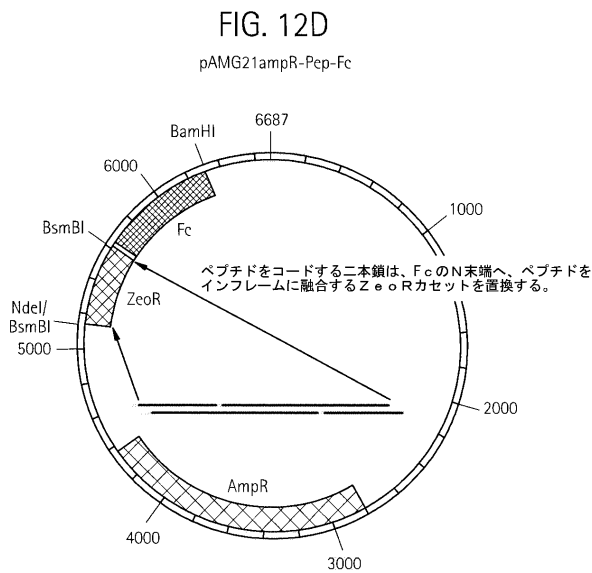
6031 CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTATCCC
GCCCTACTGACGTGGTCTTGGTCCAGTGGAGTGAGCAGGACCAAGTTTCCAGAGATAGGG 6090

【図 1 2 C】

FIG. 12C

R D E L I T K N Q V S L T C L V K G F Y P -
6091 AGCGACATCGCCCTGGAGTGGGAGAGCAATGGCGACCCGGAGAACAACTACAAGACCAG
-----+-----+ 6150
TCGCTGTAGCGGCACCTCCACCTCTCGTTACCCGTGGCCTCTTTGTGATGTTCTGTGTC
S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T -
6151 CCTCCCGTGCTGACTCCGACGGCTCCTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAG
-----+-----+ 6210
GGAGGGCACGACCTGAGGCTGCCGAGGAAGAAGAGAGTGTCTGTCGAGTGGCAGCTGTTC
P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K -
6211 AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA
-----+-----+ 6270
TCGTCCACGTCGTCCTCCCTTGCAGAGAAGATACGAGGACATACGTACTCCGAGACGTGTG
S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N -
BamHI
CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATAATGGATCC
6271 -----+-----+ 6319
GTGATGTGCTCTTCTCTGGAGAGGGACAGAGGCCATTATTATACCTAGG
H Y T Q K S L S L S P G K *

【図 1 2 D】



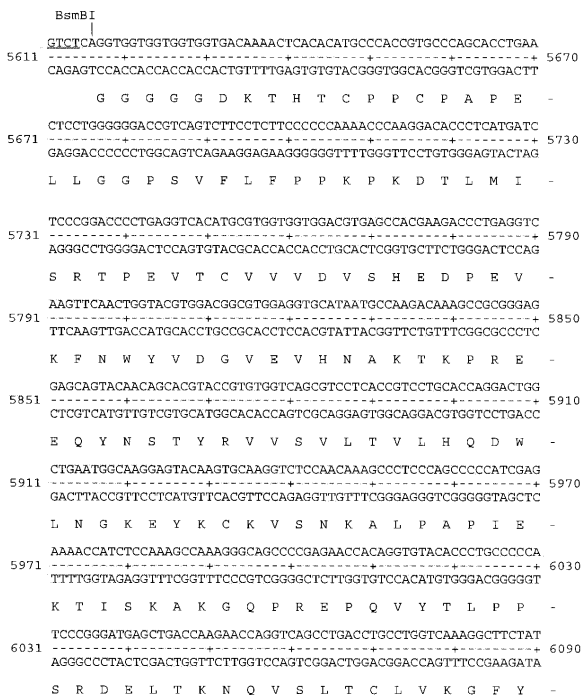
【図 1 2 E】

FIG. 12E



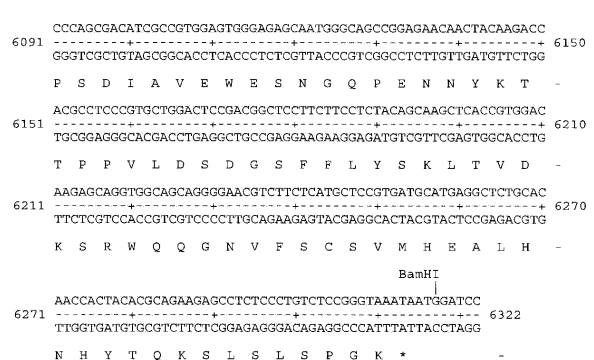
【図 1 2 F】

FIG. 12F

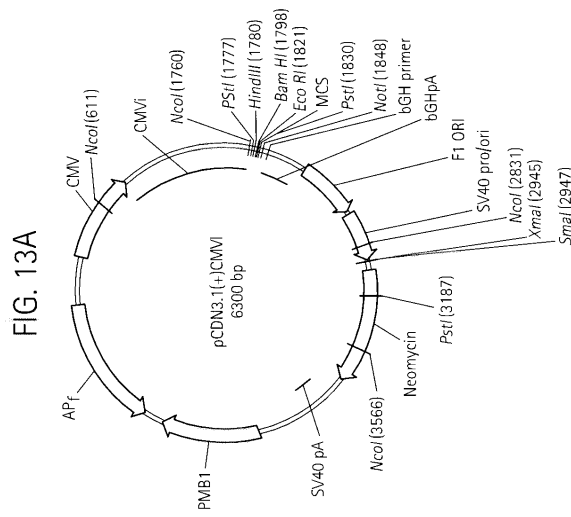


【図 1 2 G】

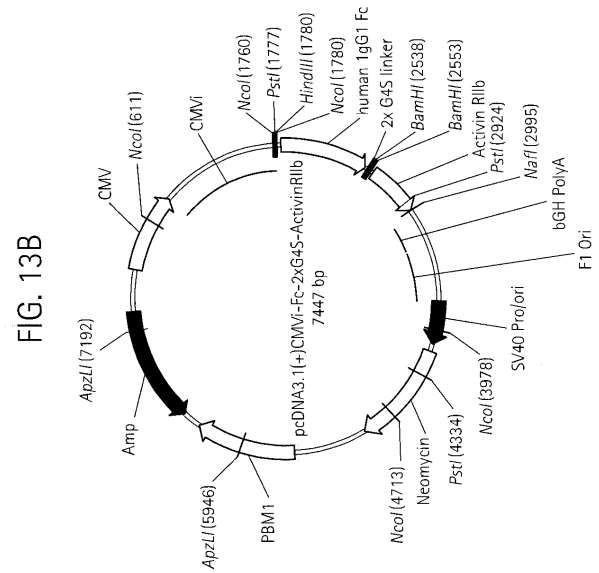
FIG. 12G



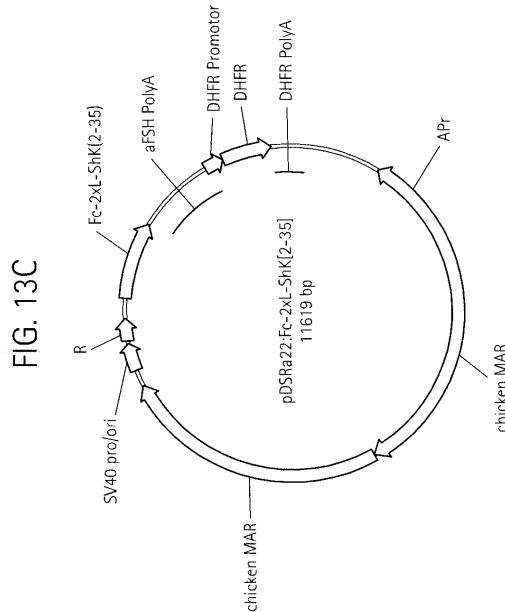
【図 13 A】



【図 13 B】



【図 13 C】



【図 14 A】

FIG. 14A

```

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCTCTGTCAGTAACGACTGGTGTCACCTCCGAC
1
TACCTTACCTCGACCCAGAAAGAGAAGGACAGTCATTGCTGACACAGGTGAGGCTG
M E W S W V F L F F L S V T T G V H S D
AAACTCACACATGCCACCGTGCCAGACACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTC
61
TTTGTAGTGTGTACGGGTGGCAGGGTCTGGGACTTGGAGACCCCTGGCAGTCAGAG
K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F
CTCTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGC
121
GAGAAGGGGGTTTGGGTCTCTGTGGGAGTACTAGACGGCCCTGGGACTCCAGTGTACG
L F P P K K D T L M I S B T P E V T C
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGCTACGTGGACGGC
181
CACCAACCTGCACTCGGTGCTTCTGGGACTCCAGTTCAAGTTGACCATGCACCTGCCG
V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G
GTGGAGGTGCATATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGT
241
CACCTCCAGGTATTACGGTTCTGTTTGGGCGCCCTCCTCGTCATGTTGCTGTCATGGCA
V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R
GTGTCAGCTCCTCACCCTCTGCACAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
301
CACCACTCGCAGGAGTGGCAGGACGTGGTCTGACGACTTACCGTCTCCTCATGTTACAG
V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
AAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG
361
TTCCAGAGGTGTTTTCGGGAGGGTCGGGGGTAGCTCTTTTGGTAGAGGTTTCGGTTCCC
K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTTGCCCCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC
421
GTCGGGGCTCTTGGTCCACATGTGGGACGGGGTAGGGCCCTACTCGACTGTTCTTG
Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N
CAGGTACGCTGACCTGCTGCTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGG
481
GTCCAGTCGGACTGGACGGACAGTTTCCGAAGTAGGGTCGCTGTAGCGGCACCTCACC
Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W
GAGAGCAATGGGACGGGAGAACAACTACAAGACCAGCCTCCGCTGCTGGACTCCGAC
541
CTCTCGTTACCGCTCGGCTCTTGTGATGTTCTGGTGGGAGGGCAGCCTGAGGCTG
E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D
GGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGGACAGTGGCAGCAGGGGAC
601
CCGAGGAAGAAGAGATGTCGTTGAGTGGACCTGTTCTCGTCCACCGTCTGCCCTTG
G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N
GTCTCTCATGCTCGGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAGAGGCTC
661
CAGAAGAGTACGAGGACATACGTACTCCGAGACGTGTTGGTGTGATGTGCTCTTCTCGAG
V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L

```

【図 1 4 B】

FIG. 14B

[illegible]

【図 15 A】

FIG. 15A

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTCTCTTCTTCTGTCAGTAACAGCTGGTGTCCACTCCGCAC

1 60
TACTCTACTCTGACCCAGAAGAAGAAGCAGCTATTGCTGACCCAGGTGAGGCTG
a M E W S A T T E F L S V T H D
AAACTACACATGCCACCGTGCCACAGCTGACTCTCTGGGGGACCGCTAGCTCTTC

61 120
TTTGTGATCTGACGGGTGCACGGGTGCTGGATCTTGAGAGCCCCCTGGCAGTCAGAG
a K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F
CTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGC

121 180
GAGAAGGGGGTTTGGGTCTCTGGGAGTCTAGAGGCCCTGGGACCTCAAGTACG
a L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C
GTGTGGTGGAGCTGAGGCACAGAAGCCTGAGGTCAAGTTCAAGTGTACTCTGGACGGC

181 240
CACACACCCTGCACTGGTGTCTTGGGAGCTCAAGTCAAGTGCACATGCACCTGGCC
a V V V D V S H E D P E V K F N W V V D G
GTGGAGGTGCATATGCCAAGACAAGCGCCGGGAGGAGCAGTACAAACGACAGCTACCGT

241 300
CACTCTCCAGTATTACGGTCTCTTTGGCGGCCCTCTCGTCAATGTTGTGCTGACGTGCA
a V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R
GTGTGACAGCTGCTCTACCGCTCTGCCACAGGAGCTGGCGTAAGTCAAGAGGATCAAGTGC

301 360
CAGCTGACGAGGATGGAGACAGCTGGTCTGACCGACTGCGGCTTCACTTCTTGTCAAG
a V V S L T V L H Q D W L N G K E Y K C
AAGGTTCCCAAAAGCCCTCCAGCGCCATCAGAAACACTTCCCAAGGCAAAAGG

361 420
TTCACAGAGTGTCTTCCGGGAGGGTGGGGGTAGCTCTTTGTAGAGAGTTCTGGTTCC
a G V S N K A L P A P I E K T I S K A K K
CAGCCCCGAGAACCAAGTGTACACCTCGCCCATCGCCGGATGAGCTGACCAAGAAC

421 480
GTCGGGGCTCTGGTGTCCACATGTGGACGGGGTAGGGCCCTACTGACTGTGTTCTTG
a Q P R E P V Y T L P P S R D E L T K N
CAGGTGACGCTGACTGCTGTGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGCTGGAGTGG

481 540
GTCCAGTCGGACTGCAGGCACAGTTTCCGAAGATAGGGTCGTGTAGCGGCACCTTACC
a Q G S L T V L K G F P A S D I A V E W
GAGGCATGGGACCGCGAGAACACTACAGAACCCAGCTCCCGCTGCTGGACTCGGAC

541 600
CTCTCGTACCGCTCGGCTCTTGTGAGTCTCTGGTGGCGAGGCGACAGCTAGGCTG
a S N G P N V Y T F V L D S D
GGTCTCTTCTCTCTACAGACAGCTCACCCTGGACAAGCAAGTGGCACAGGGGAAAC

601 660
CCGAGGAGAAGAGATGTCTTTCAGTGGACACTGTCTCTCGCCACCGCTCGCCCTTG
a G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q N
GTCTTCTCATGTCPCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACTACTACCGCAGAGAGAGCTC

661 720
CAGAAGATACGAGGCACATGCTATCCGAGAGCTGTGGTGAATGTGCGTCTTCTCGGAG
a V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L
-

【図 1 5 B】

FIG. 15B

721 TCCCTGTCTTGGGTAAGAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGAAGCAGCTGCATCGAC
 a AGGCAAGAGAGCCATTCTCTCTCTAGAGCTCTCTCTCTCTCTGTCAGCAGTAGCTG 781
 S L S P K G G G G S G G G G S S C I A D T G
 ACCATCCCCAAGAGCGCTGCACCGCCTTCAGTCAAGACACAGATGAAGTACCGCGTG
 781
 TGGTAGAGCTTCTGGCAGAGCGGGCAGAGTACAGTCTGTGTCTGATTCATGGCGGAC
 a T I P K S R C T A P A Q C K H S M K Y R L -
 AGCTTCTGGCGAAGACCTGGCGGACCTGCTAA
 841
 TCGAAGACGGCGGCTTCTGGACGCCGTGGACGATT 873
 a S F C R K T C G T C * -

【图 1 6 A】

FIG. 16A

1
ATGGAATGGAGTGGGGCTTTCTCTCTTCCTCGTAGTAACGACTGGTGCCATCCGCAC - 60
TACCTTTACTTCGCCCAAGAAGAACGAGCAACTATTGTGACCACAGGTGAGGCTG
M E W S V L F F L F L V S T T V G H S D -
AAATCATCACACATGCCACCCTGCCAGCACTGAAGCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC
61
TTTTCAGTGTGTACGGGTGGCAGGGGTCTGGACTGAGGACCCCCTGGCAGTCAGAAG
K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F -
CTTTCCCCCAAACAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC
121
GAGAAGGGGGGTTTTGGGTCTCTGGGAGTATGAGAGGCTGGGACCTCAAGTGTACG
L F P P K P K D T L M I S R T P E V T -
GTGGTGTGGAGCTGACCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGTACTGTGACGGC
181
CACCCACACTGCATCGTGGTCTTTGGGACTCCAGTTCAAGTTGACATGCAGCTCGCG
V V V D V S H E D P E V K F N Y V V D G -
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGT
241
CGCTCCAGATTTACGGTCTGTTTGGCGCGCTGCTGCTGCTTTGGTGAGTGGCAGTGA
V V H A A E K E Q N S T Y R
TGGTCAGCTCTCTACCCCTCTCCAGCAGAGCTGGCTATGATGGCAGATACAGTAACT
301
CAGCAGTCGGAGAGTGGCAGAGCTGGTCTGACCCAGTCAAGTCTCTCATGTTCTTACG
V V S V L T V L H Q D L N G K E Y K K -
AAGGTCCTCAACAAGCCTCTCCACGCCCTCCAGAAACCATCTCAAGAACCAAGGG
361
TTCCAGAGGTTGTTTGGGAGGCTGGGGGTAGCTCTTTGTAGAGGTTTCGGTTCGCC
K V S N K A L P A P I E I T S K A K K -
CAGCCCGGAGAACAAGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC
421
TTCGGGGCTTTGGTGTACATGTGGGACGGGGTAGGGCCCTACTGCACTGTTCTTG
Q P R E P V L T V L P P S R D E L T K -
CAGGTCAGCTGACCTGCTGTTCAAAGGCTCTATCCAGCAAGCTCGCGCTGGAATGG
481
GTCCAGTCGGAGTCGACGACAGTTTCCGAAGTASGGTCGTGTACGGCACTTACC
Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W
GAGAGCAATGGGACCGGAGAACAACATCAAGAACCGCTCCGGTCTGCACTCGAC
541
CTCTCTTACCGGTGGCCTTTGTTGATGTTCTGTGGCGGAGGACGACCTGAGGCTG
E S N G C P E N N Y T T P P V L D S D -
GGCTCTCTCTCTTACAGCAAGTCAACCTGGACAGAGCAAGCTGGACAGAGGGAAAC
601
CGGAGAAGAGAGATGTCTGTCAGTGGCACCTGCTCTCTGCTCAAGCTCTCCCTCTG
G B F F L Y S K L T V L D K S R W Q G N -
GTCTTTCATGTCCTGTATGCATGAGCTCTGCACAACTACTACCGAGAAGAGCTTC
661
CAGAAGACTAGGAGGACTGACTATCCGAGCACTGTTGGTATGTCGCTCTTCTCGGAG
V F S C S V M H E A L H N H Y T O K S L -

【図 2 4】

FIG. 24A

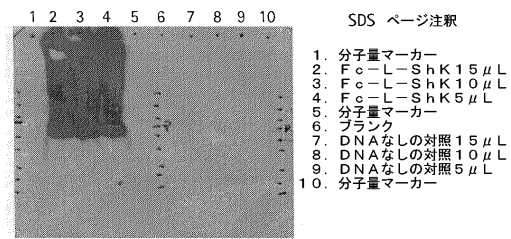
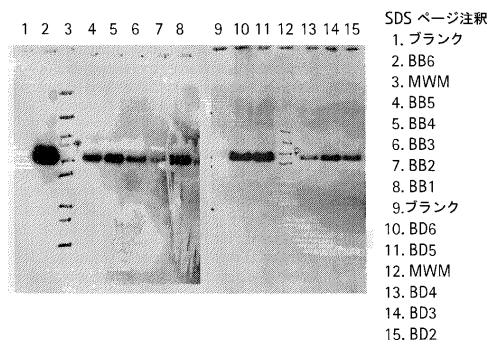


FIG. 24B



【図 2 5】

FIG. 25A

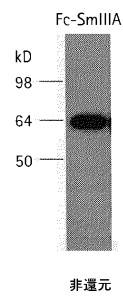
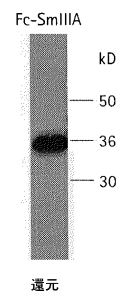
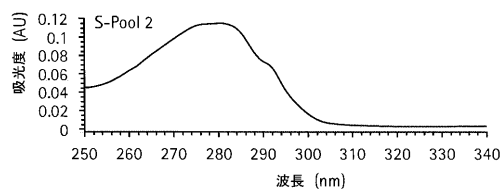


FIG. 25B



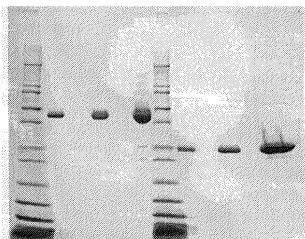
【図 2 6 A】

FIG. 26A



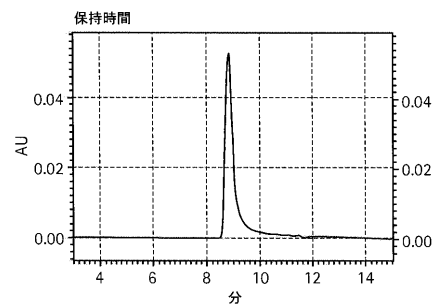
【図 2 6 B】

FIG. 26B

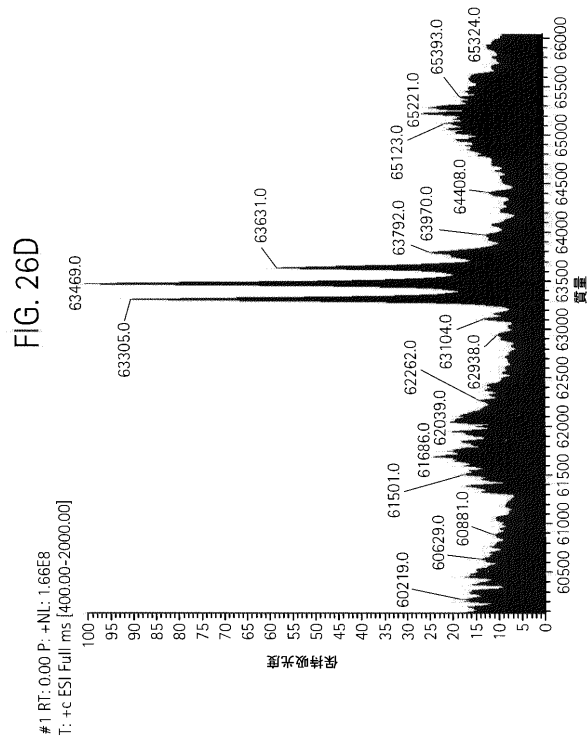


【図 2 6 C】

FIG. 26C

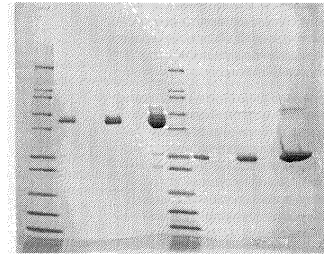


【図 26 D】



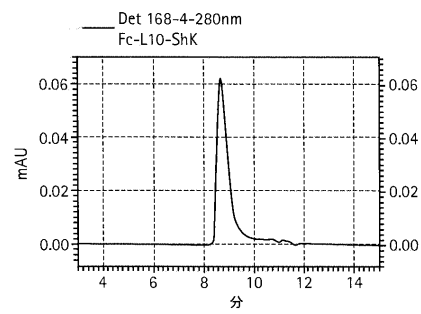
【図 27 A】

FIG. 27A



【図 27 B】

FIG. 27B



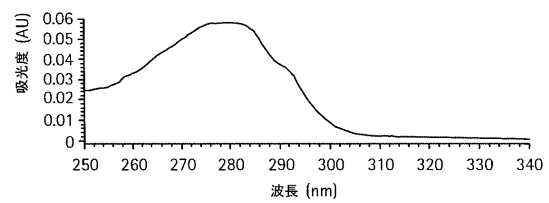
【図 27 C】

FIG. 27C



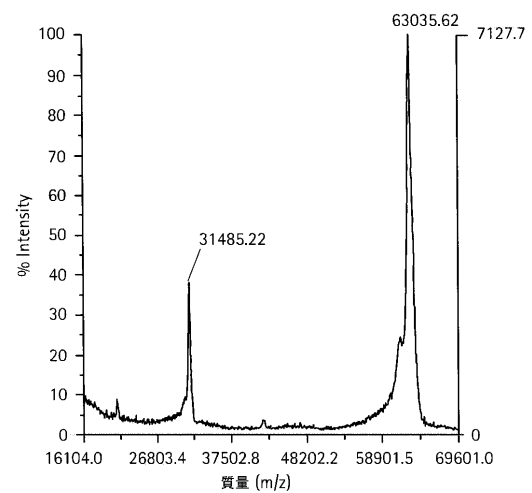
【図 27 E】

FIG. 27E



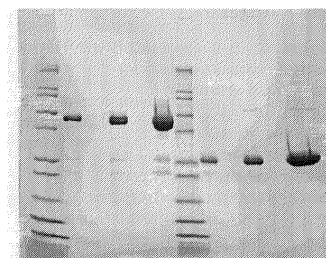
【図 27 F】

FIG. 27F



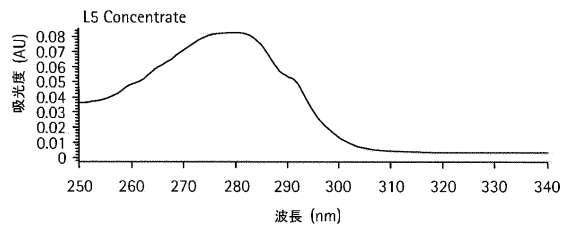
【図 27 D】

FIG. 27D



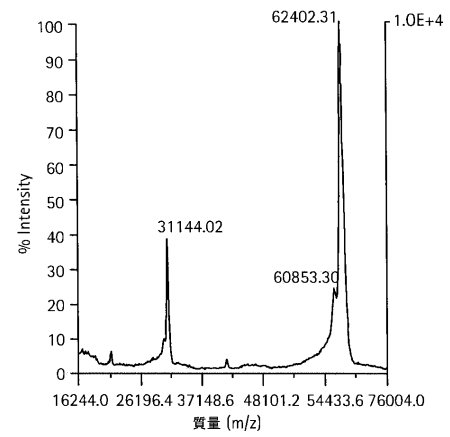
【図 27 G】

FIG. 27G



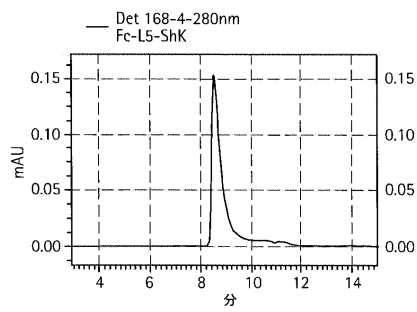
【図 27 I】

FIG. 27I



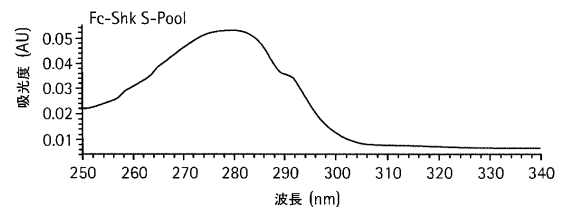
【図 27 H】

FIG. 27H



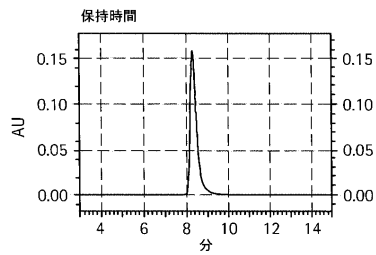
【図 27 J】

FIG. 27J



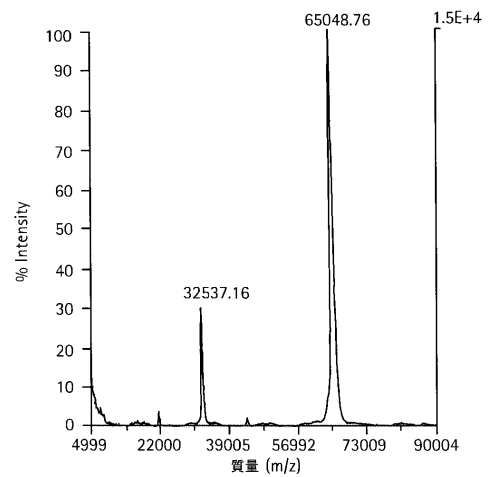
【図 27 K】

FIG. 27K



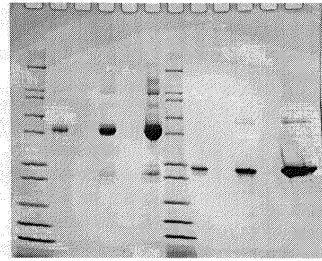
【図 27 L】

FIG. 27L



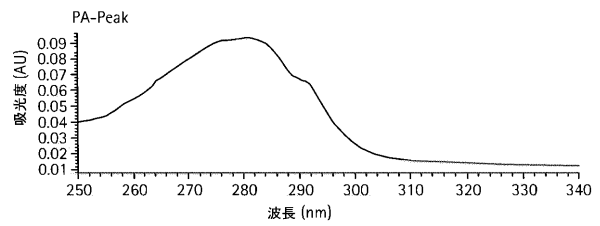
【図 2 8 A】

FIG. 28A



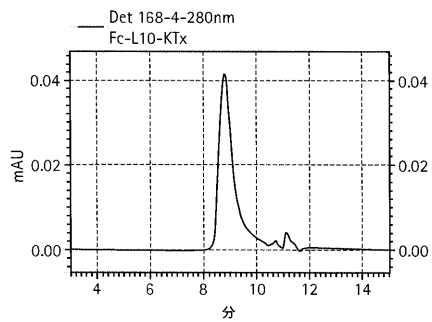
【図 2 8 C】

FIG. 28C



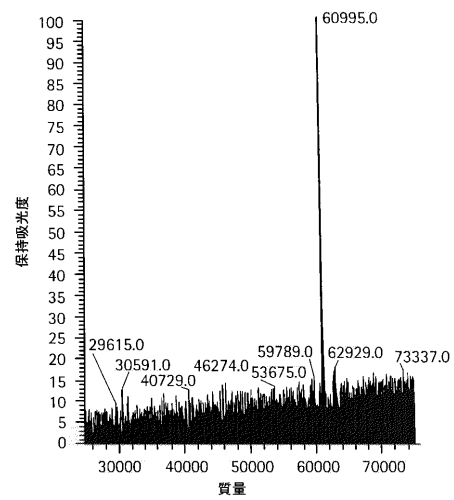
【図 2 8 B】

FIG. 28B



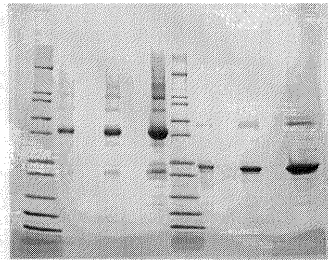
【図 2 8 D】

FIG. 28D



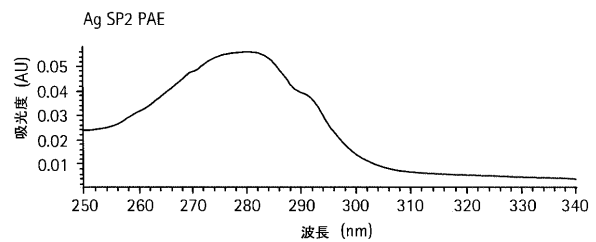
【図 2 9 A】

FIG. 29A



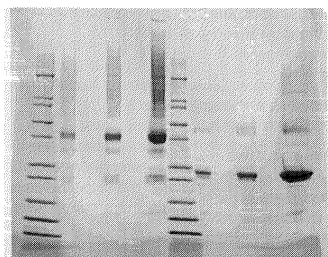
【図 2 9 C】

FIG. 29C



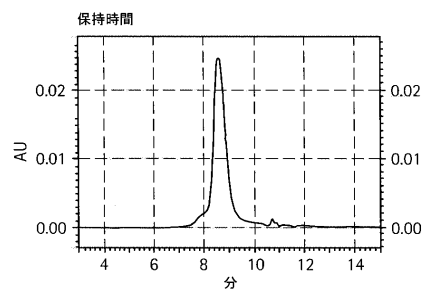
【図 2 9 B】

FIG. 29B



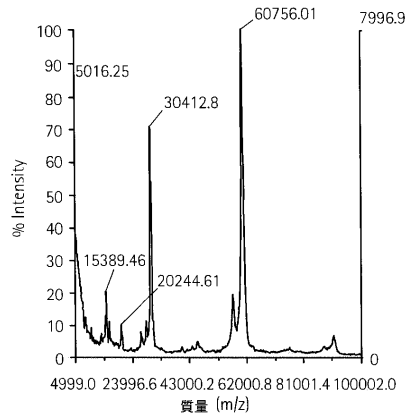
【図 2 9 D】

FIG. 29D



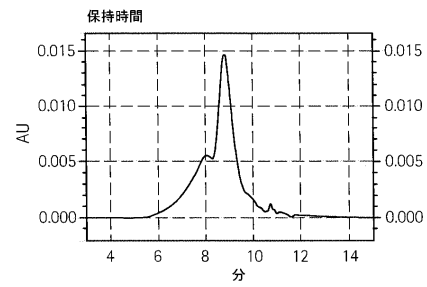
【図 29 E】

FIG. 29E



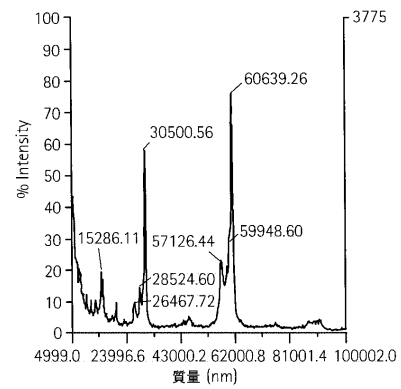
【図 29 G】

FIG. 29G



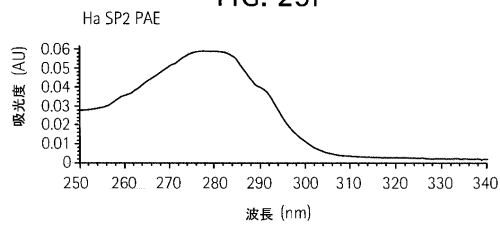
【図 29 H】

FIG. 29H



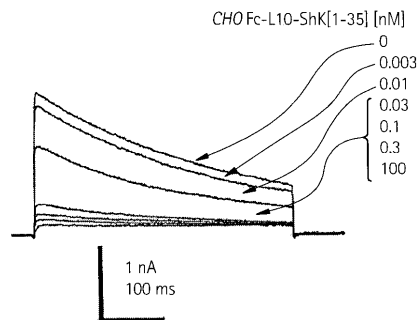
【図 29 F】

FIG. 29F



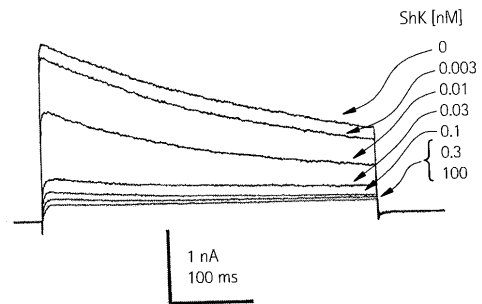
【図 30 A】

FIG. 30A



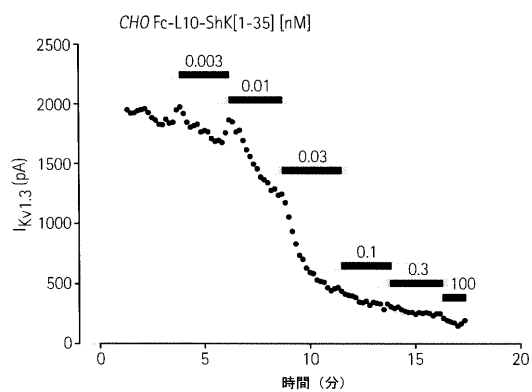
【図 30 C】

FIG. 30C



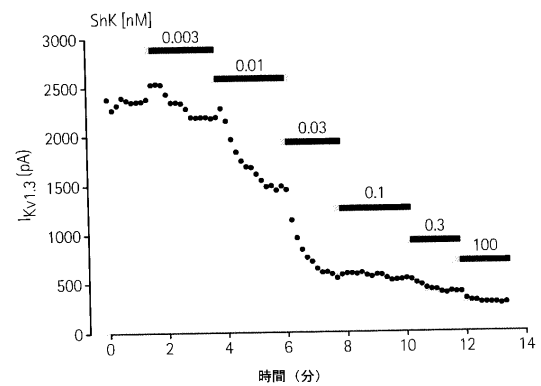
【図 30 B】

FIG. 30B



【図 30 D】

FIG. 30D



【図 3 1】

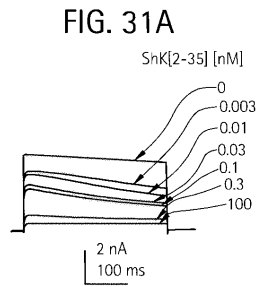


FIG. 31B

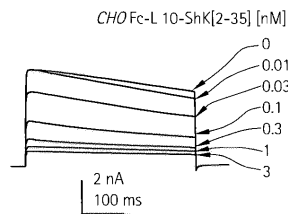
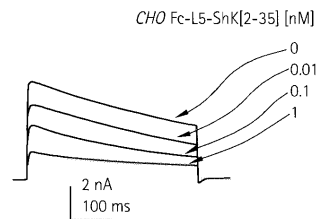


FIG. 31C



【図 3 2】

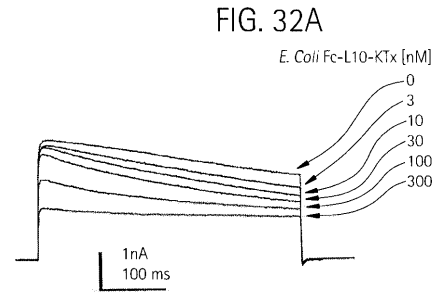
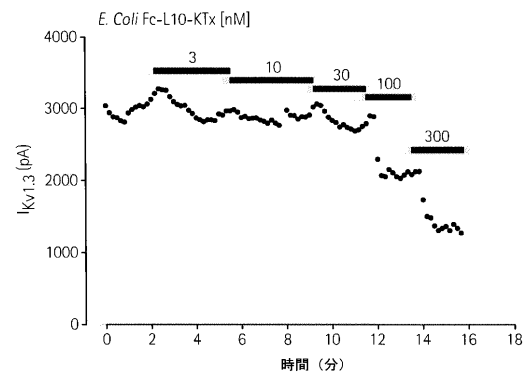


FIG. 32B



【図 3 3】

FIG. 33A

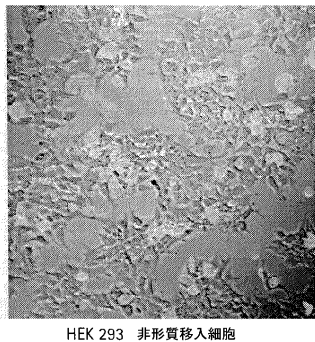
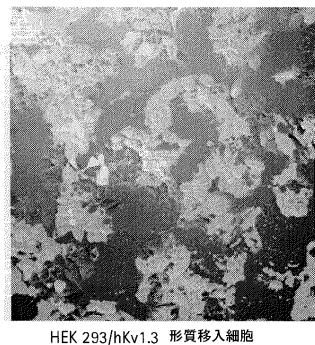


FIG. 33B



【図 3 4】

FIG. 34A

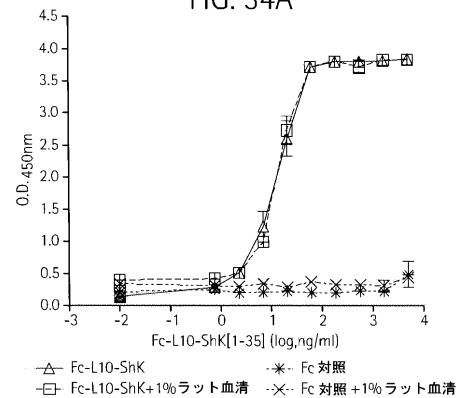
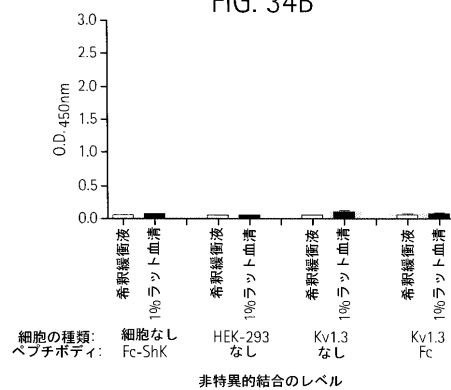
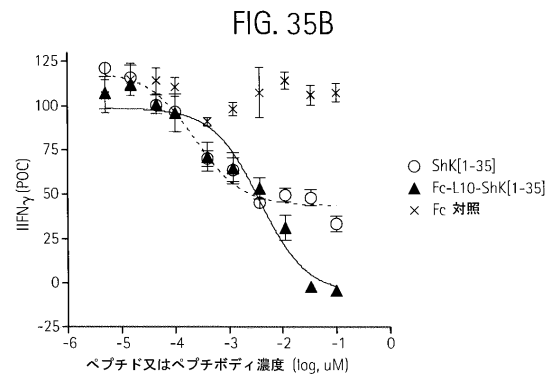
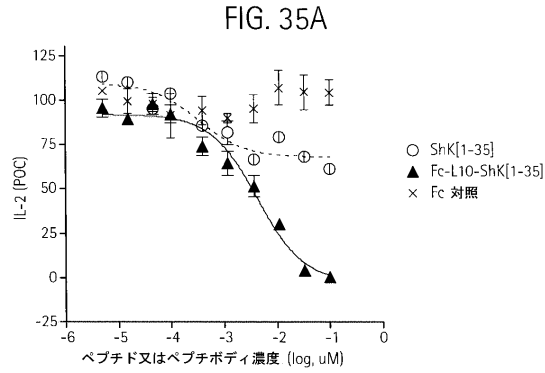


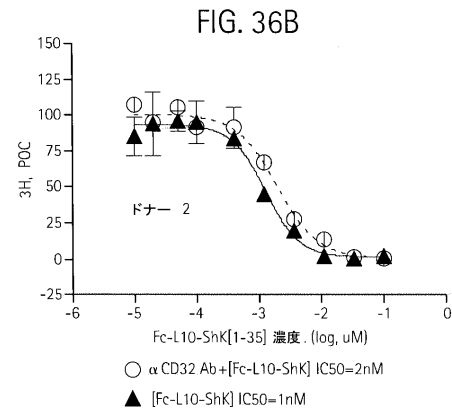
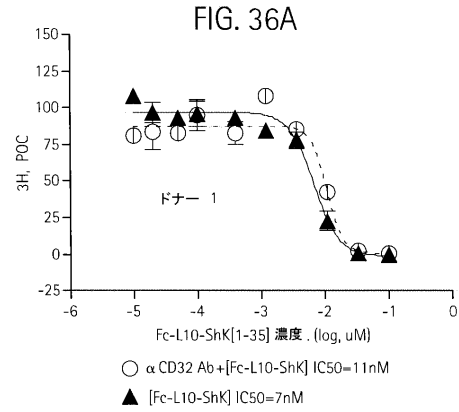
FIG. 34B



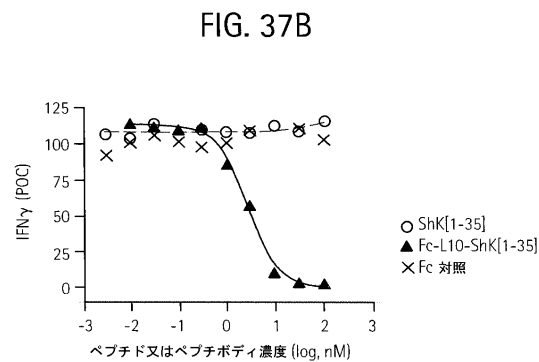
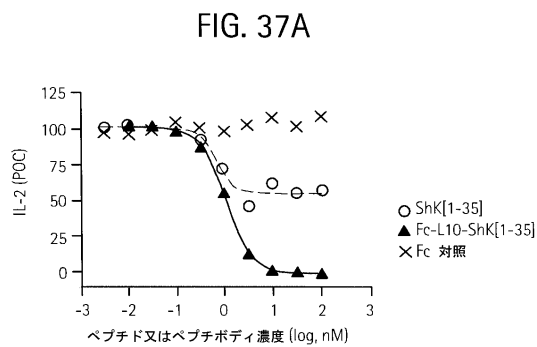
【図 3 5】



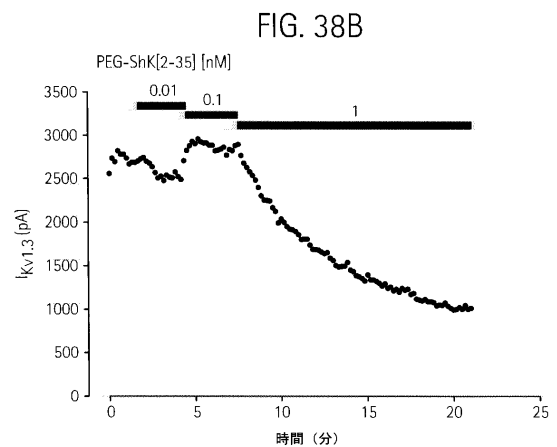
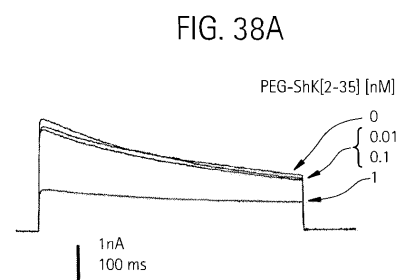
【図 3 6】



【図 3 7】



【図 3 8】



【図 3 9 A】

【図 3 9 C】

FIG. 39A

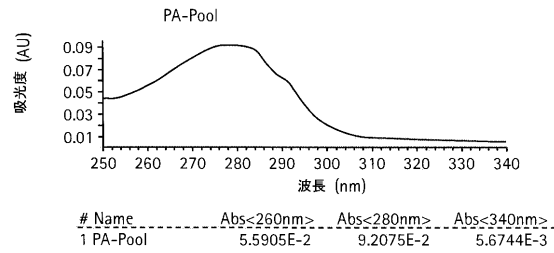
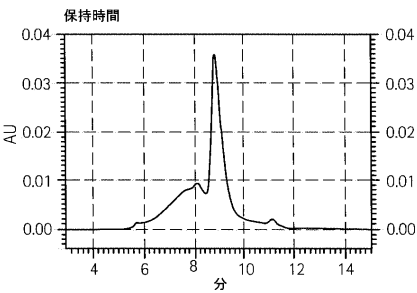
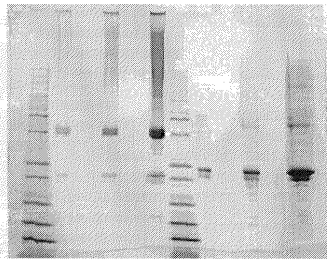


FIG. 39C



【図 3 9 B】

FIG. 39B



【図 4 0 A】

【図 4 0 C】

FIG. 40A

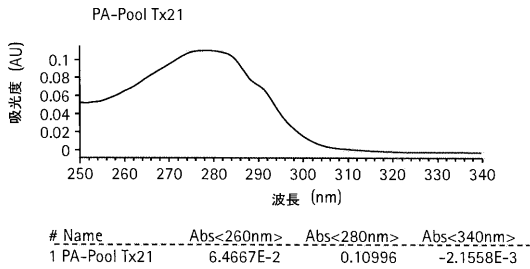
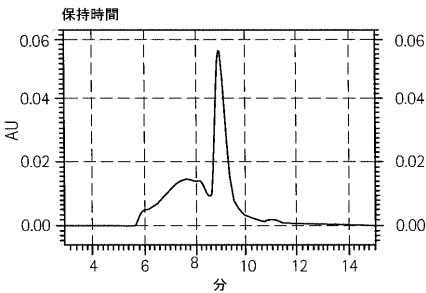
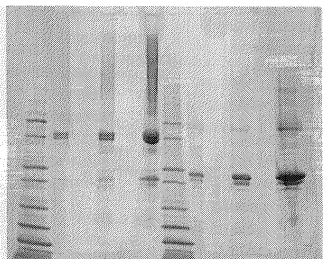


FIG. 40C

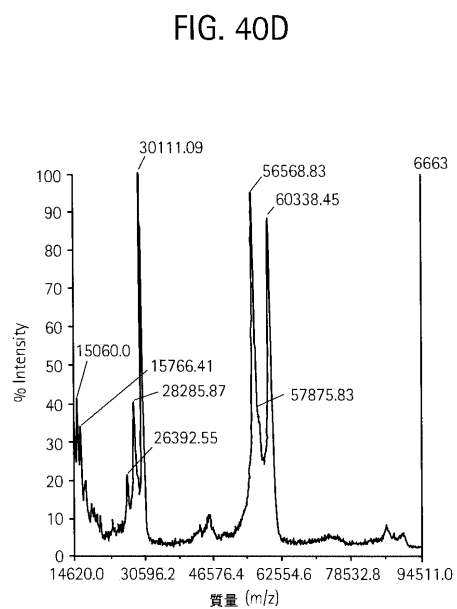


【図 4 0 B】

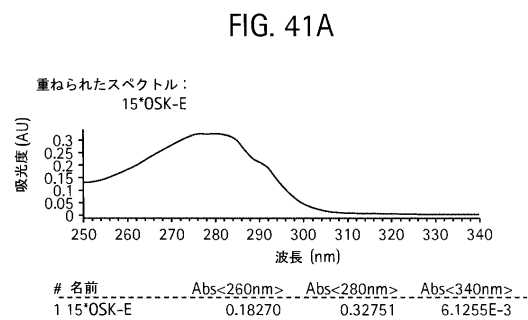
FIG. 40B



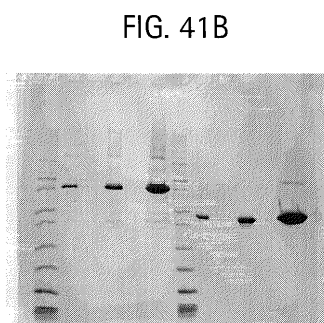
【図 4 0 D】



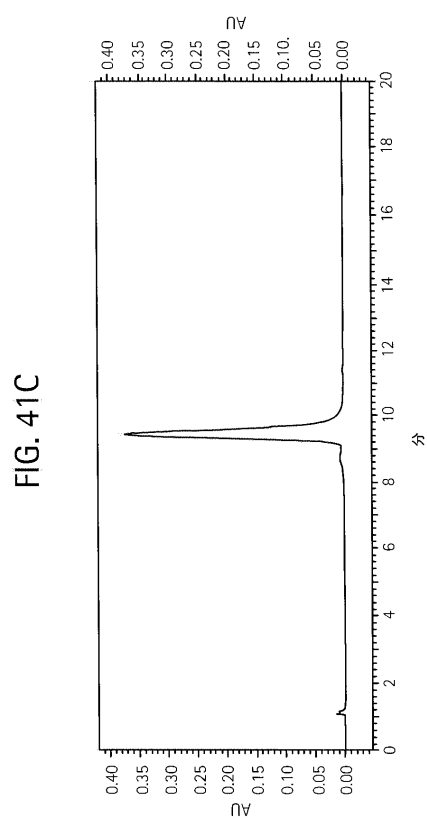
【図 4 1 A】



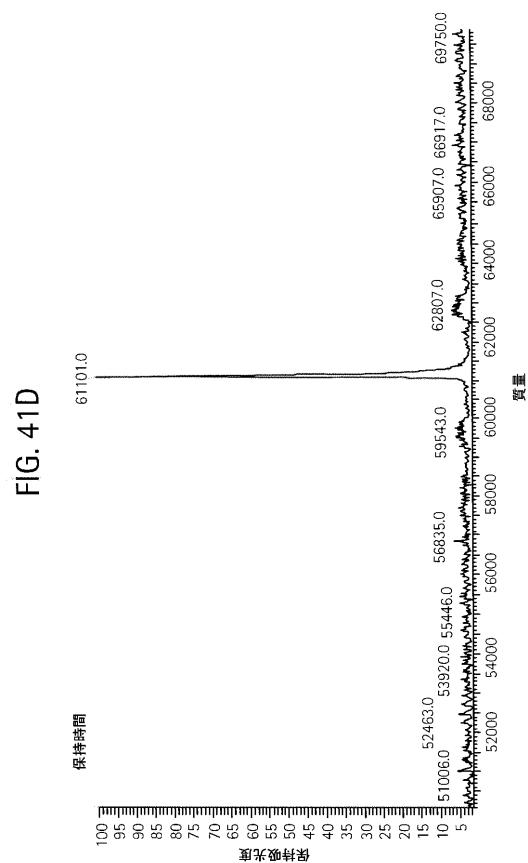
【図 4 1 B】



【図 4 1 C】



【図 4 1 D】



【図 4 2 A】

FIG. 42A

1 atggaatggagcgtgggtctttctctctctctctcgtacgtaacgactgggtgtccacatccgac 60
+
taccttacctcgccacgaagaagagaagaagacgactcattgctgaccacagtgtaggctg
M E W S W V F L F L F L S V T T G V H S D

61 aaaactcacacatgccaccgctgccaccgacctgaactctctggggggaccgtcagttcttc 120
+
ttttgagtgtgtacgggtggcaccggctcgtggactgaggacccccctggcagctagaag
K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F

121 ctcttccccccaaaaccgaagacacctcatgatctcccggaacccctgaggctcacatgc 180
+
gagaagggggggtttgggtctcctgtggagactagaggcctggggactcagtgtagc
L F F P P K P K D T L M I S R T P E V T C

181 gtgggtgtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtagctggacgcgc 240
+
caccacacactgcactcgtgctcttgggaactcagttcaagttgaccatgcacctgcgc
V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G

241 gtggaggtgcataatgccaaagacaagccggggaggagcagtcacaacacgactcagct 300
+
caccctcagctattacggctctctgttctggccgcctctcgtcatgtgtgtcgtgcagga
V E V H N A K K T K P R E E Q Y N S T Y R

301 gtggctcagcgtcctcacccgtctctgcaccaggacgtggctgaatggcaaggagtaacaatgc 360
+
caccagctcaggaggtgagcagcgtgtgtctgcagcactacccgttctcatgtttcacg
V V S V L T V V L H Q D W L N G K E Y K K

361 aaggtcttcacaaagccctccacgccccctcagagaaacacatctccaaagccaagggg 420
+
ttccagaggtgttcttcggagggtctgggggtagctctttgttagaggttttcggtttccc
K V S N K A L G A P I E K T I S K A K G

421 cagccccgagaaaccacaggtgtgtacacctgtcccccatccgggatgagctgaccaagaac 480
+
gtcggggctctcgtgttccaatgtggcagggggtaggccactcagcactgctgtcttg
Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N

481 caggtacgctcagctcgtcgttcaaggctcttatccacgcgacatcgcgctggagttgg 540
+
gtccagctcgagctggacggaccaggtttccgaagatagggtcgtctgacggcagctcacc
Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W

541 gagagcaatggcagccgggagaaactaacagaagaccagctccctcgtcgtgactccgac 600
+
ctctcgttaccctcgccgctcttggatgtctgtgtcggaggggcagcagctaggctg
E S N G Q P G E N N Y K T T P V L D S D

【図 4 3 A】

FIG. 43A

1	atggaatggaggtcgtgcttctctcttctctctgctacgaacagctggtgtccactccgac	60
	taccttacctgcaccgacaagaagagaagagacgtctattgtaccacagatggagctg	
	M E W S W V F L F L L S V T T G C V H S D	
61	aaactcaacatgcgccacctgtgccagcactgaactcctggggggaccgctcagttctt	120
	ttttgagtgtgtacgggtgggcacgggtcgtggacttgaggacccccctggcagctcagaag	
	K T H T T C P P C P A P E L L G G P S V F	
121	ctcttccccccaaaaccgaagcacacctcatgatctctccggaccctgaggtcacatgc	180
	gagaaaggggggtttgggtgtctgtgggaactactagagggcctggggagctccagttgac	
	L F P P K P K C T D L M I S R T P E V T C	
181	gtgtggtgtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggc	240
	caccaccacctgcactcgtgtctcttggaactcagttcaagttgacatgcacctgcgcg	
	V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G	
241	gtggaggtgcataatgccaaagacaagccgcggaggagcagtcacacagcagctaccgt	300
	caoctccacgatttaagggtttctcgccgcacctcctcgtcatgttgtcgtgcagtcga	
	V E V H N A K T K P R E E C T G Y N S T Y R	
301	gtgtgcagctcctcaccgtcctgcaccaggaactggctgaatggcaaggagtacaagttgc	360
	caccagtcgcagagatggcagcagctggtcctgaccgactacogtctctcatgttcaag	
	V V S V L T G V L L H Q C D W L N G K E Y K C	
361	aaggtctccaacaagctctccagcccccatcgagaaaacctctcaaagccaaaggg	420
	ttccagaggttgattctcgggaggttcggggtagctctcttgtagaggtttcaggtttccc	
	K V S N A L L P A P I E K T I S K A K G	
421	cagccccgagaaccacaggtgttaacacctgcgcccatccgggtagtgcgtaccacaagaac	480
	gtcggggctcttgggtgccacatgtggagcggggtagggccctactcgactggttcttg	
	Q P R E P G V Y T L P P S R D E L T K	
481	caggttcagctgacctgctgtgttaaaagctctctatcccagcgacatgcgcgtggaatgg	540
	gtccagtcggactggtgacgaccaggtttccgaagatagggtcgtgtagcggcactccac	
	Q V S L L T C L V K G F Y P S D I A V E W	
541	gagagcaatggggcagccggagacaacctacaagaccagcctccgtgctggaactccgac	600
	ctctcgttaccctgcgtcctctgtgtatgtctgttcggcgccggacagcactcaggtgtg	
	E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D	

【図 4 2 B】

FIG. 42B

601
ggtctctctctctctacagcaagctcacctgggacaagacaggtggcagcaggggaac

cgaggaagaagagagatgtctgttcagatggcagctgtctctctccacgtctctcccttg
G S F F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N
661
gtctctctcagcttgatcagtagagcttgcacaaacctacacgcagaagaagcctc

cagaagagtacgaggaactacgtactccagaacgtgttggtgatgtgcgtctcttcggag
V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L
721
tcctcttctccgggttaaaggaggaggagatccggaggaggaggaaagcgcgtgatcctc

aggcagaagagcccatctctctctctctcagctctctctctctctcgcgcagtagtag
S L S P G K G G G S G G G S G V I I
781
aacgtgaagtgcgaagtacagcgcccaagtgcctggagccctgcagaagcgccgcatgcgc

ttgcacttcaagttctatgtcggcggttcacggaactcgggacgttcttcggcggttaacgc
N V K C K I S R Q C L E P C K K A G M R
841
ttcggcaagtgcataacaggcaagtgcacctgcaccccccaagtagtaa

aagcgtctcagctacttcgcgttcacggctcagctgggggttcacatct
F G K C M N G K C H C T P K * *

【図 4 3 B】

FIG. 43B

601 ggctctcttcttctctacagcaagctcaccgtggacaaagacaggtggcagacaggggaac
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ccgagggaagaagagagatgtgtctcagtggaacctgtctctgtccacgcgtgtccctctg
G S F F L Y S K T G L T V D K S R W Q G Q N
661 gtcttctcaatgtctcgtatgatgaggtctgcacaaacacctacacagacagaagacctc
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
cagaagagtacagagcaactacgtactccgagacgtgtgttgatgtgcgtcttctcggag
V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L
721 tccctgtctccgggtaaaggaggagaggtaccggagaggaggaaagcggcggtatcatc
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
agggacagagcccatcttccctctcctcaggtcctctcctctctccgcacagtatgag
S L S P G K G G C G S G G G S G V I I
781 aacgtgagctgcaagatcacgccagctgctctgagccctgcaagaaggccgcgcatgcgc
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ttgcactcagcgttctagtctggcggctcacggacctcgggacgttcttccggcgctacgcg
N V S C K I S R Q C L E P C K K A G M R
841 ttcggcaagtgcatgaacggcaagtgccactgcaccccgaagttagtaa
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
aagcgttccagctactctgccttcacgtgcagctgggggttcacatatt
F G K C M N G K C H C T P K * *

【図 4 4 A】

FIG. 44A

1 atggaatggaggtcgtgctttctctctctctctcgtcagtaacgactgggtgcacatccgac 60
+
taccttacctgcaccgaaagaagagaaggaacatcttgcgtaccacaggtgaggtg
M E W S W V F L F L S V T G G V H S D

61 aaaactcacacatgccccacgtgccagcactgaaacctctggggggaccgtcagttctt 120
+
ttttgagtgtgtacgggtgggcacgggtcgtggaactgaggacccccctggcagtcagaag
K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F

121 ctcttccccccaaaaccgaagcacccctcatgatctcccggaaccttgagggtcacatgc 180
+
gagaaggggggtttgggtctctcgtggagatcaggaggccctggggagctccaggtgac
L F P P P K P K D T L M I S R T P E V T C

181 gtgtgtgtggacgtgagccacgaagacctgagggtcaagttcaactggtacgtggacgcc 240
+
caccacacctgcactcgtgctctctgggaactccagttcaagttgacatgcactgcgc
V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G

241 gtggagggtgcataatgccaaagacaagccgcgggagggagcagtaacaacgacagtcacct 300
+
cacctccagcttatcagctctctgtctcggccacctctcgtcatgtgtcgtgcagtcga
V E V H N A K T K T P R E Q Y N S T Y R

301 gtgtgcagcgtccctcacctcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaaggtc 360
+
cacagtcgcagaggtggcagagcgtggctcctgaccactacgcttctcagttctcag
V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C

361 aaggtctcccaacaagccctccccagccccctgagaaaaccatctccaaagccaaaggg 420
+
ttccagaggtgtttctgggagagctcggggtagctcttttggtagaggtttcggttctcc
K V S N L A P A P I E K T I S K A K G

421 cagccccgagaaacacaggtgtacacctgcccccataccgggagtgaactgaccaagaac 480
+
gtcggggctcttgggtccacaatgtggagcggggtagggccctatcgtactgttctcttg
Q P R E P G Y V Y T L P P S R A D E L T K N

481 caggtgcacctgacctgctcgtgtcaaaagcctctatccagcgacatcgcctgtgagttg 540
+
gtccagtccgactgagcagcaacagtttccgaagatagggtgcgtctagcggcacctcacc
Q V S L T C G L V K G F Y P S D I A V E W

541 gagagcaatgggcagcggcagaaacactacaagaccacgcctcccgctcgtgactccgac 600
+
ctcgtctaccctgcgcctcttggatgtctcgtcgtcgggggacagcaactgaggtgtg
E S N G C P E N N Y K T T P P V L D S D

【図 4 5 A】

FIG. 45A

1 atggaatggagctgggtcttctctctctctctctgtagtaacgactggtgtccacacccgac 60
taccttacctcgaccaccaagaagaagaagacagctatgctgaccacagcttgaggctg
M E W S W V L F F L F L S V T T G T G V H S D

61 aaaactcacacatgccaccgtgccagcagctgaactctctgggggacgctcagttcttc 120
ttttgagtggtgacgggtggcagggtctcggaactgaggaccacctggcagctcagaag
K T H T T C P P C P A P E L L G G P S V F

121 ctcttccccccaaaaccgaagcacacctcatgatctccggaccacctgagggtcacatgc 180
gagaagggggtcttgggtctctgtggagatcagtagggactcggggactcagtgatgc
L F P P P K P K D T L M I S R T P E V T C

181 gtgggtgtggacgtgagccacgaagacctgagggtcaagttcaactggtacgtggacgcc 240
caccacacctgcactcgtgtctctctgggaactcagttcaagttgacctgacctgcgc
V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G

241 gtggagggtcacaatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagttacaacacagctacctgt 300
cacctccagctatcaggttctgtttctggcgcacctctcctgctcgttctgtcgtgcagga
V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y A R

301 gtggtcagcgtctcaccgtctctgcaccaggaactggtcgaatggcaaggagtacaagtgc 360
caccagtcagaggtggcaggacgtggtcctgacgcacttaccgttctcatgttccag
V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C

361 aaggctccacaagaagccctccccagccccatcgagaaaacctatctccaagaagccaaaggg 420
ttccagaggttktttctgggagggtcggggtagctcttttggtagaagttctcggtttccc
K T C A G A S L A L P A F I E K T I S K A K G

421 cagccccgagaaccacaggtgtcacacctgcccccattccgggatgagctgaccaagaac 480
gtcggggctcttggtgtccacatgtggagcggggtagggccctactcagctcgttctgtg
Q P R E P Q V Y V T L P P S R D E L T K N

481 caggtcagcgtgacctcctgtgtcaaaagctctctatccagcagcgcctgcgtggagtgg 540
gtccagtcggaactggaagcaccagtttccgaagatagggtcgtctagcggcactcacc
Q V S L L T C L V K G F Y P S D I A V E W

541 gagagcaatggggcagccggagagaacaactacaagaccacgcctccctgctggactccgac 600
ctctcgttaccgctgcenctctgttgatgttctgtgtcgaggaggacagcaactgagctg
E S N G Q P C E N N Y K T T P P V L L D S D

【图 4 4 B】

FIG. 44B

601 ggctcctctcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtgtgcacaggggaaac
 660 cggaaagaaagagatgctgtctcgagtgacactgtgtctgcacagctgtgtccctgt
 G S F F L Y S K L L T V D K S R W Q Q G N
 661 gtcttctcatgctccgtgatgatgaggctctgcacaaacctacacgcagaagagcctc
 720 cagaagagtacgagcctacgtactccgagacgtgttggtgatgtgcgtctctctcgag
 V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L
 721 tccctgtctccgggttaaggagagaggaacccgagagaggaagaacgcgtgatctc
 780 agggcagagagcccatcttctctctctctacggcctctctctctctcgccagtagtag
 S L S P G K G G G G S G G G G S G V I I
 781 aacgtgaagtgcagaatcagccgcagctgctgaagccctgcaggaacgcggcatgcgc
 840 ttgcacttcagttcttatctggcgtctcaaggaacttgcggcagctctctgcggccacgcg
 N V K C K I S R Q C L K P C K D A G M R
 841 ttgcggaagtgcataagcggcaagtgccactgcaccccccaagtagtagaa
 888 aagcgttctcagtagcttgcgtttacgctgacgtgggggttctaat
 F G K C M N G K C H G T P K * *

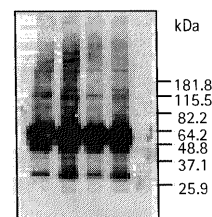
【图 4 5 B】

FIG. 45B

ggtctcttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagacagcaggtggcagcaggggaac
601
ccggaaggaagagatgtctcttgatggtccacgtctctctgcacccctgcctccctct
G S F A A L Y S K I L T V D K S R W Q Q G N
gtcttctcatgtctcctgtgatgatgaggtctgcacaccactacacgcagaaggcctc
661
cagaagagtacgaggcactacgtactccgagacgtgttggtgatgtgcgtcttctcgag
V F S C S S V M H E A L H N H Y I T Q K S L
tctcctgtctcgggtaaaggagagagatgcgcgaggaaggaggaacgcgcgtatc
721
agggacagagcccaattctctctctctctgactgcctctctctctcgcgcactagt
S L S P G K G G G G S G G G G S G V I I
aacgtgagctcgaagatcagccgcagtgctcgaagccttcgaaggacgcgcggcatgcgc
781
ttgcactcagctctctagtctggcctcagcaacttcggagcgtctctcggcgcctcagc
N V S C K I S R Q C L K P C K D A G M R
ttcgcgaagtgcataacggcaagtgccactgcacccccaagtatgtaa
841
aagcgtctcagctactcgcgtctcaacgtgacgtgggggtttctcatc *
F G K C M N G K C H C T P K * *

【图 4 6】

FIG. 46



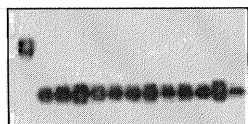
【図 4 7】

FIG. 47



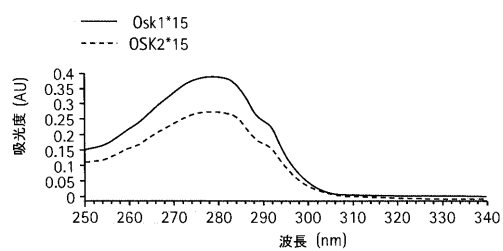
【図 4 8】

FIG. 48



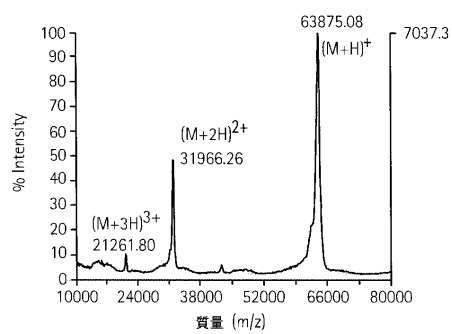
【図 4 9 A】

FIG. 49A



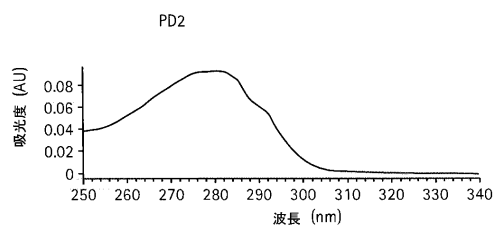
【図 4 9 D】

FIG. 49D



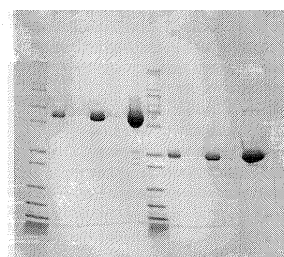
【図 5 0 A】

FIG. 50A



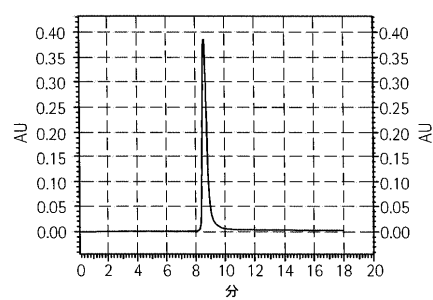
【図 4 9 B】

FIG. 49B



【図 4 9 C】

FIG. 49C



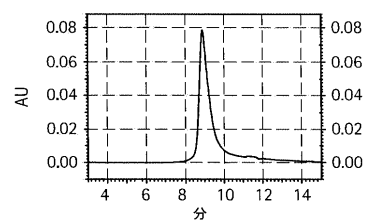
【図 5 0 B】

FIG. 50B

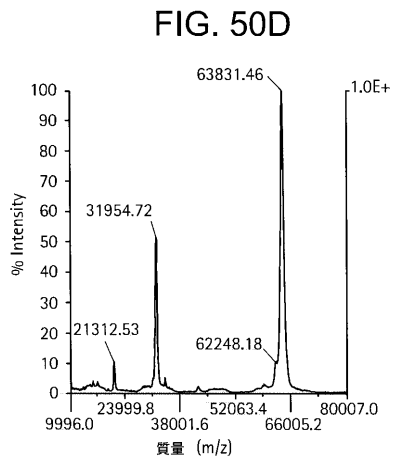


【図 5 0 C】

FIG. 50C



【図 5 0 D】



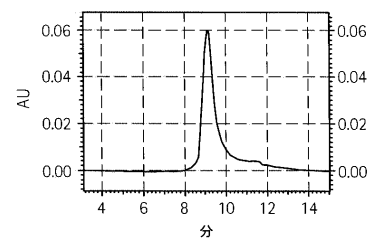
【図 5 1 B】

FIG. 51B



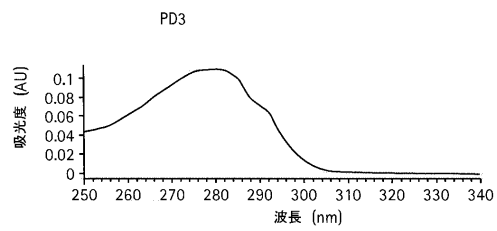
【図 5 1 C】

FIG. 51C



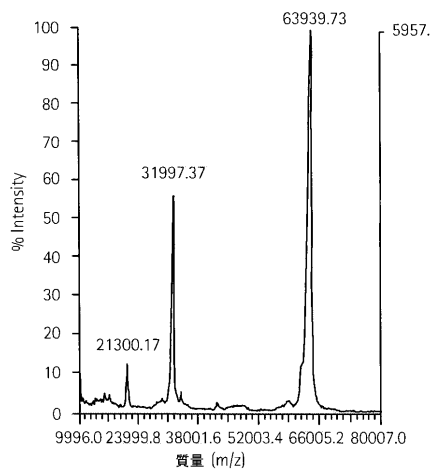
【図 5 1 A】

FIG. 51A



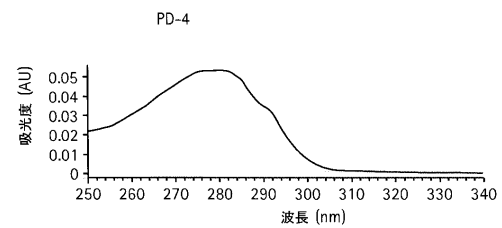
【図 5 1 D】

FIG. 51D



【図 5 2 A】

FIG. 52A

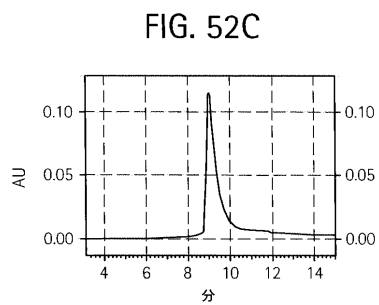


【図 5 2 B】

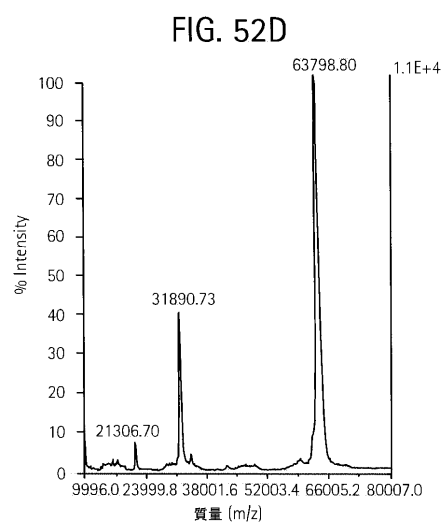
FIG. 52B



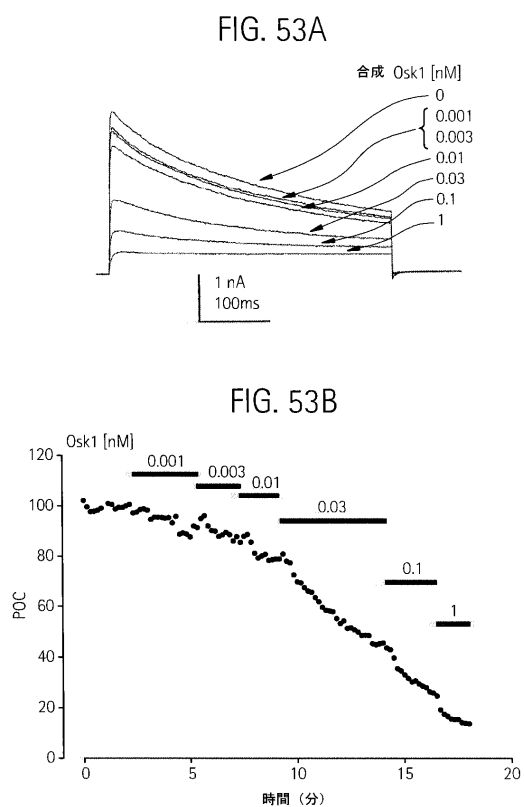
【図 5 2 C】



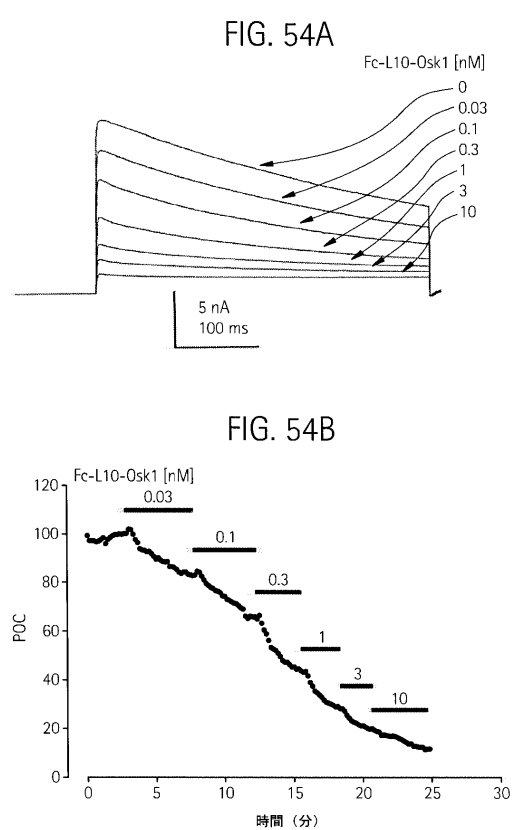
【図 5 2 D】



【図 5 3】



【図 5 4】



【図 5 5】

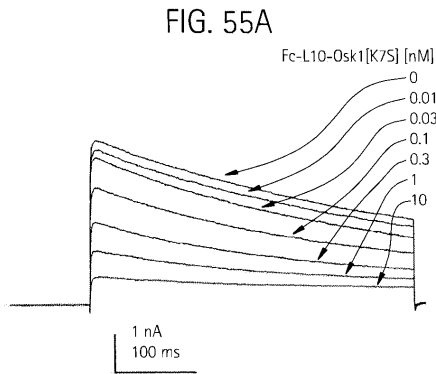
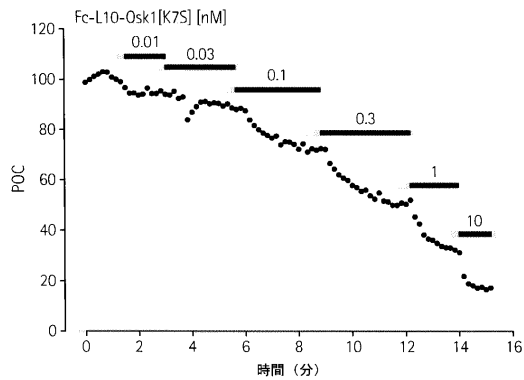


FIG. 55B



【図 5 6】

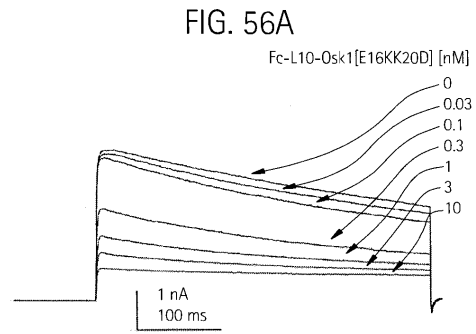
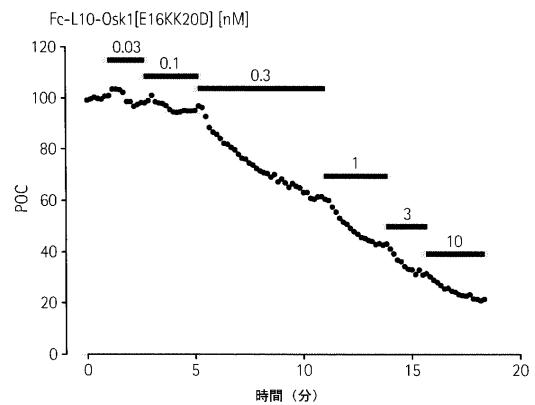


FIG. 56B



【図 5 7】

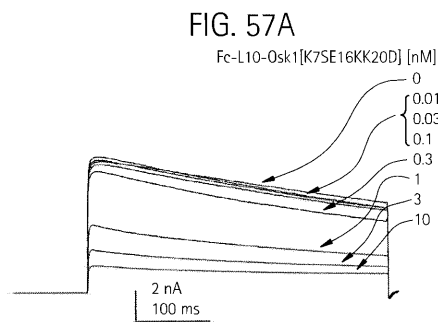
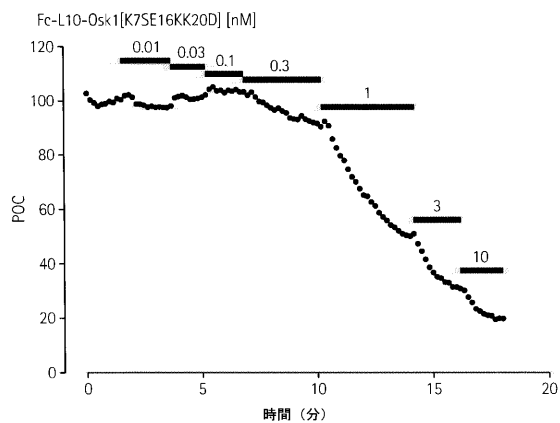


FIG. 57B



【図 5 8】

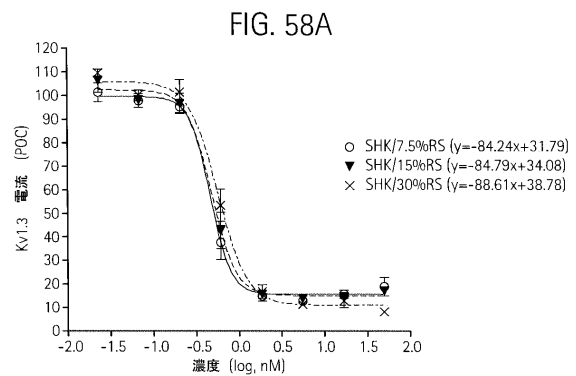
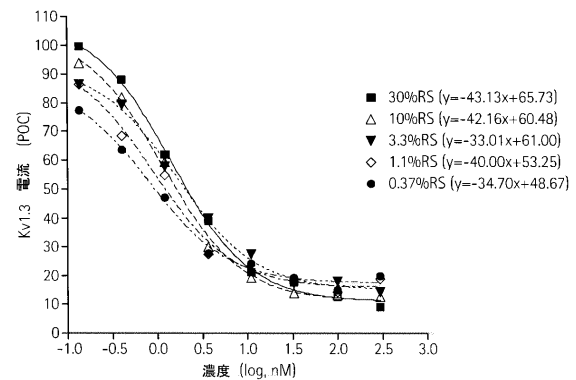
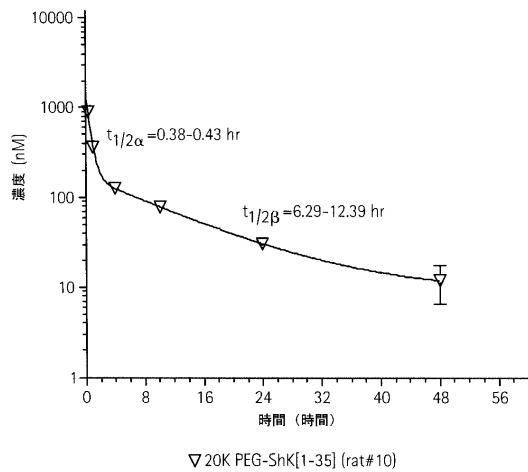


FIG. 58B



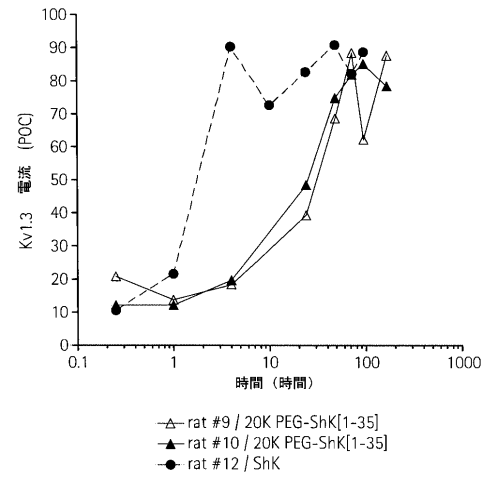
【図 59】

FIG. 59



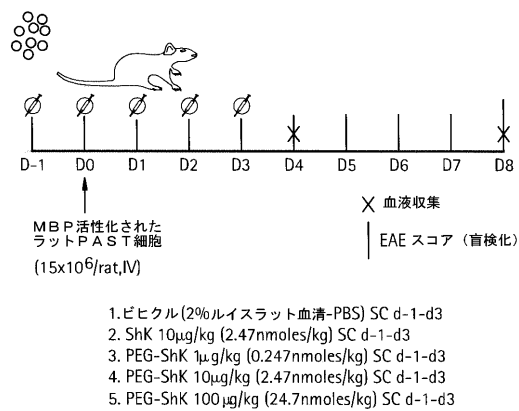
【図 60】

FIG. 60



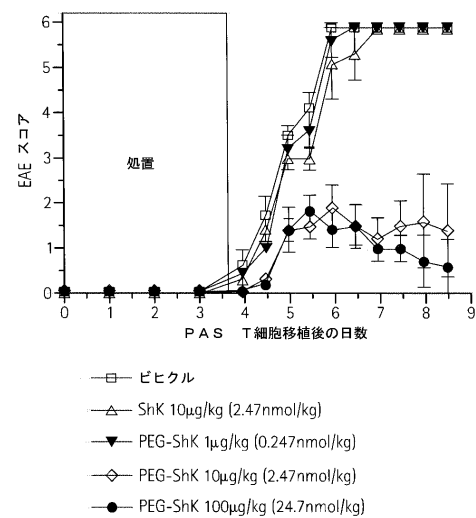
【図 61】

FIG. 61

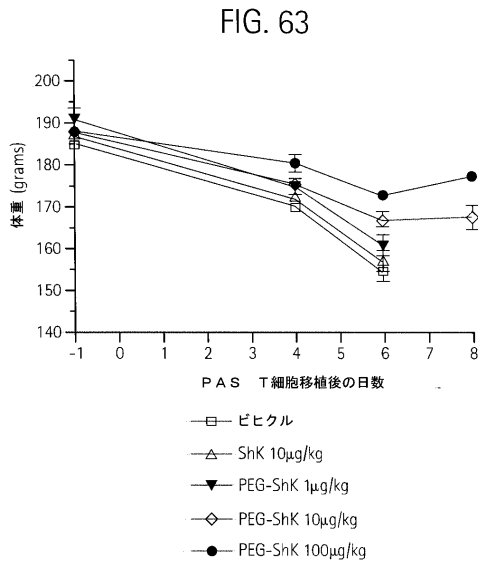


【図 62】

FIG. 62



【図 6 3】



【図 6 4】

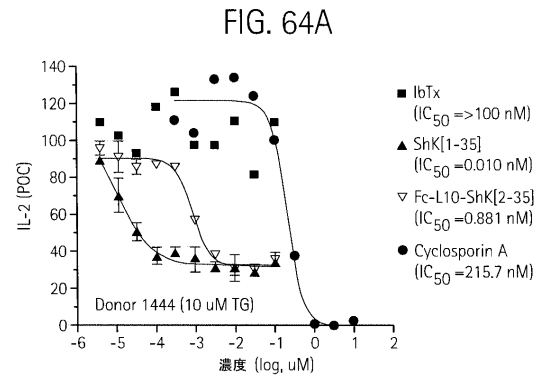
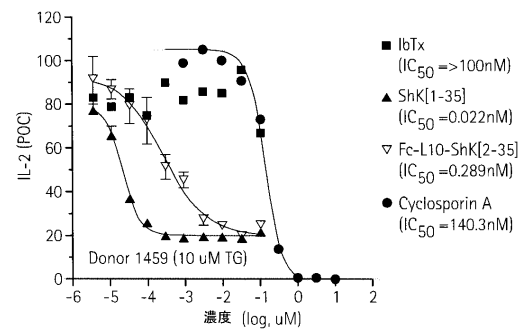
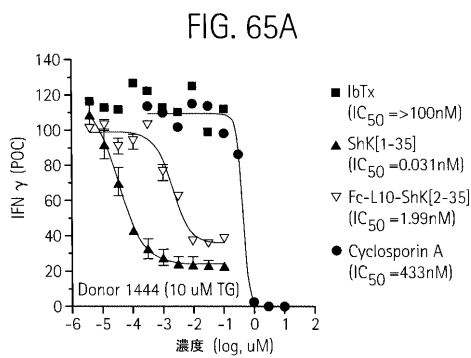


FIG. 64B



【図 6 5】



【図 6 6】

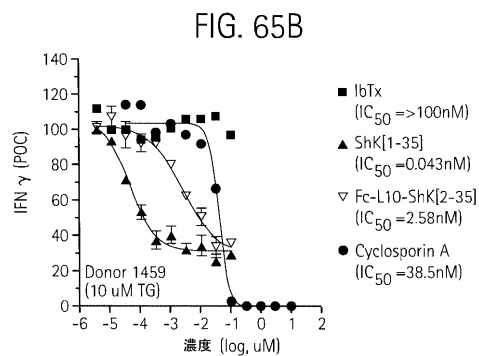


FIG. 66A

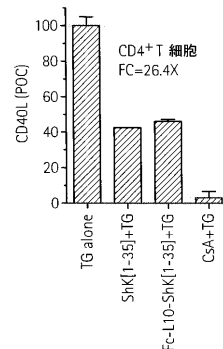
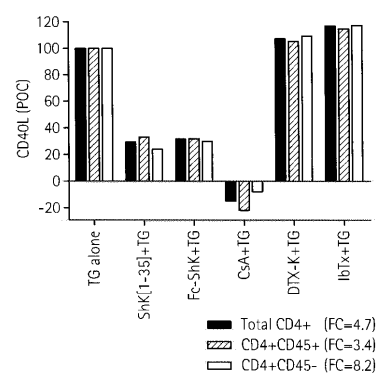
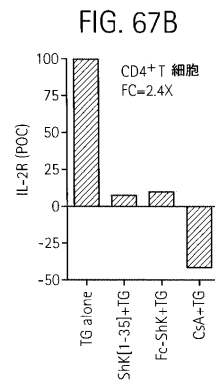
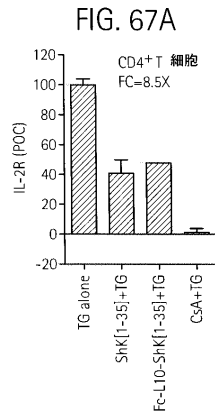


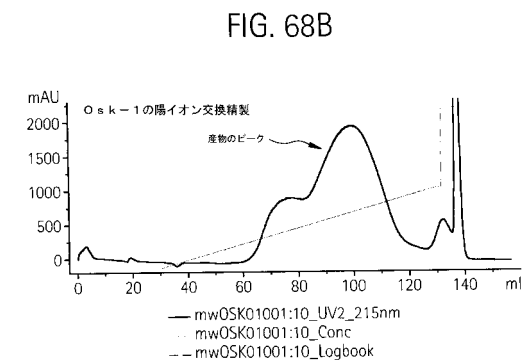
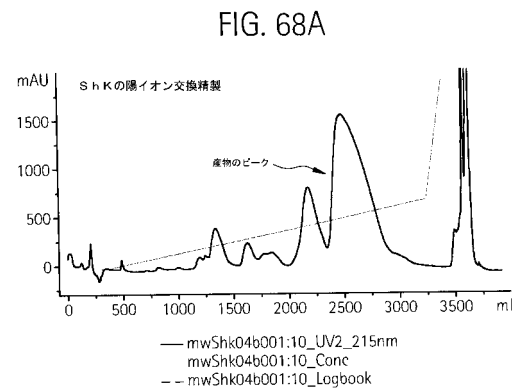
FIG. 66B



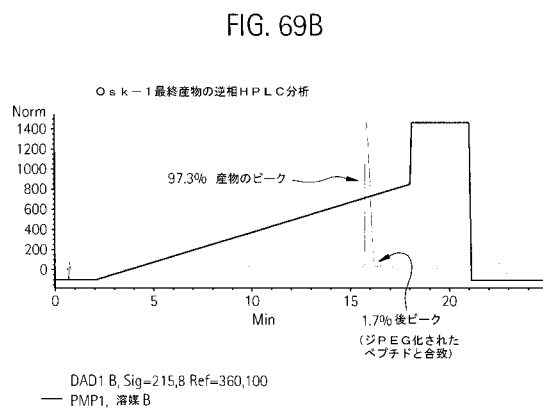
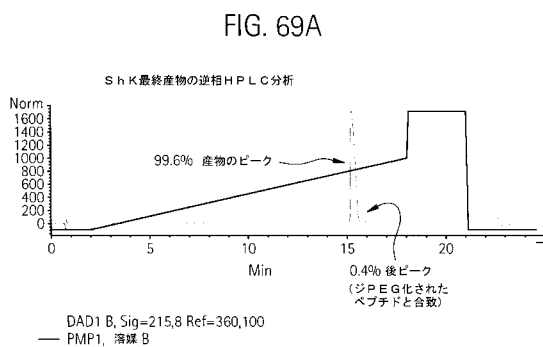
【図 67】



【図 68】



【図 69】



【図 70】

FIG. 70

```

1 mdkthtccpc papellggps vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdshe
51 dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst yrvvsvltvl hqdwlngkey
101 kckvsnkalp apiektiska kgqprepvyv tlpssrdelg ggviinvkck
151 isrqleqck kagmrfgkcm ngkchctpkq gtnqvsitc lvkgfypsdi
201 avewesnggp ennykttppv ldsdgsffly skltvdksrw qqgnvfscsv
251 mhealhnhyt qkslsispqk
  
```

【図 71】

FIG. 71

```

1 mdkthtccpc papellggps vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdshe
51 dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst yrvvsvltvl hqdwlngkey
101 kckvsnkalp apiektiska kgqprepvyv tlpssrdelg grsciditipk
151 srctafgckh smkyrlsfcr ktctctgggk nqvsltclvk gfypsdiave
201 wesngqpenn ykttppvlds dgsfflyskl tvdksrwqgg nvfscsvmhe
251 alnhnhtqks lsispqk
  
```

【図 72】

FIG. 72

```

1 mdkthtccpc papellggps vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdshe
51 dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst yrvvsvltvl hqdwlngkey
101 kckvsnkalp apiektiska kgqprepvyv tlpssrdelg grsciditipk
151 srctafgckh smkyrlsfcr ktctctgggk gtnqvsitc lvkgfypsdi
201 vewesnggpe nnykttppvl dsdgsffly kltdvksrwq qqgnvfscsv
251 healnhnhtq kslsispqk
  
```

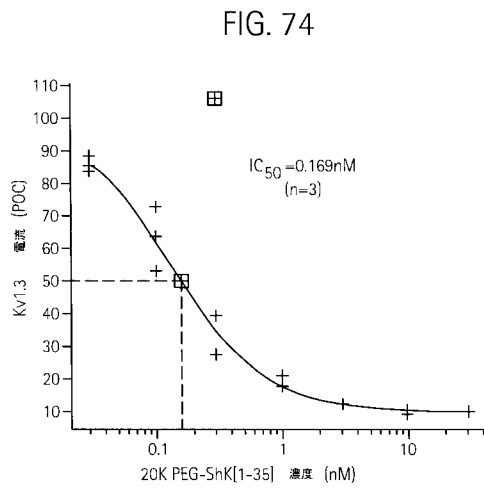
【図 73】

FIG. 73

```

1 mdkthtccpc papellggps vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdshe
51 dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst yrvvsvltvl hqdwlngkey
101 kckvsnkalp apiektiska kgqprepvyv tlpssrdelg ggggviinvk
151 ckisrqleqp ckkagmrfgk cmngkchctp kggtknqvl tclvkgfyps
201 diavewesng qpennykttppv ldsdgsff ly skltvdks rwqqgnvfsc
251 svmhealhnh ytqkslsisp qk
  
```

【図 7 4】



【図 7 5】

FIG. 75A FIG. 75B FIG. 75C FIG. 75D

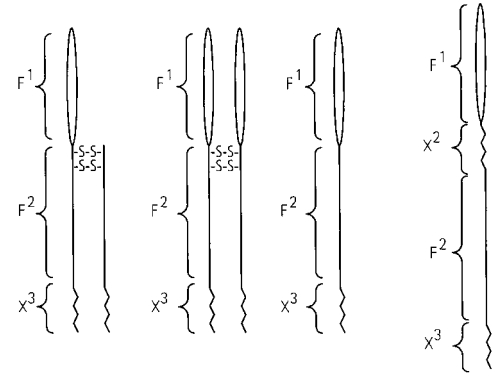
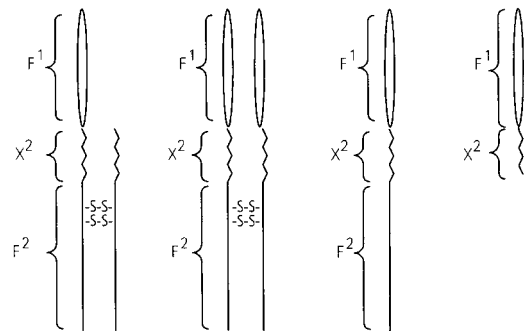
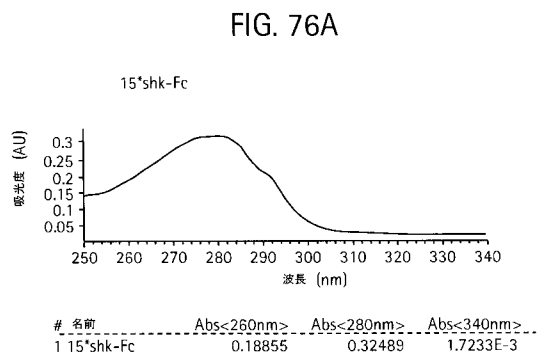


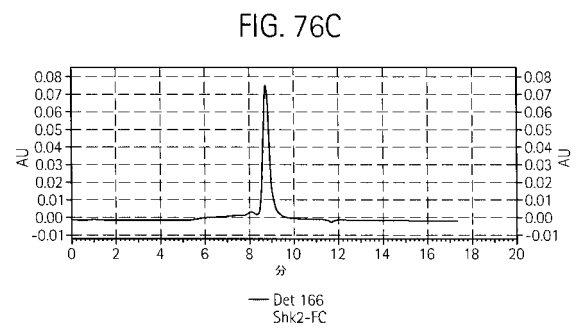
FIG. 75E FIG. 75F FIG. 75G FIG. 75H



【図 7 6 A】

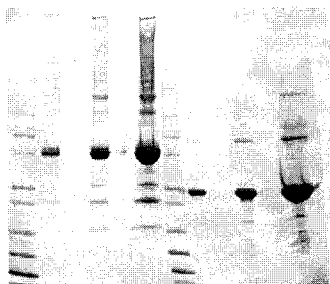


【図 7 6 C】



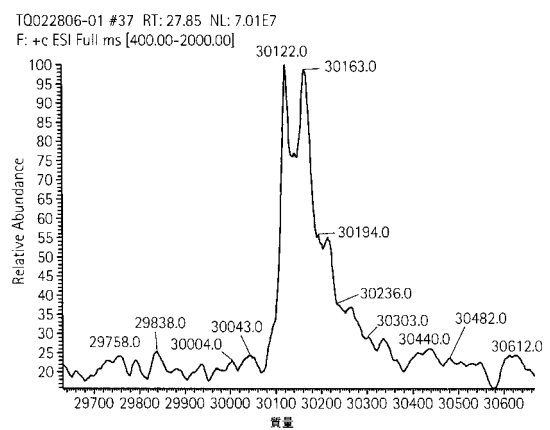
【図 7 6 B】

FIG. 76B



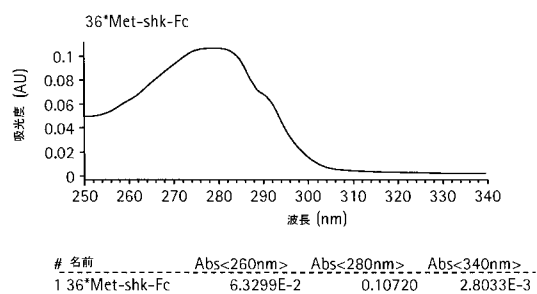
【図 7 6 D】

FIG. 76D



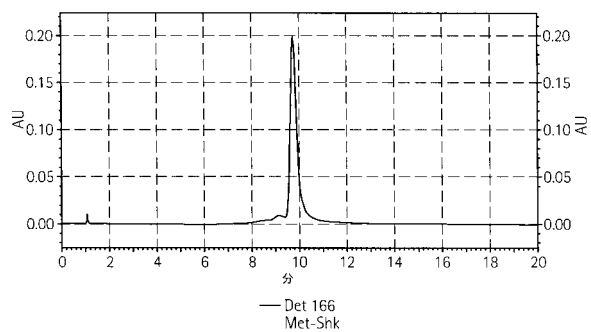
【図 7 7 A】

FIG. 77A



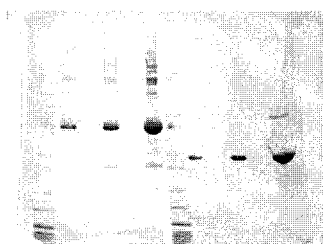
【図 7 7 C】

FIG. 77C



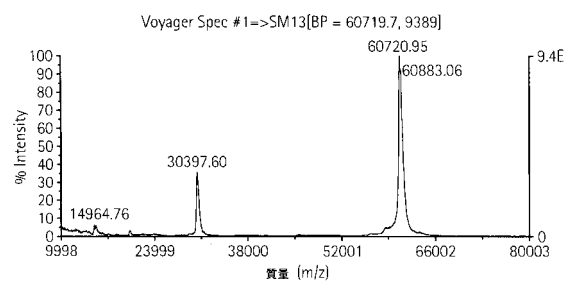
【図 7 7 B】

FIG. 77B



【図 7 7 D】

FIG. 77D



【配列表】

0005087536000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/00
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P 11/06
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P 21/00
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 サリバン, ジョン・ケイ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 2 0、ニューベリー・パーク、ロテーラ・ストリート・1 0 8 5

(72)発明者 マツギバーン, ジョージフ・ジー

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 7 7、オーク・パーク、ノルマンディ・テラス・6 2 0 8

(72)発明者 ミランダ, レスリー・ビー

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 6 2、サウザンド・オークス、メイプルノール・プレイス・3 5 8 6

(72)発明者 グエン, ヒュン・キュー

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 6 0、サウザンド・オークス、セント・チャールズ・ドライブ・8 8 1、アパートメント・1 0

(72)発明者 ウオーカー, ケネス・ダブリュ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 2 0、ニューベリー・パーク、メサ・アベニュー・1 7 5

(72)発明者 フー, ショウーフエン・シルビア

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 6 0、サウザンド・オークス、リンミア・ドライブ・9 8 6

(72)発明者 ゲツグ, コリン・ブイ, ジュニア

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 2 0、ニューベリー・パーク、デルウツド・コート・4 8 7

(72)発明者 マクドナフ, ステファン・アイ

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 2 1 3 8、ケンブリッジ、コンコード・アベニュー・1 2、ナンバー・3

審査官 神谷 昌男

(56)参考文献 特表2003-512011 (JP, A)

国際公開第2004/110472 (WO, A1)

米国特許第06077680 (US, A)

特表2003-533187 (JP, A)

特表2004-532620 (JP, A)

Mol. Pharmacol., 2005年 1月21日, 67(4), 1369-81, Epub 2005 Jan 21

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

PubMed