(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2010-527607
(P2010-527607A)
(43)公表日　平成22年8月19日(2010.8.19)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B064
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B065
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4C076
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	101	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 107 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-509392 (P2010-509392)
(86)(22)出願日　平成20年5月22日 (2008.5.22)
(85)翻訳文提出日　平成22年1月18日 (2010.1.18)
(86)国際出願番号　PCT/US2008/006593
(87)国際公開番号　WO2008/153745
(87)国際公開日　平成20年12月18日 (2008.12.18)
(31)優先権主張番号　60/931,344
(32)優先日　平成19年5月22日 (2007.5.22)
(33)優先権主張国　米国(US)

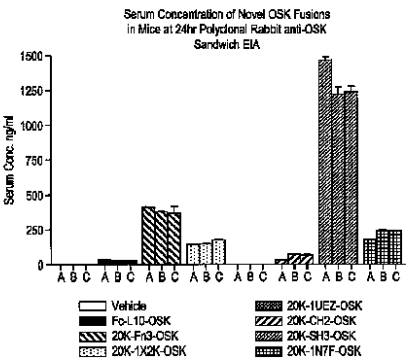
(71)出願人　500049716
アムジエン・インコーポレーテツド
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９１３２０－１７８９、サウザンド・オークス、ワン・アムジエン・センター・ドライブ（番地なし）
(74)代理人　100062007
弁理士　川口　義雄
(74)代理人　100140523
弁理士　渡邊　千尋
(74)代理人　100103920
弁理士　大崎　勝真
(74)代理人　100124855
弁理士　坪倉　道明

最終頁に続く

(54)【発明の名称】生物活性を有する融合タンパク質を作製するための組成物及び方法

(57)【要約】
薬理学的に活性なタンパク質対及び薬理学的に不活性なヒト起源の小タンパク質ドメイン対（第１０フィブロネクチンＩＩＩドメイン、ＳＨ３ドメイン、ＳＨ２ドメイン、ＩｇＧ１のＣＨ２ドメイン、ＰＤＺドメイン、トロンボスポンディン反復ドメイン、ユビキチンドメイン、ロイシンリッチ反復ドメイン、ビリンヘッドピースＨＰ３５ドメイン、ビリンヘッドピースＨＰ７６ドメイン又はこれらの何れかの断片若しくは修飾など（但し、これらに限定されない。））を含む組換え融合タンパク質を含む組成物が開示されている。融合タンパク質をコードする核酸（例えば、ＤＮＡ構築物）、融合タンパク質の発現用の発現ベクター及び組換え宿主細胞、並びに組換え融合タンパク質及び医薬として許容される担体を含有する医薬組成物、並びに薬理学的に活性な組換え融合タンパク質を作製する方法も開示されている。

FIG. 12



【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）ヒト起源の薬理学的に不活性なタンパク質ドメイン（前記薬理学的に不活性なタンパク質ドメインは、
（ｉ）約３ｋＤａから約２０ｋＤａの質量を有し、及び
（ｉｉ）他のタンパク質なしに、目的とする医薬として許容される製剤緩衝液中に懸濁されたときに、タンパク質の総質量の約１０％未満のタンパク質凝集物を特徴的に形成する。）；及び
（ｂ）約５から約８０アミノ酸残基の長さの少なくとも１つの薬理学的に活性なタンパク質
を含む組換え融合タンパク質を含む組成物。
【請求項２】
式
$(F^1)_a-X^2{}_b$
の請求項１の組成物及びその多量体
（F^1は、半減期延長部分であり、及びａは０又は１であり；
X^2は、Ｄ－$(L)_c$－$(P^5)_d$－$(X^3)_e$、$(X^4)_f$－$(P^5)_d$－$(L)_c$－Ｄ又は$(X^4)_f$－$(P^5)_d$－$(L)_c$－Ｄ－$(L)_g$－$(P^6)_h$－$(X^3)_i$であり、
ｃ及びｇは、各々独立に、０又は１であり、ｄ及びｈは、１であり、並びにｅ、ｆ及びｉは、各々独立に、０、１、２、３、又は４であり；
X^3は、－$(L)_j$－(P^7)であり、ｊは、０又は１であり；
X^4は、(P^8)－$(L)_k$－であり、ｋは、０又は１であり；
Ｄは、ヒト起源の薬理学的に不活性なタンパク質ドメインであり；
P^5、P^6、P^7及びP^8は、各々独立に、薬理学的に活性なタンパク質であり；並びに
Ｌは、各事例において、ペプチド性リンカーである。）。
【請求項３】
薬理学的に不活性なタンパク質ドメインが第１０フィブロネクチンＩＩＩドメイン、ＳＨ３ドメイン、ＳＨ２ドメイン、ＩｇＧ１のＣＨ２ドメイン、ＰＤＺドメイン、トロンボスポンディン反復ドメイン、ユビキチンドメイン、ロイシンリッチ反復ドメイン、ビリンヘッドピースＨＰ３５ドメイン若しくはビリンヘッドピースＨＰ７６ドメイン又は生理的なｐＨ及び温度で生物学的に適合的な水性緩衝液中において可溶性であり、その固有の若しくは準固有の二次又若しくは三次構造を維持するこれらの何れかの断片若しくは修飾から選択される、請求項１又は請求項２の組成物。
【請求項４】
薬理学的に不活性なタンパク質ドメインが配列番号１から８、１３、５０、６１、８６から９０、９４及び１０２から１１０から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１又は請求項２の組成物。
【請求項５】
薬理学的に活性なタンパク質が、トキシンペプチド、ＣＧＲＰペプチドアンタゴニスト、ブラジキニンＢ１受容体ペプチドアンタゴニスト、ＰＴＨアゴニストペプチド、ＰＴＨアンタゴニストペプチド、ａｎｇ－２結合ペプチド、ミオスタチン結合ペプチド、ＥＰＯ模倣ペプチド、ＴＰＯ模倣ペプチド、ＮＧＦ結合ペプチド、ＢＡＦＦアンタゴニストペプチド、ＧＬＰ－１若しくはそのペプチド模倣物又はＧＬＰ－２若しくはそのペプチド模倣物である、請求項１又は請求項２の組成物。
【請求項６】
トキシンペプチドが、ＳｈＫ、ＳｈＫペプチド類縁体、ＯＳＫ１及びＯＳＫ１ペプチド類縁体から選択される、請求項５の組成物。
【請求項７】

ａが１であり、及びＦ[1]がポリエチレングリコール、エチレングリコールの共重合体、ポリプロピレングリコール、プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリ－１，３－ジオキソラン、ポリ－１，３，６－トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸、デキストランｎ－ビニルピロリドン、ポリｎ－ビニルピロリドン、プロピレングリコールホモポリマー、プロピレンオキシドポリマー、エチレンオキシドポリマー、ポリオキシエチル化されたポリオール、ポリビニルアルコール、直鎖若しくは分岐のグリコシル化された鎖、ポリアセタール、長鎖脂肪酸、長鎖疎水性脂肪族基又はこれらの要素の何れかの組み合わせである、請求項２の組成物。

【請求項８】

ａが１であり、及びＦ[1]がポリエチレングリコールである、請求項２の組成物。

【請求項９】

ａが１であり、及びＦ[1]が長い半減期の血漿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分子リガンドから選択される、請求項２の組成物。

【請求項１０】

請求項１又は請求項２の組成物及び医薬として許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項１１】

（ａ）ヒト起源の薬理学的に不活性なタンパク質ドメイン（前記薬理学的に不活性なタンパク質ドメインは、

（ｉ）約３ｋＤａから約２０ｋＤａの質量を有し、及び

（ｉｉ）他のタンパク質なしに、目的とする医薬として許容される製剤緩衝液中に懸濁されたときに、タンパク質の総質量の約１０％未満のタンパク質凝集物を特徴的に形成する。）；及び

（ｂ）約５から約８０アミノ酸残基の長さの薬理学的に活性なタンパク質

を含む組換え融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸。

【請求項１２】

薬理学的に不活性なタンパク質ドメインが、第１０フィブロネクチンＩＩＩドメイン、ＳＨ３ドメイン、ＳＨ２ドメイン、ＩｇＧ１のＣＨ２ドメイン、ＰＤＺドメイン、トロンボスポンディン反復ドメイン、ユビキチンドメイン、ロイシンリッチ反復ドメイン、ビリンヘッドピースＨＰ３５ドメイン若しくはヴィリンヘッドピースＨＰ７６ドメイン又は生理的なｐＨ及び温度で生物学的に適合的な水性緩衝液中において可溶性であり、その固有の若しくは準固有の二次又若しくは三次構造を維持するこれらの何れかの断片若しくは修飾から選択される、請求項１１の核酸。

【請求項１３】

コードされる薬理学的に不活性なタンパク質ドメインが配列番号１から８、１３、５０、６１、８６から９０、９４及び１０２から１１０から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１１の核酸。

【請求項１４】

核酸がＤＮＡである、請求項１１の核酸。

【請求項１５】

請求項１４の核酸を含む発現ベクター。

【請求項１６】

組換え融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列へ作用可能に連結された分泌シグナルペプチドをコードするコード配列をさらに含む、請求項１４の発現ベクター。

【請求項１７】

請求項１５の発現ベクターを含む組換え宿主細胞。

【請求項１８】

宿主細胞が原核生物宿主細胞である、請求項１７の組換え宿主細胞。

【請求項１９】

原核生物宿主細胞がエシェリヒア・コリである、請求項１８の組換え宿主細胞。

【請求項２０】
（ａ）組換え融合タンパク質が発現されるように、増殖培地中に、請求項１７の組換え宿主細胞を配置すること、及び
（ｂ）細胞又は増殖培地から融合タンパク質を単離すること、
を含む、薬理学的に活性な組換え融合タンパク質を生産する方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本願は、２００７年５月２２日に出願された米国仮出願第６０／９３１，３４４号（参照により、その全体が本明細書中に組み込まれる。）の利益を主張する。
【０００２】
本願を通じて、様々な刊行物が丸括弧又は括弧内に参照されている。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、これらの刊行物の開示内容全体が、参照により本願中に組み込まれる。
【０００３】
１．技術分野
本発明は、生化学分野、具体的には、ポリペプチドの組換え発現に関する。
【背景技術】
【０００４】
２．関連技術に関する記述
生物活性ペプチド又は治療用ペプチドは、特有のシグナル伝達及び代謝経路を特異的に標的とし、調節する強力な薬物であり得る。それらのサイズは比較的小さく、組成も単純であるために、これらのペプチドは、望ましい活性を洗練し、強化するための分子加工に適している。ペプチド配列に対する僅かな変化が連結される活性間を識別することができ、又はインビボでの分解の妨害を補助する。同様に、適切に配置されたリンカー部位は、循環半減期を増大させるために、ポリ（エチレングリコール）ＰＥＧなどの巨大分子の連結を可能とし得る。しかしながら、同じこれらの特性がペプチド生産及び送達に対する特別な困難ももたらし得る。
【０００５】
多くのペプチド、特に、大き目のペプチド（１５から４０アミノ酸残基又はそれ以上）を作製するのに、人工の合成技術は費用対効果が高くない。別の方法として、生物活性ペプチド又はタンパク質の組換え生産に関して、組換え宿主細胞の使用が周知である。一般的に使用される組換え宿主細胞には、細菌（イー・コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）種）、酵母（サッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）種など）並びに他の真菌、昆虫細胞、植物細胞及び培養された哺乳動物細胞が含まれる。しかしながら、組換え発現は、しばしば困難である。組換えペプチド又はタンパク質の低い発現の理由の１つは、二次構造及び三次構造の安定性が溶液中で乏しいために、再折り畳み能が低いことによるものと思われる。
【０００６】
これを克服するために、多くのペプチドは、免疫グロブリンＦｃドメイン、ユビキチン、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ））、トランスサイレチン（ＴＴＲ）又はチロキシン結合グロブリン（ＴＢＧ）などのタンパク質とのキメラ融合物として発現されてきた。（例えば、Ｓｕｌｌｉｖａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔｏｘｉｎ Ｐｅｐｔｉｄｅ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ａｇｅｎｔｓ，ＷＯ２００６／１１６１５６Ａ２；Ｇｅｇｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｆｃ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ，ＷＯ２００６／０３６８３４Ａ２；Ｇｅｇｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｆｃ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ，ＰＣＴ／ＵＳ２００６／０３１６０９；Ｆｅｉｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｐｅｐｔｉｄｅｓ ａｓ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ａｇｅｎｔｓ，ＷＯ２０００／０２４７８２；Ｒｏｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｌｂｕｍｉｎ ｆｕｓｉｏｎ ｐｒｏｔｅｉｎｓ，米国特許第６，９２６，８９８号及びＵＳ ２００５／００５４０５１；Ｂｒｉｄｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｅｎｄｏｇｅｎｏｕｓ ｔｈｅｒａ

peutic peptides from peptidase activity through conjugation to blood components, 米国特許第６，８８７，４７０号）；Walker et al.，Use of transthyretin peptide／protein fusions to increase the serum half－life of pharmacologically active peptides／proteins，US ２００３／０１９５１５４Ａ１；ＵＳ ２００３／０１９１０５６Ａ１参照）。このような巨大融合タンパク質は治療用ペプチドの商業的発現を可能にし、それらのペプチド対の循環半減期を劇的に延長させるというさらなる利点を与えることによって、インビボでより有効なものとなる。

【０００７】

これらの融合タンパク質はずっと高いレベルでのペプチド発現をしばしば促進するが、生物活性に影響を与え得る困難な再折り畳みの問題をも提起し得る。タンパク質の回収は、融合対とジスルフィド結合異性体化の間での望ましくないドメイン－ドメイン相互作用によってさらに複雑なものとなり得る。さらに、巨大なタンパク質担体部分を有する融合タンパク質を作製する費用は、このような治療剤の商業的な実現可能性に影響を及ぼし得る。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００８】

【特許文献１】国際特許公開第２００６／１１６１５６号
【特許文献２】国際特許公開第２００６／０３６８３４号
【特許文献３】ＰＣＴ／ＵＳ２００６／０３１６０９
【特許文献４】国際特許公開第２０００／０２４７８２号
【特許文献５】米国特許第６，９２６，８９８号明細書
【特許文献６】米国特許公開第２００５／００５４０５１号明細書
【特許文献７】米国特許第６，８８７，４７０号明細書
【特許文献８】米国特許公開第２００３／０１９５１５４号明細書
【特許文献９】米国特許公開第２００３／０１９１０５６号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００９】

それ故、生物活性成分に対する担体成分の相対的に低い質量比で、生物活性融合タンパク質の高収率組換え発現のための組成物及び方法が望ましい。これらの及び他の利点が本発明によって提供される。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

本発明は、組換え融合タンパク質を含む組成物に関する。本発明の組換え融合タンパク質は、（ａ）本明細書中に記載されている、ヒト起源の薬理学的に不活性な小さなタンパク質ドメインと、及び（ｂ）薬理学的に活性なタンパク質とを含む。本発明は、融合タンパク質をコードする核酸（例えば、ＤＮＡ構築物）並びに融合タンパク質を発現するための発現ベクター及び組換え宿主細胞にも向けられる。

【００１１】

場合によって、様々な質量及び立体構造の１つ又はそれ以上の半減期延長部分を融合タンパク質に共有的に付着又は連結させることによって、特定の治療的な要求に合致させるために、本発明の組換え融合タンパク質分子の薬物速度論特性を調節する。したがって、本発明は、以下の式の組成物

$$(F^1)_a-(X^2)_b \qquad (I)$$

及びその多量体を包含する。

【００１２】

F^1は、半減期延長部分であり、ａは０又は１であり、及びｂは１であり；
X^2は、Ｄ－（Ｌ）$_c$－（P^5）$_d$－（X^3）$_e$、（X^4）$_f$－（P^5）$_d$－（Ｌ）$_c$－Ｄ又は（X^4）$_f$－（P^5）$_d$－（Ｌ）$_c$－Ｄ－（Ｌ）$_g$－（P^6）$_h$－（X^3）$_i$であり、ｃ及びｇは、各々独立に、０又は１であり、ｄ及びｈは、１であり、並びにｅ、ｆ及びｉは、各々独立に、０、１、２、３、又は４であり；
X^3は、－（Ｌ）$_j$－（P^7）であり、ｊは、０又は１であり；
X^4は、（P^8）－（Ｌ）$_k$であり、ｋは、０又は１であり；
Ｄは、ヒト起源の薬理学的に不活性な小さなタンパク質ドメインであり；
P^5、P^6、P^7及びP^8は、各々独立に、薬理学的に活性なタンパク質であり；並びに

Ｌは、各事例において、ペプチドリンカーである。式Ｉの意味において、医薬として活性なタンパク質「Ｐ」（すなわち、P^5、P^6、P^7及びP^8）は、２以上存在する場合には、本発明の組成物中に存在する他の何れのＰとも、独立に同一又は別異であり得る。これには、２以上存在する場合、他の何れのP^7及び／又はP^8とも同一又は別異であり得るP^7及び／又はP^8が含まれる。同様に、ペプチドリンカー部分「Ｌ」（すなわち、（Ｌ）$_c$、（Ｌ）$_g$、（Ｌ）$_j$及び／又は（Ｌ）$_k$）は、存在する場合、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り得る。

【００１３】

本発明は、宿主細胞中の薬理学的に活性な融合タンパク質を作製する高い効率の方法も提供する。本発明の組換え宿主細胞は、組換え融合タンパク質が発現されるように、生理的に適切な条件下で増殖培地中に配置され、次いで、融合タンパク質は細胞から単離又は精製される。これには、細胞溶解を含む慣用の生化学的技術による細胞からの分離及び細胞抽出物からの融合タンパク質の分離が含まれ得る。これには、必要であれば、再折り畳み後に、封入体から放出された融合タンパク質を可溶化することが含まれ得る。あるいは、融合タンパク質の発現が組換え宿主細胞からのその分泌を伴う場合には、細胞からの融合タンパク質の単離は、細胞を溶解せずに、分泌された融合タンパク質を含有する培地から細胞を分離するための遠心又はろ過を用いて単純に達成することができる（組換え融合タンパク質は、上清又はろ液増殖培地中に存在する。

【００１４】

薬理学的に不活性な小さなタンパク質ドメイン成分はヒトアミノ酸配列を有しており、治療薬が投与されるヒト患者に対して低い免疫原性リスクをもたらすので、この方法は、本発明の組換え融合タンパク質を治療薬として使用するために、薬理学的に不活性な小タンパク質ドメインから薬理学的に活性なタンパク質成分の発現後切断を通例必要としない。本発明は、巨大な治療用ペプチド又はタンパク質を安価にインビトロ合成するための有用な代替法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【００１５】

【図１】ｒｏｏｋｈａｖｅｎＰｒｏｔｅｉｎＤａｔａｂａｎｋ中で同定された様々なヒトＰＤＺドメインのアミノ酸配列の関連性を示す樹形図を示す。４桁のコードはＢｒｏｏｋｈａｖｅｎＰｒｏｔｅｉｎＤｔａｂａｎｋから得た受託番号である。並置は、ＶｅｃｔｏｒＮＴＩＡｌｉｇｎ－Ｘを用いて完了した。

【図２】ＢｒｏｏｋｈａｖｅｎＰｒｏｔｅｉｎＤａｔａｂａｎｋ中で同定された様々なヒトＳＨ３ドメインのアミノ酸配列の関連性を示す樹形図を示す。４桁のコードはＢｒｏｏｋｈａｖｅｎＰｒｏｔｅｉｎＤｔａｂａｎｋから得た受託番号である。並置は、ＶｅｃｔｏｒＮＴＩＡｌｉｇｎ－Ｘを用いて完了した。

【図３】ＢｒｏｏｋｈａｖｅｎＰｒｏｔｅｉｎＤａｔａｂａｎｋ中で同定された様々なヒトＳＨ２ドメインのアミノ酸配列の関連性を示す樹形図を示す。４桁のコードはＢｒｏｏｋｈａｖｅｎＰｒｏｔｅｉｎＤｔａｂａｎｋから得た受託番号である。並置は、ＶｅｃｔｏｒＮＴＩＡｌｉｇｎ－Ｘを用いて完了した。

【図４Ａ】Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ染色された１８％Ｔｒｉｓ－ＧｌｙｃｉｎｅＳＤＳ－ＰＡ

ＧＥを用いた様々なＳｈＫ（実際には、［ｄｅｓＡｒｇ１］ＳｈＫ）及びＯＳＫ１融合物の発現を示している。レーン内容は（左から右へ）、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎＢｅｎｃｈｍａｒｋ標準、非誘導の可溶化液、１Ｎ７Ｆ－ＯｓＫ１、１Ｎ７Ｆ－ＳｈＫ、１ＵＥＺ－ＯｓＫ１、１ＵＥＺ－ＳｈＫ、１ＷＡ７－ＯｓＫ１、１ＷＡ７－ＳｈＫ、１Ｘ２Ｋ－ＯｓＫ１、１Ｘ２Ｋ－ＳｈＫであった。電気泳動用の試料の調製には、細胞培養物のOD_{600}の測定、細胞の遠心及び$10OD_{600}$／ｍＬ混合物を作製するために十分なＰＢＳ（Ｄｕｌｂｅｃｃｏのリン酸緩衝化された生理的食塩水（１Ｘ）（－塩化カルシウム、－塩化マグネシウム）；ＧＩＢＣＯ）中への再懸濁が含まれた。この１５μＬを搭載緩衝液（８０％Ｔｒｉｓ－グリシンＳＤＳ試料緩衝液（２Ｘ）［Ｎｏｖｅｘ］２０％β－メルカプトエタノール）２０μＬと合わせ、次いで、９９℃で５分間加熱した。この加熱された試料材料の分取試料（１０μＬ）をゲルのウェル中に搭載した。

【図４Ｂ】Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ染色された１８％Ｔｒｉｓ－グリシンＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いた様々なＯＳＫ１融合物の発現を示す。レーン内容は（左から右へ）、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎＢｅｎｃｈｍａｒｋ標準、非誘導の可溶化液、ＦＮ３－ＯｓＫ１、１ＷＦＶ－ＯｓＫ１、１ＡＢ２－ＯｓＫ１、１ＪＹＱ－ＯｓＫ１、１ＰＨＴ－ＯｓＫ１であった。電気泳動用の試料の調製は、図４Ａに対して上述されているとおりであった。

【図５Ａ】Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ染色された１８％Ｔｒｉｓ－グリシンＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いたＴＭＰ（２２－７Ｑ）融合物の発現を示している。レーン内容は（左から右へ）、非誘導の可溶化液、ＳＨ３可溶化液Ｉ＋６、ＳＨ３不溶性Ｉ＋６、ＳＨ３可溶性Ｉ＋６、非誘導の可溶化液、ＳＨ２可溶化液Ｉ＋６、ＳＨ２不溶性Ｉ＋６、ＳＨ２可溶性Ｉ＋６、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎＢｅｎｃｈｍａｒｋ標準であった。電気泳動用の試料の調製は、細胞培養物のOD_{600}の測定、式０．５２９１／ＯＤを用いて、１ｍｇの沈降物を得るための細胞の遠心を含んだ。Ｔｒｉｓ－ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）緩衝液５０μＬ及び搭載緩衝液５０μＬ（Ｎｏｖｅｘから得た５０％Ｔｒｉｓ－グリシンＳＤＳ試料緩衝液（２×）、５０％β－メルカプトエタノール）中に沈降物を再懸濁し、次いで、これを９９℃で１０分間加熱した。この加熱された試料材料の分取試料（２０μＬ）をゲルのウェル中に搭載した。

【図５Ｂ】Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ染色された１８％Ｔｒｉｓ－グリシンＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いたＴＭＰ（２２－７Ｑ）融合物の発現を示している。レーン内容は（左から右へ）、非誘導の可溶化液、ＰＤＺ可溶化液Ｉ＋６、ＰＤＺ不溶性Ｉ＋６、ＰＤＺ可溶性Ｉ＋６、非誘導の可溶化液、Ｆｎ３可溶化液Ｉ＋６、Ｆｎ３不溶性Ｉ＋６、Ｆｎ３可溶性Ｉ＋６、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎＢｅｎｃｈｍａｒｋ標準であった。電気泳動用の試料の調製は、図５Ａに対して上述されているとおりであった。

【図６Ａ】図６ＡからＥは、Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ染色された４から２０％のｔｒｉｓ－グリシンＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いた小ドメインＯｓＫ１融合物の振盪フラスコ発現を示している。図６ＡからＣ中のレーン内容は（左から右へ）、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、可溶性画分、デオキシコール酸洗浄、水洗浄、不溶性、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、可溶性画分、デオキシコール酸洗浄、水洗浄及び不溶性画分であった。図６ＤからＥ中のレーン内容は（左から右へ）、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、可溶性画分、デオキシコール酸洗浄、水洗浄、不溶性及び不溶性画分であった。電気泳動用のウェル中に搭載するための試料の調製は、本明細書中の実施例２（タンパク質精製の部）に記載されているとおりであり、還元３×ＳＤＳ－ＰＡＧＥ試料緩衝液（１６７ｍＭｔｒｉｓｐＨ６．８、２６．７％グリセロール、５．３％ＳＤＳ及び１３．３％２－メルカプトエタノール）の１／２容積で、各ウェルに対する材料を希釈し、ウェル当り試料の分取試料２μＬを搭載した。

【図６Ｂ】図６ＡからＥは、Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ染色された４から２０％のｔｒｉｓ－グリシンＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いた小ドメインＯｓＫ１融合物の振盪フラスコ発現を示している。図６ＡからＣ中のレーン内容は（左から右へ）、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、可溶性画分、デオキシコール酸洗浄、水洗浄、不溶性、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、可溶性画分、デオキシコール酸洗浄、水洗浄及び不溶性画分であった。図６ＤからＥ中のレーン内容は（左から右へ）、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、可溶性画分、デオキシコール酸

洗浄、水洗浄、不溶性及び不溶性画分であった。電気泳動用のウェル中に搭載するための試料の調製は、本明細書中の実施例２（タンパク質精製の部）に記載されているとおりであり、還元３×ＳＤＳ－ＰＡＧＥ試料緩衝液（１６７ｍＭｔｒｉｓｐＨ６．８、２６．７％グリセロール、５．３％ＳＤＳ及び１３．３％２－メルカプトエタノール）の１／２容積で、各ウェルに対する材料を希釈し、ウェル当り試料の分取試料２μＬを搭載した。

【図６Ｃ】図６ＡからＥは、Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ染色された４から２０％のｔｒｉｓ－グリシンＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いた小ドメインＯｓＫ１融合物の振盪フラスコ発現を示している。図６ＡからＣ中のレーン内容は（左から右へ）、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、可溶性画分、デオキシコール酸洗浄、水洗浄、不溶性、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、可溶性画分、デオキシコール酸洗浄、水洗浄及び不溶性画分であった。図６ＤからＥ中のレーン内容は（左から右へ）、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、可溶性画分、デオキシコール酸洗浄、水洗浄、不溶性及び不溶性画分であった。電気泳動用のウェル中に搭載するための試料の調製は、本明細書中の実施例２（タンパク質精製の部）に記載されているとおりであり、還元３×ＳＤＳ－ＰＡＧＥ試料緩衝液（１６７ｍＭｔｒｉｓｐＨ６．８、２６．７％グリセロール、５．３％ＳＤＳ及び１３．３％２－メルカプトエタノール）の１／２容積で、各ウェルに対する材料を希釈し、ウェル当り試料の分取試料２μＬを搭載した。

【図６Ｄ】図６ＡからＥは、Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ染色された４から２０％のｔｒｉｓ－グリシンＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いた小ドメインＯｓＫ１融合物の振盪フラスコ発現を示している。図６ＡからＣ中のレーン内容は（左から右へ）、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、可溶性画分、デオキシコール酸洗浄、水洗浄、不溶性、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、可溶性画分、デオキシコール酸洗浄、水洗浄及び不溶性画分であった。図６ＤからＥ中のレーン内容は（左から右へ）、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、可溶性画分、デオキシコール酸洗浄、水洗浄、不溶性及び不溶性画分であった。電気泳動用のウェル中に搭載するための試料の調製は、本明細書中の実施例２（タンパク質精製の部）に記載されているとおりであり、還元３×ＳＤＳ－ＰＡＧＥ試料緩衝液（１６７ｍＭｔｒｉｓｐＨ６．８、２６．７％グリセロール、５．３％ＳＤＳ及び１３．３％２－メルカプトエタノール）の１／２容積で、各ウェルに対する材料を希釈し、ウェル当り試料の分取試料２μＬを搭載した。

【図６Ｅ】図６ＡからＥは、Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ染色された４から２０％のｔｒｉｓ－グリシンＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いた小ドメインＯｓＫ１融合物の振盪フラスコ発現を示している。図６ＡからＣ中のレーン内容は（左から右へ）、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、可溶性画分、デオキシコール酸洗浄、水洗浄、不溶性、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、可溶性画分、デオキシコール酸洗浄、水洗浄及び不溶性画分であった。図６ＤからＥ中のレーン内容は（左から右へ）、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、可溶性画分、デオキシコール酸洗浄、水洗浄、不溶性及び不溶性画分であった。電気泳動用のウェル中に搭載するための試料の調製は、本明細書中の実施例２（タンパク質精製の部）に記載されているとおりであり、還元３×ＳＤＳ－ＰＡＧＥ試料緩衝液（１６７ｍＭｔｒｉｓｐＨ６．８、２６．７％グリセロール、５．３％ＳＤＳ及び１３．３％２－メルカプトエタノール）の１／２容積で、各ウェルに対する材料を希釈し、ウェル当り試料の分取試料２μＬを搭載した。

【図７Ａ】図７ＡからＦは、再折り畳み及び５０ｍＭNaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９を走行緩衝液として使用し、２８０ｎｍの吸光度を観察するＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘＢｉｏＳｅｐ－ＳＥＣ３０００カラムを用いた精製後における、ＯｓＫ１融合タンパク質の様々な小ドメインＯｓＫ１融合物ＳＥ－ＨＰＬＣの分析的ＳＥＣを示している。

【図７Ｂ】図７ＡからＦは、再折り畳み及び５０ｍＭNaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９を走行緩衝液として使用し、２８０ｎｍの吸光度を観察するＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘＢｉｏＳｅｐ－ＳＥＣ３０００カラムを用いた精製後における、ＯｓＫ１融合タンパク質の様々な小ドメインＯｓＫ１融合物ＳＥ－ＨＰＬＣの分析的ＳＥＣを示している。

【図７Ｃ】図７ＡからＦは、再折り畳み及び５０ｍＭNaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９を走行緩衝液として使用し、２８０ｎｍの吸光度を観察するＰｈｅｎｏｍ

ｅｎｅｘＢｉｏＳｅｐ－ＳＥＣ３０００カラムを用いた精製後における、ＯｓＫ１融合タンパク質の様々な小ドメインＯｓＫ１融合物ＳＥ－ＨＰＬＣの分析的ＳＥＣを示している。

【図７Ｄ】図７ＡからＦは、再折り畳み及び５０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９を走行緩衝液として使用し、２８０ｎｍの吸光度を観察するＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘＢｉｏＳｅｐ－ＳＥＣ３０００カラムを用いた精製後における、ＯｓＫ１融合タンパク質の様々な小ドメインＯｓＫ１融合物ＳＥ－ＨＰＬＣの分析的ＳＥＣを示している。

【図７Ｅ】図７ＡからＦは、再折り畳み及び５０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９を走行緩衝液として使用し、２８０ｎｍの吸光度を観察するＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘＢｉｏＳｅｐ－ＳＥＣ３０００カラムを用いた精製後における、ＯｓＫ１融合タンパク質の様々な小ドメインＯｓＫ１融合物ＳＥ－ＨＰＬＣの分析的ＳＥＣを示している。

【図７Ｆ】図７ＡからＦは、再折り畳み及び５０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９を走行緩衝液として使用し、２８０ｎｍの吸光度を観察するＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘＢｉｏＳｅｐ－ＳＥＣ３０００カラムを用いた精製後における、ＯｓＫ１融合タンパク質の様々な小ドメインＯｓＫ１融合物ＳＥ－ＨＰＬＣの分析的ＳＥＣを示している。

【図８Ａ】図８ＡからＣは、Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ染色された４から２０％のｔｒｉｓ－グリシンＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いて、再折り畳み及び精製された小ドメインＯｓＫ１融合物の産物を示している。図８ＡからＣ中のレーン内容は（左から右へ）、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、タンパク質０．５μｇ、ブランク、タンパク質２．０μｇ、ブランク、タンパク質１０μｇ、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、タンパク質０．５μｇ、ブランク、タンパク質２．０μｇ、ブランク、タンパク質１０μｇであった。

【図８Ｂ】図８ＡからＣは、Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ染色された４から２０％のｔｒｉｓ－グリシンＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いて、再折り畳み及び精製された小ドメインＯｓＫ１融合物の産物を示している。図８ＡからＣ中のレーン内容は（左から右へ）、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、タンパク質０．５μｇ、ブランク、タンパク質２．０μｇ、ブランク、タンパク質１０μｇ、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、タンパク質０．５μｇ、ブランク、タンパク質２．０μｇ、ブランク、タンパク質１０μｇであった。

【図８Ｃ】図８ＡからＣは、Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ染色された４から２０％のｔｒｉｓ－グリシンＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いて、再折り畳み及び精製された小ドメインＯｓＫ１融合物の産物を示している。図８ＡからＣ中のレーン内容は（左から右へ）、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、タンパク質０．５μｇ、ブランク、タンパク質２．０μｇ、ブランク、タンパク質１０μｇ、ＮｏｖｅｘＭａｒｋ１２標準、タンパク質０．５μｇ、ブランク、タンパク質２．０μｇ、ブランク、タンパク質１０μｇであった。

【図９Ａ】図９ＡからＥは、再折り畳み及び精製された小ドメインＯｓＫ１融合物の質量分析を示している。

【図９Ｂ】図９ＡからＥは、再折り畳み及び精製された小ドメインＯｓＫ１融合物の質量分析を示している。

【図９Ｃ】図９ＡからＥは、再折り畳み及び精製された小ドメインＯｓＫ１融合物の質量分析を示している。

【図９Ｄ】図９ＡからＥは、再折り畳み及び精製された小ドメインＯｓＫ１融合物の質量分析を示している。

【図９Ｅ】図９ＡからＥは、再折り畳み及び精製された小ドメインＯｓＫ１融合物の質量分析を示している。

【図１０】ＳＰ－ＨＰセファロース、２０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液ｐＨ５．０及び０から１ＭへのＮａＣｌグラジエントを用いた、ＰＥＧ化後の１ＵＥＺ－ＯｓＫ１融合構築物の陽イオン交換精製を示している。実線は２８０ｎｍの吸光度を追跡しているのに対して、破線は伝導度を示している。

【図１１Ａ】図１１ＡからＢは、精製されたＰＥＧ化融合タンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥを示している。図１１Ａ（左から右へ）：レーン＃１及び７が分子量（ＭＷ）マーカーであり、レーン＃２、３、８及び９が非還元であり、並びにレーン＃５、６、１１及び１２が還元された。レーン＃２及び５は、連結されていない１ＵＥＺ－ＯＳＫ１融合タンパク質であり、並びにレーン＃３及び６は、精製された２０ｋＤＰＥＧ－１ＵＥＺ－ＯＳＫ１連結物であった。レーン＃８及び１１は、連結されていない１Ｎ７Ｆ－ＯＳＫ１融合タンパク質であり、並びにレーン＃９及び１２は、精製された２０ｋＤＰＥＧ－１Ｎ７Ｆ－ＯＳＫ１連結物であった。

【図１１Ｂ】図１１ＡからＢは、精製されたＰＥＧ化融合タンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥを示している。図１１Ｂ（左から右へ）：レーン＃１及び７は、分子量マーカーであった。レーン＃２、３、８及び９は、非還元であり、レーン＃５、６、１１及び１２は還元されていた。レーン＃２及び５は、連結されていないＦｎ３－ＯＳＫ１融合タンパク質であり、並びにレーン＃３及び６は、精製された２０ｋＤＰＥＧ－Ｆｎ３－ＯＳＫ１連結物であった。レーン＃８及び１１は、連結されていない１Ｘ２Ｋ－ＯＳＫ１融合タンパク質であり、並びにレーン＃８及び１２は、精製された２０ｋＤＰＥＧ－１Ｘ２Ｋ－ＯＳＫ１連結物であった。

【図１２】検出用のポリクローナルウサギ抗ＯｓＫ１抗体を用いるＥＬＩＳＡによって測定された、マウス中の静脈内注射（２ｍｇ／ｋｇ）から２４時間後における様々なＯｓＫ１構築物の血清レベルを示している。

【図１３】ニワトリ（ｃｈ；配列番号６０）及びヒト（ｈｕ；配列番号６１）ＨＰ－３５配列の並置を示している。付番は、無傷のビリンヘッドピース配列：Ｌｅｕ４２＞＞Ｐｈｅ７６に基づいている。らせん状配列には、ＮＭＲ構造に基づいて下線が付されている。

【図１４】イー・コリ可溶化液からのＰＴＨ－ＨＰ７６のＮｉ－ＮＴＡ精製から得られたクロマトグラムを示している。

【図１５】ＮｉＮＴＡカラムからの溶出されたピーク画分の４から２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを示している（図１４）。枠内の画分はウェスタンブロットによってＰＴＨ－ＨＰ７６として確認され、プールされた。

【図１６】１ｍＬのＳＰＳｅｐｈａｒｏｓｅＨＰＨｉＴｒａｐカラム（ＧＥＨｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）を用いた、ＰＥＧ化ＰＴＨ－ＨＰ７６の陽イオン交換精製から得られたクロマトグラムを示している。

【図１７】ＳＰＳｅｐｈａｒｏｓｅカラム（図１６）からの溶出されたピーク画分の４から２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを示している。精製されたＰＥＧ－ＰＴＨ－ＨＰ７６に相当する枠内の画分をプールした。

【図１８】ＰＴＨ－ＨＰ７６連結物のマウスインビボ生物アッセイの結果を示している。

【発明を実施するための形態】

【００１６】

文脈上複数表記を示さないことが明らかである場合を除き、本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される、単数形「ａ」、「ａｎ」及び「ｔｈｅ」には、複数表記が含まれる。従って、例えば、「１つのタンパク質」という表記は複数のタンパク質を含み、「細胞」という表記は複数の細胞の集団を含む。

【００１７】

「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、本明細書において互換的に使用され、ペプチド結合を通じて共有的に連結された２つ又はそれ以上のアミノ酸の分子鎖を含む。この用語は、産物の特定の長さを表さない。従って、ポリペプチドの定義の中には「ペプチド」及び「オリゴペプチド」が含まれる。この用語には、ポリペプチドの翻訳後修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化などが含まれる。さらに、タンパク質断片、類縁体、変異された又はバリアントタンパク質、融合タンパク質などが、ポリペプチドの意味の中に含まれる。公知のタンパク質改変技術を用いて組換え的に発現することができる、１つ又はそれ以上のアミノ酸類縁体又は非標準的若しくは異常なアミノ酸がその中に含まれる分子も、この用語に含まれる。さらに、本発明の融合タンパク質は、周知の有機化学

技術によって本明細書中に記載されているように誘導化することができる。

【００１８】

「融合タンパク質」という用語は、タンパク質が２以上の親タンパク質又はポリペプチドに由来するポリペプチド成分を含むことを示す。典型的には、融合タンパク質は、あるタンパク質由来のポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列が別のタンパク質由来のポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列と同じ翻訳領域中に隣接しており、場合によってリンカーによって隔てられている融合遺伝子から発現される。次いで、組換え宿主細胞によって、単一のタンパク質として融合遺伝子を発現させることができる。

【００１９】

タンパク質の「ドメイン」とは、完全なタンパク質のあらゆる一部（最大完全なタンパク質までであり、完全なタンパク質を含むが、典型的には、完全なタンパク質より短い部分を含む。）ドメインは、タンパク質鎖の残りとは独立して折り畳むことができ（但し、折り畳む必要はない。）、及び／又は特定の生物学的、生化学的又は構造的機能又は位置（例えば、リガンド結合ドメイン又は細胞質、膜貫通又は細胞外ドメイン）と相関し得る。

【００２０】

宿主細胞中において組換えＤＮＡ技術によって作製されたタンパク質に関して本明細書中で使用される「可溶性」とは、水溶液中に存在するタンパク質であり、タンパク質がツインアルギニンシグナルアミノ酸配列を含有する場合には、グラム陰性細菌宿主中において、可溶性タンパク質が周辺質腔へ排出され、又は分泌可能な真核生物宿主細胞によって若しくは適切な遺伝子（例えば、ｋｉｌ遺伝子）を有する細菌宿主によって培地中に分泌される。従って、可溶性タンパク質は、宿主細胞内部の封入体中に見出されないタンパク質である。あるいは、文脈に応じて、可溶性タンパク質は、細胞膜中に組み込まれた状態で見出されないタンパク質である。これに対して、不溶性タンパク質は、宿主細胞中において細胞質顆粒（封入体と称される。）内の変性された形態で存在するタンパク質であり、又は、同じく、文脈に応じて、不溶性タンパク質は、形質膜、ミトコンドリアの膜、葉緑体の膜、小胞体の膜など（但し、これらに限定されない。）細胞膜中に存在するタンパク質である。

【００２１】

イオン性界面活性剤（例えば、ＳＤＳ）又は変性剤（例えば、尿素、塩酸グアニジン）の著しい量なしに、水溶液中に「可溶性」である（すなわち、溶解された又は溶解され得る）タンパク質と溶液内に分散された不溶性タンパク質分子の懸濁液として存在するタンパク質との間でも区別が為される。「可溶性」タンパク質は、液体培地中に存在する細胞を除去するのに十分な条件を用いた遠心（例えば、５０００ｇでの４から５分間の遠心）によって、タンパク質を含有する溶液から除去されない。本発明の組成物の幾つかの実施形態において、組換え融合タンパク質は宿主細胞によって合成され、細胞の封入体内において不溶性形態で隔離され、これは、次いで、比較的容易に、細胞抽出物中の他の細胞成分から精製することが可能であり、続いて、組換え融合タンパク質は可溶化され、再折り畳みされ、及び／又はさらに精製され得る。

【００２２】

「可溶性」タンパク質（すなわち、宿主細胞中で発現されたときに、可溶性形態で産生されるタンパク質）と「可溶化された」タンパク質との間では、区別が為される。封入体の内側に見出される又は細胞膜中に埋め込まれて見出される不溶性組換えタンパク質は、精製された封入体又は細胞膜を塩酸グアニジン、尿素又はドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）などの変性剤で処理することによって、可溶化（すなわち、可溶性形態にされる。）され得る。これらの変性剤は、次いで、回収されたタンパク質の再生（再折り畳み）を可能とするために、可溶化されたタンパク質調製物から除去されなければならない。本発明の組成物は活性形態へ再折り畳みされ得るが、変性剤中への可溶化及び変性剤の除去後に、全てのタンパク質が活性を有する立体構造へ再折り畳みするとは限らない。変性剤を除去すると、多くのタンパク質は沈殿する。封入体及び細胞膜を可溶化するために、ＳＤＳ

が使用され得、タンパク質を溶液中に低濃度で維持する。しかしながら、透析は、ＳＤＳの全てを常に除去するとは限らず（ＳＤＳは、透析では除去されないミセルを形成し得る。）、従って、ＳＤＳによって可溶化された封入体タンパク質及びＳＤＳによって可溶化された細胞膜タンパク質は可溶性であるが、再折り畳みされない。

【００２３】

「分泌された」タンパク質は、分泌シグナルペプチド配列の結果として、小胞体、分泌小胞又は細胞外空間へ誘導され得るタンパク質及び必ずしもシグナル配列を含有せずに、細胞外空間中に放出されるタンパク質を表す。分泌されたタンパク質が細胞外空間中へ放出されるのであれば、分泌されたタンパク質は、「成熟した」タンパク質を産生するために、細胞外プロセッシングを受け得る。細胞外空間中への放出は、エキソサイトーシス及びタンパク質分解性切断などの多くの機序によって起こり得る。本発明の組成物の幾つかの他の実施形態において、組換え融合タンパク質は分泌されたタンパク質として、宿主細胞によって合成されることができ、これは、その後、細胞外空間及び／又は培地からさらに精製することができる。

【００２４】

「組換え」という用語は、物質（例えば、核酸又はポリペプチド）が、ヒトの介入によって人工的に又は合成的に（すなわち、非天然に）変化されていることを示す。その天然環境若しくは状態内の物質に対して、又はその天然環境若しくは状態から取り出された物質に対して、改変を行うことができる。例えば、「組換え核酸」とは、例えば、クローニング、ＤＮＡシャフリング又は他の周知の分子生物学的操作の間に、核酸を組換えることによって作製された核酸である。「組換えＤＮＡ分子」は、このような分子生物学的技術を用いて、一緒に連結されたＤＮＡのセグメントから構成される。本明細書において使用される「組換えタンパク質」又は「組換えポリペプチド」という用語は、組換えＤＮＡ分子を用いて発現されるタンパク質分子を表す。「組換え宿主細胞」とは、組換え核酸を含有及び／又は発現する細胞である。

【００２５】

本明細書において互換的に使用される「ポリヌクレオチド配列」又は「ヌクレオチド配列」又は「核酸配列」は、文脈に応じて、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡ及びＲＮＡ、核酸又はヌクレオチドポリマーに相当する文字列を含むヌクレオチドのポリマーである。あらゆる特定されたポリヌクレオチド配列から、所定の核酸又は相補的ポリヌクレオチド配列を決定することが可能である。一本鎖又は二本鎖であり得るゲノム又は合成起源のＤＮＡ又はＲＮＡが含まれ、センス鎖又はアンチセンス鎖に相当する。

【００２６】

本明細書において使用される「コードする核酸分子」、「コードするＤＮＡ配列」及び「コードするＤＮＡ」という用語は、デオキシリボ核酸の鎖に沿ったデオキシリボヌクレオチドの順序又は配列を表す。これらのデオキシリボヌクレオチドの順序はｍＲＮＡ鎖に沿ったリボヌクレオチドの順序を決定し、ポリペプチド（タンパク質）鎖に沿ったアミノ酸の順序も決定する。従って、ＤＮＡ配列はＲＮＡ配列をコードし、アミノ酸配列をコードする。

【００２７】

「遺伝子の発現」又は「核酸の発現」は、文脈によって示されるように、ＲＮＡへのＤＮＡの転写（ＲＮＡの修飾、例えば、スプライシングを場合によって含む。）、ポリペプチドへのＲＮＡの翻訳（ポリペプチドのその後の翻訳後修飾を含み得る。）又は転写及び翻訳の両者を意味する。

【００２８】

「遺伝子」という用語は、生物学的機能を伴うあらゆる核酸を表すために広義に使用される。遺伝子は、通例、コード配列及び／又はこのようなコード配列の発現のために必要とされる制御配列を含む。「遺伝子」という用語は、特異的なゲノム配列又は組換え配列及びその配列によってコードされるｃＤＮＡ又はｍＲＮＡに適用される。「融合遺伝子」は、融合タンパク質をコードするコード領域を含有する。遺伝子は、例えば、他のタンパ

ク質に対する認識配列を形成する発現されない核酸セグメントも含む。転写因子などの制御タンパク質が結合されている転写調節要素を含む発現されない制御配列は、隣接する配列又は付近の配列の転写をもたらす。

【００２９】

構造遺伝子に関して使用される場合、本明細書において使用される「コード領域」という用語は、ｍＲＮＡ分子の翻訳の結果としての新生ポリペプチド中に見出されるアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を表す。真核細胞中では、コード領域の５’側には、開始メチオニンをコードするヌクレオチドトリプレット「ＡＴＧ」が結合されており、停止コドンを指定する３つのトリプレット（すなわち、ＴＡＡ、ＴＡＧ、ＴＧＡ）の１つが３’側に結合されている。

【００３０】

真核生物中の転写調節シグナルは、「プロモーター」及び「エンハンサー」要素を含む。プロモーター及びエンハンサーは、転写に関与する細胞のタンパク質と特異的に相互作用するＤＮＡ配列の短い連なりからなる（Ｍａｎｉａｔｉｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ２３６：１２３７（１９８７））。プロモーター及びエンハンサー要素は、酵母、昆虫及び哺乳動物細胞中の遺伝子を含む様々な真核生物源及びウイルス（類似の調節要素、すなわち、プロモーターも、原核生物中に見出されている。）から単離されている。具体的なプロモーター及びエンハンサーの選択は、対象となるタンパク質を発現させるためにどの細胞種が使用されるかに依存する。幾つかの真核生物のプロモーター及びエンハンサーは広い宿主域を有しているが、他の真核生物のプロモーター及びエンハンサーは細胞種類の限られた一部において機能的である（総説として、Ｖｏｓｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｃｉ．，１１ ：２８７（１９８６）及びＭａｎｉａｔｉｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３６：１２３７（１９８７）参照）。

【００３１】

本明細書において使用される「発現ベクター」という用語は、所望のコード配列及び特定の宿主細胞中で作用可能に連結されたコード配列を発現させるために必要な適切な核酸配列を含有する組換えＤＮＡ分子を表す。原核生物中での発現に必要な核酸配列には、プロモーター、場合によってオペレーター配列、リボソーム結合部位及びおそらく他の配列が含まれる。真核生物の細胞は、プロモーター、エンハンサー並びに終結及びポリアデニル化シグナルを使用することが知られている。分泌性シグナルペプチド配列は、所望であれば、融合タンパク質を細胞からより容易に単離するために、発現される融合タンパク質が組換え宿主細胞によって分泌できるように、本発明の組換え融合タンパク質に対するコード配列へ作用可能に連結された発現ベクターによっても場合によってコードされ得る。このような技術は、本分野において周知である。（例えば、Ｇｏｏｄｅｙ，Ａｎｄｒｅｗ Ｒ．；ｅｔ ａｌ．，Ｐｅｐｔｉｄｅ ａｎｄ ＤＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ，米国特許第５，３０２，６９７号；Ｗｅｉｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ａｎｄ ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｐｒｏｔｅｉｎ ｓｅｃｒｅｔｉｏｎ，米国特許第６，０２２，９５２号及び米国特許第６，３３５，１７８号；Ｕｅｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｖｅｃｔｏｒ ａｎｄ ｕｔｉｌｉｚａｔｉｏｎ ｔｈｅｒｅｏｆ，米国特許第７，０２９，９０９号；Ｒｕｂｅｎ ｅｔ ａｌ．，２７ ｈｕｍａｎ ｓｅｃｒｅｔｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎｓ，ＵＳ ２００３／０１０４４００Ａ１）。

【００３２】

本明細書において使用される「作用可能な組み合わせで」、「作用可能な順序で」及び「作用可能に連結されて」という用語は、ある遺伝子の転写及び／又は所望されるタンパク質分子の合成を誘導することができる核酸分子が作製される様式で、核酸配列が結合されていることを表す。この用語は、機能的なタンパク質が作製される様式でアミノ酸配列が結合されていることも表す。

【００３３】

組換えＤＮＡ及び／又はＲＮＡによって媒介されるタンパク質発現技術又はペプチドを

調製する他のあらゆる技術を、本発明の組換え融合タンパク質の作製に適用することができる。例えば、形質転換された宿主細胞中でペプチドを作製することができる。簡潔に述べれば、ペプチドをコードする組換えＤＮＡ分子又は構築物が調製される。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、適切な制限酵素を用いて、ペプチドをコードする配列をＤＮＡから切り出すことができる。本発明の実施において、利用可能な周知の多数の宿主細胞の何れをも使用し得る。具体的な宿主の選択は、本分野によって認知された多数の要因に依存する。これらには、例えば、選択された発現ベクターとの適合性、ＤＮＡ分子によってコードされるペプチドの毒性、形質転換の割合、ペプチドの回収の容易さ、発現の特徴、生物的安全性及びコストが含まれる。全ての宿主が特定のＤＮＡ配列の発現に関して等しく有効であるわけではないということを理解して、これらの要因のバランスを採らなければならない。これらの一般的な指針の中で、培養される有用な微生物宿主細胞には、細菌（エシェリヒア・コリ（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）種など）、酵母（サッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）種など）及び他の真菌細胞、昆虫細胞、植物細胞、（ヒトを含む）哺乳動物細胞、例えば、ＣＨＯ細胞及びＨＥＫ２９３細胞が含まれる。ＤＮＡレベルで修飾を施すこともできる。ペプチドをコードするＤＮＡ配列は、選択された宿主細胞とより適合的なコドンに変化させ得る。イー・コリに関しては、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、又は選択された宿主細胞中でのＤＮＡのプロセッシングを補助し得るサイレントな制限部位を含めるために、コドンを置換することができる。次に、形質転換された宿主を培養し、精製する。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し得る。このような発酵条件は、本分野において周知である。

【００３４】

本明細書中において融合タンパク質をさらに記述する際には、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「標準的な」アミノ酸残基（表１）の種類を表記するために、一文字略号系がしばしば使用される。このような一文字略号は、三文字略号のアミノ酸名又は省略されないアミノ酸名と、意味の上で完全に互換的である。本明細書中で使用される一文字略号系において、大文字はＬ－アミノ酸を表し、小文字はＤ－アミノ酸を表す。例えば、略号「Ｒ」はＬ－アルギニンを表し、「ｒ」はＤ－アルギニンを表す。

【００３５】

【表１】

表１．標準的アミノ酸に対する一文字略号。

三文字略号がカッコ内に記載されている。

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

【００３６】

本明細書において、アミノ酸配列中でのアミノ酸の置換は、特定の位置のアミノ酸残基に対する一文字略号に続く、対象となる固有配列と比較した数的アミノ酸位置、これに続く、置換後のアミノ酸残基に対する一文字表記を用いて通例表記される。例えば、「Ｔ３０Ｄ」は、対象となる固有配列と比較して、３０位のアミノ酸位置において、スレオニン残基がアスパラギン酸残基によって置換されていることを表す。

【００３７】

組換え的に発現す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によって、本発明の範囲内で、非標準的なアミノ酸残基をペプチド中に取り込ませることができる。（例えば、Ｌｉｎｋ ｅｔ ａｌ．，Ｎｏｎ－ｃａｎｏｎｉｃａｌ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄｓ ｉｎ ｐｒｏｔｅｉｎ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１４（６）：６０３－６０９（２００３）参照。）。「非標準的なアミノ酸残基」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のアミノ酸残基に属さない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、括弧内に略号が記されている。）、シトルリン（Ｃｉｔ）、ホモシトルリン（ｈＣｉｔ）、Ｎ$^{\alpha}$－メチルシトルリン（ＮＭｅＣｉｔ）、Ｎ$^{\alpha}$－メチルホモシトルリン（Ｎ－ＭｅＨｏＣｉｔ）、オルニチン（Ｏｒｎ）、Ｎ$^{\alpha}$－メチルオルニチン（Ｎ$^{\alpha}$－ＭｅＯｒｎ又はＮＭｅＯｒｎ）、サルコシン（Ｓａｒ）、ホモリジン（ｈＬｙｓ又はｈＫ）、ホモアルギニン（ｈＡｒｇ又はｈＲ）、ホモグルタミン（ｈＱ）、Ｎ$^{\alpha}$－メチルアルギニン（ＮＭｅＲ）、Ｎ$^{\alpha}$－メチルロイシン（Ｎ$^{\alpha}$－ＭｅＬ又はＮＭｅＬ）、Ｎ－メチルホモリジン（ＮＭｅＯｈＫ）、Ｎ$^{\alpha}$－メチルグルタミン（ＮＭｅＱ）、ノルロイシン（Ｎｌｅ）、ノルバリン（Ｎｖａ）、１，２，３，４－テトラヒドロイソキノリン（Ｔｉｃ）、オクタヒドロインドール－２－カルボン酸（Ｏｉｃ）、３－（１－ナフチル

）アラニン（１－Ｎａｌ）、３－（２－ナフチル）アラニン（２－Ｎａｌ）、１，２，３，４－テトラヒドロイソキノリン（ｔｉｃ）、２－インダニルグリシン（ＩｇＩ）、ｐ－ヨードフェニルアラニン（ｐＩ－Ｐｈｅ）、ｐ－アミノフェニルアラニン（４ＡｍＰ又は４－アミノ－Ｐｈｅ）、４－グアニジノフェニルアラニン（Ｇｕｆ）、ニトロフェニルアラニン（ｎｉｔｒｏｐｈｅ）、アミノフェニルアラニン（ａｍｉｎｏｐｈｅ又はＡｍｉｎｏ－Ｐｈｅ）、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）、Ｎ$^{\alpha}$－メチルバリン（ＮＭｅＶａｌ）、Ｎ$^{\alpha}$－メチルロイシン（ＮＭｅＬｅｕ）、Ｎ$^{\alpha}$－メチルノルロイシン（ＮＭｅＮｌｅ）、シクロペンチルグリシン（Ｃｐｇ）、シクロヘキシルグリシン（Ｃｈｇ）、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）、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（又はビフェニルアラニン；４Ｂｉｐ）、α－アミノ－イソ酪酸（Ａｉｂ）、β－アラニン、β－アミノプロピオン酸、ピペリジン酸、アミノカプロン酸（ｃａｐｒｉｏｉｃ　ａｃｉｄ）、アミノヘプタン酸、アミノピメル酸、デスモシン、ジアミノピメル酸、Ｎ－エチルグリシン、Ｎ－エチルアスパラギン、ヒドロキシルリジン、アロ－ヒドロキシリジン、イソデスモシン、アロ－イソロイシン、Ｎ－メチルグリシン、Ｎ－メチルイソロイシン、Ｎ－メチルバリン、４－ヒドロキシプロリン（Ｈｙｐ）、γ－カルボキシグルタマート、ε－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルリジン、ε－Ｎ－アセチルリジン、Ｏ－ホスホセリン、Ｎ－アセチルセリン、Ｎ－ホルミルメチオニン、３－メチルヒスチジン、５－ヒドロキシリジン、ω－メチルアルギニン及び他の類似のアミノ酸、及び本明細書中に記載されているこれらのあらゆる誘導化された形態が含まれる。表２は、本発明において有用である幾つかの典型的な非標準的アミノ酸残基及び本明細書において典型的に使用される関連する略号を含むが、同じ物質に対して異なる略号及び命名法が適用され得ること、及び本明細書中において互換的に表記され得ることが当業者に理解される。

【００３８】

【表２】

表２．本発明に係るペプチド配列中へのアミノ酸の付加、挿入又は置換に対する有用な非標準的アミノ酸。表２に列記されてい略号が本明細書中に開示されている同じ物質に対する別の略号と異なっている場合には、何れの略号も適用可能であると理解される。

略号	アミノ酸
Sar	サルコシン
Nle	ノルロイシン
Ile	イソロイシン
1-Nal	3-(1-ナフチル)アラニン
2-Nal	3-(2-ナフチル)アラニン
Bip	4,4’-ビフェニルアラニン
Dip	3,3-ジフェニルアラニン
Nvl	ノルバリン
NMe-Val	Nα-メチルバリン
NMe-Leu	Nα-メチルロイシン
NMe-Nle	Nα-メチルノルロイシン
Cpg	シクロペンチルグリシン
Chg	シクロヘキシルグリシン
Hyp	ヒドロキシプラリン
Oic	オクタヒドロインドールー２ーカルボン酸
Igl	インダニルグリシン
Aib	アミノイソ酪酸
Aic	2-アミノインダンー２ーカルボン酸
Pip	ピペコリン酸
BhTic	βーホモTic
BrPro	βーホモプラリン
Tiq	1,2,3,4-L-テトラヒドロイソキノリンー１ーカルボン酸
Nip	ニペコチン酸
Thz	チアゾリジンー４ーカルボン酸
Thi	3-チエニルアラニン
4GuaPr	4-グアニジノプロリン
4Pip	4-アミノ-1-ピペリジン-4-カルボン酸
Idc	インドリン-2-カルボン酸
Hydroxyl-Tic	1,2,3,4-テトラヒドリソキノリン-7-ヒドロキシ-3-カルボン酸
Bip	4,4’-ビフェニルアラニン
Ome-Tyr	O-メチルチロシン
I-Tyr	ヨードチロシン
Tic	1,2,3,4-L-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸

Igl	インダニルグリシン
BhTic	β－ホモTic
BhPhe	β－ホモフェニルアラニン
AMeF	α-メチルフェニルアラニン
BPhe	β-フェニルアラニン
Phg	フェニルグリシン
Anc	3-アミノ-2-ナフトエ酸@
Atc	2-アミノテトラリン-2-カルボン酸
NMe-Phe	Nα-メチルフェニルアラニン
NMe-Lys	Nα-メチルリジン
Tpi	1,2,3,4-テトラヒドロノルハルマン－３－カルボン酸
Cpg	シクロペンチルグリシン
Dip	3,3-ジフェニルアラニン
4Pal	4-ピリジニルアラニン
3Pal	3-ピリジニルアラニン
2Pal	2-ピリジニルアラニン
Idc	インドリン-2-カルボン酸
Chg	シクロヘキシルグリシン
hPhe	ホモフェニルアラニン
BhTrp	β-ホモトリプトファン
pI-Phe	4-ヨードフェニルアラニン
Orn	オルニチン
Dpr	2,3-ジアミノプロピオン酸
Dbu	2,4-ジアミノ酪酸
homoLys	ホモリジン
N-eMe-K	Nε-メチル-リジン
N-eEt-K	Nε-エチル-リジン
N-eIPr-K	Nε-イソプロピル-リジン
bhomoK	β-ホモリジン
rLys	リジンΨ（CH_2NH）－還元されたアミド結合
rOrn	ＯｒｎΨ（CH_2NH）－還元されたアミド結合
Acm	アセトアミドメチル
Ahx	６－アミノヘキサン酸
εAhx	６－アミノヘキサン酸
K (NPeg11)	Nε-(O-(アミノエチル)-O'-(2-プロパノイル)-ウンデカエチレングリコール)-リジン
K (NPeg27)	Nε-(O-(アミノエチル)-O'-(2-プロパノイル)-(エチレングリコール)27-リジン
Cit	シトルリン
hCit	ホモシトルリン

NMe-Arg	Nα-メチルアルギニン(NMeR)
Guf	4-グアニジニルフェニルアラニン
bhArg	β-ホモアルギニン
3G-Dpr	2-アミノ-3-グアニジノプロパン酸
4AmP	4-アミノ-フェニルアラニン
4AmPhe	4-アミジノ-フェニルアラニン
4AmPig	2-アミノ-2-(1-カルバムイミドイルピペリジン-4-イル)酢酸
4GuaPr	4-グアニジノプロリン
N-Arg	Nα-[$(CH_2)_3NHCH(NH)NH_2$]置換されたグリシン
rArg	ArgΨ(CH2NH)ー還元されたアミド結合
4PipA	4-ピペリジニルアラニン
NMe-Thr	Nα-メチルスレオニン（又はNMeThr）

【００３９】

ＵＰＡＣ－ＩＵＢ Ｊｏｉｎｔ Ｃｏｍｍｉｓｓｉｏｎ ｏｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ（ＪＣＢＮ）によるアミノ酸及びペプチドの命名及び表記法が、以下の文献中に公開されている。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；ＰｕｒｅＡｐｐｌ．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。

【００４０】

本発明の組換え融合タンパク質のペプチドドメインに対する１つ又はそれ以上の有用な修飾には、アミノ酸の付加若しくは挿入、アミノ酸の欠失、ペプチドの末端切断、アミノ酸の置換及び／又は公知の化学的技術によって達成されるアミノ酸残基の化学的誘導化が含まれ得る。例えば、このように修飾されたアミノ酸配列は、対象となる固有配列のアミノ酸配列に比べて、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、挿入された又は置換されたアミノ酸残基が、リンカー及び／又は半減期延長部分へペプチドを連結させる求核性又は求電子性の反応性官能基を含む側鎖を有する。本発明において、このような求核性又は求電子性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、これらに限定されない。求核性の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、ホモリジン、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、これらに限定されない。

【００４１】

アミノ酸残基は、異なる化学的及び／又は物理的特性に従って、一般に分類される。「酸性アミノ酸残基」という用語は、酸性の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。典型的な酸性残基には、アスパラギン酸及びグルタミン酸残基が含まれる。「芳香族アミノ酸残基」という用語は、芳香族の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。典型的な芳香族の残基には、トリプトファン、チロシン、３－（１－ナフチル）アラニン又はフェニルアラニン残基が含まれる。「塩基性アミノ酸残基」という用語は、塩基性の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

塩基性のアミノ酸残基には、ヒスチジン、リジン、ホモリジン、オルニチン、アルギニン、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。「親水性アミノ酸残基」という用語は、極性の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。典型的な親水性の残基には、システイン、セリン、スレオニン、ヒスチジン、リジン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン及びシトルリン（Ｃｉｔ）残基が含まれる。「親油性アミノ酸残基」という用語は、非帯電、脂肪族又は芳香族の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。典型的な親油性の側鎖には、フェニルアラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、バリン、トリプトファン及びチロシンが含まれる。アラニン（Ａ）は、両親性である。すなわち、アラニンは、親水性または親油性残基として作用することができる。従って、アラニンは、「親油性残基」と「親水性残基」の両方の定義に含まれる。「非官能性アミノ酸残基」という用語は、酸性、塩基性又は芳香族の基を欠く側鎖を有するＤ型又はＬ型のアミノ酸残基を表す。典型的な中性アミノ酸残基には、メチオニン、グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン及びノルロイシン（Ｎｌｅ）残基が含まれる。

【００４２】

連結された組換え融合タンパク質のさらなる有用な実施形態は、本明細書中に開示されているポリペプチドのアミノ酸配列の保存的な修飾から生じ得る。保存的な修飾は、このような修飾が為されている連結された（例えば、ＰＥＧ連結された）ペプチドのものと類似の機能的、物理的及び化学的特徴を有する半減期延長部分が連結されたペプチドを産生する。本明細書中に開示されているビヒクル又はＰＥＧ連結されたペプチドのこのような保存的に修飾された形態も、本発明の実施形態として想定される。

【００４３】

これに対して、融合タンパク質の機能的及び／又は化学的特徴の実質的な修飾は、（ａ）置換の領域中の分子骨格の構造、例えば、α－ヘリックス立体構造、（ｂ）標的部位における分子の電荷若しくは疎水性又は（ｃ）分子のサイズの維持に対する効果が大幅に異なるアミノ酸配列中の置換を選択することによって達成され得る。

【００４４】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、当該位置のアミノ酸残基の極性又は電荷に対して殆ど又は全く効果が存在しないように、固有のアミノ酸残基を非固有の残基で置換することを含み得る。さらに、「アラニンスキャニング突然変異誘発」に関して以前に記載されているように、ポリペプチド中のあらゆる固有の残基をアラニンで置換することもできる（例えば、アラニンスキャニング突然変異誘発について論述する、ＭａｃＬｅｎｎａｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｓｃａｎｄ．Ｓｕｐｐｌ．，６４３：５５－６７（１９９８）；Ｓａｓａｋｉ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ａｄｖ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．３５：１－２４（１９９８）を参照されたい。）。

【００４５】

所望のアミノ酸置換（保存的であるか、又は非保存的であるかを問わない。）は、このような置換が所望される時点で、当業者によって決定することができる。例えば、アミノ酸置換は、ペプチド配列の重要な残基を同定するために、又は本明細書中に記載されているペプチド若しくはビヒクルが連結されたペプチド分子の親和性を増加又は減少させるために使用することができる。

【００４６】

天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて、クラスに分類され得る。

【００４７】

１）疎水性：ノルロイシン（Ｎｏｒ）、Ｍｅｔ、Ａｌａ、ＶａＩ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ；
２）中性親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ；
３）酸性：Ａｓｐ、Ｇｌｕ；
４）塩基性：Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ；
５）鎖の方向性に影響を与える残基：Ｇｌｙ、Ｐｒｏ及び

６）芳香族：Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ。

【００４８】

保存的アミノ酸置換は、同じクラスの別の一員で、これらのクラスの１つの一員を交換することを含み得る。保存的アミノ酸置換は、生物系内での合成ではなく、通例、化学的なペプチド合成によって取り込まれる天然に存在しないアミノ酸残基を包含することができる。これらには、ペプチド模倣物及びアミノ酸部分の他の反転された又は裏返えされた形態が含まれる。

【００４９】

非保存的置換は、別のクラスの一員で、これらのクラスの１つの一員を別のクラスの一員で交換することを含み得る。このような置換された残基は、融合タンパク質の領域中に導入され得る。

【００５０】

かかる変化を施す際には、ある実施形態によれば、アミノ酸の疎水性親水性指標を考慮することができる。各アミノ酸は、その疎水性及び電荷特性に基づいて疎水性親水性指標を割り当てられている。疎水性親水性指標は、イソロイシン（＋４．５）、バリン（＋４．２）、ロイシン（＋３．８）、フェニルアラニン（＋２．８）、システイン／シスチン（＋２．５）、メチオニン（＋１．９）、アラニン（＋１．８）、グリシン（－０．４）、スレオニン（－０．７）、セリン（－０．８）、トリプトファン（－０．９）、チロシン（－１．３）、プロリン（－１．６）、ヒスチジン（－３．２）、グルタミン酸（－３．５）、グルタミン（－３．５）、アスパラギン酸（－３．５）、アスパラギン（－３．５）、リジン（－３．９）及びアルギニン（－４．５）である。

【００５１】

相互作用的な生物学的機能をタンパク質に付与する際の疎水性親水性アミノ酸指標の重要性は当分野では理解されている。（例えば、Ｋｙｔｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１５７：１０５－１３１（１９８２）を参照されたい。）。ある種のアミノ酸は、類似の疎水性親水性指標又はスコアを有する他のアミノ酸を置換することができ、それでもなお類似の生物活性を保持することが知られている。疎水性親水性指標に基づいて変化を施す際には、ある実施形態において、その疎水性親水性指標が±２以内であるアミノ酸の置換が含まれる。ある実施形態において、±１以内であるアミノ酸の置換が含まれ、ある実施形態において、±０．５以内であるアミノ酸の置換が含まれる。

【００５２】

類似アミノ酸の置換は、本明細書中に開示されているように、特にそれによって産生される生物学的に機能的であるタンパク質又はペプチドが免疫学的実施形態に対して使用されることが意図されている場合には、親水性に基づいて効果的に実施することができることも当分野では理解されている。ある実施形態において、その隣接アミノ酸の親水性によって支配される、タンパク質の局所的な最大平均親水性は、その免疫原性及び抗原性、すなわち、タンパク質の生物学的特性と相関がある。

【００５３】

以下の親水性値がこれらのアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（＋３．０）、リジン（＋３．０）、アスパラギン酸（＋３．０±１）、グルタミン酸（＋３．０±１）、セリン（＋０．３）、アスパラギン（＋０．２）、グルタミン（＋０．２）、グリシン（０）、トレオニン（－０．４）、プロリン（－０．５±１）、アラニン（－０．５）、ヒスチジン（－０．５）、システイン（－１．０）、メチオニン（－１．３）、バリン（－１．５）、ロイシン（－１．８）、イソロイシン（－１．８）、チロシン（－２．３）、フェニルアラニン（－２．５）及びトリプトファン（－３．４）。類似の親水性値に基づいて変化を施す際には、ある実施形態において、その親水性値が±２以内であるアミノ酸の置換が含まれ、ある実施形態において、±１以内であるアミノ酸の置換が含まれ、ある実施形態において、±０．５以内であるアミノ酸の置換が含まれる。親水性に基づいて一次アミノ酸配列からエピトープを特定することもできる。これらの領域は、「エピトープコア領域」とも記述される。

【００５４】
保存的置換の例には、イソロイシン、バリン、ロイシン、ノルロイシン、アラニン若しくはメチオニンなどのある非極性（疎水性）アミノ酸残基を別の非極性（疎水性）アミノ酸残基と置換すること、ある極性（親水性）アミノ酸残基を別の極性（親水性）アミノ酸残基と置換すること（アルギニンとリジンの間、グルタミンとアスパラギンの間、グリシンとセリンの間など）、リジン、アルギニン若しくはヒスチジンなどのある塩基性アミノ酸残基を別の塩基性アミノ酸残基と置換すること、又はアスパラギン酸若しくはグルタミン酸などのある酸性残基を別の酸性残基と置換することが含まれる。「保存的アミノ酸置換」という用語には、誘導化されていない残基に代えて、化学的に誘導化された残基を使用することも含まれる（但し、このようなポリペプチドは、必要な生物活性を示すものとする。）。本発明において有用であり得る他の例示的なアミノ酸置換が、表２に記載されている。

【００５５】
【表３】

表２．幾つかの有用なアミノ酸置換

元の残基	典型的な置換
Ala	Val、Leu、Ile
Arg	Lys、Gln、Asn
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser、Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro、Ala
His	Asn、Gln、Lys、Arg
Ile	Leu、Val、Met、Ala、Phe、ノルロイシン
Leu	ノルロイシン、Ile、Val、Met、Ala、Phe
Lys	Arg、1,4-ジアミノ-酪酸、Gln、Asn
Met	Leu、Phe、Ile
Phe	Leu、Val、Ile、Ala、Tyr
Pro	Ala
Ser	Thr、Ala、Cys
Thr	Ser
Trp	Tyr、Phe
Tyr	Trp、Phe、Thr、Ser
Val	Ile、Met、Leu、Phe、Ala、ノルロイシン

【００５６】
本明細書中に上述されているように、本発明において、本発明の融合タンパク質のペプチド部分は、公知の有機化学技術によって、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化することもできる。「化学的誘導体」又は「化学的に誘導化された」とは、官能性側鎖基の反応によって化学的に誘導化された１つ又はそれ以上の残基を有する主題ペプチドを表す。このような誘導化された分子には、例えば、アミン塩酸塩、ｐ－トルエンスルホニル基、カルボベンゾキシ基、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ために、遊離のアミノ基が誘導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若しくはエステルの他の種類又はヒドラジドを形成するために誘導化され得る。遊離のヒドロキシル基は、Ｏ－アシル

又はＯ－アルキル誘導体を形成するために誘導化され得る。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ために誘導化され得る。Ｌ型又はＤ型であるかどうかを問わず、２０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、プロリンを４－ヒドロキシプロリンで置換することができ、リジンを５－ヒドロキシリジンで置換することができ、ヒスチジンを３－メチルヒスチジンで置換することができ、セリンをホモセリンで置換することができ、リジンをオルニチンで置換することができる。

【００５７】

幾つかの実施形態において、有用な誘導化には、Ｎ末端の遊離アミノ基においてビヒクルとの連結が起こらないように、ペプチドのアミノ末端が化学的に遮蔽されているものが含まれる。このような修飾の他の有益な効果、例えば、酵素的なタンパク分解に対する融合タンパク質の感受性の低減も存在し得る。Ｎ末端は、アシル化され、又は置換されたアミンへ修飾され、又は芳香族部分（例えば、インドール酸、ベンジル（Ｂｚｌ又はＢｎ）、ジベンジル（ＤｉＢｚｌ又は$Ｂｎ_{2}$）若しくはベンジルオキシカルボニル（Ｃｂｚ又はＺ））、Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシン若しくはクレアチンなどの別の官能基で誘導化することができる。例えば、幾つかの実施形態において、ホルミル、アセチル（Ａｃ）、プロパノイル、ブタニル、ヘプタニル、ヘキサノイル、オクタノイル又はノナノイルなどの（但し、これらに限定されない。）アシル部分は、ペプチドのＮ末端へ共有結合させることができ、これにより、ビヒクルをペプチドへ連結する間に望ましくない副反応を抑制することができる。他の例示的なＮ末端誘導体基には、$－ＮＲＲ^{1}$（$－ＮＨ_{2}$）、$－ＮＲＣ（Ｏ）Ｒ^{1}$、$－ＮＲＣ（Ｏ）ＯＲ^{1}$、$－ＮＲＳ（Ｏ）_{2}Ｒ^{1}$、$－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨＲ^{1}$、スクシンイミド又はベンジルオキシカルボニル－ＮＨ－（Ｃｂｚ－ＮＨ－）が含まれ、Ｒ及び$Ｒ^{1}$は、各々独立に、水素又は低級アルキルであり、フェニル環は$Ｃ_{1}－Ｃ_{4}$－アルキル、$Ｃ_{1}－Ｃ_{4}$アルコキシ、クロロ及びブロモから選択される１から３個の置換基で置換され得る。

【００５８】

幾つかの実施形態において、アミノ酸残基間の１つ又はそれ以上のペプチジル［－Ｃ（Ｏ）ＮＲ－］連結（結合）は、非ペプチジル連結によって置換され得る。典型的な非ペプチジル連結は、$－ＣＨ_{2}$－カルバマート［$－ＣＨ_{2}－ＯＣ（Ｏ）ＮＲ－$］、ホスホナート、$－ＣＨ_{2}$－スルホンアミド［$－ＣＨ_{2}－Ｓ（Ｏ）_{2}ＮＲ－$］、尿素［$－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨ－$］、$－ＣＨ_{2}$－二級アミン及びアルキル化されたペプチド［$－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{6}－$（$Ｒ^{6}$は、低級アルキルである。）］である。

【００５９】

幾つかの実施形態において、１つ又はそれ以上の各アミノ酸残基を誘導化することができる。以下で詳しく例として記載されているように、選択された側鎖又は末端残基と特異的に反応する様々な誘導化剤が公知である。

【００６０】

リジン残基及びアミノ末端残基は、コハク酸又は他のカルボン酸無水物と反応することができ、これによって、リジン残基の電荷は逆転する。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としては、メチルピコリンイミダートなどのイミドエステル、ピリドキサールリン酸、ピリドキサール、クロロボロヒドリド、トリニトロベンゼンスルホン酸、Ｏ－メチルイソ尿素、２，４ペンタンジオン及びグリオキシル酸とのトランスアミナーゼ触媒反応などが挙げられる。

【００６１】

アルギニン残基は、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、幾つかの従来の試薬のいずれか１つ又は組み合わせと反応させることによって修飾することができる。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基のｐＫａが高いので、反応をアルカリ条件下で実施する必要がある。さらに、これらの試薬は、リジン基及びアルギニンε－アミノ基と反応することができる。

【００６２】

チロシン残基の特異的修飾は、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ってスペクトル標識をチロシル残基に導入することに特に関心を集めて、広範に研究されてきた。最も一般的には、それぞれＯ－アセチルチロシル種及び３－ニトロ誘導体を形成するために、Ｎ－アセチルイミジゾール（ａｃｅｔｙｌｉｍｉｄｉｚｏｌｅ）及びテトラニトロメタンが使用される。

【００６３】

カルボキシル側鎖基（アスパルチル又はグルタミル）は、１－シクロヘキシル－３－（２－モルホリニル－（４－エチル）カルボジイミド又は１－エチル－３－（４－アゾニア－４，４－ジメチルペンチル）カルボジイミドなどのカルボジイミド（Ｒ’－Ｎ＝Ｃ＝Ｎ－－Ｒ’）との反応によって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って、アスパラギニル及びグルタミニル残基に転化され得る。

【００６４】

グルタミニル及びアスパラギニル残基は、脱アミドして、対応するグルタミル及びアスパルチル残基にすることができる。あるいは、これらの残基は、弱酸性条件下で脱アミド化される。これらの残基のどちらの形態も本発明の範囲に属する。

【００６５】

システイニル残基は、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するために、アミノ酸残基又は他の部分によって置換することができる。（例えば、Ｂｈａｔｎａｇａｒ ｅｔ ａｌ．（１９９６），Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ． ３９： ３８１４－９を参照されたい。）。

【００６６】

二官能性薬剤を用いた誘導化は、ペプチド又はその機能的誘導体を水不溶性支持マトリックス又は所望であれば、他の巨大分子ビヒクルに架橋させるのに有用である。一般に使用される架橋剤としては、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、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を含めたホモ二官能性イミドエステル及びビス－Ｎ－マレイミド－１，８－オクタンなどの二官能性マレイミドが挙げられる。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化剤は、光の存在下で架橋を形成することができる光活性化可能な中間体を生成する。あるいは、例えば、米国特許第３，９６９，２８７号、同３，６９１，０１６号、同４，１９５，１２８号、同４，２４７，６４２号、同４，２２９，５３７号及び同４，３３０，４４０号に記載されているような臭化シアン活性化炭水化物及び反応性基質などの反応性水不溶性マトリックスがタンパク質の固定のために使用される。

【００６７】

他の可能な修飾には、プロリン及びリジンの水酸化、セリル又はスレオニル残基の水酸基のリン酸化、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：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ（Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ＆ Ｃｏ．，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ），７９－８６（１９８３）。

【００６８】

誘導化の上記例は、網羅的な処置であることを意図したものではなく、例示に過ぎない。

【００６９】

組換え融合タンパク質の作製は、適用可能な場合、適切なタンパク質精製技術も含み得る。本発明の融合タンパク質の幾つかの実施形態において、定量又は検出を容易にするために、分子は、適切な同位体標識（例えば、^{125}Ｉ、^{14}Ｃ、^{13}Ｃ、^{35}Ｓ、^{3}Ｈ、^{2}Ｈ、^{13}Ｎ、^{15}Ｎ、^{18}Ｏ、^{17}Ｏなど）を含むように調製することができる。

【００７０】

本発明の組換え融合タンパク質内における薬理学的に不活性な小タンパク質ドメイン（「Ｄ」）の配置は、融合タンパク質の薬理学的に活性を有するタンパク質（「Ｐ」）部分より、融合タンパク質のＮ末端により近接し得る。あるいは、本発明の組換え融合タンパク質の他の有用な実施形態は、薬理学的に不活性な小タンパク質ドメインより、融合タンパク質のＮ末端により近く位置する薬理学的に活性なタンパク質を有する。場合によって、本明細書中に記載されているように、２つの融合対の間にペプチドリンカーが存在することができ、又はさらなるペプチドドメインが存在することができ、融合タンパク質のＮ末端及びＣ末端の一方又は両方に融合された「尾部」が存在し得る。

【００７１】

薬理学的に不活性な小タンパク質ドメインはヒト起源であるが、リンカー又は活性化されたＰＥＧなどの半減期延長部分への共有的連結を促進するために、対象とする固有のヒト配列と比べて、１つ又はそれ以上の様式で修飾されたヒト起源のアミノ酸配列も包含される。例えば、側鎖及び／又は末端に、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）ケト官能基などの（但し、これに限定されない。）、求核性又は求電子性の反応性官能基を付加することができる。例えば、システイン残基若しくは反応性の一級若しくは二級アミノ基を提供する残基を配列中に挿入することが可能であり、又は固有のヒト配列中に別の残基を置換することができる。

【００７２】

本発明内での使用に適した薬理学的に不活性な小タンパク質ドメインは、約３から約２０ｋＤａの範囲であり得、典型的には約４から約１２ｋＤａであり、原核生物宿主中の高レベル発現を補助し得る小さなサイズに関して選択される。さらに、このような有用な薬理学的に不活性な小タンパク質ドメインは、ヒト起源のものである。これは、本発明の組成物がヒトに投与するための治療用分子の一部として使用される場合に、免疫原性を最小化する利点を有する。薬理学的に不活性な小タンパク質ドメインは、安定な「スタンドアローン」タンパク質ドメイン（すなわち、目的の薬学的に許容される水性製剤緩衝液中において、その固有又は準固有の二次及び／又は三次構造へ折り畳む能力を維持し、折り畳まれたときに（又は、必要であれば、再度折り畳まれたときに）、このような緩衝液中において可溶性であるドメイン）を形成することを特徴とする。従って、本発明における使用に適した薬理学的に不活性な小タンパク質ドメインは、界面活性剤又はカオトロピック剤（尿素、塩酸グアニジン又は過塩素酸リチウムなど）を含有しない医薬として許容される目的の水性製剤緩衝液中に、他のタンパク質なしに（生理的に適合的な温度で）懸濁されたときに、不溶性凝集物の少量（総タンパク質の約１０％未満、典型的には約５％未満の凝集物）を形成するものとすべきである。このような製剤緩衝液は、（必要であれば、無菌再水和又は凍結乾燥された若しくは凍結された製剤緩衝液の融解後に）、注射又は他の薬物送達経路による哺乳動物への投与に適した製剤緩衝液である。タンパク質治療剤の投与に適した医薬として許容されるこのような製剤緩衝液は、生物医薬分野において周知であり、例えば、酢酸、クエン酸、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン又はリン酸緩衝系（但し、これらに限定されない。）を含み、生物医薬分野において公知の様々な他の賦形剤、凍結保護剤、界面活性剤、等張化及び／又は安定化成分（例えば、ポリソルベート２０、ポリソルベート８０）を場合によって含有する様々な組成物及びｐＨ（例えば、約ｐＨ５．０から約ｐＨ８．２の間）から選択することができる。（例えば、Ｌａｍ他の米国特許第６，１７１，５８６号；Ｐｅａｒｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，米国特許第５，０９６，８８５号；Ｏ’Ｃｏｎｎｏｒ他の米国特許第５，９８１，４８５号；Ｃａｓｔｅｎｓｓｏｎ他の米国特許第５，５６７，６７７号；Ｂｒｙｃｈ他のＵＳ２００７０１９００４７Ａ１（先述の全ての全体が、参照により、組み込まれる。）参照）。関心が持たれ得る医薬として許容される製剤緩衝液の他の例は、１０ｍＭ酢酸、９％スクロース、ｐＨ５．０；１０ｍＭＴｒｉｓ、１５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ８．０及び１０ｍＭNaH_2PO_4、１４０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ７．２を含む。

【００７３】

本発明において、安定なスタンドアローンドメインの前述の特徴が維持される限り、薬理学的に不活性な小タンパク質ドメインの有用な実施形態は、アミノ酸の付加若しくは挿入、アミノ酸の欠失、ペプチド末端切断、アミノ酸の置換又はアミノ酸残基の化学的誘導化（公知の化学的技術によって達成される。）などの、ヒト起源の固有配列の断片又は修飾を含む。

【００７４】

薬理学的に不活性な小タンパク質ドメインの有用な例には、第１０フィブロネクチンＩＩＩドメイン、ＳＨ３ドメイン、ＳＨ２ドメイン、ＩｇＧ１のＣＨ２ドメイン、ＰＤＺドメイン、トロンボスポンディン反復ドメイン、ユビキチンドメイン、ロイシンリッチ反復ドメイン、ビリンヘッドピースＨＰ３５ドメイン若しくはビリンヘッドピースＨＰ７６ドメイン又は可溶性であり、生理的なｐＨ（すなわち、約ｐＨ６．８から７．４）及び温度で生物学的に適合的な水性緩衝液中において、その固有の若しくは準固有の二次又若しくは三次構造を維持するこれらの何れかの断片若しくは修飾が含まれる。これらの幾つかに対するアミノ酸配列には、以下のものが含まれる。

【００７５】

【化１】

1. ヒトIgG1配列のCH2：

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ

YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG// 配列番号 :1;

又は、以下のような、ヒトIgG１のCH2ドメインの末端切断された断片：

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ

YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS// 配列番号 :107

又は

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY

NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS// 配列番号 :108; 又は

2. ヒト第10フィブロネクチンIIIドメイン（「FN3」又は「FNIII」又は「10thFn3」とも表記される。）

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATIS

GLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEIDKPSQ// 配列番号 :2

又は、以下のような末端切断されたその断片：

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTE// 配列番号 :13

又は、以下のような伸長物：

TVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTE// 配列番号 :50; 又は

3. ヒトPDZドメイン (Erbin):

GSMEIRVRVEKDPELGFSISGGVGGRGNPFRPDDDGIFVTRVQPEGPASKLLQPGDKIIQA
NGYSFINIEHGQAVSLLKTFQNTVELIIVREVSS// 配列番号 :3, 又は

PDZ(1N7F):

SSGAIIYTVELKRYGGPLGITISGTEEPFDPIIISSLTKGGLAERTGAIHIGDRILAINSSSLKG
KPLSEAIHLLQMAGETVTLKIKKQTDAQSASSP// 配列番号 :102,

PDZ(1UEZ):

PGEVRLVSLRRAKAHEGLGFSIRGGSEHGVGIYVSLVEPGSLAEKEGLRVGDQILRVNDK
SLARVTHAEAVKALKGSKKLVLSVYSAGRIP// 配列番号 :103,

PDZ(1WFV):

PQDFDYFTVD MEKGAKGFGF SIRGGREYKM DLYVLRLAED GPAIRNGRMR
VGDQIIEING ESTRDMTHAR AIELIKSGGR RVRLLLKRGT GQVP// 配列番号 :104;

4. ヒトSH3ドメイン (Fyn) :

VTLFVALYDYEARTEDDLSFHKGEKFQILNSSEGDWWEARSLTTGETGYIPSNYVAPV//
配列番号 :4;

SH3(1PHT):

SAEGYQYRALYDYKKEREEDIDLHLGDILTVNKGSLVALGFSDGQEARPEEIGWLNGYN
ETTGERGDFPGTYVEYIGRKKISP// 配列番号 :105,

SH3(1WA7):

PEEQGDIVVA LYPYDGIHPD DLSFKKGEKM KVLEEHGEWW KAKSLLTKKE
GFIPSNYVAK LNT// 配列番号 :106

SH3(1X2K):

KVFRALYTFE PRTPDELYFE EGDIIYITDM SDTNWWKGTS KGRTGLIPSN YVAEQ//
配列番号 :94

5. ヒトSH2ドメイン (Grb2) :

GSMAWFFGKIPRAKAEEMLSKQRHDGAFLIRESESAPGDFSLSVKFGNDVQHFKVLRDG
AGKYFLWVVKFNSLNELVDYHRSTSVSRNQQIFLRDI// 配列番号 :5

SH2(1AB2):

NSLEKHSWYH GPVSRNAAEY LLSSGINGSF LVRESESSPG QRSISLRYEG

RVYHYRINTA SDGKLYVSSE SRFNTLAELV HHHSTVADGL ITTLHYPAP// 配列番号:109;

SH2(1JYQ):

PWFFGKIPRA KAEEMLSKQR HDGAFLIRES ESAPGDFSLS VKFGNDVQHF

KVLRDGAGKY FLWVVKFNSL NELVDYHRST SVSRNQQIFL RDIEQ// 配列番号 :110;

ユビキチン:

MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNI

QKESTLHLVLRLRGG// 配列番号 :6;

トロンボスポンジン反復ドメイン:

QDGGWSHWSPWSSCSVTCGDGVITRIRLCNSPSPQMNGKPCEGEARETKACKKDACP//

配列番号 :7;

ロイシンリッチ反復ドメイン:

LHLSENLLYTFSLATLMPYTRLTQLNLDRCELTKLQVDGTLPVLGTLDLSHNQLQSLPLL

GQTLPALTVLDVSFNRLTSLPLGALRGLGELQELYLKGNELKTLPPGLLTPTPKLEKLSL

ANNNLTELPAGLLNGLENLDTLLLQENSLYTIPKGFFGSHLLPFA// 配列番号 :8; 及び

ビリンヘッドピースドメイン（以下の配列である、ＨＰ－３５サブドメイン（図１３；配列番号６１）又はＨＰ－７６サブドメイン）：

VFNANSNLSS GPLPIFPLEQ LVNKPVEELP EGVDPSRKEE HLSIEDFTQA

FGMTPAAFSA LPRWKQQNLK KEKGLF// 配列番号 :89; 又は

ＰＥＧ化を促進するための修飾された配列、例えば、VFNANSNLSS GPLPIFPLEQ

LVNKPVEELP EGVDPSRKEE HLSIEDFTQA FGMTPAAFSA LPRWKQQCLK KEKGLF//

配列番号 :90.

【００７６】

本明細書におけるドメインファミリー名の後ろの４桁コードは、ＲＣＳＢＰｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａｂａｎｋ（ｗｗｗ．ｒｃｓｂ．ｏｒｇ／ｐｄｂ／）に寄託された特定のタンパク質に対する座標データ群識別子である。例えば、ＰＤＺ（１Ｎ７Ｆ）は、ＧＲＩＰ１の第６ＰＤＺドメインを表し、ＰＤＺ（１ＵＥＺ）は、ヒトＫＩＡＡ１５２６タンパク質の第一ＰＤＺドメインを表し、ＰＤＺ（１ＷＦＶ）は、ヒト膜会合型グアニル酸キナーゼ反転－２の第５ＰＤＺドメインを表し、ＳＨ２（１ＡＢ２）は、Ｃ－ＡＢＬのＳＲＣ相同性２ドメインを表し、ＳＨ２（１ＪＹＱ）は、Ｇｒｂ２ＳＲＣ相同性２ドメインを表し、ＳＨ３（１ＰＨＴ）は、ホスファチジルイノシトール３－キナーゼＰ８５－αサブユニットＳＨ３ドメインを表し、ＳＨ３（１ＷＡ７）は、ヒトＬＹＮチロシンキナーゼのＳＨ３ドメインを表し、及びＳＨ３（１Ｘ２Ｋ）は、ヒト破骨細胞刺激因子１のＳＨ３ドメインを表す。

【００７７】

本発明の組成物は、組換え融合タンパク質の薬理学的に活性を有するタンパク質（「Ｐ」）部分を含む。「薬理学的に活性を有する」という用語は、そのように記述されている物質が、医学的パラメータ（例えば、血圧、血球数、コレステロールレベル、疼痛知覚）又は病態（例えば、癌、自己免疫疾患、慢性疼痛）に影響を及ぼす活性を有すると判定されることを意味する。逆に、「薬理学的に不活性な」という用語は、医学的パラメータ又は病状に影響を与える活性がその物質に対して測定できないことを意味する。従って、薬

理学的に活性を有するペプチド又はタンパク質は、以下に定義されている作動性又は模倣的ペプチド及び拮抗性ペプチドを含む。本発明は、約５から約８０アミノ酸残基の長さの範囲のアミノ酸配列を有し、組換え発現に適した薬理学的に活性を有するあらゆるタンパク質の使用を包含する。本発明の幾つかの有用な実施形態において、薬理学的に活性を有するタンパク質は、必要な生物活性が維持されている限り、アミノ酸付加若しくは挿入、アミノ酸欠失、ペプチド末端切断、アミノ酸置換又はアミノ酸残基の化学的誘導化（公知の化学的技術によって達成される。）など、目的の固有配列と比べて、１つ又はそれ以上の様式で修飾される。

【００７８】

「様ペプチド」、「ペプチド様」及び「アゴニストペプチド」という用語は、天然に存在する目的タンパク質（例えば（但し、これに限定されない。）、トキシンペプチド分子、例えば、天然に存在するＯＳＫ１トキシンペプチド）と同等の生物活性を有するペプチド又はタンパク質を表す。これらの用語には、天然に存在する分子の効果を強化することによるなど、天然に存在するペプチド分子の活性を間接的に模倣するペプチドがさらに含まれる。

【００７９】

「アンタゴニストペプチド」、「ペプチドアンタゴニスト」及び「阻害剤ペプチド」という用語は、目的の受容体の生物活性を遮断し、若しくは何らかの様式で妨害し、又は目的の受容体（イオンチャネル又はＧタンパク質共役型受容体（ＧＰＣＲ）など（但し、これらに限定されない。））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。

【００８０】

本発明において使用することができる薬理学的に活性なタンパク質の例には、トキシンペプチド（例えば、ＯＳＫ１又はＯＳＫ１ペプチド類縁体；ＳｈＫ又はＳｈＫペプチド類縁体）、ＣＧＲＰペプチドアンタゴニスト、ブラジキニンＢ１受容体ペプチドアンタゴニスト、副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）アゴニストペプチド、副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）アンタゴニストペプチド、ａｎｇ－２結合ペプチド、ミオスタチン結合ペプチド、エリスロポエチン様（ＥＰＯ様）ペプチド、トロンボポエチン様（ＴＰＯ様）ペプチド、神経成長因子（ＮＧＦ）結合ペプチド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）結合ペプチド及びグルカゴン様ペプチド（ＧＬＰ）－１若しくはそのペプチド模倣物又はＧＬＰ－２若しくはそのペプチド模倣物が含まれるが、これらに限定されない。

【００８１】

グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）及び関連するペプチドグルカゴンは、プログルカゴンの差異的プロセッシングを介して産生され、反対の生物活性を有する。プログルカゴン自体は、膵臓のα細胞中及び主として遠位小腸及び大腸中に位置する腸の内分泌Ｌ細胞中で産生される。膵臓中で、グルカゴンは、プログルカゴンから選択的に切断される。これに対して、腸内では、プログルカゴンは加工されて、ＧＬＰ－１及びグルカゴン様ペプチド２（ＧＬＰ－２）（それぞれ、プログルカゴンのアミノ酸残基７８から１０７及び１２６から１５８に対応する。）を形成する（例えば、Ｉｒｗｉｎ ａｎｄ Ｗｏｎｇ，１９９５，ＭｏＩ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．９：２６７－２７７及びＢｅｌｌ ｅｔ ａｉ，１９８３，Ｎａｔｕｒｅ ３０４：３６８－３７１を参照されたい。）。慣用的に、ＧＬＰ－１のアミノ酸の付番は、プログルカゴンの切断から形成されたＧＬＰ－１（１－３７）に基づく。生物学的に活性を有する形態は、このペプチドのさらなるプロセッシングから生成され、これは、１つ付番慣行において、ＧＬＰ－１（７－３７）－ＯＨ及びＧＬＰ－１（７－３６）－NH_2を与える。ＧＬＰ－１（７－３７）－ＯＨ（又は単に、ＧＬＰ－１（７－３７））及びＧＬＰ－１（７－３６）－NH_2の両者は、同一の活性を有する。便宜のため、「ＧＬＰ－１」という用語は、これらの両形態を表すために使用される。これらの加工されたペプチドの第一のアミノ酸は、この付番慣行において、Ｈｉｓ７である。しかしながら、本分野において認知されている別の付番慣行は、加工されたペプチドの付番が位置７ではなく位置１としてＨｉｓから始まると仮定する。従って、こ

の付番スキームにおいて、ＧＬＰ－１（１－３１）はＧＬＰ－１（７－３７）と同じであり、ＧＬＰ－１（１－３０）はＧＬＰ－１（７－３６）と同じである。ＧＬＰ－１様ポリペプチド配列の例には、以下のものが含まれる。

【００８２】

【化２】

HGEGTFTSDQSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG// (配列番号 :45);

HGEGTFTSDQSSYLEGQAAKEFIAWLQKGRG// (配列番号 :46);

HGEGTFTSDVSSYQEGQAAKEFIAWLVKGRG// (配列番号 :47);

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAQLVKGRG// (配列番号 :48);

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAQLQKGRG// (配列番号 :91);

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLQKGRG// (配列番号 :92);

HNETTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG// (配列番号 :93)

HGEGTFTSDVSSYLENQTAKEFIAWLVKGRG// (配列番号 :95);

HGEGTFTSDVSSYLEGNATKEFIAWLVKGRG// (配列番号 :96);

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVNGTG// (配列番号 :97);

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKNRT// (配列番号 :98);

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRNGT// (配列番号 :99);

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGGTGNGT// (配列番号 :100); 及び

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGGSGNGT// (配列番号 :101).

【００８３】

ヒトＧＬＰ－２及びＧＬＰ－２様類縁体も、本分野において公知である。（例えば、Ｐｒａｓａｄ ｅｔ ａｌ．，Ｇｌｕｃａｇｏｎｌｉｋｅ ｐｅｐｔｉｄｅ－２ ａｎａｌｏｇｕｅ ｅｎｈａｎｃｅｓ ｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ ｍｕｃｏｓａｌ ｍａｓｓ ａｆｔｅｒ ｉｓｃｈｅｍｉａ ａｎｄ ｒｅｐｅｒｆｕｓｉｏｎ，Ｊ．Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｓｕｒｇ．２０００ Ｆｅｂ；３５（２）：３５７－５９（２０００）；Ｙｕｓｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｇｌｕｃａｇｏｎ－ｌｉｋｅ ｐｅｐｔｉｄｅ－２ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｅｎｇａｇｅｓ ｂａｄ ａｎｄ ｇｌｙｃｏｇｅｎ ｓｙｎｔｈａｓｅ ｋｉｎａｓｅ－３ ｉｎ ａ ｐｒｏｔｅｉｎ ｋｉｎａｓｅ Ａ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｍａｎｎｅｒ ａｎｄ ｐｒｅｖｅｎｔｓ ａｐｏｐｔｏｓｉｓ ｆｏｌｌｏｗｉｎｇ ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ ｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｉｎｏｓｉｔｏｌ ３－ｋｉｎａｓｅ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７７（２８）：２４８９６－９０６（２００２）参照されたい。）。

【００８４】

「トキシンペプチド」には、毒から単離され得る天然に存在する薬理学的に活性なペプチド又はポリペプチドの同じアミノ酸配列を有するペプチド及びポリペプチドが含まれ、このような天然に存在する分子の修飾されたペプチド類縁体も含まれる。（例えば、Ｋａｌｍａｎ ｅｔ ａｌ．，ＳｈＫ－Ｄａｐ２２，ａ ｐｏｔｅｎｔ Ｋｖ１．３－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｉｍｍｕｎｏｓｕｐｐｒｅｓｓｉｖｅ ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７３（４９）：３２６９７－７０７（１９９８）；Ｋｅｍ ｅｔ ａｌ．，米国特許第６，０７７，６８０号；Ｍｏｕｈａｔ ｅｔ ａｌ．，ＯｓＫ１ ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ，ＷＯ２００６／００２８５０ Ａ２；Ｃｈａｎｄｙ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌｏｇｓ ｏｆ ＳＨＫ ｔｏｘｉｎ ａｎｄ ｔｈｅｉｒ ｕｓｅｓ ｉｎ ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ Ｋｖ １．３ ｐｏｔａｓｓｉｕｍ

channels，WO２００６／０４２１５１；Sullivan et al.，Toxin Peptide therapeutic agents，WO２００６／１１６１５６Ａ２（これらの全ての全体が、参照により、本明細書中に組み込まれる。）を参照されたい。）。ヘビ、サソリ、クモ、蜂、カタツムリ及びイソギンチャクは、イオンチャ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」の豊富な採取源としての役割を果たし得る毒を産生する生物の数例である。トキシンペプチドの一例は、オルトキラス・スクロビキュロサスのサソリ毒から単離されたトキシンペプチドであるＯＳＫ１（ＯｓＫ１としても知られる。）である（例えば、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，WO２００６／００２８５０Ａ２）。別の例は、イソギンチャク、スチコダクチラ・ヘリアンサス（Stichodactyla helianthus）の毒から単離されるＳｈＫである。（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）；Kem et al.，ShK toxin compositions and methods of use，米国特許第６，０７７，６８０号；Lebrun et al.，Neuropeptides originating in scorpion，米国特許第６，６８９，７４９号；Beeton et al.，Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.３ channnels for therapy of autoimmune diseases，Molec. Pharmacol. ６７（４）：１３６９－８１（２００５））。

【００８５】

トキシンペプチドは、通常、約２０と約８０アミノ酸長の間であり、２から５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、サソリ、イソギンチャク及びイモガイの毒から得られる）トキシンペプチドが単離され、イオンチャネルに対するそれらの影響に関して性質決定されてきた。このようなペプチドは、強度及び安定性の不可欠な事項に対処するために特に良好に適した比較的少数の構造的フレームワークから進化してきたようである。サソリ及びイモガイのトキシンペプチドの大半は、例えば、１０から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に対して耐性を有する極めてコンパクトで、強制された構造（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できる。これらの多くの溶液構造はＮＭＲ分光法によって測定され、コンパクトな構造を示し、それらのファミリーの折り畳みの保存が確認されている。（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 ＯＳＫｌ ｆｒｏｍ Ｏｒｔｈｏｃｈｉｒｕｓ ｓｃｒｏｂｉｃｕｌｏｓｕｓ ｓｃｏｒｐｉｏｎ ｖｅｎｏｍ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．３６（６）：１２２３－３２（１９９７）；ｄｅｌ Ｒｉｏ－Ｐｏｒｔｉｌｌｏ ｅｔ ａｌ．；ＮＭＲ ｓｏｌｕｔｉｏｎ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ Ｃｎ１２，ａ ｎｏｖｅｌ ｐｅｐｔｉｄｅ ｆｒｏｍ ｔｈｅ Ｍｅｘｉｃａｎ ｓｃｏｒｐｉｏｎ Ｃｅｎｔｒｕｒｏｉｄｅｓ ｎｏｘｉｕｓ ｗｉｔｈ ａ ｔｙｐｉｃａｌ ｂｅｔａ－ｔｏｘｉｎ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｂｕｔ ｗｉｔｈ ａｌｐｈａ－ｌｉｋｅ ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｉｃａｌ ａｃｔｉｖｉｔｙ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２７１（１２）：２５０４－１６（２００４）；Ｐｒｏｃｈｎｉｃｋａ－Ｃｈａｌｕｆｏｕｒ ｅｔ ａｌ．，Ｓｏｌｕｔｉｏｎ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ ｄｉｓｃｒｅｐｉｎ，ａ ｎｅｗ Ｋ＋－ｃｈａｎｎｅｌ ｂｌｏｃｋｉｎｇ ｐｅｐｔｉｄｅ ｆｒｏｍ ｔｈｅ ａｌｐｈａ－ＫＴｘｌ５ ｓｕｂｆａｍｉｌｙ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．４５（６）：１７９５－１８０４（２００６））。本発明の実施が有用であり得る薬理学的に活性を有するトキシンペプチドの例には、ＳｈＫ、ＯＳＫ１、カリブドトキシン（ＣｈＴｘ）、カリオトキシン１ＫＴＸ１）、又はマウロトキシン又は１つ若しくはそれ以上のアミノ酸残基において固有配列から修飾されたこれらの何れかのトキシンペプチド類縁体が含まれるが、これらに限定されない。他の例が本分野において公知であり、「Ｓｕｌｌｉｖａｎ ｅｔ ａｌ．，ＷＯ０６１１６１５６Ａ２又は米国特許出願１１／４０６，４５４号（題名：Ｔｏｘｉｎ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｇｅｎｔｓ、ＷＯ２００７／００７１７６４として公開；Ｍｏｕｈａｔ ｅｔ ａｌ．，ＯｓＫ１ ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ，ＷＯ２００６／００２８５０ Ａ２；Ｓｕｌｌｉｖａｎ ｅｔ ａｌ．，米国特許出願第Ｎｏ．１１／９７８，０７６号（題名：Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ Ｔｏｘｉｎ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｇｅｎｔｓ、２００７年１０月２５日出願）、Ｌｅｂｒｕｎ ｅｔ ａｌ．，米国特許第６，６８９，７４９号（これらの各々の全体が、参照により組み込まれる。）に見出すことができる。

【００８６】

「ペプチド類縁体」という用語は、少なくとも１つのアミノ酸残基の置換、少なくとも１つのアミノ酸の内部付加又は内部欠失及び／又はアミノ若しくはカルボキシ末端の末端切断若しくは付加）によって、天然に存在するペプチド配列と異なる配列を有するペプチドを表す。「内部欠失」とは、Ｎ末端又はＣ末端以外の位置における、天然に存在する配列からのアミノ酸の不存在を表す。同様に、「内部付加」とは、Ｎ末端又はＣ末端以外の位置における、天然に存在する配列中のアミノ酸の存在を表す。ＯＳＫ１ペプチド類縁体、ＳｈＫペプチド類縁体又はＣｈＴｘペプチド類縁体などの（但し、これらに限定されない。）「トキシンペプチド類縁体」は、対象とする固有のトキシンペプチド配列（ＯＳＫ１の場合には、ＧＶＩＩＮＶＫＣＫＩＳＲＱＣＬＥＰＣＫＫＡＧＭＲＦＧＫＣＭＮＧＫＣＨＣＴＰＫ／／配列番号１１１；ＳｈＫの場合には、ＲＳＣＩＤＴＩＰＫＳＲＣＴＡＦＱＣＫＨＳＭＫＹＲＬＳＦＣＲＫＴＣＧＴＣ／／配列番号１１２）と比べて、対象とする固有のトキシンペプチド配列の修飾（例えば、既に上述されているように、アミノ酸残基の置換、内部付加若しくは挿入、内部欠失及び／又はアミノ若しくはカルボキシ末端切断又は付加）を含有する。

【００８７】

「ＣＧＲＰペプチドアンタゴニスト」は、ＣＧＲＰペプチド類縁体などの（但し、これに限定されない。）$CGRP_1$受容体を優先的に結合し、温度、ｐＨ及びイオン強度の生理的条件下で、完全長の固有ヒトαＣＧＲＰ又はβＣＧＲＰによる$CGRP_1$受容体の活性化を拮抗し、遮断し、減少し、低下させ、妨害し、又は阻害するペプチドである。ＣＧＲＰペプチドアンタゴニストには、完全及び部分的アンタゴニストが含まれる。このよう

なアンタゴニスト活性は、公知のインビトロ法又はインビボ機能的アッセイ法によって検出することができる。（例えば、ｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ ｔｏ ｔｈｅ Ｎ－ｔｅｒｍｉｎｕｓ ｂｕｔ ｎｏｔ ｔｈｅ Ｃ－ｔｅｒｍｉｎｕｓ ｏｆ ｃａｌｃｉｔｏｎｉｎ ｇｅｎｅ－ｒｅｌａｔｅｄ ｐｅｐｔｉｄｅ（８－３７） ｐｒｏｄｕｃｅ ａｎｔａｇｏｎｉｓｔｓ ｗｉｔｈ ｉｎｃｒｅａｓｅｄ ａｆｆｉｎｉｔｙ，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，４６：２４２７－２４３５（２００３）参照）。有用なＣＧＲＰペプチドアンタゴニストの例は、Ｇｅｇｇ ｅｔ ａｌ．，ＣＧＲＰ ｐｅｐｔｉｄｅ ａｎｔａｇｏｎｉｓｔｓ ａｎｄ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ，ＷＯ２００７／０４８０２６Ａ２及び２００６年１０月１９日に出願され、ＵＳ２００８／００２０９７８Ａ１として公開された米国特許出願１１／５８４，１７７号（その全体が、参照により、本明細書に組み込まれる。）に開示されている。

【００８８】

「副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）アゴニスト」及び「ＰＨＴアゴニスト」という用語は、ＰＴＨ－１又はＰＴＨ－２受容体に結合し、完全長の固有のヒト副甲状腺ホルモンが行うように、１つ又はそれ以上のＰＴＨ活性アッセイのパラメータを増加又は減少させる分子を表す。有用なＰＴＨアゴニストペプチドの例は、「Ｍｏｄｕｌａｔｏｒｓ ｏｆ ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ ｆｏｒ ｐａｒａｔｈｙｒｏｉｄ ｈｏｒｍｏｎｅ ａｎｄ ｐａｒａｔｈｙｒｏｉｄ ｈｏｒｍｏｎｅ－ｒｅｌａｔｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎ」という題名の米国特許第６，７５６，４８０号（参照により、その全体が本明細書中に組み込まれる。）の表１に開示されている。ＰＴＨ活性アッセイの例は、米国特許第６，７５６，４８０号の実施例１に開示されている。

【００８９】

「副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）アンタゴニスト」という用語は、ＰＴＨ－１又はＰＴＨ－２受容体に結合し、完全長の固有のヒト副甲状腺ホルモンによってそのパラメータに対する正常な効果を遮断又は抑制する分子を表す。有用なＰＴＨアンタゴニストペプチドの例は、米国特許第６，７５６，４８０号（参照により、その全体が本明細書中に組み込まれる。）の表２に開示されている。ＰＴＨ活性アッセイの例は、米国特許第６，７５６，４８０の実施例２に開示されている。

【００９０】

「ブラジキニンＢ１受容体アンタゴニストペプチド」及び「ブラジキニンＢ１受容体ペプチドアンタゴニスト」という用語は、ヒトブラジキニンＢ１受容体（ｈＢ１）に関してアンタゴニスト活性を有するペプチドを意味する。有用なブラジキニンＢ１受容体アンタゴニストペプチドは、２００５年９月２９日に公開されたＮｇ他．，Ａｎｔａｇｏｎｉｓｔ ｏｆ ｔｈｅ ｂｒａｄｙｋｉｎｉｎ Ｂ１ ｒｅｃｅｐｔｏｒ、ＵＳ２００５／０２１５４７０Ａ１又は米国特許第５，８３４，４３１号又は同第５，８４９，８６３号に記載されているように同定又は誘導され得る。Ｂ１受容体活性アッセイの例は、ＵＳ２００５／０２１５４７０Ａ１の実施例６から８に開示されている。

【００９１】

「トロンボポエチン（ＴＰＯ）様ペプチド」及び「ＴＰＯ様ペプチド」という用語は、Ｃｗｉｒｌａ ｅｔ ａｌ．（１９９７），Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７６： １６９６－９、米国特許第５，８６９，４５１号及び同５，９３２，９４６号（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）、２００３年９月１８日に公開された米国特許出願第２００３／０１７６３５２号（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）、２００３年４月１７日に公開されたＷＯ０３／０３１５８９、２０００年５月４日に公開されたＷＯ００／２４７７０に記載されているように同定又は誘導され得るペプチド、及び米国特許出願公開ＵＳ２００６／０１４０９３４号（２００５年９月２３日に出願され、Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｆｃ Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓという題名の米国特許出願１１／２３４，７３１号（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。））の表５に登場するあらゆるペプチドを表す。当業者は、これらの参考文献の各々によって、異なるペプチドライブラリーを用いて、開示された手順に従って、その中で実際に開示されたものとは異なるペプチ

ドを選択することができることを理解されたい。

【００９２】

「ＥＰＯ様ペプチド」及び「エリスロポエチン様ペプチド」という用語は、「Ｗｒｉｇｈｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９６），Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７３：４５８－６３」及び「Ｎａｒａｎｄａ ｅｔ ａｌ．（１９９９），Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９６：７５６９－７４」（何れも、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に記載されているように同定又は誘導され得るペプチドを表す。有用なＥＰＯ様ペプチドには、米国特許出願公開ＵＳ２００７／０２６９３６９Ａ１及び米国特許第６，６６０，８４３号（何れも、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）の表５に列記されているＥＰＯ様ペプチドが含まれる。

【００９３】

「ａｎｇ－２結合ペプチド」という用語は、２００３年１２月１１日に公開された米国特許出願第２００３／０２２９０２３号、２００３年７月１７日に公開されたＷＯ０３／０５７１３４、２００３年１２月２５日に公開されたＵＳ ２００３／０２３６１９３（これらの各々の全体が、参照により、本明細書に組み込まれる。）に記載されているように特定又は誘導することができるペプチド、及び米国特許出願公開ＵＳ２００６／０１４０９３４号（Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｆｃ Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓという表題で、２００５年９月２３日に出願された米国特許出願１１／２３４，７３１号（参照により、その全体が本明細書中に組み込まれる。））の表６中に登場する全てのペプチドを含む。当業者は、これらの参考文献の各々によって、異なるペプチドライブラリーを用いて、開示された手順に従うことにより、その中で実際に開示されているものとは異なるペプチドを選択することができることを理解されたい。

【００９４】

「神経成長因子（ＮＧＦ）結合ペプチド」及び「ＮＧＦ結合ペプチド」という用語は、２００４年４月１日に公開されたＷＯ０４／０２６３２９に記載されているように同定又は誘導することができるペプチド、及び米国特許出願公開ＵＳ２００６／０１４０９３４（Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｆｃ Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓという表題で、２００５年９月２３日に出願された（米国特許出願１１／２３４，７３１（参照により、その全体が本明細書中に組み込まれる。））の表７に登場する全てのペプチドを含む。当業者は、この参考文献によって、異なるペプチドライブラリーを用いて、開示された手順に従うことにより、その中に実際に開示されているものとは異なるペプチドを選択することができることを理解されたい。

【００９５】

「ミオスタチン結合ペプチド」という用語は、２００３年１２月１９日に出願された米国特許出願第１０／７４２，３７９号（参照により、その全体が本明細書中に組み込まれる。）に記載されているように同定又は誘導することができるペプチド及び米国特許出願公開ＵＳ２００６／０１４０９３４（Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｆｃ Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓという表題で、２００５年９月２３日に出願された米国特許出願１１／２３４，７３１（参照により、その全体が本明細書中に組み込まれる。））の表８に登場するペプチドを含む。当業者は、これらの参考文献の各々によって、異なるペプチドライブラリーを用いて、開示された手順に従うことにより、その中で実際に開示されているものとは異なるペプチドを選択することができることを理解されたい。

【００９６】

「ＢＡＦＦアンタゴニストペプチド」及び「ＢＡＦＦ結合ペプチド」という用語は、米国特許出願公開第２００３／０１９５１５６Ａ１号（参照により、その全体が本明細書中に組み込まれる。）に記載されているように同定又は誘導され得るペプチド及び米国特許出願公開ＵＳ２００６／０１４０９３４（Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｆｃ Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓという表題で、２００５年９月２３日に出願された米国特許出願１１／２３４，７３１号（参照により、その全体が本明細書中に組み込まれる。））の表９に登場するペプチドを含む。当業者は、前述の参考文献によって、異なるペプチドライブラリーを用いて、開示

された手順に従うことにより、その中で実際に開示されているものとは異なるペプチドを選択することができることを理解されたい。

【００９７】

選択された薬理学的に不活性な小タンパク質ドメイン（Ｄ）の小さいサイズは、通例、融合タンパク質分子に対して、短い血清半減期をもたらし、これにより、融合タンパク質へ様々な質量及び立体構造の１つ又はそれ以上の半減期延長部分を共有的に付着又は連結させることによって治療的な必要性を満たすために、分子の薬物速度論的特性を調節することが場合によって可能となる。「半減期延長部分」（又は「Ｆ」）は、融合タンパク質の非連結形態と比べて、タンパク分解若しくは他の活性減弱性化学的修飾によるインビボでの分解を抑制若しくは軽減し、吸収の速度を増加させるなど（但し、これに限定されない。）、インビボでの半減期若しくは他の薬物速度論的特性を増加させ、毒性を低減し、免疫原性を低減し、溶解性を改善し、生物学的活性及び／若しくは目的の標的に関する融合タンパク質の標的選択性を増加させ、又は製造可能性を増加させる分子を表す。本発明において、半減期延長部分は、医薬として許容されるものである。半減期延長部分は、連結された融合タンパク質（すなわち、半減期延長部分が共有的に付着された融合タンパク質）がインビボでの腎臓ろ過によるクリアランスを低下させるのに十分な水力学的サイズを達成するように選択しなければならない。例えば、実質的に直鎖、分岐鎖又は樹状形態である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できる。あるいは、インビボにおいて、本発明の組成物が血漿タンパク質に結合して複合体を形成し、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し、又は低減するように、半減期延長部分を選択することができる。

【００９８】

本発明において、使用可能な半減期延長部分の例には、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）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又は中性のポリマーが含まれるが、これらに限定されない。デキストラン、コロミン酸又は炭水化物をベースとする他のポリマー、アミノ酸のポリマー及びビオチン誘導体。

【００９９】

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／無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸（例えば、ポリリジン又はポリオルニチン）、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ポリマー、プロピレンオキシドポリマー、エチレンオキシドポリマー、ポリオキシエチル化されたポリオール、ポリビニルアルコール、直鎖又は分岐のグリコシル化された鎖、ポリアセタール、長鎖脂肪酸、長鎖疎水性脂肪族基が含まれる。

【０１００】

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、長い半減期の血漿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（すなわち、有機非ペプチド性）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、サイロキシン結合グロブリン結合ペプチド若しくは小分子リガンド、抗体結合ペプチド若しくは小分子リガンド又は長い半減期の血漿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，米国特許公開ＵＳ ２００３／００６９３９５ Ａ１；Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，

Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ ａｃｔｉｖｅ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ，米国特許第６，３４２，２２５号を参照されたい。）。「長い半減期の血漿タンパク質」とは、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他の血液凝固因子、補体成分、イムノグロブリン、酵素阻害剤、アンギオテンシン及びブラジキニ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の、哺乳動物の血漿中に溶解された様々な数百のタンパク質の１つである。

【０１０１】

本発明は、融合タンパク質と連結された医薬として許容される半減期延長部分（本明細書に記載されているものなど（但し、これらに限定されない。））のあらゆる単一種の使用又は２つ若しくはそれ以上の類似の若しくは異なる半減期延長部分の組み合わせの使用を包含する。

【０１０２】

連結されている際には、本明細書に記載されている半減期延長部分は、融合タンパク質自体のアミノ酸残基へ直接共有結合されており、又は、場合によって、融合タンパク質のアミノ酸残基に共有結合されたペプチド性若しくは非ペプチド性リンカー（芳香族又はアリールリンカーを含むが、これらに限定されない。）へ共有結合されている。あらゆる「リンカー」基は、必須でない。存在するときには、本発明の組成物の幾つかの実施形態の薬理学的活性を最適化する上で有用であり得るスペーサーとして主に働くので、その化学構造は重要ではない。リンカーは、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸で構成されることが好ましい。リンカー部分が存在する場合、リンカー部分は、本発明の組成物中に存在し得る他の何れかの１つ又は複数のリンカーとは、独立に同一又は別異であり得る。

【０１０３】

上述のように、リンカーが存在する場合（組換え融合タンパク質の一次アミノ酸配列内であるか、又は融合タンパク質へ半減期延長部分を付着させるためのリンカーとしてであるかを問わない。）、リンカーはペプチド性であり得（すなわち、ペプチド結合によって一緒に連結されたアミノ酸から構成される。）、好ましくは１から最大約４０個のアミノ酸残基、より好ましくは１から最大約２０個のアミノ酸残基、最も好ましくは、１から約１０個のアミノ酸残基の長さで構成され得る。好ましくは（但し、必須ではない。）、リンカー中のアミノ酸残基は２０の標準アミノ酸残基に属し、より好ましくは、システイン、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／又はセリンである。さらにより好ましくは、ペプチド性リンカーは、グリシン、セリン及びアラニンなど、ペプチド結合によって結合された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。存在する場合、インビボにおいて、循環中の急速なタンパク分解による代謝回転を回避するペプチド性リンカーが選択されることも望ましい。当業者によってよく理解されているように、これらのアミノ酸の幾つかは、グリコシル化され得る。例えば、シアル化部位を構成する有用なリンカー配列は、$X_1X_2NX_4X_5G$（配列番号９）（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。

【０１０４】

他の実施形態において、１から４０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。好ましくは、リンカーは、グリシン及びアラニンなど、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、ポリセリン及びポリアラニン又はこれらの何れかの組み合わせが含まれる。幾つかの典型的なペプチド性リンカーは、ポリ$(Gly)_{1-8}$、特に、$(Gly)_3$、$(Gly)_4$（配列番号１０）、$(Gly)_5$（配列番号１１）及び$(Gly)_7$（配列番号１２）並びにポリ$(Gly)_4Ser$（配列番号２１）、ポリ$(Gly-Ala)_{2-4}$及びポリ$(Ala)_{1-8}$である。ペプチド性リンカーの他の具体例には、$(Gly)_5LyS$（配列番号１４）及び$(Gly)_5LysArg$（配列番号１５）が含まれる。リンカーの他の具体例は、以下のとおりである。有用なペプチド性リンカーの他の例は、以下のとおりである。

【０１０５】

（Ｇｌｙ）$_3$Ｌｙｓ（Ｇｌｙ）$_4$（配列番号１６）；
（Ｇｌｙ）$_3$ＡｓｎＧｌｙＳｅｒ（Ｇｌｙ）$_2$（配列番号１７）；
（Ｇｌｙ）$_3$Ｃｙｓ（Ｇｌｙ）$_4$（配列番号１８）；及び
ＧｌｙＰｒｏＡｓｎＧｌｙＧｌｙ（配列番号１９）。

【０１０６】

上記命名法を説明すると、例えば、（Ｇｌｙ）$_3$Ｌｙｓ（Ｇｌｙ）$_4$はＧｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ（配列番号２０）を意味する。ＧｌｙとＡｌａの他の組み合わせも有用である。

【０１０７】

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２１）、「Ｌ１０」（ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ；配列番号２２）、「Ｌ２５」（ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ；配列番号２３）として特定されるリンカー及び本明細書中の以下の実施例において使用されているあらゆるリンカーである。

【０１０８】

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。

【０１０９】

ＧＧＥＧＧＧ（配列番号２４）；
ＧＧＥＥＥＧＧＧ（配列番号２５）；
ＧＥＥＥＧ（配列番号２６）；
ＧＥＥＥ（配列番号２７）；
ＧＧＤＧＧＧ（配列番号２８）；
ＧＧＤＤＤＧＧ（配列番号２９）；
ＧＤＤＤＧ（配列番号３０）；
ＧＤＤＤ（配列番号３１）；
ＧＧＧＧＳＤＤＳＤＥＧＳＤＧＥＤＧＧＧＧＳ（配列番号３２）；
ＷＥＷＥＷ（配列番号３３）；
ＦＥＦＥＦ（配列番号３４）；
ＥＥＥＷＷＷ（配列番号３５）；
ＥＥＥＦＦＦ（配列番号３６）；
ＷＷＥＥＥＷＷ（配列番号３７）；又は
ＦＦＥＥＥＦＦ（配列番号３８）。

【０１１０】

他の実施形態において、リンカーは、リン酸化部位（例えば、$X_1X_2YX_4X_5G$（配列番号３９）（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。）；$X_1X_2SX_4X_5G$（配列番号４０）（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。）；又は$X_1X_2TX_4X_5G$（配列番号４１）（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。）を構成する。

【０１１１】

ここに示されているリンカーは、例示であり、本発明の範囲に属するペプチド性リンカーは、これらよりはるかに長くすることができ、他の残基を含むことができる。ペプチド性リンカーは、例えば、システイン、他のチオール又は半減期延長部分を連結するための求核性試薬を含有し得る。別の実施形態において、リンカーは、システイン若しくはホモシステイン残基、又はマレイミドへ連結するための他の２－アミノ－エタンチオール若しくは３－アミノ－プロパンチオール部分、ヨードアセトアミド又はチオエステル、官能化された半減期延長部分を含有する。

【０１１２】

別の有用なペプチド性リンカーは、概ね１ｋＤａのＰＥＧ分子のサイズであると推定される、無作為なＧｌｙ／Ｓｅｒ／Ｔｈｒ配列、例えば、ＧＳＧＳＡＴＧＧＳＧＳＴＡＳＳ

ＧＳＧＳＡＴＨ（配列番号４２）又はＨＧＳＧＳＡＴＧＧＳＧＳＴＡＳＳＧＳＧＳＡＴ（配列番号４３）を含む、巨大で柔軟なリンカーである。あるいは、有用なペプチド性リンカーは、剛直なヘリックス構造を形成することが本分野において知られているアミノ酸配列から構成され得る（例えば、剛直なリンカー：－ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＧ－Ｘ配列番号４４）。さらに、ペプチド性リンカーは、式－CH_2－CH_2－CH_2－CH_2－CH_2－CH_2－の６炭素の脂肪族分子のような非ペプチド性セグメントも含み得る。ペプチド性リンカーは、本明細書中に記載されているような誘導体を形成するために変化させることができる。

【０１１３】

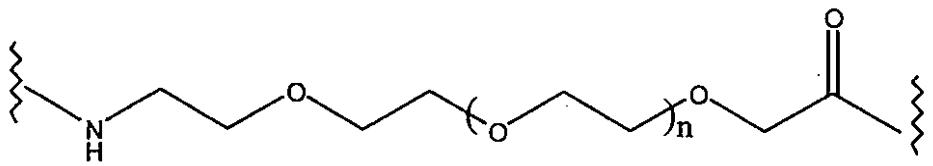
場合によっては、半減期延長部分に連結された融合タンパク質のペプチド部分へ半減期延長部分を連結させるために、非ペプチド性リンカーも有用である。例えば、－ＮＨ－（CH_2）$_s$－Ｃ（Ｏ）－（ｓ＝２から２０）などのアルキルリンカーを使用することができる。

これらのアルキルリンカーは、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非妨害性のあらゆる基によってさらに置換され得る。非ペプチド性リンカーの例は、ＰＥＧリンカーである（例えば、以下に図示されている。）。

【０１１４】

【化３】

(II)



【０１１５】

（ｎは、リンカーが約１００から約５０００キロダルトン（ｋＤａ）、好ましくは約１００から約５００ｋＤａの分子量を有するようなものである。）

【０１１６】

一実施形態において、非ペプチド性リンカーはアリールである。リンカーは、本明細書に記載されているのと同じ様式で誘導体を形成するように変化を受け得る。さらに、ＰＥＧ部分は、ＰＥＧアルデヒドを用いた還元的アルキル化又はヒドロキシスクシンイミド又はＰＥＧのカルボナートエステルを用いたアシル化又はチオール連結によって、Ｎ末端アミン又は選択された側鎖アミンへ付着させ得る。

【０１１７】

「アリール」は、フェニルであり、又は飽和、部分飽和又は不飽和の３員、４員若しくは５員の炭素架橋と隣接して縮合されたフェニルであり、フェニル又は架橋は、C_{1-8}アルキル、C_{1-4}ハロアルキル又はハロから選択される０、１、２又は３個の置換基によって置換されている。

【０１１８】

「ヘテロアリール」は、５員、６員若しくは７員の単環式又は部分飽和若しくは不飽和の６員、７員、８員、９員、１０員又は１１員の二環式環であり、少なくとも１つの環は不飽和であり、単環式及び二環式の環は、Ｎ、Ｏ及びＳから選択される１、２、３又は４個の原子を含有し、環は、C_{1-8}アルキル、C_{1-4}ハロアルキル及びハロから選択される０、１、２又は３個の置換基によって置換されている。

【０１１９】

本発明の組成物の非ペプチド部分（非ペプチド性リンカー又は非ペプチド性半減期延長部分など）は、旧来の有機化学反応によって合成することができる。

【０１２０】

上記は単なる例示であり、本発明に従って場合によって使用することが可能なリンカーの種類の網羅的な処置ではない。

【０１２１】

本発明の半減期延長部分が連結された融合タンパク質を含む本発明の組成物及び／又は組成物を作製する方法の別の有用な実施形態において、融合タンパク質は、ペプチドのアミノ末端のアミノ酸残基において半減期延長部分へ連結される。（例えば、Ｋｉｎｓｔｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎ－ｔｅｒｍｉｎａｌｌｙ ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎ ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ａｎｄ ｍｅｔｈｏｄｓ，米国特許第５，９８５，２６５号及び米国特許第５，８２４，７８４号を参照されたい。）。

【０１２２】

融合タンパク質への連結のために使用される半減期延長部分Ｆ^{1}は、半減期延長部分を連結することができるアミノ酸残基の数について、多価（例えば、二価、三価、四価又はより高次の価数）であり得るので、式Ｉ（Ｆ^{1}）$_{a}$－（Ｘ^{2}）$_{b}$の「多量体」を作製可能であることが理解される。幾つかの実施形態において、本発明の組成物のペプチド部分は、多価（例えば、二価、三価、四価又はより高次の価数）であり得、従って、本発明の組成物の幾つかの「多量体」は２以上のＦ^{1}を有し得る。その結果、組成物を作製する本発明の方法によって、様々な連結された半減期延長部分：ペプチド構造を作製することが可能である。例として、一価の半減期延長部分及び一価のペプチドは１：１連結物を作製し、二価のペプチドと一価の半減期延長部分は、ペプチド連結物が２つの半減期延長部分を有する連結物を形成し得るのに対して、二価の半減期延長部分と一価のペプチドは、２つのペプチド団が単一の半減期延長部分に連結されている種を生成し得る。より高次の価数を有する半減期延長部分の使用は、単一の半減期延長部分に結合されたペプチド団のクラスターの形成をもたらすことができるのに対して、より高次の価数を有するペプチドは、複数の半減期延長部分部分とともにクラスターを形成した状態となり得る。さらなる例として、融合タンパク質への高価の半減期延長部分の連結部位がシステイン又は他のアミノチオールである場合には、Ｄ’Ａｍｉｃｌ他によって開示された方法を使用し得る（米国特許出願第６０／６４６，６８５号、Ｍｅｔｈｏｄ ｏｆ ｃｏｎｊｕｇａｔｉｎｇ ａｍｉｎｏｔｈｉｏｌ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ｔｏ ｗａｔｅｒ－ｓｏｌｕｂｌｅ ｐｏｌｙｍｅｒｓ（この出願の全体が、参照により、本明細書中に組み込まれる。））。

【０１２３】

ペプチド部分は、活性化された半減期延長部分と反応する２以上の反応性の基を有し得、複雑な構造を形成する可能性を常に検討しなければならない。半減期延長部分とペプチドの１：１付加物などの単純な構造を形成することが望まれる場合、又はペプチド：半減期延長部分：ペプチド付加物を形成するために、二価の半減期延長部分を使用することが望まれる場合には、記載されている産物の一定割合を形成するために、活性化された半減期延長部分とペプチド材料の所定の比率、これらの所定の濃度を使用し、（期間、温度、ｐＨなどの）所定の条件下で反応を実施し、次いで、他の反応産物から記載されている産物を分離することが有益である。反応条件、試薬の割合及び濃度は、必要に応じて適切な大規模化を伴って、当業者の能力に属する比較的単純な試行錯誤の実験によって得ることができる。産物の精製及び分離は、当業者に周知の慣用技術によって同様に達成される。

【０１２４】

さらに、半減期延長部分が連結された又は連結されていない本発明の融合タンパク質の生理的に許容される塩も、本発明に包含される。「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知られている、又は後に発見される全ての塩を意味する。幾つかの具体例は、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、塩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、パモン酸塩、タンニン酸塩、没食子酸エステル、コレステロール硫酸塩およびシュウ酸塩である。

【０１２５】

例示として、本発明の組成物及び／又は組成物を作製する方法の幾つかの実施形態において、半減期延長部分はポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）である。タンパク質のポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）との共有連結は、治療用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知されてきた。ＰＥＧ部分は多大な水力学的半径をタンパク質に付加するので、ＰＥＧ化は、主として腎臓クリアランスを遅らせることによってこの効果を達成する。（Ｚａｌｉｐｓｋｙ，Ｓ．，ｅｔ ａｌ．，Ｕｓｅ ｏｆ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌｉｚｅｄ ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ｓ ｆｏｒ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅｓ．，ｉｎ ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ） ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｃａｌ ａｎｄ ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ．，Ｊ．Ｍ．Ｈａｒｒｉｓ，Ｅｄ．，Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ：Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ．，３４７－３７０（１９９２））。タンパク質のＰＥＧ化によって与えられるさらなる利点には、増加した溶解度、タンパク分解への抵抗性及び治療用ポリペプチドの低下した免疫原性がしばしば含まれる。タンパク質のＰＥＧ化の長所は、ＰＥＧ－アデノシンデアミナーゼ（Ａｄａｇｅｎ™／ＥｎｚｏｎＣｏｒｐ．）、ＰＥＧ－Ｌ－アスパラギナーゼ（Ｏｎｃａｓｐａｒ™／ＥｎｚｏｎＣｏｒｐ．）、ＰＥＧ－インターフェロンα－２ｂ（ＰＥＧ－Ｉｎｔｒｏｎ™／Ｓｈｅｒｉｎｇ／Ｅｎｚｏｎ）、ＰＥＧ－インターフェロンα－２ａ（ＰＥＧＡＳＹＳ™／Ｒｏｃｈｅ）及びＰＥＧ－Ｇ－ＣＳＦ（Ｎｅｕｌａｓｔａ™／Ａｍｇｅｎ）並びに臨床試験中の他の多くのものなど、幾つかのＰＥＧ化されたタンパク質の商業化によって裏付けられている。

【０１２６】

「ＰＥＧ化されたペプチド」又は「ＰＥＧ化されたタンパク質」とは、ペプチド自体のアミノ酸残基に又はペプチドの残基に共有結合されたペプチド性若しくは非ペプチド性リンカー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を意味する。

【０１２７】

「ポリエチレングリコール」又は「ＰＥＧ」とは、カップリング剤なしで若しくはカップリング剤ありで、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、アジルジン、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）誘導化を有する又は有さない、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。本発明において、有用なＰＥＧには、実質的に線形の、直鎖ＰＥＧ、分岐したＰＥＧ又は樹状ＰＥＧが含まれる。（例えば、Ｍｅｒｒｉｌｌ，米国特許第５，１７１，２６４号；Ｈａｒｒｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｍｕｌｔｉａｒｍｅｄ，ｍｏｎｏｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ，ｐｏｌｙｍｅｒ ｆｏｒ ｃｏｕｐｌｉｎｇ ｔｏ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ａｎｄ ｓｕｒｆａｃｅｓ，米国特許第５，９３２，４６２号；Ｓｈｅｎ，Ｎ－ｍａｌｅｉｍｉｄｙｌ ｐｏｌｙｍｅｒ ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ，米国特許第６，６０２，４９８号を参照されたい。）。

【０１２８】

ＰＥＧは、市販されている周知の水溶性ポリマーであり、又は本分野において周知の方法に従って、エチレングリコールの開環重合によって調製することができる（Ｓａｎｄｌｅｒ ａｎｄ Ｋａｒｏ，Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｖｏｌ． ３，ｐａｇｅｓ １３８－１６１）。本願において、「ＰＥＧ」という用語は、サイズ又はＰＥＧの末端における修飾に関わらず、一、二又は多官能性の形態で、あらゆるポリエチレングリコール分子を包含するように広く使用され、以下の式によって表すことができる。

【０１２９】

$X-O(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2OH$ （ＩＩＩ）
（ｎは２０から２３００であり、及びＸはＨ又は末端の修飾、例えば、C_{1-4}アルキルである。）
【０１３０】
幾つかの有用な実施形態において、本発明において使用されるＰＥＧは、一方の末端において、ヒドロキシ又はメトキシで終わる（すなわち、ＸはＨ又はCH_3である（「メトキシＰＥＧ」））。）。ＰＥＧの他方末端（式（ＩＩ）において、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、活性化部分に共有的に付着していることが注目される。化学的構造中で使用される場合、「ＰＥＧ」という用語は、図示されている水酸基の水素を持たず、エーテル結合を形成するために、リンカーの遊離の炭素原子と反応するように酸素を利用可能な状態に保った上記式（ＩＩ）を含む。より具体的には、ペプチドへＰＥＧを連結するために、ペプチドは、「活性化された」形態のＰＥＧと反応させなければならない。活性化されたＰＥＧは、以下の式によって表すことができる。
【０１３１】
（ＰＥＧ）－（Ａ） （ＩＶ）
（ＰＥＧ（上で定義されている。）は、活性化部分（Ａ）の炭素原子へ共有的に付着して、エーテル結合、アミン結合又はアミド結合を形成し、（Ａ）は、ペプチドに共有付着されたペプチド又はリンカー部分のアミノ酸残基上にアミノ、イミノ又はチオール基と反応することができる反応性基を含有する。）
【０１３２】
活性化されたＰＥＧを調製する技術及び生物活性ペプチドへの活性化されたＰＥＧを連結する技術は、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 ０５７５５４５Ｂ１；Ｐｅｔｉｔ，Ｓｉｔｅ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｐｒｏｔｅｉｎ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ，米国特許第６，４５１，９８６号及び米国特許第６，５４８，６４４号；Ｓ．Ｈｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ｗｉｔｈ ｒｅａｃｔｉｖｅ ｅｎｄｇｒｏｕｐｓ：Ｉ．Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｊ．Ｂｉｏａｃｔｉｖｅ Ｃｏｍｐａｔｉｂｌｅ Ｐｏｌｙｍｅｒｓ，１０：１４５－１８７（１９９５）；Ｙ．Ｌｕ ｅｔ ａｌ．，Ｐｅｇｙｌａｔｅｄ ｐｅｐｔｉｄｅｓ ＩＩＩ：Ｓｏｌｉｄ－ｐｈａｓｅ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｗｉｔｈ ＰＥＧｙｌａｔｉｎｇ ｒｅａｇｅｎｔｓ ｏｆ ｖａｒｙｉｎｇ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｗｅｉｇｈｔ：ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｍｕｌｔｉｐｌｙ ＰＥＧｙｌａｔｅｄ ｐｅｐｔｉｄｅｓ，Ｒｅａｃｔｉｖｅ Ｐｏｌｙｍｅｒｓ，２２：２２１－２２９（１９９４）；Ａ．Ｍ．Ｆｅｌｉｘ ｅｔ ａｌ．，ＰＥＧｙｌａｔｅｄ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ ＩＶ：Ｅｎｈａｎｃｅｄ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ａｃｔｉｖｉｔｙ ｏｆ ｓｉｔｅ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ ＰＥＧｙｌａｔｅｄ ＧＲＦ ａｎａｌｏｇｓ，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｒｅｓ．，４６：２５３－２６４（１９９５）；Ａ．Ｍ．Ｆｅｌｉｘ，Ｓｉｔｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ｙｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｅｐｔｉｄｅｓ，ＡＣＳ Ｓｙｍｐｏｓｉｕｍ Ｓｅｒｉｅｓ ６８０（ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ））：２１８－２３８（１９９７）；Ｙ．Ｉｋｅｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ，ｔｈｅｉｒ ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｐｅｐｔｉｄｅｓ，ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｐｒｏｄｕｃｉｎｇ ｔｈｅｍ ａｎｄ ｕｓｅ ｏｆ ｔｈｅ ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｐｅｐｔｉｄｅｓ，ＥＰ ０４７３０８４Ｂ１；Ｇ．Ｅ．Ｍｅａｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｌｅｃｔｅｄ ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｓｉｄｅ ｃｈａｉｎｓ，ｉｎ：Ｃｈｅｍｉｃａｌ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｈｏｌｄｅｎ Ｄａｙ，Ｉｎｃ．，２１９（１９７１）を参照されたい。）。

【０１３３】
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することができ、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。
【０１３４】
本発明において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ＰＥＧ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨＯによって表される。（例えば、米国特許第５，２５２，７１４号参照）。ＰＥＧアルデヒド水和物、例えば、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（後者は、二官能性に活性化された構造を与える。）も、「ＰＥＧアルデヒド化合物」の意義に含まれる。（例えば、Ｂｅｎｔｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ） ａｌｄｅｈｙｄｅ ｈｙｄｒａｔｅｓ ａｎｄ ｒｅｌａｔｅｄ ｐｏｌｙｍｅｒｓ ａｎｄ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｍｏｄｉｆｙｉｎｇ ａｍｉｎｅｓ，米国特許第５，９９０，２３７号を参照されたい。）（例えば、Ｂｅｎｔｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ） ａｌｄｅｈｙｄｅ ｈｙｄｒａｔｅｓ ａｎｄ ｒｅｌａｔｅｄ ｐｏｌｙｍｅｒｓ ａｎｄ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｍｏｄｉｆｙｉｎｇ ａｍｉｎｅｓ，米国特許第５，９９０，２３７号を参照されたい。）。活性化された多分岐ＰＥＧ－アルデヒド化合物を使用することができる（二価、三価、四価、八価構築物を与えるために複数のアームを含むＰＥＧ誘導体）。４アームＰＥＧ誘導体を用いて、各ＰＥＧ分子に４つの融合タンパク質が付着される。例えば、本発明において、組換え融合タンパク質は、ＰＥＧの１、２、３又は４つのアミノ官能化された部位において、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）に連結され得る。
【０１３５】
本発明の方法に従って連結される際には、本明細書中に記載されているようなポリエチレングリコール（ＰＥＧ）は、融合タンパク質自体のアミノ酸残基の少なくとも１つの溶媒に露出された遊離のアミン部分へ直接的に、還元的アミノ化によって共有結合される。本発明の方法の幾つかの実施形態において、融合タンパク質は、組換え融合タンパク質上の１つ若しくはそれ以上の一級若しくは二級アミンにおいてＰＥＧに連結され、又は融合タンパク質上の単一の一級アミン部位において２つのＰＥＧ基に連結される（例えば、これは、還元的アミノ化反応が過剰のＰＥＧ－アルデヒド化合物の存在を伴う場合に起こり得る。）。本発明者らは、還元的アミノ化によるＰＥＧ化がペプチド上の一級アミンに位置する場合に、分子当り２つ又はそれ以上のＰＥＧが存在する反応産物の量（１から１００％の範囲）を有することが珍しくなく、所望のＰＥＧ化産物が分子当り唯一つのＰＥＧを有するものである場合に、この「過剰なＰＥＧ化」が望ましくない場合があり得ることを観察した。ＰＥＧ化産物分子当り単一のＰＥＧを有するＰＥＧ化産物が所望される場合、還元的アミノ化反応において分子当り唯一つのＰＥＧ基が転移されるので、薬理学的に活性なペプチドの二級アミンを用いたＰＥＧ化を伴う本発明の方法の一実施形態を使用することができる。
【０１３６】
一級アミン部分を与えることができるアミノ酸残基には、リジン、ホモリジン、オルニチン、α，β－ジアミノプロピオン酸（Ｄａｐ）、α，β－ジアミノプロピオン酸（Ｄｐｒ）及びα，γ－ジアミノ酪酸（Ｄａｂ）、アミノ酪酸（Ａｂｕ）及びα－アミノ－イソ酪酸（Ａｉｂ）の残基が含まれる。ポリペプチドＮ末端は、ＰＥＧ化のために有用なα－アミノ基も与える。二級アミノ部分を与えることができるアミノ酸残基には、ε－Ｎ－アルキルリジン、α－Ｎ－アルキルリジン、δ－Ｎ－アルキルオルニチン、α－Ｎ－アルキルオルニチン又はＮ末端のプロリン（アルキルは、Ｃ$_1$からＣ$_6$である。）が含まれる。
【０１３７】

本発明のＰＥＧ化された組換え融合タンパク質を作製するための別の有用な活性化されたＰＥＧは、マレイミドモノメトキシＰＥＧなどのメトキシＰＥＧ－マレイミドなどの（但し、これらに限定されない。）ＰＥＧ－マレイミド化合物であり、本発明のＰＥＧ連結されたペプチドを作製するのに特に有用である。（例えば、Ｓｈｅｎ，Ｎ－ｍａｌｅｉｍｉｄｙｌ ｐｏｌｙｍｅｒ ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ，米国特許第６，６０２，４９８号；Ｃ．Ｄｅｌｇａｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ ｕｓｅｓ ａｎｄ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｆ ＰＥＧ－ｌｉｎｋｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎｓ．，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒａｐ．Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ，９：２４９－３０４（１９９２）；Ｓ．Ｚａｌｉｐｓｋｙ ｅｔ ａｌ．，Ｕｓｅ ｏｆ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌｉｚｅｄ ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ｓ ｆｏｒ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅｓ，ｉｎ：Ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｃａｌ ａｎｄ ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ（Ｊ．Ｍ．Ｈａｒｒｉｓ，Ｅｄｉｔｏｒ，Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ：Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，３４７－３７０（１９９２）；Ｓ．Ｈｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ｗｉｔｈ ｒｅａｃｔｉｖｅ ｅｎｄｇｒｏｕｐｓ：Ｉ．Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｊ．Ｂｉｏａｃｔｉｖｅ Ｃｏｍｐａｔｉｂｌｅ Ｐｏｌｙｍｅｒｓ，１０：１４５－１８７（１９９５）；Ｐ．Ｊ．Ｓｈａｄｌｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｏｌｙｍｅｒ ｔｏ ｃｏｌｏｎｙ ｓｔｉｍｕｌａｔｉｎｇ ｆａｃｔｏｒ－１，米国特許第４，８４７，３２５号；Ｇ．Ｓｈａｗ ｅｔ ａｌ．，Ｃｙｓｔｅｉｎｅ ａｄｄｅｄ ｖａｒｉａｎｔｓ ＩＬ－３ ａｎｄ ｃｈｅｍｉｃａｌ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ ｔｈｅｒｅｏｆ，米国特許第５，１６６，３２２号，ＥＰ０４６９０７４Ｂ１；Ｇ．Ｓｈａｗ ｅｔ ａｌ．，Ｃｙｓｔｅｉｎｅ ａｄｄｅｄ ｖａｒｉａｎｔｓ ｏｆ ＥＰＯ ａｎｄ ｃｈｅｍｉｃａｌ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ ｔｈｅｒｅｏｆ，ＥＰ０６６８３５３Ａ１；Ｇ．Ｓｈａｗ ｅｔ ａｌ．，Ｃｙｓｔｅｉｎｅ ａｄｄｅｄ ｖａｒｉａｎｔｓ Ｇ－ＣＳＦ ａｎｄ ｃｈｅｍｉｃａｌ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ ｔｈｅｒｅｏｆ，ＥＰ０６６８３５４Ａ１；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 ｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｉｏｎ ｓｉｔｅ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，８：３４３－３４６（１９９０））。

【０１３８】

ポリ（エチレングリコール）ビニルスルホンは、チオール化されたアミノ酸残基、例えばＣ残基での連結によって、本発明のＰＥＧ連結された融合タンパク質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、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；米国特許第５，７３９，２０８号；米国特許第５，９００，４６１号；米国特許第６，６１０，２８１号及び米国特許第６，８９４，０２５号；並びにＨａｒｒｉｓ，Ｗａｔｅｒ ｓｏｌｕｂｌｅ ａｃｔｉｖｅ ｓｕｌｆｏｎｅｓ ｏｆ ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ），ＷＯ９５／１３３１２Ａ１も参照されたい。）。

【０１３９】

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。

【０１４０】

ヘテロ二官能性に活性化されたＰＥＧの形態も有用である。（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。）。

【０１４１】

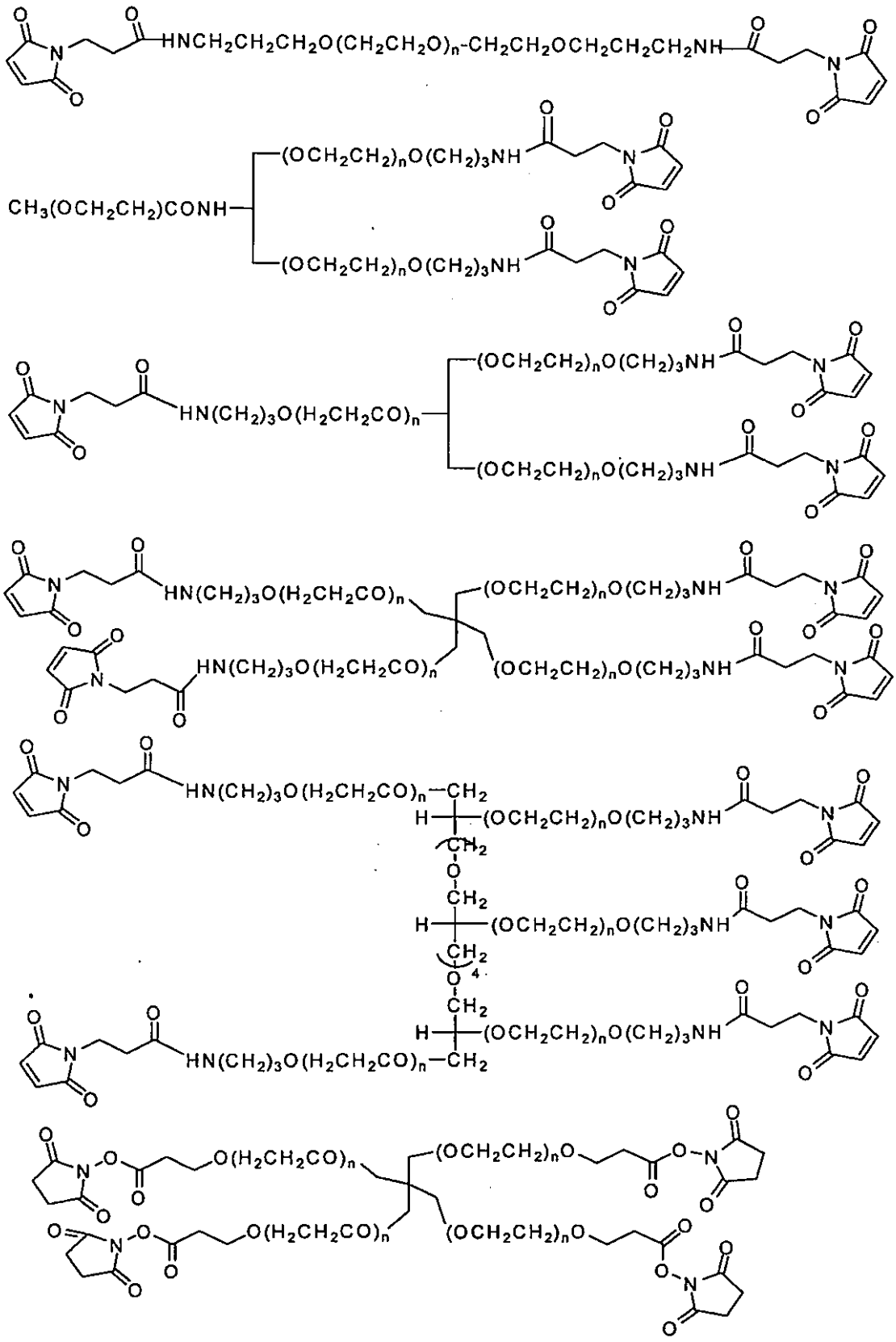
組成物を作製する本発明の方法のさらに別の実施形態において、公知の化学的技術によって、組換え融合タンパク質を、チオール活性化されたＰＥＧ化合物、ジオール活性化されたＰＥＧ化合物、ＰＥＧ－ヒドラジド化合物、ＰＥＧ－オキシアミン化合物又はＰＥＧ－ブロモアセチル化合物などの（但し、これらに限定されない。）活性化されたＰＥＧ化合物と反応させる。（例えば、Ｓ．Ｈｅｒｍａｎ，Ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ｗｉｔｈ Ｒｅａｃｔｉｖｅ Ｅｎｄｇｒｏｕｐｓ：Ｉ．Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｊ．Ｂｉｏａｃｔｉｖｅ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｔｉｂｌｅ Ｐｏｌｙｍｅｒｓ，１０：１４５－１８７（１９９５）；Ｓ．Ｚａｌｉｐｓｋｙ，Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ 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。

【０１４２】

ＰＥＧが連結された本発明の融合タンパク質を作製するためのさらにより好ましい活性化されたＰＥＧは、２以上の活性化された残基を有する多価ＰＥＧである。好ましい多価ＰＥＧ部分には、以下に示されているものが含まれるが、これらに限定されない。

【０１４３】

【化４】



【０１４４】

ＰＥＧの最も小さな実際的サイズは、約５００ダルトン（Ｄａ）であり、これを下回ると、ＰＥＧは有毒になる。約５００Ｄａを上回るＰＥＧに対するあらゆる分子量、例えば、約１，０００ダルトン（Ｄａ）から１００，０００Ｄａ（ｎは、２０から２，３００）を実用的に望ましいものとして使用することができる。ＰＥＧ単量体の数（ｎ）は、各単

量体に対するＭＷ＝４４Ｄａを用いて、平均分子量から近似される。活性化されたリンカー上のＰＥＧの合計分子量は医薬用途に適していることが好ましい。従って、ＰＥＧ分子の合計分子量は、約１００，０００Ｄａを超えるべきではない。

【０１４５】

組成物を作製する本発明の方法のさらに別の実施形態において、公知の化学的技術によって、本発明の組換え融合タンパク質をペンタエリスリトールテトラ－ポリエチレングリコールなどの（但し、これに限定されない。）活性化された多分岐ＰＥＧ化合物（二価、三価、四価、八価構築物を得るために複数のアームを含むＰＥＧ誘導体）と反応させる。Ｎ－スクシンイミジルオキシカルボニル）プロピル、ｐ－ニトロフェニルオキシカルボニル、（－CO_2－ｐ－$C_6H_4NO_2$）、３－（Ｎ－マレイミド）プロパンアミド、２－スルファニルエチル及び３－アミノプロピルなどの（但し、これらに限定されない。）官能化及び活性化された誘導体。４アームＰＥＧ誘導体を用いて、各ＰＥＧ分子に４つの組換え融合タンパク質が付着される。例えば、本発明に従って、融合タンパク質は、以下の部位において、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）に連結させることができる。

【０１４６】

（ａ）ＰＥＧの１、２、３若しくは４個のアミノ官能化された部位；
（ｂ）ＰＥＧの１、２、３若しくは４個のチオール官能化された部位；
（ｃ）ＰＥＧの１、２、３若しくは４個のマレイミド官能化された部位；
（ｄ）ＰＥＧの１、２、３若しくは４個のスクシンイミジル官能化された部位；
（ａ）ＰＥＧの１、２、３若しくは４個のカルボキシル官能化された部位；又は
（ｆ）ＰＥＧの１、２、３若しくは４個のｐ－ニトロフェニルオキシカルボニル官能化された部位。

【０１４７】

好ましくは、ＰＥＧ連結された本発明の組換え融合タンパク質中で使用されるＰＥＧの総又は合計平均分子量は、約３，０００Ｄａから６０，０００Ｄａ（合計ｎは、７０から１，４００）、より好ましくは、約１０，０００Ｄａから４０，０００Ｄａ（合計ｎは、約２３０から約９１０）である。ＰＥＧに対する最も好ましい総質量は、約２０，０００Ｄａから３０，０００Ｄａ（合計ｎは、約４５０から約６８０である。）である。

【０１４８】

本発明の化合物の使用

総論。本発明の融合タンパク質化合物は、目的とするこのようなタンパク質の固有の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、目的のタンパク質へ結合する能力に起因する薬理学的活性を有する。これらの化合物の活性は、本分野において公知のアッセイによって測定することができる。

【０１４９】

治療的使用に加えて、本発明の化合物は、目的の関連するタンパク質の機能不全によって特徴付けられる疾病を診断する上で有用である。これらの診断的実施態様の幾つかに関して、及び他の検出（半定量的及び定量的なものを含む。）目的のために、プレート表面、チップ、ビーズ、マトリックス又は粒子などの（但し、これらに限定されない。）さらなる機能的部分として、固定化された基質に活性な融合タンパク質を共有連結させることが有用であり得る。放射性同位体、酵素（例えば、ペルオキシダーゼ又はキナーゼ）、ビオチニル部分、蛍光色素又は発色団で検出可能に標識された部分も、このような目的のために有用であり得る。

【０１５０】

一実施形態において、（ａ）生物学的試料を本発明の化合物と接触させる工程及び（ｂ）前記化合物による目的のタンパク質の活性化を検出する工程を含む、活性化され得る目的のタンパク質（例えば、受容体）を生物学的試料中において検出する方法。生物学的試料には、組織試料、完全な細胞又はこれらの抽出物が含まれる。本発明の化合物は、生物学的試料中の目的の関連タンパク質の存在を検出するために、キットの一部として使用され得る。このようなキットは、検出を可能とするための標識が付着された本発明の化合物

を使用する。本化合物は、正常又は異常な目的タンパク質を特定するのに有用である。ＥＰＯ様化合物の場合、例えば、生物学的試料中の対象となる異常タンパク質の存在は、ＥＰＯ受容体の機能不全であると考えられるダイアモンドーブラックファン貧血のような疾患の指標となり得る。

【０１５１】

さらに、融合タンパク質及びこれを含有する医薬組成物又は医薬などの本発明の組成物の実施形態は、患者中の多岐にわたる疾病、疾患又は医学的症状の症候を治療し、緩和し、抑制し、又は軽減する上でも有用であり得る。症候に関して「緩和された」とは、ある患者において、その症候が完全に消失、根絶、除去又は抑制されるかどうかに関わらず、低下され、和らげられ、減弱され、弱められ、軽減され（すなわち、より穏やかに又は優しくなる。）、沈静化され、鎮められ、低減され、開放され、無にされ、又は軽くされることを意味する。

【０１５２】

ＣＧＲＰアンタゴニスト分子の治療的使用

本発明のＣＧＲＰアンタゴニスト化合物は、片頭痛を治療し、及び片頭痛を予防若しくは緩和するのに有用であり、片頭痛の症候を予防し、緩和し、及び／又は軽減する上で有益である。（例えば、Ｇｅｇｇ ｅｔ ａｌ．，ＣＧＲＰ ｐｅｐｔｉｄｅ ａｎｔａｇｏｎｉｓｔｓ ａｎｄ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ，ＷＯ２００７／０４８０２６Ａ２参照）。

【０１５３】

所望であれば、ＣＧＲＰアンタゴニストの治療的又は予防的効力は、ヒトにおける臨床的使用の前に、目的とする特定の症状に関連して、当業者に公知の適切な何れかの動物モデルを用いて、前臨床的に検査され得る。（例えば、Ｗａｎｇ ａｎｄ Ｗａｎｇ，Ａｎｉｍａｌ ａｎｄ ｃｅｌｌｕｌａｒ ｍｏｄｅｌｓ ｏｆ ｃｈｒｏｎｉｃ ｐａｉｎ，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ ５５：９４９－９６５（２００３）を参照されたい。）。片頭痛に関する適切な動物モデルは、例えば、「Ｂｅｒｇｅｒｏｔ ｅｔ ａｌ．，Ｒｅｖｉｅｗ Ａｒｔｉｃｌｅ：Ａｎｉｍａｌ ｍｏｄｅｌｓ ｏｆ ｍｉｇｒａｉｎｅ：ｌｏｏｋｉｎｇ ａｔ ｔｈｅ ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ ｐａｒｔｓ ｏｆ ａ ｃｏｍｐｌｅｘ ｄｉｓｏｒｄｅｒ，Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ ２４：１５１７－１５３４（２００６）」及び「Ａｋｅｒｍａｎ，Ｓ ａｎｄ Ｇｏａｄｓｂｙ ＰＪ，Ｔｈｅ ｒｏｌｅ ｏｆ ｄｏｐａｍｉｎｅ ｉｎ ａ ｍｏｄｅｌ ｏｆ ｔｒｉｇｅｍｉｎｏｖａｓｃｕｌａｒ ｎｏｃｉｃｅｐｔｉｏｎ，Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｅｘｐ．Ｔｈｅｒ．３１４（１）：１６２－１６９（２００５）」（何れも、参照により、全体が組み込まれる。）中に記載されている多数の方法から選択することができる。

【０１５４】

片頭痛の治療を必要としている患者又は以前に片頭痛を経験したことがある患者は、片頭痛及びその症候に習熟した医師などの熟練した医療従事者によって、十分に認識可能であり、及び／又は診断される。

【０１５５】

各々が当業者に周知の特有の特徴又は症候を有する片頭痛の数種類が存在するが、本発明は何れかの一種類に限定されるものではなく、片頭痛のあらゆる種類の症候を治療し、緩和し、予防し、又は軽減する上で有用であり得る。古典的片頭痛及び一般的片頭痛は、２つの主要な変種である。一般的片頭痛（オーラなし）は、最も頻発する種類であり、片頭痛の約８０から８５％を占める。他の頭痛と異なり、通常、片頭痛は頭の一方側に発生するが、罹患する側は新たな発作ごとにシフトし得る。また、片頭痛には、しばしば、光及び／又は音への異常な感覚という症候が伴う。片頭痛の疼痛症候は、しばしば、前頭部／こめかみ、耳／あご又は目の周囲に感じられる強烈な鼓動又は拍動として記述される。片頭痛の痛みは、通常、頭部の一方側に出現するが、片頭痛の３０から４０％は両側に発生する。片頭痛の発作は、通例、約４から７２時間持続する。片頭痛の症候には、会話困

難、悪心、嘔吐、困惑、腕又は足の虚弱及び顔又は手のヒリヒリするような痛みも含まれ得る。

【０１５６】

片頭痛の一般的な種類と古典的な種類との基本的な差は、「オーラ」の出現である。オーラは、古典的片頭痛発作の１０から３０分前に起こる神経学的症候である。片頭痛のオーラの間、片頭痛発症者は、光、ジグザグの線、幾何学的形状のきらめき又はちらつきを見ることがあり、又は視力を一時的に失い（例えば、片側視野欠損）、若しくは暗点と称される盲点を経験し、言語障害を経験し、若しくは味覚的及び／又は嗅覚的幻覚などの他の感覚的現象を体験し得る。片頭痛オーラの他の症候には、感覚喪失、ヒリヒリする痛み、会話困難及び身体の一方側の筋肉の虚弱が含まれ得る。

【０１５７】

片頭痛の別の種類は脳底動脈片頭痛であり、これは、脳底動脈の血管痙攣性の狭窄によるものと考えられる一過性の脳幹症状を伴う。脳底動脈型の片頭痛において、片頭痛の罹患者はオーラを伴う片頭痛に関する一般的な基準を充足し、以下の症候の２つ又はそれ以上を有する。構音障害、めまい、耳鳴り、難聴、複視、両側性視覚症状、運動失調、口囲無感覚、減少した意識レベル及び／又は同時両側性感覚異常。

【０１５８】

片頭痛の上記症候は例示に過ぎず、一人の患者によって又は数人の混合した片頭痛罹患者によって経験される可能性があり、本発明が関連する全ての片頭痛症候の網羅的な記載であ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ている片頭痛症候の様々な他の片頭痛症候及び片頭痛症候の群を知悉しており、片頭痛を治療する方法又は片頭痛を予防若しくは軽減する本発明の方法はそのような片頭痛症候にも向けられる。

【０１５９】

さらに、ＣＧＲＰアンタゴニストは、睡眠時無呼吸症及び他の睡眠関連の呼吸疾患などの睡眠障害の治療、軽減及び予防に有用であり得る（例えば、Ｃａｒｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ ｔｒｅａｔｍｅｎｔｓ ｆｏｒ ｓｌｅｅｐ ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ，ＷＯ２００７／０４７５７７Ａ２）。

【０１６０】

ＧＬＰ－１及びＧＬＰ－２並びにこれらの模倣物を含む分子の治療的使用

グルカゴンは、低血糖に応答して膵臓のα細胞から分泌され、グルカゴンの主な標的臓器は肝臓である。グルカゴンはグリコーゲンの分解を刺激し、グリコーゲンの生合成を阻害する。グルカゴンは脂肪酸合成も阻害するが、糖新生を増強する。これらの作用の正味の結果は、肝臓へのグルコースの放出を著しく増加させることである。これに対して、ＧＬＰ－１は、腸による栄養素の吸収に応答して、グルカゴンの分泌を低下させるとともに、インシュリンの分泌、グルコースの取り込み及び環状ＡＭＰ（ｃＡＭＰ）の形成を刺激する。様々な臨床データが、これらの活動の証拠を与えている。例えば、調節が不十分な２型糖尿病にＧＬＰを投与することによって、空腹時血中グルコースレベルが正常化された（例えば、Ｇｕｔｎｉａｋ，ｅｔ ａｌ，１９９２，Ｎｅｗ Ｅｎｇ．Ｊ．Ｍｅｄ．３２６：１３１６－１３２２を参照されたい。）。

【０１６１】

ＧＬＰ－１は、他の重要な多数の活動を有する。例えば、ＧＬＰ－１は胃の運動及び胃の分泌も阻害する（例えば、Ｔｏｌｅｓｓａ，１９９８，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１０２：７６４－７７４を参照されたい。）この効果（時に、回腸性ブレーキ効果と称される。）は、栄養素の利用可能性にラグ期をもたらし、これにより、迅速なインシュリン応答に対する必要性を著しく低下させる。

【０１６２】

ＧＬＰ－１が細胞の分化及び複製を促進することができ、その後、これは、膵島細胞の保持及びβ細胞塊の増加を助けることも研究によって示されている（例えば、Ａｎｄｒｅａｓｅｎ ｅｔ ａｌ，１９９４，Ｄｉｇｅｓｔｉｏｎ ５５：２２１－２２８；Ｗａｎｇ，ｅｔ ａｌ，１９９７，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９９：２８８３－２８８９；

Ｍｏｊｓｏｖ，１９９２，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｅｐ．Ｐｒｏｔ．Ｒｅｓ．４０：３３３－３４３；ａｎｄ Ｘｕ ｅｔ ａｌ，１９９９，Ｄｉａｂｅｔｅｓ ４８：２２７０－２２７６を参照されたい。）。ＧＬＰ－１が飽満感を増加させ、食物摂取を減少させ得ることも証拠によって示されている（例えば、Ｔｏｆｔ－Ｎｉｅｌｓｅｎ ｅｔ ａｌ，１９９９，Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｃａｒｅ ２２：１１３７－１１４３；Ｆｌｉｎｔ ｅｔ ａｌ，１９９８，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．ＪＯｉ：５１５－５２０；Ｇｕｔｓｗｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ，１９９９ Ｇｕｔ ４４：８１－８６を参照されたい。）。ＧＬＰ－１はＧＬＵＴ－１輸送体、インシュリン受容体及びヘキソキナーゼ－１などのβ細胞特異的遺伝子を誘導することが、他の研究によって示されている（例えば、Ｐｅｒｆｅｔｔｉ ａｎｄ Ｍｅｒｋｅｌ，２０００，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ １４３：７１７－７２５を参照されたい。）。このような誘導は、しばしば加齢に伴う耐糖能障害を回復させ得る。ＧＬＰ－１は代謝の恒常性を制御する上で中心的な役割を果たしているので、ＧＬＰ－１は糖尿病、肥満及びメタボリックシンドロームなどの様々な代謝性疾患を治療するための魅力的な標的である。

【０１６３】

グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）は、インシュリン分泌を刺激し、同時にグルカゴン分泌を減少させるホルモンである。インシュリン分泌促進効果は、グルコース依存性である。ＧＬＰ－１は、主として、上昇したグルコースレベルにおいてインシュリン分泌を刺激するので、２型糖尿病のＧＬＰ－１治療は低血糖症の低いリスクを呈し得る。ＧＬＰ－１は、肝臓のグルコース産生も間接的に減少させ、胃内容排除を遅延させ、２型糖尿病患者における食欲を抑制し得る。この一連の効果は、ＧＬＰ－１が２型糖尿病に対する有効且つ安全なグルコース低下剤である可能性を与える。さらに、ＧＬＰ－１はインシュリン産生細胞への膵島始源細胞の分化を刺激することが示されており、β細胞の新生にとって重要であり得る。ＧＬＰ－１の短期（１２時間）注入及びＧＬＰ－１の６週間継続的皮下注入は、２型糖尿病患者中でのインシュリン分泌を著しく改善させることが示されている。ＧＬＰ－１の作用の主な標的は膵島であり（このホルモンは、膵島において、インシュリン分泌を刺激し、β細胞の増殖及び新生を促進し、グルカゴン分泌を阻害する。）、ＧＬＰ－１受容体は膵島外にも発現されており、ＧＬＰ－１が他の臓器においても役割を果たしている可能性を増加させる。これらの機能は、主に、胃内容排出、胃酸分泌及び外分泌性膵臓分泌の阻害であり、ホルモンがエンテロガストロン（近位胃腸現象を阻害する小腸の遠位部分から放出されるホルモン）として作用することを示唆している。ＧＬＰ－１の別の重要な作用は、飽満感を誘導することである。このホルモンの他の効果には、心臓保護、神経保護、学習及び記憶の誘導、求心性感覚神経の刺激、肺内での界面活性剤産生の刺激、肺血管の拡張、利尿の誘導が含まれ、幾つかの条件下では、膵島機能に無関係の抗糖尿病作用の誘導も含まれる。従って、ＧＬＰ－１は、薬理的活性の幾つかの兆候を明確に有する。（例えば、Ｖｒａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｂｒａｉｎｓｔｅｍ ｐｒｅｐｒｏｇｌｕｃａｇｏｎ ｐｒｏｇｅｃｔｉｏｎｓ ｔｏ ｔｈｅ ｐａｒａｖｅｎｔｒｉｃｕｌａｒ ａｎｄ ｄｏｒｓｏｍｅｄｉａｌ ｈｙｐｏｔｈａｌａｍｉｃ ｎｕｃｌｅｉ，Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．１１４９：１１８－２６（２００７）；Ｋｏｒｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＧＬＰ－１ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ ｈｕｍａｎ ｔｕｍｏｒｓ ａｎｆ ｈｕｍａｎ ｎｏｒｍａｌ ｔｉｓｓｕｅｓ：ｐｏｔｅｎｔｉａｌ ｆｏｒ ｉｎ ｖｉｖｏ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，Ｊ．Ｎｕｃｌ． Ｍｅｄ．４８（５）：７３６－４３（２００７）を参照されたい。）。

【０１６４】

グルカゴン様ペプチド－２（ＧＬＰ－２）（プログルカゴンの翻訳後プロセッシングの産物）は、正常な腸内及び大規模な小腸切除後に残存する腸内において、粘膜の質量及び機能を増大させることが示されている。ＧＬＰ－２及びＧＬＰ－２模倣タンパク質類縁体によるグルカゴン様ペプチド－２受容体（ＧＬＰ－２）シグナル伝達の活性化は、成長及びアポトーシス抑制経路の活性化を介して間接的に粘膜上皮の増殖を促進させる。ＧＬＰ

－２及びＧＬＰ－２（ＧＬＰ－２α）模倣類縁体は、虚血及び再灌流（Ｉ／Ｒ）傷害後における小腸内の粘膜質量を増加させることができる。（例えば、Ｐｒａｓａｄ ｅｔ ａｌ．，Ｇｌｕｃａｇｏｎｌｉｋｅ ｐｅｐｔｉｄｅ－２ ａｎａｌｏｇｕｅ ｅｎｈａｎｃｅｓ ｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ ｍｕｃｏｓａｌ ｍａｓｓ ａｆｔｅｒ ｉｓｃｈｅｍｉａ ａｎｄ ｒｅｐｅｒｆｕｓｉｏｎ，Ｊ．Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｓｕｒｇ．２０００ Ｆｅｂ；３５（２）：３５７－５９（２０００）を参照されたい。）。

【０１６５】

ブラジキニンＢ１受容体アンタゴニスト分子の治療的使用

本発明のブラジキニンＢ１受容体アンタゴニスト化合物は、Ｂ１受容体によって媒介される疾病、疾患、医学的症状及び症候の治療、軽減及び／又は予防において、例えば、炎症及び慢性疼痛（炎症性疼痛並びに付随する痛覚過敏及び異痛症が含まれるが、これらに限定されない。）の予防又は治療において有用である。本発明の融合タンパク質及び／又は連結された融合タンパク質は、視床疼痛症候群、糖尿病、毒素及び化学療法、敗血性ショック、関節炎、混合血管及び非血管混合症候群、一般的な炎症、関節炎、リウマチ性疾患、ループス、骨関節炎、炎症性腸疾患、炎症性眼疾患、炎症性若しくは不安定ぼうこう障害、乾癬、炎症性成分を伴う皮膚病、日焼け、心臓炎、炎症性腸疾患、皮膚炎、筋炎、神経炎、膠原血管病、慢性炎症性症状、上皮性組織障害若しくは機能不全、単純ヘルペス、糖尿病性神経障害疼痛、ヘルペス後の神経痛、灼熱痛、交感神経によって維持される疼痛、求心路遮断症候群、緊張性頭痛、狭心症、片頭痛、手術痛、呼吸、泌尿生殖、胃腸若しくは血管領域での内臓運動性の障害、創傷、やけど、アレルギー性鼻炎、喘息、アレルギー性皮膚反応、掻よう症（ｐｒｕｒｉｔｉｓ）、白斑、一般的胃腸疾患、結腸炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍又は血管運動性鼻炎又はアレルギー性鼻炎などの、Ｂ１活性化と関連する又はＢ１活性化によって媒介される他の疼痛症状の予防又は治療のためにも治療的価値を有する。

【０１６６】

本発明は、急性疼痛、歯痛、背痛、腰痛、外傷由来の疼痛、手術痛、切断術若しくは膿瘍に起因する疼痛、灼熱痛、脱髄性疾患、三叉神経痛、癌、慢性アルコール依存症、発作、視床疼痛症候群、糖尿病、後天性免疫不全症候群（「ＡＩＤＳ」）、毒素及び化学療法、一般的頭痛、片頭痛、群発性頭痛、血管及び非血管混合症候群（ｍｉｘｅｄ－ｖａｓｃｕｌａｒ ａｎｄ ｎｏｎ－ｖａｓｃｕｌａｒ ｓｙｎｄｒｏｍｅｓ）、緊張性頭痛、一般的炎症、関節炎、リウマチ性疾患、狼瘡、骨関節炎、炎症性腸疾患、炎症性眼疾患、炎症性若しくは不安定ぼうこう障害、乾癬、炎症性成分を伴う皮膚病、日焼け、心臓炎、皮膚炎、筋炎、神経炎、膠原血管病、慢性炎症性症状、炎症性疼痛並びに付随する痛覚過敏及び異痛症、神経因性疼痛並びに付随する痛覚過敏及び異痛症、糖尿病性神経症疼痛、灼熱痛、交感神経によって維持される疼痛、脱求心性症候群、喘息、アレルギー性鼻炎、上皮性組織の損傷若しくは機能不全、単純ヘルペス、ヘルペス後の神経痛、呼吸、泌尿生殖、胃腸若しくは血管領域での内臓運動性の障害、創傷、やけど、アレルギー性皮膚反応、掻よう症（ｐｒｕｒｉｔｉｓ）、白斑、一般的胃腸疾患、結腸炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍及び気管支疾患の予防又は治療のための、本発明のブラジキニンＢ１受容体アンタゴニスト融合タンパク質及び／又は本発明の連結された組換え融合タンパク質の使用も提供する。

【０１６７】

ＰＴＨアンタゴニスト又はアゴニスト分子の治療的使用。本発明のＰＴＨアゴニスト融合タンパク質は、ＰＴＨ－１受容体又はＰＴＨ－２受容体とのそれらの相互作用から生じる薬理学的活性を有する。Ｍａｎｎｓｔａｄｔ ｅｔ ａｌ．（１９９９），Ａｍ．Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．２７７．５Ｐｔ ２．Ｆ６６５－７５。ＰＴＨ及びそのアゴニストは、骨再吸収を増加させ、腎カルシウム再吸収を増加させ、上皮増殖を減少させ、毛髪の成長を減少させる。Ｈｏｌｉｃｋ ｅｔ ａｌ．（１９９４） Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１（１７）：８０１４－６；Ｓｃｈｉｌｌｉ ｅｔ ａｌ．（１９９７），Ｊ．Ｉｎｖｅｓｔ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．１０８（６）：９２８－３２。従って、ＰＴＨ

－１受容体及び／又はＰＴＨ－２受容体のアンタゴニストは、原発性及び続発性副甲状腺機能亢進；固形腫瘍（乳房、肺及び腎臓）及び血液の悪性腫瘍（多発性骨髄腫、リンパ腫及び白血病）に起因する高カルシウム血症、突発性高カルシウム血症、並びに甲状腺機能亢進及び腎機能障害を伴う高カルシウム血症を含む高カルシウム血症、腫瘍転移、特に、骨への転移、並びに特に乳癌及び前立腺癌に関連する転移、特に癌と関連する悪液質及び食欲不振症、原発性骨粗鬆症、閉経後及び加齢性骨粗鬆症、内分泌性骨粗鬆症（甲状腺機能亢進、副甲状腺機能亢進、クッシング症候群及び末端肥大症）、骨粗鬆症の遺伝的及び先天性形態（例えば、骨形成不全症、ホモシステイン尿症、メンケ症候群及びリレイ－デイ症候群）、四肢の不動による骨粗鬆症、ヘモクロマトーシス、高プロラクチン血症、神経性食欲不振、甲状腺機能高進症、糖尿病、セリアック病、炎症性腸疾患、原発性胆汁性肝硬変、関節リウマチ、強直性脊髄炎、多発性骨髄症、リンパ増殖性疾患及び全身性肥満細胞症などの他の疾患に続発する骨粗鬆症、手術（例えば、胃摘出）又は薬物療法（化学療法、抗痙攣治療、免疫抑制療法及び抗凝固治療など）に続発する骨粗鬆症、関節リウマチ（ＲＡ）、全身性紅斑性狼瘡（ＳＬＥ）、喘息、側頭動脈炎、血管炎、慢性閉塞性肺疾患、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎、慢性間質性肺疾患などの疾病に対するグルココルチコステロイド治療に続発する骨粗鬆症、腎臓、肝臓、肺、心臓移植などの臓器移植後の臓器拒絶を予防するためのグルココルチコステロイド及び／又は免疫調節治療に続発する骨粗鬆症、宇宙飛行時に観察されるような微小重力への曝露に起因する骨粗鬆症、乳癌、前立腺癌などの悪性疾患に伴う骨粗鬆症、成人及び児童における骨のページェット病（変形性骨炎）などの骨粗鬆症の様々な形態、骨髄炎、又は骨減少をもたらす、骨中の感染性病変、ステロイド投与によって誘導される手術後の骨減少症並びに小腸及び大腸の疾患並びに慢性肝臓及び腎臓病の疾患に関連する骨減少症などの、異常なＰＴＨ受容体シグナル伝達に関連し、又は異常なＰＴＨ受容体シグナル伝達によって悪化される骨減少症を治療する上で有用である。ゴーシェ病、鎌形赤血球貧血症、全身性紅斑性狼瘡、関節リウマチ、歯周病、骨溶解性転移及び他の症状；アンドロゲン性脱毛症（男性型の禿げ）、毒性脱毛症、老年性脱毛症、円形脱毛症（ａｌｏｐｅｃｉａ　ａｒｅａｔａ）、円形脱毛症（ａｌｏｐｅｃｉａ　ｐｅｌａｄａ）及び抜毛癖などを含む脱毛症（毛髪成長不全又は部分的な若しくは完全な毛髪喪失）に伴う外傷性傷害又は非外傷性壊死に関連する骨壊死又は骨細胞死。

【０１６８】

ＰＴＨ又はＰＴＨｒＰの活性が患者にとって有益である他の症状が存在する。これらの適応症に関して、ＰＴＨ受容体アゴニストは治療的処置として有用である。特に、このような適応症には、骨折修復（ノンユニオン骨折の治癒を含む。）、原発性骨粗鬆症、閉経後及び加齢性骨粗鬆症、内分泌性骨粗鬆症（甲状腺機能亢進、クッシング症候群及び末端肥大症）、骨粗鬆症の遺伝的及び先天性形態（例えば、骨形成不全症、ホモシステイン尿症、メンケ症候群及びリレイ－デイ症候群）、四肢の不動による骨粗鬆症、ヘモクロマトーシス、高プロラクチン血症、神経性食欲不振、甲状腺機能高進症、糖尿病、セリアック病、炎症性腸疾患、原発性胆汁性肝硬変、関節リウマチ、強直性脊髄炎、多発性骨髄症、リンパ増殖性疾患及び全身性肥満細胞症などの他の疾患に続発する骨粗鬆症、手術（例えば、胃摘出）又は薬物療法（化学療法、抗痙攣治療、免疫抑制療法及び抗凝固治療）に続発する骨粗鬆症、ＲＡ、ＳＬＥ、喘息、側頭動脈炎、血管炎、慢性閉塞性肺疾患、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎、慢性間質性肺疾患などの疾病に対するグルココルチコステロイド治療に続発する骨粗鬆症、腎臓、肝臓、肺、心臓移植などの臓器移植後の臓器拒絶を予防するためのグルココルチコステロイド及び／又は免疫調節治療に続発する骨粗鬆症、宇宙飛行時に観察されるような微小重力への曝露に起因する骨粗鬆症、乳癌、前立腺癌などの悪性疾患に伴う骨粗鬆症などの骨粗鬆症の様々な形態を含む骨減少症が含まれる。延長された半減期を有するＰＴＨアゴニスト（例えば、Ｆｃドメインに連結されたＰＴＨアゴニスト）は、骨再吸収の阻害剤とともに使用され得る。骨再吸収の阻害剤には、ＯＰＧ及びＯＰＧ誘導体、ＯＰＧ－Ｌ（ＲＮＡＫＬ）抗体、カルシトニン（例えば、Ｍｉａｃａｌｃｉｎ（Ｒ）、Ｃａｌｃｉｍａｒ（Ｒ））、ビスホスホナート（例えば、ＡＰＤ、ア

レンドロネート、リセドロネート、エチドロネート、パミドロネート、チルドロネート、クロドロネート、ネリドロネート、イバンドロネート、ゾレドロネート）、エストロゲン類（例えば、Ｐｒｅｍａｒｉｎ（Ｒ）、Ｅｓｔｒａｄｅｒｍ（Ｒ）、Ｐｒｅｍｐｒｏ（Ｒ）、Ａｌｏｒａ（Ｒ）、Ｃｌｉｍａｒａ（Ｒ）、Ｖｉｖｅｌｌｅ（Ｒ）、Ｅｓｔｒａｔａｂ（Ｒ）、Ｏｇｅｎ（Ｒ））、選択的エストロゲン受容体調節物質（例えば、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、ラソフォキシフェン）チボロンなどが含まれる。骨再吸収阻害剤の例は、ＷＯ９８／４６７５１号及びＷＯ９７／２３６１４号（参照により、これらの全体が本明細書に組み込まれる。）に記載されている。

【０１６９】

ＥＰＯ様分子の治療的使用

本発明のＥＰＯ様化合物は、低赤血球レベルを特徴とする障害の治療に有用である。哺乳動物におけるＥＰＯ受容体の内因的活性を調節する方法、好ましくはＥＰＯ受容体の活性を増加させる方法は、本発明に含まれる。一般に、貧血などエリスロポイエチンによって治療可能なあらゆる症状が、本発明のＥＰＯ様化合物によっても治療することができる。これらの化合物は、治療する症状の性質及び重症度に適切であり、当業者によって確認することができる、量及び送達経路によって投与される。投与は、皮下、筋肉内又は静脈内の注射によることが好ましい。

【０１７０】

ＴＰＯ様化合物の治療的使用

ＴＰＯ様化合物に関して、ＷＯ９５／２６７４６「Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ａｎｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｓｔｉｍｕｌａｔｉｎｇ Ｍｅｇａｋａｒｙｏｃｙｔｅ Ｇｒｏｗｔｈ ａｎｄ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ」に記載のアッセイのような標準アッセイを利用することができる。治療すべき症状は、一般に、既存の巨核球／血小板欠乏又は（例えば、計画手術又は血小板供与による）予想される巨核球／血小板欠乏を含む症状である。かかる症状は、通常、活性Ｍｐｌリガンドのインビボでの（一時的又は恒常的）欠乏の結果である。血小板欠乏の一般的用語は血小板減少症であり、従って本発明の方法及び組成物は、一般に、治療が必要な患者における血小板減少症の治療に利用可能である。

【０１７１】

血小板減少症（血小板欠乏）は、化学療法及び様々な薬物を用いた他の治療、放射線療法、手術、偶発的な失血、他の具体的症状を含めて、様々な理由によって起こり得る。血小板減少症を含み、本発明に従って治療することができる例示的な具体的病状は、再生不良性貧血、特発性血小板減少症、血小板減少症をもたらす転移性腫瘍、全身性エリテマトーデス、脾腫、ファンコニー症候群、ビタミンＢ１２欠乏症、葉酸欠乏症、メイ－ヘグリン異常、ウィスコット－オールドリッチ症候群及び発作性夜間血色素尿症である。また、ある種のＡＩＤＳ治療も血小板減少症をもたらす（例えば、ＡＺＴ）。ある種の創傷治癒障害も、血小板数の増加による利点を得ることがある。

【０１７２】

例えば将来の手術による、予測される血小板欠乏に関しては、本発明の化合物を血小板の必要な数日から数時間前に投与することができる。急性の状況、例えば、偶発的な多量の失血に関しては、本発明の化合物を血液又は精製された血小板と一緒に投与することができる。

【０１７３】

本発明のＴＰＯ様化合物は、巨核球以外のある種の細胞タイプがＭｐｌ受容体を発現することが判明した場合には、かかる細胞の刺激にも有用であり得る。Ｍｐｌリガンドによる刺激に応答するＭｐｌ受容体を発現する細胞に関連した症状も本発明の範囲に属する。

本発明のＴＰＯ様化合物は、血小板若しくは血小板前駆細胞の産生が望まれる、又はｃ－Ｍｐｌ受容体の刺激が望まれる、あらゆる状況において使用することができる。従って、例えば、本発明の化合物は、哺乳動物において血小板、巨核球などを必要とするあらゆる症状の治療に使用することができる。かかる症状は、以下の例示的な出典、すなわち、

ＷＯ９５／２６７４６、ＷＯ９５／２１９１９、ＷＯ９５／１８８５８、ＷＯ９５／２１９２０に詳述されている（参照により、これらを本明細書に組み込む。）。

【０１７４】

本発明のＴＰＯ様化合物は、血小板及び／又は巨核球及び関連細胞の生存度又は貯蔵寿命を維持するのにも有用であり得る。従って、かかる細胞を含む組成物中に１つ又はそれ以上のかかる化合物の有効量を含めることが有用であり得る。

【０１７５】

Ａｎｇ－２結合分子の治療的使用

その治療効果を高め、又は起こり得る副作用を減少させるために、Ａｎｇ－２結合活性又は他の細胞活性を調節する薬剤は、他の治療薬と併用し得る。

【０１７６】

一態様において、本発明は、細胞におけるＡｎｇ－２活性の望ましくない又は異常なレベルを特徴とする疾患及び症状の治療に有用である試薬及び方法を提供する。これらの疾患としては、癌及び過形成などの他の過剰増殖症状、乾癬、接触性皮膚炎、免疫障害及び不妊などが挙げられる。

【０１７７】

本発明は、Ａｎｇ－２活性を阻害又は抑制する、ペプチボディなどの特異的結合剤の有効量を動物に投与することを含む、ヒトを含めた動物における癌を治療する方法も提供する。本発明は、さらに、生体系における細胞増殖、侵襲性及び転移のプロセスを含めて、癌細胞の増殖を阻害する方法を対象とする。方法は、癌細胞増殖の阻害剤として本発明の化合物を使用することを含む。本方法は、哺乳動物などの生きている動物における癌細胞増殖、侵襲性、転移又は腫瘍発生の阻害又は抑制に使用することが好ましい。本発明の方法は、アッセイシステムにおける使用、例えば、癌細胞増殖及びその諸性質のアッセイ並びに癌細胞増殖に影響を及ぼす化合物の特定にも容易に適合する。

【０１７８】

本発明の方法によって治療可能な癌は、好ましくは哺乳動物において発生する。哺乳動物としては、例えば、ヒト及び他の霊長目、並びにイヌ、ネコなどのペット又は愛玩動物、ラット、マウス及びウサギなどの実験動物並びにウマ、ブタ、ヒツジ及びウシなどの家畜が挙げられる。

【０１７９】

腫瘍又は新生物としては、細胞の増殖が調節されず、進行性である組織細胞の増殖などが挙げられる。一部のかかる増殖は良性であるが、他の増殖は悪性と称され、生物の死をもたらし得る。悪性新生物又は癌は、攻撃的な細胞増殖を示すことに加えて、周囲組織に侵入し、転移し得る点で、良性増殖と区別される。さらに、悪性新生物は、分化のより大きな喪失（より大きな脱分化）を示し、相互及びその周囲組織に対するその組織化のより大きな減少を示すことを特徴とする。この特性は「退形成」とも呼ばれる。

【０１８０】

本発明によって治療可能な新生物としては、固形腫瘍、すなわち、癌腫及び肉腫も挙げられる。癌腫としては、周囲組織に浸潤（侵入）し、転移する、上皮細胞由来の悪性新生物などが挙げられる。腺癌は、腺組織由来の癌腫、又は認識可能な腺構造を形成する癌腫である。別の広範なカテゴリー又は癌としては、肉腫（肉腫は、その細胞が胎生結合組織のような原線維物質又は均一物質中に埋め込まれた腫瘍である。）が挙げられる。本発明は、白血病、リンパ腫及び典型的には腫りゅうとして存在しないが、血管又はリンパ細網系中に分布する他の癌を含めて、骨髄系又はリンパ系の癌の治療も可能にする。

【０１８１】

従って、発明のａｎｇ－２結合分子は、固形腫瘍及び白血病を含めて、多種多様な癌の治療に有用である。本発明による治療の対象となる癌又は腫瘍細胞のタイプとしては、例えば、ＡＣＴＨ産生腫瘍；急性リンパ球性白血病；急性非リンパ性白血病；腺腫；副腎皮質癌；乳房、前立腺及び結腸の腺癌；エナメル上皮腫；アプドーマ；ぼうこう癌；脳腫瘍；さい腫；乳癌；肺の気管支原性癌の全ての形態；カルチノイド心疾患；癌腫（例えば、

ウォーカー癌、基底細胞癌、基底へん平細胞癌、ブラウン－ピアス腫瘍、腺管癌、エールリッヒ癌、Ｋｒｅｂｓ　２、メルケル細胞腫、粘液癌、非小細胞肺癌、燕麦細胞癌、乳頭状癌、硬性癌、細気管支癌、気管支癌、へん平上皮癌及び移行上皮癌）；悪性カルチノイド症候群；免疫増生性小細胞肺癌；セメント質腫；子宮頚癌；軟骨芽細胞腫；軟骨腫；軟骨肉腫；分離腫；慢性リンパ性白血病；慢性骨髄性白血病；結腸直腸癌；脊索腫；頭蓋咽頭腫；皮膚Ｔ細胞リンパ腫；未分化胚細胞腫；子宮体癌；食道癌；ユーイング肉腫；線維腫；線維肉腫；胆嚢癌；巨細胞腫；神経こう腫；有毛細胞白血病；過誤腫；頭頚部癌；肝細胞癌；組織球性障害；組織球増殖症；ホジキンリンパ腫；カポジ肉腫；腎癌；脂肪腫；脂肪肉腫；肝臓癌；肺癌（小細胞及び非小細胞）；悪性腹水；悪性胸水；黒色腫；間葉細胞腫；中腎腫；中皮腫；多発性骨髄腫；筋肉腫；粘液腫；粘液肉腫；神経芽細胞腫；非ホジキンリンパ腫；歯牙腫；骨腫；骨肉腫；卵巣癌；卵巣（胚細胞）癌；すい癌；乳頭腫；陰茎癌；プラズマ細胞腫；前立腺癌；細網内皮症；網膜芽細胞腫；皮膚癌；軟部組織肉腫；へん平上皮癌；胃癌；奇形腫；精巣癌；胸腺腫；甲状腺癌；絨毛性新生物；子宮癌；膣癌；外陰癌；ウィルムス腫瘍が挙げられる。

【０１８２】

さらに、以下のタイプの癌も治療することができる。胆管癌；胆脂腫；円柱腫（ｃｙｃｌｉｎｄｒｏｍａ）；嚢胞腺癌；嚢胞腺腫；顆粒膜細胞腫瘍；男女性胚細胞腫；汗腺腫；島細胞腫瘍；ライディッヒ細胞腫；乳頭腫；セルトリ細胞腫；卵胞膜細胞腫；平滑筋腫；平滑筋肉腫；筋芽細胞腫；筋腫；筋肉腫；横紋筋腫；横紋筋肉腫；上衣細胞腫；神経節神経腫；神経膠腫；髄目種；髄膜種；神経鞘種；神経芽細胞腫；神経上皮腫；神経線維腫；神経腫；傍神経節腫；非クロム親和性傍神経節腫；角化血管腫；好酸球増加随伴性血管類リンパ組織増殖症；硬化性血管腫（ａｎｇｉｏｍａ　ｓｃｌｅｒｏｓｉｎｇ）；血管腫症；グロムス血管腫；血管内皮腫；血管腫；血管外皮細胞腫；血管肉腫；リンパ管腫；リンパ管筋腫症；リンパ管肉腫；松果体腫；癌肉腫；軟骨肉腫；葉状嚢肉腫；線維肉腫；血管肉腫；平滑筋肉腫；白血肉腫；脂肪肉腫；リンパ管肉腫；筋肉腫；粘液肉腫；卵巣癌；横紋筋肉腫；肉腫；新生物；神経線維腫症（ｎｅｒｏｆｉｂｒｏｍａｔｏｓｉｓ）及び子宮頚部異形成。

【０１８３】

ＮＧＦ結合分子の治療的使用

ＮＧＦ結合分子は、ＮＧＦ関連疾病及び疾患の予防又は治療において使用され得る。かかる適応症としては、（炎症性疼痛並びに付随する痛覚過敏及び異痛症、神経因性疼痛並びに付随する痛覚過敏及び異痛症、糖尿病性神経障害疼痛、灼熱痛、交感神経によって維持される疼痛、求心路遮断症候群、急性痛、緊張性頭痛、片頭痛、歯痛、外傷由来の疼痛、手術痛、切断術又は膿瘍に起因する疼痛、灼熱痛、脱髄疾患及び三叉神経痛を含めて、但しこれらだけに限定されない）疼痛などが挙げられるが、これらだけに限定されない。本発明のペプチド及び修飾ペプチドは、ぜん息、切迫尿失禁（すなわち、過活動ぼうこう）、乾癬、癌（特に、すい癌及び黒色腫）、慢性アルコール依存症、卒中、視床症候群、糖尿病、後天性免疫不全症候群（「ＡＩＤＳ」）、毒素及び化学療法、一般的頭痛、片頭痛、群発性頭痛、血管及び非血管混合症候群（ｍｉｘｅｄ－ｖａｓｃｕｌａｒ　ａｎｄ　ｎｏｎ－ｖａｓｃｕｌａｒ　ｓｙｎｄｒｏｍｅｓ）、一般的炎症、関節炎、リウマチ性疾患、狼瘡、骨関節炎、炎症性腸疾患、炎症性眼疾患、炎症性若しくは不安定ぼうこう障害、乾癬、炎症性成分を伴う皮膚病、日焼け、心臓炎、皮膚炎、筋炎、神経炎、膠原性血管病、慢性炎症性症状、ぜん息、上皮組織損傷若しくは機能不全、単純ヘルペス、呼吸器、尿生殖器、胃腸若しくは血管領域における内臓運動障害、創傷、火傷、アレルギー性皮膚反応、掻よう症（ｐｒｕｒｉｔｉｓ）、白斑、一般的胃腸疾患、結腸炎、胃潰よう、十二指腸潰よう、血管運動神経性鼻炎若しくはアレルギー性鼻炎又は気管支疾患を含めて、但しこれらだけに限定されない、原因因子としてＮＧＦに関連した他の疾患の予防又は治療に対する治療学的価値を有する。

【０１８４】

ミオスタチン結合分子の治療的使用

本発明のミオスタチン結合剤は、ミオスタチンに結合し、標的細胞内のミオスタチンシグナル伝達を遮断又は阻害する。本発明は、１つ又はそれ以上のミオスタチン結合剤の有効投与量を動物に投与することによって、動物におけるミオスタチンの量又は活性を減少させる方法及び試薬を提供する。一態様において、本発明は、１つ又はそれ以上の結合剤の有効投与量を動物に投与することを含む、動物におけるミオスタチン関連障害を治療する方法及び試薬を提供する。これらのミオスタチン関連障害としては、筋肉疲労の様々な形態、糖尿病及び関連障害などの代謝障害、骨粗鬆症などの骨変性疾患などが挙げられるが、これらだけに限定されない。

【０１８５】

筋肉疲労障害としては、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、進行性筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、デジェリン－ランドゥジー筋ジストロフィー、エルブ筋ジストロフィー及び乳児型神経軸索ジストロフィーなどのジストロフィーなどが挙げられる。例えば、抗体をインビボで使用してミオスタチンを遮断すると、デュシェンヌ型筋ジストロフィーのｍｄｘマウスモデルのジストロフィー表現型が改善された（Ｂｏｇｄａｎｏｖｉｃｈ　ｅｔ　ａｌ．（２００２），Ｎａｔｕｒｅ　４２０：　２８）。

【０１８６】

さらなる筋肉疲労障害は、筋萎縮性側索硬化症、うっ血性閉塞性肺疾患、癌、ＡＩＤＳ、腎不全及びリウマチ様関節炎などの慢性疾患から生じる。例えば、悪液質又は筋肉疲労及び体重減少が、胸腺欠損ヌードマウスにおいて全身投与されたミオスタチンによって誘発された（Ｚｉｍｍｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．、同上）。他の例においては、ミオスタチン免疫反応性タンパク質の血清及び筋肉内濃度が、ＡＩＤＳ関連筋肉疲労を示す男性において増加し、除脂肪体重に反比例することが判明した（Ｇｏｎｚａｌｅｚ－Ｃａｄａｖｉｄ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８），ＰＮＡＳ　ＵＳＡ　９５：　１４９３８－１４９４３）。筋肉疲労を生じるさらなる条件は、車椅子での拘束など身体障害のための不活動、卒中、疾病、骨折又は外傷のための長期床上安静及び微小重力環境（宇宙飛行）における筋萎縮症から生じ得る。例えば、血漿ミオスタチン免疫反応性タンパク質は、長期床上安静後に増加することが判明した（Ｚａｃｈｗｉｅｊａ　ｅｔ　ａｌ．　Ｊ　Ｇｒａｖｉｔ　Ｐｈｙｓｉｏｌ．　６（２）：１１（１９９９）。スペースシャトル飛行中に微小重力環境に曝されたラットの筋肉は、曝されなかったラットの筋肉と比べて、ミオスタチンの増加した量を発現することも判明した（Ｌａｌａｎｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０００），Ｊ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎ．　１６７（３）：４１７－２８）。

【０１８７】

さらに、脂肪と筋肉の比の加齢性の増加及び加齢性の筋萎縮症は、ミオスタチンと関係していると考えられる。例えば、平均血清ミオスタチン免疫反応性タンパク質は、若年群（１９－３５歳）、中年群（３６－７５歳）及び高齢者群（７６－９２歳）の男性及び女性において年齢とともに増加したが、平均筋肉量及び除脂肪体重は、これらの群において年齢とともに減少した（Ｙａｒａｓｈｅｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．　Ｊ　Ｎｕｔｒ　Ａｇｉｎｇ　６（５）：３４３－８（２００２））。マウスにおけるミオスタチン遺伝子ノックアウトによって筋形成が増加し、脂肪生成が減少し（Ｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００２），Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｒｅｓ　Ｃｏｍｍｕｎ　２９１（３）：７０１－６、成体の筋肉量が増加し、脂肪蓄積及びレプチン分泌が減少した。

【０１８８】

さらに、ミオスタチンは、心筋において低レベルで発現されることが現在見出されており、発現は梗塞後の心筋細胞後に上方制御される（Ｓｈａｒｍａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９），Ｊ　Ｃｅｌｌ　Ｐｈｙｓｉｏｌ．　１８０（１）：１－９）。従って、心筋中のミオスタチンレベルを低下させると、梗塞後の心筋の回復が改善され得る。

【０１８９】

ミオスタチンは、２型糖尿病、インスリン非依存性糖尿病、高血糖及び肥満を含めて、代謝障害にも影響を及ぼすと考えられる。例えば、ミオスタチンの欠乏によって、２つのマウスモデルの肥満及び糖尿病表現型が改善することが判明した（Ｙｅｎ　ｅｔ　ａｌ．

同上）。さらに、ミオスタチンレベルを低下させることにより筋肉量を増加させると、骨強度が改善され、骨粗鬆症及び他の変性骨疾患が減少し得る。例えば、ミオスタチン欠乏マウスは、マウス上腕骨のミネラル含有量及び密度が増加し、海綿骨と皮質骨の両方の筋肉付着領域におけるミネラル含有量が増加し、筋肉量が増加することも判明している（Ｈａｍｒｉｃｋ ｅｔ ａｌ．（２００２），Ｃａｌｃｉｆ Ｔｉｓｓｕｅ Ｉｎｔ ７１（１）：６３－８）。

【０１９０】

本発明は、ミオスタチン結合剤の有効投与量を食用動物に投与することによって、食用動物における筋肉量を増加させる方法及び試薬も提供する。成熟Ｃ末端ミオスタチンポリペプチドは、試験した全ての種で同一であるので、ミオスタチン結合剤は、ウシ、ニワトリ、シチメンチョウ及びブタを含めて農業に重要なあらゆる種における筋肉量を増加させ、脂肪を減少させるのに有効であると予想される。

【０１９１】

本発明のミオスタチン結合分子は、その治療効果を高め、又は起こり得る副作用を減少させるために、単独で又は他の治療薬と組み合わせて使用することができる。本発明の分子は、薬剤の治療学的価値を向上させる諸特性の望ましいが予想されない１つ又はそれ以上の組み合わせを有する。これらの諸特性としては、増加した活性、増加した溶解性、低下した分解、増加した半減期、低下した毒性及び低下した免疫原性などが挙げられる。従って、本発明の分子は長期治療計画に有用である。さらに、本発明の化合物の親水性と疎水性はバランスが良好であり、これによって、インビトロと特にインビボの両方での使用にその有用性が高くなる。具体的には、本発明の化合物は、体内での吸収及び生物学的利用能を可能にする、水性媒体への適切な溶解度を有する一方で、化合物が特定の筋肉塊などの推定作用部位に向かって細胞膜を通り抜けることができる、脂質への溶解度も有する。

【０１９２】

本発明のミオスタチン結合分子は、適切な組成物中において有効投与量で投与すると、「対象」又はヒトを含めたあらゆる動物の治療に有用である。

【０１９３】

さらに、本発明のミオスタチン結合分子は、多数のアッセイにおいてミオスタチンを検出及び定量するのに有用である。これらのアッセイは、２００３年１２月１９日に出願された米国特許出願第１０／７４２，３７９号（ＵＳ２００４／０１８１０３３Ａ１号として公開された。）に詳述されている。

【０１９４】

一般に、本発明のミオスタチン結合分子は、例えば、Ａｓａｉ，ｅｄ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ，３７，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９３）に記載のアッセイと同様に、様々なアッセイにおいてミオスタチンに結合し、固定する捕捉剤として有用である。ミオスタチン結合分子は、何らかの方法で標識することができ、又はミオスタチンの検出及び定量を可能にするように標識された抗結合分子抗体などの第３の分子と反応させることができる。例えば、ミオスタチン結合分子又は第３の分子は、ビオチンなどの検出可能成分で修飾することができ、次いで酵素標識ストレプトアビジンなどの第４の分子又は他のタンパク質と結合させることができる。（Ａｋｅｒｓｔｒｏｍ（１９８５），Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １３５：２５８９；Ｃｈａｕｂｅｒｔ（１９９７），Ｍｏｄ Ｐａｔｈｏｌ １０：５８５）。

【０１９５】

あらゆる特定のアッセイを通じて、試薬の各組み合わせ後に温置及び／又は洗浄工程が必要になり得る。温置段階は約５秒から数時間、好ましくは約５分間から約２４時間までを変動することができる。しかしながら、温置時間は、アッセイ形式、溶液の体積、濃度などに依存する。通常、アッセイは、周囲温度で実施するが、ある温度範囲にわたって実施することができる。

【０１９６】
ＢＡＦＦ結合分子の治療的使用。本発明のＢＡＦＦ結合分子は、Ｂ細胞によって媒介される自己免疫疾患の治療に特に有用であり得る。特に、本発明のＢＡＦＦ結合分子は、全身性紅斑性狼瘡（ＳＬＥ）を含めた狼瘡並びに狼瘡関連疾患及び症状の治療、予防、寛解、診断又は予知に有用であり得る。他の好ましい適応症としては、Ｂ細胞リンパ腫を含めて、Ｂ細胞によって媒介される癌などが挙げられる。
【０１９７】
本発明の化合物は、関節の炎症性症状を治療するために使用することもできる。関節の炎症性症状は、世界中で数百万人が様々な程度で苦しみ、身体障害者になっている慢性関節疾患である。リウマチ様関節炎は、滑膜から誘導されるパンヌスと呼ばれる増殖性浸潤性結合組織によって軟骨及び骨が徐々に侵食されて無くなる関節疾患である。この疾患には、包、腱鞘及び腱などの関節周囲構造並びに皮下組織、心血管系、肺、脾臓、リンパ節、骨格筋、（中枢及び末梢）神経系及び眼などの関節外組織が関与し得る（Ｓｉｌｂｅｒｂｅｒｇ（１９８５），Ａｎｄｅｒｓｏｎ’ｓ Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ，Ｋｉｓｓａｎｅ（ｅｄ．），ＩＩ：１８２８）。骨関節炎は、関節軟骨における変性性変化並びに関節周囲の骨及び軟骨の反応性増殖を特徴とする一般的関節疾患である。骨関節炎は、異化及び同化刺激に対する軟骨細胞の不適当な応答に起因し得る細胞媒介性の活性なプロセスである。関節軟骨の一部のマトリックス分子の変化が初期の骨関節炎において発生するとされている（Ｔｈｏｎａｒ ｅｔ ａｌ．（１９９３），Ｒｈｅｕｍａｔｉｃ ｄｉｓｅａｓｅ ｃｌｉｎｉｃｓ ｏｆ Ｎｏｒｔｈ Ａｍｅｒｉｃａ，Ｍｏｓｋｏｗｉｔｚ（ｅｄ．），１９：６３５－６５７ ａｎｄ Ｓｈｉｎｍｅｉ ｅｔ ａｌ．（１９９２），Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｒｈｅｕｍ．，３５：１３０４－１３０８）。ＴＡＬＬ－１、ＴＡＬＬ－１Ｒ及びその調節物質は、これらの症状及び関係する症状の治療において有用であると考えられる。
【０１９８】
ＢＡＦＦ結合分子は、急性膵炎；ＡＬＳ；アルツハイマー病；ぜん息；アテローム性動脈硬化症；自己免疫性溶血性貧血；癌、特にＢ細胞に関係する癌；悪液質／食欲不振症；慢性疲労症候群；硬変（例えば、原発性胆汁性肝硬変）；糖尿病（例えば、インスリン糖尿病）；発熱；ＩｇＡ糸球体腎炎及び原発性糸球体腎炎を含めた糸球体腎炎；グッドパスチャー症候群；ギランバレー症候群；移植片対宿主病；橋本甲状腺腫；出血性ショック；痛覚過敏；炎症性腸疾患；骨関節炎、乾癬性関節炎及びリウマチ様関節炎を含めた関節の炎症性症状；挫傷、捻挫、軟骨損傷、外傷、整形外科手術、感染又は他の疾患過程に起因する炎症性症状；インスリン依存性糖尿病；脳虚血（例えば、各々が神経変性をもたらし得る、外傷、てんかん、出血又は卒中の結果としての脳傷害）を含めた虚血性傷害；学習障害；肺疾患（例えば、ＡＲＤＳ）；狼瘡、特に全身性紅斑性狼瘡（ＳＬＥ）；多発性骨髄腫；多発性硬化症；重症筋無力症；骨髄性（例えば、ＡＭＬ及びＣＭＬ）及び他の白血病；筋疾患（例えば、筋タンパク質代謝、特に敗血症）；（例えば、ＨＩＶによって誘導される）神経毒性；骨粗鬆症；疼痛；パーキンソン病；天疱瘡；多発性筋炎／皮膚筋炎；自己免疫肺炎症を含めた肺炎症；早産；乾癬；ライター病；再かん流傷害；敗血症ショック；放射線療法による副作用；シェーグレン症候群；睡眠障害；側頭下顎関節疾患；特発性血小板減少症及び自己免疫性新生児血小板減少症を含めた血小板減少症；腫瘍転移；ブドウ膜炎及び血管炎を含めて、多数のさらなる疾患及び障害の治療においても有用であり得る。
【０１９９】
併用療法。本発明の治療方法、組成物及び化合物は、血小板欠乏に加えて他の症候を特徴とする病態の治療において、単独で又は他のサイトカイン、可溶性Ｍｐｌ受容体、造血因子、インターロイキン、増殖因子若しくは抗体と組み合わせて使用することもできる。本発明の化合物は、ＩＬ－３、ＧＭ－ＣＳＦなど血球新生の一般的刺激物質と組み合わせて、血小板減少症の一部の形態を治療するのに有用であることが判明すると予測される。他の巨核球刺激因子、すなわち、ｍｅｇ－ＣＳＦ、幹細胞因子（ＳＣＦ）、白血病抑制因

子（ＬＩＦ）、オンコスタチンＭ（ＯＳＭ）又は巨核球刺激活性を有する他の分子をＭｐｌリガンドと一緒に使用することもできる。かかる同時投与用のさらなる例示的サイトカイン又は造血因子としては、ＩＬ－１アルファ、ＩＬ－１ベータ、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－１１、コロニー刺激因子－１（ＣＳＦ－１）、ＳＣＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、ＥＰＯ、インターフェロン－アルファ（ＩＦＮ－アルファ）、コンセンサスインターフェロン、ＩＦＮ－ベータ又はＩＦＮ－ガンマが挙げられる。さらに、巨核球が成熟型になった後に巨核球を血小板に断片化する効果を有すると考えられる可溶性哺乳動物Ｍｐｌ受容体の有効量を同時に又は逐次的に投与することが有用であり得る。従って、（成熟巨核球数を増加させるための）本発明の化合物の投与とそれに続く（リガンドを不活性化し、成熟巨核球が血小板を産生できるようにするための）可溶性Ｍｐｌ受容体の投与は、血小板産生を刺激する特に有効な手段であると予想される。上記投与量は、治療組成物中のかかる追加の成分を補うように調節される。治療した患者の経過は従来の方法によってモニターすることができる。

【０２００】

本発明の化合物を血小板及び／又は巨核球及び関連細胞の組成物に添加する場合には、添加量は、一般に、当分野で公知の技術及びアッセイによって実験的に確認される。例示的な量の範囲は、細胞10^6個当たり本発明の化合物０．１μｇ－１ｍｇである。

【０２０１】

トキシンペプチドを取り込んだ治療薬。

【０２０２】

本発明の組成物の幾つかの実施形態は、さらなる機能的部分としてトキシンペプチドを取り込み、トキシンペプチドは、目的とするイオンチャネル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、このような目的とするイオンチャネルへの結合能から得られる薬理学的活性を有することができる。その結果、本発明の組成物のこのような実施形態は、イオンチャネルと関連した病変の治療において有用性を有し得る。イオンチャネルに対して公知の関連性を有する遺伝疾患（「チャネル病」）は医学の様々な分野に及び、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。イオンチャネルを原因とする遺伝的疾患のリスト（カッコ内は、チャネルの種類には、

嚢胞性繊維症：（Cl^-チャネル；ＣＦＴＲ）；

デント病（タンパク質尿症及び高カルシウム尿症；Cl^-チャネル；ＣＬＣＮ５）；

骨粗鬆症（Cl^-チャネル；ＣＬＣＮ７）；家族性高インシュリン血症（ＳＵＲ１；ＫＣＮＪ１１；Ｋチャネル）；

糖尿病（ＫＡＴＰ／ＳＵＲチャネル）；

アンダーセン症候群（ＫＣＮＪ２、Ｋｉｒ２．１Ｋチャネル）；

バーター症候群（ＫＣＮＪ１；Ｋｉｒ１．１／ＲＯＭＫ；Ｋチャネル）；

遺伝性聴力喪失（ＫＣＮＱ４；Ｋチャネル）；

遺伝性高血圧（リドルの症候群；ＳＣＮＮ１；上皮性Ｎａチャネル）；

拡張性心筋症（ＳＵＲ２，Ｋチャネル）；

長いＱＴ症候群又は心臓不整脈（心臓のカリウム及びナトリウムチャネル）；

チモシー症候群　（ＣＡＣＮＡ１Ｃ，Ｃａｖ１．２）；

筋無力症候群（ＣＨＲＮＡ，ＣＨＲＮＢ，ＣＮＲＮＥ；ｎＡＣｈＲ）及び他の様々な筋症；

高カリウム性周期性四肢麻痺（Ｎａ及びＫチャネル）

てんかん（Na^+及びK^+チャネル）；

片麻痺片頭痛（ＣＡＣＮＡ１Ａ，Ｃａｖ２．１Ca^{2+}チャネル及びＡＴＰｌＡ２）；

セントラルコア病（ＲＹＲｌ，ＲｙＲｌ；Ca^{2+}チャネル）並びに筋緊張性痙攣及び筋緊張症（Na^+，Cl^-チャネル）

（Ｌ．Ｊ．Ｐｔａｃｅｋ ａｎｄ Ｙ－Ｈ Ｆｕ（２００４），Ａｒｃｈ．Ｎｅｕｒｏｌ．６１：１６６－８；Ｂ．Ａ．Ｎｉｅｍｅｙｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００１），ＥＭＢＯ ｒｅｐｏｒｔｓ ２１：５６８－７３；Ｆ．Ｌｅｈｍａｎｎ－Ｈｏｒｎ ａｎｄ

Ｋ．　Ｊｕｒｋａｔ－Ｒｏｔｔ（１９９９），　Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｒｅｖ．７９：１３１７－７２を参照されたい。）。前記リストは遺伝的起源の疾患に関するが、これらの疾患に引用されたチャネルを標的とする分子も、他の起源又は不確定な起源の関連する疾患を治療する上でも有用であり得る。

【０２０３】

先述の疾患の他に、鎌形赤血球貧血症（ＩＫＣａ１）の治療のための標的としてイオンチャネルを裏付ける証拠も提供されている。鎌形赤血球貧血症では、赤血球からの水分喪失がヘモグロビン重合並びにその後の溶血及び血管閉塞をもたらす。水分喪失は、いわゆるＧａｒｄｏｓチャネル、すなわち、ＩＫＣａ１を通じたカリウム流出の結果である。従って、ＩＫＣａ１の遮断は、鎌形赤血球貧血症に対する可能性を有する治療的処置である。緑内障（ＢＫＣａ）－緑内障では、眼内圧が高すぎて、眼神経損傷、異常な眼機能をもたらし、失明をもたらす場合があり得る。ＢＫＣａカリウムチャネルの遮断は、眼内液分泌を低減し、平滑筋収縮を増加させることができ、おそらく、より低い眼内圧及び眼内の神経保護をもたらす。

【０２０４】

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

糖尿病１型（Ｋｖ）。１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抵抗性を伴う。この疾病では、Ｋｖ１．３を発現しているＴリンパ球が膵島を攻撃及び破壊し、β細胞の喪失をもたらす。Ｋｖ１．３の遮断は、炎症性サイトカインを減少する。Ｋｖ１．３の遮断に加え、形質膜へのＧＬＵＴ４の転移を促進し、これにより、インシュリン感受性を増加させる。肥満（Ｋｖ）－Ｋｖ１．３は、エネルギー恒常性を調節する上で、及び食事によって誘導される肥満に対して保護する上で重大な役割を果たすようである。その結果、Ｋｖ１．３遮断剤は、代謝速度を増加させることができ、より大きなエネルギー利用及び減少した体重をもたらす。再狭窄（ＫＣａ、Ca^{2+}）－血管平滑筋細胞の増殖及び移動は、新生内膜肥厚及び血管の再狭窄をもたらすことができる。過剰な新生内膜血管平滑筋細胞増殖は、ＩＫＣａ１の上昇した発現を伴う。従って、ＩＫＣａ１の遮断は、血管形成術後の再狭窄を抑えるための治療的戦略に相当し得る。虚血（ＫＣａ、Ca^{2+}）－神経細胞又は心筋虚血において、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ネルの開口をもたらす。続いて、これは、細胞毒性であるカルシウム過剰負荷をもたらし得る。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させ、細胞保護効果を提供することができる。さらに、細胞膜電位を調節及び安定化させる上での重要な役割のために、電圧及びカルシウムによって活性化されたカリウムチャネルの調節物質は、カルシウムの過剰負荷を低下させ、細胞を保護するようにも作用することができる。腎失禁（ＫＣａ）、腎臓失禁は過活動膀胱平滑筋細胞を伴う。カルシウムによって活性化されたカリウムチャネルは、膀胱平滑筋細胞中で発現され、カルシウムによって活性化されたカリウムチャネルは膜電位を調節し、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たカリウムチャネルの開口物質は、膀胱中での電気的及び収縮活動を抑制するための機序を与え、排尿の切迫性が低下する。

【０２０５】

骨粗鬆症（Ｋｖ）；

疼痛（片頭痛を含む。（Na_v、ＴＲＰ［一過性受容体電位チャネル］、Ｐ２Ｘ、Ca^{2+}）、Ｎ型電圧開口型カルシウムチャネルは、脊髄中の侵害受容神経伝達の中心的制御物質である。Ｎ型カルシウムチャネルのペプチド遮断剤であるジコノチドは、侵害受容神経伝達を低下させ、ヒト内の重大な慢性疼痛の症候的緩和に関して、世界中で承認されている。侵害受容体特異的Ｎ型カルシウムチャネルの新規遮断剤は、低下した副作用特性を有する改善された鎮痛剤である。

【０２０６】

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、血管の平滑筋細胞中で発現されており、血管の平滑筋細胞中において、Ｌ型及びＴ型電圧開口型カルシウムチャンネルは興奮－収縮のカップリング及び細胞の増殖を調節する。特に、Ｔ型カルシウムチャネル活性は、高血圧の間に、新生内膜形成に関連している。Ｌ型及びＴ型カルシウムチャネルの遮断剤は、カルシウムの流入を低下させ、平滑筋細胞収縮を阻害するので、高血圧の臨床的治療に有用である。創傷治癒、細胞の遊走は、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、ケラチン産生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束は、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、イオンチャネルは、細胞遊走機構の作動に必要とされる細胞内環境に寄与する。特に、ＩＫＣａ１は、細胞遊走のために普遍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型カルシウムチャネルは、リンパ球及び神経細胞の遊走と関連している。

【０２０７】

アルツハイマー病；

パーキンソン病（ｎＡＣＨＲ、Ｎａｖ）；

躁鬱病（Ｎａｖ、Ｃａｖ）；

癌、多くの癌症状において、多くのカリウムチャネル遺伝子が増幅され、タンパク質サブユニットが上方制御されている。カリウムチャネル上方制御に対する病態生理学的役割と合致して、カリウムチャネル遮断剤は、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、子宮癌細胞及び肝臓癌細胞の増殖を抑制することが知られている。並びに、

様々な神経学的疾患、心臓血管疾患、代謝疾患及び自己免疫疾患。

【０２０８】

イオンチャネルのアゴニスト及びアンタゴニストの両者が、治療的な有益性を達成することができる。治療的な利点は、例えば、Ｋｖ１．３、ＩＫＣａ１、ＳＫＣａ、ＢＫＣａ、Ｎ型若しくはＴ型Ca^{2+}チャネルなどを拮抗させることによって生じ得る。これらのチャ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有用性を有することが示されている。

【０２０９】

電圧開口型カリウムチャネル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、特に、ＯＳＫ１ペプチド類縁体を含む組換え融合タンパク質は、半減期延長部分に連結されているか否かに関わらず、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、乾癬、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．Ｉｌｌ， １７０３－１７１３ ａｎｄ Ｈ．Ｒｕｓ ｅｔ ａｌ．（２００５） ＰＮＡＳ １０２， １１０９４－１ １０９９；Ｂｅｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．， Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｅｆｆｅｃｔｏｒ ｍｅｍｏｒｙ Ｔ ｃｅｌｌｓ ｗｉｔｈ ａ ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ｐｅｐｔｉｄｅ ｏｆ Ｋｖ１．３ ｃｈａｎｎｎｅｌｓ ｆｏｒ ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ ａｕｔｏｉｍｍｕｎｅ ｄｉｓｅａｓｅｓ， Ｍｏｌｅｃ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．６７（４）：１３６９－８１（２００５）；１ Ｂｅｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（２００６）， Ｋｖ１．３：ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｔａｒｇｅｔ ｆｏｒ ｃｅｌｌ

－ｍｅｄｉａｔｅｄ ａｕｔｏｉｍｍｕｎｅ ｄｉｓｅａｓｅ，ｅｌｅｃｔｒｏｎｉｃ ｐｒｅｐｒｉｎｔ ａｔ ｗｅｂｆｉｌｅｓ．ｕｃｉ．ｅｄｕ／ｘｙｔｈｏｓｗｆｓ／ｗｅｂｕｉ／２６７００２９．１を参照されたい。）。電圧開口型カリウムチャネルＫｖ１．３の阻害剤は、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） ＭｏＩ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．６７，１３６９］及びテタヌストキソイド［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。皮膚内の炎症を抑制することに加えて、阻害剤は、抗体の産生も低下させた［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）のラット養子伝達実験的自己免疫性ｅｎｃｅｐｈａｌｏｍｙｅｌｉｔｉｓ（ＡＴ－ＥＡＥ）モデル中で効力を示した。Ｋｖ１．３チャネルは、ＭＳ患者から得たミエリン特異的Ｔ細胞上において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与える。炎症性骨再吸収も、歯周病の前臨床養子伝達モデルにおいて、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］。この研究において、阻害剤は、細菌の外膜タンパク質（歯肉の炎症を誘導するために使用される細菌の一成分）に対する抗体の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、プリスタンによって誘導された関節炎及び糖尿病を治療する上で、Ｋｖ１．３阻害剤の効力が示された。［Ｃ．Ｂｅｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（２００６）ウェブファイル：ｕｃｉ．ｅｄｕ／ｘｙｔｈｏｓｗｆｓ／ｗｅｂｕｉ／＿ｘｙ－２６７００２９＿１からｐｒｅｐｒｉｎｔを入手可能］。Ｋｖ１．３チャネルは、Ｔ細胞及びＢ細胞の全ての亜群上において発現されているが、エフェクター記憶Ｔ細胞及びクラススイッチされた記憶Ｂ細胞は、とりわけ、Ｋｖ１．３依存性である［Ｈ．Ｗｕｌｆｆ ｅｔ ａｌ．（２００４） Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７３，７７６］。新規発症１型糖尿病を有する患者から得たＧａｄ５／インシュリン特異的Ｔ細胞、ＭＳ患者から得たミエリン特異的Ｔ細胞及び関節リウマチ患者の滑膜液から得たＴ細胞は全てＫｖ１．３を過剰発現している［Ｃ．Ｂｅｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（２００６） ウェブファイル：ｕｃｉ．ｅｄｕ／ｘｙｔｈｏｓｗｆｓ／ｗｅｂｕｉ／＿ｘｙ－２６７００２９＿１からｐｒｅｐｒｉｎｔを入手可能］。Ｋｖ１．３が欠乏しているマウスは、高脂肪食を与えたときに、体重増加の程度が少なく［Ｊ．Ｘｕ ｅｔ ａｌ．（２００３） ＨｕｍａｎＭｏＩ．Ｇｅｎｅｔ．１２，５５１］、変化を受けたグルコースの利用を示した［Ｊ．Ｘｕ ｅｔ ａｌ．（２００４） Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１０１，３１１２］。Ｋｖ１．３は、肥満及び糖尿病の治療に関しても調べられてきた。乳癌の試料［Ｍ．Ａｂｄｕｌ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２３，３３４７］及前立腺癌細胞株［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の遮断が癌の治療のために有用であり得る。本発明の融合タンパク質（Ｋｖ１．３阻害剤トキシンペプチドを含む。）で治療することができる疾患には、多発性硬化症、１型糖尿病、乾癬、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、炎症性骨再吸収、移植拒絶、移植片対宿主病並びに全身性紅斑性狼瘡（ＳＬＥ）及び狼瘡の他の形態が含まれる。

【０２１０】

中間伝導度ＩＫＣａ１のカルシウム活性化された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が欠損しているマウスから得た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］。前臨床及び臨床的研究は、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．Ｓｔｏｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００３） Ｂｌｏｏｄ １０１

，２４１２；ｗｗｗ．ｉｃａｇｅｎ．ｃｏｍ］。ＩＫＣａ１チャネルの遮断剤はＥＡＥを遮断することも示されており、ＩＫＣａ１チャネルの遮断剤がＭＳの治療において有用性を有し得ることを示唆している［Ｅ．Ｐ．Ｒｅｉｃｈ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３５，１０２７］。肥満細胞からのＩｇＥ媒介性ヒスタミン産生も、ＩＫＣａ１阻害剤によって遮断され［Ｓ．Ｍａｒｋ Ｄｕｆｆｙ ｅｔ ａｌ．（２００４）Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１４，６６］、従って、ＩＫＣａ１阻害剤は喘息を治療する上でも有益であり得る。ＩＫＣａ１チャネルは、活性化されたＴ及びＢリンパ球上において過剰発現されており［Ｈ．Ｗｕｌｆｆ ｅｔ ａｌ．（２００４）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７３，７７６］、従って、多岐にわたる免疫疾患の治療において有用性を示し得る。免疫系の枠外において、ＩＫＣａ１阻害剤は、血管再狭窄のラットモデルにおいても効力を示しており、従って、血管形成術後の再狭窄を防ぐための新しい治療的戦略となり得る［Ｒ．Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ １０８，１１１９］。阻害剤はインビボでの内皮細胞の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も有用であると考えられる［Ｉ．Ｇｒｇｉｃ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ．Ｔｈｒｏｍｂ．Ｖａｓｅ．Ｂｉｏｌ．２５，７０４］。ＩＫＣａ１チャネルは膵臓腫瘍中において上方制御されており、阻害剤は膵臓腫瘍細胞株の増殖を遮断した［Ｈ．Ｊａｇｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００４）ＭｏＩ 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の脳損傷を和らげるためのアプローチにもなり得る［Ｆ．Ｍａｕｌｅｒ（２００４）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．２０，１７６１］。ＩＫＣａ１阻害剤を含む本発明の組換え融合タンパク質で治療することができる疾患には、多発性硬化症、喘息、アレルギー、乾癬、接触媒介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、１型糖尿病、炎症性腸疾患、繊維症、強皮症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、炎症性骨再吸収、全身性硬化症、移植拒絶、移植片対宿主病、全身性紅斑性狼瘡（ＳＬＥ）及び狼瘡の他の形態、再狭窄、膵臓癌、腫瘍血管新生並びに外傷性脳傷害が含まれる。

【０２１１】

従って、中間的伝導度のカルシウム活性型カリウムチャ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であるＩＫＣａは、を治療するために使用することができる。

【０２１２】

本明細書に記載されている疾病及び薬理学的に活性な組成物は例示に過ぎず、いかなる意味においても、本発明の方法を用いて調製することができる本発明の薬理学的に活性な化合物及び組成物又は本発明の利点とともに治療することができる疾病及び疾患の範囲を限定するものではない。

【０２１３】

従って、本発明は、本明細書中に記載されている疾病、疾患又はその他の医学的症状を治療又は予防するための医薬の製造における、本発明の組成物の１つ又はそれ以上の使用にも関する。

【０２１４】

このような医薬組成物は、多様な送達経路、例えば、注射若しくは注入などの血管内送達経路、皮下、筋肉内、腹腔内、硬膜外若しくはくも膜下腔内送達経路、又は経口、経腸、経肺（例えば、吸入剤）、鼻内、経粘膜（例えば、舌下投与）、経皮又は本分野において公知の他の送達経路及び／又は投与形態によって、患者に投与するために構成することができる。本発明の医薬組成物は、液体形態で調製され得、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、薬用キャンディー、水性若しくは油性懸濁物、分散可能な粉末若しくは顆粒、乳剤、硬若しくは軟カプセル、シロップ、エリキシル又は腸処方として構成され得る。

【０２１５】

医薬組成物

総論。本発明は、本発明の組成物及び医薬として許容される担体を含む医薬組成物も提供する。かかる医薬組成物は、多岐にわたる送達経路、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、硬膜外若しくはくも膜下腔内送達経路、又は経口、経腸、経肺（例えば、吸入）、鼻内、経粘膜（例えば、舌下投与）、経皮又は本分野において公知の他の送達経路及び／又は投与形態によって、患者に投与するために構成することができる。本発明の医薬阻止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、薬用キャンディー、水性若しくは油性懸濁物、分散可能な粉末若しくは顆粒、乳剤、硬若しくは軟カプセル、シロップ、エリキシル又は腸処方として構成され得る。

【０２１６】

本発明の実施において、「医薬として許容される担体」は、医薬として許容される希釈剤、賦形剤、分散剤、結合剤、充填剤、流動促進剤、減摩剤、圧縮補助剤、錠剤崩壊剤（崩壊剤）、懸濁剤、潤滑剤、着香剤、着臭剤、甘味剤、浸透又は貫通増強剤、防腐剤、界面活性剤、可溶化剤、乳化剤、濃縮剤、佐剤、色素、コーティング、封入材料及び／又は他の添加物を単独で又は組み合わせて含む、医薬組成物を製剤化する上で有用な、当業者に公知のあらゆる生理的に許容される物質である。かかる医薬組成物としては、様々な緩衝剤含有物（例えば、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、酢酸塩、リン酸塩）、ｐＨ及びイオン強度の希釈剤；洗浄剤及び可溶化剤（例えば、Ｔｗｅｅｎ（Ｒ）８０、Ｐｏｌｙｓｏｒｂａｔｅ８０）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、防腐剤（例えば、Ｔｈｉｍｅｒｓｏｌ（Ｒ）、ベンジルアルコール）、充填物質（例えば、ラクトース、マンニトール）などの添加剤；ポリ乳酸、ポリグリコール酸などの重合体化合物の粒子調製物中への又はリポソーム中への材料の取り込みなどが挙げられる。ヒアルロン酸も使用することができ、ヒアルロン酸は、循環中の持続期間を延長する効果を有し得る。かかる組成物は、本タンパク質及び誘導体の物理的状態、安定性、インビボでの放出速度及びインビボでのクリアランス速度に影響を及ぼし得る。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れるＲｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８ｔｈ Ｅｄ．（１９９０，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ １８０４２）１４３５－１７１２ページを参照されたい。本組成物は、液体の形で調製することができ、又は凍結乾燥体などの乾燥された粉末であり得る。経皮製剤又は経粘膜製剤同様、移植可能な徐放性製剤も有用である。これに加えて（又はこれに代えて）、本発明は、肺、鼻内又は皮下送達経路を介して投与することができる、当業者に公知の様々な遅延若しくは徐放製剤又は微粒子製剤（例えば、徐放微粒子製剤）の何れかにおいて使用するための組成物も提供する。（例えば、Ｍｕｒｔｈｙ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｊｅｃｔａｂｌｅ ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌｌｙ ａｃｔｉｖｅ ｃｏｍｐｏｕｎｄ，Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ Ｎｏ．６，８８７，４８７；Ｍａｎｎｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｓｏｌｕｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ ｓｕｂｓｔａｎｃｅｓ ｉｎ ａｎ ｏｒｇａｎｉｃ ｓｏｌｖｅｎｔ ａｎｄ ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ ｐｏｗｄｅｒｓ ｕｓｉｎｇ ｔｈｅ ｓａｍｅ，米国特許第５，７７０，５５９号及び同第５，９８１，４７４号；Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｌｉｐｏｐｈｉｌｉｃ ｃｏｍｐｌｅｘｅｓ ｏｆ ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌｌｙ ａｃｔｉｖｅ ｉｎｏｒｇａｎｉｃ ｍｉｎｅｒａｌ ａｃｉｄ ｅｓｔｅｒｓ ｏｆ ｏｒｇａｎｉｃ ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ，米国特許第５，００２，９３６号；Ｇｅｎ，Ｆｏｒｍａｔｉｖｅ ａｇｅｎｔ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｃｏｍｐｌｅｘ，ＵＳ２００２／０１１９９４６Ａ１；Ｇｏｌｄｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｓｕｓｔａｉｎｅｄ ｒｅｌｅａｓｅ ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎｓ，ＷＯ ２００５／１０５０５７Ａ１）。

【０２１７】

不活性材料で本発明の組成物を希釈し、又は医薬組成物の体積を増加させることができ

る。かかる希釈剤としては、炭水化物、特にマンニトール、α－ラクトース、無水ラクトース、セルロース、スクロース、改変デキストラン、デンプンなどが挙げられる。三リン酸カルシウム、炭酸マグネシウム及び塩化ナトリウムを含めて、ある種の無機塩も充填剤として使用することができる。幾つかの市販されている希釈剤はＦａｓｔ－Ｆｌｏ、Ｅｍｄｅｘ、ＳＴＡ－Ｒｘ　１５００、Ｅｍｃｏｍｐｒｅｓｓ及びＡｖｉｃｅｌｌである。

【０２１８】

アルギナート、キサンタンガム又はペトロラタムなどの（但し、これらに限定されない。）様々な慣用の濃縮剤が医薬組成物のクリーム、軟膏、坐剤及びゲル構成において有用であり、本発明の医薬組成物のかかる構成においても使用され得る。ポリエチレングリコールモノラウラート、ジメチルスルホキシド、Ｎ－ビニル－２－ピロリドン、Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）－ピロリドン又は３－ヒドロキシ－Ｎ－メチル－２－ピロリドンなどの浸透又は透過増強物質も使用することができる。ヒドロゲルマトリックスを作製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，　ＷＯ００／３８６５１Ａ１）。かかる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多糖成分を架橋し、次いで、送達すべき本発明の組成物を搭載することによって形成することができる。

【０２１９】

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、くも膜下腔内、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できる。　（例えば、Ｇｏｌｄｅｎｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｓｕｓｐｅｎｓｉｏｎｓ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　ｓｕｓｔａｉｎｅｄ　ｒｅｌｅａｓｅ　ｏｆ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ，米国特許第６，２４５，７４０号及びＷＯ００／３８６５２Ａ１）を参照されたい。無菌溶液は、静脈内注入によって投与することもできる。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の注射可能溶媒を用いた患者への投与前の適宜の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）の中に含めることが可能である。

【０２２０】

移植可能な徐放製剤も、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非ヒト脊椎動物の皮下に移植される生物分解可能なマトリックスである。）は、上述されているものに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）。薬物送達用の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。

【０２２１】

粉末形態において、医薬として許容される担体は、本発明の組成物を含む細かく分割された固体（細かく分割された活性成分との混合物である。）である。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る場合、粉末形態が有用である。（例えば、Ｚｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｍｅｔｈｏｄ　ｏｆ　ｐｒｅｐａｒｉｎｇ　ｄｒｙ　ｐｏｗｄｅｒ　ｉｎｈａｌａｔｉｏｎ　ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ，　ＷＯ２００４／０１７９１８；Ｔｒｕｎｋ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｓａｌｔｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　ＣＧＲＰ　ａｎｔａｇｏｎｉｓｔ　ＢＩＢＮ４０９６　ａｎｄ　ｉｎｈａｌａｂｌｅ　ｐｏｗｄｅｒｅｄ　ｍｅｄｉｃａｍｅｎｔｓ　ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ　ｔｈｅｍ，米国特許第６，９００，３１７号参照。）。

【０２２２】
不活性材料を用いて、本発明の化合物の体積を希釈し、又は増加させることができる。これらの希釈剤には、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が含まれ得る。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の充填剤としても使用することができる。幾つかの市販の希釈剤は、Ｆａｓｔ－Ｆｌｏ™、Ｅｍｄｅｘ™、ＳＴＡ－Ｒｘ™１５００、Ｅｍｃｏｍｐｒｅｓｓ™及びＡｖｉｃｅｌｌ™である。

【０２２３】
医薬組成物の処方において崩壊剤を固体剤形に含めることができる。崩壊剤として使用される材料としては、デンプンを主成分とする市販の崩壊剤Ｅｘｐｌｏｔａｂ™を含めたデンプンなどが挙げられるが、これだけに限定されない。デンプングリコール酸ナトリウム、Ａｍｂｅｒｌｉｔｅ™、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ウルトラミロペクチン（ｕｌｔｒａｍｙｌｏｐｅｃｔｉｎ）、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、オレンジの皮、酸カルボキシメチルセルロース（ａｃｉｄ　ｃａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌ　ｃｅｌｌｕｌｏｓｅ）、天然海綿及びベントナイトは全て使用することができる。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及び結合剤として使用することができ、ゴム粉末としては寒天、カラヤ、トラガカントなどの粉末化されたゴムが挙げられる。アルギン酸及びそのナトリウム塩も崩壊剤として有用である。

【０２２４】
結合剤は治療薬を結合して硬い錠剤を形成するために、使用することができ、アラビアゴム、トラガカントゴム、デンプン及びゼラチンなどの天然物由来の材料などが挙げられる。他の結合剤としては、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）などが挙げられる。ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）とヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）はどちらもアルコール溶液中で治療薬を顆粒化するのに使用することができる。

【０２２５】
減摩剤は、製剤プロセス中の粘着を防止するために、治療薬の処方に含めることができる。潤滑剤は、治療薬とダイ壁との間の層として使用することができ、そのマグネシウム塩及びカルシウム塩を含めたステアリン酸、ポリテトラフルオロエチレン（ＰＴＦＥ）、流動パラフィン、植物油及び蝋などが挙げられるが、これらだけに限定されない。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、カーボワックス４０００及び６０００などの可溶性潤滑剤も使用することができる。

【０２２６】
製剤化中の薬物の流動特性を改善することができ、圧縮中の再配列を助ける流動促進剤を添加することもできる。流動促進剤としては、デンプン、タルク、熱分解法シリカ及び水和アルミノケイ酸塩などが挙げられる。

【０２２７】
水溶液環境への本発明の化合物の溶解を助けるために、界面活性剤を湿潤剤として添加することができる。界面活性剤としては、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、スルホン酸ジオクチルナトリウムなどの陰イオン性洗剤などが挙げられる。陽イオン洗剤も使用することができ、塩化ベンザルコニウム又は塩化ベンゼトニウムなどが挙げられる。界面活性剤として製剤に含めることができる非イオン洗剤候補のリストは、ラウロマクロゴール４００、ステアリン酸ポリオキシル４０、ポリオキシエチレン水添ヒマシ油１０、５０及び６０、モノステアリン酸グリセリン、ポリソルベート４０、６０、６５及び８０、ショ糖脂肪酸エステル、メチルセルロース及び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。

【０２２８】
経口剤形

本発明の組成物の経口固体剤形も有用である。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）胃又は腸から血流中への取り込みを可能とする。化合物の全般的安定性の増加及び体内循環時間の延長も望まれる。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である成分をこの目的に使用することもできる。かかる部分の例としては、ＰＥＧ、エチレングリコールとプロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン及びポリプロリンが挙げられる。例えば、Ａｂｕｃｈｏｗｓｋｉ ａｎｄ Ｄａｖｉｓ（１９８１），Ｓｏｌｕｂｌｅ Ｐｏｌｙｍｅｒ－Ｅｎｚｙｍｅ Ａｄｄｕｃｔｓ，Ｅｎｚｙｍｅｓ ａｓ Ｄｒｕｇｓ（１９８１），Ｈｏｃｅｎｂｅｒｇ ａｎｄ Ｒｏｂｅｒｔｓ，ｅｄｓ．，Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ，，ｐｐ３６７－８３；Ｎｅｗｍａｒｋ，ｅｔ ａｌ．（１９８２），Ｊ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．４：１８５－９を参照されたい。使用することができる他のポリマーは、ポリ－１，３－ジオキソラン及びポリ－１，３，６－トリオキソカン（ｔｉｏｘｏｃａｎｅ）である。薬剤の使用に好ましいのは、上述したように、ＰＥＧ部分である。

【０２２９】

経口送達剤形の場合には、本発明の治療化合物の吸収を増強する担体としてＮ－（８－［２－ヒドロキシベンゾイル］アミノ）カプリル酸ナトリウム（ＳＮＡＣ）などの改変された脂肪族アミノ酸の塩を使用することもできる。ＳＮＡＣを用いたヘパリン製剤の臨床効果は、Ｅｍｉｓｐｈｅｒｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによって実施された第二相試験において実証された。米国特許第５，７９２，４５１号「Ｏｒａｌ ｄｒｕｇ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎ ａｎｄ ｍｅｔｈｏｄｓ」を参照されたい。

【０２３０】

一実施形態において、医薬として許容される担体は液体であり得、医薬組成物は溶液、懸濁液、エマルジョン、シロップ、エリキシル又は加圧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、又は懸濁され得る。液体担体は、界面活性剤及び／又は可溶化剤（例えば、Ｔｗｅｅｎ８０、Ｐｏｌｙｓｏｒｂａｔｅ８０）、乳化剤、適切なｐＨの緩衝液（例えば、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、酢酸塩、リン酸塩）、佐剤、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、チメルソール、ベンジルアルコール）、甘味料、着香剤、懸濁剤、濃縮剤、充填物質（例えば、ラクトース、マニトール）、色素、粘度制御物質、安定化剤、電解質、ｏｓｍｏｌｕｔｅｓ@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できる。本発明の組成物の取り込みを強化するために、製剤中に添加剤を含めることもできる。この特性を有する可能性を秘めた添加物は、例えば、脂肪酸であるオレイン酸、リノール酸及びリノレン酸である。

【０２３１】

「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（１９９０）、上記、８９章」（その全体が、参照により、本明細書に組み込まれる。）中に一般的に記載されている経口固体剤形が有用である。固体剤形には、錠剤、カプセル、丸薬、トローチ又は薬用キャンデー、カシェ剤又は小丸薬が含まれる。また、本発明の組成物を調合するために、リポソーム封入又は（米国特許第４，９２５，６７３号に報告されているタンパク質様小球体のような）タンパク質様封入を使用することができる。リポソーム封入を使用することが可能であり、リポソームは、様々なポリマーで誘導化することができる（例えば、米国特許第５，０１３，５５６号）。治療薬に関する可能な固体剤形の記述は、「Ｍａｒｓｈａｌｌ，Ｋ．，Ｍｏｄｅｒｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ（１９７９）、Ｇ．Ｓ．Ｂａｎｋｅｒ ａｎｄ Ｃ．Ｔ．Ｒｈｏｄｅｓ編集、１０章」（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に与えられている。一般に、製剤は、本発明の化合物と及び胃環境に対する保護及び腸内での生物活性物質の放出を可能と

する不活性成分とを含む。

【０２３２】

本発明の組成物は、約１ｍｍの粒径の顆粒又は小丸薬の形態の微細な多粒状物として製剤中に含めることができる。カプセル投与用の物質の製剤は、粉末、僅かに圧縮された栓又は錠剤としてでもあり得る。治療薬は、圧縮によって調製することができる。

【０２３３】

着色剤及び着香剤は全て含めることができる。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）を処方し、次いで着色剤及び着香剤を含有する冷蔵飲料などの可食生成物内にさらに含有させることができる。

【０２３４】

錠剤形態では、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活性成分が混合され、所望される形状及びサイズへ圧縮される。

【０２３５】

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、ポリビニルピロリジン、低融解蝋及びイオン交換樹脂が含まれる。

【０２３６】

制御放出製剤が望ましい場合があり得る。本発明の組成物は、拡散又は浸出機序による放出を可能にする不活性マトリックス、例えばゴム中に取り込ませることができる。徐々に劣化するマトリックス、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できる。本発明の組成物の制御放出の別の形態は、Ｏｒｏｓ^{TM}治療システム（Ａｌｚａ Ｃｏｒｐ．）に基づく方法によるものである。すなわち、薬物は、浸透圧効果のために単一の小さな開口を通って水が入り、薬物を押し出す半透膜中に封入されている。一部の腸溶コーティングは、遅延放出効果も有する。

【０２３７】

他のコーティングを製剤に使用することができる。他のコーティングとしては、コーティングパンに適用することができる様々な糖などが挙げられる。治療薬はフィルムコート錠中に与えることもでき、この場合に使用される材料は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材料であり、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、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ポビドン（ｐｒｏｖｉｄｏｎｅ）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、一般にフタル酸のエステルである腸溶材料からなる。

【０２３８】

最適なフィルムコーティングを提供するために材料の混合物を使用することができる。フィルムコーティングは、パンコーター若しくは流動層中に、又は圧縮コーティングによって実施することができる。

【０２３９】

肺送達形態

本発明の組成物の肺送達も有用である。タンパク質（又は誘導体）は、吸入中に哺乳動物の肺に送達され、肺上皮内層（ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ ｌｉｎｉｎｇ）を通り抜けて血流に入る。（肺送達の他の報告としては、Ａｄｊｅｉ ｅｔ ａｌ．, Ｐｈａｒｍａ．Ｒｅｓ．（１９９０）７：５６５－９；Ａｄｊｅｉ ｅｔ ａｌ．（１９９０）, Ｉｎｔｅｒｎａｔｌ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ ６３：１３５－４４（酢酸ロイプロリド）；Ｂｒａｑｕｅｔ ｅｔ ａｌ．（１９８９）, Ｊ．Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．１３（ｓｕｐｐｌ．５）：ｓ．１４３－１４６（エンドセリン－１）；Ｈｕｂｂａｒｄ ｅｔ ａｌ．（１９８９）, Ａｎｎａｌｓ Ｉｎｔ．Ｍｅｄ．３：２０６－１２（α１－抗トリプシン）；Ｓｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ．（１９８９）, Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．８４：

１１４５－６（α１－プロテイナーゼ）；Ｏｓｗｅｉｎ ｅｔ ａｌ．（Ｍａｒｃｈ １９９０），”Ａｅｒｏｓｏｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ”，Ｐｒｏｃ．Ｓｙｍｐ．Ｒｅｓｐ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ＩＩ，Ｋｅｙｓｔｏｎｅ，Ｃｏｌｏｒａｄｏ（組換えヒト成長ホルモン）；Ｄｅｂｓ ｅｔ ａｌ．（１９８８），Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４０：３４８２－８（インターフェロン－γ及び腫瘍壊死因子α）、Ｐｌａｔｚ ｅｔ ａｌ．、米国特許第５，２８４，６５６号（顆粒球コロニー刺激因子）などが挙げられる。）。

【０２４０】

本発明の実施において有用なのは、全て当業者によく知られた、ネブライザー、定量吸入器及び粉末吸入器を含めて、但しこれらだけに限定されない、治療薬の肺送達用に設計された様々な機械装置である。本発明の実施に適切な市販装置の幾つかの具体例は、Ｍａｌｌｉｎｃｋｒｏｄｔ，Ｉｎｃ．、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、Ｍｉｓｓｏｕｒｉによって製造されているＵｌｔｒａｖｅｎｔネブライザー、Ｍａｒｑｕｅｓｔ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、Ｅｎｇｌｅｗｏｏｄ、Ｃｏｌｏｒａｄｏによって製造されているＡｃｏｒｎ ＩＩネブライザー、Ｇｌａｘｏ Ｉｎｃ．、Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｔｒｉａｎｇｌｅ Ｐａｒｋ、Ｎｏｒｔｈ Ｃａｒｏｌｉｎａによって製造されているＶｅｎｔｏｌｉｎ定量吸入器及びＦｉｓｏｎｓ Ｃｏｒｐ．、Ｂｅｄｆｏｒｄ、Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓによって製造されているＳｐｉｎｈａｌｅｒ粉末吸入器である。(例えば、Helgesson et al., Inhalation device,米国特許第6,892,728号; McDerment et al., Dry powder inhaler, WO 02/11801 Al ; Ohki et al., Inhalant medicator, 米国特許第6,273,086号を参照されたい。)。

【０２４１】

かかる装置は全て、本発明の化合物の投与に適切な製剤を使用する必要がある。典型的には、各製剤は、使用する装置のタイプに特異的であり、治療に有用な希釈剤、佐剤及び／又は担体に加えて、適切な噴霧材料を使用することを含み得る。

【０２４２】

本発明の化合物は、末端の肺に最も効果的に送達するために、平均粒径１０μｍ（又はミクロン）未満、最も好ましくは０．５から５μｍの粒子形態で最も有利には調製すべきである。

【０２４３】

医薬として許容される賦形剤としては、トレハロース、マンニトール、キシリトール、スクロース、ラクトース及びソルビトールなどの炭水化物などが挙げられる。製剤に使用する他の成分としては、ＤＰＰＣ、ＤＯＰＥ、ＤＳＰＣ及びＤＯＰＣなどを挙げることができる。天然又は合成界面活性剤を使用することができる。（タンパク質又は類縁体の誘導体化におけるその使用を別にしても）ＰＥＧを使用することができる。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係する賦活薬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。緩衝製剤中での使用など、アミノ酸を使用することができる。

【０２４４】

また、リポソーム、マイクロカプセル若しくはミクロスフェア、包接複合体又は担体の他のタイプが企図される。

【０２４５】

噴射又は超音波のネブライザーと一緒に使用するのに適切な製剤は、典型的には、溶液１ｍＬ当たり生物活性タンパク質約０．１から２５ｍｇの濃度で水に溶解させた本発明の化合物を含む。製剤は、（例えば、タンパク質安定化及び浸透圧調節用の）緩衝剤及び単糖を含むこともできる。ネブライザー製剤は、エアゾールを形成する際の溶液の微粒化によって引き起こされる、表面誘導されたタンパク質凝集を抑制又は防止するために、界面活性剤を含むこともできる。

【０２４６】

定量吸入装置と一緒に使用される製剤は、一般に、界面活性剤の補助を得て、噴射剤中

に懸濁された、本発明の化合物を含有する細かく分割された粉末を含む。噴射剤は、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及び１，１，１，２－テトラフルオロエタンを含めて、クロロフルオロ炭素、ヒドロクロロフルオロ炭素、ヒドロフルオロ炭素若しくは炭化水素又はこれらの組み合わせなどこの目的で使用されるあらゆる従来の材料とすることができる。適切な界面活性剤としては、トリオレイン酸ソルビタン及びダイズレシチンなどが挙げられる。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。)。

【０２４７】

粉末吸入装置投与用製剤は、本発明の化合物を含有する細かく分割された乾燥粉末を含み、装置からの粉末の分散を容易にする量、例えば、製剤の５０から９０重量％のラクトース、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の充填剤を含むこともできる。

【０２４８】

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、肺内への産物の堆積の必要なしに、鼻の内側への投与後、組成物が血流へ直接通過することが可能となる。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加えたものが含まれ、鼻内送達装置が公知である（例えば、Ｆｒｅｅｚｅｒ，Ｉｎｈａｌｅｒ，米国特許第４，０８３，３６８号）。

【０２４９】

経皮及び経粘膜（例えば、口頬）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システム、例えば、マトリックス型経皮パッチが公知であり、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号及び米国特許第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的である。（例えば、Ｈｅｉｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｍｕｃｏｓａｌ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｄｒｕｇｓ，米国特許第５，３４６，７０１号及び米国特許第５，５１６，５２３号；Ｌｏｎｇｅｎｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｍｅｍｂｒａｎｅ ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ｄｒｕｇ ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ，米国特許第Ｎｏ．４，９９４，４３９号）。

【０２５０】

本発明の組成物の口頬送達も有用である。口頬送達製剤は、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、口の粘膜（例えば、舌下粘膜）を通じた薬物

送達用に構成された公知の錠剤又はパッチシステムには、薬物を含有する内層、胆汁酸又はフシダートなどの浸透増強剤及びヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、デキストラン、ペクチン、ポリビニルピロリドン、デンプン、ゼラチン又はこの目的に有用である公知の他のポリマーの任意の数などの親水性ポリマーを含む。この内層は口腔の湿った粘膜組織に接触し、接着するように適合された１つの表面を有することができ、重層する非接着性の不活性層に付着させる反対側表面を有することができる。場合によって、このような経粘膜送達システムは二層錠剤の形態であり得、その中で、内層はさらなる結合剤、着香剤又は充填剤も含有する。幾つかの有用なシステムは、浸透増強剤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の遊離形態であり得、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、接着層、裏打ち層、本発明の組成物を含有する貯蔵槽を画する透過性膜、膜の下に存在する剥離シールディスク、１つ又はそれ以上の熱シール及び除去可能な放出ライナーの積層化された複合物を含む経粘膜送達システムを介し得る。（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例示に過ぎず、本発明を限定するものではない。

【０２５１】

投与量。上記症状の治療方法に関わる投与計画は、薬物の作用を加減する様々な要因、例えば患者の年齢、症状、体重、性別及び食事、何らかの感染の重症度、投与時間及び他の臨床上の要因を考慮して、主治医によって決定される。一般に、毎日の投薬計画は、体重１キログラム当たり本発明の化合物０．１－１０００マイクログラム、好ましくは０．１－１５０マイクログラム／キログラムの範囲とすべきである。

【０２５２】

以下の実施例は例示であり、いかなる意味においても、本発明の範囲を限定するものと解釈すべきではない。

【実施例】

【０２５３】

（実施例１）

融合タンパク質の発現及び生物活性

原核生物宿主中での高レベル発現を補助するために、及び不活性な担体に対する活性ペプチドの質量比に利点を与えるために、小サイズに関してヒトタンパク質ドメインを選択した。融合タンパク質の小サイズは、固有の分子に対して短い血清半減期をもたらすと予想され、短い血清半減期は、ＰＧＥ部分又は様々な質量及び立体構成のその他の半減期延長部分を付着することによって治療上の必要性に合致させるために、分子の薬物速度論特性の調節を可能とし得る。

【０２５４】

薬理学的に不活性な小タンパク質ドメインの選択。さらなる調査のために、以下のファミリーから得られる小タンパク質ドメインを選択した。ＩｇＧ１のＣＨ２ドメイン、第１０フィブロネクチンＩＩＩドメイン、ビリンヘッドピースドメイン、数個のＳＨ３ドメイン、数個のＰＤＺドメイン及び数個のＳＨ２ドメイン。二量体化に関与していない遍在性ＩｇＧ１分子中の唯一のドメインであるので、免疫グロブリンフォールドスーパーファミリーを代表するために、ＣＨ２ドメインを選択した。第１０フィブロネクチンＩＩＩドメインは安定なドメインであり、このファミリーの多くの他のメンバー中に見出されるジスルフィド結合を欠如しているので、免疫グロブリンの折り畳みを表すために第１０フィブロネクチンＩＩＩドメインも選択した。フィブロネクチンは、細胞接着、細胞移動性、オ

プソニン化、創傷治癒及び細胞形状の維持に関与する細胞外タンパク質である。Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄａｔａｂａｎｋに構造的座標が入手可能な５１のヒトＰＤＺドメインの分岐したファミリーから、３つのＰＤＺドメインを選択した（図１）。ＰＤＺドメインは、Ｃ末端ペプチドを好み、シグナル伝達複合体をしばしば形成する細胞内ペプチド結合ドメインである。Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄａｔａｂａｎｋに構造的座標が入手可能な７４のヒトＳＨ３ドメインの分岐したファミリーから、３つのＳＨ３ドメインを選択した（図２）。ＳＨ３ドメインは、細胞内プロリンモチーフ（ＰｘｘＰ）認識及び結合ドメインである。さらに、Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄａｔａｂａｎｋに構造的座標が入手可能な２２のヒトＳＨ２ドメインの分岐ファミリーから、２つのＳＨ２ドメインを選択した（図３）。ＳＨ２ドメインは、細胞内ホスホチロシン認識及び結合ドメインである。総合すると、これらのドメインは、多様な生化学的特性を有するタンパク質構造の幅広いアレイに相当する。

【０２５５】

構築物の組み立て。融合構築物（ｐＡＭＧ２１及びｐＥＴ３０）を発現させるために、２つの細菌発現ベクターを使用した。ｐＡＭＧ２１（ＢａｍＨＩ$^{-}$）ベクターは、カナマイシンに対する耐性（「Ｋａｎｒ」）をコードし、Ｒ１００由来の複製起点及びクローニングに適した複数のユニークな制限部位を含有する。ｍＡＭＧ２１構築物中での発現は、ビブリオ・フィシェリ（Ｖｉｂｒｉｏ ｆｉｓｃｈｅｒｉ）由来の誘導性プロモーターｌｕｘＰＲによって駆動される。ｐＥＴ３０ベクター（Ｎｏｖａｇｅｎ／ＥＭＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）はＫａｎｒをコードし、ｐＢＲ３２２由来の複製起点を含有する。ｐＥＴ３０中での発現は、誘導性Ｔ７プロモーターによって駆動される。

【０２５６】

ＯｓＫ１及びＳｈＫ融合物に対して、最適化、ｍＲＮＡ二次構造の還元及びそれに続く遺伝子合成を実施した。遺伝子は、（ｉ）便宜のために、開始メチオニン（Ｍ）、２つのグリシン（$Ｇ_{2}$）、６つのヒスチジン（$Ｈ_{6}$）及び２つ又は３つのグリシン（$Ｇ_{3}$）を含むアフィニティー精製タグ（「Ｍ－$Ｇ_{2}$－$Ｈ_{6}$－$Ｇ_{3}$」；配列番号４９）；（ｉｉ）薬理学的に不活性な小タンパク質ドメイン、（ｉｉｉ）４つのグリシンと１つのセリンの反復から構成される１０残基リンカー（「$（Ｇ_{4}Ｓ）_{2}$」又は「Ｌ１０」；配列番号２２）並びに最後に生物活性ペプチド（その例は、トキシンペプチドＯＳＫ１及びＳｈＫであった。）をコードした。以下のアミノ酸配列は、コードされる融合タンパク質の例である。

【０２５７】

【化５】

CH2-OsK1:

GGHHHHHHGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISGGGGSGGGGSGVIINV
KCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK// 配列番号 :80;

FnIII-OsK1:

GGHHHHHHGGGTVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPG
SKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEGGGGSGGGGSGVIINVKCKISRQC
LEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK// 配列番号 :81;

1PHT-OsK1:

GGHHHHHHGGGSAEGYQYRALYDYKKEREEDIDLHLGDILTVNKGSLVALGFSDGQEARPEEIG
WLNGYNETTGERGDFPGTYVEYIGRKKISPGGGGSGGGGSGVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRF
GKCMNGKCHCTPK// 配列番号 :82;

1N7F-OsK1:

GGHHHHHHGGGSSGAIIYTVELKRYGGPLGITISGTEEPFDPIIISSLTKGGLAERTGAIHIGDRILAI
NSSSLKGKPLSEAIHLLQMAGETVTLKIKKQTDAQSASSPGGGGSGGGGSGVIINVKCKISRQCLE
PCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK// SEQ ID NO:83;

1X2K-OsK1:

GGHHHHHHGGGKVFRALYTFEPRTPDELYFEEGDIIYITDMSDTNWWKGTSKGRTGLIPSNYVA
EQGGGGSGGGGSGVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK// 配列番号 :84; 及び

1UEZ-OsK1:

GGHHHHHHGGGPGEVRLVSLRRAKAHEGLGFSIRGGSEHGVGIYVSLVEPGSLAEKEGL
RVGDQILRVNDKSLARVTHAEAVKALKGSKKLVLSVYSAGRIPGGGGSGGGGSGVIINV
KCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK// 配列番号 :85.

【０２５８】

５’及び３’末端に追加ヌクレオチドを付加し、ＮｄｅＩ及びＥｃｏＲＩ制限部位を取り込んだ。１０残基リンカーの最後の６ヌクレオチド（ＧＡＡＴＴＣ）は、グリシン及びセリンをコードし、並びにＢａｍＨＩ制限部位を与えるように設計された。遺伝子の完全なヌクレオチド配列の例が、以下に挙げられている。

【０２５９】

【化６】

M-G_2-H_6-G_3-10^{th}Fn3-$(G_4S)_2$-OsK1（コーディング領域に下線が付されている）

catatgggtggtcatcatcatcatcatggtggtggtaccgtaagcgatgtaccacgcgatctggaagtagtagctgccacaccaacctctt
tgctgatctcttgggacgcacctgcagttacagtccgctattatcgtattacgtatggagaaaccggtggcaacagtccagtacaagaatttac
cgtgcctggttccaaaagtaccgcaacaatttcaggcctcaaaccaggtgttgattatacgattacagtttatgcggttaccggtcgtggcgatt
cacccgcatcaagtaaaccaatttctattaactatcgtacagaaggcgggggaggtagcggcggaggaggatccggagtcattatcaatgtt
aaatgtaaaatcagccgtcagtgtttagaaccatgtaaaaaagccggaatgcgctttggaaaatgtatgaatggtaaatgtcattgcaccccga
aataatgaattc// 配列番号 :62;

M-G_2-H_6-G_3-PDZ(1N7F)-$(G_4S)_2$-OsK1（コーディング領域に下線が付されている）

catatgggtggtcatcatcatcatcatggtggtggttccagcggtgcaattatctatacggtagaacttaaacgttacggtggtcctctgggt
attacaatcagcggcacagaagaacccttgatccaattattatttcatcgcttactaaaggtggtcttgctgaacgcacaggcgccattcatatt
ggagatcgtattttagctatcaactcatcatcattaaaaggcaaaccgttatcagaagctattcacttattacaaatggcgggcgaaacagttac
ccttaaaatcaaaaaacaaaccgacgcacaatctgcaagtagtccgggggggaggcggctcaggaggaggaggatccggtgttattatcaa
tgtcaaatgtaaaatttctcgtcagtgtttggaaccctgtaaaaaagccggtatgcgctttggaaaatgtatgaacggaaaatgtcactgtaccc
caaaataatgaattc// 配列番号 :63;

M-G_2-H_6-G_3-PDZ(1UEZ)-$(G_4S)_2$-OsK1（コーディング領域に下線が付されている）

catatgggtggtcatcatcatcatcatggtggtggtccgggcgaagttcgtcttgttagtttacgtcgcgcaaaagcacatgaaggcttag
gtttctcaattcgtggcggcagcgaacatggtgttggaatttatgtatccttagtagaacctggtagtttagccgaaaaagaaggcctgcgtgtc
ggcgatcaaatcttacgcgtcaacgataaatctttagcccgcgttactcatgccgaagccgttaaagcgttgaaaggtagcaaaaaattagttc
tgtctgtttattccgcaggtcgtattcctggtggtggaggaagtggtggtggtggatccggagtaattattaacgttaaatgtaaaatcagtcgtc
aatgtttggaaccctgtaaaaaagctggaatgcggtttggaaaatgtatgaatggtaaatgtcactgtacccctaaataatgaattc// 配列
番号:64;

M-G_2-H_6-G_3-PDZ(1WFV)-$(G_4S)_2$-OsK1（コーディング領域に下線が付されている）

catatgggtggtcatcatcatcatcatggtggtggtcctcaagacttcgattactttactgttgatatggaaaaaggtgcaaaaggttttggtt
tctctattcgtggcggtcgtgaatataaaatggacttatatgtgttacgcttagctgaagacggacccgcaattcgtaacggacgtatgcgtgtt
ggcgatcaaattattgaaattaatggcgaatcaactcgtgatatgacccatgcacgtgcgattgaacttattaaatctggaggacgtcgtgtac
gcttactcttaaaacgtggtacaggtcaggttcccggtggcggcggcagtggtggtggtggatccggagttattatcaatgttaaatgtaaaat
tagtcgtcaatgcttagaaccttgtaaaaaagctggaatgcgctttggaaaatgcatgaacgggaaatgtcactgcacacctaaataatgaatt
c// 配列番号 :65;

M-G_2-H_6-G_3-SH2(1AB2)-$(G_4S)_2$-OsK1（コーディング領域に下線が付されている）

catatgggtggtcatcatcatcatcatggtggtggtaattctttagaaaaacattcatggtatcatggtcctgtatcacgtaacgcagccgaa
tatctcttatcttctggcattaacggtagtttttttagtccgcgaatccgaatcttctcctggccaacgcagtatcagtctccgttatgaaggtcgtgt

gtatcattatcgcatcaataccgcttcagatggtaaattatatgtttcctcggaaagtcgtttcaataccttgcggaactcgttcatcatcattcta
ctgtggcagatggtctcattacaacgttacattatcctgcacccggcggtggtggctctggtggtggcggatccggtgttattattaatgttaaat
gtaaaattagtcgccaatgtcttgaaccttgtaaaaaagctggcatgcgctttggtaaatgtatgaacggaaaatgtcattgtaccccgaaataa
tgaattc// 配列番号 :66;

M-G_2-H_6-G_3-SH2(1JYQ)-$(G_4S)_2$-OsK1（コーディング領域に下線が付されている）

catatgggtggtcatcatcatcatcatggtggtggtccttggttttttggtaaaatcccacgtgcgaaagctgaagaaatgctctcaaaaca
acgtcatgacggtgcattcttaattcgtgaaagtgaatctgctccaggtgattttagtttaagtgttaaatttggtaatgatgtccaacattttaaagt
ccttcgtgatggtgcgggtaaatatttttttatgggtagtcaaattcaatagtcttaacgaacttgtcgattatcatcgttccaccagtgttagccgta
atcaacaaatttttctccgcgatattgaacaaggtggtggtggttcaggaggggcggatccggcgtaatcatcaatgtaaaatgtaaaatctc
tcgtcaatgtttagaaccgtgtaaaaaagcaggaatgcgtttcggtaaatgtatgaatggtaaatgtcattgtaccccaaaataatgaattc//
配列番号 :67;

M-G_2-H_6-G_3-SH3(1PHT)-$(G_4S)_2$-OsK1（コーディング領域に下線が付されている）

catatgggtggtcatcatcatcatcatggtggtggttcagcagaaggttatcaatatcgtgcattatatgattataaaaaagaacgtgaaga
agatatcgacttacatctgggagacattttaactgttaataaaggaagcttagtcgctttaggatttagtgatgggcaagaggcacgccctgaa
gaaattggatggttgaatggttataatgaaacaaccggcgaacgtggtgactttccgggtacctatgtagaatatatcggtcgtaaaaaaatta
gccctggaggaggggggtctggaggtggtggatccggtgtaattatcaatgtaaaatgtaaaattagtcgtcaatgtttagaaccttgtaaaaa
agcaggcatgcgctttggaaaatgtatgaacggtaaatgccattgcaccccaaaataatgaattc// 配列番号 :68;

M-G_2-H_6-G_3-SH3(1WA7)-$(G_4S)_2$-OsK1（コーディング領域に下線が付されている）

catatgggtggtcatcatcatcatcatggtggtggtccagaagaacaaggtgatattgtagttgctttatatccttatgatggtattcatccag
acgatttaagttttaaaaaaggtgaaaaaatgaaagtgttagaagaacatggagaatggtggaaggcaaaaagtttattaacgaaaaaagaa
ggttttattccgtctaattatgtggcaaaattaaatacaggaggtgggggtggtagtgggggggaggatccggtgtaattattaatgtaaaat
gtaaaattagtcgtcaatgtttggaaccgtgtaaaaaagcaggtatgcgctttggtaaatgtatgaatggtaaatgtcattgcactccaaaataat
gaattc// 配列番号 :69;

M-G_2-H_6-G_3-SH3(1X2K)-$(G_4S)_2$-OsK1（コーディング領域に下線が付されている）

catatgggtggtcatcatcatcatcatggtggtggtaaagtttttcgcgcactttatacctttgaaccccgtaccccagatgaattatattttga
agaaggcgacattatttatattacggacatgtcagatactaattggtggaaaggaacaagcaaaggccgtactggactgatcccaagtaatta
cgtagcagaacaaggaggaggtggctcaggaggaggtggatccggtgtaattatcaatgtaaaatgtaaaatctctcgtcaatgcctggaac
cctgtaaaaaagctggtatgcgctttggtaaatgtatgaatggtaaatgtcattgcacccctaaataatgaattc// 配列番号 :70;

M-G_2-H_6-G_3-10^{th}Fn3-$(G_4S)_2$-ShK（コーディング領域に下線が付されている）

catatgggtggtcatcatcatcatcatggtggtggtaccgtaagcgatgttccccgtgacctggaagtggttgcagcgacccctacctcat
tattaatcagttgggatgcacctgcagttacagttcggtattatcgtattacgtatggagagacaggcggcaactcaccagttcaagaatttacc
gtcccgggctctaaatcaacagcaacaatttcaggcttaaaaccaggagtagattacacaattacagtatacgcagtaacaggtcgcggcga
ctccccagctagctcaaaacctatctctattaattatcgcaccgaaggtggcggaggttccggtggtggtggatcctgcatcgatacaatccct

aagtcccgctgtactgcctttcaatgcaaacactcaatgaaataccgtctcagtttctgtcgtaaaacctgtggcacctgttaatgaattc//

配列番号 :71;

M-G_2-H_6-G_3-PDZ(1N7F)-$(G_4S)_2$-ShK（コーディング領域に下線が付されている）

catatgggtggtcatcatcatcatcatggtggtggttccagcggtgcaattatctatacggtagaacttaaacgttacggtggtcctctgggt
attacaatcagcggcacagaagaacccttgatccaattattatttcatcgcttactaaaggtggtcttgctgaacgcacaggcgccattcatatt
ggagatcgtattttagctatcaactcatcatcattaaaaggcaaaccgttatcagaagctattcacttattacaaatggcgggcgaaacagttac
ccttaaaatcaaaaaacaaaccgacgcacaatctgcaagtagtccgggggggaggcggctcaggaggaggaggatcctgcatcgatacaa
tccctaagtcccgctgtactgcctttcaatgcaaacactcaatgaaataccgtctcagtttctgtcgtaaaacctgtggcacctgttaatgaattc/
/ 配列番号 :72;

M-G_2-H_6-G_3-PDZ(1UEZ)-$(G_4S)_2$- ShK（コーディング領域に下線が付されている）

catatgggtggtcatcatcatcatcatggtggtggtccgggcgaagttcgtcttgttagtttacgtcgcgcaaaagcacatgaaggcttag
gtttctcaattcgtggcggcagcgaacatggtgttggaatttatgtatccttagtagaacctggtagtttagccgaaaaagaaggcctgcgtgtc
ggcgatcaaatcttacgcgtcaacgataaatctttagcccgcgttactcatgccgaagccgttaaagcgttgaaaggtagcaaaaaattagttc
tgtctgtttattccgcaggtcgtattcctggtggtggaggaagtggtggtggtggatcctgcatcgatacaatccctaagtcccgctgtactgcc
tttcaatgcaaacactcaatgaaataccgtctcagtttctgtcgtaaaacctgtggcacctgttaatgaattc// 配列番号 :73;

M-G_2-H_6-G_3-PDZ(1WFV)-$(G_4S)_2$- ShK（コーディング領域に下線が付されている）

catatgggtggtcatcatcatcatcatggtggtggtcctcaagacttcgattactttactgttgatatggaaaaaggtgcaaaaggttttggtt
tctctattcgtggcggtcgtgaatataaaatggacttatatgtgttacgcttagctgaagacggacccgcaattcgtaacggacgtatgcgtgtt
ggcgatcaaattattgaaattaatggcgaatcaactcgtgatatgacccatgcacgtgcgattgaacttattaaatctggaggacgtcgtgtac
gcttactcttaaaacgtggtacaggtcaggttcccggtggcggcggcagtggtggtggtggatcctgcatcgatacaatccctaagtcccgct
gtactgcctttcaatgcaaacactcaatgaaataccgtctcagtttctgtcgtaaaacctgtggcacctgttaatgaattc//

番号:74;

M-G_2-H_6-G_3-SH2(1AB2)-$(G_4S)_2$- ShK（コーディング領域に下線が付されている）

catatgggtggtcatcatcatcatcatggtggtggtaattctttagaaaaacattcatggtatcatggtcctgtatcacgtaacgcagccgaa
tatctcttatcttctggcattaacggtagtttttttagtccgcgaatccgaatcttctcctggccaacgcagtatcagtctccgttatgaaggtcgtgt
gtatcattatcgcatcaataccgcttcagatggtaaattatatgtttcctcggaaagtcgtttcaataccccttgcggaactcgttcatcatcattcta
ctgtggcagatggtctcattacaacgttacattatcctgcacccggcggtggtggctctggtggtggcggatcctgcatcgatacaatccctaa
gtcccgctgtactgcctttcaatgcaaacactcaatgaaataccgtctcagtttctgtcgtaaaacctgtggcacctgttaatgaattc// 配列
番号:75;

M-G_2-H_6-G_3-SH2(1JYQ)-$(G_4S)_2$- ShK（コーディング領域に下線が付されている）

catatgggtggtcatcatcatcatcatggtggtggtccttggttttttggtaaaatcccacgtgcgaaagctgaagaaatgctctcaaaaca
acgtcatgacggtgcattcttaattcgtgaaagtgaatctgctccaggtgattttagtttaagtgttaaatttggtaatgatgtccaacattttaaagt

10 20 30 40

ccttcgtgatggtgcgggtaaatatttttttatgggtagtcaaattcaatagtcttaacgaacttgtcgattatcatcgttccaccagtgttagccgta
atcaacaaatttttctccgcgatattgaacaaggtggtggtggttcaggaggggcggatcctgcatcgatacaatccctaagtcccgctgta
ctgcctttcaatgcaaacactcaatgaaataccgtctcagtttctgtcgtaaaacctgtggcacctgttaatgaattc// 配列番号 :76;

M-G_2-H_6-G_3-SH3(1PHT)-$(G_4S)_2$- ShK（コーディング領域に下線が付されている）

catatgggtggtcatcatcatcatcatggtggtggttcagcagaaggttatcaatatcgtgcattatatgattataaaaaagaacgtgaaga
agatatcgacttacatctgggagacattttaactgttaataaaggaagcttagtcgctttaggatttagtgatgggcaagaggcacgccctgaa
gaaattggatggttgaatggttataatgaaacaaccggcgaacgtggtgactttccgggtacctatgtagaatatatcggtcgtaaaaaaatta
gccctggaggaggggggtctggaggtggtggatcctgcatcgatacaatccctaagtcccgctgtactgcctttcaatgcaaacactcaatg
aaataccgtctcagtttctgtcgtaaaacctgtggcacctgttaatgaattc// 配列番号 :77;

M-G_2-H_6-G_3-SH3(1WA7)-$(G_4S)_2$- ShK（コーディング領域に下線が付されている）

catatgggtggtcatcatcatcatcatggtggtggtccagaagaacaaggtgatattgtagttgctttatatccttatgatggtattcatccag
acgatttaagttttaaaaaaggtgaaaaaatgaaagtgttagaagaacatggagaatggtggaaggcaaaaagtttattaacgaaaaaagaa
ggttttattccgtctaattatgtggcaaaattaaatacaggaggtgggggtggtagtgggggggggaggatcctgcatcgatacaatccctaag
tcccgctgtactgcctttcaatgcaaacactcaatgaaataccgtctcagtttctgtcgtaaaacctgtggcacctgttaatgaattc// 配列
番号:78; 及び

M-G_2-H_6-G_3-SH3(1X2K)-$(G_4S)_2$- ShK（コーディング領域に下線が付されている）

catatgggtggtcatcatcatcatcatggtggtggtaaagtttttcgcgcactttatacctttgaaccccgtaccccagatgaattatattttga
agaaggcgacattatttatattacggacatgtcagatactaattggtggaaaggaacaagcaaaggccgtactggactgatcccaagtaatta
cgtagcagaacaaggaggaggtggctcaggaggaggtggatcctgcatcgatacaatccctaagtcccgctgtactgcctttcaatgcaaa
cactcaatgaaataccgtctcagtttctgtcgtaaaacctgtggcacctgttaatgaattc// 配列番号 :79.

【０２６０】

まず、ＮｄｅＩ及びＥｃｏＲＩを用いて合成されたＤＮＡを消化し、次いで、同様に処理されたｐＡＭＧ２１（ＢａｍＨＩ⁻；表３）中に連結した。

【０２６１】

【化７】

表３．ｐＡＭＧ２１のヌクレオチド配列(BamHI⁻).

gatcagcagtccccggaacatcgtagctgacgccttcgcgttgctcagttgtccaaccccggaaacgggaaaaagcaagttttccccgctcc
cggcgtttcaataactgaaaaccatactatttcacagtttaaatcacattaaacgacagtaatccccgttgatttgtgcgccaacacagatcttcg
tcacaattctcaagtcgctgatttcaaaaaactgtagtatcctctgcgaaacgatccctgtttgagtattgaggaggcgagatgtcgcagacag
aaaatgcagtgacttcctcattgagtcaaaagcggtttgtgcgcagaggtaagcctatgactgactctgagaaacaaatggccgttgttgcaa
gaaaacgtcttacacacaaagagataaaagttttttgtcaaaaatcctctgaaggatctcatggttgagtactgcgagagagaggggataacac
aggctcagttcgttgagaaaatcatcaaagatgaactgcaaagactggatatactaaagtaaagactttacttttgtggcgtagcatgctagatta
ctgatcgtttaaggaattttgtggctggccacgccgtaaggtggcaaggaactggttctgatgtggatttacaggagccagaaaagcaaaaa
ccccgataatcttcttcaacttttgcgagtacgaaaagattaccggggcccacttaaaccgtatagccaacaattcagctatgcggggagtata
gttatatgcccggaaaagttcaagacttctttctgtgctcgctccttctgcgcattgtaagtgcaggatggtgtgactgatcttcaccaaacgtatt
accgccaggtaaagaacccgaatccggtgtttacaccccgtgaaggtgcaggaacgctgaagttctgcgaaaaactgatggaaaaggcg
gtgggcttcacttcccgttttgatttcgccattcatgtggcgcacgcccgttcgcgtgatctgcgtcgccgtatgccaccagtgctgcgtcgtcg
ggctattgatgcgctcttgcaggggctgtgtttccactatgacccgctggccaaccgcgtccagtgctccatcaccacgctggccattgagtg

cggactggcgacggagtctgctgccggaaaactctccatcacccgtgccacccgtgccctgacgttcctgtcagagctgggactgattacct
accagacggaatatgacccgcttatcgggtgctacattccgaccgatatcacgttcacatctgcactgtttgctgccctcgatgtatcagagga
ggcagtggccgccgcgcgccgcagccgtgtggtatgggaaaacaaacaacgcaaaaagcaggggctggataccctgggcatggatga
actgatagcgaaagcctggcgttttgttcgtgagcgttttcgcagttatcagacagagcttaagtcccgtggaataaagcgtgcccgtgcgcg
tcgtgatgcggacagggaacgtcaggatattgtcaccctggtgaaacggcagctgacgcgcgaaatcgcggaagggcgcttcactgcca
atcgtgaggcggtaaaacgcgaagttgagcgtcgtgtgaaggagcgcatgattctgtcacgtaaccgtaattacagccggctggccacagc
ttccccctgaaagtgacctcctctgaataatccggcctgcgccggaggcttccgcacgtctgaagcccgacagcgcacaaaaaatcagcac
cacatacaaaaaacaacctcatcatccagcttctggtgcatccggccccccctgttttcgatacaaaacacgcctcacagacggggaattttg
cttatccacattaaactgcaagggacttccccataaggttacaaccgttcatgtcataaagcgccatccgccagcgttacagggtgcaatgtat
cttttaaacacctgtttatatctcctttaaactacttaattacattcatttaaaaagaaaacctattcactgcctgtccttggacagacagatatgcac
ctcccaccgcaagcggcgggcccctaccggagccgctttagttacaacactcagacacaaccaccagaaaaaccccggtccagcgcaga
actgaaaccacaaagcccctccctcataactgaaaagcggccccgccccggtccgaagggccggaacagagtcgcttttaattatgaatgt
tgtaactacttcatcatcgctgtcagtcttctcgctggaagttctcagtacacgctcgtaagcggccctgacggcccgctaacgcggagatac
gccccgacttcgggtaaaccctcgtcgggaccactccgaccgcgcacagaagctctctcatggctgaaagcgggtatggtctggcagggc
tggggatgggtaaggtgaaatctatcaatcagtaccggcttacgccgggcttcggcggttttactcctgtttcatatatgaaacaacaggtcac
cgccttccatgccgctgatgcggcatatcctggtaacgatatctgaattgttatacatgtgtatatacgtggtaatgacaaaaataggacaagtt
aaaaatttacaggcgatgcaatgattcaaacacgtaatcaatatcgggggtgggcgaagaactccagcatgagatccccgcgctggaggat
catccagccggcgtcccggaaaacgattccgaagcccaacctttcatagaaggcggcggtggaatcgaaatctcgtgatggcaggttggg
cgtcgcttggtcggtcatttcgaaccccagagtcccgctcagaagaactcgtcaagaaggcgatagaaggcgatgcgctgcgaatcggga
gcggcgataccgtaaagcacgaggaagcggtcagcccattcgccgccaagctcttcagcaatatcacgggtagccaacgctatgtcctgat
agcggtccgccacacccagccggccacagtcgatgaatccagaaaagcggccattttccaccatgatattcggcaagcaggcatcgccat
gagtcacgacgagatcctcgccgtcgggcatgcgcgccttgagcctggcgaacagttcggctggcgcgagcccctgatgctcttcgtcca
gatcatcctgatcgacaagaccggcttccatccgagtacgtgctcgctcgatgcgatgtttcgcttggtggtcgaatgggcaggtagccggat
caagcgtatgcagccgccgcattgcatcagccatgatggatactttctcggcaggagcaaggtgagatgacaggagatcctgccccggca
cttcgcccaatagcagccagtcccttcccgcttcagtgacaacgtcgagcacagctgcgcaaggaacgcccgtcgtggccagccacgata
gccgcgctgcctcgtcctgcaattcattcaggacaccggacaggtcggtcttgacaaaaagaaccgggcgccccctgcgctgacagccgga
acacggcggcatcagagcagccgattgtctgttgtgcccagtcatagccgaatagcctctccacccaagcggccggagaacctgcgtgca
atccatcttgttcaatcatgcgaaacgatcctcatcctgtctcttgatctgatcttgatcccctgcgccatcagatccttggcggcaagaaagcca
tccagtttactttgcagggcttcccaaccttaccagagggcgccccagctggcaattccggttcgcttgctgtccataaaaccgcccagtctag
ctatcgccatgtaagcccactgcaagctacctgctttctctttgcgcttgcgttttcccttgtccagatagcccagtagctgacattcatccgggg
tcagcaccgtttctgcggactggctttctacgtgttccgcttcctttagcagcccttgcgccctgagtgcttgcggcagcgtgaagctacatata
tgtgatccgggcaaatcgctgaatattcctttgtctccgaccatcaggcacctgagtcgctgtctttttcgtgacattcagttcgctgcgctcac
ggctctggcagtgaatgggggtaaatggcactacaggcgccttttatggattcatgcaaggaaactacccataatacaagaaaagcccgtca
cgggcttctcagggcgttttatggcgggtctgctatgtggtgctatctgactttttgctgttcagcagttcctgcccctctgattttccagtctgacca
cttcggattatcccgtgacaggtcattcagactggctaatgcacccagtaaggcagcggtatcatcaacaggcttacccgtcttactgtcgaa
gacgtgcgtaacgtatgcatggtctccccatgcgagagtagggaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactggg
cctttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggcccgg
agggtggcgggcaggacgcccgccataaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgacggatggccttttgcgtttctacaa
actcttttgtttatttttctaaatacattcaaatatggacgtcgtacttaacttttaaagtatgggcaatcaattgctcctgttaaaattgctttagaaata
ctttggcagcggtttgttgtattgagtttcatttgcgcattggttaaatggaaagtgaccgtgcgcttactacagcctaatatttttgaaatatccca
agagcttttttccttcgcatgcccacgctaaacattcttttttctcttttggttaaatcgttgtttgatttattatttgctatatttatttttcgataattatcaact
agagaaggaacaattaatggtatgttcatacacgcatgtaaaaataaactatctatatagttgtctttctctgaatgtgcaaaactaagcattccg
aagccattattagcagtatgaatagggaaactaaacccagtgataagacctgatgatttcgcttctttaattacatttggagatttttttatttacagc
attgttttcaaatatattccaattaatcggtgaatgattggagttagaataatctactataggatcatatttttattaaattagcgtcatcataatattgcc
tccatttttttagggtaattatccagaattgaaatatcagatttaaccatagaatgaggataaatgatcgcgagtaaataatattcacaatgtaccatt
ttagtcatatcagataagcattgattaatatcattattgcttctacaggctttaattttattaattattctgtaagtgtcgtcggcatttatgtctttcatac
ccatctctttatccttacctattgtttgtcgcaagttttgcgtgttatatatcattaaaacggtaatagattgacatttgattctaataaattggatttttgt
cacactattatatcgcttgaaatacaattgtttaacataagtacctgtaggatcgtacaggtttacgcaagaaaatggtttgttatagtcgattaatc
gatttgattctagatttgttttaactaattaaaggaggaataacatatggttaacgcgttggaattcgagctcactagtgtcgacctgcagggtac
catggaagcttactcgaagatccgcggaaagaagaagaagaagaagaaagcccgaaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgag

caataactagcataacccccttggggcctctaaacgggtcttgaggggttttttgctgaaaggaggaaccgctcttcacgctcttcacgcggata
aataagtaacgatccggtccagtaatgacctcagaactccatctggatttgttcagaacgctcggttgccgccgggcgtttttattggtgagaa
tcgcagcaacttgtcgcgccaatcgagccatgtcgtcgtcaacgacccccccattcaagaacagcaagcagcattgagaactttggaatcca
gtccctcttccacctgctgaccg// 配列番号 :57

【０２６２】

これによって、９つのＯＳＫ１融合物及び第一のＳｈＫ融合物が作製された。残りのＳｈＫ融合物（実際には、［ｄｅｓＡｒｇ１］ＳｈＫ融合物）を作製するために、まず、ＢａｍＨＩ及びＥｃｏＲＩ消化によって、トキシンＤＮＡを切り出した。次いで、Ｓｈｋ（実際には、［ｄｅｓＡｒｇ１］ＳｈＫペプチド類縁体）コード配列を、小ドメイン融合対の下流に連結した。さらに、ＳｈＫ（実際には［ｄｅｓＡｒｇ１］ＳｈＫ融合物のいくつかを、ＮｄｅＩ／ＥｃｏＲＩ消化で切り出し、同様に消化されたｐＥＴ３０ＤＮＡに連結した（表４）。

【０２６３】

【化８】

表４．ｐＥＴ３０のヌクレオチド配列

atccggatatagttcctcctttcagcaaaaaacccctcaagacccgtttagaggccccaaggggttatgctagttattgctcagcggtggcag
cagccaactcagcttcctttcgggctttgttagcagccggatctcagtggtggtggtggtggtgctcgagtgcggccgcaagcttgtcgacg
gagctcgaattcggatccgatatcagccatggccttgtcgtcgtcgtcggtacccagatctgggctgtccatgtgctggcgttcgaatttagca
gcagcggtttctttcataccagaaccgcgtggcaccagaccagaagaatgatgatgatgatggtgcatatgtatatctccttcttaaagttaaac
aaaattatttctagaggggaattgttatccgctcacaattcccctatagtgagtcgtattaatttcgcgggatcgagatcgatctcgatcctctacg
ccggacgcatcgtggccggcatcaccggcgccacaggtgcggttgctggcgcctatatcgccgacatcaccgatggggaagatcgggct
cgccacttcgggctcatgagcgcttgtttcggcgtgggtatggtggcaggccccgtggccgggggactgttgggcgccatctccttgcatg
caccattccttgcggcggcggtgctcaacggcctcaacctactactgggctgcttcctaatgcaggagtcgcataagggagagcgtcgaga
tcccggacaccatcgaatggcgcaaaaccttcgcggtatggcatgatagcgcccggaagagagtcaattcagggtggtgaatgtgaaacc
agtaacgttatacgatgtcgcagagtatgccggtgtctcttatcagaccgtttcccgcgtggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaac
gcgggaaaaagtggaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgctga
ttggcgttgccacctccagtctggccctgcacgcgccgtcgcaaattgtcgcggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtg
gtggtgtcgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatcatta
actatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaatgttccggcgttatttcttgatgtctctgaccagacacccatc
aacagtattattttctcccatgaagacggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcggg
cccattaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaatatctcactcgcaatcaaattcagccgatagcggaacgggaagg
cgactggagtgccatgtccggttttcaacaaaccatgcaaatgctgaatgagggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagat
ggcgctgggcgcaatgcgcgccattaccgagtccgggctgcgcgttggtgcggacatctcggtagtgggatacgacgataccgaagaca
gctcatgttatatcccgccgttaaccaccatcaaacaggattttcgcctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagg
gccaggcggtgaagggcaatcagctgttgcccgtctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaatacgcaaaccgcctctcccc
gcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtaagttagct
cactcattaggcaccgggatctcgaccgatgcccttgagagccttcaacccagtcagctccttccggtgggcgcggggcatgactatcgtc
gccgcacttatgactgtcttctttatcatgcaactcgtaggacaggtgccggcagcgctctgggtcattttcggcgaggaccgctttcgctgga
gcgcgacgatgatcggcctgtcgcttgcggtattcggaatcttgcacgccctcgctcaagccttcgtcactggtcccgccaccaaacgtttcg
gcgagaagcaggccattatcgccggcatggcggccccacgggtgcgcatgatcgtgctcctgtcgttgaggacccggctaggctggcgg
ggttgccttactggttagcagaatgaatcaccgatacgcgagcgaacgtgaagcgactgctgctgcaaaacgtctgcgacctgagcaacaa
catgaatggtcttcggtttccgtgtttcgtaaagtctggaaacgcggaagtcagcgccctgcaccattatgttccggatctgcatcgcaggatg
ctgctggctaccctgtggaacacctacatctgtattaacgaagcgctggcattgaccctgagtgatttttctctggtcccgccgcatccataccg
ccagttgtttaccctcacaacgttccagtaaccgggcatgttcatcatcagtaacccgtatcgtgagcatcctctctcgtttcatcggtatcattac
ccccatgaacagaaatcccccttacacggaggcatcagtgaccaaacaggaaaaaaccgcccttaacatggcccgctttatcagaagcca
gacattaacgcttctggagaaactcaacgagctggacgcggatgaacaggcagacatctgtgaatcgcttcacgaccacgctgatgagcttt
accgcagctgcctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcgga

tgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggcgcagccatgacccagtcacgtagcgatagc
ggagtgtatactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaa
ggagaaaataccgcatcaggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcac
tcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaacc
gtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaa
cccgacaggactataaagataccaggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtc
cgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtg
tgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactg
gcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacacta
gaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctg
gtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgct
cagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgaacaataaaactgtctgcttacataaacagtaatacaaggggtgttatgagccat
attcaacgggaaacgtcttgctctaggccgcgattaaattccaacatggatgctgatttatatgggtataaatgggctcgcgataatgtcgggc
aatcaggtgcgacaatctatcgattgtatgggaagcccgatgcgccagagttgtttctgaaacatggcaaaggtagcgttgccaatgatgtta
cagatgagatggtcagactaaactggctgacggaatttatgcctcttccgaccatcaagcattttatccgtactcctgatgatgcatggttactca
ccactgcgatccccgggaaaacagcattccaggtattagaagaatatcctgattcaggtgaaaatattgttgatgcgctggcagtgttcctgcg
ccggttgcattcgattcctgtttgtaattgtccttttaacagcgatcgcgtatttcgtctcgctcaggcgcaatcacgaatgaataacggtttggtt
gatgcgagtgattttgatgacgagcgtaatggctggcctgttgaacaagtctggaaagaaatgcataaacttttgccattctcaccggattcagt
cgtcactcatggtgatttctcacttgataaccttatttttgacgaggggaaattaataggttgtattgatgttggacgagtcggaatcgcagaccg
ataccaggatcttgccatcctatggaactgcctcggtgagttttctccttcattacagaaacggcttttttcaaaaatatggtattgataatcctgata
tgaataaattgcagtttcatttgatgctcgatgagtttttctaagaattaattcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaata
ggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgaaattgtaaacgttaatattttgttaaaattcgcgttaaatttttgttaaatcagctcattt
tttaaccaatagccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagatagggttgagtgttgttccagtttggaacaagagtc
cactattaaagaacgtggactccaacgtcaaagggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcaccctaatcaag
ttttttggggtcgaggtgccgtaaagcactaaatcggaaccctaaagggagcccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaacgtg
gcgagaaaggaagggaagaaagcgaaaggagcgggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacacc
cgccgcgcttaatgcgccgctacagggcgcgtcccattcgcca// 配列番号 :58

【０２６４】

ＭＫ６Ｈ－Ｇ２－ＳＨ３－Ｇ５－２Ｘ（ＴＭＰ２２－７Ｑ）融合構築物（表４Ａ）を以下のように作製した。以下の２つのプライマーを用いて、ＳＨ３及びＭＰ２２－７Ｑをコードするプラスミドを有する株１４０６６からＰＣＲ断片を増幅した。リジン、６ヒスチジンタグ、グリシン－グリシンリンカー、ＳＨ３の最初の９アミノ酸に加えて、ＮｄｅＩ部位を含む１５ヌクレオチドの５’伸長をコードするＧＡＧ　ＧＡＡ　ＴＡＡ　ＣＡＴ　ＡＴＧ　ＡＡＡ　ＣＡＴ　ＣＡＴ　ＣＡＴ　ＣＡＴ　ＣＡＴ　ＣＡＴ　ＧＧＴ　ＧＧＴ　ＡＡＡ　ＧＴＴ　ＴＴＴ　ＣＧＣ　ＧＣＡ　ＣＴＴ　ＴＡＴ　ＡＣＣ　ＴＴＴ（配列番号５１）及びｐＡＭＧ２１ベクターに対する２０ヌクレオチドのユニバーサルリバースプライマーをコードするＧＴＴ　ＡＴＴ　ＧＣＴ　ＣＡＧ　ＣＧＧ　ＴＧＧ　ＣＡ（配列番号５２）。ＮｄｅＩ及びＥｃｏＲＩ部位を用いて、ｐＡＭＧ２１ベクター中にＰＣＲ産物をクローニングし、配列を確認した。

【０２６５】

【化９】

表４Ａ．ＭＫ６Ｈ－Ｇ２－ＳＨ３－Ｇ５－２Ｘのアミノ酸配列（ＴＭＰ２２－７Ｑ）

MKHHHHHHGGKVFRALYTFEPRTPDELYFEEGDIIYITDMSDTNWWKGTSKGRGLIPSNYVAEQ
GGSGGQGCSSGGPTLREWQQCRRMQHSGGGGGGGGQGCSSGGPTLREWQQCRRMQHSGG//
配列番号:86

【０２６６】

ＭＫ６Ｈ－Ｇ２－ＰＤＺ－Ｇ５－２Ｘ（ＴＭＰ２２－７Ｑ）融合構築物（表４Ｂ）を以下のように作製した。以下の２つのプライマーを用いて、ＰＤＺ及びＴＭＰ２２－７Ｑをコードするプラスミドを有する株１４１７５からＰＣＲ断片を増幅した。リジン、６ヒスチジンタグ、グリシン－グリシンリンカー、ＰＤＺの最初の８アミノ酸に加えて、ＮｄｅＩ部位を含む１５ヌクレオチドの５’伸長をコードするＡＧ　ＧＡＡ　ＴＡＡ　ＣＡＴ

ＡＴＧ　ＡＡＡ　ＣＡＴ　ＣＡＴ　ＣＡＴ　ＣＡＴ　ＣＡＴ　ＣＡＴ　ＧＧＴ　ＧＧＴ　ＣＣＧ　ＧＧＣ　ＧＡＡ　ＧＴＴ　ＣＧＴ　ＣＴＴ　ＧＴＴ　ＡＧＴ（配列番号５３）及びｐＡＭＧ２１ベクターに対する２０ヌクレオチドのユニバーサルリバースプライマーをコードするＧＴＴ　ＡＴＴ　ＧＣＴ　ＣＡＧ　ＣＧＧ　ＴＧＧ　ＣＡ（配列番号５４）。ＮｄｅＩ及びＥｃｏＲＩ部位を用いて、ｐＡＭＧ２１ベクター中にＰＣＲ産物をクローニングし、配列を確認した。

【０２６７】

【化１０】

表４Ｂ．ＭＫ６Ｈ－Ｇ２－ＰＤＺ－Ｇ５－２Ｘのアミノ酸配列（ＴＭＰ２２－７Ｑ）

MKHHHHHHGGPGEVRLVSLRRAKAHEGLGFSIRGGSEHGVGIYVSLVEPGSLAEKEGLRVGDQI
LRVNDKSLARVTHAEAVKALKGSKKLVLSVYSAGRIPGGSGGQGCSSGGPTLREWQQCRRMQH
SGGGGGGGGQGCSSGGPTLREWQQCRRMQHSGG// 配列番号 :87

【０２６８】

ＭＫ６Ｈ－Ｇ２－Ｆｎ３－Ｇ５－２Ｘ（ＴＭＰ２２－７Ｑ）融合構築物（表４Ｃ）を以下のように作製した。以下の２つのプライマーを用いて、Ｆｎ３及びＴＭＰ２２－７Ｑをコードするプラスミドを有する株１４１７６からＰＣＲ断片を増幅した。リジン、６ヒスチジンタグ、グリシン－グリシンリンカー、Ｆｎ３の最初の８アミノ酸に加えて、ＮｄｅＩ部位を含む１５ヌクレオチドの５’伸長をコードするＧＡＧ　ＧＡＡ　ＴＡＡ　ＣＡＴ　ＡＴＧ　ＡＡＡ　ＣＡＴ　ＣＡＴ　ＣＡＴ　ＣＡＴ　ＣＡＴ　ＣＡＴ　ＧＧＴ　ＧＧＴ　ＡＣＣ　ＧＴＡ　ＡＧＣ　ＧＡＴ　ＧＴＡ　ＣＣＡ　ＣＧＣ　ＧＡＴ（配列番号５５）及びｐＡＭＧ２１ベクターに対する２０ヌクレオチドのユニバーサルリバースプライマーをコードするＧＴＴ　ＡＴＴ　ＧＣＴ　ＣＡＧ　ＣＧＧ　ＴＧＧ　ＣＡ（配列番号５６）。ＮｄｅＩ及びＥｃｏＲＩ部位を用いて、ｐＡＭＧ２１ベクター中にＰＣＲ産物をクローニングし、配列を確認した。

【０２６９】

【化１１】

表４Ｃ．ＭＫ６Ｈ－Ｇ２－Ｆｎ３－Ｇ５－２Ｘのアミノ酸配列（ＴＭＰ２２－７Ｑ）

MKHHHHHHGGTVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQE
FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEGGSGGQGCSSGGP
TLREWQQCRRMQHSGGGGGGGGQGCSSGGPTLREWQQCRRMQHSGG// 配列番号 :88

【０２７０】

タンパク質発現。発現のために、形質転換受容性イー・コリＧＭ２２１細胞中に、全てのｐＡＭＧ２１構築物を形質転換した（ＧＭ２２１は、Ｋ１２株に由来した。）。４０μｇ／ｍＬカナマイシンが補充されたＴＢ培地（１．２％トリプトン、２．４％酵母抽出物、０．４％グリセロール、７２ｍＭK_2HPO_4及び１７ｍＭKH_2PO_4）中で、形質転換体を一晩（ｏ／ｎ）増殖させた。翌日、このｏ／ｎ培養物を新鮮な培地中に１：１００希釈した。次いで、０．４から０．６の６００ｎｍでの光学密度（ＯＤ）になるように、細胞を増殖させた。５０μｇ／ｍＬの最終濃度で、Ｎ－（３－オキソ－ヘキサノイル）ホモセリンラクトン（ＨＳＬ）を添加すると、発現が開始した。３から４時間後に、遠心による採集を行った。クマシーゲルによって、発現レベルを可視化し、評価した（図４Ａ－Ｂ及び表５参照）。

【０２７１】

ＴＭＰ融合構築物の全ての発現検査は、テリフィックブロスを使用し、５ｍＬの試験チューブを用いて行った。Ｎ－（３－オキソ－ヘキサノイル）ホモセリンラクトン（ＨＳＬ）とともに、細胞を３７℃で６時間温置した。４から２０％Ｔｒｉｓ－グリシンゲルを用いて、細胞全体抽出物、可溶性画分及び不溶性画分を分析した。ＭＫ６Ｈ－Ｇ２－ＳＨ３－Ｇ５－２Ｘ（ＴＭＰ２２－７Ａ）構築物は、不溶性組換えタンパク質の約２５％とともに優れた発現を示し、可溶性画分の多くはより下のバンド中に存在する（図５ＡからＢ）

。ＭＫ６Ｈ－Ｇ２－ＰＤＺ－Ｇ５－２Ｘ（ＴＭＰ２２－７Ｑ）構築物は、不溶性画分中に組換えタンパク質の約５０％及び可溶性画分中に組換えタンパク質の５０％を伴って、極めて優れた発現を示した。ＭＫ６Ｈ－Ｇ２－Ｆｎ３－Ｇ５－２Ｘ（ＴＭＰ２２－７Ｑ）も、不溶性画分中に組換えタンパク質の約１５％及び可溶性画分中に残りを伴って、良好に発現した。

【０２７２】

【表４】

表５．様々なＳｈＫ（実際には、［ｄｅｓＡｒｇ１］ＳｈＫ）融合及びＯＳＫ１融合構築物の相対発現レベル。「＋／－」は微かなバンドが観察されたことを意味し、「＋」組換え融合タンパク質の明確な低いレベルの発現を示す弱いバンドを表し、「＋＋」は組換え融合タンパク質の強い発現を示す中度に強いバンドを表し、「＋＋＋」は組換え融合タンパク質の高いレベルの発現を示す強いバンドを表す。表中の「クリッピングを受けた」という語は、計算された質量より著しく下方に走行したバンドを現す。幾つかの事例では、２つのバンド（一方は完全長であると予想され、他方はこれより小さな産物）が出現した。これに対しては、組換え融合タンパク質のプロテアーゼ媒介性クリッピングが最も可能性が高い説明である。

	pAMG21	pET30
M-G_2-H_6-G_3-10^{th}Fn3-$(G_4S)_2$-OsK1	+++	NA
M-G_2-H_6-G_3-PDZ(1N7F)-$(G_4S)_2$-OsK1	++	NA
M-G_2-H_6-G_3-PDZ(1UEZ)-$(G_4S)_2$-OsK1	+++	NA
M-G_2-H_6-G_3-PDZ(1WFV)-$(G_4S)_2$-OsK1	+	NA
M-G_2-H_6-G_3-SH2(1AB2)-$(G_4S)_2$-OsK1	++	NA
M-G_2-H_6-G_3-SH2(1JYQ)-$(G_4S)_2$-OsK1	+/-	NA
M-G_2-H_6-G_3-SH3(1PHT)-$(G_4S)_2$-OsK1	++	NA

M-G_2-H_6-G_3-SH3(1WA7)-$(G_4S)_2$-OsK1[b]	++ clipped	NA
M-G_2-H_6-G_3-SH3(1X2K)-$(G_4S)_2$-OsK1	+++	NA
M-G_2-H_6-G_3-CH2-$(G_4S)_2$-OsK1	+++	NA
M-G_2-H_6-G_3-10^{th}Fn3-$(G_4S)_2$-ShK	+/-	NA
M-G_2-H_6-G_3-PDZ(1N7F)-$(G_4S)_2$-ShK	+	++
M-G_2-H_6-G_3-PDZ(1UEZ)-$(G_4S)_2$- ShK	+/-	++
M-G_2-H_6-G_3-PDZ(1WFV)-$(G_4S)_2$- ShK	+/-	NA
M-G_2-H_6-G_3-SH2(1AB2)-$(G_4S)_2$- ShK	+/-	NA
M-G_2-H_6-G_3-SH2(1JYQ)-$(G_4S)_2$- ShK	+/-	NA
M-G_2-H_6-G_3-SH3(1PHT)-$(G_4S)_2$- ShK	+/-	NA
M-G_2-H_6-G_3-SH3(1WA7)-$(G_4S)_2$- ShK	+/- clipped	+ clipped
M-G_2-H_6-G_3-SH3(1X2K)-$(G_4S)_2$- ShK	+/-	++
M-G_2-H_6-G_3-CH2-$(G_4S)_2$-ShK	++	NA

【０２７３】

タンパク質精製。組織粉砕機を用いて、沈降物質量の５倍の（１ｇ＝１ｍＬと仮定して、１容量と定義した。）、約０．１ｍｇ／ｍＬのニワトリ卵白リゾチームを加えた室温の５０ｍＭｔｒｉｓＨＣｌｐＨ８．０、５ｍＭＥＤＴＡ中に凍結された細胞ペーストを融解することによって、封入体を調製した。次いで、細胞を崩壊させるために、約１２，０００ＰＳＩで、微小流体装置に懸濁液を２回通過させた。次いで、４℃で、１１，３００ｇで５０分間、均質化された懸濁液を遠心し、上清を廃棄した。組織粉砕機を用いて、１％デオキシコール酸の１／２容量中に、沈降物を再懸濁し、４℃で、１５，３００ｇで４０分間遠心し、上清を廃棄した。次いで、組織粉砕機を用いて、水の１／２容量中に沈降物を再懸濁し、４℃で、１５，３００ｇで４０分間遠心し、上清を廃棄した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって、可溶化液及び洗浄画分を評価した（図６ＡからＥ）。

【０２７４】

次いで、組織粉砕機を用いて、沈降物質量１ｇ当り５０ｍＭｔｒｉｓｐＨ８．０を加えた８Ｍ塩酸グアニジン９ｍＬの比率で、洗浄された封入体をまず溶解し、続いて、室温で３０分間、穏やかに撹拌しながら、１０ｍＭＤＴＴを用いて還元することによって、不溶性タンパク質をタンパク質再折り畳みに供した。次いで、再折り畳み緩衝液カクテル（１Ｍ尿素、５０ｍＭエタノールアミン、１６０ｍＭアルギニンＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、０．０２％NaN_3、ｐＨ９．８、４ｍＭシステイン及び１．２ｍＭシスタミンＨＣｌ）の１００容量部に対して還元され、変性されたタンパク質溶液の１容量部を４℃でゆっくり添加することによって、再折り畳みを開始した。次いで、典型的には２から４日間、穏やかに撹拌しながら、再折り畳み混合物を４℃で温置した。

【０２７５】

次いで、０．４５μｍ酢酸セルロースフィルターを通して、再折り畳み混合物をまずろ過することによって、再折り畳みカクテルの精製を行った。次いで、ろ過された溶液を濃縮し、ＰａｌｌＯｍｅｇａ３ｋＤａＵＦ／ＤＦ膜及びＮｉ－緩衝液Ａ（５０ｍＭNaH_2PO_4、３００ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ７．５）を用いて緩衝液を交換した。保持液を除去した後、装置にＮｉ緩衝液Ａを流し、これを保持液と合わせた後、０．４５μｍ酢酸セルロ

ースフィルターを通してろ過した。１ＰＨＴ及び１ＡＢ２構築物は、ＥＤＴＡの不存在下で再折り畳みされたので、これらの構築物に関しては、透析ろ過工程を省略した。緩衝液交換された材料に、５００ｍＭイミダゾールの１／１００容量を添加し、次いで、約１３℃で、Ｎｉ緩衝液Ａ中のＱｉａｇｅｎＮｉ－ＮＴＡＳｕｐｅｒｆｌｏｗカラムへタンパク質をかけた。Ｎｉ緩衝液Ａ、続いて、８％Ｎｉ緩衝液Ｂ（２５０ｍＭイミダゾール、５０ｍＭＮａH_2ＰＯ$_4$、３００ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ７．５）の数カラム容積でカラムを洗浄した。６０％緩衝液Ｂを用いて、タンパク質を溶出した。次いで、３．５ｋＤａ膜とともにＰｉｅｒｃｅＳｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒを使用して、７℃で一晩、１０ｍＭＮａH_2ＰＯ$_4$、ｐＨ７．１に対して、溶出されたタンパク質を透析した。約１３℃で、Ｓ－緩衝液Ａ（１０ｍＭＮａH_2ＰＯ$_4$、ｐＨ７．１）中のＧＥＨｉＴｒａｐＳＰ－ＨＰカラムへ搭載することによって、タンパク質をさらに精製した。Ｓ－緩衝液Ａの数カラム容量でカラムを洗浄し、次いで、６０％Ｓ－緩衝液Ｂ（１ＭＮａＣｌ、１０ｍＭＮａH_2ＰＯ$_4$、ｐＨ７．１）への線形グラジエントを用いて溶出した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析に基づいて、画分をプールし、４℃で、３ｋＤａ膜を備えたＰａｌＭａｃｒｓｅｐを用いて、２．４７から５．４４ｍｇ／ｍＬまで濃縮した。次いで、０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターを通して、最終産物をろ過した。

【０２７６】

次いで、２５０から３４０ｎｍへのスペクトル走査を実施することによって、産物の濃度を分析し、下表６に列記されている分子量と２８０ｎｍの吸光係数を用いて、濃度を計算した。次いで、１と１００ＥＵ／ｍｇの間で読み取るように試料を希釈し、ＣｈａｒｌｅｓＲｉｖｅｒＬａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓカートリッジ（０．０５から５ＥＵ／ｍＬの感度）発熱物質アッセイを用いて、発熱物質の含量を測定した。ＳＥＣ緩衝液（５０ｍＭＮａH_2ＰＯ$_4$ｐＨ６．９、２５０ｍＭＮａＣｌ）中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）上へ、１ｍＬ／分でタンパク質溶液を注入し、２８０ｎｍでの吸光度を観察することによって、凝集状態を測定した（図７ＡからＦ）。ＭＥＳＳＤＳ走行緩衝液及び非還元ＮｕＰＡＧＥ搭載緩衝液中において、３０分間、２００Ｖで展開する１．０ｍｍの４から１２％ＢｓｉＴｒｉｓＮｕＰＡＧＥゲルを用いて、タンパク質の純度を評価した。ＢｏｓｔｏｎＢｉｏｌｏｇｉｃａｌｓＱｕｉｃｋＢｌｕｅ染色でゲルを染色した（図８ＡからＣ）。質量分光法を用いて、産物の分子量を確認した（図９ＡからＥ）。

【０２７７】

【表５】

表６．OSK1 融合タンパク質の産物濃度

構築物	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)	分子量 (ダルトン)	濃度 (mg/mL)
CH2	17,460	17,373	3.35
配列番号 80			
FnIII	14,090	16,099	2.47
配列番号 81			
1X2K	17,220	12,382	5.44
配列番号 84			
1UEZ	3,280	15,574	2.70
配列番号 85			
1N7F	3,280	16,148	4.01
配列番号 83			
1PHT	15,390	15,324	3.09
配列番号 82			

【０２７８】
生物活性アッセイ。精製されたＯｓＫ１融合物の活性を測定するために、Ca^{2+}及びMg^{2+}を加えたＰＢＳ中の０．３％ウシ血清アルブミン中において、検査試料に８回、１：３の系列希釈を行った。実験の２日前に、電圧活性型K^{+}チャネルＫｖ１．３を安定的に発現するＣＨＯ細胞をＴ－１７５組織培養フラスコ中に（５×10^{6}の密度で）播種し、約９５％の集密度になるまで増殖させた。実験の直前に、ＰＢＳで細胞を洗浄した後、トリプシン（０．２５％）とＶｅｒｓｅｎｅ（１：５０００）の混合物（２ｍＬ）（１：１容積比）を用いて３７℃で（３分間）剥離させた。続いて、１０％ＦＢＳ、１×ＮＥＡＡ及びＧ４１８の７５０μｇ／ｍＬを加えた組織培地（Ｇｌｕｔａｍａｘを加えたＨＡＭのＦ－１２、ＩｎＶｉｔｒｏｇｅｎ、＃３１７６５）１０ｍＬ中、フラスコ中に細胞を再懸濁し、１０００ｒｐｍで１．５分間遠心した。３から５×10^{6}細胞／ｍＬで、得られた細胞沈降物をＰＢＳ中に再懸濁した。自動化された電気生理学システムＩｏｎＷｏｒｋｓＱｕａｔｔｒｏを用いて、ペプチドがＣＨＯ－Ｋｖ１．３細胞中のK^{+}電流を阻害する能力を調べた。再懸濁された細胞、アッセイプレート、集合パッチクランプ（ＰＰＣ）パッチプレート並びに適切な細胞内（９０ｍＭＫ－グルコナート、２０ｍＭＫＦ、２ｍＭＮａＣｌ、１ｍＭＭｇＣｌ２、１０ｍＭＥＧＴＡ、１０ｍＭＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．３５）及び細胞外（Ca^{2+}及びMg^{2+}を加えたＰＢＳ）緩衝液をＩｏｎＷｏｒｋｓＱｕａｔｔｒｏ上に配置した。アムホテリシンをベースとした有孔パッチクランプ法を用いて、ＣＨＯ－Ｋｖ１．３細胞から電気生理学的記録を行った。ＩｏｎＷｏｒｋｓＱｕａｔｔｒｏの電圧固定回路を用いて、細胞を－８０ｍＶの膜電位に固定し、４００ｍ秒間、膜電位を＋３０ｍＶまで段階的に変化させることによって、電圧によって活性化されるK^{+}電流を誘発させた。対照条件（すなわち、実験の開始時に阻害剤が存在しない。）でK^{+}電流を誘発させ、１０から１５分後に、検査溶液の存在下で温置した。４３０ｍ秒と４４０ｍ秒の間で、平均K^{+}電流振幅を測定した。検査試料の各濃度の存在下でのK^{+}電流の振幅は、同じウェル中の対照条件でのK^{+}電流のパーセントとして表した。次いで、検査溶液中のペプチド濃度の関数としてデータをプロットし、以下のロジスティック式を用いて、IC_{50}値を推定した。（$Y=A+((B-A)/(1+((X/C)^{D}))))$（Ａは最低であり、Ｂは最大であり、ＣはＩＣ５０であり、Ｄは勾配であり、Ｘは濃度範囲であり、ＹはＰＯＣ範囲である。）。

【０２７９】
（実施例２）
融合タンパク質のＰＥＧ化
Ｋｉｎｓｔｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎ－ｔｅｒｍｉｎａｌｌｙ ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎ ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ａｎｄ ｍｅｔｈｏｄｓ、米国特許第５，８２４，７８４号に以前記載された方法と同様に、各アミノ基の還元的アルキル化によって、６つの異なるＯＳＫ１融合タンパク質（配列番号８０から８５）を２０ｋＤａメトキシ－ＰＥＧ－アルデヒドでＰＥＧ化した。要約すれば、５０ｍＭＮａＯＡｃ、ｐＨ５．０中に、２ｍｇ／ｍＬになるように、精製された融合タンパク質を希釈し、これに、２０ｋＤａメトキシ－ＰＥＧ－プロピオンアルデヒド（Ｎｅｋｔａｒ、Ｈｕｎｔｓｖｉｌｌｅ、ＡＬ）を２倍モル過剰で添加した後、１０ｍＭの最終濃度を得るために、１Ｍシアノ水素化ホウ素ナトリウムの十分な容量を添加した。反応を密封し、４℃で一晩穏やかに混合した。反応期間の完了時に、２０ｍＭＮａＯＡｃ、ｐＨ４．０で４倍希釈することによって、反応を停止させた。

【０２８０】
１０ｍＭＮａＯＡｃ、ｐＨ４緩衝液中の５ｍＬＳＰＳｅｐｈａｒｏｓｅＨＰＨｉＴｒａｐカラムを用いて、調製用ＦＰＬＣ（Ａｋｔａ，ＧＥＨｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）によって、多置換された連結物及び未反応の融合タンパク質から一置換されたＰＥＧ連結物を精製し、２５カラム容積にわたる線形の０から０．５ＭＮａＣｌグラジエントを用いて溶出した。図１０は、２０ｋＤａのｍＰＥＧ－１ＵＥＺ－ＯＳＫ１の精製から得られたクロマトグラムを示しており、他の精製の代表例である。一置換され

たＰＥＧ連結物を含有する画分を同定するために、溶出されたピーク画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって評価した。これらをプールし、濃縮し、ＰＢＳ中に透析した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって、最終の精製されたプールを性質決定し（図１１ＡからＢ）、さらなる分析に供した。

【０２８１】

全血活性アッセイ。ＰＥＧ化後の化合物のインビトロ全血活性アッセイのために、ＤＭＳＯ（Ｓｉｇｍａ＃Ｄ２６５０）中に化合物を１：３で系列希釈し、次いで、ＡｓｓａｙＭｅｄｉｕｍ（ＩｓｃｏｖｅｓＤＭＥＭ（Ｇｉｂｃｏ＃２４４０－０５３）＋０．１％ＨｕｍａｎＡｌｂｕｍｉｎ（ＨｕｍａｎＳｅｒｕｍＡｌｂｕｍｉｎ２５％ＵＳＰ，Ｇｅｍｉｎｉ＃８００－１２＋１×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ／Ｇｌｕ（Ｇｉｂｃｏ＃１０３７８－０１６）＋５５μＭ２－メルカプトエタノール（Ｇｉｂｃｏ＃２１９８５－０２３）中へ、ポリプロピレン９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ＃３３６５又は＃３９５７））中の作業濃度の４倍まで希釈した。ＡｓｓａｙＭｅｄｉｕｍ中へ、作業濃度の４倍まで、試料を１；３で系列希釈した。

【０２８２】

９６ウェルの平底組織培養プレート（Ｆａｌｃｏｎ＃３５－３０７２）の各ウェルに試料５０μＬを添加した。次いで、薬を服用していない健康なドナーから得た、ヘパリン処理されたヒト全血１００μＬを添加した。プレートを３７℃で１時間温置した。温置後、１０μＭの最終濃度にするための４０μＭタプシガルギン（ＡｌｏｍｏｎｅＬａｂｓ＃Ｔ－６５０）又はアッセイ培地（陰性対照）の５０μＬ／ウェルを添加し、３７℃で４８時間、プレートを温置した。次いで、丸底ポリプロピレン９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ＃３３５５）中に上清１００μＬを集め、直ちに分析し、又は－８０℃で保存した。

【０２８３】

製造業者の推奨に従って、ＭＳＤＭＳ６０００　４ＳｐｏｔＰｌａｔｅｓ（＃Ｎ４１ＩＢ－１）上でサイトカイン（ヒトＩＬ－２及びヒトＩＦＮ－γ）を測定した。要約すれば、ウェル当り上清２０μＬをＭＳＤプレートに添加した後、ウェル当り１３０μＬの検出抗体カクテルをを添加した。次いで、プレートを密封し、室温で一晩、暗所にて振盪した。翌日、ＭＳＤＳｅｃｔｏｒＨＴＳ装置（ＭｅｓｏＳｃａｌｅＤｉｓｃｏｖｅｒｉｅｓ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）上で、プレートを読み取った。次いで、データを分析し、ＡｃｔｉｖｉｔｙＢａｓｅ及びＸｌｆｉｔプログラム（ＩＤＢＳ，Ｇｕｉｌｄｆｏｒｄ，ＵＫ）を用いてIC_{50}値を求めた。（下表７）。

【０２８４】

【表６】

表７．PEG化されたOSK1融合タンパク質の産物濃度

PEG化された構築物	IL-2IC50 ドナー１ (μM)	IL-2IC50 ドナー2 (μM)	IFN-γIC50 ドナー１ (μM)	IFN-γIC50 ドナー2 (μM)
CH2 配列番号80	0.007429	0.00922	0.088987	0.0113
FnIII 配列番号81	0.018726	0.03476	0.037399	0.03634
1X2K 配列番号84	0.007057	0.020087	0.011178	0.013763
1UEZ 配列番号85	0.00533	>0.100000	0.004107	0.014324
1N7F 配列番号83	0.033277	0.079462	>0.100000	>0.033333
1PHT 配列番号82	0.017752	>0.100000	>0.100000	>0.100000

【０２８５】

融合タンパク質の薬物速度論。融合物の薬物速度論的特性を測定するために使用されたＳｗｉｓｓＷｅｂｓｔｅｒマウスは、ＴａｃｏｎｉｃＩｎｃ．（名称：Ｔａｃ：ＳＷ）から取得した。マウスは、投薬の時点で８から１０週齢であり、平均体重は３１ｇであった。Ｓａｎｉ－Ｃｈｉｐ（Ｈａｒｌａｎ－Ｔｅｋｌａｄ，Ｉｎｃ．）ベッド上の静的フィルタートップケージ中において、５匹のグループでマウスを飼育した。放射線照射されたげっ歯類用固形飼料（Ｈａｒｌａｎ－Ｔｅｋｌａｄげっ歯類餌２９１９）をマウスに与え、逆浸透圧水を自由に飲ませた。マウスは、ＡＡＡＬＡＣによって認証された施設内で飼育した。環境条件及び衛生状態は、実験動物の飼育及び使用のための指針によって設定された基準を満たし、又は上回る。マウスは、１２時間の明期、１２時間の暗期サイクル（午前６：３０から午後６：３０）に曝露した。マウス当りに注射された総容積は、２ｍｇ／ｋｇで、静脈内に１５０μＬであった。検査化合物の注射から２４時間後に動物を安楽死させ（CO_2気体吸入）、心臓穿刺によって血液を集めた。血清分離チューブ（Ｂ．Ｄ．）中に血液を配置した。上記されている全血活性アッセイによって、融合タンパク質のレベルを測定した（図１２）。

【０２８６】

（実施例３）

ビリンヘッドピースタンパク質融合物及びＰＥＧ化

本発明の別の実施形態において、異常に熱安定的な構造を有し、システインを含有しないビリンから得られた自律的に折り畳むタンパク質断片である小さなタンパク質ドメインが選択された。ＰＥＧ化を可能とするが、薬理学的に不活性な小タンパク質ドメインのＮ末端又はＣ末端の何れかにおいて、ペプチド融合物を妨害しないシステインへの変異に適した幾つかの内部部位が同定されている。本明細書中に提供されているのは、ビリンヘッドピース融合プラットフォームが、場合によって、増強された薬物速度論特性のための容易なＰＥＧ化を可能としながら、小さな治療用ペプチドの組換え発現を可能とする実施例である。

【０２８７】

ビリンは、アクチン繊維の維持及び組織化に関与している巨大な（９２．５ｋＤａ）のアクチン結合タンパク質であり、吸収性組織中での微小絨毛の形成への関与が推定されている。このタンパク質は、様々な組織中で広く発現されており、ヒト配列が決定されてい

る。（Ａｒｐｉｎ，Ｍ．，ｅｔａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｏｆｈｕｍａｎｖｉｌｌｉｎ：Ａｌａｒｇｅｄｕｐｌｉｃａｔｅｄｄｏｍａｉｎｈｏｍｏｌｏｇｏｕｓｗｉｔｈｏｔｈｅｒａｃｔｉｎ－ｓｅｖｅｒｉｎｇｐｒｏｔｅｉｎｓａｎｄａｕｎｉｑｕｅｓｍａｌｌｃａｒｂｏｘｙ－ｔｅｒｍｉｎａｌｄｏｍａｉｎｒｅｌａｔｅｄｔｏｖｉｌｌｉｎｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ．Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．，（１９８８）．１０７：ｐ．１７５９－１７６６）。ビリン活性は、２つのドメイン（巨大なコアドメイン（８４ｋＤａ）及び「ヘッドピース」と称されるずっと小さなＣ末端ドメイン（８ｋＤａ））の間で共有されている。両ドメインは、独立したアクチン結合部位を含有する。ビリンヘッドピースドメインのＮＭＲ構造が決定されており、システインスキャン突然変異誘発によって、アクチン結合部位及び独特の構造的特徴がマッピングされている。（Ｖａｒｄａｒ，Ｄ．，ｅｔａｌ．，ＮＭＲｓｔｒｕｃｔｕｒｅｏｆａｎＦ－ａｃｔｉｎ－ｂｉｎｄｉｎｇ“ｈｅａｄｐｉｅｃｅ”ｍｏｔｉｆｆｒｏｍｖｉｌｌｉｎ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，（１９９９）２９４：ｐ．１２９９－１３１０；Ｄｏｅｒｉｎｇ，Ｄ．Ｓ．ａｎｄＰ．Ｔ．Ｍａｔｓｕｄａｉｒａ，Ｃｙｓｔｅｉｎｅｓｃａｎｎｉｎｇｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓａｔ４０ｏｆ７６ｐｏｓｉｔｉｏｎｓｉｎｖｉｌｌｉｎｈｅａｄｐｉｅｃｅｍａｐｓｔｈｅＦ－ａｃｔｉｎｂｉｎｄｉｎｇｓｉｔｅａｎｄｓｔｒｕｃｔｕｒａｌｆｅａｔｕｒｅｓｏｆｔｈｅｄｏｍａｉｎ．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，（１９９６）３５：ｐ．１２６７７－１２６８５）。ビリンヘッドピースのこれらの研究は、「ＨＰ－３５」と称され、ヘッドピースの最後の３５アミノ酸からなるヘッドピースサブドメインの同定に結び付いた。ＨＰ－３５ポリペプチドはシステインを含有せず、残りのヘッドピース配列とは独立に、イー・コリ中で容易に発現された。この断片は、安定で、単量体の、優れて秩序化された構造へ自律的に折り畳むことが見出された。（ＭｃＫｎｉｇｈｔ，Ｃ．Ｊ．，ｅｔａｌ．，Ａｔｈｅｒｍｏｓｔａｂｌｅ３５－ｒｅｓｉｄｕｅｓｕｂｄｏｍａｉｎｗｉｔｈｉｎｖｉｌｌｉｎｈｅａｄｐｉｅｃｅ，Ｊ．ＭｏＩ．Ｂｉｏｌ．，（１９９６）２６０：ｐ．１２６－１３４）。ＨＰ－３５は、ジスルフィド結合を持たない最小の公知のポリペプチドとして独特であり、異常に高い熱安定性（T_m＝７０℃）及び塩酸グアニジン変性（＞４ＭＧｕＨＣｌ）に対する耐性を有し、可逆的な折り畳み解除を示す。ＨＰ－３５サブドメインは、ヘッドピースドメイン中に見出されたアクチン結合部位の幾つかを含有し、ＨＰ－３５はアクチンを結合しない。（Ｌｕｎａ，Ｅ．Ｊ．，ｅｔａｌ．，Ａｃｔｉｎ－ｂｉｎｄｉｎｇｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅｓａｎｄｎｕｃｌｅｉｃａｃｉｄｓｅｎｃｏｄｉｎｇｔｈｅｓａｍｅ．，ＵＳ５，９８５，６０８（１９９９））。完全な状態のヘッドピース構造中に均等な配列とほぼ同一の極めて安定し、非常に稠密な三次元構造を示すＨＰ－３５に対して決定されたＮＭＲ構造も存在する。（ＭｃＫｎｉｇｈｔ，Ｊ．Ｃ，Ｐ．Ｔ．Ｍａｔｓｕｄａｉｒａ，ａｎｄＰ．Ｓ．Ｋｉｍ，ＮＭＲｓｔｒｕｃｔｕｒｅｏｆｔｈｅ３５－ｒｅｓｉｄｕｅｖｉｌｌｉｎｈｅａｄｐｉｅｃｅｓｕｂｄｏｍａｉｎ．Ｎａｔｕｒｅ Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ，（１９９７）．４：ｐ．１８０－１８４）。これらの研究は、ヘッドピースドメインの構造的安定性の多くがＨＰ－３５サブドメインに由来することを結論付ける。同様に、ＨＰ－７６と称される最後の７６アミノ酸からなるより大きな延長されたビリンヘッドピースドメインも、融合対として性質決定された。

【０２８８】

ＨＰ３５－又はＨＰ７６－ペプチド融合タンパク質のその後のＰＥＧ化を促進するために、単一のシステイン置換に対する３つの異なる位置を検査した。Ｔ４８Ｃ、Ａ５６Ｃ又はＮ６８Ｃ。これらの変異部位は、３つのヘリックスの各々の溶媒露出された表面上に位置しており、一旦、ＰＥＧ化された後、治療用ペプチド融合対との妨害を最小化するために、ポリペプチド末端に対して十分に遠位である。これらのシステイン変異の各々は、発現されたヘッドピース変異体中において、十分に耐容され、溶媒露出されていることが示された。（Ｄｏｅｒｉｎｇ，Ｄ．Ｓ．ａｎｄＰ．Ｔ．Ｍａｔｓｕｄａｉｒａ，

Ｃｙｓｔｅｉｎｅ ｓｃａｎｎｉｎｇ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ａｔ ４０ ｏｆ ７６ ｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ｉｎ ｖｉｌｌｉｎ ｈｅａｄｐｉｅｃｅ ｍａｐｓ ｔｈｅ Ｆ－ａｃｔｉｎ ｂｉｎｄｉｎｇ ｓｉｔｅ ａｎｄ ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ ｆｅａｔｕｒｅｓ ｏｆ ｔｈｅ ｄｏｍａｉｎ．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，（１９９６）．３５：ｐ．１２６７７－１２６８５）。実際、６８位のシステインは、安定化させることが見出されており、ヘッドピースの熱的安定性を８℃増加させた。ＨＰ－３５研究の多くはニワトリの配列を用いて行われてきたが、均等なヒト配列との大幅な相同性が存在する（図１３）。ヒト配列に対する推定されたシステイン変異部位は、２つの種間で同一でなくても、保存されている。

【０２８９】

ＰＴＨ－ＨＰ７６融合タンパク質。　本発明の組換え融合タンパク質の一実施形態において、副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）は、慣用の分子生物学的技術を用いて、ビリンヘッドピースドメインＨＰ７６に融合され、以下の配列のポリペプチドをもたらす。

【０２９０】

【化１２】

SVSEIQLMHN LGKHLNSMER VEWLRKKLQD VHNFGGGGGV FNANSNLSSG

PLPIFPLEQL VNKPVEELPE GVDPSRKEEH LSIEDFTQAF GMTPAAFSAL

PRWKQQCLKK EKGLFHHHHH H//　配列番号 :59.

【０２９１】

この構築物中で、治療用ペプチドＰＴＨは最初の３４アミノ酸に相当し、次の５つのグリシン残基はリンカーに相当し、この後に、ＰＥＧへの連結のためのＮ６８Ｃ変異（配列番号５９中の下線が付された残基）及びＩＭＡＣ精製を促進するための６ヒスチジン伸長を含むＨＰ７６ドメインの７６のアミノ酸が続く。

【０２９２】

イー・コリ中で発現されると、ＰＴＨ－ＨＰ７６融合物は、細胞可溶化液の可溶性及び不溶性画分の両画分中でウェスタンブロットによって検出された。しかしながら、融合タンパク質が可溶性画分から単離されたときに、ＰＴＨ－ＨＰ７６分子の幾らかの分解が観察された。これに対して、不溶性画分から単離されたＰＴＨ－ＨＰ７６は、概ね、無傷であるように見受けられた。簡潔に述べると、細胞を溶解し、遠心し、４℃で３０分撹拌することによって、不溶性沈降物を８Ｍ尿素、１０ｍＭＮａＨＰＯ$_4$、５０ｍＭＮａＣｌ、１０ｍＭＤＴＴ、ｐＨ７．５中に溶解した。

【０２９３】

遠心によって、可溶化されたＰＴＨ－ＨＰ７６を清澄化し、６Ｍ尿素、１０ｍＭＮａＨＰＯ$_4$、５０ｍＭＮａＣｌ、５ｍＭ２－メルカプトエタノール、５ｍＭイミダゾール、ｐＨ７で上清を１：４希釈した。次いで、Ｎｉ－ＮＴＡカラム（Ｑｉａｇｅｎ、ドイツ）に、希釈された融合タンパク質を搭載し、線形の５から２４５ｍＭイミダゾール勾配で溶出した（図１４）。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルによってピーク画分を分析し（図１５）、ＰＴＨ－ＨＰ７６を含有する画分をプールし、濃縮し、５０ｍＭＮａＨＰＯ$_4$、５ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ６．５中に緩衝液交換した。

【０２９４】

次いで、１．５倍モル過剰で３０ｋｍＰＥＧ－マレイミド（Ｎｅｋｔａｒ，Ｈｕｎｔｓｖｉｌｌｅ，ＡＬ）を添加することによって、単離されたＰＴＨ－ＨＰ７６融合タンパク質をＰＥＧ化し、４℃で一晩反応させた。次いで、陽イオン交換クロマトグラフィー（図１６）によって連結物を精製し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析し（図１７）、濃縮し、ＰＢＳ中に透析した。

【０２９５】

ＰＴＨによって誘導された高カルシウム血症を測定し、ＰＥＧ化された合成ＰＴＨ連結物（「ｃ３３」と表記）並びにイー・コリ由来のＰＴＨ－ＨＰ７６及びＰＥＧ－ＰＴＨ－

ＨＰ７６（図１８）を比較するマウスでのインビボ研究において、ＰＥＧ－ＰＴＨ－ＨＰ７６を検査した。この研究において、５匹のＢＤＦ１マウス（４週齢、雄）の群に、合成ＰＥＧ－ＰＴＨ２００ｎｍｏｌ、イー・コリ由来のＰＴＨ－ＨＰ７６の５８．６ｎｍｏｌ又はイー・コリ由来のＰＥＧ－ＰＴＨ７６の５８．６ｎｍｏｌの単回皮下投与を与え、０、２、６、２４、４８及び７２時間に、イオン化されたカルシウム測定を行った。

【０２９６】

データは、ＰＴＨとのＨＰ７６融合物が原核生物の微生物宿主細胞中での治療用ペプチドの発現を可能とし、６８位のシステインの取り込みが容易な部位指定ＰＥＧ化を可能とすることを示す。得られた連結物は、インビボにおいて、活性を有しており、効力があった。

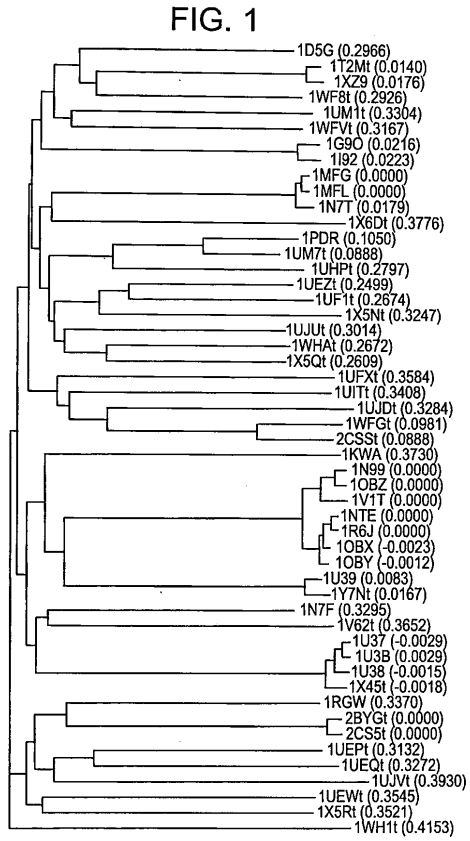
【０２９７】

この実施例に提示されているデータは、本発明の組換え融合タンパク質として発現された薬理学的に活性なペプチドが場合によってＰＥＧ化できることをさらに示し、及び延長された有効な半減期を示す。

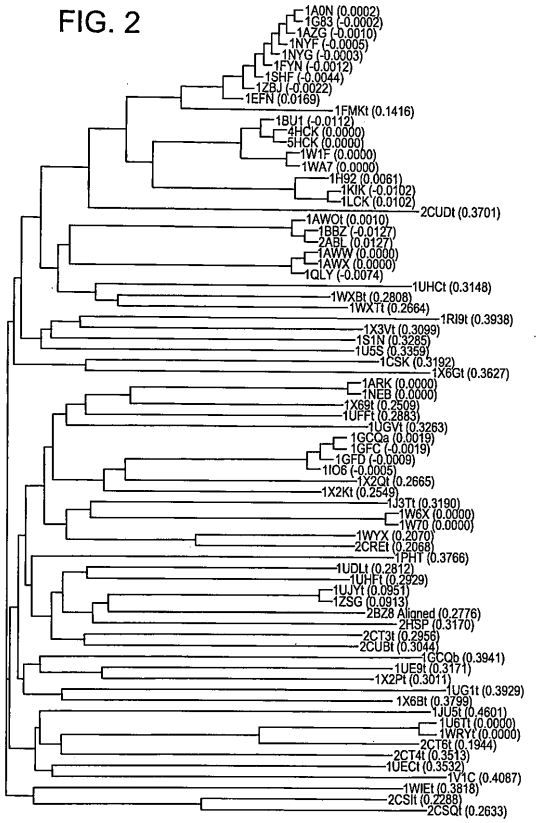
【０２９８】

前記記載は例示であって、本発明の実施形態の網羅的な記載ではなく、以下の特許請求の範囲が与えられる。

【図１】

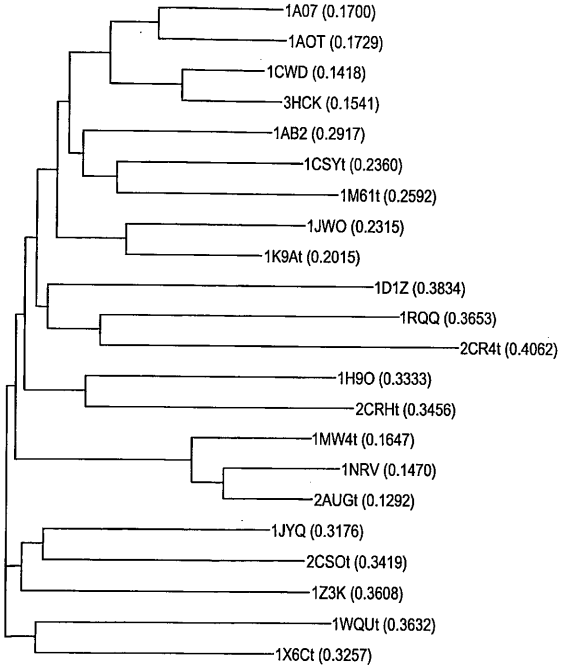


【図２】



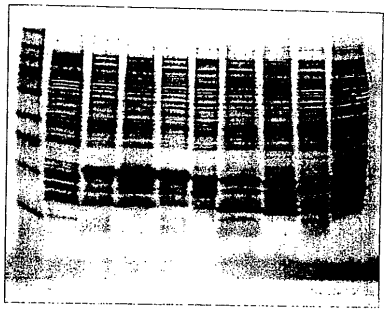
【図３】

FIG. 3



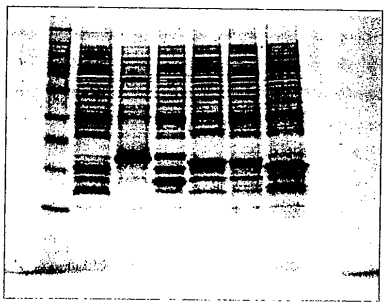
【図４Ａ】

FIG. 4A



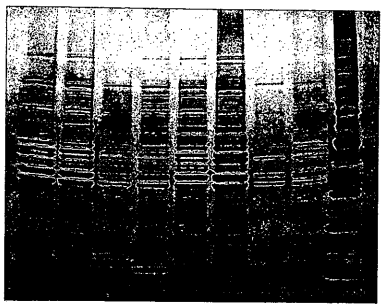
【図４Ｂ】

FIG. 4B



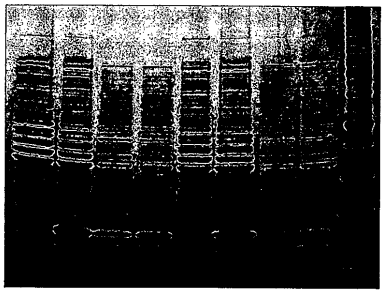
【図５Ａ】

FIG. 5A



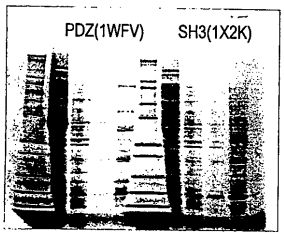
【図５Ｂ】

FIG. 5B



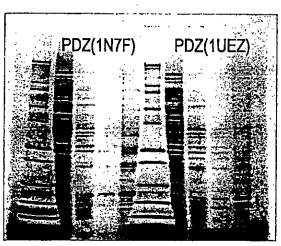
【図６Ａ】

FIG. 6A



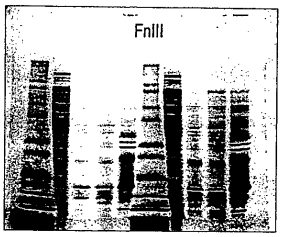
【図６Ｂ】

FIG. 6B



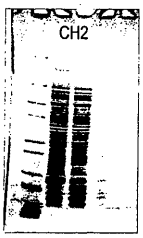
【図６Ｃ】

FIG. 6C



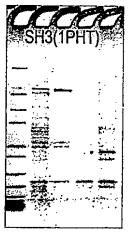
【図６Ｄ】

FIG. 6D



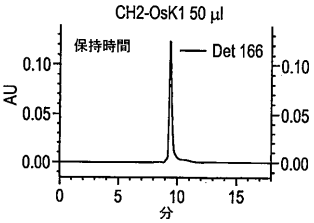
【図６Ｅ】

FIG. 6E



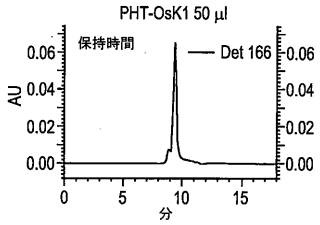
【図７Ａ】

FIG. 7A



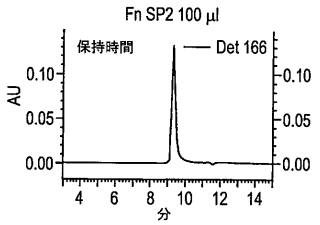
【図７Ｂ】

FIG. 7B



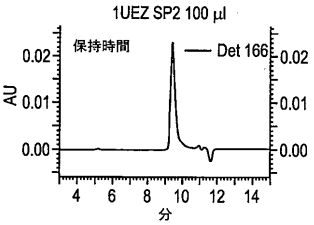
【図７Ｃ】

FIG. 7C



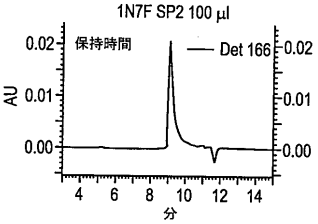
【図７Ｄ】

FIG. 7D



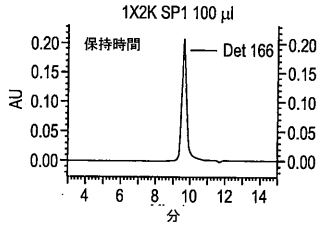
【図７Ｅ】

FIG. 7E



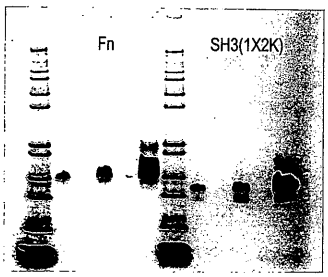
【図７Ｆ】

FIG. 7F



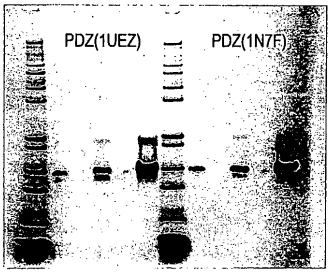
【図８Ａ】

FIG. 8A



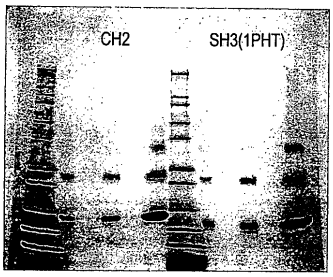
【図８Ｂ】

FIG. 8B



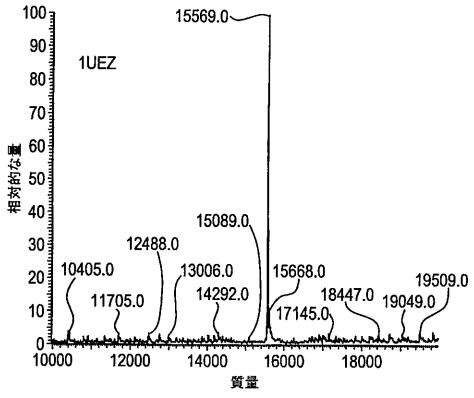
【図８Ｃ】

FIG. 8C



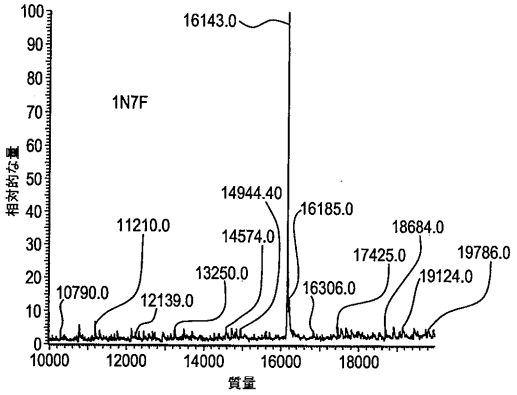
【図９Ａ】

FIG. 9A



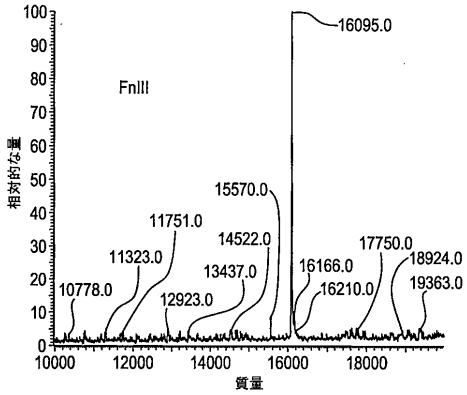
【図９Ｂ】

FIG. 9B



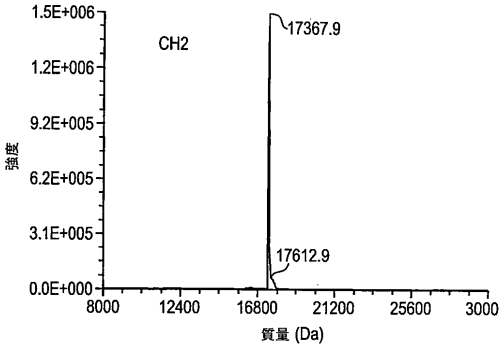
【図９Ｃ】

FIG. 9C



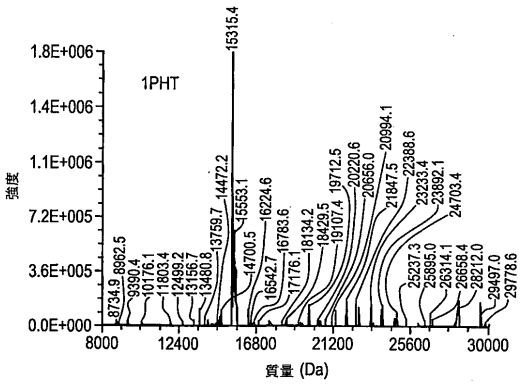
【図９Ｄ】

FIG. 9D



【図９Ｅ】

FIG. 9E



【図１０】

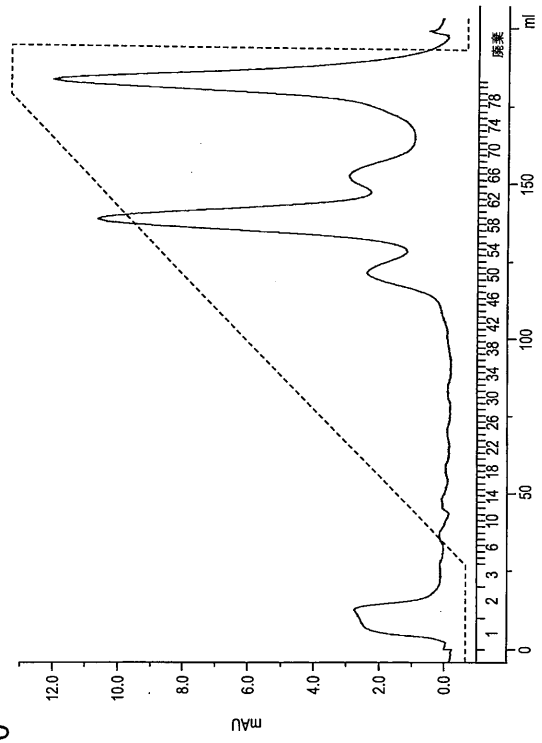
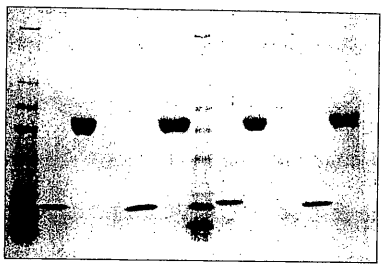


FIG. 10

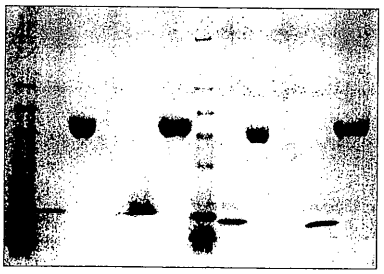
【図１１Ａ】

FIG. 11A



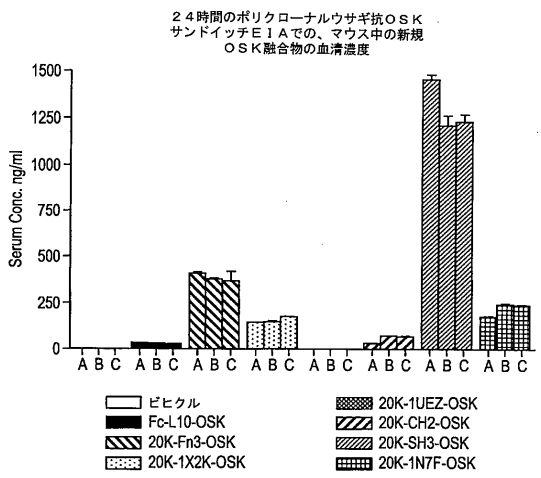
【図１１Ｂ】

FIG. 11B



【図１２】

FIG. 12



【図１３】

FIG. 13

Ch: LSDED FKAVF GMTRS AFANL PLWKQ QNLKK EKGLF
Hu: LSIED FTQAF GMTPA AFSAL PRWKQ QNLKK EKGLF

【図１４】

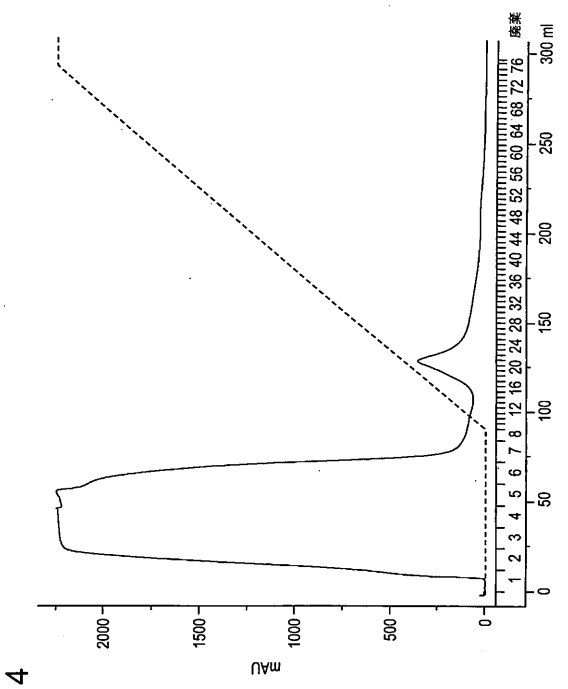
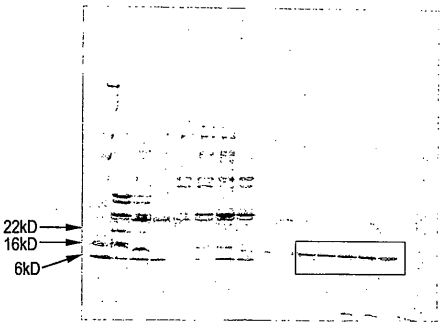


FIG. 14

【図１５】

FIG. 15



【図１６】

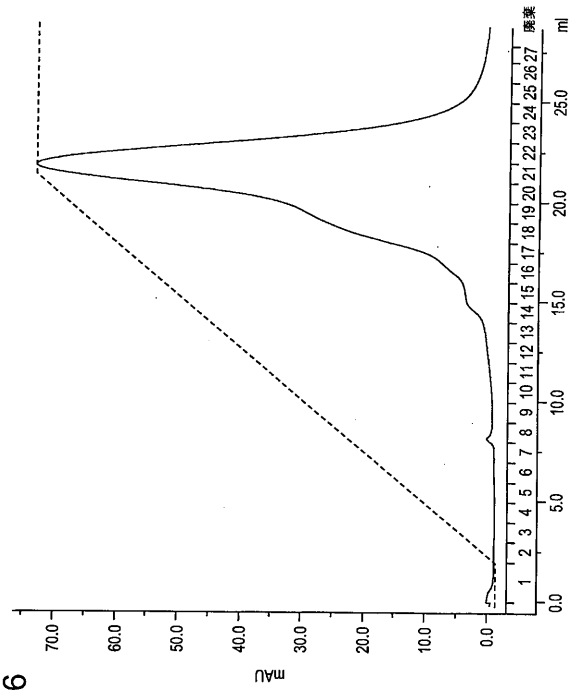
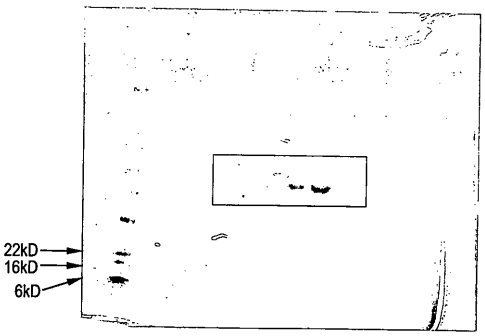


FIG. 16

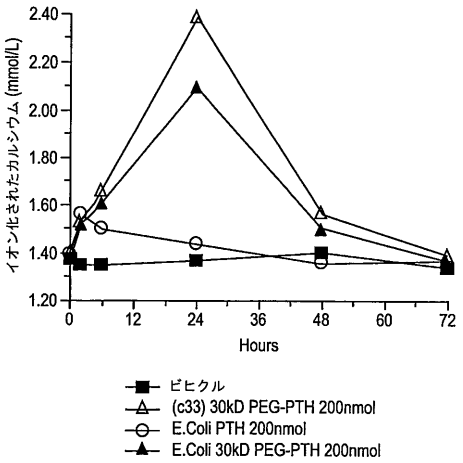
【図１７】

FIG. 17



【図１８】

FIG. 18



【配列表】

2010527607000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/006593

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/62 C07K14/435

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006/116156 A (AMGEN INC [US]) 2 November 2006 (2006-11-02) cited in the application abstract; claims 1,10-12,21,22,26 page 43, line 2 - line 29	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 January 2009	05/06/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax (+31-70) 340-3016	Vandenbogaerde, Ann

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/006593

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material

   [X] a sequence listing

   [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   [X] on paper

   [X] in electronic form

   c. time of filing/furnishing

   [X] contained in the international application as filed

   [X] filed together with the international application in electronic form

   [ ] furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/006593

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

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

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

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

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers allsearchable claims.

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

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

4. [x] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see additional sheet

Remark on Protest

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

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

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2008 /006593

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-20(part)

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a 10th fibronectin III domain as pharmacologically inactive protein domain of human origin and a pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

2. claims: 1-20(part)

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a SH3 domain as pharmacologically inactive protein domain of human origin and a pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

3. claims: 1-20(part)

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a SH2 domain as pharmacologically inactive protein domain of human origin and a pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

4. claims: 1-20(part)

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a CH2 domain of IgG1 as pharmacologically inactive protein domain of human origin and a pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

International Application No. PCT/US2008/006593

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

5. claims: 1-20(part)

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a PDZ domain as pharmacologically inactive protein domain of human origin and a pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

6. claims: 1-20(part)

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a thrombospondin repeat domain as pharmacologically inactive protein domain of human origin and a pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

7. claims: 1-20(part)

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a ubiquitin domain as pharmacologically inactive protein domain of human origin and a pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

8. claims: 1-20(part)

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a leucine-rich repeat domain as pharmacologically inactive protein domain of human origin and a pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

9. claims: 1-20(part)

International Application No. PCT/US2008 /006593

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a villin headpiece HP35 domain as pharmacologically inactive protein domain of human origin and a pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

10. claims: 1-20(part)

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a villin headpiece HP76 domain as pharmacologically inactive protein domain of human origin and a pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

11. claims: 1-20(part)

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a pharmacologically inactive protein domain of human origin of 3 kDa to 20 kDa forming protein aggregates of less then 10 percent of total mass of protein when suspended without other proteins in a pharmaceutically acceptable formulation buffer of interest and a toxin peptide as pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

12. claims: 1-20(part)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a pharmacologically inactive protein domain of human origin of 3 kDa to 20 kDa forming protein aggregates of less then 10 percent of total mass of protein when suspended without other proteins in a pharmaceutically acceptable formulation buffer of interest and a CGRP peptide antagonist as pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

13. claims: 1-20(part)

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a pharmacologically inactive protein domain of human origin of 3 kDa to 20 kDa forming protein aggregates of less then 10 percent of total mass of protein when suspended without other proteins in a pharmaceutically acceptable formulation buffer of interest and a bradykinin B1 receptor peptide antagonist as pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

14. claims: 1-20(part)

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a pharmacologically inactive protein domain of human origin of 3 kDa to 20 kDa forming protein aggregates of less then 10 percent of total mass of protein when suspended without other proteins in a pharmaceutically acceptable formulation buffer of interest and a PTH agonist peptide as pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

15. claims: 1-20(part)

International Application No. PCT/US2008/006593

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a pharmacologically inactive protein domain of human origin of 3 kDa to 20 kDa forming protein aggregates of less then 10 percent of total mass of protein when suspended without other proteins in a pharmaceutically acceptable formulation buffer of interest and a PTH antagonist peptide as pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

16. claims: 1-20(part)

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a pharmacologically inactive protein domain of human origin of 3 kDa to 20 kDa forming protein aggregates of less then 10 percent of total mass of protein when suspended without other proteins in a pharmaceutically acceptable formulation buffer of interest and a ang-2 binding peptide as pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

17. claims: 1-20(part)

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a pharmacologically inactive protein domain of human origin of 3 kDa to 20 kDa forming protein aggregates of less then 10 percent of total mass of protein when suspended without other proteins in a pharmaceutically acceptable formulation buffer of interest and a myostatin binding peptide as pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

18. claims: 1-20(part)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a pharmacologically inactive protein domain of human origin of 3 kDa to 20 kDa forming protein aggregates of less then 10 percent of total mass of protein when suspended without other proteins in a pharmaceutically acceptable formulation buffer of interest and an EPO-mimetic peptide as pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

19. claims: 1-20(part)

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a pharmacologically inactive protein domain of human origin of 3 kDa to 20 kDa forming protein aggregates of less then 10 percent of total mass of protein when suspended without other proteins in a pharmaceutically acceptable formulation buffer of interest and a TPO-mimetic peptide as pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

20. claims: 1-20

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a pharmacologically inactive protein domain of human origin of 3 kDa to 20 kDa forming protein aggregates of less then 10 percent of total mass of protein when suspended without other proteins in a pharmaceutically acceptable formulation buffer of interest and a NGF binding peptide as pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

21. claims: 1-20(part)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a pharmacologically inactive protein domain of human origin of 3 kDa to 20 kDa forming protein aggregates of less then 10 percent of total mass of protein when suspended without other proteins in a pharmaceutically acceptable formulation buffer of interest and a BAFF antagonist peptide as pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

22. claims: 1-20(part)

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a pharmacologically inactive protein domain of human origin of 3 kDa to 20 kDa forming protein aggregates of less then 10 percent of total mass of protein when suspended without other proteins in a pharmaceutically acceptable formulation buffer of interest and a GLP-1 or peptide mimetic thereof as pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

---

23. claims: 1-20(part)

The subject-matter of claims 1-20(part) relates to a recombinant fusion protein comprising a pharmacologically inactive protein domain of human origin of 3 kDa to 20 kDa forming protein aggregates of less then 10 percent of total mass of protein when suspended without other proteins in a pharmaceutically acceptable formulation buffer of interest and a GLP-2 or peptide mimetic thereof as pharmacologically active protein from 5 to 80 amino acid residues, a pharmaceutical composition comprising said fusion protein, the nucleic acid encoding said fusion protein an expression vector comprising said nucleic acid, a recombinant host cell comprising said expression vector, and a method of producing said fusion protein.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/006593

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006116156 A	02-11-2006	AR 053234 A1	25-04-2007
		AU 2006239928 A1	02-11-2006
		CA 2604999 A1	02-11-2006
		EP 1896080 A2	12-03-2008
		JP 2008538506 T	30-10-2008
		KR 20080021606 A	07-03-2008
		US 2007071764 A1	29-03-2007

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｐ 21/02	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｃ	
Ａ６１Ｋ 47/42	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ 47/42		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ウオーカー，ケネス・ダブリユ
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９１３２０、ニユーベリー・パーク、メサ・アベニユー・１７５
(72)発明者 ゲツグ，コリン・ブイ・ジユニア
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９１３２０、ニユーベリー・パーク、コーニング・ストリート・３３５７

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA07 DA06 EA04 GA11 HA03
4B064 AG01 CA02 CA19 CC15 CC24 CE20 DA01
4B065 AA26X AB01 AC14 AC16 BA02 BD01 BD14 CA24 CA44
4C076 AA94 EE41 FF31