

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5249319号
(P5249319)

(45) 発行日 平成25年7月31日(2013.7.31)

(24) 登録日 平成25年4月19日(2013.4.19)

(51) Int. Cl.	F I
C07K 14/435 (2006.01)	C O 7 K 14/435 Z N A
C12Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02
A61P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06
A61P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02
A61P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5

請求項の数 31 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-507993 (P2010-507993)	(73) 特許権者	509316165
(86) (22) 出願日	平成19年5月14日(2007.5.14)		ユニヴェルシダ ナショナル アウトノマ デ メヒコ
(65) 公表番号	特表2010-528988 (P2010-528988A)		メキシコ国 O4510 メキシコ デレ ガシオン コヨアカン シウダ ウニヴェ ルシタリア ピソ デ ラ トッレ レク トリア 9
(43) 公表日	平成22年8月26日(2010.8.26)	(74) 代理人	100147485
(86) 国際出願番号	PCT/IB2007/001544		弁理士 杉村 憲司
(87) 国際公開番号	W02008/139243	(74) 代理人	100119530
(87) 国際公開日	平成20年11月20日(2008.11.20)		弁理士 富田 和幸
審査請求日	平成22年5月14日(2010.5.14)	(74) 代理人	100160749
			弁理士 飯野 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトT-リンパ球カリウムチャンネル(Kv1.3亜型)を高い選択性で遮断し、ラットにおける生体内でのDTH-応答を減少させる二つのサソリペプチドVm23及びVm24

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1又は配列番号2から構成される単離精製されたペプチドであり、高い親和性及び特異性でカリウムチャンネルKv1.3を遮断することができることを特徴とする単離精製されたペプチド。

【請求項2】

哺乳類細胞においてKv1.3カリウムチャンネル活性を遮断するのにペプチドと前記哺乳類細胞とを接触させることを備えた哺乳類細胞におけるKv1.3カリウムチャンネル活性阻害用の配列番号1もしくは配列番号2のアミノ酸配列、又はその薬学的に許容される塩を有するペプチド。

【請求項3】

前記哺乳類細胞がヒトリンパ球細胞であることを特徴とする請求項2に記載のペプチド。

【請求項4】

Kv1.3カリウムチャンネル遮断活性を有するペプチドであって、前記ペプチドが、T-リンパ球細胞をペプチドと接触させることを備えたT-リンパ球細胞におけるカルシウムシグナル経路減衰用の配列番号1又は配列番号2から構成されるアミノ酸配列を有することを特徴とするペプチド。

【請求項5】

哺乳類細胞においてKv1.3カリウムチャンネル活性を阻害する生体外での方法であ

って、

前記哺乳類細胞において前記チャンネル活性を遮断するのに効果的な量のペプチドと、前記哺乳類細胞とを接触させる工程を含み、

前記ペプチドが、配列番号 1もしくは配列番号 2のアミノ酸配列、又はその薬学的に許容される塩を有することを特徴とする生体外での方法。

【請求項 6】

前記哺乳類細胞がヒトリンパ球細胞であることを特徴とする請求項 5 に記載の生体外での方法。

【請求項 7】

T-リンパ球細胞においてカルシウムシグナル経路を減衰させる生体外での方法であって、

前記 T-リンパ球細胞を、Kv1.3 カリウムチャンネル遮断活性を有するペプチドの効果的な量と接触させる工程を含み、

前記ペプチドが、配列番号 1 又は 配列番号 2 から構成されるアミノ酸配列を有することを特徴とする生体外での方法。

【請求項 8】

Kv1.3 カリウムチャンネル遮断活性を有するペプチドであって、

前記ペプチドが、T-細胞の集団をペプチドと接触させることを備えた哺乳動物の免疫系における T-細胞活性化過程抑制用の 配列番号 1 もしくは 配列番号 2 から構成されるアミノ酸配列、又はその薬学的に許容される塩を有することを特徴とするペプチド。

【請求項 9】

前記 T-細胞の活性化が、前記哺乳動物の免疫反応によって引き起こされることを特徴とする請求項 8 に記載のペプチド。

【請求項 10】

前記免疫反応が、異種臓器拒絶反応の結果であるか又は自己免疫疾患の結果であることを特徴とする請求項 8 又は 9 に記載のペプチド。

【請求項 11】

前記哺乳動物がヒトであることを特徴とする請求項 8 ~ 10 のいずれかに記載のペプチド。

【請求項 12】

Kv1.3 カリウムチャンネル遮断活性を有するペプチドを含む組成物であって、

前記ペプチドが、哺乳動物の免疫反応抑制用の 配列番号 1 もしくは 配列番号 2 から構成されるアミノ酸配列、又はその薬学的に許容される塩を有することを特徴とする組成物。

【請求項 13】

前記免疫反応が、異種臓器拒絶反応の結果であるか又は自己免疫疾患の結果であることを特徴とする請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

Kv1.3 カリウムチャンネル遮断活性を有するペプチドを含む組成物であって、

前記ペプチドが、異種臓器拒絶反応の予防的な処置又は治療上の処置を必要とする対象における異種臓器拒絶反応の予防的な処置又は治療上の処置用の 配列番号 1 もしくは 配列番号 2 から構成されるアミノ酸配列、又はその薬学的に許容される塩を有することを特徴とする組成物。

【請求項 15】

拒絶された臓器が、心臓、肺、肝臓、腎臓又は膵臓であることを特徴とする請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記処置を必要とする対象がヒトであることを特徴とする請求項 14 又は 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

Kv1.3 カリウムチャンネル遮断活性を有するペプチドを含む組成物であって、

10

20

30

40

50

前記ペプチドが、リンパ球 T_{E M} に関連した自己免疫疾患の予防的な処置又は治療上の処置を必要とする対象におけるリンパ球 T_{E M} に関連した自己免疫疾患の予防的な処置又は治療上の処置用の配列番号 1 もしくは配列番号 2 から構成されるアミノ酸配列、又はその薬学的に許容される塩を有することを特徴とする組成物。

【請求項 18】

前記処置を必要とする対象がヒトであることを特徴とする請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記リンパ球 T_{E M} に関連した自己免疫疾患が、多発性硬化症、関節リウマチ、I 型糖尿病、自己免疫性乾癬、紅斑性狼瘡、潰瘍性大腸炎、交感性眼炎、骨吸収歯周病、免疫性血小板減少性紫斑病及び自己免疫性リンパ球増殖性症候群からなる群から選択されることを特徴とする請求項 17 又は 18 に記載の組成物。

10

【請求項 20】

更に、前記対象に対して少なくとも一つの追加の免疫抑制剤を投与することを含むことを特徴とする請求項 17、18 又は 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記追加の免疫抑制剤が、シクロスポリン、ラパマイシン、アザチオプリン、プレドニゾン、S h K 毒素、S h K 誘導体、デオキシスバガリン、及びそれらの塩からなる群から選択されることを特徴とする請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

K v 1 . 3 カリウムチャンネル遮断活性を有する少なくとも一つのペプチドと、薬学的に許容されるキャリアーと、を含む医薬品組成物であって、

20

前記ペプチドが、配列番号 1 もしくは配列番号 2 から構成されるアミノ酸配列、又はその薬学的に許容される塩を有することを特徴とする医薬品組成物。

【請求項 23】

少なくとも一つの追加の免疫抑制剤を更に含み、

前記追加の免疫抑制剤が、シクロスポリン、ラパマイシン、アザチオプリン、プレドニゾン、S h K 毒素、S h K 誘導体、デオキシスバガリン、及びそれらの塩からなる群から選択されることを特徴とする請求項 22 に記載の医薬品組成物。

【請求項 24】

局所的、全身的、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、鼻腔内、経皮的もしくは経口的に投与されるか、又は皮内注射、気管支内点滴、胃腸内送達もしくは経粘膜的送達によって投与されることを特徴とする請求項 14 ~ 21 のいずれかに記載の組成物。

30

【請求項 25】

K v 1 . 3 カリウムチャンネルに結合する高い親和性及び特異性を有する標識ペプチドであって、配列番号 1 又は配列番号 2 から構成されるアミノ酸配列を有することを特徴とする標識ペプチド。

【請求項 26】

標識付け部分が、放射性同位体、蛍光部分、化学発光部分、発色団、ビオチンリガンド及びタンパク質からなる群から選択されることを特徴とする請求項 25 に記載の標識ペプチド。

40

【請求項 27】

標識付けタンパク質が、抗体、又は緑色蛍光タンパク質、又は異なる発光スペクトルを有する前記緑色蛍光タンパク質由来のタンパク質であることを特徴とする請求項 26 に記載の標識ペプチド。

【請求項 28】

K v 1 . 3 チャンネルを発現する細胞を同定する生体外での方法であって、

a) K v 1 . 3 カリウムチャンネルに結合する高い親和性及び特異性を有する標識ペプチドと標的細胞の集団を接触させる工程であって、前記標識ペプチドが、配列番号 1 又は配列番号 2 から構成されるアミノ酸配列を有し、標識化されている工程と、

b) 検出技術によって、前記標的細胞の集団に存在する K v 1 . 3 カリウムチャンネル

50

に結合した標識ペプチドを検出する工程と
を含むことを特徴とする生体外での方法。

【請求項 29】

前記細胞がヒトリンパ球であることを特徴とする請求項 28 に記載の生体外での方法。

【請求項 30】

所定の細胞に発現した K v 1 . 3 チャンネルの数を定量化する生体外での方法であって

a) K v 1 . 3 カリウムチャンネルに結合する高い親和性及び特異性を有する標識ペプチドと前記細胞を接触させる工程であって、前記標識ペプチドが、配列番号 1 又は配列番号 2 から構成されるアミノ酸配列を有し、標識化されている工程と、

b) 定量的な検出技術によって、前記標的細胞の集団に存在する K v 1 . 3 カリウムチャンネルに結合した標識ペプチドを検出する工程と
を含むことを特徴とする生体外での方法。

【請求項 31】

前記細胞がヒトリンパ球であることを特徴とする請求項 30 に記載の生体外での方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、概して生化学、分子生物学、免疫学及び電気生理学の分野に関連するものである。ペプチド、その医薬品組成物、それらの使用によって K v 1 . 3 カリウムチャンネルを遮断する方法、各種免疫条件の治療方法、診断的な適用方法、並びにメキシコサソリのヴァエジュビス・メキシカナス・スミシ (*Vaejovis mexicanus smithi*) (以下、V . 20
メキシカナス (*mexicanus*) と省略) の毒液から単離される二種類のタンパク質成分に対応するペプチドの化学合成方法及び正確な折り畳み方法を開示し、該ペプチドは、カリウムチャンネル特異的リガンドの新規なサブファミリーを構成し、高い親和性及び特異性で、免疫疾患及び移植片拒絶反応に関与することが知られているカリウムチャンネルの亜型 (h K v 1 . 3) を遮断することが可能である。その化学的及び機能的な特徴付けに用いられる方法及び技術を、V m 2 4 によって処理した場合の感作されたラットの D T H - 応答についての生体内での実験結果と共に開示する。このペプチド (V m 2 4) と、その同族である V m 2 3 と、それらと機能的に同等な類似体は、リード化合物であり、各種免疫 30
条件の治療及び診断的適用の候補である。

【背景技術】

【0002】

概論

ここで報告される本発明の対象に関して、幾つかの側面を考慮する必要があり、それらの中には、

1) 細胞の情報交換、シグナル伝達経路、並びに組織及び各種臓器機能の一般的な恒常性において基本的な役割を果たす「イオンチャンネル」と呼ばれる生体膜の内在タンパク質の存在；

2) 自己免疫疾患の発症に関連する現象において明確な役割を果たすことが知られている免疫系の細胞、主に T - リンパ球におけるそのチャンネルの発現レベルの違い；

3) 各種化学物質、天然リガンド、並びに天然において発見されたリガンドを再生するか又は類似の誘導体 (ペプチド模倣物) を調製することで合成的に調製される物質を加えることによって、そのチャンネル機能を制御する可能性と、それによって疾患を治療する可能性；

について生じる知識に関連した、生化学、分子生物学、免疫学及び電気生理学の分野の重要な進歩がある。

【0003】

多数のカリウム (K) チャンネルが発見され、ここ 15 年間でそれらの単離、個別の発現及び機能分析を可能にする多数のカリウム (K) チャンネルが存在すると報告された。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

それらは、細胞膜電位の測定に關与する多量体タンパク質であり、それによって、平滑筋緊張、シナプス興奮性、神経伝達物質放出及び他の過程を制御する。本発明において、我々は、Kチャンネル種、亜型Kv1.3の重要性と、リンパ球増殖でのその役割及びこのチャンネルの遮断による自己免疫疾患の制御でのその役割の重要性とを強調したい。これは、Tリンパ球で主として発現する遅延整流性のチャンネルであり [Grissmer et al., 1990; Lewis and Cahalan, 1995]、Kチャンネルの亜型のほんの一部を挙げれば、脳内に広く分布する亜型Kv1.1, Kv1.2又は心臓組織内のKv1.5と異なる。

【 0 0 0 5 】

Kv1.3チャンネル活性の調節がリンパ球増殖に影響を与える機構は、数々の研究室において研究されており、一部の特許 (v.gr. Cahalan et al.による米国特許第5397702号明細書 (1995) 及びKem et al.による米国特許第6077680号明細書 (2000)) を含めて、最近の多くの刊行物の対象であった ([Beeton and Chandy, 2005; Judge and Bever, 2006, Panyi et al., 2006] において概説されている)。

【 0 0 0 6 】

自己免疫疾患は、世界的にかなりの罹患率で知られている。これらの疾患には、ほんの一部を挙げれば、1型糖尿病 (インスリン依存性)、多発性硬化症 (MS)、関節リウマチ、シェーグレン症候群、混合性結合組織病、全身性エリテマトーデス (SLE)、重症筋無力症がある。自己免疫疾患について関連のある実験モデルは、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) である。これらの自己免疫疾患は、細胞への直接攻撃によって又は自己抗体を生成することによって、特異的組織を破壊する免疫システムの応答に起因することが一般に認められている。Kv1.3チャンネルの過剰発現は、自己反応性T細胞の特性であり、Kv1.3の遮断薬によってその増殖を変更するための素晴らしい機会を与える。

【 0 0 0 7 】

これらの研究および実験に沿って、幾つかの物質が開示され、特許されたものさえあった。その一つの例が、イソギンチャクのStichodactyla helianthusからの毒素ShK、及び幾つかのその誘導体であり、幾つかの自己免疫疾患に対して保護効果を有するとしている (v.gr. Kem et al.による米国特許第6077680号明細書 (2000))。

【 0 0 0 8 】

イオンチャンネルの機能に影響を与えることが可能な他の天然リガンドの中には、サソリの毒液から単離した毒性ペプチドがある。その毒液から単離したKチャンネル特異性ペプチドは、三つ又は四つのジスルフィド架橋によって緊密化した22~42のアミノ酸を含有する短鎖ペプチドである。それは、多くの異なる亜型チャンネルの遮断薬であり、選択性及び親和性の変動が大きい ([Giangiacomo et al., 2004; Rodriguez de la Vega and Possani, 2004] において概説されている)。例えば、カリブドトキシンは、Kv1.1、Kv1.2及び1.3 Shaker型遅延整流性チャンネルのタンパク質遮断薬であると共に、maxi型K(Ca)チャンネルをも遮断する [Rauer et al., 2000]。他のサソリ毒液ペプチドであるマーガトキシンは、K(Ca)チャンネル遮断活性を欠いているが、Kv1.3チャンネルの高親和性遮断を維持する [Garcia-Calvo et al., 1993]。アギトキシン、ノキシウストキシン、カリオトキシンは、異なる親和性及び選択性で異なる型のKチャンネルに影響を与えるサソリ毒の例であるが、通常、一つより多い亜型チャンネルを修飾する ([Panyi et al., 2006] において最近概説されている)。ジスルフィド架橋によりしっかりと維持される比較的硬い三次元構造のため、これらサソリペプチドには、Kチャンネルの外側前庭におけるKチャンネルアミノ酸残基間の距離を測定するための「分子キャリパー」として使用されるものもある [Krezel et al., 1995; Garcia et al., 2000]。Kチャンネルに対して特異的な多くのサソリ毒の三次元構造は、核磁気共鳴及び/又はX線回折法によって分解され、一部のKチャンネルの既知の構造と共に、受容体 (イオンチャンネル) とそのリガンド (サソリ毒) 間での相互作用をモデル化する手掛かりを与えた。イオンチャンネル及びそのリガンドの双方におけるアミノ酸残基の部位特異的変異誘発は、この対の受容体 - リガンドタンパク質の中にある推定相互作用面の

10

20

30

40

50

同定に関する情報を与えた [Rodriguez de la Vega et al., 2003]。この情報は、薬理学的用途の可能性のある可能性薬物の合理的設計の基本となる。この天然に存在するペプチドを可能性薬物として使用する唯一の問題は、特異性及び親和性の欠如である。現在、20サブファミリーのサソリ毒があり、構造的に関連するペプチドを125を超えて備え、配列類似性及び考えられる機能によって分類される [Tytgat et al., 1999; Rodriguez de la Vega and Possani, 2004]。

【0009】

自己免疫疾患のKv1.3阻害剤に基づく治療についての分子基盤

このセクションで、発明者は、高い親和性及び選択性でリンパ球の「エフェクターメモリT細胞」(T_{EM})のKv1.3イオンチャンネルを遮断することが可能なりガンド(ペプチド又は有機化合物)を単に適用することによって幾つかの免疫疾患を制御する最先端の知識を示す。

【0010】

Kv1.3阻害剤が生理的抗原刺激又はマイトジェンによって誘発したリンパ球の活性化過程を妨げる機構が、膜の脱分極と、結果として起こる、興味深い抗原に対して特異的なT細胞クローンを増殖及び生成する細胞周期の正常な進行に必要なCa²⁺の阻害であることはこれまでに示されている([Cahalan et al., 2001; Panyi et al., 2004; Panyi et al., 2006]において概説されている)。T細胞の十分に過分極した膜電位(-50, -60mV)の維持に關与する二種のKチャンネル[Verheugen et al., 1995]、Kv1.3として示される電位開口型の脱分極活性化チャンネル[Decoursey et al., 1984; Matteson and Deutsh, 1984]、及びIKCa1(又は最近の命名法によるとK_{Ca}3.1)として示される中間コンダクタンスのCa²⁺活性化Kチャンネル[Grismer et al., 1993]がある。これらのチャンネルの活性は、Ca²⁺放出が活性化されたCa²⁺チャンネルを通してT細胞中にCa²⁺を流入させる間、負の膜電位を維持するのに必要な平衡する正電荷の流出をもたらす[Feske et al., 2006; Yeromin et al., 2006]。この二種のKチャンネルのT細胞膜電位への寄与は、以下で説明するように、細胞の活性化状態(静止対活性化)、及びT細胞の最終分化の程度によって決まる免疫系でのそれらの機能的役割によって決まる[Wulff et al., 2003]。

【0011】

未処理細胞及び中央記憶T細胞(T_{CM})という二種のT細胞は、活性化される末梢(二次)リンパ器官において強い抗原刺激及び同時刺激を必要とする。事前に抗原と遭遇していない未処理T細胞は、CCR7⁺CD45RA⁺機能的マーカーの発現を生む。中央記憶T細胞(T_{CM}, CCR7⁺CD45RA⁻)は、反応性記憶を媒介しており、おそらく最終分化の中間段階で静止し、エフェクターメモリ細胞(T_{EM})となる[Sallusto et al., 2004]。これらの細胞は、エフェクター機能をほとんど又は全く有さないが、抗原刺激にตอบสนองして容易に増殖し、エフェクター細胞に分化する。保護記憶は、エフェクターメモリT_{EM}細胞(CCR7⁻CD45RA⁺)によって管理される。T_{EM}細胞は、それが即時のエフェクター機能を発揮する場合に、炎症組織へのホーミングに必要なケモカイン受容体及び接着分子の特徴的なセットを示す。多発性硬化症(MS)(Wulff et al., 2003)、関節リウマチ及びI型糖尿病[Beeton et al., 2006]、自己免疫性乾癬、紅斑性狼瘡、潰瘍性大腸炎、交感性眼炎並びに骨吸収歯周病を含む幾つかの自己免疫疾患において、慢性的に活性化したT_{EM}細胞は、組織損傷に關与するため、該細胞の増殖及び機能活性の選択的阻害が、これらの疾患の管理において最も重要である([Chandy et al., 2004; Beeton and Chandy, 2005; Panyi et al., 2006]において概説されている)。

【0012】

休止したヒト未処理細胞であるCD4⁺(ヘルパー)又はCD8⁺(細胞傷害性)表現型のT_{CM}及びT_{EM}は、細胞当たり、近い数(200~300)のKv1.3チャンネルと、30未満のIKCa1チャンネルとを発現する。特異的な抗原刺激による未処理細胞及びT_{CM}細胞の増殖性芽細胞への形質転換は、細胞当たりのKv1.3チャンネルの

10

20

30

40

50

数のわずかな増加（～1.5倍）を伴う一方で、IKCa1チャンネルの数は劇的に増加するため（500チャンネル/細胞）、それらはIKCa1^高Kv1.3^低イオンチャンネル表現型を獲得する。これに対して、末梢組織におけるCD4⁺又はCD8⁺のT_EMの活性化は、IKCa1レベルの変化なしに、Kv1.3チャンネルの数を約1500/細胞まで劇的に増加させることを伴い、それによって、活性化T_EMのチャンネル表現型が、IKCa1^低Kv1.3^高となる。

【0013】

Kv1.3^高T_EMと自己免疫疾患との間の因果関係は、ヒト疾患で得られた以下のデータによって立証される。

1) MS患者の末梢血からのミエリン反応性T細胞は、Kv1.3^高である [Wulff et al., 2003]。

2) 健常対照群の末梢血からのミエリン反応性T細胞は、Kv1.3^低である [Wulff et al., 2003]。

3) インスリンペプチド、オボアルブミン等の不適切な抗原又は通常のマイトジェンを持つMS患者のT細胞の刺激は、Kv1.3^高IKCa1^低イオンチャンネル表現型を持つT_EMの発生を誘発しない。

4) Kv1.3^高T_EM細胞が、死後MS脳の炎症性浸潤、及び脱髄したMS病変部の柔組織において見られた [Rus et al., 2005]。

5) 間接リウマチ(RA)に苦しむヒト患者の滑液から単離したT細胞は、同じドナーであるが末梢血から単離したT細胞と比較して多量のKv1.3を発現する。このKv1.3^高T細胞は、それがT_EM細胞であることを示すCCR7⁻であった [Beeton et al., 2006]。

6) I型糖尿病(T1DM)ヒト患者の末梢血リンパ球から生成した、T1DMに関連した自己抗原インスリン及びGAD65に特異な短期抗原特異性CD4⁺T細胞株は、CCR7抗原(CCR7⁻)の不足及びKv1.3^高チャンネル表現型を含むT_EM細胞の特性を示す [Beeton et al., 2006]。

【0014】

T_EM細胞の膜電位制御が、Kv1.3チャンネルの活性によってのみ支配されるため、それらの細胞の増殖、それらの機能活性、及び自己免疫疾患の症状は、Kv1.3阻害剤の使用によって改善されるはずである。以下に示す文献における生体外及び生体内でのデータが、この予測を支持している。

1) T_EMの特性(CCR7⁻, Kv1.3^高)を持ち、ミエリン抗原に特異的である慢性的に活性化したヒトT細胞株 [Wulff et al., 2003] 又はRA患者の滑液から単離したT_EM細胞の生体外での増殖は、ShK [Wulff et al., 2003]、ShK(L5)等のKv1.3特異的遮断ペプチド、もしくは小分子Kv1.3遮断薬PAP-1 [Beeton et al., 2006] によって、完全且つ永久に抑制される。

2) 他の高親和性Kv1.3遮断ペプチドであるマルガトキシン毒を用いた生体内での実験は、Kv1.3の遮断がミニプタにおける遅延型過敏症反応の阻害を導くことを示す。この反応は、エフェクターメモリT細胞の活性の良好な尺度になる [Koo et al., 1997]。

3) (エフェクター段階中) 受容動物中にペプチドを繰り返し適用すると共に、MBPによって生体外で刺激する間(感作段階)の、ShK又はShK-Dap²²を用いたMBP特異性ラットT細胞の治療は、実験的自己免疫性脳脊髄炎(AE-EAE)のルイスラットへの養子移植を妨げた [Beeton et al., 2001]。ラットのEAE [Ben Nun and Cohen, 1982] は、類似の病変形成及び神経学的異常を特徴とするヒト疾患MSに対して最も良く特徴付けられたモデルであり、T細胞集団を引き起こす疾患は、Kv1.3^高チャンネル表現型を有するミエリン特異性T_EMである。また、Kv1.3及びIKCa1チャンネル遮断薬の併用は、その発現を受けて投与した場合にEAEの兆候を改善した [Beeton et al., 2001]。

4) ダーク・アグーチ・ラットにおけるプリスタン誘導のMHCクラスII拘束性慢性

10

20

30

40

50

関節炎モデル (P I A) は、ヒト疾患の間接リウマチに対するラットのモデルである。 S h K (L 5) の 1 日 1 回 の 投 与 は、試 用 期 間 (最 長 3 4 日) 中 に 疾 患 に か か っ た 関 節 の 数 を 大 き く 低 減 し た [Beeton et al., 2006] 。

5) 実 験 的 自 己 免 疫 性 糖 尿 病 (E A D , ヒ ト の T 1 D M に 対 す る ラ ッ ト モ デ ル) を 妨 げ る K v 1 . 3 阻 害 剤 の 有 効 性 は、 M H C ク ラ ス I I 拘 束 性 D P - B B / W ラ ッ ト に お い て 研 究 さ れ た [Beeton et al., 2006] 。 K v 1 . 3 の 高 親 和 性 及 び 選 択 性 小 分 子 遮 断 薬 で あ る P A P - 1 の 連 日 反 復 投 与 は、 賦 形 剤 の み で 治 療 し た 対 照 動 物 と 比 較 し て、 E A D の 症 状 を 示 す ラ ッ ト の 割 合 を 約 5 0 % ま で 低 減 し た (1 1 0 日 齢 で 評 価 し た) 。 こ れ は、 膵 島 内 T 細 胞 及 び マ ク ロ フ ァ ージ 浸 潤 の 減 少 を 伴 い、 賦 形 剤 で 治 療 し た 対 照 と 比 較 し て P A P - 1 で 治 療 し た グ ル ー プ に お け る 細 胞 の 破 壊 を 低 減 し た (3 5 ~ 7 0 日 齢 で 評 価 し た) [Beeton et al., 2006] 。

10

【 0 0 1 5 】

K v 1 . 3 特 異 的 阻 害 剤 に よ る T 細 胞 増 殖 の 阻 害 は、 T_{E M} 細 胞 に 特 異 的 で あ り、 そ の 化 合 物 を 自 己 免 疫 疾 患 の 管 理 又 は 予 防 に 対 す る 理 想 的 な ツ ー ル と す る。 未 処 理 細 胞 及 び T_{C M} 細 胞 を 静 止 さ せ る 抗 原 誘 導 の 増 殖 は、 K v 1 . 3 媒 介 の 阻 害 剤 に 対 し て 部 分 的 に 感 受 性 が あ る が、 I K C a 1 チ ャ ン ネ ル の 転 写 性 上 方 規 制 は、 活 性 化 前 の T 細 胞 に お い て こ れ を 克 服 し、 そ の 細 胞 の 増 殖 を、 K v 1 . 3 阻 害 剤 で は な く I K C a 1 阻 害 剤 に 対 し て 感 受 性 が あ る も の と す る [Ghanshani et al., 2000] 。 異 な る T 細 胞 サ ブ セ ャ ッ ト に 関 す る こ の K v 1 . 3 及 び I K C a 1 阻 害 剤 の 制 限 的 作 用 は、 K v 1 . 3 に つ い て 与 え ら れ た 分 子 の 選 択 性 が I K C a 1 よ り も 重 要 で あ る こ と を 明 確 に 示 す。 ま た、 最 近、 K v 1 . 3 阻 害 剤 に よ る T_{E M} 増 殖 の 阻 害 は、 正 常 の 保 護 メ モ リ 免 疫 反 応 中 に 病 原 体 及 び ワ ク チ ン 抗 原 に よ る T_{E M} 細 胞 の 活 性 化 を 模 倣 す る 過 剰 な 抗 原 刺 激 に よ っ て 克 服 で き る こ と が 示 さ れ た [Beeton et al., 2006] 。 従 っ て、 高 親 和 性 及 び 高 選 択 性 の K v 1 . 3 阻 害 剤 の 適 用 は、 自 己 免 疫 反 応 の 間 繰 り 返 し 活 性 化 さ れ る T_{E M} 細 胞 を 標 的 と す る 一 方 で、 不 変 の 免 疫 系 の 他 の 保 護 機 能 を そ の ま ま に し て お く こ と が 理 想 的 で あ る。

20

【 0 0 1 6 】

ヒ ト T 及 び B リ ン パ 球 に 加 え て、 K v 1 . 3 チ ャ ン ネ ル は ま た、 幾 つ か の 器 官 及 び 組 織 (中 枢 神 經 系、 腎 臓、 肝 臓、 骨 格 筋 を 含 む) に お い て 発 現 し、 該 細 胞 に お け る K v 1 . 3 チ ャ ン ネ ル の 遮 断 が、 大 き な 副 作 用 を 引 き 起 こ し 得 る。 生 体 外 で の 広 範 囲 な 毒 性 試 験、 及 び 生 体 内 で の 急 性 ・ 慢 性 の 毒 性 試 験 は、 こ れ ま で に ペ プ チ ド 遮 断 薬 グ ル ー プ か ら の S h K (L 5) [Beeton et al., 2005; Beeton et al., 2006] 及 び 小 分 子 遮 断 薬 の グ ル ー プ か ら の P A P - 1 [Schmitz et al., 2005; Beeton et al., 2006] に 対 し て 行 わ れ た。 こ れ ら の 研 究 は、 神 經 学 的 及 び 心 臓 の 副 作 用 又 は K v 1 . 3 が 発 現 す る 組 織 に お け る 病 理 組 織 学 的 な 変 化 に つ い て の 臨 床 症 状 の 不 足 を 示 し た。 従 っ て、 上 述 し た K v 1 . 3 遮 断 薬 の 有 益 な 治 療 効 果 は、 最 小 の 又 は 完 全 欠 如 の 副 作 用 と 組 み 合 わ せ て、 自 己 免 疫 疾 患 の 管 理 に お け る 選 択 的 K v 1 . 3 遮 断 薬 の 適 用 性 を 示 す。

30

【 0 0 1 7 】

要 約 す る と、 上 述 の デ ー タ は、 生 理 学 的 免 疫 応 答 の 遂 行 に お い て K v 1 . 3 K チ ャ ン ネ ル の 重 要 な 役 割 を 示 唆 し て お り、 K v 1 . 3 チ ャ ン ネ ル の 阻 害 に よ る 自 己 免 疫 疾 患 に お け る 治 療 的 介 入 の 適 用 性 を 示 す。

40

【 発 明 の 概 要 】

【 0 0 1 8 】

本 発 明 は、 メ キ シ コ サ ソ リ の V . メ キ シ カ ナ ス の 毒 液 か ら 単 離 さ れ る 新 規 な ペ プ チ ド : V m 2 3 , V m 2 4 及 び 機 能 的 に 同 等 な そ の 類 似 体 の 同 定 及 び 使 用 に 関 す る も の で あ り、 そ れ ら は、 特 異 的 な イ オ ン 電 導 度 を 遮 断 す る こ と に よ っ て、 ヒ ト リ ン パ 球 か ら の h K v 1 . 3 チ ャ ン ネ ル の 機 能 を 高 い 親 和 性 及 び 特 異 性 で 遮 断 す る こ と が 可 能 で あ る。 本 発 明 の 他 の 実 施 態 様 に お い て、 本 発 明 者 ら は、 V m 2 3、 V m 2 4 及 び 機 能 的 に 同 等 な そ の 類 似 体 を 備 え る 医 薬 品 組 成 物、 そ の 使 用 に よ っ て K v 1 . 3 カ リ ウ ム チ ャ ン ネ ル を 遮 断 す る 方 法、 各 種 免 疫 条 件 の 治 療 方 法、 診 断 的 適 用 方 法、 並 び に そ の 化 学 合 成 方 法 及 び 正 確 な 折 り 畳 み 方 法 を 開 示 す る。 そ れ ら ペ プ チ ド は、 従 来 の 高 速 液 体 ク ロ マ ト グ ラ フ ィ ー を 用 い て 単 離

50

され、エドマン分解及び質量分析によって決定した一次アミノ酸配列を有し、SEQ ID No: 1 及び SEQ ID No: 2 に示される一次構造を示した。Vm24 は、分子量 3863.5 ダルトンを持つ 36 のアミノ酸を含有する。それは、C6 及び C26、C12 及び C31、C16 及び C33、C21 及び C36 の位置における対のシステイン間にあることが質量分析によって確立された四つのジスルフィド架橋によって維持される緊密化した分子であり、ここで、文字 C は、システイン残基の略称を示し、その番号は、アミノ酸配列中での相対位置に対応する。ペプチドのカルボキシ末端のアミノ酸は、アミド化されている。完全なペプチドは、メリフィールド固相法を用いて化学合成され、該合成ペプチドの正確な折り畳みが得られ、化学的分析及び機能的分析の双方によって確認された。Vm24 は、比較的高濃度で注入した場合、マウスに対して毒性がない（体重 20 g のマウスにつき 200 マイクログラムまで、即ち 10000 マイクログラム/キログラムマウス体重までアッセイした）。生体外でヒトリンパ球に適用した場合、それは、パッチクランプ法によってアッセイしたところ、hKv1.3 チャンネルに対して非常に高い親和性を示す。それは、ほとんど不可逆的な方法で hKv1.3 チャンネルに結合し、低いピコモル濃度範囲（3 ピコモル濃度 - 3 pM 未満）で Kd 値を示す。10 ナノモル濃度（10 nM）でアッセイした場合、hKv1.4、hKv1.5、rKv2.1、hBK 及び hERG - チャンネルというイオンチャンネルのカリウム電流、並びに電位開口型心臓 Na⁺ チャンネル（hNav1.5）の電流を変更しない。チャンネル hIKCa1、mKv1.1 及び hKv1.2 に対して 10 nM の濃度での電流阻害は、hKv1.3 に対する 100% の閉塞とは対照的に、約 20 ~ 50% である。毒素は、3 pM 程度の低濃度で hKv1.3 電流の 50% 以上を遮断し、従って、アッセイした他のどんなチャンネルよりもこのチャンネルの方が約 1500 倍効果的である。

10

20

【0019】

Vm24 で実施した致死試験は、最大 200 マイクログラム/マウス体重 20 g の濃度で用いて中毒症状が観察されなかった。遅延型過敏症（DTH）に対するラットモデルに適用した Vm24 は、実験動物を保護した。ジニトロフルオロベンゼン（DNFB）による実験ラットの皮膚感作は、大きな免疫応答（耳の発赤及び肉眼的炎症）を引き起こす。治療開始後 6 日目に Vm24 を 10 マイクログラム単回投与したラットのグループは、注目すべき免疫応答を示しており、治療した耳の炎症は、溶媒治療のみを受けた対照ラットと比較して大きく減少した（少なくとも 60% 小さい炎症）。

30

【0020】

また、Vm23 という関連ペプチドは、同じ毒液から単離され、SEQ ID No: 2 で見られるように完全に配列を決定した。このペプチドは、Vm24 と 83% 一致しており、四つのジスルフィド架橋によって密集した 35 のアミノ酸残基を有し、分子量 3665 ダルトンを示す。Vm23 は、Vm24 と同等の機能：hKv チャンネルに対する高い親和性及び特異性を示す。チャンネル hKv1.3、hIKCa1、mKv1.1 及び hKv1.2 に対して Vm23 濃度 10 nM での電流阻害は、それぞれ約 95%、1%、3% 及び 9% である。

【0021】

K チャンネルに特異的な 125 を超える他の既知のサソリペプチド [Bagdany et al., 2005] を用いた両ペプチドの系統発生解析は、Vm23 及び Vm24 が既に開示されたサソリ毒の構造の 20 のサブファミリーのいずれにも含まれないことを示す。それらは、新しい構造的なサブファミリーの最初の 2 例であり、ここで、 -KTx21 と名付けることを提案する。よって、Vm24 及び Vm23 は、それぞれ -KTx21.1 及び -KTx21.2 と名付けられる。K チャンネルに特異的なサソリ毒の新しいサブファミリーを決定するのに使用される基準のうち、現在使用されている体系的な命名法（[Tytgat et al., 1999] 参照）を設けた科学者の国際パネルによれば、一次構造が他のものと少なくとも 50% 異なる必要がある。実際、Vm23 及び Vm24 の双方は、他の既知の毒素と約 50% 未満の配列同一性を示す。

40

【0022】

50

当該分野の最先端の知識に基づいて、それらの特性は、V m 2 3、V m 2 4 及び機能的に同等なそれらの類似体を免疫抑制並びに免疫疾患の診断及び治療の優れた候補とする。

【 0 0 2 3 】

この開示に含まれる図面は、本明細書の一部を形成し、本発明の特定の態様を更に明らかにするためにここに含まれる。完全な発明は、一つ又はそれ以上の図面をここに示す特定の実施態様の詳細な説明、特に以下の実施例のセクションで補うことでより理解できる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 4 】

【図 1】サソリの V . メキシカナスからの可溶性毒液 1 m g の H P L C 分離である。80 を超える異なる成分が、60 分にわたる 0 % から 60 % の溶液 B (0 . 1 2 % T F A のアセトニトリル) の傾斜を用いた溶液 A (0 . 1 0 % T F A の水) で平衡化された C 1 8 逆相カラム (Vydac, Hisperia, CA のカタログ番号 218TP54) 中への可溶性毒液の適用によって分離して得られた。保持時間 2 3 分及び 2 4 分での番号 1 及び 2 は、それぞれ V m 2 3 及び V m 2 4 の溶出位置を示す。その二つのクロマト分画の一つ一つの追加の分離を同じシステムで行ったが、溶液 A から 40 % の溶液 B までの線形勾配を用い、両方のペプチドに対して 60 分間行った。その結果を差し込み図として示す。差し込み図中のアスタリスクは、高度に精製されたペプチドの溶出位置を示す。

【図 2】V m 2 3、V m 2 4 及びコンセンサスのアミノ酸配列である。V m 2 3 及び V m 2 4 の配列は、天然ペプチドと還元・アルキル化したサンプルとの直接エドマン分解を、後述する配列を示す特異的酵素 (エンドプロテアーゼ A r g - C 及び L y s - C) を持つ純ペプチドの酵素的切断によって得られるペプチドの質量分析と組み合わせて得られた。酵素加水分解及び H P L C 分離後に精製したペプチドのアミノ酸配列は、質量分析 (M S / M S、エレクトロスプレーイオン化による質量分析断片化を意味する) によって同定された。各配列において、様々な方法によって同定したセグメントを表示する。直接は、エドマン分解を意味し、A r g - C 及び L y s - C は、酵素消化後に精製した断片である。M S は、単に欠損したアミノ酸の分子量に基づく同定を意味する。コンセンサス配列は、V m 2 3 又は V m 2 4 の配列と一致した 30 のアミノ酸残基を有する。「x」とラベルした位置については、x¹ がタンパク質の三次元折り畳みを破壊しない任意のアミノ酸であり、更に良くは K 又は P であり；x² がタンパク質の三次元折り畳みを破壊しない任意のアミノ酸であり、更に良くは L 又は P であり；x³ がタンパク質の三次元折り畳みを破壊しない任意のアミノ酸であり、更に良くは K 又は R であり；x⁴ がタンパク質の三次元折り畳みを破壊しない任意のアミノ酸であり、更に良くは S 又は N であり；x⁵ がタンパク質の三次元折り畳みを破壊しない任意のアミノ酸であり、更に良くは K 又は R であり；x⁶ がタンパク質の三次元折り畳みを破壊しない任意のアミノ酸であり、更に良くは Y か又は何もない。

【図 3】V m 2 4 がアミド化 C 末端を有する。C 末端の衝突誘起解離 (C I D) [M + H]⁺ イオン (m / z 9 0 9 . 4 a . m . u .) (モノアイソトピック分子量) は、期待される理論値 [M + H]⁺ 9 1 0 . 5 a . m . u . よりも 1 . 0 単位少ない。アミド化 C 末端配列に対応する y イオンシリーズ (イタリック) を、1) と表示された挿入部分に示す。遊離カルボキシ末端ペプチドの y イオンシリーズの理論値 (T V - C O O H)、アミド化 C 末端の y イオンシリーズの理論値 (T V - N H ₂) 及び y イオンシリーズの実験値 (E X P .) を、挿入した表 (2 と表示された挿入部分) において比較する。

【図 4】ジスルフィドの帰属のための V m 2 4 ヘテロに量体である。番号 1 及び 2 は、p H 6 . 5 でのトリプシン及びキモトリプシンを用いた V m 2 4 の同時タンパク質切断によって生成したヘテロ二量体の分子量及び模式的な構造を示す。[M + H]⁺ イオン (m / z 7 8 8 . 0 a . m . u .) は、システイン半ペア (half-pair) C 4 - C 8 を含有するヘテロ二量体の分子量に対応し (番号 1)、[M + H]⁺ イオン (m / z 5 6 0 . 4 a . m . u .) は、システイン半ペア C 3 - C 7 を含有するヘテロ二量体の分子量に対応する (番号 2) 。

10

20

30

40

50

【図5】Vm24 スステイン半ペアである。A) は、 $[M + 2H]^+ 2$ イオン (m/z 1099.74 a.m.u.) の両方のスステイン半ペア C1 - C4 及び C2 - C6 を含有する複合体コアの構造に対応する質量分析である。これを断片化し、図4Bに示すMS/MS スペクトルを作成した。1137 ~ 1507 a.m.u. の b イオンシリーズの値は、明白に、少なくとも二つのスステイン半ペアの帰属を確認する標識 G S P E を示す。B) は、この図のA部分に記載の質量分析によって決定された、Vm24 の完全なジスルフィド架橋配置を示す。

【図6】合成 Vm24 の HPLC 精製である。合成的に調製した Vm24 (50 ミリグラムタンパク質) を C18 逆相分取カラムで分離した。番号1は、合成し正確に折り畳まれた Vm24 の溶出位置を示し、一方、2及び3は、不正確に折り畳まれたか又は切り詰められた配列を示す。このクロマト分画の追加の分離を同じシステムで行ったが、60分間、溶液Aから40%の溶液Bまでの線形勾配で展開した分析カラムを用いた。その結果を差し込み図として示す。

【図7】合成および天然 Vm24 ペプチドの HPLC 比較である。A) 図1に記載の HPLC システムにおける、10 マイクログラムの天然 Vm24 の分析 C18 カラム (Vydac, Hesperia, CA のカタログ番号 218TP54) 中への適用は、60分間溶液Aから40%の溶液Bまでの線形勾配で展開した場合、純ペプチドが 32.67 分で溶出することを示す。B) 同じシステム及び条件において合成的に調製し折り畳まれた 15 ミリグラムの Vm24 のクロマトグラフである。C) 同一の保持時間で同時溶出することを示す合成及び天然 Vm24 の 1:1 の混合物 (合計 8 マイクログラム) の同時注入である。グラフの X 軸は、三つのグラフを比較して観察できるようにするため、文字 B 及び C を右側にシフトし分離しているが、そうでなければ、独立した三つの HPLC 実験の流出時間が同一のピークに入れられ、区別できなくなることに言及する価値がある。

【図8a】Vm23 及び Vm24 の配列及び系統発生解析である。A) 最も密接に関わる - K T x s での Vm23 及び Vm24 の多重配列アライメントである。該アライメントは、C L U S T A L _ X [Thompson et al., 1997] ソフトウェアで実行され、Vm24 との配列同一性 (% I、最終カラム) を B i o E d i t で計算した。

【図8b】B) M r B a y e r s 3 . 0 b 4 [Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003] で計算した単純化した系統樹である。Vm23 及び Vm24 は、一緒にクラスター化し、サブファミリー - K T x 6 のメンバーと実質的に異なる。

【図9A】Vm24 によるリンパ球イオンチャンネルの選択的遮断である。A) 15 s 毎に - 120 mV の保持電位から + 50 mV までの脱分極パルスに反応して、h K v 1 . 3 チャンネルを通過する細胞全体でのカリウム電流をヒト T 細胞から誘発した。Vm24 がいない場合の電流 (対照、矢印で示す) は、1 nM の Vm24 が細胞外培地での灌流によって細胞に投与される場合、ほぼ完全に遮断される。矢印は、Vm24 の第1パルスを示す。

【図9B】B) 1 nM (黒丸) 又は 0.3 nM (白丸) の Vm24 の適用を受けて、時間に応じた正規化ピーク電流を示す。矢印は、毒の適用の開始を示す。

【図9C】C) 3 pM の Vm24 を細胞に適用し、次いで細胞外培地から除去する (洗い流す) ときの時間に応じたリンパ球の正規化ピーク電流を示す。毒のない培地での灌流は、約 3800 s の時定数で遮断からの非常に緩徐な部分回復を生じる。パルスを 30 秒毎に送った。

【図9D】D) Vm24 の用量反応関係は、毒の濃度に応じた残留電流割合 ($R C F = I / I_0$) (ここで、 I 及び I_0 は、それぞれ毒の存在又は非存在下で測定したピーク電流である) をプロットし、割合: $R C F = K_d^n / (K_d^n + [T x]^n)$ (ここで、 $[T x]$ は毒の濃度を示し、 K_d は解離定数である) によってデータ点を適合することで得られた。エラーバーは、S E M ($n = 3 \sim 6$) を示す。このようにして作成した用量反応関数は、 $K_d = 2.9$ pM で、H i l l 係数 n が約 1 である。

【図9E】E) T リンパ球の $C a^{2+}$ 活性化 K チャンネル (h I K C a 1) を C o s - 7

10

20

30

40

50

細胞で発現し、10 s 毎に -120 mV の保持電位からの -120 ~ +50 mV の電圧ランプによって電流を誘発した。毒を適用する前に記録した電流追跡（対照）、10 nM の Vm24 の存在下 4.5 分間の遮断平衡後に記録した電流追跡、2.5 分間の毒の洗い流し（洗浄）後に記録した電流追跡を示す。

【図9F】F) 1 nM 及び 10 nM の Vm24 の存在下での hIKCa1 電流の残留割合を s/s_0 で算出した。ここで、 s 及び s_0 は、それぞれ Vm24 の存在下及び非存在下、電圧ランプによって誘発した I-V の関係の傾きである。エラーバーは、SEM ($n=3$) を示す。

【図10A】Vm24 は、Shakerファミリー (Kv1.x) チャンネルの中で hKv1.3 に対して選択的である。毒を適用する前（対照）、10 nM の Vm24 による遮断平衡後、及び毒の洗い流し（洗浄）後に記録した電流追跡を示す。A) mKv1.1 チャンネルを L929 細胞で発現し、30 s 毎に -120 mV の保持電位からの +50 mV までの電圧ステップによって電流を誘発した。平衡遮断が6分で発現し、洗い流し期間は5分であった。

10

【図10B】B) hKv1.2 チャンネルを Cos-7 細胞で発現し、30 s 毎に -120 mV の保持電位からの +50 mV までの電圧ステップによって電流を誘発した。平衡遮断が5.5分で発現し、洗い流し期間は7分であった。

【図10C】C) hKv1.3 チャンネルを末梢血リンパ球で内因的に発現し、15 s 毎に -120 mV の保持電位からの +50 mV までの電圧ステップによって電流を誘発した。平衡遮断が3.5分で発現し、洗い流し期間は4.5分であった。

20

【図10D】D) 高速不活性化除去した hKv1.4 (Kv1.4 N) チャンネルを Cos-7 細胞で発現し、30 s 毎に -120 mV の保持電位からの +50 mV までの電圧ステップによって電流を誘発した。Vm24 適用期間及び洗い流し期間は、それぞれ5分及び4.5分であった。

【図10E】E) hKv1.5 チャンネルを MEL 細胞で発現し、15 s 毎に -120 mV の保持電位からの +50 mV までの電圧ステップによって電流を誘発した。Vm24 適用期間及び洗い流し期間は、それぞれ6分及び3.5分であった。

【図11A】Vm24 は、様々な生物学的に重要なイオンチャンネルを遮断又は阻害しない。毒の適用前（対照）、10 nM の Vm24 による遮断平衡後、及び毒の洗い流し（洗浄）後に記録した電流追跡を示す。A) rKv2.1 チャンネルを Cos-7 細胞で発現し、30 s 毎に -120 mV の保持電位からの +50 mV までの電圧ステップによって電流を誘発した。Vm24 適用期間及び洗い流し期間は、それぞれ7分及び3分であった。

30

【図11B】B) hERG チャンネルを HEK 細胞で発現し、+20 mV までの電圧ステップと、次いでピーク電流を測定する間は -40 mV までのステップとによって電流を誘発した。保持電位は -80 mV であり、30 s 毎にパルスを送った。Vm24 適用期間及び洗い流し期間は、それぞれ5分及び2.5分であった。

【図11C】C) hBK (Kca1.1) チャンネルを tsA-201 細胞で発現し、0 mV の保持電位からの -120 mV までの 10 -ms 過分極によって進行した 50 mV までの電圧ステップによって電流を誘発した。5 s 毎にパルスを送った。Vm24 適用期間及び洗い流し期間は、それぞれ4分及び1分であった。

40

【図11D】D) Nav1.5 チャンネルを Cos-7 細胞で発現し、15 s 毎に -120 mV の保持電位からの 0 mV までの電圧ステップによって電流を誘発した。Vm24 適用期間及び洗い流し期間は、それぞれ1分及び1分であった。

【図12A】Vm24 の選択性プロファイルである。棒は、1 nM の濃度 (A) で適用された Vm24 による表示チャンネルの平衡遮断における残留電流割合を示す。データは、 $n=3$ の独立した実験に対する平均 \pm SEM として示される。発現システム及び RCF の計算及び他の条件については、図9~11 に対する説明文中の詳細を参照する。

【図12B】棒は、10 nM の濃度 (B) で適用された Vm24 による表示チャンネルの平衡遮断における残留電流割合を示す。

【図13A】合成 Vm24 による hKv1.3 チャンネルの高親和性遮断である。A) 3

50

0 s 毎に - 1 2 0 m V の保持電位からの + 5 0 m V までの脱分極パルスにตอบสนองして、h K v 1 . 3 チャンネルを通過する細胞全体でのカリウム電流をヒト T 細胞から誘発した。ペプチドの不在下で記録した電流（対照、矢印で示す）は、1 0 0 p M の合成 V m 2 4 (s V m 2 4) が細胞外培地での灌流によって細胞に投与される場合、実質的に遮断される (> 9 0 %) 。矢印は、s V m 2 4 の第 1 パルスを示す。

【図 1 3 B】B) 1 0 0 p M の s V m 2 4 の適用を受けて、時間に応じた正規化ピーク電流を示す。矢印は、毒の適用の開始を示す。s V m 2 4 のない溶液で細胞を灌流する場合、遮断からの大きな回復は達成されない（矢印は洗い流し期間の開始を示す）。

【図 1 3 C】C) 棒は、1 0 0 p M の濃度で適用された s V m 2 4 及び V m 2 4 による h K v 1 . 3 の平衡遮断における残留電流割合を示す。データは、n = 3 の独立した実験に対する平均 ± S E M として示される。発現システム及び R C F の計算及び他の条件については、図 9 ~ 1 1 に対する説明文中の詳細を参照する。

【図 1 4 A】V m 2 3 は、h K v 1 . 3 に対して選択的である。毒の適用前（対照）、1 0 n M の V m 2 3 による遮断平衡後、及び毒の洗い流し（洗浄）後に記録した電流追跡を示す。1 0 n M の濃度の V m 2 4 によって著しく遮断したイオンチャンネルを V m 2 3 の薬理学的プロファイリングに選択した。A) h K v 1 . 3 チャンネルを末梢血リンパ球で内因的に発現し、1 5 s 毎に - 1 2 0 m V の保持電位からの + 5 0 m V までの電圧ステップによって電流を誘発した。平衡遮断が 3 . 5 分で発現し、洗い流し期間は 2 分であった。

【図 1 4 B】B) T リンパ球の C a ²⁺ 活性化 K チャンネル (h I K C a 1) を C o s - 7 細胞で発現し、1 5 s 毎に - 1 2 0 m V の保持電位からの - 1 2 0 ~ + 5 0 m V の電圧ランプによって電流を誘発した。V m 2 3 適用期間及び洗い流し期間は、それぞれ 3 . 5 分及び 2 分であった。

【図 1 4 C】C) m K v 1 . 1 チャンネルを L 9 2 9 細胞で発現し、1 5 s 毎に - 1 2 0 m V の保持電位からの + 5 0 m V までの電圧ステップによって電流を誘発した。V m 2 3 適用期間及び洗い流し期間は、それぞれ 3 . 5 分及び 1 分であった。

【図 1 4 D】D) h K v 1 . 2 チャンネルを C o s - 7 細胞で発現し、1 5 s 毎に - 1 2 0 m V の保持電位からの + 5 0 m V までの電圧ステップによって電流を誘発した。平衡遮断が 3 . 5 分で発現し、洗い流し期間は 2 分であった。

【図 1 5】V m 2 3 の選択性プロファイルである。棒は、1 0 n M の濃度で適用された V m 2 3 による表示チャンネルの平衡遮断における残留電流割合を示す。データは、n = 3 の独立した実験に対する平均 ± S E M として示される。発現システム及び R C F の計算及び他の条件については、図 9 及び 1 4 に対する説明文中の詳細を参照する。

【図 1 6】ラットの遅延型過敏症 (D T H) 反応である。3 匹のラットからなる二つのグループをそれぞれ感作し、D N F B の適用により試験した。一方のグループは P B S のみの注入を受け（対照、番号 1 ）、他方は 1 0 マイクログラムの V m 2 4 の単回注入を受けた（グループ 2 ）。この処置の後、耳の測定を 2 4 時間行った。対照の棒は、対照ラットに対して D N F B で試験した後の耳の厚みを示し、一方、治療グループ（グループ 2 ）に対応する棒は、V m 2 4 で処置したラットの耳の厚みを示す。対照ラットと比較した場合、V m 2 4 を受けたラットに炎症の約 6 0 % の減少が観察された。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 5 】

定義

別段の定義がない限り、ここで用いるすべての技術的及び科学的用語は、本発明が属する当業者によって共通に理解されるものと同じ意味を有する。ここで用いるように、以下の用語は、特記されない限り、それらに帰する意味を有する。ここで説明するものと類似又は同等の方法及び材料はいずれも本発明の実施又は試験において使用できるが、好ましい方法及び材料を説明する。本発明の目的ため、以下に用語を定義する。

【 0 0 2 6 】

本発明において、「ペプチド」、「ポリペプチド」及び「タンパク質」の用語は、本発

10

20

30

40

50

明のペプチド分子を指すのに区別なく使用される。

【0027】

「Kv1.3カリウムチャンネル遮断活性」の用語は、概して、Kv1.3カリウムチャンネル阻害剤の存在によって生じた、該Kv1.3チャンネルを通過するカリウムイオン流れの阻害の程度についての実際の概算を指す。

【0028】

「Kv1.3カリウムチャンネル遮断薬」の用語は、概して、イオン伝導経路を直接閉鎖することによって、該チャンネルを含有する細胞膜のKv1.3チャンネルを通過するカリウムイオンの流れを阻害する物質を意味する。

【0029】

「類似体」の用語は、概して、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2及びSEQ ID NO:3の36の整列位置に対して少なくとも83%の対配列同一性を共有する任意のポリペプチド鎖を意味する(36の位置に対して30の一致)。限定されないが、最大で6のアミノ酸の変更、一つ又はそれ以上の非天然アミノ酸残基、該残基の一つ又はそれ以上の化学的誘導体化、並びに他のアミノ酸残基又は他の有機部分のいずれかによるN末端及び/又はC末端伸長を挙げることができる。

【0030】

「対配列同一性パーセンテージ」は、概して、二つのタンパク質配列を並べたときの二つの並べられた配列における全ての位置に対して同一のアミノ酸を有するアミノ酸残基位置間の係数を意味する。

【0031】

「機能的に同等な」の用語は、概して、SEQ ID NO:1又はSEQ ID NO:2と同様なKv1.3への親和性及び選択性を示す任意の分子構造を意味し、但し、それは、親和性及び/又は特異性についての同一の構造的決定因子を共有し、それらの配列にKv1.3チャンネルに関する高い親和性及び選択性を与える。それは、類似体又はペプチド模倣物である。

【0032】

「親和性及び/又は特異性の構造的決定因子」の用語は、概して、hKv1.3チャンネルに対して高い親和性及び特異性を有するSEQ ID NO:1及びSEQ ID NO:2を与えるポリペプチド構造上の全ての官能基及びその三次元位置を意味する。親和性及び特異性の構造的決定因子は、同一の、部分的に重複する又は異なるアミノ酸残基に関係している場合がある。

【0033】

「官能基」の用語は、概して、ポリペプチド主鎖又はそのアミノ酸残基の側鎖におけるSEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2又はSEQ ID NO:3内の所定の化学的部分を意味し、hKv1.3チャンネルと特異的且つ強固に接触するため、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2のhKv1.3チャンネルに対する親和性及び選択性を決定する。

【0034】

「機能的に同等な類似体」の用語は、概して、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2及びSEQ ID NO:3の36の整列位置に対して少なくとも83%の対配列同一性を共有する任意のポリペプチド鎖を意味する(36の位置に対して30の一致)。限定されないが、一つ又はそれ以上の非天然アミノ酸残基、該残基の一つ又はそれ以上の化学的誘導体化、並びに他のアミノ酸残基又は他の有機部分のいずれかによるN末端及び/又はC末端伸長を挙げることができ、SEQ ID NO:1又はSEQ ID NO:2と同様なKv1.3への親和性及び選択性を示す。

【0035】

「ペプチド模倣物」の用語は、概して、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2又はSEQ ID NO:3と類似の三次元構造位置にて同一の官能基を示す任意の化合物を意味しており、従って、hKv1.3チャンネルとのSEQ ID NO:1、

10

20

30

40

50

SEQ ID NO: 2の特異的な接触を模倣する。

【0036】

「本発明のペプチド」の用語は、概して、SEQ ID NO: 3を有するペプチドを意味し、C6及びC26、C12及びC31、C16及びC33並びにC21及びC36の位置における対のシステイン間にあることが確立された四つのジスルフィド架橋によって三次構造を維持しており、ここで、文字Cは、システイン残基の略称を示し、その番号は、並べられたアミノ酸配列中での相対位置に対応する。例示的な好ましいペプチドは、配列SEQ ID NO: 1 (Vm23)及びSEQ ID NO: 2 (Vm24)を有するペプチドである。前記ペプチドは、カリウムチャンネルKv1.3を高い親和性及び特異性で遮断することが可能である。SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2又はSEQ ID NO: 3の機能的に同等な類似体、即ち、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2及びSEQ ID NO: 3の36の整列位置に対して少なくとも83%の対配列同一性を共有するもの(36の位置に対して30の一致)が含まれ、それらは、四つのジスルフィド架橋によって維持された三次構造を保存し、SEQ ID NO: 1又はSEQ ID NO: 2と同様なhKv1.3への親和性及び選択性を示す。

10

【0037】

「薬学的に許容されるキャリアー」の用語は、標準的な医薬品キャリアー、緩衝液及び賦形剤をいずれも包含し、リン酸緩衝食塩水、水、及び乳濁液(油/水又は水/油の乳濁液等)、並びに様々な種類の湿潤剤及び/又はアジュバンドを含む。適切な医薬品キャリアー及びその製剤は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Co., Easton, 19th ed. 1995)に記載されている。好適な医薬品キャリアーは、対象とする活性剤の投与方法によって決まる。典型的な投与方法は、以下に説明される。

20

【0038】

「薬学的に許容される塩」の用語は、非毒性酸付加塩を指しており、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸、過塩素酸等の無機酸で形成される塩、酢酸、シュウ酸、マレイン酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸、マロン酸等の有機酸で形成される塩が含まれる。他の薬学的に許容される塩には、限定されないが、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ金属及びアルカリ土類金属に基づく陽イオン、並びに限定されないが、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミン等の非毒性アンモニウム、第4級アンモニウム及びアミン陽イオンを含む無機硝酸塩、硫酸塩、酢酸塩、リンゴ酸塩、ギ酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩等が挙げられる。

30

【0039】

「医薬品組成物」の用語は、哺乳動物対象又はヒト対象を含む対象への薬学的使用に適した組成物を意味する。医薬品組成物は、概して、効果的な量の活性剤と薬学的に許容されるキャリアーとを備える。

【0040】

「効果的な量」の用語は、特定活性剤の投与量を意味し、Kv1.3カリウムチャンネル遮断活性を有するペプチドの場合においては、例えば、哺乳動物の免疫応答を抑制すること、治療を必要とする対象の自己免疫疾患を治療すること、哺乳動物の免疫系のT-細胞活性化過程を抑制すること、Tリンパ球におけるカルシウム信号経路を減衰させることといった所望の結果を実現するのに十分な特定活性剤の投与量を意味する。所望の結果は、上記投与量を受ける対象(細胞を含む)において客観的又は主観的な改善を備えてもよい。

40

【0041】

「対象」の用語は、ヒトを含む哺乳動物を意味することを目的としている。治療されるヒトでない哺乳動物の対象には、例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、イヌ及びネコが含まれる。

50

【 0 0 4 2 】

「自己免疫疾患」の用語は、概して、生物体の恒常性に影響する生物体の免疫細胞によって動かされる病的状態を意味する。

【 0 0 4 3 】

「リンパ球 T_{EM} に関連した自己免疫疾患」の用語は、生物体を攻撃する細胞がリンパ球 T_{EM} 細胞である場合の任意の自己免疫疾患を意味する。それらの疾患の中には、限定されないが、多発性硬化症、関節リウマチ、I型糖尿病、自己免疫性乾癬、紅斑性狼瘡、潰瘍性大腸炎、交感性眼炎、及び骨吸収歯周病が含まれる。

【 0 0 4 4 】

「予防的治療」の用語は、疾患の徴候を示さないか又は疾患の初期症状のみを示す対象に対して投与される治療であり、ここで、該治療は、病的状態、特に自己免疫疾患、より具体的にはリンパ球 T_{EM} に関連した自己免疫疾患が発症する危険を減少させる目的で投与される。

10

【 0 0 4 5 】

「治療上の処置」の用語は、病変の徴候を示す対象に対して投与される治療であり、ここで、該治療は、その病的徴候、特に自己免疫疾患、より具体的にはリンパ球 T_{EM} に関連した自己免疫疾患を軽減又は解消する目的で投与される。

【 0 0 4 6 】

「器官」の用語は、心臓、肝臓、肺、腎臓、脳、副腎、血管内皮系、免疫系等の体組織を意味する。

20

【 0 0 4 7 】

「分子プローブ」の用語は、概して、標的細胞、細胞構造、受容体又は高い親和性及び特異性でプローブが結合できる任意の分子の同定に対して特に使用できる任意の化学物質又は生物学的物質を意味する。

【 0 0 4 8 】

「非必須アミノ酸」の用語は、概して、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 又は SEQ ID NO: 3 内のアミノ酸であって、結果として生じる類似体の Kv 1.3 チャンネルに対する親和性及び特異性を実質的に変えずに、他のアミノ酸と交換することができるアミノ酸を意味する。

【 0 0 4 9 】

主な発見

30

本発明の主題は、二つの新規なペプチド (Vm 2 3 及び Vm 2 4)、そのアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 1 及び SEQ ID NO: 2)、並びに機能的に同等な類似体の可能性及び特定の免疫抑制剤としてのその使用の可能性について言及する。Vm 2 3 及び Vm 2 4 は、亜型 Kv 1.3、特にヒトリンパ球 (hKv 1.3) のカリウムイオンチャンネルの高選択性遮断薬であり、生体内でラットにおける遅延型過敏症反応への炎症反応を減少させることが示される。従って、それら二つのペプチド及びその機能的に同等な類似体は、異常 T 細胞応答に関連した一部の免疫疾患の治療に使用されるリード化合物である。その免疫抑制剤及びその hKv 1.3 への効果の詳細に入る前に、この分野におけるいくつかの基礎的な知識を復習することが重要である。

40

【 0 0 5 0 】

全ての細胞の膜電位の調整は、主として、単純に K チャンネルと呼ばれるカリウムイオンに対して透過性のあるイオンチャンネルの存在によって維持される。個別の細胞は、幾つかの異なる K チャンネルを発現し、電圧、細胞内カルシウムレベル又は特定のリガンドの変化に応じて開閉することができるが、電位開口型チャンネルが最も一般的である [Gutman et al., 2005]。K チャンネルの機能を調整できる天然リガンドの中には、蜂、サソリ、ヘビ及びイソギンチャクの毒液からの毒素がある [Castle et al., 1989; Jouirou et al., 2004; Rodriguez de la Vega and Possani, 2004]。かかる毒素の例は、サソリ *Centruroides noxius* からのノキシウストキシン [Carbone et al., 1982]、サソリ *Leiurus quinquestriatus* からのチャリーブドトキシン [Miller et al., 1985]、サソリ *Anu*

50

roctonus phayodactylusからのアニユロクトキシン [Bagdany et al., 2005]、アネモナ *Bundosoma granulifera*からの B g K [Aneiros et al., 1993] 及び *Stichodactyla helianthus*からの S h K [Castaneda et al., 1995] である。これらの毒は、K v 1 . 3 を含む様々な異なる種類及び垂型の K⁺ チャンネルを異なる親和性及び特異性で遮断することが示された [Panyi et al. によって概説されている (2006)]。K v 1 . 3 チャンネルは、Tリンパ球増殖及びリンホカイン生成に関与しており、K v 1 . 3 の遮断薬は、潜在的な免疫抑制剤として関心を集めている [Panyi et al. 2006]。

【 0 0 5 1 】

これら K チャンネルに特異的な毒の幾つかは、その三次元構造が決定された ([Mouhat et al., 2004] で概説されている)。六つの膜貫通セグメントを含有する二つの電圧依存性 K チャンネルについての 3 次元構造の解明 [Lee et al., 2005; Long et al., 2005] 及び幾つかのグループによって行われた二重変異体 (毒及びチャンネル) の実験 [Goldstein et al., 1994; Stampe et al., 1994; Aiyar et al., 1995; Hidalgo and Mackinnon, 1995] の結果、幾つかのリガンドの K チャンネルとの接触面を同定した。今日まで知られているサソリの毒に関し、125 を超える異なるペプチドが研究され、そのアミノ酸配列が報告された [Rodriguez de la Vega and Possani, 2004]。そのペプチドは、主として一次配列の類似性、ジスルフィド架橋の位置及び機能の特異性という三つの基準に基づき、20 の異なるサブファミリーにグループ化された。本発明の目的のため、両方のペプチド (V m 2 3 及び V m 2 4) を単離し、精製し、配列決定し、アッセイした。得られた独創的で独占的である重要な情報は、その一次構造の特有性と非常に特異的な機能であり、それは、その構造的な特徴の単純な観察によっては明らかにならず、本発明において示し要求するように、生体外及び生体内の双方において機能についての実験的証明を必要とする。

【 0 0 5 2 】

この研究は、当該分野における V . メキシカナス種のサソリの収集と、その毒液の電気的な刺激による抽出によって始まった。サソリは、メキシコのモレロス州において集められた。筆者は、この目的に対して公的な認可を有する (書類番号 SGPA/DGVS/02483、2005 年 3 月 18 日付で the Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales of Mexican Government によって与えられた)。通常、二酸化炭素 (CO₂) の麻醉後に 30 匹のサソリから毒を抜いた。粗毒液は、すぐに処理されるか又は使用するまで - 20 で凍結保存される。

【 0 0 5 3 】

その後、可溶性毒液を HPLC によって分離した。更に、本発明の目的である精製ペプチドは、毒性効果の可能性のためにモデル動物としてマウスを用いて生体内でアッセイされ (致死試験)、その一次構造がエドマン分解及び質量分析によって決定された。それらの実験の詳細は、以下の例 1 において説明される。

【 0 0 5 4 】

毒液中の上記ペプチドの量は比較的少ないという事実によって、更に h K v 1 . 3 チャンネルに対する作用の機能性及び特異性を特徴付けるために、相当量の V m 2 4 を化学合成した。

【 0 0 5 5 】

V m 2 4 の化学合成

固相法によるペプチドの合成は、限定されないがポリスチレン、ポリアクリルアミド、特定の繊維、他の安定な重合体等の固相樹脂の使用を含む。固相樹脂の誘導体化は、C 末端の酸を機能的に形成する方法としてクロロトリチルクロリド、2 - クロロトリチルクロリド、ヒドロキシメチルフェニル、S a s r i n 等の適切なハンドルが使用できたり、限定されないが 4 - (2', 4' - ジメトキシフェニル - F m o c - アミノメチル) - フェノキシメチル基等の樹脂リンカーを介したタンパク質安定化によって準備されてもよい。

【 0 0 5 6 】

鎖の構築は、通常、アミノ酸保護基が t - ブチルオキシカルボニル (B o c) 又は 9 -

10

20

30

40

50

フルオレニル - メチルオキシカルボニル (f m o c) である保護基戦略のいずれかを含む。ペプチドの合成に用いる様々なアミノ酸の反応性側鎖は、通常保護される。一般に使用される保護基には、t - ブチル、ベンジル、トリチル、メチルトリチル、ベンジル - メチルベンジル、トシル、ベンジルオキシメチル、t - ブチルオキシカルボニル、2 - クロロベンジル、2 - ブロモベンジル、メトキシベンジル、ホルミル、アセトアミドメチル、ペンタメチルクロマンズルホニル、ペンタメチルジヒドロベンゾフラン - スルホニル、側鎖アミンのニトロ、グアニジン類、フェノール類、アルコール類、酸、イミダゾール類、チオール及びインドール類が含まれる。一次鎖構築の間、望ましくない副反応を排除するという同一の目標を達成する他の保護基を発明し得る。

【 0 0 5 7 】

新しいアミノ酸を成長ペプチドに付加する間のアミド結合の合成は、限定されないが、対称無水物 (カルボジイミド)、H O B T エステル、フッ化アシル、限定されないが T B T U、H A T U、H B T U 等のウロニウム活性剤、限定されないが B P、P y B O P、P y B r O P 等のホスホニウム活性剤を含む酸活性化法のいずれかを用いることで達成できる。ペプチド合成の当業者が知っているのと期待されるカルボキシ基の活性化についての全ての方法がある。

【 0 0 5 8 】

また、非天然アミノ酸を配列 S E Q I D N O : 1 (V m 2 3)、S E Q I D N O : 2 (V m 2 4) 又は S E Q I D N O : 3 (V m 2 3 及び V m 2 4 のコンセンサス配列) 中への置換を含む類似体構造の合成は、本発明の特定の実施態様に対して有用な場合がある。ペプチド断片を一応構築し、それによって最終生成物が V m 2 3、V m 2 4 又はその類似体になる収束法の使用もまた当業者に知られており、使用することができる。配列 S E Q I D N O . 1 及び 2 又はその類似体を得るため、ジスルフィド架橋の合成手順及び正確な折り畳みの最後で固体支持物から合成ペプチドを切断する方法もまた、当業者に知られており、再現されることができる。毒の最終切断及び脱保護及び折り畳みは、H F 又は T F A に限定されず、合成に採用された戦略によって決めることができる。ジスルフィド結合の形成は、異なる C y s 保護を用いて、正しい形でジスルフィド結合を位置づける任意の直交的アプローチを含むものであり、V m 2 4 については、C 6 - C 2 6、C 1 2 - C 3 1、C 1 6 - C 3 3 及び C 2 1 - C 3 6 の結合である。しかしながら、ジスルフィド架橋の形成はまた、空気酸化、又は様々な割合の還元・酸化グルタチオンの存在によって補助されるシャッフリング反応によって得ることもできる。

【 0 0 5 9 】

この基礎的な方法論に従って、ヘビ、サソリ及びイソギンチャクからの天然に存在する様々な毒を合成的に作り、I ¹²⁵ で放射標識し、カリウムチャンネルの構造及び機能を調査するための分子プローブとして用いた [Strong, 1990; Moczydlowski et al., 1998; Garcia et al, 2001, Kern et al., 米国特許第 6 0 7 7 6 8 0 号]。該毒の多くは、特定の亜型 K チャンネルに対して選択的である [Auguste et al., 1990; Galvez et al., 1 990; Crest et al., 1992; Garcia-Calvo et al., 1993; Garcia et al, 1994, Kem et al., 米国特許第 6 0 7 7 6 8 0 号]。最も頻繁に使用される例の中には、ほんの一部を挙げれば、ヘビ *Dendroaspis polylepsis* の毒液からのデンドロトキシン [Harvey, 1997]、イソギンチャク *Bunodosoma granulifera* からの B g K [Aneiros et al., 1993; Alessandri Haber et al., 1999] 及びイソギンチャク *Stichodactyla helianthus* からの S h K [C astaneda et al., 1995; Pennington et al., 1995] の他、*Centruroides noxius* からのノキシアストキシン [Drakopoulou et al., 1995]、*Leiurus quinquestratus* からのチャリーブドトキシン [Sugg et al., 1990] 等の幾つかのサソリ毒がある。S h K 等の該毒には、非常に低い濃度 (< 1 n M) でジャーカット T リンパ球における K v 1 . 3 型 K チャンネルを遮断する。しかしながら、それらの多くは、特異性の欠如に苦しむ。つまり、1 0 ~ 1 0 0 n M 程度の濃度で、それらが他の亜型チャンネルをも遮断することができる。後述する例において実証されるように、V m 2 3 及び V m 2 4 は、h K v 1 . 3 チャンネルに対して極めて特異的であり、今までのところ文献にて記載される他のペプチドと異

10

20

30

40

50

なる一次構造を有するため、我々は、V m 2 4 を合成的に調製することに決めた。

【 0 0 6 0 】

V m 2 4 の共有構造は、M e r r i f i e l d の固相システム [Merrifield, 1964] に従い、これまでに我々のグループによって説明された f m o c - アミノ酸 [Drakopoulou et al., 1995] を用いた化学合成によって得られた。

【 0 0 6 1 】

生体内でより高い半減期を持つペプチド類似体を得るために他の変性アミノ酸によって、S E Q I D N O : 1、S E Q I D N O : 2 又は S E Q I D N O : 3 の一次構造のアミノ酸の一部を置換する可能性のため、天然ペプチドのプロテアーゼ感受性を低減することは本発明の範囲内である。これは、保存的なイソステリック交換による不必要な残基の交換又は置換を含むことができ、例えば、グルタミン又はアセチル-リシンのためのリシン、又はアラニン等の中性アミノ酸、又は生物学的に活性なペプチドのタンパク質分解を低減する位置での N a - メチル化アミノ酸の置換である。また、一次配列の切断は、その機能に不必要なアミノ酸の欠失又は余分な残基の付加によって、生体内でより高い安定性を持つ類似構造を与えることができる。S E Q I D N O : 1 及び S E Q I D N O : 2 の配列比較によって同定した本発明のペプチドの不必要な残基の一部には、限定されないが、整列させた S E Q I D N O : 1 及び S E Q I D N O : 2 又は整列させた S E Q I D N O : 1、S E Q I D N O : 2 及び S E Q I D N O : 3 の位置番号 1 0、1 3、1 7、2 3、2 9 及び 3 5 における残基が含まれる。

【 0 0 6 2 】

機能的に同等なペプチド類似体は、選択された D - アミノ酸の包含又はレトロ - インバーズ類似体の化学合成によって生成でき、ここで、全ての残基は D - アミノ酸であり、そのアミノ酸配列は、逆転されている [Jameson et al., 1994; Juvvadi et al., 1996]。これらの修飾は、生成物の安定性を増大し得る。

【 0 0 6 3 】

他の重要なアプローチは、非ペプチド (ペプチド模倣物) を生成するため、S E Q I D N O : 1、S E Q I D N O : 2 又は S E Q I D N O : 3 の親和性及び特異性の構造的な決定因子に基づいた低分子量化合物の開発である。この研究において、非ペプチド骨格が、設計して合成されており、親ポリペプチドのカリウムチャンネル結合表面から重要な官能基を含む。天然に存在する低分子量の非ペプチド化合物はポリペプチド又はタンパク質リガンドの効果を模倣したり無効にしたりすることが示された例が多く存在する。ペプチド模倣の化合物は、多くの治療に関連したペプチドのために設計され合成されてきた。H I V g p 1 2 0 タンパク質に結合する C D 4 受容体上に存在するループが、設計して合成的に得られ [Chen et al., 1992]、低いマイクロモル濃度で C D 4 受容体に結合する g p 1 2 0 の効果的な遮断薬となることが示された。F T I - 2 7 6 は、発癌 R a s シグナルの強力な遮断薬である R a s タンパク質の C 末端領域の模倣物についての他の例である [Lerner et al., 1995]。

【 0 0 6 4 】

上述の説明から推測できるように、Tリンパ球の異常な機能を制御するための先行薬物として使用できる二つのペプチド V m 2 3 及び V m 2 4 についての機能的に同等な類似体を調製する方法が多く存在する。Tリンパ球の適切でない活性化は、特に、自己免疫疾患 (多発性硬化症、関節リウマチ、I型糖尿病、自己免疫性乾癬、紅斑性狼瘡、潰瘍性大腸炎、骨吸収歯周病等) 及び移植片拒絶を引き起こすことが知られている。

【 0 0 6 5 】

可能性のある新規な免疫抑制剤の効率を試験するため、多くの動物モデルがあり、それらは、新規な未知化合物の効率及び起こり得る副作用を試験するための適切な生体内でのアッセイを提供するものであり、ラットにおける遅延型過敏症 (D T H - 応答) として知られる反応の場合には、本発明において使用された。後述するように、本発明のペプチドの保護効果を評価するため、少量の V m 2 4 を試験して、ジニトロフルオロベンゼン (D N F B) で前もって感作されたラットの耳で起こる炎症反応を制御した。このアッセイは

、広く使用されており、本発明の目的に適したモデルとして認められる [Phanuphak et al., 1974]。

【0066】

免疫抑制剤

シクロスポリン、FK506等の免疫抑制剤は、その治療的使用を制限する重度の副作用を示す。その二つの化合物で行った研究は、その薬剤の投与によって望ましくない副作用に關与する分子機構の少なくとも一部を同定することができた。シクロスポリンは、多くの異なる組織に存在するタンパク質シクロフィリンと相互作用し、一方、FK506は、FK結合タンパク質を標的とするため毒性を引き起こし、また多くの異なる組織においても見られた。従って、重篤な副作用のない新規な免疫抑制剤を同定するための大変な努力があった。主な目標の一つは、Kv1.3イオンチャンネル等のT-リンパ球において主に発現する新規なターゲットを同定することである。T-リンパ球にて発現するKv1.3カリウムチャンネルは、特定の細胞機能に対して非常に重要であるが、このタンパク質に対するRNAコーディングもまた他の細胞(B-リンパ球、ミクログリア、マクロファージ、破骨細胞、血小板、及び一部の脳細胞)において見られる。しかしながら、T-リンパ球の場合に限り、Kv1.3は、膜電位を支配し、遮断に重要な機能的結果を有する。Kv1.3遮断薬の作用の異なる機構、及びKv1.3チャンネルの比較的制限された組織分布のため、Kv1.3の特異的で且つ高親和性の遮断薬は、シクロスポリン及びFK506よりも低い毒性の副作用を示すことが期待され、従って、自己免疫疾患の治療及び移植医療に有用であることが証明できる。

【0067】

Merck Sharpe及びDohmeの科学者は、マーガトキシン(他のサソリ毒のペプチド)がKv1.3チャンネルの遮断薬として強力な効果を有し、動物モデル(ブタ)の免疫反応を抑制することが可能であることを示した。しかしながら、マーガトキシンは、Kv1.3に対して特異的であるだけでなく、同様の効力でKv1.2チャンネルにも作用する。また、心臓及び脳組織はKv1.2チャンネルを発現するため、その閉塞は、非常に有害な効果を有し得る。イソギンチャクから単離した他のペプチドであるShKは、Kv1.3の強力な阻害剤であり(Kem et al., 2000, 米国特許第6077680号参照)、他の関連するKv1チャンネルに影響を与えるが、同様の遮断には、100倍を超える高い濃度が必要とされる。これは、関連するチャンネルが、K1.3と比較して、その適用に対する感受性が>100倍低いことを意味する。本発明の目的であるペプチドVm23及びVm24は、異なる生物源からのものであり、ShKとは明確に異なる一次構造を有し、ShKと比べてhKv1.3チャンネルに対し特異的である。Vm23及びVm24は、hKv1.3チャンネルの同一画分を遮断するのに必要とされる濃度より3000倍以上の濃度で適用した場合、二つの他のKチャンネルを50%遮断し、このことは、以下の例において示され、詳細に説明される(例7~10)。

【0068】

また、本発明は、Vm23、Vm24及びその機能的に同等な類似体の固相法による生成を含むものである。化学合成に使用される手順には、例3で詳細に説明されるように、当業者によく知られる一連の手順が含まれる。

【0069】

電気生理学的な特性付け

異物又は自己抗原に対する効果的な免疫反応の開発には、所定の抗原に特異的なリンパ球の活性化及び増殖が求められる。これは、免疫系の異なる細胞成分間の十分に調整された相互作用を必要とする。この過程の第1ステップは、プロフェッショナル抗原提示細胞による処理された抗原のリンパ球に対する提示である[Janeway et al., 2001]。電位開口型Kチャンネル、Kv1.3に特異的な遮断薬によって、T-リンパ球媒介免疫反応(例えば、遅延型過敏症)を制御することは、本発明の目的の範囲内である。従って、我々は、T細胞に対するリンパ球の活性化においてKチャンネルが關与する同化作用を制限する。しかしながら、我々は、Bリンパ球における特定のサブセットの増殖もまたKv1.3

3チャンネルの活性次第であることについて言及すべきである [Wulff et al., 2004]。
【0070】

T細胞の抗原受容体による提示された抗原の認識は、細胞の活性化、増殖及び最終分化を導く [Sallusto et al., 2004]。抗原認識によって誘発した膜貫通シグナル経路は、幾つかのタンパク質キナーゼの活性化と、その結果として起こるホスホリパーゼC- β (PLC- β)の活性化を含む。膜リン脂質ホスファチジルイノシトール4,5-ビスホスフェート (PIP₂)のPLC- β -媒介加水分解によるイノシトール1,4,5-トリスホスフェート (IP₃)の生成は、T細胞の増殖への傾倒に必要な二相のCa²⁺シグナルを惹起する [Lewis, 2001]。IP₃は、拡散して小胞体 (ER)中の受容体に結合し、細胞質ゾル内へのCa²⁺の放出及び細胞質遊離カルシウム濃度 ([Ca²⁺]_i)の大きな上昇を引き起こす。ERからの放出を受けた[Ca²⁺]_iの一時的な上昇は、シグナル伝達カスケードの遂行のために十分でなく、持続的なCa²⁺シグナルが必要である。これは、カルシウム放出で活性化したCa²⁺チャンネル (CRACチャンネル)によって、細胞膜のCa²⁺チャンネルを通過した細胞外空間からのCa²⁺の流入により実現される [Zweifach and Lewis, 1993]。

10

【0071】

CRACチャンネルは、本質的に電圧依存であるが、Ca²⁺電流は、Ca²⁺の電気化学的な勾配に敏感であり、細胞の膜電位によって影響を受ける [Panyi et al., 2004]。脱分極性のCa²⁺流入は、負の値の膜電位を固定し、更なるCa²⁺流入に十分な推進力を与えるためにKチャンネルの活性化によって平衡化される必要がある [Fanger et al., 2001]。制御された選択的K⁺流出は、ヒトTリンパ球の膜電位の主要な決定因子の一つであり、およそ-50~-60mVである。2種類のKチャンネルは、その細胞の生理学的条件下で外向きのK⁺流動に導く。ヒトTリンパ球における支配的な電位開口型KチャンネルであるKv1.3は、細胞の静止電位に近い活性化閾値の膜脱分極で開口する [Matteson and Deutsch, 1984]。ヒトT細胞のCa²⁺で活性化したカリウムチャンネルであるIKCa1 (又はK_{Ca}3.1)は、膜電位に独立して、約200nMを超える細胞質遊離カルシウム濃度の上昇によってのみ活性化される [Grissmer et al., 1993]。

20

【0072】

Kv1.3及びIKCa1チャンネルのT細胞の膜電位制御への寄与は、細胞の活性化状態 (静止対活性)と、T細胞の最終分化の程度によって決定される免疫系での機能的役割とによって決まり [Wulff et al., 2003]、発明の背景技術のセクションにて詳細に説明されている。自己免疫疾患におけるKv1.3遮断薬の治療的適用の点から、IKCa1チャンネルを超えたKv1.3チャンネルへの選択性が最重要であることを強調することが重要である [Wulff et al., 2003]。エフェクターメモリT細胞 (T_{EM})は、例えば多発性硬化症、関節リウマチ、I型糖尿病、自己免疫性乾癬、紅斑性狼瘡、潰瘍性大腸炎、交感性眼炎及び骨吸収歯周病における組織損傷を媒介しており、活性化時にKv1.3チャンネルを選択的に上方制御し、従って、その細胞の膜電位制御は、Kv1.3チャンネルのみによって支配される [Beeton et al., 2006]。その結果、該細胞の増殖は、選択的Kv1.3阻害剤によって効果的で且つ持続的に抑制できる [Wulff et al., 2003; Vennekamp et al., 2004; Beeton et al., 2005]。これに対して、未処理細胞及び中央メモリT細胞 (T_{CM})は、IKCa1の転写上方制御 [Ghanshani et al., 2000]によってKv1.3遮断で媒介した増殖阻害 [Wulff et al., 2003]から回避する。予備活性化細胞の増殖は、IKCa1阻害剤に対して感受性が高くなるが、Kv1.3阻害剤に対しては高くない。従って、未処理細胞及びT_{CM}細胞の増殖の大きな障害なしにT_{EM}細胞の活性化を抑制するKv1.3に基づいた治療は、自己免疫疾患、特にI型糖尿病 [Viglietta et al., 2002; Beeton et al., 2006]、関節リウマチ [Beeton et al., 2006]、多発性硬化症、実験的歯周病の炎症性骨吸収 [Valverde et al., 2004]等のリンパ球T_{EM}に関連した自己免疫疾患、並びに慢性的に活性化したT_{EM}細胞によって持続することが提案された慢性移植片拒絶反応及び移植片対宿主病 [Yamashita et al.,

30

40

50

2004]等の器官拒絶反応に関連した状態の管理に使用され得る。

【0073】

選択性評価

幾つかのKv1.3の高親和性ペプチド遮断薬は、IKCa1よりKv1.3に対して選択的であり、Vm2.4に対しても同様である。これらには、サソリ毒、例えば、マルガトキシシ(MgTx)、ノキシウストキシシ(Ntx)、カリオトキシシ、アニユロクトキシシ及びイソギンチャクから単離されたShK毒等が含まれる。しかしながら、神経興奮性及び筋肉興奮性に重要なイオンチャンネルもまた、ナノモル濃度~ピコモル濃度での親和性を持つ毒によって阻害され、例えば、Kv1.1は、ShK[Kalman et al., 1998]及びカリオトキシシ[Grissmer et al., 1994]によって阻害され、一方、Kv1.2は、MgTx[Koch et al., 1997]、Ntx[Grissmer et al., 1994]及びアニユロクトキシシ[Bagdany et al., 2005]によって遮断される。

10

【0074】

毒の特異性の欠如は、大きな生物学的効果の可能性を抑制する。Kvファミリーのイオンチャンネルは、古典的な興奮性細胞及び非興奮性細胞において広く分布される(包括的な概説については[Gutman et al., 2005]参照)。神経細胞、骨細胞及び心筋細胞において、そのチャンネルは、電気的興奮性の主要な決定因子である。それは、静止膜電位の維持、再分極の速度に影響することによる作用電位の形に寄与し、また、超分極後のスパイク頻度及び神経細胞を決定する(包括的な概説については[Gutman et al., 2005]参照)。中枢神経系で発現したイオンチャンネルは、血液脳関門のため、体系的に適用された毒から更に保護されているが、Kv1.3阻害剤の潜在的適用範囲である多発性硬化症においては、この関門が損なわれ、MSの動物モデルにおける神経毒性を引き起こす[Beeton et al., 2005]。細胞の血流との直接接触によって、心筋細胞は、非選択的Kv1.3阻害剤の潜在的副作用に対してより影響を受けやすい。ヒト心房筋細胞におけるKv1.5[Feng et al., 1997]並びに心室筋細胞におけるKv1.4[Patel and Campbell, 2005]及びhERG([Sanguinetti and Tristani-Firouzi, 2006]において概説されている)チャンネルは、作用電位の再分極相を強く決定し、一方、Nav1.5は、脱分極相に関与する[Rogart et al., 1989]。BKCa²⁺で活性化したKチャンネルは、人体において広範に存在しており(脳、骨格筋、平滑筋、膵島細胞等、[Wei et al., 2005]において概説されている)、神経細胞及び骨格筋細胞の電気的興奮性並びに平滑筋のCa過渡応答等の様々な生理学的機能を調整する。BKチャンネルは、KTx1.xファミリーの毒によって遮断される(例えば、チャリーブドトキシシ[Miller et al., 1985])。

20

30

【0075】

細菌性の[Doyle et al., 1998]及びヒトの電位開口型Kチャンネル[Long et al., 2005]のX線結晶構造の利用可能性は、ここ10年間で、異なるイオンチャンネルに対するKTx特異性の分子基盤の理解を深めたが[Giangiaco et al., 2004]、今まで、一次構造に基づいた所定のペプチド毒の選択性プロファイルの予測は、不可能であった。これは、生物学的意義及び動物毒によって遮断する既知の感受性を有するイオンチャンネルに対するVm2.4の選択性的な実験的な決定因子を実証する。

40

【0076】

分子生物学の進歩及びイオンチャンネル遺伝子のクローニングは、薬理学的研究が組換え型イオンチャンネルで行われることを可能にする。適切な細胞株における組換え型チャンネルの発現は、薬理実験に対して幾つかの利点を与えており、例えば、混入する電流の大きさが無視でき、該電流の振幅は薬理分析に適している。更に、発現した組換え型チャンネルは、天然細胞で発現したチャンネルの薬理学的特性を維持する。

【0077】

医薬品組成物

本発明は、本発明のペプチドを備える医薬品組成物を提供する。前述したように、該ペプチドは、T細胞の特異的なサブセットが活性化する場合に哺乳動物における免疫反応を

50

抑制するのに有効である。特に、本発明のペプチドを備える医薬品組成物は、免疫反応が異種器官拒絶反応の結果であるか（例えば、心臓、肺、肝臓、腎臓又は膵臓）又はリンパ球 T_EM に関連した自己免疫疾患の結果である病状を治療又は予防するのに有効である。

【0078】

本発明の好ましい態様において、医薬品組成物は、本発明のペプチド又はその薬学的に許容される塩と、薬学的に許容されるキャリアーとを備える。該医薬品組成物の好ましい形態及び薬学的に許容されるキャリアーの選択は、投与及び治療的適用の目的とする形式によって決まる。医薬品組成物は、（所望の製剤に応じて）薬学的に許容できる非毒性キャリアー又は希釈剤を含み、それらは、動物又はヒト投与用の医薬品組成物を製剤化するのに一般に使用される賦形剤として定義される。加えて、任意には、医薬品組成物はまた、少なくとも一つの追加の免疫抑制剤を備えてもよく、それは、治療における相補的な効果を有し得る。具体的な免疫抑制剤の一部は、シクロスポリン、ラバマイシン、アザチオプリン、プレドニゾン、S h K 毒素、S h K 誘導体及びデオキシスパガリン、それらの誘導体、又はそれらの塩である。本発明の医薬品組成物は、以下に述べるように投与できる。

10

【0079】

治療方法及び予防方法

本発明は、哺乳動物における免疫反応の抑制が必要とされる病状の治療的又は予防的処置の方法を提供するものであり、特にはかかる処置を必要とする対象において T 細胞が活性化する場合であり、ここで、上記病状には、異種器官拒絶反応（例えば、心臓、肺、肝臓、腎臓又は膵臓）又は自己免疫疾患（例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、I 型糖尿病、自己免疫性乾癬、紅斑性狼瘡、潰瘍性大腸炎、交感性眼炎及び骨吸収歯周病）が含まれる。該対象には、ほんの一部を挙げれば、ヒトの他、イヌ、ネコ、ヤギ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ等の他の哺乳動物を挙げることができる。一の態様において、本発明は、治療的又は予防的処置を必要とする対象についての T 細胞の細胞膜における K v 1 . 3 カリウムチャンネルの阻害に対する応答又は感受性によって治療可能な病状の予防的又は治療的処置の方法を提供する。該方法は、ヒト等のそれを必要とする対象に対して、上述した本発明のペプチドを効果的な量投与する工程を備える。一般に、このペプチドは、S E Q I D N O : 1 の V m 2 4、S E Q I D N O : 2 の V m 2 3 というペプチドもしくは配列 S E Q I D N O : 3 を有するペプチド、もしくはそれらの機能的に同等な類似体、又はその薬学的に許容される塩を備えてもよい。

20

30

【0080】

好ましい実施態様において、本発明は、T 細胞活性化に関連した又は K v 1 . 3 カリウムチャンネル阻害に応答する自己免疫疾患を治療及び予防することを特に目的とする方法を提供する。かかる自己免疫疾患には、限定されないが、多発性硬化症、関節リウマチ、I 型糖尿病、自己免疫性乾癬、紅斑性狼瘡、潰瘍性大腸炎、交感性眼炎及び骨吸収歯周病が含まれる。上記方法は、ヒト等のそれを必要とする対象に対して、上述した本発明のペプチドを効果的な量投与する工程を備える。

【0081】

他の好ましい実施態様において、本発明は、異種器官（例えば、心臓、肺、肝臓、腎臓又は膵臓）の拒絶反応を治療及び予防することを特に目的とする方法を提供する。上記方法は、ヒト等のそれを必要とする対象（即ち、臓器移植を受けるか又は受けた対象）に対して、上述した本発明のペプチドを効果的な量投与する工程を備える。

40

【0082】

投与量及び投与方法

治療的適用において、本発明のペプチドは、疾患又は望ましくない病状（例えば、それぞれ自己免疫疾患又は異種臓器拒絶反応）に既に苦しむ対象に対して、該疾患及びその合併症の進行を治療し、回復し、部分的に停止し又は検出可能な程度に遅くするのに十分な量で投与できる。本発明のペプチドの治療的適用で用いるのに効果的な量は、病状の重症度、対象の一般的症状及び投与経路によって決まることになる。治療的適用におけるペプ

50

チドの効果的な量は、一般に、キログラム当たり約0.1マイクログラム～キログラム当たり約10マイクログラムの投与量当たりペプチド（又はその薬剂的に許容される塩）の範囲内である。

【0083】

予防的適用において、対象とするペプチド又はその医薬品組成物は、疾患又は望ましくない病状に苦しんでいないが危険性のある対象に対して投与される。投与されるペプチドの効果的な量は、健康な対象の状態及び免疫系の一般的な状態によって決まる。予防的適用におけるペプチドの効果的な量は、一般に、キログラム当たり約0.1マイクログラム～キログラム当たり約10マイクログラムの投与量当たりペプチドの範囲内である。

【0084】

本発明のペプチド及び医薬品組成物の送達経路は、疾患又は臨床的徴候及び治療を必要とする部位によって決定される。体の限定部位に制限されるある種の疾患については、その局所部位に上記ペプチド又は組成物を適用するのが望ましい場合がある（局所適用）。或いは、疾患が進行する場合又は局所適用と同時に、該ペプチド又は組成物を全身的に投与するのが望ましい場合もある。

【0085】

他の徴候に対して、本発明のペプチド及び医薬品組成物は、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、鼻腔内及び皮内注射、並びに気管支内点滴（例えば、噴霧器を用いる）及び経粘膜的、全身的、経皮的（例えば、皮膚用パッチの脂溶性キャリアーによる）、経口的及び胃腸内送達（例えば、カプセル又は錠剤による）によって送達できる。

【0086】

本発明の一つ又はそれ以上のペプチドは、併用療法において投与されてもよい。例えば、一つ又はそれ以上の対象ペプチドは、他の免疫抑制剤（上述のもの等）と組み合わせて、かかる処置を必要とする対象に対して投与されてもよい。免疫性血小板減少性紫斑病 [Cooper and Busse], 2006] 又は自己免疫性リンパ球増殖性症候群 [Oren et al, 2002] 等の特発性自己免疫疾患もいくつか存在し、ここで、上記処置が複数目標アプローチに必要とされる場合があるため、二つ以上の免疫抑制物質が必要となる。

【0087】

本発明のペプチドは、単独で又は「医薬品組成物」のセクションにおいて説明した薬学的に許容されるキャリアーと組み合わせて投与できる。ペプチドは、単回又は複数回投与で投与され得る。適切な薬学的に許容されるキャリアーには、不活性固体希釈剤又は充填剤、無菌水溶液、及び各種非毒性有機溶媒が含まれる。対象とするペプチドを薬学的に許容されるキャリアーと組み合わせてなる医薬品組成物は、錠剤、トローチ剤、シロップ、注射可能な溶液等の各種投薬形態で容易に投与されることができる。望ましくは、医薬品キャリアーは、香味料、結合剤、賦形剤等の追加の成分を含有してもよい。

【0088】

経口投与に関して、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム等の各種賦形剤を含有する錠剤は、澱粉、好ましくはジャガイモ又はタピオカ澱粉、アルギン酸、特定の複合ケイ酸塩等の各種錠剤分解物質と一緒に、ポリビニルピロリドン、スクロース、ゼラチン、アカシア等の結合剤を含めて使用できる。また、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、タルク等の平滑剤を錠剤化目的で加える。また、同様な種類の固体組成物は、塩及び硬ゼラチンカプセルにおいて充填剤として使用されてもよい。この目的に対して好適な材料には、ラクトース又は乳糖及び高分子量ポリエチレングリコールが含まれる。エリキシル剤の水性懸濁液が経口投与に望ましい場合、ここで重要な活性ペプチド成分は、水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリン、それらの組み合わせ等の希釈剤を含めて、各種甘味料又は香味料、着色料又は染料、望ましくは乳化剤又は懸濁剤と組み合わせることができる。

【0089】

非経口投与に関して、本発明のペプチドのゴマ油溶液もしくはピーナッツ油溶液又は含水ポリプロピレングリコール溶液は、前述した対応する薬学的に許容される水溶性金属塩

10

20

30

40

50

の無菌生理食塩水と同時に使用されてもよい。かかる水溶液は、必要ならば十分な生理食塩水又はグルコースによって最初に等浸透圧にされた液体希釈剤で、適切に緩衝されるべきである。これらの特定の水溶液は、特に静脈内、筋肉内、皮下及び腹腔内注射に適している。使用される無菌水媒体は、当業者に広く知られる標準的な技術によって完璧に得ることができる。加えて、前述の化合物は、特定の目的に適している適当な溶液を用いることによって、局所に（例えば、設置されたカテーテルを通して）投与されてもよい。

【0090】

分子プローブとしてのVm23、Vm24及び機能的に同等な類似体

本発明のペプチドの治療上の使用と別に、これらのペプチドは、動物組織又は安定な培養物から得られる幅広い細胞において、Kv1.3チャンネルの発現レベルを検出し及び特徴づけるために使用され得る。T細胞におけるKv1.3の発現を特徴付けることの重要性は、すでに本明細書において取り上げられており、従って、本発明はまた、Kv1.3チャンネル発現細胞を生理的に特徴付けるための分子プローブとしての本発明のペプチドの使用に関するものである。Kv1.3発現の検出及び特徴付けは、都合よく標識化された本発明のペプチドを用いる幾つかの検出技術によって行われることができ、限定されるものではないが、フローサイトメトリー、通常の共焦点蛍光顕微鏡、蛍光全発光、放射性結合及び置換技術、並びに免疫学的プルダウンアッセイが挙げられる。所定の細胞において発現したKv1.3チャンネルの定量は、定量検出技術によって行われることができ、限定されるものではないが、共焦点レーザー走査顕微鏡によるチャンネル計数、免疫金検出並びに放射性結合及び置換技術が挙げられる。更に、幾つかの非必須アミノ酸のポリペプチド鎖又は側鎖の化学的修飾は、Kv1.3チャンネルの検出及び定量化に使用できる標識化された機能的に同等な類似体を提供することができる。同様に、その機能的に等価な類似体は、特異的なリガンドを検索するための分子プローブとして使用でき、但し、その新規なリガンドは、Kv1.3上にVm23、Vm24及びそれらの機能的に同等な類似体と同一の結合部位を共有する。かかる化学的修飾は、Kv1.3に対して高い親和性及び特異性を持つリガンドを与えるVm23、Vm24及びそれらの機能的に同等な類似体の構造決定を未修飾のままにしておくべきである。ポリペプチド鎖の化学修飾は、有効な分子プローブを得るための常法であり、広く利用できる幾つかの方法によって達成でき、当業者に常用されている。修飾によって与えられる標識には、限定されないが、放射性同位体部分、蛍光部分、化学発光部分又は発色性部分、及びタグタンパク質（抗体、ビオチン、緑色蛍光タンパク質又はその誘導体）との架橋結合又は融合が含まれる。

【0091】

以下の実施例において、新規な本発明のペプチドをどのように単離し、精製し、化学的に特徴づけしたかを詳細に説明する。例示的なペプチドVm24の合成を説明し、ヒトTリンパ球のKv1.3チャンネルに対する二つの例示的な本発明のペプチド（Vm23及びVm24）の選択的作用を徹底的に説明する。最後に、ラットにおけるDTH-応答の生体内アッセイにおいて、低濃度でのVm24の保護作用についても説明する。

【実施例】

【0092】

以下の例には、典型的に好ましい本発明の実施形態を実証することが含まれる。報告した例のうち特定の実施態様において多くの変更がなされ、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、当業者によって同様の又は類似の結果を得ることができる。最終生成物が、ここで示す配列（SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3）又はそれらの機能的に同等な類似体を備える場合、それは、ここに示す結果と同じ結果を必ず再現し、ここで主張する本発明の実施においてよく機能すると期待される。

【0093】

例1. Vm23及びVm24の単離、マウスにおける致死試験及び一次構造決定

使用した全ての溶媒及び化学物質は分析グレードで、二回蒸留水は、以前説明したような手順によって使用された [Batista et al., 2007]。

10

20

30

40

50

【0094】

単離手順

上述した各種天然リガンドの単離に用いる手順は、クロマトグラフ技術を用いる。毒液を水中で可溶化し、10000 x gで5分間遠心分離した。浮遊物を回収し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分離した。可溶性毒液タンパク質を1.0ミリグラム含有する100マイクロリットルを、HPLCシステム（Millenium Millipore, Milford, MA）のVydac（Hisperia, CA, USA）から得た分析C18逆相カラム（大きさ10 x 250 mm, カタログ番号238TP）に適用した。溶液A（水中0.12%トリフルオロ酢酸TFAの水）から60%溶液B（アセトニトリル中0.10%TFA）までの線形勾配を用い、60分間流して、成分を精製した。230 nmの吸光度にて検出を監視し、1 ml / 分の流速で溶出した。手動で画分を収集し、Savant Speed-Vac乾燥機を用いて乾燥させた。図1に示すように、80を超える異なる画分をこのHPLC分離から収集した。20~35分の保持時間で溶出する画分は、通常、研究された他のサソリ毒液のKチャンネルに最も特異的なサソリ毒の溶出時間に対応する [Batista et al., 2007]。このため、この時間に溶出する毒液成分に専念するよう特に注意しなければならない。特に、23分と24分に溶出する二つの画分を更に分析した。なぜなら、この溶出時間からのペプチドの質量分析決定は、既知の他のKチャンネル特異性毒に対して見られた値と密接な関係があるからであり、それらは、約4000ダルトンの分子量を有する。それらの成分は依然として均質でないため、第二のクロマトグラフ分離を同一のHPLCシステムを用いて行い、但し、異なる勾配で溶出した（溶液Aから40%溶液B、60分間、Vydag, Hisperia CAのカタログ番号218TP54のC18カラムの使用）。図1の差し込み図に示されるように、主成分が、冒頭の各画分から単離された（アスタリスクでラベルされる）。左側の差し込み図は、23分で溶出する画分に対応しており、右側の差し込み図は、24分で溶出する画分に対応する。質量分析決定及び自動エドマン分解による配列決定による分析を受けて、両方のペプチドが均質であることが分かった。最初に、我々の実験条件で24分にて溶出したものを分析した。それは純粋であり、3864原子量単位（a.m.u.）の分子量が示された。本明細書において、我々は、一つの分子量単位を指定するため、置き換え可能なようにa.m.u.又はダルトン（Daと省略）を使用することになる。このため、そのペプチドはVm24と名付けられ、我々の実験条件において24分で溶出するV.メキシカナスからの毒液のペプチドを意味する。左側の差し込み図（図1）に示すクロマトグラムは、Vm23と名付けたペプチドの分離に対応する。それは、23分で溶出するV.メキシカナスからの毒液のペプチドを意味する。この成分の実験的分子量は、3665 Daであると測定された。

【0095】

V.メキシカナスからの全毒液の生体内での毒性測定並びに精製したVm23及びVm24の致死試験

毒液及び純ペプチドの効果は、サソリ毒液が種特異的な毒を含有することが知られているため、少なくとも三つの生物学的モデル：哺乳動物、コオロギ、甲殻類を用い、研究室で通常行われる。哺乳動物又は異なる種類の節足動物に特異的な毒がある（ [Possani et al., 1999] において概説されている）。本発明の目的のため、我々は、動物モデルとしてマウスを用いた実験を行ったが、これは、その結果が、毒液又は精製された毒と接触したヒトに起こる信頼性の高い徴候となるからである。V.メキシカナスの可溶性毒液を様々な量（体重20グラムのマウス当たり50~200マイクログラムのタンパク質）で注射されたマウスは、中毒症状を示さなかった。通常、毒液が上記の物量で人に対して毒性を有する場合、興奮性、唾液分泌、呼吸促迫（呼吸困難）、後肢の麻痺、下痢、痙攣、更には死等、明らかな中毒症状が見られた [Possani et al., 1985]。注射された動物に上述の症状のいずれかが現れるがペプチド投与後24時間以内に回復したらこのペプチドは「毒性」であると言え、一方、マウスが死んだら、それは「致死」とよばれる。非毒成分は、中毒症状を誘発しないものであり、pH7.2のPBS食塩水が注射されたマウスと同様の挙動を起こす [Possani et al., 1985]。最終的には、比較的低い投与量での全毒

10

20

30

40

50

液は毒性がないが、同様な投与量での精製されたペプチドは中毒症状を引き起こすことができ、これは、精製中、サンプルが特定の成分中に濃縮されるからである。このため、V・メキシカナスの可溶性毒液が200マイクログラム/20グラムマウス体重で毒性がないことを考慮して、純ペプチドVm24を様々な濃度でマウスに注射した。使用した最高投与量は、200マイクログラム/20グラム、即ち10000ミリグラム/キログラムマウス体重であり、中毒症状は観察されなかった。

【0096】

これは、他のメキシコサソリCentruoides noxiusから精製された毒素Cn2等の致死成分と明らかに異なっている。マウスにおけるCn2の50パーセント致死量(LD₅₀, 分析した動物のグループにおいて50%の死亡率をもたらす投与量を意味する)は、0.25マイクログラム/20グラムマウス体重である[Zamudio et al., 1992]。それは、800倍高いタンパク質濃度のVm24がマウスに対して毒性がない一方で、Cn2は集団の半数を死亡させることを意味する。

【0097】

Vm23及びVm24のアミノ酸配列の決定

二つの技術を用いた。自動エドマン分解と質量分析(MS)である。純毒の直接アミノ酸配列決定は、Beckman LF 3000タンパク質シーケンサー(Palo Alto, CA, USA)を用いて、該会社から供給された化学物質及び手順によって行われた。純ペプチドの還元・アルキル化したサンプルを、他のサソリ成分に関して前に説明された手順と同様な手順を用いて[Valdez et al., 2004; Batista et al., 2007; Diego-Garcia et al., 2007]、Arg-Cエンドペプチダーゼ(Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)で酵素的に切断した。対応するペプチドをHPLCで精製し、配列決定した。質量分析については、サンプルを、Surveyor MSシリンジポンプ伝達システムを用いて、Finnigan LCQ^{DUO}イオントラップ質量分析計(San Jose, CA)中で直接適用した。サンプルの5%をナノスプレー源(0.5マイクロリットル/分)に入れるため、10マイクロリットル/分の溶出液を分割した。スプレー電圧を1.7kVに設定し、毛細管温度を130に設定した。MS/MS実験については、断片化ソースを、25Vの衝突エネルギー、35~45%(任意単位)の正規化衝突エネルギー及び活性化した広帯域スキャンで操作した。全てのスペクトルを正イオンモードで得た。データ収集及びデータ解析をWindows(登録商標)NT PCシステム上のXcaliburソフトウェアで実行した。酵素的に生成したペプチドからのMS/MSスペクトルを手動及びSequestソフトウェアによって分析した[Batista et al., 2007]。

【0098】

Vm23及びVm24の両方の一次構造(図2参照)を決定し、該ペプチドを後述する電気生理学的実験に用いた(添付の本発明の例7~10を参照)。23分で溶出する画分から再精製した天然ペプチド(図1の左側差し込み図を参照)を完全に特徴付けした。その実験的分子量は、3655Daであることが分かった。このペプチドの1ナノモルをシーケンサー中に装填し、最初の34のアミノ酸をエドマン分解によって直接的に同定した(直接として下線が引かれている)。会社によって与えられた方法論を用いて(Beckman)、システイン残基を環元及びアルキル化によって確認した。位置35におけるVm23の最後の残基を質量分析によって決定した。決定された配列に基づき予想した理論平均分子量は、3665.51Daであり、従って、完全配列の明白な決定を確認した。実験的に決定した分子量と予想した理論分子量の両方は同一であり、用いた装置の誤差の範囲内であった(FinniganイオントラップLCQ^{DUO}質量分析計)。

【0099】

同様に、1ナノモルの均質ペプチドVm24(図1の右側差し込み図に示されるように再精製した)を自動エドマン分解にかけ、最初の28のアミノ酸残基の同定を可能にした(図2、Vm24とラベルされている)。様々な分量の環元・アルキル化ペプチドで行った分析をシステイン残基の確認及びエンドペプチダーゼによる消化に用いた。ArgC-

10

20

30

40

50

エンドペプチダーゼによる V m 2 4 の消化は、三つのサブペプチドを生成し、それは、A l a 1 から A r g 1 7 までの残基の配列が確認された部分（天然ペプチドを分析する際に既に決定された同一の N 末端配列を備えるため、図示しなかった。「直線」とラベルされ下線が引かれている）、「A r g - C 1」とラベルされた下線が引かれた部分によって示される A l a 1 8 から A r g 2 9 までの部分、L y s 3 0 から C y s 3 6 までの最後の部分（A r g - C 2 と下線が引かれている）である。その配列を M S / M S 断片化と組み合わせたエドマン分解によって得た（図 2、V m 2 4 参照）。最後の残基を C I D（衝突誘起解離）によって同定するため、位置 3 0 及び 3 2 におけるアミノ酸は、リシン又はグルタミンであった（同じ分子量）。不明確性を解決するため、この最後のサブペプチドのトリプシンによる追加酵素切断を行った。三つの小ペプチドを H P L C によって分離し、C I D によって画定したそのアミノ酸配列を同定したところ、C y s 2 6 から L y s 3 0（T r p 1 と下線が引かれている）、C y s 2 6 から L y s 3 2（表記の簡略化のため図示せず）及び C y s 3 3 から C y s 3 6（同様に図示せず）の位置であった。トリプシンはリシンの C 末端に位置するペプチド結合を切断するため、その二つの位置はリジン残基に割り当てられ、完全配列を明白に解いた。また、最も C 末端に位置する最後の四つのアミノ酸を L y s - C エンドプロテアーゼで加水分解した後に単離したペプチドの M S / M S 断片化によって同定した（L y s - C とラベルして下線が引かれている）。アミド化した C 末端アミノ酸を仮定すれば、予想したペプチドの理論的平均分子量は 3 8 6 3 . 6 4 D a であり、実験値は 3 8 6 4 . 0 D a であって、完全配列を確認した。三次元イオントラップの精度は 1 0 0 0 D a 未満のペプチドに対して 1 0 0 p p m の範囲であるため、0 . 3 6 単位の小さい誤差は、期待値の範囲内である（装置の精度の参考のため [Aebersold and Goodlett, 2001] 参照）。

【 0 1 0 0 】

本発明に関して、V m 2 3 及び V m 2 4 についての五つの特性を取り上げることが重要である。

1) 今までに既知である他のサソリ毒の全てと比較した一次構造は、50%を超える相違を有する（以下、例 6 参照）。この事実によって、ここで番号 - K T x 2 1（例えば - K T x 2 1 . 1 及び - K T x 2 1 . 2）と提案された新しいサブファミリー（今日まで未知である）の存在を証明する。それは、最初の開示であり、両ペプチドがイソギンチャク、ハチ及びヘビの毒ペプチドを含む他のリガンドと構造的に異なることを明確に示す。

2) 両配列の位置 1 0 のアミノ酸までの N 末端セグメントは、同一であり、ジスルフィド架橋を維持するシステインの 8 の位置の内の 7 が一次構造の同一位置にある。V m 2 3 の八番目のシステイン（C 8）は、C 末端側の最末端の位置 3 5 に配置されており、V m 2 4 と比較して一つ早いアミノ酸である。このため、V m 2 4 は 3 6 の残基を有するが、V m 2 3 は 3 5 のアミノ酸残基を有する。V m 2 3 の最終システインはアミド化されていないが、我々は、構造的折り畳みが V m 2 4 のものと同じであることを仮定した。V m 2 3 及び V m 2 4 の両方の生理学的効果が同程度であるため、N 末端領域のアミノ酸配列が活性に重要であると見込まれる。V m 2 3 及び V m 2 4 の一次構造を比較すると、五つの相違が位置 1 0、1 3、1 7、2 3 及び 2 9 で見られ、最後のアミノ酸とその前のアミノ酸の間に一つの挿入欠失がある（V m 2 3 の Y 3 4 及び V m 2 4 の Y 3 5）。最も変わりやすい領域は、両ペプチドの中央部であり（1 0 ~ 3 0 の残基で、6 の相違のうち 5 が位置する）、おそらく該残基がペプチドの機能に重要でないことを示唆する。位置 1 7（R / K）、2 3（N / S）及び 2 9（R / K）の置換は、アルギニン（R）及びリシン（K）が帯電した塩基性アミノ酸である一方で、アスパラギン（N）及びセリン（S）は、非帯電の親水性アミノ酸残基であるため、保存的な修飾であることについて言及する価値がある。V m 2 4 と比較して、位置 3 5 のチロシンの欠如（V m 2 3 のシステインと置換）は、唯一つのチロシンが両ペプチドの同一な折り畳み及び機能に十分な量であることを示唆する。

3) このように、最も変わりやすい領域は中央部分に位置しており、保守的な置換を可能

にする。これは、当業者が容易に設計でき、少なくとも83%の対配列同一性を共有する整列位置において類似の生理学的特性を持つアミノ酸による修飾又は置換が(ここではV m 2 3及びV m 2 4の場合が示される)、類似の特性を持つ機能的に同等な類似体を生成すると期待され、従って、本発明の範囲に含まれるべきである。

4)しかしながら、最も重要な特徴は、以下の例7~10において説明するように、他の亜型のカリウムチャンネルと比べて、V m 2 3及びV m 2 4の双方が有するh K v 1 . 3への高い親和性である。V m 2 3及びV m 2 4は、チャリーブドトキシン、アニユロクトキシン、B g K、S h K等の既知の他の遮断薬と比べてh K v 1 . 3に対し高い親和性を有する[Panyi et al., 2006]。上述の他の遮断薬は、大きく異なるアミノ酸配列及び/又はジスルフィド対形成を有するか、又は異なる作用特異性及びK v 1 . 3チャンネルに対する結合親和性を示す。V m 2 3及びV m 2 4の一次構造の単純な分析から、それらが他のサソリ又はイソギンチャク毒と同様な方法でK v 1 . 3に影響を与えるかは明らかでない。このように、専有情報及び使用を請求するV m 2 3及びV m 2 4の配列は、K v 1 . 3チャンネルに影響を与える他のペプチドの知識から明らかではない。本発明は、完全に異なる新規のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 1及びSEQ ID NO: 2参照)を報告する。決定した配列が正しいことを示す更なる証拠は、合成的に調製したV m 2 4で得られた結果からもたらされる。天然V m 2 4及び合成的に調製したV m 2 4の双方は、以下に示すように(例9)、全く同じ生理作用を有する。

5)最後に、二つのペプチドで見出した他の重要な事実は、それらが実験動物に対し相対的に高い濃度(20グラムマウス体重当たり最大10000マイクログラム)で注射した場合毒性がないことである。これは、以前述べたように、既知の他のサソリ毒液、例えば、Centruroides noxiusからのC n 2と比較してかなり顕著である[Zamudio et al., 1992]。V m 2 4よりも約800倍低い投与量でマウスに注入したC n 2は、50%の死亡率をもたらす。

【0101】

例2: V . メキシカナスの毒液中に存在する成分のマスフィンガープリント分析

サソリ毒液は、成分の非常に複雑な混合物であり、イオンチャンネルに関し活性がある短鎖ペプチド及び長鎖ペプチド([Possani and Rodriguez de la Vega, 2006]において概説されている)、遊離アミン、ヌクレオチド、炭水化物、脂質(Possani et al., 1999において概説されている)、ホスホリパーゼ[Zamudio et al., 1997; Valdez et al., 2004]、ヒアルロニダーゼ、リゾチーム[Batista et al., 2007]等の酵素、及び未知の機能を有するその他多くのタンパク質成分[Diego-Garcia et al., 2007]を備える。加えて、サソリは、地表上で3億年以上も進化した非常に古代の生物であり、その餌を狩ったり又は捕食動物から自身を守るための特殊な手段を選択する時間があった。このため、その毒液における生物学的活性な成分の存在を捜し求めることは魅力的で且つ賢明である。質量分析法及び装置に関する最近の進歩の結果、今では全毒液のマスフィンガープリント分析を得ることが可能である。このため、V . メキシカナスの可溶性毒液で行った最初の研究の一つは、全ての成分についての分子量の同定であり、Finnigan LCQ D U O (San Jose, CA) イオントラップ質量分析計(EI S / MS)及びAmersham Biosciences (Uppsala, Sweden)からのマトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間(MALDI - TOF)型Ettan MALDI - TOF / Pro装置を用いて同定される。使用した戦略は、精製分離の純ペプチド又はC18逆カラム(図1)において混合物として溶出する関連成分のファミリーによって予め選択し、次いで、質量分析によってその分子量を分析することであった。表1において、HPLCシステムから収集した画分の保持時間は、各画分で見られた成分の分子量に従ってリストに記載されている。340を超えた異なる分子量の成分を決定した。一部の成分は、HPLC分離システムの隣接する二つのサブ画分に現れるが、この場合、一つしか数えないことについて言及する価値がある。また、一部の画分を同定していない(NDとラベルされている)。

【0102】

【表 1】

<i>RT</i>	平均質量	<i>RT</i>	平均質量
2.92	222.334, 260.168, 372.815	27.12	1340.203 , 1642.177, 2620.029
5.06	272.055	28.24	2084.938, 2883.506 , 3770.697
B 5.06	429.1	28.72	222.295, 373.089, 4037.264, 4062.469 , 4860.475
7.40	- ND	29.12	2028.249, 4044.625, 4743.102
9.84	1235.349	S 29.82	1989.272, 2117.962 , 3770.356, 3828.061 , 4048.342 , 5125.488
10.78	994.899, 1047.829, 1234.056	29.82	2368.289, 2514.764 , 3772.141, 4131.437, 4196.231, 5612.061, 5684.0
11.28	117.063 , 1234.349	30.62	1219.7 , 2029.978, 2756.56, 4051.043 , 5487.234
B 11.28	- ND	31.20	1894.409, 2288.761, 3544, 3695.567, 3873, 4053.615 , 4623.314 , 5309.113, 5468.43 , 8340.499
13.07	300.703	31.71	2526.804, 4053.34, 4256.777 , 4623.389, 8184.727
14	1466.168, 1960.937 , 2363.969, 2441.293, 3091.036	32.22	2610.12 , 3068.716, 4050.544, 4251.603 , 4616.633, 8157.368
14.96	- ND	32.78	1727.988, 3115.418, 3838.78 , 6231.008
15	272.091 , 334.602, 427.197 , 1086.902, 1689.2	33.47	1288.661, 1630.123, 1856.102, 2076.866, 2116.85, 2306.616, 3302.189, 4160.467 , 4322.925 , 5434.357, 6514.206 , 7937.084 , 8364.316, 9125.702, 15373.608
16.22	- ND	34.11	1811.589, 2792.828 , 2890.806, 3272.21, 4008.728 , 4044.677
16.70	324.238, 418.72, 501.4 , 834.6 , 1049.296 , 1877.397	S1 35.79	3032.485, 3862.668 , 7469.49
17.34	261.344, 1205.752, 1274.737 , 1876.767, 1886.725	S2 35.72	2558.149, 3032.024 , 3987.629, 4232.375, 8260.244
17.66	261.283, 1243.892	S3 35.79	3037.876 , 3058.507, 3738.686 , 4027.624
18.35	208.909 , 223.509, 373.827, 1436.27, 1652.505	35.79	3038.075 , 3738.649, 4027.696, 8269.386
19.10	1148.738, 2096.296, 2297.193, 2318.577 , 2353.524	36.19	2814.497, 3038.868 , 3564.677, 3721.56, 3807.978 , 3878.666,

10

20

30

40

					4027.936,	8267.094,		
					13944.696			
B 19.10	2377.208 , 2593.419, 2610.334		36.72		3588.529 , 3610.297, 3625.895,			
					3983.521, 4020.726, 4223.762			
20.14.	2593.88		46.53		3915.145, 4051.546, 4319.845,			
					4710.326 , 4782.406, 4868.122,			
					5107.706 ,	7067.905,		
					13435.689			10
20.14.2	1464.42, 2098.654, 2594.163 ,		46.86		3920.472 , 4236.709 , 5044.021 ,			
	2610.477				5182.747,	8246.293,		
					11459.022, 13358.3, 16209.23			
20.23	- ND		47.82		4298.5, 4700.818, 5272.777,			
					12469.982			
20.96	1866.081, 3777.92		48.70		2166.644, 2304.621 , 2569.271,			
					2768.228, 3278.62, 3424.448,			
					3819.497, 3916.217, 4265.672,			
					4292.422			
21.98	<i>431.4</i> , <i>714.7</i> , 1259.696 ,		49		5953.928, 11315.991			20
	3777.049							
22.40	533.5, <i>788.5</i> , 2286.744 ,		49.6		- ND			
	4024.456 , 4980.605							
23.39	1014.47, <i>1129.8</i> , 1390.042,		50.75		- ND			
	1527.099, 1902.299, 2111.018,							
	2228.143, 2311.791, 3665,							
	4025.1							
S 24.11	1048.604, 1657.949, 2310.809		51.66		- ND			
S 24.11	1048.604, 1657.949, 2310.809		52.34		- ND			
24.11	1952.328, 2166.86, 3864 ,		53.31		3460.978, 3807.741, 5673.486,			
	5338.229				10978.726, 16185.602,			
					24611.234			30
B 24.11	253.04, <i>875.42</i> , 1398.661,		53.84		3548.378, 3591.69, 3899.344			
	1948.124, 2436.139, 2679.346,							
	5336.308							
25.10	<i>1489.6</i> , 1511.315 , <i>1617.7</i> ,		54.27		- ND			
	2529.512 , 3864.577							
25.10.2	253.073, <i>590.4</i> , 1194.739,		55.20		- ND			
	1511.312, 1985.92, 2075.691							
25.52	1485.399, 1728.229, 2258.489 ,		56.27		1603.661 , 1640.656			
	2387.001							
26.10	422.3 , <i>462.4</i> , 1327.008,		58.92		- ND			
	1495.436, 2258.772 , 2620.03 ,							40
	3870.226, 3917.489							
26.51	1234.369, 2621.099 , 3871.574							

【 0 1 0 3 】

太字でラベルした成分は、それが毒液中高濃度で存在することを意味しており、一方、イタリック文字のものは、その成分が E I S / M S スペクトルでしか同定されなかったことを意味する。文字 S が保持時間に先行する場合は、クロマトグラフィーのピークが対称でなく、収集した画分が曲線の上昇部分に対応することを意味しており、一方、文字が B

である場合は、それが曲線の下降部分を意味する。イタリック文字は、対応する分子量が E I S / M S のみによって得られたことを意味する。一部の値を決定しなかった (N D)

【 0 1 0 4 】

表 1 に記入された各種成分を分析し、 1 0 0 0 単位の分子量によって任意にグループ化した。 5 0 0 D a 未満の成分から始めて、次いで 5 0 0 ~ 1 0 0 0、 1 0 0 0 ~ 2 0 0 0、それ以後は (各グループ 1 0 0 0 の違いで) 9 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 D a までである。同定した 9 0 % を超える成分は、 1 0 0 0 0 D a 未満の分子量を有する。三つのグループは、少なくとも 6 0 の異なる成分を有した。それらは、 1 0 0 0 ~ 2 0 0 0、 2 0 0 0 ~ 3 0 0 0 及び 3 0 0 0 ~ 4 0 0 0 D a の範囲に含まれた。 4 0 を超える成分が、 4 0 0 0 ~ 5 0 0 0 D a の分子量を有した。

10

【 0 1 0 5 】

その結果は、機能分析に関する適切なペプチドを選択するのに重要であった。使用した論拠は、我々のグループによる *T i t y u s s t i g m u r u s* サソリを用いた最近の論文 [Batista et al., 2007] の発表により述べられており、ここで、異なる種類のサソリ (V . メキシカナスを含まない) の質量フィンガープリント分析を考慮しながら、比較分析を行った。 4 0 0 0 D a 程度の分子量を持つペプチドが、 K^+ イオンに対して透過性があるイオンチャンネルの認識に特異的であることを見出すことは一般的である。このため、我々は、後述するように生理学的研究に関してこの範囲の分子量のペプチドを選択した。この戦略に従って、二つのペプチド *V m 2 3* 及び *V m 2 4* を一次構造決定 (図 2) と更なる生物学的アッセイ (以下、例 7 ~ 1 0 参照) に対して選択した。

20

【 0 1 0 6 】

例 3 : *V m 2 3* 及び *V m 2 4* の C 末端アミノ酸配列の特徴付け

V m 2 3 の C 末端アミノ酸配列での最終残基に関して、結果は明確である。本明細書の例 1 において説明した配列分析は、その配列は図 2 において示されるが、最終残基がアミド化されず遊離カルボキシルシステイン残基を有する一次構造を終結させるということをはほぼ明確にする。

【 0 1 0 7 】

しかしながら、*V m 2 4* についての質量分析の結果は、C 末端残基がアミド化されていることを示唆する。文献は、所定のペプチドの最終アミノ酸のアミド化がその生物学的特性を明確にするのに重要であるという例を報告する。かかる例の一つは、サソリ *H e t e r o m e t r u s s p i n n i f e r* の毒 *H s T x 1* について見出した場合である [Lebrun et al., 1997]。電気物理学的実験は、この毒のアミド化形態が遊離カルボキシ末端形態より 5 倍強力であり、それはラットの脳シナプトソームへの結合実験において最大で 3 0 0 倍大きい活性があることを示した [Lebrun et al., 1997]。このため、*V m 2 4* の最終残基の化学的形態を確信することが非常に重要であった。例 1 の説明において述べたように、*V m 2 4* に対する実験的分子量は 3 8 6 4 D a であり、図 2 に示すアミノ酸配列から予想された理論的分子量は 3 8 6 4 . 6 D a であった。この 2 つの値は、 0 . 6 a . m . u . 異なっており、*V m 2 4* のアミド化 C 末端の存在に起因している可能性がある。 *A r g - C* 切断によって生成した C 末端ペプチド (9 0 9 . 4 a . m . u . モノアイソトピック質量) で行った衝突誘起解離 (C I D) 実験は、遊離カルボキシ末端ペプチドについて予想される理論値より 1 . 0 a . m . u . 低い y イオンシリーズ値と、 b イオンシリーズの正確な値とを示し、毒の C 末端がアミド化されていることを裏付ける (図 3)。

30

40

【 0 1 0 8 】

この実験については、*V m 2 4* の 2 5 マイクログラムタンパク質の一定分量を、上述の例 1 と同じ手順を用いて、酵素 *A r g - C* によって酵素的に切断した [Valdez et al., 2004; Batista et al., 2007]。酵素的加水分解の生成物を、例 1 と同じシステムの H P L C によって分離した。全てのペプチドは、均質であり、M S によって系統的に分析され、 9 0 9 . 5 a . m . u . の分子量を持つペプチドを M S / M S 分析にかけた。質量分析計のナノスプレーイオン化源についての実験プロトコールの設定は、加熱毛細管が 1 3 0

50

で、スプレー電圧が1.65 kVであった。測定溶媒送達システムを、線形モードで50%アセトニトリル(AcCN)を用い、0.6マイクロリットル/分で操作した。MS/MSスキャンは、注入時間ミリ秒当たり200スキャン、活性化した広帯域、25Vの衝突エネルギー、1.0(m/z)の単離幅、及び40%正規化衝突エネルギーによって規定された。データを手動及びカリフォルニア大学・サンフランシスコ質量分析施設によって開発されたプロテイン・プロスペクター(<http://prospector.ucsf.edu/>)のMS-プロダクト・ツールを用いた自動で分析した。MS-プロダクト・ツールは、モノイソトピック質量、未修飾システイン及びブロック化されていないN末端残基を用いて生成したペプチドKKCKYYCについての可能性のあるイオン断片の推測を可能にした。その計算を遊離カルボン酸末端及びアミド化C末端ペプチドの両方に対して行った。ESIイオントラップ装置をこの評価のために選択した。アミド化C末端ペプチドの理論的断片化を、プロテイン・プロスペクターを用いて行い、b(232.11, 360.21, 463.22, 626.28及び789.34)及びyイオン(782.27, 679.26, 551.16, 448.15, 285.09及び122.03)に対して実験的に得られた値と正確に同一な値を示した。従って、Vm24ペプチドは、アミド化したC末端、即ち、システインアミド残基を所有する。

10

【0109】

例4: Vm24のジスルフィド架橋の決定

大きさが小さいため、Vm24の毒は、構造-機能の関係を研究するための理想分子である。該ペプチドは、位置6、12、16、21、26、31、33及び36に位置する8のシステイン残基を含有し、四つの分子内ジスルフィド結合を形成する。この例は、タンパク質酵素で切断した後、RP-HPLCにより精製したペプチドのエドマン分解及び質量分析決定を用いた、Vm24のジスルフィド結合パターンの決定について説明する。

20

【0110】

ジスルフィド対形成を純毒のエンドペプチダーゼ切断及びHPLCによる分離後に得られたペプチド断片の質量分析によって測定した。タンパク質25マイクログラムを含有する毒のサンプルを、pH6.8で150mMのTris-HCl中のキモトリプシン及びトリプシン(Boehring, Mnhein, Germany)の等量混合物(各0.5マイクログラム)と共に37で12時間インキュベートした。生成したペプチドを、C18逆相カラム(Vydac, Hisperia, CAのカタログ番号218TP54)を用いたHPLCによって分離した。溶媒A(0.12%TFAの水)から60%溶媒B(0.10%TFAのアセトニトリル)までの線形勾配を上記カラムに適用して、60分間流した。流出ピークを収集し、すぐに凍結乾燥した。個々のペプチドを質量分析断片化(MS/MS)によって分析し、アミノ酸配列を得た。一次構造は知られているため、ジスルフィド架橋の決定を推測した。

30

【0111】

Vm24の還元形態及び酸化形態の分子量比較は、正確に8a.m.u.の差を示す。天然ペプチドに対する実験的分子量は、3864.0a.m.u.であり、完全に還元したペプチドについては、3872a.m.u.であり、全てのシステインがジスルフィド架橋形態で含まれていることを確認した。主な三つのペプチド断片を、pH6.8(混合ジスルフィド再編成を防ぐためのわずかに酸性のpH)でキモトリプシン及びトリプシンの同時消化から得、 $[M+H]^+788.0$ 、 $[M+H]^+560.4$ 及び $[M+2H]^2+1099.7$ a.m.u.のモノアイソトピック分子量を示した(図4-1、4-2及び5A)。 $[M+H]^+788.0$ のペプチドは、ヘテロ二量体アミノ酸配列AQGCK-CYのシステイン対(C4-C8)の期待される分子量に正確に一致する(図4-1)。決定された第二のジスルフィド架橋は、560.4a.m.u.の等しい理論値及び実験値を有するC3-C6であった(図4-2)。更に、両ペプチドは、期待されるアミノ酸配列を示すCID実験によって特徴付けられた。 $m/z[M+2H]^2+1099.7$ amu(デコンボリューション質量2197.4)のシグナルは、最後の二つのシステイン半ペアを含有するヘテロ二量体コアに由来する(図5A)。この断片を直接分析した。 $m/z[M+2H]^2+1099.7$ のシグナルからのCIDイオンシリーズは、最後の二つのシステインペアの完全な決定についての条件を満たす二つのイオン値を示す。15

40

50

07.4でのbイオン及び691.3でのyイオンは、グルタミン酸(E11)とシステイン(C12)間での同一のアミド切断結合からの生成物であり、C1-C5及びC2-C7の半ペアを明確に割り当てる。更に、b-イオン1710.5からb-イオン1137.3のタンデムでの断片化値は、図5Bにおいて模式的に表されるジスルフィド架橋配置を確認する明確な質量を持つ内部タグ(GSPEC-C)を特徴づける。

【0112】

例5：Vm24の化学合成

この例では、Vm24の化学合成を説明する前に、ペプチド化学のテーマにおける一部の基本概念と、存在する生成物の自然抽出よりむしろ化学合成によってリガンドを生成する論理的証拠について取り上げることが重要である。

【0113】

多くの毒性ポリペプチドは、毒液源から精製され、細胞情報交換を研究するのに役立つ手段であった。なぜなら、それらは、受容体(サソリ毒の場合、大部分はイオンチャンネル)に結合することによって生体膜を介したイオン分布に影響を与え、それらは、該膜を介した細胞脱分極又は電位調節を引き起こし、このようにして細胞機能を制御するからである。この理由により、異なる種類又は亜型のイオンチャンネルを区別できる特異的毒性ペプチドの発見は、実験動物の生理学的又は異常状態の範囲の治療、最終的にはヒトの病理学の治療に役立つ治療の導出である。既知のペプチドの大部分は、短く、十分に折り畳まれ詰められた構造であり、高い効力、良好な標的特異性、高い可溶性及び作用の早い開始等の他の有機化合物に対して一連の利点を示す。更に、それらは、幾つかのジスルフィド架橋によって架橋結合した小ペプチドである場合が多い。その構造的特性は、該ペプチドに高度な安定性を与えるが、合成的に調製した誘導体の正しい折り畳みは、適切な合成に対して幾つか追加の問題をもたらす。しかしながら、毒液源に存在するポリペプチドの量は、通常かなり少ない。実際、それらは生理学的作用においてかなり特異的で且つ効果的であるため、上記ペプチドを生成する動物は、その餌を狩ったり又は捕食動物から自身を守るのに効果的に該ペプチドを使用するため、大量に生成する必要がない。毒液源から直接単離した各種ペプチドは、通常、作用の一般的な機構を特徴付けるのに十分であり、過去には、主に核磁気共鳴技術によってペプチドの構造的な特徴付けを可能にしてきたが、通常、調査又は臨床適用によって探求された範囲に応じて、同一のペプチド又はその誘導体を合成的に生成することが必要である。ペプチドの三次元構造の決定及び受容体側(イオンチャンネル)の認識に關与する表面の同定は、最初のモデルの修飾したバージョンの設計又はペプチド模倣物の合成の基礎である。

【0114】

ここで、我々は、Vm24の化学合成について説明する。歴史的に、Vm24は、Vm23より前に同定された。このため、本発明の目的である、詳細の研究の大部分が、Vm24の場合に対してここで実施及び説明され、その後両方のペプチドが本物であることを確認した。

【0115】

Vm24の線状類似体をリンク・アミド・MBHA樹脂(Calbiochem-Novabiochem Corp)上での固相法によって合成した。Fmoc-アミノ酸(Calbiochem-Novabiochem Corp)は、Arg(Pbf)、Asn(Trt)、Cys(Trt)、Gln(Trt)、Glu(OtBu)、Lys(Boc)、Ser(tBu)及びTyr(tBu)の側鎖保護が使用された。

【0116】

Fmoc基は、20%ピペリジンジのメチルホルムアミド(DMF)溶液で20分間処理し、その後DMFで洗浄することによって除去された。Fmoc-アミノ酸(0.5mmol)は、活性化剤としてHBTU(2-(1-H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチル-ウロニウムヘキサフルオロホスフェート)/DIEA(ジイソプロピルエチルアミン)(0.45mmol/0.75mmol、2分間活性化)を用いてDMF中で予備形成してなる活性エステルとして、カップリングされた。カッ

10

20

30

40

50

プリング時間は、30分であった。未反応又は非ブロック化の遊離アミノ酸を、ペプチド合成のすべてのサイクルにおいて、ニンヒドリン試験で監視した (Sarin et al 1981)。全体の合成中で、次のアミノ酸をカップリングする前に、望ましくない残留遊離アミンをアセチル化によってブロック化した。全ての操作は、テフロン (登録商標) で内張りしたねじ蓋を備えた 50 ml ガラス反応容器中で手動にて行われた。ペプチド樹脂は、N - 脱保護及びカップリング工程の間緩徐な反転によって攪拌された。

【0117】

Fmoc基の最終除去の後、ペプチド樹脂 (1.7グラム) を樹脂から切断し、同時に室温にて2時間試薬 K [Drakopoulou et al 1995] を用いて脱保護した。切断後、粗ペプチドを沈殿させ、氷冷 t - ブチルエーテルで洗浄し、20% 酢酸水溶液に溶解させた。生成物を凍結乾燥し、使用まで - 20 で乾燥保存した。

【0118】

対応する分子のジスルフィド架橋を作るための環化反応を、0.1 M の NaCl、5 mM の還元グルタチオン、0.5 mM の酸化グルタチオン、20 mM の Na_2HPO_4 (pH 7.8) 及び 30 μM の折り畳まれていない合成 Vm24 中で行った。環化した粗生成物を HPLC による二つの工程で精製した。最初は、溶液 A (0.12% TFA の水) から溶液 B (0.1% TFA のアセトニトリル) までの線形勾配の C_{18} 調製カラム (238TP1022 Vydac) を用いて、60分で60%のBまで流した。得られたクロマトグラムのプロファイルを図6に示す。主成分 (図6中で番号1とラベルされている) を最終的に溶媒 A から60分で40% B までの線形勾配で流した C_{18} 分析カラム (238TP54 Vydac) を用いて精製した (図6の差し込み図)。合成毒の構造及び純度を分析 HPLC、アミノ酸配列及び質量分析決定によって確認した。アミノ酸配列を Beckman L F 3000 Protein Sequencer (Fullerton, CA) で実行し、また、質量分析を Finnigan LCQ Duo スペクトロメーター (San Jose, CA, USA) において行った。アミノ酸配列の正確性をエドマン分解によって残基番号30まで確認した。HPLC カラムからの溶出時間は、天然ペプチドが同一条件で同一カラムから溶出する時間と正確に一致した。天然 Vm24 (図7A)、ここに記載の合成 Vm24 (図7B) 並びに天然及び合成 Vm24 の等モル混合物 (図7C) によって得た溶出パターンの例を図7に示す。質量分析によって決定した分子量は、3864 Da であり、予想した配列と完全な一致を示した。用いた樹脂は、正確には Vm24 の場合に、C 末端アミド化ペプチドの生成に対して設計されることについて言及する価値がある。

【0119】

Vm24 の予想した一次配列を持つ合成的に調製したペプチドを含有する約 1.7 グラムの樹脂から、正確に折り畳まれたペプチドを約 300 ミリグラム得、(開始樹脂から) 予想した理論値の 30% の収率を示した。

【0120】

例6: アミノ酸配列比較

SEQ ID NO: 1 及び SEQ ID NO: 2 の配列は、短いペプチド鎖、リッチな塩基性アミノ酸残基、類似のシステインパターン等、-KTxファミリー内で分類される他の短鎖サソリ毒 [Tytgat et al., 1999] との類似点をいくらか示す。このファミリーの全てのメンバーは、構造的に関連しており、カリウムチャンネル遮断薬として類似の機能を果たす。それにもかからわず、それらは、特定の種類及び亜型のカリウムチャンネルに対して多様な選択性を示す [Rodriguez de la Vega and Possani, 2004; Panyi et al., 2006]。分類を提案した研究者の国際発表による論理的根拠は、所定のサブファミリーがそのメンバーの中で高い割合の類似性及び他のサブファミリーのメンバーとの低い同一性によって識別できることであった [Tytgat et al., 1999]。その後、この識別がほとんどのサブファミリーの薬理学的スペクトルを反映することが実証された [Rodriguez de la Vega et al., 2003; Zhu et al., 2004]。従って、相対的に制限されたファミリーの多様性を - そのサイズを詰めて - 考慮すると、所定の機能スペクトルを与える分子特性及び構造特性を同定することは重要である。この種の分析は、通常、配列比較及び

系統発生的推測により行われる。該比較の基礎にある考えは、同一系列に属するタンパク質が一つ又は複数の先祖遺伝子の複製及び分岐に従って又は付随した種分化の現象に関係しているという仮説によるものであり、生物情報学分析によるその進化史の再構築を可能にし、所定の配列空間内での適応度地形を浄化するのに役立つ [Thornton and DeSalle, 2000; Orengo and Thornton, 2005]。

【 0 1 2 1 】

V m 2 4 及び V m 2 3 の配列類似性の同定のため、局所アライメント (B L A S T [Altschul et al., 1990] 及び F A S T A 3 [Pearson and Lipman, 1988]) 内で発見的探索を実行するプログラムを用いが、かなり低い期待値 (E 値 > 1 0 - 5) でわずかな関係物しか同定されなかった。これまで報告された全ての短鎖毒に対しより密接な検査は、V m 2 4 及び V m 2 3 が - K T x サブファミリー 6 の新規のメンバーである可能性を示唆する ([Tytgat et al., 1999] の提案に従う)。しかしながら、対比較は、該サブファミリーの他のメンバーと同一性がほとんどないことを示す (図 8)。 - K T x ファミリーの広い配列多様性は、V m 2 4 及び V m 2 3 が先に特徴付けられた 2 0 の - K T x サブファミリーのいずれかに属するかどうかについて解明することを困難にする。 - K T x ファミリーとの関係を明確にするため、先に説明されたように [Bagdany et al., 2005]、 - K T x ファミリーに属する 9 2 の配列の多配列アライメントを用いた、M r B a y e r s 3 . 0 4 b [Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003] によって、B a y e s i a n の系統発生的推論分析を行った。B a y e s i a n の生理学的推論は、n - 1 の確率的に生成した樹上でのマルコフ連鎖モンテカルロ法 (M C M C) に基づいたサンプリング手順によって、所定の樹トポロジーの事後確率を推定する。一のマルコフ連鎖は、所定のサンプリング手順の工程での最高の事後確率を有する樹トポロジー内で発見的探索したままであり、特定の amino 酸モデルで評価した (全プロセスは、メトロポリス・カップリング・マルコフ連鎖モンテカルロ法又は M C ³ と呼ばれる)。この分析に対して、それぞれ 2 5 0 0 0 0 の樹を有する四つの鎖を J T T アミノ酸置換モデル下で生成し、2 5 0 回の反復毎にサンプリングした。合一が 1 7 5 0 0 0 の反復でほぼ得られ、最高の事後確率を有する残りの 2 5 0 樹を一つにまとめて、5 0 % 多数決合意樹を求めた。この樹は、K T x サブファミリー 6 が、最終的な樹の組の 9 2 % において、その全てのメンバーとサブファミリー 7 から密接に関係がある二つの毒を含む単系統グループとして分離することを明らかに示す。また、分析は、この分岐群の姉妹群として V m 2 4 及び V m 2 3 を置き (特定の仕切りが最終樹の 8 1 % で見られる。図 8 参照)、これは、V m 2 4 及び V m 2 3 が新規の - K T x のサブファミリーを構成することを強く支持する。これらの分析に基づき、K チャンネルに特異的なサソリ毒を分類した研究者の国際発表によって提案されたガイドラインを考慮すると [Tytgat et al., 1999]、V m 2 3 及び V m 2 4 が K チャンネルを認識するサソリ毒の新規のサブファミリーを構成することが明らかである。これらの毒間での最高の配列同一性は、他の K チャンネル遮断薬サブファミリーのように、C 末端部分に位置している。N 末端セグメントは、このサブファミリーの最も多様性のある領域であり、V m 2 4 及び V m 2 3 のみが、配列の初めに珍しい連続トリプルアラニンセグメントを示す。

【 0 1 2 2 】

例 7 : V m 2 4 は、T 細胞の C a ²⁺ 活性化 K チャンネル h I K C a 1 に優先して、選択的に電位開口型 h K v 1 . 3 チャンネルを遮断する。

V m 2 4 による h K v 1 . 3 チャンネルの高親和性遮断

V m 2 4 による h K v 1 . 3 チャンネルの遮断は、ヒト末梢血 T 細胞で内因的に発現したチャンネルにおいて特徴付けられた [Peter et al., 2001; Bagdany et al.]。電気生理学的実験用の T 細胞を得るための手順の簡単な説明は以下の通りである。ヘパリン化ヒト末梢静脈血を健康なボランティアから得た。単核細胞を F i c o l l - H y p a q u e 濃度勾配遠心分離によって分離した。収集した細胞を、2 5 m M の H E P E S 緩衝液 (p H 7 . 4) を含有する C a ²⁺ 及び M g ²⁺ 遊離ハंक溶液で 2 回洗浄した。3 7 ° C の 5 % C O ₂ 恒温器中、1 0 % の F C S / H y c l o n e (L o g a n , U t a h , U S A)

、100マイクログラム/mlのペニシリン、100マイクログラム/mlのストレプトマイシン及び2mMのLグルタミンが補給されたRPMI-1640の24ウェル培養皿において、 0.5×10^6 /mlの密度で3~4日間細胞を培養した。また、培地は、フィットヘマグルチニンA (PHA-P, Sigma-Aldrich Kft, Hungary) を6又は8マイクログラム/ml含有し、Kチャンネル発現を増加させた [Deutsch et al., 1986]。Tリンパ球は、Matteson及びDeutsch (Matteson et al., 1984) によって説明されるように、マウスの抗ヒトCD2 (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) とのインキュベーションと、その後のヤギ抗マウスIgG抗体 (Biosource, Camarillo, CA, USA) でコーティングしたペトリ皿に対する選択的接着とによって電流を記録するために選択された。上記皿を、パッチクランプ試験のため、1mlの正常な細胞外バス培地 (以下、参照) で5回穏やかに洗浄した。

10

【0123】

細胞全体での電流は、電圧固定T細胞において、Axon Digidata 1200又はDigidata 1322A データ収集ハードウェアを用いたパーソナルコンピュータに接続したAxopatch 200A又はMulticlamp 700B増幅器を用いて測定された。最大85%の直列補償によって、電圧誤差を最小化し、良好な電圧固定条件を達成した。データ収集及び分析にpClamp 8又はpClamp 9ソフトウェアパッケージ (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA) を用いた。分析に先立ち、細胞全体での電流追跡を漏れ抵抗に対して補正し、デジタルフィルタ処理を行った (3点ボックスカーブスムージング)。高度な電流遮断でのピーク電流の決定は、時定数が毒の不在下で決定したものに固定されたときのデータ追跡に、上昇する4次の指数関数を適合させることによって行われ [Hodgkin-Huxley model]、上昇成分の振幅を分離した。

20

【0124】

5段階で、Clark GC150F-15ホウケイ酸ガラス毛细管からピペットを引き出し、先端熱加工し、バス中で2~3メガオーム抵抗を有する電極をもたらした。バス溶液は、(mMで)145のNaCl、5のKCl、1のMgCl₂、2.5のCaCl₂、5.5のグルコース、0.1mg/mlのウシ血清アルブミン (Sigma) が補充された10のHEPES (pH7.35) からなった。外液の測定オスモル濃度は、302~308ミリオスモル (mOsm) の間であった。ピペット注入溶液 (内液) は、(mMで)140のKF、2のMgCl₂、1のCaCl₂、10のHEPES、11のEGTA (pH7.22) からなった。内液の測定オスモル濃度は、約295mOsmであった。異なる試験溶液での測定した細胞周囲のバスのかん流は、6の入力ライン及びフランジ開口部を持つPE10ポリエチレンチューブ出力チップを備えた重力流かん流セットアップによって達成され、乱流を低減した。過剰な液体は、連続的に除去された。

30

【0125】

T細胞に電圧K⁺電流を誘起するための標準的な電圧プロトコールは、-120mVの保持電圧からの+50mVまでの一連の14ms長の脱分極からなる。電圧パルス間の時間を15秒に設定し、hKv1.3チャンネルの累積的不活性化を回避した。正常のバス溶液の代表的な電流追跡を図9Aにおいて示す (対照)。適用した実験条件下 (ピペット注入溶液中のCa²⁺の欠如及び電圧プロトコールの性質)、細胞全体での電流をhKv1.3チャンネル単独で行った [Peter et al., 2001]。図9Aは、同じ細胞において連続して記録したhKv1.3チャンネルを通過する巨視的K⁺電流を示しており、かん流によって外液に1nMのVm24を加える前 (対照追跡) と後である。Kv1.3電流は、1nMのVm24の存在下、第12パルス (3分に相当する) によって完全に消去された。

40

【0126】

Vm24濃度1nM (黒丸) 及び0.3nM (白丸) での遮断発生の動態を図9Bに示す。対照溶液の第4パルスの後に、細胞外かん流は毒含有溶液に切り替え、脱分極パルスは15秒毎に連続させた。ピーク電流を決定し、対照溶液のピーク電流に対して正規化し、時間に応じてプロットした。図は、毒濃度が高いほど、遮断発生動態が毒及びチャネ

50

ル間の擬似一次反応から期待されるように速くなるが、両毒濃度にて細胞全体の $K_v1.3$ 電流の完全遮断が達成されることを示す。1 nM の $V_m2.4$ 濃度のデータは、図 9 A に示す実験からのものである。毒のない対照溶液での記録チャンパーのかん流は、最初の 8 分以内で非常に小さい遮断の軽減をもたらした（図示せず）。3 pM の濃度での 10.5 分間の毒の適用（図 9 C）では、電流損失が対照溶液で記録したピークの約 36% で飽和するように見える。この時間の後、30 分間の洗浄時間が続き（矢印は毒のない溶液での環流の開始を示す）、その間遮断した電流の 3 分の 1 が極めて緩徐に回復する（洗浄の推測時定数は、約 3800 秒であり、 $2.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ のオフ率に対応する）。

【0127】

サソリ毒が K チャンネルを遮断する一般機構は、チャンネルの細胞外前庭への結合上でのイオン伝導経路の閉塞である [Goldstein and Miller, 1993]。しかしながら、 $V_m2.4$ の存在下での電流低下の緩徐で不完全な可逆性は、 $hK_v1.3$ の遮断よりむしろ膜上でのペプチドの非特異的効果を示唆する。我々は、このシナリオに対して以下のように論じる。1) (高毒濃度での) 電流損失の発生速度は、 $V_m2.4$ の濃度によって決まり、毒の濃度が高いほど速くなる（図 9 B）。2) リーク電流は、毒の存在下で増加せず、 V_m2 による膜の一般的な損傷の欠如を示す。3) $V_m2.4$ は、幾つかの他の K^+ 電流を阻害しないか、又はそれらを素早く不可逆的に阻害し（毒の選択性プロファイルにおいて後述する）、細胞膜構造に対する毒の非特異的作用又は一般的な膜タンパク質の毒誘起の機能損失に対して非常に強く主張する。4) $K_v1.3$ のポア遮断薬としてよく知られる $ChTx$ 及び $V_m2.4$ の同時適用は、同一の結合部位に対する二つの毒間での競争を示し、これは、 $ChTx$ の濃度増加に従い $V_m2.4$ の遮断動態が緩徐になることから明らかであった（データを示さず）。

【0128】

用量反応関係の発生に制限を定めた毒の非常に緩徐なオン・オフ速度は、図 9 のパネル D 中に含まれる。概して、異なるペプチド濃度でのチャンネルの平衡遮断について、残留電流割合 (RCF) を、 I/I_0 として求め、ここで、 I 及び I_0 は、それぞれ毒の存在下及び不在下で記録された。低いペプチド濃度での非常に緩徐なオン速度のため、 I の決定には、各症状によるピーク電流の下降がデータ収集の間見かけ上の飽和を観察するのに十分小さいものの、依然として遮断がその平衡値に達することはなかったために問題があった。より長い期間の毒適用の使用は、細胞全体でのパッチ・クランプ記録におけるピーク電流の安定性によって制限された。更に、ピークの減少は、ペプチドの極めて長い洗い流し時間のために独立して測定できなかった。よって、図 9 D に示すデータは、異なる毒濃度での I/I_0 値の上限を示し、従って、用量反応関係から推定した K_d も実際の K_d の過大評価である。図 9 D における用量反応関係は、 $RCF = K_d^n / (K_d^n + [Tx]^n)$ の関数で適合され、ここで、 $[Tx]$ は、毒濃度を示し、 K_d は、解離定数であり、 n は、Hill 係数である。重ね合わせた実線は、パラメータ $K_d = 2.9 \text{ pM}$ 及び約 1 の Hill 係数の場合に最適な適合を示す。エラーバーは、SEM ($n = 3 \sim 6$) を示す。Hill 係数の $n \sim 1$ 値は、単一の毒分子がチャンネルと相互作用することを示す (1:1 化学量論)。我々の知っている限り、 $V_m2.4$ は、電気生理学的分析において $hK_v1.3$ の遮断薬として最高の親和性を有する。

【0129】

$V_m2.4$ は、 $hIKCa1$ チャンネルの低親和性遮断薬である

例 7 の導入にて概要を述べたように、ペプチドが選択的免疫抑制剤であるために最も重要な要求の一つは、 $IKCa1$ を越えた $K_v1.3$ への選択性である。また、 $IKCa1$ チャンネルは、T 細胞で内因的に発現する [Grissmer et al., 1993]。IKCa1 チャンネルによって運ばれる電流は、1 μM の遊離 Ca^{2+} 濃度を有するピペット注入溶液を用いて測定でき、そのチャンネルを完全に活性化させるのに十分である [Grissmer et al., 1993]。しかしながら、同一細胞中での $K_v1.3$ チャンネルの同時存在は、IKCa1 チャンネルの薬理学的な特徴付けを困難にし、 $K_v1.3$ チャンネルを活性化しない場合の膜電位の研究を制限する [Grissmer et al., 1993; Bagdany et al., 2005]。こ

10

20

30

40

50

のことと、刺激したT細胞中でさえ比較的少数のIKCa1チャンネルとが、我々に組換えチャンネルを用いたIKCa1薬理学を研究させる動機付けとなった。

【0130】

EGFPでタグ付けしたヒトIKCa1遺伝子(AF033021)は、リポフェクタミン2000試薬を用い、製造者のプロトコールに従って、Cos-7細胞内に形質移入された(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)。EGFPでタグ付けしたhIKCa1クローンは、T細胞中の天然IKCa1に対して同一の生理学的特性及び薬理学的特性を有することが先に示されており、従って、薬理学的研究において広く用いられている[Wulff et al., 2001]。Cos-7細胞を標準的な細胞培養条件において維持した[Bagdany et al., 2005]。形質移入後、電流を2~3日間記録した。GFP陽性細胞の形質導入をNikon TE2000U蛍光顕微鏡において同定し、電流の記録に用いた。正常な細胞外溶液は、上述のものと同様である。ピペット注入溶液の組成は、(mMで)150のK-アスパラギン酸塩、5のHEPES、10のEGTA、8.7のCaCl₂、2のMgCl₂(pH7.2)であった。この溶液は、1μMの遊離Ca²⁺濃度を有しており、hIKCa1電流を完全に活性化した。他の全ての記録条件(データ収集、かん流等)は、Kv1.3チャンネルについての説明と同一である。

【0131】

保持電位-120mVからの-120mV~+50mVの200ミリ秒長さの電圧ランプを用いて、Cos-7細胞中にhIKCa1電流を誘発した(ランプ速度0.85mV/ms)。電圧ランプを10s毎に流した。図9EにおけるVm24なしで記録した電流追跡(対照)は、非電位開口型の純hIKCa1電流が適用した電圧プロトコールによって誘起されたことを示す。電流の逆電位は、-75mVであり、記録溶液のイオン組成に基づいてK⁺伝導性に対して特徴的である。IKCa1電流について、線形の電流-電圧関係の傾き(s)を用いて、電流遮断を特徴付けすることができる[Grissmer et al., 1993]。sの値は、図9Eに示す実験中、10nMのVm24の存在下において対照の約52%まで減少し、平衡遮断に4.5分で到達する(27の発症)。電流遮断は、かん流を毒のない細胞外溶液に切り替えると、2.5分で完全に逆になった(図9E、洗浄)。1nM及び10nMのVm24濃度での残留電流割合をs/s₀として計算し、ここで、s及びs₀は、それぞれVm24の存在下及び不在下で電圧ランプによって誘起したI-V関係の傾きであり、図9Fに示される。エラーバーは、n=3の独立した実験に対するSEMを示す。1nMの濃度で、Vm24は、hIKCa1チャンネルを実質的に遮断せず(図9F)、一方、同じ濃度で該ペプチドはhKv1.3チャンネルを完全に遮断する(図9D)。hIKCa1に対するVm24のK_dは、一の毒分子が一のチャンネルと相互作用し、約14nMのK_dを与えるモデルから評価できる。hKv1.3(2.9pM)で決定したK_dを考慮すると、hIKCa1よりもhKv1.3に対するVm24の選択性は、少なくとも約4500倍である。

【0132】

例8: Vm24の選択性プロファイル

本研究で用いた全てのチャンネル構築は、薬理学的アッセイ及び生理学的アッセイにおいて日常的に使用されており、その適用性はリストに挙げた参考文献において確認されている。

一過性形質転換: Cos-7細胞は、ラットKv2.1(rKv2.1, Dr. S. Korn, U. of Connecticutから贈り物)[Imcke et al., 1999]; ヒトKv1.2(hKv1.2, Kv1.2の完全コード配列を含有するpcDNA3/Hygroベクター, Dr. S. Grissmer, U. of Ulm, Germanyからの贈り物)[Visan et al., 2004]; ヒトKv1.4(hKv1.4 N:Kv1.4の不活性化球欠失変異体, D. Fedia, University of British Columbia, Vancouver, Canadaからの贈り物)[Kurata et al., 2004]; 及びヒトNav1.5(R. Horn, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USAからの贈り物)[O'Leary et al., 1995; Ahern et al., 2005]チャンネルを発現するのに使用された。tsA-201細胞は、hBKチャンネル(hSl01遺伝子(U11058))

10

20

30

40

50

、pC1 - ネオプラスミド、Toshinori Hoshi, University of Pennsylvania, Philadelphia, PAからの贈り物) [Avdonin et al., 2003] を発現するのに使用された。その全てのチャンネルクローンは、製造者のプロトコールに従い、リポフェクタミン2000試薬を用いて、緑色蛍光タンパク質(GFP)をモル比1:5でコード化したプラスミドにより、一過性に同時形質導入され(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、標準条件下で培養された。形質導入後、電流を2~3日間記録した。GFP陽性細胞の形質導入をNikon TE2000U蛍光顕微鏡において同定し、電流の記録に用いた(同時形質導入では>70%の成功率)。

安定な細胞株: mKv1.1チャンネルを安定に発現するL929細胞及びhKv1.5チャンネルを安定に発現するMEL細胞は、前に説明され[Grissmer et al., 1994]、Dr. Heike Wulff (UC Davis, CA, USA) の贈り物であった。hERGチャンネルは、HEK-293細胞株において安定な方法で発現した。

【0133】

細胞全体での電流を例7で説明されるように記録した。全ての場合で、ピペット注入溶液の組成が(mMで)140のKCl、10のEGTA、9.69のCaCl₂、5のHEPES(pH7.2)である場合のhBK電流を記録することを除いて、標準的な細胞外及びピペット注入溶液を用いた(例7参照)。この後者の溶液での遊離Ca²⁺濃度は、[Ca²⁺]_{int} = 5マイクロモル濃度であり、適切な脱分極電位でのBK電流の記録を可能にする[Avdonin et al., 2003]。他の全ての実験条件(データ収集、分析原理、かん流)は、例7で記載したものと同一である。

【0134】

標準的な細胞外溶液においてKv1ファミリーのメンバー(mKv1.1、hKv1.2、hKv1.3、hKv1.4 N、hKv1.5)について得た電流追跡(対照)を図10A~10Eに示す。全ての場合において、細胞を-120mVの保持電位で保持し、+50mVまで繰り返し脱分極させて、電流を誘発した。脱分極パルスの持続時間(図10の各パネルにおいて分けて示す)を設定し、電流の完全な活性化を可能にし、不活性化を最小化した。全ての場合で、残留不活性化からのチャンネルの完全な回復のため、保持電位(-120mV)でのパルス間で十分な時間が許可された(パルス間隔は15~30秒に及んだ)。hKv1.3のバージョンを除いた速い(N型)不活性化をこの研究に用いた(hKv1.4 N、147のN末端アミノ酸を除去する)。N型不活性化が無い場合、電流遮断の決定は、このクローンのピーク電流が非常に速い不活性化処理によって影響されないため、より容易で、より正確である(時定数: 15~20ms [Kurata et al., 2004])。野生型チャンネルにおいては、時間依存電流活性化と不活性化間の競争によって、ピーク電流が推測され、電流遮断の分析を完結する。

【0135】

図10は、毒の適用前(対照)、10nMのVm24による遮断平衡後、及び毒の洗い流し(洗浄)後に記録した電流追跡を示す。パネルの分析は、hKv1.4及びhKv1.5チャンネルが、Vm24に対して部分的に非感受性であることを示す(図12Bの棒グラフも参照)。しかし、10nM濃度のVm24は、hKv1.3に対するK_dの約3500倍であり、mKv1.1チャンネル(RCF = 0.82 ± 0.02, n = 3)及びhKv1.2チャンネル(RCF = 0.54 ± 0.08, n = 3)を顕著に遮断する。更に、hKv1.2の遮断は、完全に可逆的でない。10nMのVm24濃度でのhKv1.3の遮断(ヒトT細胞にて記録)は、Kv1チャンネル(RCF = 0.01 ± 0.01, n = 3)の遮断薬としてのVm24の効力についての簡単な比較のため、図10Cに示される。mKv1.1及びhKv1.2電流の顕著な遮断によって、Vm24を低濃度(1nM)でも試験した(図12A)。1nMの濃度にて、RCF値は、mKv1.1及びhKv1.2電流についてそれぞれ0.97 ± 0.02 (n = 3)及び0.81 ± 0.015 (n = 3)であった。RCF値から、そのチャンネルに対するVm24の親和性は、一の毒分子が一のチャンネルと相互作用し、mKv1.1では30~40nMの間の及びhKv1.2では5~10nMの間のK_d値を与えるモデルから評価できる。hKv1.

3 (2.9 pM) について決定した K_d を考慮すると、Vm24 の $mKv1.1$ 及び $hKv1.2$ を越えた $hKv1.3$ に対する選択性は、それぞれ少なくとも約 10000 倍及び 1500 倍である。

【0136】

また、動物の毒による遮断に対する顕著な生物学的効果及び感受性を有する他のイオンチャンネルの活性を阻害する Vm24 の効力を決定した。これには、 $rKv2.1$ 及び $hERG$ ($Kv1.1$) 電位開口型 K チャンネルと、 Ca^{2+} 活性化 K チャンネル hBK ($KCa1.1$) 及び心臓電位開口型ナトリウムチャンネル $Nav1.5$ が含まれる。図 11 は、標準的な細胞外溶液における所定のチャンネルに適切な電圧プロトコールで誘発した代表的な細胞全体での電流を示す (対照)。 $Kv2.1$ 及び $Nav1.5$ のピーク電流は、それぞれ保持電位 -120 mV からの $+50$ mV 及び 0 mV までの脱分極に対応して得た記録から決定された (図 11A 及び 11D)。 $hERG$ チャンネルを発現する $HEK293$ 細胞は、 -80 mV で保持され、 2.5 秒間で $+20$ mV まで脱分極し、チャンネルを活性化及び不活性化した (図 11B)。これは、 -40 mV までのステップによってもたらされ、ここで、不活性化チャンネルは急速に回復し、 $hERG$ ピーク電流を決定することができる。この複雑な電圧プロトコールは、 $hERG$ 電流を記録するのに標準的である。 BK チャンネルは、膜の脱分極によって活性化されるが (図 11B)、開確率の電圧依存性は、細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度によって決まる。この研究で適用した 5 マイクロモル濃度の遊離 [Ca^{2+}] 濃度で、 50% を超えるチャンネルが $+50$ mV で活性化され、他の Kv チャンネルに対して使用したものと同一の膜電位での Vm24 の効果の比較が可能となる。 $+50$ mV での BK の完全な活性化は、安定な細胞全体での記録と不適合な [Ca^{2+}] を必要とし、逆に、 5 マイクロモル濃度の遊離 [Ca^{2+}] での BK チャンネルの完全な活性化は、 $> +100$ mV までの脱分極を必要とする。従って、 5 マイクロモル濃度の [Ca^{2+}] と $+50$ mV の試験電位の組み合わせは、Vm24 の効果を研究するのに合理的な妥協案である。試験パルスを進行する -120 mV までのパルスを非特異的なリークの評価に用いた。パルスプロトコール間の保持電位は 0 mV であり、ここで、全ての Kv チャンネルは完全に不活性化され、それにより、 $tSA-201$ 細胞で散発的に見られた内因性 Kv 電流によって記録の混入の可能性を低減する。この膜電位で、 BK チャンネルはすでに活性であり、パルス開始時での顕著な保持電流によって実証されている。

【0137】

図 11 に示す異なるチャンネル上での Vm24 の効果をアッセイするため、細胞を繰り返し脱分極し、異なる細胞外溶液に電流を誘発した。図 11 は、毒の適用前 (対照)、 10 nM の Vm24 の $4 \sim 7$ 分間の適用後、及び毒の洗い流し後 (洗浄) に記録した代表的な電流追跡を示す。図 11 の全パネルは、Vm24 の存在下で記録した電流が対照溶液及び洗い流し後に記録したものと区別できないことを示し、該チャンネルの遮断の欠如を示す。統計的分析を図 12B に示し、ここで、残留電流割合の平均及び SEM を 10 nM の Vm24 の存在下で示す ($n = 3$)。

【0138】

図 12 に示すデータは、各種 K チャンネルに対する Vm24 の遮断効力の順序が、 $hKv1.3 >>> hKv1.2 > hIKCa1 > mKv1.1 >>> hKv1.4 \quad hKv1.5 \quad rKv2.1 \quad hERG \quad hBK \quad hNav1.5$ であることを示す。用量反応関係からの $hKv1.3$ に対して得られる K_d 値と、他のチャンネルに対する K_d 値の単一点評価に基づいて (即ち、 10 nM の Vm24 及び $1:1$ の毒 - チャンネル化学量論をと仮定した電流の残留割合から計算した)、Vm24 の $hKv1.3$ に対するこの研究でアッセイした他のチャンネルを越えた選択性は、 > 1500 倍である。この値は、選択性に対して一般に認められた規準を十分に越えるものであり [Giangiacomo et al., 2004]、平衡分解定数における 100 倍の差異又は二つの異なるカリウムチャンネル $Ch1$ 及び $Ch2$ に結合する KTx についての結合自由エネルギーの差、 $G_{Ch1}; Ch2 > 2.72$ kcal/mol として決定される。

【0139】

例 9 : 合成 V m 2 4 は、天然毒と等しく強力な h K v 1 . 3 の遮断薬である

例 5 で説明したように、理論上及び実施上の考慮すべき事項が V m 2 4 の化学合成に導いた。説明のとおり、合成した毒の構造及び純度を分析的 H P L C、アミノ酸配列及び質量分析決定によって確認した。その全てのアプローチは、合成した V m 2 4 (s V m 2 4) の一次配列が天然ペプチドのものと一致することを示した。更に、s V m 2 4 の生成に対するプロトコールは、折り畳みが天然ペプチドの場合と同じジスルフィド対形成に制限されるように設計されたチオール基のための異なる保護基を用いた。しかしながら、このデータは、ペプチドの生理学的活性が維持されることを保証しない。高親和性の遮断を媒介するチャンネル及びペプチドの相補的表面は、非常に複雑であり、天然ペプチドの構造からの最小限の逸脱は、K v 1 . 3 を遮断する際の s V m 2 4 の効果を落とし得る [Gian giacomo et al., 2004]。

10

【 0 1 4 0 】

s V m 2 4 の生物活性をヒト T 細胞の K v 1 . 3 チャンネル上でアッセイした。この研究の実験条件は、例 7 に説明されるものと完全に同一であった。細胞全体でパッチクランプした T リンパ球は、異なる溶液の存在下、保持電圧 - 1 2 0 m V から + 5 0 m V まで 3 0 秒毎に繰り返し脱分極した (図 1 3 A)。s V m 2 4 の不在下で測定した h K v 1 . 3 電流 (対照) は、徐々に、そして、かん流装置を介して 1 0 0 p M の s V m を投与したときにほぼ完全に消滅した。第 1 6 パルスの後、記録チャンパーを毒のない細胞外溶液でかん流した。かん流溶液からの毒の除去は、5 分以内に h K v 1 . 3 遮断の顕著な軽減につながらなかった。これは、図 1 3 B においてより明確に実証されており、ここで、s V m 2 4 の適用前の対照溶液にて記録したピーク電流に対して正規化したピーク電流 (正規化ピーク) を時間に応じて示す。矢印は、s V m 2 4 (1 0 0 p M の s V m 2 4) を用いたかん流の開始及び毒のない溶液 (洗い流し) へのかん流の切り替えを示す。1 0 0 p M の s V m 2 4 又は V m 2 4 での遮断の平衡後に測定した残留電流割合 (R C F) を図 1 3 B において比較する (それぞれ n = 6 及び n = 4 で、バーは S E M を示す)。統計的比較 (t テスト) は、R C F が二つのグループ間で統計的に違いがないことを示した (p = 0 . 5 7)。我々の結論は、s V m 2 4 が h K v 1 . 3 チャンネルを遮断する点において天然毒と同程度強力であるということである。

20

【 0 1 4 1 】

例 1 0 : 異なるイオンチャンネル上での V m 2 3 の生物活性の分析

30

サソリ毒液は、大量の生物活性ペプチドを含む。所定の種の毒液は、V . メキシカナスの V m 2 3 及び V m 2 4 の場合のように、高度な配列同一性を有するペプチドを含む場合が多い (例 1 参照)。ペプチドの高度な配列同一性は、通常個々の分子に対して異なる生物活性を与える。これは、イオンチャンネルの外部前庭に位置する毒受容体とのペプチド毒の相互作用が、長距離静電相互作用、短距離静電相互作用及び密接相互作用を含めた複数の機構によって決定され、その要因の正味効果は、結合親和性及び選択性を決定する [Park and Miller, 1992; Peter et al., 2001; Giangiaco mo et al., 2004]。以前示されたことには、同じサソリの二つのペプチド (P . i m p e r a t o r の P i 2 及び P i 3) は、単一のアミノ酸のみが異なり、その両方がサブナノモル濃度の濃度にて K v 1 . 3 を遮断する [Peter et al., 2001]。また、M i l l e r 及び共同研究者の先駆けの研究から [Goldstein et al., 1994] 明らかであるのは、チャリーブドトキシンの幾つかの位置における非保存的なアミノ酸置換でさえ十分に許容され、毒は、S h a k e r カリウムチャンネルに対する親和性を維持する (例えば、T 9 K 及び N 2 2 K)。また、V m 2 3 と V m 2 4 間の差異が K v 1 . 3 に対する親和性及び特異性を変化させるのに重要でないことを検証するため、V m 2 3 の薬理学的プロファイルを以下に示されるように詳細に試験した。

40

【 0 1 4 2 】

V m 2 3 のイオンチャンネル遮断効力をヒト T 細胞の K v 1 . 3 チャンネルに対して、また m K v 1 . 1、h K v 1 . 2 及び h I K C a 1 チャンネルに対してアッセイした。これらのチャンネルは、V m 2 3 と 8 3 % 配列同一性を共有する関連ペプチド V m 2 4 によ

50

って該チャンネルの低親和性遮断 ($mKv1.1$ 、 $hKv1.2$ 及び $hIKCa1$) 又は高親和性遮断 ($hKv1.3$) に基づく研究において、それらのチャンネルが挙げられた。実験条件は、例 7 及び例 8 の対応するチャンネルについて記載されたものと完全に同一であった。

【0143】

細胞全体をパッチ固定した Tリンパ球は、異なる溶液の存在下で 15 秒毎に保持電位 -120 mV から +50 mV まで繰り返し脱分極された (図 14 A)。Vm23 の不在下で測定した $hKv1.3$ 電流 (対照) は、かん流装置を介した 10 nM の Vm23 の投与により 3.5 分以内で完全に消滅した。「10 nM の Vm23」として示した追跡は、遮断の平衡の後に記録された。第 19 パルス後、記録チャンパーは、毒のない細胞外溶液でかん流された (洗い流し)。かん流溶液からの毒の除去は、2 分以内での $hKv1.3$ 遮断の顕著な軽減につながらなかった。10 nM の Vm23 での遮断の平衡後に測定した残留電流割合 (RCF) を図 15 に示す ($n = 3$ 、バーは SEM を示す)。その結果は、 $hKv1.3$ チャンネルの Vm23 で媒介した遮断の特性が Vm24 で媒介した遮断の特性と非常に似ていることを示し、このアッセイで用いた時間制限を過ぎても、遮断は高親和性であり、毒のオフ速度は極めて遅い。制限された量の Vm23 (毒液の 0.5% 未満が Vm23) は、 $hKv1.3$ 遮断の用量反応関係の決定及び Vm24 との解離定数の適切な統計的比較を妨げた。

10

【0144】

10 nM の Vm23 を加える前 (対照)、3.5 分後、及び該毒の洗い流し後 (2 分) に記録した電流の比較は、10 nM の Vm23 が $hIKCa1$ チャンネル (図 14 B) 又は $mKv1.1$ チャンネル (図 14 C) を実質的に遮断しないことを示す (例 7 及び例 8 の対応するセクションにおいて実験的詳細を参照)。Vm23 による $hIKCa1$ 遮断の完全な欠如は、Vm24 の効果と異なり、同じ濃度で約 40% のチャンネルを遮断した (図 9 F 参照)。一方、 $hKv1.2$ チャンネルは、10 nM の Vm23 によってわずかに遮断され (図 14 D)、 0.91 ± 0.02 の RCF 値を与え ($n = 3$ 、SEM、図 15)、その遮断は、2 分以内で容易に逆にできなかった。同一濃度の Vm24 は、約 46% のチャンネルを遮断した (例 8 参照)。

20

【0145】

10 nM の Vm23 の存在下での $hKv1.3$ 、 $hIKCa1$ 、 $mKv1.1$ 及び $hKv1.2$ に対する残留電流割合 (図 15) の Vm24 について得られたデータ (図 12 A 及び B) との比較は、 $hKv1.3$ に対する Vm23 の選択性プロファイルが、試験したチャンネルについてわずかに良いことを示す。また、その比較から、結論としては Vm23 及び Vm24 の一次構造の差異にもかかわらず、顕著な選択性を持つ $hKv1.3$ の高親和性遮断が維持される。

30

【0146】

例 11: Vm24 の生体内での免疫効果

世界中の何億人もの人々は、限定されないが、特に、多発性硬化症、関節リウマチ、I 型糖尿病、自己免疫性乾癬、紅斑性狼瘡、潰瘍性大腸炎、交感性眼炎、骨吸収歯周病、免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性リンパ球増殖性症候群等の自己免疫疾患によって影響される。最近考えられていることには、これらの疾患の発症は、エフェクターメモリ T 細胞 (T_{EM}) に形質転換される休止状態の疾患特異的な自己反応性 T 細胞の活性化を伴う。自己反応性 T 細胞は、組織内への移動、炎症サイトカインの分泌及び即時性エフェクター効果の発揮による反復自己抗原刺激及び炎症損傷への寄与のため、未処理状態と連続活性化メモリ T 細胞を区別し得る [Sallusto et al., 1999]。遅延型過敏症 (DTH) に関する機構は、 T_{EM} 細胞に引き起こされる皮膚損傷の他の例である [Soler et al., 2003]。また、多くの自己免疫疾患の発症は、メモリ B 細胞、特に $CD27^+ IgD^-$ サブセットに属するものに起因することがある [Iglesias et al., 2001; O'Connor et al., 2001; Corcione et al., 2004]。これらの理由により、細胞の他のリンパ球サブセットの活性を損なわず、選択的に T_{EM} 及びクラス転換メモリ B 細胞を標的と

40

50

できる治療薬を開発することが望ましく、この方法で急性免疫反応の障害を避ける。本発明の例7において述べたように、電圧開口型Kv1.3チャンネルは、T_{EM}及びクラス転換メモリB細胞の免疫修飾のための新規な治療上の標的である。T_{EM}細胞は活性化時にKv1.3を上方制御し、その抗原駆動の増殖は、Kv1.3チャンネルを遮断する既知の物質に対してかなり感受性がある [Wulff et al., 2003]。逆に、未処理細胞及びT_{EM}は、Kv1.3遮断薬に対して感受性がほとんどなく、カルシウムで活性化したKチャンネルK_{Ca}3.1を上方制御することで、Kv1.3に対してすぐに抵抗性を持つようになる [Wulff et al., 2003; Chandy et al., 2004]。分化過程の間、B細胞及びT細胞は、K_{Ca}3.1からKv1.3にそのカリウムチャンネル依存性を変化させる [Wulff et al., 2004]。この事実により、Kv1.3チャンネル遮断薬は、未処理細胞及びCD27⁺IgD⁺メモリ細胞に影響を与えることなく、該細胞の増殖を阻害する。従って、Kv1.3チャンネルに特異的な遮断薬の使用は、T_{EM}及びクラス転換メモリB細胞に優先的に影響を与え、免疫反応の大半を落とすことがないが、自己免疫疾患の結果として発生した健康状態を改善する。Kv1.3チャンネルの遮断は、動物モデルにおいて、実験的な自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)、歯周病骨吸収及びDTH反応を、明らかな副作用を引き起こすことなく、改善する [Koo et al., 1997; Beeton et al., 2001; Valverde et al., 2004]。ペプチドによるKv1.3チャンネルの遮断はすぐに逆にできるため、化学療法剤又はモノクローナル抗体を用いたときの場合ではなく、正常なレベルに戻るまで数ヶ月かかる治療の過程を制御することができる。明らかなことには、主な問題は、この治療上の処置に対して非常に選択的なペプチドを発見することである [Chandy et al., 2004]。

【0147】

先に説明した例7~10において示されるように、本発明の目的である両ペプチド (Vm23及びVm24) は、生体内でKv1.3チャンネルの強力かつ非常に特異的な遮断薬である。実験は、作用の選択性を多様化するため、培養中でのヒトTリンパ球について直接行われ、そして、幾つかの電圧依存性Kチャンネルを発現する他の細胞を用いて行われた。「概念実証」のため、生体内での実験は、重要なDTH反応を誘発することが可能な薬剤としてのジニトロフルオロベンゼン (DNFB) で感作されたラットで行われた。

【0148】

この種の実験を行うため、我々は、ラットにおけるDTH反応を研究するプロトコールを設定する。使用したシステムは、基本的にPhanuphakらにより1974年に開示されている。簡単に言うと、ラットの二つのグループ (それぞれ3又は5匹) を、背部を穏やかに剃った後、0.7%のDNFBの4:1の割合のアセトン:オリーブ油溶液40マイクロリットルの適用により、連続する2日 (1日目及び2日目) で感作された。感作溶液を2回目に適用してから7日後、動物を上述のアセトン:オリーブ油溶液に溶解させた0.4% DNFBの20マイクロリットルの単回適用によって検証された。この溶液は、右側の耳の背部表面に広がり、乾燥させるが、左側の耳は、媒体溶液 (アセトン:オリーブ油) のみが広がった。プロトコールの8日目、pH7.8のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 100マイクロリットルの皮下注射を対照として使用した各動物に行い、一方、ラットの実験グループに対しては、100マイクロリットルのPBS中10マイクログラムの量の純Vm24を皮下に適用した。全ての動物の両耳の厚さをVm24の適用後24時間で測定した。

【0149】

実験の結果を図16に示す。明らかなことに、Vm24を注入されていない対照動物は、0.32mm程度の耳の炎症の平均値を有し (対照とラベルされている)、一方、10マイクログラムのVm24を1回投与したラットは、炎症を低減し、わずか0.10mmの厚みであった。それらの値は、検証されていない耳 (左側の耳) の厚さを引いたため、実際の炎症過程に対応する。これは、炎症過程の60%以上の減少を示す。結論として、これらの結果は、Vm24がラットにおけるDTH-反応に対する重要な免疫抑制剤であ

るという考えを支持する。従って、それは明らかに、T及びBリンパ球の活性化に依存する免疫疾患の阻害剤としてアッセイされる価値があるリード成分であり、Kv1.3チャンネルの寄与は、疾患を誘発又は維持するのに重要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0150】

【非特許文献1】Aebersold R, Goodlett DR (2001). Mass Spectrometry in Proteomics. *Chem. Rev.* 101 :269-95.

【非特許文献2】Ahern CA, Zhang, JF, Wookalis MJ, Horn R (2005). Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by Fyn, a Src family tyrosine kinase. *Circ Res* 96:991-8 10

【非特許文献3】Aiyar J, Withka JM, Rizzi JP, Singleton DH, Andrews GC, Lin W, Boyd J, Hanson DC, Simon M, Dethlefs B, Lee C-L, Hell JE, Gutman GA, Chandy KG (1995). Topology of the pore-region of a K⁺ channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. *Neuron* 15:1169-81.

【非特許文献4】Alessandri-Haber N, Lecoq A, Gasparini S, Grangier-Macmath G, Jaquet G, Harvey AL, de Medeiros C, Rowan EG, Gola M, Menez A, Crest M (1999). Mapping the functional anatomy of BgK on Kv1.1, Kv1.2, and Kv1.3. Clues to design analogs with enhanced selectivity. *J Biol Chem* 274:35653-61.

【非特許文献5】Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-10. 20

【非特許文献6】Aneiros A, Garcia I, Martinez JR, Harvey AL, Anderson AJ, Marshall DL, Engstrom A, Hellman U, Karlsson E (1993). A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. Isolation, amino acid sequence and biological activity. *Biochim Biophys Acta* 1157:86-92.

【非特許文献7】Auguste P, Hugues M, Grave B, Gesquiere JC, Maes P, Tartar A, Romey G, Schweitz H, Lazdunski M (1990). Leiurotoxin I (scyllatoxin), a peptide ligand for Ca²⁺-activated K⁺ channels. Chemical synthesis, radiolabeling, and receptor characterization. *J Biol Chem* 265:4753-9.

【非特許文献8】Avdonin V, Tang XD, Hoshi T (2003). Stimulatory action of internal protons on Slo1 BK channels. *Biophys J* 84:2969-80 30

【非特許文献9】Bagdany M, Batista CV, Valdez-Cruz NA, Somodi S, Rodriguez de la Vega RC, Licea AF, Varga Z, Gaspar R, Possani LD, Panyi G (2005). Anuroctoxin, a new scorpion toxin of the [α]-KTx6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCa1 ion channels of human T lymphocytes. *Mol Pharmacol* 67:1034-44

【非特許文献10】Batista CV, Roman-Gonzalez SA, Salas-Castillo SP, Zamudio FZ, Gomez-Lagunas F, Possani LD (2007). Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* (doi: 10.1016/j.cbpc.2006.12.004). 40

【非特許文献11】Beeton C, Wulff H, Barbaria J, Clot-Faybesse O, Pennington M, Bernard D, Cahalan MD, Chandy KG, Beraud E (2001). Selective blockade of T lymphocyte K⁺ channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13942-7.

【非特許文献12】Beeton C, Chandy KG (2005). Potassium channels, memory T cells, and multiple sclerosis. *Neuroscientist* 11:550-62.

【非特許文献13】Beeton C, Pennington MW, Wulff H, Singh S, Nugent D, Crossley G, Khaytin I, Calabresi PA, Chen CY, Gutman GA, Chandy KG (2005). Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases. *Mol Pharmacol* 67:1369-81. 50

【非特許文献 1 4】Beeton C, Wulff H, Standifer NE, Azam P, Mullen KM, Pennington MW, Kolski-Andreaco A, Wei E, Grino A, Counts DR, Wang PH, Leehealey CJ, Andrews S, Sankaranarayanan A, Homerick D, Roeck WW, Tehranzadeh J, Stanhope KL, Zimin P, Havel PJ, Griffey S, KnausHG, Nepom GT, Gutman GA, Calabresi PA, Chandy KG (2006). Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 : 17414-9

【非特許文献 1 5】Carbone E, Wanke E, Prestipino G, Possani LD, Maelicke A (1982). Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 296:90-1.

【非特許文献 1 6】Castaneda O, Sotolongo V, Amor AM, Stocklin R, Anderson AJ, Harvey AL, Engstrom A, Wernstedt C, Karlsson E (1995). Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicol* 33:603-13.

10

【非特許文献 1 7】Castle NA, Haylett DG, Jenkinson DH (1989). Toxins in the characterization of potassium channels. *Trends Neurosci* 12:59-65.

【非特許文献 1 8】Chandy KG, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA, Cahalan MD (2004). K⁺ channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci* 25:280-9.

【非特許文献 1 9】Cooper N, Busse J (2006). The pathogenesis of immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 133:364-74.

20

【非特許文献 2 0】Corcione A, Casazza S, Ferretti E, Giunti D, Zappia E, Pistorio A, Gambini C, Mancardi GL, Uccelli A, Pistoia V. Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11064-9.

【非特許文献 2 1】Crest M, Jacquet G, Gola M, Zerrouk H, Benslimane A, Rochat H, Mansuelle P, Martin-Eauclaire MF (1992). Kaliotoxin, a novel peptidyl inhibitor of neuronal BK-type Ca(2+)-activated K⁺ channels characterized from *Androctonus mauretanicus mauretanicus* venom. *J Biol Chem* 267:1640-7.

【非特許文献 2 2】Deutsch C, Krause SC, Lee (1986). Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester. *J Physiol (Lond)* 372:405-23

30

【非特許文献 2 3】Diego-Garcia E, Schwartz EF, D'Suze G, Gonzalez SA, Batista CV, Garcia BI, Rodriguez de la Vega RC, Possani LD (2007). Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of "orphan" components. *Peptides* 28:31-7.

【非特許文献 2 4】Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis SL, Cohen BT, Chait R, MacKinnon (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69-77

【非特許文献 2 5】Drakopoulou E, Cotton J, Virelizier H, Bernardi E, Schoofs AR, Partiseti M, Choquet D, Gurrola G, Possani LD, Vita C (1995). Chemical synthesis, structural and functional characterisation of noxiustoxin, a powerful blocker of lymphocyte voltage-dependent K⁺ channels. *Biochem Biophys Res Commun* 213:901-7.

40

【非特許文献 2 6】Fanger CM, Rauer H, Neben AL, Miller MJ, Wulff H, Rosa JC, Ganelin CR, Chandy KG, Cahalan MD (2001). Calcium-activated potassium channels sustain calcium signaling in T lymphocytes. Selective blockers and manipulated channel expression levels. *J Biol Chem* 276:12249-56

【非特許文献 2 7】Feng J, Wible B, Li GR, Wang Z, Nattel S (1997). Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res* 80

50

:572-79

【非特許文献 2 8】Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1990). Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem* 265:11083-90.

【非特許文献 2 9】Garcia ML, Garcia-Calvo M, Hidalgo P, Lee A, MacKinnon R (1994). Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K⁺ channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry* 33:6834-9.

【非特許文献 3 0】Garcia ML, Gao Y, McManus OB, Kaczorowski GJ (2001). Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. *Toxicon* 39:739-48.

【非特許文献 3 1】Garcia-Calvo M, Leonard RJ, Novick J, Stevens SP, Schmalhofer W, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1993). Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J Biol Chem* 268:18866-74.

【非特許文献 3 2】Giangiacomo KM, Ceralde Y, Mullmann TJ (2004). Molecular basis of alpha-KTx specificity. *Toxicon* 43 :877-86.

【非特許文献 3 3】Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG (2000). Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem* 275:37137-49

【非特許文献 3 4】Giangiacomo KM, Ceralde Y, Mullmann TJ (2004). Molecular basis of alpha-KTx specificity. *Toxicon* 43:877-86

【非特許文献 3 5】Goldstein SA, Miller C (1993). Mechanism of Charybdotoxin block of a voltage-gated K⁺ channel. *Biophys J* 65:1613-1619

【非特許文献 3 6】Goldstein SA, Pheasant DJ, Miller C (1994). The Charybdotoxin receptor of a Shaker K⁺ channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron* 12:1377-88

【非特許文献 3 7】Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang X (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:473-508.

【非特許文献 3 8】Grissmer S, Dethlefs B, Wasmuth JJ, Goldin AL, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG (1990). Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K⁺ channel gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9411-5.

【非特許文献 3 9】Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Karmilowicz MJ, Auperin DD, Chandy KG (1994). Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 45 : 1227-34

【非特許文献 4 0】Grissmer S, Nguyen AN, Cahalan MD (1993). Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, pharmacology. *J Gen Physiol* 102:601-30

【非特許文献 4 1】Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang X (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:473-508

【非特許文献 4 2】Harvey AL (1997). Recent studies on dendrotoxins and potassium ion channels. *Gen Pharmacol* 28:7-12.

【非特許文献 4 3】Hidalgo P, MacKinnon R (1995). Revealing the architecture of a

10

20

30

40

50

K⁺ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. *Science* 268:307-10.

【非特許文献 4 4】Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754-5.

【非特許文献 4 5】Iglesias A, Bauer J, Litzemberger T, Schubart A, Linington C (2001). T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *GHA* 36:220-34.

【非特許文献 4 6】Immke D, Wood M, Kiss L, Korn SJ (1999). Potassium-dependent changes in the conformation of the Kv2.1 potassium channel pore. *J Gen Physiol* 113:819-36

10

【非特許文献 4 7】Jameson BA, McDonnell JM, Marini JC, Korngold R (1994). A rationally designed CD4 analogue inhibits experimental allergic encephalomyelitis. *Nature* 368:744-6.

【非特許文献 4 8】Janeway CA5 Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2001). *Immunobiology*. 5 ed. Garland Publishing, New York. 187-220 pp

【非特許文献 4 9】Jouirou B, Mouhat S, Andreotti N, De Waard M, Sabatier JM (2004). Toxin determinants required for interaction with voltage-gated K⁺ channels. *Toxicon* 43:909-14.

【非特許文献 5 0】Judge SI, Bever CT Jr (2006). Potassium channel blockers in multiple sclerosis: neuronal Kv channels and effects of symptomatic treatment. *Pharmacol Ther* 111 :224-59.

20

【非特許文献 5 1】Juwadi P, Vunnam S, Merrifield RB (1996). Synthetic melittin, its enantio, retro, and retroenantio isomers, and selected chimeric analogs: their antibacterial, hemolytic, and lipid bilayer action. *J Am Chem Soc* 118:8989-97

【非特許文献 5 2】Kalman K, MW Pennington, Lanigan MD, Nguyen A, Rauer H, Mahnir V, Paschetto K, Kern WR, Grissmer S, Gutman GA, Christian EP, Cahalan MD, Norton RS, Chandy KG (1998). ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *J Biol Chem* 273:32697-707

【非特許文献 5 3】Koch RO, Wanner SG, Koschak A, Hanner M, Schwarzer C, Kaczorowski GJ, Slaughter RS, Garcia ML, Knaus HG (1997). Complex subunit assembly of neuronal voltage-gated K⁺ channels. Basis for high-affinity toxin interactions and pharmacology. *J Biol Chem* 272:27577-81

30

【非特許文献 5 4】Koo GC5 Blake JT, Talento A, Nguyen M, Lin S5 Sirotina A5 Shah K5 Mulvany K5 Hora D Jr5 Cunningham P5 Wunderler DL, McManus OB5 Slaughter R, Bugianesi R, Felix J, Garcia M, Williamson J, Kaczorowski G, Sigal NH, Springer M S, Feeney W (1997). Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J Immunol* 158:5120-8.

【非特許文献 5 5】Krezel AM, Kasibhatla C, Hidalgo P, MacKinnon R, Wagner G (1995). Solution structure of the potassium channel inhibitor agitoxin 2: caliper for probing channel geometry. *Protein Sci* 4:1478-89.

40

【非特許文献 5 6】Kurata HT, Wang Z5 Fedida D (2004). NH₂-terminal inactivation peptide binding to C-type-inactivated Kv channels. *J Gen Physiol* 123:505-20

【非特許文献 5 7】Lebrun B, Romi-Lebrun R, Martin-Eauclaire MF, Yasuda A, Ishiguro M, Oyama Y, Pongs O, Nakajima T (1997). A four-disulphide-bridged toxin, with high affinity towards voltage-gated K⁺ channels, isolated from *Heterometrus spinifer* (Scorpionidae) venom. *Biochem J* 328 :321-7.

【非特許文献 5 7】Lee SY, Lee A, Chen J, MacKinnon R (2005). Structure of the KvAP voltage-dependent K⁺ channel and its dependence on the lipid membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 15441-6.

50

- 【非特許文献 5 8】Lerner EC5 Qian Y, Blaskovich MA, Fossum RD, Vogt A, Sun J, Cox AD, Der CJ, Hamilton AD, Sebti SM (1995). Ras CAAX peptidomimetic FTI-277 selectively blocks oncogenic Ras signaling by inducing cytoplasmic accumulation of inactive Ras-Raf complexes. *J Biol Chem* 270:26802-6.
- 【非特許文献 5 9】Lewis RS, Cahalan MD (1995). Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 13:623-53.
- 【非特許文献 6 0】Lewis RS (2001). Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 19:497-521
- 【非特許文献 6 1】Long SB, Campbell EB5 Mackinnon R (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309:897-903. 10
- 【非特許文献 6 2】Matteson DR5 Deutsch C (1984). K channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. *Nature* 307:468-71
- 【非特許文献 6 3】Merrifield RB (1964). Solid-phase peptide synthesis. 2. An improved synthesis of bradykinin. *Biochemistry* 3:1385-90.
- 【非特許文献 6 4】Miller C, Moczydlowski E, Latorre R, Phillips M (1985). Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313:316-8.
- 【非特許文献 6 5】Mouhat S5 Jouirou B, Mosbah A, De Waard M5 Sabatier JM (2004). Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem J* 378:717-26. 20
- 【非特許文献 6 6】Moczydlowski E (1985). Chemical basis for alkali cation selectivity in potassium-channel proteins. *Chem Biol* 5:R291-301.
- 【非特許文献 6 7】O'Connor K, Bar-Or A, Hafler DA (2001). The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *J Clin Immunol* 21:81-92.
- 【非特許文献 6 8】O'Leary ME, Chen LQ, Kallen RG, Horn R (1995). A molecular link between activation and inactivation of sodium channels. *J Gen Physiol* 106:641-58
- 【非特許文献 6 9】Oren H, Ozkal S, Gulen H, Duman M, Ucar C, Atabay B, Yilmaz S, Kargi A, Irken G (2002). Autoimmune lymphoproliferative syndrome: report of two cases and review of the literature. *Ann Hematol* 81:651-3. 30
- 【非特許文献 7 0】Orengo CA, Thornton JM (2005). Protein families and their evolution—a structural perspective. *Annu Rev Biochem* 74:867-900.
- 【非特許文献 7 1】Panyi G, Varga Z, Gaspar R (2004). Ion channels and lymphocyte activation. *Immunol Lett* 92:55-66
- 【非特許文献 7 2】Park CS, Miller C (1992). Mapping function to structure in a channel-blocking peptide: electrostatic mutants of charybdotoxin. *Biochemistry* 31:7749-55
- 【非特許文献 7 3】Patel SP, Campbell DL (2005). Transient outward potassium current, 'I_{to}', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol* 569:7-39 40
- 【非特許文献 7 4】Pearson WR, Lipman DJ (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2444-8.
- 【非特許文献 7 5】Pennington MW, Byrnes ME, Zaydenberg I, Khaytin I, de Chastony J, Krafft DS, Hill R, Mahnir VM, Volberg WA, Gorczyca W, Kern WR (1995). Chemical synthesis and characterization of ShK toxin: a potent potassium channel inhibitor from a sea anemone. *Int J Pept Protein Res* 46:354-8.
- 【非特許文献 7 6】Peter J, Varga Z, Hajdu P, Gaspar RJ, Damjanovich S, Horjales E, Possani LD, Panyi G (2001). Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24. *J Membr Biol* 179:13-25 50

- 【非特許文献 7 7】Phanuphak P, Moorthead JW, Claman HN (1974) Tolerance and contact sensitivity to DNFB in mice. I. In vivo detection by ear swelling and correlation with in vitro cell stimulation. *J. Immunol.* 112:115-23.
- 【非特許文献 7 8】Possani LD, Martin BM, Svendsen I, Rode GS, Erickson BW (1985). Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*. Primary structures and sequence comparison by metric analysis. *Biochem J* 229:739-50.
- 【非特許文献 7 9】Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J (1999). Scorpion toxins specific for Na⁺- channels. *Eur J Biochem* 264:287-300.
- 【非特許文献 8 0】Possani LD, Rodriguez de la Vega RC (2006). Scorpion venom peptides. In: *Handbook of biologically active peptides* p.339-354 (Kastin, A. editor). Academic Press, San Diego CA, USA. 10
- 【非特許文献 8 1】Peter J, Varga Z, Hajdu P, Gaspar RJ, Damjanovich S, Horjales E, Possani LD, Panyi G (2001). Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24. *J Membr Biol* 179: 13-25
- 【非特許文献 8 2】Rogart RB, Cribbs L, Muglia LK, Kephart DD, Kaiser MW (1989). Molecular cloning of a putative tetrodotoxin-resistant rat heart Na⁺ channel isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8170-4
- 【非特許文献 8 3】Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-4.
- 【非特許文献 8 5】Rauer H, Lanigan MD, Pennington MW, Aiyar J, Ghanshani S, Cahalan MD, Norton RS, Chandy KG (2000). Structure-guided transformation of charybdoxin yields an analog that selectively targets Ca(2+)-activated over voltage-gated K(+) channels. *J Biol Chem* 275:1201-8. 20
- 【非特許文献 8 4】Rodriguez de la Vega RC, Merino E, Becerril B, Possani LD (2003). Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins. *Trends Pharmacol Sci* 24:222-7.
- 【非特許文献 8 5】Rodriguez de la Vega RC, Possani LD (2004). Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon* 43:865-75.
- 【非特許文献 8 6】Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-12. 30
- 【非特許文献 8 7】Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, maintenance. *Annu Rev Immunol* 22:745-63
- 【非特許文献 8 8】Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M (2006). hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 440:463-9
- 【非特許文献 8 9】Sarin VK, Kent SBH, Tarn JP, Merrifield BR (1981). Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal Biochem* 117:147-57
- 【非特許文献 9 0】Soler D, Humphreys TL, Spinola SM, Campbell JJ (2003). CCR4 versus CCR10 in human cutaneous TH lymphocyte trafficking. *Blood* 101:1677-82. 40
- 【非特許文献 9 1】Stampe P, Kolmakova-Partensky L, Miller C (1994). Intimations of K⁺ channel structure from a complete functional map of the molecular surface of charybdotoxin. *Biochemistry* 33:443-50.
- 【非特許文献 9 2】Strong PN (1990). Potassium channel toxins. *Pharmacol Ther* 46: 137-62.
- 【非特許文献 9 3】Sugg EE, Garcia ML, Reuben JP, Patchett AA, Kaczorowski GJ (1990). Synthesis and structural characterization of charybdotoxin, a potent peptidyl inhibitor of the high conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *J Biol Chem* 265:18745-8. 50

【非特許文献 9 4】Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997). The CLUSTALX windows (登録商標) interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876-82.

【非特許文献 9 5】Thornton JW, DeSalle R (2000). Gene family evolution and homology: genomics meets phylogenetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1:41-73.

【非特許文献 9 6】Tytgat J, Chandy KG, Garcia ML, Gutman GA, Martin-Eauclaire MF, van der Walt JJ, Possani LD (1999). A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol Sci* 20:444-7.

10

【非特許文献 9 7】Valdez-Cruz NA, Batista CV, Possani LD (2004). Phaiodactylipin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *Eur J Biochem* 271 :1453-64.

【非特許文献 9 8】Valverde P, Kawai T, Taubman MA (2004). Selective blockade of voltage-gated potassium channels reduces inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *J Bone Miner Res* 19:155-64.

【非特許文献 9 9】Vennekamp J, Wulff H, Beeton C, Calabresi PA, Grissmer S, Hansel W, Chandy KG (2004). Kv1 3-blocking 5-phenylalkoxypsoralens: a new class of immunomodulators. *Mol Pharmacol* 65:1364-1374

【非特許文献 1 0 0】Viglietta V, Kent SC, Orban T, Hafler DA (2002). GAD65-reactive T cells are activated in patients with autoimmune type 1a diabetes. *J Clin Invest* 109:895-903

20

【非特許文献 1 0 1】Visan V, Fajloun Z, Sabatier JM, Grissmer S (2004). Mapping of maurotoxin binding sites on hKv1 2, hKv1 3, hKCa1 channels. *Mol Pharmacol* 66 :1103-12

【非特許文献 1 0 2】Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:463-472

【非特許文献 1 0 3】Wulff H, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG (2001). Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1. *J Biol Chem* 276:32040-5

30

【非特許文献 1 0 4】Wulff H, Calabresi PA, Allie R, Yun S, Pennington M, Beeton C, Chandy KG (2003). The voltage-gated Kv 1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS. *J Clin Invest* 111 : 1703-13.

【非特許文献 1 0 5】Wulff H, Kiliaus HG, Pennington M, Chandy KG (2004). K+ channel expression during B cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity. *J Immunol* 173:776-86.

【非特許文献 1 0 6】Yamashita K, Choi U, Woltz PC, Foster S, Sneller MC, Hakim FT, Fowler DH (2004). Severe chronic graft-versus-host disease is characterized by a preponderance of CD4+ effector memory cells relative to central memory cells. *Blood* 103:3986-8

40

【非特許文献 1 0 7】Zamudio FZ, Saavedra R, Martin BM, Gurrola-Briones G, Herion P, Possani LD (1992). Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur J Biochem* 204:281-92.

【非特許文献 1 0 8】Zamudio FZ, Conde R, Arevalo C, Becerril B, Martin BM, Valdivia HH, Possani LD (1997). The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. *J Biol Chem* 272:11886-94.

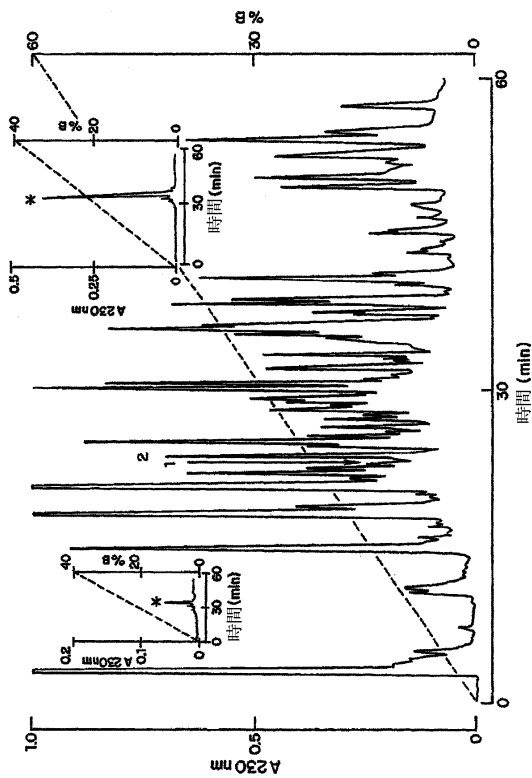
【非特許文献 1 0 9】Zhu S, Huys I, Dyason K, Verdonck F, Tytgat J (200). Evoluti

50

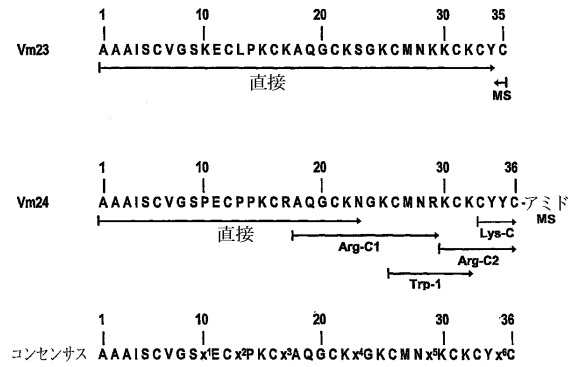
onary trace analysis of scorpion toxins specific for K-channels. Proteins 54:361-70.

【非特許文献 1 1 0】Zweifach A, Lewis RS (1993). Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. Proc Natl Acad Sci USA 90:6295-99.

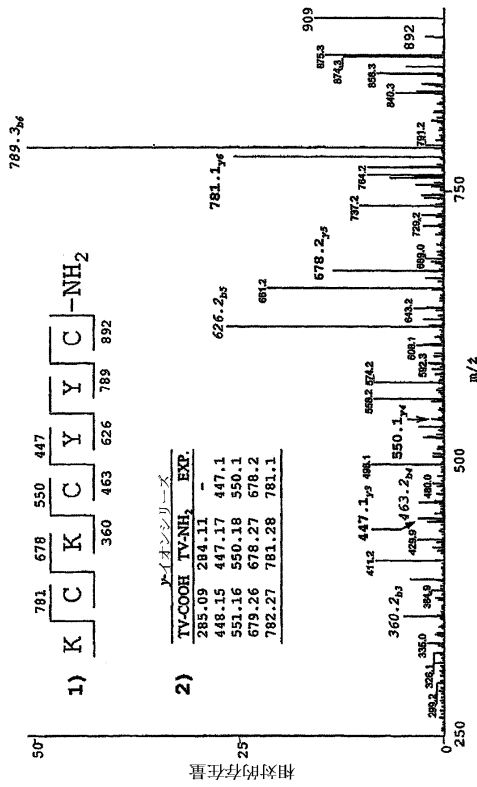
【図 1】



【図 2】

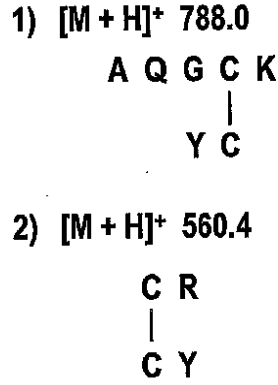


【 図 3 】

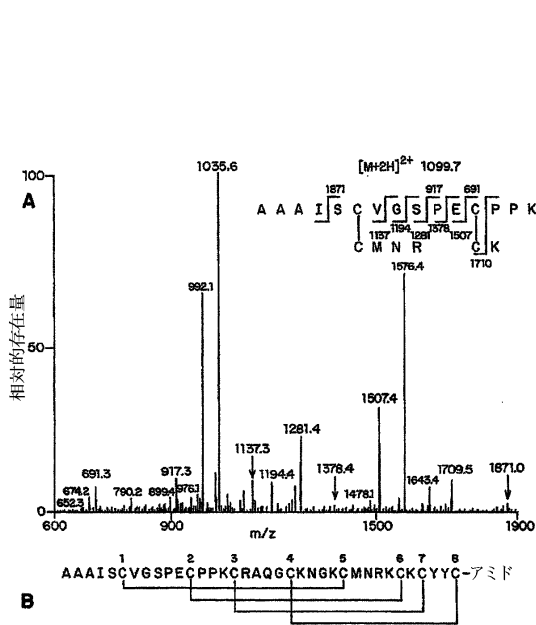


【 図 4 】

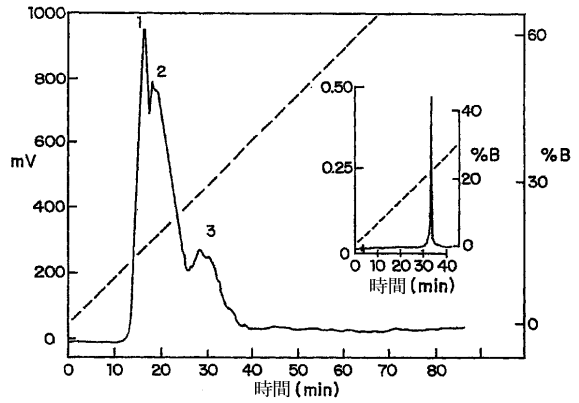
Fig. 4



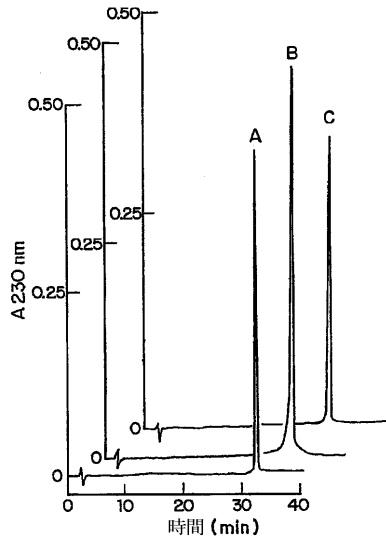
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



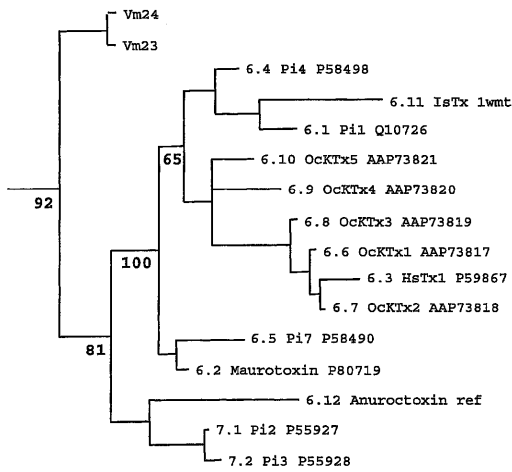
【 図 8 a 】

多重配列アライメント (CLUSTAL_X)

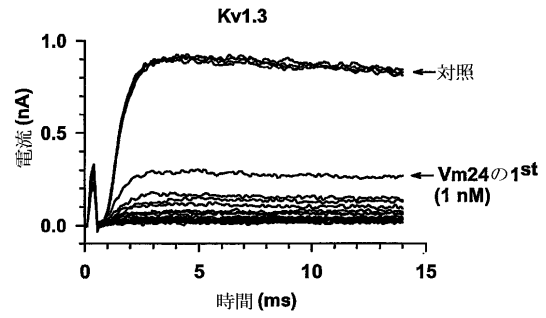
名称	並べた配列	%I
Vm24	AAAI5CVGSPECPKRAQG -CKNGKCMNRKCKCYC ---	100
Vm23	AAAI5CVGS KECLPKCKAQQ -CKSGKCMN KEKCYC -C ---	83
6.1 P11 Q10726	---VKCRGTSDCGRPCQQQTGCPNSKCNRMCKCYGC ---	43
6.2 Maurotoxin P80719	---VSC7GSKDCYAPCRKQTGCPNA KCINRSCKCYGC ---	49
6.3 HsTx1 P59867	---ASCRTPKDCADFCRKEGCPYIGKCMNRKCKNRC ---	46
6.4 P14 P58498	IEAIRCGSRDCYRPGKRGKCPNARCNINRCKCYGCS --	45
6.5 P17 P58490	DEAIRCTGKDKYIPCRYYTGCFSNSCNKNSCKCYGCT --	42
6.6 OcTx1 AAP73817	AEVIRKRTPKDCAGPCRKQTGCPHGKCMNRTRCNRC ---	46
6.7 OcTx2 AAP73818	AEVIRKRTPKDCAGPCRKQTGCPHGKCMNRTRCNRC ---	46
6.8 OcTx3 AAP73819	AEVIRKRTPKDCAGPCRKQTGCPHGKCMNRTRCNRC ---	41
6.9 OcTx4 AAP73820	AEVIRKRTPKDCAGPCRKQTGCPHGKCMNRTRCNRC ---	47
6.10 OcTx5 AAP73821	AEVIRKRTPKDCAGPCRKQTGCPHGKCMNRTRCNRC ---	51
6.12 Anuroctoxin P0C166	---OKECTGPOHCTNFCRKN -KCTHGKCMNRKCKCFNCK ---	46
6.13 spinoxin Iv56	---IRCSGSRDCYSPMKRQTGCPNARCNINRCKCYGC ---	46
6.14 HgeTx1	---TGPSCISPKQCTEPCRAKG -CRHGKCMNRKCKMCLCL --	51

【 図 8 b 】

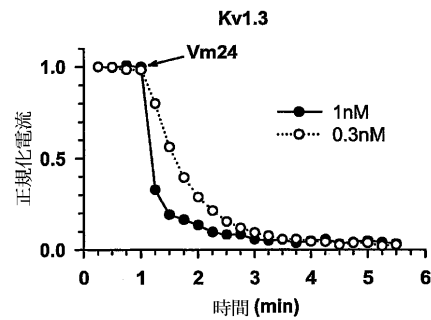
系統樹 (MrBayes 3.0b4)



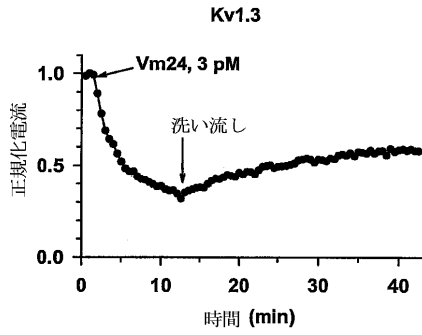
【 図 9 A 】



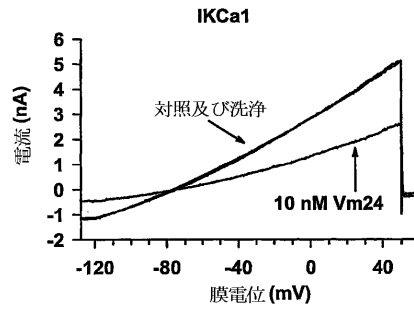
【 図 9 B 】



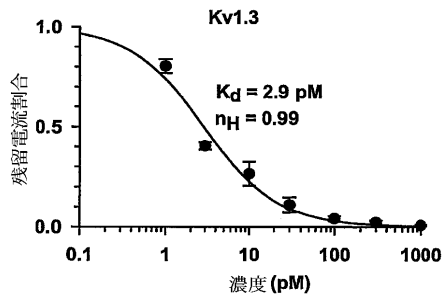
【 図 9 C 】



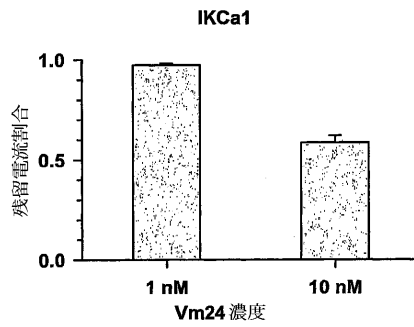
【 図 9 E 】



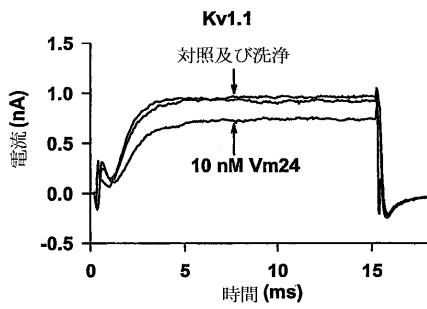
【 図 9 D 】



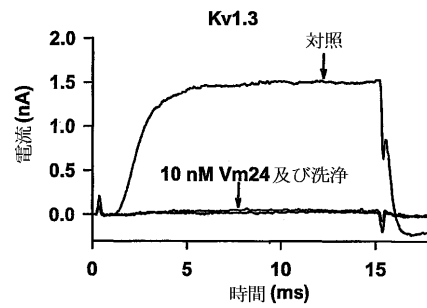
【 図 9 F 】



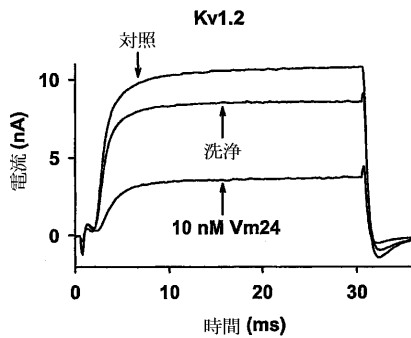
【 図 10 A 】



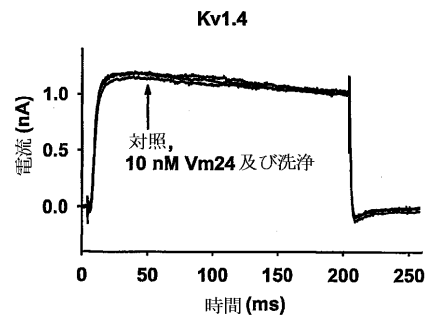
【 図 10 C 】



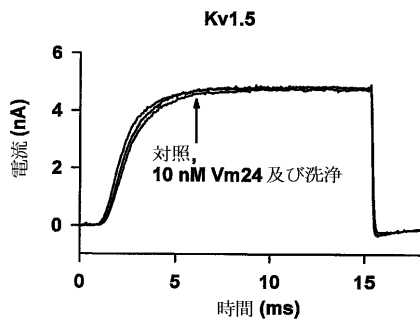
【 図 10 B 】



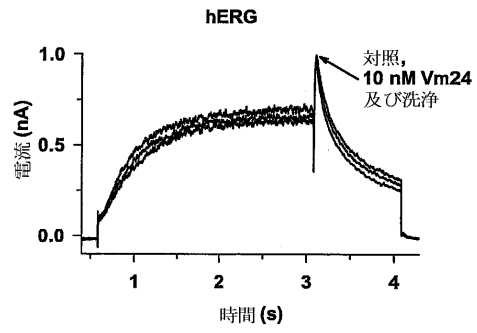
【 図 10 D 】



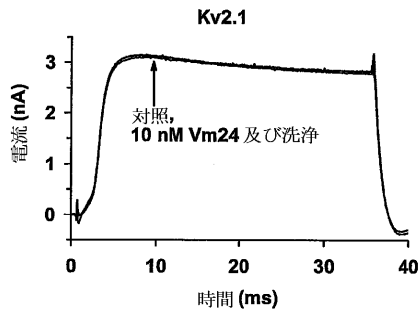
【図10E】



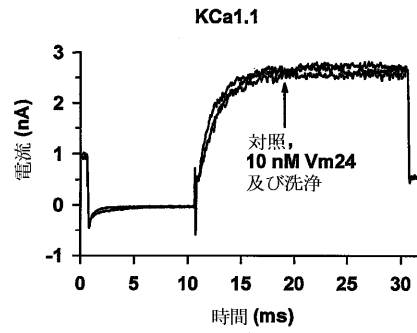
【図11B】



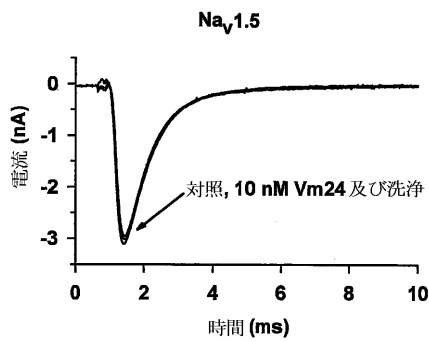
【図11A】



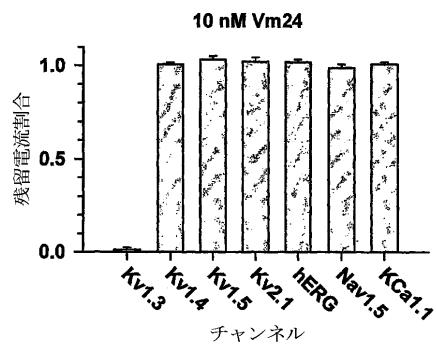
【図11C】



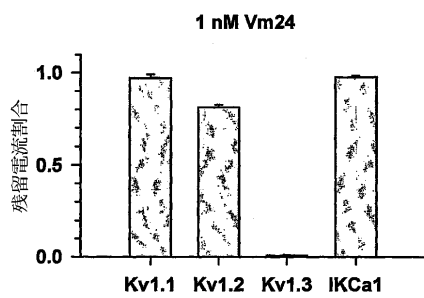
【図11D】



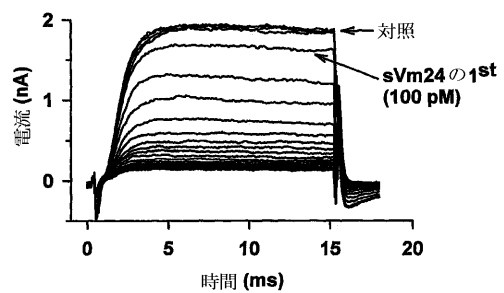
【図12B】



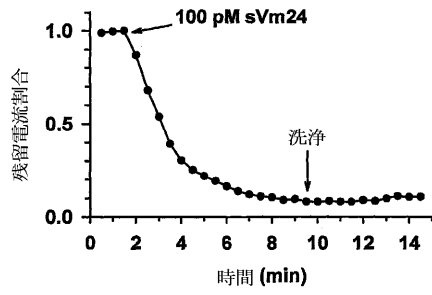
【図12A】



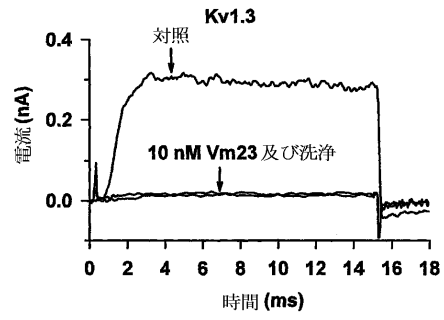
【図13A】



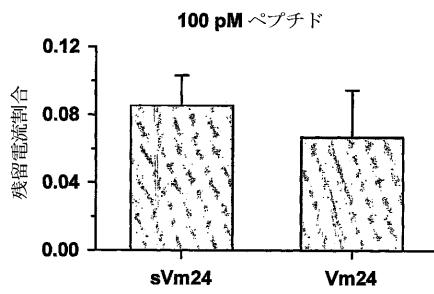
【 図 1 3 B 】



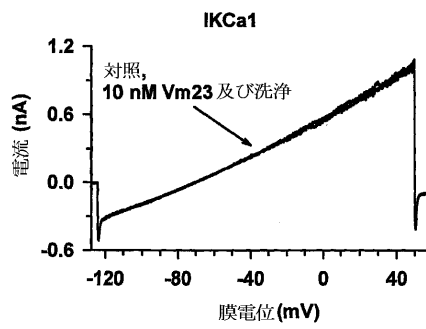
【 図 1 4 A 】



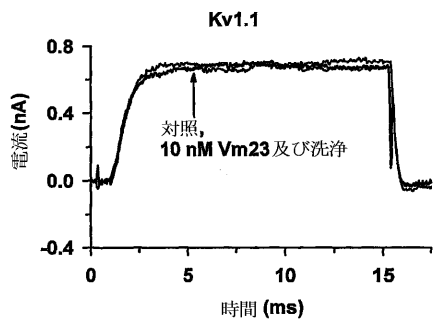
【 図 1 3 C 】



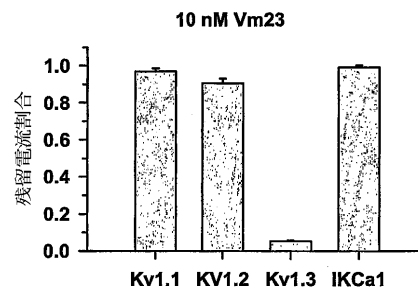
【 図 1 4 B 】



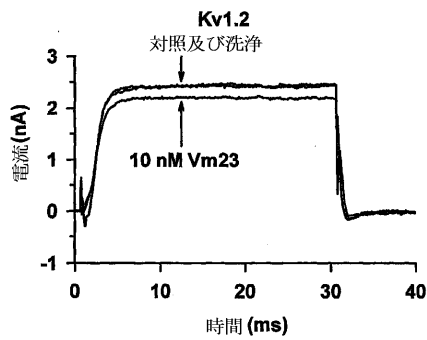
【 図 1 4 C 】



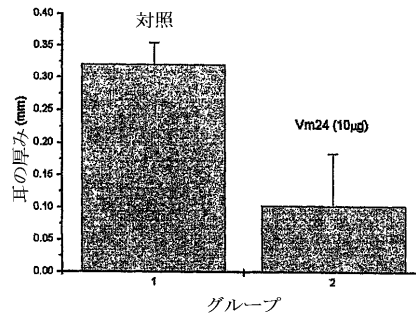
【 図 1 5 】



【 図 1 4 D 】



【 図 1 6 】



【配列表】

0005249319000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 17/06	(2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/536	(2006.01)	G 0 1 N 33/536	B
		G 0 1 N 33/536	D
		G 0 1 N 33/536	E

- (72)発明者 ルーリヴァル ドミンゴス ポッサーニ ポステイ
メキシコ国 6 2 2 1 0 モレロス クエルナヴァカ コル シャミルパ アベニーダ ウニヴェ
ルシダ ナンバー 2 0 0 1 インスティテュート デ ビオテクノロヒア - ウエネアエメ内
- (72)発明者 ゲオルヒーナ グローラ - プリオネス
メキシコ国 6 2 2 1 0 モレロス クエルナヴァカ コル シャミルパ アベニーダ ウニヴェ
ルシダ ナンバー 2 0 0 1 インスティテュート デ ビオテクノロヒア - ウエネアエメ内
- (72)発明者 サイダ パトリシア サラス - カスティロ
メキシコ国 9 2 8 8 0 ヴェラクルス トュクスパン コル ルイス コルティネス エリベル
ト ハラ ナンバー 6
- (72)発明者 セサル ヴィセンテ フェレイラ パティスタ
メキシコ国 6 2 2 1 0 モレロス クエルナヴァカ コル シャミルパ アベニーダ ウニヴェ
ルシダ ナンバー 2 0 0 1 インスティテュート デ ビオテクノロヒア - ウエネアエメ内
- (72)発明者 ゴルタン エス ヴァルガ
ハンガリー国 ハ - デブレツェン 4 0 2 8 コルハーズ ウツァ 3 セカンド / 8
- (72)発明者 ギョルギ バンイ
ハンガリー国 4 0 3 1 4 デブレツェン ゴヘル ウツァ 1 7 / ア
- (72)発明者 レッソ ガスパル
ハンガリー国 ハ - デブレツェン 4 0 3 4 デツィ ア ウツァ 3

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 Biochim. Biophys. Acta, 2 0 0 2 年 1 2 月 1 6 日, Vol.1601, No.2, pp.123-131

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq
UniProt / GeneSeq
PubMed

专利名称(译)	两种蝎子肽Vm23和Vm24高效选择性阻断人T淋巴细胞钾通道 (Kv1.3亚型) 并降低大鼠体内DTH反应		
公开(公告)号	JP5249319B2	公开(公告)日	2013-07-31
申请号	JP2010507993	申请日	2007-05-14
[标]申请(专利权)人(译)	墨西哥国立自治大学		
申请(专利权)人(译)	Univerushida全国1465自治墨西哥		
当前申请(专利权)人(译)	Univerushida全国1465自治墨西哥		
[标]发明人	ルーリヴァルドミンゴスポッサニポステイ ゲオルヒーナグローラブリオネス サイダパトリシアサラスカステイロ セサルヴィセンテフェレイラバティスタ ゾルタンエスヴァルガ ギョルギバンイ レソガスバル		
发明人	ルーリヴァルドミンゴス ポッサニ ポステイ ゲオルヒーナ グローラ-ブリオネス サイダ パトリシア サラス-カステイロ セサル ヴィセンテ フェレイラ バティスタ ゾルタン エス ヴアルガ ギョルギ バンイ レソ ガスバル		
IPC分类号	C07K14/435 C12Q1/02 A61P37/06 A61P37/02 A61P43/00 A61P25/00 A61P19/02 A61P3/10 A61P17/06 A61P17/00 A61P1/04 A61P27/02 A61K38/00 G01N33/53 G01N33/536		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/02 A61P1/04 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P27/02 C07K14/43522 G01N33/505 G01N33/564 G01N33/6872 G01N33/6893 G01N33/9493 G01N2500/00 G01N2800/245		
FI分类号	C07K14/435.ZNA C12Q1/02 A61P37/06 A61P37/02 A61P43/00.105 A61P25/00 A61P19/02 A61P3/10 A61P17/06 A61P17/00 A61P1/04 A61P27/02 A61K37/02 G01N33/53.Y G01N33/536.B G01N33/536.D G01N33/536.E		
代理人(译)	杉村健二 饭野洋一		
其他公开文献	JP2010528988A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

已知钾通道Kv1.3与免疫疾病和移植物排斥有关。公开了能够以高亲和力和特异性阻断钾通道Kv1.3的肽，它们的药物组合物，以及它们用于阻断Kv1.3钾通道，治疗各种免疫病症和诊断应用的方法。还公开了它们的化学合成和正确折叠的方法。示例性肽对应于从墨西哥蝎子Vaejovis mexicanus smithi的毒液中分离的蛋白质组分 (Vm23和Vm24)。当在体外应用于人淋巴细胞培养物时，Vm23和Vm24以几乎不可逆的方式结合hKv1.3通道，显示大约3皮摩尔范围的Kd值。化学合成Vm24并用于体内实验以成功治疗致敏大鼠 (关于DTH反应)。当以相对高的浓度注射时，Vm24和合成的Vm24都不会对小鼠有毒 (测定每千克小鼠体重高达10,000微克)。这些肽 (Vm24和Vm23) 及其具有至少83%序列同一性的功能等同类物是先导化合物，用于治疗各种免疫病症和诊断应用的候选物。

