

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 322999

(P2001 - 322999A)

(43)公開日 平成13年11月20日(2001.11.20)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/435			C 0 7 K 14/435	
A 6 1 K 39/395			A 6 1 K 39/395	D
				N
A 6 1 P 39/02			A 6 1 P 39/02	
C 0 7 K 1/04			C 0 7 K 1/04	

審査請求 未請求 請求項の数 55 O L (全 18数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 66198(P2001 - 66198)

(22)出願日 平成13年3月9日(2001.3.9)

(31)優先権主張番号 特願2000 - 67622(P2000 - 67622)

(32)優先日 平成12年3月10日(2000.3.10)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72)発明者 中村 英士

愛知県名古屋市千種区不老町1番地 名古屋

大学大学院生命農学研究科

(72)発明者 大場 裕一

愛知県名古屋市千種区不老町1番地 名古屋

大学大学院生命農学研究科

(74)代理人 100102668

弁理士 佐伯 憲生

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 受容体認識部位が保存された生理活性物質の誘導体及びその使用方法

(57)【要約】

【課題】 生理活性物質の受容体認識部位を保持したまま当該生理活性物質の生理活性を非活性化する方法とその非活性化誘導体及びその用途、並びに化学修飾後も生理活性が保持されたままの生理活性物質の誘導体及びその用途を提供することを目的とする。

【解決手段】 受容体の内部の作用部位に結合して生理活性を発現する物質において、当該生理活性物質の受容体認識部位以外の部分にリンカーを結合し、当該リンカーの他端に当該受容体に侵入することができない物質又は当該受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質を結合させることからなる生理活性物質の受容体認識部位を保存したまま当該生理活性物質を非活性化する方法、及びその非活性化誘導体、並びに当該リンカーの他端を担体に固定するか、又は当該リンカーの他端に担体に固定し得る物質、或いは担体に固定された物質と親和性を有する物質を結合させてなる、生理活性が保持された生理活性物質の誘導体に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 受容体の内部の作用部位に結合して生理活性を発現する物質において、当該生理活性物質の受容体認識部位以外の部分にリンカーを結合し、当該リンカーの他端に当該受容体に侵入することができない物質又は当該受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質を結合させることからのなる生理活性物質の受容体認識部位を保存したまま当該生理活性物質を非活性化する方法。

【請求項2】 生理活性物質の受容体認識部位以外の部分を化学修飾して、当該化学修飾部位にリンカーを結合させてなる請求項1に記載の方法。

【請求項3】 生理活性物質の受容体認識部位以外の部分が、立体的に受容体認識部位の背面部分である請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 リンカーの一端に結合する物質が、受容体に侵入することができない物質である請求項1～3にいずれかに記載の方法。

【請求項5】 リンカーの一端に結合する物質が、受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質である請求項1～3にいずれかに記載の方法。

【請求項6】 生理活性物質がタンパク質である請求項1～5にいずれかに記載の方法。

【請求項7】 生理活性物質が毒物である請求項1～6にいずれかに記載の方法。

【請求項8】 受容体が、イオンチャネルである請求項1～7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】 イオンチャネルが、ナトリウムチャネル又はカルシウムチャネルである請求項8に記載の方法。

【請求項10】 生理活性物質が μ -コノトキシンである請求項7に記載の方法。

【請求項11】 受容体の内部の作用部位に結合して生理活性を発現する物質において、当該生理活性物質の受容体認識部位以外の部分を化学修飾して、当該化学修飾部位にリンカーを結合し、当該リンカーの他端に当該受容体に侵入することができない物質又は当該受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質を結合させることからのなる生理活性物質の非活性化誘導体。

【請求項12】 生理活性物質の受容体認識部位以外の部分が、立体的に受容体認識部位の背面部分である請求項11に記載の非活性化誘導体。

【請求項13】 リンカーが、両端に官能基を有する異種原子を有してもよい炭素数1～30の化合物からのなる請求項11又は12に記載の非活性化誘導体。

【請求項14】 受容体に侵入することができない物質が、高分子物質である請求項11～13のいずれかに記載の非活性化誘導体。

【請求項15】 高分子物質がタンパク質である請求項14に記載の非活性化誘導体。

【請求項16】 タンパク質がアビジンである請求項15

5に記載の非活性化誘導体。

【請求項17】 受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質がビオチンである請求項11～16のいずれかに記載の非活性化誘導体。

【請求項18】 生理活性物質がペプチド又はタンパク質である請求項11～17のいずれかに記載の非活性化誘導体。

【請求項19】 生理活性物質が毒物である請求項18に記載の非活性化誘導体。

【請求項20】 化学修飾が、官能基を有するアミノ酸への置換である請求項18又は19に記載の非活性化誘導体。

【請求項21】 化学修飾がリンカーとの結合を容易に形成させるためのものである請求項11～20のいずれかに記載の非活性化誘導体。

【請求項22】 受容体が、イオンチャネルである請求項11～21のいずれかに記載の非活性化誘導体。

【請求項23】 イオンチャネルが、ナトリウムチャネル又はカルシウムチャネルである請求項22に記載の非活性化誘導体。

【請求項24】 生理活性物質が μ -コノトキシンである請求項19に記載の非活性化誘導体。

【請求項25】 化学修飾が、5位のトレオニンをシステインへの置換である請求項24に記載の非活性化誘導体。

【請求項26】 請求項11～25のいずれかに記載の非活性化誘導体からのなる生理活性物質の受容体認識部位が保存された非活性化抗原。

【請求項27】 生理活性物質が毒物である請求項26に記載の抗原。

【請求項28】 請求項26又は27に記載の非活性化抗原を、動物に感作させて免疫させ、当該抗原に対する抗体を製造する方法。

【請求項29】 請求項26又は27に記載の非活性化抗原に対する抗体。

【請求項30】 抗体がモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体である請求項29に記載の抗体。

【請求項31】 細胞を、リンカーの一端に受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質が結合している請求項11～25のいずれかに記載の生理活性物質の非活性化誘導体で処理して、当該生理活性物質の受容体認識部位を受容体に結合し得る状態とし、次いで当該細胞系を受容体に侵入することができない物質で処理して、当該受容体の活性を測定することからのなる当該受容体と生理活性物質との親和性を測定する方法。

【請求項32】 リンカーの長さを変えて測定する請求項31に記載の方法。

【請求項33】 受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質がビオチンであり、受容体に侵入することができない物質がアビジンである請求項31又

は32に記載の方法。

【請求項34】 細胞を、リンカーの一端に受容体に侵入することができない物質が結合している請求項11～25のいずれかに記載の生理活性物質の非活性化誘導体で処理して、当該受容体の活性を測定することからなる当該受容体の入口と当該生理活性物質の作用部位との距離を測定する方法。

【請求項35】 リンカーの長さを変えて測定する請求項34に記載の方法。

【請求項36】 細胞を、受容体の作用部位に達しない長さのリンカーの一端に受容体の入口の大きさに応じた物質が結合している請求項11～25のいずれかに記載の生理活性物質の非活性化誘導体で処理して、当該受容体の活性を測定することからなる当該受容体の入口の大きさを測定する方法。

【請求項37】 リンカーに結合している物質の立体的な大きさを変えて測定する請求項36に記載の方法。

【請求項38】 受容体の内部の作用部位に結合して生理活性を発現する物質において、当該生理活性物質の受容体認識部位以外の部分を化学修飾して、当該化学修飾部位にリンカーを結合し、当該リンカーの他端を担体に固定するか、又は当該リンカーの他端に担体に固定し得る（又は担体と親和性を有する）物質或いは担体に固定された物質と親和性を有する物質を結合させてなる、生理活性が保持された生理活性物質の誘導体。

【請求項39】 生理活性物質の受容体認識部位以外の部分が、立体的に受容体認識部位の背面部分である請求項38に記載の誘導体。

【請求項40】 リンカーが、両端に官能基を有する異種原子を有してもよい炭素数30～50の化合物からなる請求項38又は39に記載の誘導体。

【請求項41】 担体がポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ガラスビーズ、シリカゲル又は多糖類（誘導体を含む）である請求項38～40のいずれかに記載の誘導体。

【請求項42】 担体に固定された物質が、高分子物質である請求項38～41のいずれかに記載の誘導体。

【請求項43】 高分子物質がタンパク質である請求項42に記載の誘導体。

【請求項44】 タンパク質がアビジンである請求項43に記載の誘導体。

【請求項45】 担体に固定された物質と親和性を有する物質がビオチンである請求項38～44のいずれかに記載の誘導体。

【請求項46】 担体がアビジンであり、担体と親和性を有する物質がビオチンである請求項38～40のいずれかに記載の誘導体。

【請求項47】 生理活性物質がペプチド又はタンパク質である請求項38～46のいずれかに記載の誘導体。

【請求項48】 生理活性物質が毒物である請求項47*50

*に記載の誘導体。

【請求項49】 化学修飾が、官能基を有するアミノ酸への置換である請求項47又は48に記載の誘導体。

【請求項50】 化学修飾がリンカーとの結合を容易に形成させるためのものである請求項38～49のいずれかに記載の誘導体。

【請求項51】 受容体が、イオンチャンネルである請求項38～50のいずれかに記載の誘導体。

【請求項52】 イオンチャンネルが、ナトリウムチャンネル又はカルシウムチャンネルである請求項51に記載の誘導体。

【請求項53】 生理活性物質が μ -コノトキシンである請求項48に記載の誘導体。

【請求項54】 化学修飾が、5位のトレオニンをシステインへの置換である請求項53に記載の誘導体。

【請求項55】 請求項38～54のいずれかに記載の誘導体を用いるナトリウムチャンネル又はカルシウムチャンネルの単離方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生理活性物質の受容体認識部位を保存したまま当該生理活性物質の生理活性を非活性化する方法、その非活性化誘導体、それに対する抗体、及びその利用方法に関する。また、本発明は、生理活性を保持したままの同生理活性物質の誘導体及びその利用方法に関する。より詳細には、本発明は、受容体の内部の作用部位に結合して生理活性を発現する物質において、当該生理活性物質の受容体認識部位以外の部分にリンカーを結合し、当該リンカーの他端に当該受容体に侵入することができない物質又は当該受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質を結合させることからなる生理活性物質の受容体認識部位を保存したまま当該生理活性物質を非活性化する方法、その非活性化誘導体、それに対する抗体、及びその利用方法と、当該生理活性物質の受容体認識部位以外の部分を化学修飾して、当該化学修飾部位にリンカーを結合し、当該リンカーの他端を担体に固定するか、又は当該リンカーの他端に担体に固定し得る（又は担体と親和性を有する）物質或いは担体に固定された物質と親和性を有する物質を結合させてなる、生理活性が保持された生理活性物質の誘導体、及びその利用方法に関する。

【0002】

【従来の技術】蛇、サソリ、貝などの動物が毒素をもっていることがあり、これらの毒素は神経細胞の作用を抑制して、他の動物を動けなくしたり、殺したりすることがある。これらの毒素の多くは細胞の受容体（チャンネルなどを含む）に作用することが知られている。これらの毒素に対するワクチンなども作製されているが、これらの毒素そのものに対する抗体を作製することは困難な場合が多い。なぜならば、抗体を作製するためにこれらの

毒素を動物に感作させると、多くの場合感作させられた動物が抗体を作る前に死亡することが多いからである。例えば、イモ貝より単離された μ -コノトキシンは、筋肉などの細胞のナトリウムイオンチャネルを選択的に阻害するペプチド毒であるが、このものの抗体を作製することも困難であった。

【0003】また、従来は生理活性物質の生理活性を抑制するために、生理活性部位に着目して、この部位を化学修飾などを行うことにより、その生理活性を調整することが行われてきた。例えば、前述した毒素の場合には加熱して変性させるなどして、生理活性部位を変性させることにより弱毒化することが行われてきた。しかし、生理活性部位を化学的又は物理的に変えた場合には、当該生理活性物質の生理活性自体が変更されることから、それに対する抗体を製造することはできない。

【0004】さらに、生理活性物質が作用する受容体の、作用部位の深さや、当該受容体の入口の大きさなどを計測しようとする場合には、受容体の立体構造を決定しなければならず、煩雑な操作が必要とされていた。

【発明が解決しようとする課題】本発明は、このような従来の問題点を解決するために、生理活性物質の受容体認識部位を保存したまま当該生理活性物質の生理活性を非活性化する方法、及びその非活性化誘導体、並びに化学修飾後も生理活性が保持されたままの生理活性物質の誘導体を提供するものである。また、本発明は受容体の入口の大きさや、作用部位の深さを測定するための新規な方法を提供するものでもあり、更には新しいナトリウムチャネルやカルシウムチャネルを単離する方法を提供するものでもある。

【0005】
 【課題を解決するための手段】本発明は、受容体の内部の作用部位に結合して生理活性を発現する物質において、当該生理活性物質の受容体認識部位以外の部分にリンカーを結合し、当該リンカーの他端に当該受容体に侵入することができない物質又は当該受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質を結合させることからなる生理活性物質の受容体認識部位を保存したまま当該生理活性物質を非活性化する方法、及びその非活性化誘導体、並びにそれに対する抗体及びその製造方法に関する。また、本発明は、細胞を、リンカーの一端に受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質が結合している前記した生理活性物質の非活性化誘導体で処理して、当該生理活性物質の受容体認識部位を受容体に結合し得る状態とし、次いで当該細胞系を受容体に侵入することができない物質で処理して、当該受容体の活性を測定することからなる当該受容体と生理活性物質との親和性を測定する方法、細胞を、リンカーの一端に受容体に侵入することができない物質が結合している前記した生理活性物質の非活性化誘導体で処理して、当該受容体の活性を測定することからなる当該受容体の

入口と当該生理活性物質の作用部位との距離を測定する方法、及び、細胞を、受容体の作用部位に達しない長さのリンカーの一端に受容体の入口の大きさに応じた物質が結合している前記した生理活性物質の非活性化誘導体で処理して、当該受容体の活性を測定することからなる当該受容体の入口の大きさを測定する方法などの受容体の特性を測定又は計測する方法に関する。更に、本発明は、受容体の内部の作用部位に結合して生理活性を発現する物質において、当該生理活性物質の受容体認識部位以外の部分を化学修飾して、当該化学修飾部位にリンカーを結合し、当該リンカーの他端を担体に固定するか、又は当該リンカーの他端に担体に固定し得る（又は担体と親和性を有する）物質或いは担体に固定された物質と親和性を有する物質を結合させてなる、生理活性が保持された生理活性物質の誘導体に関する。更にまた、本発明は、当該生理活性が保持された生理活性物質の誘導体を用いるナトリウムチャネル又はカルシウムチャネルの単離方法に関する。

【0006】受容体としてイオンチャネルを例にして本発明の概要を説明する。図1は、細胞膜2に貫通して設けられているイオンチャネル1に、生理活性物質4、この例では毒物として作用する生理活性物質4がイオンチャネル1の作用部位3に結合している状態を模式的に示すものである。生理活性物質3の受容体認識部位5が、当該生理活性物質に対するイオンチャネル1の作用部位3に結合することにより、イオンチャネル1が塞がれイオンが細胞内に入ってこれなくなり、その結果細胞に異常が生じることになる。

【0007】図2は本発明のひとつの態様を示したものである。生理活性物質4はリンカー6により、受容体に侵入することができない物質7に結合しており、リンカー6の長さが十分でないために生理活性物質4の受容体認識部位5と、イオンチャネル1の作用部位3とが結合することができず、その結果生理活性物質4によりイオンチャネル1を塞ぐことができず、イオンはイオンチャネル1を自由に通過することができる。その結果、生理活性物質4は受容体認識部位5をその活性な化学構造を保持しているにもかかわらず、イオンチャネル1に対する活性が非活性化されることになる。

【0008】図3は本発明の他のひとつの態様を示したものである。生理活性物質4はリンカー6により、受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質8に結合しており、この物質8は受容体に侵入することができない物質7に親和力により結合している。そして、前記した図2の場合と同様に、リンカー6の長さが十分でないために生理活性物質4の受容体認識部位5と、イオンチャネル1の作用部位3とが結合することができず、その結果生理活性物質4によりイオンチャネル1を塞ぐことができず、イオンはイオンチャネル1を自由に通過することができる。その結果、生理活性物質4

は受容体認識部位5をその活性化化学構造を保持しているにもかかわらず、イオンチャンネル1に対する活性が非活性化されることになる。なお、図2及び図3において、リンカーが十分に長い場合(例えば、後記化合物6の場合等)には当然のことながら、活性阻害はなく、本来の活性を示す。

【0009】次に、本発明を生理活性物質としてイモ貝より単離された μ -コノトキシンにより、より具体的に説明する。ペプチド毒である μ -コノトキシンは、ナトリウムチャンネルのサイト1に作用する毒物として、テトロドトキシンやサキシトキシンなどと同種の毒物であることが知られている。 μ -コノトキシンのアミノ酸配列とその立体構造の概要を図4に示す。図4は、 μ -コノトキシンGIIIAを示し、このものは1位のアルギニンから22位アラニンまでの22個のアミノ酸からなるものである。3位のシステインと15位のシステイン、4位のシステインと20位のシステイン、及び10位のシステインと21位のシステインが、各々S-S結合により結合している。 μ -コノトキシンGIIIAの活性中心は13位のアルギニン付近である。

【0010】 μ -コノトキシンGIIIAの各アミノ酸の生理活性に与える影響を各アミノ酸をアラニン又はリジンに代えることにより調べた結果を図5に示す。図5の縦軸はラット横隔膜標本の電気刺激による収縮を50%阻害する濃度(IC_{50} ($\log(M)$))を示し、点線は天然の μ -コノトキシンGIIIAの IC_{50} を示している。図5の横軸は1位から22位までのアミノ酸を示し、図5の黒塗りは該当部位のアミノ酸をアラニンに置換した場合の IC_{50} を示し、灰色は該当部位のアミノ酸をリジンに置換した場合の IC_{50} を示している。図5によれば、例えば13位のアルギニンをアラニンやリジンに代えると IC_{50} が上昇し、即ち活性が無くなる、即ち13位のアルギニンは μ -コノトキシンGIIIAの生理活性に必須の部分形成していると考えられる。一方、5位のトレオニンや9位のリジンは、これをアラニンに代えても IC_{50} に変化がみられず、これはこの部位は μ -コノトキシンGIIIAの生理活性に影響を与えない部位であると考えられる。

【0011】本発明者らは、13位の活性部位、即ち受容体認識部位の立体的にほぼ反対側に相当する5位のトレオニンに着目した。5位のトレオニンの部位は、立体的に受容体認識部位の背面に相当し、かつ生理活性に影響を与えない部分である。本発明者らは、この5位のトレオニンの部位にリンカーを導入するために、官能基を有するアミノ酸で置換した。本実験においては、官能基を有するアミノ酸としてシステイン又はリジンを採用した。 μ -コノトキシンGIIIAは8位、9位などにリジンを有しており、このリジンのアミノ基との化学反応性を明確にするために、官能基を有するアミノ酸としては、メルカプト基を有するシステインが好ましい。

【0012】天然の μ -コノトキシンGIIIA(μ GIIIA)、5位のトレオニンをS-メチルベンジルシステインで置換した μ -コノトキシンGIIIA(Cys(MeBzl)5)、及び5位をN-ビオチン化リジンで置換した μ -コノトキシンGIIIA(Lys(Biot)5)について、ラット骨格筋の収縮について試験をした。結果を図6に示す。図6は骨格筋収縮実験の結果を示す図面に代わる写真である。図6の縦軸は骨格筋の張力(mN(ミリニュートン))を示し、黒い部分が大きいことはナトリウムイオンチャンネルが正常な状態であった、骨格筋が十分な張力を有していることを示している。図6の横軸は時間(分)である。図6の上段は、天然の μ -コノトキシンGIIIAを0.3 μ M添加したときの張力の推移を示している。 μ -コノトキシンGIIIAの添加により張力が急速に低下し、骨格筋に異常が生じていることを示している。張力が無くなった後、これを水洗(wash)(図6中の白抜きの矢印)すると、添加された μ -コノトキシンGIIIAが洗い流され張力が回復してくることがわかる。このときの0.3 μ Mの阻害率は99%であった。

【0013】図6の中段は、5位をS-メチルベンジルシステインで置換した μ -コノトキシンGIIIA(Cys(MeBzl)5)を0.3 μ M添加し、さらに1 μ M添加したときをしめしている。張力が無くなることから、このものも天然のものと同様の生理活性を有していることがわかる。水洗(図6中の白抜きの矢印)により天然のものと同様に張力の回復が見られる。このときの0.3 μ Mの阻害率は47%であった。図6の下段は、5位をN-ビオチン化リジンで置換した μ -コノトキシンGIIIA(Lys(Biot)5)を0.3 μ M添加し、さらに1 μ M添加したときを示している。張力が無くなることから、このものも天然のものと同様の生理活性を有していることがわかる。水洗(図6中の白抜きの矢印)により天然のものと同様に張力の回復が見られる。このときの0.3 μ Mの阻害率は62%であった。

【0014】このように生理活性物質の受容体認識部位以外の部分を簡単な化学修飾してみても、当該生理活性物質の生理活性を非活性化することはできない。これはそもそも生理活性物質の受容体認識部位以外の部分はその生理活性に大きな寄与をしていないからである。次に、本発明者らは、ビオチンに対して親和性を有しているアビジンをを用いて、前記の5位をN-ビオチン化リジンで置換した μ -コノトキシンGIIIA(Lys(Biot)5)についての実験を行った。結果を図7に示す。図7は骨格筋収縮実験の結果を示す図面に代わる写真である。図7の縦軸及び横軸は図6のそれと同様である。図7のa(図7最上段)は、Lys(Biot)5とアビジン(Av)を同時に添加した場合を示す。最初1 μ Mを添加したが骨格筋収縮の異常は観測できなかった。次いでその濃度を3 μ M、10 μ Mと上げていって

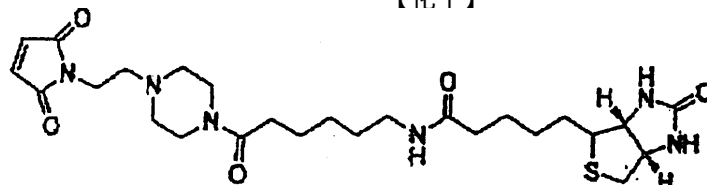
もμ-コノトキシンGIIIAによる生理活性を観測することはできなかった。図6の下段に示される実験においてはLys(Biot)5は0.3μMで62%の阻害率を示し、1μMで天然のμ-コノトキシンGIIIAとほぼ同程度の阻害を示したが、これにアビジンを存在させることにより、10μMの濃度においても非活性化できることが分かった。

【0015】次に先にアビジン(Av)を1μM添加しておき、次いでLys(Biot)5を1μM、3μMと添加して行った場合の結果を図7のb(図7上から2段目)に示す。この結果、先にアビジンを添加していても、Lys(Biot)5の活性が発現しないことがわかった。図7のbの右端、図7cの右端及び図のdは比較のために天然のμ-コノトキシンGIIIAを添加した場合の結果を示している。図7のbの右端の結果から、天然のμ-コノトキシンGIIIAの場合には、アビジンが存在していてもその生理活性に影響はほとんど無く、アビジンが存在しない場合とほぼ同程度の生理活性が発現することが分かる。さらに、図7のc(図7の上から3段目)は、まずLys(Biot)5を1μM添加した場合の結果を示す。Lys(Biot)5の添加による骨格筋の収縮の阻害が観察される。次いで、その系にアビジン0.5μM、1μMを添加してゆくと、Lys(Biot)5による骨格筋収縮の阻害が徐々に無くなり、骨格筋収縮が正常化してくることがわかった。正常化したところに天然のμ-コノトキシンGIIIAを添加すると、骨格筋収縮の阻害がみられた(図7のcの右端)。

*【0016】以上の実験結果から、5位をN-ビオチン化リジンで置換したμ-コノトキシンGIIIA(Lys(Biot)5)は天然のものと同様な骨格筋収縮の阻害作用を有しているが、これにLys(Biot)5の添加と同時に、添加前、又は添加後にビオチンに親和性を有するアビジンを添加すると、その阻害活性が非活性化されることがわかった。そして、μ-コノトキシンGIIIAは、細胞のナトリウムチャンネルのサイト1に作用することが知られており、これは当該チャンネルの中程であることから、天然のものと同様な生理活性を有する5位をN-ビオチン化リジンで置換したμ-コノトキシンGIIIA(Lys(Biot)5)は化学修飾されていても、天然のものと同様にナトリウムチャンネルの作用部位に結合して骨格筋収縮を阻害するが、これにアビジンを添加した場合には、Lys(Biot)5のビオチン部分がアビジンに優先的に結合し、もはやナトリウムチャンネルに結合することができなくなったことを意味している。そして、アビジンは分子量約6万5千の巨大なタンパク質であり、ナトリウムチャンネルのような小さなチャンネルの中には侵入できない分子種であるから、丁度チャンネルの外側から生理活性物質μ-コノトキシンGIIIAを化学修飾されたビオチンにより釣り上げたものと考えられる。

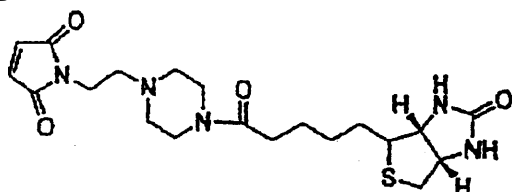
【0017】さらに、5位のトレオニンシステインで置換したμ-コノトキシンGIIIA(Cys-5)のメルカプト基の部分に、次式(I)、

【0018】
【化1】



【0019】で示されるビオチン化PEAC5を結合させた非活性化誘導体A(ビオチンPEAC5マレイミド)、及び、5位のトレオニンシステインで置換したμ-コノトキシンGIIIA(Cys-5)のメルカプト基の部分に、次式(II)、

【0020】
【化2】



【0021】で示されるビオチン化PEを結合させた非活性化誘導体B(ビオチンPEマレイミド)を用いて同

様の実験を行った。結果を図8に示す。図8は骨格筋収縮実験の結果を示す図面に代わる写真である。図8の縦軸及び横軸は図6のそれと同様である。非活性化誘導体A(ビオチンPEAC5マレイミド)は、少し長めのリンカーを用いた例であり、非活性化誘導体B(ビオチンPEマレイミド)は短めのリンカーを用いた例である。図8のa(図8の最上段)は、まず非活性化誘導体A(ビオチンPEAC5マレイミド)を1μM添加し、骨格筋の収縮が阻害されたときにアビジン(Av)を1μM添加した場合を示している。アビジンの添加により徐々に収縮の阻害が緩和されてきているが、その程度は比較的弱い。図8のb(図8の上から2段目)は、非活性化誘導体A(ビオチンPEAC5マレイミド)を1μMとアビジンとを同時に添加した場合を示している。アビジンの存在にもかかわらず、骨格筋の収縮阻害活性が少

しずつでてきているようすがわかる。図8のc(図8の上から3段目)は、まず非活性化誘導体B(ピオチンPEマレイミド)を $1\mu\text{M}$ 、次いで $3\mu\text{M}$ 添加し、骨格筋の収縮が阻害されたときにアビジン(Av)を $1\mu\text{M}$ 添加した場合を示している。アビジンの添加により比較的早く緩和されてきていることがわかる。

【0022】非活性化誘導体A(ピオチンPEAC5マレイミド)に使用されているピオチン-リンカーでは、リンカー部の長さが比較的長くピオチンがチャンネルの入口付近にまで達していることにより、アビジンを添加しても釣り上げられる距離が少なく、生理活性物質とチャンネルとの解離が充分に行えない結果、アビジンの添加によっても急速な骨格筋収縮の回復が観測できなかつたと考えられる。一方、非活性化誘導体B(ピオチンPEマレイミド)の場合には、リンカー部の長さが比較的短く、アビジンの添加により大きく釣り上げられ、その結果図7に示した場合と同様に急速な骨格筋収縮の回復が観測できたと考えられる。

【0023】これらの実験の結果は、先程の図3に示される状態であると考えられる。即ち、生理活性物質である μ -コノトキシンGIIIA(図3の(4))のリンカー(6)を介してピオチン(8)が結合されている。そして、アビジン(7)が無い場合には μ -コノトキシンGIIIA(4)の受容体認識部位(5)とナトリウムチャンネル(1)の作用部位(3)が結合しており、ナトリウムイオンの細胞内への流入が阻害され、その結果骨格筋の収縮が阻害されることになる。本発明の化学修飾は受容体認識部位以外の部分においておこなわれることを特徴とするものであるから、本発明の化学修飾が行われてもその生理活性に大きな影響が無いのは当然のことである。このことは、図6の下段に示す実験や、図7のcの前半の実験の結果からも明らかである。この系にアビジン(7)が存在してくると、アビジン(7)は分子が大きいのでチャンネル(1)の内部には侵入することができなくて、図3に示されるようにチャンネル(1)の外側に存在することになる。そして、ピオチン(8)とアビジン(7)の親和性によりピオチン部分を有するLys(Biot)5全体がアビジン(7)に釣り上げられたような格好になる。その結果、チャンネル(1)と生理活性物質(4)との結合が解かれ、チャンネル(1)は正常な作用をすることができるようになる。

【0024】さらに、このことは、ピオチンとリンカーの長さが、チャンネルの入口から作用部位までの距離よりも短いことを示している。なぜならば、仮にリンカーとピオチンの長さがチャンネルの入口から作用部位の距離よりも長いのであるならば、ピオチンはチャンネルの外側にできることができ、アビジンとの結合においては生理活性物質を動かすことなくチャンネルの外側で自由にできるからである。その結果、アビジンとピオチンが結合しても生理活性に影響は生じないことになるからである。この

ことは、リンカーの長さを変えてその生理活性を測定することにより、生理活性に変化が生じないリンカーの最少の長さが、受容体の入口と作用部位の距離であるということを示している。したがって、この方法により、受容体において生理活性物質が作用している部位と当該受容体の入口の距離を、本発明の非活性化誘導体のリンカーの長さにより測定することができる。

【0025】また、Lys(Biot)5全体がアビジンに釣り上げられるということは、アビジンが受容体の中に侵入できない大きさであることを示している。なぜならば、仮にアビジンが受容体の中に侵入できる大きさであったならば、ピオチンと結合するためにアビジンのほうが受容体内に入り込み、生理活性物質と受容体との結合に変更が生じない結果、生理活性にも影響が生じないことになるからである。このことは、本発明の非活性化誘導体における受容体に侵入することができない物質として、大きさの分かっている種々の物質を用いて生理活性物質の生理活性を測定することにより、当該生理活性に変更が生じる大きさの物質が、当該受容体の入口の大きさにほぼ匹敵するということになる。したがって、この方法により目的の受容体の入口の大きさを測定することができることになる。

【0026】さらに、受容体の作用部位に生理活性物質が結合していたものが、ピオチンとアビジンとの親和力により解離させられるということから、受容体と生理活性物質との結合力よりもピオチンとアビジンの親和力のほうが大きいことがわかる。このことは、本発明の「受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質」と「受容体に侵入することができない物質」との組み合わせをその親和力が既知の種々のものに変更することにより、受容体と生理活性物質との結合力を測定することができることを示している。したがって、本発明のこの方法により受容体と生理活性物質との結合力を測定することが可能となる。

【0027】

【発明の実施の形態】本発明は、受容体の内部に入ってその生理活性を発現する生理活性物質における、化学修飾に関するものであるが、当該化学修飾を生理活性部位ではなく、生理的に非活性の部分から行うことを特徴とするものである。特に、生理活性中心の立体的な背面に相当する部分の生理的に非活性な箇所を化学修飾することを特徴とし、かつその部分に釣り糸の如きリンカーを結合し、更に当該リンカーの他端に当該受容体に侵入することができない物質又は当該受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質を結合させることを特徴とするものである。本発明は、このような化学修飾を行うことにより、生理活性中心をそのままの形で保存しながらも、生理的に非活性にすることができることを見出したものである。しかも、このような化学修飾により、生理活性物質の受容体に対する親和力と、立体的な

障害や化学修飾部分の親和力との関係を測定することができる新規なツールを提供するものである。

【0028】本発明の受容体としては、いわゆる受容体に限定されるものではなく、レセプター（受容体）、イオンチャンネル、トランスポーター、ポンプなどの孔を形成するものであればよい。ナトリウムチャンネル、カルシウムチャンネル、アミノ酸トランスポーター、セレトニントランスポーターなどのイオンチャンネルやトランスポーターなどは、細胞膜を貫通する孔を有しており本発明の受容体として好ましいものである。本発明の生理活性物質としては、前記受容体の内部に入ってその生理活性を

発現するもので、生理活性中心の背面に化学修飾ができる部位を有するものであればよい。分子量が余り小さいと化学修飾可能な部分が無いので好ましくない。受容体の内部にすっぽり入ってゆけて、かつ生理的に非活性な部分を有するものであればよい。本発明の生理活性物質は、前記受容体の中に入って作用して細胞に生理的な影響を与えるものであればよく、生理的作用を亢進するものであってもよいし、阻害するものであってもよい。生体内生理活性物質であってもよいし、医薬品のような物質であってもよいし、毒物となる物質であってもよい。また、タンパク質性の物質であっても、非タンパク質性の物質であってもよい。

【0029】本発明のリンカーとしては、分子の一端に生理活性物質又は化学修飾された生理活性物質と化学結合し得る官能基を有し、他端に「受容体に侵入することができない物質」又は「受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質」と化学結合し得る官能基を有するものであって、両端の官能基の間に生理的に非活性の部分

を有する化合物が好ましい。例えば、前記した一般式(I)や一般式(II)で示されるもの、或いは後記実施例5及び実施例6で得られた化合物に含まれるリンカー等が好ましいものとして挙げられる。両端の官能基の間の部分としては、非活性化誘導体の場合には、例えば炭素数1~30、また、生理活性が保持された誘導体の場合には、例えば炭素数20~50の鎖状基を有する基が挙げられる。なお、当該鎖状のなかの炭素原子の一部又は全部が酸素原子、窒素原子、イオウ原子などの異種原子によって置換されていてもよく、また、当該鎖状のなかに環を有していてもよい。このような環としては、炭素環であつてもよいし、酸素原子、窒素原子、イオウ原子などの異種原子を有する複素環であつてもよい。

【0030】本発明の受容体に侵入することができない物質としては、受容体の入口の大きさよりも大きな分子で受容体の内部に侵入できないものであればよい。当該物質がリンカーに直接結合する場合には、前記リンカー分子に化学結合し得る官能基を有する分子である。また、当該物質がリンカーに直接結合しない場合には、リンカーに直接結合する物質と親和性がある物質である。当該

物質は必要に応じて、放射性元素や蛍光物質などで標識化することもできる。

【0031】本発明の受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質としては、前記した「受容体に侵入することができない物質」と親和性を有し、リンカーに化学結合し得る官能基を有するものが好ましい。親和性としては特に制限はないが、化学親和力でも物理的な親和力であってもよいが、当該親和力を細胞系と同様な環境下で測定可能なものが好ましい。

【0032】本発明の生理活性物質の非活性化誘導体は、生理活性部分を天然物と同じ形態で保持して、しかも生理的に非活性化されたものであることから、特に毒物の無毒化抗原として有用なものである。本発明の抗体を製造する方法としては、通常の抗体の製造方法に従って製造することができる。生理活性物質が毒物であっても、本発明の非活性化誘導体は無毒化されていることから、そのまま感作動物に投与することができる。本発明の生理活性物質の非活性化誘導体をラット、マウスなどの動物に投与して、感作し、抗体を含有する細胞を取り出し、これを常法にしたがって抗体を製造することができる。例えば、細胞融合法や抗体の遺伝子をクローニングしてキメラ抗体やヒト化抗体とするなどの方法を採用することができる。

【0033】一方、本発明において、生理活性物質の受容体認識部位以外の部分を化学修飾して、当該化学修飾部位にリンカーを結合し、当該リンカーの他端を担体に固定する場合の担体としては、例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ガラスビーズ、シリカゲル、多糖類（誘導体を含む）等が挙げられる。また、リンカーの他端に結合させた物質と親和性を有する物質としては、例えばアビジン等が挙げられる。なお、アビジンはそれ自体を担体とすることも可能である。アビジンを担体とした場合、若しくはアビジンを担体に固定させた場合には、リンカーの他端に結合させる物質はビオチンとなる。リンカーが十分に長い本発明化合物（例えば、後記化合物6等）は、例えばこれをアビジンカラムと使用することにより、新しいナトリウムチャンネルやカルシウムチャンネルを単離することが可能となる。また、リンカーが長く、活性を保持したままの本発明化合物（ビオチンアナログ）をアビジンと複合させて分子量を大きくさせると、感度が上がり、例えば極低温電子顕微鏡等を用いて、ナトリウムチャンネル上での結合部位を明らかにすることが出来る（毒そのものでは、分子が小さすぎて電子顕微鏡などで観察しにくい。）。従って、リンカーが長く、活性を保持したままの本発明化合物は、生物学的にも利用価値の高いアナログとすることが出来る。

【0034】

【実施例】次に実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの具体例に限定されるものでは

ない。

【0035】実施例1 Cys(MeBzl)5- μ -コノトキシンの製造

脱離が可能な保護基を有するアミノ酸、Arg(Pmc)、Asp(OtBu)、Cys(Trt)、Gln(Trt)、Lys(Boc)、Ser(t-Bu)、Thr(tBu)、Hyp(tBu)ならびにMeBzlCysを有する保護ペプチドをFMOC法を用いた固相合成によって調製した。保護ペプチドは、樹脂をTFA-チオアニソール-H₂O-フェノール-EDTによって氷冷下5分間、室温1.5時間攪拌することによって樹脂からはずし、エーテルで樹脂とともに沈殿させ、濾過後、2M酢酸で溶出した。樹脂を水で洗浄し、この洗液を先の酢酸溶液に加え、アンモニア水にてpHを7.8とした。この粗ペプチド(0.5mM, 0.2M酢酸アンモニウム溶液)を1-2日間攪拌し、空気酸化した。凍結乾燥後、30%酢酸によるセファデックスG-50Fカラム、CM-セルロースCM-52によるイオン交換(酢酸アンモニウム0.01M~0.7M)クロマト、ならびにODS-HPLC(0.1%TFA-アセトニトリル)によって精製し、収率4.7%で合成した。結果のHPLCならびにMALDI-TOFマスを図9に示す。

【0036】実施例2 Lys(Biot)5- μ -コノトキシンの製造

脱離が可能な保護基を有するアミノ酸、Arg(Pmc)、Asp(OtBu)、Cys(Trt)、Gln(Trt)、Lys(Boc)、Ser(t-Bu)、Thr(tBu)、Hyp(tBu)、ならびにLys(Biot)を使い、5位にLys(Biot)を有する保護ペプチドをFMOC法を用いた固相合成機によって調製した。保護ペプチドは、樹脂をTFA-チオアニソール-H₂O-フェノール-EDTによって氷冷下5分間、室温1.5時間攪拌することによって樹脂からはずし、エーテルで樹脂とともに沈殿させ、濾過後、2M酢酸で溶出した。樹脂を水で洗浄し、この洗液を先の酢酸溶液に加え、アンモニア水にてpHを7.8とした。この粗ペプチド(0.5mM, 0.2M酢酸アンモニウム溶液)を1-2日間攪拌し、空気酸化した。凍結乾燥後、30%酢酸によるセファデックスG-50Fカラム、CM-セルロースCM-52によるイオン交換(酢酸アンモニウム0.01M~0.7M)クロマト、ならびにODS-HPLC(0.1%TFA-アセトニトリル)によって精製し、収率6.0%で合成した。結果のHPLCならびにMALDI-TOFマスを図10に示す。

【0037】実施例3 S-ピオチンPEAC5システイン-5- μ -コノトキシンの製造

(1) [Cys(MeBzl)5]- μ -コノトキシンをHFに溶解し0にて1時間反応した。HFを除去後、水に溶解してエーテルにて洗浄し、凍結乾燥した。*

*生成物をODS-HPLC(0.1%TFA-9%アセトニトリル)にて精製し、[Cys5]- μ -コノトキシンを65%の収率で合成した。結果のHPLCならびにMALDI-TOFマスを図11に示す。(2) [Cys5]- μ -コノトキシンを0.02M酢酸アンモニウム溶液中、ピオチンPEAC5マレイミドと30秒間反応させ、セファデックスG25Fによるゲル濾過(0.02M酢酸アンモニウム)にて精製し、凍結乾燥した。結果のMALDI-TOFマスを図12に示す。

【0038】実施例4 S-ピオチンPE5システイン-5- μ -コノトキシンの製造

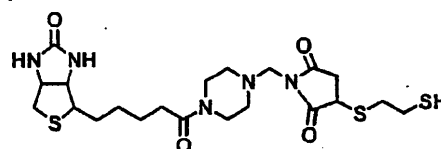
[Cys5]- μ -コノトキシンを0.02M酢酸アンモニウム溶液中ピオチンPEマレイミドと30秒間反応させ、セファデックスG25Fによるゲル濾過(0.02M酢酸アンモニウム)にて精製し、凍結乾燥した。結果のMALDI-TOFマスを図13に示す。

【0039】実施例5 PE-EDT-BM(PEO)₄ [Cys5]- μ -コノトキシンの製造

(1) ピオチンPEマレイミド(3.4mg)を0.02M酢酸アンモニウム溶液(pH4.0, 1ml)に溶解し、エタンジチオール(20 μ l)を含有する0.02M酢酸アンモニウム溶液(pH4.0, 500 μ l)中に滴下し、30分攪拌した。反応後、ジエチルエーテル(1ml \times 5)でエタンジチオールを除き、凍結乾燥した。これをRP-HPLCで精製した後、再度凍結乾燥して、下式

【0040】

【化3】

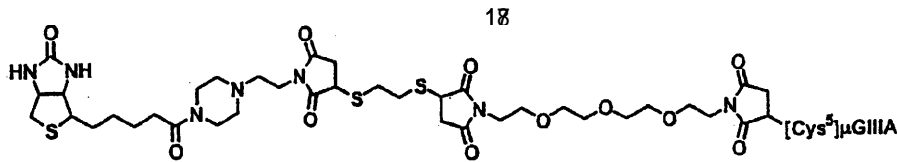


【0041】で示される化合物(PE-EDT)を得た。得られた化合物の質量スペクトルチャートを図14に示す。

(2) 5mMのBM(PEO)₄(20 μ l)を含有する0.02M酢酸アンモニウム(pH4.0)溶液に、[Cys5]- μ -コノトキシンの(0.1 μ mol)を0.02MアンモニウムpH4.0(30 μ l)に溶解した溶液を加え、10分間攪拌した。これに6mMの上記(1)で得られた化合物(50 μ l)を加え、30分間攪拌した。この溶液をそのままRP-HPLCで精製し、凍結乾燥して、下式

【0042】

【化4】



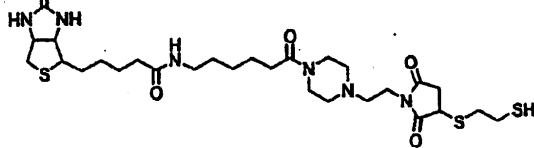
【0043】で示される化合物を得た。得られた化合物の質量スペクトルチャートを図15に示す。

【0044】実施例6 PEAC-EDT-BM(PEO)₄化[Cys5]-μ-コノトキシシ(化合物6)の製造

(1) ピオチンPEAC5マレイミド(4.2mg)を0.02M酢酸アンモニウム溶液(pH4.0、1ml)に溶解し、エタンジチオール(20μl)を含有する0.02M酢酸アンモニウム溶液(pH4.0、500μl)に滴下し、30分間攪拌した。反応後、ジエチルエーテル(1ml×5)でエタンジチオールを除き、凍結乾燥した。これをRP-HPLCで精製した後、再度凍結乾燥して、下式

【0045】

【化5】



【0048】で示される化合物を得た。得られた化合物の質量スペクトルチャートを図17に示す。

【0049】また、図18に、化合物5及び化合物6について行った骨格筋収縮実験の結果を示す図面に代わる写真を示す。図18の縦軸及び横軸は図6のそれと同様である。図18の最上段は、まずPE-EDT-BM(PEO)₄化[Cys5]-μ-コノトキシシ(化合物5)を1μM、次いで3μM添加し、骨格筋の収縮が阻害されたときにアビジン(Av)を3μM添加した場合を示している。アビジンの添加により収縮の阻害が緩和されている。図18の上から2段目は、まずPE-EDT-BM(PEO)₄化[Cys5]-μ-コノトキシシ(化合物5)を1μM、次いで3μM添加し、次いで3μM添加した場合を示している。アビジンの場合と同様アビジンの添加により収縮の阻害が緩和されていることが判る。図18の上から3段目は、まずPEAC-EDT-

*【0046】で示される化合物(PEAC-EDT)を得た。得られた化合物の質量スペクトルチャートを図16に示す。

(2) 5mMのBM(PEO)₄(20μl)を含有する0.02M酢酸アンモニウム溶液(pH4.0)に、[Cys5]-μ-コノトキシシ(0.1μmol)を0.02M酢酸アンモニウム溶液(pH4.0、30μl)に溶かした溶液を加え、10分間攪拌した。これに6mMの上記(1)で得た化合物(50μl)を加え、30分間攪拌した。この溶液をそのままRP-HPLCで精製し、凍結乾燥して、下式

【0047】

【化6】

BM(PEO)₄化[Cys5]-μ-コノトキシシ(化合物6)を1μM、次いで3μM添加し、骨格筋の収縮が阻害されたときにストレプトアビジン(StAv)を3μM添加した場合を示している。この場合も最上段及び2段目と同様、ストレプトアビジンの添加により収縮の阻害が緩和されている。図18の最下段は、PEAC-EDT-BM(PEO)₄化[Cys5]-μ-コノトキシシ(化合物6)を1μM添加し、骨格筋の収縮が阻害されたときにアビジン(Av)を1μM添加した場合を示しているが、この場合にはアビジンを添加しても収縮の阻害が緩和されない、即ち、μ-コノトキシシの骨格筋収縮に対する阻害活性がそのまま保持されていることが判る。

【0050】試験例1 ラット骨格筋の収縮試験

ラットの横隔膜を摘出後、適当な大きさに裁断してリンガー液中に懸垂する。この筋標本の電気刺激によって生じる張力を電氣的に測定した。サンプルを水に溶解し、

この標本に加えその際生じる張力の減少を測定した。また、リンガー液を代えることあるいはさらに薬物を添加することによって薬物の影響からの回復する過程を記録した。

【0051】試験例2 骨格筋収縮に対する阻害活性 (IC₅₀)の測定

天然のμ-コノトキシンGIIIA、5位のトレオニン*

*システインで置換したμ-コノトキシンGIIIA及びμ-コノトキシンGIIIAの各種ピオチンアナログについて、電気刺激に対する骨格筋収縮における阻害活性の程度を測定した。結果を表1に示す。

【0052】

【表1】

化合物	阻害活性 IC ₅₀ , μM	IC ₅₀ (アナログ)
		IC ₅₀ (天然のGIIIA)
天然のGIIIA	0.10	1
[Cys5]GIIIA	1.9	1.9
化合物2	0.59	5.9
+Av	>3.0	>3.0
化合物4	2.18	21.8
+Av	>3.0	>3.0
化合物3	1.00	10.0
+Av	>3.0	>3.0
+StAv	>3.0	>3.0
化合物5	2.14	21.4
+Av	>3.0	>3.0
+StAv	>3.0	>3.0
化合物6	1.11	11.1
+Av	1.64	16.4
+StAv	>3.0	>3.0

[Cys5]GIIIA : 5位のトレオニンをシステインで置換したμ-コノト

キシシンGIIIA

Av : アビジン、 StAv : ストレプトアビジン

【0053】

【発明の効果】本発明は、生理活性物質の生理的に非活性な部分、好ましくは生理活性部分の立体的に裏側の部分を化学修飾し、これにリンカー部及び立体的に大きな分子を結合させることにより、生理活性部分をそのまま保持した生理的に非活性な誘導体と、生理活性を保持したままの誘導体とを提供するものである。また、本発明は生理活性物質の新規な非活性化方法と、生理活性物質の非活性化誘導体に対する抗体を提供するものである。本発明の非活性化誘導体は生理活性中心がそのまま保持されていることから、毒物であっても抗体の製造が容易となるばかりでなく、当該生理活性物質の受容体の構造解析をするための新規な方法をも提供するものである。また、リンカーが長く、活性を保持したままの本発明化合物を用いることにより、新しいナトリウムチャンネルやカルシウムチャンネルの単離も可能である。更に、リンカーが長く、活性を保持したままの本発明化合物を用いる

ことにより、例えば極低温電子顕微鏡等を用いて、ナトリウムチャンネル上での結合部位を明らかにすることが出来る

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、生理活性物質と受容体との関係を模式的に示したものである。

【図2】図2は、本発明の非活性化誘導体と受容体との関係を模式的に示したものである。

【図3】図3は、本発明の別の態様の非活性化誘導体と受容体との関係を模式的に示したものである。

【図4】図4は、μ-コノトキシンGIIIAのアミノ酸配列及びその立体構造を模式的に示したものである。

【図5】図5は、μ-コノトキシンGIIIAの各位のアミノ酸をアラニン又はリジンに置換した場合のIC₅₀をグラフ化したものである。黒塗りはアラニンに置換した場合を、灰色はリジンに置換した場合を、NTは試験していない場合を示す。

40

50

【図6】図6は、 μ -コノトキシンGIIIA (μ GIIIA) (図6の上段)、5位のトレオニンをS-メチルベンジルシステインで置換した μ -コノトキシンGIIIA (Cys(MeBzl)5) (図6の中段)、及び5位をN-ピオチン化リジンで置換した μ -コノトキシンGIIIA (Lys(Biot)5) (図6の下段)について、ラット骨格筋の骨格筋収縮実験の結果を示す図面に代わる写真である。図6の縦軸は骨格筋の張力(mN(ミリニュートン))を示し、図6の横軸は時間(分)である。

【図7】図7は、Lys(Biot)5とアビジン(Av)を同時に添加した場合(図7最上段)、先にアビジン(Av)を添加し、次いでLys(Biot)5を添加した場合(図7上から2段目)、まずLys(Biot)5を添加し、次いで、その系にアビジンを添加した場合(図7の上から3段目)、 μ -コノトキシンGIIIA (μ GIIIA)のみの場合(図7の最下段)について、ラット骨格筋の骨格筋収縮実験の結果を示す図面に代わる写真である。図7の縦軸は骨格筋の張力(mN(ミリニュートン))を示し、図7の横軸は時間(分)である。

【図8】図8は、まず非活性化誘導体A(ピオチンPEAC5マレイミド)を添加し、次いでアビジン(Av)を添加した場合(図8の最上段)、非活性化誘導体A(ピオチンPEAC5マレイミド)とアビジンとを同時に添加した場合(図8の上から2段目)、及び非活性化誘導体B(ピオチンPEマレイミド)を添加し、次いでアビジン(Av)を添加した場合(図8の上から3段目)について、ラット骨格筋の骨格筋収縮実験の結果を示す図面に代わる写真である。図8の縦軸は骨格筋の張力(mN(ミリニュートン))を示し、図8の横軸は時間(分)である。

【図9】図9は、[Cys(MeBzl)5]- μ -コノトキシンのHPLC(左)とMALDI-TOFマス(右)のチャートを示す。

【図10】図10は、[Lys(Biot)5]- μ -コノトキシンのHPLC(左)とMALDI-TOFマス(右)のチャートを示す。

【図11】図11は、[Cys5]- μ -コノトキシンのHPLC(左)とMALDI-TOFマス(右)のチャートを示す。

【図12】図12は、ピオチンPEAC5マレイミド化

[Cys5]- μ -コノトキシンのMALDI-TOFマスのチャートを示す。

【図13】図13は、ピオチンPEマレイミド[Cys5]- μ -コノトキシンのMALDI-TOFマスのチャートを示す。

【図14】図14は、PE-EDTの質量スペクトルチャートを示す。

【図15】図15は、PE-EDT-BM(PEO)₄化[Cys5]- μ -コノトキシンの質量スペクトルチャートを示す。

【図16】図16は、PEAC-EDTの質量スペクトルチャートを示す。

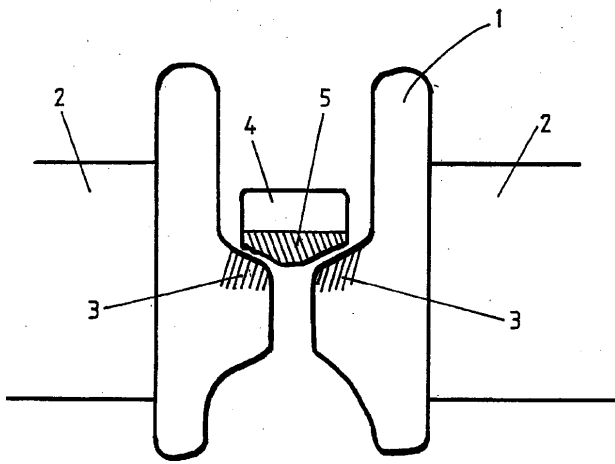
【図17】図17は、PEAC-EDT-BM(PEO)₄化[Cys5]- μ -コノトキシンの質量スペクトルチャートを示す。

【図18】図18は、まずPE-EDT-BM(PEO)₄化[Cys5]- μ -コノトキシン(化合物5)を添加し、次いでアビジン(Av)を添加した場合(図18の最上段)、まずPE-EDT-BM(PEO)₄化[Cys5]- μ -コノトキシン(化合物5)を添加し、次いでストレプトアビジン(StAv)を添加した場合(図18の上から2段目)、まずPEAC-EDT-BM(PEO)₄化[Cys5]- μ -コノトキシン(化合物6)を添加し、次いでストレプトアビジン(StAv)アビジン(Av)を添加した場合(図18の上から3段目)、及び、まずPEAC-EDT-BM(PEO)₄化[Cys5]- μ -コノトキシン(化合物6)を添加し、次いでアビジン(Av)を添加した場合(図18の最下段)について、ラット骨格筋の骨格筋収縮実験の結果を示す図面に代わる写真である。図8の縦軸は骨格筋の張力(mN(ミリニュートン))を示し、図8の横軸は時間(分)である。

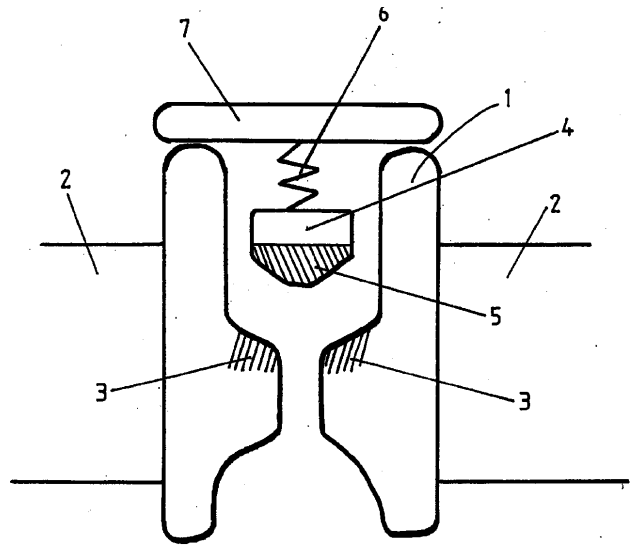
【符号の説明】

- 1 受容体
- 2 細胞膜
- 3 受容体の作用部位
- 4 生理活性物質
- 5 生理活性物質の受容体認識部位
- 6 リンカー
- 7 受容体に侵入することができない物質
- 8 受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質

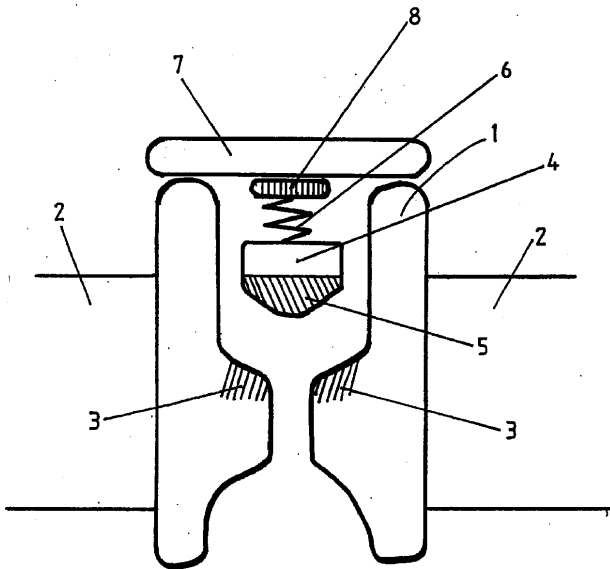
【図1】



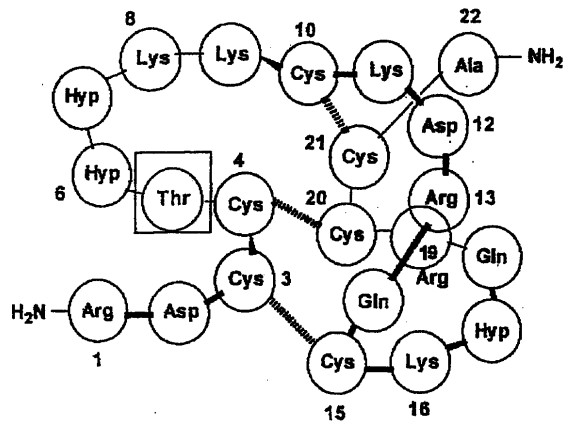
【図2】



【図3】

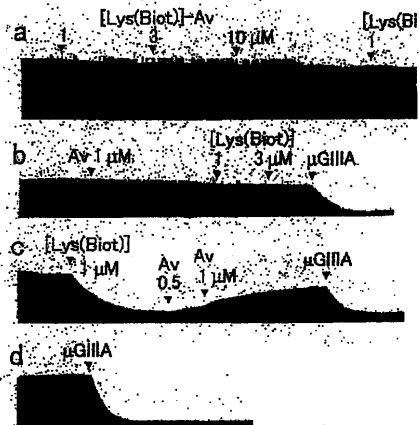
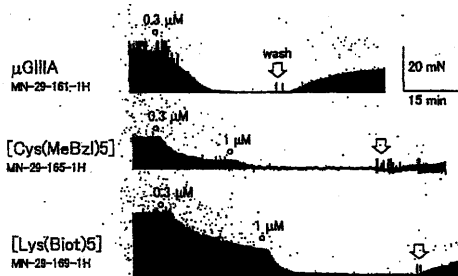


【図4】

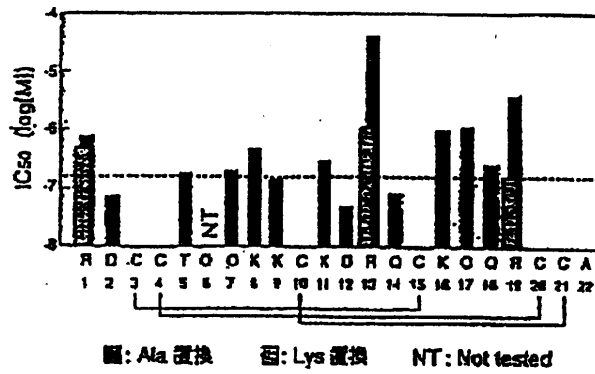


【図7】

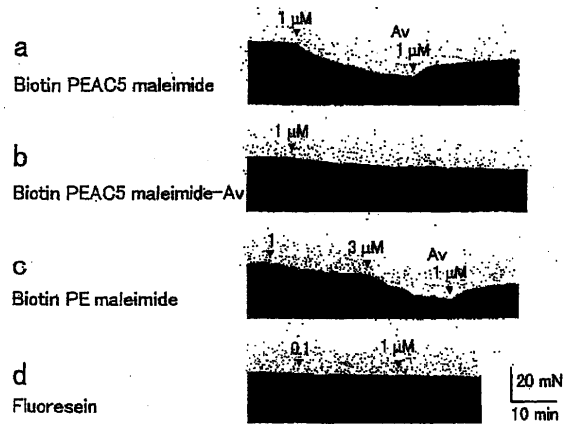
【図6】



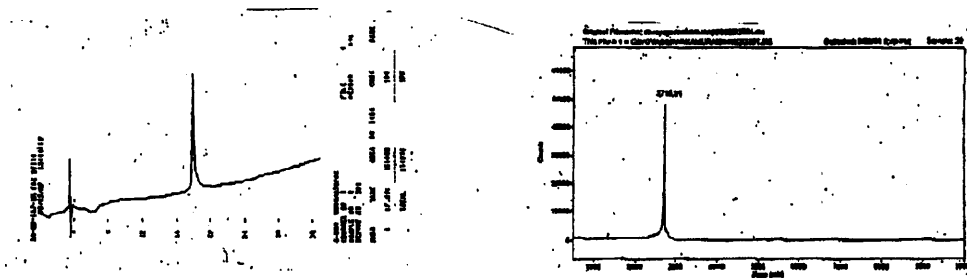
【図5】



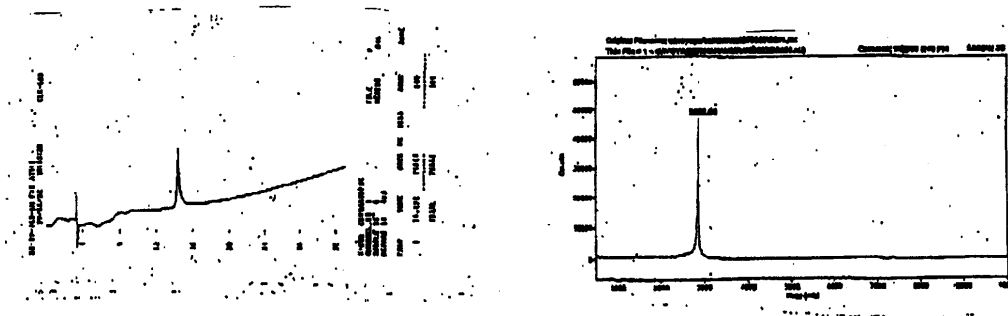
【図8】



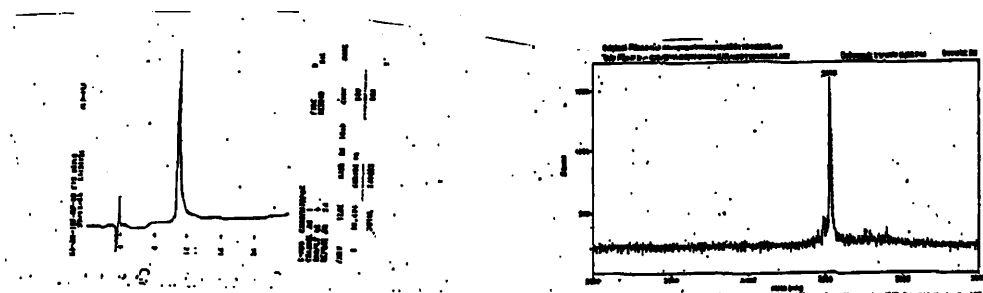
【図9】



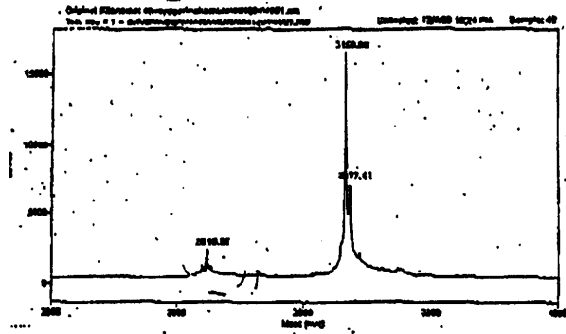
【図10】



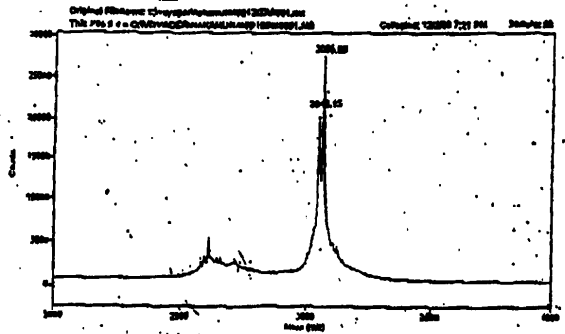
【図11】



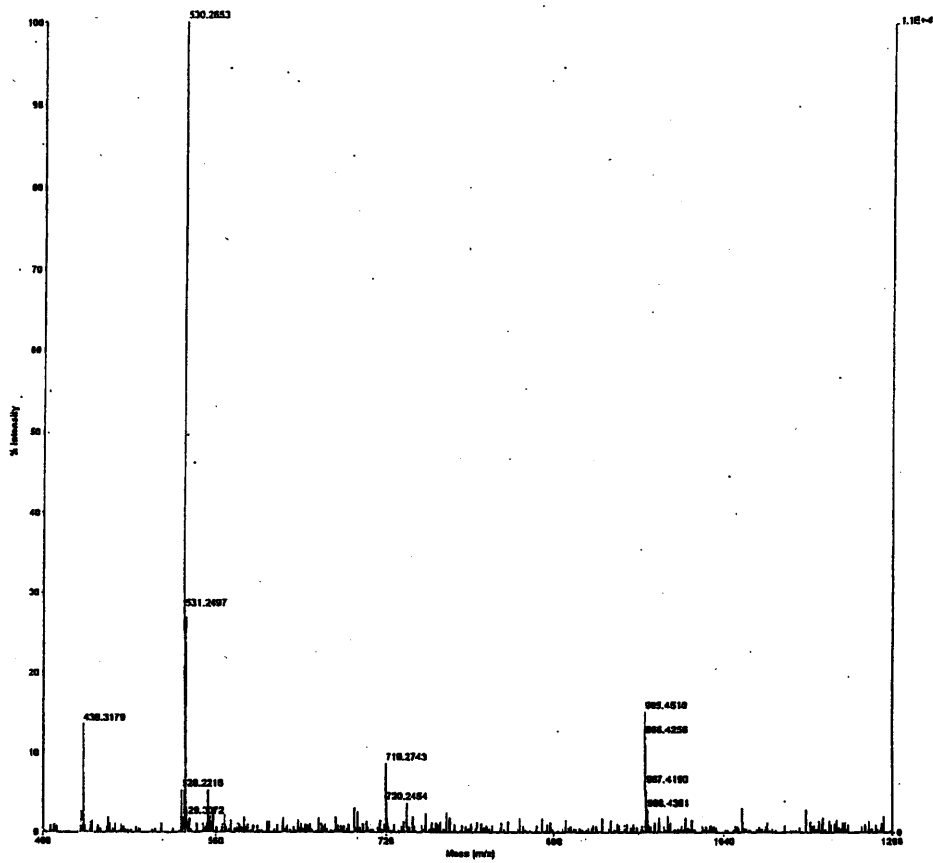
【図12】



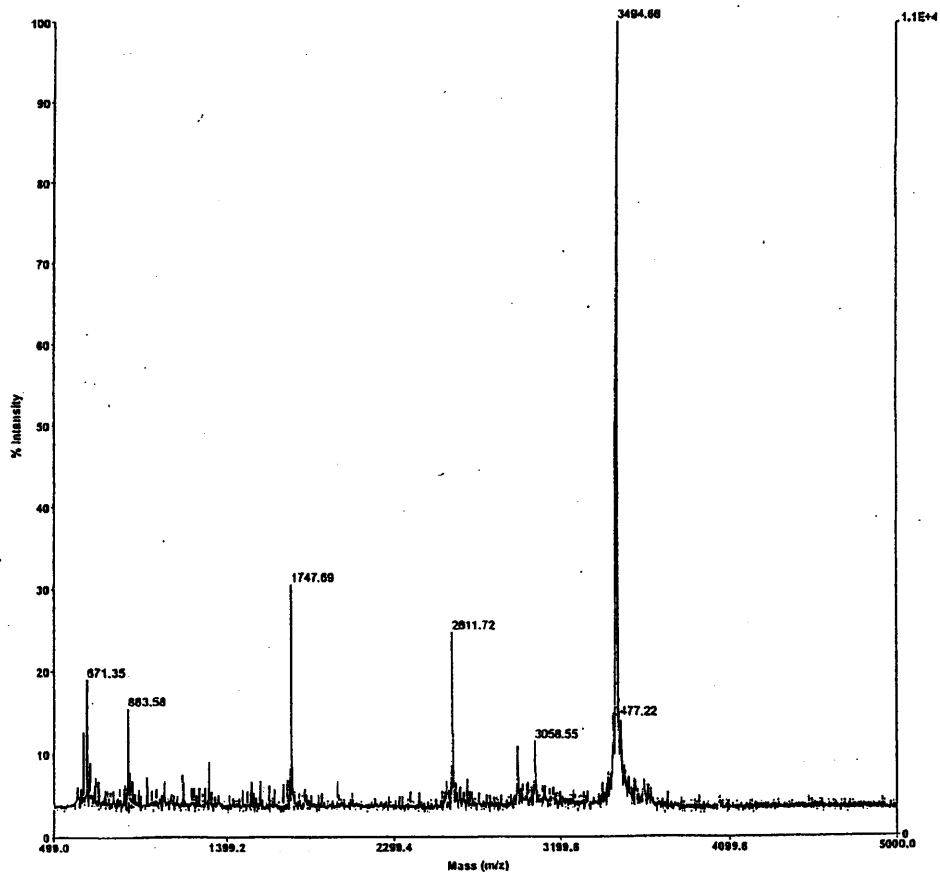
【図13】



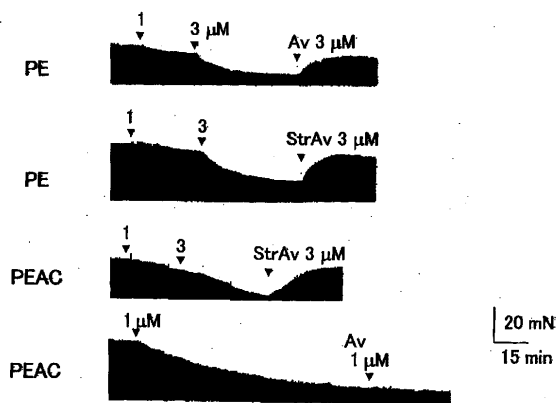
【図14】



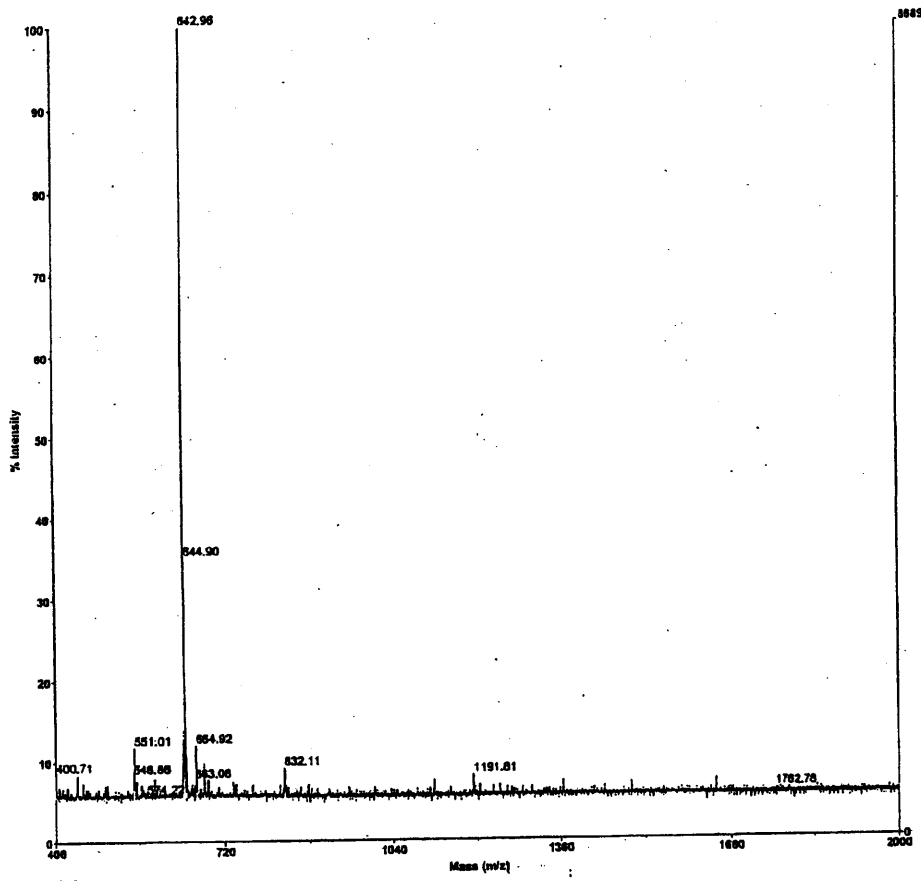
【図15】



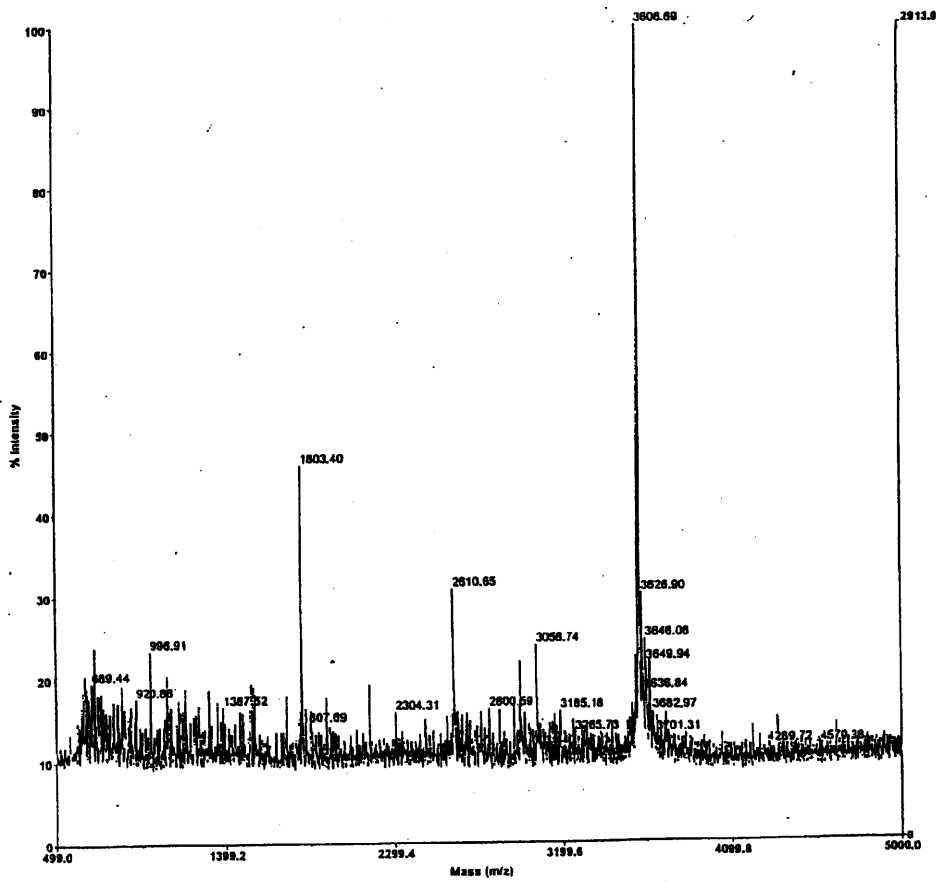
【図18】



【図16】



【図17】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テ-マコード (参考)

C 0 7 K 16/18
 17/02
 C 1 2 P 21/08
 G 0 1 N 33/53
 33/566
 33/68

C 0 7 K 16/18
 17/02
 C 1 2 P 21/08
 G 0 1 N 33/53
 33/566
 33/68

D

专利名称(译)	生理活性物质的衍生物保留了受体识别位点和使用方法		
公开(公告)号	JP2001322999A	公开(公告)日	2001-11-20
申请号	JP2001066198	申请日	2001-03-09
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
申请(专利权)人(译)	科学技术振兴事业团		
[标]发明人	中村英士 大場裕一 中村光裕		
发明人	中村 英士 大場 裕一 中村 光裕		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P39/02 C07K1/04 C07K14/435 C07K16/18 C07K17/02 C12P21/08 G01N33/566 G01N33/68		
FI分类号	C07K14/435 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P39/02 C07K1/04 C07K16/18 C07K17/02 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/68 C07K16/00		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/DA80 2G045/FA02 2G045/FA20 2G045/FA34 2G045/ /FB03 2G045/FB06 2G045/GC03 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC24 4C085/DD02 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/ /AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA17 4H045/BA60 4H045/BA72 4H045/CA50 4H045/DA76 4H045/DA83 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50		
代理人(译)	佐伯 宪生		
优先权	2000067622 2000-03-10 JP		
其他公开文献	JP4132694B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：使生理活性物质的生理活性失活，同时保留该生理活性物质的受体识别位点，其失活的衍生物及其用途，并在化学修饰后保持生理活性。本发明的目的是提供生理活性物质的衍生物及其用途。在与受体内部的作用位点结合并表达生理活性的物质中，连接子与生理活性物质的受体识别位点以外的部分结合，并且受体附着于连接子的另一端。在保留生理活性物质的受体识别位点的同时，使生理活性物质失活，这包括与不能进入细胞的物质或不能进入受体的物质结合具有亲和力的物质。及其非活化衍生物，以及能够将连接基团的另一端固定到载体上的物质，或者能够在连接基团的另一端固定到载体上的物质，或者对固定在载体上的物质具有亲和力的物质。以及保留生理活性的生理活性物质的衍生物。

