

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 501012

(P2003 - 501012A)

(43)公表日 平成15年1月14日(2003.1.14)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 P 31/04	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/55		39/02	4 B 0 6 4
A 6 1 P 31/04		43/00	4 B 0 6 5
39/02		C 0 7 K 7/06	4 C 0 8 4
43/00	111	11/00	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 59数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 618307(P2000 - 618307)

(86)(22)出願日 平成12年5月15日(2000.5.15)

(85)翻訳文提出日 平成13年11月16日(2001.11.16)

(86)国際出願番号 PCT/US00/13215

(87)国際公開番号 W000/069891

(87)国際公開日 平成12年11月23日(2000.11.23)

(31)優先権主張番号 60/134,446

(32)優先日 平成11年5月17日(1999.5.17)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 デパートメント オブ ジ アーミー
アメリカ合衆国,メリーランド州 21702 -
5012,フォート デトリック,504 スコット
ストリート,ユーエス アーミー メディ
カル リサーチ アンド マテリアル コ
マンド

(72)発明者 ゴードン, リチャード, ケー
アメリカ合衆国,メリーランド州 20854,ポ
トマック,9024 ウィロー パレー ドライ
ブ

(74)代理人 弁理士 堀 和子 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ボツリヌス菌毒素B及び破傷風菌神経毒素の特異的阻害剤及び治療薬としてのプレピン類

(57)【要約】

本発明の化合物は、一般に式(1): B₁Z*₂B₃Z

*₄X*₅Q₆F₇X₈X₉X₁₀X₁₁、(2) B₁

X₂X₃X₄X₅Q₆F₇X₈X₉X₁₀X₁₁、又は

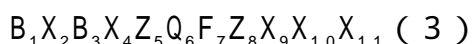
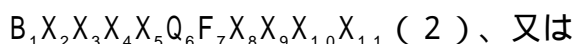
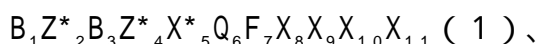
(3) B₁X₂B₃X₄Z*₅Q₆F₇Z₈X₉X₁₀X₁₁

(3)で記載され、及び、その塩類、エステル類、アミド類、及びアシル化形態である。1つの文字で表された各位置は、1つのアミノ酸残基を示し、その中で、Bは塩基性の、又は極性の/大きいアミノ酸、又はその修飾された形態；Xは、小さい又は疎水性のアミノ酸、又はその修飾された形態；X*は、小さい又は極性の/大きなアミノ酸、又はその修飾された形態；Zは、極性の/大きい、又は疎水性のアミノ酸、又はその修飾された形態；Z*は、プロリン又は極性の/大きい又は疎水性のアミノ酸、又は、その修飾された形態である。以下に説明するように、アミノ酸残基の間で1つ又はそれ以上のペプチド結合が擬似ペプチド結合で置き換えられてもよい。これらの化合物は、ボツリヌス菌毒素B及び破傷風菌毒素のプロテアーゼ活性を阻害するために最適化される化合物を創生する分子構築ブロックとして使用できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

精製され単離された形態での式：



式中、

Bは塩基性の、又は極性の／大きいアミノ酸、又はその修飾された形態；

Xは、小さい又は疎水性のアミノ酸、又はその修飾された形態；

X*は、小さい又は極性の／大きなアミノ酸、又はその修飾された形態；

Zは、極性の／大きい、又は疎水性のアミノ酸、又はその修飾された形態である；

Z*は、プロリン又は極性の／大きい又は疎水性のアミノ酸、又は、その修飾された形態である、

の化合物、及び、その塩類、エステル類、アミド類、及びアシル化物。

【請求項2】

少なくとも1つのアミノ酸残基がD-コンフィギュレーションである請求項1記載の化合物。

【請求項3】

2つのアミノ酸残基の間の少なくとも1つの結合が擬似ペプチド結合又はペプターゼ分子である請求項1記載の化合物。

【請求項4】

Bは、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン、グルタミン又はリジン；

Xは、アラニン、セリン、スレオニン、イソロイシン、ロイシン、バリン又はグリシン；

X*は、アラニン、グリシン、セリン、スレオニン、アスパラギン又はグルタミン；

Zは、アスパラギン、グルタミン、チロシン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン又はトリプトファン；

Z*は、アスパラギン、グルタミン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン又はプロリンである請求項1の化合物。

【請求項5】

B₁はアルギニン、又は
Z*₂はプロリン、又は
B₃はリジン、又は
Z*₄はプロリン、又は
X*₅はグルタミン、又は
X₈はフェニルアラニン、又は
X₉はグリシン、又は
X₁₀はロイシン、又は
X₁₁はメチオニンである請求項1の式(1)の化合物。

【請求項6】

B₁はアルギニン、
Z*₂はプロリン、
B₃はリジン、
Z*₄はプロリン、
X*₅はグルタミン、
X₈はフェニルアラニン、
X₉はグリシン、
X₁₀はロイシン、及び
X₁₁はメチオニンである請求項1の式(1)の化合物。

【請求項7】

RPKPQQFFGLM	(配列番号 1) ,
TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	(配列番号 2) ,
TRAARAGLQFPVGRVHRLLRK	(配列番号 3) ,
TRLLRAGLQFPVGRVHRLLRK	(配列番号 4) ,
RAKPQQFFGLM	(配列番号 5) ,
RAKAQQFFGLM	(配列番号 6) ,
RAKAQQFPGLM	(配列番号 7) ,
RAKLQQFPGLM	(配列番号 8) ,
RAKGLQFPGLM	(配列番号 9) ,
RAGLGQFFGLM	(配列番号 10) ,
DAARAKGLQFPGLMAKLK	(配列番号 11) ,
DAARAKGLQFPGLLAKLK	(配列番号 12) ,
TRSRAGLQFPGLMVHRL	(配列番号 13) , 及び
XQF-----Y	(配列番号 14)

式中、「 - 」はスペーサ分子であり、「 X 」は配列番号 1 - 12 の QF サイトの上流のアミノ酸配列と相同の適切なアミノ酸配列の全てである、からなる群から選ばれた請求項 1 の化合物。

【請求項 8】

ボツリヌス菌毒素 B 又は破傷風菌毒素のプロテアーゼ活性を阻害することができる、請求項 1 の式 (1)、(2) 及び (3) のコア構造を含むペプチドの産生のための組換え発現システムであって、発現システムが、発現をもたらす制御配列に操作可能に連結される前記ペプチドをコードするヌクレオチド配列から成ることを特徴とする組換え発現システム。

【請求項 9】

前記ペプチドをコードするヌクレオチド配列がプレカーサー・ペプチドをコードする請求項 8 の組換え発現システム。

【請求項 10】

請求項 8 の発現システムを含むように修飾された組換え宿主細胞。

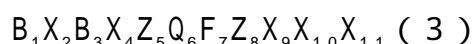
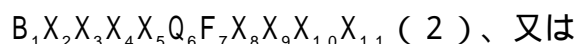
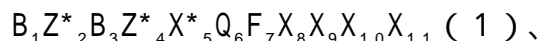
【請求項 11】

ボツリヌス菌毒素 B 又は破傷風菌毒素のプロテアーゼ活性を阻害することがで

きるペプチドを生産する方法であって、請求項10の修飾された宿主細胞を、前記ペプチドが生産される条件下に培養することから成る方法。

【請求項12】

式：



式中、

Bは塩基性の、又は極性の/大きいアミノ酸、又はその修飾された形態；

Xは、小さい又は疎水性のアミノ酸、又はその修飾された形態；

X*は、小さい又は極性の/大きなアミノ酸、又はその修飾された形態；

Zは、極性の/大きい、又は疎水性のアミノ酸、又はその修飾された形態である；

Z*は、プロリン又は極性の/大きい又は疎水性のアミノ酸、又は、その修飾された形態である、

のコア構造及び、その塩類、エステル類、アミド類、及びアシル化形態を含むボツリヌス菌又は破傷風菌中毒を処置するためのの製薬組成物。

【請求項13】

Bは、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン、グルタミン又はリジン；

Xは、アラニン、セリン、スレオニン、イソロイシン、ロイシン、バリン又はグリシン；

X*は、アラニン、グリシン、セリン、スレオニン、アスパラギン又はグルタミン；

Zは、アスパラギン、グルタミン、チロシン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン又はトリプトファン；

Z*は、アスパラギン、グルタミン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン又はプロリンである請求項12の製薬組成物。

【請求項14】

B₁はアルギニン、又は

Z^{*}₂はプロリン、又は
B₃はリジン、又は
Z^{*}₄はプロリン、又は
X^{*}₅はグルタミン、又は
X₈はフェニルアラニン、又は
X₉はグリシン、又は
X₁₀はロイシン、又は
X₁₁はメチオニンである前記式(1)の化合物を含むことを特徴とする請求
項12の製薬組成物。

【請求項15】

B₁はアルギニン、
Z^{*}₂はプロリン、
B₃はリジン、
Z^{*}₄はプロリン、
X^{*}₅はグルタミン、
X₈はフェニルアラニン、
X₉はグリシン、
X₁₀はロイシン、及び
X₁₁はメチオニンである前記式(1)の化合物を含むことを特徴とする請求
項12の製薬組成物。

【請求項16】

前記化合物は、

RPKPQQFFGLM	(配列番号 1) ,
TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	(配列番号 2) ,
TRAARAGLQFPVGRVHRLLRK	(配列番号 3) ,
TRLLRAGLQFPVGRVHRLLRK	(配列番号 4) ,
RAKPQQFFGLM	(配列番号 5) ,
RAKAQQFFGLM	(配列番号 6) ,
RAKAQQFPGLM	(配列番号 7) ,
RAKLQQFPGLM	(配列番号 8) ,
RAKGLQFPGLM	(配列番号 9) ,
RAGLGQFFGLM	(配列番号 10) ,
DAARAKGLQFPGLMAKLK	(配列番号 11) ,
DAARAKGLQFPGLLAKLK	(配列番号 12) ,
TRSRAGLQFPGLMVHRL	(配列番号 13) , 及び
XQF-----Y	(配列番号 14)

式中、「 - 」はスペーサ分子であり、「X」は配列番号1 - 12のQFサイトの
上流のアミノ酸配列と相同の適切なアミノ酸配列の全てである、及びそのアミド
化形態

からなる群から選ばれる請求項12の製薬組成物。

【請求項17】

請求項1の化合物に特異的免疫反応性の抗体。

【請求項18】

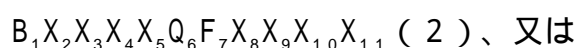
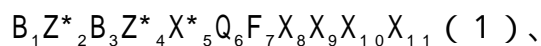
請求項17の抗体を利用する分析。

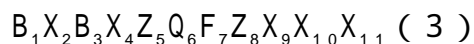
【請求項19】

不明化合物のボツリヌス菌毒素B又は破傷風菌毒素プロテアーゼ活性の阻害能
力を測定することにより、前記不明化合物がプレビンであるかどうかを決定する
方法。

【請求項20】

式：





式中、

Bは塩基性の、又は極性のノ大きいアミノ酸、又はその修飾された形態；

Xは、小さい又は疎水性のアミノ酸、又はその修飾された形態；

X*は、小さい又は極性のノ大きなアミノ酸、又はその修飾された形態；

Zは、極性のノ大きい、又は疎水性のアミノ酸、又はその修飾された形態である；

Z*は、プロリン又は極性のノ大きい又は疎水性のアミノ酸、又は、その修飾された形態である、

の化合物、及び、その塩類、エステル類、アミド類、及びアシル化物を、ポツリヌス菌B又は破傷風菌毒素のプロテアーゼ活性阻害能力を有する化合物を構築するために使用する方法。

【請求項21】

Bは、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン、グルタミン又はリジン；

Xは、アラニン、セリン、スレオニン、イソロイシン、ロイシン、バリン又はグリシン；

X*は、アラニン、グリシン、セリン、スレオニン、アスパラギン又はグルタミン；

Zは、アスパラギン、グルタミン、チロシン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン又はトリプトファン；

Z*は、アスパラギン、グルタミン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン又はプロリンである請求項20の方法。

【請求項22】

B₁はアルギニン、又は

Z*₂はプロリン、又は

B₃はリジン、又は

Z*₄はプロリン、又は

X*₅はグルタミン、又は

X₈はフェニルアラニン、又は

X_9 はグリシン、又は

X_{10} はロイシン、又は

X_{11} はメチオニンである前記式(1)の化合物を利用する請求項20の方法

。

【請求項23】

B_1 はアルギニン、

Z^*_2 はプロリン、

B_3 はリジン、

Z^*_4 はプロリン、

X^*_5 はグルタミン、

X_8 はフェニルアラニン、

X_9 はグリシン、

X_{10} はロイシン、及び

X_{11} はメチオニンである前記式(1)の化合物を利用する請求項20の方法

。

【請求項24】

前記化合物は、

RPKPQQFFGLM	(配列番号 1) ,
TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	(配列番号 2) ,
TRAARAGLQFPVGRVHRLLRK	(配列番号 3) ,
TRLLRAGLQFPVGRVHRLLRK	(配列番号 4) ,
RAKPQQFFGLM	(配列番号 5) ,
RAKAQQFFGLM	(配列番号 6) ,
RAKAQQFPGLM	(配列番号 7) ,
RAKLQQFPGLM	(配列番号 8) ,
RAKGLQFPGLM	(配列番号 9) ,
RAGLGQFFGLM	(配列番号 10) ,
DAARAKGLQFPGLMAKLK	(配列番号 11) ,
DAARAKGLQFPGLLAKLK	(配列番号 12) ,
TRSRAGLQFPGLMVHRL	(配列番号 13) , 及び
XQF-----Y	(配列番号 14)

式中、「 - 」はスペーサ分子であり、「 X 」は配列番号 1 - 12 の QF サイトの上流のアミノ酸配列と相同の適切なアミノ酸配列の全てである、からなる群から選ばれる請求項 20 の方法。

【請求項 25】

少なくとも 1 つのプレビン組成物を含むボツリヌス菌毒素 B 又は破傷風菌毒素中毒を治療又は防止するためのキット。

【請求項 26】

前記組成物は、式：

$$B_1 Z^* B_3 Z^* X^* Q_6 F_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} \quad (1)$$

$$B_1 X_2 X_3 X_4 X_5 Q_6 F_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} \quad (2)$$
、又は

$$B_1 X_2 B_3 X_4 Z_5 Q_6 F_7 Z_8 X_9 X_{10} X_{11} \quad (3)$$

式中、

B は塩基性の、又は極性の / 大きいアミノ酸、又はその修飾された形態；

X は、小さい又は疎水性のアミノ酸、又はその修飾された形態；

X* は、小さい又は極性の / 大きなアミノ酸、又はその修飾された形態；

Z は、極性の / 大きい、又は疎水性のアミノ酸、又はその修飾された形態であ

る；

Z*は、プロリン又は極性のノ大きい又は疎水性のアミノ酸、又は、その修飾された形態である、
のコア配列を含む化合物、及び、その塩類、エステル類、アミド類、及びアシル化合物を含有することを特徴とする請求項25のキット。

請求項26

少なくとも1つのプレビンに免疫特異的な抗体を含むことからなる、試料がプレビンを含むかどうか、そのプレビンの量、又はそのプレビンのタイプを決定するためのキット。

【請求項27】

試料がボツリヌス菌毒素を含むかどうか、又はそのボツリヌス菌毒のタイプを決定するためのキットであって、前記ボツリヌス菌毒素と相互関係を有する少なくとも1つのプレビンに免疫特異的な抗体を含み、前記相互作用は観察可能な結果を産出することを特徴とするキット。

【請求項28】

試料が破傷風菌毒素を含むかどうかを決定するためのキットであって、前記破傷風菌毒素と相互関係を有する少なくとも1つのプレビンに免疫特異的な抗体を含み、前記相互作用は観察可能な結果を産出することを特徴とするキット。

【発明の詳細な説明】**【0001】****政府関与の承認**

本発明は、米国陸軍の被雇用者によりなされた。米国政府はこの発明の権利を所有する。

【0002】**技術分野**

本発明は、ボツリヌス菌毒素B及び破傷風菌神経毒素の酵素活性を阻害する、且つ、ボツリヌス菌毒素B及び破傷風菌神経毒素の酵素活性を阻害するように最適化される化合物を創生するための分子構築ブロックとして使用することができる、一種のペプチド及びペプチド様化合物、「プレビン類」に関する。

【0003】**発明の背景**

ボツリヌス菌毒素類(Bttxs)は動物に対する最も強力な毒素に含まれ、例えば二十日ねずみにおけるLD₅₀は1ng/kgである。Bttxsは7つの異なる血清タイプ(A-G)の集まりからなる。Bttxsは100キロダル神経細胞照準重鎖及び50キロダルの末端蛋白質活性軽鎖からなる2つのサブユニットから構成される。これらの毒素はZn-メタロプロテアーゼであり、Zn-蛋白質結合モチーフHEXXHを含む。

【0004】

しかしながら、酵素阻害剤に変換するアンジオテンシン、カプトプリル、及びフォスフォラミドンのようなZn-メタロプロテアーゼ阻害剤はBttxsの効果的阻害剤ではない。亜鉛キレート剤類は体外でBttxプロテアーゼ活性を阻害するが、体内及び完全な神経及び筋肉細胞及び/又は組織を備えた組織調製においては、単にBttxプロテアーゼ活性を遅延させるだけである。更に、ある亜鉛キレート剤はBttxプロテアーゼ活性の遅延に要する濃度において有毒である。ジチオカルバメート類は、SODのような他の亜鉛含有蛋白質を阻害するが、Bttx血清タイプB(BttxB)には効果がない。明らかに、BttxBなど、これら種々のBttx血清タイプの阻害剤は必要である。

【0005】

BttxBは、特に、グルタミン76及びフェニルアラニン77(QF結合又は分裂サイト)との間でシナプトブレビン(VAMP2)を裂く。最小長基質を生成する努力によって示されるように体内ターゲットVAMP2の為の比較的長い基質のための義務的要求がある。VAMP2の30個のアミノ酸が要求され、VAMP2の40個のアミノ酸が最適分裂のために要求されることが示された。Shone, C. C.他(1993) Eur. J. Biochem. 217:965 - 971参照。VAMP2から誘導されるペプチド、V2は分裂位置から上流の4残基に位置する10アミノ酸配列であり、BttxB活性を阻害することが見出された。Pellizzari R.他(1996) J. Biol. Chem. 271:20353 - 20358参照。VAMP2において、C末端アミノ酸の変異は殆ど影響しない。ヘリックスを乱す置換であるAlaをProに置換するとBttxB活性は28%まで阻害される。更に、幾つかのマイナスに荷電したアミノ酸の置換は、ほぼ完全な不活性をもたらす。Whitcome, M他(1996) FEBS Let. 386:133 - 136参照。

【0006】

VAMP2のコンピュータ支援の二次構造分析は、分裂サイトQFを側面に位置している螺旋構造の2つの伸びを予測した。Whitcome, M. R他(1996) FEBS Let. 386:133 - 136参照。コンピュータ支援の三次構造分析は、この2つの螺旋は逆の回転で分離した螺旋でヘリックス束のスーパー二次構造を形成することに自己関連可能であることを示す。Lebeda F.J.他(1996) Med. Defense Biosci. Rev. 204参照。

【0007】

上記の結果は、毒素が基質分裂するために丁度QF結合より多くを認識する必要があることを示す。

【0008】

我々は、先に、特徴的なコンフォーメーションであるOQ結合を有し、BttxBプロテアーゼ活性を阻害する新種の化合物であるブフォリニンについて記載している。

【0009】

しかしながら、我々は、最近、これらのブフォリニン類に存在するコア構造及

び基礎構造として働くと思われる物質Pとして例示されたコア構造、またはBttxB及びTttxBプロテアーゼ活性を阻害する化合物の分子構築ブロックを解明した。これらのコア配列はBttxB及びTttxBプロテアーゼ活性を阻害する化合物の基本構造で有り得る。これらのコア配列及びその用途が、以下に記載される。

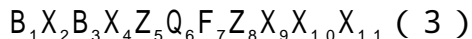
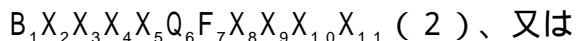
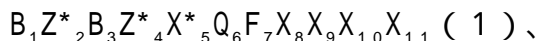
【0010】

発明の概要

本発明は、内部QF結合と、BttxBプロテアーゼ活性を阻害能を有する「プレピン」と呼ばれるコア構造に向けられている。破傷風菌毒素開裂サイトはBttxBと同じなので、これらのコア構造は、競合的に破傷風菌プロテアーゼ活性を阻害する化合物のコア構造としても働くことができる。

【0011】

このように、一観点において、本発明は、式(1)、(2)及び(3)：



の構造を有する化合物、及び、その塩類、エステル類、アミド類、及びアシル化物に関する。1つの文字で表された各位置は、1つのアミノ酸残基を示し、その中で、Bは塩基性の、又は極性の/大きいアミノ酸、又はその修飾された形態；Xは、小さい又は疎水性のアミノ酸、又はその修飾された形態；X*は、小さい又は極性の/大きなアミノ酸、又はその修飾された形態；Zは、極性の/大きい、又は疎水性のアミノ酸、又はその修飾された形態である；Z*は、プロリン又は極性の/大きい又は疎水性のアミノ酸、又は、その修飾された形態である。以下に説明するように、アミノ酸残基の間で1つ又はそれ以上のペプチド結合が擬似ペプチド結合で置き換えられてもよい。

【0012】

他の観点において、本発明は、本発明のペプチドを製造するのに有用な遺伝子でコードされたアミノ酸含有組替え物質に向けられている。同様に、これらのペプチドの生産のための発現システムを含むように改良された植物又は動物に向けられている。本発明は、更に、これらの組替え物質を調製し、操作する方法を包

含する。

【0013】

加えて、本発明は、活性成分として本発明のコア構造を含む化合物を含有する医薬組成物に、及び、これらのペプチド類を製造する為の発現システムを含む組成物に向けられている。本発明は、合成的に本発明のコア構造を含む化合物を製造する方法、これらの化合物に特異的な抗体、及び保健薬、治療薬、予防薬としてのこれらの化合物の用途に向けられている。

【0014】

本発明は、選択的阻害を用いてBttxB及びTttxを検出するため、及び、与えられた毒素の為の阻害剤及び基質を検出するための分析における本発明のコア構造を含む化合物の使用にも向けられている。

【0015】

本発明は、更に破傷風菌神経毒素の酵素活性を阻害するための素材、組成物、キット、及び方法に関する。

【0016】

本発明は、更にボツリヌス菌毒素B及び破傷風菌中毒等の毒による中毒を防ぎ又は処置するための素材、組成物、キット、及び方法に関する。このキットは単一の又は複数の薬量を提供でき、操作に必要な取扱い説明書、溶液、及び組成物など、他の従来 of 付属物質を含むことができる。これら組成物及び溶液は試験管、その他の容器に入れられる。容器は虫や蛇に噛まれたときに使用されるキットと同様であっても良く、別々の部屋に収められた、本発明のコア構造を含む化合物とTCEPを供給する注射器を含む。

【0017】

ある試料が本発明のコア構造を含む化合物を含むかどうか、その化合物の量又はその化合物のタイプを決定するためのキットは、そのコア構造のための免疫特異性抗体を含むことができる。

【0018】

ある試料がボツリヌス菌毒素又はその種のボツリヌス菌毒素を含むかどうかを決定するキットは、ボツリヌス菌毒素と相互関係を有する少なくとも1つのその

コア構造を含む化合物のための免疫特異性抗体を含むことができる。同様に、ある試料が破傷風菌毒素を含むかどうかを決定するキットは、破傷風菌毒素と相互関係を有する少なくとも1つの本発明のコア構造を含む化合物のための免疫特異性抗体を含むだろう。

【0019】

他の実施態様はボツリヌス菌B及び/又は破傷風菌毒素の汚染除去と関連付けられた1つ以上の公知のペプチド阻害剤を伴うブフォリンIを含む。加えて、そのキットは、解毒のために食品又は傷に散布するための、本発明のコア構造を含む化合物を含む安定なペプチド混合物又は粉末を含んでいてもよい。

【0020】

更に他の実施態様において、BttxB及びTttxBプロテアーゼ活性阻害のために最適化された化合物を構築する分子構築ブロックとして本発明の化合物を使用することを含む。

【0021】

発明の詳細な説明

BttxB阻害剤の検索において、我々は、QF分裂サイトを含むがQF開裂サイトを含むが、QFサイトを取り囲む主配列がVAMP2と同一でないペプチドを研究した。QF結合を含む11個のアミノ酸のペプチドである物質PはBttxBの基質ではない。実施例1及び2、並びに図1を参照。この結果は、好ましい螺旋-回転-螺旋及び/又は長い基質仮説を支持する。

【0022】

ブフォリンI (B-1) はアジアヒキガエル*Bufo bufo gargarizans*の胃から単離されたペプチドであり、QF結合を持つ。従って、我々は、B-1が基質であるか、BttxBプロテアーゼ活性阻害剤であるかを決定する為にエンドペプチダーゼ分析を用いた。B-1はBttxBの基質ではないこと、及び、B-1は薬量依存的に及び競合的にBttxB活性を阻害することを見出した。図2及び図3参照。阻害の範囲は $C_{50} = 1 \times 10^{-6}$ Mを与えた。図4参照。これは、B-1がVAMP2 55-94と保全アミノ酸のたった18%相同性であるので、驚くべき結果であった。表1参照。

【0023】

【表1】

表1 VAMP2, ブフォリンI及びブフォリンI誘導体ペプチド及び物質Pの配列整合	
ペプチド	配列
VAMP2 ₅₅₋₉₄	ERDQKLSELDADRADALQAGASQ ^a FETSAAKLKRKYWWKNLK
ブフォリンI ^a	AGRGKQGGKVRKAKTRSSRAGLQ ^a FPVGRVHRLLRKGY
ブフォリンII ^b	TRSSRAGLQ ^a FPVGRVHRLLRK
ペプチド ^c 24°	TRSSRAGLQ ^a FPVGRVHRLLRKGY
ペプチド ^c 36°	AGRGKQGGKVRKAKTRSSRAGLQ ^a FPVGRVHRLLRK

^aArcher, B. T. III., et al. (1990) J. Biol. Chem. 265 (28), 17267-17273.
^bPark C. B., et al. (1996).
^cGarcia, G. E. et al. (1998).

【0024】

我々は、次いで、先端を切断したB-1ペプチドを我々のエンドペプチダーゼ活性分析で評価した。我々の評価した先端切断ペプチド類は、B-1のアミノ酸1-36を含むペプチド36とB-1のアミノ酸16-39を含むペプチド24である。B-1と同様に、これらの先端切断ペプチド類はBttxBの基質ではない。しかしながら、これらの先端切断ペプチド類はBttxB活性の阻害剤としてはB-1と比べてより効果が少ない。図2参照。ペプチド36はB-1と比べて有効性は約50%であった。ペプチド24はB-1と比べて有効性は約25%であった。我々は、B-1のアミノ酸16-36を含むブフォリンII (B-II) も又評価し、B-1と比べて有効性が25%であると分かった。

【0025】

B-1はヒキガエルのヒストン蛋白質2A (H2A) から誘導され、トリH2Aの配列とほぼ同一である。表2及びPark, C.B.他(1996) Biochem. Biophys. Res. Comm. 218:408-413参照。表2Bは、物質PとブフォリンIIとの間で関連のあるアミノ酸比較を示す。ニワトリ・ヒストン蛋白質粒子のX線結晶分析はK15からY39の領域でQFサイトの上流及び下流に螺旋のあることを示す。図5及びArents, G.他(1991) PNAS 88:10148-52及びWang, S. W.他(1985) Nucleic Acids Res. 13:1369-138.参照。また、B-IIのNMR解析はQFサイトから上流の領域が α -ヘリックスを形成できたことを示す。Yi,他(1996) FEBS Lett. 398:87-90参照。

【0026】

【表2】

表2 A 関連したアミノ酸配列のためのヒキガエルに対するトリのH2A比較

ソース	データベース ^{GB} 受け入れ番号		% 相同性 ^a
<i>Bufo bufo gargarizans</i>	BBU70133	GRGKQGGKVRKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGN	
<i>Gallus gallus</i>	X02218	GRGKQGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGN	100

The suffix ^{GB} signifies accession numbers in the GenBank database.

^aHomology to toad sequence. Similarity; basic: Arg, Lys; acidic: Asp, Glu; polar: Asn, Gln; hydrophobic: Ala, Ile, Leu, Met, Val; aromatic: Phe, Tyr, Trp; size: Ala, Ser, Thr.

[1] Kim, H. S., Park, C. B., Kim, M. S., Kim, S. C. (96) Biochem. Biophys. Res. Comm. 229:381-387.

[2] Wang, S. W., Robins, A. J., d=Andrea, R. Wells, J. R. (85) Nucleic Acids Res. 13:1369-1387.

【0027】

表2 B 物質 P とブフォリン II 間の関連したアミノ酸配列の比較

ソース	データベース 受け入れ番号		% 相同性 ^a
物質 P	P41333 ^{SP}	RPKPQQFFGLM	
ブフォリン II	BBU 736002.1 ^{GB}	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	

The suffix ^{SP} signifies accession numbers in the Swiss Protein database.

The suffix ^{GB} signifies accession numbers in the GeneBank database.

【0028】

これらの結果は、長いブフォリン類が類似のヘリックス・バンドリングで逆回転したスーパー二次構造を形成する能力があることを示す。表3参照。従って、我々は、BttxBプロテアーゼ活性を競合的に阻害する、ブフォリンI (39個のアミノ酸)、ブフォリンII (21個のアミノ酸)、ペプチド36及びペプチド24、及びQF結合を有する他の相似ペプチド類を含むブフォリン類のような化合物を構築するために用いられる新種のペプチド、「プレビン類」を定義した。

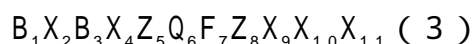
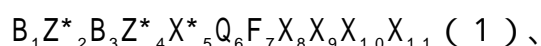
【0029】

【表3】

表3 コンピュータ支援の二次構造予測 ^a	
VAMP2 ₅₅₋₉₄	ERDQKLSELD DRADALQAGASQF ETSAAKLKRKYWKNLK
Gibrat ^b	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCHHHHHHHHHHHHHHTTHTCT
Nnpredict ^c	-----HH-HHHHHHH---HHHHHHHHHHHHHH-----
B-I	AGRGKQGGKVR AKAKTRSSRAGLQF PVGRVHRLLRKGN
Gibrat	HTTTTTCCEEEHHHHHHHHHHCTEEEEHHHEEEETTTC
Nnpredict	-----EHE-----E----HHHHHH-----
B-I	
両端で5つのアミノ酸が切り取られたもの	QGGKVR AKAKTRSSRAGLQF PVGRVHRL
Gibrat	HCCHHEEHHHHHHHHHCCEEEECHEHEEE
Nnpredict	-----E----HHHHHH-----
^a H, helix; E, sheet; C, coil; T, turn; -, no prediction. QF cleavage site is indicated in bold.	
^b Garnier J. <i>et al.</i> (1987) <i>J. Mol. Biol.</i> 120:97-120.	
^c McClelland, D. G, Rumelhart D. E. In <i>Explorations in Parallel Distributed Processing</i> , 3:318-362. 1988. MIT Press, Cambridge MA; Kneller D. G., <i>et al.</i> (1990) <i>J. Mol. Biol.</i> 214:171-182.	

【0030】

これらのプレピン類又はコア構造は一般的に式：



の化合物、及び、その塩類、エステル類、アミド類、及びアシル化形態に関する。1つの文字で表された各位置は、1つのアミノ酸残基を示し、その中で、Bは塩基性の、又は極性の/大きいアミノ酸、又はその修飾された形態；Xは、小さい又は疎水性のアミノ酸、又はその修飾された形態；X*は、小さい又は極性の/大きなアミノ酸、又はその修飾された形態；Zは、極性の/大きい、又は疎水性のアミノ酸、又はその修飾された形態；Z*は、プロリン又は極性の/大きい又は疎水性のアミノ酸、又は、その修飾された形態である。以下に説明するように、アミノ酸残基の間で1つ又はそれ以上のペプチド結合が擬似ペプチド結合で置き換えられてもよい。

【0031】

本発明の化合物は、式(1)、(2)及び(3)で表されるコア構造を含むものである。

【0032】

このペプチドのアミノ末端は遊離形態であっても、式RCO-の基でアシル化さ

れていてもよい。式においてRは1 - 6Cのヒドロカルビル基を表す。ヒドロカルビル基は飽和又は不飽和のものであり、典型的には、例えばメチル、エチル、i - プロピル、t - ブチル、n - ペンチル、シクロヘキシル、シクロヘキセン - 2 - イル、ヘキセン - 3 - イル、ヘキシン - 4 - イルなどである。

【0033】

本発明のペプチドのC - 末端は、遊離酸として又は受け容れ可能な塩、例えばカリウム、ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、その他の無機イオンの塩、又はカフェインのような有機イオンの塩として、誘導されないカルボキシル基の形態であってよい。カルボキシル末端は式ROHで表わされるアルコールのエステル形成で誘導されていても良く、式NH₃、又はRNH₂又はR₂NHのアミンでアミド化されていても良い。ここで、各Rは独立的に上記の1 - 6Cのヒドロカルビル基である。C - 末端が式CONH₂であるこれらペプチド類のアミド化された形態は好ましい。

【0034】

本発明のペプチド類は、酸添加塩の形態で供給されてもよい。典型的な酸添加塩は塩化物、臭化物、沃化物、弗化物など、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩などの無機イオンのものであり、また、アセテート、フォーマート、ベンゾエートなどの有機陰イオンの塩であっても良い。これらの塩のそれぞれの受け容れ可能性は目的とする用途に依存し、普通に理解される。

【0035】

本発明のペプチドにおけるアミノ酸は遺伝子又はそのアナログによりコード化され得るペプチド、及び、それらのD - 異性体であってもよい。好ましい態様は、式(1)、(2)又は(3)のコア構造を含む化合物であり、少なくともいくつかの残基がD - コンフィギュレーションを有することにより、プロテアーゼ活性に抵抗し、且つBttxBプロテアーゼ活性を阻害する能力を保持する化合物である。

【0036】

ここで用いられるアミノ酸の命名は従来通りであり、次の通りである：

アミノ酸	1文字表記	3文字表記
アラニン	A	Ala
アルギニン	R	Arg
アスパラギン	N	Asn
アスパラギン酸	D	Asp
システイン	C	Cys
グルタミン	Q	Gln
グルタミン酸	E	Glu
グリシン	G	Gly
ヒスチジン	H	His
イソロイシン	I	Ile
ロイシン	L	Leu
リジン	K	Lys
メチオニン	M	Met
フェニルアラニン	F	Phe
プロリン	P	Pro
セリン	S	Ser
スレオニン	T	Thr
トリプトファン	W	Trp
チロシン	Y	Tyr
バリン	V	Val

【0037】

本発明の化合物は指定されたクラスのアミノ酸残基で部分的に定義されたペプチド又はペプチド様化合物である。アミノ酸残基は次の通り、通常、主要なサブクラスにサブクラス分けできる：

酸性：この残基は、生理的pHにおいてHイオンを失うことで、マイナスのチャージを有する。この残基は、これを含むペプチドが生理的pHの水性媒体中にあるとき、水溶液によって引きつけられ、そのペプチドのコンフォーメーションにおいて、表面位置を求める。

【0038】

塩基性：この残基は、生理的pHにおいて、又は、その1つ又は2つのpH単位（例えばヒスチジン）内で、Hイオンと会合することによりプラスのチャージを有する。この残基は、これを含むペプチドが生理的pHの水性媒体中にあるとき、水溶液によって引きつけられ、そのペプチドのコンフォーメーションにおいて、表面位置を求める。

【0039】

疎水性：この残基は、生理的pHにおいてチャージされていない。しかし、この残基は、これを含むペプチドが水性媒体中にあるとき、そのペプチドの形態で、水溶液によって撥ね返され、内側位置を求める。

【0040】

中性/極性：この残基は生理的pHでチャージされないが、水溶液によって十分には撥ね返されないので、これを含むペプチドが水性媒体中にあるとき、そのペプチドの形態で、内側の位置を求めるだろう。

【0041】

この説明では、特定のアミノ酸を、それらの側鎖にたとえ極性基がなくても、疎水性を授けるのに充分には大きくないゆえに、「小さい」と特徴づける。「小さい」アミノ酸は、側鎖に少なくとも1つの極性基がある場合は、炭素数4つ以下のものであり、無い場合には炭素数3つ以下のものである。

【0042】

個々の残基分子の統計上の収集において、幾つかの分子はチャージされ、幾つかはチャージされず、水性媒体により大きく又は小さく引付けられたり反発されたりするだろうことは当然理解される。「チャージされ」の定義に適合させるには、独自の分子のかなりのパーセンテージ(少なくともほぼ25%)がその適切なpHでチャージされる。極性又は非極性と分類するために必要な吸引力又は反発力の程度は任意である。従って、本発明で特に取上げられるアミノ酸はどちらか一方に分類された。特に名付けられていない大部分のアミノ酸は、既知の挙動を基礎として分類できる。

【0043】

アミノ酸残基は、更に、環状、非環状、芳香族、非芳香族、その残基の側鎖の置換基に関連した自己説明的分類、及び、大きい又は小さいとしてサブクラス分けできる。この残基は、もしそれがカルボキシル炭素も含めて全炭素数が4個以下で、極性置換基が存在すると、小さいと考えられ、もし存在しないなら3個以下が小さいと考えられる。小さい残基は当然常に非芳香族である。

【0044】

天然に発生する蛋白質アミノ酸の前記表に従うサブ分類は、次の通りである。

酸性	アスパラギン酸及びグルタミン酸
塩基性	非環状の：アルギニン，リジン 環状の：ヒスチジン
小さな	グリシン，セリン，アラニン，スレオニン，システイン
極少の/大きな	アスパラギン，グルタミン
疎水性	チロシン，バリン，イソロイシン，ロイシン， メチオニン，フェニルアラニン，トリプトファン

【0045】

遺伝子 - コード化された二次アミノ酸プロリンは、ペプチド・チェーンの二次コンフォメーションにおける周知の影響、即ち、螺旋構造分裂による特例である。従って、プロリンは位置26において許されるだけである。その位置では、プロリンはQF開裂サイトの両側で見出される螺旋構造を分裂させて、螺旋 - 回転 - 螺旋構造をプロモートするのを助けるであろう。

【0046】

システインは小さなアミノ酸である。一般に、VAMP2基質、B - I、B - II、ペプチド24、ペプチド36においてステイン又はメチオニンは存在しない。システインの側鎖はいくぶん疎水性であるが、非常に反応性が高い。硫黄成分は他のシステインの硫黄と反応する能力がありシスチン或はジサルファイド結合を生成する。システインは、二次構造におけるその関与を妨げる様に修飾できる。加えて、システイン式(1)、(2)又は(3)の化合物中でスペーサ・アンカーとして用いてもよい。更に、蛍光マーカーでコア構造をラベルするため反応サイトとして用いるためにシステインを取込むことは、有利である。

【0047】

これらのコア構造に含まれてもよい「修飾された」アミノ酸は、遺伝子翻訳の後、例えばメチル基の付加、他の置換基への共有結合による誘導體形成、酸化又は還元、或は他の共有結合による修飾により処理された遺伝子 - コード化されたアミノ酸である。その結果生じる修飾されたアミノ酸を先の分類に入れるには、修飾された形態の特徴で決定してよい。例えば、リジンはそのアミノ基がアシル化で修飾されると、修飾された形態は塩基性としてではなく、極性の/大きいア

ミノ酸として分類される。

【0048】

通常よく現れるアミノ酸で、遺伝コードでコード化されないものとして、例えば、ベータ - アラニン (beta - Ala) 又は他のオメガ - アミノ酸が含まれ、例えば3 - アミノプロピオン酸、2, 3 - ジアミノアミノプロピオン酸(2, 3 - diaP)、4 - アミノ酪酸など、アルファアミノイソ酪酸(Aib)、サルコシン(Sar)、オルニチン(Orn)、シツルリン(Cit)、t - ブチルアラニン(t - BuA)、t - ブチルグリシン(t - BuG)、N - メチルイソロイシン(N - MeIle)、フェニルグリシン(Phg)、シクロヘキシルアラニン(Cha)、ノルロイシン(NIle)、2 - ナフチルアラニン(2 - NaI); 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロイソキノリン - 3 - カルボン酸(Tic); 3 - 2 - チエニルアラニン(Thi); メチオニン・スルフォキシド(MSO); 及びホモアルギニン(Har)がある。これらも、便宜的に特定のカテゴリーに分類される。

【0049】

上記定義に基いて、

Sar、beta - Ala及びAib は小さい;

t - BuA、t - BuG、N - MeIle、NIle、Mvl、Cha、Phg、NaI、Thi及びTicは疎水性

;

2, 3 - diaP、Orn及びHarは塩基性;

Cit、Acetyl Lys及びMSOは中性/極性/大きい。

【0050】

多種類のオメガアミノ酸は、サイズが小さい(beta - Ala及び3 - アミノプロピオン酸)と分類され、或は、大きい及び疎水性(他の全て)と分類される。

【0051】

他のアミノ酸置換体で、遺伝子コード化されないものは、本発明の範囲内のペプチド化合物に含まれて、それらの構造によって、この一般分類の範囲内で分類される。例えば、D - アミノ酸置換体は、特に経口投薬ルートにとって重要な内生的プロテアーゼ活性故に潜在する安定性問題を迂回するために望ましい。

【0052】

本発明の全ての化合物において、1以上のアミド結合(-CO-NH)は他の等価

な結合、例えば $\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ （シス及びトランス）、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 及び $-\text{CH}_2\text{SO}-$ で適宜置き換えられて良い。この置き換えは、当業界で知られている方法により行うことができる。以下の参考文献は、互換的結合部位を含むペプチド・アナログの調製が記載されている：Spatola, A. F., Vega Data (March 1983)、Vol. 1, Issue 3、「Peptide Backbone Modifications」(general review)；Spatola, A. F.の「Chemistry and Biochemistry of Amino Acids Peptides and Proteins」B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p.267 (1983) (general review)；Morley, J. S., Trends Pharm Sci (1980) pp.463 - 468 (general review)；Hudson, D.他、Int J Pept Prot Res (1979) 14:177 - 185 ($-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)；Spatola, A. F.他、Life Sci (1986) 38:1243 - 1249 ($-\text{CH}_2-\text{S}$)；Hann, M. M., J Chem Soc Perkin Trans I (1982) 307 - 314 ($-\text{CH}-\text{CH}-$, cis及びtrans)；Almquist, R.G.他、J Med Chem (1980) 23:1392 - 1398 ($-\text{COCH}_2-$)；Jennings - White, C.他、Tetrahedron Lett (1982) 23:2533 ($-\text{COCH}_2-$)；Szelke, M.,他、European Application EP45665 (1982) CA:97:39405 (1982) ($-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$)；Holladay, M.W.他、Tetrahedron Lett (1983) 24:4401 - 4404 ($-\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$)；及びHruby, V.J., Life Sci (1982) 31:189 - 199 ($-\text{CH}_2-\text{S}-$)。

【 0 0 5 3 】

本発明の範囲内の典型的化合物は次の通りである：

RPKPQQFFGLM	(配列番号 1) ,
TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	(配列番号 2) ,
TRAARAGLQFPVGRVHRLLRK	(配列番号 3) ,
TRLLRAGLQFPVGRVHRLLRK	(配列番号 4) ,
RAKPQQFFGLM	(配列番号 5) ,
RAKAQQFFGLM	(配列番号 6) ,
RAKAQQFPGLM	(配列番号 7) ,
RAKLQQFPGLM	(配列番号 8) ,
RAKGLQFPGLM	(配列番号 9) ,
RAGLGQFFGLM	(配列番号 10) ,
DAARAKGLQFPGLMAKLK	(配列番号 11) ,
DAARAKGLQFPGLLAKLK	(配列番号 12) ,
TRSRAKGLQFPGLMVHRL	(配列番号 13) ,
XQF-----Y	(配列番号 14)

【0054】

式中、「-」はスペーサ分子であり、「X」はSEQ ID NO 1-12のQFサイトの
上流のアミノ酸配列と相同の適切なアミノ酸配列の全てである。

【0055】

「活性な」化合物は、本発明のコア配列を含む化合物で、BttxB及び/又はTtt
xプロテアーゼ活性を阻害するものとして定義される。本発明の化合物のコンフ
ォーメーションは、円偏光二色性とFT-IRによって決定できる。CBnaves. J. M.
他(1998) J. Biol. Chem. 273:43214 - 34221参照。陽子NMRも又使用できる。
Yi G他(1996) FEBS Lett. 398:87 - 90参照。X線結晶学も又使用できる。Sutton
, R. B.他(1998) Nature 395,347 - 353参照。

【0056】

「誘導体」は、本発明のコア配列を有し、既知の21のアミノ酸(通常20で
あるが、一般的ではない、天然に現れる遺伝子コードされないアミノ酸であるセ
レノシステインを含めて)以外の「非天然」アミノ酸を含むアミノ酸修飾、又は
、他の化学物質、ラベル又は蛋白質と結合する反応中心を与えるために末端にシ
ステイン及びリジンなどの付加を有する化合物として定義される。

【0057】

式(1)、(2)又は(3)の化合物はBttxB又はTttxのプロテアーゼ活性を阻害するために最適化される化合物の構築に用いることができる。最適化はQFサイトの上流での螺旋構造の形成をプロモートするアミノ酸を置換することによりなされる。このような例は図7に示されるアミノ酸配列を有するペプチドである。

【0058】

物質PはBttxBの弱い阻害剤である。これはQFサイトの下流に螺旋構造を含む。これはQFサイトの上流に螺旋構造を有していない。コンピュータ・モデリングは物質Pと同じであるが、QFサイトの上流と下流に螺旋を有している化合物を構築するのに用いられている。このように、物質Pのような化合物は、強い阻害剤であるブフォリニンよりも、強力な阻害剤を構築するための分子構築ブロックとして利用できる。従って、物質Pは、本発明の化合物のコア構造と考えられる。

【0059】

例えば、物質PはP2A、G3K、P4L、Q5Gの4置換により修飾されて、配列RAGLGQFFGLMを有する化合物を得ることができる。これらの置換はBttxBプロテアーゼ活性を阻害するために要求される螺旋構造を生成すると予測される。Garcia他. J. Applied Toxicology, in press参照。

【0060】

他の実施態様において、B-1におけるチロシンの除去が阻害を減少するので、チロシンの位置は重要である。QFサイトのF残基からチロシンを位置決め(～21オングストローム)する目的でスペーサが物質P様分子構築ブロックにおいて利用できた。。

【0061】

適切なスペーサとして、ビス-マレイミドエタン(BMIE)8オングストロームス・スペーサ・アーム; 1,4-ビス-マレイミドブタン(BMB)10.9オングストロームス・スペーサ・アームが含まれる。Chen, L. L.他 J. Biol参照。

【0062】

下記のように、B - 1、VAMP 2 及びペプチド 3 6 のTyrの位置には明らかな類似性がある。

AGRGKQGGKVRAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGN	ブフォリン I
ERDQKLSELDDRADALQAGASQFETSAAKLKRKYWWKLNK	VAMP2 ₅₄₋₉₄
AGRGKQGGKVRAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	ペプチド36
RPKPQQFFGLM-----YYY	

【0063】

C - 末端の3つのアミノ酸の削除はB - 1と比べて50%BttxB阻害を減少させる。Garcia他(1999) J Applied Toxicol. in press参照。これは、Tyr残基の位置がこれらの化合物の阻害機能に重要であるだろうことを示す。

【0064】

従って、QF開裂サイトから最適な距離をTyr又は他の疎水性アミノ酸で置き換えて修飾することにより、物質P様分子構築ブロックから、BttxB阻害能を高めた化合物を創生することができる。この距離はペプチド配列又は他の適切なスペーサ分子によって与えられた。

【0065】

例えば、QFサイトのQから約6オングストロームの位置にTyrがあるV2配列において、そのQFサイトの上方に組み込まれたスペーサは阻害を改良できた。Whitcome他(1996) FEBS Let. 386: 133-136 (ELDDRADALQ)参照。

【0066】

スペーサは、望まれる距離に達するように個々の成分を架橋するために用いることができる。このようなスペーサは望まれる繰返し及び長さの炭素鎖を含む。炭素鎖スペーサは、それが分裂及び分解に対する抵抗性を与えるので有利である。スペーサ及びスペーサの使用は当業界で知られている。例、Synthetic Peptides Ed. G. A. Gant, W. H. Freeman & Co. New York, NY, 1992参照。

【0067】

これに代えて、QFサイトから適切な距離で活性基を導入するため、又は構造を強化するためにアミノ酸残基を用いてもよい。例えば、Cysはジスルフィド・ループのような特別な構造を持つように又は持たないように化合物を操作するのに

用いることができる。しかしながら、TCEPのような他の化合物の使用は、このように操作された構造に反作用する、即ちジスルフィド・ループが開かれる、かもしれない。

【0068】

このように、プレビン又は式(1)、(2)又は(3)のコア構造を、プフォルニン様化合物又はBttxBプロテアーゼ活性を高度に阻害する他の物質を構築するために使用できる。

【0069】

本発明化合物の調製

ここで「プレビン類」と頻繁に指定している本発明の化合物は、本質的に、コア構造又は分子構築ブロックであり、N-又はC-末端で修飾されていてもよく、BttxB又はTttxのプロテアーゼ活性を阻害する化合物を構築するために最適化されていてもよい。

【0070】

標準的方法が、サイズ及びコンフォーメーションがプレビンと同様のコア構造を合成するのに用いられる。固相合成技術が、現在、最も一般に用いられ、実に、ペプチド・チェーンを組織的に構築する自動装置を購入することができる。溶液相合成も用いることができるが、便利さがかなり落ちる。これらの標準の技術を使用して合成されると、遺伝子とD-エンアンチオマーによってコード化されないアミノ酸を合成で使用することができる。

【0071】

N-及び/又はC-末端を従来の化学の技術で修飾することができる。本発明の化合物は、アミノ末端で任意にアシル基又はアセチル基を含んでいてもよい。N-末端遊離アミノ基のアセチル化、更に一般的にはアシル化方法は、一般に当業界で知られている。

【0072】

カルボキシ末端で、カルボキシル基は塩の形で存在していてもよい。製薬組成物の場合、その塩は調剤上受け入れられる塩である。適切な塩は、 NH_4^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{++} 、 Ca^{++} 、などのような無機イオンで形成されるもの、及び

、カフェイン及び他の高度に置換したアミンような有機陽イオンで形成された塩を含む。カルボキシ末端は、上記で定義されるように、Rがヒドロカルビル(1-6C)である式ROHのアルコールを使用してエステル化されてもよい。同様に、カルボキシ末端は、ここで定義されるように、アミド化されて式 $-CONH_2$ 、 $-CONHR$ 、又は、 $-CONR_2$ をもっているとしても良く、各Rは独立的にヒドロカルビル(1-6C)である。エステル化とアミド化の技術は塩基の存在下に中和して塩を生成するのと同様に全ての標準の有機化学の技術である。

【0073】

本発明のコア構造が生理的状況の下で調製される場合、塩基性アミノ酸の側鎖アミノ基は関連する酸付加塩の形態であるだろう。

【0074】

ペプチド骨格が完全に遺伝子コードされたアミノ酸から成るか、又は、その若干の部分がそのように構成されるなら、そのペプチド又は関連部分は、DNA組換え技術を使用して合成されてもよい。本発明のコア構造をコードするDNAは、従来の装置で固層DNA合成のような当業界で標準の技術を使用して合成しうる。これには、フォスフォルアミダイト合成化学(Beaucage, S. L.他(1981) *Tetrahedron Lett.* 22:1859 - 1862)を利用するABI 3948核酸合成システム(Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA)が含まれる。DNAオリゴマーは、相補的配列にマッチするオーバーラップで合成される。これらの配列のアニール化は、ダブルストランド合成遺伝子を形成する。このプロセスでの構築において、必要な遺伝子が構築されるまで、より大きなそして、より大きなダブルストランド生成物を与えるだろう。また、DNA組換え手段は、本発明のコア構造、このコア構造を含む化合物又はH2A蛋白質の同様のフラグメントのクローニング、次にサイトに向けられた突然変異生成又はDNA-カセット置換、又は当業界の他の手段(*Methods Enzymology* vol. 152; Eds. S. L. Berge及び A. R. Kimmel, Academic Press, Inc., Orlando, FL, 1998)による望まれる修飾を行うための修飾に用いることができるだろう。コドン選択は、宿主の性質に依存して合成中に組み込むことができる。

【0075】

組換え生産のために、このコア構造をコードしているDNAは、適切なプロモータ及び計画された宿主細胞と適合できる他の制御配列の制御の下に、これらのコーディング配列を配置する表現システム中に含まれる。利用できる宿主細胞のタイプは、植物界と動物界のほとんど全ての範囲にわたる。このように、本発明のコア構造又はこのコア構造を含む化合物は、動物性細胞、昆虫細胞及び植物細胞におけるのと同様に細菌又はイースト（それらが非毒性又はリフラクチルな形態で生産され緊張に抵抗して利用できる範囲で）中で生産できる。

【0076】

本発明のコア構造又はこのコア構造を含む化合物は、このコア構造を含む化合物のコア構造をコードしているDNAに適切な信号ペプチドをコードしているDNAを融合することにより宿主細胞からそれらの分泌物になるであろう形態で生産できる。又は、細胞内に生産されてもよい。それらは、追加のアミノ酸配列との融合蛋白質として生産されてもよい。この配列はその後BttxBプロテアーゼ活性阻害剤としてこれらの化合物を使用するに先だって除去する必要があるかもしれないし、無いかもしれない。

【0077】

このように、本発明のコア構造は、化学合成、組換え生産又はこれらの技術の組合せを含む様々な様式で製造できる。

【0078】

自然に発生するプレビン分類のどんなメンバーでも精製され単離された形態で供給される。「精製され単離された」とは、このペプチドが普通に発生する（天然に発生するペプチドの場合に）環境からフリーであり、実際に使用できる形態であることを意味する。このように、「精製され単離された」形態はそのペプチドが実質的に純粋で、即ち、90%以上純粋で、望ましくは95%以上純粋で、より望ましくは99%以上純粋であるか、又は製薬的調製のそのような完全に異なる状況にあることを意味する。

【0079】

本発明は、また、これらのコア構造を有する化合物のためのスクリーニング分析とこれらのコア構造及びこれらのコア構造を有する化合物を利用している分析

に向けられている。

【0080】

本発明は、また、BttxBの細胞内阻害剤としてのこれらのコア構造を有する化合物の用途に向けられている。細胞表面ガングリオシドの受容器様認識と毒素の重鎖(HC)サブユニットを標的としている神経細胞によるシナプトガミン(synaptogamin)のゆえに、Bttxsは特に神経細胞を標的とする。Kozaki, S.他(1998) Microb. Pathog. 25:91 - 99参照。一旦、結合すると、この毒素は完全には理解されていないメカニズムで内面化されるが、明らかに、エンドゾームの酸性化と、そのHCとそのエンドプロテオリチカリ(endoproteolytically)に活性な軽鎖(LC)とを結合している二硫化物結合の開裂を要求する。

【0081】

この分配システムの特異性が、BttxBで毒を入れられるか潜在的に毒を入れられるそれらの細胞タイプにこれらのコア構造を有する化合物を分配するのに役立つであろう。そして、不思議な弾丸アプローチは現実になっているので、1つの「不思議な弾丸」として使うことができるだろう。例えば、Pastan, I.他(1994) Ann. Rev. Biochem. 61:331 - 354及びEngert, A.他(1998) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 234:13 - 33(ジフテリア毒素又はRicin A chainに結合した免疫毒素の紹介)参照。

【0082】

従って、これらのコア構造又はこれらのコア構造を有する化合物は二硫化物結合のような結合で、BttxB HCに連結されるかもしれない。あるいは、プフォリニンは人間のアルブミン又はもう一つの橋のような担体タンパク質で、BttxB HCに連結して多蛋白質共軛体を成形しているかもしれない。この共軛体は、その後BttxBと同様に影響されやすい細胞を標的とするに違いない。細胞中に入ると、この共軛体はBttxBを阻害でき、又は、その結合が開裂してそのコア構造を有する化合物又は担体 - コア構造を遊離し、BttxBを阻害しうる。

【0083】

抗体

これらのコア構造に対する抗体は、ポリクロナール抗血清の生産の標準的免疫

学技術を使用して製造できる。必要に応じて、モノクローナル抗体生産源のために免疫された宿主の抗体産生細胞を不滅にして生産し得る。関心の有るどんな物質に対しても抗体を生産する技術は、よく知られている。特にここでは物質が短いペプチドだけであるが、その物質の免疫原性をこのハプテンをキャリアに連結させることによって、強化することが必要であるかもしれない。この目的のための適切なキャリアは、施されるべき哺乳類中で、それ自身でそのハプテン - キャリア共軛体に免疫応答を生産しない物質を含む。使用される共通のキャリアは、鍵穴カサガイ・ヘモシアニン (KLH)、ジフテリア・トキソイド、血清アルブミン、及びロータウイルス (VP6) のウィルスのコートタンパク質を含む。キャリアに対するハプテンの結合は、ジシクロヘキシルカルボジイミドなどの脱水剤の存在下にそのペプチドとキャリアを接触させ、又はPierce Chemical社、シカゴ、ILを通して入手可能な結合剤を使用するような標準的技術により行われる。

【0084】

免疫原性形態のこれらのコア構造又はこれらのコア構造を有する化合物は、次に適切な哺乳類宿主に注射され、血清中の抗体の滴定濃度が監視される。

【0085】

滴定濃度が十分に高いとき、ポリクローナル抗血清は収穫されてよい。あるいは、脾臓細胞又は周辺血液リンパ球のような宿主の抗体産生細胞が収穫され、不滅化されてもよい。不滅にされた細胞は、それから個々のコロニーとしてクローンにされ、望まれるモノクローナル抗体の生産のために選別される。選択されたハイブリドーマ又は他細胞によって分泌されるモノクローナル抗体をコードしている遺伝子は、例えば、多数のエピトープ特異性を提供するか、単鎖形態をコード化するために必要に応じて回収し、操作してもよく、CHO細胞などの他の宿主細胞中での発現のために加工されてもよい。

【0086】

このように、ここで使われる「抗体」は、Fab、Fab'及びF(ab')₂断片などの免疫グロブリンの免疫学的に反応性のある全ての断片を含み、同様に、Fv領域のような修飾された免疫反応性形態を含む。これらは関連する遺伝子（例えば、適当なハイブリドーマから単離可能な）の操作によって生産される。

【0087】

本発明の抗体は、もちろん、本発明のコア構造の量又は存在を決定するための免疫測定で役立つ。そのような分析は、本発明のコア構造を含有する組成物の品質制御生産において不可欠である。加えて、この抗体はこのコア構造の組換え生産の有効性を評価するのに用いることができる。同様に、プレビンコード化遺伝子の存在のための発現ライブラリをスクリーニングするためにも用いることができる。それらは、また、これらのコア構造及びこれらのコア構造を有する化合物を精製し及び/又は単離するための親和性リガンドとして用いることができる。それらは、また、RIA及びELISAのような技術においてよく知られた方法によって血清又はプラズマ中のコア構造検出及び測定するために用いることができる。従って、十分な薬量を保証するために、循環するプレビン又は本発明のコア構造を有する化合物のレベルを監視することができる。

【0088】

プレビン類含有組成物と使用方法

これらのコア構造はBttxB及び破傷風菌神経毒のプロテアーゼ活性の阻害に効果の有る化合物の構築に有用である。従って、本発明のコア構造を含む化合物は、BttxB及びTttx中毒のために防止、予防と療法に用いることができる。そのような状況のために、このコア構造を含む化合物を単独で投与してもよく、コア構造を含む化合物類と遊離のプレビン類の様々な集まりとして投与してもよい。更に、追加のプロテアーゼ阻害剤又はトリス - (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) のような補助の化学物質との混合物として投与してもよい。

【0089】

TCEPは、無臭の、スルフヒドリルを含まない還元剤であり、動物に比較的毒性が無い($\text{P} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$)₃HCl ; Molecular Probes, Inc. Eugene OR)。TCEPはHC及びLCとの間の二硫化物結合を還元でき、BttxB又はTttxサブユニットの解離を許すことができる。この解離により、BttxBプロテアーゼ活性を阻害する化合物は活性QFサイトの利用性を増加する。その上、毒素の解離は、神経細胞浸透を妨害する。ジチオスレイトール (DTT) のような他の還元剤を使用してもよい。しかしながら、それらの特徴的な臭気と毒性のために異議があるかもしれない。従

って、TCEPは好ましい。

【0090】

本発明のコア構造は、また、分析を監視する際の標準物質、及びその後のこれらのコア構造を含む化合物の生産の効果を評価するための分析において標準物質として役立つ。これは、BttxBに対するエンドペプチターゼ活性分析を利用することによって行うことができた。このエンドペプチターゼ分析において、可能性のあるペプチドが、細胞内ターゲット、VAMP2のアミノ酸55-94を含んでいる合成ペプチド基質の開裂能力によって、BttxBの阻害剤として機能するか、基質として機能するかを評価できる。開裂生成物は、 C_{18} 逆相HPLCカラムによって分離でき、205nmでの吸光度により検出できる。

【0091】

動物対象でBttxB及びTttxによって引き起こされる初期中毒又は更なる中毒を防ぐために、これらのコア構造又はこれらのコア構造を含む化合物は医薬又は獣医薬組成物として処方することができる。処置される対象、投与モード、及び要求される治療のタイプ、例えば防止、予防、治療などにより、これらのコア構造又はこれらのコア構造を含む化合物は、これらのパラメータに調和するように処方される。そのような技術の概要は、レミントンのPharmaceutical Sciences (最新版)、Mack Publishing社、イーストン、PAに見出される。

【0092】

一般に、治療又は予防における使用のために、プレビン類又はこれらのコア構造を含む化合物は単独で、或は、VAMP2のようなプロテアーゼ活性を阻害する他の化合物と組合せて使用してよい。全てのD-アミノ酸を含んでいるエナンチオメリック(enantiomeric)形態の使用は、トリプシン及びキモトリプシンのようなプロテアーゼに対する抵抗などの利点を授けるかもしれない。

【0093】

プレビン類又はこれらのコア構造を含む化合物は、単独で又は幾つかのプレビン類又は化合物類の混合物として、或は、他の薬学的に活性な成分との組合せて、並びに、単一投与又は多重投与で投与され得る。処方は全身の投与に適切な方法で調製されてよい。全身処方、例えば、筋肉内注射、静脈内注射、皮下注射

などの注射用に設計されたものを含み、経皮投与、経粘膜投与又は経口投与用に調製されてもよい。処方是一般に希釈剤を含み、場合によっては、助剤、緩衝剤、防腐剤なども含む。プフォリニン類は、従来の技術を用いて脂質性被膜粒子組成物に含めて、又は微細乳液としても投与できる。

【0094】

経口投与される場合、本発明の化合物は適切な消化器官コーティングを用いて、胃で分解されないように保護されるべきである。これはD-コンフィギュレーションのアミノ酸を用い、プロテアーゼに対する抵抗を与えることである程度避けることができる。しかしながら、このペプチドは、なお酸による加水分解に影響されやすいので、ある程度の消化器官のコーティングは、まだ必要かもしれない。

【0095】

本発明における有用な化合物及びそれらの関連化合物の投与及び処方の方法は、状態の逼真性、状態の厳しさ、処置されるべき特定の対象、開業医の判断に依存する。処方は投与形態に依存する。本発明の化合物が小分子であるので、それらは適切な製薬賦形剤と混合され、タブレット、カプセル、シロップなどにされて、経口投与により便利に投与される。経口投与のための適切な処方は、緩衝剤、風味剤などの微量成分を含んでいてもよい。典型的には、処方における活性成分の量は、全処方の5% - 95%の範囲にあるが、そのキャリアに依存して幅広い変化が許容される。適切なキャリアは、サッカロース、ペクチン、ステアリン酸マグネシウム塩、ラクトース、落花生油、オリーブ油、水などを含む。

【0096】

本発明における有用な化合物は、また、座薬又は他の経粘膜媒体により投与されてもよい。典型的には、このような処方は、調剤上受け入れられる洗浄剤のような粘膜を通してこの化合物の通過を容易にする賦形剤を含む。

【0097】

これらの化合物は、乾癬のような局所の状況のために、又は皮膚に浸透するように計画された処方で、局所投与されてもよい。これらは、ローション、クリーム、軟膏等を含み、既知の方法で処方することができる。

【0098】

これらの化合物は、静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射、又は腹膜内注射を含む注射によって投与されてもよい。そのような用途の典型的処方、ハंक溶液又はリンゲル溶液のような等張媒体中の液体処方である。

【0099】

適切な他の処方は、鼻のスプレー、脂質性被膜粒子処方、緩慢放出処方などを含む。

【0100】

それに代わる如何なる適切な処方が用いられてよい。業界公知の処方の解説は、レミントンのPharmaceutical Sciences (最新版)、Mack Publishing社、イーストン、PAに見出される。このマニュアルの参照は、当業界で日常的である。

【0101】

本発明のプレビン類又はコア構造を含む化合物を分配する好ましい手段は、TCEPの使用を含むだろう。TCEPは、ホロトキシンを開裂してこれらのコア構造が利用できるサイトを生成するからである。TCEPは更にその毒素を個々の構成要素に解離して、その神経細胞浸透を妨げる。

【0102】

更に、これらのコア構造は、BttxB毒素に冒された細胞に的をしぼってプレビン類又はこれらのコア構造を含む化合物を送り込むために、BttxB重鎖を含むが軽鎖を除外してある様々な化合物に連結することができた。

【0103】

本発明の化合物の薬量は、数多くの要因に依存し、患者毎に変わるだろう。

【0104】

以下の実施例は、本発明を説明するためのものであって制限するものではない。

【0105】

実施例 1エンドペプチターゼ活性分析

この毒素は、活性化混合物中で25 で30分間培養することにより、使用直前

に活性化された。活性化混合物は1消化当たり7.5 μ l中に毒素2.4 μ g (16pmol)、30mMのNaHEPESバッファ、pH7.3、及び5mMのDTT又はTCEPを含む。1消化当たり1 nmolの基質ペプチド (VAMP2 55 - 94)、4%のDMSO、4%のトリトンX-100及び80 mMのNaHEPESバッファ (pH7.3)を含む基質ペプチド混合物が調製された。最終反応混合物は25 μ lの基質ペプチド混合物、4.5 μ lの新鮮な10mMのDTT、13 μ lのH₂O又は試験ペプチド、及び7.5 μ lの活性化混合物を加えることで調製された。反応は37°Cで培養することによって開始された。この反応は、1volのトリフルオロ酢酸 (TFA) を0.25%まで添加することで停止された。試料は、遠心分離によって澄明にされた。

【0106】

この分析法では、16pmolのBttxBIは、37°C、45分未満で1 nmolの基質を完全に消化した。

【0107】

実施例2

消化生成物の逆相HPLC分析

消化されたペプチド生成物は、Beckmanシステム・ゴールドVer8.1のソフトウェアによって制御されたBeckman126ポンプとモデル168Diode Array検出器に取付けられたウォーターズのBondapak分析用C₁₈カラム (3.9mmのx30cm)でRP-HPLCによって分別された。溶媒系は、バッファA (BA; H₂O - 0.1% TFA)とバッファB (BB; CH₃CN - 0.1% TFA)からなる。展開プログラムは、0から1分後まで97%のBA、1分後から30分後まで33%のBB、次に5分間97%のBBで洗浄し、続いて10分間97%のBAで均衡化するというものであった。流速は、1.5ml min⁻¹であった洗浄及び均衡相の間以外ではml min⁻¹であった。ウォーターズIntelligent Sample Processor (WISP Model 712)で75 μ リットルが注入された。流出液は、205 nmと280 nmの2つの波長で監視された。

【0108】

最初に、消化生成物は、フェニルチオヒドレーション誘導のアミノ酸検出用のHPLC (ABIモデル120A)とインラインで取付けられたABI477A蛋白質シーケンサで自動化エドマン分解を用いるペプチド配列決定により同定される。消化の

範囲は、未消化のコントロール（毒素が加えられていない）と全消化（消化は2乃至3時間で完全に行われる）とのピーク領域の比較によって決定された。阻害又は消化の範囲は、標準物質及び/又は定量された標準物質又は阻害剤を加えることなく完了するまで消化された消化物と比較して作られた生成物とのピーク領域の比較によりクロマトグラムの検査で決定される。

【0109】

実施例3

二次構造予測

二次構造はnnpredict及びGibrat (GOR2) プログラムを用いて予測された。McClelland, D. G、Rumelhart D. E、In Explorations in Parallel Distributed Processing. vol. 3:318 - 362. 1988. MIT Press、Cambridge MA ; Kneller D. G. 他(1990) J. Mol. Biol. 214:171 - 182 ; Garnier, J. 他(1978) J. Mol. Biol 198 ; 425 - 443 ; Garnier J. 他(1987) J. Mol. Biol. 120:97 - 120 ; Garnier, J. 他(1996) Methods Enzymol. 266: 540 - 553. 螺旋輪突起は、AntheptrotプログラムVer 4を使用してなされた。Deleage, G.、Institut de Biologie et Chimie des Proteins、Lyon、France参照。

【0110】

Gibratプログラムは、B-1がVAMP2のそれと同様の - 螺旋 - 回転 - - 螺旋コンフィグレーションが形成できたと予測する。表3参照。ブフォリンIがそれからVAMP2と同様の二次構造を形成できるという結果は、B-Iも又VAMP2と同様の螺旋バンドリングで逆回転のスーパー二次構造を成形できることを示唆する。Lebeda他(1996)参照。この予測を支持して、我々は、ブフォリンIが先端切断されるにつれてBttxB活性の阻害及びその螺旋内容が減少することは、基質削除でBttxB活性が減少することを反映していることを見出した。表1と図4におけるブフォリン-IIについてのデータを参照。

【0111】

実施例4

ブフォリニン類、プレピン類及びコア構造を含む化合物の調製

Park, C. B他 (Park, C.B.他(1996) Biochem. Biophys. Res. Comm. 218:408

- 413参照)により記載された方法を使用した腸洗浄によって、これらのプフォリニン及びこのコア構造を含む化合物類は両生類の胃から得ることができる。

【0112】

L.A. Carpino, J. Am. Chem. Soc. 79,4427 (1957)、C.D. Chang他、Int. J. Pept. Protein Res. 11,246 (1978)、E. Atherton,他、J. Chem Soc. Chem. Commun., 537 (1978)及びR.B. Merrifield、J. Am. Chem. Soc. 85,2149 (1963)及びBarlos, K.他(1989)、Tetrahedron Lett. 30:3947に記載されるように、プフォリニン類及びこのコア構造を含む化合物類は固相ペプチド合成(SSPS)によって合成できる。

【0113】

これらのプフォリニン、プレビン及びコア構造を含む化合物は、当業界で一般に知られているDNA組換え手段で生産できる。即ち、混成システムにおいて発現に適するプロモータ、即ち、細菌、真菌、昆虫又は哺乳類の細胞培養が用いられたい。DNA配列は、特定の宿主とtRNA含有量のために最適化できる。例えば、プフォリニン、又は本発明のコア配列を含む他の化合物は、このコア配列を単離するために酵素的に消化される。単離されると、組換え手段を用いて、BttxB又はTttxのプロテアーゼ活性を効果的に阻害する化合物を創る目的で、この配列を修飾し又はこの配列に追加のアミノ酸又は他の成分を付加したりすることができる。

【0114】

実施例5

プフォリニンによるプロテアーゼ活性の阻害

実施例1及び2で述べられたように、エンドペプチターゼ分析と逆相HPLCは、開裂生成物とプロテアーゼ阻害範囲を検出するのに用いることができる。簡潔に言えば、Garica、他により記載された毒素を含む活性化混合物の添加の直前に、潜在的阻害剤が基質ペプチド混合物に加えられてよい。37 で45分間培養後、反応は停止されなければならず、消化生成物はRP HPLCを用いて分析できる。もし蛍光ラベル化基質が使われるなら、生成物の形成はインライン蛍光探知器で決定されるだろう。

【0115】

阻害又は消化の範囲は、実施例2で記載したようにして決定されるだろう。即ち、残存する未消化の基質及び/又は形成された生成物が、定量された標準物質と、又は阻害剤を加えることなく完了まで消化された消化物と比較される。

【0116】

それに代わる手段として、濃度測定法を含むものがある。その基質及び生成物が、電気泳動で分離され、蛋白質特異性の染料、即ち、Coomassieブリリアント・ブルーで染色され、測定される。基質又は生成物に特異的抗体を利用することによって、阻害又は消化の範囲を決定する免疫測定を行ってもよい。

【0117】

それに代わる手段は、生体内保護又は組織特異機能分析をも含む。例えば、実験動物に付加剤と共に或は付加剤なしで阻害剤を投薬し、それから毒素に挑戦する。例えば、TCEPのような還元剤と共にブフォリニンを生体内注射する。その後、徴候の発症又はLD₅₀の変化が、評価される。組織保護分析は、完全な神経-筋肉調製物を使用し、神経細胞刺激への筋肉痙攣反応が評価される。毒素は、ブフォリニン及び付加剤と共に前培養されて、それから組織調製物に加えられる。

【0118】

実施例6BttxBプロテアーゼ活性に影響を与えるブフォリニン類、プレビン類及び本発明のコア配列を含む他の化合物の設計

標準的方法と技術を用いて、本発明のペプチドは、Pro₂₆を基質に更に似ている活性サイトをつくるためにグルタミンに、又はProにより強いられる回転の抑制なしに回転に有利に働く他のアミノ酸で代えることを含む変異又は置換によって修飾されてもよい。そのような置換は、毒素の解離を起こす更に効果的な螺旋バンドリングに帰結すると予測される。螺旋領域の他のアミノ酸置換又は変異がなされることにより両親媒性になり、螺旋バンドリングを改善するか、或は、毒素との相互作用を改良する。このような変化は、L又は他の螺旋嗜好アミノ酸でのR11の置換を含む。図6A及び図6Bを参照。同様に、R11L、K15L及びS18L、又は他アミノ酸類の多重置換が行われることは、螺旋形成及びバンドリングに好

ましい。

【0119】

それに代わって、B-Iの予測される上流螺旋が欠落するB-IIを、BttxBプロテアーゼ活性の阻害能力を強化して、向上させるために修飾できる。例えば、置換S3A及びS4A (SEQ ID NO:5)を持つペプチドは、QFサイトの^{上流}に予測された螺旋を持っている。もう一つの例は、置換S2LとS4L (SEQ ID NO:6)を持つペプチドである。同様に、このペプチドは、QFサイトの^{上流}に予測された螺旋を持つ。

【0120】

実施例7

ブフォリニン類、プレビン類及び本発明のコア配列を含む他の化合物での前処理

ブフォリニン類、プレビン類及び本発明のコア配列を含む他の化合物は、BttxB又はTttxBで汚染されるかもしれない食物と液体を前処理するのに用いることができる。例えば、ブフォリニン、プレビン又は本発明のコア配列を含む他の化合物の有効量が、BttxBプロテアーゼ活性を阻害するためにBttxBを含む水の中に混合される。例えば、1ugのBttxBを含む水100mlが、タブレット、粉末又は液状の100ugのブフォリニン、プレビン又は本発明のコア配列を含む他の化合物と0.1mmolの還元剤、即ちTCEPで処理される。

【0121】

これらの種々の形態は、ブフォリニン、プレビン又はこのコア配列を含む他の化合物、TCEPのような還元剤及び他の充填剤及び安定剤からなる。液状形態は、タブレット又は粉末から作られ、それが使用前に予め溶解される。ブフォリニン、プレビン又は本発明のコア配列を含む他の化合物の溶液は、表面にBttxBを有する固形食物の表面に塗布されてもよい。あるいは、その溶液の有効量は、食物の表面で見つからないBttxBの量へその溶液の活性成分が接近できるように微粒子に粉碎された固形食物を処理するのに用いることができる。

【0122】

汚染されているか疑惑のある食品以外のものの表面は、ブフォリニン、プレビン又は本発明のコア構造を含む他の化合物の溶液で洗ってもよい。浸したり、表

面を拭いたりして使用されるスプレー、泡、おしぼり又はスポンジとして、本発明の化合物は適用される。その量は、典型的には適用される溶液ml当たり200ugである。しかし、要求される濃度は汚染の範囲に依存し、適切な活性成分の濃度は必要に応じて調整されてよい。

【0123】

実施例8

予防処置での使用

ブフォリニン、プレビン又は本発明のコア配列を含む他の化合物のは、BttxB又はTttx中毒に対する予防薬として使用できた。対象は、BttxB又はTttxと接触しそうな状況に入る前にブフォリニン、プレビン又は本発明のコア配列を含む他の化合物で処置することができた。投薬モードと量は、接触で予想される毒素の量と接触が起こるかもしれない時間に依存している。瞬間接触のための好ましい投与は体内投与である。より遅くてより長びく曝露のための好ましい投与形態は、摂取である。しかし、パッチのような他の遅い分配の放出形態が、用いられてもよい。

【0124】

実施例9

エアゾール汚染の防止

ブフォリニン、プレビン又は本発明のコア配列を含む他の化合物は、エアゾール形態のBttxBを不活性化するために、使い捨ての、湿ったフィルタの、呼吸マスクに組み込ませてもよい。この毒素は湿ったフィルタで捕獲され、ブフォリニンで不活性化されるだろう。

【0125】

そのようなフィルタのデザインは、バクテリアより小さい、例えばHEPAなどのように1ミクロンの毒素粒子から保護する。これらのフィルタは、予め湿らせ、ブフォリニンとTCEPなどの補助化学薬品を含浸させて提供できた。これに代えて、これらのフィルタは、予め含浸させた乾燥フィルタを濡らすことによって、又はフィルタをブフォリニンの溶液に浸すことによって製造する事もできた。空気の処理能力を持つ閉鎖領域でも、適切な大きさに設定されたフィルタでこの形式

で保護することができる。

【0126】

実施例10

傷治療

毒素が体内に吸収される機会を持つ前に、開いた傷口にブフォリニン、プレビン又は本発明のコア配列を含む他の化合物を局所的に適用して、BttxB又はTttx中毒を阻止することができた。ブフォリニンと、還元剤及び他の安定剤又は充填剤を含む補助剤を含む粉末混合物が直接傷に適用されてよい。この試みは、傷がブフォリニン、プレビン又は本発明のコア配列を含む他の化合物を溶かすほどに濡れていることを頼りにしている。これに代えて、ブフォリニン含む軟膏、液体、スプレー、泡又はおしぼりを傷の表面にあてがってもよい。おしぼりは、実施例10のフィルタと同様の方法で供給され又は作ることができた。

【0127】

実施例11

曝露後

BttxB又はTttx中毒に既に冒されている対象をブフォリニン、プレビン又は本発明のコア配列を含む他の化合物で治療することができた。これらの処置は、感受性細胞に未だ入りこんでいず、アクセスできる毒素を掃除することである。感受性細胞の中毒は、細胞機能抑制に至るが、細胞自身に致命的でない。十分な時間があれば、細胞は回復することができて、再び機能的になることができる。この回復過程は、数ヶ月続くかもしれない。したがって、ブフォリニン、プレビン又は本発明のコア配列を含む他の化合物での治療は、対象の回復を手伝い、互換的生命維持手段の必要を減らす。この治療は、ブフォリニン - BttxB HC又は他の、プレビン又は本発明のコア配列を含む他の化合物の類似共軛体の使用からなる。Bttx - HC部は、感受性細胞にこの共軛体を特異的に方向付け、この毒素と同様の方法で取込が発生すると思われる。細胞内で、ブフォリニンは毒素に接近して、プロテアーゼ活性を阻害し、それによって、毒素が内部で発生するタンパク質分解によって細胞から除去されるまで、細胞を更なる毒素損害から保護する。

【0128】

実施例 1 2

ボツリヌス菌毒素サブクラスの識別

ブフォリニン、プレビン又は本発明のコア配列を含む他の化合物を、BttxB又はTttxの識別のために使用できる。未知のBttx又はTttxが基質及びもし存在するならばBttxB及びTttxを特異的に阻害する1つのブフォリニン、プレビン又は本発明のコア配列を含む他の化合物と培養される。未開裂の基質の検出又は消化生成物の減少は、毒素の識別を許す。

【0129】

これは、阻害が特異的である故に、確認分析として有用である。例えば、VAMP 2のようなC-末端蛍光ラベル化基質が、微量滴定プレートに取り付けられる。Hallis. B.他、(1996) J. Clin. Microbiol. 34:1934-1938参照。次に、未知の試料が、ウエル(well)に加えられて、培養される。反応が停止され、ウエルはすすがれる。蛍光の減少は、毒素に基質が感受性であることを示す。ブフォリニン、プレビン又は本発明のコア配列を含む他の化合物が消化混合物に含まれるならば、BttxB又はTttx毒素は特異的に阻害され、蛍光レベルは阻害剤なしでBttxBを含んでいる反応生成物より高いだろう。

【0130】

実施例 1 3

ボツリヌス菌B毒素のプロテアーゼ活性を阻害するために最適化されたコア構造を有する化合物の構築

式(1)、(2)又は(3)のコア構造は、図7に示されるような配列に装飾又は置換を行うことにより最適化できる。これらのコア構造は、次にボツリヌス菌B毒素のプロテアーゼ活性を高度に阻害する化合物構築するために使用できる。

【0131】

例えば、標準方法及び技術を用いて、本発明のコア構造は、変異され、或は、回転フォーメーションに味方する置換及びアミノ酸付加を行うことにより修飾される。他のアミノ酸付加、変異化、又は置換は、そのヘリックスがヘリックス・バンドリングを改良し、又はその毒素との相互関係を改良して、更に両親媒性に

なるように行われる。

【0132】

出典明示による記載

本発明の開示を理解し完全にするために必要な範囲まで、ここに記載した全ての出版物、特許及び特許出願は、個々に取り込まれた同じ範囲で明白に取り入れられる。

【0133】

本発明は図面を参照して更に理解される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1 A及びBは、物質PがBttxBの基質ではないが、阻害剤であることを示す。

【図2】

図2は、物質PのBttxB阻害度を示す。

【図3】

図3は、プフォリンIによるBttxBエンドプロテアーゼ活性の阻害を示す2軸逆数表示グラフである。

【図4】

図4は、各種プフォリニンによるBttxBエンドプロテアーゼ活性の阻害を説明している。

【図5】

図5は、ブルックヘブン蛋白質データベース#1HI0により生成されたトリ染色体蛋白質ヒストンオクタマーH2A残基Lys15 - Try39のX線結晶構造を説明している。

【図6】

図6 Aは、プフォリンIと変異体B - I R11L及び変異体B - I R11L, K15L, S18Lのアミノ酸配列の比較である。

図6 Bは、プフォリンIのヘリックス1及びヘリックス2の螺旋輪突起を示す。

図6 Cは、変異体B - I R11L及びB - I R11L, K15L, S18Lのヘリックス1の螺旋

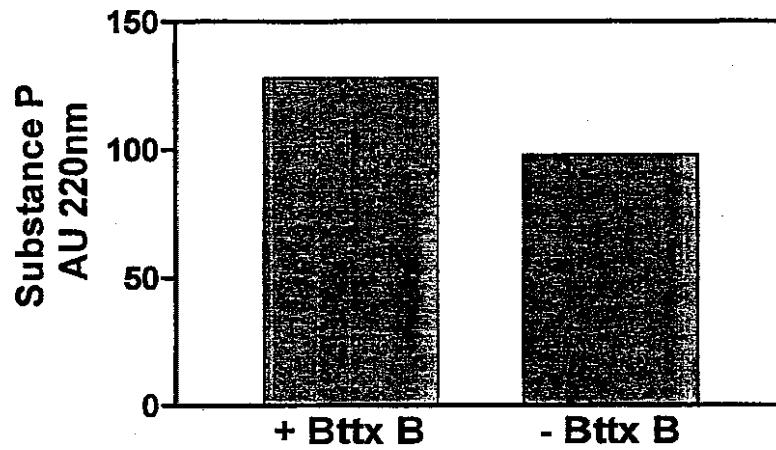
輪突起を示す。

【図7】

図7は、式(1)、(2)又は(3)の典型的化合物を示す。

【図1】

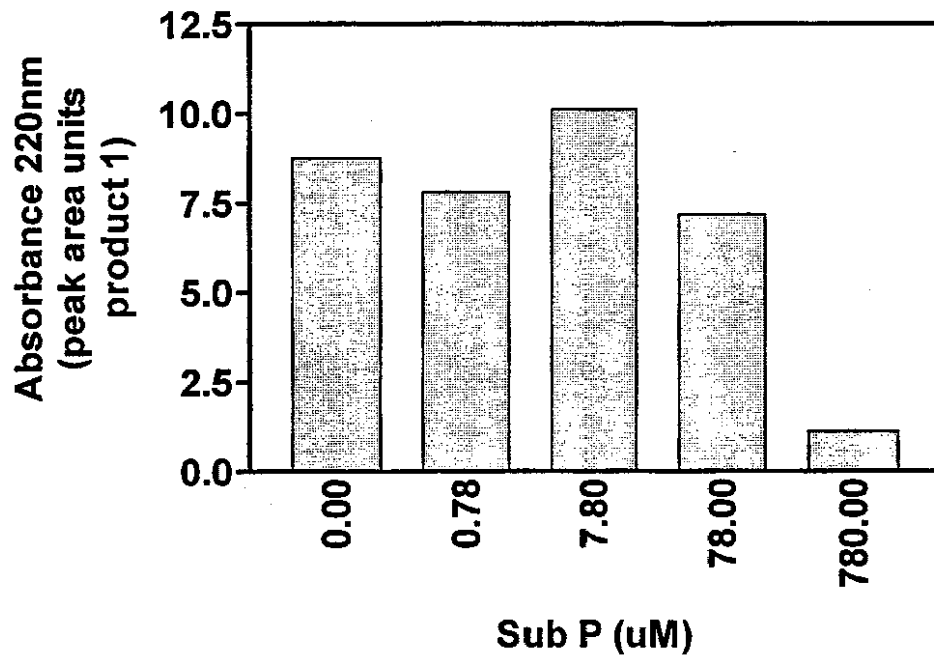
FIG. 1



物質PはBttxBの基質ではない。
BttxBエンドペプチダーゼ分析に於ける物質P(Sub P)の
消化後RP-HPLCにより解析した。
両方の条件のSub P濃度は30 μ Mであった。

【図2】

FIG. 2



物質PのBttx B活性阻害。実施例1に記載されるようにBttx Bエンドペプチダーゼ分析へ加えられる物質Pの濃度を上昇させ、実施例2に記載されるように分析した。生成物1は基質消化で放出されたより小さいペプチドである。

【図3】

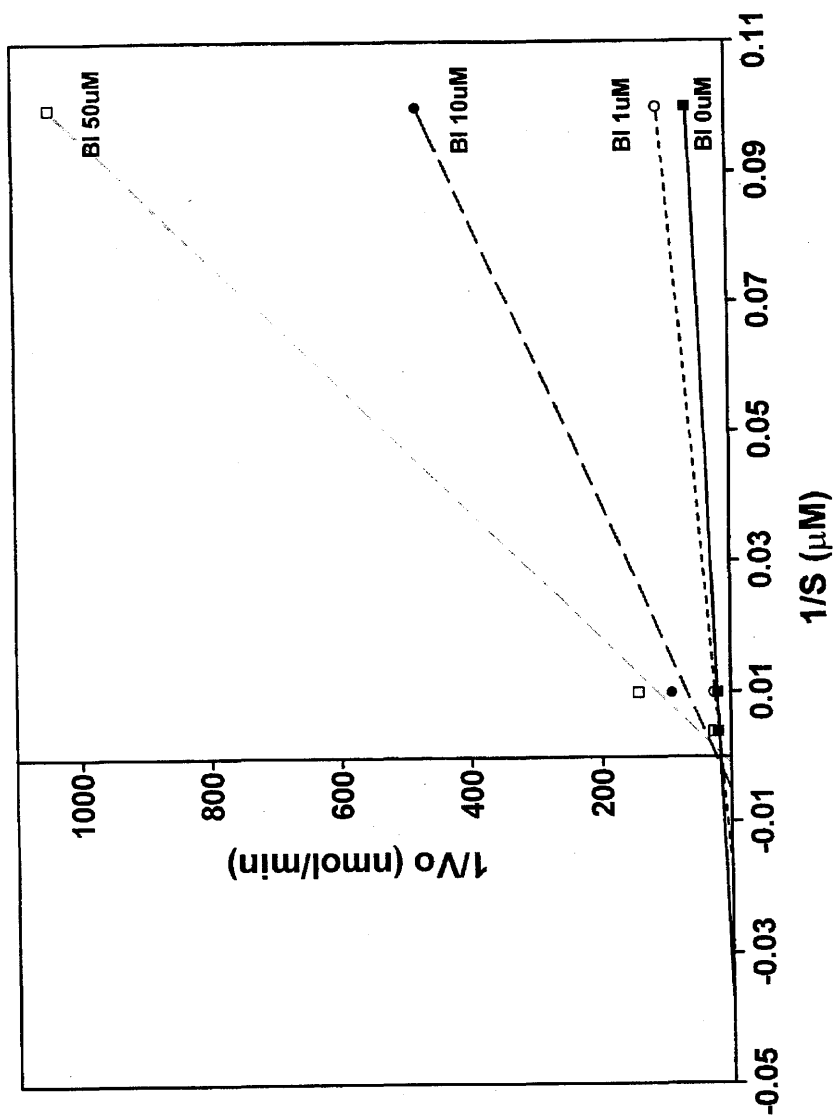


FIG. 3

ブフォリン-IによるBttx Bエンドプロテアーゼ活性の阻害の2軸逆数表示。平均値がプロットされた。

【図4】

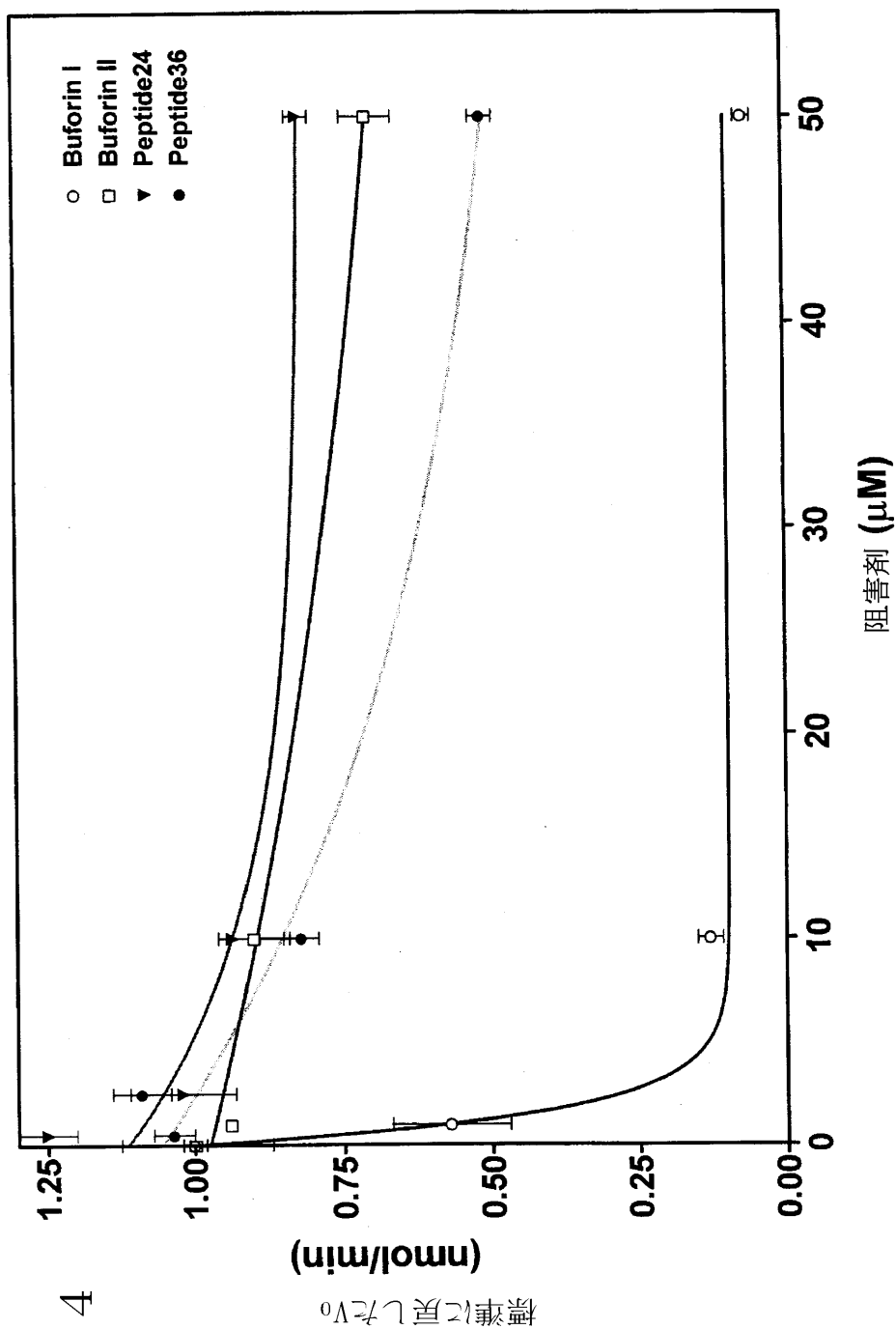
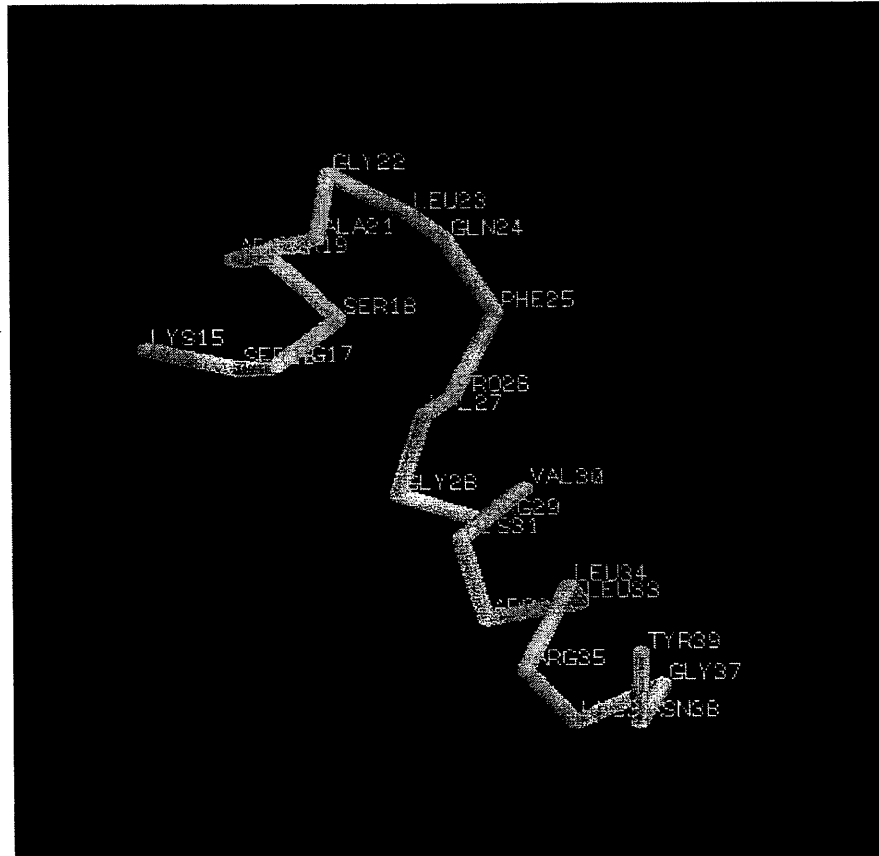


FIG. 4

Bttx Bエンドプロテアーゼ活性の阻害。ブフォリン-I, ブフォリン-II, ペプチド24及びペプチド36の配列は表1の通り。エラーバーは+/-SEMを示す。

【図5】

FIG. 5



X線結晶学で決定されたニワトリH2Aの炭素骨格。QFサイトはGln24-Phe25。
ブルックヘブンPDB#1HI0から誘導された配列, Arents, G., et al. (1991)
PNAS 88:10148-52参照。

【図6】

FIG. 6

A.
B-I



B-I R11L

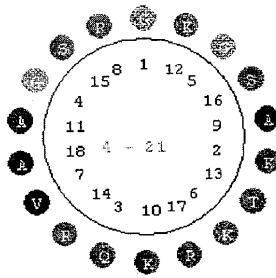


B-I R11L, K15L, S18L

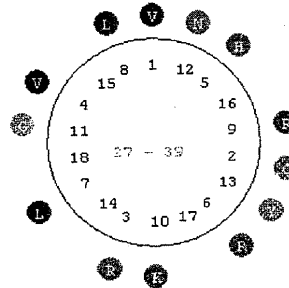


B.

B-I
Helix 1

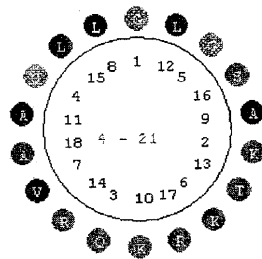


B-I
Helix 2

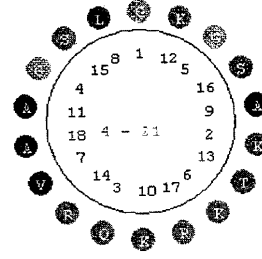


C.

B-I R11
Helix 1



B-I R11L, K15L, S18L
Helix 1



ブフォリン-I と幾つかの可能なヘリックス1 変異体との比較。
 ヘリックス1 及び2はそれぞれQFサイトの 上流及び下流の配列として予測される
 螺線である(表2 参照)。変異体は示されたヘリックスの両親媒性を増大する
 ように選択された。B-Iヘリックス2は、ヘリックス1が会合すると予測される
 相手として示される。A. アミノ酸配列。B. ブフォリン-I の螺線輪突起。
 ヘリックス1はQFサイトの予測される上流ヘリックスであり、ヘリックス2は
 下流ヘリックスである。ヘリックスのアミノ酸は、円の中に示されている。
 C. ブフォリン-I の変異体の螺線輪突起。アミノ酸の順序は同心の数字で示される。
 A. B. 及びCにおける色コードは円の中に示されたアミノ酸に関して次の通り
 である：黒灰色：疎水性；白灰色：親水性；点描灰色：その他；

【図7】

FIG. 7

RPKPQQFFGLM CCCCHHHHHHH	物質P
RAK PQQFFGLM HHCHHHHHHHH	上流配列におけるヘリックス構造をプロモートする変化。
RAKA QFFGLM HHHHHHHHHHH	ヘリックス構造をプロモートする変化。
RAKA QFFPGLM HHHHHHCHHHH	変化は、QFサイトの次にヘリックス開裂を導入する。
RAKL QFFPGLM HHHHHHCCHHH	QFサイトの次により多い回転特性をもたらす置換
RAKGL QFFPGLM HHHCCCCCHH	QFサイトの次により多い回転特性をもたらす置換
RAGL GQFFGLM HHHHCCHHHH	QFサイトの周りにより少ない回転特性をもたらす置換。
DAARAKGL QFFPGLMAKLK HHHHHCCCCCHHHHHHHH	置換及び変異の混合はQFサイトの上流及び下流に計画された螺旋を与え、これらの螺旋同志及び/又はBttxB (GOR)への相互作用を強化する。
DAARAKGL QFFPGLLAKLK HHHHHCCCEHHHHHHHHH	置換及び変異の混合はQFサイトの上流及び下流に計画された螺旋を与え、これらの螺旋同志及び/又はBttxB (GOR)への相互作用を強化し、潜在 M酸化問題 (GOR)を除去する。
TRSRAKGL QFFPGLMVHRL HHHHHCCCECHHHHHHHH	代替的置換及び変異はQFサイトの上流及び下流に計画された螺旋を与え、これらの螺旋同志及び/又はBttxBへの相互作用を強化する。
XQF-----Y	QFサイトの下流に有効性を高めるアミノ酸を供給するため、少なくとも1つの炭素スペーサ及び疎水性アミノ酸で下流配列の代替。
-- = スペーサ X = QFの上流の適切なコア配列(式 1, 2, 3) 予測構造はGibrat法又はGORで表示された。 H = ヘリックス C = コイル状でランダムな潜在的回転 E = シート	

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/US 00/13215
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C07K7/06 C07K7/08 C07K7/22 C07K14/81 A61K38/08 A61K38/57 G01N33/68 C12N15/11	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 99 37664 A (KIM SUN CHANG ;PARK CHAN BAE (KR); HONG SEUNG SUH (KR); LEE HYUN S) 29 July 1999 (1999-07-29) the whole document	1-28
X	GARCIA GREGORY E ET AL: "Botulinum B toxin activity is inhibited by Buforin I." FASEB JOURNAL, vol. 12, no. 8, 24 April 1998 (1998-04-24), page A1472 XP002157884 Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology; Washington, D.C., USA; May 16-20, 1998 ISSN: 0892-6638 abstract	1-28
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 22 January 2001		Date of mailing of the international search report 06/02/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Cervigni, S

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 00/13215

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>PARK C B ET AL: "A NOVEL ANTIMICROBIAL PEPTIDE FROM BUFO BUTO GARGARIZANS" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 218, 1996, pages 408-413, XP000941590 ISSN: 0006-291X table 2</p> <p>---</p>	7
X	<p>NORINDER U ET AL: "A QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP STUDY OF SOME SUBSTANCE P-RELATED PEPTIDES. A MULTIVARIATE APPROACH USING PLS AND VARIABLE SELECTION" JOURNAL OF PEPTIDE RESEARCH, DK, MUNKSGAARD INTERNATIONAL PUBLISHERS, COPENHAGEN, vol. 49, no. 2, 1 February 1997 (1997-02-01), pages 155-162, XP000679593 ISSN: 1397-002X table 1</p> <p>---</p>	7
X	<p>NIEDZWIECKI, LISA ET AL.: "SUBSTRATE SPECIFICITY OF THE HUMAN MATRIX METALLOPROTEINASE STROMELYSIN AND THE DEVELOPMENT OF CONTINUOUS FLUOROMETRIC ASSAYS" BIOCHEMISTRY (1992) 31(50) 12618-23, XP002157885 tables I-VI</p> <p>---</p>	7
X	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; BOKSA, PATRICIA ET AL.: "CHARACTERIZATION OF SUBSTANCE P AND SOMATOSTATIN RECEPTORS ON ADRENAL CHROMAFFIN CELLS USING STRUCTURAL ANALOGS" retrieved from STN XP002157886 abstract & BRAIN RES (1982) 245(2) 275-83,</p> <p>-----</p>	7

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-3, 5, 7-12, 14, 16-20, 22, 24-29

The ISA noticed two "claim 26" in the application, consequently the claims have been renumbered from 1 to 29.

Present claims 19,25,27-29 relate to compounds called previns defined by reference to a desirable characteristic or property, namely the capacity of inhibit Botulinum toxin B or Tetanus toxin protease activity. The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

In addition, claims 1-3, 5, 7-12, 14, 16-18, 20, 22, 24, 26 relate to an extremely large number of possible compounds. Support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds claimed. Formulas consisting virtually of variables as in claim 1 or ill-defined peptide sequences such as SEQ ID 14 cannot be considered to be a clear and concise definition of patentable subject matter (Art. 6 PCT).

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be sufficiently supported and disclosed, namely those parts relating to compounds represented by SEQ IDs 1-13 listed in claim 7, (e.g.: excluding SEQ ID 14) and extended also to compounds of claim 1 where B, X, X*,Z and Z* are defined as further specified in claim 4.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/13215

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9937664 A	29-07-1999	AU 1984699 A EP 1049709 A	09-08-1999 08-11-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
C 0 7 K	7/06	C 0 7 K	14/81
	11/00		16/38
	14/81	C 1 2 N	1/15
	16/38		1/19
C 1 2 N	1/15		1/21
	1/19	C 1 2 P	21/02
	1/21	G 0 1 N	33/53
	5/10		33/569
C 1 2 P	21/02	C 1 2 N	15/00
G 0 1 N	33/53		5/00
	33/569	A 6 1 K	37/64

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ムーラッド, デボラ, アール
アメリカ合衆国, メリーランド州, ロックビル

(72)発明者 ドクトル, ブペンドラ, ピー
アメリカ合衆国, メリーランド州 20854,
ポトマック, 10613 グレート アーバー
ドライブ

(72)発明者 ガルシア, グレゴリー, イー
アメリカ合衆国, メリーランド州, ジャー
マントウン

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA19 BA50 DA06
EA04 GA11 HA01
4B064 AG21 AG27 CA02 CA19 CC24
DA01
4B065 AA26X AA99Y AB01 BA02
CA24 CA44
4C084 AA02 AA07 BA02 BA08 BA11
BA17 BA18 BA23 BA41 CA43
DC32 NA14 ZB351 ZC202
ZC371 ZC412
4H045 AA11 CA53 DA56 EA22 EA29
FA74

专利名称(译)	肉毒杆菌毒素B和破伤风神经毒素和prebins作为治疗剂的特异性抑制剂		
公开(公告)号	JP2003501012A	公开(公告)日	2003-01-14
申请号	JP2000618307	申请日	2000-05-15
[标]申请(专利权)人(译)	部Obuji军		
申请(专利权)人(译)	司军		
[标]发明人	ゴードンリチャードケー ムーラッドデボラアール ドクトルブペンドラピー ガルシアグレゴリーイー		
发明人	ゴードン,リチャード,ケー ムーラッド,デボラ,アール ドクトル,ブペンドラ,ピー ガルシア,グレゴリー,イー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K38/55 A61P31/04 A61P39/02 A61P43/00 C07K7/06 C07K7/08 C07K7/22 C07K11/00 C07K14/81 C07K16/38 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 G01N33/569		
CPC分类号	A61K38/00 A61P31/04 A61P39/02 A61P43/00 C07K7/06 C07K7/08 C07K7/22 C07K14/8146		
FI分类号	A61P31/04 A61P39/02 A61P43/00.111 C07K7/06 C07K11/00 C07K14/81 C07K16/38 C12N1/15 C12N1 /19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.S G01N33/569.F C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/64		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA19 4B024/BA50 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024 /HA01 4B064/AG21 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA26X 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084 /BA02 4C084/BA08 4C084/BA11 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA23 4C084/BA41 4C084/CA43 4C084/DC32 4C084/NA14 4C084/ZB351 4C084/ZC202 4C084/ZC371 4C084/ZC412 4H045/AA11 4H045/CA53 4H045/DA56 4H045/EA22 4H045/EA29 4H045/FA74		
优先权	60/134446 1999-05-17 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的化合物通常具有式(1): B1Z*2B3Z*4X*5Q6F7X8X9X10X11, (2) B1X2X3X4X5Q6F7X8X9X10X11, 或(3) B1X2B3X4Z5Q6F7Z8X9X10X11 (3) 及其盐, 酯, 酰胺和酰化形式。一个字母代表的每个位置代表一个氨基酸残基, 其中B是碱性或极性/大氨基酸, 或其修饰形式; X是小或疏水性氨基酸或其修饰形式; X*为小或极性/大氨基酸或其修饰形式; Z为极性/大或疏水性氨基酸或其修饰形式; Z*是脯氨酸或极性/大或疏水性氨基酸, 或其修饰形式。如下所述, 氨基酸残基之间的一个或多个肽键可以被伪肽键取代。这些化合物可用作分子构建基, 以产生经优化可抑制肉毒杆菌毒素B和破伤风毒素的蛋白酶活性的化合物。

VAMP2, プフォリンI及びプフォリンI誘導体ペプチド及び物質Pの配列整合	
ペプチド	配列
VAMP2 ₂₅₅₋₃₀₄	ERDQKISELDDRADALQAGASQ Q FETSAAKLKRKYWWKNLK
プフォリン ^a	ACRGKQGGKVRRAKAKTRSSRAGL Q FPVGRVHRLLRKGY
プフォリン ^b	TRSSRAGL Q FPVGRVHRLLRK
プフォリン ^c 24°	TRSSRAGL Q FPVGRVHRLLRKGY
プフォリン ^c 36°	ACRGKQGGKVRRAKAKTRSSRAGL Q FPVGRVHRLLRK

^a Archer, B. T. III, et al. (1990). J. Biol. Chem. 265 (28), 17267-17273.
^b Park C. B., et al. (1996).
^c Garcia, G. E. et al. (1998).