

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-533250
(P2004-533250A)

(43) 公表日 平成16年11月4日(2004.11.4)

(51) Int.Cl.⁷

C12N 15/09
A61K 31/711
A61K 35/74
A61K 38/00
A61K 48/00

F 1

C12N 15/00
A61K 31/711
A61K 35/74
A61K 48/00
A61P 11/00

A

テーマコード(参考)

4B024
4C084
4C086
4C087
4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 166 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-592975 (P2002-592975)
(86) (22) 出願日 平成14年5月21日 (2002.5.21)
(85) 翻訳文提出日 平成15年11月18日 (2003.11.18)
(86) 國際出願番号 PCT/GB2002/002384
(87) 國際公開番号 WO2002/096467
(87) 國際公開日 平成14年12月5日 (2002.12.5)
(31) 優先権主張番号 0112687.9
(32) 優先日 平成13年5月24日 (2001.5.24)
(33) 優先権主張国 英国(GB)

(71) 出願人 503191210
ヘルス プロテクション エージェンシー
イギリス国 エスピ-4 オジエイジー
ウィルトシャー, ソールズベリー, ポート
ン ダウン(番地なし)
(74) 代理人 100104673
弁理士 南條 博道
(72) 発明者 サットン, ジョン マーク
イギリス国 エスピ-4 オジエイジー
ウィルトシャー, ソールズベリー, ポート
ン ダウン(番地なし), ヘルス プロテ
クション エージェンシー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分泌された細菌エフェクタタンパク質の薬学的使用

(57) 【要約】

ポリペプチド結合体は、タイプIIIまたはタイプIV分泌装置を含む改変された線毛または「針様」構造によって分泌された細菌の注入可能なエフェクタタンパク質、および標的細胞に該結合体をターゲティングするキャリアを含む。エフェクタタンパク質は、神経変性疾患、細胞内感染、および分泌の欠陥に関連する疾患の治療を含む種々の目的に使用される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

注入された細菌エフェクタータンパク質と、該エフェクタータンパク質を標的細胞にターゲティングするキャリアとの結合体であって、

該キャリアが、該エフェクターを標的細胞にターゲティングし、そしてレセプター媒介エンドサイトーシスを受ける第1のドメイン、および該エフェクターをエンドソーム膜を横切って該細胞のサイトゾル内にトランスロケートする第2のドメインを含む、結合体。

【請求項 2】

リンカーによって前記キャリアに連結された前記エフェクタータンパク質を含む、請求項1に記載の結合体。

10

【請求項 3】

前記リンカーが、切断可能であり、そのため、該リンカーが前記標的細胞内に侵入した後に切断され、前記エフェクターを前記キャリアから遊離し得る、請求項2に記載の結合体。

【請求項 4】

前記キャリアが、上皮細胞、神経細胞、分泌細胞、免疫細胞、内分泌細胞、炎症細胞、外分泌細胞、骨細胞、および心臓血管系の細胞から選択される細胞にエフェクターをターゲティングする、請求項1から3のいずれかの項に記載の結合体。

【請求項 5】

単一のポリペプチドである、請求項1から4のいずれかの項に記載の結合体。

20

【請求項 6】

前記注入された細菌エフェクタータンパク質が、GTPアーゼの活性化、GTPアーゼの不活性化、結合したGDPのGTPによる置換の増強、GTPアーゼの共有結合改变の惹起、プロテインキナーゼ活性、プロテインホスファターゼ活性、イノシトールホスファターゼ活性、マイトジエン活性化プロテインキナーゼキナーゼの阻害、遺伝子発現の調節、転写因子、および細胞輸送の調節から選択される活性を有する、請求項1から5のいずれかの項に記載の結合体。

【請求項 7】

請求項1から6のいずれかの項に記載の結合体を含む、薬学的組成物。

30

【請求項 8】

細胞の生存を促進すること、細胞に対する損傷を防止すること、細胞に対する損傷を復帰させること、細胞の増殖を促進すること、アポトーシスを阻害すること、細胞からの炎症メディエーターの放出を阻害すること、細胞の分割を促進すること、および細胞内感染を治療することから選択される治療のための、請求項1から6のいずれかの項に記載の結合体を含む、薬学的組成物。

【請求項 9】

細胞内感染を治療するための、請求項7または8に記載の薬学的組成物。

40

【請求項 10】

細胞の生存を阻害すること、細胞の増殖を阻害すること、細胞の分割を阻害すること、アポトーシスを促進すること、細胞を殺傷すること、細胞からの炎症メディエーターの放出を促進すること、細胞からの窒素酸化物放出を調節すること、細胞からの分泌を阻害すること、細胞内輸送を妨害すること、および細胞表面マーカーの発現を調節することから選択される治療のための、請求項7から9のいずれかの項に記載の薬学的組成物。

【請求項 11】

細胞内輸送を妨害するための、請求項10に記載の薬学的組成物。

【請求項 12】

細胞表面マーカーの発現を調節するための、請求項10に記載の薬学的組成物。

【請求項 13】

細胞からの分泌を阻害するための、請求項10に記載の薬学的組成物。

【請求項 14】

50

神経細胞の治療のための、請求項 7 から 13 のいずれかの項に記載の薬学的組成物。

【請求項 15】

神経細胞の生存を促進するための、請求項 14 に記載の薬学的組成物。

【請求項 16】

請求項 1 から 6 のいずれかの項に記載の結合体をコードする、DNA 構築物。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の DNA 構築物を含む、薬学的組成物。

【請求項 18】

請求項 16 に記載の DNA 構築物を含有するベクターを含む、薬学的組成物。

【請求項 19】

注入された細菌エフェクタタンパク質を細胞に送達するための薬学的組成物であって、該エフェクタタンパク質を含み；

該エフェクタタンパク質は切断可能なリンカーによって細胞ターゲティング成分に連結され、

該細胞ターゲティング成分が、細胞に結合し、そしてレセプター媒介エンドサイトーシスを受ける第 1 のドメイン、および該組成物の該エフェクタタンパク質をエンドソーム膜を横切って該細胞のサイトゾル内にトランスロケートする第 2 のドメインを含む、組成物。

【請求項 20】

前記第 1 のドメインが、(a) クロストリジウム菌毒素の神経細胞結合ドメイン；ならびに (b) 該 (a) のドメインの神経細胞結合活性を実質的に保持する (a) のドメインのフラグメント、改変体、および誘導体から選択される、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記第 2 のドメインが、(a) ポリペプチド配列を細胞にトランスロケートするクロストリジウム菌神経毒素のドメイン、ならびに (b) 該 (a) のドメインのトランスロケーティング活性を実質的に保持する (a) のドメインのフラグメント、改変体、および誘導体から選択される、請求項 19 または 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

前記第 2 のドメインが、

(a) クロストリジウム菌毒素の H_N ドメインではなく、そしてクロストリジウム菌毒素の H_N ドメインのフラグメントまたは誘導体ではない、トランスロケーションドメイン；
(b) 生理学的緩衝液中でサイズによって測定される場合の非凝集トランスロケーションドメイン；

(c) ジフテリア毒素の H_N ドメイン；

(d) ジフテリア毒素の H_N ドメインのトランスロケーティング活性を実質的に保持する (c) のフラグメントまたは誘導体；

(e) 融合性ペプチド；

(f) 膜破壊ペプチド；および

(g) (e) および (f) のトランスロケーティングフラグメントおよび誘導体から選択される、請求項 19 または 20 に記載の組成物。

【請求項 23】

前記リンカーが、神経細胞中で切断されて、前記ターゲティング成分から前記エフェクタタンパク質を遊離させる、請求項 19 から 22 のいずれかの項に記載の組成物。

【請求項 24】

前記リンカーが、ジスルフィド結合または前記標的細胞中で見出されるプロテアーゼ部位である、請求項 23 に記載の組成物。

【請求項 25】

請求項 1 から 6 のいずれかに記載の結合体を調製する方法であって、

該方法が、前記エフェクタタンパク質を前記キャリアと結合する工程を含む、方法。

【請求項 26】

10

20

30

40

50

前記エフェクタータンパク質を前記キャリアと化学的に連結する工程を含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記エフェクタータンパク質に相当する第1の領域および前記キャリアをコードする第2の領域を有するポリペプチドをコードするDNAを発現させる工程を含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記ポリペプチドが、前記第1および第2の領域の間に第3の領域を含み、該第3の領域が前記標的細胞に存在するタンパク質分解酵素によって切断される、請求項 25 から 27 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 29】

前記第1および第2の領域の間で前記ポリペプチドを連結する工程、および該第1および該第2の領域をジスルフィド結合によって連結する工程を含む、請求項 25 から 27 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 30】

医薬品の製造における、注入された細菌エフェクタータンパク質と該エフェクタータンパク質を標的細胞にターゲティングするキャリアとの結合体の使用であって、該キャリアが、該エフェクタータンパク質を標的細胞にターゲティングし、そしてレセプター媒介エンドサイトーシスを受ける第1のドメイン、およびエンドソーム膜を横切って該細胞サイトゾル内に該エフェクターをトランスロケートする第2のドメインを含む、使用。

【請求項 31】

医薬品の製造における、請求項 1 から 6 のいずれかの項に記載の結合体をコードする、DNA構築物の使用。

【請求項 32】

神経細胞の治療のための医薬品の製造における、請求項 30 または 31 に記載の使用。

【請求項 33】

細胞内感染を治療するための医薬品の製造における、請求項 30 または 31 に記載の使用。

【請求項 34】

細胞内輸送を妨害するための医薬品の製造における、請求項 30 または 31 に記載の使用。

【請求項 35】

細胞表面マーカーの発現を調節するための医薬品の製造における、請求項 30 または 31 に記載の使用。

【請求項 36】

細胞からの分泌を阻害するための医薬品の製造における、請求項 30 または 31 に記載の使用。

【請求項 37】

神経細胞の治療のための医薬品の製造における、注入された細菌エフェクタータンパク質の使用。

【請求項 38】

細胞内感染を治療するための医薬品の製造における、注入された細菌エフェクタータンパク質の使用。

【請求項 39】

細胞内輸送を妨害するための医薬品の製造における、注入された細菌エフェクタータンパク質の使用。

【請求項 40】

細胞表面マーカーの発現を調節するための医薬品の製造における、注入された細菌エフェクタータンパク質の使用。

【請求項 41】

10

20

30

40

50

細胞からの分泌を阻害するための医薬品の製造における、注入された細菌エフェクタータンパク質の使用。

【請求項 4 2】

神経細胞の治療のための医薬品の製造における、注入された細菌エフェクタータンパク質をコードするDNA構築物の使用。

【請求項 4 3】

細胞内感染を治療するための医薬品の製造における、注入された細菌エフェクタータンパク質をコードするDNA構築物の使用。

【請求項 4 4】

細胞内輸送を妨害するための医薬品の製造における、注入された細菌エフェクタータンパク質をコードするDNA構築物の使用。 10

【請求項 4 5】

細胞表面マーカーの発現を調節するための医薬品の製造における、注入された細菌エフェクタータンパク質をコードするDNA構築物の使用。

【請求項 4 6】

細胞からの分泌を阻害するための医薬品の製造における、注入された細菌エフェクタータンパク質をコードするDNA構築物の使用。

【請求項 4 7】

請求項 17 から 24 のいずれかの項に記載の組成物を含む、注入された細菌エフェクタータンパク質を神経細胞に送達するための投与用組成物。 20

【請求項 4 8】

前記投与が注射である、請求項 4 7 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、分泌され、注入された細菌エフェクタータンパク質の薬学的使用に関する。特に、本発明は、このようなタンパク質ならびに該タンパク質とキャリアとの組み合わせおよび結合体の製造および使用に関する。

【背景技術】

【0002】

神経治療の有効性および適切性には多くの欠陥が存在する。現時点では、大多数の神経障害は、治療の介入については対策が不十分である。例えば、現在、虚血または外傷により生じた神経損傷に対する効果的な処置はない。運動ニューロン疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、およびCJDのようなプリオൺ障害などの他の神経変性障害は、いずれも現在の治療法によって完全には扱われない。これは、一部は、神経系の複雑性および冒された特定の細胞に対して適切な治療法をターゲティングすることの困難性を反映する。損傷後の神経修復は、別の障害であり、これには効果的な処置がない。

【0003】

多くの神経学的障害は、アポトーシスのような内部プロセスによる神経損傷を刺激する神経外傷から生じることが知られている。スーパー・オキシドジスムターーゼを、該酵素をニューロンにターゲティングする成分と組み合わせて使用することによって、このような障害を治療することが知られている。しかし、神経疾患の処置のためのさらなる活性な化合物が所望されている。

【0004】

薬学的組成物において、タイプIIIエフェクターを使用することが知られている。

【0005】

米国特許5,972,899は、シゲラIpaB、IpaB融合タンパク質または機能的な誘導体またはアンタゴニスト、もしくはアポトーシスを誘起または阻害するために真核生物細胞に送達するためのIpaB-DNAを含む組成物を記載している。部位特異的送達は、ターゲティングされた免疫リポソーム内で達成され得る。細胞タイプ特異性は、脂質二重層

10

20

30

40

50

への細胞タイプ選択的モノクローナル抗体の組み込みによって達成される。この送達方法に関する不利点としては、免疫リポソームの非常に大きなサイズ、低い安定性、および不十分な組織浸透、ならびに治療に使用するための免疫リポソームの一貫した製造に関する困難性が挙げられる。リポソーム膜の固有の特性によって生じる非標的細胞タイプと免疫リポソームとの融合による高いバックグラウンド効果の可能性もある。

【0006】

WO 01/19393は、HIV-TATタンパク質のタンパク質形質導入ドメインに連結されたタイプIIIエフェクターを記載している。エフェクター-トランスデューサー融合タンパク質をコードするDNA構築物は、組織特異的なウイルスベクターまたはプラスミドベクターを使用して、タイプIII分泌系を含む宿主細胞にターゲティングされる。形質転換された宿主細胞における発現の際、エフェクター-トランスデューサー結合体は分泌され、そして二次的な再分布を受け、そして隣接した細胞によって取り込まれる。

10

【0007】

HIV-TAT形質導入ドメインは、いかなる細胞タイプにも特異的ではなく、したがって、エフェクターのターゲティングは、DNAレベルでのみ行われる。（エフェクタータンパク質をターゲティングすることよりもむしろ）エフェクターDNAをターゲティングすることの不利点としては、エフェクターDNAからエフェクタータンパク質へのプロセシングのタイムラグが挙げられる。ウイルスベクターが使用される場合、免疫原性効果の危険性およびゲノムへのベクターの組込みの危険性がある。

20

【0008】

WO 00/37493は、タイプIII分泌系に関する百日咳菌エフェクタービルレンス遺伝子を記載している。この病原性遺伝子またはコードされたポリペプチドは、ワクチン組成物に用いられ、そして別の分子に結合され得るか、または送達のためのキャリアとともに提供され得る。病原性ポリペプチドは、インビボにおいて、*Bordetella*病原性ポリヌクレオチドの発現に関するベクターを介して送達され得る。

30

【0009】

WO 98/56817は、YopJタンパク質を発現する非病原性生物を含む薬学的組成物を記載し、そしてYopJタンパク質は腸管から胃腸細胞へのYopJの送達のためのキャリアと合わされる。この文献に開示された送達メカニズムは、正常な細菌タイプIII分泌系-すなわち、細菌から標的細胞までの一工程による。

30

【0010】

WO 99/52563は、診断/治療目的のための、組換えエルシニアによって產生されるタンパク質の、真核生物細胞のサイトゾルへのターゲティングを記載している。YopEターゲティングシグナルとの融合タンパク質は、エルシニア細胞で発現され、そしてSycEシヤペロンの存在下でタイプIII分泌系により真核生物細胞に直接送達される。

40

【0011】

米国特許5,965,381は、免疫診断および治療の目的でタンパク質を真核生物細胞に送達するための組換えエルシニアのインビトロでの使用を記載している。タンパク質は、エルシニアタイプIII分泌系によって認識される送達配列に融合される。

40

【0012】

望ましくない免疫応答を誘起する危険性のため、治療タンパク質を送達するために細菌を使用することに利点はない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明は、種々の用途のための新たな薬学的組成物の提供を目的とする。さらなる目的は、神経細胞の治療のための新たな薬学的組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0014】

したがって、本発明は、新しいクラスの細菌由来タンパク質に基づく新たな治療法を提供

50

する。しかし、本発明の範囲は、天然のタンパク質の特性を保持するフラグメント、誘導体、およびその改変体も包含することを意図する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

したがって、本発明の第1の局面は、タイプIIIまたはタイプIV分泌経路によって分泌される細菌の注入されたエフェクターを含む薬学的組成物である。

【0016】

薬学的組成物は、患者における細胞の亜集団の治療のために使用され得る。特に、細胞の生存を促進すること、細胞に対する損傷を防止すること、細胞に対する損傷を復帰させること、細胞の増殖を促進すること、アポトーシスを阻害すること、細胞からの炎症メディエーターの放出を阻害すること、および細胞の分割を促進することから選択される治療のために、あるいは、細胞の生存を阻害すること、細胞の増殖を阻害すること、細胞の分割を阻害すること、アポトーシスを促進すること、細胞を殺傷すること、細胞からの炎症メディエーターの放出を促進すること、および細胞からの窒素酸化物放出を調節することから選択される治療のために、使用され得る。

【0017】

キャリアは、エフェクタータンパク質を標的細胞にターゲティングするために提供され得る。必要に応じて、上皮細胞、神経細胞、分泌細胞、免疫細胞、内分泌細胞、炎症細胞、外分泌細胞、骨細胞、および心臓血管系の細胞から選択される細胞にエフェクターをターゲティングするために提供され得る。

【0018】

エフェクターの送達のもう1つの手段は、エフェクタータンパク質およびキャリアの結合体によるものであり、この2つはリンカーによって適切に連結される。1つの特に好ましいリンカーは、切断可能であり、そのため、このリンカーは、標的細胞内に侵入した後に切断されて、キャリアからエフェクターを遊離させ得る。このリンカーは、ジスルフィド結合または標的細胞中で見出されるプロテアーゼ部位を含むペプチド配列であり得る。本発明のもう1つの実施態様では、リンカーは、2つの協同タンパク質、すなわちエフェクターに関連する第1の協同タンパク質および細胞ターゲティング成分に関連する第2の協同タンパク質から構成される。これらのそれぞれの部分は、別々に投与され、そしてインビオで組み合わせて、エフェクターを細胞ターゲティング成分に連結し得る。このような2部分リンカーの例は、ボツリヌス菌毒素C₂₁とC₂₂との協同である。

【0019】

本発明の1つの実施態様では、以下でさらに詳述するが、組成物は、切断可能なリンカーによってエフェクタータンパク質に連結された神経細胞ターゲティング成分を含む。好ましくは、神経細胞ターゲティング成分は、エフェクターを神経細胞にターゲティングする第1のドメインおよび該エフェクターを該神経細胞のサイトゾル内にトランスロケートする第2のドメインを含む。

【0020】

本発明の組成物の調製は、タイプIIIエフェクタータンパク質を薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせることによって行われ得る。このような組成物において、エフェクタータンパク質は、単独であり得るか、または(ターゲティング)キャリアと化学的に連結され得る。もう1つの調製方法は、エフェクタータンパク質に対応する第1の領域およびキャリアをコードする第2の領域を有するポリペプチドをコードするDNAを発現することである。第1および第2の領域の間の第3の領域は、標的細胞に存在するタンパク質分解酵素によって切断され、これは必要に応じて含まれる。

【0021】

神経細胞への細菌タイプIIIエフェクタータンパク質の送達のための本発明の特定の組成物は、

該エフェクタータンパク質および神経細胞ターゲティング成分を含み；

該エフェクタータンパク質は切断可能なリンカーによって該神経細胞ターゲティング成分

10

20

30

40

50

に連結され、

該神経細胞ターゲティング成分は、神経細胞に結合する第1のドメインおよび該神経細胞内に該組成物の該エフェクタータンパク質をトランスロケートする第2のドメインを含む。第1のドメインが、(a)クロストリジウム菌毒素の神経細胞結合ドメイン；ならびに(b)該(a)のドメインの神経細胞結合活性を実質的に保持する(a)のドメインのフラグメント、改変体、および誘導体から選択されることが好ましい。第2のドメインが、(a)ポリペプチド配列を細胞にトランスロケートするクロストリジウム菌神経毒素のドメイン、ならびに(b)該(a)のドメインのトランスロケーティング活性を実質的に保持する(a)のドメインのフラグメント、改変体、および誘導体から選択されることがさらに好ましい。

10

【0022】

神経症状の治療のために本発明の組成物を使用する場合、リンカーは、神経細胞中で切断されて、ターゲティング成分からエフェクタータンパク質を遊離させ、したがって、ターゲティング成分の付着によって妨げられることなく、細胞中でエフェクターが効果を発揮することを可能にする。

【0023】

したがって、本発明はまた、細菌タイプIIIエフェクタータンパク質を神経細胞に送達する方法を提供し、これは本発明の組成物を投与する工程を含む。

【0024】

第1のドメインは、(a)クロストリジウム菌毒素の神経細胞結合ドメイン；ならびに(b)該(a)のドメインの神経細胞結合活性を実質的に保持する(a)のドメインのフラグメント、改変体、および誘導体から適切に選択され得る。第2のドメインは、(a)ポリペプチド配列を細胞にトランスロケートするクロストリジウム菌神経毒素のドメイン、ならびに(b)該(a)のドメインのトランスロケーティング活性を実質的に保持する(a)のドメインのフラグメント、改変体、および誘導体から適切に選択される。第2のドメインはさらに：

20

(a)クロストリジウム菌毒素のH_Nドメインではなく、そしてクロストリジウム菌毒素のH_Nドメインのフラグメントまたは誘導体ではない、トランスロケーションドメイン；(b)生理学的緩衝液中でサイズによって測定される場合の非凝集トランスロケーションドメイン；

30

(c)ジフテリア毒素のH_Nドメイン；

(d)ジフテリア毒素のH_Nドメインのトランスロケーティング活性を実質的に保持する(c)のフラグメントまたは誘導体；

(e)融合性ペプチド；

(f)膜破壊ペプチド；および

(g)(e)および(f)のトランスロケーティングフラグメントおよび誘導体から適切に選択される。

30

【0025】

本発明の実施態様においては、構築物は、ジスルフィド結合によって神経細胞ターゲティング成分に連結されたエフェクタータンパク質を含み、この神経細胞ターゲティング成分は、神経細胞に結合する第1のドメインおよびエフェクタータンパク質を神経細胞にトランスロケートする第2のドメインを含む。この構築物は、単一のポリペプチドとして、組換えにより作成され、エフェクタータンパク質上に第2のドメインのシステイン残基とジスルフィド結合を形成するシステイン残基を有している。エフェクタータンパク質は、最初に第2のドメインに共有結合される。この単一のポリペプチドの発現後、エフェクタータンパク質は第2のドメインから切断され、構築物の残りにジスルフィド結合のみによって連結されたエフェクタータンパク質を遊離する。

40

【0026】

本発明の特定の局面は、結合ドメインおよびトランスロケーションドメインのさらなる選択にある。そして1つのこのような局面は、神経細胞へのエフェクタータンパク質の送達

50

のための非毒性ポリペプチドを提供し、該非毒性ポリペプチドは：
 神経細胞に結合する結合ドメイン、および
 エフェクタータンパク質を神経細胞内にトランスロケートするトランスロケーションドメイン
 を含み、ここで、トランスロケーションドメインは、クロストリジウム菌神経毒素の H_N ドメインではなく、そしてクロストリジウム菌毒素の H_N ドメインのフラグメントまたは誘導体ではない。

【0027】

結合ドメインは、適切には、クロストリジウム菌重鎖フラグメントまたは改変されたクロストリジウム菌重鎖フラグメントを含むかあるいはこれらに由来する。本明細書で使用する場合、用語「改変されたクロストリジウム菌重鎖フラグメント」とは、ボツリヌス菌または破傷風菌の神経毒素の対応する重鎖と類似の生物学的機能を保持するが、対応する重鎖と比較してアミノ酸配列およびその他の特性が異なるポリペプチドフラグメントを意味する。本発明は、より詳細には、ボツリヌス菌および破傷風菌の神経毒素に由来するフラグメントに基づくこのような構築物を提供する。

10

【0028】

さらなる局面において、本発明はまた、神経細胞へのエフェクタータンパク質の送達のためのポリペプチドを提供し、該ポリペプチドは：
 神経細胞に結合する結合ドメイン、および
 エフェクタータンパク質を神経細胞内にトランスロケートするトランスロケーションドメインを含み、ここで、得られる構築物は非凝集である。

20

【0029】

構築物が凝集物であるかどうかは、通常、構築物の溶解性が十分でないことから明らかであり、そしてこれは水性媒体中での構築物の簡単な可視検査で確かめられ得る：非凝集ドメインは、一部または好ましくは全部が可溶性である本発明の構築物を生じるが、凝集ドメインは、単一のポリペプチドのサイズの数十倍あるいは数百倍の見かけのサイズを有するポリペプチドの非溶解性凝集物を生じる。一般に、構築物は、ゲル電気泳動法でのサイズによって測定した場合、非凝集であるべきであり、そしてドメインのサイズまたはこのように測定された見かけのドメインのサイズは、生理学的条件を用いた未変性 PAGE で適切に行われる測定では、好ましくは 1.0×10^6 ダルトン未満、より好ましくは 3.0×10^5 ダルトン未満であるべきである。

30

【0030】

本発明のさらなる局面は、神経細胞へのエフェクタータンパク質の送達のためのポリペプチドを提供し、該ポリペプチドは：

神経細胞に結合する結合ドメイン、および

エフェクタータンパク質を神経細胞内にトランスロケートするトランスロケーションドメインを含み、ここで、該トランスロケーションドメインは、(1)ジフテリア毒素の H_N ドメイン、(2)ジフテリア毒素の H_N ドメインのトランスロケーティング活性を実質的に保持する(1)のフラグメントまたは誘導体、(3)融合性ペプチド、(4)膜破壊ペプチド、(5)ボツリヌス菌毒素 C₂ 由来の H_N、および(6)(3)、(4)、および(5)のトランスロケーティングフラグメントおよび誘導体から選択される。

40

【0031】

ボツリヌス菌毒素 C₂ が、神経特異性を有さないので神経毒素ではなく、その代わりにエンテロトキシンであり、そして非凝集トランスロケーションドメインを提供するために本発明で使用することに適切であることは、注目すべきである。

【0032】

本発明のさらなる局面は、神経細胞へのエフェクタータンパク質の送達のためのポリペプチドを提供し、該ポリペプチドは：

神経細胞に結合する結合ドメイン、および

エフェクタータンパク質を神経細胞にトランスロケートするトランスロケーションドメイ

50

ンを含み、ここで、該ポリペプチドは、天然の破傷風菌毒素重鎖の中和抗体に対する親和性と比較して、破傷風菌毒素の中和抗体に対して低い親和性を有する。

【0033】

上記の局面は、単独であるいはいくつか組み合わせて、本発明のポリペプチドによって提示され得る。したがって、代表的な好ましい本発明のポリペプチドは、(i) ボツリヌス菌および破傷風菌毒素の神経毒性活性を欠き、(ii) クロストリジウム菌神経毒素の神経細胞に対する親和性に相当する神経細胞に対する高い親和性を示し、(iii) 細胞膜を横切るransportationをもたらし得るドメインを含み、そして(iv) 生理学的緩衝液中でボツリヌス菌または破傷風菌毒素由来の対応する重鎖よりも凝集されない状態で存在する。

10

【0034】

本発明の特定の局面のポリペプチドの顕著な有利点は、非凝集状態であり、したがって、可溶性のポリペプチドとしてさらに有用になる。本発明のポリペプチドは、一般に、ボツリヌス菌および破傷風菌神経毒素のH_cドメイン由来の配列を含み、そしてこれらは、天然のままの重鎖の必須の機能が保持されるように、他のタンパク質由来の機能的ドメインと組み合わされる。したがって、例えば、ボツリヌス菌タイプF神経毒素のH_cドメインは、ジフテリア毒素由来のransportationドメインに融合されて、改変されたクロストリジウム菌重鎖フラグメントを与える。驚くべきことに、このようなポリペプチドは、天然のままのクロストリジウム菌重鎖よりも、物質を神経細胞に送達するための構築物として、より有用である。

20

【0035】

本発明は、タイプIIIの分泌されたエフェクタータンパク質、および必要に応じて、神経細胞へのタイプIIIエフェクター部分の特異的な送達をもたらす他の機能的ドメインを含む構築物を提供する。これらの構築物は、神経疾患の治療のための種々の臨床用途を有する。

【0036】

グラム陰性細菌病原体のタイプIII分泌メカニズムは、タンパク質を真核生物細胞に送達するために用いられる複合系である。分泌メカニズムは、少なくとも10～15の必須のタンパク質を利用し、細菌の表面から伸長して宿主細胞内に貫通する注射針を形成する。エフェクタータンパク質は、次いで、針の内腔を通して細菌膜および宿主膜を横切って輸送され、そして細胞サイトゾルに直接注入される。このプロセスは、さらに不確定な分泌シグナルを含み、そしてエフェクターを分泌機構に送達する特異的なシャペロンタンパク質を含む。この系は、宿主細胞機能を調節し得る広範なタンパク質エフェクターを宿主に送達し、病原体を残存または蔓延させる。これらのエフェクターは、多くのシグナリング経路を調節し、そしてある病原体は、異なる経路を調節するいくつかのエフェクターを、同時にまたはそのライフサイクルの異なる相でのいずれかに輸出し得る。広範な病原性細菌におけるタイプIII分泌系が記載されており、以下のものが挙げられるが、これらに制限されない：

哺乳動物病原体；エルシニア種(pestis, pseudotuberculosis, enterocoliticaを含む)、サルモネラ種(typhimurium, enterica, dublin, typhiを含む)、大腸菌、シグラ種(例えば、flexneri)、緑膿菌、クラミジア種(例えば、pneumoniae, trachomatis)、およびボルデテラ種、ならびにバークホルデリア種

植物病原体；Pseudomonas syringae、エルウィニア種、ザントモナス種、Ralstonia solanacearum、およびリゾビウム種

昆虫病原体；Sodalis glossinidius、Edwardsiella ictaluri、およびPlesiomonas種。

【0037】

これらの種のいずれかに由来のエフェクタータンパク質は、哺乳動物病原体であろうがなからうが、ヒトまたは動物の疾患を処置するための治療上の可能性を有する。

【0038】

表1に、現在までに同定されている多くのタイプIIIエフェクターを挙げる。

50

【0039】

タイプIV分泌系は、エフェクタータンパク質が宿主細胞の細胞質中に注入される場合に通る針様構造を形成する点で、タイプIII系と注目すべき程度の類似性を示す。しかし、針の構造に関連するタンパク質は、2つの系で異なり、そしてエフェクターも多岐にわたる。エフェクターは、細胞シグナリングを調節するために機能して、細胞内ニッチを確立および維持し、および/または侵襲および増殖を促進する。この系は、*Legionella pneumophila*、百日咳菌、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*、*Bartonella henselae*、大腸菌、*Helicobacter pylori*、*Coxiella burnetii*、*Brucella abortus*、ナイセリア種、およびリケッチャ種（例えば、*prowazekii*）を含む多くの重要な細菌病原体に必須であるとして記載されている。類似のタイプIV分泌系は、植物または無脊椎動物病原体に存在し、そしてまた治療薬のソースである。多くの記載されたタイプIVエフェクターもまた、目的の機能と共に表1に挙げる。

【0040】

近年、種々のタイプIIIエフェクターの機能が記載されている。興味深いことに、異なる生物由来の多くのエフェクターは、特定のシグナリング経路をターゲティングするように進化し、これは病原性のメカニズムにおけるいくつかの類似点を示唆する。特定のエフェクターの正確な特異性は、病原体および細胞タイプに従って変化し得、そしてこの活性の範囲は、それらを治療上の適用のための魅力的な候補にする。本発明に有用なエフェクターのファミリーのいくつかの例を以下に記載する。

【0041】

GTPアーゼ活性化タンパク質。*Yersinia pseudotuberculosis*由来のYopE、*Salmonella typhimurium*由来のSptP、ならびに*Pseudomonas aeruginosa*由来のExoSおよびExoTは、すべてRhoファミリーGTPアーゼに対するGTPアーゼ活性化タンパク質（GAP）であり、保存された「アルギニンフィンガー」ドメインによって特徴付けられる（BlackおよびBliska, (2000) *Molecular Microbiology* 37: 515-527頁；FuおよびGalán(1999) *Nature* 401: 293-297頁；Goehringら(1999) *Journal of Biological Chemistry* 274: 36369-36372頁）。結合したGTPの加水分解を促進させることによって、これらは、不活性なGTPアーゼのGDP結合体の形成を促進する。これは、細胞においてある範囲のGTPアーゼの機能をダウンレギュレートするように作用する。YopEは、23kDaエフェクターであり、*Y. pseudotuberculosis*および他の株による感染中に、細胞のサイトゾル内にトランスロケートされる。Rasに対してでなく、RhoA、Cdc42、およびRac1に対してGAPとして作用することが、インビトロでの研究で示されている（BlackおよびBliska, (2000) *Molecular Microbiology* 37: 515-527頁）。アルギニンフィンガーモチーフ内の点変異は、GAP活性の喪失を引き起こし、そしてこれは、細胞における生物学的活性と直接的に関連する。エルシニア感染の正常な部位を模倣する細胞モデルを用いて行われたインビトロ研究において、YopEは、Cdc42に対して、より大きな特異性を有するようである（Andorら(2001) *Cellular Microbiology* 3: 301-310頁）。SptPのGAP活性は、RhoAと比較してCdc42およびRac1に対して、より大きな特異性を示す。特定のタンパク質のGAP活性は、異なる細胞タイプおよび送達経路について変化するようである。SptP、ExoS、およびExoTは、さらなる酵素ドメイン（SptP、チロシンホスファターゼ；ExoS、ExoT、ADP-リボシリルトランスフェラーゼ）を有する二機能酵素である。ExoSの場合、この活性は、異なるシグナリング経路の共同作用調節が可能であるRas-GTPアーゼの活性化をブロックする（Henrikssonら(2000) *Biochemical Journal* 347: 217-222頁）。

【0042】

グアニンヌクレオチド交換因子。*Salmonella typhimurium*由来のSopEおよびSopE2、ならびに関連するタンパク質は、ある範囲のGTPアーゼに対してグアニンヌクレオチド交換因子（GEF）として作用する（Hardtら(1998) *Cell* 93:815頁）。GEFは、結合したGDPのGTPによる置換の割合を増強することによって機能し、GTPアーゼの活性化を引き起こす。これは、細胞において特異的なGTPアーゼの活性を効果的にア

10

20

30

40

50

ップレギュレートする。天然の SopE は、240 アミノ酸のタンパク質であり、S. *typhimurium* によって宿主細胞サイトゾル内に注入される。タンパク質の N 末端 77 アミノ酸は、分泌シグナルとして作用し、そしてタンパク質の生理学的活性は重要ではない (Hardt ら (1998) *Cell* 93:815 頁)。インビトロの研究では、SopE は、Cdc42、Rac1、Rac2、RhoA、および RhoG に対する GEF として作用する。細胞 GEF は、特定の GTP アーゼに対して高度の特異性を示し、そして SopE は、インビボにおいてより大きな特異性を示すようである。この特異性は、細胞タイプおよび送達経路に応じて変化するようである。Legionella pneumophila 由来のタイプIV エフェクター RalF は、小さな GTP アーゼの機能に影響を与えるさらなる交換因子である。この場合、標的は、ADP リボシル化因子 (ARF) ファミリーであり、そしてこれは、このファミリーをターゲティングする細菌エフェクターの最初の例である (Nagai ら (2002) *Science* 295: 679-682 頁)。

10

20

30

40

50

【0043】

GTP アーゼの共有結合改変。 *Y. pestis* および特定の他のエルシニア株由来のタイプIII エフェクター YopT は、インビボにおいて YopE と類似の効果を有する (Iriarte および Cornelis (1998) *Molecular Microbiology* 29: 915-929 頁)。HeLa 細胞において、YopT は、RhoA の電気泳動移動度のシフトを引き起こすが、Cdc42 または Rac では引き起こさない (Zumbihl ら (1999) *Journal of Biological Chemistry* 274: 29289-29293 頁)。これが、YopT による RhoA の直接改変を示すかどうか、または他の細胞因子が関連するかどうかは、まだ不明である。RhoA に対する YopT の特異性は、顕著な治療の可能性を提供する。

【0044】

プロテインキナーゼおよびホスファターゼによる細胞シグナリングの調節。 *Yersinia* spp 由来の YopO / YpkA は、真核生物のセリン / スレオニンキナーゼに関連するプロテインキナーゼである (Galyov ら (1993) *Nature* 361: 730-732 頁)。YopO / YpkA は、YopE のような他のエフェクターで観察されるのと類似の細胞の球状化を引き起こし、これは GTP アーゼ機能を調節する役割を示唆する。小さな GTP アーゼ RhoA および RacI は、YopO および YpkA に結合することを示しており、これらがキナーゼに対する細胞内標的であることを示唆する (Barz C ら (2000) *FEBS Letters* 482: 139-143 頁)。*Helicobacter pylori* 由来のタイプIV エフェクター CagA もまた、感染した細胞の細胞骨格に影響を及ぼし、そしてその活性は、細胞内キナーゼによるリン酸化に依存する。CagA は、SHP-2 チロシンホスファターゼを介して機能して、下流のシグナリングを調節する。

【0045】

イノシトールホスファターゼ。 *Salmonella typhimurium* 由来の SigD、*S. dublin* 由来の SopB、および *Shigella flexneri* 由来の IpgD は、すべて推定のイノシトールホスファターゼである。腸管細胞において、SopB は、イノシトール 1,4,5,6, テトラキスリン酸の蓄積を引き起こす。SopB の活性部位における変異は、そのホスファターゼ活性およびイノシトールテトラキスリン酸の蓄積の両方をなくす (Norris ら (1998) *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A* 95: 14057-14059 頁)。SopB は、インビトロで広い範囲のイノシトールおよびホスファチジルイノシトールリン酸を加水分解するようであるが、その正確な細胞内標的は明らかにされなければならない (Eckmann ら (1997) *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A* 94: 14456-14460 頁)。イノシトール 1,4,5,6, テトラキスリン酸のレベルを増加させないので、SigD はインビボでは異なる特異性を有するようである (Eckmann ら (1997))。さらに、正確な細胞内標的は明らかにされていないが、SigD は、上皮細胞において Akt / プロテインキナーゼ B を活性化させることが示されている (Steele-Mortimer (2000) *Journal of Biological Chemistry* 275: 37718-37724 頁)。その活性は、タンパク質の C 末端付近のシナプトジヤニン相同領域の存在に依存することが示されている。相同タンパク質 IpgD もまた、これらの細胞において Akt の活性化を刺激する (Marcus ら (2001))。Akt を

活性化する可能性は、細胞生存の重要なレギュレーターであるので、多くの治療機会を提供する (VanhaesebroeckおよびAlessi (2000) *Biochemical Journal* 346: 561-576頁に総説される)。

【0046】

マイトジエン活性化プロテインキナーゼキナーゼの阻害。 *Yersinia pestis*由来の YopJ は、*Salmonella* spp. 由来の AvrA および植物病原体由来の種々のエフェクターを含む広い範囲のホモログを有する、もう一つのトランスロケートされたエフェクターである。YopJ は、広い範囲のマイトジエン活性化プロテインキナーゼキナーゼ (MKK) を不活性化することが示され (Orthら (1999) *Science* 285: 1920-1923頁)、マクロファージにおいてアポトーシスを引き起す。YopJ は、ユビキチン様タンパク質プロテアーゼとして作用して、MKK由来の Sumo-1タグの除去によりシグナリング分子の代謝回転を増加させることが示唆される (Orthら (2000) *Science* 290: 1594-1597頁)。興味深いことに、サイトカイン産生およびマクロファージ殺傷の細胞モデルにおいて、AvrA は、YopJとの相同性にもかかわらず、活性を示さず、これはタンパク質の特異性が異なり得ることを示唆する (Schesser Kら (2000) *Microbial Pathogenesis* 28: 59-70頁)。神経細胞において、これらの異なる特異性は、しばしば、アポトーシスまたは炎症応答に関連する M KK を調節するための可能性のある治療上の適用を提供し得る。

【0047】

細胞輸送のモジュレーター。 *Salmonella enterica*由来の Spic は、エンドソーム小胞の融合を阻害して、サルモネラ菌のリソソーム分解への曝露を防止する (Uchiyら (1999) *EMBO Journal* 18: 3924-3933頁)。細胞内輸送経路を調節する能力は、レセプターのサイクリングまたは膜結合小胞から物質の放出を調節するための多くの治療上の機会を提供する。

【0048】

多くの他のエフェクタータンパク質は、細菌病原体によって占領された細胞内コンパートメントを調節および維持することに関連する。サルモネラ菌は、多くの他の病原体と同様に、特殊化した細胞内コンパートメントを樹立する。サルモネラ菌は、このコンパートメント内から宿主細胞サイトゾル中にタンパク質を分泌する専用のタイプIII分泌系を有し、そして、この系によって分泌されるエフェクター (Spic; SopE/E2; SseE, F, G, J; PipA, B; SifA, Bを含む) は、このコンパートメントの完全性を維持する。最近の論文は、液胞膜からの調節過程における SseJ および SifA の相乗効果を記載している (Ruiz-Albertら (2002) *Molecular microbiology* 44: 645-661頁)。これらのタンパク質および他の細胞内病原体由来の対応物は、細胞内輸送経路に影響を及ぼす障害を治療するための重要な可能性を有する。Raf1F および既述の多くの他のエフェクターはまた、このような障害に対する顕著な治療の可能性を有し得る。

【0049】

ボツリヌス菌神経毒素は、構造的に類似しているが、抗原性が異なる 7 つのタンパク質毒素のファミリーであり、その 1 次作用部位は神経筋接合部であり、そこで伝達物質であるアセチルコリンの放出をブロックする。ヒトおよび動物の末梢神経系におけるこれらの毒素の作用は、ボツリヌス中毒症候群を生じさせ、これは広範な弛緩した筋麻痺によって特徴付けられる (Shone (1986) 「Natural Toxicants in Foods」、D. Watson編, Ellis Harwood, UK)。それぞれのボツリヌス菌神経毒素は、2 つのジスルフィド結合したサブユニットからなる；神経末端への神経毒素の最初の結合およびインターナリゼーションで役割を果たす 100 kDa の重サブユニット (Dollyら (1984) *Nature*, 307, 457-460頁) およびエンドサイトーシスプロセスをブロックするように細胞内で作用する 50 kDa の軽サブユニット (McInnes および Dolly (1990) *Febs Lett.*, 261, 323-326頁; de Paiva および Dolly (1990) *Febs Lett.*, 277, 171-174頁)。したがって、顕著な神経特異性を与えるのは、ボツリヌス菌神経毒素の重鎖である。

【0050】

破傷風菌毒素は、ボツリヌス菌神経毒素と構造的に非常に類似しているが、その 1 次作用

10

20

30

40

50

の部位は中枢神経系であり、そこで、中枢シナプス（レンショウ細胞）からの抑制性神経伝達物質の放出をロックする。ボツリヌス菌毒素について記載したように、神経細胞のレセプターに結合するのは、破傷風菌毒素の重鎖内のドメインである。

【0051】

クロストリジウム菌神経毒素（破傷風菌およびボツリヌス菌）重鎖の結合機能およびインターナリゼーション（トランスロケーション）機能は、それらの構造内の少なくとも2つのドメインに割り当てられ得る。最初の結合工程は、エネルギー非依存的であり、そして神経毒素のH_c フラグメント（約50kDaのC末端フラグメント）内の1以上のドメインによって媒介されるようである（Shoneら(1985), Eur. J. Biochem., 151, 75-82頁）が、トランスロケーション工程は、エネルギー依存的であり、そして神経毒素のH_N フラグメント（約50kDaのN末端フラグメント）内の1以上のドメインによって媒介されるようである。

【0052】

単離された重鎖は、天然の神経毒素に比べて非毒性であるが、それにもかかわらず神経細胞に対して高親和性結合を保持する。7つの血清型のほとんどに由来する破傷風菌神経毒素およびボツリヌス菌神経毒素は、それらの由来する重鎖とともに、nMの範囲の高親和性で種々の神経細胞タイプに結合することが示されている（例えば、ボツリヌス菌タイプB神経毒素；Evansら(1986) Eur. J. Biochem. 154, 409-416頁）。神経細胞への破傷風菌およびボツリヌス菌重鎖の結合のもう一つの重要な特徴は、種々の毒素の血清型によって認識されるレセプターリガンドが異なることである。したがって、例えば、ボツリヌス菌タイプA重鎖は、ボツリヌス菌タイプF重鎖と異なるレセプターに結合し、そしてこれらの2つのリガンドは、神経細胞へのそれらの結合に関して非競合である（Wadsworthら(1990), Biochem J. 268, 123-128頁）。現在までに特徴付けられているクロストリジウム菌神経毒素血清型（破傷風菌、ボツリヌス菌A、B、C₁、D、E、およびF）のうち、すべてが神経細胞上の異なるレセプター集団を認識するようである。まとめると、クロストリジウム菌神経毒素重鎖は、神経細胞に特異的であるレセプターのファミリー全体を認識する高親和性結合リガンドを提供する。

【0053】

本発明はまた、神経細胞にタイプIIIエフェクタータンパク質を特異的に送達するための構築物を提供する。これらの構築物によってタイプIIIエフェクタータンパク質が細胞に送達されるメカニズムは、宿主細菌によって使用されるメカニズムとは全く異なる。細胞サイトゾルに直接的に注入される代わりに、本発明の特異的な構築物は、多くの連続的に作用する生物学的に活性なドメインによっておよびレセプター媒介エンドサイトーシスに類似のプロセスによって、タイプIIIエフェクタータンパク質を細胞に送達する。驚くべきことに、この全く異なるメカニズムによって送達される場合、タイプIIIエフェクタータンパク質は、細胞サイトゾル内で生物学的に活性である。

【0054】

本発明の特定の構築物は、それらの生物学的活性によって定義される3つの機能的ドメインを含む。これらは：

タイプIIIエフェクター部分（例えば、表1を参照のこと）；

構築物をレセプターに結合し、そして神経細胞に対して高度の特異性を提供するターゲティングドメイン；および

構築物のインターナリゼーション後、エンドソーム膜を通して細胞サイトゾルへのタイプIIIエフェクター部分のトランスロケーションをもたらすトランスロケーションドメインである。

【0055】

タイプIIIエフェクター含有構築物はまた、これらのドメインが相互に連結される「リンクータンパク質」を含み得る。本発明の1つの実施態様においては、タイプIIIエフェクター部分は、トランスロケーションドメインにジスルフィド結合により連結される。

【0056】

10

20

30

40

50

本発明の好ましい実施態様においては、ターゲティングドメインは、クロストリジウム菌神経毒素結合フラグメント (H_c ドメイン) 由来である。これは、破傷風菌毒素あるいは8つのボツリヌス菌毒素血清型 (A ~ G) のいずれか1つに由来し得る。クロストリジウム菌神経毒素レセプターを介する送達は、タイプIIIエフェクターの正常な送達経路と明らかに異なり、そして多くの有利点を提供する。

【0057】

クロストリジウム菌の H_c フラグメントは、細胞表面上のレセプターに高親和性で結合し、そして神経細胞に対して高い特異性を提供する。クロストリジウム菌神経毒素は、酸性エンドソームを介してインターナライズされ、これが引き金となってタイプIIIエフェクター部分は膜を横切ってサイトゾル内へトランスロケートする。

10

【0058】

非神経細胞について、特異的な細胞タイプに対する広い範囲の高親和性結合ドメインは、明らかにされている。その例は、多くの細胞標的について記載されている。

【0059】

薬剤は、リガンドまたはターゲティングドメインを含み得、これは、内分泌細胞に結合し、したがって、これらの細胞タイプに特異的になる。適切なリガンドの例としては、ヨウ素；甲状腺刺激ホルモン (TSH)；TSHレセプター抗体；島特異的モノシアロガングリオシドGM2-1に対する抗体；インスリン、インスリン様増殖因子、および両方のレセプターに対する抗体；TSH放出ホルモン (プロチレリン) およびそのレセプターに対する抗体；FSH/LH放出ホルモン (ゴナドレリン) およびそのレセプターに対する抗体；コルチコトロピン放出ホルモン (CRH) およびそのレセプターに対する抗体；ならびにACTHおよびそのレセプターに対する抗体が挙げられる。

20

【0060】

薬剤を炎症細胞にターゲティングするために適切なリガンドとしては、(i)マスト細胞に対しては、一般にFc IgEのC4ドメインを含む補体レセプター、およびC3a/C4a-R補体レセプターに対する抗体/リガンド；(ii)好酸球に対しては、C3a/C4a-R補体レセプターに対する抗体/リガンド、抗VLA-4モノクローナル抗体、抗IL5レセプター、CR4補体レセプターに反応性の抗原または抗体；(iii)マクロファージおよび単球に対しては、マクロファージ刺激因子；(iv)マクロファージ、単球、および好中球に対しては、細菌LPS、およびCR3に結合する酵母菌B-グルカン；(v)好中球に対しては、OX42に対する抗体、iC3b補体レセプター関連抗原、またはIL8；(vi)線維芽細胞に対しては、マンノース6-リン酸/インスリン様増殖因子 (M6P/IGF-II) レセプターおよびPA2.26、マウスにおいて活性な線維芽細胞についての細胞表面レセプターに対する抗体が挙げられる。

30

【0061】

薬剤を外分泌細胞にターゲティングするために適切なリガンドとしては、下垂体アデニルシクラーゼ活性化ペプチド (PACAP-38)、またはそのレセプターに対する抗体が挙げられる。

【0062】

薬剤を免疫細胞にターゲティングするために適切なリガンドとしては、エプスタイン・バーウイルスのフラグメント/表面特徴すなわちイディオタイプ抗体 (Bリンパ球およびリンパ節濾胞樹状細胞のCR2レセプターに結合する) が挙げられる。

40

【0063】

不十分な血小板活性化および血栓形成に関連する疾患状態の治療のために血小板をターゲティングするために適切なリガンドとしては、トロンビンおよびTRAP (トロンビンレセプターアゴニストペプチド) またはCD31/PECAM-1、CD24、またはCD106/VCAM-1に対する抗体が挙げられ、そして高血圧の治療のために心臓血管の内皮細胞をターゲティングするためのリガンドとしては、GPIb表面抗原を認識する抗体が挙げられる。

【0064】

50

骨化石症および骨粗鬆症から選択される疾患の治療のために骨芽細胞をターゲティングするために適切なリガンドとしては、カルシトニンが挙げられ、そして薬剤を破骨細胞にターゲティングするために適切なリガンドとしては、破骨細胞分化因子（例えば、TRANCA、RANKL、またはOPGL）、およびレセプターRANKに対する抗体が挙げられる。

【0065】

本発明の1つの実施態様においては、トランスロケーションドメインは、細菌毒素由来である。適切なトランスロケーションドメインの例は、クロストリジウム菌神経毒素またはジフテリア毒素由来である。

【0066】

本発明の他の実施態様においては、トランスロケーションドメインは、膜破壊ペプチドまたは「融合性」ペプチドであり、これは、トランスロケーションドメインとして機能する。このようなペプチドの例は、インフルエンザウイルス赤血球凝集素HA2（1～23残基）由来である。

【0067】

本発明の構築物の1つの例では、タイプIIIエフェクタータンパク質は、*Salmonella* spp.由来のSigDである。本発明の構築物の他の例では、タイプIIIエフェクタータンパク質は、*Yersinia* spp.由来のYopEである。

【0068】

タイプIIIエフェクター部分が*Salmonella* spp.由来のSigDである場合の本発明の構築物の例では、構築物は、以下のものからなり得る：

SigD タイプIIIエフェクター部分；

ジフテリア毒素由来のトランスロケーションドメイン；

ボツリヌス菌タイプA神経毒素由来の結合ドメイン（H_cドメイン）；および

ジスルフィド結合によるトランスロケーションドメインへのSigDエフェクターの付着を可能にするリンカーペプチド。

【0069】

タイプIIIエフェクター部分が*Salmonella* spp.由来のSigDである場合の本発明の構築物の他の例では、構築物は、以下のものからなる：

SigD タイプIIIエフェクター部分；

融合性ペプチドの形態でのトランスロケーションドメイン；

ボツリヌス菌タイプF神経毒素由来の結合ドメイン（H_cドメイン）；および

ジスルフィド結合によるトランスロケーションドメインへのSigDエフェクターの付着を可能にするリンカーペプチド。

【0070】

タイプIIIエフェクター部分が*Yersinia* spp.由来のYopEである場合の本発明の構築物の例では、構築物は、以下のものからなり得る：

YopE タイプIIIエフェクター部分；

ジフテリア毒素由来のトランスロケーションドメイン；

ボツリヌス菌タイプF神経毒素由来の結合ドメイン（H_cドメイン）；および

ジスルフィド結合によるトランスロケーションドメインへのYopEエフェクターの付着を可能にするリンカーペプチド。

【0071】

本発明は、細胞シグナリングの操作を可能にし、そして特定の例では、SigDは、本発明の構築物に組み込まれ、そしてストレス下での神経細胞生存を促進するために使用され得る。適切な細胞内シグナリング経路をターゲティングすることによって、多くの経路を同時に調節し、神経細胞生存の見込みを向上させることが可能になる。SigD（SopBとしても知られている）は、プロテインキナーゼAktを活性化し、これは、種々の増殖因子によって媒介されるプロサバイバルシグナリング経路における重要な中間体である。AktはNF- κ Bのようなプロサバイバル転写因子をアップレギュレートするだけ

10

20

30

40

50

なく、BadおよびForkheadのようないくつかのプロアポトーシス因子をダウンレギュレートする。

【0072】

多くのタイプIIIおよびタイプIVエフェクターは、宿主細胞内で細菌の細胞内ニッチを維持するために機能する。いくつかの細菌病原体は細胞サイトゾル中に放出されるが、多くは、時に液胞と呼ばれる特殊化された細胞内コンパートメントを形成し、維持する。多くのエフェクタータンパク質の主な機能の1つは、コンパートメントと、潜在的に損傷しているファゴリソームのような他の細胞内コンパートメントとの融合を調節することである。同時に、病原体は、被包化された病原体に栄養源を提供するか、あるいは他の部位へ病原体を播種させるかのいずれかのために、再利用エンドソームを含む他の膜結合コンパートメントの融合を促進することが必要であり得る。細胞内病原体は、細胞内輸送および膜融合を調節するために広い範囲のエフェクター分子を提供する。

10

【0073】

膜結合した小胞の融合の基礎になるメカニズムは、多くの細胞プロセスで保存されている。広く言えば、膜融合事象は、原形質膜からの物質の放出のための分泌プロセス、または物質を原形質膜からリソーム系に移動させるエンドサイトシスプロセスのいずれかに分類される。この単純化した分類は、これらの経路内または2つの経路間の多数の連絡点内で生じる退行性および順行性のプロセスを考慮しない。すべての膜融合事象における基礎になるメカニズムは、4つの構成相に分類され得る。

20

【0074】

輸送された物質は、ドナー膜上の特異的部位で濃縮され、そしてこの膜から分離される小胞中に「ピンチオフ」される。

【0075】

小胞は、細胞骨格の纖維（例えば、微小管）に沿ってアクセプター膜に輸送される。

【0076】

小胞は、次いで、アクセプター膜に、SNARE複合体タンパク質によって媒介される「ドッキング/テサリング」メカニズムにより付着する。

【0077】

小胞およびアクセプター膜は融合して、アクセプター膜を通して小胞の内容物を放出する。

30

【0078】

したがって、類似のSNAREタンパク質および調節タンパク質は、エンドソーム小胞とリソームとの融合、小胞体とゴルジ体およびトランスゴルジネットワークとの融合、および分泌小胞と原形質膜との融合を補強する。膜融合メカニズムの機能的な保存とは、特異的な事象の融合を正常に調節する細菌エフェクタータンパク質が他の融合事象を調節することに関与し得ることを意味する。例えば、リソームとのエンドソーム融合をブロックするエフェクターは、分泌小胞と原形質膜との融合またはER小胞とゴルジネットワークとの融合をブロックすることに再関与し得る。

【0079】

小胞輸送で明らかにされている調節タンパク質の重要なクラスの1つは、Rabタンパク質（または酵母菌のYptタンパク質）と名付けられたRasスーパーファミリーの小さなGTPアーゼである。Rabタンパク質は、膜融合の全ての段階に関係する。例えば、Rab1、2、5、および9は、輸送のために物質をソーティングすることに関係し（上記の段階1）、Rab5、6、27およびSec4は輸送を媒介し（段階2）、Rab1、5、Ypt1、7、Sec4は、アクセプター膜へのドッキングに影響を与える（段階3）、そして他のRabタンパク質は、膜融合の促進に関係する。上記のリストは、Rab1およびRab5のようなあるRabタンパク質が1より多くの段階の融合プロセスに関係することを示す。同様に、いくつかのRabタンパク質は、全ての膜小胞に存在するが、他は、特異的な融合事象において、より特殊化された役割を有する。

40

【0080】

50

Rabタンパク質は、重要な潜在的な改変の標的であり、この改変は、膜融合事象をブロックまたは促進することを意図する細菌病原体、または細胞内輸送を調節するように設計された治療薬のいずれかによってなされる。Rab機能の効果を有するとして述べられた最初のエフェクタータンパク質の1つは、サルモネラ菌種由来の分泌されたエフェクタータンパク質SopE2であった。SopE2は、Rab5aについてのグアニンヌクレオチド交換因子として作用し、その結果、細胞膜上のタンパク質の活性化が上昇する。この活性は、感染したHeLa細胞およびマクロファージにおけるサルモネラ菌の生存の増加に関連している (Cell Microbiol. 3, 473頁)。SpiCは、エンドソーム融合をブロックするもう1つのサルモネラ菌エフェクターである (EMBO J. 18, 3924-3933頁)。GTPアーゼの正常な細胞レギュレーターといくつかの保存を示すSopEとは異なり、SpiCは、他のタンパク質と明確な相同意を示さない。小胞融合の4段階のうちの1つをブロックする能力が知られている。これは、SNAREタンパク質のレベルでその活性を示すか、Rab機能を直接的に調節するか、またはRab機能のレギュレーターの1つのレベルで操作し得る。膜挿入は、Rab活性に必須である。Rabタンパク質は、サイトゾルにおいてRabエスコートタンパク質 (REP) と安定な複合体を形成し、そしてこれは、C末端イソブレノイド部分を付加するゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ (RabGGT) の基質である。REPまたはRabGGTの不在下で、Rabタンパク質は、サイトゾルにおいて不活性形態のままである。REPはまた、ドナー膜への改変されたRabの膜挿入を媒介する。Rabタンパク質はまた、RabGDP解離インヒビター (RabGDI) の作用により膜から回収され得る。これらのタンパク質はすべて、膜融合事象を変更する細菌病原体のための潜在的な標的である。正確な効果は、変更がドナー膜において活性なRabのレベルを増加または減少させるかどうか、および特定のRabタンパク質の特異性に依存する。

【0081】

現在、変異がRabタンパク質またはそれらのレギュレーターのいずれかに影響を及ぼす多くのヒト疾患が同定されている。これらのヒト疾患は、細胞においてRab制御での変更の細胞効果を明らかにするのに役立つ。このように、Rab27 (グリセリ症候群)、REP1 (先天性脈絡膜欠如)、RabGDI (X染色体性精神遅滞疾患)、およびRabGGTサブユニット (ヘルマンスキー-プラック症候群) の変異はすべて、ヒト疾患に関係している (Seabraら, Trends in Molecular Medicine (2002) 8; 23-26頁、01k konenおよびIkonen, New England Journal of Medicine (2000) 343; 1104頁に総説される)。広い範囲のヒト疾患は、細胞内輸送における欠陥に関連する (AridorおよびHannan, Traffic (2000) 1; 836-851頁に総説される)。上記の4つのメカニズムの1つに関する細菌エフェクタータンパク質の特殊化した特性による膜融合の調節は、これらの疾患および輸送特性が影響を及ぼす他の疾患に対する治療の機会を提供する。

【0082】

分泌小胞と原形質膜との間の膜融合事象のターゲティングは、細胞からの分泌の制御を可能にする。直接かまたは上記のメカニズムの1つによるかのいずれかにより、Rab3a、b、c、およびd、Rab8aおよびb、Rab26、Rab27a、Rab37を含む特異的なRabタンパク質の調節を変更するエフェクター、あるいは膜融合に関する他の分子事象 (上記1~4で述べた) のいずれかに影響を及ぼすエフェクターは、分泌を調節し得る。エフェクタータンパク質は、特異的な細胞タイプからの分泌の増加あるいは減少のいずれかに適用され得る。治療の面において、これは、筋痙攣 (眼瞼痙攣、斜頸など)、過分泌障害 (COPD、気管支炎、喘息) を含む広い範囲の障害の治療に価値がある。

【0083】

再利用エンドソームとリソソームまたは原形質膜のいずれかとの融合を調節することによって、細胞表面マーカーの特異的なファミリーの提示を調節することも可能である。また、Rab4aおよびb、Rab11aおよびb、Rab15、Rab17、Rab18のような特異的なRabタンパク質の調節を変更すること、または融合メカニズムにおいて

10

20

30

40

50

他の分子事象に影響を及ぼすことに関するエフェクターは、細胞表面マーカーの提示をアップレギュレートまたはダウンレギュレートし得る。治療上、これは、外部の刺激に対する細胞の応答を変更すること（例えば、増殖因子、ホルモン、サイトカイン、ケモカイン、または他のシグナリング分子に対する応答を調節すること）、外部因子による細胞の認識を改変すること（例えば、免疫監視）、または細胞シグナリング経路のオンまたはオフを切り換えることに、非常に大きな可能性を有する。

【0084】

本発明の構築物を用いることによって、アルツハイマー病およびプリオン疾患（V C J D）のような神経変性障害に治療の介入が提供され得る。両疾患とも、細胞タンパク質のミスフォールディングによる不溶性タンパク質ラークの蓄積によって特徴付けられる。両方の場合とも、エンドソーム・リソソームコンパートメントの通過によるミスフォールドしたタンパク質の細胞内増幅は、疾患の進行に関係する。本明細書で記載する場合、神経をターゲティングした細菌エフェクターは、エンドソームおよびリソソームのコンパートメントの融合を調節し、不溶性のタンパク質の蓄積の制御を可能にする。これは、多くの細胞内細菌病原体の重要な生存方策の1つであるので、多くの治療分子、例えば、S p i C、S p t P、およびS o p E 2のようなサルモネラ菌エフェクターが利用可能である。

【0085】

本発明のさらなる実施態様では、分泌の阻害または促進のための構築物が提供され、これはタイプIIIエフェクターおよびターゲティング部分を含む。この目的のための特異的なエフェクターは、S p i C、S o p E、R a 1 F、S s e E、F、G、およびJ、P i p A、P i p B、S i f A、ならびにS i f Bから選択される。これらの構築物は、細胞からの分泌の制御を可能にするために、分泌小胞と原形質膜との間の膜融合事象をターゲティングする。直接的かまたは上記のメカニズムの1つによるかのいずれかにより、R a b 3 a、b、c、およびd、R a b 8 aおよびb、R a b 2 6、R a b 2 7 a、R a b 3 7を含む特異的なR a bタンパク質の調節を変更するエフェクター、あるいはいずれかの膜融合に関する他の分子事象に影響を及ぼすエフェクターは、分泌を調節し得る。エフェクタータンパク質は、特異的な細胞タイプからの分泌の増加あるいは減少のいずれかに適用され得る。治療の面において、これは、筋痙攣（眼瞼痙攣、斜頸など）、過分泌障害（C O P D、気管支炎、喘息）を含む広い範囲の障害の治療に価値がある。

【0086】

特殊化した細胞内ニッチを樹立し、およびそのコンパートメントと他の小胞との融合を調節するための病原体の方策は、非常に広い範囲の病原体について保存される。これは、上述のように細胞事象を調節し得る非常に広い範囲の分子を提供するだけでなく、このような分子についての潜在的な治療標的のアレイを提供する。表2に記載の多くの細胞内病原体は、膜結合コンパートメントを樹立するが、正確な生化学およびシグナリング事象、ならびにこれらのコンパートメントを維持するために必要とされるエフェクターは、非常に異なる。少数の細胞内病原体は、それらが細胞に侵入するファゴソームまたはエンドソームコンパートメントから逸脱する。このプロセスに関連するエフェクタータンパク質は、膜コンパートメントに残存する病原体のライフサイクルに適合性がない。膜結合小胞に存在する2つの細胞内病原体のエフェクタータンパク質もまた、必ずしも適合性ではない。例えば、マクロファージにおけるサルモネラ菌によるR a b 5 a活性の増強は、増強された生存と関係がある（Cell Microbiology 3; 473頁）。しかし、R a b 5 a発現/活性の上昇は、マクロファージにおけるListeria monocytogenesの細胞内破壊を加速させる（J. Biological Chemistry 274; 11459頁）。したがって、R a b 5 a補充に関連すると思われるサルモネラ菌エフェクタータンパク質（例えば、S o p E 2、S p i C、または他のS P I - 2分泌されたエフェクター）は、細胞内リストリア菌を治療するための可能性のある治療剤である。

【0087】

最も天然のままの形態において、抗菌療法は、2つの細胞内コンパートメントおよび生物の要求が適合しないことに基づいて、1つの細胞内病原体を第2の病原体で処置する工程

10

20

30

40

50

を含み得る。例えば、T B 感染したマクロファージをサルモネラ菌で治療することは、マクロファージ内に、誘発された液胞リソソーム融合物を生じ、T B を絶滅させることが期待され得る。この重複感染している病原体のタイプおよび運命は、元の生物の感染力および広がりを悪化させないように注意深く選択されなければならない。

【0088】

したがって、重複感染方策の改善は、本発明により述べるように、特異的な標的細胞へのエフェクター分子のターゲティングされた送達に焦点を合わせる。これは、非常に弱毒化された病原体（例えば、SopE2またはSptPのみを分泌するサルモネラ菌）またはターゲティングされたタンパク質送達（例えば、毒素送達ドメイン、抗体、または類似の細胞ターゲティングリガンドを使用して）のいずれかを利用し得る。Bacillus anthracis 10 由来の防御抗原は、広い範囲の細菌病原体の治療のためにエフェクターをマクロファージにターゲティングすることができる。炭水化物部分の特異的な付加は、マンノースレセプターによるマクロファージのプールの特異的なターゲティングを可能にする（例えば、Vyasら、International Journal of Pharmaceutics (2000) 210, 1-14頁）。感染した細胞に特異的な細胞表面マーカーは、（感染していない細胞と異なるので）送達システムに対する理想的な標的を提供する。病原体によって感染した細胞タイプは、送達リガンドの選択を決定するが、細胞コンパートメントの正確な運命は、エフェクターの選択を決定する（例えば、細胞アポトーシス、溶菌、エンドソーム-リソソーム融合、エンドソーム酸性化など）。

【0089】

このタイプの治療の重要な利点は、エフェクタータンパク質が細胞に対して本質的に毒性ではないことであり、したがって、感染していない標的細胞へのタンパク質の送達は、いかなる有害な影響も与えないようである。この場合、ターゲティングリガンドの正確な特異性は望ましいが、治療の成功のために必須ではない。

【0090】

広い範囲の細胞内病原体およびこれらの生物に対して治療／免疫することの困難性は、このアプローチを抗生物質療法に代わるべき価値のある手段にする。この方法はまた、抗菌剤の回避が、病原体がエフェクター誘導された細胞刺激を無効にし得る分子を産生しなければならないか、またはそのライフスタイルを明らかに改変しなければならないかのいずれかを意味するので魅力的である。偏性細胞内病原体に対して、あるいは細胞内の段階が増殖に必須である場合、これは、特異的な生化学的相互作用でターゲティングされる現在の抗生物質方策よりも広い範囲の抗菌用途に非常に大きな希望を提供し得る。

【0091】

エフェクタータンパク質がSalmonella spp由来のSptCである場合における本発明のもう1つの例においては、構築物は、以下の：

防御抗原と相互作用し得るドメインに融合されたSptCエフェクター部分；

Bacillus anthracis由来の防御抗原；

からなり得、

該構築物は同時に投与されるか、または該防御抗原の後にSptC部分が投与されるかのいずれかである。

【0092】

本発明の構築物は、好ましくは、全部がまたは部分的に組換え技法によって作成される。本発明の実施態様においては、本発明の構築物が組換え技法によって作成される場合、本発明の構築物は、N末端から、

タイプIIIエフェクター部分；

リンカーペプチド；

トランスロケーションドメイン；および

結合ドメイン

を含む単一の多ドメインポリペプチドとして作成される。

【0093】

10

20

30

40

50

このような構築物において、タイプIIIエフェクタータンパク質のC末端はリンカーペプチドを介してトランスロケーションドメインのN末端に融合される。このようなリンカーペプチドの例は、配列CGLVPAGSGPであり、これは、トロンビンプロテアーゼ切断部位およびジスルフィド結合形成のためのシステイン残基を含む。次いで、後者の一本鎖融合タンパク質は、二本鎖タンパク質を得るためにトロンビンで処理され得、該二本鎖タンパク質においては、タイプIIIエフェクターは、ジスルフィド結合によってトランスロケーションドメインに連結される。トランスロケーションドメインが融合性ペプチドである場合のように、トランスロケーションドメインがそのC末端付近に遊離のシステイン残基を含まない場合のリンカーペプチドのもう1つの例において、リンカーペプチドは、ジスルフィド結合に必要とされる両方のシステイン残基を含む。後者のリンカーペプチドの例は、アミノ酸配列：CGLVPAGSGPSAGSSACである。10

【0094】

タイプIIIエフェクター部分が、組換え技術によって作成されたSalmonella spp由来のSig Dである場合の本発明の構築物の例においては、該構築物は、(N末端から)以下のドメインを含むポリペプチドからなり得る：

Sig D タイプIIIエフェクター部分；

ジスルフィド結合によるトランスロケーションドメインへのSig D エフェクターの付着を可能にするリンカーペプチド(配列CGLVPAGSGP)；

ジフテリア毒素(残基194~386)由来のトランスロケーションドメイン；およびボツリヌス菌タイプA神経毒素(残基872~1296)由来の結合ドメイン(Hcドメイン)。20
。

【0095】

本発明の構築物はまた、化学的連結法を用いて作成され得る。タイプIIIエフェクタータンパク質が、種々の確立された化学的連結技法を用いて、トランスロケーションドメインおよび結合ドメインからなるポリペプチドに連結され得る種々の方策が知られている。これらの技術を用いて、種々のタイプIIIエフェクター構築物が作成され得る。タイプIIIエフェクタータンパク質は、例えば、連結試薬N-スクシンイミジル3-[2-ピリジルジチオ]プロピオネートで誘導体化される。次いで、誘導体化されたタイプIIIエフェクターは、トランスロケーションドメインおよび結合ドメインを含むペプチドに、トランスロケーションドメインに存在する遊離のシステイン残基を介して連結される。30

【0096】

タンパク質エフェクターは、それらの通常の作用部位以外の細胞内コンパートメントへの送達を可能にするように改変され得る。例えば、ミトコンドリアまたは核ターゲティングシグナルは、エフェクターをこれらのコンパートメントに指向させるために付加され得る。エフェクターをターゲティングドメインに共有結合させることによって、エフェクターは、エンドソーム/リソソームコンパートメントに保持され得るが、これは、通常には、細菌による送達によって入っていかない。エフェクターは、ミリストイル化、パルミトイ化、あるいはSH2、SH3、WWドメイン、Rabタンパク質のフラグメント、またはシナプトジャニン様ドメインを含み得る短いタンパク質ドメインの付加を含む脂質改変により、特異的な膜の位置にターゲティングされ得る。当業者は、これらのターゲティング方策が、ある治療方策についての有利点を提供することを認識する。40

【0097】

本発明の構築物は、当該技術分野で知られている方法を用いて、神経または非神経組織のいずれかに導入され得る。それに続く神経細胞組織への特異的結合によって、ターゲティングされた構築物は、その治療効果を発揮する。理想的には、構築物は、治療介入を必要とする部位付近に注射される。

【0098】

本発明の構築物は、治療物質の適用および特性に応じて、懸濁液、乳濁液、溶液、または凍結乾燥粉末として生成され得る。本発明の構築物は、適用に応じて、種々の薬学的に受容可能な液体で再懸濁または希釈され得る。50

【0099】

「クロストリジウム菌神経毒素」とは、破傷風菌神経毒素または7つのボツリヌス菌神経毒素のうちの1つのいずれかを意味し、後者は、血清型A、B、C₁、D、E、F、またはGと命名され、そして毒素のドメインと言うときは、完全なドメインあるいはドメインの必須の機能を保持するフラグメントまたは誘導体を言うことが意図される。

【0100】

「結合体」とは、2つのポリペプチドに関し、ポリペプチドが共有結合、代表的には結果として単一のポリペプチドを形成すること、またはジスルフィド結合によって連結されることを意味する。

【0101】

「結合ドメイン」とは、標的細胞に特異的な高親和性結合、例えば、クロストリジウム菌神経毒素の結合に対応する神経細胞の結合を示すポリペプチドを意味する。クロストリジウム菌神経毒素由来の結合ドメインの例としては、以下のとおりである：

ボツリヌス菌タイプA神経毒素	- アミノ酸残基 (872~1296)
ボツリヌス菌タイプB神経毒素	- アミノ酸残基 (859~1291)
ボツリヌス菌タイプC神経毒素	- アミノ酸残基 (867~1291)
ボツリヌス菌タイプD神経毒素	- アミノ酸残基 (863~1276)
ボツリヌス菌タイプE神経毒素	- アミノ酸残基 (846~1252)
ボツリヌス菌タイプF神経毒素	- アミノ酸残基 (865~1278)
ボツリヌス菌タイプG神経毒素	- アミノ酸残基 (864~1297)

破傷風菌神経毒素 - アミノ酸残基 (880~1315)

10

20

30

40

「クロストリジウム菌神経毒素の結合に対応する神経細胞に特異的な高親和性結合」とは、リガンドが所定の神経毒素の特異的結合に関連する神経細胞の細胞表面レセプターに強く結合する能力をいう。所定のリガンドがこれらの細胞表面レセプターに強く結合する能力は、従来の競合結合アッセイを用いて評価され得る。このようなアッセイにおいては、放射標識されたクロストリジウム菌神経毒素を、放射標識されていない種々の濃度のリガンドの存在下で神経細胞と接触させる。リガンド混合物を低温 (0~3) で細胞とインキュベートし、リガンドのインターナリゼーションを防止するが、その間放射標識されたクロストリジウム菌神経毒素と放射標識されていないリガンドとの競合が生じ得る。このようなアッセイにおいて、使用される放射標識されていないリガンドが、放射標識された神経毒素の濃度と同じ場合、放射標識されたクロストリジウム菌神経毒素は、放射標識されていない神経毒素の濃度が上昇するにつれて、神経細胞レセプターから置換される。したがって、この場合に得られた競合曲線は、本明細書で使用される場合、「クロストリジウム菌神経毒素の結合に対応する神経細胞に特異的な高親和性結合」を示すリガンドの挙動の例である。

【0103】

特定の細胞を「ターゲティングする」キャリアは、一般に、そのキャリアまたはその一部分が細胞に結合することによりターゲティングし、そして例として、所定の細胞タイプ特異性を有する多くの異なるリガンドが本明細書に記載される。

【0104】

「ransporter protein domain」とは、膜または脂質二重層を横切ってそれ自体および/または他のタンパク質ならびに物質の輸送をもたらすタンパク質のドメインまたはフラグメントを意味する。後者の膜は、ransporter protein domainがレセプター媒介エンドサイトーシスのプロセス中に生じる場合のエンドソームの膜であり得る。ransporter protein domainは、しばしば、低pHで脂質膜中に測定可能な細孔を形成し得るという特性によって同定され得る (Shoneら、Eur J. Biochem. 167, 175-180頁)。ransporter protein domainの例を、以下にさらに詳しく記載する：

ジフェリア毒素	- アミノ酸残基 (194~386)
ボツリヌス菌タイプA神経毒素	- アミノ酸残基 (449~871)

50

- ボツリヌス菌タイプB神経毒素 - アミノ酸残基(441~858)
 ボツリヌス菌タイプC神経毒素 - アミノ酸残基(442~866)
 ボツリヌス菌タイプD神経毒素 - アミノ酸残基(446~862)
 ボツリヌス菌タイプE神経毒素 - アミノ酸残基(423~845)
 ボツリヌス菌タイプF神経毒素 - アミノ酸残基(440~864)
 ボツリヌス菌タイプG神経毒素 - アミノ酸残基(442~863)
 破傷風菌神経毒素 - アミノ酸残基(458~879)

トランスロケーションドメインは、本明細書ではしばしば「H_Nドメイン」と言う。

【0105】

トランスロケーションドメインに関して「トランスロケーション」とは、細胞表面への結合後に生じるインターナリゼーション事象を意味する。これらの事象により、標的細胞のサイトゾル中へ物質を輸送する。 10

【0106】

「タイプIIIまたはタイプIV分泌系によって分泌された、注入されたエフェクター」とは、タイプIIIまたはタイプIV分泌系としばしば言われる改変された線毛または「針様」注入システムにより宿主細胞（哺乳動物、植物、昆虫、魚、またはその他）に注入される細菌タンパク質を意味し、そしてこの用語は、必須のエフェクター活性を保持するフラグメント、改変体、および誘導体を包含する。

【0107】

したがって、本発明は、神経成長を促進するための細胞内シグナリングの改変を使用する。成長円錐の発達を制御する多くのエフェクターおよびインヒビターは、細胞骨格成分のリン酸化状態を調節し、そして軸索が成長するか崩壊するかを最終的に決定する、共通の細胞内シグナリング経路を通って作用する。したがって、細胞内シグナリングの適切な操作は、アポトーシスおよび成長円錐崩壊を誘導することが示された多くの因子の複数のインヒビターの必要性を除去するための強力なアプローチである。アポトーシスを阻害する転写因子のアップレギュレーションは、神経再生を促進するための細胞内シグナリングの操作の一例である。 20

【0108】

本発明のエフェクターおよび組成物を用いる治療介入の方策としては、ストレス誘導因子を除去するための薬剤の送達、および細胞生存を促進するための細胞内シグナリングの改変が挙げられる。後者のアプローチは特に強力であり、そして本発明は、このような方策が実行できるようなタイプIIIエフェクター部分との結合体を記載する。 30

【0109】

本発明の構築物は、所望の細胞への治療薬剤の送達を確実にするために特異的なターゲティングシステムを使用し、そして細胞の細胞シグナリング機構で重要な段階を調節するように進化した細菌毒素を使用する。この方策は、他の薬物計画よりも多くの有利な点を提供する。細胞特異性は、細胞シグナリングの変更がいずれも、この改変が所望される細胞でのみ生じ、その他の隣接細胞では生じないことを確実にする。例えば、神経細胞をターゲティングした構築物において、シグナリングの変化は、ニューロンでのみ起こり、そしてこのような変化が所望され得ない隣接したグリア細胞では起こらない。シグナリング経路において重要な中間体をターゲティングすることによって、所望の効果を促進するための多くの重複する細胞事象を協調的に調節することが可能である。例えば、S i g D によるA k t の活性化は、細胞生存を積極的に促進し、そしてストレス因子に応じてアポトーシスの誘導をブロックするように、多くのシグナリング経路を協調させることによって、細胞に対する効果を生じる。これはまた、細胞シグナリング経路の成分を活性化するエフェクターの好例である。ほとんどの薬物発見のアプローチは、特定の成分のインヒビターを同定する傾向にある。 40

【0110】

本発明を、以下の特定の実施例で説明する。

【実施例】

【0111】

実施例1. タイプIIIエフェクター遺伝子のクローニングおよび発現

すべての遺伝子操作について、標準的な分子生物学プロトコルを用いた (Sambrookら、1989, *Molecular cloning; A laboratory manual*. 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.)。タイプIIIエフェクター、N末端疎水性ドメインを除去している短縮型（例えば、*Sig D*については1~28、*Spt P*については1~69、*Sop E*については1~76のアミノ酸の除去）、または個々のサブドメイン（例えば、*ExoS GAP*ドメインのアミノ酸96~234およびADP-リボシリルトランスフェラーゼドメインのアミノ酸232~453）をコードする遺伝子をPCRによってゲノムDNAから増幅して、クローニングに適切な制限部位を生成した。いくつかの場合では、大腸菌における発現に最適化されたコドン使用頻度を有する合成遺伝子を調製した。

Bam H I(5')および*Bgl I I*(3')のような制限酵素をクローニングに用いて、リーディングフレームを維持した。構築物の配列を決定して、正確な配列の存在を確認した。発現用構築物を、適切なフラグメントとして、*T7*ポリメラーゼプロモーター部位を有する発現ベクター（例えば、*pET 28*、*pET 30*、または誘導体（Novagen Inc, Madison, WI））中にサブクローニングして、マルトース結合タンパク質との融合物（例えば、*pMAL c 2 x*（NEB））を生成させるか、あるいは当業者に公知の他の発現ベクターにサブクローニングした。確認された配列を有するクローランを用いて、発現宿主を形質転換した：*T7*ポリメラーゼベクターについては、大腸菌*BL 21 (DE3)*（StudierおよびMoffatt 1986 *Journal of Molecular Biology* 189:113-130頁）、*JM 109 (DE3)*または*DE3*溶原菌と等価の株である。*pMAL c 2 x*については、*JM 109*、*BL 21*、*TG 1*、*TB 1*、または他の適切な発現株である。

【0112】

標準的な融合タンパク質としてのタイプIIIエフェクターの発現の他に、他のアプローチを用いて融合タンパク質を生成した。タイプIIIエフェクターまたは上記のように生成した短縮型エフェクターを、細胞ターゲティングリガンドをコードする遺伝子の5'末端にクローニングした。このリガンドとしては、毒素フラグメント、抗体、増殖因子、レクチン、インターロイキン、ペプチドが挙げられる。これらの融合タンパク質をクローニングし、そして6-Hisタグ付けした融合物、MBPタグ付けした融合物、または上記のような他の融合物のいずれかとして発現させた。

【0113】

発現培養物を、30 μg/mlカナマイシンおよび0.5% (w/v) グルコースを含むTerrificプロス中で、2.0のOD₆₀₀になるまで増殖し、そしてタンパク質発現を、500 μMのIPTGで2時間誘導した。細胞を、超音波処理または適切なデタージェント処理（例えば、Bugbuster試薬；Novagen）のいずれかによって溶解し、細胞破碎物を遠心分離によってペレットにし、そして上清をCu²⁺で荷電した金属キレートカラム（Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden）に載せた。

【0114】

*pET*ベクターから発現させた組換えタンパク質は、アミノ末端ヒスチジン(6-His)タグおよび*T7*ペプチドタグを含み、これらのタグはCu²⁺荷電した金属キレートカラムを用いるアフィニティーコロマトグラフィーによるタンパク質精製を可能にする。タンパク質をカラムに載せそして洗浄した後、タンパク質をイミダゾールを用いて溶出させた。すべての緩衝液を、製造業者によって記載されたように使用した。ここでは精製用タグの適切な除去を、製造業者の指示書に従って行った。

【0115】

100 μg/mlアンピシリンを含むTerrificプロス中で増殖し、そして上記のように溶菌し、次いで、MBP融合物を、製造業者（NEB）によって記載されたようにアミロース樹脂カラムで精製した。

【0116】

他の融合システムを、製造業者の指示書に従って使用し、そして精製を所定の方法を用い

10

20

30

40

50

て適切なカラムで行った。

【0117】

実施例2. トランスロケーションドメインおよび結合ドメインからなる組換えターゲティングベクターの作成

すべての遺伝子操作について、標準的な分子生物学プロトコルを用いた (Sambrookら、1989, *Molecular cloning; A laboratory manual*. 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)。天然の遺伝子または大腸菌での発現に最適化されたコドン使用頻度を有する合成遺伝子のいずれかに由来するクロストリジウム菌神経毒素結合ドメイン (B o N T / H c または T e N T / H c) を、P C R によって増幅した。導入した B a m H I (5') 制限部位および H i n d I I I 、 S a l I 、または E c o R I (3') 部位を、ほとんどのクローニング操作に用いて、リーディングフレームが制限部位の最初の塩基で始まるように設計した。構築物を配列決定して、正確な配列の存在を確認した。ジフテリア毒素のトランスロケーションドメイン (D i p T) を、その天然のままの遺伝子から増幅して、B a m H I および B g l I I 部位をそれぞれ5'および3'末端に導入した。この B a m H I および B g l I I フラグメントを、H c フラグメントの5'末端の B a m H I 部位にサブクローニングして、インフレーム融合物を生成した。重鎖フラグメント全体 (D i p T - H c) を、B a m H I - H i n d I I I または B a m H I - S a l I または B a m H I - E c o R I フラグメントとして切り出し、そして適切な発現ベクターにサブクローニングした。

【0118】

発現用の構築物を、T 7 ポリメラーゼプロモーター部位を有する発現ベクター (例えば、p E T 2 8 、 p E T 3 0 、または誘導体 (Novagen Inc, Madison, WI)) のいずれか中に、あるいはマルトース結合タンパク質との融合物 (例えば、p M A L c 2 x (NEB)) を生成するために、適切なフラグメントとしてサブクローニングした。確認された配列を有するクローンを用いて、発現宿主を形質転換した: T 7 ポリメラーゼベクターについては、大腸菌 B L 2 1 (D E 3) (StudierおよびMoffatt 1986 *Journal of Molecular Biology* 189:113-130頁)、J M 1 0 9 (D E 3) または D E 3 溶原菌と等価の株である。p M a l c 2 x については、J M 1 0 9 、 B L 2 1 、 T G 1 、 T B 1 、または他の適切な発現株である。

【0119】

p E T ベクターから発現させた組換えタンパク質は、アミノ末端ヒスチジン (6-His) タグおよびT 7 ペプチドタグを含み、これらはCu²⁺荷電した金属キレートカラムを用いるアフィニティーコロマトグラフィーによるタンパク質の精製を可能にする。発現培養物を、30 μ g/ml カナマイシンおよび0.5% (w/v) グルコースを含むTerrificプロス中で、2.0のOD₆₀₀ になるまで増殖し、そしてタンパク質発現を、500 μ M の I P T G で2時間誘導した。細胞を、超音波処理または適切なデタージェント処理 (例えば、Bugbuster試薬; Novagen) のいずれかによって溶解し、細胞破碎物を遠心分離によってペレットにし、そして上清をCu²⁺で荷電した金属キレートカラム (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) に載せた。タンパク質をカラムにロードしそして洗浄した後、タンパク質をイミダゾールを用いて溶出させた。すべての緩衝液を、製造業者によって記載されたように使用した。ここでは精製用タグの適切な除去を、製造業者の指示書に従って行った。

【0120】

100 μ g/ml アンピシリンを含むTerrificプロス中で増殖し、そして上記のように溶菌し、次いで、M B P 融合物を、製造業者 (NEB) によって記載されたようにアミロース樹脂カラムで精製した。

【0121】

トロンビンまたは第X a 因子プロテアーゼ部位をタンパク質内に含ませ、これらの精製用タグをその後除去した。

【0122】

アフィニティー精製用タグおよびこれらのアフィニティータグのその後の除去のための 1

10

20

30

40

50

以上の特異的プロテアーゼ部位を付加するためのさらなる配列もまた、遺伝子産物のリーディングフレーム中に含まれ得る。所望のタンパク質の発現を可能にする他のコード配列も受容可能である。他のタグまたは連結部位も、配列に組込まれ得る。

【0123】

上記の技法を用いて、ターゲティングベクターフラグメントを、ボツリヌス菌タイプA、タイプF、または破傷風菌神経毒素のいずれかのH_c フラグメントのドメインと、ジフテリア毒素のトランスロケーションドメインとを融合することによって構築した。

【0124】

実施例3. 化学的方法によるボツリヌス菌重鎖の調製

種々の血清型のクロストリジウム菌神経毒素は、既述のような標準的なタンパク質精製技法を用いる方法 (ShoneおよびTranter 1995, Current Topics in Microbiology, 194, 143-160頁; Springer) によって、ボツリヌス菌および破傷風菌の種々の毒素産生株から調製されそして精製され得る。ボツリヌス菌神経毒素の試料 (1 mg/ml) を、50mM Tris-HCl pH8.0、1 M NaCl、および2.5M尿素を含む緩衝液に対して4 にて少なくとも4時間透析し、次いでジチオトレイトールを100mMとし、そして22 にて16時間インキュベートする。次いで、沈殿した軽鎖を含む濁った溶液を、15000×gで2分間遠心分離し、そして重鎖を含む上清液を保持し、そして0.2M NaClおよび5 mMジチオトレイトールを含む50mM HEPES pH7.5に対して4 にて少なくとも4時間透析する。透析した重鎖を15000×gで2分間遠心分離し、そして上清液を保持し、そして0.2M NaClを含む50mM HEPES pH7.5の緩衝液に対して十分に透析し、そして-70 にて保存する。後者の手順により、化学的カップリングの目的に使用され得る遊離のシステイン残基を有する重鎖を95%を超える純度で得る。重鎖の生物学的(結合)活性は、実施例5に記載のようにアッセイされ得る。

【0125】

ボツリヌス菌神経毒素の重鎖はまた、ShoneおよびTranter (1995) (Current Topics in Microbiology, 194, 143-160頁; Springer) の方法に記載のようにQAE Sephadexでのクロマトグラフィーによって生成され得る。

【0126】

実施例4. タンパク質の化学的結合

Salmonella spp.由来の組換えS Ig DタイプIIIエフェクターを、実施例1に記載のようにクローニングして精製した。S Ig DタイプIIIエフェクターを、0.1M NaClを含む0.05 M Hepes緩衝液pH7.0中の3~5モル過剰のN-スクシンイミジル3-[2-ピリジルジチオ]プロピオネート (SPDP) での22 にて60分間の処理によって化学的に改変した。過剰のSPDPを、4 にて16時間同様の緩衝液に対する透析によって除去した。次いで、置換されたS Ig Dエフェクターを、トランスロケーションドメイン(利用可能な遊離のシステイン残基を有する)および神経ターゲティングドメインを含むターゲティングベクターと1:1の割合で混合し、そして4 にて16時間インキュベートした(実施例2を参照のこと)。後者はまた、実施例3に記載のように精製したボツリヌス菌タイプA神経毒素から精製された天然の重鎖であり得る。インキュベーション期間中、S Ig Dエフェクターを、遊離のスルフヒドリル基によってターゲティングベクターフラグメントに結合した。インキュベーション後、S Ig D構築物を、Sephadex G200でのゲルfiltrationクロマトグラフィーによって精製した。

【0127】

実施例5. 構築物の生物学的活性のアッセイ - 神経細胞への高親和性結合の証明

クロストリジウム菌神経毒素は、クロラミンTを用いて125-ヨウ素で標識され、そしてその種々の細胞への結合は、Evansら、1986, Eur J. Biochem., 154, 409頁またはWadsworthら、1990, Biochem. J. 268, 123頁に記載のような標準的方法によって評価され得る。これらの実験において、神経細胞または脳シナプトソームに存在するレセプターに対して天然のクロストリジウム菌神経毒素と競合するタイプIII構築物の能力を評価した。すべての結合実験を、結合緩衝液中で行った。ボツリヌス菌神経毒素については、この緩衝液は、50mM HEPES pH7.0、30mM NaCl、0.25%スクロース、0.25%ウシ血清アルブミンから

10

20

20

30

40

50

なった。破傷風菌毒素については、結合緩衝液は、0.6%ウシ血清アルブミンを含む0.05Mトリス酢酸pH6.0であった。代表的な結合実験において、放射標識したクロストリジウム菌神経毒素を、1~20nMの間の固定濃度で保持した。反応混合物を、放射標識した毒素を種々の濃度の非標識神経毒素または構築物と混合することによって調製した。次いで、反応混合物を、神経細胞またはラット脳シナプトソームに添加し、次いで0~3にて2時間インキュベートした。この期間の後、神経細胞またはシナプトソームを、氷冷した結合緩衝液で2回洗浄し、そして細胞またはシナプトソームに結合した標識されたクロストリジウム菌神経毒素の量を、カウンティングによって評価した。ボツリヌス菌タイプA神経毒素由来の結合ドメインを含むタイプIIIエフェクター構築物を用いる実験では、構築物は、非標識の天然のボツリヌス菌タイプA神経毒素と同様に神経細胞レセプターに対して¹²⁵I標識したボツリヌス菌タイプA神経毒素と競合することが見られた。これらのデータは、構築物が天然の神経毒素の結合特性を保持することを示した。

10

20

40

50

【0128】

実施例6.組換えタイプIIIエフェクター構築物

以下のエレメントの組み合わせを含む組換えタイプIIIエフェクター-ターゲティングベクター構築物を調製した：

- タイプIIIエフェクター（例えば、*Salmonella* spp.由来のSigD）；
- リンカー領域、これは、タイプIIIエフェクターとトランスロケーションドメインとの間のジスルフィド結合の形成を可能にし、そして二本鎖分子の形成を可能にするために第Xa因子またはトロンビンによる切断のための独特的なプロテアーゼ切断部位も含む；
- ジフテリア毒素由来のトランスロケーションドメインまたはインフルエンザウイルス赤血球凝集素由来のエンドソーム溶解（融合性）ペプチド；および
- 神経細胞特異的結合ドメイン（例えば、破傷風菌またはボツリヌス菌神経毒素タイプAまたはボツリヌス菌神経毒素タイプF由来）。

【0129】

これらの種々のドメインのタンパク質配列は、本発明の特定の実施態様を形成し、そして以下に実施例を示す。

【0130】

これらの構造の性質を確認するために、組換えタイプIIIエフェクター-ターゲティングベクター構築物を、リンカー領域内の切断部位配列に対応する独特的なプロテアーゼでの処理によって二本鎖形態に変換した。トロンビン切断部位を含む結合体を、トロンビン（1mgの結合体あたり20μg）で37にて20時間処理し；第Xa因子切断部位を含む結合体を、第Xa因子（1mgの結合体あたり20μg）で22にて20分間処理した。

30

【0131】

非還元条件下でのSDS-PAGEゲルでは、大部分のタイプIIIエフェクター-ターゲティングベクター構築物は、単一バンドとして出現した。還元剤（ジチオトレイトル）の存在下では、タイプIIIエフェクターおよびターゲティングベクター（トランスロケーションドメインおよび結合ドメイン）に対応する2本のバンドを観察した。これらのデータは、独特的なプロテアーゼでの処理後、結合体が、ジスルフィド結合によって連結される後者の2つの成分からなることを示す。

40

【0132】

実施例7.タイプIIIエフェクター-ジフテリア毒素A(CRM197)融合タンパク質からのタイプIIIエフェクター構築物の形成

タイプIIIエフェクター-ターゲティングベクター構築物はまた、インビトロで2つの組換えフラグメントからの再構成によって形成され得る。これらは、次の2つである：

実施例1に記載のようにジフテリアフラグメントA(CRM197)を不活性化するように融合されたタイプIIIエフェクター；

ジフテリア毒素のトランスロケーションドメインが例えばクロストリジウム菌神経毒素由来の神経ターゲティングドメインに融合される、組換えターゲティングベクター。これらの产生は、実施例2に記載される。

【0133】

タイプIIIエフェクター構築物は、10mMジチオトレイトルの存在下でフラグメント1および2を等モルの割合で混合する工程、次いで、pH7.4のリン酸緩衝化生理食塩液に対する透析、次いで0.15M NaClを含むHEPES(0.05M、pH7.4)に対する透析によって、還元剤を完全に除去する工程によって形成され得る。実施例6に記載のように、これらの構築物は非還元条件下のSDSゲルでは単一バンドとして、および還元剤の存在下では2つのバンドとして出現する。

【0134】

実施例8. 臨床使用のためのタイプIIIエフェクター構築物の処方物

臨床使用のためのタイプIIIエフェクター構築物の処方物において、組換えタイプIIIエフェクター構築物は、現行の医薬品の製造および品質管理に関する基準の下で調製される。構築物を、凍結乾燥中の製品の安定性を得るために、希釈によって溶液に移す。このような処方物は、5mM HEPES緩衝液(pH7.2)、50mM NaCl、1%ラクトース中にタイプIIIエフェクター構築物(0.1~10mg/mlの濃度)を含み得る。溶液を、滅菌濾過後、小分けし、凍結乾燥し、そして窒素下で-20で保存する。

【0135】

実施例9. 神経防御特性を有する構築物の作成

SigDを、実施例1に概説する方法を用いてクローニングした(最初の29コドンを含まない)。タンパク質を発現し、そしてマルトース結合タンパク質(例えば、pMALc2xを用いて)またはヒスチジン6(例えば、pET28aを用いて)のいずれかとの融合物として精製した。次いで、精製用タグを、融合タンパク質のアフィニティー精製後に標準的方法によって除去した。SigDの化学的構築物を、実施例4に概説するように調製した。

【0136】

ボツリヌス菌タイプA神経毒素のトランスロケーションドメインおよび結合ドメインに連結されたSigDを含む本発明の組換え構築物を、実施例1に概説する標準的な分子生物学的手順を用いて実施例6に概説するように調製した。

【0137】

神経細胞への上記構築物の適用により、SigDのレセプター媒介インターナリゼーション、およびそれに続くAktキナーゼの活性化が起こる。このような細胞は、増殖因子除去のようなストレスに耐える能力が増強されている。

【0138】

実施例10. 神経変性疾患の治療のための構築物

エフェクターSpic、SptP、またはSopE2を含む神経変性疾患の治療のための構築物を、実施例9に概説するように調製した。

【0139】

実施例11. 細胞分泌および細胞表面レセプターの発現を調節するための構築物

神経細胞に対して、エフェクターSpic、SopE、RalF、SseE、F、GおよびJ、PipaおよびB、SifAおよびBを含む構築物を、実施例9に概説するように調製した。

【0140】

非神経細胞に対しては、ターゲティングドメインは、標的細胞タイプに特異性を有するリガンドと置き換えられ得る。このようなりガンドは、抗体、炭水化物、ビタミン、ホルモン、サイトカイン、レクチン、インターロイキン、ペプチド、増殖因子、細胞付着タンパク質、毒素フラグメント、ウイルスコートタンパク質を含むリストから選択され得る。

【0141】

実施例12. 細胞内病原体の治療のための構築物

エフェクターSopE/SopE2、RalF、Spic、SseE、F、GまたはJ、PipaまたはB、SifAまたはB、あるいは他のエフェクター(例えば、表1に記載されるエフェクター)を含む構築物は、疾患の治療に有用な治療剤である。

10

20

30

40

50

【0142】

構築物を、本質的には実施例9に記載のように調製したが、抗体、炭水化物、ビタミン、ホルモン、サイトカイン、レクチン、インターロイキン、ペプチド、増殖因子、細胞付着タンパク質、毒素フラグメント、ウイルスコートタンパク質などを含むリストから選択される適切な結合ドメインを用いた。マクロファージへのターゲティングには、これは、*Bacillus anthracis*由来の防御抗原または特異的取り込みを可能にするマンノース改変のような炭水化物部分を含み得る。

【0143】

本発明の組換え構築物は、エフェクタータンパク質、および所望の細胞タイプへのエフェクターのターゲティングに適切な結合ドメインを含む。

10

【0144】

細胞に送達される場合、このような構築物は、細胞内病原体の死を引き起こし、感染した細胞タイプからのその放出を防止し、あるいは感染して疾患を引き起こす能力を減少させる細胞事象を生じる。

【0145】

本発明のさらなる実施態様は、記載されたエフェクターと、記載されたリンカー-トランスロケーションドメイン-結合ドメイン結合体とのすべての組み合わせにより示される。

20

【0146】

本出願は、配列表を含み、その配列番号によって示される以下の配列は、本発明の以下の実施態様を表す。

20

【0147】

配列番号 説明

- | | | |
|----|--|----|
| 1 | ジフテリア毒素トランスロケーションドメイン | |
| 2 | ジフテリア毒素トランスロケーションドメイン、T e N T - H c | |
| 3 | トロンビンリンカー、ジフテリア毒素トランスロケーションドメイン、
T e N T - H c | |
| 4 | 第Xa因子リンカー、ジフテリア毒素トランスロケーションドメイン、
T e N T - H c | |
| 5 | ジフテリア毒素トランスロケーションドメイン、B o N T / F - H c | |
| 6 | トロンビンリンカー、ジフテリア毒素トランスロケーションドメイン、
B o N T / F - H c | 30 |
| 7 | 第Xa因子リンカー、ジフテリア毒素トランスロケーションドメイン、
B o N T / F - H c | |
| 8 | AAC46234侵襲遺伝子Dタンパク質 [<i>Salmonella typhimurium</i>] S i g D | |
| 9 | AAF21057侵襲タンパク質D [<i>Salmonella typhimurium</i>] S o p B | |
| 10 | CAC05808 I p g D、M x i - S p a 機構により分泌され、
上皮細胞への細菌の侵入を調節する [<i>Shigella flexneri</i>] | |
| 11 | ACC69766ターゲティングされたエフェクタータンパク質 [<i>Yersinia pestis</i>]
Y o p J | |
| 12 | AAC02071 S o p E [<i>Salmonella typhimurium</i>] | 40 |
| 13 | AAC44349プロテインチロシンホスファターゼS p t P
[<i>Salmonella typhimurium</i>] | |
| 14 | NP_047628ターゲティングされたエフェクター [<i>Yersinia pestis</i>] Y o p E | |
| 15 | AAK39624外酵素S [<i>Pseudomonas aeruginosa</i>] | |
| 16 | AAG03434外酵素T [<i>Pseudomonas aeruginosa</i>] | |
| 17 | NP_047619 Y o pターゲティングされたエフェクター [<i>Yersinia pestis</i>]
Y o p T 1 8 NP_052380プロテインキナーゼY o p O [<i>Yersinia enterocolitica</i>] | |
| 19 | AAF82095外部タンパク質A v r A [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> se
rovar <i>Dublin</i>] | |
| 20 | AAC44300 S p i C [<i>Salmonella typhimurium</i>] | 50 |

- 2 1 最初の29コドンを除去した S i g D、トロンビンリンカー、
ジフテリアトランスロケーションドメイン、T e N T - H c
- 2 2 最初の29コドンを除去した S i g D、第Xa因子リンカー、
ジフテリアトランスロケーションドメイン、T e N T - H c
- 2 3 最初の29コドンを除去した S i g D、トロンビンリンカー、
ジフテリア毒素トランスロケーションドメイン、B o N T / F - H c
- 2 4 S i g D、第X a 因子リンカー、
ジフテリア毒素トランスロケーションドメイン、B o N T / F - H c
- 2 5 Y o p T、第X a 因子リンカー、
ジフテリアトランスロケーションドメイン、T e N T - H c 10
- 2 6 Y o p T、第X a 因子リンカー、
ジフテリア毒素トランスロケーションドメイン、B o N T / F - H c
- 2 7 S p i C、トロンビンリンカー、ジフテリアトランスロケーションドメイン、
T e N T - H c
- 2 8 S p i C、第X a 因子リンカー、ジフテリアトランスロケーションドメイン、
T e N T - H c
- 2 9 防御抗原と相互作用し得る *Bacillus anthracis* 致死因子由来の N 末端の
254残基からなるドメインに融合した S p i C
- 3 0 *Bacillus anthracis* 防御抗原
- 3 1 ボツリヌス菌 C 2 毒素成分 1 20
- 3 2 ボツリヌス菌 C 2 毒素成分 2
- 【0 1 4 8】
- 【表 1】

タイプIIIおよびタイプIVエフェクターならびにそれらの活性の例

エフェクター	生化学的機能	可能性のある適用	
YopT <i>Yersinia</i> spp	Rho GTPアーゼを直接不活性化する	傷害後の神経再生を刺激する	
ExoS(N末端ドメイン) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rho GTPアーゼに対するGTPアーゼ活性化タンパク質	神経再生を刺激する	
YopE <i>Yersinia</i> spp			10
ExoS(C末端ドメイン) <i>P.aeruginosa</i>	ADP-リボシルトランスフェラーゼはRasおよびRap GTPアーゼを改変する	Ras/Rapシグナリング経路をブロックする	
SptP(N末端ドメイン) <i>Salmonella</i> spp	Rac 1/Cdc 42に対するGAP活性		
SopE/E2 <i>S.typhimurium</i>	Cdc42/Racに対するグアニヌクレオチド交換因子	窒素酸化物放出を調節する	
YpkO/YopO <i>Yersinia</i> spp	セリン/トレオニンキナーゼはRhoA/Racを改変する		
YopP/YopJ <i>Yersinia</i> spp AvrXv/AvrBsT <i>Xanthomonas campestris</i>	種々のMAPキナーゼ経路の活性化をブロックする	腫瘍細胞におけるアポトーシスの誘導 傷害を受けた細胞からの炎症メディエーターの放出をブロックする	20
SopB/SigA/SigD <i>Salmonella</i> spp	AKTキナーゼを活性化する	傷害を受けた/老化したニューロンにおけるアポトーシスをブロックする	
IpgD <i>Shigella flexneri</i>			
SpiC <i>S.enterica</i>	エンドソーム融合をブロックする	痛覚線維からの神経伝達物質放出を防止する	
IpaB SipB	キヤスパー1の直接活性化によってアポトーシスを誘導する	グリオーマ/神経芽腫細胞におけるアポトーシスの誘導	30
Orf19 <i>E.coli</i>	ミトコンドリアの機能に影響を与える	細胞死および他のミトコンドリア機能の誘導の調節	
IpgB <i>Shigella flexneri</i>			
未同定エフェクター <i>Chlamydia</i> spp	アポトーシスをブロックする	傷害を受けた/老化したニューロンにおけるアポトーシスを防止する	
RalF <i>Listeria monocytogenes</i>	ARFに対するグアニヌクレオチド交換因子	膜コンパートメント融合を促進または防止する	
SpiC, SopE, SseE,F,GまたはJ, PipAまたはB, SifAまたはB, <i>Salmonella</i> spp. RalF, <i>Listeria monocytogenes</i>	種々	細胞内病原体または細胞内輸送の障害を治療すること	40
CagA <i>Helicobacter pylori</i>	細胞骨格改変	膜小胞内容物の取り込みまたは放出を変更する	
YopM <i>Yersinia</i> spp, PopC <i>Ralstonia solanacearum</i>	ロイシンリッチの繰り返しタンパク質。転写因子の可能性あり	細胞サイクルまたは細胞増殖に関連する遺伝子(YopM)または他の遺伝子のアップリギュレーション	

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
5 December 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/096467 A2(51) International Patent Classification⁵: A61K 47/48

(81) Designated States (national): A11, AG, A12, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI1, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI1, GM, IIR, IIU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TI, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number: PCT/GB02/02384

(22) International Filing Date: 21 May 2002 (21.05.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0112687.9 24 May 2001 (24.05.2001) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): MICROBIOLOGICAL RESEARCH AUTHORITY [GB/GB]; CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0IG (GB).

(72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): SUTTON, John, Mark [GB/GB]; Microbiological Research Authority, CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0IG (GB); SHONE, Clifford, Charles [GB/GB]; Microbiological Research Authority, CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0IG (GB).

(74) Agents: SCHLICH, George, William et al.; Mathys & Squire, 100 Gray's Inn Road, London WC1X 8AL (GB).

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AL, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/096467 A2

(54) Title: PHARMACEUTICAL USE FOR SECRETED BACTERIAL EFFECTOR PROTEINS

(57) Abstract: A polypeptide conjugate contains a bacterial injectable effector protein, secreted by a modified pilus or "needle-like" structure comprising a type III or type IV secretion apparatus, and a carrier that targets the conjugate to a target cell. The effector protein is used for a variety of purposes including treatment of neurodegenerative disease, intracellular infection and diseases associated with defects of secretion.

**PHARMACEUTICAL USE OF SECRETED
BACTERIAL EFFECTOR PROTEINS**

- 5 The present invention relates to pharmaceutical use of secreted, injected bacterial effector proteins. In particular, the present invention relates to manufacture and use of such proteins and combination and conjugation of the proteins with carriers.
- 10 A number of deficiencies exist in the availability and suitability of neuronal therapies. At the present time, a large number of neuronal disorders have inadequate provisions for therapeutic intervention. For example there is currently no effective treatment for neuronal damage caused by ischemia or trauma. Other neurodegenerative disorders such as Motor neurone disease, 15 Alzheimer's disease, Parkinson's disease and prion disorders such as CJD are all poorly addressed by current therapies. This reflects in part the complexity of the nervous system and the difficulties in targeting suitable therapies to the specific cells affected. Neuronal repair after damage is another disorder for which there is no effective treatment.
- 20 A number of neurological disorders are known that arise from neuronal trauma that stimulates nerve damage due to internal processes such as apoptosis. It is known to treat such disorders using a superoxide dismutase in combination with a components that targets the enzyme to neurons. However, further active 25 compounds for treatment of neuronal disease are desired.
- It is known to use type III effectors in pharmaceutical compositions.
- 30 US 5972899 describes a composition comprising *Shigella* IpaB, an IpaB fusion protein or a functional derivative or antagonist, or IpaB DNA for delivery to a eukaryotic cell to induce or to inhibit apoptosis. Site-specific delivery may be achieved within a targeted immunoliposome. Cell-type specificity is achieved by the incorporation of a cell-type selective monoclonal antibody into the lipid bilayer. Disadvantages associated with this delivery method include the very 35 large size, low stability and poor tissue penetration of immunoliposomes, and difficulties associated with consistent immunoliposome manufacture for therapeutic use. There is also the likelihood of a high background effect due

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

- 2 -

to fusion of immunoliposomes with non-target cell types, caused by the inherent properties of the liposome membrane.

5 WO 01/19393 describes Type III effector proteins linked to a protein transduction domain of the HIV TAT protein. DNA constructs encoding the effector-transducer fusion protein are targeted to host cells comprising a Type III secretion system using a tissue-specific viral or plasmid vector. Upon expression in the transformed host cells, the effector-transducer conjugate is secreted and undergoes secondary redistribution and uptake by neighbouring 10 cells.

15 The HIV TAT transduction domain is not specific to any cell type, hence, targeting of effector is carried out solely at the DNA level. Disadvantages of targeting effector DNA (rather than targeting effector protein) include the time lag for processing of effector DNA to effector protein. Where viral vectors are used, there are the risks of immunogenic effects and of the vector integrating 20 into the genome.

25 WO 00/37493 describes *Bordetella pertussis* effector virulence genes associated with a Type III secretion system. The pathogenicity genes or encoded polypeptides are used in vaccine compositions and may be conjugated to another molecule or provided with a carrier for delivery. Pathogenicity polypeptide may be delivered via a vector directing expression 30 of *Bordetella* pathogenicity polynucleotide in vivo.

35 WO 98/56817 describes pharmaceutical compositions comprising a non-pathogenic organism expressing the YopJ protein, and YopJ protein combined with a carrier, for delivery of YopJ to gastrointestinal cells from the gut. The delivery mechanism disclosed in this document is via the normal bacterial Type III secretion system - that is, one step from bacterium to target cell.

WO 99/52563 describes targeting of proteins produced by recombinant *Yersinia* to the cytosol of eukaryotic cells for diagnostic/ therapeutic purposes. Fusion proteins with the YopE targeting signal are expressed in *Yersinia* cells 35 and delivered directly to eukaryotic cells via the Type III secretion system in the presence of the SycE chaperone.

- 3 -

US 5965381 describes the *in vitro* use of recombinant *Yersinia* to deliver proteins to eukaryotic cells for immune diagnostic and therapeutic purposes. The proteins are fused to a delivery sequence, recognised by the *Yersinia* Type III secretion system.

5 It is not advantageous to make use of bacteria for delivering therapeutic proteins due to the risk of eliciting an unwanted immune response.

10 The present invention has as an object the provision of new pharmaceutical compositions for a variety of uses. A further object is to provide new pharmaceutical compositions for treatment of neuronal cells.

15 Accordingly, the present invention provides new therapies based upon a new class of bacterial-derived proteins, though the scope of the invention is intended to embrace also fragments and derivatives and modifications thereof that retain the properties of the native proteins.

20 A first aspect of the invention thus lies in a pharmaceutical composition, comprising a bacterial injected effector secreted by the type III or IV secretion pathway.

25 The pharmaceutical composition can be used for treatment of a subpopulation of cells in a patient, especially for a treatment selected from promoting survival of cells, preventing damage to cells, reversing damage to cells, promoting growth of cells, inhibiting apoptosis, inhibiting release of an inflammatory mediator from cells and promoting division of cells, or for a treatment selected from inhibiting survival of cells, inhibiting growth of cells, inhibiting division of cells, promoting apoptosis, killing cells, promoting release of an inflammatory mediator from cells and regulating nitric oxide release from cells.

30 A carrier can be provided to target the effector protein to a target cell, optionally targeting the effector to a cell selected from an epithelial cell, a neuronal cell, a secretory cell, an immunological cell, an endocrine cell, an inflammatory cell, an exocrine cell, a bone cell and a cell of the cardiovascular system.

35 Another means of delivery of the effector is via a conjugate of the effector protein and the carrier, the two suitably linked by a linker. One particularly

- 4 -

preferred linker is cleavable, in that it can be cleaved after entry into the target cell so as to release the effector from the carrier. This linker can be a disulphide bridge or a peptide sequence including a site for a protease found in the target cell. In another embodiment of the invention, the linker is composed of two cooperating proteins, a first cooperating protein associated with the effector and the second associated with the cell targetting component. These respective parts can be administered separately and combine *in vivo* to link the effector to the cell targetting component. An example of such a two-part linker is botulinum toxin C2₁ in cooperation with C2₂.

In one embodiment of the invention, described in more detail below, a composition comprises a neuronal cell targeting component, linked by a cleavable linker to the effector protein. Preferably, the neuronal cell targeting component comprises a first domain targeting the effector to a neuronal cell and a second domain that translocates the effector into the cytosol of the neuronal cell.

Preparation of the compositions of the invention can be by combining a type III effector protein with a pharmaceutically acceptable carrier. In such compositions, the effector protein may be on its own or may be chemically linked with a (targetting) carrier. Another preparation method is to express a DNA that encodes a polypeptide having a first region that corresponds to the effector protein and a second region that codes for the carrier. A third region, between the first and second regions, which is cleaved by a proteolytic enzyme present in the target cell is optionally included.

A specific composition of the invention, for delivery of a bacterial type III effector protein to neuronal cells, comprises:-
the effector protein; linked by a cleavable linker to
30 a neuronal cell targeting component, comprising a first domain that binds to a neuronal cell and a second domain that translocates the effector protein of the composition into the neuronal cell. It is preferred that the first domain is selected from (a) neuronal cell binding domains of clostridial toxins; and (b) fragments, variants and derivatives of the domains in (a) that substantially retain the neuronal cell binding activity of the domains of (a).
35 It is further preferred that the second domain is selected from (a) domains of clostridial neurotoxins that translocate polypeptide sequences into cells, and

- 5 -

(b) fragments, variants and derivatives of the domains of (a) that substantially retain the translocating activity of the domains of (a).

5 In use of a composition of the invention for treatment of a neuronal condition, the linker is cleaved in the neuronal cell so as to release the effector protein from the targeting component, thus enabling the effector to have effect in the cell without being hindered by attachment to the targeting component.

10 Hence, also, the invention provides a method of delivering a bacterial type III effector protein to a neuronal cell comprising administering a composition of the invention.

15 The first domain may suitably be selected from (a) neuronal cell binding domains of clostridial toxins; and (b) fragments, variants and derivatives of the domains in (a) that substantially retain the neuronal cell binding activity of the domains of (a). The second domain is suitably selected from (a) domains of clostridial neurotoxins that translocate polypeptide sequences into cells, and (b) fragments, variants and derivatives of the domains of (a) that substantially retain the translocating activity of the domains of (a). The second domain is further suitably selected from:-

20 (a) a translocation domain that is not a H_N domain of a clostridial toxin and is not a fragment or derivative of a H_N domain of a clostridial toxin;
(b) a non-aggregating translocation domain as measured by size in physiological buffers;
25 (c) a H_N domain of a diphtheria toxin,
(d) a fragment or derivative of (c) that substantially retains the translocating activity of the H_N domain of a diphtheria toxin,
(e) a fusogenic peptide,
30 (f) a membrane disrupting peptide, and
(g) translocating fragments and derivatives of (e) and (f).

35 In an embodiment of the invention a construct comprises effector protein linked by a disulphide bridge to a neuronal cell targeting component comprising a first domain that binds to a neuronal cell and a second domain that translocates the effector protein into the neuronal cell. This construct is made recombinantly as a single polypeptide having a cysteine residue on the effector protein which forms a disulphide bridge with a cysteine residue on the second domain. The

- 6 -

effector protein is covalently linked, initially, to the second domain. Following expression of this single polypeptide, effector protein is cleaved from the second domain leaving the effector protein linked only by the disulphide bridge to the rest of the construct.

5

Particular aspects of the invention reside in further choices for the binding and translocation domains, and one such aspect provides a non-toxic polypeptide, for delivery of the effector protein to a neuronal cell, comprising:-

10 a binding domain that binds to the neuronal cell, and
 a translocation domain that translocates the effector protein into the neuronal cell,
 wherein the translocation domain is not a H_N domain of a clostridial neurotoxin and is not a fragment or derivative of a H_N domain of a clostridial toxin.

15 The binding domain is suitably comprised of or derived from clostridial heavy chain fragments or modified clostridial heavy chain fragments. As used herein, the term "modified clostridial heavy chain fragment" means a polypeptide fragment that retains similar biological functions to the corresponding heavy chain of a botulinum or tetanus neurotoxin but differs in its amino acid sequence and other properties compared to the corresponding heavy chain. The invention more specifically provides such constructs that are based on fragments derived from botulinum and tetanus neurotoxins.

20 In a further aspect, the invention also provides a polypeptide, for delivery of a effector protein to a neuronal cell, comprising:-
 a binding domain that binds to the neuronal cell, and
 a translocation domain that translocates the effector protein into the neuronal cell,
 wherein the resulting construct is non-aggregating.

25 30 Whether the construct is an aggregating one is usually apparent from a lack of solubility of the construct, and this may be seen upon simple visual inspection of the construct in aqueous media: non-aggregating domains result in constructs of the invention that are partially or preferably totally soluble whereas aggregating domains result in non-soluble aggregates of polypeptides having apparent sizes of many tens or even hundreds the size of a single polypeptide. Generally, the construct should be non-aggregating as measured

30

35

- 7 -

by its size on gel electrophoresis, and domain sizes or apparent domain sizes thus measured should preferably be less than 1.0×10^6 daltons, more preferably less than 3.0×10^5 daltons, with the measuring being suitably carried out on native PAGE using physiological conditions.

5

A still further aspect of the invention provides a polypeptide, for delivery of a effector protein to a neuronal cell, comprising:-
a binding domain that binds to the neuronal cell, and
a translocation domain that translocates the effector protein into the neuronal cell,
wherein the translocation domain is selected from (1) a H_N domain of a diphtheria toxin, (2) a fragment or derivative of (1) that substantially retains the translocating activity of the H_N domain of a diphtheria toxin, (3) a fusogenic peptide, (4) a membrane disrupting peptide, (5) a H_N from botulinum toxin C₂ and (6) translocating fragments and derivatives of (3), (4) and (5).

It is to be noted that botulinum toxin C₂ is not a neurotoxin as it has no neuronal specificity, instead it is an enterotoxin and suitable for use in the invention to provide a non-aggregating translocation domain.

20

A yet further aspect of the invention provides a polypeptide, for delivery of a effector protein to a neuronal cell, comprising:-
a binding domain that binds to the neuronal cell, and
a translocation domain that translocates the effector protein into the neuronal cell,
wherein the polypeptide has reduced affinity to neutralising antibodies to tetanus toxin compared with the affinity to such antibodies of native tetanus toxin heavy chain.

30

The above aspects may singly or in any combination be exhibited by polypeptides of the invention and thus a typical preferred polypeptide of the invention (i) lacks the neurotoxic activities of botulinum and tetanus toxins, (ii) displays high affinity to neuronal cells corresponding to the affinity of a clostridial neurotoxin for those cells, (iii) contains a domain which can effect translocation across cell membranes, and (iv) occurs in a less aggregated state than the corresponding heavy chain from botulinum or tetanus toxin in physiological buffers.

35

- 8 -

5 A significant advantage of the polypeptides of particular aspects of the invention is their non-aggregated state, thus rendering them more usable as soluble polypeptides. The polypeptides according to the invention generally include sequences from the H_c domains of the botulinum and tetanus neurotoxins and these are combined with functional domains from other proteins, such that the essential functions of the native heavy chains are retained. Thus, for example, the H_c domain of botulinum type F neurotoxin is fused to the translocation domain derived from diphtheria toxin to give modified clostridial heavy chain fragment. Surprisingly, such polypeptides are more useful as constructs for delivering substances to neuronal cells than are the native clostridial heavy chains.

10 The current invention provides constructs containing type III secreted effector proteins and optionally other functional domains that effect the specific delivery 15 of the type III effector moiety to neuronal cells. These constructs have a variety of clinical uses for the treatment of neuronal diseases.

20 The type III secretion mechanism of Gram negative bacterial pathogens is a complex system used to deliver proteins to eukaryotic cells. The secretion mechanism utilises at least 10 -15 essential proteins to form an injection needle that extends from the surface of the bacteria and penetrates into the host cell. The effector proteins are then trafficked across the bacterial and host membranes through the lumen of the needle and injected directly into the cell cytosol. This process involves a still undefined secretion signal and involves 25 specific chaperone proteins that deliver the effector to the secretion machinery. The system delivers a wide range of protein effectors capable of modulating host cell function in such a way as to allow the persistence or spread of the pathogen in the host. These effectors modulate a number of signalling pathways and one pathogen may export several effectors that regulate different 30 pathways either concurrently or during different phases of its life cycle. Type III secretion systems have been described in a wide range of pathogenic bacteria including but not restricted to :
35 Mammalian pathogens; *Yersinia* species (including *pestis*, *pseudotuberculosis*, *enterocolitica*), *Salmonella* species (including *typhimurium*, *enterica*, *dublin*, *typhi*) *Escherichia coli*, *Shigella* species (e.g *flexneri*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia* species (e.g *pneumoniae*, *trachomatis*), and *Bordetella* species, and *Burkholderia* species

- 9 -

Plant pathogens; *Pseudomonas syringae*, *Erwinia* species, *Xanthomonas* species, *Ralstonia solanacearum*, and *Rhizobium* species

5 Insect pathogens; *Sodalis glossinidius*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Plesiomonas* species

Effector proteins from any of these species, whether mammalian pathogens or not, have therapeutic potential for treating human or animal disease.

10 Table 1 lists a number of type III effectors that have been identified to date.

15 The type IV secretion system shows a remarkable degree of similarity to the type III system in that it forms a needle-like structure through which effector proteins are injected into the host cell cytoplasm. However, the proteins involved in the structure of the needle are different for the two systems and the effectors are also divergent. The effectors function to modulate cellular signalling to establish and maintain the intracellular niche and/or promote invasion and proliferation. The system is described as essential in a number of important bacterial pathogens including *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bartonella henselae*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Coxiella burnetii*, *Brucella abortus*, *Neisseria* species and *Rickettsia* species (e.g. *prowazekii*). Similar type IV secretion systems exist in plant or invertebrate pathogens and are also a source of therapeutic agents. A number of described type IV effectors are also listed in table 1 with proposed functions.

20 The function of a variety of type III effectors has been described in recent years. Interestingly a number of effectors from different organisms have evolved to target particular signalling pathways suggesting some similarities in the mechanism of pathogenicity. The precise specificity of particular effectors may vary according to pathogen and cell type and this range of activities make them attractive candidates for therapeutic applications. Examples of some of the families of effectors useful in the present invention are described below:

25 GTPase activating proteins. YopE from *Yersinia pseudotuberculosis*, SptP from *Salmonella typhimurium* and ExoS and ExoT from *Pseudomonas aeruginosa* are all GTPase activating proteins (GAPs) for Rho family GTPases and are

- 10 -

characterised by a conserved "arginine finger" domain (Black and Bliska, (2000) *Molecular Microbiology* 37:515-527; Fu and Galan (1999) *Nature* 401:293-297; Goehring *et al*(1999) *Journal of Biological Chemistry* 274:36369-36372). By increasing the hydrolysis of bound GTP they promote the formation of the inactive GDP-bound of the GTPase. This acts to down-regulate the function of a range of GTPases in cells. YopE is a 23kDa effector which is translocated into the cytosol of cells during infection by *Y.pseudotuberculosis* and other strains. Studies *in vitro* have shown that it acts as a GAP for RhoA, Cdc42 and Rac1, but not for Ras (Black and Bliska, (2000) *Molecular Microbiology* 37:515-527). A point mutation within the arginine finger motif causes a loss of GAP activity and this correlates directly with its biological activity in cells. In *in vivo* studies carried out using a cell model that mimics the normal site of *Yersinia* infection YopE appears to have a greater specificity for Cdc42 (Andor *et al* (2001) *Cellular Microbiology* 3:301-310). The GAP activity of SptP shows greater specificity for Cdc42 and Rac1 compared to RhoA. The GAP activity of particular proteins is likely to vary for different cell types and delivery routes. SptP, ExoS and ExoT are bifunctional enzymes with additional enzymatic domains (SptP, tyrosine phosphatase; ExoS, ExoT, ADP-ribosyltransferase). In the case of ExoS this activity blocks the activation of Ras GTPase allowing a co-ordinated modulation of different signalling pathways (Henriksson *et al* (2000) *Biochemical Journal* 347:217-222).

Guanine nucleotide exchange factor. SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* and related proteins act as guanine nucleotide exchange factors (GEFs) for a range of GTPases (Hardt *et al* (1998) *Cell* 93:815). GEFs function by enhancing the rate of replacement of bound GDP by GTP causing the activation of the GTPase. This effectively upregulates the activity of specific GTPases in the cell. Native SopE is a 240 amino acid protein which is injected into the host cell cytosol by *S.typhimurium*. The N-terminal 77 amino acids of the protein act as a secretion signal and are dispensable for the biological activity of the protein (Hardt *et al* (1998) *Cell* 93:815). In *in vitro* studies SopE acts as a GEF for CDc42, Rac1, Rac2, RhoA, and RhoG. Cellular GEFs show a high degree of specificity for particular GTPases and it is likely that SopE will show greater specificity *in vivo*. This specificity is likely to vary according to cell type and delivery route. The type IV effector, RalF, from *Legionella pneumophila* is a further exchange factor affecting the function of small GTPases. In this case the target is the ADP ribosylation factor (ARF) family and

- 11 -

this is the first example of a bacterial effector that targets this family (Nagai *et al* (2002) *Science* **295**:679-682).

5 **Covalent modification of GTPase.** The type III effector YopT from *Y.pestis* and certain other *Yersinia* strains has similar effects *in vivo* to YopE (Iriarte and Cornelis (1998) *Molecular Microbiology* **29**:915-929). In HeLa cells YopT causes a shift in the electrophoretic mobility of RhoA but not Cdc-42 or Rac (Zumbihl *et al* (1999) *Journal of Biological Chemistry* **274**:29289-29293). It is still not known whether this represents a direct modification of RhoA by YopT or whether other cellular factors are involved. The specificity of YopT for RhoA offers significant therapeutic possibilities.

10 **Regulation of cell signalling via protein kinase and phosphatase.** YopO/YpkA from *Yersinia* spp are protein kinase related to eukaryotic serine/threonine kinases (Galyov *et al* (1993) *Nature* **361**:730-732). YopO/YpkA causes a similar cell rounding to that observed for other effectors such as YopE suggesting a role in modulating GTPase function. The small GTPases RhoA and Rac1 have been shown to bind to YopO and YpkA suggesting that these are the intracellular targets for the kinase (Barz C *et al* (2000) *FEBS Letters* **482**:139-143). The type IV effector CagA from *Helicobacter pylori* also affects the cytoskeleton of infected cells and its activity is dependent on its phosphorylation by intracellular kinases. CagA functions via the SHP-2 tyrosine phosphatase to modulate downstream signalling.

15 **Inositol phosphatases.** SigD from *Salmonella typhimurium*, SopB from *S.dublin* and IpgD from *Shigella flexneri* are all putative inositol phosphatases. In intestinal cells SopB causes an accumulation of inositol 1,4,5,6, tetrakisphosphate. Mutations in active site of SopB abolishes both its phosphatase activity and the accumulation of inositol tetrakisphosphate (Norris *et al* (1998) *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A* **95**:14057-14059). SopB appears to hydrolyse a wide range of inositol and phosphatidylinositol phosphates *in vitro* although its precise intracellular target remains to be defined (Eckmann *et al* (1997) *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A* **94**:14456-14460). SigD appears to have a different specificity *in vivo* as it does not lead to an increase in the levels of inositol 1,4,5,6, tetrakisphosphate (Eckmann *et al* (1997)). Although again the precise intracellular target has not been defined, SigD has been shown to lead to the

- 12 -

- activation of Akt /Protein kinase B in epithelial cells (Steele-Mortimer (2000) *Journal of Biological Chemistry* **275**:37718-37724). The activity has been shown to be dependent on the presence of a synaptojanin-homologous region close to the C-terminus of the protein (Marcus *et al* (2001) *FEBS letters* **494**:201-207). The homologous protein lpgD also stimulates the activation of Akt in these cells (Marcus *et al* (2001)). The potential to activate Akt offers a number of therapeutic opportunities as it is a key regulator of cellular survival (reviewed in Vanhaesebroeck and Alessi (2000) *Biochemical Journal* **346**:561-576).
- 10** Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase. YopJ from *Yersinia pestis* is another translocated effector with a wide range of homologs including AvrA from *Salmonella* spp. and a variety of effectors from plant pathogens. YopJ has been shown to inactivate a broad range of mitogen-activated protein kinase kinases (MKKs) (Orth *et al* (1999) *Science* **285**:1920-1923) causing apoptosis in macrophages. YopJ is suggested to act as a ubiquitin-like protein protease causing increased turnover of signalling molecules via removal of a Sumo-1 tag from the MKK (Orth *et al* (2000) *Science* **290**:1594-1597). Interestingly in cell models of cytokine production and macrophage killing AvrA shows no activity despite its homology to YopJ suggesting that the specificity of the proteins may be different (Schesser K *et al* (2000) *Microbial Pathogenesis* **28**:59-70). In neuronal cells these different specificities may offer potential therapeutic applications for modulating MKKs involved in apoptosis or inflammatory responses.
- 15** Modulators of cellular trafficking. SpiC from *Salmonella enterica* inhibits the fusion of endosomal vesicles to prevent the exposure of *Salmonella* to lysosomal degradation (Uchiya *et al* (1999) *EMBO Journal* **18**:3924-3933). The ability to modulate intracellular trafficking pathways offers a number of therapeutic opportunities for modulating cycling of receptors or release of material from membrane bound vesicles.
- 20**
- A number of additional effector proteins are implicated in regulating and maintaining the intracellular compartments occupied by bacterial pathogens. *Salmonella*, in common with many other pathogens, establishes a specialised intracellular compartments. *Salmonella* has a dedicated type III secretion system that secretes proteins into the host cell cytosol from within this
- 25**
- 30**
- 35**

- 13 -

- compartment and the effectors secreted by this system (including SpiC, SopE/E2, SseE,F,G,J, PipA,B, SifA,B) maintain the integrity of this compartment. A recent paper described the synergistic effects of SseJ and SifA in regulating processes from the vacuolar membrane (Ruiz-Albert *et al/* (2002) *Molecular microbiology* 44;p645-661). These proteins and their counterparts from other intracellular pathogens have significant potential for treating disorders affecting intracellular trafficking pathways. RalF and a number of the other effectors described previously may also have significant therapeutic potential for such disorders.
- The botulinum neurotoxins are a family of seven structurally similar, yet antigenically different, protein toxins whose primary site of action is the neuromuscular junction where they block the release of the transmitter acetylcholine. The action of these toxins on the peripheral nervous system of man and animals results in the syndrome botulism, which is characterised by widespread flaccid muscular paralysis (Shone (1986) in 'Natural Toxicants in Foods', Editor D. Watson, Ellis Harwood, UK). Each of the botulinum neurotoxins consist of two disulphide-linked subunits; a 100 kDa heavy subunit which plays a role in the initial binding and internalisation of the neurotoxin into the nerve ending (Dolly *et. al.* (1984) *Nature*, 307, 457-460) and a 50 kDa light subunit which acts intracellularly to block the exocytosis process (McInnes and Dolly (1990) *Febs Lett.*, 261, 323-326; de Paiva and Dolly (1990) *Febs Lett.*, 277, 171-174). Thus it is the heavy chains of the botulinum neurotoxins that impart their remarkable neuronal specificity.
- Tetanus toxin is structurally very similar to botulinum neurotoxins but its primary site of action is the central nervous system where it blocks the release of inhibitory neurotransmitters from central synapses (Renshaw cells). As described for the botulinum toxins above, it is domains within the heavy chain of tetanus toxin that bind to receptors on neuronal cells.
- The binding and internalisation (translocation) functions of the clostridial neurotoxin (tetanus and botulinum) heavy chains can be assigned to at least two domains within their structures. The initial binding step is energy-independent and appears to be mediated by one or more domains within the H_c fragment of the neurotoxin (C-terminal fragment of approximately 50kDa) (Shone *et al.* (1985), *Eur. J. Biochem.*, 151, 75-82) while the translocation step

- 14 -

is energy-dependent and appears to be mediated by one or more domains within the H_N fragment of the neurotoxin (N-terminal fragment of approximately 50kDa).

5 Isolated heavy chains are non-toxic compared to the native neurotoxins and yet retain the high affinity binding for neuronal cells. Tetanus and the botulinum neurotoxins from most of the seven serotypes, together with their derived heavy chains, have been shown to bind a wide variety of neuronal cell types with high affinities in the nM range (e.g botulinum type B neurotoxin; Evans *et al.* (1986) Eur. J. Biochem. 154, 409-416). Another key characteristic of the binding of the tetanus and botulinum heavy chains to neuronal cells is that the receptor ligand recognised by the various toxin serotypes differ. Thus for example, botulinum type A heavy chain binds to a different receptor to botulinum type F heavy chain and these two ligands are non-competitive with respect to their binding to neuronal cells (Wadsworth *et al.* (1990), Biochem J. 268, 123-128). Of the clostridial neurotoxin serotypes so far characterised (tetanus, botulinum A, B, C₁, D, E and F), all appear to recognise distinct receptor populations on neuronal cells. Collectively, the clostridial neurotoxin heavy chains provide high affinity binding ligands that recognise a whole family of receptors that are specific to neuronal cells.

10 The present invention also provides constructs for the delivery of type III effector proteins specifically to neuronal cells. The mechanism by which the type III effector protein is delivered to the cell by these constructs is completely different to that used by the host bacteria. Instead of being injected directly into the cellular cytosol, specific constructs of the invention deliver the type III effector protein to cells via a number of sequentially acting biologically active domains and by a process resembling receptor-mediated endocytosis. Surprisingly, when delivered by this completely different mechanism, the type 15 III effector proteins are biologically active within the cellular cytosol.

20 Particular constructs of the invention comprise three functional domains defined by their biological activities. These are:
the type III effector moiety (for examples see Table 1);
25 a targeting domain that binds the construct to receptors and that provides a high degree of specificity to neuronal cells; and
30 a translocation domain that after internalisation of the construct, effects

- 15 -

the translocation of the type III effector moiety through the endosomal membrane into the cell cytosol.

5 The type III effector-containing construct may also contain 'linker proteins' by which these domains are interconnected. In one embodiment of the invention the type III effector moiety is linked to the translocation domain via a disulphide bridge.

10 In a preferred embodiment of the invention, the targeting domain is derived from a clostridial neurotoxin binding fragment (H_c domain). This may be derived from tetanus toxin or any one of the eight botulinum toxin serotypes (A-G). Delivery via the clostridial neurotoxin receptors differs significantly to the normal delivery route of the type III effectors and offers a number of advantages:

15 The clostridial H_c fragments bind with high affinity to receptors on the cell surface and provide high specificity to neuronal cells. The clostridial neurotoxins are internalised via an acidic endosome which triggers the translocation of the type III effector moiety across the membrane and into the cytosol.

20 For non-neuronal cells a wide range of high affinity binding domains have been defined for specific cell types. Examples are described for a number of cellular targets.

25 The agent can comprise a ligand or targeting domain, which binds to an endocrine cell and is thus rendered specific for these cell types. Examples of suitable ligands include iodine; thyroid stimulating hormone (TSH); TSH receptor antibodies; antibodies to the islet-specific monosialo-ganglioside GM2-1; insulin, insulin-like growth factor and antibodies to the receptors of both; TSH 30 releasing hormone (protirelin) and antibodies to its receptor; FSH/LH releasing hormone (gonadorelin) and antibodies to its receptor; corticotrophin releasing hormone (CRH) and antibodies to its receptor; and ACTH and antibodies to its receptor.

35 Ligands suitable to target an agent to inflammatory cells include (i) for mast cells, complement receptors in general, including C4 domain of the Fc IgE, and antibodies/ligands to the C3a/C4a-R complement receptor; (ii) for eosinophils,

- 16 -

- 5 antibodies/ligands to the C3a/C4a-R complement receptor, anti VLA-4 monoclonal antibody, anti-IL5 receptor, antigens or antibodies reactive toward CR4 complement receptor; (iii) for macrophages and monocytes, macrophage stimulating factor, (iv) for macrophages, monocytes and neutrophils, bacterial LPS and yeast B-glucans which bind to CR3, (v) for neutrophils, antibody to OX42, an antigen associated with the iC3b complement receptor, or IL8; (vi) for fibroblasts, mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-beta (M6P/IGF-II) receptor and PA2.26, antibody to a cell-surface receptor for active fibroblasts in mice.
- 10 Ligands suitable to target an agent to exocrine cells include pituitary adenyl cyclase activating peptide (PACAP-38) or an antibody to its receptor.
- 15 Ligands suitable to target an agent to immunological cells include Epstein Barr virus fragment/surface feature or idiotypic antibody (binds to CR2 receptor on B-lymphocytes and lymph node follicular dendritic cells).
- 20 Suitable ligands for targeting platelets for the treatment of disease states involving inappropriate platelet activation and thrombus formation include thrombin and TRAP (thrombin receptor agonist peptide) or antibodies to CD31/PECAM-1, CD24 or CD106/VCAM-1, and ligands for targeting cardiovascular endothelial cells for the treatment of hypertension include GP1b surface antigen recognising antibodies.
- 25 Suitable ligands for targeting osteoblasts for the treatment of a disease selected from osteopetrosis and osteoporosis include calcitonin, and for targeting an agent to osteoclasts include osteoclast differentiation factors (eg. TRANCE, or RANKL or OPGL), and an antibody to the receptor RANK.
- 30 In one embodiment of the invention the translocation domain is derived from a bacterial toxin. Examples of suitable translocation domains are those derived from the clostridial neurotoxins or diphtheria toxin.
- 35 In another embodiment of the invention, the translocation domain is a membrane disrupting or 'fusogenic' peptide, which functions as a translocation domain. An example of such a peptide is that derived from influenza virus haemagglutinin HA2 (residues 1-23).

- 17 -

In one example of the construct of the invention, the type III effector protein is SigD from *Salmonella* spp. In another example of the construct of the invention, the type III effector protein is YopE from *Yersinia* spp.

5 In an example of the construct of the invention in which the type III effector moiety is SigD from *Salmonella* spp, the construct may consist of the following:-
the SigD type III effector moiety;
the translocation domain from diphtheria toxin;
the binding domain (H_c domain) from botulinum type A neurotoxin; and
10 a linker peptide to enable attachment of the SigD effector to the translocation domain via a disulphide bridge.

In an another example of the construct of the invention in which the type III effector moiety is SigD from *Salmonella* spp, the construct consists of the 15 following:-
the SigD type III effector moiety;
the translocation domain in the form of a fusogenic peptide;
the binding domain (H_c domain) from botulinum type F neurotoxin; and
a linker peptide to enable attachment of the SigD effector to the 20 translocation domain via a disulphide bridge.

In an example of the construct of the invention in which the type III effector moiety is YopE from *Yersinia* spp, the construct may consist of the following:-
the YopE type III effector moiety;
25 the translocation domain from diphtheria toxin;
the binding domain (H_c domain) from botulinum type F neurotoxin; and
a linker peptide to enable attachment of the YopE effector to the translocation domain via a disulphide bridge.

30 The invention enables manipulation of cell signalling, and in a specific example SigD is incorporated into a construct of the invention and can be used to promote neuronal cell survival under stress. By targeting the appropriate intracellular signalling pathway, it is possible to simultaneously regulate a number of pathways to improve the prospects for neuronal survival. SigD (also known as SopB) activates the protein kinase Akt, which is a key intermediate 35 in the pro-survival signalling pathways mediated by various growth factors. Not only does Akt up-regulate pro-survival transcription factors such as NF- κ B,

- 18 -

but it also down-regulates several pro-apoptotic factors such as Bad and Forkhead.

5 A number of type III and IV effectors function to maintain the intracellular niche of the bacteria within the host cell. Whilst some bacterial pathogens are released into the cell cytosol, many form and maintain a specialised intracellular compartment sometimes termed a vacuole. One of the principle functions of many effector protein is to regulate the fusion of the compartment with other intracellular compartments such as potentially damaging 10 phagolysosomal. At the same time the pathogen may need to promote fusion with other membrane bound compartments, including recycling endosomes, to either provide nutrients to the encapsulated pathogen or allow the dissemination of the pathogen to other locations. Intracellular pathogens offer 15 a wide range of effector molecules for regulating intracellular trafficking and membrane fusion.

20 The mechanism underlying the fusion of membrane bound vesicles is conserved in a number of cellular processes. Broadly speaking, membrane fusion events are classified either as secretory processes for the release of material from the plasma membrane, or as endocytic processes that move material from the plasma membrane to the lysosomal system. This simplified classification does not take into account retrograde and anterograde processes, which occur within these pathways, or multiple points of communication between the two pathways. The underlying mechanism in all 25 membrane fusion events can be broken down into 4 component phases:

20 The transported material is concentrated at a specific site on the donor membrane and is "pinched off" in a vesicle that becomes separated from this membrane.

30 The vesicle is transported to the acceptor membrane along cytoskeletal fibres (e.g. microtubules).

35 The vesicle then attaches to the acceptor membrane via a "docking/tethering" mechanism mediated by SNARE complex proteins.

The vesicle and the acceptor membrane fuse to release the contents of the

- 19 -

vesicle through the acceptor membrane.

Thus similar SNARE proteins and regulatory proteins underpin the fusion of 5 endosomal vesicles with the lysosome, endoplasmic reticulum with the Golgi and trans-Golgi network, and secretory vesicles with the plasma membrane. The functional conservation of the membrane fusion mechanism means that a bacterial effector protein that would normally regulate the fusion of a specific event can be directed to modulate other fusion events. For example, an 10 effector that blocks endosomal fusion with the lysosome can be redirected to block the fusion of secretory vesicles with the plasma membrane, or ER vesicles with the Golgi network.

One of the key classes of regulatory proteins that have been defined in vesicle 15 trafficking are small GTPases of the Ras superfamily termed Rab proteins (or Ypt proteins in yeast). Rab proteins are implicated in every stage of membrane fusion. For example Rab 1,2,5 and 9 are involved in sorting material for transport (stage 1 above), Rab5,6,27 and Sec4 mediate transport (stage 2), Rab1,5, Ypt1,7 Sec4 influence docking to the acceptor membrane (stage 3) 20 and other Rab proteins implicated in promoting membrane fusion. The list above shows that certain Rab proteins, such as Rab1 and Rab5, are involved in more than 1 stage of the fusion process. Similarly some Rab proteins are present on all membrane vesicles whilst others have more specialised roles in specific fusion events.

25 Rab proteins are key potential targets for modification by either bacterial pathogens intent on blocking or promoting membrane fusion events or by therapeutic agents designed to regulate intracellular trafficking. One of the first effector proteins to be described as having an effect on Rab function was the 30 secreted effector protein SopE2 from *Salmonella* species. SopE2 acts as a guanine nucleotide exchange factor for Rab5a resulting in increased activation of the protein on the cell membrane. This activity has been correlated with increased survival of *Salmonella* in infected HeLa cells and macrophages (Cell Microbiol. 3 p473). SpiC is another *Salmonella* effector that blocks endosome 35 fusion (EMBO J. 18p3924-3933). Unlike SopE, which shows some conservation with normal cellular regulators of GTPase, SpiC shows no clear homology to other proteins. Its ability to block one of the four stages of vesicle fusion is known. It could exert its activity at the level of the SNARE proteins,

- 20 -

- modulate Rab function directly or operate at the level of one of the regulators of Rab function. Membrane insertion is essential for Rab activity. Rab proteins form a stable complex with Rab escort protein (REP) in the cytosol and this is a substrate for a geranyl geranyl transferase (RabGGT) which adds a C-terminal isoprenoid moiety. In the absence of REP or RabGGT the Rab protein would remain in an inactive form in the cytosol. REP also mediates the membrane insertion of the modified Rab into the donor membrane. Rab proteins can also be retrieved from the membrane via the action of Rab GDP dissociation inhibitor (RabGDI). All of these proteins are potential targets for bacterial pathogens to alter membrane fusion events. The precise effect would depend on whether alterations cause an increase or decrease in the levels of active Rab in the donor membrane, and the specificity for particular Rab proteins.
- 15 A number of human diseases have now been identified in which mutations affect either Rab proteins or their regulators. These human diseases serve to illustrate the cellular effects of alterations in Rab control in cells. Thus mutations in Rab27 (Griscelli syndrome), REP1 (choroiderma), RabGDI α (X-linked mental retardation) and RabGGT α subunit (Hermansky-Pudlack syndrome) are all implicated in human disease (as reviewed in Seabra *et al* *Trends in Molecular Medicine* (2002) 8:23-26, Olkkonen and Ikonen *New England Journal of Medicine* (2000) 343:1104)). A wide range of human diseases involve defects in intracellular trafficking (as reviewed in Aridor and Hannan *Traffic* (2000) 1:836-851). Modulation of membrane fusion via the specialised properties of bacterial effector proteins directed at one of the 4 mechanisms described above offers therapeutic opportunities for these diseases and others where transport properties are affected.
- 20
- 25
- 30 The targeting of the membrane fusion event between secretory vesicles and the plasma membrane allow the control of secretion from cells. Effectors that alter regulation of specific Rab proteins, either directly or via one of the mechanisms described above, including Rab3a,b,c and d, Rab8a and b, Rab26, Rab27a Rab37, or affect any of the other molecular events of membrane fusion (1-4 described above) can regulate secretion. Effector proteins can be applied to either increase or decrease secretion from a specific cell type. In a therapeutic context this is valuable for the treatment of a wide range of disorders including muscle spasms (blephorospasm, torticollis etc)
- 35

- 21 -

hypersecretion disorders (COPD, bronchitis, asthma).

- By modulating the fusion of recycling endosomes with either the lysosome or the plasma membrane it is also possible to modulate the presentation of specific families of cell surface marker. Again effectors directed to alter regulation of specific Rab proteins, such as Rab4a and b, Rab11a and b, Rab15, Rab17, Rab18 or affect other molecular events in the fusion mechanism, can either up or down regulate presentation of cell surface marker. Therapeutically this has enormous potential for altering the response of cells to external stimuli (e.g. modulating response to growth factors, hormones, cytokines, chemokines or other signalling molecules), modifying the recognition of cells by external factors (e.g. immune surveillance) or for switching cell signalling pathways on or off.
- Using constructs of the invention, therapeutic intervention can be provided in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease and Prion diseases (vCJD). Both diseases are characterised by the accumulation of insoluble protein plaques due to misfolding of cellular proteins. In both cases an intracellular amplification of misfolded protein, via passage through endosomal-lysosomal compartments, is implicated in the progression of the disease. Neuronally targeted bacterial effectors as described herein, which modulate the fusion of endosomal and lysosomal compartments, allow control of the accumulation of insoluble protein. As this is one of the key survival strategies of many intracellular bacterial pathogens, a number of therapeutic molecules are available, for example *Salmonella* effectors such as SpiC, SptP and SopE2.
- In still further embodiments of the invention, constructs are provided for inhibition or promotion of secretion, containing a type III effector and a targeting moiety. Specific effectors for this purpose are selected from SpiC, SopE, RalF, Sse E, F, G and J, PipA, PipB, SifA and SifB. These constructs target the membrane fusion event between secretory vesicles and the plasma membrane to allow the control of secretion from cells. Effectors that alter regulation of specific Rab proteins, either directly or via one of the mechanisms described above, including Rab3a,b,c and d, Rab8a and b, Rab26, Rab27a Rab37, or affect any of the other molecular events of membrane fusion, can regulate secretion. Effector proteins can be applied to either increase or

- 22 -

decrease secretion from a specific cell type. In a therapeutic context this is valuable for the treatment of a wide range of disorders including muscle spasms (blepharospasm, torticollis etc) hypersecretion disorders (COPD, bronchitis, asthma).

5 The pathogenic strategy to establish a specialised intracellular niche and to modulate fusion of that compartment with other vesicles is conserved for a vast range of pathogens. Not only does this provide a vast range of molecules capable of modulating the cellular events as described above, but it also 10 provides an array of potential therapeutic targets for such molecules. Although many of the intracellular pathogens described in table 2 establish membrane bound compartments, the precise biochemistry and the signalling events and 15 effectors needed to maintain these compartments are very different. A few intracellular pathogens escape from the phagosomal or endosomal compartment in which they enter the cell. The effector proteins involved in this process are incompatible with the life cycle of pathogens that remain in membrane compartments. The effector proteins of two intracellular pathogens existing in membrane bound vesicles are also not necessarily compatible. For 20 example, enhancement of Rab5a activity by *Salmonella* in macrophages is correlated with enhanced survival (Cell Microbiology 3:473-). However, increases in Rab5a expression/activity accelerates intracellular destruction of *Listeria monocytogenes* in macrophages (J. Biological Chemistry 274:11459). The *Salmonella* effector proteins that are likely to be involved in Rab5a 25 recruitment (e.g. SopE2, SpiC or other SPI-2 secreted effectors) are therefore potential therapeutic agents for treating intracellular *Listeria*.

30 In its crudest form anti-microbial therapy could involve treating one intracellular pathogen with a second pathogen on the basis that the two intracellular compartments and requirements of the organisms would not be compatible. For example treatment of TB infected macrophages with *Salmonella* might be expected to result in provoked "vacuole" lysosome fusion within the macrophage leading to the eradication of the TB. The type and fate of the super-infecting pathogen would have to be carefully chosen so as not to exacerbate the infectivity or spread of the original organism.

35 A refinement of the superinfection strategy would therefore focus on the targeted delivery of effector molecules to specific target cells as described by

- 23 -

- this invention. This could either utilise a highly attenuated pathogen (e.g. *Salmonella* that only secretes SopE2 or SptP) or targeted protein delivery (e.g. using a toxin delivery domain, antibody or similar cell targeting ligands). Protective antigen from *Bacillus anthracis* would be capable of targeting 5 effectors to macrophages for the treatment of a wide range of bacterial pathogens. The specific addition of carbohydrate moieties will enable specific targeting of pools of macrophages via the mannose receptor (e.g Vyas et al, International Journal of Pharmaceutics (2000) 210p1-14). A cell surface marker specific for infected cells (as distinct from uninfected cells) would offer an ideal 10 target for delivery systems. The cell type infected by the pathogen would determine the choice of delivery ligand whilst the precise fate of the cell compartment would determine the choice of effector (e.g. cell apoptosis, lysis, endosome-lysosome fusion, endosome acidification etc).
- 15 A key benefit of this type of therapy is that the effector proteins are not intrinsically toxic to the cell and therefore delivery of the protein to uninfected target cells is unlikely to have any deleterious effects. In this case, whilst desirable, the precise specificity of the targeting ligand is not essential for successful therapy.
- 20 The wide range of intracellular pathogens and the difficulty in treating/immunising against these organisms make this approach a valuable alternative to antibiotic therapy. The method is also attractive as avoidance of the antimicrobial agent either means that the pathogen must produce a 25 molecule capable of overriding the effector-induced cell stimulus or must significantly modify its lifestyle. For obligate intracellular pathogens or where the intracellular stage is essential for propagation, this may offer greater hopes for extended antimicrobial use than current antibiotic strategies targeted at specific biochemical interactions.
- 30 In another example of the invention in which the effector protein is SpiC from *Salmonella* spp, the construct may consist of the following:-
- the SpiC effector moiety fused to a domain capable of interacting with protective antigen;
 - 35 the protective antigen from *Bacillus anthracis*;
 - where the construct is either co-administered or where the SpiC moiety is administered after the protective antigen.

5 The constructs of the invention are preferably produced either wholly or partially by recombinant technology. In an embodiment of the invention where a construct of the invention is produced by recombinant technology, the construct of the invention will be produced as a single multi-domain polypeptide comprising from the N-terminus:-
the type III effector moiety;
a linker peptide;
10 the translocation domain; and
the binding domain.

15 In such a construct, the C-terminus of the type III effector protein is fused to the N-terminus of the translocation domain via the linker peptide. An example of such a linker peptide is the sequence CGLVPAGSGP which contains the thrombin protease cleavage site and a cysteine residue for disulphide bridge formation. The latter single chain fusion protein may then be treated with thrombin to give a dimeric protein in which the type III effector is linked to the translocation domain by a disulphide link. In another example of a linker peptide in which the translocation domain does not contain a free cysteine 20 residue near its C-terminus, such as is the case when the translocation domain is a fusogenic peptide, the linker peptide contains both cysteine residues required for the disulphide bridge. An example of the latter linker peptide is the amino acid sequence: CGLVPAGSGPSAGSSAC.

25 In an example of the construct of the invention in which the type III effector moiety is SigD from *Salmonella spp* produced by recombinant technology, the construct may consist of polypeptide containing (from the N-terminus) the following domains:-
the SigD type III effector moiety;
30 linker peptide (sequence CGLVPAGSGP) to enable attachment of the SigD effector to the translocation domain via a disulphide bridge;
the translocation domain from diphtheria toxin (residues 194-386); and
the binding domain (H_c domain) from botulinum type A neurotoxin (residues 35 872-1296).

35 The constructs of the invention may also be produced using chemical cross-linking methods. Various strategies are known by which type III effector

- 25 -

- proteins can be linked to a polypeptide consisting of the translocation domain and binding domain using a variety of established chemical cross-linking techniques. Using these techniques a variety of type III effector constructs can be produced. The type III effector protein is, for example, derivatised with the cross-linking reagent N-succinimidyl 3-[2-pyridyl]dithio] propionate. The derivatised type III effector is then linked to a peptide containing a translocation domain and binding domain via a free cysteine residue present on the translocation domain.
- 5
- 10 Protein effectors can be altered to allow their delivery to intracellular compartments other than their usual site of action. For example, mitochondrial or nuclear targeting signals could be added to direct the effector to these compartments. By covalently linking the effector to the targeting domain the effector can be retained in the endosome/lysosome compartment, which would not normally be accessible by bacterial delivery. Effectors can be targeted to specific membrane locations via lipid modifications including myristylation, palmitoylation, or the addition of short proteins domains that might include SH2, SH3, WW domains, fragments of Rab proteins or synaptosomal-like domains. Those practised in the art would recognise that these targeting strategies offer an advantage for certain therapeutic strategies.
- 15
- 20
- 25 Constructs of the invention may be introduced into either neuronal or non-neuronal tissue using methods known in the art. By subsequent specific binding to neuronal cell tissue, the targeted construct exerts its therapeutic effects. Ideally, the construct is injected near a site requiring therapeutic intervention.
- 30
- 35 The construct of the invention may be produced as a suspension, emulsion, solution or as a freeze dried powder depending on the application and properties of the therapeutic substance. The construct of the invention may be resuspended or diluted in a variety of pharmaceutically acceptable liquids depending on the application.
- "Clostridial neurotoxin" means either tetanus neurotoxin or one of the seven botulinum neurotoxins, the latter being designated as serotypes A, B C₁, D, E, F or G, and reference to the domain of a toxin is intended as a reference to the intact domain or to a fragment or derivative thereof which retains the essential function of the domain.

- 26 -

"Conjugate" means, in relation to two polypeptides, that the polypeptides are linked by a covalent bond, typically forming a single polypeptide as a result, or by a di-sulphide bond.

5 "Binding domain" means a polypeptide which displays high affinity binding specific to a target cell, e.g. neuronal cell binding corresponding to that of a clostridial neurotoxin. Examples of binding domains derived from clostridial neurotoxins are as follows:-

10	Botulinum type A neurotoxin	- amino acid residues (872 - 1296)
	Botulinum type B neurotoxin	- amino acid residues (859 - 1291)
	Botulinum type C neurotoxin	- amino acid residues (867 - 1291)
	Botulinum type D neurotoxin	- amino acid residues (863 - 1276)
	Botulinum type E neurotoxin	- amino acid residues (846 - 1252)
15	Botulinum type F neurotoxin	- amino acid residues (865 - 1278)
	Botulinum type G neurotoxin	- amino acid residues (864 - 1297)
	Tetanus neurotoxin	- amino acid residues (880 - 1315)

20 "High affinity binding specific to neuronal cell corresponding to that of a clostridial neurotoxin" refers to the ability of a ligand to bind strongly to cell surface receptors of neuronal cells that are involved in specific binding of a given neurotoxin. The capacity of a given ligand to bind strongly to these cell surface receptors may be assessed using conventional competitive binding assays. In such assays radiolabelled clostridial neurotoxin is contacted with neuronal cells in the presence of various concentrations of non-radiolabelled ligands. The ligand mixture is incubated with the cells, at low temperature (0-3°C) to prevent ligand internalization, during which competition between the radiolabelled clostridial neurotoxin and non-labelled ligand may occur. In such assays when the unlabelled ligand used is the same as that of the labelled neurotoxin, the radiolabelled clostridial neurotoxin will be displaced from the neuronal cell receptors as the concentration of non-labelled neurotoxin is increased. The competition curve obtained in this case will therefore be representative of the behaviour of a ligand which shows "high affinity binding specificity to neuronal cells corresponding to that of a clostridial neurotoxin", as used herein.

30 A carrier that "targets" a particular cell generally does so due to binding of the

35

- 27 -

carrier, or a portion thereof, to that cell and, by way of example, many different ligands with given cell type specificity are described herein.

5 "Translocation domain" means a domain or fragment of a protein which effects transport of itself and/or other proteins and substances across a membrane or lipid bilayer. The latter membrane may be that of an endosome where translocation will occur during the process of receptor-mediated endocytosis. Translocation domains can frequently be identified by the property of being able to form measurable pores in lipid membranes at low pH (Shone *et al.* Eur. J. Biochem. 167, 175-180). Examples of translocation domains are set out in more detail below:

15	Diphtheria toxin	– amino acid residues (194 - 386)
	Botulinum type A neurotoxin	– amino acid residues (449 - 871)
	Botulinum type B neurotoxin	– amino acid residues (441 - 858)
	Botulinum type C neurotoxin	– amino acid residues (442 - 866)
	Botulinum type D neurotoxin	– amino acid residues (446 - 862)
	Botulinum type E neurotoxin	– amino acid residues (423 - 845)
	Botulinum type F neurotoxin	– amino acid residues (440 - 864)
20	Botulinum type G neurotoxin	– amino acid residues (442 - 863)
	Tetanus neurotoxin	– amino acid residues (458 - 879)

Translocation domains are frequently referred to herein as "H_n domains".

25 "Translocation" in relation to translocation domain, means the internalization events that occur after binding to the cell surface. These events lead to the transport of substances into the cytosol of target cells.

30 "Injected effector secreted by type III or type IV secretion system" means bacterial proteins that are injected into host cells (mammalian, plant, insect, fish or other) via a modified pilus or "needle-like" injection system frequently referred to as type III or type IV secretion systems" and the term embraces fragments, modifications and variations thereof that retain the essential effector activity.

35 The invention thus uses modification of intracellular signalling for promoting neuronal growth. Many of the effectors and inhibitors that control the

- 28 -

development of the growth cone act through common intracellular signalling pathways that modulate the phosphorylation state of cytoskeletal components and that ultimately determine whether the axon grows or collapses. The appropriate manipulation of intracellular signalling is therefore a powerful approach for eliminating the need for multiple inhibitors of the many factors shown to induce apoptosis and growth cone collapse. The up-regulation of transcription factors that inhibit apoptosis is an example of manipulation of intracellular signalling to promote neural regeneration.

5 Strategies for therapeutic intervention using the effectors and compositions of the invention include the delivery of agents to eliminate stress-inducing factors and the modification of intracellular signalling to promote cell survival. The latter approach is particularly powerful and the present invention describes conjugates with type III effector moieties which allow such strategies to be pursued.

10 The constructs of this invention use a specific targeting system to ensure delivery of the therapeutic agent to the desired cells and uses bacterial toxins that have evolved to regulate key stages in the cell signalling machinery of the cells. This strategy offers a number of advantages over other drug platforms. The cell specificity ensures that any alterations in cell signalling occur only in the cells where this modification is desirable and not in other adjacent cells. For example, in neuronal cell-targeted constructs, changes in signalling would only take place in neurones and not in adjacent glial cells where such changes 15 might not be desirable. By targeting key intermediates in the signalling pathway it is possible to co-ordinately regulate a number of overlapping cellular events to promote the desired effect. For example, the activation of Akt by SigD causes an effect on cells by co-ordinating a number of signalling pathways to actively promote cell survival and block the induction of apoptosis in response to stress factors. This is also a good example of an effector that activates a 20 component of a cell-signalling pathway. Most drug discovery approaches tend to identify inhibitors of specific components.

25 The invention is now illustrated in the following specific examples.

30

35 **Examples:**

- 29 -

Example 1. Cloning and expression of type III effector genes.

Standard molecular biology protocols were used for all genetic manipulations (Sambrook *et al* 1989, Molecular cloning; A laboratory manual. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.). Genes encoding Type III effectors, truncated versions removing the N-terminal hydrophobic domain (e.g removal of amino acids 1-28 for SigD, 1-69 for StpP, 1-76 for SopE), or individual sub-domains (e.g. ExoS GAP domain amino acids 96-234 and ADP-ribosyltransferase domain amino acids 232-453), were amplified from genomic DNA by PCR to generate suitable restriction sites for cloning. In some cases synthetic genes were prepared with codon usage optimised for expression in *E.coli*. Restriction enzymes such as *Bam*H1 (5') and *Bgl*II (3') were used for cloning with reading frames maintained. Constructs were sequenced to confirm the presence of the correct sequence. Constructs for expression were subcloned, as a suitable fragment, into an expression vector carrying a T7 polymerase promoter site (e.g. pET28, pET30 or derivatives (Novagen Inc, Madison, WI)), to generate a fusion with maltose binding protein (e.g. pMALc2x (NEB)) or into other expression vectors known to those familiar with the art. Clones with confirmed sequences were used to transform expression hosts: For T7 polymerase vectors *E.coli* BL21 (DE3) (Studier and Moffatt 1986 *Journal of Molecular Biology* 189:113-130) JM109 (DE3) or equivalent strains with a DE3 lysogen. For pMalc2x JM109, BL21, TG1, TB1 or other suitable expression strains.

In addition to the expression of type III effectors as standard fusion proteins an additional approach was used to generate fusion proteins. The type III effector or truncated effector generated as above were cloned into the 5' end of a gene encoding a cell targeting ligand, which include toxin fragments, antibodies, growth factors, lectins, interleukins, peptides. These fusion proteins were cloned and expressed as either 6-His tagged, MBP tagged or other fusions as described above.

Expression cultures were grown in Terrific Broth containing 30µg/ml kanamycin and 0.5% (w/v) glucose to an OD_{600} of 2.0 and protein expression was induced with 500µM IPTG for 2 hours. Cells were lysed by either sonication or suitable detergent treatment (e.g. Bugbuster reagent; Novagen), cell debris pelleted by centrifugation and the supernatant loaded onto a metal chelate column charged

- 30 -

with Cu²⁺ (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

5 The recombinant proteins expressed from pET vectors contain amino-terminal histidine (6-His) and T7 peptide tags allowing proteins to be purified by affinity chromatography on either a Cu²⁺ charged metal chelate column. After loading proteins on the column and washing, proteins were eluted using imidazole. All buffers were used as specified by manufacturers. Where appropriate removal of the purification tag was carried out according to manufacturers instructions.

10 MBP fusions were purified on amylose resin columns as described by the manufacturer (NEB) following growth in Terrific Broth containing 100 µg/ml ampicillin and lysis as described above.

15 Other fusion systems were used according to manufacturer's instructions and purification carried out on suitable columns using defined methods.

Example 2. Production of recombinant targeting vectors consisting of translocation and binding domains

20 Standard molecular biology protocols were used for all genetic manipulations (Sambrook *et al* 1989, Molecular cloning: A laboratory manual. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.) Clostridial neurotoxin binding domains (BoNT/Hc or TeNT/Hc) derived from either their native genes or synthetic genes with codon usage optimised for expression in *E.coli* were amplified by PCR. Introduced *Bam*HI (5') restriction sites and *Hind*III, *Sall* or *Eco*RI (3') sites were used for most cloning operations with reading frames designed to start with the first base of the restriction site. Constructs were sequenced to confirm the presence of the correct sequence. The translocation domain of diphtheria toxin (DipT) was amplified from its native gene to introduce *Bam*HI and *Bgl*II sites at the 5' and 3' ends respectively. This *Bam*HI and *Bgl*II fragment was subcloned into the *Bam*HI site at the 5' end of the Hc fragment to generate an in-frame fusion. The entire heavy chain fragment (DipT-Hc) was excised as a *Bam*HI-*Hind*III or *Bam*HI-*Sall* or *Bam*HI-*Eco*RI fragment and subcloned into a suitable expression vector.

25 30 35 Constructs for expression were subcloned into either an expression vector carrying a T7 polymerase promoter site (e.g. pET28, pET30 or derivatives

- 31 -

- (Novagen Inc, Madison, WI)) or to generate a fusion with maltose binding protein (e.g. pMALc2x (NEB)) as a suitable fragment. Clones with confirmed sequences were used to transform expression hosts: For T7 polymerase vectors *E.coli* BL21 (DE3) (Studier and Moffatt 1986 *Journal of Molecular Biology* 189:113-130) JM109 (DE3) or equivalent strains with a DE3 lysogen. For pMALc2x JM109, BL21, TG1, TB1 or other suitable expression strains.
- The recombinant proteins expressed from pET vectors contain amino-terminal histidine (6-His) and T7 peptide tags allowing proteins to be purified by affinity chromatography on either a Cu²⁺ charged metal chelate column. Expression cultures were grown in Terrific Broth containing 30microg/ml kanamycin and 0.5% (w/v) glucose to an OD₆₀₀ of 2.0 and protein expression was induced with 500microM IPTG for 2 hours. Cells were lysed by either sonication or suitable detergent treatment (e.g. Bugbuster reagent; Novagen), cell debris pelleted by centrifugation and the supernatant loaded onto a metal chelate column charged with Cu²⁺ (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). After loading proteins on the column and washing, proteins were eluted using imidazole. All buffers were used as specified by manufacturers. Where appropriate removal of the purification tag was carried out according to manufacturers instructions.
- MBP fusions were purified on amylose resin columns as described by the manufacturer (NEB) following growth in Terrific Broth containing 100 microg/ml ampicillin and lysis as described above.
- Thrombin or factor Xa protease sites were included within the protein for subsequent removal of these purification tags.
- Additional sequences for adding affinity purification tags and one or more specific protease sites for the subsequent removal of these affinity tags may also be included in the reading frame of the gene products. Other coding sequences that enable expression of the desired protein would also be acceptable. Other tags or linking sites may also be incorporated into the sequence.
- Using the techniques described above, targeting vector fragments were constructed by fusing domains of the H_c fragments of either botulinum type A, type F or tetanus neurotoxins with the translocation domain of diphtheria toxin.

Example 3. Preparation of botulinum heavy chains by chemical methods.

5 The various serotypes of the clostridial neurotoxins may be prepared and purified from various toxigenic strains of *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* by methods employing standard protein purification techniques as described previously (Shone and Tranter 1995, Current Topics in Microbiology, 194, 143-160; Springer). Samples of botulinum neurotoxin (1mg/ml) are dialysed against a buffer containing 50mM Tris-HCl pH 8.0, 1M NaCl and 2.5M
10 urea for at least 4 hours at 4°C and then made 100mM with dithiothreitol and incubated for 16h at 22°C. The cloudy solution, which contains precipitated light
15 chain, is then centrifuged at 15000 x g for 2 minutes and the supernatant fluid containing the heavy chain retained and dialysed against 50mM HEPES pH 7.5 containing 0.2M NaCl and 5mM dithiothreitol for at least 4 hours at 4°C. The dialysed heavy chain is centrifuged at 15000 x g for 2 minutes and the supernatant retained and dialysed thoroughly against 50mM HEPES pH 7.5 buffer containing 0.2M NaCl and stored at -70°C. The latter procedure yields heavy chain >95% pure with a free cysteine residue which can be used for chemical coupling purposes. Biological (binding) activity of the heavy chain
20 may be assayed as described in Example 5.

The heavy chains of the botulinum neurotoxins may also be produced by chromatography on QAE Sephadex as described by the methods in Shone and Tranter (1995) (Current Topics in Microbiology, 194, 143-160; Springer).

25 **Example 4. Chemical conjugation of proteins**

30 Recombinant SigD type III effector from *Salmonella spp.* was cloned and purified as described in Example 1. The SigD type III effector was chemically modified by treatment with a 3-5 molar excess of N-succinimidyl 3-[2-pyridyldithio] propionate (SPDP) in 0.05M Hepes buffer pH 7.0 containing 0.1M NaCl for 60 min at 22°C. The excess SPDP was removed by dialysis against the same buffer at 4°C for 16h. The substituted SigD effector was then mixed in a 1:1 ratio and incubated at 4°C for 16h with a targeting vector comprising a translocation domain (with an available free cysteine residue) and a neuronal targeting domain (see Example 2). The latter may also be native heavy chain purified from *Clostridium botulinum* type A neurotoxin purified as described in
35

- 33 -

Example 3. During the incubation period the SigD effector was conjugated to the targeting vector fragment by a free sulphhydryl group. After incubation, the SigD-construct was purified by gel filtration chromatography on Sephadex G200.

5

Example 5. Assay of the biological activity of constructs - demonstration of high affinity binding to neuronal cells.

10 Clostridial neurotoxins may be labelled with 125-iodine using chloramine-T and its binding to various cells assessed by standard methods such as described in Evans *et al.* 1986, Eur J. Biochem., 154, 409 or Wadsworth *et al.* 1990, Biochem. J. 268, 123). In these experiments the ability of Type III constructs to compete with native clostridial neurotoxins for receptors present on neuronal cells or brain synaptosomes was assessed. All binding experiments were 15 carried out in binding buffers. For the botulinum neurotoxins this buffer consisted of: 50mM HEPES pH 7.0, 30mM NaCl, 0.25% sucrose, 0.25% bovine serum albumin. For tetanus toxin, the binding buffer was: 0.05M tris-acetate pH 6.0 containing 0.6% bovine serum albumin. In a typical binding experiment 20 the radiolabelled clostridial neurotoxin was held at a fixed concentration of between 1-20nM. Reaction mixtures were prepared by mixing the radiolabelled toxin with various concentrations of unlabelled neurotoxin or construct. The reaction mixtures were then added to neuronal cells or rat brain synaptosomes and then incubated at 0-3°C for 2hr. After this period the neuronal cells of 25 synaptosomes were washed twice with binding ice-cold binding buffer and the amount of labelled clostridial neurotoxin bound to cells or synaptosomes was assessed by α -counting. In an experiment using an Type III effector construct what contained the binding domain from botulinum type A neurotoxin, the construct was found to compete with 125 I-labelled botulinum type A neurotoxin for neuronal cell receptors in a similar manner to unlabelled native botulinum 30 type A neurotoxin. These data showed that the construct had retained binding properties of the native neurotoxin.

Example 6. Recombinant Type III effector constructs

35 Recombinant Type III effector-targeting vector constructs were prepared comprising a combination of the following elements:-
- a type III effector (e.g. SigD from *Salmonella spp.*)

- 34 -

- a linker region, which allows the formation of a disulphide bond between the type III effectors and the translocation domain and which also contains a unique protease cleavage site for cleavage by factor Xa or thrombin to allow the formation of a dimer molecule;
- 5 - a translocation domain from diphtheria toxin or a endosomolytic (fusogenic) peptide from influenza virus haemagglutinin); and
- 10 - a neuronal cell-specific binding domain (e.g. from tetanus or botulinum neurotoxin type A or botulinum neurotoxin type F).

The protein sequences of these various domains form specific embodiments of the invention and are shown below the examples.

- 15 To confirm the nature of their structure, the recombinant Type III effector-targeting vector constructs were converted to the dimer form by treatment with a unique protease corresponding to the cleavage site sequences within the linker region. Conjugates containing the thrombin cleavage site were treated with thrombin (20microg per mg of conjugate) for 20h at 37°C; conjugates containing the factor Xa cleavage site were treated with factor Xa (20microg per mg of conjugate) for 20 min at 22°C.
- 20

On SDS-PAGE gels, under non-reducing conditions, the majority of Type III effector-targeting vector construct appeared as single band. In the presence of reducing agent (dithiothreitol) two bands were observed corresponding to the type III effector and targeting vector (translocation and binding domains). These data illustrate that, after treatment with the unique protease, the conjugates consist of the latter two components which are linked by a disulphide bridge.

- 30 **Example 7. Formation of Type III effector constructs from Type III effector-diphtheria toxin A (CRM197) fusion proteins.**

Type III effector-targeting vector constructs may also formed *in vitro* by reconstitution from two recombinant fragments. These are:-

- 35 A Type III effector fused to inactive diphtheria fragment A (CRM197) as described in Example 1.

- 35 -

A recombinant targeting vector in which the translocation domain of diphtheria toxin is fused to a neuronal targeting domain such as that from a clostridial neurotoxin. Production of these is described in Example 2.

5 Type III effector constructs may be formed by mixing fragments 1 and 2 in equimolar proportions in the presence of 10mM dithiothreitol and then completely removing the reducing agent by dialysis against phosphate buffered saline at pH 7.4 followed by dialysis against HEPES (0.05M, pH 7.4) containing 0.15 M NaCl. As described above in Example 6, these constructs
10 appear as a single band in SDS gels under non-reducing conditions and two bands in the presence of a reducing agent.

Example 8. Formulation of the Type III effector construct for clinical use.

15 In a formulation of the Type III effector construct for clinical use, recombinant Type III effector construct would be prepared under current Good Manufacturing Procedures. The construct would be transferred, by dilution, to a solution to give the product stability during freeze-drying. Such a formulation
20 may contain Type III effector construct (concentration between 0.1 -10 mg/ml) in 5mM HEPES buffer (pH 7.2), 50mM NaCl, 1% lactose. The solution, after sterile filtration, would be aliquotted, freeze-dried and stored under nitrogen at -20°C.

25 **Example 9. Production of constructs with neuroprotective properties.**

30 SigD was cloned (without the first 29 codons) using the methods outlined in Example 1. The protein was expressed and purified either as a fusion with maltose binding protein (e.g. using pMALc2x) or with a Histidine6 (e.g. using pET28a). Purification tags were then removed by standard procedures after affinity purification of the fusion protein. Chemical constructs of SigD were prepared as outlined in Example 4.

35 A recombinant construct of the invention containing SigD linked to the translocation domain and binding domain of botulinum type A neurotoxin was prepared as outlined in Example 6 using the standard molecular biology procedures outlined in Example 1.

- 36 -

Application of the above constructs to neuronal cells leads to the receptor-mediated internalisation of SigD and subsequent activation of Akt Kinase. Such cells have an enhanced ability to withstand stress such as growth factor removal.

5

Example 10. Constructs for the treatment of neurodegenerative disease

10 Constructs for treatment of neurodegenerative disease and containing the effectors SpiC, SptP or SopE2 were prepared as outlined in Example 9.

Example 11. Constructs for regulating cellular secretion and expression of cell surface receptors

15 For neuronal cells, constructs containing the effectors SpiC, SopE, RalF, SseE,F,G and J, PipA and B, SifA and B were prepared as outlined in Example 9.

20 For non-neuronal cells, the targeting domain may be replaced by a ligand with specificity for the target cell type. Such ligands may be selected from a list including: antibodies, carbohydrates, vitamins, hormones, cytokines, lectins, interleukins, peptides, growth factors, cell attachment proteins, toxin fragments, viral coat proteins.

25 **Example 12 Constructs for the treatment of intracellular pathogens**

Constructs containing the effectors SopE/SopE2, RalF, SpiC, SseE,F,G or J, PipA or B, SifA or B, or other effectors, for example those described in table 1, are useful therapeutic agents for treatment of disease.

30

Constructs were prepared essentially as described in example 9 but with a suitable binding domain selected from a list including: antibodies, carbohydrates, vitamins, hormones, cytokines, lectins, interleukins, peptides, growth factors, cell attachment proteins, toxin fragments, viral coat proteins etc.

35

For targeting to macrophages this might include protective antigen from *Bacillus anthracis* or a carbohydrate moiety such as a mannose modification allowing specific uptake.

- 37 -

A recombinant construct of the invention includes an effector protein and a binding domain suitable for targeting the effector to a desired cell type.

5 When delivered to cells such constructs result in cellular events that cause the death of the intracellular pathogen, prevent its release from the infected cell type or otherwise reduce its ability to infect and cause disease.

10 Further embodiments of the invention are represented by all combinations of the recited effectors with the recited linker-translocation domain-binding domain conjugates.

15 The present application includes a sequence listing in which the following sequences referred to by their SEQ ID No.s represent the following embodiments of the invention:-

	<u>SEQ_ID_NO.</u>	<u>DESCRIPTION</u>
	1	Diphtheria toxin translocation domain
20	2	Diphtheria toxin translocation domain, TeNT-Hc
	3	Thrombin linker, Diphtheria toxin translocation domain, TeNT-Hc
25	4	Factor Xa linker, Diphtheria toxin translocation domain, TeNT-Hc
	5	Diphtheria toxin translocation domain, BoNT/F-Hc
30	6	Thrombin linker, Diphtheria toxin translocation domain, BoNT/F-Hc
	7	Factor Xa linker, Diphtheria toxin translocation domain, BoNT/F-Hc
35	8	AAC46234 invasion gene D protein [Salmonella typhimurium] SigD

- 38 -

- 9 AAF21057 invasion protein D [Salmonella typhimurium]
SopB
- 5 10 CAC05808 IpgD, secreted by the Mxi-Spa machinery,
modulates entry of bacteria into epithelial cells [Shigella
flexneri]
- 11 AAC 69766 targeted effector protein [Yersinia pestis]
YopJ
- 10 12 AAC02071 SopE [Salmonella typhimurium]
- 13 AAC44349 protein tyrosine phosphatase SptP
[Salmonella typhimurium]
- 15 14 NP_047628 targeted effector [Yersinia pestis] YopE
- 15 15 AAK39624 exoenzyme S [Pseudomonas aeruginosa]
- 20 16 AAG03434 exoenzyme T [Pseudomonas aeruginosa]
- 17 NP_047619 Yop targeted effector [Yersinia pestis] YopT
- 18 NP_052380 protein kinase YopO [Yersinia enterocolitica]
- 25 19 AAF82095 outer protein AvrA [Salmonella enterica subsp.
enterica serovar Dublin]
- 20 AAC44300 SpiC [Salmonella typhimurium]
- 30 21 SigD with the first 29 codons removed, thrombin linker,
diphtheria translocation domain, TeNT-H_c
- 22 SigD with the first 29 codons removed, factor Xa linker,
diphtheria translocation domain, TeNT-H_c
- 35 23 SigD with the first 29 codons removed, thrombin linker,

- 39 -

diphtheria toxin translocation domain, with BoNT/F-H_c

- 24 SigD, factor Xa linker, diphtheria toxin translocation domain, with BoNT/F-H_c
- 5 25 YopT, factor Xa linker, diphtheria translocation domain, TeNT-H_c
- 10 26 YopT, factor Xa linker, diphtheria toxin translocation domain, with BoNT/F-H_c
- 27 SpiC, thrombin linker, diphtheria translocation domain, TeNT-H_c
- 15 28 SpiC, factor Xa linker, diphtheria translocation domain, TeNT-H_c
- 29 SpiC fused to a domain consisting the N-terminal 254 residues from *Bacillus anthracis* lethal factor capable of interacting with protective antigen
- 20 30 *Bacillus anthracis* protective antigen
- 31 *Clostridium botulinum* C2 toxin component 1
- 25 32 *Clostridium botulinum* C2 toxin component 2

- 40 -

Table 1: Examples of type III and type IV effectors and their activity.

	Effector	Biochemical function	Possible applications
5	YopT <i>Yersinia spp</i>	Inactivates Rho GTPases by direct GTPase activating protein for Rho GTPases	Stimulate nerve regrowth following damage Stimulate nerve regrowth
	ExoS (N-terminal domain) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
10	YopE <i>Yersinia spp</i>		
	ExoS (C-terminal domain) <i>P. aeruginosa</i>	ADP-ribosyltransferase modifies Ras and Rap GTPases	Block Ras/Rap signalling pathways
	SptP (N-terminal domain) <i>Salmonella spp</i>	GAP activity for Rac 1/ Cdc 42	
15	SopE/E2 <i>S.typhimurium</i>	Guanine nucleotide exchange factor for Cdc42/Rac	Regulates nitric oxide release
	YpkO/YopO <i>Yersinia spp</i>	Serine/threonine kinase modifies Rho/Rac	
	YopP/YopJ <i>Yersinia spp</i>	Blocks activation of various MAP kinase pathways	Induction of apoptosis in tumour cells
20	AvrXv/AvrBs1 <i>Xanthomonas campestris</i>		Block release of inflammatory mediators from damaged cells
	SopB/SigA/SigD <i>Salmonella spp</i>	Activate AKT kinase	Block apoptosis in damaged/ageing neurons
25	IpgD <i>Shigella flexneri</i>	Block endosome fusion	Prevent neurotransmitter release from pain fibres
	SpIC <i>S.enterica</i>		Induction of apoptosis in glioma/neuroblastoma cells
	IpaB	Induces apoptosis by direct activation of caspase 1	Modulation of induction of cell death and other mitochondrial functions
	SpIC		
30	IpgB <i>Shigella flexneri</i>	Affects mitochondrial function	
	Orf19 <i>E.coli</i>		
	Unidentified effector <i>Chlamydia spp</i>	Blocks apoptosis	Prevent apoptosis in damaged/ageing neurones
35	RalF <i>Listeria monocytogenes</i>	Guanine nucleotide exchange factor for ARF	Promote or prevent membrane compartment fusion Treating intracellular pathogens or disorders of intracellular trafficking
	SpIC, SopE, SseF, F, G or J, PipA or B, SifA or B, <i>Salmonella spp</i> , RalF, <i>Listeria monocytogenes</i> , CagA <i>Helicobacter pylori</i>	Various	Alter uptake or release of membrane vesicle contents
40	YopM <i>Yersinia spp</i> , PopC <i>Ralstonia solanacearum</i>	Cytoskeletal modification	Upregulation of genes involved in cell cycle and cell growth (YopM) or other genes.
		Leucine rich repeat protein. Possible transcription factors	

CLAIMS

1. A conjugate of an injected bacterial effector protein and a carrier that targets the effector protein to a target cell.
5
2. A conjugate according to claim 1, comprising the effector protein linked by a linker to the carrier.
10
3. A conjugate according to claim 2, wherein the linker is cleavable, in that it can be cleaved after entry into the target cell so as to release the effector from the carrier.
15
4. A conjugate according to any previous claim, wherein the carrier targets the effector to a cell selected from an epithelial cell, a neuronal cell, a secretory cell, an immunological cell, an endocrine cell, an inflammatory cell, an exocrine cell, a bone cell and a cell of the cardiovascular system.
20
5. A conjugate according to any previous claim, wherein the carrier is a cell targeting component that comprises a first domain targeting the effector to a target cell and a second domain that translocates the effector into the cytosol of the cell.
25
6. A conjugate according to any previous claim, which is a single polypeptide.
30
7. A conjugate according to any previous claim, wherein the injected bacterial effector protein has an activity selected from activating GTPase, inactivating GTPase, enhancing replacement of bound GDP by GTP, causing covalent modification of GTPase, protein kinase activity, protein phosphatase, inositol phosphatase activity, inhibition of mitogen activated protein kinase kinase, regulation of gene expression, transcription factor and modulation of cellular trafficking.
35
8. A pharmaceutical composition comprising a conjugate according to any previous claim.

- 42 -

9. A pharmaceutical composition comprising a conjugate according to claims 1-7 for a treatment selected from promoting survival of cells, preventing damage to cells, reversing damage to cells, promoting growth of cells, inhibiting apoptosis, inhibiting release of an inflammatory mediator from cells, promoting division of cells and treating intracellular infection.
10. A pharmaceutical composition according to claims 8 or 9, for treating intracellular infection.
11. A pharmaceutical composition according to any of claims 8-10, for a treatment selected from inhibiting survival of cells, inhibiting growth of cells, inhibiting division of cells, promoting apoptosis, killing cells, promoting release of an inflammatory mediator from cells, regulating nitric oxide release from cells, inhibiting secretion from cells, interfering with intracellular trafficking and modulating expression of cell-surface markers.
12. A pharmaceutical composition according to claim 11, for interfering with intracellular trafficking.
13. A pharmaceutical composition according to claim 11, for modulating expression of cell-surface markers.
14. A pharmaceutical composition according to claim 11, for inhibiting secretion from cells
15. A pharmaceutical composition according to any of claims 8-14, for treatment of neuronal cells.
16. A pharmaceutical composition according to Claim 15, for promoting survival of neuronal cells.
17. A DNA construct encoding a conjugate according to any of claims 1-7.
18. A pharmaceutical composition, comprising the DNA construct of claim

17.

19. A pharmaceutical composition, comprising a vector containing the DNA construct of claim 17.
- 5 20. A pharmaceutical composition for delivery of an injected bacterial effector protein to a cell, comprising:-
the effector protein; linked by a cleavable linker to
a cell targeting component, comprising a first domain that binds to a
10 cell and a second domain that translocates the effector protein of the composition into the cell.
- 15 21. A composition according to Claim 20 wherein the first domain is selected from (a) neuronal cell binding domains of clostridial toxins; and (b) fragments, variants and derivatives of the domains in (a) that substantially retain the neuronal cell binding activity of the domains of (a).
- 20 22. A composition according to Claim 20 or 21 wherein the second domain is selected from (a) domains of clostridial neurotoxins that translocate polypeptide sequences into cells, and (b) fragments, variants and derivatives of the domains of (a) that substantially retain the translocating activity of the domains of (a).
- 25 23. A composition according to Claim 20 or 21 wherein the second domain is selected from:-
(a) a translocation domain that is not a H_N domain of a clostridial toxin and is not a fragment or derivative of a H_N domain of a clostridial toxin;
30 (b) a non-aggregating translocation domain as measured by size in physiological buffers;
(c) a H_N domain of a diphtheria toxin,
(d) a fragment or derivative of (c) that substantially retains the translocating activity of the H_N domain of a diphtheria toxin,
(e) a fusogenic peptide,
35 (f) a membrane disrupting peptide, and
(g) translocating fragments and derivatives of (e) and (f).

- 44 -

24. A composition according to any of Claims 20 to 23 wherein the linker is cleaved in the neuronal cell so as to release the effector protein from the targeting component.
- 5 25. A composition according to Claim 24, wherein the linker is a disulphide bridge or a site for a protease found in the target cell.
- 10 26. A method of preparation of a conjugate according to any of claims 1 to 7 by combining the effector protein with the carrier.
- 15 27. A method according to claim 26, comprising chemically linking the effector protein with the carrier.
- 20 28. A method according to claim 26, comprising expressing a DNA that encodes a polypeptide having a first region that corresponds to the effector protein and a second region that codes for the carrier.
- 25 29. A method according to any of claims 26 to 28, wherein the polypeptide includes a third region, between the first and second regions, which is cleaved by a proteolytic enzyme present in the target cell.
- 30 30. A method according to any of claims 26 to 29, comprising linking the polypeptide between the first and second region and linking the first and second regions via a disulphide bridge.
- 35 31. Use of a conjugate of an injected bacterial effector protein and a carrier that targets the effector protein to a target cell in manufacture of a medicament.
32. Use of a DNA construct encoding a conjugate of an injected bacterial effector protein and a carrier that targets the effector protein to a target cell in manufacture of a medicament.
33. Use according to claims 31 or 32 in manufacture of a medicament for treatment of a neuronal cell.

- 45 -

34. Use according to claims 31 or 32 in manufacture of a medicament for treating intracellular infection.
- 5 35. Use according to claims 31 or 32 in manufacture of a medicament for interfering with intracellular trafficking.
36. Use according to claims 31 or 32 in manufacture of a medicament for modulating expression of cell-surface markers.
- 10 37. Use according to claims 31 or 32 in manufacture of a medicament for inhibiting secretion from cells.
38. Use of an injected bacterial effector protein in manufacture of a medicament for treatment of a neuronal cell.
- 15 39. Use of an injected bacterial effector protein in manufacture of a medicament for treating intracellular infection.
40. Use of an injected bacterial effector protein in manufacture of a medicament for interfering with intracellular trafficking.
- 20 41. Use of an injected bacterial type effector protein in manufacture of a medicament for modulating expression of cell-surface markers.
42. Use of an injected bacterial effector protein in manufacture of a medicament for inhibiting secretion from cells.
- 25 43. Use of a DNA construct encoding an injected bacterial effector protein in manufacture of a medicament for treatment of a neuronal cell.
44. Use of a DNA construct encoding an injected bacterial effector protein in manufacture of a medicament for treating intracellular infection.
- 30 45. Use of a DNA construct encoding an injected bacterial effector protein in manufacture of a medicament for interfering with

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

- 46 -

intracellular trafficking.

46. Use of a DNA construct encoding an injected bacterial effector protein in manufacture of a medicament for modulating expression of cell-surface markers.
- 5 47. Use of a DNA construct encoding an injected bacterial effector protein in manufacture of a medicament for inhibiting secretion from cells.
- 10 48. A method of delivering an injected bacterial effector protein to a neuronal cell comprising administering a composition according to any of Claims 19 to 24.
- 15 49. A method according to Claim 46 comprising injecting the composition.

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-1-

SEQUENCE LISTING

<110> Microbiological Research Authority

Clifford, Shone C

John, Sutton M

Nigel, Silman

<120> Pharmaceutical use of secreted bacterial effector proteins

<130> GWS/PG/23433

<160> 32

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 210

<212> PRT

<213> diphtheria toxin translocation domain

<400> 1

Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val Ile
1 5 10 15Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly Pro
20 25 30Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu Glu
35 40 45Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu His
50 55 60Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe
65 70 75 80Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val Ile
85 90 95

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-2-

Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu Ser
100 105 110

Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala Val
115 120 125

His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser
130 135 140

Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp Ile
145 150 155 160

Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln
165 170 175

Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His Lys
180 185

Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val
195 200 205

Arg Ser
210

<210> 2

<211> 665

<212> PRT

<213> diphtheria toxin translocation domain TeNT-HC

<400> 2

Gly Ser Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp
1 5 10 15

Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His
20 25 30

Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser
35 40 45

Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu
50 55 60

Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro
65 70 75 80

Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-3-

85

90

95

Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala
 100 105 110

Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly
 115 120 125

Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu
 130 135 140

Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val
 145 150 155 160

Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu
 165 170 175

Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly
 180 185 190

His Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn
 195 200 205

Thr Val Arg Ser Lys Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp Asn Glu Glu Asp
 210 215 220

Ile Asp Val Ile Leu Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn Leu Asp Ile Asn
 225 230 235 240

Asn Asp Ile Ile Ser Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser Ser Val Ile Thr
 245 250 255

Tyr Pro Asp Ala Gln Leu Val Pro Gly Ile Asn Gly Lys Ala Ile His
 260 265 270

Leu Val Asn Asn Glu Ser Ser Glu Val Ile Val His Lys Ala Met Asp
 275 280 285

Ile Glu Tyr Asn Asp Met Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu
 290 295 300

Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gln Tyr Gly Thr Asn
 305 310 315 320

Glu Tyr Ser Ile Ile Ser Ser Met Lys Lys His Ser Leu Ser Ile Gly
 325 330 335

Ser Gly Trp Ser Val Ser Leu Lys Gly Asn Asn Leu Ile Trp Thr Leu
 340 345 350

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-4-

Lys Asp Ser Ala Gly Glu Val Arg Gln Ile Thr Phe Arg Asp Leu Pro
 355 360 365

Asp Lys Phe Asn Ala Tyr Leu Ala Asn Lys Trp Val Phe Ile Thr Ile
 370 375 380

Thr Asn Asp Arg Leu Ser Ser Ala Asn Leu Tyr Ile Asn Gly Val Leu
 385 390 395 400

Met Gly Ser Ala Glu Ile Thr Gly Leu Gly Ala Ile Arg Glu Asp Asn
 405 410 415

Asn Ile Thr Leu Lys Leu Asp Arg Cys Asn Asn Asn Gln Tyr Val
 420 425 430

Ser Ile Asp Lys Phe Arg Ile Phe Cys Lys Ala Leu Asn Pro Lys Glu
 435 440 445

Ile Glu Lys Leu Tyr Thr Ser Tyr Leu Ser Ile Thr Phe Leu Arg Asp
 450 455 460

Phe Trp Gly Asn Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Tyr Tyr Leu Ile Pro
 465 470 475 480

Val Ala Ser Ser Ser Lys Asp Val Gln Leu Lys Asn Ile Thr Asp Tyr
 485 490 495

Met Tyr Leu Thr Asn Ala Pro Ser Tyr Thr Asn Gly Lys Leu Asn Ile
 500 505 510

Tyr Tyr Arg Arg Leu Tyr Asn Gly Leu Lys Phe Ile Ile Lys Arg Tyr
 515 520 525

Thr Pro Asn Asn Glu Ile Asp Ser Phe Val Lys Ser Gly Asp Phe Ile
 530 535 540

Lys Leu Tyr Val Ser Tyr Asn Asn Asn Glu His Ile Val Gly Tyr Pro
 545 550 555 560

Lys Asp Gly Asn Ala Phe Asn Asn Leu Asp Arg Ile Leu Arg Val Gly
 565 570 575

Tyr Asn Ala Pro Gly Ile Pro Leu Tyr Lys Lys Met Glu Ala Val Lys
 580 585 590

Leu Arg Asp Leu Lys Thr Tyr Ser Val Gln Leu Lys Leu Tyr Asp Asp
 595 600 605

Lys Asn Ala Ser Leu Gly Leu Val Gly Thr His Asn Gly Gln Ile Gly
 610 615 620

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-5-

Asn Asp Pro Asn Arg Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asn Trp Tyr Phe Asn
 625 630 635 640

His Leu Lys Asp Lys Ile Leu Gly Cys Asp Trp Tyr Phe Val Pro Thr
 645 650 655

Asp Glu Gly Trp Thr Asn Asp Leu Gln
 660 665

<210> 3

<211> 677

<212> PRT

<213> thrombin linker, diphtheria toxin translocation domain, TeNT-HC

<400> 3

Arg Ser Cys Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Pro Gly Ser Ser Val
 1 5 10 15

Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp
 20 25 30

Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly Pro Ile Lys
 35 40 45

Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala
 50 55 60

Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu His Pro Glu
 65 70 75 80

Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly
 85 90 95

Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val Ile Asp Ser
 100 105 110

Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu
 115 120 125

Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala Val His His
 130 135 140

Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met
 145 150 155 160

Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-6-

165 170 175

Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln Val Val
180 185 190His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln
195 200 205Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val Arg Ser
210 215 220Lys Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp Asn Glu Glu Asp Ile Asp Val Ile
225 230 235 240Leu Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn Leu Asp Ile Asn Asn Asp Ile Ile
245 250 255Ser Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser Ser Val Ile Thr Tyr Pro Asp Ala
260 265 270Gln Leu Val Pro Gly Ile Asn Gly Lys Ala Ile His Leu Val Asn Asn
275 280 285Glu Ser Ser Glu Val Ile Val His Lys Ala Met Asp Ile Glu Tyr Asn
290 295 300Asp Met Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys
305 310 315 320Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gln Tyr Gly Thr Asn Glu Tyr Ser Ile
325 330 335Ile Ser Ser Met Lys Lys His Ser Leu Ser Ile Gly Ser Gly Trp Ser
340 345 350Val Ser Leu Lys Gly Asn Asn Leu Ile Trp Thr Leu Lys Asp Ser Ala
355 360 365Gly Glu Val Arg Gln Ile Thr Phe Arg Asp Leu Pro Asp Lys Phe Asn
370 375 380Ala Tyr Leu Ala Asn Lys Trp Val Phe Ile Thr Ile Thr Asn Asp Arg
385 390 395 400Leu Ser Ser Ala Asn Leu Tyr Ile Asn Gly Val Leu Met Gly Ser Ala
405 410 415Glu Ile Thr Gly Leu Gly Ala Ile Arg Glu Asp Asn Asn Ile Thr Leu
420 425 430

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-7-

Lys Leu Asp Arg Cys Asn Asn Asn Gln Tyr Val Ser Ile Asp Lys
 435 440 445

Phe Arg Ile Phe Cys Lys Ala Leu Asn Pro Lys Glu Ile Glu Lys Leu
 450 455 460

Tyr Thr Ser Tyr Leu Ser Ile Thr Phe Leu Arg Asp Phe Trp Gly Asn
 465 470 475 480

Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Tyr Tyr Leu Ile Pro Val Ala Ser Ser
 485 490 495

Ser Lys Asp Val Gln Leu Lys Asn Ile Thr Asp Tyr Met Tyr Leu Thr
 500 505 510

Asn Ala Pro Ser Tyr Thr Asn Gly Lys Leu Asn Ile Tyr Tyr Arg Arg
 515 520 525

Leu Tyr Asn Gly Leu Lys Phe Ile Ile Lys Arg Tyr Thr Pro Asn Asn
 530 535 540

Glu Ile Asp Ser Phe Val Lys Ser Gly Asp Phe Ile Lys Leu Tyr Val
 545 550 555 560

Ser Tyr Asn Asn Glu His Ile Val Gly Tyr Pro Lys Asp Gly Asn
 565 570 575

Ala Phe Asn Asn Leu Asp Arg Ile Leu Arg Val Gly Tyr Asn Ala Pro
 580 585 590

Gly Ile Pro Leu Tyr Lys Lys Met Glu Ala Val Lys Leu Arg Asp Leu
 595 600 605

Lys Thr Tyr Ser Val Gln Leu Lys Leu Tyr Asp Asp Lys Asn Ala Ser
 610 615 620

Leu Gly Leu Val Gly Thr His Asn Gly Gln Ile Gly Asn Asp Pro Asn
 625 630 635 640

Arg Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asn Trp Tyr Phe Asn His Leu Lys Asp
 645 650 655

Lys Ile Leu Gly Cys Asp Trp Tyr Phe Val Pro Thr Asp Glu Gly Trp
 660 665 670

Thr Asn Asp Leu Gln
 675

<210> 4

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-8-

<211> 677

<212> PRT

<213> factor Xa linker, Diphtheria toxin translocation domain, TeNT-HC

<400> 4

Arg Ser Cys Gly Ile Glu Gly Arg Ala Pro Gly Pro Gly Ser Ser Val
1 5 10 15Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp
20 25 30Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly Pro Ile Lys
35 40 45Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala
50 55 60Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu His Pro Glu
65 70 75 80Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly
85 90 95Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val Ile Asp Ser
100 105 110Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu
115 120 125Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala Val His His
130 135 140Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met
145 150 155 160Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe
165 170 175Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln Val Val
180 185 190His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln
195 200 205Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val Arg Ser
210 215 220

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-9-

Lys Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp Asn Glu Glu Asp Ile Asp Val Ile
 225 230 235 240

Leu Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn Leu Asp Ile Asn Asn Asp Ile Ile
 245 250 255

Ser Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser Ser Val Ile Thr Tyr Pro Asp Ala
 260 265 270

Gln Leu Val Pro Gly Ile Asn Gly Lys Ala Ile His Leu Val Asn Asn
 275 280 285

Glu Ser Ser Glu Val Ile Val His Lys Ala Met Asp Ile Glu Tyr Asn
 290 295 300

Asp Met Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys
 305 310 315 320

Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gln Tyr Thr Asn Glu Tyr Ser Ile
 325 330 335

Ile Ser Ser Met Lys Lys His Ser Leu Ser Ile Gly Ser Gly Trp Ser
 340 345 350

Val Ser Leu Lys Gly Asn Asn Leu Ile Trp Thr Leu Lys Asp Ser Ala
 355 360 365

Gly Glu Val Arg Gln Ile Thr Phe Arg Asp Leu Pro Asp Lys Phe Asn
 370 375 380

Ala Tyr Leu Ala Asn Lys Trp Val Phe Ile Thr Ile Thr Asn Asp Arg
 385 390 395 400

Leu Ser Ser Ala Asn Leu Tyr Ile Asn Gly Val Leu Met Gly Ser Ala
 405 410 415

Glu Ile Thr Gly Leu Gly Ala Ile Arg Glu Asp Asn Asn Ile Thr Leu
 420 425 430 435

Lys Leu Asp Arg Cys Asn Asn Asn Gln Tyr Val Ser Ile Asp Lys
 435 440 445

Phe Arg Ile Phe Cys Lys Ala Leu Asn Pro Lys Glu Ile Glu Lys Leu
 450 455 460

Tyr Thr Ser Tyr Leu Ser Ile Thr Phe Leu Arg Asp Phe Trp Gly Asn
 465 470 475 480

Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Tyr Tyr Leu Ile Pro Val Ala Ser Ser
 485 490 495

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-10-

Ser Lys Asp Val Gln Leu Lys Asn Ile Thr Asp Tyr Met Tyr Leu Thr
 500 505 510

Asn Ala Pro Ser Tyr Thr Asn Gly Lys Leu Asn Ile Tyr Tyr Arg Arg
 515 520 525

Leu Tyr Asn Gly Leu Lys Phe Ile Ile Lys Arg Tyr Thr Pro Asn Asn
 530 535 540

Glu Ile Asp Ser Phe Val Lys Ser Gly Asp Phe Ile Lys Leu Tyr Val
 545 550 555 560

Ser Tyr Asn Asn Glu His Ile Val Gly Tyr Pro Lys Asp Gly Asn
 565 570 575

Ala Phe Asn Asn Leu Asp Arg Ile Leu Arg Val Gly Tyr Asn Ala Pro
 580 585 590

Gly Ile Pro Leu Tyr Lys Lys Met Glu Ala Val Lys Leu Arg Asp Leu
 595 600 605

Lys Thr Tyr Ser Val Gln Leu Lys Leu Tyr Asp Asp Lys Asn Ala Ser
 610 615 620

Leu Gly Leu Val Gly Thr His Asn Gly Gln Ile Gly Asn Asp Pro Asn
 625 630 635 640

Arg Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asn Trp Tyr Phe Asn His Leu Lys Asp
 645 650 655

Lys Ile Leu Gly Cys Asp Trp Tyr Phe Val Pro Thr Asp Glu Gly Trp
 660 665 670

Thr Asn Asp Leu Gln
 675

<210> 5

<211> 645

<212> PRT

<213> diphtheria toxin translocation domain with BoNT/F-HC

<400> 5

Gly Ser Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp
 1 5 10 15

Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-11-

20

25

30

Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser
 35 40 45

Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu
 50 55 60

Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro
 65 70 75 80

Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln
 85 90 95

Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala
 100 105 110

Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly
 115 120 125

Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu
 130 135 140

Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val
 145 150 155 160

Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu
 165 170 175

Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly
 180 185 190

His Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn
 195 200 205

Thr Val Arg Ser Thr Met Ser Tyr Thr Asn Asp Lys Ile Leu Ile Leu
 210 215 220

Tyr Phe Asn Lys Leu Tyr Lys Lys Ile Lys Asp Asn Ser Ile Leu Asp
 225 230 235 240

Met Arg Tyr Glu Asn Asn Lys Phe Ile Asp Ile Ser Gly Tyr Gly Ser
 245 250 255

Asn Ile Ser Ile Asn Gly Asp Val Tyr Ile Tyr Ser Thr Asn Arg Asn
 260 265 270

Gln Phe Gly Ile Tyr Ser Ser Lys Pro Ser Glu Val Asn Ile Ala Gln
 275 280 285

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-12-

Asn Asn Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Arg Tyr Gln Asn Phe Ser Ile Ser
 290 295 300

Phe Trp Val Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Lys Val Asn Leu Asn Asn
 305 310 315 320

Glu Tyr Thr Ile Ile Asp Cys Ile Arg Asn Asn Asn Ser Gly Trp Lys
 325 330 335

Ile Ser Leu Asn Tyr Asn Lys Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Ala
 340 345 350

Gly Asn Asn Gln Lys Leu Val Phe Asn Tyr Thr Gln Met Ile Ser Ile
 355 360 365

Ser Asp Tyr Ile Asn Lys Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg
 370 375 380

Leu Gly Asn Ser Arg Ile Tyr Ile Asn Gly Asn Leu Ile Asp Glu Lys
 385 390 395 400

Ser Ile Ser Asn Leu Gly Asp Ile His Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe
 405 410 415

Lys Ile Val Gly Cys Asn Asp Thr Arg Tyr Val Gly Ile Arg Tyr Phe
 420 425 430

Lys Val Phe Asp Thr Glu Leu Gly Lys Thr Glu Ile Glu Thr Leu Tyr
 435 440 445

Ser Asp Glu Pro Asp Pro Ser Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr
 450 455 460

Leu Leu Tyr Asn Lys Arg Tyr Tyr Leu Leu Asn Leu Leu Arg Thr Asp
 465 470 475 480

Lys Ser Ile Thr Gln Asn Ser Asn Phe Leu Asn Ile Asn Gln Gln Arg
 485 490 495

Gly Val Tyr Gln Lys Pro Asn Ile Phe Ser Asn Thr Arg Leu Tyr Thr
 500 505 510

Gly Val Glu Val Ile Ile Arg Lys Asn Gly Ser Thr Asp Ile Ser Asn
 515 520 525

Thr Asp Asn Phe Val Arg Lys Asn Asp Leu Ala Tyr Ile Asn Val Val
 530 535 540

Asp Arg Asp Val Glu Tyr Arg Leu Tyr Ala Asp Ile Ser Ile Ala Lys
 545 550 555 560

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-13-

Pro Glu Lys Ile Ile Lys Leu Ile Arg Thr Ser Asn Ser Asn Asn Ser
 565 570 575

Leu Gly Gln Ile Ile Val Met Asp Ser Ile Gly Asn Asn Cys Thr Met
 580 585 590

Asn Phe Gln Asn Asn Asn Gly Gly Asn Ile Gly Leu Leu Gly Phe His
 595 600 605

Ser Asn Asn Leu Val Ala Ser Ser Trp Tyr Tyr Asn Asn Ile Arg Lys
 610 615 620

Asn Thr Ser Ser Asn Gly Cys Phe Trp Ser Phe Ile Ser Lys Glu His
 625 630 640

Gly Trp Gln Glu Asn
 645

<210> 6

<211> 657

<212> PRT

<213> thrombin linker, diphtheria toxin translocation domain, BoNT/F-HC

<400> 6

Arg Ser Cys Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Pro Gly Ser Ser Val
 1 5 10 15

Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp
 20 25 30

Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly Pro Ile Lys
 35 40 45

Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala
 50 55 60

Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu His Pro Glu
 65 70 75 80

Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly
 85 90 95

Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val Ile Asp Ser
 100 105 110

Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-14-

115	120	125
Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala Val His His		
130	135	140
Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met		
145	150	155
Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe		
165	170	175
Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln Val Val		
180	185	190
His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln		
195	200	205
Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val Arg Ser		
210	215	220
Thr Met Ser Tyr Thr Asn Asp Lys Ile Leu Ile Leu Tyr Phe Asn Lys		
225	230	235
Leu Tyr Lys Lys Ile Lys Asp Asn Ser Ile Leu Asp Met Arg Tyr Glu		
245	250	255
Asn Asn Lys Phe Ile Asp Ile Ser Gly Tyr Gly Ser Asn Ile Ser Ile		
260	265	270
Asn Gly Asp Val Tyr Ile Tyr Ser Thr Asn Arg Asn Gln Phe Gly Ile		
275	280	285
Tyr Ser Ser Lys Pro Ser Glu Val Asn Ile Ala Gln Asn Asn Asp Ile		
290	295	300
Ile Tyr Asn Gly Arg Tyr Gln Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg		
305	310	315
Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Lys Val Asn Leu Asn Asn Glu Tyr Thr Ile		
325	330	335
Ile Asp Cys Ile Arg Asn Asn Asn Ser Gly Trp Lys Ile Ser Leu Asn		
340	345	350
Tyr Asn Lys Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Ala Gly Asn Asn Gln		
355	360	365
Lys Leu Val Phe Asn Tyr Thr Gln Met Ile Ser Ile Ser Asp Tyr Ile		
370	375	380

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-15-

Asn Lys Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu Gly Asn Ser
 385 390 395 400

Arg Ile Tyr Ile Asn Gly Asn Leu Ile Asp Glu Lys Ser Ile Ser Asn
 405 410 415

Leu Gly Asp Ile His Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys Ile Val Gly
 420 425 430

Cys Asn Asp Thr Arg Tyr Val Gly Ile Arg Tyr Phe Lys Val Phe Asp
 435 440 445

Thr Glu Leu Gly Lys Thr Glu Ile Glu Thr Leu Tyr Ser Asp Glu Pro
 450 455 460

Asp Pro Ser Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr Leu Leu Tyr Asn
 465 470 475 480

Lys Arg Tyr Tyr Leu Leu Asn Leu Leu Arg Thr Asp Lys Ser Ile Thr
 485 490 495

Gln Asn Ser Asn Phe Leu Asn Ile Asn Gln Gln Arg Gly Val Tyr Gln
 500 505 510

Lys Pro Asn Ile Phe Ser Asn Thr Arg Leu Tyr Thr Gly Val Glu Val
 515 520 525

Ile Ile Arg Lys Asn Gly Ser Thr Asp Ile Ser Asn Thr Asp Asn Phe
 530 535 540

Val Arg Lys Asn Asp Leu Ala Tyr Ile Asn Val Val Asp Arg Asp Val
 545 550 555 560

Glu Tyr Arg Leu Tyr Ala Asp Ile Ser Ile Ala Lys Pro Glu Lys Ile
 565 570 575

Ile Lys Leu Ile Arg Thr Ser Asn Ser Asn Asn Ser Leu Gly Gln Ile
 580 585 590

Ile Val Met Asp Ser Ile Gly Asn Asn Cys Thr Met Asn Phe Gln Asn
 595 600 605

Asn Asn Gly Gly Asn Ile Gly Leu Leu Gly Phe His Ser Asn Asn Leu
 610 615 620

Val Ala Ser Ser Trp Tyr Tyr Asn Asn Ile Arg Lys Asn Thr Ser Ser
 625 630 635 640

Asn Gly Cys Phe Trp Ser Phe Ile Ser Lys Glu His Gly Trp Gln Glu
 645 650 655

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-16-

Asn

<210> 7

<211> 657

<212> PRT

<213> factor Xa linker, diphtheria toxin translocation domain,
BoNT/F-Hc

<400> 7

Arg Ser Cys Gly Ile Glu Gly Arg Ala Pro Gly Pro Gly Ser Ser Val
1 5 10 15Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp
20 25 30Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly Pro Ile Lys
35 40 45Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala
50 55 60Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu His Pro Glu
65 70 75 80Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly
85 90 95Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val Ile Asp Ser
100 105 110Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu
115 120 125Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala Val His His
130 135 140Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met
145 150 155 160Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe
165 170 175Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln Val Val
180 185 190

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-17-

His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln
 195 200 205

Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val Arg Ser
 210 215 220

Thr Met Ser Tyr Thr Asn Asp Lys Ile Leu Ile Leu Tyr Phe Asn Lys
 225 230 235 240

Leu Tyr Lys Lys Ile Lys Asp Asn Ser Ile Leu Asp Met Arg Tyr Glu
 245 250 255

Asn Asn Lys Phe Ile Asp Ile Ser Gly Tyr Gly Ser Asn Ile Ser Ile
 260 265 270

Asn Gly Asp Val Tyr Ile Tyr Ser Thr Asn Arg Asn Gln Phe Gly Ile
 275 280 285

Tyr Ser Ser Lys Pro Ser Glu Val Asn Ile Ala Gln Asn Asn Asp Ile
 290 295 300

Ile Tyr Asn Gly Arg Tyr Gln Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg
 305 310 315 320

Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Lys Val Asn Leu Asn Asn Glu Tyr Thr Ile
 325 330 335

Ile Asp Cys Ile Arg Asn Asn Asn Ser Gly Trp Lys Ile Ser Leu Asn
 340 345 350

Tyr Asn Lys Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Ala Gly Asn Asn Gln
 355 360 365

Lys Leu Val Phe Asn Tyr Thr Gln Met Ile Ser Ile Ser Asp Tyr Ile
 370 375 380

Asn Lys Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu Gly Asn Ser
 385 390 395 400

Arg Ile Tyr Ile Asn Gly Asn Leu Ile Asp Glu Lys Ser Ile Ser Asn
 405 410 415

Leu Gly Asp Ile His Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys Ile Val Gly
 420 425 430

Cys Asn Asp Thr Arg Tyr Val Gly Ile Arg Tyr Phe Lys Val Phe Asp
 435 440 445

Thr Glu Leu Gly Lys Thr Glu Ile Glu Thr Leu Tyr Ser Asp Glu Pro
 450 455 460

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-18-

Asp Pro Ser Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr Leu Leu Tyr Asn
 465 470 475 480

Lys Arg Tyr Tyr Leu Leu Asn Leu Leu Arg Thr Asp Lys Ser Ile Thr
 485 490 495

Gin Asn Ser Asn Phe Leu Asn Ile Asn Gln Gln Arg Gly Val Tyr Gln
 500 505 510

Lys Pro Asn Ile Phe Ser Asn Thr Arg Leu Tyr Thr Gly Val Glu Val
 515 520 525

Ile Ile Arg Lys Asn Gly Ser Thr Asp Ile Ser Asn Thr Asp Asn Phe
 530 535 540

Val Arg Lys Asn Asp Leu Ala Tyr Ile Asn Val Val Asp Arg Asp Val
 545 550 555 560

Glu Tyr Arg Leu Tyr Ala Asp Ile Ser Ile Ala Lys Pro Glu Lys Ile
 565 570 575

Ile Lys Leu Ile Arg Thr Ser Asn Ser Asn Ser Leu Gly Gln Ile
 580 585 590

Ile Val Met Asp Ser Ile Gly Asn Asn Cys Thr Met Asn Phe Gln Asn
 595 600 605

Asn Asn Gly Gly Asn Ile Gly Leu Leu Gly Phe His Ser Asn Asn Leu
 610 615 620

Val Ala Ser Ser Trp Tyr Tyr Asn Asn Ile Arg Lys Asn Thr Ser Ser
 625 630 635 640

Asn Gly Cys Phe Trp Ser Phe Ile Ser Lys Glu His Gly Trp Gln Glu
 645 650 655

Asn

<210> 8

<211> 563

<212> PRT

<213> AAC46234 invasion gene D protein [Salmonella typhimurium] SigD

<400> 8

Met Gln Ile Gln Ser Phe Tyr His Ser Ala Ser Leu Lys Thr Gln Glu

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-19-

1	5	10	15
Ala Phe Lys Ser Leu Gln Lys Thr Leu Tyr Asn Gly Met Gln Ile Leu			
20	25	30	
Ser Gly Gln Gly Lys Ala Pro Ala Lys Ala Pro Asp Ala Arg Pro Glu			
35	40	45	
Ile Ile Val Leu Arg Glu Pro Gly Ala Thr Trp Gly Asn Tyr Leu Gln			
50	55	60	
His Gln Lys Ala Ser Asn His Ser Leu His Asn Leu Tyr Asn Leu Gln			
65	70	75	80
Arg Asp Leu Leu Thr Val Ala Ala Thr Val Leu Gly Lys Gln Asp Pro			
85	90	95	
Val Leu Thr Ser Met Ala Asn Gln Met Glu Leu Ala Lys Val Lys Ala			
100	105	110	
Asp Arg Pro Ala Thr Lys Gln Glu Ala Ala Ala Lys Ala Leu Lys			
115	120	125	
Lys Asn Leu Ile Glu Leu Ile Ala Ala Arg Thr Gln Gln Gln Asp Gly			
130	135	140	
Leu Pro Ala Lys Glu Ala His Arg Phe Ala Ala Val Ala Phe Arg Asp			
145	150	155	160
Ala Gln Val Lys Gln Leu Asn Asn Gln Pro Trp Gln Thr Ile Lys Asn			
165	170	175	
Thr Leu Thr His Asn Gly His His Tyr Thr Asn Thr Gln Leu Pro Ala			
180	185	190	
Ala Glu Met Lys Ile Gly Ala Lys Asp Ile Phe Pro Ser Ala Tyr Glu			
195	200	205	
Gly Lys Gly Val Cys Ser Trp Asp Thr Lys Asn Ile His His Ala Asn			
210	215	220	
Asn Leu Trp Met Ser Thr Val Ser Val His Glu Asp Gly Lys Asp Lys			
225	230	235	240
Thr Leu Phe Phe Asp Gly Ile Arg His Gly Val Leu Ser Pro Tyr His			
245	250	255	
Glu Lys Asp Pro Leu Leu Arg His Val Gly Ala Glu Asn Lys Ala Lys			
260	265	270	

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-20-

Glu Val Leu Thr Ala Ala Leu Phe Ser Lys Pro Glu Leu Leu Asn Lys
 275 280 285

Ala Leu Ala Gly Glu Ala Val Ser Leu Lys Leu Val Ser Val Gly Leu
 290 295 300

Leu Thr Ala Ser Asn Ile Phe Gly Lys Glu Gly Thr Met Val Glu Asp
 305 310 315 320

Gln Met Arg Ala Trp Gln Ser Leu Thr Gln Pro Gly Lys Met Ile His
 325 330 335

Leu Lys Ile Arg Asn Lys Asp Gly Asp Leu Gln Thr Val Lys Ile Lys
 340 345 350

Pro Asp Val Val Ala Ala Phe Asn Val Gly Val Asn Glu Leu Ala Leu
 355 360 365

Lys Leu Gly Phe Gly Leu Lys Ala Ser Asp Ser Tyr Asn Ala Glu Ala
 370 375 380

Leu His Gln Leu Leu Gly Asn Asp Leu Arg Pro Glu Ala Arg Pro Gly
 385 390 395 400

Gly Trp Val Gly Glu Trp Leu Ala Gln Tyr Pro Asp Asn Tyr Glu Val
 405 410 415

Val Asn Thr Leu Ala Arg Gln Ile Lys Asp Ile Trp Lys Asn Asn Gln
 420 425 430

His His Lys Asp Gly Gly Glu Pro Tyr Lys Leu Ala Gln Arg Leu Ala
 435 440 445

Met Leu Ala His Glu Ile Asp Ala Val Pro Ala Trp Asn Cys Lys Ser
 450 455 460

Gly Lys Asp Arg Thr Gly Met Met Asp Ser Glu Ile Lys Gly Glu Ile
 465 470 475 480

Ile Ser Leu His Gln Thr His Met Leu Ser Ala Pro Gly Ser Leu Pro
 485 490 495

Asp Ser Gly Gly Gln Lys Ile Phe Gln Lys Val Leu Leu Asn Ser Gly
 500 505 510

Asn Leu Glu Ile Gln Lys Gln Asn Thr Gly Gly Ala Gly Asn Lys Val
 515 520 525

Met Lys Asn Leu Ser Pro Glu Val Leu Asn Leu Ser Tyr Gln Lys Arg
 530 535 540

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-21-

Val Gly Asp Glu Asn Ile Trp Gln Ser Val Lys Gly Ile Ser Ser Leu
545 550 555 560

Ile Thr Ser

<210> 9

<211> 433

<212> PRT

<213> AAF21057 invasion protein D [Salmonella typhimurium] SopB

<400> 9

Val Leu Thr Ser Met Ala Asn Gln Met Glu Leu Ala Lys Val Lys Ala
1 5 10 15

Asp Arg Pro Ala Thr Lys Gln Glu Glu Ala Ala Ala Lys Ala Leu Lys
20 25 30

Lys Asn Leu Ile Glu Leu Ile Ala Ala Arg Thr Gin Gln Gln Asp Gly
35 40 45

Leu Pro Ala Lys Glu Ala His Arg Phe Ala Ala Val Ala Phe Arg Asp
50 55 60

Ala Gln Val Lys Gln Leu Asn Asn Gln Pro Trp Gln Thr Ile Lys Asn
65 70 75 80

Thr Leu Thr His Asn Gly His His Tyr Thr Asn Thr Gln Leu Pro Ala
85 90 95

Ala Glu Met Lys Ile Gly Ala Lys Asp Ile Phe Pro Ser Ala Tyr Glu
100 105 110

Gly Lys Gly Val Cys Ser Trp Asp Thr Lys Asn Ile His His Ala Asn
115 120 125

Asn Leu Trp Met Ser Thr Val Ser Val His Glu Asp Gly Lys Asp Lys
130 135 140

Thr Leu Phe Cys Gly Ile Arg His Gly Val Leu Ser Pro Tyr His Glu
145 150 155 160

Lys Asp Pro Leu Leu Arg His Val Gly Ala Glu Asn Lys Ala Lys Glu
165 170 175

Val Leu Thr Ala Ala Leu Phe Ser Lys Pro Glu Leu Leu Asn Lys Ala

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-22-

180

185

190

Leu Ala Gly Glu Ala Val Ser Leu Lys Leu Val Ser Val Gly Leu Leu
195 200 205Thr Ala Ser Asn Ile Phe Gly Lys Glu Gly Thr Met Val Glu Asp Gln
210 215 220Met Arg Ala Trp Gln Ser Leu Thr Gln Pro Gly Lys Met Ile His Leu
225 230 235 240Lys Ile Arg Asn Lys Asp Gly Asp Leu Gln Thr Val Lys Ile Lys Pro
245 250 255Asp Val Ala Ala Phe Asn Val Gly Val Asn Glu Leu Ala Leu Lys Leu
260 265 270Gly Phe Gly Leu Lys Ala Ser Asp Ser Tyr Asn Ala Glu Ala Leu His
275 280 285Gln Leu Leu Gly Asn Asp Leu Arg Pro Glu Ala Arg Pro Gly Gly Trp
290 295 300Val Gly Glu Trp Leu Ala Gln Tyr Pro Asp Asn Tyr Glu Val Val Asn
305 310 315 320Thr Leu Ala Arg Gln Ile Lys Asp Ile Trp Lys Asn Asn Gln His His
325 330 335Lys Asp Gly Gly Glu Pro Tyr Lys Leu Ala Gln Arg Leu Ala Met Leu
340 345 350Ala His Glu Ile Asp Ala Val Pro Ala Trp Asn Cys Lys Ser Gly Lys
355 360 365Asp Arg Thr Gly Met Met Asp Ser Glu Ile Lys Arg Glu Ile Ile Ser
370 375 380Leu His Gln Thr His Met Leu Ser Ala Pro Gly Ser Leu Pro Asp Ser
385 390 395 400Gly Gly Gln Lys Ile Phe Gln Lys Val Leu Leu Asn Ser Gly Asn Leu
405 410 415Glu Ile Gln Gln Asn Thr Gly Gly Ala Gly Asn Lys Val Met Lys
420 425 430

Asn

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-23-

<210> 10

<211> 538

<212> PRT

<213> CAC05808 IpgD, secreted by the Mxi-Spa machinery, modulates entry of bacteria into epithelial cells [Shigella flexneri]

<400> 10

Met His Ile Thr Asn Leu Gly Leu His Gln Val Ser Phe Gln Ser Gly
1 5 10 15Asp Ser Tyr Lys Gly Ala Glu Glu Thr Gly Lys His Lys Gly Val Ser
20 25 30Val Ile Ser Tyr Gln Arg Val Lys Asn Gly Glu Arg Asn Lys Gly Ile
35 40 45Glu Ala Leu Asn Arg Leu Tyr Leu Gln Asn Gln Thr Ser Leu Thr Gly
50 55 60Lys Ser Leu Leu Phe Ala Arg Asp Lys Ala Glu Val Phe Cys Glu Ala
65 70 75 80Ile Lys Leu Ala Gly Gly Asp Thr Ser Lys Ile Lys Ala Met Met Glu
85 90 95Arg Leu Asp Thr Tyr Lys Leu Gly Glu Val Asn Lys Arg His Ile Asn
100 105 110Glu Leu Asn Lys Val Ile Ser Glu Glu Ile Arg Ala Gln Leu Gly Ile
115 120 125Lys Asn Lys Lys Glu Leu Gln Thr Lys Ile Lys Gln Ile Phe Thr Asp
130 135 140Tyr Leu Asn Asn Lys Asn Trp Gly Pro Val Asn Lys Asn Ile Ser His
145 150 155 160His Gly Lys Asn Tyr Ser Phe Gln Leu Thr Pro Ala Ser His Met Lys
165 170 175Ile Gly Asn Lys Asn Ile Phe Val Lys Glu Tyr Asn Gly Lys Gly Ile
180 185 190Cys Cys Ala Ser Thr Arg Glu Arg Asp His Ile Ala Asn Met Trp Leu
195 200 205

Ser Lys Val Val Asp Asp Glu Gly Lys Glu Ile Phe Ser Gly Ile Arg

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-24-

210 215 220

His Gly Val Ile Ser Ala Tyr Gly Leu Lys Lys Asn Ser Ser Glu Arg
225 230 235 240Ala Val Ala Ala Arg Asn Lys Ala Glu Glu Leu Val Ser Ala Ala Leu
245 250 255Tyr Ser Arg Pro Glu Leu Leu Ser Gln Ala Leu Ser Gly Lys Thr Val
260 265 270Asp Leu Lys Ile Val Ser Thr Ser Leu Leu Thr Pro Thr Ser Leu Thr
275 280 285Gly Gly Glu Glu Ser Met Leu Lys Asp Gln Val Ser Ala Leu Lys Gly
290 295 300Leu Asn Ser Lys Arg Gly Gly Pro Thr Lys Leu Leu Ile Arg Asn Ser
305 310 315 320Asp Gly Leu Leu Lys Glu Val Ser Val Asn Leu Lys Val Val Thr Phe
325 330 335Asn Phe Gly Val Asn Glu Leu Ala Leu Lys Met Gly Leu Gly Trp Arg
340 345 350Asn Val Asp Lys Leu Asn Asp Glu Ser Ile Cys Ser Leu Leu Gly Asp
355 360 365Asn Phe Leu Lys Asn Gly Val Ile Gly Gly Trp Ala Ala Glu Ala Ile
370 375 380Glu Lys Asn Pro Pro Cys Lys Asn Asp Val Ile Tyr Leu Ala Asn Gln
385 390 395 400Ile Lys Glu Ile Val Asn Asn Lys Leu Gln Lys Asn Asp Asn Gly Glu
405 410 415Pro Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Val Thr Leu Leu Ala Tyr Thr Ile Gly
420 425 430Ala Val Pro Cys Trp Asn Cys Lys Ser Gly Lys Asp Arg Thr Gly Met
435 440 445Gln Asp Ala Glu Ile Lys Arg Glu Ile Ile Arg Lys His Glu Thr Gly
450 455 460Gln Phe Ser Gln Leu Asn Ser Lys Leu Ser Ser Glu Glu Lys Arg Leu
465 470 475 480

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-25-

Phe Ser Thr Ile Leu Met Asn Ser Gly Asn Met Glu Ile Gln Glu Met
 485 490 495

Asn Thr Gly Val Pro Gly Asn Lys Val Met Lys Lys Leu Pro Leu Ser
 500 505 510

Ser Leu Glu Leu Ser Tyr Ser Glu Arg Ile Gly Asp Pro Lys Ile Trp
 515 520 525

Asn Met Val Lys Gly Tyr Ser Ser Phe Val
 530 535

<210> 11

<211> 288

<212> PRT

<213> AAC69766 targeted effector protein [Yersinia pestis] YopJ

<400> 11

Met Ile Gly Pro Ile Ser Gln Ile Asn Ile Ser Gly Gly Leu Ser Glu
 1 5 10 15

Lys Glu Thr Ser Ser Leu Ile Ser Asn Glu Glu Leu Lys Asn Ile Ile
 20 25 30

Thr Gln Leu Glu Thr Asp Ile Ser Asp Gly Ser Trp Phe His Lys Asn
 35 40 45

Tyr Ser Arg Met Asp Val Glu Val Met Pro Ala Leu Val Ile Gln Ala
 50 55 60

Asn Asn Lys Tyr Pro Glu Met Asn Leu Asn Leu Val Thr Ser Pro Leu
 65 70 75 80

Asp Leu Ser Ile Glu Ile Lys Asn Val Ile Glu Asn Gly Val Arg Ser
 85 90 95

Ser Arg Phe Ile Ile Asn Met Gly Glu Gly Gly Ile His Phe Ser Val
 100 105 110

Ile Asp Tyr Lys His Ile Asn Gly Lys Thr Ser Leu Ile Leu Phe Glu
 115 120 125

Pro Ala Asn Phe Asn Ser Met Gly Pro Ala Met Leu Ala Ile Arg Thr
 130 135 140

Lys Thr Ala Ile Glu Arg Tyr Gln Leu Pro Asp Cys His Phe Ser Met
 145 150 155 160

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-26-

Val Glu Met Asp Ile Gln Arg Ser Ser Ser Glu Cys Gly Ile Phe Ser
 165 170 175

Leu Ala Leu Ala Lys Lys Leu Tyr Ile Glu Arg Asp Ser Leu Leu Lys
 180 185 190

Ile His Glu Asp Asn Ile Lys Gly Ile Leu Ser Asp Gly Glu Asn Pro
 195 200 205

Leu Pro His Asp Lys Leu Asp Pro Tyr Leu Pro Val Thr Phe Tyr Lys
 210 215 220

His Thr Gln Gly Lys Lys Arg Leu Asn Glu Tyr Leu Asn Thr Asn Pro
 225 230 235 240

Gln Gly Val Gly Thr Val Val Asn Lys Lys Asn Glu Thr Ile Val Asn
 245 250 255

Arg Phe Asp Asn Asn Lys Ser Ile Val Asp Gly Lys Glu Leu Ser Val
 260 265 270

Ser Val His Lys Lys Arg Ile Ala Glu Tyr Lys Thr Leu Leu Lys Val
 275 280 285

<210> 12

<211> 180

<212> PRT

<213> AAC02071 SopE [Salmonella typhimurium]

<400> 12

Met Thr Lys Ile Thr Leu Ser Pro Gln Asn Phe Arg Ile Gln Lys Gln
 1 5 10 15

Glu Thr Thr Leu Leu Lys Glu Lys Ser Thr Glu Lys Asn Ser Leu Ala
 20 25 30

Lys Ser Ile Leu Ala Val Lys Asn His Phe Ile Glu Leu Arg Ser Lys
 35 40 45

Leu Ser Glu Arg Phe Ile Ser His Lys Asn Thr Glu Ser Ser Ala Thr
 50 55 60

His Phe His Arg Gly Ser Ala Ser Glu Gly Arg Ala Val Leu Thr Asn
 65 70 75 80

Lys Val Val Lys Asp Phe Met Leu Gln Thr Leu Asn Asp Ile Asp Ile

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-27-

85

90

95

Arg Gly Ser Ala Ser Lys Asp Pro Ala Tyr Ala Ser Gln Thr Arg Glu
 100 105 110

Ala Ile Leu Ser Ala Val Tyr Ser Lys Asn Lys Asp Gln Cys Cys Asn
 115 120 125

Leu Leu Ile Ser Lys Gly Ile Asn Ile Ala Pro Phe Leu Gln Glu Ile
 130 135 140

Gly Glu Ala Ala Lys Asn Ala Gly Leu Pro Gly Thr Thr Lys Asn Asp
 145 150 155 160

Val Phe Thr Pro Ser Gly Ala Gly Ala Asn Pro Phe Ile Thr Pro Leu
 165 170 175

Ile Ser Ser Ala
 180

<210> 13

<211> 543

<212> PRT

<213> AAC44349 protein tyrosine phosphatase SptP [Salmonella typhimurium]

<400> 13

Met Leu Lys Tyr Glu Glu Arg Lys Leu Asn Asn Leu Thr Leu Ser Ser
 1 5 10 15

Phe Ser Lys Val Gly Val Ser Asn Asp Ala Arg Leu Tyr Ile Ala Lys
 20 25 30

Glu Asn Thr Asp Lys Ala Tyr Val Ala Pro Glu Lys Phe Ser Ser Lys
 35 40 45

Val Leu Thr Trp Leu Gly Lys Met Pro Leu Phe Lys Asn Thr Glu Val
 50 55 60

Val Gln Lys His Thr Glu Asn Ile Arg Val Gln Asp Gln Lys Ile Leu
 65 70 75 80

Gln Thr Phe Leu His Ala Leu Thr Glu Lys Tyr Gly Glu Thr Ala Val
 85 90 95

Asn Asp Ala Leu Leu Met Ser Arg Ile Asn Met Asn Lys Pro Leu Thr
 100 105 110

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-28-

Gln Arg Leu Ala Val Gln Ile Thr Glu Cys Val Lys Ala Ala Asp Glu
 115 120 125

Gly Phe Ile Asn Leu Ile Lys Ser Lys Asp Asn Val Gly Val Arg Asn
 130 135 140

Ala Ala Leu Val Ile Lys Gly Gly Asp Thr Lys Val Ala Glu Lys Asn
 145 150 155 160

Asn Asp Val Gly Ala Glu Ser Lys Gln Pro Leu Leu Asp Ile Ala Leu
 165 170 175

Lys Gly Leu Lys Arg Thr Leu Pro Gln Leu Glu Gln Met Asp Gly Asn
 180 185 190

Ser Leu Arg Glu Asn Phe Gln Glu Met Ala Ser Gly Asn Gly Pro Leu
 195 200 205

Arg Ser Leu Met Thr Asn Leu Gln Asn Leu Asn Lys Ile Pro Glu Ala
 210 215 220

Lys Gln Leu Asn Asp Tyr Val Thr Thr Leu Thr Asn Ile Gln Val Gly
 225 230 235 240

Val Ala Arg Phe Ser Gln Trp Gly Thr Cys Gly Gly Glu Val Glu Arg
 245 250 255

Trp Val Asp Lys Ala Ser Thr His Glu Leu Thr Gln Ala Val Lys Lys
 260 265 270

Ile His Val Ile Ala Lys Glu Leu Lys Asn Val Thr Ala Glu Leu Glu
 275 280 285

Lys Ile Glu Ala Gly Ala Pro Met Pro Gln Thr Met Ser Gly Pro Thr
 290 295 300

Leu Gly Leu Ala Arg Phe Ala Val Ser Ser Ile Pro Ile Asn Gln Gln
 305 310 315 320

Thr Gln Val Lys Leu Ser Asp Gly Met Pro Val Pro Val Asn Thr Leu
 325 330 335

Thr Phe Asp Gly Lys Pro Val Ala Leu Ala Gly Ser Tyr Pro Lys Asn
 340 345 350

Thr Pro Asp Ala Leu Glu Ala His Met Lys Met Leu Leu Glu Lys Glu
 355 360 365

Cys Ser Cys Leu Val Val Leu Thr Ser Glu Asp Gln Met Gln Ala Lys

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-29-

370 375 380

Gln Leu Pro Pro Tyr Phe Arg Gly Ser Tyr Thr Phe Gly Glu Val His
385 390 395 400Thr Asn Ser Gln Lys Val Ser Ser Ala Ser Gln Gly Glu Ala Ile Asp
405 410 415Gln Tyr Asn Met Gln Leu Ser Cys Gly Glu Lys Arg Tyr Thr Ile Pro
420 425 430Val Leu His Val Lys Asn Trp Pro Asp His Gln Pro Leu Pro Ser Thr
435 440 445Asp Gln Leu Glu Tyr Leu Ala Asp Arg Val Lys Asn Ser Asn Gln Asn
450 455 460Gly Ala Pro Gly Arg Ser Ser Ser Asp Lys His Leu Pro Met Ile His
465 470 475 480Cys Leu Gly Gly Val Gly Arg Thr Gly Thr Met Ala Ala Ala Leu Val
485 490 495Leu Lys Asp Asn Pro His Ser Asn Leu Glu Gln Val Arg Ala Asp Phe
500 505 510Arg Asp Ser Arg Asn Asn Arg Met Leu Glu Asp Ala Ser Gln Phe Val
515 520 525Gln Leu Lys Ala Met Gln Ala Gln Leu Leu Met Thr Thr Ala Ser
530 535 540

<210> 14

<211> 219

<212> PRT

<213> NP_047628 targeted effector [Yersinia pestis] YopE

<400> 14

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Thr Ser
1 5 10 15Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30Gln Gln Thr Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
35 40 45

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-30-

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
 50 55 60

Ser Val Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
 65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Pro Thr Pro Ala Gln Met
 85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
 100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Asn Ser Leu Asp Ala Glu Met
 115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Gly Ser Gly Pro Leu Arg
 130 135 140

Gly Ser Ile Thr Gln Cys Gln Gly Leu Met Gln Phe Cys Gly Gly Glu
 145 150 155 160

Leu Gln Ala Glu Ala Ser Ala Ile Leu Asn Thr Pro Val Cys Gly Ile
 165 170 175

Pro Phe Ser Gln Trp Gly Thr Ile Gly Gly Ala Ala Ser Ala Tyr Val
 180 185 190

Ala Ser Gly Val Asp Leu Thr Gln Ala Ala Asn Glu Ile Lys Gly Leu
 195 200 205

Ala Gln Gln Met Gln Lys Leu Leu Ser Leu Met
 210 215

<210> 15

<211> 453

<212> PRT

<213> AAK39624 exoenzyme S [Pseudomonas aeruginosa]

<400> 15

Met His Ile Gln Ser Leu Gln Gln Ser Pro Ser Phe Ala Val Glu Leu
 1 5 10 15

His Gln Ala Ala Ser Gly Arg Leu Gly Gln Ile Glu Ala Arg Gln Val
 20 25 30

Ala Thr Pro Ser Glu Ala Gln Gln Leu Ala Gln Arg Gln Asp Ala Pro
 35 40 45

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-31-

Lys Gly Glu Gly Leu Leu Ala Arg Leu Gly Ala Ala Leu Val Arg Pro
 50 55 60

Phe Val Ala Ile Met Asp Trp Leu Gly Lys Leu Leu Gly Ser His Ala
 65 70 75 80

Arg Thr Gly Pro Gln Pro Ser Gln Asp Ala Gln Pro Ala Val Met Ser
 85 90 95

Ser Ala Val Val Phe Lys Gln Met Val Leu Gln Gln Ala Leu Pro Met
 100 105 110

Thr Leu Lys Gly Leu Asp Lys Ala Ser Glu Leu Ala Thr Leu Thr Pro
 115 120 125

Glu Gly Leu Ala Arg Glu His Ser Arg Leu Ala Ser Gly Asp Gly Ala
 130 135 140

Leu Arg Ser Leu Ser Thr Ala Leu Ala Gly Ile Arg Ala Gly Ser Gln
 145 150 155 160

Val Glu Glu Ser Arg Ile Gln Ala Gly Arg Leu Leu Glu Arg Ser Ile
 165 170 175

Gly Gly Ile Ala Leu Gln Gln Trp Gly Thr Thr Gly Gly Ala Ala Ser
 180 185 190

Gln Leu Val Leu Asp Ala Ser Pro Glu Leu Arg Arg Glu Ile Thr Asp
 195 200 205

Gln Leu His Gln Val Met Ser Glu Val Ala Leu Leu Arg Gln Ala Val
 210 215 220

Glu Ser Glu Val Ser Arg Val Ser Ala Asp Lys Ala Leu Ala Asp Gly
 225 230 235 240

Leu Val Lys Arg Phe Gly Ala Asp Ala Glu Lys Tyr Leu Gly Arg Gln
 245 250 255

Pro Gly Gly Ile His Ser Asp Ala Glu Val Met Ala Leu Gly Leu Tyr
 260 265 270

Thr Gly Ile His Tyr Ala Asp Leu Asn Arg Ala Leu Arg Gln Gly Gln
 275 280 285

Glu Leu Asp Ala Gly Gln Lys Leu Ile Asp Gln Gly Met Ser Ala Ala
 290 295 300

Phe Glu Lys Ser Gly Gln Ala Glu Gln Val Val Lys Thr Phe Arg Gly

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-32-

305	310	315	320
Thr Arg Gly Gly Asp Ala Phe Asn Ala Val Glu Glu Gly Lys Val Gly			
325	330	335	
His Asp Asp Gly Tyr Leu Ser Thr Ser Leu Asn Pro Gly Val Ala Arg			
340	345	350	
Ser Phe Gly Gln Gly Thr Ile Ser Thr Val Phe Gly Arg Ser Gly Ile			
355	360	365	
Asp Val Ser Gly Ile Ser Asn Tyr Lys Asn Glu Lys Glu Ile Leu Tyr			
370	375	380	
Asn Lys Glu Thr Asp Met Arg Val Leu Leu Ser Ala Ser Asp Glu Gln			
385	390	395	400
Gly Val Thr Arg Arg Val Leu Glu Ala Ala Leu Gly Glu Gln Ser			
405	410	415	
Gly His Ser Gln Gly Leu Leu Asp Ala Leu Asp Leu Ala Ser Lys Pro			
420	425	430	
Glu Arg Ser Gly Glu Val Gln Glu Gln Asp Val Arg Leu Arg Met Arg			
435	440	445	
Gly Leu Asp Leu Ala			
450			
<210> 16			
<211> 457			
<212> PRT			
<213> AAG03434 exoenzyme T [Pseudomonas aeruginosa]			
<400> 16			
Met His Ile Gln Ser Ser Gln Gln Asn Pro Ser Phe Val Ala Glu Leu			
1	5	10	15
Ser Gln Ala Val Ala Gly Arg Leu Gly Gln Val Glu Ala Arg Gln Val			
20	25	30	
Ala Thr Pro Arg Glu Ala Gln Gln Leu Ala Gln Arg Gln Glu Ala Pro			
35	40	45	
Lys Gly Glu Gly Leu Leu Ser Arg Leu Gly Ala Ala Leu Ala Arg Pro			
50	55	60	

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-33-

Phe Val Ala Ile Ile Glu Trp Leu Gly Lys Leu Leu Gly Ser Arg Ala
 65 70 75 80

His Ala Ala Thr Gln Ala Pro Leu Ser Arg Gln Asp Ala Pro Pro Ala
 85 90 95

Ala Ser Leu Ser Ala Ala Glu Ile Lys Gln Met Met Leu Gln Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Leu Thr Leu Gly Gly Leu Gly Lys Ala Ser Glu Leu Ala Thr
 115 120 125

Leu Thr Ala Glu Arg Leu Ala Lys Asp His Thr Arg Leu Ala Ser Gly
 130 135 140

Asp Gly Ala Leu Arg Ser Leu Ala Thr Ala Leu Val Gly Ile Arg Asp
 145 150 155 160

Gly Ser Arg Ile Glu Ala Ser Arg Thr Gln Ala Ala Arg Leu Leu Glu
 165 170 175

Gln Ser Val Gly Gly Ile Ala Leu Gln Gln Trp Gly Thr Ala Gly Gly
 180 185 190

Ala Ala Ser Gln His Val Leu Ser Ala Ser Pro Glu Gln Leu Arg Glu
 195 200 205

Ile Ala Val Gln Leu His Ala Val Met Asp Lys Val Ala Leu Leu Arg
 210 215 220

His Ala Val Glu Ser Glu Val Lys Gly Glu Pro Val Asp Lys Ala Leu
 225 230 235 240

Ala Asp Gly Leu Val Glu His Phe Gly Leu Glu Ala Glu Gln Tyr Leu
 245 250 255

Gly Glu His Pro Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Ala Glu Val Met Ala Leu
 260 265 270

Gly Leu Tyr Thr Asn Gly Glu Tyr Gln His Leu Asn Arg Ser Leu Arg
 275 280 285

Gln Gly Arg Glu Leu Asp Ala Gly Gln Ala Leu Ile Asp Arg Gly Met
 290 295 300

Ser Ala Ala Phe Glu Lys Ser Gly Pro Ala Glu Gln Val Val Lys Thr
 305 310 315 320

Phe Arg Gly Thr Gln Gly Arg Asp Ala Phe Glu Ala Val Lys Glu Gly
 325 330 335

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-34-

Gln Val Gly His Asp Ala Gly Tyr Leu Ser Thr Ser Arg Asp Pro Gly
 340 345 350

Val Ala Arg Ser Phe Ala Gly Gln Gly Thr Ile Thr Thr Leu Phe Gly
 355 360 365

Arg Ser Gly Ile Asp Val Ser Glu Ile Ser Ile Glu Gly Asp Gln
 370 375 380

Glu Ile Leu Tyr Asp Lys Gly Thr Asp Met Arg Val Leu Leu Ser Ala
 385 390 395 400

Lys Asp Gly Gln Gly Val Thr Arg Arg Val Leu Glu Glu Ala Thr Leu
 405 410 415

Gly Glu Arg Ser Gly His Gly Glu Gly Leu Leu Asp Ala Leu Asp Leu
 420 425 430

Ala Thr Gly Thr Asp Arg Ser Gly Lys Pro Gln Glu Gln Asp Leu Arg
 435 440 445

Leu Arg Met Arg Gly Leu Asp Leu Ala
 450 455

<210> 17

<211> 322

<212> PRT

<213> NP_047619 Yop targeted effector [Yersinia pestis] YopT

<400> 17

Met Asn Ser Ile His Gly His Tyr His Ile Gln Leu Ser Asn Tyr Ser
 1 5 10 15

Ala Gly Glu Asn Leu Gln Ser Ala Thr Leu Thr Glu Gly Val Ile Gly
 20 25 30

Ala His Arg Val Lys Val Glu Thr Ala Leu Ser His Ser Asn Leu Gln
 35 40 45

Lys Lys Leu Ser Ala Thr Ile Lys His Asn Gln Ser Gly Arg Ser Met
 50 55 60

Leu Asp Arg Lys Leu Thr Ser Asp Gly Lys Ala Asn Gln Arg Ser Ser
 65 70 75 80

Phe Thr Phe Ser Met Ile Met Tyr Arg Met Ile His Phe Val Leu Ser

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-35-

85	90	95
Thr Arg Val Pro Ala Val Arg Glu Ser Val Ala Asn Tyr Gly Gly Asn		
100	105	110
Ile Asn Phe Lys Phe Ala Gln Thr Lys Gly Ala Phe Leu His Lys Ile		
115	120	125
Ile Lys His Ser Asp Thr Ala Ser Gly Val Cys Glu Ala Leu Cys Ala		
130	135	140
His Trp Ile Arg Ser His Ala Gln Gly Gln Ser Leu Phe Asp Gln Leu		
145	150	155
Tyr Val Gly Gly Arg Lys Gly Lys Phe Gln Ile Asp Thr Leu Tyr Ser		
165	170	175
Ile Lys Gln Leu Gln Ile Asp Gly Cys Lys Ala Asp Val Asp Gln Asp		
180	185	190
Glu Val Thr Leu Asp Trp Phe Lys Lys Asn Gly Ile Ser Glu Arg Met		
195	200	205
Ile Glu Arg His Cys Leu Leu Arg Pro Val Asp Val Thr Gly Thr Thr		
210	215	220
Gly Ser Glu Gly Leu Asp Gln Leu Leu Asn Ala Ile Leu Asp Thr His		
225	230	235
Gly Ile Gly Tyr Gly Tyr Lys Lys Ile His Leu Ser Gly Gln Met Ser		
245	250	255
Ala His Ala Ile Ala Ala Tyr Val Asn Glu Lys Ser Gly Val Thr Phe		
260	265	270
Phe Asp Pro Asn Phe Gly Glu Phe His Phe Ser Asp Lys Glu Lys Phe		
275	280	285
Arg Lys Trp Phe Thr Asn Ser Phe Trp Gly Asn Ser Met Tyr His Tyr		
290	295	300
Pro Leu Gly Val Gly Gln Arg Phe Arg Val Leu Thr Phe Asp Ser Lys		
305	310	315
Glu Val		

<210> 18

<211> 729

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-36-

<212> PRT

<213> NP_052380 protein kinase YopO [Yersinia enterocolitica]

<400> 18

Met Lys Ile Met Gly Thr Met Pro Pro Ser Ile Ser Leu Ala Lys Ala
1 5 10 15His Glu Arg Ile Ser Gln His Trp Gln Asn Pro Val Gly Glu Leu Asn
20 25 30Ile Gly Gly Lys Arg Tyr Arg Ile Ile Asp Asn Gln Val Leu Arg Leu
35 40 45Asn Pro His Ser Gly Phe Ser Leu Phe Arg Glu Gly Val Gly Lys Ile
50 55 60Phe Ser Gly Lys Met Phe Asn Phe Ser Ile Ala Arg Asn Leu Thr Glu
65 70 75 80Thr Leu His Ala Ala Gln Lys Thr Thr Ser Gln Glu Leu Arg Ser Asp
85 90 95Ile Pro Asn Ala Leu Ser Asn Leu Phe Gly Ala Lys Pro Gln Thr Glu
100 105 110Leu Pro Leu Gly Trp Lys Gly Lys Pro Leu Ser Gly Ala Pro Asp Leu
115 120 125Glu Gly Met Arg Val Ala Glu Thr Asp Lys Phe Ala Glu Gly Glu Ser
130 135 140His Ile Ser Ile Ile Glu Thr Lys Asp Asn Gln Arg Leu Val Ala Lys
145 150 155 160Ile Glu Arg Ser Ile Ala Glu Gly His Leu Phe Ala Glu Leu Glu Ala
165 170 175Tyr Lys His Ile Tyr Lys Thr Ala Gly Lys His Pro Asn Leu Ala Asn
180 185 190Val His Gly Met Ala Val Val Pro Tyr Gly Asn Arg Lys Glu Glu Ala
195 200 205Leu Leu Met Asp Glu Val Asp Gly Trp Arg Cys Ser Asp Thr Leu Arg
210 215 220Ser Leu Ala Asp Ser Trp Lys Gln Gly Lys Ile Asn Ser Glu Ala Tyr
225 230 235 240

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-37-

Trp Gly Thr Ile Lys Phe Ile Ala His Arg Leu Leu Asp Val Thr Asn
 245 250 255

His Leu Ala Lys Ala Gly Ile Val His Asn Asp Ile Lys Pro Gly Asn
 260 265 270

Val Val Phe Asp Arg Ala Ser Gly Glu Pro Val Val Ile Asp Leu Gly
 275 280 285

Leu His Ser Arg Ser Gly Glu Gln Pro Lys Gly Phe Thr Glu Ser Phe
 290 295 300

Lys Ala Pro Glu Leu Gly Val Gly Asn Leu Gly Ala Ser Glu Lys Ser
 305 310 315 320

Asp Val Phe Leu Val Val Ser Thr Leu Leu His Gly Ile Glu Gly Phe
 325 330 335

Glu Lys Asp Pro Glu Ile Lys Pro Asn Gln Gly Leu Arg Phe Ile Thr
 340 345 350

Ser Glu Pro Ala His Val Met Asp Glu Asn Gly Tyr Pro Ile His Arg
 355 360 365

Pro Gly Ile Ala Gly Val Glu Thr Ala Tyr Thr Arg Phe Ile Thr Asp
 370 375 380

Ile Leu Gly Val Ser Ala Asp Ser Arg Pro Asp Ser Asn Glu Ala Arg
 385 390 395 400

Leu His Glu Phe Leu Ser Asp Gly Thr Ile Asp Glu Glu Ser Ala Lys
 405 410 415

Gln Ile Leu Lys Asp Thr Leu Thr Gly Glu Met Ser Pro Leu Ser Thr
 420 425 430

Asp Val Arg Arg Ile Thr Pro Lys Lys Leu Arg Glu Leu Ser Asp Leu
 435 440 445

Leu Arg Thr His Leu Ser Ser Ala Ala Thr Lys Gln Leu Asp Met Gly
 450 455 460

Val Val Leu Ser Asp Leu Asp Thr Met Leu Val Thr Leu Asp Lys Ala
 465 470 475 480

Glu Arg Glu Gly Gly Val Asp Lys Asp Gln Leu Lys Ser Phe Asn Ser
 485 490 495

Leu Ile Leu Lys Thr Tyr Ser Val Ile Glu Asp Tyr Val Lys Gly Arg

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-38-

500 505 510

Glu Gly Asp Thr Lys Ser Ser Ser Ala Glu Val Ser Pro Tyr His Arg
515 520 525Ser Asn Phe Met Leu Ser Ile Ala Glu Pro Ser Leu Gln Arg Ile Gln
530 535 540Lys His Leu Asp Gln Thr His Ser Phe Ser Asp Ile Gly Ser Leu Val
545 550 555 560Arg Ala His Lys His Leu Glu Thr Leu Leu Glu Val Leu Val Thr Leu
565 570 575 580Ser Pro Gln Gln Pro Val Ser Ser Glu Thr Tyr Ser Phe Leu Asn
580 585 590Arg Leu Ala Glu Ala Lys Val Thr Leu Ser Gln Gln Leu Asp Thr Leu
595 600 605Gln Gln Gln Gln Glu Ser Ala Lys Ala Gln Leu Ser Ile Leu Ile Asn
610 615 620Arg Ser Gly Ser Trp Ala Asp Val Ala Arg Gln Ser Leu Gln Arg Phe
625 630 635 640Asp Ser Thr Arg Pro Val Val Lys Phe Gly Thr Glu Gln Tyr Thr Ala
645 650 655 660Ile His Arg Gln Met Met Ala Ala His Ala Ala Ile Thr Leu Gln Glu
660 665 670Val Ser Glu Phe Thr Asp Asp Met Arg Asn Phe Thr Ala Asp Ser Ile
675 680 685Pro Leu Leu Ile Arg Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ile Asp Glu His Leu
690 695 700Val Glu Gln Arg Glu Lys Leu Arg Glu Leu Thr Thr Ile Ala Glu Arg
705 710 715 720Leu Asn Arg Leu Glu Arg Glu Trp Met
725

<210> 19

<211> 129

<212> PRT

<213> AAF82095 outer protein AvrA [Salmonella enterica subsp. enterica]

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-39-

serovar Dublin]

<400> 19

Val Met Asp Gly Lys Thr Ser Val Ile Leu Phe Glu Pro Ala Ala Cys
1 5 10 15Ser Ala Phe Gly Pro Ala Leu Leu Ala Leu Arg Thr Lys Ala Ala Leu
20 25 30Glu Arg Glu Gln Leu Pro Asp Cys Tyr Phe Ala Met Val Glu Leu Asp
35 40 45Ile Gln Arg Ser Ser Ser Glu Cys Gly Ile Phe Ser Leu Ala Leu Ala
50 55 60Lys Lys Leu Gln Leu Glu Phe Met Asn Leu Val Lys Ile His Glu Asp
65 70 75 80Asn Ile Cys Glu Arg Leu Cys Gly Glu Pro Phe Leu Pro Ser Asp
85 90 95Lys Ala Asp Arg Tyr Leu Pro Val Ser Phe Tyr Lys His Thr Gln Gly
100 105 110Val Gln Arg Leu Asn Glu Tyr Val Glu Ala Asn Pro Ala Ala Gly Ser
115 120 125

Ser

<210> 20

<211> 133

<212> PRT

<213> AAC44300 SpiC [Salmonella typhimurium]

<400> 20

Met Ser Glu Glu Gly Phe Met Leu Ala Val Leu Lys Gly Ile Pro Leu
1 5 10 15Ile Gln Asp Ile Arg Ala Glu Gly Asn Ser Arg Ser Trp Ile Met Thr
20 25 30Ile Asp Gly His Pro Ala Arg Gly Glu Ile Phe Ser Glu Ala Phe Ser
35 40 45

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-40-

Ile Ser Leu Phe Leu Asn Asp Leu Glu Ser Leu Pro Lys Pro Cys Leu
50 55 60

Ala Tyr Val Thr Leu Leu Ala Ala His Pro Asp Val His Asp Tyr
65 70 75 80

Ala Ile Gln Leu Thr Ala Asp Gly Gly Trp Leu Asn Gly Tyr Tyr Thr
85 90 95

Thr Ser Ser Ser Glu Leu Ile Ala Ile Glu Ile Glu Lys His Leu
100 105 110

Ala Leu Thr Cys Ile Leu Lys Asn Val Ile Arg Asn His His Lys Leu
115 120 125

Tyr Ser Gly Gly Val
130

<210> 21

<211> 1212

<212> PRT

<213> Protein sequence for SigD with the first 29 codons removed,
thrombin linker, diphtheria translocation domain, TeNT-HC

<400> 21

Met Gln Ile Leu Ser Gly Gln Gly Lys Ala Pro Ala Lys Ala Pro Asp
1 5 10 15

Ala Arg Pro Glu Ile Ile Val Leu Arg Glu Pro Gly Ala Thr Trp Gly
20 25 30

Asn Tyr Leu Gln His Gln Lys Ala Ser Asn His Ser Leu His Asn Leu
35 40 45

Tyr Asn Leu Gln Arg Asp Leu Leu Thr Val Ala Ala Thr Val Leu Gly
50 55 60

Lys Gln Asp Pro Val Leu Thr Ser Met Ala Asn Gln Met Glu Leu Ala
65 70 75 80

Lys Val Lys Ala Asp Arg Pro Ala Thr Lys Gln Glu Glu Ala Ala Ala
85 90 95

Lys Ala Leu Lys Lys Asn Leu Ile Glu Leu Ile Ala Ala Arg Thr Gln
100 105 110

Gln Gln Asp Gly Leu Pro Ala Lys Glu Ala His Arg Phe Ala Ala Val

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-41-

115

120

125

Ala Phe Arg Asp Ala Gln Val Lys Gln Leu Asn Asn Gln Pro Trp Gln
 130 135 140

Thr Ile Lys Asn Thr Leu Thr His Asn Gly His His Tyr Thr Asn Thr
 145 150 155 160

Gln Leu Pro Ala Ala Glu Met Lys Ile Gly Ala Lys Asp Ile Phe Pro
 165 170 175

Ser Ala Tyr Glu Gly Lys Gly Val Cys Ser Trp Asp Thr Lys Asn Ile
 180 185 190

His His Ala Asn Asn Leu Trp Met Ser Thr Val Ser Val His Glu Asp
 195 200 205

Gly Lys Asp Lys Thr Leu Phe Phe Asp Gly Ile Arg His Gly Val Leu
 210 215 220

Ser Pro Tyr His Glu Lys Asp Pro Leu Leu Arg His Val Gly Ala Glu
 225 230 235 240

Asn Lys Ala Lys Glu Val Leu Thr Ala Ala Leu Phe Ser Lys Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Asn Lys Ala Leu Ala Gly Glu Ala Val Ser Leu Lys Leu Val
 260 265 270

Ser Val Gly Leu Leu Thr Ala Ser Asn Ile Phe Gly Lys Glu Gly Thr
 275 280 285

Met Val Glu Asp Gln Met Arg Ala Trp Gln Ser Leu Thr Gln Pro Gly
 290 295 300

Lys Met Ile His Leu Lys Ile Arg Asn Lys Asp Gly Asp Leu Gln Thr
 305 310 315 320

Val Lys Ile Lys Pro Asp Val Val Ala Ala Phe Asn Val Gly Val Asn
 325 330 335

Glu Leu Ala Leu Lys Leu Gly Phe Gly Leu Lys Ala Ser Asp Ser Tyr
 340 345 350 355

Asn Ala Glu Ala Leu His Gln Leu Leu Gly Asn Asp Leu Arg Pro Glu
 355 360 365

Ala Arg Pro Gly Gly Trp Val Gly Glu Trp Leu Ala Gln Tyr Pro Asp
 370 375 380

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-42-

Asn Tyr Glu Val Val Asn Thr Leu Ala Arg Gln Ile Lys Asp Ile Trp
 385 390 395 400

Lys Asn Asn Gln His His Lys Asp Gly Gly Glu Pro Tyr Lys Leu Ala
 405 410 415

Gln Arg Leu Ala Met Leu Ala His Glu Ile Asp Ala Val Pro Ala Trp
 420 425 430

Asn Cys Lys Ser Gly Lys Asp Arg Thr Gly Met Met Asp Ser Glu Ile
 435 440 445

Lys Gly Glu Ile Ile Ser Leu His Gln Thr His Met Leu Ser Ala Pro
 450 455 460

Gly Ser Leu Pro Asp Ser Gly Gly Gln Lys Ile Phe Gln Lys Val Leu
 465 470 475 480

Leu Asn Ser Gly Asn Leu Glu Ile Gln Lys Gln Asn Thr Gly Gly Ala
 485 490 495

Gly Asn Lys Val Met Lys Asn Leu Ser Pro Glu Val Leu Asn Leu Ser
 500 505 510

Tyr Gln Lys Arg Val Gly Asp Glu Asn Ile Trp Gln Ser Val Lys Gly
 515 520 525

Ile Ser Ser Leu Ile Thr Ser Arg Ser Cys Gly Leu Val Pro Arg Gly
 530 535 540

Ser Gly Pro Gly Ser Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu
 545 550 555 560

Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu
 565 570 575

Lys Glu His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys
 580 585 590

Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln
 595 600 605

Thr Ala Leu Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly
 610 615 620

Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn
 625 630 635 640

Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr
 645 650 655

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-43-

Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile
 660 665 670

Ala Asp Gly Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser
 675 680 685

Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly
 690 695 700

Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile
 705 710 715 720

Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Ser Ala Tyr
 725 730 735

Ser Pro Gly His Lys Thr Gin Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val
 740 745 750

Ser Trp Asn Thr Val Arg Ser Lys Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp Asn
 755 760 765

Glu Glu Asp Ile Asp Val Ile Leu Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn Leu
 770 775 780

Asp Ile Asn Asn Asp Ile Ile Ser Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser Ser
 785 790 795 800

Val Ile Thr Tyr Pro Asp Ala Gln Leu Val Pro Gly Ile Asn Gly Lys
 805 810 815

Ala Ile His Leu Val Asn Asn Glu Ser Ser Glu Val Ile Val His Lys
 820 825 830

Ala Met Asp Ile Glu Tyr Asn Asp Met Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser
 835 840 845

Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gln Tyr
 850 855 860

Gly Thr Asn Glu Tyr Ser Ile Ile Ser Ser Met Lys Lys His Ser Leu
 865 870 875 880

Ser Ile Gly Ser Gly Trp Ser Val Ser Leu Lys Gly Asn Asn Leu Ile
 885 890 895

Trp Thr Leu Lys Asp Ser Ala Gly Glu Val Arg Gln Ile Thr Phe Arg
 900 905 910

Asp Leu Pro Asp Lys Phe Asn Ala Tyr Leu Ala Asn Lys Trp Val Phe

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-44-

915

920

925

Ile Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Ser Ser Ala Asn Leu Tyr Ile Asn
 930 935 940

Gly Val Leu Met Gly Ser Ala Glu Ile Thr Gly Leu Gly Ala Ile Arg
 945 950 955 960

Glu Asp Asn Asn Ile Thr Leu Lys Leu Asp Arg Cys Asn Asn Asn Asn
 965 970 975

Gln Tyr Val Ser Ile Asp Lys Phe Arg Ile Phe Cys Lys Ala Leu Asn
 980 985 990

Pro Lys Glu Ile Glu Lys Leu Tyr Thr Ser Tyr Leu Ser Ile Thr Phe
 995 1000 1005

Leu Arg Asp Phe Trp Gly Asn Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Tyr
 1010 1015 1020

Tyr Leu Ile Pro Val Ala Ser Ser Ser Lys Asp Val Gln Leu Lys
 1025 1030 1035

Asn Ile Thr Asp Tyr Met Tyr Leu Thr Asn Ala Pro Ser Tyr Thr
 1040 1045 1050

Asn Gly Lys Leu Asn Ile Tyr Tyr Arg Arg Leu Tyr Asn Gly Leu
 1055 1060 1065

Lys Phe Ile Ile Lys Arg Tyr Thr Pro Asn Asn Glu Ile Asp Ser
 1070 1075 1080

Phe Val Lys Ser Gly Asp Phe Ile Lys Leu Tyr Val Ser Tyr Asn
 1085 1090 1095

Asn Asn Glu His Ile Val Gly Tyr Pro Lys Asp Gly Asn Ala Phe
 1100 1105 1110

Asn Asn Leu Asp Arg Ile Leu Arg Val Gly Tyr Asn Ala Pro GLY
 1115 1120 1125

Ile Pro Leu Tyr Lys Lys Met Glu Ala Val Lys Leu Arg Asp Leu
 1130 1135 1140

Lys Thr Tyr Ser Val Gln Leu Lys Leu Tyr Asp Asp Lys Asn Ala
 1145 1150 1155

Ser Leu Gly Leu Val Gly Thr His Asn Gly Gln Ile Gly Asn Asp
 1160 1165 1170

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-45-

Pro Asn Arg Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asn Trp Tyr Phe Asn His
1175 1180 1185

Leu Lys Asp Lys Ile Leu Gly Cys Asp Trp Tyr Phe Val Pro Thr
1190 1195 1200

Asp Glu Gly Trp Thr Asn Asp Leu Gln
1205 1210

<210> 22

<211> 1212

<212> PRT

<213> Protein sequence for SigD with the first 29 codons removed, factor Xa linker, diphtheria translocation domain, TeNT-HC

<400> 22

Met Gln Ile Leu Ser Gly Gln Gly Lys Ala Pro Ala Lys Ala Pro Asp
1 5 10 15

Ala Arg Pro Glu Ile Ile Val Leu Arg Glu Pro Gly Ala Thr Trp Gly
20 25 30

Asn Tyr Leu Gln His Gln Lys Ala Ser Asn His Ser Leu His Asn Leu
35 40 45

Tyr Asn Leu Gln Arg Asp Leu Leu Thr Val Ala Ala Thr Val Leu Gly
50 55 60

Lys Gln Asp Pro Val Leu Thr Ser Met Ala Asn Gln Met Glu Leu Ala
65 70 75 80

Lys Val Lys Ala Asp Arg Pro Ala Thr Lys Gln Glu Ala Ala Ala
85 90 95

Lys Ala Leu Lys Lys Asn Leu Ile Glu Leu Ile Ala Ala Arg Thr Gln
100 105 110

Gln Gln Asp Gly Leu Pro Ala Lys Glu Ala His Arg Phe Ala Ala Val
115 120 125

Ala Phe Arg Asp Ala Gln Val Lys Gln Leu Asn Asn Gln Pro Trp Gln
130 135 140

Thr Ile Lys Asn Thr Leu Thr His Asn Gly His His Tyr Thr Asn Thr
145 150 155 160

Gln Leu Pro Ala Ala Glu Met Lys Ile Gly Ala Lys Asp Ile Phe Pro

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-46-

165

170

175

Ser Ala Tyr Glu Gly Lys Gly Val Cys Ser Trp Asp Thr Lys Asn Ile
 180 185 190

His His Ala Asn Asn Leu Trp Met Ser Thr Val Ser Val His Glu Asp
 195 200 205

Gly Lys Asp Lys Thr Leu Phe Phe Asp Gly Ile Arg His Gly Val Leu
 210 215 220

Ser Pro Tyr His Glu Lys Asp Pro Leu Leu Arg His Val Gly Ala Glu
 225 230 235 240

Asn Lys Ala Lys Glu Val Leu Thr Ala Ala Leu Phe Ser Lys Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Asn Lys Ala Leu Ala Gly Glu Ala Val Ser Leu Lys Leu Val
 260 265 270

Ser Val Gly Leu Leu Thr Ala Ser Asn Ile Phe Gly Lys Glu Gly Thr
 275 280 285

Met Val Glu Asp Gln Met Arg Ala Trp Gln Ser Leu Thr Gln Pro Gly
 290 295 300

Lys Met Ile His Leu Lys Ile Arg Asn Lys Asp Gly Asp Leu Gln Thr
 305 310 315 320

Val Lys Ile Lys Pro Asp Val Val Ala Ala Phe Asn Val Gly Val Asn
 325 330 335

Glu Leu Ala Leu Lys Leu Gly Phe Gly Leu Lys Ala Ser Asp Ser Tyr
 340 345 350

Asn Ala Glu Ala Leu His Gln Leu Leu Gly Asn Asp Leu Arg Pro Glu
 355 360 365

Ala Arg Pro Gly Gly Trp Val Gly Glu Trp Leu Ala Gln Tyr Pro Asp
 370 375 380

Asn Tyr Glu Val Val Asn Thr Leu Ala Arg Gln Ile Lys Asp Ile Trp
 385 390 395 400

Lys Asn Asn Gln His His Lys Asp Gly Gly Glu Pro Tyr Lys Leu Ala
 405 410 415

Gln Arg Leu Ala Met Leu Ala His Glu Ile Asp Ala Val Pro Ala Trp
 420 425 430

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-47-

Asn Cys Lys Ser Gly Lys Asp Arg Thr Gly Met Met Asp Ser Glu Ile
 435 440 445

Lys Gly Glu Ile Ile Ser Leu His Gln Thr His Met Leu Ser Ala Pro
 450 455 460

Gly Ser Leu Pro Asp Ser Gly Gly Gln Lys Ile Phe Gln Lys Val Leu
 465 470 475 480

Leu Asn Ser Gly Asn Leu Glu Ile Gln Lys Gln Asn Thr Gly Gly Ala
 485 490 495

Gly Asn Lys Val Met Lys Asn Leu Ser Pro Glu Val Leu Asn Leu Ser
 500 505 510

Tyr Gln Lys Arg Val Gly Asp Glu Asn Ile Trp Gln Ser Val Lys Gly
 515 520 525

Ile Ser Ser Leu Ile Thr Ser Arg Ser Cys Gly Ile Glu Gly Arg Ala
 530 535 540

Pro Gly Pro Gly Ser Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu
 545 550 555 560

Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu
 565 570 575

Lys Glu His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys
 580 585 590

Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln
 595 600 605

Thr Ala Leu Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly
 610 615 620

Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn
 625 630 635 640

Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr
 645 650 655

Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile
 660 665 670

Ala Asp Gly Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser
 675 680 685

Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly
 690 695 700

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-48-

Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile
 705 710 715 720

Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Ser Ala Tyr
 725 730 735

Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val
 740 745 750

Ser Trp Asn Thr Val Arg Ser Lys Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp Asn
 755 760 765

Glu Glu Asp Ile Asp Val Ile Leu Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn Leu
 770 775 780

Asp Ile Asn Asn Asp Ile Ile Ser Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser Ser
 785 790 795 800

Val Ile Thr Tyr Pro Asp Ala Gln Leu Val Pro Gly Ile Asn Gly Lys
 805 810 815

Ala Ile His Leu Val Asn Asn Glu Ser Ser Glu Val Ile Val His Lys
 820 825 830

Ala Met Asp Ile Glu Tyr Asn Asp Met Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser
 835 840 845

Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gln Tyr
 850 855 860

Gly Thr Asn Glu Tyr Ser Ile Ile Ser Ser Met Lys Lys His Ser Leu
 865 870 875 880

Ser Ile Gly Ser Gly Trp Ser Val Ser Leu Lys Gly Asn Asn Leu Ile
 885 890 895

Trp Thr Leu Lys Asp Ser Ala Gly Glu Val Arg Gln Ile Thr Phe Arg
 900 905 910

Asp Leu Pro Asp Lys Phe Asn Ala Tyr Leu Ala Asn Lys Trp Val Phe
 915 920 925

Ile Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Ser Ser Ala Asn Leu Tyr Ile Asn
 930 935 940

Gly Val Leu Met Gly Ser Ala Glu Ile Thr Gly Leu Gly Ala Ile Arg
 945 950 955 960

Glu Asp Asn Asn Ile Thr Leu Lys Leu Asp Arg Cys Asn Asn Asn

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-49-

965

970

975

Gln Tyr Val Ser Ile Asp Lys Phe Arg Ile Phe Cys Lys Ala Leu Asn
 980 985 990

Pro Lys Glu Ile Glu Lys Leu Tyr Thr Ser Tyr Leu Ser Ile Thr Phe
 995 1000 1005

Leu Arg Asp Phe Trp Gly Asn Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Tyr
 1010 1015 1020

Tyr Leu Ile Pro Val Ala Ser Ser Ser Lys Asp Val Gln Leu Lys
 1025 1030 1035

Asn Ile Thr Asp Tyr Met Tyr Leu Thr Asn Ala Pro Ser Tyr Thr
 1040 1045 1050

Asn Gly Lys Leu Asn Ile Tyr Tyr Arg Arg Leu Tyr Asn Gly Leu
 1055 1060 1065

Lys Phe Ile Ile Lys Arg Tyr Thr Pro Asn Asn Glu Ile Asp Ser
 1070 1075 1080

Phe Val Lys Ser Gly Asp Phe Ile Lys Leu Tyr Val Ser Tyr Asn
 1085 1090 1095

Asn Asn Glu His Ile Val Gly Tyr Pro Lys Asp Gly Asn Ala Phe
 1100 1105 1110

Asn Asn Leu Asp Arg Ile Leu Arg Val Gly Tyr Asn Ala Pro Gly
 1115 1120 1125

Ile Pro Leu Tyr Lys Lys Met Glu Ala Val Lys Leu Arg Asp Leu
 1130 1135 1140

Lys Thr Tyr Ser Val Gln Leu Lys Leu Tyr Asp Asp Lys Asn Ala
 1145 1150 1155

Ser Leu Gly Leu Val Gly Thr His Asn Gly Gln Ile Gly Asn Asp
 1160 1165 1170

Pro Asn Arg Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asn Trp Tyr Phe Asn His
 1175 1180 1185

Leu Lys Asp Lys Ile Leu Gly Cys Asp Trp Tyr Phe Val Pro Thr
 1190 1195 1200

Asp Glu Gly Trp Thr Asn Asp Leu Gln
 1205 1210

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-50-

<210> 23

<211> 1192

<212> PRT

<213> Protein sequence for SigD with the first 29 codons removed, thrombin linker, diphtheria toxin translocation domain, with BoNT/F-HC

<400> 23

Met Gln Ile Leu Ser Gly Gln Gly Lys Ala Pro Ala Lys Ala Pro Asp
1 5 10 15Ala Arg Pro Glu Ile Ile Val Leu Arg Glu Pro Gly Ala Thr Trp Gly
20 25 30Asn Tyr Leu Gln His Gln Lys Ala Ser Asn His Ser Leu His Asn Leu
35 40 45Tyr Asn Leu Gln Arg Asp Leu Leu Thr Val Ala Ala Thr Val Leu Gly
50 55 60Lys Gln Asp Pro Val Leu Thr Ser Met Ala Asn Gln Met Glu Leu Ala
65 70 75 80Lys Val Lys Ala Asp Arg Pro Ala Thr Lys Gln Glu Glu Ala Ala Ala
85 90 95Lys Ala Leu Lys Asn Leu Ile Glu Leu Ile Ala Ala Arg Thr Gln
100 105 110Gln Gln Asp Gly Leu Pro Ala Lys Glu Ala His Arg Phe Ala Ala Val
115 120 125Ala Phe Arg Asp Ala Gln Val Lys Gln Leu Asn Asn Gln Pro Trp Gln
130 135 140Thr Ile Lys Asn Thr Leu Thr His Asn Gly His His Tyr Thr Asn Thr
145 150 155 160Gln Leu Pro Ala Ala Glu Met Lys Ile Gly Ala Lys Asp Ile Phe Pro
165 170 175Ser Ala Tyr Glu Gly Lys Gly Val Cys Ser Trp Asp Thr Lys Asn Ile
180 185 190His His Ala Asn Asn Leu Trp Met Ser Thr Val Ser Val His Glu Asp
195 200 205

Gly Lys Asp Lys Thr Leu Phe Phe Asp Gly Ile Arg His Gly Val Leu

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-51-

210 215 220

Ser Pro Tyr His Glu Lys Asp Pro Leu Leu Arg His Val Gly Ala Glu
225 230 235 240Asn Lys Ala Lys Glu Val Leu Thr Ala Ala Leu Phe Ser Lys Pro Glu
245 250 255Leu Leu Asn Lys Ala Leu Ala Gly Glu Ala Val Ser Leu Lys Leu Val
260 265 270Ser Val Gly Leu Leu Thr Ala Ser Asn Ile Phe Gly Lys Glu Gly Thr
275 280 285Met Val Glu Asp Gln Met Arg Ala Trp Gln Ser Leu Thr Gln Pro Gly
290 295 300Lys Met Ile His Leu Lys Ile Arg Asn Lys Asp Gly Asp Leu Gln Thr
305 310 315 320Val Lys Ile Lys Pro Asp Val Val Ala Ala Phe Asn Val Gly Val Asn
325 330 335Glu Leu Ala Leu Lys Leu Gly Phe Gly Leu Lys Ala Ser Asp Ser Tyr
340 345 350Asn Ala Glu Ala Leu His Gln Leu Leu Gly Asn Asp Leu Arg Pro Glu
355 360 365Ala Arg Pro Gly Gly Trp Val Gly Glu Trp Leu Ala Gln Tyr Pro Asp
370 375 380Asn Tyr Glu Val Val Asn Thr Leu Ala Arg Gln Ile Lys Asp Ile Trp
385 390 395 400Lys Asn Asn Gln His His Lys Asp Gly Gly Glu Pro Tyr Lys Leu Ala
405 410 415Gln Arg Leu Ala Met Leu Ala His Glu Ile Asp Ala Val Pro Ala Trp
420 425 430Asn Cys Lys Ser Gly Lys Asp Arg Thr Gly Met Met Asp Ser Glu Ile
435 440 445Lys Gly Glu Ile Ile Ser Leu His Gln Thr His Met Leu Ser Ala Pro
450 455 460Gly Ser Leu Pro Asp Ser Gly Gly Gln Lys Ile Phe Gln Lys Val Leu
465 470 475 480

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-52-

Leu Asn Ser Gly Asn Leu Glu Ile Gln Lys Gln Asn Thr Gly Gly Ala
 485 490 495

Gly Asn Lys Val Met Lys Asn Leu Ser Pro Glu Val Leu Asn Leu Ser
 500 505 510

Tyr Gln Lys Arg Val Gly Asp Glu Asn Ile Trp Gln Ser Val Lys Gly
 515 520 525

Ile Ser Ser Leu Ile Thr Ser Arg Ser Cys Gly Leu Val Pro Arg Gly
 530 535 540

Ser Gly Pro Gly Ser Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu
 545 550 555 560

Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu
 565 570 575

Lys Glu His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys
 580 585 590

Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln
 595 600 605

Thr Ala Leu Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly
 610 615 620

Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn
 625 630 635 640

Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr
 645 650 655

Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile
 660 665 670

Ala Asp Gly Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser
 675 680 685

Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly
 690 695 700

Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile
 705 710 715 720

Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Ser Ala Tyr
 725 730 735

Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val
 740 745 750

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-53-

Ser Trp Asn Thr Val Arg Ser Thr Met Ser Tyr Thr Asn Asp Lys Ile
 755 760 765
 Leu Ile Leu Tyr Phe Asn Lys Leu Tyr Lys Lys Ile Lys Asp Asn Ser
 770 775 780
 Ile Leu Asp Met Arg Tyr Glu Asn Asn Lys Phe Ile Asp Ile Ser Gly
 785 790 795 800
 Tyr Gly Ser Asn Ile Ser Ile Asn Gly Asp Val Tyr Ile Tyr Ser Thr
 805 810 815
 Asn Arg Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Ser Ser Lys Pro Ser Glu Val Asn
 820 825 830
 Ile Ala Gln Asn Asn Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Arg Tyr Gln Asn Phe
 835 840 845
 Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Lys Val Asn
 850 855 860
 Leu Asn Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asp Cys Ile Arg Asn Asn Asn Ser
 865 870 875 880
 Gly Trp Lys Ile Ser Leu Asn Tyr Asn Lys Ile Ile Trp Thr Leu Gln
 885 890 895
 Asp Thr Ala Gly Asn Asn Gln Lys Leu Val Phe Asn Tyr Thr Gln Met
 900 905 910
 Ile Ser Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr
 915 920 925
 Asn Asn Arg Leu Gly Asn Ser Arg Ile Tyr Ile Asn Gly Asn Leu Ile
 930 935 940
 Asp Glu Lys Ser Ile Ser Asn Leu Gly Asp Ile His Val Ser Asp Asn
 945 950 955 960
 Ile Leu Phe Lys Ile Val Gly Cys Asn Asp Thr Arg Tyr Val Gly Ile
 965 970 975
 Arg Tyr Phe Lys Val Phe Asp Thr Glu Leu Gly Lys Thr Glu Ile Glu
 980 985 990
 Thr Leu Tyr Ser Asp Glu Pro Asp Pro Ser Ile Leu Lys Asp Phe Trp
 995 1000 1005
 Gly Asn Tyr Leu Leu Tyr Asn Lys Arg Tyr Tyr Leu Leu Asn Leu

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-54-

1010 1015 1020

Leu Arg Thr Asp Lys Ser Ile Thr Gln Asn Ser Asn Phe Leu Asn
1025 1030 1035Ile Asn Gln Gln Arg Gly Val Tyr Gln Lys Pro Asn Ile Phe Ser
1040 1045 1050Asn Thr Arg Leu Tyr Thr Gly Val Glu Val Ile Ile Arg Lys Asn
1055 1060 1065Gly Ser Thr Asp Ile Ser Asn Thr Asp Asn Phe Val Arg Lys Asn
1070 1075 1080Asp Leu Ala Tyr Ile Asn Val Val Asp Arg Asp Val Glu Tyr Arg
1085 1090 1095Leu Tyr Ala Asp Ile Ser Ile Ala Lys Pro Glu Lys Ile Ile Lys
1100 1105 1110Leu Ile Arg Thr Ser Asn Ser Asn Asn Ser Leu Gly Gln Ile Ile
1115 1120 1125Val Met Asp Ser Ile Gly Asn Asn Cys Thr Met Asn Phe Gln Asn
1130 1135 1140Asn Asn Gly Gly Asn Ile Gly Leu Leu Gly Phe His Ser Asn Asn
1145 1150 1155Leu Val Ala Ser Ser Trp Tyr Tyr Asn Asn Ile Arg Lys Asn Thr
1160 1165 1170Ser Ser Asn Gly Cys Phe Trp Ser Phe Ile Ser Lys Glu His Gly
1175 1180 1185Trp Gln Glu Asn
1190

<210> 24

<211> 1192

<212> PRT

<213> Protein sequence for SigD, factor Xa linker, diphtheria toxin
translocation domain, with BoNT/F-HC

<400> 24

Met Gln Ile Leu Ser Gly Gln Gly Lys Ala Pro Ala Lys Ala Pro Asp
1 5 10 15

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-55-

Ala Arg Pro Glu Ile Ile Val Leu Arg Pro Gly Ala Thr Trp Gly
 20 25 30

Asn Tyr Leu Gln His Gln Lys Ala Ser Asn His Ser Leu His Asn Leu
 35 40 45

Tyr Asn Leu Gln Arg Asp Leu Leu Thr Val Ala Ala Thr Val Leu Gly
 50 55 60

Lys Gln Asp Pro Val Leu Thr Ser Met Ala Asn Gln Met Glu Leu Ala
 65 70 75 80

Lys Val Lys Ala Asp Arg Pro Ala Thr Lys Gln Glu Glu Ala Ala Ala
 85 90 95

Lys Ala Leu Lys Lys Asn Leu Ile Glu Leu Ile Ala Ala Arg Thr Gln
 100 105 110

Gln Gln Asp Gly Leu Pro Ala Lys Glu Ala His Arg Phe Ala Ala Val
 115 120 125

Ala Phe Arg Asp Ala Gln Val Lys Gln Leu Asn Asn Gln Pro Trp Gln
 130 135 140

Thr Ile Lys Asn Thr Leu Thr His Asn Gly His His Tyr Thr Asn Thr
 145 150 155 160

Gln Leu Pro Ala Ala Glu Met Lys Ile Gly Ala Lys Asp Ile Phe Pro
 165 170 175

Ser Ala Tyr Glu Gly Lys Gly Val Cys Ser Trp Asp Thr Lys Asn Ile
 180 185 190

His His Ala Asn Asn Leu Trp Met Ser Thr Val Ser Val His Glu Asp
 195 200 205

Gly Lys Asp Lys Thr Leu Phe Phe Asp Gly Ile Arg His Gly Val Leu
 210 215 220

Ser Pro Tyr His Glu Lys Asp Pro Leu Leu Arg His Val Gly Ala Glu
 225 230 235 240

Asn Lys Ala Lys Glu Val Leu Thr Ala Ala Leu Phe Ser Lys Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Asn Lys Ala Leu Ala Gly Glu Ala Val Ser Leu Lys Leu Val
 260 265 270

Ser Val Gly Leu Leu Thr Ala Ser Asn Ile Phe Gly Lys Glu Gly Thr

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-56-

275

280

285

Met Val Glu Asp Gln Met Arg Ala Trp Gln Ser Leu Thr Gln Pro Gly
 290 295 300

Lys Met Ile His Leu Lys Ile Arg Asn Lys Asp Gly Asp Leu Gln Thr
 305 310 315 320

Val Lys Ile Lys Pro Asp Val Val Ala Ala Phe Asn Val Gly Val Asn
 325 330 335

Glu Leu Ala Leu Lys Leu Gly Phe Gly Leu Lys Ala Ser Asp Ser Tyr
 340 345 350

Asn Ala Glu Ala Leu His Gln Leu Leu Gly Asn Asp Leu Arg Pro Glu
 355 360 365

Ala Arg Pro Gly Gly Trp Val Gly Glu Trp Leu Ala Gln Tyr Pro Asp
 370 375 380

Asn Tyr Glu Val Val Asn Thr Leu Ala Arg Gln Ile Lys Asp Ile Trp
 385 390 395 400

Lys Asn Asn Gln His His Lys Asp Gly Gly Glu Pro Tyr Lys Leu Ala
 405 410 415

Gln Arg Leu Ala Met Leu Ala His Glu Ile Asp Ala Val Pro Ala Trp
 420 425 430

Asn Cys Lys Ser Gly Lys Asp Arg Thr Gly Met Met Asp Ser Glu Ile
 435 440 445

Lys Gly Glu Ile Ile Ser Leu His Gln Thr His Met Leu Ser Ala Pro
 450 455 460

Gly Ser Leu Pro Asp Ser Gly Gly Gln Lys Ile Phe Gln Lys Val Leu
 465 470 475 480

Leu Asn Ser Gly Asn Leu Glu Ile Gln Lys Gln Asn Thr Gly Ala
 485 490 495

Gly Asn Lys Val Met Lys Asn Leu Ser Pro Glu Val Leu Asn Leu Ser
 500 505 510

Tyr Gln Lys Arg Val Gly Asp Glu Asn Ile Trp Gln Ser Val Lys Gly
 515 520 525

Ile Ser Ser Leu Ile Thr Ser Arg Ser Cys Gly Ile Glu Gly Arg Ala
 530 535 540

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-57-

Pro Gly Pro Gly Ser Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu
 545 550 555 560

Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu
 565 570 575

Lys Glu His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys
 580 585 590

Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln
 595 600 605

Thr Ala Leu Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly
 610 615 620

Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn
 625 630 635 640

Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr
 645 650 655

Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile
 660 665 670

Ala Asp Gly Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser
 675 680 685

Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly
 690 695 700

Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile
 705 710 715 720

Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Ser Ala Tyr
 725 730 735

Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val
 740 745 750

Ser Trp Asn Thr Val Arg Ser Thr Met Ser Tyr Thr Asn Asp Lys Ile
 755 760 765

Leu Ile Leu Tyr Phe Asn Lys Leu Tyr Lys Lys Ile Lys Asp Asn Ser
 770 775 780

Ile Leu Asp Met Arg Tyr Glu Asn Asn Lys Phe Ile Asp Ile Ser Gly
 785 790 795 800

Tyr Gly Ser Asn Ile Ser Ile Asn Gly Asp Val Tyr Ile Tyr Ser Thr
 805 810 815

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-58-

Asn Arg Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Ser Ser Lys Pro Ser Glu Val Asn
 820 825 830

Ile Ala Gln Asn Asn Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Arg Tyr Gln Asn Phe
 835 840 845

Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Lys Val Asn
 850 855 860

Leu Asn Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asp Cys Ile Arg Asn Asn Asn Ser
 865 870 875 880

Gly Trp Lys Ile Ser Leu Asn Tyr Asn Lys Ile Ile Trp Thr Leu Gln
 885 890 895

Asp Thr Ala Gly Asn Asn Gln Lys Leu Val Phe Asn Tyr Thr Gln Met
 900 905 910

Ile Ser Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr
 915 920 925

Asn Asn Arg Leu Gly Asn Ser Arg Ile Tyr Ile Asn Gly Asn Leu Ile
 930 935 940

Asp Glu Lys Ser Ile Ser Asn Leu Gly Asp Ile His Val Ser Asp Asn
 945 950 955 960

Ile Leu Phe Lys Ile Val Gly Cys Asn Asp Thr Arg Tyr Val Gly Ile
 965 970 975

Arg Tyr Phe Lys Val Phe Asp Thr Glu Leu Gly Lys Thr Glu Ile Glu
 980 985 990

Thr Leu Tyr Ser Asp Glu Pro Asp Pro Ser Ile Leu Lys Asp Phe Trp
 995 1000 1005

Gly Asn Tyr Leu Leu Tyr Asn Lys Arg Tyr Tyr Leu Leu Asn Leu
 1010 1015 1020

Leu Arg Thr Asp Lys Ser Ile Thr Gln Asn Ser Asn Phe Leu Asn
 1025 1030 1035

Ile Asn Gln Gln Arg Gly Val Tyr Gln Lys Pro Asn Ile Phe Ser
 1040 1045 1050

Asn Thr Arg Leu Tyr Thr Gly Val Glu Val Ile Ile Arg Lys Asn
 1055 1060 1065

Gly Ser Thr Asp Ile Ser Asn Thr Asp Asn Phe Val Arg Lys Asn

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-59-

1070 1075 1080

Asp Leu Ala Tyr Ile Asn Val Val Asp Arg Asp Val Glu Tyr Arg
1085 1090 1095Leu Tyr Ala Asp Ile Ser Ile Ala Lys Pro Glu Lys Ile Ile Lys
1100 1105 1110Leu Ile Arg Thr Ser Asn Ser Asn Asn Ser Leu Gly Gln Ile Ile
1115 1120 1125Val Met Asp Ser Ile Gly Asn Asn Cys Thr Met Asn Phe Gln Asn
1130 1135 1140Asn Asn Gly Gly Asn Ile Gly Leu Leu Gly Phe His Ser Asn Asn
1145 1150 1155Leu Val Ala Ser Ser Trp Tyr Tyr Asn Asn Ile Arg Lys Asn Thr
1160 1165 1170Ser Ser Asn Gly Cys Phe Trp Ser Phe Ile Ser Lys Glu His Gly
1175 1180 1185Trp Gln Glu Asn
1190

<210> 25

<211> 999

<212> PRT

<213> Protein sequence for YopT, factor Xa linker, diphtheria translocator domain, TeNT- HC

<400> 25

Met Asn Ser Ile His Gly His Tyr His Ile Gln Leu Ser Asn Tyr Ser
1 5 10 15Ala Gly Glu Asn Leu Gln Ser Ala Thr Leu Thr Glu Gly Val Ile Gly
20 25 30Ala His Arg Val Lys Val Glu Thr Ala Leu Ser His Ser Asn Leu Gln
35 40 45Lys Lys Leu Ser Ala Thr Ile Lys His Asn Gln Ser Gly Arg Ser Met
50 55 60Leu Asp Arg Lys Leu Thr Ser Asp Gly Lys Ala Asn Gln Arg Ser Ser
65 70 75 80

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-60-

Phe Thr Phe Ser Met Ile Met Tyr Arg Met Ile His Phe Val Leu Ser
 85 90 95

Thr Arg Val Pro Ala Val Arg Glu Ser Val Ala Asn Tyr Gly Gly Asn
 100 105 110

Ile Asn Phe Lys Phe Ala Gln Thr Lys Gly Ala Phe Leu His Lys Ile
 115 120 125

Ile Lys His Ser Asp Thr Ala Ser Gly Val Cys Glu Ala Leu Cys Ala
 130 135 140

His Trp Ile Arg Ser His Ala Gln Gly Gln Ser Leu Phe Asp Gln Leu
 145 150 155 160

Tyr Val Gly Gly Arg Lys Gly Lys Phe Gln Ile Asp Thr Leu Tyr Ser
 165 170 175

Ile Lys Gln Leu Gln Ile Asp Gly Cys Lys Ala Asp Val Asp Gln Asp
 180 185 190

Glu Val Thr Leu Asp Trp Phe Lys Lys Asn Gly Ile Ser Glu Arg Met
 195 200 205

Ile Glu Arg His Cys Leu Leu Arg Pro Val Asp Val Thr Gly Thr Thr
 210 215 220

Glu Ser Glu Gly Leu Asp Gln Leu Leu Asn Ala Ile Leu Asp Thr His
 225 230 235 240

Gly Ile Gly Tyr Gly Tyr Lys Ile His Leu Ser Gly Gln Met Ser
 245 250 255

Ala His Ala Ile Ala Ala Tyr Val Asn Glu Lys Ser Gly Val Thr Phe
 260 265 270

Phe Asp Pro Asn Phe Gly Glu Phe His Phe Ser Asp Lys Glu Lys Phe
 275 280 285

Arg Lys Trp Phe Thr Asn Ser Phe Trp Gly Asn Ser Met Tyr His Tyr
 290 295 300

Pro Leu Gly Val Gly Gln Arg Phe Arg Val Leu Thr Phe Asp Ser Lys
 305 310 315 320

Glu Val Arg Ser Cys Gly Ile Glu Gly Arg Ala Pro Gly Pro Gly Ser
 325 330 335

Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val Ile

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-61-

340

345

350

Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly Pro
 355 360 365

Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu Glu
 370 375 380

Lys Ala Lys Gln Tyr Lys Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu His
 385 390 395 400

Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe
 405 410 415

Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val Ile
 420 425 430

Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu Ser
 435 440 445

Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala Val
 450 455 460

His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser
 465 470 475 480

Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp Ile
 485 490 495

Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln
 500 505 510

Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Ser Ala Tyr Ser Pro Gly His Lys
 515 520 525

Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val
 530 535 540

Arg Ser Lys Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp Asn Glu Glu Asp Ile Asp
 545 550 555 560

Val Ile Leu Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn Leu Asp Ile Asn Asn Asp
 565 570 575

Ile Ile Ser Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser Ser Val Ile Thr Tyr Pro
 580 585 590

Asp Ala Gln Leu Val Pro Gly Ile Asn Glys Ala Ile His Leu Val
 595 600 605

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-62-

Asn Asn Glu Ser Ser Glu Val Ile Val His Lys Ala Met Asp Ile Glu
 610 615 620

Tyr Asn Asp Met Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val
 625 630 635 640

Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gln Tyr Gly Thr Asn Glu Tyr
 645 650 655

Ser Ile Ile Ser Ser Met Lys Lys His Ser Leu Ser Ile Gly Ser Gly
 660 665 670

Trp Ser Val Ser Leu Lys Gly Asn Asn Leu Ile Trp Thr Leu Lys Asp
 675 680 685

Ser Ala Gly Glu Val Arg Gln Ile Thr Phe Arg Asp Leu Pro Asp Lys
 690 695 700

Phe Asn Ala Tyr Leu Ala Asn Lys Trp Val Phe Ile Thr Ile Thr Asn
 705 710 715 720

Asp Arg Leu Ser Ser Ala Asn Leu Tyr Ile Asn Gly Val Leu Met Gly
 725 730 735

Ser Ala Glu Ile Thr Gly Leu Gly Ala Ile Arg Glu Asp Asn Asn Ile
 740 745 750

Thr Leu Lys Leu Asp Arg Cys Asn Asn Asn Gln Tyr Val Ser Ile
 755 760 765

Asp Lys Phe Arg Ile Phe Cys Lys Ala Leu Asn Pro Lys Glu Ile Glu
 770 775 780

Lys Leu Tyr Thr Ser Tyr Leu Ser Ile Thr Phe Leu Arg Asp Phe Trp
 785 790 795 800

Gly Asn Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Tyr Tyr Leu Ile Pro Val Ala
 805 810 815

Ser Ser Ser Lys Asp Val Gln Leu Lys Asn Ile Thr Asp Tyr Met Tyr
 820 825 830

Leu Thr Asn Ala Pro Ser Tyr Thr Asn Gly Lys Leu Asn Ile Tyr Tyr
 835 840 845

Arg Arg Leu Tyr Asn Gly Leu Lys Phe Ile Ile Lys Arg Tyr Thr Pro
 850 855 860

Asn Asn Glu Ile Asp Ser Phe Val Lys Ser Gly Asp Phe Ile Lys Leu
 865 870 875 880

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-63-

Tyr Val Ser Tyr Asn Asn Asn Glu His Ile Val Gly Tyr Pro Lys Asp
885 890 895

Gly Asn Ala Phe Asn Asn Leu Asp Arg Ile Leu Arg Val Gly Tyr Asn
900 905 910

Ala Pro Gly Ile Pro Leu Tyr Lys Lys Met Glu Ala Val Lys Leu Arg
915 920 925

Asp Leu Lys Thr Tyr Ser Val Gln Leu Lys Leu Tyr Asp Asp Lys Asn
930 935 940

Ala Ser Leu Gly Leu Val Gly Thr His Asn Gly Gln Ile Gly Asn Asp
945 950 955 960

Pro Asn Arg Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asn Trp Tyr Phe Asn His Leu
965 970 975

Lys Asp Lys Ile Leu Gly Cys Asp Trp Tyr Phe Val Pro Thr Asp Glu
980 985 990

Gly Trp Thr Asn Asp Leu Gln
995

<210> 26

<211> 579

<212> PRT

<213> Protein sequence for YopT, factor Xa linker, diphtheria toxin
translocation domain, with BoNT/F-HC

<400> 26

Met Asn Ser Ile His Gly His Tyr His Ile Gln Leu Ser Asn Tyr Ser
1 5 10 15

Ala Gly Glu Asn Leu Gln Ser Ala Thr Leu Thr Glu Gly Val Ile Gly
20 25 30

Ala His Arg Val Lys Val Glu Thr Ala Leu Ser His Ser Asn Leu Gln
35 40 45

Lys Lys Leu Ser Ala Thr Ile Lys His Asn Gln Ser Gly Arg Ser Met
50 55 60

Leu Asp Arg Lys Leu Thr Ser Asp Gly Lys Ala Asn Gln Arg Ser Ser
65 70 75 80

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-64-

Phe Thr Phe Ser Met Ile Met Tyr Arg Met Ile His Phe Val Leu Ser
 85 90 95

Thr Arg Val Pro Ala Val Arg Glu Ser Val Ala Asn Tyr Gly Gly Asn
 100 105 110

Ile Asn Phe Lys Phe Ala Gin Thr Lys Gly Ala Phe Leu His Lys Ile
 115 120 125

Ile Lys His Ser Asp Thr Ala Ser Gly Val Cys Glu Ala Leu Cys Ala
 130 135 140

His Trp Ile Arg Ser His Ala Gln Gly Gln Ser Leu Phe Asp Gln Leu
 145 150 155 160

Tyr Val Gly Gly Arg Lys Gly Lys Phe Gln Ile Asp Thr Leu Tyr Ser
 165 170 175

Ile Lys Gln Leu Gln Ile Asp Gly Cys Lys Ala Asp Val Asp Gln Asp
 180 185 190

Glu Val Thr Leu Asp Trp Phe Lys Lys Asn Gly Ile Ser Glu Arg Met
 195 200 205

Ile Glu Arg His Cys Leu Leu Arg Pro Val Asp Val Thr Gly Thr Thr
 210 215 220

Glu Ser Glu Gly Leu Asp Gln Leu Leu Asn Ala Ile Leu Asp Thr His
 225 230 235 240

Gly Ile Gly Tyr Gly Tyr Lys Ile His Leu Ser Gly Gln Met Ser
 245 250 255

Ala His Ala Ile Ala Ala Tyr Val Asn Glu Lys Ser Gly Val Thr Phe
 260 265 270

Phe Asp Pro Asn Phe Gly Glu Phe His Phe Ser Asp Lys Glu Lys Phe
 275 280 285

Arg Lys Trp Phe Thr Asn Ser Phe Trp Gly Asn Ser Met Tyr His Tyr
 290 295 300

Pro Leu Gly Val Gly Gln Arg Phe Arg Val Leu Thr Phe Asp Ser Lys
 305 310 315 320

Glu Val Arg Ser Cys Gly Ile Glu Gly Arg Ala Pro Gly Pro Gly Ser
 325 330 335

Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val Ile
 340 345 350

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-65-

Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly Pro
 355 360 365

Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu Glu
 370 375 380

Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu His
 385 390 395 400

Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe
 405 410 415

Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val Ile
 420 425 430

Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu Ser
 435 440 445

Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala Val
 450 455 460

His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser
 465 470 475 480

Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp Ile
 485 490 495

Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln
 500 505 510

Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Ser Ala Tyr Ser Pro Gly His Lys
 515 520 525

Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val
 530 535 540

Arg Ser Thr Met Ser Tyr Thr Asn Asp Lys Ile Leu Ile Leu Tyr Phe
 545 550 555 560

Asn Lys Leu Tyr Lys Lys Ile Lys Asp Asn Ser Ile Leu Asp Met Arg
 565 570 575

Tyr Glu Asn Asn Lys Phe Ile Asp Ile Ser Gly Tyr Gly Ser Asn Ile
 580 585 590

Ser Ile Asn Gly Asp Val Tyr Ile Tyr Ser Thr Asn Arg Asn Gln Phe
 595 600 605

Gly Ile Tyr Ser Ser Lys Pro Ser Glu Val Asn Ile Ala Gln Asn Asn

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-66-

610	615	620
Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Arg Tyr Gln Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp		
625	630	635
640		
Val Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Lys Val Asn Leu Asn Asn Glu Tyr		
645	650	655
Thr Ile Ile Asp Cys Ile Arg Asn Asn Ser Gly Trp Lys Ile Ser		
660	665	670
Leu Asn Tyr Asn Lys Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Ala Gly Asn		
675	680	685
Asn Gln Lys Leu Val Phe Asn Tyr Thr Gln Met Ile Ser Ile Ser Asp		
690	695	700
Tyr Ile Asn Lys Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu Gly		
705	710	720
Asn Ser Arg Ile Tyr Ile Asn Gly Asn Leu Ile Asp Glu Lys Ser Ile		
725	730	735
Ser Asn Leu Gly Asp Ile His Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys Ile		
740	745	750
Val Gly Cys Asn Asp Thr Arg Tyr Val Gly Ile Arg Tyr Phe Lys Val		
755	760	765
Phe Asp Thr Glu Leu Gly Lys Thr Glu Ile Glu Thr Leu Tyr Ser Asp		
770	775	780
Glu Pro Asp Pro Ser Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr Leu Leu		
785	790	795
800		
Tyr Asn Lys Arg Tyr Tyr Leu Leu Asn Leu Leu Arg Thr Asp Lys Ser		
805	810	815
Ile Thr Gln Asn Ser Asn Phe Leu Asn Ile Asn Gln Gln Arg Gly Val		
820	825	830
Tyr Gln Lys Pro Asn Ile Phe Ser Asn Thr Arg Leu Tyr Thr Gly Val		
835	840	845
Glu Val Ile Ile Arg Lys Asn Gly Ser Thr Asp Ile Ser Asn Thr Asp		
850	855	860
Asn Phe Val Arg Lys Asn Asp Leu Ala Tyr Ile Asn Val Val Asp Arg		
865	870	875
880		

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-67-

Asp Val Glu Tyr Arg Leu Tyr Ala Asp Ile Ser Ile Ala Lys Pro Glu
 885 890 895

Lys Ile Ile Lys Leu Ile Arg Thr Ser Asn Ser Asn Asn Ser Leu Gly
 900 905 910

Gln Ile Ile Val Met Asp Ser Ile Gly Asn Asn Cys Thr Met Asn Phe
 915 920 925

Gln Asn Asn Asn Gly Gly Asn Ile Gly Leu Leu Gly Phe His Ser Asn
 930 935 940

Asn Leu Val Ala Ser Ser Trp Tyr Tyr Asn Asn Ile Arg Lys Asn Thr
 945 950 955 960

Ser Ser Asn Gly Cys Phe Trp Ser Phe Ile Ser Lys Glu His Gly Trp
 965 970 975

Gln Glu Asn

<210> 27

<211> 810

<212> PRT

<213> Protein sequence for SpiC, thrombin linker, diphtheria translocation domain, TeNT-HC

<400> 27

Met Ser Glu Glu Gly Phe Met Leu Ala Val Leu Lys Gly Ile Pro Leu
 1 5 10 15

Ile Gln Asp Ile Arg Ala Glu Gly Asn Ser Arg Ser Trp Ile Met Thr
 20 25 30

Ile Asp Gly His Pro Ala Arg Gly Glu Ile Phe Ser Glu Ala Phe Ser
 35 40 45

Ile Ser Leu Phe Leu Asn Asp Leu Glu Ser Leu Pro Lys Pro Cys Leu
 50 55 60

Ala Tyr Val Thr Leu Leu Ala Ala His Pro Asp Val His Asp Tyr
 65 70 75 80

Ala Ile Gln Leu Thr Ala Asp Gly Gly Trp Leu Asn Gly Tyr Tyr Thr
 85 90 95

Thr Ser Ser Ser Glu Leu Ile Ala Ile Glu Ile Glu Lys His Leu

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-68-

100

105

110

Ala Leu Thr Cys Ile Leu Lys Asn Val Ile Arg Asn His His Lys Leu
 115 120 125

Tyr Ser Gly Gly Val Arg Ser Cys Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly
 130 135 140

Pro Gly Ser Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp
 145 150 155 160

Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu
 165 170 175

His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val
 180 185 190

Ser Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala
 195 200 205

Leu Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn
 210 215 220

Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala
 225 230 235 240

Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala
 245 250 255

Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp
 260 265 270

Gly Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala
 275 280 285

Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu
 290 295 300

Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn
 305 310 315 320

Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Ser Ala Tyr Ser Pro
 325 330 335

Gly His Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp
 340 345 350

Asn Thr Val Arg Ser Lys Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp Asn Glu Glu
 355 360 365

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-69-

Asp Ile Asp Val Ile Leu Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn Leu Asp Ile
 370 375 380

Asn Asn Asp Ile Ile Ser Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser Ser Val Ile
 385 390 395 400

Thr Tyr Pro Asp Ala Gln Leu Val Pro Gly Ile Asn Gly Lys Ala Ile
 405 410 415

His Leu Val Asn Asn Glu Ser Ser Glu Val Ile Val His Lys Ala Met
 420 425 430

Asp Ile Glu Tyr Asn Asp Met Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
 435 440 445

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gln Tyr Gly Thr
 450 455 460

Asn Glu Tyr Ser Ile Ile Ser Ser Met Lys Lys His Ser Leu Ser Ile
 465 470 475 480

Gly Ser Gly Trp Ser Val Ser Leu Lys Gly Asn Asn Leu Ile Trp Thr
 485 490 495

Leu Lys Asp Ser Ala Gly Glu Val Arg Gln Ile Thr Phe Arg Asp Leu
 500 505 510

Pro Asp Lys Phe Asn Ala Tyr Leu Ala Asn Lys Trp Val Phe Ile Thr
 515 520 525

Ile Thr Asn Asp Arg Leu Ser Ser Ala Asn Leu Tyr Ile Asn Gly Val
 530 535 540

Leu Met Gly Ser Ala Glu Ile Thr Gly Leu Gly Ala Ile Arg Glu Asp
 545 550 555 560

Asn Asn Ile Thr Leu Lys Leu Asp Arg Cys Asn Asn Asn Asn Gln Tyr
 565 570 575

Val Ser Ile Asp Lys Phe Arg Ile Phe Cys Lys Ala Leu Asn Pro Lys
 580 585 590

Glu Ile Glu Lys Leu Tyr Thr Ser Tyr Leu Ser Ile Thr Phe Leu Arg
 595 600 605

Asp Phe Trp Gly Asn Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Tyr Tyr Leu Ile
 610 615 620

Pro Val Ala Ser Ser Ser Lys Asp Val Gln Leu Lys Asn Ile Thr Asp
 625 630 635 640

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-70-

Tyr Met Tyr Leu Thr Asn Ala Pro Ser Tyr Thr Asn Gly Lys Leu Asn
 645 650 655

Ile Tyr Tyr Arg Arg Leu Tyr Asn Gly Leu Lys Phe Ile Ile Lys Arg
 660 665 670

Tyr Thr Pro Asn Asn Glu Ile Asp Ser Phe Val Lys Ser Gly Asp Phe
 675 680 685

Ile Lys Leu Tyr Val Ser Tyr Asn Asn Asn Glu His Ile Val Gly Tyr
 690 695 700

Pro Lys Asp Gly Asn Ala Phe Asn Asn Leu Asp Arg Ile Leu Arg Val
 705 710 715 720

Gly Tyr Asn Ala Pro Gly Ile Pro Leu Tyr Lys Lys Met Glu Ala Val
 725 730 735

Lys Leu Arg Asp Leu Lys Thr Tyr Ser Val Gln Leu Lys Leu Tyr Asp
 740 745 750

Asp Lys Asn Ala Ser Leu Gly Leu Val Gly Thr His Asn Gly Gln Ile
 755 760 765

Gly Asn Asp Pro Asn Arg Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asn Trp Tyr Phe
 770 775 780

Asn His Leu Lys Asp Lys Ile Leu Gly Cys Asp Trp Tyr Phe Val Pro
 785 790 795 800

Thr Asp Glu Gly Trp Thr Asn Asp Leu Gln
 805 810

<210> 28

<211> 810

<212> PRT

<213> Protein sequence for SpiC, factor Xa linker, diphtheria translocation domain, TeNT- HC

<400> 28

Met Ser Glu Glu Gly Phe Met Leu Ala Val Leu Lys Gly Ile Pro Leu
 1 5 10 15

Ile Gln Asp Ile Arg Ala Glu Gly Asn Ser Arg Ser Trp Ile Met Thr
 20 25 30

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-71-

Ile Asp Gly His Pro Ala Arg Gly Glu Ile Phe Ser Glu Ala Phe Ser
 35 40 45

Ile Ser Leu Phe Leu Asn Asp Leu Glu Ser Leu Pro Lys Pro Cys Leu
 50 55 60

Ala Tyr Val Thr Leu Leu Ala Ala His Pro Asp Val His Asp Tyr
 65 70 75 80

Ala Ile Gln Leu Thr Ala Asp Gly Gly Trp Leu Asn Gly Tyr Tyr Thr
 85 90 95

Thr Ser Ser Ser Glu Leu Ile Ala Ile Glu Ile Glu Lys His Leu
 100 105 110

Ala Leu Thr Cys Ile Leu Lys Asn Val Ile Arg Asn His His Lys Leu
 115 120 125

Tyr Ser Gly Gly Val Arg Ser Cys Gly Ile Glu Gly Arg Ala Pro Gly
 130 135 140

Pro Gly Ser Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp
 145 150 155 160

Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu
 165 170 175

His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val
 180 185 190

Ser Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala
 195 200 205

Leu Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn
 210 215 220

Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala
 225 230 235 240

Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala
 245 250 255

Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp
 260 265 270

Gly Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala
 275 280 285

Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu
 290 295 300

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-72-

Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn
 305 310 315 320

Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Ser Ala Tyr Ser Pro
 325 330 335

Gly His Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp
 340 345 350

Asn Thr Val Arg Ser Lys Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp Asn Glu Glu
 355 360 365

Asp Ile Asp Val Ile Leu Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn Leu Asp Ile
 370 375 380

Asn Asn Asp Ile Ile Ser Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser Ser Val Ile
 385 390 395 400

Thr Tyr Pro Asp Ala Gln Leu Val Pro Gly Ile Asn Gly Lys Ala Ile
 405 410 415

His Leu Val Asn Asn Glu Ser Ser Glu Val Ile Val His Lys Ala Met
 420 425 430

Asp Ile Glu Tyr Asn Asp Met Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
 435 440 445

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gln Tyr Gly Thr
 450 455 460

Asn Glu Tyr Ser Ile Ile Ser Ser Met Lys Lys His Ser Leu Ser Ile
 465 470 475 480

Gly Ser Gly Trp Ser Val Ser Leu Lys Gly Asn Asn Leu Ile Trp Thr
 485 490 495

Leu Lys Asp Ser Ala Gly Glu Val Arg Gln Ile Thr Phe Arg Asp Leu
 500 505 510

Pro Asp Lys Phe Asn Ala Tyr Leu Ala Asn Lys Trp Val Phe Ile Thr
 515 520 525

Ile Thr Asn Asp Arg Leu Ser Ser Ala Asn Leu Tyr Ile Asn Gly Val
 530 535 540

Leu Met Gly Ser Ala Glu Ile Thr Gly Leu Gly Ala Ile Arg Glu Asp
 545 550 555 560

Asn Asn Ile Thr Leu Lys Leu Asp Arg Cys Asn Asn Asn Gln Tyr

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-73-

565	570	575
Val Ser Ile Asp Lys Phe Arg Ile Phe Cys Lys Ala Leu Asn Pro Lys		
580	585	590
Glu Ile Glu Lys Leu Tyr Thr Ser Tyr Leu Ser Ile Thr Phe Leu Arg		
595	600	605
Asp Phe Trp Gly Asn Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Tyr Tyr Leu Ile		
610	615	620
Pro Val Ala Ser Ser Ser Lys Asp Val Gln Leu Lys Asn Ile Thr Asp		
625	630	635
Tyr Met Tyr Leu Thr Asn Ala Pro Ser Tyr Thr Asn Gly Lys Leu Asn		
645	650	655
Ile Tyr Tyr Arg Arg Leu Tyr Asn Gly Leu Lys Phe Ile Ile Lys Arg		
660	665	670
Tyr Thr Pro Asn Asn Glu Ile Asp Ser Phe Val Lys Ser Gly Asp Phe		
675	680	685
Ile Lys Leu Tyr Val Ser Tyr Asn Asn Asn Glu His Ile Val Gly Tyr		
690	695	700
Pro Lys Asp Gly Asn Ala Phe Asn Asn Leu Asp Arg Ile Leu Arg Val		
705	710	715
Gly Tyr Asn Ala Pro Gly Ile Pro Leu Tyr Lys Lys Met Glu Ala Val		
725	730	735
Lys Leu Arg Asp Leu Lys Thr Tyr Ser Val Gln Leu Lys Leu Tyr Asp		
740	745	750
Asp Lys Asn Ala Ser Leu Gly Leu Val Gly Thr His Asn Gly Gln Ile		
755	760	765
Gly Asn Asp Pro Asn Arg Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asn Trp Tyr Phe		
770	775	780
Asn His Leu Lys Asp Lys Ile Leu Gly Cys Asp Trp Tyr Phe Val Pro		
785	790	795
Thr Asp Glu Gly Trp Thr Asn Asp Leu Gln		
805	810	

<210> 29

<211> 393

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-74-

<212> PRT

<213> Protein sequence for SpiC fused to a domain consisting the N-terminal 254 residues from *Bacillus anthracis* lethal factor capable of interacting with protective antigen

<400> 29

Met Ser Glu Glu Gly Phe Met Leu Ala Val Leu Lys Gly Ile Pro Leu
1 5 10 15Ile Gln Asp Ile Arg Ala Glu Gly Asn Ser Arg Ser Trp Ile Met Thr
20 25 30Ile Asp Gly His Pro Ala Arg Gly Glu Ile Phe Ser Glu Ala Phe Ser
35 40 45Ile Ser Leu Phe Leu Asn Asp Leu Glu Ser Leu Pro Lys Pro Cys Leu
50 55 60Ala Tyr Val Thr Leu Leu Ala Ala His Pro Asp Val His Asp Tyr
65 70 75 80Ala Ile Gln Leu Thr Ala Asp Gly Gly Trp Leu Asn Gly Tyr Tyr Thr
85 90 95Thr Ser Ser Ser Glu Leu Ile Ala Ile Glu Ile Glu Lys His Leu
100 105 110Ala Leu Thr Cys Ile Leu Lys Asn Val Ile Arg Asn His His Lys Leu
115 120 125Tyr Ser Gly Gly Val Met Asn Ile Lys Lys Glu Phe Ile Lys Val Ile
130 135 140Ser Met Ser Cys Leu Val Thr Ala Ile Thr Leu Ser Gly Pro Val Phe
145 150 155 160Ile Pro Leu Val Gln Gly Ala Gly His Gly Asp Val Gly Met His
165 170 175Val Lys Glu Lys Glu Lys Asn Lys Asp Glu Asn Lys Arg Lys Asp Glu
180 185 190Glu Arg Asn Lys Thr Gln Glu Glu His Leu Lys Glu Ile Met Lys His
195 200 205Ile Val Lys Ile Glu Val Lys Gly Glu Glu Ala Val Lys Lys Glu Ala
210 215 220

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-75-

Ala Glu Lys Leu Leu Glu Lys Val Pro Ser Asp Val Leu Glu Met Tyr
 225 230 235 240

Lys Ala Ile Gly Gly Lys Ile Tyr Ile Val Asp Gly Asp Ile Thr Lys
 245 250 255

His Ile Ser Leu Glu Ala Leu Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ile Lys Asp
 260 265 270

Ile Tyr Gly Lys Asp Ala Leu Leu His Glu His Tyr Val Tyr Ala Lys
 275 280 285

Glu Gly Tyr Glu Pro Val Leu Val Ile Gln Ser Ser Glu Asp Tyr Val
 290 295 300

Glu Asn Thr Glu Lys Ala Leu Asn Val Tyr Tyr Glu Ile Gly Lys Ile
 305 310 315 320

Leu Ser Arg Asp Ile Leu Ser Lys Ile Asn Gln Pro Tyr Gln Lys Phe
 325 330 335

Leu Asp Val Leu Asn Thr Ile Lys Asn Ala Ser Asp Ser Asp Gly Gln
 340 345 350

Asp Leu Leu Phe Thr Asn Gln Leu Lys Glu His Pro Thr Asp Phe Ser
 355 360 365

Val Glu Phe Leu Glu Gln Asn Ser Asn Glu Val Gln Glu Val Phe Ala
 370 375 380

Lys Ala Phe Ala Tyr Tyr Ile Glu Pro
 385 390

<210> 30

<211> 764

<212> PRT

<213> Protein sequence of *Bacillus anthracis* protective antigen

<400> 30

Met Lys Lys Arg Lys Val Leu Ile Pro Leu Met Ala Leu Ser Thr Ile
 1 5 10 15

Leu Val Ser Ser Thr Gly Asn Leu Glu Val Ile Gln Ala Glu Val Lys
 20 25 30

Gln Glu Asn Arg Leu Leu Asn Glu Ser Glu Ser Ser Gln Gly Leu
 35 40 45

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-76-

Leu Gly Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Asn Phe Gln Ala Pro Met Val Val
 50 55 60

Thr Ser Ser Thr Thr Gly Asp Leu Ser Ile Pro Ser Ser Glu Leu Glu
 65 70 75 80

Asn Ile Pro Ser Glu Asn Gln Tyr Phe Gln Ser Ala Ile Trp Ser Gly
 85 90 95

Phe Ile Lys Val Lys Lys Ser Asp Glu Tyr Thr Phe Ala Thr Ser Ala
 100 105 110

Asp Asn His Val Thr Met Trp Val Asp Asp Gln Glu Val Ile Asn Lys
 115 120 125

Ala Ser Asn Ser Asn Lys Ile Arg Leu Glu Lys Gly Arg Leu Tyr Gln
 130 135 140

Ile Lys Ile Gln Tyr Gln Arg Glu Asn Pro Thr Glu Lys Gly Leu Asp
 145 150 155 160

Phe Lys Leu Tyr Trp Thr Asp Ser Gln Asn Lys Lys Glu Val Ile Ser
 165 170 175

Ser Asp Asn Leu Gln Leu Pro Glu Leu Lys Gln Lys Ser Ser Asn Ser
 180 185 190

Arg Lys Lys Arg Ser Thr Ser Ala Gly Pro Thr Val Pro Asp Arg Asp
 195 200 205

Asn Asp Gly Ile Pro Asp Ser Leu Glu Val Glu Gly Tyr Thr Val Asp
 210 215 220

Val Lys Asn Lys Arg Thr Phe Leu Ser Pro Trp Ile Ser Asn Ile His
 225 230 235 240

Glu Lys Lys Gly Leu Thr Lys Tyr Lys Ser Ser Pro Glu Lys Trp Ser
 245 250 255

Thr Ala Ser Asp Pro Tyr Ser Asp Phe Glu Lys Val Thr Gly Arg Ile
 260 265 270

Asp Lys Asn Val Ser Pro Glu Ala Arg His Pro Leu Val Ala Ala Tyr
 275 280 285

Pro Ile Val His Val Asp Met Glu Asn Ile Ile Leu Ser Lys Asn Glu
 290 295 300

Asp Gln Ser Thr Gln Asn Thr Asp Ser Gln Thr Arg Thr Ile Ser Lys

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-77-

305	310	315	320
Asn Thr Ser Thr Ser Arg Thr His Thr Ser Glu Val His Gly Asn Ala			
325	330	335	
Glu Val His Ala Ser Phe Phe Asp Ile Gly Gly Ser Val Ser Ala Gly			
340	345	350	
Phe Ser Asn Ser Asn Ser Ser Thr Val Ala Ile Asp His Ser Leu Ser			
355	360	365	
Leu Ala Gly Glu Arg Thr Trp Ala Glu Thr Met Gly Leu Asn Thr Ala			
370	375	380	
Asp Thr Ala Arg Leu Asn Ala Asn Ile Arg Tyr Val Asn Thr Gly Thr			
385	390	395	400
Ala Pro Ile Tyr Asn Val Leu Pro Thr Thr Ser Leu Val Leu Gly Lys			
405	410	415	
Asn Gln Thr Leu Ala Thr Ile Lys Ala Lys Glu Asn Gln Leu Ser Gln			
420	425	430	
Ile Leu Ala Pro Asn Asn Tyr Tyr Pro Ser Lys Asn Leu Ala Pro Ile			
435	440	445	
Ala Leu Asn Ala Gln Asp Asp Phe Ser Ser Thr Pro Ile Thr Met Asn			
450	455	460	
Tyr Asn Gln Phe Leu Glu Leu Glu Lys Thr Lys Gln Leu Arg Leu Asp			
465	470	475	480
Thr Asp Gln Val Tyr Gly Asn Ile Ala Thr Tyr Asn Phe Glu Asn Gly			
485	490	495	
Arg Val Arg Val Asp Thr Gly Ser Asn Trp Ser Glu Val Leu Pro Gln			
500	505	510	
Ile Gln Glu Thr Thr Ala Arg Ile Ile Phe Asn Gly Lys Asp Leu Asn			
515	520	525	
Leu Val Glu Arg Arg Ile Ala Ala Val Asn Pro Ser Asp Pro Leu Glu			
530	535	540	
Thr Thr Lys Pro Asp Met Thr Leu Lys Glu Ala Leu Lys Ile Ala Phe			
545	550	555	560
Gly Phe Asn Glu Pro Asn Gly Asn Leu Gln Tyr Gln Gly Lys Asp Ile			
565	570	575	

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-78-

Thr Glu Phe Asp Phe Asn Phe Asp Gln Gln Thr Ser Gln Asn Ile Lys
 580 585 590

Asn Gln Ieu Ala Glu Leu Asn Ala Thr Asn Ile Tyr Thr Val Leu Asp
 595 600 605

Lys Ile Lys Leu Asn Ala Lys Met Asn Ile Leu Ile Arg Asp Lys Arg
 610 615 620

Phe His Tyr Asp Arg Asn Asn Ile Ala Val Gly Ala Asp Glu Ser Val
 625 630 635 640

Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile Asn Ser Ser Thr Glu Gly Leu
 645 650 655

Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile
 660 665 670

Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly Leu Lys Glu Val Ile Asn Asp Arg
 675 680 685

Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu Arg Gln Asp Gly Lys Thr Phe
 690 695 700

Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Asn
 705 710 715 720

Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu Asn Thr Ile
 725 730 735

Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr Ser Thr Asn Gly Ile Lys Lys
 740 745 750

Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly Tyr Glu Ile Gly
 755 760

<210> 31

<211> 431

<212> PRT

<213> Protein sequence of Clostridium botulinum C2 toxin component 1

<400> 31

Met Pro Ile Ile Lys Glu Pro Ile Asp Phe Ile Asn Lys Pro Glu Ser
 1 5 10 15

Glu Ala Gln Lys Trp Gly Lys Glu Glu Lys Arg Trp Phe Thr Lys
 20 25 30

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-79-

Leu Asn Asn Leu Glu Glu Val Ala Val Asn Gln Leu Lys Thr Lys Glu
 35 40 45

Asp Lys Thr Lys Ile Asp Asn Phe Ser Thr Asp Ile Leu Phe Ser Ser
 50 55 60

Leu Thr Ala Ile Glu Ile Met Lys Glu Asp Glu Asn Gln Asn Leu Phe
 65 70 75 80

Asp Val Glu Arg Ile Arg Glu Ala Leu Leu Lys Asn Thr Leu Asp Arg
 85 90 95

Glu Val Ile Gly Tyr Val Asn Phe Thr Pro Lys Glu Leu Gly Ile Asn
 100 105 110

Phe Ser Ile Arg Asp Val Glu Leu Asn Arg Asp Ile Ser Asp Glu Ile
 115 120 125

Leu Asp Lys Val Arg Gln Gln Ile Ile Asn Gln Glu Tyr Thr Lys Phe
 130 135 140

Ser Phe Val Ser Leu Gly Leu Asn Asp Asn Ser Ile Asp Glu Ser Ile
 145 150 155 160

Pro Val Ile Val Lys Thr Arg Val Pro Thr Thr Phe Asn Tyr Gly Val
 165 170 175

Leu Asn Asn Lys Glu Thr Val Ser Leu Leu Leu Asn Gln Gly Phe Ser
 180 185 190

Ile Ile Pro Glu Ser Ala Ile Ile Thr Thr Ile Lys Gly Lys Asp Tyr
 195 200 205

Ile Leu Ile Glu Gly Ser Leu Ser Gln Glu Leu Asp Phe Tyr Asn Lys
 210 215 220

Gly Ser Glu Ala Trp Gly Glu Lys Asn Tyr Gly Asp Tyr Val Ser Lys
 225 230 235 240

Leu Ser Gln Glu Leu Gly Ala Leu Glu Gly Tyr Leu His Ser Asp
 245 250 255

Tyr Lys Ala Ile Asn Ser Tyr Leu Arg Asn Asn Arg Val Pro Asn Asn
 260 265 270

Asp Glu Leu Asn Lys Lys Ile Glu Leu Ile Ser Ser Ala Leu Ser Val
 275 280 285

Lys Pro Ile Pro Glu Thr Leu Ile Ala Tyr Arg Arg Val Asp Gly Ile

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-80-

290 295 300

Pro Phe Asp Leu Pro Ser Asp Phe Ser Phe Asp Lys Lys Glu Asn Gly
305 310 315 320Glu Ile Ile Ala Asp Lys Thr Lys Leu Asn Glu Phe Ile Asp Lys Trp
325 330 335Thr Gly Lys Glu Ile Glu Asn Leu Ser Phe Ser Ser Thr Ser Leu Lys
340 345 350Ser Thr Pro Leu Ser Phe Ser Lys Ser Arg Phe Ile Phe Arg Leu Arg
355 360 365Leu Ser Glu Gly Thr Ile Gly Ala Phe Ile Tyr Gly Phe Ser Gly Phe
370 375 380Gln Asp Glu Gln Glu Ile Leu Leu Asn Lys Asn Ser Thr Phe Lys Ile
385 390 395 400Phe Arg Ile Thr Pro Ile Thr Ser Ile Ile Asn Arg Val Thr Lys Met
405 410 415Thr Gln Val Val Ile Asp Ala Glu Val Ile Gln Asn Lys Glu Ile
420 425 430

<210> 32

<211> 721

<212> PRT

<213> Protein sequence of Clostridium botulinum C2 toxin component 2

<400> 32

Met Leu Val Ser Lys Phe Glu Asn Ser Val Lys Asn Ser Asn Lys Asn
1 5 10 15Tyr Phe Thr Ile Asn Gly Leu Met Gly Tyr Tyr Phe Glu Asn Asp Phe
20 25 30Phe Asn Leu Asn Ile Ile Ser Pro Thr Leu Asp Gly Asn Leu Thr Phe
35 40 45Ser Lys Glu Asp Ile Asn Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ile Ile Lys Ser
50 55 60Ala Arg Trp Ile Gly Leu Ile Lys Pro Ser Ile Thr Gly Glu Tyr Ile
65 70 75 80

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-81-

Leu Ser Thr Asn Ser Pro Asn Cys Arg Val Glu Leu Asn Gly Glu Ile
 85 90 95

Phe Asn Leu Ser Leu Asn Thr Ser Asn Thr Val Asn Leu Ile Gln Gly
 100 105 110

Asn Val Tyr Asp Ile Arg Ile Glu Gln Leu Met Ser Glu Asn Gln Leu
 115 120 125

Leu Lys Asn Tyr Glu Gly Ile Lys Leu Tyr Trp Glu Thr Ser Asp Ile
 130 135 140

Ile Lys Glu Ile Ile Pro Ser Glu Val Leu Leu Lys Pro Asn Tyr Ser
 145 150 155 160

Asn Thr Asn Glu Lys Ser Lys Phe Ile Pro Asn Asn Thr Leu Phe Ser
 165 170 175

Asn Ala Lys Leu Lys Ala Asn Ala Asn Arg Asp Thr Asp Arg Asp Gly
 180 185 190

Ile Pro Asp Glu Trp Glu Ile Asn Gly Tyr Thr Val Met Asn Gln Lys
 195 200 205

Ala Val Ala Trp Asp Asp Lys Phe Ala Ala Asn Gly Tyr Lys Lys Tyr
 210 215 220

Val Ser Asn Pro Phe Lys Pro Cys Thr Ala Asn Asp Pro Tyr Thr Asp
 225 230 235 240

Phe Glu Lys Val Ser Gly Gln Ile Asp Pro Ser Val Ser Met Val Ala
 245 250 255

Arg Asp Pro Met Ile Ser Ala Tyr Pro Ile Val Gly Val Gln Met Glu
 260 265 270

Arg Leu Val Val Ser Lys Ser Glu Thr Ile Thr Gly Asp Ser Thr Lys
 275 280 285

Ser Met Ser Lys Ser Thr Ser His Ser Ser Thr Asn Ile Asn Thr Val
 290 295 300

Gly Ala Glu Val Ser Gly Ser Leu Gln Leu Ala Gly Gly Ile Phe Pro
 305 310 315 320

Val Phe Ser Met Ser Ala Ser Ala Asn Tyr Ser His Thr Trp Gln Asn
 325 330 335

Thr Ser Thr Val Asp Asp Thr Thr Gly Glu Ser Phe Ser Gln Gly Leu
 340 345 350

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-82-

Ser Ile Asn Thr Gly Glu Ser Ala Tyr Ile Asn Pro Asn Ile Arg Tyr
 355 360 365

Tyr Asn Thr Gly Thr Ala Pro Val Tyr Asn Val Thr Pro Thr Thr Thr
 370 375 380

Ile Val Ile Asp Lys Gln Ser Val Ala Thr Ile Lys Gly Gln Glu Ser
 385 390 395 400

Leu Ile Gly Asp Tyr Leu Asn Pro Gly Gly Thr Tyr Pro Ile Ile Gly
 405 410 415

Glu Pro Pro Met Ala Leu Asn Thr Met Asp Gln Phe Ser Ser Arg Leu
 420 425 430

Ile Pro Ile Asn Tyr Asn Gln Leu Lys Ser Ile Asp Asn Gly Gly Thr
 435 440 445

Val Met Leu Ser Thr Ser Gln Phe Thr Gly Asn Phe Ala Lys Tyr Asn
 450 455 460

Ser Asn Gly Asn Leu Val Thr Asp Gly Asn Asn Trp Gly Pro Tyr Leu
 465 470 475 480

Gly Thr Ile Lys Ser Thr Thr Ala Ser Leu Thr Leu Ser Phe Ser Gly
 485 490 495

Gln Thr Thr Gln Val Ala Val Ala Pro Asn Phe Ser Asp Pro Glu
 500 505 510

Asp Lys Thr Pro Lys Leu Thr Leu Glu Gln Ala Leu Val Lys Ala Phe
 515 520 525

Ala Leu Glu Lys Lys Asn Gly Lys Phe Tyr Phe His Gly Leu Glu Ile
 530 535 540

Ser Lys Asn Glu Lys Ile Gln Val Phe Leu Asp Ser Asn Thr Asn Asn
 545 550 555 560

Asp Phe Glu Asn Gln Leu Lys Asn Thr Ala Asp Lys Asp Ile Met His
 565 570 575

Cys Ile Ile Lys Arg Asn Met Asn Ile Leu Val Lys Val Ile Thr Phe
 580 585 590

Lys Glu Asn Ile Ser Ser Ile Asn Ile Ile Asn Asp Thr Asn Phe Gly
 595 600 605

Val Gln Ser Met Thr Gly Leu Ser Asn Arg Ser Lys Gly Gln Asp Gly

WO 02/096467

PCT/GB02/02384

-83-

610 615 620

Ile Tyr Arg Ala Ala Thr Thr Ala Phe Ser Phe Lys Ser Lys Glu Leu
625 630 635 640Lys Tyr Pro Glu Gly Arg Tyr Arg Met Arg Phe Val Ile Gln Ser Tyr
645 650 655Glu Pro Phe Thr Cys Asn Phe Lys Leu Phe Asn Asn Leu Ile Tyr Ser
660 665 670Ser Ser Phe Asp Lys Gly Tyr Tyr Asp Glu Phe Phe Tyr Phe Tyr Tyr
675 680 685Asn Gly Ser Lys Ser Phe Phe Asn Ile Ser Cys Asp Ile Ile Asn Ser
690 695 700Ile Asn Arg Leu Ser Gly Val Phe Leu Ile Glu Leu Asp Lys Leu Ile
705 710 715 720

Ile

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
5 December 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/096467 A3

(51) International Patent Classification: C07K 147/24, 14/33, C12N 15/62, A61K 38/16

(21) International Application Number: PCT/GB02/02384

(22) International Filing Date: 21 May 2002 (21.05.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0112687.9 24 May 2001 (24.05.2001) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): MICROBIOLOGICAL RESEARCH AUTHORITY [GB/GB];

CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG (GB);
Wiltshire SP4 0JG (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SUTTON, John,

Mark [GB/GB]; Microbiological Research Authority, CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG (GB); SHONE, Clifford, Charles [GB/GB]; Microbiological Research Authority, CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG (GB).

(74) Agents: SCHLICH, George, William et al.; Mathys &

Squire, 100 Gray's Inn Road, London WC1X 8AL (GB).

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, 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, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TI, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GL, GM,

KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW);

Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TU, TM);

European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,

GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,

NE, SN, TD, TG).

(85) Published: — with international search report

(88) Date of publication of the international search report:

10 April 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/096467 A3

(54) Title: PHARMACEUTICAL USE FOR SECRETED BACTERIAL EFFECTOR PROTEINS

(57) Abstract: A polypeptide conjugate contains a bacterial injectable effector protein, secreted by a modified pilus or "needle-like" structure comprising a type III or type IV secretion apparatus, and a carrier that targets the conjugate to a target cell. The effector protein is used for a variety of purposes including treatment of neurodegenerative disease, intracellular infection and diseases associated with defects of secretion.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 02/02384
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/24 C07K14/33 C12N15/62 A61K38/16		
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 A61K C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 19393 A (CORNELL RES FOUNDATION INC) 22 March 2001 (2001-03-22) cited in the application page 8, line 30 - line 34 page 14, line 1 - line 23 page 9, line 6 - line 13 ---	1-21, 24-49
Y	WO 98 56817 A (KAROLINSKA INNOVATIONS AB ;PETTERSSON SVEN (SE); WOLF WATZ HANS (S) 17 December 1998 (1998-12-17) cited in the application page 4, line 2 - line 10 ---	22, 23
X	WO 98 56817 A (KAROLINSKA INNOVATIONS AB ;PETTERSSON SVEN (SE); WOLF WATZ HANS (S) 17 December 1998 (1998-12-17) cited in the application page 4, line 2 - line 10 ---	1, 7-17, 26, 31-49
Y	---	2-6, 18-25, 27-30 -/-
<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		
B earlier document but published on or after the international filing date		
L document which may throw doubt on priority, claim(s) or searchability, or which may indicate a date of another citation or other unusual reason (as specified)		
C 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		
** 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 novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken in combination with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		
Date of the actual completion of the International search 22 November 2002		Date of mailing of the International search report 16/01/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patenttaan 2 NL-2280 Rijswijk Tel. (+31-70) 390-3010, Tx. 31 651 epo nl Fax. (+31-70) 390-3016		Authorized officer Schwachtgen, J-L

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		In one Application No PCT/GB 02/02384
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHADDOCK J A ET AL: "A CONJUGATE COMPOSED OF NERVE GROWTH FACTOR COUPLED TO A NON-TOXIC DERIVATIVE OF CLOSTRIDIUM BOTULINUM NEUROTOXIN TYPE A CAN INHIBIT NEUROTRANSMITTER RELEASE IN VITRO" GROWTH FACTORS, HARWOOD ACADEMIC PUBLISHERS GMBH, XX, vol. 18, no. 2, 2000, pages 147-155, XP001064444 ISSN: 0897-7194 the whole document -----	2-6, 18-25, 27-30

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No	
Information on patent family members				PCT/GB 02/02384	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
WO 0119393	A 22-03-2001	AU WO	7577600 A 0119393 A1	17-04-2001 22-03-2001	
WO 9856817	A 17-12-1998	AU EP WO	8049098 A 0998492 A1 9856817 A1	30-12-1998 10-05-2000 17-12-1998	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 21/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 19/00	Z N A
C 0 7 K 19/00	A 6 1 K 37/02	
// C 0 7 K 14/33	C 0 7 K 14/33	
C 0 7 K 14/34	C 0 7 K 14/34	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,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,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ショーン , クリフォード チャールズ

イギリス国 エスピ-4 0 ジェイジー ウィルトシャー , ソールズベリー , ポートン ダウン (番地なし) , ヘルス プロテクション エージェンシー

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA38 BA80 CA07 DA03 GA11 HA17
 4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 BA41
 BA42 CA04 DA01 DB01 DB70 MA17 MA66 NA01 NA07 NA13
 NA14 ZA012 ZA162 ZA592 ZA942 ZB212 ZB322 ZB352 ZC202
 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 MA17 MA66 NA01
 NA07 NA13 NA14 ZA01 ZA16 ZA59 ZA94 ZB21 ZB32 ZB35
 ZC20
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA17 MA66 NA01 NA07 NA13 NA14
 ZA01 ZA16 ZA59 ZA94 ZB21 ZB32 ZB35 ZC20
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA11 DA83 EA21 EA29 FA74