

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6290918号
(P6290918)

(45) 発行日 平成30年3月7日(2018.3.7)

(24) 登録日 平成30年2月16日(2018.2.16)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 39/08	(2006.01)	A 61 K 39/08	Z N A
A 61 K 39/39	(2006.01)	A 61 K 39/39	
A 61 K 47/26	(2006.01)	A 61 K 47/26	
A 61 K 47/36	(2006.01)	A 61 K 47/36	
A 61 K 47/28	(2006.01)	A 61 K 47/28	

請求項の数 13 (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-545783 (P2015-545783)
(86) (22) 出願日	平成25年12月3日 (2013.12.3)
(65) 公表番号	特表2016-502551 (P2016-502551A)
(43) 公表日	平成28年1月28日 (2016.1.28)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2013/075405
(87) 國際公開番号	W02014/086787
(87) 國際公開日	平成26年6月12日 (2014.6.12)
審査請求日	平成28年11月30日 (2016.11.30)
(31) 優先権主張番号	1221875.6
(32) 優先日	平成24年12月5日 (2012.12.5)
(33) 優先権主張国	英國 (GB)

(73) 特許権者	305060279 グラクソsmithkline バイオロジカル ズ ソシエテ アノニム ベルギー ベーー1330 リクセンサー ル リュ ドランスティチュ 89
(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
(74) 代理人	100169971 弁理士 菊田 尚子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫原性組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 単離されたクロストリジウム・ディフィシル(*Clostridium difficile*)トキシンA断片及び/又は単離されたクロストリジウム・ディフィシルトキシンB断片を含むポリペプチドであって、該ポリペプチドが第1の断片及び第2の断片を含み、

(i) 第1の断片がトキシンA繰り返しドメイン断片であり、

(ii) 第2の断片がトキシンB繰り返しドメイン断片であり、

(iii) 第1の断片が第1の近位末端を有し、

(iv) 第2の断片が第2の近位末端を有する、

上記ポリペプチド、並びに

b) リポソームの形で提示される、QS21である免疫学的活性サポニン画分を含むアジュバント

を含む、免疫原性組成物。

【請求項 2】

前記アジュバントがリボ多糖をさらに含む、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項 3】

前記アジュバントがステロールをさらに含み、前記組成物が1:1~1:100 w/w又は1:1~1:10 w/w又は1:1~1:5 w/wのサポニン:ステロールの比でステロールを含む、請求項1又は請求項2に記載の免疫原性組成物。

【請求項 4】

10

20

前記ステロールがコレステロールである、請求項3に記載の免疫原性組成物。

【請求項 5】

アジュvantが、

0.1 ~ 0.5mgのコレステロール、

0.25 ~ 2mgのDOPC、

10 μ g ~ 70 μ gの3D-MPL、及び

10 μ g ~ 70 μ gのQS21

を含む用量で製剤化されている、請求項1 ~ 4のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 6】

ポリペプチドがクロストリジウム・ディフィシルトキシンA繰り返しドメイン断片及び/
又はクロストリジウム・ディフィシルトキシンB繰り返しドメイン断片を含む、請求項1 ~
5のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。 10

【請求項 7】

第1の近位末端及び第2の近位末端がショートリピート-ロングリピート-ショートリピート(SR-LR-SR)部分を破壊しない、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項 8】

第1の近位末端がトキシンAのリピート部分VIII(アミノ酸2645 ~ 2710)内、例えばトキシンAのアミノ酸2700 ~ 2710又は2680 ~ 2690の範囲内にある、請求項1 ~ 7のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 9】

第2の近位末端がトキシンBのリピート部分II(アミノ酸1927 ~ 2057)内、例えばトキシンBのアミノ酸1960 ~ 1970、1988 ~ 1998、又は1867 ~ 1877の範囲内にある、請求項1 ~ 8のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。 20

【請求項 10】

第1の近位末端がトキシンAのリピート部分VIIIのショートリピート2(アミノ酸2665 ~ 2686)内にあり、第2の近位末端がトキシンBのリピート部分Iのショートリピート3(アミノ酸1877 ~ 1896)内にある、又は第1の近位末端がトキシンAのリピート部分VIIIのショートリピート3(アミノ酸2645 ~ 2686)内にあり、第2の近位末端がトキシンBのリピート部分Iのショートリピート1(アミノ酸1834 ~ 1854)内にある、請求項1 ~ 9のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。 30

【請求項 11】

ポリペプチドが、

(i)配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、若しくは配列番号34、若しくは配列番号35、又は
(ii)配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、若しくは配列番号34、若しくは配列番号35と少なくとも90%、95%、98%、99%、若しくは100%の類似性を有する変異体、又は

(iii)配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、若しくは配列番号34、若しくは配列番号35の少なくとも250、280、300、350、380、400、430、450、480、500、530、550、580、若しくは600個のアミノ酸の断片 40

を含む、請求項1 ~ 10のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 12】

ポリペプチドが第1の断片及び第2の断片を含むポリペプチドであり、

(i)第1の断片がトキシンA繰り返しドメイン断片であり、

(ii)第2の断片がトキシンB繰り返しドメイン断片であり、

(iii)第1の断片が第1の近位末端を第1のリピート部分内に含み、 50

(iv) 第2の断片が第2の近位末端を第2のリピート部分内に含み、
第1の断片と第2の断片が互いに隣接しており、第1のリピート部分と第2のリピート部分が
互いに構造的類似性を有する、
請求項1~8のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項13】

クロストリジウム・ディフィシル疾患の予防又は処置のための医薬の製造における請求項1~12のいずれか一項に記載の免疫原性組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

本発明は、クロストリジウム・ディフィシル (*C. difficile*) ポリペプチド及びアルミニウム不含アジュバントを含む免疫原性組成物に関する。本発明はまた、ワクチン組成物、並びに予防若しくは治療における又は医薬の製造における本発明のワクチン及び免疫原性組成物の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

20

*C.ディフィシル*は、院内腸管感染のもっとも重大な原因であり、ヒトの偽膜性大腸炎の主要な原因である (Bartlett et al Am. J. Clin. Nutr. 11 suppl:2521-6 (1980))。*C.ディフィシル*に感染した個体の総関連死亡率は、診断から3ヶ月以内で5.99%であると計算されたが、それより高い死亡率が高齢と関連しており、80歳を超える患者では13.5%であった (karas et al Journal of Infection 561:1-9 (2010))。*C.ディフィシル*感染の現在の治療法は、抗生物質 (メトロニダゾール及びバンコマイシン) 投与であるが、これらの抗生物質に耐性を有する菌株が証明されている (Shah et al., Expert Rev. Anti Infect. Ther. 8(5), 555-564 (2010))。したがって、*C.ディフィシル*に対する抗体、及び/又は*C.ディフィシル*に対する保護的免疫反応を誘導する能力を有する免疫原性組成物が必要である。

【0003】

30

*C.ディフィシル*の腸管毒性は、おもに2つの毒素、トキシンA (ToxA) 及びトキシンB (ToxB) の作用に起因する。トキシンA及びトキシンBのC末端ドメインは繰り返しの単位を含んでいるが、たとえばトキシンAのC末端ドメインは切れ目なく連続する繰り返し単位で構成されており (Dove et al Infect. Immun. 58:480-499 (1990))、こうした理由から、C末端ドメインを「繰り返しドメイン」と呼ぶことができる。これらの繰り返し部分は、Ho et al (PNAS 102:18373-18378 (2005))に記載のように、ショートリピート (SR) 及びロングリピート (LR) にさらに分けることができる。

【0004】

40

*C.ディフィシル*由来の抗原を含む免疫原性組成物は記載されている。W096/12802及びW000/61762及びLyerlyら (Current Microbiology 21:29 ~ 32 (1990))は、ハムスターにおいて保護的免疫反応を誘導するための、トキシンAの断片、特にそのC末端ドメインの断片に関する。W09920304は、ホルムアルデヒド中のインキュベーションにより不活性化された同時精製トキシンA及びトキシンBの混合物に関する。W000/61762は、*C.ディフィシル*のトキシンA及びトキシンBの完全長C末端ドメイン又はC末端ドメインの断片のいずれかを含む免疫原性組成物に関する。同様に、W02012/163817、W02012/163811、及びW02012/163810は、トキシンA及びトキシンBの可能な断片、並びにそれらの融合タンパク質の開示を提供する。

【0005】

免疫原性が向上した新しい組成物又はワクチンが必要とされている。一つのストラテジーとして、アジュバントを用いて、任意の所定の抗原に対して生じる免疫反応を向上させようと試みられている。例えば、W02009035707は、*C.ディフィシル*トキシンA及びBのトキソイド、並びに水酸化アルミニウム化合物などのアジュバントを含む組成物を記載している。

50

【0006】

リポ多糖及びQuillajaサポニンの組み合わせを含有するアジュバントが、以前に、例えば、EP0671948に開示されている。水中油型エマルジョン自体は、当技術分野においてよく知られており、アジュバント組成物として有用であることが示唆されている(EP399843、WO95/17210)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】WO96/12802

【特許文献2】WO00/61762

10

【特許文献3】WO9920304

【特許文献4】WO00/61762

【特許文献5】WO2012/163817

【特許文献6】WO2012/163811

【特許文献7】WO2012/163810

【特許文献8】WO2009035707

【特許文献9】EP0671948

【特許文献10】EP 399843

【特許文献11】WO 95/17210

【非特許文献】

20

【0008】

【非特許文献1】Bartlett et al Am. J. Clin. Nutr. 11 suppl:2521-6 (1980)

【非特許文献2】karas et al Journal of Infection 561:1-9 (2010)

【非特許文献3】Shah et al., Expert Rev. Anti Infect. Ther. 8(5), 555-564 (2010)

【非特許文献4】Dove et al Infect. Immun. 58:480-499 (1990)

【非特許文献5】Ho et al PNAS 102:18373-18378 (2005)

【非特許文献6】Lyerly et al Current Microbiology 21:29-32 (1990)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

30

C. ディフィシルに対する適切な免疫反応を提供するワクチン及び免疫原性組成物の必要性が依然として存在する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

一態様において、本発明は、クロストリジウム・ディフィシル(C. ディフィシル)トキシンA断片及び/又はC. ディフィシルトキシンB断片を含むポリペプチド、並びにリポソームの形で示される免疫学的活性サポニン画分を含むアジュバントを含む免疫原性組成物に関する。免疫学的活性サポニン画分は、QS21であってもよく、リポ多糖は3D-MPLであってもよい。適切には、免疫原性組成物は、約50 μgの3D-MPL及び約50 μgのQS21を含み得る。

【0011】

40

一態様において、本発明は、C. ディフィシルトキシンA断片及び/又はC. ディフィシルトキシンB断片を含むポリペプチド、並びに水中油型エマルジョンを含むアジュバントを含む免疫原性組成物であって、前記水中油型エマルジョンが代謝性油、トコール、及び乳化剤を含む、免疫原性組成物に関する。代謝性油は、約5.35mgの量で存在してもよい。トコールは、約5.94mgの量で存在してもよい。適切には、乳化作用物質は、約2.425mgの量で存在してもよい。適切には、代謝性油はスクアレンであり、トコールは-トコフェロールであり、乳化作用物質は、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートである。

【0012】

適切には、本発明の任意の態様による免疫原性組成物は、C. ディフィシルトキシンA繰り返しドメイン断片及びC. ディフィシルトキシンB繰り返しドメイン断片を含み、トキシ

50

ンA及びトキシンBを中和する抗体を惹起する。本発明のさらなる実施形態において、免疫原性組成物は、C. ディフィシルトキシンA断片及びC. ディフィシルトキシンB断片を含み、その断片の1つがN末端断片であり、その他が繰り返しドメイン断片である。

【 0 0 1 3 】

適切には、本発明の任意の態様による免疫原性組成物は、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号21、配列番号23、配列番号25、又は配列番号27のポリペプチド変異体を含む。

【 0 0 1 4 】

適切には、本発明の任意の態様による免疫原性組成物は、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、若しくは配列番号35、又はこれらの配列のいずれかの変異体若しくは断片を含むポリペプチドを含む。

【 0 0 1 5 】

本発明に係る免疫原性組成物は、肺炎レンサ球菌(*Streptococcus pneumoniae*)(*S. pneumoniae*)、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)(*H. influenzae*)、髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)(*N. meningitidis*)、大腸菌(*Escherichia coli*)(*E. coli*)、カタル球菌(*Moraxella catarrhalis*)(*M. catarrhalis*)、破傷風菌(*Clostridium tetani*)(*C. tetani*)、ジフテリア菌(*Corynebacterium diphtheriae*)(*C. diphtheriae*)、百日咳菌(*Bordetella pertussis*)(*B. pertussis*)、表皮ブドウ球菌(*Staphylococcus epidermidis*)(*S. epidermidis*)、腸球菌(*enterococci*)、及び黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)(*S. aureus*)からなる群から選択される細菌に由来する抗原などの追加の抗原を含んでもよい。

【 0 0 1 6 】

一態様において、本発明は、本発明に係る免疫原性組成物及び薬学的に許容される賦形剤を含むワクチンに関する。

【 0 0 1 7 】

一態様において、本発明は、C. ディフィシル疾患の処置又は予防における本発明に係る免疫原性組成物又はワクチンの使用に関する。

【 0 0 1 8 】

一態様において、本発明は、C. ディフィシル疾患の処置又は予防に用いるための、本発明に係る免疫原性組成物又はワクチンに関する。

【 0 0 1 9 】

一態様において、本発明は、C. ディフィシル疾患の予防又は処置のための医薬の製造における本発明に係る免疫原性組成物又はワクチンの使用に関する。

【 0 0 2 0 】

一態様において、本発明は、本発明に係る免疫原性組成物又はワクチンを対象に投与することを含む、C. ディフィシル疾患を予防又は処置する方法に関する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 1 】

【 図 1 】アジュバントA、QS21を含まないアジュバントA、及びMPLを含まないアジュバントAと共に製剤化されたF2で免疫されたハムスターについての抗ToxA及び抗ToxB ELISA結果を示すグラフである。

【 図 2 】アジュバント非添加F2、又はアジュバントA、アジュバントB、及びミョウバンと共に製剤化されたF2で免疫されたハムスターについての抗ToxA及び抗ToxB ELISA結果を示すグラフである。

【 図 3 】アジュバントB、AS04D、アジュバントA、又はアジュバントC中に製剤化された様々な用量範囲のF2融合タンパク質で免疫された雄及び雌ハムスターのPost I血清についての抗ToxA及び抗ToxB ELISA結果を示すグラフである。

【 図 4 】アジュバントB、AS04D、アジュバントA、又はアジュバントC中に製剤化された様々な用量範囲のF2融合タンパク質で免疫された雄及び雌ハムスターのPost II血清につい

10

20

30

40

50

ての抗ToxA及び抗ToxB ELISA結果を示すグラフである。

【図5】アジュバントB、AS04D、アジュバントA、又はアジュバントC中に製剤化された様々な用量範囲のF2融合タンパク質で免疫された雄及び雌ハムスターのPost III血清についての抗ToxA及び抗ToxB ELISA結果を示すグラフである。

【図6】アジュバントB、AS04D、アジュバントA、又はアジュバントC中に製剤化された様々な用量範囲のF2融合タンパク質で免疫された雄及び雌ハムスターのPost III 87日目の血清についての抗ToxA及び抗ToxB ELISA結果を示すグラフである。

【図7】Post I、II、及びIIIの血清における、アジュバントB、AS04D、アジュバントA、又はアジュバントC中に製剤化された様々な用量範囲のF2融合タンパク質で免疫された雄ハムスターについての抗ToxA及び抗ToxB ELISA結果を示すグラフである。 10

【図8】ミョウバン又はアジュバントA中に製剤化された、混合物(ToxA+ToxB)又はF2融合タンパク質で免疫された雄及び雌ハムスターについての抗ToxA及び抗ToxB ELISA結果を示すグラフである。

【図9】アジュバントB中に製剤化された、トキシンAのC末端の断片(アミノ酸2387～2706)、トキシンBのC末端の断片(アミノ酸1750～2360)、又は融合体1、2、3、4、若しくは5で免疫されたマウスにおける抗ToxA免疫原性を示すグラフである。

【図10】アジュバントB中に製剤化された、トキシンAのC末端の断片(アミノ酸2387～2706)、トキシンBのC末端の断片(アミノ酸1750～2360)、又は融合体1、2、3、4、若しくは5で免疫されたマウスにおける赤血球凝集抑制を示すグラフである。

【図11】アジュバントB中に製剤化された、トキシンAのC末端の断片(アミノ酸2387～2706)、トキシンBのC末端の断片(アミノ酸1750～2360)、又は融合体1、2、3、4、若しくは5で免疫されたマウスにおける抗ToxB免疫原性を示すグラフである。 20

【図12】アジュバントB中に製剤化された、トキシンAのC末端の断片(アミノ酸2387～2706)、トキシンBのC末端の断片(アミノ酸1750～2360)、又は融合体1、2、3、4、若しくは5で免疫されたマウスからの細胞傷害性阻害力値を示すグラフである。

【図13】アジュバントB中に製剤化されたF2、F52New、F54G1y、G54New、又はF5 ToxB融合体で免疫されたマウスについての抗ToxA ELISA結果を示すグラフである。

【図14】アジュバントB中に製剤化されたF2、F52New、F54G1y、F54New、又はF5 ToxB融合体で免疫されたマウスについての抗ToxB ELISA結果を示すグラフである。

【図15】アジュバントB中に製剤化されたF2、F52New、F54G1y、F54New、又はF5 ToxB融合体で免疫されたマウスにおける赤血球凝集抑制を示すグラフである。 30

【図16】アジュバントB中に製剤化されたF2、F52New、F54G1y、F54New、又はF5 ToxB融合体で免疫されたマウスからのHT29細胞における細胞傷害性力値を示すグラフである。

【図17】アジュバントB中に製剤化されたF2、F52New、F54G1y、F54New、又はF5 ToxB融合体で免疫されたマウスからのIMR90細胞における細胞傷害性力値を示すグラフである。

【図18】(アジュバント非添加)C. ディフィシル ToxA-Cter(アミノ酸2387～2706)、ToxB-Cter(アミノ酸1750～2360)、及び融合タンパク質で免疫されたマウスについての抗ToxA ELISA結果を示すグラフである。

【図19】(アジュバント非添加)C. ディフィシル ToxA-Cter(アミノ酸2387～2706)、ToxB-Cter(アミノ酸1750～2360)、及び融合タンパク質で免疫されたマウスについての抗ToxB ELISA結果を示すグラフである。 40

【図20】Post II、III、ブースト前、Post IVの血清における、アジュバントB中に製剤化されたC. ディフィシル ToxA-Cter(アミノ酸2387～2706)、ToxB-Cter(アミノ酸1750～2360)、及び融合タンパク質で免疫されたマウスについての抗ToxA ELISA結果を示すグラフである。

【図21】Post II、III、ブースト前、Post IVの血清における、アジュバントB中に製剤化されたC. ディフィシル ToxA-Cter(アミノ酸2387～2706)、ToxB-Cter(アミノ酸1750～2360)、及び融合タンパク質で免疫されたマウスについての抗ToxB ELISA結果を示すグラフである。

【図22】円二色性を用いて測定された、融合体2、3、4、及び5の遠紫外スペクトルを記 50

載するグラフである。融合体2についてのスペクトルは、小さな四角形で描かれた点を有する線で表され、融合体3についてのスペクトルは、小さな菱形で描かれた点を有する線で表され、融合体4は、円で描かれた点を有する線で表され、融合体5は、十字で描かれた点を有する線で表されている。

【図23】円二色性を用いて測定された、融合体2、3、4、及び5の近紫外スペクトルを記載するグラフである。融合体2についてのスペクトルは、十字で描かれた点を有する線で表され、融合体3についてのスペクトルは、円で描かれた点を有する線で表され、融合体4についてのスペクトルは、三角形で描かれた点を有する線で表され、融合体5についてのスペクトルは、小さな菱形で描かれた点を有する線で表されている。

【図24】円二色性を用いて測定された、融合体F52New、F54Gly、F54New、及びF5 ToxBの遠紫外スペクトルを記載するグラフである。F52Newについてのスペクトルは、二重十字で描かれた点を有する線で表され、F54Glyについてのスペクトルは、三角形で描かれた点を有する線で表され、F54Newは、四角形で描かれた点を有する線で表され、F5 ToxBは、十字で描かれた点を有する線で表されている。

【図25】円二色性を用いて測定された、融合体F52New、F54Gly、F54New、及びF5 ToxBの近紫外スペクトルを記載するグラフである。F52Newについてのスペクトルは、二重十字で描かれた点を有する線で表され、F54Glyについてのスペクトルは、三角形で描かれた点を有する線で表され、F54Newは、四角形で描かれた点を有する線で表され、F5 ToxBは、十字で描かれた点を有する線で表されている。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明者らは、ミョウバンを含まないアジュバント、特に本明細書に記載されたアジュバントA及びアジュバントBなどのアジュバントと共に製剤化されたC. ディフィシルトキシンA断片及び/又はC. ディフィシルトキシンB断片を含むポリペプチドを含む免疫原性組成物が、アジュバント非添加C. ディフィシルポリペプチド含有組成物と比較して、C. ディフィシルに対する免疫反応を向上させることを示している。本発明に係る免疫原性組成物はまた、ミョウバンと共に製剤化されたC. ディフィシルポリペプチドと比較しても、C. ディフィシルに対する免疫反応を向上させ得る。

【0023】

ポリペプチド

C. ディフィシルトキシンA断片及び/又はC. ディフィシルトキシンB断片を含むポリペプチドは、適切にはW09920304に記載されたものなどのホルムアルデヒド中のインキュベーションにより、不活性化されている精製トキシンA又はトキシンBを含んでもよい。

【0024】

ポリペプチドは、C. ディフィシルトキシンA N末端断片及びC. ディフィシルトキシンB繰り返しドメイン断片を含んでもよい。ポリペプチドは、C. ディフィシルトキシンA繰り返しドメイン断片及びC. ディフィシルトキシンB N末端断片を含有してもよい。ポリペプチドは、C. ディフィシルトキシンA繰り返しドメイン断片及びC. ディフィシルトキシンB繰り返しドメイン断片を含んでもよい。

【0025】

ポリペプチドは、C. ディフィシルのトキシンA及びトキシンBの完全長N末端及び/若しくはC末端ドメイン又はその断片のいずれかを含んでもよい。

【0026】

一実施形態において、本発明に係る免疫原性組成物におけるポリペプチドは、C. ディフィシルのトキシンA及び/又はトキシンBの完全長N末端ドメインを含有しない。一実施形態において、本発明に係る免疫原性組成物におけるポリペプチドは、C. ディフィシルのトキシンA及び/又はトキシンBのN末端ドメイン断片を含有しない。

【0027】

ポリペプチドは、融合タンパク質であってもよい。例えば、融合タンパク質は、配列番号36及び37などの融合配列又はW02012/028741に記載された他の配列を含んでもよい。

10

20

30

40

50

【0028】

本ポリペプチドは、第1の断片及び第2の断片を含むものであって、この

- (i) 第1の断片はトキシンAの繰り返しドメイン断片である；
- (ii) 第2の断片はトキシンBの繰り返しドメイン断片である；
- (iii) 第1の断片は、第1のリピート部分内の第1の近位末端を含む；
- (iv) 第2の断片は、第2のリピート部分内の第2の近位末端を含む；並びに

この第1の断片と第2の断片は互いに隣接しており、第1のリピート部分と第2のリピート部分は構造類似性を有する。

【0029】

ポリペプチドという用語は、アミノ酸の連続した配列を意味する。 10

【0030】

「トキシンA繰り返しドメイン」という用語は、C. ディフィシル由来トキシンAタンパク質のC末端ドメインを指しており、これは反復配列を含む。例えば、トキシンAタンパク質のC末端ドメインは、菌株VPI10463 (ATCC43255)由来トキシンAのアミノ酸1832 - 2710、及び/又は異なる菌株におけるそれらの同等物を指す。この菌株VPI10463 (ATCC43255)由来のトキシンAのアミノ酸1832 - 2710は、配列番号1のアミノ酸1832 - 2710に相当する。

【0031】

「トキシンB繰り返しドメイン」という用語は、C. ディフィシル由来トキシンBタンパク質のC末端ドメインを指す。例えば、トキシンBタンパク質のC末端ドメインは、菌株VPI10463 (ATCC43255)由来のトキシンBのアミノ酸1834 - 2366、及び/又は異なる菌株におけるそれらの同等物を指す。この菌株VPI10463 (ATCC43255)由来のトキシンBのアミノ酸1834 - 2366は、配列番号2のアミノ酸1834 - 2366に相当する。 20

【0032】

トキシンAの全長N末端ドメインは、菌株VPI10463 (ATCC43255)由来のトキシンAのアミノ酸1-542、及び/又は異なる菌株におけるそれらの同等物でありうる。したがって、「C. ディフィシル トキシンAのN末端断片」又は「トキシンAのN末端ドメイン断片」という用語は、菌株VPI10463 (ATCC43255)由来のトキシンAのアミノ酸1-542の断片、及び/又は異なる菌株におけるそれらの同等物を指す。菌株VPI10463 (ATCC43255)由来のトキシンAのアミノ酸1-542は、配列番号1のアミノ酸1-542に相当する。

【0033】

トキシンBの全長N末端ドメインは、菌株VPI10463 (ATCC43255)由来のトキシンBのアミノ酸1-543、及び/又は異なる菌株におけるそれらの同等物でありうる。したがって、「C. ディフィシル トキシンBのN末端断片」又は「トキシンBのN末端ドメイン断片」という用語は、菌株VPI10463 (ATCC43255)由来のトキシンBのアミノ酸1-543の断片、及び/又は異なる菌株におけるそれらの同等物を指す。菌株VPI10463 (ATCC43255)由来のトキシンBのアミノ酸1-543は、配列番号2のアミノ酸1-543に相当する。 30

【0034】

C. ディフィシルのトキシンA及びBは、保存されたタンパク質である。しかしながら、その配列は、菌株間で少し異なっている。その上、異なる菌株のトキシンA及びBのアミノ酸配列は、アミノ酸の数が異なる可能性がある。 40

【0035】

一実施形態において、トキシンA繰り返しドメイン及び/又はトキシンB繰り返しドメインは、配列番号1のアミノ酸1832 - 2710に対して少なくとも90%、95%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する変異体、又は配列番号2のアミノ酸1834-2366に対して少なくとも90%、95%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する変異体である配列でありうる。

【0036】

一実施形態において、トキシンA N末端ドメインは、配列番号1のアミノ酸1-542に対して少なくとも90%、95%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する変異体である配列でありうる。一実施形態において、トキシンB N末端ドメインは、配列番号2のアミ 50

ノ酸1-543に対して少なくとも90%、95%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する変異体である配列でありうる。

【0037】

「変異体」は、保存的なアミノ酸置換によって、基準のポリペプチドとは異なるものとなっているポリペプチドであり、これによってある残基が同じ物理化学的性質を有する別の残基で置き換えられている。典型的には、このような置換は、Ala、Val、Leu及びIleの間で；Ser及びThrの間で；酸性残基Asp及びGluの間で；Asn及びGlnの間で：並びに塩基性残基Lys及びArgの間で；又は芳香族残基Phe及びTyrの間で起こる。

【0038】

さらに、アミノ酸ナンバリングは、ある菌株由来のトキシンA（又はトキシンB）と別の菌株由来のトキシンA（又はトキシンB）のC末端ドメイン又はN末端ドメインの間で異なることがある。この理由により、「異なる菌株における同等物（同等な部分）」という用語は、基準となる菌株（たとえばC.ディフィシル VPI10463）のアミノ酸に相当するが、異なる菌株由来の毒素中に見いだされ、したがって異なる番号付けがなされる可能性のある、アミノ酸を意味する。「同等な」アミノ酸の領域は、異なる菌株に由来する毒素の、配列のアラインメントを行うことによって、決定することができる。全体を通して与えられるアミノ酸番号は、菌株VPI10463の番号を指している。

【0039】

ポリペプチド又はタンパク質の「断片」という用語は、そのポリペプチド又はタンパク質からの連続した部分、例えば少なくとも100、150、180、200、230、250、300、350、380、400、450、480、500、530、550、580、又は600アミノ酸の連続した部分を指す。

【0040】

C.ディフィシルの「トキシンAのN末端ドメイン断片」とは、トキシンAの全長N末端ドメインからの連続した部分、例えば少なくとも100、150、180、200、230、250、300、350、380、400、450、480、500又は530アミノ酸の連続した部分を指す。C.ディフィシルの「トキシンBのN末端ドメイン断片」とは、トキシンBの全長N末端ドメインからの連続した部分、例えば少なくとも100、150、180、200、230、250、300、350、380、400、450、480、500又は530アミノ酸の連続した部分を指す。

【0041】

トキシンA繰り返しドメイン断片は、トキシンA繰り返しドメインからの少なくとも100、200、230、250、300、350、380、400、450、480、500、530、550、580又は600アミノ酸の連続した部分とすることができます。トキシンA繰り返しドメイン断片は、750アミノ酸未満、700アミノ酸未満、650アミノ酸未満、600アミノ酸未満、又は580アミノ酸未満の連続した部分としてもよい。トキシンB繰り返しドメイン断片は、トキシンB繰り返しドメインからの少なくとも100、200、230、250、300、350、380、400、450、480、500、530、550、580又は600アミノ酸の連続した部分とすることができます。トキシンB繰り返しドメイン断片は、530アミノ酸未満、500アミノ酸未満、480アミノ酸未満、又は450アミノ酸未満の連続した部分としてもよい。

【0042】

「第1の断片」という用語は、トキシンA繰り返しドメインの少なくとも100アミノ酸の連続した部分、例えば150、180、250、300、350、380、400、450、480、500、530、550、580、又は600アミノ酸の連続した部分を指す。「第2の断片」という用語は、トキシンB繰り返しドメインの少なくとも100アミノ酸の連続した部分、例えば200、230、250、280、300、350、400、450、又は500アミノ酸の連続した部分を指す。

【0043】

「第1の近位末端」という用語は、第1の断片（ToxA断片）の末端であって、第2の断片（ToxB断片）に共有結合しているか、又は第1の断片と第2の断片の間のリンカー配列に共有結合している前記末端を指す。「第2の近位末端」という用語は、第2の断片の末端であって、一次構造（アミノ酸配列）で第1の断片に最も近い前記末端を指す。

【0044】

10

20

30

40

50

トキシンAのC末端ドメインは、8個のリピート部分（リピート部分I、リピート部分II、リピート部分III、リピート部分IV、リピート部分V、リピート部分VI、リピート部分VII、及びリピート部分VIIIと称する）からなる。これらのリピート部分の各々は、さらに、ショートリピート（SR）及びロングリピート（LR）に分けられる（ロングリピートを持たないToxAリピート部分VIIIを除いて）。ロングリピートはそれぞれ、他のロングリピートとある程度の構造及び配列類似性を有する。同様に、ショートリピートは、互いにある程度の配列及び構造上の類似性を有する。同様に、トキシンBのC末端ドメインは、SR及びLRにさらに細分化される5個のリピート部分からなる。リピート部分はそれぞれ、1個のLR、及び2から5個までのSRを含有する（ロングリピートのないToxBリピート部分Vを除いて）。本明細書の上で、「リピート部分」という表現は、ToxAの8個のリピート部分（I、II、III、IV、V、VI、VII、若しくはVIIIと称する）の1つ、又はToxBの5個のリピート部分（I、II、III、IV、若しくはVと称する）の1つ、又はトキシンA若しくはトキシンB繰り返しドメインからの部分リピート部分を指す。本明細書で使用される「第1のリピート部分」という表現は、トキシンA繰り返しドメイン由来のリピート部分（又はリピート部分の一部）を指す。「第2のリピート部分」という表現は、トキシンB繰り返しドメイン由来のリピート部分（又はリピート部分の一部）を指す。
10

【0045】

たとえば、ToxAのリピート部分Iは、SRを3個、及びLRを1個含有しており、これらはそれぞれ、ToxAの1番目のSRI、ToxAの2番目のSRI、ToxAの3番目のSRI、及びToxAのLRIと称することができる。
20

【0046】

第1の近位末端は、第1の断片がそのリピート部分の範囲内にあるアミノ酸で終わっている場合、「リピート部分」内にあるとみなされる（すなわち、第1の近位末端は、リピート部分の配列の一部だけを含有する）。同様に、第2の近位末端は、第2の断片がそのリピート部分の範囲内にあるアミノ酸で終わっている場合、「リピート部分」内にあるとみなされる。たとえば、第1の近位末端は、第1の断片がVPI10463のアミノ酸1833-1923（両端を含む）のいずれか1つ、又は別の菌株の同等物で終わっているならば、「ToxAのリピート部分I」内にある。第1の近位末端は、第1の断片が「ロングリピート」又は「ショートリピート」の範囲内にあるアミノ酸で終わっている場合、「ロングリピート」又は「ショートリピート」内にある。同様に、第2の近位末端は、第2の断片が「ロングリピート」又は「ショートリピート」の範囲内にあるアミノ酸で終わっている場合、「ロングリピート」又は「ショートリピート」内にある。
30

【0047】

各ドメインのアミノ酸位置は、菌株VPI10463 (ATCC43255) 由来のトキシンA及びトキシンBについて定義した。これらの位置は次の通りである（表1）。

【0048】

【表 1】

名称		開始位置	終了位置
ToxA_I	SR1	1832	1852
	SR2	1853	1873
	SR3	1874	1893
	LR	1894	1924
	SR1	1925	1944
ToxA_II	SR2	1945	1965
	SR3	1966	1986
	SR4	1987	2007
	SR5	2008	2027
	LR	2028	2058
ToxA_III	SR1	2059	2078
	SR2	2079	2099
	SR3	2100	2120
	SR4	2121	2141
	SR5	2142	2161
ToxA_IV	LR	2162	2192
	SR1	2193	2212
	SR2	2213	2233
	SR3	2234	2253
	SR4	2254	2275
ToxA_V	LR	2276	2306
	SR1	2307	2326
	SR2	2327	2347
	SR3	2348	2368
	SR4	2369	2389
	SR5	2390	2409
	LR	2410	2440

10

20

30

ToxA_VI	SR1	2441	2460
	SR2	2461	2481
	SR3	2482	2502
	SR4	2503	2522
	LR	2523	2553
ToxA_VII	SR1	2554	2573
	SR2	2574	2594
	SR3	2595	2613
	LR	2614	2644
ToxA_VIII	SR1	2645	2664
	SR2	2665	2686
	SR3	2687	2710
ToxB_I	SR1	1834	1854
	SR2	1855	1876
	SR3	1877	1896
	LR	1897	1926
ToxB_II	SR1	1927	1946
	SR2	1947	1967
	SR3	1968	1987
	SR4	1988	2007
	SR5	2008	2027
	LR	2028	2057
ToxB_III	SR1	2058	2078
	SR2	2079	2099
	SR3	2100	2119
	SR4	2120	2139
	SR5	2140	2159
	LR	2160	2189
ToxB_IV	SR1	2190	2212
	SR2	2213	2233
	SR3	2234	2253
	SR4	2254	2273
	SR5	2274	2293
	LR	2294	2323
ToxB_V	SR1	2324	2343
	SR2	2344	2366

【 0 0 4 9 】

一実施形態において、トキシンAのリピート部分は、トキシンA(配列番号1)のアミノ酸1832-1924、1925-2058、2059-2192、2193-2306、2307-2440、2441-2553、2554-2644、若しくは2645-2710、又はC.ディフィシルの異なる菌株におけるそれらの同等物を指す。

10

20

30

40

50

別の実施形態において、トキシンBのリピート部分は、トキシンB(配列番号2)のアミノ酸1834-1926、1927-2057、2058-2189、2190-2323、若しくは2324-2366、又はC.ディフィシルの異なる菌株におけるそれらの同等物を指す。

【0050】

「ショートリピート」という用語は、トキシンA(配列番号1)のアミノ酸1832-1852、1853-1873、1874-1893、1925-1944、1945-1965、1966-1986、1987-2007、2008-2027、2059-2078、2079-2099、2100-2120、2121-2141、2142-2161、2193-2212、2213-2233、2234-2253、2254-2275、2307-2326、2327-2347、2348-2368、2369-2389、2390-2409、2441-2460、2461-2481、2482-2502、2503-2522、2554-2573、2574-2594、2595-2613、2645-2664、2665-2686、若しくは2687-2710、又はトキシンB(配列番号2)のアミノ酸1834-1854、1855-1876、1877-1896、1927-1946、1947-1967、1968-1987、1988-2007、2008-2027、2058-2078、2079-2099、2100-2119、2120-2139、2140-2159、2190-2212、2213-2233、2234-2253、2254-2273、2274-2293、2324-2343、若しくは2344-2366、又はC.ディフィシルの異なる菌株におけるそれらの同等物を指すといえる。 10

【0051】

同様に、「ロングリピート」という用語は、トキシンA(配列番号1)のアミノ酸1894-1924、2028-2058、2162-2192、2276-2306、2410-2440、2523-2553、若しくは2614-2644、又はトキシンB(配列番号2)のアミノ酸1897-1926、2028-2057、2160-2189、若しくは2294-2323、又はC.ディフィシルの異なる菌株におけるそれらの同等物を指すといえる。 20

【0052】

本発明のポリペプチドは、前駆体若しくは融合タンパク質などの、もっと大きなタンパク質の一部であってもよい。複数のヒスチジン残基などの、精製に役立つ配列を含有する追加のアミノ酸配列、又は組換え体製造中の安定性のための追加の配列を含んでいることは、多くの場合有利である。さらに、最終的な分子の免疫原性能力を高めるために、外来ポリペプチド又は脂質テール又はポリヌクレオチド配列を追加することも考慮される。 30

【0053】

「隣接する」という用語は、一次構造において20個以下、15個以下、10個以下、8個以下、5個以下、2個以下、1個以下、又は0個のアミノ酸で隔てられていることを意味する。 35

【0054】

断片は、第1の断片のN末端が第2の断片のC末端に隣接するように、あるいはまた第1の断片のC末端が第2の断片のN末端に隣接するように、又は第1の断片のC末端が第2の断片のC末端に隣接するように、又は第1の断片のN末端が第2の断片のN末端に隣接するように、配置することができる。 40

【0055】

2つの配列は、それらが30%、50%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%を超える又は100%の配列同一性を有する場合に互いに「配列類似性」を有することになる。 45

【0056】

「同一性」という用語は、当技術分野で知られている。同一性は、場合によって、配列を比較することによって決定される、2つ以上のポリペプチド配列、又は2つ以上のポリヌクレオチド配列の間の関係性である。当技術分野において、「同一性」は、場合によって、一列に並んだポリペプチド又はポリヌクレオチド配列間の一致によって決定される、そうした配列間の配列関連性の程度も意味する。「同一性」は、既知の方法によって容易に計算することが可能であり、その方法にはComputational Molecular Biology, Lesk, A.M.編、Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W.編、Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M.及びGriffin, H.G.編、Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; 及びSequence Analysis Primer, Gribskov, M.及びDevereux, J.編、M Stockton Press, New York, 1991; 並びにCarillo, H.及びLipman, D., SIAM J. Applied Math., 45

8: 1073 (1988)に記載のものがあるがそれらに限定されない。同一性を決定する方法は、テストする配列間で最大の一一致を与えるようにデザインされる。さらに、同一性を決定する方法は、公開されているコンピュータープログラムで体系化される。2つの配列間の同一性を決定するためのコンピュータープログラム法には、Needleプログラム、BLASTP、BLASTN (Altschul, S.F. et al., J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990))、及びFASTA(Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85; 2444-2448 (1988))があるがこれに限定されない。BLASTファミリーのプログラムは、NCBI及び他のソースから公開されている (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990))。よく知られているSmith Watermanアルゴリズムも同一性を決定するために使用することができる。

10

【 0 0 5 7 】

一例では、ポリペプチド配列比較のためのパラメーターには下記のものがある：
 アルゴリズム : Needleman and Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970)
 比較行列 : BLOSSUM62、Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992)より
 ギャップペナルティ : 10
 ギャップ伸長ペナルティ : 0.5
 これらのパラメーターを用いた有用なプログラムは、'Needle' プログラムとしてEMBOSSパッケージから公開されている (Rice P. et al., Trends in Genetics 2000 col.16(6):276-277)。前記パラメーターは、ペプチド比較のためのデフォルトパラメーターである (末端ギャップに対するペナルティを加えない)。

20

【 0 0 5 8 】

一実施形態において、第1のリピート部分及び第2のリピート部分は、互いに高い構造類似性を有する。2つの配列は、それらの配列同一性が40%、45%、50%又は60%よりも高い場合に、高い構造類似性を有するとみなされる。高い配列同一性の存在は、配列アライメントを可能にするソフトウェア (EMBOSS、Blast、...) を用いて決定することができる。3Dモデル構造は、あるタンパク質について、それが既知の3D構造を有するタンパク質と40%、45%、50%又は60%を超える配列同一性を有する場合に、SwissModelウェブサーバを用いて忠実に構築することができる。

30

一実施形態において、本発明のポリペプチドは、トキシンA又はトキシンBを中和する抗体を惹起する。別の実施形態において、ポリペプチドはトキシンAを中和する抗体を惹起する。他の実施形態において、ポリペプチドはトキシンBを中和する抗体を惹起する。他の実施形態において、ポリペプチドはトキシンA及びトキシンBを中和する抗体を惹起する。「中和抗体を惹起する」という表現は、その組成物を用いて、哺乳動物、例えばマウス、モルモット又はヒトを免疫した場合に、その哺乳動物が中和抗体を生成することを意味する。

【 0 0 6 0 】

ポリペプチドが毒素に対する中和抗体を惹起するかどうかは、そのポリペプチドを含有する免疫原性組成物でマウスを免疫し、血清を採取して、血清の抗毒素力値を酵素連結免疫吸着アッセイ (ELISA) で分析することによって、評価することができる。血清は、免疫されていないマウスから得られる基準サンプルと比較することができる。この方法の例は、実施例 6 に見いだすことができる。本発明のポリペプチドは、そのポリペプチドに対する血清が、基準サンプルを10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、又は100%を超える高いELISAの計測値を与えるならば、トキシンAを中和する抗体を惹起している。

40

【 0 0 6 1 】

他の実施形態において。本発明のポリペプチドは、C.ディフィシル菌株に対する、哺乳動物宿主の保護的免疫反応を惹起する。「保護的免疫応答を惹起する」という文章は、本発明の免疫原性組成物を用いて、マウス、モルモット又はヒトなどの哺乳動物を免疫し、その哺乳動物がC.ディフィシルによって引き起こされる死から哺乳動物を保護することが

50

できる抗体を生成することを意味する。一実施形態において、哺乳動物宿主は、マウス、ウサギ、モルモット、サル、非ヒト靈長類又はヒトからなる群から選択される。一実施形態において、哺乳動物宿主はマウスである。他の実施形態において、哺乳動物宿主はヒトである。

【0062】

ポリペプチドが哺乳動物宿主においてC.ディフィシル菌株に対する保護的免疫反応を惹起するかどうかは、チャレンジアッセイで判定することができる。こうしたアッセイでは、哺乳動物宿主はポリペプチドによるワクチン接種を受けてから、C.ディフィシルに暴露することで攻撃を受ける。攻撃後にその哺乳動物が生存する期間を、ポリペプチドで免疫されていない参考哺乳動物が生存する期間と比較する。ポリペプチドは、そのポリペプチドで免疫された哺乳動物が、該ポリペプチドによる免疫を受けなかった参考哺乳動物と比べて、C.ディフィシルによる攻撃後に、少なくとも10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、又は100%長く生存すれば、保護的免疫反応を惹起している。一実施形態において、本発明のポリペプチドは、マウス、モルモット、サル又はヒトからなる群より選択される哺乳動物において、C.ディフィシルに対する保護的免疫応答を惹起する。一実施形態において、哺乳動物はマウスであり、別の実施形態において、哺乳動物はヒトである。10

【0063】

トキシンA及びBのC末端(リピート)ドメインの天然構造は、伸長したソレノイド様構造からなる。この構造は、Ho et al (PNAS 102:18373-18378 (2005))で明らかのように、基本的にシート構造からなり、少しのヘリックス構造を伴う。存在する二次構造は、円二色性(CD)を用いて決定することができる。たとえば、遠紫外領域(190-250nm)におけるCDスペクトルの形及び大きさを測定し、その結果を既知の構造と比較することによって、二次構造を決定することができる。これは、たとえば下記の実施例5に示すように、Jasco J-720分光偏光計にて1nmの分解能及び帯域幅で、178から250nmまで0.01cmの光路を用いて、実施することができる。20

【0064】

ある実施形態において、第1の断片は、28%、25%、23%、20%、18%、15%、10%、又は7%未満のヘリックス二次構造を含有する。ある実施形態において、第2の断片は、28%、25%、23%、20%、18%、15%、10%、又は7%未満のヘリックス二次構造を含有する。他の実施形態において、第1の断片及び第2の断片はどちらも、28%、25%、23%、20%、18%、15%、10%、又は7%未満のヘリックス二次構造を含有する。30

【0065】

ある実施形態において、第1の断片は、20%、25%、28%、30%、33%、35%、38%、40%、又は42%を超えるシート構造を含有する。ある実施形態において、第2の断片は、20%、25%、28%、30%、33%、35%、38%、40%、又は42%を超えるシート構造を含有する。他の実施形態において、第1の断片及び第2の断片はいずれも、20%、25%、28%、30%、33%、35%、38%、40%、又は42%を超えるシート構造を含有する。

【0066】

ある実施形態において、第1の近位末端は、トキシンAのリピート部分V(配列番号1のアミノ酸2307-2440、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)、リピート部分VI(配列番号1のアミノ酸2441-2553、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)、リピート部分VII(配列番号1のアミノ酸2554-2644、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)、又はリピート部分VIII(配列番号1のアミノ酸2645-2710、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内にある。他の実施形態において、第1の近位末端は、トキシンAのリピート部分VII(配列番号1のアミノ酸2554-2644、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内にある。他の実施形態において、第1の近位末端は、トキシンAのリピート部分VIII(配列番号1のアミノ酸2645-2710、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内にある。

【0067】

ある実施形態において、第2の近位末端は、トキシンBのリピート部分I(配列番号2のアミノ酸1834-1926、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)、リピート部分II(配列40

番号2のアミノ酸1927-2057、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)、又はリピート部分III(配列番号2のアミノ酸2058-2189、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内にある。他の実施形態において、第2の近位末端は、トキシンBのリピート部分II(配列番号2のアミノ酸1927-2057、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内にある。他の実施形態において、第2の近位末端は、トキシンBのリピート部分I(配列番号2のアミノ酸1834-1926、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内にある。

【0068】

ある実施形態において、第1の近位末端はロングリピート内にある。第1の近位末端は、トキシンAのロングリピートV(配列番号1のアミノ酸2410-2440、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内、又はトキシンAのロングリピートVI(配列番号1のアミノ酸2523-2553、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内、又はトキシンAのロングリピートVI(配列番号1のアミノ酸2614-2644、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内にある。

10

【0069】

ある実施形態において、第2の近位末端は、ロングリピート内にある。第2の近位末端は、トキシンBのロングリピートI(配列番号2のアミノ酸1897-1926、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内、又はトキシンBのロングリピートII(配列番号2のアミノ酸2028-2057、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内、又はトキシンBのロングリピートIII(配列番号2のアミノ酸2160-2189、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内にある。

20

【0070】

別の実施形態において、第1の近位末端及び第2の近位末端はいずれもロングリピート内にある。一実施形態において、第1の近位末端は、トキシンAのロングリピートV(配列番号1のアミノ酸2410-2440、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内、トキシンAのロングリピートVI(配列番号1のアミノ酸2523-2553、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内、又はトキシンAのロングリピートVII(配列番号1のアミノ酸2614-2644、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内にあり、第2の近位末端は、トキシンBのロングリピートI(配列番号2のアミノ酸1897-1926、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内、又はトキシンBのロングリピートII(配列番号2のアミノ酸2028-2057、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内、又はトキシンBのロングリピートIII(配列番号2のアミノ酸2160-2189、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内にある。一実施形態において、第1の近位末端はトキシンAのロングリピートVII(配列番号1のアミノ酸2614-2644、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内にあり、第2の近位末端はトキシンBのロングリピートII(配列番号2のアミノ酸2028-2057、若しくは異なる菌株のそれらと同等の部分)内にある。

30

【0071】

一実施形態において、第1の近位末端はトキシンAのアミノ酸2620-2660の範囲内にある。一実施形態において、第2の近位末端は、トキシンBのアミノ酸2030-2050の範囲内にある。別の実施形態において、第1の近位末端はトキシンAのアミノ酸2620-2660の範囲内にあり、第2の近位末端はトキシンBのアミノ酸2030-2050の範囲内にある。

40

【0072】

ある実施形態において、第1の断片は、少なくとも100、150、180、200、240、250、280、300、330、350、380、400、430、450、480、500又は530個のアミノ酸を含む。ある実施形態において、第2の断片は、少なくとも100、130、150、180、200、230、250、270、300、330、350、390、又は400個のアミノ酸を含む。

【0073】

ある実施形態において、ポリペプチドはさらにリンカーを含む。このリンカーは、第1の近位末端と第2の近位末端との間にあってもよいが、あるいは、リンカーは、第1の断片及び/又は第2の断片の遠位末端を他のアミノ酸配列に連結していてもよい。

【0074】

50

ペプチドリンカー配列は、第1の断片と第2の断片を隔てるために用いることができる。このようなペプチドリンカー配列は、当技術分野で周知の標準的な方法を用いて融合タンパク質に組み入れられる。適当なペプチドリンカー配列は、次の要因に基づいて選択することができる：(1) フレキシブルな伸びたコンフォメーションをとることができること；(2) 第1の断片及び/又は第2の断片上の機能性エピトープと相互作用しうる二次構造をとることができないこと；並びに(3) ToxA及び/又はToxBの機能性エピトープと反応する可能性のある疎水性若しくは荷電残基がないこと。ペプチドリンカー配列は、グリシン(Gly)、アスパラギン(Asn)、及びセリン(Ser)残基を含有することができる。他の中性に近いアミノ酸、Thr及びAlaなどもリンカー配列に使用することができる。リンカーとして有効に使用することができるアミノ酸配列には、Maratea et al., Gene 40:39-46 (1985); Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262 (1986)；米国特許第4,935,233号、及び米国特許第4,751,180号に記載のものが含まれる。リンカー配列は、一般的に1～約50アミノ酸の長さである。

【0075】

ある実施形態において、リンカーは1-20、1-15、1-10、1-5、1-2、5-20、5-15、5-15、10-20、又は10-15個のアミノ酸を含む。ある実施形態において、リンカーは、グリシンリンカーであって、リンカーは、多数(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、17、又は20個)の連続したグリシン残基を含んでいてもよく、あるいはまた、リンカーは、いくつかのグリシン残基及びいくつかの他のアミノ酸、たとえばアラニンなどを含んでいてもよい。他の実施形態において、リンカーは1つのグリシン残基を含有する。

【0076】

ある実施形態において、本発明のポリペプチドは、大きな融合タンパク質の一部である。融合タンパク質は、他のタンパク質抗原の免疫原性部分をコードするアミノ酸を追加して含有することができる。たとえば、融合タンパク質は、肺炎レンサ球菌(*S.pneumoniae*)、インフルエンザ菌(*H.influenzae*)、髄膜炎菌(*N.meningitidis*)、大腸菌(*E.coli*)、カタル球菌(*M.catarrhalis*)、破傷風菌(*C.tetani*)、ジフテリア菌(*C.diphtheriae*)、百日咳菌(*B.pertussis*)、表皮ブドウ球菌(*S.epidermidis*)、腸球菌、黄色ブドウ球菌(*S.aureus*)、及び緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)からなる群から選択される細菌から得られ、又は導き出されるタンパク質抗原の免疫原性部分をさらに含有することができる。この場合、リンカーは第1の断片若しくは第2の断片と、他のタンパク質抗原の免疫原性部分との間にあってもよい。

【0077】

「その免疫原性部分」又は「免疫原性断片」という用語は、その断片が、細胞傷害性Tリンパ球、ヘルパーTリンパ球、又はB細胞によって認識されるエピトープを含んでいるような、ポリペプチドの断片を指す。好適には、免疫原性部分は、基準配列のアミノ酸の少なくとも30%、適切には少なくとも50%、特に少なくとも75%、そして特に少なくとも90%（たとえば95%又は98%）を含有する。一実施形態において、免疫原性部分は、基準配列のエピトープ領域のすべてを含有する。

【0078】

本明細書に記載するC.ディフィシリトルキシンA繰り返しドメイン断片及びC.ディフィシリトルキシンB繰り返しドメイン断片の特定の融合タンパク質を含む本発明に係る免疫原性組成物はまた、既知のC.ディフィシリルポリペプチド又は断片を含む組成物と比較して、C.ディフィシリルに対する改善された免疫応答を提供することが予想される。

【0079】

アジュバント

本明細書に開示する免疫原性組成物は、アルミニウム不含アジュバントと組み合わされた少なくとも1つのC.ディフィシリルポリペプチドを含む。ポリペプチドは、アルミニウム又はアルミニウム塩を含まないアジュバント、すなわちアルミニウム不含アジュバント又はアジュバント系と共に製剤化される。

【0080】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、C.ディフィシルポリペプチドは、リポソームの形態で提示される免疫学的活性を有するサポニン画分を含むアジュバントを用いて製剤化される。アジュバントはさらにリポ多糖を含んでもよい。アジュバントはQS21を含む。例えば、一実施形態において、アジュバントは、リポソーム製剤中のQS21を含有する。一実施形態において、アジュバント系は3D-MPL及びQS21を含む。例えば、一実施形態において、アジュバントは、リポソーム製剤中の3D-MPL及びQS21を含有する。場合により、アジュバント系はまたコレステロールを含有してもよい。具体的な一実施形態において、アジュバントはQS21及びコレステロールを含む。場合により、アジュバント系は、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)を含有する。例えば、1つの具体的な例において、アジュバント系は、コレステロール、DOPC、3D-MPL及びQS21を含有する。

10

【0081】

具体的な一例において、免疫原性組成物は、約0.1～約0.5mgのコレステロール；約0.25～約2mgのDOPC；約10 μg～約100 μgの3D-MPL；及び約10 μg～約100 μgのQS21を含む用量で製剤化されているアジュバントを含む。別の具体的な例において、免疫原性組成物は約0.1～約0.5mgのコレステロール、約0.25～約2mgのDOPC、約10 μg～約100 μgの3D-MPL、及び約10 μg～約100 μgのQS21を含む用量で製剤化されているアジュバントを含む。別の具体的な製剤において、アジュバントは、約0.1～約0.5mgのコレステロール、約0.25～約2mgのDOPC、約10 μg～約70 μgの3D-MPL、及び約10 μg～約70 μgのQS21を含む用量で製剤化されている。具体的な一製剤において、アジュバントは、約0.25 mgのコレステロール；約1.0 mgのDOPC；約50 μgの3D-MPL；及び約50 μgのQS21を含む単一用量で製剤化される。他の実施形態において、免疫原性組成物は、分割用量（すなわち、前記単一用量製剤の分割である用量、例えば前記成分（コレステロール、DOPC、3D-MPL及びQS21）の量の2分の1、前記成分の量の4分の1、又は前記成分の量の別の分割用量（例えば、1/3、1/6など））で製剤化される。

20

【0082】

一実施形態において、本発明に係る免疫原性組成物は、以前に、例えばEP0671948に開示された、リポ多糖及びキラヤ(Quillaja)サポニンの組み合わせを含有するアジュバントを含む。この特許は、リポ多糖(3D-MPL)をキラヤサポニン(QS21)と組み合わせた場合の強力な相乗作用を実証した。

30

【0083】

アジュバントはさらに、免疫刺激オリゴヌクレオチド（例えばCpG）又はキャリアをさらに含んでもよい。

【0084】

本発明における使用のため特に好適なサポニンは、Quill A及びその誘導体である。Quill Aは、南米の樹木キラヤ・サボナリア・モリナ(Quillaja Saponaria Molina)から単離されたサポニン調製物であり、Dalsgaardら、1974(「サポニンアジュバント」、Archiv. für die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254)によってアジュバント活性を有すると初めて記載された。Quill Aの精製断片、例えば、QS7及びQS21(QA7及びQA21としても知られる)は、Quill Aに関連する毒性なしにアジュバント活性を保持するHPLCにより単離された(EP 0 362 278)。QS21は、CD8+細胞傷害性T細胞(CTL)、Th1細胞及び主なIgG2a抗体応答を誘導するキラヤ・サボナリア・モリナの樹皮から誘導された天然サポニンであり、本発明の内容において好ましいサポニンである。

40

【0085】

特定の実施形態において、QS21は、外因性ステロール、例えばコレステロールなどでクエンチされる場合により反応原性の低い組成物において提供される。外因性コレステロールによってQS21がクエンチされる反応原性の低い組成物のいくつかの特定の形態が存在する。特定の実施形態において、サポニン/ステロールは、リポソーム構造の形態で存在する(WO 96/33739、実施例1)。この実施形態において、リポソームは、中性脂質、例えばホスファチジルコリン(室温で好適な非晶質である)、例として卵黄ホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)又はジラウリルホスファチジルコリンを

50

好適に含有する。リポソームはまた、飽和脂質から構成されるリポソームについてリポソーム-QS21構造の安定性を増大する荷電脂質を含有してもよい。これらの場合、荷電脂質の量は、好適には1~20% w/w、好ましくは5~10%である。リン脂質に対するステロールの比は1~50% (mol/mol)、好適には20~25%である。

【0086】

好適なステロールは、 β -シトステロール、スチグマステロール、エルゴステロール、エルゴカルシフェロール及びコレステロールを含む。特定の一実施形態において、アジュバント組成物は、ステロールとしてコレステロールを含む。これらのステロールは当技術分野で周知であり、例えばコレステロールはMerck Index, 11th Edn., 341頁に動物脂肪にみられる天然のステロールとして開示されている。

10

【0087】

活性サポニン画分がQS21である場合、QS21:ステロールの比が典型的には1:100~1:1 (w/w)のオーダーの範囲内、好適には1:10~1:1 (w/w)であり、好ましくは1:5~1:1 (w/w)である。好適には、過剰なステロールが存在し、QS21:ステロールの比は少なくとも1:2 (w/w)である。一実施形態において、QS21:ステロールの比は1:5 (w/w)である。ステロールは、好適にはコレステロールである。

【0088】

一実施形態において、本発明は、免疫学的活性サポニン、好ましくはQS21を、60 μ g以下のレベル、例えば1~60 μ gのレベルで含む免疫原性組成物の用量を提供する。一実施形態において、免疫原性組成物の用量は、QS21を、用量あたりおよそ約50 μ gのレベル、例えば45~55 μ g、好適には46~54 μ g又は47~53 μ g又は48~52 μ g又は49~51 μ g、又は50 μ gのレベルで含む。

20

【0089】

別の実施形態において、免疫原性組成物の用量は、QS21を、約25 μ g、例えば20~30 μ g、好適には21~29 μ g又は22~28 μ g又は23~27 μ g又は24~26 μ g、又は25 μ gのレベルで含む。

【0090】

別の実施形態において、免疫原性組成物の用量は、QS21を、当たり約10 μ g、例えば5~15 μ g、好適には6~14 μ g、例えば7~13 μ g又は8~12 μ g又は9~11 μ g、又は10 μ gのレベルで含む。

30

【0091】

具体的には、0.5 mlワクチン用量体積は、用量あたり25 μ g又は50 μ gのQS21を含有する。具体的には、0.5 mlワクチン用量体積は、用量あたり50 μ gのQS21を含有する。

【0092】

リポ多糖は、リピドAの非毒性誘導体、特にモノホスホリルリピドA、又はより具体的には3-脱アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL)とすることができます。

【0093】

3D-MPLはGlaxoSmithKline Biologicals N.A.からMPLという名称で販売されており、本明細書全体を通してMPL又は3D-MPLと称するものとする。例えば、米国特許第4,436,727号；第4,877,611号；第4,866,034号及び第4,912,094号を参照されたい。3D-MPLは主にIFN-(Th1)表現型を有するCD4+T細胞応答を促進する。3D-MPLはGB2220211 Aに開示されている方法に従って製造することができる。化学的には、3D-MPLは3、4、5又は6アシル化鎖を有する3-脱アシル化モノホスホリルリピドAの混合物である。本発明の組成物においては、小粒子3D-MPLを使用することが好ましい。小粒子3D-MPLは、0.22 μ mフィルターに通して滅菌ろ過できるような粒径を有する。かかる調製物はWO94/21292に記載されている。

40

【0094】

したがって、本発明は、リポ多糖、好ましくは3D-MPLを、75 μ g以下、例えば1~60 μ gのレベルで含む免疫原性組成物の用量を提供する。一実施形態において、リポ多糖は用量

50

あたり約50 μgの量で存在する。

【0095】

一実施形態において、免疫原性組成物の用量は、3D-MPLを、約50 μg、例えば45～55 μg、好適には46～54 μg又は47～53 μg又は48～52 μg又は49～51 μg、又は50 μgのレベルで含む。

【0096】

一実施形態において、免疫原性組成物の用量は、3D-MPLを、約25 μg、例えば20～30 μg、好適には21～29 μg又は22～28 μg又は23～27 μg又は24～26 μg、又は25 μgのレベルで含む。

【0097】

別の実施形態において、免疫原性組成物の用量は、3D-MPLを、約10 μg、例えば5～15 μg、好適には6～14 μg、例えば7～13 μg又は8～12 μg又は9～11 μg、又は10 μgのレベルで含む。

【0098】

一実施形態において、用量の体積は0.5 mlである。別の実施形態において、免疫原性組成物は、0.5 mlよりも大きい体積の用量に好適な体積、例えば0.6、0.7、0.8、0.9又は1 mlである。別の実施形態において、ヒトの用量は1 ml～1.5 mlである。

【0099】

具体的には、0.5 mlワクチン用量体積は、用量あたり25 μg又は50 μgの3D-MPLを含有する。

具体的には、0.5 mlワクチン用量体積は、用量あたり50 μgの3D-MPLを含有する。

【0100】

本発明のいずれかの態様の免疫原性組成物の用量は、好適にはヒト用量を指す。「ヒト用量」という用語は、ヒトへの使用に好適な体積にある用量を意味する。一般的には、これは0.3～1.5 mlである。一実施形態において、ヒト用量は0.5 mlである。別の実施形態において、ヒト用量は、0.5 mlより大きく、例えば0.6、0.7、0.8、0.9又は1 mlである。別の実施形態において、ヒト用量は1 ml～1.5 mlである。

【0101】

本発明の好適な組成物は、最初にMPLを使用しないでリポソームを調製し(WO 96/33739に記載のように)、続いてMPLを、好適には100nm以下の粒子又は0.22 μm膜を通した滅菌濾過を受けることができる粒子の小粒子として添加するものである。したがって、MPLは、小胞膜内には含まれない(MPLアウトとして知られる)。MPLが小胞膜内に含まれる組成物(MPLインとして知られる)もまた本発明の一態様を構成する。C. ディフィシルトキシンA断片及び/又はC. ディフィシルトキシンB断片を含むポリペプチドは、小胞膜内に含まれてもよいし、又は小胞膜外に含まれてもよい。

【0102】

特定の実施形態において、QS21及び3D-MPLは、免疫原性組成物の用量あたり同じ最終濃度で存在する。この実施形態の一態様では、免疫原性組成物の用量は、25 μgの3D-MPL及び25 μgのQS21、又は50 μgの3D-MPL及び50 μgのQS21の最終レベルを含む。

【0103】

一実施形態において、アジュバントは、水中油型エマルジョンを含む。例えば、水中油型エマルジョンは、代謝性油を組み込む油相、及び追加の油相成分、例えばトコールを含むことができる。水中油型エマルジョンはまた、水性成分、例えば緩衝化生理食塩水溶液(例えばリン酸緩衝化生理食塩水など)を含んでもよい。さらに、水中油型エマルジョンは典型的には、乳化剤を含む。一実施形態において、代謝性油はスクアレンである。一実施形態において、トコールは -トコフェロールである。一実施形態において、乳化剤は、非イオン性界面活性剤乳化剤(例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、TWEEN80(商標))である。例示的な実施形態において、水中油型エマルジョンは、スクアレン及び -トコフェロールを1 (w/w)に等しい又はそれ未満の比で含有する。

【0104】

10

20

30

40

50

水中油型エマルジョン中の代謝性油は、0.5～10mgの量で存在することができる。水中油型エマルジョン中のトコールは、0.5～11mgの量で存在することができる。水中油型エマルジョン中の乳化作用物質は、0.4～4mgの量で存在することができる。

【0105】

任意の水中油型組成物をヒト投与にとって好適なものとするために、エマルジョン系の油相は代謝性油を含む必要がある。用語「代謝性油」の意味は当業界でよく知られている。代謝可能性を、「代謝により変換され得ること」と定義することができる(Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company、第25版(1974))。この油は、レスピエントに対して毒性的ではなく、代謝により変換され得る任意の植物油、魚油、動物油又は合成油であってよい。堅果(ナッツ)、種子、及び穀物は、植物油の一般的な供給源である。合成油もまた本発明の一部であり、NEOBEE(登録商標)、(植物油源由来のグリセロールとココナッツ若しくはパーム核油由来の中鎖脂肪酸(MCT)を用いて製造されたカプリル酸/カプリン酸トリグリセリド)及び他のものなどの市販の油が挙げられる。特に好適な代謝性油は、スクアレンである。スクアレン(2,6,10,15,19,23-ヘキサメチル-2,6,10,14,18,22-テトラコサヘキサエン)は、サメの肝油中に大量に認められ、オリーブ油、小麦胚種油、ぬか油、及び酵母中に少量に認められる不飽和の油であり、本発明における使用にとって特に好ましい油である。スクアレンは、それがコレステロールの生合成における中間体であるという事実により、代謝性油である(Merck index、第10版、エントリー番号8619)。

【0106】

好適には、代謝性油は、0.5～10 mg、好ましくは1～10、2～10、3～9、4～8、5～7、又は5～6 mg(例えば、2～3、5～6、又は9～10 mg)、具体的には、約5.35 mg又はおよそ2.14 mg/用量の量でアジュバント組成物中に存在する。

【0107】

トコールは当技術分野で周知であり、EP0382271に記載されている。好適には、トコールは -トコフェロール又はコハク酸 -トコフェロール(ビタミンEコハク酸塩としても知られる)などのその誘導体である。好適には、前記トコールは、0.5～11 mg、好ましくは1～11、2～10、3～9、4～8、5～7、5～6mg(例えば、10～11、5～6、2.5～3.5又は1～3 mg)の量で存在する。特定の実施形態においては、トコールは約5.94 mg又はおよそ2.38 mg/用量の量で存在する。

【0108】

水中油型エマルジョンはさらに、乳化作用物質を含む。好適には、乳化作用物質はポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートであってよい。特定の実施形態においては、乳化作用物質をPolysorbate(登録商標)80(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート)又はTween(登録商標)80とすることができます。

【0109】

前記乳化作用物質は、好適には0.1～5、0.2～5、0.3～4、0.4～3又は2～3 mg(例えば、0.4～1.2、2～3又は4～5 mg)の乳化作用物質の量でアジュバント組成物中に存在する。特定の実施形態においては、乳化作用物質は約0.97 mg又は約2.425 mgの量で存在する。

【0110】

一実施形態において、組成物中に存在する具体的な成分の量は、0.5 mlヒト用量中に存在する量である。さらなる実施形態においては、免疫原性組成物はヒト用量に好適な容積であり、この容積は0.5 mlより高く、例えば、0.6、0.7、0.8、0.9又は1 mlである。さらなる実施形態においては、ヒト用量は1 ml～1.5 mlである。

【0111】

アジュバントが液体形態であり液体形態のポリペプチド組成物と混合される場合、ヒト用量中のアジュバント組成物は、例えば、意図される最終容量の約半分、例えば、0.7 mlの意図されるヒト用量については350 μl容量、又は0.5 mlの意図されるヒト用量については250 μl容量などの、ヒト用量の意図される最終容量の画分にあるであろう。ポリペプチド抗原組成物と混合して最終ヒト用量のワクチンを提供する場合、アジュバント組成物を

10

20

30

40

50

希釈する。そのような用量の最終容量は勿論、アジュバント組成物の最初の容量及びアジュバント組成物に添加されるポリペプチド抗原組成物の容量に依存して変化するであろう。代替的な実施形態においては、液体アジュバントを用いて、凍結乾燥されたポリペプチド組成物を再構成する。この実施形態においては、アジュバント組成物のヒト用量は、ヒト用量の最終容量とほぼ等しい。液体アジュバント組成物を、凍結乾燥されたポリペプチド組成物を含むバイアルに添加する。最終ヒト用量は0.5~1.5 mlの間で変化してもよい。

【0112】

水中油型エマルジョンの製造方法は、当業者に周知である。一般的に、この方法は、トコール含有油相と、界面活性剤（PBS/ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート溶液など）とを混合し、続いてホモジナイザーを用いてホモジナイズすることを含む。当業者には、混合物を2回注射針に通すことを含む方法が、少量の液体をホモジナイズするのに好適であることは明確でありうる。同様に、当業者であれば、マイクロフルイダイザ（M110S Microfluidics機器、最大50回通過、最大圧入力6bar（出力圧約850bar）で2分間にわたる）における乳化プロセスを適合させて、少量又は多量のエマルジョンを製造することができる。要求される直径の油滴を有する調製物が達成されるまで、得られるエマルジョンの測定を含む慣用の実験によってこの適合を達成することができる。

【0113】

水中油型エマルジョンにおいては、油と乳化剤は水性担体中にあるべきである。水性担体は、例えば、リン酸緩衝生理食塩水であつてよい。

【0114】

好ましくは、本発明の水中油型エマルジョン系は、マイクロメートル以下の範囲の小さい油滴サイズを有する。好適には、液滴サイズは直径120~750 nm、より好ましくは120~600 nmの範囲にあるであろう。最も好ましくは、水中油型エマルジョンは、強度少なくとも70%の油滴が直径500 nm未満であり、より好ましくは、強度少なくとも80%が直径300 nm未満であり、より好ましくは強度少なくとも90%が直径120~200 nmの範囲にある、当該油滴を含有する。

【0115】

一実施形態において、免疫原性組成物は、0.5mlの用量あたり0.125mLのSB62エマルジョン（全体積）、5.35mgのスクアレン、5.94mgのDL- -トコフェロール、及び2.425mgのポリソルベート80を有する水中油型エマルジョンを含むアジュバントと組み合わされた、3 μg又は10 μgの配列番号1~7のいずれでもない。一実施形態において、免疫原性組成物は、0.5mlの用量あたり5.35mgのスクアレン、5.94mgのDL- -トコフェロール、及び2.425mgのポリソルベート80を有する水中油型エマルジョンを含むアジュバントと組み合わされた、3 μg又は10 μgの配列番号1~7のいずれでもない。一実施形態において、免疫原性組成物は、スクアレン、DL- -トコフェロール、及びポリソルベート80を有する水中油型エマルジョンを含むアジュバントを含有しない。

【0116】

免疫原性組成物及びワクチン

ある実施形態において、免疫原性組成物は、追加の抗原をさらに含有する。ある実施形態において、追加の抗原は、肺炎レンサ球菌（*S.pneumoniae*）、インフルエンザ菌（*H.influenzae*）、髄膜炎菌（*N.meningitidis*）、大腸菌（*E.coli*）、カタル球菌（*M.catarrhalis*）、破傷風菌（*C.tetani*）、ジフテリア菌（*C.diphtheriae*）、百日咳菌（*B.perussis*）、表皮ブドウ球菌（*S.epidermidis*）、腸球菌、及び黄色ブドウ球菌（*S.aureus*）からなる群から選択される細菌に由来する抗原である。他の実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、C.ディフィシル由来の他の抗原、たとえばS層タンパク質（W001/73030）を含有していてもよい。場合により、免疫原性組成物は、C.ディフィシル由来の糖をさらに含んでもよい。

【0117】

さらに、免疫原性組成物を含むワクチンが提供される。このワクチンはさらに、薬学的

10

20

30

40

50

に許容される賦形剤を含有してもよい。本発明の別の態様において、本発明の免疫原性組成物及びアジュバントを含むワクチンが提供される。

【0118】

本発明の免疫原性組成物を含有するワクチン製剤を用いて、当該ワクチンを全身経路又は粘膜経路で投与することによって、C.ディフィシル感染を起こしやすい哺乳動物を保護し、又はC.ディフィシル感染症にかかった哺乳動物を治療することができる。これらの投与には、筋肉内、腹腔内、皮内、若しくは皮下経路による注射；又は経口/消化管、気道、尿生殖路への粘膜投与がある。本発明のワクチンは、単回投与として与えることができるが、その成分を、同時に併用投与しても、異なる時に併用投与してもよい（たとえば、肺炎球菌糖コンジュゲートは、相互の免疫反応を調整するために、別々に、同時に、又はワクチンのなんらかの細菌タンパク質成分を投与した1-2週間後に、投与することができる）。単一の投与経路に加えて、2つの異なる投与経路を使用することもできる。たとえば、糖又は糖コンジュゲートは、筋肉内（IM）又は皮内（ID）投与することができ、細菌タンパク質は、鼻腔内（IN）又は皮内（ID）投与することができる。さらに、本発明のワクチンは、プライミング（初回抗原刺激）用量についてはIM投与し、ブースター（追加免疫）用量についてはIN投与することができる。

【0119】

ワクチン中の毒素の含量は、典型的には1~250 μg、好ましくは5~50 μg、もっとも典型的には5~25 μgの範囲内とする。初回ワクチン接種後、対象は、適切な間隔をおいて1回又は数回の追加免疫を受けることができる。ワクチン製剤は、一般的にはVaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York)に記載されている。リポソーム内カプセル化はFullerton, 米国特許第4,235,877号に記載されている。

【0120】

本発明のある態様においてワクチンキットが提供されるが、これは、場合によっては凍結乾燥形態にある、本発明の免疫原性組成物の入ったバイアルを含み、本明細書に記載のアジュバントの入ったバイアルをさらに含んでいる。本発明のこの態様では、アジュバントは凍結乾燥された免疫原性組成物を再構成するために使用されると考えられる。

【0121】

本発明の他の態様は、免疫保護用量の、本発明の免疫原性組成物若しくはワクチンを対象に投与することを含む、C.ディフィシル感染を予防若しくは治療する方法である。ある実施形態において、免疫保護用量の、本発明の免疫原性組成物若しくはワクチンを対象に投与することを含む、C.ディフィシル感染の最初の症状発現及び/又は再発の症状発現を予防又は治療する方法が提供される。一実施形態において、対象は、マウス、ウサギ、モルモット、サル、非ヒト霊長類又はヒトからなる群より選択される。一実施形態において、対象はマウスである。別の実施形態において、対象はヒトである。

【0122】

本発明の他の態様は、C.ディフィシルによって引き起こされる感染若しくは疾患の治療若しくは予防に使用するための本発明の免疫原性組成物若しくはワクチン若しくはキットである。ある実施形態において、C.ディフィシル疾患の最初の症状発現及び/又は再発の症状発現の治療若しくは予防に使用するための、本発明の免疫原性組成物若しくはワクチン若しくはキットが提供される。

【0123】

本発明のもう1つの態様は、C.ディフィシル疾患の治療若しくは予防のための医薬の製造における、本発明の免疫原性組成物若しくはワクチン若しくはキットの使用である。ある実施形態において、C.ディフィシル疾患の最初の症状発現及び/又は再発の症状発現の治療若しくは予防のための医薬の製造に使用するための、本発明の免疫原性組成物若しくはワクチン若しくはキットが提供される。

【0124】

「C.ディフィシル疾患」は、C.ディフィシルによって放出される毒素により引き起こさ

10

20

30

40

50

れるあらゆる感染症又は疾患を指す。C.ディフィシル疾患の例は、抗生物質に関連する下痢（AAD）、偽膜性大腸炎及び中毒性巨大結腸であり、これらは生命にかかわるものである。

【0125】

「約」若しくは「およそ」は、本発明の上で、与えられた数字の上下10%の範囲内と定義される。

【0126】

「含んでいる」、「含む」、及び「含んでなる」という用語は、本明細書では、いかなる場合も、選択肢として、それぞれ「からなる」、「からなっている」、及び「からなる」(consists of)という用語で置き換えられるものと本発明者らは意図している。「含んでなる」という用語は、「含む」(include)を意味する。したがって、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、「含んでいる」という用語、並びに「含む」及び「含んでなる」のような語形変化は、当然のことながら、言明された化合物若しくは組成物（たとえば核酸、ポリペプチド、抗原）若しくはステップ、又は一群の化合物若しくはステップの包含を意味するが、他のいかなる化合物、組成物、ステップ、又はそれらの一群の除外を意味するものではない。略語"e.g."（たとえば）は、ラテン語の"exempli gratia"（たとえば）に由来し、本明細書では、限定されない例を示すために使用される。したがって、略語"e.g."は、"例えれば"（たとえば）という用語と同義である。

【0127】

本明細書において、本発明の「ワクチン」に関する実施形態は、本発明の「免疫原性組成物」に関する実施形態に適用可能であるし、逆もまた同様である。

【0128】

他に説明のない限り、本明細書で使用されるあらゆる科学技術用語は、本明細書の属する技術分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。分子生物学の一般用語の定義は、Benjamin Lewin, Genes V, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (編), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 及びRobert A. Meyers (編), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)に見いだすことができる。

【0129】

単数の用語 "a"、"an"、及び "the" は、文脈上明白に別の指示がない限り、複数の指示対象を含む。同様に、"or"（又は/若しくは）という単語は、文脈上明白に別の指示がない限り、"and"（及び/並びに）を包含するものとする。「複数」という用語は、2個以上を指す。さらに当然のことながら、核酸若しくはポリペプチドに関して与えられる、すべての塩基サイズ若しくはアミノ酸サイズ、及びすべての分子量若しくは分子質量値は推定であり、説明のために与えられる。加えて、ポリペプチド、抗原などの物質の濃度若しくはレベルに関して与えられる数値限定は、概算であると考えられる。

【0130】

この特許明細書の中で引用された参考文献若しくは特許出願はすべて、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0131】

以下に示す実施例は、説明だけを目的としており、いかなる形でも本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない。

【0132】

本明細書に記載する特定の態様及び実施形態が例示目的で示され、本発明の限定として示されるものではないことを理解されたい。本発明の主要特徴は、本発明の範囲を逸脱することなく種々の実施形態において用いることができる。当業者は、慣用の研究、本明細書に記載する具体的な手順の多数の等価物を理解し、又はそれを用いて確定することができる。そのような等価物は、本発明の範囲内であるとみなされ、特許請求の範囲に包含さ

10

20

30

40

50

れる。

【 0 1 3 3 】

本明細書で言及するすべての刊行物及び特許出願は、本発明が属する分野の当業者のレベルの指標である。すべての刊行物及び特許出願は、その個々の刊行物又は特許出願が参考により組み込まれると具体的かつ個別的に示されているかのと同程度にまで参照により本明細書に組み込まれる。本明細書で参照するすべての刊行物は、許容可能な祭壇滅にまで参照により組み入れられる。

【 0 1 3 4 】

特許請求の範囲及び / 又は明細書における用語「含む (comprising)」と共に用いられる場合、単語「a」又は「an」の使用は、「1 (one)」を意味しうるが、これは「1又はそれ以上 (one or more)」、「少なくとも1つ (at least one)」、及び「1又は1を超える (one or more than one)」の意味とも一致する。
10

【 0 1 3 5 】

本発明を、以下の非限定的な図及び実施例を参照してさらに説明する。

【 実施例 】

【 0 1 3 6 】

実験で使用したアジュバント：

アジュバント A

0.5ml用量あたり、リポソームの形態で提示される50 μgのQS21、50 μgの3D-MPL、0.25m
gのコレステロール及び1.0mgのDOPCを有するアジュバント。ハムスターの免疫に好適な50
μlの用量は、5 μgのQS21、5 μgの3D-MPL、0.025mgのコレステロール及び0.1mgのDOPCを
含有する。
20

【 0 1 3 7 】

アジュバント B

0.5ml用量あたり0.125 mLのSB62エマルジョン（総体積）、5.35mgのスクアレン、5.94m
gのDL- -トコフェロール及び2.425mgのポリソルベート80を有する水中油型エマルジョン
からなるアジュバント。50 μl用量は、0.0125mLのSB62エマルジョン（総体積）、0.535mg
のスクアレン、0.594mgのDL- -トコフェロール及び0.2425mgのポリソルベート80を含む
。
30

【 0 1 3 8 】

アジュバント C

リポソームの形態で提示される25 μgのQS21、25 μgの3D-MPL、0.25mgのコレステロール
及び1.0mgのDOPCを有するアジュバントである。50 μl用量は、2.5 μgのQS1、2.5 μgの3D-
MPL、0.025mgのコレステロール及び0.1mgのDOPCを含有する。

【 0 1 3 9 】

GSK アジュバント AS04D

0.5ml用量当たり50 μg MPL及び0.5mg (Al³⁺合計)を有するアジュバント。50 μlの用量
は5 μg MPL及び50 μg (Al³⁺合計)を含有する。

【 0 1 4 0 】

ミヨウバン

0.5ml用量当たり水酸化アルミニウム500 μgを有するアジュバント。ハムスター免疫に
好適な50 μlの用量は50 μg用量当たり50 μgを含有する。

【 0 1 4 1 】

プロトコール

抗ToxA及び抗ToxB ELISA反応：プロトコール（実施例 2 ~ 4、7 及び 8 について）

ToxA又はToxB断片（実施例 2 及び 4 についてはToxA (2121-2686) 及びToxB (1968-2366)
、実施例 3、5、6、7 及び 8 についてはToxA (2387-2706) 及びToxB (1750-2360)）を、
リン酸緩衝食塩水（PBS）中2 μg/ml（ToxAについて）又は1 μg/ml（ToxBについて）で、
高結合マイクロタイヤープレート（Nunc MAXISORP（商標））上に4 にて一晩コーティン
グした。そのプレートを、振盪しながら、室温にて30分間、PBS + 1% ウシ血清アルブミン
50

(BSA)でブロッキングした。ハムスター又はマウス血清を、PBS-BSA 0.2%-TWEEN(商標)0.05%で、1/100(用量I若しくはIIの後のサンプルについて)又は1/500(用量III後サンプルについて)にあらかじめ希釈した後、さらに2倍希釈を2回マイクロプレート内で行って、室温(RT)にて30分間インキュベートした。洗浄後、結合したハムスター又はマウス抗体を、PBS-BSA 0.2%-tween 0.05%で1:5000希釈した、Jackson ImmunoLaboratories Inc.製のペルオキシダーゼ結合抗マウス(ref: 110-035-003)又は抗ハムスター(ref: 107-035-142)(「検出抗体」)を用いて検出した。検出抗体を、振盪しながら20にて30分間インキュベートした。0.1Mクエン酸バッファーpH 4.5、10mLにつき4mgのO-フェニレンジアミン(OPD)+5μL H₂O₂を用いて、室温にて暗黒下で15分間発色させた。50μL HClで反応を止め、光学密度(OD)を490nmで読み取って620nmと対比した。

10

【0142】

各個々の血清中に存在する抗ToxA抗体又は抗ToxB抗体のレベルは、各プレートに添加され、μg/mLで表された血清(対照群Jackson Global IgGに対して較正)と比較して決定される。ハムスター又はマウス免疫に関して、それぞれの処置群のサンプルについてExcelソフトウェアを用いて、幾何平均力価GMTを計算した。

【0143】

実施例1

5つのC.ディフィシリToxA-ToxB融合タンパク質のデザイン

ToxA及びToxBのC末端繰り返しドメインの断片を含有する融合タンパク質(「融合体」ともいう)をデザインした。これらの融合タンパク質は、ToxAのC末端繰り返しドメインの断片、及びToxBのC末端繰り返しドメインの断片、並びにToxA断片のC末端とToxB断片のN末端との間のジャンクションを含有していた。2つのストラテジーが考案されたが、第1のストラテジーでは、融合体は、長いソレノイド構造が2つの断片間のジャンクションで維持されるようにデザインされた。第2のストラテジーでは、融合体の2つの断片は、独立した正しいフォールディングを可能にするようにリンカーで隔てられる。

20

【0144】

ToxA及びToxBのC末端部分は、繰り返し配列:ショートリピート(SR)及びロングリピート(LR)で構成されている(PNAS 2005 vol 102: 18373-18378)。

【0145】

ToxAのC末端ドメインの既知の立体構造の一部が記載されている(PNAS 2005 Greco et al., vol 102: 18373-18378; Nature Structural & Molecular biology 2006 vol 13(5): 460-461; PDB codes: 2F6E, 2G7C and 2QJ6)。

30

【0146】

ToxA及びToxBのC末端部分の残基の間には2種類の重要な相互作用があると本発明者らは予想した。第1の相互作用は、LRとその前のSRに含まれる残基の間に生じ、ソレノイド様構造を維持するために重要である。第2のタイプの相互作用は、LRとその次のSRに含まれる残基の間に生じ、この相互作用は毒素の糖鎖結合機能を仲介している。

【0147】

新たな「構造機能」リピートSR-LR-SRを定義した。このリピートの構造は、デザインした融合体ではそのまま損なわれずに維持された。

40

【0148】

ToxA及びToxBのショートリピート(SR)及びロングリピート(LR)の位置を表1に示す。

【0149】

ToxA及びToxBのC末端ドメインに含まれる"SR-LR-SR"ボックスの一覧を以下の表2に示す。

【表2】

名称	開始位置	終了位置
ToxA_1	1874	1944
ToxA_2	2008	2078
ToxA_3	2142	2212
ToxA_4	2254	2326
ToxA_5	2390	2460
ToxA_6	2503	2573
ToxA_7	2595	2664
ToxB_1	1877	1946
ToxB_2	2008	2078
ToxB_3	2140	2212
ToxB_4	2274	2343

10

【0150】

最終的に、2つのLRの間のSRの数は、長いソレノイド様構造を保持するように、デザインされた融合体において維持された。

20

【0151】

融合体のためのジャンクションデザインの前に、2つの作業仮説を設定した：第1の仮説、融合体が短いほど、融合体が安定して過剰発現される可能性が高い；第2の仮説、"SR-LR-SR"ボックスの概念にしたがって、開始位置は、上記で定義されたSR-LR-SRボックスの最初のSRの、正しいフォールディングを確実にするように選択されなければならない。したがって、融合体はSR-LR-SRボックスの前にあるSRのはじめから始まる。上記の2つの仮説によって、3つの開始位置を分析した：ToxAの残基2370、2234、及び2121。

【0152】

開始位置2370は除外された。開始位置2234も除外されたのは、タンパク質の構造的安定性に重要な、相互作用に関わる残基の1つが保存されていないためである。そのため、デザインされた融合体のすべてが、ToxAの残基2121から始まることが決定された。

30

【0153】

すべての融合体はToxBの最後の残基で終わることになる。

【0154】

融合体全体を、2つの融合断片の間で長いソレノイド様構造に保つように、4つの融合体(F1-4)をデザインした。

【0155】

融合体1(F1)及び2(F2)は同じ仮説によってデザインした。ToxA及びToxBのすべてのSRタンパク質配列は、多重アラインメントソフトウェアで比較されていた(ClustalW - Thompson JD et al. (1994) Nucleic Acids Res., 22, 4673-4680)。類似性の高い配列は、ToxAの3番目のSR VIII、及びToxBの3番目のSR II、及びToxBの3番目のSR IIIであった。ToxBの上記2つのSRのうちどちらかを選択するために、ToxBのC末端部分について、部分的なToxA C末端ドメインの既知の立体構造(PDBコード: 2QJ6)を用いて、構造的相同性モデリング(SwissModelインターフェースを使用 - Arnold K et al. (2006) Bioinformatics, 22, 195-201)を行った。ToxAの3番目のSR IIIを用いて、局所構造の最高の重ね合わせ(SwissPDBViewerを用いて実施 - Guex N et al. (1997), Electrophoresis 18, 2714-2723)が、ToxBの3番目のSR IIに対して得られた。そこで、2つのジャンクションをデザインした：第1のジャンクションは、ToxAの3番目のSR IIIとToxBの4番目のSR IIとの間にあり(F1)、第2のジャンクションは、ToxAの2番目のSR VIIIとToxBの3番目のSR IIと

40

50

の間にある(F2)。

【0156】

融合体3(F3)をデザインするために、ToxAの部分的なC末端ドメインの既知の構造と、ToxBのC末端ドメインの予想される構造との間で、全体的な構造の重ね合わせを行った(SwissModel及びSwissPDBViewerソフトウェアを使用)。ToxAのLR VIIとToxBのLR IIの間に、最高の重ね合わせが見られた。そこで、この類似したLRの中にジャンクションを作ることにした。連結は、まず第1にToxAとToxBの間で配列が保存されている領域内で、次に、前のSRと相互作用する残基を融合体のToxA部分の中に保持するように、そして最後に、後のSRと相互作用する残基をToxB部分の中に保持するように、実施された。

【0157】

10

融合体4(F4)をデザインするために、ToxBのC末端ドメインを4つの断片に分け、それらについてより正確な相同性モデリング(SwissModel)を行った。“SR-LR-SR”ボックスを完全な状態に保つように、分割を実現した(各ドメインはLRの後に続くSRの末端で終わる)。これらの断片の予想される構造とToxAの既知の立体構造との間で構造の重ね合わせを行い、最高の構造の重ね合わせが、ToxBの3番目のSR(SR I)及びToxAの最後のSR(3番目のSR VIII)について得られた。そこで、ToxAの2番目のSR VIIIとToxBの3番目のSR Iとの間で連結を行った。

【0158】

最後の融合体(F5)は、融合体の2つの断片の、独立した正しいフォールディングを可能にするようにデザインされた。ToxAタンパク質の最後の残基とToxBの4番目のSR IIの先頭との間にリンカーを加えた(常に“SR-LR-SR”ボックスの重要性を考慮した)。外来残基(グリシン)を1つだけリンカーとして加え、既存の2つのグリシンの間に位置づけた。したがって、リンカーは、(ToxAについては)既知の、そして(ToxBについては)予想されるストランドで周りを囲んだ3つのグリシン残基からなるともいえる。

20

【0159】

実施例2

F2融合タンパク質:アジュバントA、QS21を含まないアジュバントA、又はMPLを含まないアジュバントAによるハムスターの免疫、及びアジュバントB、ミョウバン、又はアジュバント非添加製剤との比較

16匹のハムスター(雄及び雌の混合)の群を、50 μlのアジュバントA、MPLを含まないアジュバントA、QS21を含まないアジュバントA、アジュバントB、ミョウバンでアジュバント添加された、又はアジュバント添加されていない1 μgのF2融合タンパク質で、0日目、14日目、及び28日目に筋肉内に免疫した。抗ToxA及び抗ToxB ELISA力値を、41/42日目(Post III)に収集された個々の血清において決定した。結果は、表3及び4、並びに図1及び2に記載されている。

【0160】

30

【表3】

表3:ELISA 抗 ToxA: 42日目の個々の血清における濃度(μg/ml)

群	1 F2 1 μg/用量	2 F2 1 μg/用量	3 F2 1 μg/用量	4 F2 1 μg/用量	5 F2 1 μg/用量	6 F2 1 μg/用量
アジュバント	A	A-QS21	A-MPL	B	Al(OH)3	アジュバント非添加
1	1472	29	935	457	577	3
2	1828	39	414	197	329	23
3	4928	35	747	375	401	64
4	2966	28	550	60	769	25
5	2025	19	388	408	652	3
6	1116	155	1498	173	449	37
7	2579	43	879	732	360	179
8	2463	33	780	196	1342	31
9	1425	52	1183	681	817	7
10	1984	307	696	190	534	199
11	1093	198	572	344	2665	106
12	2080	126	972	508	1944	22
13	3541	403	1823	193	1603	221
14	1635	152	813	1142	2209	680
15	4688	630	1046	494	855	359
16	3360	21	1119	163	664	100
幾何平均	2213	77	830	312	815	49
CI-	1717	40	655	202	563	14
CI+	2802	124	1032	454	1129	104
St Dev 最小値	496	37	174	111	251	36
St Dev 最大値	589	47	202	141	314	55

CI=信頼区間

St Dev=標準偏差

【0 1 6 1】

10

20

30

【表4】

表4:ELISA 抗 ToxB: 42 日目の個々の血清における濃度(μg/ml)

群	1 F2 1 μg/用量	2 F2 1 μg/用量	3 F2 1 μg/用量	4 F2 1 μg/用量	5 F2 1 μg/用量	6 F2 1 μg/用量
アジュバント	A	A-QS21	A-MPL	B	Al(OH)3	アジュバント非添加
1	811	33	817	65	63	5
2	1186	88	1144	107	177	5
3	4388	90	943	207	216	92
4	1158	66	1224	464	239	26
5	1992	53	1088	212	91	5
6	1518	305	1070	193	138	44
7	5437	54	1021	244	44	57
8	1493	74	899	266	313	28
9	1488	281	1506	189	135	30
10	2637	346	1588	214	318	256
11	1568	215	1125	251	863	95
12	1879	50	1890	549	534	93
13	1920	237	1724	147	355	57
14	1709	266	2450	606	543	57
15	1553	492	2033	301	251	178
16	1556	95	744	167	115	88
幾何平均	1789	125	1254	225	207	41
Cl-	1387	76	1039	162	128	16
Cl+	2264	186	1498	301	308	76
St Dev 最小値	402	49	215	63	79	25
St Dev 最大値	475	61	244	75	101	34

【0162】

図1及び2。

図1についての結果：

F2を、完全アジュバントA、QS21を含まない、又はMPLを含まない同様の製剤と共に注射した。抗ToxA反応について、QS21が最も効果的であるように思われるとはいえ、MPLとQS21のどちらも、付加価値を示している。

抗ToxB反応について、MPLの効果はあまりはっきりしていないが、QS21除去は、IgG力値に劇的な効果を生じている。

【0163】

図2についての結果：

アジュバント比較に関して、アジュバントAは、ミョウバン、アジュバントB、又はアジュバント非添加製剤と比較して、有意により高い抗ToxA及び抗ToxB抗体を誘導した。アジュバントBは、アジュバント非添加製剤と比較して、より高い抗ToxA及び抗ToxB抗体を誘導した。

【0164】

実施例3

Pims 20110544 - アジュバントB、AS04D、アジュバントA、又はアジュバントC中に製剤化された様々な用量範囲のF2融合タンパク質での雄ハムスターの免疫

10匹の雄ハムスターの群を、50 μl用量のアジュバントB、AS04D、アジュバントA、又はアジュバントCでアジュバント添加された、0.3 μg、1 μg、又は3 μgのF2融合タンパク質で、0日目、14日目、及び28日目に筋肉内に免疫した。

抗ToxA及び抗ToxB ELISA力値を、13日目(post I)、27日目(Post II)、42日目(Post III 14)、及び84日目(Post III 56)に収集された個々の血清から測定した。

10

20

30

40

50

【0165】

Pims 20110545 - アジュバントB、AS04D、アジュバントA、又はアジュバントC中に製剤化された様々な用量範囲のF2融合タンパク質での雌ハムスターの免疫

10匹の雌ハムスターの群を、アジュバントB、AS04D、アジュバントA、又はアジュバントCでアジュバント添加された、 $0.3\mu\text{g}$ 、 $1\mu\text{g}$ 、又は $3\mu\text{g}$ のF2融合タンパク質で、0日目、14日目、及び28日目に筋肉内に免疫した。抗ToxA及び抗ToxB ELISA力値を、13日目(Post I)、27日目(Post II)、42日目(Post III 14)、及び84日目(Post III 56)に収集された個々の血清から測定した。

【0166】

図3~7。

10

【0167】

Pims 20110544及び20110545

【0168】

【表5】

表5:Post I抗 ToxA ELISA 力値(幾何平均力値、すなわち GMT)

群	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
抗原/動物	$3\mu\text{g}$	$1\mu\text{g}$	$0.3\mu\text{g}$									
アジュバント	C	C	C	A	A	A	B	B	B	AS0	AS0	AS0
544	28	17	6	84	17	6	44	27	3	4D	4D	4D
545	50	36	12	109	111	26	85	20	16	68	74	33

【0169】

【表6】

表6:Post I抗 ToxB ELISA 力値(GMT)

群	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
抗原/動物	$3\mu\text{g}$	$1\mu\text{g}$	$0.3\mu\text{g}$									
アジュバント	C	C	C	A	A	A	B	B	B	AS0	AS0	AS0
544	115	82	52	412	121	79	189	119	34	4D	4D	4D
545(雌)	178	257	150	391	383	224	196	164	69	7	5	5

20

【0170】

【表7】

表7:Post II抗 ToxA ELISA 力値(GMT)

群	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
抗原/動物	$3\mu\text{g}$	$1\mu\text{g}$	$0.3\mu\text{g}$									
アジュバント	C	C	C	A	A	A	B	B	B	AS0	AS0	AS0
544	475	416	191	974	530	277	312	332	138	4D	4D	4D
545	762	834	428	1466	1424	688	818	423	650	487	597	401

30

【0171】

40

【表 8】

表 8:Post II 抗 ToxB ELISA 力値(GMT)

群	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
抗原/動物	3μg	1μg	0.3μg	3μg	1μg	0.3μg	3μg	1μg	0.3μg	3μg	1μg	0.3μg
アジュバント	C	C	C	A	A	A	B	B	B	AS04 D	AS04 D	AS04 D
544(雄)	319	686	488	1181	1120	1049	435	401	340	64	56	28
545(雌)	974	1555	1419	1552	1871	2386	585	649	1486	215	109	91

【0 1 7 2】

10

【表 9】

表 9:Post III 42 日目抗 ToxA ELISA 力値(GMT)

群	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
抗原/動物	3μg	1μg	0.3μg	3μg	1μg	0.3μg	3μg	1μg	0.3μg	3μg	1μg	0.3μg
アジュバント	C	C	C	A	A	A	B	B	B	AS04 D	AS04 D	AS04 D
544	449	674	471	1462	720	688	247	486	266	662	599	566
545	642	814	667	1654	1020	1560	800	539	888	923	1005	794

【0 1 7 3】

20

【表 10】

表 10:Post III 42 日目抗 ToxB ELISA 力値(GMT)

群	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
抗原/動物	3μg	1μg	0.3μg	3μg	1μg	0.3μg	3μg	1μg	0.3μg	3μg	1μg	0.3μg
アジュバント	C	C	C	A	A	A	B	B	B	AS04 D	AS04 D	AS04 D
544	630	612	594	1259	1116	1172	335	426	512	67	86	51
545	568	831	550	1213	828	1273	556	695	944	182	145	134

【0 1 7 4】

30

【表 11】

表 11:Post III 84 日目抗 ToxA ELISA 力値(GMT)

群	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
抗原/動物	3μg	1μg	0.3μg	3μg	1μg	0.3μg	3μg	1μg	0.3μg	3μg	1μg	0.3μg
アジュバント	C	C	C	A	A	A	B	B	B	AS04 D	AS04 D	AS04 D
544	213	239	169	357	356	307	106	70	154	182	257	266
545	311	309	401	595	578	717	311	251	417	353	414	337

【0 1 7 5】

40

【表 12】

表 12:Post III 84 日目抗 ToxB ELISA 力値(GMT)

群	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
抗原/動物	3μg	1μg	0.3μg	3μg	1μg	0.3μg	3μg	1μg	0.3μg	3μg	1μg	0.3μg
アジュバント	C	C	C	A	A	A	B	B	B	AS04 D	AS04 D	AS04 D
544(雄)	291	195	145	299	360	440	78	70	315	24	25	15
545(雌)	250	299	328	318	374	435	134	211	392	60	41	41

【0 1 7 6】

50

実施例 4

Pims 20120011及び20120008 - ミョウバン、アジュバントA中に製剤化された、又はアジュバント非添加の、F2融合タンパク質、又はトキシンAとトキシンB断片の混合物でのハムスターの免疫

ミョウバン、アジュバントA中に製剤化された、又はアジュバント非添加の、 $1\mu\text{g}$ のF2融合タンパク質、ポリHisタグを有するF2融合体(F2-Hisタグ付)、又はC-terToxA(2387~2706)($0.6\mu\text{g}$)+C-terToxB(1750~2360)($0.4\mu\text{g}$)の混合物で、0日目、14日目、及び28日目に筋肉内に免疫した。

【0177】

抗ToxA及び抗ToxB ELISA力値を、13日目、27日目、及び42日目(Post III)に収集された個々の血清において決定した。図8。 10

【0178】

【表13】

表13

20120008 及び 20120011:雌及び雄ハムスター免疫 ミョウバン又はアジュバント A 中に製剤化された、混合物(ToxA+ToxB)の F2 融合タンパク質との免疫原性の比較 ELISA 抗 ToxA:個々の Post III 血清における濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)						
群	1 混合物 ToxA ($0.6\mu\text{g}$)+ToxB($0.4\mu\text{g}$) Al(OH)3	2 F2($1\mu\text{g}$) Al(OH)3	3 混合物 ToxA ($0.6\mu\text{g}$)+ToxB($0.4\mu\text{g}$) アジュバント A	4 F2($1\mu\text{g}$) アジュバント A	5 F2-His タグ 付($1\mu\text{g}$) アジュバント A	6 F2($1\mu\text{g}$) アジュバント非添加
1	62	1156	41	3075	4006	195
2	77	871	105	1385	2463	127
3	104	833	239	3119	1202	31
4	66	506	143	3806	3903	574
5	179	736	340	3180	6852	116
6	641	1239	48	死亡	5571	32
7	128	328	345	5327	3174	10
8	48	3998	63	3542	4990	47
9	59	681	296	888	6769	13
10	352	491	164	978	1192	2
11	死亡	604	363	2913	1791	3
12	47	1524	87	1231	4362	68
13	88	486	77	3473	1647	123
14	23	1185	62	1341	4929	35
15	254	602	644	2794	3085	136
16	206	1094	24	2975	3354	90
幾何平均	101	823	144	2310	3234	42
CI-	65	612	78	1727	2398	20
CI+	172	1148	213	3196	4381	99

【0179】

10

20

30

40

【表14】

表14

20120008 及び 20120011:雌及び雄ハムスター免疫 ミョウバン又はアジュバントA中に製剤化された、混合物(ToxA+ToxB)の F2融合タンパク質との免疫原性の比較 ELISA 抗 ToxB:個々の Post III 血清における濃度(μg/ml)						
群	1	2	3	4	5	6
	混合物 ToxA (0.6 μ g)+ToxB(0.4 μ g)	F2(1 μ g)	混合物 ToxA (0.6 μ g)+ToxB(0.4 μ g)	F2(1 μ g)	F2-His タグ付(1 μ g)	F2(1 μ g)
	Al(OH)3	Al(OH)3	アジュバントA	アジュバントA	アジュバントA	アジュバント非添加
1	58	591	2510	2364	2647	304
2	172	302	4981	952	1021	302
3	14	167	1409	2630	804	125
4	53	186	4158	2261	1090	299
5	107	408	3046	2553	2682	296
6	925	373	1190	死亡	3808	193
7	40	65	1673	2938	2820	170
8	112	1112	1809	1404	3186	51
9	160	652	2701	1385	2837	128
10	24	75	1210	2252	1676	38
11	死亡	242	546	1749	2174	12
12	61	1081	5746	1623	2557	74
13	15	193	1975	1507	2020	130
14	56	344	3499	1018	4735	14
15	15	237	2897	2554	2673	80
	332	309	2489	2894	2148	127
Geomean	61	297	2228	1834	2210	100
CI-	35	194	1626	1542	1708	59
CI+	132	457	3094	2319	2850	176

Geomean=幾何平均力価

10

20

30

【0180】

結果:

F2融合タンパク質での免疫化後、抗ToxA及び抗ToxB抗体が誘導されたが、ToxAとToxBの混合物でも誘導された。アジュバントAは、他の製剤と比較して、有意により高いELISA力値を誘導する。

【0181】

実施例5ToxA又はToxB断片 及びToxA-ToxB融合体によるマウスの免疫

図9~12

Balb/Cマウスは実施例1に記載の構築物で免疫した。

40

【0182】

各群15匹の雌Balb/Cマウスを、アジュバントBでアジュバント添加した、3 μg又は10 μgのToxA及びToxBの別々の断片 (ToxA C-term (2387-2706) (0.6 μg)+C-termToxB (1750-2360)) により、並びにToxA-ToxB融合タンパク質（実施例3を参照されたい）により、0日目、14日目、及び28日目に、IM免疫化した。対照群の10匹のマウスは、アジュバントBのみのワクチン接種を受けた。

【0183】

42日目に採取した個々の血清で、抗ToxA及び抗ToxB ELISA力値を測定した (Post III)。

。

【0184】

50

プールしたPost III血清で、赤血球凝集抑制力値を測定した。

【0185】

抗ToxA及び抗ToxB ELISA反応：プロトコール

ToxA及びToxB断片のサンプルを、リン酸緩衝食塩水（PBS）中ToxB断片については $1\mu\text{g}/\text{ml}$ で又はToxA断片については $2\mu\text{g}/\text{ml}$ で、高結合マイクロタイタープレート（Nunc MAXISO RP（商標名））上に4 にて一晩コーティングした。そのプレートを、振盪しながら、室温にて30分間、PBS-BSA 1%でブロッキングした。マウス抗血清を、PBS-BSA 0.2%-TWEEN（商標名）0.05%で、1/1000にあらかじめ希釈した後、さらに2倍希釈をマイクロプレート内で行って、振盪しながら室温にて30分間インキュベートした。洗浄後、結合したマウス抗体を、PBS-BSA 0.2%-tween 0.05%で1:5000希釈した、Jackson ImmunoLaboratories Inc. 製のペルオキシダーゼ結合AffiniPureヤギ抗マウスIgG (H+L) (ref: 115-035-003) を用いて検出した。検出抗体を、振盪しながら20 にて30分間インキュベートした。0.1M クエン酸バッファーpH 4.5、10 mlにつき4 mg 0-フェニレンジアミン（OPD）+ 5 μl H₂O₂を用いて、室温にて暗黒下で15分間かけて発色させた。50 μl HClで反応を止め、光学密度（OD）を490 nmで読み取って620 nmと対比した。
10

【0186】

血清中に存在する抗ToxA及び抗ToxB抗体のレベルは、基準血清との比較により中間力値で表される。それぞれの処理群の15サンプルについて（対照群については10サンプル）、GMTを計算した。
20

【0187】

赤血球凝集抑制アッセイ：プロトコール

96ウェルU底マイクロプレート内でリン酸緩衝食塩水（PBS）により、プールしたマウス抗血清（25 μl）の2倍希釈を8回連続して行った。

【0188】

そこで、25 μlの未変性トキシンA（0.2 μg/ウェル）を加え、プレートを室温で30分間インキュベートした。

【0189】

インキュベーション後、2%に希釈された精製ウサギ赤血球50 μlを各ウェルに添加した。プレートを37 にて2時間インキュベートした。
30

【0190】

プレートを目で見て分析したが、血球凝集はウェル内に拡散する赤色細胞として現れ、血球凝集抑制はウェル内で沈降した赤い点として観察される。

【0191】

抑制力値は、赤血球凝集を抑制する血清の最大希釈度の逆数として定義された。

【0192】

細胞傷害性アッセイ

IMR90線維芽細胞を、イーグル最小基本培地(EMEM) + 10% ウシ胎仔血清 + 1% グルタミン + 1% 抗生物質（ペニシリン-ストレプトマイシン-アンホテリシン）中で、37 にて5% CO₂で培養し、96ウェル組織培養プレートに 5×10^4 細胞/ウェルの密度で播種した。
40

【0193】

24時間後、100 μlの細胞培地をウェルから取り出した。

【0194】

プールしたマウス抗血清（50 μl）の2倍希釈を、8回連続で（実施例5の実験について）又は12回連続で（実施例6の実験について）細胞培地で行った。

【0195】

そこで、50 μlの未変性トキシンB（0.5 ng/ml）を加え、プレートを37 にて5% CO₂により24時間インキュベートした。

【0196】

24時間後に細胞を観察し、円形の細胞の割合を測定した。
50

【 0 1 9 7 】

阻害力価は、細胞円形化を50%阻害する血清の最大希釈度の逆数として定義された。

【 0 1 9 8 】結果：

抗ToxA抗体は、ToxA断片のみによる免疫後に誘導されたが、5つの融合体のそれぞれによっても誘導された。

【 0 1 9 9 】

これらの抗体の機能的性質を、赤血球凝集アッセイで調べた。ToxBについては赤血球凝集は見られないでの、このアッセイは、ToxAの評価にのみ適している。

【 0 2 0 0 】

赤血球凝集抑制は、抗ToxA断片血清、又はそれぞれのToxA-ToxB融合体に対する血清について認められた。

【 0 2 0 1 】

ToxB抗体を使用したELISAも行った。抗ToxB抗体はToxB断片のみによる免疫後に誘導されたが、F2、F3、及びF4融合体によっても誘導された。

【 0 2 0 2 】

ToxB断片又はToxA-ToxB融合体で免疫されたマウスから得られた血清を用いて得られた阻害力価は、対照血清を用いて得られた力価より大きかった。

【 0 2 0 3 】実施例 6

10

ToxA-ToxB融合体によるマウスの免疫

25匹の雌マウスの群を、アジュバントB中に製剤化した3 μgのToxA-ToxB融合タンパク質、又はToxA(6 μg) + ToxB(4 μg)の10 μgのアジュバント非添加混合物により、0日目、14日目、及び28日目に、IM免疫した。F2に加えて、他の4つの融合タンパク質構築物F54 Gly (配列番号21)、F54 New (配列番号23)、F5 ToxB (配列番号25)、及びF52 New (配列番号27)を使用した。

【 0 2 0 4 】

ToxA若しくはToxB断片のサンプルが、高結合マイクロタイタープレート上に、リン酸緩衝食塩水中1 μg/mlでコーティングされる以外は、実施例5に記載の抗ToxA及び抗ToxB ELISA反応：プロトコールを用いて、ELISAを行った。ウサギ赤血球を2.5%に希釈した以外は、実施例5に記載のように、赤血球凝集抑制アッセイを行った。50 μlのトキシンBを0.015 μg/mlの濃度で使用した以外は、実施例5に記載のように、ToxB細胞傷害性アッセイを行った。さらにToxA細胞傷害性アッセイを以下のように実施した。

30

【 0 2 0 5 】

抗ToxA ELISA及び抗ToxB ELISA力価は、42日目(Post 111 14)に収集した個々の血清において決定した。図13及び14。

【 0 2 0 6 】

【表15】

表15

<u>20110350 :アジュバントB中に製剤化されたC.ディフィシル融合タンパク質によるマウス免疫 ELISA a-ToxA : Post III 血清における濃度 (μg/ml)</u>						
群	1	2	3	4	5	6
	F2	融合体A (F52new)	融合体B (F54Gly)	融合体C (F54new)	融合体D (F5 ToxB)	混合 ToxA + ToxB
	3μg 抗原/動物	3μg 抗原/動物	3μg 抗原/動物	3μg 抗原/動物	3μg 抗原/動物	10μg (6μg A + 4μg B) 抗原/動物
	アジュバントB	アジュバントB	アジュバントB	アジュバントB	アジュバントB	アジュバント非 添加
	IM	IM	IM	IM	IM	IM
1	518	681	735	436	586	328
2	761	1058	975	455	1252	22
3	557	718	977	684	1108	327
4	1415	992	862	577	555	152
5	782	457	1202	861	622	135
6	563	724	611	575	569	54
7	615	585	1330	824	807	147
8	994	878	611	576	1108	169
9	412	623	死亡	389	887	124
10	495	993	死亡	809	1146	219
11	366	1039	923	872	965	12
12	1075	1089	1454	748	950	122
13	882	754	1176	809	725	196
14	1028	1550	1164	1578	696	312
15	738	1268	1170	1352	678	188
16	519	721	1028	781	930	224
17	927	890	805	346	791	209
18	946	992	647	1255	410	32
19	715	1346	1142	670	634	92
20	546	死亡	1061	死亡	死亡	166
21	1107	1604	826	1038	791	112
22	1351	1289	1223	708	778	66
23	889	1319	61	567	759	102
24	976	824	597	414	456	281
25	1153	1212	995	868	758	242
幾何平均	764	937	841	704	761	126
CI-	656	818	641	597	674	89
CI+	889	1074	1103	830	858	179

【0207】

10

20

30

【表16】

表16

<u>20110350 :アジュバントB中に製剤化されたC.ディフィシル融合タンパク質によるマウス免疫</u>						
<u>ELISA a-ToxB : Post III 血清における濃度(μg/ml)</u>						
群	1	2	3	4	5	6
	F2	融合体A (F52new)	融合体B (F54Gly)	融合体C (F54new)	融合体D (F5 ToxB)	混合 ToxA + ToxB
	3μg 抗原/動物	3μg 抗原/動物	3μg 抗原/動物	3μg 抗原/動物	3μg 抗原/動物	10μg (6μg A + 4μg B) 抗原/動物
	アジュバントB	アジュバントB	アジュバントB	アジュバントB	アジュバントB	アジュバントB
1	916	749	736	454	581	1823
2	1090	551	491	517	872	575
3	687	1178	574	549	529	1386
4	940	868	501	536	828	854
5	837	522	653	420	866	1170
6	836	609	397	757	690	2132
7	309	702	405	792	732	1466
8	569	381	598	737	856	1539
9	382	450	死亡	914	632	1461
10	552	693	死亡	465	639	2267
11	679	832	1273	520	505	1037
12	1123	575	809	551	431	2273
13	764	659	532	1077	930	1405
14	944	970	909	1065	870	1978
15	812	628	222	727	1052	1414
16	502	552	736	560	1001	1269
17	983	639	551	431	728	1732
18	1133	628	604	561	1085	1211
19	938	1058	805	470	435	2017
20	519	死亡	857	死亡	死亡	2140
21	887	1025	319	670	310	2342
22	861	769	596	555	1025	2897
23	903	1161	552	694	260	2343
24	1327	536	431	737	313	3074
25	674	518	680	472	663	2697
幾何平均	765	688	581	611	653	1661
CI-	663	607	495	545	550	1411
CI+	884	781	682	686	776	1957

【0208】

図15～17。

【0209】

赤血球凝集抑制アッセイを実施例5に記載のように実施した。

【0210】

toxB細胞傷害性アッセイを、プールしたマウス抗血清を8回ではなく12回連続2倍希釈を実施し、プレートを細胞観察前24時間にわたってではなく一晩インキュベートした以外は実施例5に記載のように実施した。別のtoxA細胞傷害性アッセイを以下に記載するように実施した。

【0211】

ToxA細胞傷害性アッセイ

HT29細胞を、DMEM +10%ウシ胎仔血清+1%グルタミン+1%抗生物質(ペニシリン・ストレプトマイシン・アンホテリシン)中37℃にて5%CO₂を用いて培養し、96ウェル組織培養プレートに5.10⁴細胞/ウェルの密度で播種した。24時間後、細胞培地をウェルから取り出した。細胞培地においてプールマウス抗血清(50μl)の連続2倍希釈を実施した。

10

20

30

40

50

【 0 2 1 2 】

続いて、 $50\mu l$ の未変性トキシンA($0.15\text{ng}/\text{ml}$)を添加し、プレートを 37°C にて $5\%\text{CO}_2$ と共に48時間インキュベートする。細胞を48時間後に観察し、丸形細胞の割合を決定した。抗ToxA ELISA、抗ToxB Elisa、赤血球凝集抑制及び細胞傷害性アッセイの結果を、上記の図13～17に記載する。

【 0 2 1 3 】**実施例 7****アジュバント非添加製剤中のC.ディフィシルToxA-Cter、ToxB-Cter又は融合タンパク質によるマウスの免疫**

15匹の雌マウスの群を、1又は $3\mu g$ のToxA C-ter、ToxB C-ter又はToxA-ToxB融合タンパク質により、0日目、14日目、28日目及び120日目にIM免疫した。これらの抗原は全てアジュバント非添加製剤において注射した。対照群(マウス10匹)には、NaCl単体を注射した。10

【 0 2 1 4 】

抗ToxA及び抗ToxB ELISA力値を、28日目(Post II)、42日目(Post III 14)、120日目(ブースト前III 87)及び134日目(Post IV 14)に回収した個々の血清において決定した。図18及び19。

【 0 2 1 5 】

【表 1 7】

ELISA a-ToxA : GMT 濃度 (μg/ml)										
採血	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ToxA (aa 2387- 2706)	ToxB (aa 1750- 2360)	融合体 F1	融合体 F2	融合体 F3	融合体 F4	融合体 F5	ToxA (aa 2387- 2706)	ToxB (aa 1750- 2360)	融合体 F1	融合体 F2
抗原/ml	10 ^μ g	10 ^μ g	10 ^μ g	10 ^μ g	10 ^μ g	10 ^μ g	3 ^μ g	3 ^μ g	3 ^μ g	3 ^μ g
アジュバント 非添加	ア'ジ'バ'ン ト非添加	ア'ジ'バ'ン ト非添加	ア'ジ'バ'ン ト非添加	ア'ジ'バ'ン ト非添加	ア'ジ'バ'ン ト非添加	ア'ジ'バ'ン ト非添加	ア'ジ'バ'ン ト非添加	ア'ジ'バ'ン ト非添加	ア'ジ'バ'ン ト非添加	ア'ジ'バ'ン ト非添加
IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM
Post I	178	3	16	60	74	44	269	84	3	10
Post II	222	2	40	94	192	109	366	137	1.25	51
ベースト 前	128	4	28	70	120	58	172	165	4	48
Post IV	539	5	90	174	249	177	353	466	3	168

表

【 0 2 1 6 】

【表 18】

ELISA a-ToxB : GMT 濃度 (μg/ml)										
		採血		ToxA (aa 2387- 2706)		ToxB (aa 1750- 2360)		ToxA (aa 2387- 2706)		ToxB (aa 1750- 2360)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
		F1	F2	F3	F4	F5				
抗原/ml	10μg	10μg	10μg	10μg	10μg	10μg	10μg	3μg	3μg	3μg
アジュバント	アジュバン ト非添加	アジュバン ト非添加	アジュバン ト非添加	アジュバン ト非添加	アジュバン ト非添加	アジュバン ト非添加	アジュバン ト非添加	アジュバン ト非添加	アジュバン ト非添加	アジュバン ト非添加
IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM
Post II	2	62	2	110	58	283	18	2	7	2
Post III	3	316	7	200	199	455	65	4	105	13
ブースト前	3	125	5	81	53	157	18	4	38	8
Post IV	5	856	27	258	227	380	125	6	632	79

表 18

【0217】

実施例 8

アジュバントB中に製剤化されたC.ディフィシルToxA-Cter、ToxB-Cter又は融合タンパク

10

20

30

40

50

質によるマウスの免疫

図20及び21。

15匹の雌マウスの群を、1又は 3 µgのToxA C-term (アミノ酸2387-2706) 及びToxB C-term (アミノ酸1750-2360) 又はToxA-ToxB融合タンパク質により、0日目、14日目及び28日目及び120日目にIM免疫した。これらのタンパク質は、アジュバントB製剤において注射した。

対照群(マウス10匹)には、アジュバントB単体を注射した。

【0218】

抗ToxA及び抗ToxB ELISA力値を、28日目(Post II)、42日目(Post III 14)、120日目(ブースト前III 87又はブースト前)及び134日目(Post IV 14)に回収した個々の血清において決定した。

【0219】

【表19】

表19
アジュバントB中に製剤化したC.ディフィシルToxA-Cter、ToxB-Cter及び融合タンパク質によるマウス免疫
ELISA a-ToxA : Post II, III, ブースト前, Post IV 血清における濃度(µg/ml)

採血	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ToxA (aa 2387 - 2706)	ToxB (aa 1750- 2360)	F1	F2	F3	F4	F5	ToxA (aa 2387- 2706)	ToxB (aa 1750- 2360)	F1	F2	F3	F4	F5 n	/	
抗原 /ml	10µg	10µg	10µg	10µg	10µg	10µg	3µg	3µg	3µg	3µg	3µg	3µg	3µg	3µg	/
ADJ UVA NT	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Post II	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM
	213	2.3	465	332	312	158	672	534	1.7	620	498	578	248	925	2.1
Post III	852	3	1144	859	695	644	1137	1376	4	1356	768	950	470	1537	2
ブー スト 前	738	4	762	484	417	394	674	1091	3	725	513	598	324	1197	3
Post IV	2764	9	1450	1423	1036	986	1626	301	26	990	1000	1099	732	1465	1

【0220】

10

20

30

【表20】

表20

20100798: アジュvant B 中に製剤化した C. ディフィシル ToxA-Cter、ToxB-Cter 及び融合タンパク質によるマウス免疫															
ELISA a-ToxB : Post II, III, ブースト前, Post IV 血清における濃度 (μg/ml)															
採血	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ToxA (aa 2387- 2706)	ToxB (aa 1750- 2360)	F1	F2	F3	F4	F5	ToxA (aa 2387- 2706)	ToxB (aa 1750- 2360)	F1	F2	F3	F4	F5	/	
抗原 /ml	10μg	10μg	10μg	10μg	10μg	10μg	3μg	3μg	3μg	3μg	3μg	3μg	3μg	/	
ADJ UVA NT	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	
	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	
Post II	2	246	10	424	284	794	25	3	338	17	619	471	753	93	2
Post III	2	1762	285	793	671	1204	253	4	1888	232	951	834	1026	365	2
ブー スト 前	3	989	180	512	396	761	129	4	984	108	479	441	581	205	3
Post IV	3	4212	911	1422	1353	1799	1046	78	657	738	1272	747	1572	812	2

【0221】

10

実施例9

融合タンパク質のクローニング発現及び精製

20

発現プラスミド及び組換え菌株

ToxA及びToxBの部分的C末端ドメインの融合タンパク質（配列番号3、4、5、6、及び7）及びHisタグをコードする遺伝子を、標準的な手順により、pET24b(+)発現ベクター（Novagen）内に、NdeI/XbaI制限酵素部位を用いてクローニングした。CaCl₂処理細胞による標準的な方法にしたがって、大腸菌（E. coli）BLR (DE3) 株を組換え発現ベクターで形質転換することによって、最終的な構築物が作製された（Hanahan D. << Plasmid transformation by Simanis. >> In Glover, D. M. (Ed), DNA cloning. IRL Press London. (1985) : p. 109-135.）。

【0222】

30

宿主菌株：

BLR (DE3)。BLRはBL21のrecA派生株である。（DE3）の名称を有する菌株は、IPTG誘導性T7 RNAポリメラーゼを含有するプロファージに対して溶原性である。DE3溶原菌は、pETベクターからのタンパク質発現のためにデザインされている。この菌株はまた、lon及びompTプロテアーゼを欠失している。

【0223】

遺伝子型：大腸菌（E. coli）BLR::DE3 株、F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3) (srI-recA)306::Tn10 (Tet^R)。

【0224】

40

組換えタンパク質の発現：

大腸菌（E. coli）形質転換体を寒天プレートから掻き取り、それを用いて200 mlのLBT培養液 ± 1% (w/v) グルコース + カナマイシン (50 μg/ml) に接種して、0.1~0.2の間のO.D. 600 nmを得た。培養物を37 °C にて250 RPMで一晩インキュベートした。

【0225】

この一夜培養物を、カナマイシン (50 μg/ml) 含有LBT培地500 mlで1:20に希釈し、37 °C にて250 rpmの搅拌速度で、O.D. 620が0.5/0.6に達するまで増殖させた。

【0226】

およそ0.6のO.D. 600 nmで、培養物を冷却してから、1 mMイソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG; EMD Chemicals Inc., カタログ番号: 5815) の添加によって組

50

換えタンパク質の発現を誘導し、23にて250 rpmで一晩インキュベートした。

【0227】

一晩(約16時間)誘導した後、誘導後のO.D._{600 nm}を調べてから、培養物を14000 rpmで15分間遠心分離し、ペレットを-20°で別々に凍結した。

【0228】

精製：

細菌のペレットを、500 mM NaCl及びプロテアーゼインヒビター混合物(コンプリート(Complete)、Roche)を含有する20 mMビシン(bicine)バッファー(pH 8.0)中に再懸濁した。20000 PSIでフレンチプレスシステムを用いて細菌を溶解させた。可溶性(上清)及び不溶性(ペレット)成分を、たとえば20 000gで30分間4にて、遠心することによって分離した。
10

【0229】

6-Hisタグのついたタンパク質は、IMACによって非変性条件下で精製された。可溶性成分を、細菌の再懸濁に使用したのと同じバッファーであらかじめ平衡化したGEカラム(たとえば15 ml)(Ni負荷)にロードした。カラムにロードした後、カラムを同バッファーで洗浄した。溶出は、500 mM NaCl及び異なる濃度のイミダゾール(5~600 mM)を含有する20 mMビシンバッファー(pH 8.0)を用いて行った。ゲル分析の後、より純粋な画分を選択して濃縮し、さらなる精製ステップのためにSECクロマトグラフィーにロードした。

【0230】

SDS-PAGEによる純度に基づいて、融合タンパク質を含有する画分を選択し、ビシンバッファー(20 mMビシン；150 mM NaCl；5 mM EDTAあり又はなし；pH 8.0)に対して透析した。タンパク質濃度は、バイオラッド(BioRad)のDCプロテインアッセイを用いて測定した。そこで、タンパク質をプールし、0.22 μmで無菌濾過して、-80°で保存した。
20

【0231】

あるいはまた、IMAC精製に先だって、ロード及び洗浄に2 mMビシンバッファー(pH 8.0)を用いたDEAE精製ステップを行い、1 M NaClを添加した以外は同じバッファーによって勾配を用いて溶出した。

【0232】

実施例 10

個別のC.ディフィシルToxA断片及びToxB断片のクローニング発現及び精製

30

発現プラスミド及び組換え菌株

ToxA及びToxBのタンパク質断片(配列番号8及び配列番号9)及びHisタグをコードする遺伝子を、標準的な手順により、pET24b(+)発現ベクター(Novagen)内に、NdeI/XbaI制限酵素部位を用いてクローニングした。CaCl₂処理細胞による標準的な方法にしたがって、大腸菌(E. coli)BLR(DE3)株を組換え発現ベクターで形質転換することによって、最終的な構築物が作製された(Hanahan D. << Plasmid transformation by Simanis. >> In Glover, D. M. (Ed), DNA cloning. IRL Press London. (1985): p. 109-135.)。

【0233】

宿主菌株：

BLR(DE3)。BLRはBL21のrecA派生株である。(DE3)の名称を有する菌株は、IPTG誘導性T7 RNAポリメラーゼを含有するプロファージに対して溶原性である。DE3溶原菌は、pETベクターからのタンパク質発現のためにデザインされている。この菌株はまた、lon及びompTプロテアーゼを欠失している。
40

【0234】

遺伝子型：大腸菌(E. coli)BLR::DE3株、F⁻ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3) (srI-recA)306::Tn10(Tet^R)。

【0235】

組換えタンパク質の発現：

大腸菌(E. coli)形質転換体を寒天プレートから搔き取り、それを用いて200 mlのLBT培養液±1% (w/v)グルコース+カナマイシン(50 μg/ml)に接種して、0.1~0.2の間
50

のO.D. 600 nmを得た。培養物を37 にて250 RPMで一晩インキュベートした。

【0236】

この一夜培養物を、カナマイシン (50 µg/ml) 含有LBT培地500 mlで1:20に希釀し、37 にて250 rpmの搅拌速度で、O.D.₆₂₀が0.5/0.6に達するまで増殖させた。

【0237】

およそ0.6のO.D. 600 nmで、培養物を冷却してから、1 mMイソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG; EMD Chemicals Inc., カタログ番号: 5815) の添加によって組換えタンパク質の発現を誘導し、23 にて250 rpmで一晩インキュベートした。

【0238】

一晩 (約16時間) 誘導した後、誘導後の600 nmでのO.D.を調べてから、培養物を14 000 rpmで15分間遠心分離し、ペレットを-20 で別々に凍結した。 10

【0239】

精製 :

500 mM NaClを含有し、プロテアーゼインヒビター混合物(コンプリート (Complete)、EDTAなし、Rocheカタログ11873580001)及びベンゾナーゼ (Rocheカタログ 1.01695.0001)を添加した、20 mMビシンバッファー (pH 8.0) 中に、細菌ペレットを再懸濁した。フレンチプレスシステムによって2 X 20000 PSIで細菌を溶解させた。可溶性 (上清) 及び不溶性 (ペレット) 成分を、34 000g若しくは48 000gで25 ~ 30分間4 にて遠心することによって分離した。上清を集めて、0.22 µmフィルターで濾過した。 20

【0240】

6-Hisタグのついたタンパク質は、IMACによって非変性条件下で精製された。可溶性成分を、細菌の再懸濁に使用したのと同じバッファーであらかじめ平衡化したGEカラム (たとえば15 ml) (Ni負荷) にロードした。ロードした後、カラムを同バッファーで洗浄した。 20

【0241】

ToxA用 :

溶出は、500 mM NaCl及び異なる濃度のイミダゾール (5 ~ 100 mM) を含有する20 mMビシンバッファー (pH 8.0) を用いて行った。ゲル分析の後、より純粋な画分を選択して濃縮し、さらなる精製ステップのために、イミダゾールなしの同バッファーで、SECクロマトグラフィー (SUPERDEX(商標名)75) にロードした。 30

【0242】

ToxB用 :

500 mM NaCl及び0.5% デオキシコール酸を含有する20 mMビシンバッファー (pH 8.0) 、又は150 mM NaClを含有する同バッファーで、2回目の洗浄を行った。溶出は、500 mM NaCl及び異なる濃度のイミダゾール (10 ~ 500 mM) を含有する20 mMビシンバッファー (pH 8.0) を用いて行った。ゲル分析の後、より純粋な画分を選択して5 mM EDTAを添加し、さらなる精製ステップのために、5 mM EDTAを含有する同バッファーで、SECクロマトグラフィー (SUPERDEX (商標名) 200) にロードした。 30

【0243】

SDS-PAGEによる純度に基づいて、ToxA又はToxB断片を含有する画分を選択し、ビシンバッファー (20 mMビシン、150 mM NaCl、pH 8.0) に対して透析し、タンパク質濃度を、バイオラッド (BioRad) のRCDCプロテインアッセイを用いて測定した。そこで、タンパク質をプールし、0.22 µmで無菌濾過して、-80 で保存した。 40

【0244】

実施例 11

5つのC.ディフィシリToxA-ToxB融合体の分子量評価

分析超遠心を用いて、遠心力に応じて分子が移動する速度を測定することによって、タンパク質サンプルにおいて異なる種の溶液中で均一性及びサイズ分布を決定する。これは、沈降速度実験によって得られる異なる種の沈降係数の算出に基づくが、それは分子の形状及び質量によって決まる。 50

【0245】

1. AN-60Tiローターを15に平衡化しておいた後、タンパク質サンプルをBeckman-Coulter PROTEOMELAB（商標名）XL-1分析用超遠心機で、42 000 rpmで回転させる。

- a. F1融合タンパク質、500g μ/ml、20mMビシン、150mM NaCl、pH8.0
- b. F2融合タンパク質、500g μ/ml、20mMビシン、150mM NaCl、pH8.0
- c. F3融合タンパク質、500g μ/ml、20mMビシン、150mM NaCl、pH8.0
- d. F4融合タンパク質、500g μ/ml、20mMビシン、150mM NaCl、pH8.0
- e. F5融合タンパク質、500g μ/ml、20mMビシン、150mM NaCl、pH8.0

2. データ収集のため、280nmで5分ごとに160スキャンを記録した。

3. C(S)分布を求めるためにSEDFITプログラムを用いてデータ解析を行った。タンパク質の偏比容の決定は、タンパク質のアミノ酸配列からSEDNTERPソフトウェアを用いて行った。SEDNTERPを用いて、バッファーの粘度及び密度も求めた。 10

4. 異なる種の分子量は、C(S)分布プロット（濃度-沈降係数）が、混合物のサイズ分布を特徴付けるC(M)分布（濃度 - 分子量）よりすぐれた生データの表現であることを考慮して、C(S)分布プロットから求めた。 20

【0246】

5つすべてのToxA-ToxB融合タンパク質のC(S)分布から検知された主要分子種の分子量は、単量体型に相当する。5つの融合体にもっとも適合する摩擦比はいずれも2から2.2の間である。これは、タンパク質が引き伸ばされた形で溶液中に存在することを示すと考えられ、それはタンパク質の構造と一貫するだろう。 20

【0247】

実施例12円二色性及び蛍光分光法によるC.ディフィシルToxA-ToxB融合体の二次構造及び三次構造の評価

円二色性を用いて、構造的非対称に起因する、左回り偏光と右回り偏光の吸収の差を測定することによって、タンパク質の二次構造の構成を確定する。遠紫外領域（190-250 nm）のCDスペクトルの形及び強さは、タンパク質がシート、ヘリックス、又はランダムコイル構造を示すかどうかで異なる。所定のタンパク質サンプル中のそれぞれの二次構造タイプの相対存在量は、基準スペクトルと比較することによって計算することができる。 30

【0248】

タンパク質サンプルの三次構造は、芳香族アミノ酸の不動性を評価することによって判定することができる。近紫外領域（250-50nm）でのCDシグナルの観察は、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン残基の極性化に起因する可能性があり、タンパク質が明確に定義された構造にフォールディングされていることのすぐれた指標である。 30

【0249】

以下のプロトコールを用いた：

1. Jasco J-720分光偏光計で、1 nmの分解能及び帯域幅によって、178から250 nmまで0.0 1 cmの光路を用いて遠紫外スペクトルを測定する。細胞の温度は、Peltier恒温RTE-111セルブロックによって23に維持する。測定の間、10L/分の窒素気流を維持する。 40

2. Jasco J-720分光偏光計で、1 nmの分解能及び帯域幅によって、250から300 nmまで0.0 1 cmの光路を用いて近紫外スペクトルを測定する。細胞の温度は、Peltier恒温RTE-111セルブロックによって23に維持する。測定の間、6L/分の窒素気流を維持する。

【0250】

5つのToxA-ToxB融合タンパク質のすべての遠紫外スペクトルの測定結果（図22）は、ヘリックス構造の含量が少なく、シート構造の含量が多いことを示唆する。また、すべてのタンパク質は230 nmで最大を示したが、これは可溶性球状タンパク質にとって異例である。このことは、特に、文献で十分に特徴付けられており、ヘリックスがなくてシート及び芳香族アミノ酸の含量が高いことで知られているタンパク質の小グループと関連付けられる（Zsilla, Analytical Biochemistry, 391(2009) 154-156）。それらの詳細事項は、ToxA-ToxB融合タンパク質に期待される構造と合致する。230 nmに陽性シグナル 50

を有する特徴的なCDスペクトルを示す13個のタンパク質の結晶構造を比較した(Protein Data Bank)。それらのタンパク質の平均的な二次構造含量は、42% シート±9%、及び7% ヘリックス±6%である。これは、ToxA-ToxB融合タンパク質のスペクトルの特徴が高いシート及び低ヘリックス含有タンパク質に特徴的であることを強く示唆する。

【0251】

5つの融合タンパク質すべての近紫外スペクトルの測定結果(図23)は、芳香族アミノ酸の少なくとも一部が動かなくなっていることを示し、これはコンパクトで特異的な三次構造を強く示すものである。さらに、変性させる濃度の尿素でタンパク質を処理すると、近紫外シグナルが消失したが、これは、こうした特徴的なスペクトルがタンパク質フォールディングに起因することを追加的に示すものである。

10

【0252】

実施例13

さらに4つの融合タンパク質のデザイン、クローニング、発現、及び精製

実施例1に記載のデザイン原則によって、さらに4つの融合タンパク質をデザインし、これらは、F54 Gly(配列番号21)、F54 New(配列番号23)、F5 ToxB(配列番号25)、及びF52 New(配列番号27)と名付けられた。

【0253】

これらの融合タンパク質は、実施例9に記載の手順にしたがって発現された。

【0254】

実施例14

20

配列番号21、配列番号23、配列番号25、及び配列番号27に記載のC.ディフィシリToxA-ToxB融合体の分子量評価

配列番号21、配列番号23、配列番号25、及び配列番号27に記載の融合体の分子量を、実施例11に記載のように測定した。

【0255】

配列番号21、配列番号23、配列番号25、及び配列番号27に記載の4つすべてのタンパク質融合体の、C(S)分布から決定された主要な分子種の分子量は、それらの単量体型に相当するものであって、すべてのタンパク質はF1からF5までの融合体と類似した沈降特性を示す。

【0256】

30

実施例15

配列番号21、配列番号23、配列番号25、及び配列番号27に記載のC.ディフィシリToxA-ToxB融合体の二次構造及び三次構造の評価

配列番号21、配列番号23、配列番号25、及び配列番号27に記載の融合体の二次構造及び三次構造を、実施例5に記載の方法にしたがって評価した。これらの融合タンパク質に関する遠紫外CDは図24で見られ、これらの融合体の近紫外スペクトルは図25に見いだすことができる。

【0257】

配列番号21、配列番号23、配列番号25、及び配列番号27に記載のタンパク質の近紫外、及び遠紫外CDスペクトルの分析は、4つすべてが、F1からF5までの融合体と同じく高率のシート構造を有することを示す。それに加えて、近紫外スペクトルの観測は、F1からF5までの融合体と比較して三次構造で芳香族アミノ酸の位置に有意な差がないことを示す。

40

【0258】

配列

配列番号1-トキシンAの配列

MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTTNNNENKYLQLKKLNESIDVFMNKYKTSSRNRLASNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFVWIGGEVDIALEYIKQWADI
NAEYNIKLWYDSEAFLVNTLKKAIIVESSTTEALQLEEEIQNPQFDNMKFYKCRMFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPTIDDIKSHLVSEYNRDETLESYRTNSLRKINSNHGIDIR
ANSLFTEQELLNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLALKNFGGVYLDVDMLPGIHSDLFKTISRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYYINNYTSENFDKLDQQQLKDNFKLIIESKSEKSEIFS
KLENLNVSDELIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSDLFNSATAENSMFLTKIAPYLVQGFMPEARSTISLSGPAYASAYYDF
INLQENTIEKTLKASDLIEFKPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYTGGSLEDNGVDFNKNTAIDKNYLLNNKIPSNNEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF
SKNPKNSSIIQRNMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLNKEKVVTFIGHKGDEF
NTSEFARLSVDSLSNEISSFLDTIKLDKDISPKNVEVNLGCNMFSYDFNVEETYPGKLLS
IMDKITSTLPDVNKNSTITGANQYEVRIINSEGRKEELAHSGKWINKEEAIMSDLSSKEYIFFFDISDNKLUKAKSKNIPGLASISEDIKTLLDASVSPDTKFILNNKLNIESSIGDYIYY
EKLEPVKNIIHNSIDDLIDEFNLLENVSDELYELKLNDEKYLISFEDISKNNSTYSVRFINKSNGESVYVETEKEIFSKYEHITKEJSTIKNSIITDVGNLLNDNIQLDHTSQVNT
LNAAFFIQLSLIDYSSNMDVLNDSLTSVVKVQLYAQLFSTGLNTIYDSIQLVNLIISNAVNDTINVLPTEGIPIVSTILDGINLGAAIKELLDDEHDPLLKKELEAKVGVLAINMLSIAAT
VASIVGIGAEVTIPLLPIAGISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLESKKYGPLKT
EDDKILVPIDDVLVISEIDFNNNSIKLGTNCNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIPSLSIYSAIGIETENLDFSKKIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLENDGTRLLSDIRDLY
PGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNIKLKDTRNFIMPTITTNEIRNKLSSYFDGA
GGTYSLLLSSYPISTNINLSKDDLWIFNIDNEVREISIENGTIKKGLIKDVLSKIDINK
NKLIIGNQTIDFSGIDDNKDRYIFLTCELDKIKSIIIEINLVAKSYSLLLSDGKNYLISN
LSNTIEKINTLGLDSKNIAYNYTDESNNKYFGAISKTSQKSIIHYKKDSKNILEFYNDST
LEFNSKDFIAEDINVFMKDDINTITGKYYVDNNNTDKSIDFSISLVSKNQVKVNGLYLNES
VYSSYLDVFKNSDGHHTSNFMNLFLDNISFWKLFGENINFVIDKYFTLVGKTNLGYVE
FICDNNKNIDIFYGEWKTSSSKSTIFSGNGRNVVVEPIYNPDGEDISTSLDFSYEPLYG
IDRYINKVLIAPDLYTSLININTNYYSEYYPEIIIVLPNTFHKKVNINLDSSSFYEWKWS
TEGSDFILVRYLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKMSIDFKDIKKLSSLGYIMSNFKSF
NSENELDRDHGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIEFNLVTGWQTINGK
KYYFDINTGAALTSYKIINGKHFYFNNNDGVMQLGVFKGPDGFEYFAPANTQNNNIEGQAI
VYQSKFLTLNGKYYFDNNSKAVTGWRIINNEKYYFPNNNAIAAVGLQVIDNNKYYFNPDT
TAIISKGWQTVNGSRYYFDTDATAIFNGYKTIIDGKHFYFDSDCVVKIGVFSTSNGFEYFA
PANTYNNNIEGQAIIVYQSKFLTLNGKYYFDNNSKAVTGLQTDSSKYYFNTNTAEAATG
WQTIDGKYYFNTNTAEAATGWQTIIDGKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQ
IGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTLNGKYYFGSDSKAVTGWRIINNK
KYYFPNNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGLILQNGYITIERNNFYFDANNESKMTGVFKG
PNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTLNGKYYFDNDSSKAVTGWQTIIDGKYYFNL
NTAEAATGWQTIIDGKYYFNLNTAEAATGWQTIIDGKYYFNTNTFIASTGTSINGKHFY
FNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKYYFGSDSKAVT
GLRTIDGKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDG
NRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAI
RYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV
DGVKAPGIYG

10

20

30

配列番号2-トキシンBの配列

MSLVNRKQLEKMANVRVRTQEDVEYVAILDALEEYHNMSENTVVEKYLKLKDINSLTDIYIDTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD
VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLNDPRFDYNKFFRKRMEEIIYDKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDEINTYIEESLNKITQNSGNDV

40

RNFEEFKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEIGGMYLDVDMPLGIQPDLFES
 TEKPSSVTDFWEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSEHFDMLEEVQSSFESVLASKSDKSEIF
 SSLGDMEA SPLEVKIAFNSKGIIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE
 DNDFNTTTNTFIDSIMAANADNGRFMMELGKYLGVFFF DVKTTINLSGPEAYAAAYQD
 LLMFKEGSMNIHLIEADLRNEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKRNYFE
 GSLGEDDNLDLFSQNIVVDKEYLLEKISSLARSSERGYIHYIVQLQGDKISYEAACNLFAK
 TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYNNPGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNT
 DIFAGFDVDSLSTEIAAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFSYSINVEETYPGKLLLKVK
 DKISELMPsisQDSIIVSANQYEVRIINSEGRRRELLDHSGEWINKEESIIKDISSKEYISF
 NPKENKITVKSKNLPTELSTLLQEIRNNSSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEER
 IEEAKNLTSDSINYIKDEFKLIESISDALCDLKQNELEDSHFISFEDISSETDEGFSIRF
 INKETGESIFVETEKTIFSEYANHITEEISKIKGTIFDTVNGKLVKKVNLDTHEVNTLN
 AAFFIQSLIEYNSSKESLSNVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 10
 LLPTLSEGLPIIATIIDI GVSLGAIAKELSETSDPLLQEQIEAKIGIMAVNLTTATTAIIT
 SSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELVLRDKATKVVDFKHVSLVETEGVFTLLD
 DKIMMPQDDLVISEIDFNNNSIVLGKCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL
 SIYDVLLEVQKEELDL SKDLMVL PNA PN RVFA WET GWT PGLRSLEN DGT KLL DRIRD NY EG
 EFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRS FIVPIITTEYIREKLSYSFYGSG
 GTYALSLSQYNMGINIELSES DVWIIDDVDNVRDV TIES DSKIKKGDLIEGILSTSIEEN
 KIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTFSILEGINAIIEVDLLSKSYKLLISGELKILMLNS
 NHIQQKIDYIGFNSELQKNIPYSFVDSEGFINGSTKEGLFVSELPDVVLISKVYMD
 DSKPSFGYYSSNNLKDVKITKDNVNILTGYYLKDDIKISLSLTLQDEKTIKLN SVHLD
 GVAEILKFMNRKGNTNTSDSMSFLES MNIKSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTT SIGQ
 FEFICDENDNIQPYFIKFNTLETNYTLYVGNRQNMIVEP NYD LDDSGDISSTVINFSQKY
 LY GIDSCVNKVVISPNIYTDEINITPVYETNNTYPEVIVLDANYINEKINVNINDLSIRY
 VWSNDGND FILM STSEENKVSVQVKIRFVNFKD KTLANKLSFNFS DK QDP VPSEIILSFT
 PSYYEDGLIGYDLGLVSLYNEKFYINNFGMMVSGLIYIINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVG 20
 DDKYYFNPINGGAASI GETIIDDKNYYFNQSGVLQ TG FV STEDGFKYFAPANTLDENLEG
 EAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGA E伟KE LDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN
 SDGVMQKG FVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFN TEDGFKYFA
 HHNEDLGNEEGEEIS YSGILNFNNKIYYFDDSF TAVVGWD LEDGSKYYFDE DTA EAYIG
 LSLINDGQYYFNDDGIMQVGFV TINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDNYFYIDDNGIVQIG
 VFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYQGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESD
 KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIED
 KMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINTGWLDLDEKRYFTDEYI
 AATGSVIIDGE EYYFDPDTAQLVISE

配列番号 3 – 融合体 1 の配列

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNF EYFAPANTDANNIEQAILYQ 30
 NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWI INNKYYYFPNPNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
 YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDND SKAVTGWQTIDGKK
 YYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTG TSINGKHFYFNTDGIM
 QIGVFKGPNF EYFAPANTDANNIEQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
 VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGF EYFAPANTDANNIEQAIRY
 QNRFLY LHNDIYYFGNNSKAATGWV TIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGF
 YFAPANTDANNIEQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAATGWQTINGKVYYFMPDTAMAAGGLFEIDGVI
 YFFGVGVKAPGFV SINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFN TEDGFKYFAHHNEDLGN
 EEEGEEIS YSGILNFNNKIYYFDDSF TAVVGWD LEDGSKYYFDE DTA EAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVG 40
 FVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDNYFYIDDNGIVQIGVFDTS DGYKYFAPANTVNDNIYQGQAVEYSGLV

RVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYY
FNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDEKRYYFT
DEYIAATGSVIIDGEEMYFDPTAQLVISE

配列番号 4 – 融合体 2 の配列

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNFSEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGRIINNKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNFSEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFSEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGNSNGF
YFAPANTDANNIEGQAIRYQNRLHLLGKIYYFGNNSKAATGWQTINGKVYYFMPDTAMAAGGLNQIGDYK
YYFNSDGMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGN
EEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDGIMQVG
FVTINDKVFYFSDGIIIESGVQNIDDNFYIIDDNGIVQIGVFDTSRGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLV
RVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYY
FNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDEKRYYFT
DEYIAATGSVIIDGEEMYFDPTAQLVISE

10

配列番号 5 – 融合体 3 の配列

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNFSEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGRIINNKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNFSEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFSEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGNSNGF
YFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQY
YFNDGIMQVGFVTINDKVFYFSDGIIIESGVQNIDDNFYIIDDNGIVQIGVFDTSRGYKYFAPANTVNDNI
YGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRT
GLISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTG
WLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEMYFDPTAQLVISE

30

配列番号 6 – 融合体 4 の配列

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNFSEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGRIINNKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNFSEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA

40

VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPFGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
 QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
 YFAPANTDANNIEGQAIRYQNRLFHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVVYFMPDTAMAAAGGETIIDDKN
 YYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIIDENIYYFDDNYRGAIVEWKELEDGEMHY
 FSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGV
 FNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFATAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGL
 SLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNFYIIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAP
 ANTVDNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETTYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYF
 DEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEG
 ESINYTGWLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

10

配列番号 7 – 融合体 5 の配列

MGWQТИDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
 NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
 YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLLNGKKYYFDNDSKAVTGWQТИDGKK
 YYFNLNTAEAATGWQТИDGKKYYFNLNTAEAATGWQТИDGKKYYFNTNTFIASTGTSINGKHFYFNTDGIM
 QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
 VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPFGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
 QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
 YFAPANTDANNIEGQAIRYQNRLFHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVVYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVI
 YFFGVDGVKAPGIYGGGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHN
 EDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFATAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDG
 IMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNFYIIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVE
 YSGLVRVGEDVYYFGETTYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFE
 NNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDEK
 RYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

20

配列番号 8 - 個々のトキシン A 断片の配列

MASTGTSINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLLNGKKYYFGSDSK
 AVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKPD
 GFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRLFYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRRYFEPNTAMGANGYKTIDN
 KNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRLFHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKV
 YYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVKAP

30

配列番号 9 – 個々のトキシン B 断片の配列

MILMSTSEENKSVQVKIRFVNFKDKTLANKLSFNFSQDKQDVPVSEIIILSFTPSYYEDGLIGYDLGLVSLYN
 EKFYINNFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVGDDKYYFNPPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSG
 VLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIIDENIYYFDDNYRGAIVEWKELEDGEMHYFSPETGK
 AFKGLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGF
 KYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFATAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQ

40

YYFNDDGIMQVGFVTINDKFYFSDSGIIESGVQNIDDNFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDN
IYGQAVEYSGLVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKACKGINLDDIKYYFDEKGIMR
TGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTG
WLDLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEHEYYFDPTA

配列番号 10 – 融合体 1 からのトキシン A 断片の配列

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNFSEYFAPANTDANNIEQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGRIINNKYYFNPNNAAIAIHLCIINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNFSEYFAPANTDANNIEQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFSEYFAPANTDANNIEQAIRY
QNRFPLYLHDNIYYFGNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGNSNGFE
YFAPANTDANNIEQAIRYQNRFLLGKIYYFGNSKAATGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVI
YFFGVGVKAP

10

配列番号 11 – 融合体 2 からのトキシン A 断片の配列

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNFSEYFAPANTDANNIEQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGRIINNKYYFNPNNAAIAIHLCIINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNFSEYFAPANTDANNIEQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFSEYFAPANTDANNIEQAIRY
QNRFPLYLHDNIYYFGNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGNSNGFE
YFAPANTDANNIEQAIRYQNRFLLGKIYYFGNSKAATGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAG

20

配列番号 12 – 融合体 3 からのトキシン A 断片の配列

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNFSEYFAPANTDANNIEQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGRIINNKYYFNPNNAAIAIHLCIINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNFSEYFAPANTDANNIEQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFSEYFAPANTDANNIEQAIRY
QNRFPLYLHDNIYYFGNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGNSNGFE
Y

30

配列番号 13 – 融合体 4 からのトキシン A 断片の配列

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNFSEYFAPANTDANNIEQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGRIINNKYYFNPNNAAIAIHLCIINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK

40

YYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
 QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
 VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
 QNRFLYLDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
 YFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAG

配列番号 14 – 融合体 5 からのトキシン A 断片の配列

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
 NEFLTLNGKYYFGSDSKAVTGRIINNKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF 10
 YFDANNESKMTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIYQNKFLTLNGKYYFDNDSKAVTGWQTINGKK
 YYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
 QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
 VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
 QNRFLYLDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
 YFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAGGLFEIDGVI
 YFFGVDPVKAPGIYG

配列番号 15 – 融合体 1 からのトキシン B 断片の配列

GFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYS 20
 LNFNNKIYYFDDSFATAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGSLINDGQYYFNDGIMQVGFVTINDKFYF
 SDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGE
 TYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGY
 INIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDEKRYYFTDEYIAATGSVI
 IDGEEYYYFDPDTAQLVISE

配列番号 16 – 融合体 2 からのトキシン B 断片の配列

GLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYF
 AHHNEDLGNEEGEEISYS GILNFNNKIYYFDDSFATAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGSLINDGQYYF 30
 NDDGIMQVGFVTINDKFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYG
 QAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGL
 ISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFYFAHQNTLDENFEGESINYTGWL
 DLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYYFDPDTAQLVISE

配列番号 17 – 融合体 3 からのトキシン B 断片の配列

FAHHNEDLGNEEGEEISYS GILNFNNKIYYFDDSFATAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGSLINDGQYY
 FNDDGIMQVGFVTINDKFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIY
 GQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTG 40
 LISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFYFAHQNTLDENFEGESINYTGWL
 DLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYYFDPDTAQLVISE

配列番号 18 – 融合体 4 からのトキシン B 断片の配列

GETI IDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEW
 KELDGEHYFSPETGAKGLNQIGDYKYYFNSDGVQMKGFSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFA
 ENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFATVVGWDLEDGSKYYFDE
 DTAEAYIGLSLINDGQYYFNDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFD
 SDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGIN
 LIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQ
 NTLDENFEGESINYTGWLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEYYFDPDTAQLVISE

配列番号 19 – 融合体 5 からのトキシン B 断片の配列

GFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGI
 LNFNNKIYYFDDSFATVVGWDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDGIMQVGFVTINDKVFYF
 SDSGIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSLVRVGEDVYYFGE
 TYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGY
 INIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHONTLDENFEGESINYTGWLDEKRYYFTDEYIAATGSVI
 IDGEYYFDPDTAQLVISE

10

配列番号 20 – F54 Gly 融合タンパク質のヌクレオチド配列

ATGGCAACCGGTTGGCAGACCATCGATGGAAAAAATTATTAAACCAACACCGCAATTGCAAGCACCGCTATACCATTATCAAC
 GGCAAACACTTTATTTAACACCGACGGCATTATGCAGATTGGTGTGTTAAAGGTCGAACGGCTTGAATACCTTGACCGCAAAAT
 ACCGATGCCAATAATTAAAGGCCAGGGCATTCTGTATCAGAATGAATTCTGACCCCTGAACGGAAAAAATACTACTTTGGCAGCGAT
 AGCAAAGCAGTTACCGGTTGGCGCATCATACAATAAGAAAATTACTCAACCCGAAATGCAATTGCAAGCAATTCTGTGACCC
 ATTAACACGACAATTATTTCAGCTATGACGGTATTCTGCAGAATGGCTACATTACCATCGAACGCAACAACTTTATTCGATGCC
 AACAAACGAAAGCAAATGGTGACCGGTGTTCAAAGGCCATTAGGCTTAATGGCTGAAACACCCATAATAACAAACATT
 GAAGGTCAAGCGATCGTTATCAGAACAAATTCCCTGACGCTGAATGGTAAGAAAATACTATTTCGATAATGACAGCAAAGCGTGACCGC
 TGGCAGACAATTGACGGGAAGAAAATTACTTTAATCTGAATACCGCAGAACGAGCAACGGTTGGCAAACGATCGACGGTAAAAGTAC
 TACTTCACCTGAAACACAGCGGAAGCAGGCCACAGGATGGCAGACTATTGATGGAAAAAATACTATTCAACACCAACACCTTTATGCA
 TCTACCGTTATACAGCATTAAACGGTAAACATTCTACTTCACACCCGATGGTATCATGCAGATCGCTGGTTCAAAGGTCCAATGGT
 TTGCAATACTTGCCTGCCAATACAGATGCAAATAACATCGAGGGTCAGGCAATTCTGTACCAAAACAAATTCTGACCCCTGAATGGG
 AAAAATATTACTTTGGTAGCGATTCTAAAGCGTTACCGGTGCGTACATTGATGGTAAAATACTACTTTAATACGAATACAGCC
 GTTGCCTTACAGGCTGGCAGACCATTAACGGAAAAAATACTATTAAACAAATACCGCATTCGCCTAACGGTTAACCTATT
 TCCTGGTAAACACTTCTACTTTAATACCGATGGTATTATGCAAATCGAGCTTCTGTATCTGCACGACAACATCTATTATTCGCAAC
 AACACTGCGAACATACTGAAGGACAGGCAATCCGTATCAGAACGCTTCTGTACATTGATGGTAAAATACTACTTTGGC
 ATTCAAAAGCAGCCACCGCTGGTTAACATTGATGCCAACCCCTACTATTTCGAACCGAACACCGCAATTGGTCAATGGCTACAAA
 ACCATCGATAATAAAATTCTATTTCGCAACGGCTGCGCAGATCGGGTATTAAAGGTAGCAACGGCTCGAATACTTCGCTCCA
 GCGAACACGGACGCGAACATAATTGAGGGTCAGCGATCGTTATCAAACCGTTCTGCATCTGCTGGCAAATACTACTTTGGC
 AATAACACTAAAGCAGTTACTGGATGGCAGACAATCGAACATTGGTAAAGGTACTATTTCGATGGGATACCGCATGGCAGCGCGTGGT
 CTGTTGAAATTGATGGCGTGTACTATTTCGATGGGATGGTAAAGCACGGGAATACGGTGGTACCGCTTGTGACCGTG
 GGTGATGATAAAATACTATTCAATCGATGGGATGGGATGGTAAAGCACGGGAATACGGTGGTACCGCTTGTGACCGTG
 CAGAGCGGTGCGCAGACGGGTGTTAGCACCGAACGGTAAATTTGCCACCGAACACCCCTGGATGAAAACCTGGAA
 GGCAGACGGATTGATTTACCGCAAACACTGATCATCGATGAAAACACTTACTTCGATGATAACTATCGGGTGCCTGGAAATGGAAA
 GAACCTGGATGGCAGGAAATGCAATTATTTCTCCGGAAACCGTAAAGCGTTAAAGGCTGAACGAGATCGCGATTACAAATACTACTTC
 AACAGCGATGGCGTGTACTGGGATGGGATGGTAAAGCAGGAAAGGCTGAGCATCACGATAACAAACACTATTTCGATGAGCGGTGATGAAAATGGCTAT
 ACCGAAATTGATGCCAACATTCGCGGAAACCGGCAATGCGAGATTGGCGTGTCAATACCGAACGGATGGTCAAATACTTC
 CGCAGGAAACGAGATCTGGGATGGGATGGGAAAGGCGAACGAGGCTGAGCATCACGATAACAAACAAATCTACTACTTT
 GATGATAGCTTACCGCGGTGGTGGCTGGAAAGATCTGGAGATGGCAGCAAATATTTCGATGAGCGTATATT

20

30

40

GGCCTGACCCGTGATTAACGATGCCAGTACTATTAAACGATGATGCCATTATGCAGCTGGTTCTGACCATTAATGATAAAGTGTTC
TATTTCAGCGATAACGGCATTATTGAAACCGCGTCCAGAACATTGATGATAACTACTCTACATCGATGATAACGGCATTGTGCAGATC
GGCGTTTTGATACCAGCGATGGCTACAATATTCCGACCGGCAATACCGTGAACGATAACATTATGCCAGCGGTGAAATATAGC
GGTCTGGTGCCTGTCGGCGAAGATGTATTATTCGGCAAACCTATACCATCGAACCCGGCTGGATTATGATATGAAAAGCAAAGC
GATAAAATTACTTTAATCCGAAACGAAAAAGCGTCAAAGGCATAACCTGATCGATGATACTAAATACTATTGATGAAAAGGC
ATTATGCCTACCGGTCTGATTAGCTTCGAAAACAACACTATTACTCAACGAAAACGGTAAATGCGAGTCGGCTACATCAACATCGAA
GATAAAATGTTCTACTTCGGCGAAGATGGTGTATGCAGATTGGTTTTAACACCCGGATGGCTCAAATACCTTGCCCACATCAGAAT
ACCTGGATGAAAATTTCGAAGGTGAAAGCATTAACTATACCGCTGGCTGGATCTGGATGAAAACGCTACTACTTCACCGATGAAATAC
ATTGCGGCACCGGCAGCGTGTATTGATGGCGAAGAATACTACTTCGATCCGGATACCGCGCAGCTGGTGTAGCGAACATCATCAT
CATCACCAT

配列番号 21 – F54 Gly 融合タンパク質のアミノ酸

10

MATGWQTIDGKYYFNTNTAIASTGYTIINGKFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQAILYQNEFLTLN
GKKYYFGSDSKAVTGWRILNNKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGLQNYITIERNNFYDANNESKMTGVF
KGPNFGEYFAPANTHNNNIEQAIYQNKEFLNLNGKYYFDNDSKAVTGWTIDGKYYFNLNTAAATGWQTIDGKYY
FNLNTAAATGWQTIDGKYYFNTNTFIASTGTSINGKFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQAILY
QNKEFLNLNGKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKYYFNTNTAVAVTGWTIDGKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDG
IMQIGVFKGPDFEYFAPANTDANNIEQAIKYQNRFYLHDNIIYFGNNNSKAATGWWTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKT
IDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEQAIKYQNRFLLNLGKITYFGNNSKAVTGWTIDGKYYFNTDG
DTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVKAPGIYGGTGFVTVGDDKYYFNPNGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVF
TEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYFDDNYRGAWEVKELDGMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN
SDGVMQKGFVSLNDNKHFFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDEGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSIL
NFNNNKIYYFDDSFATVVGWDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDGIMQVGFVTTNDKVFYFSDSGIIESG
VQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSRGKXFAPANTVNNDNIYQGAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESD
KYYFPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPD
GFKYFAHQNTLDENEGESINYTGWLDEKRYYFTDEYIAATGVIIDGEYYYFDPDTAQLVISEHHHHHH

配列番号 22 – F54 New 融合タンパク質のスクレオチド配列

ATGGCAACCGGTTGGCAGACCATCGATGCCAAAAAATTATTTAACCGACGGCATTATGCAGATTGGTGTGTTAAAGGTCGAAACGGCTTGTAAACTTTGACCCGAAAT
ACCGATGCCATAATATTGAAGGCCAGGCCATTCTGATCAGAAATGAAATTCTGACCCGAAACGGCTTGTAAACTTTGACCCGAAAT
ACCAAAGCAGTTACCGGTTGGCGCATCATCAACAATAAGAAATTACTTCACCCGAAATATGCAATTGCAATTGCAATTCTGACCCGAAAT
ATTAACAACGACAATATTTCAGCTATGACGGTATTCTGACGAAATGGCTACATTACCATGCAACGCAACAACTTTATTGACCCGAAAT
AAACAACGAAAGCAAATGGTACCGGTGTTCAAGGCCCTAATGGTTGGTATTTCGCTCCGGCAAACCCATAATAACACATT
GAAGGTCAAGGGTACGTTTATCAGAACAAATTCCGACGCTGAATGGTAAGAAATTACTATTTCGATAATGCAAGCAACGGTGTGACCCGAA
TGGCAGACAATTGACGGAAAGAAATTACTTCAGCTTAACCGCAAGCAGCAACGGTGTGCAACGATCGACGGTAAAGTAC
TACTTCACCTGAAACACAGCGAACAGCCACAGGATGGCAGACTATTGATGGAAAAAAATTACTATTTCACACCAAACACCTTTATTGCA
TCTACCGGTTATACCAGCATTAACGGTAAACATTCTACTTCACACCCGATGGTATCATGCAAGTCGGCTTCAAGGTCAAATGGT
TCGAATACTTTGCCCTGCAATACAGATGCAAATAACATCGAGGGTCAGGCAATTCTGTACCAAAACAAATTCTGACCCGAAATGGG
AAAAAATTACTTTGGTACCGATTCTAAAGCCGTTACCGGCTCGCTGCTACATTGATGGTAAAAAAATTACTTTAACGAAATACGAATACGCC
GTTGCGGTTACAGGCTGGCAGACCATAACGGGAAAAAAATTACTATTAAACAAATACCGCATTGCTCAACGGGTTACCAATT
TCGGTAAACACTTCACTTTAACCGATGGTATTATGCAAATCGGACTTTAAAGGACCTGATGGGTTGAAATTGGCCTGCG
AACACTGATGCGAACAAATATGCAAGGACAGGCAATCCGCTACAGAACATTCTGACCCGAAACATCTATTATGGCAAC
AATTCAAAGCAGCCACCGCTGGTTACAATTGATGGCAACGGCTACTATTGCAACCGAATACCGCAATGGGTCGAAATGGCTACAA
ACCATCGATAATAAAATTCTATTTCGCAACGGCTCGCCGAGATGGGTTATTAAAGGTAGCAACGGCTCGAAATCTCGCTCCA
GCGAACATCGAACAACTATTGAGGGTCAAGCGATTGTTATCAACCGTTCTGCACTGCTGGCAAACATTACTACTTTGGC
ATAAACAGTAAAGCAGTTACTGGATGGCAGACAATCAATGGTAAAGTGTACTATTATGCGGATACCGCCATGGCAGCAGCCGGTGGT
CTGTTGAAATTGATGGCGTGTCTATTGGTGTGGATGGTAAAGCAGTTACCGGCTTGTGACCGTGGGTGATGATAAATAC

20

30

40

TATTTCAATCCGATTAACGGTGGTCAGCGAGCATTGGCAAACCATCATCGATGACAAAAACTATTATTCACCAAGAGCGGTGTGCTG
 CAGACCCGGTGTGTTAGCACCGAAGATGGTTAAATTTGGCCAGCGAACACCCCTGGATGAAACCTGGAAAGCGAAGCGATTGAT
 TTTACCGGAAACTGATCATCGATGAAAACATCTATTACTTCGATGATAACTATCGTGGTGCAGGGATGGAAAGAAGACTGGATGGCAA
 ATGCATTATTTCTCCGAAACCGGTTAAAGCGTAAAGGCCGATTACAATACACTTCGATGAGCGGTGTGATGAAAGTGGCTATACCGAA
 ATGCAGAAAGGCTTGTGAGCATCACGATAACAAACATATTTCGATGAGCGGTGTGATGAAAGTGGCTATACCGAAATTGATGGC
 AAACATTCTACTTCGGGAAACCGCGAATGCGAGATTGGCGTGTCAATACCGAAGATGGTTCAAATACCTCGCGACCATAACGAA
 GATCTGGTAACGAAGAAGCGAAGAAATTAGCTATAGCGGATCCTGAACTTCACAAACAAATCTACTACTTGATGATAGCTTAC
 CGCGTGGTGGCTGAAAGATCGGAAGATGGCAGCAAATTATTTCGATGAGATAACCGCGAACCGTATATTGGCCTGAGCCTGATT
 AACGATGGCAGTACTATTAAACGATGATGGCATTATCGAGGTGGTTCTGACCATTAAATGATAAGTGTCTATTCAGCGATAGC
 GGCATTATTGAAAGCGCGTGCAGAACATTGATGATAACTACTTCACATCGATGATAACGGCATTGTGCGAGATCGCGTTTGATACC
 AGCGATGGCTACAAATTTCGACCGGCAATACCGTAACGATAACATTATGGCCAGCGGTGGAATATAGCGGTCTGGTGCCTG
 GCGGAAGATGTATTTCGCGAAACCTATACCATCGAAACCGCTGGATTATGATAATGAAACGAAAGCGATAATATTACTTT
 AATCCGGAACGAAAAAGCGTCAAAGGCTTAACCTGATGATGATAATCAAATACTATTGATGAAAGGCTTATCGTACCGG
 CTGATTAGCTCGAAAACAACACTATTACTCAACGAAAACGGTGAATGCACTTCGCTACATCACACATCGAAGATAAAATGTTAC
 TTCCGCGAAGATGGTGTATGAGATTGGTTAAACACCCGGATGGCTCAAATACCTTGCACATCGAATAACCCGGATGAAAAT
 TTGCAAGGTGAAAGCATTAACATACCGCTGGCTGGATCTGGATGAAAAACGCTACTACTTCACCGATGAAATACATTGCGCGACCGC
 AGCGTGAATTGATGGCGAAGAATACACTTCGATCCGATACCGCGAGCTGGTATTAGCGAACATCATCATCACCAT

配列番号 23 - F54 New 融合タンパク質のアミノ酸配列

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQQAILYQN
 EFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWIINNKYYFNPNNAIAIHLCTINNDKYYFSYDGLQNGYITIERNNFYFDANNESK
 MVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEQQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEATGWQTI
 DGKKYYFNLNTAEATGWQTIIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIE
 QQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHF
 YFNTDGIMQIGVFKGPDPGEYFAPANTDANNIEQAIRYQNRFLYHLHDNIIYFGNNSKAATGWWVTDGNRYYFEPNTAMG
 ANGYKTIDNKFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEQAIRYQNRFLHLLGKIYFGNNSKAATGWWVTDGNRYYFEPNTAMG
 VYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVYFFGVGDGVKAVTFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVF
 STEDFGFYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAIVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYF
 NSDGVMQKGFVSINDNKHFDSDGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEQIGVFNTEDGFYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGI
 LNFNNKIIYFDDSTAVVGWDLEDGSKYYFDEDETAEAYIGSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTTINDKVFYFSDSGIIES
 GVQNIIDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSRGKYFAPANTVNDNIYQOAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENES
 DKYYFNPETKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEQFGYIINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTP
 DGFKYFAHONTLDENFEGESINYTGWLIDLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISEHHHHHH

配列番号 24 -F5 ToxB 融合タンパク質のヌクレオチド配列

ATGGCAACCGGTTGCCAGACCATCGATGCCAAAAATTATTTAACCAACACCGCAATTGCAAGCACCGCTATACCATATCAAC
 GGCACAAACACTTTATTTAACACCGACGGCATTATCGAGATTGGTGTGTTAAAGGTCCGAACGGCTTGAATACTTCGACCGCAAAT
 ACCGATGCCAATAATATTGAAGGCCAGGCCATTCTGTATCAGAAATGAAATTCTGACCCCTGAACGCCAAAAACTACTTCGACCG
 AGCAAAGCAGTTACCGGTTGGCGCATCATCACAAATAAGAAATATTACTTCACCCGAAATATGCAATTGCAAGCAATTCTGTG
 ACCATTAAACACGACAAATTATTCAGCTATGACGGTATTCTGCAGAAATGGCTACATTACCATCGAACGCAACACTTTATTCGATGCC
 AACAAACGAAAGCAAATGGTACCGGTGTTCAAAAGGCCCTAATGGTTGAGTATTCGCTCCGCAAACACCCATAATAACACATT
 GAAGGGTCAGGGCAGTCGTTATCAGAACAAATTCTGACCGCTGAATGGTAAGAAATACTATTGATAATGACAGCAAAGCCGTGACCG
 TGGCAGACAATTGACGGGAAGAAATTACTTTAACGCAACACCGCAGCAGCACAGGATGGCAGACTATTGATGGAAAAAAACTATT
 TCAACCTGAAACACAGCGAACGCAGCACAGGATGGCAGACTATTGATGGAAAAAAACTATTCAACACCAACACCTTTATTGCA
 TCTACCGGTTATACCGCATTAACGGTAAACATTCTACTTCACACCCGATGGTATCATGCAAGATCGCGTTTCAAAGGTCCAATGGT
 TTCGAATACTTGCCCTGCCAATACAGATGCAAATAACATCGAGGGTCAGGCAATTCTGACCAAACAAATTCTGACCCGATGGG
 AAAAATATTACTTTGGTAGCGATTCTAAAGCCGTTACCGGTCTGCGTACCAATTGATGGTAAAAAAACTACTTTAACAGAACAGCC
 GTTGCAGGTTACAGGCTGGCAGACCATAACGGGAAAAAAACTATTAAACACAAATACAGCATTGCCAACGGGTTATACCAATT

10

20

30

40

TCGGGTAAACACTTCACTTTAACCGATGGTATTATGCAAATCGGAGTCCTTAAGGACCTGATGGGTCGAATATTTGCACCTGCG
 AACACTGATCGAACAAATATCGAAGGACAGGCAATCCCTATCAGAATCGCTTCTGTATCTGCACGACAATCTATTATTTGGCAAC
 AATTCAAAGCAGGCCACCGGCTGGGTTACAATTGATGGCAACCCTACTATTCGAACCGAATACCGCAATGGGTCGAATGGCTACAAA
 ACCATCGATAATAAAATTTCTATTTCGCAACGGCTGCCGAGATCGGGGATTAAAGGTAGCAACGGCTCGAATACCGCTCCA
 GCGAACATCGGACGCGAACAAATTGAGGGTCAAGCGATTCTGTTATCAAAACCGTTCTCATCTGCTGGCAAATCTACTAC
 AATAACAGTAAAGCAGTTACTGGATGGCAGACAATCAATGGTAAAGGTACTATTTATGCCGATACCGCATGGCAGCCGGTGGT
 CTGTTGAAATTGATGGCGTGTACTATTGGTGGATGGTGTAAAGCAGTGACCGGTCTGATTATTAACCGATAGCCTGTAT
 TACTTTAACCCACCGGTGATAAACCTGATTACCGCTTGTGACCGGGGTGATGATAAAACTATTCAATCGATTAACGGTGGTGA
 GCGAGCATTGGCAGAACCATCAGTACGACAAAAACTATTATTCACCAACAGCGGTGTGCTGCAGACCGGTGTTAGCACCGAAGAT
 GGCTTAAATATTTGCAGCGAACACCCCTGGATGAAAACCTGGAAGGCGAAGCGATTGATTTACCGCAAACACTGATCATCGATGAA
 AACATCTATTACTTCGATGATAACTATCGTGGTGCCTGGAATGAAAGAACTGGATGGCGAAATGCAATTATTTCTCCGAAACCGG
 AAAGCGTTAAAGGCTGAAACCAGATCGCATTACAATAACTACTTCAACAGCGATGGCGTGTGAGAAAGCCTTGTGAGCATCAC
 GATAACAAACACTATTCGATGATAGCGGTGATGAAAGTGGGCTATACCGAAATTGATGCCAAACATTCTACTTCGCGAAACCGC
 GAAATGCGAGATTGGCGTGTCAATACCGAAGATGGTTCAAATACTTCGCGCACCATAACGAAGATCTGGTAACGAAGAAGGCGAAGAA
 ATTAGCTATAGCGGCATCTGAACTTCAACACAAATCTACTACTTGTGATGAGCTTACCGCGTGGTGGCTGGAAAGATCTGCAA
 GATGGCAGCAAATATTTCGATGAAAGATACCGCGAAGCGTATATTGGCCTGAGCTGATTAACGATGGCAGTACTATTAAACGAT
 GATGGCATTATGCAGGTGGGTTCTGTGACCATTAATGATAAAAGTGTCTATTTCAGCGATAGCGCATTATTGAAAGCGCGTGCAGAAC
 ATTGATGATAACTACTTCACTACGATGATAACCGCATTGTGCAAGATCGCGTTTGATACCAGCGATGGCTACAAATATTCCGACCG
 GCCAATACCGTAACGATAACATTATGCCAGCGGTGGAATATAGCGGTCTGGTGCCTGGCGAAGATGTGATTATTCGGCGAA
 ACCTATAACCATCGAAACCGGCTGGATTATGATATGAAAACGAAAGCGATAAAATTACTTAAATCCGAAACGAAAAAGCGTGCAA
 GGCATTAACTGATGATGATAACTATTGATGAAAAGGCAATTGCGTACCGGTCTGATTAGCTTCGAAACAAACAACAT
 TACTTCACGAAAACCGTGAATGCAAGTTCGCTACATCAACATCGAAGAAAATGTTCTACTTCGCGAAGATGGTGTATGAGATT
 GGTGTTTAAACACCCGGATGGCTCAAATACTTTGCCATCAGAATACCGGATGAAAATTGAAAGGTGAAAGCATTAAACTATACC
 GGCTGGCTGGATCTGGATGAAAACGCTACTACTTCACCGATGAAATACATTGCGGCACCGCAGCGTATTGATGGCGAAGAATAC
 TACTTCGATCCGGATACCGCGCAGCTGGTGAATTAGCGAACATCATCATCACCAT

10

配列番号 25 -F5 ToxB 融合タンパク質のアミノ酸配列

MATGWQTIDGKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQAILYQN
 EFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWIINNKYYFNPNNATAIHLCTINDKYFSYDGLLQNGYITIERNNFYFDANNESK
 MVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSSKAVTGWQTDGKKYYFNLNTAEATGWQTI
 DGKKYYFNLNTAEATGWQTDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIE
 QOAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHF
 YFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQAIRYQNRFLYLDNIYYFGNNSKAATGWVTDGNRYYFEPNTAMG
 ANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEQAIRYQNRFLHLLGKIYFGNNSKAVTGWQTINGK
 VYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVGDGVKAWSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGE
 TIIDDKNYFNQSGVLQTVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIIDENIYYFDDNYRGAWEVKELDGEMHYF
 SPETGKAFKGKLNQIGDYKYYFNQSDGVMQKGVISINDNKHFFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKY
 FAHHNEDLGNEEGEEISYSGLNFPNNKIIYFDDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDETAEAYIGLSLINDGQYYFNDGIMQ
 VGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNFYIDNGIVQIGVFDTSRGYKYFAPANTVNDNIYQQAVEYSLVRVGEDV
 YYFGETTYTETGWIYDMENESDKYYFNPEPKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINI
 EDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINTGWLDLDEKRYYFTDEYIAATGSIIDGEYYFDPD
 TAQLVISEHHHHHH

20

配列番号 26 - F52 new 融合タンパク質のスクレオチド配列

ATGGCAACCGGTTGGCAGACCATCGATGGCAAAAAATTATTTAACCAACACCGCAATTGCAAGCACCGCTATACCATTATCAAC
 GGCAAAACACTTTATTTAACACCGACGGCATTATGCAAGATTCTGTGTAAAGGTCGAACGGCTTGTAAACCTTCGACCGCAAAT
 ACCGATGCCAATAATATTGAAGGCCAGGCCATTCTGTATCAGAATGAATTCTGACCCCTGAACGGCAAAACACTACTTCGACCGAT
 AGCAAAGCAGTTACCGGTTGGCGCATCATCAACAAATAAGAAATTACTTCACCCGAAATGCAATTGCAGCAATTCTGTGCACC

30

40

ATTAACAAACGACAAATATTATTCAGCTATGACGGTATTCTGCAGAATGGCTACATTACCATCGAACGCAACAACCTTTATTCGATGCC
 AACAAACGAAAGCAAATGGTGACCGGTGTTCAAAAGGCCATAATGGTTTGAGTATTCGCTCCGCAAACACCATAATAACAAACATT
 GAAGGTGAGCGATCGTTATCAGAACAAATCCGTGACGCTGAATGGTAAGAAATACTATTCGATAATGACAGCAAAGCCGTGACCGGC
 TGGCAGACAATTGACGGGAAGAAATATTACTTAACTGAATACCGCAGAACGGTTGGCAAACGATCGACGGTAAAAAGTAC
 TACTTCACCTGAACACAGCCGAAGCAGCACAGGATGGCAGACTATTGATGGAAAAAAATACTATTCAACACCAACACCTTTATTGCA
 TCTACCGTTATACCAGCATTAACGGTAAACATTCTACTTCACACCCGATGGTATCATGCAGATCGGCTTCAAAGGTCCAATGGT
 TTCGAATACTTTGCCCTGCAATACAGATGCAAATAACATCGAGGGTCAGGCAATCTGTACCAAAACAAATTTGACCCCTGAATGGG
 AAAAAAATATTACTTTGGTAGCGATTCTAAAGCGTTACCGGTGCGTACCATGATGGTAAAAAAATACTACTTTAATACGAATACAGCC
 GTTGCCTTACAGCCTGGCAGACCAATTACGGGAAAAAAATACTATTAAACACAAATACCGCATTCACGGGTATACCAATTATT
 TCAGGTTAACACTTCTACTTTAATACCGATGGTATTATGCAAATCGGAGTCTTAAAGGACCTGATGGGTTGAAATATTTGCGCTGCG
 AACACTGATGCGAACAAATATCGAAGGACAGGCAATCGCTATCAGAATCGCTTCTGTATCTGCACGACAACATCTATTGAC
 ATTCAAAAGCAGCCACCGCTGGTTACAATTGATGGCAACCGCTACTATTGAAACCGGAATACCGCAATGGGTGCAAATGGTACAAA
 ACCATCGATAATAAAATTTCTATTTCGCAACGGTCTGCCGAGATCGGGTATTTAAAGGATGCAACGGCTCGAATACTTCGCTCCA
 CGCAATACGGACGCGAACAAATATTGAGGGTCAAGCGATCGTTATCAGGTTCTGCATCTGCTGGCAAATCTACTACTTGGC
 AATAACAGTAAAGCAGTTACTGGATGGCAGACAATCAATGGTAAAGTGTACTATTGATGGGATACCGCATGGCAGCAGCCGGTGGT
 CTGTTGAAATTGATGGCGTGTATCTTTGGTGTGGATGGTAAAGCAGTGAAGGGCTGAACCAGATGGCATTACAAATAC
 TACTTCACAGCGATGGCGTGTGAGAAAGGCTTGTGAGCATCAACGATAACAAACACTATTGATGATAGGGTGTGATGAAAGTG
 GGCTATACCGAAATTGATGGCAAACATTCTACTTCGGGAAACGGGAAATGCAAGATTGGCTGTTAAACCGGAATGGTTCAAA
 TACTTCGCGACCATAACGAAGATCTGGTAACGAAGAAGCGAACAAATTAGCTATAGCGGCATCCTGAACACTCAACAAACAAATCTAC
 TACTTGTGATGATGCTTACCGCGTGGTGGCTGGAAAGATCTGGAGATGGCAGCAAATATTGATGAAAGATACCGCGGAAGCG
 TATATTGGCTGAGCCTGATTAACGATGCCAGTACTATTGAAACGATGGCATTATGCAAGGTGGTTCTGTGACCATTAAATGATAAA
 GTGTTCTATTTCAGCGATAACGGCATTATGAAACGGCGTGCAGAACATTGATGATAACTACTTCACATCGATGATAACGGCATTGTG
 CAGATCGCGTGGTGTGATACCGCAGTGGCTACAAATATTGCAACGGGCAATACCGTGAACGATAACATTGATGAAAGCGCGTGGAA
 TATAGCGGTCTGGTGTGGCGAAGATGTGTATTATTCGGCAGAACCTATACCATCGAACACCGGCTGGATTATGATGATGGAAA
 GAAAGCGATAAAATATTACTTTAATCCGAAACGAAAAAGCGTGCAGAACGATTAACCTGATGATGATGATGATAACGAAATATTGATGAA
 AAAGGCATTATGCGTACCGGTGATTAGCTTCGAAAAACAACAACATTACTTCACGAAAACGGTGAATGCAAGTTGGCTCATCAAC
 ATCGAAGATAAAATGTTCTACTTCGGCGAAGATGGTGTATGCAAGATTGGTGTAAACACCCGGATGGCTCAAATACCTTGGCCAT
 CAGAATACCCCTGGATGAAATTGCAAGGTGAAACGATTAACCTACCCGGTGGATCTGGATGAAACGCTACTACTTCACCGGAT
 GAATACATTGCGCGACCGGCAGCGTATTGATGGCGAAGAATACTACTTCGATCCGGATACCGCGCAGCTGGTATTAGCGAACAT
 CATCATCATCACCAT

配列番号 27 – F52 New 融合タンパク質のアミノ酸配列

MATGWQTIDGKKYYFNTNTIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTLN
 GKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNYITIERNNFYFDANNESKMTGVF
 KGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIYQNKFLTLNGKYYFDNDGSKAVTGWQTDGKYYFNLNTAAATGWQTDGKYY
 FNLTAAATGQWTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILY
 QNKFLTLNGKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVTGWQTINGKYYFNTNTSIASTGYTISGKHFYFNTDG
 IMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAIYQNRFLYLDNIYYFGNNNSKAATGWVTDGKYYFEPNTAMGANGYKT
 IDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKYYFMP
 DTAMAAAGGLFEIDGVIYFEGVDGVKAVKGLNQIGDYKYYFNNSDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFY
 FAENGENQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIIYYFDDSFATVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAY
 IGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDDNYFYIDDNGIVQIGVFTSDGYKYFAPANTVN
 DNIYQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISF
 ENNNYYFNENGENQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDEKRYYFTDE
 YIAATGSVIIDGEYYYFDPTAQLVISEHHHHHH

10

20

30

40

配列番号 28 – F54 Gly のトキシン A 断片の配列

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQAIL
 YQNEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRINNNKYYFPNNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERN
 NFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDG
 KKYYFNLNTAEEATGWQTIDGKKYYFNLNTAEEATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGTSINGKHFYFNTDG
 IMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQAILYQNKFLLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTA
 VAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEQAI
 RYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNG
 FEYFAPANTDANNIEQAIRYQNRLFHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLEIDG
 VIYFFGVDGVKAPGIYG

10

配列番号 29 – F54 New のトキシン A 断片の配列

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQAIL
 YQNEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRINNNKYYFPNNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERN
 NFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDG
 KKYYFNLNTAEEATGWQTIDGKKYYFNLNTAEEATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGTSINGKHFYFNTDG
 IMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQAILYQNKFLLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTA
 VAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEQAI
 RYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNG
 FEYFAPANTDANNIEQAIRYQNRLFHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLEIDG
 VIYFFGVDGVKAV

20

配列番号 30 – F5 ToxB のトキシン A 断片の配列

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQAIL
 YQNEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRINNNKYYFPNNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERN
 NFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDG
 KKYYFNLNTAEEATGWQTIDGKKYYFNLNTAEEATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGTSINGKHFYFNTDG
 IMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQAILYQNKFLLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTA
 VAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEQAI
 RYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNG
 FEYFAPANTDANNIEQAIRYQNRLFHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLEIDG
 VIYFFGVDGVKAV

30

配列番号 31 – F52 New のトキシン A 断片の配列

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQAIL
 YQNEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRINNNKYYFPNNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERN
 NFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDG
 KKYYFNLNTAEEATGWQTIDGKKYYFNLNTAEEATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGTSINGKHFYFNTDG
 IMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQAILYQNKFLLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTA

40

VAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDFEYFAPANTDANNIEGQAI
RYQNRFILHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNG
FEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDG
VIYFFGVDGVKAV

配列番号 32 – F54Gly のトキシン B 断片の配列

TGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDF
TGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFVSINDNKH
YFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGLNFNNKIYYF
10 DDSFTAVVGWWDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFTINDKVFYFSDSGIIESGV
QNIDDNYFYIIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIY
DMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYF
GEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEYYYFDP
DTAQLVISE

配列番号 33 – F54 New のトキシン B 断片の配列

TGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDF
TGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFVSINDNKH
YFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGLNFNNKIYYF
20 DDSFTAVVGWWDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFTINDKVFYFSDSGIIESGV
QNIDDNYFYIIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIY
DMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYF
GEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEYYYFDP
DTAQLVISE

配列番号 34 – F5 ToxB のトキシン B 断片の配列

SGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDG
FKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYK
30 YYFNSDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLG
NEEGEEISYSGLNFNNKIYYFDDSFATAVVGWWDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVG
FVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGL
RVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYY
FNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDEKRYYFT
DEYIAATGSVIIDGEYYYFDPDTAQLVISE

配列番号 35 – F52 New のトキシン B 断片の配列

KGLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKY
FAHHNEDLGNEEGEEISYSGLNFNNKIYYFDDSFATAVVGWWDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYY
40 FNDDGIMQVGFTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIY
GQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTG

LISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWL
DLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPTAQLVISE

配列番号 36 – C-TAB.G5 融合タンパク質

MVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLLNGKKYYFDND SKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAE
ATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKH FYFNTDGIMQIGVFKGP
GFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGQTING
KKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFYLHD
NIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDA
NNIEGQAIRYQNRFHLGGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVYIYFFGV
APGIYGRSMHNLTGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVFSTEDGFKYFAPAN
TLDENLEGEAIDFTGKLIIIDENIYYFDDNYRGAWEVKELDGE MHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGV
MQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKH FYFAENGEMQIGVFNTE
DGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISY
SGILNFNNKIYYFDDSFATAVVGWDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDGIMQVGFVTINDK
FYFSDSGIIESGVQNIDDNFYIDDNGIVQIGVFDTS
DGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYY
FGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKG
IMRTGLISFENNNYYFNEN
GEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWL
DLDEKRYYFTDEYIAATGS
VIIDGEEYYFDPTAQLVISE

10

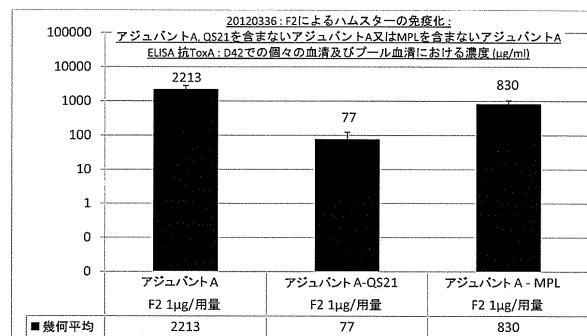
配列番号 37 C-TAB.G5.1 融合タンパク質

20

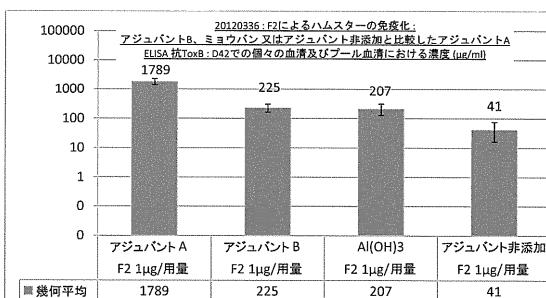
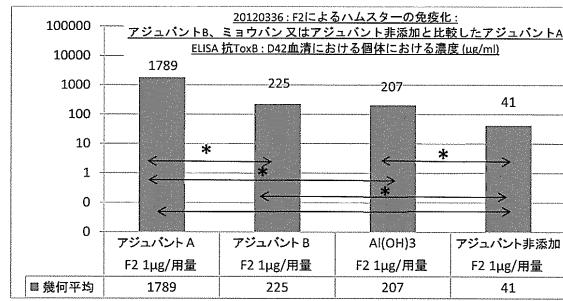
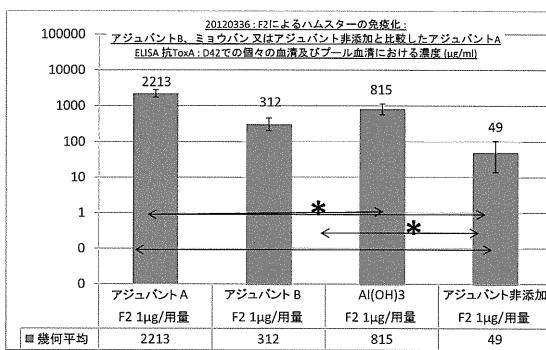
VTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLLNGKKYYFDND SKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEA
ATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKH FYFNTDGIMQIGVFKGP
GFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGQTING
KKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFYLHD
IYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDA
NNIEGQAIRYQNRFHLGGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVYIYFFGV
PGIYGRSMHNLTGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVFSTEDGFKYFAPAN
LDENLEGEAIDFTGKLIIIDENIYYFDDNYRGAWEVKELDGE MHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGV
QKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKH FYFAENGEMQIGVFNTE
DGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYS
GILNFNNKIYYFDDSFATAVVGWDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDGIMQVGFVTINDK
FYFSDSGIIESGVQNIDDNFYIDDNGIVQIGVFDTS
DGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYY
FGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKG
IMRTGLISFENNNYYFNEN
GEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWL
DLDEKRYYFTDEYIAATGS
VIIDGEEYYFDPTAQLVISE

30

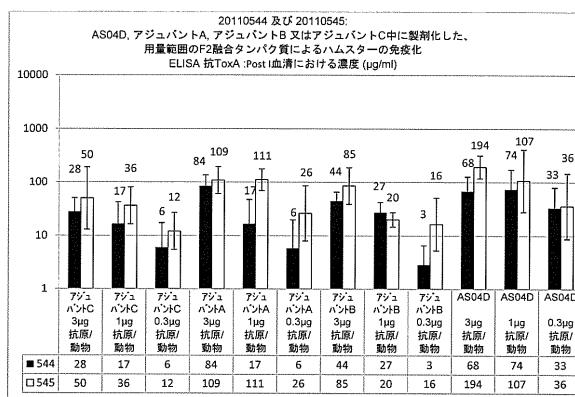
【図1】



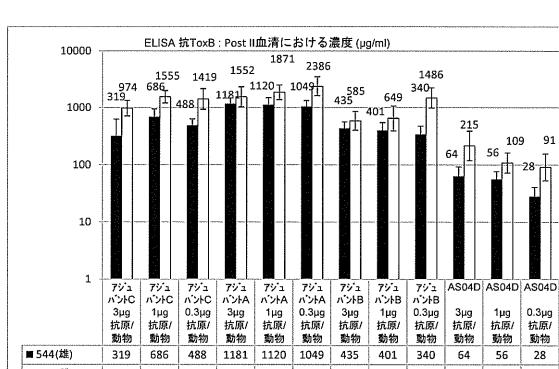
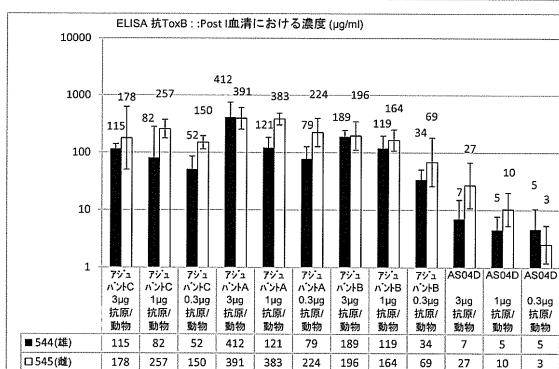
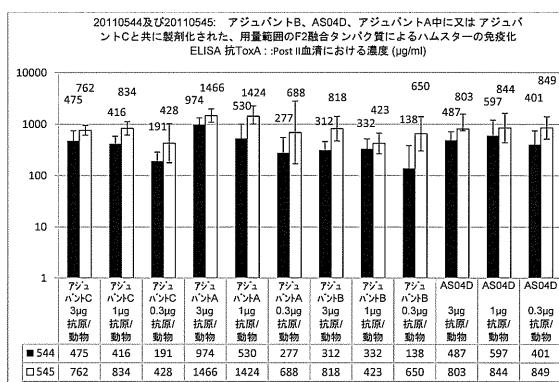
【図2】



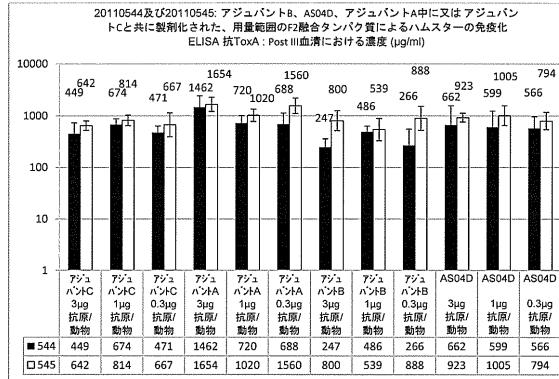
【図3】



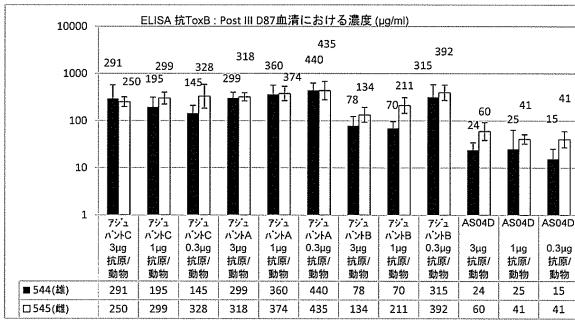
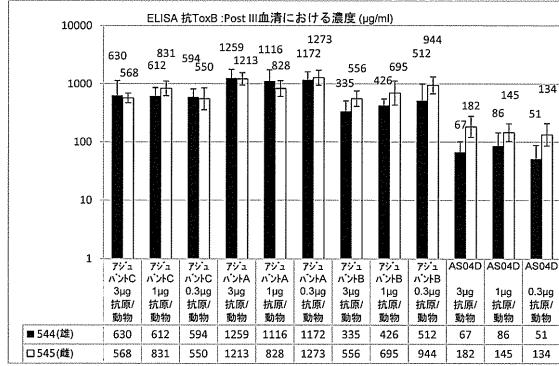
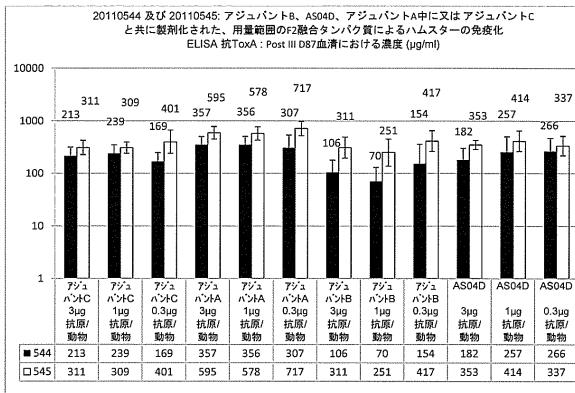
【図4】



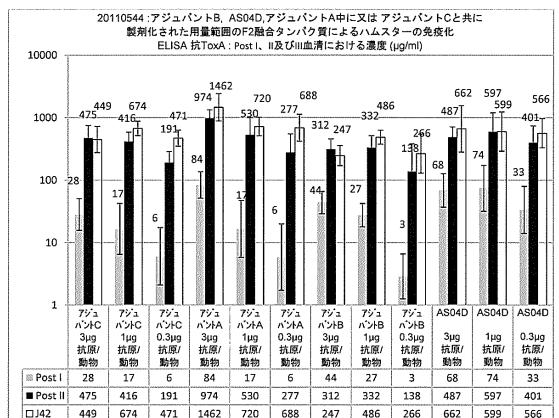
【図5】



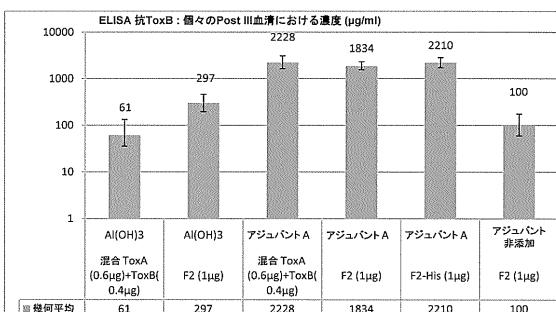
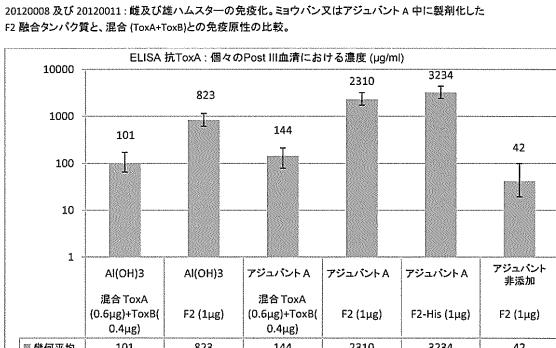
【図6】



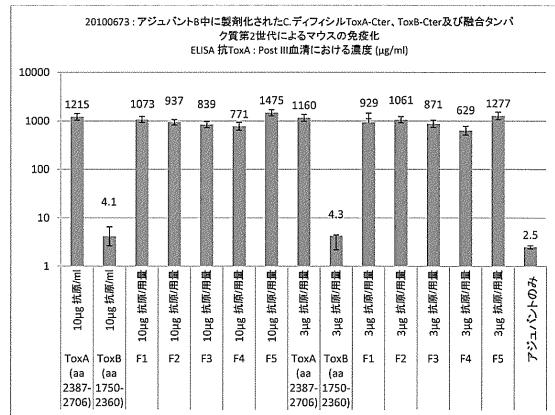
【図7】



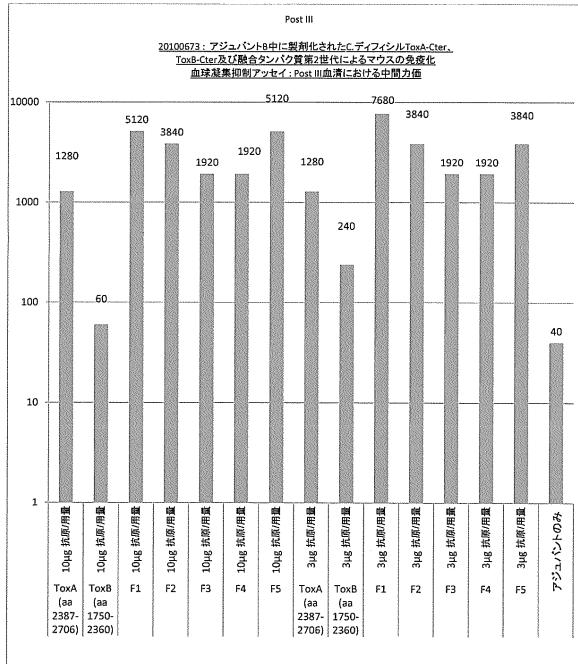
【図8】



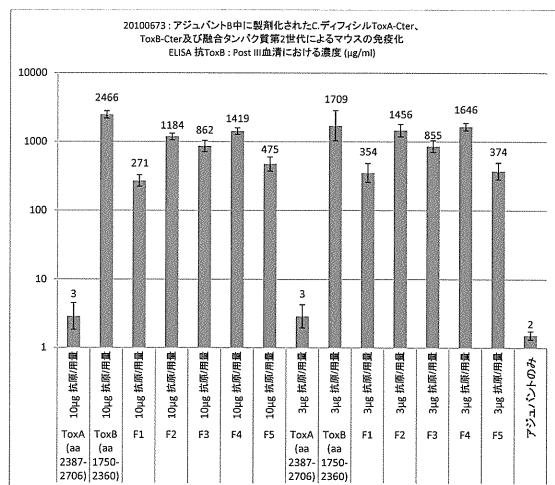
【図9】



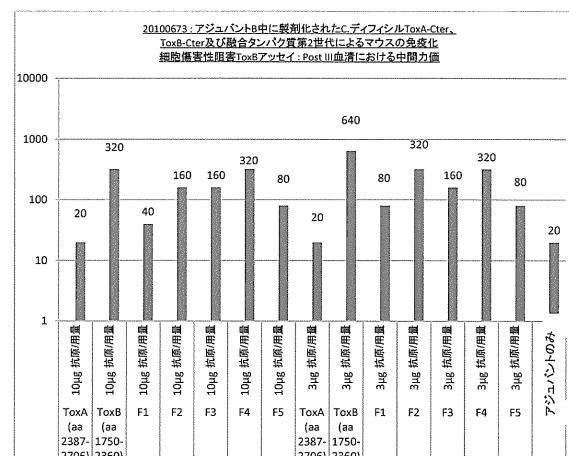
【図10】



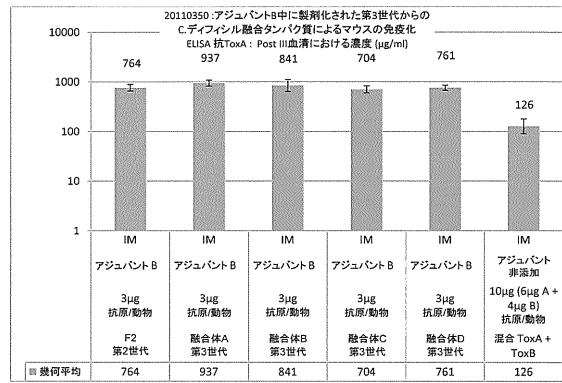
【図11】



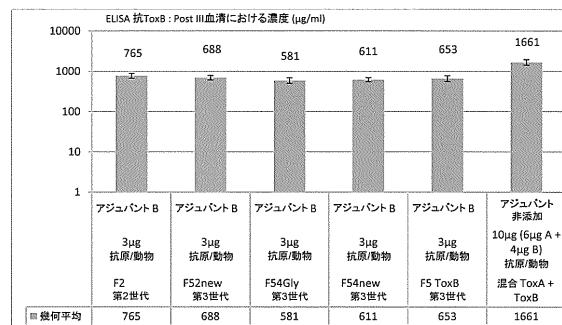
【図12】



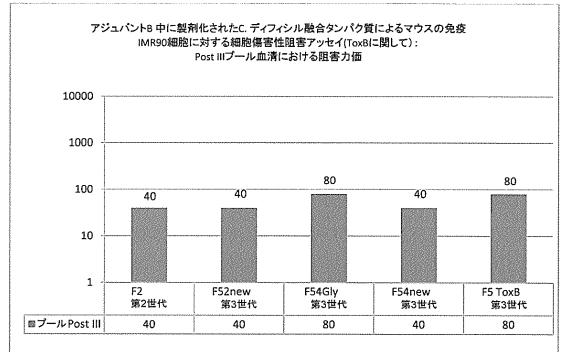
【 図 1 3 】



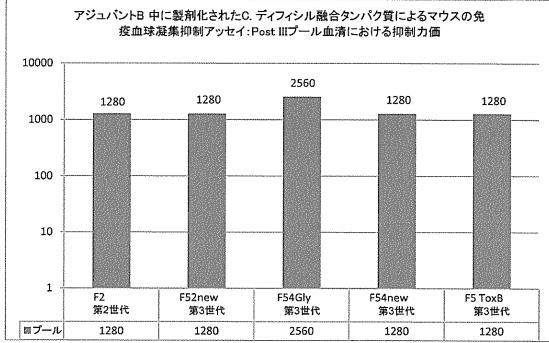
【図14】



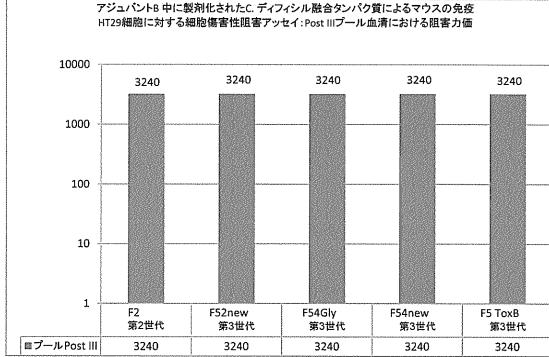
【図17】



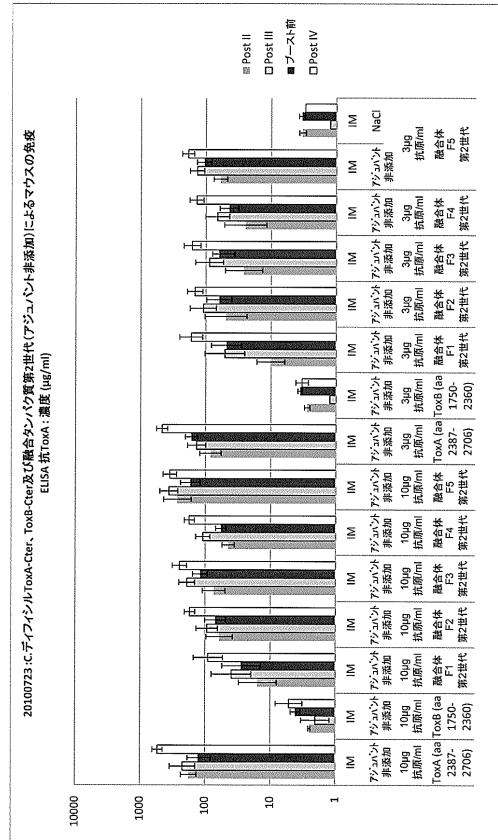
【図15】



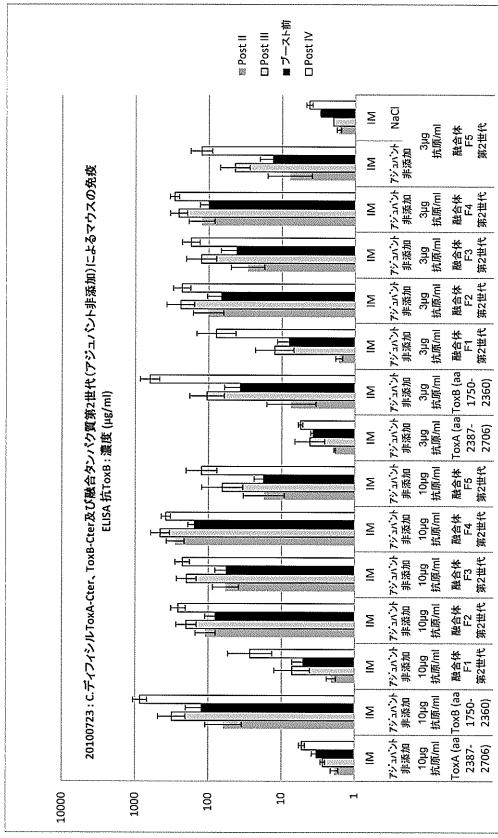
【 図 1 6 】



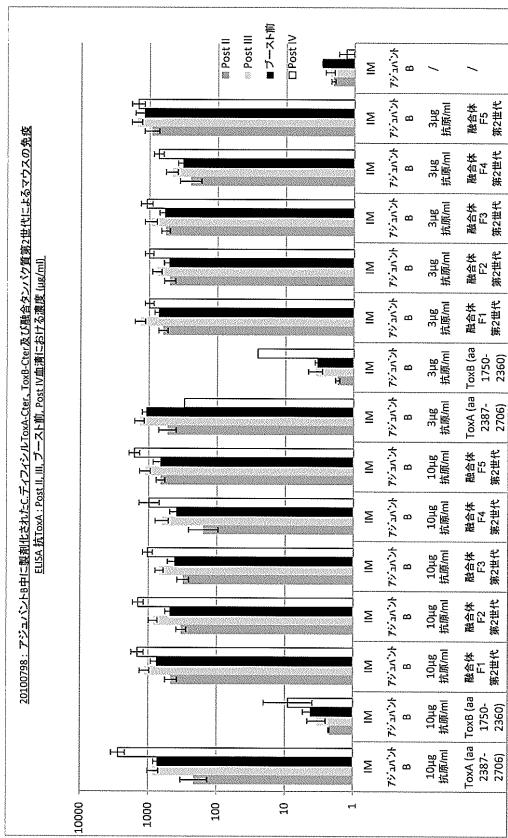
【 図 1 8 】



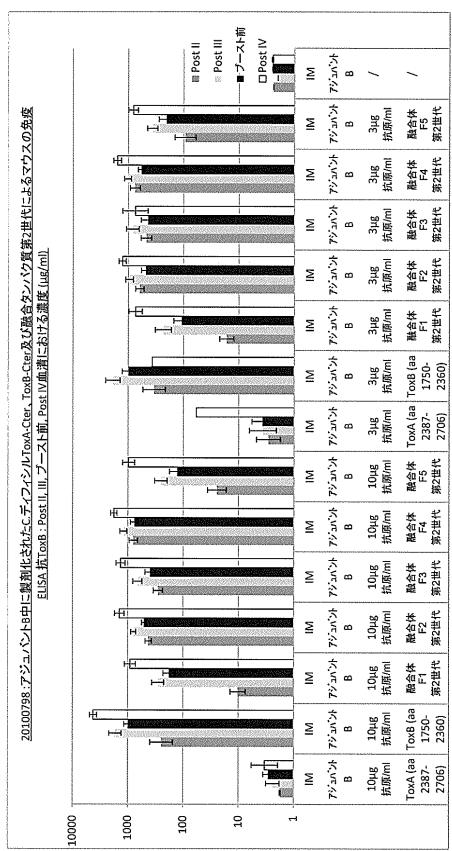
【図19】



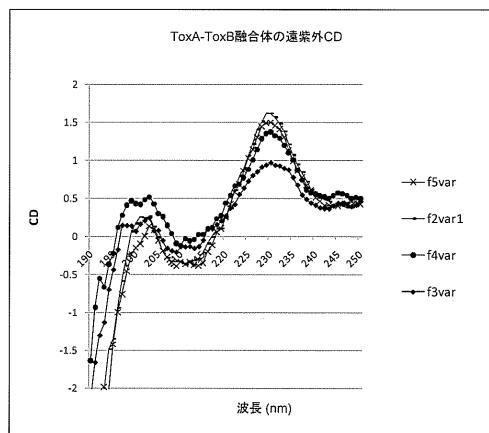
【図20】



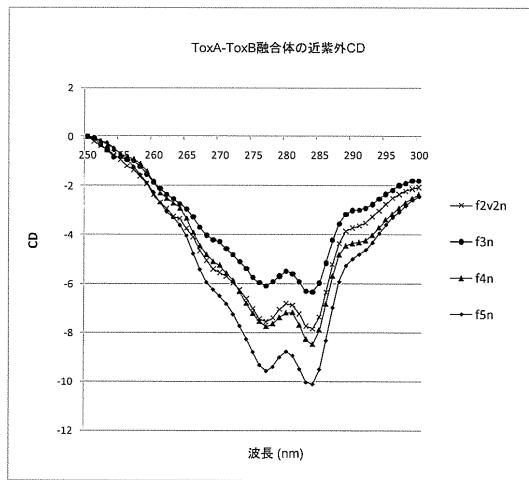
【図21】



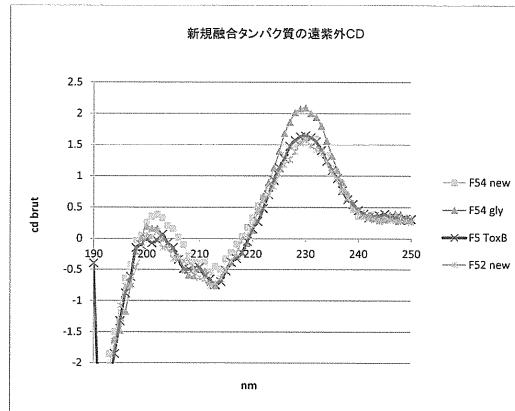
【図22】



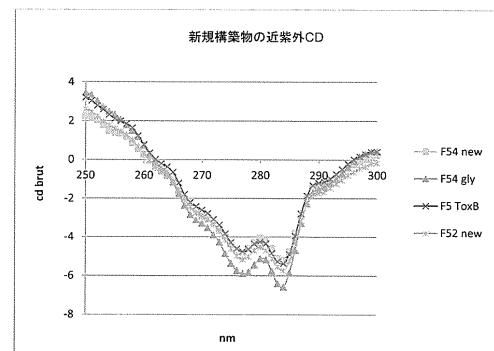
【図23】



【図24】



【図25】



【配列表】

0006290918000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00
C 0 7 K 14/33 (2006.01)	C 0 7 K 14/33

(74)代理人 100194618

弁理士 鶴田 聰子

(72)発明者 ボウトリュー, ドミニク

ベルギー ベー- 1330 リクセンサール, リュ ドランステイテュ 89, グラクソスミスク
ライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72)発明者 ジャーメイン, ソフィー マリー ジェーン バレンタイン

ベルギー ベー- 1330 リクセンサール, リュ ドランステイテュ 89, グラクソスミスク
ライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72)発明者 ウォールマック, ヒューゲース

ベルギー ベー- 1330 リクセンサール, リュ ドランステイテュ 89, グラクソスミスク
ライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

審査官 幸田 俊希

(56)参考文献 国際公開第2007/068907 (WO, A1)

国際公開第2012/028741 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 39 / 00

C 1 2 N 15 / 00

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)