

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7511549号
(P7511549)

(45)発行日 令和6年7月5日(2024.7.5)

(24)登録日 令和6年6月27日(2024.6.27)

(51)国際特許分類		F I		
C 0 7 K	14/33 (2006.01)	C 0 7 K	14/33	Z N A
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/39	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	13/10 (2006.01)	A 6 1 P	13/10	
請求項の数 9 (全83頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2021-517796(P2021-517796)	(73)特許権者	517340507	
(86)(22)出願日	令和1年9月27日(2019.9.27)		イプセン バイオファーム リミテッド	
(65)公表番号	特表2022-512573(P2022-512573 A)		I P S E N B I O P H A R M L I M I T E D	
(43)公表日	令和4年2月7日(2022.2.7)		イギリス, エルエル13 9ユーエフ レクサム, レクサム インダストリアル エステート, ユニット 9 アッシュ ロード	
(86)国際出願番号	PCT/GB2019/052732	(74)代理人	110000774	
(87)国際公開番号	WO2020/065336		弁理士法人 もえぎ特許事務所	
(87)国際公開日	令和2年4月2日(2020.4.2)	(72)発明者	クビンスキー, アダム	
審査請求日	令和3年12月20日(2021.12.20)		イギリス, レクサム エルエル13 9ユーエフ, レクサム インダストリアル エステート, アッシュ ロード, ユニット 9, イプセン バイオファーム リミテッド内	
審判番号	不服2023-18315(P2023-18315/J 1)			
審判請求日	令和5年10月30日(2023.10.30)			
(31)優先権主張番号	1815817.0			
(32)優先日	平成30年9月28日(2018.9.28)			
(33)優先権主張国・地域又は機関				
	最終頁に続く			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 外因性活性化ループを含むクロストリジウム神経毒

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

単鎖改変クロストリジウム神経毒を、対応する二本鎖改変クロストリジウム神経毒ヘタ
ンパク分解性にプロセッシングする方法であって、

a. 内因性活性化ループが外因性活性化ループと置き換えられている単鎖改変クロストリ
ジウム神経毒を提供することと、

b. 当該単鎖改変クロストリジウム神経毒を、エンテロキナーゼと接触させることと
を含み、

当該外因性活性化ループは、ポリペプチド配列Cys-(Xaa)_a-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cys(配列番号1)を含み、a=1~10およびb=4~20であり、

当該改変クロストリジウム神経毒はボツリヌス神経毒血清型C1(BoNT/C1)ではなく、
かつ

エンテロキナーゼは、当該外因性活性化ループの配列番号1のArgとYaaの間のペプチド
結合を加水分解し、それによって、前記二本鎖改変クロストリジウム神経毒を生成する、
方法。

【請求項2】

内因性活性化ループが、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番
号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30
、配列番号31、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配
列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70または配列番号71から

選択される1つ以上である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

請求項1又は2に記載の方法: ここで、

a. $a=2\sim 4$ である;

b. $a=3$ である;

c. $b=6\sim 10$ である;

d. $b=8$ である;

e. 外因性活性化ループは、配列番号2または配列番号3に対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む;

f. 外因性活性化ループは、配列番号2または配列番号3を有するポリペプチド配列を含む;

g. 外因性活性化ループは、配列番号2を含む; 且つ/又は

h. 外因性活性化ループは、配列番号2からなる。

【請求項4】

請求項1から3のいずれか一項に記載の方法: ここで、

a. クロストリジウム神経毒は、クロストリジウム神経毒の機能的Hcドメインを欠く;

b. クロストリジウム神経毒は、非クロストリジウムの標的化部分(TM)を含む再標的化されたクロストリジウム神経毒である;

c. 改変クロストリジウム神経毒は、標的化部分(TM)を含む再標的化されたクロストリジウム神経毒であり、TMは、炭疽病毒毒素防御抗原(PA)またはその断片を含み、当該断片はPAd1、PAd2、PAd3、PAd4、PA63、PAd3-d4、PAd2-d4、又はこれらの組合せである; 且つ/又は

d. 改変クロストリジウム神経毒は、

i. 配列番号52またはその断片、ここで、当該断片はPAd1、PAd2、PAd3、PAd4、PA63、PAd3-d4、PAd2-d4、又はこれらの組合せである、および

ii. 配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59または配列番号60

を含むポリペプチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチド配列を有する。

【請求項5】

請求項1から4のいずれか一項に記載の方法: ここで、

a. クロストリジウム神経毒は、BoNT/A、BoNT/B、BoNT/D、BoNT/E、BoNT/F、BoNT/G、BoNT/XおよびTeNTから選択される;

b. クロストリジウム神経毒は、BoNT/X、BoNT/E、キメラBoNTまたはハイブリッドBoNTである; 且つ/又は

c. クロストリジウム神経毒は、

i. 配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10もしくは配列番号12に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるか、または

ii. 配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11もしくは配列番号13に対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。

【請求項6】

請求項1から5のいずれか一項に記載の方法によって得ることができる二本鎖改変クロストリジウム神経毒。

【請求項7】

請求項6に記載の二本鎖改変クロストリジウム神経毒および医薬上許容される担体、賦形剤、アジュバント、噴射剤および/または塩を含む医薬組成物。

【請求項8】

不要な免疫分泌と関連する状態、斜視、眼瞼痙攣、内斜視、ジストニア、痙攣性ジストニア、顎口腔ジストニア、局所性ジストニア、遅発性ジストニア、喉頭ジストニア、四肢ジストニア、頸部ジストニア、斜頸、痙攣性斜頸、細胞/筋肉無能力化(SNARE下方制御または不活性化による)から恩恵を受ける美容療法(美容)適用、眼性運動性の神経筋障害または

10

20

30

40

50

状態、共同性(concomitant)斜視、上下斜視、外直筋麻痺、眼振、甲状腺異常筋疾患、書痙、歯ぎしり、ウィルソン病、振戦、チック、分節性ミオクロヌス、攣縮、慢性多発性硬化症による痙縮、異常な膀胱制御をもたらす痙縮、背部痙攣、こむら返り、緊張性頭痛、骨盤拳筋症候群、二分脊椎症、遅発性ジスキネジア、パーキンソン病、吃音、片側顔面痙攣、眼瞼障害、脳性麻痺、局所性痙縮、痙攣性大腸炎、神経因性膀胱、アニスムス、四肢痙縮、裂肛、アカラシア、嚥下障害、流涙、多汗症、過度の唾液分泌、過度の胃腸管分泌、筋肉痛、筋肉攣縮からの疼痛、頭痛疼痛、緊張性頭痛、皺のよった額、皮膚の皺、癌、子宮障害、泌尿生殖器障害、泌尿生殖器-神経疾患、慢性神経原性炎症および平滑筋障害のうち1以上の処置において使用するための医薬であって、請求項6に記載の二本鎖改変クロストリジウム神経毒または請求項7に記載の医薬組成物を含む医薬。

10

【請求項9】

試験管内又は生体外における、 $a=1\sim 10$ および $b=4\sim 20$ であるポリペプチド配列Cys-(Xaa)_a-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cys(配列番号1)を含むポリペプチドのペプチド結合を加水分解するためのエンテロキナーゼの使用:ここで、エンテロキナーゼは、当該ポリペプチドに含まれる配列番号1のArgとYaaの間のペプチド結合を加水分解する。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、クロストリジウム神経毒ならびにそれを活性化および使用する方法に関する。

【背景技術】

20

【0002】

クロストリジウム属の細菌は、高度に強力な特異的タンパク質毒素を産生し、これは、送達されるニューロンおよびその他の細胞を毒することができる。このようなクロストリジウム神経毒の例として、C.テタニ(tetani)によって産生される神経毒(TeNT)およびC.ボツリヌム(botulinum)によって産生される神経毒(BoNT)血清型A～GおよびX(WO2018/009903A2を参照されたい)ならびにC.バラティ(baratii)およびC.ブチリカム(butyricum)によって産生されるものが挙げられる。

【0003】

クロストリジウム神経毒は既知の最も強力な毒の一つである。例として、ボツリヌス神経毒は、血清型に応じて0.5～5ng/kgの範囲のマウスの半致死量(LD₅₀)値を有する。破傷風およびボツリヌス毒素の両方とも、冒されたニューロンの機能、具体的には、神経伝達物質の放出を阻害することによって作用する。ボツリヌス毒素は、神経筋接合部で作用し、末梢神経系においてコリン作動性伝達を阻害するが、破傷風菌毒素は、中枢神経系において作用する。

30

【0004】

クロストリジウム神経毒は、クロストリジウムにおいて単鎖ポリペプチドとして発現される。各クロストリジウム神経毒は、活性化ループと呼ばれる露出領域によって重鎖(N末端側転位置ドメインおよびC末端側受容体結合ドメインを包含する)から分離された触媒軽鎖を有する。タンパク質成熟の際に、活性化ループのタンパク質分解性切断によって、クロストリジウム神経毒の軽鎖および重鎖が分離され、これがジスルフィド橋によって一緒になって、完全に活性の二本鎖毒素を作出する。このプロセスが、組換え毒素生成の際に再現されなくてはならない。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

単鎖クロストリジウム神経毒をタンパク質分解性に活性化するために、トリプシンまたはLys-Cなどの外因性プロテアーゼが使用される。しかし、一部のクロストリジウム神経毒については、Lys-Cまたはトリプシンとともにインキュベーションは、単鎖ポリペプチドの部分的なまたは不適切な切断をもたらす、その結果、混入単鎖および/または不活性切断/分解生成物が生成し(例えば、BoNT/Eの場合)、全長二本鎖ポリペプチドの精製を必要と

50

する。したがって、現在、クロストリジウム神経毒の活性化のための普遍的な外因性プロテアーゼはない。これは、新規クロストリジウム神経毒の同定または修飾された(例えば、キメラまたはハイブリッド)神経毒の生成の際に特に問題となり、正しい活性化を決定するために複数のプロテアーゼのスクリーニングを必要とする。

【0006】

ボツリヌス神経毒血清型X(BoNT/X)は、最近同定された(WO2018/009903 A2)。BoNT/Xは、活性化するために特に問題があり、トリプシンまたはLys-Cを用いる切断によってポリペプチドが完全に分解されることが分かっている。

【0007】

本発明は、上記の問題のうち1つ以上を克服する。

【0008】

プロテアーゼエンテロキナーゼは、従来使用されるトリプシンおよびLys-Cと比較してかなり高い基質特異性を示す。このプロテアーゼは、DDDDKペプチド配列(配列番号72)のすぐC末端側を認識し、切断する。注目すべきことに、この配列は、クロストリジウム神経毒活性化ループのすべてに存在せず(図1を参照されたい)、したがって、エンテロキナーゼは、クロストリジウム神経毒の活性化において使用するためのプロテアーゼとしてはこれまで除外されてきた。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、驚くべきことに、エンテロキナーゼが、BoNT/C1活性化ループ中に存在するIDGR配列のすぐC末端側を認識して切断することを見出した(図1を参照されたい)。有利なことに、この配列はまた、高い基質特異性(例えば、トリプシンおよびLys-Cと比較して)を示す別のプロテアーゼである第Xa因子によって認識および切断され得る。さらに、BoNT/C1活性化ループはまた、リジンおよびアルギニン残基も有し、リジンまたはトリプシンのいずれかによる切断が可能となる。したがって、本発明者は、驚くべきことに、BoNT/C1ループが、クロストリジウム神経毒の普遍的な活性化ループを構成し、従って、4つの異なるプロテアーゼを使用するための柔軟性を提供することを見出した。

【0010】

一態様では、本発明は、単鎖クロストリジウム神経毒(例えば、本明細書において記載される改変クロストリジウム神経毒の)を、対応する二本鎖クロストリジウム神経毒ヘタンパク分解性にプロセッシングする方法であって、

- a. 単鎖クロストリジウム神経毒を提供することと、
- b. 単鎖クロストリジウム神経毒を、エンテロキナーゼと接触させることとを含み、

単鎖クロストリジウム神経毒が、ポリペプチド配列Cys-(Xaa)_a-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cys(配列番号1)を含む活性化ループを有し、

エンテロキナーゼが、活性化ループのペプチド結合を加水分解し、それによって、二本鎖クロストリジウム神経毒(例えば、本明細書において記載される改変二本鎖クロストリジウム神経毒)を生成する、方法を提供する。

【0011】

関連態様では、本発明は、単鎖クロストリジウム神経毒(例えば、本明細書において記載される改変クロストリジウム神経毒の)を、対応する二本鎖クロストリジウム神経毒にタンパク分解性にプロセッシングする方法であって、

- a. 単鎖クロストリジウム神経毒を提供することと、
- b. 単鎖クロストリジウム神経毒を、第Xa因子と接触させることとを含み、

単鎖クロストリジウム神経毒が、ポリペプチド配列Cys-(Xaa)_a-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cys(配列番号1)を含む活性化ループを有し、

第Xa因子が、活性化ループのペプチド結合を加水分解し、それによって、二本鎖クロストリジウム神経毒(例えば、本明細書において記載される改変二本鎖クロストリジウム神経

10

20

30

40

50

毒)を生成する、方法を提供する。

【0012】

単鎖クロストリジウム神経毒は、好ましくは、本発明の改変単鎖クロストリジウム神経毒であり、活性化ループは、外因性活性化ループである。有利なことに、本発明者らは、内因性クロストリジウム神経毒活性化ループを、配列番号1として示される外因性活性化ループ(その天然状況においてプロテアーゼ切断部位を含有する)と置き換えることが、プロテアーゼ切断部位(例えば、第Xa因子切断部位、例えば、Ile-Asp-Gly-Arg[配列番号18]またはIle-Glu-Gly-Arg[配列番号19])を挿入するように内因性活性化ループを修飾することに関連する問題を克服することを見出した。特に、プロテアーゼ切断部位を挿入するように内因性活性化ループを修飾することは、コンホメーション変化につながる可能性があり、これは、次いで、切断効率に対して負の効果を有する可能性がある(本明細書における実施例7を参照されたい)。

10

【0013】

特に好ましい実施形態では、本発明の方法は、エンテロキナーゼの使用を含む。

【0014】

一態様では、本発明は、配列番号18または配列番号19(好ましくは、配列番号18)として示される配列を含むポリペプチド(例えば、クロストリジウム神経毒)のペプチド結合を加水分解するためのエンテロキナーゼの使用を対象とする。好ましくは、エンテロキナーゼは、ポリペプチド配列内に含まれる配列番号18または配列番号19(より好ましくは、配列番号18)のすぐC末端側のペプチド結合を加水分解する。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1として示されるポリペプチド配列または配列番号2もしくは配列番号3に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。

20

【0015】

本発明はまた、改変クロストリジウム神経毒を作製する方法であって、

a.クロストリジウム神経毒の内因性活性化ループを同定し、該クロストリジウム神経毒は、クロストリジウム神経毒の内因性活性化ループの外側のペプチド結合がトリプシンまたはLys-Cによって加水分解される点を特徴とすることと、

b.内因性活性化ループを、外因性活性化ループと置き換え、それによって改変クロストリジウム神経毒を提供し、該外因性活性化ループは、ポリペプチド配列Cys-(Xaa)_a-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cys(配列番号1)を含むことと

30

を含む、方法を提供する。

【0016】

本発明はまた、改変クロストリジウム神経毒を作製する方法であって、

a.クロストリジウム神経毒の内因性活性化ループを同定し、該クロストリジウム神経毒は、内因性活性化ループがトリプシンまたはLys-Cによって非効率的にタンパク分解性にプロセッシングされる点を特徴とすることと、

b.内因性活性化ループを外因性活性化ループと置き換え、それによって改変クロストリジウム神経毒を提供し、該外因性活性化ループは、ポリペプチド配列Cys-(Xaa)_a-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cys(配列番号1)を含むことと

40

を含む、方法を提供する。

【0017】

一実施形態では、クロストリジウム神経毒は、クロストリジウム神経毒の内因性活性化ループの外側のペプチド結合が、トリプシンまたはLys-Cによって加水分解され、内因性活性化ループが、トリプシンまたはLys-Cによって非効率的にタンパク分解性にプロセッシングされることを特徴とする。

【0018】

内因性活性化ループが、トリプシンによって非効率的にタンパク分解性にプロセッシングされる(好ましくは、クロストリジウム神経毒の内因性活性化ループの外側のペプチド結合が、トリプシンによって加水分解されない)実施形態では、方法は、改変クロストリジウム神経毒を、改変クロストリジウム神経毒の外因性活性化ループ中のペプチド結合を加水分

50

解可能であるトリプシンと接触させることをさらに含み得る。同様に、内因性活性化ループが、Lys-Cによって非効率的にタンパク分解性にプロセッシングされる(好ましくは、クロストリジウム神経毒の内因性活性化ループの外側のペプチド結合が、Lys-Cによって加水分解されない)実施形態では、方法は、改変クロストリジウム神経毒を、改変クロストリジウム神経毒の外因性活性化ループ中のペプチド結合を加水分解可能であるLys-Cと接触させることをさらに含み得る。

【0019】

一実施形態では、方法は、クロストリジウム神経毒を、本発明の方法において使用するためのその適合性についてスクリーニングするステップを含む。スクリーニングステップは、クロストリジウム神経毒の内因性活性化ループの外側のペプチド結合が、トリプシンまたはLys-Cによって加水分解されるか否かを決定することを含み得る。あるいは、またはさらに、スクリーニングステップは、クロストリジウム神経毒の内因性活性化ループが、トリプシンまたはLys-Cによって非効率的にタンパク分解性にプロセッシングされるか否かを決定することを含み得る。

10

【0020】

クロストリジウム神経毒(改変前)とは対照的に、一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、エンテロキナーゼもしくは第Xa因子によって非効率的にタンパク分解性にプロセッシングされない、および/または改変クロストリジウム神経毒の外因性活性化ループの外側のペプチド結合は、エンテロキナーゼもしくは第Xa因子によって加水分解されない。したがって、クロストリジウム神経毒(改変前)は、好ましくは、エンテロキナーゼおよび/または第Xa因子によるタンパク分解性プロセッシングに対して耐性である。

20

【0021】

クロストリジウム神経毒は、50mM Tris-HCl pH8.0、50mM NaCl反応バッファー中で、1mgのクロストリジウム神経毒を、少なくとも0.25 μ gのトリプシンと ≥ 3350 ユニット/mgで、またはLys-Cと ≥ 200 ユニット/mgで、少なくとも4°Cで少なくとも5時間接触させることを含むアッセイによって、本発明の方法において改変するのに適していると同定され得る。

【0022】

一実施形態では、アッセイは、50mM Tris-HCl pH8.0、50mM NaCl反応バッファー中で、1mgのクロストリジウム神経毒を、0.25 μ gのトリプシンと ≥ 3350 ユニット/mg(約1:611モル比のクロストリジウム神経毒対トリプシン)で、またはLys-Cと ≥ 200 ユニット/mg(約1:734モル比のクロストリジウム神経毒対Lys-C)で、4°Cで18時間接触させることを含む。

30

【0023】

別の実施形態では、アッセイは、50mM Tris-HCl pH8.0、50mM NaCl反応バッファー中で、1mgのクロストリジウム神経毒を、0.40 μ gのトリプシンと ≥ 3350 ユニット/mg(約1:978モル比のクロストリジウム神経毒対トリプシン)で、またはLys-Cと ≥ 200 ユニット/mg(約1:1174モル比のクロストリジウム神経毒対Lys-C)で、20°Cで5時間接触させることを含む。

【0024】

使用されるトリプシンは、好ましくは、市販のTrypZean(Sigma番号T3568)である。トリプシンは、配列番号47に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を有し得る。一実施形態では、トリプシンは、配列番号47に対して少なくとも80%または90%の配列同一性を有するポリペプチド配列を有し得る。好ましくは、トリプシンは、配列番号47として示されるポリペプチド配列を有し得る。1ユニットの前記トリプシン(Trypzean)は、3.2mLの反応容量において、基質として0.23mMのNa-ベンゾイル-L-アルギニンエチルエステル溶液(BAEE)を使用して、pH7.6、25°Cで1分あたり0.003の253nmでの吸光度の変化をもたらす酵素の量として定義される。

40

【0025】

使用されるLys-Cは、好ましくは、市販のLys-C(Sigma番号000000011047825001)

50

である。Lys-Cは、配列番号48に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を有し得る。一実施形態では、Lys-Cは、配列番号48に対して少なくとも80%または90%の配列同一性を有するポリペプチド配列を有し得る。好ましくは、Lys-Cは、配列番号48として示されるポリペプチド配列を有し得る。1ユニットの前記Lys-Cは、25℃、pH7で1分あたり1.0 μ molのTos-Gly-Pro-Lys-pNAを加水分解する酵素の量として定義される。

【0026】

SDS-PAGEによって(好ましくは、クマシーまたは同等の感度の色素を用いて染色された場合)、クロストリジウム神経毒のH鎖およびL鎖の切断生成物に加えて、1種以上の切断生成物が観察される場合には、トリプシンまたはLys-Cによってクロストリジウム神経毒の内因性活性化ループの外側のペプチド結合が加水分解されることが確認される。好ましくは、上記のアッセイを実施した後に、SDS-PAGEによって、クロストリジウム神経毒の鎖およびL鎖の切断生成物に加えて、少なくとも3、4、5、6、7、8、9または10種の切断生成物が観察される場合には、トリプシンまたはLys-Cによって、クロストリジウム神経毒の内因性活性化ループの外側のペプチド結合が加水分解されることが確認される。

【0027】

さらにまたはあるいは、内因性活性化ループの70%未満が、トリプシンまたはLys-Cによってタンパク分解性にプロセッシングされて、二本鎖クロストリジウム神経毒をもたらす場合(上記のアッセイを実施した後にSDS-PAGEによって、好ましくは、クマシーまたは同等の感度の色素を用いて染色された場合に評価される)には、内因性活性化ループが、トリプシンまたはLys-Cによって非効率的にタンパク分解性に切断されることが確認される。好ましくは、内因性活性化ループの60%、50%、40%、30%、10%または5%未満が、トリプシンまたはLys-Cによってタンパク分解性にプロセッシングされる(上記のアッセイを実施した後にSDS-PAGEによって評価される)場合に、クロストリジウム神経毒は、内因性活性化ループが、トリプシンまたはLys-Cによって非効率的にタンパク分解性に切断されることを特徴とし得る。より好ましくは、内因性活性化ループの30%未満が、トリプシンまたはLys-Cによってタンパク分解性にプロセッシングされる(上記のアッセイを実施した後にSDS-PAGEによって評価される)場合には、クロストリジウム神経毒は、内因性活性化ループが、トリプシンまたはLys-Cによって非効率的にタンパク分解性に切断されることを特徴とし得る。

【0028】

クロストリジウム神経毒(改変前)は、好ましくは、ペプチド結合(活性化ループ内またはその外側のいずれか)が、エンテロキナーゼまたは第Xa因子によって加水分解されない、または実質的に加水分解されないものである。「実質的に加水分解されない」という用語は、反応物中に存在するクロストリジウム神経毒の10%、5%、4%、3%、2%または1%未満が、本発明の方法においてエンテロキナーゼまたは第Xa因子によって加水分解されているペプチド結合を含有することを意味する。

【0029】

一実施形態では、本発明の方法は、改変クロストリジウム神経毒を、エンテロキナーゼまたは第Xa因子(より好ましくは、エンテロキナーゼ)と接触させ、それによって、対応する二本鎖改変クロストリジウム神経毒を生成することをさらに含む。

【0030】

一態様では、本発明は、改変クロストリジウム神経毒(例えば、本発明の方法によって得ることができる)を提供し、クロストリジウム神経毒の内因性活性化ループは、外因性活性化ループによって置き換えられており、それによって、改変クロストリジウム神経毒を生成し、外因性活性化ループは、ポリペプチド配列Cys-(Xaa)_a-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cys(配列番号1)を含む。

【0031】

一実施形態では、クロストリジウム神経毒(改変前)は、クロストリジウム神経毒の内因性活性化ループの外側のペプチド結合が、トリプシンまたはLys-Cによって加水分解され

10

20

30

40

50

ることを特徴とする。一実施形態では、クロストリジウム神経毒(改変前)は、内因性活性化ループが、トリプシンまたはLys-Cによって非効率的にタンパク分解性にプロセッシングされることを特徴とする。別の実施形態では、クロストリジウム神経毒(改変前)は、クロストリジウム神経毒の内因性活性化ループの外側のペプチド結合が、トリプシンまたはLys-Cによって加水分解され、内因性活性化ループが、トリプシンまたはLys-Cによって非効率的にタンパク分解性にプロセッシングされることを特徴とする。クロストリジウム神経毒(改変前)のこれらの特徴の確認は、好ましくは、前記のアッセイによってである。

【0032】

本発明は、任意のクロストリジウム神経毒の内因性活性化ループを、本明細書において記載される外因性活性化ループと置き換えることを含み得る。好ましくは、クロストリジウム神経毒は、BoNT/C1ではない。クロストリジウム神経毒は、ボツリヌス神経毒または破傷風神経毒であり得る。好ましくは、クロストリジウム神経毒は、ボツリヌス神経毒(BoNT)、例えば、BoNT/A、BoNT/B、BoNT/D、BoNT/E、BoNT/F、BoNT/GまたはBoNT/Xである。

10

【0033】

一実施形態では、本発明において使用するためのクロストリジウム神経毒は、BoNT/X、BoNT/EまたはBoNT/A1C1ハイブリッドである。好ましくは、クロストリジウム神経毒は、BoNT/XまたはBoNT/Eであり、その両方とも、トリプシンおよび/またはLys-Cが、その内因性活性化ループの外側のペプチド結合を加水分解する点を、ならびに/または両クロストリジウム神経毒が、トリプシンおよび/もしくはLys-Cによって非効率的にタンパク分解性にプロセッシングされる内因性活性化ループを含有する点を特徴とする。最も好ましくは、本発明において使用するためのクロストリジウム神経毒は、BoNT/Xである。

20

【0034】

「内因性活性化ループ」という用語は、本明細書において使用される場合、対象クロストリジウム神経毒、例えば、示された血清型の対象クロストリジウム神経毒中に存在する活性化ループを意味する。例えば、BoNT/A1は、BoNT/A1重鎖および軽鎖を含み、従って、BoNT/A1の内因性活性化ループは、A1活性化ループである。クロストリジウム神経毒キメラまたはハイブリッドについて、当業者は、例えば、L鎖およびH_Nドメインが由来する血清型(複数可)を決定することによって「内因性活性化ループ」を同定できる。一部の実施形態では、キメラまたはハイブリッドクロストリジウム神経毒は、2つの異なる血清型に由来する活性化ループの融合物である内因性活性化ループを有し得る。例として、キメラクロストリジウム神経毒、例えば、BoNT/A1C1は、BoNT/A1軽鎖および転位置ドメインを有し、したがって、内因性BoNT/A1C1活性化ループは、A1活性化ループである。活性化ループの例は、図1において提供される。

30

【0035】

好ましくは、「内因性活性化ループ」は、配列番号1ではない任意の活性化ループである。一実施形態では、「内因性活性化ループ」は、配列番号2および/または配列番号3ではない任意の活性化ループである。

【0036】

対照的に、「外因性活性化ループ」は、本明細書において使用される場合、対象クロストリジウム神経毒、例えば、示された血清型の対象クロストリジウム神経毒中に存在する内因性活性化ループとは異なる活性化ループを意味する。例えば、BoNT/C1活性化ループは、野生型BoNT/A1活性化ループとは異なるポリペプチド配列を有し、したがって、BoNT/C1活性化ループは、BoNT/A1にとって外因性である。クロストリジウム神経毒キメラまたはハイブリッドについて、当業者は、例えば、L鎖およびH_Nドメインが由来する血清型(複数可)を決定することによって、活性化ループが「外因性活性化ループ」であるか否かを決定できる。L鎖が、BoNT/B L鎖であり、H_Nドメインが、BoNT/D由来である場合には、内因性活性化ループは、BoNT/B配列の部分およびBoNT/D配列の部分を有する場合があります。活性化ループ(例えば、C1活性化ループ)がそれと異なる場合には、「外因性活性化ループ」と考えられる。

40

50

【0037】

活性化ループが、「外因性活性化ループ」であるか否かを決定することは、対象クロストリジウム神経毒の配列を活性化ループとアラインすること、および活性化ループが対象クロストリジウム神経毒配列中に存在するかどうかを確かめることによって行われ得る。存在しない場合には、活性化ループは、外因性活性化ループとして同定され得る。

【0038】

好ましくは、内因性活性化ループの全体が、本明細書において記載される外因性活性化ループによって置き換えられる。しかし、一部の実施形態では、内因性活性化ループの一部が、置き換えられる、例えば、内因性活性化の少なくとも5、10、15、20、25、30、35または40個のアミノ酸残基が置き換えられる。

【0039】

内因性活性化ループの置き換えは、当技術分野で公知の任意の方法によって達成され得る。例えば、置き換えは、アミノ酸修飾によって達成され得る。一実施形態では、内因性活性化ループは、内因性活性化ループの1個以上のアミノ酸残基を欠失することによって置き換えられ得る。内因性活性化ループは、内因性活性化ループの1個以上のアミノ酸残基を、外因性活性化ループのアミノ酸残基と置換することによって置き換えられ得る。一部の実施形態では、内因性活性化ループ(またはその部分)は、欠失されることもあり、外因性活性化ループが、好ましくは、本来は内因性活性化ループによって占められる位置で挿入されることもある。あるいは、内因性活性化ループは、本発明の改変クロストリジウム神経毒において保持され、好ましくは、不活性化され得る(例えば、突然変異によって)。内因性活性化ループ(またはその部分、より好ましくは、内因性活性化ループの全体)が、本発明の改変クロストリジウム神経毒中に存在しないことが好ましい。外因性活性化ループが、本来は内因性活性化ループによって占められるクロストリジウム神経毒中の位置を占めることが好ましい。

【0040】

アミノ酸残基の置換、挿入または欠失によってタンパク質を修飾する方法は、当技術分野で公知であり、本発明を実施する際に使用され得る。例として、アミノ酸修飾は、クロストリジウム神経毒をコードするDNA配列の修飾によって導入され得る。これは、標準的分子クローニング技術を使用して、例えば、ポリメラーゼ酵素を使用して元のコード配列を置き換えるために所望のアミノ酸(複数可)をコードするDNAの短い鎖(オリゴヌクレオチド)が使用される部位特異的突然変異誘発によって、または種々の酵素(例えば、リガーゼおよび制限エンドヌクレアーゼ)を用いて遺伝子の部分を挿入/欠失することによって達成され得る。あるいは、修飾された遺伝子配列が化学合成される場合もある。

【0041】

一実施形態では、内因性活性化ループは、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70または配列番号71に対して少なくとも70%(例えば、少なくとも80%または90%)の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。一実施形態では、内因性活性化ループは、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70または配列番号71に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。好ましくは、内因性活性化ループは、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70または配列番号71として示されるポリペプチド配列を含む。

【0042】

一実施形態では、内因性活性化ループは、配列番号20、配列番号21、配列番号24、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号67、配列番号68または配列番号69に対して少なくとも70%(例えば、少なくとも80%または90%)の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。一実施形態では、内因性活性化ループは、配列番号20、配列番号21、配列番号24、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号67、配列番号68または配列番号69に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。好ましくは、内因性活性化ループは、配列番号20、配列番号21、配列番号24、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号67、配列番号68または配列番号69として示されるポリペプチド配列を含む。

【0043】

一実施形態では、内因性活性化ループは、配列番号20、配列番号21または配列番号24に対して少なくとも70%(例えば、少なくとも80%または90%)の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。一実施形態では、内因性活性化ループは、配列番号20、配列番号21または配列番号24に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。好ましくは、内因性活性化ループは、配列番号20、配列番号21または配列番号24として示されるポリペプチド配列を含む。

【0044】

好ましくは、内因性活性化ループは、配列番号20に対して少なくとも70%(例えば、少なくとも80%または90%)の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。一実施形態では、内因性活性化ループは、配列番号20に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。より好ましくは、内因性活性化ループは、配列番号20として示されるポリペプチド配列を含む。

【0045】

好ましくは、内因性活性化ループは、配列番号21に対して少なくとも70%(例えば、少なくとも80%または90%)の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。一実施形態では、内因性活性化ループは、配列番号21に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。より好ましくは、内因性活性化ループは、配列番号21として示されるポリペプチド配列を含む。

【0046】

好ましくは、内因性活性化ループは、配列番号24に対して少なくとも70%(例えば、少なくとも80%または90%)の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。一実施形態では、内因性活性化ループは、配列番号24に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。より好ましくは、内因性活性化ループは、配列番号24として示されるポリペプチド配列を含む。

【0047】

本発明は、内因性活性化ループが、外因性活性化ループ、例えば、Cys-(Xaa)_a-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cys(配列番号1)として示されるポリペプチドを含む外因性活性化ループによって置き換えられている、方法およびクロストリジウム神経毒を包含する。XaaまたはYaaは、任意のアミノ酸であり得る。位置XaaおよびYaaでのアミノ酸の数は、それぞれ文字「a」および「b」によって示される。一実施形態では、「a」および「b」は、活性化ループのタンパク分解性切断を可能にし、活性二本鎖クロストリジウム神経毒をもたらす任意の整数であり得る。一実施形態では、「a」は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9または10である。一実施形態では、「b」は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15である。一実施形態では、「a」は、 ≤ 12 、 ≤ 11 、 ≤ 10 、 ≤ 9 、 ≤ 8 、 ≤ 7 、 ≤ 6 、 ≤ 5 または ≤ 4 である。一実施形態では、「b」は、 ≤ 20 、 ≤ 19 、 ≤ 18 、 ≤ 17 、 ≤ 16 、 ≤ 15 、 ≤ 14 、 ≤ 13 、 ≤ 12 、 ≤ 11 、 ≤ 10 または ≤ 9 である。

【0048】

一実施形態では、「a」は、1~12、例えば、1~10である。好ましくは、「a」は、1~7、例えば、2~4である。より好ましくは、「a」は、3である。一実施形態では、「b

10

20

30

40

50

」は、1～20、例えば、4～15である。好ましくは、「b」は、6～10である。より好ましくは、「b」は、8である。

【0049】

XaaまたはYaaは、1種類のためのアミノ酸に制限されるということは意図されない。したがって、位置Xaaに存在する1以上の残基は、標準アミノ酸、すなわち、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、リジン、ヒスチジン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、メチオニン、トリプトファン、システイン、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリンおよびフェニルアラニンから独立に選択され得る。位置Yaaに存在する1以上の残基は、標準アミノ酸、すなわち、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、リジン、ヒスチジン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、メチオニン、トリプトファン、システイン、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリンおよびフェニルアラニンから独立に選択され得る。好ましくは、位置Yaaの(より好ましくは、配列番号1のArg残基のすぐC末端側の)アミノ酸は、プロリンではない。

【0050】

あるいは/さらに、位置XaaまたはYaaに存在する1以上の残基が、非標準アミノ酸(上記の20種の標準セットの一部ではないアミノ酸)から独立に選択され得る。例として、非標準アミノ酸は、4-ヒドロキシプロリン、6-N-メチルリジン、2-アミノイソ酪酸、イソバリン、 α -メチルセリン、トランス-3-メチルプロリン、2,4-メタノ-プロリン、シス-4-ヒドロキシプロリン、トランス-4-ヒドロキシ-プロリン、N-メチルグリシン、アロ-トレオニン、メチル-トレオニン、ヒドロキシ-エチルシステイン、ヒドロキシエチルホモ-システイン、ニトロ-グルタミン、ホモグルタミン、ピペコリン酸、t-ロイシン、ノルバリン、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニル-アラニン、4-アザフェニル-アラニン、L-オルニチン、L-2-アミノ-3-グアニジノプロピオン酸またはリジン、アルギニンおよび/もしくはオルニチンのD-異性体ならびに4-フルオロフェニルアラニンを含み得る。非標準アミノ酸をタンパク質中に導入する方法は、当技術分野で公知であり、大腸菌(E.coli)栄養要求性発現宿主を使用する組換えタンパク質合成を含む。

【0051】

標準アミノ酸の性質を以下の表に示す:

10

20

30

40

50

【表 A】

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

【0052】

以下のアミノ酸は、荷電アミノ酸と考えられる。すなわち、アスパラギン酸(負)、グルタミン酸(負)、アルギニン(正)およびリジン(正)である。

【0053】

配列番号1中に含まれる配列Ile-Asp/Glu-Gly-Argは、エンテロキナーゼ(ならびに第Xa因子)によって認識されると本発明者によって驚くべきことに発見された部位を指す。好ましくは、配列は、Ile-Asp-Gly-Arg、例えば、Cys-(Xaa)_a-Ile-Asp-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cysである。エンテロキナーゼおよび第Xa因子は、配列番号1のArgのすぐC末端側のペプチド結合(すなわち、ArgとYaaの間のペプチド結合)を加水分解すると考えられる。

【0054】

一実施形態では、配列番号1のIleのすぐN末端側のXaaのアミノ酸残基は、無電荷疎水性アミノ酸、好ましくは、アラニンである。一部の実施形態では、「a」は、少なくとも2であり、Xaaは、少なくともC末端側無電荷極性アミノ酸およびそのすぐN末端側の荷電塩基性アミノ酸を含む。荷電塩基性アミノ酸は、好ましくは、リジンである。したがって、「a」が少なくとも2である実施形態では、Xaaは、少なくともLys-Alaを含む場合があり

、Alaは、配列番号1のIleのすぐN末端側である。

【0055】

一実施形態では、Xaaは、配列HKAを含むかまたはからなる。

【0056】

一実施形態では、配列番号1のArgのすぐC末端側のYaaのアミノ酸残基は、無電荷極性アミノ酸、好ましくは、セリンである。一部の実施形態では、「b」は、少なくとも2であり、Yaaは、少なくともN末端側無電荷極性アミノ酸およびそのすぐC末端側の無電荷疎水性アミノ酸を含む。無電荷疎水性アミノ酸は、好ましくは、ロイシンである。したがって、「b」が少なくとも2である実施形態では、Yaaは、少なくともSer-Leuを含む場合があり、Serは、配列番号1のArgのすぐC末端側である。

10

【0057】

一実施形態では、Yaaは、配列SLYNKTLDCを含むかまたはからなる。

【0058】

一部の実施形態では、外因性活性化ループは、配列番号2に対して少なくとも70%の配列同一性を有する。一実施形態では、外因性活性化ループは、配列番号2に対して少なくとも80%、85%または90%の配列同一性を有する。好ましくは、外因性活性化ループは、配列番号2に対して少なくとも95%の配列同一性を有する。より好ましくは、外因性活性化ループは、配列番号2に対して少なくとも99%の配列同一性を有する。

【0059】

特に好ましい実施形態では、外因性ループは、配列番号2を含む。より好ましくは、外因性ループは、配列番号2からなる。

20

【0060】

外因性ループはまた、配列番号2の変異型、例えば、配列番号3またはそれに対して少なくとも70%の配列同一性を有する配列であり得る。配列番号3は、エンテロキナーゼ認識部位IDGRが、IEGRに突然変異されている、配列番号2の変異型である。一実施形態では、外因性活性化ループは、配列番号3に対して少なくとも80%、85%または90%の配列同一性を有する。好ましくは、外因性活性化ループは、配列番号3に対して少なくとも95%の配列同一性を有する。より好ましくは、外因性活性化ループは、配列番号3に対して少なくとも99%の配列同一性を有する。

【0061】

特に好ましい実施形態では、外因性ループは、配列番号3を含む。より好ましくは、外因性ループは、配列番号3からなる。

30

【0062】

本発明のクロストリジウム神経毒(例えば、改変クロストリジウム神経毒)は、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10または配列番号12に対して少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされ得る。一実施形態では、本発明のクロストリジウム神経毒は、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10または配列番号12に対して少なくとも80%または90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされ得る。好ましくは、本発明のクロストリジウム神経毒は、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10または配列番号12を含む(より好ましくは、からなる)ヌクレオチド配列によってコードされ得る。

40

【0063】

本発明のクロストリジウム神経毒(例えば、改変クロストリジウム神経毒)は、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11または配列番号13に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得る。一実施形態では、本発明のクロストリジウム神経毒は、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11または配列番号13に対して少なくとも80%または90%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得る。好ましくは、本発明のクロストリジウム神経毒は、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11または配列番号13として示されるポリペプチド配列を含み得る(より好ましくは、からなり得る)。

50

【0064】

本発明のクロストリジウム神経毒(例えば、改変クロストリジウム神経毒)は、好ましくは、BoNT/Xであり、クロストリジウム神経毒は、配列番号4に対して少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。一実施形態では、クロストリジウム神経毒は、配列番号4に対して少なくとも80%または90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。好ましくは、クロストリジウム神経毒は、配列番号4を含む(またはからなる)ヌクレオチド配列によってコードされる。本発明のクロストリジウム神経毒は、好ましくは、BoNT/Xであり、クロストリジウム神経毒は、配列番号5に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。一実施形態では、クロストリジウム神経毒は、配列番号5に対して少なくとも80%または90%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。好ましくは、クロストリジウム神経毒は、配列番号5として示されるポリペプチド配列を含む(またはからなる)。

10

【0065】

本発明のクロストリジウム神経毒(例えば、改変クロストリジウム神経毒)は、好ましくは、BoNT/Eであり、クロストリジウム神経毒は、配列番号10に対して少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。一実施形態では、クロストリジウム神経毒は、配列番号10に対して少なくとも80%または90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。好ましくは、クロストリジウム神経毒は、配列番号10を含む(またはからなる)ヌクレオチド配列によってコードされる。本発明のクロストリジウム神経毒は、好ましくは、BoNT/Eであり、クロストリジウム神経毒は、配列番号11に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。一実施形態では、クロストリジウム神経毒は、配列番号11に対して少なくとも80%または90%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。好ましくは、クロストリジウム神経毒は、配列番号11として示されるポリペプチド配列を含む(またはからなる)。

20

【0066】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチド配列(またはそれをコードするヌクレオチド配列)は、精製タグ、例えば、His-タグを含み得る。本発明はまた、精製タグが除去されているポリペプチド配列(およびそれをコードするヌクレオチド配列)も包含することが意図される。

【0067】

本発明は、単鎖クロストリジウム神経毒(例えば、本発明の改変クロストリジウム神経毒)を、単鎖クロストリジウム神経毒の活性化ループ中のペプチド結合を加水分解可能であるプロテアーゼと接触させ、それによって二本鎖クロストリジウム神経毒を生成することを包含する。プロテアーゼは、エンドペプチダーゼであり得る。プロテアーゼは、エンテロキナーゼ、第Xa因子、Lys-Cまたはトリプシンであり得る。好ましくは、プロテアーゼは、エンテロキナーゼまたは第Xa因子、より好ましくは、エンテロキナーゼであり得る。

30

【0068】

「エンテロキナーゼ」または「EK」という用語は、本明細書において記載されるエンテロキナーゼならびに配列番号1のペプチド結合を加水分解可能である構造的および/または機能的類似性(好ましくは、構造的および機能的類似性)を有する任意のプロテアーゼを包含する。適したエンテロキナーゼは、エンテロキナーゼ軽鎖であり、NEBから市販されている(P8070番)。1ユニットは、25 μ lの総反応容量(20mM Tris-HCl、50mM NaCl、2 mM CaCl_2 (25°CでpH8.0))中、25°C、16時間で、25 μ gのMBP-EK-パラミオシン- Δ Sal基質を95%完了まで切断するのに必要な酵素の量として定義され得る。

40

【0069】

一実施形態では、エンテロキナーゼは、配列番号49に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。一部の実施形態では、エンテロキナーゼは、配列番号49に対して少なくとも80%または90%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。好ましくは、エンテロキナーゼは、配列番号49を含む(より好ましくは、からなる)。

【0070】

50

一部の実施形態では、エンテロキナーゼは、重鎖をさらに含む場合があり、重鎖および軽鎖は、ジスルフィド橋によって接続されている。このようなエンテロキナーゼは、市販されている(例えば、R&D Systemsから)。

【0071】

「第Xa因子」という用語は、本明細書において記載される第Xa因子ならびに配列番号1のペプチド結合を加水分解可能である構造的および/または機能的類似性(好ましくは、構造的および機能的類似性)を有する任意のプロテアーゼを包含する。適した第Xa因子は、NEBから市販されている(P8010番)。1ユニットは、50 μ lの反应用量(20mM Tris-HCl、100mM NaCl、2mM CaCl_2 (pH8.0))中、23°C、6時間以下で、50 μ gのMBP融合タンパク質試験基質、MBP- Δ Sal(基質MBP- Δ Salは、パラミオシンの短縮化形態に融合されたマルトース結合タンパク質であり、融合接合部にアミノ酸Ile-Glu-Gly-Argを有する)を95%完了まで切断するのに必要な第Xa因子の量として定義され得る。

【0072】

一実施形態では、第Xa因子は、配列番号50に対して少なくとも70%の配列同一性を有する重鎖および配列番号51に対して少なくとも70%の配列同一性を有する軽鎖を有するポリペプチド配列を含み、重鎖および軽鎖がジスルフィド橋によって接続されている。一部の実施形態では、第Xa因子は、配列番号50に対して少なくとも80%または90%の配列同一性を有する重鎖および配列番号51に対して少なくとも80%または90%の配列同一性を有する軽鎖を有するポリペプチド配列を含み、重鎖および軽鎖は、ジスルフィド橋によって接続されている。好ましくは、第Xa因子は、配列番号50および配列番号51を含み(より好ましくは、からなり)、重鎖および軽鎖は、ジスルフィド橋によって接続されている。

【0073】

接触は、前記クロストリジウム神経毒の活性化ループの外側のペプチド結合の実質的な加水分解を伴う、または伴わない、タンパク分解性にプロセシングされている単鎖クロストリジウム神経毒の30%、40%、50%または60%を超えるもの(好ましくは、70%を超えるもの)の、対応する二本鎖クロストリジウム神経毒への生成をもたらす任意の適した条件下で生じ得る。「実質的な加水分解を伴わない」とは、接触されたクロストリジウム神経毒の5%、4%、3%、2%または1%未満が、活性化ループの外側のペプチド結合において本発明の方法でプロテアーゼによって加水分解されていることを意味し得る。

【0074】

当業者ならば、上記を達成するための適当な反応時間、温度、バッファーおよびプロテアーゼ対単鎖クロストリジウム神経毒のモル比を選択できる。このような条件の最適化は、日常的な技術、例えば、前記接触後の反応生成物のSDS-PAGE(例えば、クマシーまたは同様の感度の色素を用いて染色される)視覚的分析または分光測定技術(例えば、質量分析)を使用して経験的に決定され得る。

【0075】

SDS-PAGE(例えば、クマシーまたは同様の感度の色素を用いて染色される)によって評価される場合、本発明の方法は、好ましくは、クロストリジウム神経毒L鎖およびH鎖のみの生成をもたらす。

【0076】

一実施形態では、本発明の方法におけるプロテアーゼによるタンパク分解性プロセシングは、クロストリジウム神経毒L鎖またはH鎖の5種未満の分解生成物、より好ましくは、4、3、2もしくは1種未満の分解生成物の生成をもたらす、好ましくは、本発明の方法によって生成されるL鎖およびH鎖は、全長L鎖およびH鎖である。

【0077】

したがって、特に好ましい実施形態では、本発明の方法において使用されるプロテアーゼ(例えば、エンテロキナーゼまたは第Xa因子)は、配列番号1のペプチド結合のみ、より好ましくは、配列番号1のArgとYaaの間のペプチド結合のみを加水分解する。

【0078】

一実施形態では、接触は、少なくとも1時間、例えば、少なくとも2、4、6、8、10、1

10

20

30

40

50

2、14、16、18または20時間生じる。

【0079】

一実施形態では、接触は、少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40℃の温度で生じる。

【0080】

一実施形態では、接触は、1～10℃(好ましくは、約4℃)の温度で生じる。好ましくは、接触は、1～10℃(より好ましくは、約4℃)の温度で、10～25時間(好ましくは、15～20時間)生じる。

【0081】

一実施形態では、接触は、15～25℃(好ましくは、約20℃)の温度で生じる。好ましくは、接触は、15～25℃(より好ましくは、約20℃)の温度で、10～25時間(好ましくは、15～20時間)生じる。

【0082】

一実施形態では、接触は、20～30℃(好ましくは、約25℃)の温度で生じる。好ましくは、接触は、20～30℃(より好ましくは、約25℃)の温度で、10～25時間(好ましくは、15～20時間)生じる。

【0083】

本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり少なくとも1μgのプロテアーゼの使用を含み得る。一実施形態では、本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり少なくとも0.1、0.2、0.4、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15または20μgのプロテアーゼの使用を含む。好ましくは、本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり少なくとも2μg(より好ましくは、少なくとも4μg)のプロテアーゼの使用を含む。

【0084】

一実施形態では、本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり $\leq 20\mu\text{g}$ のプロテアーゼの使用を含む。一実施形態では、本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり $\leq 15\mu\text{g}$ のプロテアーゼの使用を含む。好ましくは、本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり $\leq 10\mu\text{g}$ のプロテアーゼの使用を含む。より好ましくは、本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり $\leq 7\mu\text{g}$ のプロテアーゼの使用を含む。

【0085】

本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり0.1～20μgのプロテアーゼの使用を含み得る。一実施形態では、本発明の方法は、クロストリジウム神経毒1mgあたり1～10μgのプロテアーゼ、好ましくは、クロストリジウム神経毒1mgあたり4～7μgのプロテアーゼの使用を含み得る。

【0086】

本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり少なくとも10、20、30、40、50、60または70ユニットのエンテロキナーゼの使用を含み得る。好ましくは、本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり少なくとも60ユニットのエンテロキナーゼ(より好ましくは、少なくとも70ユニット)の使用を含み得る。一部の実施形態では、本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり ≤ 150 、 ≤ 140 、 ≤ 130 、 ≤ 120 、 ≤ 110 、 ≤ 100 、 ≤ 90 ユニットのエンテロキナーゼの使用を含み得る。好ましくは、本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり ≤ 100 ユニットのエンテロキナーゼ(より好ましくは、 ≤ 90 ユニット)の使用を含み得る。本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり50～110ユニットのエンテロキナーゼの使用を含み得る。一実施形態では、本発明の方法は、クロストリジウム神経毒1mgあたり70～90ユニットのエンテロキナーゼ、例えば、クロストリジウム神経毒1mgあたり約80ユニットのエンテロキナーゼの使用を含み得る。

【0087】

本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり少なくとも0.5、1、2、3、4または5ユニットの第Xa因子の使用を含み得る。好ましくは、本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり少なくとも3ユニットの第Xa因子(より好ましくは、少なくとも4ユニット)の使用を含み得る。一部の実施形態では、本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり ≤ 15 、 ≤ 14 、 ≤ 13 、 ≤ 12 、 ≤ 11 、 ≤ 10 、 ≤ 9 、 ≤ 8 または ≤ 7 ユニットの第Xa因子の使用を含み得る。好ましくは、本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり ≤ 8 ユニットの第Xa因子(より好ましくは、 ≤ 7 ユニット)の使用を含み得る。本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり0.5~15ユニットの第Xa因子の使用を含み得る。一実施形態では、本発明の方法は、クロストリジウム神経毒1mgあたり1~10ユニット(好ましくは、4~7ユニット)の第Xa因子、例えば、クロストリジウム神経毒1mgあたり約5または6ユニットの第Xa因子の使用を含み得る。

10

【0088】

本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり少なくとも0.02、0.04、0.06または0.08ユニットのLys-Cの使用を含み得る。好ましくは、本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり少なくとも0.04ユニットのLys-Cの使用を含み得る。一部の実施形態では、本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり ≤ 0.5 、 ≤ 0.4 または ≤ 0.2 ユニットのLys-Cの使用を含み得る。好ましくは、本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり ≤ 0.2 ユニットのLys-Cの使用を含み得る。本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり0.02~0.5ユニットのLys-Cの使用を含み得る。好ましくは、本発明の方法は、クロストリジウム神経毒1mgあたり0.04~0.2ユニットのLys-Cの使用を含み得る。

20

【0089】

本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり少なくとも0.1、0.2、0.3または0.4ユニットのトリプシンの使用を含み得る。好ましくは、本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり少なくとも0.4ユニットのトリプシンの使用を含み得る。一部の実施形態では、本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり ≤ 2.5 、 ≤ 2.3 、 ≤ 2.1 、 ≤ 1.9 ユニットのトリプシンの使用を含み得る。好ましくは、本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり ≤ 1.8 ユニットのトリプシンの使用を含み得る。本発明の方法の接触ステップは、クロストリジウム神経毒1mgあたり0.1~2.5ユニットのトリプシンの使用を含み得る。好ましくは、本発明の方法は、クロストリジウム神経毒1mgあたり0.3~2ユニット(より好ましくは、0.4~1.8ユニット)のトリプシンの使用を含み得る。

30

【0090】

一実施形態では、クロストリジウム神経毒(例えば、改変前)は、BoNT/Xであり得る。参照BoNT/X配列は、配列番号33として示されている。BoNT/Xのヒスチジンタグ付加版は、配列番号34として提示されている。BoNT/Xをコードする参照ヌクレオチド配列は、配列番号32として示されている。

【0091】

一実施形態では、クロストリジウム神経毒(例えば、改変前)は、BoNT/Aであり得る。参照BoNT/A配列は、配列番号35として示されている。

40

【0092】

別の実施形態では、クロストリジウム神経毒(例えば、改変前)は、BoNT/Bであり得る。参照BoNT/B配列は、配列番号36として示されている。

【0093】

別の実施形態では、クロストリジウム神経毒(例えば、改変前)は、BoNT/Cであり得る。参照BoNT/C₁配列は、配列番号37として示されている。

【0094】

別の実施形態では、クロストリジウム神経毒(例えば、改変前)は、BoNT/Dであり得る。参照BoNT/D配列は、配列番号38として示されている。

50

【0095】

別の実施形態では、クロストリジウム神経毒(例えば、改変前)は、BoNT/Eであり得る。参照BoNT/E配列は、配列番号39として示されている。

【0096】

別の実施形態では、クロストリジウム神経毒(例えば、改変前)は、BoNT/Fであり得る。参照BoNT/F配列は、配列番号40として示されている。

【0097】

別の実施形態では、クロストリジウム神経毒(例えば、改変前)は、BoNT/Gであり得る。参照BoNT/G配列は、配列番号41として示されている。

【0098】

別の実施形態では、クロストリジウム神経毒(例えば、改変前)は、TeNTであり得る。参照TeNT配列は、配列番号42として示されている。

【0099】

上記で論じたように、クロストリジウム神経毒は、2つのポリペプチド鎖、およそ100kDaの分子量を有する重鎖(H鎖)およびおよそ50kDaの分子量を有する軽鎖(L鎖)から形成される。H鎖は、C末端側標的化構成成分(受容体結合ドメインまたはH_Cドメイン)およびN末端側転位置構成成分(H_Nドメイン)を含む。

【0100】

軽鎖参照配列の例として、以下が挙げられる。

ボツリヌスA型神経毒:アミノ酸残基1~448

ボツリヌスB型神経毒:アミノ酸残基1~440

ボツリヌスC1型神経毒:アミノ酸残基1~441

ボツリヌスD型神経毒:アミノ酸残基1~445

ボツリヌスE型神経毒:アミノ酸残基1~422

ボツリヌスF型神経毒:アミノ酸残基1~439

ボツリヌスG型神経毒:アミノ酸残基1~441

破傷風神経毒:アミノ酸残基1~457。

【0101】

最近同定されたBoNT/Xについては、L鎖は、そのアミノ酸1~439に対応し、L鎖境界は、およそ25個のアミノ酸で変わる可能性がある(例えば、1~414または1~464)と報告されている。

【0102】

血清亜型に従ってわずかな変動が生じ得るので、上記で同定された参照配列は、案内と考えられなければならない。例として、US2007/0166332(その全文が参照により本明細書に組み込まれる)は、わずかに異なるクロストリジウム配列を引用している。

ボツリヌスA型神経毒:アミノ酸残基M1~K448

ボツリヌスB型神経毒:アミノ酸残基M1~K441

ボツリヌスC1型神経毒:アミノ酸残基M1~K449

ボツリヌスD型神経毒:アミノ酸残基M1~R445

ボツリヌスE型神経毒:アミノ酸残基M1~R422

ボツリヌスF型神経毒:アミノ酸残基M1~K439

ボツリヌスG型神経毒:アミノ酸残基M1~K446

破傷風神経毒:アミノ酸残基M1~A457。

【0103】

転位置ドメインは、プロテアーゼの、標的細胞への転位置を可能にする分子であり、その結果、標的細胞のサイトゾル内でプロテアーゼ活性の機能的発現が生じる。任意の分子(例えば、タンパク質またはペプチド)が、本発明の必要な転位置機能を有するか否かは、いくつかの従来アッセイのうちいずれか1つによって確認され得る。

【0104】

例えば、Shone C. (1987)には、試験分子に曝露されるリポソームを使用するin vitro

10

20

30

40

50

アッセイが記載されている。必要な転位置機能の存在は、容易にモニタリングされ得る K^+ および/または標識NADのリポソームからの放出によって確認される[Shone C. (1987) *Eur. J. Biochem*; vol. 167(1): pp. 175-180を参照されたい]。

【0105】

さらなる例は、平面リン脂質二層膜を使用する簡単なin vitroアッセイを記載するBlaustein R. (1987)によって提供されている。膜は、試験分子に曝露され、必要な転位置機能は、前記膜を横切るコンダクタンスの増大によって確認される[Blaustein (1987) *FEB S Letts*; vol. 226, no. 1: pp. 115-120を参照されたい]。

【0106】

膜融合物の評価、ひいては、本発明において使用するのに適した転位置ドメインの同定を可能にするさらなる方法論は、*Methods in Enzymology Vol 220 and 221, Membrane Fusion Techniques, Parts A and B*, Academic Press 1993に提供されている。

【0107】

本発明はまた、変異型ドメインが必要な転位置活性を依然として実証する限り、変異型転位置ドメインを包含する。例として、変異型は、参照転位置ドメインと、少なくとも70%、好ましくは、少なくとも80%、より好ましくは、少なくとも90%、最も好ましくは、少なくとも95%または少なくとも98%のアミノ酸配列相同性を有し得る。断片という用語は、転位置ドメインに関連して使用される場合、参照転位置ドメインの少なくとも20個、好ましくは、少なくとも40個、より好ましくは、少なくとも80個、最も好ましくは、少なくとも100個のアミノ酸残基を有するペプチドを意味する。クロストリジウム転位置ドメインの場合には、断片は、好ましくは、参照転位置ドメイン(例えば、 H_N ドメイン)の少なくとも100個、好ましくは、少なくとも150個、より好ましくは、少なくとも200個、最も好ましくは、少なくとも250個のアミノ酸残基を有する。本発明の転位置「断片」は、参照配列に基づく変異型転位置ドメインの断片を包含する。

【0108】

転位置ドメインは、好ましくは、低pHの条件下で脂質膜中にイオン透過性孔を形成可能である。好ましいことに、エンドソーム膜内に孔形成可能な、タンパク質分子のそれらの部分のみを使用することが見い出された。

【0109】

転位置ドメインは、微生物タンパク質供給源から、特に、細菌またはウイルスタンパク質供給源から得ることができる。したがって、一実施形態では、転位置ドメインは、酵素、例えば、細菌毒素またはウイルスタンパク質の転位置ドメインである。

【0110】

細菌毒素分子のある特定のドメインがこのような孔を形成可能であることは十分に実証されている。ウイルスによって発現された膜融合タンパク質のある特定の転位置ドメインが、このような孔を形成可能であることも公知である。このようなドメインは、本発明において使用され得る。

【0111】

転位置ドメインは、クロストリジウム起源のもの、例えば、 H_N ドメイン(またはその機能的構成成分)であり得る。 H_N とは、 H 鎖のアミノ末端の半分とほぼ同等のクロストリジウム神経毒の H 鎖の部分もしくは断片またはインタクトの H 鎖中のその断片に対応するドメインを意味する。一実施形態では、 H 鎖の H_C 機能は、 H_C アミノ酸配列の欠失(ヌクレアーゼまたはプロテアーゼ処置によるDNA合成レベルで、または合成後レベルでのいずれかでの)によって除去され得る。あるいは、 H_C 機能は、化学的または生化学的処置によって不活性化され得る。したがって、一部の実施形態では、 H 鎖は、天然クロストリジウム神経毒(すなわち、ホロ毒素)が結合する標的細胞上の結合部位に結合不可能であり得る。

【0112】

適した(参照)転位置ドメインの例として、以下が挙げられる。

ボツリヌスA型神経毒-アミノ酸残基(449~871)

ボツリヌスB型神経毒-アミノ酸残基(441~858)

10

20

30

40

50

ボツリヌスC型神経毒-アミノ酸残基(442~866)
ボツリヌスD型神経毒-アミノ酸残基(446~862)
ボツリヌスE型神経毒-アミノ酸残基(423~845)
ボツリヌスF型神経毒-アミノ酸残基(440~864)
ボツリヌスG型神経毒-アミノ酸残基(442~863)
破傷風神経毒-アミノ酸残基(458~879)。

【0113】

血清型に従ってわずかな変動が生じ得るので、上記で同定された参照配列は、案内と考えられなければならない。例として、US2007/0166332(その全文が参照により本明細書に組み込まれる)は、わずかに異なるクロストリジウム配列を引用している。

10

ボツリヌスA型神経毒-アミノ酸残基(A449~K871)
ボツリヌスB型神経毒-アミノ酸残基(A442~S858)
ボツリヌスC型神経毒-アミノ酸残基(T450~N866)
ボツリヌスD型神経毒-アミノ酸残基(D446~N862)
ボツリヌスE型神経毒-アミノ酸残基(K423~K845)
ボツリヌスF型神経毒-アミノ酸残基(A440~K864)
ボツリヌスG型神経毒-アミノ酸残基(S447~S863)
破傷風神経毒-アミノ酸残基(S458~V879)。

【0114】

本発明に関連して、本発明の態様において転位置ドメインを含む種々のクロストリジウム神経毒H_N領域は、これらの活性断片が、細胞内小胞から標的細胞の細胞質への非細胞傷害性プロテアーゼ(例えば、クロストリジウムのL鎖)の放出を促進し、ひいては、クロストリジウム神経毒が基質をタンパク分解性に切断する全体的な細胞機序の実行に参加できる限り、有用であり得る。クロストリジウム神経毒の重鎖に由来するH_N領域は、およそ410~430個のアミノ酸長であり、転位置ドメインを含む。研究によって、クロストリジウム神経毒重鎖由来のH_N領域の全長が、転位置ドメインの転位置活性にとって必要であるわけではないということが示されている。したがって、この実施形態の態様は、例えば、少なくとも350個のアミノ酸、少なくとも375個のアミノ酸、少なくとも400個のアミノ酸および少なくとも425個のアミノ酸の長さを有する転位置ドメインを含むクロストリジウム神経毒H_N領域を含み得る。この実施形態の他の態様は、例えば、多くとも350個のアミノ酸、多くとも375個のアミノ酸、多くとも400個のアミノ酸および多くとも425個のアミノ酸の長さを有する転位置ドメインを含むクロストリジウム神経毒H_N領域を含み得る。

20

30

【0115】

クロストリジウム・ボツリヌム(クロストリジウム・ボツリヌム)およびC.テタニ(tetani)における毒素生成の遺伝学的基礎に関するさらなる詳細については、本発明者らは、Henderson et al (1997) in *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis*, Academic pressを参照している。

【0116】

H_Nという用語は、天然に生じる神経毒H_N部分、ならびに修飾されたH_N部分が上記の転位置機能を依然として実証する限り天然では生じないアミノ酸配列および/または合成アミノ酸残基を有する修飾されたH_N部分を包含する。

40

【0117】

あるいは、転位置ドメインは、非クロストリジウム起源のものであり得る。非クロストリジウム(参照)転位置ドメイン起源の例として、ジフテリア毒素の転位置ドメイン[O'Keefe et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89, 6202-6206; Silverman et al., *J. Biol. Chem.* (1993) 269, 22524-22532; および London, E. (1992) *Biochem. Biophys. Acta.*, 1112, pp.25-51]、シュードモナス外毒素A型の転位置ドメイン[Prior et al. *Biochemistry* (1992) 31, 3555-3559]、炭疽病毒素の転位置ドメイン[Blanke et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996) 93, 8437-8442]、転位置機能の種々の膜融合性または疎水性ペプチド[Plank et al. *J. Biol. Chem.* (1994) 269, 12918-12924; お

50

よびWagner et al (1992) PNAS, 89, pp.7934-7938]および両親媒性ペプチド[Murata et al (1992) Biochem., 31, pp.1986-1992]が挙げられるが、それに制限されない。転位置ドメインは、天然に生じるタンパク質中に存在する転位置ドメインに酷似し得る、またはアミノ酸変異を、変異が転位置ドメインの転位置能を破壊しない限り含み得る。

【0118】

本発明において使用するのに適したウイルス(参照)転位置ドメインの特定の例として、ウイルスによって発現された膜融合タンパク質の特定の転位置ドメインが挙げられる。例えば、Wagner et al. (1992)およびMurata et al. (1992)には、インフルエンザウイルス血球凝集素のN末端側領域に由来するいくつかの膜融合性および両親媒性ペプチドの転位置(すなわち、膜融合および小胞化)機能が記載されている。所望の転位置活性を有する
10
と知られている他のウイルスによって発現された膜融合タンパク質として、セムリキ森林ウイルス(SFV)の膜融合ペプチドの転位置ドメイン、水泡性口内炎ウイルス(VSV)糖タンパク質Gの転位置ドメイン、SERウイルスFタンパク質の転位置ドメインおよび泡沫状ウイルスエンベロープ糖タンパク質の転位置ドメインが挙げられる。ウイルスによってコードされるアスパイク(Aspik)タンパク質は、本発明に関連して特定の適用を有する、例えば、SFVのE1タンパク質およびVSVのGタンパク質。

【0119】

表(以下)に列挙される(参照)転位置ドメインの使用は、その配列変異型の使用を含む。変異型は、変異型が必要な転位置機能を有する限り、1以上の保存的核酸置換および/または核酸欠失もしくは挿入を含み得る。変異型はまた、変異型が必要な転位置機能を有する
20
限り、1以上のアミノ酸置換および/またはアミノ酸欠失もしくは挿入も含み得る。

10

20

30

40

50

【表 B】

転位置ドメイン 供給源	アミノ酸残基	参考文献
ジフテリア毒素	194-380	Silverman et al. , 1994, J. Biol. Chem. 269, 22524-22532 London E. , 1992, Biochem. Biophys. Acta., 1113, 25-51
シュードモナス外 毒素のドメイン II	405-613	Prior et al. , 1992, Biochemistry 31, 3555-3559 Kihara & Pastan , 1994, Bioconj Chem. 5, 532-538
インフルエンザウ イルス血球凝集素	GLFGAIAGFIENGWE GMIDGWYG (配列番号 73), およびその変異型	Plank et al. , 1994, J. Biol. Chem. 269, 12918-12924 Wagner et al. , 1992, PNAS, 89, 7934-7938 Murata et al. , 1992, Biochemistry 31, 1986-1992
セムリキ森林ウイ ルス膜融合タンパ ク質	転位置ドメイン	Kielian et al. , 1996, J Cell Biol. 134(4), 863-872
水泡性口内炎ウイ ルス糖タンパク質 G	118-139	Yao et al. , 2003, Virology 310(2), 319-332
SER ウイルス F タ ンパク質	転位置ドメイン	Seth et al. , 2003, J Virol 77(11) 6520-6527
泡沫状ウイルスエ ンベローブ糖タン パク質	転位置ドメイン	Picard-Maureau et al. , 2003, J Virol. 77(8), 4722-4730

【0120】

クロストリジウム神経毒H_Cドメイン参照配列の例として、以下が挙げられる。

【0121】

BoNT/A-N872～L1296
BoNT/B-E859～E1291
BoNT/C1-N867～E1291
BoNT/D-S863～E1276
BoNT/E-R846～K1252
BoNT/F-K865～E1274
BoNT/G-N864～E1297
TeNT-I880～D1315。

【0122】

最近同定されたBoNT/Xについては、H_Cドメインは、そのアミノ酸893～1306に対応し、ドメイン境界は、およそ25個のアミノ酸で変わる可能性がある(例えば、868～1306または918～1306)と報告されている。

【0123】

本明細書において記載されるクロストリジウム神経毒は、転位置促進ドメインをさらに含み得る。前記ドメインは、非細胞傷害性プロテアーゼの、標的細胞のサイトゾルへの送

達を促進し、例えば、各々、参照により本明細書に組み込まれるW008/008803およびW008/008805に記載されている。

【0124】

例として、適した転位置促進ドメインは、エンベロープ型ウイルス膜融合ペプチドドメインを含み、例えば、適した膜融合ペプチドドメインとして、インフルエンザウイルス膜融合ペプチドドメイン(例えば、23個のアミノ酸のインフルエンザAウイルス膜融合ペプチドドメイン)、アルファウイルス膜融合ペプチドドメイン(例えば、26個のアミノ酸のセムリキ森林ウイルス膜融合ペプチドドメイン)、ベジクロウイルス膜融合ペプチドドメイン(例えば、21個のアミノ酸の水疱性口内炎ウイルス膜融合ペプチドドメイン)、レスピロウイルス膜融合ペプチドドメイン(例えば、25個のアミノ酸のセンダイウイルス膜融合ペプチドドメイン)、モルビリウイルス膜融合ペプチドドメイン(例えば、25個のアミノ酸のイヌジステンパーウイルス膜融合ペプチドドメイン)、アブラウイルス膜融合ペプチドドメイン(例えば、25個のアミノ酸のニューカッスル病ウイルス膜融合ペプチドドメイン)、ヘニパウイルス膜融合ペプチドドメイン(例えば、25個のアミノ酸のヘンドラウイルス膜融合ペプチドドメイン)、メタニューモウイルス膜融合ペプチドドメイン(例えば、25個のアミノ酸のヒトメタニューモウイルス膜融合ペプチドドメイン)またはスプーマウイルス膜融合ペプチドドメイン、例えば、サル泡沫状ウイルス膜融合ペプチドドメインまたはそれらの断片または変異型が挙げられる。

【0125】

さらなる例として、転位置促進ドメインは、クロストリジウム神経毒H_{CN}ドメインまたはその断片または変異型を含み得る。より詳細には、クロストリジウム神経毒H_{CN}転位置促進ドメインは、少なくとも200個のアミノ酸、少なくとも225個のアミノ酸、少なくとも250個のアミノ酸、少なくとも275個のアミノ酸の長さを有し得る。この関連で、クロストリジウム神経毒H_{CN}転位置促進ドメインは、好ましくは、多くとも200個のアミノ酸、多くとも225個のアミノ酸、多くとも250個のアミノ酸または多くとも275個のアミノ酸の長さを有する。具体的な(参照)例として、以下が挙げられる。

ボツリヌスA型神経毒-アミノ酸残基(872~1110)
ボツリヌスB型神経毒-アミノ酸残基(859~1097)
ボツリヌスC型神経毒-アミノ酸残基(867~1111)
ボツリヌスD型神経毒-アミノ酸残基(863~1098)
ボツリヌスE型神経毒-アミノ酸残基(846~1085)
ボツリヌスF型神経毒-アミノ酸残基(865~1105)
ボツリヌスG型神経毒-アミノ酸残基(864~1105)
破傷風神経毒-アミノ酸残基(880~1127)。

【0126】

上記の配列位置は、血清型/亜型に従ってわずかに変わる可能性があり、適した(参照)クロストリジウム神経毒H_{CN}ドメインのさらなる例として、以下が挙げられる。

ボツリヌスA型神経毒-アミノ酸残基(874~1110)
ボツリヌスB型神経毒-アミノ酸残基(861~1097)
ボツリヌスC型神経毒-アミノ酸残基(869~1111)
ボツリヌスD型神経毒-アミノ酸残基(865~1098)
ボツリヌスE型神経毒-アミノ酸残基(848~1085)
ボツリヌスF型神経毒-アミノ酸残基(867~1105)
ボツリヌスG型神経毒-アミノ酸残基(866~1105)
破傷風神経毒-アミノ酸残基(882~1127)。

【0127】

上記の促進ドメインのいずれも、本発明において使用するのに適しているこれまでに記載された転位置ドメインペプチドのいずれかと組み合わせることができる。したがって、例として、非クロストリジウム促進ドメインを、非クロストリジウム転位置ドメインペプチドと、またはクロストリジウム転位置ドメインペプチドと組み合わせることができる。

あるいは、クロストリジウム神経毒H_{CN}転位置促進ドメインを、非クロストリジウム転位置ドメインペプチドと組み合わせることができる。あるいは、クロストリジウム神経毒H_{CN}促進ドメインを、クロストリジウム転位置ドメインペプチドと組み合わせることができる、その例として、以下が挙げられる。

ボツリヌスA型神経毒-アミノ酸残基(449~1110)

ボツリヌスB型神経毒-アミノ酸残基(442~1097)

ボツリヌスC型神経毒-アミノ酸残基(450~1111)

ボツリヌスD型神経毒-アミノ酸残基(446~1098)

ボツリヌスE型神経毒-アミノ酸残基(423~1085)

ボツリヌスF型神経毒-アミノ酸残基(440~1105)

ボツリヌスG型神経毒-アミノ酸残基(447~1105)

破傷風神経毒-アミノ酸残基(458~1127)。

【0128】

一部の実施形態では、本発明のクロストリジウム神経毒は、クロストリジウム神経毒の機能的H_Cドメインを欠く場合がある。したがって、前記クロストリジウム神経毒は、Shone et al. (1985) Eur. J. Biochem. 151, 75-82に記載される結合アッセイにおいて、ラットシナプトソーム膜に(クロストリジウムH_C構成成分を介して)結合できない。一実施形態では、クロストリジウム神経毒は、好ましくは、クロストリジウム神経毒ホロ毒素の最後の50個のC末端側アミノ酸を欠く。別の実施形態では、クロストリジウム神経毒は、好ましくは、クロストリジウム神経毒ホロ毒素の最後の100個、好ましくは、最後の150個、より好ましくは、最後の200個、特に好ましくは、最後の250個の、最も好ましくは、最後の300個のC末端側アミノ酸残基を欠く。あるいは、H_C結合活性は、突然変異誘発によって無効に/低減され得る-例として、便宜のためにBoNT/Aに言及すると、ガングリオシド結合ポケット中の1つまたは2つのアミノ酸残基突然変異の修飾(W1266のLへの、およびY1267のFへの)が、H_C領域にその受容体結合機能を失わせる。類似の突然変異を、非血清型Aクロストリジウムのペプチド構成成分に行うことができる、例えば、突然変異を有するボツリヌスB(W1262のLへの、およびY1263のFへの変異)またはボツリヌスE(W1224のLへの、およびY1225のFへの変異)に基づく構築物。活性部位(例えば、ボツリヌスA型毒素におけるY1267Sおよび他のクロストリジウム神経毒中の対応する高度に保存された残基)への他の突然変異は、H_C受容体結合活性の同じ消失を達成する。この突然変異および他の突然変異の詳細は、参照により本明細書に組み込まれるRummel et al (2004) (Molecular Microbiol. 51:631-634)に記載されている。

【0129】

天然クロストリジウム神経毒のH_Cペプチドは、およそ400~440個のアミノ酸残基を含み、各々およそ25kDaの2つの機能的に別個のドメイン、すなわち、N末端側領域(H_{CN}ペプチドまたはドメインと一般に呼ばれる)およびC末端側領域(H_{CC}ペプチドまたはドメインと一般に呼ばれる)からなる。この事実は、各々、その全文が参照により本明細書に組み込まれる以下の刊行物によって確認されている:Umland TC (1997) Nat. Struct. Biol. 4: 788-792; Herreros J (2000) Biochem. J. 347: 199-204; Halpern J (1993) J. Biol. Chem. 268: 15, pp. 11188-11192; Rummel A (2007) PNAS 104: 359-364; Lacey DB (1998) Nat. Struct. Biol. 5: 898-902; Knapp (1998) Am. Cryst. Assoc. Abstract Papers 25: 90; Swaminathan and Eswaramoorthy (2000) Nat. Struct. Biol. 7: 1751-1759;およびRummel A (2004) Mol. Microbiol. 51(3), 631-643。さらに、C末端側の160~200個のアミノ酸残基を構成するC末端側領域(H_{CC})は、クロストリジウム神経毒がその天然細胞受容体、すなわち、神経筋接合部の神経終末へ結合するのに関与している、ということは十分に実証されており、この事実もまた、上記の刊行物によって確認されている。したがって、本明細書を通して、クロストリジウム重鎖が機能的重鎖H_Cペプチド(またはドメイン)を欠き、当該重鎖が天然クロストリジウム神経毒が結合する細胞表面受容体に結合できないということは、クロストリジウム重鎖は単純に機能的H_{CC}ペプチドを欠いているということを意味する。言い換えれば、H_{CC}ペプチド領域

は、神経筋接合部の神経終末に対するその天然結合能を不活性化するように、部分的または完全に欠失され得る、そうでなければ、修飾され得る(例えば、従来の化学的またはタンパク分解性処置によって)。

【0130】

したがって、一実施形態では、本発明のクロストリジウム神経毒 H_N ペプチドは、クロストリジウム神経毒のC末端側ペプチド部分(H_{CC})の一部を欠き、したがって、天然クロストリジウム神経毒の H_C 結合機能を欠く。例として、一実施形態では、C末端側に伸長されたクロストリジウム H_N ペプチドは、クロストリジウム神経毒重鎖のC末端側の40個のアミノ酸残基またはC末端側の60個のアミノ酸残基またはC末端側の80個のアミノ酸残基またはC末端側の100個のアミノ酸残基またはC末端側の120個のアミノ酸残基またはC末端側の140個のアミノ酸残基またはC末端側の150個のアミノ酸残基またはC末端側の160個のアミノ酸残基を欠く。別の実施形態では、本発明のクロストリジウム H_N ペプチドは、クロストリジウム神経毒のC末端側ペプチド部分(H_{CC})の全体を欠き、したがって、天然クロストリジウム神経毒の H_C 結合機能を欠く。例として、一実施形態では、クロストリジウム H_N ペプチドは、クロストリジウム神経毒重鎖のC末端側の165個のアミノ酸残基またはC末端側の170個のアミノ酸残基またはC末端側の175個のアミノ酸残基またはC末端側の180個のアミノ酸残基またはC末端側の185個のアミノ酸残基またはC末端側の190個のアミノ酸残基またはC末端側の195個のアミノ酸残基を欠く。さらなる例として、本発明のクロストリジウム H_N ペプチドは、以下からなる群から選択されるクロストリジウム H_{CC} 参照配列を欠く。

ボツリヌスA型神経毒-アミノ酸残基(Y1111~L1296)

ボツリヌスB型神経毒-アミノ酸残基(Y1098~E1291)

ボツリヌスC型神経毒-アミノ酸残基(Y1112~E1291)

ボツリヌスD型神経毒-アミノ酸残基(Y1099~E1276)

ボツリヌスE型神経毒-アミノ酸残基(Y1086~K1252)

ボツリヌスF型神経毒-アミノ酸残基(Y1106~E1274)

ボツリヌスG型神経毒-アミノ酸残基(Y1106~E1297)

破傷風神経毒-アミノ酸残基(Y1128~D1315)。

【0131】

血清亜型に従ってわずかな変動が生じ得るので、上記で同定された参照配列は、案内と考えられなければならない。

【0132】

本発明は、クロストリジウム神経毒の多数の異なる変種への適用に適している。したがって、本発明に関連して、「クロストリジウム神経毒」という用語は、C.ボツリヌム(*botulinum*)によって(ボツリヌス神経毒血清型A、B、C1、D、E、F、G、HおよびX)、C.テタニ(*tetani*)によって(破傷風神経毒)、C.ブチリカム(*butyricum*)によって(ボツリヌス神経毒血清型E)およびC.バラティー(*baratii*)によって(ボツリヌス神経毒血清型F)産生された毒素ならびに修飾されたクロストリジウム神経毒または前記のいずれかに由来する誘導体を包含する。「クロストリジウム神経毒」という用語はまた、ボツリヌス神経毒血清型Hを包含する。好ましくは、クロストリジウム神経毒は、BoNT/C1ではない。

【0133】

ボツリヌス神経毒(BoNT)は、C.ボツリヌム(*botulinum*)によって大きなタンパク質複合体の形態で産生され、BoNT自体と複合体形成されたいくつかのアクセサリータンパク質とからなる。現在9種の異なるクラスのボツリヌス神経毒、すなわち、ボツリヌス神経毒血清型A、B、C1、D、E、F、G、HおよびXがあり、そのすべてが、類似構造および作用様式を共有している。異なるBoNT血清型は、特異的中和抗血清による不活性化に基づいて区別することができ、このような血清型による分類は、アミノ酸レベルでの配列同一性パーセンテージと相関する。所与の血清型のBoNTタンパク質は、アミノ酸配列同一性パーセンテージに基づいて異なる亜型にさらに分けられる。

【0134】

BoNTは、胃腸管において吸収され、全身循環に入ったのち、コリン作動性神経末端のシナプス前膜と結合し、その神経伝達物質アセチルコリンの放出を妨げる。BoNT/B、BoNT/D、BoNT/FおよびBoNT/Gは、シナプトブレビン/小胞関連膜タンパク質(VAMP)を切断し、BoNT/C1、BoNT/AおよびBoNT/Eは、25kDaのシナプトソーム関連タンパク質(SNAP-25)を切断し、BoNT/C1は、シンタキシンを切断する。BoNT/Xは、SNAP-25、VAMP1、VAMP2、VAMP3、VAMP4、VAMP5、Ykt6およびシンタキシン1を切断するとわかっている。

【0135】

破傷風菌毒素は、C.テタニ(tetani)によって単一血清型で産生される。C.ブチリカム(butyricum)は、BoNT/Eを産生し、C.バラティー(baratii)は、BoNT/Fを産生する。

【0136】

「クロストリジウム神経毒」という用語はまた、修飾されたクロストリジウム神経毒およびその誘導体を包含するものとし、それだけには限らないが、以下に記載されるものを含む。修飾されたクロストリジウム神経毒または誘導体は、クロストリジウム神経毒の天然(未修飾)形態と比較して修飾されている1個以上のアミノ酸を含有し得る、またはクロストリジウム神経毒の天然(未修飾)形態には存在しない1個以上の挿入されたアミノ酸を含有し得る。例として、修飾されたクロストリジウム神経毒は、天然(未修飾)クロストリジウム神経毒配列と比較して、1つ以上のドメイン中に修飾されたアミノ酸配列を有し得る。このような修飾は、毒素の機能的態様、例えば、生物活性または残留性を修飾し得る。したがって、一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、改変修飾クロストリジウム神経毒または改変修飾クロストリジウム神経毒誘導体または改変クロストリジウム神経毒誘導体である。

【0137】

修飾されたクロストリジウム神経毒は、重鎖のアミノ酸配列(例えば、修飾されたHcドメイン)中に1つ以上の修飾を有する場合があります。前記修飾された重鎖は、天然(未修飾)クロストリジウム神経毒よりも高いまたは低い親和性で標的神経細胞に結合する。Hcドメインにおけるこのような修飾は、Hcドメインのガングリオシド結合部位中の、またはガングリオシド受容体および/もしくは標的神経細胞のタンパク質受容体への結合を変更する、タンパク質(SV2またはシナプトタグミン)結合部位中の残基を修飾することを含み得る。このような修飾されたクロストリジウム神経毒の例は、WO2006/027207およびWO2006/114308に記載されており、その両方とも参照によりその全文が本明細書に組み込まれる。

【0138】

修飾されたクロストリジウム神経毒は、軽鎖のアミノ酸配列中に1つ以上の修飾、例えば、修飾されたL鎖のSNAREタンパク質特異性を変更または修飾し得る、基質結合または触媒ドメイン中の修飾を有し得る。このような修飾されたクロストリジウム神経毒の例は、WO2010/120766およびUS2011/0318385に記載されており、その両方とも参照によりその全文が本明細書に組み込まれる。

【0139】

修飾されたクロストリジウム神経毒は、修飾されたクロストリジウム神経毒の生物活性および/または生物学的残留性を増大/減少させる1つ以上の修飾を含み得る。例えば、修飾されたクロストリジウム神経毒は、ロイシン-またはチロシン-ベースのモチーフを含む場合があります。前記モチーフは、修飾されたクロストリジウム神経毒の生物活性および/または生物学的残留性を増大または減少させる。適したロイシン-ベースのモチーフとして、xDxxxLL(配列番号74)、xExxxLL(配列番号75)、xExxxIL(配列番号76)およびxExxxLM(配列番号77)(式中、xは、任意のアミノ酸である)が挙げられる。適したチロシン-ベースのモチーフとして、Y-x-x-Hy(配列番号78)(式中、Hyは、疎水性アミノ酸である)が挙げられる。ロイシン-およびチロシン-ベースのモチーフを含む修飾されたクロストリジウム神経毒の例は、参照によりその全文が本明細書に組み込まれるWO2002/08268に記載されている。

【0140】

「クロストリジウム神経毒」という用語は、ハイブリッドおよびキメラクロストリジウム神経毒を包含するものとする。ハイブリッドクロストリジウム神経毒は、あるクロストリジウム神経毒またはその亜型に由来する軽鎖の少なくとも部分、および別のクロストリジウム神経毒またはクロストリジウム神経毒亜型に由来する重鎖の少なくとも部分を含む。一実施形態では、ハイブリッドクロストリジウム神経毒は、あるクロストリジウム神経毒亜型に由来する全軽鎖および別のクロストリジウム神経毒亜型に由来する重鎖を含有し得る。別の実施形態では、キメラクロストリジウム神経毒は、あるクロストリジウム神経毒亜型に由来する重鎖の部分(例えば、結合ドメイン)を含有し、重鎖の別の部分は、別のクロストリジウム神経毒亜型に由来し得る。同様に、またはあるいは、治療要素は、異なるクロストリジウム神経毒に由来する軽鎖部分を含み得る。このようなハイブリッドまたはキメラクロストリジウム神経毒は、例えば、このようなクロストリジウム神経毒の治療的有用性を、所与のクロストリジウム神経毒亜型に対して免疫学的に耐性である患者に、所与のクロストリジウム神経毒重鎖結合ドメインに対する受容体を平均よりも低い濃度で有し得る患者に、または膜もしくは小胞毒素基質(例えば、SNAP-25、VAMPおよびシンタキシン)のプロテアーゼ耐性変異型を有し得る患者に送達する手段として有用である。ハイブリッドおよびキメラクロストリジウム神経毒は、US8,071,110に記載されており、この刊行物は、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる。したがって、一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、改変ハイブリッドクロストリジウム神経毒または改変キメラクロストリジウム神経毒である。

10

20

【0141】

特に好ましい実施形態では、クロストリジウム神経毒は、非BoNT/Xクロストリジウム神経毒由来の少なくとも1つのドメインを含むBoNT/Xである(例えば、BoNT/Xハイブリッドまたはキメラ)。

【0142】

例えば、一実施形態では、本発明のクロストリジウム神経毒(外因性活性化ループを含む)は、以下を含み得る。

- i. BoNT/X L鎖および非BoNT/X H_NおよびH_Cドメイン、
- ii. BoNT/X H_Nドメインならびに非BoNT/X L鎖およびH_Cドメイン、
- iii. BoNT/X H_Cドメインならびに非BoNT/X L鎖およびH_Nドメイン、
- iv. BoNT/X L鎖およびH_Nドメインならびに非BoNT/X H_Cドメイン、
- v. BoNT/X L鎖およびH_Cドメインならびに非BoNT/X H_Nドメインまたは
- vi. BoNT/X H_NドメインおよびH_Cドメインならびに非BoNT/X L鎖。

30

【0143】

一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/A H_Cドメインを含む。一実施形態では、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/A H_Cドメインを含む本発明の改変クロストリジウム神経毒は、配列番号6に対して少なくとも70%の配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされる。一実施形態では、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/A H_Cドメインを含む本発明の改変クロストリジウム神経毒は、配列番号6に対して少なくとも80%または90%の配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされる。好ましくは、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/A H_Cドメインを含む本発明の改変クロストリジウム神経毒は、配列番号6を含む(より好ましくは、からなる)ヌクレオチド配列によってコードされる。一実施形態では、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/A H_Cドメインを含む本発明の改変クロストリジウム神経毒は、配列番号7に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。一実施形態では、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/A H_Cドメインを含む本発明の改変クロストリジウム神経毒は、配列番号7に対して少なくとも80%または90%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。好ましくは、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/A H_Cドメインを含む本発明の改変クロストリジウム神経毒は、配列番号7として示されるポリペプチド配列を含む(

40

50

より好ましくは、からなる)。

【0144】

一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/B H_Cドメインを含む。一実施形態では、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/A H_Cドメインを含む本発明の改変クロストリジウム神経毒は、配列番号8に対して少なくとも70%の配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされる。一実施形態では、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/A H_Cドメインを含む本発明の改変クロストリジウム神経毒は、配列番号8に対して少なくとも80%または90%の配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされる。好ましくは、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/A H_Cドメインを含む本発明の改変クロストリジウム神経毒は、配列番号8を含む(より好ましくは、からなる)ヌクレオチド配列によってコードされる。一実施形態では、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/A H_Cドメインを含む本発明の改変クロストリジウム神経毒は、配列番号9に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。一実施形態では、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/A H_Cドメインを含む本発明の改変クロストリジウム神経毒は、配列番号9に対して少なくとも80%または90%の配列同一性をポリペプチド配列を含む。好ましくは、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/A H_Cドメインを含む本発明の改変クロストリジウム神経毒は、配列番号9として示されるポリペプチド配列を含む(より好ましくは、からなる)。

【0145】

一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/C H_Cドメインを含む。一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/D H_Cドメインを含む。一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/E H_Cドメインを含む。一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/F H_Cドメインを含む。一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/G H_Cドメインを含む。一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、BoNT/X L鎖およびH_NドメインならびにTeNT H_Cドメインを含む。

【0146】

一実施形態では、クロストリジウム神経毒は、非BoNT/Aクロストリジウム神経毒に由来する少なくとも1つのドメインを含むBoNT/Aである。

【0147】

例えば、一実施形態では、本発明のクロストリジウム神経毒(外因性活性化ループを含む)は、以下を含み得る。

- i. BoNT/A L鎖ならびに非BoNT/A H_NおよびH_Cドメイン、
- ii. BoNT/A H_Nドメインならびに非BoNT/A L鎖およびH_Cドメイン、
- iii. BoNT/A H_Cドメインならびに非BoNT/A L鎖およびH_Nドメイン、
- iv. BoNT/A L鎖およびH_Nドメインならびに非BoNT/A H_Cドメイン、
- v. BoNT/A L鎖およびH_Cドメインならびに非BoNT/A H_Nドメイン、または
- vi. BoNT/A H_NドメインおよびH_Cドメインならびに非BoNT/A L鎖。

【0148】

一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、BoNT/A L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/C1 H_Cドメインを含む。一実施形態では、BoNT/A L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/C1 H_Cドメインを含む本発明の改変クロストリジウム神経毒は、配列番号12に対して少なくとも70%の配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされる。一実施形態では、BoNT/A L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/C1 H_Cドメインを含む本発明の改変クロストリジウム神経毒は、配列番号12に対して少なくとも80%または90%の配列同一性を含むヌクレオチド配列によってコードされる。好ましくは、BoNT/A L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/C1 H_Cドメインを含む本発明の改変クロストリジ

ウム神経毒は、配列番号12を含む(より好ましくは、からなる)ヌクレオチド配列によってコードされる。一実施形態では、BoNT/A L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/C1 H_Cドメインを含む本発明の改変クロストリジウム神経毒は、配列番号13に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。一実施形態では、BoNT/A L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/C1 H_Cドメインを含む本発明の改変クロストリジウム神経毒は、配列番号13に対して少なくとも80%または90%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。好ましくは、BoNT/A L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/C1 H_Cドメインを含む本発明の改変クロストリジウム神経毒は、配列番号13として示されるポリペプチド配列を含む(より好ましくは、からなる)。

【0149】

一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、BoNT/A L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/B H_Cドメインを含む。一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、BoNT/A L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/D H_Cドメインを含む。一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、BoNT/A L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/E H_Cドメインを含む。一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、BoNT/A L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/F H_Cドメインを含む。一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、BoNT/A L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/G H_Cドメインを含む。一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、BoNT/A L鎖およびH_NドメインならびにBoNT/X H_Cドメインを含む。一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、BoNT/A L鎖およびH_NドメインならびにTeNT H_Cドメインを含む。

【0150】

例えば、一実施形態では、本発明のクロストリジウム神経毒(外因性活性化ループを含む)は、以下を含み得る。

- i. BoNT/B L鎖ならびに非BoNT/B H_NおよびH_Cドメイン、
- ii. BoNT/B H_Nドメインならびに非BoNT/B L鎖およびH_Cドメイン、
- iii. BoNT/B H_Cドメインならびに非BoNT/B L鎖およびH_Nドメイン、
- iv. BoNT/B L鎖およびH_Nドメインならびに非BoNT/B H_Cドメイン、
- v. BoNT/B L鎖およびH_Cドメインならびに非BoNT/B H_Nドメイン、または
- vi. BoNT/B H_NドメインおよびH_Cドメインならびに非BoNT/B L鎖。

【0151】

例えば、一実施形態では、本発明のクロストリジウム神経毒(外因性活性化ループを含む)は、以下を含み得る。

- i. BoNT/D L鎖ならびに非BoNT/XD H_NおよびH_Cドメイン、
- ii. BoNT/D H_Nドメインならびに非BoNT/D L鎖およびH_Cドメイン、
- iii. BoNT/D H_Cドメインならびに非BoNT/D L鎖およびH_Nドメイン、
- iv. BoNT/D L鎖およびH_Nドメインならびに非BoNT/D H_Cドメイン、
- v. BoNT/D L鎖およびH_Cドメインならびに非BoNT/D H_Nドメイン、または
- vi. BoNT/D H_NドメインおよびH_Cドメインならびに非BoNT/D L鎖。

【0152】

例えば、一実施形態では、本発明のクロストリジウム神経毒(外因性活性化ループを含む)は、以下を含み得る。

- i. BoNT/E L鎖ならびに非BoNT/E H_NおよびH_Cドメイン、
- ii. BoNT/E H_Nドメインならびに非BoNT/E L鎖およびH_Cドメイン、
- iii. BoNT/E H_Cドメインならびに非BoNT/E L鎖およびH_Nドメイン、
- iv. BoNT/E L鎖およびH_Nドメインならびに非BoNT/E H_Cドメイン、
- v. BoNT/E L鎖およびH_Cドメインならびに非BoNT/E H_Nドメイン、または
- vi. BoNT/E H_NドメインおよびH_Cドメインならびに非BoNT/E L鎖。

【0153】

例えば、一実施形態では、本発明のクロストリジウム神経毒(外因性活性化ループを含む)

)は、以下を含み得る。

- i. BoNT/F L鎖ならびに非BoNT/F H_NおよびH_Cドメイン、
- ii. BoNT/F H_Nドメインならびに非BoNT/F L鎖およびH_Cドメイン、
- iii. BoNT/F H_Cドメインならびに非BoNT/F L鎖およびH_Nドメイン、
- iv. BoNT/F L鎖およびH_Nドメインならびに非BoNT/F H_Cドメイン、
- v. BoNT/F L鎖およびH_Cドメインならびに非BoNT/F H_Nドメイン、または
- vi. BoNT/F H_NドメインおよびH_Cドメインならびに非BoNT/F L鎖。

【0154】

例えば、一実施形態では、本発明のクロストリジウム神経毒(外因性活性化ループを含む)は、以下を含み得る。

- i. BoNT/G L鎖ならびに非BoNT/G H_NおよびH_Cドメイン、
- ii. BoNT/G H_Nドメインならびに非BoNT/G L鎖およびH_Cドメイン、
- iii. BoNT/G H_Cドメインならびに非BoNT/G L鎖およびH_Nドメイン、
- iv. BoNT/G L鎖およびH_Nドメインならびに非BoNT/G H_Cドメイン、
- v. BoNT/G L鎖およびH_Cドメインならびに非BoNT/G H_Nドメイン、または
- vi. BoNT/G H_NドメインおよびH_Cドメインならびに非BoNT/G L鎖。

【0155】

例えば、一実施形態では、本発明のクロストリジウム神経毒(外因性活性化ループを含む)は、以下を含み得る。

- i. TeNT L鎖ならびに非TeNT H_NおよびH_Cドメイン、
- ii. TeNT H_Nドメインならびに非TeNT L鎖およびH_Cドメイン、
- iii. TeNT H_Cドメインならびに非TeNT L鎖およびH_Nドメイン、
- iv. TeNT L鎖およびH_Nドメインならびに非TeNT H_Cドメイン、
- v. TeNT L鎖およびH_Cドメインならびに非TeNT H_Nドメイン、または
- vi. TeNT H_NドメインおよびH_Cドメインならびに非TeNT L鎖。

【0156】

「クロストリジウム神経毒」という用語はまた、非クロストリジウムの微生物によって発現された新たに発見されたボツリヌス神経毒タンパク質ファミリーメンバー、例えば、BoNT/Xに対して最も近い配列同一性を有するエンテロコッカス属(*Enterococcus*)によってコードされた毒素、BoNT/Wo(NCBI参照配列:WP_027699549.1)と呼ばれる、W89-W90でVAMP2を切断するワイセラ・オリゼ(*Weissella oryzae*)によってコードされる毒素、VAMP2およびSNAP25を切断するエンテロコッカス・フェシウム(*Enterococcus faecium*)によってコードされる毒素(GenBank:OT022244.1)およびクリセオバクテリウム・ピペロ(*Chryseobacterium piperi*)によってコードされる毒素(NCBI参照配列:WP_034687872.1)も包含し得る。

【0157】

「クロストリジウム神経毒」という用語は、再標的化されたクロストリジウム神経毒を包含するものとする。再標的化されたクロストリジウム神経毒では、クロストリジウム神経毒は、標的化部分(TM)として知られる外因性リガンドを含むように修飾されている。TMは、所望の標的細胞に対する結合特異性を提供するように選択され、再標的化プロセスの一部として、クロストリジウム神経毒の天然結合部分(例えば、H_CドメインまたはH_{CC}ドメイン)が除去され得る。再標的化技術は、例えば、EP-B-0689459、WO1994/021300、EP-B-0939818、US6,461,617、US7,192,596、WO1998/007864、EP-B-0826051、US5,989,545、US6,395,513、US6,962,703、WO1996/033273、EP-B-0996468、US7,052,702、WO1999/017806、EP-B-1107794、US6,632,440、WO2000/010598、WO2001/21213、WO2006/059093、WO2000/62814、WO2000/04926、WO1993/15766、WO2000/61192およびWO1999/58571に記載されており、そのすべては、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる。したがって、一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、改変された再標的化されたクロストリジウム神経毒である。本発明の改変クロストリジウム神経毒は、クロストリジウ

10

20

30

40

50

ム神経毒の機能性H_Cドメインを欠き、また、任意の機能的に同等のTMも欠く場合がある。したがって、前記ポリペプチドは、クロストリジウム神経毒の天然結合機能を欠き、Shone et al. (1985) Eur. J. Biochem. 151, 75-82に記載される結合アッセイにおいて、ラットシナプトソーム膜(クロストリジウムH_C構成成分を介して、または任意の機能的に同等のTMを介して)に結合できない。一実施形態では、TMは、好ましくは、コムギ胚芽凝集素(WGA)ペプチドではない。

【0158】

一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、本明細書において記載される改変LH_Nポリペプチドを含み得る。

【0159】

一実施形態では、改変クロストリジウム神経毒は、本明細書において記載される改変LH_Nポリペプチドおよび標的化部分(TM)を含み得る。

【0160】

参照改変LH_Nポリペプチド配列は、配列番号53~60として本明細書において提示されるが、改変LH_Nポリペプチド配列は、配列番号53~60のいずれかに対して少なくとも70%の配列同一性を有し得る。一実施形態では、改変LH_Nポリペプチド配列は、配列番号53~60のいずれかに対して少なくとも80%または90%の配列同一性を有し得る。好ましくは、改変LH_Nポリペプチド配列は、配列番号53~60のいずれかを含む(より好ましくは、からなる)。

【0161】

一実施形態では、TMは、炭疽毒素防御抗原(PA)またはその断片を含み得る。PAの参照配列は、配列番号52として示されている。一部の実施形態では、PAは、配列番号52またはその断片に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。一部の実施形態では、PAは、配列番号52またはその断片に対して少なくとも80%または90%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。他の実施形態では、PAは、配列番号52またはその断片として示されるポリペプチド配列を含む(またはからなる)。

【0162】

したがって、一実施形態では、本発明の改変クロストリジウム神経毒は、クロストリジウム神経毒非細胞傷害性プロテアーゼドメイン、クロストリジウム神経毒転位置ドメイン(例えば、クロストリジウム神経毒のLH_N)およびPAまたはその断片を含むTMを含み得る。前記改変クロストリジウム神経毒は、ポリペプチド配列Cys-(Xaa)_a-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cys(配列番号1)を含む外因性活性化ループを含む。

【0163】

したがって、一実施形態では、改変クロストリジウム神経毒は、PAまたはその断片およびLH_N/A、LH_N/B、LH_N/D、LH_N/E、LH_N/F、LH_N/G、LH_N/XまたはLH_N/TeNTを含み、内因性クロストリジウム神経毒活性化ループは、ポリペプチド配列Cys-(Xaa)_a-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cys(配列番号1)を含む外因性活性化ループで置き換えられている。

【0164】

Lys-Cは、前記クロストリジウム神経毒の内因性活性化ループの外側の1つ以上のペプチド結合を加水分解する、例えば、Lys-Cは、PA TM中の1つ以上のペプチド結合を加水分解することがわかっているので、Lys-Cは、LH_NおよびPA TMを含む従来のクロストリジウム神経毒とともに使用するのに適していない。

【0165】

したがって、一部の実施形態では、改変クロストリジウム神経毒は、PA(またはその断片)および、

- i. 配列番号35のアミノ酸残基1~871、
- ii. 配列番号36のアミノ酸残基1~858、
- iii. 配列番号38のアミノ酸残基1~862、
- iv. 配列番号39のアミノ酸残基1~845、

10

20

30

40

50

- v.配列番号40のアミノ酸残基1～864、
 - vi.配列番号41のアミノ酸残基1～863、
 - vii.配列番号42のアミノ酸残基1～879または
 - viii.配列番号33のアミノ酸残基1～924
- を含み、

内因性クロストリジウム神経毒活性化ループは、ポリペプチド配列Cys-(Xaa)_a-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cys(配列番号1)を含む外因性活性化ループと置き換えられている。

【0166】

一実施形態では、改変クロストリジウム神経毒は、以下を含むポリペプチドに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を有する:

a.配列番号52、および

b.配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59または配列番号60。

【0167】

一実施形態では、改変クロストリジウム神経毒は、以下を含むポリペプチドに対して少なくとも80%または90%の配列同一性を有するポリペプチド配列を有する:

a.配列番号52、および

b.配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59または配列番号60。

【0168】

好ましくは、改変クロストリジウム神経毒は、以下を含むポリペプチド配列を有する:

a.配列番号52、および

b.配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59または配列番号60。

【0169】

一実施形態では、改変クロストリジウム神経毒は、以下を含むポリペプチドに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を有する:

a.配列番号52の断片、および

b.配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59または配列番号60。

【0170】

一実施形態では、改変クロストリジウム神経毒は、以下を含むポリペプチドに対して少なくとも80%または90%の配列同一性を有するポリペプチド配列を有する:

a.配列番号52の断片、および

b.配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59または配列番号60。

【0171】

好ましくは、改変クロストリジウム神経毒は、以下を含むポリペプチド配列を有する:

a.配列番号52の断片、および

b.配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59または配列番号60。

【0172】

一実施形態では、PA断片は、配列番号52の残基1～258に位置するPAd1であり得る。

一実施形態では、PA断片は、配列番号52の残基259～487に位置するPAd2であり得る。

一実施形態では、PA断片は、配列番号52の残基488～594に位置するPAd3であり得る。

一実施形態では、PA断片は、配列番号52の残基595～735に位置するPAd4であり得る。

他の実施形態では、PA断片は、PAd1、PAd2、PAd3またはPAd4の任意の組合せを含有し得る。

【0173】

全長83kDaのPA(PA83)は、フーリンまたは他のフーリン様プロテアーゼによって

10

20

30

40

50

タンパク分解性にプロセシングされ、したがって、N末端側断片を除去し得る(PA20)。PA63として知られる63kDaのプロセシングされた形態は、PAのオリゴマー形成可能な形態である。

【0174】

一実施形態では、PA断片は、PA63、PAd3-d4、PAd2-d4およびPAd4のうち1つ以上を含み得る(またはからなり得る)。

【0175】

一実施形態では、PA断片は、PAのC末端側受容体結合ドメインまたはANTXR2もしくはは侵害受容器ニューロン結合タンパク質への結合活性を保持するそのPA断片(または変異型)であり得る。

【0176】

本発明はまた、非天然プロテアーゼ切断部位を有するクロストリジウム神経毒を包含する。このようなクロストリジウム神経毒では、天然プロテアーゼ切断部位(上記のように活性化部位としても同様に知られる)は、クロストリジウム神経毒にとって天然ではないプロテアーゼ切断部位(すなわち、外因性切断部位)を用いて修飾されるか、または置き換えられる。このような部位は、切断のために外因性プロテアーゼを必要とし、これによって、切断事象のタイミングおよび位置についての改善された制御が可能となる。クロストリジウム神経毒において使用され得る非天然プロテアーゼ切断部位として、以下が挙げられる。

TEV(タバコエッチウイルス)(ENLYFQ↓G)(配列番号79)

トロンピン(LVPR↓GS)(配列番号80)

PreScission(LEVLFG↓GP)(配列番号81)。

【0177】

さらなるプロテアーゼ切断部位として、非細胞傷害性プロテアーゼによって、例えば、クロストリジウム神経毒の軽鎖によって切断される認識配列が挙げられる。これらとして、非細胞傷害性プロテアーゼ、例えば、クロストリジウム神経毒の軽鎖によって切断されるSNARE(例えば、SNAP-25、シンタキシン、VAMP)タンパク質認識配列が挙げられる。非天然プロテアーゼ切断部位を含むクロストリジウム神経毒は、US7,132,259、EP1206554-B2およびUS2007/0166332に記載されており、そのすべては、その全文が参照により本明細書に組み込まれる。また、自己切断性配列であるインティンもプロテアーゼ切断部位という用語によって包含される。自己スプライシング反応は、例えば、存在する還元剤の濃度を変更することによって制御可能である。

【0178】

本発明はまた、「破壊性切断部位」を含むクロストリジウム神経毒も包含する。前記クロストリジウム神経毒では、非天然プロテアーゼ切断部位は、クロストリジウム神経毒中に、前記部位での切断が、クロストリジウム神経毒の活性を低下させる、または不活性化するような位置で組み込まれる。破壊性プロテアーゼ切断部位は、クロストリジウム神経毒が、投与後に、非標的位置に移動する事象において局所プロテアーゼによる切断を受けやすい可能性がある。適した非天然プロテアーゼ切断部位として、上記のものが挙げられる。破壊性切断部位を含むクロストリジウム神経毒は、WO2010/094905およびWO2002/044199に記載されており、それらの両方とも、その全文が参照により本明細書に組み込まれる。

【0179】

本発明の改変クロストリジウム神経毒、特に、その軽鎖構成成分は、PEG化され得る-これは、軽鎖構成成分の安定性、例えば、作用の持続期間を増大するのに役立ち得る。ペグ化は、軽鎖がBoNT/A、BまたはC1プロテアーゼを含む場合に特に好ましい。ペグ化は、好ましくは、軽鎖構成成分のN末端へのPEGの付加を含む。例として、軽鎖のN末端が、同一である場合も、異なっている場合もある1個以上のアミノ酸(例えば、システイン)残基を用いて伸長され得る。前記アミノ酸残基のうち1個以上は、それに付着された(例えば、共有結合によって付着された)その自身のPEG分子を有し得る。この技術の例は、その全文が参照により本明細書に組み込まれるWO2007/104567に記載されている。

10

20

30

40

50

【0180】

本発明の改変クロストリジウム神経毒は、天然に存在するクロストリジウム神経毒複合体中に存在する複合体形成タンパク質を含まない場合がある。

【0181】

本発明の改変クロストリジウム神経毒は、組換え核酸技術を使用して生成され得る。したがって、一実施形態では、改変クロストリジウム神経毒(上記のような)は、組換え改変クロストリジウム神経毒である。

【0182】

別の態様では、本発明は、上記のような改変クロストリジウム神経毒をコードする核酸配列を含む核酸(例えば、DNA)を提供する。一実施形態では、核酸配列は、プロモーターおよびターミネーターを含むDNAベクターの一部として調製される。

10

【0183】

好ましい実施形態では、ベクターは、以下から選択されるプロモーターを有する。

プロモーター / 誘導剤 / 通常の誘導条件

Tac(ハイブリッド) / IPTG / 0.2mM(0.05~2.0mM)

AraBAD / L-アラビノース / 0.2%(0.002~0.4%)

T7-lacオペレーター / IPTG / 0.2mM(0.05~2.0mM)。

【0184】

別の好ましい実施形態では、ベクターは、以下から選択されたプロモーターを有する。

プロモーター 誘導剤 通常の誘導条件

Tac(ハイブリッド) / IPTG / 0.2mM(0.05~2.0mM)

AraBAD / L-アラビノース / 0.2%(0.002~0.4%)

T7-lacオペレーター / IPTG / 0.2mM(0.05~2.0mM)

T5-lacオペレーター / IPTG / 0.2mM(0.05~2.0mM)。

20

【0185】

本発明の核酸分子は、当技術分野で公知の任意の適したプロセスを使用して作製され得る。したがって、核酸分子は、化学合成技術を使用して作製され得る。あるいは、本発明の核酸分子は、分子生物学技術を使用して作製され得る。

【0186】

本発明のDNA構築物は、好ましくは、コンピュータで設計され、次いで、従来のDNA合成技術によって合成される。

30

【0187】

上記の核酸配列情報は、随意により、使用されるべき最終的な宿主細胞(例えば、大腸菌(E.coli))発現系に従ってコドンバイアスのために修飾される。

【0188】

一態様では、本発明は、本発明の改変クロストリジウム神経毒をコードするヌクレオチド配列を提供する。ヌクレオチド配列は、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10または配列番号12に対して少なくとも70%の配列同一性を有する配列を含む。一実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10または配列番号12に対して少なくとも80%または90%の配列同一性を有する配列を含む。好ましくは、ヌクレオチド配列は、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10または配列番号12を含む(より好ましくは、からなる)。

40

【0189】

本発明のヌクレオチド配列は、配列番号1を含むポリペプチドをコードする。

【0190】

「ヌクレオチド配列」および「核酸」という用語は、本明細書において同義的に使用される。好ましくは、ヌクレオチド配列は、DNA配列である。

【0191】

本発明は、軽鎖および重鎖を有する単鎖(改変)クロストリジウム神経毒タンパク質を生成する方法であって、適した宿主細胞において本明細書において記載される核酸を発現さ

50

せること、宿主細胞を溶解して単鎖(改変)クロストリジウム神経毒タンパク質を含有する宿主細胞ホモネートを提供することおよび単鎖(改変)クロストリジウム神経毒タンパク質を単離することを含む、方法を提供する。一態様では、本発明は、本発明の(改変された)クロストリジウム神経毒を、対応する二本鎖クロストリジウム神経毒にタンパク分解性にプロセシングする方法であって、(改変)クロストリジウム神経毒を、プロテアーゼ(好ましくは、エンドペプチダーゼ、例えば、エンテロキナーゼまたは第Xa因子)と接触させ、それによって、二本鎖クロストリジウム神経毒(例えば、軽鎖および重鎖が、ジスルフィド結合によって一緒に接合されている)を生成することを含む、方法を提供する。

【0192】

本発明は、したがって、本発明の方法によって得ることができる二本鎖クロストリジウム神経毒を提供する。

【0193】

「得ることができる」という用語は、本明細書において、「得られた」という用語も包含する。一実施形態では、「得ることができる」という用語は、得られたを意味する。

【0194】

本発明のクロストリジウム神経毒は、医薬または化粧品において有用性を適宜見出す。使用において、クロストリジウム神経毒は、好ましくは、二本鎖形態である。

【0195】

本発明の(改変)クロストリジウム神経毒は、ある特定の医学的または美容的疾患および状態を予防または処置するために使用され得る。したがって、さらなる態様において、本発明は、医薬において使用するために上記のような(改変)クロストリジウム神経毒を提供する。

【0196】

関連態様では、本発明は、以下から選択された疾患または状態の予防または処置において使用するために上記のような(改変)クロストリジウム神経毒を提供する：不要な免疫分泌と関連する状態、斜視、眼瞼痙攣、内斜視、ジストニア(例えば、痙攣性ジストニア、顎口腔ジストニア、局所性ジストニア、遅発性ジストニア、喉頭ジストニア、四肢ジストニア、頸部ジストニア)、斜頸(例えば、痙攣性斜頸)、細胞/筋肉無能力化(SNARE下方制御または不活性化による)から恩恵を受ける美容療法(美容)適用、眼性運動性の神経筋障害または状態(例えば、共同性(concomitant)斜視、上下斜視、外直筋麻痺、眼振、甲状腺異常筋疾患)、書痙、眼瞼痙攣、歯ぎしり、ウィルソン病、振戦、チック、分節性ミオクロヌス、攣縮、慢性多発性硬化症による攣縮、異常な膀胱管理をもたらす攣縮、アニムス、背部痙攣、こむら返り、緊張性頭痛、骨盤拳筋症候群、二分脊椎症、遅発性ジスキネジア、パーキンソン病、吃音、片側顔面痙攣、眼瞼障害、脳性麻痺、局所性攣縮、痙攣性大腸炎、神経因性膀胱、アニスムス、四肢攣縮、チック、振戦、歯ぎしり、裂肛、アカラシア、嚥下障害、流涙、多汗症(hyperhidrosis)、過度の唾液分泌、過度の胃腸管分泌、筋肉痛(例えば、筋肉攣縮からの疼痛)、頭痛疼痛(例えば、緊張性頭痛)、皺のよった額、皮膚の皺、癌、子宮障害、泌尿生殖器障害、泌尿生殖器-神経疾患、慢性神経原性炎症および平滑筋障害。

【0197】

本発明の(改変)クロストリジウム神経毒が、BoNT/X配列(またはその部分)を含む場合には、前記クロストリジウム神経毒は、VAMP4、VAMP5および/またはYkt6を切断するその能力のために、ニューロン以外の他の種類の分泌細胞を標的とすることが可能であり得る。一部の実施形態では、標的化される分泌細胞は、分泌性免疫細胞である。「分泌性免疫細胞」とは、本明細書において使用される場合、サイトカイン、ケモカインまたは抗体を分泌する免疫細胞を指す。このような分泌性免疫細胞は、限定するものではないが、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好酸球、好塩基球、マクロファージ、好中球および樹状細胞を含む自然免疫細胞であり得る。抗体を分泌する分泌性免疫細胞(例えば、白血球)もまた、本開示のクロストリジウム神経毒によって標的化され得る。抗体分泌細胞の限定されない例として、限定するものではないが、形質B細胞、形質細胞、プラズマ細胞およびエフェクターB細胞が挙げられる。一部の実施形態では、クロストリジウム神経毒は、

免疫応答を調節できる。したがって、不要の分泌、好ましくは、不要の免疫分泌と関連する状態を処置するための本発明のクロストリジウム神経毒の治療的使用が、本明細書においてさらに考慮される。不要の免疫分泌と関連する状態として、限定するものではないが、炎症、乾癬、アレルギー、血球貪食性リンパ組織球症およびアルコール性肝臓疾患が挙げられる。

【0198】

一態様では、本発明は、本発明の(改変)クロストリジウム神経毒または二本鎖クロストリジウム神経毒および医薬上許容される担体、賦形剤、アジュバント、噴射剤および/または塩を含む医薬組成物を提供する。

【0199】

本発明の(改変)クロストリジウム神経毒は、経口、非経口、連続注入、吸入または局所適用のために製剤化され得る。注射に適した組成物は、溶液、懸濁液もしくはエマルジョンまたは使用前に適したビヒクル中に溶解または懸濁される乾燥粉末の形態であり得る。

【0200】

局所に送達されるべき(改変)クロストリジウム神経毒の場合には、(改変)クロストリジウム神経毒は、クリーム(例えば、局所適用用)として、または皮下注射のために製剤化され得る。

【0201】

局所送達手段として、エアロゾルまたは他のスプレー(例えば、ネブライザー)を挙げることができる。これに関連して、(改変)クロストリジウム神経毒のエアロゾル製剤は、肺および/または他の鼻腔および/または気管支もしくは気道への送達を可能にする。

【0202】

本発明の(改変)クロストリジウム神経毒は、影響を受けた臓器の神経支配に関与する脊髄分節のレベルで脊柱中に、くも膜下腔内または硬膜外注射によって患者に投与され得る。

【0203】

好ましい投与経路は、腹腔鏡下および/または限局化、特に、筋肉内の注射によってである。

【0204】

本発明の(改変)クロストリジウム神経毒の投与のための投与量範囲は、所望の治療効果をもたらすものである。必要な投与量範囲は、(改変)クロストリジウム神経毒または組成物の正確な性質、投与経路、製剤の性質、患者の年齢、患者の状態の性質、程度または重症度、あるとすれば、主治医の判断に応じて変わるということは認められよう。これらの投与量レベルの変動は、最適化のための標準の経験的なルーチンを使用して調整され得る。

【0205】

適した1日投与量(患者の体重1kgあたり)は、範囲0.0001~1ng/kg、好ましくは、0.0001~0.5ng/kg、より好ましくは、0.002~0.5ng/kg、特に好ましくは、0.004~0.5ng/kgにある。単位投与量は、1ピコグラム未満~30ngで変わり得るが、通常、用量あたり0.01~1ngとなり、これは、毎日、または好ましくは、より少ない頻度で、例えば、毎週または毎月投与され得る。

【0206】

特に好ましい投薬レジメンは、1×用量としての0.05ngの(改変)クロストリジウム神経毒に基づいている。これに関連して、好ましい投与量は、範囲1×~100×(すなわち、0.05~5ng)中にある。

【0207】

流体投与形は、通常、(改変)クロストリジウム神経毒および発熱物質不含滅菌ビヒクルを使用して調製される。(改変)クロストリジウム神経毒は、使用されるビヒクルおよび濃度に応じて、ビヒクルに溶解または懸濁され得る。溶液の調製では、(改変)クロストリジウム神経毒は、ビヒクルに溶解され、溶液は、必要な場合には、塩化ナトリウムの添加によって等張性にされ、無菌技術を使用して滅菌フィルターを通して濾過することによって滅菌され、その後、適した滅菌バイアルまたはアンプル中に充填され、密閉され得る。あ

10

20

30

40

50

るいは、溶液安定性が適切である場合には、その密閉容器中の溶液は、オートクレーブ処理によって滅菌され得る。有利なことに、添加物、例えば、緩衝剤、滑沢剤、安定化剤、保存料または殺菌剤、懸濁剤または乳化剤およびまたは局所麻酔剤が、ビヒクル中に溶解され得る。

【0208】

使用前に適したビヒクル中に溶解または懸濁される乾燥粉末は、予め滅菌した成分を、滅菌区域において無菌技術を使用して滅菌容器中に充填することによって調製され得る。あるいは、成分が、滅菌区域において無菌技術を使用して適した容器中に溶解され得る。次いで、製品は凍結乾燥され、容器は無菌的に密閉される。

【0209】

筋肉内、皮下または皮内注射に適した非経口懸濁液は、滅菌構成成分が、溶解される代わりに滅菌ビヒクルに懸濁され、滅菌が濾過によって達成され得ない点を除いて実質的に同じ方法で調製される。構成成分は、滅菌状態で単離され得るか、あるいは、単離後に、例えば、ガンマ照射によって滅菌される場合もある。

【0210】

有利なことに、構成成分の均一分布を促進するために、組成物(複数可)中に懸濁剤、例えば、ポリビニルピロリドンが含まれる。

【0211】

本発明に従う投与は、微粒子カプセル封入、ウイルス送達系または高圧エアロゾル衝突を含む種々の送達技術を利用できる。

【0212】

本発明の種々の方法と関連する実施形態は、他の方法、クロストリジウム神経毒、例えば、改変クロストリジウム神経毒(単鎖形態であろうが、二本鎖形態であろうが)、使用または医薬組成物に同等に適用されるものとする、逆もまた真なり。

【0213】

配列相同性

【0214】

限定するものではないが、グローバル法、ローカル法およびハイブリッド法、例えば、セグメントアプローチ法などを含む種々の配列アラインメント法のいずれも、同一性パーセントを決定するために使用され得る。同一性パーセントを決定するためのプロトコールは、当業者の範囲内の常法である。グローバル法は、分子の開始から最後まで配列をアラインし、個々の残基対のスコアを合計することによって、およびギャップペナルティーを課すことによって最良アラインメントを決定する。限定されない方法として、例えば、CLUSTAL W、例えば、Julie D. Thompson et al., CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22(22) Nucleic Acids Research 4673-4680 (1994)を参照されたい、および反復改良、例えば、Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) J. Mol. Biol. 823-838 (1996)を参照されたい、が挙げられる。ローカル法は、インプット配列のすべてによって共有される1以上の保存されたモチーフを同定することによって配列をアラインする。限定されない方法として、例えば、Match-box、例えば、Eric Depiereux and Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) CABIOS 501-509 (1992)を参照されたい、Gibbsサンプリング、例えば、C. E. Lawrence et al., Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262(5131) Science 208-214 (1993); Align-M, see, e.g., Ivo Van Walle et al., Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9) Bioinformatics:1428-1435 (2004)を参照されたい、が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0215】

したがって、配列同一性パーセントは、従来法によって決定される。例えば、Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48: 603-16, 1986およびHenikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19, 1992を参照されたい。手短には、2つのアミノ酸配列が、10のギャップ開始ペナルティー、1のギャップ伸長ペナルティーおよび以下に示されるようなHenikoff and Henikoff(同書)の「blosum 62」スコアリングマトリックス(アミノ酸は標準一文字コードによって示される)を使用してアラインメントスコアを最適化するようにアラインされる。

【0216】

2つ以上の核酸またはアミノ酸配列間の「配列同一性パーセント」は、配列によって共有される同一位置数の関数である。したがって、同一性%は、ヌクレオチド/アミノ酸の総数によって除され、100が乗じられた同一ヌクレオチド/アミノ酸数として算出され得る。配列同一性%の算出はまた、2つ以上の配列のアラインメントを最適化するために導入される必要があるギャップの数および各ギャップの長さも考慮する場合がある。2つ以上の配列の配列比較および同一性パーセントの決定は、特定の数学的アルゴリズム、例えば、当業者が精通するであろうBLASTを使用して実施され得る。

【数1】

配列同一性を決定するためのアラインメントスコア

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

【0217】

次いで、同一性パーセントは、以下として算出される。

【数2】

10

20

30

40

50

同一の一致の総数

× 100

[より長い配列の長さ+2 配列のアラインメント

のためにより長い配列に導入されたギャップ数]

【0218】

実質的に相同なポリペプチドは、1つ以上のアミノ酸置換、欠失または付加を有すると特性決定される。これらの変化は、好ましくは、保存的アミノ酸置換、ポリペプチドのフォールディングもしくは活性に有意に影響を及ぼさない他の置換、通常1個～約30個のアミノ酸の小さい欠失、小さいアミノ-もしくはカルボキシル-末端伸長、例えば、アミノ-末端メチオニン残基、最大約20～25残基の小さいリンカーペプチドまたは親和性タグである(以下を参照されたい)小さい性質のものである。

保存的アミノ酸置換

塩基性:

アルギニン

リジン

ヒスチジン

酸性:

グルタミン酸

アスパラギン酸

極性:

グルタミン

アスパラギン

疎水性:

ロイシン

イソロイシン

バリン

芳香族:

フェニルアラニン

トリプトファン

チロシン

小さい:

グリシン

アラニン

セリン

トレオニン

メチオニン

【0219】

20個の標準アミノ酸に加えて、非標準アミノ酸(例えば、4-ヒドロキシプロリン、6-N-メチルリジン、2-アミノイソ酪酸、イソバリンおよびα-メチルセリン)が、本発明のポリペプチドのアミノ酸残基と置換され得る。限られた数の非保存的アミノ酸、遺伝暗号によってコードされないアミノ酸および非天然アミノ酸が、ポリペプチドアミノ酸残基と置換され得る。本発明のポリペプチドはまた、天然に存在しないアミノ酸残基を含み得る。

【0220】

天然に存在しないアミノ酸として、限定するものではないが、トランス-3-メチルプロリン、2,4-メタノ-プロリン、シス-4-ヒドロキシプロリン、トランス-4-ヒドロキシ-プロリン、N-メチルグリシン、アロ-トレオニン、メチル-トレオニン、ヒドロキシ-エチルシステ

イン、ヒドロキシエチルホモ-システイン、ニトロ-グルタミン、ホモグルタミン、ピペコリン酸、t-ロイシン、ノルバリン、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニル-アラニン、4-アザフェニル-アラニンおよび4-フルオロフェニルアラニンが挙げられる。天然に存在しないアミノ酸残基をタンパク質中に組み込むためのいくつかの方法が、当技術分野で公知である。例えば、ナンセンス突然変異が、化学的にアミノアシル化された サプレッサー-tRNAを使用して抑制されるin vitro系が使用され得る。アミノ酸を合成し、tRNAをアミノアシル化する方法は、当技術分野で公知である。ナンセンス突然変異を含有するプラスミドの転写および翻訳は、大腸菌(*E.coli*)S30抽出物および市販の酵素および他の試薬を含む無細胞系において実施される。タンパク質は、クロマトグラフィーによって精製される。例えば、Robertson et al., *J. Am. Chem. Soc.* 113:2722, 1991; Ellman et al., *Methods Enzymol.* 202:301, 1991; Chung et al., *Science* 259:806-9, 1993; and Chung et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10145-9, 1993)を参照されたい。第2の方法では、翻訳は、突然変異されたmRNAおよび化学的にアミノアシル化されたサプレッサー-tRNAのマイクロインジェクションによってアフリカツメガエル卵母細胞において実施される(Turcatti et al., *J. Biol. Chem.* 271:19991-8, 1996)。第3の方法内で、大腸菌(*E.coli*)細胞は、置き換えられるべき天然アミノ酸(例えば、フェニルアラニン)の不在下および所望の天然に存在しないアミノ酸(複数可)(例えば、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニンまたは4-フルオロフェニルアラニン)の存在下で培養される。天然に存在しないアミノ酸は、その天然の対応物の代わりにポリペプチド中に組み込まれる。Koide et al., *Biochem.* 33:7470-6, 1994を参照されたい。天然に存在するアミノ酸残基は、in vitro化学修飾によって天然に存在しない種に変換され得る。置換の範囲をさらに拡大するために、化学修飾が部位特異的突然変異誘発と組み合わせられることもある(Wynn and Richards, *Protein Sci.* 2:395-403, 1993)。

【0221】

限られた数の非保存的アミノ酸、遺伝暗号によってコードされないアミノ酸、天然に存在しないアミノ酸および非天然アミノ酸が、本発明のポリペプチドのアミノ酸残基と置換され得る。

【0222】

本発明のポリペプチド中の必須アミノ酸は、当技術分野で公知の手順、例えば、部位特異的突然変異誘発またはアラニンスキャニング突然変異誘発に従って同定され得る(Cunningham and Wells, *Science* 244: 1081-5, 1989)。推定接触部位アミノ酸の突然変異とともに、生物学的相互作用の部位も、核磁気共鳴、結晶学、電子回折または光親和性標識のような技術によって決定されるような構造の物理的分析によって決定され得る。例えば、de Vos et al., *Science* 255:306-12, 1992; Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224:899-904, 1992; Wlodaver et al., *FEBS Lett.* 309:59-64, 1992を参照されたい。必須アミノ酸の同一性もまた、本発明のポリペプチドの関連構成成分(例えば、転位置またはプロテアーゼ構成成分)との相同性の分析から推論され得る。

【0223】

突然変異誘発およびスクリーニングの公知の方法、例えば、Reidhaar-Olson and Sauer (*Science* 241:53-7, 1988)またはBowie and Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2152-6, 1989)によって開示されるものを使用して、複数のアミノ酸置換が行われ、試験され得る。手短には、これらの著者は、ポリペプチド中の2つ以上の位置を同時にランダム化し、機能的ポリペプチドを選択し、次いで、突然変異誘発されたポリペプチドを配列決定して、各位置で許容可能な置換の範囲を決定する方法を開示している。使用され得る他の方法として、ファージディスプレイ(例えば、Lowman et al., *Biochem.* 30:10832-7, 1991; Ladner et al., U.S. Patent No. 5,223,409; Huse, WIPO公開WO92/06204)および領域によって指示される突然変異誘発(Derbyshire et al., *Gene* 46:145, 1986; Ner et al., *DNA* 7:127, 1988)が挙げられる。

【0224】

別に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術および科学用語は、

本開示が属する技術分野における当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994)およびHale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991)は、当業者に、本開示において使用される用語の多くの一般的な辞書を提供する。

【0225】

本開示は、本明細書において開示される例示的方法および材料によって限定されず、本明細書において記載されるものと同様または同等の任意の方法および材料が、本開示の実施形態の実施または試験において使用され得る。数値範囲には、範囲を定義する数値が含まれる。特に断りのない限り、任意の核酸配列が、5'から3'配向で左から右に書かれ、アミノ酸配列は、アミノからカルボキシ配向で左から右に書かれる。

10

【0226】

本明細書において提供された見出しは、本開示の種々の態様または実施形態の限定ではない。

【0227】

アミノ酸は、アミノ酸の名称、三文字略語または一文字略語を使用して本明細書において参照される。「タンパク質」という用語は、本明細書において使用される場合、タンパク質、ポリペプチドおよびペプチドを含む。本明細書において、「アミノ酸配列」という用語は、「ポリペプチド」という用語および/または「タンパク質」という用語と同義である。一部の例では、「アミノ酸配列」という用語は、「ペプチド」という用語と同義である。一部の例では、「アミノ酸配列」という用語は、「酵素」という用語と同義である。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、本明細書において同義的に使用される。本開示および特許請求の範囲では、従来のアミノ酸残基の一文字および三文字コードが使用され得る。生化学的命名法に関するIUPACIUB合同委員会(JCBN)に準拠して定義されたアミノ酸の3文字コード。また、ポリペプチドは、遺伝暗号の縮重のために1つより多いヌクレオチド配列によってコードされ得るということも理解される。

20

【0228】

用語の他の定義が、本明細書を通して現れる場合もある。例示的实施形態がより詳細に記載される前に、本開示は、記載される特定の实施形態に限定されず、そのようなものとして変わり得るということは理解されるべきである。本開示の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ定義されるので、本明細書において使用される技術用語は、単に特定の实施形態を説明するためであって、限定であることを意図しないということも理解されるべきである。

30

【0229】

値の範囲が提供される場合には、その範囲の上限と下限との間の、文脈が明確に別段の指示をしない限り下限の単位の10分の1までの各介在値もまた、具体的に開示されることは理解される。記載された値または記載された範囲内の介在値と、その記載された範囲内の他の記載された値または介在する値との間のそれぞれのより小さい範囲は、本開示内に包含される。これらのより小さい範囲の上限および下限は独立に、範囲に含まれる場合も、除外される場合もあり、両限界の一方がより小さい範囲に含まれる、両方が含まれない、または両方が含まれる場合の各範囲も、本開示内に包含され、記載された範囲中で限界が具体的に除外される場合はそれに従う。記載された範囲が限界の一方または両方を含む場合には、それらの含まれた限界の一方または両方を除外する範囲も本開示に含まれる。

40

【0230】

本明細書において、および添付の特許請求の範囲において、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈が明確に別に示さない限り複数の言及を含むということは注記されなければならない。したがって、例えば、「クロストリジウム神経毒」への言及は、複数のこのような候補物質を含み、「クロストリジウム神経毒」への言及は、1つ以上のクロストリジウム神経毒および当業者に公知のその等価物などへの言及を含む。

50

【0231】

本明細書において論じられた刊行物は、単に本出願の出願日より前のその開示のために提供された。本明細書のいかなるものも、そのような刊行物が本明細書に添付された特許請求の範囲の先行技術を構成することを認めるものと解釈されるべきではない。

【0232】

本発明の実施形態を、以下の図および実施例を参照してここで単に例として記載する。

【図面の簡単な説明】

【0233】

【図1】図1は、すべてのBoNT血清型及び破傷風菌毒素の活性化ループのタンパク質配列比較を示す図であり、毒素分子の軽鎖および重鎖を接続するジスルフィド橋を形成する2つの隣接するシステインを示す。BoNT/C1およびBoNT/CD中の第Xa因子切断部位(IDGR)に下線が引かれている。

【図2】図2は、試験されたプロテアーゼの4種すべてのトリプシン(TrypZean)、Lys-C、第Xa因子(FXa)およびエンテロキナーゼ(EK)が、C-プロテアーゼ未処置対照と比較して、BoNT/C1活性化ループを切断し、二本鎖分子を作出する能力を有することを示す図である。(A,B)非還元(A)および還元条件(B)でのSDS-PAGEによって試験された表示通り第Xa因子(FXa)、エンテロキナーゼ(EK)およびトリプシン(1~16時間の経時的推移)を用いて処置されたBoNT/C1(0)(配列番号15)。同様に、Lys-Cによるタンパク分解性消化によって、BoNT/C1の二本鎖分子が作出される(C)。トリプシンおよびLys-Cの両方とも、BoNT/C1の重鎖内でオフターゲット切断を示す。1-ベンチマーク(5 µl)、2-対照サンプル(-Lys C)-DTT、3-対照サンプル(-LysC)+DTT、4-活性化された-DTT、5-活性化された+DTT。

【図3】図3(A)は、Lys-CによるBoNT/X切断を示す図である。サンプルを非還元および還元(+DTT)条件で試験した。1-ベンチマーク(5 µl)、2-プロテアーゼなし対照、3-LysC 0.125 µg/ml、4-LysC 0.25 µg/ml、5-LysC 0.5 µg/ml、6-LysC 1 µg/ml、7-LysC 2 µg/ml、8-LysC 4 µg/ml、9-プロテアーゼなし対照+DTT、10-LysC 0.125 µg/ml+DTT、11-LysC 0.25 µg/ml+DTT、12-LysC 0.5 µg/ml+DTT、13-LysC 1 µg/ml+DTT、14-LysC 2 µg/ml+DTT、15-LysC 4 µg/ml+DTTおよび16-ベンチマーク(5 µl)。図3(B)は、トリプシン(TrypZean)、第Xa因子およびエンテロキナーゼによるBoNT/X切断を示す図である。サンプルを、非還元および還元(+DTT)条件で試験した。1-ベンチマーク(5 µl)、2-プロテアーゼなし対照、3-TrypZean 0.125 µg/ml、4-TrypZean 0.25 µg/ml、5-プロテアーゼなし対照、6-TrypZean 1 µg/ml、7-TrypZean 2 µg/ml、8-TrypZean 4 µg/ml、9-第Xa因子5 µg/ml、10-エンテロキナーゼ 0.01 µg/ml、11-プロテアーゼなし対照+DTT、12-TrypZean 0.125 µg/ml+DTT、13-TrypZean 0.25 µg/ml+DTT、14-プロテアーゼなし対照+DTT、15-TrypZean 1 µg/ml+DTT、16-TrypZean 2 µg/ml+DTT、17-TrypZean 4 µg/ml+DTT、18-第Xa因子5 µg/ml、19-エンテロキナーゼ0.01 µg/mlおよび20-ベンチマーク(5 µl)。

【図4】図4は、非還元(-DTT)および還元(+DTT)条件の間の比較による、表示されたプロテアーゼを用いて処置された改変BoNT/X(配列番号5)および成功したBoNT二本鎖形成事象を示す図である。レーン4~7は、プロセス中のサンプルを示す。レーン8~11は、最終ポリッシングステップ後の最終サンプルを示す。1-捕捉HisHPロード、2-対照-DTT-プロテアーゼ、3-対照+DTT-プロテアーゼ、4-活性化された-DTT+EK、5-活性化された+DTT+EK、6-活性化された-DTT+FXa、7-活性化された+DTT+FXa、8-最終-DTT EK活性、9-最終+DTT EK活性、10-最終-DTT FXa活性、11-最終+DTT FXa活性。

【図5】図5(A)は、10 µg/mlのリゾバクター・エンジモゲネス(Lysobacter enzymogenes)由来の(「Lys-C」)およびシュードモナス・エルジノーサ(Pseudomonas aeruginosa)由来の(「rLys-C」)エンドプロテアーゼLys-Cを用いて、37°Cで2時間試験したBoNT/Eを示す図である。サンプルは、非還元および還元(+TCEP)条件で試験した。図5(B)は、表示された量のトリプシンを用いて、20°Cで7時間処置したBoNT/Eを示す図である。(C)-20°Cで保存したサンプル。(T)20°Cのプロテアーゼなし対照。サンプルは、還元(+DTT)条件で試験した。

【図6】図6は、非還元(-DTT)および還元(+DTT)条件の間の比較による、示されたプロテアーゼを用いて処置された改変BoNT/E(配列番号11)および成功したBoNT二本鎖形成事象を示す図である。1-ベンチマーク(5 μl)、2-対照サンプル(-EK)-DTT、3-対照サンプル(-EK)+DTT、4-活性化された(+EK)-DTT、5-活性化された(+EK)+DTT、11-ベンチマーク(5 μl)、6-対照サンプル(-FXa)-DTT、7-対照サンプル(-FXa)+DTT、8-活性化された(+FXa)-DTT、9-活性化された(+FXa)+DTT。

【図7】図7(A)は、非還元(-DTT)および還元(+DTT)条件の間の比較による、第Xa因子プロテアーゼを用いて処置した改変BoNT/A1C1(配列番号13)および成功したBoNT二本鎖形成事象を示す図である。1-ベンチマークラダー、2-対照(-FXa-DTT)、3-対照(-FXa+DTT)、4-活性化された(+FXa-DTT)、5-活性化された(+FXa+DTT)。図7(B)は、陽性対照(二本鎖BoNT/A1)と比較した2時間後のFXaまたはEKを用いたBoNT/A1の切断を示す図である。

10

【図8】図8は、一次ラットニューロンからのグルタミン酸放出のBoNT/A1C1およびBoNT/C1用量依存性阻害を示す図である。

【図9】図9は、143853Daの示された質量を有する、エンテロキナーゼによって活性化された非還元改変BoNT/E(配列番号11)のインタクト質量分析を示す図である。

【図10】図10は、47518Daおよび96338Daの示された質量を有する、エンテロキナーゼによって活性化された還元改変BoNT/E(配列番号11)のインタクト質量分析を示す図である。

【図11】図11は、143850Daの示された質量を有する、第Xa因子によって活性化された非還元改変BoNT/E(配列番号11)のインタクト質量分析を示す図である。

20

【図12】図12は、47518Daおよび96335Daの示された質量を有する、第Xa因子によって活性化された還元改変BoNT/E(配列番号11)のインタクト質量分析を示す図である。

【図13】図13は、Lys-Cを用いて処置された天然A1ループ(配列番号46)と比較した、活性化ループ(配列番号44)中に挿入されたEK切断部位を含有し、EKを用いて処置されたLH_N/A1を示す図である。1-ベンチマーク(5 μl)、2-空、3-配列番号44+EK-DTT、4-配列番号44+EK+DTT、5-配列番号44-EK-DTT、6-配列番号44-EK+DTT、7-ベンチマーク、8-配列番号46-LysC-DTT、9-配列番号46-LysC+DTT、10-配列番号46+LysC-DTT、11-配列番号46-LysC+DTT、12-配列番号46+LysC+DTTおよび13-配列番号46-LysC+DTT。

30

【図14】図14は、FXaを用いる改変BoNT/XA(配列番号7)の活性化を示す図である。

【図15】図15は、FXaを用いる改変BoNT/XB(配列番号9)の活性化を示す図である。

【0234】

配列表

【0235】

最初のMetアミノ酸残基または対応する最初のコドンが、以下の配列番号のうちいずれかにおいて示される場合には、前記残基/コドンの存在は随意である。

【0236】

配列番号1 (C1活性化ループコンセンサス配列)

Cys-(Xaa)_a-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cys

40

【0237】

配列番号2 (C1活性化ループ)

CHKAIDGRSLYNKTLDC

【0238】

配列番号3 (C1活性化ループ変異型)

CHKAIEGRSLYNKTLDC

【0239】

配列番号4 (核酸配列, BoNT/X, C1活性化ループ付き)

ATGAAACTGGAAATCAACAAATTCAACTACAACGATCCGATCGATGGCATTAAATGTT
ATTACCATGCGTCCGCCTCGTCATAGCGATAAAATCAATAAAGGTAAAGGTCCGTTCAA

50

AGCCTTTCAGGTGATTAAAAACATTTGGATTGTGCCGGAACGCTACAACCTTTACCAATA
ATACCAACGATCTGAACATTCCGAGCGAACCGATTATGGAAGCAGATGCCATTTATAAC
CCGAACTATCTGAATACCCCGAGCGAAAAAGATGAATTTCTGCAGGGTGTTATCAAAGT
GCTGGAACGCATTAAAAGCAAACCGGAAGGTGAAAACTGCTGGAACCTGATTAGCAGCA
GCATTCCGCTGCCGCTGGTTAGCAATGGTGCCTGACCTGAGCGATAATGAAACCATT
GCATATCAAGAGAACAACAACATTGTGAGCAATCTGCAGGCAAACCTGGTTATTTATGG
TCCGGGTCTGATATTGCAAATAATGCAACCTATGGTCTGTATAGCACCCCGATTAGTA
ATGGTGAAGGTACACTGAGCGAAGTTAGCTTTAGCCGTTTTATCTGAAACCGTTTGAT
GAAAGCTATGGCAATTATCGTAGCCTGGTGAATATCGTGAACAAATTCGTGAAACGTGA
ATTTGCACCTGATCCGGCAAGCACCTGATGCATGAACTGGTTCATGTTACCCATAATC
TGTATGGTATTAGCAACCGCAACTTCTACTATAACTTTGACACCGGCAAATTTGAAACC
AGCCGTCAGCAGAATAGCCTGATTTTTGAAGAACTGCTGACCTTTGGTGGCATTGATAG
CAAAGCAATTAGCAGCCTGATCATCAAGAAAATTATCGAAACCGCCAAGAACAACTATA
CCACGCTGATTAGCGAACGCCTGAATACCGTTACCGTTGAAAATGATCTGCTGAAATAT
ATCAAAAACAAAATCCCGGTTTCAGGGTCTGCTGGGTAACCTTTAACTGGATACCGCAGA
ATTCGAGAAAAAGCTGAATACCATTCTGTTTGTGCTGAACGAAAGCAATCTGGCACAGC
GTTTTAGCATTCTGGTTCGTAAACATTACCTGAAAGAACGTCCGATTGATCCGATTTAT
GTGAACATTCTGGATGACAATAGCTACAGCACCTGGAAGGTTTTAACATTAGCAGTCA
GGGTAGCAATGATTTCCAAGGTCAGCTGCTGGAAGCAGCTATTTTGAAAAAATTGAAA
GCAATGCCCTGCGTGCCTTTATCAAAATTTGTCATAAAGCCATTGATGGTCGCAGCCTG
TATAACAAAACCCTGGATTGTATTGAGGTGGAAAAACAAAGACCTGTTTCTGATTAGCAA
CAAAGATAGCCTGAACGATATTAACCTGAGCGAAGAAAAAATCAAACCGGAAACCACCG
TGTTCTTCAAAGATAAACTGCCTCCGCAGGATATTACGCTGAGCAATTATGATTTTACC
GAAGCCAATAGCATTCCGAGCATTAGCCAGCAGAACATTCTGGAACGTAATGAAGAACT
GTATGAACCGATTGCAATAGCCTGTTTGAAATCAAACCATCTATGTGGATAAGCTGA
CCACCTTTTATTTTCTGGAAGCCCAGAATATTGATGAGAGCATTGATAGCAGCAAAATT
CGTGTTGAACTGACCGATAGCGTTGATGAAGCACTGAGCAATCCGAATAAAGTTTATAG
CCCGTTCAAGAACATGAGCAACACCATTAAATAGCATTGAAACCGGTATTACCAGCACCT
ACATCTTTTATCAGTGGCTGCGTAGCATCGTGAAAGATTTTAGTGATGAAACCGGCAAA
ATCGACGTGATTGATAAAGCAGCGATACCCTGGCAATTGTTCCGTATATTGGTCCGCT
GCTGAATATTGGTAATGATATTCGTCTATGGCGATTTTGTGGGTGCAATTGAACTGGCAG
GCATTACCGCACTGCTGGAATATGTTCCGGAATTTACCATTCCGATTCTGGTTGGTCTG
GAAGTTATTGGTGGCGAACTGGCACGTGAACAGGTTGAAGCAATTGTTAATAATGCCCT
GGATAAACGCGATCAGAAATGGGCAGAAGTTTACAATATTACCAAAGCACAGTGGTGGG
GCACCATTCATTTACAGATTAATACCCGTCTGGCCCATACCTATAAAGCCCTGAGCCGT
CAGGCAAATGCCATTAAATGAATATGGAATTTAGCTGGCCAACTACAAAGGCAACAT
TGATGATAAAGCCAAGATCAAAAACGCCATCAGCGAAACCGAAATTCTGCTGAACAAAA
GCGTTGAACAGGCCATGAAAAACACCGAGAAATTCATGATTAACTGAGCAACAGCTAC
CTGACCAAAGAAATGATTCCGAAAGTTCAGGACAACCTGAAAACTTTGATCTGGAAAC
CAAAAAGACCCTGGACAAGTTCATCAAAGAGAAAGAAGATATCCTGGGCACCAATCTGA
GCAGCAGCCTGCGTCGTAAAGTTAGCATTCTGTCTGAATAAAAAACATTGCCTTCGACATC
AACGATATCCCGTTTAGCGAATTTGATGATCTGATCAACCAGTACAAAAACGAGATCGA
AGATTATGAAGTGCTGAATCTGGGTGCAGAAGATGGCAAAATCAAAGATCTGAGCGGTA
CAACCAGCGATATCAATATTGGTTCAGATATCGAACTGGCCGATGGTCGTGAAAATAAA
GCGATTAAGATTAAAGGCAGCGAGAACAGCACCATCAAATGCAATGAACAAATATCT
GCGTTTTAGCGCGACCGATAACTTTAGCATTAGCTTTTGGATCAAACATCCGAAACCGA
CCAATCTGCTTAATAACGGTATTGAATATACCCTGGTCGAGAACTTTAATCAGCGTGGT
TGGAAAATTAGCATCCAGGATAGCAAACCTGATTTGGTATCTGCGCGATCACAATAACAG
CATCAAATCGTTACACCGGATTATATTGCGTTTAATGGCTGGAACCTGATTACCATTA
CAAACAATCGTAGCAAAGGCAGCATCGTGTATGTTAACGGTAGCAAATTTGAAGAGAAG

10

20

30

40

50

GACATTAGCAGCATTTGGAATACCGAAGTGGATGATCCGATTATCTTCCGCCTGAAAAA
TAACCGTGATACCCAGGCATTTACCCTGCTGGATCAGTTTAGCATTTATCGCAAAGAAC
TGAACCAGAACGAAGTGGTGAACTGTATACTACTTCAACAGCAACTACATTCGC
GATATTTGGGGTAATCCGCTGCAGTACAACAAAAAATACTATCTGCAGACCCAGGACAA
ACCTGGTAAAGGTCTGATCCGCGAATATTGGAGCAGCTTTGGTTATGATTATGTGATTC
TGAGCGATAGCAAGACCATTACCTTTCCGAATAATATCCGTTATGGTGCCCTGTATAAT
GGTAGCAAAGTGCTGATCAAGAACAGCAAAAAAAGTGGATGGTCTGGTGCGCAATAAAGA
TTTCATTGAGCTGGAAATCGATGGCTATAATATGGGTATTAGCGCAGATCGCTTTAACG
AGGATACCAACTATATTGGCACCACCTATGGTACAACCCATGATCTGACCACCGATTTT
GAAATTATTGAGCGCCAAGAGAAATACCGCAATTATTGTGAGCTGAAAACCCCGTATAA
CATCTTTCATAAAAGCGGTCTGATGAGCACCAGAAACCGACCTTCCATGATT
ATCGCGATTGGGTTTATAGCAGCGCATGGTATTTTCAGAACTATGAAAATCTGAACCTG
CGCAAACATACCAAAACCAACTGGTATTTTATCCCGAAAGATGAAGGTTGGGATGAAGA
TCTGGAAGTGCTGTTTCAGGGTCCGCATCATCACCACCATCACCATCATCACTGA
【0240】

配列番号5 (ポリペプチド配列, BoNT/X, C1活性化ループ付き)

MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIKNIWIVPERYNFTNN
TNDLNIPSEPI MEADAIYNP NYLNT PSEKDEFLQGVIVLERIKSKPEGEKLELISSSIPLP
LVSNGALTLS DNETIAYQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTLS
EVSFSPFY LKPFDES YGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHELVHVTHNLYGISNRN
FYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGIDSKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTV
ENDLLKYIKNKIPVQGR LGNFKLDTA EF EK LNTILFVLNESNLAQRFSILVRKHYLKERPI
DPIYVNILDDNSYSTLEGFNISSQGSNDFQGGQLLESSYFEKIESNALRAFIKICHKAIDGRSL
YNKTLDCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKDKLPPQDITLSNYDFTEAN
SIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSV
DEALSNPNKVYSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDET GKIDVIDKSSDTL
AIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPILVGLEVIGGELAREQVEAI
VNNALDKRDQKWA EVYNITKAQWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLA
NYKGNIDDKAKIKNAISET EILLNK SVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKE MIPKVQDNLKN
FDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEI
EDYEVLNLGAEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIELADGRENKAIKIKGSENSTIKIAMNKYLR
SATDNFSISFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLRDHNN SIKIV
TPDYIAFNGWNLITITNNRSKGSIVYVNGSKIEEKDISSIWNTEVDDPIIFRLKNNRDTQAF
TLLDQFSIYRKELNQNEVVKLYNYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIRE
YWSSFGYDYVILSDSKTITFPNNIRYGALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNKDFIQLEIDGYN
MGISADRFNEDTNYIGTTYGTTHDLTTDFEIIQRQEKYRNYCQLKTPYNIFHKSGLMSTET
SKPTFH DYRDWVYSSAWYFQNYENLNL RKHTKTNWYFIPKDEGWDEDLEVL FQGP HH
HHHHHHHH

【0241】

配列番号6 (核酸配列, BoNT/XA [LH_NX-H_CA], C1活性化ループ付き)

ATGAAACTGGAAATCAACAAATTCAACTACAACGATCCGATCGATGGCATTAAATGTT
ATTACCATGCGTCCGCCTCGTCATAGCGATAAAATCAATAAAGGTAAAGGTCCGTTCAA
AGCCTTTCAGGTGATTAAAAACATTTGGATTGTGCCGGAACGCTACAACCTTACCAATA
ATACCAACGATCTGAACATTCCGAGCGAACCGATTATGGAAGCAGATGCCATTTATAAC
CCGAACATCTGAATACCCGAGCGAAAAAGATGAATTTCTGCAGGGTGTTATCAAAGT
GCTGGAACGCATTAAAAGCAAACCGGAAGGTGAAAAACTGCTGGAACGATTAGCAGCA
GCATTCCGCTGCCGCTGGTTAGCAATGGTGCCTGACCCTGAGCGATAATGAAACCAT
GCATATCAAGAGAACAACAACATTGTGAGCAATCTGCAGGCAAACCTGGTTATTTATGG
TCCGGGTCCTGATATTGCAAATAATGCAACCTATGGTCTGTATAGCACCCCGATTAGTA
ATGGTGAAGGTACACTGAGCGAAGTTAGCTTTAGCCGTTTTATCTGAAACCGTTTGAT

GAAAGCTATGGCAATTATCGTAGCCTGGTGAATATCGTGAACAAATTCGTGAAACGTGA
ATTTGCACCTGATCCGGCAAGCACCTGATGCATGAACTGGTTCATGTTACCCATAATC
TGTATGGTATTAGCAACCGCAACTTCTACTATAACTTTGACACCGGCAAAATTGAAACC
AGCCGTCAGCAGAATAGCCTGATTTTTGAAGAACTGCTGACCTTTGGTGGCATTGATAG
CAAAGCAATTAGCAGCCTGATCATCAAGAAAATTATCGAAACCGCCAAGAACAACCTATA
CCACGCTGATTAGCGAACGCCTGAATACCGTTACCGTTGAAAATGATCTGCTGAAATAT
ATCAAAAACAAAATCCCGGTTTCAGGGTCTGCTCTGGGTAACCTTTAAACTGGATACCGCAGA
ATTCGAGAAAAAGCTGAATACCATTCTGTTTGTGCTGAACGAAAGCAATCTGGCACAGC
GTTTTAGCATTCTGGTTTCGTAAACATTACCTGAAAGAACGTCCGATTGATCCGATTTAT
GTGAACATTCTGGATGACAATAGCTACAGCACCTGGAAGGTTTTAACATTAGCAGTCA
GGGTAGCAATGATTTTTAGGGCCAGCTGCTGGAAAGCAGCTATTTTGAAAAAATTGAAT
CCAATGCGCTGCGTGCCTTTATCAAAATTTGTCATAAAGCCATTGATGGTCGCAGCCTG
TATAACAAAACCTGGATTGTATTGAAGTGGAACAAAGACCTGTTCTCTGATTAGCAA
TAAAGATAGCCTGAACGATATCAACCTGAGCGAAGAAAAAATCAAACCGGAAACCACCG
TGTTCTTCAAAGATAAACTGCCTCCGCAGGATATTACCCTGAGCAATTATGATTTTACC
GAAGCCAATAGCATTCCGAGCATTAGCCAGCAGAACATTCTGGAACGTAATGAAGAACT
GTATGAACCGATTTCGCAATAGCCTGTTTGAAATCAAACCATCTATGTGGATAAGCTGA
CCACCTTTCATTTTCTGGAAGCCCAGAATATTGATGAGAGCATTGATAGCAGCAAAATT
CGTGTGAACTGACCGATAGCGTTGATGAAGCACTGAGCAATCCGAATAAAGTTTATAG
CCCGTTCAAGAACATGAGCAACACCATTAAATAGCATTGAAACCGGTATTACCAGCACCT
ACATCTTTTATCAGTGGCTGCGTAGCATCGTGAAAGATTTTAGTGATGAAACCGGCAAA
ATCGACGTGATTGATAAAAGCAGCGATACCCTGGCCATTGTTCCGTATATTGGTCCGCT
GCTGAATATTGGTAATGATATTCGTTCATGGCGATTTTGTGGGTGCAATTGAACTGGCAG
GCATTACCGCACTGCTGGAATATGTTCCGGAATTTACCATTCCGATTCTGGTTGGTCTG
GAAGTTATTGGTGGCGAACTGGCACGTGAACAGGTTGAAGCAATTGTTAATAATGCCCT
GGATAAACGCGATCAGAAATGGGCAGAAGTTTACAATATTACCAAAGCACAGTGGTGGG
GCACCATTCATTTACAGATTAATACCCGTCTGGCCCATACCTATAAAGCCCTGAGCCGT
CAGGCAAATGCCATTAATAATGAATATGGAATTTAGCTGGCCAACTACAAAGGCAACAT
TGATGATAAAGCCAAGATCAAAAACGCCATCAGCGAAACCGAAATTCTGCTGAACAAAA
GCGTTGAACAGGCCATGAAAAACACCGAGAAATTCATGATTAACTGAGCAACAGCTAC
CTGACCAAAGAAATGATTCCGAAAGTTCAGGACAACCTGAAAAACTTTGATCTGGAAAC
CAAAAAGACCCTGGACAAGTTCATCAAAGAGAAAGAAGATATCCTGGGCACCAATCTGA
GCAGCAGCCTGCGTCGTAAAGTTAGCATTCTGCTGAATAAAAAACATTGCCTTCGACATC
AACGATATCCCGTTTAGCGAATTTGATGATCTGATCAACCAGTACAAAAACGAGATCGA
AGATTATGAAGTGCTGAATCTGGGTGCAGAAGATGGCAAAATCAAAGATCTGAGCGGTA
CAACCAGCGATATTAACATTGGTAGCGATATCGAAATCATCAACACCAGCATTCTGAAT
CTGCGCTATGAAAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCGTCCAAAATCAATAT
TGGCAGCAAAGTGAATTTGACCCGATCGATAAAAATCAGATCCAGCTGTTTAATCTGG
AAAGCTCCAAAATTGAGGTGATTCTGAAAAACGCGATTGTGTACAATAGCATGTATGAG
AATTTCTCAACCAGCTTCTGGATTGCGATTCCGAAATACTTTAACAGCATCAGCCTGAA
CAACGAGTATACCATTATCAACTGCATGGAAAACAATAGCGGTTGGAAAGTGAGCCTGA
ATTATGGTGAATTATCTGGACCCTGCAGGATACCCAAGAAATCAAACAGCGTGTTGTG
TTCAAATACAGCCAGATGATTAACATCAGCGATTACATTAACCGCTGGATCTTTGTTAC
CATTACCAACAATCGCCTGAATAACAGCAAGATCTATATTAACGGTCTGCTGATTGACC
AGAAACCGATTAGTAATCTGGGTAAATATTCATGCCAGCAACAACATCATGTTCAAACCTG
GATGGTTGTCGTGATACCCATCGTTATATTTGGATCAAGTATTTTAACCTGTTTGATAA
AGAACTGAACGAAAAAGAAATTAAGGATCTGTATGATAACCAGTCCAATAGCGGCATCC
TGAAGGATTTTTGGGGTGATTATCTGCAGTATGACAAACCGTATTATATGCTGAACCTG
TACGATCCGAACAAATATGTGGATGTGAATAATGTGGGTATCCGTGGCTATATGTATCT
GAAAGGTCCGCGTGGTAGCGTTATGACCACCAACATTTATCTGAATAGCAGCCTGTATC

10

20

30

40

50

GTGGCACCAAATTCATCATCAAAAAATACGCCAGCGGCAACAAAGATAATATTGTGCGT
AATAATGACCGCGTGTATATCAATGTGGTGGTGAAGAATAAAGAATATCGTCTGGCAAC
CAATGCAAGCCAGGCAGGCGTTGAAAAAATTCTGAGCGCACTGGAAATCCCGGATGTGG
GTAATCTGAGCCAGGTTGTTGTTATGAAAAGCAAAAATGATCAGGGCATCACCAACAAG
TGCAAAATGAATCTGCAGGACAATAACGGCAACGACATTGGTTTTATTGGCTTTCACCA
GTTTAACAACATTGCCAAACTGGTTGCGAGCAATTGGTATAATCGTCAGATTGAACGTA
GCAGTCGTACCCTGGGTTGTAGCTGGGAATTTATTCCGGTTGATGATGGTTGGGGTGAA
CGTCCGCTGCATCATCACCACCATCACCATCACCACCATTAA

【0242】

配列番号7 (ポリペプチド配列, BoNT/XA [$\text{LH}_\text{N}\text{X}-\text{H}_\text{C}\text{A}$], C1活性化ループ付き)

10

MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIKNIWIVPERYNFTNN
TNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPEKDEFLQGVKVLERIKSKPEGEKLELISSSIPLP
LVSNGALTLSDNETIAYQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTLS
EVSFSPFYLKPFDESYGNYSRLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHELVHVTHNLYGISNRN
FYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGIDSKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTV
ENDLLKYIKNKIPVQGR LGNFKLDTAEFKKLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKHYLKERPI
DPIYVNILDDNSYSTLEGFNISSQGSNDFQGQLLESSYFEKIESNALRAFIKICHKAIDGRSL
YNKTLDCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKDKLPPQDITLSNYDFTEAN
SIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSV
DEALSNPNKVYSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDET GKIDVIDKSSDTL
AIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPILVGLEVIGGELAREQVEAI
VNNALDKRDQKWAEVYNITKAQWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNM EFQLA
NYKGNIDDKAKIKNAISET EILLNK SVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKE MIPKVQDNLKN
FDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEI
EDYEVLNLGAEDGKIKDLSGTTS DINIGSDIEIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKV
NFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINC
MENNSGWKVSLNYGEI IWTLQDTQEIKQRV VFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNS
KIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWI KYFNLFDKELNEKEIKDLY
DNQSN SGILKDFWGDY LQYDKPYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTT
NIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNDRVYINVVVK NKEYRLATNASQAGVEKILS
ALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFN NIAKLVASNW
YNRQIERSSRTLGC SWEFIPVDDGWGERPLHHHHHHHHH

20

30

【0243】

配列番号8 (核酸配列, BoNT/XB [$\text{LH}_\text{N}\text{X}-\text{H}_\text{C}\text{B}$], C1活性化ループ付き)

ATGAAACTGGAAATCAACAAATTCAACTACAACGATCCGATCGATGGCATTAAATGTT
ATTACCATGCGTCCGCCTCGTCATAGCGATAAAATCAATAAAGGTAAAGGTCCGTTCAA
AGCCTTTCAGGTGATTAAAAACATTTGGATTGTGCCGGAACGCTACAAC TTTACCAATA
ATACCAACGATCTGAACATTCGAGCGAACC GATTATGGAAGCAGATGCCATTTATAAC
CCGAACTATCTGAATACCCGAGCGAAAAAGATGAATTTCTGCAGGGTGTTATCAAAGT
GCTGGAACGCATTAAAAGCAAACCGGAAGGTGAAAACTGCTGGAAC T GATTAGCAGCA
GCATTCCGCTGCCGCTGGTTAGCAATGGTGCACTGACCCTGAGCGATAATGAAACCAT T
GCATATCAAGAGAACAACAACATTGTGAGCAATCTGCAGGCAAACCTGGTTATTTATGG
TCCGGGTCTTGATATTGCAAATAATGCAACCTATGGTCTGTATAGCACCCCGATTAGTA
ATGGTGAAGGTACACTGAGCGAAGTTAGCTTTAGCCGTTTTATCTGAAACCGTTTGAT
GAAAGCTATGGCAATTATCGTAGCCTGGTGAATATCGTGAACAAATTCGTGAAACGTGA
ATTTGCACCTGATCCGGCAAGCACCTGATGCATGAACTGGTTCATGTTACCCATAATC
TGTATGGTATTAGCAACCGCAACTTCTACTATAACTTTGACACCGGCAAAATTGAAACC
AGCCGTCAGCAGAATAGCCTGATTTTTGAAGAACTGCTGACCTTTGGTGGCATTGATAG
CAAAGCAATTAGCAGCCTGATCATCAAGAAAATTATCGAAACCGCCAAGAACA ACTATA
CCACGCTGATTAGCGAACGCCTGAATACCGTTACCGTTGAAAATGATCTGCTGAAATAT

40

50

ATCAAAAACAAAATCCCGGTTTCAGGGTTCGCTCTGGGTAACCTTTAACTGGATACCGCAGA
ATTCGAGAAAAAGCTGAATACCATTCTGTTTGTGCTGAACGAAAGCAATCTGGCACAGC
GTTTTAGCATTCTGGTTCGTAAACATTACCTGAAAGAACGTCCGATTGATCCGATTTAT
GTGAACATTCTGGATGACAATAGCTACAGCACCTTGGAAAGGTTTTAACATTAGCAGTCA
GGGTAGCAATGATTTTTCAGGGCCAGCTGCTGGAAAGCAGCTATTTTGA AAAAATTGAAT
CCAATGCGCTGCGTGCCCTTTATCAAAATTTGTCATAAAGCCATTGATGGTCGCAGCCTG
TATAACAAAACCCTGGATTGTATTGAAGTGGA AAACAAAGACCTGTTCTTGATTAGCAA
TAAAGATAGCCTGAACGATATCAACCTGAGCGAAGAAAAAATCAAACCGGAAACCACCG
TGTTCTTCAAAGATAAACTGCCTCCGCAGGATATTACCCTGAGCAATTATGATTTTACC
GAAGCCAATAGCATTCCGAGCATTAGCCAGCAGAACATTCTGGAACGTAATGAAGAACT
GTATGAACCGATTTCGCAATAGCCTGTTTGAAATCAAAACCATCTATGTGGATAAGCTGA
CCACCTTTTCATTTTCTGGAAGCCCAGAATATTGATGAGAGCATTGATAGCAGCAAAATT
CGTGTTGAACTGACCGATAGCGTTGATGAAGCACTGAGCAATCCGAATAAAGTTTATAG
CCCGTTCAAGAACATGAGCAACACCATTAAATAGCATTGAAACCGGTATTACCAGCACCT
ACATCTTTTATCAGTGGCTGCGTAGCATCGTGAAAGATTTTAGTGATGAAACCGGCAAA
ATCGACGTGATTGATAAAAGCAGCGATACCCTGGCCATTGTTCCGTATATTGGTCCGCT
GCTGAATATTGGTAATGATATTCGT CATGGCGATTTTGTGGGTGCAATTGAACTGGCAG
GCATTACCGCACTGCTGGAATATGTTCCGGAATTTACCATTCCGATTCTGGTTGGTCTG
GAAGTTATTGGTGGCGAACTGGCACGTGAACAGGTTGAAGCAATTGTTAATAATGCCCT
GGATAAACGCGATCAGAAATGGGCAGAAGTTTACAATATTACCAAAGCACAGTGGTGGG
GCACCATTCATTTACAGATTAATACCCGTCTGGCCATACCTATAAAGCCCTGAGCCGT
CAGGCAAATGCCATTAAAATGAATATGGAATTTAGCTGGCCAACTACAAAGGCAACAT
TGATGATAAAGCCAAGATCAAAAACGCCATCAGCGAAACCGAAATTCTGCTGAACAAAA
GCGTTGAACAGGCCATGAAAAACACCGAGAAATTCATGATTAACTGAGCAACAGCTAC
CTGACCAAAGAAATGATTCCGAAAGTTCAGGACAACCTGAAAAACTTTGATCTGGAAAC
CAAAAAGACCCTGGACAAGTTCATCAAAGAGAAAGAAGATATCCTGGGCACCAATCTGA
GCAGCAGCCTGCGTCGTAAAGTTAGCATTCTGCTGAATAAAAACATTGCCTTCGACATC
AACGATATCCCGTTTAGCGAATTTGATGATCTGATCAACCAGTACAAAAACGAGATCGA
AGATTATGAAGTGCTGAATCTGGGTGCAGAAGATGGCAAAATCAAAGATCTGAGCGGTA
CAACCAGCGATATTAACATTGGTAGCGATATCGAAATCCTGAACAACATTATTCTGAAC
CTGCGCTATAAAGATAACAACCTGATTGATCTGAGTGGCTATGGTGCAAAAGTTGAAGT
TTATGATGGTGTGGAACCTGAACGACAAAAACAGTTCAAACCTGACCAGCAGCGCAAATT
CAAAAATTCGCGTTACCCAGAACCAGAACATCATTTTTAACAGCGTGTTTCTGGATTTT
AGCGTGAGCTTTTGGATTTCGTATTCCGAAATATAAGAACGACGGCATCCAGAACTATAT
CCACAATGAATATAACCATCATCAACTGCATGAAGAATAACAGCGGTTGGAAAATTAGCA
TCCGTGGCAATCGTATTATTTGGACCCTGATCGATATTAATGGCAAAACCAAGAGCGTG
TTTTTCGAGTATAACATCCGTGAAGATATCAGCGAATACATCAACCGTTGGTTTTTTGT
GACCATTACCAACAATCTGAACAACGCCAAAATCTACATTAACGGCAAACTGGAAAGCA
ACACCGATATCAAAGATATTCGTGAAGTGATTGCCAACGGCGAGATTATCTTTAACTG
GATGGTGATATTGATCGCACCCAGTTTATTTGGATGAAATACTTCAGCATCTTCAACAC
CGAACTGAGCCAGAGCAATATTGAAGAACGCTATAAAATCCAGAGCTACAGCGAGTATC
TGAAAGACTTTTGGGGTAATCCGCTGATGTACAACAAAGAATACTACATGTTTAATGCC
GGTAACAAAAACAGCTATATCAAACCTGAAAAAGGATAGTCCGGTGGGTGAAATTCTGAC
CCGTAGCAAATATAACCAGAATAGCAAGTATATCAACTATCGCGATCTGTACATCGGCG
AGAAATTTATCATTCGTGCTAAAGCAACTCCAGAGCATTAAACGATGATATTGTGCGC
AAAGAGGATTACATCTACCTGGATTTTTTCAACCTGAATCAAGAGTGGCGTGTGTACAC
CTATAAGTACTTCAAAAAGAAGAAATGAACTGTTTCTGGCACCGATCTATGATAGCG
ACGAATTTTACAATACCATTTCAGATTAAAGAATATGATGAACAGCCGACCTATAGCTGT
CAGCTGCTGTTTAAAAAGGATGAAGAAAGCACGGATGAAATTGGCCTGATTGGTATCCA
TCGTTTTTATGAAAGCGGCATCGTGTTTGAAGAGTACAAAGATTATTTCTGCATCAGCA

10

20

30

40

50

AATGGTATCTTAAAGAGGTGAAACGCAAACCGTATAATCTGAAACTGGGTTGCAATTGG
CAGTTCATCCCAGAAAGATGAAGGTTGGACCGAACATCATCACCACCATCACCATCATCA
TCACTGA

【0244】

配列番号9 (ポリペプチド配列, BoNT/XB [LH_NX-H_CB], C1活性化ループ付き)

MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIKNIWIVPERYNFTNN
TNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPEKDEFLQGVKVLERIKSKPEGEKELLELISSSIPLP
LVSNGALTLSDNETIAYQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTSL
EVSFSPFYLKPFDESYGNYSRLVNIIVNKFVKREFAPDPASTLMHELVHVTHNLYGISNRN
FYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGIDSKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTV
ENDLLKYIKNKIPVQGR LGNFKLDTAEFKKLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKHYLKERPI
DPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGQLLESSYFEKIESNALRAFIKICHKAIDGRSL
YNKTLDCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKDKLPPQDITLSNYDFTEAN
SIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSV
DEALSNPNKVYSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDET GKIDVIDKSSDTL
AIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPILVGLEVIGGELAREQVEAI
VNNALDKRDQKWAEVYNITKAQWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLA
NYKGNIDDKAKIKNAISET EILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKE MIPKVQDNLKN
FDLETKKTLDKFIKEKEDILGTLNLSLRRKVSIRLNKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEI
EDYEVNLN LG AEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIEILNNIILNLRYKDNNLIDLSGYGAKVEVYD
GVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEY
TIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWT LIDINGKTKSVFFEYNIREDISEYINRWFFVTITNNLN
NAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQS NIEERY
KIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYIN
YRDLYIGEKFII RRKSNSQSINDDIVRKEDIYILDFFNLNQEW RVYTYKYFKKEEMKLFLA
PIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCI
SKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTEHHHHHHHHHH

【0245】

配列番号10 (核酸配列, BoNT/E, C1活性化ループ付き)

atgccgaaatcaactctttcaactacaacgacccggtaacgaccgtaccatcctgtatatcaaaccgggt
gggtgccaggagttctacaaatctttcaacatcatgaaaaacatctggatcatcccggaacgtaacgttatcgg
taccaccccgaggacttccacccgccgacctcttgaaaaacgggtgactcttcttactacgacccgaactacc
tccagtctgacgaagaaaaagaccgtttcctgaaaatcgttacaaaatcttcaaccgtatcaacaacaacctg
tctggtggtatcctgctggaagaactgtctaaagctaaccggtacctgggtaacgacaacaccccggaacaacc
agttccacatcggtgacgcttctgctgttgaaatcaaattctctaacggttctcaggacatcctgctgccgaacg
ttatcatcatgggtgctgaaccggacctgttcgaaaccaactcttctaactctctctgcgtaacaactacatgc
cgtctaaccacggttctcggttctatcgctatcgttaccttctctccggaatactctttccgtttcaacgacaacag
catgaacgagttcatccaggacccggctctgacctgatgcaccaactgatctattctctgcacgggtctgtacg
gtgctaaagggtatcaccacaaatacaccatcaccagaaacagaacccgctgatcaccaacatccgtgggtac
caacatcgaagagttcctgaccttcgggtggtaccgacctgaacatcatcacctctgctcagtctaacgacatct
acaccaacctgctggctgactacaaaaaatcgcttctaaactgtctaaagttcaggtttctaaccgctgctga
acccgtacaaagacgttttcgaagctaaatacgggtctggacaaagacgcttctggtatctactctgttaacatca
acaaattcaacgacatcttcaaaaaactgtactctttcaccgagttcgacctggcgaccaaattccaggttaaat
gccgtcagacctacatcggtcagtaacaaatacttcaaactgtctaacctgctgaacgactctatctacaacatct
ctgaagggttacaacatcaacaacctgaaagtttaacttccgtgggtcagaacgctaacctgaacccgcgtatcatc
accccgatcacgggtcgtggtctggttaaaaaatcatccgtttcTGCCACAAAGCGATTGATGGCCG
CTCTCTCTATAACAAAACGCTGGATTGCatcgaaatcaacaacgggtgaactgttcttctggttctg
aaaactcttacaacgacgacaacatcaacaccccgaaagaaatcgacgacacggttacctctaacaacaacta
cgaaaacgacctggaccaggttatcctgaacttcaactctgaatctgctccgggtctgtctgacgaaaaactga
acctgacctccagaacgacgcttacatcccgaatacgactctaacgggtacctctgacatcgaacagcacga

10

20

30

40

50

cgtaaactgaactgaacgttttcttctacctggacgctcagaaagttccggaagggtgaaaacaacgttaacctga
cctcttctatcgacaccgctctgctggaacagccgaaaatctacaccttcttcttctgagttcatcaacaacgt
taacaaaccggttcaggctgctctgttcgtttcttgattcagcaggttctggttgacttcaccaccgaagctaa
ccagaaatctaccgttgacaaaatcgctgacatctctatcgttggtccgtacatcggctctggtctgaacatcgg
taacgaagctcagaaaggtaacttcaaagacgctctggaactgctgggtgctggtatcctgctggagttcgaa
ccggaactgctgatcccgaaccatcctggtttcaccatcaaatctttcctgggttcttctgacaacaaaaacaaa
gttatcaaagctatcaacaacgctctgaaagaacgtgacgaaaaatggaaagaagtttactctttcatcgtttct
aactggatgacaaaaatcaacaccagttcaacaaacgtaaagaacagatgtaccaggctctccagaaccag
gttaacgctatcaaaaccatcatcgaatctaaatacaactcttacacctggaagaaaaaacgaactgacca
acaaatacgacatcaaacagatcgaaaacgaactgaaccagaaagtttctatcgctatgaacaacatcgaccg
tttctgaccgaatcttctatcttcttacctgatgaaactcatcaacgaagttaaaatcaacaaactgctgaata
cgacgaaaacgttaaaacctacctgctgaactacatcatccagcacggttctatcctgggtgaatctcagcagg
aactgaactctatggttaccgacaccctgaacaactctatcccgttcaaactgtcttcttacaccgacgacaaaa
tcctGATCTCTTACTTCAACAAATTCTTTAAAcgcATTAAGAGTTCATCGGTTtgaatATG
CGGTACAAAAATGATAAAtatGTCGATACTTCTGGATATgatAGCAATATCAACATTAAC
GGCGACGTGTATAAATATccgACAAATAAAAACCAGTTTGGGATATATAACGACAAGctg
TCGGAGGTCAATattTCTCAAAACGACtatATCattTACGATAATaaaTATAAAAACTTTAG
CATTAGTtttTGGGTTcgtATACCTAATtatGACAATAaaattGTAAATGTGAATAACGAGTA
TACCATTATAAACTGTATGcgcGACAATAACAGTGGTTGGAAGGTATCGctgAACCATAA
TGAGATTATCTGGACCctgcagGATAATgcaGGTATAAACAGAACTGGCTTTTAACTAT
GGAAACGCAAATGGGATCTCAGATTACATTaataaaTGGatttttGTTaccATTACGAACGAT
cgcTTAGGCGACTCAAACTTTATATTAATggcAATctgATAGATCAGAAATCAATCTTAA
ATTTGGGCAATATTCATGTCTCTgatAACATCTTGTTCAAGATCGTTAATTGCAGTTACA
CTcgtTATATTGGCATTTCGTTACTTTAATATCTTCgataaaaGAActgGACGAGACGGAAATC
cagACTCTGTATTCAAACGAGCCCAATACTAATATATTGAAAGATTTTTTGGGGTAACTAT
CTTTTATATGATAAAGAATACTATCTCCTGaattGTATTGAAGCCAAACAATTTTCATAGAT
AGACGCAAGGATAGCACATTAAGTATCAACAATATCAGATCTACTATActgttaGCAAAT
CGCCTcTACTCCgggtATTAAAGTGAAGATTcagCGGGTTAATAACTCCAGTACCAATGAT
AATCTGGTCCGTAAAGAACGATCAGGTATACATCaattTCGTCGCGAGCAAAACTcatCTC
TTCCCGCTTTACGCCgatACAGCTACGACAAACAAGGAAAAAACCATAAAAATTTCCAGC
TCCGGAAACAGATTCAATCAAGTAGTTGTAATGAACTCTGTGGGTaatAATTGTACGATG
AACTTTaagAATAACAATGGGAACAATattGGACTTTTGGGCTTcAAAGCCGACACAGTG
GTGGCGTCCACCTGGTATTACACGcacATGcggGACCATACGAATTTCGAACGGTTGCTTC
TGGAACTTTATCTCGGAAGaaCACGGGTGGCAAGAAAAA

【 0 2 4 6 】

配列番号11 (ポリペプチド配列, BoNT/E, C1活性化ループ付き)

10

20

30

40

50

【化 1】

SEQ ID NO: 11 (Polypeptide Sequence of BoNT/E with a C1 Activation Loop)

MPKINSFNNDPVDNRITILYIKPGGCQEFYKSFNIMKNIWIIIPERNVIGTTPQDFHPPTSLKNGDSSY
 YDPNYLQSDEEKDRFLKIVTKIFNRINNLSGGILLEELSKANPYLGNDNTPDNQFHDGASAVEIKF
 SNGSQDILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISLRNNYMPSNHGFGSIAIVTFSPEYSFRFNDNSMNEFIQ
 DPALTLMHQLIYSLHGLYGAKGITTKYTITQKQNPLITNIRGTNIEEFLTFGGTDLNIITSAQSNDIY
 TNLLADYKKIASKLSKVQVSNPLLNPYKDVFEAKYGLDKDASGIYSVNINKFNDIFKKLYSFTFEDLA
 TKFQVKCRQTYIGQYKYFKLSNLLNDSIYNISEGYNNLNKVNFRGQANLNPRIITPITGRGLVKKI
 IRFCHKAIDGRSLYNKTLDCIEINNNGELFFVASENSYDDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLDQVILN
 FNSESAPGLSDEKLNLTIQNDAYIPKYDSNGTSDIEQHDVNELNVFFYLDAQKVPPEGENNVLTSID
 TALLEQPKIYTFESSEFINNVNKPVQAALFVSWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIADISIVVPYIGLAL
 NIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFEPELLIPTILVFTIKSFLGSSDNKNKVIKAINNALKERDEKW
 KEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNAIKTIIIESKYSYTLKEKNELTNKYDIKQIENE
 LNQKVSIAMNNIDRFLTESSISYLMKLINVEVKINKLREYDENVKTYLLNYIIQHGSIILGESQQELNSM
 VTDTLNNSIPFKLSSYTDDKILISYFNKFFKRIKSSSVLNMYKNDKYVDTSYDSDNININGDVYKYP
 TNKNQFGIYNDKLSEVNISQNDYIIYDNKYKNFSISFWVRIPNYDNKIVNVNNEYTIINCMRDNNSGW
 KVS LNHNHNEIIWTLQDNAGINQKLAFNYGNANGISDYINKWIFVTITNDRLGDSKLYINGNLIDQKSIL
 NLGNIHVSDNIFKIVNCSYTRYIGIRYFNIFDKELDETEIQTLYSNEPNTNLIKDFWGNLYLLYDKEY
 YLLNVLPNNFIDRRKDSTLSINNIRSTILLANRLYSGIKVKIQRVNNSSTNDNLVRKNDQVYINFVA
 SKTHLFPLYADTATTNKEKTIKISSSGNRFNQVVMNSVGNCTMNFKNNGNNGNIGLLGFKADTVVAS
 TWYYTHMRDHTNSNGCFWNFISEEHWQEK.

10

20

【0 2 4 7】

配列番号12 (核酸配列, BoNT/A1C1, C1活性化ループ付き)

ATGCCATTCTGCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCG
 CATACATCAAGATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAGATCCAC
 AACAAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAGAAGGCGATCT
 GAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCAGCTACTACGATTCGACGTACCTGA
 GCACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTTGAACGTATC
 TACAGCACGGATCTGGGTGCGATGCTGCTGACTAGCATTGTTTCGCGGTATCCCGTTCTG
 GGGTGGTAGCACGATTGACACCGAACTGAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTA
 TTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAATCTGGTCATCATTGGCCCGAGC
 GCAGACATTATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTTTGGTCACGAGGTTCTGAATCTGACCCG
 CAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTCGTTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTG
 AAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGAT
 CCGGCTGTCACGCTGGCCCATGAAGTATCAGCAGGCCACCGCCTGTACGGCATTGC
 CATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATGAGCGGCC
 TGGAAGTCAGCTTCGAAGAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGAC
 AGCTTGCAAGAGAATGAGTTCCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAG
 CACGTTGAACAAGGCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGA
 ATGTGTTTTAAAGAGAAGTACCTGCTGTCCGAGGATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGAT
 AAGCTGAAGTTTGACAACTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGACAACCT
 TGTGAAATTCCTCAAAGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTTT
 TCAAGATTAACATCGTGCCGAAGGTGAAGTACACCATCTATGACGGTTTTAACCTGCGT
 AACACCAACCTGGCGGCGAAGTTTAAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACATGAATTT
 CACGAAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTTCGAGTTCTATAAGCTGCTGTGCCACAAAG
 CGATTGATGGCCGCTCTCTCTATAACAAAACGCTGGATTGCATTAAGGTAAACAATTGG
 GATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAAGATAATTTTACCAACGACCTGAACAAGGGTGAAGA
 AATCACCAGCGATACGAATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCC
 AGCAGTACTATCTGACCTTTAACTTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATTGAGAAT
 CTGAGCAGCGACATTATCGGTGAGCTGGAAGTATGCCGAATATCGAACGTTTCCCGAA
 CGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCATTACCTGCGTGACAGGAGT

30

40

50

TTGAACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCCCTGCTGAAC
CCGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCCAC
TGAGGCCGCGATGTTCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGAGA
CGAGCGAAGTGAGCACTACCGACAAAATTGCTGATATTACCATCATTATCCCGTATATT
GGTCCGGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGACGATTTTGTGGGTGCCCTGAT
CTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTCATTCCGGAGATTGCGATCCCGGTGTTGG
GTACCTTCGCGCTGGTGTCTACATCGCGAATAAGGTTCTGACGGTTCAGACCATCGAT
AACGCGCTGTGAAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTTTACAAATACATTGTTACGAA
TTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAGATCGACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGC
TGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAGCAATTATCAACTACCAATACAACAGTACACG
GAAGAAGAGAAGAATAACATTAACCTTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGA
ATCTATCAACAAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGT
ACCTGATGAATAGCATGATTCCGTATGGCGTCAAACGTCTGGAGGACTTCGACGCCAGC
CTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGACAATCGTGGTACGCTGATTGGCCAAGT
TGACCGCTTGAAAGACAAAGTTAACAATACCCTGAGCACCAGCATCCCATTTCAACTGA
GCAAGTATGTTGATAATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATT
AATGACAGCAAAATTCTGAGCCTGCAGAATCGTAAGAATACGCTGGTAGATACCAAGTGG
ATATAATGCGGAAGTCTCAGAAGAGGGTGATGTACAGCTGAACCCGATCTTTCGGTTCG
ACTTTAAACTGGGGTCTAGTGGTGAAGATCGCGGTAAAGTGATCGTTACCCAAAACGAG
AACATTGTGTATAACAGCATGTACGAGAGTTTCTCAATTTCTTCTGGATTGCGATCAA
TAAATGGGTTTCTAATTTGCCTGGCTATACCATCATTGATAGCGTCAAAAACAACCTCGG
GCTGGTCGATTGGCATTATTAGCAACTTTCTGGTGTTTACCCTGAAACAGAATGAGGAT
TCGGAACAGAGCATTAACTTCTCTACGACATCAGCAACAATGCACCAGGGTATAACAA
ATGGTTCTTCGTAACGGTGACGAACAATATGATGGGCAATATGAAAATCTACATTAACG
GGAACTTATCGACACCATTAAAGTGAAAGAGCTTACTGGGATCAATTTTAGTAAACCC
ATTACCTTTGAGATCAACAAAATTCCGGACACGGGTCTGATTACCTCCGATTCCGGATAA
TATCAATATGTGGATTTCGCGACTTTTATATCTTCGCCAAAGAACTTGATGGCAAAGATA
TCAACATTTTGTTTAATTCCCTGCAGTATACCAATGTCGTTAAGGACTATTGGGGCAAT
GATCTCCGCTACAATAAAGAATACTACATGGTTAACATCGACTATCTCAATCGCTACAT
GTATGCTAACTCGCGTCAAATTGTGTTTAACACACGTCGTAACAACAACGATTTTAACG
AAGGTTATAAAATCATTATCAAACGGATCCGCGGCAATACGAACGATACTCGTGTTTCGT
GGCGGTGACATTCTGTATTTTCGACATGACGATTAATAATAAAGCGTACAATCTGTTTCAT
GAAGAACGAAACCATGTACGCCGATAACCATTCCTGAAGATATCTACGCAATCGGAC
TTCGCGAACAGACCAAAGACATTAACGACAACATCATCTTTCAGATTCAACCGATGAAT
AATACCTACTACTATGCCTCCCAGATCTTCAAAAGTAATTTCAACGGCGAAAACATTTTC
AGGCATTTGCTCAATCGGCACCTTATCGGTTCCGGTTAGGTGGTGATTGGTATCGTCACA
ACTACCTTGTTCCACAGTGAAACAAGGCAACTATGCATCGCTCTTAGAAAGCACATCT
ACGCATTGGGGTTTTGTGCCAGTCAGTGAATAA

【0248】

配列番号13 (ポリペプチド配列, BoNT/A1C1, C1活性化ループ付き)

10

20

30

40

50

【化 2】

SEQ ID NO: 13 (Polypeptide Sequence of BoNT/A1C1 with a C1 Activation Loop)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWPVPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQV
PVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCIN
VIQPDGSYRSEELNLVIIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDT
NPLLGAAGKFAATDPAVTLAHELIIHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAAK
FIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLFKFDK
LYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRLNTNLAANFNGQNTET
NNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCHKAIDGRSLYNKTLDCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSD
TNIEAAEENISLDLIQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIEFPPNGKKYELDKYTMFH
YLRAQEFEGHKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSE
VSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANK
VLTVQTIIDNALSKEKWDDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTE
EEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLDFDASLKDALLKYIY
DNRGTLIGQVDRLLKDKVNNLTLDIPFQLSKYVDNQRLSTFTYIKNINDSKILSLQNRKNTLVDT
GYNAEVSEEGDVQLNPIFPDFKLGSSEEDRGKVIIVTQENENIVNSMYESFSISFWIRINKWVSNLPG
YTIIDSVKNNSGWSIGIISNLFVFTLKQNEDEQSINFSYDISNAPGYNKWFFVTVTNNMMGNMKIY
INGKLIDTIKVKELTGINFSTITFEINKIPDTGLITSDSDNINMWIRDFYIFAKELDGKDINILFNS
LQYTNVVKDYWGNDLRYNKEYYMVNIDYLNRYMYANSRQIVFNTRNNNDNFNEGYKIIKIRIRGNTND
TRVRGGDILYFDMTINNKAYNLFMKNETMYADNHSTEDIYAIGLREQTKDINDNIIIFIQIPMNNTYYY
ASQIFKSNFNGENISGICSIGTYRFRLLGGDWYRHNYLVPTVKQGNYSLLSTSTHWGFVPVSE

10

20

【0 2 4 9】

配列番号14 (核酸配列, BoNT/C1(0) (Endonegative))

ATGCCGATCACGATTAATAATTTCAACTATAGCGATCCGGTGGACAATAAGAATATTC
TGTATCTGGATACTCATCTGAATACGCTGGCTAACGAACCGGAGAAAGCGTTCCGCATC
ACAGGCAACATCTGGGTTATTCCCGATCGCTTTTACGCAACAGCAACCCTAATCTGAA
CAAACCTCCTCGTGTCACCAGTCCTAAATCCGGTTATTACGACCCAACTATCTGAGTA
CGGATAGCGATAAAGATCCCTTTCTGAAAGAGATCATTAAAGCTGTTCAAACGCATTAAC
TCTCGCGAAATTGGGGAAGAGCTGATCTATCGGCTTTTCGACAGATATCCCGTTCCAGG
TAACAATAATACCCCGATTAATACTTTGCACTTTGATGTTGATTTCAATTCTGTGGATG
TGAAAACGCGTCAAGGCAATAATTGGGTGAAAACCTGGTAGCATTAAACCGAGTGTAATT
ATCACAGGTCCCGTGAGAACATCATCGACCCGGAACCTCTACCTTCAAGCTGACGAA
CAACACGTTTGCTGCACAGGAAGGGTTTGGTGCCCTGTCAATCATTTCATCTCACCGC
GTTTCATGTAACTACTCCAATGCCACAAATGATGTTGGCGAAGGACGTTTTAGCAAA
TCAGAATTTTGATGGACCAATTCTCATTCTGATGgGcAcGCTGAACaATGCGATGCAC
AACTTGTATGGCATTGCTATTCCAAACGATCAAACCATTAAGCTCCGTTACCAGTAATAT
CTTCTATAGCCAGTATAATGTCAAATTGGAGTATGCCGAAATTTACGCCTTTGGAGGCC
CGACCATTTGACCTGATTCCGAAATCTGCACGCAATACTTCGAAGAAAAGGCGTTAGAT
TACTATCGCAGCATCGCGAAACGCCTGAACTCGATTACCACGGCCAATCCGTCGTCGTT
CAACAAATACATTGGTGAATATAAACAGAACTGATTGCGAAATATCGGTTTGTCTGATG
AAAGCTCTGGTGAAGTGACTGTAAACCGCAACAAATTTGTGCAACTCTACAACGAGTTG
ACCCAAATCTTTACCGAGTTTAACTACGCAAGATCTATAACGTACAGAACCGCAAGAT
TTATCTTAGCAATGTATACACACCGGTTACTGCGAACATCTTAGACGACAATGTGTATG
ATATTCAGAATGGCTTTAACATCCCGAAATCAAATCTGAACGTTCTGTTTATGGGCCAG
AACCTGAGTCGTAATCCAGCACTGCGTAAAGTGAACCCGGAATAATGCTCTACTTGT
TACCAAATTTTGCACAAAGCGATTGATGGCCGCTCTCTCTATAACAAAACGCTGGATT
GTCGTGAGTTACTTGTGAAGAACACTGATTTACCGTTCATTGGGGATATCTCCGACGTG
AAAACCGATATCTTCTGCGCAAAGACATTAATGAAGAAACGGAAGTCATCTATTACCC
CGACAATGTGAGCGTTGATCAGGTCAATTTTATCGAAGAACACCTCCGAACATGGTCAGT
TGGATTTGCTGTACCCTAGCATTGACTCGGAGAGTGAAATCCTTCCGGGCGAAAATCAA

30

40

50

GTGTTTTACGACAACCGTACCCAAAATGTTGATTATTTGAATTCTTATTACTACCTGGA
ATCTCAGAAATTGAGCGACAATGTGGAAGATTTACGTTACACGCTCCATTGAGGAAG
CGCTGGATAATAGCGCGAAAGTGTATACGTATTTCCCTACCTTGGCGAATAAAGTAAAT
GCTGGTGTCCAGGGAGGCTTATTTCTGATGTGGGCGAATGATGTGGTAGAAGATTTTAC
GACCAATATTTTGCCTAAGGACACCTTAGATAAAATTAGCGATGTTAGCGCCATCATCC
CCTATATTGGCCCAGCACTGAATATCTCGAACTCTGTGCGTCGCGGAACTTCACCGAA
GCATTTGCGGTGACCGGGGTTACTATTCTGTTGGAAGCCTTTCCGGAGTTTACTATTCC
GGCGCTGGGTGCGTTTGTGATTTATTTCGAAAGTACAAGAACGCAATGAAATTATCAAAA
CCATCGATAATTGCCTGGAACAACGCATTAAACGCTGGAAGGATTCTTATGAATGGATG
ATGGGCACCTGGTTATCCCGTATTATCACACAGTTTAACAACATCTCGTATCAGATGTA
CGATTCACTGAACTACCAAGCAGGGGCGATCAAAGCCAAGATCGACTTAGAATACAAGA
AATATTCAGGTAGCGATAAAGAGAATATTTAAAGCCAGGTTGAAAACCTGAAGAACTCT
CTGGATGTCAAAATTTTCAAGAGGCTATGAACAACATTAACAAATTTATCCGCGAATGTAG
CGTCACGTATCTGTTTAAAAACATGCTCCCGAAAGTGATTGATGAGCTCAACGAGTTTG
ATCGCAACACAAAGGCCAAACTGATTAACCTGATTGATAGTCACAATATTATTTTAGTC
GGTGAAGTTGACAAGCTGAAGGCTAAGGTCAATAACAGCTTTCAGAACACTATTCCGTT
TAATATTTTCTCCTATACGAACAATAGTCTGCTGAAAGACATTATCAACGAATACTTCA
ACAATATTAATGACAGCAAAATTTCTGAGCCTGCAGAATCGTAAGAATACGCTGGTAGAT
ACCAGTGGATATAATGCGGAAGTCTCAGAAGAGGGTGATGTACAGCTGAACCCGATCTT
TCCGTTTCGACTTTAACTGGGGTCTAGTGGTGAAGATCGCGGTAAAGTGATCGTTACCC
AAAACGAGAACATTGTGTATAACAGCATGTACGAGAGTTTCTCAATTTCTTCTGGATT
CGCATCAATAAATGGGTTTCTAATTTGCCTGGCTATACCATCATTGATAGCGTCAAAAA
CAACTCGGGCTGGTCGATTGGCATTATTAGCAACTTTCTGGTGTTTACCCTGAAACAGA
ATGAGGATTCGGAACAGAGCATTAACTTCTCCTACGACATCAGCAACAATGCACCAGGG
TATAACAAATGGTTCTTCGTAACGGTGACGAACAATATGATGGGCAATATGAAAATCTA
CATTAAACGGGAACTTATCGACACCATTAAAGTGAAAGAGCTTACTGGGATCAATTTTA
GTAAAACCATTACCTTTGAGATCAACAAAATTCCGGACACGGGTCTGATTACCTCCGAT
TCGGATAATATCAATATGTGGATTTCGCGACTTTTATATCTTCGCCAAAGAACTTGATGG
CAAAGATATCAACATTTTGTTTAATTCCCTGCAGTATACCAATGTCGTTAAGGACTATT
GGGGCAATGATCTCCGCTACAATAAAGAATACTACATGGTTAACATCGACTATCTCAAT
CGCTACATGTATGCTAACTCGCGTCAAATTGTGTTTAACACACGTCGTAACAACAACGA
TTTTAACGAAGGTTATAAAATCATTATCAAACGGATCCGCGGCAATACGAACGATACTC
GTGTTCTGTCGGGTGACATTCTGTATTTTCGACATGACGATTAATAATAAAGCGTACAAT
CTGTTTATGAAGAACGAAACCATGTACGCCGATAACCATTCCTACTGAAGATATCTACGC
AATCGGACTTCGCGAACAGACCAAAGACATTAACGACAACATCATCTTTCAGATTCAAC
CGATGAATAATACCTACTACTATGCCTCCAGATCTTCAAAGTAATTTCAACGGCGAA
AACATTTCAAGGCATTTGCTCAATCGGCACCTTATCGGTTCCGGTTAGGTGGTGATTGGTA
TCGTCACAACTACCTTGTTCCACAGTGAAACAAGGCAACTATGCATCGCTCTTAGAAA
GCACATCTACGCATTGGGGTTTTGTGCCAGTCAGTGAAAtaatg

【0250】

配列番号15 (ポリペプチド配列, BoNT/C1(0) (Endonegative))

MPITINNFNYSDPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNPNLN
KPPRVTSPPKSGYYDPNYLSTDSKDPFLKEIILFKRINSREIGEELIYRLSTDIPFPGNNNT
PINTDFDFDVFNSVDVKTRQGNNWVKTSINPSVIITGPRENIIDPETSTFKLTNNTFAAQ
EGFGALSIIISPRFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILILMGTLLNNAMHNLYGIAIP
NDQTISSVTSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKALDYYSIAKRLNSI
TTANPSSFNKEYIGEYKQKLIRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVELYNELTQIFTEFNKYIYN
VQNRKIYLSNVYTPVTANILDDNVYDIQNGFNIPKSNLNVLFMGQNLSRNPALRKVNPE
NMLYLFTKFCHKAIDGRSLYNKTLDCRELLVKNTDLPFIGDISDVKTDFLRKDINEETEVI
YYPDNVSDQVILSKNTSEHGQLDLLYPSIDSESEILPGENQVFYDNRTQNVLDYLSYYY

LESQKLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFPTLANKVNAGVQGGFLFMWANDVVED
FTTNILRKDTLDKISDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFTEAFVAVTGVTILLEAFPEFTIPAL
GAFVIYSKVQERNEIIKTIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGTWLSRIITQFNNISYQMYDSL
NYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNNINKFIRECSVTYLF
KNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNIILVGEVDKLKAKVNNSFQNTIPFNIFSNTN
NSLLKDIINEYFNNINDSKILSLQNRKNTLVDTSGYNAEVSEEGDVQLNPIFPDFKLGSSG
EDRGKVIVTQENENIVYNSMYESFSISFWIRINKWVSNLPGYTIIDSVKNNSGWSIGIISNFL
VFTLKQNEDESEQSINFSDISNNAPGYNKWWFFVTVTNNMMGNMKIYINGKLIDTIKVKEL
TGINFSTITFEINKIPDTGLITSDSDNINMWIRDFYIFAKELDGKDINILFNSLQYTNVVK
DYWGNDLRYNKEYYMVNIDYLNRYMYANSRQIVFNTRNNNDNFNEGKIIKIRRGNTN
DTRVRGGDILYFDMTINNKAYNLFMKNETMYADNHSTEDIYAIGLREQTKDINDNIIFIQI
QPMNNTYYYASQIFKSNFNGENISGICSIGTYRFLGGDWYRHNYLVPTVKQGNYSALLE
STSTHWGFPVSE

【0251】

配列番号16 (核酸配列, BoNT/C1)

ATGCCGATCACGATTAATAATTTCAACTATAGCGATCCGGTGGACAATAAGAATATTC
TGTATCTGGATACTCATCTGAATACGCTGGCTAACGAACCGGAGAAAGCGTTCCGCATC
ACAGGCAACATCTGGGTTATTCCCGATCGCTTTTACGCAACAGCAACCCTAATCTGAA
CAAACCTCCTCGTGTCACCAGTCTAAATCCGGTTATTACGACCCAAACTATCTGAGTA
CGGATAGCGATAAAGATCCCTTTCTGAAAGAGATCATTAAAGCTGTTCAAACGCATTAAC
TCTCGCGAAATTGGGGAAGAGCTGATCTATCGGCTTTCGACAGATATCCCGTTCCAGG
TAACAATAATACCCCGATTAATACTTTGACTTTGATGTTGATTTCAATTCTGTGGATG
TGAAAACGCGTCAAGGCAATAATTGGGTGAAAACCTGGTAGCATTAAACCGAGTGTAATT
ATCACAGGTCCCCGTGAGAACATCATCGACCCGGAAACCTCTACCTTCAAGCTGACGAA
CAACACGTTTGCTGCACAGGAAGGGTTTGGTGCCCTGTCAATCATTTCCATCTCACCGC
GTTTCATGTAACTACTCCAATGCCACAAATGATGTTGGCGAAGGACGTTTTAGCAAA
TCAGAATTTTGCATGGACCCAATTCTCATTCTGATGCACGAGCTGAACCATGCGATGCA
CAACTTGTATGGCATTGCTATTCCAAACGATCAAACCATTAGCTCCGTTACCAGTAATA
TCTTCTATAGCCAGTATAATGTCAAATTGGAGTATGCCGAAATTTACGCCTTTGGAGGC
CCGACCATTGACCTGATTCCGAAATCTGCACGCAAATACTTCGAAGAAAAGGCGTTAGA
TACTATCGCAGCATCGCGAAACGCCTGAACTCGATTACCACGGCCAATCCGTCGTCGT
TCAACAAATACATTGGTGAATATAAACAGAACTGATTGCGAAATATCGGTTTGTGTA
GAAAGCTCTGGTGAAGTGAAGTGTAAACCGCAACAAATTTGTGCAACTCTACAACGAGTT
GACCCAAATCTTTACCGAGTTTAACTACGCAAAGATCTATAACGTACAGAACCGCAAGA
TTTATCTTAGCAATGTATACACACCGGTTACTGCGAACATCTTAGACGACAATGTGTAT
GATATTCAGAATGGCTTTAACATCCCGAAATCAAATCTGAACGTTCTGTTTATGGGCCA
GAACCTGAGTCGTAATCCAGCACTGCGTAAAGTGAACCCGGAAAATATGCTCTACTTGT
TTACCAAATTTTGCCACAAAGCGATTGATGGCCGCTCTCTCTATAACAAAACGCTGGAT
TGTCGTGAGTTACTTGTGAAGAACACTGATTTACCGTTTATTGGGGATATCTCCGACGT
GAAAACCGATATCTTCTGCGCAAAGACATTAATGAAGAAACGGAAGTCATCTATTACC
CCGACAATGTGAGCGTTGATCAGGTCATTTTATCGAAGAACACCTCCGAACATGGTCAG
TTGGATTTGCTGTACCCTAGCATTGACTCGGAGAGTGAAATCCTTCCGGGCGAAAATCA
AGTGTTTTACGACAACCGTACCCAAAATGTTGATTATTTGAATTCTTATTACTACCTGG
AATCTCAGAAATTGAGCGACAATGTGGAAGATTTACAGTTCACACGCTCCATTGAGGAA
GCGCTGGATAATAGCGCGAAAGTGTATACGTATTTCCCTACCTTGGCGAATAAAGTAA
TGCTGGTGTCCAGGGAGGCTTATTTCTGATGTGGGCGAATGATGTGGTAGAAGATTTTA
CGACCAATATTTTGCCTAAGGACACCTTAGATAAAAATTAGCGATGTTAGCGCCATCATC
CCCTATATTGGCCAGCACTGAATATCTCGAACTCTGTGCGTCGCGGAAACCTTACCGA
AGCATTTGCGGTGACCGGGGTTACTATTCTGTTGGAAGCCTTTCCGGAGTTTACTATTC
CGGCGCTGGGTGCGTTTGTGATTTATTCGAAAGTACAAGAACGCAATGAAATTATCAAA

10

20

30

40

50

ACCATCGATAATTGCCTGGAACAACGCATTAAACGCTGGAAGGATTCTTATGAATGGAT
GATGGGCACCTGGTTATCCCGTATTATCACACAGTTTAAACAACATCTCGTATCAGATGT
ACGATTCACTGAACTACCAAGCAGGGGCGATCAAAGCCAAGATCGACTTAGAATACAAG
AAATATTTCAGGTAGCGATAAAGAGAATATTTAAAGCCAGGTTGAAAACCTGAAGAACTC
TCTGGATGTCAAAATTTTCAGAGGCTATGAACAACATTAACAAATTTATCCGCGAATGTA
GCGTCACGTATCTGTTTAAAAACATGCTCCCGAAAGTGATTGATGAGCTCAACGAGTTT
GATCGCAACACAAAGGCCAAACTGATTAACCTGATTGATAGTCACAATATTATTTTAGT
CGGTGAAGTTGACAAGCTGAAGGCTAAGGTCAATAACAGCTTTCAGAACACTATTCCGT
TTAATATTTTCTCCTATACGAACAATAGTCTGCTGAAAGACATTATCAACGAATACTTC
AACAAATATTAATGACAGCAAAATTCTGAGCCTGCAGAATCGTAAGAATACGCTGGTAGA
TACCAGTGGATATAATGCGGAAGTCTCAGAAGAGGGTGATGTACAGCTGAACCCGATCT
TTCCGTTTCGACTTTAAACTGGGGTCTAGTGGTGAAGATCGCGGTAAAGTGATCGTTACC
CAAAACGAGAACATTGTGTATAACAGCATGTACGAGAGTTTCTCAATTTCTTTCTGGAT
TCGCATCAATAAATGGGTTTCTAATTTGCCTGGCTATACCATCATTGATAGCGTCAAAA
ACAACTCGGGCTGGTCGATTGGCATTATTAGCAACTTTCTGGTGTTTACCCTGAAACAG
AATGAGGATTTCGGAACAGAGCATTAACTTCTCCTACGACATCAGCAACAATGCACCAGG
GTATAACAAATGGTTCTTCGTAACGGTGACGAACAATATGATGGGCAATATGAAAATCT
ACATTAACGGGAACTTATCGACACCATTAAAGTGAAAGAGCTTACTGGGATCAATTTT
AGTAAAACCATTACCTTTGAGATCAACAAAATTCCGGACACGGGTCTGATTACCTCCGA
TTCGGATAATATCAATATGTGGATTTCGCGACTTTTATATCTTCGCCAAAGAAGTTGATG
GCAAAGATATCAACATTTTGTTTAATTCCCTGCAGTATACCAATGTCGTTAAGGACTAT
TGGGGCAATGATCTCCGCTACAATAAAGAATACTACATGGTTAACATCGACTATCTCAA
TCGCTACATGTATGCTAACTCGCGTCAAATTGTGTTTAAACACACGTCGTAACAACAACG
ATTTTAAACGAAGGTTATAAAATCATTATCAAACGGATCCGCGGCAATACGAACGATACT
CGTGTTTCGTGGCGGTGACATTCTGTATTTTCGACATGACGATTAATAATAAAGCGTACAA
TCTGTTTCATGAAGAACGAAACCATGTACGCCGATAACCATTCCTACTGAAGATATCTACG
CAATCGGACTTCGCGAACAGACCAAAGACATTAAACGACAACATCATCTTTCAGATTCAA
CCGATGAATAATACCTACTACTATGCCTCCCAGATCTTCAAAGTAATTTCAACGGCGA
AAACATTTTCAGGCATTTGCTCAATCGGCACTTATCGGTTCCGGTTAGGTGGTGGATTGGT
ATCGTCACAACCTACCTTGTTCACAGTGAAACAAGGCAACTATGCATCGCTCTTAGAA
AGCACATCTACGCATTGGGGTTTTGTGCCAGTCAGTGAAtaa

【 0 2 5 2 】

配列番号17 (ポリペプチド配列, BoNT/C1)

MPITINNFNYSDPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNPNLN
KPPRVTSPPKSGYYDPNYLSTDSKDPFLKEIKLFRKINSREIGEELIYRLSTDIPFPGNNNT
PINTDFDFVDFNSVDVKTRQGNNWVKTGSINPSVIITGPRENIIDPETSTFKLTNNTFAAQ
EGFGALSIISISPRFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILILMHELNHAMHNLYGIAIP
NDQTISSVTSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKALDYYSIAKRLNSI
TTANPSSFNKYIGEYKQKLIRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVELYNELTQIFTEFNKYIYN
VQNRKIYLSNVYTPVTANILDDNVYDIQNGFNIPKSNLNVLFMGQNLSRNPALRKVNPE
NMLYLFTKFCHKAIDGRSLYNKTLDCRELLVKNTDLPFIGDISDVKTDFLRKDINEETEVI
YYPDNVSVDQVILSKNTSEHGQLDLLYPSIDSESEILPGENQVFYDNRTQNVVDYLNSSYY
LESQKLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFPTLANKVNAGVQGGFLMWANDVVED
FTTNILRKDTLDKISDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFTEAFVAVTGVTILLEAFPEFTIPAL
GAFVIYSKVQERNEIIKTIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGTWLSRIITQFNNISYQMYDSL
NYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNNINKFIRECSVTYLF
KNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNIIILVGEVDKLKAKVNNSFQNTIPFNIFSNTN
NSLLKDIINEYFNNINDSKILSLQNRKNTLVDTSGYNAEVSEEGDVQLNPFPDFKLGSSG
EDRGKVIVTQENENIVYNSMYESFSISFWIRINKWVSNLPGYTIIDSVKNNSGWSIGIISNFL
VFTLKQNEDEQSINFSDISNNAPGYNKWFFVTVTNNMMGNMKIYINGKLIDTIKVKEL

10

20

30

40

50

TGINFSKITITFEINKIPDTGLITSDSDNINMWIRDFYIFAKELDGKDINILFNSLQYTNVVK
DYWGNDLRYNKEYYMVNIDYLNRYMYANSRQIVFNTRRNNNDFNEGKIIIKRIRGNTN
DTRVRGGDILYFDMTINNKAYNLFMKNETMYADNHSTEDIYAIGLREQTKDINDNIIFQI
QPMNNTYYYASQIFKSNFNGENISGICSIGTYRFRLLGGDWYRHNYLVPTVKQGNYASLLE
STSTHWGFVPVSE

【0253】

配列番号18 (エンテロキナーゼ 及び 第Xa因子 切断部位)

IDGR

【0254】

配列番号19 (エンテロキナーゼ 及び 第Xa因子 切断部位変異型)

IEGR

【0255】

配列番号20 (BoNT/X活性化ループ)

CPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNDLEDKKTTSKTNVSYPCSLNGC

【0256】

配列番号21 (BoNT/A1 & A6活性化ループ)

CVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLC

【0257】

配列番号22 (BoNT/B2, B3 & B6活性化ループ)

CKSVRAPGIC

【0258】

配列番号23 (BoNT/D活性化ループ)

CLRLTKNSRDDSTC

【0259】

配列番号24 (BoNT/E1 から E5, E9 & E12活性化ループ)

CKNIVSVKGIRKSIC

【0260】

配列番号25 (BoNT/F1 及び F6活性化ループ)

CKSVIPRKGTKAPPRLC

【0261】

配列番号26 (BoNT/F2 及び F3活性化ループ)

CKSIIPRKGTKQSPSLC

【0262】

配列番号27 (BoNT/F4活性化ループ)

CKSIIPRKGTKAPPRLC

【0263】

配列番号28 (BoNT/F5活性化ループ)

CLNSSFKKNTKKPLC

【0264】

配列番号29 (BoNT/F7活性化ループ)

CKSIVSKKGTKNSLC

【0265】

配列番号30 (TeNT活性化ループ)

CKKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLGELC

【0266】

配列番号31 (BoNT/G活性化ループ)

CKPVMYKNTGKSEQC

【0267】

配列番号32 (核酸配列, 野生型 BoNT/X-10HT)

ATGAAACTGGAAATCAACAAATTCAACTACAACGATCCGATCGATGGCATTAAATGTT

10

20

30

40

50

ATTACCATGCGTCCGCCTCGTCATAGCGATAAAATCAATAAAGGTAAAGGTCCGTTCAA
AGCCTTTCAGGTGATTAAAAACATTTGGATTGTGCCGGAACGCTACAACTTTACCAATA
ATACCAACGATCTGAACATTCCGAGCGAACCGATTATGGAAGCAGATGCCATTTATAAC
CCGAACTATCTGAATACCCGAGCGAAAAAGATGAATTTCTGCAGGGTGTTATCAAAGT
GCTGGAACGCATTAAAAGCAAACCGGAAGGTGAAAACTGCTGGAACCTGATTAGCAGCA
GCATTCCGCTGCCGCTGGTTAGCAATGGTGCCTGACCCTGAGCGATAATGAAACCATT
GCATATCAAGAGAACAACAACATTGTGAGCAATCTGCAGGCAAACCTGGTTATTTATGG
TCCGGGTCCTGATATTGCAAATAATGCAACCTATGGTCTGTATAGCACCCCGATTAGTA
ATGGTGAAGGTACACTGAGCGAAGTTAGCTTTAGCCCGTTTTATCTGAAACCGTTTGAT
GAAAGCTATGGCAATTATCGTAGCCTGGTGAATATCGTGAACAAATTCGTGAAACGTGA
ATTTGCACCTGATCCGGCAAGCACCTGATGCATGAACTGGTTCATGTTACCCATAATC
TGTATGGTATTAGCAACCGCAACTTCTACTATAACTTTGACACCGGCAAAATTGAAACC
AGCCGTCAGCAGAATAGCCTGATTTTTGAAGAACTGCTGACCTTTGGTGGCATTGATAG
CAAAGCAATTAGCAGCCTGATCATCAAGAAAATTATCGAAACCGCCAAGAACAACATA
CCACGCTGATTAGCGAACGCCTGAATACCGTTACCGTTGAAAATGATCTGCTGAAATAT
ATCAAAAACAAAATCCCGGTTTCAGGGTCGTCTGGGTAACTTTAACTGGATACCGCAGA
ATTCGAGAAAAAGCTGAATACCATTCTGTTTGTGCTGAACGAAAGCAATCTGGCACAGC
GTTTTAGCATTCTGGTTCGTAAACATTACCTGAAAGAACGTCCGATTGATCCGATTTAT
GTGAACATTCTGGATGACAATAGCTACAGCACCTGGAAGGTTTTAACATTAGCAGTCA
GGGTAGCAATGATTTCCAAGGTCAGCTGCTGGAAAGCAGCTATTTTGAAAAAATTGAAA
GCAATGCCCTGCGTGCCTTCATTAATACTGTCCGCGTAATGGTCTGCTGTATAATGCC
ATTTATCGCAACAGCAAAAACTACCTGAACAACATTGATCTGGAAGATAAAAAGACCAC
GAGCAAAACCAATGTTAGCTATCCGTGTAGCCTGCTGAATGGTTGTATTGAAGTTGAAA
ACAAAGACCTGTTCCCTGATTAGCAACAAAGATAGCCTGAACGATATTAACCTGAGCGAA
GAAAAAATCAAACCGGAAACCAACCGTGTTCTTCAAAGATAAACTGCCTCCGCAGGATAT
TACGCTGAGCAATTATGATTTTACCGAAGCCAATAGCATTCCGAGCATTAGCCAGCAGA
ACATTCTGGAACGTAATGAAGAACTGTATGAACCGATTGCAATAGCCTGTTTGAAATC
AAAACCATCTATGTGGATAAGCTGACCACCTTTCATTTTCTGGAAGCCCAGAATATTGA
TGAGAGCATTGATAGCAGCAAAATTCGTGTTGAACTGACCGATAGCGTTGATGAAGCAC
TGAGCAATCCGAATAAAGTTTATAGCCCGTTCAAGAACATGAGCAACACCATTAATAGC
ATTGAAACCGGTATTACCAGCACCTACATCTTTTATCAGTGGCTGCGTAGCATCGTGAA
AGATTTTAGTGATGAAACCGGCAAAATCGACGTGATTGATAAAAGCAGCGATACCCTGG
CAATTGTTCCGTATATTGGTCCGCTGCTGAATATTGGTAATGATATTCGTCATGGCGAT
TTTGTGGGTGCAATTGAACTGGCAGGCATTACCGCACTGCTGGAATATGTTCCGGAATT
TACCATTCCGATTCTGGTTGGTCTGGAAGTTATTGGTGGCGAACTGGCACGTGAACAGG
TTGAAGCAATTGTTAATAATGCCCTGGATAAACCGGATCAGAAATGGGCAGAAGTTTAC
AATATTACCAAAGCACAGTGGTGGGGCACCATTCAATTTACAGATTAATACCCGTCTGGC
CCATACCTATAAAGCCCTGAGCCGTCAGGCAAATGCCATTAAAATGAATATGGAATTTC
AGCTGGCCAACTACAAAGGCAACATCGATGATAAAGCCAAAATCAAAAACGCCATCAGC
GAAACCGAAATCCTGCTGAACAAAAGCGTTGAACAGGCAATGAAAAACCCGAGAAATT
CATGATCAAACCTGAGCAACAGCTATCTGACCAAAGAAATGATTCCGAAAGTGCAGGATA
ACCTGAAAAATTTGATCTGGAAACCAAGAAAACCCTGGACAAATTTATCAAAGAGAAA
GAGGACATTCTGGGCACCAATCTGAGCAGCAGCCTGCGTCGTAAAGTTAGCATTTCGTCT
GAATAAAAACATTGCCTTCGACATCAACGATATCCCGTTTAGCGAATTTGATGATCTGA
TCAACCAGTACAAAAACGAGATCGAAGATTATGAAGTGCTGAATCTGGGTGCAGAAGAT
GGGAAAATCAAAGATCTGAGCGGTACAACCAGCGATATCAATATTGGTTCAGATATCGA
ACTGGCCGATGGTCTGTGAAAATAAAGCCATTAAGATTAAAGGCAGCGAGAACAGCACCA
TCAAATTTGCAATGAACAAATATCTGCGTTTTAGCGCGACCGATAACTTTAGCATTAGC
TTTTGGATCAAACATCCGAAACCGACCAATCTGCTTAATAACGGTATTGAATATACCCT
GGTCGAGAACTTTAATCAGCGTGGTTGGAAAATTAGCATCCAGGATAGCAAACCTGATTT

10

20

30

40

50

GGTATCTGCGCGATCACAATAACAGCATCAAAATCGTTACACCGGATTATATTGCGTTT
AATGGCTGGAACCTGATTACCATTACAAACAATCGTAGCAAAGGCAGCATTGTGTATGT
GAACGGTAGCAAAATTGAAGAGAAGGATATTAGCAGCATCTGGAATACCGAAGTGGATG
ATCCGATTATCTTTCGCCTGAAAAACAATCGCGATACCCAGGCGTTTACCCTGCTGGAT
CAGTTTAGCATTTATCGGAAAGAACTGAACCAGAACGAAGTGGTGAAGTGTATAACTA
CTACTTCAACAGCAACTACATTCGCGATATTTGGGGTAATCCGCTGCAGTACAACAAAA
AATACTATCTGCAGACCCAGGACAAACCTGGTAAAGGTCTGATCCGCGAATATTGGAGC
AGCTTTGGTTATGATTATGTGATTCTGAGCGATAGCAAGACGATTACCTTTCCGAATAA
TATCCGTTATGGTGCCCTGTATAACGGCAGCAAAGTTCTGATCAAAAATAGCAAAAAAC
TGGATGGTCTGGTGCGCAATAAAGATTTTCATTAGCTGGAATCGATGGCTATAATATG
GGTATTAGCGCAGATCGCTTTAACGAGGATACCAACTATATTGGCACCACCTATGGTAC
AACCCATGATCTGACCACCGATTTTGAATTATTTCAGCGCCAAGAGAAATACCGCAATT
ATTGTCAGCTGAAAACCCCGTATAACATCTTTCATAAAAGCGGTCTGATGAGCACCAGAA
ACCAGCAAACCGACCTTTCATGATTATCGTGACTGGGTTTATAGCAGCGCATGGTATTT
TCAGAACTATGAAAATCTGAACCTGCGCAAACATACCAAAACCAACTGGTATTTTATCC
CGAAAGATGAAGTTGGGATGAAGATCTTGAAGTTCTGTTTCAGGGTCCGCATCATCAC
CACCATCACCATCATCATCAC

【0268】

配列番号33 (ポリペプチド配列, BoNT/X)

MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIKNIWIVPERYNFTNNT
NDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPEKDEFLQGVKVLERIKSKPEGEKLELISSSIP
LPLVSNLALTLSDNETIAYQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEG
TLSEVSFSPFYLKPFDESYGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHELVHVTHNLYGIS
NRNFYFNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGIDSKAISSLIKKIETAKNNYTTLISE
RLNTVTVENDLLKYIKNKIPVQGR LGNFKLDTAEFKKLNTILFVLNESNLAQRFSILVR
KHYLKERPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISSQGSNDFQGQLLESSYFEKIESNALRAFI
KICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVSYPCSLNGCIEVENKDLFLISN
KDSLNDINLSEEKIPETTVFFKDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELY
EPIRNSLFEIKTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYSPF
KNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDET GKIDVIDKSSDTLAIVPYIGPLLN
GNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPILVGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRD
QKWAEVYNITKAQWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANAIKMNMEFQLANYKGNID
DKAK

IKNAISETTEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKE MIPKVQDNLKNFDLETKKTLDK
FIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIEDYEVLNL
GAEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIELADGRENKAIKIKGSENSTIKIAMNKYLRFSATDNF
SISFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLRDHNNNSIKIVTPDYI
AFNGWNLITITNNRSKGSIVYVNGSKIEEKDISSIWNTEVDDPIIFRLKNNRDTQAFTLL
DQFSIYRKELNQNEVVKLYNYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREY
WS

SFGYDYVILSDSKTITFPNNIRYGALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNKDFIQLEIDGYNMG
ISADRFNEDTNYIGTTYGTTDLTTDFEIIQRQEKYRNYCQLKTPYNIFHKSGLMSTETS
KPTFHDYRDWVYSSAWYFQNYENLNLRKHTKTNWYFIPKDEGWDED

【0269】

配列番号34 (ポリペプチド配列, 野生型 BoNT/X-10HT)

MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIKNIWIVPERYNFTNN
TNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPEKDEFLQGVKVLERIKSKPEGEKLELISSSIPLP
LVSNGALTLSDNETIAYQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTLS
EVSFSPFYLKPFDESYGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHELVHVTHNLYGISNRN
FYFNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGIDSKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTV

10

20

30

40

50

ENDLLKYIKNKIPVQGR LGNFKLD TAEFEKKLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKHYLKERPI
DPIYVNILDDNSYSTLEGFNIS SQGSNDFQGGQLLESSYFEKIESNALRAFIKICPRNGLLYN
AIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVSYPC SLLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEK
IKPETTVFFKDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKTIYVD
KLTTFFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALS NPKNKVYSPFKNMSNTINSIETGITSTYI
FYQWLRSIVKDFSDET GKIDVIDKSSDTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITAL
LEYVPEFTIPILVGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWADEVYNITKAQWWGTIHLQ
INTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGNIDDKAKIKNAISET EILLNKSVEQAMK
NTEKFMIKLSNSYLT KEMIPKVQDNLKNFDLET KKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSI
RLNKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIEDYEVLNLGAEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIELA
DGRENKAIKIGSENSTIKIAMNKYLRF SATDNFSISFWIKHPKPTNLLNGIEYTLVENF
NQRGWKISIQDSKLIWYLRDHNN SIKIVTPDYIAFNGWNLITITNNRSKGSIVYVNGSKIE
EKDISSIWNTEVDDPIIFRLKNNRDTQAFTLLDQFSIYRKELNQNEVVKLYNYFYFNSNYIR
DIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREYWSSFGYDYVILSDSKTITFPNNIRYGALYNG
SKVLIKNSKKLDGLVRNKDFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTT HDLTTFDEII
QRQEKYRNYCQLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTFH DYRDWVYSSAWYFQNYENLNLRK
HTKTNWYFIPKDEGWDEDLEVL FQGPHHHHHHHHHH

[0 2 7 0]

配列番号35 (BoNT/A - UniProt P10845)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNVGQM QP VKAFKIH NKI WVIPERDTFTNPEEGD
LN

PPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEK DNYLKGVT KLFERIYSTD LGRMLLTSIVRGIPFWG
G

STIDTELKVIDTNCINVIQPDG SYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGY
GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLL GAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGI AINPN
RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIAS TLNK

A
KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYL SEDTSGKFSVDK LKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKV
LNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNL RNTNLAANFNGQNT EINN MNFTKLKN

FT
GLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEE
ITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENIS IENLSSDIIGQLELMPNIERFPNG
KKYELDKYTMFHYLRAQEF EHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVY TFFSSDYVKKVNKAT

EA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSG
AVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLT VQTIDNALS KRNEKWDEVYKYIVTNWLAK
VNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKA
MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLED FDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDR LKD

K
VNNTLSTDIPFQLSKYVDNQ RLLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINI
GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNN
EYTIINCMENNSGWKVSLNYGEIIWTLQDTQEIKQRV VFKYSQMINISDYINRWIFVTIT
NNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWI KYFNLFDKELN
EKEIKDLYDNQSN SGILKDFWGDYLYQDKPY YMLNLYDPN KYVDVNNVGIRGYMYLK

GPR
GSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVK NKEYRLATNASQ

A
GVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFN NI

AK
LVASNWYNRQIERSSRTLGC SWEFIPVDDGWGERPL

10

20

30

40

50

【0271】

配列番号36 (BoNT/B - UniProt P10844)

MPVTINNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGRIYKAFKITDRIWIIPERYTTFGYKPEDF
NKSSGIFNRDVCYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLEMIINGIPYLG
DRRVPLEEFNTNIASVTVNKLISNPGEVERKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQNHFA
SREGFGGIMQMKFCPEYVSFVFNQENKGASIFNRRGYFSDPALILMHELIHVLHGLYGI
KVDDLPIVPNEKKFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNFGRGIVDRL
NKVLVCISDPNININIKNFKDKYKFVEDSEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGFTETNIAENY
KIKTRASYFSDSLPPVVIKNLLDNEIYTIIEGFNISDKDMEKEYRGQNKAINKQAYEEISKE
HLAVYKIQMCKSVKAPGICIDVDNEDLFFIADKNSFSDDLKNERIEYNTQSNYIENDFPI
NELILDITDLISKIELPSENTESLTDNFVDVPVYEKQPAIKKIFTDENTIFQYLYSQTFLDIR
DISLTSSFDDALLFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVNDFVIEANKSNTM
DKIADISLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFEIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLLSYIDN
KNKIKTIDNALTRNEKWSMDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEEII
KYRYNIYSEKEKSNINIDFNDINSKLNIGINQAINNINFINGCSVSYLMKKMIPLAVEKLL
DFDNTLKKNLLNYIDENKLYLIGSAEYKSKVNKYLKTIMPFDLSIYNTDILIEFMFNKYN
SEILNNIILNLRYKDNNLIDLSGYGAKVEVYDGVLELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIF
NSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTIDINGK
TKSVFFEYNIREDISEYINRWFFVTITNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKL
DGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIEERYKIQSYSEYLDKDFWGNPLMYNKEYYMFNAG
NKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYINYRDLYIGEKFIIRKSNSQSINDDIVRKEDI
YLDFFNLNQEWVRVYTYKYFKKEEEKLFLAPISDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKD
EESTDEIGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGW
TE

10

20

【0272】

配列番号37 (BoNT/C - UniProt P18640)

MPITINNFNYSDPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNPNLN
KPPRVTSPPKSGYYDPNYLSTDSKDPFLKEIKLFRKINSREIGEELIYRLSTDIPFPGNNNT
PINTDFDFDVFNSVDVKTRQGNNWVKTGSIINPSVIITGPRENIIDPETSTFKLTNNTFAAQ
EGFGALSIIISPRFMLTYSNATNDVGEGRFKSEFCMDPILILMHELNHAMHNLYGIAIP
NDQTISSVTSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKALDYRSIAKRLNSI
TTANPSSFNKYIGEYKQKLIRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVELYNELTQIFTEFNIAKIYN
VQNRKIYLSNVYTPVTANILDDNVYDIQNGFNIPKSNLNVLFMGQNLSRNPALRKVNPE
NMLYLFTKFCHKAIDGRSLYNKTLDCRELLVKNTDLPFIGDISDVKTDIFLRKDINEETEVI
YYPDNVSVDQVILSKNTSEHGQLDLLYPSIDSESEILPGENQVFYDNRTQNVLYLNSYYY
LESQKLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFPTLANKVNAGVQGGFLMWANDVVED
FTTNILRKDTLDKISDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFTEAFVAVTGVTILLEAFPEFTIPAL
GAFVIYSKVQERNEIITIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGTWLSRIITQFNNISYQMYDSL
NYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNLSLDVKISEAMNNINKFIRECSVTYLF
KNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNIIILVGEVDKLKAKVNNSFQNTIPFNIFSNTN
NSLLKDIINEYFNNINDSKILSLQNRKNTLVDTSGYNAEVSEEGDVQLNPFPDFKLGSSG
EDRGKVIVTQENENIVYNSMYESFSISFWIRINKWVSNLPGYTIIDSVKNNSGWSIGIISNFL
VFTLKQNEDESEQSINFSDISNAPGYNKWWFFVTVTNNMMGMNKIYINGKLIDTIKVKEL
TGINFSKTITFEINKIPDTGLITSDSDNINMWIRDFYIFAKELDGKDINILFNSLQYTNVVK
DYWGNDLRYNKEYYMNIDYLNRYMYANSRQIVFNTRNNNDNFNEGKIIKIRRGNTN
DTRVRGGDILYFDMTINNKAYNLFMKNETMYADNHSTEDIYAIGLREQTKDINDNIIFQI
QPMNNTYYYASQIFKSNFNGENISGICSIGTYRFRLLGGDWYRHNYLVPTVKQGNYSALLE
STSTHWGFVPVSE

30

40

【0273】

配列番号38 (BoNT/D - UniProt P19321)

50

MTWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLITTPVKAFMITQNIWVIPERFSSDTNPSLS
KPPRPTSKYQSYDPSYLSTDEQKDTFLKGIKLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDS
TPEDTFDFTRHTTNI AVEKFENG SWKVTNIITPSVLIFGPLPNILDY TASLTLQGGQSNPS
FEGFGTLSILKVAPEFLTFS DVTSNQSSAVLGKSIFC MDPVIALMHELTHSLHQLYGINIP
SDKRIRPQVSEGGFSQDGP NVQFEELYTFGGLDVEIIPQ IERSQLREKALGHYKDI AKRLN
NINKTIPSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDK DNTGNFVVNIDKFNSLYSDLTNVMSEVVYSSQ
YNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIRDGFNL TNKGFNIENSGQNIERNPALQKLSSE
SVVDLFTKVCLRLTKNSRDDSTCIKVKNRLPYVADKDSISQE IFENKIITDETNVQNYSD
KFSLDESILDGQVPINPEIVDPLL PNVNMEPLNLP GEEIVFYDDITKYVDYLN SYYYLESQ
KLSNNVENITLTTSVEEALGYSNKIYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNI
MKKDTLDKISDVSVIIPYIGPALNIGNSALRGNF NQAFATAGVAFLL EGFPFTIPALGVFT
FYSSIQEREKIIKTIENCLEQRVKRWKDSYQW MVSNWLSRITTQFNHINYQMYDSL SYQA
DAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKS QVENLNKSLDV KISEAMNNINKFIRECSVTYLFKNML
PKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHN IILVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNIFS YTNNSLLK
DIINEYFNSINDSKILSLQNKKNALVD TSGYNAEVRVGD NVQLNTIYTND FKLSSSGDKIIV
NLNNNILYSAIYENSSVSFWIKISKDLTNSH NEYTIINSIEQNSGWKLCIRNGNIEWILQDV
NRKYKSLIFDYSESLSHTGYTNK WFFVTITNNIMGYMKLYINGELKQS QKIEDLDEVKLD
KTIVFGIDENIDENQMLWIRDFNIFSKEL SNEDINIVYEGQILRNVIKDYWGNPLKFDTEY
YIINDNYIDRYIAPESNVLVLVQYPDR SKLYTGNPITIKSVSDKNPYSRILNGDNIILHMLY
NSRKYMIIRD TDIYATQGGEC SQNCVYALKLQSN LGNYGIGIFS IKNIVSKNKYCSQIFSS
FRENTMLLADIYKPWRFSFKNAYTPVA VTNYETKLLSTSSFWKFISRDPGWVE
[0274]

配列番号39 (BoNT/E - UniProt Q00496)

MPKINSFNYNDPVNDRTILYIKPGGCQEFYKSFNIMKNIWIIPERNVIGTTPQDFHPPTS
LKNGDSSYYDPNYLQSDEEKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANPYLGNDNTPD
NQFHIGDASAVEIKFSNGSQDILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISLRNNYMPSNHRFGSIAI
VTFSPEYSFRFNDNCMNEFIQDPAL TLMHELIHSLHGLYGAKGITT KYTITQKQNPLITNI
RGTNIEEFLTFGGTD LNIITSAQSNDIYT NLLADYKKIASKLSKVQVSNPLLNPYKDVFEAK
YGLDKDASGIYSVNINKFNDIFKKLYS FTEFDLRTKFQVKCRQTYIGQYKYFKLSNLLNDSI
YNISEGYNINNLKVNFRGQ NANLNPRIITPITGRGLVKKIIRFCKNIVSVKGIRKSICIEINN
GELFFVASSENSYNDDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLDQVILNFNSE SAPGLSDEKLNLT
QNDAYIPKYDSNGTSDIEQH DVNELNVFFYLDAQKVPEGENN VNLTSSIDTALLEQPKIY
TFFSSEFINNVNKPVQAALFVSWIQQLV DFTTEANQKSTVDKIADISIVVPYIGLALNIG
NEAQKGNFKDALELLGAGILLEFEPELLIPTILVFTIKSFLGSSDNKNKVIKAINNALKERD
EKWKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQ MYQALQNQVNAIKTIIESKYNSYTL EEKNELT
NKYDIKQIENELNQKVS IAMNNIDRFLTESSISYLMKIINEVKINKLREYDENVKTYLLNYI
IQHGSILGESQQELNSMVTDTL NNSIPFKLSSYTDDKILISYFNKFFKRIKSSSVLNMRYKN
DKYVDTSGYDSNININGDVYKYPTNKNQFGIYNDKLSEVNISQNDYI IYDNKYKNFSISFW
VRIPNYDNKIVNVNNEYTIINCMRDNNSGWKVSLNHNEI IWT FEDNRGINQKLA FN YGN
ANGISDYINKWIFVTITNDR LGDSKLYINGNLIDQKSILNLGNIHVSDN ILFKIVNCSYTRYI
GIRYFNIFDKELDETEIQTLYSNEPNTN ILKDFWGN YLLYDKEYYLLNVLPNNFIDRRKD
STLSINNIRSTILLANRLYSGIKVKIQRVNNSSTNDNLVRKNDQVYIN FVASKTHL FPLYA
DTATTNKEKTIKISSSGNRFNQVVVMNSVG NCTMNFKNNGN NIGLLGFKADTVVASTW
YYTHMRDHTNSNGCFWNFI SEEHGWQEK

[0275]

配列番号40 (BoNT/F - UniProt A7GBG3)

MPVVINSFNYNDPVNDTILYMQIPYEEKSKKYYKA FEIMRNVWIIPERN TIGTDPSDF
DPPASLENGSSAYYDPNYLT TDAEKDRYLKTTIKL FKRINSNPAGEVLLQEISYAKPYLGN
EHTPINEFHPVTRTTSVNIKSSTNVKSSIILNLLVLGAGPDIFENSSYPVRKLMDSGGVYDP
SNDGFGSINIVTFSPEY EYTFNDISGGYNSSTESFIADPAISLAHELIHALHGLYGARGVTY

10

20

30

40

50

KETIKVKQAPLMIAEKPIRLEEFLTFGGQDLNIITSAMKEKIYNNLLANYEKIATRLSRVNS
APPEYDINEYKDYFQWKYGLDKNADGSYTVNENKFNEIYKKLYSFTEIDLANFKVKCRN
TYFIKYGFLKVPNLLDDDIYTVSEGFNIGNLAVNNRGQNIKLNPKIIDSIPDKGLVEKIVKF
CKSVIPRKGTKAPPRLCIRVNNREFFVASESSYNENDINTPKEIDDTNLNNNYRNNLDE
VILDYNSETIPQISNQTTLNTLVQDDSYVPRYDSNGTSEIEEHNVDLNVFFYLHAQKVPE
GETNISLTSSIDTALSEESQVYTFFSSEFINTINKPVHAALFISWINQVIRDFTEATQKSTF
DKIADISLVVPYVGLALNIGNEVQKENFKEAFELLGAGILLEFVPELLIPTILVFTIKSFIGSS
ENKNKIIKAINNSLMERETKWKEIYSWIVSNWLTRINTQFNKRKEQMYQALQNQVDAIK
TVIEYKYNNYTSDERNRLESEYNINNIREELNKKVSLAMENIERFITESSIFYLMKLINEAK
VSKLREYDEGVKEYLLDYISEHRSILGNSVQELNDLVTSTLNNNSIPFELSSYTNDKILILYF
NKLYKKIKDNSILDMRYENNKFIDISGYGSNISINGDVYIYSTNRNQFGIYSSKPSEVNIAQ
NNDIYNGRYQNFSSISFWVRIPKYFNKVNLNNEYTIIDCIRNNNSGWKISLNYNKIIWTLQ
DTAGNNQKLVFNYTQMISISDYINKWIFVTITNNRLGNSRIYINGNLIDEKSISNLGDIHVS
DNILFKIVGCNDTRYVGIRYFKVFDTELGKTEIETLYSDEPDPSILKDFWGNLYLLYNKRY
LLNLLRTDKSITQNSNFLNINQQRGVYQKPNIFSNTRLYTGVEVIIRKNGSTDISNTDNFV
RKNDLAYINVVDRDVEYRLYADISIAKPEKIIKLRTSNNNSLGQIIVMDSIGNNCTMNFQ
NNNGGNIGLLGFHSNNLVASSWYYNNIRKNTSSNGCFWSFISKEHGWQEN

【0 2 7 6】

配列番号41 (BoNT/G - UniProt Q60393)

MPVNIKXFNYNDPINDDIIMMEPFNDPGPGTYKAFRIIDRIWIVPERFTYGFQPDQF
NASTGVFSKDVYEYDPTYLKTDAEKDKFLKTMIKLFNRINSKPSGQRLDMDIVDAIPYL
GNASTPPDKFAANVANVSINKKIIQPGAEDQIKGLMTNLIIFGPGPVLSNFTDSMIMNG
HSPISEGFGARM MIRFCPSCLNVFNQENKDTISFRRAYFADPALTMHELIHVLHGL
YGIKISNLPITPNTKEFFMQHSDPVQAEELYTFGGHDPSPVISPSTDMNIYNKALQNFQDIA
NRLNIVSSAQSGIDISLYKQIYKNKYDFVEDPNGKYSVDKDKFDKLYKALMFGFTETNLA
GEYGIKTRYSYFSEYLPPIKTEKLLDNTIYTQNEGFNIASKNLKTEFNGQNKAVNKEAYEEI
SLEHLVIYRIAMCKPVMYKNTGKSEQCIIVNNEDLFFIANKDSFSKDLAKAETIAYNTQNN
TIENNFSIDQLILDNDLSSGIDLNPENTEPFTNFDDIDIPVYIKQSALKKIFVDGDSLFEYLH
AQTFPSNIENLQLTNSLNDALRNNNKVYTFSTNLVEKANTVVGASLFVNWVKGVIDDF
TSESTQKSTIDKVSVDVSIIPYIGPALNVGNETAKENFKNAFEIGGAAILMEFIPELIVPIVGF
FTLESYVGNKGHIIMTISNALKKRDQKWTDMYGLIVSQWLSTVNTQFYTIKERMYNALN
NQSQAIEKIIEDQYNRYSEEDKMNIIDFNIDFKLNQSLNLAINNIDDFINQCSISYLMNR
MIPLAVKKLKDFDDNLKRDLLEYIDTNELLYLLDEVNILKSKVNRHLKDSIPFDLSLYTKDT
ILIQVFNNYISNISSNAILSLSYRGGRLIDSSGYGATMNVGSDVIFNDIGNGQFKLNNSENS
NITAHQSKFVVYDSMFDNFSINFVWRTPKYNNNDIQTYLQNEYTIISCIKNDSGWKVSIK
GNRIIWTLIDVNAKSKSIFFEYSIKDNISDYINKWFSITITNDRLGNANIYINGSLKKSEKIL
NLDRINSSNDIDFKLINCTDTTKFVWIKDFNIFGRELNATEVSSLYWISSTNTLKDFWGN
PLRYDTQYYLFNQGMQNIYIKYFSKASMGETAPRTNFNNAAINYQNLYLGLRFIIKKASN
SRNINNDNIVREGDYIYLNIDNISDESRYVYVLVNSKEIQTQLFLAPINDDPTFYDVLQIKK
YYEKTYYNCQILCEKDTKTGFLFGIGKFVKDYG YVWD TYDNYFCISQWYLRRISENINKL
RLGCNWQFIPVDEGWTE

【0 2 7 7】

配列番号42 (TeNT - UniProt P04958)

MPITINNFRYSDPVNNDTIIMMEPPYCKGLDIYYKAFKITDRIWIVPERYEFGTKPEDF
NPPSSLIEGASEYDPNYLRTDSDKDRFLQTMVKLFNRKNNVAGEALLDKIINAIPYLG
SYSLLDKFDTNSNSVSFNLLEQDPSGATTKSAMLTNLIIFGPGPVLNKNEVRGIVLRVDNK
NYFPCR DGFGSIMQMAFCPEYVPTFDNVIENTSLTIGKSKYFQDPALLMHELIHVLHGL
YGMQVSSHEIIPSKQEIMQHTYPISAEELFTFGGQDANLISIDIKNDLYEKTLDYKAIAN
KLSQVTSCNDPNIDISYKQIYQQKYQFDKDSNGQYIVNEDKFQILYNSIMYGFTIEELGK
KFNIKTRLSYFSMNHDPVKIPNLLDDTIYNDTEGFNIESKDLKSEYKGQNM RVNTNAFRN

10

20

30

40

50

VDGSGLVSKLIGLCKKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLGELCIKIKNEDLTFIAEKNSFSEEP
FQDEIVSYNTKNKPLNFNYSLDKIIVDYNLQSKITLPNDRTTPVTKGIPYAPEYKSNAASTI
EIHNIDDNTIYQYLYAQKSPTTLQRITMTNSVDDALINSTKIYSYFPSVISKVNQGAQGILF
LQWVRDIIDDFTNESSQKTTIDKISDVSTIVPYIGPALNIVKQGYEGNFIGALETGGVLL
EYIPEITLPVIAALSIAESSTQKEKIIKTIDNFLEKRYEKWIEVYKLVKAKWLGTVNTQFQK
RSYQMYRSLEYQVDAIKKIIDYEYKIYSGPDKEQIADEINNLLKNKLEEKANKAMININIFM
RESSRSFLVNQMINEAKKQLLEFDTQSKNILMQYIKANSKFIGITELKKLESKINKVFSTPI
PFSYSKNLDCWVDNEEDIDVILKKSTILNLDINNDIISDISGFNSSVITYPDAQLVPGINGK
AIHLVNNESEVIVHKAMDIEYNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQYGTNEYSIISMK
KHSLSIGSGWSVSLKGNNLIWTLKDSAGEVRQITFRDLPDKFNAYLANKWVFITITNDRL
SSANLYINGVLMGSAEITGLGAIREDNNTLKLDRCNNNNQYVVSIDKFRIFCKALNPKEIEK
LYTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYLIPVASSSKDVQLKNITDYMILTANPSYTNGKLN
YYRRLYNGLKFKIKRYTPNNEIDSFVKSGDFIKLYVSYNNNEHIVGYPKDGNAFNNLDRIL
RVGYNAPGIPLYKKMEAVKLRDLKTYSVQLKLYDDKNASLGLVGTHNGQIGNDPNRDILI
ASNWYFNHLKDKILGCDWYFVPTDEGWTND

【0278】

配列番号43 (核酸配列, L_HN/A1, EK切断部位付き)

atggagttcgttaacaaacagttcaactataaagacccagttaacggtgttgacattgcttacatcaaaatcc
cgaacgctggccagatgcagccggttaaaggcattcaaaatccacaacaaaatctgggttatcccggaaacgtg
atacctttactaaccggaagaaggtagctgaaccgcccaccggaagcgaaacaggtgccggtatcttacta
tgactccacctacctgtctaccgataacgaaaaggacaactacctgaaagggtgttactaaactgttcgagcgta
tttactccaccgacctgggcccgtatgctgctgactagcatcgttcgcggtatcccgttctggggcggttctacca
tcgataccgaactgaaagtaatcgacactaactgcataacgttattcagccggacggttcctatcgttccgaa
gaactgaacctggtgatcatcgggcccgtctgctgatatcatccagttcgagtgtgaagagctttggtcacgaagt
tctgaacctcaccgtaacggctacggttcactcagtagcatccgtttctctccgacttcaccttcggttttgaa
gaatccctggaagtagacacgaaccactgctgggcgctggtaaattcgcaactgatcctgcggttaccctgg
ctcacgaactgattcatgcaggccaccgacctgtacggtatcgccatcaatccgaaccgtgtcttcaaagttaac
accaacgcgtattacgagatgtccggtctggaagtttagcttcgaagaactgcgtacttttggcggtcacgacgc
taaattcatcgactctctgcaagaaaacgagttccgtctgtactactataacaagttcaaagatatcgcatccac
cctgaacaaagcgaaatccatcggtgggtaccactgcttctctccagtagcatgaagaacggttttaagaaaaat
acctgctcagcgaagacacctccggcaaatctctgttagacaagttgaaattcgataaactttacaaaatgctg
actgaaatttacaccgaagacaacttcgttaagttctttaagttctgaaccgcaaaacctatctgaacttcgac
aaggcagttatcaaaatcaacatcggtccgaaagtttaactacactatctacgatggtttcaacctgcgtaacac
caacctgggtgctaattttaacggccagaaacacggaaatcaacaacatgaacttcacaaaactgaaaaacttc
actggctgttgcaggttttaacagctgtgtgcGTCGACGGCATCATTACCTCCAAAATAAATCT
GACGATGACGATAAAAACAAAGCGCTGAACCTGCAGtgatatcaagggttaacaactgggatttatt
cttcagcccagtgaaagacaacttcaccaacgacctgaacaaagggtgaagaaatcacctcagatactaacatc
gaagcagccgaagaaaacatctcgtggtgacctgatccagcagtagctacacctgacctttaatttcgacaacgagc
cggaacacatttctatcgaaaacctgagctctgatcatcgccagctggaactgatgccgaacatcgaacg
tttcccaaacggtaaaaagtacgagctggacaaatataccatgttccactacctgcgcgcgaggaatttgaac
acggcaaatcccgtatcgactgactaactccgttaacgaagctctgctcaaccggtcccgtgtatacaccttct
tctctagcgactacgtgaaaaagggtcaacaaagcgactgaagctgcaatgttcttgggttgggttgaacagctt
gtttatgattttaccgacgagacgtccgaagtatctactaccgacaaaattgcggatatcactatcatcatcccg
tacatcggtccggctctgaacattggcaacatgctgtacaaagacgacttcgttggcgactgatcttctccgg
tgcggtgatcctgtgagttcatcccgaaatcgccatccgggtactgggcacctttgctctggtttcttacat
tgcaacaagggttctgactgtacaaacctcgacaacgcgtgagcaaacgtaacgaaaaatgggatgaagt
ttacaaatatatctgtgaccaactggctggctaagggttaatactcagatcgacctatccgcaaaaaaatgaaag
aagcactggaaaaccaggcggaagctaccaaggcaatcattaactaccagtacaaccagtacaccgaggaa
gaaaaaaacaacatcaacttcaacatcgacgatctgtctctaaactgaacgaatccatcaacaagctatgat
caacatcaacaagttcctgaaccagtgctctgtaagctatctgatgaactccatgatcccgtagcgtgttaaac

10

20

30

40

50

gtctggaggacttcgatgcgtctctgaaagacgccctgctgaaatacatttacgacaaccgtggcactctgatc
ggtcaggttgatcgctctgaaggacaaagtgaacaataccttatcgaccgacatcccttttcagctcagtaaata
tgtcgataaccaacgccttttgtccactctagaagcaCACCATCATCACcaccatcaccatcaccat

【0279】

配列番号44 (ポリペプチド配列, L_HN/A1, EK切断部位付き)

MEFVNKQFNYPKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMMPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGD
LNPPPEAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTCLFERIYSTD LGRMLLTSIVRGIPFW
GGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYG
STQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLL GAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGIAINPNRV
FKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASLTNKA
KSI VGTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNR
KTYLNFDAVKINIVPKVNYTIYDGFNLRTNLAANFNGQNTNINMNF TKLKNFTGLF
EFYKLLCVDGIITSKTKSDDDDKNKALNLQCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITS
D TNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIEFPNGKKYELDK
YTMFHYLRAQEFEGHKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGW
VEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIPIYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIP
EIAIPVLGTFALVSYIANKVLTQVTDNALS KRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRK
KMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQ
C SVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPF
QLSKYVDNQRLSTLEAHHHHHHHHHHH

【0280】

配列番号45 (核酸配列, BoNT, 天然A1ループ付き)

ATGAAACTGGAAATCAACAAATTCAACTACAACGATCCGATCGATGGCATTAAATGTT
ATTACCATGCGTCCGCCTCGTCATAGCGATAAAATCAATAAAGGTAAAGGTCCGTTCAA
AGCCTTTCAGGTGATTAAAAACATTTGGATTGTGCCGGAACGCTACAACCTTACCAATA
ATACCAACGATCTGAACATTCGAGCGAACCGATTATGGAAGCAGATGCCATTTATAAC
CCGAACTATCTGAATACCCCGAGCGAAAAAGATGAATTTCTGCAGGGTGTTATCAAAGT
GCTGGAACGCATTAAAAGCAAACCGGAAGGTGAAAAACTGCTGGAACGATTAGCAGCA
GCATTCCGCTGCCGCTGGTTAGCAATGGTGCCTGACCTGAGCGATAATGAAACCAT
GCATATCAAGAGAACAACAACATTGTGAGCAATCTGCAGGCAAACCTGGTTATTTATGG
TCCGGGTCTGATATTGCAAATAATGCAACCTATGGTCTGTATAGCACCCCGATTAGTA
ATGGTGAAGGTACACTGAGCGAAGTTAGCTTTAGCCGTTTTATCTGAAACCGTTTGAT
GAAAGCTATGGCAATTATCGTAGCCTGGTGAATATCGTGAACAAATTCGTGAAACGTGA
ATTTGCACCTGATCCGGCAAGCACCTGATGCATGAACTGGTTCATGTTACCCATAATC
TGTATGGTATTAGCAACCGCAACTTCTACTATAACTTTGACACCGGCAAATGAAACC
AGCCGTCAGCAGAATAGCCTGATTTTTGAAGAACTGCTGACCTTTGGTGGCATTGATAG
CAAAGCAATTAGCAGCCTGATCATCAAGAAAATTATCGAAACCGCCAAGAACAACTATA
CCACGCTGATTAGCGAACGCCTGAATACCGTTACCGTTGAAAATGATCTGCTGAAATAT
ATCAAAAACAAATCCCGGTTTCAGGGTCTGCTGGGTAACCTTTAACTGGATACCGCAGA
ATTCGAGAAAAAGCTGAATACCATTCTGTTTGTGCTGAACGAAAGCAATCTGGCACAGC
GTTTTAGCATTCTGGTTCGTAAACATTACCTGAAAGAACGTCCGATTGATCCGATTTAT
GTGAACATTCTGGATGACAATAGCTACAGCACCTGGAAGGTTTTAACATTAGCAGTCA
GGGTAGCAATGATTTCCAAGGTCAGCTGCTGGAAAGCAGCTATTTTGAAAAAATTGAAA
GCAATGCCCTGCGTGCCTTCATTAATCTGTCCGCGTAATGGTCTGCTGTATAATGCC
ATTTATCGCAACAGCAAAAATCTGGAAGTTCTGTTTCAGGGTCCGCATCATCACCACCA
TCACCATCATCATCACCTGGAAGTGTTATTTAGGGACCGTATCTGAATAACATTGATC
TGGAAGATAAAAAGACCACGAGCAAAACCAATGTTAGCTATCCGTGTAGCCTGCTGAAT
GGTTGTATTGAAGTTGAAAACAAAGACCTGTTCTGATTAGCAACAAAGATAGCCTGAA
CGATATTAACCTGAGCGAAGAAAAAATCAAACCGGAACACCGTGTTCTTCAAAGATA
AACTGCCTCCGCAGGATATTACGCTGAGCAATTATGATTTTACCGAAGCCAATAGCATT

10

20

30

40

50

CCGAGCATTAGCCAGCAGAACATTCTGGAACGTAATGAAGAACTGTATGAACCGATTCCG
CAATAGCCTGTTTGAAATCAAAACCATCTATGTGGATAAGCTGACCACCTTTTCATTTTC
TGGAAGCCCAGAATATTGATGAGAGCATTGATAGCAGCAAAATTCGTGTTGAACTGACC
GATAGCGTTGATGAAGCACTGAGCAATCCGAATAAAGTTTATAGCCCGTTCAAGAACAT
GAGCAACACCATTAATAGCATTGAAACCGGTATTACCAGCACCTACATCTTTTATCAGT
GGCTGCGTAGCATCGTGAAAGATTTTAGTGATGAAACCGGCAAAATCGACGTGATTGAT
AAAAGCAGCGATACCTGGCAATTGTTCCGTATATTGGTCCGCTGCTGAATATTGGTAA
TGATATTTCGTCATGGCGATTTTGTGGGTGCAATTGAACTGGCAGGCATTACCGCACTGC
TGGAATATGTTCCGGAATTTACCATTCCGATTCTGGTTGGTCTGGAAGTGATTGGTGGC
GAACTGGCACGTGAACAGGTTGAAGCAATTGTTAATAATGCCCTGGATAAACGCGATCA
GAAATGGGCAGAAAGTTTACAATATTACCAAAGCACAGTGGTGGGGCACCATTTCATTTAC
AGATTAATACCCGTCTGGCCCATACCTATAAAGCCCTGAGCCGTCAGGCAAATGCCATT
AAAATGAATATGGAATTTTCAGCTGGCCAACTACAAAGGCAACATTGATGATAAAGCCAA
GATCAAAAACGCCATCAGCGAAACCGAAATTCTGCTGAACAAAAGCGTTGAACAGGCCA
TGAAAAACACCGAGAAATTCATGATTAACTGAGCAACAGCTACCTGACCAAAGAAATG
ATTCCGAAAGTTCAGGACAACCTGAAAAACTTTGACCTGGAAACCAAAAAAACCTGGA
CAAGTTCATCAAAGAGAAAGAAGATATCCTGGGCACCAATCTGAGCAGCAGCCTGCGTC
GTAAAGTTAGCATTTCGTCTGAATAAAAACATTGCCTTCGACATCAACGATATCCCGTTT
AGCGAATTTGATGATCTGATCAACCAGTACAAAAACGAGATCGAAGATTATGAAGTGCT
GAATCTGGGTGCAGAAAGATGGCAAAATCAAAGATCTGAGCGGTACAACCAGCGATATCA
ATATTGGTTCAGATATCGAACTGGCCGATGGTCGTGAAAATAAAGCCATTAAGATTAA
GGCAGCGAGAACAGCACCATCAAAATTGCAATGAACAAATATCTGCGTTTTAGCGCCAC
CGATAACTTTAGCATTAGCTTTTGGATCAAACATCCGAAACCGACCAATCTGCTTAATA
ACGGTATTGAATATACCTGGTCGAGAACTTTAATCAGCGTGGTTGGAAAATTAGCATC
CAGGATAGCAAACCTGATTTGGTATCTGCGCGATCACAATAACAGCATCAAAATCGTTAC
ACCGGATTATATTGCGTTTAATGGCTGGAACCTGATCACCATTACGAATAATCGTAGCA
AAGGCAGCATCGTGTATGTGAATGGTAGCAAAATTGAAGAGAAGGACATTAGCAGCATT
TGGAATACCGAAGTGGATGATCCGATTATCTTCCGCCTGAAAAATAACCGTGATACCCA
GGCATTACCTGCTGGATCAGTTTAGCATTATTCGGAAGAAGTGAACCAGAACGAAG
TGGTGAACTGTATAACTACTACTTCAACAGCAACTACATTCGCGATATTTGGGGTAAT
CCGCTGCAGTACAACAAAAAATACTATCTGCAGACCCAGGACAAACCTGGTAAAGGTCT
GATCCGCGAATATTGGAGCAGCTTTGGTTATGATTATGTGATTCTGAGCGATAGCAAGA
CGATTACCTTTCCGAACAATATCCGTTATGGTGCCCTGTATAACGGTAGCAAAGTTCTG
ATCAAGAACAGCAAGAAATTAGATGGTCTGGTGCGCAATAAAGATTTTCATTTCAGCTGGA
AATCGATGGCTATAATATGGGTATTAGCGCAGATCGCTTTAACGAGGATACCAACTATA
TTGGCACCCACTATGGTACAACCCATGATCTGACCACCGATTTTGAATTTATTCAGCGC
CAAGAGAAATACCGCAATTATTGTCAGCTGAAAACCCCGTATAACATCTTTCATAAAAG
CGGTCTGATGAGCACCGAAACCGACAAACCGACCTTCCATGATTATCGCGATTGGGTTT
ATAGCAGCGCATGGTATTTTCAGAACTATGAAAATCTGAACCTGCGCAAACATACCAAA
ACCAACTGGTATTTTATCCCGAAAGATGAAGTTGGGACGAAGAT

10

20

30

40

【0281】

配列番号46 (ポリペプチド配列, BoNT, 天然A1ループ付き)

MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIKNIWIVPERYNFTNN
TNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTTPSEKDEFLQGVIKVLERIKSKPEGEKLELISSSIPLP
LVSNGALTLSDNETIAYQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTLS
EVSFSPFYLPKFDESYGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHELVHVTHNLYGISNRN
FYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGIDSKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTV
ENDLLKYIKNKIPVQGR LGNFKLDTAEFKKLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKHYLKERPI
DPIYVNILDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGQLLESSYFEKIESNALRAFIKICPRNGLLYN
AIYRNSKNLEVLFFQGP HHHHHHHHHHLEVLFFQGPYLN NIDLEDKKTTSKTNVSYP C SLL

50

NGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSI
SQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEAL
SNPNKVYSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLRISIVKDFSDETGKIDVIDKSSDTLAIVP
YIGPLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPILVGLEVIGGELAREQVEAIVNNA
LDKRDQKWAEVYNITKAQWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKG
NIDDKAKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTKFMIKLSNSYLTKE MIPKVQDNLKNFDLET
KKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIEDYEV
LNLGAEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIELADGRENKA IKIKGSENSTIKIAMNKYLRF SATDN
FSISFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLRDHNN SIKIVTPDYI
AFNGWNLITITNNRSKGSIVYVNGSKIEEKDISSIWNTEVDDPIIFRLKNNRDTQAFTLLD
QFSIYRKELNQNEVVKLYNYFFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREYWSS
FGYDYVILSDSKTITFPNNIRYGALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNKDFIQLEIDGYNMGISA
DRFNEDTNYIGTTYGTTDHLTTDFEIIQRQEKYRNYCQLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTF
HDYRDWVYSSAWYFQNYENLNLRKHTKTNWYFIPKDEGWDED

【0282】

配列番号47 (ポリペプチド配列, Trypsin)

MHPLLILAFVGA AVAFPSDDDDKIVGGYTCAENSVPYQVSLNAGYHFCGGS LINDQWV
VS AAHCYQYHIQVRLGEYNIDVLEGGEQFIDASKIIRHPKYSSWTLDNDILLIKLSTPAVI
N ARVSTLALPSACASGSTEC LISGWGNTLSSGVNYPDLLQC LEAPLLSHADCEASYPGEIT
NNMICAGFLEGGKDSCQGD SGGPVACNGQLQGIVSWGYGCAQKGKPGVYTKVCNYVDW
IQ ETIAANS

【0283】

配列番号48 (ポリペプチド配列, Lys-C)

G V S G S C N I D V V C P E G N G H R D V I R S V A A Y S K Q G T M W C T
G S L V N N S A N D K K M Y F L T A N H C G M T T A A I A S S M V V Y W N
Y Q N S T C R A P G S S S S G A N G D G S L A Q S Q T G A V V R A T N A A S
D F T L L E L N T A A N P A Y N L F W A G W D R R D Q N F A G A T A I H H P
N V A E K R I S H S T V A T E I S G Y N G A T G T S H L H V F W Q A S G G V T
E P G S S G S P I Y S P E K R V L G Q L H 211 G G P S S C S A T G A D R S D Y
Y G R V F T S W T G G G T S A T R L S D W L D A A G T G A Q F I D G L D S T G T P P V

【0284】

配列番号49 (ポリペプチド配列, エンテロキナーゼ軽鎖)

IVGGSDSREGAWPWVVALYFDDQQVCGASLVSRDWLVSAAHCVYGRNMEPSKWKAV
LGLHMASNL TSPQIETRLIDQIVINRHYNKRRKNNDIAMMHLEMKVNYTDYIQPICLPEE
NQVFPPGRICSIAGWGALIQGSTADVLQEADVPLLSNEKCQQQMPEYNITENMVCAGY
DAGGVDSCQGD SGGPLMCQENNRWLLAGVTSFGYQCALPNRPGVYARVPRFTEWIQSF
LH

【0285】

配列番号50 (ポリペプチド配列, 第Xa因子重鎖)

IVGGRDCAEGECPWQALLVNEENEGFCGGTILNEFYVLTAAHCLHQAKRFTVRVGDRN
TEQEEGNEMAHEVEMTVKHSRFVKETYDFDIAVLRLKTPIRFRRNVAPACLPEKD WAEA
TLMTQKTGIVSGFGRTHEKGRLSSTLKMLEVPYVDRSTCKLSSSFTITPNMFCAGYDTQP
EDACQGD SGGPHVTRFKD TYFVTGIVSWGEGCARKGKFGVYTKVSNFLKWIDKIMKARA
GAAGSRGHSEAPATWTVPPPLPL

【0286】

配列番号51 (ポリペプチド配列, 第Xa因子軽鎖)

ANSFLEE VKQGNLERECLEEEACSL EEAREVFEDAEQTDEFWSKYKDG DQCEGHPCLNQ
GHCKDGIGDYTCTCAEGFEGKNCE FSTREICSLDNGGCDQFCREERSEVRCSCAHGYVLG
DDSKSCVSTERFPCGKFTQGRS

【0287】

10

20

30

40

50

配列番号52 (ポリペプチド配列, Anthrax Toxin Protective Antigen - NCBI Ref Seq: NP_052806)

1 mkkrrkvlipl malstilvss tgnleviqae vkqenrllne sesssqgllg yyfsdlnfqa
61 pmvvtsttgg dlsipssele nipsenqyfz saiwsqfikk kksdeytfat sadnhvtmwv
121 ddqevinkas nsnkirlekq rlyqikiqqy renptekgld fklywtdsqn kkevisssnl
181 qlpelkqkss nsrkkrtsa gtpvprdrnd gipdsleveg ytvdvknkrt flspwisnih
241 ekkgltkyks spekwestasd pysdfekvtg ridknvspea rhplvaaypi vhdvmeniil
301 sknedqstqn tdsqtrtisk ntstsrthts evhgnaevha sffdiggsvs agfsnsnsst
361 vaidhsllsa gertwaetmg lntadtarl n aniryvntgt apiynvlptt slvlgknqtl
421 atikakenql sqilapnnyy psknlapial naqddfsstp itmnyngfle lektkqlrld
481 tdqvygniat ynfengrvrv dtgsnwsevl ppiqettari ifngkdlnlv erriaavnps
541 dplettkpdm tlkealkiaf gfnepnngnlq yqgkditefd fnfdqqtqn iknqlaelna
601 tniyvtldki klnakmnili rdkrfhydrn niavgadesv vkeahrevin ssteglllni
661 dkdirkilsg yiveiedteg lkevindryd mlnisslrqd gktfidfkky ndklplyisn
721 pnykvnyvav tkentiinps engdtstngi kkilifskkg yeig

[0288]

配列番号53 (LH_N/A, C1活性化ループ付き)

[化3]

SEQ ID NO: 53 (LH_N/A with a C1 Activation Loop)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNVGQMOPVKAFKIHNKIWIPIPERDTFTNPEEGDLN
PPPEAKQVPVSYDSTYLSTDNEDNYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGG
STIDTELKVIDTNCINVIQPDGSRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGY
GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAKEFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAPNPN
RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIASTLNKA
KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKV
LNRKTYLNFDAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLNNTNLAANFNGQNTNINNMNFTKLKNFT
GLFEFYKLLCHKAIDGRSLYNKTLDCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEE
ITSNTNIEAAEENISLDLIQYYLTFNFDNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIEFNPNG
KKYELDKYTMFHYLRAQEFEGHKSRIALTNVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSG
AVILLEFIPEIAIPVLGTALVSYIANKVLTVTQIDNALSKEKWDDEVYKYIVTNWLAK
VNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKA
MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRDKDK
VNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTTEYIK

[0289]

配列番号54 (LH_N/B, C1活性化ループ付き)

[化4]

SEQ ID NO: 54 (LH_N/B with a C1 Activation Loop)

MPVTINNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGRIYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKPEDFN
KSSGIFNRDVCEYYDPDYLNNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLEMIINGIPYLG
DRRVPLEEFNTNIASVTNKLISNPGEVERKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQNH
FASREGFGGIMQMKFCPEYVSFNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALILMHელიHVLHGLY
GIKVDLPIVPNEKKFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNFGRIV
DRLNKVLVCISDPNININIKNFKDKYKFVEDSEKYSIDVESFDKLYKSLMFGFTETN
IAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIIEGFNISDKDMEKEYRGQNKAINKQA
YEEISKEHLAVYKIQMCHKAIDGRSLYNKTLDCIDVDNEDLFFIADKNSFSDLSKNERIEYNTQSNYIENDFPI
NELILDLDLISKIELPSENTESLTDENVDPVYKQPAIKKIFTDENTIFQY
LYSQTFPLDIRDISLTSSFDALLFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAQVWKQIVND
FVIEANKSNTMDKIADISLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFEIAGASILLEFIPELLI
PVVGAFLLESYIDNKNKIIKTIDNALTNRNEKWSMDYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMY
KALNYQAQALEEIIKYRYNIYSEKEKSNINIDFNDINSKLNIGINQAIDNINNFINGCSV
SYLMKKMIPLAVEKLLDFDNTLKNLLNYIDENKLYLIGSAEYKSKVNKYLKTIMPFDL
SIYTNDTILIEFMFNKYN

10

20

30

40

50

【0290】

配列番号55 (LH_N/D, C1活性化ループ付き)

【化5】

SEQ ID NO: 55 (LH_N/D with a C1 Activation Loop)

MTWPKVDFNYSDPVNDNDILYLRIPOQNKLIITPVKAFMITQNIWVIPERFSSDTNPSSLK
PPRPTSKYQSYDPSYLSSTDEQKDTFLKGIKLFKRINERDIGKKLINYLTVGSPFMGDS
STPEDTFDFTRHTTNIAVEKFENGSKVNTNIITPSVLIFGPLPNILDYASLTQQQQSN
PSFEGFGTSLILKVAPEFLLTFSDVTSNQSSAVLGKSIFCNDPVIAMHETHSLHQLYG
INIPSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLDVEIIPQIERSQLREKALGHYKDI
AKRLNNINKTIPSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDDKNTGNFVNVNIDKFNSLYSDLTNVMS
VVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIRDGFNLTKGFNIENSGQNIERNPA
LQKLSSSESVVDLFTKVCHKAIDGRSLYNKTLDCIKVKNRNPYVADKDSISQEIFENKIITDE
TNVQNYSDKFSLDSEILDGQVPINPEIVDPLLPNVNMEPLNLPGEIIVFYDDITKYVDYL
NSYYLESQKLSNNVENITLTSVEEALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKGQAGLFNLANE
VVEDFTTNIMKKDLDKISDVSVIIPYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGGFP
EFTIPALGVFTFYSSIQEREKIIKTIENCLEQVRKRWKDSYQWMVSNWLSRITTFQFNHIN
YQMYDSLSYQADAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDKISEAMNNINKFIR
ECSVTYLFKNMPLPKVIDELNKFIDLRTKTELINLIDSHNIIIVGEVDRLKAKVNESFENTM
PFNIFSYTNNSSLKDIINEYFN

10

【0291】

配列番号56 (LH_N/E, C1活性化ループ付き)

【化6】

SEQ ID NO: 56 (LH_N/E with a C1 Activation Loop)

MPKINSFNNDPVNDRTILYIKPGGCQEFYKSFNIMKNIWIIPERNVIGTTPQDFHPPTS
LKNQDSSYYDPNYLQSDDEKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANPYLGNNTNP
DNQFHIGDASAVEIKFSNGSQDILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISLRNNYMPSNHRFGS
IAIVTFSPEYSFRFNDNCMNEFIQDPALTMHELIIHSLHGLYGAKGITTKYTITQKQNPL
ITNIRGTNIEEFLTFGGTDLNIIITSAQSNDIYTNLLADYKKIASKLSKVQVSNPLLNPKY
DVFEAKYGLDKDASGIYSVNINKFNDIFKKLYSFTFEFLRTKFQVKCRQTYIGQYKYFKL
SNLNDISIYNISEGYNINNLKVNFRGQANLNPRIITPITGRGLVKKIIRF
CHKAIDGRSLYNKTLDCIEINNGELFFVASENSYNDNINTPKEIDDTVTSSNNYENDLDQVILNFNSESAPGLS
DEKLNLTIQNDAYIPKYDSNGTSDIEQHDVNEINLVFFYLDAQVPEGENNVNLTSS
IDTALLEQPKIYTFSSSEFINNVNPKPVQAALFVSWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIADIS
IVVPYIGLALNIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFEPELLIPTILVFTIKSFLGSSDNK
NKVIKAINNALKERDEKWKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNVNAIKTIE
SKYNSYTLKKNELTNKYDIKQIENELNQKVSAMNNIDRFLTESSISYLMKIINEVKIN
KLREYDENVKTYLLNYIIQHGSILGESQQELNSMVTDTLNNISIPFKLSSYTDDKILISYF
NKFFK

30

【0292】

配列番号57 (LH_N/F, C1活性化ループ付き)

40

【化 7】

SEQ ID NO: 57 (LH_N/F with a C1 Activation Loop)

MPVVINSFNNDPVNDDTILYMQIPYEEKSKKYYKA FEIMRNVWII PERNTIGTDPSDFD
PPASLENGSSAYYDPNYLTDAEKDRYLKTTIKLFKRINSNPAGEVLLQEISYAKPYLGN
EHTPINEFHFPVTRTTSVNIKSSTNVKSSIIILNLLVLGAGPDIFENS SYPVRKLMDSGGVY
DPSNDGFGSINIVTFSPEYEYTFNDISGGYNSSTESFIADPAISLAHELIALHGLYGAR
GVTYKETIKVKQAPLMIAEKPIRLEEFLTFGGQDLNIITSAMKEKIYNNLLANYEKIATR
LSRVNSAPPEYDINEYKDYFQWKYGLDKNADGSYTVNENKFNEIYKKLYSFT EIDLANKF
KVKCRNTYFIKYGFLKVPNLLDDDIYTVSEGFNIGNLAVNNRGQNIKLNPKIID SIPDKG
LVEKIVKFCHKA IDGRSLYNKTLDCIRVNNRELFVASESSYNENDINTPKEIDDTN LN
NNYRNNLDEVILDYNSETIPQISNQT LNTLVQDDSYVPRYDSNGTSEIEEHNVDLNVFF
YLHAQKVPEGETNISLTSSIDTALSEE SQVYTFSSFEFINTINKPVHAALFISWINQVIR
DFTTEATQKSTFDKIADISLVVPYVGLALNIGNEVQKENFKEAFELLGAGILLEFVPELL
IPTILVFTIKSFIGSSENKNKIIKAINNSLMERETKWKEIYSWIVSNWLTRINTQFNKRK
EQMYQALQNQVDAIKTVIEYKYNNTSDERNRLESEYNINNIREELNKKVSLAMENIERF
ITESSIFYLMKLINEAKVSKLREYDEGVKEYLLDYISEHRSILGNSVQELNDLVSTLNN
SIPFELSSYTNDKILILYFNKLYK

10

【0 2 9 3】

配列番号 58 (LH_N/G, C1 活性化ループ付き)

【化 8】

20

SEQ ID NO: 58 (LH_N/G with a C1 Activation Loop)

MPVNIKXFNYNDPINNDDIIMMEPFNDPGPGTYKAFRIIDRIWIVPERFTYGFQPDQFN
ASTGVFSKDVYEYDPTYLKTDAEKDKFLKTMIKLFNRINSKPSGQRLLDMIVDAIPYLG
NASTPPDKFAANVANVSINKKIIQPGAEDQIKGLMTNLIIFGPGPVLSDNFTDSMIMNGH
SPISEGFARMIRFCPSCLNVFNQENKDT SIFSRRAYFADPALTMHELIVHLHGLY
GIKISNLPITPNTKEFFMQHSDPVQAEELYTFGGHDPSVISPSTDMNIYNKALQNFQDIA
NRLNIVSSAQGSGIDISLYKQIYKNKYDFVEDPNGKYSVDKDKFDKLYKALMF'GFTETNL
AGEYGIKTRYSYFSEYLPPIKTEKLLDNTIYTQNEGFNIASKNLKTEFNGQNKAVNKEAY
EEISLEHLVIYRIAMCHKA IDGRSLYNKTLDCIIVNNEDLFFIANKDSFSKDLAKAETIAYN
TQNNTIENNF SIDQLILDNDLSSGIDL PNENTEPFTNFDDIDIPVYIKQSALKKIFVDGD
SLFEYLHAQTFPSNIENLQLTNSLNDALRNNNKVYTFSTNLVEKANTVVGASLFVNWVK
GVIDDFTSESTQKSTIDKVS DVSIIIPYIGPALNVGNETAKENFKNAFEIGGAAILMEFI
PELIVPIVGFFTLESYVGNGKHIIMTISNALKKRDQKWTDMYGLIVSQWLSTVNTQFYTI
KERMYNALNNQSQAIEKIIEDQYNRYSEEDKMNIINIDFNDIDFKLNQ SINLAINNIDDFI
NQCSISYLMNRMIPLAVKKLKDFDDNLKRD LLEYIDTNELYLLDEVN ILKSKVNRHLKDS
IPFDLSLYTKDTILIQVFNNYIS

30

【0 2 9 4】

配列番号 59 (LH_N/TeNT, C1 活性化ループ付き)

40

50

【化 9】

SEQ ID NO: 59 (LH_N/TeNT with a C1 Activation Loop)

MPITINNFRYSDPVNNDTIIMMEPPYCKGLDIYYKAFKITDRIWIVPERYEFGTKPEDFN
 PPSSLIEGASEYYDPNYLRTDSKDRFLQTMVKLFNRIKNNVAGEALLDKIINAIPYLG
 SYSLLDKFDTNSNSVSFNLLEQDPGATTKSAMLNLIIIFGPGPVLNKNEVRGIVLRVDN
 KNYFPCRDGFGSIMQMAFCPEYVPTFDNVIEINITSLTIGKSKYFQDPALLMHელიHVLH
 GLYGMQVSSHEIIPSKQEIYMQHTYPISAEELFTFGGQDANLISIDIKNDLYEKTNDYK
 AIANKLSQVTSCNDPNIDIDSYKQIYQQKYQFDKDSNGQYIVNEDKQILYNSIMYGTE
 IELGKKFNIKTRLSYFSMNHDPVKIPNLLDDTIYNDTEGFNIESKDLKSEYKQNMVRNT
 NAFRNVGDGSLVSKLIGLCHKAIDGRSLYNKTLDCIKIKNEDLTFIAE
 KNSFSEEPFQDEIVSYNTKNKPLNFNYSLDKIIVDYNLQSKITLPNDRTTPVTKGIPYAP
 EYKSNAASTIEIHNDNTIYQYLYAQKSPTTLQRITMTNSVDDALINSTKIYSYFPSVI
 SKVNQGAQGIQLFQWVRDIIDDFTNESQKTTIDKISDVSTIVPYIGPALNIVKQGYEGN
 FIGALETTGVVLLLEYIPEITLPVIAALSIAESSTQKEKIIKTIDNFLEKRYEKWIEVYK
 LVKAKWLGTVNTQFQKRSYQMYRSLEYQVDAIKKIIDYEYKIYSGPDKEQIADENNLKN
 KLEEKANKAMININIFMRESSRSFLVNQMINEAKKQLLEFDTQSKNILMQYIKANSKFIG
 ITELKKLESKINKVFSTPIPFSSYKNLDCWVDNEEDIDV

10

【0 2 9 5】

配列番号 60 (LH_N/X, C1 活性化ループ付き)

【化 1 0】

20

SEQ ID NO: 60 (LH_N/X with a C1 Activation Loop)

MKLEINKFNNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIKNIWIVPERYNFTNNT
 NDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPSEKDEFLQGVIKVLERIKSKPEGEKLELISSSIP
 LPLVSNAGLTLSNETIAYQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEG
 TLSEVSFSFPYLFKPFDESIGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHELHVHVTNLYGIS
 NRNFYYNFDTGKIETSRQNSLIFEELLFTFGGIDSKAISSLI IKKIIETAKNNYTTLISE
 RLNTVTVENDLLKYIKNKIPVQGRGLGNFKLDTAEFEKKLNTILFVLNESNLAQRFSILVR
 KHYLKERPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGLLESSYFEKIESNALRAFI
 KICHKAIDGRSLYNKTLDCIEVENKDLFLISN
 KDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKDKLPQDITLSNYDFTANSIPSISQQNILERNEELY
 EPIRNSLFEIKTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYSPF
 KNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLRISIVKDFSDETGKIDVIDKSSDTLAIVPYIGPLN
 GNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPILVGLVIGGELAREQVEAIVNNALDKRD
 QKWADEVYNITKAQWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGNIDDKAK
 IKNAISETTEILLNKSVEQAMKNTTEKFMIKLSNSYLTKEMIPKVQDNLKNFDLETKKTLDK
 FIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIEDYEVLNL
 GAEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIE

30

【実施例】

【0 2 9 6】

材料および方法

【0 2 9 7】

材料

40

【0 2 9 8】

- ・ 5ml HiTrap ブチル HP (GE 番号: 28411005)
- ・ 5ml HiTrap Q HP (GE 番号: 17-1154-01)
- ・ 5ml HiTrap フェニル HP カラム (GE 番号 17-5195-01)
- ・ CHT II 型 カラム (Biorad 番号 7324756)
- ・ TrypZean (Sigma 番号 T3568)
- ・ Lys-C (Sigma 番号 000000011047825001)
- ・ エンテロキナーゼ、軽鎖 (NEB 番号 P8070)
- ・ 第 Xa 因子 (NEB 番号 P8010)
- ・ ACQUITY UPLC タンパク質 BEH C4 カラム (Waters 番号 186004495)

50

【0299】

タンパク質精製

【0300】

タンパク質発現のために大腸菌(E.coli)BL21(DE3)またはNiCo(DE3)(NEB)を利用した。一般に、細菌を誘導まで37℃で培養し、温度を16℃に低下させ、1mM IPTGを用いて一晚タンパク質発現を誘導した。

【0301】

C1ループを有するBoNT/AC(配列番号13)

【0302】

溶解バッファー(50mM Tris-HCl pH=8)中で細菌ペレットを超音波処理によって粉碎し、遠心分離によって清澄化した。硫酸アンモニウム濃度を1.3Mに調整し、ブチルHP樹脂(GE)を使用して標的タンパク質を捕捉した。標的タンパク質を含有する画分を脱塩し、Q HP樹脂(GE)上にロードした。精製されたタンパク質を、4℃で6 µg/1mgBoNTの第Xa因子(NEB)を用いて一晚活性化し、続いて、フェニルHP樹脂(GE)を使用してポリッシングした。

10

【0303】

C1ループを有するBoNT/E(配列番号11)

【0304】

溶解バッファー(100mMリン酸ナトリウムpH=7.8、100mM NaCl)中で細菌ペレットを超音波処理によって粉碎し、遠心分離によって清澄化した。硫酸アンモニウム濃度を1.25Mに調整し、ブチルHP樹脂(GE)を使用して標的タンパク質を捕捉した。標的タンパク質を含有する画分を脱塩し、Q HP樹脂(GE)上にロードした。精製されたタンパク質を、4℃で5 µg/1mgBoNTの第Xa因子(NEB)を用いて、または80U/mlのエンテロキナーゼ(NEB)を用いて一晚活性化し、続いて、CHT II型樹脂(Biorad)を使用してポリッシングした。

20

【0305】

BoNT/X(配列番号5)

【0306】

溶解バッファー(50mM Tris-HCl pH=8)中で細菌ペレットを超音波処理によって粉碎し、遠心分離によって清澄化した。標的タンパク質を、HisTrap HPカラム(GE)を使用して捕捉した。標的タンパク質を含有する画分を脱塩し、Q HP樹脂(GE)上にロードした。精製されたタンパク質を、4℃で5 µg/1mgBoNTの第Xa因子(NEB)を用いて、または80U/mlのエンテロキナーゼ(NEB)を用いて一晚活性化し、続いて、1mlのHisTrapカラム(GE)を使用してポリッシングした。

30

【0307】

LC/MS

【0308】

分析の前に、サンプルを50mM重炭酸アンモニウムにバッファー交換した。サンプルは、インタクトのタンパク質であるか、または37℃で30分間の10mM DTTとともインキュベーションによって還元した。サンプルを、Waters Xevo G2-XS QToF質量分析計と組み合わせたWaters Acquity H-Class UPLCシステムを使用して試験した。

40

- ・移動相A 水中、0.1%ギ酸

- ・移動相B アセトニトリル中、0.1%ギ酸

- ・カラム:ACQUITY UPLCタンパク質BEH C4(Waters)

【0309】

[実施例1]

【0310】

BoNT/C1活性化ループは、複数のプロテアーゼによって切断され得る

【0311】

不活性BoNT/C1(0)(配列番号15)を、一連のプロテアーゼ、即ち、トリプシン、Lys-C、エンテロキナーゼおよび第Xa因子とともにインキュベートした。すべてのプロテアーゼ

50

が、活性化ループ内での切断を示した。BoNT/C1(0)(配列番号15)を、エンテロキナーゼ(EK)または第Xa因子(FXa)を用いて4℃および25℃で一晩消化した。さらに、BoNT/C1(0)を、トリプシンで20℃で16時間の時間経過をかけて消化した(図2A、B)。3種のプロテアーゼすべてが、プロテアーゼ未処置対照と比較した場合に、BoNT/C1活性化ループを切断し、二本鎖分子を作出できる。しかし、トリプシンおよびLys-C消化後にさらなる切断生成物を視認できた。

【0312】

[実施例2]

【0313】

BoNT/Xタンパク分解性活性化の特性決定および改善

10

【0314】

部分精製された野生型BoNT/X-10HT(配列番号34)を、4℃で漸増量のトリプシン(TrypZean)およびLys-Cならびに第Xa因子(FXa)およびエンテロキナーゼ(EK)とともに一晩インキュベートした。

【0315】

図3は、野生型BoNT/Xが、Lys-C(図3A)およびトリプシン(図3B、レーン12~13および15~17)の両方によって完全に分解されたことを示す。注目すべきことに、FXaおよびEKは、タンパク質を、二本鎖形態に切断できなかった(図3B、それぞれ、レーン18および19)。

【0316】

20

BoNT/Xの活性化を改善しようとして、BoNT/X活性化ループを、BoNT/C1活性化ループ(配列番号2)によって置き換え、改変BoNTタンパク質配列番号5を作出した。改変BoNTを、いくつかのクロマトグラフィーステップを使用して精製し、エンテロキナーゼ(EK)または第Xa因子(FXa)を用いて処置し、BoNT/Cループの存在が、二本鎖分子の生成を可能にすることを確認した。驚くべきことに、図4は、EKおよびFXaが、改変BoNT/Xを特異的に切断して、二本鎖形態にすることを示す。

【0317】

[実施例3]

【0318】

BoNT/Eタンパク分解性活性化の特性決定および改善

30

【0319】

野生型BoNT/Eを、Lys-Cおよびトリプシン(TryZean)を用いて切断した。図5Aは、Lys-Cが、BoNT/Eを不正確に切断/分解することを示す。トリプシンを用いる処置は、BoNT/Eの短縮化をもたらし、これは、全長タンパク質を短縮化生成物から分離するためにさらなる精製ステップが必要であったことを意味する(図5B)。

【0320】

BoNT/Eの活性化を改善しようとして、BoNT/E活性化ループを、BoNT/C1活性化ループ(配列番号2)によって置き換え、改変BoNTタンパク質配列番号11を作出した。改変BoNTを、いくつかのクロマトグラフィーステップを使用して精製し、エンテロキナーゼ(EK)または第Xa因子(FXa)を用いて処置し、BoNT/Cループの存在が、二本鎖分子の生成を可能にすることを確認した。驚くべきことに、図6は、EKおよびFXaが、改変BoNT/Eを特異的に切断して、二本鎖形態にすることを示す。

40

【0321】

[実施例4]

【0322】

BoNT/A1C1キメラのタンパク分解性活性化

【0323】

タンパク分解性タンパク質活性化を容易にするために、BoNT/Cループを、(LHN/A1とC1 H₂ドメインとの)BoNT/A1C1キメラ中に導入した。BoNT/A1C1のBoNT/A1活性化ループを、BoNT/C1ループと置き換え、改変BoNTタンパク質配列番号13を作出した。改

50

変BoNTをいくつかのクロマトグラフィーステップを使用して精製し、第Xa因子(FXa)を用いて処置して、BoNT/Cループの存在が、二本鎖分子の生成を可能にすることを確認した。図7Aは、FXaが、改変BoNT/A1C1を特異的に切断して、二本鎖形態にすることを示す。比較目的で、A1活性化ループを含有する野生型Met BoNT/A1(Metabionics A108 0116から市販されている)を、FXaおよびEKとともにインキュベートした。図7Bは、FXaはA1活性化ループを切断せず、EKは最小活性でのみ切断し、FXaおよびEKの両方とも、追加の不適当な切断生成物(分解生成物)の形成をもたらすことを示す。

【0324】

[実施例5]

【0325】

C1ループを含有するBoNTは、SNARE切断活性を保持する

【0326】

ラット一次皮質ニューロンを、BoNT/C1活性化ループを含有する実施例4のBoNT/A1C1(配列番号13)を用いて24時間処置し、組換えBoNT/C1(配列番号17)を精製した。インキュベーション後に、塩化カリウムによって刺激された細胞からのSNARE依存性グルタミン酸放出を測定した(図8)。これらのデータによって、BoNT/C1活性化ループを含むように修飾されたクロストリジウム神経毒の活性が確認される。

【0327】

[実施例6]

【0328】

第Xa因子およびエンテロキナーゼは、同一部位IDGR↓SLでBoNT/C活性化ループを切断する

【0329】

BoNT/C1ループ(配列番号11)を含有する精製されたBoNT/Eを、エンテロキナーゼまたは第Xa因子プロテアーゼのいずれかによって活性化し、10mM DTTとともにインキュベートして、ジスルフィド橋を還元し、軽鎖および重鎖を分離した。インタクトタンパク質質量の液体クロマトグラフィ-質量分析による分析を、還元および非還元改変BoNT/E(配列番号11)サンプルで実施して、両プロテアーゼの切断部位をマッピングした。両プロテアーゼとも、BoNT/Eを切断して、同一の大きさの軽鎖および重鎖を生成し、これは、エンテロキナーゼおよび第Xa因子の両方とも、同一部位で切断することを示した(表1)。

【表1】

表 1. C-ループ内の IDGR↓SL 部位での切断後の改変 BoNT/E(配列番号 11)の予測質量および測定質量の比較。重鎖質量は、エンテロキナーゼおよび第 Xa 因子両方による予測部位での切断を示す。

	予測された理論質量 [Da]	EK 切断後の実測質量 [Da]	FXa 切断後の実測質量 [Da]
インタクト分子	143952	143853 (Fig.9)	143850 (Fig.11)
軽鎖	47633	47518 (Fig.10)	47518 (Fig.12)
重鎖	96337	96338 (Fig.10)	96335 (Fig. 12)

【0330】

比較例7

【0331】

内因性ループへのプロテアーゼ認識部位の挿入

【0332】

BoNT/C1活性化ループは、部位特異的プロテアーゼFXa(および驚くべきことにEK)の

天然に存在する切断部位を含有する唯一のBoNT活性化ループである(図1を参照されたい)。すべての他のループは、非特異的プロテアーゼ、例えば、トリプシンまたはLys-Cによって切断される。Lys-Cおよびトリプシンによる切断は、切断部位が、特定の認識配列よりもプロテアーゼ到達性によって決定されるので、望まれないタンパク質短縮化につながることが多い。

【0333】

各血清型に由来する天然活性化ループは、プロテアーゼ到達性を可能にし、クロストリジウムによって毒素を二本鎖形態にプロセッシングするように進化した。理論に捉われようとは思わないが、これらのループを、プロテアーゼ認識部位を作出するように突然変異させることは、コンホメーション変化につながる可能性があり、これは切断効率に負の影響を及ぼし得ると考えられる。

10

【0334】

この仮説を試験するために、BoNT/A1軽鎖および転位置ドメインを有するポリペプチド(LH_N/A1)を、EKプロテアーゼ認識配列DDDDK(配列番号44)を含むように修飾した。修飾されたLH_N/A1のEKを用いるタンパク分解性切断の効率を、評価し、野生型A1活性化ループのLys-Cを用いる切断と比較した(野生型ループ中にEK認識部位がないために、EKを使用する直接比較は可能でないことを留意されたい)。図13は、修飾されたループの切断が、野生型ループよりもかなり効率的でないことを示す。

【0335】

[実施例8]

20

【0336】

BoNT/XAキメラのタンパク分解性活性化

【0337】

BoNT/Xの軽鎖および転位置ドメイン、BoNT/A1の結合ドメインおよびBoNT/C1活性化ループを含有するBoNT/XAキメラを作製した(配列番号7)。図14は、改変BoNT/XAキメラの二本鎖形態が、FXaを用いる活性化後に生成されたことを示す。

【0338】

[実施例9]

【0339】

BoNT/XBキメラのタンパク分解性活性化

30

【0340】

BoNT/Xの軽鎖および転位置ドメイン、BoNT/Bの結合ドメインおよびBoNT/C1活性化ループを含有するBoNT/XBキメラを作製した(配列番号9)。図15は、改変BoNT/XBキメラの二本鎖形態が、FXaを用いる活性化後に生成されたことを示す。

【0341】

上記の明細書に記載されているすべての刊行物は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明の記載された方法およびシステムの様々な修正および変形は、本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく、当業者には明らかであろう。本発明は、特定の好ましい実施形態に関連して説明されてきたが、特許請求される本発明は、そのような特定の実施形態に過度に限定されるべきではないことを理解されるべきである。実際、生化学およびバイオテクノロジーまたは関連分野の当業者に明らかである、本発明を実施するための記載された様式の様々な修正は、以下の特許請求の範囲内にあることと意図されている。

40

【符号の説明】

【0342】

[図1]

Protein id: タンパク質番号

aa start: aa開始

Sequence: 配列

aa end: aa終了

SEQ ID NO: 配列番号

50

[図2]

20°C Time course (hr): 20°C時間経過(時間)

intact: インタクト

[図4]

intact: インタクト

[図5]

Benchmark: ベンチマーク

-ve control: 陰性対照

+ve control: 陽性対照

Trypsine: トリプシン

intact: インタクト

10

[図6]

intact: インタクト

[図7]

intact: インタクト

[図8]

Glutamate: グルタミン酸

Stimulated: 刺激された

Basal: 基底

[図9～12]

20

Intensity [Counts]: 強度[カウント]

Mass [Da]: 質量[Da]

[図14]

Bench Mark ladder: ベンチマークラダー

HisTrap load: HisTrapロード

Control: 対照

Control+DTT: 対照+DTT

Activated: 活性化された

Activated+DTT: 活性化された+DTT

[図15]

30

Bench Mark ladder: ベンチマークラダー

Final product 1 µg: 最終生成物1 µg

Final product 1 µg + DTT: 最終生成物1 µg+DTT

intact: インタクト

40

50

【図面】
【図 1 - 1】

1 / 17

FIGURE 1

Protein id	aa start	Sequence	aa end	SEQ ID NO:
D_AB012112	437	CLRLTKNSRDDSTC	450	23
DC_AB745660	437	CLRLTRNSRDDSTC	450	61
C1_X62389	437	CHKAIDGRSLYNKTLDC	453	2
CD_AB200360	437	CHKAIDGRSLYNKTLDC	453	
A4_EU341307	430	CVRGITSKTKSLDEGYNKALNELC	454	62
A7_JQ954969	430	CVRGITSKTKSLDEGYNKALNDLC	454	63
A6_FJ981696	430	CVRGITSKTKSLDKGYNKALNDLC	454	21
A1_AF488749	430	CVRGITSKTKSLDKGYNKALNDLC	454	
A5_EU679004	430	CVRGITSKTKSLDEGYNKALNDLC	454	63
A3_DQ185900	426	CVRGIIPFKTKSLDEGYNKALNYLC	450	64
A2_X73423	430	CVRGIIPFKTKSLDEGYNKALNDLC	454	65
A8_KM233166	430	CVRGIIPFKTKSLDEGYNKALNDLC	454	
H_KGO15617	428	CSNSNTKNSLC	438	66
E9_JX424534	414	CKNIVSVKGIRKSIC	429	24
E12_KM370319	414	CKNIVSVKGIRKSIC	429	
E11_KF861875	411	CTNIFSPKGIRKSIC	426	67
E10_KF861917	411	CKNIVFSKGITKSIC	426	68
E7_JN695729	411	CKNIVFSKGITKSIC	426	
E8_JN695730	411	CKNIVFSKGITKSIC	426	24
E5_AB037711	411	CKNIVSVKGIRKSIC	426	
E6_AM695759	411	CKNIVFSKGIRKSIC	426	69
E4_AB088207	411	CKNIVSVKGIRKSIC	426	24
E3_EF028403	411	CKNIVSVKGIRKSIC	426	
E1_GQ244314	411	CKNIVSVKGIRKSIC	426	
E2_EF028404	411	CKNIVSVKGIRKSIC	426	
F7_GU213233	420	CKSVSKKGTKNSLC	434	29
F5_GU213211	428	CLNSSFKKNTKKPLC	442	28
F1_GU213203	429	CKSVIPRKGTKAPPRLC	445	25
F4_GU213214	429	CKSIIPRKGTKAPPRLC	445	27
F2_GU213209	429	CKSIIPRKGTKQSPSLC	445	26
F3_GU213227	429	CKSIIPRKGTKQSPSLC	445	
F6_M92906	429	CKSVIPRKGTKAPPRLC	445	25
T_P04958	439	CKKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLGGEIC	467	30
G_X74162	436	CKPVMYKNTGKSEQC	450	31
B4_EF051570	437	CKSVKVPGLIC	446	70
B8_JQ964806	437	CKSVRAPGLIC	446	22
B7_JQ354985	437	CKSVKAPGLIC	446	71
B6_AB302852	437	CKSVRAPGLIC	446	22
B2_AB084152	437	CKSVRAPGLIC	446	
B3_EF028400	437	CKSVRAPGLIC	446	

【図 1 - 2】

2 / 17

FIGURE 1 CONTINUED

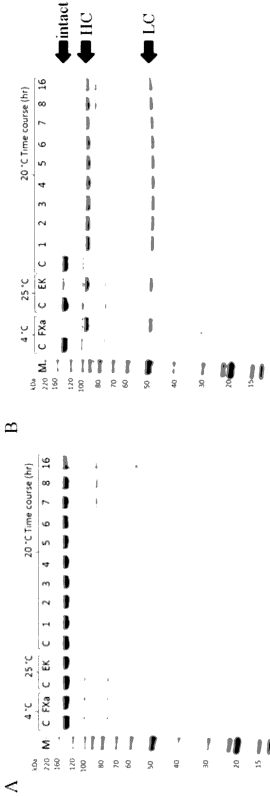
Protein id	aa start	Sequence	aa end	SEQ ID NO:
B1_AB232927	437	CKSVKAPGLIC	446	71
B5_EF033130	437	CKSVKAPGLIC	446	
X_BAQ12790	423	CPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNDLEDKK TTSKTNVSYPICSLNGC	467	20

10

20

【図 2 A B】

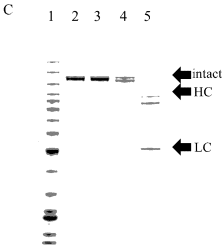
FIGURE 2



【図 2 C】

4 / 17

FIGURE 2 CONTINUED



30

40

50

【図 3 A】

FIGURE 3

A

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

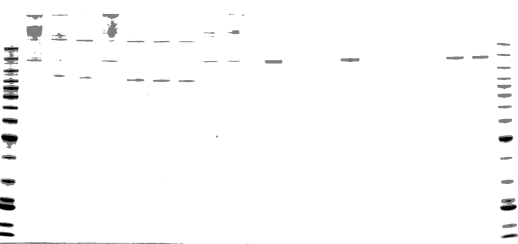


【図 3 B】

FIGURE 3 CONTINUED

B

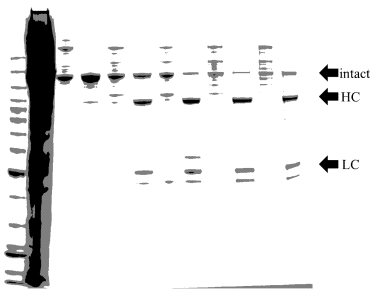
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



【図 4】

FIGURE 4

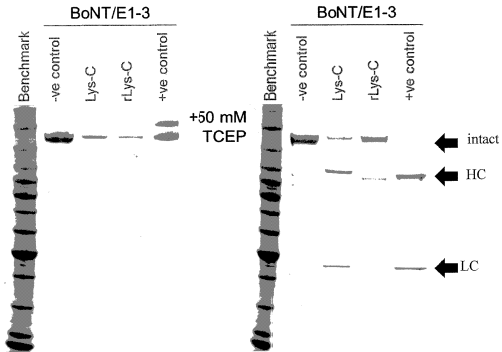
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



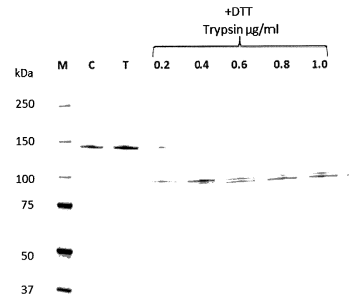
【図 5】

FIGURE 5

A



B



10

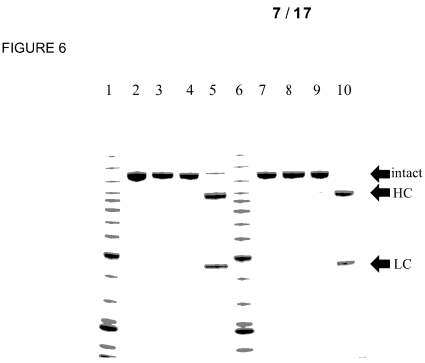
20

30

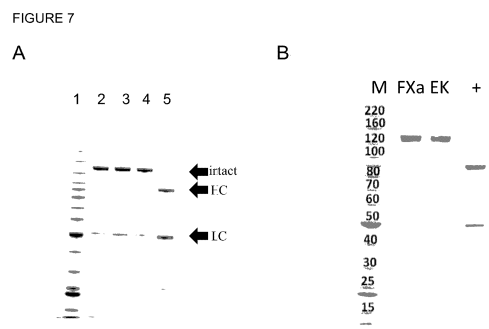
40

50

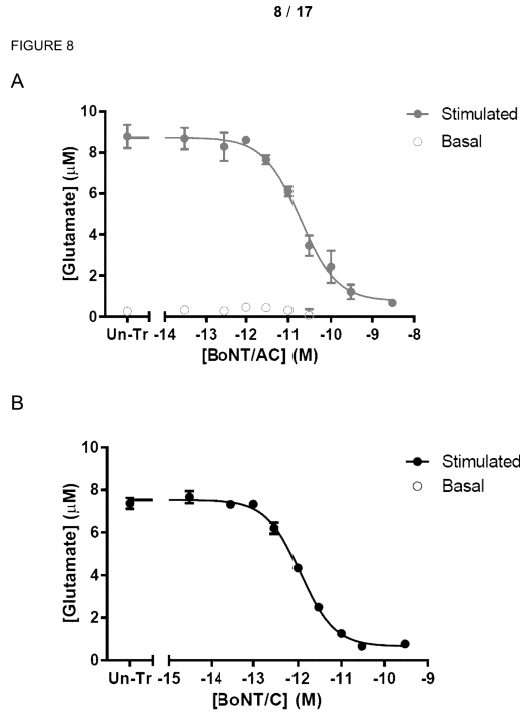
【図 6】



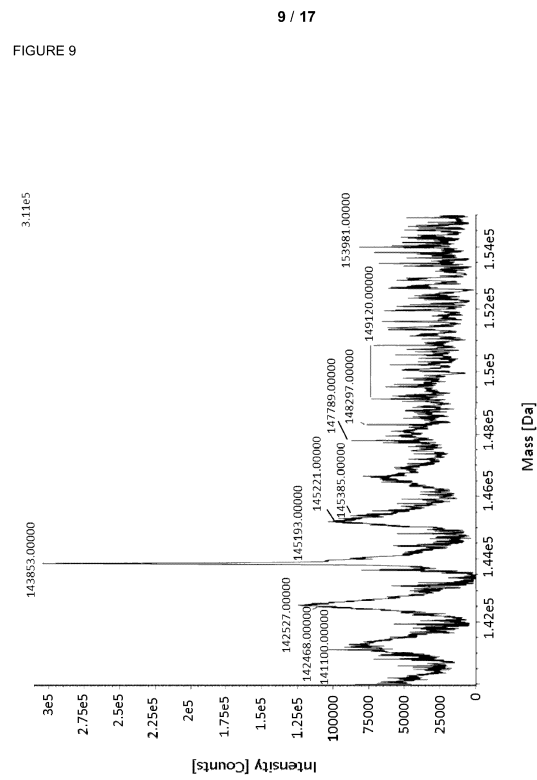
【図 7】



【図 8】



【図 9】



10

20

30

40

50

【配列表】
0007511549000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 15/00 (2006.01)
A 6 1 P 17/00 (2006.01)
A 6 1 P 25/00 (2006.01)
A 6 1 P 25/04 (2006.01)
A 6 1 P 25/08 (2006.01)
A 6 1 P 25/16 (2006.01)
A 6 1 P 27/02 (2006.01)
A 6 1 P 29/02 (2006.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)
C 1 2 P 21/06 (2006.01)
C 1 2 N 15/31 (2006.01)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)

F I

A 6 1 P 15/00
A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 25/04
A 6 1 P 25/08
A 6 1 P 25/16
A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 29/02
A 6 1 P 35/00
C 0 7 K 19/00
C 1 2 P 21/06
C 1 2 N 15/31
C 1 2 N 15/62

Z

英国(GB)

早期審理対象出願

(72)発明者 ラブロック, ローラ
イギリス, レクサム エルエル13 9ユーエフ, レクサム インダストリアル エステート, アッ
シュ ロード, ユニット9, イプセン バイオフาร์ม リミテッド内

合議体

審判長 福井 悟
審判官 北田 祐介
審判官 天野 貴子

(56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0048431 (US, A1)

特表2018-502580 (JP, A)

特表2012-500018 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/FSTA/AGRICOLA/BIOTECHNO/CABA/SCISEARCH/TOXCENTER (STN)