(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-520000
(P2005-520000A)
(43)公表日　平成17年7月7日(2005.7.7)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C07K 7/00	C07K 7/00	ZNA	2G054
C07K 7/06	C07K 7/06		4B063
C07K 7/08	C07K 7/08		4H045
C07K 14/00	C07K 14/00		
C07K 14/47	C07K 14/47		

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 111 頁）　最終頁に続く

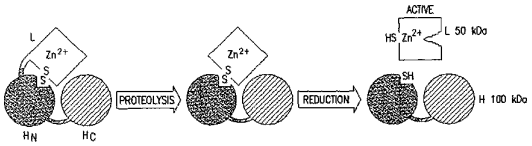
(21)出願番号　特願2004-541415 (P2004-541415)
(86)(22)出願日　平成14年8月22日 (2002.8.22)
(85)翻訳文提出日　平成16年5月6日 (2004.5.6)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/027212
(87)国際公開番号　WO2004/031773
(87)国際公開日　平成16年4月15日 (2004.4.15)
(31)優先権主張番号　09/942,098
(32)優先日　平成13年8月28日 (2001.8.28)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　591018268
アラーガン、インコーポレイテッド
ＡＬＬＥＲＧＡＮ，ＩＮＣＯＲＰＯＲＡＴＥＤ
アメリカ合衆国９２６１２カリフォルニア州アーヴィン、デュポン・ドライブ２５２５番
(74)代理人　100068526
弁理士　田村　恭生
(74)代理人　100103230
弁理士　高山　裕貢
(74)代理人　100087114
弁理士　齋藤　みの里

最終頁に続く

(54)【発明の名称】クロストリジウム毒素のためのＦＲＥＴプロテアーゼアッセイ

(57)【要約】
本発明は、全ての血清型のボツリヌス毒素および破傷風毒素を含むいずれのクロストリジウム毒素のプロテアーゼ活性をアッセイするのにも有用な、クロストリジウム毒素基質を提供する。本発明のクロストリジウム毒素基質は、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むクロストリジウム毒素認識配列を含み、ここで該切断部位はドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、ドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で共鳴エネルギー転移が見られる。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
(a)ドナー・フルオロフォア;
(b)該ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター;および、
(c)切断部位を含むクロストリジウム毒素認識配列、
を含むクロストリジウム毒素基質であって、該切断部位が該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間に介在し、適切な条件下、該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間で共鳴エネルギー転移が見られるクロストリジウム毒素基質。
【請求項２】
ボツリヌス毒素認識配列を含む、請求項１記載の基質。
【請求項３】
該ボツリヌス毒素認識配列がＢ血清型ボツリヌス毒素(ＢｏＮＴ／Ｂ）認識配列でない、請求項２記載の基質。
【請求項４】
(a)ドナー・フルオロフォア;
(b)該ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター;および
(c)切断部位を含むＡ血清型ボツリヌス毒素(ＢｏＮＴ／Ａ）認識配列、
を含むＢｏＮＴ／Ａ基質であって、該切断部位が該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間に介在し、適切な条件下、該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間で共鳴エネルギー転移が見られるＢｏＮＴ／Ａ基質。
【請求項５】
ＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ－Ａｒｇを含むもの、またはその模擬ペプチドを含む、請求項４記載の基質。
【請求項６】
ヒトＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基であってGln_{197}－Arg_{198}を含むもの、またはその模擬ペプチドを含む、請求項５記載の基質。
【請求項７】
アミノ酸配列 Glu-Ala-Asn-GlnArg-Ala-Thr-Lys (配列番号：1)またはその模擬ペプチドを含む、請求項６記載の基質。
【請求項８】
ヒトＳＮＡＰ－２５(配列番号：２)の残基１８７－２０３、またはその模擬ペプチドを含む、請求項６記載の基質。
【請求項９】
(a)ドナー・フルオロフォア;
(b)該ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター;および、
(c)切断部位を含むＢ血清型ボツリヌス毒素(ＢｏＮＴ／Ｂ）認識配列、
を含むＢｏＮＴ／Ｂ基質であって、該切断部位が該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間に介在し、適切な条件下、該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間で共鳴エネルギー転移が見られるＢｏＮＴ／Ｂ基質。
【請求項１０】
ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ－Ｐｈｅを含むもの、またはその模擬ペプチドを含む、請求項９記載の基質。
【請求項１１】
ヒトＶＡＭＰ－２の少なくとも６つの連続する残基であってGln_{76}－Phe_{77}を含むもの、またはその模擬ペプチドを含む、請求項１０記載の基質。
【請求項１２】
アミノ酸配列 Gly-Ala-Ser-GlnPhe-Glu-Thr-Ser (配列番号：３)またはその模擬ペプチ

ドを含む、請求項１１記載の基質。
【請求項１３】
以下よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１１記載の基質:
ヒトＶＡＭＰ－２(配列番号：４)の残基５５－９４またはその模擬ペプチド；
ヒトＶＡＭＰ－２(配列番号：４)の残基６０－９４またはその模擬ペプチド；および、
ヒトＶＡＭＰ－２(配列番号：４)の残基６０－８８またはその模擬ペプチド。
【請求項１４】
(a)ドナー・フルオロフォア;
(b)該ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター;および、
(c)切断部位を含むＣ１血清型ボツリヌス毒素(ＢｏＮＴ／Ｃ１）認識配列、
を含むＢｏＮＴ／Ｃ１基質であって、該切断部位が該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間に介在し、適切な条件下、該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間で共鳴エネルギー転移が見られるＢｏＮＴ／Ｃ１基質。
【請求項１５】
Ｓｙｎｔａｘｉｎの少なくとも６つの連続する残基であってＬｙｓ－Ａｌａを含むもの、またはその模擬ペプチドを含む、請求項１４記載の基質。
【請求項１６】
ヒトｓｙｎｔａｘｉｎの少なくとも６つの連続する残基であって$Ｌｙｓ_{253}$－$Ａｌａ_{254}$を含むもの、またはその模擬ペプチドを含む、請求項１５記載の基質。
【請求項１７】
アミノ酸配列 Asp-Thr-Lys-Lys-Ala-Val-Lys-Tyr (配列番号：５)またはその模擬ペプチドを含む、請求項１６記載の基質。
【請求項１８】
ＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基であってＡｒｇ－Ａｌａを含むもの、またはその模擬ペプチドを含む、請求項１４記載の基質。
【請求項１９】
ヒトＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基であって$Ａｒｇ_{198}$－$Ａｌａ_{199}$を含むもの、またはその模擬ペプチドを含む、請求項１８記載の基質。
【請求項２０】
ヒトＳＮＡＰ－２５(配列番号：２)の残基９３－２０２、またはその模擬ペプチドを含む、請求項１９記載の基質。
【請求項２１】
(a)ドナー・フルオロフォア;
(b)該ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター;および、
(c)切断部位を含むＤ血清型ボツリヌス毒素(ＢｏＮＴ／Ｄ）認識配列、
を含むＢｏＮＴ／Ｄ基質であって、該切断部位が該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間に介在し、適切な条件下、該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間で共鳴エネルギー転移が見られるＢｏＮＴ／Ｄ基質。
【請求項２２】
ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＬｙｓ－Ｌｅｕを含むもの、またはその模擬ペプチドを含む、請求項２１記載の基質。
【請求項２３】
ヒトＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であって$Ｌｙｓ_{59}$－$Ｌｅｕ_{60}$を含むもの、またはその模擬ペプチドを含む、請求項２２記載の基質。
【請求項２４】
アミノ酸配列 Arg-Asp-Gln-Lys-Leu-Ser-Glu-Leu (配列番号：６)またはその模擬ペプチドを含む、請求項２３記載の基質。
【請求項２５】

ラットＶＡＭＰ－２(配列番号：７)の残基２７－１１６またはその模擬ペプチドを含む、請求項２２記載の基質。

【請求項２６】

(a)ドナー・フルオロフォア;

(b)該ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター;および、

(c)切断部位を含むＥ血清型ボツリヌス毒素(ＢｏＮＴ／Ｅ）認識配列、

を含むＢｏＮＴ／Ｅ基質であって、該切断部位が該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間に介在し、適切な条件下、該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間で共鳴エネルギー転移が見られるＢｏＮＴ／Ｅ基質。

【請求項２７】

ＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基であってＡｒｇ－Ｉｌｅを含むもの、またはその模擬ペプチドを含む、請求項２６記載の基質。

【請求項２８】

ヒトＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基であってArg_{180}－Ile_{181}を含むもの、またはその模擬ペプチドを含む、請求項２７記載の基質。

【請求項２９】

アミノ酸配列 Gln-Ile-Asp-Arg-Ile-Met-Glu-Lys (配列番号：８)またはその模擬ペプチドを含む、請求項２８記載の基質。

【請求項３０】

ヒトＳＮＡＰ－２５(配列番号：２)の残基１５６－１８６またはその模擬ペプチドを含む、請求項２８記載の基質。

【請求項３１】

(a)ドナー・フルオロフォア;

(b)該ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター;および、

(c)切断部位を含むＦ血清型ボツリヌス毒素(ＢｏＮＴ／Ｆ）認識配列、

を含むＢｏＮＴ／Ｆ基質であって、該切断部位が該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間に介在し、適切な条件下、該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間で共鳴エネルギー転移が見られるＢｏＮＴ／Ｆ基質。

【請求項３２】

ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ－Ｌｙｓを含むもの、またはその模擬ペプチドを含む、請求項３１記載の基質。

【請求項３３】

ヒトＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってGln_{58}－Lys_{59}を含むもの、またはその模擬ペプチドを含む、請求項３２記載の基質。

【請求項３４】

アミノ酸配列 Glu-Arg-Asp-Gln-Lys-Leu-Ser-Glu (配列番号：９）、またはその模擬ペプチドを含む、請求項３３記載の基質。

【請求項３５】

ラットＶＡＭＰ－２(配列番号：７)の残基２７－１１６またはその模擬ペプチドを含む、請求項３１記載の基質。

【請求項３６】

(a)ドナー・フルオロフォア;

(b)該ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター;および、

(c)切断部位を含むＧ血清型ボツリヌス毒素(ＢｏＮＴ／Ｇ）認識配列、

を含むＢｏＮＴ／Ｇ基質であって、該切断部位が該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間に介在し、適切な条件下、該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間で共鳴エネルギー転移が見られるＢｏＮＴ／Ｇ基質。

【請求項３７】
ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＡｌａ－Ａｌａを含むもの、またはその模擬ペプチドを含む、請求項３６記載の基質。
【請求項３８】
ヒトＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＡｌａ$_{83}$－Ａｌａ$_{84}$を含むもの、またはその模擬ペプチドを含む、請求項３７記載の基質。
【請求項３９】
アミノ酸配列 Glu-Thr-Ser-Ala-Ala-Lys-Leu-Lys (配列番号：１０)、またはその模擬ペプチドを含む、請求項３８記載の基質。
【請求項４０】
(a)ドナー・フルオロフォア;
(b)該ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター;および、
(c)切断部位を含む破傷風毒素(ＴｅＮＴ）認識配列、
を含むＴｅＮＴ基質であって、該切断部位が該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間に介在し、適切な条件下、該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間で共鳴エネルギー転移が見られるＴｅＮＴ基質。
【請求項４１】
ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ－Ｐｈｅを含むもの、またはその模擬ペプチドを含む、請求項４０記載の基質。
【請求項４２】
ヒトＶＡＭＰ－２の少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ$_{76}$－Ｐｈｅ$_{77}$を含むもの、またはその模擬ペプチドを含む、請求項４１記載の基質。
【請求項４３】
アミノ酸配列 Gly-Ala-Ser-Gln-Phe-Glu-Thr-Ser (配列番号：１１)またはその模擬ペプチドを含む、請求項４２記載の基質。
【請求項４４】
以下よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項４１記載の基質：
ヒトＶＡＭＰ－２(配列番号：４)の残基３３－９４、またはその模擬ペプチド；
ヒトＶＡＭＰ－２(配列番号：４)の残基２５－９３、またはその模擬ペプチド；および、
ラットＶＡＭＰ－２(配列番号：７)の残基２７－１１６、またはその模擬ペプチド。
【請求項４５】
少なくとも１ナノモル／分／ミリグラム毒素の活性で切断され得る、請求項１、２、３、４、９、１４、２１、２６、３１、３６または４０のいずれかに記載の基質。
【請求項４６】
少なくとも２０ナノモル／分／ミリグラム毒素の活性で切断され得る、請求項１、２、３、４、９、１４、２１、２６、３１、３６または４０のいずれかに記載の基質。
【請求項４７】
少なくとも５０ナノモル／分／ミリグラム毒素の活性で切断され得る、請求項１、２、３、４、９、１４、２１、２６、３１、３６または４０のいずれかに記載の基質。
【請求項４８】
少なくとも１００ナノモル／分／ミリグラム毒素の活性で切断され得る、請求項１、２、３、４、９、１４、２１、２６、３１、３６または４０のいずれかに記載の基質。
【請求項４９】
少なくとも１５０ナノモル／分／ミリグラム毒素の活性で切断され得る、請求項１、２、３、４、９、１４、２１、２６、３１、３６または４０のいずれかに記載の基質。
【請求項５０】
該アクセプターがアクセプター・フルオロフォアである、請求項１記載の基質。
【請求項５１】
該アクセプター・フルオロフォアが少なくとも１ミリ秒の蛍光寿命を有する、請求項５

０記載の基質。
【請求項５２】
該アクセプターが非蛍光性である、請求項１記載の基質。
【請求項５３】
該ドナー・フルオロフォアがフルオレセインである、請求項１記載の基質。
【請求項５４】
該ドナー・フルオロフォアがＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８である、請求項１記載の基質。
【請求項５５】
該ドナー・フルオロフォアがＤＡＢＣＹＬである、請求項１記載の基質。
【請求項５６】
該ドナー・フルオロフォアがＢＯＤＩＰＹである、請求項１記載の基質。
【請求項５７】
該アクセプターがテトラメチルローダミンである、請求項１、請求項５３、または請求項５４記載の基質。
【請求項５８】
該アクセプターがＥＤＡＮＳである、請求項１または請求項５５記載の基質。
【請求項５９】
該アクセプターがＱＳＹ（登録商標）７である、請求項１、請求項５３または請求項５４記載の基質。
【請求項６０】
最大１００残基を有するペプチドまたは模擬ペプチドである、請求項１記載の基質。
【請求項６１】
最大５０残基を有するペプチドまたは模擬ペプチドである、請求項６０記載の基質。
【請求項６２】
最大４０残基を有するペプチドまたは模擬ペプチドである、請求項６１記載の基質。
【請求項６３】
最大２０残基を有するペプチドまたは模擬ペプチドである、請求項６２記載の基質。
【請求項６４】
該ドナー・フルオロフォアおよび該アクセプター・フルオロフォアが最大１５残基で隔てられている、請求項１記載の基質。
【請求項６５】
該ドナー・フルオロフォアおよび該アクセプター・フルオロフォアが最大１０残基で隔てられている、請求項６４記載の基質。
【請求項６６】
該ドナー・フルオロフォアおよび該アクセプター・フルオロフォアが最大８残基で隔てられている、請求項６５記載の基質。
【請求項６７】
該ドナー・フルオロフォアおよび該アクセプター・フルオロフォアが最大６残基で隔てられている、請求項６６記載の基質。
【請求項６８】
クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を測定する方法であって、
(a)(i) ドナー・フルオロフォア;
(ii) 該ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター;および、
(iii) 切断部位を含むクロストリジウム毒素認識配列、
を含み、該切断部位が該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間に介在し、適切な条件下、該ドナー・フルオロフォアと該アクセプターの間で共鳴エネルギー転移が見られるクロストリジウム毒素基質により、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件下、試料を処置し、

(b)該ドナー・フルオロフォアを励起し；そして、
(c)該処置済基質の共鳴エネルギー転移を対照基質と対比して測定する段階を含み、
該対照基質と比較した場合の該処置済基質の共鳴エネルギー転移における相違がクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を示す方法。
【請求項６９】
該クロストリジウム毒素基質がボツリヌス毒素基質である、請求項６８記載の方法。
【請求項７０】
該ボツリヌス毒素基質がＢｏＮＴ／Ａ認識配列を含むＢｏＮＴ／Ａ基質である、請求項６９記載の方法。
【請求項７１】
該ボツリヌス毒素基質がＢｏＮＴ／Ｂ認識配列を含むＢｏＮＴ／Ｂ基質である、請求項６９記載の方法。
【請求項７２】
該ボツリヌス毒素基質がＢｏＮＴ／Ｃ1認識配列を含むＢｏＮＴ／Ｃ1基質である、請求項６９記載の方法。
【請求項７３】
該ボツリヌス毒素基質がＢｏＮＴ／Ｄ認識配列を含むＢｏＮＴ／Ｄ基質である、請求項６９記載の方法。
【請求項７４】
該ボツリヌス毒素基質がＢｏＮＴ／Ｅ認識配列を含むＢｏＮＴ／Ｅ基質である、請求項６９記載の方法。
【請求項７５】
該ボツリヌス毒素基質がＢｏＮＴ／Ｆ認識配列を含むＢｏＮＴ／Ｆ基質である、請求項６９記載の方法。
【請求項７６】
該ボツリヌス毒素基質がＢｏＮＴ／Ｇ認識配列を含むＢｏＮＴ／Ｇ基質である、請求項６９記載の方法。
【請求項７７】
該クロストリジウム毒素基質がＴｅＮＴ認識配列を含むＴｅＮＴ毒素基質である、請求項６８記載の方法。
【請求項７８】
該試料が未精製細胞溶解物である、請求項６８記載の方法。
【請求項７９】
該試料が単離クロストリジウム毒素である、請求項６８、または７０から７７までのいずれか記載の方法。
【請求項８０】
該試料が単離クロストリジウム毒素軽鎖である、請求項６８、または７０から７７までのいずれか記載の方法。
【請求項８１】
該試料が製剤化クロストリジウム毒素製品である、請求項６８記載の方法。
【請求項８２】
該試料がＢＯＴＯＸ（登録商標）である、請求項６８記載の方法。
【請求項８３】
段階(c)が該処置済基質のドナー蛍光強度を検出することを含み、該対照基質と比較して増加した該処置済基質のドナー蛍光強度がクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を示す、請求項６８記載の方法。
【請求項８４】
段階(c)が該処置済基質のアクセプター蛍光強度を検出することを含み、該対照基質と比較して減少した該処置済基質のアクセプター蛍光強度がクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を示す、請求項６８記載の方法。

【請求項８５】
段階(c)が該処置済基質のアクセプター発光極大およびドナー・フルオロフォア発光極大を検出することを含み、該アクセプター発光極大付近から該ドナー・フルオロフォア発光極大付近への発光極大におけるシフトがクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を示す、請求項６８記載の方法。
【請求項８６】
段階(c)がアクセプター発光極大付近の蛍光振幅のドナー・フルオロフォア発光極付近の蛍光振幅に対する比率を検出することを含み、対照試料と比較して減少した該処置済試料における比率がクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を示す、請求項６８記載の方法。
【請求項８７】
段階(c)が該処置済基質におけるドナー・フルオロフォアの励起状態寿命を検出することを含み、対照基質と比較して増加した該処置済基質におけるドナー・フルオロフォア励起状態寿命がクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を示す、請求項６８記載の方法。
【請求項８８】
さらに、段階（c）を１またはそれ以上の時間間隔おいて繰り返すことを含む、請求項６８記載の方法。
【請求項８９】
少なくとも９０％の該クロストリジウム毒素基質が切断される、請求項６８記載の方法。
【請求項９０】
最大２５％の該クロストリジウム毒素基質が切断される、請求項６８記載の方法。
【請求項９１】
最大１５％の該クロストリジウム毒素基質が切断される、請求項９０記載の方法。
【請求項９２】
最大５％の該クロストリジウム毒素基質が切断される、請求項９１記載の方法。
【請求項９３】
アッセイが線形となるようクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件が選択される、請求項６８記載の方法。
【請求項９４】
該アクセプターがアクセプター・フルオロフォアである、請求項６８記載の方法。
【請求項９５】
該アクセプターが非蛍光性である、請求項６８記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【０００１】
発明の背景
（発明の分野）
本発明は、一般的には蛍光共鳴エネルギー転移およびプロテアーゼアッセイ、例えばボツリヌス毒素および破傷風毒素のようなクロストリジウム毒素のプロテアーゼ活性のアッセイに関し、より具体的には、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性をアッセイするための分子間でクエンチングされた基質および方法に関する。
【０００２】
（背景技術）
破傷風、およびまれではあるが致死的な疾患となる可能性のなるボツリヌス中毒症の神経麻痺症候群は、クロストリジウム属の細菌によって産生される神経毒素により引き起こされる。これらのクロストリジウム神経毒素は、神経細胞に対し非常に強くまた特異的な毒であり、ボツリヌス毒素のヒト致死量はマイクログラムのオーダーである。従って、飲食物に存在するボツリヌス毒素が微量であっても公衆衛生を害し、それは厳しい試験を通

して回避されなければならない。

【０００３】

しかしながら、それらの潜在的に有害な作用にも関わらず、低用量に制御されたボツリヌス神経毒素は治療薬として使用され成功を収めている。これらの毒素は、様々な局所または分節的失調、斜視、およびコリン作動性神経終末活性の可逆的抑制が望まれる他の症状の治療管理に使用されている。ヒトにおけるボツリヌス神経毒素の確立された治療的使用には、例えば、眼瞼痙攣、半側顔面痙攣、喉頭発生障害、局所多汗症、流涎、口顎ジストニア、頚部ジストニア、斜頚、斜視、肢ジストニア、職業性痙攣および筋波動症が含まれる(Rossetto et al, Toxicon 39:27-41 (2001))。例えば、少量のＢｏＮＴ／Ａの痙攣組織への筋肉内注射は、脳障害、脊髄障害、脳卒中、多発性硬化症および脳性麻痺による痙縮の処置に効果的に用いられる。クロストリジウム毒素のさらなる可能性ある臨床学的使用は、今でも調査されている。

【０００４】

食料品中の少量のボツリヌス毒素に関する潜在的危険性および的確な医薬製剤を調製する必要性がある場合、現在食品および医薬品業界の両方においてボツリヌス神経毒素についてのアッセイが用いられている。食品業界では、新しい食品包装方法の有効性を確認し、食品の安全性を保証するために、ボツリヌス神経毒素に対するアッセイが要求される。ボツリヌス毒素の臨床上の用途は増加しており、医薬品調製および品質管理のためのボツリヌス神経毒素活性に対する的確なアッセイが必要とされる。両業界において、現在マウス致死性試験がボツリヌス毒素活性をアッセイするのに使用されている。残念なことに、このアッセイにはいくつかの欠点がある：多数の実験動物が必要とされることによる費用；特異性の欠如；および大きな動物集団を使用しない場合に不正確なアッセイとなる可能性。

【０００５】

従って、クロストリジウム毒素活性をアッセイするための新規な材料および方法が必要とされる。本発明は、この要求を満たし、その上関連する利点を提供する。

【０００６】

発明の概要

本発明は、全ての血清型のボツリヌス毒素および破傷風毒素を含むいずれのクロストリジウム毒素のプロテアーゼ活性をアッセイするのにも有用な、クロストリジウム毒素基質を提供する。本発明のクロストリジウム毒素基質は、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むクロストリジウム毒素認識配列を含み、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られる。このようなクロストリジウム毒素基質は、例えばボツリヌス毒素認識配列を含むことができる。ある態様においては、本発明のクロストリジウム毒素基質には、Ｂ血清型ボツリヌス毒素（ＢｏＮＴ／Ｂ）認識配列でない、ボツリヌス毒素認識配列を含む。

【０００７】

本発明はまた、（ａ）ドナー・フルオロフォア、（ｂ）ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および、（ｃ）切断部位を含むＢｏＮＴ／ＡまたはＢｏＮＴ／Ｅ認識配列を含むＡ／Ｅ血清型ボツリヌス（ＢｏＮＴ／Ａ／Ｅ）基質であって、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるＢｏＮＴ／Ａ／Ｅ基質を提供する。そのようなＡ／Ｅ血清型ボツリヌス基質はまた、ＢｏＮＴ／ＡおよびＢｏＮＴ／Ｅ毒素の両方によって切断されやすい場合もある。

【０００８】

本発明はさらに、例えば、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むＡ血清型ボツリヌス毒素（ＢｏＮＴ／Ａ）認識配列を含むＢｏＮＴ／Ａ基質であって、該切断部

位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるＢｏＮＴ／Ａ基質を提供する。本発明のＢｏＮＴ／Ａ基質は、例えばＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ－Ａｒｇを含むもの、またはその模擬ペプチドを含み得る。これら、および本明細書に記載される他のアミノ酸配列において、配列はＮ末端からＣ末端への方向で記載されていると理解される。本発明のＢｏＮＴ／Ａ基質はまた、例えばヒトＳＮＡＰ－２５の少なくとも6つの連続する残基であってＧｌｎ$_{197}$－Ａｒｇ$_{198}$を含むもの、またはその模擬ペプチドを有することができる。ある態様においては、本発明のＢｏＮＴ／Ａ基質は、アミノ酸配列Glu-Ala-Asn-GlnArg-Ala-Thr-Lys (配列番号：１)またはその模擬ペプチドを含む。別の態様においては、本発明のＢｏＮＴ／Ａ基質は、ヒトＳＮＡＰ－２５（配列番号：２）の残基１８７－２０３、またはその模擬ペプチドを含む。本発明のＢｏＮＴ／Ａ基質においては様々なドナー・フルオロフォアおよびアクセプターが有用であり、それにはフルオレセイン－テトラメチルローダミン、ＤＡＢＣＹＬ－ＥＤＡＮＳ、およびＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－ＱＳＹ（登録商標）７が含まれるが、これらに限定されない。

【０００９】

本発明によってさらに提供されるのは、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むＢ血清型ボツリヌス毒素（ＢｏＮＴ／Ｂ）認識配列を含むＢｏＮＴ／Ｂ基質であって、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるＢｏＮＴ／Ｂ基質である。本発明のＢｏＮＴ／Ｂ基質は、例えばＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ－Ｐｈｅを含むもの、またはその模擬ペプチドを含み得る。例えば、本発明のＢｏＮＴ／Ｂ基質は、ヒトＶＡＭＰ－２の少なくとも６つの連続する残基でＧｌｎ$_{76}$－Ｐｈｅ$_{77}$、を含むもの、またはその模擬ペプチドを含み得る。ある態様においては、本発明のＢｏＮＴ／Ｂ基質は、アミノ酸配列Gly-Ala-Ser-GlnPhe-Glu-Thr-Ser (配列番号：３)またはその模擬ペプチドを含む。別の態様においては、本発明のＢｏＮＴ／Ｂ基質は、ヒトＶＡＭＰ－２（配列番号：４）の残基５５－９４、ヒトＶＡＭＰ－２（配列番号：４）の残基６０－９４、ヒトＶＡＭＰ－２（配列番号：４）の残基６０－８８、またはこれら配列の一つの模擬ペプチドを含む。本発明のＢｏＮＴ／Ｂ基質においては様々なドナー・フルオロフォアおよびアクセプターが有用であることが理解される；そのようなドナー・フルオロフォア－アクセプターの組み合わせには、フルオレセイン－テトラメチルローダミン、ＤＡＢＣＹＬ－ＥＤＡＮＳ、およびＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－ＱＳＹ（登録商標）７が含まれるが、これらに限定されない。

【００１０】

本発明はまた、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むＣ１血清型ボツリヌス毒素（ＢｏＮＴ／Ｃ１）認識配列を含むＢｏＮＴ／Ｃ１基質であって、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるＢｏＮＴ／Ｃ１基質を提供する。本発明のＢｏＮＴ／Ｃ１基質は、例えばｓｙｎｔａｘｉｎの少なくとも６つの連続する残基であってＬｙｓ－Ａｌａを含むもの、またはその模擬ペプチドを含み得る。例えば、本発明のＢｏＮＴ／Ｃ１基質は、ヒトｓｙｎｔａｘｉｎの少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ$_{253}$－Ｐｈｅ$_{254}$を含むもの、またはその模擬ペプチドを有することができる。ある態様においては、本発明のＢｏＮＴ／Ｃ１基質は、アミノ酸配列Asp-Thr-Lys-Lys-Ala-Val-Lys-Tyr (配列番号：５)またはその模擬ペプチドを含む。

【００１１】

本発明のＢｏＮＴ／Ｃ１基質はまた、例えばＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基であってＡｒｇ－Ａｌａを含むもの、またはその模擬ペプチドを含み得る。そのようなＢｏＮＴ／Ｃ１基質は、例えばヒトＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基

であってＡｒｇ$_{198}$－Ａｌａ$_{199}$を含むもの、またはその模擬ペプチドを含み得る。典型的ＢｏＮＴ／Ｃ１基質は、ヒトＳＮＡＰ－２５（配列番号：２）の残基９３－２０２、またはその模擬ペプチドを含む。本発明の全てのクロストリジウム基質と同様に、様々なドナー・フルオロフォア－アクセプターの組み合わせがＢｏＮＴ／Ｃ１基質に有用であり、例えばフルオレセイン－テトラメチルローダミン、ＤＡＢＣＹＬ－ＥＤＡＮＳ、およびＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－ＱＳＹ（登録商標）７が含まれる。

【００１２】

本発明はさらに、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むＤ血清型ボツリヌス毒素（ＢｏＮＴ／Ｄ）認識配列含むＢｏＮＴ／Ｄ基質であって、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるＢｏＮＴ／Ｄ基質を提供する。本発明のＢｏＮＴ／Ｄ基質は、例えばＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＬｙｓ－Ｌｅｕを含むもの、またはその模擬ペプチドを含み得る。ある態様においては、ＢｏＮＴ／Ｄ基質は、ヒトＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＬｙｓ$_{59}$－Ｌｅｕ$_{60}$を含むもの、またはその模擬ペプチドを含む。別の態様においては、本発明のＢｏＮＴ／Ｄ基質は、アミノ酸配列Arg-Asp-Gln-Lys-Leu-Ser-Glu-Leu (配列番号：６)またはその模擬ペプチドを含む。さらなる態様においては、本発明のＢｏＮＴ／Ｄ基質は、ラットＶＡＭＰ－２（配列番号：７）の残基２７－１１６、またはその模擬ペプチドを含む。本発明のＢｏＮＴ／Ｄ基質においては様々なドナー・フルオロフォアおよびアクセプターが有用であることが理解される；そのようなドナー・フルオロフォア－アクセプターペアには、フルオレセイン－テトラメチルローダミン、ＤＡＢＣＹＬ－ＥＤＡＮＳ、およびＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－ＱＳＹ（登録商標）７が含まれるが、これらに限定されない。

【００１３】

本発明はさらに、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むＥ血清型ボツリヌス毒素（ＢｏＮＴ／Ｅ）認識配列を含むＢｏＮＴ／Ｅ基質であって、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるＢｏＮＴ／Ｅ基質を提供する。ＢｏＮＴ／Ｅ基質は、例えばＳＡＮＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基であってＡｒｇ－Ｉｌｅを含むもの、またはその模擬ペプチドを含む。そのようなＢｏＮＴ／Ｅ基質は、例えばヒトＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基であってＡｒｇ$_{180}$－Ｉｌｅ$_{181}$を含むもの、またはその模擬ペプチドを含み得る。ある態様においては、本発明のＢｏＮＴ／Ｅ基質は、アミノ酸配列Gln-Ile-Asp-Arg-Ile-Met-Glu-Lys (配列番号：８)またはその模擬ペプチドを含む。別の態様においては、本発明のＢｏＮＴ／Ｅ基質は、ヒトＳＮＡＰ－２５（配列番号：２）の残基１５６－１８６、またはその模擬ペプチドを含む。本発明のＢｏＮＴ／Ｅ基質においては様々なドナー・フルオロフォア－アクセプターの組み合わせが有用である。これらのドナー・フルオロフォア－アクセプターの組み合わせには、フルオレセイン－テトラメチルローダミン、ＤＡＢＣＹＬ－ＥＤＡＮＳ、およびＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－ＱＳＹ（登録商標）７が含まれるが、これらに限定されない。

【００１４】

本発明によりさらに提供されるのは、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むＦ血清型ボツリヌス毒素（ＢｏＮＴ／Ｆ）認識配列を含むＢｏＮＴ／Ｆ基質であって、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるＢｏＮＴ／Ｆ基質である。このようなＢｏＮＴ／Ｆ基質は、例えばＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ－Ｌｙｓを含むもの、またはその模擬ペプチドを含み得る。ある態

様において、ＢｏＮＴ／Ｆ基質は、ヒトＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＧＬｎ$_{58}$－Ｌｙｓ$_{59}$を含むもの、またはその模擬ペプチドを含む。別の態様においては、本発明のＢｏＮＴ／Ｆ基質は、ラットＶＡＭＰ－２（配列番号：７）の残基２７－１１６、またはその模擬ペプチドを含む。さらなる態様においては、ＢｏＮＴ／Ｆ基質は、アミノ酸配列Glu-Arg-Asp-Gln-Lys-Leu-Ser-Glu (配列番号：９)またはその模擬ペプチドを含む。蛍光共鳴エネルギー転移の業界における当業者は、フルオレセイン－テトラメチルローダミン、ＤＡＢＣＹＬ－ＥＤＡＮＳ、およびＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－ＱＳＹ（登録商標）７を含む様々なドナー・フルオロフォア－アクセプターの組み合わせが本発明のＢｏＮＴ／Ｆ基質において有用であり、同時にこれらに限定されないことを理解している。

【００１５】

本発明また、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むＧ血清型ボツリヌス毒素（ＢｏＮＴ／Ｇ）認識配列を含むＢｏＮＴ／Ｇ基質であって、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるＢｏＮＴ／Ｇ基質を提供する。ＢｏＮＴ／Ｇ基質は、例えばＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＡｌａ－Ａｌａを含むもの、またはその模擬ペプチドを含み得る。そのようなＢｏＮＴ／Ｇ基質は、例えばヒトＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＡｌａ$_{83}$－Ａｌａ$_{84}$を含むもの、またはその模擬ペプチドを含む。ある態様においては、本発明のＢｏＮＴ／Ｇ基質は、アミノ酸配列Glu-Thr-Ser-Ala-Ala-Lys-Leu-Lys (配列番号：１０)またはその模擬ペプチドを含む。他のクロストリジウム毒素基質に関して前述されるように、様々なドナー・フルオロフォア－アクセプターの組み合わせが本発明のＢｏＮＴ／Ｇ基質において有用である。そのようなドナー・フルオロフォア－アクセプターの組み合わせには、フルオレセイン－テトラメチルローダミン、ＤＡＢＣＹＬ－ＥＤＡＮＳ、およびＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－ＱＳＹ（登録商標）７が含まれる。

【００１６】

本発明によってまた提供されるのは、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含む破傷風毒素（ＴｅＮＴ）認識配列を含むＴｅＮＴ基質であって、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるＴｅＮＴ基質である。本発明のＴｅＮＴ基質は、例えばＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ－Ｐｈｅを含むもの、またはその模擬ペプチドを含み得る。例えば、そのようなＴｅＮＴ基質は、例えばヒトＶＡＭＰ－２の少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ$_{76}$－Ｐｈｅ$_{77}$を含むもの、またはその模擬ペプチドを含む。ある態様においては、本発明のＴｅＮＴ基質は、アミノ酸配列Gly-Ala-Ser-Gln-Phe-Glu-Thr-Ser (配列番号：１１)またはその模擬ペプチドを含む。別の態様においては、ＴｅＮＴ基質は、ヒトＶＡＭＰ－２（配列番号：４）の残基３３－９４、ラットＶＡＭＰ－２（配列番号：７）の残基２７－１１６またはこれら配列の一つの模擬ペプチドを含む。様々なドナー・フルオロフォア－アクセプターの組み合わせが本発明のＴｅＮＴ基質において有用であり、フルオレセイン－テトラメチルローダミン、ＤＡＢＣＹＬ－ＥＤＡＮＳ、およびＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－ＱＳＹ（登録商標）７が含まれるが、それらに限定されない。

【００１７】

具体的態様において本発明は、少なくとも１ナノモル／分／ミリグラム毒素の活性により切断されるＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｃ1、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／Ｅ、ＢｏＮＴ／Ｆ、ＢｏＮＴ／ＧまたはＴｅＮＴ基質を提供する。他の態様において、本発明のＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｃ1、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／Ｅ、ＢｏＮＴ／Ｆ、ＢｏＮＴ／ＧまたはＴｅＮＴ基質は、少なくとも１０ナノモル／分／ミリグラム毒素の活性により切断される。更なる態様において、本発明のＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮ

Ｔ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｃ1、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／Ｅ、ＢｏＮＴ／Ｆ、ＢｏＮＴ／ＧまたはＴｅＮＴ基質は、少なくとも２０ナノモル／分／ミリグラム毒素の活性により切断される。なお更なる態様においては、本発明のＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｃ1、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／Ｅ、ＢｏＮＴ／ＦまたはＴｅＮＴ基質は、少なくとも５０、１００または１５０ナノモル／分／ミリグラム毒素の活性により切断される。

【００１８】

蛍光および非蛍光アクセプターを含む、様々なドナー・フルオロフォアおよびアクセプターが本発明のクロストリジウム毒素基質において有用である。本発明において有用なドナー・フルオロフォアは、フルオレセイン、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）、ＤＡＢＣＹＬおよびＢＯＤＩＰＹを含むが、これらに限定されない。本発明において有用なアクセプターは、テトラメチルローダミン、ＥＤＡＮＳおよびＱＳＹ（登録商標）７含むが、これらに限定されない。本発明のクロストリジウム毒素において有用な典型的ドナー・フルオロフォア－アクセプターペアは、フルオレセイン－テトラメチルローダミン、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－テトラメチルローダミン、ＤＡＢＣＹＬ－ＥＤＡＮＳ、フルオレセイン－ＱＳＹ（登録商標）７およびＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－ＱＳＹ（登録商標）７が含まれるが、それらに限定されない。

【００１９】

本発明のクロストリジウム毒素基質は、様々な長さのペプチドまたは模擬ペプチドを包み、そこで、ドナー・フルオロフォアとアクセプターは異なる長さの残基によって隔てられている。具体的態様において、本発明のクロストリジウム毒素基質は最大２０残基、最大４０残基、最大５０残基、または最大１００残基を有するペプチドまたは模擬ペプチドである。他の態様においては、ドナー・フルオロフォアとアクセプターは最大６残基、最大８残基、最大１０残基または最大１５残基によって隔てられている。

【００２０】

本発明によってさらに提供されるのは、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性の測定方法である。本方法は、（ａ）クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件下、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むクロストリジウム毒素認識配列を含むクロストリジウム毒素基質であって、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるクロストリジウム毒素基質により試料を処置し、（ｂ）ドナー・フルオロフォアを励起し、そして（ｃ）対照基質と対比して処置済基質の共鳴エネルギー転移を測定する段階を含み、ここで、対照基質と比較した場合の処置済基質の共鳴エネルギー転移における相違がクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を示す。本発明の方法は蛍光または非蛍光アクセプターによって実行可能である。

【００２１】

本発明の方法は、いずれのクロストリジウム毒素のプロテアーゼ活性をアッセイするのにも使用できる。ある態様においては、本発明の方法はＢｏＮＴ／Ａプロテアーゼ活性を測定するためＢｏＮＴ／Ａ基質に依存する。本発明の方法において有用なＢｏＮＴ／Ａ基質は、本明細書に開示されるいずれのＢｏＮＴ／Ａ基質であってもよく、例えば、ＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基を含み、該６つの連続するアミノ酸残基がＧｌｎ－Ａｒｇを含むＢｏＮＴ／Ａ基質である。別の態様において、本発明の方法はＢｏＮＴ／Ｂプロテアーゼ活性を測定するためＢｏＮＴ／Ｂ基質に依存する。本発明の方法において有用なＢｏＮＴ／Ｂ基質は、本明細書に開示されるいずれのＢｏＮＴ／Ｂ基質であってもよく、例えば、ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基を含み、該６つの連続するアミノ酸残基がＧｌｎ－Ｐｈｅを含むＢｏＮＴ／Ｂ基質である。本発明の方法はまた、ＢｏＮＴ／Ｃ１プロテアーゼ活性を測定するためＢｏＮＴ／Ｃ１基質を利用可能である。本発明の方法において有用なＢｏＮＴ／Ｃ１基質は、本明細書に開示されるいずれのＢｏＮＴ／Ｃ１基質であってもよく、例えば、ｓｙｎｔａｘｉｎの少なくとも６つの連続する残基

を含み、該６つの連続するアミノ酸残基がＬｙｓ－Ａｌａを含む、または、ＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基を含み、該６つの連続するアミノ酸残基がＡｒｇ－Ａｌａを含む、ＢｏＮＴ／Ｃ１基質である。

【００２２】

別の態様において、本発明の方法はＢｏＮＴ／Ｄプロテアーゼ活性を測定するためＢｏＮＴ／Ｄ基質に依存する。本発明の方法において有用なＢｏＮＴ／Ｄ基質は、本明細書に開示されるいずれのＢｏＮＴ／Ｄ基質であってもよく、例えば、ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基を含み、該６つの連続するアミノ酸残基がＬｙｓ－Ｌｅｕを含むＢｏＮＴ／Ｄ基質である。さらなる態様において、本発明の方法はＢｏＮＴ／Ｅプロテアーゼ活性を測定するためＢｏＮＴ／Ｅ基質に依存する。本発明の方法において有用なＢｏＮＴ／Ｅ基質は、本明細書に開示されるいずれのＢｏＮＴ／Ｅ基質であってもよく、例えば、ＳＡＮＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基を含み、該６つの連続するアミノ酸残基がＡｒｇ－Ｉｌｅを含むＢｏＮＴ／Ｅ基質である。さらなる態様において、本発明の方法はＢｏＮＴ／Ｆプロテアーゼ活性を測定するためＢｏＮＴ／Ｆ基質に依存する。本発明の方法において有用なＢｏＮＴ／Ｆ基質は、本明細書に開示されるいずれのＢｏＮＴ／Ｆ基質であってもよく、例えば、ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基を含み、該６つの連続するアミノ酸残基がＧｌｎ－Ｌｙｓを含むＢｏＮＴ／Ｆ基質である。

【００２３】

本発明の方法はまた、ＢｏＮＴ／Ｇプロテアーゼ活性を測定するためＢｏＮＴ／Ｇ基質を利用可能である。本発明の方法において有用なＢｏＮＴ／Ｇ基質は、本明細書に開示されるいずれのＢｏＮＴ／Ｇ基質であってもよく、例えば、ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基を含み、該６つの連続するアミノ酸残基がＡｌａ－Ａｌａを含むＢｏＮＴ／Ｇ基質である。本発明の方法はまた、ＴｅＮＴプロテアーゼ活性を測定するのに有用であり、この場合、ＴｅＮＴ基質に依存する。本明細書に開示されるいずれのＴｅＮＴ基質も本発明の方法に有用であり、例えば、ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基を含み、該６つの連続するアミノ酸残基がＧｌｎ－Ｐｈｅを含むＴｅＮＴ基質である。

【００２４】

活性あるクロストリジウム毒素、またはその軽鎖または断片を含む可能性のある様々な試料が、本発明の方法において有用である。そのような試料は、未精製細胞溶解物、単離クロストリジウム毒素、単離クロストリジウム毒素軽鎖、製剤化クロストリジウム毒素製品、例えばＢＯＴＯＸ（登録商標）、および生、調理済、特に調理済または加工済食物または飲物を含む飲食物を含むが、これらに限定されない。

【００２５】

本発明の方法において、共鳴エネルギー転移は様々な方法によって測定可能である。ある態様では、共鳴エネルギー転移を測定する段階は処置済基質のドナー蛍光強度を検出することを含み、ここで、対照基質と比較して増加した処置済基質のドナー蛍光強度は、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を示す。別の態様において、共鳴エネルギー転移を測定する段階は、処置済基質のアクセプター蛍光強度を検出することを含み、ここで、対照基質と比較して減少した処置済基質のアクセプター蛍光強度は、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を示す。さらなる態様において、共鳴エネルギー転移を測定する段階は、処置済基質のアクセプター発光極大およびドナー・フルオロフォア発光極大を検出することを含み、ここで、アクセプター発光極大付近からドナー・フルオロフォア発光極大付近への発光極大におけるシフトは、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を示す。さらなる態様において、共鳴エネルギー転移を測定する段階は、アクセプター発光極大付近の蛍光振幅の、ドナー発光極大付近の蛍光振幅に対する比率を検出することを含み、ここで、対照試料と比較して減少した処置済試料の比率は、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を示す。なお更なる態様において、共鳴エネルギー転移を測定する段階は、ドナー・フルオロフォアの励起状態寿命を検出することによって実行され、ここで、対照基質と比較して増加した処置済基質のドナー・フルオロフォアの励起状態寿命は、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を示す。

【００２６】
以下にさらに論じるように、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した様々な条件が本発明の方法において有用である。ある態様では、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件は、アッセイが線形となるよう選択される。別の態様においては、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件は、クロストリジウム毒素基質の少なくとも９０％が切断されるように選択される。更なる態様においては、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件は、最大５％、最大１０％、最大１５％、最大２０％、または最大２５％のクロストリジウム毒素基質が切断されるように選択される。
【００２７】
発明の詳細な説明
本発明は、クロストリジウム毒素の有無を測定するのに、または全ての血清型のボツリヌス毒素および破傷風毒素を含むいずれかのクロストリジウム毒素のプロテアーゼ活性を測定するのに有用な、クロストリジウム毒素基質を提供する。本発明のクロストリジウム毒素基質は、一つには、切断産物を非切断産物から分離する必要がなく、かつ動物に対する毒性に依存しない迅速かつ単純な均一スクリーニングアッセイに利用可能であるため価値がある。さらに、本発明のクロストリジウム毒素基質は、例えば、高度精製二本鎖毒素または単離クロストリジウム毒素軽鎖と同様に、未精製で大量の試料およびを解析するのに使用できる。
【００２８】
以下に述べるように、蛍光共鳴エネルギー転移（ＦＲＥＴ)は、光子の発光なく励起がドナー・フルオロフォアからアクセプターに転移される、二つの分子の電子励起状態間の距離依存性相互作用である。エネルギー転移の過程は、ドナー・フルオロフォアの蛍光強度および励起状態寿命の減少（クエンチング）を結果としてもたらし、アクセプターがフルオロフォアの場合はアクセプターの発光強度を増加することができる。本発明のクロストリジウム毒素基質の切断後、共鳴エネルギー転移は減少し、例えば増加したドナー蛍光発光、減少したアクセプター蛍光発光、またはアクセプター発光極大付近からドナー発光極大付近への発光極大におけるシフトによって検出できる。必要であれば、試料中のクロストリジウム毒素の量は、ＦＲＥＴの度合いの相違の関数として適当な基準を用いて計算することができる。
【００２９】
本発明のクロストリジウム毒素基質は、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むクロストリジウム毒素認識配列を含み、ここで、該切断部位はドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られる。本発明のクロストリジウム毒素基質は、例えばボツリヌス毒素認識配列を含むことができる。ある態様においては、本発明のクロストリジウム毒素基質には、Ｂ血清型ボツリヌス毒素（ＢｏＮＴ／Ｂ）認識配列でない、ボツリヌス毒素認識配列を含む。
【００３０】
ある態様において、本発明は、少なくとも１ナノモル／分／ミリグラム毒素の活性で切断される、ＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｃ1、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／Ｅ、ＢｏＮＴ／Ｆ、ＢｏＮＴ／ＧまたはＴｅＮＴ基質を提供する。他の態様において、本発明のＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｃ1、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／Ｅ、ＢｏＮＴ／Ｆ、ＢｏＮＴ／ＧまたはＴｅＮＴ基質は、少なくとも１０ナノモル／分／ミリグラム毒素の活性で切断される。さらなる態様において、本発明のＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｃ1、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／Ｅ、ＢｏＮＴ／Ｆ、ＢｏＮＴ／ＧまたはＴｅＮＴ基質は、少なくとも２０ナノモル／分／ミリグラム毒素の活性で切断される。なお更なる態様において、本発明のＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｃ1、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／Ｅ、ＢｏＮＴ／Ｆ、ＢｏＮＴ／ＧまたはＴｅＮＴ基質は、少なくとも５０、１００または１５０ナノモル／分／ミリグラム毒素の活性で切断される。このよう

な活性は標準的速度条件の下測定される。

【００３１】

蛍光および非蛍光アクセプターを含む、様々なドナー・フルオロフォアおよびアクセプターが本発明のクロストリジウム毒素基質において有用である。本発明において有用なドナー・フルオロフォアは、フルオレセイン、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８、ＤＡＢＣＹＬおよびＢＯＤＩＰＹを含むが、これらに限定されない。本発明において有用なアクセプターは、テトラメチルローダミン、ＥＤＡＮＳ、およびＱＳＹ（登録商標）７を含むが、これらに限定されない。本発明のクロストリジウム毒素において有用な典型的ドナー・フルオロフォアーアクセプターペアは、フルオレセイン－テトラメチルローダミン、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－テトラメチルローダミン、ＤＡＢＣＹＬ－ＥＤＡＮＳ、フルオレセイン－ＱＳＹ（登録商標）７およびＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－ＱＳＹ（登録商標）７を含むが、それらに限定されない。

【００３２】

本発明のクロストリジウム毒素基質は、様々な長さのタンパク質、ペプチド、および模擬ペプチドを含み、ここで、ドナー・フルオロフォアとアクセプターは異なる数の残基によって隔てられている。具体的態様において、本発明のクロストリジウム毒素基質は、最大２０残基、最大４０残基、最大５０残基、最大１００残基、最大１５０残基、最大２００残基、最大２５０残基、最大３００残基、最大３５０残基または最大４００残基を有する。他の態様においては、ドナー・フルオロフォアとアクセプターは、最大６残基、最大８残基、最大１０残基、最大１２残基、最大１５残基、最大２０残基、最大２５残基、最大３０残基、最大３５残基または最大４０残基によって隔てられている。

【００３３】

破傷風およびボツリヌス神経毒素はクロストリジウム属によって産生され、破傷風およびボツリヌス中毒症の神経麻痺症候群を引き起こす。破傷風神経毒素が主にＣＮＳシナプスに作用する一方、ボツリヌス神経毒素は末梢性に作用する。クロストリジウム神経毒素は近似した細胞中毒機序を共用し、神経伝達物質の放出を抑制する。ジスルフィド結合した二つのポリペプチド鎖より構成されるこれらの毒素において、大きい方のサブユニットは、神経特異的結合および小さい方のサブユニットの細胞質内へのトランスロケーションに関与する。神経細胞内におけるトランスロケーションおよび還元の後、小さい方の鎖が、神経細胞細胞質におけるニューロエキソサイトーシスに関与するタンパク質成分に特異的なペプチダーゼ活性を示す。クロストリジウム毒素の標的であるＳＮＡＲＥタンパク質は、様々な非神経細胞タイプにおけるエキソサイトーシスに共通している；神経細胞と同様にこれらの細胞において、軽鎖ペプチダーゼ活性がエキソサイトーシスを阻害する。

【００３４】

破傷風およびボツリヌス神経毒素Ｂ、Ｄ、Ｆ、およびＧは、ＶＡＭＰ（ｓｙｎａｐｔｏｂｒｅｖｉｎ）を特異的に認識するが、これは神経毒素によって異なる結合の所で切断されるシナプス小胞膜内在性タンパク質である。ボツリヌスＡおよびＥ神経毒素は、シナプス前膜のタンパク質であるＳＮＡＰ－２５を、そのタンパク質のカルボキシ末端部分における二つの相異なる部位で特異的に認識および切断する。ボツリヌス神経毒素Ｃは、ＳＮＡＰ－２５に加えて、神経細胞膜タンパク質であるｓｙｎｔａｘｉｎを切断する。三つのクロストリジウム神経毒素標的タンパク質は酵母からヒトまで保存されているが、切断部位および毒素感受性は必ずしも保存されていない（以下参照；Humeau et al., Biochimie 82:427 446 (2000); Niemann et al., Trends in Cell Biol. 4:179 185 (1994); および Pellizzari et al., Phil. Trans. R. Soc. London 354:259-268 (1999))も参照）。

【００３５】

天然の破傷風およびボツリヌス神経毒素は、リーダー配列のない１５０ｋＤａの不活性ポリペプチド鎖として産生される。これらの毒素は、露出したプロテアーゼ感受性ループのところで細菌または組織プロテイナーゼによって切断され、活性二本鎖毒素を生成し得る。天然のクロストリジウム毒素は、重鎖（Ｈ、１００ｋＤａ）および軽鎖（Ｌ、５０ｋＤａ）を架橋する鎖間ジスルフィド結合を一つ含む；このような架橋は、細胞外に加えら

れた毒素の神経毒性にとって重要である(Montecucco and Schiavo, Quarterly Rev. Biophysics 28:423-472 (1995)。

【００３６】

図１に示すように、クロストリジウム毒素は三つの別個の５０ｋＤａドメインに折り畳まれているようであり、各ドメインは別個の機能的役割を有する。図２に描かれるように、クロストリジウム毒素の細胞中毒機序は４つの異なる段階より成る：（１）結合、（２）内在化、（３）膜トランスロケーション、および（４）酵素的標的修飾。重鎖のカルボキシ末端部分（H_C）は神経特異的結合において機能し、一方Ｈ鎖のアミノ末端部分（H_N）は、膜トランスロケーションにおいて機能する。Ｌ鎖は、細胞内触媒活性に関与する(Montecucco and Schiavo, 前述, 1995)。

【００３７】

８種類のヒトクロストリジウム神経毒素のアミノ酸配列は、対応する遺伝子に由来している(Neimann, "Molecular Biology of Clostridial Neurotoxins" in Sourcebook of Bacterial Protein Toxins Alouf and Freer (Eds.) pp. 303-348 London: Academic Press 1991)。Ｌ鎖およびＨ鎖は、それぞれおよそ４３９および８４３残基より構成される。相同性あるセグメントが、ほとんどまたは全く類似しない領域によって隔てられている。Ｌ鎖の最も良く保存された領域は、アミノ末端部分（１００残基）および中心領域（ＴｅＮＴの残基２１６－２４４に相当）、および鎖間ジスルフィド結合を形成している二つのシステインである。この２１６－２４４の領域は、亜鉛－エンドペプチダーゼに特徴的なHis-Glu-X-X-His結合モチーフを含む。

【００３８】

重鎖は軽鎖ほどよくは保存されておらず、H_Cのカルボキシ末端部分（ＴｅＮＴの残基１１４０－１３１５に相当）が最も変化に富んでいる。このことは、H_Cドメインが神経終末への結合に関与していること、および異なる神経毒素は異なる受容体に結合しているようであるという事実と一致する。多くの血清型特異的抗体が重鎖決定基を認識することは驚くべきことではない。

【００３９】

クロストリジウム毒素のヌクレオチドおよびアミノ酸配列の比較により、それらが共通の先祖遺伝子に由来することがわかる。これら遺伝子の拡散は、クロストリジウム神経毒素遺伝子が移動性の遺伝子エレメント上に位置することよって促進されている可能性がある。以下にさらに述べるように、７種類のボツリヌス毒素の配列変異体が当業界で知られている。例えば図５から図７、および Humeau et al., 前述, 2000 参照。

【００４０】

前述のように、クロストリジウム神経毒素の本来の標的は、ＶＡＭＰ、ＳＮＡＰ－２５、およびｓｙｎｔａｘｉｎを含む。ＶＡＭＰはシナプス小胞膜に結合しており、一方ＳＮＡＰ－２５およびｓｙｎｔａｘｉｎは標的膜に結合している（図３参照）。ＢｏＮＴ／ＡおよびＢｏＮＴ／ＥはＳＮＡＰ－２５をカルボキシ末端領域において切断してそれぞれ９または２６アミノ酸残基を放出し、ＢｏＮＴ／Ｃ１もまたＳＮＡＰ－２５をカルボキシ末端付近で切断する。ボツリヌス血清型ＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／ＦおよびＢｏＮＴ／Ｇ、および破傷風毒素は、ＶＡＭＰの保存された中心部分に作用し、ＶＡＭＰのアミノ末端部分を細胞質中へ放出する。ＢｏＮＴ／Ｃ１は、ｓｙｎｔａｘｉｎを細胞膜内側膜表面付近の単一の部位で切断する。従ってＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｃ１、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／Ｆ、ＢｏＮＴ／Ｇ、およびＴｅＮＴの作用により、ＶＡＭＰおよびｓｙｎｔａｘｉｎの細胞質内ドメインの大部分が放出されるが、一方ＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｃ1またはＢｏＮＴ／Ｅのタンパク分解によっては、ＳＮＡＰ－２５の小さな部分しか放出されない (Montecucco and Schiavo, 前述, 1995)。

【００４１】

膜貫通セグメントを欠く約２０６残基のタンパク質であるＳＮＡＰ－２５は、神経細胞膜の細胞質内表面に結合している（図３、Hodel et al., Int. J. Biochemistry and Cell Biology 30:1069-1073 (1998)も参照）。Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａから哺乳類まで高度に

保存されたホモログに加えて、ＳＮＡＰ－２５関連タンパク質はまた酵母からも単離されている。ＳＮＡＰ－２５は発生中の軸索伸長に必要であり、また成熟神経系における神経終末可塑性にとって必要な可能性がある。ヒトにおいては、発生中に二つのアイソフォームが相異なるかたちで発現する；アイソフォームａは、胎児段階の初期に構成的に発現し、一方アイソフォームｂは出生時に現れ成年期に主に発現する。ＳＮＡＰ－２３のようなＳＮＡＰ－２５アナログもまた、神経系外部、例えば膵臓細胞に発現している。

【００４２】

ＶＡＭＰは約１２０残基のタンパク質であり、正確な長さは種およびアイソタイプに依存する。図３に示すように、ＶＡＭＰは短いカルボキシ末端セグメントを小胞内腔内に含むが、一方でその分子のほとんどは細胞質に露出している。プロリンリッチアミノ末端３０残基は種およびアイソフォーム間で相違するが、ＶＡＭＰの中心部分（残基３０－９６）は高度に保存されており、荷電および親水性残基に富み、かつ高度に保存された既知の切断部位を含む。ＶＡＭＰは、シナプトフィジンとともにシナプス小胞膜上に結合している。

【００４３】

ヒト、ラット、ウシ、Ｔｏｒｐｅｄｏ、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ、酵母、イカおよびＡｐｌｙｓｉａホモログを含む、様々なＶＡＭＰの種ホモログが当業界において知られている。さらに、ＶＡＭＰ－１、ＶＡＭＰ－２およびセルブレビンを含む、多数のＶＡＭＰアイソフォームが同定されており、かつ非神経細胞において非感受性型が同定されている。ＶＡＭＰ－１およびＶＡＭＰ－２の分布は相異なる細胞タイプにおいて様々であるが、ＶＡＭＰはすべての脊椎動物組織において存在するようである。チキンおよびラットＶＡＭＰ－１は、ＴｅＮＴまたはＢｏＮＴ／Ｂによって切断される。これらのＶＡＭＰ－１ホモログは、ＴｅＮＴまたはＢｏＮＴ／Ｂ切断部位において、ヒトまたはマウスＶＡＭＰ－１ではグルタミンが存在する場所にバリンを有する。置換はＢｏＮＴ／Ｄ、／Ｆ、または／Ｇには影響せず、それらはＶＡＭＰ－１およびＶＡＭＰ－２を同様の率で切断する。

【００４４】

Ｓｙｎｔａｘｉｎは神経細胞膜の細胞膜内側表面上に位置し、カルボキシ末端セグメントを介して膜に固定されており、そのタンパク質のほとんどが細胞質に露出している。Ｓｙｎｔａｘｉｎは、シナプス前膜の活性領域にカルシウムチャンネルと共に局在する。さらに、ｓｙｎｔａｘｉｎはＳＳＶ膜タンパク質であるシナプトタグミンと相互作用し、細胞膜と小胞の間に機能的架橋を形成する。様々なｓｙｎｔａｘｉｎアイソフォームが同定されている。幾分長さの異なる二つのアイソフォーム（２８５残基および２８８残基）が神経細胞において同定されており（アイソフォーム１Ａおよび１Ｂ）、アイソフォーム２、３、４、および５は他の組織に存在する。これらアイソフォームはＢｏＮＴ／Ｃ１に対する感受性が様々であり、ｓｙｎｔａｘｉｎ １Ａ、１Ｂ、２および３アイソフォームが本毒素によって切断される。

【００４５】

本発明のクロストリジウム毒素基質は、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むクロストリジウム毒素認識配列を含み、ここで、該切断部位はドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られる。従ってクロストリジウム毒素基質は、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件下、少なくとも一つのクロストリジウム毒素によって切断されやすい、ポリペプチド、ペプチドまたは模擬ペプチドである。

【００４６】

本明細書で用いる場合、「ドナー・フルオロフォア」なる用語は、ある波長の光が照射されたときに、異なる波長の光（蛍光とも称する）を放出する分子を意味する。フルオロフォアなる用語は、当業界において「蛍光色素（フルオロクローム）」なる用語と同義語である。

【００４７】

「アクセプター」なる用語は、本明細書で用いる場合、ドナー・フルオロフォアからその励起の際にエネルギーを吸収することができる分子を意味し、非蛍光分子およびフルオロフォアを包含する用語である。本発明のクロストリジウム毒素基質において有用なアクセプターは、ドナー・フルオロフォアオの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有する。通常本発明において有用なアクセプターはまた、ドナー・フルオロフォアの励起に適した波長における吸収がどちらかといえば低い。

【００４８】

本発明のクロストリジウム毒素基質において、アクセプターは、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有する。「重複する」なる用語は、本明細書でアクセプターの吸収スペクトルとドナー・フルオロフォアの発光スペクトルに関して用いる場合、部分的または完全に共有された吸収スペクトルと発光スペクトルを意味する。従って、そのような重複スペクトルにおいては、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルの範囲の高い方の端は、アクセプターの吸収スペクトルの範囲の低い方の端よりも高い。

【００４９】

本明細書で用いる場合、「クロストリジウム毒素認識配列」なる用語は、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に敵した条件下、クロストリジウム毒素によって切断容易な結合におけるタンパク分解を検出可能とするのに十分な、その切断容易な結合および近接または非近接認識エレメントを意味する。

【００５０】

本発明のクロストリジウム毒素基質は、ドナー・フルオロフォアと、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプターの間に「介在」する切断部位を含む。つまり切断部位は、その部位における切断によってフルオロフォアを含む第一の分子とアクセプターを含む第二の分子を生じるように、フルオロフォアとアクセプターの間に位置する。

【００５１】

本発明はさらに、クロストリジウム毒素基質「合成体」を提供する。そのようなクロストリジウム毒素基質合成体は、（ａ）アフィニティーカップルの第一のパートナーと連結した、ドナー・フルオロフォア－アクセプターペアの第一のメンバー、および、（ｂ）切断部位を含むクロストリジウム毒素認識配列を含み、認識配列はドナー・フルオロフォア－アクセプターペアの第二のメンバーおよびアフィニティーカップルの第二のパートナーと連結し、切断部位はドナー・フルオロフォア－アクセプターペアの第二のメンバーとアフィニティーカップルの第二のパートナーの間に介在し、ここで（ａ）および（ｂ）は、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォア－アクセプターペアの第一と第二のメンバーの間で見られるように、安定的に結合している。つまり、本発明のクロストリジウム毒素基質合成体は、要するに、二つの部分がアフィニティーカップルを介して安定的に結合した二連のクロストリジウム毒素基質である。他のクロストリジウム毒素基質と同様に、共鳴エネルギー転移は基質合成体の切断後に変化する。クロストリジウム毒素基質合成体において、および、アフィニティーカップルを含まなくてもよいクロストリジウム毒素基質非合成体において、本明細書に記載の、および、当業界において周知の、クロストリジウム毒素認識配列および切断部位が有用であり得ることは理解される。

【００５２】

「ドナー・フルオロフォア－アクセプターペア」なる用語は、本明細書で用いられる場合、ドナー・フルオロフォアおよびドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプターを意味する。本ペアの第一のメンバーがドナー・フルオロフォアである場合、本ペアの第二のメンバーはアクセプターであろう。該ペアの第一のメンバーがアクセプターである場合、該ペアの第二のメンバーはドナー・フルオロフォアであろう。

【００５３】

ある態様において、ドナー・フルオロフォア－アクセプターペアの第一のメンバーはド

ナー・フルオロフォアであり、第二のメンバーはアクセプターである。別の態様において、ドナー・フルオロフォアーアクセプターペアの第一のメンバーはアクセプターであり、第二のメンバーはドナー・フルオロフォアである。本明細書に記載されるドナー・フルオロフォアおよびアクセプターを含む、様々なドナー・フルオロフォアおよびアクセプターが本発明のクロストリジウム毒素基質合成体に有用である。ある態様において、ドナー・フルオロフォアはランタニドである。本発明の基質合成体において有用なランタニド・ドナー・フルオロフォアは、テルビウム、ユウロピウム、ジスプロシウム、およびサマリウムである。

【００５４】

「アフィニティーカップル」なる用語は、本明細書で用いる場合、安定的非共有結合的会合を形成することができる二つの分子を意味する。本発明の基質合成体に有用なアフィニティーカップルは、ストレプトアビジン-ビオチン；Ｓペプチド-Ｓタンパク質；ヒスチジンタグーニッケルキレート；抗体－抗原、例えば、ＦＬＡＧおよび抗ＦＬＡＧ抗体；および受容体－リガンドである。

【００５５】

ある態様において、アフィニティーカップルはストレプトアビジン－ビオチンである。更なる態様においては、アフィニティーカップルの第一のパートナーはストレプトアビジンであり、第二のパートナーはビオチンである。別の態様において、アフィニティーカップルの第一のパートナーはビオチンであり、第二のパートナーはストレプトアビジンである。なお更なる態様において、アフィニティーカップルはストレプトアビジン－ビオチンであり、ドナー・フルオロフォアはテルビウム、ユウロピウム、ジスプロシウム、およびサマリウムである。

【００５６】

クロストリジウム毒素は、特異的かつ別個の切断部位を切断する。ＢｏＮＴ／ＡはＧｌｎ－Ａｒｇ結合を切断する；ＢｏＮＴ／ＢおよびＴｅＮＴはＧｌｎ－Ｐｈｅ結合を切断する；ＢｏＮＴ／Ｃ１はＬｙｓ－ＡｌａまたはＡｒｇ－Ａｌａ結合を切断する；ＢｏＮＴ／ＤはＬｙｓ－Ｌｅｕ結合を切断する；ＢｏＮＴ／ＥはＡｒｇ－Ｉｌｅ結合を切断する；ＢｏＮＴ／ＦはＧｌｎ－Ｌｙｓ結合を切断する；およびＢｏＮＴ／ＧはＡｌａ－Ａｌａ結合を切断する（表1参照）。

切断容易な結合はP_1－P_1’と表すことができ、P_1またはP_1’部位、または両方を、天然の残基に代えて別のアミノ酸または模擬アミノ酸に置換できることが理解される。例えば、ＢｏＮＴ／Ａ基質は、P_1位置（Ｇｌｎ）がアラニン、２－アミノ酪酸またはアスパラギン残基に改変され、調製されている；これらの基質は、P_1－Ａｒｇ結合においてＢｏＮＴ／Ａによって加水分解される(Schmidt and Bostian, J. Protein Chem. 16: 19-26 (1997))。しかしながら、置換は、切断容易な結合、例えばＢｏＮＴ／Ａの切断容易な結合のP_1位置に導入することができるが、検出可能なタンパク分解にとってP_1’残基の保存が通常重要であることは理解される(Vaidyanathan et al., J. Neurochem. 72 :327-337 (1999))。従って、ある態様において本発明は、クロストリジウム毒素によって切断される標的タンパク質の天然の残基と比較してP_1’残基が改変または置換されていない、クロストリジウム毒素基質を提供する。別の態様において本発明は、クロストリジウム毒素によって切断される標的タンパク質の天然の残基と比較してP_1が改変または置換されている、クロストリジウム毒素基質を提供する；そのような基質はP_1およびP_1’残基の間のペプチド結合切断に対する感受性を保持している。

【表１】

ヒトＶＡＭＰ－２、ＳＮＡＰ－２５またはｓｙｎｔａｘｉｎにおいて切断される結合

毒素	標的	P_4-P_3-P_2-P_1 -- P_1'-P_2'-P_3'-P_4'
BoNT/A	SNAP-25	Glu-Ala-Asn-Gln—Arg*-Ala-Thr-Lys 配列番号：１
BoNT/B	VAMP-2	Gly-Ala-Ser-Gln—Phe*-Glu-Thr-Ser 配列番号：３
BoNT/C1	syntaxin	Asp-Thr-Lys-Lys—Ala*-Val-Lys-Tyr 配列番号：５
BoNT/D	VAMP-2	Arg-Asp-Gln-Lys—Leu*-Ser-Glu-Leu 配列番号：６
BoNT/E	SNAP-25	Gln-Ile-Asp-Arg—Ile*-Met-Glu-Lys 配列番号：８
BoNT/F	VAMP-2	Glu-Arg-Asp-Gln—Lys*-Leu-Ser-Glu 配列番号：９
BoNT/G	VAMP-2	Glu-Thr-Ser-Ala—Ala*-Lys-Leu-Lys 配列番号：１０
TeNT	VAMP-2	Gly-Ala-Ser-Gln—Phe*-Glu-Thr-Ser 配列番号：１１

＊ 太字で示した切断容易な結合

【００５７】

ＳＮＡＰ－２５、ＶＡＭＰおよびｓｙｎｔａｘｉｎは、αヘリカル構造をとると予想される領域内に位置する短いモチーフを共有する。このモチーフは、本神経毒素に感受性のある動物に発現するＳＮＡＰ－２５、ＶＡＭＰおよびｓｙｎｔａｘｉｎアイソフォーム中に存在する。それに対し、これらの神経毒素に対して抵抗性のあるＤｒｏｓｏｐｈｉｌａおよび酵母ホモログ、およびエキソサイトーシスに関与しないｓｙｎｔａｘｉｎアイソフォームは、これらＶＡＭＰおよびｓｙｎｔａｘｉｎタンパク質のαヘリカルモチーフ領域中に配列変動を含む。

【００５８】

αヘリカルモチーフの複数の反復が、クロストリジウム毒素による切断に感受性のあるタンパク質に存在する：ＳＮＡＰ－２５において４つのコピーが天然に存在する；ＶＡＭ

Ｐにおいて二つのコピーが天然に存在する；およびｓｙｎｔａｘｉｎにおいて二つのコピーが天然に存在する（図４Ａ参照）。さらに、αヘリカルモチーフの特異的配列に相当するペプチドは、ｉｎ ｖｉｔｒｏ およびｉｎ ｖｉｖｏにおいて神経毒性活性を阻害することができ、このようなペプチドは異なる神経毒素を交差阻害することができる。さらに、このようなペプチドに対して作られた抗体は、この三つの標的タンパク質の間で交差反応でき、このことは、このαヘリカルモチーフが細胞表面上に露出し、三つの標的タンパク質各々において良く似た構造をとっていることを意味している。これらの知見と一致して、ＳＮＡＰ－２５特異的、ＶＡＭＰ特異的およびｓｙｎｔａｘｉｎ特異的神経毒素は、同じ結合部位に対し競合することによって互いに交差阻害する。これらの結果は、クロストリジウム毒素認識配列が、要すれば、αヘリカルモチーフを少なくとも一つ含むことができることを意味する。以下の詳説するが、ＢｏＮＴ／Ａに対する１６ｍｅｒおよび１７ｍｅｒ基質によって証明されるように、αヘリカルモチーフはクロストリジウム毒素による切断に必ずしも必要ではないことは認識される。

【００５９】

ＳＮＡＰ－２５、ＶＡＭＰ、およびｓｙｎｔａｘｉｎには複数のαヘリカルモチーフが見られるが、ある態様において本発明は、クロストリジウム毒素認識配列が単一のαヘリカルモチーフを含むクロストリジウム毒素基質を提供する。別の態様において本発明は、クロストリジウム毒素認識配列が二つまたはそれ以上のαヘリカルモチーフを含むクロストリジウム毒素基質を提供する。ＢｏＮＴ／ＡまたはＢＯＮＴ／Ｅ認識配列は、例えばＳ４αヘリカルモチーフを単独で、または一つまたはそれ以上の更なるαヘリカルモチーフと組み合わせて含むことができる；ＢｏＮＴ／Ｂ、ＢＯＮＴ／Ｇ、およびＴｅＮＴ認識配列は、例えばＶ２αヘリカルモチーフを単独で、または一つまたはそれ以上のαヘリカルモチーフと組み合わせて含むことができる；ＢｏＮＴ／Ｃ１認識配列は、例えばＳ４αヘリカルモチーフを単独で、または一つまたはそれ以上のαヘリカルモチーフと組み合わせて、またはＸ２αヘリカルモチーフを単独で、または一つまたはそれ以上のαヘリカルモチーフと組み合わせて含むことができる；ＢｏＮＴ／ＤまたはＢｏＮＴ／Ｆ認識配列は、例えばＶ１αヘリカルモチーフを単独で、または一つまたはそれ以上のαヘリカルモチーフと組み合わせて含むことができる（図４Ａ参照）。

【００６０】

本発明のクロストリジウム毒素基質は、同じまたは相異なるクロストリジウム毒素に対する一つまたは複数のクロストリジウム毒素切断部位を含むことができる。ある態様において、本発明のクロストリジウム毒素基質は、単一の切断部位を含む。他の態様において、本発明のクロストリジウム毒素基質は、同じクロストリジウム毒素に対する複数の切断部位を有する。これらの切断部位は、同じまたは相異なるクロストリジウム毒素認識配列を伴ってもよい。更なる態様において、本発明のクロストリジウム毒素基質は、同じクロストリジウム毒素に対する複数の切断部位であって同じドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在するものを有する。本発明のクロストリジウム毒素基質は、例えば、同じクロストリジウム毒素に対する２個またはそれ以上、３個またはそれ以上、５個またはそれ以上、１０個またはそれ以上の切断部位であって同じまたは異なるドナー・フルオロフォア－アクセプターペアの間に介在するものを含むことができる。本発明のクロストリジウム基質はまた、例えば、同じクロストリジウム毒素に対する２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の切断部位であって、同じまたは異なるドナー・フルオロフォア－アクセプターペアの間に介在するものを有することができる。

【００６１】

複数の切断部位を含む本発明のクロストリジウム毒素基質は、相異なるクロストリジウム毒素に対する切断部位および認識配列を含むことができる。ある態様において、本発明のクロストリジウム毒素基質は、異なるクロストリジウム毒素に対する複数の切断部位であってすべて同じドナー・フルオロフォア－アクセプターペアの間に介在するものを含む。本発明のクロストリジウム毒素基質は、例えば、異なるクロストリジウム毒素に対する２個もしくはそれ以上、３個もしくはそれ以上、５個もしくはそれ以上、または１０個も

しくはそれ以上の切断部位であって、すべて同じドナー・フルオロフォアーアクセプターペアの間に介在するものを含むことができる。本発明のクロストリジウム毒素基質はまた、例えば、２個もしくはそれ以上、３個もしくはそれ以上、５個もしくはそれ以上、または１０個もしくはそれ以上の切断部位であって、少なくとも二つのドナー・フルオロフォアーアクセプターペアの間に介在するものを含むことができる。具体的態様において、本発明のクロストリジウム基質はまた、異なるクロストリジウム毒素に対する２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の切断部位であって、その切断部位が同じまたは異なるドナー・フルオロフォアとアクセプターペアの間に介在するものを有することができる。複数の切断部位を有する本発明のクロストリジウム毒素基質は、例えば、以下のクロストリジウム毒素のいずれかの組み合わせに対する、２、３、４、５、６、７または８個の切断部位の組み合わせをどれでも有することができる：ＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｃ1、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／Ｅ、ＢｏＮＴ／Ｆ、ＢｏＮＴ／ＧおよびＴｅＮＴ。

【００６２】

本発明のクロストリジウム毒素基質は、ＳＮＡＰ－２５、ＶＡＭＰ、またはｓｙｎｔａｘｉｎと比較して、または外来のフルオロフォアを含まない近似のペプチドまたは模擬ペプチドと比較して、減少または増強された率で切断され得ると理解される。ＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｃ1、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／Ｅ、ＢｏＮＴ／Ｆ、ＢｏＮＴ／ＧまたはＴｅＮＴ基質のような本発明のクロストリジウム毒素基質は、例えば、クロストリジウム毒素基質およびＳＮＡＰ－２５、ＶＡＭＰ、またはｓｙｎｔａｘｉｎが各々濃度１．０ｍＭで存在する場合に、基質以外は同一の条件下で、ヒトＳＮＡＰ－２５、ＶＡＭＰ、またはｓｙｎｔａｘｉｎの初期加水分解率の少なくとも５％である初期加水分解率で切断され得る。

【００６３】

従って、本発明のＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｃ１またはＢｏＮＴ／Ｅ基質は、例えば、本発明の基質およびヒトＳＮＡＰ－２５が各々濃度１．０ｍＭで存在する場合に、それ以外は同一の条件下で、ＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｃ１またはＢｏＮＴ／ＥによるヒトＳＮＡＰ－２５の初期加水分解率の少なくとも５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、または３００％である初期加水分解率で切断され得る。他の態様において、本発明のＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｃ１またはＢｏＮＴ／Ｅ基質は、例えば、本発明の基質およびヒトＳＮＡＰ－２５が各々濃度５０ｍＭで存在する場合に、それ以外は同一の条件下で、ヒトＳＮＡＰ－２５のＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｃ１またはＢｏＮＴ／Ｅによる初期加水分解率の少なくとも５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、または３００％である初期加水分解率を有する。

【００６４】

同様に、本発明のＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／ＦまたはＢｏＮＴ／Ｇ基質は、例えば、本発明の基質およびヒトＶＡＭＰ－２が各々濃度１．０ｍＭで存在する場合に、それ以外は同一の条件下で、ＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／ＦまたはＢｏＮＴ／ＧによるヒトＶＡＭＰ－２の初期加水分解率の少なくとも５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、または３００％である初期加水分解率で切断され得る。他の態様において、本発明のＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／ＦまたはＢｏＮＴ／Ｇ基質は、本発明の基質およびヒトＶＡＭＰ－２が各々濃度５０ｍＭで存在する場合に、それ以外は同一の条件下で、ＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／ＦまたはＢｏＮＴ／GによるヒトＶＡＭＰ－２の初期加水分解率の少なくとも５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、または３００％である初期加水分解率で切断される。

【００６５】

本発明はまた、ＢｏＮＴ／Ｃ１基質およびヒトｓｙｎｔａｘｉｎが各々濃度１ｍＭで存在する場合に、それ以外は同一の条件下、ＢｏＮＴ／Ｃ１によるヒトｓｙｎｔａｘｉｎの初期加水分解率の少なくとも５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、または３００％である初期加水分解率で切断される、本発明のＢｏＮＴ／Ｃ１基質を提供する。他の態様において、本発明は、ＢｏＮＴ／Ｃ１基質およびヒトｓｙｎｔａｘｉｎが各々濃度５０ｍＭで存在する場合に、基質以外は同一の条件下、ＢｏＮＴ／Ｃ１によるヒトｓｙｎｔａｘｉｎの初期加水分解率の少なくとも５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、または３００％である初期加水分解率で切断される、ＢｏＮＴ／Ｃ１基質を提供する。

【００６６】

「ターンオーバー数」またはk_{cat}は、毒素基質複合体の崩壊速度である。本発明のクロストリジウム毒素基質は、同じクロストリジウム毒素によって同じ条件下で切断された場合に、ヒトＳＮＡＰ－２５、ヒトＶＡＭＰ－２またはヒトｓｙｎｔａｘｉｎ標的タンパク質のk_{cat}と比較して減少または増強されたk_{cat}で切断され得る。ＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｃ１、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／Ｅ、ＢｏＮＴ／Ｆ、ＢｏＮＴ／ＧまたはＴｅＮＴ基質のような本発明のクロストリジウム毒素基質は、例えば、約０．００１から約４０００秒$^{-1}$のk_{cat}で切断され得る。ある態様において、ＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｃ１、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／Ｅ、ＢｏＮＴ／Ｆ、ＢｏＮＴ／ＧまたはＴｅＮＴ基質のような本発明のクロストリジウム毒素基質は、約１から約４０００秒$^{-1}$のk_{cat}で切断される。他の態様において、本発明のＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｃ１、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／Ｅ、ＢｏＮＴ／Ｆ、ＢｏＮＴ／ＧまたはＴｅＮＴ基質は、５秒$^{-1}$、１０秒$^{-1}$、２５秒$^{-1}$、５０秒$^{-1}$、１００秒$^{-1}$、２５０秒$^{-1}$、５００秒$^{-1}$または１０００秒$^{-1}$未満のk_{cat}を有する。ＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｃ１、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／Ｅ、ＢｏＮＴ／Ｆ、ＢｏＮＴ／ＧまたはＴｅＮＴ基質のような本発明のクロストリジウム毒素基質はまた、例えば、１から１０００秒$^{-1}$；１から５００秒$^{-1}$；１から２５０秒$^{-1}$；１から１００秒$^{-1}$；１から５０秒$^{-1}$；１０から１０００秒$^{-1}$；１０から５００秒$^{-1}$；１０から２５０秒$^{-1}$；１０から１００秒$^{-1}$；１０から５０秒$^{-1}$；２５から１０００秒$^{-1}$；２５から５００秒$^{-1}$；２５から２５０秒$^{-1}$；２５から１００秒$^{-1}$；２５から５０秒$^{-1}$；５０から１０００秒$^{-1}$；５０から５００秒$^{-1}$；５０から２５０秒$^{-1}$；５０から１００秒$^{-1}$；１００から１０００秒$^{-1}$；１００から５００秒$^{-1}$；または１００から２５０秒$^{-1}$の範囲のk_{cat}を有することができる。ターンオーバー数、k_{cat}は、標準的速度条件のもと過剰量の基質の存在下でアッセイすることを当業者は理解している

【００６７】

具体的態様において、本発明のクロストリジウム毒素基質はペプチドまたは模擬ペプチドである。本明細書で用いる場合、「模擬ペプチド」なる用語は、それが構造的に基づいているペプチド基質と同じクロストリジウム毒素によって切断されるペプチド様分子を意味するのに広く使用される。そのような模擬ペプチドは、化学修飾ペプチド、非天然アミノ酸を含有するペプチド様分子、およびペプトイド（Ｎ置換グリシンのオリゴマー集合より生じるペプチド様分子）を含み、その模擬ペプチドのもととなるペプチド基質と同じクロストリジウム毒素によって切断される（例えば、Goodman and Ro, Peptidomimetics for Drug Design, in ”Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery” Vol. 1 (ed. M.E. Wolff; John Wiley & Sons 1995)、803-861ページ参照）。

【００６８】

例えば、拘束（ｃｏｎｓｔｒａｉｎｅｄ）アミノ酸、ペプチド二次構造を模した非ペプチド構成要素、またはアミド結合イソスターを含有するペプチド様分子を含む、様々な模擬ペプチドが当業界において知られている。拘束（ｃｏｎｓｔｒａｉｎｅｄ）非天然アミノ酸を含有する模擬ペプチドは、例えば、αメチル化アミノ酸、α，α－ジアルキルグリ

シンまたはアミノシクロアルカンカルボン酸;N^{α}－C^{α}環化アミノ酸; N^{α}メチル化アミノ酸；β－またはγ－アミノシクロアルカンカルボン酸;α，β－不飽和アミノ酸; β，β－ジメチルまたはβ－メチルアミノ酸;β-置換-2,3-メタノアミノ酸;Ｎ－C^{δ}またはC^{α}－C^{δ}環化アミノ酸; または置換プロリンまたは別の模擬アミノ酸を含むことができる。さらに、ペプチド二次構造を模する模擬ペプチドは、例えば、非ペプチド模擬β-ターン、模擬γ-ターン、模擬βシート構造、または模擬ヘリカル構造を含むことができ、それら各々は、当業界にて良く知られている。模擬ペプチドはまた、例えば、レトロ-インバーソ（retro-inverso）改変のようなアミド結合イソスター；還元アミド結合；メチレンチオエーテルまたはメチレンスルホキシド結合; メチレンエーテル結合; エチレン結合; チオアミド結合; トランス-オレフィンまたはフルオロオレフィン結合; 1,5-二置換テトラゾール環; ケトメチレンまたはフルオロケトメチレン結合または別のアミドイソスターを含む、ペプチド様分子であってよい。当業者は、これらおよび他の模擬ペプチドが、本明細書で使用される「模擬ペプチド」なる用語の意味に包含されることを理解している。

【００６９】

本発明は、例えば、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むＡ血清型ボツリヌス毒素（ＢｏＮＴ／Ａ）認識配列を含むＢｏＮＴ／Ａ基質であって、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるＢｏＮＴ／Ａ基質を提供する。本発明のＢｏＮＴ／Ａ基質は、例えば、ＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ－Ａｒｇを含むもの、またはその模擬ペプチドを含み得る。このようなＢｏＮＴ／Ａ基質はまた、例えばヒトＳＮＡＰ－２５の少なくとも6つの連続する残基であってGln_{197}－Arg_{198}を含むもの、またはその模擬ペプチドを有することができる。ある態様においては、本発明のＢｏＮＴ／Ａ基質は、アミノ酸配列Glu-Ala-Asn-GlnArg-Ala-Thr-Lys (配列番号：１)またはその模擬ペプチドを含む。別の態様においては、本発明のＢｏＮＴ／Ａ基質は、ヒトＳＮＡＰ－２５（配列番号：２）の残基１８７－２０３、またはその模擬ペプチドを含む。本発明のＢｏＮＴ／Ａ基質においては様々なドナー・フルオロフォアおよびアクセプターが有用であり、それにはフルオレセイン－テトラメチルローダミン、ＤＡＢＣＹＬ－ＥＤＡＮＳ、およびＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－ＱＳＹ（登録商標）７が含まれるが、これらに限定されない。本発明のＢｏＮＴ／Ａ基質において有用なさらなるドナー・フルオロフォアおよびアクセプターは、本明細書中以下にさらに記載される。

【００７０】

本明細書で用いられる場合、「Ａ血清型ボツリヌス毒素認識配列」なる用語は、「ＢｏＮＴ／Ａ認識配列」と同義語であり、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件下、ＢｏＮＴ／Ａによって切断容易な結合におけるタンパク分解を検出可能とするのに十分な、その切断容易な結合および近接または非近接認識エレメントを意味する。ＢｏＮＴ／Ａによって切断される切断容易な結合は、例えば、Ｇｌｎ－Ａｌａである。

【００７１】

様々なＢｏＮＴ／Ａ認識配列が当業界においてよく知られている。ＢｏＮＴ／Ａ認識配列は、例えば、ヒトＳＮＡＰ－２５の残基１３４－２０６または残基１３７－２０６を有することができる(Ekong et al., 前述, 1997; U.S. Patent No. 5,962,637)。ＢｏＮＴ／Ａ認識配列はまた、配列Thr-Arg-Ile-Asp-Glu-Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys-Met (配列番号： 27)またはその模擬ペプチド（ヒトＳＮＡＰ－２５の残基１９０－２０２に相当）; Ser-Asn-Lys-Thr-Arg-Ile-Asp-Glu-Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys (配列番号： 28)またはその模擬ペプチド（ヒトＳＮＡＰ－２５の残基１８７－２０１に相当）; Ser-Asn-Lys-Thr-Arg-Ile-Asp-Glu-Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys-Met (配列番号： 29) またはその模擬ペプチド（ヒトＳＮＡＰ－２５の残基１８７－２０２に相当）; Ser-Asn-Lys-Thr-Arg-Ile-Asp-Glu-Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys-Met Leu (配列番号： 30) またはその模

擬ペプチド（ヒトＳＮＡＰ－２５の残基１８７－２０３に相当）；Asp-Ser-Asn-Lys-Thr-Arg-Ile-Asp-Glu-Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys-Met (配列番号： 31) またはその模擬ペプチド（ヒトＳＮＡＰ－２５の残基１８６－２０２に相当）；またはAsp-Ser-Asn-Lys-Thr-Arg-Ile-Asp-Glu-Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys-Met-Leu (配列番号： 32) またはその模擬ペプチド（ヒトＳＮＡＰ－２５の残基１８６－２０３に相当）を含むことができるが、これらに限定されない。例えば、Schmidt and Bostian, J. Protein Chem. 14:703 708 (1995); Schmidt and Bostian, 前述, 1997; Schmidt et al., FEBS Letters 435:61-64 (1998); and Schmidt and Bostian, U.S. Patent No. 5,965,699)参照。要すれば、近似するＢｏＮＴ／Ａ認識配列は、別のＢｏＮＴ／Ａ感受性ＳＮＡＰ－２５アイソフォームまたはマウス、ラット、ゴールドフィッシュまたはゼブラフィッシュＳＮＡＰ－２５のようなホモログの対応する（相同性ある）セグメントから調製することができ、または、本明細書に開示される、または当業界において（例えばU.S. Patent No. 5,965,699に）記載される、いずれかのペプチドであってよい。

【００７２】

ＢｏＮＴ／Ａ認識配列は、Ａ血清型ボツリヌス毒素による切断に感受性のあるタンパク質のセグメントに一致してよく、またはＢｏＮＴ／Ａ感受性タンパク質のセグメントに実質的に近似してもよい。表２に描かれるように、ＢｏＮＴ／Ａによる切断に感受性のある様々な天然タンパク質が当業界において知られており、例えば、ヒト、マウス、およびラットＳＮＡＰ－２５、ゴールドフィッシュＳＮＡＰ－２５ＡおよびＳＮＡＰ－２５Ｂを包含する。従って、本発明のＢｏＮＴ／Ａ基質に有用なＢｏＮＴ／Ａ認識配列は、例えば、ヒトＳＮＡＰ－２５、マウスＳＮＡＰ－２５、ラットＳＮＡＰ－２５、ゴールドフィッシュＳＮＡＰ－２５Ａまたは２５Ｂ、またはＢｏＮＴ／Ａによる切断に感受性のある別の天然タンパク質の、セグメントと一致してよい。さらに、ＢｏＮＴ／Ａによって切断される本来のＳＮＡＰ－２５アミノ酸配列を比較すると、そのような配列は完全には保存されていないことがわかり（表２および図５参照）、このことは、天然ＢｏＮＴ／Ａ感受性ＳＮＡＰ－２５配列と比較して、様々なアミノ酸置換および改変が本発明のＢｏＮＴ／Ａ基質において許容されることを意味している。

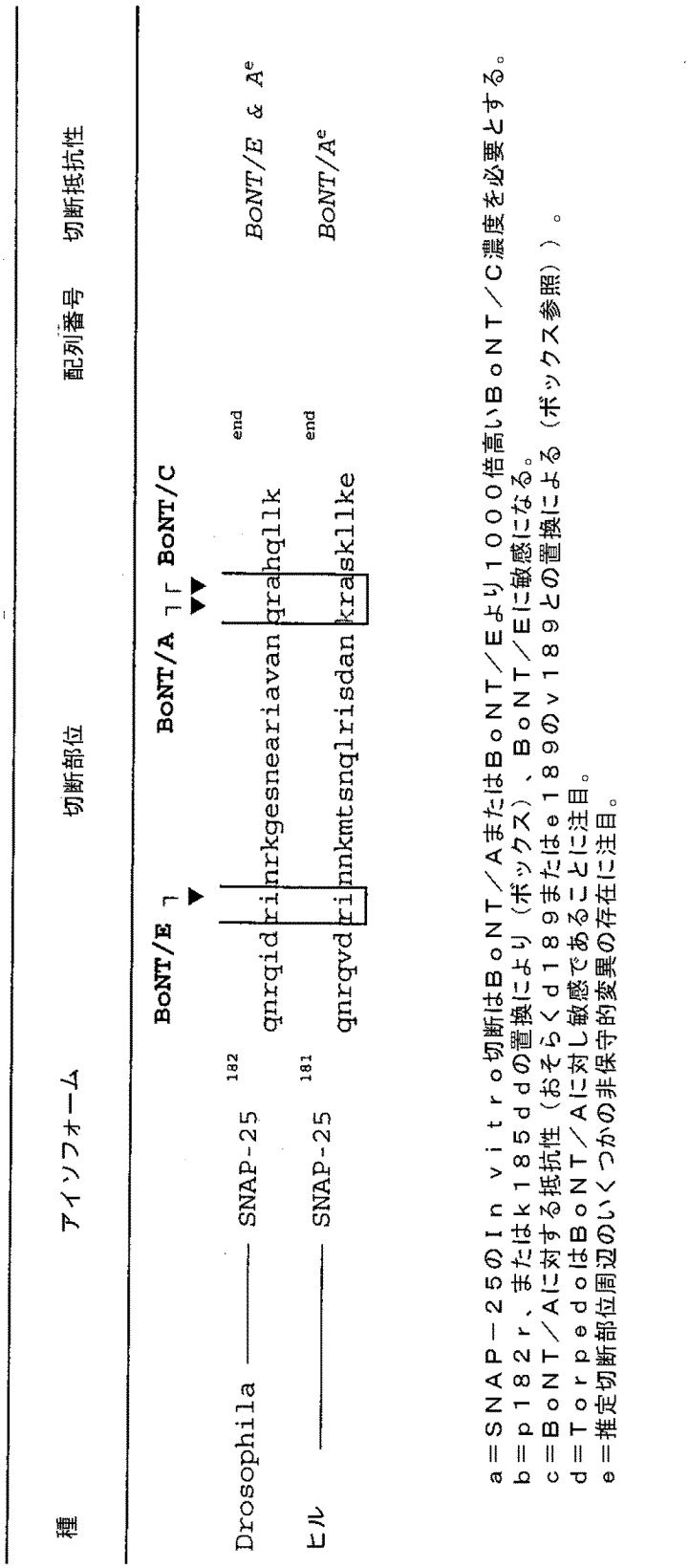
【表２－１】

SNAP－２５およびSNAP－２５関連タンパク質の切断a，b，c，d

種	アイソフォーム	切断部位	配列番号	切断抵抗性
ヒト				
マウス	SNAP-25	qnrqidrimekadsnktrideanqratkmlgsg	206	なしa
ラット				
ヒト	SNAP-23	qnpqikritdkadtnrdridianarakklids	end	すべてb
マウス	SNAP-23	qnqqikitekadtnknridiantrakklids	end	*BoNT/A & C*
チキン	SNAP-25	qnrqidrimeklipikpglmkptsvqqrcsavvk	end	*BoNT/A & C*
ゴールドフィッシュ	SNAP-25 A	qnrqidrimdmadsnktrideanqratkmlgsg	end	なし
	SNAP-25 B	qnrqidrimekadsnktrideanqratkmlgsg	end	なし
Torpedo	SNAP-25	qnaqvdrivvkgdmnkarideankhatkml	end	*BoNT/E[c] & A[d]*
ウニ	SNAP-25	qnsqvgritskaesnegrinsadkraknilrnk	end	(?)[e]
C-elegans	SNAP-25	qnrqldrihdkqsnevrvesankrakmlitk	end	*BoNT/A & C*

BoNT/E ▼　BoNT/A ▼▼　BoNT/C ▼▼

【表２－２】



【００７３】

本発明のクロストリジウム毒素基質、例えばＢｏＮＴ／Ａ基質は、対応するクロストリジウム毒素によって切断される天然配列と比較して、一つまたは複数の改変を有することができる。例えば、ヒトＳＮＡＰ－２５の残基１８７－２０３に相当する１７ｍｅｒと比較して、ＢｏＮＴ／Ａ基質におけるＡｓｐ１９３のＡｓｎとの置換により、タンパク分解

の相対率が０．２３になる；Ｇｌｕ１９４のＧｌｎとの置換により、相対率は２．０８になる；Ａｌａ１９５の２－アミノ酪酸との置換により、相対率が０．３８となる；そしてＧｌｎ１９７のＡｓｎ、２－アミノ酪酸、またはＡｌａとの置換により、相対率がそれぞれ０．６６、０．２５、または０．１９となる（表３参照）。その上、Ａｌａ１９９と２－アミノ酪酸との置換により、相対率は０．７９となる；Ｔｈｒ２００のＳｅｒまたは２－アミノ酪酸との置換により、相対率はそれぞれ０．２６または１．２０となる；Ｌｙｓ２０１のＡｌａとの置換により、相対率は０．１２になる；そしてＭｅｔ２０２のＡｌａまたはノルロイシンとの置換により、相対率はそれぞれ０．３８または１．２０になる。Schmidt and Bostian, 前述, 1997参照。これらの結果は、本発明のクロストリジウム毒素基質において、天然の毒素感受性配列と比較して様々な残基が置換可能であることを意味している。ＢｏＮＴ／Ａの場合、これらの結果は、Ｇｌｕ１９４、Ａｌａ１９５、Ｇｌｎ１９７、Ａｌａ１９９、Ｔｈｒ２００およびＭｅｔ２０２、Ｌｅｕ２０３、Ｇｌｙ２０４、Ｓｅｒ２０５、およびＧｌｙ２０６を含む（ただしこれらに限定されない）残基およびＧｌｎ－Ａｒｇの切断容易な結合からもっと離れている残基が、置換可能であること、または、本発明のＢｏＮＴ／Ａ基質を生産するためドナー・フルオロフォアまたはアクセプターと結合できることを意味している。このようなＢｏＮＴ／Ａ基質は、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件下、ＢｏＮＴ／Ａのよって、その切断容易な結合において検出可能にタンパク分解される。つまり、本発明のＢｏＮＴ／Ａ基質は、要すれば、天然ＳＮＡＰ－２５配列に対する一つまたはいくつかのアミノ酸置換、付加、欠失を含むことができる。

【表３】

ＢｏＮＴ／Ａ合成ペプチド基質の速度パラメーター

ペプチド	配列ａ	配列番号	相対率ｂ
[1-15]	SNKTRIDEANQRATK	28	0.03
[1-16]	SNKTRIDEANQRATKM	29	1.17
[1-17]	SNKTRIDEANQRATKML	30	1.00
M16A	SNKTRIDEANQRATK**A**L	44	0.38
M16X	SNKTRIDEANQRATK**X**L	45	1.20
K15A	SNKTRIDEANQRAT**A**ML	46	0.12
T14S	SNKTRIDEANQRA**S**KML	47	0.26
T14B	SNKTRIDEANQRA**B**KML	48	1.20
A13B	SNKTRIDEANQR**B**TKML	49	0.79
Q11A	SNKTRIDEAN**A**RATKML	50	0.19
Q11B	SNKTRIDEAN**B**RATKML	51	0.25
Q11N	SNKTRIDEAN**N**RATKML	52	0.66
N10A	SNKTRIDEA**A**QRATKML	53	0.06
A9B	SNKTRIDE**B**NQRATKML	54	0.38
E8Q	SNKTRID**Q**ANQRATKML	55	2.08
D7N	SNKTRI**N**EANQRATKML	56	0.23

ａ：非標準的アミノ酸省略記号は、Ｂ：２－アミノ酪酸、Ｘ：２－アミノヘキサン酸（ノルロイシン）。

ｂ：ペプチド[1－17]と対比した初期加水分解率。　ペプチド濃度は１．０ｍＭであった。

【００７４】

標準的命名において、クロストリジウム毒素切断部位周辺の配列は、$P_5-P_4-P_3-P_2-P_1-P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$で示され、$P_1-P_1'$が切断容易な結合である。ある態様において、本発明は、P_1、P_2、P_3、P_4、P_5または$P_{>5}$の位置の残基がドナー・フルオロフォアまたはアクセプターと結合したアミノ酸と置換されており、P_1'、P_2'、P_3'、P_4'、P_5'または$P_{>5}'$の位置の残基がドナー・フルオロフォアまたはアクセプターと結合したアミノ酸と置換されている、ＢｏＮＴ／Ａ基質または他のクロストリジウム毒素基質を提供する。別の態様において、本発明は、P_1、P_3、P_4、または$P_{>5}$における残基がドナー・フルオロフォアまたはアクセプターと結合したアミノ酸と置換されており、P_2'、P_3'、P_5'または$P_{>5}'$の位置の残基がドナー・フルオロフォアまたはアクセプターと結合したアミノ酸と置換されているＢｏＮＴ／Ａ基質または他のクロストリジウム毒素基質を提供する。ドナー・フルオロフォアまたはアクセプターに結合した残基のアミノ酸側鎖は、その他の点では天然の標的タンパク質の対応する位置に存在する残基と同一であってよく、または、例えば異なる側鎖を含んでもよいことがさらに理解される。本発明によってさらに提供されるのは、P_3、P_4、または$P_{>5}$の位置の残基がドナー・フルオロフォアまたはアクセプターと結合したアミノ酸と置換されており、P_2'、P_3'、P_5'または$P_{>5}'$の位置の残基がドナー・フルオロフォアまたはアクセプターと結合したアミノ酸と置換されているＢｏＮＴ／Ａ基質または他のクロストリジウム毒素基質である。同様に、ドナー・フ

ルオロフォアまたはアクセプターに結合した残基のアミノ酸側鎖は、その他の点では天然の標的タンパク質の対応する位置に存在する残基と同一であってよく、または、例えば異なる側鎖を含んでもよい。

【００７５】

本発明のＢｏＮＴ／Ａ基質はまた、要すれば、カルボキシ末端アミドを含むことができる。従って、本発明のＢｏＮＴ／Ａ基質は、例えば、最大２０、３０、４０、５０残基を有し、かつカルボキシ末端アミドを含むペプチドであってよい。

【００７６】

本発明によってさらに提供されるのは、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むＢ血清型ボツリヌス毒素（ＢｏＮＴ／Ｂ）認識配列を含むＢｏＮＴ／Ｂ基質であって、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるＢｏＮＴ／Ｂ基質である。本発明のＢｏＮＴ／Ｂ基質は、例えば、ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ－Ｐｈｅを含むもの、またはその模擬ペプチドを含むことができる。例えば、本発明のＢｏＮＴ／Ｂ基質は、ヒトＶＡＭＰ－２の少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ$_{76}$－Ｐｈｅ$_{77}$を含むもの、またはその模擬ペプチドを含むことができる。ある態様において、ＢｏＮＴ／Ｂ基質は、Gly-Ala-Ser-GlnPhe-Glu-Thr-Ser（配列番号：３)またはその模擬ペプチドを含む。他の態様においては、ヒトＶＡＭＰ－２(配列番号：４)の残基５５－９４；ヒトＶＡＭＰ－２(配列番号：４)の残基６０－９４；またはヒトＶＡＭＰ－２（配列番号：４）の残基６０－８８、またはこれら配列のうち一つの模擬ペプチドを含む。様々なドナー・フルオロフォアとアクセプターが本発明のＢｏＮＴ／Ｂ基質において有用であることは理解される；そのようなドナー・フルオロフォア－アクセプターの組み合わせには、フルオレセイン－テトラメチルローダミン、ＤＡＢＣＹＬ－ＥＤＡＮＳ、およびＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－ＱＳＹ（登録商標）７が含まれるが、これらに限定されない。本発明のＢｏＮＴ／Ｂ基質に有用な様々なさらなるドナー・フルオロフォアとアクセプターが当業界において知られており、以下にさらに記載される。

【００７７】

本明細書で用いる場合、「Ｂ血清型ボツリヌス毒素認識配列」なる用語は、「ＢｏＮＴ／Ｂ認識配列」と同義語であり、適した条件下、ＢｏＮＴ／Ｂによって切断容易な結合におけるタンパク分解を検出可能とするのに十分な、その切断容易な結合および近接または非近接認識エレメントを意味する。ＢｏＮＴ／Ｂによって切断される切断容易な結合は、例えば、Ｇｌｎ－Ｐｈｅである。

【００７８】

様々なＢｏＮＴ／Ｂ認識配列が当業界においてよく知られており、あるいは平凡な方法によって規定できる。そのようなＢｏＮＴ／Ｂ認識配列は、例えば、ヒトＶＡＭＰ－１またはヒトＶＡＭＰ－２のようなＶＡＭＰタンパク質の親水性コアのいくつかまたは全てに相当する配列を含むことができる。ＢｏＮＴ／Ｂ認識配列は、ヒトＶＡＭＰ－２（配列番号：４）の残基３３－９４、残基４５－９４、残基５５－９４、残基６０－９４、残基６５－９４、残基６０－８８または残基６５－８８、またはヒトＶＡＭＰ－１（配列番号９６）の残基６０－９４を含み得るが、これらに限定されない(例えば Shone ら、Eur. J. Biochem. 217: 965-971 (1993) および 米国特許番号5,962,637参照)。要すれば、別のＢｏＮＴ／Ｂ感受性ＶＡＭＰアイソフォームまたはヒトＶＡＭＰ－１またはラットもしくはチキンＶＡＭＰ－２のようなホモログの対応する（相同性ある）セグメントから、近似するＢｏＮＴ／Ｂ認識配列を調製できる。

【００７９】

つまり、ＢｏＮＴ／Ｂ認識配列は、Ｂ血清型ボツリヌス毒素による切断に感受性のあるタンパク質のセグメントに一致してよく、またはＢｏＮＴ／Ｂ感受性タンパク質のそのようなセグメントに実質的に近似してもよい。表４に描かれるように、ＢｏＮＴ／Ｂによる

切断に感受性のある様々な天然タンパク質が当業界において知られており、例えば、ヒト、マウス、およびウシＶＡＭＰ－１およびＶＡＭＰ－２、ラットＶＡＭＰ－２、ラットセルブレビン、チキンＶＡＭＰ－２、ＴｏｒｐｅｄｏＶＡＭＰ－１、ウニＶＡＭＰ、Ａｐｌｙｓｉａ ＶＡＭＰ、イカＶＡＭＰ、Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ ＶＡＭＰ、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｎ－ｓｙｂ、およびヒルＶＡＭＰを含む。つまり、本発明のＢｏＮＴ／Ｂ基質に有用なＢｏＮＴ／Ｂ認識配列は、例えば、ヒトＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、マウスＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、ウシＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、ラットＶＡＭＰ－２、ラットセルブレビン、チキンＶＡＭＰ－２、ＴｏｒｐｅｄｏＶＡＭＰ－１、ウニＶＡＭＰ、ＡｐｌｙｓｉａＶＡＭＰ、イカＶＡＭＰ、Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓＶＡＭＰ、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｎ－ｓｙｂ、ヒルＶＡＭＰ、またはＢｏＮＴ／Ｂによる切断に感受性のある別の天然タンパク質の、セグメントと一致してよい。さらに、表４に示すように、ＢｏＮＴ／Ｂによって切断される本来のＶＡＭＰアミノ酸配列を比較すると、そのような配列は完全には保存されていないことがわかり（図６も参照）、このことは、天然ＶＡＭＰ配列と比較して、様々なアミノ酸置換および改変が本発明のＢｏＮＴ／Ｂ基質において許容されることを意味している。

【表４－１】

VAMPの切断a，b

種	アイソフォーム	切断部位	配列番号	切断抵抗性
ヒト マウス ウシ	VAMP-1	BoNT/F, BoNT/D: dkvlerdqkl BoNT/B, TeNT: selddradalqagas BoNT/G: qfessaaklkrkyww	53 92	なし
	VAMP-2	dkvlerdqkl selddradalqagas qfetsaaklkrkyww	51 90	なし
ラット	VAMP-1	dkvlerdqkl selddradalqagas vfessaaklkrkyww	53 92	TeNT & BoNT/B
	VAMP-2	dkvlerdqkl selddradalqagas qfetsaaklkrkyww	51 90	なし
	セルブレビン	dkvlerdqkl selddradalqagas qfetsaaklkrkyww	38 77	なし
	TI-VAMP	dlvaqrgerl ellidktenlvdssv tfkttsrnlaramcm	146 175	すべて

【表４－２】

VAMPの切断a，b

種	アイソフォーム	切断部位	配列番号	切断抵抗性
		BoNT/F, BoNT/D, BoNT/B, TeNT, BoNT/G		
チキン	VAMP-1	----erdqklselddradalqagasvfessaaklkr----		TeNT & BoNT/B
	VAMP-2	----erdqklselddradalqagasqfetsaaklkr----		なし
Torpedo	VAMP-1	dkvlerdqklselddradalqagasqfessaaklkrkyww	94	なし
ウニ	VAMP	dkvldrdqalsvlddradalqggasqfetnagklkrkyww	74	BoNT/F, D & G
Aplysia	VAMP	ekvldrdqkisqlddraealqagasqfeasagklkrkyww	80	BoNT/G

ＶＡＭＰの切断ａ，ｂ

種	アイソフォーム	切断部位	配列番号	切断抵抗性
		BoNT/F, BoNT/D, BoNT/B TeNT, BoNT/G		
イカ	VAMP	60 dkvlerdskiselddradalqagasqfeasagklkrkfww 99		*BoNT/F & G*
C. elegans	VAMP	86 nkvmerdvqlnsldhraevlqngasqfqqssrelkrqyww 115		*BoNT/F, D & G*
Drosphila	syb[a]	67 ekvlerdqklselgeradqleqgasqseqqagklkrkqww 106		*TeNT & BoNT/B & G*
	n-syb[b]	61 ekvlerdsklselddradalqqgasqfeqqagklkrkfwl 100		*BoNT/F & G*
ヒル	VAMP	49 dkvlekdqklaeldgradalqagasqfeasagklkrkfww 88		*BoNT/G*

ａ＝位置９３を訂正した配列（ｆ＞ｓ）
ｂ＝位置６８を訂正した配列（ｔ＞ｓ）

【００８０】

本発明はまた、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むＣ１血清型ボツリヌス毒素（ＢｏＮＴ／Ｃ１）認識配列を含むＢｏＮＴ／Ｃ１基質であって、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるＢｏＮＴ／Ｃ１基質を提供する。本発明のＢｏＮＴ／Ｃ１基質は、例えば、ｓｙｎｔａｘｉｎの少なくとも６つの連続する残基であってＬｙｓ－Ａｌａを含むもの、またはその模擬ペプチドを含むことができる。例えば、本発明のＢｏＮＴ／Ｃ１基質は、ヒトｓｙｎｔａｘｉｎの少なくとも６つの連続する残基であって$Ｌｙｓ_{２５３}$－$Ａｌａ_{２５４}$を含むもの、またはその模擬ペプチドを含むことができる。ある態様において、ＢｏＮＴ／Ｃ１基質は、Asp-Thr-Lys-Lys-Ala-Val-Lys-Tyr (配列番号：５)またはその模擬ペプチドを含む。

【００８１】

本発明のＢｏＮＴ／Ｃ１基質はまた、例えば、ＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基であってＡｒｇ－Ａｌａを含むもの、またはその模擬ペプチドを含むことができる。そのようなＢｏＮＴ／Ｃ１基質は、例えば、ヒトＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基であって$Ａｒｇ_{１９８}$－$Ａｌａ_{１９９}$を含むもの、またはその模擬ペプチドを有することができる。典型的ＢｏＮＴ／Ｃ１基質は、ヒトＳＮＡＰ－２５(配列番号：２)の残基９３－２０２またはその模擬ペプチドを含む。本発明のすべてのクロストリジウム毒素基質と同様に、様々なドナー・フルオロフォアとアクセプターの組み合わせが本発明のＢｏＮＴ／Ｃ１基質において有用であり、それにはフルオレセイン－テトラメチルローダミン、ＤＡＢＣＹＬ－ＥＤＡＮＳ、およびＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－ＱＳＹ（登録商標）７が含まれるが、これらに限定されない。本発明のＢｏＮＴ／Ｃ１基質に有用なさらなるドナー・フルオロフォアとアクセプターが本明細書中以下に記載される。

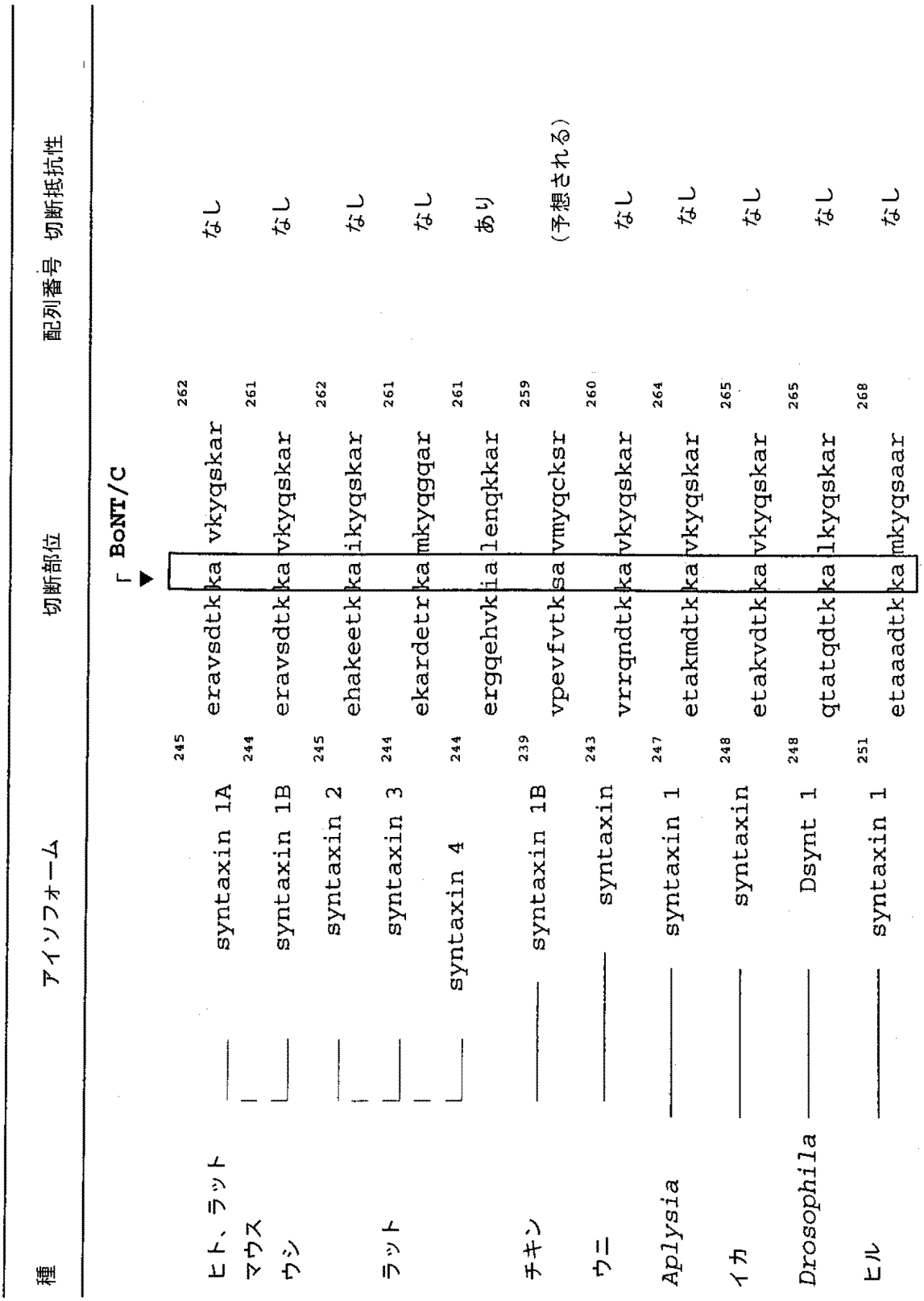
【００８２】

本明細書で用いる場合、「Ｃ１血清型ボツリヌス毒素認識配列」なる用語は、「ＢｏＮＴ／Ｃ１認識配列」と同義語であり、適した条件下、ＢｏＮＴ／Ｃ１によって切断容易な結合におけるタンパク分解を検出可能とするのに十分な、切断容易な結合および近接または非近接認識エレメントを意味する。ＢｏＮＴ／Ｃ１によって切断される切断容易な結合は、例えば、Ｌｙｓ－ＡｌａまたはＡｒｇ－Ａｌａである。

【００８３】

ＢｏＮＴ／Ｃ１認識配列は、Ｃ１血清型ボツリヌス毒素による切断に感受性のあるタンパク質のセグメントに一致してよく、またはＢｏＮＴ／Ｃ１感受性タンパク質のセグメントに実質的に近似してもよい。表５に示されるように、ＢｏＮＴ／Ｃ１による切断に感受性のある様々な天然タンパク質が当業界において知られており、例えば、ヒト、ラット、マウス、およびウシｓｙｎｔａｘｉｎ １Ａまたは１Ｂ、ラットｓｙｎｔａｘｉｎ２および３、ウニｓｙｎｔａｘｉｎ、Ａｐｌｙｓｉａ ｓｙｎｔａｘｉｎ １、イカｓｙｎｔａｘｉｎ、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ Ｄｓｙｎｔ1、およびヒルｓｙｎｔａｘｉｎ １を含む。つまり、本発明のＢｏＮＴ／Ｃ１基質に有用なＢｏＮＴ／Ｃ１認識配列は、例えば、ヒト、ラット、マウス、またはウシｓｙｎｔａｘｉｎ １Ａまたは１Ｂ、ラットｓｙｎｔａｘｉｎ２、ラットｓｙｎｔａｘｉｎ３、ウニｓｙｎｔａｘｉｎ、Ａｐｌｙｓｉａ ｓｙｎｔａｘｉｎ １、イカｓｙｎｔａｘｉｎ、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ Ｄｓｙｎｔ1、およびヒルｓｙｎｔａｘｉｎ １、またはＢｏＮＴ／Ｃ１による切断に感受性のある別の天然タンパク質の、セグメントと一致してよい。さらに、ＢｏＮＴ／Ｃ１によって切断される本来のｓｙｎｔａｘｉｎアミノ酸配列を比較すると、そのような配列は完全には保存されていないことがわかり（表５および図７も参照）、このことは、天然ＢｏＮＴ／Ｃ１感受性ｓｙｎｔａｘｉｎ配列と比較して、様々なアミノ酸置換および改変が本発明のＢｏＮＴ／Ｃ１基質において許容されることを意味している。

【表５】



【００８４】

様々な天然ＳＮＡＰ－２５タンパク質もまたＢｏＮＴ／Ｃ１による切断に感受性があり、それには、ヒト、マウス、およびラットＳＮＡＰ－２５、ゴールドフィッシュＳＮＡＰ－２５Ａおよび２５Ｂ、およびＤｒｏｓｏｐｈｉｌａおよびヒルＳＮＡＰ－２５が含まれ

る。従って、本発明のＢｏＮＴ／Ｃ１基質に有用なＢｏＮＴ／Ｃ１認識配列は、例えば、ヒト、マウス、またはラットＳＮＡＰ－２５、ゴールドフィッシュＳＮＡＰ－２５Ａまたは２５Ｂ、ＴｏｒｐｅｄｏＳＮＡＰ－２５、ゼブラフィッシュＳＮＡＰ－２５、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ、ヒルＳＮＡＰ－２５またはＢｏＮＴ／Ｃ１による切断に感受性のある別の天然タンパク質の、セグメントと一致してよい。天然ｓｙｎｔａｘｉｎ配列の変異体に関して前述されているように、ＢｏＮＴ／Ｃ１によって切断される本来のＳＮＡＰ－２５アミノ酸配列と比較すると、顕著な配列変動性があることがわかり（表２および図５も参照）、このことは、天然ＳＮＡＰ－２５配列と比較して、様々なアミノ酸置換および改変が本発明のＢｏＮＴ／Ｃ１基質において許容されることを意味している。

【００８５】

本発明はさらに、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むＤ血清型ボツリヌス毒素（ＢｏＮＴ／Ｄ）認識配列を含むＢｏＮＴ／Ｄ基質であって、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるＢｏＮＴ／Ｄ基質を提供する。本発明のＢｏＮＴ／Ｄ基質は、例えば、ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＬｙｓ－Ｌｅｕを含むもの、またはその模擬ペプチドを含むことができる。ある態様において、本発明のＢｏＮＴ／Ｄ基質は、ヒトＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＬｙｓ$_{59}$－Ｌｅｕ$_{60}$を含むもの、またはその模擬ペプチドを含むことができる。別の態様において、本発明のＢｏＮＴ／Ｄ基質は、Arg-Asp-Gln-Lys-Leu-Ser-Glu-Leu（配列番号：６)またはその模擬ペプチドを含む。さらなる態様において、本発明のＢｏＮＴ／Ｄ基質は、ラットＶＡＭＰ－２（配列番号：７）の残基２７－１１６またはその模擬ペプチドを含む。様々なドナー・フルオロフォア－アクセプターの組み合わせが本発明のＢｏＮＴ／Ｄ基質において有用であることは理解される；そのようなドナー・フルオロフォア－アクセプターペアは、フルオレセイン－テトラメチルローダミン、ＤＡＢＣＹＬ－ＥＤＡＮＳ、およびＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－ＱＳＹ（登録商標）７を含むが、これらに限定されない。本発明のＢｏＮＴ／Ｄ基質に有用なさらなる典型的ドナー・フルオロフォアおよびアクセプターが本明細書中以下に示される。

【００８６】

「Ｄ血清型ボツリヌス毒素認識配列」なる用語は、「ＢｏＮＴ／Ｄ認識配列」と同義語であり、適した条件下、ＢｏＮＴ／Ｄによって切断容易な結合におけるタンパク分解を検出可能とするのに十分な、切断容易な結合および近接または非近接認識エレメントを意味する。ＢｏＮＴ／Ｄによって切断される切断容易な結合は、例えば、Ｌｙｓ－Ｌｅｕである。

【００８７】

様々なＢｏＮＴ／Ｄ認識配列が当業界でよく知られており、あるいは平凡な方法で規定できる。ＢｏＮＴ／Ｄ認識配列は、例えばラットＶＡＭＰ－２（配列番号：７、Yamasakiら、J. Biol. Chem. 269:12764 12772 (1994)）の残基２７－１１６、残基３７－１１６、残基１－８６、残基１－７６または残基１－６９を含むことができる。従って、ＢｏＮＴ／Ｄ認識配列は、例えばラットＶＡＭＰ－２（配列番号：７）の残基２７－６９または残基３７－６９を含むことができる。要すれば、別のＢｏＮＴ／Ｄ感受性ＶＡＭＰアイソフォームまたはヒトＶＡＭＰ－１またはヒトＶＡＭＰ－２のようなホモログの、対応する（相同性ある）セグメントから、近似のＢｏＮＴ／Ｄ認識配列を調製できる。

【００８８】

ＢｏＮＴ／Ｄ認識配列は、Ｄ血清型ボツリヌス毒素による切断に感受性のあるタンパク質のセグメントに一致してよく、またはＢｏＮＴ／Ｄ感受性タンパク質のセグメントに実質的に近似してもよい。表５に示されるように、ＢｏＮＴ／Ｄによる切断に感受性のある様々な天然タンパク質が当業界において知られており、例えば、ヒト、マウス、およびウシＶＡＭＰ－１およびＶＡＭＰ－２、ラットＶＡＭＰ－１およびＶＡＭＰ－２、ラットセルブレビン、チキンＶＡＭＰ－１およびＶＡＭＰ－２、Ｔｏｒｐｅｄｏ　ＶＡＭＰ－１、

Ａｐｌｙｓｉａ ＶＡＭＰ、イカＶＡＭＰ、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｓｙｂおよびｎ－ｓｙｂおよびヒルＶＡＭＰを含む。つまり、本発明のＢｏＮＴ／Ｄ基質に有用なＢｏＮＴ／Ｄ認識配列は、例えば、ヒトＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、マウスＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、ウシＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、ラットＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、ラットセルブレビン、チキンＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、Ｔｏｒｐｅｄｏ ＶＡＭＰ－１、ＡｐｌｙｓｉａＶＡＭＰ、イカＶＡＭＰ、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｓｙｂまたはｎ－ｓｙｂ、ヒルＶＡＭＰ、またはＢｏＮＴ／Ｄによる切断に感受性のある別の天然タンパク質の、セグメントと一致してよい。さらに、上記表５に示されるように、ＢｏＮＴ／Ｄによって切断される本来のＶＡＭＰアミノ酸配列の比較により、顕著な配列変動性が明らかとなり（図６も参照）、このことは、天然ＢｏＮＴ／Ｄ感受性ＶＡＭＰ配列と比較して、様々なアミノ酸置換および改変が本発明のＢｏＮＴ／Ｄ基質において許容されることを意味している。

【００８９】

本発明はさらに、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むＥ血清型ボツリヌス毒素（ＢｏＮＴ／Ｅ）認識配列を含むＢｏＮＴ／Ｅ基質であって、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるＢｏＮＴ／Ｅ基質を提供する。本発明のＢｏＮＴ／Ｅ基質は、例えば、ＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基であってＡｒｇ－Ｉｌｅを含むもの、またはその模擬ペプチドを含むことができる。そのようなＢｏＮＴ／Ｅ基質は、例えば、ヒトＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基であってArg_{180}－Ile_{181}を含むもの、またはその模擬ペプチドを含むことができる。ある態様において、ＢｏＮＴ／Ｅ基質は、Gln-Ile-Asp-Arg-Ile-Met-Glu-Lys（配列番号：８)またはその模擬ペプチドを含む。別の態様において、ＢｏＮＴ／Ｅ基質は、ヒトＳＮＡＰ－２５（配列番号：２）の残基１５６－１８６またはその模擬ペプチドを含む。様々なドナー・フルオロフォアとアクセプターの組み合わせが本発明のＢｏＮＴ／Ｅ基質において有用である。これらドナー・フルオロフォア－アクセプターの組み合わせは、フルオレセイン－テトラメチルローダミン、ＤＡＢＣＹＬ－ＥＤＡＮＳ、およびＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－ＱＳＹ（登録商標）７、および以下にさらに記載される更なるドナー・フルオロフォアおよびアクセプターを含むが、これらに限定されない。

【００９０】

本明細書で使用される場合、「Ｅ血清型ボツリヌス毒素認識配列」なる用語は、「ＢｏＮＴ／Ｅ認識配列」と同義語であり、適した条件下、ＢｏＮＴ／Ｅによって切断容易な結合におけるタンパク分解を検出可能とするのに十分な、切断容易な結合および近接または非近接認識エレメントを意味する。ＢｏＮＴ／Ｅによって切断される切断容易な結合は、例えば、Ａｒｇ－Ｉｌｅである。

【００９１】

当業者は、ＢｏＮＴ／Ｅ認識配列が、Ｅ血清型ボツリヌス毒素による切断に感受性のあるタンパク質のセグメントに一致してよく、またはＢｏＮＴ／Ｅ感受性タンパク質のセグメントに実質的に近似してもよいことを認識している。ＢｏＮＴ／Ｅによる切断に感受性のある様々な天然タンパク質が当業界で知られており、例えば、ヒト、マウスおよびラットＳＮＡＰ－２５、マウスＳＮＡＰ－２３、チキンＳＮＡＰ－２５、ゴールドフィッシュＳＮＡＰ－２５ＡおよびＳＮＡＰ－２５Ｂ、ゼブラフィッシュＳＮＡＰ－２５、Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓＳＮＡＰ－２５およびヒルＳＮＡＰ－２５（表２参照）が含まれる。つまり、本発明のＢｏＮＴ／Ｅ基質に有用なＢｏＮＴ／Ｅ認識配列は、例えば、ヒトＳＮＡＰ－２５、マウスＳＮＡＰ－２５、ラットＳＮＡＰ－２５、マウスＳＮＡＰ－２３、チキンＳＮＡＰ－２５、ゴールドフィッシュＳＮＡＰ－２５ＡまたはＳＮＡＰ－２５Ｂ、Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓＳＮＡＰ－２５、ヒルＳＮＡＰ－２５、またはＢｏＮＴ／Ｅによる切断に感受性のある別の天然タンパク質の、セグメントと一致してよい。さらに、上記表２および図５

に示されるように、ＢｏＮＴ／Ｅによって切断される本来のＳＮＡＰ－２３およびＳＮＡＰ－２５のアミノ酸配列を比較すると、そのような配列は完全には保存されていないことがわかり、このことは、天然ＢｏＮＴ／Ｅ感受性ＳＮＡＰ－２３またはＳＮＡＰ－２５配列と比較して、様々なアミノ酸置換および改変が本発明のＢｏＮＴ／Ｅ基質において許容されることを意味している。

【００９２】

本発明はまた、（ａ）ドナー・フルオロフォア、（ｂ）ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および、（ｃ）切断部位を含むＡ／Ｅ血清型ボツリヌス（ＢｏＮＴ／Ａ／Ｅ）認識配列を含むＢｏＮＴ／Ａ／Ｅ基質であって、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるＢｏＮＴ／Ａ／Ｅ基質を提供する。本明細書で使用される場合、「Ａ／Ｅ血清型ボツリヌス基質」または「ＢｏＮＴ／Ａ／Ｅ基質」または「Ａ／Ｅ基質」なる用語は、Ａ血清型ボツリヌス毒素またはＥ血清型ボツリヌス毒素のいずれかによる切断をうけやすい基質を意味する。そのようなＡ／Ｅ血清型ボツリヌス基質はまた、ＢｏＮＴ／ＡおよびＢｏＮＴ／Ｅ毒素の両方による切断を受けやすい場合もある。本明細書に記載される、または当業界で知られているいずれのＢｏＮＴ／ＡまたはＢｏＮＴ／Ｅ認識配列も、本発明のＢｏＮＴ／Ａ／Ｅ基質において有用である。

【００９３】

本発明によってさらに提供されるのは、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むＦ血清型ボツリヌス毒素（ＢｏＮＴ／Ｆ）認識配列を含むＢｏＮＴ／Ｆ基質であって、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるＢｏＮＴ／Ｆ基質である。そのようなＢｏＮＴ／Ｆ基質は、例えば、ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ－Ｌｙｓを含むもの、またはその模擬ペプチドを含むことができる。ある態様において、ＢｏＮＴ／Ｆ基質は、ヒトＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ$_{58}$－Ｌｙｓ$_{59}$を含むもの、またはその模擬ペプチドを含むことができる。別の態様において、本発明のＢｏＮＴ／Ｆ基質は、ラットＶＡＭＰ－２（配列番号：７）の残基２７－１１６、またはその模擬ペプチドを含む。さらなる態様において、ＢｏＮＴ／Ｆ基質は、アミノ酸配列Glu-Arg-Asp-Gln-Lys-Leu-Ser-Glu (配列番号：９)またはその模擬ペプチドを含む。蛍光共鳴エネルギー転移の業界における当業者は、様々なドナー・フルオロフォア－アクセプターの組み合わせが本発明のＢｏＮＴ／Ｆ基質において有用であることを理解している。本発明のＢｏＮＴ／Ｆ基質において有用なドナー・フルオロフォア－アクセプターペアの例は、限定はされないが、フルオレセイン－テトラメチルローダミン、ＤＡＢＣＹＬ－ＥＤＡＮＳ、およびＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－ＱＳＹ（登録商標）７、および以下に詳説する更なるドナー・フルオロフォア－アクセプターの組み合わせを含む。

【００９４】

本明細書で用いる場合「Ｆ血清型ボツリヌス毒素認識配列」なる用語は、「ＢｏＮＴ／Ｆ認識配列」と同義語であり、適した条件下、ＢｏＮＴ／Ｆによって切断容易な結合におけるタンパク分解を検出可能とするのに十分な、切断容易な結合および近接または非近接認識エレメントを意味する。ＢｏＮＴ／Ｆによって切断される切断容易な結合は、例えば、Ｇｌｎ－Ｌｙｓである。

【００９５】

様々なＢｏＮＴ／Ｆ認識配列が当業界でよく知られており、あるいは平凡な方法で規定できる。ＢｏＮＴ／Ｆ認識配列は、例えばラットＶＡＭＰ－２（配列番号：７、Yamasaki et al., 前述, 1994）の残基２７－１１６、残基３７－１１６、残基１－８６、残基１－７６または残基１－６９を含むことができる。ＢｏＮＴ／Ｆ認識配列はまた、例えばラットＶＡＭＰ－２（配列番号：７）の残基２７－６９または残基３７－６９残基を含むこ

とができる。近似のＢｏＮＴ／Ｆ認識配列は、要すれば、別のＢｏＮＴ／Ｆ感受性ＶＡＭＰアイソフォームまたはヒトＶＡＭＰ－１またはヒトＶＡＭＰ－２のようなホモログの、対応する（相同性ある）セグメントから調製できることは理解される。

【００９６】

ＢｏＮＴ／Ｆ認識配列は、Ｆ血清型ボツリヌス毒素による切断に感受性のあるタンパク質のセグメントに一致してよく、またはＢｏＮＴ／Ｆ感受性タンパク質のセグメントに実質的に近似してもよい。ＢｏＮＴ／Ｆによる切断に感受性のある様々な天然タンパク質が当業界において知られており、例えば、ヒト、マウス、およびウシＶＡＭＰ－１およびＶＡＭＰ－２、ラットＶＡＭＰ－１およびＶＡＭＰ－２、ラットセルブレビン、チキンＶＡＭＰ－１およびＶＡＭＰ－２、Ｔｏｒｐｅｄｏ ＶＡＭＰ－１、Ａｐｌｙｓｉａ ＶＡＭＰ、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｓｙｂおよびヒルＶＡＭＰを含む（表５参照）。つまり、本発明のＢｏＮＴ／Ｆ基質に有用なＢｏＮＴ／Ｆ認識配列は、例えば、ヒトＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、マウスＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、ウシＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、ラットＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、ラットセルブレビン、チキンＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、Ｔｏｒｐｅｄｏ ＶＡＭＰ－１、Ａｐｌｙｓｉａ ＶＡＭＰ、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｓｙｂ、ヒルＶＡＭＰ、またはＢｏＮＴ／Ｆによる切断に感受性のある別の天然タンパク質の、セグメントと一致してよい。さらに、上記表５に示されるように、ＢｏＮＴ／Ｆによって切断される本来のＶＡＭＰアミノ酸配列を比較すると、そのような配列は完全には保存されておらず（図６も参照）、このことは、天然ＢｏＮＴ／Ｆ感受性ＶＡＭＰ配列と比較して、様々なアミノ酸置換および改変が本発明のＢｏＮＴ／Ｆ基質において許容されることを意味している。

【００９７】

本発明はまた、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むＧ血清型ボツリヌス毒素（ＢｏＮＴ／Ｇ）認識配列を含むＢｏＮＴ／Ｇ基質であって、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるＢｏＮＴ／Ｇ基質を提供する。ＢｏＮＴ／Ｇ基質は、例えば、ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＡｌａ－Ａｌａを含むもの、またはその模擬ペプチドを含むことができる。そのようなＢｏＮＴ／Ｇ基質は、例えば、ヒトＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＡｌａ$_{83}$－Ａｌａ$_{84}$を含むもの、またはその模擬ペプチドを含むことができる。ある態様において、本発明のＢｏＮＴ／Ｇ基質は、アミノ酸配列Glu-Thr-Ser-Ala-Ala-Lys-Leu-Lys (配列番号：１０)またはその模擬ペプチドを含む。他のクロストリジウム毒素基質に関して前述されるように、様々なドナー・フルオロフォア－アクセプターの組み合わせが本発明のＢｏＮＴ／Ｇ基質において有用であり、それには、例えばフルオレセイン－テトラメチルローダミン、ＤＡＢＣＹＬ－ＥＤＡＮＳ、およびＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－ＱＳＹ（登録商標）７、および本明細書中以下に開示される、または当業界にて周知の、他のドナー・フルオロフォア－アクセプターの組み合わせが含まれる。

【００９８】

本明細書で用いる場合「Ｇ血清型ボツリヌス毒素認識配列」なる用語は、「ＢｏＮＴ／Ｇ認識配列」と同義語であり、適した条件下、ＢｏＮＴ／Ｇによって切断容易な結合におけるタンパク分解を検出可能とするのに十分な、切断容易な結合および近接または非近接認識エレメントを意味する。ＢｏＮＴ／Ｇによって切断される切断容易な結合は、例えば、Ａｌａ－Ａｌａである。

【００９９】

ＢｏＮＴ／Ｇ認識配列は、Ｇ血清型ボツリヌス毒素による切断に感受性のあるタンパク質のセグメントに一致してよく、またはそのようなＢｏＮＴ／Ｇ感受性セグメントに実質的に近似してもよい。上記表５に示されるように、ＢｏＮＴ／Ｇによる切断に感受性のある様々な天然タンパク質が当業界において知られており、例えば、ヒト、マウス、およびウシＶＡＭＰ－１およびＶＡＭＰ－２、ラットＶＡＭＰ－１およびＶＡＭＰ－２、ラット

セルブレビン、チキンＶＡＭＰ－１およびＶＡＭＰ－２、Ｔｏｒｐｅｄｏ ＶＡＭＰ－１、を含む。従って、本発明のＢｏＮＴ／Ｇ基質に有用なＢｏＮＴ／Ｇ認識配列は、例えば、ヒトＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、マウスＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、ウシＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、ラットＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、ラットセルブレビン、チキンＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、Ｔｏｒｐｅｄｏ ＶＡＭＰ－１、またはＢｏＮＴ／Ｇによる切断に感受性のある別の天然タンパク質の、セグメントと一致してよい。さらに、上記表５に示されるように、ＢｏＮＴ／Ｇによって切断される本来のＶＡＭＰアミノ酸配列を比較すると、そのような配列は完全には保存されておらず（図６も参照）、このことは、天然ＢｏＮＴ／Ｇ感受性ＶＡＭＰ配列と比較して、様々なアミノ酸置換および改変が本発明のＢｏＮＴ／Ｇ基質において許容されることを意味している。

【０１００】

本発明によってまた提供されるのは、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含む破傷風毒素（ＴｅＮＴ）認識配列を含むＴｅＮＴ基質であって、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるＴｅＮＴ基質である。本発明のＴｅＮＴ基質は、例えば、ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ－Ｐｈｅを含むもの、またはその模擬ペプチドを有することができる。例えば、そのようなＴｅＮＴ基質は、ヒトＶＡＭＰ－２の少なくとも６つの連続する残基であってGln_{76}－Phe_{77}を含むもの、またはその模擬ペプチドを有することができる。ある態様において、ＴｅＮＴ基質は、アミノ酸配列Gly-Ala-Ser-Gln-Phe-Glu-Thr-Ser (配列番号：１１)またはその模擬ペプチドを含む。別の態様において、ＴｅＮＴ基質は、ヒトＶＡＭＰ－２（配列番号：４）の残基３３－９４、ヒトＶＡＭＰ－２（配列番号：４）の残基２５－９３、ラットＶＡＭＰ－２（配列番号：７）の残基２７－１１６、またはこれら配列のうち一つの模擬ペプチドを含む。様々なドナー・フルオロフォア－アクセプターの組み合わせが本発明のＴｅＮＴ基質において有用であり、それには、例えばフルオレセイン－テトラメチルローダミン、ＤＡＢＣＹＬ－ＥＤＡＮＳ、およびＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－ＱＳＹ（登録商標）７が含まれるが、これらに限定されない。以下の詳説されるものを含む更なるドナー・フルオロフォアおよびアクセプターが、本発明のＴｅＮＴ基質において有用であり得る。

【０１０１】

「破傷風毒素認識配列」なる用語は、適した条件下、破傷風毒素によって切断容易な結合におけるタンパク分解を検出可能とするのに十分な、切断容易な結合および近接または非近接認識エレメントを意味する。ＴｅＮＴによって切断される切断容易な結合は、例えば、Ｇｌｎ－Ｐｈｅであり得る。

【０１０２】

様々なＴｅＮＴ認識配列が当業界でよく知られており、あるいは平凡な方法で規定でき、ヒトＶＡＭＰ－１またはヒトＶＡＭＰ－２のようなＶＡＭＰタンパク質の親水性コアのいくつかまたは全てに相当する配列を含む。ＴｅＮＴ認識配列は、例えばヒトＶＡＭＰ－２（配列番号：４、Cornille ら、Eur. J. Biochem. 222:173-181 (1994); Foranら、Biochem. 33: 15365-15374 (1994)）の残基３３－９４、ラットＶＡＭＰ－２（配列番号：７、Yamasaki et al., 前述, 1994）の残基５１－９３または残基１－８９、またはヒトＶＡＭＰ－１（配列番号９６）の残基３３－９４を含むことができる。ＴｅＮＴ認識配列はまた、例えばヒトＶＡＭＰ－２（配列番号：４）の残基２５－８６、残基３３－８６、または残基５１－８６を含むことができる。近似のＴｅＮＴ認識配列は、要すれば、別のＴｅＮＴ感受性ＶＡＭＰアイソフォームまたはヒトＶＡＭＰ－１またはウニまたはＡｐｌｙｓｉａ ＶＡＭＰのようなホモログの、対応する（相同性ある）セグメントから調製できることは理解される。

【０１０３】

つまり、ＴｅＮＴ認識配列は、破傷風毒素による切断に感受性のあるタンパク質のセグ

メントに一致してよく、またはＴｅＮＴ感受性タンパク質のセグメントに実質的に近似してもよい。上記表５に示されるように、ＴｅＮＴによる切断に感受性のある様々な天然タンパク質が当業界において知られており、例えば、ヒト、マウス、およびウシＶＡＭＰ－１およびＶＡＭＰ－２、ラットＶＡＭＰ－２、ラットセルブレビン、チキンＶＡＭＰ－２、Ｔｏｒｐｅｄｏ ＶＡＭＰ－１、ウニＶＡＭＰ、Ａｐｌｙｓｉａ ＶＡＭＰ、イカＶＡＭＰ、Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ ＶＡＭＰ、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｎ－ｓｙｂおよびヒルＶＡＭＰを含む。従って、本発明のＴｅＮＴ基質に有用なＴｅＮＴ認識配列は、例えば、ヒトＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、マウスＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、ウシＶＡＭＰ－１またはＶＡＭＰ－２、ラットＶＡＭＰ－２、ラットセルブレビン、チキンＶＡＭＰ－２、Ｔｏｒｐｅｄｏ ＶＡＭＰ－１、ウニＶＡＭＰ、Ａｐｌｙｓｉａ ＶＡＭＰ、イカＶＡＭＰ、Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ ＶＡＭＰ、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｎ－ｓｙｂ、ヒルＶＡＭＰまたはＴｅＮＴによる切断に感受性のある別の天然タンパク質のセグメントと一致してよい。さらに、ＴｅＮＴによって切断される本来のＶＡＭＰアミノ酸配列を比較すると、そのような配列は完全には保存されていないことがわかり（表５および図６）、このことは、天然ＴｅＮＴ感受性ＶＡＭＰ配列と比較して、様々なアミノ酸置換および改変が本発明のＴｅＮＴ基質において許容されることを意味している。

【０１０４】

本発明は、一つには、蛍光共鳴エネルギー転移（ＦＲＥＴ）、すなわち、エネルギーが分子内長距離双極子カップリング（intramolecular long-range dipole-dipole coupling）を介して励起されたドナー・フルオロフォアからアクセプター（別のフルオロフォアであってもよい）に非放射性に転移される物理学的過程、に依存する。ＦＲＥＴは、ドナー・フルオロフォアとアクセプターの分子内分離の逆６乗に依存し、また、効果的な転移のため、ドナー・フルオロフォアとアクセプターは近接して、例えば約１０Åから約１００Åで隔てられている。効果的なエネルギー転移は、ドナー・フルオロフォアおよびアクセプターのスペクトル特性およびそれらの相対配向に依存する。１０から１００Åを越える効果的な転移のため、ドナー・フルオロフォアの量子収率は一般的に少なくとも０．１であり、アクセプターの吸収係数は一般的に少なくとも１０００である（Clegg, Current Opinion in Biotech. 6:103 110 (1995); およびSelvin, Nature Structural Biol. 7:730-734 (2000))参照）。

【０１０５】

本発明のクロストリジウム毒素基質において、ドナー・フルオロフォアおよびアクセプターは、ドナー・フルオロフォアが励起された場合にドナー・フルオロフォアおよびアクセプターが共鳴エネルギー転移を示すよう選択される。ドナー・フルオロフォア／アクセプターペアを選択するにあたり考慮すべき因子の一つは、ドナー・フルオロフォアとアクセプターの間のＦＲＥＴの効率である。ある態様において本発明は、最適な条件下、ドナー・フルオロフォアとアクセプターの間のＦＲＥＴの効率が少なくとも１０％であるクロストリジウム毒素基質を提供する。別の態様において本発明は、最適な条件下、ドナー・フルオロフォアとアクセプターの間のＦＲＥＴの効率が少なくとも２０％であるクロストリジウム毒素基質を提供する。なお更なる態様において本発明は、最適な条件下、ドナー・フルオロフォアとアクセプターの間のＦＲＥＴの効率が少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％または８０％である、クロストリジウム毒素基質を提供する。

【０１０６】

当業界において周知のように、ＦＲＥＴの効率は、Ｆｏｅｒｓｔｅｒ方程式によって示されるように、ドナー・フルオロフォアとアクセプターの分離距離および配向、およびドナー・フルオロフォアの蛍光量子収率並びにアクセプターとのエネルギー的重複に依存する。特に、ＦＲＥＴの効率（Ｅ）は、以下のように測定できる：

$$E = 1 - F_{DA}/F_{D} = 1/(1 + (R/R_{0})^{6})$$

（式中、F_{DA}およびF_{D}は、それぞれ、アクセプターの存在または非存在下のドナー・フルオロフォアの蛍光強度であり、Ｒはドナー・フルオロフォアとアクセプターの間の距離である。

【０１０７】

Ｆｏｅｒｓｔｅｒ半径（R_0）は、共鳴エネルギー転移が５０％有効、すなわち、励起ドナー・フルオロフォアの５０％がＦＲＥＴによって不活性化される距離である。Ｆｏｅｒｓｔｅｒ半径（R_0）の大きさは、ドナー・フルオロフォアの量子収率；アクセプターの消光係数；および、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルとアクセプターの励起スペクトルの間の重複に依存する。

$R_O = [8.8\times10^{23}\cdot\kappa^2\cdot n^{-4}\cdot QY_D\cdot J(\lambda)]^{1/6}$ Å

（式中、

κ^2＝双極子配向因子（dipole orientation factor）（レンジ０から４；$\kappa^2 = 2/3$、ランダムに配向したドナーおよびアクセプターについて）、

QY_D＝アクセプター非存在下におけるドナーの蛍光量子収率、

ｎ＝屈折率、

Ｊ(λ)＝スペクトル重複積分（spectral overlap integral）

$= \int \varepsilon_A(\lambda)\cdot F_D(\lambda)\cdot\lambda^4\, d\lambda$ $cm^3 M^{-1}$

（式中、ε_A＝アクセプターの励起係数、

ＦＤ＝全積分強度のフラクションとしてのドナー蛍光発光強度である）、

である(Ｆｏｅｒｓｔｅｒ，Ann. Physik 2:55 75 (1948))。

【０１０８】

様々なドナー・フルオロフォア／アクセプターペアについての典型的Ｆｏｅｒｓｔｅｒ半径値を、以下の表６に示す（Wu and Brand, Analytical Biochem. 218:1-13 (1994)（引用により本明細書に含まれる）も参照）。Ｆｏｅｒｓｔｅｒ半径の総合的一覧もまた、当業界にて知られている（例えば、 Berlman, Energy Transfer Parameters of Aromatic Compounds Academic Press, New York 1973 参照）。さらに、Ｆｏｅｒｓｔｅｒ半径(Ｒｏ）の構成因子は環境に依存し、観察される実際の値は一覧の値とは異なることがあることを当業者は認識している。

【０１０９】

様々な組み合わせにおける多くのドナー・フルオロフォアおよびアクセプターが、いずれも本発明のクロストリジウム毒素基質において有用であり得る。ドナー・フルオロフォアは、一般的に、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルとアクセプターの励起スペクトルとの間に実質的スペクトル重複が存在するように選択される。さらに、ドナー・フルオロフォアは、例えば、Ｈｅｌｉｕｍ－Ｃａｄｍｉｕｍ４４２ｎｍまたはアルゴン４８８ｎｍのようなレーザー周波数に近い励起極大を有し、それ故レーザー光はドナー・フルオロフォアを励起する効果的手段として機能する。ある態様において、アクセプター部分の発光スペクトルの波長極大は、ドナー・フルオロフォアの励起スペクトルの波長極大より少なくとも１０ｎｍ大きい。さらなる態様において、アクセプターは、可視スペクトルの赤部分に発光スペクトルを有するフルオロフォアである。さらなる態様において、アクセプターはスペクトルの赤外領域に発光スペクトルを有するフルオロフォアである。様々なドナー・フルオロフォア－アクセプターペア、およびそれらのＦｏｅｒｓｔｅｒ半径が、本明細書中表６および７に与えられている。Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 6th Edition, Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, 1996（引用により本明細書に含まれる）も参照。

【表６－１】

ドナー・フルオロフォア	アクセプター	R_o (Å)	参考文献
フルオレセイン	TMR	49-54	Johnson et al., Biochemistry 32:6402-6410 (1993); Odom et al., Biochemistry 23:5069-5076 (1984)
フルオレセイン	QSY® 7	61	----
EDANS	DABCYL	33	----
ナフタレン	ダンシル	22	Haas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:1807-1811 (1975)
IANBD	DDPM	25	Kasprzyk et al., Biochemistry 22:1877-1882 (1983)
IAEDANS	DDPM	25-29	Dalbey et al., Biochemistry 22:4696-4706 (1983); Cheung et al., Biophys. Chem. 40:1-17 (1991)
DNSM	LY	26-32	Nalin et al., Biochemistry 28:2318-2324 (1985)

【表６－２】

ドナー・フルオロフォア	アクセプター	R_o (Å)	参考文献
IAEDANS	IANBD	27-51	Franzen et al., Biochemistry 19:6080-6089 (1980); First et al., Biochemistry 28:3606-3613(1989)
ε-A	F_2DNB	29	Perkins et al., J. Biol. Chem. 259:8786-8793 (1984)
ピレン	ビマン	30	Borochov-Neori and Montal, Biochemistry 28:1711-1718 (1989)
ANAI	IPM	30	Peerce and Wright, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8092-8096 (1986)
IAANS	IAF	31	Grossman, Biochim. Biophys. Acta 1040:276-280 (1990)
ε-A	F_2DPS	31	Perkins et al., *supra*, 1984
ε-A	DDPM	31	Miki and Mihashi, Biochim. Biophys. Acta 533:163-172 (1978)
IAEDANS	TNP	31-40	Takashi et al., Biochemistry 21:5661-5668 (1982); dos Remedios and Cooke, Biochim. Biophys. Acta 788:193-205 (1984)

【表６－３】

ドナー・フルオロフォア	アクセプター	R_o (Å)	参考文献
MNA	DACM	32	Amir and Haas, Biochemistry 26:2162-2175 (1987)
PM	NBD	32	Snyder and Hammes, Biochemistry 24:2324-2331 (1985)
FITC	TNP-ATP	32	Amler et al., Biophys. J. 61:553-568 (1992)
DANZ	DABM	34	Albaugh and Steiner, J. Phys. Chem. 93:8013-8016 (1989)
NCP	CPM	34	Mitra and Hammes, Biochemistry 28:3063-3069 (1989)
NAA	DNP	33-37	McWherter et al., Biochemistry 25:1951-1963 (1986)
LY	TNP-ATP	35	Nalin, *supra*, 1985
IAF	diI-C_{18}	35	Shahrokh et al., J. Biol. Chem. 266:12082-12089 (1991)
IAF	TMR	37	Taylor et al., J. Cell Biol. 89:362-367 (1981)
FMA	FMA	37	Dissing et al., Biochim. Biophys. Acta 553:66-83 (1979)
PM	DMAMS	38	Lin and Dowben, J. Biol. Chem. 258:5142-5150 (1983)

【表６－４】

ドナー・フルオロフォア	アクセプター	R_o (Å)	参考文献
mBBR	FITC	38	Tompa and Batke, Biochem. Int. 20:487-494 (1990)
mBBR	DABM	38	Kasprzak et al., Biochemistry 27:4512-4523 (1988)
εA	NBD	38	Miki and Iio, Biochim. Biophys. Acta 790:201-207 (1984)
ピレン	クマリン	39	Borochov-Neori and Montal, *supra*, 1989
IPM	FNAI	39	Peerce and Wright, *supra*, 1986
IAEDANS	DABM	40	Tao et al. Biochemistry 22:3059-3066 (1983)
IAEDANS	TNP-ATP	40	Tao et al., *supra*, 1983
ε-A	IANBD	40	Miki and Wahl, Biochim. Biophys. Acta 786:188-196 (1984)
NBD	SRH	40-74	Wolf et al., Biochemistry 31:2865-2873 (1992)
ISA	TNP	42	Jacobson and Colman, Biochemistry 23:3789-3799 (1984)
ダンシル	ODR	43	Lu et al., J. Biol. Chem. 264:12956-12962 (1989)

【表６－５】

ドナー・フルオロフォア	アクセプター	R_o (Å)	参考文献
DANZ	IAF	44-49	Cheung et al., Biochemistry 21:5135-5142 (1983)
FNAI	EITC	45	Peerce and Wright, *supra*, 1986
NBD	LRH	45-70	Wolf et al., *supra*, 1992
IAF	EIA	46	Taylor et al., *supra*, 1981
FITC	ENAI	46	Peerce and Wright, *supra*, 1986
プロフラビン	ETSC	46	Robbins et al., Biochemistry 20:5301-5309 (1981)
CPM	TNP-ATP	46	Snyder and Hammes, *supra*, 1985
IAEDANS	IAF	46-56	Franzen, *supra*, 1985; Grossman, *supra*, 1990
CPM	フルオレセイン	47	Thielen et al., Biochemistry 23:6668-6674 (1984)
IAEDANS	FITC	49	Jona et al., Biochim. Biophys. Acta 1028:183-199 (1990); Birmachu et al., Biochemistry 28:3940-3947 (1989)

【表６－６】

ドナー・フルオロフォア	アクセプター	R_o (Å)	参考文献
IAF	TMR	50	Shahrokh et al., J. Biol. Chem. 266:12082-12089 (1991)
CF	TR	51	Johnson et al., *supra*, 1993
CPM	TRS	51	Odom et al., *supra*, 1984
ε-A	TNP-ATP	51	dos Remedios and Cooke, *supra*, 1984
CPM	FM	52	Odom et al., *supra*, 1984
LY	EM	53	Shapiro et al., J. Biol. Chem. 266:17276-17285 (1991)
FITC	EITC	54	Carraway et al., J. Biol. Chem. 264:8699-8707 (1989)
IAEDANS	DiO-C_{14}	57	Shahrokh et al., *supra*, 1991
IAF	ErITC	58	Amler et al., *supra*, 1992
FITC	EM	60	Kosk-Kosicka et al., J. Biol. Chem. 264:19495-19499 (1989)
FITC	ETSC	61-64	Robbins et al., *supra*, 1981
FITC	ErITC	62	Amler et al., *supra*, 1992

【表６－７】

ドナー・フルオロフォア	アクセプター	R_o (Å)	参考文献
BPE	CY5	72	Ozinskas et al., Anal. Biochem. 213:264-270 (1993)
フルオレセイン	フルオレセイン	44	----
BODIBY FL	BODIPY FL	57	----

【０１１０】
ＡＮＡＩ，２－アントラセンス（anthracence） Ｎ－アセチルイミダゾール；
ＢＰＥ，Ｂ－フィコエリトリン；
ＣＦ，カルボキシフルオレセインスクシニミジルエステル；
ＣＰＭ，７－ジエチルアミノ－３－（４'－マレイミジルフェニル）－４メチルクマリン；ＣＹ５，カルボキシメチルインドシアニン－Ｎ－ヒドロキシスクシニミジルエステル；
ｄｉＩ－C_{18}，１，１'－ジオクタデシル－３－３，３，３'，３'－テトラメチル－インドカルボシアニン；
ｄｉＯ－C_{14}，３，３'－ジテトラデシルオキサカルボシアニン；
ＤＡＢＭ，４－ジメチルアミノフェニルアゾ－フェニル－４'－マレイミド；
ＤＡＣＭ，（７－（ジメチルアミノ）クマリン－４－イル）－アセチル；
ＤＡＮＺ，ダンシルアジリジン（dansylaziridine）；ＤＤＰＭ，Ｎ－（４－ジメチルアミノ－３，５－ジニトロフェニル）マレイミド；
ＤＭＡＭＳ，ジメチルアミノ－４－マレイミドスチルベン（maleimidostilbene）；
ＤＳＭＮ，Ｎ－（２，５'－ジメトキシスチベン（dimethoxystiben）－４－イル）－マレイミド；
ＤＮＰ，２，４－ジニトロフェニル；
ε－Ａ，１，N^6－エタノアデノシン；
ＥＩＡ，５－ヨードアセテトアミド（iodoacetetamido）エオシン；
ＥＩＴＣ，エオシン－５－イソチオシアネート；
ＥＮＡＩ，エオシン Ｎ－ａｃＥＴＹＬＩＭＩＤＡＺＯＬＥ；
ＥＭ，エオシンマレイミド；
ＥｒＩＴＣ，エリスロシン－５'-イソチオシアネート；
ＥＴＳＣ，エオシン チオセミカラジド（thiosemicarazide）；
F_2ＤＮＢ，１，５－ジフルロ－２，４'－ジニトロベンゼン；
F_2ＤＰＳ，４，４'－ジフルオロ－３，３'－ジニトロフェニルスルフォン；
ＦＩＴＣ，フルオレセインチオセミカルバジド；
ＩＡＡＮＳ，２－（４'－ヨードアセトアミド）アニリーノ）ナフタレン－６－スルホン酸；
ＩＡＥＤＡＮＳ，５－（２－（（ヨードアセチル）アミノ）エチル）アミノ）－ナフタレン－１－スルホン酸；
ＩＡＦ，５－ヨードアセトアミドフルオレセイン；
ＩＡＮＢＤ，Ｎ－（（２－（ヨードアセトキシ）エチル）－Ｎ－メチル）アミノ－７－ニトロベンズ－２－オキサ－１，３－ジアゾール；
ＩＰＭ，３（４－イソチオシアネートフェニル）７－ジエチル－４－アミノ－４－メチルクマリン；

ＩＳＡ，４－（ヨードアセトアミド）サリチル酸；
ＬＲＨ，リスアミンローダミン（lissaminerhodamine）；
ＬＹ，ルシファーイエロー；
ｍＢＢＲ，モノブロモビアマン（monobromobiamane）；
ＭＮＡ，（２－メトキシ－１－ナフチル）－メチル；
ＮＡＡ，２－ナフトキシアセチル酸；
ＮＢＤ，７－ニトロ－２，１，３－ベンゾオキサジアゾール（benzoxadiazol）－４－イル；
ＮＣＰ，Ｎ－シクロヘキシル－Ｎ'－（１－ピレニル）カルボジイミド；
ＯＤＲ，オクタデシルローダミン；
ＰＭ，Ｎ－（１－ピレン）－マレイミド；
ＳＲＨ，スルホローダミン；
ＴＭＲ，テトラメチルローダミン；
ＴＮＰ，トリニトロフェニル；および
ＴＲ，テキサスレッド。

【０１１１】

トリプトファンまたはチロシンのような芳香族アミノ酸はまた、本発明のクロストリジウム毒素基質において有用なドナー・フルオロフォアであり得る。トリプトファンまたはチロシンがドナー・フルオロフォアである典型的ドナー・フルオロフォア－アクセプターペア、および適当なＦｏｅｒｓｔｅｒ距離は、以下の表７に示される。修飾アミノ酸もまた、本発明のクロストリジウム毒素基質においてドナー・フルオロフォアまたはアクセプターとして有用であり得る。そのような蛍光またはクエンチング修飾アミノ酸は当業界において既知であり、例えば、蛍光アミノ酸であるＬ－ピレニルアラニン（Ｐｙａ）および非蛍光アクセプターであるｐ－ニトロフェニルアラニン（Ｎｏｐ）を含む（例えば、Anne et al., Analytical Biochem. 291:253-261 (2001)に記載）。

【表７－１】

ドナーとしてＴｒｐを用いるＦｏｅｒｓｔｅｒ距離

ドナー	アクセプター	R_0 (Å)	参考文献
Trp	$Ru(III)(NH_3)_5$	12-16	Recchia et al., Biochim. Biophys. Acta 702:105-111 (1982)
Trp	ニトロベンゾイル	16	Wiczk et al., J. Fluo 1:273-286 (1991)
Trp	ダンシル	21	Steinberg, Annu. Rev. Biochem. 40:83-114 (1971)
Trp	IAEDANS	22	Matsumoto and Hammes, Biochemistry 14:214-224 (1975)
Trp	ANS	23	Conrad and Brand, Biochemistry 7:777-787 (1968)
Trp	アントロイルオキシ (Anthroyloxy)	24	Wiczk et al., *supra*, 1991
Trp	TNB	24	Wu and Brand, Biochemistry 31:7939-7947 (1992)
Trp	アントロイル (Anthroyl)	25	Burgun et al., Arch. Biochem. Biophys. 286:394-401 (1991)
Trp	$Tyr-NO_2$	26	Steiner et al., J. Fluo. 1:15-22 (1991)

【表７－２】

ドナーとしてＴｒｐを用いるＦｏｅｒｓｔｅｒ距離

ドナー	アクセプター	R_0 (Å)	参考文献
Trp	ピレン	28	Vekshin, Mol. Biol. 17:827-832 (1983)
Trp	ヘム	29	Ladokhin et al., Proc. SPIE 1640:562-569 (1992)
Trp	NBS	30	Wiczk et al., *supra*, 1991
Trp	DNBS	33	Wiczk et al., *supra*, 1991
Trp	DPH	40	Le Doan et al., Biochim. Biophys. Acta 735:259-270 (1983)

【０１１２】

上記観点から、様々なドナー・フルオロフォア／アクセプターペアが本発明のクロストリジウム毒素基質において有用であることが理解される。本発明において有用なドナー・フルオロフォア－アクセプターペアは、例えば、ＲＯＸ(６－カルボキシ-Ｘ-ローダミン；Applied Biosystems Division of Perkin Elmer Corporation; Foster City, CA)；ＴＡＭＲＡ(Ｎ,Ｎ,Ｎ’,Ｎ－テトラメチル－６－カルボキシ－ローダミン；Applied Biosystems)；ローダミン；テキサスレッドまたはエオシンであり得る。本発明において有用なドナー・フルオロフォア－アクセプターペアはまた、例えば、ドナーフルオロフォアカスケードブルー（アクセプターとしてフルオレセイン）；ドナー・フルオロフォアＢＯＤＩＰＹ（登録商標）５３０／５５０　(４,４－ジフルオロ－５,７－ジフェニル－４－ボラ－３ａ,４ａ－ジアザ－Ｓ－インダセン（indacene）、アクセプターとしてのＢＯＤＩＰＹ（登録商標）５４２／５６３(４,４－ジフルオロ－５－ｐ－メトキシフェニル－４－ボラ－３ａ,４ａ－ジアザ－Ｓ－インダセン）との組み合わせ）；またはＢＯＤＩＰＹ（登録商標）５４２／５６３(４,４－ジフルオロ－５－ｐ－メトキシフェニル－４－ボラ-３ａ,４ａ－ジアザ－Ｓ－インダセン、アクセプターとしてのＢＯＤＩＰＹ（登録商標）５６４／５７０(４,４－ジフルオロ－５－スチリル－４－ボラ－３ａ,４ａ－ジアザ－Ｓ－インダセン）との組み合わせ）。ＢＯＤＩＰＹ（登録商標）の名前の後の数字は、該分子の励起極大および発光極大を反映する；ＢＯＤＩＰＹ（登録商標）化合物は、Molecular Probes (Eugene Oregon)から市販されている。

【０１１３】

ある態様において、ドナー・フルオロフォアはフルオレセインである。さらなる態様において、本発明のクロストリジウム毒素基質は、ドナー・フルオロフォアとしてフルオレセインを、アクセプターとしてテトラメチルローダミンを含む。そのような基質は、４８０ｎｍから５０５ｎｍの範囲で、例えば、４８８ｎｍまたは４９２ｎｍで励起でき、発光は５２０ｎｍ（λ_{em}フルオレセイン）、５８５ｎｍ（λ_{em}テトラメチルローダミン）、またはその両方で検出できる。クロストリジウム毒素切断部位における基質の切断前は、テトラメチルローダミン発光強度は、フルオレセインのものよりも大きい。基質切断の結果、テトラメチルローダミンに対するフルオレセインの強度の比率が変化する。一般的に切断により、フルオレセインが主に発光するフルオロフォアとなる。フルオレセインおよびテトラメチルローダミンを含むタンパク質およびペプチドを調製する方法は、当業界において周知である(例えば、 Matsumoto et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry L

etters 10:1857 1861 (2000)参照）。

【０１１４】

本発明の基質において有用なドナー・フルオロフォアはまた、例えば、ＥＤＡＮＳ（λ_{Ab}３４０ｎＭ，λ_{Em}４９０ｎｍ)であり、それはＤＡＢＣＹＬのようなアクセプターと組み合わせることができる。ＤＡＢＣＹＬおよびＥＤＡＮＳを本発明のクロストリジウム毒素基質と組み合わせた場合、切断前の基質においてエネルギーがＥＤＡＮＳドナー・フルオロフォアからＤＡＢＣＹＬアクセプターへ転移し、その結果ＥＤＡＮＳ発光蛍光がクエンチングされる。毒素切断部位の切断後、切断されたＥＤＡＮＳ製品の蛍光は増加し、例えば遊離ドナー・フルオロフォアレベルまで回復し得る。切断前の基質における効率的な蛍光クエンチングは、ＥＤＡＮＳ発光スペクトルおよびＤＡＢＣＹＬ吸収スペクトルの好ましいエネルギー的重複、およびＥＤＡＮＳドナー・フルオロフォアの比較的長い励起状態寿命の結果として生じる(Wang et al., Tetrahedron Lett. 31:6493-6496 (1991); Holskin et al., Anal. Biochem. 226:148-155 (1995); および Wang et al., Anal. Biochem. 210:351-359 (1993))。

【０１１５】

ダンシル(ＤＮＳまたは５－ジメチルアミノナフタレン－１－スルホニル）もまた、本発明の基質においてドナー・フルオロフォアまたはアクセプターとして有用であり得る。ある態様において、本発明のクロストリジウム毒素基質は、ダンシルをドナー・フルオロフォアとして含む；ダンシル・ドナーは、例えば、ダンシル・ドナー・フルオロフォアと近接する場合にクエンチャーとして働く、Ｐｈｅ（ｐＮＯ２）のようなニトロフェニル残基アクセプターと組み合わせることができる。例えばニトロフェニル残基と組み合わせた、ダンシル・ドナー・フルオロフォアを含有する基質は、例えばFlorentinら、Anal. Biochem. 141:62-69 (1984) または Goudreauら、Anal. Biochem. 219:87-95 (1994)に記載されるように調製できる。別の態様において、クロストリジウム毒素基質は、アクセプターとしてダンシルを含む。ダンシル・アクセプターは、例えばＴｒｐ（λ_{ex}２９０ｎｍ，λ_{em}３６０ｎｍ）のようなドナー・フルオロフォアと組み合わせた場合、クエンチャーとして機能しうる。Ｔｒｐおよびダンシルを含む基質において、Ｔｒｐ蛍光は、ダンシル基へのエネルギー転移によって６０％クエンチングでき、このクエンチングは、毒素切断部位における毒素プロテアーゼ活性の存在下、顕著に減少または消失し得る（例えば、Geoghegan et al., FEBS Letters 262:119-122 (1990)参照）。

【０１１６】

十分分離した発光極大を有するドナーアクセプターペアが、本発明の基質および方法において有用であり得ることは理解される；十分分離した発光極大により、ドナー発光の混入のなく、変化したアクセプター発光の検出が可能になる。ドナー・フルオロフォアもしくはアクセプター、またはその両方が、例えば、近赤外（例えば６５０ｎｍより大）において、発光することができる。そのような近赤外発光ドナー・フルオロフォアおよびアクセプターは、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５およびＣｙ７のようなシアニン色素を含む(Selvin, 前述, 2000)。ある態様において、本発明は、Ｃｙ３およびＣｙ５をドナー・フルオロフォアアクセプターペアとして含む、クロストリジウム毒素基質を提供する；Ｃｙ３は最大５７０ｎｍで発光し、Ｃｙ５は最大６７０ｎｍで発光する。そのようなシアニン色素は、例えば Gruber et al., Bioconj. Chem. 11:161-166 (2000) に記載されるように、簡単な合成により調製できる。

【０１１７】

本発明のクロストリジウム毒素基質において有用なドナー・フルオロフォアはまた、例えば、希土類元素としてもまた知られるランタニド原子であってよい。テルビウム（Ｔｂ）、ユーロピウム（Ｅｕ）、ジスプロシウム（Ｄｙ）およびサマリウム（Ｓｍ）のようなランタニドは、鋭く突き立った波長、励起パルスに続くミリ秒の寿命を有し、極性がなく、かつ高量子収率を有する。テルビウムまたはユーロピウムキレートのようなランタニド・ドナー・フルオロフォアは、有機色素アクセプターを含む様々なアクセプターと組み合わせることができる。Ｅｕキレート・ドナー・フルオロフォアは、例えば、アロフィコシ

アニン（ＡＰＣ）と組み合わせることができ、Ｔｂキレート・ドナー・フルオロフォアは、例えば、テトラメチルローダミンと組み合わせることができる。直接励起によるバックグラウンド蛍光は時間的に除かれる；有機アクセプターの寿命は、一般的に、ナノ秒範囲内であり、一方、感光発光はドナー・フルオロフォアの寿命に従い、マイクロ秒からミリ秒のオーダーである（Selvin, 前述, 2000参照）。従って、共鳴エネルギー転移の測定は、励起に続いて非特異的干渉蛍光が退色した後、比較的後の段階で開始できる。ランタニドキレートは当業界にて周知であり、例えばＥＧ＆Ｇ（登録商標）Wallac (Turku, Finland) から市販されている。

【０１１８】

本発明において有用なドナー・フルオロフォアはまた、周知のフルオロフォア(７－メトキシクマリン－４－イル）アセチル （Ｍｃａ）であってよく、それはクエンチャーである２,４－ジニトロフェニル（Ｄｎｐ）のようなアクセプターと組み合わせることができる。例えば、Kakiuchiら、J. Virol. Methods 80:77-84 (1999)参照。本発明のクロストリジウム毒素基質においてＭｃａがＤｎｐのような適切なクエンチャーと組み合わされると、クロストリジウム毒素切断部位における切断後、増加したＭｃａ（λ_{Em}３９３ｎｍ）からのドナー発光蛍光が検出され、それは毒素プロテアーゼ活性を示す。

【０１１９】

本発明のクロストリジウム毒素基質において有用なドナー・フルオロフォアはまた、例えば、２－アミノベンゾイル（Ａｂｚ）基であり、要すれば、２,４－ジニトロフェニル（Ｄｎｐ）のようなクエンチャーと組み合わせることができる。切断前のクロストリジウム毒素基質において、Ｄｎｐ基は、共鳴エネルギー転移によってＡｂｚ基の蛍光をクエンチングする；基質のタンパク分解的切断はクエンチングを解放し、その結果放出されたＡｂｚフラグメントの濃度に比例して蛍光が増加する。例えば、Ａｂｚをアミノ末端に含み、かつリジンのようなＤｎｐ誘導体化残基を含むクロストリジウム毒素基質は、例えば Le Bonniec et al., Biochemistry 35:7114-7122 (1996)に記載される平凡な方法によって調製可能である。

【０１２０】

本発明のクロストリジウム毒素基質において有用なドナー・フルオロフォアはまた、Molecular Probes (Eugene, OR)から市販されるＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）色素であり得る。本発明において有用なＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）色素は、例えば、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）３５０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４３０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５３２、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５４６、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５６８、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５９４、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６３３、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６６０およびＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６８０である。

【０１２１】

本発明において有用なドナー・フルオロフォアまたはアクセプターはまた、遺伝的にコードされた色素、例えば緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、青色蛍光タンパク質（ＢＦＰ）、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）、またはｄｓＲｅｄ（BD Biosciences Clontech; Palo Alto, CA）のような赤色蛍光タンパク質であってよい。そのような遺伝的コード・ドナー・フルオロフォアおよびアクセプターは、例えばSelvin, 前述, 2000 および Mahajan et al., Chemistry and Biology 6:401-409 (1999)に記載されているように、当業界にて周知である。例えば、ＣＦＰは４３３ｎｍに励起極大を、４７６ｎｍに発光極大を有し、アクセプターとしてのＹＦＰ（５２７ｎｍに発光極大）と組み合わせて、ドナー・フルオロフォアとして使用できる。要すれば、ＢＦＰは、アクセプターとしてのＧＦＰと組み合わせてドナー・フルオロフォアとして使用でき、または、ＣＦＰは、アクセプターとしてのＹＦＰと組み合わせてドナー・フルオロフォアとして使用できる。Ａｅｑｕｏｒｅａ関連蛍光タンパク質を含む、更なる遺伝的コード・ドナー・フルオロフォアおよびアクセプターは、例えば米国特許番号5,981,200に記載されるよ

うに、当業界にて周知である。ＧＦＰ、ＢＦＰ、ＣＦＰ、またはＹＦＰのような遺伝的コード色素は、互いにＦＲＥＴペアを形成することができ、あるいは他の適したドナー・フルオロフォアまたはアクセプターと組み合わせることができる。ある態様において本発明は、ドナー・フルオロフォアおよびアクセプターの両方が遺伝的にコードされているクロストリジウム毒素基質を提供する。所望の毒素認識配列は、選択したドナー・フルオロフォア／アクセプターペアの間に切断部位があり、かつ基質を例えば細菌中で発現させ精製するように設計できる。

【０１２２】

別の態様において本発明は、少なくともミリ秒の長い蛍光寿命を有するフルオロフォアであるアクセプターを含む、クロストリジウム毒素基質を提供する。不純物の蛍光寿命は一般にナノ秒単位なので、そのようなアクセプターは蛍光発光の時間分解測定を可能にし、シグナル対ノイズ比率を増強できる。時間分解蛍光に有用なドナー・フルオロフォア／アクセプターペアは、例えば、１０５ｋＤａのフィコビリプロテイン（phycobiliprotein）・アクセプター・フルオロフォアであるアロフィコシアニンと組み合わせた、Ｅｕトリスビピリジン（trisbipyridine）クリプテート(ＴＢＰ－ＥＵ$^{3+}$，λ_{Ex} ３３７ ｎｍ)のようなユーロピウムクリプテート・ドナー・フルオロフォアである(Sittampalam et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 1:384-391 (1997))。Ｅｕトリスビピリジンクリプテートは、光を取り込み、それをケージ化ＥＵ$^{3+}$へと導く二つのビピリジル基を有する；このドナー・フルオロフォアは、長い蛍光寿命を有し、アロフィコシアニンに近接したときに非放射性にエネルギーをそのアクセプターに転移し、ドナー・フルオロフォア－アクセプター距離９．５ｎｍで５０％より大きい転移効率を示す。ＴＢＰ－ＥＵ$^{3+}$およびアロフィコシアニンの両者およびそれらの分光学的特性は、生物学的培地中で非常に安定であり、アロフィコシアニンはドナーの長い寿命に従い発光し（λ_{Em}＝６６５ｎｍ）、時間分解検出を可能にする(Kolb et al., J. Biomol. Screening 1:203-210 (1996))。そのようなドナー・フルオロフォア－アクセプターペアを含む基質の調製方法は、例えば、Kolb et al., 前述, 1996、および、Sittampalam et al., 前述, 1997に記載されるように、当業界にて周知である。

【０１２３】

さらなる態様において本発明は、しばしば「真のクエンチャー」として示される、非蛍光アクセプターに依存する。非蛍光アクセプターは、例えば、直接的（非感光）アクセプター励起の結果生じるバックグラウンド蛍光を除去するのに有用であり得る。様々な非蛍光アクセプターが当業界にて知られており、例えば、ＤＡＢＣＹＬおよびＱＳＹ（登録商標）７色素が含まれる（Molecular Probes, 前述, 1996参照）。

【０１２４】

本発明のクロストリジウム毒素基質は、ドナー・フルオロフォアおよびアクセプターの間に位置するクロストリジウム毒素基質切断部位を含む。ある態様において、ドナー・フルオロフォアは該切断部位のアミノ末端に位置し、一方アクセプターは該切断部位のカルボキシ末端に位置する。別の態様においては、ドナー・フルオロフォアは該切断部位のカルボキシ末端に位置し、一方アクセプターは該切断部位のアミノ末端に位置する。

【０１２５】

当業者は、本発明のクロストリジウム毒素基質においてドナー・フルオロフォアおよびアクセプターを選択し、そして位置づけるのにはいくつか考慮する点があることを理解している。ドナー・フルオロフォアおよびアクセプターは一般に、クロストリジウム毒素に対する基質結合または該毒素によるタンパク分解への障害を最小限にするように位置づけられる。従ってドナー・フルオロフォアおよびアクセプターを、例えば、（基質）結合に重要である、結合または非結合相互作用の崩壊を最小限にするように、かつ立体障害を最小限にするように、選択し位置づけることができる。さらに、アクセプターおよびドナー・フルオロフォアの間の空間距離は、一般に、ドナー・フルオロフォアからアクセプターへの効率的エネルギー転移を達成するよう限定される。

【０１２６】

前述のように、ドナー・フルオロフォアからアクセプターへのエネルギー転移の効率は、一つには、ドナー・フルオロフォアおよびアクセプター分子の空間分離に依存する。ドナー・フルオロフォアとアクセプターの間の距離が増加するにつれて、アクセプターへのエネルギー転移が小さくなり、それゆえ、切断前であっても、ドナー・フルオロフォアシグナルが増加する。基質切断後のドナー・フルオロフォアの蛍光収量の全体的増加は、基質におけるドナー・フルオロフォアとアクセプターの間の分離距離、ドナー・フルオロフォアおよびアクセプターの間のスペクトル重複、およびアッセイに使用される基質の濃度を含む、多くの因子に依存する。基質濃度が増加すると、ドナーの分子間クエンチングがタンパク分解切断後であっても一因子になりうることを当業者は理解している。この減少は「内部フィルター効果」と表される（以下参照）。

【０１２７】

Ｆｏｅｒｓｔｅｒ距離、即ち５０％エネルギー転移のためのドナー・フルオロフォアとアクセプターの間の分離は、優れた感受性を与えるドナー・フルオロフォアとアクセプターの間の空間分離を意味する。ペプチド基質について、近接する残基は、最も広がった構造において約３．６Åの距離によって隔てられている。例えば、フルオレセイン／テトラメチルローダミンペアについて計算したＦｏｅｒｓｔｅｒ距離は５５Åであり、それは最も広がった構造におけるフルオレセインとテトラメチルローダミンの間の約１５残基の空間分離を意味する。溶液中のペプチドおよび模擬ペプチドは完全に広がった構造を有することはまれなので、ドナー・フルオロフォアおよびアクセプターは、一残基につき３．６Åを用いて行った計算に基づいて期待されるよりもより広く隔てられているが、依然としてＦｏｅｒｓｔｅｒ距離内に留まっている場合がある。

【０１２８】

Ｆｏｅｒｓｔｅｒ理論は、ドナー・フルオロフォアとアクセプターの間の非常に弱い相互作用に基づく；一方のフルオロフォアの、吸収のような分光学的性質は、他方の存在下で変化を受けるべきではなく、該理論が有効な最短距離範囲を規定する。多くのドナー・フルオロフォア－アクセプターペアにとって、ドナー・フルオロフォアとアクセプターが約１０Åから１００Åの距離によって隔てられている場合に、Ｆｏｅｒｓｔｅｒ理論は有効である。しかしながら、特定のドナー・フルオロフォア－アクセプターペアにとっては、Ｆｏｅｒｓｔｅｒ理論は、サブピコ秒技術によって測定されるように１０Å以下で有効である(Kaschke and Ernsting, Ultrafast Phenomenon in Spectroscopy (Klose and Wilhelmi (Eds.)) Springer-Verlag, Berlin 1990。

【０１２９】

従って、ある態様において本発明は、ドナー・フルオロフォアが最大１００Åの距離でアクセプターから隔てられているクロストリジウム毒素基質を提供する。他の態様において、本発明は、ドナー・フルオロフォアが最大９０Å、８０Å、７０Å、６０Å、５０Å、４０Å、３０Åまたは２０Åの距離でアクセプターから隔てられている、クロストリジウム毒素基質を提供する。さらなる態様において、本発明は、ドナー・フルオロフォアが１０Åから１００Å、１０Åから８０Å、１０Åから６０Å、１０Åから４０Å、１０Åから２０Å、２０Åから１００Å、２０Åから８０Å、２０Åから６０Å、２０Åから４０Å、４０Åから１００Å、４０Åから８０Åまたは４０Åから６０Åの距離でアクセプターから隔てられている、クロストリジウム毒素基質を提供する。

【０１３０】

当業者は、本発明のクロストリジウム毒素基質を、ＦＲＥＴの効率およびプロテアーゼ活性の検出能力を最適化するように設計できることを理解している。当業者は、要すれば、高量子収率を有するドナー・フルオロフォアを選択することができ、また要すれば、Ｆｏｅｒｓｔｅｒ距離を最大化するため、高消光係数を有するアクセプターを選択することができることを理解している。当業者はさらに、アクセプターの直接励起により生じる蛍光は、共鳴エネルギー転移の結果生じる蛍光と区別するのが難しい場合があることを理解している。従って、ドナー・フルオロフォアおよびアクセプターは、アクセプターを直接励起しない波長においてドナーを励起できるように、それらの励起スペクトルの重複が比

較的小さいものを選択することができる。さらに、本発明のクロストリジウム毒素基質は、二つの発光が容易に区別できるように、ドナー・フルオロフォアおよびアクセプターの発光スペクトルが比較的小さくしか重複しないように設計できることが認識されている。要すれば、高蛍光量子収率を有するアクセプターを選択することができる；アクセプター蛍光発光をクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性の唯一の指標として、または発光比率の一部分として検出するならば、そのようなアクセプターが好ましい（以下参照）。

【０１３１】

ドナー・フルオロフォア、アクセプター、またはその両者は、ボツリヌスまたは破傷風毒素ホロ酵素の活性部位キャビティー内に位置することが可能であることは理解される。当業者は、要すれば、ドナー・フルオロフォア、アクセプター、またはその両者が、毒素と結合した場合に毒素ホロ酵素の活性部位キャビティーから排除されるように、クロストリジウム毒素基質を設計できることを理解している。従って、ある態様において、本発明は、ドナー・フルオロフォア、アクセプター、またはその両者が、毒素と結合した場合にクロストリジウム毒素ホロ酵素の活性部位キャビティーから排除される、ボツリヌス毒素基質または破傷風毒素基質を提供する。本発明は、例えば、ドナー・フルオロフォア、アクセプター、またはその両者が、毒素と結合した場合に毒素ホロ酵素の活性部位キャビティーから排除される、ＢＯＮＴ／Ａ、ＢＯＮＴ／Ｂ、ＢＯＮＴ／Ｃ1、ＢＯＮＴ／Ｄ、ＢＯＮＴ／Ｅ、ＢＯＮＴ／ＦまたはＢＯＮＴ／Ｇ基質を提供する。ある態様において、本発明は、ヒトＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの残基であってGln_{197}－Arg_{198}を含むものを含有するＢｏＮＴ／Ａ基質であって、ドナー・フルオロフォア、アクセプター、またはその両者が、ＢｏＮＴ／Ａホロ酵素の活性部位キャビティー内に存在し得る残基Arg_{191}からMet_{202}の間に位置しないものを提供する。他の態様において、本発明は、ＶＡＭＰ－２の少なくとも６つの残基であってGln_{76}－Phe_{77}を含むものを含有するＢｏＮＴ／Ｂ基質であって、ドナー・フルオロフォア、アクセプター、またはその両者が、ＢｏＮＴ／Ｂホロ酵素の活性部位キャビティー内に存在する残基Leu_{70}からAla_{81}の間に位置しないもの提供する。

【０１３２】

ＶＡＭＰ基質およびＢｏＮＴ／Ｂ軽鎖（ＬＣ／Ｂ）複合体において、水素結合アクセプターまたはドナーを含有する側鎖を有するＶＡＭＰ残基のほとんど全てが、ＬＣ／Ｂと水素結合していた。従って本発明のクロストリジウム毒素基質は、要すれば、例えばＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ｔｙｒ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、ＡｓｎまたはＧｌｎ残基による水素結合の可能性が、該クロストリジウム毒素基質において、その毒素による切断に感受性のある本来のタンパク質と比較して減少しないように調製できることは理解できる。つまり、具体的態様において本発明は、水素結合の可能性が、対応するボツリヌスまたは破傷風毒素による切断に感受性のある本来のタンパク質と比較してそのクロストリジウム毒素基質において減少していない、クロストリジウム毒素基質を提供する。

【０１３３】

ドナー・フルオロフォア、アクセプター、およびクロストリジウム毒素基質認識配列に加えて、本発明のクロストリジウム毒素基質は、要すれば、１つまたはそれ以上の更なる構成要素を含むことができることは理解される。例として、ＧＧＧＧＳ（配列番号：８４）のような柔軟性あるスペーサー配列が本発明のクロストリジウム毒素基質に含まれ得る。基質はさらにまた、以下のうち１つまたはそれ以上（但しこれらに限定されない）を含むことができる：アフィニティータグ、例えば、ＨＩＳ6、ビオチン、または、ＦＬＡＧ、ヘマグルチニン（ＨＡ）、ｃ－ｍｙｃまたはＡＵ１のようなエピトープ；イムノグロブリンヒンジ領域；Ｎ－ヒドロキシスクシニミドリンカー；ヘアピンターンペプチドまたは模擬ペプチド；または、親水性配列、もしくはクロストリジウム毒素基質の溶解性または安定性を促進する他の構成要素または配列。

【０１３４】

タンパク質、ペプチド、および模擬ペプチドをドナー・フルオロフォアまたはアクセプターを含むように修飾する方法は、当業界にて周知である(Fairclough and Cantor, Meth

ods Enzymol. 48:347-379 (1978); Glaser et al., Chemical Modification of Proteins Elsevier Biochemical Press, Amsterdam (1975); Haugland, Excited States of Biopolymers (Steiner Ed.) pp. 29-58, Plenum Press, New York (1983); Means and Feeney, Bioconjugate Chem. 1:2-12 (1990); Matthews et al., Methods Enzymol. 208:468-496 (1991); Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification 2nd Ed., CRC Press, Boca Ratan, Florida (1991); Haugland, 前述, 1996)。ドナー・フルオロフォアまたはアクセプターを、例えばクロストリジウム毒素認識配列を含むペプチドまたは模擬ペプチドにつなぐのに、様々な基が使用できる。本発明のクロストリジウム毒素基質を生産するため、ドナー・フルオロフォアまたはアクセプターをペプチドまたは模擬ペプチドの所望の位置とつなぐのに、例えばチオール基を使用することができる。ハロアセチルおよびマレイミド標識試薬もまた、本発明の基質の調製においてドナー・フルオロフォアまたはアクセプターをつなぐのに使用できる(例えば Wu and Brand, 前述, 1994参照)。

【０１３５】

ＧＦＰおよびアロフィコシアニン（ＡＰＣ）のようなタンパク質を含むドナー・フルオロフォアおよびアクセプターは、様々な手段によってクロストリジウム毒素認識配列に連結することができる。ドナー・フルオロフォアまたはアクセプターは、クロス－リンカー部分を介する化学的手段によって連結できる。クロス－リンカーは当業界にて周知であり、例えばＢＭＨおよびＳＰＤＰのような、ホモ－またはヘテロ－二機能クロス－リンカーを含む。ドナー・フルオロフォアまたはアクセプターがタンパク質である場合、タンパク質のアミノ－またはカルボキシ－末端に特異的に分子を連結するため、周知の化学的方法を用いることができる。例えば、Protein Engineering－ A Practical Approach, Rees et al. (Eds) Oxford University Press, 1992の、”Chemical Approaches to Protein Engineering”参照。

【０１３６】

当業者は、ドナー・フルオロフォアのみを含む基質が混入すると、高蛍光バックグラウンドが生じうることを理解している。そのようなバックグラウンドは、例えば、クロストリジウム毒素基質の調製において、ドナー・フルオロフォアに対して比較的過剰のアクセプターを使用することにより減少させる、または防ぐことができる。

【０１３７】

本発明はまた、試料中のクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を測定するためのキットを提供する。キットは、本発明のクロストリジウム毒素基質をバイアルまたは他の容器中に含む。一般的にキットはまた、使用のための説明書も含む。ある態様において、本発明のキットはさらに、陽性対照として、キットに含まれるクロストリジウム毒素基質を切断できる既知量のボツリヌスまたは破傷風毒素を含む。別の態様において、キットは、本発明のクロストリジウム毒素基質を含み、さらに陽性対照として切断産物の一方または両方を含む。具体的態様において、キットは、本発明のクロストリジウム毒素基質、および、陽性対照として、ドナー・フルオロフォアを含む対応する切断産物を含む。本発明のキットは、任意で、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した緩衝液を伴う容器も含むことができる。本明細書中以下にさらに記載されるように、本発明の方法はクロストリジウム毒素基質を組み合わせて行うことができる。従って、ある態様において本発明は、本発明のクロストリジウム毒素基質を少なくとも二つ含む、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を測定するためのキットを提供する。

【０１３８】

本発明はまた、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を検出するのに有用なクロストリジウム毒素標的を提供する。クロストリジウム毒素標的は、ポリペプチド、ペプチドまたは模擬ペプチドであって、ドナー・フルオロフォア、アクセプター、および切断部位を含むクロストリジウム毒素認識配列を含み、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるものを提供する。エネルギーは、例えば、衝突エネルギー転移を介して転移でき、アクセプターが、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する

吸収スペクトルを有することを必要としない。そのようなクロストリジウム毒素標的は、例えば、ボツリヌス毒素認識配列を含むことができる。本明細書に開示されるクロストリジウム毒素認識配列はいずれも、本発明のクロストリジウム毒素標的において有用であり得る。衝突エネルギー転移が示されるようなドナー・フルオロフォアおよびアクセプターの選択および位置づけは当業界にて周知であり、例えば、Gershkkovich and Kholodovych, J. Biochem. Biophys. Methods 33:135-162 (1996)に記載される。

【０１３９】

本発明はまた、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を測定する方法を提供する。そのような方法は、一つには、それらが迅速なスクリーニングに受け入れられやすく、かつ非切断基質から切断産物を分離する必要がないため価値がある。さらに、本発明の方法は、未精製試料および高度精製二本鎖毒素に適用可能であり、さらに、以下に詳説されるように、クロストリジウム毒素軽鎖に適用可能である。本発明の方法は、（ａ）クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件下、ドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有するアクセプター、および切断部位を含むクロストリジウム毒素認識配列を含み、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるクロストリジウム毒素基質により試料を処置し、（ｂ）ドナー・フルオロフォアを励起し、そして（ｃ）対照基質と対比して処置済基質の共鳴エネルギー転移を測定する段階を含み、ここで、対照基質と比較した処置済基質の共鳴エネルギー転移における相違がクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を示す。本発明の方法は、フルオロフォアであるアクセプターを用いて、または非蛍光アクセプターを用いて行うことができる。

【０１４０】

本発明の方法は、いずれのクロストリジウム毒素のプロテアーゼ活性を測定するのにも使用することができる。ある態様において、本発明の方法は、ＢｏＮＴ／Ａプロテアーゼ活性を測定するためにＢｏＮＴ／Ａ基質に依存する。本発明の方法に有用なＢｏＮＴ／Ａ基質は、本明細書に開示されるいずれのＢｏＮＴ／Ａ基質であってもよく、例えば、ＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ－Ａｒｇを含むものを含有するＢｏＮＴ／Ａ基質である。別の態様において、本発明の方法は、ＢｏＮＴ／Ｂプロテアーゼ活性を測定するのにＢｏＮＴ／Ｂ基質に依存する。本発明の方法に有用なＢｏＮＴ／Ｂ基質は、本明細書に開示されるいずれのＢｏＮＴ／Ｂ基質であってもよく、例えば、ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ－Ｐｈｅを含むものを含有するＢｏＮＴ／Ｂ基質である。本発明の方法はまた、ＢｏＮＴ／Ｃ１プロテアーゼ活性を測定するのにＢｏＮＴ／Ｃ１基質を利用することができる。本発明の方法に有用なＢｏＮＴ／Ｃ１基質は、本明細書に開示されるいずれのＢｏＮＴ／Ｃ１基質であってもよく、例えば、ｓｙｎｔａｘｉｎの少なくとも６つの連続する残基であってＬｙｓ－Ａｌａを含むもの、またはＡｒｇ－Ａｌａを含むものを含有する、ＢｏＮＴ／Ｂ基質である。

【０１４１】

別の態様において、本発明の方法は、ＢｏＮＴ／Ｄプロテアーゼ活性を測定するためにＢｏＮＴ／Ｄ基質に依存する。本発明の方法に有用なＢｏＮＴ／Ｄ基質は、本明細書に開示されるＢｏＮＴ／Ｄ基質のいずれであってもよく、例えば、ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＬｙｓ－Ｌｅｕを含むものを含有するＢｏＮＴ／Ｄ基質である。さらなる態様において、本発明の方法は、ＢｏＮＴ／Ｅプロテアーゼ活性を測定するのにＢｏＮＴ／Ｅ基質に依存する。本発明の方法に有用なＢｏＮＴ／Ｅ基質は、本明細書に開示されるいずれのＢｏＮＴ／Ｅ基質であってもよく、例えば、ＳＮＡＰ－２５の少なくとも６つの連続する残基であってＡｒｇ－Ｉｌｅを含むものを含有するＢｏＮＴ／Ｅ基質である。なお更なる態様において、本発明の方法は、ＢｏＮＴ／Ｆプロテアーゼ活性を測定するのにＢｏＮＴ／Ｆ基質に依存する。本発明の方法に有用なＢｏＮＴ／Ｆ基質は、本明細書に開示されるいずれのＢｏＮＴ／Ｆ基質であってもよく、例えば、ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ－Ｌｙｓを含むものを含有するＢｏＮＴ／Ｆ基質

である。

【０１４２】

本発明の方法はまた、ＢｏＮＴ／Ｇプロテアーゼ活性を測定するのにＢｏＮＴ／Ｇ基質を利用することができる。本発明の方法に有用なＢｏＮＴ／Ｇ基質は、本明細書に開示されるいずれのＢｏＮＴ／Ｇ基質であってもよく、例えば、ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＡｌａ－Ａｌａを含むものを含有するＢｏＮＴ／Ｇ基質である。本発明の方法はまた、ＴｅＮＴプロテアーゼ活性を測定するのに有用であり、この場合、ＴｅＮＴ基質に依存する。本明細書に開示されるＴｅＮＴ基質はいずれも本発明の方法に有用であり得るもので、例えば、ＶＡＭＰの少なくとも６つの連続する残基であってＧｌｎ－Ｐｈｅを含むものを含有するＴｅＮＴ基質である。

【０１４３】

本発明の方法においては様々な試料が有用である。そのような試料は、未精製細胞溶解物；単離クロストリジウム毒素；単離クロストリジウム毒素軽鎖；製剤化クロストリジウム毒素製品、例えば、ＢＯＴＯＸ（登録商標）；および、生、調理済、半調理済および加工済食物および飲物を含む飲食物を含むが、これらに限定されない。

【０１４４】

本発明の方法において、共鳴エネルギー転移は、様々な手段によって測定することができる。ある態様において、共鳴エネルギー転移を測定する段階は、処置済基質のドナー蛍光強度を検出することを含み、ここで、対照基質と比較して増加した処置済基質のドナー蛍光強度は、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を示す。別の態様において、共鳴エネルギー転移を測定する段階は、処置済基質のアクセプター蛍光強度を検出すること含み、ここで、対照基質と比較して減少した処置済基質のアクセプター蛍光強度は、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を示す。さらなる態様において、共鳴エネルギー転移を測定する段階は、アクセプター発光極大およびドナー・フルオロフォア発光極大を検出することを含み、ここで、アクセプター発光極大付近からドナー・フルオロフォア発光極大付近への発光極大におけるシフトは、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を示す。さらなる態様において、共鳴エネルギー転移を測定する段階は、アクセプター発光極大付近の蛍光振幅の、ドナー・フルオロフォア発光極大付近の蛍光振幅に対する比率を検出することを含み、ここで対照試料と比較して減少した処置済試料における比率は、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を示す。なおさらなる態様において、共鳴エネルギー転移を測定する段階は、処置済基質のドナー・フルオロフォアの励起状態寿命を検出することによって行われ、ここで、対照基質と比較して増加した処置済基質のドナー・フルオロフォア励起状態寿命は、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を示す。

【０１４５】

以下に詳説するように、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した様々な条件が本発明の方法において有用である。例えば、少なくとも１０％の基質が切断されるようにクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件を規定することができる。同様に、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％または９５％のクロストリジウム毒素基質が切断されるように、または１００％のクロストリジウム毒素基質が切断されるように、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件を規定することができる。ある態様においては、アッセイが線形となるようクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件を選択する。別の態様においては、少なくとも９０％のクロストリジウム毒素基質が切断されるようにクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件を規定する。さらなる態様においては、最大２５％のクロストリジウム毒素基質が切断されるようにクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件を規定する。なお更なる態様においては、最大２０％、最大１５％、最大１０％、または最大５％のクロストリジウム毒素基質が切断されるようにクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件を規定する。

【０１４６】

本明細書で用いる場合、「試料」なる用語は、活性クロストリジウム毒素、または軽鎖

あるいはそのタンパク分解活性フラグメントを含む、または含む可能性のある、生物学的物質を意味する。従って、試料なる用語は、精製または半精製クロストリジウム毒素；天然または非天然配列を有する組換え一本鎖または二本鎖毒素；複数のクロストリジウム毒素種またはサブタイプに由来する構造エレメントを含むキメラ毒素；天然または非天然配列を有する組換え毒素軽鎖；バルク毒素；製剤化製品；細胞、または未精製、分画化または半精製細胞溶解物であって、例えば、クロストリジウム毒素またはその軽鎖をコードする組換え核酸を含むように設計されたもの（細菌、バキュロウィルスおよび酵母溶解物を含む）；生、調理済、半調理済または加工済食物；飲物；動物飼料；土壌試料；水試料；池堆積物；ローション；化粧品；および臨床製剤を包含するが、これらに限定されない。さらに、試料なる用語は組織試料を含み、それは哺乳類試料、および霊長類およびヒト試料（これらに限定されない）を含み、また、例えば幼児腸試料のような腸試料および傷から得られた試料を包含することが理解される。従って本発明の方法は、限定はされないが、以下ものに有用であり得ることが理解される：食物または飲物中のクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性のアッセイ；ヒトまたは動物（例えば、クロストリジウム毒素にさらされたもの、または１つまたはそれ以上のクロストリジウム毒素症状を有するもの）由来の試料のアッセイ；クロストリジウム毒素の生産および精製中の活性の追跡、および製剤化クロストリジウム毒素製品（医薬品および化粧品を含む）のアッセイ。

【０１４７】

本発明の方法は、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を有するいずれのタンパク質または分子をアッセイするのにも適しており、例えばクロストリジウム毒素の神経細胞に結合する能力、または膜を越えて取り込まれる、あるいは転位される能力に依存しないことを当業者は理解している。従って、本発明の方法は、クロストリジウム毒素軽鎖単独のタンパク分解活性のアッセイにも適しており、また、一本鎖または二本鎖ヘテロ毒素のアッセイに有用であるが、重鎖の存在は必要としない。さらに、本発明の方法は、本来の、および組換えクロストリジウム毒素（例えば膵臓腺房細胞を標的とするよう設計されたクロストリジウム毒素）を含む、非神経クロストリジウム毒素に適用可能である。

【０１４８】

本発明の方法において、試料は、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件下クロストリジウム毒素基質を処置される。クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した典型的条件は当業界にて周知であり、さらに平凡な方法で決定できる。例えばHallis et al., J. Clin. Microbiol. 34:1934-1938 (1996); Ekong et al., Microbiol. 143:3337-3347 (1997); Shone et al., WO 95/33850; Schmidt and Bostian, 前述, 1995; Schmidt and Bostian, 前述, 1997; Schmidt et al., 前述, 1998; および Schmidt and Bostian, U.S. Patent No. 5,965,699 参照。クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件は、一つには、アッセイされる特異的クロストリジウム毒素タイプまたはサブタイプおよび毒素調製物の純度に依存し得る。クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件は、一般的に、緩衝液、例えばＨＥＰＥＳ、Ｔｒｉｓ、またはリン酸ナトリウムを含み、典型的にはｐＨ５．５から９．５の範囲、例えばｐＨ６．０から９．０、ｐＨ６．５から８．５、またはｐＨ７．０から８．０の範囲である。クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件はまた、要すれば、例えば二本鎖毒素をアッセイする場合、ジチオスレイトール、β－メルカプトエタノール、または他の還元剤を含むことができる(Ekong et al., 前述, 1997)。ある態様において、該条件は、０．０１ｍＭから５０ｍＭの範囲のＤＴＴを含む；他の態様において、該条件は、０．１ｍＭから２０ｍＭ、１ｍＭから２０ｍＭ、または５ｍＭから１０ｍＭの範囲のＤＴＴを含む。要すれば、クロストリジウム毒素基質添加前に約３０分間、単離クロストリジウム毒素または試料を、還元剤、例えば１０ｍＭジチオスレイトール（ＤＴＴ）とプレインキュベートすることができる。

【０１４９】

クロストリジウム毒素は亜鉛メタロプロテアーゼであり、要すれば、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件の一部として、亜鉛源、例えば塩化亜鉛または酢酸亜鉛を、典型的には１から５００μＭ、例えば５から１０μＭの範囲で含むことができる。

一般的にＥＤＴＡのような亜鉛キレーターはクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性をアッセイするための緩衝液から除かれることを、当業者は理解している。

【０１５０】

クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件はまた、要すれば、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含むことができる。ＢＳＡが含まれる場合、典型的には０．１ｍｇ／ｍｌから１０ｍｇ／ｍｌの範囲で提供される。ある態様においてＢＳＡは、濃度１ｍｇ／ｍｌで含まれる。例えば、Schmidt and Bostian, 前述, 1997 参照。

【０１５１】

本発明の方法において、クロストリジウム毒素基質の量は様々であり得る。本発明の方法に有用なペプチド基質濃度には、例えば、５μＭから３．０ｍＭの範囲の濃度が含まれる。ペプチド基質は、例えば、濃度５μＭから５００μＭ、５μＭから５０μＭ、５０μＭから３．０ｍＭ、０．５ｍＭから３．０ｍＭ、０．５ｍＭから２．０ｍＭ、または０．５ｍＭから１．０ｍＭの濃度で供給することができる。クロストリジウム毒素基質の濃度または試料の量は、要すれば、アッセイが線形になるように限定できることを当業者は理解している。より高い基質または毒素濃度においては、分子間エネルギー転移が関与する「内部フィルター効果」のため、アッセイの線形性が失われる。従ってある態様においては、本発明の方法は、分子間クエンチングが起こらないように限定されたクロストリジウム毒素基質濃度に依存する。別の態様において、本発明の方法は、１００μＭ未満のクロストリジウム毒素基質濃度に依存する。さらなる態様において、本発明の方法は、５０μＭ未満または２５μＭ未満のクロストリジウム毒素基質濃度に依存する。要すれば線形アッセイはまた、クロストリジウム毒素基質と、そのクロストリジウム毒素基質のドナー・フルオロフォアおよびアクセプターを欠く、対応する「非標識」基質とを混合することによって行うことができる。適切な希釈は、例えば、クロストリジウム毒素基質の段階的希釈を、対応する非標識基質において調製することによって決定することができる。

【０１５２】

本発明の方法においてアッセイされる、精製または半精製クロストリジウム毒素の濃度は、一般的に毒素約０．０００１から５０００ｎｇ／ｍｌ、例えば毒素約０．００１から５０００ｎｇ／ｍｌ、０．０１から５０００ｎｇ／ｍｌ、０．１から５０００ｎｇ／ｍｌ、１から５０００ｎｇ／ｍｌまたは１０から５０００ｎｇ／ｍｌの範囲内であり、それは例えば、精製組換え軽鎖もしくは二本鎖毒素、またはヒト血清アルブミンおよび賦形剤を含む製剤化クロストリジウム毒素製品であってよい。一般的には、本発明の方法に使用される精製毒素の量は、０．１ｐｇから１０μｇの範囲である。精製、半精製、または未精製試料は、標準曲線に対してクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性をアッセイするのに都合のよい範囲内に希釈できる。同様に、要すれば毒素プロテアーゼ活性についてのアッセイが線形となるように、試料を希釈できることを、当業者は理解している。

【０１５３】

クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件にはまた、一般的に、例えば約２０℃から約４５℃の範囲、例えば２５℃から４０℃の範囲、または３５℃から３９℃の範囲の温度が含まれる。アッセイボリュームは、通常約５から約２００μｌの範囲、例えば約１０μｌから１００μｌまたは約０．５μｌから１００μｌの範囲であるが、ナノリットル反応ボリュームもまた本発明の方法に用いることができる。アッセイボリュームはまた、例えば１００μｌから２．０ｍｌの範囲内、または０．５ｍｌから１．０ｍｌの範囲内であってもよい。

【０１５４】

アッセイ時間は、当業者によって適宜変更され得るが、一般的に、一つには、クロストリジウム毒素の濃度、純度および活性に依存する。具体的態様において、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％または１００％のクロストリジウム毒素基質が切断される。さらなる態様において、プロテアーゼ反応は、５％、１０％、１５％、２０％、２５％または５０％を超えるクロストリジウム毒素基質が切断される前に停止される。プロテアーゼ反応は、例えば、実施例Ｉのよう

なH$_2$SO$_4$の添加、約０．５－１．０ホウ酸ナトリウム（ｐＨ９．０から９．５）の添加、または亜鉛キレーターの添加によって停止できる。プロテアーゼ反応はドナー・フルオロフォアの励起またはエネルギー転移の測定の前に終わらせることができることを、当業者は理解している。

【０１５５】

例として、ＢｏＮＴ／Ａプロテアーゼ活性に適した条件は、緩衝液、例えば５ｍＭ ジチオスレイトールのような還元剤、２５μＭ 塩化亜鉛のような亜鉛源、および毒素１μｇ／ｍｌ（およそ７ｎＭ、Schmidt and Bostian, 前述, 1997）を含有する、３０ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．３）中での３７℃におけるインキュベーションであり得る。０．１ｍｇ／ｍｌから１０ｍｇ／ｍｌの範囲のＢＳＡ、例えばＢＳＡ １ｍｇ／ｍｌもまた、試料をＢｏＮＴ／Ａまたは他のクロストリジウム毒素基質で処置する場合に含まれ得る (Schmidt and Bostian, 前述, 1997)。要すれば、ＢｏＮＴ／Ａ、特に二本鎖ＢｏＮＴ／Ａを、例えば基質の添加前に３０分間、ジチオスレイトールとプレインキュベートすることができる。別の例として、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性、例えばＢｏＮＴ／Ａプロテアーゼ活性に適した条件は、５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）、１％ウシ胎児血清、１０μＭ $ZnCl_2$、および１０ｍＭ ＤＴＴを、１０μＭの基質とともに含む緩衝液中における、３７℃、３０分間のインキュベーションであり得る（実施例Ｉ参照）。更なる例として、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性、例えばＢｏＮＴ／Ｂ活性に適した条件は、５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）、１０μＭ 塩化亜鉛、１％ウシ胎児血清、および１０ｍＭ ＤＴＴ中における、３７℃、９０分間のインキュベーションであり得る (Shone and Roberts, Eur. J. Biochem. 225:263-270 (1994); Hallis et al., 前述, 1996);または、例えば、１０ｍＭ ジチオスレイトールを含む４０ｍＭ リン酸ナトリウム、ｐＨ７．４（任意で０．２％(ｖ／ｖ）ＴｒｉｔｏｎＸ－１００を含む）中における、３７℃、２時間のインキュベーションであり得る (Shone et al., 前述, 1993)。破傷風毒素プロテアーゼ活性または他のクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性に適した条件は、例えば、２０ ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ ７．２）および１００ｍＭ ＮａＣｌにおける、２５μＭペプチド基質との３７℃、２時間のインキュベーションであり得る(Cornille et al., 前述, 1994)。

【０１５６】

クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を測定するための本発明の方法において、試料は、第一のドナー・フルオロフォア、ドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有する第一のアクセプター、および切断部位を含む第一のクロストリジウム毒素認識配列を含み、該切断部位がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間に介在し、適切な条件下、共鳴エネルギー転移がドナー・フルオロフォアとアクセプターの間で見られるクロストリジウム毒素基質を処置される。要すれば、第二のクロストリジウム毒素基質が含まれてもよい；この第二の基質は、第二のドナー・フルオロフォア、第二のドナー・フルオロフォアの発光スペクトルと重複する吸収スペクトルを有する第二のアクセプター、および、第一のクロストリジウム毒素認識配列を切断する毒素と相違するクロストリジウム毒素によって切断される第二のクロストリジウム毒素認識配列を含む。第二の基質におけるドナー・フルオロフォア－アクセプターペアは、第一の基質におけるドナー・フルオロフォア－アクセプターペアと同じでも、または相違してもよい。このように、単一の試料を複数のクロストリジウム毒素の存在についてアッセイすることができる。

【０１５７】

クロストリジウム毒素、例えば２、３、４、５、６、７、８、９、１０種類またはそれ以上のクロストリジウム毒素の、いずれの組み合わせについてもアッセイできることが理解される。例えば、ＴｅＮＴ、ＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｃ１、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／Ｅ、ＢｏＮＴ／ＦおよびＢｏＮＴ／Ｇのうち２、３、４、５、６、７または８種類の組み合わせのいずれでもアッセイすることができる。例えば、各々がＢｏＮＴ／Ａ、ＢｏＮＴ／Ｂ、ＢｏＮＴ／Ｃ１、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／Ｅ、ＢｏＮＴ／Ｆま

たはＢｏＮＴ／Ｇ認識配列を挟むフルオレセインおよびテトラメチルローダミンを含む７種類の基質を、ボツリヌス毒素プロテアーゼ活性に適した条件下に試料で処置し、その後約４８８ｎｍの吸収波長でドナー・フルオロフォアを励起し、エネルギー転移を測定することができる。アクセプターであるテトラメチルローダミンの発光極大（５８５ｎｍ）におけるフルオレセインの発光極大（５２０ｎｍ）へのシフトは、少なくとも１種類のボツリヌス毒素のプロテアーゼ活性を示す。そのようなアッセイは、例えば、いずれかのクロストリジウム毒素の存在について食物試料または組織試料をアッセイするのに有用であり、要すれば、その後の、個々のクロストリジウム毒素またはクロストリジウム毒素の特定の組み合わせのための１つまたはそれ以上のアッセイと組み合わせることができる。

【０１５８】

別の態様においては、２つまたはそれ以上の相異なるクロストリジウム毒素基質であって各々相異なるドナー・フルオロフォア－アクセプターペアを含有するものを用いて、１つの試料を２つまたはそれ以上の相異なるクロストリジウム毒素についてアッセイする。複数の基質の使用は、例えば米国特許番号6,180,340に記載されるように、アッセイのダイナミック・レンジを拡張するのに有用であり得る。複数のクロストリジウム毒素基質の使用の例として、ドナー・フルオロフォアであるフルオレセインおよびアクセプターであるテトラメチルローダミンおよび介在するＢｏＮＴ／Ａ認識配列を含む第一のクロストリジウム毒素基質、および、ドナー・フルオロフォアであるＥＤＡＮＳおよびアクセプターであるＤＡＢＣＹＬおよび介在するＢｏＮＴ／Ｂ認識配列を含む第二のクロストリジウム毒素基質を用いて、１つの試料をＢｏＮＴ／ＡおよびＢｏＮＴ／Ｂプロテアーゼ活性についてアッセイすることができる。第一のドナー・フルオロフォアであるフルオレセインを約４８８ｎｍで励起し、そしてエネルギー転移を測定し、ここで、約５２０ｎｍにおいて増加した第一のドナーの蛍光強度は、ＢｏＮＴ／Ａプロテアーゼ活性を示す。第二のドナー・フルオロフォアであるＥＤＡＮＳは、約３４０ｎｍの吸収波長で励起され、ここで、増加した第二のドナーの蛍光強度（４９０ｎｍ）は、ＢｏＮＴ／Ｂプロテアーゼ活性を示す。同様に、１つの試料をアッセイするのに２つまたはそれ以上の相異なるドナー・フルオロフォアを一緒に用いる場合、例えば以下のランタニドの組み合わせ、または全てを、組み合わせることができる：テルビウム、ジスプロシウム、ユーロピウム、およびサマリウム(EG&G（登録商標） Wallac)。これらランタニドは、崩壊時間および波長に基づいてはっきりと区別できるスペクトルを有する。当業者は、第二のドナー・フルオロフォアの励起の前、それと同時、またはその後に第一のドナー・フルオロフォアを励起できること、および、第二の基質のエネルギー転移の測定の前、それと同時、またはその後に第一の基質のエネルギー転移を測定できることを理解している。

【０１５９】

複数の基質はまた、アッセイのレンジをひろげるために本発明の方法において使用できる。ある態様においては、少なくとも二つのクロストリジウム基質を相異なる希釈で一緒に用いる；それら基質はドナー・フルオロフォア－アクセプターペアを有するので別々に検出可能であるが、同じクロストリジウム毒素に対する認識配列を有する。別の態様においては、本アッセイのレンジをひろげるため、相異なるドナー・フルオロフォア－アクセプターペアを有し、それ以外は同一のクロストリジウム毒素基質を相異なる希釈で一緒に用いる。

【０１６０】

本発明の方法は、クロストリジウム毒素基質に含まれるドナー・フルオロフォアを励起することに関与する。当業者は、ドナー・フルオロフォアを一般的にドナー・フルオロフォアの最適吸収波長（励起波長）において、またはその付近で励起することを理解している。ドナー・フルオロフォアがフルオレセインである場合、例えば４８８ｎｍの最適吸収波長で、またはその付近でドナーを励起できる。

【０１６１】

クロストリジウム毒素基質のタンパク分解、つまりクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性は、様々な手段によって検出することができ、例えば、増加したドナー蛍光強度;減

少したアクセプター蛍光強度；アクセプター発光極大付近からドナー・フルオロフォア発光極大付近への、発光極大におけるシフト；減少した、アクセプター発光極大付近の蛍光振幅のドナー・フルオロフォア発光極大付近の蛍光振幅に対する比率；または増加したドナー・フルオロフォア励起状態寿命を検出することによる。適当な蛍光強度または励起状態寿命は、選択した適切な波長または波長範囲にて検出されることは理解される。例えば、ドナー蛍光強度を検出する場合、選択した適切な波長は、ドナー・フルオロフォアの発光極大またはその付近であるか、またはドナー・フルオロフォアの発光極大を包含する、またはその付近の、波長の範囲である。

【０１６２】

基質の絶対量、励起強度、および励起波長での試料の濁度または他のバックグラウンド吸収は、ドナーおよびアクセプター・フルオロフォアの蛍光強度にほぼ同時に影響する。従って発光強度の比率は、基質の絶対量、励起強度、または濁度もしくは他のバックグラウンド吸収に依存せず、クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性の有用な指標であり得る。同様に、ドナー・フルオロフォアの励起状態寿命は、基質の絶対量、励起強度、または濁度もしくは他のバックグラウンド吸収に依存せず、本発明の方法において有用であり得ることを当業者は理解している。

【０１６３】

ある態様においてはドナー蛍光強度を検出し、増加したドナー蛍光強度がクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を示す。このような増加した強度は、例えば、同じ波長における、試料と未接触の同じクロストリジウム毒素基質の蛍光強度に対して、少なくとも２倍、３倍、５倍、１０倍、２０倍またはそれ以上であり得る。

【０１６４】

ドナー蛍光強度の検出のため、励起をドナー・フルオロフォア吸収波長に定め、ドナー・フルオロフォアの発光をモニターする。ドナー・フルオロフォアの発光波長は一般的に、アクセプター蛍光の寄与が殆どまたは全く観察されないように選択する。アクセプターが存在するとドナー蛍光をクエンチングする。エネルギー転移効率、Ｅは、$E = 1 - I_{DA} / I_{D}$により計算され、ここでI_{DA}およびI_{D}は、アクセプターの存在および非存在下におけるドナー強度である。どちらも同じドナー・フルオロフォア濃度にノーマライズされる。要すれば、ドナー・フルオロフォア濃度を必要としない時間分解測定を、$E = 1 - \{\tau_{DA}\} / \tau_{D}$で行うことができ、ここで$\{\tau_{DA}\}$および$\{\tau_{D}\}$は、アクセプターの存在および非存在下における振幅平均寿命である。

【０１６５】

ある態様において、発光極大における、アクセプター発光極大付近からドナー・フルオロフォア発光極大付近へのシフトを、共鳴エネルギー転移の測定として検出する。テトラメチルローダミンアクセプターをドナー・フルオロフォアであるフルオレセインと組み合わせる場合、減少した共鳴エネルギー転移、つまりクロストリジウム毒素プロテアーゼ活性の指標として、主に赤色の発光から主に緑色の発光へのシフトを検出することができる。発光極大において観察されるシフトは、一般に完全なシフトでなく、発光強度の一部分しかドナー・フルオロフォア発光強度付近へシフトしないであろうことは理解される。

【０１６６】

本発明の方法において、処置済基質の共鳴エネルギー転移は、対照基質と比較して測定する。一般にそのような対照基質は、例えば、試料を処置していないか、または１種類またはそれ以上のクロストリジウム毒素を含む規定の試料を処置した、同じクロストリジウム毒度基質であってよい。様々な対照基質が本発明の方法において有用であり、対照基質は陽性対照基質または陰性対照基質であり得ることを当業者は理解している。対照基質は、例えば、活性クロストリジウム毒素を含有しない近似の試料と接触したか、またはどの試料とも接触していない、近似または同一の基質のような陰性対照である。対照基質はまた、例えば、クロストリジウム毒素基質のクロストリジウム毒素タンパク分解の結果生じた二つの精製切断産物であってもよい。対照基質は、ドナー・フルオロフォア含有切断産物、アクセプター含有切断産物、または両者の組み合わせであり得る。

【０１６７】
クロストリジウム毒素プロテアーゼ活性を測定するための本発明の方法は、試料を処置したクロストリジウム毒素基質の共鳴エネルギー転移を、対照基質と対比して測定することを含み、「固定時間」アッセイとして、または連続時間アッセイとして行うことができる。従ってある態様においてＦＲＥＴ測定は、１つまたはそれ以上の時間間隔をおいて繰り返される。蛍光共鳴エネルギー転移は、例えば、２またはそれ以上、５またはそれ以上、１０またはそれ以上、または２０またはそれ以上異なる間隔で測定できる。蛍光強度およびＦＲＥＴの他の指標はまた、周知の方法によって連続的に検出することができる（例えば、Wang et al., 前述, 1993; Holskin et al., 前述, 1995; およびKakiuchi et al., 前述, 1999参照)。

【０１６８】
本発明の方法において、処置済基質の蛍光は、フルオリメーターを用いて測定される。一般に、はじめの波長を有する励起源からの励起放射は励起光系を通過する。励起光系は、基質を励起する励起放射を引き起こす。それに応答して、基質中のフルオロフォアが励起波長と異なる波長の光を放射する。その後集光系がその発光を収集する；スキャン中特定の温度にクロストリジウム毒素基質を維持するため、要すれば、該機器は温度制御装置を含む。要すれば、複数軸並行移動台が、多数の試料を含むマイクロタイタープレートを異なるウェルが露出するよう位置付けるため動かす。複数軸並行移動台、温度制御装置、自動焦点機能、および画像化およびデータ収集に関する電子機器は、適切なデジタルコンピューターにより管理することができる。

【０１６９】
つまり、本発明の方法は自動化することができ、さらに、例えば９６ウェル、３８４ウェル、または１５３６ウェルプレートを用いるハイスループットまたはウルトラハイスループットフォーマットに設定できる。一例として、９６ウェルプレートアッセイ用に設計されたMolecular Devices FLIPR（登録商標）装置(Molecular Devices; Sunnyvale, CA)を用いて蛍光発光を検出することができる(Schroeder et al., J. Biomol. Screening 1: 75-80 (1996))。ＦＬＩＰＲは、水冷４８８ｎｍアルゴンイオンレーザー（５ワット）またはキセノンアークランプ、および、プレート全体を照らし、画像化するための電化結合素子（ＣＣＤ）カメラを備えた半共焦点最適系（semiconfocal optimal system）を利用する。ＦＰＭ－２ ９６ウェルプレートリーダー(Folley Consulting and Research; Round Lake, Illinois)もまた、本発明の方法において蛍光発光を検出するのに有用であり得る。当業者は、これらおよび適切な分光学的互換性を有する他の自動化系、例えば、ＥＣＬＩＰＳＥキュベットリーダー(Varian Cary; Walnut Creek, CA)、SPECTRA$_{max}$ GEMINI XS (Molecular Devices)、および他の系、例えばPerkin Elmerの他の系が、本発明の方法において有用であり得ることを当業者は理解している。

【０１７０】
以下の実施例は本発明を説明するものであるが、これを限定するものではない。

【実施例】

【０１７１】
実施例１

蛍光共鳴エネルギー転移を用いたＢｏＮＴ／Ａ活性の解析

本実施例は、ボツリヌス毒素のタンパク分解活性を解析するためのＦＲＥＴアッセイの使用について示す。

【０１７２】
ＦＲＥＴ基質 X1-Asp-Ser-Asn-Lys-Thr-Arg-Ile-Asp-Glu-Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys-Met-Leu-Z2-NH_2 （配列番号：８５）は、Alpha Diagnostics International (San Antonio, TX)により合成された。本基質は、蛍光修飾リジン残基（「Ｘ１」）およびカルボキシ末端アミドが続くテトラメチルローダミン修飾リジン残基（「Ｚ２」）に挟まれた、ＢｏＮＴ／Ａのための認識配列を含む。Ａ血清型ボツリヌス毒素によるタンパク分解に続いて、切断産物 X1-Asp-Ser-Asn-Lys-Thr-Arg-Ile-Asp-Glu-Ala-Asn-Gln （配列番号：８６

）およびArg-Ala-Thr-Lys-Met-Leu-Z2-NH_2（配列番号：８７）が産生される。

【０１７３】

更なるＦＲＥＴ基質もまた合成される：X1-Asp-Ser-Asn-Lys-Thr-Arg-Ile-Asp-Glu-Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys-Met-Leu-Gly-Ser-Gly-Z2-NH_2（配列番号：８８）；X1-Ala-Asp-Ser-Asn-Lys-Thr-Arg-Ile-Asp-Glu-Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys-Met-Leu-Z2-NH_2（配列番号：８９）；X1-Ala-Asp-Ser-Asn-Lys-Thr-Arg-Ile-Asp-Glu-Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys-Met Leu-Gly-Ser-Gly-Z2-NH_2（配列番号：９０）；X1-Thr-Arg-Ile-Asp-Glu-Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys-Met-Leu-Z2-NH_2（配列番号：９１）；X1-Thr-Arg-Ile-Asp-Glu-Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys-Met Leu-Gly-Ser-Gly-Z2-NH_2（配列番号：９２）；X1-Met-Glu-Lys-Thr-Arg-Ile-Asp-Glu-Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys-Met-Leu-Gly-Ser-Gly-Z2-NH_2（配列番号：９３）（おのおの、Ｘ１はフルオレセイン修飾リジン残基であり、Ｚ２はテトラメチルローダミン修飾リジン残基である）；X3-Thr-Arg-Ile-Asp-Glu-Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys-Met-Leu-Z4-NH_2（配列番号：９４）（Ｘ３はＤＡＢＣＹＬ修飾リジン残基であり、Ｚ４はＥＤＡＮＳ修飾グルタミン酸残基である）；および、X3-Thr-Arg-Ile-Asp-Glu-Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys-Met-Leu-Gly-Ser-Gly-Z5-NH_2（配列番号：９５）（Ｘ３はＤＡＢＣＹＬ修飾リジン残基であり、Ｚ５はＥＤＡＮＳ修飾リジン残基である）。

【０１７４】

精製ＢｏＮＴ／Ａ軽鎖（ＬＣ／Ａ）またはＬＣ／Ａを含有する細胞抽出液を、アッセイ緩衝液（０．０５Ｍ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）；１％ＦＢＳ；１０μＭ$ZnCl_2$；および１０ｍＭＤＴＴ）に希釈する。解析の前に、二本鎖ＢｏＮＴ／Ａを１０ｍＭジチオスレイトール（ＤＴＴ）と約３０分間インキュベートする。反応は、０．１ｎｇから１０μｇまで、様々な濃度のＬＣ／Ａ、二本鎖毒素、または製剤化ＢＯＴＯＸ（登録商標）製品を含む。毒素は以下のようにしてアッセイする：ＦＲＥＴ基質を最終濃度１０μＭで最終ボリューム１００μＬのアッセイ緩衝液に添加する。反応物を３７℃で３０分間インキュベートし、その後2Ｍ H_2SO_4 ５０μＬを添加して停止させる。

【０１７５】

蛍光は、フルオリメーター・マイクロプレートリーダー(Molecular Devices $SPECTRA_{max}$ GEMINI XS)で、λ_{ex}＝４８８ｎＭ、λ_{Em}＝５２０ｎＭおよびλ_{em}＝５８５ｎｍにて測定する。λ_{em}＝５８５ｎｍにおける少なくとも約５％の減少は、ＢｏＮＴ／Ａプロテアーゼ活性を示す。λ_{em}＝５２０ｎｍにおける約５％の増加もまた、二本鎖または軽鎖ボツリヌス毒素のＢｏＮＴ／Ａプロテアーゼ活性を示す。

速度解析は以下のように行った。等量のＬＣ／Ａまたは二本鎖毒素を含むいくつかの反応を上記の緩衝液中および条件下で開始する。それぞれの反応を２または５分間隔で停止させ、上記のように蛍光を検出する。

これらの結果は、分子内でクエンチングされているＦＲＥＴ基質を用いて、ボツリヌス毒素タンパク分解活性をアッセイできることを示している。

【０１７６】

前述の全ての学術論文、文献および特許引例は、括弧内のものもそうでないものも、以前に記載されているか否かに関わらず、それら全体が引用により本明細書に含まれる。

本発明は前述の例に関連して示されているが、本発明の精神から離れることなく様々に修飾できることは理解されるべきである。すなわち、本発明は、本特許請求の範囲のみに限定されるものではない。

【図面の簡単な説明】

【０１７７】

【図１】図１は、クロストリジウム神経毒素の活性化の推定構造および仮定機序の図を示す。毒素は、ループによってつながった三つの５０ｋＤａドメインより成る、１５０ｋＤａの不活性単一ポリペプチド鎖として生産できる。選択的タンパク分解切断が、ジスルフィド結合した二つの鎖：５０ｋＤａのＬ鎖および１００ｋＤａのＨ鎖（H_NおよびH_Cと示される二つのドメインより構成される）を生成することにより該毒素を活性化する。三

つのドメインは別個の働きをする：重鎖のＣ末ドメイン（H_C）は、細胞結合において機能し、一方重鎖のＮ末ドメイン（H_N）は、エンドソームから細胞質へのトランスロケーションを可能にする。細胞内におけるジスルフィド結合の還元に続き、Ｌ鎖の亜鉛－エンドペプチダーゼ活性が発生する。

【図２】図２は、中枢および末梢神経における破傷風およびボツリヌス毒素活性に必要な４つの段階の図を示す。

【図３】図３は、ＳＮＡＰ－２５、ＶＡＭＰおよびｓｙｎｔａｘｉｎの細胞膜における細胞内局在および切断部位を示す。ＶＡＭＰはシナプス小胞膜に結合し、一方ＳＮＡＰ－２５およびｓｙｎｔａｘｉｎは標的細胞膜に結合している。ＢｏＮＴ／Ａおよび／ＥはＳＡＮＰ－２５をＣ末端付近で切断し、９または２６残基をそれぞれ放出する。ＢｏＮＴ／Ｂ、／Ｄ、／Ｆ、／ＧおよびＴｅＮＴは、ＶＡＭＰの中心保存部分（ドット）に作用し、ＶＡＭＰのアミノ末端部分を細胞質に放出する。ＢｏＮＴ／Ｃ１は、カルボシキ末端でＳＮＡＰ－２５を切断し、同様にｓｙｎｔａｘｉｎを細胞質内膜表面近くの単一の部位で切断する。ＢｏＮＴ／Ｂ、／Ｃ１、／Ｄ、／Ｆ、／GおよびＴｅＮＴの作用により、ＶＡＭＰまたはｓｙｎｔａｘｉｎの細胞内ドメインの大部分が放出されるが、一方ＢｏＮＴ／Ａ、／Ｃ１、または／Ｅによる選択的タンパク分解よっては、ＳＮＡＰ－２５のほんの小さな部分しか放出されない。

【図４Ａ】図４は、ＶＡＭＰ、ＳＮＡＰ－２５およびｓｙｎｔａｘｉｎの神経毒素認識モチーフを示す。斜線ボックスは、三つのクロストリジウム毒素の標的に共通するモチーフの存在および部分を示す。

【図４Ｂ】図４は、ＶＡＭＰ、ＳＮＡＰ－２５およびｓｙｎｔａｘｉｎの神経毒素認識モチーフを示す。認識部位は、疎水性残基（「ｈ」）；負の電荷を帯びたＡｓｐまたはＧｌｕ残基（「－」）および極性残基（「ｐ」）；「ｘ」はいずれかのアミノ酸を示す。本モチーフは、ＶＡＭＰ、ＳＮＡＰ－２５およびｓｙｎｔａｘｉｎのα‐ヘリカル構造をとると予想される領域に含まれる。

【図４Ｃ】図４は、ＶＡＭＰ、ＳＮＡＰ－２５およびｓｙｎｔａｘｉｎの神経毒素認識モチーフを示す。α‐ヘリカル構造における本モチーフを上から見た図が示される。負の電荷を帯びた残基が一方の面にならび、一方疎水性残基は第二の面に並ぶ。

【図５】図５は、様々なＳＮＡＰ－２５タンパク質およびそれらのＢｏＮＴ／Ｅ、ＢｏＮＴ／ＡおよびＢｏＮＴ／Ｃ１切断部位を示す。ヒトＳＮＡＰ－２５（配列番号：２）ジーンバンクアクセション g4507099、関連ヒトＳＮＡＰ－２５配列 g2135800も参照）；マウスＳＮＡＰ－２５（配列番号：１２、ジーンバンクアクセション G6755588）;Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ＳＮＡＰ－２５ (配列番号：１３、ジーンバンクアクセション g548941）；ゴールドフィッシュＳＡＮＰ－２５（配列番号：１４、ジーンバンクアクセション g2133923);ウニＳＮＡＰ－２５（配列番号：１５、ジーンバンクアクセション g2707818）およびチキンＳＮＡＰ－２５（配列番号：１６、ジーンバンクアクセション g481202）が描かれている。

【図６】図６は、様々なＶＡＭＰタンパク質およびそれらのＢｏＮＴ／Ｆ、ＢｏＮＴ／Ｄ、ＢｏＮＴ／Ｂ、ＴｅＮＴおよびＢｏＮＴ／Ｇ切断部位のアライメントを示す。ヒトＶＡＭＰ－１ (配列番号：９６; ジーンバンクアクセション g135093); ヒトＶＡＭＰ－２ (配列番号： ４; ジーンバンクアクセション g135094); マウスＶＡＭＰ－２ (配列番号：１７; ジーンバンクアクセション g2501081); ウシＶＡＭＰ (配列番号：１５; ジーンバンクアクセション g89782); カエルＶＡＭＰ (配列番号：１９; ジーンバンクアクセション g6094391);およびウニＶＡＭＰ (配列番号：２０; ジーンバンクアクセション g5031415)が描かれている。

【図７】図７は、様々なｓｙｎｔａｘｉｎタンパク質およびそれらのＢｏＮＴ／Ｃ１切断部位のアライメントを示す。ヒトｓｙｎｔａｘｉｎ １Ａ (配列番号：２１; ジーンバンクアクセション g15079184), ヒトｓｙｎｔａｘｉｎ １Ｂ２ (配列番号：２２; ジーンバンクアクセション g15072437), マウスｓｙｎｔａｘｉｎ １Ａ (配列番号：２３; ジーンバンクアクセション g15011853), Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｓｙｎｔａｘｉｎ １Ａ (配列

番号：２４；ジーンバンクアクセション g2501095)；Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ ｓｙｎｔａｘｉｎ Ａ (配列番号：２５；ジーンバンクアクセション g7511662) およびウニｓｙｎｔａｘｉｎ(配列番号：２６；ジーンバンクアクセション g13310402)が描かれている。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Allergan Incorporated
Steward, Lance E.
Fernandez-Salas, Ester
Aoki, Kei Roger

<120> Fret Protease Assays For Clostridial Toxins

<130> 17451(BOT)

<150> US 09/942,098
<151> 2001-08-28

<160> 96

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic construct

<400> 1
Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys
1 5

<210> 2
<211> 206
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
1 5 10 15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
20 25 30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
35 40 45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
50 55 60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65 70 75 80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
85 90 95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
100 105 110

```
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
        115                 120                 125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
    130                 135                 140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145                 150                 155                 160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
                165                 170                 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
            180                 185                 190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195                 200                 205
```

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic construct

<400> 3
```
Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser
 1               5
```

<210> 4
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
```
Met Ser Ala Thr Ala Ala Thr Ala Pro Pro Ala Ala Pro Ala Gly Glu
 1               5                  10                  15
Gly Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro Asn Leu Thr Ser Asn Arg Arg Leu
            20                  25                  30
Gln Gln Thr Gln Ala Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val
        35                  40                  45
Asn Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp
    50                  55                  60
Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser
65                  70                  75                  80
Ala Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Leu Lys Met Met
                85                  90                  95
Ile Ile Leu Gly Val Ile Cys Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Val
            100                 105                 110
Tyr Phe Ser Ser
        115
```

<210> 5
<211> 8

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic construct

<400> 5
Asp Thr Lys Lys Ala Val Lys Trp
1 5

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic construct

<400> 6
Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu
1 5

<210> 7
<211> 206
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 7
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
1 5 10 15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
20 25 30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
35 40 45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
50 55 60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65 70 75 80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
85 90 95
Ser Ser,Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
100 105 110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
115 120 125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
130 135 140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145 150 155 160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg

```
                165                 170                 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
            180                 185                 190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195                 200                 205
```

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic construct

<400> 8
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys
1 5

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic construct

<400> 9
Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic construct

<400> 10
Glu Thr Ser Ala Ala Lys Leu Lys
1 5

<210> 11
<211> 8
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic construct

<400> 11
Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser
1 5

<210> 12
<211> 206
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 12
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
1 5 10 15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
20 25 30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
35 40 45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
50 55 60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65 70 75 80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
85 90 95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
100 105 110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
115 120 125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
130 135 140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145 150 155 160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
165 170 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
180 185 190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
195 200 205

<210> 13
<211> 212
<212> PRT
<213> Drosophila sp.

<400> 13
Met Pro Ala Asp Pro Ser Glu Glu Val Ala Pro Gln Val Pro Lys Thr
1 5 10 15
Glu Leu Glu Glu Leu Gln Ile Asn Ala Gln Gly Val Ala Asp Glu Ser
20 25 30
Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met Leu Ala Leu Cys Glu Glu Ser Lys Glu

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

<210> 14
<211> 203
<212> PRT
<213> Carassius auratus

<400> 14

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

Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
195 200

<210> 15
<211> 212
<212> PRT
<213> Strongylocentrotus purpuratus

<400> 15
Met Glu Asp Gln Asn Asp Met Asn Met Arg Ser Glu Leu Glu Glu Ile
1 5 10 15
Gln Met Gln Ser Asn Met Gln Thr Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg
20 25 30
Arg Met Leu Gln Met Ala Glu Glu Ser Gln Asp Met Gly Ile Lys Thr
35 40 45
Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Asp Arg Ile Glu Glu
50 55 60
Gly Met Asp Gln Ile Asn Thr Asp Met Arg Glu Ala Glu Lys Asn Leu
65 70 75 80
Thr Gly Leu Glu Lys Cys Cys Gly Ile Cys Val Cys Pro Trp Lys Lys
85 90 95
Leu Gly Asn Phe Glu Lys Gly Asp Asp Tyr Lys Lys Thr Trp Lys Gly
100 105 110
Asn Asp Asp Gly Lys Val Asn Ser His Gln Pro Met Arg Met Glu Asp
115 120 125
Asp Arg Asp Gly Cys Gly Gly Asn Ala Ser Met Ile Thr Arg Ile Thr
130 135 140
Asn Asp Ala Arg Glu Asp Glu Met Asp Glu Asn Leu Thr Gln Val Ser
145 150 155 160
Ser Ile Val Gly Asn Leu Arg His Met Ala Ile Asp Met Gln Ser Glu
165 170 175
Ile Gly Ala Gln Asn Ser Gln Val Gly Arg Ile Thr Ser Lys Ala Glu
180 185 190
Ser Asn Glu Gly Arg Ile Asn Ser Ala Asp Lys Arg Ala Lys Asn Ile
195 200 205
Leu Arg Asn Lys
210

<210> 16
<211> 249
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<400> 16
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
1 5 10 15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
20 25 30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
35 40 45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Asp Arg Val Glu Glu Gly Met
50 55 60
Asn His Ile Asn Gln Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Lys Asp

```
65                  70                  75                  80
Leu Gly Lys Cys Cys Gly Leu Phe Ile Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
                85                  90                  95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
            100                 105                 110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
        115                 120                 125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
    130                 135                 140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145                 150                 155                 160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
                165                 170                 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Leu Ile Pro Ile Lys Pro Gly Leu
            180                 185                 190
Met Lys Pro Thr Ser Val Gln Gln Arg Cys Ser Ala Val Val Lys Cys
        195                 200                 205
Ser Lys Val His Phe Leu Leu Met Leu Ser Gln Arg Ala Val Pro Ser
    210                 215                 220
Cys Phe Tyr His Gly Ile Tyr Leu Leu Gly Leu His Thr Cys Thr Tyr
225                 230                 235                 240
Gln Pro His Cys Lys Cys Cys Pro Val
                245
```

<210> 17
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 17

```
Met Ser Ala Thr Ala Ala Thr Val Pro Pro Ala Ala Pro Ala Gly Glu
 1               5                  10                  15
Gly Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro Asn Leu Thr Ser Asn Arg Arg Leu
            20                  25                  30
Gln Gln Thr Gln Ala Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val
        35                  40                  45
Asn Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp
    50                  55                  60
Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser
65                  70                  75                  80
Ala Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Leu Lys Met Met
                85                  90                  95
Ile Ile Leu Gly Val Ile Cys Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Val
            100                 105                 110
Tyr Phe Ser Thr
        115
```

<210> 18
<211> 116
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 18

```
Met Ser Ala Thr Ala Ala Thr Ala Pro Pro Ala Ala Pro Ala Gly Glu
 1               5                  10                  15
Gly Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro Asn Leu Thr Ser Asn Arg Arg Leu
            20                  25                  30
Gln Gln Thr Gln Ala Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val
        35                  40                  45
Asn Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp
    50                  55                  60
Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser
65                  70                  75                  80
Ala Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Leu Lys Met Met
                85                  90                  95
Ile Ile Leu Gly Val Ile Cys Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Val
            100                 105                 110
Tyr Phe Ser Ser
        115
```

<210> 19
<211> 114
<212> PRT
<213> Xenopus laevis

```
<400> 19
Met Ser Ala Pro Ala Ala Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly Asp Gly
 1               5                  10                  15
Ala Pro Gln Gly Pro Pro Asn Leu Thr Ser Asn Arg Arg Leu Gln Gln
            20                  25                  30
Thr Gln Ala Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val Asn Val
        35                  40                  45
Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Thr Lys Leu Ser Glu Leu Asp Asp Arg
    50                  55                  60
Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser Ala Ala
65                  70                  75                  80
Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Met Lys Met Met Ile Ile
                85                  90                  95
Met Gly Val Ile Cys Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Val Tyr Phe
            100                 105                 110
Ser Thr
```

<210> 20
<211> 104
<212> PRT
<213> Strongylocentrotus purpuratus

```
<400> 20
Met Ala Ala Pro Pro Pro Pro Gln Pro Ala Pro Ser Asn Lys Arg Leu
 1               5                  10                  15
Gln Gln Thr Gln Ala Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val
            20                  25                  30
Asn Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Ala Leu Ser Val Leu Asp
        35                  40                  45
Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Gln Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Asn
```

```
    50                  55                  60
Ala Gly Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Cys Lys Met Met
65                  70                  75                  80
Ile Ile Leu Ala Ile Ile Ile Ile Val Ile Leu Ile Ile Ile Ile Val
                85                  90                  95
Ala Ile Val Gln Ser Gln Lys Lys
            100
```

<210> 21
<211> 288
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

```
Met Lys Asp Arg Thr Gln Glu Leu Arg Thr Ala Lys Asp Ser Asp Asp
 1               5                  10                  15
Asp Asp Asp Val Ala Val Thr Val Asp Arg Asp Arg Phe Met Asp Glu
            20                  25                  30
Phe Phe Glu Gln Val Glu Glu Ile Arg Gly Phe Ile Asp Lys Ile Ala
        35                  40                  45
Glu Asn Val Glu Glu Val Lys Arg Lys His Ser Ala Ile Leu Ala Ser
    50                  55                  60
Pro Asn Pro Asp Glu Lys Thr Lys Glu Glu Leu Glu Glu Leu Met Ser
65                  70                  75                  80
Asp Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Val Arg Ser Lys Leu Lys Ser Ile
                85                  90                  95
Glu Gln Ser Ile Glu Gln Glu Glu Gly Leu Asn Arg Ser Ser Ala Asp
            100                 105                 110
Leu Arg Ile Arg Lys Thr Gln His Ser Thr Leu Ser Arg Lys Phe Val
        115                 120                 125
Glu Val Met Ser Glu Tyr Asn Ala Thr Gln Ser Asp Tyr Arg Glu Arg
    130                 135                 140
Cys Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr
145                 150                 155                 160
Thr Ser Glu Glu Leu Glu Asp Met Leu Glu Ser Gly Asn Pro Ala Ile
                165                 170                 175
Phe Ala Ser Gly Ile Ile Met Asp Ser Ser Ile Ser Lys Gln Ala Leu
            180                 185                 190
Ser Glu Ile Glu Thr Arg His Ser Glu Ile Ile Lys Leu Glu Asn Ser
        195                 200                 205
Ile Arg Glu Leu His Asp Met Phe Met Asp Met Ala Met Leu Val Glu
    210                 215                 220
Ser Gln Gly Glu Met Ile Asp Arg Ile Glu Tyr Asn Val Glu His Ala
225                 230                 235                 240
Val Asp Tyr Val Glu Arg Ala Val Ser Asp Thr Lys Lys Ala Val Lys
                245                 250                 255
Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys Ile Met Ile Ile Ile Cys Cys
            260                 265                 270
Val Ile Leu Gly Ile Val Ile Ala Ser Thr Val Gly Gly Ile Phe Ala
        275                 280                 285
```

<210> 22
<211> 288

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Met Lys Asp Arg Thr Gln Glu Leu Arg Ser Ala Lys Asp Ser Asp Asp
1 5 10 15
Glu Glu Glu Val Val His Val Asp Arg Asp His Phe Met Asp Glu Phe
20 25 30
Phe Glu Gln Val Glu Glu Ile Arg Gly Cys Ile Glu Lys Leu Ser Glu
35 40 45
Asp Val Glu Gln Val Lys Lys Gln His Ser Ala Ile Leu Ala Ala Pro
50 55 60
Asn Pro Asp Glu Lys Thr Lys Gln Glu Leu Glu Asp Leu Thr Ala Asp
65 70 75 80
Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Val Arg Ser Lys Leu Lys Ala Ile Glu
85 90 95
Gln Ser Ile Glu Gln Glu Glu Gly Leu Asn Arg Ser Ser Ala Asp Leu
100 105 110
Arg Ile Arg Lys Thr Gln His Ser Thr Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu
115 120 125
Val Met Thr Glu Tyr Asn Ala Thr Gln Ser Lys Tyr Arg Asp Arg Cys
130 135 140
Lys Asp Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr
145 150 155 160
Asn Glu Glu Leu Glu Asp Met Leu Glu Ser Gly Lys Leu Ala Ile Phe
165 170 175
Thr Asp Asp Ile Lys Met Asp Ser Gln Met Thr Lys Gln Ala Leu Asn
180 185 190
Glu Ile Glu Thr Arg His Asn Glu Ile Ile Lys Leu Glu Thr Ser Ile
195 200 205
Arg Glu Leu His Asp Met Phe Val Asp Met Ala Met Leu Val Glu Ser
210 215 220
Gln Gly Glu Met Ile Asp Arg Ile Glu Tyr Asn Val Glu His Ser Val
225 230 235 240
Asp Tyr Val Glu Arg Ala Val Ser Asp Thr Lys Lys Ala Val Lys Tyr
245 250 255
Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys Ile Met Ile Ile Ile Cys Cys Val
260 265 270
Val Leu Gly Val Val Leu Ala Ser Ser Ile Gly Gly Thr Leu Gly Leu
275 280 285

<210> 23
<211> 288
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 23
Met Lys Asp Arg Thr Gln Glu Leu Arg Thr Ala Lys Asp Ser Asp Asp
1 5 10 15
Asp Asp Asp Val Thr Val Thr Val Asp Arg Asp Arg Phe Met Asp Glu
20 25 30
Phe Phe Glu Gln Val Glu Glu Ile Arg Gly Phe Ile Asp Lys Ile Ala
35 40 45
Glu Asn Val Glu Glu Val Lys Arg Lys His Ser Ala Ile Leu Ala Ser

```
    50                  55                  60
Pro Asn Pro Asp Glu Lys Thr Lys Glu Glu Leu Glu Glu Leu Met Ser
65                  70                  75                  80
Asp Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Val Arg Ser Lys Leu Lys Ser Ile
                85                  90                  95
Glu Gln Ser Ile Glu Gln Glu Glu Gly Leu Asn Arg Ser Ser Ala Asp
            100                 105                 110
Leu Arg Ile Arg Lys Thr Gln His Ser Thr Leu Ser Arg Lys Phe Val
        115                 120                 125
Glu Val Met Ser Glu Tyr Asn Ala Thr Gln Ser Asp Tyr Arg Glu Arg
    130                 135                 140
Cys Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr
145                 150                 155                 160
Thr Ser Glu Glu Leu Glu Asp Met Leu Glu Ser Gly Asn Pro Ala Ile
                165                 170                 175
Phe Ala Ser Gly Ile Ile Met Asp Ser Ser Ile Ser Lys Gln Ala Leu
            180                 185                 190
Ser Glu Ile Glu Thr Arg His Ser Glu Ile Ile Lys Leu Glu Thr Ser
        195                 200                 205
Ile Arg Glu Leu His Asp Met Phe Met Asp Met Ala Met Leu Val Glu
    210                 215                 220
Ser Gln Gly Glu Met Ile Asp Arg Ile Glu Tyr Asn Val Glu His Ala
225                 230                 235                 240
Val Asp Tyr Val Glu Arg Ala Val Ser Asp Thr Lys Lys Ala Val Lys
                245                 250                 255
Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys Ile Met Ile Ile Ile Cys Cys
            260                 265                 270
Val Ile Leu Gly Ile Ile Ile Ala Ser Thr Ile Gly Gly Ile Phe Gly
        275                 280                 285
```

<210> 24
<211> 291
<212> PRT
<213> Drosophila sp.

<400> 24

```
Met Thr Lys Asp Arg Leu Ala Ala Leu His Ala Ala Gln Ser Asp Asp
 1               5                  10                  15
Glu Glu Glu Thr Glu Val Ala Val Asn Val Asp Gly His Asp Ser Tyr
            20                  25                  30
Met Asp Asp Phe Phe Ala Gln Val Glu Glu Ile Arg Gly Met Ile Asp
        35                  40                  45
Lys Val Gln Asp Asn Val Glu Glu Val Lys Lys Lys His Ser Ala Ile
    50                  55                  60
Leu Ser Ala Pro Gln Thr Asp Glu Lys Thr Lys Gln Glu Leu Glu Asp
65                  70                  75                  80
Leu Met Ala Asp Ile Lys Lys Asn Ala Asn Arg Val Arg Gly Lys Leu
                85                  90                  95
Lys Gly Ile Glu Gln Asn Ile Glu Gln Glu Glu Gln Gln Asn Lys Ser
            100                 105                 110
Ser Ala Asp Leu Arg Ile Arg Lys Thr Gln His Ser Thr Leu Ser Arg
        115                 120                 125
Lys Phe Val Glu Val Met Thr Glu Tyr Asn Arg Thr Gln Thr Asp Tyr
    130                 135                 140
```

```
Arg Glu Arg Cys Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly
145                 150                 155                 160
Arg Pro Thr Asn Asp Asp Glu Leu Glu Lys Met Leu Glu Glu Gly Asn
                165                 170                 175
Ser Ser Val Phe Thr Gln Gly Ile Ile Met Glu Thr Gln Gln Ala Lys
            180                 185                 190
Gln Thr Leu Ala Asp Ile Glu Ala Arg His Gln Asp Ile Met Lys Leu
        195                 200                 205
Glu Thr Ser Ile Lys Glu Leu His Asp Met Phe Met Asp Met Ala Met
    210                 215                 220
Leu Val Glu Ser Gln Gly Glu Met Ile Asp Arg Ile Glu Tyr His Val
225                 230                 235                 240
Glu His Ala Met Asp Tyr Val Gln Thr Ala Thr Gln Asp Thr Lys Lys
                245                 250                 255
Ala Leu Lys Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys Ile Met Ile Leu
            260                 265                 270
Ile Cys Leu Thr Val Leu Gly Ile Leu Ala Ala Ser Tyr Val Ser Ser
        275                 280                 285
Tyr Phe Met
    290
```

<210> 25
<211> 291
<212> PRT
<213> Caenorhabditis elegans

<400> 25

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

```
    210                 215                 220
Glu Ser Gln Gly Glu Met Val Asp Arg Ile Glu Tyr Asn Val Glu His
225                 230                 235                 240
Ala Lys Glu Phe Val Asp Arg Ala Val Ala Asp Thr Lys Lys Ala Val
                245                 250                 255
Gln Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys Ile Cys Ile Leu Val Thr
            260                 265                 270
Gly Val Ile Leu Ile Thr Gly Leu Ile Ile Phe Ile Leu Phe Tyr Ala
        275                 280                 285
Lys Val Leu
    290
```

<210> 26
<211> 288
<212> PRT
<213> Strongylocentrotus purpuratus

<400> 26

```
Met Arg Asp Arg Leu Gly Ser Leu Lys Arg Asn Glu Glu Asp Asp Val
 1               5                  10                  15
Gly Pro Glu Val Ala Val Asn Val Glu Ser Glu Lys Phe Met Glu Glu
            20                  25                  30
Phe Phe Glu Gln Val Glu Glu Val Arg Asn Asn Ile Asp Lys Ile Ser
        35                  40                  45
Lys Asn Val Asp Glu Val Lys Lys Lys His Ser Asp Ile Leu Ser Ala
    50                  55                  60
Pro Gln Ala Asp Glu Lys Val Lys Asp Glu Leu Glu Glu Leu Met Ser
65                  70                  75                  80
Asp Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Val Arg Ala Lys Leu Lys Met Met
                85                  90                  95
Glu Gln Ser Ile Glu Gln Glu Glu Ser Ala Lys Met Asn Ser Ala Asp
            100                 105                 110
Val Arg Ile Arg Lys Thr Gln His Ser Thr Leu Ser Arg Lys Phe Val
        115                 120                 125
Glu Val Met Thr Asp Tyr Asn Ser Thr Gln Thr Asp Tyr Arg Glu Arg
    130                 135                 140
Cys Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Lys Ser Thr
145                 150                 155                 160
Thr Asp Ala Glu Leu Glu Asp Met Leu Glu Ser Gly Asn Pro Ala Ile
                165                 170                 175
Phe Thr Ser Gly Ile Ile Met Asp Thr Gln Gln Ala Lys Gln Thr Leu
            180                 185                 190
Arg Asp Ile Glu Ala Arg His Asn Asp Ile Ile Lys Leu Glu Ser Ser
        195                 200                 205
Ile Arg Glu Leu His Asp Met Phe Met Asp Met Ala Met Leu Val Glu
    210                 215                 220
Ser Gln Gly Glu Met Ile Asp Arg Ile Glu Tyr Asn Val Glu Gln Ser
225                 230                 235                 240
Val Asp Tyr Val Glu Thr Ala Lys Met Asp Thr Lys Lys Ala Val Lys
                245                 250                 255
Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys Phe Tyr Ile Ala Ile Cys Cys
            260                 265                 270
Gly Val Ala Leu Gly Ile Leu Val Leu Val Leu Ile Ile Val Leu Ala
        275                 280                 285
```

<210> 27
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met
1 5 10

<210> 28
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys
1 5 10 15

<210> 29
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29
Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met
1 5 10 15

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30
Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met
1 5 10 15
Leu

<210> 31
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31
Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys
1 5 10 15
Met

<210> 32
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys
1 5 10 15
Met Leu

<210> 33
<211> 33
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 33
Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys
1 5 10 15
Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser
20 25 30
Gly

<210> 34
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Gln Asn Pro Gln Ile Lys Arg Ile Thr Asp Lys Ala Asp Thr Asn Arg
1 5 10 15
Asp Arg Ile Asp Ile Ala Asn Ala Arg Ala Lys Lys Leu Ile Asp Ser
20 25 30

<210> 35
<211> 32
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 35
Gln Asn Gln Gln Ile Gln Lys Ile Thr Glu Lys Ala Asp Thr Asn Lys
1 5 10 15
Asn Arg Ile Asp Ile Ala Asn Thr Arg Ala Lys Lys Leu Ile Asp Ser
20 25 30

<210> 36
<211> 34
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<400> 36
Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Leu Ile Pro Ile Lys
1 5 10 15
Pro Gly Leu Met Lys Pro Thr Ser Val Gln Gln Arg Cys Ser Ala Val
20 25 30
Val Lys

<210> 37
<211> 33
<212> PRT
<213> Carassius auratus

<400> 37
Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Asp Met Ala Asp Ser Asn Lys
1 5 10 15
Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser
20 25 30
Gly

<210> 38
<211> 33
<212> PRT
<213> Carassius auratus

<400> 38
Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys
1 5 10 15
Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser
20 25 30
Gly

<210> 39
<211> 30
<212> PRT
<213> Torpedo sp.

<400> 39
Gln Asn Ala Gln Val Asp Arg Ile Val Val Lys Gly Asp Met Asn Lys
1 5 10 15
Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys His Ala Thr Lys Met Leu
20 25 30

<210> 40
<211> 33
<212> PRT
<213> Strongylocentrotus purpuratus

<400> 40
Gln Asn Ser Gln Val Gly Arg Ile Thr Ser Lys Ala Glu Ser Asn Glu
1 5 10 15
Gly Arg Ile Asn Ser Ala Asp Lys Arg Ala Lys Asn Ile Leu Arg Asn
20 25 30
Lys

<210> 41
<211> 31
<212> PRT
<213> Caenorhabditis elagans

<400> 41
Gln Asn Arg Gln Leu Asp Arg Ile His Asp Lys Gln Ser Asn Glu Val
1 5 10 15
Arg Val Glu Ser Ala Asn Lys Arg Ala Lys Asn Leu Ile Thr Lys
20 25 30

<210> 42
<211> 31
<212> PRT
<213> Drosophila sp.

<400> 42
Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Asn Arg Lys Gly Glu Ser Asn Glu
1 5 10 15
Ala Arg Ile Ala Val Ala Asn Gln Arg Ala His Gln Leu Leu Lys
20 25 30

<210> 43
<211> 32
<212> PRT
<213> Hirudinida sp.

<400> 43
Gln Asn Arg Gln Val Asp Arg Ile Asn Asn Lys Met Thr Ser Asn Gln
1 5 10 15
Leu Arg Ile Ser Asp Ala Asn Lys Arg Ala Ser Lys Leu Leu Lys Glu
20 25 30

<210> 44
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 44
Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Ala

1 5 10 15
Leu

<210> 45
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<221> MOD_RES
<222> 16
<223> Xaa=Nle

<400> 45
Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Xaa
1 5 10 15
Leu

<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 46
Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Ala Met
1 5 10 15
Leu

<210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 47
Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Ser Lys Met
1 5 10 15
Leu

<210> 48

<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<221> MOD_RES
<222> 14
<223> Xaa=Abu

<400> 48
Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Xaa Lys Met
1 5 10 15
Leu

<210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<221> MOD_RES
<222> 13
<223> Xaa=Abu

<400> 49
Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Xaa Thr Lys Met
1 5 10 15
Leu

<210> 50
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 50
Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Ala Arg Ala Thr Lys Met
1 5 10 15
Leu

<210> 51
<211> 16
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<221> MOD_RES
<222> 11
<223> Xaa=Abu

<400> 51
Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Xaa Ala Thr Lys Met Leu
1 5 10 15

<210> 52
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 52
Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Asn Arg Ala Thr Lys Met
1 5 10 15
Leu

<210> 53
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 53
Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Ala Gln Arg Ala Thr Lys Met
1 5 10 15
Leu

<210> 54
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<221> MOD_RES
<222> 9
<223> Xaa=Abu

<400> 54
Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Xaa Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met
1 5 10 15
Leu

<210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 55
Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Gln Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met
1 5 10 15
Leu

<210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 56
Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asn Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met
1 5 10 15
Leu

<210> 57
<211> 40
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57
Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp Asp Arg
1 5 10 15
Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Ser Ser Ala Ala
20 25 30
Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp
35 40

<210> 58
<211> 40
<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 58
Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp Asp Arg
1 5 10 15
Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser Ala Ala
20 25 30
Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp
35 40

<210> 59
<211> 40
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 59
Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp Asp Arg
1 5 10 15
Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Val Phe Glu Ser Ser Ala Ala
20 25 30
Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp
35 40

<210> 60
<211> 40
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 60
Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp Asp Arg
1 5 10 15
Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser Ala Ala
20 25 30
Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp
35 40

<210> 61
<211> 40
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 61
Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp Asp Arg
1 5 10 15
Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser Ala Ala
20 25 30
Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp
35 40

<210> 62
<211> 40

<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 62
Asp Leu Val Ala Gln Arg Gly Glu Arg Leu Glu Leu Leu Ile Asp Lys
1 5 10 15
Thr Glu Asn Leu Val Asp Ser Ser Val Thr Phe Lys Thr Thr Ser Arg
20 25 30
Asn Leu Ala Arg Ala Met Cys Met
35 40

<210> 63
<211> 32
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<400> 63
Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp Asp Arg Ala Asp Ala Leu
1 5 10 15
Gln Ala Gly Ala Ser Val Phe Glu Ser Ser Ala Ala Lys Leu Lys Arg
20 25 30

<210> 64
<211> 32
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<400> 64
Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp Asp Arg Ala Asp Ala Leu
1 5 10 15
Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser Ala Ala Lys Leu Lys Arg
20 25 30

<210> 65
<211> 40
<212> PRT
<213> Torpedo sp.

<400> 65
Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp Asp Arg
1 5 10 15
Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Ser Ser Ala Ala
20 25 30
Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp
35 40

<210> 66
<211> 40
<212> PRT
<213> Strongylocentrotus purpuratus

<400> 66
Asp Lys Val Leu Asp Arg Asp Gly Ala Leu Ser Val Leu Asp Asp Arg
1 5 10 15
Ala Asp Ala Leu Gln Gln Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Asn Ala Gly
20 25 30
Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp
35 40

<210> 67
<211> 40
<212> PRT
<213> Aplysia sp.

<400> 67
Glu Lys Val Leu Asp Arg Asp Gln Lys Ile Ser Gln Leu Asp Asp Arg
1 5 10 15
Ala Glu Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Ala Ser Ala Gly
20 25 30
Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp
35 40

<210> 68
<211> 40
<212> PRT
<213> Teuthoida sp.

<400> 68
Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Ser Lys Ile Ser Glu Leu Asp Asp Arg
1 5 10 15
Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Ala Ser Ala Gly
20 25 30
Lys Leu Lys Arg Lys Phe Trp Trp
35 40

<210> 69
<211> 40
<212> PRT
<213> Caenorhabditis elegans

<400> 69
Asn Lys Val Met Glu Arg Asp Val Gln Leu Asn Ser Leu Asp His Arg
1 5 10 15
Ala Glu Val Leu Gln Asn Gly Ala Ser Gln Phe Gln Gln Ser Ser Arg
20 25 30
Glu Leu Lys Arg Gln Tyr Trp Trp
35 40

<210> 70
<211> 40
<212> PRT
<213> Drosophila sp.

<400> 70
Glu Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Gly Glu Arg
1 5 10 15
Ala Asp Gln Leu Glu Gly Gly Ala Ser Gln Ser Glu Gln Gln Ala Gly
20 25 30
Lys Leu Lys Arg Lys Gln Trp Trp
35 40

<210> 71
<211> 40
<212> PRT
<213> Drosophila sp.

<400> 71
Glu Lys Val Leu Glu Arg Asp Ser Lys Leu Ser Glu Leu Asp Asp Arg
1 5 10 15
Ala Asp Ala Leu Gln Gln Gly Ala Ser Gln Phe Glu Gln Gln Ala Gly
20 25 30
Lys Leu Lys Arg Lys Phe Trp Leu
35 40

<210> 72
<211> 39
<212> PRT
<213> Hirudinida sp.

<400> 72
Asp Lys Val Leu Glu Lys Asp Gln Lys Leu Ala Glu Leu Asp Arg Ala
1 5 10 15
Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Ala Ser Ala Gly Lys
20 25 30
Leu Lys Arg Lys Phe Trp Trp
35

<210> 73
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73
Glu Arg Ala Val Ser Asp Thr Lys Lys Ala Val Lys Tyr Gln Ser Lys
1 5 10 15
Ala Arg

<210> 74
<211> 18
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 74
Glu Arg Ala Val Ser Asp Thr Lys Lys Ala Val Lys Tyr Gln Ser Lys
1 5 10 15
Ala Arg

<210> 75
<211> 18
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 75
Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr Gln Ser Lys
1 5 10 15
Ala Arg

<210> 76
<211> 18
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 76
Glu Lys Ala Arg Asp Glu Thr Arg Lys Ala Met Lys Tyr Gln Gly Gly
1 5 10 15
Ala Arg

<210> 77
<211> 18
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 77
Glu Arg Gly Gln Glu His Val Lys Ile Ala Leu Glu Asn Gln Lys Lys
1 5 10 15
Ala Arg

<210> 78
<211> 18
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<400> 78
Val Pro Glu Val Phe Val Thr Lys Ser Ala Val Met Tyr Gln Cys Lys
1 5 10 15
Ser Arg

<210> 79
<211> 18
<212> PRT
<213> Strongylocentrotus purpuratus

<400> 79
Val Arg Arg Gln Asn Asp Thr Lys Lys Ala Val Lys Tyr Gln Ser Lys
1 5 10 15
Ala Arg

<210> 80
<211> 18
<212> PRT
<213> Aplysia sp.

<400> 80
Glu Thr Ala Lys Met Asp Thr Lys Lys Ala Val Lys Tyr Gln Ser Lys
1 5 10 15
Ala Arg

<210> 81
<211> 18
<212> PRT
<213> Teuthoida sp.

<400> 81
Glu Thr Ala Lys Val Asp Thr Lys Lys Ala Val Lys Tyr Gln Ser Lys
1 5 10 15
Ala Arg

<210> 82
<211> 18
<212> PRT
<213> Drosophila sp.

<400> 82
Gln Thr Ala Thr Gln Asp Thr Lys Lys Ala Leu Lys Tyr Gln Ser Lys
1 5 10 15
Ala Arg

<210> 83
<211> 18
<212> PRT
<213> Hirudinida sp.

<400> 83
Glu Thr Ala Ala Ala Asp Thr Lys Lys Ala Met Lys Tyr Gln Ser Ala

1 5 10 15
Ala Arg

<210> 84
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic construct

<400> 84
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 85
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic construct

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> Xaa=fluorescein-modified lysine

<221> MOD_RES
<222> 20
<223> Xaa=tetramethylrhodamine-modified lysine

<221> AMIDATION
<222> (0)...(0)
<223> at the C-terminal

<400> 85
Xaa Asp Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys
1 5 10 15
Met Leu Xaa

<210> 86
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic construct

<221> MOD_RES
<222> 1

<223> Xaa=fluorescein-modified lysine

<400> 86
Xaa Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 1   5   10

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic construct

<221> MOD_RES
<222> 7
<223> Xaa=tetramethylrhodamine-modified lysine

<221> AMIDATION
<222> (0)...(0)
<223> at the C-terminal

<400> 87
Arg Ala Thr Lys Met Leu Xaa
 1   5

<210> 88
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> Xaa=fluorescein-modified lysine

<221> MOD_RES
<222> 23
<223> Xaa=tetramethylrhodamine-modified lysine

<221> AMIDATION
<222> (0)...(0)
<223> at the C-terminal

<400> 88
Xaa Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr
 1   5   10   15
Lys Met Leu Gly Ser Gly Xaa
            20

<210> 89
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> Xaa=fluorescein-modified lysine

<221> MOD_RES
<222> 21
<223> Xaa=tetramethylrhodamine-modified lysine

<221> AMIDATION
<222> (0)...(0)
<223> at the C-terminal

<400> 89
Xaa Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala
1 5 10 15
Thr Lys Met Leu Xaa
20

<210> 90
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> Xaa=fluorescein-modified lysine

<221> MOD_RES
<222> 24
<223> Xaa=tetramethylrhodamine-modified lysine

<221> AMIDATION
<222> (0)...(0)
<223> at the C-terminal

<400> 90
Xaa Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala
1 5 10 15
Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly Xaa
20

<210> 91

<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> Xaa=fluorescein-modified lysine

<221> MOD_RES
<222> 16
<223> Xaa=tetramethylrhodamine-modified lysine

<221> AMIDATION
<222> (0)...(0)
<223> at the C-terminal

<400> 91
Xaa Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Xaa
1 5 10 15

<210> 92
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> Xaa=fluorescein-modified lysine

<221> MOD_RES
<222> 19
<223> Xaa=tetramethylrhodamine-modified lysine

<221> AMIDATION
<222> (0)...(0)
<223> at the C-terminal

<400> 92
Xaa Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly
1 5 10 15
Ser Gly Xaa

<210> 93
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> Xaa=fluorescein-modified lysine

<221> MOD_RES
<222> 22
<223> Xaa=tetramethylrhodamine-modified lysine

<221> AMIDATION
<222> (0)...(0)
<223> at the C-terminal

<400> 93
Xaa Met Glu Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys
1 5 10 15
Met Leu Gly Ser Gly Xaa
20

<210> 94
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> Xaa-DABCYL modified lysine

<221> MOD_RES
<222> 16
<223> Xaa=EDANS modified glutamate

<221> AMIDATION
<222> (0)...(0)
<223> at the C-terminal

<400> 94
Xaa Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Xaa
1 5 10 15

<210> 95
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> Xaa=DABCYL modified lysine

<221> MOD_RES
<222> 19
<223> Xaa=EDANS modified lysine

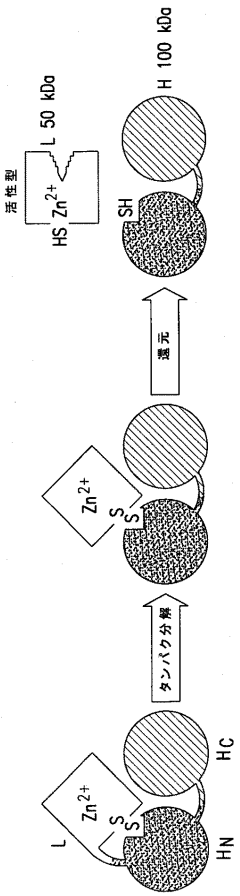
<221> AMIDATION
<222> (0)...(0)
<223> at the C-terminal

<400> 95
Xaa Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly
 1   5   10   15
Ser Gly Xaa

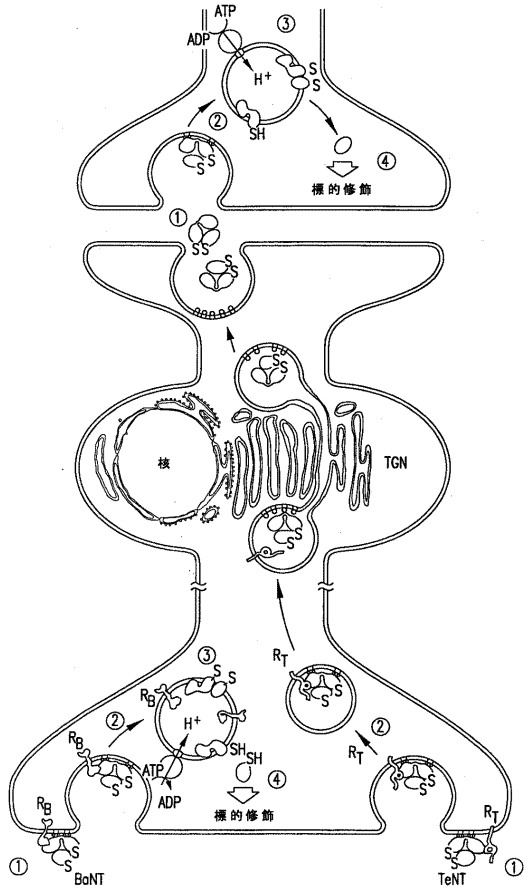
<210> 96
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 96
Met Ser Ala Pro Ala Gln Pro Pro Ala Glu Gly Thr Glu Gly Thr Ala
 1   5   10   15
Pro Gly Gly Gly Pro Pro Gly Pro Pro Pro Asn Met Thr Ser Asn Arg
            20   25   30
Arg Leu Gln Gln Thr Gln Ala Gln Val Glu Glu Val Val Asp Ile Ile
        35   40   45
Arg Val Asn Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu
    50   55   60
Leu Asp Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu
65   70   75   80
Ser Ser Ala Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Cys Lys
                85   90   95
Met Met Ile Met Leu Gly Ala Ile Cys Ala Ile Ile Val Val Val Ile
            100   105   110
Val Ile Tyr Phe Phe Thr
        115

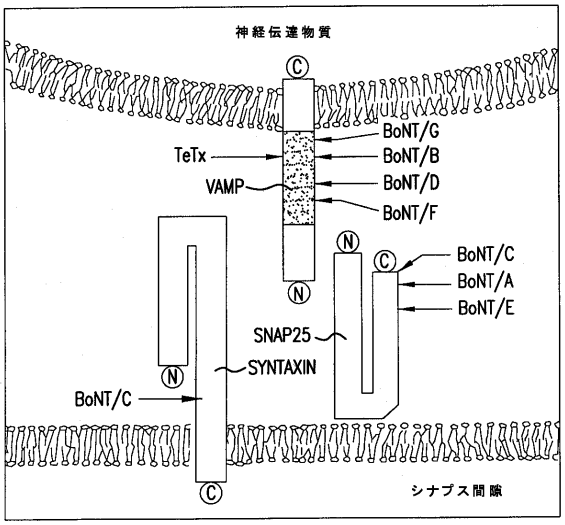
【図１】


H 100 kDa
L 50 kDa
活性型
HS
SH
還元
タンパク分解
HC
HN
L

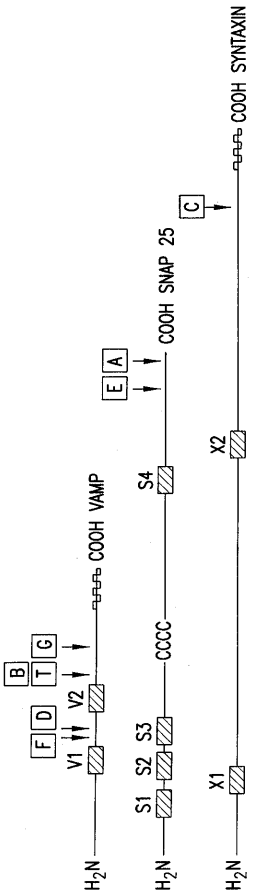
【図２】


ATP
ADP
標的修飾
核
TGN
BoNT
TeNT

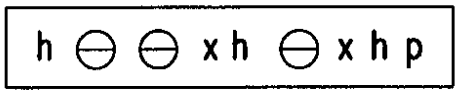
【図３】


神経伝達物質
TeTx
VAMP
BoNT/G
BoNT/B
BoNT/D
BoNT/F
BoNT/C
BoNT/A
BoNT/E
SNAP25
SYNTAXIN
BoNT/C
シナプス間隙

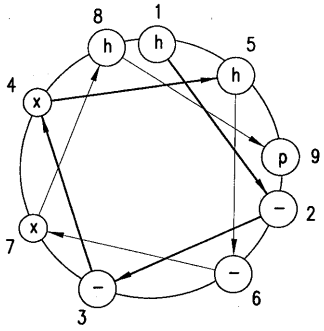
【図４Ａ】


COOH SYNTAXIN
COOH SNAP 25
COOH VAMP
CCCC
X1
X2
S1
S2
S3
S4
V1
V2
H2N

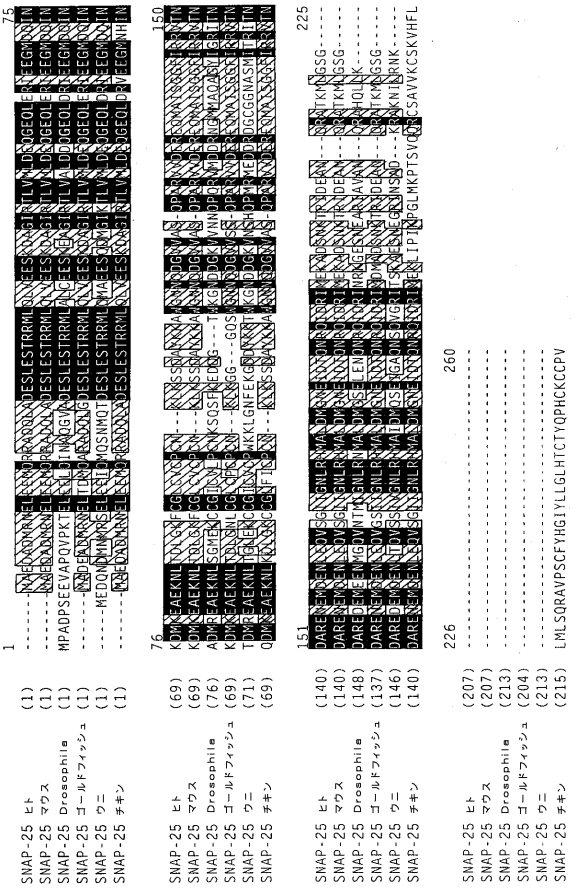
【図４Ｂ】



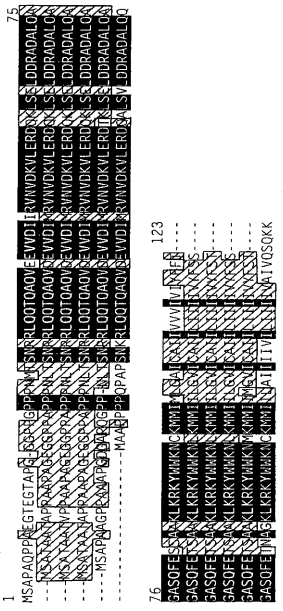
【図４Ｃ】



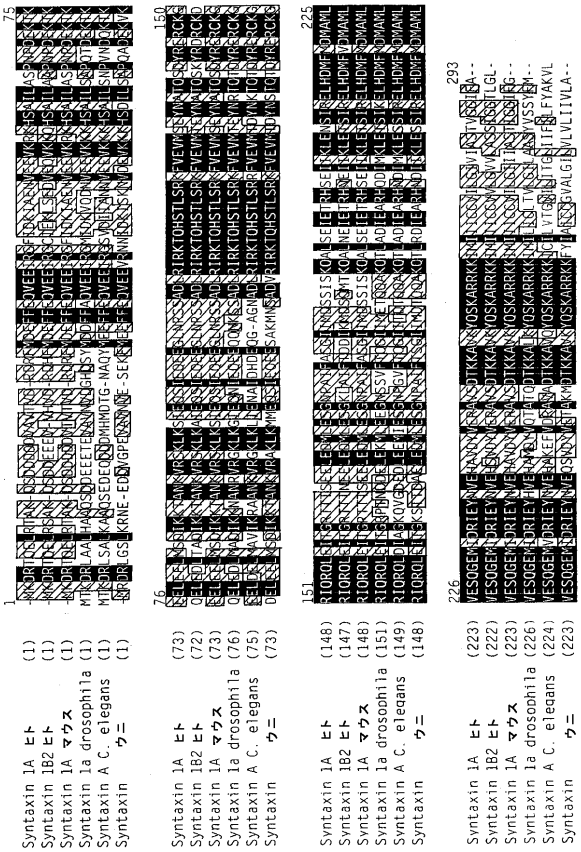
【図５】



【図６】



【図７】



【手続補正書】
【提出日】平成16年5月6日(2004.5.6)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】変更
【補正の内容】
【配列表】
2005520000000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/27212

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : G01N 33/573, 33/53, 33/58, 33/60; C07K 1/00, 5/00, 7/00, 14/00, 16/00, 17/00; C08H 1/00; A61K 38/04
US CL : 530/402, 350, 327; 435/7.4, 7.6, 7.72, 968

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 530/402, 350, 327; 435/7.4, 7.6, 7.72, 968

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EKNOG et al. Recombinant SNAP-25 is an effective substrate for Clostridium botulinum type A toxin endopeptidase activity in vitro. Microbiology. 1994, Vol. 143, pages 3337-3347, see entire document.	4-8, 45-49, 68-70, 78-95
Y	ANNE et al. High-Throughput fluorogenic assay for determination of botulinum type B neurotoxin protease activity. Analytical Biochemistry. 2001, Vol. 291, pages 253-261, see entire document.	1-95
A	SITTAMPALAM et al. High-throughput screening: advances in assay technologies. Current Opinion in Chemical Biology, 1997, Vol. 1, pages 384-391, see entire document.	1-95
Y	US 5,965,699 A (SCHMIDT et al) 12 October 1999 (12.10.1999), see entire document.	1-95
Y	WO 97/34620 A1 (THE REAGENT OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 25 September 1997 (25.09.97), see entire document.	1-95
Y	WO 95/33850 A1 (MICROBIOLOGICAL RESEARCH AUTHORITY) 14 December 1995 (14.12.95) see entire document.	1-95
Y	US 6,043,042 A (SHONE et al) 28 March 2000 (28.03.2000), see entire document.	1-95

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 December 2003 (18.12.2003)	25 MAR 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Nita M. Minnifield Telephone No. 703-308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

PCT/US02/27212

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,962,637 A (SHONE et al) 05 October 1999 (05.10.1999), see entire document.	1-95
Y	SCHMIDT et al. Type A botulinum neurotoxin proteolytic activity: development of competitive inhibitors and implications for substrate specificity at the S1' binding subsite. FEBS Letters. 1998, Vol. 435, pages 61-64, see entire document.	4-8, 45-49, 68-70, 78-95
Y	HOLSKIN et al. A continuous fluorescence-based assay of human cytomegalovirus protease using a peptide substrate. Analytical Biochemistry. 1995, Vol. 226, pages 148-155, see entire document.	1-95
A, P	WO 01/18038 A2 (IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LIMITED) 15 March 2001 (15.03.01), see entire document.	1-95
X, P	US 2003/0143650 A1 (STEWARD et al) 31 July2003 (31.07.2003), see entire document.	1-95
X, P	US 2003/0143651 A1 (STEWARD et al) 31 July 2003 (31.07.2003), see entire document.	1-95
A, P	US 6,573,244 B1 (GORDON et al) 3 June 2003 (03.06.2003), see entire document.	1-95
A, P	US 6,504,006 B1 (SHINE et al) 7 January 2003 (07.01.2003), see entire document.	1-95
A	BINZ et al. Proteolysis of SNAP-25 by types E and A Botulinal Neurotoxins. J. Biological Chemistry. 21 January 1994, Vol. 269, No. 3, pages 1617-1620, see entire document.	1-95
A	HALLIS et al. Development of novel assays for botulinum type A and B neurotoxins based on their endopeptidase activities. J. Clinical Microbiology. August 1996, Vol. 34, No. 8, pages 1934-1938, see entire document.	1-95
A	SCHIAVO et al. Identification of the nerve terminal targets of Botulinum neurotoxin serotypes A, D, and E. J. Biological Chemistry. 15 November 1993, Vol. 268, No. 32, pages 23784-23787, see entire document.	1-95
A	SCHIAVO et al. Botulinum neurotoxins serotypes A and E cleave SNAP-25 at distinct COOH-terminal peptide bonds. FEBS Letters. November 1993, Vol. 335, No. 1, pages 99-103.	1-95

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/27212

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
WEST, Sequence search of SEQ ID NO: 1-11 on commercial and interference databases, BIOSIS, MEDLINE, AGRICOLA, EMBASE, CABA, WPIDS, JAPIO, BIOTECHDS, LIFESCI, CAPLUS

Search terms: inventor names, FRET, bont$, edans, dabcy, QSY7, acceptor, donor, fluorophore, botulinum, recognit$, SNAP-25, clostridial, alexafluoro488

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｑ 1/37	Ｃ１２Ｑ 1/37		
Ｇ０１Ｎ 21/78	Ｇ０１Ｎ 21/78	Ｃ	

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

(72)発明者 ランス・イー・スチュワード
アメリカ合衆国９２６１４カリフォルニア州アーヴィン、ウッドファーン９番
(72)発明者 エステル・フェルナンデス－サラス
アメリカ合衆国９２８３１カリフォルニア州フラートン、ロッキー・ロード１７１０番
(72)発明者 ケイ・ロジャー・アオキ
アメリカ合衆国９２６７９カリフォルニア州コト・デ・カサ、ジンジャー・リリー・コート２２番

Ｆターム(参考) 2G054 AB03 CE02 EA03
4B063 QA01 QQ36 QR41 QR48 QR58 QR66 QS28 QS36 QX02
4H045 AA10 AA30 BA10 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18 BA19 BA20
BA21 CA45 EA55 FA33