

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7659653号
(P7659653)

(45)発行日 令和7年4月9日(2025.4.9)

(24)登録日 令和7年4月1日(2025.4.1)

(51)国際特許分類		F I		
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16	Z N A
A 6 1 P	25/04 (2006.01)	A 6 1 P	25/04	
A 6 1 P	25/06 (2006.01)	A 6 1 P	25/06	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	13/10 (2006.01)	A 6 1 P	13/10	
請求項の数 11 (全114頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2023-559998(P2023-559998)	(73)特許権者	517340507	
(86)(22)出願日	令和3年3月30日(2021.3.30)		イプセン バイオファーム リミテッド	
(65)公表番号	特表2024-509634(P2024-509634 A)		I P S E N B I O P H A R M L I M I T E D	
(43)公表日	令和6年3月4日(2024.3.4)		イギリス, エルエル13 9ユーエフ レクサム, レクサム インダストリアル エステート, ユニット 9 アッシュ ロード	
(86)国際出願番号	PCT/GB2021/050783	(74)代理人	110000774	
(87)国際公開番号	WO2022/208039		弁理士法人 もえぎ特許事務所	
(87)国際公開日	令和4年10月6日(2022.10.6)	(72)発明者	カリニチェフ, ミハイル	
審査請求日	令和5年12月7日(2023.12.7)		イギリス, エルエル13 9ユーエフ レクサム, レクサム インダストリアル エステート, ユニット 9 アッシュ ロード, イプセン バイオファーム リミテッド内	
早期審査対象出願前置審査				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 疼痛及び炎症性障害の処置

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

疼痛の処置に使用するための、ポリペプチドを含む医薬:ここで、前記ポリペプチドは以下を含む:

クロストリジウム神経毒素軽鎖(L鎖);クロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_Cドメイン);及びクロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_Nドメイン);

前記L鎖は触媒的に不活性であり;且つ

前記ポリペプチドは、前記クロストリジウム神経毒素L鎖、H_Nドメイン、及び/又はH_Cドメインに追加の共有結合的に又は非共有結合的に結びつけられた治療薬剤を含まない。

【請求項2】

前記ポリペプチドは、ニューロン成長の促進、ニューロン修復の促進、又はニューロン成長及び修復の促進のいずれかによって疼痛を処置するのではない、請求項1に記載の医薬。

【請求項3】

炎症性障害における疼痛の処置に使用するための、ポリペプチドを含む医薬:ここで、前記ポリペプチドは以下を含む:

クロストリジウム神経毒素軽鎖(L鎖);クロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_Cドメイン);及びクロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_Nドメイン);且つ

前記L鎖は触媒的に不活性である。

【請求項4】

前記ポリペプチドは、ニューロン成長の促進、ニューロン修復の促進、又はニューロン成長及び修復の促進のいずれかによって炎症性の状態を処置するのではなく、且つ/又は、前記ポリペプチドは、前記クロストリジウム神経毒素L鎖又はH_cドメインに追加の治療薬剤又は共有結合的に又は非共有結合的に結びつけられた治療薬剤を含まない、請求項3に記載の医薬。

【請求項5】

- (a)前記ポリペプチドは更なる触媒的に活性なドメインを含まない、
- (b)前記ポリペプチドは、前記クロストリジウム神経毒素L鎖及び/又はH_cドメインに追加の診断薬剤又は共有結合的に又は非共有結合的に結びつけられた診断薬剤を含まない、
- (c)前記ポリペプチドは、更なる治療又は診断薬剤と投与されない、
- (d)前記ポリペプチドは更に非クロストリジウムの触媒ドメインを含まない、
- (e)前記ポリペプチドは前記対象の細胞において発現されず、又は、前記ポリペプチドをコードする核酸は前記対象の細胞によって発現されない、
- (f)前記ポリペプチドは更に1つ以上の非クロストリジウム神経毒素配列を含み、
随意により、

前記1つ以上の非クロストリジウム神経毒素配列は、細胞の受容体に結合しない、且つ/又は、前記1つ以上の非クロストリジウム神経毒素配列は、細胞の受容体にとってのリガンドを含まない、且つ/又は

- (g)前記ポリペプチドはCys-(Xaa)_a-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cys(配列番号71)を含み、ここで、a=1~10かつb=4~15である、

請求項1~4のいずれか1項に記載の医薬。

【請求項6】

前記疼痛は慢性の疼痛又は急性の疼痛である、請求項1~5の何れか1項に記載の医薬。

【請求項7】

前記疼痛は膀胱痛、炎症性疼痛、ニューロパチー性疼痛、混合性疼痛、アロディニア、内臓痛、頭痛の疼痛、片頭痛及び/又は片頭痛疼痛、術後疼痛、関連痛、体性痛、又は幻肢痛である、請求項1~6のいずれか1項に記載の医薬。

【請求項8】

- (a)前記炎症性疼痛は、日焼け、UVによって誘導される損傷、関節炎性の障害、自己免疫性疾患、結合組織障害、傷害、感染、神経炎、関節の炎症、頭痛、筋肉性/筋原性頭痛、血管性頭痛、高血圧性頭痛、ホルモン性頭痛、反跳性頭痛、慢性の副鼻腔炎性頭痛、器質性の頭痛、又は発作性頭痛によって引き起こされるか、又はそれに関連する、

- (b)前記ニューロパチー性疼痛は、神経痛、求心路遮断、複合性局所疼痛症候群(CRPS)、ニューロパチー、又は中枢若しくは末梢ニューロパチーである又はそれによって引き起こされるか若しくはそれに関連する、

- (c)前記内臓痛は、機能性内臓痛、慢性の胃腸炎症、自己免疫性疼痛、器質性の内臓痛、又は処置によって誘導される内臓痛である又はそれによって引き起こされるか若しくはそれに関連する、

- (d)前記頭痛の疼痛は、筋肉性/筋原性頭痛、血管性頭痛、高血圧性頭痛、ホルモン性頭痛、反跳性頭痛、慢性の副鼻腔炎性頭痛、器質性の頭痛、又は発作性頭痛によって引き起こされるか、又はそれに関連する、

- (e)前記体性痛は、過剰な筋張力、反復動作障害、筋肉の障害、筋痛症、感染、又は薬物によって引き起こされるか、又はそれに関連する、

- (f)前記膀胱痛は間質性膀胱炎によって引き起こされるか、又はそれに関連する、

請求項7に記載の医薬。

【請求項9】

前記炎症性障害は、膀胱炎、間質性膀胱炎、子宮内膜症、関節リウマチ、複合性局所疼痛症候群、神経炎、及び末梢神経炎から選択される1つ以上である、請求項3~5のいずれか1項に記載の医薬

【請求項10】

10

20

30

40

50

- (a)投与される前記ポリペプチドの単一用量は250 μ g超である、
 - (b)投与される前記ポリペプチドの単一用量は251 μ gから10gである、
 - (c)投与される前記ポリペプチドの単一用量は251 μ gから1gである、
 - (d)投与される前記ポリペプチドの単一用量は251~1000 μ gである、
 - (e)前記ポリペプチドは反復投与される、又は、前記ポリペプチドは疼痛処置レジメンの一部として反復投与される、
 - (f)前記ポリペプチドは真皮内投与される、
 - (g)前記ポリペプチドは、配列番号2、18、又は62のいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み、ただし、前記L鎖は触媒的に不活性である、
 - (h)前記ポリペプチドは、配列番号2、18、又は62のいずれか1つのポリペプチド配列を含む、
 - (i)前記ポリペプチドは触媒的に不活性なBoNT/Aである、且つ/又は
 - (j)前記ポリペプチドは、改変されたクロストリジウム神経毒素、キメラクロストリジウム神経毒素、又はハイブリッドクロストリジウム神経毒素であり、随意により、前記ポリペプチドは天然のクロストリジウム神経毒素H鎖を含まない、
- 請求項1~9のいずれか1項に記載の医薬。

【請求項11】

前記疼痛は炎症性疼痛である、請求項1~10のいずれか1項に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、治療に使用するためのポリペプチド、例えば、疼痛又は炎症性障害の処置のためのポリペプチドの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

クロストリジウム綱の属の細菌は高度に強力なかつ特異的なタンパク質毒素を生成し、これらはそれらが送達されるニューロン及び他の細胞を毒し得る。かかるクロストリジウム神経毒素の例は、C.テタニ(TeNT)並びにC.ボツリヌム(BoNT)血清型A~G及びXによって生成される神経毒素(WO 2018/009903 A2参照)、並びにC.バラティ及びC.ブチリカムによって生成されるものを包含する。破傷風及びボツリヌス毒素両方は、冒されたニューロンの機能、具体的には神経伝達物質の放出を阻害することによって作用する。ボツリヌス毒素は神経筋接合部において作用し、末梢神経系におけるコリン作動性の伝達を阻害するが、破傷風毒素は中枢神経系において作用する。

【0003】

天然では、クロストリジウム神経毒素は単鎖ポリペプチドとして合成され、これがタンパク分解性切断イベントによって翻訳後修飾されて、ジスルフィド結合によって一緒に繋がれた2つのポリペプチド鎖を形成する。切断は、多くの場合に活性化部位と言われる特異的な切断部位において生起し、これは鎖間ジスルフィド結合を提供するシステイン残基間に位置付けられる。毒素の活性な形態であるのはこの二鎖形態である。2つの鎖は、およそ100kDaの分子質量を有する重鎖(H鎖)及びおよそ50kDaの分子質量を有する軽鎖(L鎖)と呼称される。H鎖はN末端の転位置コンポーネント(H_N ドメイン)及びC末端の標的化コンポーネント(H_C ドメイン)を含む。切断部位はL鎖及び転位置ドメインコンポーネントの間に位置付けられる。その標的ニューロンに対する H_C ドメインの結合とエンドソームを介する細胞内への結合した毒素の内在化との後に、 H_N ドメインはL鎖をエンドソーム膜を通してサイトゾルへと転位置させ、L鎖はプロテアーゼ機能を提供する(非細胞毒性のプロテアーゼとしてもまた公知)。

【0004】

非細胞毒性のプロテアーゼは、SNAREタンパク質として公知の細胞内輸送タンパク質(例えばSNAP-25、VAMP、又はシンタキシン)をタンパク分解性に切断することによって

10

20

30

40

50

作用する。アクロニムのSNAREは可溶性NSF接着受容体という用語に由来し、ここで、NSFはN-エチルマレイミド感受性因子を意味する。SNAREタンパク質は、細胞内小胞融合にとって、それゆえに細胞からの小胞輸送による分子の分泌にとって不可欠である。プロテアーゼ機能は亜鉛依存性エンドペプチダーゼ活性であり、SNAREタンパク質に対する高い基質特異性を見せる。従って、ひとたび所望の標的細胞に送達されると、非細胞毒性のプロテアーゼは標的細胞からの細胞性の分泌を阻害することができる。クロストリジウム神経毒素のL鎖プロテアーゼはSNAREタンパク質を切断する非細胞毒性のプロテアーゼである。

【0005】

SNAREタンパク質の遍在的な性質に鑑みて、ボツリヌス毒素などのクロストリジウム神経毒素は広い範囲の治療に首尾よく採用されている。

10

【0006】

クロストリジウム神経毒素は公知の最も強力な毒素のうちのいくつかである。例として、ボツリヌス神経毒素は、血清型に依存して、0.5から5ng/kgの範囲に渡るマウスの半数致死量(LD₅₀)値を有する。それゆえに、前記の毒素の使用はリスクがないわけではない。投与部位からの取り巻く組織又は全身循環への毒素の広がり、クロストリジウム神経毒素処置の望ましくない副作用を担っていると思料され、これらは極端なケースにおいては生命を脅かし得る。これはクロストリジウム神経毒素を高い用量、濃度、及び/又は注射体積で用いるときには特に懸念であり得る。商業的なBoNT/A治療薬について報告されている有害作用は、無力症、全身筋力低下、複視、眼瞼下垂、嚥下障害、ジスフォニア、ディ

20

【発明の概要】

【0007】

本発明は上で言及されている問題の1つ以上を克服する。

【0008】

本発明者らは、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素が疼痛を処置することにおいて有効であるということを見出した。SNAREタンパク質切断をもたらす触媒活性は、クロストリジウム神経毒素治療の基礎となっている本質的な作用機序であると思料されたので、この知見は特に驚くべきである。それゆえに、本発明のポリペプチドは、従来の触媒的に活性なクロストリジウム神経毒素治療に関連する毒性の副作用を回避し、より安全な(実質的に非毒性の)治療薬を構成する。有利には、従来の触媒的に活性なクロストリジウム神経毒素治療薬と比較したときに、本発明のポリペプチドはより多大な量で投薬され得る。更にその上、本発明のポリペプチドの縮減された毒性は、製品ライフサイクルの間の製造及び取り扱いの容易さを可能にし、対象における毒性を回避することを狙った複雑な(例えば個別化された)投薬レジメン計算を医師が行なう必要を除去する。

30

【0009】

等しく驚くべきことに、本発明者らは、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素が炎症性障害を処置することにおいて有効であるということを見出した。

【発明を実施するための形態】

40

【0010】

1つの態様において、本発明は疼痛の処置に使用するためのポリペプチド(例えば鎮痛ポリペプチド)を提供し、ここで、ポリペプチドはクロストリジウム神経毒素軽鎖(L鎖)、クロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_Nドメイン)、及び/又はクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含み、ここで、ポリペプチドがクロストリジウム神経毒素L鎖を含む場合、L鎖は触媒的に不活性である。

【0011】

関係する態様においては、疼痛を処置するための方法が提供され、方法は、ポリペプチド(例えば鎮痛ポリペプチド)を対象に投与することを含み、ここで、ポリペプチドはクロストリジウム神経毒素軽鎖(L鎖)、クロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_Nドメイン)

50

)、及び/又はクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C ドメイン)を含み、ここで、ポリペプチドがクロストリジウム神経毒素L鎖を含む場合、L鎖は触媒的に不活性である。

【0012】

別の関係する態様において、本発明は、疼痛を処置するための医薬の製造におけるポリペプチド(例えば鎮痛ポリペプチド)の使用を提供し、ここで、ポリペプチドはクロストリジウム神経毒素軽鎖(L鎖)、クロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_N ドメイン)、及び/又はクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C ドメイン)を含み、ここで、ポリペプチドがクロストリジウム神経毒素L鎖を含む場合、L鎖は触媒的に不活性である。

【0013】

本発明のポリペプチドは、好ましくは鎮痛特性を有する。換言すると、本発明のポリペプチドは好ましくは鎮痛ポリペプチドである。

【0014】

好ましくは、本発明のポリペプチドは疼痛を処置するためにニューロン成長もニューロン修復も促進しない。換言すると、好ましくは、ポリペプチドは、ニューロン成長の促進、ニューロン修復の促進、又はニューロン成長及び修復の促進という手段のいずれかによって疼痛を処置するのではない。

【0015】

1つの態様において、本発明は炎症性障害の処置に使用するためのポリペプチドを提供し、ここで、ポリペプチドはクロストリジウム神経毒素軽鎖(L鎖)、クロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_N ドメイン)、及び/又はクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C ドメイン)を含み、ここで、ポリペプチドがクロストリジウム神経毒素L鎖を含む場合、L鎖は触媒的に不活性である。

【0016】

関係する態様においては、炎症性障害を処置するための方法が提供され、方法はポリペプチドを対象に投与することを含み、ここで、ポリペプチドはクロストリジウム神経毒素軽鎖(L鎖)、クロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_N ドメイン)、及び/又はクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C ドメイン)を含み、ここで、ポリペプチドがクロストリジウム神経毒素L鎖を含む場合、L鎖は触媒的に不活性である。

【0017】

別の関係する態様において、本発明は、炎症性障害を処置するための医薬の製造におけるポリペプチドの使用を提供し、ここで、ポリペプチドはクロストリジウム神経毒素軽鎖(L鎖)、クロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_N ドメイン)、及び/又はクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C ドメイン)を含み、ここで、ポリペプチドがクロストリジウム神経毒素L鎖を含む場合、L鎖は触媒的に不活性である。

【0018】

本発明のポリペプチドは抗炎症性の特性を有し得る。換言すると、本発明のポリペプチドは抗炎症性のポリペプチドであり得る。

【0019】

ポリペプチドが、本明細書に記載される通り炎症性障害を処置することに用いられる場合には、ポリペプチドはボツリヌス神経毒素血清型X($BoNT/X$)のL鎖、 $BoNT/X$ の H_N ドメイン、及び/又は $BoNT/X$ の H_C ドメインを含み得て、ここで、ポリペプチドがクロストリジウム神経毒素L鎖を含む場合、L鎖は触媒的に不活性である。例えば、ポリペプチドは、触媒的に不活性な $BoNT/X$ の軽鎖及び転位置ドメインと、異なる(すなわち非 $BoNT/X$)クロストリジウム神経毒素からの受容体結合ドメイン(H_C ドメイン)とを含むキメラボツリヌス神経毒素($BoNT$)であり得る。それゆえに、1つの態様において、本発明は、炎症性障害の処置に使用するためのポリペプチドを提供し、ここで、ポリペプチドは、触媒的に不活性な $BoNT/X$ の軽鎖及び転位置ドメインと、異なる(すなわち非 $BoNT/X$)クロストリジウム神経毒素からの受容体結合ドメイン(H_C ドメイン)(好ましくは $BoNT/B$ の H_C ドメイン)とを含む。処置及び使用の対応する方法もまた提供される。

【0020】

好ましくは、本発明のポリペプチドは、炎症性の状態を処置するためにニューロン成長もニューロン修復も促進しない。換言すると、好ましくは、ポリペプチドは、ニューロン成長の促進、ニューロン修復の促進、又はニューロン成長及び修復の促進という手段のいずれかによって炎症性の状態を処置するのではない。

【0021】

用語「ニューロン成長及び/又はニューロン修復を促進する」は、ニューロン成長及び/又はニューロン修復の速度の増大を包摂する。用語「ニューロン成長及び/又はニューロン修復」は、損傷したニューロン回路の再構築を包摂し、それによってニューロンのネットワーク又は集団の活性及び/又はニューロンの連絡を回復させる。それゆえに、本明細書において用いられる用語「ニューロン修復」は、特定のニューロンの修復及びニューロン回路の修復を包摂する。用語はニューロン可塑性をもまた包摂する。本明細書において用いられる用語「ニューロン可塑性」は、軸索発芽、樹状突起発芽、神経新生(例えば、新たなニューロンの生成)、成熟、分化、及び/又はシナプス可塑性(例えば、シナプスの強さ、活性、解剖学、及び/又は接続性の変更を包含する)を包摂する。用語「ニューロン成長及び/又はニューロン修復を促進する」は、(例えば、傷害の部位又はその近くにおいて)機能的なシナプスの確立を促進することをもまた包摂する。本明細書において用いられる用語「ニューロン成長」は、ニューロンのいずれかの一部の成長を包摂し、軸索及び/又は樹状突起の成長を包含する。前記の用語は、増大の神経突起長さ、神経突起数(例えば、細胞あたりの神経突起の数)、並びに/又は増大のニューロンの細胞体若しくは細胞膜からの突起部の長さ及び/若しくは数、例えばニューロンの軸索成長及び/若しくは軸索発芽、例えば対象におけるニューロンを包摂する。前記の軸索成長はニューロン間の接続及び/又は化学的連絡を促進し得る。

【0022】

好ましくは、本発明のポリペプチドは、疼痛又は炎症性障害を処置するために神経免疫応答を促進しない。この文脈において、神経免疫応答はミクログリア応答を包摂する。それゆえに、1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは疼痛又は炎症性の状態を処置するためにミクログリア応答を促進しない。

【0023】

好ましい実施形態において、疼痛は、脳の障害に関連するか又はそれによって引き起こされる疼痛ではない。別の好ましい実施形態において、炎症性障害は炎症性の脳の障害ではない。この文脈において用いられる用語「脳の障害」は「脳疾患」と交換可能である。この文脈において用いられる「脳の障害」は、脳の内又は外を起源とする障害を包摂し、脳組織損傷を引き起こす体への攻撃に関連する障害を包含する。この文脈に包摂される脳の障害の例は、外傷性脳損傷、癌(例えば脳腫瘍)、感染性疾患(例えば脳炎、髄膜炎、脳膿瘍、及び脳炎)、卒中、神経変性性の障害(例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、パーキンソン病関連障害、運動ニューロン疾患(例えば筋萎縮性側索硬化症)、プリオン病、ハンチントン病、脊髄小脳運動失調症、運動失調症、ハラーフォルデン・シュパッツ病、及び前頭側頭葉変性症)、脳動脈瘤、多発性硬化症、無酸素性傷害、毒性の傷害、並びに代謝性傷害のいずれか1つ(以上)を包含する。脳の障害は、外傷性脳損傷、癌、感染性疾患(例えば脳炎、髄膜炎、脳膿瘍、及び脳炎)、卒中、神経変性性の障害(例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、パーキンソン病関連障害、運動ニューロン疾患(例えば筋萎縮性側索硬化症)、プリオン病、ハンチントン病、脊髄小脳運動失調症、運動失調症、ハラーフォルデン・シュパッツ病、及び前頭側頭葉変性症)、脳動脈瘤、多発性硬化症、無酸素性傷害、毒性の傷害、及び/又は代謝性傷害によって引き起こされ得る。

【0024】

活性なクロストリジウム神経毒素L鎖は非細胞毒性のプロテアーゼ活性を有する。具体的には、活性なクロストリジウム神経毒素L鎖はエンドペプチダーゼ活性を有し、標的細胞内のエキソサイトーシス系融合装置のタンパク質を切断することができる。エキソサイトーシス系融合装置のタンパク質は、好ましくはSNAREタンパク質、例えばSNAP25、シ

10

20

30

40

50

ナプトブレビン/VAMP、又はシンタキシンである。

【0025】

クロストリジウム神経毒素L鎖について本明細書において用いられる用語「触媒的に不活性」は、前記のL鎖が実質的に非細胞毒性のプロテアーゼ活性を見せないということを意味する。好ましくは、クロストリジウム神経毒素L鎖について本明細書において用いられる用語「触媒的に不活性」は、前記のL鎖が非細胞毒性のプロテアーゼ活性を見せないということを意味する。1つの実施形態において、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素L鎖は、標的細胞内のエキソサイトーシス系融合装置のタンパク質を切断しないものである。用語「実質的に非細胞毒性のプロテアーゼ活性なし」は、クロストリジウム神経毒素L鎖が、触媒的に活性なクロストリジウム神経毒素L鎖の非細胞毒性のプロテアーゼ活性の5%未満、例えば、触媒的に活性なクロストリジウム神経毒素L鎖の非細胞毒性のプロテアーゼ活性の2%、1%未満、又は好ましくは0.1%未満を有するということを意味する。非細胞毒性のプロテアーゼ活性は、試験クロストリジウム神経毒素L鎖をSNAREタンパク質とインキュベーションすること、及び同じ条件において触媒的に活性なクロストリジウム神経毒素L鎖によって切断されたSNAREタンパク質の量と比較したときに、試験クロストリジウム神経毒素L鎖によって切断されたSNAREタンパク質の量を比較することによって、インビトロで決定され得る。SDS-PAGE及びウエスタンブロットティングなどの慣例的な技術が、切断されたSNAREタンパク質の量を定量するために用いられ得る。好適なインビトロアッセイはWO 2019/145577 A1に記載され、これは参照によって本明細書に組み込まれる。

【0026】

細胞に基づく及びインビボのアッセイもまた、L鎖と機能的な細胞結合及び転位位置ドメインを含むクロストリジウム神経毒素が非細胞毒性のプロテアーゼ活性を有するかどうかを決定するために用いられ得る。指外転スコア(DAS)アッセイ、後根神経節(DRG)アッセイ、脊髄ニューロン(SCN)アッセイ、及びマウス横隔神経半横隔膜(PNHD)アッセイなどのアッセイが当分野において慣例的である。非細胞毒性のプロテアーゼ活性を決定するための好適なアッセイは、Aoki KR, Toxicon 39: 1815-1820; 2001又はDonald et al (2018), Pharmacol Res Perspect, e00446, 1-14に記載されているものであり得る。これらは参照によって本明細書に組み込まれる。

【0027】

触媒的に不活性なL鎖は、前記の触媒活性を不活性化する1つ以上の変異を有し得る。それゆえに、触媒的に活性なL鎖(例えば本明細書に記載される通り)は、L鎖の触媒活性を不活性化する1つ以上の変異を導入するように改変され得る。例えば、触媒的に不活性なL鎖は活性部位残基の変異を含み得る。変異は置換又は欠失であり得る。しかしながら、置換、特に、化学的に類似のアミノ酸による置換が好ましい。グルタミン酸はグルタミンによって置換され得て、ヒスチジンはチロシンによって置換され得て、アルギニンはグルタミンによって置換され得て、及び/又はチロシンはフェニルアラニンによって置換され得る。代替的には、いずれかの残基がアラニンによって置換され得る。

【0028】

触媒的に不活性なBoNT/AのL鎖は、変異をH223、E224、H227、E262、R363、及び/又はY366に、好ましくは少なくともE224及びH227に含み得る。好ましくは、触媒的に不活性なBoNT/AのL鎖は、グルタミンによるE224における置換(E224Q)及びチロシンによるH227における置換(H227Y)を含み得る。位置付番は配列番号60のアミノ酸位置に対応し、ポリペプチドを配列番号60とアライメントすることによって決定され得る。配列番号60の位置1におけるメチオニン残基の存在は随意であるので、当業者はアミノ酸残基付番を決定するときにメチオニン残基の存在/不在を考慮に入れるであろう。例えば、配列番号60がメチオニンを包含する場合には、位置付番は上で定められる通りであろう(例えばHis223は配列番号60のHis223になるであろう)。代替的には、メチオニンが配列番号60に存在しない場合には、アミノ酸残基付番は-1だけ修正されるべきである(例えばHis223は配列番号60のHis222であろう)。本明細書に記載される他のポリペプチド配列の位

10

20

30

40

50

置1のメチオニンが存在する/存在しないときには、類似の考えが適用され、当業者は当分野の慣例的な技術を用いて正しいアミノ酸残基付番を難なく決定するであろう。

【0029】

触媒的に不活性なBoNT/BのL鎖は、変異をE231及び/又はH234、好ましくはE231及びH234に含み得る。好ましくは、触媒的に不活性なBoNT/BのL鎖は、グルタミンによるE231における置換(E231Q)及びチロシンによるH234における置換(H234Y)を含む。位置付番は配列番号52のアミノ酸位置に対応し、ポリペプチドを配列番号52とアライメントすることによって決定され得る。配列番号52の位置1におけるメチオニン残基の存在は随意であるので、当業者はアミノ酸残基付番を決定するときにメチオニン残基の存在/不在を考慮に入れるであろう。

10

【0030】

触媒的に不活性なBoNT/CのL鎖は、変異をH229、E230、及び/又はH233、好ましくはH229、E230、及びH233に含み得る。好ましくは、触媒的に不活性なBoNT/CのL鎖は、グリシンによるH229における置換(H229G)、スレオニンによるE230における置換(E230T)、及びアスパラギンによるH233における置換(H233N)を含む。位置付番は配列番号53のアミノ酸位置に対応し、ポリペプチドを配列番号53とアライメントすることによって決定され得る。配列番号53の位置1におけるメチオニン残基の存在は随意であるので、当業者はアミノ酸残基付番を決定するときにメチオニン残基の存在/不在を考慮に入れるであろう。

20

【0031】

触媒的に不活性なBoNT/DのL鎖は、変異をH229、E230、H233、及び/又はH236に、好ましくは少なくともE230及びH236に含み得る。好ましくは、触媒的に不活性なBoNT/DのL鎖は、少なくとも、グルタミンによるE230における置換(E230Q)及びチロシンによるH236における置換(H236Y)を含む。位置付番は配列番号54のアミノ酸位置に対応し、ポリペプチドを配列番号54とアライメントすることによって決定され得る。配列番号54の位置1におけるメチオニン残基の存在は随意であるので、当業者はアミノ酸残基付番を決定するときにメチオニン残基の存在/不在を考慮に入れるであろう。

【0032】

触媒的に不活性なBoNT/EのL鎖は、変異をE213及び/又はH216に、好ましくはE213及びH216に含み得る。好ましくは、触媒的に不活性なBoNT/EのL鎖は、グルタミンによるE213(E213Q)及びチロシンによるH216(H216Y)における置換を含む。位置付番は配列番号55のアミノ酸位置に対応し、ポリペプチドを配列番号55とアライメントすることによって決定され得る。配列番号55の位置1におけるメチオニン残基の存在は随意であるので、当業者はアミノ酸残基付番を決定するときにメチオニン残基の存在/不在を考慮に入れるであろう。

30

【0033】

触媒的に不活性なBoNT/FのL鎖は、変異をE228及び/又はH231に、好ましくはE228及びH231に含み得る。好ましくは、触媒的に不活性なBoNT/FのL鎖は、グルタミンによるE228(E228Q)及びチロシンによるH231(H231Y)における置換を含む。位置付番は配列番号56のアミノ酸位置に対応し、ポリペプチドを配列番号56とアライメントすることによって決定され得る。配列番号56の位置1におけるメチオニン残基の存在は随意であるので、当業者はアミノ酸残基付番を決定するときにメチオニン残基の存在/不在を考慮に入れるであろう。

40

【0034】

触媒的に不活性なBoNT/GのL鎖は、変異をE231及び/又はH234に、好ましくはE231及びH234に含み得る。好ましくは、触媒的に不活性なBoNT/GのL鎖は、グルタミンによるE231(E231Q)及びチロシンによるH234(H234Y)における置換を含む。位置付番は配列番号57のアミノ酸位置に対応し、ポリペプチドを配列番号57とアライメントすることによって決定され得る。配列番号57の位置1におけるメチオニン残基の存在は随意であるので、当業者はアミノ酸残基付番を決定するときにメチオニン残基の存在/不在を考慮に入

50

れるであろう。

【0035】

触媒的に不活性なBoNT/XのL鎖は、変異をE228及び/又はH231に、好ましくはE228及びH231に含み得る。好ましくは、触媒的に不活性なBoNT/XのL鎖は、グルタミンによるE228(E228Q)及びチロシンによるH231(H231Y)における置換を含む。位置付番は配列番号59のアミノ酸位置に対応し、ポリペプチドを配列番号59とアライメントすることによって決定され得る。配列番号59の位置1におけるメチオニン残基の存在は随意であるので、当業者はアミノ酸残基付番を決定するときにメチオニン残基の存在/不在を考慮に入れるであろう。

【0036】

触媒的に不活性なTeNTのL鎖は、変異をE234、R372、及び/又はY375に、好ましくは少なくともR372及びY375に(例えばE234、R372、及びY375に)含み得る。好ましくは、触媒的に不活性なTeNTのL鎖は、グルタミン又はアラニンによる(R372Q又はR372A)、より好ましくはアラニンによるR372における置換、並びにフェニルアラニンによるY375における置換(Y375F)を含む。位置付番は配列番号58のアミノ酸位置に対応し、ポリペプチドを配列番号58とアライメントすることによって決定され得る。配列番号58の位置1におけるメチオニン残基の存在は随意であるので、当業者はアミノ酸残基付番を決定するときにメチオニン残基の存在/不在を考慮に入れるであろう。

【0037】

本発明のポリペプチドは、全長のクロストリジウム神経毒素(ただし、L鎖は触媒的に不活性である)、又は非細胞毒性のプロテアーゼ活性を有さないクロストリジウム神経毒素の断片(例えばH_Nドメイン及び/又はH_Cドメイン)を含み得る。換言すると、本発明のポリペプチドは非細胞毒性のプロテアーゼ活性を有さない。

【0038】

用語「クロストリジウム神経毒素」は、C.ボツリヌム(ボツリヌス神経毒素血清型A、B、C₁、D、E、F、G、及びX)、C.テタニ(破傷風神経毒素)、C.ブチリカム(ボツリヌス神経毒素血清型E)、及びC.バラティ(ボツリヌス神経毒素血清型F)によって生成される毒素を包摂する。参照BoNT/A配列は配列番号51として示される。参照BoNT/B配列は配列番号52として示される。参照BoNT/C配列は配列番号53として示される。参照BoNT/D配列は配列番号54として示される。参照BoNT/E配列は配列番号55として示される。参照BoNT/F配列は配列番号56として示される。参照BoNT/G配列は配列番号57として示される。参照TeNT配列は配列番号58として示される。参照BoNT/X配列は配列番号59として示される。用語「クロストリジウム神経毒素」は、非クロストリジウムの微生物によって発現される新たに発見されたボツリヌス神経毒素タンパク質ファミリー構成員をもまた包摂し得る。例えば、最も近い配列同一性をBoNT/Xに対して有するエンテロコッカスによってコードされる毒素、VAMP2をW89-W90で切断するBoNT/Woと呼ばれるワイセラ・オリゼーによってコードされる毒素(NCBIのRefSeq:WP_027699549.1)、VAMP2及びSNAP25を切断するエンテロコッカス・フェシウムによってコードされる毒素(GenBank:OT022244.1)、並びにクリセオバクテリウム・ピペロによってコードされる毒素(NCBIのRef.Seq:WP_034687872.1)である。

【0039】

それゆえに、クロストリジウム神経毒素はBoNT/A、BoNT/B、BoNT/C、BoNT/D、BoNT/E、BoNT/F、BoNT/G、BoNT/X、及びTeNT(破傷風神経毒素)から選択され得る。好ましくは、クロストリジウム神経毒素は、ボツリヌス神経毒素、例えばBoNT/A、BoNT/B、BoNT/C、BoNT/D、BoNT/E、BoNT/F、BoNT/G、及びBoNT/Xから選択されるボツリヌス神経毒素である。例えば、クロストリジウム神経毒素H_Nドメインは、BoNTのA、B、C₁、D、E、F、G、X、又はTeNTからのH_Nドメインであり得る。類似に、L鎖はBoNTのA、B、C₁、D、E、F、G、X、又はTeNTからのL鎖であり得るが、ただし、前記のL鎖は触媒的に不活性である(例えば、それを触媒的に不活性にするように改変されている)。より好ましくは、クロストリジウム神経毒素はBoNT/Aである。

【0040】

上で論じられている通り、(全長の)クロストリジウム神経毒素は、2つのポリペプチド鎖、およそ100kDaの分子質量を有する重鎖(H鎖)及びおよそ50kDaの分子質量を有する軽鎖(L鎖)から形成される。H鎖はC末端標的化コンポーネント(受容体結合ドメイン又はH_Cドメイン)及びN末端転位位置コンポーネント(H_Nドメイン)を含む。ボツリヌス神経毒素(BoNT)は、いくつかのアクセサリタンパク質と複合体化したBoNTそれ自体からなる大きなタンパク質複合体の形態で、C.ボツリヌムによって生成される。現在、ボツリヌス神経毒素の8つの異なるクラス、つまりボツリヌス神経毒素血清型A、B、C1、D、E、F、G、及びXがあり、これらの全ては類似の構造及び作用モードを共有する。異なる複数のBoNT血清型は、特異的な中和抗血清による不活性化に基づいて区別され得る。血清型によるかかる分類はアミノ酸レベルでのパーセンテージの配列同一性と相関する。アミノ酸のパーセンテージの配列同一性に基づいて、所与の血清型のBoNTタンパク質は更に異なるサブタイプに分けられる。

10

【0041】

従来の(触媒的に活性な)BoNTは胃腸管において吸収され、全身循環に入った後に、コリン作動性神経終末のシナプス前膜に結合し、それらの神経伝達物質アセチルコリンの放出を防止する。BoNT/B、BoNT/D、BoNT/F、及びBoNT/Gはシナプトブレビン/小胞関連膜タンパク質(VAMP)を切断し、BoNT/C1、BoNT/A、及びBoNT/Eは25kDaのシナプトソーム関連タンパク質(SNAP-25)を切断し、BoNT/C1はシンタキシンを切断する。BoNT/XはSNAP-25、VAMP1、VAMP2、VAMP3、VAMP4、VAMP5、Ykt6、及びシンタキシン1を切断することが見出されている。破傷風毒素はC.テタニによって単一の血清型で生成される。C.ブチリカムはBoNT/Eを生成し、C.バラティはBoNT/Fを生成する。

20

【0042】

1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、又は49のいずれか1つに対して少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされ得るが、ただし、ポリペプチドがクロストリジウム神経毒素L鎖を含む場合、L鎖は触媒的に不活性である。1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、又は49のいずれか1つに対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされ得るが、ただし、ポリペプチドがクロストリジウム神経毒素L鎖を含む場合、L鎖は触媒的に不活性である。好ましくは、本発明のポリペプチドは、配列番号1、7、9、11、13、15、17、21、25、29、33、37、41、43、45、47、又は49のいずれか1つを含むヌクレオチド配列によってコードされ得る。

30

【0043】

1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、74、75、又は76のいずれか1つに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得るが、ただし、ポリペプチドがクロストリジウム神経毒素L鎖を含む場合、L鎖は触媒的に不活性である。1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、74、75、又は76のいずれか1つに対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得るが、ただし、ポリペプチドがクロストリジウム神経毒素L鎖を含む場合、L鎖は触媒的に不活性である。好ましくは、本発明のポリペプチドは、配列番号2、8、10、12、14、16、18、22、26、30、34、38、42、44、46、48、50、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、74、75、又は76のいずれか1つ

40

50

のポリペプチド配列を含み得る。

【0044】

1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号2、10、12、14、16、18、26、34、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、又は70のいずれか1つに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列の断片を含み得るが、ただし、ポリペプチドがクロストリジウム神経毒素L鎖を含む場合、L鎖は触媒的に不活性である。1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号2、10、12、14、16、18、26、34、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、又は70のいずれか1つに対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するポリペプチド配列の断片を含み得るが、ただし、ポリペプチドがクロストリジウム神経毒素L鎖を含む場合、L鎖は触媒的に不活性である。好ましくは、本発明のポリペプチドは、配列番号2、10、12、14、16、18、26、34、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、又は70のいずれか1つを含むポリペプチド配列の断片を含み得るが、ただし、ポリペプチドがクロストリジウム神経毒素L鎖を含む場合、L鎖は触媒的に不活性である。断片は前記の配列番号のいずれかの触媒的に不活性なL鎖、H_Nドメイン、又はH_Cドメインであり得る。

【0045】

好ましくは、本発明のポリペプチドは、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素L鎖を含む(又はそれからなる)。この文脈において触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素と言うことは、クロストリジウム神経毒素L鎖の断片をもまた包摂する。クロストリジウム神経毒素L鎖の断片は、クロストリジウム神経毒素L鎖の ≤ 400 、 ≤ 350 、 ≤ 300 、 ≤ 250 、 ≤ 200 、 ≤ 150 、 ≤ 100 、又は ≤ 50 アミノ酸残基を有し得る。1つの実施形態において、クロストリジウム神経毒素L鎖の断片は、クロストリジウム神経毒素L鎖の少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、150、又は200アミノ酸残基を有する。例えば、クロストリジウム神経毒素L鎖の断片は、クロストリジウム神経毒素L鎖の20~400、50~300、又は100~200アミノ酸残基を有し得る。しかしながら、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素と言うことは、全長の触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素L鎖と言うことであるということが好ましい。

【0046】

L鎖参照配列の例は以下を包含する：

ボツリヌスA型神経毒素:アミノ酸残基1-448

ボツリヌスB型神経毒素:アミノ酸残基1-440

ボツリヌスC1型神経毒素:アミノ酸残基1-441

ボツリヌスD型神経毒素:アミノ酸残基1-445

ボツリヌスE型神経毒素:アミノ酸残基1-422

ボツリヌスF型神経毒素:アミノ酸残基1-439

ボツリヌスG型神経毒素:アミノ酸残基1-441

破傷風神経毒素:アミノ酸残基1-457

【0047】

最近同定されたBoNT/Xでは、L鎖はそのアミノ酸1~439に対応すると報告されており、L鎖の境界は可能性としておよそ25アミノ酸だけ変動する(例えば1~414又は1~464)。

【0048】

軽微な変動が血清型サブタイプに従って生じ得るので、上で同定されている参照配列はガイドと考えられるべきである。例として、US 2007/0166332(その全体が参照によってここに組み込まれる)は軽微に異なるクロストリジウム配列を引用している：

ボツリヌスA型神経毒素:アミノ酸残基M1-K448

ボツリヌスB型神経毒素:アミノ酸残基M1-K441

ボツリヌスC1型神経毒素:アミノ酸残基M1-K449

ボツリヌスD型神経毒素:アミノ酸残基M1-R445
ボツリヌスE型神経毒素:アミノ酸残基M1-R422
ボツリヌスF型神経毒素:アミノ酸残基M1-K439
ボツリヌスG型神経毒素:アミノ酸残基M1-K446
破傷風神経毒素:アミノ酸残基M1-A457

【0049】

好適なクロストリジウム神経毒素L鎖が本明細書に記載される。

【0050】

クロストリジウム神経毒素L鎖は、配列番号6、24、32、40、74、又は76のいずれか1つに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得るが、ただし、L鎖は触媒的に不活性である(例えば、L鎖は改変によって不活性化されている)。1つの実施形態において、クロストリジウム神経毒素L鎖は、配列番号6、24、32、40、74、又は76のいずれか1つに対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み、ただし、L鎖は触媒的に不活性である(例えば、L鎖は改変によって不活性化されている)。好ましくは、クロストリジウム神経毒素L鎖は、L鎖を触媒的に不活性化するように改変されている配列番号6、24、32、又は40のいずれか1つを含むポリペプチド配列、例えば配列番号74又は76を含む(より好ましくはそれからなる)。

10

【0051】

クロストリジウム神経毒素L鎖は、配列番号5、23、31、又は39のいずれか1つに対して少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるものであり得るが、ただし、L鎖は触媒的に不活性である(例えば、L鎖は改変によって不活性化されている)。1つの実施形態において、クロストリジウム神経毒素L鎖は、配列番号5、23、31、又は39のいずれか1つに対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるものであり、ただし、L鎖は触媒的に不活性である(例えば、L鎖は改変によって不活性化されている)。好ましくは、クロストリジウム神経毒素L鎖は、コードされるL鎖を触媒的に不活性化するように改変されている配列番号5、23、31、又は39のいずれか1つを含むヌクレオチド配列によってコードされるものである。

20

【0052】

軽鎖の触媒活性が疼痛を処置する有効性のために要求されなかったということから、L鎖を含まない(又はL鎖の断片のみを含む)ポリペプチドが疼痛を処置し得るということは信頼性がある。類似の理由から、L鎖を含まない(又はL鎖の断片のみを含む)ポリペプチドが炎症性の状態を処置し得るということは信頼性がある。それゆえに、1つの実施形態において、ポリペプチドはクロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_N ドメイン)及び/又はクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C ドメイン)を含み得る。1つの実施形態において、本発明のポリペプチドはクロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_N ドメイン)及びクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C ドメイン)の両方は含まない。

30

【0053】

1つの実施形態において、本発明のポリペプチドはクロストリジウム神経毒素重鎖(H鎖)を含む(又はそれからなる)。前記のH鎖はクロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_N ドメイン)及び受容体結合ドメイン(H_C ドメイン)を含む。この文脈においてクロストリジウム神経毒素H鎖と言うことは、クロストリジウム神経毒素H鎖の断片をもまた包摂する。クロストリジウム神経毒素H鎖の断片は、クロストリジウム神経毒素H鎖の ≤ 800 、 ≤ 700 、 ≤ 600 、 ≤ 500 、 ≤ 400 、 ≤ 350 、 ≤ 300 、 ≤ 250 、 ≤ 200 、 ≤ 150 、 ≤ 100 、又は ≤ 50 アミノ酸残基を有し得る。1つの実施形態において、クロストリジウム神経毒素H鎖の断片は、クロストリジウム神経毒素H鎖の少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、150、又は200アミノ酸残基を有する。例えば、クロストリジウム神経毒素H鎖の断片は、クロストリジウム神経毒素H鎖の20~800、30~600、40~400、50~300、又は100~200アミノ酸残基を有し得る。しかしながら、H鎖と言うことは全長のH

40

50

鎖とすることであるということが好ましい。

【0054】

1つの実施形態において、本発明のポリペプチドはクロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_N ドメイン)を含む(又はそれからなる)。この文脈においてクロストリジウム神経毒素転位置ドメインと言うことは、転位置ドメインの断片をもまた包摂する。クロストリジウム神経毒素転位置ドメインの断片は、クロストリジウム神経毒素転位置ドメインの ≤ 400 、 ≤ 350 、 ≤ 300 、 ≤ 250 、 ≤ 200 、 ≤ 150 、 ≤ 100 、又は ≤ 50 アミノ酸残基を有し得る。1つの実施形態において、クロストリジウム神経毒素転位置ドメインの断片は、クロストリジウム神経毒素転位置ドメインの少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、150、又は200アミノ酸残基を有する。例えば、クロストリジウム神経毒素転位置ドメインの断片は、クロストリジウム神経毒素転位置ドメインの20~400、50~300、又は100~200アミノ酸残基を有し得る。しかしながら、転位置ドメインと言うことは全長の転位置ドメインとすることであるということが好ましい。

10

【0055】

転位置ドメインは、H鎖のアミノ末端半分とおよそ同等のクロストリジウム神経毒素のH鎖の断片、又はインタクトなH鎖上のその断片に対応するドメインである。1つの実施形態において、H鎖の H_C 機能は H_C アミノ酸配列の欠失によって除去され得る(DNA合成レベル又は合成後のレベルのどちらかで、ヌクレアーゼ若しくはプロテアーゼ処置による)。代替的には、 H_C 機能は化学的又は生物学的処置によって不活性化され得る。それゆえに、いくつかの実施形態において、H鎖は、天然のクロストリジウム神経毒素(すなわちホロ毒素)が結合する標的細胞上の結合部位に結合することができない場合がある。

20

【0056】

好適な(参照)転位置ドメインの例は以下を包含する:

ボツリヌスA型神経毒素-アミノ酸残基(449-871)

ボツリヌスB型神経毒素-アミノ酸残基(441-858)

ボツリヌスC型神経毒素-アミノ酸残基(442-866)

ボツリヌスD型神経毒素-アミノ酸残基(446-862)

ボツリヌスE型神経毒素-アミノ酸残基(423-845)

ボツリヌスF型神経毒素-アミノ酸残基(440-864)

ボツリヌスG型神経毒素-アミノ酸残基(442-863)

破傷風神経毒素-アミノ酸残基(458-879)

30

【0057】

軽微な変動が血清型サブタイプに従って生起し得るので、上で同定されている参照配列はガイドと考えられるべきである。例として、US 2007/0166332(その全体が参照によってここに組み込まれる)は軽微に異なるクロストリジウム配列を引用している:

ボツリヌスA型神経毒素-アミノ酸残基(A449-K871)

ボツリヌスB型神経毒素-アミノ酸残基(A442-S858)

ボツリヌスC型神経毒素-アミノ酸残基(T450-N866)

ボツリヌスD型神経毒素-アミノ酸残基(D446-N862)

ボツリヌスE型神経毒素-アミノ酸残基(K423-K845)

ボツリヌスF型神経毒素-アミノ酸残基(A440-K864)

ボツリヌスG型神経毒素-アミノ酸残基(S447-S863)

破傷風神経毒素-アミノ酸残基(S458-V879)

40

【0058】

本発明の文脈において、転位置ドメインを含む種々のクロストリジウム神経毒素 H_N 領域は、本発明の態様において有用であり得る。クロストリジウム神経毒素の重鎖からの H_N 領域は長さがおよそ410~430アミノ酸であり、転位置ドメインを含む。研究は、クロストリジウム神経毒素重鎖からの H_N 領域の全体の長さが、転位置ドメインの転位置活性にとって必要なわけではないことを示している。それゆえに、この実施形態の態様は、例えば少なくとも350アミノ酸、少なくとも375アミノ酸、少なくとも400アミノ酸、少な

50

くとも425アミノ酸の長さを有する転位置ドメインを含むクロストリジウム神経毒素H_N領域を包含し得る。この実施形態の他の態様は、例えば最大で350アミノ酸、最大で375アミノ酸、最大で400アミノ酸、最大で425アミノ酸の長さを有する転位置ドメインを含むクロストリジウム神経毒素H_N領域を包含し得る。

【0059】

クロストリジウム・ボツリヌム及びC.テタニにおける毒素生成の遺伝学的な基礎についての更なる詳細は、Henderson et al (1997), The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis, Academic pressを参照。

【0060】

用語H_Nは、天然に生起する神経毒素H_N部分、並びに天然には生起しないアミノ酸配列及び/又は合成アミノ酸残基を有する改変されたH_N部分を包摂する。1つの実施形態において、前記の改変されたH_N部分は上で言及されている転位置機能を依然として実証する。

【0061】

1つの実施形態において、本発明のポリペプチドはクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含む(又はそれからなる)。この文脈においてクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C)と言うことは、クロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C)の断片をもまた包摂する。クロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C)の断片は、クロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C)の ≤ 350 、 ≤ 300 、 ≤ 250 、 ≤ 200 、 ≤ 150 、 ≤ 100 、又は ≤ 50 アミノ酸残基を有し得る。1つの実施形態において、クロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C)の断片は、クロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C)の少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、150、又は200アミノ酸残基を有する。例えば、クロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C)の断片は、クロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C)の20~350、50~300、又は100~200アミノ酸残基を有し得る。しかしながら、クストリジウム系神経毒素受容体結合ドメイン(H_C)と言うことは全長のクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C)と言うことであるということが好ましい。

【0062】

クロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C)参照配列の例は以下を包含する：

BoNT/A - N872-L1296

BoNT/B - E859-E1291

BoNT/C1 - N867-E1291

BoNT/D - S863-E1276

BoNT/E - R846-K1252

BoNT/F - K865-E1274

BoNT/G - N864-E1297

TeNT - I880-D1315

【0063】

最近同定されたBoNT/Xでは、H_Cドメインはそのアミノ酸893~1306に対応すると報告されており、ドメインの境界は可能性としておよそ25アミノ酸だけ変動する(例えば868~1306又は918~1306)。

【0064】

クロストリジウム神経毒素H鎖(例えばH_Cドメイン部分)は、更に転位置促進ドメインを含み得る(又はその断片が転位置促進ドメイン断片であり得る)。前記のドメインは標的細胞のサイトゾル中へのL鎖の送達を促進し、例えばWO 08/008803及びWO 08/008805に記載されている。これらのそれぞれはその参照によって本明細書に組み込まれる。

【0065】

例として、転位置促進ドメインはクロストリジウム神経毒素H_{CN}ドメイン又はその断片若しくは変異体を含み得る。より詳細には、クロストリジウム神経毒素H_{CN}転位置促進ドメインは、少なくとも200アミノ酸、少なくとも225アミノ酸、少なくとも50アミノ酸、少なくとも275アミノ酸の長さを有し得る。これについて、クロストリジウム神経毒素H_C

N転位置促進ドメインは、好ましくは、最大で200アミノ酸、最大で225アミノ酸、最大で250アミノ酸、又は最大で275アミノ酸の長さを有する。特定の(参照)例は以下を包含する:

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

10

【0066】

上の配列位置は血清型/サブタイプに従って少し変動し得る。好適な(参照)クロストリジウム神経毒素H_{CN}ドメインの更なる例は以下を包含する:

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

20

【0067】

好適なクロストリジウム神経毒素H_Cドメインが本明細書に記載される。

【0068】

クロストリジウム神経毒素H_Cドメインは、配列番号8、22、30、38、42、44、46、48、又は50のいずれか1つに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得る。1つの実施形態において、クロストリジウム神経毒素H_Cドメインは、配列番号8、22、30、38、42、44、46、48、又は50のいずれか1つに対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。好ましくは、クロストリジウム神経毒素H_Cドメインは、配列番号8、22、30、38、42、44、46、48、又は50のいずれか1つを含むポリペプチド配列を含む(より好ましくはそれからなる)。

30

【0069】

クロストリジウム神経毒素H_Cドメインは、配列番号7、21、29、37、41、43、45、47、又は49のいずれか1つに対して少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるものであり得る。1つの実施形態において、クロストリジウム神経毒素H_Cドメインは、配列番号7、21、29、37、41、43、45、47、又は49のいずれか1つに対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるものである。好ましくは、クロストリジウム神経毒素H_Cドメインは、配列番号7、21、29、37、41、43、45、47、又は49のいずれか1つを含むヌクレオチド配列によってコードされるものである。

40

【0070】

上に記載されている促進ドメインのいずれかは、本発明における使用にとって好適である先に記載された転位置ドメインペプチドのいずれかと組み合わせられ得る。それゆえに、例として、非クロストリジウムの促進ドメインは、非クロストリジウムの転位置ドメインペプチド又はクロストリジウムの転位置ドメインペプチドと組み合わせられ得る。代替的には、クロストリジウム神経毒素H_{CN}転位置促進ドメインは、非クロストリジウムの転位置ドメインペプチドと組み合わせられ得る。代替的には、クロストリジウム神経毒素H_{CN}促進ドメインは、クロストリジウム転位置ドメインペプチドと組み合わせられ得る。これらの例は以下を包含する:

50

ボツリヌスA型神経毒素-アミノ酸残基(449-1110)
ボツリヌスB型神経毒素-アミノ酸残基(442-1097)
ボツリヌスC型神経毒素-アミノ酸残基(450-1111)
ボツリヌスD型神経毒素-アミノ酸残基(446-1098)
ボツリヌスE型神経毒素-アミノ酸残基(423-1085)
ボツリヌスF型神経毒素-アミノ酸残基(440-1105)
ボツリヌスG型神経毒素-アミノ酸残基(447-1105)
破傷風神経毒素-アミノ酸残基(458-1127)

【0071】

いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、クロストリジウム神経毒素の機能的なH_Cドメインを欠き得る。1つの実施形態において、ポリペプチドは、好ましくは、クロストリジウム神経毒素ホロ毒素の最後の50個のC末端アミノ酸を欠く。別の実施形態において、ポリペプチドは、好ましくは、クロストリジウム神経毒素ホロ毒素の最後の100、好ましくは最後の150、より好ましくは最後の200、特に好ましくは最後の250、最も好ましくは最後の300個のC末端アミノ酸残基を欠く。代替的には、H_C結合活性は変異導入によって無効化/縮減され得る-例として、便宜のためにBoNT/Aを参照すると、ガングリオシド結合ポケット上の1つ又は2つのアミノ酸残基変異(W1266からL及びY1267からF)の改変は、H_C領域がその受容体結合機能を失うことを引き起こす。相似の変異が非血清型Aクロストリジウムペプチドコンポーネントになされ得る。例えば、変異を有するボツリヌスB(W1262からL及びY1263からF)又はボツリヌスE(W1224からL及びY1225からF)に基づくコンストラクトである。活性部位の他の変異、例えばボツリヌスA型毒素のY1267S及び他のクロストリジウム神経毒素の対応する高度に保存された残基は、H_C受容体結合活性の同じ削減を達成する。これ及び他の変異の詳細はRummel et al (2004) (Molecular Microbiol. 51: 631-634)に記載され、これはその参照によってここに組み込まれる。

【0072】

天然のクロストリジウム神経毒素のH_Cペプチドはおよそ400~440アミノ酸残基を含み、各およそ25kDaの2つの機能的に明確なドメイン、つまりN末端領域(普通にはH_{CN}ペプチド又はドメインと言われる)及びC末端領域(普通にはH_{CC}ペプチド又はドメインと言われる)からなる。この事実は以下の出版物によって確認され、これらのそれぞれはその全体がその参照によって本明細書に組み込まれる。Umland TC (1997) Nat. Struct. Biol. 4: 788-792;Herreros J (2000) Biochem. J. 347: 199-204;Halpern J (1993) J. Biol. Chem. 268: 15, pp. 11188-11192;Rummel A (2007) PNAS 104: 359-364;Lacey DB (1998) Nat. Struct. Biol. 5: 898-902;Knapp (1998) Am. Cryst. Assoc. Abstract Papers 25: 90;Swaminathan and Eswaramoorthy (2000) Nat. Struct. Biol. 7: 1751-1759;及びRummel A (2004) Mol. Microbiol. 51(3), 631-643。その上、C末端160~200アミノ酸残基を構成するC末端領域(H_{CC})は、その天然の細胞受容体に対する、つまり神経筋接合部の神経終末に対するクロストリジウム神経毒素の結合を担うということが良く立証されている-この事実もまた上の出版物によって確認される。それゆえに、本明細書において、重鎖が天然のクロストリジウム神経毒素が結合する細胞表面受容体に結合することができないようにして機能的な重鎖H_Cペプチド(又はドメイン)を欠くクロストリジウム重鎖と言うことは、クロストリジウム重鎖が単純に機能的なH_{CC}ペプチドを欠くということを意味する。換言すると、神経筋接合部の神経終末に対するその天然の結合能力を縮減するために、H_{CC}ペプチド領域は、部分的に若しくは丸ごと欠失又は別様に(例えば、従来の化学的若しくはタンパク分解性処置によって)修飾され得る。

【0073】

それゆえに、1つの実施形態において、本発明のクロストリジウム神経毒素H_Nペプチドは、クロストリジウム神経毒素のC末端ペプチド部分(H_{CC})の一部を欠き、それゆえに、天然のクロストリジウム神経毒素のH_C結合機能を欠く。例として、1つの実施形態において、C末端延長したクロストリジウムH_Nペプチドは、クロストリジウム神経毒素重鎖のC末

端40アミノ酸残基、又はC末端60アミノ酸残基、又はC末端80アミノ酸残基、又はC末端100アミノ酸残基、又はC末端120アミノ酸残基、又はC末端140アミノ酸残基、又はC末端150アミノ酸残基、又はC末端160アミノ酸残基を欠く。別の実施形態において、本発明のクロストリジウムH_Nペプチドはクロストリジウム神経毒素のC末端ペプチド部分全体(H_{CC})を欠き、それゆえに、天然のクロストリジウム神経毒素のH_C結合機能を欠く。例として、1つの実施形態において、クロストリジウムH_Nペプチドは、クロストリジウム神経毒素重鎖のC末端165アミノ酸残基、又はC末端170アミノ酸残基、又はC末端175アミノ酸残基、又はC末端180アミノ酸残基、又はC末端185アミノ酸残基、又はC末端190アミノ酸残基、又はC末端195アミノ酸残基を欠く。更なる例として、本発明のクロストリジウムH_Nペプチドは、以下からなる群から選択されるクロストリジウムH_{CC}参照配列を欠く:

ボツリヌスA型神経毒素-アミノ酸残基(Y1111-L1296)
ボツリヌスB型神経毒素-アミノ酸残基(Y1098-E1291)
ボツリヌスC型神経毒素-アミノ酸残基(Y1112-E1291)
ボツリヌスD型神経毒素-アミノ酸残基(Y1099-E1276)
ボツリヌスE型神経毒素-アミノ酸残基(Y1086-K1252)
ボツリヌスF型神経毒素-アミノ酸残基(Y1106-E1274)
ボツリヌスG型神経毒素-アミノ酸残基(Y1106-E1297)
破傷風神経毒素-アミノ酸残基(Y1128-D1315)。

【0074】

軽微な変動が血清型サブタイプに従って生じ得るので、上で同定されている参照配列はガイドと考えられるべきである。

【0075】

他の実施形態において、H_Cドメインの断片は、本明細書に記載されるH_{CC}ペプチドを含み得る。

【0076】

本発明のポリペプチドは、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素L鎖並びにクロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_Nドメイン)及び/又はクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含み得る。例えば、ポリペプチドは、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素L鎖及びクロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_N)を含み得る。

【0077】

触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素L鎖及び転位置ドメインを含む好適なポリペプチドが本明細書に記載される。

【0078】

クロストリジウム神経毒素L鎖及び転位置ドメインを含むポリペプチドは、配列番号4、20、28、36、又は75のいずれか1つに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得るが、ただし、L鎖は触媒的に不活性である(例えば、L鎖は改変によって不活性化されている)。1つにおいて、クロストリジウム神経毒素L鎖及び転位置ドメインを含むポリペプチドは、配列番号4、20、28、36、又は75のいずれか1つに対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み、ただし、L鎖は触媒的に不活性である(例えば、L鎖は改変によって不活性化されている)。好ましくは、クロストリジウム神経毒素L鎖及び転位置ドメインを含むポリペプチドは、L鎖を触媒的に不活性化するように改変されている配列番号4、20、28、36、又は75のいずれか1つ、例えば配列番号75を含むポリペプチド配列を含む(より好ましくはそれからなる)。

【0079】

クロストリジウム神経毒素L鎖及び転位置ドメインを含む(又はそれからなる)ポリペプチドは、配列番号3、19、27、又は35のいずれか1つに対して少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるものであり得るが、ただし、L鎖は触媒的に不活性である(例えば、L鎖は改変によって不活性化されている)。1つの実施形態にお

いて、クロストリジウム神経毒素L鎖及び転位置ドメインを含む(又はそれからなる)ポリペプチドは、配列番号3、19、27、又は35のいずれか1つに対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるものであり、ただし、L鎖は触媒的に不活性である(例えば、L鎖は改変によって不活性化されている)。好ましくは、クロストリジウム神経毒素L鎖及び転位置ドメインを含む(又はそれからなる)ポリペプチドは、コードされるL鎖を触媒的に不活性化するように改変されている配列番号3、19、27、又は35のいずれか1つを含むヌクレオチド配列によってコードされるものである。

【0080】

好ましくは、ポリペプチドは、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素L鎖、クロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_N ドメイン)、及びクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C ドメイン)を含む。

10

【0081】

1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、クロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C)又は少なくともクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメインのC末端部分(H_{CC})を含まない。それゆえに、1つの実施形態において、本発明のポリペプチドはクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメインのC末端部分(H_{CC})を欠く。有利には、かかるポリペプチドは内在性のクロストリジウム神経毒素受容体結合能を欠き、それゆえに、前記のポリペプチドを投与された対象においてより少ないオフターゲット効果を見せ得る。

【0082】

20

本発明のポリペプチドは、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素軽鎖(L鎖)、クロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_N ドメイン)、及び/又はクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C ドメイン)から本質的になり得る。例えば、ポリペプチドは、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素L鎖及びクロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_N)から本質的になり得る。

【0083】

好ましくは、ポリペプチドは、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素L鎖、クロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_N ドメイン)、及びクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C ドメイン)から本質的になる。

【0084】

30

この文脈において用いられる用語「から本質的になる」は、ポリペプチドが、例えば対象に投与されたときに追加の機能性をポリペプチドに授ける1つ以上のアミノ酸残基を更に含まないということの意味する。換言すると、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素軽鎖(L鎖)、クロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_N ドメイン)、及び/又はクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C ドメイン)「から本質的になる」ポリペプチドは、更に1つ以上のアミノ酸残基を(触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素軽鎖(L鎖)、クロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_N ドメイン)、及び/又はクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C ドメイン)のものに)含み得るが、前記の1つ以上の更なるアミノ酸残基は、例えば対象に投与されたときに追加の機能性をポリペプチドに授けない。追加の機能性は、何らかの酵素活性、結合活性、及び/又はいずれかの生理活性を包含し得る。

40

【0085】

本発明のポリペプチドは、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素軽鎖(L鎖)、クロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_N ドメイン)、及び/又はクロストリジウム神経毒素受容体結合ドメイン(H_C ドメイン)からなり得る。例えば、ポリペプチドは、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素L鎖及びクロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_N)からなり得る。

【0086】

好ましくは、ポリペプチドは、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素L鎖、クロストリジウム神経毒素転位置ドメイン(H_N ドメイン)、及びクロストリジウム神経毒素受容

50

体結合ドメイン(H_Cドメイン)からなる。

【0087】

1つの実施形態において、非クロストリジウム神経毒素配列(クロストリジウム神経毒素ではない配列)が(例えば疼痛を処置するための)その治療上の効果を達成するポリペプチドの能力を遮断しない限り、ポリペプチドは、いずれかのクロストリジウム神経毒素配列に加えて非クロストリジウム神経毒素配列を含み得る。好ましくは、非クロストリジウム神経毒素配列は、触媒活性、例えば酵素活性を有するものではない。1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、触媒的に活性なドメイン(例えば非クロストリジウムの触媒的に活性なドメイン)を含まない。1つの実施形態において、非クロストリジウムの配列は、細胞の受容体に結合するものではない。換言すると、1つの実施形態において、非クロストリジウムの配列は細胞の受容体にとってのリガンドではない。細胞の受容体は、膜内在性タンパク質などのタンパク質性の細胞の受容体であり得る。細胞の受容体の例は、https://www.guidetopharmacology.org/download.jsp#db_reportsで利用可能なIUPHAR薬理学ガイドデータベース・バージョン2019.4(IUPHAR Guide to Pharmacology Database, version 2019.4)に見出され得る。非クロストリジウム神経毒素配列は、Hisタグなどの精製を補助するためのタグを包含し得る。1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、標識、又は標識を追加するための部位、例えばソルターゼアクセプター又はドナー部位を含まない。

10

【0088】

好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドは、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素L鎖、H_Nドメイン、及び/又はH_Cドメインに追加の治療薬剤又は診断薬剤(例えば核酸、タンパク質、ペプチド、又は低分子治療薬剤若しくは診断薬剤)を含まない。例えば、1つの実施形態において、ポリペプチドは、共有結合的に又は非共有結合的に結びつけられた治療薬剤又は診断薬剤を含まない場合がある。それゆえに、本発明のポリペプチドは、好ましくは、更なる治療薬剤又は診断薬剤のための送達基剤としては機能しない。

20

【0089】

本発明のポリペプチドは、下で記載されるものを包含するがこれらに限定されない改変されたクロストリジウム神経毒素若しくはその誘導体、又は改変されたクロストリジウム神経毒素断片若しくは誘導体断片を含み(又はそれからなり)得るが、ただし、存在するいずれかのL鎖は触媒的に不活性である。改変されたクロストリジウム神経毒素若しくは誘導体(又は改変されたクロストリジウム神経毒素断片若しくは誘導体断片)は、クロストリジウム神経毒素(若しくはクロストリジウム神経毒素断片)の天然の(未改変の)形態と比較して改変されている1つ以上のアミノ酸を含有し得るか、又はクロストリジウム神経毒素(又はクロストリジウム神経毒素断片)の天然の(未改変の)形態には存在しない1つ以上の挿入されたアミノ酸を含有し得る。例として、改変されたクロストリジウム神経毒素(又はクロストリジウム神経毒素断片)は、天然の(未改変の)クロストリジウム神経毒素配列(又はクロストリジウム神経毒素断片)に対して相対的に、改変されたアミノ酸配列を1つ以上のドメイン上に有し得る。かかる改変は毒素(又は毒素断片)の機能的な側面を改変し得る。それゆえに、1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、改変されたクロストリジウム神経毒素、又は改変されたクロストリジウム神経毒素誘導体、又はクロストリジウム神経毒素誘導体、又は改変されたクロストリジウム神経毒素断片若しくは誘導体断片(例えば、触媒的に不活性なL鎖、H_Nドメイン、及び/又はH_Cドメイン)であるか又はそれを含み、ただし、存在するいずれかのL鎖は触媒的に不活性である。

30

40

【0090】

本発明のポリペプチドは、重鎖のアミノ酸配列上に1つ以上の改変を有する改変されたクロストリジウム神経毒素又はクロストリジウム神経毒素断片(例えばH_Cドメイン)(例えば改変されたH_Cドメイン)を含み(又はそれからなり)得て、ここで、前記の改変された重鎖は天然の(未改変の)クロストリジウム神経毒素又はクロストリジウム神経毒素断片よりも高い又は低い親和性で標的神経細胞に結合し、ただし、存在するいずれかのL鎖は触媒的に不活性である。H_Cドメイン上のかかる改変は、標的神経細胞のガングリオシド受容体

50

及び/又はタンパク質受容体に対する結合を変調させるH_Cドメインのガングリオシド結合部位又はタンパク質(SV2又はシナプトタグミン)結合部位上の残基を改変することを包含し得る。かかる改変されたクロストリジウム神経毒素の例はWO 2006/027207及びWO 2006/114308に記載されている。これらの両方はそれらの全体が参照によってここに組み込まれる。

【0091】

改変されたクロストリジウム神経毒素(又はクロストリジウム神経毒素断片)は、クロストリジウム神経毒素の等電点を増大させる1つ以上の改変を、前記の1つ以上の改変を欠く同等の未改変のクロストリジウム神経毒素(又はクロストリジウム神経毒素断片)と比較した時に含むものであり得るが、ただし、存在するいずれかのL鎖は触媒的に不活性である。好適な改変されたクロストリジウム神経毒素(ただし、存在するいずれかのL鎖は触媒的に不活性であるように改変されている)は、下で並びに参照によって本明細書に組み込まれるWO 2015/004461 A1及びWO 2016/110662 A1に記載されている。例示的な配列は本明細書に記載される配列番号42及び62を包含する。

【0092】

1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、改変されたBoNT/A又はその断片(例えばBoNT/AのH_Cドメイン又はその断片)を含み得る。改変されたBoNT/A又はその断片は、ASN886、ASN905、GLN915、ASN918、GLU920、ASN930、ASN954、SER955、GLN991、GLU992、GLN995、ASN1006、ASN1025、ASN1026、ASN1032、ASN1043、ASN1046、ASN1052、ASP1058、HIS1064、ASN1080、GLU1081、GLU1083、ASP1086、ASN1188、ASP1213、GLY1215、ASN1216、GLN1229、ASN1242、ASN1243、SER1274、及びTHR1277から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数又は複数)に改変を含むものであり得る。

【0093】

改変は、配列番号2として示される触媒的に不活性なBoNT/Aと比較したときの改変であり得て、ここで、アミノ酸残基付番は配列番号2とのアライメントによって決定される。配列番号2(及び本明細書に記載される改変されたBoNT/Aポリペプチド又はそれらの断片に対応する配列番号)の位置1におけるメチオニン残基の存在は随意であるので、当業者はアミノ酸残基付番を決定するときにメチオニン残基の存在/不在を考慮に入れるであろう。例えば、配列番号2がメチオニンを包含する場合には、位置付番は上で定められている通りであろう(例えばASN886は配列番号2のASN886であろう)。代替的には、メチオニンが配列番号2に存在しない場合には、アミノ酸残基付番は-1だけ修正されるべきである(例えばASN886は配列番号2のASN885になるであろう)。本明細書に記載される他のポリペプチド配列の位置1のメチオニンが存在する/存在しないときには、類似の考えが適用され、当業者は当分野の慣例的な技術を用いて正しいアミノ酸残基付番を難なく決定するであろう。

【0094】

アミノ酸残基付番を決定するための本明細書に記載されるアライメントは、配列相同性及び/又は%の配列同一性を決定するための本明細書に記載される方法のいずれかを用いて実施され得る。

【0095】

上の改変について示されているアミノ酸残基(単数又は複数)は表面露出アミノ酸残基(単数又は複数)である。

【0096】

改変されたBoNT/A又はその断片は、ASN886、ASN930、ASN954、SER955、GLN991、ASN1025、ASN1026、ASN1052、ASN1188、ASP1213、GLY1215、ASN1216、GLN1229、ASN1242、ASN1243、SER1274、及びTHR1277から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数又は複数)に改変を含み得る。

【0097】

用語「1つ以上のアミノ酸残基(単数又は複数)」は、改変されたBoNT/A又はその断片の

文脈において用いられるときに、好ましくは、示されているアミノ酸残基(単数又は複数)の少なくとも2、3、4、5、6、又は7つを意味する。それゆえに、改変されたBoNT/A又はその断片は、示されているアミノ酸残基(単数又は複数)に少なくとも2、3、4、5、6、又は7つの(好ましくは7つの)改変を含み得る。改変されたBoNT/A又はその断片は1~30、3~20、又は5~10個のアミノ酸改変を含み得る。より好ましくは、用語「1つ以上のアミノ酸残基(単数又は複数)」は、改変されたBoNT/A又はその断片の文脈において用いられるときに、示されているアミノ酸残基(単数又は複数)の全てを意味する。

【0098】

好ましくは、示されているアミノ酸残基(単数又は複数)における1つ以上のアミノ酸改変(単数又は複数)以外には、改変されたBoNT/A又はその断片は配列番号2と比較したときにいずれかの更なるアミノ酸改変を含有しない。

【0099】

改変は以下から選択され得る:

- i. 塩基性のアミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;
- ii. 非荷電アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;
- iii. 塩基性のアミノ酸残基による非荷電の表面露出アミノ酸残基の置換;
- iv. 塩基性のアミノ酸残基の挿入;及び
- v. 酸性の表面露出アミノ酸残基の欠失。

【0100】

上で示されている改変は、対応する未改変のBoNT/A又はその断片と比較したときに、増大した正の表面電荷及び増大した等電点を有する改変されたBoNT/A又はその断片をもたらす。

【0101】

等電点(pI)は所与のタンパク質の特異的な特性である。当分野において周知である通り、タンパク質はアミノ酸(タンパク質上有的时候はアミノ酸残基ともまた言われる)の特定の配列から作られる。20の標準的なセットの各アミノ酸は異なる側鎖(又はR基)を有し、タンパク質上の各アミノ酸残基が異なる化学的特性、例えば電荷及び疎水性を呈するということを意味する。これらの特性は、取り巻く化学的環境、例えば温度及びpHによって影響され得る。タンパク質の総体的な化学的特徴はこれらの種々の因子の総計に依存するであろう。

【0102】

ある種のアミノ酸残基(下で詳述される)は、取り巻くpHに依存して電荷を呈し得るイオン化可能な側鎖を所有する。かかる側鎖が所与のpHにおいて荷電しているか否かは該当するイオン化可能な部分のpKaに依存し、ここで、pKaは、共役塩基からの所定のプロトンについての酸解離定数(Ka)の負の対数である。

【0103】

例えば、アスパラギン酸及びグルタミン酸などの酸性の残基は、およそ4.1のpKa値を有する側鎖カルボン酸基を有する(精確なpKa値は温度、イオン強度、及びイオン化可能な基の微小環境に依存し得る)。それゆえに、これらの側鎖は7.4のpH(多くの場合には「生理的pH」と言われる)において負電荷を見せる。低いpH値においては、これらの側鎖はプロトン化され、それらの電荷を失うであろう。

【0104】

逆に、リジン及びアルギニンなどの塩基性の残基はおよそ10~12のpKa値を有する窒素含有側鎖基を有する。よって、これらの側鎖は7.4のpHにおいては正電荷を見せる。これらの側鎖は高いpH値においては脱プロトン化されて、それらの電荷を失うであろう。

【0105】

よって、タンパク質分子の総体的な(正味)電荷は、タンパク質上に存在する酸性及び塩基性の残基の数(並びにそれらの表面露出の度合い)、並びに取り巻くpHに依存する。取り巻くpHを変化させることは、タンパク質上の総体的な電荷を変化させる。従って、タンパク質毎に、正及び負電荷の数が等しく、タンパク質が総体的な正味電荷を呈さない所与の

10

20

30

40

50

pHがある。この点は等電点(pI)として公知である。等電点はタンパク質生化学における標準的な概念であり、当業者はこれに精通しているであろう。

【0106】

よって、等電点(pI)は、タンパク質がゼロの正味電荷を呈するpH値として定められる。pIの増大は、より高いpH値が、タンパク質がゼロの正味電荷を呈するために要求されるということを意味する。それゆえに、pIの増大は所与のpHにおけるタンパク質の正味正電荷の増大を表している。逆に、pIの減少は、より低いpH値が、タンパク質がゼロの正味電荷を呈するために要求されるということを意味する。それゆえに、pIの減少は所与のpHにおけるタンパク質の正味正電荷の減少を表している。

【0107】

タンパク質のpIを決定する方法は当分野において公知であり、当業者はこれに精通しているであろう。例として、タンパク質のpIはタンパク質上に存在する各アミノ酸の平均pKa値から計算され得る(「計算上のpI」)。かかる計算は、当分野において公知のコンピュータプログラム、例えばExPASyからのCompute-pI/MWツール(https://web.expasy.org/compute_pi/)を用いて行なわれ得る。これは本発明に従ってpIを計算するための好ましい方法である。異なる分子間のpI値の比較は、同じ計算技術/プログラムを用いてなされるべきである。

【0108】

適当な場合には、タンパク質の計算上のpIは、等電点電気泳動の技術を用いて実験的に確認され得る(「観察上のpI」)。この技術は電気泳動を用いてタンパク質をそれらのpIに従って分離する。等電点電気泳動は、典型的には、固定化されたpH勾配を有するゲルを用いて行なわれる。電場が印加されるときに、タンパク質は、ゼロの正味電荷を有するpHに達するまでpH勾配中を泳動する。この点がタンパク質のpIである。等電点電気泳動によって提供される結果は典型的には性質が比較的低下分解能であり、それゆえに、本発明者らは、計算上のpI(上に記載されている通り)によって提供される結果は使用により適当であると思料する。

【0109】

本明細書においては、別様に申し立てられない限り、「pI」は「計算上のpI」を意味する。

【0110】

タンパク質のpIは、その表面上に呈される塩基性及び/又は酸性基の数を変調させることによって増大又は減少し得る。これはタンパク質の1つ以上のアミノ酸を改変することによって達成され得る。例えば、pIの増大は、酸性残基数を縮減することによって又は塩基性残基数を増大させることによって提供され得る。

【0111】

本発明の改変されたBoNT/A又はその断片は、触媒的に不活性なBoNT/A(例えば配列番号2)又はその断片のものよりも少なくとも0.2、0.4、0.5、又は1pI単位高いpI値を有し得る。好ましくは、改変されたBoNT/A又はその断片は、少なくとも6.6、例えば少なくとも6.8のpIを有し得る。

【0112】

20個の標準アミノ酸の特性は下表において示されている:

10

20

30

40

50

【表 A】

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

【0113】

以下のアミノ酸は荷電アミノ酸と考えられる:アスパラギン酸(負)、グルタミン酸(負)、アルギニン(正)、及びリジン(正)。

【0114】

7.4のpHにおいては、アスパラギン酸(pKa3.1)及びグルタミン酸(pKa4.1)の側鎖は負電荷を有し、アルギニン(pKa12.5)及びリジン(pKa10.8)の側鎖は正電荷を有する。アスパラギン酸及びグルタミン酸は酸性アミノ酸残基と言われる。アルギニン及びリジンは塩基性アミノ酸残基と言われる。

【0115】

10

20

30

40

50

以下のアミノ酸は非荷電の極性の(それらが水素結合に関与し得るということを意味する)アミノ酸と考えられる:アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、メチオニン、及びトリプトファン。

【0116】

以下のアミノ酸は非荷電の疎水性アミノ酸と考えられる:アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、プロリン、及びグリシン。

【0117】

アミノ酸挿入では、追加のアミノ酸残基(正常では存在しないもの)がBoNT/Aポリペプチド配列又はその断片上に組み込まれ、それゆえに、前記の配列上のアミノ酸残基の総数を増大させる。アミノ酸欠失では、アミノ酸残基がクロストリジウム毒素アミノ酸配列から除去され、それゆえに、前記の配列上のアミノ酸残基の総数を縮減する。

【0118】

好ましくは、改変は置換であり、これは有利には同じ数のアミノ酸残基を改変されたBoNT/A又はその断片上に維持する。アミノ酸置換では、BoNT/Aポリペプチド配列又はその断片の一部を形成するアミノ酸残基が、異なるアミノ酸残基によって置き換えられる。置き換えアミノ酸残基は、上に記載されている20個の標準アミノ酸の1つであり得る。代替的には、アミノ酸置換の置き換えアミノ酸は非標準アミノ酸(上に記載されている20個の標準的なセットの一部ではないアミノ酸)であり得る。例として、置き換えアミノ酸は、塩基性の非標準アミノ酸、例えばL-オルニチン、L-2-アミノ-3-グアニジノプロピオン酸、又はリジン、アルギニン、及びオルニチンのD異性体であり得る)。タンパク質上に非標準アミノ酸を導入するための方法は当分野において公知であり、E.coli栄養要求性発現ホストを用いる組み換えタンパク質合成を包含する。

【0119】

1つの実施形態において、置換は、塩基性のアミノ酸残基による酸性のアミノ酸残基の置換、非荷電アミノ酸残基による酸性のアミノ酸残基の置換、及び塩基性のアミノ酸残基による非荷電アミノ酸残基の置換から選択される。置換が非荷電アミノ酸残基による酸性のアミノ酸残基の置換である1つの実施形態において、酸性のアミノ酸残基はその対応する非荷電アミノ酸残基によって置き換えられる(すなわちアスパラギン酸はアスパラギンによって置き換えられ、グルタミン酸はグルタミンによって置き換えられる)。

【0120】

好ましくは、塩基性のアミノ酸残基はリジン残基又はアルギニン残基である。換言すると、置換はリジン又はアルギニンによる置換である。最も好ましくは、改変はリジンによる置換である。

【0121】

好ましくは、本発明に使用するための改変されたBoNT/A又はその断片は、クロストリジウム毒素HCNDメイン上に位置付けられる4~40個のアミノ酸改変を含む。前記の改変されたBoNT/A又はその断片は、好ましくは少なくとも6.6のpIをもた有する。前記の改変されたBoNT/Aは、好ましくは、ASN886、ASN930、ASN954、SER955、GLN991、ASN1025、ASN1026、及びASN1052から選択される少なくとも4つのアミノ酸の改変を含む、ここで、前記の改変はリジン残基又はアルギニン残基によるアミノ酸の置換を含む。例えば、前記の改変されたBoNT/A又はその断片は、以下から選択される少なくとも5つのアミノ酸の改変を含み得る。ASN886、ASN930、ASN954、SER955、GLN991、ASN1025、ASN1026、ASN1052、及びGLN1229、ここで、前記の改変はリジン残基又はアルギニン残基によるアミノ酸の置換を含む。

【0122】

アミノ酸残基の置換、挿入、又は欠失によってタンパク質を改変するための方法は当分野において公知である。例として、アミノ酸改変は、ポリペプチドをコードする(例えば、未改変のBoNT/A又はその断片をコードする)DNA配列の改変によって導入され得る。これは標準的な分子クローニング技術を用いて達成され得る。例えば、所望のアミノ酸(単数又は複数)をコードするDNAの短いストランド(オリゴヌクレオチド)が用いられてポリメラー

10

20

30

40

50

ゼ酵素を用いて元々のコード配列を置き換える部位特異的変異導入によるか、又は種々の酵素(例えばリガーゼ及び制限エンドヌクレアーゼ)によって遺伝子の一部を挿入/欠失することによる。代替的には、改変された遺伝子配列が化学合成され得る。

【0123】

1つの実施形態において、本発明に従う用途のためのポリペプチドは、配列番号42に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列、及び/又は配列番号41に対して少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド配列を含む。1つの実施形態において、本発明に従う用途のためのポリペプチドは、配列番号42に対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。好ましくは、本発明に従う用途のためのポリペプチドは配列番号42として示されるポリペプチド配列を含む。1つの実施形態において、本発明に従う用途のためのポリペプチドは、配列番号41に対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド配列を含む。好ましくは、本発明に従う用途のためのポリペプチドは、配列番号41として示されるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド配列を含む。

10

【0124】

1つの実施形態において、本発明に従う用途のためのポリペプチドは、配列番号62に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。1つの実施形態において、本発明に従う用途のためのポリペプチドは、配列番号62に対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。好ましくは、本発明に従う用途のためのポリペプチドは、配列番号62として示されるポリペプチド配列を含む(より好ましくはそれからなる)。

20

【0125】

配列番号42は改変されたBoNT/A断片の例であり、配列番号62は触媒的に不活性である改変されたBoNT/Aポリペプチドの例である。かかる改変されたBoNT/Aポリペプチド及び断片は、本発明における使用にとって特に好ましい。配列番号42及び62として示されるポリペプチドは、野生型BoNT/Aと比較したときにいくつものアミノ酸改変(例えば置換)を有し、これらはポリペプチドの等電点を増大させる。理論によって拘束されることを欲することなしに、増大した正味の正電荷がポリペプチド及びアニオン性の細胞外コンポーネントの間の静電的相互作用を促進し、それによってポリペプチド及び細胞表面の間の結合を促進し、それゆえに投与の部位における保持及び/又は作用持続時間を増大させると思料される。それゆえに、配列番号42及び62を用いる処置は、前記の改変を欠く同等のポリペプチドと比較して改善されるであろうということが想定される。

30

【0126】

1つの実施形態において、配列番号42若しくは62に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む及び/又は配列番号41に対して少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド配列を含むポリペプチドは、位置930、955、991、1026、1052、1229、及び886の1つ以上(好ましくは2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、又は6つ以上、より好ましくは全てに)に置換を含む。

40

【0127】

好ましくは、配列番号42若しくは62に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む及び/又は配列番号41に対して少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド配列を含むポリペプチドは、リジン又はアルギニン(より好ましくはリジン)を位置930、955、991、1026、1052、1229、及び886の1つ以上に含む。1つの実施形態において、ポリペプチドは、リジン又はアルギニン(より好ましくはリジン)を位置930、955、991、1026、1052、1229、及び886の少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、又は全てに含む。最も好ましくは、ポリペプチドはリジン又はアルギニン(より好ましくはリジン)を位置930、955、991、1026、1052、1229、及び886の全てに含む。

50

【0128】

1つの実施形態において、本発明に使用するためのクロストリジウム神経毒素H_Cドメインは、改変されたBoNT/AのH_Cドメインであり、Y1117、F1252、H1253、及びL1278から選択される1つ以上のアミノ酸残基の改変を含む。例えば、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは、Y1117V、F1252Y、H1253K、及びL1278F又はL1278Hの改変の1つ以上(好ましくは2つ以上)を含み得る。

【0129】

1つの実施形態において、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは、Y1117V及びH1253K、又はY1117V、F1252Y、H1253K、及びL1278F、又はY1117V、F1252Y、H1253K、及びL1278Hの改変を含む。

【0130】

好ましくは、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは、Y1117V及びH1253K、又はY1117V、F1252Y、H1253K、及びL1278Hの改変を含む。

【0131】

改変は、配列番号2として示される触媒的に不活性なBoNT/Aと比較したときの改変であり得て、ここで、アミノ酸残基付番は配列番号2とのアライメントによって決定される。配列番号2の位置1におけるメチオニン残基の存在は随意であるので、当業者はアミノ酸残基付番を決定するときにメチオニン残基の存在/不在を考慮に入れるであろう。例えば、配列番号2がメチオニンを包含する場合には、位置付番は上で定められている通りであろう(例えばY1117は配列番号2のY1117とアライメントするであろう)。代替的には、メチオニンが配列番号2に存在しない場合には、アミノ酸残基付番は-1だけ修正されるべきである(例えばY1117は配列番号2のY1116とアライメントするであろう)。本明細書に記載される他のポリペプチド配列の位置1のメチオニンが存在する/存在しないときには、類似の考えが適用され、当業者は当分野の慣例的な技術を用いて正しいアミノ酸残基付番を難なく決定するであろう。

【0132】

改変されたBoNT/AのH_Cドメインは、配列番号46、48、又は50のいずれか1つに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得るが、ただし、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは上に記載されている改変を含む。1つの実施形態において、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは、配列番号46、48、又は50のいずれか1つに対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み、ただし、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは上に記載されている改変を含む。1つの実施形態において、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは、配列番号46、48、又は50のいずれか1つに対して少なくとも99%又は99.9%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み、ただし、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは上に記載されている改変を含む。好ましくは、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは、配列番号46、48、又は50のいずれか1つを含むポリペプチド配列を含む(より好ましくはそれからなる)。

【0133】

改変されたBoNT/AのH_Cドメインは、配列番号46又は50のいずれか1つに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得るが、ただし、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは上に記載されている改変を含む。1つの実施形態において、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは、配列番号46又は50のいずれか1つに対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み、ただし、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは上に記載されている改変を含む。1つの実施形態において、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは、配列番号46又は50のいずれか1つに対して少なくとも99%又は99.9%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み、ただし、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは上に記載されている改変を含む。好ましくは、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは、配列番号46又は50のいずれか1つを含むポリペプチド配列を含む(より好ましくはそれからなる)。

【0134】

改変されたBoNT/AのH_Cドメインは、配列番号45、47、又は49のいずれか1つに対して少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるものであり得るが、ただし、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは上に記載されている改変を含む。1つの実施形態において、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは、配列番号45、47、又は49のいずれか1つに対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるものであり、ただし、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは上に記載されている改変を含む。1つの実施形態において、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは、配列番号45、47、又は49のいずれか1つに対して少なくとも99%又は99.9%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるものであり、ただし、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは上に記載されている改変を含む。好ましくは、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは、配列番号45、47、又は49のいずれか1つによってコードされるものである。

【0135】

改変されたBoNT/AのH_Cドメインは、配列番号45又は49のいずれか1つに対して少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるものであり得るが、ただし、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは上に記載されている改変を含む。1つの実施形態において、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは、配列番号45又は49のいずれか1つに対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるものであり、ただし、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは上に記載されている改変を含む。1つの実施形態において、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは、配列番号45又は49のいずれか1つに対して少なくとも99%又は99.9%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるものであり、ただし、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは上に記載されている改変を含む。好ましくは、改変されたBoNT/AのH_Cドメインは、配列番号45又は49のいずれか1つによってコードされるものである。

【0136】

本発明のポリペプチドは、ハイブリッド若しくはキメラクロストリジウム神経毒素(又はハイブリッド若しくはキメラクロストリジウム神経毒素の断片)を含み(又はそれからなり)得るが、ただし、L鎖は触媒的に不活性である(存在するとき)。ハイブリッドクロストリジウム神経毒素は、1つのクロストリジウム神経毒素又はそのサブタイプからの軽鎖の少なくともある部分と、別のクロストリジウム神経毒素又はクロストリジウム神経毒素サブタイプからの重鎖の少なくともある部分とを含む。1つの実施形態において、ハイブリッドクロストリジウム神経毒素は、1つのクロストリジウム神経毒素サブタイプからの軽鎖の軽鎖全体と、別のクロストリジウム神経毒素サブタイプからの重鎖とを含有し得るが、ただし、L鎖は触媒的に不活性である(存在するとき)。別の実施形態において、キメラクロストリジウム神経毒素は、1つのクロストリジウム神経毒素サブタイプの重鎖のある部分(例えば結合ドメイン)を含有し、重鎖の別の部分は別のクロストリジウム神経毒素サブタイプ由来であり得る。類似に又は代替的には、治療薬要素は、異なるクロストリジウム神経毒素からの軽鎖部分を含み得るが、ただし、L鎖は触媒的に不活性である(存在するとき)。かかるハイブリッド又はキメラクロストリジウム神経毒素は、例えば、かかるクロストリジウム神経毒素の治療上の利益を、所与のクロストリジウム神経毒素サブタイプに対して免疫学的に耐性である患者に、所与のクロストリジウム神経毒素重鎖結合ドメインの受容体の平均よりも低い濃度を有し得る患者に、又は膜若しくは小胞毒素基質(例えばSNAP-25、VAMP、及びシンタキシン)のプロテアーゼ耐性変異体を有し得る患者に送達する手段として、有用である。ハイブリッド及びキメラクロストリジウム神経毒素はUS 8,071,110に記載されている。この公開はその全体が参照によってここに組み込まれる。それゆえに、1つの実施形態において、本発明のポリペプチドはハイブリッドクロストリジウム神経毒素又はキメラクロストリジウム神経毒素であるか又はそれを含み、ただし、L鎖は触媒的に不活性である。

【0137】

特に好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドは、触媒的に不活性なBoNT/A

の軽鎖及び転位置ドメイン(LH_Nドメイン)と、BoNT/B受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)又はその部分を含む(好ましくはそれからなる)キメラクロストリジウム神経毒素であり得る。好適なキメラ及び/又はハイブリッドクロストリジウム神経毒素は、参照によって本明細書に組み込まれるWO 2017/191315 A1において教示されているものであり得るが、ただし、L鎖は触媒的に不活性である(例えば、改変によって不活性化されている)。かかる好ましい配列は配列番号44及び61を包含する。

【0138】

触媒的に不活性なBoNT/AのLH_Nドメインは、共有結合的にBoNT/BのH_Cドメインに連結され得る。前記のキメラBoNT/Aは本明細書においては「BoNT/AB」又は「BoNT/ABキメラ」ともまた言われる。

【0139】

LH_NドメインのC末端アミノ酸残基は、BoNT/AのLH_N及びH_Cドメインを分離する3₁₀ヘリックスの第1のアミノ酸残基に対応し得る。H_CドメインのN末端アミノ酸残基は、BoNT/BのLH_N及びH_Cドメインを分離する3₁₀ヘリックスの第2のアミノ酸残基に対応し得る。

【0140】

本明細書において、「BoNT/AのLH_N及びH_Cドメインを分離する3₁₀ヘリックスの第1のアミノ酸残基」と言うことは、LH_N及びH_Cドメインを分離する3₁₀ヘリックスのN末端残基を意味する。

【0141】

本明細書において、「BoNT/BのLH_N及びH_Cドメインを分離する3₁₀ヘリックスの第2のアミノ酸残基」と言うことは、LH_N及びH_Cドメインを分離する3₁₀ヘリックスのN末端残基の以下のアミノ酸残基を意味する。

【0142】

「3₁₀ヘリックス」は、αヘリックス、βシート、及びリバースターンと併せてタンパク質及びポリペプチド上に見出される二次構造の型である。3₁₀ヘリックス上のアミノ酸は右巻きのらせん構造で配置され、ここで、各ターン全長は、3つの残基と、それらの間の分子間水素結合を分離する10個の原子とによって完成する。各アミノ酸は、ヘリックス上の120°のターン(すなわち、ヘリックスはターンあたり3つの残基を有する)と、らせん軸に沿った2.0 Å (=0.2nm)の並進とに対応し、水素結合を作ることによって形成される環上に10個の原子を有する。最も重要なことに、アミノ酸のN-H基は3残基前のアミノ酸のC=O基との水素結合を形成する。この繰り返しのi+3→i水素結合が3₁₀ヘリックスを定める。3₁₀ヘリックスは構造生物学における標準的な概念であり、当業者はこれに精通する。

【0143】

この3₁₀ヘリックスは、実際のヘリックスを形成する4つの残基と、これらの4つの残基の各端に1つずつある2つのキャップ(又は接続)残基とに対応する。本明細書において用いられる用語「LH_N及びH_Cドメインを分離する3₁₀ヘリックス」はそれらの6残基からなる。

【0144】

構造分析及び配列アライメントを実施することによって、LH_N及びH_Cドメインを分離する3₁₀ヘリックスが同定された。この3₁₀ヘリックスは、そのN末端においては(すなわちLH_NドメインのC末端部においては)αヘリックスによって、そのC末端においては(すなわちH_CドメインのN末端部においては)βストランドによって取り巻かれている。3₁₀ヘリックスの第1の(N末端)残基(キャップ又は接続残基)もまたこのαヘリックスのC末端残基に対応する。

【0145】

LH_N及びH_Cドメインを分離する3₁₀ヘリックスは、例えば、ボツリヌス神経毒素の公に利用可能な結晶構造、例えば3BTA(<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3BTA>)及び1EPW(<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1EPW>)からそれぞれボツリヌス神経毒素A1及びB1について決定され得る。

【0146】

公に利用可能であるインシリコモデリング及びアライメントツールもまた、他の神経毒素上のLH_N及びH_Cドメインを分離する3₁₀ヘリックスの位置付けを決定するために用いられ得る。例えば、相同性モデリングサーバーLOOPP(ラーニング・オブザービング・アンド・アウトプット・プロテインパターンズ(Learning, Observing and Outputting Protein Patterns)、<http://loopp.org>)、PHYRE(プロテインホモロジー/アナロジー・リコグニションエンジン(Protein Homology/analogY Recognition Engine)、<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>)、及びRosetta(<https://www.rosettacommons.org/>)、タンパク質重ね合わせサーバーSuperPose(<http://wishart.biology.ualberta.ca/superpose/>)、アライメントプログラムClustalオメガ(<http://www.clustal.org/omega/>)、並びにインターネットリソース・フォー・モレキュラーアンドセルバイオロジスト(Internet Resources for Molecular and Cell Biologists)に列記されているいくつかの他のツール/サービス(<http://molbiol-tools.ca/>)である。特に、「H_N/H_{CN}」接続部の周りの領域は構造的に高度に保存され、これは、それを異なる複数の血清型を重ね合わせるための理想的な領域にする。

【0147】

例えば、以下の方法論が、他の神経毒素上のこの3₁₀ヘリックスの配列を決定するために用いられ得る:

1. 構造相同性モデリングツールLOOPP(<http://loopp.org>)が、BoNT/A1結晶構造(3BTA.pdb)に基づいて他のBoNT血清型の予測される構造を得るために用いられた;
2. それゆえに得られた構造(pdb)ファイルは、H_{CN}ドメインのN末端の端及びその前の約80残基(これらはH_Nドメインの一部である)のみを包含し、それによって、構造的に高度に保存されている「H_N/H_{CN}」領域を保持するように編集された;
3. タンパク質重ね合わせサーバーSuperPose(<http://wishart.biology.ualberta.ca/superpose/>)が、各血清型を3BTA.pdb構造上に重ね合わせるために用いられた;
4. 重ね合わせられたpdbファイルは、BoNT/A1のH_Cドメインの始めの3₁₀ヘリックスを位置付けるために検分され、それから、他の血清型における対応する残基が同定された;
5. 他のBoNT血清型配列は、対応する残基が正しかったということをチェックするためにClustalオメガによってアライメントされた。

【0148】

この方法によって決定されたLH_N、H_C、及び3₁₀ヘリックスドメインの例が下で提示される:

10

20

30

40

50

【表 B】

神経毒素	アクセッション番号 (プラス小数点の後に 配列バージョン)	LH _N	H _C	3 ₁₀ ヘリックス
触媒的に不 活 性 な BoNT/A1 (配列番号 2)	N/A	1-872	873-1296	⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷
BoNT/A2	X73423.3	1-872	873-1296	⁸⁷² NIVNTS ⁸⁷⁷
BoNT/A3	DQ185900.1 (別 名 Q3LRX9.1)	1-872	873-1292	⁸⁷² NIVNTS ⁸⁷⁷
BoNT/A4	EU341307.1 (別 名 Q3LRX8.1)	1-872	873-1296	⁸⁷² NITNAS ⁸⁷⁷
BoNT/A5	EU679004.1 (別 名 C1IPK2.1)	1-872	873-1296	⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷
BoNT/A6	FJ981696.1	1-872	873-1296	⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷
BoNT/A7	JQ954969.1 (別 名 K4LN57.1)	1-872	873-1296	⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷
BoNT/A8	KM233166.1	1-872	873-1297	⁸⁷² NITNTS ⁸⁷⁷
BoNT/B1 (a.k.a. 配列 番号 52)	B1INP5.1	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴
BoNT/B2	AB084152.1 (別 名 Q8GR96.1)	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴
BoNT/B3	EF028400.1 (別 名 A2I2S2.1)	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴
BoNT/B4	EF051570.1 (別 名 A2I2W0.1)	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴
BoNT/B5	EF033130.1 (別 名 A2I2U6.1)	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ DILNNI ⁸⁶⁴
BoNT/B6	AB302852.1 (別 名 A8R089.1)	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴
BoNT/B7	JQ354985.1 (別 名 H9CNK9.1)	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴
BoNT/B8	JQ964806.1 (別 名 I6Z8G9.1)	1-859	860-1292	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴

【0149】

構造分析及び配列アライメントを用いて、LH_N及びH_Cドメインを分離する3₁₀ヘリックスの後のβストランドは、全てのボツリヌス及び破傷風神経毒素において保存された構造であり、LH_N及びH_Cドメインを分離する3₁₀ヘリックスの第1の残基から始めるときには第8の残基において(例えば、BoNT/A1では残基879において)始まるということが見出された。

【0150】

BoNT/ABキメラは、BoNT/BからのH_Cドメインに共有結合的に連結されたBoNT/AからのLH_Nドメイン(触媒的に不活性なL鎖を有する)を含み得て、

- ここで、LH_NドメインのC末端アミノ酸残基は、BoNT/AのH_Cドメインの開始(N末)に位置付けられたβストランドのN末端の第8のアミノ酸残基に対応し、

- ここで、H_CドメインのN末端アミノ酸残基は、BoNT/BのH_Cドメインの開始(N末)に位置付けられたβストランドのN末端の第7のアミノ酸残基に対応する。

【0151】

BoNT/ABキメラは、BoNT/BからのH_Cドメインに共有結合的に連結されたBoNT/AからのLH_Nドメイン(触媒的に不活性なL鎖を有する)を含み得て、

- ここで、LH_NドメインのC末端アミノ酸残基は、BoNT/AのLH_Nドメインの終わり(C末)に位置付けられたαヘリックスのC末端アミノ酸残基に対応し、

- ここで、H_CドメインのN末端アミノ酸残基は、BoNT/BのLH_Nドメインの終わり(C末)に位置付けられたαヘリックスのC末端アミノ酸残基の直ちにC末端のアミノ酸残基に対応する。

【0152】

BoNT/ABキメラの設計プロセスの原理は、二次構造が毀損されないということを保証し、それによって三次構造のいずれかの変化を最小化しようと努力することであった。理論によって拘束されることを欲することなしに、BoNT/ABキメラ上の3₁₀ヘリックスの4つの中心的なアミノ酸残基を遮断しないことにより、キメラ神経毒素にとって最適な立体配座を保証するということが仮定される。

【0153】

BoNT/Aからの触媒的に不活性なLH_Nドメインは、配列番号2若しくは61のアミノ酸残基1から872、又はそれに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。BoNT/Aからの触媒的に不活性なLH_Nドメインは、配列番号2若しくは61のアミノ酸残基1から872、又はそれに対して少なくとも80%、90%、若しくは95%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。好ましくは、BoNT/Aからの触媒的に不活性なLH_Nドメインは配列番号2又は61のアミノ酸残基1から872に対応する。

【0154】

BoNT/BからのH_Cドメインは、配列番号52のアミノ酸残基860から1291、又はそれに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。BoNT/BからのH_Cドメインは、配列番号52のアミノ酸残基860から1291、又はそれに対して少なくとも80%、90%、若しくは95%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。好ましくは、BoNT/BからのH_Cドメインは配列番号52のアミノ酸残基860から1291に対応する。

【0155】

好ましくは、触媒的に不活性なLH_NドメインはBoNT/A(配列番号2又は61)のアミノ酸残基1から872に対応し、H_CドメインはBoNT/B(配列番号52)のアミノ酸残基860から1291に対応する。

【0156】

好ましくは、BoNT/BのH_Cドメインは、更に、少なくとも1つのアミノ酸残基置換、追加、又は欠失をH_{CC}サブドメイン上に含み、これは、天然BoNT/B配列と比較して、ヒトSytIIに対するBoNT/B神経毒素の結合親和性を増大させる効果を有する。BoNT/BのH_{CC}サブドメイン上の好適なアミノ酸残基置換、追加、又は欠失はWO 2013/180799及びWO 2016/154534に開示されている(両方とも参照によって本明細書に組み込まれる)。

【0157】

BoNT/BのH_{CC}サブドメイン上の好適なアミノ酸残基置換、追加、又は欠失は、V1118M、Y1183M、E1191M、E1191I、E1191Q、E1191T、S1199Y、S1199F、S1199L、S1201V、E1191C、E1191V、E1191L、E1191Y、S1199W、S1199E、S1199H、W1178Y、W1178Q、W1178A、W1178S、Y1183C、Y1183P、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される置換変異を包含する。

【0158】

BoNT/BのH_{CC}サブドメイン上の好適なアミノ酸残基置換、追加、又は欠失は、更に、E

10

20

30

40

50

1191M及びS1199L、E1191M及びS1199Y、E1191M及びS1199F、E1191Q及びS1199L、E1191Q及びS1199Y、E1191Q及びS1199F、E1191M及びS1199W、E1191M及びW1178Q、E1191C及びS1199W、E1191C及びS1199Y、E1191C及びW1178Q、E1191Q及びS1199W、E1191V及びS1199W、E1191V及びS1199Y、又はE1191V及びW1178Qからなる群から選択される2つの置換変異の組み合わせを包含する。

【0159】

BoNT/BのH_{CC}サブドメイン上の好適なアミノ酸残基置換、追加、又は欠失は、E1191M、S1199W、及びW1178Qである3つの置換変異の組み合わせをもまた包含する。

【0160】

好ましくは、BoNT/BのH_{CC}サブドメイン上の好適なアミノ酸残基置換、追加、又は欠失は、E1191M及びS1199Yである2つの置換変異の組み合わせを包含する。

【0161】

改変は、配列番号52として示される未改変のBoNT/Bと比較したときの改変であり得て、ここで、アミノ酸残基付番は配列番号52とのアライメントによって決定される。配列番号52の位置1におけるメチオニン残基の存在は随意であるので、当業者はアミノ酸残基付番を決定するときにメチオニン残基の存在/不在を考慮に入れるであろう。例えば、配列番号52がメチオニンを包含する場合には、位置付番は上で定められている通りであろう(例えばE1191は配列番号52のE1191であろう)。代替的には、メチオニンが配列番号52に存在しない場合には、アミノ酸残基付番は-1だけ修正されるべきである(例えばE1191は配列番号52のE1190となるであろう)。本明細書に記載される他のポリペプチド配列の位置1のメチオニンが存在する/存在しないときには、類似の考えが適用され、当業者は当分野の慣例的な技術を用いて正しいアミノ酸残基付番を難なく決定するであろう。

【0162】

1つの実施形態において、本発明に従う用途のためのポリペプチドは、配列番号61に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。1つの実施形態において、本発明に従う用途のためのポリペプチドは、配列番号61に対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。好ましくは、本発明に従う用途のためのポリペプチドは、配列番号61として示されるポリペプチド配列を含む(より好ましくはそれからなる)。

【0163】

本発明に使用するためのキメラ及び/又はハイブリッドクロストリジウム神経毒素は、BoNT/Aポリペプチドのある部分とBoNT/Bポリペプチドのある部分とを含み得る。この例は、配列番号44として本明細書に記載されるポリペプチドを包含する。

【0164】

1つの実施形態において、本発明に従う用途のためのポリペプチドは、配列番号44に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列、及び/又は配列番号43に対して少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド配列を含む。1つの実施形態において、本発明に従う用途のためのポリペプチドは、配列番号44に対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。好ましくは、本発明に従う用途のためのポリペプチドは、配列番号44として示されるポリペプチド配列を含む。1つの実施形態において、本発明に従う用途のためのポリペプチドは、配列番号43に対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド配列を含む。好ましくは、本発明に従う用途のためのポリペプチドは、配列番号43として示されるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド配列を含む。

【0165】

好適なキメラクロストリジウム神経毒素はBoNT/FAを包含し得るが、ただし、存在するいずれかのL鎖は触媒的に不活性である。それゆえに、本発明のポリペプチドはBoNT/FA又はその断片を含み得るが、ただし、存在するいずれかのL鎖は触媒的に不活性である。BoNT/FAの触媒的に不活性な形態は配列番号26及び34として本明細書に記載される。BoN

10

20

30

40

50

T/FAの好適な断片もまた配列番号28、30、及び32として本明細書に記載される。

【0166】

別の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドは、触媒的に不活性なBoNT/Xの軽鎖及び転位置ドメイン(LH_Nドメイン)と、異なる(すなわち非BoNT/X)クロストリジウム神経毒素からの受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)又はその部分とを含むキメラクロストリジウム神経毒素であり得る。好適なキメラ及び/又はハイブリッドクロストリジウム神経毒素は、参照によって本明細書に組み込まれるWO 2020/065336 A1で教示されているものであり得るが、ただし、L鎖は触媒的に不活性である(例えば、改変によって不活性化されている)。かかる好ましい配列は、本明細書に記載される配列番号63~70を包含する。

10

【0167】

キメラクロストリジウム神経毒素は、触媒的に不活性なBoNT/Xの軽鎖及び転位置ドメイン(LH_Nドメイン)、並びに以下を含み得る:

- (i) BoNT/A受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)若しくはその部分;又は
- (ii) BoNT/B受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)若しくはその部分;又は
- (iii) BoNT/C受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)若しくはその部分;又は
- (iv) BoNT/D受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)若しくはその部分;又は
- (v) BoNT/E受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)若しくはその部分;又は
- (vi) BoNT/F受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)若しくはその部分;又は
- (vii) BoNT/G受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)若しくはその部分;又は
- (viii) TeNT受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)若しくはその部分。

20

【0168】

1つの実施形態において、異なる(すなわち非BoNT/X)クロストリジウム神経毒素ドメインからの受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)又はその部分は、シナプトタグミンI及び/又はI(SytI/II)に結合するものであり得る。

【0169】

好ましくは、キメラクロストリジウム神経毒素は、触媒的に不活性なBoNT/Xの軽鎖及び転位置ドメイン(LH_Nドメイン)と、BoNT/Bの受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)又はその部分とを含み得る。

【0170】

触媒的に不活性なBoNT/Xの軽鎖及び転位置ドメイン(LH_Nドメイン)と、異なる(すなわち非BoNT/X)クロストリジウム神経毒素からの受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)又はその部分とを含むポリペプチドは、配列番号63~70のいずれか1つに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得る。1つの実施形態において、触媒的に不活性なBoNT/Xの軽鎖及び転位置ドメイン(LH_Nドメイン)と、異なる(すなわち非BoNT/X)クロストリジウム神経毒素からの受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)又はその部分とを含むポリペプチドは、配列番号63~70のいずれか1つに対して少なくとも80%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む。好ましくは、触媒的に不活性なBoNT/Xの軽鎖及び転位置ドメイン(LH_Nドメイン)と、異なる(すなわち非BoNT/X)クロストリジウム神経毒素からの受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)又はその部分とを含むポリペプチドは、配列番号63~70のいずれか1つ(より好ましくは、からなる)。それらのポリペプチドのうち、配列番号63~66が最も好ましい。

30

40

【0171】

触媒的に不活性なBoNT/Xの軽鎖及び転位置ドメイン(LH_Nドメイン)と、異なる(すなわち非BoNT/X)クロストリジウム神経毒素からの受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)又はその部分とを含むポリペプチドは、以下のN末端アミノ酸配列MGSを含み得る。配列番号63~66が前記のN末端アミノ酸配列を含有する場合には、前記の配列は随意である。1つの実施形態において、配列番号63~66はMGSとして示されるN末端アミノ酸配列を欠く。1つの実施形態において、配列番号63~66はMGSとして示されるN末端アミノ酸配列を含む。

【0172】

50

BoNT/Xからの触媒的に不活性なLH_Nドメインは、配列番号63のアミノ酸残基1から899、又はそれに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。BoNT/Xからの触媒的に不活性なLH_Nドメインは、配列番号63のアミノ酸残基1から899、又はそれに対して少なくとも80%、90%、若しくは95%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。好ましくは、BoNT/Xからの触媒的に不活性なLH_Nドメインは配列番号63のアミノ酸残基1から899に対応し得る。

【0173】

BoNT/Xからの触媒的に不活性なLH_Nドメインは、配列番号63のアミノ酸残基4から899、又はそれに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。BoNT/Xからの触媒的に不活性なLH_Nドメインは、配列番号63のアミノ酸残基4から899、又はそれに対して少なくとも80%、90%、若しくは95%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。好ましくは、BoNT/Xからの触媒的に不活性なLH_Nドメインは配列番号63のアミノ酸残基4から899に対応し得る。

10

【0174】

BoNT/Xからの触媒的に不活性なLH_Nドメインは、配列番号65のアミノ酸残基1から866、又はそれに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。BoNT/Xからの触媒的に不活性なLH_Nドメインは、配列番号65のアミノ酸残基1から866、又はそれに対して少なくとも80%、90%、若しくは95%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。好ましくは、BoNT/Xからの触媒的に不活性なLH_Nドメインは配列番号65のアミノ酸残基1から866に対応し得る。

20

【0175】

BoNT/Xからの触媒的に不活性なLH_Nドメインは、配列番号65のアミノ酸残基4から866、又はそれに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。BoNT/Xからの触媒的に不活性なLH_Nドメインは、配列番号65のアミノ酸残基4から866、又はそれに対して少なくとも80%、90%、若しくは95%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。好ましくは、BoNT/Xからの触媒的に不活性なLH_Nドメインは配列番号65のアミノ酸残基4から866に対応し得る。

【0176】

BoNT/BからのH_Cドメインは、配列番号52のアミノ酸残基860から1291、又はそれに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。BoNT/BからのH_Cドメインは、配列番号52のアミノ酸残基860から1291、又はそれに対して少なくとも80%、90%、若しくは95%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。好ましくは、BoNT/BからのH_Cドメインは配列番号52のアミノ酸残基860から1291に対応する。

30

【0177】

好ましくは、BoNT/BのH_Cドメインは、更に、少なくとも1つのアミノ酸残基置換、追加、又は欠失をH_{CC}サブドメイン上に含み、これは、天然BoNT/B配列と比較して、ヒトSytIIに対するBoNT/B神経毒素の結合親和性を増大させる効果を有する。BoNT/BのH_{CC}サブドメイン上の好適なアミノ酸残基置換、追加、又は欠失はWO 2013/180799及びWO 2016/154534に開示されている(両方とも参照によって本明細書に組み込まれる)。

40

【0178】

BoNT/BのH_{CC}サブドメイン上の好適なアミノ酸残基置換、追加、又は欠失は、V1118M、Y1183M、E1191M、E1191I、E1191Q、E1191T、S1199Y、S1199F、S1199L、S1201V、E1191C、E1191V、E1191L、E1191Y、S1199W、S1199E、S1199H、W1178Y、W1178Q、W1178A、W1178S、Y1183C、Y1183P、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される置換変異を包含する。

【0179】

BoNT/BのH_{CC}サブドメイン上の好適なアミノ酸残基置換、追加、又は欠失は、更に、E1191M及びS1199L、E1191M及びS1199Y、E1191M及びS1199F、E1191Q及びS1199L、E1191Q及びS1199Y、E1191Q及びS1199F、E1191M及びS1199W、E1191

50

M及びW1178Q、E1191C及びS1199W、E1191C及びS1199Y、E1191C及びW1178Q、E1191Q及びS1199W、E1191V及びS1199W、E1191V及びS1199Y、又はE1191V及びW1178Qからなる群から選択される2つの置換変異の組み合わせを包含する。

【0180】

BoNT/BのH_{CC}サブドメイン上の好適なアミノ酸残基置換、追加、又は欠失は、E1191M、S1199W、及びW1178Qである3つの置換変異の組み合わせをもまた包含する。

【0181】

好ましくは、BoNT/BのH_{CC}サブドメイン上の好適なアミノ酸残基置換、追加、又は欠失は、E1191M及びS1199Yである2つの置換変異の組み合わせを包含する。

【0182】

改変は、配列番号52として示される未改変のBoNT/Bと比較したときの改変であり得て、ここで、アミノ酸残基付番は配列番号52とのアライメントによって決定される。配列番号52の位置1におけるメチオニン残基の存在は随意であるので、当業者はアミノ酸残基付番を決定するときにメチオニン残基の存在/不在を考慮に入れるであろう。例えば、配列番号52がメチオニンを包含する場合には、位置付番は上で定められている通りであろう(例えばE1191は配列番号52のE1191であろう)。代替的には、メチオニンが配列番号52に存在しない場合には、アミノ酸残基付番は-1だけ修正されるべきである(例えばE1191は配列番号52のE1190になるであろう)。本明細書に記載される他のポリペプチド配列の位置1のメチオニンが存在する/存在しないときには、類似の考えが適用され、当業者は当分野の慣例的な技術を用いて正しいアミノ酸残基付番を難なく決定するであろう。

【0183】

BoNT/AからのH_Cドメインは、配列番号60のアミノ酸残基873から1296、又はそれに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。BoNT/AからのH_Cドメインは、配列番号60のアミノ酸残基873から1296、又はそれに対して少なくとも80%、90%、若しくは95%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。好ましくは、BoNT/BからのH_Cドメインは配列番号60のアミノ酸残基873から1296に対応する。

【0184】

1つの実施形態において、ポリペプチドが、炎症性障害の処置に使用するものである場合には、用いられるポリペプチドは、触媒的に不活性なBoNT/XのL鎖、BoNT/Xの転位置ドメイン(H_Nドメイン)、及びBoNT/Aの受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含まない。それゆえに、1つの実施形態において、ポリペプチドが炎症性障害の処置に使用するものである場合には、ポリペプチドは、触媒的に不活性なBoNT/XのL鎖、BoNT/Xの転位置ドメイン(H_Nドメイン)、及び(i)BoNT/Bの受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)、(ii)BoNT/Dの受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)、又は(iii)BoNT/Fの受容体結合(H_Cドメイン)を含み得る。

【0185】

同様に、1つの実施形態において、ポリペプチドが疼痛の処置に使用するものである場合には、用いられるポリペプチドは、触媒的に不活性なBoNT/XのL鎖、BoNT/Xの転位置ドメイン(H_Nドメイン)、及びBoNT/Aの受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含まない。それゆえに、1つの実施形態において、ポリペプチドが疼痛の処置に使用するものである場合には、ポリペプチドは、触媒的に不活性なBoNT/XのL鎖、BoNT/Xの転位置ドメイン(H_Nドメイン)、及び(i)BoNT/Bの受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)、(ii)BoNT/Dの受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)、又は(iii)BoNT/Fの受容体結合(H_Cドメイン)を含み得る。

【0186】

BoNT/DからのH_Cドメインは、配列番号54のアミノ酸残基865から1276、又はそれに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。BoNT/DからのH_Cドメインは、配列番号54のアミノ酸残基865から1276、又はそれに対して少なくとも80%、90%、若しくは95%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。好

10

20

30

40

50

ましくは、BoNT/DからのH_Cドメインは配列番号54のアミノ酸残基865から1276に対応する。

【0187】

BoNT/FからのH_Cドメインは、配列番号56のアミノ酸残基866から1278、又はそれに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。BoNT/FからのH_Cドメインは、配列番号56のアミノ酸残基866から1278、又はそれに対して少なくとも80%、90%、若しくは95%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。好ましくは、BoNT/FからのH_Cドメインは配列番号56のアミノ酸残基866から1278に対応し、位置1241におけるヒスチジンからリジンの置換(H1241K)を有する。

【0188】

好ましくは、キメラクロストリジウム神経毒素は、触媒的に不活性なBoNT/Xの軽鎖及び転位置ドメイン(LH_Nドメイン)並びに異なる(すなわち非BoNT/X)クロストリジウム神経毒素からの受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)又はその部分と、Cys-(Xaa)_a-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cys(配列番号71)とを含み(好ましくはそれからなり)得て、式中、a=1~10かつb=4~15である。配列番号71は、BoNT/C1活性化ループに基づく活性化ループコンセンサス配列である。

【0189】

その上、本発明のいずれかのポリペプチドはCys-(Xaa)_a-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cys(配列番号71)を含み得て、式中、a=1~10かつb=4~15である。前記の活性化ループは、好適には、本明細書に記載されるポリペプチド上に存在するクロストリジウム神経毒素L鎖及び/又は転位置ドメイン(H_Nドメイン)のどちらかに存在するいずれかの活性化ループ配列を置き換え得る。

【0190】

Xaa又はYaaは配列番号71の文脈において用いられるときにはいずれかのアミノ酸であり得る。位置Xaa及びYaaのアミノ酸数はそれぞれ文字「a」及び「b」によって示される。1つの実施形態において、「a」及び「b」は、活性化ループのタンパク分解性切断を可能にし、活性な二鎖クロストリジウム神経毒素を産むいずれかの整数であり得る。1つの実施形態において、「a」は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10である。1つの実施形態において、「b」は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15である。1つの実施形態において、「a」は≤12、≤11、≤10、≤9、≤8、≤7、≤6、≤5、又は≤4である。1つの実施形態において、「b」は≤20、≤19、≤18、≤17、≤16、≤15、≤14、≤13、≤12、≤11、≤10、又は≤9である。

【0191】

1つの実施形態において、「a」は1~12、例えば1~10である。好ましくは、「a」は1~7、例えば2~4である。より好ましくは、「a」は3である。1つの実施形態において、「b」は1~20、例えば4~15である。好ましくは、「b」は6~10である。より好ましくは、「b」は8である。

【0192】

Xaa又はYaaがアミノ酸の1つの型のみに限定されるということは意図されない。それゆえに、位置Xaaに存在する1つ以上の残基は独立して標準アミノ酸であるアスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、リジン、ヒスチジン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、メチオニン、トリプトファン、システイン、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、及びフェニルアラニンから選択され得る。位置Yaaに存在する1つ以上の残基は独立して標準アミノ酸であるアスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、リジン、ヒスチジン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、メチオニン、トリプトファン、システイン、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、及びフェニルアラニンから選択され得る。好ましくは、位置Yaaのアミノ酸(より好ましくは、配列番号71のArg残基の直ちにC末端)はプロリンではない。

【0193】

代替的には/加えて、位置Xaa又はYaaに存在する1つ以上の残基は、独立して非標準アミノ酸(上に記載されている20個の標準的なセットの一部ではないアミノ酸)から選択され得る。例として、非標準アミノ酸は、4-ヒドロキシプロリン、6-N-メチルリジン、2-アミノイソ酪酸、イソバリン、 α -メチルセリン、トランス-3-メチルプロリン、2,4-メタノプロリン、シス-4-ヒドロキシプロリン、トランス-4-ヒドロキシプロリン、N-メチルグリシン、アロスレオニン、メチルスレオニン、ヒドロキシエチルシステイン、ヒドロキシエチルホモシステイン、ニトログルタミン、ホモグルタミン、ピペコリン酸、tert-ロイシン、ノルバリン、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニン、L-オルニチン、L-2-アミノ-3-グアニジノプロピオン酸、又はリジン、アルギニン、及び/若しくはオルニチンのD異性体、並びに4-フルオロフェニルアラニンを包含し得る。非標準アミノ酸をタンパク質上に導入するための方法は当分野において公知であり、E.コリ栄養要求性発現ホストを用いる組み換えタンパク質合成を包含する。

10

【0194】

配列番号71に含まれる配列Ile-Asp/Glu-Gly-Argは、WO 2020/065336 A1において驚くべきことにエンテロキナーゼ(及び第Xa因子)によって認識されることが見出された部位を言う。前記の文献は、Ile-Asp/Glu-Gly-Argにおいて切断し、それによって二鎖ポリペプチドを生成するための好適な方法を記載している。好ましくは、配列はIle-Asp-Gly-Arg、例えばCys-(Xaa)_a-Ile-Asp-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cysである。エンテロキナーゼ及び第Xa因子は配列番号71のArgの直ちにC末端のペプチド結合(すなわちArg及びYaaの間のペプチド結合)を加水分解すると思料される。

20

【0195】

1つの実施形態において、配列番号71のIleの直ちにN末端のXaaのアミノ酸残基は、非荷電の疎水性アミノ酸、好ましくはアラニンである。いくつかの実施形態において、「a」は少なくとも2であり、Xaaは少なくともC末端の非荷電の極性アミノ酸とその直ちにN末端の荷電の塩基性アミノ酸とを含む。荷電の塩基性アミノ酸は好ましくはリジンである。それゆえに、「a」が少なくとも2である実施形態において、Xaaは少なくともLys-Alaを含み得て、ここで、Alaは配列番号71のIleの直ちにN末端である。

【0196】

1つの実施形態において、Xaaは配列HKAを含むか又はそれからなる。

【0197】

1つの実施形態において、配列番号71のArgの直ちにC末端のYaaのアミノ酸残基は、非荷電の極性アミノ酸、好ましくはセリンである。いくつかの実施形態において、「b」は少なくとも2であり、Yaaは少なくともN末端の非荷電の極性アミノ酸とその直ちにC末端の非荷電の疎水性アミノ酸とを含む。非荷電の疎水性アミノ酸は好ましくはロイシンである。それゆえに、「b」が少なくとも2である実施形態において、Yaaは少なくともSer-Leuを含み得て、ここで、Serは配列番号71のArgの直ちにC末端である。

30

【0198】

1つの実施形態において、Yaaは配列SLYNKTLDCを含むか又はそれからなる。

【0199】

いくつかの実施形態において、本明細書のポリペプチドは、配列番号72に対して少なくとも70%の配列同一性を有する活性化ループを含む。1つの実施形態において、本明細書のポリペプチドは、配列番号72に対して少なくとも80%、85%、又は90%の配列同一性を有する活性化ループを含む。好ましくは、本明細書のポリペプチドは配列番号72に対して少なくとも95%の配列同一性を有する活性化ループを含む。より好ましくは、本明細書のポリペプチドは配列番号72に対して少なくとも99%の配列同一性を有する活性化ループを含む。

40

【0200】

特に好ましい実施形態において、本明細書のポリペプチドは、配列番号72を含む、より好ましくは配列番号72からなる活性化ループを含む。

【0201】

50

活性化ループは、配列番号72の変異体、例えば、配列番号73、又はそれに対して少なくとも70%の配列同一性を有する配列でもまたあり得る。配列番号73は、エンテロキナーゼ認識部位IDGRがIEGRに変異している配列番号72の変異体である。1つの実施形態において、本明細書のポリペプチドは配列番号73に対して少なくとも70%の配列同一性を有する活性化ループを含む。1つの実施形態において、本明細書のポリペプチドは、配列番号73に対して少なくとも80%、85%、又は90%の配列同一性を有する活性化ループを含む。好ましくは、本明細書のポリペプチドは配列番号73に対して少なくとも95%の配列同一性を有する活性化ループを含む。より好ましくは、本明細書のポリペプチドは配列番号73に対して少なくとも99%の配列同一性を有する活性化ループを含む。

【0202】

特に好ましい実施形態において、本明細書のポリペプチドは、配列番号73を含む、より好ましくは配列番号73からなる活性化ループを含む。

【0203】

1つの実施形態において、本明細書に記載される活性化ループ(例えば配列番号71、72、又は73)は、追加の又は代替的なプロテアーゼ部位を包含するように改変され得る。例えば配列番号77として示されるプロテアーゼ部位である。かかる改変された活性化ループの例は配列番号78として示される。それゆえに、1つの実施形態において、本明細書のポリペプチドは配列番号78に対して少なくとも70%の配列同一性を有する活性化ループを含む。1つの実施形態において、本明細書のポリペプチドは、配列番号78に対して少なくとも80%、85%、又は90%の配列同一性を有する活性化ループを含む。好ましくは、本明細書のポリペプチドは配列番号78に対して少なくとも95%の配列同一性を有する活性化ループを含む。より好ましくは、本明細書のポリペプチドは配列番号78に対して少なくとも99%の配列同一性を有する活性化ループを含む。特に好ましい実施形態において、本明細書のポリペプチドは、配列番号78を含む、より好ましくは配列番号78からなる活性化ループを含む。

【0204】

1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、再標的化クロストリジウム神経毒素を含み(又はそれからなり)得るが、ただし、存在するいずれかのL鎖は触媒的に不活性である。再標的化クロストリジウム神経毒素では、クロストリジウム神経毒素は、標的化部分(TM)として公知の外來性のリガンドを包含するように改変される。TMは所望の標的細胞に対する結合特異性を提供するように選択され、再標的化プロセスの一部として、クロストリジウム神経毒素の天然の結合部分(例えばH_Cドメイン又はH_{CC}ドメイン)は除去され得る。再標的化テクノロジーは例えば、EP-B-0689459、WO 1994/021300、EP-B-0939818、US 6,461,617、US 7,192,596、WO 1998/007864、EP-B-0826051、US 5,989,545、US 6,395,513、US 6,962,703、WO 1996/033273、EP-B-0996468、US 7,052,702、WO 1999/017806、EP-B-1107794、US 6,632,440、WO 2000/010598、WO 2001/21213、WO 2006/059093、WO 2000/62814、WO 2000/04926、WO 1993/15766、WO 2000/61192、及びWO 1999/58571に記載されており、これらの全ては全体が参照によってここに組み込まれる。それゆえに、1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、再標的化クロストリジウム神経毒素であり、ただし、存在するいずれかのL鎖は触媒的に不活性である。本発明のポリペプチドは、クロストリジウム神経毒素の機能的なH_Cドメインを欠きかつ如何なる機能的に同等のTMをもまた欠き得る。

【0205】

本明細書に記載されるポリペプチドが精製のためのタグ(例えばHisタグ)及び/又はリンカーを有する実施形態では、前記のタグ及び/又はリンカーは随意である。

【0206】

本発明のポリペプチドは、天然に生起するクロストリジウム神経毒素複合体に存在する複合体化タンパク質を不含であり得る。

【0207】

10

20

30

40

50

本発明のポリペプチドは組み換え核酸テクノロジーを用いて生成され得る。それゆえに、1つの実施形態において、ポリペプチド(上に記載されている通り)は組み換えポリペプチドである。

【0208】

1つの実施形態においては、ポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸(例えばDNA)が提供される。1つの実施形態において、核酸配列はプロモーター及びターミネーターを含むDNAベクターの一部として調製される。核酸配列は本明細書に記載される核酸配列のいずれかから選択され得る。

【0209】

好ましい実施形態において、ベクターは以下から選択され得るプロモーターを有する:

プロモーター / 誘導薬剤 / 典型的な誘導条件

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

AraBAD / L-アラビノース / 0.2%(0.002~0.4%)

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

【0210】

別の好ましい実施形態において、ベクターは以下から選択されるプロモーターを有する:

プロモーター / 誘導薬剤 / 典型的な誘導条件

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

AraBAD / L-アラビノース / 0.2%(0.002~0.4%)

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

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

【0211】

核酸分子は、当分野において公知のいずれかの好適なプロセスを用いて作られ得る。それゆえに、核酸分子は化学合成技術を用いて作られ得る。代替的には、本発明の核酸分子は分子生物学技術を用いて作られ得る。

【0212】

本発明のDNAコンストラクトは好ましくはインシリコで設計され、それから従来のDNA合成技術によって合成される。

【0213】

上で言及されている核酸配列情報は、採用されるべきである最終的な宿主細胞(例えばE.コリ)発現系に従うコドンバイアスのために随意に改変される。

【0214】

用語「ヌクレオチド配列」及び「核酸」は本明細書においては同義的に用いられる。好ましくはヌクレオチド配列はDNA配列である。

【0215】

本発明のポリペプチド(とりわけ、そのいずれかのクロストリジウム神経毒素部分)は単鎖として又は二鎖として存在し得る。しかしながら、ポリペプチドは二鎖として存在し、これにおいては触媒的に不活性なL鎖がジスルフィド結合を介してH鎖(又はそのコンポーネント、例えばH_Nドメイン)に連結されるということが好ましい。

【0216】

本発明は、触媒的に不活性な軽鎖と重鎖とを有する単鎖ポリペプチドを生成する方法を提供し、方法は、本明細書に記載される核酸を発現宿主において発現すること、宿主細胞をリシスして単鎖ポリペプチドを含有する宿主細胞ホモジネートを提供すること、及び単鎖ポリペプチドを単離することを含む。1つの態様において、本発明は、本明細書に記載されるポリペプチドをタンパク分解性にプロセッシングする方法を提供し、方法は、ポリペプチドの活性化ループ上のペプチド結合を加水分解するプロテアーゼとポリペプチドを接触させることを含み、それによって、(単鎖)ポリペプチドを対応する二鎖ポリペプチドに変換する(例えば、ここで、触媒的に不活性な軽鎖及び重鎖はジスルフィド結合によって一緒に繋がれる)。

【0217】

よって、本発明は本発明の方法によって得られ得る二鎖ポリペプチドを提供する。

【0218】

本明細書において用いられる「対象」は、哺乳動物、例えばヒト又は他の哺乳動物であり得る。好ましくは、「対象」はヒト対象を意味する。

【0219】

本明細書において用いられる用語「障害」は「疾患」をもまた包摂する。1つの実施形態において、障害は疾患である。

【0220】

本明細書において用いられる用語「処置する」又は「処置すること」は、予防上の処置(例えば障害[例えば疼痛]の発生を防止するための)及び矯正的な処置(障害[例えば疼痛]を既に患っている対象の処置)を包摂する。好ましくは、本明細書において用いられる「処置する」又は「処置すること」は矯正的な処置を意味する。

10

【0221】

本明細書において用いられる用語「処置する」又は「処置すること」は障害(例えば疼痛)及び/又はその症状を言う。

【0222】

よって、本発明のポリペプチドは治療上有効な量又は予防上有効な量で対象に投与され得る。好ましくは、本発明のポリペプチドは治療上有効な量で対象に投与される。

【0223】

「治療上有効な量」は、前記の障害(例えば疼痛)(又はその症状)を処置するために対象に単独で又は別の薬剤と組み合わせて投与されるときに、障害又はその症状のかかる処置を実現するために十分であるポリペプチドのいずれかの量である。

20

【0224】

「予防上有効な量」は、対象に単独で又は別の薬剤と組み合わせて投与されるときに、障害(例えば疼痛)(又はその症状)の発生又は再発を阻害又は遅延させるポリペプチドのいずれかの量である。いくつかの実施形態において、予防上有効な量は、障害(例えば疼痛)の発生又は再発を全く防止する。発生を「阻害する」は、障害の発生(例えばここで障害は疼痛である)(若しくはその症状)の蓋然性を減らすこと、又は発生を全く防止することどちらかを意味する。

【0225】

本発明のポリペプチドは、対象への投与のためのいずれかの好適な様式で、例えば医薬組成物の一部として製剤され得る。それゆえに、1つの態様において、本発明は、本発明のポリペプチドと薬学的に許容される担体、賦形剤、アジュバント、プロペラント、及び/又は塩とを含む医薬組成物を提供する。

30

【0226】

本発明のポリペプチドは、経口、非経口、連続輸注、吸入、又は外用のために製剤され得る。注射にとって好適な組成物は、溶液、懸濁液、若しくはエマルション、又は使用に先立って好適な基剤中に溶解若しくは懸濁される乾燥粉末の形態であり得る。

【0227】

局所送達されるべきであるポリペプチドのケースでは、ポリペプチドは、クリームとして(例えば外用のために)又は真皮下注射のために製剤され得る。

40

【0228】

局所送達手段は、エアロゾル又は他のスプレー(例えばネブライザー)を包含し得る。これについて、ポリペプチドのエアロゾル製剤は肺並びに/或いは他の鼻腔及び/又は気管支若しくは気道への送達を可能化する。

【0229】

本発明のポリペプチドは、冒された臓器の神経支配に関わる脊髄分節のレベルで、脊柱における髄腔内又は硬膜外注射によって、患者に投与され得る。

【0230】

投与経路は腹腔鏡下の及び/又は局在化した注射によってであり得る。1つの実施形態に

50

において、本発明のポリペプチドは、処置されるべき部位又はその近くにおいて、好ましくは処置されるべき部位において投与される。例えば、ポリペプチドは髄腔内又は脊髄内投与され得る。1つの実施形態において、本発明のポリペプチドの投与経路は神経周囲、神経内、脊髄内、及び/又は髄腔内であり得る。

【0231】

1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは末梢投与され得る。1つの実施形態において、ポリペプチドは真皮内、皮下、又は筋肉内投与され得る。好ましくは、本発明のポリペプチドは真皮内投与される。

【0232】

本発明のポリペプチドの投与のための投与量範囲は、所望の治療上の及び/又は予防上の効果を生成するべきものである。要求される投与量範囲は、クロストリジウム神経毒素又は組成物の精確な性質、投与経路、製剤の性質、対象の年齢、対象の状態の性質、程度、又は重症度、何らかの禁忌、及び担当医の判断に依存するということは了解されるであろう。これらの投与量レベルのバリエーションは、最適化のための標準的な経験的な慣例を用いて調整され得る。

【0233】

1つの実施形態において、ポリペプチドの投与量は一定用量である。一定用量は、50pgから250 μ g、好ましくは100pgから100 μ gの範囲であり得る。1つの実施形態において、一定用量は少なくとも50pg、100pg、500pg、1ng、50ng、100ng、500ng、1 μ g、又は50 μ gであり得る。前記の用量は単一の一定用量であり得る。

【0234】

好ましい実施形態において、ポリペプチドは250 μ g超の量で投薬され得る。1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、500 μ g、1mg、10mg、100mg、500mg、1g、又は5g超の量で投薬され得る。1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、10g、5g、1g、500mg、100mg、10mg、又は1mgに等しいか又は未満の量で投薬され得る。好ましくは、本発明のポリペプチドは、251 μ gから10g、251 μ gから5g、251 μ gから1g、251 μ gから500mg、251 μ gから100mg、251 μ gから10mg、又は251 μ gから1000 μ g、例えば251 μ gから500 μ gの量で投薬される。1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、500 μ gから5g、例えば1mgから1g又は1gから3gの量で投薬される。これは本発明のポリペプチドの非毒性の(例えば実質的に非毒性の)性質によって可能になる。

【0235】

流体剤形は、典型的には、ポリペプチド及びパイロジェンフリーの無菌の基剤を利用して調製される。クロストリジウム神経毒素は、用いられる基剤及び濃度に依存して、基剤中に溶解され得るか又は懸濁され得るかどちらかである。溶液を調製することにおいては、ポリペプチドは基剤中に溶解され得て、溶液は、必要な場合には塩化ナトリウムの追加によって等張にされ、好適な無菌バイアル又はアンプルへの充填及び密封の前に、無菌技術を用いて無菌フィルターによる濾過によって滅菌される。代替的には、溶液の安定性が充分である場合には、その密封された容器中の溶液はオートクレーブによって滅菌され得る。有利には、添加剤、例えば緩衝剤、可溶化剤、安定化剤、保存料若しくは殺菌剤、懸濁剤若しくは乳化剤、及び/又は局所麻酔剤が基剤中に溶解され得る。

【0236】

使用に先立って好適な基剤中に溶解又は懸濁される乾燥粉末は、無菌エリアにおいて無菌技術を用いて無菌容器中に予め滅菌された成分を充填することによって調製され得る。代替的には、成分は、無菌エリアにおいて無菌技術を用いて好適な容器中に溶解され得る。それから、生成物はフリーズドライされ、容器は無菌的に密封される。

【0237】

本明細書に記載される投与経路にとって好適な非経口懸濁液は、無菌のコンポーネントが溶解される代わりに無菌基剤中に懸濁され、滅菌が濾過によって達成され得ないということを例外として、実質的に同じ様式で調製される。コンポーネントは無菌状態で分離さ

10

20

30

40

50

れ得るか、又は代替的にはそれは単離後に例えばガンマ照射によって滅菌され得る。

【0238】

有利には、懸濁剤、例えばポリビニルピロリドンが組成物(単数又は複数)中に包含されて、コンポーネントの様な分布を促進する。

【0239】

本発明に従う投与は、微粒子カプセル化又は高圧エアロゾル衝撃を包含する種々の送達テクノロジーを活用し得る。

【0240】

本発明のポリペプチドは好ましくは処置レジメンの一部として反復投与される(例えば最高で5、10、15、又は20回まで)。反復投与は、少なくとも2回、例えば少なくとも5、10、15、又は20回の投与を意味する。それゆえに、1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは対象を処置するために(例えば対象の疼痛を処置するために)2回以上投与され得る。これは、継続中の処置が典型的には必要である慢性の疼痛などの慢性の状態の処置に特に当てはまる。1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、毎週、月2回、毎月、2ヶ月毎、6ヶ月毎、又は毎年、好ましくは少なくとも年2回又は毎年投与され得る。1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは10年、5年、2年、又は1年の期間に2回以上投与される。好ましくは、本発明のポリペプチドは1年の期間に2回以上投与される。処置は少なくとも6ヶ月、1年、2年、3年、5年、10年、15年、20年、25年、又は30年連続し得る。

【0241】

ポリペプチドは、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素L鎖、H_Nドメイン、及び/又はH_Cドメインに追加の更なる治療又は診断薬剤(例えば核酸、タンパク質、ペプチド、又は低分子治療若しくは診断薬剤)と一緒に投与されないということが好ましい。例えば、1つの実施形態において、ポリペプチドは更なる鎮痛薬及び/又は抗炎症薬と共に投与されない。1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、共有結合的に結びつけられた治療薬剤と一緒に投与されない。1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、非共有結合的に結びつけられた治療薬剤と一緒に投与されない。

【0242】

本明細書に記載されるポリペプチドは、1つ以上の種類の疼痛を患う対象を処置するために用いられ得る。疼痛は慢性又は急性の疼痛であり得る。疼痛は、侵害受容性疼痛、ニューロパチー性疼痛、混合性疼痛、及び未知の起源の疼痛の4つのカテゴリーの疼痛から選択される1つ以上であり得る。侵害受容性疼痛は、侵害受容器(疼痛受容体)に対する公知の侵害刺激によって引き起こされ得て、体性又は内臓性であり得る。ニューロパチー性疼痛は、神経系の原発性の病変又は機能障害によって開始されるか又は引き起こされる疼痛であり得る。混合性疼痛は侵害受容性疼痛及びニューロパチー性疼痛の組み合わせであり得る。

【0243】

本発明によって処置される疼痛の(例えば慢性の疼痛の)例は、ニューロパチー性疼痛、炎症性疼痛、頭痛の疼痛、体性痛、内臓痛、関連痛、アロディニア、混合性疼痛、及び術後疼痛を包含する。

【0244】

ここで用いられる用語「疼痛」は、通常は身体的な障害に関連するいずれかの不快な感覚経験を意味する。身体的な障害は臨床医に明らかであるか又はそうでない場合がある。疼痛は慢性及び急性の2種類である。「急性の疼痛」は、突発性の発生を有する短い持続時間の疼痛である。急性の疼痛の1つの型は、例えば皮膚又は他の表在組織の傷害によって感じられる皮膚痛であり、例えば切創又は熱傷によって引き起こされる。皮膚侵害受容器は皮膚の直下を終末とし、神経末端の高い濃度を原因として、短い持続時間のはっきりした局在化した疼痛を生成する。「慢性の疼痛」は急性の疼痛以外の疼痛である。

【0245】

本発明のポリペプチドは、以下のニューロパチー性疼痛状態のいずれかによって引き起

こされるか又は別様に関連する疼痛を処置するために用いられ得る。「ニューロパチー性疼痛」は、不快感をもたらす末梢神経系、中枢神経系、又は両方からの異常な感覚入力を意味する。ニューロパチー性疼痛の症状には、遷延性の特発痛、及びアロディニア(正常では有痛性ではない刺激に対する有痛性の応答)、痛覚過敏(軽度の不快感のみを通常は引き起こす有痛性刺激、例えばピンプリックに対する強調された応答)、又は痛感過敏(短い不快感が長期の重度の疼痛になる)が関わり得る。ニューロパチー性疼痛は以下のいずれかによって引き起こされ得る:

1. 外傷性の攻撃、例えば、例えば神経圧迫傷害(例えば神経挫滅、神経伸張、神経絞扼、又は不完全な神経トランスセクション)、脊髄傷害(例えば、脊髄ヘミセクション)、四肢切断、挫創、炎症(例えば、脊髄の炎症)、又は外科術。
2. 例えば卒中及び心臓麻痺を包含する虚血性事象。
3. 感染性因子。
4. 例えば、薬物、アルコール、重金属(例えば鉛、ヒ素、水銀)、工業用の薬剤(例えば溶剤、接着剤からの蒸気)、又は亜酸化窒素を包含する毒性の薬剤に対する暴露。
5. 例えば、炎症性障害、新生物性の腫瘍、後天性免疫不全症候群(AIDS)、ライム病、レプロシー、代謝性疾患、神経腫のような末梢神経障害、モノニューロパチー、又はポリニューロパチーを包含する疾患。

【0246】

ニューロパチー性疼痛の型は次を包含する:

【0247】

1. 神経痛

【0248】

神経痛は、通常は神経構造のいずれかの明白な病理学的変化なしに、1つ以上の特定の神経のコースに沿って広がる疼痛である。神経痛の原因は様々である。化学的な痛痒、炎症、外傷(手術を包含する)、近傍の構造(例えば腫瘍)による圧迫、及び感染は全て神経痛に至り得る。しかしながら、多くのケースでは、原因は未知又は同定不可能である。神経痛は高齢者において最も普通であるが、それはいずれかの年齢において生起し得る。神経痛は、限定なしに、三叉神経痛、帯状疱疹後(post-herpetic)神経痛、帯状疱疹後(postherpetic)神経痛、舌咽神経痛、坐骨神経痛、及び非定型顔面痛を包含する。

【0249】

神経痛は、ある神経(単数又は複数)の分布における疼痛である。例は、三叉神経痛、非定型顔面痛、及び帯状疱疹後神経痛(シングルス又はヘルペスによって引き起こされる)である。冒される神経は、顎から額までの顔面のエリアにおける接触、温度、及び圧力を感じ覚することを担う。障害は、一般的に、通常は2分未満のかつ顔面の1つの側面のみの激しい疼痛の短いエピソードを引き起こす。疼痛は「刺すような」、「鋭い」、「雷のような」、「灼熱性」、及び更には「ムズムズ」などの種々のやり方で記載され得る。TNの非定型形態では、疼痛は重度又は単にうずきとしてもまた発症し、延長された期間に渡って続き得る。TNに関連する疼痛は、経験され得る最も激しい疼痛の1つとして認識される。

【0250】

単純な刺激、例えば摂食、発話、洗顔、又はいずれかの軽い接触若しくは感覚(更には微風の感覚)は、発作の誘因となり得る。発作は群発で又は孤立した発作として生起し得る。

【0251】

症状は、各エピソードについて同じ位置付けで、通常は体の表面又はその近くのどこかに位置付けられる鋭い刺すような疼痛又は絶え間ない灼熱性の疼痛、特定の神経の軌道上の疼痛、疼痛を原因とする冒された体の一部の損なわれた機能、又は随伴する運動神経損傷を原因とする筋力低下、冒された皮膚のエリアの皮膚の増大した感受性又はしびれ(ノボカイン注射などの局所麻酔に類似の感じ)を包含し、いずれかの接触又は圧力は疼痛として解釈される。動きもまた有痛であり得る。

【0252】

三叉神経痛は神経痛の最も普通の形態である。それは、顔面の主な感覚神経の三叉神経

10

20

30

40

50

を冒す(「三叉」は文字通り「3つの起源」を意味し、3つの分岐への神経の分枝を言う)。この状態には、その側面における三叉神経によって供給されるエリアに沿って、顔面の側面における重度の疼痛の突発性のかつ短い発作が関わる。疼痛発作は、顔面の歪みを引き起こすために十分に重度であり得る。これは古典的には有痛性チック(疼痛性チック)と言われる。場合によっては、三叉神経痛の原因は血管又は小さい腫瘍が神経を押圧することである。多発性硬化症(脳及び脊髄を冒す炎症性の疾患)、ある種の形態の関節炎、及び糖尿病(高血糖)などの障害もまた三叉神経痛を引き起こし得るが、原因は必ずしも同定されるわけではない。この状態では、ある種の動き、例えば咀嚼すること、発話すること、嚥下すること、又は顔面のあるエリアに接触することは、激しい疼痛の痙攣の誘因となり得る。

10

【0253】

関係するがやや珍しい神経痛は、喉への感覚を提供する舌咽神経を冒す。この神経痛の症状は、喉に位置付けられる疼痛の短いショック様のエピソードである。

【0254】

神経痛は、ヘルペスウイルスのある型の水痘帯状疱疹ウイルスによって引き起こされるシングルズなどの感染後に生じ得る。この神経痛は、シングルズの発疹が治った後に絶え間ない灼熱性の疼痛を生成する。疼痛は冒されたエリアの動き又は接触によって悪化する。シングルズと診断されたものの全てが、シングルズよりも有痛であり得る帯状疱疹後神経痛を経験するまで進むわけではない。疼痛及び感受性は数ヶ月又は更には数年に渡って続き得る。疼痛は、通常は、いずれかの接触、とりわけ軽い接触に対する耐えられない感受性の形態である。帯状疱疹後神経痛は顔面に制限されない。それは体のどこかで生じ得るが、通常はシングルズの発疹の位置において生起する。病の間の疼痛及び社会的孤立を原因として、抑うつは珍しくない。

20

【0255】

帯状疱疹後神経痛は元々のヘルペス感染の徴候が消失した後に長く消耗性であり得る。神経痛を引き起こし得る他の感染性疾患は梅毒及びライム病である。

【0256】

糖尿病は神経痛の別の普通の原因である。この非常に普通の医学的問題は、成人期の米国人20人毎にほぼ1人を冒す。糖尿病は、循環を神経に供給する細動脈を損傷し、神経線維機能異常及び場合によっては神経の喪失をもたらす。糖尿病は、三叉神経痛、手根管症候群(手及び手首の疼痛及びしびれ)、並びに感覚異常性大腿痛(外側大腿皮神経の損傷を原因とする大腿のしびれ及び疼痛)を包含するほぼいずれかの神経痛を生成し得る。血糖の厳格な制御は糖尿病性の神経損傷を防止し得るが、現実には神経痛を発生する対象においては回復を加速させ得る。

30

【0257】

神経痛に関連し得る他の医学的状态は、慢性の腎機能低下及びポルフィリア、つまり体の血の正常な分解後に生成されるある種の物質を体がそれ自体から取り除き得ない遺伝性疾患である。ある種の薬物もまたこの問題を引き起こし得る。

【0258】

2. 求心路遮断

40

【0259】

求心路遮断は、体のある部分からの感覚入力の喪失を示し、末梢感覚線維又は中枢神経系からの神経のどちらかの中断によって引き起こされ得る。求心路遮断疼痛症候群は限定なしに、脳又は脊髄の傷害、卒中後疼痛、ファントムペイン、パラプレジア、腕神経叢引き抜き傷害、腰椎神経根症を包含する。

【0260】

3. 複合性局所疼痛症候群(CRPS)

【0261】

CRPSは、交感神経依存性疼痛からもたらされる慢性の疼痛症候群であり、2つの形態で発症する。CRPS1は当時点では用語「反射性交感神経性ジストロフィー症候群」を置き換

50

えている。それは、最も多くの場合には小規模な又は大規模な傷害の後に腕又は脚において生起する慢性の神経障害である。CRPS1は、重度の疼痛、爪、骨、及び皮膚の変化、並びに冒された四肢の接触に対する増大した感受性に関連する。CRPS2はカウザルギーという用語を置き換え、神経の同定された傷害からもたらされる。CRPSは、限定なしに、CRPS I型(反射性交感神経性ジストロフィー)及びCRPS II型(カウザルギー)を包含する。

【0262】

4.ニューロパチー

【0263】

ニューロパチーは、神経の機能的な又は病理学的な変化であり、感覚又は運動ニューロンの異常を臨床的特徴とする。

【0264】

中枢ニューロパチーは中枢神経系の機能的な又は病理学的な変化である。

【0265】

末梢ニューロパチーは1つ以上の末梢神経の機能的な又は病理学的な変化である。末梢神経は、情報を自身の中枢神経系(脳及び脊髄)から筋肉及び他の臓器に、並びに自身の皮膚、関節、及び他の臓器から再び自身の脳に中継する。末梢ニューロパチーは、これらの神経が脳及び脊髄からの及びそれらへの情報を伝えることに失敗するときに生起し、疼痛、感覚の喪失、又は筋肉を制御することの不能をもたらす。いくつかのケースでは、血管、腸、及び他の臓器を制御する神経の不全は、異常な血圧、消化の問題、及び他の基本的な体のプロセスの喪失をもたらす。ニューロパチーのリスク因子は、糖尿病、アルコールの大量使用、並びにある種の化学物質及び薬物に対する暴露を包含する。人によってはニューロパチーの遺伝性素因を有する。神経に対する長期の圧力は、神経傷害を発生する別のリスクである。圧傷は、長期の不動(例えば長い外科術若しくは長引く病)、又はキャスト、スプリント、ブレース、クラッチ、若しくは他のデバイスによる神経の圧迫によって引き起こされ得る。ポリニューロパチーは、通常は体の両方の側面を等しく冒す広範囲のプロセスを含意する。症状はどの型の神経が冒されるのかに依存する。神経の3つの主な型は感覚性、運動性、及び自律性である。ニューロパチーは神経の全ての3つの型のいずれか1つ又は組み合わせを冒し得る。症状は、状態が全身又はただ1つの神経を(傷害からのように)冒すかどうかにもまた依存する。慢性の炎症性のポリニューロパチーの原因は異常な免疫応答である。特異的な抗原、免疫プロセス、及び誘因因子は可変であり、多くのケースでは未知である。それは、他の状態、例えばHIV、炎症性腸疾患、全身性エリテマトーデス(lupus erythematosus)、慢性の活動性肝炎、及び血球異常に関連して生起し得る。

【0266】

末梢ニューロパチーには、単一の神経若しくは神経群の機能の若しくは病理学的な変化(モノニューロパチー)、又は複数の神経を冒す機能の若しくは病理学的な変化(ポリニューロパチー)が関わり得る。

【0267】

末梢ニューロパチーは次を包含し得る:

遺伝性障害

シャルコー・マリー・トゥース病

フリードライヒ運動失調症

全身性又は代謝性障害

糖尿病(糖尿病性ニューロパチー)

食事不足(とりわけビタミンB12)

アルコールの過剰使用(アルコール性ニューロパチー)

尿毒症(腎臓の不全からの)

癌

感染性又は炎症性の状態

AIDS

肝炎
 コロラドダニ熱
 ジフテリア
 ギラン・バレー症候群
 AIDSの発生なしのHIV感染
 レプロシー
 ライム
 結節性多発動脈炎
 関節リウマチ
 サルコイドーシス
 シェーグレン症候群
 梅毒
 全身性エリテマトーデス
 アミロイド

毒性の化合物に対する暴露

接着剤又は他の毒性の化合物を嗅ぐこと
 亜酸化窒素
 工業用の薬剤-とりわけ溶剤
 重金属(鉛、ヒ素、水銀など)

鎮痛薬性腎症のような薬物の二次的なニューロパチー

雑多な原因

虚血(減少した酸素/減少した血流)

冷温に対する長期暴露

a. ポリニューロパチー

ポリニューロパチーは、複数の末梢神経の損傷又は破壊によって引き起こされるあるエリアの動き又は感覚の喪失が関わる末梢ニューロパチーである。ポリニューロパチー性疼痛は限定なしに、ポストポリオ症候群、乳房切除後症候群、糖尿病性ニューロパチー、アルコール性ニューロパチー、アミロイド、毒素、AIDS、甲状腺機能低下症、尿毒症、ビタミン欠乏、化学療法によって誘導される疼痛、2',3'-ジデオキシシチジン(didexoycytidine)(ddC)処置、ギラン・バレー症候群、又はファブリー病を包含する。

b. モノニューロパチー

モノニューロパチーは、単一の末梢神経又は神経群の損傷又は破壊によって引き起こされるあるエリアの動き又は感覚の喪失が関わる末梢ニューロパチーである。モノニューロパチーは、最も多くの場合には、傷害又は外傷からもたらされる局所エリアの損傷によって引き起こされるが、時には、全身性の障害が孤立した神経損傷を(多発単神経炎のように)引き起こし得る。通常の原因は、直接的な外傷、神経に対する長期の圧力、及び近傍の体の構造の膨潤又は傷害による神経の圧迫である。損傷は、神経の髄鞘(被覆)又は神経細胞の一部(軸索)の破壊を包含する。この損傷は神経上のインパルスの伝導を低速化又は防止する。モノニューロパチーには体のいずれかの一部が関わり得る。モノニューロパチー性疼痛は、限定なしに、坐骨神経機能障害、総腓骨神経機能障害、橈骨神経機能障害、尺骨神経機能障害、脳神経モノニューロパチーVI、脳神経モノニューロパチーVII、脳神経モノニューロパチーIII(圧迫型)、脳神経モノニューロパチーIII(糖尿病型)、腋窩神経機能障害、手根管症候群、大腿神経機能障害、脛骨神経機能障害、ベル麻痺、胸郭出口症候群、手根管症候群、及び第6(外転)神経麻痺を包含する。

c. 汎発型の末梢ニューロパチー

汎発型の末梢ニューロパチーは対称性であり、通常は、末梢神経系をその全体において冒す種々の全身(systematic)病及び疾患プロセスを原因とする。それらは更にいくつかのカテゴリーに細分される:

i. 遠位軸索障害は、ニューロンの何らかの代謝性又は毒性の攪乱の結果である。それらは、代謝性疾患、例えば糖尿病、腎不全、欠乏症候群、例えば低栄養及びアルコール依

10

20

30

40

50

存症、又は毒素若しくは薬物の効果によって引き起こされ得る。遠位軸索障害(別名ダイニングバック型ニューロパチー)は、末梢神経系(PNS)ニューロンの何らかの代謝性の又は毒性の攪乱からもたらされる型の末梢ニューロパチーである。それは、代謝性又は毒性の異常に対する神経の最も普通の応答であり、そのため、代謝性疾患、例えば糖尿病、腎不全、欠乏症候群、例えば低栄養及びアルコール依存症、又は毒素若しくは薬物の効果によって引き起こされ得る。遠位軸索障害の最も普通の原因は糖尿病であり、最も普通の遠位軸索障害は糖尿病性ニューロパチーである。

ii. ミエリノパチーは、インパルス伝導の急性不全を引き起こすミエリンに対する原発性の攻撃を原因とする。最も普通の原因は急性の炎症性脱髄性ポリニューロパチー(AIDP、別名ギラン・バレー症候群)であるが、他の原因は慢性の炎症性脱髄症候群(CIDP)、遺伝学的な代謝性障害(例えば白質ジストロフィー)、又は毒素を包含する。ミエリノパチーはミエリン又はミエリン形成シュワン細胞の原発性の破壊を原因とし、これは軸索をインタクトなまま残すが、インパルス伝導の急性不全を引き起こす。この脱髄は神経上の電氣的インパルスの伝導を低速化又は完全にブロックする。最も普通の原因は急性の炎症性脱髄性ポリニューロパチー(ギラン・バレー症候群としてより周知のAIDP)であるが、他の原因は慢性の炎症性脱髄性ポリニューロパチー(CIDP)、遺伝学的な代謝性障害(例えば、白質ジストロフィー若しくはシャルコー・マリー・トゥース病)、又は毒素を包含する。

iii. ニューロノパチーは、末梢神経系(PNS)ニューロンの破壊の結果である。それらは運動ニューロン疾患、感覚ニューロノパチー(例えば帯状疱疹)、毒素、又は自律機能障害によって引き起こされ得る。神経毒素、例えば化学療法剤ビンクリスチンはニューロノパチーを引き起こし得る。ニューロノパチーは、末梢神経系(PNS)のニューロンの損傷を原因とする機能障害であり、末梢ニューロパチーをもたらす。それは運動ニューロン疾患、感覚ニューロノパチー(例えば帯状疱疹)、毒性の物質、又は自律機能障害によって引き起こされ得る。ニューロノパチーを有する者は、原因、それが神経細胞を冒すやり方、及び最も冒される神経細胞の型に依存して異なるやり方で発症し得る。

iv. 局所性絞扼性ニューロパチー(例えば手根管症候群)

【0268】

疼痛がニューロパチー性疼痛である場合には、1つの実施形態において、用いられるポリペプチドは、触媒的に不活性なBoNT/XのL鎖、BoNT/Xの転位置ドメイン(H_Nドメイン)、及び/又はBoNT/Xの受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含まない。1つの実施形態において、疼痛がニューロパチー性疼痛である場合には、用いられるポリペプチドは、随意に異なる(すなわち非BoNT/X)クロストリジウム神経毒素からのH_Cドメイン(例えばBoNT/BからのH_Cドメイン)と組み合わせられた触媒的に不活性なBoNT/XのL鎖及び転位置ドメイン(H_Nドメイン)を含まない。好ましくは、疼痛がニューロパチー性疼痛である場合には、用いられるポリペプチドは、触媒的に不活性なBoNT/XのL鎖及び転位置ドメイン(H_Nドメイン)と、BoNT/BのH_Cドメインとを含まない。

【0269】

本発明のポリペプチドは、以下の炎症性の状態のいずれかによって引き起こされるか又は別様に関連する疼痛を処置するために用いられ得る。同様に、本発明のポリペプチドは以下の炎症性の状態の1つ以上を処置するために用いられ得る。

【0270】

A. 関節炎性の障害

関節炎性の障害は例えば、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス(SLE)、痛風性関節炎、強皮症、変形性関節症、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、ライター症候群(反応性関節炎)、成人スティル病、ウイルス感染からの関節炎、細菌感染からの関節炎、例えば、例えば淋菌性関節炎及び非淋菌性の細菌性関節炎(化膿性関節炎)等、晩期ライム病、結核性関節炎、並びに真菌感染からの関節炎、例えばブラストミセス症等を包含する。

【0271】

B. 自己免疫性疾患

自己免疫性疾患は例えば、ギラン・バレー症候群、橋本甲状腺炎、悪性貧血、アジソン病、I型糖尿病、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、ライター症候群、及びグレーブス病を包含する。

【0272】

C.結合組織障害

結合組織障害は例えば脊椎関節炎、皮膚筋炎、及び線維筋痛症を包含する。

【0273】

D.傷害

例えば組織又は関節の挫滅、穿刺、伸張を包含する傷害によって引き起こされる炎症は、慢性の炎症性疼痛を引き起こし得る。

【0274】

E.感染

例えば結核又は間質性角膜炎を包含する感染によって引き起こされる炎症は、慢性の炎症性疼痛を引き起こし得る。

【0275】

F.神経炎

神経炎は、神経又は神経群を冒す炎症性のプロセスである。症状は関わる神経に依存するが、疼痛、錯感覚、不全麻痺、又は感覚鈍麻(しびれ)を包含し得る。

例は以下を包含する:

a.上腕神経炎

b.眼球の直ちに裏側に在る視神経の一部を冒す炎症性のプロセスの眼球後神経ニューロパチー。

c.冒された眼の突発性の視力低下を引き起こす視神経を冒す炎症性のプロセスの視神経ニューロパチー。視神経炎の原因は未知である。視神経(眼及び脳を接続する神経)の突発性の炎症は髄鞘の膨潤及び破壊に至る。炎症は時にはウイルス感染の結果で有り得るか、又はそれは多発性硬化症などの自己免疫性疾患によって引き起こされ得る。リスク因子が可能な原因に関係している。

d.前庭神経を冒す炎症性のプロセスを引き起こすウイルス感染の前庭神経炎。

【0276】

G.関節の炎症

関節の炎症、例えば滑液包炎又は腱炎によって引き起こされるものは、例えば、慢性の炎症性疼痛を引き起こし得る。

【0277】

H.日焼け及び/又はUVによって誘導される損傷

【0278】

本発明のポリペプチドは、以下の頭痛状態のいずれかによって引き起こされるか又は別様に関連する疼痛を処置するために用いられ得る。頭痛(医学的にはセファルジアとして公知)は頭部の軽度から重度の疼痛の状態である。場合によっては、頸部又は背中上部の疼痛もまた頭痛として解釈され得る。それは、基礎となっている局所の若しくは全身性の疾患を示し得るか、又は障害それ自体であり得る。

【0279】

A.筋肉性/筋原性頭痛

筋肉性/筋原性頭痛には、顔面及び頸部筋肉の張り又は緊張が関わるように見える。それらは額まで広がり得る。緊張性頭痛は筋原性頭痛の最も普通の形態である。

【0280】

緊張性頭痛は、頭部、頭皮、又は頸部の疼痛又は不快感が関わる状態であり、通常はこれらのエリアにおける筋タイトネスに関連する。緊張性頭痛は頸部及び頭皮筋肉の収縮からもたらされる。この筋肉収縮の1つの原因はストレス、抑うつ、又は不安に対する応答である。頭部が動くことなしに長い時間に渡って1つの位置に保たせるいずれかの活動は

10

20

30

40

50

頭痛を引き起こし得る。かかる活動はタイピング、又はコンピュータの使用、細かい手作業、及び顕微鏡の使用を包含する。寒い部屋における睡眠又は頭部が異常な位置にある状態での睡眠もまたこの型の頭痛の誘因となり得る。緊張型頭痛は、限定なしに、挿間性の緊張性頭痛及び慢性の緊張性頭痛を包含する。

【0281】

B.血管性頭痛

血管性頭痛の最も普通の型は片頭痛である。他の種類の血管性頭痛は、強度の疼痛の繰り返しのエピソードを引き起こす群発頭痛、及び高血圧からもたらされる頭痛を包含する。

1.片頭痛

片頭痛は、一般的に再発性頭痛に関わる不均一な障害である。それらは例えば吐き気、嘔吐、又は光に対する感受性などの他の症状と共に生起するので、片頭痛は他の頭痛とは異なる。ほとんどの人では、拍動痛が頭部の1つの側面のみに感じられる。臨床的特徴、例えば前兆症状の型、前駆症状の存在、又は関連する症状、例えばめまいは、異なる基礎となっている病態生理学的及び遺伝学的メカニズムを有する対象のサブグループにおいて見られ得る。片頭痛の頭痛は、限定なしに、前兆なしの片頭痛(普通型片頭痛)、前兆ありの片頭痛(古典的片頭痛)、月経時片頭痛、片頭痛等価症(無頭痛性の(acephalic)頭痛)、複雑片頭痛、腹部片頭痛、及び混合型の緊張型片頭痛を包含する。

10

2.群発頭痛

群発頭痛は頭部の1つの側面を冒し(片側)、眼の流涙及び鼻づまりに関連し得る。それらは群発で生起し、数週に渡って毎日同じ時間に繰り返し起こり、それから軽快する。

20

【0282】

D.高血圧性頭痛

【0283】

E.牽引性及び炎症性の頭痛

牽引性及び炎症性の頭痛は、通常は、卒中から副鼻腔感染の範囲に渡る他の障害の症状である。

【0284】

F.ホルモン性頭痛

【0285】

G.反跳性頭痛

薬物乱用頭痛としてもまた公知の反跳性頭痛は、頭痛を和らげるための薬があまりに頻繁に取られるときに生起する。頻繁には、反跳性頭痛は毎日生起し、非常に有痛性であり得る。

30

【0286】

H.慢性の副鼻腔炎性頭痛

副鼻腔炎は、副鼻腔の細菌性、真菌性、ウイルス性、アレルギー性、又は自己免疫性のどちらかの炎症である。慢性の副鼻腔炎は普通感冒の最も普通の合併症の1つである。症状は、鼻づまり、顔面痛、頭痛、発熱、全身倦怠感、濃い緑色又は黄色の鼻水、前屈みによって悪化する顔面の「膨満感」の感じを包含する。少数のケースでは、慢性の上顎洞炎もまた歯の感染からの細菌の広がりによって惹起され得る。慢性の過形成性好酸球性副鼻腔炎は慢性の副鼻腔炎の非感染性形態である。

40

【0287】

I.器質性の頭痛

【0288】

J.発作性頭痛

発作性(ital)頭痛はてんかん発作活動に関連する頭痛である。

【0289】

本発明のポリペプチドは、以下の体性痛状態のいずれかによって引き起こされるか又は別様に関連する疼痛を処置するために用いられ得る。体性痛は靱帯、腱、骨、血管、及び更には神経それら自体を起源とする。それは体性侵害受容器によって検知される。これら

50

のエリアにおける疼痛受容体の希少性は、皮膚痛よりも長い持続時間の鈍い不良に局在化した疼痛を生成する。例は捻挫及び骨折を包含する。追加の例は次を包含する。

【0290】

A.過剰な筋張力

過剰な筋張力は例えば捻挫又は肉離れによって引き起こされ得る。

【0291】

B.反復動作障害

反復動作障害は、手、手首、肘、肩、頸部、背中、腰、膝、足、脚、又は足首の酷使からもたらされ得る。

【0292】

C.筋肉の障害

体性痛を引き起こす筋肉の障害は、例えば多発性筋炎、皮膚筋炎、ループス、線維筋痛症、リウマチ性多発筋痛症、及び横紋筋融解症を包含する。

【0293】

D.筋痛症

筋痛症は筋肉の疼痛であり、多くの疾患及び障害の症状である。筋痛症の最も普通の原因は、筋肉又は筋肉群の酷使又は過伸張のどちらかである。外傷の既往なしの筋痛症は多くの場合にはウイルス感染を原因とする。より長期的な筋痛症は、代謝性ミオパチー、いくつかの栄養欠乏、又は慢性疲労症候群を示し得る。

【0294】

E.感染

感染は体性痛を引き起こし得る。かかる感染の例は例えば、筋肉の膿瘍、トリヒナ症、インフルエンザ、ライム病、マラリア、ロッキー山紅斑熱、鳥インフルエンザ、普通感冒、市中肺炎、髄膜炎、サル痘、重症急性呼吸器症候群、トキシックショック症候群、トリヒナ症、チフス熱、及び上気道感染を包含する。

【0295】

F.薬物

薬物は体性痛を引き起こし得る。かかる薬物は例えば、コカイン、コレステロールを下げるためのスタチン(例えばアトルバスタチン、シンバスタチン、及びロバスタチン)、並びに血圧を下げるためのACE阻害剤(例えばエナラプリル及びカプトプリル)を包含する。

【0296】

本発明のポリペプチドは、以下の内臓痛状態のいずれかによって引き起こされるか又は別様に関連する疼痛を処置するために用いられ得る。内臓痛は体の内臓又は臓器を起源とする。内臓性侵害受容器は体の臓器及び内腔内に位置付けられる。これらのエリアにおける侵害受容器のもっと多大な希少性は、通常は体性痛よりもうずきかつ長い持続時間である疼痛を生成する。内臓痛は局在化することが極端に困難であり、内臓組織のいろいろな傷害は、感覚が傷害部位とは完全に無関係のエリアに局在化される「関連」痛を見せる。内臓痛の例は次を包含する。

【0297】

A.機能性内臓痛

機能性内臓痛は、例えば、過敏性腸症候群及び慢性の機能性腹痛(CFAP)、機能性便秘及び機能性ディスペプシア、非心臓性胸痛(NCCP)、並びに慢性の腹痛を包含する。

【0298】

B.慢性の胃腸炎症

慢性の胃腸炎症は、例えば、胃炎、例えばクローン病のような炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、顕微鏡的大腸炎、憩室炎、及び胃腸炎、間質性膀胱炎、腸の虚血、胆嚢炎、虫垂炎、胃食道逆流症、潰瘍、腎結石症、尿路感染、膀胱炎、及びヘルニアを包含する。

【0299】

C.自己免疫性疼痛

自己免疫性疼痛は例えばサルコイドーシス及び血管炎を包含する。

10

20

30

40

50

【0300】

D.器質性の内臓痛

器質性の内臓痛は、例えば、腸管の外傷性、炎症性、若しくは変性病変からもたらされるか又は腫瘍が感覚神経支配に衝突することによって生成される疼痛を包含する。

【0301】

E.処置によって誘導される内臓痛

処置によって誘導される内臓痛は、例えば、化学療法治療に伴う疼痛又は放射線治療に伴う疼痛を包含する。

【0302】

本発明のポリペプチドは、以下の関連痛状態のいずれかによって引き起こされるか又は別様に関連する疼痛を処置するために用いられ得る。

【0303】

関連痛は、疼痛刺激の部位とは別のエリアに局在化した疼痛に起因する。多くの場合に、関連痛は、神経がその起源又はその近くにおいて圧迫又は損傷されるときに生ずる。この状況では、損傷は他所を起源とするにもかかわらず、疼痛の感覚は、一般的には、神経が仕えるテリトリーにおいて感じられるであろう。普通の例は、脊髄から生ずる神経根が隣接する椎間板材料によって圧迫される椎間板ヘルニアにおいて生起する。疼痛は損傷した椎間板それ自体から生じ得るが、疼痛は、圧迫された神経が仕える領域においてもまた感じられるであろう(例えば、大腿、膝、又は足)。神経根に対する圧力を和らげることは、永久的な神経損傷が生起していないという条件で、関連痛を改善し得る。心筋虚血(心筋組織の一部への血流の喪失)はあるいは関連痛の最も周知の例である。感覚は、胸上部において制限された感じとして、又は左肩、腕、若しくは更には手の痛みとして生起し得る。

【0304】

本発明のポリペプチドは術後疼痛を処置するために用いられ得る。

【0305】

術後(例えば手術後)疼痛は、外科的処置からもたらされる不快な感覚である。術後疼痛は、切開、処置それ自体、創傷の閉鎖、及び処置中に適用されるいずれかの力による組織の損傷によって引き起こされ得る。手術後の疼痛(例えば術後疼痛)は、手術に付随する因子からまた派生し得る。例えば、対象は対象が手術台上に位置したやり方を原因として背部痛を患い得るか、又は胸痛は胸部の切開を原因とし得る。呼吸管の挿入は痛痒を引き起こし得るので、喉痛は全身麻酔後にもまた生起し得る。しかしながら、外科的切開からの皮膚及び筋肉の切創によって引き起こされる術後疼痛が最も普通である。

【0306】

例えば、外科術(又はより具体的には外科的切開)は、疼痛を引き起こす「侵害刺激」を代表し得る。組織損傷を誘発し得る刺激の侵害刺激は、侵害受容性の求心性終末からの神経伝達物質の放出と、感覚終末からのP物質及びカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)などのニューロペプチドの放出とを活性化し得る。それから、侵害情報は末梢神経系から中枢神経系に伝達され、ここで疼痛が個体によって知覚される。

【0307】

術後疼痛は炎症及び神経組織損傷の組み合わせによって引き起こされ得る。例えば、組織傷害に応答した活性化マスト細胞の脱顆粒は、プロテアーゼ、サイトカイン、セロトニン、及び細胞外空間を包含する種々の物質の放出をもたらし得る。これらの物質は一次求心性ニューロンを感作(より低い閾値で活性化)して疼痛過敏を生成し得る。組織は大いに神経支配されているので、体のいずれかの領域は手術からの神経損傷を受けやすい。

【0308】

手術と言うことは、体の一部を切開に付すこと(随意に、体の損傷した一部を除去又は修復すること)を含む対象の傷害又は疾患の処置が関わる医学的な処置を意味する。侵襲度のレベル(例えば要求される外科的切開のレベル)は手術の型の間で変動し得るが、ひとたび手術が完了すると対象の疼痛を引き起こす侵襲度のレベルを有する手術は、包摂されることを意図される。

10

20

30

40

50

【0309】

手術は皮膚及び/又はファシア及び/又は筋肉の切開を含み得る。好ましくは、手術は皮膚の切開を含む。

【0310】

手術は、医師によって実施され得るものに限定されず、例えば歯科手術をもまた包含する。手術の非限定的な例は、虫垂切除術、乳房組織生検、豊胸又は乳房縮小、フェイスリフト、胆嚢摘出術、冠動脈バイパス、デブリードマン(例えば創傷、熱傷、又は感染の)、皮膚グラフト、臓器移植、及び口蓋扁桃摘出術を包含する。

【0311】

好ましくは、「術後」は、手術の最大で1日事後に(例えば手術後に)始まる時期を言い得る。換言すると、用語「術後」は、手術の1日後を超えずに始まる時期を言い得る。例えば、用語「術後」は、手術の1~20時間後、随意に手術の2~15時間後、随意に手術の5~10時間後に始まる時点と言い得る。かかる時間は、対象に投与された外科麻酔の鎮痛効果が逡減(例えばテーパリング)し、それゆえに対象が疼痛を知覚し始める時系列的な境界点において始まる時期を表し得る。

10

【0312】

更にその上、「術後」は本明細書においては「手術」の意味で用いられるので、用語「術後」は用語「手術後」と交換可能に用いられ得る。

【0313】

類似に、用語「術後疼痛」は、手術の最大で1日事後に(例えば手術後に)始まる時期中に知覚される(又はより具体的には知覚され始める)疼痛を言い得る。換言すると、用語「術後疼痛」は、手術の1日後を超えずに始まる時期中に対象によって知覚される疼痛を言い得る。例えば、用語「術後疼痛」は、手術の1~20時間後、随意に手術の2~15時間後に、随意に手術の5~10時間後に始まる時期中に知覚される疼痛を言い得る。

20

【0314】

前記の時期は手術後の1~50週、例えば5~45週、10~40週、又は10~35週であり得る。

【0315】

これは用語「周術期」とは対照をなし、これは、例えば、対象が手術を受けている時間(例えば対象が手術室にいる時間)又はその前後の時期、好適には、手術の少なくとも1時間前に始まる及び/又は手術の1時間後未満に終わる期間を言い得る。

30

【0316】

本発明は、広い範囲の疼痛状態、例えば慢性の疼痛状態に対処する。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは癌性及び非癌性疼痛を処置するためである。

【0317】

好ましくは、本発明のポリペプチドはニューロパチー性疼痛を処置するために用いられる。ニューロパチー性疼痛は急性又は慢性であり得る。1つの実施形態において、ニューロパチー性疼痛は、傷害によって誘導されるニューロパチー性疼痛(傷害に関連するニューロパチー性疼痛)である。1つの実施形態において、ニューロパチー性疼痛は、化学療法によって誘導されるニューロパチー性疼痛(化学療法に関連するニューロパチー性疼痛)である。

40

【0318】

好ましくは、本発明のポリペプチドは炎症性疼痛を処置するために用いられる。炎症性疼痛は急性又は慢性であり得る。1つの実施形態において、炎症性疼痛は熱傷であり得る。例えば、炎症性疼痛はUV損傷(例えばUV-B損傷)によって引き起こされ得る。

【0319】

最も好ましくは、本発明のポリペプチドは膀胱痛症候群、幻肢痛、又は片頭痛の疼痛を処置するために用いられる。膀胱痛症候群は間質性膀胱炎によって引き起こされ得るか、又はそれに関連し得る。

【0320】

50

疼痛を処置することは、好ましくは疼痛を縮減することを意味する。換言すると、1つの実施形態において、本発明のポリペプチドの投与は対象の疼痛を縮減する。

【0321】

より詳細には、(疼痛の点で)「縮減される」又は「縮減する」と言うことは、好ましくは、投与に先立って(投与前に)対象によって知覚される疼痛のレベルと比較したときに、本発明のポリペプチドの投与後には(投与後に)、より低いレベルの疼痛が対象によって知覚されるということを意味する。例えば、知覚される疼痛のレベルは、投与前に対して相対的に、投与後に少なくとも15%、25%、35%、45%、55%、65%、75%、85%、又は95%だけ縮減され得る。例えば、知覚される疼痛のレベルは、投与後に少なくとも75%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも95%だけ縮減され得る。

10

【0322】

疼痛知覚を評価するための種々の手段が当業者に公知である。例えば、参照によって本明細書に組み込まれるPogatzki-Zahn et. al. (Pain Rep. 2017 Mar; 2(2): e588)に記載されている通り、機械的アロディニア(静的又は動的のどちらか)の評価が慣例的にヒト疼痛研究に用いられる。

【0323】

対象の疼痛知覚を評価するための(非限定であるが)好適な方法は数値的評価スケール(NRS)スコアを包含するが、当業者は、加えて又は代替的に用いられ得る他の方法、例えば感覚閾値、疼痛知覚閾値、静的機械的アロディニア、動的機械的アロディニア、時間的加重、圧痛閾値、条件刺激性疼痛調節、及び温度閾値を知っている。

20

【0324】

疼痛知覚尺度の他の非限定的な例は、各予定時点におけるベースラインからのSF-36スコアの変化、研究の間に取られたレスキュー薬の量、及びレスキュー薬の初回服用までの時間を包含する。これらは「探索的」エンドポイント又は疼痛知覚評価尺度と考えられ得る。

【0325】

それゆえに、好ましい実施形態においては、本発明のポリペプチドの投与後に、疼痛知覚は、(a)数値的評価スケール(NRS)、(b)刺激によって誘起されるNRS、(c)有痛のエリアの温度、(d)有痛のエリアのサイズ、(e)鎮痛効果の発生までの時間、(f)ピーク鎮痛効果、(g)ピーク鎮痛効果までの時間、(h)鎮痛効果の持続時間、及び(i)SF-36クオリティ・オブ・ライフのうちの1つ以上によって評価され得る。

30

【0326】

当業者は疼痛知覚を評価するためのかかる方法を知っている。便宜のために、数値的評価スケール及びクオリティ・オブ・ライフ質問票短縮版-36の更なる記載が下で提供される。

【0327】

数値的評価スケール(NRS)。典型的には、本発明に従う疼痛知覚は数値的評価スケール(NRS)を用いる。NRSは対象の疼痛知覚を評価するための11点スケールである。対象は、それらの疼痛強度に最も良く一致する0~10の数を答えるように依頼される。ゼロは「全く疼痛なし」を表し、上限の10は「可能な最悪の疼痛」を表す。

40

【0328】

NRSは、特発性の平均の疼痛、特発性の最悪の疼痛、及び特発性の当時点の疼痛を包含する疼痛の数々の様相を評価するために用いられ得る。特発性の平均の疼痛は、ある時期、例えば少なくとも6時間、12時間、24時間、又は少なくとも48時間に渡る対象の平均の疼痛(例えば知覚される疼痛)を最も良く表現する数を選択するように対象に依頼することによって評価される。特発性の最悪の疼痛は、所定の期間、例えば少なくとも先の6時間、12時間、24時間、又は先の48時間の間のその最悪時の対象の疼痛を最も良く表現する数を選択するように対象に依頼することによって評価される。特発性の当時点の疼痛は、評価時に対象がどれほどの疼痛であるかを最も良く表現する数を選択するように対象に依頼することによって評価される。

50

【0329】

NRSは、種々の異なる刺激に応答した対象の疼痛知覚を評価するためにもまた用いられ得る。刺激に応答した疼痛知覚を評価するためには、対象は、有痛のエリアに適用される種々の性質の刺激に曝されるであろう。対象は、投薬前及び刺激後のそれらの時点のNRSスコアは何であるかを尋ねられるであろう。

【0330】

用いられる刺激の例は、(i)軽い接触(これは、本明細書に記載される通りフォンフライフィラメントの適用後に、放射状のスポーク線上で有痛エリアの表面の疼痛を測定することによって評価され得る)、(ii)増大して行く圧力が圧力アルゴメータを用いて適用される際のNRSスコアを答えるように対象に依頼することによって評価され得る圧力(圧痛閾値)、及び(iii)温度(これは、有痛のエリアに適用されたサーモドを用いて温、冷、及び熱刺激についてのNRSスコアを対象に尋ねることによって評価され得る)を包含する。

10

【0331】

好ましくは、本発明のポリペプチドの投与は、投与前の対象のNRSスコアと比較したときに、対象のNRSスコアを投与後に縮減する(例えば ≥ 7 の成績から ≤ 6 の成績に)。

【0332】

クオリティ・オブ・ライフ質問票短縮版-36(SF-36)。SF-36クオリティ・オブ・ライフ質問票は対象の疼痛知覚を評価するために用いられ得る。SF-36は、対象によって報告される、対象の健康の36項目の調査である。SF-36は8つのスケールスコアからなる(バイタリティ、身体的な機能、体の疼痛、全般的な健康の知覚、身体的な役割機能、情動的役割機能、社会的な役割機能、及びメンタルヘルス)。各質問が等しい重みを持つという前提で、各スケールは直接的に0~100スケールに変換される。SF-36で記録されるスコアが高いほど、能力低下は少ない。

20

【0333】

疼痛の処置のための治験において普通に試験される該当するパラメータは、当分野において公知であり、当業者によって難なく選択され得る。かかるパラメータの例は、NRS、刺激によって誘起されるNRS、有痛のエリアの温度、有痛のエリアのサイズ、鎮痛効果の発生までの時間、ピーク鎮痛効果、ピーク鎮痛効果までの時間、鎮痛効果の持続時間、及び/又は本明細書に記載されるSF-36クオリティ・オブ・ライフを包含するが、これらに限定されない。これらのパラメータを評価するための方法もまた当分野において公知であり、慣例的な方法及び手順を用いて当業者によって実施され得る。

30

【0334】

好ましくは、本発明のポリペプチドの投与は、投与前の対象のSF-36スコアと比較したときに、対象のSF-36スコアを投与後に増大させる(例えば ≤ 50 のスコアから ≥ 50 のスコアに)。

【0335】

本発明のポリペプチドによって処置される炎症性障害は、神経系、心血管系、呼吸器系、消化系、外皮系、筋骨格系、泌尿器系、生殖系、内分泌系、又はリンパ系の炎症性障害であり得る。

【0336】

神経系の炎症性障害は、中枢神経系炎症(例えば脳炎、脊髄炎、髄膜炎、又はくも膜炎)、末梢神経系炎症(例えば神経炎)、眼の炎症(例えば涙腺炎、強膜炎、上強膜炎、角膜炎、網膜炎、脈絡網膜炎、眼瞼炎、結膜炎、又はぶどう膜炎)、及び耳の炎症(例えば外耳炎、中耳炎、内耳炎、及び乳突起炎)からなる群から選択される1つ以上であり得る。

40

【0337】

心血管系の炎症性障害は、心炎(例えば心内膜炎、心筋炎、又は心膜炎)、及び血管炎(例えば動脈炎、静脈炎、又は毛細血管炎)からなる群から選択される1つ以上であり得る。

【0338】

呼吸器系の炎症性障害は、上部呼吸器系の炎症性障害(例えば副鼻腔炎、鼻炎、咽頭炎、又は喉頭炎)、下部呼吸器系の炎症性障害(例えば気管炎、気管支炎、細気管支炎、肺臓炎

50

、又は胸膜炎)、及び縦隔炎からなる群から選択される1つ以上であり得る。

【0339】

消化系の炎症性障害は、口の炎症(例えば口内炎、歯肉炎、歯肉口内炎、舌炎、扁桃炎、唾液腺炎/耳下腺炎、口唇炎、歯髓炎、又は顎炎)、胃腸管炎症(例えば食道炎、胃炎、胃腸炎、腸炎、大腸炎、小腸・大腸炎、十二指腸炎、回腸炎、盲腸炎、虫垂炎、又は直腸炎)、及び消化副器官の炎症(例えば肝炎、上行性胆管炎、胆嚢炎、膵炎、又は腹膜炎)からなる群から選択される1つ以上であり得る。

【0340】

外皮系の炎症性障害は、皮膚炎(例えば毛包炎)、蜂窩織炎、及び汗腺炎からなる群から選択される1つ以上であり得る。

10

【0341】

筋骨格系の炎症性障害は、関節炎、皮膚筋炎、軟部組織炎症(例えば筋炎、滑膜炎/腱鞘炎、滑液包炎、腱付着部炎、筋膜炎、関節包炎、上顎炎、腱板炎、又は脂肪織炎)、骨軟骨炎、骨炎/骨髄炎、脊椎炎、骨膜炎、及び軟骨炎からなる群から選択される1つ以上であり得る。

【0342】

泌尿器系の炎症性障害は、腎炎(例えば糸球体腎炎又は腎盂腎炎)、尿管炎、膀胱炎、及び尿道炎からなる群から選択される1つ以上であり得る。

【0343】

生殖系の炎症性障害は、女性の生殖系の炎症(例えば卵巣炎、卵管炎、子宮内膜炎、子宮傍結合織炎、子宮頸管炎、膣炎、外陰炎、又は乳腺炎)、男性の生殖系の炎症(例えば精巣炎、精巣上体炎、前立腺炎、精嚢炎、亀頭炎、包皮質炎、又は亀頭包皮質炎)、並びに妊娠、出産、及び/又は新生児に関連する炎症(例えば絨毛膜羊膜炎、臍帯炎、又は臍炎)なる群から選択される1つ以上であり得る。

20

【0344】

内分泌系の炎症性障害は、膵島炎、下垂体炎、甲状腺炎、副甲状腺炎、及び副腎炎からなる群から選択される1つ以上であり得る。

【0345】

リンパ系の炎症性障害は、リンパ管炎及びリンパ節炎からなる群から選択される1つ以上であり得る。

30

【0346】

好ましくは、炎症性障害は、複合性局所疼痛症候群、子宮内膜症、関節リウマチ、膀胱炎、及び神経炎から選択される1つ以上である。膀胱炎は好ましくは間質性膀胱炎である。神経炎は好ましくは末梢神経炎である。

【0347】

本発明の種々の治療上の使用に関係する実施形態は処置の方法に等しく適用されることを意図され、逆もまた同様である。

【0348】

配列相同性

【0349】

限定なしに、グローバル法、ローカル法、及びハイブリッド法、例えば、セグメントアプローチ法等を包含する種々の配列アライメント方法のいずれかが、パーセントの同一性を決定するために用いられ得る。パーセントの同一性を決定するためのプロトコールは当業者の範囲内の慣例的な処置である。グローバル法は複数の配列を分子の始めから終わりまでアライメントし、個々の残基ペアのスコアを合計することによって及びギャップペナルティーを課すことによって最良のアライメントを決定する。非限定的な方法は例えば以下を包含する。CLUSTAL-W、例えばJulie D. Thompson et al., CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22(22) Nucleic Acids Research 4673-4680 (1994)参照;及び反復改善法、例えばOsa

40

50

mu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein. Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) J. Mol. Biol. 823-838 (1996)参照。ローカル法は、入力配列の全てによって共有される1つ以上の保存されたモチーフを同定することによって複数の配列をアライメントする。非限定的な方法は例えば以下を包含する。Match-box、例えばEric Depiereux and Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) CABIOS 501-509 (1992)参照;Gibbsサンプリング、例えばC. E. Lawrence et al., Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262(5131) Science 208-214 (1993)参照;Align-M、例えばIvo Van Walle et al., Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9) Bioinformatics:1428-1435 (2004)参照。

【0350】

それゆえに、パーセントの配列同一性は従来の方法によって決定される。例えば、Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48: 603-16, 1986及びHenikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-19, 1992参照。手短には、下に示される通り、2つのアミノ酸配列が、10のギャップオープンペナルティー、1のギャップ延長ペナルティー、及びHenikoff and Henikoff(同書)の「blosum62」スコア付け行列を用いてアライメントスコアを最適化するようにアライメントされる(アミノ酸は標準的な1文字コードによって示される)。好ましくは、この方法は、本明細書に記載される通り、アミノ酸位置付番を定めるために、ある配列を本明細書に記載される配列番号とアライメントために用いられる。

【0351】

2つ以上の核酸又はアミノ酸配列の間の「パーセントの配列同一性」は、複数の配列によって共有される同一の位置の数の関数である。それゆえに、%の同一性は、ヌクレオチド/アミノ酸の総数によって除算される100によって乗算された同一のヌクレオチド/アミノ酸の数として計算され得る。%の配列同一性の計算は、2つ以上の配列のアライメントを最適化するために導入されることを必要とするギャップの数及び各ギャップの長さをもまた考慮に入れ得る。2つ以上の配列間の配列比較及びパーセントの同一性の決定は、BLASTなどの特定の数理アルゴリズムを用いて実施され得る。当業者はこれに精通しているであらう。

【数1】

10

20

30

40

50

配列同一性を決定するためのアライメントスコア

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

【0352】

それから、パーセントの同一性が以下として計算される:

[同一のマッチの総数×100] / [より長い配列の長さ+2つの配列をアライメントするためにより長い配列に導入されるギャップの数]

【0353】

実質的に相同なポリペプチドは、1つ以上のアミノ酸置換、欠失、又は追加を有するとしてキャラクタリゼーションされる。これらの変化は、好ましくは、小規模な性質、つまり、ポリペプチドの折りたたみ又は活性に有意には影響しない保存的アミノ酸置換(下参照)及び他の置換、典型的には1から約30アミノ酸の小さい欠失、並びに小さいアミノ又はカ

10

20

30

40

50

ルボキシル末端延長、例えばアミノ末端メチオニン残基、最高で約20～25残基までの小さいリンカーペプチド、又はアフィニティータグである。

【0354】

保存的アミノ酸置換

塩基性:

アルギニン

リジン

ヒスチジン

酸性:

グルタミン酸

アスパラギン酸

極性:

グルタミン

アスパラギン

疎水性:

ロイシン

イソロイシン

バリン

芳香族性:

フェニルアラニン

トリプトファン

チロシン

小:

グリシン

アラニン

セリン

スレオニン

メチオニン

【0355】

20個の標準アミノ酸に加えて、非標準アミノ酸(例えば4-ヒドロキシプロリン、6-N-メチルリジン、2-アミノイソ酪酸、イソバリン、及び α -メチルセリン)が本発明のポリペプチドのアミノ酸残基と置換され得る。限定された数の非保存的なアミノ酸、遺伝暗号によってコードされないアミノ酸、及び非天然アミノ酸が、ポリペプチドアミノ酸残基と置換され得る。本発明のポリペプチドは天然には生起しないアミノ酸残基をもまた含み得る。

【0356】

天然には生起しないアミノ酸は、限定なしに、トランス-3-メチルプロリン、2,4-メタノプロリン、シス-4-ヒドロキシプロリン、トランス-4-ヒドロキシプロリン、N-メチルグリシン、アロスレオニン、メチルスレオニン、ヒドロキシエチルシステイン、ヒドロキシエチルホモシステイン、ニトログルタミン、ホモグルタミン、ピペコリン酸、tert-ロイシン、ノルバリン、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニン、及び4-フルオロフェニルアラニンを包含する。天然には生起しないアミノ酸残基をタンパク質上に組み込むためのいくつかの方法が当分野において公知である。例えば、化学的にアミノアシル化されたサプレッサ-tRNAを用いてナンセンス変異が抑圧されるインビトロ系が採用され得る。アミノ酸を合成及びtRNAをアミノアシル化するための方法は当分野において公知である。ナンセンス変異を含有するプラスミドの転写並びに翻訳が、E. コリS30抽出物並びに市販の酵素及び他の試薬を含む無細胞系において実施される。タンパク質がクロマトグラフィーによって精製される。例えば、Robertson et al., J. Am. Chem. Soc. 113: 2722, 1991; Ellman et al., Methods Enzymol. 202: 301, 1991; Chung et al., Science 259: 806-9, 1993; 及び Chung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10145-9, 1993参照)。第2の方法では、翻訳が、変異したmRNA及び化学的に

10

20

30

40

50

アミノアシル化されたサプレッサーtRNAのマイクロインジェクションによってゼノパス卵母細胞において実施される(Turcatti et al., J. Biol. Chem. 271: 19991-8, 1996)。第3の方法では、E.コリ細胞が、置き換えられるべきである天然アミノ酸(例えばフェニルアラニン)の不在下においてかつ所望の天然には生起しないアミノ酸(単数又は複数)(例えば、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニン、又は4-フルオロフェニルアラニン)の存在下において培養される。天然には生起しないアミノ酸はその天然のカウンターパートの代わりにポリペプチド上に組み込まれる。Koide et al., Biochem. 33: 7470-6, 1994参照。天然に生起するアミノ酸残基は、インビトロの化学修飾によって天然には生起しない種に変換され得る。化学修飾は、置換の範囲を更に拡大するために部位特異的変異導入と組み合わせられ得る(Wynn and Richards, Protein Sci. 2: 395-403, 1993)。

10

【0357】

限定された数の非保存的なアミノ酸、遺伝暗号によってコードされないアミノ酸、天然には生起しないアミノ酸、及び非天然アミノ酸が、本発明のポリペプチドのアミノ酸残基と置換され得る。

【0358】

本発明のポリペプチド上の必須アミノ酸は、当分野において公知の手順、例えば部位特異的変異導入又はアラニンスキャン変異導入に従って同定され得る(Cunningham and Wells, Science 244: 1081-5, 1989)。生物学的相互作用の部位もまた、推定上の接触部位アミノ酸の変異と共に、核磁気共鳴、結晶学、電子回折、又は光親和性標識などの技術によって決定される構造の物理的分析によって決定され得る。例えば、de Vos et al., Science 255: 306-12, 1992; Smith et al., J. Mol. Biol. 224: 899-904, 1992; Wlodaver et al., FEBS Lett. 309: 59-64, 1992参照。必須アミノ酸のアイデンティティは、本発明のポリペプチドの関係するコンポーネント(例えば、転位置又はプロテアーゼコンポーネント)との相同性の分析からもまた推量され得る。

20

【0359】

複数のアミノ酸置換が、変異導入及びスクリーニングの公知の方法、例えばReidhaar-Olson and Sauer(Science 241: 53-7, 1988)又はBowie and Sauer(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-6, 1989)によって開示されているものを用いてなされ、試験され得る。手短には、これらの著者は、同時に、ポリペプチド上の2つ以上の位置をランダム化し、機能的なポリペプチドをセレクションし、それから変異導入されたポリペプチドをシーケンシングして各位置における許され得る置換のスペクトルを決定するための方法を開示している。用いられ得る他の方法はファージディスプレイ(例えばLowman et al., Biochem. 30: 10832-7, 1991; Ladner et al., 米国特許第5,223,409号; Huse, 国際公開第92/06204号)及び領域特異的変異導入(Derbyshire et al., Gene 46: 145, 1986; Ner et al., DNA 7: 127, 1988)を包含する。

30

【0360】

別様に定められない限り、本明細書において用いられる全ての技術及び科学用語は、本開示が属する分野の当業者に普通に理解されるのと同じ意味を有する。Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994)及びHale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991)は、本開示において用いられる用語の多くの総合辞書を当業者に提供する。

40

【0361】

本開示は本明細書において開示される例示的な方法及び材料によって限定されず、本明細書に記載されるものと類似又は同等のいずれかの方法及び材料は、本開示の実施形態の実施又は試験に用いられ得る。数的範囲は範囲を定める数を包含する。別様に示されない限り、それぞれ、いずれかの核酸配列は左から右に5'から3'の向きで書かれる。アミノ酸配列は左から右にアミノからカルボキシの向きで書かれる。

【0362】

50

本明細書において提供される見出しは本開示の種々の態様又は実施形態の限定ではない。

【0363】

アミノ酸は本明細書においてはアミノ酸の名称、3文字略称、又は1文字略称を用いて言われる。本明細書において用いられる用語「タンパク質」は、タンパク質、ポリペプチド、及びペプチドを包含する。本明細書において用いられる用語「アミノ酸配列」は用語「ポリペプチド」及び/又は用語「タンパク質」と同義である。いくつかの場合には、用語「アミノ酸配列」は用語「ペプチド」と同義である。いくつかの場合には、用語「アミノ酸配列」は用語「酵素」と同義である。用語「タンパク質」及び「ポリペプチド」は本明細書においては交換可能に用いられる。本開示及び請求項においては、アミノ酸残基の従来の1文字及び3文字コードが用いられ得る。アミノ酸の3文字コードは、生化学の命名法に関するIUPACIUB合同委員会(IUPACIUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature)(JCBN)に従って定められる通りである。ポリペプチドは遺伝暗号の縮重を原因として1つよりも多くのヌクレオチド配列によってコードされ得るということもまた理解される。

10

【0364】

用語の他の定義が本明細書において現れ得る。例示的な実施形態がより詳細に記載される前に、本開示は記載される具体的な実施形態に限定されず、そのため、変形し得るということは理解されるべきである。本開示の範囲は添付される請求項のみによって定められるので、本明細書において用いられる術語は具体的な実施形態を記載する目的のためのみであり、限定しようということを意図されないということもまた理解されるべきである。

20

【0365】

値の範囲が提供される場合には、その範囲の上限及び下限の間の各介在値もまた、文脈が明瞭に別様に述べない限り下限の単位の十分の一まで具体的に開示されるということが理解される。申し立てられている範囲内のいずれかの申し立てられている値又は介在する値とその申し立てられている範囲内のいずれかの他の申し立てられている又は介在する値との間のより小さい各範囲は本開示に包摂される。これらのより小さい範囲の上限及び下限は独立して範囲に包含又は除外され得る。申し立てられている範囲内のいずれかの具体的に除外される限度を条件として、どちらかの限度がより小さい範囲に包含されるか、どれも包含されないか、又は両方の限度が含まれる各範囲もまた本開示に包摂される。申し立てられている範囲が限度の1つ又は両方を包含する場合には、それらの包含される限度のどちらか又は両方を除外する範囲もまた本開示に包含される。

30

【0366】

本明細書及び添付の請求項において用いられる単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が明瞭に別様に述べない限り、複数のリファレントを包含するということが指摘されなければならない。それゆえに、例えば、「クロストリジウム神経毒素(a clostridial neurotoxin)」と言うことは複数のかかる候補薬剤を包含し、「クロストリジウム神経毒素(the clostridial neurotoxin)」と言うことは当業者に公知の1つ以上のクロストリジウム神経毒素及びそれらの同等物を言うことを包含するなどである。

【0367】

本明細書において論じられる出版物は単に本願の出願日に先立つそれらの開示から提供されている。本明細書のいかなることも、それに添付される請求項に対してかかる出版物が先行技術を構成するという自認として解釈されるべきではない。

40

【0368】

ここで、本発明の実施形態が、例としてのみ、以下の図及び実施例を参照して記載される。

【図面の簡単な説明】

【0369】

【図1】図1は、BoNT/A又はBoNT/A(0)を投与されたヒトニューロン細胞における%のSNAP25切断を示す。

【図2】図2は、BoNT/A又はBoNT/A(0)を投与されたラットニューロン細胞における%

50

のSNAP25切断を示す。

【図3】(A)尾でぶら下げられたマウスの特徴的な驚愕反応を示す。(B)指外転スコア(DAS)アッセイに用いられたスコア付けを示す。

【図4】(A)は、成体の雄スプラグドローラット(220~250g)における慢性のニューロパチー性疼痛の慢性絞扼性損傷(CCI)モデルを用いる研究の実験の概略図を提示する。BoNT/A(0)(60pg/kgのi.pl.投与)、BoNT/A(30pg/kgの足底内(i.pl.)投与)、BoNT/A(60pg/kgのi.pl.投与)、基剤(ゼラチンリン酸緩衝液(GPB)i.pl.投与-負の対照)、又はガバペンチン(100mg/kgのp.o.投与-正の対照)の投与前及び後の日数(D)が示されている。投与が第0日(D0)に生起し、CCI手術がD-14に実施された。vFは、フォンフライ試験が示されている日に実施されたということを示す。(B)経時的な同側の足(すなわち、対照組成物、BoNT/A、又はBoNT/A(0)が投与された足)の機械的感受性(フォンフライ試験によって測定された)を、(A)に記載されている通り投与された動物について示す。(C)経時的な反対側の足(すなわち、対照組成物、BoNT/A、又はBoNT/A(0)が投与されなかった足)の機械的感受性(フォンフライ試験によって測定された)を、(A)に記載されている通り投与された動物について示す。(D)経時的な(A)に記載されている通り投与されたラットについて体重の変化を示す。

【図5】(A)成体の雄スプラグドローラットにおける急性のオキサリプラチンによって誘導されるニューロパチー性疼痛のモデルを用いる研究の実験の概略図を提示する。オキサリプラチン(10mg/kgの腹腔内(i.p.)投与)及びBoNT/A(0)(1000pg/kgのi.pl.投与)、BoNT/A(50pg/kgのi.pl.投与)、BoNT/A(100pg/kgのi.pl.投与)、BoNT/A(160pg/kgのi.pl.投与)、又は基剤(GPBのi.pl.投与-負の対照)が第0日(D0)に投与された。オキサリプラチン処置の更なる負の対照として、ラットのサブセットが5%グルコースi.p.及びGBP(i.pl.投与)を投与された。デュロキセチン(100mg/kgのp.o.投与-正の対照)がD3の試験の1h前に投与された。投与後の日数及び時間が示されている。PIは、足浸漬(冷温)試験が示されている日に実施されたということを示す。(B)経時的な同側の足(すなわち、対照組成物、BoNT/A、又はBoNT/A(0)が投与された足)の冷温感受性(足浸漬試験によって測定された)を、(A)に記載されている通り投与された動物について示す。(C)経時的な反対側の足(すなわち、対照組成物、BoNT/A、又はBoNT/A(0)が投与されなかった足)の冷温感受性(足浸漬試験によって測定された)を、(A)に記載されている通り投与された動物について示す。

【図6】(A)成体の雄スプラグドローラット(180~210g)における慢性のオキサリプラチンによって誘導されるニューロパチー性疼痛のモデルを用いる研究の実験の概略図を提示する。オキサリプラチンが第-2日(D-2)に投与された。BoNT/A(0)(100pg/kgのi.pl.投与)、BoNT/A(100pg/kgのi.pl.投与)、又は基剤(GPBのi.pl.投与-負の対照)が第0日(D0)に投与された。プレガバリン(30mg/kgのp.o.投与-正の対照)は第3日に投与された。投与前及び後の日数が示されている。vF及びCPは、フォンフライ及びコールドプレート試験(それぞれ)が示されている日に実施されたということを示す。(B)経時的な同側の足(すなわち、対照組成物、BoNT/A、又はBoNT/A(0)が投与された足)の機械的感受性(フォンフライ試験によって測定された)を、(A)に記載されている通り投与された動物について示す。(C)は、経時的な反対側の足(すなわち、対照組成物、BoNT/A、又はBoNT/A(0)が投与されなかった足)の機械的感受性(フォンフライ試験によって測定された)を、(A)に記載されている通り投与された動物について示す。(D)は、経時的な温度感受性(コールドプレート試験によって測定された)を(A)に記載されている通り投与された動物について示す。

【図7】(A)成体の雄ウィスターラット(180~210g)における急性の紫外線B(UV-B)熱傷によって誘導される炎症性疼痛のモデルを用いる研究の実験の概略図を提示する。BoNT/A(0)(100pg/kgのi.pl.投与)、BoNT/A(100pg/kgのi.pl.投与)、又は基剤(GPBのi.pl.投与-負の対照)が、第0日(D0)に投与された。インドメタシン(5mg/kgのp.o.投与-正の対照)がD3のリードアウトの1h前に投与された。ラットが第1日(D1)にUV-B(500mJ/cm²)に暴露された。vFは、フォンフライ試験が示されている日に実施されたということを示す。(B)機械的感受性(フォンフライ試験によって測定された)を(A)に記載されている通り投与さ

れた動物について示す。

【図8】マウスの機械的感受性(フォンフライ試験によって測定された)を示す。基剤、触媒的に活性なキメラBoNT/XB(0.3ng/kg、n=10)、触媒的に活性なキメラBoNT/XB(30ng/kg、n=10)、触媒的に不活性なキメラBoNT/XB(0)(0.3ng/kg、n=10)、触媒的に不活性なキメラBoNT/XB(0)(30ng/kg、n=10)、BoNT/A(160pg/kg、n=10)、又はインドメタシン(10mg/kg、n=9)を投与された。無処置の動物における(ベースライン)、BoNT又は基剤の投与の2日後のかつ完全フロイントアジュバント(CFA)投与前(第0日CFA、第2日)、及びCFA投与の1日後の(第1日CFA、第3日)感受性が示されている。^{**}P<0.1、^{*}P<0.01(反復測定二元配置ANOVA後の基剤に対するダネット多重比較)。

【0370】

配列表

【0371】

開始Metアミノ酸残基又は対応する開始コドンが以下の配列番号のいずれかにおいて示されている場合には、前記の残基/コドンは随意である。

【0372】

配列番号1-組み換えの触媒的に不活性なBoNT/A(rBoNT/A(0))のヌクレオチド配列

配列番号2-rBoNT/A(0)のポリペプチド配列

配列番号3-rLH_N/A(軽鎖プラス転位置ドメインのみ)のヌクレオチド配列

配列番号4-rLH_N/Aのポリペプチド配列

配列番号5-rL/A(軽鎖のみ)のヌクレオチド配列

配列番号6-rL/Aのポリペプチド配列

配列番号7-rH_C/Aのヌクレオチド配列

配列番号8-rH_C/Aのポリペプチド配列

配列番号9-rBoNT/B(0)のヌクレオチド配列

配列番号10-rBoNT/B(0)のポリペプチド配列

配列番号11-rBoNT/C(0)のヌクレオチド配列

配列番号12-rBoNT/C(0)のポリペプチド配列

配列番号13-rBoNT/E(0)のヌクレオチド配列

配列番号14-rBoNT/E(0)のポリペプチド配列

配列番号15-rBoNT/F(0)のヌクレオチド配列

配列番号16-rBoNT/F(0)のポリペプチド配列

配列番号17-rBoNT/A(0)(Hisタグ付き)のヌクレオチド配列

配列番号18-rBoNT/A(0)(Hisタグ付き)のポリペプチド配列

配列番号19-rLH_N/A(Hisタグ付き)のヌクレオチド配列

配列番号20-rLH_N/A(Hisタグ付き)のポリペプチド配列

配列番号21-rH_C/A(Hisタグ付き)のヌクレオチド配列

配列番号22-rH_C/A(Hisタグ付き)のポリペプチド配列

配列番号23-rLC/A(Hisタグ付き)のヌクレオチド配列

配列番号24-rLC/A(Hisタグ付き)のポリペプチド配列

配列番号25-rBoNT/FA(0)(Hisタグ付き)のヌクレオチド配列

配列番号26-rBoNT/FA(0)(Hisタグ付き)のポリペプチド配列

配列番号27-rLH_N/FA(Hisタグ付き)のヌクレオチド配列

配列番号28-rLH_N/FA(Hisタグ付き)のポリペプチド配列

配列番号29-rH_C/FA(Hisタグ付き)のヌクレオチド配列

配列番号30-rH_C/FA(Hisタグ付き)のポリペプチド配列

配列番号31-rLC/FA(Hisタグ付き)のヌクレオチド配列

配列番号32-rLC/FA(Hisタグ付き)のポリペプチド配列

配列番号33-rBoNT/F(0)(Hisタグ付き)のヌクレオチド配列

配列番号34-rBoNT/F(0)(Hisタグ付き)のポリペプチド配列

配列番号35-rLH_N/F(Hisタグ付き)のヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

配列番号36-rLH _N /F(Hisタグ付き)のポリペプチド配列	
配列番号37-rH _C /F(Hisタグ付き)のヌクレオチド配列	
配列番号38-rH _C /F(Hisタグ付き)のポリペプチド配列	
配列番号39-rLC/F(Hisタグ付き)のヌクレオチド配列	
配列番号40-rLC/F(Hisタグ付き)のポリペプチド配列	
配列番号41-カチオン性rH _C /A(Hisタグ付き)のヌクレオチド配列	
配列番号42-カチオン性rH _C /A(Hisタグ付き)のポリペプチド配列	
配列番号43-rH _C /AB(Hisタグ付き)のヌクレオチド配列	
配列番号44-rH _C /AB(Hisタグ付き)のポリペプチド配列	
配列番号45-rH _C /A変異体Y1117V H1253K(Hisタグ付き)のヌクレオチド配列	10
配列番号46-rH _C /A変異体Y1117V H1253K(Hisタグ付き)のポリペプチド配列	
配列番号47-rH _C /A変異体Y1117V F1252Y H1253K L1278F(Hisタグ付き)のヌクレオチド配列	
配列番号48-rH _C /A変異体Y1117V F1252Y H1253K L1278F(Hisタグ付き)のポリペプチド配列	
配列番号49-rH _C /A変異体Y1117V F1252Y H1253K L1278H(Hisタグ付き)のヌクレオチド配列	
配列番号50-rH _C /A変異体Y1117V F1252Y H1253K L1278H(Hisタグ付き)のポリペプチド配列	
配列番号51-BoNT/Aのポリペプチド配列-UniProtのP10845	20
配列番号52-BoNT/Bのポリペプチド配列-UniProtのP10844	
配列番号53-BoNT/Cのポリペプチド配列-UniProtのP18640	
配列番号54-BoNT/Dのポリペプチド配列-UniProtのP19321	
配列番号55-BoNT/Eのポリペプチド配列-UniProtのQ00496	
配列番号56-BoNT/Fのポリペプチド配列-UniProtのA7GBG3	
配列番号57-BoNT/Gのポリペプチド配列-UniProtのQ60393	
配列番号58-TeNTのポリペプチド配列-UniProtのP04958	
配列番号59-BoNT/Xのポリペプチド配列	
配列番号60-未改変のBoNT/A1のポリペプチド配列	
配列番号61-mrBoNT/AB(0)のポリペプチド配列	30
配列番号62-mrBoNT/A(0)のポリペプチド配列	
配列番号63-BoNT/XB(0)(Hisタグ付き)のポリペプチド配列	
配列番号64-BoNT/XB(0)のポリペプチド配列	
配列番号65-BoNT/XB(0)変異体(Hisタグ付き)のポリペプチド配列	
配列番号66-BoNT/XB(0)変異体のポリペプチド配列	
配列番号67-BoNT/XA(0)のポリペプチド配列	
配列番号68-BoNT/XA(0)変異体のポリペプチド配列	
配列番号69-BoNT/XD(0)のポリペプチド配列	
配列番号70-BoNT/XF(0)のポリペプチド配列	
配列番号71-C1活性化ループコンセンサス配列	40
配列番号72-C1活性化ループ	
配列番号73-C1活性化ループ変異体	
配列番号74-rLC/A(0)(Hisタグ付き)のポリペプチド配列	
配列番号75-rLH _N /A(0)(Hisタグ付き)のポリペプチド配列	
配列番号76-rLC/X(0)のポリペプチド配列	
配列番号77-PreScissionプロテアーゼ部位	
配列番号78-C1活性化ループ変異体2	
【0373】	
配列番号1 - 核酸配列, rBoNT/A(0)	
ATGCCATTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGC	50

ATACATCAAGATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAGATCCACA
ACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAGAAGGCGATCTG
AACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCAGCTACTACGATTTCGACGTACCTGAG
CACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTTCGAACGTATCT
ACAGCACGGATCTGGGTCTGCATGCTGCTGACTAGCATTGTTTCGCGGTATCCCGTTCTGG
GGTGGTAGCACGATTGACACCGAACTGAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTAT
TCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAATCTGGTCATCATTGGCCCCGAGCG
CAGACATTATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTTTGGTCACGAGGTTCTGAATCTGACCCGC
AATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTCGTTTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGA
AGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATC
CGGCTGTCACGCTGGCCCATCAACTGATCTACGCAGGCCACCGCCTGTACGGCATTGCCA
TCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATGAGCGGCCTG
GAAGTCAGCTTCGAAGAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACAG
CTTGCAAGAGAATGAGTTCGCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCA
CGTTGAACAAGGCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAAT
GTGTTTAAAGAGAAGTACCTGCTGTCCGAGGATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAA
GCTGAAGTTTGACAACTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGACAACTTTG
TGAAATTCCTCAAAGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTTTTTC
AAGATTAACATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAACCTGCGTAA
CACCAACCTGGCGGCGAACTTTAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACATGAATTTCA
CGAAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTTCGAGTTCTATAAGCTGCTGTGCGTGCGCGGT
ATCATCACCAGCAAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAACAAGGCGCTGAATGACCT
GTGCATTAAGGTAAACAATTGGGATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAAGATAATTTTACCA
ACGACCTGAACAAGGGTGAAGAAATCACCAGCGATACGAATATTGAAGCAGCGGAAGAG
AATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCTGACCTTTAACTTCGACAATGAACC
GGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATTATCGGTTCAGCTGGAACCTGATGC
CGAATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTTC
CATTACCTGCGTGACAGGAGTTTGAACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAG
CGTTAACGAGGCCCTGCTGAACCCGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATG
TTAAGAAAGTGAACAAAGCCACTGAGGCCGCGATGTTCTGCGGTGGGTGGAACAGCTG
GTATATGACTTCACGGACGAGACGAGCGAAGTGAGCACTACCGACAAAATTGCTGATAT
TACCATCATTATCCCGTATATTGGTCCGGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAG
ACGATTTTGTGGGTGCCCTGATCTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTCATTCCG
GAGATTGCGATCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCTACATCGCGAATAAGGT
TCTGACGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTGAAACGTAATGAAAAATGGGACGAGG
TTTACAAATACATTGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAGATCGACCTGATC
CGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAATTATCAA
CTACCAATACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAGAATAACATTAACCTCAATATCGATG
ATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTT
TTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATGATTCCGTATGGCGTCAAACG
TCTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGACAATC
GTGGTACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAAAGACAAAGTTAACAATACCTTGAGC
ACCGACATCCCATTTCAACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGTCTGTTGAGCACTTT
CACCGAGTATATCAAAAACATCATCAATACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCA
ATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCAAGCAAGATCAACATCGGTAGCAAGGTCAAT
TTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTGTTTAATCTGGAATCGAGCAAAATTGA
GGTTATCCTGAAAAACGCCATTGTCTACAACCTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCT
TCTGGATTTCGCATCCCGAAATACTTCAACAGCATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATC
ATCAACTGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCAT
TTGGACCTTGCAGGACACCCAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAGTACTCTCAA

10

20

30

40

50

TGATCAACATTTCCGATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGT
CTGAATAACAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAA
CCTGGGTAATATCCACGCAAGCAACAACATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATA
CCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAATGAGAAG
GAGATCAAAGATTTGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGGGG
CGATTATCTGCAATACGATAAGCCGTAATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAAT
ATGTGGATGTCAATAATGTGGGTATTCTGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCCGCGTGGC
AGCGTTATGACGACCAACATTTACCTGAACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCAT
CATTAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATTGTGCGTAATAACGATCGTGTCT
ACATCAACGTGGTCTGTGAAGAATAAAGAGTACCGTCTGGCGACCAACGCTTCGCAGGCG
GGTGTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTGCGTAATCTGAGCCAAGT
CGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACCAGGGTATCACTAACAAGTGCAAGATGAACCTGC
AAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTTATTGGTTTCCACCAGTTCAACAATATTGCT
AACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGCCGTAATTTGGG
CTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGATGATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

【0374】

配列番号2 - ポリペプチド配列, rBoNT/A(0)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMGPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDL
NPPPEAKQVPVSYDYDSTYLDNEKDNLYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWG
GSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGS
TQYIRFSPDFTFGFEESLEVDNPLLGAGKFATDPAVTLAHQLIYAGHRLYGIAPNPNRVF
KVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIASTLNKAKSIV
GTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSKGFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRK
TYLNFDAVKINIVPKVNYTIYDGFNLNRNTNLAANFNQNTNINMFTKLKNFTGLFE
FYKLLCVRGIITSKTSKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITS
DTNIEAAEENISLDLIQYYLTFNFDNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKY
TMFHYLRAQEFHKGSRALTNVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWV
EQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEI
AIPVLGTFALVSYIANKVLTQVTDNALSQRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLRKK
MKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCS
VSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRDKDKVNNTLSTDIPFQ
LSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQ
LFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWKVS
LNYGEIWTQLQDTQEIQRVVFYKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQK
PISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNIGILKDF
WGDYLYQDKPYMYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRG
TFIHKYASGNKDNIVRNDRVYINVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQ
VVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNAKLVASNWYNRQIERSRTL
GCSWEFIPVDDGWGERPL

【0375】

配列番号3 - 核酸配列, rLH_N/A

atggagttcgttaacaaacagttcaactataaagaccagttaacggtgttgacattgcttacatcaaatcccg
aacgctggccagatgcagccggttaaaggcattcaaatccacaacaaaatctgggttatcccggaacgtgata
cctttactaaccggaagaagggtgacctgaacccgccaccggaagcgaaacaggtgccggtatcttactatga
ctccacctacctgtctaccgataacgaaaaggacaactacctgaaagggtgttactaaactgttcgagcgtattt
actccaccgacctgggcccgtatgctgctgactagcatcgcttcgcggtatcccgttctggggcggttctaccatc
gataccgaactgaaagtaatcgacactaactgcatcaacgttattcagccggacggttcctatcgttccgaaga
actgaacctggtgatcatcgccccgtctgctgatcatccagttcgagtgaagagctttggtcacgaagttct
gaacctcaccgtaacggctacgggttcactcagtagcatccgtttctctccggacttcaccttcggttttgaaga
atccctggaagtagacacgaaccactgctgggctggtgtaattcgcaactgatcctgcggttacctggct

10

20

30

40

50

cacgaactgattcatgcaggccaccgcctgtacgggtatcgccatcaatccgaaccgtgtcttcaaagttaacac
caacgcgtattacgagatgtccgggtctggaagtttagcttcgaagaactgcgtacttttggcgggtcacgcacgta
aattcatcgactctctgcaagaaaacgagttccgtctgtactactataacaagttcaaagatatcgcatccaccc
tgaacaaagcgaatccatcggtgggtaccactgcttctctccagtacatgaagaacgtttttaagaaaaatac
ctgctcagcgaagacacctccggcaaattctctgtagacaagttgaaattcgataaactttacaaaatgctgac
tgaaatttacaccgaagacaacttcgttaagttctttaagttctgaaccgcaaaacctatctgaacttcgacaa
ggcagtattcaaatcaacatcggtgccgaagtttaactacactatctacgatggtttcaacctgcgtaacacca
acctggctgctaattttaacggccagaacacggaaatcaacaacatgaacttcacaaaactgaaaaacttcact
ggctgttctgagttttacaagctgctgtgcGTCGACGGCATCATTACCTCCAAAATAAATCTGAC
GATGACGATAAAAACAAAGCGCTGAACCTGCAGTgtatcaaggttaacaactgggatttatttctca
gcccagtgtaagacaacttcaccaacgacctgaacaaagggtgaagaatcacctcagataactaacatcgaag
cagccgaagaaaacatctcgttggacctgatccagcagtactacctgaccttaatttcgacaacgagccgga
aaacatttctatcgaaaacctgagctctgatatcatcgccagctggaactgatgccgaacatcgaacgtttcc
caaacggtaaaaagtacgagctggacaaatataccatgttccactacctgcgcgcgcaggaatttgaacacgg
caaatcccgtatcgactgactaactccgttaacgaagctctgctcaaccgctccgtgtatacaccttcttctc
tagcgactacgtgaaaaagggtcaacaaagcgactgaagctgcaatgttcttgggttgggttgaacagcttgtt
atgattttaccgacgagacgtccgaagtatctactaccgacaaaattgcggatatcactatcatcatcccgtaca
tcggtccggctctgaacattggcaacatgctgtacaaagacgacttcgttggcgactgatcttctccgggtgcg
gtgatcctgctggagttcatcccggaaatcgccatcccgggtactgggcacctttgctctggttcttaccattgca
aacaaggttctgactgtacaaaccatcgacaacgcgctgagcaaacgtaacgaaaaatgggatgaagtttaca
aatatatcgtgaccaactggctggctaagggttaatactcagatcgacctcatccgcaaaaaaatgaaagaagc
actggaaaaccaggcggaagctaccaaggcaatcattaactaccagtacaaccagtacaccgaggaagaaa
aaaacaacatcaacttcaacatcgacgatctgtcctctaaactgaacgaatccatcaacaaagctatgatcaac
atcaacaagttcctgaaccagtgtctgtgaagctatctgatgaactccatgatcccgtacgggtgttaaacgtctg
gaggacttcgatgcgtctctgaaagacgccctgctgaaatacatttacgacaaccgtggcactctgatcggtca
ggttgatcgtctgaaggacaaagtgaacaataccttatcgaccgacatcccttttcagctcagtaaataatgtcg
ataaccaacgccttttgtccactctagaagcaCACCATCATCACcaccatcaccatcaccat

【0376】

配列番号4 - ポリペプチド配列, rLH_N/A

MEFVNKQFNYPVNGVDIAYIKIPNAGQMMPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDL
NPPPEAKQVPVSYDYDSTYLDNEKDNLYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLSIVRGIPFWG
GSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGS
TQYIRFSPDFTFGFEESLEVDNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAPNPNRVF
KVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKAKSIV
GTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSKGFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRK
TYLNFDAVKINIVPKVNYTIYDGFNLNRNTNLAANFNGQNTNINMFTKLKNFTGLFE
FYKLLCVDGIITSKTKSDDDDKNKALNLQCIKVNNDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITS
NIEAAEENISLDLIQYYLTFNFDNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKY
TMFHYLRAQEFHKGSRALNTSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWV
EQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIPIYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEI
AIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSkrNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKK
MKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCS
VSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQ
LSKYVDNQRLSTLEAHHHHHHHHHH

【0377】

配列番号5 - 核酸配列, rL/A

ATGCCATTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGC
ATACATCAAGATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAGATCCACA
ACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAGAAGGCGATCTG
AACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCAGCTACTACGATTTCGACGTACCTGAG

10

20

30

40

50

CACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTCTGAACGTATCT
ACAGCACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGTTTCGCGGTATCCCGTTCTGG
GGTGGTAGCACGATTGACACCGAACTGAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAAACGTTAT
TCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAATCTGGTCATCATTGGCCCCGAGCG
CAGACATTATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTTTGGTACGAGGTTCTGAATCTGACCCGC
AATGGCTATGGTAGCACCAGTACATTCGTTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGA
AGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATC
CGGCTGTCACGCTGGCCCATGAACTGATCCACGCAGGCCACCGCCTGTACGGCATTGCC
ATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATGAGCGGCCT
GGAAGTCAGCTTCGAAGAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACA
GCTTGCAAGAGAATGAGTTCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGC
ACGTTGAACAAGGCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAA
TGTGTTTTAAAGAGAAGTACCTGCTGTCCGAGGATACCTCCGGCAAAGTTTAGCGTTGATA
AGCTGAAGTTTGACAACTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGACAACCTTT
GTGAAATTCTTCAAAGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTTTT
CAAGATTAACATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAACCTGCGTA
ACACCAACCTGGCGGCGAACTTTAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACATGAATTC
ACGAAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTTCGAGTTCTATAAGCTGCTGggtctagaagcaC
ACCATCATCACcaccatcaccatcaccat

【0378】

配列番号6 - ポリペプチド配列, rL/A

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQM QPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDL
NPPPEAKQVPVSYDYDSTYLDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWG
GSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGEVLNLTRNGYGS
TQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLL GAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAINPNRVF
KVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKAKSIV
GTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTS GKFSVDKLFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRK
TYLNFDAVKINIVPKVNYTIYDGFNL RNTNLAANFNGQNTEINNMNFTKLKNFTGLFE
FYKLLGLEAHHHHHHHHHH

【0379】

配列番号7 - 核酸配列, rH_C/A

ATGCATCATCACCATCACCACAAAAACATCATCAATACTAGCATTCTGAACCTGCGTTA
CGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCAAGCAAGATCAACATCGGTAGCA
AGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTGTTTAATCTGGAATCGAGC
AAAATTGAGGTTATCCTGAAAAACGCCATTGTCTACAACCTCCATGTACGAGAATTTCTC
CACCAGCTTCTGGATTTCGCATCCCGAAATACTTCAACAGCATTAGCCTGAACAACGAGT
ATACTATCATCAACTGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTATGGT
GAGATCATTTGGACCTTGCAGGACACCCAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAGTA
CTCTCAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGA
ATAACCGTCTGAATAACAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCG
ATTAGCAACCTGGGTAATATCCACGCAAGCAACAACATTATGTTCAAATTGGACGGTTG
CCGCGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGA
ATGAGAAGGAGATCAAAGATTTGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGAC
TTCTGGGGCGATTATCTGCAATACGATAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCC
GAACAAATATGTGGATGTCAATAATGTGGGTATTTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTC
CGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTGAACTCTAGCCTGTACCGTGGTACG
AAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATTGTGCGTAATAACGA
TCGTGTCTACATCAACGTGGTTCGTGAAGAATAAAGAGTACCGTCTGGCGACCAACGCTT
CGCAGGCGGGTGTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTGCGTAATCTG
AGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACCAGGGTATCACTAACAAAGTGCAAGAT

GAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTTATTGGTTTCCACCAGTTCAACA
ATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGCCGT
ACTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGATGATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG
【0380】

配列番号8 - ポリペプチド配列, rH_C/A

MHHHHHHKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIE
VILKNAIVYNSMYENFSTSWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWKVS LNYGEIIWT
LQDTQEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIH
ASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDEKELNEKEIKDLYDNQSN SGILKDFWGDYLYQD
KPY YMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASG
NKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKN
DQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFN NIAKLVASN WYNRQIERSSRTLGC SWEFIPV
DDGWGERPL

【0381】

配列番号9 - 核酸配列, rBoNT/B(0)

ATGCCGGTGACGATTAACAACCTTCAACTACAACGACCCGATTGACAACAACAACATTAT
CATGATGGAACCGCCGTTTGCACGCGGCACGGGCCGTTATTACAAAGCGTTTAAAATCA
CCGATCGTATTTGGATTATCCCGGAACGCTACACGTTTGGTTATAAACCGGAAGACTTC
AACAAAAGCTCTGGCATCTTCAACCGTGATGTTTGCGAATACTACGATCCGGACTACCT
GAACACCAACGATAAGAAAAACATTTTTCTGCAAACGATGATCAAACCTGTTCAATCGCA
T TAAAAGCAAACCGCTGGGTGAAAAACTGCTGGAAATGATTATCAATGGCATTCCGTAT
CTGGGTGATCGTCGCGTGCCGCTGGAAGAATTTAACACCAATATCGCGAGTGTTACGGT
CAACAAACCTGATTTCCAATCCGGGTGAAGTCGAACGTAAAAAAGGCATCTTCGCCAACC
TGATCATCTTCGGCCCCGGGTCCGGTGCTGAACGAAAATGAAACCATTGATATCGGTATT
CAGAACCATTTTGCCTCACGCGAAGGCTTCGGCGGTATTATGCAAATGAAATTTTGGCC
GGAATATGTGTCGGTTTTCAACAATGTTTCAGGAAAACAAAGGTGCAAGCATCTTTAATC
GTCGCGGCTATTTCTCTGATCCGGCTCTGATCCTGATGCACCAACTGATTtATGTGCTGC
ACGGCCTGTATGGTATCAAAGTGGATGACCTGCCGATCGTTCCGAACGAGAAAAAATTT
TTCATGCAGAGCACCGACGCAATTCAAGCTGAAGAACTGTATACGTTTGGCGGTCAGGA
CCCGTCTATTATCACCCCGAGCACCGACAAAAGCATCTACGATAAAGTGCTGCAAAACT
TTCGTGGCATTGTTGACCGCCTGAATAAAGTCCTGGTGTGTATCTCTGATCCGAACATC
AACATCAACATCTACAAAAACAAATTCAAAGACAAATACAAATTCGTTGAAGATTCTGA
AGGCAAATATAGTATTGACGTCGAATCCTTTGATAAACTGTACAAAAGTCTGATGTTG
GTTTCACCGAAACGAACATCGCGGAAAACCTACAAAATCAAACCCGCGCCTCCTATTT
AGCGACTCTCTGCCGCCGGTTAAAATCAAATCTGCTGGATAACGAAATTTATACGAT
CGAAGAAGGTTTCAACATCAGCGATAAAGACATGGAAAAAGAATACCGTGGCCAGAATA
AAGCAATCAACAAACAGGCGTATGAAGAAATTAGTAAAGAACATCTGGCGGTCTACAAA
ATTCAGATGTGCAAATCCGTGAAAGCCCCGGGTATTTGTATCGATGTTGACAATGAAGA
CCTGTTTTTTCATCGCCGATAAAAAACAGTTTTTCCGATGACCTGTCAAAAAATGAACGCA
TCGAATACAACACCCAATCGAACTACATCGAAAACGATTTCCCGATCAACGAACCTGATT
CTGGATACGGACCTGATTAGTAAAATCGAACTGCCGTCAGAAAACACCGAATCGCTGAC
GGACTTTAATGTTGATGTCCCGGTGTATGAAAAACAGCCGGCAATTAAGAAAATTTT
CCGATGAAAACACGATCTTCCAGTACCTGTACAGCCAAACCTTTCCGCTGGACATTTCG
GATATCTCTCTGACGAGTTCCTTTGATGACGCACTGCTGTTGAGCAACAAAGTGACTC
CTTTTTCTCAATGGATTACATCAAAACCGCTAACAAAGTGGTTGAAGCGGGCCTGTTTG
CCGGTTGGGTGAAACAGATCGTTAACGATTTTCGTCATCGAAGCCAACAAAAGTAACACG
ATGGATAAAATTGCTGATATCTCCCTGATTGTCCCGTATATTGGCCTGGCACTGAATGT
GGGTAAACGAAACGGCGAAAGGCAATTTTGAAAACGCCTTCGAAATTGCAGGCGCTTCAA
TCCTGCTGGAATTTATTCCGGAACCTGCTGATCCCGGTCGTGGGTGCGTTCCTGCTGGAA
TCTTACATCGACAACAAAAACAAAATCATCAAAACCATTGATAACGCGCTGACGAAACG

10

20

30

40

50

TAACGAAAAATGGTCAGATATGTACGGCCTGATTGTTGCCAGTGGCTGAGCACCGTCA
ACACGCAATTTTACACCATCAAAGAAGGTATGTACAAAGCGCTGAATTATCAGGCGCAA
GCCCTGGAAGAAATCATCAAATACCGCTACAACATCTACAGCGAAAAAGAAAAATCTAA
CATCAACATCGACTTTAATGATATCAACAGCAAACCTGAACGAAGGTATCAACCAGGCAA
TCGATAACATCAACAACCTTCATCAACGGCTGCTCAGTGTCTGATCTGATGAAGAAAATG
ATCCCGCTGGCTGTTGAAAACTGCTGGATTTTGACAACACCCTGAAGAAAAACCTGCT
GAACTACATCGATGAAAACAACTGTACCTGATCGGCTCAGCCGAATACGAAAAATCGA
AAGTGAACAAATACCTGAAAACCATCATGCCGTTTGACCTGAGTATTTACACCAACGAT
ACGATCCTGATCGAAATGTTCAACAAATACAACTCCGAAATTCTGAACAATATTATCCT
GAACCTGCGTTACAAAGACAACAATCTGATCGATCTGAGCGGCTATGGTGCAAAAGTTG
AAGTCTACGACGGTGTGAACTGAACGATAAAAACCAGTTCAAACCTGACCTCATCGGCT
AACTCAAAAATTCGTGTGACGCAGAACCAAAACATCATCTTCAACTCGGTCTTTCTGGA
CTTCAGCGTGTCTTTCTGGATTTCGCATCCCGAAATATAAAAATGATGGCATCCAGA
ACATCCATAACGAATACACCATCATCAACTGTATGAAAAACAACAGTGGTTGGAAAATT
TCCATCCGTGGCAACCGCATTATCTGGACCCTGATTGATATCAATGGTAAAACGAAAAG
CGTGTTTTTTCGAATACAACATCCGTGAAGATATCTCTGAATACATCAATCGCTGGTTTT
TCGTGACCATTACGAACAATCTGAACAATGCGAAAATCTATATCAACGGCAAACTGGAA
AGTAATACCGACATCAAAGATATTCGTGAAGTTATCGCCAACGGTGAAATCATCTTCAA
ACTGGATGGCGACATCGATCGCACCCAGTTCATTTGGATGAAATACTTCTCCATCTTCA
ACACGGAACCTGAGTCAGTCCAATATCGAAGAACGCTACAAAATCCAATCATACTCGGAA
TACCTGAAAGATTTCTGGGGTAACCCGCTGATGTACAACAAAGAATACTACATGTTCAA
CGCGGGCAACAAAACTCATAACATCAAACCTGAAAAAAGATTGCGCGGTGGGTGAAATCC
TGACCCGTAGCAAATACAACCAGAACTCTAAATACATCAACTATCGCGATCTGTACATT
GGCGAAAAATTTATTATCCGTGCGAAAAGCAACTCTCAGAGTATTAATGATGACATCGT
GCGTAAAGAAGACTACATCTATCTGGATTTCTTTAATCTGAACCAAGAATGGCGCGTTT
ATACCTACAAATACTTCAAAAAAGAAGAAGAGAACTGTTTCTGGCCCCGATTAGCGAC
AGCGATGAATTTTACAACACCATCCAGATCAAAGAATACGATGAACAGCCGACGTATAG
TTGCCAACTGCTGTTCAAAAAAGACGAAGAATCCACCGATGAAATTGGCCTGATTGGTA
TCCACCGTTTCTATGAAAGCGGTATCGTTTTCGAAGAATACAAAGATTACTTCTGTATC
TCTAAATGGTATCTGAAAGAAGTCAAACGCAAACCGTACAACCTGAACTGGGCTGCAA
CTGGCAATTTATCCCGAAAGACGAAGGCTGGACCGAA

【0382】

配列番号10 - ポリペプチド配列, rBoNT/B(0)

MPVTINNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGRIYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKPEDFN
KSSGIFNRDVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLEMIINGIPYLGDR
RVPLEEFNTNIASVTVNKLISNPGEVERKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQNHFASRE
GFGGIMQMKFCPEYVSFVFNQENKGASIFNRRGYFSDPALILMHQLIYVLHGLYGIKVD
DLPIVPNEKKFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNFRGIVDRLNKV
LVCISDPNININIKYKFKDKYKFVEDSEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGFTETNIAENYKIK
TRASYSFDSLPPVKIKNLLDNEIYTIEEGFNISDKDMEKEYRGQNKAINQAYEEISKEHLA
VYKIQMCKSVKAPGICIDVDNEDLFFIADKNSFSDDLKNERIEYNTQSNYIENDFPINELI
LDTDLISKIELPSENTESLTDNFNDVPVYEKQPAIKKIFTDENTIFQYLYSQTFPLDIRDISL
TSSFDDALLFSNKVYSFFSMFYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVNDFVIEANKSNTMDKIA
DISLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFEIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLLSEYIDNKNKII
KTIDNALTKRNEKWSMDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEEIIKYRY
NIYSEKEKSNINIDFNDINSKLNENINQAIDNINNFINGCSVSYLMKKMIPLAVEKLLDFDN
TLKKNLLNYIDENKLYLIGSAEYKSKVNKYLTIMPFDLSIYTNDTILIEFMFNKYNSEILN
NIILNLRYKDNNLIDLSGYGAKVEVYDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVF
LDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLIDINGKTKSV
FFEYNIREDISSEYINRWFFVTITNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDI

10

20

30

40

50

DRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKN
SYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYINYRDLYIGEKFIIRKSNQSQSINDDIVRKEDIYILD
FFNLNQEWVRVYTYKYFKKEEEKLFLAPISDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEES
TDEIGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE
【0383】

配列番号11 - 核酸配列, rBoNT/C(0)

ATGCCGATCACGATTAATAATTTCAACTATAGCGATCCGGTGGACAATAAGAATATTCT
GTATCTGGATACTCATCTGAATACGCTGGCTAACGAACCGGAGAAAGCGTTCGCATCA
CAGGCAACATCTGGGTTATTTCCCGATCGCTTTTCACGCAACAGCAACCCTAATCTGAAC
AAACCTCCTCGTGTCACCAGTCCTAAATCCGGTTATTACGACCCAAACTATCTGAGTAC
GGATAGCGATAAAGATCCCTTTCTGAAAGAGATCATTAAGCTGTTCAAACGCATTAAC
CTCGCGAAATTGGGGAAGAGCTGATCTATCGGCTTTTCGACAGATATCCCGTTCCAGGT
AACAATAATACCCCGATTAATACTTTGACTTTGATGTTGATTTCAATTCTGTGGATGT
GAAAACGCGTCAAGGCAATAATTGGGTGAAAACCTGGTAGCATTAACCCGAGTGTAATTA
TCACAGGTCCCCGTGAGAACATCATCGACCCGGAAACCTCTACCTTCAAGCTGACGAAC
AACACGTTTGCTGCACAGGAAGGGTTTGGTGCCCTGTCAATCATTTCCATCTCACC
GCGTTTCATGTTAACCTACTCCAATGCCACAAATGATGTTGGCGAAGGACGTTTTAG
CAAATCAGAATTTTGCATGGACCCAATTCTCATTCTGATGggCacGCTGAACaATGCGATGCACA
ACTTGTATGGCATTGCTATTCCAAACGATCAAACCATTAGCTCCGTTACCAGTAATATC
TTCTATAGCCAGTATAATGTCAAATTGGAGTATGCCGAAATTTACGCCTTTGGAGGCC
GACCATTGACCTGATTCCGAAATCTGCACGCAAATACTTCGAAGAAAAGGCGTTAGATT
ACTATCGCAGCATCGCGAAACGCCTGAACTCGATTACCACGGCCAATCCGTCGTCGTT
CAACAAATACATTGGTGAATATAAACAGAACTGATTTCGCAAATATCGGTTTGTCTGTA
AAGCTCTGGTGAAGTGACTGTAAACCGCAACAAATTTGTGCAACTCTACAACGAGTTGA
CCCAAATCTTTACCGAGTTTAACTACGCAAAGATCTATAACGTACAGAACCGCAAGATT
TATCTTAGCAATGTATACACACCGGTTACTGCGAACATCTTAGACGACAATGTGTATGA
TATTCAGAATGGCTTTAACATCCCGAAATCAAATCTGAACGTTCTGTTTATGGGCCAGA
ACCTGAGTCGTAATCCAGCACTGCGTAAAGTGAACCCGGAAAATATGCTCTACTTGT
TTACCAAATTTTGGCCACAAAGCGATTGATGGCCGCTCTCTCTATAACAAAACGCTGGATT
GTCGTGAGTTACTTGTGAAGAACTGATTTACCGTTCAATTGGGGATATCTCCGACGTGA
AAACCGATATCTTCTGCGCAAAGACATTAATGAAGAAACGGAAGTCATCTATTACCC
GACAATGTGAGCGTTGATCAGGTCATTTTATCGAAGAACACCTCCGAACATGGTCAGTT
GGATTTGCTGTACCTAGCATTGACTCGGAGAGTGAAATCCTTCCGGGCGAAAATCAAG
TGTTTTACGACAACCGTACCCAAAATGTTGATTATTTGAATTCTTATTACTACCTGGAA
TCTCAGAAATTGAGCGACAATGTGGAAGATTTACGTTTACACGCTCCATTGAGGAAGC
GCTGGATAATAGCGCGAAAGTGATACGTATTTCCCTACCTTGGCGAATAAAGTAAATG
CTGGTGTCCAGGGAGGCTTATTTCTGATGTGGGCGAATGATGTGGTAGAAGATTTTACG
ACCAATATTTTGCCTAAGGACACCTTAGATAAAATTAGCGATGTTAGCGCCATCATCCC
CTATATTGGCCAGCACTGAATATCTCGAACTCTGTGCGTCGCGGAACTTCACCGAAG
CATTTGCGGTGACCGGGGTTACTATTCTGTTGGAAGCCTTTCCGGAGTTTACTATTCCG
GCGCTGGGTGCGTTTGTGATTTATTCGAAAGTACAAGAACGCAATGAAATTATCAAAAC
CATCGATAATTGCCTGGAACAACGCATTAACGCTGGAAGGATTCTTATGAATGGATGA
TGGGCACCTGGTTATCCCGTATTATCACACAGTTTAAACAACATCTCGTATCAGATGTAC
GATTCATGAACTACCAAGCAGGGGCGATCAAAGCCAAGATCGACTTAGAATACAAGAA
ATATTCAGGTAGCGATAAAGAGAATATTAAGGAGGTTGAAAACCTGAAGAACTCTC
TGGATGTCAAATTTTCAAGAGGCTATGAACAACATTAACAAATTTATCCGCGAATGTAGC
GTCACGTATCTGTTTAAAAACATGCTCCCGAAAGTGATTGATGAGCTCAACGAGTTTGA
TCGCAACACAAAGGCCAAACTGATTAACCTGATTGATAGTCACAATATTATTTTAGTCG
GTGAAGTTGACAAGCTGAAGGCTAAGGTCAATAACAGCTTTCAGAACACTATTCCGTTT
AATATTTTCTCCTATACGAACAATAGTCTGCTGAAAGACATTATCAACGAATACTTCAA

10

20

30

40

50

CAATATTAATGACAGCAAAATTCTGAGCCTGCAGAATCGTAAGAATACGCTGGTAGATA
CCAGTGGATATAATGCGGAAGTCTCAGAAGAGGGTGATGTACAGCTGAACCCGATCTTT
CCGTTGACTTTAACTGGGGTCTAGTGGTGAAGATCGCGGTAAAGTGATCGTTACCCA
AAACGAGAACATTGTGTATAACAGCATGTACGAGAGTTTCTCAATTTCTTTCTGGATTG
GCATCAATAAATGGGTTTCTAATTTGCCTGGCTATACCATCATTGATAGCGTCAAAAAC
AACTCGGGCTGGTCGATTGGCATTATTAGCAACTTTCTGGTGTGTACCTGAAACAGAA
TGAGGATTGCGAACAGAGCATTAACTTCTCCTACGACATCAGCAACAATGCACCAGGGT
ATAACAAATGGTTCTTCGTAACGGTGACGAACAATATGATGGGCAATATGAAAATCTAC
ATTAACGGGAACTTATCGACACCATTAAAGTGAAAGAGCTTACTGGGATCAATTTTAG
TAAACCATTAACCTTTGAGATCAACAAAATTCGGACACGGGTCTGATTACCTCCGATT
CGGATAATATCAATATGTGGATTGCGGACTTTTATATCTTCGCCAAAGAACTTGATGGC
AAAGATATCAACATTTTGTGTTAATTCCCTGCAGTATACCAATGTCGTTAAGGACTATTG
GGGCAATGATCTCCGCTACAATAAAGAATACTACATGGTTAACATCGACTATCTCAATC
GCTACATGTATGCTAACTCGCGTCAAATTGTGTTTAACACACGTCGTAACAACAACGAT
TTTAACGAAGGTTATAAAATCATTATCAAACGGATCCGCGGCAATACGAACGATACTCG
TGTTTCGTGGCGGTGACATTCTGTATTTGACATGACGATTAATAATAAAGCGTACAATC
TGTTTCATGAAGAACGAAACCATGTACGCCGATAACCATTCCACTGAAGATATCTACGCA
ATCGGACTTCGCGAACAGACCAAAGACATTAAACGACAACATCATCTTTCAGATTCAACC
GATGAATAATACCTACTACTATGCCTCCCAGATCTTCAAAGTAATTTCAACGGCGAAA
ACATTTTCAGGCATTTGCTCAATCGGCACTTATCGGTTCCGGTTAGGTGGTGATTGGTAT
CGTCACAACCTACCTTGTTCACAGTGAAACAAGGCAACTATGCATCGCTCTTAGAAAG
CACATCTACGCATTGGGGTTTTGTGCCAGTCAGTGAA

【0384】

配列番号12 - ポリペプチド配列, rBoNT/C(0)

MPITINNFNYS DPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKA FRITGNIWVIPDRFSRNSNP NLNK
PPRVTSPKSGYYDPNYLSTDSKDPFLKEIKLFKRINSREIGEELIYRLSTDIPFPGNNNT P
INTFDFD VDFNSVDVKTRQGNNWVK TGSINPSVIITGP RENIIDPETSTFKLTNNTFAAQE
GFGALSIISIPRFLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILILMGT LNNAMHNL YGIAIPN
DQTISSVTSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKALDYRSIAKRLNSIT
TANPSSFNKYIGEYKQKLIRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVELYNELTQIFTEFN YAKIYNV
QNRKIYLSNVYTPVTANILDDNVYDIQNGFNIPKSNLNLVLFMGQNL SRNPALRKVN PEN
MLYLFTKFCHKAIDGRSLYNKTLDCRELLVKNTDLPFIGDISDVKT DIFLRKDINEETEVIY
YPDNVSV DQVILSKNTSEHGQLDLLYPSIDSESEILPGENQVFYDNRTQNVDY LNSYYL
ESQKLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFPTLANKV NAGVQGGLFLMWANDVVEDF
TTNILRKDTLDKISDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFTEAF AVTGVTILLEAFPEFTIPALG
AFVIYSKVQERNEIKTIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGTWLSRIITQFNNISYQMYDSL N
YQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKS QVENLKNSLDVKISEAMNNINKFIRECSVTYLFK
NMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHN ILVGEVDKLKAKVNNSFQNTIPFNIFS YTNN
SLLKDIINEYFNNINDSKILSLQNRKNTLVDTSGYNAEVSEEGDVQLNP IFFDFKL GSSGE
DRGKVIVTQ NENIVYNSMYESFSISFWIRINKWVSNLPGYTIIDSVKNNSGWSIGIISN FLV
FTLKQNE DSEQSINF SYDISNNAPGYNKWFFVTVTNNMMGNMKIYINGKLIDTIKV KELT
GINFSKTITFEINKIPDTGLITSDSDNINMWIRDFYIFAKELDGKDINILFNSLQYTNV VKD
YWGNDLRYNKEYYMVNIDYLNRYMYANSRQIVFNTRRNNDNFNEGYKIIIKRIRGNTND
TRVRGGDILYFDMTINN KAYNLFMKNETMYADNHSTEDIYAIGLREQTKDINDNIIFQIQ
PMNNTYYYASQIFKSNFNGENISGIC SIGTYRFRLGGDWYRHNYLVPTVKQGN YASLLES
TSTHWGFVPVSE

【0385】

配列番号13 - 核酸配列, rBoNT/E(0)

atgccgaaaatcaactctttcaactacaacgaccgggtaacgaccgtaccatcctgtatatcaaaccgggtgg
ttgccaggagttctacaaatctttcaacatcatgaaaaacatctggatcatcccgaacgtaacgttatcggtac

10

20

30

40

50

caccccgaggacttccacccgccgacctctctgaaaaacggtagactcttcttactacgacccgaactacctcc
agtctgacgaagaaaaagaccgtttcctgaaaatcggtaccaaaatcttcaaccgtatcaacaacaacctgtct
ggtagtatcctgctggaagaactgtctaaagctaaccgtagctgggtaacgacaacaccccggaaccagt
tccacatcggtagcgttctgctgttgaaatcaaattctctaacggttctcaggacatcctgctgccgaacgta
tcatcatgggtgctgaaccggacctgttcgaaaccaactcttctaacatctctctgcgtaacaactacatgccgt
ctaaccacggtttcggttctatcgctatcgttaccttctctccggaatactctttccggttcaacgacaacagcat
gaacgagttcatccaggacccggctctgacctgatgcaccaactgatctactctctgcacggctgtacggtg
ctaaaggatcaccaccaatacaccatcaccagaaacagaaccgctgatccaacatccgtggtagcaa
catcgaagagttctgaccttcggtaggtaccgacctgaacatcatcacctctgctcagtctaacgacatctaca
ccaacctgctgggtgactacaaaaaatcgcttctaaactgtctaaagttcagggttctaacccgctgctgaacc
cgtaacaagacgttttcgaagctaaatacggctctggacaaagacgcttctggtagtctactctgttaacatcaaca
aattcaacgacatcttcaaaaaactgtactctttcaccgagttcgacctggcgaccaaattccagggttaaatgcc
gtcagacctacatcggtcagtacaaatacttcaaactgtctaacctgtgaacgactctatctacaacatctctg
aaggttacaacatcaacaacctgaaagttaacttccgtgggtcagaacgctaacctgaaccgcgtatcatcacc
ccgatcaccggctcgtgggtctgggttaaaaaaatcatccgtttctgcAAGAATATTGTAAGCGTTAAAGG
ATAAAGAAAAAGTATCtgcacgaaatcaacaacggtagactgttcttcgttgcttctgaaaactcttaca
acgacgacaacatcaacaccccgaaagaaatcgacgacaccgttacctctaacaacaactacgaaaacgacc
tggaccagggttatcctgaacttcaactctgaatctgctccgggtctgtctgacgaaaaactgaacctgaccatc
cagaacgacgcttacatcccgaatacgaactctaacggtagcttctgacatcgaacagcagcaggttaacgaac
tgaacgttttcttctacctggacgctcagaagttccggaaggtagaaacaacgttaacctgaccttctctatcg
acaccgctctgctggaacagccgaaaaatctacaccttcttctctctgagttcatcaacaacgttaacaaaccgg
ttcaggctgctctgttcgttcttggttcagcaggttctgggtgacttcaccaccgaagctaaccagaaatctac
cgttgacaaaaatcgctgacatctctatcggtgttcctgacatcggtctggctctgaacatcggttaacgaagctca
gaaaggtaacttcaaagacgctctggaactgctgggtgctgggtatcctgctggagttcgaaccggaactgctg
atcccgacctcctgggtttcaccatcaaactcttctcgtgggttcttctgacaacaaaaaagttatcaaagct
atcaacaacgctctgaaagaacgtgacgaaaaatggaaagaagttactctttcatcgtttctaactggatgac
caaaatcaacacccagttcaaaaaacgtaagaacagatgtaccaggctctccagaaccagggttaacgctatc
aaaacctcatcgaatctaaatacaactcttacacctggaagaaaaaacgaactgaccaacaaatacgcaca
tcaaacagatcgaaaacgaactgaaccagaaagtttctatcgctatgaacaacatcgacctttcctgaccga
atcttctatctcttacctgatgaaactcatcaacgaagttaaaatcaaaaaactgctgaatacgcagaaaacg
ttaaaacctacctgctgaactacatcatccagcaggttctatcctgggtgaatctcagcaggaactgaactct
atggttaccgacacctgaacaactctatcccggttcaaactgtcttcttacaccgacgacaaaaatcctGATCT
CTACTTCAACAAATTCTTTAAAcgcATTAAGAGTTCATCGGTTctgaatATGCGGTACAA
AAATGATAAAatGTCGATACTTCTGGATATgatAGCAATATCAACATTAACGGCGACGT
GTATAAATATccgACAAATAAAAACCAGTTTGGGATATATAACGACAAGctgTCGGAGGT
CAATattTCTCAAAACGACtatATCattTACGATAATaaaTATAAAAACTTTAGCATTAGTtt
tTGGGTTcgtATACCTAATtatGACAATaaaattGTAAATGTGAATAACGAGTATACCATTA
TAACTGTATGcgcGACAATAACAGTGGTTGGAAGGTATCGctGAACCATAATGAGATTA
TCTGGACCctgcagGATAATgcaGGTATAAACAGAACTGGCTTTTAACTATGGAAACGC
AAATGGGATCTCAGATTACATTAataaaTGGatttttGTTaccATTACGAACGATcgcTTAGG
CGACTCAAAACTTTATATTAATggcAATctgATAGATCAGAAATCAATCTTAAATTTGGG
CAATATTTCATGTCTCTgatAACATCTTGTTCAAGATCGTTAATTGCAGTTACACTcgtTAT
ATTGGCATTTCGTTACTTTAATATCTTCgataaaGAActgGACGAGACGGAAATCagACTC
TGTATTCAAACGAGCCCAATACTAATATATTGAAAGATTTTTGGGGTAACTATCTTTTA
TATGATAAAGAATACTATCTCCTGaattGTATTGAAGCCAAACAATTTCATAGATAGACGC
AAGGATAGCACATTAAGTATCAACAATATCAGATCTACTATActgttaGCAAATCGCCTcT
ACTCCggtATTAAAGTGAAGATTcagCGGGTTAATAACTCCAGTACCAATGATAATCTGG
TCCGTAAGAACGATCAGGTATACATCaatTTCGTCGCGAGCAAACTcatCTCTTCCCGCT
TTACGCCgatACAGCTACGACAAACAAGGAAAAAACCATAAAAATTTCCAGCTCCGGAA
ACAGATTCAATCAAGTAGTTGTAATGAACTCTGTGGGTaatAATTGTACGATGAACTTTa

10

20

30

40

50

agAATAACAATGGGAACAATattGGACTTTTGGGCTTcAAAGCCGACACAGTGGTGGCGT
CCACCTGGTATTACACGcacATGcggGACCATACGAATTCGAACGGTTGCTTCTGGAAC
TTATCTCGGAAGaaCACGGGTGGCAAGAAAAA

【0386】

配列番号14 - ポリペプチド配列, rBoNT/E(0)

MPKINSFNYNPNDPNDRTILYIKPGGCQEFYKSFNIMKNIWIIPERNVIGTTPQDFHPPTSL
KNGDSSYYDPNYLQSDEEKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANPYLGNDNTPDN
QFHIGDASAVEIKFSNGSQDILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISLRNNYMPSNHGFGSIAIV
TFSPEYSFRFNDNSMNEFIQDPALTLMHQLIYSLHGLYGAKGITT KYTITQKQNPLITNIR
GTNIEEFLTFGGTDLNIITSAQSNDIYTNLLADYKKIASKLSKVQVSNPLLNPYKDVFEAKY
GLDKDASGIYSVNINKFNDIFKKLYSFEFDLATKFQVKCRQTYIGQYKYFKLSNLLNDSIY
NISEGYNNINLKVNFRRGQANLNPRIITPITGRGLVKKIIRFCKNIVSVKGIRKSICIEINNG
ELFFVASSENSYNDDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLDQVILNFNSESAPGLSDEKLNLTIQ
NDAYIPKYDSNGTSDIEQHDVNELNVFFYLDAQKVPGENNVNLTSSIDTALLEQPKIYTF
FSSEFINNVNKPVQAALFVSWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIADISIVVPYIGLALNIGNE
AQKGNFKDALELLGAGILLEFEPELLIPTILVFTIKSFLGSSDNKNKVIKAINNALKERDEK
WKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNAIKTIIESKYSYTL EEKNELTN
KYDIKQIENELNQKVSIAMNNIDRFLT ESSIDSYLMKLINEVKINKLREYDENVKTYLLNYII
QHGSILGESQQELNSMVTDTLNN SIPFKLSSYTDDKILISYFNKFFKRIKSSSVLNMRYKN
DKYVDTSGYDSNININGDVYKYPTNKNQFGIYNDKLSEVNISQNDYIYDNKYKNFSISFW
VRIPNYDNKIVNVNNEYTIINCMRDNNSGWKVSLSNHNEIWT LQDNAGINQKLA FN YGN
ANGISDYINKWIFVTITNDR LGDSKLYINGNLIDQKSILNLGNIHVSDNILFKIVNCSYTRYI
GIRYFNIFDKELDETEIQTLYSNEPNTN ILKDFWGN YLLYDKEYYLLNVLPNNFIDRRKD
STLSINNIRSTILLANRLYSGIKVKIQRVNNSSTNDNLVRKNDQVYIN FVASKTHLFLPLYA
DTATTNKEKTIKISSSGNRFNQVVVMNSVGNNCTMNFKNNGN NIGLLGFKADTVVAST
WYYTHMRDHTNSNGCFWNFISEEHGWQEK

【0387】

配列番号15 - 核酸配列, rBoNT/F(0)

ATGCCGGTGGTCATCAACAGCTTCAACTACAACGACCCAGTAAACGACGACACGATCCT
GTATATGCAAATCCCGTATGAAGAGAAGAGCAAGAAGTACTATAAGGCCTTTGAAATCA
TGCGCAATGTGTGGATTATTCGCGAGCGTAATACGATTGGTACTGACCCAAGCGACTTC
GATCCACCTGCGTCTTTGGAAAACGGCTCGTCCGCATATTACGACCCGAATTACCTGAC
CACCGATGCGGAGAAAGATCGTTATTTGAAAACCACCATCAAGCTGTTCAAACGCATTA
ACAGCAATCCGGCAGGTGAGGTCCTGCTGCAAGAGATTAGCTACGCAAAGCCTTATCTG
GGTAATGAGCATACGCCTATTAACGAGTTTCACCCGGTTACCCGCACTACCAGCGTTAA
CATCAAGTCCTCGACCAACGTGAAGTCTAGCATTATCCTGAACCTGCTGGTTCTGGGTG
CCGGTCCGGACATCTTCGAAAACCTCTAGCTACCCGGTTCGTAAACTGATGGATAGCGGC
GGTGTATATGACCCGAGCAATGACGGTTTTGGCAGCATCAATATCGTGACGTTTAGCCC
GGAGTACGAGTACACCTTCAATGATATCAGCGGTGGTTACAATTCTTCTACCGAGAGCT
TCATCGCCGACCCGGCGATCAGCCTGGCACACCAACTGATCTATGCATTGCATGGCTTG
TACGGTGCCCGTGGTGTGACGTATAAAGAGACTATCAAGGTTAAGCAGGCACCTCTGAT
GATTGCGGAAAAGCCGATTCGCCTGGAAGAGTTCTTGACCTTCGGCGGTCAAGATTTGA
ACATCATTACCTCGGCCATGAAAGAGAAAATCTATAACAATTTGCTGGCCAACTATGAA
AAGATTGCAACGCGCTTGTCTCGTGTTAACTCCGCTCCGCCGAATACGACATTAATGA
GTACAAAGACTACTTTCAATGGAAATATGGCCTGGACAAAAATGCGGATGGTTCTTATA
CCGTGAATGAAAACAAATTCAATGAAATCTACAAGAACTGTACAGCTTCACCGAAATC
GATCTGGCGAACAAGTTCAAAGTCAAATGTCGTAATACCTACTTCATCAAATATGGCTT
CCTGAAAGTCCCGAACCTGCTGGACGATGACATCTATACCGTCAGCGAAGGCTTCAACA
TCGGCAATCTGGCCGTGAATAATCGTGGTCAGAACATCAAACCTGAATCCGAAAATCATT
GACTCCATCCCAGACAAGGGCCTGGTTGAGAAAATCGTGAAGTTCTGCAAAAGCGTTAT

10

20

30

40

50

TCCGCGTAAAGGTACGAAAGCACCGCCTCGCCTGTGCATTTCGCGTTAACAACCGTGAGT
TGTTCTTTGTGGCATCTGAAAGCAGCTACAACGAGAACGACATCAACACCCCTAAAGAA
ATTGATGATACCACGAACCTGAATAACAATTATCGCAACAATCTGGACGAGGTGATCCT
GGATTACAATTCGGAAACCATTCCGCAAATTAGCAATCAGACGCTGAACACCCTGGTTC
AGGACGATAGCTACGTTCCGCGTTACGACTCCAATGGTACTAGCGAGATTGAAGAACAC
AACGTAGTGGACTTGAACGTTTTCTTTATCTGCACGCCCAGAAGGTTCCGGAGGGCGA
AACCAATATTAGCCTGACCAGCTCGATCGACACCGCGCTGTCTGAGGAGAGCCAAGTCT
ACACCTTTTTTCAGCAGCGAGTTTATCAACACTATTAACAAGCCAGTTCATGCTGCATTG
TTTATCTCTTGGATTAACCAGGTGATTTCGCGACTTTACGACGGAGGGCGACCCAGAAGTC
TACCTTCGACAAAATTGCAGACATCTCCCTGGTCGTCCCATACGTCGGCCTGGCGTTGA
ATATTGGCAATGAAGTTCAAAAAGAGAACTTCAAAGAAGCGTTCGAGCTGCTGGGTGCA
GGCATCCTGCTGGAGTTCGTGCCGGAAGTGTGATCCCGACCATCCTGGTGTTACCAT
TAAGAGCTTCATTGGATCCTCCGAGAATAAGAACAAGATCATCAAGGCGATCAATAACA
GCCTGATGGAGCGTGAAACGAAGTGGAAGAAATCTATAGCTGGATTGTTAGCAATTGG
CTGACTCGTATTAACACGCAATTCAACAAGCGTAAAGAGCAAATGTACCAAGCCCTGCA
AAACCAAGTTGACGCCATCAAAACGGTAATTGAATACAAGTACAACAATTACACGAGCG
ATGAGCGCAACCGCCTGGAAAGCGAATACAACATCAACAACATTCGCGAAGAATTGAAC
AAGAAAGTGAGCCTGGCGATGGAGAACATTGAGCGTTTTATCACCGAAAGCAGCATCTT
TTACCTGATGAAATTGATTAATGAGGCGAAAGTCTCGAAACTGCGTGAGTACGACGAAG
GTGTGAAAGAGTATCTGCTGGATTACATTAGCGAGCACCGTAGCATCTTGGGTAACTCG
GTTCAGGAGCTGAACGATCTGGTGACCTCTACCCTGAACAATAGCATCCCGTTTGAAGT
GAGCAGCTATACCAATGACAAGATTCTGATTCTGTATTTCAATAAACTGTATAAGAAGA
TCAAGGATAACAGCATTCTGGATATGCGTTACGAAAACAATAAGTTTATCGACATTTCT
GGTTACGGCAGCAACATTTCCATCAATGGCGATGTCTACATCTACAGCACCAATCGCAA
CCAGTTCGGCATCTACTCTAGCAAACCGAGCGAAGTTAACATCGCACAGAACAAATGATA
TTATTTATAACGGTCGTTATCAAACTTCTCTATCAGCTTTTGGGTCCGTATCCCGAAGT
ACTTCAATAAAGTCAATCTGAATAATGAATACACGATCATCGACTGCATTTCGCAATAAC
AACAGCGGTTGGAAAATCAGCCTGAATTACAACAAAATTATTTGGACCTGCAAGATAC
GGCGGGTAACAATCAGAACTGGTGTTTAACTACACGCAAATGATCAGCATTTTCTGACT
ATATCAACAAGTGGATCTTTGTTACCATACCAATAATCGTCTGGGCAATAGCCGTATT
TACATCAACGGTAACCTGATTGATGAGAAAAGCATCAGCAACCTGGGCGATATTCACGT
CAGCGACAACATTCTGTTCAAATTTGTTGGTTGTAACGATACCCGTTACGTCGGCATCC
GTTATTTCAAGGTTTTTCGATACGGAGCTGGGTAAAACGGAAATCGAAACGTTGTACTCC
GATGAACCAGATCCGAGCATTCTGAAGGACTTTTGGGGTAACTACTTGCTGTACAATAA
ACGTTACTATCTGCTGAATCTGTTGCGCACCGACAAGAGCATTACCCAAAACAGCAATT
TCCTGAACATTAATCAGCAACGCGGCGTATACCAAAAACCGAACATCTTCAGCAATACG
CGCCTGTATACTGGTGTGGAAGTGATCATTGTAAGAACGGTAGCACCGACATTAGCAA
CACGGACAATTTTCGTCCGTAAGAATGACCTGGCGTACATTAACGTCGTGGACCGTGATG
TCGAGTATCGTCTGTACGCAGACATCAGCATTGCGAAACCGGAAAAGATTATCAAGCTG
ATCCGTACCAGCAACAGCAACAACAGCCTGGGTGAGATCATTGTGATGGACAGCATTGG
TAATAACTGCACGATGAACTTCCAGAACAACAATGGTGGTAATATCGGTCTGCTGGGTT
TTCACAGCAATAATCTGGTTGCTTCCAGCTGGTACTACAATAACATTCGTAAAAACACG
TCTAGCAATGGTTGTTTTTGGAGCTTTATCAGCAAAGAGCACGGCTGGCAAGAAAAT
【0388】

10

20

30

40

配列番号16 - ポリペプチド配列, rBoNT/F(0)

MPVVINSFNYNDPVNDITILYMQIPYEEKSKKYYKA FEIMRNVWIIPERNITIGTDP SDFD
PPASLENGSSAYYDPNYLTDDAEKD RYLKTTIKLFRINSNPAGEVLLQEISYAKPYLGNE
HTPINEFHPVTRTTSVNIKSSTNVKSSIILNLLVLGAGPDIFENSSYPVRKLMDSGGVYDPS
NDGFGSINIVTFSPEYEYTFNDISGGYNSSTESFIADPAISLAHQLIYALHGLYGARGV TYK
ETIKVKQAPLMIAEKPIRLEEFLTFGGQDLNIITSAMKEKIYNNLLANYEKIATRLSRVNSA

50

PPEYDINEYKDYFQWKYGLDKNADGSYTVNENKFNEIYKKLYSFTEIDLANKFVKVCRNT
YFIKYGFLKVPNLLDDIYTVSEGFNIGNLAVNNRGQNIKLNPKIIDSIPDKGLVEKIVKFC
KSVIPRKGTKAPPRLCIRVNNREFFVASESSYNENDINTPKEIDDTNLNNNYRNNLDEV
ILDYNSETIPQISNQTNLTLVQDDSYVPRYDSNGTSEIEEHNVDLNVFFYLHAQKVPEGE
TNISLTSSIDTALSEESQVYTFFSSEFINTINKPVHAALFISWINQVIRDFTEATQKSTFDK
IADISLVVPYVGLALNIGNEVQKENFKEAFELLGAGILLEFVPELLIPTILVFTIKSFIGSSEN
KNKIIKAINNSLMERETKWKEIYSWIVSNWLTRINTQFNKRKEQMYQALQNQVDAIKTVI
EYKYNNTSDERNRLESEYNINNIREELNKKVSLAMENIERFITESSIFYLMKLINEAKVSK
LREYDEGVKEYLLDYISEHRSILGNSVQELNDLVTSTLNNNSIPFELSSYTNDKILILYFNKL
YKKIKDNSILD MRYENNKFIDISGYGSNISINGDVYIYSTNRNQFGIYSSKPSEVNIAQNND
IIYNGRYQNFSISFWVRIPKYFNKVNLNNEYTIIDCIRNNNSGWKISLNYNKIIWTLQDTA
GNNQKLVFNYTQMISISDYINKWIFVTITNRLGNSRIYINGNLIDEKSISNLGDIHVSDNI
LFKIVGCNDTRYVGIRYFKVFDTELGKTEIETLYSDEPDPSILKDFWGNLYLLYNKRYLLN
LLRTDKSITQNSNFLNINQQRGVYQKPNIFSNTRLYTGVEVIIRKNGSTDISNTDNFVRKN
DLAYINVVDRDVEYRLYADISIAKPEKIIKLIRTSNSNSLQIIVMDSIGNNCTMNFQNN
NGGNIGLLGFHSNNLVASSWYYNNIRKNTSSNGCFWSFISKEHGWQEN

【0389】

配列番号17 - 核酸配列, rBoNT/A(0) (Hisタグ付き)

ATGCCGTTTGTGAACAAGCAGTTCAACTATAAAGATCCGGTTAATGGTGTGGATATCGC
CTATATCAAAATTCCGAATGCAGGTCAGATGCAGCCGGTTAAAGCCTTTAAAATCCATA
ACAAAATTTGGGTGATTCCGGAACGTGATACCTTTACCAATCCGGAAGAAGGTGATCTG
AATCCGCCTCCGGAAGCAAAACAGGTTCCGGTTAGCTATTATGATAGCACCTATCTGAG
CACCGATAACGAGAAAGATAACTATCTGAAAGGTGTGACCAAACTGTTTGAACGCATTT
ATAGTACCGATCTGGGTCTGATGCTGCTGACCAGCATTGTTCTGTTGTTTCCGTTTGG
GGTGGTAGCACCATTGATACCGAACTGAAAGTTATTGACACCAACTGCATTAATGTGAT
TCAGCCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAACTGAATCTGGTTATTATTGGTCCGAGCG
CAGATATCATTCAAGTTTGAATGTAAAAGCTTTGGCCACGAAGTTCTGAATCTGACCCGT
AATGGTTATGGTAGTACCCAGTATATTCGTTTTAGTCCGGATTTTACCTTTGGCTTTGA
AGAAAGCCTGGAAGTTGATACAAATCCGCTGTTAGGTGCAGGTAAATTTGCAACCGATC
CGGCAGTTACCCTGGCACACCAGCTGATTTATGCCGGTCATCGTCTGTATGGTATTGCC
ATTAATCCGAATCGTGTGTTCAAAGTGAATACCAACGCCTATTATGAAATGAGCGGTCT
GGAAGTGAGTTTTGAAGAACTGCGTACCTTTGGTGGTCATGATGCCAAATTTATCGATA
GCCTGCAAGAAAATGAATTTGCGCTGTACTACTATAACAAATTCAAGGATATTGCGAGC
ACCCTGAATAAAGCCAAAAGCATTGTTGGCACCACCGCAAGCCTGCAGTATATGAAAAA
TGTGTTTTAAAGAAAAATATCTGCTGAGCGAAGATACCAGCGGTAAATTTAGCGTTGACA
AACTGAAATTCGATAAACTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTATACCGAAGATAACTTC
GTGAAGTTTTTCAAAGTGCTGAACCGCAAAACCTACCTGAACTTTGATAAAGCCGTGTT
CAAAATCAACATCGTGCCGAAAGTGAAGTATAACCATCTATGATGGTTTTAACCTGCGCA
ATACCAATCTGGCAGCAAACTTTAATGGTCAGAACACCGAAATCAACAACATGAACTTT
ACCAAATGAAGAACTTCACCGGTCTGTTTCGAATTTTACAACTGCTGTGTGTTCTGTGG
CATTATTACCAGCAAAACCAAAAGTCTGGATAAAGGCTACAATAAAGCCCTGAATGATC
TGTGCATTAAGGTGAATAATTGGGACCTGTTTTTTAGCCCGAGCGAGGATAATTTACC
AACGATCTGAACAAAGGCGAAGAAATTACCAGCGATACCAATATTGAAGCAGCCGAAGA
AAACATTAGCCTGGATCTGATTCAGCAGTATTATCTGACCTTCAACTTCGATAATGAGC
CGGAAAATATCAGCATTGAAAACCTGAGCAGCGATATTATTGGCCAGCTGGAAGTATG
CCGAATATTGAACGTTTTTCCGAACGGCAAAAAATACGAGCTGGATAAATACACCATGTT
CCATTATCTGCGTGCCCAAGAATTTGAACATGGTAAAAGCCGTATTGCACTGACCAATA
GCGTTAATGAAGCACTGCTGAACCCGAGCCGTGTTTATACCTTTTTTAGCAGCGATTAC
GTGAAAAAGGTTAACAAGCAACCGAAGCAGCCATGTTTTTTAGGTTGGGTTGAACAGCT
GTTTTATGATTTACCGATGAAACCAGCGAAGTTAGCACCACCGATAAAATTGCAGATA

10

20

30

40

50

TTACCATCATCATCCCGTATATCGGTCCGGCACTGAATATTGGCAATATGCTGTATAAA
GACGATTTTGTGGGTGCCCTGATTTTTAGCGGTGCAGTTATTCTGCTGGAATTTATTCC
GGAAATTGCCATTCCGGTTCTGGGCACCTTTGCACTGGTGAGCTATATTGCAAATAAAG
TTCTGACCGTGCAGACCATCGATAATGCACTGAGCAAACGTAACGAAAAATGGGATGAA
GTGTACAAGTATATCGTGACCAATTGGCTGGCAAAAGTTAACACCCAGATTGACCTGAT
TCGCAAGAAGATGAAAGAAGCACTGGAAAATCAGGCAGAAGCAACCAAAGCCATTATCA
ACTATCAGTATAACCACTACACCGAAGAAGAGAAAAATAACATCAACTTCAACATCGAC
GATCTGTCCAGCAAACCTGAACGAAAGCATCAACAAAGCCATGATTAACATTAACAAATT
TCTGAACCAGTGCAGCGTGAGCTATCTGATGAATAGCATGATTCCGTATGGTGTGAAAC
GTCTGGAAGATTTTGTATGCAAGCCTGAAAGATGCCCTGCTGAAATATATCTATGATAAT
CGTGGCACCCCTGATTGGTCAGGTTGATCGTCTGAAAGATAAAGTGAACAACACCCTGAG
TACCGATATTCCTTTTCAGCTGAGCAAATATGTGGATAATCAGCGTCTGCTGTCAACCT
TTACCGAATACATTAAGAACATCATCAACACCAGCATTCTGAACCTGCGTTATGAAAGC
AATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCCAGCAAATCAATATAGGCAGCAAGGTTAA
CTTCGACCCGATTGACAAAAATCAGATACAGCTGTTTAATCTGGAAAGCAGCAAAATTG
AGGTGATCCTGAAAAACGCCATTGTGTATAATAGCATGTACGAGAATTTCTCGACCAGC
TTTTGGATTTCGTATCCCGAAATACTTTAATAGCATCAGCCTGAACAACGAGTACACCAT
TATTAACCTGCATGGAAAACAATAGCGGCTGGAAAGTTAGCCTGAATTATGGCGAAATTA
TCTGGACCCTGCAGGATACCCAAGAAATCAAACAGCGTGTGGTTTTCAAATACAGCCAG
ATGATTAATATCAGCGACTATATCAACCGCTGGATTTTTGTGACCATTACCAATAATCG
CCTGAATAACAGCAAGATCTATATTAACGGTCGTCTGATTGACCAGAAACCGATTAGTA
ATCTGGGTAATATTCATGCGAGCAACAACATCATGTTTAACTGGATGGTTGTCGTGAT
ACCCATCGTTATATTTGGATCAAGTACTTCAACCTGTTTCGATAAAGAGTTGAACGAAAA
AGAAATTAAAGACCTGTATGATAACCAGAGCAACAGCGGTATTCTGAAGGATTTTTGGG
GAGATTATCTGCAGTATGACAAACCGTATTATATGCTGAATCTGTACGACCCGAATAAA
TACGTGGATGTGAATAATGTTGGCATCCGTGGTTATATGTACCTGAAAGGTCCGCGTGG
TAGCGTTATGACCACAAACATTTATCTGAATAGCAGCCTGTATCGCGGAACCAAATTCA
TCATTAATAAAGTATGCCAGCGGCAACAAGGATAATATTGTGCGTAATAATGATCGCGTG
TACATTAACGTTGTGGTGAAGAATAAAGAATATCGCCTGGCAACCAATGCAAGCCAGGC
AGGCGTTGAAAAAATTCTGAGTGCCCTGGAAATTCGGGATGTTGGTAATCTGAGCCAGG
TTGTTGTGATGAAAAGCAAAAATGATCAGGGCATCACCAACAAGTGCAAAATGAATCTG
CAGGACAATAACGGCAACGATATTGGTTTTATTGGCTTCCACCAGTTCAACAATATTGC
GAAACTGGTTGCAAGCAATTGGTATAATCGTCAGATTGAACGTAGCAGTCGTACCCTGG
GTTGTAGCTGGGAATTTATCCCTGTGGATGATGGTTGGGGTGAACGTCCGCTGGAAAAC
CTGTATTTTCAAGGTGCAAGTCATCATCACCATCACCACCATCATTA

【0390】

配列番号18 - ポリペプチド配列, rBoNT/A(0) (Hisタグ付き)

MPFVNKQFNYPVNGVDIAYIKIPNAGQMMPVKAFKIHNKIWVIPERDFTNPEEGDL
NPPPEAKQVPVSYDYDSTYLDNEKDNLYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLSIVRGIPFWG
GSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGEVLNLTRNGYGS
TQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAAGKFDTPAVTLAHQLIYAGHRLYGIAINPNRVF
KVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASLTNKAKSIV
GTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSKGFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRK
TYLNFDAVKINIVPKVNYTIYDGFNLNNTNLAANFNGQNTNINMFTKLKNFTGLFE
FYKLLCVRGIITSKTSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITS
NIEAAEENISLDLIQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKY
TMFHYLRAQEFHKGSRALNTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWV
EQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEI
AIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSQRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKK
MKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCS

10

20

30

40

50

VSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQ
LSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQ
LFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWKVS
LNYGEIHWTLQDTQEIKQRVVFYKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQK
PISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNISGILKDF
WGDYLYQDKPYMYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRG
KFIKKYASGNKDNIVRNDRVYINVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQ
VVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNAKLVASNWNRYNIERSRSL
GCSWEFIPVDDGWGERPLENLYFQGASHHHHHHHH

【0391】

配列番号19 - 核酸配列, rLH_N/A (Hisタグ付き)

ATGCCGTTTGTGAACAAGCAGTTCAACTATAAAGATCCGGTTAATGGTGTGGATATCGC
CTATATCAAAATTCCGAATGCAGGTCAGATGCAGCCGGTTAAAGCCTTTAAATCCATA
ACAAAATTTGGGTGATTCCGGAACGTGATACCTTTACCAATCCGGAAGAAGGTGATCTG
AATCCGCCTCCGGAAGCAAAACAGGTTCCGGTTAGCTATTATGATAGCACCTATCTGAG
CACCGATAACGAGAAAGATAACTATCTGAAAGGTGTGACCAAACTGTTTGAACGCATTT
ATAGTACCGATCTGGGTCGTATGCTGCTGACCAGCATTGTTCTGGTATTCCGTTTTGG
GGTGGTAGCACCATTGATACCGAACTGAAAGTTATTGACACCAACTGCATTAATGTGAT
TCAGCCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAACTGAATCTGGTTATTATTGGTCCGAGCG
CAGATATCATTCAAGTTTGAATGTAAATCCTTTGGCCACGAAGTTCTGAATCTGACCCGT
AATGGTTATGGTAGTACCCAGTATATTCGTTTCAGTCCGGATTTTACCTTTGGCTTTGA
AGAAAGCCTGGAAGTTGATACAAATCCGCTGTTAGGTGCAGGTAAATTTGCAACCGATC
CGGCAGTTACCCTGGCACATGAACTGATTGATGCCGGTCATCGTCTGTATGGTATTGCA
ATTAATCCGAACCGTGTGTTCAAAGTGAATACCAACGCATATTATGAAATGAGCGGTCT
GGAAGTGTCAATTTGAAGAACTGCGTACCTTTGGTGGTCATGATGCCAAATTTATCGATA
GCCTGCAAGAAAATGAATTTGCTGCTGACTACTATAACAAATTCAAGGATATTGCGAGC
ACCCTGAATAAAGCCAAAAGCATTGTTGGCACCACCGCAAGCCTGCAGTATATGAAAAA
TGTGTTTAAAGAAAAATATCTGCTGAGCGAAGATACCAGCGGTAAATTTAGCGTTGACA
AACTGAAATTCGATAAACTGTACAAGATGCTGACCAGGATTTATACCGAAGATAACTTC
GTGAAGTTTTTCAAAGTGTGAACCGCAAAACCTACCTGAACTTTGATAAAGCCGTGTT
CAAAATCAACATCGTGCCGAAAGTGAAGTATAACCATCTATGATGGTTTTAACCTGCGCA
ATACCAATCTGGCAGCAAACTTTAATGGTCAGAACACCGAAATCAACAACATGAACTTT
ACCAAATGAAGAACTTCACCGGTCTGTTTCGAATTTTACAACTGCTGTGTGTTCTGTTG
CATTATTACCAGCAAAACCAAAAGTCTGGATAAAGGCTACAATAAAGCCCTGAATGATC
TGTGCATTAAGGTGAATAATTGGGACCTGTTTTTTAGCCCGAGCGAGGATAATTTACCC
AACGATCTGAACAAAGGCGAAGAAATTACCAGCGATACCAATATTGAAGCAGCCGAAGA
AAACATTAGCCTGGATCTGATTCAGCAGTATTATCTGACCTTCACTTCGATAATGAGC
CGGAAAATATCAGCATTGAAAACCTGAGCAGCGATATTATTGGCCAGCTGGAAGTATG
CCGAATATTGAACGTTTTTCCGAACGGCAAAAATACGAGCTGGATAAATACACCATGTT
CCATTATCTGCGTGCCCAAGAATTTGAACATGGTAAAGCCGTATTGCACTGACCAATA
GCGTTAATGAAGCACTGCTGAACCCGAGCCGTGTTTATACCTTTTTTAGCAGCGATTAC
GTGAAAAAGGTTAACAAAGCAACCGAAGCAGCCATGTTTTTAGGTTGGGTTGAACAGCT
GGTTTATGATTTACCGATGAAACCAGCGAAGTTAGCACCAACCGATAAAATTGCAGATA
TTACCATCATCATCCCGTATATCGGTCCGGCACTGAATATTGGCAATATGCTGTATAAA
GACGATTTTGTGGGTGCCCTGATTTTTAGCGGTGCAGTTATTCTGCTGGAATTTATTCC
GGAAATTGCCATTCCGGTTCTGGGCACCTTTGCACTGGTGAGCTATATTGCAAATAAAG
TTCTGACCGTGCGAGACCATCGATAATGCACTGAGCAAACGTAACGAAAAATGGGATGAA
GTGTACAAGTATATCGTGACCAATTGGCTGGCAAAAGTTAACACCCAGATTGACCTGAT
TCGCAAGAAGATGAAAGAAGCACTGGAAAATCAGGCAGAAGCAACCAAGCCATTATCA
ACTATCAGTATAACCAGTACACCGAAGAAGAGAAAAATAACATCACTTCAACATCGAC

10

20

30

40

50

GATCTGTCCAGCAAACCTGAACGAAAGCATCAACAAAGCCATGATTAACATTAACAAATT
TCTGAACCAGTGCAGCGTGAGCTATCTGATGAATAGCATGATTCCGTATGGTGTGAAAC
GTCTGGAAGATTTTGTATGCAAGCCTGAAAGATGCCCTGCTGAAATATATCTATGATAAT
CGTGGCACCTGTATTGGTCAGGTTGATCGTCTGAAAGATAAAGTGAACAACACCCTGAG
TACCGATATTCTTTTCAGCTGAGCAAATATGTGGATAATCAGCGTCTGCTGTCAACCG
AAAATCTGTATTTCCAGGGTGCAAGTCATCATCACCATCACCACCATCATTA

【0392】

配列番号20 - ポリペプチド配列, rLH_N/A (Hisタグ付き)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDL
NPPPEAKQVPVSYDYDSTYLSTDNEKDNLYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLSIVRGIPFWG
GSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGS
TQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAAGKATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAPNPNRVF
KVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASLTNKAASIV
GTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRK
TYLNFDAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLNNTNLAANFNGQNTNINMNFNKLKNTGLFE
FYKLLCVRGIITSKTSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITS
NIEAAEENISLDLIQYYLTFNFDNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIEFNPNGKKYELDKY
TMFHYLRAQEFHKGSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWV
EQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEI
AIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSKEKWDDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLRKK
MKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCS
VSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQ
LSKYVDNQRLSTENLYFQGASHHHHHHHH

【0393】

配列番号21 - 核酸配列, rH_C/A (Hisタグ付き)

atgcatcatcaccatcaccacGAAAATCTATACTTCCAAGGAaaaaacatcatcaactactagcattctg
aacctgcgttacgagagcaatcatctgattgatctgagccgttatgcaagcaagatcaacatcggtagcaagg
tcaattttgacccgatcgataagaaccagatccagctgttaatatctggaatcgagcaaaattgaggttatcctga
aaaacgccattgtctacaactccatgtacgagaatttctccaccagcttctggattcgcatcccgaataacttca
acagcattagcctgaacaacgagtatactatcatcaactgtatggagaacaacagcgggttggaaggtgtctct
gaactatggtgagatcatttgaccttgacggacacccaagagatcaagcagcgcgtcgtgttcaagtactctc
aatgatcaacatttccgattacattaatcgttgatcttcttgaccattacgaataaccgtctgaataacagca
agatttacatcaatggctgcgttgatcgatcagaaaccgattagcaacctgggtaatatccacgcaagcaacaac
attatgttcaaattggacggttgccgcgatacccatcggtatatctggatcaagtatttcaacctgttgataaag
aactgaatgagaaggagatcaagattgtatgacaaccaatctaacagcggcattttgaaggacttctgggg
cgattatctgcaatacgataagccgtactatatgctgaacctgtatgatccgaacaaatatgtggatgtcaataa
tgtgggtattcgtgggtacatgtatttgaagggtccgcgtggcagcgttatgacgaccaacatttacctgaactc
tagcctgtaccgtggtagcgaattcatcattaagaaatatgccagcggcaacaaagataacattgtgcgtaata
acgatcgtgtctacatcaacgtggctgtaagaataaagagtagcgtctggcgaccaacgcttcgcaggcggg
tggtgagaaaattctgagcgcgttgagatccctgatgtcggtaatctgagccaagtcgtgggttatgaagagca
agaacgaccagggtatcactaacaagtgaagatgaacctgcaagacaacaatggtaacgacatcggctttat
tggtttccaccagttcaacaatattgctaaactggtagcgagcaattggtagaatcgtcagattgagcgcagca
gccgtactttgggctgtagctgggagtttatcccggtcgatgatgggtggggcgaacgtccgctgtaa

【0394】

配列番号22 - ポリペプチド配列, rH_C/A (Hisタグ付き)

MHHHHHHENLYFQGKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLF
NLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWKVS
LNYGEIWTQLQDTQEIQRVVFYKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPI
SNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFKELNEKEIKDLYDNQSNISGILKDFW
GDYLYQYDKPYMLNLYDPNKKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKF

10

20

30

40

50

IIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVV
VMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNIAKLVASNWNQRQIERSSRTLGC
SWEFIPVDDGWERPL

【0395】

配列番号23 - 核酸配列, rLC/A (Hisタグ付き)

ATGCCGTTTGTGAACAAGCAGTTCAACTATAAAGATCCGGTTAATGGTGTGGATATCGC
CTATATCAAAATTCCGAATGCAGGTCAGATGCAGCCGGTTAAAGCCTTTAAAATCCATA
ACAAAATTTGGGTGATTCCGGAACGTGATACCTTTACCAATCCGGAAGAAGGTGATCTG
AATCCGCCTCCGGAAGCAAAACAGGTTCCGGTTAGCTATTATGATAGCACCTATCTGAG
CACCGATAACGAGAAAGATAACTATCTGAAAGGTGTGACCAAACTGTTTGAACGCATTT
ATAGTACCGATCTGGGTCGTATGCTGCTGACCAGCATTGTTCTGGTATTCCGTTTTGG
GGTGGTAGCACCATTGATACCGAACTGAAAGTTATTGACACCAACTGCATTAATGTGAT
TCAGCCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAACTGAATCTGGTTATTATTGGTCCGAGCG
CAGATATCATTCAAGTTTGAATGTAAATCCTTTGGCCACGAAGTTCTGAATCTGACCCGT
AATGGTTATGGTAGTACCCAGTATATTCGTTTTAGTCCGGATTTTACCTTTGGCTTTGA
AGAAAGCCTGGAAGTTGATACAAATCCGCTGTTAGGTGCAGGTAAATTTGCAACCGATC
CGGCAGTTACCCTGGCACATGAACTGATTCATGCCGGTCATCGTCTGTATGGTATTGCA
ATTAATCCGAACCGTGTGTTCAAAGTGAATACCAACGCATATTATGAAATGAGCGGTCT
GGAAGTGTCAATTTGAAGAACTGCGTACCTTTGGTGGTCATGATGCCAAATTTATCGATA
GCCTGCAAGAAAATGAATTTGCGCTGTACTACTATAACAAATTCAAGGATATTGCGAGC
ACCCTGAATAAAGCCAAAAGCATTGTTGGCACCACCGCAAGCCTGCAGTATATGAAAAA
TGTGTTTAAAGAAAAATATCTGCTGAGCGAAGATACCAGCGGTAAATTTAGCGTTGACA
AACTGAAATTCGATAAACTGTACAAGATGCTGACCAGAGATTTATACCGAAGATAACTTC
GTGAAGTTTTTCAAAGTGTGAACCGCAAAACCTACCTGAACTTTGATAAAGCCGTGTT
CAAAATCAACATCGTGCCGAAAGTGAACCTATACCATCTATGATGGTTTTAACCTGCGCA
ATACCAATCTGGCAGCAAACTTTAATGGTCAGAACACCGAAATCAACAACATGAACTTT
ACCAAATGAAGAACTTCACCGGTCTGTTTGAAGAGAATCTGTATTTCCAGGGTGCAAG
TCATCATCACCATCACCACCATCATTA

【0396】

配列番号24 - ポリペプチド配列, rLC/A (Hisタグ付き)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQM QP VKAFKIHNKIWVIPERDFTNPEEGDL
NPPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWG
GSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGEVLNLTRNGYGS
TQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLL GAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGIAINPNRVF
KVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHD AKFIDSLQENEFRLYYNKF KDIASTLNKAKSIV
GTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTS GKFSVDKLFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRK
TYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNL RNTNLAANFNQNT EINN MNFTKLKNFTGLFE
ENLYFQGASHHHHHHHH

【0397】

配列番号25 - 核酸配列, rBoNT/FA(0) (Hisタグ付き)

ATGCCGGTTGTGATTAACAGCTTCAATTATGATGATCCGGTGAACGATAACACCATCAT
TTATATCCGTCCGCCTTATTATGAAACCAGCAACACCTATTTCAAAGCCTTCCAGATTA
TGGATAACGTGTGGATTATTCGGAACGTTATCGTCTGGGTATTGATCCGAGCCTGTTT
AATCCGCCTGTTAGCCTGAAAGCAGGTAGTGATGGTTATTTTATCCGAATTATCTGAG
CACCAACACCGAGAAAAACAAATACCTGCAGATTATGATCAAGCTGTTCAAACGCATTA
ATAGCAAACCGGCAGGTCAGATTCTGCTGGAAGAAATCAAAAATGCAATTCCGTATCTG
GGCAACAGCTATACCCAAGAAGAACAGTTTACCACCAATAATCGTACCGTGAGCTTTAA
TGTTAAACTGGCCAATGGTAATATCGTT CAGCAGATGGCAAATCTGATTATTTGGGGTC
CGGGTCCTGATCTGACCACAAATAAAACCGGTGGTATCATCTATAGCCCGTATCAGAGC
ATGGAAGCAACCCCGTATAAAGATGGTTTTGGTAGCATTATGACCGTGGAATTTAGTCC

10

20

30

40

50

GGAATATGCAACCGCCTTTAACGATATTTCAATTGCAAGCCATAGTCCGTCGCTGTTTA
TCAAAGATCCGGCACTGATTCTGATGCACCAGCTGATTTATGTTCTGCATGGTCTGTAT
GGCACCTATATCACCGAATACAAAATTACCCCGAATGTGGTTCAGAGCTATATGAAAGT
TACCAAACCGATTACCAGCGCAGAATTTCTGACCTTTGGTGGTCGTGATCGCAATATTG
TTCCGCAGAGCATTGAGAGCCAGCTGTATAACAAAGTTCTGAGCGATTATAAACGTATT
GCCAGCCGTCTGAATAAAGTTAATACCGCAACCGCACTGATCAACATCGATGAATTCAA
AAACCTGTACGAGTGGAATACCAGTTTGCCAAAGATAGCAATGGTGTGTATAGCGTGG
ATCTGAACAAATTTGAGCAGCTGTACAAAAAATCTATAGCTTCACCGAATTCAACCTG
GCCTATGAGTTTAAATCAAAACCGTCTGGGTTATCTGGCCGAAAATTTTGGTCCGTT
TTATCTGCCGAATCTGCTGGATGATAGCATTATACCGAAGTGGATGGTTTTAACATTG
GTGCACTGAGCATTAACTATCAGGGTCAGAATATTGGCAGCGATATCAACAGCATCAAA
AAACTGCAAGGTCAGGGTGTTGTTAGCCGTGTTGTTCTGTGTAGCAATAGCAATAC
CAAAAACAGCCTGTGCATTACCGTTAATAATCGCGACCTGTTTTTTATCGCAAGCCAAG
AAAGCTATGGCGAGAATACCATTAACACCTATAAAGAGATTGACGATACCACCACACTG
GATCCGAGCTTTGAAGATATTCTGGATAAAGTGATCCTGAACTTCAACGAACAGGTTAT
TCCGCAGATGCCGAATCGTAATGTTAGCACCGATATTGAGAAAGACAACCTACATCCCGA
AATACGATTATAACCGCACCGACATTATCGATAGCTATGAAGTTGGTCGCAACTACAAC
ACCTTTTTCTATCTGAATGCCCAGAAATTTAGCCCGAACGAAAGCAATATTACCCTGAC
CAGCAGCTTTGATACAGGTCTGTTAGAAGGTAGCAAAGTGATACCTTTTTCAGCAGCG
ATTTCATTAACAACATCAACAAACCGGTTGAGGCCCTGCTGTTTATTGAATGGGTTAAA
CAGGTGATTGCGGATTTTACCACCGAAGCAACCAAAACCTCAACCGTTGATAAACTGAA
AGATATTAGCCTGGTGGTGCCGTATATTGGTCTGGCACTGAATATTGGTGATGAGATCT
ACAAACAGCATTTTGCGAGAAGCAGTTGAACTGGTTGGTGAGGTCTGCTGCTGGAATTT
TCACCGGAATTTCTTATTCCGACGCTGCTGATTTTTACCATCAAAGGTTATCTGACCGG
TAGCATTGCGGATAAAGACAAAATCATTAAACCTGGATAACGCCCTGAATGTTCTGTG
ATCAGAAATGGAAAGAACTGTATCGTTGGGTTGTTAGCAAATGGCTGACCACCATTAAT
ACGCAGTTCAACAAACGCAAAGAACAATGTACAAAGCCCTGAAAAATCAGGCCACCGC
CATTAAAAAGATCATCGAGAACAATATAACAACCTATACCACCGATGAAAAAAGCAAGA
TCGATAGCAGCTATAACATCAACGAAATTGAACGCACCCTGAACGAAAAAATCAATCTG
GCCATGAAAAACATCGAGCAGTTTATTACCGAAAGCAGCATTGCCTATCTGATCAATAT
CATCAACAACGAAACGATCCAGAACTGAAAAGCTATGATGACCTGGTTGCTCGTTATC
TGCTGGGTTATATTGTAATCATAGCAGCATTCTGGGCAATAGCGTTGAAGAACTGAAT
TCAAAGTGAACAACCATCTGGATAATGGCATTCCGTTTGAACCTGAGCAGTTATACCAA
TGATAGCCTGCTGATCCGCTACTTCAATAAAAACTATGGCGAACTGAAGTACAACCTGCA
TTCTGAACATCAAATATGAGATGGATCGTGACAACTGGTTGATAGCAGCGGTTATCGT
AGCCGTATCAATATTGGTACAGGCGTCAAATTTAGCGAGATCGATAAAAAATCAAGTGCA
GCTGAGCAATCTGGAATCCAGCAAAATTGAAGTCATTCTGAATAACGGCGTCATCTATA
ACAGCATGTATGAAAACCTTTTCGACCAGCTTTTGGATTGCGATTCCGAAATACTTTTCGC
AACATCAATAACGAGTACAAGATCATCAGCTGTATGCAGAATAATAGCGGTTGGGAAGT
GAGCCTGAATTTTAGCAATATGAACTCGAAAATCATCTGGACCCTGCAGGATACCGAAG
GTATCAAAAAAACCGTTGTGTTTCAGTACACCCAGAACATTAACATTAGCGACTATATC
AACCGCTGGATCTTTGTGACCATTACAAATAATCGTCTGAGCAACAGCAAAATCTACAT
TAATGGTGCCTGATCAACGAAGAAAGCATTAGCGATCTGGGTAATATCCATGCCAGCA
ACAACATTATGTTTAACTGGATGGTTGCCGTGATCCGCATCGTTATATCTGGATTAAA
TACTTTAACCTGTTTGACAAAGAGCTGAACAAGAAAGAAATTAAGATCTGTACGACAA
CCAGAGCAATAGCGGTATTCTGAAAGATTTCTGGGGTGATTATCTGCAGTATGACAAAC
CGTATTATATGCTGAATCTGTATGACCCGAATAAGTATCTGGATGTGAATAATGTTGGC
ATCCGTGGCTATATGTATCTGAAAGGTCCGCGTGGTCGTATTGTGACCACCAACATTTA
TCTGAATAGCACCTGTATATGGGCACCAAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCA
ACAAAGATAACATTGTGCGTAATAATGATCGCGTGTATATTAACGTGGTGGTGAAGAAT

10

20

30

40

50

AAAGAATATCGCCTGGCAACCAATGCAAGCCAGGCAGGCGTTGAAAAAATTCTGAGCGC
AGTTGAAATCCCGGATGTTGGTAATCTGAGCCAGGTTGTTGTGATGAAAAGCGAAATG
ATCAGGGCATTTCGCAACAAGTGTAATAATGAATCTGCAAGACAATAACGGCAACGATATT
GGCTTTATCGGCTTTCACCAGTTTAATAACATTGCAAAACTGGTGGCCAGCAACTGGTA
TAACCGTCAGATTGGTAAGCAAGCCGTACCTTTGGTTGTAGCTGGGAATTTATCCCGG
TTGATGATGGTTGGGGTGAAAGCAGCCTGGAAAATCTGTATTTCCAGGGTGCCAGTCAT
CATCACCACCATCACCATCACTGA

【0398】

配列番号26 - ポリペプチド配列, rBoNT/FA(0) (Hisタグ付き)

MPVVINSFNYDDPVNDNTIYIRPPYYETSNTYFKAFQIMDNVWIIPERYRLGIDPSLFNP
PVSLKAGSDGYFDPNYLSTNTEKNKYLQIMIKLFKRINSKPAGQILLEIKNAIPYLGNSYT
QEEQFTTNNRTVSFNVKLANGNIVQQMANLIIWGPDPDLTTNKTGGIIYSPYQSMEATPY
KDGFGSIMTVEFSPEYATAFNDISIASHSPSLFIKDPALILMHQLIYVLHGLYGTYTEYKIT
PNVVQSYMKVTKPITSAEFLTFGGRDRNIVPQSIQSQLYNKVLSYDKRIASRLNKVNTAT
ALINIDEFKNLYEWKYQFAKDSNGVYSVDLNKFEQLYKKIYSFTEFNLAYEFKIKTRLGYL
AENFGPFYLPNLLDDSIYTEVDGFGNIGALSINYQGQNGSDINSIKKLQGQGVVSRVRLC
SNSNTKNSLCITVNNRDLFFIASQESYGENTINTYKEIDDTTTLDPSEFILDKVILNFNEQ
VIPQMPNRNVSTDIQKDNYPKYDYNRTDIIDSYEVGRNYNTFFYLNAQKFSPNESNITLT
SSFDTGLLEGSKVYTFSSDFINNINKPVQALLFIEWVKQVIRDFTTTEATKTSTVDKLDKDIS
LVVPYIGLALNIGDEIYKQHFAEAVELVGAGLLLEFSPEFLIPTLLIFTIKGYLTGSIRDKDK
IIKTLDNALNVRDQKWKELYRWVVSQWLTINTQFNKRKEQMYKALKNQATAIKKIEN
KYNNTTDEKSKIDSSYNINEIERTLNEKINLAMKNIEQFITESSIAYLINIINNETIQKLKS
YDDLVRRYLLGYIRNHSSILGNSVEELNSKVNNHLDNGIPFELSSYTNDSSLIRYFNKNYG
ELKYNCILNIKYEMDRDKLVDSSGYRSRINIGTGKVFSEIDKNQVQLSNLESSKIEVILNNG
VIYNSMYENFSTSFWIRIPKYFRNINNEYKIISCMQNNSGWEVSLNFSNMNSKIIWTLQD
TEGIKKTVMVFQYTNINISDYINRWIFVTITNNRLSNSKIYINGRLINEESISDLGNIHASNN
IMFKLDGCRDPHRYIWIKYFNLFDKELNKKEIKDLYDNQSNSGILKDFWGDYLQYDKPYY
MLNLYDPNKYLDVNNVGIRGYMYLKGPGRIVTTNIYLNSTLYMGTKFIIKKYASGNKDN
IVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSAVEIPDVGNLSQVVVMKSENDQGIR
NKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNAIKLVASNWYNRQIGKASRTFGCSWEFIPVDDGW
GESSLENLYFQGASHHHHHHHH

【0399】

配列番号27 - 核酸配列, rLH_N/FA (Hisタグ付き)

ATGCCGGTTGTGATTAACAGCTTCAATTATGATGATCCGGTGAACGATAACACCATCAT
TTATATCCGTCCGCCTTATTATGAAACCAGCAACACCTATTTCAAAGCCTTCCAGATTA
TGGATAACGTGTGGATTATTCGGAACGTTATCGTCTGGGTATTGATCCGAGCCTGTTT
AATCCGCCTGTTAGCCTGAAAGCAGGTAGTGATGGTTATTTTGATCCGAATTATCTGAG
CACCAACACCGAGAAAAACAAATACCTGCAGATTATGATCAAGCTGTTCAAACGCATTA
ATAGCAAACCGGCAGGTCAGATTCTGCTGGAAGAAATCAAAAATGCAATTCCGTATCTG
GGCAACAGCTATACCCAAGAAGAACAGTTTACCACCAATAATCGTACCGTGAGCTTTAA
TGTTAAACTGGCCAATGGTAATATCGTTCAGCAGATGGCAAATCTGATTATTTGGGGTC
CGGGTCCTGATCTGACCACAAATAAAACCGGTGGTATCATCTATAGCCCGTATCAGAGC
ATGGAAGCAACCCCGTATAAAGATGGTTTTGGTAGCATTATGACCGTGGAATTTAGTCC
GGAATATGCAACCGCCTTTAACGATATTTCAATTGCAAGCCATAGTCCGTCGCTGTTTA
TCAAAGATCCGGCACTGATTCTGATGCATGAACTGATTCATGTTCTGCATGGTCTGTAT
GGCACCTATATTACCGAATACAAAATTACCCCGAATGTGGTGCAGAGCTATATGAAAGT
TACCAAACCGATTACCAGCGCAGAATTTCTGACCTTTGGTGGTCGTGATCGCAATATTG
TTCCGCAGAGCATTACAGAGCCAGCTGTATAACAAAGTTCTGAGCGATTATAAACGTATT
GCCAGCCGTCTGAATAAAGTTAATACCGCAACCGCACTGATCAACATCGATGAATTCAA
AAACCTGTACGAGTGGAATACCAGTTTGCCAAAGATAGCAATGGTGTGTATAGCGTGG

ATCTGAACAAATTTGAGCAGCTGTACAAAAAATCTATAGCTTCACCGAATTCAACCTG
GCCTATGAGTTTAAATCAAAACCCGTCTGGGTTATCTGGCCGAAAATTTTGGTCCGTT
TTATCTGCCGAATCTGCTGGATGATAGCATTATACCGAAGTGGATGGTTTTAACATTG
GTGCACTGAGCATTAACTATCAGGGTCAGAATATTGGCAGCGATATCAACAGCATCAAA
AACTGCAAGGTCAGGGTGTTGTTAGCCGTGTTGTTCTGTGTAGCAATAGCAATAC
CAAAAACAGCCTGTGCATTACCGTTAATAATCGCGACCTGTTTTTTATCGCAAGCCAAG
AAAGCTATGGCGAGAATACCATTAACACCTATAAAGAGATTGACGATACCACCACACTG
GATCCGAGCTTTGAAGATATTCTGGATAAAGTGATCCTGAACTTCAACGAACAGGTTAT
TCCGCAGATGCCGAATCGTAATGTTAGCACCGATATTAGAAAGACAACCTACATCCCGA
AATACGATTATAACCGCACCGACATTATCGATAGCTATGAAGTTGGTCGCAACTACAAC
ACCTTTTTCTATCTGAATGCCAGAAATTTAGCCCGAACGAAAGCAATATTACCCTGAC
CAGCAGCTTTGATACAGGTCTGTTAGAAGGTAGCAAAGTGTATACCTTTTTTCAGCAGCG
ATTTCAATTAACAACATCAACAAACCGGTTACAGGCCCTGCTGTTTATTGAATGGGTTAAA
CAGGTGATTGCGGATTTTACCACCGAAGCAACCAAAACCTCAACCGTTGATAAACTGAA
AGATATTAGCCTGGTGGTGCCGTATATTGGTCTGGCACTGAATATTGGTGATGAGATCT
ACAAACAGCATTGTCAGAAAGCAGTTGAACTGGTGGTGAGGTCTGCTGCTGGAATTT
TCACCGGAATTTCTTATTCCGACGCTGCTGATTTTTACCATCAAAGGTTATCTGACCGG
TAGCATTGCGGATAAAGACAAAATCATTAAAACCTGGATAACGCCCTGAATGTTCTGTG
ATCAGAAATGGAAAGAACTGTATCGTTGGGTTGTTAGCAAATGGCTGACCACCATTAAT
ACGCAGTTCAACAAACGCAAAGAACAATGTACAAAGCCCTGAAAAATCAGGCCACCGC
CATTA AAAAGATCATCGAGAACAAATATACAACTATACCACCGATGAAAAAAGCAAGA
TCGATAGCAGCTATAACATCAACGAAATTGAACGCACCCTGAACGAAAAAATCAATCTG
GCCATGAAAAACATCGAGCAGTTTATTACAGAAAGCAGCATTGCCTACCTGATCAATAT
CATCAACAACGAAACCATTCAGAAACTGAAAAGCTATGATGACCTGGTTGCTCGTTATC
TGCTGGGTTATATTGTAATCATAGCAGCATTCTGGGCAATAGCGTTGAAGAACTGAAT
TCAAAGTGAACAACCATCTGGATAATGGCATTCCGTTTGAAGTGAAGCAGTTATACCAA
TGATAGCCTGCTGATCCGCTACTTCAATAAAAACTATGGCGAAGAGAACCTGTATTTCC
AGGGTGCCAGTCATCATCACCACCATCACCATCACTGA

【0400】

配列番号28 - ポリペプチド配列, rLH_N/FA (Hisタグ付き)

MPVVINSFNYDDPVNDNTIYIRPPYYETSNTYFKAQIMDNVWIIPERYRLGIDPSLFNP
PVSLKAGSDGYFDPNYLSTNTEKNKYLQIMIKLFKRINSKPAGQILLEIKNAIPYLGNSYT
QEEQFTTNNRTVSFNVKLANGNIVQQMANLIWGPDPDLTTNKTGGIIYSPYQSMEATPY
KDGFGSIMTVEFSPEYATAFNDISIASHSPSLFIKDPALILMHელიHVLHGLYGTYTEYKIT
PNVVQSYMKVTKPITSAEFLTGGGRDRNIVPQSIQSQLYNKVLSYDKRIASRLNKVNTAT
ALINIDEFKNLYEWKYQFAKDSNGVYSVDLNKFEQLYKKIYSFTEFNLAYEFKIKTRLGYL
AENFGPFYLPNLLDDSIYTEVDGFGNIGALSINYQGQNGSDINSIKKLQGGVVSrvVRLC
SNSNTKNSLCITVNNRDLFFIASQESYGENTINTYKEIDDTTLDPSFEDILDKVILNFNEQ
VIPQMPNRNVSTDIQKDNYPKYDYNRTDIIDSYEVGRNYNTFFYLNQKFSPNESNITLT
SSFDTGLLEGSKVYTFSSDFINNINKPVQALLFIEWVKQVIRDFTEATKTSTVDKLKDIS
LVVPYIGLALNIGDEIYKQHFAEAVELVGAGLLLEFSPEFLIPTLLIFTIKGYLTGSIRDKDK
IIKTLDNALNVRDQKWKELYRWVVSQWLTINTQFNKRKEQMYKALKNQATAIKKIEN
KYNNTTDEKSKIDSSYNINEIERTLNEKINLAMKNIEQFITESSIAYLINIINNETIQKLKS
YDDLVRRLYLLGYIRNHSSILGNSVEELNSKVNNHLDNGIPFELSSYTNDSELLIRYFNKNYG
EENLYFQGASHHHHHHHH

【0401】

配列番号29 - 核酸配列, rH_C/FA (Hisタグ付き)

ATGCTGAAGTATAACTGCATCCTGAACATCAAATATGAGATGGATCGTGATAAACTGGT
TGATAGCAGCGGTTATCGTAGCCGTATCAATATTGGCACCGGTGTGAAATTTAGCGAGA
TCGATAAAAATCAGGTGCAGCTGAGCAATCTGGAAAGCAGCAAAATTGAAGTGATTCTG

AATAACGGCGTGATCTACAATAGCATGTATGAAAACCTTTTCGACCAGCTTCTGGATTTCG
CATTCCGAAATACTTTTCGCAACATCAACAACGAGTACAAGATTATCAGCTGTATGCAGA
ATAATAGCGGTTGGGAAGTTAGCCTGAATTTTCAGCAATATGAACAGCAAAATCATTG
ACCCTGCAGGATACCGAAGGTATCAAAAAACCGTTGTGTTTCAGTACACCCAGAACAT
TAACATCAGCGATTACATTAACCGCTGGATCTTTGTGACCATTACCAATAATCGTCTGA
GCAACAGCAAGATCTATATTAACGGTGCCTGATTAACGAAGAGAGCATTAGCGATCTG
GGTAATATTCATGCCAGCAACAACATCATGTTTAACTGGATGGTTGTCGTGATCCGCA
TCGTTATATTTGGATCAAATACTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAACAAAAAAGAAA
TCAAAGACCTGTATGATAACCAGAGCAATAGCGGCATTCTGAAAGATTTTGGGGTGAT
TATCTGCAGTATGACAAACCGTATTACATGCTGAATCTGTACGATCCGAACAAATATCT
GGATGTGAATAATGTGGGTATCCGTGGCTATATGTATCTGAAAGGTCCGCGTGGTCGTA
TTGTTACCACCAACATTTATCTGAATAGCACCTGTATATGGGCACCAAAATTCATCATT
AAAAAGTATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATTGTGCGTAATAATGATCGCGTGTATAT
CAATGTGGTGGTGAAGAATAAAGAATATCGTCTGGCCACCAATGCAAGCCAGGCAGGCG
TTGAAAAAATTCTGAGCGCAGTTGAAATTCCGGATGTTGGTAATCTGAGCCAGGTTGTT
GTTATGAAAAGCGAAAATGATCAGGGCATTTCGCAACAAATGCAAAATGAATCTGCAGGA
CAATAACGGCAACGATATTGGTTTTATTGGCTTCCACCAGTTCAACAACATTGCAAAAC
TGGTGGCGAGCAATTGGTATAATCGTCAGATTGGTAAAGCAAGCCGTACCTTTGGTTGT
AGCTGGGAATTTATTCCGGTTGATGATGGTTGGGGTGAAAGCAGCCTGGAAAATCTGTA
TTTTCAGGGTGCAAGTCATCATCACCACCATCACCATCATTA

【0402】

配列番号30 - ポリペプチド配列, rH_C/FA (Hisタグ付き)

MLKYNCILNIKYEMDRDKLVDSSGYRSRINIGTGVKFSEIDKNQVQLSNLESSKIEVILNN
GVIYNSMYENFSTSWIRIPKYFRNINNEYKIISCMQNNSGWEVSLNFSNMNSKIIWTLQ
DTEGIKKTUVFQYTQININISDYINRWIFVTITNNRLSNSKIYINGRLINEESISDLGNIHASN
NIMFKLDGCRDPHRYIWIKYFNLFDKELNKKEIKDLYDNQSNIGILKDFWGDYLDQYDKPY
YMLNLYDPNKYLDVNNVGIRGYMYLKGPRGRIVTTNIYLNSTLYMGTKFIIKKYASGNKD
NIVRNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSAVEIPDVGNLSQVVVMKSENDQGI
RNKCKMNLQDNNNGNDIGFIGFHQFNNAIKLVASNWYNRQIGKASRTFGCSWEFIPVDDG
WGESLENLYFQGASHHHHHHHH

【0403】

配列番号31 - 核酸配列, rLC/FA (Hisタグ付き)

ATGCCGTTGTGATTAACAGCTTCAATTATGATGATCCGGTGAACGATAACACCATCAT
TTATATCCGTCCGCCTTATTATGAAACCAGCAACACCTATTTCAAAGCCTTCCAGATTA
TGGATAACGTGTGGATTATTCGGAACGTTATCGTCTGGGTATTGATCCGAGCCTGTTT
AATCCGCCTGTTAGCCTGAAAGCAGGTAGTGATGGTTATTTTGATCCGAATTATCTGAG
CACCAACACCGAGAAAAACAAATACCTGCAGATTATGATCAAGCTGTTCAAACGCATTA
ATAGCAAACCGGCAGGTCAGATTCTGCTGGAAGAAATCAAAAATGCAATTCGGTATCTG
GGCAACAGCTATACCCAAGAAGAACAGTTTACCACCAATAATCGTACCGTGAGCTTTAA
TGTTAACTGGCCAATGGTAATATCGTTCAGCAGATGGCAAATCTGATTATTTGGGGTC
CGGGTCCTGATCTGACCACAAATAAAACCGGTGGTATCATCTATAGCCCGTATCAGAGC
ATGGAAGCAACCCCGTATAAAGATGGTTTTGGTAGCATTATGACCGTGGAATTTAGTCC
GGAATATGCAACCGCCTTTAACGATATTTCAATTGCAAGCCATAGTCCGTCGCTGTTTA
TCAAAGATCCGGCACTGATTCTGATGCATGAACTGATTCATGTTCTGCATGGTCTGTAT
GGCACCTATATTACCGAATACAAAATTACCCCGAATGTGGTGCAGAGCTATATGAAAGT
TACCAAACCGATTACCAGCGCAGAATTTCTGACCTTTGGTGGTCGTGATCGCAATATTG
TTCCGCAGAGCATTACAGAGCCAGCTGTATAACAAAGTTCTGAGCGATTATAAACGTATT
GCCAGCCGTCTGAATAAAGTTAATACCGCAACCGCACTGATCAACATCGATGAATTCAA
AAACCTGTACGAGTGGAATACAGTTTGCCAAAGATAGCAATGGTGTGTATAGCGTGG
ATCTGAACAAATTTGAGCAGCTGTACAAAAAATCTATAGCTTCACCGAATTCAACCTG

10

20

30

40

50

GCCTATGAGTTTAAATCAAAACCCGTCTGGGTTATCTGGCCGAAAATTTTGGTCCGTT
TTATCTGCCGAATCTGCTGGATGATAGCATTTATACCGAAGTGGATGGTTTTAACATTG
GTGCACTGAGCATTAACTATCAGGGTCAGAATATTGGCAGCGATATCAACAGCATCAAA
AAACTGCAAGGTCAGGGTGTGTAGCCGTGTTGTTCTGTGTAGCAATAGCGAAAA
TCTGTATTTTTCAGGGTGCCAGTCATCATCACCACCATCACCATCACTGA

【0404】

配列番号32 - ポリペプチド配列, rLC/FA (Hisタグ付き)

MPVVINSFNYDDPVNDNTIIYIRPPYYETSNTYFKAFQIMDNVWIIPERYRLGIDPSLFNP
PVSLKAGSDGYFDPNYLSTNTEKNKYLQIMIKLFKRINSKPAGQILLEEKNAIPYLGNSYT
QEEQFTTNNRTVSFNVKLANGNIVQQMANLIIWGPDPDLTTNKTGGIIYSPYQSMEATPY
KDGFGSIMTVEFSPEYATAFNDISIASHSPSLFIKDPALILMHELIHVLHGLYGTYTEYKIT
PNVVQSYMKVTKPITSAEFLTFGGRDRNIVPQSIQSQLYNKVLSDYKRIASRLNKVNTAT
ALINIDEFKNLYEWKYQFAKDSNGVYSVDLNKFEQLYKKIYSFTEFNLAYEFKIKTRLGYL
AENFGPFYLPNLLDDSIYTEVDGFNIGALSINYQGQNGSDINSIKKLQGQGVVSRVRLC
SNSENLYFQGASHHHHHHHH

【0405】

配列番号33 - 核酸配列, rBoNT/F(0) (Hisタグ付き)

ATGCCGTTGTGATTAAACAGCTTCAATTATAACGATCCGGTGAACGATGATACCATCCT
GTATATGCAGATTCCGTATGAAGAGAAAAGCAAAAAGTACTACAAAGCCTTTGAGATCA
TGCGCAACGTTTGGATTATTCGGAACGTAATACCATTGGCACCGATCCGAGCGATTTT
GATCCGCCTGCAAGCCTGGAAAATGGTAGCAGCGCATATTATGATCCGAATTATCTGAC
CACCGATGCCGAAAAAGATCGTTATCTGAAAACCACCATCAAACCTGTTCAAACGCATTA
ATAGCAATCCGGCAGGCGAAGTTCTGCTGCAAGAAATTAGCTATGCAAAACCGTATCTG
GGCAATGAACATACCCCGATTAATGAATTTTCATCCGGTTACACGTACCACGAGCGTTAA
CATTAAAAGCAGCACCAATGTGAAGTCCAGCATTATTCTGAATCTGCTGGTTTTAGGTG
CAGGTCCGGATATTTTTGAAAATTCAAGCTATCCGGTGCGCAAACTGATGGATAGCGGT
GGTGTGTATGATCCGTCAAATGATGGTTTTGGCAGCATTAAACATTGTGACCTTTAGTCC
GGAATATGAATACACCTTCAACGATATTAGCGGTGGCTATAATAGCAGCACCGAAAGTT
TTATTGCAGATCCGGCAATTAGCCTGGCACACCAGCTGATTTATGCACTGCATGGTCTG
TATGGTGCACGTGGTGTTACCTATAAAGAAACCATTAAAGTTAAACAGGCACCGCTGAT
GATTGCGGAAAAACCGATTCGTCTGGAAGAATTTCTGACCTTTGGTGGTCAGGATCTGA
ACATTATTACCAGCGCAATGAAAGAGAAAATCTATAATAACCTGCTGGCCAACTATGAG
AAAATTGCAACCCGTCTGAGCCGTGTTAATAGCGCACCTCCTGAATATGATATCAACGA
GTATAAAGACTATTTTTCAGTGGAAATACGGCCTGGATAAAAATGCAGATGGTAGCTATA
CCGTGAACGAGAACAAATTTAACGAGATCTACAAAAAACTGTATAGCTTCACCGAAATC
GATCTGGCCAACAAATTCAAAGTGAAATGCCGCAACACCTACTTCATCAAATATGGCTT
TCTGAAAGTTCCGAACCTGCTTGATGATGATATCTATACCGTTAGCGAAGGCTTTAACA
TTGGTAATCTGGCCGTTAATAATCGCGGTCAGAACATTAACTGAACCCGAAAATTATC
GATAGCATCCCGGATAAAGGCCTGGTTGAAAAAATTGTGAAATTCTGCAAAAGCGTGAT
TCCGCGTAAAGGCACCAAGCACCGCCTCGTCTGTGTATTCTGTGTGAATAATCGTGAAC
TGTTTTTTTGTGCAAGCGAGAGCAGCTATAACGAGAATGATATTAACACCCCGAAAGAG
ATTGACGATACCACCAATCTGAATAACAACCTATCGCAACAATCTGGATGAAGTGATCCT
GGATTATAACAGCGAAACCATTCGCGCAGATTAGCAATCAGACCCTGAATACCCTGGTTC
AGGATGATAGCTATGTTCCGCGTTATGATAGCAATGGCACCAGCGAAATTGAAGAACAT
AATGTGGTTGATCTGAACGTGTTCTTTTATCTGCATGCACAGAAAGTGCCGGAAGGTGA
AACCAATATTAGCCTGACCAGCAGCATTGATACCGCACTGAGCGAAGAAAGCCAGGTTT
ATACCTTTTTTAGCAGCGAATTCATCAACACCATTAAACAAACCGGTTTCATGCAGCACTG
TTTATTAGCTGGATTAATCAGGTGATTCGCGATTTTACCACCGAAGCAACCCAGAAAAG
CACCTTTGATAAAATTGCCGATATTAGTCTGGTGGTGCCGTATGTTGGTCTGGCACTGA
ATATTGGTAATGAAGTGCAGAAAGAGAACTTTAAAGAAGCCTTCGAACTGTTAGGTGCC

10

20

30

40

50

GGTATTCTGCTGGAATTTGTGCCGGAAGCTGCTGATTCCGACCATTCTGGTTTTTACCAT
TAAGAGCTTTATTGGCAGCAGCGAGAACAAGAACAATAATCATTAAAGCCATCAACAACA
GCCTGATGGAACGCGAAACCAAATGGAAAGAAATTTACAGCTGGATTGTGAGCAATTGG
CTGACCCGTATCAATACCCAGTTTAAACAAACGCAAAGAACAATGTATCAGGCCCTGCA
GAATCAGGTTGATGCAATTAACACCGTGATCGAATACAAATACAACAACCTATACCAGCG
ACGAACGTAATCGCCTGGAAAGCGAATACAACATTAATAACATTCGCGAAGAACTGAAC
AAAAAAGTGAGCCTGGCAATGGAAAACATCGAACGTTTTATTACCGAAAGCAGCATCTT
CTACCTGATGAAACTGATTAACGAAGCCAAAGTTAGCAAACCTGCGCGAATATGATGAAG
GCGTTAAAGAATATCTGCTGGACTATATTAGCGAACATCGTAGCATTCTGGGTAATAGC
GTTCAAGAGCTGAATGATCTGGTTACCAGCACACTGAATAATAGCATTCCGTTTGAAC
GAGCAGCTACACCAACGATAAAATCCTGATCCTGTACTTCAACAAACTGTACAAGAAGA
TCAAGGACAACAGCATACTGGATATGCGCTATGAAAACAACAAGTTCATTGATATCAGC
GGCTATGGTAGCAACATTAGCATTAAATGGTGATGTGTATATCTACAGCACCAACCGCAA
TCAGTTTGGTATTTATAGCAGCAAACCGAGCGAAGTTAATATTGCGCAGAATAACGATA
TCATCTACAACGGTCGCTATCAGAACTTTAGCATTAGCTTTTGGGTTTCGCATTCCGAAA
TACTTTAACAAGGTGAACCTGAACAACGAGTACACCATTATTGATTGCATTTCGAATAA
TAACAGCGGCTGGAAAATCAGCCTGAACTATAACAAAATTATCTGGACCCTGCAGGATA
CCGCAGGTAATAATCAGAAACTGGTGTTTAACTACACCAGATGATTAGCATCAGCGAC
TATATCAACAAATGGATCTTTGTGACCATTACCAACAATCGTCTGGGTAACAGCCGCAT
TTATATCAATGGCAATCTGATCGACGAAAAAAGCATTTCAAATCTGGGCGATATTCACG
TGAGCGATAACATTCTGTTCAAATTTGTTGGCTGCAACGATACCCGTTATGTTGGTATT
CGTTACTTCAAAGTGTTTGATACGGAACTGGGCAAAACGGAAATTGAAACCCTGTATAG
TGATGAACCGGATCCGAGCATTCTGAAAGATTTTTGGGGTAATTATCTGCTGTACAACA
AACGCTACTATCTGCTGAACCTGCTGCGTACCGATAAAAGCATTACACAGAATAGCAAC
TTTCTGAACATCAATCAGCAGCGTGGTGTTTATCAGAAACCGAACATTTTTAGCAACAC
CCGTCTGTATACCGGTGTGGAAGTTATTATTCTGTA AAAACGGTAGCACCGATATCAGCA
ACACCGATAACTTTGTGCGTAAAAATGACCTGGCCTATATTAACGTTGTTGATCGTGAT
GTTGAGTATCGTCTGTATGCGGATATTAGCATTGCCAAACCGGAAAAGATTATCAAAC
GATCCGTACCAGCAACAGCAATAATTCACTGGGTCAGATTATCGTGATGGACAGCATTG
GTAACAATTGCACCATGAATTTCCAGAACAATAACGGTGGAATATTGGCCTGCTGGGC
TTTCATAGCAATAATCTGGTTGCAAGCAGCTGGTATTACAACAACATCCGTAAAAATAC
CAGCAGTAATGGTTGCTTTTGGAGCTTTATCAGTAAAGAACATGGCTGGCAAGAAAACG
AGAACCTGTATTTTCAGGGTGCAAGTCATCATCACCATCACCACCATCATTA

【0406】

配列番号34 - ポリペプチド配列, rBoNT/F(0) (Hisタグ付き)

MPVVINSFNYPVNDPNDTILYMQIPYEEKSKKYYKA FEIMRNVWIIPERNITIGTDPSPDFD
PPASLENGSSAYYDPNYLTDDAEKD RYLKTTIKLFKRINSNPAGEVLLQEISYAKPYLGNE
HTPINEFHPVTRTTSVNIKSSTNVKSSIILNLLVLGAGPDIFENSSYPVRKLMDSGGVYDPS
NDGFGSINIVTFSPEYEYTFNDISGGYNSSTESFIADPAISLAHQLIYALHGLYGARGVTYK
ETIKVKQAPLMIAEKPIRLEEFLTFGGQDLNIITSAMKEKIYNNLLANYEKIATRLSRVNSA
PPEYDINEYKDYFQWKYGLDKNADGSYTVNENKFNEIYKKLYSFTEIDLANKFKVKCRNT
YFIKYGFLKVPNLLDDDIYTVSEGFNIGNLAVNNRGQNIKLNPKIIDSIPDKGLVEKIVKFC
KSVIPRKGTKAPPRLCIRVNNRELFFVASESSYNENDINTPKEIDDTNLNNNYRNNLDEV
ILDYNSETIPQISNQTLNLTQDDSYVPRYDSNGTSEIEHNVVDLNVFFYLHAQKVPEGE
TNISLTSSIDTALSEESQVYTFSSFEINTINKPVHAALFISWINQVIRDFTEATQKSTFDK
IADISLVVPYVGLALNIGNEVQKENFKEAFELLGAGILLEFVPELLIPTILVFTIKSFIGSSEN
KNKIIKAINNSLMERETKWKEIYSWIVSNWLTRINTQFNKRKEQMYQALQNQVDAIKTVI
EYKYNNTSDERNRLESEYNINNIREELNKKVSLAMENIERFITESSIFYLMKLINEAKVSK
LREYDEGVKEYLLDYISEHRSILGNSVQELNDLVTSTLNN SIPFELSSYTNDKILILYFNKL
YKKIKDNSILDMRYENNKFIDISGYGSNISINGDVYIYSTNRNQFGIYSSKPSEVNIAQNND

10

20

30

40

50

IIYNGRYQNFISISFWVRIPKYFNKVNLNNEYTIIDCIRNNNSGWKISLNYNKIIWTLQDTA
GNNQKLVFNYSQTMISISDYINKWIFVTITNNRLGNSRIYINGNLIDEKSISNLGDIHVSDNI
LFKIVGCNDTRYVVGIRYFKVFDTELKGKTEIETLYSDEPDPSILKDFWGNLYLLYNKRYLLN
LLRTDKSITQNSNFLNINQQRGVYQKPNIFSNTRLYTGVVEVIIRKNGSTDISNTDNFVRKN
DLAYINVVDRDVEYRLYADISIAKPEKIIKLIRTSNSNSLSLQIIVMDSIGNNCTMNFQNN
NGGNIGLLGFHSNNLVASSWYYNNIRKNTSSNGCFWSFISKEHGWQENENLYFQGASHH
HHHHHH

【0407】

配列番号35 - 核酸配列, rL_HN/F (Hisタグ付き)

ATGCCGTTGTGATTAACAGCTTCAATTATAACGATCCGGTGAACGATGATACCATCCT
GTATATGCAGATTCCGTATGAAGAGAAAAGCAAAAAGTACTACAAAGCCTTTGAGATCA
TGCGCAACGTTTGGATTATTCCGGAACGTAATACCATTGGCACCGATCCGAGCGATTTT
GATCCGCCTGCAAGCCTGGAAAATGGTAGCAGCGCATATTATGATCCGAATTATCTGAC
CACCGATGCCGAAAAAGATCGTTATCTGAAAACCACCATCAAACCTGTTCAAACGCATTA
ATAGCAATCCGGCAGGCGAAGTTCTGCTGCAAGAAATTAGCTATGCAAAACCGTATCTG
GGCAATGAACATAACCCCGATTAATGAATTTTCATCCGGTTACACGTACCACGAGCGTTAA
CATTAAAAGCAGCACCAATGTGAAGTCCAGCATTATTCTGAATCTGCTGGTTTTAGGTG
CAGGTCCGGATATTTTTGAAAATTCAAGCTATCCGGTGCGCAAACCTGATGGATAGCGGT
GGTGTGTATGATCCGTCAAATGATGGTTTTGGCAGCATTAAACATTGTGACCTTTAGTCC
GGAATATGAATACACCTTCAACGATATTAGCGGTGGCTATAATAGCAGCACCGAAAGTT
TTATTGCAGATCCGGCAATTAGCCTGGCACATGAACTGATTCATGCACTGCATGGTCTG
TATGGTGCACGTGGTGTTACCTATAAAGAAACCATTAAAGTTAAACAGGCACCGCTGAT
GATTGCGGAAAAACCGATTCGTCTGGAAGAATTTCTGACCTTTGGTGGTCAGGATCTGA
ACATTATTACCAGCGCAATGAAAGAGAAAAATCTATAATAACCTGCTGGCCAACTATGAG
AAAATTGCAACCCGTCTGAGCCGTGTTAATAGCGCACCTCCTGAATATGATATCAACGA
GTATAAAGACTATTTTTCAGTGGAAATACGGCCTGGATAAAAATGCAGATGGTAGCTATA
CCGTGAACGAGAACAAATTTAACGAGATCTACAAAAAACTGTATAGCTTCACCGAAATC
GATCTGGCCAAACAAATTCAAAGTGAAATGCCGCAACACCTACTTCATCAAATATGGCTT
TCTGAAAGTTCCGAACCTGCTTGATGATGATATCTATACCGTTAGCGAAGGCTTTAACA
TTGGTAATCTGGCCGTTAATAATCGCGGTCAGAACATTAACTGAACCCGAAAATTATC
GATAGCATCCCGGATAAAGGCCTGGTTGAAAAAATTGTGAAATTCTGCAAAAGCGTGAT
TCCGCGTAAAGGCACCAAAGCACCGCCTCGTCTGTGTATTTCGTGTGAATAATCGTGAAC
TGTTTTTTGTTGCAAGCGAGAGCAGCTATAACGAGAATGATATTAACACCCCGAAAGAG
ATTGACGATACCACCAATCTGAATAACAACCTATCGCAACAATCTGGATGAAGTGATCCT
GGATTATAACAGCGAAACCATTCGCGAGATTAGCAATCAGACCCTGAATACCCTGGTTC
AGGATGATAGCTATGTTCCGCGTTATGATAGCAATGGCACCCAGCGAAATTGAAGAACAT
AATGTGGTTGATCTGAACGTGTTCTTTTATCTGCATGCACAGAAAGTGCCGGAAGGTGA
AACCAATATTAGCCTGACCAGCAGCATTGATACCGCACTGAGCGAAGAAAGCCAGGTTT
ATACCTTTTTTTAGCAGCGAATTCATCAACACCATTAAACAAACCGGTTTCATGCAGCACTG
TTTATTAGCTGGATTAATCAGGTGATTCGCGATTTTACCACCGAAGCAACCCAGAAAAG
CACCTTTGATAAAATTGCCGATATTAGTCTGGTGGTGCCGTATGTTGGTCTGGCACTGA
ATATTGGTAATGAAGTGAGAAAGAGAACTTTAAAGAAGCCTTCGAACTGTTAGGTGCC
GGTATTCTGCTGGAATTTGTGCCGGAACCTGCTGATTCGACCATTTCTGGTTTTTACCAT
TAAGAGCTTTATTGGCAGCAGCGAGAACAAAGAACAAATCATTAAAGCCATCAACAACA
GCCTGATGGAACGCGAAACCAATGGAAAGAAATTTACAGCTGGATTGTGAGCAATTGG
CTGACCCGTATCAATACCCAGTTTAAACAAACGCAAAGAACAAATGTATCAGGCCCTGCA
GAATCAGGTTGATGCAATTAAAACCGTGATCGAATACAAATACAACAACTATACCAGCG
ACGAACGTAATCGCCTGGAAAGCGAATACAACATTAATAACATTCGCGAAGAACTGAAC
AAAAAAGTGAGCCTGGCAATGGAAAACATCGAACGTTTTTATTACCGAAAGCAGCATCTT
CTACCTGATGAAACTGATTAACGAAGCCAAAGTTAGCAAACCTGCGCGAATATGATGAAG

10

20

30

40

50

GCGTTAAAGAATATCTGCTGGACTATATTAGCGAACATCGTAGCATTCTGGGTAATAGC
GTTCAAGAGCTGAATGATCTGGTTACCAGCACACTGAATAATAGCATTCCGTTTGAAC
GAGCAGCTACACCAACGATAAAATCCTGATCCTGTACTTCAACAAACTGTACAAGAAAG
AAAACCTGTATTTTCAGGGTGCAAGCCATCATCACCACCATCACCATCATTA

【0408】

配列番号36 - ポリペプチド配列, r_{LH}N/F (Hisタグ付き)

MPVVINSFNYPVNDPNDTILYMQIPYEEKSKKYYKAFEIMRNVWIIPERTIGTDPSDFD
PPASLENGSSAYYDPNYLTDDAEKDRYLKTTIKLFKRINSNPAGEVLLQEISYAKPYLGNE
HTPINEFHPVTRRTTSVNIKSSTNVKSSIILNLLVLGAGPDIFENSSYPVRKLMDSGGVYDPS
NDGFGSINIVTFSPEYEYTFNDISGGYNSSTESFIADPAISLAHELIALHGLYGARGVTYK
ETIKVKQAPLMIAEKPIRLEEFLTFGGQDLNIITSAMKEKIYNNLLANYEKIATRLSRVNSA
PPEYDINEYKDYFQWKYGLDKNADGSYTVNENKFNEIYKKLYSFTEIDLANKFKVKCRNT
YFIKYGFLKVPNLLDDIYTVSEGFNIGNLAVNNRGQNIKLNPKIIDSIPDKGLVEKIVKFC
KSVIPRKGTKAPPRLCIRVNNRELFFVASESSYNENDINTPKEIDDTNLNNNYRNNLDEV
ILDYNSETIPQISNQTNLTLVQDDSYVPRYDSNGTSEIEHNVDLNVFFYLHAQKVPEGE
TNISLTSSIDTALSEESQVYTFSSFEINTINKPVHAALFISWINQVIRDFTEATQKSTFDK
IADISLVVPYVGLALNIGNEVQKENFKEAFELLGAGILLEFVPELLIPTILVFTIKSFIGSSEN
KNKIIKAINNSLMERETKWKEIYSWIVSNWLTRINTQFNKRKEQMYQALQNQVDAIKTVI
EYKYNNTSDERNRLESEYNINNIREELNKKVSLAMENIERFITESSIFYLMKLINEAKVSK
LREYDEGVKEYLLDYISEHRSILGNSVQELNDLVTSTLNNNSIPFELSSYTNDKILILYFNKL
YKKENLYFQGASHHHHHHHH

【0409】

配列番号37 - 核酸配列, r_HC/F (Hisタグ付き)

ATGATCAAGGATAACAGCATTCTGGATATGCGCTATGAGAACAACAAATTCATTGATAT
TAGCGGCTATGGCAGCAACATTAGCATTAAATGGTGATGTGTATATCTACAGCACCAACC
GTAATCAGTTTGGCATTATATAGCAGCAAACCGAGCGAAGTTAATATTGCCCAGAACAAC
GATATCATCTATAACGGTCGCTATCAGAACTTCAGCATTAGCTTTTGGGTTTCGCATTCC
GAAATACTTCAATAAGGTGAACCTGAACAACGAGTATACCATCATTGATTGCATTTCGCA
ATAATAACAGCGGCTGGAAAATTAGCCTGAACTACAACAAAATTATCTGGACCCTGCAG
GATACCGCAGGTAATAATCAGAACTGGTGTTTAACTACACCCAGATGATTAGCATCAG
CGACTATATCAACAAATGGATCTTTGTGACCATTACCAATAATCGCCTGGGTAATAGCC
GCATTTATATCAATGGTAACCTGATCGATGAGAAAAGCATTAGCAATCTGGGTGATATT
CATGTGAGCGATAACATCCTGTTTAAAATCGTGGGTTGTAACGATACCCGTTATGTTGG
TATTCGCTACTTCAAAGTGTTTGATACCGAACTGGGTAAAACCGAAATTGAAACCCTGT
ATAGTGATGAACCGGATCCGAGCATTCTGAAAGATTTTGGGGTAATTATCTGCTGTAC
AACAAACGCTACTATCTGCTGAATCTGCTGCGTACCGATAAATCAATTACCCAGAATAG
CAACTTCCTGAACATTAATCAGCAGCGTGGTGTTTATCAGAAACCGAACATTTTATAGCA
ACACCCGTCTGTATACCGGTGTGGAAGTTATTATTCGTAAAAATGGCAGCACCGATATC
AGCAACACCGATAACTTTGTTTCGCAAAAATGATCTGGCGTATATCAACGTTGTTGATCG
TGATGTTGAATATCGTCTGTATGCCGATATTAGCATTGCCAAACCGGAAAAAATCATCA
AACTGATCCGTACCAGCAACAGCAATAATTCAGTGGGTCAGATTATTGTGATGGATAGC
ATTGGTAATAACTGCACCATGAACTTTTCAAGACAATAACGGTGGTAATATTGGTCTGCT
GGGCTTTCATAGTAATAATCTGGTTGCAAGCAGCTGGTATTATAACAACATCCGTAAAA
ATACCAGCAGCAATGGTTGCTTTTGGAGCTTTATTAGCAAAGAACATGGCTGGCAAGAA
AACGAGAATCTGTATTTTCAGGGTGCAAGTCATCATCACCACCATCACCATCATTA

【0410】

配列番号38 - ポリペプチド配列, r_HC/F (Hisタグ付き)

MIKDNSILDMRYENNKFIDISGYGSNISINGDVYIYSTNRNQFGIYSSKPSEVNIAQNNDII
YNGRYQNFISFWVRIPKYFNKVNLNNEYTIIDCIRNNNSGWKISLNYNKIIWTLQDTAG
NNQKLVFNYTQMISISDYINKWIFVTITNNRLGNSRIYINGNLIDEKSISNLGDIHVSDNIL

FKIVGCNDTRYVGIRYFKVFDTELGKTEIETLYSDEPDPSILKDFWGNLYLLYNKRYLLNL
LRTDKSITQNSNFLNINQQRGVYQKPNIFSNTRLYTGVVEIIRKNGSTDISNTDNFVRKND
LAYINVVDRDVEYRLYADISIAKPEKIIKLIRTSNSNNSLGQIIVMDSIGNNCTMNFQNNN
GGNIGLLGFHSNNLVASSWYNNIRKNTSSNGCFWSFISKEHGWQENENLYFQGASHHH
HHHHH

【0411】

配列番号39 - 核酸配列, rLC/F (Hisタグ付き)

ATGCCGGTTGTGATTAAACAGCTTCAATTATAACGATCCGGTGAACGATGATACCATCCT
GTATATGCAGATTCCGTATGAAGAGAAAAGCAAAAAGTACTACAAAGCCTTTGAGATCA
TGCGCAACGTTTGGATTATTCGGAACGTAATACCATTGGCACCGATCCGAGCGATTTT
GATCCGCCTGCAAGCCTGGAAAATGGTAGCAGCGCATATTATGATCCGAATTATCTGAC
CACCGATGCCGAAAAAGATCGTTATCTGAAAACCACCATCAAACCTGTTCAAACGCATTA
ATAGCAATCCGGCAGGCGAAGTTCTGCTGCAAGAAATTAGCTATGCAAAACCGTATCTG
GGCAATGAACATAACCCGATTAATGAATTTTCATCCGGTTACACGTACCACGAGCGTTAA
CATTAAAAGCAGCACCAATGTGAAGTCCAGCATTATTCTGAATCTGCTGGTTTTAGGTG
CAGGTCCGGATATTTTTGAAAATTCAAGCTATCCGGTGGCGCAAACCTGATGGATAGCGGT
GGTGTGTATGATCCGTCAAATGATGGTTTTGGCAGCATTAAACATTGTGACCTTTAGTCC
GGAATATGAATACACCTTCAACGATATTAGCGGTGGCTATAATAGCAGCACCGAAAGTT
TTATTGCAGATCCGGCAATTAGCCTGGCACATGAACTGATTCATGCACTGCATGGTCTG
TATGGTGCACGTGGTGTTACCTATAAAGAAACCATTAAAGTTAAACAGGCACCGCTGAT
GATTGCGGAAAAACCGATTCGTCTGGAAGAATTTCTGACCTTTGGTGGTCAGGATCTGA
ACATTATTACCAGCGCAATGAAAGAGAAAATCTATAATAACCTGCTGGCCAACTATGAG
AAAATTGCAACCCGTCTGAGCCGTGTTAATAGCGCACCTCCTGAATATGATATCAACGA
GTATAAAGACTATTTTTCAGTGGAAATACGGCCTGGATAAAAATGCAGATGGTAGCTATA
CCGTGAACGAGAACAAATTTAACGAGATCTACAAAAAACTGTATAGCTTCACCGAAATC
GATCTGGCCAAACAAATTCAAAGTGAAATGCCGCAACACCTACTTCATCAAATATGGCTT
TCTGAAAGTTCCGAACCTGCTTGATGATGATATCTATACCGTTAGCGAAGGCTTTAACA
TTGGTAATCTGGCCGTTAATAATCGCGGTCAGAACATTAACTGAACCCGAAAATTATC
GATAGCATCCCGGATAAAGGCCTGGTTGAAAAAATTGTGAAATTCTGCAAAAGCGAGAA
CCTGTATTTTTCAGGGTGCAAGTCATCATCACCATCACCACCATCATTA

【0412】

配列番号40 - ポリペプチド配列, rLC/F (Hisタグ付き)

MPVVINSFNYPVNDITILYMQIPYEEKSKKYYKAFEIMRNVWIIPERNITIGTDPSTFD
PPASLENGSSAYYDPNYLTDAEKDRYLKTTIKLFRINSNPAGEVLLQEISYAKPYLGNE
HTPINEFHPVTRTTSVNIKSSTNVKSSIILNLLVLGAGPDIFENSSYPVRKLMDSGGVYDPS
NDGFGSINIVTFSPEYEYTFNDISGGYNSSTESFIADPAISLAHELIHALHGLYGARGVTYK
ETIKVKQAPLMIAEKPIRLEEFLTFGGQDLNIITSAMKEKIYNNLLANYEKIATRLSRVNSA
PPEYDINEYKDYFQWKYGLDKNADGSYTVNENKFNEIYKKLYSFTEIDLANKFKVKCRNT
YFIKYGFLKVPNLLDDDIYTVSEGFNIGNLAVNNRGQNIKLNPKIIDSIPDKGLVEKIVKFC
KSENLYFQGASHHHHHHHH

【0413】

配列番号41 - 核酸配列, カチオン性 rH_C/A (Hisタグ付き)

ATGATCATCAACACCAGCATTCTGAACCTGCGTTATGAAAGCAAACATCTGATTGATCT
GAGCCGTTATGCCAGCAAAATCAATATAGGCAGCAAGGTTAACTTCGACCCGATTGACA
AAAATCAGATACAGCTGTTTAATCTGGAAAGCAGCAAAATTGAGGTGATCCTGAAAAAA
GCGATCGTGTATAATAGCATGTACGAGAATTTTTTCGACCAGCTTTTGGATTTCGCATCCC
GAAATACTTTAACAAGATTAGCCTGAACAACGAGTATACCATCATTAACCTGCATGGAAA
ACAATAGCGGTTGGAAAGTCAGCCTGAATTATGGCGAAATTATCTGGACCCTGCAGGAT
ACCAAAGAAATCAAACAGCGTGTGGTGTTCAAATACAGCCAGATGATTAATATCAGCGA
CTATATCAACCGCTGGATTTTTGTGACCATTACCAATAATCGGCTGAACAAGAGCAAGA

TCTATATTAACGGTCGTCTGATTGACCAGAAACCGATTAGTAATCTGGGTAATATTCAT
GCGAGCAACAAAATCATGTTTAAACTGGATGGTTGCCGTGATACCCATCGTTATATTTG
GATCAAATACTTCAACCTGTTTCGATAAAGAGTTGAACGAAAAAGAAATTAAGACCTGT
ACGATAACCAGAGCAATAGCGGCATACTGAAAGATTTTTGGGGAGATTATCTGCAGTAT
GACAAACCGTATTATATGCTGAATCTGTACGACCCGAATAAATACGTGGATGTTAATAA
TGTGGGCATCCGTGGTTATATGTACCTGAAAGGTCCGCGTGGTAGCGTTATGACCACAA
ACATTTATCTGAATAGCAGCCTGTATCGCGGAACCAAATTCATCATTAAAAAGTATGCC
AGCGGCAACAAGGATAATATTGTGCGTAATAATGATCGCGTGTACATTAACGTTGTGGT
GAAGAATAAAGAATATCGCCTGGCAACCAATGCAAGCCAGGCAGGCGTTGAAAAAATTC
TGAGTGCCCTGGAAATTCGGGATGTTGGTAATCTGAGCCAGGTTGTTGTGATGAAAAGC
AAAAACGATAAAGGCATCACCAACAAATGCAAGATGAATCTGCAGGACAATAACGGCAA
TGATATTGGCTTCATTGGCTTTCACCAAGTTTAAACAACATTGCAAAACTGGTTGCGAGCA
ATTGGTATAATCGTCAGATTGAACGTAGCAGTCGTACCCTGGGTTGTAGCTGGGAATTT
ATCCCTGTGGATGATGGTTGGGGTGAACGTCCGCTGAAGCTTGCGGCCCGCACTCGAGCA
CCACCACCACCACCACTGA

【0414】

配列番号42 - ポリペプチド配列, カチオン性 rH_C/A (Hisタグ付き)

MIINTSILNLRYESKHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKKAIVY
NSMYENFSTSFWIRIPKYFNKISLNNEYTIINCMENNSGWKVSLNYGEIHWTLQDTKEIKQ
RVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNLSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNKIMFKL
DGC RDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSN SGILKDFWGDY LQYDKPYMLNL
YDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRN
NDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDKGITNKCK
MNLQDNNGNDIGFIGFHQFN NIAKLVASN WYNRQ IERSSRTLGC SWEFIPVDDGWGERP
LKLA AALEHHHHHH

【0415】

配列番号43 - 核酸配列, rH_C/AB (Hisタグ付き)

ATGATTCTGAACAATATTATCCTGAACCTGCGTTACAAAGACAACAATCTGATCGATCT
GAGCGGCTATGGTGCAAAAGTTGAAGTCTACGACGGTGTGGAACCTGAACGATAAAAACC
AGTTCAAACCTGACCTCATCGGCTAACTCAAAAATTCGTGTGACGCAGAACCAAAACATC
ATCTTCAAACCTCGGTCTTTCTGGACTTCAGCGTGTCTTTCTGGATTTCGCATCCCGAAATAT
AAAAATGATGGCATCCAGAACTACATCCATAACGAATACACCATCATCAACTGTATGAA
AAACAACAGTGGTTGGAAAATTTCCATCCGTGGCAACCGCATTATCTGGACCCTGATTG
ATATCAATGGTAAAACGAAAAGCGTGTTTTTTCGAATACAACATCCGTGAAGATATCTCT
GAATACATCAATCGCTGGTTTTTTCGTGACCATTACGAACAATCTGAACAATGCGAAAAT
CTATATCAACGGCAAACTGGAAAGTAATACCGACATCAAAGATATTCGTGAAGTTATCG
CCAACGGTGAATCATCTTCAAACCTGGATGGCGACATCGATCGCACCCAGTTCATTTGG
ATGAAATACTTCTCCATCTTCAACACGGAACCTGAGTCAGTCCAATATCGAAGAACGCTA
CAAAATCCAATCATACTCGGAATACCTGAAAGATTTCTGGGGTAACCCGCTGATGTACA
ACAAAGAATACTACATGTTCAACGCGGGCAACAAAAAATCATACTCAAACTGAAAAAA
GATTCGCCGGTGGGTGAAATCCTGACCCGTAGCAAATACAACCAGAACTCTAAATACAT
CAACTATCGCGATCTGTACATTGGCGAAAAATTTATTATCCGTGCGAAAAGCAACTCTC
AGAGTATTAATGATGACATCGTGC GTAAAGAAGACTACATCTATCTGGATTTCTTTAAT
CTGAACCAAGAATGGCGCGTTTATACCTACAAATACTTCAAAAAAGAAGAAATGAAACT
GTTCTTGGCCCCGATTTACGACAGCGATGAATTTTACAACACCATCCAGATCAAAGAAT
ACGATGAACAGCCGACGTATAGTTGCCAACTGCTGTTCAAAAAAGACGAAGAATCCACC
GATGAAATTGGCCTGATTGGTATCCACCGTTTCTATGAAAGCGGTATCGTTTTTCGAAGA
ATACAAAGATTACTTCTGTATCTCTAAATGGTATCTGAAAGAAGTCAAACGCAAACCGT
ACAACCTGAAACTGGGCTGCAACTGGCAATTTATCCCGAAAGACGAAGGCTGGACCGAA
AAGCTTGCGGCCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA

10

20

30

40

50

【0416】

配列番号44 - ポリペプチド配列, rH_C/AB (Hisタグ付き)

MILNNIILNLRKYKDNNDLIDLSGYGAKVEVYDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIF
NSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLLIDINGK
TKSVFFEYNIREDISEYINRWFFVTITNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKL
DGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAG
NKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYINYRDLYIGEKFIIRKSNSSQSINDDIVRKEDYI
YLDFFNLNQEWVRVYTYKYFKKEEMKLFLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKK
DEESTDEIGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEG
WTEKLAAALEHHHHHH

10

【0417】

配列番号45 - 核酸配列, rH_C/A 変異体 Y1117V H1253K (Hisタグ付き)

ATGATCATCAATACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCT
GAGCCGTTATGCAAGCAAGATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATA
AGAACCAGATCCAGCTGTTTAATCTGGAATCGAGCAAAATTGAGGTTATCCTGAAAAAC
GCCATTGTCTACAACCTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTGCGATCCC
GAAATACTTCAACAGCATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGA
ACAACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGACAGGAC
ACCCAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAGTACTCTCAAATGATCAACATTTCCGA
TTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAATAACAGCAAGA
TTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCAC
GCAAGCAACAACATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCATCGTTATATCTG
GATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGATCAAAGATTTGT
ATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGGGGCGATTATCTGCAATAC
GATAAGCCGTAATATGCTGAACCTGgtTGATCCGAACAAATATGTGGATGTCAATAA
TGTGGGTATTTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCA
ACATTTACCTGAACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAAGAAATATGCC
AGCGGCAACAAAGATAACATTGTGCGTAATAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTTCGT
GAAGAATAAAGAGTACCGTCTGGCGACCAACGCTTCGCAGGCGGGTGTGAGAAAATTC
TGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTCGGTAATCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGC
AAGAACGACCAGGGTATCACTAACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAA
CGACATCGGCTTTATTGTTTTCaAaCAGTTCAACAATATTGCTAACTGGTAGCGAGCA
ATTGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGCCGTACTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTT
ATCCCGGTTCGATGATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTGCaCcatcaccatCaCcatcaccatCaCc
atT

20

30

【0418】

配列番号46 - ポリペプチド配列, rH_C/A 変異体 Y1117V H1253K (Hisタグ付き)

MIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVY
NSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWKVSLNYGEIHWTLQDTQEIKQ
RVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKL
DGC RDTHRYIWI KYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSN SGILKDFWGDY LQYDKPY YMLNL
VDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRN
NDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVG NLSQVVVMKSKNDQGITNKCK
MNLQDNNGNDIGFIGFKQFN NIAKL VASNWYNRQIERSSRTLGC SWEFIPVDDGWGERP
LHHHHHHHHHH

40

【0419】

配列番号47 - 核酸配列, rH_C/A 変異体 Y1117V F1252Y H1253K L1278F (Hisタグ付き)

ATGATCATCAATACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCT
GAGCCGTTATGCAAGCAAGATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATA
AGAACCAGATCCAGCTGTTTAATCTGGAATCGAGCAAAATTGAGGTTATCCTGAAAAAC

50

GCCATTGTCTACAACCTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTTCGCATCCC
GAAATACTTCAACAGCATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGA
ACAACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGAC
ACCCAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAGTACTCTCAAATGATCAACATTTCCGA
TTACATTAATCGTTGGATCTTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAATAACAGCAAGA
TTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCAC
GCAAGCAACAACATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCATCGTTATATCTG
GATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGATCAAAGATTTGT
ATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGGGGCGATTATCTGCAATAC
GATAAGCCGTAATATATGCTGAACCTGgtTGATCCGAACAAATATGTGGATGTCAATAA
TGTGGGTATTTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCA
ACATTTACCTGAACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCC
AGCGGCAACAAAGATAACATTGTGCGTAATAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGT
GAAGAATAAAGAGTACCGTCTGGCGACCAACGCTTCGCAGGCGGGTGTGAGAAAATTC
TGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTGCGTAATCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGC
AAGAACGACCAGGGTATCACTAACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAA
CGACATCGGCTTTATTGGTTaCaAaCAGTTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAA
TTGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGCCGTAATTTGGCTGTAGCTGGGAGTTTAT
CCCGTTCGATGATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTGCaCcatcaccatCaCcatcaccatCaCcat
TAA

10

20

【0420】

配列番号48 - ポリペプチド配列, rH_C/A 変異体 Y1117V F1252Y H1253K L1278F (Hisタグ付き)

MIINTSILNLRYESNHLIDLRLRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVY
NSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWKVSILNYGEIHWTLQDTQEIKQ
RVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKL
DGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNISGILKDFWGDYLYQYDKPYMLNL
VDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRN
NDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLISQVVVMKSKNDQGITNKCK
MNLQDNNGNDIGFIGYKQFNIAKLVASNWYNRQIERSSRTFGCSWEFIPVDDGWGERP
LHHHHHHHHHH

30

【0421】

配列番号49 - 核酸配列, rH_C/A 変異体 Y1117V F1252Y H1253K L1278H (Hisタグ付き)

ATGATCATCAATACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCT
GAGCCGTTATGCAAGCAAGATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATA
AGAACCAGATCCAGCTGTTTAATCTGGAATCGAGCAAAATTGAGGTTATCCTGAAAAAC
GCCATTGTCTACAACCTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTTCGCATCCC
GAAATACTTCAACAGCATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGA
ACAACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGAC
ACCCAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAGTACTCTCAAATGATCAACATTTCCGA
TTACATTAATCGTTGGATCTTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAATAACAGCAAGA
TTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCAC
GCAAGCAACAACATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCATCGTTATATCTG
GATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGATCAAAGATTTGT
ATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGGGGCGATTATCTGCAATAC
GATAAGCCGTAATATATGCTGAACCTGgtTGATCCGAACAAATATGTGGATGTCAATAA
TGTGGGTATTTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCA
ACATTTACCTGAACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCC
AGCGGCAACAAAGATAACATTGTGCGTAATAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGT
GAAGAATAAAGAGTACCGTCTGGCGACCAACGCTTCGCAGGCGGGTGTGAGAAAATTC

40

50

TGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTCGGTAATCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGC
AAGAACGACCAGGGTATCACTAACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAA
CGACATCGGCTTTATTGGTTaCaAaCAGTTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAA
TTGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGCCGTAActcatGGCTGTAGCTGGGAGTTTAT
CCCGGTCTGATGATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTGCaCcatcaccatCaCcat

【0422】

配列番号50 - ポリペプチド配列, rH_C/A 変異体 Y1117V F1252Y H1253K L1278H (Hisタグ付き)

MIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVY
NSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWKVS LNYGEIHWTLQDTQEIKQ
RVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKL
DGC RDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSN SGILKDFWGDY LQYDKPY YMLNL
VDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRG SVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRN
NDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCK
MNLQDNNGNDIGFIGYKQFN NIAKLVASNWYNRQIERSSRTHGCSWEFIPVDDGWGERP
LHHHHHH

【0423】

配列番号51 - ポリペプチド配列, BoNT/A - UniProt P10845

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNVGQM QPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLN
PPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTD LGRMLLTSIVRGIPFWGG
STIDTELKVIDTNCINVIQPDG SYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGY
GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLL GAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGI AINPN
RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIAS TLNKA
KSIVGTTASLQYMKNVFKYKYLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKV
LNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNL RNTNLAANFNGQNT EINN MNFTKLKNFT
GLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEE
ITSDTNIEAAEENISLDLIQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNG
KKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSG
AVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLT VQTIDNALS KRNEKWDEVYKYIVTNWLAK
VNTQIDLIRKKMKEALENQA EATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKA
MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDK
VNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINI
GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNN
EYTIINCMENNSGWKVS LNYGEIHWTLQDTQEIKQ RVVFKYSQMINISDYINRWIFVTIT
NNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGC RDTHRYIWIKYFNLFDKELN
EKEIKDLYDNQSN SGILKDFWGDY LQYDKPY YMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPR

R
GSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQA
GVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFN NIAK
LVASNWYNRQIERSSRTLGC SWEFIPVDDGWGERPL

【0424】

配列番号52 - ポリペプチド配列, BoNT/B - UniProt P10844

MPVTINNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTG RYYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKPEDFN
KSSGIFNRDVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTM IKLFNRIKSKPLGEK LLEMIINGIPYLGDR
RVPLEEFNTNIASVTVNKLISNPGEVERKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQNH FASRE
GFGGIMQM KFCPEYVS VFNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALILMHELIHVLHGLYGIKVD
DLPIVPNEKKFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTD KSIYDKVLQNFRGIVDRLNKV
LVCISDPNININIYKNKFKDKYKFVEDSEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGFTETNIAENYKIK
TRASYSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIEEGFNISDKDMEKEYRGQNKAINKQAYEEISKEHLA

VYKIQMCKSVKAPGICIDVDNEDLFFIADKNSFSDDLKNERIEYNTQSNYIENDFPINELI
LDTDLISKIELSENTESLTDFNVDVPVYEKQPAIKKIFTDENTIFQYLYSQTFLDIRDISL
TSSFDDALLFSNKVVSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVNDFVIEANKSNTMDKIA
DISLIVPYIGLALNVGNETAAGNFENAFEIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLLSEYIDNKNKII
KTIDNALTKRNEKWSDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEEIIKYRY
NIYSEKEKSNINIDFNDINSKLNENINQAINNINFINGCSVSYLMKKMIPLAVEKLLDFDN
TLKKNLLNYIDENKLYLIGSAEYEKSKVNKYLKTIMPFDSLITNDTILIEFMFNKYNSEILN
NIILNLRYKDNNLIDLSGYGAKVEVYDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVF
LDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLIDINGKTKSV
FFEYNIREDISSEYINRWFFVTITNNLNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDI
DRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIERYKIQSYSEYKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKN
SYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYINYRDLYIGEKFIRRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLD
FFNLNQEWVRVYTYKYFKKEEEKLFLAPISDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEES
TDEIGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE
【0425】

配列番号53 - ポリペプチド配列, BoNT/C - UniProt P18640

MPITINNFNYSDPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNPNLNK
PPRVTSPKSGYYDPNYLSTDSDKDPFLKEIKLFRINSREIGEELIYRLSTDIPFPGNNNT
INTDFDFDVFNSVDVKTRQGNWVKTGSINPSVIITGPRENIIDPETSTFKLTNNTFAAQE
GFGALSIISISPRFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILILMHELNHAMHNLYGIAIPN
DQTISSVTSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKALDYRSIAKRLNSIT
TANPSSFNKYIGEYKQKLIRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVELYNELTQIFTEFNKYAKIYNV
QNRKIYLSNVYTPVTANILDDNVYDIQNGFNIPKSNLNVLFMGQNLSPALRKVNPNEN
MLYLFTKFCHKAIDGRSLYNKTLDCRELLVKNLTLDPFIGDISDVKTDFLTKDINEETEVIY
YPDNVSVDQVILSKNTSEHGQLDLLYPSIDSESEILPGENQVFYDNRTQNVDYLSYYYL
ESQKLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFPTLANKVNAGVQGGLFLMWANDVVEDF
TTNILRKDTLDKISDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFTEAFVAVTGVTILLEAFPEFTIPALG
AFVIYSKVQERNEIKTIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGTWLSRIITQFNNISYQMYDSL
YQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNNINKFIRECSVTYLFK
NMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNILLVGEVDKLKAKVNNSFQNTIPFNIFSNTN
SLLKDIINEYFNNINDSKILSLQNRKNTLVDTSYGNAEVSEEGDVQLNPIFPDFKLGSSE
DRGKVIVTQENIVYNSMYESFSISFWIRINKWVSNLPGYTIIDSVKNNSGWSIGIISNFLV
FTLKQNEDESEQSINFSDISNAPGYNKWFFVTVTNNMMGMKIYINGKLIDTIKVKELT
GINFSKTITFEINKIPDTGLITSDSDNINMWIRDFYIFAKELDGKDINILFNSLQYTNVVKD
YWGNDLRYNKEYYMNIDYLNRYMYANSRQIVFNTRRNNDNFEGYKIIKIRIRGNTND
TRVRGGDILYFDMTINNKAYNLFMKNETMYADNHSTEDIYAIGLREQTKDINDNIIFQIQ
PMNNTYYYASQIFKSNFNGENISGICSIGTYRFRLLGGDWYRHNYLVPTVKQGNYSALLES
TSTHWGFPVSE

【0426】

配列番号54 - ポリペプチド配列, BoNT/D - UniProt P19321

MTWPVKDFNYSDPVDNDILYLRIPQNKLTTPVKAFMITQNIWVIPERFSSDTNPSSLK
PPRPTSKYQSYDPSYLSSTDEQKDTFLKGIIKLFKRINERDIGKKLINYLTVGSPFMGDSST
PEDTDFDTRHTTNIAVEKFENGSWKVNTNIITPSVLIFGPLPNILDYASLTQGGQSNPSF
EGFGTSLILKVAPEFLLTFSDVTSNQSSAVLGKSIFCMDPVIALMHELTHSLHQLYGINIPS
DKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLDVEIIPQIERSQLREKALGHYKDIKRLNNI
NKTIPSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKDNTGNFVVNIDKFNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYN
VKNRTHYFSRHYPVFANILDDNIYTIRDGFNLTNKGFNIEENSGQNIERNPALQKLSSSV
VDLFTKVCLRLTKNSRDDSTCIKVKNNRLPYVADKDSISQEIFENKIITDETQVQNYSDKF
SLDESILDGQVPINPEIVDPLLPNVNMEPLNLPGEIIVFYDDITKYVDYLSYYYLESQKL
SNNVENITLTTSVEEALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKGVQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMK

10

20

30

40

50

KDTLDKISDVSVIIPYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLLLEGFPFETIPALGVFTFY
SSIQEREKIIKTIENCLEQVRVKRWKDSYQWMVSNWLSRITTQFNHINYQMYDSLQYQAD
AIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNNINKFIRECSVTYLFKNMLP
KVIDELNKFDFLRTKTELINLIDSHNIIIVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNIFSNTNSSLKD
IINEYFNSINDSKILSLQNKKNALVDTSGYNAEVRVGDNVQLNTIYTNDFKLSSSGDKIIVN
LNNNIIYSAIYENSSVSFWIKISKDLTNSHNEYTIINSIEQNSGWKLCIRNGNIEWILQDVN
RKYKSLIFDYSESLSHTGYTNKWWFFVTITNNIMGYMKLYINGELKQSQKIEDLDEVKLDKT
IVFGIDENIDENQMLWIRDFNIFSKELSNEDINIVYEGQILRNVIKDYWGNPLKFDTEYYII
NDNYIDRYIAPESNVLVLVQYPDRSKLYTGNPITIKSVSDKNPYSRILNGDNIILHMLYNS
RKYMIIRDTDTIYATQGGECSSQNCVYALKLQSNLGNYGIGIFSINKNIVSKNKYCSQIFSSFR
ENTMLLADIYKPWRFSFKNAYTPVAVTNYETKLLSTSSFWKFSRDPGWVE

10

【0427】

配列番号55 - ポリペプチド配列, BoNT/E - UniProt Q00496

MPKINSFNNDPVNDRTILYIKPGGCQEFYKSFNIMKNIWIIPERNVIGTTPQDFHPPTSL
KNGDSSYYDPNYLQSDDEEKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANPYLGNDNTPDN
QFHIGDASAVEIKFSNGSQDILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISLRNNYMPSNHRFGSIAIV
TFSPEYSFRFNDNCMNEFIQDPALTMHELIHSLHGLYGAKGITT KYTITQKQNPLITNIR
GTNIEEFLTFFGGTDLNIITSAQSNDIYTNLLADYKKIASKLSKVQVSNPLLNPYKDVFEAKY
GLDKDASGIYSVNINKFNDIFKKLYSFTEFDLRTKFQVKCRQTYIGQYKYFKLSNLLNDSIY
NISEGYNINNLKVNFRGQANLNPRIITPITGRGLVKKIIRFCKNIVSVKGIRKSICIEINNG
ELFFVASSENSYNDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLDQVILNFNSESAPGLSDEKLNLTIQ
NDAYIPKYDSNGTSDIEQHVDNELNVFFYLDAQKVPEGENNVNLTSSIDTALLEQPKIYTF
FSSEFINNVNKPVQAALFVSWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIADISIVVPYIGLALNIGNE
AQKGNFKDALELLGAGILLEFEPELLIPTILVFTIKSFLGSSDNKNKVIKAINNALKERDEK
WKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNAIKTIIESKYNSYTL EEKNELTN
KYDIKQIENELNQKVSIA MNNIDRFLTESSISYLMKIINEVKINKLREYDENVKTYLLNYII
QHGSILGESQQELNSMVTDTLNN SIPFKLSSYTDDKILISYFNKFFKRIKSSSVLNMRYKN
DKYVDTSGYDSNININGDVYKYPTNKNQFGIYNDKLSEVNISQNDYIYDNKYKNFSISFW
VRIPNYDNKIVNVNNEYTIINCMRDNNSGWKVSLNHNEI IWTFEDNRGINQKLA FN YGN
ANGISDYINKWIFVTITNDR LGDSKLYINGNLIDQKSILNLGNIHVSDNILFKIVNCSYTRYI
GIRYFNIFDKELDETEIQTLYSNEPNTN ILKDFWGN YLLYDKEYYLLNV LKPN NFIDRRKD
STLSINNIRSTILLANRLYSGIKVKIQRVNNSSTNDNLVRKNDQVYIN FVASKTHLFPLYA
DTATTNKEKTIKISSSGNRFNQVVVMNSVG NCTMNFKNNGN NIGLLGFKADTVVASTW
YYTHMRDHTNSNGCFWNFISEEHGWQEK

20

30

【0428】

配列番号56 - ポリペプチド配列, BoNT/F - UniProt A7GBG3

MPVVINSFNNDPVNDTILYMQIPYEEKSKKYYKA FEIMRNVWIIPERN TIGTDP SDFD
PPASLENGSSAYYDPNYLT TDAEKDRYLKTTIKLFRINSNPAGEVLLQEISYAKPYLGNE
HTPINEFHVPVTRTTSVNIKSSTNVKSSII LNLVLGAGPDIFENSSYPVRKLMDSGGVYDPS
NDGFGSINIVTFSPEYEYTFNDISGGYNSSTESFIADPAISLAHELIALHGLYGARGVTYK
ETIKVKQAPLMIAEKPIRLEEFLTFFGGQDLNIITSAMKEKIYNNLLANYEKIATRLSRVNSA
PPEYDINEYKDYFQWKYGLDKNADGSYTVNENKFNEIYKKLYSFTEIDLANKFKVKCRNT
YFIKYGFLKVPNLLDDDIYTVSEGFNIGNLAVNNRGQNIKLNPKIIDSIPDKGLVEKIVKFC
KSVIPRKGTKAPPRLCIRVNNRELFFVASESSYNENDINTPKEIDDTTNLNNNYRNNLDEV
ILDYNSETIPQISNQTLNTLVQDDSYVPRYDSNGTSEIEEHNVDLNVFFYLHAQKVPEGE
TNISLTSSIDTALSEESQVYTFFSSEFINTINKPVHAALFISWINQVIRDFTTTEATQKSTFDK
IADISLVVPYVGLALNIGNEVQKENFKEAFELLGAGILLEFVPELLIPTILVFTIKSFIGSSEN
KNKIIKAINNSLMERETKWKEIYSWIVSNWLTRINTQFNKRKEQMYQALQNQVDAIKTVI
EYKYNNYTSDERNRLESEYNINNIREELNKKVSLAMENIERFITESSIFYLMKLINEAKVSK
LREYDEGVKEYLLDYISEHRSILGNSVQELNDLVTSTLNN SIPFELSSYTNDKILILYFNKL

40

50

YKKIKDNSILDMRYENNKFIDISGYGSNISINGDVYIYSTNRNQFGIYSSKPSEVNIAQNND
IIYNGRYQNFISFWVRIPKYFNKVNLNNEYTIIDCIRNNNSGWKISLNYNKIIWTLQDTA
GNNQKLVFNYTQMISISDYINKWIFVTITNNRLGNSRIYINGNLIDEKSISNLGDIHVSDNI
LFKIVGCNDTRYVVGIRYFKVFDTELGKTEIETLYSDEPDPSILKDFWGNLYLLYNKRYLLN
LLRTDKSITQNSNFLNINQQRGVYQKPNIFSNTRLYTGVEVIIRKNGSTDISNTDNFVRKN
DLAYINVVDRDVEYRLYADISIAKPEKIIKLRTSNSNSNLGQIIVMDSIGNNCTMNFQNN
NGGNIGLLGFHSNNLVASSWYYNNIRKNTSSNGCFWSFISKEHGWQEN

【0429】

配列番号57 - ポリペプチド配列, BoNT/G - UniProt Q60393

MPVNIKXFNYNDPINDDIIMMEPFNDPGPGTYKAFRIIDRIWIVPERFTYGFQPDQFN
ASTGVFSKDVVEYYDPTYLKTDAEKDKFLKTMIKLFNRINSKPSGQRLLDMIVDAIPYLG
NASTPPDKFAANVANVSINKKIIQPGAEDQIKGLMTNLIIFGPGPVLSDNFTDSMIMNGHS
PISEGFARMIRFCPSCLNVFNNVQENKDTSFSSRRAYFADPALTMHELIHVLHGLYGI
KISNLPITPNTKEFFMQHSDPVQAEELYTFGGHDPSVISPSTDMNIYNKALQNFQDIANR
LNIVSSAQGSGIDISLYKQIYKNKYDFVEDPNGKYSVDKDKFDKLYKALMFGFTETNLAGE
YGIKTRYSYFSEYLPPIKTEKLLDNTIYTQNEGFNIASKNLKTEFNGQNKAVNKEAYEEISL
EHLVIYRIAMCKPVMYKNTGKSEQCIIVNNEDLFFIANKDSFSKDLAKAETIAYNTQNNTI
ENNFSIDQLILDNDLSSGIDLNPENTEPFTNFDDIDIPVYIKQSALKKIFVDGDSLFEYLHA
QTFPSNIENLQLTNSLNDALRNNNKVYTFSTNLVEKANTVVGASLFVNWVKGVIDDFTS
ESTQKSTIDKVSVDVSIIIPYIGPALNVGNETAKENFKNAFEIGGAAILMEFIPELIVPIVGFF
TLESYVGNKGHIIMTISNALKKRDQKWTDMYGLIVSQWLSTVNTQFYTIKERMYNALNN
QSQAIEKIIEDQYNRYSEEDKMNINIDFNDIDFKLNQSINLAINNIDDFINQCSISYLMNRM
IPLAVKKLKDFDDNLKRDLLEYIDTNELLYLLDEVNLIKSKVNRHLKDSIPFDLSLYTKDTIL
IQVFNNYISNISSNAILSLSYRGGRLIDSSGYGATMNVGSDVIFNDIGNGQFKLNSENSENI
TAHQSKFVVYDSMFDNFSINFWVRTPKYNNNDIQTYLQNEYTIISCIKNDSGWKVSIKGN
RIIWTLIDVNAKSKSIFFEYSIKDNISDYINKWFSITITNDRLGNANIYINGSLKKSEKILNL
DRINSSNDIDFKLINCTDTTKFVWIKDFNIFGRELNATEVSSLYWIQSSTNTLKDFWGNPL
RYDTQYYLNFNQGMQNIYIKYFSKASMGETAPRTNFNNAAINYQNLYLGLRFIIKKASNSR
NINNDNIVREGDYIYLNIDNISDESRYVYVLVNSKEIQTQLFLAPINDDPTFYDVLQIKKYY
EKTTYNCQILCEKDKTFTGLFGIGKFVKDYG YVWD TYDNYFCISQWYLRRISENINKLRL
GCNWQFIPVDEGWTE

【0430】

配列番号58 - ポリペプチド配列, TeNT - UniProt P04958

MPITINNFYSDPVNNDTIIMMEPPYCKGLDIYYKAFKITDRIWIVPERYEFGTKPEDFNP
PSSLIEGASEYYDPNYLRTDSDKDRFLQTMVKLFNRKNNVAGEALLDKIINAIPYLGNSY
SLLDKFDTNSNSVSFNLLEQDPSGATTKSAMLTNLIIFGPGPVLNKNEVRGIVLRVDNKN
YFPCRDGFGSIMQMAFCPEYVPTFDNVIENTSLTIGKSKYFQDPALLLMHELIHVLHGLY
GMQVSSHEIIPSKQEIYMQHTYPISAEELFTFGGQDANLISIDIKNDLYEKTLDNYKAIANK
LSQVTSCNDPNIDIDSYKQIYQQKYQFDKDSNGQYIVNEDKFQILYNSIMYGFTIEELGKK
FNIKTRLSYFSMNHDPVKIPNLLDDTIYNDTEGFNIESKDLKSEYKGQNM RVNTNAFRNV
DGSGLVSKLIGLCKKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLGGEICIKIKNEDLTFIAEKNSFSEEPF
QDEIVSYNTKNKPLNFNYSLDKIIVDYNLQSKITLPNDRTPVTKGIPYAPEYKSNAASTIE
IHNIDDNTIYQYLYAQKSPTTLQRITMTNSVDDALINSTKIYSYFSPVISKVNQGAQGILFL
QWVRDIIDFTNESSQKTTIDKISDVSTIVPYIGPALNIVKQGYEGNFIGALETTGVVLLLE
YIPEITLPVIAALSIAESSTQKEKIIKTIDNFLEKRYEKWIEVYKLVKAKWLGTVNTQFQKR
SYQMYRSLEYQVDAIKKIIDYEYKIYSGPDKEQIADEINNLLKNKLEEKANKAMININIFMR
ESSRSFLVNQMINEAKKQLLEFDTQSKNILMQYIKANSKFIGITELKKLESKINKVFSTPIP
FSYSKNLDCWVDNEEDIDVILKKSTILNLDINNDIISDISGFNSSVITYPDAQLVPGINGKAI
HLVNNESESEVIVHKAMDIEYNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQYGTNEYSIISSMKK
HLSIGSGWSVSLKGNNLIWTLKDSAGEVRQITFRDLPDKFNAYLANKWVFITITNDRLLS

ANLYINGVLMGSAEITGLGAIREDDNNITLKLDRCNNNNQYVVSIDKFRIFCKALNPKEIEKL
YTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYLIPVASSSKDVQLKNITDYMVLTNAPSYTNGKLNII
YRRLYNGLKFIIKRYTPNNEIDSFVKSGDFIKLYVSYNNNEHIVGYPKDGNAFNNLDRILR
VGYNAPGIPLYKKMEAVKLRDLKTYSVQLKLYDDKNASLGLVGTHNGQIGNDPNRDILIA
SNWYFNHLKDKILGCDWYFVPTDEGWTND

【0431】

配列番号59 - ポリペプチド配列, BoNT/X

MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIKNIWIVPERYNFTNNT
NDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTNPSEKDEFLQGVIKVLERIKSKPEGEKLELISSIP
LPLVSNGALTLSDNETIAYQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEG
TLSEVSFSPFYLLKPFDESYGNYSRLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHELHVHTHNLGIS
NRNFYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGIDSKAISSLIKKIETAKNNYTTLISE
RLNTVTVENDLLKYIKNKIPVQGR LGNFKLDTAEFKKLNTILFVLNESNLAQRFSILVR
KHYLKERPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISSQGSNDFQGGQLLESSYFEKIESNALRAFI
KICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVSYPCSLNGCIEVENKDLFLISN
KDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELY
EPIRNSLFEIKTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYSPF
KNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLRSIVKDFSDET GKIDVIDKSSDTLAIVPYIGPLNI
GNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPILVGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRD
QKWAEVYNITKAQWWGTIHLQINTRLAHTYKALSQRQANA IKMNMEFQLANYKGNIDDK
AK

IKNAISETTEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKE MIPKVQDNLKNFDLETKKTLDK
FIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIEDYEVLNL
GAEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIELADGRENKAIKIKGSENSTIKIAMNKYLRF SATDNF
SISFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLRDHNNSIKIVTPDYI
AFNGWNLITITNNRSKGSIVYVNGSKIEEKDISSIWNTEVDDPIIFRLKNNRDTQAFTLL
DQFSIYRKELNQNEVVKLYNYFYNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREYWS
SFGYDYVILSDSKTITFPNNIRYGALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNKDFIQLEIDGYNMG
ISADRFNEDTNYIGTTYGTTDHLTTDFEIIQRQEKYRNYCQLKTPYNIFHKSGLMSTETS
KPTFHDYRDWVYSSAWYFQNYENLNL RKHTKTNWYFIPKDEGWDED

【0432】

配列番号60 - ポリペプチド配列, 無修飾 BoNT/A1

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQM QPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDL
NPPPEAKQVPVSYDYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWG
GSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGEVLNLTRNGYGS
TQYIRFSPDFTFGFEESLEVD TNPLL GAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAINPNRVF
KVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIAS TLNKAKSIV
GTTASLQYMKNVFKEKYLLSED TSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRK
TYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNL RNTNLAANFNGQNT EINN MNFTKLKNFTGLFE
FYKLLCVRGIITSKTSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITS DT
NIEAAEENISLDLIQQYYLT FNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIE RFPNGKKYELDKY
TMFHYLRAQEFEGHKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWV
EQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEI
AIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALS KRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKK
MKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCS
VSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQ
LSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQ
LFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWKVS
LNYGEIIWTLQDTQEIKQRVVF KYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQK
PISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYI WIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSN SGILKDF

WGDYLYQYDKPYMYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPGRGSVMTTNIYLNSSLYRGT
KFIKKYASGNKDNIVRNDRVYINVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQ
VVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNAKLVASNWYNRQIERSRTL
GCSWEFIPVDDGWGERPL

【0433】

配列番号61 - ポリペプチド配列, mrBoNT/AB(0)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMMPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDL
NPPPEAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNLYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWG
GSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGS
TQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAAGKATDPAVTLAHQLIYAGHRLYGIAPNPNRVF
KVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAGKIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKAKSIV
GTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRK
TYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRTNLAANFNGQNTNMMNFTKLKNFTGLFE
FYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITS
DTNIEAAEENISLDLIQYYLTFFNFDNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIEFPNGKKYELDKY
TMFHYLRAQEFEGHKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWV
EQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEI
AIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALS KRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKK
MKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCS
VSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRKDKVNNTLSTDIPFQ
LSKYVDNQRLSTFTEYIKNINILNLRYKDNNLIDLSGYGAKVEVYDGVELNDKNQFK
LTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNNSG
WKISIRGNRIIWTLDINGKTKSVFFEYNIREDISYINRWFFVTITNNLNNAKIYINGKLES
NTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIERYKIQSYSEYKDF
WGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYINRYDLIGEFII
RRKSNSQSINDDIVRKEDIYLDFFNLNQEWRYTYKYFKKEEMKLFLAPIYDSDEFYNTI
QIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGHRFYESGIVFEEYKDYFCISKWYLKEVKKR
PYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE

【0434】

配列番号62 - ポリペプチド配列, mrBoNT/A(0)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMMPVKAFKIHNKIWVIPERDT
FTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNLYLKGVTCLFERIYS
TDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELN
LVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESL
EVDTNPLLGAAGKATDPAVTLAHQLIYAGHRLYGIAPNPNRVFKVNTNAY
YEMSGLEVSFEELRTFGGHDAGKIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKA
KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYT
EDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRTNLAAN
FNGQNTNMMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKAL
NDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITS DTNIEAAEENISLDLIQ
QYYLTFFNFDNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIEFPNGKKYELDKYTM
FHYLRAQEFEGHKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKD
DFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALS
KRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQ
YNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSM
IPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRKDKVNNTLSTDIP
FQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESKHLIDLSRYASKINI
GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKKAIVNSMYENFSTSFWIRIP
KYFNKISLNNEYTIINCMENNSGWKVS LNYGEI IWTLQDTKEIKQRVVFK

10

20

30

40

50

YSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNKSkiYINGRLIDQKPISNLGNIHAS
NKIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNsgILKDF
WGDYLQYDKPYMYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGRGSVMTTNIYL
NSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQA
GVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDKGITNKCKMNLQDNNGNDIGFI
GFHQFNNAIAKLVASNWYNRQIERSSRTLGCSEFIPVDDGWGERPL

【0435】

配列番号63 - ポリペプチド配列, BoNT/XB(0) (Hisタグ付き)

MGSMKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRH SDKINKGKGPFKAQVIKNIWIVPERYNFT
NNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTNSE KDEFLLQGVIVLERIKSKPEGEKLELIS
SIPLPLVSNGALTLSNETIAYQENNNIVS NLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISN
GEGTLSEVSFSFPYLKPFDESIGNYRSLVN IVNKFVKREFAPDPASTLMHQLVYVTHNLY
GISNRNFYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEEL LTFGGIDSKAISSLIICKIIETAKNNYTTL
ISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPVQGRNGN FKLDTAEFKKLNTILFVLNESNLAQRFSI
LVRKHLYKERPIDPIYVNILDDNSYSTLEG FNISQGSNDFQGGQLLESSYFEKIESNALR
AFIKICHKAIDGRSLYNKTLDCIEVENKDL FLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKDK
LPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILER NEELYEPIRNSLFEIKTIYVDKLTTFHFLE
AQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNK VYSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR
SIVKDFSDETGGIDVIDKSSDTLAIVPYIG PLLNIGNDIRHGDVGAIELAGITALLEYV
PEFTIPILVGLVIGGELAREQVEAIVNNA LDKRDQKWADEVYNITKAQWWGTIHLQINTR
LAHTYKALSRQANAIAKMNMEFQLANYKGN DDKAKIKNAISETTEILLNKSVEQAMKNTK
FMIKLSNSYLTKEIPKVQDNLKNFDLETK KTLDFKIEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRL
NKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIEDY EVLNLGAEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIEI
LNNIILNLRYKDNNLIDLSGYGAKVEVYDG VELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFN
SVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEY TIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTIDING
KTKSVFFEYNIREDISYINRWFFVTITNN LNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEI
IFKLDGDDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSN IEERYKIQSYSEYKDFWGNPLMYNKEYYM
FNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQN SKYINYRDLYIGEFKIRRSNSQSINDDI
VRKEDIYLDFFNLNQEWRYTYKYFKKEE MKLFLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYS
CQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVF EYKDYFCISKWYLKEVKKRPYNLKLGCNW
QFIPKDEGWTEHHHHHHHHHH

【0436】

配列番号64 - ポリペプチド配列, BoNT/XB(0)

MGSMKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRH SDKINKGKGPFKAQVIKNIWIVPERYNFT
NNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTNSE KDEFLLQGVIVLERIKSKPEGEKLELIS
SIPLPLVSNGALTLSNETIAYQENNNIVS NLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISN
GEGTLSEVSFSFPYLKPFDESIGNYRSLVN IVNKFVKREFAPDPASTLMHQLVYVTHNLY
GISNRNFYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEEL LTFGGIDSKAISSLIICKIIETAKNNYTTL
ISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPVQGRNGN FKLDTAEFKKLNTILFVLNESNLAQRFSI
LVRKHLYKERPIDPIYVNILDDNSYSTLEG FNISQGSNDFQGGQLLESSYFEKIESNALR
AFIKICHKAIDGRSLYNKTLDCIEVENKDL FLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKDK
LPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILER NEELYEPIRNSLFEIKTIYVDKLTTFHFLE
AQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNK VYSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR
SIVKDFSDETGGIDVIDKSSDTLAIVPYIG PLLNIGNDIRHGDVGAIELAGITALLEYV
PEFTIPILVGLVIGGELAREQVEAIVNNA LDKRDQKWADEVYNITKAQWWGTIHLQINTR
LAHTYKALSRQANAIAKMNMEFQLANYKGN DDKAKIKNAISETTEILLNKSVEQAMKNTK
FMIKLSNSYLTKEIPKVQDNLKNFDLETK KTLDFKIEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRL
NKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIEDY EVLNLGAEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIEI
LNNIILNLRYKDNNLIDLSGYGAKVEVYDG VELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFN
SVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEY TIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTIDING

KTKSVFFEYNIREDISSEYINRWFFVTITNN LNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEI
IFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSN IEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYM
FNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQN SKYINYRDLYIGEKFIIRKSNSSQSINDDI
VRKEDIYLDFFNLNQEWVRVYTYKYFKKEE MKLFLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYS
CQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVF EEEKDYFCISKWYLKEVKKRPYNLKLGCNW
QFIPKDEGWTE

【0437】

配列番号65 - ポリペプチド配列, BoNT/XB(0) 変異体 (Hisタグ付き)

MGSMKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRH SDKINKGKGPFKAFQVIKNIWIVPERYNFT
NNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTNSE KDEFLLQGVIVLERIKSKPEGEKLELLEISS
SIPLPLVSNAGALTSDNETIAYQENNNIVS NLQANLVIYGGPGDIANNATYGLYSTPISN
GEGTLSEVSFSFPYLKPFDESYGNYRSLVN IVNKFVKREFAPDPASTLMHQLVYVTHNLY
GISNRNFYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEEL LTFGGIDSKAISSLIKKIETAKNNYTTL
ISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPVQGRNGN FKLDTAEFKKLNTILFVLNESNLAQRFSI
LVRKHLYKERPIDPIYVNILDDNSYSTLEG FNISSQGSNDFQGGQLLESSYFEKIESNALR
AFIKICHKAIDGRSLYNKTLDCIEVENKDL FLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKDK
LPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILER NEELYEPIRNSLFEIKTIYVDKLTTFHFLE
AQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNK VYSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR
SIVKDFSDETGGIDVIDKSSDTLAIVPYIG PLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYV
PEFTIPILVGLEVIGGELAREQVEAIVNNA LDKRDQKWADEVYNITKAQWWGTIHLQINTR
LAHTYKALSRQANAIAKMNMEFQLANYKGNI DDKAKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTK
FMIKLSNSYLTKEIMPKVQDNLKNFDLETK KTLDFKIEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRL
NKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEILNN IILNLRYKDNNDLIDLSGYGAKVEVYDGVLE
NDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVF LDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTII
NCMKNNSGWKISIRGNRIIWTIDINGKTK SVFFEYNIREDISSEYINRWFFVTITNNLNN
AKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFK LDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIEE
RYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNA GNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKY
INYRDLYIGEKFIIRKSNSSQSINDDIVRK EDYIYLDFFNLNQEWVRVYTYKYFKKEEMKL
FLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSQCL LFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVFEEY
KDYFCISKWYLKEVKKRPYNLKLGCNWQFI PKDEGWTEHHHHHHHHHHH

【0438】

配列番号66 - ポリペプチド配列, BoNT/XB(0) 変異体

MGSMKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRH SDKINKGKGPFKAFQVIKNIWIVPERYNFT
NNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTNSE KDEFLLQGVIVLERIKSKPEGEKLELLEISS
SIPLPLVSNAGALTSDNETIAYQENNNIVS NLQANLVIYGGPGDIANNATYGLYSTPISN
GEGTLSEVSFSFPYLKPFDESYGNYRSLVN IVNKFVKREFAPDPASTLMHQLVYVTHNLY
GISNRNFYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEEL LTFGGIDSKAISSLIKKIETAKNNYTTL
ISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPVQGRNGN FKLDTAEFKKLNTILFVLNESNLAQRFSI
LVRKHLYKERPIDPIYVNILDDNSYSTLEG FNISSQGSNDFQGGQLLESSYFEKIESNALR
AFIKICHKAIDGRSLYNKTLDCIEVENKDL FLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKDK
LPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILER NEELYEPIRNSLFEIKTIYVDKLTTFHFLE
AQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNK VYSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR
SIVKDFSDETGGIDVIDKSSDTLAIVPYIG PLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYV
PEFTIPILVGLEVIGGELAREQVEAIVNNA LDKRDQKWADEVYNITKAQWWGTIHLQINTR
LAHTYKALSRQANAIAKMNMEFQLANYKGNI DDKAKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTK
FMIKLSNSYLTKEIMPKVQDNLKNFDLETK KTLDFKIEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRL
NKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEILNN IILNLRYKDNNDLIDLSGYGAKVEVYDGVLE
NDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVF LDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTII
NCMKNNSGWKISIRGNRIIWTIDINGKTK SVFFEYNIREDISSEYINRWFFVTITNNLNN
AKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFK LDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIEE

RYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNA GNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKY
INYRDLYIGEKFIIRRKSNSQSINDDIVRK EDIYLDFFNLNQEWVRVYTYKYFKKEEMKL
FLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQL LFKKDEESTDEIGLIGHRFYESGIVFEEY
KDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFI PKDEGWTE

【0439】

配列番号67 - ポリペプチド配列, BoNT/XA(0)

MGSMKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRH SDKINKGKGPFKAFQVIKNIWIVPERYNFT
NNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTNSE KDEFLLQGVIVLERIKSKPEGEKLELLEISS
SIPLPLVSNAGALTLSNETIAYQENNNIVS NLQANLVIYGGPGDIANNATYGLYSTPISN
GEGTLSEVSFSFPYLLKPFDESIGNYRSLVN IVNKFVKREFAPDPASTLMHQLVYVTHNLY
GISNRNFYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEEL LTFGGIDSKAISSLIKKIETAKNNYTTL
ISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPVQGR LGN FKLDTAEFKKLNTILFVLNESNLAQRFSI
LVRKHLYKERPIDPIYVNILDDNSYSTLEG FNISQGSNDFQGGQLLESSYFEKIESNALR
AFIKICHKAIDGRSLEVLFFQGPLYNKTLDC IEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPE
TTVFFKDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSI SQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKTIYVDK
LTTFFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVD EALSNPNKVYSPFKNMSNTINSIETGITST
YIFYQWLRISIVKDFSDETGGKIDVIDKSSDT LAIVPYIGPLLNIGNDIRHGDFVGAIELAG
ITALLEYVPEFTIPILVGLLEVIGGELAREQ VEAIVNNALDKRDQKWADEVYNITKAQWWGT
IHLQINTRLAHTYKALSRQANAIKMNMEFQ LANYKGNIDDKAKIKNAISETTEILLNKSV
QAMKNTEKFMIKLSNSYLTKE MIPKVQDNL KNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSL
RRKVSIRLNKNIAFDINDIPFSEFDDLINQ YKNEIEDYEVNLGAEDGKIKDLSGTTSDI
NIGSDIEIINTSILNLRYESNHLIDLSRYA SKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIE
VILKNAIVYNSMYENFSTSFWRIPKYFNS ISLNNEYTIINCMENNSGWKVS LNYGEI IW
TLQDTQEIKQRVVF KYSQMINISDYINRWI FVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLG
NIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWI KYFNLF DKELNEKEIKDLYDNQSN SGILKDFWGDYL
QYDKPYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMY LKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKY
ASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLAT NASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKS
KNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQF NNI AKLVASNWYNRQIERSSRTLGC SWEFI
PVDDG WGERPL

【0440】

配列番号68 - ポリペプチド配列, BoNT/XA(0) 変異体

MGSMKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRH SDKINKGKGPFKAFQVIKNIWIVPERYNFT
NNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTNSE KDEFLLQGVIVLERIKSKPEGEKLELLEISS
SIPLPLVSNAGALTLSNETIAYQENNNIVS NLQANLVIYGGPGDIANNATYGLYSTPISN
GEGTLSEVSFSFPYLLKPFDESIGNYRSLVN IVNKFVKREFAPDPASTLMHQLVYVTHNLY
GISNRNFYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEEL LTFGGIDSKAISSLIKKIETAKNNYTTL
ISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPVQGR LGN FKLDTAEFKKLNTILFVLNESNLAQRFSI
LVRKHLYKERPIDPIYVNILDDNSYSTLEG FNISQGSNDFQGGQLLESSYFEKIESNALR
AFIKICHKAIDGRSLEVLFFQGPLYNKTLDC IEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPE
TTVFFKDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSI SQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKTIYVDK
LTTFFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVD EALSNPNKVYSPFKNMSNTINSIETGITST
YIFYQWLRISIVKDFSDETGGKIDVIDKSSDT LAIVPYIGPLLNIGNDIRHGDFVGAIELAG
ITALLEYVPEFTIPILVGLLEVIGGELAREQ VEAIVNNALDKRDQKWADEVYNITKAQWWGT
IHLQINTRLAHTYKALSRQANAIKMNMEFQ LANYKGNIDDKAKIKNAISETTEILLNKSV
QAMKNTEKFMIKLSNSYLTKE MIPKVQDNL KNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSL
RRKVSIRLNKNIAFDINDIPFSEFDDLINQ YKNEIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKI
NIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVIL KNAIVYNSMYENFSTSFWRIPKYFNSISL
NNEYTIINCMENNSGWKVS LNYGEI IWTLQ DTQEIKQRVVF KYSQMINISDYINRWIFVT
ITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGN I HASNNIMFKLDGCRDTHRYIWI KYFNLF DKE
LNEKEIKDLYDNQSN SGILKDFWGDYLQYD KPYYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYL

KG

PRGSMVTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASG NKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNAS
QAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKND QGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNI
AKLVASNWYNRQIERSRSLGCSWEFIPVD DGWGERPL

【0441】

配列番号69 - ポリペプチド配列, BoNT/XD(0)

MGSMKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRH SDKINKGKGPFKAFQVIKNIWIVPERYNFT
NNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTNSE KDEFLLQGVIVLERIKSKPEGEKLELLEISS
SIPLPLVSNAGLTLSNETIAYQENNNIVS NLQANLVIYGGPGDIANNATYGLYSTPISN
GEGTLSEVSFSFPFYLKPFDES YGNYRSLVN IVNKFVKREFAPDPASTLMHQLVYVTHNLY
GISNRNFYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEEL LTFGGIDSKAISSLIKKIETAKNNYTTL
ISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPVQGR LGN FKLDTAEFKKLNTILFVLNESNLAQRFSI
LVRKHLYKERPIDPIYVNILDDNSYSTLEG FNISQGSNDFQGLLESSYFEKIESNALR
AFIKICHKAIDGRSLYNKTLDCIEVENKDL FLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKDK
LPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILER NEELYEPIRNSLFEIKTIYVDKLTTFHFLE
AQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNK VYSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR
SIVKDFSDETGKIDVIDKSSDTLAIVPYIG PLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYV
PEFTIPILVGLEVIGGELAREQVEAIVNNA LDKRDQKWADEVYNITKAQWWGTIHLQINTR
LAHTYKALSRQANAIAKMNMEFQLANYKGN I DDKAKIKNAISETTEILLNKSVEQAMKNTK
FMIKLSNSYLTKE MIPKVQDNLKNFDLETK KTLDFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRL
NKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIEDY EVLNLGAEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIEN
DSKILSLQNKKNALVDTSGYNAEVRVGDNV QLNTIYTNDFKLSSSGDKIIVNLNNNLYS
AIYENSSVSFWIKISKDLTNSHNEYTIINS IEQNSGWKLCIRNGNIEWILQDVNRKYKSL
IFDYSESLSHTGYTNKWFFVTITNNIMGYM KLYINGELKQSQKIEDLDEVKLDKTIVFGI
DENIDENQMLWIRDFNIFSKELSNEDINIV YEGQILRNVIKDYWGNPLKFDTEYYIINDN
YIDRYIAPESNVLVLVQYPDRSKLYTGNPI TIKSVSDKNPYSRILNGDNILHMLYNSRK
YMIIRDTDTIYATQGGEC SQNCVYALKLQS NLGNYGIGIFS IKNIVSKNKYCSQIFSSFR
ENTMLLADIYKPWRFSFKNAYTPVAVTN YE TKLLSTSSFWKFISRDPGWVE

【0442】

配列番号70 - ポリペプチド配列, BoNT/XF(0)

MGSMKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRH SDKINKGKGPFKAFQVIKNIWIVPERYNFT
NNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTNSE KDEFLLQGVIVLERIKSKPEGEKLELLEISS
SIPLPLVSNAGLTLSNETIAYQENNNIVS NLQANLVIYGGPGDIANNATYGLYSTPISN
GEGTLSEVSFSFPFYLKPFDES YGNYRSLVN IVNKFVKREFAPDPASTLMHQLVYVTHNLY
GISNRNFYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEEL LTFGGIDSKAISSLIKKIETAKNNYTTL
ISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPVQGR LGN FKLDTAEFKKLNTILFVLNESNLAQRFSI
LVRKHLYKERPIDPIYVNILDDNSYSTLEG FNISQGSNDFQGLLESSYFEKIESNALR
AFIKICHKAIDGRSLYNKTLDCIEVENKDL FLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKDK
LPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILER NEELYEPIRNSLFEIKTIYVDKLTTFHFLE
AQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNK VYSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR
SIVKDFSDETGKIDVIDKSSDTLAIVPYIG PLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYV
PEFTIPILVGLEVIGGELAREQVEAIVNNA LDKRDQKWADEVYNITKAQWWGTIHLQINTR
LAHTYKALSRQANAIAKMNMEFQLANYKGN I DDKAKIKNAISETTEILLNKSVEQAMKNTK
FMIKLSNSYLTKE MIPKVQDNLKNFDLETK KTLDFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRL
NKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIEDY EVLNLGAEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIEI
KDNSILDMRYENNK FIDISGYGSNISINGD VYIYSTNRNQFGIYSSKPSEVNIAQNNDII
YNGRYQNFSISFWVRIPKYFNKVN LNNEYT IIDCIRNNNSGWKISLNYNKIIWTLQDTAG
NNQKLVFNYTQMISISDYINKWIFVTITNN RLGNSRIYINGNLIDEKSISNLGDIHVSDN
ILFKIVGCNDTRYVGIRYFKVFDTELKTE IETLYSDEPDPSILKDFWGNLYLLYNKRYYL
LNLLRTDKSITQNSNFLNINQQRGVYQKPN IFSNTRLYTGVEVIIRKNGSTDISNTDNFV

RKNDLAYINVVDRDVEYRLYADISIAKPEK IIKLIRTSNSNNSLGQIIVMDSIGNNCTMN
FQNNNGGNIGLLGFKSNNLVASSWYYNNIR KNTSSNGCFWSFISKEHWQEN

【0443】

配列番号71 - C1 活性化ループコンセンサス配列

Cys-(Xaa)_a-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cys, ここで a = 1-10 かつ b = 4-15

【0444】

配列番号72 - C1 活性化ループ

CHKAIDGRSLYNKTLDC

【0445】

配列番号73 - C1 活性化ループ 変異体

CHKAIEGRSLYNKTLDC

【0446】

配列番号74 - ポリペプチド配列, rLC/A(0) (Hisタグ付き)

MPFVNKQFNY KDPVNGVDIA YIKIPNAGQM QPVKAFKIHN KIWVIPERDT FTNPEEG
DLN

PPPEAKQVPV SYVDSTYLST DNEKDNYLKG VTKLFERIYS TDLGRMLLTS IVRGIPFWGG
STIDTELKVI DTNCINVIQP DGSYRSEELN LVIIGPSADI IQFECKSFGH EVLNLTRNGY
GSTQYIRFSP DFTFGFEESL EVDTNPLLGA GK FATDPAVT LAHQ LIYAGH RLYGIAINPN
RVFKVNTNAY YEMSGLEV SF EELRTFGGHD AKFIDSLQEN EFRLYYYNKF KDIAS TLNKA
KSIVGTTASL QYMKNVFKEK YLLSEDTSGK FSVDK LKFDK LYKMLTEIYT EDNFVKFFKV
LNRKTYLNFD KAVFKINIVP KVN YTIYDGF NLRNTNLAAN FNGQNT EINN MNFTKLK
NFT

GLFEENLYFQ GASHHHHHHH H

【0447】

配列番号75 - ポリペプチド配列, rLH_N/A(0) (Hisタグ付き)

MPFVNKQFNY KDPVNGVDIA YIKIPNAGQM QPVKAFKIHN KIWVIPERDT FTNPEEG
DLN

PPPEAKQVPV SYVDSTYLST DNEKDNYLKG VTKLFERIYS TDLGRMLLTS IVRGIPFWGG
STIDTELKVI DTNCINVIQP DGSYRSEELN LVIIGPSADI IQFECKSFGH EVLNLTRNGY
GSTQYIRFSP DFTFGFEESL EVDTNPLLGA GK FATDPAVT LAHQ LIYAGH RLYGIAINPN
RVFKVNTNAY YEMSGLEV SF EELRTFGGHD AKFIDSLQEN EFRLYYYNKF KDIAS TLNKA
KSIVGTTASL QYMKNVFKEK YLLSEDTSGK FSVDK LKFDK LYKMLTEIYT EDNFVKFFKV
LNRKTYLNFD KAVFKINIVP KVN YTIYDGF NLRNTNLAAN FNGQNT EINN MNFTKLK
NFT

GLFEFYKLLC VRGIITSKTK SLDKGYNKAL NDLCIKVNNW DLFFSPSEDN FTNDLNKGEE
ITSDTNIEAA EENISLDLIQ QYYLTFNFDN EPENISIENL SSDIIGQLEL MPNIERFPNG
KKYELDKYTM FHYLRAQEFE HGKSRIALT N SVNEALLNPS RVYTFSSDY VKKV NKA
TEA

AMFLGWVEQL VYDFTDETSE VSTTDKIADI TIIIPYIGPA LNIGNMLYKD DFGALIFSG
AVILLEFIPE IAIPVLGTFA LVSYIANKVL TVQTIDNALS KRNEKWDEVY KYIVTNWLAK
VNTQIDLIRK KMKEALENQA EATKAIINYQ YNQYTEEEKN NINFNIDDL SSKLNESINKA
MININKFLNQ CSVSYLMNSM IPYGVKRLED FDASLKDALL KYIYDNRGTL IGQVDRL
KDK

VNNTLSTDIP FQLSKYVDNQ RLLSTENLYF QGASHHHHHH HH

【0448】

配列番号76 - ポリペプチド配列, rLC/X(0)

MKLEINKFNY NDPIDGINVI TMRPPRHSDK INKGKGPFKA FQVIKNIWIV PERYNFTNNT
NDLNIPSEPI MEADAIYNPN YLNT PSEKDE FLQGVIVLE RIKSKPEGEK LLELISSIP
LPLVSNGALT LSDNETIAYQ ENNNIVSNLQ ANLVIYGP GP DIANNATYGL YSTPISNGEG
TLSEVSFSPF YLKPFD ESYG NYRSLVNIVN KFKV KREFAPD PASTLMHQLV YVTHNLYGIS

10

20

30

40

50

NRNFYYNFD T GKIETSRQQN SLIFEELLTF GGIDSKAISS LIIKKIETA KNNYTTLISE
RLNTVTVEND LLKYIKNKIP VQGRLGNFKL DTAEFKKLN TILFVLNESN LAQRFSILVR
KHYLKERPID PIYVNILDDN SYSTLEGFNI SSQGSNDFQG QLLESSYFEK IESNALRAFI
KIAPRNGLLY NAIYRNSK

【0449】

配列番号77 - PreScission プロテアーゼ部位

LEVLFQGP

【0450】

配列番号78 - C1 活性化ループ 変異体 2

CHKAIDGRSLEVLFQGPLYNKTLD C

【実施例】

【0451】

実施例1

【0452】

BoNT/A(0)はインビトロ及びインビボで触媒的に不活性である

【0453】

BoNT/A(0)(配列番号2)の触媒活性をインビトロの細胞に基づくモデルにおいて試験した。これらはBoNT/A標的SNAREタンパク質SNAP25の切断を測定する。図1は、野生型BoNT/A(配列番号60)とは対照的に、BoNT/A(0)がヒトニューロンアッセイにおいてSNAP25を切断しないということを示している。図2はラットニューロンアッセイにおいてこの結果を確認している。

【0454】

確認として、インビボDASアッセイをBoNT/A及びBoNT/A(0)を用いて実施した。DASアッセイは、マウス腓腹筋/ヒラメ筋複合体へのゼラチンリン酸緩衝液中に製剤された20 µlのクロストリジウム毒素の注射、次にAokiの方法(Aoki KR, Toxicon 39: 1815-1820; 2001)を用いる指外転スコアの評価によって行なった。DASアッセイでは、特徴的な驚愕反応を誘発するためにマウスを尾で手短にぶら下げた(図3A)。これにおいては、マウスはその後肢を伸展し、その後肢指を外転する。クロストリジウム毒素注射後に、指外転の変動する度合いが5点スケールでスコア付けされた(0=正常から4=指外転の最大の縮減-図3B)。これは、神経筋接合部における神経毒素の活性によって誘導される麻痺の機能的な尺度を提供する。加えて、体重の変化を投与から7日以内のマウスにおいて評価した。これは、投与の部位からの毒素拡散の毒性及び望まれない効果の尺度を提供する。結果が下の表1に提示されている。

【表1】

表 1. BoNT/A(0)又は BoNT/A の投与後の DAS スコア(24 時間後)及び体重の変化。

	DAS スコア	観察された体重の変化
BoNT/A	4	あり
BoNT/A(0)	0	なし

【0455】

結果は、BoNT/A(0)がインビボで触媒的に不活性であり、毒性のいずれかの症状をもたらさないということを確認している。それゆえに、BoNT/A(0)は安全な実質的に非毒性の治療薬である。

【0456】

実施例2

【0457】

触媒的に不活性なBoNTを用いる慢性のニューロパチー性疼痛(慢性絞扼性損傷(CCI)ラットモデル)の処置

【0458】

材料及び方法

【0459】

慢性絞扼性損傷(CCI)を、Bennett and Xie (1988), Pain, 33(1):87-107によって先に記載された通り行なった。第-14日に、左坐骨神経のセグメントを露出させ、絹製縫合糸の4つの緩い結紮を神経上に留置する前に、成体の雄スプライングドローラット(220~250g)を麻酔した。第0日(D0)に、ラットにBoNT/A(30pg/kg)、BoNT/A(60pg/kg)、BoNT/A(0)(60pg/kg)、又は基剤(GPB)のどれかを注射し、足底内(i.pl.)経路によって投与し(n=10~11/群)、正の対照ガバペンチン(100mg/kg)は経口(p.o.)経路によって投与した(n=8/群)。ガバペンチンによって処置された動物を処置の1、2、及び4h後に試験した。BoNT/A、BoNT/A(0)、又は基剤処置された動物を第3、5、及び9日に試験した。動物をフォンフライ試験において機械的感受性について評価した。

10

【0460】

結果

【0461】

実験は、触媒的に不活性なBoNT(BoNT/A(0))を投与することによって、同側の足の機械的感受性が縮減されたということを示した(図4B)。その上、BoNT/A(0)は、同等に投与されたBoNT/Aと比較したときに、機械的感受性を縮減することにおいてより有効であった。より後の時点において、BoNT/A(0)はガバペンチンよりもまた有効であった。縮減された感受性がBoNT/A(0)投与の結果としてであったということを確認するために、反対側の足の機械的感受性をもまた試験した。結果は、条件間における反対側の足の機械的感受性の違いが有意ではなかったということを示した(図4C)。更にその上、BoNT/A(0)の実質的な非毒性の確認として、経時的な体重の変化は、基剤又はガバペンチンを投与されたラットのものと同等であった(図4D)。これは、第9日に統計的に有意に異なった触媒的に活性なBoNT/Aを投与されたラットで観察された変化とは対照的である。

20

【0462】

結論として、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素は、驚くべきことに疼痛(例えば慢性のニューロパチー性疼痛)を縮減することができ、それによって、かかる神経毒素が好適な疼痛治療薬であるということを示唆する。

【0463】

実施例3

30

【0464】

触媒的に不活性なBoNTを用いる急性のニューロパチー性疼痛(オキサリプラチンラットモデル)の処置

【0465】

材料及び方法

【0466】

オキサリプラチンによって誘導される末梢感覚ニューロパチーの実験モデルを、オキサリプラチンの腹腔内注射によって誘導した(Ling et al (2007), Pain, 128(3):225-234; Ling et al (2007), Toxicology, 20;234(3):176-84)。第0日に、成体の雄スプライングドローラット(100~133g)が、シャム処置(5%グルコース)又はオキサリプラチン(10mg/kg)のi.p.注射を受けた。直後に、シャム処置された動物は基剤のi.pl.注射を受け、オキサリプラチン処置された動物はBoNT/A(0)(1000pg/kg)、BoNT/A(50pg/kg)、BoNT/A(100pg/kg)、BoNT/A(160pg/kg)、又は基剤(GPB;n=10/群)のi.pl.注射を受けた。D3に、正の対照デュロキセチン(100mg/kg)をp.o.経路によって与えた。動物を温度(冷温)感受性についてD3及びD5に評価した。

40

【0467】

結果

【0468】

実験は、触媒的に不活性なBoNT(BoNT/A(0))を投与することによって、同側の足の冷温感受性が縮減されたということを示した(図5B)。BoNT/A、BoNT/A(0)、又は基剤によ

50

って処置された群間で、反対側の足の温度感受性の違いはなかった(図5C)。

【0469】

結論として、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素は、驚くべきことに、急性のニューロパチー性疼痛を縮減することができ、それによって、かかる神経毒素が疼痛の処置のための汎用的な用途を有するということを示唆する。

【0470】

実施例4

【0471】

触媒的に不活性なBoNTを用いる慢性のニューロパチー性疼痛(オキサリプラチンラットモデル)の処置

【0472】

材料及び方法

【0473】

第0日にi.pl.経路によるBoNT/A(100pg/kg)、BoNT/A(0)(100pg/kg)、又は基剤(GPB)によって処置される前に、第-2日(D-2)に、成体の雄スプライングドローラット(180~210g)がオキサリプラチンのi.p.注射を受けた(10mg/kg)(n=11~12/群)。正の対照プレガバリンはD3に投与した(n=12)。動物を機械的感受性(フォンフライ試験)及び温度(冷温感受性(コールドプレート試験))について第3、6、及び9日に試験した。

【0474】

結果

【0475】

実験は、触媒的に不活性なBoNT(BoNT/A(0))を投与することによって、同側の足の機械的感受性(図6B)及び冷温感受性(図6D)が縮減されたということを示した。

【0476】

結論として、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素は、驚くべきことに、異なる化学療法によって誘導される疼痛モデルにおいて慢性のニューロパチー性疼痛を縮減することができる。

【0477】

実施例5

【0478】

触媒的に不活性なBoNTを用いる炎症性疼痛(UV-B熱傷ラットモデル)の処置

【0479】

材料及び方法

【0480】

ヒトにおいて、及び齧歯類モデルにおいて、紫外線(UV)B照射線は機械痛覚過敏及び温度痛覚過敏の両方をもたらす。成体の雄ウィスターラット(180~210g)にBoNT/A(100pg/kg)、BoNT/A(0)(100pg/kg)、又は基剤(GPB;n=12/群)をi.pl.注射によって投与した。24時間後に、同側の足の足底表面が紫外線B(UVB)照射に対しておよそ5minに渡って暴露され、500mJ/cm²の線量を受けた。UVBの48時間後に、かつBoNT/A、BoNT/A(0)、又は基剤注射の72時間後に、動物をフォンフライ試験において機械的感受性について試験した。UVB暴露された動物の追加の群に48時間後に正の対照インドメタシンを注射し、注射の1時間後にフォンフライ試験において試験した(n=12/群)。

【0481】

結果

【0482】

実験は、触媒的に不活性なBoNT(BoNT/A(0))を投与することによって、機械的感受性が縮減されたということを示した(図7B)。結論として、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素は、驚くべきことに、炎症性疼痛(例えば急性の炎症性疼痛)を縮減することができ、それによって、かかる神経毒素が疼痛の処置のための汎用的な適用を有するということを確認している。

10

20

30

40

50

【0483】

触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素が炎症性疼痛を縮減したという驚くべき知見は、それが、基礎となっている炎症性の状態を処置すること(例えば、炎症性の状態の少なくとも1つの症状、すなわち関連する疼痛を処置することを包含する)において有用性を見出すということを示した。それゆえに、触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素は炎症性の状態を処置するために用いられ得るということは信頼性があると考えられた。

【0484】

実施例6

【0485】

触媒的に不活性なキメラBoNTを用いる炎症性疼痛(CFAによって誘導される炎症性疼痛モデル)の処置

【0486】

材料及び方法

【0487】

BoNT又は基剤投薬に先立って、70匹の成体の雄C57/BL6マウス(22~26g)の足引っ込み閾値(PWT、g)を、増大して行く力の段階的なフォンフライフィラメントを用いて3日連続で評価した。最後の2日の平均をベースラインと考えた。第0日に、ガス麻酔下において、BoNT/XB(0.3及び30ng/kg)、BoNT/XB(0)(0.3及び30ng/kg)、BoNT/A(160pg/kg)、又は基剤(840µl/kg)を左後肢足の足蹠の足底内に注射した(n=10/群)。第2日に、CFA注射に先立って、PWTを再評価した。それから、イソフルラン麻酔下において、固定された20µL体積のCFA(1.5mg/mL)を同じ後肢足に注射した。第3日(CFA後の第1日)に、PWT評価に1時間先立って、インドメタシン群に割り付けられた動物にインドメタシンを経口投薬した(10mg/kg、n=9)。

【0488】

結果

【0489】

実験は、触媒的に不活性なBoNT/XのL鎖及び転位置ドメイン(BoNT/XのLH_N)とBoNT/B受容体結合ドメインBoNT/X(H_Cドメイン)とを含む触媒的に不活性なキメラBoNT(BoNT/XB(0))が、炎症性疼痛を処置することにおいて有効であったということを示した。より詳細には、図8は、炎症性疼痛のCFA誘導後の機械的感受性が、触媒的に活性なBoNT/XB及び触媒的に不活性なBoNT/XB(0)を30ng/kgの用量で投与されたマウスにおいて縮減されたということを示す。感受性の縮減はBoNT/A又は正の対照インドメタシンのものと同等であった。

【0490】

BoNT/XB(0)が炎症性疼痛を縮減したという驚くべき知見は、それが、基礎となっている炎症性の状態を処置すること(例えば、炎症性の状態の少なくとも1つの症状、すなわち関連する疼痛を処置することを包含する)において有用性を見出すということを示した。それゆえに、それは、炎症性の状態の処置に使用するための触媒的に不活性なクロストリジウム神経毒素の信頼性の更なる証拠と考えられた。

【0491】

実施例7

【0492】

触媒的に不活性なキメラBoNTを用いるアトピー性皮膚炎の処置

【0493】

基剤又はBoNT/XB(0)(40pg/マウス、100pg/マウス、又は400pg/マウス)が、カルシポトリオールに対する暴露に1日先立って成体のC57/BL6マウスの背中の中央部に皮下投与される。それから、マウスが5日連続でカルシポトリオールによって処置される。研究の終わりに、動物は安楽死させられ、背中の皮膚が組織学的分析のために収集、固定、及び処置される。ヘマトキシリン・エオジン染色後に、表皮厚さが評価される。CD45+細胞を証明するための免疫標識が行なわれる。

10

20

30

40

50

【0494】

実験は、触媒的に不活性なBoNT/XのL鎖及び転位置ドメイン(BoNT/XのLH_N)とBoNT/B受容体結合ドメインBoNT/X(H_Cドメイン)とを含む触媒的に不活性なキメラBoNT(BoNT/XB(0))が、モデルの炎症性の状態のアトピー性皮膚炎を処置することにおいて有効であるということを示す。結果は、BoNT/XB(0)の投与後の真皮厚さの改善を示す。真皮厚さは、カルシボトリオールに対する炎症性の応答の線維化の指標であり、BoNT/XB(0)処置された動物では統計的に有意に縮減されることが示される。その上、BoNT/XB(0)の抗炎症性の効果は、BoNT/XB(0)処置された動物におけるCD45陽性細胞数の縮減によって確認される(CD45は炎症性の細胞において活性化シグナルを伝達する)。

【0495】

それゆえに、BoNT/XB(0)は抗炎症性の特性を有し、それゆえに炎症性障害を処置することにおいて有用性を見出すということが結論される。

【0496】

上の明細書において言及された全ての出版物は参照によって本明細書に組み込まれる。本発明の記載された方法及び系の種々の改変及び変形は、本発明の範囲及び趣旨から外れることなしに当業者には明らかであろう。本発明は特定の好ましい実施形態に関連して記載されたが、請求される通りの本発明はかかる特定の実施形態に不当に限定されるべきではないということは理解されるべきである。実に、生化学及びバイオテクノロジー又は関係する分野の当業者には自明である本発明を実施するための記載されたモードの種々の改変は、以下の請求項の範囲内であることを意図される。

【符号の説明】

【0497】

[図1]

Cleavage: 切断

[図2]

cleavage: 切断

[図4A]

Surgery: 手術

Administration: 投与

[図4B]

Paw withdrawal threshold: 足引っ込め閾値

Ipsilateral paw: 同側の足

Time: 時間

days: 日

Day 0: 第0日

Dosing day: 投薬日

2 weeks post surgery: 手術の2週間後

Vehicle: 基剤

Gabapentin: ガバペンチン

[図4C]

Contralateral paw: 反対側の足

[図4D]

Body weight change: 体重の変化

% vs wk2: wk2に対する%

Day3: 第3日

Day5: 第5日

Day9: 第9日

Days after injection: 注射後の日数

[図5A]

injection: 注射

Administration: 投与

[図5B]

潜時: 待ち時間

Time after treatment (day): 処置後の時間(日)

Pre induction: 誘導前

Baseline: ベースライン

glucose: グルコース

Vehicle: 基剤

Oxaliplatin: オキサリプラチン

Duloxetine: デュロキセチン

Ipsilateral paw: 同側の足

[図5C]

Contralateral paw: 反対側の足

[図6]

injection: 注射

Administration: 投与

[図6B]

Withdrawal threshold: 引っ込め閾値

Day -2: 第-2日

Day 0: 第0日

Day 3: 第3日

Day 6: 第6日

Day 9: 第9日

Baseline: ベースライン

Days after neurotoxin injection: 神経毒素注射後の日数

Vehicle: 基剤

Pregabalin: プレガバリン

Ipsilateral paw: 同側の足

[図6C]

Contralateral paw: 反対側の足

[図6D]

Latency to paw withdrawal: 足引っ込めまでの潜時

[図7A]

Administration: 投与

post-UVB: UVB後

[図7B]

Paw withdrawal threshold: 足引っ込め閾値

Baseline: ベースライン

time post-UVB: UVB後の時間

Day 3: 第3日

after neurotoxin injection: 神経毒素注射後

Vehicle: 基剤

Indomethacin: インドメタシン

[図8]

Paw withdrawal threshold: 足引っ込め閾値

Baseline: ベースライン

Day 0: 第0日

Day 2: 第2日

Day 1: 第1日

Day 3: 第3日

10

20

30

40

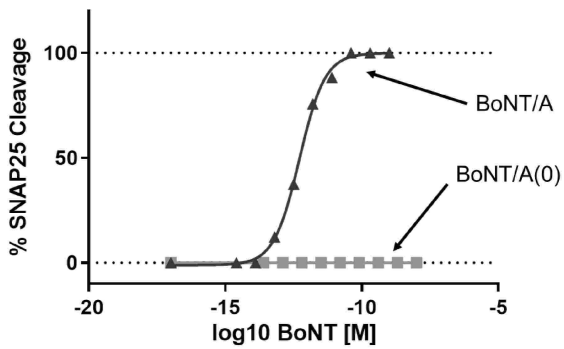
50

Diluent: 希釈剤
Indomethacin: インドメタシン
or Vehicle Injection: 又は基剤注射
injection: 注射

【図面】

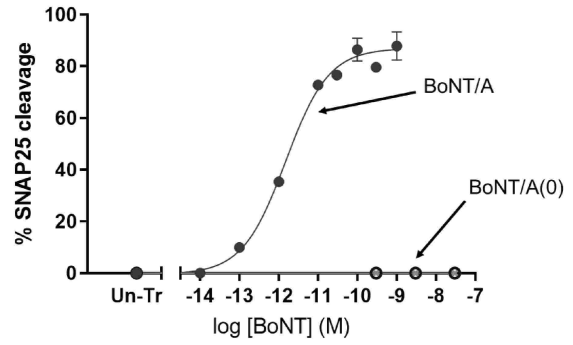
【図 1】

FIGURE 1



【図 2】

FIGURE 2



【図 3 A B】

FIGURE 3

A



B

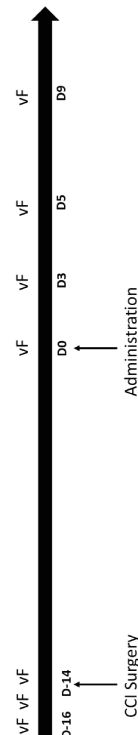


DAS 0 DAS 1 DAS 2 DAS 3 DAS 4

【図 4 A】

FIGURE 4

A



10

20

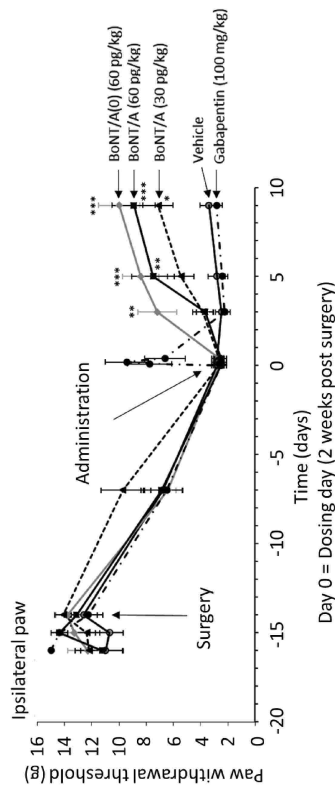
30

40

50

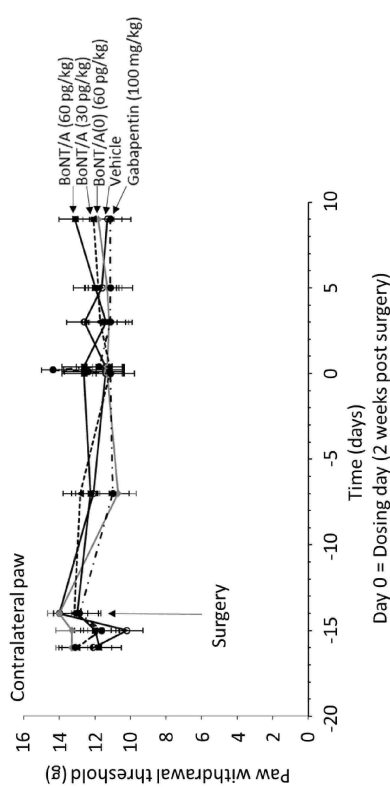
【図 4 B】

FIGURE 4 CONTINUED
B



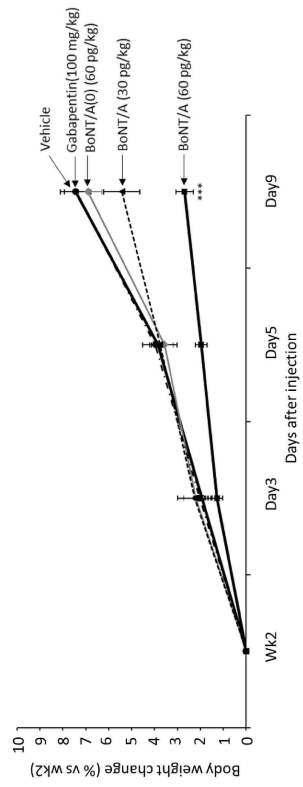
【図 4 C】

FIGURE 4 CONTINUED
C



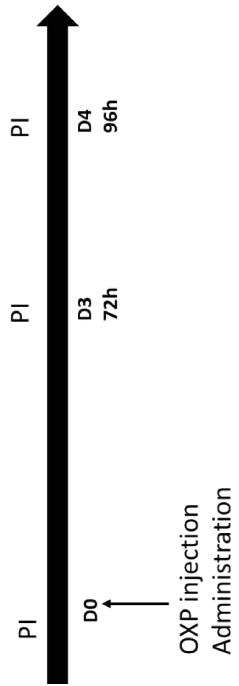
【図 4 D】

FIGURE 4 CONTINUED
D



【図 5 A】

FIGURE 5
A



10

20

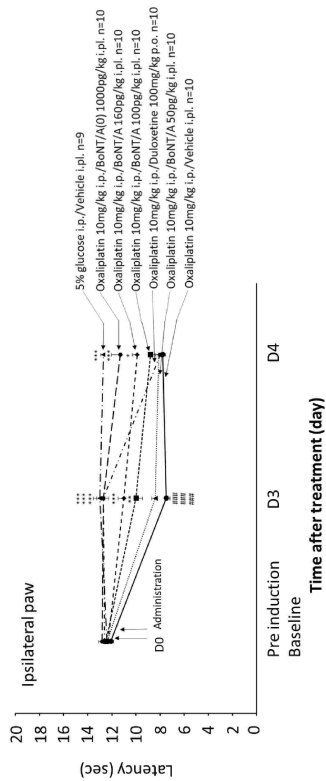
30

40

50

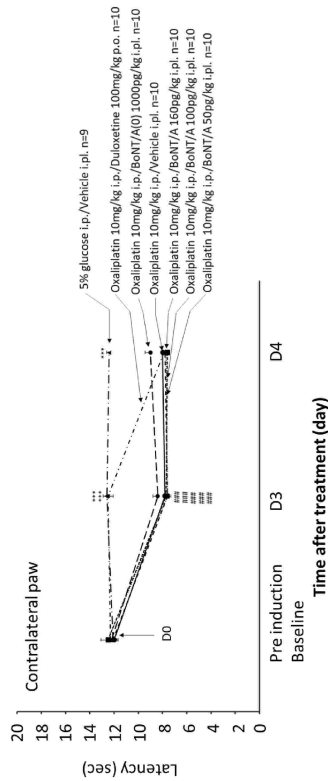
【図 5 B】

FIGURE 5 CONTINUED
B



【図 5 C】

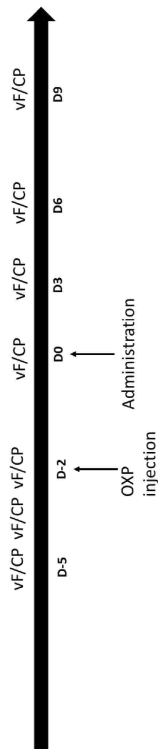
FIGURE 5 CONTINUED
C



【図 6 A】

FIGURE 6

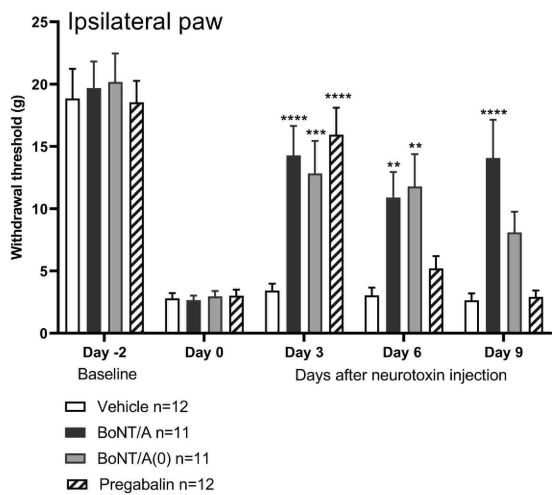
A



【図 6 B】

FIGURE 6 CONTINUED

B



10

20

30

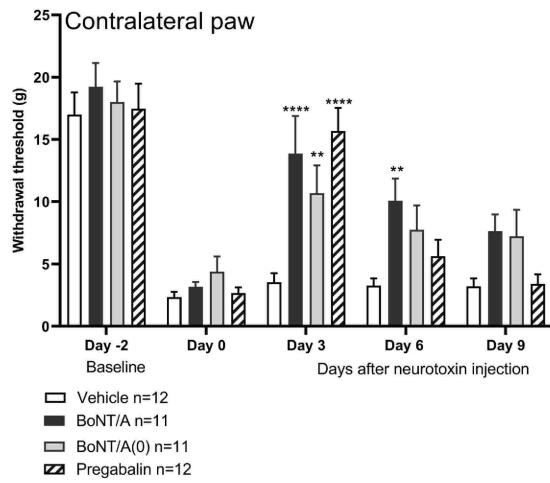
40

50

【 6 C 】

FIGURE 6 CONTINUED

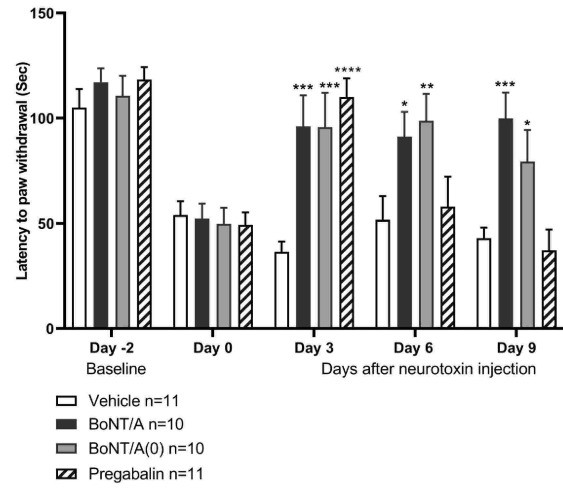
C



【 6 D 】

FIGURE 6 CONTINUED

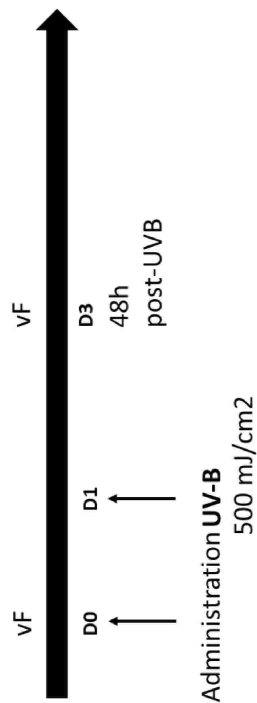
D



【 7 A 】

FIGURE 7

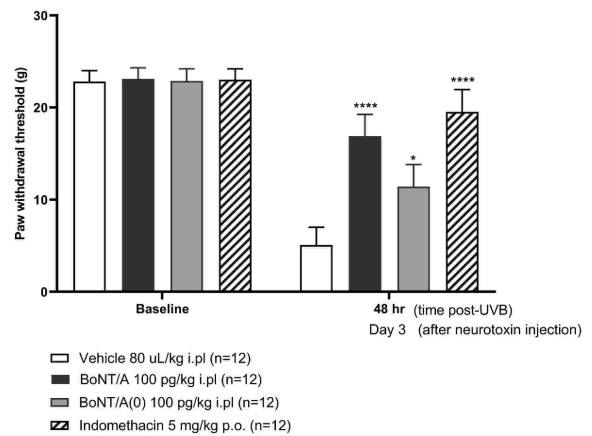
A



【 7 B 】

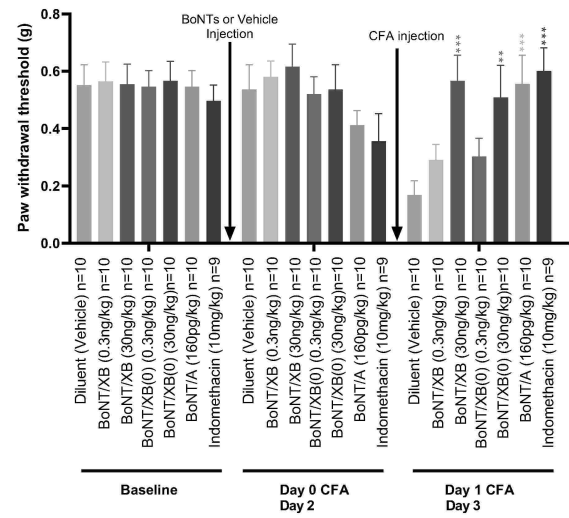
FIGURE 7 CONTINUED

B



【図 8】

FIGURE 8



10

【配列表】

0007659653000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	25/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
C 0 7 K	14/33	(2006.01)	A 6 1 P	25/02	
			C 0 7 K	14/33	

- (72)発明者 ペリエ, サンディ
イギリス, エルエル13 9ユーエフ レクサム, レクサム インダストリアル エステート, ユニ
ット 9 アッシュ ロード, イプセン バイオフィーム リミテッド内
- (72)発明者 ファーブル, クリスティーナ
イギリス, エルエル13 9ユーエフ レクサム, レクサム インダストリアル エステート, ユニ
ット 9 アッシュ ロード, イプセン バイオフィーム リミテッド内
- (72)発明者 コルネット, シルビー
イギリス, エルエル13 9ユーエフ レクサム, レクサム インダストリアル エステート, ユニ
ット 9 アッシュ ロード, イプセン バイオフィーム リミテッド内
- (72)発明者 クルップ, ヨハネス
イギリス, エルエル13 9ユーエフ レクサム, レクサム インダストリアル エステート, ユニ
ット 9 アッシュ ロード, イプセン バイオフィーム リミテッド内
- (72)発明者 エリオット, マーク
イギリス, エルエル13 9ユーエフ レクサム, レクサム インダストリアル エステート, ユニ
ット 9 アッシュ ロード, イプセン バイオフィーム リミテッド内

審査官 池上 文緒

- (56)参考文献 国際公開第2020/219358 (WO, A2)
特表2007-511609 (JP, A)
J. Biol. Chem., 2011年, vol.286, no.8, p.6375-6385
FEBS J., 2011年, vol.278, issue 23, p.4454-4466
Toxins, 2019年, vol.11, issue 8, 459, p.1-24

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 8 / 1 6
A 6 1 P 2 5 / 0 4
A 6 1 P 2 5 / 0 6
A 6 1 P 2 9 / 0 0
C 0 7 K 1 4 / 3 3
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
U n i P r o t / G e n e S e q