

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-508886

(P2008-508886A)

(43) 公表日 平成20年3月27日(2008.3.27)

(51) Int.Cl.

**C 12 N 15/09** (2006.01)  
**C 12 N 1/19** (2006.01)  
**C 12 N 1/21** (2006.01)  
**C 12 N 5/10** (2006.01)

F 1

C 12 N 15/00 Z N A A  
C 12 N 1/19  
C 12 N 1/21  
C 12 N 5/00

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4  
4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 116 頁)

(21) 出願番号 特願2007-525034 (P2007-525034)  
(86) (22) 出願日 平成17年8月3日 (2005.8.3)  
(85) 翻訳文提出日 平成19年3月30日 (2007.3.30)  
(86) 國際出願番号 PCT/US2005/027917  
(87) 國際公開番号 WO2006/017749  
(87) 國際公開日 平成18年2月16日 (2006.2.16)  
(31) 優先権主張番号 60/599,121  
(32) 優先日 平成16年8月4日 (2004.8.4)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

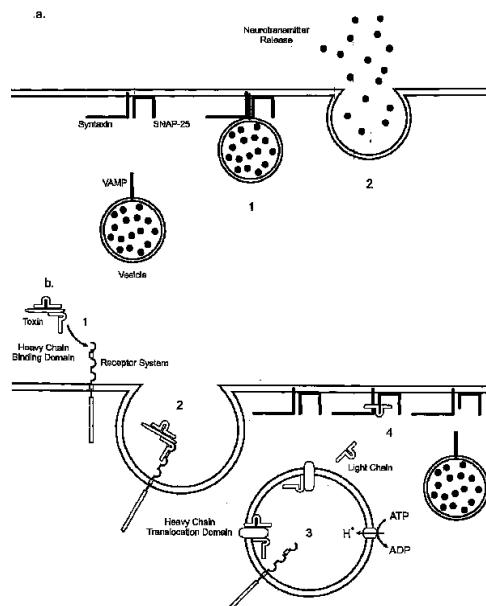
(71) 出願人 591018268  
アーラーガン、インコーポレイテッド  
A L L E R G A N, I N C O R P O R A T  
E D  
アメリカ合衆国92612カリフォルニア  
州アーヴィン、デュポン・ドライブ252  
5番  
(74) 代理人 100081422  
弁理士 田中 光雄  
(74) 代理人 100084146  
弁理士 山崎 宏  
(74) 代理人 100106518  
弁理士 松谷 道子  
(74) 代理人 100127638  
弁理士 志賀 美苗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】活性ボツリヌス毒素A型の発現の最適化

## (57) 【要約】

コードされている活性BoNT/Aの異種細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子、そのような核酸分子を含む発現コンストラクトおよび細胞、ならびにコードされている活性BoNT/Aをそのような核酸分子、発現コンストラクトおよび細胞から発現させるのに有用な方法。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子であって、改変オープンリーディングフレームが、同じ活性BoNT/Aをコードする無改変オープンリーディングフレームと比較して、原核細胞が好む同義コドンの数を増加させるヌクレオチド変化を含み、そして

改変オープンリーディングフレームが、コードされている活性BoNT/Aの原核細胞における発現を増加させる、核酸分子。

**【請求項 2】**

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも100個の同義コドンを変化させるヌクレオチド変化を含む、請求項1の分子。

**【請求項 3】**

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも300個の同義コドンを変化させるヌクレオチド変化を含む、請求項1の分子。

**【請求項 4】**

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも500個の同義コドンを変化させるヌクレオチド変化を含む、請求項1の分子。

**【請求項 5】**

活性BoNT/Aが配列番号1、配列番号111または配列番号113を含む、請求項1の分子。

**【請求項 6】**

原核細胞がバクテロイデス・フラギリス (Bacteroides fragilis) 株、バチルス・リケニホルミス (Bacillus licheniformis) 株、枯草菌 (Bacillus subtilis) 株、カウロバクター・クレセンタス (Caulobacter crescentus) 株、クロストリジウム・ディフィシレ (Clostridia difficile) 株、ウェルシュ菌 (Clostridia perfringens) 株、大腸菌 (Escherichia coli) 株、ラクトコッカス・ラクティス (Lactococcus lactis) 株、メチロバクテリウム・エキストルクエンス (Methylobacterium extorquens) 株、シュードモナス・フルオレッセンス (Pseudomonas fluorescens) 株、ナイセリア・メニンギルルス (Neisseria meningitidis) 株またはネズミチフス菌 (Salmonella typhimurium) 株を含む、請求項1の分子。

**【請求項 7】**

原核細胞が大腸菌の株である、請求項1の分子。

**【請求項 8】**

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも2倍は高い、請求項1の分子。

**【請求項 9】**

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも5倍は高い、請求項1の分子。

**【請求項 10】**

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも10倍は高い、請求項1の分子。

**【請求項 11】**

活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子であって、改変オープンリーディングフレームが、同じ活性BoNT/Aをコードする無改変オープンリーディングフレームと比較して、総G+C含量を原核細胞が好むレベルまで増加させるヌクレオチド変化を含み、そして

改変オープンリーディングフレームが、コードされている活性BoNT/Aの原核細胞における

10

20

30

40

50

る発現を、他の点では同一である核酸分子中の無改变オーブンリーディングフレームからの原核細胞における同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、増加させる、核酸分子。

【請求項 1 2】

改变オーブンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも30%まで増加させる又クレオチド変化を含む、請求項11の分子。

【請求項 1 3】

改变オーブンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも40%まで増加させる又クレオチド変化を含む、請求項11の分子。

【請求項 1 4】

改变オーブンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも50%まで増加させる又クレオチド変化を含む、請求項11の分子。

【請求項 1 5】

活性BoNT/Aが配列番号1、配列番号111または配列番号113を含む、請求項11の分子。

【請求項 1 6】

原核細胞がバクテロイデス・フラギリス株、バチルス・リケニホルミス株、枯草菌株、カウロバクター・クレセンタス株、クロストリジウム・ディフィシレ株、ウェルシュ菌株、大腸菌株、ラクトコッカス・ラクティス株、メチロバクテリウム・エキストルクエンス株、シュードモナス・フルオレッセンス株、ナイセリア・メニンギルルス株またはネズミチフス菌株を含む、請求項11の分子。

10

【請求項 1 7】

原核細胞が大腸菌の株である、請求項11の分子。

【請求項 1 8】

改变オーブンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改变オーブンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも2倍は高い、請求項11の分子。

【請求項 1 9】

改变オーブンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改变オーブンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも5倍は高い、請求項11の分子。

30

【請求項 2 0】

改变オーブンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改变オーブンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも10倍は高い、請求項11の分子。

【請求項 2 1】

配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号110、配列番号112、配列番号122、配列番号123、配列番号124または配列番号125を含む改变オーブンリーディングフレームを含む核酸分子。

40

【請求項 2 2】

改变オーブンリーディングフレームが配列番号3を含む、請求項21の分子。

【請求項 2 3】

改变オーブンリーディングフレームが配列番号110を含む、請求項21の分子。

【請求項 2 4】

改变オーブンリーディングフレームが配列番号112を含む、請求項21の分子。

【請求項 2 5】

発現コンストラクトを含む、請求項21の分子。

50

**【請求項 26】**

発現コンストラクトを含む原核細胞であって、発現コンストラクトが  
i) 活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレーム、および  
ii) 発現ベクター

を含み、

改変オープンリーディングフレームが、同じ活性BoNT/Aをコードする無改変オープンリーディングフレームと比較して、原核細胞が好む同義コドンの数を増加させるヌクレオチド変化を含み、そして

改変オープンリーディングフレームが、コードされている活性BoNT/Aの原核細胞における発現を増加させる、

原核細胞。

**【請求項 27】**

原核細胞がバクテロイデス・フラギリス株、バチルス・リケニホルミス株、枯草菌株、カウロバクター・クレセンタス株、クロストリジウム・ディフィシレ株、ウェルシュ菌株、大腸菌株、ラクトコッカス・ラクティス株、メチロバクテリウム・エキストルクエンス株、シュードモナス・フルオレッセンス株、ナイセリア・メニンギルルス株またはネズミチフス菌株を含む、請求項26の細胞。

**【請求項 28】**

原核細胞が大腸菌の株である、請求項26の細胞。

**【請求項 29】**

発現コンストラクトが原核細胞に一過性に含有される、請求項26の細胞。

**【請求項 30】**

発現コンストラクトが原核細胞に安定に含有される、請求項26の細胞。

**【請求項 31】**

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも100個の同義コドンを変化させるヌクレオチド変化を含む、請求項26の細胞。

**【請求項 32】**

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも300個の同義コドンを変化させるヌクレオチド変化を含む、請求項26の細胞。

**【請求項 33】**

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも500個の同義コドンを変化させるヌクレオチド変化を含む、請求項26の細胞。

**【請求項 34】**

活性BoNT/Aが配列番号1、配列番号111または配列番号113を含む、請求項26の細胞。

**【請求項 35】**

発現ベクターが原核発現ベクターである、請求項26の細胞。

**【請求項 36】**

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも2倍は高い、請求項26の細胞。

**【請求項 37】**

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも5倍は高い、請求項26の細胞。

**【請求項 38】**

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも10倍は高い、請求項26の細胞。

**【請求項 39】**

発現コンストラクトを含有する原核細胞であって、発現コンストラクトが

10

20

30

40

50

i) 活性BoNT/Aをコードする改変オーブンリーディングフレーム、および  
ii) 発現ベクター

を含み、

改変オーブンリーディングフレームが、同じ活性BoNT/Aをコードする無改変オーブンリーディングフレームと比較して、総G+C含量を原核細胞が好むレベルまで増加させるヌクレオチド変化を含み、そして

改変オーブンリーディングフレームが、コードされている活性BoNT/Aの原核細胞における発現を増加させる、  
原核細胞。

【請求項 4 0】

原核細胞がバクテロイデス・フラギリス株、バチルス・リケニホルミス株、枯草菌株、カウロバクター・クレセンタス株、クロストリジウム・ディフィシレ株、ウェルシュ菌株、大腸菌株、ラクトコッカス・ラクティス株、メチロバクテリウム・エキストルクエンス株、シュードモナス・フルオレッセンス株、ナイセリア・メニンギルルス株またはネズミチフス菌株を含む、請求項39の細胞。

【請求項 4 1】

原核細胞が大腸菌の株である、請求項39の細胞。

【請求項 4 2】

発現コンストラクトが原核細胞に一過性に含有される、請求項39の細胞。

【請求項 4 3】

発現コンストラクトが原核細胞に安定に含有される、請求項39の細胞。

【請求項 4 4】

改変オーブンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも30%まで増加させるヌクレオチド変化を含む、請求項39の細胞。

【請求項 4 5】

改変オーブンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも40%まで増加させるヌクレオチド変化を含む、請求項39の細胞。

【請求項 4 6】

改変オーブンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも50%まで増加させるヌクレオチド変化を含む、請求項39の細胞。

【請求項 4 7】

活性BoNT/Aが配列番号1、配列番号111または配列番号113を含む、請求項39の細胞。

【請求項 4 8】

発現ベクターが原核発現ベクターである、請求項39の細胞。

【請求項 4 9】

改変オーブンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オーブンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも2倍は高い、請求項39の細胞。

【請求項 5 0】

改変オーブンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オーブンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも5倍は高い、請求項39の細胞。

【請求項 5 1】

改変オーブンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オーブンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも10倍は高い、請求項39の細胞。

【請求項 5 2】

活性BoNT/Aをコードする改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子であって、改変オーブンリーディングフレームが、同じ活性BoNT/Aをコードする無改変オーブンリーディングフレームと比較して、酵母細胞が好む同義コドンの数を増加させるヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド変化を含み、そして

改変オープンリーディングフレームが、コードされている活性BoNT/Aの酵母細胞における発現を増加させる、  
核酸分子。

【請求項 5 3】

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも100個の同義コドンを変化させる又  
クレオチド変化を含む、請求項52の分子。

【請求項 5 4】

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも300個の同義コドンを変化させる又  
クレオチド変化を含む、請求項52の分子。 10

【請求項 5 5】

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも500個の同義コドンを変化させる又  
クレオチド変化を含む、請求項52の分子。

【請求項 5 6】

活性BoNT/Aが配列番号1、配列番号111または配列番号113を含む、請求項52の分子。

【請求項 5 7】

酵母細胞がピキア・パストリス (Pichia pastoris) 株、ピキア・メタノリカ (Pichia methanolica) 株、ピキア・アングスタ (Pichia angusta) 株、シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) 株、サッカロミセス・セレビシェ (Saccharomyces cerevisiae) 株またはヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) 株を含む、請求項52の分子。 20

【請求項 5 8】

酵母細胞がピキア・パストリスの株である、請求項52の分子。

【請求項 5 9】

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも2倍は高い、請求項52の分子。

【請求項 6 0】

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも5倍は高い、請求項52の分子。 30

【請求項 6 1】

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも10倍は高い、請求項52の分子。

【請求項 6 2】

活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子であって、改変オープンリーディングフレームが、同じ活性BoNT/Aをコードする無改変オープンリーディングフレームと比較して、総G+C含量を酵母細胞が好むレベルまで増加させる又クレオチド変化を含み、そして

改変オープンリーディングフレームが、コードされている活性BoNT/Aの酵母細胞における発現を増加させる、  
核酸分子。 40

【請求項 6 3】

改変オープンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも30%まで増加させる又  
クレオチド変化を含む、請求項62の分子。

【請求項 6 4】

改変オープンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも40%まで増加させる又  
クレオチド変化を含む、請求項62の分子。

【請求項 6 5】

10

20

30

40

50

改变オープンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも50%まで増加させる又クレオチド変化を含む、請求項62の分子。

【請求項 6 6】

活性BoNT/Aが配列番号1、配列番号111または配列番号113を含む、請求項62の分子。

【請求項 6 7】

酵母細胞がピキア・パストリス株、ピキア・メタノリカ株、ピキア・アングスタ株、シゾサッカロミセス・ポンベ株、サッカロミセス・セレビシェ株またはヤロウイア・リポリティカ株を含む、請求項62の分子。

【請求項 6 8】

酵母細胞がピキア・パストリスの株である、請求項62の分子。

10

【請求項 6 9】

改变オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改变オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも2倍は高い、請求項62の分子。

【請求項 7 0】

改变オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改变オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも5倍は高い、請求項62の分子。

【請求項 7 1】

改变オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改变オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも10倍は高い、請求項62の分子。

20

【請求項 7 2】

配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37 配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44または配列番号45を含む改变オープンリーディングフレームを含む核酸分子。

【請求項 7 3】

改变オープンリーディングフレームが配列番号34を含む、請求項72の分子。

【請求項 7 4】

改变オープンリーディングフレームが配列番号36を含む、請求項72の分子。

30

【請求項 7 5】

発現コンストラクトを含む、請求項72の分子。

【請求項 7 6】

発現コンストラクトを含む酵母細胞であって、発現コンストラクトが

i ) 活性BoNT/Aをコードする改变オープンリーディングフレーム、および

ii ) 発現ベクター

を含み、

改变オープンリーディングフレームが、同じ活性BoNT/Aをコードする無改变オープンリーディングフレームと比較して、酵母細胞が好む同義コドンの数を増加させる又クレオチド変化を含み、そして

40

改变オープンリーディングフレームが、コードされている活性BoNT/Aの酵母細胞における発現を増加させる、

酵母細胞。

【請求項 7 7】

酵母細胞がピキア・パストリス株、ピキア・メタノリカ株、ピキア・アングスタ株、シゾサッカロミセス・ポンベ株、サッカロミセス・セレビシェ株またはヤロウイア・リポリティカ株を含む、請求項76の細胞。

【請求項 7 8】

酵母細胞がピキア・パストリスの株である、請求項76の細胞。

【請求項 7 9】

50

発現コンストラクトが酵母細胞に一過性に含有される、請求項76の細胞。

【請求項 8 0】

発現コンストラクトが酵母細胞に安定に含有される、請求項76の細胞。

【請求項 8 1】

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも100個の同義コドンを変化させる又クレオチド変化を含む、請求項76の細胞。

【請求項 8 2】

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも300個の同義コドンを変化させる又クレオチド変化を含む、請求項76の細胞。

【請求項 8 3】

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも500個の同義コドンを変化させる又クレオチド変化を含む、請求項76の細胞。

【請求項 8 4】

活性BoNT/Aが配列番号1、配列番号111または配列番号113を含む、請求項76の細胞。

【請求項 8 5】

発現ベクターが酵母発現ベクターである、請求項76の細胞。

【請求項 8 6】

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも2倍は高い、請求項76の細胞。

【請求項 8 7】

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも5倍は高い、請求項76の細胞。

【請求項 8 8】

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも10倍は高い、請求項76の細胞。

【請求項 8 9】

発現コンストラクトを含む酵母細胞であって、発現コンストラクトが

i) 活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレーム、および

ii) 発現ベクター

を含み、

改変オープンリーディングフレームが、同じ活性BoNT/Aをコードする無改変オープンリーディングフレームと比較して、総G+C含量を酵母細胞が好むレベルまで増加させる又クレオチド変化を含み、そして

改変オープンリーディングフレームが、コードされている活性BoNT/Aの酵母細胞における発現を増加させる、

酵母細胞。

【請求項 9 0】

原核細胞がピキア・パストリス株、ピキア・メタノリカ株、ピキア・アングスタ株、シゾサッカロミセス・ポンベ株、サッカロミセス・セレビシェ株またはヤロウイア・リポリティカ株を含む、請求項89の細胞。

【請求項 9 1】

酵母細胞がピキア・パストリスの株である、請求項89の細胞。

【請求項 9 2】

発現コンストラクトが酵母細胞に一過性に含有される、請求項89の細胞。

【請求項 9 3】

発現コンストラクトが酵母細胞に安定に含有される、請求項89の細胞。

【請求項 9 4】

10

20

30

40

50

改变オーブンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも30%まで増加させる又クレオチド変化を含む、請求項89の細胞。

【請求項 9 5】

改变オーブンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも40%まで増加させる又クレオチド変化を含む、請求項89の細胞。

【請求項 9 6】

改变オーブンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも50%まで増加させる又クレオチド変化を含む、請求項89の細胞。

【請求項 9 7】

活性BoNT/Aが配列番号1、配列番号111または配列番号113を含む、請求項89の細胞。 10

【請求項 9 8】

発現ベクターが酵母発現ベクターである、請求項89の細胞。

【請求項 9 9】

改变オーブンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改变オーブンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも2倍は高い、請求項89の細胞。

【請求項 1 0 0】

改变オーブンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改变オーブンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも5倍は高い、請求項89の細胞。 20

【請求項 1 0 1】

改变オーブンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改变オーブンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも10倍は高い、請求項89の細胞。

【請求項 1 0 2】

活性BoNT/Aをコードする改变オーブンリーディングフレームを含む核酸分子であって、改变オーブンリーディングフレームが、同じ活性BoNT/Aをコードする無改变オーブンリーディングフレームと比較して、昆虫細胞が好む同義コドンの数を増加させる又クレオチド変化を含み、そして

改变オーブンリーディングフレームが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞における発現を増加させる、核酸分子。 30

【請求項 1 0 3】

改变オーブンリーディングフレームが、少なくとも100個の同義コドンを変化させる又クレオチド変化を含む、請求項102の分子。

【請求項 1 0 4】

改变オーブンリーディングフレームが、少なくとも300個の同義コドンを変化させる又クレオチド変化を含む、請求項102の分子。

【請求項 1 0 5】

改变オーブンリーディングフレームが、少なくとも500個の同義コドンを変化させる又クレオチド変化を含む、請求項102の分子。 40

【請求項 1 0 6】

活性BoNT/Aが配列番号1、配列番号111または配列番号113を含む、請求項102の分子。

【請求項 1 0 7】

昆虫細胞がヨトウガ(Spodoptera frugiperda)株、イラクサギンウワバ(Trichoplusia ni)株、キイロショウジョウバエ(Drosophila melanogaster)株またはタバコスズメガ(Manduca sexta)株を含む、請求項102の分子。

【請求項 1 0 8】

昆虫細胞がヨトウガ細胞系、イラクサギンウワバ細胞系、キイロショウジョウバエ細胞系またはタバコスズメガ細胞系を含む、請求項102の分子。 50

**【請求項 109】**

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも2倍は高い、請求項102の分子。

**【請求項 110】**

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも5倍は高い、請求項102の分子。

**【請求項 111】**

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも10倍は高い、請求項102の分子。 10

**【請求項 112】**

活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子であって、改変オープンリーディングフレームが、同じ活性BoNT/Aをコードする無改変オープンリーディングフレームと比較して、総G+C含量を昆虫細胞が好むレベルまで増加させるヌクレオチド変化を含み、そして

改変オープンリーディングフレームが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞における発現を増加させる、核酸分子。 20

**【請求項 113】**

改変オープンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも30%まで増加させるヌクレオチド変化を含む、請求項112の分子。

**【請求項 114】**

改変オープンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも40%まで増加させるヌクレオチド変化を含む、請求項112の分子。

**【請求項 115】**

改変オープンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも50%まで増加させるヌクレオチド変化を含む、請求項112の分子。

**【請求項 116】**

活性BoNT/Aが配列番号1、配列番号111または配列番号113を含む、請求項112の分子。 30

**【請求項 117】**

昆虫細胞がヨトウガ株、イラクサギンウワバ株、キイロショウジョウバエ株またはタバコスズメガ株を含む、請求項112の分子。

**【請求項 118】**

昆虫細胞がヨトウガ細胞系、イラクサギンウワバ細胞系、キイロショウジョウバエ細胞系またはタバコスズメガ細胞系を含む、請求項112の分子。

**【請求項 119】**

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも2倍は高い、請求項112の分子。 40

**【請求項 120】**

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも5倍は高い、請求項112の分子。

**【請求項 121】**

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも10倍は高い、請求項112の分子。

**【請求項 122】**

10

20

30

40

50

配列番号58、配列番号59、配列番号60 配列番号61、配列番号62または配列番号63を含む改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子。

【請求項 1 2 3】

改変オープンリーディングフレームが配列番号60を含む、請求項122の分子。

【請求項 1 2 4】

改変オープンリーディングフレームが配列番号63を含む、請求項122の分子。

【請求項 1 2 5】

発現コンストラクトを含む、請求項122の分子。

【請求項 1 2 6】

発現コンストラクトを含む昆虫細胞であって、発現コンストラクトが

10

i) 活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレーム、および

ii) 発現ベクター

を含み、

改変オープンリーディングフレームが、同じ活性BoNT/Aをコードする無改変オープンリーディングフレームと比較して、昆虫細胞が好む同義コドンの数を増加させるヌクレオチド変化を含み、そして

改変オープンリーディングフレームが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞における発現を増加させる、

昆虫細胞。

【請求項 1 2 7】

昆虫細胞がヨトウガ株、イラクサギンウワバ株、キイロショウジョウバエ株またはタバコスズメガ株を含む、請求項126の細胞。

20

【請求項 1 2 8】

昆虫細胞がヨトウガ細胞系、イラクサギンウワバ細胞系、キイロショウジョウバエ細胞系またはタバコスズメガ細胞系を含む、請求項126の細胞。

【請求項 1 2 9】

発現コンストラクトが昆虫細胞に一過性に含有される、請求項126の細胞。

【請求項 1 3 0】

発現コンストラクトが昆虫細胞に安定に含有される、請求項126の細胞。

【請求項 1 3 1】

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも100個の同義コドンを変化させるヌクレオチド変化を含む、請求項126の細胞。

30

【請求項 1 3 2】

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも300個の同義コドンを変化させるヌクレオチド変化を含む、請求項126の細胞。

【請求項 1 3 3】

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも500個の同義コドンを変化させるヌクレオチド変化を含む、請求項126の細胞。

【請求項 1 3 4】

活性BoNT/Aが配列番号1、配列番号111または配列番号113を含む、請求項126の細胞。

40

【請求項 1 3 5】

発現ベクターが昆虫発現ベクターである、請求項126の細胞。

【請求項 1 3 6】

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも2倍は高い、請求項126の細胞。

【請求項 1 3 7】

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも5倍は高い、請求項126の細胞。

50

## 【請求項 138】

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも10倍は高い、請求項126の細胞。

## 【請求項 139】

発現コンストラクトを含む昆虫細胞であって、発現コンストラクトが  
i) 活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレーム、および  
ii) 発現ベクター

を含み、

改変オープンリーディングフレームが、同じ活性BoNT/Aをコードする無改変オープンリーディングフレームと比較して、総G+C含量を昆虫細胞が好むレベルまで増加させるヌクレオチド変化を含み、そして

改変オープンリーディングフレームが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞における発現を増加させる、  
昆虫細胞。

## 【請求項 140】

昆虫細胞がヨトウガ株、イラクサギンウワバ株、キイロショウジョウバエ株またはタバコスズメガ株を含む、請求項139の細胞。

## 【請求項 141】

昆虫細胞がヨトウガ細胞系、イラクサギンウワバ細胞系、キイロショウジョウバエ細胞系またはタバコスズメガ細胞系を含む、請求項139の細胞。

## 【請求項 142】

発現コンストラクトが昆虫細胞に一過性に含有される、請求項139の細胞。

## 【請求項 143】

発現コンストラクトが昆虫細胞に安定に含有される、請求項139の細胞。

## 【請求項 144】

改変オープンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも30%まで増加させるヌクレオチド変化を含む、請求項139の細胞。

## 【請求項 145】

改変オープンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも40%まで増加させるヌクレオチド変化を含む、請求項139の細胞。

## 【請求項 146】

改変オープンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも50%まで増加させるヌクレオチド変化を含む、請求項139の細胞。

## 【請求項 147】

活性BoNT/Aが配列番号1、配列番号111または配列番号113を含む、請求項139の細胞。

## 【請求項 148】

発現ベクターが昆虫発現ベクターである、請求項139の細胞。

## 【請求項 149】

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも2倍は高い、請求項139の細胞。

## 【請求項 150】

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも5倍は高い、請求項139の細胞。

## 【請求項 151】

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも10倍は高い、請求項139の細胞。

10

20

30

40

50

**【請求項 152】**

活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子であって、改変オープンリーディングフレームが、同じ活性BoNT/Aをコードする無改変オープンリーディングフレームと比較して、哺乳動物細胞が好む同義コドンの数を増加させるヌクレオチド変化を含み、そして

改変オープンリーディングフレームが、コードされている活性BoNT/Aの哺乳動物細胞における発現を増加させる、核酸分子。

**【請求項 153】**

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも100個の同義コドンを変化させるヌクレオチド変化を含む、請求項152の分子。 10

**【請求項 154】**

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも300個の同義コドンを変化させるヌクレオチド変化を含む、請求項152の分子。

**【請求項 155】**

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも500個の同義コドンを変化させるヌクレオチド変化を含む、請求項152の分子。

**【請求項 156】**

活性BoNT/Aが配列番号1、配列番号111または配列番号113を含む、請求項152の分子。

**【請求項 157】**

哺乳動物細胞がマウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、ブタ細胞、ウシ細胞、ウマ細胞、靈長類細胞またはヒト細胞を含む、請求項152の分子。 20

**【請求項 158】**

哺乳動物細胞がマウス細胞系、ラット細胞系、ハムスター細胞系、ブタ細胞系、ウシ細胞系、ウマ細胞系、靈長類細胞系またはヒト細胞系を含む、請求項152の分子。

**【請求項 159】**

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも2倍は高い、請求項152の分子。 25

**【請求項 160】**

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも5倍は高い、請求項152の分子。 30

**【請求項 161】**

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも10倍は高い、請求項152の分子。

**【請求項 162】**

活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子であって、改変オープンリーディングフレームが、同じ活性BoNT/Aをコードする無改変オープンリーディングフレームと比較して、総G+C含量を哺乳動物細胞が好むレベルまで増加させるヌクレオチド変化を含み、そして 40

改変オープンリーディングフレームが、コードされている活性BoNT/Aの哺乳動物細胞における発現を増加させる、核酸分子。

**【請求項 163】**

改変オープンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも30%まで増加させるヌクレオチド変化を含む、請求項162の分子。

**【請求項 164】**

改変オープンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも40%まで増加させるヌ 50

クレオチド変化を含む、請求項162の分子。

【請求項 165】

改変オープンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも50%まで増加させる又クレオチド変化を含む、請求項162の分子。

【請求項 166】

活性BoNT/Aが配列番号1、配列番号111または配列番号113を含む、請求項162の分子。

【請求項 167】

哺乳動物細胞がマウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、ブタ細胞、ウシ細胞、ウマ細胞、靈長類細胞またはヒト細胞を含む、請求項162の分子。

【請求項 168】

哺乳動物細胞がマウス細胞系、ラット細胞系、ハムスター細胞系、ブタ細胞系、ウシ細胞系、ウマ細胞系、靈長類細胞系またはヒト細胞系を含む、請求項162の分子。

【請求項 169】

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも2倍は高い、請求項162の分子。

【請求項 170】

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも5倍は高い、請求項162の分子。

【請求項 171】

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも10倍は高い、請求項162の分子。

【請求項 172】

配列番号76 配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98または配列番号99を含む改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子。

【請求項 173】

改変オープンリーディングフレームが配列番号78を含む、請求項172の分子。

【請求項 174】

改変オープンリーディングフレームが配列番号99を含む、請求項172の分子。

【請求項 175】

発現コンストラクトを含む、請求項172の分子。

【請求項 176】

発現コンストラクトを含む哺乳動物細胞であって、発現コンストラクトが  
i) 活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレーム、および  
ii) 発現ベクター

を含み、

改変オープンリーディングフレームが、同じ活性BoNT/Aをコードする無改変オープンリーディングフレームと比較して、哺乳動物細胞が好む同義コドンの数を増加させる又クレオチド変化を含み、そして

改変オープンリーディングフレームが、コードされている活性BoNT/Aの哺乳動物細胞における発現を増加させる、

哺乳動物細胞。

【請求項 177】

哺乳動物細胞がマウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、ブタ細胞、ウシ細胞、ウマ細胞、靈長類細胞またはヒト細胞を含む、請求項176の細胞。

10

20

30

40

50

**【請求項 178】**

哺乳動物細胞がマウス細胞系、ラット細胞系、ハムスター細胞系、ブタ細胞系、ウシ細胞系、ウマ細胞系、靈長類細胞系またはヒト細胞系を含む、請求項176の細胞。

**【請求項 179】**

発現コンストラクトが哺乳動物に一過性に含有される、請求項176の細胞。

**【請求項 180】**

発現コンストラクトが哺乳動物細胞に安定に含有される、請求項176の細胞。

**【請求項 181】**

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも100個の同義コドンを変化させる又クレオチド変化を含む、請求項176の細胞。 10

**【請求項 182】**

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも300個の同義コドンを変化させる又クレオチド変化を含む、請求項176の細胞。

**【請求項 183】**

改変オープンリーディングフレームが、少なくとも500個の同義コドンを変化させる又クレオチド変化を含む、請求項176の細胞。

**【請求項 184】**

活性BoNT/Aが配列番号1、配列番号111または配列番号113を含む、請求項176の細胞。

**【請求項 185】**

発現ベクターが哺乳動物発現ベクターである、請求項176の細胞。 20

**【請求項 186】**

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも2倍は高い、請求項176の細胞。

**【請求項 187】**

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも5倍は高い、請求項176の細胞。

**【請求項 188】**

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも10倍は高い、請求項176の細胞。 30

**【請求項 189】**

発現コンストラクトを含む哺乳動物細胞であって、発現コンストラクトが

i) 活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレーム、および

ii) 発現ベクター

を含み、

改変オープンリーディングフレームが、同じ活性BoNT/Aをコードする無改変オープンリーディングフレームと比較して、総G+C含量を哺乳動物細胞が好むレベルまで増加させる又クレオチド変化を含み、そして

改変オープンリーディングフレームが、コードされている活性BoNT/Aの哺乳動物細胞における発現を増加させる、  
哺乳動物細胞。 40

**【請求項 190】**

哺乳動物細胞がマウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、ブタ細胞、ウシ細胞、ウマ細胞、靈長類細胞またはヒト細胞を含む、請求項189の細胞。

**【請求項 191】**

哺乳動物細胞がマウス細胞系、ラット細胞系、ハムスター細胞系、ブタ細胞系、ウシ細胞系、ウマ細胞系、靈長類細胞系またはヒト細胞系を含む、請求項189の細胞。

**【請求項 192】**

発現コンストラクトが哺乳動物細胞に一過性に含有される、請求項189の細胞。

【請求項193】

発現コンストラクトが哺乳動物細胞に安定に含有される、請求項189の細胞。

【請求項194】

改変オープンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも30%まで増加させる又クレオチド変化を含む、請求項189の細胞。

【請求項195】

改変オープンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも40%まで増加させる又クレオチド変化を含む、請求項189の細胞。

【請求項196】

改変オープンリーディングフレームが、総G+C含量を少なくとも50%まで増加させる又クレオチド変化を含む、請求項189の細胞。

【請求項197】

活性BoNT/Aが配列番号1、配列番号111または配列番号113を含む、請求項189の細胞。

【請求項198】

発現ベクターが哺乳動物発現ベクターである、請求項189の細胞。

【請求項199】

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも2倍は高い、請求項189の細胞。

【請求項200】

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも5倍は高い、請求項189の細胞。

【請求項201】

改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/Aの増加した発現が、無改変オープンリーディングフレームからの同じ活性BoNT/Aの発現レベルと比較して、少なくとも10倍は高い、請求項189の細胞。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

本願は、米国特許法第119条(e)項に基づいて、米国仮特許出願第60/599132号(2004年8月4日出願)および米国仮特許出願第60/599121号(2004年8月4日出願)への優先権を主張し、これらの仮特許出願は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0002】

本願において言及する特許および刊行物は全て、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。本願において言及するGeneBank配列表(それぞれのGenBankアクセスション番号で同定されるもの)は、National Center for Biotechnological Informationから入手することができ、いずれも参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。本願において言及するURLアドレスは全て、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0003】

クロストリジウム毒素、例えばBoNT/A、BoNT/B、BoNT/C1、BoNT/D、BoNT/E、BoNT/FおよびBoNT/Gなどのボツリヌス神経毒(BoNT)、ならびに破傷風神経毒(TeNT)が持つ、ニューロン伝達を阻害する能力は、広範囲にわたるさまざまな治療用途および美容用途に活用されている。例えばWilliam J.Lipham「Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin」(Slack, Inc., 2004)を参照されたい。一例として、BOTOX(登録商標)は現在、以下の適応症について、一ヵ国以上で承認されている:アカラシア、成人痙攣、裂肛、背痛、眼瞼痙攣、歯ぎしり、頸部ジストニア、本態性振戦、眉間のしわまたは運動過多性顔面線(hyperkinetic facial lines)、頭痛、片側顔面痙攣、膀胱の過活動、多汗症、若年性脳性麻痺、多発性硬化症、ミオクローヌス障害、鼻唇溝、痙攣性発声障害、斜

10

20

30

40

50

視および第VII神経障害。また、以下に挙げる障害の処置にも、BoNT治療が提案されている：神経筋障害〔例えばKei Roger Aokiら「Method for Treating Neuromuscular Disorders and Conditions with Botulinum Toxin Types A and B(ボツリヌス毒A型およびB型を使って神経筋障害および神経筋状態を処置する方法)」米国特許第6,872,397号(2005年3月29日)；Rhett M.Schiffman「Methods for Treating Uterine Disorders(子宮障害を処置するための方法)」米国特許出願公開第2004/0175399号(2004年9月9日)；Richard L.Barron「Methods for Treating Ulcers and Gastroesophageal Reflux Disease(潰瘍および胃食道逆流疾患を処置するための方法)」米国特許出願公開第2004/0086531号(2004年5月7日)；およびKei Roger Aokiら「Method for Treating Dystonia with Botulinum Toxin C to G(ボツリヌス毒素C～Gを使ってジストニアを処置する方法)」米国特許第6,319,505号(2001年11月20日)を参照されたい〕、眼障害〔例えばEric R.First「Methods and Compositions for Treating Eye Disorders(眼障害を処置するための方法および組成物)」米国特許出願公開第2004/0234532(2004年11月25日)；Kei Roger Aokiら「Botulinum Toxin Treatment for Blepharospasm(眼瞼痙攣のボツリヌス毒素処置)」米国特許出願公開第2004/0151740号(2004年8月5日)；およびKei Roger Aokiら「Botulinum Toxin Treatment for Strabismus(斜視のボツリヌス毒素処置)」米国特許出願公開第2004/0126396号(2004年7月1日)を参照されたい〕、疼痛〔例えばKei Roger Aokiら「Pain Treatment by Peripheral Administration of a Neurotoxin(神経毒の末梢投与による疼痛処置)」米国特許第6,869,610号(2005年3月22日)；Stephen Donovan「Clostridial Toxin Derivatives and Methods to Treat Pain(クロストリジウム毒素誘導体および疼痛を処置するための方法)」米国特許第6,641,820号(2003年11月4日)；Kei Roger Aokiら「Method for Treating Pain by Peripheral Administration of a Neurotoxin(神経毒の末梢投与によって疼痛を処置する方法)」米国特許第6,464,986号(2002年1月15日)；Kei Roger AokiおよびMinglei Cui「Methods for Treating Pain(疼痛を処置するための方法)」米国特許第6,113,915号(2000年9月5日)；Martin Voet「Botulinum Toxin Therapy for Fibromyalgia(線維筋痛症のボツリヌス毒素治療法)」米国特許出願公開第2004/0062776号(2004年4月1日)；およびKei Roger Aokiら「Botulinum Toxin Therapy for Lower Back Pain(腰痛のボツリヌス毒素治療法)」米国特許出願公開第2004/0037852号(2004年2月26日)を参照されたい〕、筋傷害〔例えばGregory F. Brooks「Methods for Treating Muscle Injuries(筋傷害を処置するための方法)」米国特許第6,423,319号(2002年7月23日)を参照されたい〕、頭痛〔例えばMartin Voet「Methods for Treating Sinus Headache(副鼻腔性頭痛を処置するための方法)」米国特許第6,838,434号(2005年1月4日)；Kei Roger Aokiら「Methods for Treating Tension Headache(緊張性頭痛を処置するための方法)」米国特許第6,776,992号(2004年8月17日)；およびKei Roger Aokiら「Method for Treating Headache(頭痛を処置するための方法)」米国特許第6,458,365号(2002年10月1日)を参照されたい〕、心血管疾患〔例えばGregory F. BrooksおよびStephen Donovan「Methods for Treating Cardiovascular Diseases with Botulinum Toxin(ボツリヌス毒素を使って心血管疾患を処置する方法)」米国特許第6,767,544号(2004年7月27日)を参照されたい〕、神経障害〔例えばStephen Donovan「Parkinson's Disease Treatment(パーキンソン病の処置)」米国特許第6,620,415号(2003年9月16日)；およびStephen Donovan「Method for Treating Parkinson's disease with a Botulinum Toxin(ボツリヌス毒素を使ってパーキンソン病を処置する方法)」米国特許第6,306,403号(2001年10月23日)を参照されたい〕、神経精神障害〔例えばStephen Donovan「Botulinum toxin therapy for neuropsychiatric disorders(神経精神障害のボツリヌス毒素治療)」米国特許出願公開第2004/0180061号(2004年9月16日)；およびSteven Donovan「Therapeutic Treatments for Neuropsychiatric Disorders(神経精神障害の治療的処置)」米国特許出願公開第2003/0211121号(2003年11月13日)を参照されたい〕、内分泌障害〔例えばStephen Donovan「Method for Treating Endocrine Disorders(内分泌障害を処置するための方法)」米国特許第6,827,931号(2004年12月7日)；Stephen Donovan「Method for Treating Thyroid Disorders with Botulinum Toxin(ボツリヌス毒素

10

20

30

40

50

を使って甲状腺障害を処置する方法)」米国特許第6740321号(2004年5月25日); Kei Roger Aokiら「Method for Treating a Cholinergic Influenced Sweat Gland(コリン作用の影響を受ける汗腺を処置するための方法)」米国特許第6,683,049号(2004年1月27日); Stephen Donovan「Neurotoxin Therapy for Diabetes(糖尿病の神経毒治療)」米国特許第6,416,765号(2002年7月9日); Stephen Donovan「Methods for Treating Diabetes(糖尿病を処置するための方法)」米国特許第6,337,075号(2002年1月8日); Stephen D onovan「Method for Treating a Pancreatic Disorder with a Neurotoxin(神経毒を使って膵臓障害を処置する方法)」米国特許第6,261,572号(2001年7月17日); Stephen Do novan「Methods for Treating Pancreatic Disorders(膵臓障害を処置するための方法)」米国特許第6,143,306号(2000年11月7日)を参照されたい]、癌[例えばStephen Dono van「Methods for Treating Bone Tumors(骨腫瘍を処置するための方法)」米国特許第6,565,870号(2003年5月20日); Stephen Donovan「Method for Treating Cancer with a Neurotoxin to Improve Patient Function(患者の身体機能を改善するために神経毒を使って癌を処置する方法)」米国特許第6,368,605号(2002年4月9日); Stephen Donovan「Method for Treating Cancer with a Neurotoxin(神経毒を使って癌を処置する方法)」米国特許第6,139,845号(2000年10月31日); ならびにMitchell F.BrinおよびStephen Do novan「Methods for treating diverse cancers(さまざまな癌を処置するための方法)」米国特許出願公開第2005/0031648号(2005年2月10日)を参照されたい]、耳障害[例えばStephen Donovan「Neurotoxin therapy for inner ear disorder(内耳障害の神経毒治療)」米国特許第6358926号(2002年3月19日); およびStephen Donovan「Method for Treating Otic Disorders(耳障害を処置するための方法)」米国特許第6265379号(2001年7月24日)を参照されたい]、ならびに他の障害[例えばStephen Donovan「Use of a Clostridial Toxin to Reduce Appetite(食欲を低下させるためのクロストリジウム毒素の使用)」米国特許出願公開第2004/40253274号(2004年12月16日); Howard I.KatzおよびAndrew M.Blumenfeld「Botulinum Toxin Dental Therapies and Procedures(ボツリヌス毒素歯科治療および歯科措置)」米国特許出願公開第2004/0115139号(2004年1月17日); Kei Roger Aokiら「Treatment of Neuromuscular Disorders and Conditions with Different Botulinum(異なるボツリヌス菌による神経筋障害および神経筋状態の処置)」米国特許出願公開第2002/0010138号(2002年1月24日); ならびにKei Roger Aokiら「Use of Botulinum Toxins for Treating Various Disorders and Conditions and Associated Pain(種々の障害および状態ならびに関連痛を処置するためのボツリヌス毒素の使用)」米国特許出願公開第2004/0013692号(2004年1月22日)を参照されたい]。また、今後、BoNT(例えばBoNT/A、BoNT/B、BoNT/C1、BoNT/D、BoNT/E、BoNT/FおよびBoNT/Gなど)の使用は、ヒトの治療的処置においても、美容的処置においても、これらの毒素の性質から利益を得ることができる広範な疾患および病気に、ますます拡大していくと予想される。

#### 【0004】

BoNT治療がより一層広範なヒトの苦悩の処置に多用されるようになれば、これらの毒素の生産効率を増加させる必要が生じる。しかし、この増加し続ける、それらBoNT処置の需要の要求を満たすことは、困難になるかもしれない。懸案の課題の一つは、異種生物を使ってBoNTを発現させる、今までに記載された方法では、工業的な量で至適レベルのBoNTを達成することができていないということである。この非効率は、将来の治療に予想されるBoNTの量が増加しつつあるという理由だけでなく、この非効率が総合的生産コストを高くするという理由からも問題である。その上、外因性プロテアーゼによるインピトロ活性化を必要とするBoNT(例えばBoNT/AおよびBoNT/G)の場合は、活性化措置に伴う毒素の損失がさらに多量の出発物質を要求することになるので、この問題はさらに深刻になる。したがって、今までに記載された方法を使って得られる低い収量は、これらBoNTの工業的生産全体にとって重大な障害であり、それゆえに大きな課題である。というのも、科学用途、治療用途および美容用途には、これらの毒素の活性型が必要とされるからである。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

10

20

30

40

50

## 【0005】

本発明は、異種生物を使った活性クロストリジウム毒素の高レベルかつ高品質な工業的生産の必要性を認識するものである。例えばBoNT/A、BoNT/B、BoNT/C、BoNT/D、BoNT/E、BoNT/FおよびBoNT/GなどのBoNT、ならびにTeNTなどといった（ただしこれらに限定されるわけではない）、科学用途、治療用途および美容用途に有用な全てのクロストリジウム毒素が想定される。クロストリジウム毒素の高レベル生産は、コードされている毒素の異種細胞における発現を増加させてタンパク質収量を向上させる改変核酸分子を使うことによって達成される。本発明の諸側面において、クロストリジウム毒素をコードする核酸分子は、1) 当該分子を発現させるために選択した異種細胞内に見いだされるネイティブ核酸分子のオープンリーディングフレーム中に典型的に存在するコドンを含有すること；2) 当該分子を発現させるために選択した異種細胞中に見いだされるネイティブ核酸分子のオープンリーディングフレームの平均G+C含量とより良く一致するG+C含量を含有すること；3) 活性クロストリジウム毒素をコードするオープンリーディングフレーム内に見いだされるポリモノスクレオチド領域を減らすこと；および/または4) 活性クロストリジウム毒素をコードするオープンリーディングフレーム内に見いだされる内部調節部位または内部構造部位を排除すること、になるように設計された改変オープンリーディングフレームを含む。具体的な異種細胞の選択には数多くの生産要素が影響を及ぼすので、本明細書に開示する核酸分子は、例えば細菌株、酵母株、植物細胞および植物由来の細胞系、昆虫細胞および昆虫由来の細胞系、ならびに哺乳動物細胞および哺乳動物由来の細胞系を含む（ただしこれらに限定されるわけではない）広範な原核細胞および真核細胞に向けられる。本発明の諸側面は、本明細書に開示する改変核酸分子を発現させるのに有用な発現コンストラクトおよび細胞組成物にも対応する。また、本発明の諸側面は、ここに開示する核酸分子を使ってクロストリジウム毒素を生産する方法も提供する。

## 【0006】

本発明の諸側面は、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子を提供する。改変オープンリーディングフレームは、同じ活性BoNT/Aをコードする無改変オープンリーディングフレームと比較して、少なくとも一つのスクレオチド変化を含む。異種細胞における改変オープンリーディングフレームからの活性BoNT/A発現の増加は、同じタイプの異種細胞で同じ活性BoNT/Aをコードする無改変オープンリーディングフレームからの発現レベルを比較することによって決定される。改変オープンリーディングフレームおよび無改変オープンリーディングフレームを除けば、それらオープンリーディングフレームを含む核酸分子は性質が類似しているか同一であると想定される。スクレオチド変化は、オープンリーディングフレーム内の同義コドンを、本明細書に開示する分子を発現させるために選択した異種細胞に見いだされる内在的コドン使用頻度と合致するように変化させることができる。さらに、スクレオチド変化は、オープンリーディングフレーム内のG+C含量を、異種細胞中に存在する内在性核酸分子に見いだされるオープンリーディングフレームの平均G+C含量とより良く一致するように変化させることもできる。スクレオチド変化は、ネイティブ核酸分子内に見いだされるポリモノスクレオチド領域または内部調節部位もしくは内部構造部位を変化させることもできる。例えば、コードされている活性BoNT/Aの原核細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む分子、コードされている活性BoNT/Aの酵母細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む分子、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む分子、コードされている活性BoNT/Aの哺乳動物細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む分子、およびコードされている活性BoNT/Aの無細胞抽出物発現系における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む分子などといった（ただしこれらに限定されるわけではない）、広範囲にわたるさまざまな改変核酸分子が想定される。

## 【0007】

本発明の別の側面は、異種細胞中でBoNT/Aを発現させるのに有用な発現ベクターに作動

10

20

30

40

40

50

可能に連結された本明細書に開示する核酸分子を含む発現コンストラクトを提供する。例えば、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む原核発現コンストラクト、コードされているBoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む酵母発現コンストラクト、コードされているBoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む昆虫発現コンストラクト、コードされているBoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む哺乳動物発現コンストラクト、およびコードされているBoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む無細胞抽出物発現系のための発現コンストラクトなどといった（ただしこれらに限定されるわけではない）、広範囲にわたるさまざまな発現ベクターが想定される。

10

## 【0008】

本発明の諸側面は、さらに、本明細書に開示する発現コンストラクトを含む異種細胞を提供する。細胞は、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む原核発現コンストラクトを含有する原核細胞、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む酵母発現コンストラクトを含有する酵母細胞、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む昆虫発現コンストラクトを含有する昆虫細胞、およびコードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む哺乳動物発現コンストラクトを含有する哺乳動物細胞など（ただしこれらに限定されるわけではない）を含むことができると想定される。

20

## 【0009】

本発明の別の側面は、活性BoNT/Aを生産する方法であって、異種細胞中で核酸分子から活性BoNT/Aを発現させる段階を含み、核酸分子が活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレームを含む方法を提供する。これらの方法の諸側面では、本明細書に開示する核酸分子、発現コンストラクトおよび細胞を使用する。無細胞発現系と、細胞に基づく発現系は、どちらも、本明細書に開示する活性BoNT/Aをこの方法で生産するために使用することができると想定される。

## 【0010】

本発明の諸側面は、一つには、異種細胞中の活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子を提供する。本明細書で使用する「オープンリーディングフレーム」という用語は「ORF」と同義であり、潜在的にタンパク質またはタンパク質の一部をコードすることができる任意のヌクレオチド配列を意味する。オープンリーディングフレームは、通常、開始コドン（標準コードでは、例えば、RNA分子の場合はAUG、DNA分子においてはATGとして表される）で始まり、フレームが停止コドン（標準コードでは、例えば、RNA分子の場合はUAA、UGAまたはUAG、DNA分子においてはTAA、TGAまたはTAGとして表される）で終わるまで、コドントリプレットとして読み取られる。本明細書において「コドン」という用語は、タンパク質合成時に特定のアミノ酸を指定する核酸分子中の3ヌクレオチドの配列を意味し、トリプレットまたはコドントリプレットとも呼ばれる。例えば、標準遺伝コードの考え方の64コドンのうち、2つのコドンGAAおよびGAGはアミノ酸グルタミンをコードするのに対して、コドンAAAおよびAAGはアミノ酸リジンを指定する。標準遺伝コードでは、3つのコドンが、アミノ酸を指定しない停止コドンである。本明細書で使用する「同義コドン」という用語は、単一のアミノ酸をコードする全てのコドンを意味する。メチオニン（Met）およびトリプトファン（Trp）を除くアミノ酸は、2~6個の同義コドンによってコードされる（例えば表1を参照されたい）。例えば、標準遺伝コードの場合、アミノ酸アラニンをコードする四つの同義コドンはGCA、GCC、GCGおよびGCUであり、グルタミンを指定する二つの同義コドンはGAAおよびGAGであり、リジンをコードする二つの同義コドンはAAAおよびAAGである（限定でない他の例については表1を参照されたい）。

30

## 【0011】

したがって、ある態様では、ネイティブのボツリヌス菌（Clostridium botulinum）コド

40

50

ンのヌクレオチド配列を、本明細書に開示する核酸分子を発現させるために選択した異種細胞によって用いられる同義コドンとより良く一致するようによることによって、活性BoNT/Aをコードする改変オーブンリーディングフレームを変化させる。BoNT/Aを発現させるボツリヌス菌 (*C. botulinum*) 株は、他の同義コドンと比較して、ある一つの同義コドンに、特異的な選好または偏倚を示し、このボツリヌス菌株特異的なコドン使用頻度と、対応するイソアクセプター tRNAとの間には、直接的な相関関係がある。既知オーブンリーディングフレームまたは予想オーブンリーディングフレーム中に、生物特異的、細胞特異的、または機能クラス特異的な形で、同義コドンが不均等に存在するのは、コドン偏倚またはコドン選好と呼ばれる現象である。したがって、異種細胞は他の同義コドンと比較してある同義コドンへの偏倚を持つ、または異種細胞はある同義コドンを他の同義コドンよりも好むと言うことができる。また、最も豊富なイソアクセプター tRNAと一致する同義コドンは生物間で異なることが多く、場合によっては、同じ生物の異なる組織タイプを構成する細胞間、または同じ生物のタンパク質機能クラス間（例えば細菌の指数増殖期に発現されるタンパク質と細菌の定常増殖期に発現されるタンパク質との対比）でも異なる。コドン偏倚の相違がオーブンリーディングフレームの全長にわたって存在することもある。例えばオーブンリーディングフレームの5'側の三分の一にあるコドンは、同じオーブンリーディングフレームの3'側の残り三分の二と比較して、異なるコドンを使用しうる。例えば上述のように、GCA、GCC、GCGおよびGCUは、アラニン (Ala) をコードする四つの同義コドンである。ボツリヌス菌中で最も豊富なAlaイソアクセプターはGCAコドンを認識するが、細菌・大腸菌 (*Escherichia coli*) はGCGを認識し、酵母ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) はGCTを認識し、ほとんどの多細胞真核生物はGCCを認識するようである（例えば表1を参照されたい）。したがって、BoNT/Aを発現させるボツリヌス菌で通常使用される一定のコドンは、BoNT/Aの工業的発現でよく使用される異種細胞中には、まれにしか存在しないかもしれない。これらの異種生物は、対応するイソアクセプター tRNAを、高レベルなBoNT/A発現を支えるのに十分な濃度では産生しないので、最適なタンパク質収量が達成されない。したがって、異種細胞が好む同義コドンの数を増加させるヌクレオチド変化を含む改変オーブンリーディングフレームは、コードされている活性BoNT/Aの発現を、同じ活性BoNT/Aをコードする無改変オーブンリーディングフレームと比較して増加させるだろう。オーブンリーディングフレームの同義コドンは、コドンの第3位にあるヌクレオチドを異なるヌクレオチドで置換することにより、そのコドンがコードするアミノ酸の同一性を保ったまま変化させることができる。限定でない一例として、トリペプチド・NH<sub>2</sub>-リジン-チロシン-ロイシン-COOHをコードする5'-AAATACCTA-3' オーブンリーディングフレームは、5'-AAGTATCTG-3' に変化させてもなお、トリペプチド・NH<sub>2</sub>-リジン-チロシン-ロイシン-COOHをコードすることができる。

### 【0012】

したがってこの態様の一側面では、少なくとも一つのヌクレオチド変化を核酸分子に加えて、オーブンリーディングフレーム中のコドンを同義コドンで置換することにより、コードされている活性BoNT/Aの異種細胞における発現を増加させる。この態様のもう一つの側面では、複数のヌクレオチド変化を核酸分子に加えて、オーブンリーディングフレーム中の複数のコドンを複数の同義コドンで置換することにより、コードされている活性BoNT/Aの異種細胞における発現を増加させる。したがってこの態様の諸側面は、例えば少なくとも10個の同義コドン、少なくとも25個の同義コドン、少なくとも50個の同義コドン、少なくとも75個の同義コドン、少なくとも100個の同義コドン、少なくとも200個の同義コドン、少なくとも300個の同義コドン、少なくとも400個の同義コドン、少なくとも500個の同義コドン、少なくとも600個の同義コドン、少なくとも700個の同義コドン、少なくとも800個の同義コドン、少なくとも900個の同義コドン、少なくとも1000個の同義コドン、少なくとも1100個の同義コドンまたは少なくとも1200個の同義コドンを変えるヌクレオチド変化を含む改変オーブンリーディングフレームを包含することができる。この態様の別の側面では、改変オーブンリーディングフレームが、例えば多くとも10個の同義コドン、多くとも25個の同義コドン、多くとも50個の同義コドン、多くとも75個の同義コドン、多く

10

20

30

40

50

とも100個の同義コドン、多くとも200個の同義コドン、多くとも300個の同義コドン、多くとも400個の同義コドン、多くとも500個の同義コドン、多くとも600個の同義コドン、多くとも700個の同義コドン、多くとも800個の同義コドン、多くとも900個の同義コドン、多くとも1000個の同義コドン、多くとも1100個の同義コドンまたは多くとも1200個の同義コドンを変えるヌクレオチド変化を含む。

#### 【0013】

もう一つの態様では、ネイティブのボツリヌス菌G+C含量を、本明細書に開示する核酸分子を発現させるために選択した異種細胞中に見いだされるG+C含量とより良く一致するように変えることによって、活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレームを変化させる。BoNT/Aをコードするオープンリーディングフレームを含むボツリヌス菌核酸分子の平均グアニンおよびシトシン含量(G+C含量という)は約25%である。この非常に低いG+C含量は、BoNT/Aの工業的発現でよく使用される異種細胞に見いだされるタンパク質をコードする内在性核酸分子の約50%というG+C含量とは対照的である(例えば表2を参照されたい)。既知オープンリーディングフレームまたは予想オープンリーディングフレーム中のG+C含量がこのように生物特異的な形で異なるのは、G+C含量偏倚またはG+C含量選好と呼ばれる現象である。したがって、異種細胞は、異なるG+C含量レベルと比較して、ある一定のG+C含量レベルへの偏倚を持つ、または異種細胞は、異なるG+C含量と比較して、ある一定のG+C含量レベルを好むということができる。BoNT/Aをコードするオープンリーディングフレームの低いG+C含量は、逆に、アデニンおよびチミジン含量(A+T含量)の高い領域をもたらす。高いA+T含量は異種細胞におけるタンパク質発現を妨害するようである。なぜなら、これらの領域は、例えば、転写または翻訳発現を終結させうる調節シグナルを模倣したり、転写または翻訳リードスルーレを邪魔しうる二次構造を形成したり、転写または翻訳スリップを促進しうる繰り返し配列を含んだりしうるからである。それゆえに、オープンリーディングフレームの平均G+C含量は、異種細胞におけるBoNT/Aの発現レベルに影響を及ぼしうる。したがって、総G+C含量を異種細胞が好むレベルまで増加させるようなヌクレオチド変化を含む改変オープンリーディングフレームは、同じ活性BoNT/Aをコードする無改変オープンリーディングフレームと比較して、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させるだろう。配列のG+C含量は、コドンの第3位にあるアデニンまたはチミジンをグアニンまたはシトシンで置換することにより、そのコドンがコードするアミノ酸を同一に保ったまま変化させることができる。限定でない一例として、オープンリーディングフレームとインフレームである5'-AAATATTAA-3'領域は、5'-AAGTACCTG-3'に変化させてもなお、トリペプチド・NH<sub>2</sub>-リジン-チロシン-ロイシン-COOHをコードすることができるだろう。逆に、配列のG+C含量は、コドンの第3位にあるグアニンまたはシトシンをアデニンまたはチミジンで置換することにより、そのコドンがコードするアミノ酸を同一に保ったまま低下させることができる。限定でない一例として、NH<sub>2</sub>-リジン-チロシン-ロイシン-COOHをコードする5'-AAGTACCTG-3'オープンリーディングフレームは、5'-AAATA TTTA-3'に変化させてもなお、トリペプチド・NH<sub>2</sub>-リジン-チロシン-ロイシン-COOHをコードすることができる。

#### 【0014】

したがってこの態様の一側面では、オープンリーディングフレームのG+C含量を変えるような少なくとも一つのヌクレオチド変化を核酸分子に加えることにより、コードされている活性BoNT/Aの異種細胞における発現を増加させる。この態様のもう一つの側面では、オープンリーディングフレームのG+C含量を変えるような複数のヌクレオチド置換を核酸分子に加えることにより、コードされている活性BoNT/Aの異種細胞における発現を増加させる。したがってこの態様の諸側面は、総G+C含量レベルを、例えば少なくとも30%の総G+C含量、少なくとも40%の総G+C含量、少なくとも50%の総G+C含量、少なくとも60%の総G+C含量または少なくとも70%の総G+C含量に増加させるようなヌクレオチド変化を含む改変オープンリーディングフレームを包含することができる。さらにまた、そのようなオープンリーディングフレームは、任意の50連続ヌクレオチドの総G+C含量を、例えば少なくとも30%総G+C含量、少なくとも40%総G+C含量、少なくとも50%総G+C含量、少なくとも6

10

20

30

40

50

0% 総G+C含量または少なくとも70% 総G+C含量だけ変えることも包含することができる。別の側面において、改変オープンリーディングフレームは、任意の75連続ヌクレオチドの総G+C含量を、例えば少なくとも30% 総G+C含量、少なくとも40% 総G+C含量、少なくとも50% 総G+C含量、少なくとも60% 総G+C含量または少なくとも70% 総G+C含量だけ変えることを包含することができる。さらに別の側面において、改変オープンリーディングフレームは、任意の100連続ヌクレオチドの総G+C含量を、例えば少なくとも30% 総G+C含量、少なくとも40% 総G+C含量、少なくとも50% 総G+C含量、少なくとも60% 総G+C含量または少なくとも70% 総G+C含量だけ変えることを包含することができる。

#### 【0015】

この態様の別の側面は、総G+C含量レベルを、例えば多くとも30% の総G+C含量、多くとも40% の総G+C含量、多くとも50% の総G+C含量、多くとも60% の総G+C含量または多くとも70% の総G+C含量に増加させるようなヌクレオチド変化を含む改変オープンリーディングフレームを包含する。さらにまた、そのようなオープンリーディングフレームは、任意の50連続ヌクレオチドの総G+C含量を、例えば多くとも30% 総G+C含量、多くとも40% 総G+C含量、多くとも50% 総G+C含量、多くとも60% 総G+C含量または多くとも70% 総G+C含量だけ変えることも包含することができる。別の側面において、改変オープンリーディングフレームは、任意の75連続ヌクレオチドの総G+C含量を、例えば多くとも30% 総G+C含量、多くとも40% 総G+C含量、多くとも50% 総G+C含量、多くとも60% 総G+C含量または多くとも70% 総G+C含量だけ変えることを包含することができる。さらに別の側面において、改変オープンリーディングフレームは、任意の100連続ヌクレオチドの総G+C含量を、例えば多くとも30% 総G+C含量、多くとも40% 総G+C含量、多くとも50% 総G+C含量、多くとも60% 総G+C含量または多くとも70% 総G+C含量だけ変えることを包含することができる。

#### 【0016】

もう一つの態様では、ポリモノヌクレオチド領域を変えることによって、活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレームを変化させる。ポリモノヌクレオチド領域（すなわち、ポリアデニン、ポリA；ポリチミジン、ポリT；ポリグアニン、ポリG；およびポリシトシン、ポリC）は、タンパク質合成にとって有害な場合があり、これらの領域が5個以上のヌクレオチドから構成される場合は特にそうである。これらの領域は、例えば1) 翻訳ストール（これは、タンパク質合成の速度を低下させると共に、合成される不完全な/部分的なペプチドの数を増加させる）の一因になったり、2) 翻訳スキップ（この場合は、翻訳装置がオープンリーディングフレームと正しく整列していない状態になることにより、例えばフレームシフトのせいで切断されていたり異なるアミノ酸配列を含有したりする異常タンパク質が產生される）に関与したりすることがある。ポリモノヌクレオチド領域は、そのポリモノヌクレオチド領域に含まれていて、その領域の途中に存在するコドンの第3位にあるヌクレオチドを、それとは異なるヌクレオチドで置換することにより、そのコドンがコードするアミノ酸を同一に維持したまま変化させることができる。限定でない一例として、トリペプチド・NH<sub>2</sub>-リジン-リジン-リジン-COOHをコードする9個のアデノシンを含有するポリA領域（すなわち5'-AAAAAAA-3'）は、その配列を5'-AAGAAGA AG-3'に変化させることによって排除することができ、それでもなお、トリペプチド・NH<sub>2</sub>-リジン-リジン-リジン-COOHをコードすることができる。

#### 【0017】

したがってこの態様の一側面として、オープンリーディングフレーム中に見いだされるポリモノヌクレオチド領域を変えるような少なくとも一つのヌクレオチド変化を核酸分子に加えることにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させることができる。この態様のもう一つの側面では、オープンリーディングフレーム中の複数のポリモノヌクレオチド領域を変えるような複数のヌクレオチド変化を核酸分子に加えることにより、コードされているBoNT/Aの発現を増加させる。この態様の諸側面において、オープンリーディングフレームは、例えば少なくとも一つのヌクレオチド変化、少なくとも二つのヌクレオチド変化、少なくとも三つのヌクレオチド変化、少なくとも四つのヌクレオチド変化、少なくとも五つのヌクレオチド変化、少なくとも10個のヌクレオチド変化、少なくとも20個

10

20

30

30

40

50

のヌクレオチド、または少なくとも30個のヌクレオチド変化を含むことができる。この態様の別の側面において、オープンリーディングフレームは、例えば多くとも一つのヌクレオチド変化、多くとも二つのヌクレオチド変化、多くとも三つのヌクレオチド変化、多くとも四つのヌクレオチド変化、多くとも五つのヌクレオチド変化、多くとも10個のヌクレオチド変化、多くとも20個のヌクレオチド変化、または多くとも30個のヌクレオチド変化を含むことができる。

#### 【0018】

もう一つの態様では、内部調節部位または内部構造部位が変わるようにヌクレオチド配列を変えることによって、改変オープンリーディングフレームを変化させる。内部調節部位または内部構造部位には、内部翻訳開始部位または潜在性翻訳開始部位、RNアーゼ切断部位、フレーム外(out-of-frame)停止コドン、メチル化部位およびヘアピンループ構造などがあるが、これらに限定されるわけではない。内部翻訳開始部位は、翻訳装置を正しくない開始部位に誤って導くことにより、合成される不完全な/部分的なまたは異常なタンパク質の数を増加させることができる。オープンリーディングの第2読み枠および第3読み枠にフレーム外停止コドンが存在すると、翻訳効率が増加し、したがってタンパク質収量が増加しうる。例えば翻訳装置が、所望のタンパク質をコードしない読み枠にシフトすると、時間、資源およびエネルギーが欠損タンパク質の翻訳に浪費される。フレーム外停止コドンの存在は、これら異常ペプチドの翻訳に費やされる細胞の労力を減少させる。RNアーゼは、RNA分子を切断することにより、関心対象のタンパク質をコードする転写物を破壊し、収量を低下させる酵素である。ヘアピンループ構造は、翻訳装置を物理的に遮断または妨害することにより、タンパク質合成を妨げたり、合成される不完全な/部分的なまたは異常なペプチドの数を増加させたりすることができる。内部調節部位または内部構造部位は、コンセンサス配列に含まれるヌクレオチドを、それとは異なるヌクレオチドで置換して、コンセンサス配列に対するヌクレオチド一致度を変えることにより、インフレームの読み枠に存在するコドンがコードするアミノ酸を同一に維持したまま変化させることができる。

#### 【0019】

この態様の一側面では、内部翻訳開始部位が変わるようにヌクレオチド配列を変えることによって、改変オープンリーディングフレームを変化させる。内部翻訳開始部位は、コンセンサス配列に含まれているヌクレオチドであってコドンの第3位にあるものを、それとは異なるヌクレオチドで置換して、コンセンサス配列に対するヌクレオチド一致度を低下させることにより、そのコドンがコードするアミノ酸を同一に維持したまま変化させることができる。限定でない一例として、昆虫・キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)における典型的翻訳開始部位は5'-ACAACCAAAATG-3'であり、オープンリーディングフレーム内に存在する場合、これは、ペプチド・NH<sub>2</sub>-スレオニン-スレオニン-リジン-メチオニン-COOHをコードするだろう。この翻訳開始部位は、この配列を5'-ACGACTAAG ATG-3'に変化させることによって排除することができ、それでもなお、ペプチド・NH<sub>2</sub>-スレオニン-スレオニン-リジン-メチオニン-COOHをコードすることができる。この態様のもう一つの側面として、少なくとも一つのヌクレオチド変化を核酸分子加えて、オープンリーディングフレーム内に見いだされる内部翻訳開始部位のコンセンサス配列を変えることにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させることができる。この態様のもう一つの側面では、複数のヌクレオチド変化を核酸分子に加えて、オープンリーディングフレームの一つ以上の内部翻訳開始部位を変えることにより、コードされているBoNT/Aの発現を増加させる。したがってこの態様の諸側面において、オープンリーディングフレームは、例えば、少なくとも一つのヌクレオチド変化、少なくとも二つのヌクレオチド変化、少なくとも三つのヌクレオチド変化、少なくとも四つのヌクレオチド変化、少なくとも五つのヌクレオチド変化または少なくとも10個のヌクレオチド変化を含むことができる。この態様の別の側面において、オープンリーディングフレームは、例えば、多くとも一つのヌクレオチド変化、多くとも二つのヌクレオチド変化、多くとも三つのヌクレオチド変化、多くとも四つのヌクレオチド変化、多くとも五つのヌクレオチド変化、または多くとも

10

20

30

40

50

10個のヌクレオチド変化を含むことができる。

【0020】

この態様のもう一つの側面では、RNアーゼ切断部位が変わるようにヌクレオチド配列を変えることにより、改変オープンリーディングフレームを変化させる。RNアーゼ切断部位は、コンセンサス配列に含まれているヌクレオチドであってコドンの第3位にあるものを、それとは異なるヌクレオチドで置換して、コンセンサス配列に対するヌクレオチド一致度を低下させることにより、そのコドンがコードするアミノ酸を同一に維持したまま変化させることができる。限定でない一例として、典型的なRNアーゼE切断部位は5'-GGTAATTG C-3'であり、オープンリーディングフレーム内に存在する場合、これは、ペプチド・NH<sub>2</sub>-グリシン-イソロイシン-システイン-COOHをコードする。このRNアーゼ切断部位は、この配列を5'-GGCAACTGC-3'に変化させることによって排除することができ、それでもなお、ペプチド・NH<sub>2</sub>-スレオニン-スレオニン-リジン-メチオニン-COOHをコードすることができる。この態様のもう一つの側面として、少なくとも一つのヌクレオチド変化を核酸分子に加えて、オープンリーディングフレーム中に見いだされるRNアーゼ切断部位のコンセンサス配列を変えることにより、コードされているBoNT/Aの発現を増加させることができる。この態様のもう一つの側面では、複数のヌクレオチド変化を核酸分子に加えて、オープンリーディングフレームの一つ以上のRNアーゼ切断部位を変えることにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる。したがってこの態様の諸側面において、オープンリーディングフレームは、例えば、少なくとも一つのヌクレオチド変化、少なくとも二つのヌクレオチド変化、少なくとも三つのヌクレオチド変化、少なくとも四つのヌクレオチド変化、少なくとも五つのヌクレオチド変化または少なくとも10個のヌクレオチド変化を含むことができる。この態様の別の側面において、オープンリーディングフレームは、例えば、多くとも一つのヌクレオチド変化、多くとも二つのヌクレオチド変化、多くとも三つのヌクレオチド変化、多くとも四つのヌクレオチド変化、多くとも五つのヌクレオチド変化、または多くとも10個のヌクレオチド変化を含むことができる。ポリモノヌクレオチド領域は、そのポリモノヌクレオチド領域に含まれているヌクレオチドであって、その領域の途中に存在するコドンの第3位にあるものを、それとは異なるヌクレオチドで置換することにより、そのコドンがコードするアミノ酸を同一に維持したまま変化させることができる。

【0021】

この態様のもう一つの側面では、フレーム外の読み枠に停止コドンが付加されることにより、改変オープンリーディングフレームを変化させる。フレーム外の読み枠にある停止コドンは、コドンの第3位に含まれるヌクオチドを、それとは異なるヌクレオチドで置換し、その結果として、フレーム外のコドンに停止コドンを作り出すことにより、インフレームのコドンがコードするアミノ酸を同一に維持したまま、付加することができる。限定でない一例として、5'-GGCAACTGC-3'というヌクレオチド配列を持つインフレームのオープンリーディングフレームは、ペプチド・NH<sub>2</sub>-グリシン-イソロイシン-システイン-COOHをコードする。フレーム外の停止コドンは、この配列を5'-GGTAACTGC-3'（下線部の配列）に変化させることによって付加することができ、それでもなおペプチド・NH<sub>2</sub>-グリシン-イソロイシン-システイン-COOHをコードすることができる。この態様のもう一つの側面として、少なくとも一つのヌクレオチド変化を核酸分子に加えて、フレーム外の読み枠に停止コドンを付加することにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させることができる。この態様のもう一つの側面では、複数のヌクレオチド変化を核酸分子に加えて、フレーム外の読み枠に一つ以上の停止コドンを付加することにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる。したがってこの態様の諸側面において、フレーム外の読み枠は、例えば少なくとも一つのヌクレオチド変化、少なくとも二つのヌクレオチド変化、少なくとも三つのヌクレオチド変化、少なくとも四つのヌクレオチド変化、少なくとも五つのヌクレオチド変化、少なくとも10個のヌクレオチド変化、少なくとも20個のヌクレオチド変化、または少なくとも30個のヌクレオチド変化を含むことができる。この態様の別の側面において、フレーム外の読み枠は、例えば多

10

20

30

40

50

くとも一つのヌクレオチド変化、多くとも二つのヌクレオチド変化、多くとも三つのヌクレオチド変化、多くとも四つのヌクレオチド変化、多くとも五つのヌクレオチド変化、多くとも10個のヌクレオチド変化、多くとも20個のヌクレオチド変化、または多くとも30個のヌクレオチド変化を含むことができる。

#### 【0022】

この態様のもう一つの側面では、ヘアピンループ構造が変わるようにヌクレオチド配列を変えることによって、改変オープンリーディングフレームを変化させる。ヘアピンループ構造は、コンセンサス配列に含まれているヌクレオチドであってコドンの第3位にあるものを、それとは異なるヌクレオチドで置換して、コンセンサス配列に対するヌクレオチド一致度を低下させることにより、そのコドンがコードするアミノ酸を同一に維持したまま変化させることができる。限定でない一例として、ヘアピンループ構造5'-GCTTGGCCAAG C-3'がオープンリーディングフレーム内に存在し、ペプチド・NH<sub>2</sub>-アラニン-トリプトファン-プロリン-セリン-COOHをコードする。このヘアピンループ構造は、この配列を5'-GC ATGGCCTAGC-3'に変化させることによって除去することができ、それでもなお、ペプチド・NH<sub>2</sub>-アラニン-トリプトファン-プロリン-セリン-COOHをコードすることができる。この態様のもう一つの側面として、少なくとも一つのヌクレオチド変化を核酸分子に加えて、オープンリーディングフレーム中に見いだされるヘアピンループ構造のコンセンサス配列を変えることにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させることができる。この態様のもう一つの側面では、複数のヌクレオチド変化を核酸分子に加えて、オープンリーディングフレーム中に見いだされるヘアピンループ構造のコンセンサス配列を変えることにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる。したがってこの態様の諸側面において、オープンリーディングフレームは、例えば、少なくとも一つのヌクレオチド変化、少なくとも二つのヌクレオチド変化、少なくとも三つのヌクレオチド変化、少なくとも四つのヌクレオチド変化、少なくとも五つのヌクレオチド変化、少なくとも10個のヌクレオチド変化、少なくとも20個のヌクレオチド変化、または少なくとも30個のヌクレオチド変化を含むことができる。この態様の別の側面において、オープンリーディングフレームは、例えば、多くとも一つのヌクレオチド変化、多くとも二つのヌクレオチド変化、多くとも三つのヌクレオチド変化、多くとも四つのヌクレオチド変化、多くとも五つのヌクレオチド変化、多くとも10個のヌクレオチド変化、多くとも20個のヌクレオチド変化、または多くとも30個のヌクレオチド変化を含むことができる。

10

20

30

40

50

#### 【0023】

さらにもう一つの態様では、改変オープンリーディングフレームを配列番号2のオープンリーディングフレームとの比較で変化させて、同義コドン、G+C含量、ポリモノヌクレオチド領域および内部調節部位もしくは内部構造部位またはそれらの任意の組み合わせを変えることにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる。

#### 【0024】

この態様の一側面では、オープンリーディング中のコドンを同義コドンで置き換えると共にオープンリーディングフレームのG+C含量を変えるような、少なくとも一つのヌクレオチド変化を核酸分子に加えることにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる。この態様のもう一つの側面では、オープンリーディングフレーム中の複数のコドンを複数の同義コドンで置き換えると共にオープンリーディングフレームのG+C含量を変えるような、複数のヌクレオチド変化を核酸に加えることにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる。この態様のもう一つの側面では、オープンリーディングフレーム中のコドンを同義コドンで置き換えると共にオープンリーディングフレーム中に見いだされるポリモノヌクレオチド領域を変えるような、少なくとも一つのヌクレオチド変化を核酸に加えることにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる。この態様のもう一つの側面では、オープンリーディングフレーム中の複数のコドンを複数の同義コドンで置き換えると共にオープンリーディングフレーム中に見いだされる複数のポリモノヌクレオチド領域を変えるような、複数のヌクレオチド変化を核酸に加えることにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる。この態様のさらにもう一つの側面では、オ-

プンリーディングフレーム中のコドンを同義コドンで置き換えると共にオープンリーディングフレーム中に見いだされる内部調節部位または内部構造部位を変えるような、少なくとも一つのヌクレオチド変化を核酸に加えることにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる。この態様のもう一つの側面では、オープンリーディングフレーム中の複数のコドンを複数の同義コドンで置き換えると共にオープンリーディングフレーム中に見いだされる複数の内部調節部位または内部構造部位を変えるような、複数のヌクレオチド変化を核酸に加えることにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる。

#### 【0025】

この態様のさらにもう一つの側面では、オープンリーディングフレーム中のコドンを同義コドンで置き換え、オープンリーディングフレームのG+C含量を変え、そしてポリモノヌクレオチド領域を変えるような、少なくとも一つのヌクレオチド変化を核酸分子に加えることにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる。この態様のもう一つの側面では、オープンリーディングフレーム中の複数のコドンを複数の同義コドンで置き換え、オープンリーディングフレームのG+C含量を変え、そして複数のポリモノヌクレオチド領域を変えるような、複数のヌクレオチド変化を核酸分子に加えることにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる。この態様のさらにもう一つの側面では、オープンリーディングフレーム中のコドンを同義コドンで置き換え、オープンリーディングフレームのG+C含量を変え、そして内部調節部位または内部構造部位を変えるような、少なくとも一つのヌクレオチド変化を核酸分子に加えることにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる。この態様のもう一つの側面では、オープンリーディングフレーム中の複数のコドンを複数の同義コドンで置き換え、オープンリーディングフレームのG+C含量を変え、そして複数の内部調節部位または内部構造部位を変えるような、複数のヌクレオチド変化を核酸分子に加えることにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる。

10

20

30

#### 【0026】

この態様の一側面では、オープンリーディングフレーム中のコドンを同義コドンで置き換え、オープンリーディングフレームのG+C含量を変え、ポリモノヌクレオチド領域を変え、そして内部調節部位または内部構造部位を変えるような、少なくとも一つのヌクレオチドを核酸に加えることにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる。この態様のもう一つの側面では、オープンリーディングフレーム中の複数のコドンを複数の同義コドンで置き換え、オープンリーディングフレームのG+C含量を変え、複数のポリモノヌクレオチド領域を変え、そして複数の内部調節部位または内部構造部位を変えるような、複数のヌクレオチドを核酸に加えることにより、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる。

#### 【0027】

本明細書に開示する核酸分子の限定でない例として、配列番号3～配列番号99、配列番号110、配列番号112および配列番号122～配列番号125を含む核酸配列分子が挙げられる。

#### 【0028】

任意のさまざまな追加ヌクレオチド改変を行なって、核酸分子およびそのような分子がコードする活性BoNT/Aの製造および使用を支援することができると想定される。一態様として、本明細書に開示する核酸分子は、制限エンドヌクレアーゼ結合部位を含む少なくとも一つのヌクレオチド配列領域が付加されるように改変することができる。この態様のもう一つの側面として、本明細書に開示する分子は、複数の制限エンドヌクレアーゼ結合部位を含むことができる。したがってこの態様の諸側面は、一つ以上の制限エンドヌクレアーゼ結合部位、二つ以上の制限エンドヌクレアーゼ部位、三つ以上の制限エンドヌクレアーゼ部位、四つ以上の制限エンドヌクレアーゼ部位、または五つ以上の制限エンドヌクレアーゼ部位を含む核酸領域を持つ核酸分子を包含することができる。制限エンドヌクレアーゼ結合部位を含む核酸領域の場所は、分子の5'末端でも、分子の3'末端でも、分子内でも、またはそれらの任意の組み合わせでもよいと想定される。この態様のもう一つの側面では、制限エンドヌクレアーゼ部位を含む領域が、核酸分子に含まれるオープンリーディ

40

50

ングフレームの5'末端と3'末端の両方に付加される。この態様のもう一つの側面では、制限エンドヌクレアーゼ部位が、配列番号1のBoNT/Aをコードするオープンリーディングフレームの各末端に隣接して位置する。広範囲にわたるさまざまな制限エンドヌクレアーゼ結合部位はどれでも、本明細書に開示する核酸分子と共に使用することができると思定される。制限エンドヌクレアーゼ結合部位の選択、作製および使用は、本明細書の教示内容からして当業者には十分に可能な日常的な作業である。

#### 【0029】

もう一つの態様として、本明細書に開示する核酸分子は、オープンリーディングフレーム内から制限エンドヌクレアーゼ結合部位を排除するような、少なくとも一つのヌクレオチド変化を含むことができる。この態様のもう一つの側面として、本明細書に開示する分子は、オープンリーディングフレーム内から制限エンドヌクレアーゼ結合部位を排除するような、複数のヌクレオチド置換を含むことができる。したがってこの態様の諸側面は、オープンリーディングフレーム内に見いだされる制限エンドヌクレアーゼ結合部位の認識配列を、一つ以上のヌクレオチド、二つ以上のヌクレオチド、三つ以上のヌクレオチド、または四つ以上のヌクレオチドによって変化させる核酸分子を包含することができる。制限エンドヌクレアーゼ結合部位は、その酵素のパリンドローム認識配列に含まれているヌクレオチドであって、その部位の途中に存在するコドンの第3位にあるものを、それとは異なるヌクレオチドで置換することにより、そのコドンがコードするアミノ酸配列を同一に維持したまま変えることができる。限定でない一例として、オープンリーディングフレーム中に見いだされ、ジペプチド・NH<sub>2</sub>-グルタミン酸-フェニルアラニン-COOHをコードする、5'-GAATTC-3' というEcoRI認識部位は、そのEcoRI認識部位を排除するために5'-GAGTT C-3'に変化させることができ、それでもなお、ジペプチドジペプチド・NH<sub>2</sub>-グルタミン酸-フェニルアラニン-COOHをコードすることができる。この態様のさらにもう一つの側面として、本明細書に開示する核酸分子は、オープンリーディングフレームからの少なくとも一つの制限エンドヌクレアーゼ結合部位の排除を含むことができる。この態様のさらにもう一つの側面として、本明細書に開示する分子は、オープンリーディングフレームからの複数の制限エンドヌクレアーゼ結合部位の排除を含むことができる。したがってこの態様の諸側面は、オープンリーディングフレームから一つ以上の制限エンドヌクレアーゼ結合部位、オープンリーディングフレームから二つ以上の制限エンドヌクレアーゼ結合部位、オープンリーディングフレームから三つ以上の制限エンドヌクレアーゼ結合部位、またはオープンリーディングフレームから四つ以上の制限エンドヌクレアーゼ結合部位を排除することができる。

#### 【0030】

さらにもう一つの態様として、本明細書に開示する核酸分子は、結合ペプチドをコードする少なくとも一つの核酸領域を含むことができる。そのような結合ペプチドは、融合タンパク質として、BoNT/Aをコードするオープンリーディングフレームにインフレームで作動可能に連結される。この態様のもう一つの側面として、本明細書に開示する核酸分子は、複数の作動可能に連結された結合ペプチドをコードする複数の核酸領域を含むことができる。したがってこの態様の諸側面は、一つ以上の作動可能に連結された結合ペプチド、二つ以上の作動可能に連結された結合ペプチド、三つ以上の作動可能に連結された結合ペプチド、四つ以上の作動可能に連結された結合ペプチド、または五つ以上の作動可能に連結されたペプチドをコードする核酸領域を含む核酸分子を包含することができる。この態様のもう一つの側面として、複数の結合ペプチドを含む核酸領域は、同じ結合ペプチドの複数コピーをコードするか、異なる結合ペプチドをコードするか、またはそれらの任意の組み合わせをコードすることができる。結合ペプチドをコードする核酸領域の場所は、例えばBoNT/Aのアミノ酸末端の前、BoNT/A内、またはBoNT/Aおよび結合ペプチドのカルボキシル末端の後など（ただしこれらに限定されるわけではない）、さまざまな位置にあることができる。本明細書に開示する核酸領域によってコードされうる結合ペプチドの例には、エピトープ結合ペプチド、例えばFLAG、Express（商標）、ヒトインフルエンザウィルスヘマグロチニン（HA）、ヒトp62<sup>c-Myc</sup>タンパク質（c-MYC）、水疱性口内炎ウイルス糖

10

20

30

40

50

タンパク質(VSV-G)、単純ヘルペスウイルス(HSV)の糖タンパク質D前駆体、V5、およびAU1；アフィニティ結合ペプチド、例えばポリヒスチジン(HIS)、ストレプトアビシン結合ペプチド(strep)、およびビオチン；ならびにペプチド結合ドメイン、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼのグルタチオン結合ドメイン、カルモジュリン結合タンパク質のカルモジュリン結合ドメイン、S-ペプチド結合ドメインおよびマルトース結合タンパク質のマルトース結合ドメインなどがあるが、これらに限定されるわけではない。適当な結合ペプチドを選択し、作製し、使用するための具体的プロトコールの限定でない例は、「MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL」(Joseph SambrookおよびDavid W.Russell編,Cold Spring Harbor Laboratory Press,第3版,2001)、「ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL」(Edward HarlowおよびDavid Lane編,Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版,1998)、および「USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL: PORTABLE PROTOCOL No.1」(Edward HarlowおよびDavid Lane,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1998)などに記載されており、これらは参考により本明細書に組み入れられる。また、結合ペプチドならびに詳細に特徴づけられた試薬類、条件およびプロトコールの限定でない例は、BD Biosciences-Clontech(カリフォルニア州パロアルト)、BD Biosciences Pharmingen(カリフォルニア州サンディエゴ)、Invitrogen, Inc(カリフォルニア州カールズバッド)、QIAGEN Inc.(カリフォルニア州バレンシア)、およびStratagene(カリフォルニア州ラホーヤ)などの供給業者(ただしこれらに限定されるわけではない)から、容易入手することができる。これらのプロトコールは、本明細書の教示内容からして当業者には十分に可能な日常的作業である。10

#### 【0031】

もう一つの態様として、本明細書に開示する核酸分子は、プロテアーゼ切断部位をコードする少なくとも一つの核酸領域を含むことができる。そのようなプロテアーゼ切断部位は、融合タンパク質として、活性BoNT/Aおよび結合ペプチドをコードするオープンリーディングフレームにインフレームで作動可能に連結される。この態様のもう一つの態様として、本明細書に開示する分子は、複数のプロテアーゼ切断部位をコードする複数の核酸領域を含むことができる。さらに、二つ以上の核酸領域を含有する分子の場合、これらの領域は同じプロテアーゼ切断部位をコードしてもよいし、異なるプロテアーゼ切断部位をコードしてもよいと想定される。切断部位をコードする核酸領域の場所は、例えば、結合ペプチドと活性BoNT/Aのアミノ酸末端との間、または活性BoNT/Aのカルボキシ末端と結合ペプチド要素との間など(ただしこれらに限定されるわけではない)、さまざまな位置にあることができる。本明細書に開示する核酸領域によってコードされうるプロテアーゼ切断部位の例には、エンテロキナーゼ切断部位、トロンビン切断部位、第Xa因子切断部位、ヒトライノウイルス3Cプロテアーゼ切断部位、タバコエッチャイルス(TEV)プロテアーゼ切断部位、ジペプチジルアミノペプチダーゼ切断部位および低分子ユビキチン様修飾因子(small ubiquitin-like modifier: SUMO) / ユビキチン様タンパク質1(ULP-1)プロテアーゼ切断部位などがあるが、これらに限定されるわけではない。プロテアーゼ切断部位ならびに詳細に特徴づけられた試薬類、条件およびプロトコールの限定でない例は、BD Biosciences-Clontech(カリフォルニア州パロアルト)、BD Biosciences Pharmingen(カリフォルニア州サンディエゴ)、Invitrogen, Inc(カリフォルニア州カールズバッド)、QIAGEN Inc.(カリフォルニア州バレンシア)、およびStratagene(カリフォルニア州ラホーヤ)などの供給業者(ただしこれらに限定されるわけではない)から、容易入手することができる。適当なプロテアーゼ切断部位の選択、作製および使用は、本明細書の教示内容からして当業者には十分に可能な日常的作業である。20

#### 【0032】

活性BoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを作製するために変化させるべき適当なヌクレオチドを同定するには、さまざまな手段をどれでも使用することができると思定される。適当なヌクレオチド変化は、公表されたコドン使用頻度表(例えば「Codon Usage Database」前掲(2004)を参照されたい)または当業者が開発したコドン使用頻度表を使って、手作業で同定することができる。また、ヌクレオチド変化の選40

10

20

30

40

50

択を支援するように設計されたコンピュータプログラム。そのようなソフトウェアの限定でない例には、eCodonOpt [ Gregory L.MooreおよびCostas D.Maranas 「eCodonOpt: A Systematic Computational Framework for Optimizing Codon Usage in Directed Evolution Experiments ( eCodonOpt : 定方向進化実験においてコドン使用頻度を最適化するための体系化された計算フレームワーク ) 」 30(11) Nucleic Acids Res. 2407-2416 (2002) ] ; DNA Works [ 例えばDavid M.HooverおよびJacek Lubkowski 「DNAWorks: An Automated Method for Designing Oligonucleotides for PCR-Based Gene Synthesis ( DNAWorks : PCRに基づく遺伝子合成のためのオリゴヌクレオチドを設計する自動化された方法 ) 」 30(10) Nucleic Acids Res. e43 (2002) を参照されたい ] ; DNA2.0 [ 例えばClaes Gustafssonら 「Codon Bias and Heterologous Protein Expression ( コドン偏倚および異種タンパク質発現 ) 」 22(7) Trends Biotechnol. 346-353 (2004) を参照されたい ] ; GeMS [ 例えばSarah J.Kodumalら 「Total Synthesis of Long DNA Sequences: Synthesis of a Contiguous 32-Kb Polyketide Synthase Gene Cluster ( 長いDNA配列の全合成 : 連続した32Kbポリケチドシナーゼ遺伝子クラスター ) 」 101 (44) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 15573-15578 (2004) を参照されたい ] ; CAD PAM [ 例えばLance StewartおよびAlex B.Burgen, 前掲, 2005を参照されたい ] ; およびGene Composer [ 例えばLance StewartおよびAlex B. Burgen, 前掲, 2005を参照されたい ] などがある。また、コドン偏倚を同定するのに有用な公けに利用できるインターネットサイト、例えばgcua.schoedl.deのGraphical Codon User Analyzer [ 例えばMarkus Fuhrmannら 「Monitoring Dynamic Expression of Nuclear Genes in Chlamydomonas Reinhardtii by Using a Synthetic Luciferase Reporter Gene ( 合成ルシフェラーゼレポーター遺伝子を使ってコナミドリムシにおける核遺伝子の動的発現を監視する ) 」 55(6) Plant Mol. Biol. 869-881 (2004) を参照されたい ] およびURLアドレスvectorcore.pitt.edu/upgene/upgene.htmlのUpGene [ 例えばWentao Gaoら 「UpGene: Application of a Web-based DNA Codon Optimization Algorithm ( UpGene : ウェブベースのDNAコドン最適化アルゴリズムの応用 ) 」 20 BIOTECHNOL. PROG. 443-448, (2004) を参照されたい ] なども、利用することができる。もう一つの選択肢として、Aptagen, Inc. ( バージニア州ハーツデール ) ; BlueHeron ( 登録商標 ) Biotechnology ( ワシントン州ボセル ) ; deCODE Biostructures, Inc. ( ワシントン州ベインブリッジアイランド ) ; DNA2.0 ( カリフォルニア州メンロパーク ) ; Entelechon, GmbH. ( ドイツ・レーゲンスブルク ) ; Genscript Corp. ( ニュージャージー州ピスカタウェイ ) ; Modular Genetics, Inc. ( マサチューセッツ州ウォーバーン ) ; およびQIAGEN, Inc. ( カリフォルニア州バレンシア )などのさまざまな供給業者 ( ただしこれらに限定されるわけではない ) が、ヌクレオチド最適化サービスを提供している。本明細書に開示する改変オープンリーディングフレーム中に加えるべき適当なヌクレオチド変化の同定は、本明細書の教示内容からして当業者には十分に可能な日常的作業である。

#### 【 0 0 3 3 】

本明細書に開示する改変オープンリーディングを含む核酸分子を作製するには、さまざまな方法を使用することができる ( 例えばLance StewartおよびAlex B.Burgen, 前掲, 2005を参照されたい ) 。例として、オリゴヌクレオチドライゲーション法、インビボ修復法およびPCRに基づく方法などが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。核酸分子の合成は、本明細書の教示内容からして当業者には十分に可能な日常的作業である。

#### 【 0 0 3 4 】

相補ヌクレオチドの逐次的組み立てによる核酸合成は、不活性支持体に化学結合された出発オリゴヌクレオチドへのオーバーラップ相補ヌクレオチドの逐次的ハイブリダイゼーションを伴う固相法である ( 例えばZdenek HostomskyおよびJiri Smrt 「Solid-phase assembly of DNA duplexes from synthetic oligonucleotides ( 合成オリゴヌクレオチドからのDNA二重鎖の固相組み立て ) 」 18 Nucleic Acids Symp Ser. 241-244 (1987) ; ならびにK.L.BeattieおよびR.F.Fowler 「Solid-phase gene assembly ( 固相遺伝子組み立て ) 」 352(6335) Nature 548-549 (1991) を参照されたい ) 。このオリゴヌクレオチドライゲーション法では、遺伝子全体のトップ鎖およびボトム鎖に対応する約30ヌクレオチド長のオリ

10

20

30

40

50

ゴヌクレオチド構築単位を個別に変性させ、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製する。これらの精製オリゴヌクレオチドの5'末端をリン酸化し、部分集団に分割した後、ハイブリダイズして、固相支持体上で部分組立品を形成させる。固相支持体への部分組立品のハイブリダイゼーションを逐次的に繰り返して、完全長遺伝子が構築されるまで、取付けられたDNA分子を伸長させる。

#### 【0035】

FokI法による核酸合成では、大腸菌 (*E. coli*) のインビボDNA合成修復機構を利用して、オリゴヌクレオチドから合成遺伝子を構築する（例えばWlodek MandeckiおよびTimothy J. Boiling「FokI Method of Gene Synthesis (FokI DNA合成法)」68(1) GENE 101-107, (1988)を参照されたい）。この方法は、オリゴデオキシヌクレオチド（オリゴ）指定二本鎖切断修復技術を使ってプラスミド中に大きな（約100bp長）インサートをクローニングすることができるという知見に基づいている。この方法では、約40~90ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドの変性混合物および線状化したプラスミドを大腸菌に形質転換する。オリゴヌクレオチドはFokI制限エンドヌクレアーゼ部位を含有する末端配列を持つように設計され、同様にFokI部位を持つ線状化されたプラスミドの末端を相補する。ヌクレオチド(nt)配列はプラスミドの二つのFokI部位の間に挿入される。FokIは、その認識部位から9ヌクレオチドおよび13ヌクレオチド離れた部位に食い違い型の二本鎖切断を作るクラスIIエンドヌクレアーゼである。プラスミドDNAをFokIで切断すると、4ヌクレオチドのFokI 5'オーバーハング配列を予定どおり含有する制限断片が遊離され、そのオーバーハング配列は、その後、関心対象の遺伝子が構築されるまで、より大きな合成DNAの断片を組み立てる際に、付着末端として役立つことができる。  
10

#### 【0036】

ポリメラーゼサイクリングアセンブリー (polymerase cycling assembly : PCA) またはアセンブリーPCRによる核酸合成では、オーバーラップオリゴヌクレオチドの連結を必要とする方法の代わりに、ポリメラーゼ連鎖反応を使って、オリゴヌクレオチドから遺伝子を構築する（例えばPatrick J.DillonおよびCraig A.Rosen「A Rapid Method for the Construction of Synthetic Genes Using the Polymerase Chain Reaction (ポリメラーゼ連鎖反応を使って合成遺伝子を構築するための迅速な方法)」9(3) BIOTECHNIQUES 298-300, (1990)；ならびにWillem P.Stemmerら「Single-Step Assembly of a Gene and Entire Plasmid from Large Numbers of Oligodeoxyribonucleotides (多数のオリゴデオキシリボヌクレオチドからの遺伝子およびプラスミド全体の一階組み立て)」164(1) GENE 49-53, (1995)を参照されたい）。この方法では、遺伝子全体のトップ鎖およびボトム鎖に相当する約40~60ヌクレオチド長のオーバーラップオリゴヌクレオチドをプールし、複数サイクルの変性、再生および重合にかける。次に、その結果生じるPCR産物を、最終PCR産物のクローニングを容易にする制限エンドヌクレアーゼ部位を含有する外側隣接プライマーを使ってPCR増幅にかける。  
20

#### 【0037】

もう一つの選択として、例えばAptagen, Inc. (バージニア州ハーンドン) ; BlueHeron (登録商標) Biotechnology (ワシントン州ボセル) ; DNA2.0 (カリフォルニア州メンロパーク) ; Entelechon, GmbH. (ドイツ・レーゲンスブルク) ; Genscript Corp. (ニュージャージー州ピスカタウェイ) ; Modular Genetics, Inc. (マサチューセッツ州ウォーバーン) ; およびQIAGEN, Inc. (カリフォルニア州バレンシア) などのさまざまな供給業者（ただしこれらに限定されるわけではない）が、ハイスクループット遺伝子合成プラットフォームの使用による核酸合成サービスを提供している。核酸合成の方法を実施例2に示す。本明細書に開示する改変オープンリーディングフレームの合成は、本明細書の教示内容からして当業者には十分に可能な日常的作業である。  
30

#### 【0038】

抗原的に異なる7タイプのボツリヌス毒素 (BoNT) が、ヒト (BoNT/A, /B, /E および/F) 、動物 (BoNT/C1および/D) におけるボツリヌス中毒の大発生を調査することによって同定されるか、土壤から単離 (BoNT/G) されている。BoNT類は、互いに約35%のアミノ酸  
50

一致度を持ち、同じ機能ドメイン編成および全体的な構造構成を共有している。八つのクロストリジウム毒素血清型のアミノ酸配列が、対応する遺伝子から導かれている（例えば Niemann 「Molecular Biology of Clostridial Neurotoxins (クロストリジウム毒素の分子生物学)」303-348 (「Sourcebook of Bacterial Protein Toxins」Alouf およびFreer 編, Academic Press, 1991) を参照されたい）。各タイプのクロストリジウム毒素には、アミノ酸配列がいくらか異なり、それらのタンパク質をコードする核酸配列もいくらか異なるサブタイプが存在しすると、当業者には認識されている。例えば、BoNT/Aには現時点で四つのサブタイプ、すなわちBoNT/A1、BoNT/A2、BoNT/A3およびBoNT/A4が存在し、特定のサブタイプをもう一つのBoNT/Aサブタイプと比較すると約89%のアミノ酸一致度を示す。七つのBoNT血清型は全て、類似する構造および薬理学的性質を持つが、それぞれは異質な微生物学的特徴も示す。対照的に、破傷風毒素 (TeNT) は、均一な破傷風菌 (*C. tetani*) 群によって產生される。クロストリジウム属の他の二種、クロストリジウム・バラティ (*C. baratii*) およびクロストリジウム・ブチリカム (*C. butyricum*) も、それぞれBoNT/FおよびBoNT/Eに類似する毒素を产生する。

10

## 【0039】

クロストリジウム毒素 (CoNT) はそれぞれ、約150kDaの単鎖ポリペプチとして翻訳され、次にそれは、細菌プロテアーゼまたは組織プロテアーゼによるジスルフィドループ内のタンパク質分解的切断によって切斷される。この翻訳後プロセシングにより、一つのジスルフィド結合および非共有結合相互作用によって一つに保たれた約50kDaの軽鎖 (LC) と約100kDaの重鎖 (HC) とを含む二鎖分子が生じる。各成熟二鎖分子は機能的に異なる三つのドメイン、すなわち、1) LC内に配置された酵素ドメイン（これは、神経伝達物質放出装置のコア構成要素を特異的に標的とする亜鉛依存性エンドペプチダーゼ活性を含有するメタロプロテアーゼ領域を含む）；2) HCのアミノ末端側の半分 ( $H_N$ ) に含有されるトランスロケーションドメイン（これは、細胞内小胞から標的細胞の細胞質への毒素の放出を容易にする）；および3) HCのカルボキシル末端側の半分 ( $H_C$ ) 内に見いだされる結合ドメイン（これは、標的細胞の表面に配置された受容体複合体に対する毒素の結合活性および結合特異性を決定する）を含む。

20

## 【0040】

毒性にとっては、これら三つの機能ドメインの結合活性、トランスロケーション活性および酵素活性が全て必要である。この過程の詳細は全てが正確にわかっているわけではないが、CoNTがニューロンに侵入し神経伝達物質放出を阻害する際に用いる細胞中毒機序全体はタイプにかかわらず類似している。出願人は以下の説明に束縛されることを望まないが、中毒機序は少なくとも四つの段階、すなわち1) 受容体結合、2) 複合体内部移行、3) 軽鎖トランスロケーション、および4) 酵素による標的修飾を含むと、説明することができる（図1参照）。この過程は、CoNTの $H_C$ ドメインが、標的細胞の形質膜上に配置されたCoNT特異的受容体複合体に結合した時に開始される。受容体複合体の結合特異性は、一つには、各クロストリジウム受容体複合体を弁別的に構成するガングリオシドとタンパク質受容体の特異的組み合わせによって達成されると考えられる。ひとたび結合されると、CoNT/受容体複合体はエンドサイトーシスによって内在化され、内在化された小胞は、特異的細胞内経路に仕分けされる。トランスロケーション段階は、小胞コンパートメントの酸性化によって引き金が引かれるようである。この過程は、毒素の疎水性を増加させ、毒素の酵素活性を増進する二つの重要なpH依存的構造再編成を開始すると思われる。ひとたび活性化されると、毒素の軽鎖エンドペプチダーゼは細胞内小胞から細胞質ゾルへと放出され、そこでは、神経伝達物質放出装置の三つの既知コア構成要素の一つを特異的に標的とする。これらのコアタンパク質、すなわち小胞関連膜タンパク質 (VAMP) /シナプトブレビン、25kDaのシナプトソーム関連タンパク質 (SNAP-25) およびシンタキシンは、神經終末におけるシナプスの小胞ドッキングおよび小胞融合に必要であり、可溶性N-エチルマレイミド感受性因子付着タンパク質受容体 (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein-receptor : SNARE) ファミリーのメンバーを構成する。BoNT/AおよびBoNT/EはSNAP-25をカルボキシ末端領域で切断して、9または24アミノ酸セグメントをそ

30

40

50

れぞれ放出させ、BoNT/C1もSNAP-25をカルボキシル末端近くで切断する。ボツリヌス血清型BoNT/B、BoNT/D、BoNT/FおよびBoNT/G、ならびに破傷風毒素は、VAMPの保存された中心部分に作用して、VAMPのアミノ末端部分を細胞ゾル内に放出させる。BoNT/C1はシンタキシンを細胞質ゾル側膜表面近くの単一部位で切断する。シナプスSNAREの選択的タンパク質分解は、クロストリジウム毒素がインビボで引き起こす神経伝達物質放出遮断の理由である。クロストリジウム毒素のSNAREタンパク質標的は、さまざまな非ニューロンタイプのエキソサイトーシスに共通し、これらの細胞では、ニューロンの場合と同様に、軽鎖ペプチダーゼ活性がエキソサイトーシスを阻害する（例えば、参照により本明細書に組み入れられるYann Humeauら「How Botulinum and Tetanus Neurotoxins Block Neurotransmitter Release（ボツリヌス神経毒および破傷風神経毒が神経伝達物質放出を遮断する方法）」82(5) Biochimie. 427-446 (2000)；Kathryn Turtonら「Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Structure, Function and Therapeutic Utility（ボツリヌス神経毒および破傷風神経毒：構造、機能および治療的有用性）」27(11) Trends Biochem. Sci. 552-558. (2002)；M.Zouhair Atassi「Basic and Therapeutic Aspects of Botulinum and Tetanus Toxins（ボツリヌス毒素および破傷風毒素の基礎的側面および治療的側面）」（Dirk W.DressierおよびJoseph J.Jankovic編，2003）；Giovanna Lalliら「The Journey of Tetanus and Botulinum Neurotoxins in Neurons（ニューロンにおける破傷風神経毒およびボツリヌス神経毒の行程）」11(9) Trends Microbiol. 431-437, (2003)を参照されたい）。

10

20

30

**【0041】**

本発明の諸側面は、一つには、活性BoNT/Aを提供する。本明細書で使用する「活性BoNT/A」という用語は、BoNT/Aがニューロンに侵入し、神経伝達物質放出を阻害する際に用いる細胞機序全体（低親和性または高親和性受容体複合体へのBoNT/Aの結合、毒素/受容体複合体の内部移行、細胞質内へのBoNT/A軽鎖のトランスロケーション、およびBoNT/A基質の酵素的修飾を含む）を遂行することができる任意のタンパク質またはその断片を意味する。したがって活性BoNT/Aは、天然活性BoNT/A変種（例えば活性BoNT/AアイソフォームおよびBoNT/Aサブタイプなど）、非天然活性BoNT/A変種（例えば保存的BoNT/A変種、非保存的BoNT/A変種、BoNT/Aキメラ変種およびその活性BoNT/A断片など）、またはそれらの任意の組み合わせを含むが、これらに限定されるわけではない。本明細書で使用する「BoNT/A変種」という用語は、天然であるか非天然であるかを問わず、配列番号1の対応する領域と比較して少なくとも一つのアミノ酸変化を持ち、配列番号1に対応する領域に対する一致率で記述することができる活性BoNT/Aを意味する。限定でない一例として、配列番号1のアミノ酸1～1296を含む活性BoNT/A変種は、配列番号1のアミノ酸領域1～1296と比較して、少なくとも一つのアミノ酸相違、例えばアミノ酸の置換、欠失または付加などを持つだろう。限定でないもう一つの例として、配列番号1のアミノ酸15～1290を含むBoNT/A変種は、配列番号1のアミノ酸領域15～1290と比較して、少なくとも一つのアミノ酸相違、例えばアミノ酸の置換、欠失または付加を持つだろう。

40

**【0042】**

一致率の決定には、グローバル法、ローカル法およびハイブリッド法、例えばセグメントアプローチ法などを含む（ただしこれらに限定されるわけではない）、さまざまな配列アラインメント法をどれでも使用することができる。一致率を決定するためのプロトコルは、本明細書の教示内容からして当業者には十分に可能な日常的な作業である。

**【0043】**

グローバル法では、配列を分子の最初から最後まで整列し、個々の残基対のスコアを合計することによって、またギャップペナルティーを課すことによって、最適なアラインメントを決定する。例えば、CLUSTAL W[ 例えばJulie D.Thompsonら「CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice (CLUSTAL W: 配列重み付け、位置特異的ギャップペナルティおよび重みマトリックス選択による累進多重配列アラインメントの感度の改善)」22(22) Nucleic Acids Research 4673-4680 (1994)

50

を参照されたい] および反復精密化 [ 例えばOsamu Gotoh 「Significant improvement in accuracy of multiple protein sequence alignments by iterative refinement as assessed by reference to structural alignments (構造アラインメントを参照して評価した反復精密化による多重タンパク質配列アラインメントの正確度の有意な改善) 」 264(4) J. Mol. Biol. 823-838 (1996) を参照されたい] などがその例であるが、これらに限定されるわけではない。

## 【 0 0 4 4 】

ローカル法では、入力配列の全てが共有している一つ以上の保存されたモチーフを同定することによって配列を整列する。例えば、Match-box [ 例えばEric Depiereux およびErnest Feytmans 「Match-box: a fundamentally new algorithm for the simultaneous alignment of several protein sequences (Match-box : 数個のタンパク質配列を同時整列するための根本的に新しいアルゴリズム) 」 8(5) CABIOS 501-509 (1992) を参照されたい] ; ギブスサンプリング [ 例えばC.E.Lawrenceら 「Detecting subtle sequence signals: a gibbs sampling strategy for multiple alignment (とらえにくい配列シグナルの検出 : 多重アラインメントのためのギブスサンプリング戦略) 」 262(5131) Science 208-214 (1993) を参照されたい] ; Align-M [ 例えばIvo Van Walleら 「Align-m - a new algorithm for multiple alignment of highly divergent sequences (Align-m - 著しく遠い配列の多重アラインメントのための新しいアルゴリズム) 」 20(9) Bioinformatics, 1428-1435 (2004) を参照されたい] などがその例であるが、これらに限定されるわけではない。

## 【 0 0 4 5 】

ハイブリッド法では、グローバルアラインメント法とローカルアラインメント法の機能的側面を併用する。例えば、セグメント間比較 [ 例えばBurkhard Morgensternら 「Multiple DNA and protein sequence alignment based on segment-to-segment comparison (セグメント間比較に基づく多重DNAおよびタンパク質配列アラインメント) 」 93(22) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 12098-12103 (1996) を参照されたい] ; T-Coffee [ 例えばCedric Notredameら 「T-Coffee: a novel algorithm for multiple sequence alignment (T-Coffee : 多重配列アラインメントのための新規アルゴリズム) 」 302(1) J. Mol. Biol. 205-217 (2000) を参照されたい] ; MUSCLE [ 例えばRobert C.Edgar 「MUSCLE: Multiple sequence alignment with high score accuracy and high throughput (MUSCLE : 高いスコア正確度および高いスループットを持つ多重配列アラインメント) 」 32(5) Nucleic Acids Res. 1792-1797 (2004) を参照されたい] ; およびDIALIGN-T [ 例えばAmarendran R Subramanianら 「DIALIGN-T: An improved algorithm for segment-based multiple sequence alignment (DIALIGN-T : セグメントに基づく多重配列アラインメントのための改良されたアルゴリズム) 」 6(1) BMC Bioinformatics 66 (2005) を参照されたい] などがその例であるが、これらに限定されるわけではない。

## 【 0 0 4 6 】

本明細書で使用する「天然BoNT/A変種」という用語は、人為的操作の助けを借りずに產生される任意の活性BoNT/Aを意味し、選択的スプライシングを受けた転写物から產生されるBoNT/Aアイソフォーム、および自発的突然変異によって產生されるBoNT/Aアイソフォームを含むが、これらに限定されるわけではない。本明細書において「非天然BoNT/A変種」という用語は、人為的操作の助けを借りて產生される任意の活性BoNT/Aを意味し、無作為突然変異誘発法または合理的設計を使って遺伝子工学により製造される活性BoNT/A、および化学合成によって製造される活性BoNT/Aを含むが、これらに限定されるわけではない。

## 【 0 0 4 7 】

本明細書で使用する「保存的BoNT/A変種」という用語は、少なくとも一つのアミノ酸が、元のアミノ酸の性質と類似する少なくとも一つの性質を持つ別のアミノ酸またはアミノ酸類似体で置換されている活性BoNT/Aを意味する。性質の例には、類似するサイズ、形態、電荷、疎水性、親水性、親油性、共有結合能、水素結合能、物理化学的性質など、またはそれらの任意の組み合わせがあるが、これらに限定されるわけではない。保存的BoNT/A変種は、その保存的BoNT/A変種の元となった活性BoNT/Aと実質的に同じように機能するこ

10

20

30

40

50

とができ、本発明のどの側面においても、活性BoNT/Aの代わりに使用することができる。保存的BoNT/A変種では、その保存的BoNT/A変種の元となった活性BoNT/Aから、1個以上のアミノ酸、2個以上のアミノ酸、3個以上のアミノ酸、4個以上のアミノ酸、5個以上のアミノ酸、10個以上のアミノ酸、20個以上のアミノ酸、30個以上のアミノ酸、40個以上のアミノ酸、50個以上のアミノ酸、100個以上のアミノ酸、200個以上のアミノ酸、300個以上のアミノ酸、400個以上のアミノ酸、または500個以上のアミノ酸を置換することができる。保存的BoNT/A変種では、その保存的BoNT/A変種の元となった活性BoNT/Aから、その保存的BoNT/A変種の元となった活性BoNT/Aに対して少なくとも50%のアミノ酸一致度、65%のアミノ酸一致度、75%のアミノ酸一致度、85%のアミノ酸一致度または95%のアミノ酸一致度を持つ、少なくとも10個の連続するアミノ酸、少なくとも15個の連続するアミノ酸、少なくとも20個の連続するアミノ酸、または少なくとも25個の連続するアミノ酸を置換することもできる。  
10

#### 【0048】

本明細書で使用する「非保存的BoNT/A変種」という用語は、1) その非保存的BoNT/A変種の元となった活性BoNT/Aから少なくとも一つのアミノ酸が欠失しているか、2) その非保存的BoNT/A変種の元となった活性BoNT/Aに少なくとも一つのアミノ酸が付加されているか、または3) 少なくとも一つのアミノ酸が、元のアミノ酸の性質と類似する性質を何も共有しない別のアミノ酸またはアミノ酸類似体によって置換されている、任意の活性BoNT/Aを意味する。非保存的BoNT/A変種は、その非保存的BoNT/A変種の元となった活性BoNT/Aと実質的に同じように機能することができ、本発明のどの側面においても、活性BoNT/Aの代わりに使用することができる。非保存的BoNT/A変種では、その非保存的BoNT/A変種の元となった活性BoNT/Aから、1個以上のアミノ酸、2個以上のアミノ酸、3個以上のアミノ酸、4個以上のアミノ酸、5個以上のアミノ酸、または10個以上のアミノ酸を欠失させることができる。非保存的BoNT/A変種では、その非保存的BoNT/A変種の元となった活性BoNT/Aに、1個以上のアミノ酸、2個以上のアミノ酸、3個以上のアミノ酸、4個以上のアミノ酸、5個以上のアミノ酸、および10個以上のアミノ酸を付加することができる。非保存的BoNT/Aでは、その非保存的BoNT/A変種の元となった活性BoNT/Aから、1個以上のアミノ酸、2個以上のアミノ酸、3個以上のアミノ酸、4個以上のアミノ酸、5個以上のアミノ酸、10個以上のアミノ酸、20個以上のアミノ酸、30個以上のアミノ酸、40個以上のアミノ酸、50個以上のアミノ酸、100個以上のアミノ酸、200個以上のアミノ酸、300個以上のアミノ酸、400個以上のアミノ酸、または500個以上のアミノ酸を置換することができる。非保存的BoNT/A変種では、その非保存的BoNT/A変種の元となった活性BoNT/Aから、その非保存的BoNT/A変種の元となった活性BoNT/Aに対して少なくとも50%のアミノ酸一致度、65%のアミノ酸一致度、75%のアミノ酸一致度、85%のアミノ酸一致度または95%のアミノ酸一致度を持つ、少なくとも10個の連続するアミノ酸、少なくとも15個の連続するアミノ酸、少なくとも20個の連続するアミノ酸、または少なくとも25個の連続するアミノ酸を置換することもできる。  
20

#### 【0049】

本明細書で使用する「BoNT/Aキメラ変種」という用語は、活性BoNT/Aの少なくとも一部と少なくとも一つの他のタンパク質の少なくとも一部とを含み、その結果、活性BoNT/Aを形成している分子を意味する。そのようなBoNT/Aキメラ分子は、例えばClifford C.Shoneら「Recombinant Toxin Fragments(組換え毒素断片)」US 6,461,617(2002年10月8日); Keith A.Fosterら「Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions(末梢知覚求心機能を修飾する能力を持つクロストリジウム毒素誘導体)」US 6,395,513(2002年5月28日); Wei-Jin Linら「Neurotoxins with Enhanced Target Specificity(標的特異性が強化された神経毒)」US 2002/0137886(2002年9月26日); Keith A.Fosterら「Inhibition of Secretion from Non-neuronal Cells(非神経細胞からの分泌の阻害)」US 2003/0180289(2003年9月25日); J. Oliver Dollyら「Activatable Recombinant Neurotoxins(活性化可能な組換え神経毒)」WO 2001/014570(2001年3月1日); Clifford C.Shoneら「Recombinant Toxin Fragments(組換え毒素断片)」  
30

」WO 2004/024909 (2004年3月25日)；およびKeith A.Fosterら「Re-targeted Toxin Conjugates(標的を変えた毒素コンジュゲート)」WO 2005/023309 (2005年3月17日)などに記載されている。

#### 【0050】

また、さまざまな活性BoNT/A断片はいずれも、活性BoNT/Aが基質をタンパク質分解的に切斷する際に用いる細胞機序全体をそれらの活性断片が遂行できる限り、本発明の諸側面において、有用であることができると想定される。したがってこの態様の諸側面は、例えば少なくとも300アミノ酸、少なくとも400アミノ酸、少なくとも500アミノ酸、少なくとも600アミノ酸、少なくとも700アミノ酸、少なくとも800アミノ酸、少なくとも900アミノ酸、少なくとも1000アミノ酸、少なくとも1100アミノ酸および少なくとも1200アミノ酸の長さを持つ活性BoNT/A断片を包含することができる。この態様の別の側面は、例えば多くとも300アミノ酸、多くとも400アミノ酸、多くとも500アミノ酸、多くとも600アミノ酸、多くとも700アミノ酸、多くとも800アミノ酸、多くとも900アミノ酸、多くとも1000アミノ酸、多くとも1100アミノ酸および多くとも1200アミノ酸の長さを持つ活性BoNT/A断片を包含することができる。10

#### 【0051】

したがって、ある態様では、本明細書に開示する改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子は、活性BoNT/Aをコードする。この態様の別の側面は、天然BoNT/A変種（例えばBoNT/Aアイソフォームなど）、非天然BoNT/A変種（例えば保存的BoNT/A変種、非保存的BoNT/A変種および活性BoNT/A断片など）、またはそれらの任意の組み合わせを包含する。もう一つの態様では、本明細書に開示する改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子は、配列番号1を含む活性BoNT/Aをコードする。この態様の別の側面は、配列番号1の天然BoNT/A変種（例えば配列番号1のBoNT/Aアイソフォームなど）、配列番号1の非天然BoNT/A変種（例えば配列番号1の保存的BoNT/A変種、配列番号1の非保存的BoNT/A変種および配列番号1の活性BoNT/A断片など）、またはそれらの任意の組み合わせを包含する。20

#### 【0052】

この態様のさらに別の側面において、活性BoNT/Aは、例えば、配列番号1と少なくとも70%のアミノ酸一致度、配列番号1と少なくとも75%のアミノ酸一致度、配列番号1と少なくとも80%のアミノ酸一致度、配列番号1と少なくとも85%のアミノ酸一致度、配列番号1と少なくとも90%のアミノ酸一致度または配列番号1と少なくとも95%のアミノ酸一致度を持つ。この態様のさらに別の側面において、活性BoNT/Aは、例えば、配列番号1と多くとも70%のアミノ酸一致度、配列番号1と多くとも75%のアミノ酸一致度、配列番号1と多くとも80%のアミノ酸一致度、配列番号1と多くとも85%のアミノ酸一致度、配列番号1と多くとも90%のアミノ酸一致度、配列番号1と多くとも95%のアミノ酸一致度を持つ。30

#### 【0053】

この態様の別の側面では、活性BoNT/Aが、配列番号1と比較して、例えば多くとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、20個、30個、40個、50個、100個、200個または500個の連続していないアミノ酸置換を持つ。この態様の別の側面では、活性BoNT/Aが、配列番号1と比較して、例えば少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、20個、30個、40個、50個、100個、200個または500個の連続していないアミノ酸置換を持つ。この態様のさらに別の側面では、活性BoNT/Aが、配列番号1と比較して、例えれば多くとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、20個、30個、40個、50個、100個、200個または500個の連続していないアミノ酸欠失を持つ。この態様のさらに別の側面では、活性BoNT/Aが、配列番号1と比較して、例えれば少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、20個、30個、40個、50個、100個、200個または500個の連続していないアミノ酸付加を持つ。この態様の別の側面では、活性BoNT/Aが、配列番号1と比較して、例えれば少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、20個、30個、40個、50個、100個、200個または500個の連続していないアミノ酸付加を持つ。40

この態様のさらに別の側面では、活性BoNT/Aが、配列番号1と比較して、例えれば少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、20個、30個、40個、50個、100個、200個または500個の連続していないアミノ酸付加を持つ。50

、40個、50個、100個、200個または500個の連続していないアミノ酸付加を持つ。

【0054】

この態様の別の側面では、活性BoNT/Aが、配列番号1と比較して、例えば多くとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、20個、30個、40個、50個、100個、200個または500個の連続したアミノ酸置換を持つ。この態様の別の側面では、活性BoNT/Aが、配列番号1と比較して、例えば少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、20個、30個、40個、50個、100個、200個または500個の連続したアミノ酸置換を持つ。この態様のさらに別の側面では、活性BoNT/Aが、配列番号1と比較して、例えば多くとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、20個、30個、40個、50個、100個、200個または500個の連続したアミノ酸欠失を持つ。この態様のさらに別の側面では、活性BoNT/Aが、配列番号1と比較して、例えば少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、20個、30個、40個、50個、100個、200個または500個の連続したアミノ酸欠失を持つ。この態様のさらに別の側面では、活性BoNT/Aが、配列番号1と比較して、例えば多くとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、20個、30個、40個、50個、100個、200個または500個の連続したアミノ酸付加を持つ。この態様の別の側面では、活性BoNT/Aが、配列番号1と比較して、例えば少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、20個、30個、40個、50個、100個、200個または500個の連続したアミノ酸付加を持つ。

10

【0055】

本発明の諸側面は、一つには、異種細胞を提供する。本明細書で使用する「異種細胞」という用語は、当該クロストリジウム毒素が発見される元となった本来のクロストリジウム株以外の細胞であって、本明細書に開示する活性BoNT/Aを発現させるか、発現させるように操作することができる任意の細胞を意味する。したがって、例えば、活性BoNT/Aをコードする改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子を発現させる異種細胞は、A血清型を産生するボツリヌス菌株以外の任意の原核細胞または真核細胞であるだろう。異種細胞という用語は、細菌株、酵母株、植物細胞および植物由来の細胞系、昆虫細胞および昆虫由来の細胞系、ならびに哺乳動物細胞および哺乳動物由来の細胞系を含む（ただしこれらに限定されるわけではない）、さまざまな生物に由来する細胞を包含する。本発明の諸側面において有用な細胞としては、初代細胞、培養細胞、樹立細胞、正常細胞、形質転換細胞、腫瘍細胞、感染細胞、増殖性最終分化細胞、および安定トランسفェクト細胞または一過性トランسفェクト細胞などが挙げられるが、これらに限定されるわけではないと理解される。さらに、本発明の諸側面において有用な細胞は、例えば増殖状態または静止状態、無傷の状態または透過処理された状態、例えば化学的トランسفェクション（例えばリン酸カルシウム法、ジエチルアミノエチル（DEAE）デキストララン法、脂質法、ポリエチレンイミン（PEI）法およびポリブレン法）、物理的トランسفェクション（例えばバイオリストリック粒子送達、マイクロインジェクションおよびエレクトロポレーション）、およびウイルスによるトランسفェクション（例えばレトロウイルスによるトランسفェクション）などによって透過処理された状態など、任意の状態にあることができると理解される。さらに、本発明の諸側面において有用な細胞には、構成的、組織特異的、細胞特異的もしくは誘導性であるプロモーター要素、エンハンサー要素、またはその両者の制御を受けて活性BoNT/Aを発現させる細胞が含まれうると理解される。

20

30

40

【0056】

具体的な異種細胞の選択には広範囲にわたる種々の因子が影響を及ぼしうるので、さまざまな原核細胞および真核細胞で発現させるために、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子を設計することができる。原核生物および真核生物に関するコドン使用頻度表およびG+C含量情報は、URLアドレス [www.kazusa.or.jp/codon](http://www.kazusa.or.jp/codon) のかずさDNA研究所コドン使用頻度データベース（2004）によって公的に維持されている。

【0057】

したがって、ある態様では、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる改変オ-

50

10 プンリーディングフレームを含む核酸分子を、原核細胞中で発現させる。原核細胞の限定でない例には、好気性細菌細胞、微好気性細菌細胞、好二酸化炭素性細菌細胞、通性細菌細胞、嫌気性細菌細胞、グラム陰性細菌細胞およびグラム陽性細菌細胞の株、例えば大腸菌、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、バチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*)、バクテロイデス・フラギリス (*Bacteroides fragilis*)、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)、クロストリジウム・ディフィシレ (*Clostridia difficile*)、カウロバクター・クレセンタス (*Caulobacter crescentus*)、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*)、メチロバクテリウム・エキストルクエンス (*Methylobacterium extorquens*)、ナイセリア・メニンギルルス (*Neisseria meningitidis*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*) およびネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) に由来する株などがある。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を大腸菌株で発現させる。この態様の別の側面では、大腸菌株で発現させる核酸分子が、例えば配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号110、配列番号112および配列番号122～配列番号125のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子をバクテロイデス・フラギリス (*B. fragilis*) 株で発現させる。この態様の別の側面では、バクテロイデス・フラギリス株で発現させる核酸分子が、例えば配列番号7、配列番号8または配列番号9のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、バチルス・リケニホルミス (*B. licheniformis*) 株で発現させる。この態様の別の側面では、バチルス・リケニホルミス株で発現させる核酸分子が、例えば配列番号10、配列番号11または配列番号12のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、枯草菌 (*B. subtilis*) 株で発現させる。この態様の別の側面では、枯草菌株で発現させる核酸が、例えば配列番号13、配列番号14または配列番号15のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、カウロバクター・クレセンタス (*C. crescentus*) 株で発現させる。この態様の別の側面では、カウロバクター・クレセンタスで発現させる核酸分子が、例えば配列番号16、配列番号17または配列番号18のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、クロストリジウム・ディフィシレ (*C. difficile*) 株で発現させる。この態様のもう一つの側面では、クロストリジウム・ディフィシレ株で発現させる核酸分子が、例えば配列番号19、配列番号20または配列番号21のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ウェルシュ菌株で発現させる。この態様の別の側面では、ウェルシュ菌株で発現させる核酸分子が、例えば配列番号22、配列番号23または配列番号24のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ラクトコッカス・ラクティス (*L. lactis*) 株で発現させる。この態様の別の側面では、ラクトコッカス・ラクティス株で発現させる核酸分子が、例えば配列番号25、配列番号26または配列番号27のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、メチロバクテリウム・エキストルクエンス (*M. extorquens*) 株で発現させる。この態様のもう一つの側面では、メチロバクテリウム・エキストルクエンス株で発現させる核酸分子が、例えば配列番号28、配列番号29または配列番号30のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ナイセリア・メニンギルルス (*N. meningitidis*) 株で発現させる。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、シュードモナス・フルオレッセンス (*P. fluorescens*) 株で発現させる。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ネズミチフス菌 (*S. typhimurium*) 株で発現させる。この態様の別の側面では、ネズミチフス菌株で発現させる核酸分子が、例えば配列番号31、配列番号32または配列番号33のオープンリーディングフレームを含む。

## 【0058】

もう一つの態様では、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子を、真核細胞または真核細胞に由来する細胞系で発現

10

20

30

40

50

させる。この態様の諸側面では、真核細胞または真核細胞に由来する細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号34～配列番号99のオープンリーディングフレームのいずれか一つを含む。

#### 【0059】

さらにもう一つの態様では、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸配列分子を、酵母株で発現させる。酵母株の限定でない例には、ピキア・パストリス、ピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*)、ピキア・アングスタ (*Pichia angusta*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、サッカロミセス・セレビシェ (*Saccharomyces cerevisiae*) およびヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) などに由来する株がある。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ピキア・パストリス (*P. pastoris*) 株で発現させる。この態様の別の側面では、ピキア・パストリス株で発現させる核酸分子が、例えば配列番号34、配列番号35または配列番号36のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ピキア・メタノリカ (*P. methanolica*) 株で発現させる。この態様の別の側面では、ピキア・メタノリカ株で発現させる核酸分子が、例えば配列番号34、配列番号35または配列番号36のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ピキア・アングスタ (*P. angusta*) 株で発現させる。この態様の別の側面では、ピキア・アングスタ株で発現させる核酸分子が、例えば配列番号34、配列番号35または配列番号36のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、サッカロミセス・セレビシェ (*S. cerevisiae*) 株で発現させる。この態様の別の側面では、サッカロミセス・セレビシェ株で発現させる核酸分子が、例えば配列番号37、配列番号38または配列番号39のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、シゾサッカロミセス・ポンベ (*S. pombe*) 株で発現させる。この態様の別の側面では、シゾサッカロミセス・ポンベ株で発現させる核酸分子が、例えば配列番号40、配列番号41または配列番号42のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ヤロウイア・リポリティカ (*Y. lipolytica*) 株で発現させる。この態様の別の側面では、ヤロウイア・リポリティカ株で発現させる核酸分子が、例えば配列番号43、配列番号44または配列番号45のオープンリーディングフレームを含む。

#### 【0060】

さらにもう一つの態様では、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸配列分子を、粘菌株で発現させる。粘菌株の限定でない例には、キイロタマホコリカビ (*Dictyostelium discoideum*) などに由来する株がある。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子をキイロタマホコリカビ (*D. discoideum*) 株で発現させる。この態様の別の側面では、キイロタマホコリカビ株で発現させる核酸分子が、例えば配列番号46、配列番号47または配列番号48のオープンリーディングフレームを含む。

#### 【0061】

さらにもう一つの態様では、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸配列分子を、植物細胞で発現させる。植物細胞および植物細胞に由来する細胞系の限定でない例には、単子葉植物種（例えばトウモロコシ (*Zea mays*) など）に由来するもの、および双子葉植物種（例えばシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、コムギ (*Triticum aestivum*)、イボウキクサ (*Lemna gibba*) およびコウキクサ (*Lemna minor*) など）に由来するものなどがある。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、単子葉植物細胞または単子葉植物細胞に由来する細胞系で発現させる。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、双子葉植物細胞または双子葉植物細胞に由来する細胞系で発現させる。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、シロイヌナズナ (*A. thaliana*) 細胞またはシロイヌナズナ細胞に由来する細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、シロイヌナズナ細胞またはシ

10

20

30

40

50

ロイヌナズナ細胞に由来する細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号49、配列番号50または配列番号51のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、コムギ (*T. aestivum*) 細胞またはシロイヌナズナ細胞に由来する細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、シロイヌナズナ細胞またはコムギ細胞に由来する細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号52、配列番号53または配列番号54のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子をトウモロコシ (*Z. mays*) 細胞またはトウモロコシ細胞に由来する細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、トウモロコシ細胞またはトウモロコシ細胞に由来する細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号55、配列番号56または配列番号57のオープンリーディングフレームを含む。

10

## 【0062】

さらにもう一つの態様では、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸配列分子を、昆虫細胞または昆虫に由来する細胞系で発現させる。昆虫細胞および昆虫に由来する細胞系の限定でない例には、ヨトウガ (*Spodoptera frugiperda*)、イラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*)、キイロショウジョウバエおよびタバコスズメガ (*Manduca sexta*) などに由来するものがある。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、キイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) 細胞またはキイロショウジョウバエに由来する細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、キイロショウジョウバエ細胞またはキイロショウジョウバエに由来する細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号58、配列番号59または配列番号60のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ヨトウガ (*S. frugiperda*) 株またはヨトウガに由来する細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、ヨトウガ細胞またはヨトウガに由来する細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号61、配列番号62または配列番号63のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、イラクサギンウワバ (*T. ni*) 細胞またはイラクサギンウワバに由来する細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、イラクサギンウワバ細胞またはイラクサギンウワバに由来する細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号61、配列番号62または配列番号63のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、タバコスズメガ (*M. sexta*) 株またはタバコスズメガに由来する細胞系で発現させる。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子をSf9細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、Sf9細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号61、配列番号62または配列番号63のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子をSf21細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、Sf21細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号61、配列番号62または配列番号63のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子をHigh-Five細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、High-Five細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号61、配列番号62または配列番号63のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、シュナイダーショウジョウバエ株2 (S2) 細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、シュナイダーショウジョウバエ株2 (S2) 細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号58、配列番号59または配列番号60のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子をKc細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、Kc細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号58、配列番号59または配列番号60のオープンリーディングフレームを含む。

20

30

40

## 【0063】

さらにもう一つの態様では、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸配列分子を、魚類細胞または魚類細胞に由来する細胞系で発現させる。魚類細胞および魚類細胞に由来する細胞系の限定でない例には、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) などに由来するものがある。この態様の一側面では、本明

50

細書に開示する核酸分子を、ゼブラフィッシュ (*D. rerio*) 細胞またはゼブラフィッシュに由来する細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、ゼブラフィッシュ細胞またはゼブラフィッシュに由来する細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号64、配列番号65または配列番号66のオープンリーディングフレームを含む。

#### 【0064】

さらにもう一つの態様では、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸配列分子を、両生類細胞で発現させる。両生類細胞および両生類細胞に由来する細胞系の限定でない例には、ゼノパス (*Xenopus*) などに由来するものがある。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、アフリカツメガエル (*X. laevis*) 細胞またはアフリカツメガエルに由来する細胞系で発現させる。  
この態様の別の側面では、アフリカツメガエル細胞またはアフリカツメガエルに由来する細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号67、配列番号68または配列番号69のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ニシツメガエル (*X. tropicalis*) 細胞またはニシツメガエル由来の細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、ニシツメガエル細胞またはニシツメガエル由来の細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号70、配列番号71または配列番号72のオープンリーディングフレームを含む。

10

#### 【0065】

さらにもう一つの態様では、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸配列分子を、鳥類細胞で発現させる。鳥類細胞および鳥類細胞に由来する細胞系の限定でない例には、ニワトリ (*Gallus gallus*) などに由来するものがある。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ニワトリ (*G. gallus*) 細胞またはニワトリ由来の細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、ニワトリ細胞またはニワトリ由来の細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号73、配列番号74または配列番号75のオープンリーディングフレームを含む。

20

#### 【0066】

さらにもう一つの態様では、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸配列分子を、哺乳動物細胞で発現させる。哺乳動物細胞および哺乳動物細胞に由来する細胞系の限定でない例には、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、ウシ、ウマ、靈長類およびヒトなどに由来するものがある。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、マウス細胞またはマウス由来の細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、マウス細胞またはマウス由来の細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号76、配列番号77または配列番号78のオープンリーディングフレームを含む。この態様のさらにもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ハツカネズミ (*Mus musculus*) 細胞またはハツカネズミ (*M. musculus*) 由来の細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、ハツカネズミ細胞またはハツカネズミ由来の細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号76、配列番号77または配列番号78のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を10T1/2細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、10T1/2細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号76、配列番号77または配列番号78のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をBALB/3T3細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、BALB/3T3細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号76、配列番号77または配列番号78のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をL-M細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、L-M細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号76、配列番号77または配列番号78のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をNB4細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、NB4細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号76、配列番号77または配列番号78のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子を1A3細胞系で発現させる。この態様のさらに別

30

40

50

の側面では、1A3細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号76、配列番号77または配列番号78のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子を、NIE-115細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、NIE-115細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号76、配列番号77または配列番号78のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をNG108-15細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、NG108-15細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号76、配列番号77または配列番号78のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をNIH3T3細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、NIH3T3細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号76、配列番号77または配列番号78のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をNCTC細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、NCTC細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号76、配列番号77または配列番号78のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をNeuro-2A細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、Neuro-2A細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号76、配列番号77または配列番号78のオープンリーディングフレームを含む。

10

20

30

40

#### 【0067】

この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子をラット細胞またはラット由来の細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、ラット細胞またはラット由来の細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号79、配列番号80または配列番号81のオープンリーディングフレームを含む。この態様のさらにもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ドブネズミ (*Rattus norvegicus*) 細胞またはドブネズミ (*R. norvegicus*) 由来の細胞系で発現させる。この態様のさらにもう一つの側面では、ドブネズミ細胞またはドブネズミ由来の細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号79、配列番号80または配列番号81のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子をPC12細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、PC12細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号79、配列番号80または配列番号81のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をGH1細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、GH1細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号79、配列番号80または配列番号81のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をGH3細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、GH3細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号79、配列番号80または配列番号81のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をC6細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、C6細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号79、配列番号80または配列番号81のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をL2細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、L2細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号79、配列番号80または配列番号81のオープンリーディングフレームを含む。

50

50

#### 【0068】

この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ハムスター細胞またはハムスター由来の細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、ハムスター細胞またはハムスター由来の細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号82、配列番号83または配列番号84のオープンリーディングフレームを含む。この態様のさらにもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子を、モンゴルキヌゲネズミ (*Cricetulus griseus*) 細胞またはモンゴルキヌゲネズミ (*C. griseus*) 由来の細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、モンゴルキヌゲネズミ細胞またはモンゴルキヌゲネズミ由来の細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号82、配列番号83または配列番号84のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子をCHO細胞系で

発現させる。この態様の別の側面では、CHO細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号82、配列番号83または配列番号84のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子を6E6細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、6E6細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号82、配列番号83または配列番号84のオープンリーディングフレームを含む。

#### 【0069】

この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ブタ由来の細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、ブタ細胞またはブタ由来の細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号85、配列番号86または配列番号87のオープンリーディングフレームを含む。この態様のさらにもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子を、イノシシ (*Sus scrofa*) 細胞またはイノシシ (*S. scrofa*) 由来の細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、イノシシ細胞またはイノシシ由来の細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号85、配列番号86または配列番号87のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子をPK15細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、PK15細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号85、配列番号86または配列番号87のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をLLC-PK1細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、LLC-PK1細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号85、配列番号86または配列番号87のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をST細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、ST細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号85、配列番号86または配列番号87のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をESK-4細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、ESK-4細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号85、配列番号86または配列番号87のオープンリーディングフレームを含む。

#### 【0070】

この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ウシ細胞またはウシ由来の細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、ウシ細胞またはウシ由来の細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号88、配列番号89または配列番号90のオープンリーディングフレームを含む。この態様のさらにもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ボス・タウルス (*Bos taurus*) 細胞またはボス・タウルス (*B. taurus*) 由来の細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、ボス・タウルス細胞またはボス・タウルス由来の細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号88、配列番号89または配列番号90のオープンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子をCPAE細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、CPAE細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号88、配列番号89または配列番号90のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をBT細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、BT細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号88、配列番号89または配列番号90のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をSBAC細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、SBAC細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号88、配列番号89または配列番号90のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をFB2細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、FB2細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号88、配列番号89または配列番号90のオープンリーディングフレームを含む。

#### 【0071】

この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ウマ細胞またはウマ由来の細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、ウマ細胞またはウマ由来の細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号91、配列番号92または配列番号93のオープンリーディングフレームを含む。この態様のさらにもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子

10

20

30

40

50

を、エクウス・カバルス (Equus caballus) 細胞またはエクウス・カバルス (E. caballus) 由来の細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、エクウス・カバルス細胞またはエクウス・カバルス由来の細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号91、配列番号92または配列番号93のオーブンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子をNBL-6細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、NBL-6細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号91、配列番号92または配列番号93のオーブンリーディングフレームを含む。

【0072】

この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を靈長類細胞または靈長類由来の細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、靈長類細胞または靈長類由来の細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号94、配列番号95または配列番号96のオーブンリーディングフレームを含む。この態様のさらにもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子を、サバンナモンキー (Cercopithecus aethiops) 細胞またはサバンナモンキー (C. aethiops) 由来の細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、サバンナモンキー細胞またはサバンナモンキー由来の細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号94、配列番号95または配列番号96のオーブンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子をCOS-1細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、COS-1細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号94、配列番号95または配列番号96のオーブンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をCOS-7細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、COS-7細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号94、配列番号95または配列番号96のオーブンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をVV-1細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、VV-1細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号94、配列番号95または配列番号96のオーブンリーディングフレームを含む。

【0073】

この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ヒト細胞またはヒト由来の細胞系で発現させる。この態様のもう一つの側面では、ヒト細胞またはヒト由来の細胞系で発現せる核酸分子が、例えば配列番号97、配列番号98または配列番号99のオーブンリーディングフレームを含む。この態様のさらにもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子を、ホモ・サピエンス (Homo sapiens) 細胞またはホモ・サピエンス (H. sapiens) 由来の細胞系で発現させる。この態様のもう一つの側面では、ホモ・サピエンス細胞またはホモ・サピエンス由来の細胞系で発現せる核酸分子が、例えば配列番号97、配列番号98または配列番号99のオーブンリーディングフレームを含む。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子をSH-SY5Y細胞系で発現させる。この態様の別の側面では、SH-SY5Y細胞系で発現せる核酸分子が、例えば配列番号97、配列番号98または配列番号99のオーブンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をSK-N-DZ細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、SK-N-DZ細胞系で発現せる核酸分子が、例えば配列番号97、配列番号98または配列番号99のオーブンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をSK-N-SH細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、SK-N-SH細胞系で発現せる核酸分子が、例えば配列番号97、配列番号98または配列番号99のオーブンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をBE(2)-C細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、BE(2)-C細胞系で発現せる核酸分子が、例えば配列番号97、配列番号98または配列番号99のオーブンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をHeLa細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、HeLa細胞系で発現せる核酸分子が、例えば配列番号97、配列番号98または配列番号99のオーブンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をHEK293細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、HEK293細胞系で発現せる核酸分子が、例

10

20

30

40

50

えば配列番号97、配列番号98または配列番号99のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をMCF-7細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、MCF-7細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号97、配列番号98または配列番号99のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をHepG2細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、HepG2細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号97、配列番号98または配列番号99のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をHL-60細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、HL-60細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号97、配列番号98または配列番号99のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をIMR-32細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、IMR-32細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号97、配列番号98または配列番号99のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をSW-13細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、SW-13細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号97、配列番号98または配列番号99のオープンリーディングフレームを含む。この態様のもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子をCHP3細胞系で発現させる。この態様のさらに別の側面では、CHP3細胞系で発現させる核酸分子が、例えば配列番号97、配列番号98または配列番号99のオープンリーディングフレームを含む。

#### 【0074】

本明細書に開示する核酸分子は、一つには、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む。活性BoNT/Aの発現の増加は、改変オープンリーディングフレームから発現される活性BoNT/Aの量を、他の点では同一である核酸分子中の無改変オープンリーディングフレームから発現される同じ活性BoNT/Aの量と比較することによって決定される。本明細書で使用する「改変オープンリーディングフレーム」という用語は、コードされている活性BoNT/Aの定量的および定性的発現を増加させる少なくとも一つのスクレオチド変化を含有するオープンリーディングフレームを意味する。本明細書で使用する「無改変オープンリーディングフレーム」という用語は、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させるスクレオチド変化を含有していないオープンリーディングフレームを意味する。限定でない一例として、配列番号2、配列番号114および配列番号115は、コードされている活性BoNT/Aの異種細胞における発現を増加させないであろう無改変オープンリーディングフレームであり、配列番号3～配列番号99、配列番号110、配列番号112および配列番号122～配列番号125は、適当な異種細胞において、コードされている活性BoNT/Aの発現を増加させることができる改変オープンリーディングフレームである。さらに、正確かつ一貫した比較を確保するために、改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子を発現させるために使用する方法および手順は、無改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子を発現させるために使用する方法および手順と同じであるか類似しているべきであると、当業者には理解される。

#### 【0075】

改変オープンリーディングフレームから発現された活性BoNT/Aの量を、他の点では同一である核酸分子中の無改変オープンリーディングフレームから発現された同じ活性BoNT/Aの量と比較するには、広範囲にわたる種々の確立された方法を使用することができる。発現された活性BoNT/Aの量の比較は、定量的比較であることも、定性的比較であることもできる。

#### 【0076】

活性BoNT/A量は、細胞溶解物からタンパク質を分離し可視化することができる任意の手法（例えば、ゲル電気泳動およびタンパク質染色、ウェスタンプロットティング、タンパク質ラベリングを伴う手法、ならびにタンパク質の分離および可視化を伴う他の手法）を使って測定することができる。例えば活性BoNT/Aの量は、活性BoNT/Aを放射性アミノ酸トレーサーで標識し、ゲル電気泳動後のオートラジオグラフィーで発現を可視化することによ

10

20

30

40

50

って見積ることができる。同様に、活性BoNT/Aへの放射標識アミノ酸の組み込みを、トリクロロ酢酸(TCA)沈殿後のシンチレーション計数によって測定することもできる。活性BoNT/Aの量は、ゲル電気泳動で分離したタンパク質を、例えばクーマシープリリアントブルーやコロイドクーマシープリリアントブルーのような色素染色法を使って、またはSYPRO(登録商標)ルビーやルテニウムIIのような蛍光染色法を使って、または銀染色法を使って染色することにより、評価することもできる。活性BoNT/Aの量は、ウェスタンプロット解析後の抗体染色によって、同様に決定することができる。さらにまた、例えばSNAP25切断アッセイおよびGFP-SNAP25蛍光放出アッセイなどといった活性BoNT/Aの生物学的活性を測定する機能アッセイを使って、改変オープンリーディングフレームから発現された活性BoNT/Aの量を、他の点では同一である核酸分子中の無改変オープンリーディングフレームから発現された同じ活性BoNT/Aの量と比較することもできる。タンパク質量を分離し可視化するための具体的手法ならびに詳細に特徴づけられた試薬類、条件およびプロトコールの限定でない例は、Amersham Biosciences(ニュージャージー州ピスカタウェイ)、Bio-Rad Laboratories(カリフォルニア州ハーキュリーズ)、Pierce Biotechnology, Inc.(イリノイ州ロックフォード)、Promega Corporation(ウィスコンシン州マディソン)およびStratagene(カリフォルニア州ラホーヤ)などの供給業者(ただしこれらに限定されるわけではない)から、容易に入手することができる。また、タンパク質を分離し、可視化し、定量するための具体的プロトコールの限定でない例は、「MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL」前掲(2001)および「CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY」前掲(2004)などに記述されている。これらのプロトコールは、本明細書の教示内容からして当業者には十分に可能な日常的作業である。

10

20

30

40

50

## 【0077】

活性BoNT/A量は、例えばゲル電気泳動およびタンパク質染色、ウェスタンプロッティング、タンパク質ラベリング、UV吸光度、ローリーアッセイ、ビューレットアッセイ、スミス銅/ビシンコニン酸(BCA)アッセイ、およびプラッドフォード色素アッセイなど(ただしこれらに限定されるわけではない)を使って、一つ以上の精製段階後に測定することができる(例えばChristine V.Sapanら「Colorimetric Protein Assay Techniques(比色法によるタンパク質アッセイ技法)」29(2) Biotechnol. Appl. Biochem. 99-108, (1999)を参照されたい)。本明細書に開示する活性BoNT/Aの精製には、さまざまな方法をどれでも使用することができる。精製方法の例には、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、レクチンクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、疎水相互作用クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(fast performance liquid chromatography:FPLC)、および高性能液体クロマトグラフィー(high performance liquid chromatography:HPLC)などがあるが、これらに限定されるわけではない。関心対象である標的ペプチドの結合部分は、樹脂、アガロース、および磁気ビーズなどといった(ただしこれらに限定されるわけではない)さまざまな物質のどれにでも取付けることができる。また、バッチ式処理および重力落下式カラムなどといった(ただしこれらに限定されるわけではない)さまざまな処理技法を、どれでも使用することができる。本明細書に開示する核酸分子がコードする機能的に活性なBoNT/Aを確実に回収するには、タンパク質再折り畳み段階が必要になることもありうる。具体的プロトコールの限定でない例は、John Abelsonら「GUIDE TO PROTEIN PURIFICATION」(Academic Press, 1990)、「PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE」(Robert K.Scopesら編, Springer Verlag, 第3版, 1994)、「PROTEIN PURIFICATION TECHNIQUES: A PRACTICAL APPROACH」(Simon Roe編, Oxford University Press, 第2版, 2001)、「MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL」前掲(2001)、Ian M.Rosenberg「PROTEIN ANALYSIS & PURIFICATION: BENCHTOP TECHNIQUES」(Springer Verlag, 2002)などに記載されている。これらのプロトコールは、本明細書の教示内容からして当業者には十分に可能な日常的作業である。

**【 0 0 7 8 】**

したがって、ある態様では、改変オーブンリーディングフレームから発現される活性BoNT/Aの量が、無改変オーブンリーディングフレームから発現される同じ活性BoNT/Aの量と比較して増加する。改変オーブンリーディングフレームおよび無改変オーブンリーディングフレームを除けば、オーブンリーディングフレームを含む核酸分子は、類似する性質または同一の性質を持つと想定される。この態様の諸側面では、改変オーブンリーディングフレームから発現される活性BoNT/Aの量は、例えば、他の点では同一な核酸分子中の無改変オーブンリーディングフレームから発現される同じBoNT/Aの量と比較して少なくとも1.5倍増加するか；他の点では同一な核酸分子中の無改変オーブンリーディングフレームから発現される同じBoNT/Aの量と比較して少なくとも2倍増加するか；他の点では同一な核酸分子中の無改変オーブンリーディングフレームから発現される同じBoNT/Aの量と比較して少なくとも3倍増加するか；他の点では同一な核酸分子中の無改変オーブンリーディングフレームから発現される同じBoNT/Aの量と比較して少なくとも4倍増加するか；他の点では同一な核酸分子中の無改変オーブンリーディングフレームから発現される同じBoNT/Aの量と比較して少なくとも5倍増加するか；他の点では同一な核酸分子中の無改変オーブンリーディングフレームから発現される同じBoNT/Aの量と比較して少なくとも10倍増加するか；他の点では同一な核酸分子中の無改変オーブンリーディングフレームから発現される同じBoNT/Aの量と比較して少なくとも25倍増加するか；他の点では同一な核酸分子中の無改変オーブンリーディングフレームから発現される同じBoNT/Aの量と比較して少なくとも100倍増加するか；または他の点では同一な核酸分子中の無改変オーブンリーディングフレームから発現される同じBoNT/Aの量と比較して少なくとも200倍増加する。

10

20

30

40

**【 0 0 7 9 】**

この態様の諸側面では、改変オーブンリーディングフレームから発現される活性BoNT/Aの量が、例えば、他の点では同一な核酸分子中の無改変オーブンリーディングフレームから発現される同じBoNT/Aの量と比較して多くとも1.5倍増加するか；他の点では同一な核酸分子中の無改変オーブンリーディングフレームから発現される同じBoNT/Aの量と比較して多くとも2倍増加するか；他の点では同一な核酸分子中の無改変オーブンリーディングフレームから発現される同じBoNT/Aの量と比較して多くとも3倍増加するか；他の点では同一な核酸分子中の無改変オーブンリーディングフレームから発現される同じBoNT/Aの量と比較して多くとも4倍増加するか；他の点では同一な核酸分子中の無改変オーブンリーディングフレームから発現される同じBoNT/Aの量と比較して多くとも5倍増加するか；他の点では同一な核酸分子中の無改変オーブンリーディングフレームから発現される同じBoNT/Aの量と比較して多くとも10倍増加するか；他の点では同一な核酸分子中の無改変オーブンリーディングフレームから発現される同じBoNT/Aの量と比較して多くとも25倍増加するか；他の点では同一な核酸分子中の無改変オーブンリーディングフレームから発現される同じBoNT/Aの量と比較して多くとも100倍増加するか；または他の点では同一な核酸分子中の無改変オーブンリーディングフレームから発現される同じBoNT/Aの量と比較して多くとも200倍増加する。

50

**【 0 0 8 0 】**

本発明の別の側面は、本明細書に開示する核酸分子がその核酸分子を異種細胞中で発現させるのに有用な発現ベクターに作動可能に連結されてなる発現コンストラクトを提供する。例えば、コードされている活性BoNT/Aの原核細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子を発現させるのに有用な原核発現ベクター；コードされている活性BoNT/Aの酵母細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子を発現させるのに有用な酵母発現ベクター；コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子を発現させるのに有用な昆虫発現ベクター；コードされている活性BoNT/Aの哺

50

乳動物細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子を発現させるのに有用な哺乳動物発現ベクター、およびコードされている活性BoNT/Aの無細胞抽出物における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む無細胞抽出物中の核酸分子を発現させるのに有用な発現ベクターなど（ただしこれらに限定されるわけではない）、広範囲にわたるさまざまな発現ベクターが想定される。

### 【0081】

本明細書に開示する発現コンストラクトは、一つには、核酸分子を含む。本明細書に開示する核酸分子は全て使用することができると想定される。したがってこの態様の諸側面には、コードされている活性BoNT/Aの原核細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子；コードされている活性BoNT/Aの酵母細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子；コードされている活性BoNT/Aの粘菌細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子；コードされている活性BoNT/Aの植物細胞または植物細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子；コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞または昆虫細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子；コードされている活性BoNT/Aの魚類細胞または魚類細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子；コードされている活性BoNT/Aの両生類細胞または両生類細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子；コードされている活性BoNT/Aの鳥類細胞または鳥類細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子；およびコードされている活性BoNT/Aの哺乳動物細胞または哺乳動物細胞（例えばマウス、ラット、ハムスター、ブタ、ウシ、ウマ、靈長類およびヒト）由来の細胞系における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

10

20

30

40

### 【0082】

本明細書に開示する発現コンストラクトは、一つには、異種細胞を含む。本明細書に開示する異種細胞は全て使用することができると想定される。したがってこの態様の諸側面には、例えば原核細胞、限定するわけではないが、好気性細菌細胞、微好気性細菌細胞、好二酸化炭素性細菌細胞、通性細菌細胞、嫌気性細菌細胞、グラム陰性細菌細胞およびグラム陽性細菌細胞の株（例えば大腸菌、枯草菌、バチルス・リケニホルミス、バクテロイデス・フラギリス、ウェルシュ菌、クロストリジウム・ディフィシレ、カウロバクター・クレセンタス、ラクトコッカス・ラクティス、メチロバクテリウム・エキストルクエンス、ナイセリア・メニンギルルス、髄膜炎菌、シードモナス・フルオレッセンスおよびネズミチフス菌に由来する株など）；および真核細胞、限定するわけではないが、酵母株（例えばピキア・パストリス、ピキア・メタノリカ、ピキア・アンゲスタ、シゾサッカロミセス・ポンベ、サッカロミセス・セレビシェおよびヤロウイア・リポリティカに由来する株など）；粘菌株（例えばキイロタマホコリカビなどに由来するものなど）；植物細胞および植物細胞由来の細胞系（例えば单子葉植物種、双子葉植物種、トウモロコシおよびシロイヌナズナに由来するものなど）；昆虫細胞および昆虫由来の細胞系（例えばヨトウガ、イラクサギンウワバ、キイロショウジョウバエおよびタバコスズメガに由来するものなど）；魚類細胞および魚類細胞由来の細胞系（例えばゼブラフィッシュに由来するものなど）；両生類細胞および両生類細胞由来の細胞系（例えばアフリカツメガエルおよびニシツメガエルに由来するものなど）；鳥類細胞および鳥類細胞由来の細胞系（例えばニワトリに由来するものなど）；哺乳動物細胞および哺乳動物細胞由来の細胞系（例えばマウス、ラット、ハムスター、ブタ、ウシ、ウマ、靈長類およびヒトに由来するものなど）が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

50

### 【0083】

本明細書に開示する発現コンストラクトは、一つには、発現ベクターに作動可能に連結された本明細書に開示する核酸分子を含む。本明細書で使用する「作動可能に連結された」という用語は、本明細書に開示する核酸分子を、異種細胞への導入時にその核酸分子に

50

よってコードされるペプチドが発現されるような形で、発現ベクターに接合することができる、さまざまなクローニング方法のいずれかを意味する。本明細書に開示する発現コンストラクトを作製するために必要となりうる確立された分子生物学的技法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、制限酵素反応、アガロースゲル電気泳動、核酸ライゲーション、細菌形質転換、核酸精製、核酸シークエンスおよび組換えに基づく技法など（ただしこれらに限定されるわけではない）、本明細書の教示内容からして当業者には十分に可能な日常的作業である。発現コンストラクトの作製に必要な具体的プロトコールの限定でない例は、「MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL」前掲（2001）および「CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY」（Frederick M.Ausubelら編，John Wiley & Sons，2004）などに記載されており、これらは参照により本明細書に組み入れられる。これらのプロトコールは、本明細書の教示内容からして当業者には十分に可能な日常的作業である。10

#### 【0084】

活性BoNT/Aをコードするオープンソリーディングフレームの発現には、広範囲にわたるさまざまな発現ベクターを使用することができ、これにはウイルス発現ベクター、原核発現ベクターおよび真核発現ベクター（酵母、昆虫、植物および哺乳動物発現ベクターなど）が含まれるが、これらに限定されるわけではない。発現ベクターの限定でない例は、そのような発現ベクターから発現コンストラクトを作製し使用するための確立された試薬類および条件と共に、BD Biosciences-Clontech（カリフォルニア州パロアルト）、BD Biosciences Pharmingen（カリフォルニア州サンディエゴ）、Invitrogen, Inc（カリフォルニア州カールズバッド）、QIAGEN Inc.（カリフォルニア州バレンシア）、およびStratagene（カリフォルニア州ラホーヤ）などの供給業者（ただしこれらに限定されるわけではない）から、容易入手することができる。適当な発現ベクターの選択、作製および使用は、本明細書の教示内容からして当業者には十分に可能な日常的作業である。20

#### 【0085】

本明細書に開示する発現コンストラクトにはさまざまな発現ベクターがいずれも有用でありうると想定される。発現系には、細胞に基づく系と無細胞発現系の両方が含まれる。細胞に基づく系には、ウイルス発現系、原核発現系、酵母発現系、バキュロウイルス発現系、昆虫発現系および哺乳動物発現系が含まれるが、これらに限定されるわけではない。限定するわけではないが、無細胞系には、コムギ胚芽抽出物、ウサギ網状赤血球抽出物および大腸菌抽出物などがあり、一般に本明細書に開示する方法と等価である。発現系を用いる発現は、誘導性発現、非誘導性発現、構成的発現、ウイルスによる発現、安定に組み込まれた発現および一過性発現などのさまざまな特徴（ただしこれらに限定されるわけではない）を、どれでも含むことができる。詳細に特徴づけられたベクター、試薬類、条件および細胞を含む発現系は確立されており、Ambion, Inc.（テキサス州オースティン）、BD Biosciences-Clontech（カリフォルニア州パロアルト）、BD Biosciences Pharmingen（カリフォルニア州サンディエゴ）、Invitrogen, Inc（カリフォルニア州カールズバッド）、QIAGEN Inc.（カリフォルニア州バレンシア）、Roche Applied Science（インディアナ州インディアナポリス）、およびStratagene（カリフォルニア州ラホーヤ）などの供給業者（ただしこれらに限定されるわけではない）から、容易入手することができる。適当な異種発現系の選択および使用に関する限定でない例は、「PROTEIN EXPRESSION. A PRACTICAL APPROACH」（S.J.HigginsおよびB.David Hames編，Oxford University Press, 1999）；Joseph M.FernandezおよびJames P.Hoeffler「GENE EXPRESSION SYSTEMS. USING NATURE FOR THE ART OF EXPRESSION」（Academic Press, 1999）；ならびにMeena RaiおよびHarish Padh「Expression Systems for Production of Heterologous Proteins（異種タンパク質を産生させるための発現系）」80(9) CURRENT SCIENCE 1121-1128, (2001)などに記載されており、これらは参照により本明細書に組み入れられる。これらのプロトコールは、本明細書の教示内容からして当業者には十分に可能な日常的作業である。30

#### 【0086】

したがって、本発明において開示される一態様では、本明細書に開示する核酸分子が、コードされている活性BoNT/Aをウイルス発現系で発現させるのに有用なウイルス発現ベク40

ターに由来する制御配列に、作動可能に連結される。ウイルス発現ベクターの限定でない例には、レンチウイルスベクター、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルスベクター、セムリキ森林ウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、およびアデノウイルスベクターなどがあるが、これらに限定されるわけではない。この態様の一側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの哺乳動物細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたウイルス発現ベクターを含む。

### 【0087】

本発明において開示されるもう一つの態様では、本明細書に開示する核酸分子が、コードされている活性BoNT/Aを原核細胞中で発現させるのに有用な原核発現ベクターに由来する制御配列に、作動可能に連結される。原核発現ベクターの限定でない例には、大腸菌発現ベクター、枯草菌発現ベクター、バチルス・リケニホルミス発現ベクター、バクテロイデス・フラギリス発現ベクター、ウェルシュ菌発現ベクター、クロストリジウム・ディフィシレ発現ベクター、カウロバクター・クレセンタス発現ベクター、ラクトコッカス・ラクティス発現ベクター、メチロバクテリウム・エキストルクエンス発現ベクター、ナイセリア・メニンギルス発現ベクター、髄膜炎菌発現ベクター、シュードモナス・フルオレッセンス発現ベクターおよびネズミチフス菌発現ベクターなどがある。この態様の一側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの原核細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結された原核発現ベクターを含む。この態様の一側面では、発現コンストラクトが、pET28発現ベクターと、コードされている活性BoNT/Aの大腸菌細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームとを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの大腸菌細胞における発現を増加させる配列番号3の改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpET28発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの大腸菌細胞における発現を増加させる配列番号4の改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpET28発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの大腸菌細胞における発現を増加させる配列番号5の改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpET28発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの大腸菌細胞における発現を増加させる配列番号6の改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpET28発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの大腸菌細胞における発現を増加させる配列番号3の改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpET29発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの大腸菌細胞における発現を増加させる配列番号4の改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpET29発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの大腸菌細胞における発現を増加させる配列番号5の改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpET29発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの大腸菌細胞における発現を増加させる配列番号6の改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpET29発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの大腸菌細胞における発現を増加させる配列番号3の改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpRSET発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの大腸菌細胞における発現を増加させる配列番号4の改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpRSET発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの大腸菌細胞における発現を増加させる配列番号5の改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpRSET発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの大腸菌細胞における発現を増加させる配列番号6の改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpRSET発現ベクターを含む。

10

20

30

40

50

クトが、コードされている活性BoNT/Aの大腸菌細胞における発現を増加させる配列番号6の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpRSET発現ベクターを含む。

#### 【0088】

本発明において開示されるさらにもう一つの態様では、本明細書に開示する発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aを真核細胞で発現させるのに有用な真核発現ベクターに由来する制御配列に、作動可能に連結される。この態様の一側面では、本明細書に開示する核酸分子が、コードされているBoNT/Aを酵母細胞で発現させるのに有用な酵母発現ベクターに由来する制御配列に、作動可能に連結される。酵母発現ベクターの限でない例には、ピキア・パストリス発現ベクター、ピキア・メタノリカ発現ベクター、ピキア・アングスタ発現ベクター、シゾサッカロミセス・ポンベ発現ベクター、サッカロミセス・セレビシェ発現ベクターおよびヤロウイア・リポリティカ発現ベクターなどがある。この態様の一側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの酵母細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結された酵母発現ベクターを含む。この態様の一側面では、発現コンストラクトが、pPICZ A発現ベクターと、コードされている活性BoNT/Aのピキア・パストリス細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームとを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのピキア・パストリス細胞における発現を増加させる配列番号34の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpPICZ A発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのピキア・パストリス細胞における発現を増加させる配列番号35の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpPICZ A発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのピキア・パストリス細胞における発現を増加させる配列番号36の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpPICZ A発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、pMET発現ベクターと、コードされている活性BoNT/Aのピキア・メタノリカ細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームとを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのピキア・メタノリカ細胞における発現を増加させる配列番号34の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpMET発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのピキア・メタノリカ細胞における発現を増加させる配列番号35の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpMET発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのピキア・メタノリカ細胞における発現を増加させる配列番号36の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpMET発現ベクターを含む。この態様のさらにもう一つの側面では、発現コンストラクトが、pYES2.1発現ベクターと、コードされている活性BoNT/Aのサッカロミセス・セレビシェ細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームとを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのサッカロミセス・セレビシェ細胞における発現を増加させる配列番号37の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpYES2.1発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのサッカロミセス・セレビシェ細胞における発現を増加させる配列番号38の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpYES2.1発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのサッカロミセス・セレビシェ細胞における発現を増加させる配列番号39の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpYES2.1発現ベクターを含む。

#### 【0089】

この態様のさらにもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子が、コードされている活性BoNT/Aを昆虫細胞で発現させるのに有用な昆虫発現ベクターに由来する制御配列

10

20

30

40

50

に作動可能に連結される。昆虫発現ベクターの限定でない例には、ヨトウガ発現ベクター、イラクサギンウワバ発現ベクター、キイロショウジョウバエ発現ベクターおよびタバコスズメガ発現ベクターなどがある。この態様の一側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞または昆虫細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結された昆虫発現ベクターを含む。この態様の一側面では、発現コンストラクトが、pFastBac(商標)HT発現ベクターと、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばSf9、Sf21およびHigh-Fiveなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームとを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばSf9、Sf21およびHigh-Fiveなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpFastBac(商標)HT発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばSf9、Sf21およびHigh-Fiveなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpFastBac(商標)HT発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばSf9、Sf21およびHigh-Fiveなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpFastBac(商標)HT発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばSf9、Sf21およびHigh-Fiveなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームとを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、pBACgus3発現ベクターと、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばSf9、Sf21およびHigh-Fiveなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームとを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばSf9、Sf21およびHigh-Fiveなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpBACgus3発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばSf9、Sf21およびHigh-Fiveなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpBACgus3発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばSf9、Sf21およびHigh-Fiveなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpBACgus3発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばSf9、Sf21およびHigh-Fiveなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpBACgus3発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばSf9、Sf21およびHigh-Fiveなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpBACgus3発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばSf9、Sf21およびHigh-Fiveなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpBACgus3発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばSf9、Sf21およびHigh-Fiveなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpBACgus3発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばSf9、Sf21およびHigh-Fiveなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpBACgus3発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばSf9、Sf21およびHigh-Fiveなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpBACgus3発現ベクターを含む。

#### 【0090】

この態様の一側面では、発現コンストラクトが、pMT/BiP-V5-His/GFP発現ベクターと、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばシュナイダーショウジョウバエ株2(S2)およびKcなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームとを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばシュナイダーショウジョウバエ株2(S2)およびKcなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpMT/BiP-V5-His/GFP発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばシュナイダーショウジョウバエ株2(S2)およびKcなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpMT/BiP-V5-His/GFP発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばシュナイダーショウジョウバエ株2(S2)およびKcなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpMT/BiP-V5-His/GFP発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞系(例えばシュナイダーショウジョウバエ株2(S2)およびKcなど)における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結されたpMT/BiP-V5-His/GFP発現ベクターを含む。この態様のさらにもう一つの側面では、本明細書に開示する核酸分子が、コードされている活性BoNT/Aを哺乳動物細胞または哺乳動物細胞由来の細胞系で発現させるのに有用な哺乳動物発現ベクターに由来する制御配列に、作動可能に連結される。哺乳動物発現ベクターからのBoNT/Aの発現は、構成的、組織特異的、細胞特異的もしくは誘導性であるプロ

10

20

30

40

50

モーター要素、エンハンサー要素、またはその両方の制御を受けることができる。哺乳動物発現ベクターの限定でない例には、マウス発現ベクター、ラット発現ベクター、ハムスター発現ベクター、ブタ発現ベクター、ウシ発現ベクター、ウマ発現ベクター、靈長類発現ベクターおよびヒト発現ベクターなどがある。具体的発現ベクターには、pCMV-Script、pCMVTNT、pDisplay、pSECTag、pSECTag2、pVAX1およびpQBI25などがあるが、これらに限定されるわけではない。この態様の一側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの哺乳動物細胞または哺乳動物細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結された哺乳動物発現ベクターを含む。

#### 【 0 0 9 2 】

この態様の一側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのマウス細胞またはマウス細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたマウス発現ベクターを含む。この態様の一側面では、発現コンストラクトが、pSECTag2発現ベクターと、コードされている活性BoNT/Aのマウス細胞系（例えば10T1/2、BALB/3T3、L-M、NB4 1A3、NIE-115、NG108-15、NIH3T3、NCTCおよびNeuro 2Aなど）における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームとを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのマウス細胞系（例えば10T1/2、BALB/3T3、L-M、NB4 1A3、NIE-115、NG108-15、NIH3T3、NCTCおよびNeuro 2Aなど）における発現を増加させる配列番号76の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのマウス細胞系（例えば10T1/2、BALB/3T3、L-M、NB4 1A3、NIE-115、NG108-15、NIH3T3、NCTCおよびNeuro 2Aなど）における発現を増加させる配列番号77の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのマウス細胞系（例えば10T1/2、BALB/3T3、L-M、NB4 1A3、NIE-115、NG108-15、NIH3T3、NCTCおよびNeuro 2Aなど）における発現を増加させる配列番号78の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。

#### 【 0 0 9 3 】

この態様の一側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのラット細胞またはラット細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたラット発現ベクターを含む。この態様の一側面では、発現コンストラクトが、pSECTag2発現ベクターと、コードされている活性BoNT/Aのラット細胞系（例えばPC12、GH1、GH3、C6およびL2など）における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームとを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのラット細胞系（例えばPC12、GH1、GH3、C6およびL2など）における発現を増加させる配列番号79の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのラット細胞系（例えばPC12、GH1、GH3、C6およびL2など）における発現を増加させる配列番号80の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのラット細胞系（例えばPC12、GH1、GH3、C6およびL2など）における発現を増加させる配列番号81の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。

#### 【 0 0 9 4 】

この態様の一側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのハムスター細胞またはハムスター細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたハムスター発現ベクターを含む。この態様の一側面では、発現コンストラクトが、pSECTag2発現ベクターと、コードされている活性BoNT/Aのハムスター細胞系（例えばCHOおよび6E6など）における発現を増加させる改変オーブ

10

20

30

40

50

ンリーディングフレームとを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのハムスター細胞系（例えばCHOおよび6E6など）における発現を増加させる配列番号82の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのハムスター細胞系（例えばCHOおよび6E6など）における発現を増加させる配列番号83の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのハムスター細胞系（例えばCHOおよび6E6など）における発現を増加させる配列番号84の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。

10

#### 【0095】

この態様の一側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのブタ細胞またはブタ細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたブタ発現ベクターを含む。この態様の一側面では、発現コンストラクトが、pSECTag2発現ベクターと、コードされている活性BoNT/Aのブタ細胞系（例えばPK15、LLC-PK1、STおよびESK-4など）における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームとを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのブタ細胞系（例えばPK15、LLC-PK1、STおよびESK-4など）における発現を増加させる配列番号85の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのブタ細胞系（例えばPK15、LLC-PK1、STおよびESK-4など）における発現を増加させる配列番号86の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのブタ細胞系（例えばPK15、LLC-PK1、STおよびESK-4など）における発現を増加させる配列番号87の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。

20

#### 【0096】

この態様の一側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのウシ細胞またはウシ細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたウシ発現ベクターを含む。この態様の一側面では、発現コンストラクトが、pSECTag2発現ベクターと、コードされている活性BoNT/Aのウシ細胞系（例えばCPAE、BT、SBACおよびFB2など）における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームとを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのウシ細胞系（例えばCPAE、BT、SBACおよびFB2など）における発現を増加させる配列番号88の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのウシ細胞系（例えばCPAE、BT、SBACおよびFB2など）における発現を増加させる配列番号89の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのウシ細胞系（例えばCPAE、BT、SBACおよびFB2など）における発現を増加させる配列番号90の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。

30

#### 【0097】

この態様の一側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのウマ細胞またはウマ細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたウマ発現ベクターを含む。この態様の一側面では、発現コンストラクトが、pSECTag2発現ベクターと、コードされている活性BoNT/Aのウマ細胞系（例えばNBL-6など）における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームとを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのウマ細胞系（例えばNBL-6など）における発現を増加させる配列番号91の改変オープン

40

50

リーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのウマ細胞系（例えばNBL-6など）における発現を増加させる配列番号92の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのウマ細胞系（例えばNBL-6など）における発現を増加させる配列番号93の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。

【 0 0 9 8 】

この態様の一側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの靈長類細胞または靈長類細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結された靈長類発現ベクターを含む。この態様の一側面では、発現コンストラクトが、pSECTag2発現ベクターと、コードされている活性BoNT/Aの靈長類細胞系（例えばCOS-1、COS-7およびVV-1など）における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームとを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの靈長類細胞系（例えばCOS-1、COS-7およびVV-1など）における発現を増加させる配列番号94の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの靈長類細胞系（例えばCOS-1、COS-7およびVV-1など）における発現を増加させる配列番号95の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの靈長類細胞系（例えばCOS-1、COS-7およびVV-1など）における発現を増加させる配列番号96の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。

10

20

30

40

【 0 0 9 9 】

この態様の一側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aのヒト細胞またはヒト細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたヒト発現ベクターを含む。この態様の一側面では、発現コンストラクトが、pSECTag2発現ベクターと、コードされている活性BoNT/Aの靈長類細胞系（例えばSH-SY5Y、SK-N-DZ、SK-N-F1、SK-N-SH、BE(2)-C、HeLa、HEK293、MCF-7、HepG2、HL-60、IMR-32、SW-13およびCHP3など）における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームとを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの靈長類細胞系（例えばSH-SY5Y、SK-N-DZ、SK-N-F1、SK-N-SH、BE(2)-C、HeLa、HEK293、MCF-7、HepG2、HL-60、IMR-32、SW-13およびCHP3など）における発現を増加させる配列番号97の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの靈長類細胞系（例えばSH-SY5Y、SK-N-DZ、SK-N-F1、SK-N-SH、BE(2)-C、HeLa、HEK293、MCF-7、HepG2、HL-60、IMR-32、SW-13およびCHP3など）における発現を増加させる配列番号98の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。この態様のもう一つの側面では、発現コンストラクトが、コードされている活性BoNT/Aの靈長類細胞系（例えばSH-SY5Y、SK-N-DZ、SK-N-F1、SK-N-SH、BE(2)-C、HeLa、HEK293、MCF-7、HepG2、HL-60、IMR-32、SW-13およびCHP3など）における発現を増加させる配列番号99の改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたpSECTag2発現ベクターを含む。

50

【 0 1 0 0 】

本発明の諸側面は、本明細書に開示する発現コンストラクトを含む細胞を、さらに提供する。限定するわけではないが、細胞は、コードされている活性BoNT/Aの原核細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子を発現させるのに有用な原核発現コンストラクトを含有する原核細胞；コードされている活性BoNT/Aの酵母細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子を発現させるのに有用な酵母発現コンストラクトを含有する酵母細胞；コードされている活性Bo

50

NT/Aの昆虫細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子を発現させるのに有用な昆虫発現コンストラクトを含有する昆虫細胞；およびコードされている活性BoNT/Aの哺乳動物細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子を発現させるのに有用な哺乳動物発現コンストラクトを含有する哺乳動物細胞を包含することができると想定される。

### 【0101】

本明細書に開示する細胞は、一つには、発現コンストラクトを含む。本明細書に開示する発現コンストラクトは全て使用することができると想定される。したがってこの態様の諸側面は、コードされている活性BoNT/Aの哺乳動物細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたウイルス発現ベクターを含む細胞；コードされている活性BoNT/Aの原核細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結された原核発現ベクターを含む細胞；コードされている活性BoNT/Aの酵母細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結された酵母発現ベクターを含む細胞；コードされている活性BoNT/Aの粘菌細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結された粘菌発現ベクターを含む細胞；コードされている活性BoNT/Aの植物細胞または植物細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結された植物発現ベクターを含む細胞；コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞または昆虫細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結された昆虫発現ベクターを含む細胞；コードされている活性BoNT/Aの魚類細胞または魚類細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結された魚類発現ベクターを含む細胞；コードされている活性BoNT/Aの両生類細胞または両生類細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結された両生類発現ベクターを含む細胞；コードされている活性BoNT/Aの鳥類細胞または鳥類細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結された鳥類発現ベクターを含む細胞；およびコードされている活性BoNT/Aの哺乳動物細胞または哺乳動物細胞（例えばマウス、ラット、ハムスター、ブタ、ウシ、ウマ、靈長類およびヒトなど）由来の細胞系における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結された哺乳動物発現ベクターを含む細胞を包含するが、これらに限定されるわけではない。限定するわけではないが、この態様の別の側面は、配列番号3～配列番号99、配列番号110、配列番号112および配列番号122～配列番号125のいずれか一つを含む改変オープンリーディングフレームを含む発現コンストラクトを含む。

### 【0102】

本明細書に開示する細胞は、一つには、異種細胞を含む。本明細書に開示する異種細胞は全て使用することができると想定される。したがって、この態様の諸側面は、例えば原核細胞、限定するわけではないが、好気性細菌細胞、微好気性細菌細胞、好二酸化炭素性細菌細胞、通性細菌細胞、嫌気性細菌細胞、グラム陰性細菌細胞およびグラム陽性細菌細胞の株（例えば大腸菌、枯草菌、バチルス・リケニホルミス、バクテロイデス・フラギリス、ウェルシュ菌、クロストリジウム・ディフィシレ、カウロバクター・クレセンタス、ラクトコッカス・ラクティス、メチロバクテリウム・エキストルクエンス、ナイセリア・メンингィルス、髄膜炎菌、シュードモナス・フルオレッセンスおよびネズミチフス菌に由来する株など）；および真核細胞、限定するわけではないが、酵母株（例えばピキア・パストリス、ピキア・メタノリカ、ピキア・アングスタ、シゾサッカロミセス・ポンベ、サッカロミセス・セレビシェおよびヤロウイア・リポリティカに由来する株など）；粘菌株（例えばキイロタマホコリカビなどに由来するものなど）；植物細胞および植物細胞由来の細胞系（例えば単子葉植物種、双子葉植物種、トウモロコシおよびシロイヌナズナに由来するものなど）；昆虫細胞および昆虫由来の細胞系（例えばヨトウガ、イラクサギンウワバ、キイロショウジョウバエおよびタバコスズメガに由来するものなど）；魚類細胞および魚類細胞由来の細胞系（例えばゼブラフィッシュに由来するものなど）；両生類細

10

20

30

40

50

胞および両生類細胞由来の細胞系（例えばアフリカツメガエルおよびニシツメガエルに由来するものなど）；鳥類細胞および鳥類細胞由来の細胞系（例えばニワトリに由来するものなど）；哺乳動物細胞および哺乳動物細胞由来の細胞系（例えばマウス、ラット、ハムスター、ブタ、ウシ、ウマ、靈長類およびヒトに由来するものなど）が包含されるが、これらに限定されるわけではない。細胞系は、URLアドレスwww.atcc.orgのAmerican Type Culture Collection (2004)；URLアドレスwww.ecacc.org.ukのEuropean Collection of Cell Cultures (2204)；およびURLアドレスwww.dsmz.deのGerman Collection of Microorganisms and Cell Cultures (2004)から入手することができる。適当な細胞系を選択し、作製し、使用するための具体的プロトコールの限定でない例は、「INSECT CELL CULTURE ENGINEERING」(Mattheus F.A.Goosenら編, Marcel Dekker, 1993)；「INSECT CELL CULTURES: FUNDAMENTAL AND APPLIED ASPECTS」(J.M.Vlakら編, Kluwer Academic Publishers, 1996)；Maureen A.HarrisonおよびIan F.Rae「GENERAL TECHNIQUES OF CELL CULTURE」(Cambridge University Press, 1997)；「CELL AND TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES」(Alan Doyleら編, John Wiley and Sons, 1998)；R.Ian Freshney「CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE」(Wiley-Liss, 第4版, 2000)；「ANIMAL CELL CULTURE: A PRACTICAL APPROACH」(John R.W.Masters編, Oxford University Press, 第3版, 2000)；「MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL」前掲(2001)；「BASIC CELL CULTURE: A PRACTICAL APPROACH」(John M.Davis, Oxford Press, 第2版, 2002)；ならびに「CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY」前掲(2004)などに記載されている。これらのプロトコールは、本明細書の教示内容からして当業者には十分に可能な日常的作業である。10  
20

#### 【0103】

本明細書に開示する発現コンストラクトを細胞内に導入するための方法は全て使用することができると想定される。本明細書に開示する細胞は、発現コンストラクトを一過性にまたは安定に維持することができる。安定に維持されるコンストラクトは、染色体外にあって自律的に複製するものであってもよいし、細胞の染色体物質中に組み込まれて非自律的に複製するものであってもよい。細胞内に核酸分子を導入するのに役立つ方法には、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、脂質法、ポリブレン法、ポリリジン法、ウイルス法、マイクロインジェクション、プロトプラスト融合、バイオリスティック、およびエレクトロポレーションなどがあるが、これらに限定されるわけではない（例えば「Introducing Cloned Genes into Cultured Mammalian Cells (培養哺乳動物細胞へのクローニング遺伝子の導入)」16.1～16.62頁(SambrookおよびRussell編「MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL」第3巻, 第3版, 2001)を参照されたい）。細胞内に発現コンストラクトを導入するための具体的方法の選択が、一つには、その細胞が発現コンストラクトを一過性に含有することになるのか、それともその細胞が発現コンストラクトを安定に含有することになるのかに依存することは、当業者には理解される。これらのプロトコールは、本明細書の教示内容からして当業者には十分に可能な日常的作業である。30

#### 【0104】

この態様の一側面では、活性BoNT/Aを発現させるコンストラクトを異種細胞内に導入するために、トランスフェクションと呼ばれる化学的方法が使用される。化学的トランスフェクション法では、化学試薬が核酸との複合体を形成し、それが細胞へのその核酸の取り込みを容易にする。そのような化学試薬には、リン酸カルシウム法（例えばMartin JordonおよびFlorian Worm「Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate (リン酸カルシウムによる付着細胞および懸濁細胞のトランスフェクション)」33(2) Methods 136-143 (2004)を参照されたい）；ジエチル-アミノエチル(DEAE)デキストラン法、脂質法、カチオン性ポリマー法、例えばポリエチレンイミン(PEI)法およびポリリジン法、ならびにポリブレン法（例えばChun Zhangら「Polyethyleneimine strategies for plasmid delivery to brain-derived cells (脳由来細胞へのプラスミド送達のためのポリエチレンイミン戦略)」33(2) Methods 144-150 (2004)を参照されたい）などがあるが、これらに限定されるわけではない。そのような化学的送達系は標準的方法によ40  
50

って調製することができ、市販されている（例えばCellPfectトランスフェクションキット（Amersham Biosciences, ニュージャージー州ピスカタウェイ）；哺乳動物用トランスフェクションキット、リン酸カルシウムおよびDEAE デキストラン（Stratagene, Inc., カリフォルニア州ラホーヤ）；Lipofectamine（商標）トランスフェクション試薬（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）；ExGen 500トランスフェクションキット（Fermentas, Inc., メリーランド州ハノーバー）、ならびにSuperFectおよびEffecteneトランスフェクションキット（Qiagen, Inc., カリフォルニア州バレンシア）を参照されたい）。

#### 【0105】

この態様のもう一つの側面では、活性BoNT/Aを発現させるコンストラクトを異種細胞内に導入するために、物理的方法が使用される。物理的作用には、エレクトロポレーション、バイオリストイックおよびマイクロインジェクションなどがあるが、これらに限定されるわけではない。バイオリストイック法およびマイクロインジェクション法では、細胞内に核酸分子を導入するために、細胞壁に孔を開ける（例えばJeike E.Biewengaら「Plasmid-mediated gene transfer in neurons using the biolistics technique（バイオリストイック法によるニューロンへのプラスミド媒介遺伝子導入）」71(1) J. Neurosci. Methods. 67-75 (1997)；ならびにJohn O'BrienおよびSarah C.R.Lummis「Biolistic and diolistic transfection: using the gene gun to deliver DNA and lipophilic dyes into mammalian cells（バイオリストイックおよびジオリストイックトランスフェクション：遺伝子銃を使った哺乳動物細胞へのDNAおよび親油性色素の送達）」33(2) Methods 121-125 (2004)を参照されたい）。エレクトロポレーションは、電気透過処理（electroporation）とも呼ばれ、短い高電圧の電気パルスを使って膜に一過性の孔を作り、その孔を通って核酸分子が侵入する方法であり、あらゆる細胞タイプの安定トランスフェクションおよび一過性トランスフェクションに効果的に使用することができる（例えばM.Golzioら「In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression（インビトロおよびインビボでの電場による透過処理、遺伝子導入、および発現）」33(2) Methods 126-135 (2004)；およびOliver Greschら「New non-viral method for gene transfer into primary cells（初代細胞に遺伝子を導入するための新しい非ウイルス的方法）」33(2) Methods 151-163 (2004)を参照されたい）。

#### 【0106】

この態様のもう一つの側面では、活性BoNT/Aを発現させるコンストラクトを異種細胞内に導入するために、形質導入と呼ばれるウイルスによる方法が使用される。ウイルスによる一過性形質導入法では、ウイルス粒子が宿主細胞に感染し宿主細胞内で複製する過程が、この機序を使って細胞内に核酸分子が導入されるように操作されている。ウイルスによる方法は、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、ピコルナウイルス、アルファウイルスおよびバキュロウイルスなど（ただしこれらに限定されるわけではない）、広範囲にわたるさまざまなウイルスから開発されている（例えば、Armin Blesch「Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer（エクスピボおよびインビボ遺伝子導入用のレンチウイルスおよびMLVに基づくレトロウイルスベクター）」33(2) Methods 164-172 (2004)；およびMaurizio Federico「From lentiviruses to lentivirus vectors（レンチウイルスからレンチウイルスベクターへ）」229 Methods Mol. Biol. 3-15 (2003)；E.M.Poeschla「Non-primate lentiviral vectors（非靈長類レンチウイルスベクター）」5(5) Curr. Opin. Mol. Ther. 529-540 (2003)；Karim Benihoudら「Adenovirus vectors for gene delivery（遺伝子送達用アデノウイルスベクター）」10(5) Curr. Opin. Biotechnol. 440-447 (1999)；H.Bueler「Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy（遺伝子導入および遺伝子治療用のアデノ随伴ウイルスベクター）」380(6) Biol. Chem. 613-622 (1999)；Choi M.Laiら「Adenovirus and adeno-associated virus vectors（アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスベクター）」21(12) DNA Cell Biol. 895-913 (2002)；Edward A.Burtonら「Gene delivery using herpes simplex virus vectors（

10

20

30

40

50

単純ヘルペスウイルスベクターを使った遺伝子送達)」21(12) DNA Cell Biol. 915-936 (2002); Paola Grandiら「Targeting HSV amplicon vector (ターゲティングHSVアンプリコンベクター)」33(2) Methods 179-186 (2004); Ilya Frolovら「Alphavirus-based expression vectors: strategies and applications (アルファウイルス系発現ベクター: 戦略と応用)」93(21) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 11371-11377 (1996); Markus U. Ehrengruber「Alphaviral gene transfer in neurobiology (神経生物学におけるアルファウイルス遺伝子導入)」59(1) Brain Res. Bull. 13-22 (2002); Thomas A. KostおよびJ. Patrick Condreay「Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors (哺乳動物細胞遺伝子送達ベクターとしての組換えバキュロウイルス)」20(4) Trends Biotechnol. 173-180 (2002); ならびにA. HuserおよびC. Hofmann「Baculovirus vectors: novel mammalian cell gene-delivery vehicles and their applications (バキュロウイルスベクター: 新しい哺乳動物細胞遺伝子送達ビヒクルおよびそれらの応用)」3(1) Am. J. Pharmacogenomics 53-63 (2003)を参照されたい)。

#### 【0107】

エンベロープを持たない二本鎖DNAウイルスであるアデノウイルスは、哺乳動物細胞形質導入にしばしば選択される。アデノウイルスは約36kdという比較的大きな核酸分子を取り扱い、高い力価で産生され、分裂細胞でも、非分裂細胞でも、広範囲にわたるさまざまな細胞に効率よく感染することができるからである（例えばWim T.J.M.C. Hermensら「Transient gene transfer to neurons and glia: analysis of adenoviral vector performance in the CNS and PNS (ニューロンおよび神経膠への一過性遺伝子導入: CNSおよびPNSにおけるアデノウイルスベクターの性能)」71(1) J. Neurosci. Methods 85-98 (1997); およびHiroyuki Mizuguchiら「Approaches for generating recombinant adenovirus vectors (組換えアデノウイルスベクターを作製するためのアプローチ)」52(3) Adv. Drug Deliv. Rev. 165-176 (2001)を参照されたい）。アデノウイルスに基づく系を使った形質導入では、長期間にわたるタンパク質発現は維持されない。核酸分子は、宿主細胞染色体に組み込まれるよりも、細胞核内のエピソームとして運ばれるからである。アデノウイルスベクター系およびそのようなベクターの使い方に関する具体的なプロトコールは、例えばViraPower（商標）アデノウイルス発現系（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）および「ViraPower（商標）Adenoviral Expression System Instruction Manual 25-0543 version A」Invitrogen, Inc. (2002年7月15日); ならびにAdEasy（商標）アデノウイルスベクター系（Stratagene, Inc., カリフォルニア州ラホーヤ）および「AdEasy（商標）Adenoviral Vector System Instruction Manual 064004f」Stratagene, Inc. に開示されている。

#### 【0108】

核酸分子送達には、オノコレトロウイルスおよびレンチウイルスなどの一本鎖RNAレトロウイルスを使用することもできる。レトロウイルスによる形質導入は100%近い形質導入効率をもたらすことが多く、感染の多重度（MOI）を変えることによってプロウイルスコピー数を容易に制御することができ、細胞を一過性または安定に形質導入するために使用することができる（例えばTiziana Toniniら「Transient production of retroviral-and lentiviral-based vectors for the transduction of Mammalian cells (哺乳動物細胞の形質導入のためのレトロウイルス系ベクターおよびレンチウイルス系ベクターの一時的生成)」285 Methods Mol. Biol. 141-148 (2004); Armin Blesch「Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer (エクスピボおよびインビボ遺伝子導入のためのレンチウイルスベクターおよびMLV系レトロウイルスベクター)」33(2) Methods 164-172 (2004); Felix Recillas-Targa「Gene transfer and expression in mammalian cell lines and transgenic animals (哺乳動物細胞系およびトランスジェニック動物における遺伝子導入および発現)」267 Methods Mol. Biol. 417-433 (2004); およびRoland Wolkowiczら「Lentiviral vectors for the delivery of DNA into mammalian cells (哺乳動物細胞へのDNA送達のためのレンチウイルスベクター)」246 Methods Mol. Biol. 391-411 (2004)を参照されたい）。レトロウイルス粒子は、

10

20

30

40

50

タンパク質キャプシドにパッケージングされたRNAゲノムからなり、全体が脂質エンベロープで包まれている。レトロウイルスは、そのRNAを逆転写酵素と共に細胞質中に注入することによって、宿主細胞に感染する。次に、RNAテンプレートは直線状二本鎖cDNAに逆転写され、それは宿主細胞ゲノムに組み込まれることにより、自らを複製する。ウイルス粒子は垂直方向にも（親細胞から娘細胞にプロウイルスを介して）水平方向にも（細胞から細胞へとウイルス粒子を介して）伝播する。この複製戦略は長期間持続する発現を可能にする。というのも、関心対象の核酸分子は宿主細胞の染色体中に安定に組み込まれ、その結果、タンパク質の長期間発現を可能にするからである。例えば、さまざまな組織に注入されたレンチウイルスベクターは、1年を超える持続的タンパク質発現をもたらすことが、動物研究で示されている（例えばLuigi Naldiniら「*In vivo* gene delivery and stable transduction of non-dividing cells by a lentiviral vector（レンチウイルスベクターによる非分裂細胞のインビオ遺伝子送達および安定形質導入）」272(5259) Science 263-267 (1996)を参照されたい）。オンコレトロウイルス由来のベクター系（例えばモロニーマウス白血病ウイルス（MoMLV）など）は広く使用されており、多種多様な非分裂細胞に感染する。レンチウイルスも分裂細胞および非分裂細胞を含む多種多様な細胞タイプに感染することができ、高度に特異的な細胞ターゲティングを可能にする複雑なエンベロープタンパク質を持っている。

#### 【0109】

レトロウイルスベクターおよびそのようなベクターの使い方に関する具体的プロトコールは、例えばManfred GossenおよびHermann Bujard「Tight control of gene expression in eukaryotic cells by tetracycline-responsive promoters（テトラサイクリン応答性プロモーターによる真核細胞における遺伝子発現の厳密な制御）」米国特許第5,464,758号（1995年11月7日）；Hermann BujardおよびManfred Gossen「Methods for regulating gene expression（遺伝子発現を調節するための方法）」米国特許第5,814,618号（1998年9月29日）；David S.Hogness「Polynucleotides encoding insect steroid hormone receptor polypeptides and cells transformed with same（昆虫ステロイドホルモン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびそれで形質転換された細胞）」米国特許第5,514,578号（1996年5月7日）；David S.Hogness「Polynucleotide encoding insect ecdysone receptor（昆虫エクジソン受容体をコードするポリヌクレオチド）」米国特許第6,245,531号（2001年6月12日）；Elisabetta Vegetoら「Progesterone receptor having C-terminal hormone binding domain truncations（C末端ホルモン結合ドメインが切断されたプロゲステロン受容体）」米国特許第5,364,791号（1994年11月15日）；Elisabetta Vegetoら「Mutated steroid hormone receptors, methods for their use and molecular switch for gene therapy（突然変異型ステロイドホルモン受容体、それらの使用方法および遺伝子治療のための分子スイッチ）」米国特許第5,874,534号（1999年2月23日）ならびにElisabetta Vegetoら「Mutated steroid hormone receptors, methods for their use and molecular switch for gene therapy（突然変異型ステロイドホルモン受容体、それらの使用方法および遺伝子治療のための分子スイッチ）」米国特許第5,935,934号（1999年8月10日）に開示されている。さらにまた、そのようなウイルス送達系は標準的方法によって調製することができ、市販されている（例えばBD（商標）Tet-OffおよびTet-On遺伝子発現系（BD Biosciences-Clonetech, カリフォルニア州パロアルト）ならびに「BD（商標）Tet-OffおよびTet-On遺伝子発現系ユーザーマニュアルPT3001-1」BD Biosciences Clonetech（2003年3月14日）、GeneSwitch（商標）系（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）および「GeneSwitch（商標）System A Mifepristone-Regulated Expression System for Mammalian Cells version D 25-0313」Invitrogen, Inc.（2002年11月4日）；ViraPower（商標）レンチウイルス発現系（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）および「ViraPower（商標）Lentiviral Expression System Instruction Manual 25-0501 version E」Invitrogen, Inc.（2003年12月8日）；ならびにComplete Control（登録商標）レトロウイルス誘導性哺乳動物発現系（Stratagene, カリフォルニア州ラホーヤ）および「Complete Control（登録商標）Retroviral Inducible

10

20

30

40

50

Mammalian Expression System Instruction Manual, 064005e」を参照されたい)。

【0110】

したがって、ある態様では、細胞が、コードされているBoNT/Aの哺乳動物細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含む哺乳動物細胞を含む。この態様の一側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの哺乳動物細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを一過性に含有する哺乳動物細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの哺乳動物細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを安定に含有する哺乳動物細胞を含む。この態様のさらにもう一つの側面では、発現コンストラクトがウイルス発現コンストラクトである。この態様のさらなる側面では、ウイルス発現コンストラクトがレンチウイルス発現コンストラクト、家禽ポックスウイルス発現コンストラクト、仮性狂犬病ウイルス発現コンストラクト、レトロウイルス発現コンストラクト、セムリキ森林ウイルス発現コンストラクト、シンドビスウイルス発現コンストラクト、ワクシニアウイルス発現コンストラクト、またはアデノウイルス発現コンストラクトである。この態様のさらに別の側面では、核酸分子が、配列番号64～配列番号99の改変オープンリーディングフレームのいずれかを含む。

10

【0111】

したがって、ある態様では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの原核細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含む原核細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの原核細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを一過性に含有する原核細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの原核細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを安定に含有する原核細胞を含む。この態様のさらにもう一つの側面では、原核細胞が、好気性細菌細胞、微好気性細菌細胞、好二酸化炭素性細菌細胞、通性細菌細胞、嫌気性細菌細胞、グラム陰性細菌細胞またはグラム陽性細菌細胞に由来する。この態様のさらにもう一つの側面では、原核細胞が、大腸菌、枯草菌、バチルス・リケニホルミス、バクテロイデス・フラギリス、ウェルシュ菌、クロストリジウム・ディフィシレ、カウロバクター・クレセンタス、ラクトコッカス・ラクティス、メチロバクテリウム・エキストルクエンス、ナイセリア・メニンギルルス、髄膜炎菌、シュードモナス・フルオレッセンスおよびネズミチフス菌に由来する原核生物株である。この態様のさらにもう一つの側面では、発現コンストラクトが原核発現コンストラクトである。この態様のさらにもう一つの側面では、核酸分子が、配列番号3～配列番号33、配列番号110、配列番号112および配列番号122～配列番号125の改変オープンリーディングフレームのいずれかを含む。

20

【0112】

ある態様では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの真核細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含む真核細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの真核細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを一過性に含有する真核細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの真核細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを安定に含有する真核細胞を含む。この態様のさらにもう一つの側面では、発現コンストラクトが真核発現コンストラクトである。この態様のさらに別の側面では、核酸分子が、配列番号34～配列番号99の改変オープンリーディングフレームのいずれかを含む。

30

40

50

**【 0 1 1 3 】**

ある態様では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの酵母細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含む酵母細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの酵母細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを一過性に含有する酵母細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの酵母細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを安定に含有する酵母細胞を含む。この態様のさらにもう一つの側面では、酵母細胞が、ピキア・パストリス、ピキア・メタノリカ、ピキア・アングスタ、シゾサッカロミセス・ポンベ、サッカロミセス・セレビシエまたはヤロウイア・リポリティカ由来の酵母株である。この態様のさらにもう一つの側面では、発現コンストラクトが酵母発現コンストラクトである。この態様のさらにもう一つの側面では、核酸分子が、配列番号34～配列番号45の改変オーブンリーディングフレームのいずれかを含む。

10

**【 0 1 1 4 】**

ある態様では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの粘菌細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含む粘菌細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの粘菌細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを一過性に含有する粘菌細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの粘菌細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを安定に含有する粘菌細胞を含む。この態様のさらにもう一つの側面では、粘菌細胞が、キイロタマホコリカビ由来の粘菌株である。この態様のさらにもう一つの側面では、発現コンストラクトが粘菌発現コンストラクトである。この態様のさらにもう一つの側面では、核酸分子が、配列番号46～配列番号48の改変オーブンリーディングフレームのいずれかを含む。

20

**【 0 1 1 5 】**

ある態様では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの植物細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含む植物細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの植物細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを一過性に含有する植物細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの植物細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを安定に含有する植物細胞を含む。この態様のさらにもう一つの側面では、植物細胞が、単子葉植物細胞もしくは単子葉植物細胞由来の細胞系または双子葉植物細胞もしくは双子葉植物細胞由来の細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、植物細胞または植物細胞由来の細胞系が、トウモロコシ、シロイヌナズナまたはコムギに由来する。この態様のさらにもう一つの側面では、発現コンストラクトが植物発現コンストラクトである。この態様のさらにもう一つの側面では、核酸分子が、配列番号49～配列番号57の改変オーブンリーディングフレームのいずれかを含む。

30

**【 0 1 1 6 】**

ある態様では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含む昆虫細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを一過性に含有する昆虫細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの昆虫

40

50

細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを安定に含有する昆虫細胞を含む。この態様のさらにもう一つの側面では、昆虫細胞が、ヨトウガ、イラクサギンウワバ、キイロショウジョウバエまたはタバコスズメガに由来する昆虫株である。この態様のさらにもう一つの側面では、昆虫細胞が、Sf9、Sf21、High-five、S2およびKcに由来する昆虫細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、発現コンストラクトが昆虫発現コンストラクトである。この態様のさらにもう一つの側面では、核酸分子が、配列番号58～配列番号63の改変オープンリーディングフレームのいずれかを含む。この態様のさらなる側面では、Sf9細胞系が、配列番号61、配列番号62または配列番号63の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；Sf21細胞系が、配列番号61、配列番号62または配列番号63の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；High-Five細胞系が、配列番号61、配列番号62または配列番号63の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；S2細胞系が、配列番号58、配列番号59または配列番号60の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；またはKc細胞系が、配列番号58、配列番号59または配列番号60の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有する。

10

#### 【0117】

ある態様では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの魚類細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含む魚類細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの魚類細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを一過性に含有する魚類細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの魚類細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを安定に含有する魚類細胞を含む。この態様のさらにもう一つの側面では、魚類細胞が、ゼブラフィッシュに由来する魚類細胞である。この態様のさらにもう一つの側面では、発現コンストラクトが魚類発現コンストラクトである。この態様のさらにもう一つの側面では、核酸分子が、配列番号64～配列番号66の改変オープンリーディングフレームのいずれかを含む。

20

#### 【0118】

ある態様では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの両生類細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含む両生類細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの両生類細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを一過性に含有する両生類細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの両生類細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを安定に含有する両生類細胞を含む。この態様のさらにもう一つの側面では、両生類細胞が、アフリカツメガエル由来の両生類細胞またはアフリカツメガエル由来の両生類細胞に由来する細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、両生類細胞が、ニシツメガエル由来の両生類細胞またはニシツメガエル由来の両生類細胞に由来する細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、発現コンストラクトが両生類発現コンストラクトである。この態様のさらにもう一つの側面では、核酸分子が、配列番号67～配列番号72の改変オープンリーディングフレームのいずれかを含む。

30

#### 【0119】

ある態様では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの鳥類細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コン

40

50

ストラクトを含む鳥類細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの鳥類細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを一過性に含有する鳥類細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの鳥類細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを安定に含有する鳥類細胞を含む。この態様のさらにもう一つの側面では、鳥類細胞が、ニワトリ由来の鳥類細胞またはニワトリ由来の鳥類細胞に由来する細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、発現コンストラクトが鳥類発現コンストラクトである。この態様のさらにもう一つの側面では、核酸分子が、配列番号73～配列番号75の改変オープンリーディングフレームのいずれかを含む。

10

## 【0120】

ある態様では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの哺乳動物細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含む哺乳動物細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの哺乳動物細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを一過性に含有する哺乳動物細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの哺乳動物細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを安定に含有する哺乳動物細胞を含む。この態様のさらにもう一つの側面では、哺乳動物細胞が、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、ウシ、ウマ、靈長類またはヒト由来の哺乳動物細胞またはマウス、ラット、ハムスター、ブタ、ウシ、ウマ、靈長類またはヒト由来の哺乳動物細胞に由来する細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、発現コンストラクトが哺乳動物発現コンストラクトである。この態様のさらにもう一つの側面では、核酸分子が、配列番号76～配列番号99の改変オープンリーディングフレームのいずれかを含む。

20

## 【0121】

ある態様では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのマウス細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含むマウス細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのマウス細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを一過性に含有するマウス細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのマウス細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを安定に含有するマウス細胞を含む。この態様のさらにもう一つの側面では、マウス細胞が、ハツカネズミ由来のマウス細胞またはハツカネズミ由来のマウス細胞に由来する細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、マウス細胞が、10T1/2、BALB/3T3、L-M、NB4 1A3、NIE-115、NG108-15、NIH3T3、NCTCまたはNeuro 2Aに由来するマウス細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、発現コンストラクトがマウス発現コンストラクトである。この態様のさらにもう一つの側面では、核酸分子が、配列番号76～配列番号78の改変オープンリーディングフレームのいずれかを含む。この態様のさらなる側面では、Neuro 2A細胞系が、配列番号76、配列番号77または配列番号78の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；10T1/2細胞系が、配列番号76、配列番号77または配列番号78の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；BALB/3T3細胞系が、配列番号76、配列番号77または配列番号78の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；NG108-15細胞系が、配列番号76、配列番号77または配列番号78の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；またはNIE-115細胞系が、配列番号76、配列番号77または配列番号78の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能

30

40

50

に連結された発現コンストラクトを含有する。

【0122】

ある態様では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのラット細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含むラット細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのラット細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを一過性に含有するラット細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのラット細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを安定に含有するラット細胞を含む。この態様のさらにもう一つの側面では、ラット細胞が、ドブネズミ由来のラット細胞またはドブネズミ由来のラット細胞に由来する細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、ラット細胞が、PC12、GH1、Gh3、C6またはL2に由来するラット細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、発現コンストラクトがラット発現コンストラクトである。この態様のさらにもう一つの側面では、核酸分子が、配列番号79～配列番号81の改変オープンリーディングフレームのいずれかを含む。この態様のさらなる側面では、PC12細胞系が、配列番号79、配列番号80または配列番号81の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；GH1細胞系が、配列番号79、配列番号80または配列番号81の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；Gh3細胞系が、配列番号79、配列番号80または配列番号81の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；C6細胞系が、配列番号79、配列番号80または配列番号81の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；またはL2細胞系が、配列番号79、配列番号80または配列番号81の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有する。

10

20

30

40

【0123】

ある態様では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのハムスター細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含むハムスター細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのハムスター細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを一過性に含有するハムスター細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのハムスター細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを安定に含有するハムスター細胞を含む。この態様のさらにもう一つの側面では、ハムスター細胞が、モンゴルキヌゲネズミ由来のハムスター細胞またはモンゴルキヌゲネズミ由来のハムスター細胞に由来する細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、ハムスター細胞が、CHOまたは6E6に由来するハムスター細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、発現コンストラクトがハムスター発現コンストラクトである。この態様のさらにもう一つの側面では、核酸分子が、配列番号82～配列番号84の改変オープンリーディングフレームのいずれかを含む。この態様のさらなる側面では、CHO細胞系が、配列番号82、配列番号83または配列番号84の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；6E6細胞系が、配列番号82、配列番号83または配列番号84の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有する。

50

【0124】

ある態様では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのブタ細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含むブタ細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされ

ている活性BoNT/Aのブタ細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを一過性に含有するブタ細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのブタ細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを安定に含有するブタ細胞を含む。この態様のさらにもう一つの側面では、ブタ細胞が、イノシシ由来のブタ細胞またはイノシシ由来のブタ細胞に由来する細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、ブタ細胞が、PK15、LLC-PK1、STまたはESK-4に由来するブタ細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、発現コンストラクトがブタ発現コンストラクトである。この態様のさらにもう一つの側面では、核酸分子が、配列番号85～配列番号87の改変オーブンリーディングフレームのいずれかを含む。この態様のさらなる側面では、PK15細胞系が、配列番号85、配列番号86または配列番号87の改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；LLC-PK1細胞系が、配列番号85、配列番号86または配列番号87の改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；ST細胞系が、配列番号85、配列番号86または配列番号87の改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；またはESK-4細胞系が、配列番号85、配列番号86または配列番号87の改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有する。

10

20

30

40

50

## 【0125】

ある態様では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのウシ細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含むウシ細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのウシ細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを一過性に含有するウシ細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのウシ細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを安定に含有するウシ細胞を含む。この態様のさらにもう一つの側面では、ウシ細胞が、ボス・タウルス由来のウシ細胞またはボス・タウルス由来のウシ細胞に由来する細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、ウシ細胞が、CPAE、BT、SBACまたはFB2に由来するウシ細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、発現コンストラクトがウシ発現コンストラクトである。この態様のさらにもう一つの側面では、核酸分子が、配列番号88～配列番号90の改変オーブンリーディングフレームのいずれかを含む。この態様のさらなる側面では、CPAE細胞系が、配列番号88、配列番号89または配列番号90の改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；BT細胞系が、配列番号88、配列番号89または配列番号90の改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；SBAC細胞系が、配列番号88、配列番号89または配列番号90の改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；またはFB2細胞系が、配列番号88、配列番号89または配列番号90の改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有する。

## 【0126】

ある態様では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのウマ細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含むウマ細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのウマ細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを一過性に含有するウマ細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのウマ細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動

可能に連結された発現コンストラクトを安定に含有するウマ細胞を含む。この態様のさらにもう一つの側面では、ウマ細胞が、エクウス・カバレス由来のウマ細胞またはエクウス・カバレス由来のウマ細胞に由来する細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、ウマ細胞が、NBL-6に由来するウマ細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、発現コンストラクトがウマ発現コンストラクトである。この態様のさらにもう一つの側面では、核酸分子が、配列番号91～配列番号94の改変オーブンリーディングフレームのいずれかを含む。この態様のさらなる側面では、NBL-6細胞系が、配列番号91、配列番号92または配列番号93の改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有する。

## 【0127】

10

ある態様では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの靈長類細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含む靈長類細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの靈長類細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを一過性に含有する靈長類細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aの靈長類細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを安定に含有する靈長類細胞を含む。この態様のさらにもう一つの側面では、靈長類細胞が、サバンナモンキー由来の靈長類細胞またはサバンナモンキー由来の靈長類細胞に由来する細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、靈長類細胞が、COS-1、COS-7またはVV-1に由来する靈長類細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、核酸分子が、配列番号94～配列番号96の改変オーブンリーディングフレームのいずれかを含む。この態様のさらなる側面では、COS-1細胞系が、配列番号94、配列番号95または配列番号96の改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；COS-7細胞系が、配列番号94、配列番号95または配列番号96の改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；またはVV-1細胞系が、配列番号94、配列番号95または配列番号96の改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有する。

20

## 【0128】

30

ある態様では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのヒト細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含むヒト細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのヒト細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを一過性に含有するヒト細胞を含む。この態様のもう一つの側面では、細胞が、コードされている活性BoNT/Aのヒト細胞における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを安定に含有するヒト細胞を含む。この態様のさらにもう一つの側面では、ヒト細胞が、ホモ・サピエンス由来のヒト細胞またはホモ・サピエンス由来のヒト細胞に由来する細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、ヒト細胞が、SH-SY5Y、SK-N-DZ、SK-N-F1、SK-N-SH、BE(2)-C、HeLa、HEK293、MCF-7、He pG2、HL-60、IMR-32、SW-13またはCHP3に由来するヒト細胞系である。この態様のさらにもう一つの側面では、発現コンストラクトがヒト発現コンストラクトである。この態様のさらにもう一つの側面では、核酸分子が、配列番号97～配列番号99の改変オーブンリーディングフレームのいずれかを含む。この態様のさらなる側面では、SH-SY5Y細胞系が、配列番号97、配列番号98または配列番号99の改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；SK-N-DZ細胞系が、配列番号97、配列番号98または配列番号99の改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；SK-N-F1細胞系が、配列番号97、配列番号98または配列番号99の改変オーブンリーディングフレームを含む核酸分子

40

50

に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；SK-N-SH細胞系が、配列番号97、配列番号98または配列番号99の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；BE(2)-C細胞系が、配列番号97、配列番号98または配列番号99の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；HeLa細胞系が、配列番号97、配列番号98または配列番号99の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；HEK293細胞系が、配列番号97、配列番号98または配列番号99の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；MCF-7細胞系が、配列番号97、配列番号98または配列番号99の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；HepG2細胞系が、配列番号97、配列番号98または配列番号99の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；HL-60細胞系が、配列番号97、配列番号98または配列番号99の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；IMR-32細胞系が、配列番号97、配列番号98または配列番号99の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；SW-13細胞系が、配列番号97、配列番号98または配列番号99の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有するか；またはCHP3細胞系が、配列番号97、配列番号98または配列番号99の改変オープンリーディングフレームを含む核酸分子に作動可能に連結された発現コンストラクトを含有する。

10

20

30

40

50

#### 【0129】

本発明のもう一つの側面は、活性BoNT/Aを製造する方法であって、コードされている活性BoNT/Aの異種細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む発現コンストラクトを発現させる段階を含む方法を提供する。本発明のもう一つの側面は、活性BoNT/Aを製造する方法であって、コードされているBoNT/Aの発現を増加させる改変オープンリーディングフレームを含む発現コンストラクトを異種細胞中に導入する段階、および異種細胞中で発現コンストラクトを発現させる段階を含む方法を提供する。

#### 【0130】

本明細書に開示する方法は、一つには、活性BoNT/Aを含む。本明細書に開示する活性BoNT/Aは全て、本明細書に開示する方法を使って製造することができると想定される。したがって、限定するわけではないが、この態様の諸側面は、活性BoNT/A、天然活性BoNT/A変種（例えばBoNT/Aアイソフォームなど）、非天然活性BoNT/A変種（例えば保存的BoNT/A変種、非保存的BoNT/A変種およびその活性BoNT/A断片など）、またはそれらの任意の組み合わせの製造を含む。限定するわけではないが、この態様の別の側面は、配列番号1の活性BoNT/A、配列番号1の天然活性BoNT/A変種（例えば配列番号1の活性BoNT/Aアイソフォームなど）、配列番号1の非天然活性BoNT/A変種（例えば配列番号1の保存的BoNT/A変種、配列番号1の非保存的BoNT/A変種および配列番号1の活性BoNT/A断片など）、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

#### 【0131】

本明細書に開示する方法は、一つには、発現コンストラクトを含む。本明細書に開示する発現コンストラクトは全て使用することができると想定される。したがって、限定するわけではないが、この態様の諸側面は、コードされている活性BoNT/Aの哺乳動物細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたウイルス発現ベクターを含む細胞；コードされている活性BoNT/Aの原核細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結された原核発現ベクターを含む細胞；コードされている活性BoNT/Aの酵母細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結された酵母発現ベクターを含む細胞；コードされている活性BoNT/Aの粘菌細胞における発現を増加させる改変オープンリーディングフレームに作動可能に連結された粘菌発現ベクターを含む細胞；コードされている活性BoNT/Aの

植物細胞または植物細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結された植物発現ベクターを含む細胞；コードされている活性BoNT/Aの昆虫細胞または昆虫細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結された昆虫発現ベクターを含む細胞；コードされている活性BoNT/Aの魚類細胞または魚類細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結された魚類発現ベクターを含む細胞；コードされている活性BoNT/Aの両生類細胞または両生類細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結された両生類発現ベクターを含む細胞；コードされている活性BoNT/Aの鳥類細胞または鳥類細胞由来の細胞系における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結された鳥類発現ベクターを含む細胞；およびコードされている活性BoNT/Aの哺乳動物細胞または哺乳動物細胞（例えばマウス、ラット、ハムスター、ブタ、ウシ、ウマ、靈長類およびヒトなど）由来の細胞系における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結された哺乳動物発現ベクターを含む細胞を包含する。限定するわけではないが、この態様の別の側面は、無細胞抽出物を使って本明細書に開示するBoNT/Aを発現させるのに適した発現コンストラクトであって、コードされている活性BoNT/Aの無細胞抽出物における発現を増加させる改変オーブンリーディングフレームに作動可能に連結された発現ベクターを含むものを包含する。限定するわけではないが、この態様の別の側面は、配列番号3～配列番号99、配列番号110、配列番号112および配列番号122～配列番号125のいずれか一つを含む改変オーブンリーディングフレームを含む発現コンストラクトを含む。

### 【0132】

本明細書に開示する方法は、一つには、異種細胞を含む。本明細書に開示する異種細胞は全て使用することができると想定される。したがってこの態様の諸側面は、例えば原核細胞、限定するわけではないが、好気性細菌細胞、微好気性細菌細胞、好二酸化炭素性細菌細胞、通性細菌細胞、嫌気性細菌細胞、グラム陰性細菌細胞およびグラム陽性細菌細胞の株（例えば大腸菌、枯草菌、バチルス・リケニホルミス、バクテロイデス・フラギリス、ウェルシュ菌、クロストリジウム・ディフィシレ、カウロバクター・クレセンタス、ラクトコッカス・ラクティス、メチロバクテリウム・エキストルクエンス、ナイセリア・メンギルルス、髄膜炎菌、シュードモナス・フルオレッセンスおよびネズミチフス菌に由来する株など）；および真核細胞、限定するわけではないが、酵母株（例えばピキア・パストリス、ピキア・メタノリカ、ピキア・アングスタ、シゾサッカロミセス・ポンベ、サッカロミセス・セレビシエおよびヤロウイア・リポリティカに由来する株など）；粘菌株（例えばキイロタマホコリカビなどに由来するものなど）；植物細胞および植物細胞由来の細胞系（例えば単子葉植物種、双子葉植物種、トウモロコシおよびシロイヌナズナに由来するものなど）；昆虫細胞および昆虫由来の細胞系（例えばヨトウガ、イラクサギンウワバ、キイロショウジョウバエおよびタバコスズメガに由来するものなど）；魚類細胞および魚類細胞由来の細胞系（例えばゼブラフィッシュに由来するものなど）；両生類細胞および両生類細胞由来の細胞系（例えばアフリカツメガエルおよびニシツメガエルに由来するものなど）；鳥類細胞および鳥類細胞由来の細胞系（例えばニワトリに由来するものなど）；哺乳動物細胞および哺乳動物細胞由来の細胞系（例えばマウス、ラット、ハムスター、ブタ、ウシ、ウマ、靈長類およびヒトに由来するものなど）を包含するが、これらに限定されるわけではない。細胞系は、URLアドレスwww.atcc.orgのAmerican Type Culture Collection (2004)；URLアドレスwww.ecacc.org.ukのEuropean Collection of Cell Cultures (2204)；およびURLアドレスwww.dsmz.deのGerman Collection of Microorganisms and Cell Cultures (2004)から入手することができる。適当な細胞系を選択し、作製し、使用するための具体的プロトコールの限定でない例は、「INSECT CELL CULTURE ENGINEERING」(Mattheus F.A.Goosenら編, Marcel Dekker, 1993)；「INSECT CELL CULTURES: FUNDAMENTAL AND APPLIED ASPECTS」(J.M.Vlakら編, Kluwer Academic Publishers, 1996)；Maureen A.HarrisonおよびIan F.Rae「GENERAL TECHNIQUES OF CELL CULTURE」(Cambridge University Press, 1997)；「CELL AND TISSUE CULTURE: LABORATORY PR

10

20

30

40

50

OCEDURES」(Alan Doyleら編, John Wiley and Sons, 1998); R.Ian Freshney「CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE」(Wiley-Liss, 第4版, 2000); 「ANIMAL CELL CULTURE: A PRACTICAL APPROACH」(John R.W.Masters編, Oxford University Press, 第3版, 2000); 「MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL」前掲(2001); 「BASIC CELL CULTURE: A PRACTICAL APPROACH」(John M.Davis, Oxford Press, 第2版, 2002); ならびに「CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY」前掲(2004)などに記載されている。これらのプロトコールは、本明細書の教示内容からして当業者には十分に可能な日常的作業である。

#### 【0133】

本明細書に開示する方法は、一つには、発現コンストラクトを異種細胞内に導入することを含む。本明細書に開示する発現コンストラクトの導入方法は全て使用することができると想定される。本明細書に開示する細胞は、発現コンストラクトを一過性にまたは安定に維持することができる。安定に維持されるコンストラクトは、染色体外にあって自律的に複製するものであってもよいし、細胞の染色体物質中に組み込まれて非自律的に複製するものであってもよい。細胞内に核酸分子を導入するのに役立つ方法には、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、脂質法、ポリブレン法、ポリリジン法、ウイルス法、マイクロインジェクション、プロトプラスト融合、バイオリストック、およびエレクトロポレーションなどがあるが、これらに限定されるわけではない(例えば「Introducing Cloned Genes into Cultured Mammalian Cells(培養哺乳動物細胞へのクローニング遺伝子の導入)」16.1~16.62頁(SambrookおよびRussell編「MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL」第3巻, 第3版, 2001)を参照されたい)。細胞内に発現コンストラクトを導入するための具体的方法の選択が、一つには、その細胞が発現コンストラクトを一過性に含有することになるのか、それともその細胞が発現コンストラクトを安定に含有することになるのかに依存することは、当業者には理解される。これらのプロトコールは、本明細書の教示内容からして当業者には十分に可能な日常的作業である。

#### 【0134】

本明細書に開示する方法を使った活性BoNT/Aの製造には、無細胞法と細胞に基づく方法をどちらも使用することができると思定される。これらの手法では、BD Biosciences-Clo ntech(カリフォルニア州パロアルト)、BD Biosciences Pharmingen(カリフォルニア州サンディエゴ)、Invitrogen, Inc(カリフォルニア州カールズバッド)、QIAGEN Inc.(カリフォルニア州バレンシア)、Roche Applied Science(インディアナ州インディアナポリス)、およびStratagene(カリフォルニア州ラホーヤ)などの供給業者(ただしこれに限定されるわけではない)から容易に入手することができる詳細に特徴づけられたベクター、試薬類、条件および細胞を使用する。活性BoNT/Aの製造に適した手法の選択および使用は、「PROTEIN EXPRESSION. A PRACTICAL APPROACH」前掲(1999)ならびにFernandezおよびHoeffler, 前掲(1999)などに記載されている。これらのプロトコールは、本明細書の教示内容からして当業者には十分に可能な日常的作業である。

#### 【0135】

活性BoNT/Aを製造する手法の一つでは、原核生物抽出物および真核生物抽出物など(ただしこれらに限定されるわけではない)の無細胞発現系を使用する。原核細胞抽出物の限定でない例には、RTS100大腸菌HYキット(Roche Applied Science, インディアナ州インディアナポリス)、ActiveProインビトロ翻訳キット(Ambion, Inc., テキサス州オースチン)、EcoPro(商標)系(EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン)およびExpressway(商標)Plus発現系(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)などがある。真核細胞抽出物には、RTS100コムギ胚芽CECFキット(Roche Applied Science, インディアナ州インディアナポリス)、TnT(登録商標)共役コムギ胚芽抽出物系(Promega Corp., ウィスコンシン州マディソン)、コムギIVT(商標)キット(Ambion, Inc., テキサス州オースチン)、網状赤血球溶解物IVT(商標)キット(Ambion, Inc., テキサス州オースチン)、PROTEINscript(登録商標)II系(Ambion, Inc., テキサス州オースチン)およびTnT(登録商標)共役網状赤血球溶解物系(Promega Corp., ウィスコン

10

20

30

40

50

シン州マディソン)などがあるが、これらに限定されるわけではない。

【0136】

また、種々の細胞に基づく発現法はどれでも、本明細書に開示する活性BoNT/Aをコードする核酸分子を発現させるのに役立つと想定される。例えば、ウイルス発現系、原核発現系、酵母発現系、植物発現系、バキュロウイルス発現系、昆虫発現系および哺乳動物発現系などがあるが、これらに限定されるわけではない。ウイルス発現系には、ViraPower(商標)レンチウイルス発現系(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)、アデノウイルス発現系(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)、AdEasy(商標)XLアデノウイルスベクター系(Stratagene, カリフォルニア州ラホーヤ)およびViraPort(登録商標)レトロウイルス遺伝子発現系(Stratagene, カリフォルニア州ラホーヤ)などがあるが、これらに限定されるわけではない。原核発現系の限定でない例には、Champion(商標)pET発現系(EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン)、TriEx(商標)細菌発現系(EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン)、QIAexpress(登録商標)発現系(QIAGEN, Inc.)、Affinity(登録商標)タンパク質発現・精製系(Stratagene, カリフォルニア州ラホーヤ)などがある。酵母発現系には、EasySelect(商標)ピキア発現キット(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)、YES-Echo(商標)発現ベクターキット(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)およびSpECTRA(商標)シゾサッカロミセス・ポンベ発現系(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)などがあるが、これらに限定されるわけではない。バキュロウイルス発現系の限定でない例には、BaculoDirect(商標)(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)、Bac-to-Bac(登録商標)(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)、およびBD BaculoGold(商標)(BD Biosciences-Pharmigen, カリフォルニア州サンディエゴ)などがある。昆虫発現系には、ショウジョウバエ発現系(DES(登録商標))(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)、InsectSelect(商標)系(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)およびInsectDirect(商標)系(EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン)などがあるが、これらに限定されるわけではない。哺乳動物発現系の限定でない例には、T-REx(商標)(テトラサイクリン調節発現)系(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)、Flp-In(商標)T-REx(商標)系(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)、pcDNA(商標)系(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)、pSecTag2系(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)、Exchanger(登録商標)系, InterPlay(商標)哺乳動物TAP系(Stratagene, カリフォルニア州ラホーヤ)、Complete Control(登録商標)誘導性哺乳動物発現系(Stratagene, カリフォルニア州ラホーヤ)およびLacSwitch(登録商標)II誘導性哺乳動物発現系(Stratagene, カリフォルニア州ラホーヤ)などがあるが、これらに限定されるわけではない。

【0137】

以下の限定でない実施例は、ここに開示する態様をより完全に理解することが容易になるように、例示を目的として記載するに過ぎず、決して、本明細書に開示する態様のいずれかを限定しようとするものではない。

【実施例1】

【0138】

コードされている活性BoNT/Aの異種細胞における発現を増加させるオープンソリーディングフレームのためのヌクレオチド改変の選択

1. ヌクレオチド改変の手作業による選択

特定の異種細胞のコドン使用を決定し、それがボツリヌス菌に見いだされるコドン使用頻度とどのように似ているかを決定するために、ボツリヌス菌および選択した異種細胞のコドン使用頻度を、公的に維持されているコドン使用頻度データベース(URLアドレスwww.kazusa.or.jp/codon)から得られる情報を使って表にすることで、生物間の比較を容易にした(表1)。

10

20

30

40

【表1-1】

表1：コドン使用頻度

アミノ酸	コドン	コドン使用頻度 (%)																		
		ボツリヌス菌	大腸菌K12	ピキア・ペスト	ヤロウイア・リ	ヤロボリティカ	トウガ	キイロウジ	ロシヨウ	カバ	ハツカ	ネミ	ドネズ	モングル	キヌゲ	イノシシ	ボス・タウルス	エクウス・カバ	サバンナモキ	エビン
Gly	GGG	0.10	0.15	0.10	0.05	0.05	0.07	0.23	0.24	0.21	0.26	0.25	0.24	0.26	0.25	0.24	0.24	0.26	0.25	
Gly	GGA	0.50	0.11	0.32	0.29	0.28	0.28	0.26	0.25	0.25	0.23	0.24	0.23	0.24	0.23	0.24	0.23	0.24	0.25	
Gly	GGT	0.33	0.34	0.44	0.32	0.37	0.21	0.18	0.17	0.20	0.14	0.16	0.16	0.17	0.15	0.16	0.17	0.15	0.16	
Gly	GGC	0.07	0.40	0.14	0.34	0.31	0.43	0.33	0.34	0.34	0.37	0.35	0.37	0.37	0.35	0.37	0.35	0.35	0.34	
Glu	GAG	0.17	0.31	0.43	0.77	0.59	0.67	0.60	0.61	0.60	0.64	0.60	0.64	0.60	0.64	0.62	0.58	0.64	0.62	0.58
Glu	GAA	0.83	0.69	0.57	0.23	0.41	0.33	0.40	0.39	0.40	0.36	0.40	0.36	0.40	0.36	0.40	0.36	0.38	0.42	
Asp	GAT	0.90	0.63	0.58	0.34	0.37	0.53	0.44	0.42	0.47	0.39	0.42	0.41	0.42	0.46	0.42	0.41	0.42	0.46	
Asp	GAC	0.10	0.37	0.42	0.66	0.63	0.47	0.56	0.58	0.53	0.61	0.58	0.59	0.58	0.54	0.58	0.59	0.58	0.54	
Val	GTG	0.07	0.37	0.19	0.33	0.35	0.47	0.46	0.48	0.46	0.51	0.49	0.50	0.46	0.47	0.49	0.50	0.46	0.47	
Val	GTA	0.47	0.15	0.15	0.05	0.15	0.11	0.12	0.11	0.12	0.08	0.10	0.08	0.08	0.12	0.08	0.10	0.08	0.08	0.12
Val	GTT	0.45	0.26	0.42	0.25	0.20	0.18	0.17	0.16	0.18	0.14	0.16	0.14	0.17	0.18	0.16	0.14	0.17	0.18	
Val	GTC	0.02	0.22	0.23	0.37	0.30	0.24	0.25	0.26	0.24	0.27	0.26	0.28	0.29	0.24	0.27	0.26	0.28	0.29	
Ala	GCG	0.04	0.35	0.06	0.08	0.17	0.19	0.10	0.10	0.07	0.12	0.11	0.12	0.10	0.11	0.12	0.10	0.10	0.11	
Ala	GCA	0.46	0.21	0.24	0.11	0.15	0.17	0.23	0.22	0.24	0.18	0.20	0.18	0.19	0.23	0.20	0.18	0.19	0.23	
Ala	GCT	0.45	0.16	0.45	0.35	0.36	0.19	0.29	0.28	0.33	0.24	0.26	0.25	0.26	0.26	0.24	0.26	0.25	0.26	
Ala	GCC	0.06	0.27	0.26	0.46	0.31	0.45	0.38	0.40	0.37	0.46	0.43	0.44	0.45	0.40	0.46	0.43	0.44	0.45	
Arg	AGG	0.12	0.02	0.15	0.04	0.21	0.11	0.22	0.21	0.19	0.20	0.21	0.22	0.20	0.21	0.22	0.20	0.21	0.21	
Arg	AGA	0.73	0.04	0.47	0.13	0.16	0.09	0.21	0.19	0.19	0.19	0.20	0.20	0.20	0.16	0.21	0.20	0.20	0.21	
Ser	AGT	0.30	0.15	0.15	0.07	0.11	0.14	0.15	0.15	0.16	0.12	0.14	0.13	0.14	0.15	0.14	0.13	0.14	0.15	
Ser	AGC	0.06	0.28	0.09	0.11	0.17	0.25	0.24	0.25	0.22	0.27	0.25	0.26	0.26	0.24	0.27	0.25	0.26	0.24	
Lys	AAG	0.19	0.23	0.54	0.85	0.69	0.71	0.61	0.63	0.61	0.63	0.61	0.63	0.61	0.63	0.61	0.63	0.61	0.57	
Lys	AAA	0.81	0.77	0.46	0.15	0.31	0.29	0.39	0.37	0.39	0.37	0.39	0.37	0.39	0.37	0.39	0.37	0.39	0.43	
Asn	AAT	0.90	0.45	0.47	0.17	0.29	0.44	0.43	0.40	0.45	0.39	0.40	0.39	0.41	0.47	0.39	0.40	0.39	0.41	
Asn	AAC	0.10	0.55	0.53	0.83	0.71	0.56	0.57	0.60	0.55	0.61	0.60	0.61	0.59	0.53	0.61	0.60	0.61	0.53	
Met	ATG	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
Ile	ATA	0.52	0.07	0.18	0.03	0.12	0.19	0.16	0.14	0.14	0.13	0.14	0.13	0.12	0.16	0.14	0.13	0.12	0.16	
Ile	ATT	0.43	0.51	0.50	0.44	0.29	0.34	0.34	0.32	0.35	0.29	0.33	0.29	0.30	0.36	0.29	0.33	0.29	0.30	
Ile	ATC	0.05	0.42	0.32	0.53	0.60	0.47	0.51	0.54	0.51	0.57	0.53	0.58	0.58	0.48	0.57	0.53	0.58	0.48	
Thr	ACG	0.04	0.27	0.11	0.11	0.16	0.26	0.11	0.12	0.08	0.15	0.13	0.13	0.18	0.12	0.15	0.13	0.13	0.12	
Thr	ACA	0.44	0.13	0.24	0.13	0.21	0.19	0.29	0.28	0.29	0.22	0.25	0.22	0.27	0.28	0.22	0.25	0.22	0.28	
Thr	ACT	0.46	0.17	0.40	0.26	0.27	0.17	0.25	0.23	0.26	0.20	0.22	0.22	0.22	0.24	0.20	0.22	0.22	0.24	
Thr	ACC	0.06	0.43	0.25	0.50	0.36	0.38	0.35	0.37	0.37	0.43	0.39	0.43	0.34	0.36	0.43	0.39	0.43	0.36	

10

20

30

40

【表1-2】

表1：コドン使用頻度（続き）

アミノ酸	コドン	コドン使用頻度 (%)																	
		ボツリヌス菌	大腸菌K12	ピクリス	ト	ヤロウイア・リ	ヤボリティカ	ヨトウガ	シヨウバエ	ハツカネズミ	ドブネズミ	モンゴルキヌゲ	イノシシ	ホス・タカルス	エクウス・カバ	サバンナモンキ	サビエン	モモス	
Trp	TGG	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00		
End	TGA	0.03	0.29	0.18	0.15	0.16	0.26	0.50	0.49	0.49	0.55	0.49	0.42	0.48	0.49			10	
Cys	TGT	0.80	0.45	0.66	0.45	0.35	0.29	0.48	0.44	0.47	0.39	0.42	0.43	0.39	0.45				
Cys	TGC	0.20	0.55	0.34	0.55	0.65	0.71	0.52	0.56	0.53	0.61	0.58	0.57	0.61	0.55				
End	TAG	0.23	0.07	0.28	0.39	0.16	0.33	0.23	0.23	0.26	0.19	0.23	0.23	0.32	0.23				
End	TAA	0.74	0.64	0.54	0.46	0.69	0.41	0.27	0.28	0.25	0.25	0.29	0.35	0.20	0.28				
Tyr	TAT	0.90	0.57	0.44	0.17	0.25	0.37	0.42	0.40	0.44	0.36	0.39	0.35	0.41	0.44				
Tyr	TAC	0.10	0.43	0.56	0.83	0.75	0.63	0.58	0.60	0.56	0.64	0.61	0.65	0.59	0.56				
Leu	TTG	0.10	0.13	0.33	0.09	0.20	0.18	0.13	0.12	0.15	0.11	0.12	0.11	0.12	0.13				
Leu	TTA	0.65	0.13	0.15	0.01	0.07	0.05	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06	0.05	0.06	0.07				
Phe	TTT	0.88	0.57	0.54	0.37	0.24	0.37	0.43	0.41	0.47	0.38	0.41	0.39	0.40	0.46				
Phe	TTC	0.12	0.43	0.46	0.63	0.76	0.63	0.57	0.59	0.53	0.62	0.59	0.61	0.60	0.54				
Ser	TCG	0.02	0.15	0.09	0.16	0.13	0.20	0.05	0.06	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06			
Ser	TCA	0.28	0.12	0.19	0.08	0.15	0.09	0.14	0.14	0.14	0.12	0.13	0.12	0.13	0.15				
Ser	TCT	0.30	0.15	0.29	0.28	0.19	0.08	0.19	0.19	0.22	0.17	0.18	0.18	0.19	0.19				
Ser	TCC	0.04	0.15	0.20	0.31	0.25	0.24	0.22	0.23	0.22	0.26	0.23	0.25	0.23	0.22				
Arg	CGG	0.01	0.10	0.05	0.11	0.05	0.15	0.19	0.20	0.20	0.21	0.20	0.18	0.22	0.21				
Arg	CGA	0.04	0.06	0.11	0.55	0.07	0.15	0.12	0.12	0.14	0.10	0.11	0.10	0.11	0.11				
Arg	CGT	0.09	0.38	0.16	0.10	0.26	0.16	0.09	0.09	0.11	0.07	0.08	0.10	0.08	0.08				
Arg	CGC	0.01	0.40	0.05	0.07	0.24	0.33	0.18	0.19	0.17	0.22	0.20	0.20	0.22	0.19				
Gln	CAG	0.14	0.65	0.39	0.82	0.60	0.70	0.75	0.76	0.77	0.78	0.76	0.76	0.73	0.74			30	
Gln	CAA	0.86	0.35	0.61	0.18	0.40	0.30	0.25	0.24	0.23	0.22	0.24	0.24	0.27	0.26				
His	CAT	0.87	0.57	0.54	0.32	0.32	0.40	0.40	0.38	0.44	0.35	0.36	0.38	0.36	0.42				
His	CAC	0.13	0.43	0.46	0.68	0.68	0.60	0.60	0.62	0.56	0.65	0.64	0.62	0.64	0.58				
Leu	CTG	0.01	0.50	0.16	0.38	0.31	0.43	0.40	0.42	0.40	0.45	0.43	0.46	0.41	0.40				
Leu	CTA	0.10	0.04	0.11	0.05	0.07	0.09	0.08	0.07	0.08	0.05	0.06	0.06	0.06	0.07				
Leu	CTT	0.13	0.10	0.16	0.18	0.13	0.10	0.13	0.12	0.13	0.11	0.12	0.11	0.15	0.13				
Leu	CTC	0.01	0.10	0.08	0.29	0.22	0.15	0.20	0.21	0.19	0.23	0.21	0.22	0.20	0.20				
Pro	CCG	0.03	0.52	0.09	0.09	0.16	0.29	0.10	0.11	0.08	0.14	0.13	0.11	0.11	0.11				
Pro	CCA	0.44	0.19	0.40	0.10	0.23	0.25	0.28	0.27	0.28	0.24	0.25	0.23	0.33	0.27				
Pro	CCT	0.46	0.16	0.35	0.32	0.30	0.13	0.30	0.30	0.32	0.26	0.27	0.30	0.24	0.28				
Pro	CCC	0.07	0.13	0.15	0.49	0.31	0.33	0.31	0.32	0.32	0.37	0.35	0.35	0.33	0.33			40	

## 【0139】

特定異種細胞のG+C含量を決定し、それがボツリヌス菌に見いだされるコドン使用頻度とどのように似ているかを決定するために、ボツリヌス菌および選択した異種細胞のG+C含量を、公的に維持されているコドン使用頻度データベース（URLアドレスwww.kazusa.or.jp/codon）から得られる情報を使って表にすることで、生物間の比較を容易にした（表2）。

【表2】

表2: G+C含量				
生物	総G+C含量 (%)	コドン第1塩基位置のG+C含量 (%)	コドン第2塩基位置のG+C含量 (%)	コドン第3塩基位置のG+C含量 (%)
ボツリヌス菌	25.29	33.44	28.38	14.04
大腸菌	51.80	58.89	40.72	55.79
ピキア・パストリス	42.99	49.16	37.49	42.32
ヤロウイア・リポリティカ	54.69	58.17	41.18	64.71
トウモロコシ	54.60	57.46	43.03	63.31
ヨトウガ	51.44	53.92	39.52	60.88
キイロショウジョウバエ	53.99	55.90	41.51	64.57
ハツカネズミ	52.33	55.57	42.19	59.24
ドブネズミ	52.82	55.64	41.64	61.19
モンゴルキヌゲネズミ	51.26	55.29	40.43	58.07
イノシシ	54.68	56.47	41.95	65.63
ボス・タウルス	53.14	55.43	41.46	62.53
エクウス・カバルス	53.63	55.96	40.71	64.21
サバンナモンキー	52.81	53.80	42.36	62.26
ホモ・サピエンス	52.54	56.10	42.55	58.99

## 【0140】

30

表1および表2を使用することにより、当業者は、オープンリーディングフレームが、そのオープンリーディングフレームを発現させるために選択した異種細胞によって好まれる同義コドンを与え、その異種細胞のG+C含量とより良く一致するようにG+C含量を増加させることになるように、配列番号2のオープンリーディングフレームに対して変化させるべきヌクレオチドを、手作業で選択することができる。

## 【0141】

40

## 2. コンピュータ支援によるヌクレオチド改変の選択

コードされているBoNT/Aの異種細胞における発現を増加させるために配列番号2のオープンリーディングフレームを改変する目的で、公けに利用できるBacktranslate Toolバージョン2(Entelechon,GmbH, ドイツ・レーゲンスブルグ, URLアドレスentelechon.com/en/g/backtranslation)を使って、各生物の同義コドン使用頻度を決定した。配列番号1の活性BoNT/Aアミノ酸配列を、このウェブベースのプログラムに投入して、期待の持てる改変オープンリーディングフレームを生成させた。次に、これらの改変配列をG+C含量について解析し、具体的異種細胞のG+C含量とより良く一致するような置換を行なった。この作業により、配列番号4～配列番号99の改変オープンリーディングフレームを得た。これらは、それぞれ配列番号1の活性BoNT/Aをコードするが、異種細胞中で発現させるために最適化されている。表示した種のコドン表を使って、核酸分子配列・配列番号4、7、10、13、16、19、22、25、28、31、34、37、40、43、46、49、52、55、58、61、64、67、70、73、76、79、82、85、88、91、94および97を作成した。この場合は、核酸分子の作成に際して、各アミノ酸に関するコドン使用頻度が維持されるようにした。例えば、大腸菌で発現

50

させるための核酸分子・配列番号4を作成する場合、アルギニンに関して選択したコドン使用頻度は、CGGが10%、CGAが6%、CGTが38%、CGCが40%、AGGが2%、そしてAGAが4%であり；アラニンに関するコドン使用頻度は、GCGが35%、GCAが21%、GCTが16%、そしてGCCが27%であり；システインに関するコドン使用頻度は、TGTが45%およびTGCが55%とした。

#### 【0142】

表示した種のコドン表を使って、核酸分子配列・配列番号5、8、11、14、17、20、23、26、29、32、35、38、41、44、47、50、53、56、59、62、65、68、71、74、77、80、83、86、89、92、95および98を作成した。この場合は、核酸分子を作成するために、各アミノ酸について最も頻繁に使用されるコドンだけを選択した。例えば、大腸菌で発現させるための核酸分子・配列番号5を作成する場合、アルギニンにはコドンCGCを使用し、アラニンにはコドンGCGを使用し、コドンTGCをシステインを使用した。10

#### 【0143】

表示した種のコドン表を使って、核酸分子配列・配列番号6、9、12、15、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、78、81、84、87、90、93、96および99を作成した。この場合は、核酸分子を作成する際に、各アミノ酸について、理論比の50%未満であるコドンを捨てた。アルギンは16.7%という理論比を持つ。なぜならこのアミノ酸は6種類のコドンによってコードされるからである。また、アラニンは25%という理論比を持つ。なぜならこのアミノ酸は4種類のコドンによってコードされるからである。また、システインは50%という理論比を持つ。なぜならこのアミノ酸は2種類のコドンによってコードされるからである。理論比の50%未満であるコドンを捨てるとは、アルギニンの場合は使用頻度が8.35%未満であるコドンを全て捨て、アラニンの場合は使用頻度12.5%未満のコドンを全て捨て、システインの場合は使用頻度25%未満のコドンを全て捨てるということを意味することになる。例えば、大腸菌で発現させるための核酸分子・配列番号6を作成する場合、アルギニンにはコドンCGG、CGTおよびCGCを使用し、アラニンにはコドンGCG、GCA、GCTおよびGCCを使用し、システインにはコドンTGTおよびTGCを使用した。20

#### 【実施例2】

#### 【0144】

#### 核酸分子の合成

BoNT/Aをコードする核酸分子を、大腸菌が好む特定の同義コドンが組み入れられ、かつG+C含量が約25%から約40%に増加するように改変した。まず、あるアルゴリズムにより、配列番号1のBoNT/Aをコードする改変オーブンリーディングフレームを生成させた(BlueHeron(登録商標)Biotechnology, ワシントン州ボセル)。このプログラムは、1)核酸のmRNA二次構造を減少させ(自由エネルギー計算に基づく)、2)核酸分子のオーブンリーディングフレームの同義コドン使用頻度を、大腸菌が好む総コドン使用頻度に変化させた。このアルゴリズムでは、反復過程によって改善解(すなわち、代表的コドン使用頻度と、より低い自由エネルギーとの組み合わせ)を探すために、統計モデルを使用する。次に、この配列を、Allerganにおいて当業者が改変することにより、発現ベクターへのクローニングを容易にするために核酸分子の5'末端(例えばEcoRV、BamH1、EcoRI、SacIおよびNdeI)ならびに3'末端(例えばSalI、HindIII、NotI、EagI、XbaIおよびAvaI)に、ユニークな制限エンドヌクレアーゼ部位を付加し、ポリモノヌクレオチド領域を減らし、内部調節配列または内部構造部位配列を除去した。3040

#### 【0145】

上述したこの配列情報に基づいて、BlueHeron(登録商標)Biotechnologyにより、配列番号3の核酸分子が合成された。標準的なホスホロアミダイト合成を使って、20~50塩基長のオリゴヌクレオチドを合成した。これらのオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせて二本鎖とし、それらを一つにライゲートすることにより、完全長核酸分子を組み立てた。標準的な分子生物学的方法を使って、この核酸分子をpUCBHB1ベクターのSmaI部位にクローニングすることにより、pUCBHB1-BoNT/Aを作製した。Big Dye Terminator(商標)Ch

10

20

30

40

50

emistry 3.1 (Applied Biosystems, カリフォルニア州フォスター・シティ) およびABI3100シーケンサー (Applied Biosystems, カリフォルニア州フォスター・シティ) を使って配列決定することにより、合成された核酸分子を検証した。

### 【実施例3】

#### 【0146】

##### pUCBHB1/iBoNT/A(H227Y)の構築

規制と安全性を考慮して、BoNT/Aをコードする改変オーブンリーディングフレームを含むコンストラクトの初期の発現は、酵素的に不活性なBoNT/A (iBoNT/A) を使って行なった。これら初期発現の試みにより、活性BoNT/Aをコードするコンストラクトを発現させるために必要なプロトコールおよび戦略の開発が可能になった。LC内の亜鉛結合モチーフの突然変異が酵素活性を妨害するという知見に基づいて、いくつかのiBoNT/A分子を設計した。まず最初に、BoNT/A中のヒスチジン227をチロシンで置換した (H227Y)。第2の点突然変位 (グルタミンでグルタミン酸224を置き換えるもの (E224Q)) も構築した。亜鉛結合残基を突然変異させたH227Y突然変異体とは異なり、H224Q突然変異では、開裂するペプチド結合に付加される求核性水分子の配位および活性化を担う残基が置き換えられる。これらの不活性突然変異はどちらも、高度に保存された亜鉛結合モチーフ内にある (表3)。

10

20

#### 【表3】

表3：亜鉛結合モチーフ不活性化突然変異

コンセンサスモチーフ：	HExxH
ネイティブBoNT/A	HELIH
iBoNT/A (H227Y)	HELIY
iBoNT/A (E224Q)	HQLIH

#### 【0147】

実施例3のpUCBHB1/BoNT/Aを、コンストラクトpUCBHB1/iBoNT/A(H227Y)の構築をもたらす部位特異的インピトロ突然変異誘発実験の出発コンストラクトとして使用した。pUCBHB1/iBoNT/A(H227Y)を構築するために、テンプレートとしてのpUCBHB1-BoNT/Aコンストラクト、以下のH227Yプライマー対：センスオリゴヌクレオチド, 5'-GTGACCTGGCACATGAACCTA TTTATGCCGGCATCGCTTGTATGGAATGCC-3' (配列番号100) およびアンチセンスオリゴヌクレオチド, 5'-GGCGATTCCATACAAGCGATGCCGGCATAAATAAGTTCATGTGCCAAGGTCAC-3' (配列番号101)、ならびにQuickChange (登録商標) II XL Site-Directed Mutagenesisキット (Stratagene, カリフォルニア州ラホーヤ) に含まれる試薬類を使って、50 μLの反応を組み立てた。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) ミックスは、10 × 緩衝液5 μL、デオキシリボヌクレオチド類 (dNTPs) 1 μL、PfuUltra (商標) High Fidelity DNAポリメラーゼ (2.5単位/ μL) 1 μL、各プライマー125ng、テンプレートDNA 100ng、および最終体積を50 μLにする量のヌクレアーゼフリー水を含有した。サーモサイクラーの条件は以下のとおりとした：95

30

で60秒を1サイクル；95 で30秒、55 で60秒、および72 で10分を16サイクル；72 で5分を1サイクル；および4 で保持。サーモサイクリング後に、DpnI制限酵素 (Stratagene, カリフォルニア州ラホーヤ) 1 μLを反応に加え、テンプレートDNAを消化するために37 で1時間インキュベートした。反応をQIAquickキット (QIAGEN, Inc., カリフォルニア州バレンシア) で精製し、アガロースゲル電気泳動で解析したところ、反応は完全長プラスミドをもたらしたことがわかった。突然変異誘発産物を化学的にコンピテントな大腸菌DH5 細胞 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) に熱ショック法によって形質転換し、100 μg/mLのアンピシリンを含有する1.5%ルリア-ベルタニ寒天平板 (p H7.0) に播種し、37 の培養器に入れて、終夜成長させた。候補突然変異誘発コンストラクトをアンピシリン耐性コロニーとして単離し、発現コンストラクトを単離するためにア

40

50

ルカリ溶解プラスミド少量調製法を使用し、インサートの存在を決定するためにエンドヌクレアーゼ消化を使用することによって解析した。候補プラスミドコンストラクトの配列解析により、点突然変異の組み込みを決定した。配列番号116の核酸分子は配列番号117のiBoNT/A(H227Y)をコードする。

【実施例4】

【0148】

pRSETb/His-iBoNT/A(H227Y)の構築

pRSETb/His-iBoNT/A(H227Y)を構築するために、pUCBHB1/iBoNT/A(H227Y)コンストラクトをBamHⅠおよびHindIIIで消化して、iBoNT/A(H227Y)インサートをコードする断片を切り出した。得られた制限断片をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Inc., カリフォルニア州バレンシア)で精製し、オープンリーディングフレーム全体を含有する断片を、制限エンドヌクレアーゼBamHⅠおよびHindIIIで消化しておいたpRSETbベクター(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)にサブクローニングした。断片とベクターをT4 DNAリガーゼにより16<sup>10</sup>で終夜ライゲートすることにより、pRSETb/His-iBoNT/A(H227Y)を得た。ライゲーション混合物の一部を化学的にコンピテントなTOP10細胞(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)に標準的な熱ショックプロトコールで形質転換し、100 μg/mLのアンピシリンを含有する1.5%ルリア-ベルタニ寒天平板(pH7.0)に播種し、37<sup>20</sup>の培養器に入れて終夜成長させた。候補発現コンストラクトをアンピシリン耐性コロニーとして選択した。耐性コロニーを使って、100 μg/mLのアンピシリンを含有するルリア-ベルタニ培地2mLに接種し、次にそれを37<sup>20</sup>の培養器中、250rpmで振とうしながら終夜成長させた。微量遠心分離によって細菌細胞を収集し、QIAGENミニプレップキット(QIAGEN, Inc., カリフォルニア州バレンシア)を使ってプラスミドDNAを単離した。BamHⅠおよびPstIを使った制限消化で正しいインサート断片の存在および向きを決定することにより、候補発現コンストラクトをスクリーニングした。所望の発現コンストラクトを含有する培養物を使って、100 μg/mLのアンピシリンを含有するルリア-ベルタニ培地200mL<sup>30</sup>が入っている1Lバッフル付きフラスコに接種し、37<sup>30</sup>の培養器に入れて、250rpmで振とうしながら終夜成長させた。発現コンストラクトに相当する精製プラスミドDNAを、QIAGEN Maxi-prep法(QIAGEN, Inc., カリフォルニア州バレンシア)を使って単離し、配列決定することにより、正しい発現コンストラクトが作製されたことを検証した。このクローニング戦略により、配列番号119のアミノ末端エンテロキナーゼ切断可能ポリヒスチジンアフィニティ結合ペプチドに作動可能に連結されたiBoNT/A(H227Y)をコードする配列番号118の核酸分子を含むpRSETb発現コンストラクトを得た。

【実施例5】

【0149】

pRSETb/His-iBoNT/A(H227Y)の発現

以下の実施例は、本明細書に開示する発現コンストラクトからBoNT/Aを発現させるのに役立つ手法を例示するものである。pRSETb/His-iBoNT/A(H227Y)発現コンストラクトを、熱ショック形質転換プロトコールを使って、化学的にコンピテントな大腸菌BL21(DE3)細胞(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)に導入した。その熱ショック反応を、100 μg/mLのアンピシリンを含有する1.5%ルリア-ベルタニ寒天平板(pH7.0)<sup>40</sup>に播種し、37<sup>40</sup>の培養器に入れて、終夜成長させた。pRSETb/His-iBoNT/A(H227Y)を含有する形質転換大腸菌のアンピシリン耐性コロニーを使って、100 μg/mLのアンピシリンを含有するPA-0.5G培地3.0mLが入っているバッフル付きフラスコに接種し、次にそれを37<sup>40</sup>の培養器に入れて、250rpmで振とうながら終夜成長させた。得られた終夜スター<sup>40</sup>培養物を使って、今度は、100 μg/mLのアンピシリンを含有するZYP-5052自己誘導培地が入っている3Lバッフル付きフラスコに、1:1000の希釈率で接種した。培養体積は約600mL(フラスコ体積の20%)~約750mL(フラスコ体積の25%)の範囲とした。これらの培養物を37<sup>40</sup>の培養器中、250rpmで振とうしながら、約5.5時間成長させた後、16<sup>40</sup>の培養器に移し、250rpmで振とうしながら終夜発現させた。細胞を遠心分離(4,000rpm、4<sup>40</sup>で、20<sup>40</sup>~30分)によって収集し、直ちに使用するか、必要になるまで-80<sup>40</sup>で乾燥保存した。

10

20

30

40

50

## 【実施例 6】

## 【0150】

## His-iBoNT/A(H227Y)の精製および定量

以下の実施例は、本明細書に開示するBoNT/Aの精製および定量に役立つ方法を例示するものである。固定化金属アフィニティーカラムクロマトグラフィー（IMAC）タンパク質精製のために、実施例5に記載の、His-iBoNT/A(H227Y)を発現させるために使用した大腸菌BL21(DE3)細胞ペレットを、カラム結合緩衝液（25mM N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES), pH7.8; 500mM塩化ナトリウム; 10mMイミダゾール; 2×Protease Inhibitor Cocktail Set III (EMD Biosciences-Calbiochem, カリフォルニア州サンディエゴ); 5単位/mLのベンゾナーゼ(Benzonase) (EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン); 0.1%(v/v)Triton-X(登録商標)100, 4-オクチルフェノールポリエトキシレート; 10%(v/v)グリセロール)に再懸濁し、次に冷たいオークリッジ遠心管に移した。細胞を溶解し、His-iBoNT/Aを放出させるために、細胞懸濁液を氷上で超音波処理し(Branson Digital Sonifierを使用して、40%の強度で10秒間のパルスを60秒間の冷却期間を挟んで10~12回)、次に溶解液を清澄化するために遠心分離した(16,000rpm, 4°で20分)。TALON(商標)SuperFlow Co<sup>2+</sup>アフィニティー樹脂(BD Biosciences-Clontech, カリフォルニア州パロアルト)を充填した20mL Econo-Pacカラムサポート(Bio-Rad Laboratories, カリフォルニア州ハーキュリーズ)を使って固定化金属アフィニティーカラムクロマトグラフィーカラムを調製し、次に、それを、5カラム体積の脱イオン蒸留水ですすぎ、次いで5カラム体積のカラム結合緩衝液ですすぐことによって平衡化した。清澄化した溶解液を、平衡化したカラムに、重力流によってゆっくり適用した(約0.25~0.3mL/分)。次に、5カラム体積のカラム洗浄緩衝液(N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES), pH7.8; 500mM塩化ナトリウム; 10mMイミダゾール; 0.1%(v/v)Triton-X(登録商標)100, 4-オクチルフェノールポリエトキシレート; 10%(v/v)グリセロール)で、カラムを洗浄した。His-iBoNT/Aを、20~30mLのカラム溶出緩衝液(25mM N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES), pH7.8; 500mM塩化ナトリウム; 500mMイミダゾール; 0.1%(v/v)Triton-X(登録商標)100, 4-オクチルフェノールポリエトキシレート; 10%(v/v)グリセロール)で溶出させ、およそ12個の1mL画分に集めた。各溶出画分に含まれるHis-iBoNT/A(H227Y)の量をプラッドフォード色素アッセイによって決定した。この作業では、各1.0mL画分のうち20μLを、Bio-Rad Protein Reagent(Bio-Rad Laboratories, カリフォルニア州ハーキュリーズ)200μLと混合し、脱イオン蒸留水で1対4に希釈した後、比色シグナルの強さを分光光度計を使って測定した。最も強いシグナルを持つ五つの画分を溶出ピークであるとみなして、プールした。プールしたピーク溶出画分の総タンパク質濃度を、ウシガソマグロプリン(Bio-Rad Laboratories, カリフォルニア州ハーキュリーズ)を標準を使って見積ることにより、総タンパク質収量を決定した。

## 【0151】

FPLC脱塩カラムを使ってBoNT/Aを精製するために、HiPrep(商標)26/10サイズ排除カラム(Amersham Biosciences, ニュージャージー州ピスカタウェイ)を、4のカラム緩衝液(50mMリン酸ナトリウム, pH6.5)80mLで、予め平衡化した。カラムを平衡化した後、BioLogic DuoFlowクロマトグラフィーシステム(Bio-Rad Laboratories, カリフォルニア州ハーキュリーズ)を使って、His-iBoNT/A(H227Y)試料を、4カラム緩衝液の定組成移動相と共に10mL/分の流速で、サイズ排除カラムに適用した。脱塩されたHis-iBoNT/A(H227Y)試料を約7~12mLの单一画分として集めた。

## 【0152】

FPLCイオン交換カラムを使ってBoNT/Aを精製するために、IMACカラムからの溶出後に脱塩しておいたHis-iBoNT/A(H227Y)試料を、1mL UNO-S1(商標)カチオン交換カラム(Bio-Rad Laboratories, カリフォルニア州ハーキュリーズ)に、BioLogic DuoFlowクロマトグラフィーシステム(Bio-Rad Laboratories, カリフォルニア州ハーキュリーズ)を使って適用した。試料を、4のカラム緩衝液(50mMリン酸ナトリウム, pH6.5)中のカラムに適

10

20

30

40

50

用し、4 の溶出緩衝液（50mMリン酸ナトリウム，1M塩化ナトリウム，pH6.5）を使った以下の直線的勾配で溶出させた：ステップ1，流速1mL/分の5%溶出緩衝液5.0mL；ステップ2，流速1mL/分の5～30%溶出緩衝液20.0mL；ステップ3，流速1.0mL/分の50%溶出緩衝液2.0mL；ステップ4，流速1.0mL/分の100%溶出緩衝液4.0mL；およびステップ5，流速1.0mL/分の0%溶出緩衝液5.0mL。カラムからのペプチドの溶出を280、260、および214nmで監視し、280nmで最小閾値（0.01au）を超えて吸収するピークを集めた。His-iBoNT/Aの大部分は約100～200mMの塩化ナトリウム濃度で溶出した。ブラッドフォードアッセイで決定したHis-iBoNT/A(H227Y)の平均総収量は、約1～2mg/Lだった。

#### 【0153】

His-iBoNT/A(H227Y)の発現をポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析した。上述の手法を使って精製した試料を2×LDS Sample Buffer (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)に加え、NuPAGE (登録商標) Novex 4-12% ビス-トリスプレキャストポリアクリルアミドゲル (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) を用いるMOPSポリアクリルアミドゲル電気泳動により、変性還元条件下でペプチドを分離した。ゲルをSYPRO (登録商標) Ruby (Bio-Rad Laboratories, カリフォルニア州ハーキュリーズ) で染色し、分離されたペプチドを、Fluor-S MAX MultiImager (Bio-Rad Laboratories, カリフォルニア州ハーキュリーズ) で撮像することにより、ペプチド発現レベルを定量した。His-iBoNT/A(H227Y)のサイズおよび量は、MagicMark (商標) タンパク質分子量標準 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)との比較によって決定した。現われたのは完全長His-iBoNT/A(H227Y)であることが、ゲルによって明らかになった。

#### 【0154】

His-iBoNT/A(H227Y)の発現をウェスタンプロット解析でも解析した。上述の手法を使って精製したタンパク質試料を2×LDS Sample Buffer (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)に加え、NuPAGE (登録商標) Novex 4-12% ビス-トリスプレキャストポリアクリルアミドゲル (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) を用いるMOPSポリアクリルアミドゲル電気泳動により、変性還元条件下で分離した。分離したペプチドを、Trans-Blot (登録商標) SDセミドライ電気泳動転写セル装置 (Bio-Rad Laboratories, カリフォルニア州ハーキュリーズ) を使ったウェスタンプロッティングにより、ゲルからポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) に移した。25mMトリス緩衝食塩水 (25mM 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール-塩酸 (トリス-HCl) (pH7.4), 137mM塩化ナトリウム, 2.7mM塩化カリウム)、0.1%TWEEN-20 (登録商標)，モノラウリン酸ポリオキシエチレン(20)ソルビタン、2%ウシ血清アルブミン、5%脱脂粉乳を含有する溶液中、室温で2時間インキュベートすることにより、PVDF膜をブロックした。ブロックした膜を、プローブとして以下の一次抗体の一つを含有するトリス緩衝食塩水TWEEN-20 (登録商標) (25mMトリス緩衝食塩水、0.1%TWEEN-20 (登録商標)，モノラウリン酸ポリオキシエチレン(20)ソルビタン) 中、4 で終夜インキュベートした：ウサギポリクローナル抗BoNT/A抗血清 (Allergan, Inc.) の1:5,000希釈液；またはウサギポリクローナル抗ポリヒスチジン抗血清 (Abcam Inc., マサチューセッツ州ケンブリッジ) の1:10,000希釈液。一次抗体でプローブしたプロットを、トリス緩衝食塩水TWEEN-20 (登録商標) 中で、15分ずつ3回洗浄した。洗浄した膜を、二次抗体としてセイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) にコンジュゲートしたヤギポリクローナル抗ウサギ免疫グロブリンG重鎖および軽鎖 (IgG, H+L) 抗体 (Pierce Biotechnology, Inc., イリノイ州ロックフォード) の1:20,000希釈液を含有するトリス緩衝食塩水TWEEN-20 (登録商標) 中、室温で2時間インキュベートした。二次抗体でプローブしたプロットを、トリス緩衝食塩水TWEEN-20 (登録商標) 中で、15分ずつ3回洗浄した。標識されたHis-iBoNT/A(H227Y)のシグナル検出を、ECL Plus (商標) Western Blot Detection System (Amersham Biosciences, ニュージャージー州ピスカタウェイ) を使って可視化し、Typhoon 9410 Variable Mode Imager (Amersham Biosciences, ニュージャージー州ピスカタウェイ) で撮像することにより、His-iBoNT/A(H227Y)発現レベルを定量した

。

### 【実施例 7】

#### 【0 1 5 5】

##### pET30b/His-iBoNT/A(H227Y)の構築

pET30b/His-iBoNT/A(H227Y)を構築するために、pRSETb/iBoNT/A(H227Y)コンストラクトをBamHⅠおよびHindIIIで消化して、iBoNT/A(H227Y)をコードする断片を切り出した。得られた制限断片をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Inc., カリフォルニア州バレンシア)で精製し、オープンリーディングフレーム全体を含有する断片を、制限エンドヌクレアーゼBamHⅠおよびHindIIIで消化しておいたpET30bベクター(EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン)にサブクローニングした。断片とベクターをT4 DNAリガーゼにより16<sup>10</sup>で終夜ライゲートすることにより、pET30b/His-iBoNT/A(H227Y)を得た。

ライゲーション混合物の一部を化学的にコンピテントなTOP10細胞(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)に標準的な熱ショックプロトコールで形質転換し、50 μg/mlのカナマイシンを含有する1.5%ルリア-ペルタニ寒天平板(pH7.0)に播種し、37

の培養器に入れて終夜成長させた。候補発現コンストラクトをカナマイシン耐性コロニーとして選択した。耐性コロニーを使って、50 μg/mLのカナマイシンを含有するルリア-ペルタニ培地2mLに接種し、次にそれを37<sup>20</sup>の培養器中、250rpmで振とうしながら終夜成長させた。微量遠心分離によって細菌細胞を収集し、QIAGENミニプレップキット(QIAGEN, Inc., カリフォルニア州バレンシア)を使ってプラスミドDNAを単離した。BamHⅠおよびPstIを使った制限消化で正しいインサート断片の存在および向きを決定することにより、候補発現コンストラクトをスクリーニングした。所望の発現コンストラクトを含有する培養物を使って、50 μg/mLのカナマイシンを含有するルリア-ペルタニ培地200mLが入っている1Lバッフル付きフラスコに接種し、37<sup>20</sup>の培養器に入れて、250rpmで振とうしながら終夜成長させた。発現コンストラクトに相当する精製プラスミドDNAを、QIAGEN Maxi-prep法(QIAGEN, Inc., カリフォルニア州バレンシア)を使って単離し、配列決定することにより、正しい発現コンストラクトが作製されたことを検証した。このクローニング戦略により、配列番号119のアミノ末端エンテロキナーゼ切断可能ポリヒスチジンアフィニティ結合ペプチドに作動可能に連結されたiBoNT/A(H227Y)をコードする配列番号118の核酸分子を含むpET30b発現コンストラクトを得た。

### 【実施例 8】

#### 【0 1 5 6】

##### pET30b/His-iBoNT/A(H227Y)の発現およびHis-iBoNT/A(H227Y)の精製と定量

以下の実施例は、本明細書に開示する発現コンストラクトからBoNT/Aを発現させるのに役立つ手法を例示するものである。pET30b/His-iBoNT/A(H227Y)発現コンストラクトを、熱ショック形質転換プロトコールを使って、化学的にコンピテントな大腸菌BL21(DE3)細胞(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)に導入した。その熱ショック反応を、50 μg/mLのカナマイシンを含有する1.5%ルリア-ペルタニ寒天平板(pH7.0)に播種し、37<sup>40</sup>の培養器に入れて、終夜成長させた。pET30b/His-iBoNT/A(H227Y)を含有する形質転換大腸菌のカナマイシン耐性コロニーを使って、50 μg/mLのカナマイシンを含有するPA-0.5G培地3.0mLが入っているバッフル付きフラスコに接種し、次にそれを37<sup>40</sup>の培養器に入れて、250rpmで振とうしながら終夜成長させた。得られた終夜スター培養物を使って、今度は、50 μg/mLのカナマイシンを含有するZYP-5052自己誘導培地が入っている3Lバッフル付きフラスコに、1:1000の希釈率で接種した。培養体積は約600mL(フラスコ体積の20%)~約750mL(フラスコ体積の25%)の範囲とした。これらの培養物を37

の培養器中、250rpmで振とうしながら、約5.5時間成長させた後、16<sup>40</sup>の培養器に移し、250rpmで振とうながら終夜発現させた。細胞を遠心分離(4,000rpm、4<sup>40</sup>で、20~30分)によって収集し、直ちに使用するか、必要になるまで-80<sup>40</sup>で乾燥保存した。

#### 【0 1 5 7】

pET30b/His-iBoNT/A(H227Y)発現コンストラクトから発現させたHis-iBoNT/A(H227Y)を、上記実施例6で述べたように精製し、定量した。His-iBoNT/A(H227Y)発現レベルを解析

10

20

30

40

50

するために、実施例6で述べた精製手法を使って、His-iBoNT/A(H227Y)を精製した。各培養物からの発現を、(実施例6に記述したように)プラッドフォード色素アッセイ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンプロット解析で評価した(図6a参照)。His-iBoNT/A(H227Y)の平均総収量は、プラッドフォードアッセイで決定したところ、約4~5 mg/Lだった。

#### 【実施例9】

#### 【0158】

#### pET30b/His-BoNT/Aの構築

活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレームを含むプラスミド(図2)を、pET30b/His-iBoNT/A(H227Y)の部位特異的突然変異誘発によって作製した。実施例3で述べた手法および以下の二つのオリゴヌクレオチドを用いる一段階の部位特異的突然変異誘発で不活化H227Yの修正を行なうことにより、pRSETb/His-BoNT/Aを得た: Y227Hプライマー対, センスオリゴヌクレオチド, 5'-GTGACCTTGGCACATGAACCTATTCATGCCGGGCATCGCTTGTATGGAATCGCC-3'(配列番号102)およびアンチセンスオリゴヌクレオチド, 5'-GGCGATTCCA TACAAGCGATGCCGGCCATGAATAAGTTCATGTGCCAAGGTCAC-3(配列番号103)。アミノ酸番号は、アミノ末端ポリヒスチジンタグを持たないネイティブ配列に対応している。H227Yを修正するために変化させたヌクレオチドを太字で表し、下線を付す。この突然変異誘発により、配列番号111の活性His-BoNT/Aをコードする配列番号110の改変オープンリーディングフレームが得られた。

#### 【0159】

活性は、GFP-SNAP25蛍光放出アッセイを使って、GFP-SNAP25基質のタンパク質加水分解的切断によって同定した(例えばLance E.Stewardら「GFP-SNAP25 Fluorescence Release Assay for Botulinum Neurotoxin Protease Activity(ボツリヌス神経毒プロテアーゼ活性のGFP-SNAP25蛍光放出アッセイ」米国特許出願公開第2005/0100973号(2005年5月12日)を参照されたい)。候補pET30b/His-BoNT/A発現コンストラクトを、熱ショック法を使って、化学的にコンピテントな大腸菌BL21(DE3)細胞(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)に形質転換し、50 μg/mLのカナマイシンを含有する1.5%ルリア-ペルタニ寒天平板(pH7.0)に播種し、37℃の培養器に入れて、終夜成長させた。pET30b/His-BoNT/A候補を含有するカナマイシン耐性コロニーを使って、メンブレンリッドを取付けたエッペンドルフLid-Bacチューブ中の、50 μg/mLのカナマイシンを含有するZYP-5052自己誘導培地の1mL培養物に接種した。バイオセイフティーキャビネットに置いたサーモミキサー(1400rpm、37℃)で、濁りが生じるまで、培養物をインキュベートした(約7~8時間)。次に温度を22℃に下げ、培養物を約16時間インキュベートした。細胞を遠心分離(6,000×g、4℃で30分)によって収集し、デカントし、溶解を改善するために-80℃で短時間凍結した。細胞ペレットを氷上で解凍し、25単位/mLのベンゾナーゼヌクレアーゼ(EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン)、1KU/mLリゾチーム(EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン)および2×Protease Inhibitor Cocktail III(EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン)を含有するBugBuster(登録商標)溶解溶液(EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン)350 μLに、それぞれを再懸濁し、その混合物を、サーモミキサー中、22℃、400rpmで、30分間インキュベートした。遠心分離(36,000×g、4℃で15分間)によって溶解液を清澄化し、上清溶液を低残渣微量遠心管に移し、氷上に置いた。

#### 【0160】

GFP-SNAP25基質のタンパク質分解的切断によって、His-BoNT/A候補の活性を同定した。各アッセイ反応は、2×毒素反応緩衝液(100mM N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES), pH7.4; 20 μM塩化亜鉛; 20mMジチオスレイトール; 0.2%(v/v)TWEEN-20(登録商標), モノラウリン酸ポリオキシエチレン(20)ソルビタン)25 μL、清澄化した溶解液10 μL、および50 μM GFP-SNAP25<sub>(134-206)</sub>基質15 μLを含有した。対照反応は、溶解液の代わりに10 μLの水または0.2 μg/mLのLC/Aを含有した。反応を三つ一组にして、37℃で1時間インキュベートした後、8M塩酸グアニジン20 μLでクエンチした

10

20

30

40

50

。クエンチした反応を、TALON(商標) SuperFlow Co<sup>2+</sup>アフィニティ樹脂(BD Bioscience s-Clontech, カリフォルニア州パロアルト)75 μLが入っているフィルターブレートのウェル(脱イオン蒸留水200 μLおよびアッセイリンス緩衝液(50mM N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES), pH7.4)200 μLですすぐことによって調整しておいたもの)に移した。樹脂上で15分間インキュベートした後、反応溶液を減圧濾過によって溶出させて、黒色96穴プレートに集め、それをさらに2回、樹脂床に通し、最終通過後に集めた。次に、各樹脂床をアッセイリンス緩衝液210 μLですすぎ、それを反応溶液が入っているブレートに溶出させた。溶出した反応溶液の蛍光をSpectraMax Gemini XS分光光度計(Molecular Devices,  $\lambda_{ex}$  474nm;  $\lambda_{em}$  509nm; 495nmカットオフフィルター)で測定した。対照反応は、溶解液の代わりに10 μLの水または0.2 μg/mLのLC/Aを含有した。陽性のHis-BoNT/A候補は、有意なプロテアーゼ活性を示した(図3参照)。

10

## 【実施例10】

## 【0161】

改変オープンリーディングフレームおよび無改変オープンリーディングフレームから発現されるHis-BoNT/A量の比較

無改変オープンリーディングフレームと比較して、改変オープンリーディングフレームから発現される増加したBoNT/Aの量は、以下のようにして決定することができる。別々の反応で、配列番号3の改変オープンリーディングフレームを含むpET30b/His-BoNT/A発現コンストラクト、および配列番号2の無改変オープンリーディングフレームを含むpET30b/His-BoNT/Aコンストラクトを、熱ショック形質転換プロトコールを使って、化学的にコンピメントな大腸菌BL21(DE3)細胞(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)に導入する。その熱ショック反応を、50 μg/mLのカナマイシンを含有する1.5%ルリア-ベルタニ寒天平板(pH7.0)に播種し、37 の培養器に入れて、終夜成長させる。両発現コンストラクトから得られるpET30b/His-BoNT/Aコンストラクトを含有する形質転換大腸菌のカナマイシン耐性コロニーを使って、カナマイシン耐性選択PA-0.5G培地3.0mLが入っている別々の15mLチューブに接種し、それを37 の培養器に入れて、250rpmで振とうしながら終夜成長させる。各コンストラクトから得られる終夜スターーター培養物のうち約600 μLを使って、カナマイシン耐性ZYP-5052自己誘導培地600mLが入っている3.0Lバッフル付きフラスコに接種する。接種した培養物を37 の培養器中、250rpmで振とうしながら約5.5時間成長させた後、16 の培養器に移し、250rpmで振とうながら終夜発現させる。遠心分離(4,000rpm、4 で20~30分)によって細胞を収集する。

20

## 【0162】

改変オープンリーディングフレームと無改変オープンリーディングフレームの両者から得られるHis-BoNT/A発現レベルを解析するために、実施例8に記載のIMAC法を使って、His-BoNT/Aを精製する。配列番号3の改変オープンリーディングフレームから產生されるHis-BoNT/Aの量が、配列番号2の無改変オープンリーディングフレームから発現されるHis-BoNT/Aの量と比較して大きいかどうかを決定するために、各培養物からの発現を(実施例6で述べたように)プラッドフォード色素アッセイ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンプロット解析で評価する。改変オープンリーディングフレームから発現される活性His-BoNT/Aの量には5倍の増加が予想される。改変オープンリーディングフレームから発現されるIMAC精製活性His-BoNT/Aの平均量は約5mg/Lと予測されるのに対して、他の点では同一である核酸分子中の無改変オープンリーディングフレームから発現されるIMAC精製活性His-BoNT/Aは約1mg/Lであると予測される。

30

## 【実施例11】

## 【0163】

pET29b/iBoNT/A-KHis(H227Y)の構築

40

pET29b/iBoNT/A-KHis(H227Y)を構築するために、三段階戦略を使用して、まず、pRSETb/His-iBoNT/A(H227Y)コンストラクトのiBoNT/A(H227Y)をコードするオープンリーディングフレームから、二つの内部NdeI制限エンドヌクレアーゼ部位を除去し、次にカルボキシ末端リジン残基をiBoNT/A(H227Y)に付加し、最後にこの改変断片をpET29bベクターにサブ

50

クローニングした。iBoNT/A(H227Y)をコードするオープンリーディングフレームから、部位特異的突然変異誘発プロトコールを使って、二つの内部NdeI制限エンドヌクレアーゼ部位を除去した。テンプレートとしてのpRSETb/iBoNT/A(H227Y)発現コンストラクト、Quick Change (登録商標) II XL Site-Directed Mutagenesisキット (Stratagene, カリフォルニア州ラホーヤ)に含まれる試薬類、ならびに以下の四つのオリゴヌクレオチドプライマー：SL103プライマー対，センスオリゴヌクレオチド，5'-GATGAACTCGATGATCCCTTACGGTGTGAAACGTCTGG-3' (配列番号104) およびアンチセンスオリゴヌクレオチド，5'-CCAGACGTTCAACCGTAAGGGATCATCGAGTTCATC-3' (配列番号105)；ならびにSL104プライマー対，センスオリゴヌクレオチド，5'-CCAGACGTTCACACCGTAAGGGATCATCGAGTTCATC-3' (配列番号106) およびアンチセンスオリゴヌクレオチド，5'-GATGAACTCGATGATCCCTTACGGTGTGAAACGTCTGG-3' (配列番号107) を使って、50 μLの反応を組み立てた。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) ミックスは、10×緩衝液5 μL、デオキシリボヌクレオチド類 (dNTPs) 1 μL、PfuUltra (商標) High Fidelity DNAポリメラーゼ (2.5単位 / μL) 1 μL、各プライマー125ng、テンプレートDNA 50ng、および最終体積を50 μLにする量のヌクレアーゼフリー水を含有した。サーモサイクラーの条件は以下のとおりとした：95 で120秒を1サイクル；90 で60秒、55 で30秒、および72 で20分を20サイクル；72 で9分を1サイクル；および10 で保持。サーモサイクリング後に、DpnI制限酵素1 μLを反応に加え、テンプレートDNAを消化するために37 で2時間インキュベートした。反応をQIAquickキット (QIAGEN, Inc., カリフォルニア州バレンシア) で精製し、アガロースゲル電気泳動で解析したところ、反応は完全長プラスミドをもたらしたことがわかった。突然変異誘発産物を化学的にコンピメントな大腸菌TOP10細胞 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) に熱ショック法によって形質転換し、100 μg/mLのアンピシリンを含有する1.5%ルリア-ベルタニ寒天平板 (pH7.0) に播種し、37 の培養器に入れて、終夜成長させた。候補コンストラクトをアンピシリン耐性コロニーとして単離し、発現コンストラクトを単離するためにアルカリ溶解プラスミド少量調製法を使用し、NdeI部位を持たないインサートの存在を決定するためにNdeI制限エンドヌクレアーゼ消化を使用して解析した。候補プラスミドコンストラクトのオープンリーディングフレーム全体の配列解析により、二つの内部NdeI部位の除去が確認された。このクローニング戦略により、二つの内部NdeI制限エンドヌクレアーゼ部位を欠くオープンリーディングフレームを含むpRSETb/His-iBoNT/A(H227Y)コンストラクトが得られた。

## 【0164】

NdeI 改変pRSETb/His-iBoNT/A(H227Y)コンストラクトによってコードされるiBoNT/A(H227Y)を、トリプシン切断部位として役立ちうるリジン残基をタンパク質のカルボキシル末端に付加するオリゴヌクレオチドプライマーを使ってオープンリーディングフレームをPCR增幅することにより、pET29bベクターにサブクローニングした。テンプレートとしてのNdeI 改変pRSETb/His-iBoNT/A(H227Y)発現コンストラクト、Expand High Fidelity PCRシステム (Roche Applied Science, インディアナ州インディアナポリス) に含まれる試薬類、ならびに以下の二つのオリゴヌクレオチドプライマー：SL101プライマー対，NdeIセンスオリゴヌクレオチド，5'-CGCCATATGCCGTTCGTAAACAAACAGTTC-3' (配列番号108) およびアンチセンスオリゴヌクレオチド，5'-CCCAAGCTTGTGACTTTCAATGGCGTTCTCCCCAACGTC-3' (配列番号109) を使って、50 μLの反応を組み立てた。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) ミックスは、10×緩衝液5 μL、デオキシリボヌクレオチド類 (dNTPs) 1 μL、PfuUltra (商標) High Fidelity DNAポリメラーゼ (2.5単位 / μL) 1 μL、各プライマー125ng、テンプレートDNA 100ng、および最終体積を50 μLにする量のヌクレアーゼフリー水を含有した。サーモサイクラーの条件は以下のとおりとした：95 で120秒を1サイクル；95 で45秒、55 で60秒、および72 で3分を25サイクル；72 で7分を1サイクル；および10 で保持。*iBoNT/A-K(H227Y)*インサートを切り出すために、PCR増幅産物をHindIIIおよびNdeIにより、37 で2.5時間消化した。得られた制限断片を、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Inc., カリフォルニア州バレンシア) で精製し、オープンリーディングフレームを含有する断片を、制限エンドヌクレアーゼHindIIIおよびNdeIで消化しておいたpET29bベク

10

20

30

40

50

ター（EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン）にサブクローニングした。T4 DNAリガーゼプロトコールを使って断片とベクターとをライゲートすることにより、pET29b/BoNT/A-KHis(H227Y)を得た。このライゲーション混合物の一部を、標準的な熱ショックプロトコールによって、コンピテントTOP10細胞（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）に形質転換し、50 μg/mLのカナマイシンを含有する1.5%ルリア-ベルタニ寒天平板（pH7.0）に播種し、37 の培養器に入れて、終夜成長させた。候補発現コンストラクトをカナマイシン耐性コロニーとして単離した。耐性コロニーを使って、50 μg/mLのカナマイシンを含有するルリア-ベルタニ培地2mLに接種し、37 の培養器中、250rpmで振とうしながら終夜成長させた。微量遠心分離によって細菌細胞を収集し、QIAGENミニプレップキット（QIAGEN, Inc., カリフォルニア州バレンシア）を使ってプラスミドDNAを単離した。NdeIおよびHindIIIによる制限消化で正しいインサート断片の存在を決定することにより、候補発現コンストラクトをスクリーニングした。所望の発現コンストラクトを含有する培養物を使って、50 μg/mLのカナマイシンを含有するルリア-ベルタニ培地200mLが入っている1Lバッフル付きフラスコに接種し、37 の培養器に入れて、250rpmで振とうしながら終夜成長させた。QIAGEN Maxi-prep法（QIAGEN, Inc., カリフォルニア州バレンシア）を使って、発現コンストラクトに相当する精製プラスミドDNAを単離し、それを配列決定することにより、正しい発現コンストラクトが作製されたことを検証した。このクローニング戦略により、配列番号121の、カルボキシル末端リジン残基とそれに続くトリプシン切断可能なポリヒスチジンアフィニティ結合ペプチドに作動可能に連結されたiBoNT/A(H227Y)をコードする、配列番号120の核酸分子を含むpET29b発現コンストラクトが得られた。

10

20

20

30

40

50

## 【実施例 1 2】

## 【0 1 6 5】

## pET29b/BoNT/A-KHisの構築

活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレームを含むプラスミド（図4）を、pET29b/iBoNT/A-KHis(H227Y)のインビトロ部位特異的突然変異誘発によって作製した。実施例3で述べた手法および以下の二つのオリゴヌクレオチドを用いる一段階の部位特異的突然変異誘発で不活性H227Yの修正を行なうことにより、pET29b/BoNT/A-KHisを得た：Y227Hプライマー対，センスオリゴヌクレオチド，5'-GTGACCTTGGCACATGAACCTATT<sub>CATGCC</sub>GGGCATCGCTTGATGGAATCGCC-3'（配列番号102）およびアンチセンスオリゴヌクレオチド，5'-GGCGATTCCATACAAGCGATGCCGGCATGAATAAGTCATGTGCCAAGGTCAC-3'（配列番号103）。アミノ酸番号は、アミノ末端ポリヒスチジンタグを持たないネイティブ配列に対応している。H227Yを修正するために変化させたヌクレオチドを太字で表し、下線を付す。この突然変異誘発により、配列番号113の活性BoNT/A-KHisをコードする配列番号112の改変オープンリーディングフレームが得られた。

## 【0 1 6 6】

活性は、GFP-SNAP25蛍光放出アッセイを使って、GFP-SNAP25基質のタンパク質加水分解的切断によって同定した（例えばLance E.Stewardら「GFP-SNAP25 Fluorescence Release Assay for Botulinum Neurotoxin Protease Activity（ボツリヌス神経毒プロテアーゼ活性のGFP-SNAP25蛍光放出アッセイ」米国特許出願公開第2005/0100973号（2005年5月12日）を参照されたい）。候補pET29b/BoNT/A-KHis発現コンストラクトを、熱ショック法を使って、化学的にコンピテントな大腸菌BL21(DE3)細胞（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）に形質転換し、50 μg/mLのカナマイシンを含有する1.5%ルリア-ベルタニ寒天平板（pH7.0）に播種し、37 の培養器に入れて、終夜成長させた。pET29b/BoNT/A-KHis候補を含有するカナマイシン耐性コロニーを使って、メンブレンリッドを取付けたエッペンドルフLid-Bacチューブ中の、50 μg/mLのカナマイシンを含有するZYP-5052自己誘導培地の1mL培養物に接種した。バイオセイフティーキャビネットに置いたサーモミキサー（1400rpm、37 ）で、濁りが生じるまで、培養物をインキュベートした（約7~8時間）。次に温度を22 に下げ、培養物を約16時間インキュベートした。細胞を遠心分離（6,000×g、4 で30分）によって収集し、デカントし、溶解を改善するために-80

で短時間凍結した。細胞ペレットを氷上で解凍し、25単位/mLのベンゾナーゼヌクレアーゼ(EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン)、1KU/mL リゾチーム(EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン)および2×Protease Inhibitor Cocktail III(EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン)を含有するBug Buster(登録商標)溶解溶液(EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン)350 μLに、それぞれを再懸濁し、その混合物を、サーモミキサー中、22℃、400rpmで、30分間インキュベートした。遠心分離(36,000×g、4℃で15分間)によって溶解液を清澄化し、上清溶液を低残渣微量遠心管に移し、氷上に置いた。

## 【0167】

GFP-SNAP25基質のタンパク質分解的切断によって、BoNT/A-KHis候補の活性を同定した。各アッセイ反応は、2×毒素反応緩衝液(100mM N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES), pH7.4; 20 μM塩化亜鉛; 20mMジチオスレイトール; 0.2%(v/v)TWEEN-20(登録商標), モノラウリン酸ポリオキシエチレン(20)ソルビタン)25 μL、清澄化した溶解液10 μL、および50 μM GFP-SNAP25<sub>(134-206)</sub>基質15 μLを含有した。対照反応は、溶解液の代わりに10 μLの水または0.2 μg/mLのLC/Aを含有した。反応を三つ一組にして、37℃で1時間インキュベートした後、8M塩酸グアニジン20 μLでクエンチした。クエンチした反応を、TALON(商標)SuperFlow Co<sup>2+</sup>アフィニティ樹脂(BD Biosciences-Clontech, カリフォルニア州パロアルト)75 μLが入っているフィルターブレートのウェル(脱イオン蒸留水200 μLおよびアッセイリンス緩衝液(50mM N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES), pH7.4)200 μLですすぐことによって調整しておいたもの)に移した。樹脂上で15分間インキュベートした後、反応溶液を減圧濾過によって溶出させて、黒色96穴ブレートに集め、それをさらに2回、樹脂床に通し、最終通過後に集めた。次に、各樹脂床をアッセイリンス緩衝液210 μLですすぎ、それを反応溶液が入っているブレートに溶出させた。溶出した反応溶液の蛍光をSpectraMax Gemini XS分光光度計(Molecular Devices,  $\lambda_{ex}$  474nm;  $\lambda_{em}$  509nm; 495nmカットオフフィルター)で測定した。対照反応は、溶解液の代わりに10 μLの水または0.2 μg/mLのLC/Aを含有した。陽性のBoNT/A-KHis候補は、有意なプロテアーゼ活性を示した(図5参照)。

## 【実施例13】

## 【0168】

## pET29b/BoNT/A-KHisの発現

以下の実施例は、本明細書に開示する発現コンストラクトからBoNT/Aを発現させるのに役立つ手法を例示するものである。pET29b/BoNT/A-KHis発現コンストラクトを、熱ショック形質転換プロトコールを使って、化学的にコンピテンントな大腸菌BL21(DE3)細胞(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)に導入した。その熱ショック反応を、50 μg/mLのカナマイシンを含有する1.5%ルリア-ベルターニ寒天平板(pH7.0)に播種し、37℃の培養器に入れて、終夜成長させた。pET29b/BoNT/A-KHisを含有する形質転換大腸菌のカナマイシン耐性コロニーを使って、50 μg/mLのカナマイシンを含有するPA-0.5G培地3.0mLが入っているバッフル付きフラスコに接種し、次にそれを37℃の培養器に入れて、250rpmで振とうしながら終夜成長させた。得られた終夜スターー培養物を使って、今度は、50 μg/mLのカナマイシンを含有するZYP-5052自己誘導培地が入っている3Lバッフル付きフラスコに、1:1000の希釈率で接種した。培養体積は約600mL(フラスコ体積の20%)~約750mL(フラスコ体積の25%)の範囲とした。これらの培養物を37℃の培養器中、250rpmで振とうしながら、約5.5時間成長させた後、16℃の培養器に移し、250rpmで振とうしながら終夜発現させた。細胞を遠心分離(4,000rpm、4℃で、20~30分)によって収集し、直ちに使用するか、必要になるまで-80℃で乾燥保存した。

## 【実施例14】

## 【0169】

## BoNT/A-KHisの発現および定量

以下の実施例は、本明細書に開示するBoNT/Aの精製および定量に役立つ方法を例示するものである。固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)タンパク質精製のた

10

20

30

40

50

めに、実施例8に記載の、BoNT/A-KHisを発現させるために使用した大腸菌BL21(DE3)細胞ペレットを、カラム結合緩衝液(25mM N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES), pH7.8; 500mM塩化ナトリウム; 10mMイミダゾール; 2×Protease Inhibitor Cocktail Set III(EMD Biosciences-Calbiochem, カリフォルニア州サンディエゴ); 5単位/mLのベンゾナーゼ(EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン); 0.1%(v/v)Triton-X(登録商標)100, 4-オクチルフェノールポリエトキシレート; 10%(v/v)グリセロール)に再懸濁し、次に冷たいオークリッジ遠心管に移した。細胞を溶解し、BoNT/A-KHisを放出させるために、細胞懸濁液を氷上で超音波処理し(Branson Digital Sonifierを使用して、40%の強度で10秒間のパルスを60秒間の冷却期間を挟んで10~12回)、次に溶解液を清澄化するために遠心分離した(16,000rpm, 4で20分)。  
10 TALON(商標)SuperFlow Co<sup>2+</sup>アフィニティー樹脂(BD Biosciences-Clontech, カリフォルニア州パロアルト)を充填した20mL Econo-Pacカラムサポート(Bio-Rad Laboratories, カリフォルニア州ハーキュリーズ)を使って固定化金属アフィニティクロマトグラフィーカラムを調製し、次に、それを、5カラム体積の脱イオン蒸留水ですすぎ、次いで5カラム体積のカラム結合緩衝液ですすことによって平衡化した。清澄化した溶解液を、平衡化したカラムに、重力流によってゆっくり適用した(約0.25~0.3mL/分)。次に、5カラム体積のカラム洗浄緩衝液(N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES), pH7.8; 500mM塩化ナトリウム; 10mMイミダゾール; 0.1%(v/v)Triton-X(登録商標)100, 4-オクチルフェノールポリエトキシレート; 10%(v/v)グリセロール)で、カラムを洗浄した。BoNT/A-Hisを、20~30mLのカラム溶出緩衝液(25mM N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES), pH7.8; 500mM塩化ナトリウム; 500mMイミダゾール; 0.1%(v/v)Triton-X(登録商標)100, 4-オクチルフェノールポリエトキシレート; 10%(v/v)グリセロール)で溶出させ、およそ12個の1mL画分に集めた。各溶出画分に含まれるBoNT/A-KHisの量をブラッドフォード色素アッセイによって決定し、最も強いシグナルを持つ五つの画分を溶出ピークであるとみなして、プールした(図6b参照)。プールしたピーク溶出画分の総タンパク質濃度を、ウシガムマグロプリン(Bio-Rad Laboratories, カリフォルニア州ハーキュリーズ)を標準に使って見積ることにより、総タンパク質収量を決定した。

## 【0170】

FPLC脱塩カラムを使ってBoNT/Aを精製するために、HiPrep(商標)26/10サイズ排除カラム(Amersham Biosciences, ニュージャージー州ピスカタウェイ)を、4のカラム緩衝液(50mMリン酸ナトリウム, pH6.5)80mLで、予め平衡化した。カラムを平衡化した後、BioLogic DuoFlowクロマトグラフィーシステム(Bio-Rad Laboratories, カリフォルニア州ハーキュリーズ)を使って、BoNT/A-KHis試料を、4カラム緩衝液の定組成移動相と共に10mL/分の流速で、サイズ排除カラムに適用した。脱塩されたBoNT/A-His試料を約7~12mLの单一画分として集めた。

## 【0171】

FPLCイオン交換カラムを使ってBoNT/Aを精製するために、IMACカラムからの溶出後に脱塩しておいたBoNT/A-KHis試料を、1mL UNO-S1(商標)カチオン交換カラム(Bio-Rad Laboratories, カリフォルニア州ハーキュリーズ)に、BioLogic DuoFlowクロマトグラフィーシステム(Bio-Rad Laboratories, カリフォルニア州ハーキュリーズ)を使って適用した。試料を、4のカラム緩衝液(50mMリン酸ナトリウム, pH6.5)中のカラムに適用し、4の溶出緩衝液(50mMリン酸ナトリウム, 1M塩化ナトリウム, pH6.5)を使った以下の直線的勾配で溶出させた:ステップ1, 流速1mL/分の5%溶出緩衝液5.0mL;ステップ2, 流速1mL/分の5~30%溶出緩衝液20.0mL;ステップ3, 流速1.0mL/分の50%溶出緩衝液2.0mL;ステップ4, 流速1.0mL/分の100%溶出緩衝液4.0mL;およびステップ5, 流速1.0mL/分の0%溶出緩衝液5.0mL。カラムからのペプチドの溶出を280、260、および214nmで監視し、280nmで最小閾値(0.01au)を超えて吸収するピークを集めた。BoNT/A-KHisの大部分は約100~200mMの塩化ナトリウム濃度で溶出した。ブラッドフォードアッセイで決定したBoNT/A-Hisの平均総収量は、約7~12mg/Lだった。

10

20

30

40

50

## 【0172】

BoNT/A-KHisの発現をポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析した。上述の手法を使って精製した試料を2× LDS Sample Buffer ( Invitrogen, Inc. , カリフォルニア州カールズバッド ) に加え、NuPAGE ( 登録商標 ) Novex 4-12% ビス-トリスプレキャストポリアクリルアミドゲル ( Invitrogen, Inc. , カリフォルニア州カールズバッド ) を用いるMOPSポリアクリルアミドゲル電気泳動により、変性還元条件下でペプチドを分離した。ゲルをSYPRO ( 登録商標 ) Ruby ( Bio-Rad Laboratories , カリフォルニア州ハーキュリーズ ) で染色し、分離されたペプチドを、Fluor-S MAX MultiImager ( Bio-Rad Laboratories , カリフォルニア州ハーキュリーズ ) で撮像することにより、ペプチド発現レベルを定量した。BoNT/A-Hisのサイズおよび量は、MagicMark ( 商標 ) タンパク質分子量標準 ( Invitrogen, Inc. , カリフォルニア州カールズバッド )との比較によって決定した。現われたのは完全長BoNT/A-KHisであることが、ゲルによって明らかになった。

10

## 【0173】

BoNT/A-KHisの発現をウェスタンプロット解析でも解析した。上述の手法を使って精製したタンパク質試料を2× LDS Sample Buffer ( Invitrogen, Inc. , カリフォルニア州カールズバッド ) に加え、NuPAGE ( 登録商標 ) Novex 4-12% ビス-トリスプレキャストポリアクリルアミドゲル ( Invitrogen, Inc. , カリフォルニア州カールズバッド ) を用いるMOPSポリアクリルアミドゲル電気泳動により、変性還元条件下で分離した。分離したペプチドを、Trans-Blot ( 登録商標 ) SDセミドライ電気泳動転写セル装置 ( Bio-Rad Laboratories , カリフォルニア州ハーキュリーズ ) を使ったウェスタンプロッティングにより、ゲルからポリフッ化ビニリデン ( PVDF ) 膜 ( Invitrogen, Inc. , カリフォルニア州カールズバッド ) に移した。25mMトリス緩衝食塩水 ( 25mM 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール-塩酸 ( トリス-HCl ) ( pH7.4 ) , 137mM塩化ナトリウム , 2.7mM塩化カリウム ) 、0.1% TWEEN-20 ( 登録商標 ) , モノラウリン酸ポリオキシエチレン(20)ソルビタン、2%ウシ血清アルブミン、5%脱脂粉乳を含有する溶液中、室温で2時間インキュベートすることにより、PVDF膜をブロックした。ブロックした膜を、プローブとして以下の一次抗体の一つを含有するトリス緩衝食塩水TWEEN-20 ( 登録商標 ) ( 25mMトリス緩衝食塩水、0.1% TWEEN-20 ( 登録商標 ) , モノラウリン酸ポリオキシエチレン(20)ソルビタン ) 中、4 度終夜インキュベートした：ウサギポリクローナル抗BoNT/A抗血清 ( Allergan, Inc. ) の1 : 5,000希釈液；またはウサギポリクローナル抗ポリヒスチジン抗血清 ( Abcam Inc. , マサチューセッツ州ケンブリッジ ) の1 : 10,000希釈液。一次抗体でプローブしたプロットを、トリス緩衝食塩水TWEEN-20 ( 登録商標 ) 中で、15分ずつ3回洗浄した。洗浄した膜を、二次抗体としてセイヨウワサビペルオキシダーゼ ( HRP ) にコンジュゲートしたヤギポリクローナル抗ウサギ免疫グロブリンG重鎖および軽鎖 ( IgG, H+L ) 抗体 ( Pierce Biotechnology, Inc. , イリノイ州ロックフォード ) の1 : 20,000希釈液を含有するトリス緩衝食塩水TWEEN-20 ( 登録商標 ) 中、室温で2時間インキュベートした。二次抗体でプローブしたプロットを、トリス緩衝食塩水TWEEN-20 ( 登録商標 ) 中で、15分ずつ3回洗浄した。標識されたBoNT/A-KHisのシグナル検出を、ECL Plus ( 商標 ) Western Blot Detection System ( Amersham Biosciences , ニュージャージー州ピスカタウェイ ) を使って可視化し、Typhoon 9410 Variable Mode Imager ( Amersham Biosciences , ニュージャージー州ピスカタウェイ ) で撮像することにより、ペプチド発現レベルを定量した。

20

30

40

## 【実施例15】

## 【0174】

改变オープンリーディングフレームおよび無改变オープンリーディングフレームから発現されるBoNT/A-His量の比較

無改变オープンリーディングフレームと比較して、改变オープンリーディングフレームから発現される増加したBoNT/Aの量は、以下のようにして決定することができる。別々の反応で、配列番号112の改变オープンリーディングフレームを含むpET29b/BoNT/A-KHis発現コンストラクト、および配列番号115の無改变オープンリーディングフレームを含むpET29b/BoNT/A-KHisコンストラクトを、熱ショック形質転換プロトコールを使って、化学的

50

にコンピテントな大腸菌BL21(DE3)細胞 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) に導入する。その熱ショック反応を、50 μg/mLのカナマイシンを含有する1.5%ルリア-ベルターニ寒天平板 (pH7.0) に播種し、37 の培養器に入れて、終夜成長させる。両発現コンストラクトから得られるpET29b/BoNT/A-KHisコンストラクトを含有する形質転換大腸菌のカナマイシン耐性コロニーを使って、カナマイシン耐性選択PA-0.5G培地3.0mLが入っている別々の15mLチューブに接種し、それを37 の培養器に入れて、250rpmで振とうしながら終夜成長させる。各コンストラクトから得られる終夜スターー培養物のうち約600 μLを使って、カナマイシン耐性ZYP-5052自己誘導培地600mLが入っている3.0Lバッフル付きフラスコに接種する。接種した培養物を37 の培養器中、250rpmで振とうしながら約5.5時間成長させた後、16 の培養器に移し、250rpmで振とうしながら終夜発現させる。遠心分離 (4,000rpm、4 で20~30分) によって細胞を収集する。

#### 【0175】

改変オープンリーディングフレームと無改変オープンリーディングフレームの両者から得られるBoNT/A-KHis発現レベルを解析するために、(実施例14に記載するように)IMAC法を使って、BoNT/A-KHisを精製する。配列番号112の改変オープンリーディングフレームから産生されるBoNT/A-KHisの量が、配列番号115の無改変オープンリーディングフレームから発現されるBoNT/A-KHisの量と比較して大きいかどうかを決定するために、各培養物からの発現を(実施例14で述べたように)ブラッドフォード色素アッセイ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンプロット解析で評価する。改変オープンリーディングフレームから発現される活性BoNT/A-KHisの量には約12倍の増加が予想される。改変オープンリーディングフレームから発現されるIMAC精製活性BoNT/A-KHisの平均量は約12mg/Lと予測されるのに対して、他の点では同一である核酸分子中の無改変オープンリーディングフレームから発現されるIMAC精製活性BoNT/A-KHisは約1mg/Lであると予測される。

#### 【実施例16】

#### 【0176】

#### pRSET/BoNT/A-Hisの構築および発現

作動可能に連結された核酸分子をpRSETベクター (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) 中にクローニングするのに適した制限エンドヌクレアーゼ部位を、改変オープンリーディングフレーム配列番号3の5'末端および3'末端に組み入れる。この核酸分子を実施例2で述べたように合成し、pUCBHB1/BoNT/Aコンストラクトを得る。このコンストラクトを、1) 活性BoNT/Aをコードする配列番号3のオープンリーディングフレームを含有するインサートを切り出すと共に、2) このインサートをpRSETベクターに作動可能に連結することを可能にするような制限酵素で、消化する。このインサートを、適當な制限エンドヌクレアーゼで消化したpRSETベクターに、T4 DNAリガーゼ法を使ってサブクローニングすることにより、pRSET/BoNT/A-His(図7)を得る。ライゲーション混合物を、熱ショック法を使って、化学的にコンピテントな大腸菌DH5 細胞 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) に形質転換し、100 μg/mLのアンピシリンを含有する1.5%ルリア-ベルターニ寒天平板 (pH7.0) に播種し、37 の培養器に入れて終夜成長させる。発現コンストラクトを含有する細菌をアンピシリン耐性コロニーとして同定する。アルカリ溶解プラスミド少量調製法を使って候補コンストラクトを単離し、インサートの存在および向きを決定するために、制限エンドヌクレアーゼ消化マッピングによって解析する。このクローニング戦略により、カルボキシル末端のポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする原核発現コンストラクトが得られる。同様のクローニング戦略を使って、発現レベルに関する対照として用いる配列番号2の無改変オープンリーディングフレームを含有するpRSET発現コンストラクトを作製すると共に、配列番号4~配列番号33の改変オープンリーディングフレームのいずれか一つがpRSETベクターに作動可能に連結されているpRSET発現コンストラクトを作製する。

#### 【0177】

改変オープンリーディングフレームからの増加したBoNT/A発現量は、以下のように決定される。別々の反応で、改変オープンリーディングフレーム(例えば配列番号3~配列番

10

20

30

40

50

号33など)を含むpRSET/BoNT/A-His発現コンストラクト、および無改变オープンリーディングフレーム(例えば配列番号2など)を含むpRSET/BoNT/A-Hisコンストラクトを、標準的な形質転換プロトコール(例えば熱ショック形質転換プロトコールなど)を使って、化学的にコンピテントな細菌細胞に導入する。その形質転換反応を、適切な抗生物質を含有する1.5%ルリア-ペルタニ寒天平板(pH7.0)に播種し、37の培養器に入れて、終夜成長させる。両核酸分子から得られるpRSET/BoNT/A-Hisコンストラクトを含有する形質転換細胞の抗生物質耐性コロニーを使って、抗生物質耐性選択PA-0.5G培地3.0mLが入っている別々の15mLチューブに接種し、それを37の培養器に入れて、250rpmで振とうしながら終夜成長させる。各コンストラクトから得られる終夜スターー培養物のうち約600μLを使って、適切な抗生物質耐性成長培地600mLが入っている3.0Lバッフル付きフラスコに接種する。接種した培養物を37の培養器中、250rpmで振とうしながら約5.5時間成長させた後、最終濃度が0.5~1.0mMになるようにIPTGを添加することによって誘導し、培養物を16の培養器に移し、250rpmで振とうしながら終夜発現させる。遠心分離(4,000rpm、4で20~30分)によって細胞を収集する。

10

## 【0178】

ネイティブオープンリーディングフレームと改変オープンリーディングフレームの両者から得られるBoNT/A-His発現レベルを解析するために、IMAC法を使って(実施例6および14で述べたように)BoNT/A-Hisを精製する。改変オープンリーディングフレームから產生されるBoNT/A-Hisの量が、配列番号2の無改变オープンリーディングフレームから発現されるBoNT/A-Hisの量と比較して大きいかどうかを決定するために、各培養物からの発現を(実施例6および14で述べたように)ブラッドフォード色素アッセイ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、および抗BoNT/A抗体または抗His抗体を用いるウェスタンプロット解析によって評価する。

20

## 【実施例17】

## 【0179】

## pPICZ A/BoNT/A-myc-Hisの構築および発現

作動可能に連結された核酸分子をpPIC Aベクター(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)中にクローニングするのに適した制限エンドヌクレアーゼ部位を、改変オープンリーディングフレーム配列番号36の5'末端および3'末端に組み入れる。この核酸分子を実施例2で述べたように合成し、pUCBHB1/BoNT/Aコンストラクトを得る。このコンストラクトを、1)活性BoNT/Aをコードする配列番号36のオープンリーディングフレームを含有するインサートを切り出すと共に、2)このインサートをpPIC Aベクターに作動可能に連結することを可能にするような制限酵素で、消化する。このインサートを、適當な制限エンドヌクレアーゼで消化したpPIC Aベクターに、T4 DNAリガーゼ法を使ってサブクローニングすることにより、pPIC A/BoNT/A-myc-His(図8)を得る。ライゲーション混合物を、熱ショック法を使って、化学的にコンピテントな大腸菌DH5細胞(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)に形質転換し、25μg/mLのZeocin(商標)を含有する1.5%低塩濃度ルリア-ペルタニ寒天平板(pH7.5)に播種し、37の培養器に入れて終夜成長させる。発現コンストラクトを含有する細菌をZeocin(商標)耐性コロニーとして同定する。アルカリ溶解プラスミド少量調製法を使って候補コンストラクトを単離し、インサートの存在および向きを決定するために、制限エンドヌクレアーゼ消化マッピングによって解析する。このクローニング戦略により、カルボキシル末端のc-mycペプチドおよびポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする酵母発現コンストラクトが得られる。同様のクローニング戦略を使って、発現レベルに関する対照として用いる配列番号2の無改变オープンリーディングフレームを含有するpPIC A発現コンストラクトを作製すると共に、配列番号34、配列番号35、配列番号37~配列番号45の改変オープンリーディングフレームのいずれか一つがpPIC Aベクターに作動可能に連結されているpPIC A発現コンストラクトを作製する。

30

## 【0180】

活性なBoNT/Aを発現させる酵母細胞系を構築するために、pPICZ A/BoNT/A-myc-Hisを適

40

50

切な制限エンドヌクレアーゼ（すなわちSacI、PmeIまたはBstXI）で消化し、得られた線状化発現コンストラクトを、適當なピキア・パストリスMut<sup>S</sup>株KM71Hにエレクトロポレーション法を使って形質転換する。形質転換混合物を、100 μg/mLのZeocin（商標）を含有する1.5%YPD寒天平板（pH7.5）に播種し、28～30 の培養器に入れて、1～3日間成長させる。5'AOX1座にpPICZ A/BoNT/A-myc-Hisを組み込んでいる形質転換体の選択は、Zeocin（商標）に対するコロニー耐性によって決定される。同様の戦略を使って、発現レベルに関する対照として使用する配列番号2を含有するpPICZ A発現コンストラクトを含有する細胞系を作出する。pPICZ A/BoNT/A-myc-Hisコンストラクトを組み込んだ細胞系を、小規模発現試験を使ってBoNT/A-myc-His発現について試験する。pPICZ A/BoNT/A-myc-Hisを組み込んだ試験細胞系から生じる孤立コロニーを使って、MGYH培地100mLが入っている1.0Lバッフル付きフラスコに接種し、振とう培養器（250rpm）中、約28～30 で、培養物がOD<sub>600</sub> = 2～6に達するまで（約16～18時間）成長させる。遠心分離（3,000×g、22 で5分）によって細胞を収集する。発現を誘導するために、細胞ペレットをMMH培地15mLに再懸濁し、メタノールを最終濃度が0.5%になるように加える。培養物を振とう培養器（250rpm）中、約28～30 で6日間生育する。24時間ごとに、最終濃度が0.5%になるように、100%メタノールを培養物に追加する。時刻0から開始して24時間ごとに時刻144時間まで、1.0mLの試験アリコートを培養物から採取する。そのアリコートから微量遠心分離によって細胞を収集することによって細胞をペレット化し、-80 で5分、次に37 で5分からなる3ラウンドの凍結融解を使って、それらを溶解する。溶解試料を2×LDS Sample Buffer（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）に加え、配列番号2対照からBoNT/A-myc-Hisを発現させる樹立細胞系と比較して、配列番号36から產生されるBoNT/A-myc-Hisの発現量が増加している細胞系を同定するために、抗BoNT/A抗体、抗myc抗体または抗His抗体を用いるウェスタンプロット解析により、樹立細胞系からの発現を（実施例6および14で述べたように）測定する。配列番号2対照と比較して最も高いBoNT/A-myc-Hisの発現レベルを示すピキア・パストリスMut<sup>S</sup> KM71H細胞系を、工業的発酵手法を用いる大規模発現のために選択する。大規模発現の手法は、培養体積が、5L BioFlo 3000発酵槽で生育されるMGYH培地約2.5Lであることを除いて上に概説したとおりであり、試薬類の濃度は全てこの体積に合わせて比例的に増加させることになる。この実施例に記載した全ての手順に関するさらなる詳細については、「EasySelect（商標）Pichia Expression Kit, version G, A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ in Pichia pastoris, 122701, 25-0172」（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）を参照されたい。

## 【実施例 18】

## 【0 1 8 1】

## pMET/BoNT/A-V5-Hisの構築および発現

作動可能に連結された核酸分子をpMETベクター（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）中にクローニングするのに適した制限エンドヌクレアーゼ部位を、改変オープンリーディングフレーム配列番号36の5'末端および3'末端に組み入れる。この核酸分子を実施例2で述べたように合成し、pUCBHB1/BoNT/Aコンストラクトを得る。このコンストラクトを、1) 活性BoNT/Aをコードする配列番号36のオープンリーディングフレームを含有するインサートを切り出すと共に、2) このインサートをpMETベクターに作動可能に連結することを可能にするような制限酵素で、消化する。このインサートを、適當な制限エンドヌクレアーゼで消化したpMETベクターに、T4 DNAリガーゼ法を使ってサブクローニングすることにより、pMET/BoNT/A-V5-His（図9）を得る。ライゲーション混合物を、熱ショック法を使って、化学的にコンピテントな大腸菌DH5 細胞（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）に形質転換し、100 μg/mLのアンピシリンを含有する1.5%低塩濃度ルリア-ベルターニ寒天平板（pH7.5）に播種し、37 の培養器に入れて終夜成長させる。発現コンストラクトを含有する細菌をアンピシリン耐性コロニーとして同定する。アルカリ溶解プラスミド少量調製法を使って候補コンストラクトを単離し、インサートの存在および向きを決定するために、制限エンドヌクレアーゼ消化マッピングによって

10

20

30

40

50

解析する。このクローニング戦略により、カルボキシル末端のV5ペプチドおよびポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする酵母発現コンストラクトが得られる。同様のクローニング戦略を使って、発現レベルに関する対照として用いる配列番号2の無改変オープンリーディングフレームを含有するpMET発現コンストラクトを作製すると共に、配列番号34、配列番号35、配列番号37～配列番号45の改変オープンリーディングフレームのいずれか一つがpMETベクターに作動可能に連結されているpMET発現コンストラクトを作製する。

#### 【0182】

活性なBoNT/Aを発現させる酵母細胞系を構築するために、pMET/BoNT/A-V5-Hisを適切な制限エンドヌクレアーゼ（すなわちApal、Ascl、Fsel、PacI、KpnIまたはPstI）で消化し、得られた線状化発現コンストラクトを、適當なピキア・メタノリカMut<sup>S</sup>株PMAD16にエレクトロポレーション法を使って形質転換する。形質転換混合物を、アデニンを欠く1.5%M D寒天平板（pH7.5）に播種し、28～30 の培養器に入れて、3～4日間成長させる。pMET/BoNT/A-V5-Hisを組み込んでいる形質転換体の選択は、アデニン欠乏培地でのコロニー成長によって決定される。同様の戦略を使って、発現レベルに関する対照として使用する配列番号2を含有するpMET発現コンストラクトを含有する細胞系を作出する。pMET/BoNT/A-V5-Hisコンストラクトを組み込んだAde<sup>+</sup>細胞系を、小規模発現試験を使ってBoNT/A-myc-His発現について試験する。pMET/BoNT/A-V5-Hisを組み込んだ試験細胞系から生じる孤立コロニーを使ってBMDY培地15mLに接種し、振とう培養器（250rpm）中、約28～30 で、培養物がOD<sub>600</sub> = 2～10に達するまで（約16～18時間）、細胞を成長させる。遠心分離（1,500 × g、22 で5分）によって細胞を収集する。発現を誘導するために、細胞ペレットをBMMY培地5mLに再懸濁し、振とう培養器（250rpm）中、約28～30 で成長させる。24時間後に、500 μLのアリコートを取り出し、メタノールを最終濃度が0.5%になるように加え、培養物を振盪培養器（250rpm）中、約28～30 で成長させる。24時間ごとに、3～5日間にわたって、500 μLのアリコートを除去し、メタノールを最終濃度が0.5%になるように培養物に追加する。誘導されたBoNT/A-V5-Hisの発現を検出するために、各時点の細胞ペレットを酸洗浄ガラスピーブル法を使って溶解する。溶解試料を2×LDS Sample Buffer（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）に加え、配列番号2対照からBoNT/A-V5-Hisを発現させる樹立細胞系と比較して、配列番号36から產生されるBoNT/A-V5-Hisの発現量が増加している細胞系を同定するために、抗BoNT/A抗体、抗V5抗体または抗His抗体を用いるウェスタンプロット解析により、樹立細胞系からの発現を（実施例6および14で述べたように）測定する。配列番号2対照と比較して最も高いBoNT/A-V5-Hisの発現レベルを示すピキア・メタノリカMut<sup>S</sup> PMAD16細胞系を、工業的発酵手法を用いる大規模発現のために選択する。大規模発現の手法は、培養体積が、5L BioFlo 3000発酵槽で生育されるBMDY/BMMY培地約2.5Lであることを除いて上に概説したとおりであり、試薬類の濃度は全てこの体積に合わせて比例的に増加させることになる。この実施例に記載した全ての手順に関するさらなる詳細については、「P. metanolica Expression Kit, version C, A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in Pichia metanolica, 062101, 25-0288」（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）を参照されたい。

#### 【実施例19】

#### 【0183】

pYES2/BoNT/A-V5-Hisの構築および発現

作動可能に連結された核酸分子をpYES2ベクター（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）中にクローニングするのに適した制限エンドヌクレアーゼ部位を、改変オープンリーディングフレーム配列番号39の5'末端および3'末端に組み入れる。この核酸分子を実施例2で述べたように合成し、pUCBHB1/BoNT/Aコンストラクトを得る。このコンストラクトを、1) 活性BoNT/Aをコードする配列番号39のオープンリーディングフレームを含有するインサートを切り出すと共に、2) このインサートをpYES2ベクターに作動可能に連結することを可能にするような制限酵素で、消化する。このインサートを、適當な制限エンドヌクレアーゼで消化したpYES2ベクターに、T4 DNAリガーゼ法を使ってサブクロ

10

20

30

40

50

ーニングすることにより、pYES2/BoNT/A-V5-His（図10）を得る。ライゲーション混合物を、熱ショック法を使って、化学的にコンピテントな大腸菌DH5 細胞（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）に形質転換し、100 µg/mLのアンピシリンを含有する1.5%低塩濃度ルリア-ベルターニ寒天平板（pH7.5）に播種し、37 の培養器に入れて終夜成長させる。発現コンストラクトを含有する細菌をアンピシリン耐性コロニーとして同定する。アルカリ溶解プラスミド少量調製法を使って候補コンストラクトを単離し、インサートの存在および向きを決定するために、制限エンドヌクレアーゼ消化マッピングによって解析する。このクローニング戦略により、カルボキシル末端のV5ペプチドおよびポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする酵母発現コンストラクトが得られる。同様のクローニング戦略を使って、発現レベルに関する対照として用いる配列番号2の無改变オープンリーディングフレームを含有するpYES2発現コンストラクトを作製すると共に、配列番号34～配列番号38および配列番号40～配列番号45の改变オープンリーディングフレームのいずれか一つがpYES2ベクターに作動可能に連結されているpYES2発現コンストラクトを作製する。

#### 【0184】

活性なBoNT/Aを発現させる酵母細胞系を構築するために、リチウムベースの形質転換法を使って、pYES2/BoNT/A-V5-Hisを、コンピテントなサッカロミセス・セレビシェINVSc1株に形質転換する。形質転換混合物を、2%グルコースを含有する2%SC最少培地寒天平板（pH7.5）（0.01%ウラシルを含むもの、またはウラシルを欠くもの）に播種し、28～30

の培養器に入れて、1～3日間成長させる。pYES2/BoNT/A-V5-Hisを含有する形質転換体の選択は、ウラシルを含有する平板でしか起こらないコロニー成長によって決定した。同様の戦略を使って、発現レベルに関する対照として使用する配列番号2を含有するpYES2発現コンストラクトを含有する細胞系を作出する。pYES2/BoNT/A-V5-Hisコンストラクトを含有する細胞を、小規模発現試験を使ってBoNT/A-V5-His発現について試験する。pYES2/BoNT/A-V5-Hisを含有する試験細胞から生じる孤立コロニーを使って、2%グルコースおよび0.01%ウラシルを含有するSC培地15mLに接種し、振とう培養器（250rpm）中、約28～30で終夜成長させる。終夜培養物のOD<sub>600</sub>を決定し、体積50mL中にOD<sub>600</sub>が0.4の細胞濃度になるように小分けする。これらのアリコートを遠心分離（1,500×g、22で5分）し、得られた細胞ペレットを、20%グルコースおよび10%ラフィノースを含有するSC培地に再懸濁する。細胞を振とう培養器（250rpm）中、約28～30で成長させ、0時間、4時間、8時間、12時間、16時間および24時間の時点で、5mLずつアリコートを採取し、各試料についてOD<sub>600</sub>濃度を決定する。収集した細胞を遠心分離（1,500×g、4で5分）し、水で1回洗浄し、必要になるまで細胞ペレットを-80で保存する。誘導されたBoNT/A-V5-Hisの発現を検出するために、各時点の細胞ペレットを酸洗浄ガラスビーズ法を使って溶解する。溶解試料を2×LDS Sample Buffer（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）に加え、最大BoNT/A-V5-His発現を得るために必要な至適誘導時間を同定するために、抗BoNT/A抗体、抗V5抗体または抗His抗体を用いるウェスタンプロット解析により、各時点での発現を（実施例6および14で述べたように）測定する。配列番号2対照の無改变オープンリーディングフレームと比較して、変更オープンリーディングフレームがコードするBoNT/A-V5-Hisの最も高い発現レベルをもたらす誘導条件を、工業的発酵手法を用いる大規模発現のために選択する。大規模発現の手法は、培養体積が、5L BioFlo 3000発酵槽で生育されるSC培地約2.5Lであることを除いて上に概説したとおりであり、試薬類の濃度は全てこの体積に合わせて比例的に増加されることになる。この実施例に記載した全ての手順に関するさらなる詳細については、「pYES2/CT, pYES3/CT, and pYC2/CT Yeast Expression Vectors with C-terminal Tags and Auxotrophic Selection Markers, version E, 25-0304, Jan. 27, 2003」（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）を参照されたい。

#### 【実施例20】

#### 【0185】

pFastBacHT/His-BoNT/Aの構築および発現

10

20

30

40

50

作動可能に連結された核酸分子をpFastBacHTベクター（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）中にクローニングするのに適した制限エンドヌクレアーゼ部位を、改変オープンリーディングフレーム配列番号63の5'末端および3'末端に組み入れる。この核酸分子を実施例2で述べたように合成し、pUCBHB1/BoNT/Aコンストラクトを得る。このコンストラクトを、1) 活性BoNT/Aをコードする配列番号63のオープンリーディングフレームを含有するインサートを切り出すと共に、2) このインサートをpFastBacHTベクターに作動可能に連結することを可能にするような制限酵素で、消化する。このインサートを、適当な制限エンドヌクレアーゼで消化したpFastBacHTベクターに、T4 DNAリガーゼ法を使ってサブクローニングすることにより、pFastBacHT/BoNT/A（図11）を得る。ライゲーション混合物を、熱ショック法を使って、化学的にコンピテントな大腸菌DH5<sup>+</sup>細胞（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）に形質転換し、100 μg/mLのアンピシリンを含有する1.5%低塩濃度ルリア-ベルターニ寒天平板（pH7.0）に播種し、37<sup>°</sup>Cの培養器に入れて終夜成長させる。発現コンストラクトを含有する細菌をアンピシリン耐性コロニーとして同定する。アルカリ溶解プラスミド少量調製法を使って候補コンストラクトを単離し、インサートの存在および向きを決定するために、制限エンドヌクレアーゼ消化マッピングによって解析する。このクローニング戦略により、カルボキシル末端のTEV切断可能なポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードするバキュロウイルストラנסファーコンストラクトが得られる。同様のクローニング戦略を使って、発現レベルに関する対照として用いる配列番号2の無改変オープンリーディングフレームを含有するpFastBacHTコンストラクトを作製すると共に、配列番号58～配列番号59、配列番号60、配列番号61または配列番号62の改変オープンリーディングフレームのいずれか一つがpFastBacHTベクターに作動可能に連結されているpFastBacHT発現コンストラクトを作製する。

#### 【0186】

活性BoNT/Aを発現させるバクミドコンストラクトを作製するために、pFastBacHT/His-BoNT/Aコンストラクトを、熱ショック法により、バクミドへの転位のためのMAX Efficiency（登録商標）DH10Bac（商標）大腸菌細胞に形質転換する。形質転換混合物を、50 μg/mLのカナマイシン、7 μg/mLのゲンタマイシン、10 μg/mLのテトラサイクリン、100 μg/mLのBluo-galおよび40 μg/mLのIPTGを含有する1.5%ルリア-ベルターニ寒天平板（pH7.0）に播種し、組換えバクミドDNAを単離するために約48時間成長させる。候補バクミドコンストラクトを、カナマイシン、ゲンタマイシンおよびテトラサイクリン耐性である白色コロニーとして単離する。アルカリ溶解プラスミド少量調製法を使って候補バクミドコンストラクトを単離し、インサートの存在および向きを決定するために、制限エンドヌクレアーゼ消化マッピングによって解析する。同様のクローニング戦略を使って、配列番号2コンストラクトの無改変オープンリーディングフレームを含有する組換えバキュロウイルストックを作製する。50単位/mLのペニシリンおよび50 μg/mLのストレプトマイシンを含む完全Sf-900 II SFM培地2mLが入っている35mm組織培養皿に播種した約5 × 10<sup>5</sup>個のSf9細胞を、トランスフェクション溶液1.0mLでトランスフェクトすることにより、P1組換えバキュロウイルストックを単離する。トランスフェクション溶液は、DNA：脂質複合体を形成するために30分間プレインキュベートしておいた精製バクミドHis-BoNT/Aコンストラクト1.0 μgおよびCellfectin（登録商標）Reagent 6 μLを含有する無添加グレース培地200 μLに無添加グレース培地800 μLを加えることによって調製する。細胞をこのトランスフェクション溶液と共に27<sup>°</sup>Cの培養器中で5時間インキュベートした後、この溶液を、50単位/mLのペニシリンおよび50 μg/mLのストレプトマイシンを含む完全Sf-900 II SFM培地2.0mLで置き換える。Sf9細胞を27<sup>°</sup>Cの培養器中で約72時間成長させて、培地中にウイルスを放出させる。ウイルス感染昆虫細胞から15mLスナップキャップチューブに培地を移し、デブリを除去するためにチューブを500 × gで5分間遠心分離することによって、ウイルスを収集する。清澄化した上清を新しい15mLスナップキャップチューブに移す。これは約1 × 10<sup>6</sup>～10<sup>7</sup>plaques forming units (pfu)のバキュロウイルスを含有するはずである。次に、このP1ウイルスストックを増幅してP2組換えバキュロウイルスストックを生成させる。50

10

20

30

40

50

単位/mLのペニシリンおよび50 μg/mLのストレプトマイシンを添加したSf-900 II SFM培地2mLが入っている35mm培養皿に、約 $2 \times 10^6$ 個のSf9細胞を播種し、P1組換えバキュロウイルスストック（約 $5 \times 10^6$ pfu/ml）400 μLを接種し、27 の培養器で約48時間インキュベートする。15mLスナップキャップチューブに培地を移し、デブリを除去するためにチューブを $500 \times g$ で5分間遠心分離することによって、ウイルスを収集する。清澄化した上清を新しい15mLスナップキャップチューブに移す。これは約 $1 \times 10^7 \sim 10^8$ pfuのバキュロウイルスを含有するはずである。

#### 【0187】

バキュロウイルス発現系を使ってHis-BoNT/Aを発現させるために、50単位/mLのペニシリンおよび50 μg/mLのストレプトマイシンを添加したSf-900 II SFM培地が入っている35mm培養皿に、約 $2 \times 10^6$ 個のSf9細胞を播種し、P1組換えバキュロウイルスストック（約 $5 \times 10^7$ pfu/ml）約4 μLを接種し、27 の培養器中で、約48時間インキュベートする。BoNT/A-His発現のために培地と細胞の両方を集め。培地は、15mLスナップキャップチューブに培地を移し、デブリを除去するためにチューブを $500 \times g$ で5分間遠心分離することによって収集する。細胞は、100mMリン酸緩衝食塩水（pH7.4）3.0mLで細胞を1回すすぎ、62.6mM 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール塩酸（トリス-HCl），pH6.8および2%ラウリル硫酸ナトリウム（SDS）を含有する緩衝液で細胞を溶解することによって収集する。培地試料と細胞試料の両者を2×LDS Sample Buffer（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）に加え、配列番号2対照からHis-BoNT/Aを発現させるストックと比較して、配列番号63から產生されるHis-BoNT/Aの発現量が増加しているP2バキュロウイルスストックを同定するために、抗BoNT/A抗体または抗His抗体を用いるウェスタンプロット解析により、発現を（実施例6および14で述べたように）測定する。この実施例に記載した全ての手順に関するさらなる詳細については、「Bac-to-Bac（登録商標）Baculo virus Expression System, version D, An Efficient Site-specific Transposition System to Generate Baculovirus for High-level Expression of Recombinant Proteins, 1 0359」（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）を参照されたい。

10

20

30

40

50

#### 【実施例21】

#### 【0188】

#### pBACgus3/gp64-BoNT/A-Hisの構築および発現

作動可能に連結された核酸分子をpBACgus3ベクター（EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン）中にクローニングするのに適した制限エンドヌクレアーゼ部位を、改変オープンリーディングフレーム配列番号63の5'末端および3'末端に組み入れる。この核酸分子を実施例2で述べたように合成し、pUCBHB1/BoNT/Aコンストラクトを得る。このコンストラクトを、1) 活性BoNT/Aをコードする配列番号63のオープンリーディングフレームを含有するインサートを切り出すと共に、2) このインサートをpBACgus3ベクターに作動可能に連結することを可能にするような制限酵素で、消化する。このインサートを、適当な制限エンドヌクレアーゼで消化したpBACgus3ベクターに、T4 DNAリガーゼ法を使ってサブクローニングすることにより、pBACgus3/BoNT/A-His（図12）を得る。ライゲーション混合物を、熱ショック法を使って、化学的にコンピテントな大腸菌DH5 細胞（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）に形質転換し、100 μg/mLのアンピシリンを含有する1.5%ルリア-ベルターニ寒天平板（pH7.0）に播種し、37 の培養器に入れて終夜成長させる。発現コンストラクトを含有する細菌をアンピシリン耐性コロニーとして同定する。アルカリ溶解プラスミド少量調製法を使って候補コンストラクトを単離し、インサートの存在および向きを決定するために、制限エンドヌクレアーゼ消化マッピングによって解析する。このクローニング戦略により、アミノ末端のgp64シグナルペプチドおよびカルボキシル末端のトロンビン切断可能なポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードするバキュロウイルストラ\_nsファーコンストラクトが得られる。同様のクローニング戦略を使って、発現レベルに関する対照として用いる配列番号2の無改変オープンリーディングフレームを含有するpBACgus3コンストラクトを作製すると共に、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61または配列番号62の改

変オープンリーディングフレームのいずれか一つがpBACgus3ベクターに作動可能に連結されているpBACgus3発現コンストラクトを作製する。

#### 【0189】

バキュロウイルス発現系を使ってBoNT/A-Hisを発現させるために、BacVector（登録商標）Insect培地（EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン）2mLが入っている60mm培養皿4枚に、約 $2.5 \times 10^6$ 個のSf9細胞を播種し、28 の培養器で約20分間インキュベートする。pBACgus3/gp64-BoNT/A-His 100ngおよびTlowEトランスマスファープラスミド500ngを含有するBacVector（登録商標）Insect培地25 μLを、Insect GeneJuice（登録商標）（EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン）5 μLおよびヌクレアーゼフリー水20 μLを含有する希釀Insect GeneJuice（登録商標）25 μLに加えることによって、各トランスマスフェクションにつき50 μLのトランスマスフェクション溶液を6mLポリスチレンチューブ中に調製し、この溶液を約15分間インキュベートする。15分間のインキュベーション後に、BacVector（登録商標）培地450 μLをトランスマスフェクション溶液に加え、穏やかに混合する。このトランスマスフェクション原液を1/10希釀液として使用することにより、さらに1/50、1/250および1/1250希釀のトランスマスフェクション溶液を作る。トランスマスフェクション溶液100 μLを、4枚の60mm培養皿のうちの1枚に入っているSf9細胞に加え、抗生物質フリー血清フリーBacVector（登録商標）Insect培地で2回洗浄し、22 でインキュベートする。1時間後に、5%ウシ血清アルブミンを含有する1%BacPlaqueアガロース-BacVector（登録商標）Insect培地6mLを加える。アガロースを固化させた後、5%ウシ血清アルブミンを含有するBacVector（登録商標）Insect培地2mLをトランスマスフェクト細胞に加え、プラーカが見えるようになるまで3~5日にわたって、細胞を28 の培養器に移す。トランスマスフェクションの3~5日後に、単層中のプラーカは、pBACgus3/BoNT/A-Hisを含有する組換えウイルスプラーカの存在について試験するために、洗浄した単層を、20mg/mL X-Gluc Solution（EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン）30 μLを含有するBacVector（登録商標）Insect培地2mLと共に、28 の培養器中で約2時間インキュベートすることにより、-グルロニダーゼレポーター遺伝子活性について染色されるだろう。  
10

#### 【0190】

候補組換えウイルスプラーカを同定した後、数個の候補ウイルスプラーカを溶出させ、プラーカ精製する。組換えウイルスを溶出させるために、組換えウイルスプラーカを含有するプラグを、滅菌パストールピペットで、滅菌スクリューキャップバイアル中のBacVector（登録商標）Insect培地（EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン）1mLに移す。バイアルを22 で約2時間または4 で約16時間インキュベートする。各組換えウイルスプラーカにつき $2.5 \times 10^5$ 個のSf9細胞を、BacVector（登録商標）Insect培地（EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン）2mLが入っている35mm培養皿に播種し、28 の培養器で約20分間インキュベートする。培地を除去し、溶出させた組換えウイルス200 μLを加える。1時間後に、5%ウシ血清アルブミンを含有する1%BacPlaqueアガロース-BacVector（登録商標）Insect培地1mLを加える。アガロースを固化させた後、5%ウシ血清アルブミンを含有するBacVector（登録商標）Insect培地1mLをトランスマスフェクト細胞に加え、プラーカが見えるようになるまで3~5日にわたって、細胞を28 の培養器に移す。トランスマスフェクションの3~5日後に、単層中のプラーカは、pBACgus3/BoNT/A-Hisを含有する組換えウイルスプラーカの存在について試験するために、洗浄した単層を、20mg/mL X-Gluc Solution（EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン）30 μLを含有するBacVector（登録商標）Insect培地2mLと共に、28 の培養器中で約2時間インキュベートすることにより、-グルロニダーゼレポーター遺伝子活性について染色されるだろう。  
20

#### 【0191】

ウイルスのシードストックを調製するために、組換えウイルスプラーカを含有するプラグを滅菌パストールピペットで滅菌スクリューキャップバイアル中のBacVector（登録商標）Insect培地（EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン）1mLに移すことによって、組換えウイルスを溶出させる。そのバイアルを4 で約16時間インキュベー  
30

40

50

50

トする。約 $5 \times 10^5$ 個のSf9細胞を、BacVector（登録商標）Insect培地（EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン）5mLが入っているT-25フラスコに播種し、28 の培養器で約20分間インキュベートする。培地を除去し、溶出させた組換えウイルス300 μLを加える。1時間後に、5%ウシ血清アルブミンを含有するBacVector（登録商標）5mLをトランスクレクト細胞に加え、細胞の大半が付着していない不健全な状態になるまで3~5日間にわたって、28 の培養器に細胞を移す。15mLスナップキャップチューブに培地を移し、デブリを除去するためにチューブを1000 × gで5分間遠心分離することによって、ウイルスを収集する。清澄化した上清を新しい15mLスナップキャップチューブに移し、4 で保存する。

## 【0192】

10

ウイルスの高力価ストックを調製するために、約 $2 \times 10^7$ 個のSf9細胞を、BacVector（登録商標）Insect培地（EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン）10mLが入っているT-75フラスコに播種し、28 の培養器で約20分間インキュベートする。培地を除去し、ウイルスシードストック500 μLを加える。1時間後に、5%ウシ血清アルブミンを含有するBacVector（登録商標）Insect培地10mLをトランスクレクト細胞に加え、細胞の大半が付着していない不健全な状態になるまで3~5日間にわたって、28 の培養器に細胞を移す。15mLスナップキャップチューブに培地を移し、デブリを除去するためにチューブを1000 × gで5分間遠心分離することによって、ウイルスを収集する。清澄化した上清を新しい15mLスナップキャップチューブに移し、4 で保存する。高力価ウイルスストックは約 $2 \times 10^8 \sim 3 \times 10^9$ pfuのバキュロウイルスを含有するはずである。

20

## 【0193】

バキュロウイルス発現系を使ってgp64-BoNT/A-Hisを発現させるために、BacVector（登録商標）Insect培地250mLが入っている1Lフラスコに、約 $1.25 \times 10^8$ 個のSf9細胞を播種し、細胞密度が約 $2.5 \times 10^8$ になるまでオービタルシェーカー（150rpm）で成長させる。その培養物に約 $2.5 \times 10^9$ の高力価ストック組換えバキュロウイルスを接種し、28 のオービタルシェーカー（150rpm）で約48時間インキュベートする。培地をチューブに移し、デブリを除去するために500 × gで5分間チューブを遠心分離することにより、培地を収集する。培地試料を2 × LDS Sample Buffer（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）に加え、配列番号2からgp64-BoNT/A-Hisを発現させるストックと比較して、配列番号63から產生されるHis-BoNT/Aの発現量が増加しているバキュロウイルスストックを同定するために、抗BoNT/A抗体または抗His抗体を用いるウェスタンプロット解析により、発現を（実施例6および14で述べたように）測定する。この実施例に記載した全ての手順に関するさらなる詳細については、「BacVector（登録商標）Transfection Kits, TB216, revision A 1203」（EMD Biosciences-Novagen, ウィスコンシン州マディソン）を参照されたい。

30

## 【実施例22】

## 【0194】

## pMT/BiP-BoNT/A-V5-Hisの構築および発現

作動可能に連結された核酸分子をpMTベクター（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）中にクローニングするのに適した制限エンドヌクレアーゼ部位を、改変オーブンリーディングフレーム配列番号60の5'末端および3'末端に組み入れる。この核酸分子を実施例2で述べたように合成し、pUCBHB1/BoNT/Aコンストラクトを得る。このコンストラクトを、1) 活性BoNT/Aをコードする配列番号60のオーブンリーディングフレームを含有するインサートを切り出すと共に、2) このインサートをpMTベクターに作動可能に連結することを可能にするような制限酵素で、消化する。このインサートを、適当な制限エンドヌクレアーゼで消化したpMTベクターに、T4 DNAリガーゼ法を使ってサブクローニングすることにより、pMT/BiP-BoNT/A-V5-His（図13）を得る。ライゲーション混合物を、熱ショック法を使って、化学的にコンピテントな大腸菌DH5 細胞（Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド）に形質転換し、100 μg/mLのアンピシリンを含有する1.5 %ルリア-ベルタニ寒天平板（pH7.0）に播種し、37 の培養器に入れて終夜成長させる

40

50

。発現コンストラクトを含有する細菌をアンピシリン耐性コロニーとして同定する。アルカリ溶解プラスミド少量調製法を使って候補コンストラクトを単離し、インサートの存在および向きを決定するために、制限エンドヌクレアーゼ消化マッピングによって解析する。このクローニング戦略により、カルボキシル末端のV5ペプチドおよびポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする昆虫発現コンストラクトが得られることになる。同様のクローニング戦略を使って、発現レベルに関する対照として用いる配列番号2の無改変オープンリーディングフレームを含有するpMTコンストラクトを作製すると共に、配列番号58、配列番号59、配列番号61、配列番号62または配列番号63の改変オープンリーディングフレームのいずれか一つがpMTベクターに作動可能に連結されているpMT発現コンストラクトを作製する。

10

## 【0195】

昆虫細胞で活性BoNT/A-V5-Hisを一過性に発現させるために、シュナイダーショウジョウバエ培地3mLが入っている35mm組織培養皿に約 $3 \times 10^6$ 個のS2細胞を播種し、細胞が約 $9 \times 10^6$ 細胞/mlの密度に達するまで(6~16時間)、28℃の培養器で成長させる。pMT/BiP-BoNT/A-V5-His 19 μgを含有する240mM塩化カルシウム300 μLに、2×HEPES緩衝食塩水pH7.1(50mM N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES), pH7.4; 1.5mMリン酸ナトリウム(一塩基性); 280mM塩化ナトリウム)300 μLを加えることによって、600 μLトランスフェクション溶液を調製し、この溶液を約30分間インキュベートする。トランスフェクション溶液をS2細胞に加え、細胞を28℃の培養器で約16~24時間インキュベートする。発現を誘導するために、トランスフェクション培地を、500 μM硫酸銅を含有する新しいシュナイダーショウジョウバエ培地3mLに置き換える。細胞を28℃の培養器でさらに48時間インキュベートする。15mLスナップキャップチューブに培地を移し、デブリを除去するためにチューブを500 × gで5分間遠心分離することにより、培地を収集する。試料を2×LDS Sample Buffer(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)に加え、配列番号2対照からBoNT/A-V5-Hisを発現させるコンストラクトと比較して、配列番号60から產生されるBiP-BoNT/A-V5-Hisの発現量が増加しているpMTコンストラクトを同定するために、抗BoNT/A抗体、抗V5抗体または抗His抗体を用いるウェスタンプロット解析により、発現を(実施例6および14で述べたように)測定する。

20

## 【0196】

活性BoNT/A-V5-Hisを発現させる安定に組み込まれた昆虫細胞系を作出するために、シュナイダーショウジョウバエ培地3mLが入っている35mm組織培養皿に約 $3 \times 10^6$ 個のS2細胞を播種し、細胞が約 $9 \times 10^6$ 細胞/mlの密度に達するまで(6~16時間)、28℃の培養器で成長させる。pMT/BiP-BoNT/A-V5-His 19 μgおよびpCoHYgro 1 μgを含有する240mM塩化カルシウム300 μLに、2×HEPES緩衝食塩水pH7.1(50mM N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES), pH7.4; 1.5mMリン酸ナトリウム(一塩基性); 280mM塩化ナトリウム)300 μLを加えることによって、600 μLトランスフェクション溶液を調製し、この溶液を約30分間インキュベートする。トランスフェクション溶液をS2細胞に加え、細胞を28℃の培養器で約16~24時間インキュベートする。トランスフェクション培地を新しいシュナイダーショウジョウバエ培地3mLに置き換え、細胞を28℃の培養器で約48時間インキュベートする。培地を、約500 μg/mLのハイグロマイシンBを含有する新しいシュナイダーショウジョウバエ培地3mLで置き換える。細胞を28℃の培養器で約3~4週間インキュベートし、4~5日ごとに古い培地を新しいハイグロマイシンB選択培地で置き換える。ハイグロマイシンB耐性コロニーが樹立されたら、約500 μg/mLのハイグロマイシンBを添加した新しいシュナイダーショウジョウバエ培地が入っている新しい35mm培養プレートに耐性コロニーを再播種し、細胞が約 $6 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/mlの密度に達するまで培養する。pMT/BiP-BoNT/A-V5-Hisが安定に組み込まれているS2細胞系からのBoNT/A-V5-Hisの発現を調べるために、各細胞系に由来する約 $3 \times 10^6$ 個のS2細胞を、シュナイダーショウジョウバエ培地3mLが入っている35mm組織培養皿に播種し、28℃の培養器で、細胞が約 $9 \times 10^6$ 細胞/mlの密度に達するまで(6~16時間)成長させる。発現を誘導するために、トランスフェクション培地を、500 μM硫酸銅を含有する新しいシュナイダーショウジョウバエ培地3mL

30

40

50

に置き換える。細胞を28 の培養器でさらに48時間インキュベートする。15mLスナップキャップチューブに培地を移し、デブリを除去するためにチューブを500×gで5分間遠心分離することにより、培地を収集する。試料を2×LDS Sample Buffer ( Invitrogen, Inc. , カリフォルニア州カールズバッド ) に加え、配列番号2対照からBoNT/A-V5-Hisを発現させる細胞系と比較して、配列番号60から産生されるBoNT/A-V5-Hisの発現量が増加しているS2細胞系を同定するために、抗BoNT/A抗体、抗V5抗体または抗His抗体を用いるウェスタンプロット解析により、発現を（実施例6および14で述べたように）測定する。配列番号2対照と比較して最も高いBoNT/A-V5-Hisの発現レベルを示す樹立S2細胞系を、3Lスピナーフラスコを用いる大規模発現用に選択する。大規模発現の手法は、培養培地がシュナイダーショウジョウバエ培地約800～1000mLであることを除いて上に概説したとおりであり、試薬類の濃度は全てこの体積に合わせて比例的に増加させる。この実施例に記載した全ての手順に関するさらなる詳細については、「Drosophila Expression System, version H, For the Stable Expression and Purification of Heterologous Proteins in Schneider 2 Cells, 25-0191」( Invitrogen, Inc. , カリフォルニア州カールズバッド ) を参照されたい。

10

### 【実施例 2 3】

#### 【 0 1 9 7 】

##### pQBI25/BoNT/A-GFPの構築および発現

作動可能に連結された核酸分子をpQBI25ベクター ( Qbiogene, Inc. , カリフォルニア州カールズバッド ) 中にクローニングするのに適した制限エンドヌクレアーゼ部位を、改変オープンリーディングフレーム配列番号99の5'末端および3'末端に組み入れる。この核酸分子を実施例2で述べたように合成し、pUCBHB1/BoNT/Aコンストラクトを得る。このコンストラクトを、1) 活性BoNT/Aをコードする配列番号99のオープンリーディングフレームを含有するインサートを切り出すと共に、2) このインサートをpQBI25ベクターに作動可能に連結することを可能にするような制限酵素で、消化する。このインサートを、適当な制限エンドヌクレアーゼで消化したpQBI25ベクターに、T4 DNAリガーゼ法を使ってサブクローニングすることにより、pQBI25/BoNT/A-GFP ( 図14 ) を得る。ライゲーション混合物を、熱ショック法を使って、化学的にコンピテントな大腸菌DH5 細胞 ( Invitrogen, Inc. , カリフォルニア州カールズバッド ) に形質転換し、100 μg/mLのアンピシリンを含有する1.5%ルリア-ベルタニ寒天平板 ( pH7.0 ) に播種し、37 の培養器に入れて終夜成長させる。発現コンストラクトを含有する細菌をアンピシリン耐性コロニーとして同定する。アルカリ溶解プラスミド少量調製法を使って候補コンストラクトを単離し、インサートの存在および向きを決定するために、制限エンドヌクレアーゼ消化マッピングによって解析する。このクローニング戦略により、カルボキシル末端のGFPペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする哺乳動物発現コンストラクトが得られる。同様のクローニング戦略を使って、発現レベルに関する対照として用いる配列番号2の無改変オープンリーディングフレームを含有するpQBI25コンストラクトを作製すると共に、配列番号76～配列番号98の改変オープンリーディングフレームのいずれか一つがpQBI25ベクターに作動可能に連結されているpQBI25発現コンストラクトを作製する。

20

#### 【 0 1 9 8 】

活性BoNT/A-GFPを細胞系で一過性に発現させるために、10%ウシ胎仔血清 ( FBS ) 、1×ペニシリン/ストレプトマイシン溶液 ( Invitrogen, Inc. , カリフォルニア州カールズバッド ) および1×MEM非必須アミノ酸溶液 ( MEM ) ( Invitrogen, Inc. , カリフォルニア州カールズバッド ) を添加した完全ダルベッコ変法イーグル培地3mLが入っている35mm組織培養皿に、約 $1.5 \times 10^5$ 個のSH-SY5Y細胞を播種し、細胞が約 $5 \times 10^5$ 細胞/mLの密度に達するまで ( 6～16時間 ) 、37 の培養器中、5%二酸化炭素下で成長させる。pQBI25/BoNT/A-GFP 5 μgを含有するOPTI-MEM Reduced Serum Medium 250 μLに、室温で5分間インキュベートしたLipofectAmine 2000 ( Invitrogen, Inc. , カリフォルニア州カールズバッド ) 15 μLを含有するOPTI-MEM Reduced Serum Medium 250 μLを加えることによって、500 μLトランスフェクション溶液を調製する。このトランスフェクションを室温で約20分間インキュベート

30

40

50

する。完全添加DMEM培地をOPTI-MEM Reduced Serum Medium 2mLで置き換え、500 μLトランسفェクション溶液をSH-SY5Y細胞に加え、細胞を37 の培養器中、5%二酸化炭素下で約6~18時間インキュベートする。トランسفェクション培地を新しい完全添加DMEM 3mLで置き換え、細胞を37 の培養器中、5%二酸化炭素下で48時間インキュベートする。細胞を100mMリン酸緩衝食塩水 (pH7.4) 3.0mLで1回すすぎ、50mM N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸) (HEPES) , pH6.8、150mM塩化ナトリウム、1.5mM塩化マグネシウム、10%(v/v)グリセロール、1mMエチレングリコールビス(アミノエチルエーテル)N,N,N',N'-四酢酸 (EGTA) 、2%(v/v)Triton-X (登録商標) 100 (4-オクチルフェノールポリエトキシレート) および1×Completeプロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche Applied Science, インディアナ州インディアナポリス) で細胞を溶解することにより、細胞を収集する。細胞試料を2×LDS Sample Buffer (Invitrogen, Inc. , カリフォルニア州カールズバッド) に加え、配列番号2対照からBoNT/A-GFPを発現させるコンストラクトと比較して、配列番号99から産生されるBoNT/A-GFPの発現量が増加しているpQBI25コンストラクトを同定するために、抗BoNT/A抗体または抗GFP抗体を用いるウェスタンプロット解析により、発現を (実施例6および14で述べたように) 測定する。

10

#### 【実施例24】

#### 【0199】

#### pcDNA (商標) 6/BoNT/A-V5-Hisの構築および発現

作動可能に連結された核酸分子をpcDNA (商標) 6ベクター (Invitrogen, Inc. , カリフォルニア州カールズバッド) 中にクローニングするのに適した制限エンドヌクレアーゼ部位を、改変オープンリーディングフレーム配列番号99の5'末端および3'末端に組み入れる。この核酸分子を実施例2で述べたように合成し、pUCBHB1/BoNT/Aコンストラクトを得る。このコンストラクトを、1) 活性BoNT/Aをコードする配列番号99のオープンリーディングフレームを含有するインサートを切り出すと共に、2) このインサートをpcDNA (商標) 6ベクターに作動可能に連結することを可能にするような制限酵素で、消化する。このインサートを、適当な制限エンドヌクレアーゼで消化したpcDNA (商標) 6ベクターに、T4 DNAリガーゼ法を使ってサブクローニングすることにより、pcDNA (商標) 6/BoNT/A-V5-His (図15) を得る。ライゲーション混合物を、熱ショック法を使って、化学的にコンピテントな大腸菌DH5 細胞 (Invitrogen, Inc. , カリフォルニア州カールズバッド) に形質転換し、100 μg/mLのアンピシリンを含有する1.5%ルリア-ベルターニ寒天平板 (pH7.0) に播種し、37 の培養器に入れて終夜成長させる。発現コンストラクトを含有する細菌をアンピシリン耐性コロニーとして同定する。アルカリ溶解プラスミド少量調製法を使って候補コンストラクトを単離し、インサートの存在および向きを決定するために、制限エンドヌクレアーゼ消化マッピングによって解析する。このクローニング戦略により、カルボキシル末端のV5ペプチドおよびポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする哺乳動物発現コンストラクトが得られる。同様のクローニング戦略を使って、発現レベルに関する対照として用いる配列番号2の無改変オープンリーディングフレームを含有するpcDNA (商標) 6コンストラクトを作製すると共に、配列番号76~配列番号98の改変オープンリーディングフレームのいずれか一つがpcDNA (商標) 6ベクターに作動可能に連結されているpcDNA (商標) 6発現コンストラクトを作製する。

20

#### 【0200】

活性BoNT/A-V5-Hisを細胞系で一過性に発現させるために、10%ウシ胎仔血清 (FBS) 、1×ペニシリン/ストレプトマイシン溶液 (Invitrogen, Inc. , カリフォルニア州カールズバッド) および1×MEM非必須アミノ酸溶液 (MEM) 非必須アミノ酸溶液 (Invitrogen, Inc. , カリフォルニア州カールズバッド) を添加した完全ダルベッコ変法イーグル培地3mLが入っている35mm組織培養皿に、約 $1.5 \times 10^5$ 個のSH-SY5Y細胞を播種し、細胞が約 $5 \times 10^5$ 細胞/mLの密度に達するまで (6~16時間) 、37 の培養器中、5%二酸化炭素下で成長させる。pcDNA (商標) 6/BoNT/A-V5-His 5 μgを含有するOPTI-MEM Reduced Serum Medium 250 μLに、室温で5分間インキュベートしたLipofectAmine 2000 (Invitrogen, Inc. , カリフォルニア州カールズバッド) 15 μLを含有するOPTI-MEM Reduced Serum Medium 250 μLを

30

40

50

加えることによって、500 μLトランスフェクション溶液を調製する。このトランスフェクションを室温で約20分間インキュベートする。完全添加DMEM培地をOPTI-MEM Reduced Serum Medium 2mLで置き換え、500 μLトランスフェクション溶液をSH-SY5Y細胞に加え、細胞を37 の培養器中、5%二酸化炭素下で約6~18時間インキュベートする。トランスフェクション培地を新しい完全添加DMEM 3mLで置き換え、細胞を37 の培養器中、5%二酸化炭素下で48時間インキュベートする。BoNT/A-V5-Hisの発現解析を行なうために、培地と細胞の両方を集め。培地は、15mLスナップキャップチューブに培地を移し、デブリを除去するためにチューブを500 × gで5分間遠心分離することによって、収集する。細胞は、100 mMリン酸緩衝食塩水 (pH7.4) 3.0mLで細胞を1回すすぐことによって収集し、62.6mM 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール塩酸 (トリス-HCl), pH6.8および2%ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を含有する緩衝液で、細胞を溶解する。培地試料と細胞試料の両者を2 × LDS Sample Buffer (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) に加え、配列番号2対照からBoNT/A-V5-Hisを発現させるコンストラクトと比較して、配列番号99から產生されるBoNT/A-V5-Hisの発現量が増加しているpcDNA (商標) 6コンストラクトを同定するために、抗BoNT/A抗体、抗V5抗体または抗His抗体を用いるウェスタンプロット解析により、発現を (実施例6および14で述べたように) 測定する。

#### 【0201】

活性BoNT/A-V5-Hisを発現させる安定に組み込まれた細胞系を作出するために、10%FBS、1 × ペニシリン/ストレプトマイシン溶液 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) および1 × MEM非必須アミノ酸溶液 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) を添加した完全DMEM 3mLが入っている35mm組織培養皿に、約 $1.5 \times 10^5$ 個のSH-SY5Y細胞を播種し、細胞が約 $5 \times 10^5$ 細胞/mLの密度に達するまで (6~16時間) 、37 の培養器中、5%二酸化炭素下で成長させる。pcDNA (商標) 6/BoNT/A-V5-His 5 μgを含有するOPTI-MEM Reduced Serum Medium 250 μLに、室温で5分間インキュベートしたLipofectA mine 2000 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) 15 μLを含有するOPTI-MEM Reduced Serum Medium 250 μLを加えることによって、500 μLトランスフェクション溶液を調製する。このトランスフェクションを室温で約20分間インキュベートする。完全添加DMEM培地をOPTI-MEM Reduced Serum Medium 2mLで置き換え、500 μLトランスフェクション溶液をSH-SY5Y細胞に加え、細胞を37 の培養器中、5%二酸化炭素下で約6~18時間インキュベートする。トランスフェクション培地を新しい完全添加DMEM 3mLで置き換える、細胞を37 の培養器中、5%二酸化炭素下で約48時間インキュベートする。培地を、約5 μg/mLのプラスチックサイジン、10%FBS、1 × ペニシリン/ストレプトマイシン溶液 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) および1 × MEM非必須アミノ酸溶液 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) を含有する新しい完全DMEM 3mLで置き換える。4~5日ごとに古い培地を新しいプラスチックサイジン選択完全添加DMEMで置き換えるながら、細胞を37 の培養器中、5%二酸化炭素下で、約3~4週間インキュベートする。プラスチックサイジン耐性コロニーが樹立されたら、約5 μg/mLのプラスチックサイジン、10%FBS、1 × ペニシリン/ストレプトマイシン溶液 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) および1 × MEM非必須アミノ酸溶液 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) を添加した新しい完全DMEMが入っている新しい35mm培養プレートに耐性コロニーを再播種し、これらの細胞が $6~20 \times 10^5$ 細胞/mLの密度に達するまで培養する。pcDNA (商標) 6/BoNT/A-V5-Hisが安定に組み込まれているSH-SY5Y細胞系からのBoNT/A-V5-Hisの発現を調べるために、プラスチックサイジン選択完全添加DMEM 3mLが入っている35mm組織培養皿に、各細胞系に由来する約 $1.5 \times 10^5$ 個のSH-SY5Y細胞を播種し、37 の培養器中、5%二酸化炭素下で、細胞が約 $5 \times 10^5$ 細胞/mLの密度に達するまで (6~16時間) 成長させる。培地を、新しいプラスチックサイジン選択完全添加DMEM 3mLで置き換える、細胞を37 の培養器中、5%二酸化炭素下で48時間インキュベートする。BoNT/A-V5-Hisの発現解析を行なうために、培地と細胞の両方を集め。培地は、15mLスナップキャップチューブに培地を移し、デブリを除去するためにチューブを500 × gで5分間遠心分離することによって、収集する。細胞は、100mMリン酸緩衝食塩水 (pH7.4) 3.0mLで細胞を1回すすぎ、62.6mM 2-アミノ-2-

10

20

30

40

50

ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール塩酸（トリス-HCl），pH6.8および2%ラウリル硫酸ナトリウム（SDS）を含有する緩衝液で細胞を溶解することによって、収集する。培地試料と細胞試料の両者を2×LDS Sample Buffer（Invitrogen, Inc.，カリフォルニア州カールズバッド）に加え、配列番号2対照からBoNT/A-V5-Hisを発現させる細胞系と比較して、配列番号99から產生されるBoNT/A-V5-Hisの発現量が増加しているSH-SY5Y細胞系を同定するために、抗BoNT/A抗体、抗V5抗体または抗His抗体を用いるウェスタンプロット解析により、発現を（実施例6および14で述べたように）測定する。配列番号2対照と比較して最も高いBoNT/A-V5-Hisの発現レベルを示す樹立SH-SY5Y細胞系を、3Lフラスコを用いる大規模発現用に選択する。大規模発現の手法は、出発体積が完全DMEM約800～1000mLであることを除いて上に概説したとおりであり、試薬類の濃度は全てこの体積に合わせて比例的に増加させる。この実施例に記載した全ての手順に関するさらなる詳細については、「pcDNA（商標）6/V5-His A, B, and C, version C, 28-0183」（Invitrogen, Inc.，カリフォルニア州カールズバッド）を参照されたい。

10

#### 【実施例25】

#### 【0202】

#### pSecTag2/BoNT/A-c-myc-Hisの構築および発現

作動可能に連結された核酸分子をpSecTag2ベクター（Invitrogen, Inc.，カリフォルニア州カールズバッド）中にクローニングするのに適した制限エンドヌクレアーゼ部位を、改変オープンリーディングフレーム配列番号99の5'末端および3'末端に組み入れる。この核酸分子を実施例2で述べたように合成し、pUCBHB1/BoNT/Aコンストラクトを得る。このコンストラクトを、1) 活性BoNT/Aをコードする配列番号99のオープンリーディングフレームを含有するインサートを切り出すと共に、2) このインサートをpSecTag2ベクターに作動可能に連結することを可能にするような制限酵素で、消化する。このインサートを、適當な制限エンドヌクレアーゼで消化したpSecTag2ベクターに、T4 DNAリガーゼ法を使ってサブクローニングすることにより、pSecTag2/BoNT/A-V5-His（図16）を得る。ライゲーション混合物を、熱ショック法を使って、化学的にコンピテントな大腸菌DH5<sup>+</sup>細胞（Invitrogen, Inc.，カリフォルニア州カールズバッド）に形質転換し、100 μg/mLのアンピシリンを含有する1.5%ルリア-ベルターニ寒天平板（pH7.0）に播種し、37℃の培養器に入れて終夜成長させる。発現コンストラクトを含有する細菌をアンピシリン耐性コロニーとして同定する。アルカリ溶解プラスミド少量調製法を使って候補コンストラクトを単離し、インサートの存在および向きを決定するために、制限エンドヌクレアーゼ消化マッピングによって解析する。このクローニング戦略により、カルボキシル末端のc-mycペプチドおよびポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする哺乳動物発現コンストラクトが得られる。同様のクローニング戦略を使って、発現レベルに関する対照として用いる配列番号2の無改変オープンリーディングフレームを含有するpSecTag2コンストラクトを作製すると共に、配列番号76～配列番号98の改変オープンリーディングフレームのいずれか一つがpSecTag2ベクターに作動可能に連結されているpSecTag2発現コンストラクトを作製する。

20

#### 【0203】

活性BoNT/A-c-myc-Hisを細胞系で一過性に発現させるために、10%ウシ胎仔血清（FBS）、1×ペニシリン/ストレプトマイシン溶液（Invitrogen, Inc.，カリフォルニア州カールズバッド）および1×MEM非必須アミノ酸溶液（MEM）非必須アミノ酸溶液（Invitrogen, Inc.，カリフォルニア州カールズバッド）を添加した完全ダルベッコ変法イーグル培地3mLが入っている35mm組織培養皿に、約1.5 × 10<sup>5</sup>個のSH-SY5Y細胞を播種し、細胞が約5 × 10<sup>5</sup>細胞/mLの密度に達するまで（6～16時間）、37℃の培養器中、5%二酸化炭素下で成長させる。pSecTag2/BoNT/A-c-myc-His 5 μgを含有するOPTI-MEM Reduced Serum Medium 250 μLに、室温で5分間インキュベートしたLipofectAmine 2000（Invitrogen, Inc.，カリフォルニア州カールズバッド）15 μLを含有するOPTI-MEM Reduced Serum Medium 250 μLを加えることによって、500 μLトランスフェクション溶液を調製する。このトランスフェクションを室温で約20分間インキュベートする。完全添加DMEM培地をOPTI-MEM Reduced Ser

30

40

50

um Medium 2mLで置き換え、500 μLトランスフェクション溶液をSH-SY5Y細胞に加え、細胞を37 の培養器中、5%二酸化炭素下で約6~18時間インキュベートする。トランスフェクション培地を新しい完全添加DMEM 3mLで置き換え、細胞を37 の培養器中、5%二酸化炭素下で48時間インキュベートする。BoNT/A-c-myc-Hisの発現解析を行なうために、培地と細胞の両方を集め。培地は、15mLスナップキャップチューブに培地を移し、デブリを除去するためにチューブを500 × gで5分間遠心分離することによって、収集する。細胞は、100mMリン酸緩衝食塩水 (pH7.4) 3.0mLで細胞を1回すすぎ、62.6mM 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール塩酸 (トリス-HCl) , pH6.8および2%ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を含有する緩衝液で細胞を溶解することによって、収集する。培地試料と細胞試料の両者を2×LDS Sample Buffer (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) に加え、配列番号2対照からBoNT/A-V5-Hisを発現させるコンストラクトと比較して、配列番号99から產生されるBoNT/A-c-myc-Hisの発現量が増加しているpSecTag2コンストラクトを同定するために、抗BoNT/A抗体、抗c-myc抗体または抗His抗体を用いるウェスタンプロット解析により、発現を(実施例6および14で述べたように)測定する。

#### 【0204】

活性BoNT/A-V5-Hisを発現させる安定に組み込まれた細胞系を作出するために、10%FBS、1×ペニシリン/ストレプトマイシン溶液 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) および1×MEM非必須アミノ酸溶液 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) を添加した完全DMEM 3mLが入っている35mm組織培養皿に、約 $1.5 \times 10^5$ 個のSH-SY5Y細胞を播種し、細胞が約 $5 \times 10^5$ 細胞/mLの密度に達するまで(6~16時間)、37 の培養器中、5%二酸化炭素下で成長させる。pSecTag2/BoNT/A-c-myc-His 5 μgを含有するOPTI-MEM Reduced Serum Medium 250 μLに、室温で5分間インキュベートしたLipofectAmine 2000 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) 15 μLを含有するOPTI-MEM Reduced Serum Medium 250 μLを加えることによって、500 μLトランスフェクション溶液を調製する。このトランスフェクションを室温で約20分間インキュベートする。完全添加DMEM培地をOPTI-MEM Reduced Serum Medium 2mLで置き換え、500 μLトランスフェクション溶液をSH-SY5Y細胞に加え、細胞を37 の培養器中、5%二酸化炭素下で約6~18時間インキュベートする。トランスフェクション培地を新しい完全添加DMEM 3mLで置き換え、細胞を37 の培養器中、5%二酸化炭素下で約48時間インキュベートする。培地を、約5 μg/mLのZeocin (商標) 、10%FBS、1×ペニシリン/ストレプトマイシン溶液 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) および1×MEM非必須アミノ酸溶液 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) を含有する新しい完全DMEM 3mLで置き換える。4~5日ごとに古い培地を新しいZeocin (商標) 選択完全添加DMEMで置き換ながら、細胞を37 の培養器中、5%二酸化炭素下で、約3~4週間インキュベートする。Zeocin (商標) 耐性コロニーが樹立されたら、約5 μg/mLのZeocin (商標) 、10%FBS、1×ペニシリン/ストレプトマイシン溶液 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) および1×MEM非必須アミノ酸溶液 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド) を添加した新しい完全DMEMが入っている新しい35mm培養プレートに耐性コロニーを再播種し、これらの細胞が $6 \sim 20 \times 10^5$ 細胞/mLの密度に達するまで培養する。pSecTag2/BoNT/A-c-myc-Hisが安定に組み込まれているSH-SY5Y細胞系からのBoNT/A-c-myc-Hisの発現を調べるために、Zeocin (商標) 選択完全添加DMEM 3mLが入っている35mm組織培養皿に、各細胞系に由来する約 $1.5 \times 10^5$ 個のSH-SY5Y細胞を播種し、37 の培養器中、5%二酸化炭素下で、細胞が約 $5 \times 10^5$ 細胞/mLの密度に達するまで(6~16時間)成長させる。培地を、新しいZeocin (商標) 選択完全添加DMEM 3mLで置き換え、細胞を37 の培養器中、5%二酸化炭素下で48時間インキュベートする。BoNT/A-c-myc-Hisの発現解析を行なうために、培地と細胞の両方を集め。培地は、15mLスナップキャップチューブに培地を移し、デブリを除去するためにチューブを500 × gで5分間遠心分離することによって、収集する。細胞は、100mMリン酸緩衝食塩水 (pH7.4) 3.0mLで細胞を1回すすぎ、62.6mM 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール塩酸 (トリス-HCl) , pH6.8および2%ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を含有する緩衝液で細胞を溶解することによって、収集する。培地試料と細胞試

料の両者を2×LDS Sample Buffer (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)に加え、配列番号2対照からBoNT/A-c-myc-Hisを発現させる細胞系と比較して、配列番号99から產生されるBoNT/A-c-myc-Hisの発現量が増加しているSH-SY5Y細胞系を同定するために、抗BoNT/A抗体、抗c-myc抗体または抗His抗体を用いるウェスタンプロット解析により、発現を(実施例6および14で述べたように)測定する。配列番号2対照と比較して最も高いBoNT/A-c-myc-Hisの発現レベルを示す樹立SH-SY5Y細胞系を、3Lフラスコを用いる大規模発現用に選択する。大規模発現の手法は、出発体積が完全DMEM約800~1000mLであることを除いて上に概説したとおりであり、試薬類の濃度は全てこの体積に合わせて比例的に増加させる。この実施例に記載した全ての手順に関するさらなる詳細については、「pSecTag2 A, B and C, version E, 28-0159」(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)を参照されたい。

10

## 【実施例26】

## 【0205】

## pIVEX2.3d/BoNT/A-Hisの構築および発現

作動可能に連結された核酸分子をpIVEX2.3dベクター(Roche Applied Science, インディアナ州インディアナポリス)中にクローニングするのに適した制限エンドヌクレアーゼ部位を、改変オープンリーディングフレーム配列番号3の5'末端および3'末端に組み入れる。この核酸分子を実施例2で述べたように合成し、pUCBHB1/BoNT/Aコンストラクトを得る。このコンストラクトを、1) 活性BoNT/Aをコードする配列番号3のオープンリーディングフレームを含有するインサートを切り出すと共に、2) このインサートをpIVEX2.3dベクターに作動可能に連結することを可能にするような制限酵素で、消化する。このインサートを、適当な制限エンドヌクレアーゼで消化したpIVEX2.3dベクターに、T4 DNAリガーゼ法を使ってサブクローニングすることにより、pIVEX2.3d/BoNT/A-His(図17)を得る。ライゲーション混合物を、熱ショック法を使って、化学的にコンピテントな大腸菌DH5<sup>+</sup>細胞(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)に形質転換し、100 μg/mLのアンピシリンを含有する1.5%ルリア-ベルターニ寒天平板(pH7.0)に播種し、37℃の培養器に入れて終夜成長させる。発現コンストラクトを含有する細菌をアンピシリン耐性コロニーとして同定する。アルカリ溶解プラスミド少量調製法を使って候補コンストラクトを単離し、インサートの存在および向きを決定するために、制限エンドヌクレアーゼ消化マッピングによって解析する。このクローニング戦略により、カルボキシル末端のポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする原核発現コンストラクトが得られる。同様のクローニング戦略を使って、発現レベルに関する対照として用いる配列番号2の無改変オープンリーディングフレームを含有するpIVEX2.3dコンストラクトを作製すると共に、配列番号4~配列番号33の改変オープンリーディングフレームのいずれか一つがpIVEX2.3dベクターに作動可能に連結されているpIVEX2.3d発現コンストラクトを作製する。

20

## 【0206】

無細胞発現系を使って活性BoNT/Aを発現させるために、RTS 100 *E. coli* HY Kit (Roche Applied Science, インディアナ州インディアナポリス)を使用する。大腸菌溶解液12 μl、反応ミックス10 μl、アミノ酸12 μl、メチオニン1 μl、復元緩衝液5 μlおよびpIVEX2.3d/BoNT/A-His 0.5 μgからなる50 μl反応混合物を、30℃のサー モミキサーで4~6時間インキュベートする。この反応混合物から採取した5 μlの試料を2×LDS Sample Buffer(Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールズバッド)に加え、配列番号2からBoNT/A-Hisを発現させるコンストラクトと比較して、配列番号3から產生されるBoNT/A-Hisの発現量が増加しているpIVEX2.3dコンストラクトを同定するために、抗BoNT/A抗体または抗His抗体を用いるウェスタンプロット解析により、発現を(実施例6および14で述べたように)測定する。大規模発現の手法は、RTS 9000 *E. coli* HY Kit (Roche Applied Science, インディアナ州インディアナポリス)を使用することを除いて上に概説したとおりである。この実施例に記載した全ての手順に関するさらなる詳細については、「RTS 100 *E. coli* HY Kit, *In vitro* protein synthesis system based on *E. coli* lysate, Instruction M

30

40

50

anual, version 3, Oct. 2003」(Roche Applied Science, インディアナ州インディアナポリス)および「Rapid Translation System RTS 9000 *E. coli* HY Kit, In vitro protein synthesis system based on an enhanced *E. coli* lysate, Instruction Manual, version 3, Nov. 2001」(Roche Applied Science, インディアナ州インディアナポリス)を参照されたい。

#### 【0207】

本発明の諸側面を、開示した態様に関して説明したが、開示した具体的実験はこれらの側面の実例に過ぎず、決して本発明を限定するものでないことは、当業者にはすぐに理解されるだろう。本発明の要旨から逸脱することなくさまざまな変更を加えることができる。

10

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0208】

【図1】中枢ニューロンおよび末梢ニューロンにおける神経伝達物質放出およびクロストリジウム毒素中毒の現在のパラダイムを図解したものである。図1aは、中枢ニューロンおよび末梢ニューロンの神経伝達物質放出機序を図解したものである。放出過程は次の2段階を含むと説明することができる：1) 小胞のドッキング（ここでは、神経伝達物質分子を含有する小胞の小胞結合型SNAREタンパク質が、形質膜に配置された膜結合型SNAREタンパク質と会合する）；および2) 神経伝達物質放出（ここでは、小胞が形質膜と融合し、神経伝達物質がエキソサイトーシスされる）。図1bは、中枢ニューロンおよび末梢ニューロンにおける破傷風毒素活性およびボツリヌス毒素活性の中毒機序を図解したものである。この中毒過程は次の4段階を含むと説明することができる：1) 受容体結合（ここでは、クロストリジウム毒素がクロストリジウム受容体系に結合して、中毒過程を開始する）；2) 複合体の内部移行（ここでは、毒素の結合後に、毒素/受容体系複合体を含有する小胞が細胞内にエンドサイトーシスされる；3) 軽鎖トランスロケーション（ここでは、例えば小胞の内部pHの変化、クロストリジウム毒素重鎖のH<sub>N</sub>ドメインを含むチャネル孔の形成、クロストリジウム毒素軽鎖の重鎖からの分離、および活性型軽鎖の放出などといった複数の事象が起こると考えられる）；および4) 酵素による標的修飾（ここでは、クロストリジウム毒素の活性型軽鎖がその標的SNARE基質（例えばSNAP-25、VAMPまたはシンタキシンなど）をタンパク質分解的に切断することによって、小胞のドッキングおよび神経伝達物質放出を妨げる）。

20

【図2】アミノ末端ポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/A（配列番号111）をコードする配列番号110の改変オープンリーディングフレームを含む原核発現コンストラクトpET30b/His-BoNT/Aのプラスミド地図を表す。エンテロキナーゼプロテアーゼ切断部位が、ポリヒスチジン結合ペプチドとBoNT/Aとの間に作動可能に連結される。略号は以下のとおりである：P<sub>T17</sub>，バクテリオファージT7プロモーター領域；6xHis，ポリヒスチジン結合ペプチド配列をコードする領域；エンテロキナーゼ，エンテロキナーゼ切断部位をコードする領域；BoNT/A，活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレーム；T7 TT，バクテリオファージT7転写終結領域；f1起点，バクテリオファージf1複製起点；カナマイシン，カナマイシン耐性を付与するアミノホスホトランスフェラーゼペプチドをコードする領域；pBR322 ori，pBR322プラスミド複製起点領域；lacI，ラクトースIペプチドをコードする領域。

30

【図3】活性His-BoNT/Aを発現させるコンストラクトを同定するために使用したGFP-SNAP25活性アッセイの結果を表す。His-BoNT/A候補1、2、5、6および8は統計的に有意なBoNT/A酵素活性を示した。

40

【図4】カルボキシル末端ポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/A（配列番号113）をコードする配列番号112の改変オープンリーディングフレームを含む原核発現コンストラクトpET29b/BoNT/A-KHisのプラスミド地図を表す。トリプシンプロテアーゼ切断部位が、ポリヒスチジン結合ペプチドとBoNT/Aとの間に作動可能に連結される。略号は以下のとおりである：P<sub>T17</sub>，バクテリオファージT7プロモーター領域；6xHis，ポリヒスチジン結合ペプチド配列をコードする領域；トリプシン，トリプシン切断部位を

50

コードする領域；BoNT/A，活性BoNT/Aをコードする改変オーブンリーディングフレーム；T7 TT，バクテリオファージT7転写終結領域；f1起点，バクテリオファージf1複製起点；カナマイシン，カナマイシン耐性を付与するアミノホスホトランスフェラーゼペプチドをコードする領域；pBR322 ori，pBR322プラスミド複製起点領域；lacI，ラクトースIペプチドをコードする領域。

【図5】活性BoNT/A-Hisを発現させるコンストラクトを同定するために使用したGFP-SNAP 25活性アッセイの結果を表す。BoNT/A-His候補2、3、6および9は統計的に有意なBoNT/A酵素活性を示した。

【図6】改変オーブンリーディングフレームから発現されたIMAC精製BoNT/Aを表す。図6aは、配列番号110の改変オーブンリーディングフレームを含むpET30b/His-BoNT/A発現コンストラクトから発現されたHis-BoNT/AのIMAC精製プロファイルを表す。得られたHis-BoNT/Aの量は平均で約5mg/Lだった。これは同じ活性His-BoNT/Aをコードする無改変オーブンリーディングフレームから得られるタンパク質量の5倍増に相当する。図6bは、配列番号112の改変オーブンリーディングフレームを含むpET29b/BoNT/A-KHis発現コンストラクトから発現されたBoNT/A-KHisのIMAC精製プロファイルを表す。得られたBoNT/A-KHisの量は平均で約12mg/Lだった。これは同じ活性BoNT/A-KHisをコードする無改変オーブンリーディングフレームから得られるタンパク質量の12倍増に相当する。

【図7】アミノ末端ポリヒスチジン結合ペプチドおよびXpress（商標）結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする改変オーブンリーディングフレームを含む原核発現コンストラクトpRSETb/His-BoNT/Aのプラスミド地図を表す。エンテロキナーゼプロテアーゼ切断部位が、ポリヒスチジン結合ペプチドおよびXpress（商標）結合ペプチドとBoNT/Aとの間に作動可能に連結される。略号は以下のとおりである：P<sub>T17</sub>，バクテリオファージT7プロモーター領域；6xHis，ポリヒスチジン結合ペプチド配列をコードする領域；Xpress<sup>TM</sup>，Xpress（商標）結合ペプチド配列をコードする領域；エンテロキナーゼ，EnterokinaseMax（商標）切断部位をコードする領域；BoNT/A，活性BoNT/Aをコードする配列番号6の改変オーブンリーディングフレーム；f1起点，バクテリオファージf1複製起点；アンピシリン，アンピシリン耐性を付与する-L-ラクタマーゼペプチドをコードする領域；pBR322 ori，pBR322プラスミド複製起点領域。

【図8】カルボキシル末端c-myc結合ペプチドおよびポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする改変オーブンリーディングフレームを含む酵母発現コンストラクトpPICZ A/BoNT/A-myc-Hisのプラスミド地図を表す。略号は以下のとおりである：P<sub>AOX1</sub>，アルデヒドオキシダーゼ1プロモーター領域；BoNT/A，活性BoNT/Aをコードする配列番号36の改変オーブンリーディングフレーム；c-myc，c-myc結合ペプチド配列をコードする領域；6xHis，ポリヒスチジン結合ペプチド配列をコードする領域；AOX1 TT，アルデヒドオキシダーゼ1転写終結領域；Zeocin<sup>TM</sup>，Zeocin（商標）耐性ペプチドをコードする領域；pUC ori，pUCプラスミド複製起点領域。

【図9】カルボキシル末端V5結合ペプチドおよびポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする改変オーブンリーディングフレームを含む酵母発現コンストラクトpMET/BoNT/A-V5-Hisのプラスミド地図を表す。略号は以下のとおりである：P<sub>AUG1</sub>，アルコールオキシダーゼプロモーター領域；BoNT/A，活性BoNT/Aをコードする配列番号36の改変オーブンリーディングフレーム；V5，V5結合ペプチド配列をコードする領域；6xHis，ポリヒスチジン結合ペプチド配列をコードする領域；AUG1 TT，アルコールオキシダーゼ転写終結領域；ADE2，栄養要求性選択のためのADE2遺伝子；3'AUG1；pUC ori，pUCプラスミド複製起点領域；アンピシリン，アンピシリン耐性を付与する-L-ラクタマーゼペプチドをコードする領域。

【図10】カルボキシル末端V5結合ペプチドおよびポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする改変オーブンリーディングフレームを含む酵母発現コンストラクトpYES2.1/BoNT/A-V5-Hisのプラスミド地図を表す。略号は以下のとおりである：P<sub>GAL1</sub>，ガラクトース誘導性プロモーター領域；BoNT/A，活性BoNT/Aをコードする配列番号39の改変オーブンリーディングフレーム；V5，V5結合ペプチド配列をコードす

10

20

30

40

50

る領域；6xHis，ポリヒスチジン結合ペプチド配列をコードする領域；cyc1 TT，アルコールオキシダーゼ転写終結領域；pUC ori，pUCプラスミド複製起点領域；アンピシリン，アンピシリン耐性を付与する - ラクタマーゼペプチドをコードする領域；URA3，栄養要求性選択のためのURA3遺伝子；2 μ 複製起点，2 μ 複製起点；f1起点，バクテリオファージf1複製起点。

【図11】アミノ末端ポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレームを含むバキュロウイルストラ nsファーコンストラクトpFastBacHT/His-BoNT/Aのプラスミド地図を表す。タバコエッチャイルス(TEV)プロテアーゼ切断部位が、ポリヒスチジン結合ペプチドとBoNT/Aとの間に作動可能に連結される。略号は以下のとおりである：PPH，ポリヘドリンプロモーター領域；6xHis，ポリヒスチジン結合ペプチド配列をコードする領域；TEV，TEVプロテアーゼ切断配列をコードする領域；BoNT/A，活性BoNT/Aをコードする配列番号63の改変オープンリーディングフレーム；SV40 pA，シミアンウイルス40ポリアデニル化部位；アンピシリン，アンピシリン耐性を付与する - ラクタマーゼペプチドをコードする領域；pUC ori，pUCプラスミド複製起点領域；ゲンタマイシン，ゲンタマイシン耐性を付与するアミノホスホトランスフェラーゼペプチドをコードする領域。

【図12】カルボキシル末端ポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレームを含むバキュロウイルストラ nsファーコンストラクトpBACgus3/BoNT/A-Hisのプラスミド地図を表す。トロンビンプロテアーゼ切断部位が、BoNT/Aとポリヒスチジン結合ペプチドとの間に作動可能に連結される。略号は以下のとおりである：PPH，ポリヘドリンプロモーター領域；gp64，gp64シグナルペプチドをコードする領域；BoNT/A，活性BoNT/Aをコードする配列番号63の改変オープンリーディングフレーム；トロンビン，トロンビンプロテアーゼ切断配列をコードする領域；6xHis，ポリヒスチジン結合ペプチド配列をコードする領域；pUC ori，pUCプラスミド複製起点領域；アンピシリン，アンピシリン耐性を付与する - ラクタマーゼペプチドをコードする領域；f1 ori，バクテリオファージf1複製起点；gus， - グルクロニダーゼペプチドをコードする領域。

【図13】カルボキシル末端V5結合ペプチドおよびポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレームを含む昆虫発現コンストラクトpMT/BiP-BoNT/A-V5-Hisのプラスミド地図を表す。略号は以下のとおりである： $P_{MT}$ ，メタロチオネインプロモーター領域；BiPSS，BiPシグナル配列をコードする領域；BoNT/A，活性BoNT/Aをコードする配列番号60の改変オープンリーディングフレーム；V5，V5結合ペプチド配列をコードする領域；6xHis，ポリヒスチジン結合ペプチド配列をコードする領域；SV40 pA，シミアンウイルス40ポリアデニル化部位；pUC ori，pUCプラスミド複製起点領域；アンピシリン，アンピシリン耐性を付与する - ラクタマーゼペプチドをコードする領域。

【図14】カルボキシル末端GFPペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレームを含む哺乳動物発現コンストラクトpQB125/BoNT/A-GFPのプラスミド地図を表す。略号は以下のとおりである： $P_{CMV}$ ，サイトメガロウイルスプロモーター領域；BoNT/A，活性BoNT/Aをコードする配列番号99の改変オープンリーディングフレーム；GFP，緑色蛍光タンパク質ペプチドをコードする領域；BGH pA，ウシ成長ホルモンポリアデニル化部位；ネオマイシン，ネオマイシン耐性を付与するアミノホスホトランスフェラーゼペプチドをコードする領域；pUC ori，pUCプラスミド複製起点領域；アンピシリン，アンピシリン耐性を付与する - ラクタマーゼペプチドをコードする領域。

【図15】カルボキシル末端V5結合ペプチドおよびポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする改変オープンリーディングフレームを含む哺乳動物発現コンストラクトpcDNA(商標)6/BoNT/A-V5-Hisのプラスミド地図を表す。略号は以下のとおりである： $P_{CMV}$ ，サイトメガロウイルスプロモーター領域；BoNT/A，活性BoNT/Aをコードする配列番号99の改変オープンリーディングフレーム；V5，V5結合ペプチド配列

10

20

30

40

50

をコードする領域；6xHis，ポリヒスチジン結合ペプチド配列をコードする領域；BGH pA，ウシ成長ホルモンポリアデニル化部位；プラスチックサイジン，プラスチックサイジン耐性ペプチドをコードする領域；pUC ori，pUCプラスミド複製起点領域；アンピシリン，アンピシリン耐性を付与する -ラクタマーゼペプチドをコードする領域。

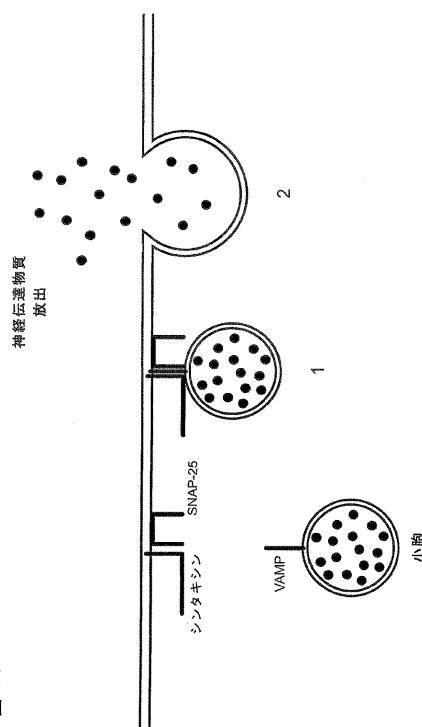
【図16】カルボキシル末端c-myc結合ペプチドおよびポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする改変オーブンリーディングフレームを含む哺乳動物発現コンストラクトpSecTag2/BoNT/A-c-myc-Hisのプラスミド地図を表す。略号は以下のとおりである： $P_{CMV}$ ，サイトメガロウイルスプロモーター領域；BoNT/A，活性BoNT/Aをコードする配列番号99の改変オーブンリーディングフレーム；c-myc，c-myc結合ペプチド配列をコードする領域；6xHis，ポリヒスチジン結合ペプチド配列をコードする領域；BGH pA，ウシ成長ホルモンポリアデニル化部位；f1 ori，バクテリオファージf1複製起点； $P_{SV40}$ ，シミアンウイルス40プロモーター領域；Zeocin<sup>TM</sup>，Zeocin（商標）耐性ペプチドをコードする領域；pUC ori，pUCプラスミド複製起点領域；アンピシリン，アンピシリン耐性を付与する -ラクタマーゼペプチドをコードする領域。

【図17】カルボキシル末端ポリヒスチジン結合ペプチドに作動可能に連結された活性BoNT/Aをコードする改変オーブンリーディングフレームを含む無細胞発現コンストラクトpVEX2.3d/BoNT/A-Hisのプラスミド地図を表す。略号は以下のとおりである： $P_{T7}$ ，バクテリオファージT7プロモーター領域；RBS，リボソーム結合部位；BoNT/A，活性BoNT/Aをコードする配列番号3の改変オーブンリーディングフレーム；6xHis，ポリヒスチジン結合ペプチド配列をコードする領域；T7 TT，バクテリオファージT7転写終結領域；pUC ori，pUCプラスミド複製起点領域；アンピシリン，アンピシリン耐性を付与する -ラクタマーゼをコードする領域。

10

20

【図1a】



【図1b】

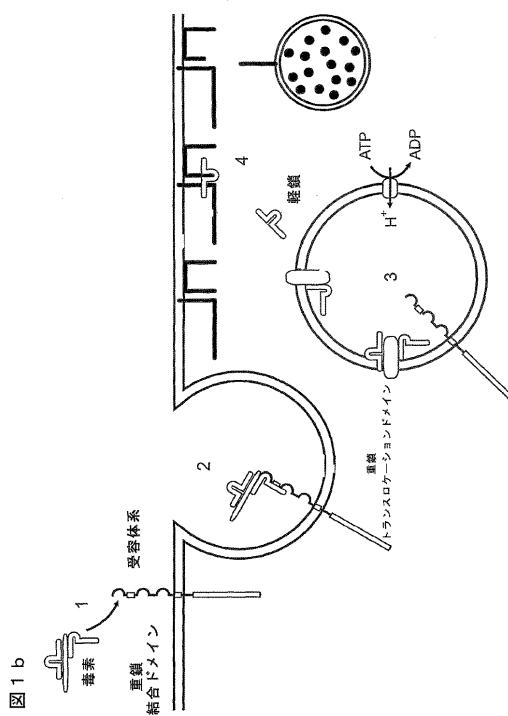
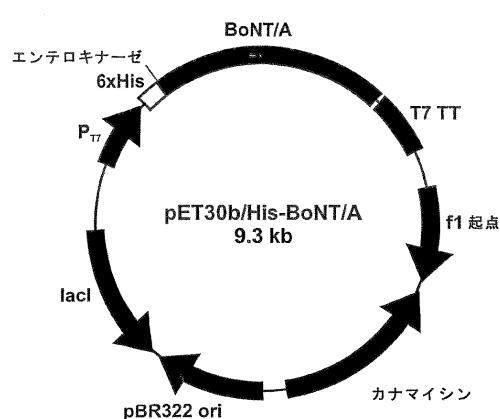


図1a

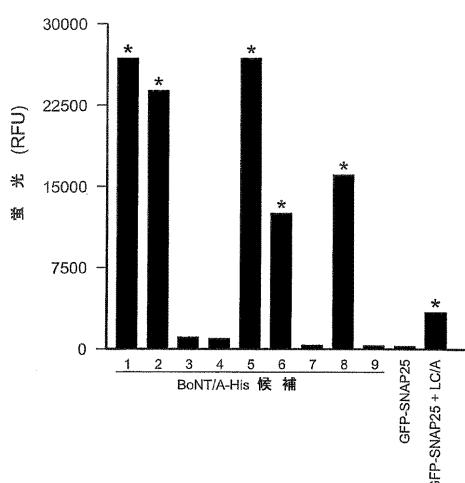
【図2】

図2



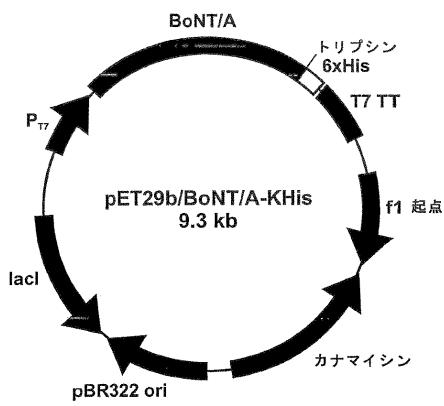
【図3】

図3



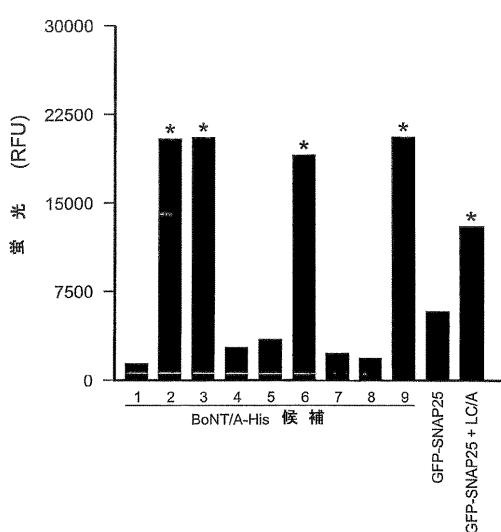
【図4】

図4



【図5】

図5



【図6】

図6 a

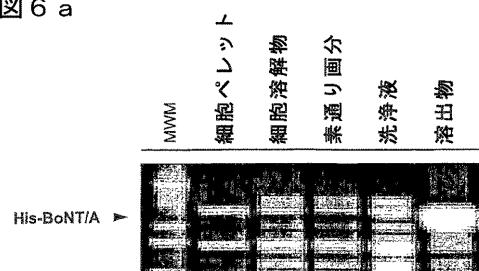
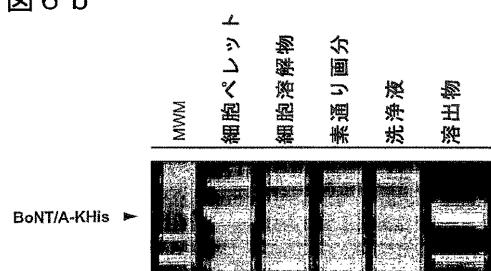
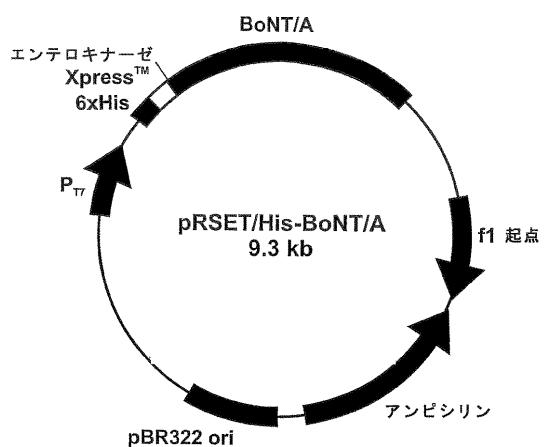


図6 b



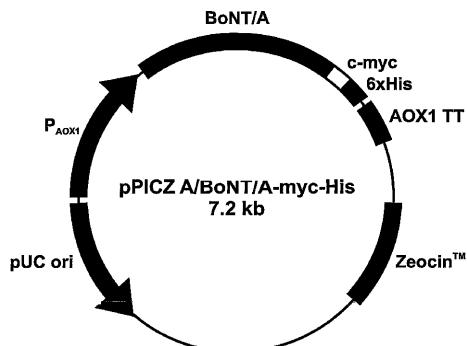
【図7】

図7



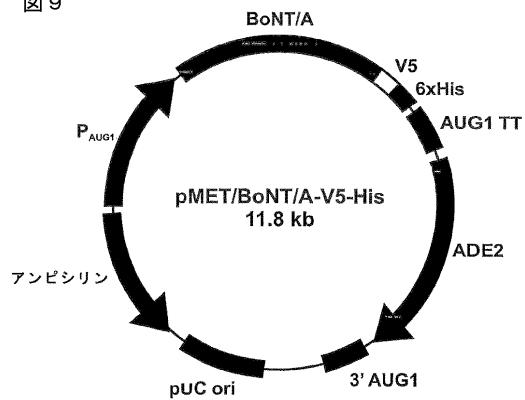
【図8】

FIG. 8.



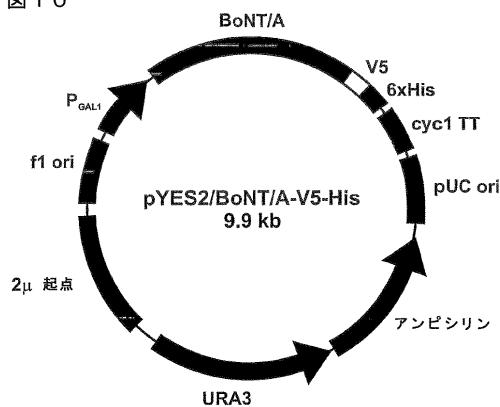
【図9】

図9



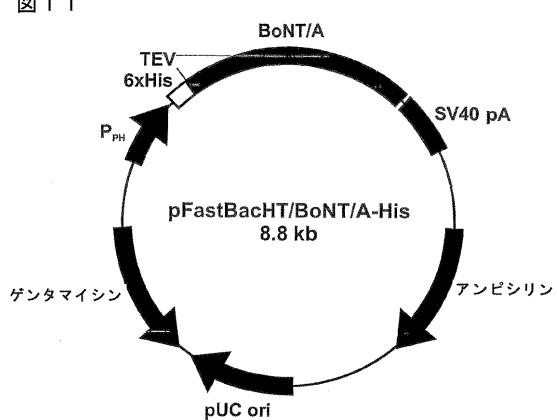
## 【図 10】

図 10



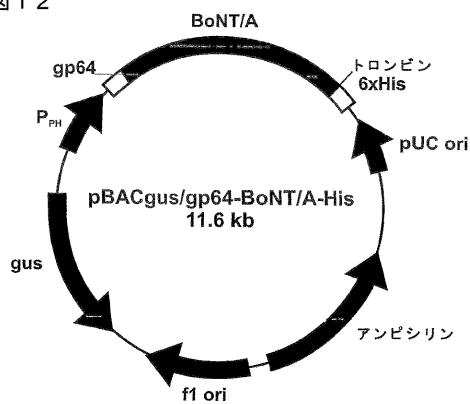
## 【図 11】

図 11



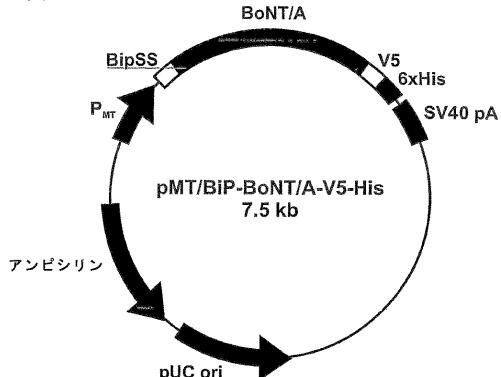
## 【図 12】

図 12

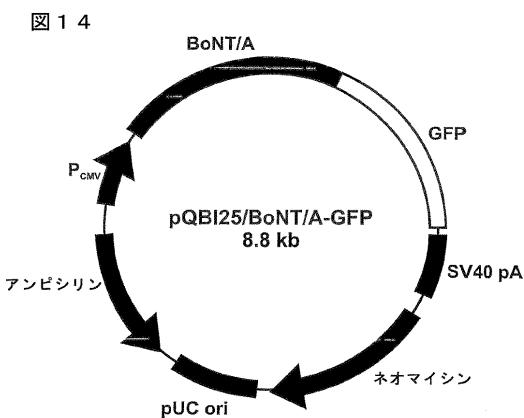


## 【図 13】

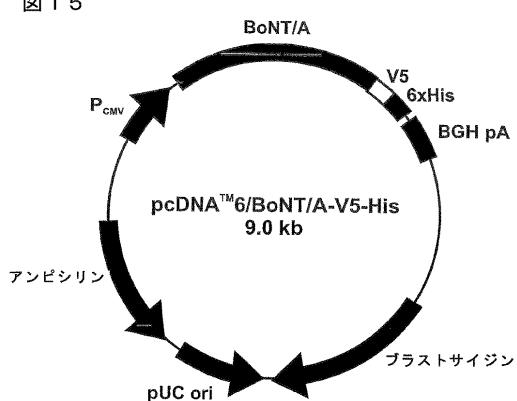
図 13



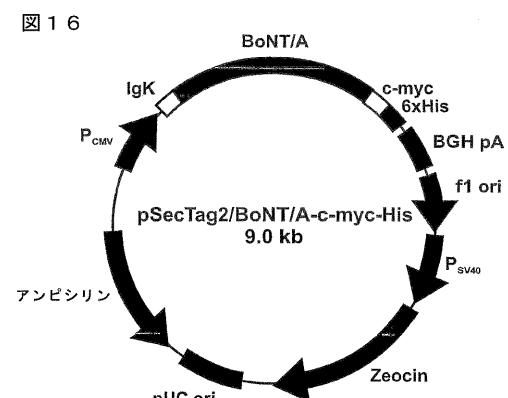
## 【図14】



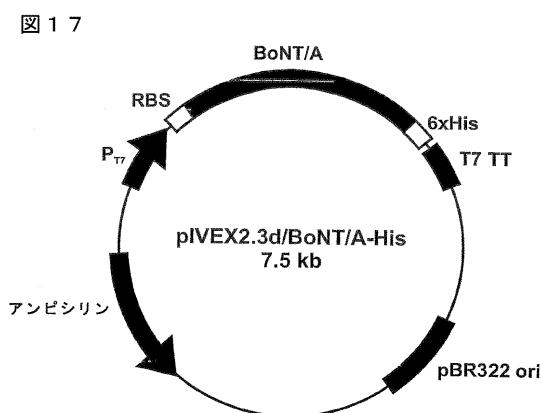
## 【図15】



## 【図16】



## 【図17】



【配列表】

2008508886000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成19年3月30日(2007.3.30)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2008508886000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No IS2005/027917									
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C07K14/33 A61K39/08											
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, WPI Data											
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">US 2003/009025 A1 (SMITH LEONARD A ET AL) 9 January 2003 (2003-01-09) paragraphs '0014!, '0020!, '0055! - '0058!, '0129! - '0132! example 10 claims 7-9 ----- SMITH L A: "DEVELOPMENT OF RECOMBINANT VACCINES FOR BOTULINUM NEUROTOXIN" TOXICON, ELMFSFORD, NY, US, vol. 36, no. 11, November 1998 (1998-11), pages 1539-1548, XP001156933 ISSN: 0041-0101 page 1543 table 2 ----- -/-</td> <td style="padding: 2px;">1-201</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;"></td> <td style="padding: 2px;">1-201</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	US 2003/009025 A1 (SMITH LEONARD A ET AL) 9 January 2003 (2003-01-09) paragraphs '0014!, '0020!, '0055! - '0058!, '0129! - '0132! example 10 claims 7-9 ----- SMITH L A: "DEVELOPMENT OF RECOMBINANT VACCINES FOR BOTULINUM NEUROTOXIN" TOXICON, ELMFSFORD, NY, US, vol. 36, no. 11, November 1998 (1998-11), pages 1539-1548, XP001156933 ISSN: 0041-0101 page 1543 table 2 ----- -/-	1-201	Y		1-201
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
Y	US 2003/009025 A1 (SMITH LEONARD A ET AL) 9 January 2003 (2003-01-09) paragraphs '0014!, '0020!, '0055! - '0058!, '0129! - '0132! example 10 claims 7-9 ----- SMITH L A: "DEVELOPMENT OF RECOMBINANT VACCINES FOR BOTULINUM NEUROTOXIN" TOXICON, ELMFSFORD, NY, US, vol. 36, no. 11, November 1998 (1998-11), pages 1539-1548, XP001156933 ISSN: 0041-0101 page 1543 table 2 ----- -/-	1-201									
Y		1-201									
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.									
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed											
*T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the International search  4 January 2006		Date of mailing of the International search report  26/01/2006									
Name and mailing address of the ISA  European Patent Office, P.O. 508886 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Surdej, P									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No 'US2005/027917
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>SMITH LEONARD A ET AL: "Roads from vaccines to therapies."</p> <p>MOVEMENT DISORDERS : OFFICIAL JOURNAL OF THE MOVEMENT DISORDER SOCIETY. MAR 2004, vol. 19 Suppl 8, March 2004 (2004-03), pages S48-S52, XP002356279</p> <p>ISSN: 0885-3185</p> <p>page S49 - page S50</p> <p>-----</p>	1-201
Y	<p>ZHANG LI ET AL: "Complete DNA sequences of the botulinum neurotoxin complex of Clostridium botulinum type A-Hall (Allergan) strain."</p> <p>GENE. 2 OCT 2003,</p> <p>vol. 315, 2 October 2003 (2003-10-02), pages 21-32, XP002361444</p> <p>ISSN: 0378-1119</p> <p>abstract</p> <p>page 22, left-hand column</p> <p>figure 2</p> <p>-&amp; DATABASE EMBL 'Online! 24 October 2003 (2003-10-24), "Clostridium botulinum neurotoxin BoNT gene, complete cds."</p> <p>XP002361452</p> <p>retrieved from EBI accession no.</p> <p>EM_PRO:AF488749</p> <p>Database accession no. AF488749</p> <p>-----</p>	1-201

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

				International Application No
				US2005/027917
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 2003009025	A1 09-01-2003	NONE		

---

フロントページの続き

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

(72)発明者 ランス・イー・スチュワード

アメリカ合衆国 9 2 6 1 4 カリフォルニア州アーヴィン、ウッドファーン 9 番

(72)発明者 マーセラ・エイ・ギルモア

アメリカ合衆国 9 2 7 0 5 カリフォルニア州サンタ・アナ、セント・トーマス・ドライブ 1 3 1 5  
番

(72)発明者 エスター・エ・フェルナンデス - サラス

アメリカ合衆国 9 2 8 3 1 カリフォルニア州フラートン、ロッキー・ロード 1 7 1 0 番

(72)発明者 シェンウェン・リ

アメリカ合衆国 9 2 6 2 0 カリフォルニア州アーヴィン、マウント・バーノン 5 4 番

(72)発明者 ロナルド・ジー・ミラー

アメリカ合衆国 9 2 6 8 8 カリフォルニア州ランチョ・サンタ・マルガリータ、ラス・カスタネタ  
ス 3 6 番

(72)発明者 ケイ・ロジャー・アオキ

アメリカ合衆国 9 2 6 7 9 カリフォルニア州コト・デ・カサ、ジンジャー・リリー・コート 2 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA31 CA04 DA02 DA06 DA12

4B065 AA23Y AA26X AA77X AA90X AB01 BA02 CA24 CA44