(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7017932号
(P7017932)

(45)発行日　令和4年2月9日(2022.2.9)

(24)登録日　令和4年2月1日(2022.2.1)

(51)国際特許分類

		FI		
C12N 15/62 (2006.01)		C12N	15/62	Z ZNA
A61K 38/17 (2006.01)		A61K	38/17	100
A61K 39/395 (2006.01)		A61K	39/395	D
A61P 25/00 (2006.01)		A61K	39/395	N
A61P 39/06 (2006.01)		A61P	25/00	

請求項の数　47　（全201頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-530748(P2017-530748)
(86)(22)出願日　平成27年12月9日(2015.12.9)
(65)公表番号　特表2017-538414(P2017-538414A)
(43)公表日　平成29年12月28日(2017.12.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/064787
(87)国際公開番号　WO2016/094555
(87)国際公開日　平成28年6月16日(2016.6.16)
審査請求日　平成30年12月10日(2018.12.10)
審判番号　不服2020-16738(P2020-16738/J1)
審判請求日　令和2年12月4日(2020.12.4)
(31)優先権主張番号　62/089,646
(32)優先日　平成26年12月9日(2014.12.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
最終頁に続く

(73)特許権者　511060836
ニューヨーク・ユニバーシティ
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニューヨーク ワシントン スクエア サウス ７０
(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名 雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口 裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部 俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上 隆一
(74)代理人　100148699
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　クロストリジウム神経毒融合タンパク質、プロペプチド融合体、それらの発現及び使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ボツリヌス菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ）神経毒の軽鎖領域；

ボツリヌス菌神経毒の重鎖領域；及び

前記軽鎖領域の上流に位置する一本鎖抗体のＶＨＨドメイン

を含む、融合タンパク質であって、

前記軽鎖及び重鎖領域がジスルフィド結合によって連結しており、かつ、

前記一本鎖抗体のＶＨＨドメインが、細胞質内の移行後の神経細胞内の標的に対する抗原結合活性を有する、

前記融合タンパク質。

【請求項２】

前記ボツリヌス菌神経毒が、ボツリヌス菌血清型Ｃ、ボツリヌス菌血清型Ａ、ボツリヌス菌血清型Ｅ、ボツリヌス菌血清型Ｄ、ボツリヌス菌血清型Ｂ、ボツリヌス菌血清型Ｆ、ボツリヌス菌血清型Ｇ、ボツリヌス菌血清型Ｈからなる群から選択される血清型のボツリヌス菌神経毒である、請求項１に記載の融合タンパク質。

【請求項３】

前記ボツリヌス菌神経毒が血清型Ｃである、請求項２に記載の融合タンパク質。

【請求項４】

前記軽鎖及び重鎖領域が切断されていない、請求項１に記載の融合タンパク質。

【請求項５】

前記軽鎖領域と前記一本鎖抗体のＶＨＨドメインとの間に位置するアミノ酸スペーサー配列をさらに含む、請求項１に記載の融合タンパク質。
【請求項６】
前記ボツリヌス菌神経毒の前記軽鎖領域が無毒性である、請求項１に記載の融合タンパク質。
【請求項７】
前記軽鎖領域がボツリヌス菌神経毒ＢｏＮＴ／Ａに由来し、突然変異Ｅ２２４＞Ａ及びＹ３６６＞Ａをさらに含む、請求項６に記載の融合タンパク質。
【請求項８】
野生型ボツリヌス菌神経毒のＬＤ５０よりも少なくとも１，０００倍高いＬＤ５０を有する、請求項６に記載の融合タンパク質。
【請求項９】
前記ボツリヌス菌神経毒の前記軽鎖領域が基質切断活性を失っている、請求項６に記載の融合タンパク質。
【請求項１０】
前記軽鎖領域がボツリヌス菌神経毒ＢｏＮＴ／Ａに由来し、突然変異Ｑ１６２＞Ｙ、Ｌ２５６＞Ｙ、Ｒ２５７＞Ｅ、及びＬ３２２＞Ｅ、または突然変異Ｑ１６３＞Ｅ、Ｅ２６３＞Ｌ、及びＬ３２３＞Ｉをさらに含む、請求項９に記載の融合タンパク質。
【請求項１１】
前記軽鎖領域がボツリヌス菌神経毒ＢｏＮＴ／Ｃに由来し、突然変異Ｅ２３０＞Ａ；Ｈ２３３＞Ｇ；Ｙ３７５＞Ａをさらに含む、請求項９に記載の融合タンパク質。
【請求項１２】
前記ボツリヌス菌神経毒の前記軽鎖及び重鎖領域が、（ｉ）前記軽鎖及び重鎖の安定性、（ｉｉ）前記融合タンパク質による神経細胞の特異的標的化、及び（ｉｉｉ）神経細胞の細胞質へのＶＨＨドメインの送達、に必要な立体構造を有する、請求項６に記載の融合タンパク質。
【請求項１３】
請求項１～１２のいずれか一項に記載の融合タンパク質、及び
薬学的に許容可能な担体
を含む、治療剤。
【請求項１４】
ボツリヌス菌神経毒の毒性作用に対して対象を治療するための、請求項１３に記載の治療剤を含む薬学的組成物であって、
ボツリヌス菌神経毒の毒性作用に対して前記対象を治療するのに有効な条件下で前記対象に投与するための、前記薬学的組成物。
【請求項１５】
請求項１～１２のいずれか一項に記載の融合タンパク質を含む薬学的組成物であって、対象を治療するのに有効な条件下で前記対象に投与するための、前記薬学的組成物。
【請求項１６】
前記投与が、吸入、非経口、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、鼻腔内滴下、または粘膜への塗布によって行われる、請求項１５に記載の薬学的組成物
【請求項１７】
ボツリヌス菌神経毒の軽鎖領域；
ボツリヌス菌神経毒の重鎖領域；
高特異性プロテアーゼ切断部位を有し、前記軽鎖及び重鎖領域を連結する中間領域；ならびに
前記軽鎖領域の上流に位置する一本鎖抗体のＶＨＨドメイン
を含む、プロペプチド融合体であって、
前記軽鎖及び重鎖領域がジスルフィド結合によって連結しており、
前記高特異性プロテアーゼ切断部位が、前記高特異性プロテアーゼが認識して切断可能な

３残基以上の特異的な隣接するアミノ酸残基を有し、かつ
前記一本鎖抗体のＶＨＨドメインが、細胞質内の移行後の神経細胞内の標的に対する抗原結合活性を有する、
前記プロペプチド融合体。
【請求項１８】
前記軽鎖領域の上流に位置する第一検出タグと、重鎖の下流に位置する第二検出タグとをさらに含む、請求項１７に記載のプロペプチド融合体。
【請求項１９】
前記一本鎖抗体のＶＨＨドメインに隣接するＮ末端及びＣ末端検出タグをさらに含み、前記検出タグが、神経細胞の細胞質への前記一本鎖抗体のＶＨＨドメインの送達を検出することができる、請求項１７に記載のプロペプチド融合体。
【請求項２０】
前記Ｎ末端検出タグの上流に位置する第一アフィニティー精製タグ；
前記第一アフィニティー精製タグと前記Ｎ末端検出タグとの間に位置する高特異性プロテアーゼ切断部位；
前記重鎖領域の下流に位置する第二アフィニティー精製タグ；及び、
前記第二アフィニティー精製タグと前記重鎖領域との間に位置する高特異性プロテアーゼ切断部位
をさらに含む、請求項１９に記載のプロペプチド融合体。
【請求項２１】
前記中間領域の前記高特異性プロテアーゼ切断部位、前記アフィニティー精製タグと前記Ｎ末端検出タグとの間に位置する前記高特異性プロテアーゼ切断部位、及び前記第二アフィニティー精製タグと前記重鎖領域との間に位置する前記高特異性プロテアーゼ切断部位がすべて、エンテロキナーゼ切断部位及びＴＥＶ認識配列から選択される同一の配列を有する、請求項２０に記載のプロペプチド融合体。
【請求項２２】
前記一本鎖抗体のＶＨＨドメインの上流に位置する分解促進ドメインをさらに含む、請求項１７に記載のプロペプチド融合体。
【請求項２３】
前記一本鎖抗体のＶＨＨドメインが、野生型ボツリヌス菌神経毒の軽鎖に対して特異的である、請求項１７に記載のプロペプチド融合体。
【請求項２４】
前記軽鎖及び重鎖領域が切断されていない、請求項１７に記載のプロペプチド融合体。
【請求項２５】
前記ボツリヌス菌神経毒が、ボツリヌス菌血清型Ｃ、ボツリヌス菌血清型Ａ、ボツリヌス菌血清型Ｅ、ボツリヌス菌血清型Ｄ、ボツリヌス菌血清型Ｂ、ボツリヌス菌血清型Ｆ、ボツリヌス菌血清型Ｇ、ボツリヌス菌血清型Ｈからなる群から選択される血清型のボツリヌス菌神経毒である、請求項１７に記載のプロペプチド融合体。
【請求項２６】
ボツリヌス菌神経毒が血清型Ａである、請求項２５に記載のプロペプチド融合体。
【請求項２７】
ボツリヌス菌神経毒が血清型Ｃである、請求項２５に記載のプロペプチド融合体。
【請求項２８】
前記軽鎖及び重鎖領域が切断されていない、請求項１７に記載のプロペプチド融合体。
【請求項２９】
前記軽鎖領域と前記一本鎖抗体のＶＨＨドメインとの間に位置するアミノ酸スペーサー配列をさらに含む、請求項１７に記載のプロペプチド融合体。
【請求項３０】
前記軽鎖領域がボツリヌス菌神経毒ＢｏＮＴ／Ａに由来し、突然変異Ｅ２２４＞Ａ及びＹ３６６＞Ａをさらに含む、請求項１７に記載のプロペプチド融合体。

【請求項３１】
前記軽鎖領域がボツリヌス菌神経毒ＢｏＮＴ／Ａに由来し、突然変異Ｑ１６２＞Ｙ、Ｌ２５６＞Ｙ、Ｒ２５７＞Ｅ、及びＬ３２２＞Ｅ、または突然変異Ｑ１６３＞Ｅ、Ｅ２６３＞Ｌ、及びＬ３２３＞Ｉをさらに含む、請求項２９に記載のプロペプチド融合体。
【請求項３２】
前記軽鎖領域がボツリヌス菌神経毒ＢｏＮＴ／Ｃに由来し、突然変異Ｅ２３０＞Ａ；Ｈ２３３＞Ｇ；Ｙ３７５＞Ａをさらに含む、請求項３１に記載のプロペプチド融合体。
【請求項３３】
請求項１７～３２のいずれか一項に記載のプロペプチド融合体をコードする、単離核酸分子。
【請求項３４】
請求項３３に記載の核酸分子を異種ベクターに含む、発現系。
【請求項３５】
前記核酸分子が、適切なセンス方向及び正しいリーディングフレームで前記ベクターに挿入されている、請求項３４に記載の発現系。
【請求項３６】
請求項３３に記載の核酸分子を含有する、宿主細胞。
【請求項３７】
前記核酸分子が異種発現系に挿入されている、請求項３６に記載の宿主細胞。
【請求項３８】
前記中間領域が、前記発現系または前記宿主細胞の内在性プロテアーゼによって切断されない、請求項３６に記載の宿主細胞。
【請求項３９】
植物細胞、哺乳類細胞、昆虫細胞、酵母細胞、及び細菌細胞からなる群から選択される、請求項３６に記載の宿主細胞。
【請求項４０】
昆虫細胞である、請求項３９に記載の宿主細胞。
【請求項４１】
融合タンパク質の発現方法であって：
請求項３３に記載の核酸分子と；
前記核酸分子に機能的に連結した異種プロモーターと；
前記核酸分子に機能的に連結した３′調節領域と
を含む核酸構築物を提供する段階、及び、
前記融合タンパク質のプロペプチドを発現するのに有効な条件下で宿主細胞に前記核酸構築物を導入する段階
を含む、前記発現方法。
【請求項４２】
前記中間領域が、前記宿主細胞の内在性プロテアーゼによって切断されない、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記宿主細胞が昆虫細胞である、請求項４１に記載の方法。
【請求項４４】
前記中間領域で切断を引き起こすのに有効な条件下で、前記発現させた融合タンパク質のプロペプチドを高特異性プロテアーゼに接触させる段階
をさらに含む、請求項４１に記載の方法。
【請求項４５】
前記融合タンパク質を約３０ｍｇ／Ｌの濃度で単離する段階をさらに含む、請求項４１に記載の方法。
【請求項４６】
２段階の非変性かつ高度選択的なアフィニティー精製を用いて、前記融合タンパク質を均

質に精製する段階をさらに含む、請求項４１に記載の方法。
【請求項４７】
請求項１７～３２のいずれか一項に記載のプロペプチド融合タンパク質を、高特異性プロテアーゼ切断部位で切断することによって産生する融合タンパク質であって、前記軽鎖領域及び重鎖領域がジスルフィド結合によって連結している、前記融合タンパク質。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本願は、２０１４年１２月９日に出願された米国仮特許出願第６２／０８９，６４６号及び２０１５年２月２０日に出願された米国仮特許出願第６２／１１８，９７０号の利益を主張する。
【０００２】
本発明は、国立衛生研究所によって付与された助成金番号ＲＯ１ＡＩ０９３５０４のもとで、政府の支援によってなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。
【０００３】
発明の分野
本発明は、一本鎖抗体を含むクロストリジウム神経毒融合タンパク質、プロペプチド融合体、及びその方法に関する。
【背景技術】
【０００４】
発明の背景
細胞内標的への抗体の送達
標準的な抗体は、大型の多量体タンパク質であり、細胞膜を貫通できず、したがって、細胞の細胞質区画内の標的に直接アクセスできない。多くの薬学的に重要な標的が細胞の細胞質に専ら露出していることから、抗体または抗体由来断片を細胞内標的に送達するための複数の技術的アプローチが検証されている。これらの方法は、核酸及び他のタンパク質分子を細胞内区画に送達するために用いられてきた方法に類似している。そのような方法として、電気穿孔法、超音波処理、及びマイクロインジェクションなどの物理的方法、リポソームまたはポリマーシェル内へのカプセル化、及び細胞質へアクセスするためにエンドサイトーシス及び／または細胞膜への浸透を容易にするポリマー及び脂質との複合体形成が挙げられる（Ｔｏｒｃｈｉｌｉｎ，“Ｍｕｌｔｉｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ａｎｄ Ｓｔｉｍｕｌｉ‐Ｓｅｎｓｉｔｉｖｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｎａｎｏｃａｒｒｉｅｒｓ，”Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ ａｎｄ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ：Ｏｆｆｉｃｉａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｒｂｅｉｔｓｇｅｍｅｉｎｓｃｈａｆｔ ｆｕｒ Ｐｈａｒｍａｚｅｕｔｉｓｃｈｅ Ｖｅｒｆａｈｒｅｎｓｔｅｃｈｎｉｋ ｅ．Ｖ． ７１（３）：４３１‐４４４（２００９）；Ｔｏｒｃｈｉｌｉｎ，“Ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ ａｎｄ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，”Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｔｏｄａｙ：Ｔｅｃｈｎｏｌ．（２００９）；Ｅｌ‐Ｓａｙｅｄ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｍａｒｔ Ｐｏｌｙｍｅｒｉｃ Ｃａｒｒｉｅｒｓ ｆｏｒ Ｅｎｈａｎｃｅｄ Ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ，”Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｏｎ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｔｈｅｒａｐｙ ５（１）：２３‐３２（２００５））。
【０００５】
一本鎖抗体またはその断片は、多量体抗体では不可能な方法によって、細胞の細胞質に送達することができる。これらには、以下が含まれる：（１）ウイルスキャリアを用いるか、またはその他の方法で宿主細胞に遺伝子を組み込むことによる、抗体断片をコードする核酸の標的細胞への遺伝子移入；（２）抗体が細胞膜に浸透することを可能にするタンパク質形質導入ドメイン（ＰＴＤ）（例えば、ＴＡＴ融合ドメイン）への抗体の融合；（３）細胞膜を介して自然に移行可能な細胞標的化タンパク質またはドメインに対する抗体の

化学的または遺伝学的融合（Ｍａｒｓｃｈａｌｌ ｅｔ ａｌ．，“Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｔｏ ｔｈｅ Ｃｙｔｏｐｌａｓｍ，”ｍＡｂｓ ３（１）：３‐１６（２０１１））。

【０００６】

これらの方法論すべてが有効であることがｉｎ ｖｉｔｒｏにおいて実証されているものの、これらはすべて治療用途には限界がある（Ｍａｒｓｃｈａｌｌ ｅｔ ａｌ．，“Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｔｏ ｔｈｅ Ｃｙｔｏｓｏｌ：Ｄｅｂｕｎｋｉｎｇ ｔｈｅ Ｍｙｔｈｓ，”ｍＡｂｓ ６（４）：９４３‐９５６（２０１４）；Ｙｉｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｎｏｎ‐Ｖｉｒａｌ Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｇｅｎｅ‐Ｂａｓｅｄ Ｔｈｅｒａｐｙ，”Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １５（８）：５４１‐５５５（２０１４））。特に、遺伝子移入に基づく方法は、主に毒性及び特異性の欠如の点から、治療用製品で使用することに対しては限界があることが周知である。ウイルス媒介性の形質導入は、臨床応用のために検証されてはいるものの、治療介入に重大なリスクを示すと考えられており、規制上の大きな障壁に直面している。神経細胞特異的ウイルスキャリアは、臨床用途には利用できない。タンパク質形質導入ドメインの利用は、神経細胞特異的ではなく、同様に安全面での重大な懸念を有する。細胞膜を介して自然に移行可能なタンパク質への抗体の化学的または遺伝学的融合が広範に研究されている。ＲＮＡｓｅ Ａスーパーファミリーのリボヌクレアーゼを抗体に融合することが行われたが、この融合の目的は、ＲＮＡｓｅ活性を目的の細胞へ標的化するために抗体を使用することであった（Ｓｃｈｉｒｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｔａｒｇｅｔｅｄ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ＲＮａｓｅｓ（ＩｍｍｕｎｏＲＮａｓｅｓ），”Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｏｎ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｔｈｅｒａｐｙ ９（１）：７９‐９５（２００９））。同様に、ジフテリア毒素（Ｗｅａｖｅｒ ｅｔ ａｌ．，“Ｔｒａｎｓｆｅｒｒｉｎ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ｌｉｇａｎｄ‐Ｔａｒｇｅｔｅｄ Ｔｏｘｉｎ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅ （Ｔｆ‐ＣＲＭ１０７） ｆｏｒ Ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｍａｌｉｇｎａｎｔ Ｇｌｉｏｍａｓ，”Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｎｅｕｒｏ‐Ｏｎｃｏｌｏｇｙ ６５（１）：３‐１３（２００３））及びリシン（Ｍｅｓｓｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，“Ａ Ｐｈａｓｅ Ｉ Ｓｔｕｄｙ ｏｆ Ｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ Ｔｈｅｒａｐｙ ｗｉｔｈ Ｉｍｍｕｎｏｔｏｘｉｎｓ ＩｇＧ‐ＨＤ３７‐Ｄｅｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｅｄ Ｒｉｃｉｎ Ａ Ｃｈａｉｎ （ｄｇＡ） ａｎｄ ＩｇＧ‐ＲＦＢ４‐ｄｇＡ （Ｃｏｍｂｏｔｏｘ） ｉｎ Ｐａｔｉｅｎｔｓ ｗｉｔｈ Ｒｅｆｒａｃｔｏｒｙ ＣＤ１９（＋），ＣＤ２２（＋） Ｂ Ｃｅｌｌ Ｌｙｍｐｈｏｍａ，”Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ：Ａｎ Ｏｆｆｉｃｉａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ６（４）：１３０２‐１３１３（２０００））を、毒素の標的化送達を可能にする抗体へ融合することが行われており、ここでもまた、特定の細胞の細胞質に毒素を標的化するために用いる抗体に対して融合が行われる。これらの場合のいずれにおいても、抗体を神経細胞へ送達するために毒素を用いている例はなく、実際に毒素は神経細胞に特異的に向けられているわけではない。

【０００７】

抗体のカチオン化を利用して、一本鎖抗体の送達を向上させるなどの、抗体を細胞へ送達しやすくするための工夫も行われている。（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，“Ｃｅｌｌ‐Ｐｅｎｅｔｒａｔｉｎｇ Ａｎｔｉ‐ＧＦＡＰ ＶＨＨ ａｎｄ Ｃｏｒｒｅｓｐｏｎｄｉｎｇ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｆｕｓｉｏｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ ＶＨＨ‐ＧＦＰ Ｓｐｏｎｔａｎｅｏｕｓｌｙ Ｃｒｏｓｓ ｔｈｅ Ｂｌｏｏｄ‐Ｂｒａｉｎ Ｂａｒｒｉｅｒ ａｎｄ Ｓｐｅｃｉｆｉｃａｌｌｙ Ｒｅｃｏｇｎｉｚｅ Ａｓｔｒｏｃｙｔｅｓ：Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｔｏ Ｂｒａｉｎ Ｉｍａｇｉｎｇ，”ＦＡＳＥＢ Ｊｏｕｒｎａｌ：Ｏｆｆｉｃｉａｌ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｆｅｄｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｉｅｓ ｆｏｒ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２６（１０）：３９６９‐３９７９（２０１２））。そのメカニズムはおそらくは、カチオン性抗体と負に荷電した細胞膜との相互作用が高まることに関係しており、また、細胞結合の特

異性は、抗体のみに由来しており、送達媒体に由来するものではないと考えられる。

【０００８】

Ｔｈａｎｏｎｇｓａｋｓｒｉｋｕｌ ｅｔ ａｌ．，“Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎｓ ａｎｄ Ｂｏｔｕｌｉｓｍ：Ａ Ｎｏｖｅｌ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｐｐｒｏａｃｈ，”Ｔｏｘｉｎｓ ３（５）：４６９‐４８８（２０１１）は、ボツリヌス神経毒を阻害するＶＨＨ（一本鎖抗体）血清型Ａの酵素活性を細胞透過性ペプチド（「ＣＰＰ」）に遺伝的に融合することができたが、神経細胞に機能的抗体を送達するこの技術の成功を示すデータは、その後提示されていない。この仮定ＶＨＨ‐ＣＰＰ融合タンパク質を神経細胞内部に導入するメカニズムは示唆されていない。

【０００９】

ＢｏＮＴが神経細胞への標的化選択性を有することから、いくつかの研究室は、治療剤を送達するためにＢｏＮＴに基づいた分子媒体を使用することを検討するようになった。初期の研究は、野生型ＢｏＮＴの重鎖（「ＨＣ」）及び軽鎖（「ＬＣ」）が分離可能であり、また、野生型ＬＣを用いて、またはＬＣを無毒化できるＨｉｓ２２７＞Ｔｙｒのような点突然変異を有し得る組換え型ＬＣを用いて、ｉｎ ｖｉｔｒｏで野生型ＨＣを再構成できることを報告した（Ｚｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，“Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ａｎｄ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｌｉｇｈｔ Ｃｈａｉｎ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ａ：Ａ Ｓｉｎｇｌｅ Ｍｕｔａｔｉｏｎ Ａｂｏｌｉｓｈｅｓ Ｉｔｓ Ｃｌｅａｖａｇｅ ｏｆ ＳＮＡＰ‐２５ ａｎｄ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｃｉｔｙ Ａｆｔｅｒ Ｒｅｃｏｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎ Ｗｉｔｈ ｔｈｅ Ｈｅａｖｙ Ｃｈａｉｎ，”Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３４（４６）：１５１７５‐１５１８１（１９９５）；Ｍａｉｓｅｙ ｅｔ ａｌ．，“Ｉｎｖｏｌｖｅｍｅｎｔ ｏｆ ｔｈｅ Ｃｏｎｓｔｉｔｕｅｎｔ Ｃｈａｉｎｓ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎｓ Ａ ａｎｄ Ｂ Ｉｎ ｔｈｅ Ｂｌｏｃｋａｄｅ ｏｆ Ｎｅｕｒｏｔｒａｎｓｍｉｔｔｅｒ Ｒｅｌｅａｓｅ，”Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１７７（３）：６８３‐６９１（１９８８）；Ｓａｔｈｙａｍｏｏｒｔｈｙ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎ，Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ，Ｐａｒｔｉａｌ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｈｅａｖｙ ａｎｄ Ｌｉｇｈｔ Ｃｈａｉｎｓ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｔｙｐｅｓ Ａ，Ｂ，ａｎｄ Ｅ，”Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６０（１９）：１０４６１‐１０４６６（１９８５））。再構成したＢｏＮＴホロトキシン誘導体は、ＬＣを神経細胞質ゾルに輸送する能力が著しく低下しており、おそらくは、ＨＣ‐ＬＣ分離に必要な厳しい条件、及びタンパク質を再生して元のジスルフィド結合を再構築することが困難であったことに起因していたと考えられる。

【００１０】

デキストランをＨＣに化学的にカップリングして蛍光マーカーまたは治療剤の付着用部位を提供することによって、単離した野生型ＨＣを標的化送達に用いる試みもなされている（Ｇｏｏｄｎｏｕｇｈ ｅｔ ａｌ．，“Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ ａ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｖｅｈｉｃｌｅ ｆｏｒ Ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ Ｔｒａｎｓｐｏｒｔ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ａｎｔａｇｏｎｉｓｔｓ，”ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ． ５１３：１６３‐１６８（２００２））。この「半合成」ＢｏＮＴ誘導体は神経細胞に内部移行したが、デキストランはエンドソーム区画に局在したままであり、取込みの特異性は不確実であった。細胞質ゾルへの移行には、毒素ＬＣに関連する構造的特徴が必要であるため、ＢｏＮＴのＨＣへ積荷分子を直接化学的または生化学的に付着させるだけでは、細胞質ゾルの送達を達成するには不十分である可能性がある（Ｂａｌｄｗｉｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｔｈｅ Ｃ‐Ｔｅｒｍｉｎｕｓ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｔｙｐｅ Ａ Ｌｉｇｈｔ Ｃｈａｉｎ Ｃｏｎｔｒｉｂｕｔｅｓ ｔｏ Ｓｏｌｕｂｉｌｉｔｙ，Ｃａｔａｌｙｓｉｓ，ａｎｄ Ｓｔａｂｉｌｉｔｙ，”Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒ．Ｐｕｒｉｆ．３７（１）：１８７‐１９５（２００４）；Ｂｒｕｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，“Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｈｅａｖｙ Ｃｈａｉｎ Ｂｅｌｔ ａｓ ａｎ Ｉｎｔｒａｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｈａｐｅｒｏｎｅ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｌｉｇ

ｈｔ Ｃｈａｉｎ，”ＰＬｏＳ Ｐａｔｈｏｇ．３（９）：ｅ１１３（２００７））。さらに、化学的方法を用いてＢｏＮＴトキソイドに積荷を付着させる場合、積荷の付着は十分に選択的ではなく、その結果、異種の誘導体集団を産生する。これらの問題はまた、ＢｏＮＴ輸送経路を確定的に示すためのプローブとしての化学標識ＢｏＮＴの有用性をも制限する。

【００１１】

Ｂａｄｅ ｅｔ ａｌ．，“Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｔｙｐｅ Ｄ Ｅｎａｂｌｅｓ Ｃｙｔｏｓｏｌｉｃ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ Ｅｎｚｙｍａｔｉｃａｌｌｙ Ａｃｔｉｖｅ Ｃａｒｇｏ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｔｏ Ｎｅｕｒｏｎｓ Ｖｉａ Ｕｎｆｏｌｄｅｄ Ｔｒａｎｓｌｏｃａｔｉｏｎ Ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａｔｅｓ，”Ｊ．Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．９１（６）：１４６１‐１４７２（２００４）は、ＬＣプロテアーゼに対する不活性化突然変異（Ｅ２３０＞Ａ）の存在下または非存在下において大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）で発現する効果的な送達媒体としてのＢｏＮＴ／Ｄの組換え全長誘導体を記載した。神経細胞培養におけるプロトタイプの積荷タンパク質の送達を評価するために、緑色蛍光タンパク質（「ＧＦＰ」）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、ホタルルシフェラーゼ、またはＢｏＮＴ／Ａ ＬＣを、組換えＢｏＮＴ／ＤホロトキシンのＮ末端に融合させた。細胞質ゾルへの送達は、ＢｏＮＴ／Ｄ細胞質基質であるシナプトブレビンの切断を測定することによって評価した。ジヒドロ葉酸レダクターゼ及びＢｏＮＴ／Ａ ＬＣが効果的に送達されることが報告された。ルシフェラーゼまたはＧＦＰが積荷の場合、対応するＢｏＮＴ／Ｄ ＬＣ触媒活性の細胞質ゾルへの送達は有意に減少したが、これはおそらく、積荷のサイズの大きさ（ルシフェラーゼ）またはその剛性（ＧＦＰ）に起因したものである（Ｂｒｅｊｃ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｂａｓｉｓ ｆｏｒ Ｄｕａｌ Ｅｘｃｉｔａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｐｈｏｔｏｉｓｏｍｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ａｅｑｕｏｒｅａ ｖｉｃｔｏｒｉａ Ｇｒｅｅｎ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ，”Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ） ９４（６）：２３０６‐１２３１（１９９７）；Ｐａｌｍ ｅｔ ａｌ．，“Ｔｈｅ Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｂａｓｉｓ ｆｏｒ Ｓｐｅｃｔｒａｌ Ｖａｒｉａｔｉｏｎｓ ｉｎ Ｇｒｅｅｎ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ，”Ｎａｔ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．４（５）：３６１‐３６５（１９９７））。送達した活性型軽鎖は、神経細胞の細胞質内において非常に低い濃度でも有効であるため、大腸菌で発現した組換えＢｏＮＴ／Ｄを用いた軽鎖送達の効率は、示されたデータからは明らかではない。

【００１２】

エンドソーム区画から細胞質ゾルへの組換え毒素ＬＣの移行をうまく設計することは、特に困難であることが判明した。この移行は、内腔環境を酸性化することによって、ＢｏＮＴヘテロ二量体の立体構造変化を誘発するか、またはトランスロケーションメディエーターとの相互作用ができるようにする必要がある（Ｂｒｕｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，“Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｈｅａｖｙ Ｃｈａｉｎ Ｂｅｌｔ ａｓ ａｎ Ｉｎｔｒａｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｈａｐｅｒｏｎｅ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｌｉｇｈｔ Ｃｈａｉｎ，”ＰＬｏＳ Ｐａｔｈｏｇ．３（９）：ｅ１１３ （２００７）；Ｋａｍａｔａ ｅｔ ａｌ．，“Ｉｎｖｏｌｖｅｍｅｎｔ ｏｆ Ｐｈｏｓｐｈｏｌｉｐｉｄｓ Ｉｎ ｔｈｅ Ｉｎｔｏｘｉｃａｔｉｏｎ Ｍｅｃｈａｎｉｓｍ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ，”Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ．１１９９（１）：６５‐６８（１９９４）；Ｔｏｒｔｏｒｅｌｌａ ｅｔ ａｌ．，“Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ Ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａ Ｔｏｘｉｎ Ｓｈｏｗｓ ａｌｌ Ｔｈｒｅｅ Ｄｏｍａｉｎｓ Ｕｎｄｅｒｇｏ Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｃｈａｎｇｅｓ ａｔ Ｌｏｗ ｐＨ，”Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７０（４６）：２７４３９‐２７４４５（１９９５）；Ｔｏｒｔｏｒｅｌｌａ ｅｔ ａｌ．，“Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｓｈｏｗｓ Ａｌｌ Ｔｈｒｅｅ Ｄｏｍａｉｎｓ ｏｆ Ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａ Ｔｏｘｉｎ Ｐｅｎｅｔｒａｔｅ Ａｃｒｏｓｓ Ｍｏｄｅｌ Ｍｅｍｂｒａｎｅｓ，”Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７０（４６）：２７４４６

‐２７４５２（１９９５））。ＢｏＮＴ ＬＣとＨＣのトランスロケーションドメインとの間で協同作用が必要であることは、ＬＣが細胞質ゾルへ首尾良く移行するために、いくつかのＢｏＮＴ血清型のＨＣ$_N$ならびにジフテリア及び炭疽毒素に共通して存在するデカペプチドモチーフが必要であることを示す証拠によって裏付けられている（Ｒａｔｔｓ ｅｔ ａｌ．，“Ａ Ｃｏｎｓｅｒｖｅｄ Ｍｏｔｉｆ ｉｎ Ｔｒａｎｓｍｅｍｂｒａｎｅ Ｈｅｌｉｘ １ ｏｆ Ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａ Ｔｏｘｉｎ Ｍｅｄｉａｔｅｓ Ｃａｔａｌｙｔｉｃ Ｄｏｍａｉｎ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｔｏ ｔｈｅ Ｃｙｔｏｓｏｌ，”Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ） １０２（４３）：１５６３５‐１５６４０（２００５））。

【００１３】

組換えＢｏＮＴを発現させる努力により、効果的な免疫原を産生することに成功し、これらは上皮トランスサイトーシスに適したものである場合もあるが、それでもなお、これらの努力の結果として、野生型毒素と同等の効率で神経細胞の細胞質ゾルを標的化するのに必要な構造的特徴を有する組換えタンパク質を産生することはできなかった。これらの限界は、天然の毒素構造、ジスルフィド結合、及び生理学的な輸送を保持する完全長ＢｏＮＴ誘導体を産生可能な発現系を選択することの重要性を際立たせている。また、複数の研究室による研究が、野生型ボツリヌス菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ）神経毒血清型Ａ（「ＢｏＮＴ／Ａ」）の構造ドメインがニューロンエキソサイトーシスをいかにして無効化するかについて明らかにしているが、重要な疑問は未解決のままである。

【００１４】

神経細胞への送達のためにクロストリジウム神経毒を用いて一本鎖抗体を送達するという事例は存在しない。神経細胞内の細胞内標的を標的とした一本鎖抗体の開発には多くの研究努力がなされているが、いずれの場合も抗体を融合タンパク質として送達するのではなく、遺伝子移入によって細胞内抗体として発現させる。Ｔｒｅｍｂｌａｙ ｅｔ ａｌ．，“Ｃａｍｅｌｉｄ Ｓｉｎｇｌｅ Ｄｏｍａｉｎ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ （ＶＨＨｓ） ａｓ Ｎｅｕｒｏｎａｌ Ｃｅｌｌ Ｉｎｔｒａｂｏｄｙ Ｂｉｎｄｉｎｇ Ａｇｅｎｔｓ ａｎｄ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ ｏｆ Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ （ＢｏＮＴ） Ｐｒｏｔｅａｓｅｓ，”Ｔｏｘｉｃｏｎ：Ｏｆｆｉｃｉａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｏｎ Ｔｏｘｉｎｏｌｏｇｙ ５６（６）：９９０‐９９８（２０１０）は、遺伝子移入によって神経細胞に発現させた抗ボツリヌス神経毒血清型Ａ ＶＨＨ細胞内抗体が、野生型ＢｏＮＴ／Ａによる不死化神経細胞株の中毒状態を予防することができたことを報告した。遺伝子移入はまた、抗ボツリヌス神経毒血清型Ａ ＶＨＨへのプロテアソーム標的化配列の融合が、野生型ＢｏＮＴ／Ａによる中毒状態からの回復を促進し得ることを実証するためにも用いた（Ｋｕｏ ｅｔ ａｌ．，“Ａｃｃｅｌｅｒａｔｅｄ Ｎｅｕｒｏｎａｌ Ｃｅｌｌ Ｒｅｃｏｖｅｒｙ ｆｒｏｍ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｉｎｔｏｘｉｃａｔｉｏｎ ｂｙ Ｔａｒｇｅｔｅｄ Ｕｂｉｑｕｉｔｉｎａｔｉｏｎ，”ＰｌｏＳ Ｏｎｅ ６（５）：ｅ２０３５２（２０１１）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用される）。細胞内抗体として発現させる一本鎖抗体はまた、ハンチントン病、パーキンソン病、及び神経細胞に影響を及ぼす可能性のある他のタンパク質ミスフォールディング障害の治療可能性を有することが示された（Ｂｕｔｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，“Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｔｈｅｒａｐｉｅｓ ｔｏ Ｃｏｕｎｔｅｒａｃｔ Ｍｕｔａｎｔ Ｈｕｎｔｉｎｇｔｉｎ ａｎｄ Ｒｅｌａｔｅｄ Ｔｏｘｉｃ Ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，”Ｐｒｏｇｒｅｓｓ ｉｎ Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ９７（２）：１９０‐２０４（２０１２）；Ｂｕｔｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，“Ｂｉｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ａｎｔｉ‐Ｈｕｎｔｉｎｇｔｉｎ Ｐｒｏｔｅａｓｏｍｅ‐Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｉｎｔｒａｂｏｄｉｅｓ Ｍｅｄｉａｔｅ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ Ｄｅｇｒａｄａｔｉｏｎ ｏｆ Ｍｕｔａｎｔ Ｈｕｎｔｉｎｇｔｉｎ Ｅｘｏｎ １ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ，”ＰｌｏＳ Ｏｎｅ ６（１２）：ｅ２９１９９（２０１１）；Ｍｅ

ｓｓｅｒ ｅｔ ａｌ．，“Ｉｎｔｒａｂｏｄｉｅｓ ａｓ Ｎｅｕｒｏｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，”Ｎｅｕｒｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ：Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ ＮｅｕｒｏＴｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ １０（３）：４４７‐４５８（２０１３））。これらの一本鎖抗体のいずれも、これまで、クロストリジウム神経毒と遺伝学的に融合した後に送達することを目的として検証されたことはなかった。

【００１５】

クロストリジウム神経毒

ボツリヌス菌及び破傷風菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｔｅｔａｎｉ）の神経毒は、神経細胞に対する非常に強力かつ特異的な毒性物質である（Ｊｏｈｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｓｔｒａｉｎｓ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ ａｎ Ｉｎｆａｎｔ Ｂｏｔｕｌｉｓｍ Ｃａｓｅ ｉｎ ｔｈｅ Ｕｎｉｔｅｄ Ｋｉｎｇｄｏｍ，”Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．４３：２６０２‐２６０（２００５）；Ｓｃｈｉａｖｏ ｅｔ ａｌ．，“Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎｓ Ａｆｆｅｃｔｉｎｇ Ｎｅｕｒｏｅｘｏｃｙｔｏｓｉｓ，”Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｒｅｖ．８０：７１７‐７６６（２０００）；Ｓｉｍｐｓｏｎ，“Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｍａｊｏｒ Ｓｔｅｐｓ ｉｎ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｔｏｘｉｎ Ａｃｔｉｏｎ，”Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．４４：１６７‐１９３（２００４））。これらの神経毒は、人に知られている最も致命的な物質の一つである。両毒素は、冒した神経細胞において神経伝達物質の放出を阻害することによって作用する。破傷風毒素（「ＴｅＮＴ」）は、主に末梢神経系と中枢神経系を連結する介在ニューロンに作用し、ボツリヌス神経毒（「ＢｏＮＴ」）は、末梢神経系の神経筋接合部及び他のコリン作動性シナプスに作用する。これらの神経毒は両方とも、影響を受けた神経細胞の軸索からシナプスへの神経伝達物質の放出を阻害することにより作用し、麻痺をもたらす。

【００１６】

現在記載されている８つのＢｏＮＴ血清型（Ａ～Ｈ）及び複数のサブタイプは、全て共通の構造的特徴を有している（Ｓｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｖａｒｉａｔｉｏｎ ｗｉｔｈｉｎ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｓｅｒｏｔｙｐｅｓ Ｉｍｐａｃｔｓ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｂｉｎｄｉｎｇ ａｎｄ Ｎｅｕｔｒａｌｉｚａｔｉｏｎ，”Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．７３：５４５０‐５４５７（２００５）；Ｂａｒａｓｈ ｅｔ ａｌ．，“Ａ Ｎｏｖｅｌ Ｓｔｒａｉｎ ｏｆ Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ ｔｈａｔ Ｐｒｏｄｕｃｅｓ Ｔｙｐｅ Ｂ ａｎｄ Ｔｙｐｅ Ｈ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｔｏｘｉｎｓ，”Ｊ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．２０９：１８３‐９１（２０１４）；Ｄｏｖｅｒ ｅｔ ａｌ．，“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ａ Ｎｏｖｅｌ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｔｙｐｅ Ｈ Ｇｅｎｅ，”Ｊ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．２０９：１９２‐２０２（２０１４）；Ｈｉｌｌ ｅｔ ａｌ．，“Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｄｉｖｅｒｓｉｔｙ ｗｉｔｈｉｎ Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｓｅｒｏｔｙｐｅｓ，Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｇｅｎｅ Ｃｌｕｓｔｅｒｓ ａｎｄ Ｔｏｘｉｎ Ｓｕｂｔｙｐｅｓ，”Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３６４：１‐２０（２０１３））。ＢｏＮＴはその毒性にもかかわらず、少用量であれば塗布して局所的に筋肉群を麻痺させ、それによって標的化した治療的麻痺の効果を有するため、医薬品として広く使用されている。およそ０．５ｎｇ／ｋｇのマウスＬＤ５０を有するＢｏＮＴ／Ａは、臨床医学において最もよく使用される血清型であり（例えば、それぞれ商品名Ｂｏｔｏｘ（登録商標）、Ｄｙｓｐｏｒｔ（登録商標）、及びＸｅｏｍｉｎ（登録商標）で販売されているＯｎａ‐、Ａｂｏ‐、及びＩｎｃｏｂｏｔｕｌｉｎｕｍトキシン Ａ）、広範囲の適応症に対して承認されている。

【００１７】

ＢｏＮＴは、それらのメタロプロテアーゼ実体（軽鎖（ＬＣ））を神経細胞の細胞質ゾル

へ送達するうえで理想的に進化した構造的及び輸送的特徴を有する。それらは、腸及び肺の上皮性関門を通過し、循環器系に入ることができる。循環器系から、主として活性型神経筋接合部を標的とし、神経伝達物質の放出をブロックし、末梢神経筋遮断を引き起こす（Ｆｕｊｉｎａｇａ，“Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｔｏｘｉｎ ｗｉｔｈ ｔｈｅ Ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ Ｂａｒｒｉｅｒ，”Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１０：９７４９４３（２０１０）；Ｊａｈｎ ｅｔ ａｌ．，“ＳＮＡＲＥｓ‐Ｅｎｇｉｎｅｓ ｆｏｒ Ｍｅｍｂｒａｎｅ Ｆｕｓｉｏｎ，”Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．７：６３１‐６４３（２００６）；Ｍｏｎｔａｌ，“Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ：Ａ Ｍａｒｖｅｌ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄｅｓｉｇｎ，”Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．７９：５９１‐６１７（２０１０））。呼吸器系の麻痺は死亡につながる（Ｓｃｈｉａｖｏ ｅｔ ａｌ．，“Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎｓ Ａｆｆｅｃｔｉｎｇ Ｎｅｕｒｏｅｘｏｃｙｔｏｓｉｓ，”Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｒｅｖ．８０：７１７‐７６６（２０００））。すべてのＢｏＮＴ血清型は、同様の構造的特徴、及びシナプス小胞放出のための分子機構のすべての標的可溶性Ｎ‐エチルマレイミド感受性因子付着タンパク質受容体（「ＳＮＡＲＥ」）成分を有する（Ｊｏｈｎｓｏｎ，“Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉａｌ Ｔｏｘｉｎｓ ａｓ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｇｅｎｔｓ：Ｂｅｎｅｆｉｔｓ ｏｆ Ｎａｔｕｒｅ’ｓ Ｍｏｓｔ Ｔｏｘｉｃ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，”Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．５３：５５１‐５７５（１９９９））。例えば、野生型（ｗｔ）ＢｏＮＴ／Ａは、内在性クロストリジウムプロテアーゼによるタンパク質分解を経て活性化され、軽鎖（ＬＣ、Ｍｒ約５０，０００）及び必須のジスルフィド結合により結合した重鎖（ＨＣ、Ｍｒ約１００，０００）を含むヘテロダイマーを生成する一本鎖タンパク質（Ｍｒ約１５０，０００）として合成される（Ｓｃｈｉａｖｏ ｅｔ ａｌ．，“Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎｓ Ａｆｆｅｃｔｉｎｇ Ｎｅｕｒｏｅｘｏｃｙｔｏｓｉｓ，”Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｒｅｖ．８０：７１７‐７６６（２０００）；Ｊｏｈｎｓｏｎ，“Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉａｌ Ｔｏｘｉｎｓ ａｓ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｇｅｎｔｓ：Ｂｅｎｅｆｉｔｓ ｏｆ Ｎａｔｕｒｅ’ｓ Ｍｏｓｔ Ｔｏｘｉｃ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，”Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．５３：５５１‐５７５（１９９９）；Ｍｏｎｔｅｃｕｃｃｏ ｅｔ ａｌ．，“Ｍｅｃｈａｎｉｓｍ ｏｆ Ａｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｔｅｔａｎｕｓ ａｎｄ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎｓ，”Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１３：１‐８（１９９４））。

【００１８】

成熟野生型ＢｏＮＴ／Ａ毒素は、３つの主要機能ドメインを含むジスルフィド結合性のヘテロ二量体である：（１）毒性の原因であるＬＣメタロプロテアーゼドメイン；（２）重鎖（ＨＣ）Ｃ末端領域（H_C）を含む受容体結合ドメイン；及び（３）ＬＣの細胞質ゾルへの推進を担うＨＣ Ｎ末端領域（H_N）を含む重鎖（ＨＣ）トランスロケーションドメイン（Ｓｃｈｉａｖｏ ｅｔ ａｌ．，“Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎｓ Ａｆｆｅｃｔｉｎｇ Ｎｅｕｒｏｅｘｏｃｙｔｏｓｉｓ，”Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｒｅｖ．８０：７１７‐７６６（２０００）；Ｓｉｍｐｓｏｎ，“Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｍａｊｏｒ Ｓｔｅｐｓ ｉｎ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｔｏｘｉｎ Ａｃｔｉｏｎ，”Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．４４：１６７‐１９３（２００４）；Ｊｏｈｎｓｏｎ，“Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉａｌ Ｔｏｘｉｎｓ ａｓ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｇｅｎｔｓ：Ｂｅｎｅｆｉｔｓ ｏｆ Ｎａｔｕｒｅ’ｓ Ｍｏｓｔ Ｔｏｘｉｃ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，”Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．５３：５５１‐５７５（１９９９）；Ｄｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，“ＳＶ２ ｉｓ ｔｈｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｆｏｒ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ａ，”Ｓｃｉｅｎｃｅ ３１２：５９２‐５９６（２００６）；Ｍａｈｒｈｏｌｄ ｅｔ ａｌ．，“Ｔｈｅ Ｓｙｎａｐｔｉｃ Ｖｅｓｉｃｌｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ ２Ｃ Ｍｅｄｉａｔｅｓ ｔｈｅ Ｕｐｔａｋｅ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ａ Ｉｎｔｏ Ｐｈｒｅｎｉｃ Ｎｅｒｖｅｓ，”ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．５８０：２０１１‐２０１４（２００６））。

【００１９】

活性型神経細胞を特異的に標的とする野生型ＢｏＮＴ／Ａの毒性と医薬効力とを、同じ多段階分子機構が担っており、この特異性は、小型シナプス小胞の内腔に突出して存在するＢｏＮＴ／Ａ受容体であるシナプス小胞タンパク質２（「ＳＶ２」）が、シナプス小胞融合事象の間に細胞膜上にのみ露出するという事実に由来する（Ｄｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，“ＳＶ２ ｉｓ ｔｈｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｆｏｒ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ａ，”Ｓｃｉｅｎｃｅ ３１２（５７７３）：５９２‐５９６（２００６））。野生型ＢｏＮＴ／Ａの結合及び内部移行にはガングリオシドも関与し（Ｊｏｈｎｓｏｎ，“Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉａｌ Ｔｏｘｉｎｓ ａｓ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｇｅｎｔｓ：Ｂｅｎｅｆｉｔｓ ｏｆ Ｎａｔｕｒｅ’ｓ Ｍｏｓｔ Ｔｏｘｉｃ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，”Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．５３：５５１‐５７５（１９９９）；Ｋｅｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，“Ｐｅｒｓｉｓｔｅｎｃｅ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ａｃｔｉｏｎ ｉｎ Ｃｕｌｔｕｒｅｄ Ｓｐｉｎａｌ Ｃｏｒｄ Ｃｅｌｌｓ，”ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ． ４５６：１３７‐１４２（１９９９））、内部移行の直後にＢｏＮＴ／Ａは初期エンドソーム区画に見出され（Ｓｉｍｐｓｏｎ，“Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｍａｊｏｒ Ｓｔｅｐｓ ｉｎ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｔｏｘｉｎ Ａｃｔｉｏｎ，”Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．４４：１６７‐１９３（２００４）；Ｆｉｓｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，“Ｃｒｕｃｉａｌ Ｒｏｌｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｄｉｓｕｌｆｉｄｅ Ｂｒｉｄｇｅ Ｂｅｔｗｅｅｎ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｌｉｇｈｔ ａｎｄ Ｈｅａｖｙ Ｃｈａｉｎｓ ｉｎ Ｐｒｏｔｅａｓｅ Ｔｒａｎｓｌｏｃａｔｉｏｎ Ａｃｒｏｓｓ Ｍｅｍｂｒａｎｅｓ，”Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８２：２９６０４‐２９６１１（２００７）；Ｆｉｓｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｉｎｇｌｅ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａｔｅｓ Ｄｕｒｉｎｇ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｔｒａｎｓｌｏｃａｔｉｏｎ Ａｃｒｏｓｓ Ｍｅｍｂｒａｎｅｓ，”Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １０４：１０４４７‐１０４５２（２００７））、ＢｏＮＴ／Ａはシナプス小胞の再生にも関連している。エンドソームの酸性化に際して、ＢｏＮＴ／Ａは機能的に重要な立体構造変化を受け、ＬＣがＨＣを介して神経細胞の細胞質へ移行することが可能になる（Ｂａｎｄ ｅｔ ａｌ．，“Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ａ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ｆｏｒ Ｔｒａｆｆｉｃｋｉｎｇ Ｓｔｕｄｉｅｓ ａｎｄ Ｎｅｕｒｏｎａｌ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，”Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐ．Ｐｕｒｉｆ．７１：６２‐７３（２０１０）；Ｐｅｌｌｅｔｔ ｅｔ ａｌ．，“Ｎｅｕｒｏｎａｌ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ， Ｉｎｔｅｒｎａｌｉｚａｔｉｏｎ， ａｎｄ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｃｔｉｖｉｔｙ ｏｆ ａ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ａｔｏｘｉｃ Ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ａ，”Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．４０５：６７３‐６７７（２０１１））。バフィロマイシンまたはコンカナマイシンＡなどの薬剤による初期エンドソーム酸性化プロセスの中断は、神経細胞の細胞質への軽鎖の移行を防止する（Ｓｉｍｐｓｏｎ，“Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｍａｊｏｒ Ｓｔｅｐｓ ｉｎ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｔｏｘｉｎ Ａｃｔｉｏｎ，”Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．４４：１６７‐１９３（２００４））。神経細胞の細胞質ゾルにおいて、Zn^{2+}‐エンドペプチダーゼであるＬＣは、シナプス小胞エキソサイトーシスに必要なＳＮＡＲＥタンパク質であるシナプトソーム関連タンパク質２５（「ＳＮＡＰ‐２５」）を特異的に切断する（Ｍａｈｒｈｏｌｄ ｅｔ ａｌ．，“Ｔｈｅ Ｓｙｎａｐｔｉｃ Ｖｅｓｉｃｌｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ ２Ｃ Ｍｅｄｉａｔｅｓ ｔｈｅ Ｕｐｔａｋｅ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ａ Ｉｎｔｏ Ｐｈｒｅｎｉｃ Ｎｅｒｖｅｓ，”ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．５８０：２０１１‐２０１４（２００６））。ＳＮＡＰ‐２５の切断は、神経伝達物質の放出を阻害し、末梢神経筋麻痺を引き起こす。

【００２０】

組換え完全長ＢｏＮＴヘテロ二量体誘導体の産生を可能にする組換えクロストリジウム構築物、バキュロウイルス発現系、及び精製方法に基づく技術プラットフォームが開発され

ている（Ｉｃｈｔｃｈｅｎｋｏ及びＢａｎｄの米国特許第７，７８５，６０６号参照）。このプラットフォームは、天然の毒素の構造及び輸送特性を保持する組換えボツリヌス神経毒のバイオエンジニアリングに、現代の分子生物学のツールを適用できるようにする（Ｂａｎｄ ｅｔ ａｌ．，“Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ａ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ｆｏｒ Ｔｒａｆｆｉｃｋｉｎｇ Ｓｔｕｄｉｅｓ ａｎｄ Ｎｅｕｒｏｎａｌ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，”Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒ．Ｐｕｒｉｆ．７１：６２‐７３（２０１０））。ボツリヌス菌神経毒血清型Ａの無毒性誘導体（「ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ」）は、このプラットフォームを用いて産生した野生型ボツリヌス菌神経毒血清型Ａ（ＢｏＮＴ／Ａ）の組換え誘導体である。この誘導体（すなわち、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ）は、機能的な受容体結合ドメイン及びトランスロケーションドメイン、ならびに積荷部位を表す配列に融合した無毒性軽鎖（ＬＣ）を含む（Ｉｃｈｔｃｈｅｎｋｏ及びＢａｎｄの米国特許出願公開第２０１１／０２０６６１６号参照）。一実施形態では、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ ＬＣは、プロテアーゼの酵素コアに導入した２つの突然変異を有し、それにより、その強力な毒性を劇的に低下させている。ＢｏＮＴ／Ａ ａｄは、野生型毒素より１００，０００倍高いＬＤ５０を有する。従前の分析からは、全身腹腔内投与後のマウスの横隔膜の神経筋接合部にＢｏＮＴ／Ａ ａｄが蓄積し、神経細胞培養物から、ＳＮＡＰ‐２５との複合体として免疫沈降することができ（Ｂａｎｄ ｅｔ ａｌ．，“Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ａ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ｆｏｒ Ｔｒａｆｆｉｃｋｉｎｇ Ｓｔｕｄｉｅｓ ａｎｄ Ｎｅｕｒｏｎａｌ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，”Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒ．Ｐｕｒｉｆ．７１：６２‐７３（２０１０）；Ｐｅｌｌｅｔｔ ｅｔ ａｌ．，“Ｎｅｕｒｏｎａｌ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ， Ｉｎｔｅｒｎａｌｉｚａｔｉｏｎ， ａｎｄ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｃｔｉｖｉｔｙ ｏｆ ａ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ａ ｔｏｘｉｃ Ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ａ，”Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．４０５：６７３‐６７７（２０１１））、野生型ＢｏＮＴ／Ａよりも遅い速度でＳＮＡＰ‐２５を切断し、神経細胞内にマイクロモル濃度で蓄積することが示されている（Ｖａｚｑｕｅｚ‐Ｃｉｎｔｒｏｎ，“Ａ ｔｏｘｉｃ Ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ａ ａｓ ａ Ｐｒｏｔｏｔｙｐｅ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｖｅｈｉｃｌｅ ｆｏｒ Ｔａｒｇｅｔｅｄ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｔｏ ｔｈｅ Ｎｅｕｒｏｎａｌ Ｃｙｔｏｐｌａｓｍ，”ＰＬｏＳＯｎｅ ９（１）：ｅ８５５１７（２０１４））。

【００２１】

本発明は、当該技術分野における欠点を克服することを目的とする。これは、神経細胞の細胞質に露出する標的に対する機能的一本鎖抗体の送達に関連する課題を克服することを含む。

【発明の概要】

【００２２】

本発明の１つの態様は、クロストリジウム神経毒の軽鎖領域及びクロストリジウム神経毒の重鎖領域を含む融合タンパク質に関する。軽鎖及び重鎖領域は、ジスルフィド結合によって連結している。一本鎖抗体は軽鎖領域の上流に位置する。一本鎖抗体は、抗原結合活性を有する。

【００２３】

本発明の別の態様は、本発明の融合タンパク質及び薬学的に許容可能な担体を含む治療剤に関する。

【００２４】

本発明のさらなる態様は、クロストリジウム神経毒の毒性作用についての対象の治療方法に関する。本方法は、クロストリジウム神経毒の毒性作用について対象を治療するのに有効な条件下で、本発明の治療剤を対象に投与することを含む。

【００２５】

本発明のさらに別の態様は、治療方法に関する。本方法は、対象に治療を提供するのに有

効な条件下で、本発明の融合タンパク質を対象に投与することを含む。
【００２６】
さらに、本発明のさらなる態様は、プロペプチド融合体に関する。プロペプチド融合体は、クロストリジウム神経毒の軽鎖領域及びクロストリジウム神経毒の重鎖領域を有する。軽鎖及び重鎖領域は、ジスルフィド結合によって連結している。中間領域は、軽鎖及び重鎖領域を連結し、高特異性プロテアーゼ切断部位を含む。高特異性プロテアーゼ切断部位は、高特異性プロテアーゼが認識して切断できる３つ以上の特異的な隣接するアミノ酸残基を有する。一本鎖抗体は軽鎖領域の上流に位置する。一本鎖抗体は、抗原結合活性を有する。
【００２７】
本発明の別の態様は、本発明のプロペプチド融合体をコードする単離核酸分子に関する。
【００２８】
本発明のさらなる態様は、本発明による核酸分子を異種ベクターに含む発現系に関する。
【００２９】
本発明のさらに別の態様は、本発明の核酸分子を含有する宿主細胞に関する。
【００３０】
さらに、本発明のさらなる態様は、融合タンパク質の発現方法に関する。本方法は、本発明の核酸分子、前記核酸分子に機能的に連結した異種プロモーター、及び前記核酸分子に機能的に連結した３′調節領域を含む核酸構築物を提供することを含む。核酸構築物は、融合タンパク質のプロペプチドを発現するのに有効な条件下で宿主細胞に導入される。
【００３１】
本発明の別の態様は、本発明のプロペプチド融合タンパク質を高特異性プロテアーゼ切断部位で切断することによって産生する融合タンパク質に関する。軽鎖領域及び重鎖領域は、ジスルフィド結合によって連結している。
【００３２】
本発明の背景において上述した抗体の送達方法は、薬学的な応用に対して制限があり、本発明はこれを克服しようとするものである。具体的には、上記の方法は、神経細胞の細胞質に露出した標的に対し、機能的一本鎖抗体を特異的に送達することができない。抗体を無毒性クロストリジウム神経毒誘導体に融合させることにより、本明細書に記載の融合タンパク質は、一本鎖抗体を神経細胞に導き、内部移行したエンドソームから細胞質に移行させて、遠位の神経細胞体及び他の神経細胞への逆行輸送によって抗体を潜在的に送達するとともに、経口及び吸入を含む複数の経路によって治療剤を投与する手段を提供する。
【００３３】
一本鎖抗体は、様々な治療目的を含む様々な目的のために開発されている。本発明は、組換えクロストリジウム神経毒誘導体への一本鎖抗体の遺伝学的融合に基づく細胞内標的への一本鎖抗体の送達分子及び送達方法に関し、本発明により、クロストリジウム神経毒誘導体は分子媒体として働き、これは神経細胞の細胞質への抗体の輸送を標的指向させかつシャペロンとして補助し、それによって抗体が特異的な神経細胞内タンパク質を標的とすることを可能にする。したがって、本発明の一実施形態によれば、抗体は薬剤であり、組換えクロストリジウム神経毒誘導体は主に抗体の送達媒体として働く。
【００３４】
本明細書に記載の以下の実施例は、クロストリジウム神経毒の無毒性誘導体を用いた一本鎖抗体の良好な送達に関する証拠を提供する。本発明の融合タンパク質は、神経細胞を標的とし、神経細胞培養物の細胞質ゾル画分にマイクロモル濃度で蓄積可能であり、シナプスタンパク質と共局在する。一本鎖抗体を送達することにより、神経細胞の細胞質に存在する病原性タンパク質を標的とし、及びこれを排除することができ、多数の神経症状の治療薬として役立てることができる。
[本発明1001]
クロストリジウム神経毒の軽鎖領域；
クロストリジウム神経毒の重鎖領域；及び

抗原結合活性を有し、前記軽鎖領域の上流に位置する一本鎖抗体
を含み、
前記軽鎖及び重鎖領域がジスルフィド結合によって連結している、
融合タンパク質。
[本発明1002]
前記クロストリジウム神経毒が、ボツリヌス菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ）血清型Ｃ、ボツリヌス菌血清型Ａ、ボツリヌス菌血清型Ｅ、ボツリヌス菌血清型Ｄ、ボツリヌス菌血清型Ｂ、ボツリヌス菌血清型Ｆ、ボツリヌス菌血清型Ｇ、ボツリヌス菌血清型Ｈからなる群から選択される血清型のボツリヌス菌神経毒である、本発明1001の融合タンパク質。
[本発明1003]
前記ボツリヌス菌神経毒が血清型Ｃである、本発明1002の融合タンパク質。
[本発明1004]
前記軽鎖及び重鎖領域が切断されていない、本発明1001の融合タンパク質。
[本発明1005]
前記軽鎖領域と前記一本鎖抗体との間に位置するアミノ酸スペーサー配列をさらに含む、本発明1001の融合タンパク質。
[本発明1006]
前記クロストリジウム神経毒の前記軽鎖領域が無毒性である、本発明1001の融合タンパク質。
[本発明1007]
前記軽鎖領域がクロストリジウム神経毒ＢｏＮＴ／Ａに由来し、突然変異$Ｅ_{224}$＞Ａ及び$Ｙ_{366}$＞Ａをさらに含む、本発明1006の融合タンパク質。
[本発明1008]
前記軽鎖領域が、野生型クロストリジウム神経毒の$ＬＤ_{50}$よりも少なくとも１，０００倍高い$ＬＤ_{50}$を有する、本発明1006の融合タンパク質。
[本発明1009]
前記クロストリジウム神経毒の前記軽鎖領域が基質切断活性を失っている、本発明1006の融合タンパク質。
[本発明1010]
前記軽鎖領域がクロストリジウム神経毒ＢｏＮＴ／Ａに由来し、突然変異$Ｑ_{162}$＞Ｙ、$Ｌ_{256}$＞Ｙ、$Ｒ_{257}$＞Ｅ、及び$Ｌ_{322}$＞Ｅ、または突然変異$Ｑ_{163}$＞Ｅ、$Ｅ_{263}$＞Ｌ、及び$Ｌ_{323}$＞Ｉをさらに含む、本発明1009の融合タンパク質。
[本発明1011]
前記軽鎖領域がクロストリジウム神経毒ＢｏＮＴ／Ｃに由来し、突然変異$Ｅ_{446}$＞Ａ；$Ｈ_{449}$＞Ｇ；$Ｙ_{591}$＞Ａをさらに含む、本発明1009の融合タンパク質。
[本発明1012]
前記クロストリジウム神経毒の前記軽鎖及び重鎖領域が、（ｉ）前記軽鎖及び重鎖の安定性、（ｉｉ）前記融合タンパク質による神経細胞の特異的標的化、及び（ｉｉｉ）神経細胞の細胞質への融合タンパク質の送達、に必要な立体構造を有する、本発明1006の融合タンパク質。
[本発明1013]
前記一本鎖抗体がＶＨＨドメインである、本発明1001の融合タンパク質。
[本発明1014]
本発明1001～1013のいずれかの融合タンパク質、及び
薬学的に許容可能な担体
を含む、治療剤。
[本発明1015]
クロストリジウム神経毒の毒性作用についての対象の治療方法であって：
クロストリジウム神経毒の毒性作用について前記対象を治療するのに有効な条件下で、前

記対象に本発明1014の治療剤を投与する段階を含む、前記治療方法。
[本発明1016]
本発明1001～1013のいずれかの融合タンパク質を、対象に治療を提供するのに有効な条件下で前記対象に投与する段階を含む、治療方法。
[本発明1017]
前記投与する段階の前に、治療を必要とする対象を選択する段階をさらに含む、本発明1016の方法。
[本発明1018]
前記投与する段階を、吸入、非経口、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、鼻腔内滴下、または粘膜への塗布によって行う、本発明1016の方法。
[本発明1019]
クロストリジウム神経毒の軽鎖領域；
クロストリジウム神経毒の重鎖領域；
高特異性プロテアーゼ切断部位を有し、前記軽鎖及び重鎖領域を連結する中間領域；ならびに
抗原結合活性を有し、前記軽鎖領域の上流に位置する一本鎖抗体
を含み、
前記軽鎖及び重鎖領域がジスルフィド結合によって連結しており、
前記高特異性プロテアーゼ切断部位が、前記高特異性プロテアーゼが認識して切断可能な3残基以上の特異的な隣接するアミノ酸残基を有する、
プロペプチド融合体。
[本発明1020]
前記軽鎖領域の上流に位置する第一検出タグと、重鎖の下流に位置する第二検出タグとをさらに含む、本発明1019のプロペプチド融合体。
[本発明1021]
前記一本鎖抗体に隣接するＮ末端及びＣ末端検出タグをさらに含み、前記検出タグが、神経細胞の細胞質への前記一本鎖抗体の送達を検出することができる、本発明1019のプロペプチド融合体。
[本発明1022]
前記Ｎ末端検出タグの上流に位置する第一アフィニティー精製タグ；
前記第一アフィニティー精製タグと前記Ｎ末端検出タグとの間に位置する高特異性プロテアーゼ切断部位；
前記重鎖領域の下流に位置する第二アフィニティー精製タグ；及び、
前記第二アフィニティー精製タグと前記重鎖領域との間に位置する高特異性プロテアーゼ切断部位
をさらに含む、本発明1021のプロペプチド融合体。
[本発明1023]
前記中間領域の前記高特異性プロテアーゼ切断部位、前記アフィニティー精製タグと前記Ｎ末端検出タグとの間に位置する前記高特異性プロテアーゼ切断部位、及び前記第二アフィニティー精製タグと前記重鎖領域との間に位置する前記高特異性プロテアーゼ切断部位がすべて、エンテロキナーゼ切断部位及びＴＥＶ認識配列から選択される同一の配列を有する、本発明1022のプロペプチド融合体。
[本発明1024]
前記一本鎖抗体の上流に位置する分解促進ドメインをさらに含む、本発明1019のプロペプチド融合体。
[本発明1025]
前記一本鎖抗体が、野生型クロストリジウム神経毒の軽鎖に対して特異的である、本発明1019のプロペプチド融合体。
[本発明1026]
前記軽鎖及び重鎖領域が切断されていない、本発明1019のプロペプチド融合体。

[本発明1027]
前記クロストリジウム神経毒が、ボツリヌス菌血清型Ｃ、ボツリヌス菌血清型Ａ、ボツリヌス菌血清型Ｅ、ボツリヌス菌血清型Ｄ、ボツリヌス菌血清型Ｂ、ボツリヌス菌血清型Ｆ、ボツリヌス菌血清型Ｇ、ボツリヌス菌血清型Ｈからなる群から選択される血清型のボツリヌス菌神経毒である、本発明1019のプロペプチド融合体。
[本発明1028]
ボツリヌス菌神経毒が血清型Ａである、本発明1027のプロペプチド融合体。
[本発明1029]
ボツリヌス菌神経毒が血清型Ｃである、本発明1027のプロペプチド融合体。
[本発明1030]
前記軽鎖及び重鎖領域が切断されていない、本発明1019のプロペプチド融合体。
[本発明1031]
前記軽鎖領域と前記一本鎖抗体との間に位置するアミノ酸スペーサー配列をさらに含む、本発明1019のプロペプチド融合体。
[本発明1032]
前記軽鎖領域がクロストリジウム神経毒ＢｏＮＴ／Ａに由来し、突然変異$Ｅ_{224}$＞Ａ及び$Ｙ_{366}$＞Ａをさらに含む、本発明1019のプロペプチド融合体。
[本発明1033]
前記軽鎖領域がクロストリジウム神経毒ＢｏＮＴ／Ａに由来し、突然変異$Ｑ_{162}$＞Ｙ、$Ｌ_{256}$＞Ｙ、$Ｒ_{257}$＞Ｅ、及び$Ｌ_{322}$＞Ｅ、または突然変異$Ｑ_{163}$＞Ｅ、$Ｅ_{263}$＞Ｌ、及び$Ｌ_{323}$＞Ｉをさらに含む、本発明1031のプロペプチド融合体。
[本発明1034]
前記軽鎖領域がクロストリジウム神経毒ＢｏＮＴ／Ｃに由来し、突然変異$Ｅ_{446}$＞Ａ；$Ｈ_{449}$＞Ｇ；$Ｙ_{591}$＞Ａをさらに含む、本発明1033のプロペプチド融合体。
[本発明1035]
前記一本鎖抗体がＶＨＨドメインである、本発明1019のプロペプチド融合体。
[本発明1036]
本発明1019～1035のいずれかのプロペプチド融合体をコードする、単離核酸分子。
[本発明1037]
本発明1036の核酸分子を異種ベクターに含む、発現系。
[本発明1038]
前記核酸分子が、適切なセンス方向及び正しいリーディングフレームで前記ベクターに挿入されている、本発明1037の発現系。
[本発明1039]
本発明1036の核酸分子を含有する、宿主細胞。
[本発明1040]
前記核酸分子が異種発現系に挿入されている、本発明1039の宿主細胞。
[本発明1041]
前記中間領域が、前記発現系または前記宿主細胞の内在性プロテアーゼによって切断されない、本発明1039の宿主細胞。
[本発明1042]
植物細胞、哺乳類細胞、昆虫細胞、酵母細胞、及び細菌細胞からなる群から選択される、本発明1039の宿主細胞。
[本発明1043]
昆虫細胞である、本発明1042の宿主細胞。
[本発明1044]
融合タンパク質の発現方法であって：
本発明1036の核酸分子と；
前記核酸分子に機能的に連結した異種プロモーターと；
前記核酸分子に機能的に連結した3′調節領域と

を含む核酸構築物を提供する段階、及び、
前記融合タンパク質のプロペプチドを発現するのに有効な条件下で宿主細胞に前記核酸構築物を導入する段階
を含む、前記発現方法。
[本発明1045]
前記中間領域が、前記宿主細胞の内在性プロテアーゼによって切断されない、本発明1044の方法。
[本発明1046]
前記宿主細胞が昆虫細胞である、本発明1044の方法。
[本発明1047]
前記中間領域で切断を引き起こすのに有効な条件下で、前記発現させた融合タンパク質のプロペプチドを高特異性プロテアーゼに接触させる段階
をさらに含む、本発明1044の方法。
[本発明1048]
前記融合タンパク質を約30ｍｇ／Ｌの濃度で単離する段階をさらに含む、本発明1044の方法。
[本発明1049]
2段階の非変性かつ高度選択的なアフィニティー精製を用いて、前記融合タンパク質を均質に精製する段階をさらに含む、本発明1044の方法。
[本発明1050]
本発明1019～1035のいずれかのプロペプチド融合タンパク質を、高特異性プロテアーゼ切断部位で切断することによって産生する融合タンパク質であって、前記軽鎖領域及び重鎖領域がジスルフィド結合によって連結している、前記融合タンパク質。
【図面の簡単な説明】
【００３５】
【図１】図１Ａ～Ｂは、全長一本鎖発現産物のプロセシング前（図１Ａ）及びプロセシング後（図１Ｂ）の、クロストリジウム神経毒（例えば、ＢｏＮＴ）の模式図である。このクロストリジウム神経毒は一本鎖抗体融合タンパク質ではない。すなわち、融合一本鎖抗体を含有していない。具体的には、図１Ａは、プロセシング前のＢｏＮＴの全長一本鎖発現産物の模式図である。アフィニティー精製タグ（「ＡＰＴ」）は、Ｎ末端（APT_N）及びＣ末端（APT_C）にそれぞれ存在し、２段階アフィニティー精製に使用する。検出タグ（「ＤＴ」）を配置して、成熟ヘテロダイマーの軽鎖及び重鎖を検出する。例えば、免疫細胞化学（ＩＣＣ）技術を用いたタンパク質の視覚化のために、ＬＣのＮ末端上にＯｌｌａｓタグ及びＨＣのＣ末端上にＨＡタグを導入してもよい。図１Ｂは、本明細書において「高特異性プロテアーゼ切断部位」とも呼ぶ制限特異性プロテアーゼ（ＲＳＰ）部位を切断し、ＡＰＴを除去し、ＬＣとＨＣの間にある発現産物を切り出す制限特異性プロテアーゼ（「ＲＳＰ」）による切断を介して図１Ａに示す実施形態の発現産物をプロセシングすることによって産生したＢｏＮＴのジスルフィド結合型ＬＣ‐ＨＣヘテロ二量体の模式図である。
【図２】ｉｎ ｖｉｔｒｏでの成熟完全長ＢｏＮＴ神経毒（すなわち、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１、以下に記載）薬物担体の一実施形態について、ＳＮＡＰ‐２５の切断がないことを示すウェスタンブロット結果の写真である。Ｅ１９ラット海馬神経細胞をｉｎ ｖｉｔｒｏで１４日間培養し（１４ＤＩＶ）、次いで５０ｎＭのＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１に、０、１、２４、または４８時間曝露した。ＯＬＬＡＳタグに対するモノクローナル抗体及びＨＡタグに対するモノクローナル抗体を用いてウェスタンブロット分析を行い、それぞれＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１ ＬＣ及びＨＣの存在を検出及び測定した。ＶＡＭＰ‐２を添加対照として用いた。このブロットは、ＳＮＡＰ‐２５がＢｏＮＴ／Ａの天然の基質であるにもかかわらず、ＳＮＡＰ‐２５切断が検出されなかったことを示している。図２はまた、ＶＡＭＰ‐２は他のＢｏＮＴ血清型の基質であるが、この特異的誘導体が、その変化した一次構造にもかかわらず、ＶＡＭＰ‐２に対する切断活性を有さないことも示している。

【図３】図３Ａ～Ｃは、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐１　ＬＣが、神経細胞の細胞質ゾルに独占的に露出するシナプスタンパク質と共局在することを示す写真である。Ｅ１９ラット海馬神経細胞をｉｎ　ｖｉｔｒｏで１０日間培養し、次いで５０ｎＭのＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐１に１６時間曝露した。共焦点顕微鏡分析は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐１　ＬＣがＶＡＭＰ‐２（図３Ａ）およびＳＮＡＰ‐２５（図３Ｂ）と共局在することを示す。図３Ｃにおいて、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐１　ＬＣは初期エンドソームマーカーＥＥＡ１と共局在しない。

【図４】図４Ａ～Ｂは、全長一本鎖発現産物（すなわち、プロペプチド融合体）のプロセシング前（図４Ａ）およびプロセシング後（図４Ｂ）の、本発明の融合タンパク質の一実施形態の模式図である。特に、図４Ａは、プロセシング前の全長一本鎖発現産物（プロペプチド融合体）を示す模式図である。アフィニティー精製タグ（ＡＰＴ）を、Ｎ末端（APT_N）及びＣ末端（APT_C）にそれぞれ配置し、２段階アフィニティー精製のために使用する。一本鎖抗体（ＶＨＨ）のＮ末端上の検出タグ（DT_1）は、免疫細胞化学（ＩＣＣ）または他の免疫学的技術を用いてタンパク質を視覚化するためのものである。スペーサー配列（「ＳＳ」）を、ＶＨＨとＬＣのＮ末端との間に配置する。図４Ｂは、制限特異性プロテアーゼ（ＲＳＰ）による切断により、ＡＰＴを除去するとともにＬＣとＨＣとの発現産物を切り出すことによる発現産物のプロセシングによって産生するジスルフィド結合型ＬＣ‐ＨＣヘテロ二量体を示す模式図である。一実施形態において、このプロペプチド融合体及び融合タンパク質を、「ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐１　ＶＨＨ」と呼ぶ。

【図５】図５Ａ～Ｂは、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐１　ＶＨＨ（以下に記載する本発明の融合タンパク質の一実施形態）が神経細胞の細胞質ゾルに内部移行することを示す写真である。Ｅ１９ラット海馬神経細胞をｉｎ　ｖｉｔｒｏで１０日間培養し、次いで５０ｎＭのＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐１　ＶＨＨに２４時間曝露した。ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐１　ＶＨＨ　ＬＣは、残存ＳＮＡＰ‐２５切断活性（例えば、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０）を保有するＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ分子と同じパターンを有することを、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐１　ＬＣとＳＮＡＰ‐２５（図５Ａ）およびＶＡＭＰ‐２（図５Ｂ）との共局在によって示す。

【図６】図６Ａ～Ｂは、分解促進ドメイン（「ＡＤＤ」）と呼ぶ、細胞内排除促進タンパク質を標的とする配列を含む本発明の一実施形態によるプロペプチド融合体（図６Ａ）および融合タンパク質（図６Ｂ）の模式図である。例えば、ＢｏＮＴ／Ｂに結合するＢ１０‐ＶＨＨを有するＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐１を、プロテアソーム経路による排除のために複合体への標識として付加するＡＤＤシグナルと共に例示する。構築物のＲＳＰプロセシング前（図６Ａ、プロペプチド融合体）およびＲＳＰプロセシング後（図６Ｂ、融合タンパク質）の模式図を示す。

【図７】図７Ａ～Ｂは、本発明の一実施形態によるプロペプチド融合体（図７Ａ）および融合タンパク質（図７Ｂ）の模式図である。図中、成熟ヘテロダイマー（図７Ｂ）のＮ末端アミノ酸がリジン（‐Ｋ‐）残基となって、プロテアソーム系による分解を促進するようにプロペプチドを設計する。

【図８】図８Ａ～Ｂは、本発明の一実施形態による、ＲＳＰプロセシング前（図８Ａ）およびＲＳＰプロセシング後（図８Ｂ）を示すプロペプチド融合体の模式図である。本明細書に示す実施形態によれば、プロペプチド融合体（図８Ａ）は、図４Ａのプロペプチド融合体と同じ構造を有するが、検出タグ（ＤＴ）が欠けている。

【図９Ａ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列の間にテキストボックスを提示する。

【図９Ｂ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列の間にテキストボックスを提示する。

【図９Ｃ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号２）を示す。ＤＮＡ配

列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列の間にテキストボックスを提示する。
【図９Ｄ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列の間にテキストボックスを提示する。
【図９Ｅ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列の間にテキストボックスを提示する。
【図９Ｆ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列の間にテキストボックスを提示する。
【図９Ｇ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列の間にテキストボックスを提示する。
【図９Ｈ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列の間にテキストボックスを提示する。
【図９Ｉ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列の間にテキストボックスを提示する。
【図９Ｊ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列の間にテキストボックスを提示する。
【図９Ｋ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列の間にテキストボックスを提示する。
【図９Ｌ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列の間にテキストボックスを提示する。
【図１０Ａ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１０Ｂ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１０Ｃ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。

【図１０Ｄ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１０Ｅ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１０Ｆ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１０Ｇ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１０Ｈ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１０Ｉ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１０Ｊ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１０Ｋ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１０Ｌ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１１Ａ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号５）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号６）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１１Ｂ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号５）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号６）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１１Ｃ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号５）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号６）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１１Ｄ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号５）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号６）を示す。ＤＮＡ

配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１１Ｅ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号５）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号６）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１１Ｆ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号５）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号６）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１１Ｇ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号５）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号６）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１１Ｈ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号５）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号６）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１１Ｉ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号５）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号６）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１１Ｊ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号５）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号６）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１１Ｋ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号５）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号６）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１１Ｌ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号５）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号６）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１２Ａ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号７）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号８）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１２Ｂ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号７）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号８）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１２Ｃ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号７）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号８）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１２Ｄ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号７）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号８）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。

【図１２Ｅ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号７）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号８）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１２Ｆ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号７）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号８）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１２Ｇ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号７）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号８）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１２Ｈ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号７）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号８）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１２Ｉ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号７）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号８）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１２Ｊ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号７）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号８）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１２Ｋ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号７）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号８）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１２Ｌ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号７）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号８）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１２Ｍ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号７）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号８）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。
【図１３】図１３Ａ～Ｂは、本発明の一実施形態によるプロペプチド融合体（図１３Ａ）および融合タンパク質（図１３Ｂ）の模式図であり、融合タンパク質のクロストリジウム神経毒部分は、残存ＳＮＡＰ‐２５切断活性を有する（すなわち、ＢｏＮＴ　ＬＣ　ａｄ‐０）。図１３Ａは、プロセシング前の全長一本鎖発現産物（プロペプチド融合体）の模式図である。（２段階）アフィニティー精製に使用するために、ＡＰＴをそれぞれＮ末端（$ＡＰＴ_{Ｎ}$）及びＣ末端（$ＡＰＴ_{Ｃ}$）に配置する。免疫細胞化学（ＩＣＣ）技術を用いたタンパク質の視覚化のために、ＬＣのＮ末端上にＤＴ（$ＤＴ_{1}$）を導入する。図１３Ｂは、図１３Ａのプロペプチド融合体の融合タンパク質産物の模式図であって、ＲＳＰによる切断を介した発現産物のプロセシングによって産生するジスルフィド結合型ＬＣ‐ＨＣヘテロ二量体を示しており、ここで、ＲＳＰによる切断は、ＡＰＴを除去し、ＬＣとＨＣとの発現産物を切り出す。
【図１４】ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０タンパク質（すなわち、融合型一本鎖抗体を有さない限り、非融合型タンパク質）のＳＮＡＰ‐２５切断を示す。Ｅ１９ラット海馬神経細胞をｉｎ　ｖｉｔｒｏで１４日間培養し、次いで異なる濃度のＢｏＮＴ／Ａ

ａｄ‐０に７２時間曝露した。ウェスタンブロット分析は、ＳＮＡＰ‐２５の切断産物及び非切断産物を示す。

【図１５】Ｅ１９ラット海馬神経細胞培養物中の成熟全長ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０　ＶＨＨ融合タンパク質（すなわち、図１３Ｂに示す融合タンパク質の構造を有する）のＳＮＡＰ‐２５切断を示す。ＬＣがＳＮＡＰ‐２５基質へアクセスするには、細胞質へのＬＣ送達が必要であることから、ＳＮＡＰ‐２５切断を、ＬＣ及びその関連ＶＨＨ積荷の細胞質への送達に対するレポーターとして使用する。Ｅ１９ラット海馬神経細胞をｉｎ　ｖｉｔｒｏで１４日間培養し、次に５０ｎＭのＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０　ＶＨＨに０、１、２４、４８及び７２時間、曝露した。βアクチンを添加対照として用いた。

【図１６】ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０　ＶＨＨの指外転スコア（ＤＡＳ）評価の結果を示す写真であり、ＬＣ　ａｄ‐０の上流にＶＨＨを配置しても、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０　ＶＨＨの麻痺活性が消失しないことを示している。

【図１７Ａ】本発明のプロペプチド融合体及び融合タンパク質を形成するための一本鎖抗体を有するボツリヌス菌血清型Ｃの無毒性誘導体の二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号９）及びアミノ酸配列（配列番号１０）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図１７Ａ～Ｌは、図４Ａの一般的な構成の１つの具体的な実施形態を示す。

【図１７Ｂ】本発明のプロペプチド融合体及び融合タンパク質を形成するための一本鎖抗体を有するボツリヌス菌血清型Ｃの無毒性誘導体の二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号９）及びアミノ酸配列（配列番号１０）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図１７Ａ～Ｌは、図４Ａの一般的な構成の１つの具体的な実施形態を示す。

【図１７Ｃ】本発明のプロペプチド融合体及び融合タンパク質を形成するための一本鎖抗体を有するボツリヌス菌血清型Ｃの無毒性誘導体の二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号９）及びアミノ酸配列（配列番号１０）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図１７Ａ～Ｌは、図４Ａの一般的な構成の１つの具体的な実施形態を示す。

【図１７Ｄ】本発明のプロペプチド融合体及び融合タンパク質を形成するための一本鎖抗体を有するボツリヌス菌血清型Ｃの無毒性誘導体の二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号９）及びアミノ酸配列（配列番号１０）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図１７Ａ～Ｌは、図４Ａの一般的な構成の１つの具体的な実施形態を示す。

【図１７Ｅ】本発明のプロペプチド融合体及び融合タンパク質を形成するための一本鎖抗体を有するボツリヌス菌血清型Ｃの無毒性誘導体の二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号９）及びアミノ酸配列（配列番号１０）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図１７Ａ～Ｌは、図４Ａの一般的な構成の１つの具体的な実施形態を示す。

【図１７Ｆ】本発明のプロペプチド融合体及び融合タンパク質を形成するための一本鎖抗体を有するボツリヌス菌血清型Ｃの無毒性誘導体の二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号９）及びアミノ酸配列（配列番号１０）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図１７Ａ～Ｌは、図４Ａの一般的な構成の１つの具体的な実施形態を示す。

【図１７Ｇ】本発明のプロペプチド融合体及び融合タンパク質を形成するための一本鎖抗体を有するボツリヌス菌血清型Ｃの無毒性誘導体の二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号９）及び

アミノ酸配列（配列番号１０）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図１７Ａ～Ｌは、図４Ａの一般的な構成の１つの具体的な実施形態を示す。

【図１７Ｈ】本発明のプロペプチド融合体及び融合タンパク質を形成するための一本鎖抗体を有するボツリヌス菌血清型Ｃの無毒性誘導体の二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号９）及びアミノ酸配列（配列番号１０）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図１７Ａ～Ｌは、図４Ａの一般的な構成の１つの具体的な実施形態を示す。

【図１７Ｉ】本発明のプロペプチド融合体及び融合タンパク質を形成するための一本鎖抗体を有するボツリヌス菌血清型Ｃの無毒性誘導体の二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号９）及びアミノ酸配列（配列番号１０）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図１７Ａ～Ｌは、図４Ａの一般的な構成の１つの具体的な実施形態を示す。

【図１７Ｊ】本発明のプロペプチド融合体及び融合タンパク質を形成するための一本鎖抗体を有するボツリヌス菌血清型Ｃの無毒性誘導体の二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号９）及びアミノ酸配列（配列番号１０）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図１７Ａ～Ｌは、図４Ａの一般的な構成の１つの具体的な実施形態を示す。

【図１７Ｋ】本発明のプロペプチド融合体及び融合タンパク質を形成するための一本鎖抗体を有するボツリヌス菌血清型Ｃの無毒性誘導体の二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号９）及びアミノ酸配列（配列番号１０）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図１７Ａ～Ｌは、図４Ａの一般的な構成の１つの具体的な実施形態を示す。

【図１７Ｌ】本発明のプロペプチド融合体及び融合タンパク質を形成するための一本鎖抗体を有するボツリヌス菌血清型Ｃの無毒性誘導体の二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号９）及びアミノ酸配列（配列番号１０）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図１７Ａ～Ｌは、図４Ａの一般的な構成の１つの具体的な実施形態を示す。

【図１８】Ｃｙｔｏ‐３０２（ＢｏＮＴ／Ａ‐Ｂ１０を保有するＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０融合タンパク質、その配列を図１９Ａ～Ｌに示し、模式的に図１３Ａに示す）が、神経細胞に内部移行した後に、ＬＣ／Ｂ結合一本鎖抗体としてその活性を保持することを示している。１４‐ＤＩＶ　Ｅ１９ラット海馬神経細胞を５０ｎＭ　Ｃｙｔｏ‐３０２または緩衝液に２４時間曝露した。細胞を洗浄し、５０％の条件培地でさらに２４時間追跡した。細胞を洗浄し、０．５％Ｔｒｉｔｏｎ（商標）Ｘ１００緩衝液で抽出し、ＢｏＮＴ／Ｂ軽鎖を細胞質ゾル抽出物に加え、１時間インキュベートした。ＢｏＮＴ／Ｂ　ＬＣは、タンパク質のＣ末端に６‐Ｈｉｓタグを有し、簡単に同定できる。次いで、試料を抗ＢｏＮＴ／Ａポリクローナル抗体と共に１時間インキュベートし、続いてプロテインＧ磁気ビーズで免疫沈降した。ウェスタンブロット分析：レーン１：Ｃｙｔｏ‐３０２で処理していない細胞の投入溶解産物。レーン２：Ｃｙｔｏ‐３０２で処理した投入溶解細胞産物。レーン３～５：免疫沈降後の試料。レーン３：溶解産物を含まない試験管内ＩＰ。Ｃｙｔｏ‐３０２及びＬＣ／Ｂを０．５％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ‐１００溶解緩衝液中で混合した。レーン４：Ｃｙｔｏ‐３０２で処理していない細胞のＩＰ。レーン５：Ｃｙｔｏ‐３０２で処理した細胞のＩＰ。レーン６：４ｎｇのＬＣ／Ｂのみ。レーン７：プロテインＧ単独の対照。レーン４と５の比較は、ＬＣ／Ｂに対するＢｏＮＴ融合ＶＨＨが神経細胞の細胞質への

送達後に回収することができ、回収したＶＨＨが免疫沈降実験においてＬＣ／Ｂを沈降させる能力を保持していることを示す。
【図１９Ａ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図１９Ｂ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図１９Ｃ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図１９Ｄ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図１９Ｅ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図１９Ｆ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図１９Ｇ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図１９Ｈ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図１９Ｉ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図１９Ｊ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別する

ために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図１９Ｋ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図１９Ｌ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１１）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１２）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図２０Ａ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図２０Ｂ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図２０Ｃ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図２０Ｄ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図２０Ｅ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図２０Ｆ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図２０Ｇ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図２０Ｈ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別する

ために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図２０Ｉ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図２０Ｊ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図２０Ｋ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図２０Ｌ】本発明のプロペプチド融合体の一実施形態をコードする二本鎖ＤＮＡ配列（配列番号１３）及びそのプロペプチド融合体のアミノ酸配列（配列番号１４）を示す。ＤＮＡ配列及び／またはその翻訳アミノ酸配列の機能的及び／または構造的特徴を識別するために、二本鎖ＤＮＡ配列に沿ってテキストボックスを提示する。図示する実施形態は、図１３Ａの模式図に対応する。
【図２１】図２１Ａ～Ｃは、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄプロペプチド精製及びプロセシングの結果を、クーマシーＢＢ　Ｒ‐２５０染色した還元１２％ＳＤＳ‐ＰＡＧＥにおいて示す。図２１Ａは、レーン１～６においてＮｉ‐ＮＴＡ　ＳｕｐｅｒＦｌｏｗクロマトグラフィー精製、レーン８～１１においてＳｔｒｅｐＴａｃｔｉｎアガロースクロマトグラフィー、及びレーン１２においてＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄプロペプチドの溶出を示す。図２１Ｂは、タバコエッチ病ウイルス（ＴＥＶ）によるタンパク質分解切断によるＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄプロペプチドのヘテロ二量体へのプロセシングを示す。レーン１～５：非還元試料、レーン６～１０：β‐メルカプトエタノールの添加による還元試料。レーン１及び６：ＴＥＶなし；レーン２～５及び７～１０はＴＥＶで以下の時間処理した：レーン２及び７、１時間；レーン３及び８、６時間；レーン４及び９、２４時間；レーン５及び１０、４８時間。図２１Ｃは、ＴＥＶの除去を示す。レーン１：ロード；レーン２～４：５ｍＭイミダゾールで洗浄；レーン６～８：４０ｍＭイミダゾールで洗浄；レーン９～１０：２５０ｍＭでのＴＥＶの溶出。
【図２２Ａ】ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄが細胞ベースのアッセイにおいて野生型ＢｏＮＴ／Ｃ基質に対して触媒的に活性でないことを示す。１４‐ＤＩＶ　Ｅ１９ラット皮質神経細胞を異なる濃度のＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄに９６時間曝露し、ウェスタンブロットにより分析した。図２２Ａは、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄがシンタキシン‐１を切断しないことを、陽性対照として０．５ｎＭのＢｏＮＴ／Ｃで処理した細胞と比較して示す。ＶＡＭＰ‐２は内部添加対照として機能する。
【図２２Ｂ】ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄが細胞ベースのアッセイにおいて野生型ＢｏＮＴ／Ｃ基質に対して触媒的に活性でないことを示す。１４‐ＤＩＶ　Ｅ１９ラット皮質神経細胞を異なる濃度のＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄに９６時間曝露し、ウェスタンブロットにより分析した。図２２Ｂは、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄがシンタキシン‐１またはＳＮＡＰ‐２５を切断しないことを確認する。ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ　ＬＣの検出は、皮質細胞に関連するＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄの存在を示す。ＶＡＭＰ‐２は内部添加対照として機能する。
【図２３】図２３Ａ～Ｂは、神経細胞培養物中でＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄがシナプス前性マーカーＶＡＭＰ‐２と共局在することを示す。１４‐ＤＩＶ　Ｅ１９ラット海馬培養物を２５ｎＭのＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄに１６時間曝露した。細胞を免疫細胞化学用に調製し、共焦

点顕微鏡法を用いて分析した。図２３Ａは、ＶＡＭＰ‐２及びＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ　ＬＣについて染色した細胞を示す。図２３Ｂは、ＶＡＭＰ‐２及びＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ　ＨＣで染色した細胞を示す。

【図２４】神経細胞培養物中でＢｏＮＴ／Ｃ　ＬＣが初期エンドソームマーカーＥＥＡ‐１とほとんど共局在しないことを示す。１４‐ＤＩＶ　Ｅ１９ラット海馬培養物を２５ｎＭのＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄで１６時間処理した。細胞を免疫細胞化学用に調製し、共焦点顕微鏡法を用いて分析した。細胞をＥＥＡ‐１及びＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ　ＬＣについて染色した。

【図２５Ａ】ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄの全身投与後の神経筋接合部への輸送を示す。６週齢のマウスに０．４ｍｇ／ｋｇのＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄを腹腔内注射した。全身注入の２４時間後、マウスを安楽死させ、横隔膜を単離し、染色用に調製した。組織をシンタキシン、ＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣ及びαブンガロトキシンで染色し、共焦点顕微鏡法で分析した。図２５Ａは、神経筋接合部の側面図を示す；左下から時計回りに：ＢｏＮＴ／Ｃ‐ＨＣ、シンタキシン、αブンガロトキシン、ならびにＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣ、シンタキシン、及びαブンガロトキシンの複合体。棒線＝１０μｍである。

【図２５Ｂ】ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄの全身投与後の神経筋接合部への輸送を示す。６週齢のマウスに０．４ｍｇ／ｋｇのＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄを腹腔内注射した。全身注入の２４時間後、マウスを安楽死させ、横隔膜を単離し、染色用に調製した。組織をシンタキシン、ＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣ及びαブンガロトキシンで染色し、共焦点顕微鏡法で分析した。左下から時計回りに：ＢｏＮＴ／Ｃ‐ＨＣ、シンタキシン、αブンガロトキシン、ならびにＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣ、シンタキシン、及びαブンガロトキシンの複合体。棒線＝１０μｍである。

【図２６】神経細胞培養物中でＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ　Ｂ８（「Ｃ／Ｂ８」）がシナプスタンパク質と共局在することを示す一連の写真である。１４‐ＤＩＶ　Ｅ１９ラット海馬培養物を２５ｎＭのＣ／Ｂ８で２４時間処理した。細胞をＩＣＣ用に調製し、共焦点顕微鏡法を用いて分析した。上部パネル：シナプシン‐１及びＣ‐ＬＣ／Ｂ８について染色した（ＢｏＮＴ／Ｃ　ＬＣに対するモノクローナル抗体を用いて）細胞。下部パネル：ＶＡＭＰ‐２に対する免疫染色。棒線＝１０μｍである。

【図２７】Ｃ／Ｂ８が、細胞ベースのアッセイ系においてＳＮＡＰ‐２５に対する野生型ＢｏＮＴ／Ａ　ＬＣの活性をブロックすることを示す。１４‐ＤＩＶ　Ｅ１９皮質神経細胞を、５ｐＭの野生型ＢｏＮＴ／Ａ及び５０ｎＭのＣ／Ｂ８、５０ｎＭのＢ８単独、５０ｎＭのＢｏＮＴ／Ｃ‐ａｄ（ＢｏＮＴ／Ｃ分子媒体のみ）、５０ｎＭのＪＬＪＧ３単独（ＢｏＮＴ／Ｂ　に対するＶＨＨ）、または５０ｎＭ　ＪＬＪＧ３／Ｃ（ＪＬＪＧ３を有するＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ）。Ｃ／Ｂ８に同時曝露した試料（矢印で示す）のみが、ＳＮＡＰ‐２５切断の部分的阻害を示す。

【図２８】Ｃ／Ｂ８がＢｏＮＴ／Ａ　ＬＣ活性をブロックし、毒物への曝露後モデルの細胞ベースの系においてＳＮＡＰ‐２５の回収を促進することを示す。１４‐ＤＩＶ　Ｅ１９皮質神経細胞を５ｐＭのＢｏＮＴ／Ａで９０分間毒物と接触させた。細胞を細胞培地で２回洗浄し、５０ｎＭのＣ／Ｂ８の存在下で追跡し、処理した１日後（Ｄ１）、４日後（Ｄ４）、及び７日後（Ｄ７）に、ウェスタンブロットによって分析した。非処理群（ｎ／ｔ）またはＣ‐ａｄ（分子媒体単独）と比較して、Ｃ／Ｂ８で処理した細胞は７日目までＳＮＡＰ‐２５の回収を示す。

【図２９】ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ分子媒体と比較したＣ／Ｂ８のｉｎ　ｖｉｖｏ有効性を示す。１０匹のマウスの群に、２ＭＩＰＬＤ５０ユニットを腹腔内注射した。毒物投与３時間後に、プラセボ（緩衝液のみ）、０．４ｍｇ／ｋｇのＣ／Ｂ８または０．４ｍｇ／ｋｇのＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄをマウスに注入した。生存率を毎日測定し、毒物投与後の時間（日）に対して生存率をプロットした。

【図３０Ａ】毒物投与後の異なる時間における標準的な抗体ベースの抗毒素に対するＣ／Ｂ８の有効性を示すグラフである。１０匹のマウスの群に、１．２ＭＩＰＬＤ５０の腹腔内投与で毒物投与した。毒物投与の６時間後に、０．４ｍｇ／ｋｇのＣ／Ｂ８または１Ｕ

の抗毒素のいずれかをマウスに腹腔内注射した。生存率を毎日測定し、毒物投与後の時間（日）に対して生存率をプロットした。
【図３０Ｂ】毒物投与後の異なる時間における標準的な抗体ベースの抗毒素に対するＣ／Ｂ８の有効性を示すグラフである。１０匹のマウスの群に、１．２ＭＩＰＬＤ５０の腹腔内投与で毒物投与した。毒物投与の１２時間後に、０．４ｍｇ／ｋｇのＣ／Ｂ８または１Ｕの抗毒素のいずれかをマウスに腹腔内注射した。生存率を毎日測定し、毒物投与後の時間（日）に対して生存率をプロットした。
【図３０Ｃ】毒物投与後の異なる時間における標準的な抗体ベースの抗毒素に対するＣ／Ｂ８の有効性を示すグラフである。１０匹のマウスの群に、１．２ＭＩＰＬＤ５０の腹腔内投与で毒物投与した。毒物投与の２０時間後に、０．４ｍｇ／ｋｇのＣ／Ｂ８または１Ｕの抗毒素のいずれかをマウスに腹腔内注射した。生存率を毎日測定し、毒物投与後の時間（日）に対して生存率をプロットした。
【図３１Ａ】毒物投与後の異なる時間における標準的な抗体ベースの抗毒素に対するＣ／Ｂ８の有効性を示すグラフである。１０匹のマウスの群に、４ＭＩＰＬＤ５０の腹腔内投与で毒物投与した。毒物投与の６時間後に、０．４ｍｇ／ｋｇのＣ／Ｂ８または１Ｕの抗毒素のいずれかをマウスに腹腔内注射した。生存率を毎日測定し、毒物投与後の時間（日）に対して生存率をプロットした。
【図３１Ｂ】毒物投与後の異なる時間における標準的な抗体ベースの抗毒素に対するＣ／Ｂ８の有効性を示すグラフである。１０匹のマウスの群に、４ＭＩＰＬＤ５０の腹腔内投与で毒物投与した。毒物投与の８時間後に、０．４ｍｇ／ｋｇのＣ／Ｂ８または１Ｕの抗毒素のいずれかをマウスに腹腔内注射した。生存率を毎日測定し、毒物投与後の時間（日）に対して生存率をプロットした。
【図３１Ｃ】毒物投与後の異なる時間における標準的な抗体ベースの抗毒素に対するＣ／Ｂ８の有効性を示すグラフである。１０匹のマウスの群に、４ＭＩＰＬＤ５０の腹腔内投与で毒物投与した。毒物投与の１０時間後に、０．４ｍｇ／ｋｇのＣ／Ｂ８または１Ｕの抗毒素のいずれかをマウスに腹腔内注射した。生存率を毎日測定し、毒物投与後の時間（日）に対して生存率をプロットした。
【図３２】ＤＮＡ構築物がコードする融合タンパク質の分子構築に用いる前記ＤＮＡ構築物の一実施形態の模式図である。特に、図３２は、任意のボツリヌス菌血清型のＢｏＮＴ　ＬＣ及びＢｏＮＴ　ＨＣをコードするヌクレオチドを有するＤＮＡ構築物を示し、ＢｏＮＴ　ＬＣとＢｏＮＴ　ＨＣは、ＲＳＰコード配列によって分けられかつこの配列と隣接し、必要に応じて、ＡＦＰ及びＤＴを含むが必ずしもこれらに限定されないタグコード配列（タグ）を有し、かつヌクレオチドスペーサー及び／またはリンカーも含む。必要に応じて、ＬＣとＨＣコード配列との間のＲＳＰを、ヌクレオチドスペーサー配列（ＳＳ）によってさらに分ける。
【図３３Ａ】本発明の融合タンパク質をコードするＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１６）を示す。図３３Ａ～Ｎの配列は、図３２に一般的に表すＤＮＡ構築物の具体例である。特に、図３３Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０　ＬＣドメイン及びＢｏＮＴ／Ａ　ＨＣドメインを保有する。
【図３３Ｂ】本発明の融合タンパク質をコードするＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１６）を示す。図３３Ａ～Ｎの配列は、図３２に一般的に表すＤＮＡ構築物の具体例である。特に、図３３Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０　ＬＣドメイン及びＢｏＮＴ／Ａ　ＨＣドメインを保有する。
【図３３Ｃ】本発明の融合タンパク質をコードするＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１６）を示す。図３３Ａ～Ｎの配列は、図３２に一般的に表すＤＮＡ構築物の具体例である。特に、図３３Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０　ＬＣドメイン及びＢｏＮＴ／Ａ　ＨＣドメインを保有する。

【図３３Ｄ】本発明の融合タンパク質をコードするＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１６）を示す。図３３Ａ～Ｎの配列は、図３２に一般的に表すＤＮＡ構築物の具体例である。特に、図３３Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０ ＬＣドメイン及びＢｏＮＴ／Ａ ＨＣドメインを保有する。

【図３３Ｅ】本発明の融合タンパク質をコードするＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１６）を示す。図３３Ａ～Ｎの配列は、図３２に一般的に表すＤＮＡ構築物の具体例である。特に、図３３Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０ ＬＣドメイン及びＢｏＮＴ／Ａ ＨＣドメインを保有する。

【図３３Ｆ】本発明の融合タンパク質をコードするＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１６）を示す。図３３Ａ～Ｎの配列は、図３２に一般的に表すＤＮＡ構築物の具体例である。特に、図３３Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０ ＬＣドメイン及びＢｏＮＴ／Ａ ＨＣドメインを保有する。

【図３３Ｇ】本発明の融合タンパク質をコードするＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１６）を示す。図３３Ａ～Ｎの配列は、図３２に一般的に表すＤＮＡ構築物の具体例である。特に、図３３Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０ ＬＣドメイン及びＢｏＮＴ／Ａ ＨＣドメインを保有する。

【図３３Ｈ】本発明の融合タンパク質をコードするＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１６）を示す。図３３Ａ～Ｎの配列は、図３２に一般的に表すＤＮＡ構築物の具体例である。特に、図３３Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０ ＬＣドメイン及びＢｏＮＴ／Ａ ＨＣドメインを保有する。

【図３３Ｉ】本発明の融合タンパク質をコードするＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１６）を示す。図３３Ａ～Ｎの配列は、図３２に一般的に表すＤＮＡ構築物の具体例である。特に、図３３Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０ ＬＣドメイン及びＢｏＮＴ／Ａ ＨＣドメインを保有する。

【図３３Ｊ】本発明の融合タンパク質をコードするＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１６）を示す。図３３Ａ～Ｎの配列は、図３２に一般的に表すＤＮＡ構築物の具体例である。特に、図３３Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０ ＬＣドメイン及びＢｏＮＴ／Ａ ＨＣドメインを保有する。

【図３３Ｋ】本発明の融合タンパク質をコードするＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１６）を示す。図３３Ａ～Ｎの配列は、図３２に一般的に表すＤＮＡ構築物の具体例である。特に、図３３Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０ ＬＣドメイン及びＢｏＮＴ／Ａ ＨＣドメインを保有する。

【図３３Ｌ】本発明の融合タンパク質をコードするＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１６）を示す。図３３Ａ～Ｎの配列は、図３２に一般的に表すＤＮＡ構築物の具体例である。特に、図３３Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０ ＬＣドメイン及びＢｏＮＴ／Ａ ＨＣドメインを保有する。

【図３３Ｍ】本発明の融合タンパク質をコードするＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１６）を示す。図３３Ａ～Ｎの配列は、図３２に一般的に表すＤＮＡ構築物の具体例である。特に、図３３Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０ ＬＣドメイン及びＢｏＮＴ／Ａ ＨＣドメインを保有する。

【図３３Ｎ】本発明の融合タンパク質をコードするＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１６）を示す。図３３Ａ～Ｎの配列は、図３２に一般的に表すＤＮＡ構築物の具体例である。特に、図３３Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０ ＬＣドメイン及びＢｏＮＴ／Ａ ＨＣドメインを保有する。

【図３４Ａ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１８）を示す。図３４Ａ～Ｎの配列は、図３２に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３４Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄ‐０ ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ ＨＣを保有する。

【図３４Ｂ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１８）を示す。図３４Ａ～Ｎの配列は、図３２に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３４Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄ‐０ ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ ＨＣを保有する。

【図３４Ｃ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１８）を示す。図３４Ａ～Ｎの配列は、図３２に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３４Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄ‐０ ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ ＨＣを保有する。

【図３４Ｄ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１８）を示す。図３４Ａ～Ｎの配列は、図３２に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３４Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄ‐０ ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ ＨＣを保有する。

【図３４Ｅ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１８）を示す。図３４Ａ～Ｎの配列は、図３２に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３４Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄ‐０ ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ ＨＣを保有する。

【図３４Ｆ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１８）を示す。図３４Ａ～Ｎの配列は、図３２に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３４Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄ‐０ ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ ＨＣを保有する。

【図３４Ｇ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１８）を示す。図３４Ａ～Ｎの配列は、図３２に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３４Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄ‐０ ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ ＨＣを保有する。

【図３４Ｈ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１８）を示す。図３４Ａ～Ｎの配列は、図３２に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３４Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄ‐０ ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ ＨＣを保有する。

【図３４Ｉ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１８）を示す。図３４Ａ～Ｎの配列は、図３２に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３４Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄ‐０ ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ ＨＣを保有する。

【図３４Ｊ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１８）を示す。図３４Ａ～Ｎの配列は、図３２に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３４Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ‐０　ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣを保有する。

【図３４Ｋ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１８）を示す。図３４Ａ～Ｎの配列は、図３２に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３４Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ‐０　ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣを保有する。

【図３４Ｌ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１８）を示す。図３４Ａ～Ｎの配列は、図３２に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３４Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ‐０　ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣを保有する。

【図３４Ｍ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１８）を示す。図３４Ａ～Ｎの配列は、図３２に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３４Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ‐０　ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣを保有する。

【図３４Ｎ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号１８）を示す。図３４Ａ～Ｎの配列は、図３２に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３４Ａ～Ｎの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ‐０　ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣを保有する。

【図３５】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態の模式図である。特に、図３５は、上流にＲＳＰ及びＡＤＤを有する任意の血清型のＢｏＮＴ　ＬＣを示す。ＲＳＰは、切断後に、正に荷電したアミノ酸（‐Ｘ＋‐）がＡＤＤ領域のすぐ上流（またはＮ末端）に位置するように選択する。

【図３６Ａ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２０）を示す。図３６Ａ～Ｆの配列は、図３５に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３６Ａ～Ｆの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０　ＬＣをコードする。

【図３６Ｂ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２０）を示す。図３６Ａ～Ｆの配列は、図３５に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３６Ａ～Ｆの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０　ＬＣをコードする。

【図３６Ｃ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２０）を示す。図３６Ａ～Ｆの配列は、図３５に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３６Ａ～Ｆの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０　ＬＣをコードする。

【図３６Ｄ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２０）を示す。図３６Ａ～Ｆの配列は、図３５に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３６Ａ～Ｆの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０　ＬＣをコードする。

【図３６Ｅ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤ

ＮＡ配列（配列番号１９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２０）を示す。図３６Ａ～Ｆの配列は、図３５に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３６Ａ～Ｆの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ－０ ＬＣをコードする。

【図３６Ｆ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号１９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２０）を示す。図３６Ａ～Ｆの配列は、図３５に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３６Ａ～Ｆの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ－０ ＬＣをコードする。

【図３７Ａ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２２）を示す。図３７Ａ～Ｅの配列は、図３５に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３７Ａ～Ｅの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄ－０ ＬＣをコードする。

【図３７Ｂ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２２）を示す。図３７Ａ～Ｅの配列は、図３５に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３７Ａ～Ｅの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄ－０ ＬＣをコードする。

【図３７Ｃ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２２）を示す。図３７Ａ～Ｅの配列は、図３５に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３７Ａ～Ｅの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄ－０ ＬＣをコードする。

【図３７Ｄ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２２）を示す。図３７Ａ～Ｅの配列は、図３５に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３７Ａ～Ｅの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄ－０ ＬＣをコードする。

【図３７Ｅ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２２）を示す。図３７Ａ～Ｅの配列は、図３５に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３７Ａ～Ｅの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄ－０ ＬＣをコードする。

【図３８】図３８Ａ～Ｃは、本発明の融合タンパク質の分子構築に用いるＤＮＡ構築物の実施形態の模式図である。特に、図３８Ａ～Ｃは、図３５に記載の構築物の、図３２に記載の構築物へのクローニングを示す。図３８Ａ～Ｃは、ドナー（図３８Ｂ）とレシピエント（図３８Ａ）構築物との間の対応するユニークな制限酵素部位（「ＵＲＳ」、破線は対応を示す）を示しており、これにより、ドナーＤＮＡをレシピエントＤＮＡに挿入することができる。得られる構築物（図３８Ｃ）は、図３５に記載の構築物のエレメントをコードしており、このエレメントが図３２に記載の構築物のタグ、ＲＳＰ、及びＢｏＮＴ ＬＣエレメントを置換している。

【図３９Ａ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２４）を示す。図３９Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３９Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ－０ ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ａ ＨＣをコードしている。

【図３９Ｂ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２４）を示す。図３９Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／

有する構築物の具体例である。特に、図３９Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ａ　ＨＣをコードしている。
【図３９Ｃ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２４）を示す。図３９Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３９Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ａ　ＨＣをコードしている。
【図３９Ｄ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２４）を示す。図３９Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３９Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ａ　ＨＣをコードしている。
【図３９Ｅ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２４）を示す。図３９Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３９Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ａ　ＨＣをコードしている。
【図３９Ｆ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２４）を示す。図３９Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３９Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ａ　ＨＣをコードしている。
【図３９Ｇ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２４）を示す。図３９Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３９Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ａ　ＨＣをコードしている。
【図３９Ｈ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２４）を示す。図３９Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３９Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ａ　ＨＣをコードしている。
【図３９Ｉ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２４）を示す。図３９Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３９Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ａ　ＨＣをコードしている。
【図３９Ｊ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２４）を示す。図３９Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３９Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ａ　ＨＣをコードしている。
【図３９Ｋ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２４）を示す。図３９Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３９Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ａ　ＨＣをコードしている。
【図３９Ｌ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２４）を示す。図３９Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／

有する構築物の具体例である。特に、図３９Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ａ　ＨＣをコードしている。
【図３９Ｍ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２４）を示す。図３９Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３９Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ａ　ＨＣをコードしている。
【図３９Ｎ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２４）を示す。図３９Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３９Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ａ　ＨＣをコードしている。
【図３９Ｏ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２４）を示す。図３９Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図３９Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ａ　ＨＣをコードしている。
【図４０Ａ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２６）を示す。図４０Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４０Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣをコードしている。
【図４０Ｂ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２６）を示す。図４０Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４０Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣをコードしている。
【図４０Ｃ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２６）を示す。図４０Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４０Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣをコードしている。
【図４０Ｄ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２６）を示す。図４０Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４０Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣをコードしている。
【図４０Ｅ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２６）を示す。図４０Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４０Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣをコードしている。
【図４０Ｆ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２６）を示す。図４０Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４０Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣをコードしている。
【図４０Ｇ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２６）を示す。図４０Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／

有する構築物の具体例である。特に、図４０Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣをコードしている。

【図４０Ｈ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２６）を示す。図４０Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４０Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣをコードしている。

【図４０Ｉ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２６）を示す。図４０Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４０Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣをコードしている。

【図４０Ｊ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２６）を示す。図４０Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４０Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣをコードしている。

【図４０Ｋ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２６）を示す。図４０Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４０Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣをコードしている。

【図４０Ｌ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２６）を示す。図４０Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４０Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣをコードしている。

【図４０Ｍ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２６）を示す。図４０Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４０Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣをコードしている。

【図４０Ｎ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２６）を示す。図４０Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４０Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣをコードしている。

【図４０Ｏ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２６）を示す。図４０Ａ～Ｏの配列は、図３８Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４０Ａ～Ｏの構築物は、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ－０ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣをコードしている。

【図４１】本発明の融合タンパク質の分子構築に用いるＤＮＡ構築物の一実施形態の模式図である。特に、図４１は、ＶＨＨ領域、ならびに上流のＲＳＰ及び任意のタグ、リンカー、またはスペーサーを示す。ＶＨＨ＊として示すＶＨＨ領域は、必要に応じてスペーサーまたはリンカーを有する１つ以上のＶＨＨであってもよい。

【図４２Ａ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２８）を示す。図４２Ａ～Ｂの配列は、図４１に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４２Ａ～Ｂの構築物は、ＶＨＨ領域にＢｏＮＴ／Ａ

ＬＣに対するＢ８　ＶＨＨをコードしている。
【図４２Ｂ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号２８）を示す。図４２Ａ～Ｂの配列は、図４１に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４２Ａ～Ｂの構築物は、ＶＨＨ領域にＢｏＮＴ／ＡＬＣに対するＢ８　ＶＨＨをコードしている。
【図４３Ａ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３０）を示す。図４３Ａ～Ｂの配列は、図４１に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４３Ａ～Ｂの構築物は、ＶＨＨ領域にＢｏＮＴ／ＢＬＣに対するＪＬＪＧ３　ＶＨＨ及びＢｏＮＴ／Ｂ　ＬＣに対するＢ１０　ＶＨＨをコードしている。
【図４３Ｂ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号２９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３０）を示す。図４３Ａ～Ｂの配列は、図４１に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４３Ａ～Ｂの構築物は、ＶＨＨ領域にＢｏＮＴ／ＢＬＣに対するＪＬＪＧ３　ＶＨＨ及びＢｏＮＴ／Ｂ　ＬＣに対するＢ１０　ＶＨＨをコードしている。
【図４４Ａ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３２）を示す。図４４Ａ～Ｂの配列は、図４１に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４４Ａ～Ｂの構築物は、ＶＨＨ領域にＢｏＮＴ／ＢＬＣに対するＪＬＪＧ３　ＶＨＨ及びＢｏＮＴ／Ｂ　ＬＣに対するＪＮＥ‐Ｂ１０　ＶＨＨをコードしている。
【図４４Ｂ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３２）を示す。図４４Ａ～Ｂの配列は、図４１に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４４Ａ～Ｂの構築物は、ＶＨＨ領域にＢｏＮＴ／ＢＬＣに対するＪＬＪＧ３　ＶＨＨ及びＢｏＮＴ／Ｂ　ＬＣに対するＪＮＥ‐Ｂ１０　ＶＨＨをコードしている。
【図４５Ａ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３４）を示す。図４５Ａ～Ｂの配列は、図４１に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４５Ａ～Ｂの構築物は、ＶＨＨ領域にＥＰＥＡαシヌクレインＶＨＨ１及びＥＰＥＡαシヌクレインＶＨＨ２をコードしている。
【図４５Ｂ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３４）を示す。図４５Ａ～Ｂの配列は、図４１に示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例である。特に、図４５Ａ～Ｂの構築物は、ＶＨＨ領域にＥＰＥＡαシヌクレインＶＨＨ１及びＥＰＥＡαシヌクレインＶＨＨ２をコードしている。
【図４６】図４６Ａ～Ｃは、本発明の融合タンパク質の分子構築に用いるＤＮＡ構築物の実施形態の模式図である。特に、図４６Ａ～Ｃは、図４１に記載の構築物の、図３８Ｃに記載の構築物へのクローニングを示す。図４６Ａ～Ｃは、ドナー（図４６Ｂ）とレシピエント（図４６Ａ）構築物との間の対応するユニークな制限酵素部位（「ＵＲＳ」、破線は対応を示す）を示しており、これにより、ドナーＤＮＡをレシピエントＤＮＡに挿入することができる。得られる構築物（図４６Ｃ）は、図４１に記載の構築物のエレメントを保有しており、このエレメントが図３８Ｃに記載の構築物のタグ、ＲＳＰ、及びＡＤＤエレメントを置換している。
【図４７】図４７Ａ～Ｃは、本発明の融合タンパク質の分子構築に用いるＤＮＡ構築物の実施形態の模式図である。特に、図４７Ａ～Ｃは、図４１に記載の構築物の、図３８Ｃに

記載の構築物へのクローニングを示す。特に、図４７Ａ～Ｃは、ドナー（図４７Ｂ）とレシピエント（図４７Ａ）構築物との間の対応するユニークな制限酵素部位（ＵＲＳ、破線は対応を示す）を示しており、これにより、ドナーＤＮＡをレシピエントＤＮＡに挿入することができる。得られる構築物（図４７Ｃ）は、図４１に記載の構築物、ならびに図３８Ｃに記載の構築物のエレメントを保有する。

【図４８Ａ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３６）を示す。図４８Ａ～Ｏの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４８Ｂ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３６）を示す。図４８Ａ～Ｏの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４８Ｃ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３６）を示す。図４８Ａ～Ｏの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４８Ｄ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３６）を示す。図４８Ａ～Ｏの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４８Ｅ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３６）を示す。図４８Ａ～Ｏの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４８Ｆ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３６）を示す。図４８Ａ～Ｏの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４８Ｇ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３６）を示す。図４８Ａ～Ｏの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４８Ｈ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３６）を示す。図４８Ａ～Ｏの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／

有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４８Ｉ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３６）を示す。図４８Ａ～Ｏの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４８Ｊ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３６）を示す。図４８Ａ～Ｏの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４８Ｋ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３６）を示す。図４８Ａ～Ｏの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４８Ｌ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３６）を示す。図４８Ａ～Ｏの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４８Ｍ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３６）を示す。図４８Ａ～Ｏの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４８Ｎ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３６）を示す。図４８Ａ～Ｏの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４８Ｏ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３６）を示す。図４８Ａ～Ｏの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４９Ａ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３８）を示す。図４９Ａ～Ｐの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨ

Ｉを使用して得られる配列である。
【図４９Ｂ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３８）を示す。図４９Ａ～Ｐの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図４９Ｃ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３８）を示す。図４９Ａ～Ｐの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図４９Ｄ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３８）を示す。図４９Ａ～Ｐの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図４９Ｅ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３８）を示す。図４９Ａ～Ｐの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図４９Ｆ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３８）を示す。図４９Ａ～Ｐの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図４９Ｇ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３８）を示す。図４９Ａ～Ｐの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図４９Ｈ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３８）を示す。図４９Ａ～Ｐの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図４９Ｉ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３８）を示す。図４９Ａ～Ｐの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図４９Ｊ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤ

ＮＡ配列（配列番号３７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３８）を示す。図４９Ａ～Ｐの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４９Ｋ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３８）を示す。図４９Ａ～Ｐの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４９Ｌ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３８）を示す。図４９Ａ～Ｐの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４９Ｍ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３８）を示す。図４９Ａ～Ｐの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４９Ｎ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３８）を示す。図４９Ａ～Ｐの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４９Ｏ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３８）を示す。図４９Ａ～Ｐの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図４９Ｐ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号３８）を示す。図４９Ａ～Ｐの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４２Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５０Ａ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４０）を示す。図５０Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５０Ｂ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４０）を示す。図５０Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／

有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５０Ｃ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４０）を示す。図５０Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５０Ｄ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４０）を示す。図５０Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５０Ｅ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４０）を示す。図５０Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５０Ｆ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４０）を示す。図５０Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５０Ｇ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４０）を示す。図５０Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５０Ｈ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４０）を示す。図５０Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５０Ｉ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４０）を示す。図５０Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５０Ｊ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４０）を示す。図５０Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩ

を使用して得られる配列である。
【図５０Ｋ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４０）を示す。図５０Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５０Ｌ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４０）を示す。図５０Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５０Ｍ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４０）を示す。図５０Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５０Ｎ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４０）を示す。図５０Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５００】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４０）を示す。図５０Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５０Ｐ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号３９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４０）を示す。図５０Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５１Ａ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４２）を示す。図５１Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５１Ｂ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４２）を示す。図５１Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５１Ｃ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌ

クレオチド配列（配列番号４１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４２）を示す。図５１Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５１Ｄ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４２）を示す。図５１Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５１Ｅ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４２）を示す。図５１Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５１Ｆ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４２）を示す。図５１Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５１Ｇ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４２）を示す。図５１Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５１Ｈ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４２）を示す。図５１Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５１Ｉ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４２）を示す。図５１Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５１Ｊ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４２）を示す。図５１Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５１Ｋ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４２）を示す。図５１Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコード

する／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５１Ｌ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４２）を示す。図５１Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５１Ｍ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４２）を示す。図５１Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５１Ｎ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４２）を示す。図５１Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５１Ｏ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４２）を示す。図５１Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５１Ｐ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４２）を示す。図５１Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５１Ｑ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４１）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４２）を示す。図５１Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４３Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５２Ａ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４４）を示す。図５２Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造を有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５２Ｂ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４４）を示す。図５２Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造を有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用

して得られる配列である。
【図５２Ｃ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４４）を示す。図５２Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造を有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５２Ｄ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４４）を示す。図５２Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造を有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５２Ｅ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４４）を示す。図５２Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造を有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５２Ｆ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４４）を示す。図５２Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造を有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５２Ｇ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４４）を示す。図５２Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造を有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５２Ｈ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４４）を示す。図５２Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造を有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５２Ｉ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４４）を示す。図５２Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造を有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５２Ｊ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４４）を示す。図５２Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造を有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５２Ｋ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌ

クレオチド配列（配列番号４３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４４）を示す。図５２Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造を有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５２Ｌ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４４）を示す。図５２Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造を有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５２Ｍ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４４）を示す。図５２Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造を有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５２Ｎ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４４）を示す。図５２Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造を有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５２Ｏ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４４）を示す。図５２Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造を有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５２Ｐ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のヌクレオチド配列（配列番号４３）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４４）を示す。図５２Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造を有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５３Ａ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４６）を示す。図５３Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５３Ｂ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４６）を示す。図５３Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５３Ｃ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４６）を示す。図５３Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／

有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５３Ｄ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４６）を示す。図５３Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５３Ｅ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４６）を示す。図５３Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５３Ｆ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４６）を示す。図５３Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５３Ｇ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４６）を示す。図５３Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５３Ｈ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４６）を示す。図５３Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５３Ｉ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４６）を示す。図５３Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５３Ｊ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４６）を示す。図５３Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５３Ｋ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４６）を示す。図５３Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨ

Ｉを使用して得られる配列である。
【図５３Ｌ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４６）を示す。図５３Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５３Ｍ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４６）を示す。図５３Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５３Ｎ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４６）を示す。図５３Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５３Ｏ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４６）を示す。図５３Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５３Ｐ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４６）を示す。図５３Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５３Ｑ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４５）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４６）を示す。図５３Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４４Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５４Ａ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４８）を示す。図５４Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５４Ｂ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４８）を示す。図５４Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５４Ｃ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤ

ＮＡ配列（配列番号４７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４８）を示す。図５４Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５４Ｄ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４８）を示す。図５４Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５４Ｅ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４８）を示す。図５４Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５４Ｆ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４８）を示す。図５４Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５４Ｇ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４８）を示す。図５４Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５４Ｈ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４８）を示す。図５４Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５４Ｉ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４８）を示す。図５４Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５４Ｊ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４８）を示す。図５４Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５４Ｋ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４８）を示す。図５４Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／

有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５４Ｌ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４８）を示す。図５４Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５４Ｍ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４８）を示す。図５４Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５４Ｎ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４８）を示す。図５４Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５４Ｏ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４８）を示す。図５４Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５４Ｐ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４７）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号４８）を示す。図５４Ａ～Ｐの配列は、図４６Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＺｒａＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５５Ａ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号５０）を示す。図５５Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５５Ｂ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号５０）を示す。図５５Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５５Ｃ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号５０）を示す。図５５Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨ

Ｉを使用して得られる配列である。
【図５５Ｄ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号５０）を示す。図５５Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５５Ｅ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号５０）を示す。図５５Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５５Ｆ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号５０）を示す。図５５Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５５Ｇ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号５０）を示す。図５５Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５５Ｈ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号５０）を示す。図５５Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５５Ｉ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号５０）を示す。図５５Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５５Ｊ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号５０）を示す。図５５Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５５Ｋ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号５０）を示す。図５５Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。
【図５５Ｌ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤ

ＮＡ配列（配列番号４９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号５０）を示す。図５５Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５５Ｍ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号５０）を示す。図５５Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５５Ｎ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号５０）を示す。図５５Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５５Ｏ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号５０）を示す。図５５Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５５Ｐ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号５０）を示す。図５５Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【図５５Ｑ】本発明の融合タンパク質の分子構築のためのＤＮＡ構築物の一実施形態のＤＮＡ配列（配列番号４９）及びそのＤＮＡ構築物の対応するアミノ酸配列（配列番号５０）を示す。図５５Ａ～Ｑの配列は、図４７Ｃに示す構築物の一般的な構造をコードする／有する構築物の具体例であって、図４５Ａ～Ｂに記載の構築物をドナー配列とし、及び図４０Ａ～Ｏに記載の構築物をレシピエント配列として、ＵＲＳ　ＳｇｒＡＩ及びＢａｍＨＩを使用して得られる配列である。

【発明を実施するための形態】

【００３６】

発明の詳細な説明

本発明の一態様は、クロストリジウム神経毒の軽鎖領域及びクロストリジウム神経毒の重鎖領域を含む融合タンパク質に関する。軽鎖及び重鎖領域は、ジスルフィド結合によって連結している。一本鎖抗体は軽鎖領域の上流に位置する。一本鎖抗体は、抗原結合活性を有する。

【００３７】

クロストリジウム神経毒は、シナプス小胞エキソサイトーシスのためのニューロン機構を標的とする構造的に類似性の高いタンパク質ファミリーである。クロストリジウム属の嫌気性細菌が産生するボツリヌス神経毒及び破傷風神経毒は、静脈または筋肉経路で投与する場合に重量ベースで０．５～２．５ｎｇ／ｋｇの範囲のＬＤ５０を有することが知られている最も有毒な物質である（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　Ｏｃｃｕｐａｔｉｏｎａｌ　Ｓａｆｅｔｙ　ａｎｄ　Ｈｅａｌｔｈｙ，“Ｒｅｇｉｓｔｒｙ　ｏｆ　Ｔｏｘｉｃ　Ｅｆｆｅｃｔｓ　ｏｆ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｓｕｂｓｔａｎｃｅｓ　（Ｒ‐ＴＥＣ

Ｓ），”Ｃｉｎｃｉｎｎａｔｉ，　Ｏｈｉｏ：Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　Ｏｃｃｕｐａｔｉｏｎａｌ　Ｓａｆｅｔｙ　ａｎｄ　Ｈｅａｌｔｈ（１９９６）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。

【００３８】

野生型ボツリヌス菌神経毒の一般的な構造的特徴は、Ｉｃｈｔｃｈｅｎｋｏ及びＢａｎｄの米国特許第７，７８５，６０６号に記載されており、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する。これらの構造的特徴は、ＢｏＮＴ／Ａを例として説明しているが、すべてのＢｏＮＴ血清型にわたって一般化される。

【００３９】

以下に考察するように、ボツリヌス神経毒は、一本鎖プロペプチドとして合成され、その後、特異的タンパク質分解切断事象により活性化し、ジスルフィド結合で連結した二量体を生成する。成熟ＢｏＮＴ／Ａは、Ｍｒ約５０，０００の３つの機能的ドメインからなり、このうち、毒性の原因となる触媒機能は軽鎖（残基１～４３７）に限定されており、移行活性には重鎖のＮ末端側半分（残基４４８～８７２）が関与、細胞結合にはＣ末端側半分（残基８７３～１，２９５）が関与している（Ｊｏｈｎｓｏｎ，“Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉａｌ　Ｔｏｘｉｎｓ　ａｓ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　Ａｇｅｎｔｓ：Ｂｅｎｅｆｉｔｓ　ｏｆ　Ｎａｔｕｒｅ’ｓ　Ｍｏｓｔ　Ｔｏｘｉｃ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，”Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．５３：５５１‐５７５（１９９９）；Ｍｏｎｔｅｃｕｃｃｏ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　ａｎｄ　Ｆｕｎｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｔｅｔａｎｕｓ　ａｎｄ　Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ　Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎｓ，”Ｑ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．２８：４２３‐４７２（１９９５）、これらの文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。

【００４０】

以下に述べるように、ＢｏＮＴプロペプチドをコードするヌクレオチド配列に１つ以上の改変を導入することにより、ＢｏＮＴ血清型に対する組換え神経毒の、天然及び生理学的に活性な状態での最適な発現及び回収を達成する。これらの突然変異は、天然毒素の構造及び生物学的活性を保持する一方で組換えボツリヌス神経毒の収率を最大化するように、ならびに神経毒を無毒化、すなわち野生型ＢｏＮＴに比べて毒性が数桁低減するように設計されており、場合によっては基質切断活性が失われている。本発明の融合タンパク質は、少なくとも約０．１ｍｇ／Ｌ、少なくとも約０．５ｍｇ／Ｌ、少なくとも約１ｍｇ／Ｌ、少なくとも約５ｍｇ／Ｌ、少なくとも約１０ｍｇ／Ｌ、約１０～２０ｍｇ／Ｌ、約２０～３０ｍｇ／Ｌ、または少なくとも約３０ｍｇ／Ｌの収量もしくは濃度で単離することができる。以下に詳細に記載するように、本明細書に記載するプロペプチド融合体及びその発現方法の特定の利点の１つは、２段階の非変性及び高度に選択的なアフィニティー精製を用いて、融合タンパク質を均質に精製することができることである。

【００４１】

本発明の単離した融合タンパク質は、一実施形態によれば、生理学的に活性である。この生理学的活性には、野生型クロストリジウム神経毒の特性である、毒素免疫原性、経細胞輸送及び細胞内輸送、ならびに細胞認識のいずれか１つ以上が含まれるが、必ずしもこれらに限定するものではない。

【００４２】

クロストリジウム毒素の細胞結合及び内部移行のメカニズムは、依然としてほとんど理解されていない。明白に同定された単一の受容体はなく、結合定数は特徴付けられていない。全てのボツリヌス神経毒の重鎖のＣ末端部分は、ガングリオシド（シアル酸含有糖脂質）に結合し、特にＧ１ｂシリーズのガングリオシドに優先的に結合する（Ｍｏｎｔｅｃｕｃｃｏ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　ａｎｄ　Ｆｕｎｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｔｅｔａｎｕｓ　ａｎｄ　Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ　Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎｓ，”Ｑ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．２８：４２３‐４７２（１９９５）；Ｍｏｎｔｅｃｕｃｃｏ，“Ｈｏｗ　Ｄｏ　Ｔｅｔａｎｕｓ　ａｎｄ　Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ　Ｔｏｘｉｎｓ　Ｂｉｎｄ　ｔｏ　Ｎｅｕｒｏｎａｌ　Ｍｅｍｂｒａｎｅｓ？”ＴＩＢＳ　１１：３１４‐３１７（１９８６）；及びＶａｎ　Ｈｅｙｎｉｎｇｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｔｈｅ　Ｆｉｘａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｔｅｔａｎｕｓ

Ｔｏｘｉｎ ｂｙ Ｇａｎｇｌｉｏｓｉｄｅ，”Ｊ．Ｇｅｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２４：１０７‐１１９（１９６１）、これらの文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。ガングリオシド結合に関与する配列を、構造的に類似するＴｅＮＴ分子について同定した。前記配列はその重鎖のＣ末端側アミノ酸３４残基以内に位置する。この領域内では、ＢｏＮＴ／Ａ、／Ｂ、／Ｃ、／Ｅ、及び／Ｆは、ＴｅＮＴと高度の相同性を共有している（Ｓｈａｐｉｒｏ ｅｔ ａｌ．，“Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ａ Ｇａｎｇｌｉｏｓｉｄｅ Ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ Ｄｏｍａｉｎ ｏｆ Ｔｅｔａｎｕｓ Ｔｏｘｉｎ Ｕｓｉｎｇ ａ Ｎｏｖｅｌ Ｇａｎｇｌｉｏｓｉｄｅ Ｐｈｏｔｏａｆｆｉｎｉｔｙ Ｌｉｇａｎｄ，”Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７２：３０３８０‐３０３８６（１９９７）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。複数の種類の証拠が、ボツリヌス神経毒の神経細胞膜への結合に関与する少なくとも１つの追加成分の存在を示唆している（Ｍｏｎｔｅｃｕｃｃｏ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｔｅｔａｎｕｓ ａｎｄ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎｓ，”Ｑ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．２８：４２３‐４７２（１９９５）；Ｍｏｎｔｅｃｕｃｃｏ，“Ｈｏｗ Ｄｏ Ｔｅｔａｎｕｓ ａｎｄ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｔｏｘｉｎｓ Ｂｉｎｄ ｔｏ Ｎｅｕｒｏｎａｌ Ｍｅｍｂｒａｎｅｓ？”ＴＩＢＳ １１：３１４‐３１７（１９８６）、これらの文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。２つの報告（Ｎｉｓｈｉｋｉ ｅｔ ａｌ．，“Ｔｈｅ Ｈｉｇｈ‐Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｂｉｎｄｉｎｇ ｏｆ Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｔｙｐｅ Ｂ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ ｔｏ Ｓｙｎａｐｔｏｔａｇｍｉｎ ＩＩ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ Ｇａｎｇｌｉｏｓｉｄｅｓ G_{T1b}／G_{D1a}，”ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．３７８：２５３‐２５７（１９９６）；Ｄｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｙｎａｐｔｏｔａｇｍｉｎｓ Ｉ ａｎｄ ＩＩ Ｍｅｄｉａｔｅ Ｅｎｔｒｙ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｂ ｉｎｔｏ Ｃｅｌｌｓ，”Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１６２：１２９３‐１３０３（２００３）、これらの文献はその全体を参照として本明細書に援用する）において、シナプトタグミンは可能性のある補助的なＢｏＮＴ／Ｂ受容体候補として同定され、及びシナプトタグミンＩ及びＩＩは、ＢｏＮＴ／Ｇに対する神経細胞性受容体として位置づけられた（Ｒｕｍｍｅｌ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｙｎａｐｔｏｔａｇｍｉｎｓ Ｉ ａｎｄ ＩＩ Ａｃｔ ａｓ Ｎｅｒｖｅ Ｃｅｌｌ Ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｇ，”Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７９：３０８６５‐３０８７０（２００４）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。しかしながら、ボツリヌス神経毒の推定上の受容体結合ドメインにおける構造的類似性にもかかわらず、他の毒素サブタイプは、シナプトタグミンまたはシナプトタグミン関連分子に対して親和性を示さない。脂質ラフト（Ｈｅｒｒｅｒｏｓ ｅｔ ａｌ．，“Ｌｉｐｉｄ Ｒａｆｔｓ Ａｃｔ ａｓ Ｓｐｅｃｉａｌｉｚｅｄ Ｄｏｍａｉｎｓ ｆｏｒ Ｔｅｔａｎｕｓ Ｔｏｘｉｎ Ｂｉｎｄｉｎｇ ａｎｄ Ｉｎｔｅｒｎａｌｉｚａｔｉｏｎ Ｉｎｔｏ Ｎｅｕｒｏｎｓ，”Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｃｅｌｌ １２：２９４７‐２９６０（２００１）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）は、ＴｅＮＴの結合及び神経細胞への内部移行に関与する特殊化したドメインとして位置づけられるが、これらのドメインは複数の細胞型に広く分布しているため、神経細胞に対する毒素の高い特異性を簡単に説明することはできない。

【００４３】

ボツリヌス神経毒は、エネルギー依存的なメカニズムによってシナプス前膜を介して内部移行し（Ｍｏｎｔｅｃｕｃｃｏ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｔｅｔａｎｕｓ ａｎｄ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎｓ，”Ｑ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．２８：４２３‐４７２（１９９５）；Ｍａｔｔｅｏｌｉ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｙｎａｐｔｉｃ Ｖｅｓｉｃｌｅ Ｅｎｄｏｃｙｔｏｓｉｓ Ｍｅｄｉａｔｅｓ ｔｈｅ Ｅｎｔｒｙ ｏｆ Ｔｅｔａｎｕｓ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ ｉｎｔｏ Ｈｉｐｐｏｃａｍｐａｌ Ｎｅｕｒｏｎｓ，”Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：１３３１０‐１３３１５（１９９６）；及びＭｕｋｈｅｒｊｅｅ ｅｔ ａｌ．，“Ｅｎｄｏｃｙｔｏｓｉｓ，”Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｒｅｖ．７７：７５９‐８０３（１９９

７）、これらの文献はその全体を参照として本明細書に援用する）、そして急速に小胞内に出現し、小胞内でそれらは、分解から少なくとも部分的に保護される（Ｄｏｌｌｙ ｅｔ ａｌ．，“Ａｃｃｅｐｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｒｅｓｉｄｅ ｏｎ Ｍｏｔｏｒ Ｎｅｒｖｅ Ｔｅｒｍｉｎａｌｓ ａｎｄ Ｍｅｄｉａｔｅ Ｉｔｓ Ｉｎｔｅｒｎａｌｉｚａｔｉｏｎ，”Ｎａｔｕｒｅ ３０７：４５７‐４６０（１９８４）；Ｃｒｉｔｃｈｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，“Ｆａｔｅ ｏｆ Ｔｅｔａｎｕｓ Ｔｏｘｉｎ Ｂｏｕｎｄ ｔｏ ｔｈｅ Ｓｕｒｆａｃｅ ｏｆ Ｐｒｉｍａｒｙ Ｎｅｕｒｏｎｓ ｉｎ Ｃｕｌｔｕｒｅ：Ｅｖｉｄｅｎｃｅ ｆｏｒ Ｒａｐｉｄ Ｉｎｔｅｒｎａｌｉｚａｔｉｏｎ，”Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１００：１４９９‐１５０７（１９８５）、これらの文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。ＢｏＮＴの軽鎖と重鎖の複合体は、シャペロン様の様式でエンドサイトーシス小胞膜と相互作用し、凝集を防ぎ、滑面小胞体、ミトコンドリア、及び葉緑体のタンパク質透過／輸送チャネルと同様の様式で軽鎖の移行を促進する（Ｋｏｒｉａｚｏｖａ ｅｔ ａｌ．，“Ｔｒａｎｓｌｏｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｌｉｇｈｔ Ｃｈａｉｎ Ｐｒｏｔｅａｓｅ Ｔｈｒｏｕｇｈ ｔｈｅ Ｈｅａｖｙ Ｃｈａｉｎ Ｃｈａｎｎｅｌ，”Ｎａｔ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．１０：１３‐１８（２００３）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。エンドソームの酸性化は、ポア形成を誘導すると考えられており、これにより、鎖間ジスルフィド結合の還元時に細胞質ゾルへの軽鎖の移行が可能になる（Ｈｏｃｈ ｅｔ ａｌ．，“Ｃｈａｎｎｅｌｓ Ｆｏｒｍｅｄ ｂｙ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ，Ｔｅｔａｎｕｓ，ａｎｄ Ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａ Ｔｏｘｉｎｓ ｉｎ Ｐｌａｎａｒ Ｌｉｐｉｄ Ｂｉｌａｙｅｒｓ：Ｒｅｌｅｖａｎｃｅ ｔｏ Ｔｒａｎｓｌｏｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ Ａｃｒｏｓｓ Ｍｅｍｂｒａｎｅｓ，”Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８２：１６９２‐１６９６（１９８５）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。細胞質ゾル内で、軽鎖は、シナプス小胞エキソサイトーシス装置のタンパク質成分に特異的な亜鉛‐エンドペプチダーゼ活性を示す。ＴｅＮＴ及びＢｏＮＴ／Ｂ、／Ｄ、／Ｆ、及び／Ｇは、ＶＡＭＰ／シナプトブレビンを認識する。シナプス小胞膜のこの一体型タンパク質は、各神経毒ごとに異なる単一のペプチド結合部において切断される。ＢｏＮＴ／Ａ、／Ｃ、及び／Ｅは、シナプス前膜のタンパク質であるＳＮＡＰ‐２５をＣ末端内の２つの異なる部位で認識及び切断する。ＢｏＮＴ／Ｃはまた、神経細胞膜の別のタンパク質であるシンタキシンを切断する（Ｍｏｎｔｅｃｕｃｃｏ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｔｅｔａｎｕｓ ａｎｄ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎｓ，”Ｑ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．２８：４２３‐４７２（１９９５）；Ｓｕｔｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｃｒｙｓｔａｌ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ ａ ＳＮＡＲＥ Ｃｏｍｐｌｅｘ Ｉｎｖｏｌｖｅｄ ｉｎ Ｓｙｎａｐｔｉｃ Ｅｘｏｃｙｔｏｓｉｓ ａｔ ２．４Å Ｒｅｓｏｌｕｔｉｏｎ，”Ｎａｔｕｒｅ ３９５：３４７‐３５３（１９９８）、これらの文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。シナプス放出機構の任意の成分の切断は、神経伝達物質放出の阻害をもたらし、最終的に神経筋麻痺を導く。

【００４４】

ボツリヌス神経毒の毒性は、多段階のメカニズムによってもたらされる。ＢｏＮＴは上皮性関門を通過することができ、循環器中で安定である。循環器を出たＢｏＮＴは、主に神経筋接合部のシナプス前膜を標的とし、そこから内部移行し、末梢神経系に対してその毒性効果を直接発揮する（Ｄｏｌｌｙ ｅｔ ａｌ．，“Ａｃｃｅｐｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｒｅｓｉｄｅ ｏｎ Ｍｏｔｏｒ Ｎｅｒｖｅ Ｔｅｒｍｉｎａｌｓ ａｎｄ Ｍｅｄｉａｔｅ Ｉｔｓ Ｉｎｔｅｒｎａｌｉｚａｔｉｏｎ，”Ｎａｔｕｒｅ ３０７：４５７‐４６０（１９８４）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。神経筋接合部の毒性には、ニューロン結合；シナプス小胞リサイクリングに関与するものと同様のエンドサイトーシス小胞への内部移行；毒素のタンパク質分解活性型ＬＣが神経細胞の細胞質に浸透することを可能にする酸性区画内での活性化；及びシナプス小胞エキソサイトーシスのための神経細胞機構における基質の標的認識及び

触媒的切断が関係している。

【００４５】

一実施形態によれば、本発明の融合タンパク質は、クロストリジウム神経毒の生理学的輸送活性を有するが、無毒である。一実施形態では、融合タンパク質は無毒であってもよく、依然として基質切断活性を保持している。基質切断活性を保持していることにより、不活性な薬物担体（例えば、一本鎖抗体の担体）として機能する融合タンパク質の能力を制限してしまう可能性があるが、以下の実施例において考察するように、一本鎖抗体を細胞へ適切に送達するためのマーカーを設けるという追加の利点が得られる。別の実施形態では、融合タンパク質は無毒であり、ＳＮＡＰ‐２５切断活性が残っておらず、したがって、より不活性な薬物担体として機能する。本明細書中に記載する融合タンパク質のこれらの異なる特性は、以下により詳細に議論するように、本発明のプロペプチド融合体への特定のアミノ酸置換及び他の修飾の導入によって達成することができる。

【００４６】

「無毒」とは、融合タンパク質が野生型クロストリジウム神経毒に比べて少なくとも約１０００倍低下した毒性を有することを意味する。特定の例示的な実施形態では、本発明の融合タンパク質のＬＤ５０は、野生型クロストリジウム神経毒のＬＤ５０より少なくとも１，０００倍；２，０００倍；５，０００倍；７，０００倍；９，０００倍；１０，０００倍；２０，０００倍；３０，０００倍；４０，０００倍；５０，０００倍；６０，０００倍；７０，０００倍；８０，０００倍；９０，０００倍；１００，０００倍；または５００，０００倍以上高い。特定の投与様式（後述）はまた、融合タンパク質のＬＤ５０に影響を及ぼし得る。有意な量のそれらのＬＣを神経細胞の細胞質に送達する能力を保持する組換えＢｏＮＴ誘導体は、アミノ酸置換によってその基質切断能力を排除したとしても、ある程度の毒性を保持すると考え得る。ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１の低毒性は、それがＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０（Ｅ２２４Ａ＞Ａ及びＹ３６６＞Ａ変異を含むＢｏＮＴ／Ａタンパク質誘導体）よりも薬物送達用の分子媒体として有用であり得ることを示唆している。ＢｏＮＴ／Ｃは、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１またはａｄ‐０よりも有意に毒性が低い。

【００４７】

ボツリヌス神経毒毒性の原因となるエンドペプチダーゼ活性は、メタロプロテアーゼの特徴である軽鎖中のＨＥｘｘＨｘｘＨ（配列番号５１）モチーフの存在に関連すると考えられている。ＢｏＮＴ／Ａ軽鎖に突然変異を誘発し、続いて対応するｍＲＮＡをジャンボアメフラシ（Ａｐｌｙｓｉａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ）シナプス前コリン作動性ニューロンへマイクロインジェクションすることにより、毒性の原因となる最小必須ドメインを同定した（Ｋｕｒａｚｏｎｏ ｅｔ ａｌ．，“Ｍｉｎｉｍａｌ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｄｏｍａｉｎｓ Ｓｐｅｃｉｆｙｉｎｇ Ｔｏｘｉｃｉｔｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｌｉｇｈｔ Ｃｈａｉｎｓ ｏｆ Ｔｅｔａｎｕｓ Ｔｏｘｉｎ ａｎｄ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｔｙｐｅ Ａ，”Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６７：１４７２１‐１４７２９（１９９２）、前記文献は、その全体を参照として本明細書に援用する）。ＢｏＮＴ／Ａ軽鎖の部位特異的突然変異誘発により、Ｚｎ２＋配位に関与するアミノ酸残基、及びＳＮＡＰ‐２５を切断する活性型メタロエンドペプチダーゼコア構造を特定した（Ｒｉｇｏｎｉ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｉｔｅ‐ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｉｄｅｎｔｉｆｉｅｓ Ａｃｔｉｖｅ‐Ｓｉｔｅ Ｒｅｓｉｄｕｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｌｉｇｈｔ Ｃｈａｉｎ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｔｙｐｅ Ａ，”Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．２８８：１２３１‐１２３７（２００１）、前記文献は、その全体を参照として本明細書に援用する）。ボツリヌス神経毒及びその誘導体の三次元構造により、突然変異誘発の結果を確認し、タンパク質ドメインの空間的構成を詳細に記述した。ＢｏＮＴ／Ａホロトキシンについては、結晶構造が３．３Åの分解能で得られた（Ｌａｃｙ ｅｔ ａｌ．，“Ｃｒｙｓｔａｌ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｔｙｐｅ Ａ ａｎｄ Ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ Ｔｏｘｉｃｉｔｙ，”Ｎａｔ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．５：８９８‐９０２（１９９８）、前記文献は、その全体を参照として本明細書に援用する）。ＢｏＮＴ／Ｂホロトキシン

結晶構造は、１．８及び２．６Åの分解能で測定した（Ｓｗａｍｉｎａｔｈａｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｃａｔａｌｙｔｉｃ ａｎｄ Ｂｉｎｄｉｎｇ Ｓｉｔｅｓ ｏｆ Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｂ，”Ｎａｔ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．７：６９３‐６９９（２０００）、前記文献は、その全体を参照として本明細書に援用する）。近年、ＢｏＮＴ／Ｅ触媒ドメインの結晶構造が２．１Åの分解能で決定された（Ａｇａｒｗａｌ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｔｙｐｅ Ｅ Ｃａｔａｌｙｔｉｃ Ｄｏｍａｉｎ ａｎｄ Ｉｔｓ Ｍｕｔａｎｔ Ｇｌｕ$_{212}$＞Ｇｌｎ Ｒｅｖｅａｌｓ ｔｈｅ Ｐｉｖｏｔａｌ Ｒｏｌｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｇｌｕ$_{212}$ Ｃａｒｂｏｘｙｌａｔｅ ｉｎ ｔｈｅ Ｃａｔａｌｙｔｉｃ Ｐａｔｈｗａｙ，”Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ４３：６６３７‐６６４４（２００４）、前記文献は、その全体を参照として本明細書に援用する）。後の研究は、興味深い複数の構造的詳細を提供し、これはＢｏＮＴ／Ｅ ＬＣ Ｅ$_{212}$＞Ｑ突然変異体におけるメタロエンドプロテオーム活性の完全な消失を説明するのに役立つ。アミノ酸配列とクロストリジウム毒素の生物学的活性との間の関係におけるこの詳細な情報の有効性を利用して、治療を目的に特別に改変した特性を有する改変毒素遺伝子を設計することができる。

【００４８】

本明細書に記載の融合タンパク質の一実施形態において、クロストリジウム神経毒は、ボツリヌス菌神経毒の血清型Ａ（ＢｏＮＴ／Ａ）、血清型Ｂ（ＢｏＮＴ／Ｂ）、血清型Ｃ（ＢｏＮＴ／Ｃ）、血清型Ｄ（ＢｏＮＴ／Ｄ）、血清型Ｅ（ＢｏＮＴ／Ｅ）、血清型Ｆ（ＢｏＮＴ／Ｆ）、血清型Ｇ（ＢｏＮＴ／Ｇ）、または血清型Ｈ（ＢｏＮＴ／Ｈ）である。

【００４９】

本明細書に記載の融合タンパク質において、軽鎖領域のクロストリジウム神経毒は、重鎖領域のクロストリジウム神経毒と同一であっても異なっていてもよい。例えば、融合タンパク質の一実施形態では、軽鎖領域のクロストリジウム神経毒はＢｏＮＴ／Ａの軽鎖領域であり、重鎖領域のクロストリジウム神経毒はＢｏＮＴ／Ａの重鎖領域である。別の非限定的な例において、軽鎖領域はＢｏＮＴ／Ａ由来であり、重鎖領域はＢｏＮＴ／Ｅ由来である。

【００５０】

一実施形態によれば、クロストリジウム神経毒の軽鎖及び重鎖領域は、その野生型の長さから短縮化されていない。言い換えれば、軽鎖領域及び重鎖領域は、その全長が、野生型軽鎖領域及び重鎖領域と同じであるか、またはほとんど同様である。

【００５１】

一実施形態では、融合タンパク質は、軽鎖領域に以下のアミノ酸置換を有する：Ｅ２２４＞Ａ及びＹ３６６＞Ａ、ならびに（ｉ）Ｑ１６２＞Ｙ、Ｌ２５６＞Ｙ、Ｒ２５７＞Ｅ、及びＬ３２２＞Ｅまたは（ｉｉ）Ｑ１６３＞ Ｅ、Ｅ２６３＞Ｌ、及びＬ３２３＞Ｉのいずれか。これらの特定の突然変異は、ＢｏＮＴ／Ａ軽鎖に関するものである。本発明に従って、対応する突然変異をＢｏＮＴの他の血清型に対して設けてもよい。

【００５２】

一実施形態では、融合タンパク質は、軽鎖領域に以下のアミノ酸置換を有する：Ｅ４４６＞Ａ、Ｈ４４９＞Ｇ、Ｙ５９１＞Ａ。これらの特定の突然変異は、ＢｏＮＴ／Ｃ軽鎖に関するものである。本発明に従って、対応する突然変異をＢｏＮＴの他の血清型に対して作成してもよい。

【００５３】

本明細書中で使用する場合、用語「一本鎖抗体」は、単一ポリペプチド上の免疫グロブリン一本鎖可変ドメインを意味し、追加の可変免疫グロブリンドメインと対になることなく、抗原のエピトープに特異的に結合することができる。免疫グロブリン一本鎖可変ドメインの一例として、ラクダ科動物由来の「ＶＨＨドメイン」（または単に「ＶＨＨ」）が挙げられる。免疫グロブリン単一可変ドメインの別の例は、免疫グロブリン単一可変ドメインＶＨ及びＶＬ（ＶＨドメイン及びＶＬドメイン、人工構築物中に一緒に融合した場合）

などの「ドメイン抗体」を含む。
【００５４】
本明細書中で使用する場合、用語「一本鎖抗体」は、追加の可変免疫グロブリンドメインと対形成することなく、抗原のエピトープに特異的に結合することができる免疫グロブリン単一可変ドメインを意味する。免疫グロブリン単一可変ドメインの一例は、ラクダ科動物由来の「ＶＨＨドメイン」（または単に「ＶＨＨ」）を含む。免疫グロブリン単一可変ドメインの別の例として、免疫グロブリン単一可変ドメインＶＨ及びＶＬ（ＶＨドメイン及びＶＬドメイン）などの「ドメイン抗体」が挙げられる。
【００５５】
一本鎖抗体またはその断片は、複数鎖抗体から生成し得るか（Ｓｈｅｅｔｓ ｅｔ ａｌ．，“Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ Ｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ａ Ｌａｒｇｅ Ｎｏｎｉｍｍｕｎｅ Ｐｈａｇｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｌｉｂｒａｒｙ：Ｔｈｅ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｉｇｈ‐Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｈｕｍａｎ Ｓｉｎｇｌｅ‐Ｃｈａｉｎ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｔｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｎｔｉｇｅｎｓ，”ＰＮＡＳ ＵＳＡ ９５（１１）：６１５７‐６１６２（１９９８）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）、またはサメやラクダ科動物のような一本鎖抗体を天然に産生する種に由来し得る（Ｄｕｍｏｕｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｉｎｇｌｅ‐Ｄｏｍａｉｎ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ ｗｉｔｈ Ｈｉｇｈ Ｃｏｎｆｏｒｍａｔｉｏｎａｌ Ｓｔａｂｉｌｉｔｙ，”Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ：Ａ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ １１（３）：５００‐５１５（２００２）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。上記のように、一本鎖抗体の１つのクラスをＶＨＨ抗体と呼び、以下に、より詳細に記載する。
【００５６】
ＶＨＨ、V_{HH}ドメイン、ＶＨＨ抗体フラグメント、及びＶＨＨ抗体としても知られる「ＶＨＨドメイン」は、もともと、「重鎖抗体」の（すなわち、「軽鎖欠損抗体」の）抗原結合免疫グロブリン（可変）ドメインとして記載されていた（Ｈａｍｅｒｓ‐Ｃａｓｔｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｎａｔｕｒａｌｌｙ Ｏｃｃｕｒｒｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｄｅｖｏｉｄ ｏｆ Ｌｉｇｈｔ Ｃｈａｉｎｓ，”Ｎａｔｕｒｅ ３６３：４４６‐４４８（１９９３）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。用語「ＶＨＨドメイン」は、これらの可変ドメインを、従来の４鎖抗体に存在する重鎖可変ドメイン（一般的に「V_Hドメイン」または「ＶＨドメイン」と呼ばれる）、及び従来の４鎖抗体に存在する軽鎖可変ドメイン（一般的に「V_Lドメイン」または「ＶＬドメイン」と呼ばれる）と区別するために選ばれた。ＶＨＨドメインは、追加的な抗原結合ドメインを必要とせずにエピトープに特異的に結合することができる（ＶＨドメインとＶＬドメインが一体となってエピトープを認識する従来の４鎖抗体のＶＨまたはＶＬドメインとは対照的に）。ＶＨＨドメインは、単一の免疫グロブリンドメインによって形成される小型、頑健、及び効率的な抗原認識ユニットである。
【００５７】
ＶＨＨドメインは：ＦＲ１‐ＣＤＲ１‐ＦＲ２‐ＣＤＲ２‐ＦＲ３‐ＣＤＲ３‐ＦＲ４の構造を有し、上記のように、第二の免疫グロブリン可変ドメインの存在を必要とせずにエピトープに特異的に結合する。ＶＨＨドメインのアミノ酸残基は、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｕ．Ｓ． Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．，Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）によって与えられるV_Hドメインの一般的な番号付けに基づいて番号が付与されており、例えば、その全体を参照として本明細書に援用するＲｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｉｎｇｌｅ Ｄｏｍａｉｎ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｏｆ Ｃａｍｅｌ ＶＨ ａｎｄ Ｃａｍｅｌｉｓｅｄ Ｈｕｍａｎ ＶＨ Ｄｏｍａｉｎｓ，”Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２３１：２５‐３８（１９９９）の図２に示すラクダ科動物由来のＶＨＨドメインに対し、この番号付けが適用さ

れる。この番号付けによれば、ＦＲ１は１～３０位のアミノ酸残基を含み、ＣＤＲ１は３１～３５位のアミノ酸残基を含み、ＦＲ２は３６～４９位のアミノ酸を含み、ＣＤＲ２は５０～６５位のアミノ酸残基を含み、ＦＲ３は６６～９４位のアミノ酸残基を含み、ＣＤＲ３は９５～１０２位のアミノ酸残基を含み、ＦＲ４は１０３～１１３位のアミノ酸残基を含む。しかしながら、当該技術分野で周知のように、V_Hドメイン及びＶＨＨドメインについて、ＣＤＲの各々におけるアミノ酸残基の総数は様々に異なる場合があり、Ｋａｂａｔ氏の番号付けによって示されるアミノ酸残基の総数に対応しない場合がある（すなわち、Ｋａｂａｔ氏の番号付けによる１つ以上の位置が実際の配列では存在しないか、またはＫａｂａｔ氏の番号付けによって許容される数より多くのアミノ酸残基を実際の配列が含む場合がある）。これは、一般的に、実際の配列中において、Ｋａｂａｔ氏の番号付けが、アミノ酸残基の実際の番号付けに対応する場合もあるが、対応していない場合もあることを意味している。V_Hドメインのアミノ酸残基に番号付けする別の方法は、ＶＨＨドメインに対する方法と同様にして適用することも可能だが、当該分野で公知である。

【００５８】

ＶＨＨドメイン中のアミノ酸残基の総数は、通常、１１０～１２０、しばしば１１２～１１５の範囲にある。しかしながら、より短い及びより長い配列も、本明細書に記載の目的に適する場合があることに留意すべきである。

【００５９】

ＶＨＨドメイン及びそれを含むポリペプチドのさらなる構造的特徴及び機能的特性は、以下のように要約することができる：ＶＨＨドメイン（これは、本質的に、軽鎖可変ドメインの存在、及びそれとの相互作用を必要とせずに、抗原に機能的に結合するように「設計」されている）は、単一の、比較的小型で機能的な抗原結合構造ユニット、ドメイン、またはポリペプチドとして機能することができる。この点は、ＶＨＨドメインを、従来の４鎖抗体のＶＨ及びＶＬドメインから区別する特徴であり、従来のＶＨ及びＶＬドメインの場合は、それ自体は一般に単一抗原結合タンパク質または免疫グロブリン単一可変ドメインとして実際に作用させるのに適しておらず、何らかの形態で組み合わせて機能的抗原結合ユニットを提供する必要がある（例えば、Ｆａｂフラグメントなどの従来の抗体断片などの形態で）。

【００６０】

これらの独特の性質のために、ＶＨＨドメインを単独またはより大きなポリペプチドの一部として使用することは、従来のＶＨ及びＶＬドメイン、ｓｃＦｖ、または従来の抗体断片（例えば、ＦａｂまたはＦ（ａｂ′）２フラグメント）の使用に比べて多数の有意な利点を提供する：高親和性及び高選択性で抗原に結合するために単一のドメインのみを必要とし、したがって２つの別個のドメインを存在させる必要がなく、これら２つのドメインを適切な立体配座及び立体配置で（すなわち、ｓｃＦｖの場合のように、特別に設計したリンカーの使用を通じて）存在させる必要もなく；ＶＨＨドメインは単一の遺伝子から発現し、翻訳後フォールディングまたは修飾を必要とせず；ＶＨＨドメインは、多価及び多特異性のフォーマットに容易に改変することができ；ＶＨＨドメインは高度に可溶性であり、凝集する傾向はなく；ＶＨＨドメインは、熱、ｐＨ、プロテアーゼ、及び他の変性剤または条件に対して安定であり、したがって冷凍装置を使用せずに、調製、保存または輸送して、コスト、時間及び環境の節約をもたらし得るものであって；ならびにＶＨＨドメインは、製造用に要求されるようなスケールであっても、調製が容易で比較的安価である。例えば、ＶＨＨドメインは、微生物発酵を用いて産生することができ、例えば、従来の抗体断片と同様に哺乳類発現系の使用を必要とせず；ＶＨＨドメインは、従来の４鎖抗体及びその抗原結合断片に比べて比較的小さく（およそ１５ｋＤａ、すなわち従来のＩｇＧに比べて１０分の１である）、したがって、そのような従来の４鎖抗体及びその抗原結合断片よりも、組織への高い浸透を示し、より高い用量で投与でき；ＶＨＨドメインは、いわゆるキャビティ結合特性を示す（とりわけ、従来のＶＨドメインに比べてそのＣＤＲ３ループが拡張されているため）ことができ、したがって、従来の４鎖抗体及びその抗原結合断片がアクセスできない標的及びエピトープにアクセスすることができる。

【００６１】
特定の抗原またはエピトープに結合するＶＨＨドメインを得る方法は、従前にＰＣＴ公開番号ＷＯ２００６／０４０１５３及びＷＯ２００６／１２２７８６に記載されており、これらの文献は参照としてその全体を本明細書に援用する。同様に前記文献に詳細に記載されているように、ラクダ科動物由来のＶＨＨドメインを、ＶＨＨ配列のアミノ酸配列中の１つ以上のアミノ酸残基を、ヒト由来の従来の４鎖抗体由来のＶＨドメイン中の対応する位置に存在する１つ以上のアミノ酸残基で置換することによって「ヒト化」することができる。ヒト化ＶＨＨドメインは、１つ以上の完全ヒトフレームワーク領域配列を含むことができ、さらにより具体的な実施形態では、ＤＰ‐２９、ＤＰ‐４７、ＤＰ‐５１、またはその一部に由来するヒトフレームワーク領域配列を、必要に応じてＪＨ５のようなＪＨ配列と組み合わせて含むことができる。

【００６２】
「Ｄａｂ」、「ドメイン抗体」及び「ｄＡｂ」としても知られる「ドメイン抗体」は、例えば、Ｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．，“Ｂｉｎｄｉｎｇ Ａｃｔｉｖｉｔｉｅｓ ｏｆ ａ Ｒｅｐｅｒｔｏｉｒｅ ｏｆ Ｓｉｎｇｌｅ Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ Ｖａｒｉａｂｌｅ Ｄｏｍａｉｎｓ Ｓｅｃｒｅｔｅｄ ｆｒｏｍ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ，”Ｎａｔｕｒｅ ３４１：５４４‐５４６（１９８９）；Ｈｏｌｔ ｅｔ ａｌ．，“Ｄｏｍａｉｎ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｆｏｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，”ＴＲＥＮＤＳ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２１（１１）：４８４‐４９０（２００３）；及びＰＣＴ公開番号ＷＯ２００３／００２６０９に記載されており；これらの文献のすべては、その全体を参照として本明細書に援用する。

【００６３】
ドメイン抗体は、本質的に、非ラクダ哺乳類のＶＨまたはＶＬドメイン、特にヒト４鎖抗体に対応する。単一の抗原結合ドメインとして、すなわちＶＬまたはＶＨドメインとそれぞれ対合せずにエピトープを結合するために、そのような抗原結合特性に対する特異的選択を、例えばヒト単一ＶＨまたはＶＬドメイン配列のライブラリを用いて行う必要がある。ドメイン抗体は、ＶＨＨのように、およそ１３ｋＤａ～およそ１６ｋＤａの分子量を有し、完全にヒト配列に由来する場合、ヒトにおける治療用途などのためにヒト化する必要がない。ＶＨＨドメインの場合と同様に、それらは原核生物の発現系においてもよく発現し、全体的な製造コストを有意に低減する。

【００６４】
ドメイン抗体及びＶＨＨドメインは、１つ以上のＣＤＲのアミノ酸配列に１つ以上の改変を導入することによって親和性成熟に供することができ、その改変により、得られる免疫グロブリン単一可変ドメインの、それぞれの抗原に対する親和性が、それぞれの親分子に比べて向上する。親和性成熟免疫グロブリン単一可変ドメイン分子は、例えば、参照としてその全体を援用するＪｏｈｎｓｏｎ＆Ｈａｗｋｉｎｓ，Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｍａｔｕｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｕｓｉｎｇ Ｐｈａｇｅ Ｄｉｓｐｌａｙ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ １９９６によって記載されるように、当該技術分野で公知の方法によって調製することができる。

【００６５】
二機能性一本鎖抗体構築物を設計する方法も開発されている（Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．，“Ａ Ｎｏｖｅｌ Ｍｕｌｔｉｖａｌｅｎｔ， Ｓｉｎｇｌｅ‐Ｄｏｍａｉｎ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ＴｃｄＡ ａｎｄ ＴｃｄＢ Ｐｒｅｖｅｎｔｓ Ｆｕｌｍｉｎａｎｔ Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ Ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ｉｎ Ｍｉｃｅ，”Ｊ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．２１０（６）：９６４‐９７２（２０１４）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。本明細書に記載する一本鎖抗体の他のすべての例と同様に、これらの二価一本鎖抗体はまた、本明細書に記載の融合タンパク質において使用する（すなわち、組み込む）ことができる。

【００６６】
ファージディスプレイまたは同様のハイスループット手法によって一本鎖抗体を最適化す

るために開発した方法は、本明細書に記載の融合タンパク質にも適用可能である。
【００６７】
本明細書に記載の融合タンパク質を作製するためのクロストリジウム神経毒の軽鎖領域、クロストリジウム神経毒の重鎖領域、及び一本鎖抗体の融合は、以下に記載の組換え技術に従って行うことができる。
【００６８】
一実施形態では、アミノ酸スペーサー配列は、軽鎖領域と一本鎖抗体との間に位置する。
【００６９】
本明細書に記載する融合タンパク質は、（ｉ）軽鎖及び重鎖の安定性、（ｉｉ）融合タンパク質による神経細胞の特異的ターゲティング、及び（ｉｉｉ）神経細胞質ゾルへの融合タンパク質の送達のために必要とされる構造的立体配座を有するように、クロストリジウム神経毒の軽鎖領域及び重鎖領域を有する。本明細書中で使用する場合、軽鎖及び重鎖の安定性のために必要とされる構造的立体配座を維持するということは、以下の１つ以上を意味している：対応する野生型分子と比較してＬＣまたはＨＣの切断がない、非特異的タンパク質分解に対して二次構造における露出部位がない、ならびに精製及び保存中の変性が最小限に抑えられている。
【００７０】
本明細書中で使用する場合、融合タンパク質による神経細胞の特異的ターゲティングに必要な構造的立体配座を維持すること、及び神経細胞の細胞質への融合タンパク質の送達に必要な構造的立体配座を維持することは、以下の１つ以上を意味する：ジスルフィド結合型ヘテロ二量体の形態にあり、それによってHC_Cドメインが依然として神経細胞に特異的に結合することができる；HC_Nドメインを有し、エンドソーム酸性化後にＬＣ輸送細孔を形成することができる；ならびにＬＣ及びその関連ＶＨＨ積荷がHC_N細孔を通過することができ、そこにおいてＶＨＨが抗原結合のための活性を維持している。
【００７１】
本明細書に記載の融合タンパク質は、抗原結合活性を有する一本鎖抗体を含む。本明細書中で使用する場合、「抗原結合活性」は、融合タンパク質が他のタンパク質または分子よりも高い親和性で抗原に（一本鎖抗体部分で）結合することを意味する。あるいは、「抗原結合活性」は、融合タンパク質が一本鎖抗体に特異的な単一の抗原のみと結合する（一本鎖抗体部分で）ことを意味する。「抗原結合活性」はまた、融合タンパク質が、クロストリジウム神経毒の軽鎖及び重鎖によって細胞に送達された後でもその機能を保持している機能的抗体を含むことを意味し得る。一実施形態において、抗体は、それをクロストリジウム神経毒の軽鎖及び重鎖領域への積荷として細胞に送達した後、細胞から抗体を除去した後に免疫学的試験を行うことによって、機能的または活性であると判定される。
【００７２】
一実施形態によれば、軽鎖領域の上流に位置する一本鎖抗体を含む融合タンパク質はさらに、一本鎖抗体のＮ末端に検出タグ（ＤＴ）を含み、ここで検出タグは、神経細胞の細胞質に対する一本鎖抗体の送達を検出することができる。検出タグの適切な例を以下に述べる。別の実施形態によれば、融合タンパク質は検出タグを含まない。
【００７３】
別の実施形態によれば、軽鎖領域の上流に位置する一本鎖抗体を含む融合タンパク質は、一本鎖抗体のＣ末端にスペーサー配列（ＳＳ）をさらに含み、ここでスペーサー配列は以下に記載する特性を有する。
【００７４】
本発明の別の態様は、本明細書に記載の融合タンパク質を含む治療剤に関する。一実施形態では、融合タンパク質を、薬学的に許容可能な担体とともに提供する。
【００７５】
一実施形態によれば、一本鎖抗体は、野生型ボツリヌス菌神経毒の軽鎖に対して特異的である。本実施形態によれば、治療剤は、野生型ボツリヌス菌神経毒の軽鎖が神経細胞の細胞質に浸透した後に解毒活性を発揮し、それによって解毒活性を発揮するための曝露後の

時間ウィンドウを拡大することができる。クロストリジウム神経毒に対するこれらのタイプの有効な解毒剤を開発するには、毒素の輸送に重要な構造的特徴の保存が必要である。実用的な観点からは、これは、天然の毒素の構造的特徴及び毒性を保持する組換え分子を最初に産生し、次いで選択的修飾によって毒性を排除し、及び治療的有用性を導入することによって最も容易に達成される。

【００７６】

一実施形態では、解毒剤は、野生型クロストリジウム神経毒の生理活性を有し、その活性には、経細胞輸送及び細胞内輸送、ならびに細胞認識が含まれるが、必ずしもこれらに限定するものではない。

【００７７】

無毒性神経毒は、クロストリジウム神経毒中毒の候補解毒剤として検討することができる。融合タンパク質は、本明細書に記載の方法で造成した上記の無毒性誘導体を用いて作製する。非経口投与経路を最初に試験し、続いて適用可能な経口経路及び吸入経路を評価する。解毒剤としての有用性は、マウス横隔神経平滑筋における神経筋遮断を防止するか、またはそれぞれの血清型の細胞内基質の神経細胞培養中における切断を阻害する神経毒性誘導体の能力を試験することによってｉｎ　ｖｉｔｒｏで評価することができる。上記の無毒性誘導体を用いて作製する融合タンパク質は、現在利用可能な抗体に基づく解毒剤より優れている場合があり、なぜならばそれらは、天然の毒素吸収及び輸送経路を効果的に模倣しており、したがって従来の抗体であれば効果的に毒素を標的化できない毒物投与された神経細胞内において野生型神経毒を隔離した後に有効であることが可能なためである。ｉｎ　ｖｉｖｏでの解毒剤の有効性は、複数の投薬レジメンを用いて評価することができる。毒素と同時に投与した場合に有効であることが判明した神経毒誘導体について、危機状況下での解毒剤の使用に関連する追加の投薬量及びタイミングパラメータをさらに評価する。これらの手順を用いて、一連の無毒性誘導体及び融合タンパク質を作製し、それらの生物学的活性を体系的にカタログ化する。これらの十分に特徴付けた構築物及び毒素誘導体の有効性により、新規抗クロストリジウム神経毒治療剤の合理的な設計が可能になる。用量応答分析及び活性神経毒に対するチャレンジ試験によって、さらなる開発のための最良の候補解毒薬の選択を可能にするデータが得られる。

【００７８】

本発明のさらなる態様は、クロストリジウム神経毒の毒性作用に対する対象の治療方法に関する。本方法は、クロストリジウム神経毒の毒性作用に対して対象を治療するのに有効な条件下で、本明細書に記載の治療剤を対象に投与することを含む。

【００７９】

本明細書中に記載する本方法及び他の方法の実施に際して、投与は、経口、非経口、例えば、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、腹腔内、鼻腔内滴下によって、または鼻、咽喉、及び気管支などの粘膜への塗布によって実行する。融合タンパク質（または治療剤）は、単独で、または適切な薬学的担体と共に投与してもよく、錠剤、カプセル剤、散剤、液剤、懸濁剤、または乳剤などの固体または液体形態であり得る。

【００８０】

融合タンパク質（または治療剤）は、例えば、不活性希釈剤または吸収可能な食用担体と共に経口投与されてもよく、または硬質または軟質シェルカプセルに封入してもよく、または錠剤に圧縮してもよく、または食品に直接組み込んでもよい。経口治療投与のために、神経毒（任意の積荷と一緒に）を賦形剤とともに含ませ、錠剤、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップなどの形態で使用してもよい。そのような組成物及び調製物は、少なくとも０．００１％の活性化合物を含有すべきである。これらの組成物中の化合物の割合は、もちろん様々に異なっていてもよく、好都合にはユニットの重量の約０．０１％～約１０％の間であってもよい。そのような治療的に有用な組成物中の活性化合物の量は、適切な投与量が得られるような量である。一実施形態では、経口用量単位が約１μｇ～１ｇの活性化合物を含有するように組成物を調製する。

【００８１】

錠剤、カプセルなどはまた、トラガントガム、アカシア、コーンスターチ、またはゼラチンなどの結合剤；リン酸二カルシウムのような賦形剤；コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸などの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤；及びスクロース、ラクトース、またはサッカリンのような甘味料を含有する。単位剤形がカプセルである場合、それは、上記のタイプの物質に加えて、脂肪油のような液体担体を含有してもよい。

【００８２】

コーティングとして、または単位剤形の物理的形態を変更するために、様々な他の物質が存在してもよい。例えば、錠剤はシェラック、砂糖、またはその両方でコーティングしてもよい。シロップは、活性成分に加えて、甘味料としてスクロース、防腐剤としてメチル及びプロピルパラベン、色素、ならびにチェリーまたはオレンジフレーバーのような香味料を含んでいてもよい。

【００８３】

融合タンパク質（または治療剤）は、非経口的に投与してもよい。水中でヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合して、溶液または懸濁液を調製することができる。グリセロール、液体ポリエチレングリコール、及びそれらの油中混合物中において、分散液を調製することもできる。油の例として、動物、植物、または合成由来の石油、例えば、ピーナッツ油、ダイズ油、または鉱油が挙げられる。一般的に、水、生理食塩水、水性デキストロース及び関連する糖溶液、ならびに以下のようなグリコール類、例えばプロピレングリコール、ヒアルロナン及びその誘導体、カルボキシメチルセルロース及び他の可溶性多糖誘導体、またはポリエチレングリコールなどは、特に注射剤のための好ましい液体担体である。貯蔵及び使用に関する通常の条件下でこれらの調製物は保存剤を含有し、これらの調製物を無菌条件下で製造しない場合でも、微生物の増殖を防ぐ。

【００８４】

注入用途に適した剤形として、滅菌水溶液または分散液、及び滅菌注入溶液または分散液の即時調製用の滅菌粉末が挙げられる。この剤形は、無菌である必要があり、また、容易に注入可能な程度には流動的である必要がある。この剤形は、製造及び貯蔵条件下で安定である必要があり、細菌及び真菌のなどの微生物の汚染作用から保護する必要がある。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール）、それらの適切な混合物、及び植物油を含む溶媒または分散媒であり得る。

【００８５】

融合タンパク質（または治療剤）は、エアロゾルの形態で気道に直接投与してもよい。エアロゾルとして使用するために、溶液または懸濁液中の融合タンパク質（または治療剤）を、適切な噴射剤、例えば、プロパン、ブタンまたはイソブタンなどの炭化水素噴射剤、ならびに通常のアジュバントとともに加圧エアロゾル容器にパッケージングしてもよい。融合タンパク質（または治療剤）はまた、ネブライザーまたは噴霧器のような非加圧形態で投与してもよい。

【００８６】

ＢｏＮＴは、破壊されることなく、または局所毒性を引き起こすことなく、上皮表面を通過する。上皮の通過は、特異的結合及びトランスサイトーシスによって起こると考えられている。インタクトなＢｏＮＴ／Ａが、肺上皮を通過してタンパク質分解性不活性化に耐える能力を有することを、ラット初代肺胞上皮細胞及び不死化ヒト肺腺癌（Ｃａｌｕ‐３）細胞において示した。輸送速度は、基底‐頂端方向よりも頂端‐基底方向でより速く、血清型特異的毒素抗体によってブロックされた（Ｐａｒｋ ｅｔ ａｌ．，“Ｉｎｈａｌａｔｉｏｎａｌ Ｐｏｉｓｏｎｉｎｇ ｂｙ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｔｏｘｉｎ ａｎｄ Ｉｎｈａｌａｔｉｏｎ Ｖａｃｃｉｎａｔｉｏｎ ｗｉｔｈ Ｉｔｓ Ｈｅａｖｙ‐Ｃｈａｉｎ Ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ，”Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．７１：１１４７‐１１５４（２００３）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。

【００８７】

中枢神経系（「ＣＮＳ」）を標的とするためには、髄腔内または脳室内投与が必要である場合がある。投与はＣＮＳに直接行ってもよい。あるいは、ＣＮＳへの投与は、末梢神経細胞（運動ニューロン、侵害受容器）から脊髄神経節への逆行性輸送を伴い得る（Ｃａｌｅｏ ｅｔ ａｌ．，“Ａ Ｒｅａｐｐｒａｉｓａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ｃｅｎｔｒａｌ Ｅｆｆｅｃｔｓ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｔｙｐｅ Ａ：Ｂｙ Ｗｈａｔ Ｍｅｃｈａｎｉｓｍ？”Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ １０９：１５‐２４（２００９）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。

【００８８】

一実施形態では、例えば併用療法として、融合タンパク質（または治療剤）を用いて、野生型クロストリジウム神経毒（例えば、ＢＯＴＯＸ（登録商標））の内在性医薬活性を増大させることができる。

【００８９】

ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０ ＶＨＨ（以下に記載）を用いる場合、融合タンパク質のＶＨＨ部分とＳＮＡＰ‐２５切断活性は、相乗効果を発揮し得る。

【００９０】

融合タンパク質（または治療剤）を、薬学的に許容可能な水溶性ポリマー部分との複合体として投与することができる。一例として、ポリエチレングリコール複合体は、治療化合物の循環半減期を延長し、分子の免疫原性を低下させるのに有用である。特異的ＰＥＧ複合体は、Ｄａｕｇｓらの米国特許出願公開第２００６／００７４２００号に記載されており、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する。機能性に影響を及ぼす他の物質として、例えば、Ｔａｙｌｏｒの米国特許第７，８７９，３４１号及びＢｌａｎｄａらの米国特許出願公開第２０１２／０１４１５３２号に記載されているようなヒアルロン酸（「ＨＡ」）が挙げられ、これらの各々はその全体を参照として本明細書に援用する。リポソーム封入製剤をはじめとする液体剤形の例として、注入用溶液及び懸濁液が挙げられる。固体剤形の例として、カプセル、錠剤、及び制御放出剤形、例えばミニ浸透圧ポンプまたはインプラントが挙げられる。例えば、その全体を参照として本明細書に援用するＡｎｓｅｌ＆Ｐｏｐｏｖｉｃｈ，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ ａｎｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ，５ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｌｅａ＆Ｆｅｂｉｇｅｒ １９９０），Ｇｅｎｎａｒｏ（ｅｄ．）；Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１９ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ １９９５）；及びＲａｎａｄｅ＆Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒ，Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ（ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ １９９６）に示されるように、当業者は他の剤形を考案することができる。

【００９１】

一実施形態では、対象の治療は、投与する前に治療が必要な対象を選択することをさらに含む。

【００９２】

本明細書に記載の方法による治療対象の対象として、ヒト及び非ヒト霊長類、またはイヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、もしくはげっ歯類（例えば、マウスまたはラット）が挙げられる。

【００９３】

特定の症状の治療を標的とするために開発された一本鎖抗体が知られており、例えば、ハンチントン病治療用のハンチントン・プロテイン、パーキンソン病治療用のシヌクレイン、悪性ニューロンのアップレギュレートされた細胞分裂遺伝子、非悪性型神経症におけるアップレギュレートされた遺伝子、アルツハイマー病においてアミロイド原線維の過剰蓄積を引き起こす遺伝子、潜伏性神経栄養性（ｎｅｕｒｏｔｒｏｐｈｉｃ）ウイルス種、帯状疱疹の発症時に活性化するヘルペスウイルス、プリオン病、神経障害性疼痛（疼痛経路をダウンレギュレートする）、及び慢性疼痛の誘導物質を標的とする一本鎖抗体が挙げられる。これらの一本鎖抗体の治療標的は神経細胞の内部にあり、本発明の背景技術（前出）に記載するように、治療環境における一本鎖抗体の細胞内部への非ウイルス性送達には

限界があった。本明細書に記載する治療方法は、これらの欠点を克服し、一本鎖抗体をクロストリジウム神経毒誘導体に融合し、それによって一本鎖抗体を神経細胞に誘導し、内部移行したエンドソームから細胞質内部へ移行させることによって、機能的一本鎖抗体を神経細胞の細胞質に露出する標的へ送達する。

【００９４】

本発明のさらなる態様は、プロペプチド融合体に関する。プロペプチド融合体は、クロストリジウム神経毒の軽鎖領域及びクロストリジウム神経毒の重鎖領域を含む。軽鎖及び重鎖領域は、ジスルフィド結合によって連結している。中間領域は、軽鎖及び重鎖領域を連結し、高特異性プロテアーゼ切断部位を含む。高特異性プロテアーゼ切断部位は、高特異性プロテアーゼが認識して切断できる３つ以上の特異的な隣接するアミノ酸残基を有する。一本鎖抗体は軽鎖領域の上流に位置する。一本鎖抗体は、抗原結合活性を有する。

【００９５】

ＢｏＮＴ／Ａプロペプチドは、Ｃｙｓ４２９とＣｙｓ４５３の間のジスルフィド結合によって連結した２つの鎖、すなわちＭｒ約５０，０００の軽鎖及びＭｒ約１００，０００の重鎖を有する。野生型ＢｏＮＴ／Ａプロペプチドは、下記のＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＡＢＰ４８１０６（配列番号５２）に記載のアミノ酸配列を有する：

MPFVNKQFNY KDPVNGVDIA YIKIPNAGQM QPVKAFKIHN KIWVIPERDT FTNPEEGDLN
PPPEAKQVPV SYYDSTYLST DNEKDNYLKG VTKLFERIYS TDLGRMLLTS IVRGIPFWGG
STIDTELKVI DTNCINVIQP DGSYRSEELN LVIIGPSADI IQFECKSFGH EVLNLTRNGY
GSTQYIRFSP DFTFGFEESL EVDTNPLLGA GKFATDPAVT LAHELIHAGH RLYGIAINPN
RVFKVNTNAY YEMSGLEVSF EELRTFGGHD AKFIDSLQEN EFRLYYYNKF KDIASTLNKA
KSIVGTTASL QYMKNVFKEK YLLSEDTSGK FSVDKLKFDK LYKMLTEIYT EDNFVKFFKV
LNRKTYLNFD KAVFKINIVP KVNYTIYDGF NLRNTNLAAN FNGQNTEINN MNFTKLKNFT
GLFEFYKLLC VRGIITSKTK SLDKGYNKAL NDLCIKVNNW DLFFSPSEDN FTNDLNKGEE
ITSDTNIEAA EENISLDLIQ QYYLTFNFDN EPENISIENL SSDIIGQLEL MPNIERFPNG
KKYELDKYTM FHYLRAQEFE HGKSRIALTN SVNEALLNPS RVYTFFSSDY VKKVNKATEA
AMFLGWVEQL VYDFTDETSE VSTTDKIADI TIIIPYIGPA LNIGNMLYKD DFVGALIFSG
AVILLEFIPE IAIPVLGTFA LVSYIANKVL TVQTIDNALS KRNEKWDEVY KYIVTNWLAK
VNTQIDLIRK KMKEALENQA EATKAIINYQ YNQYTEEEKN NINFNIDDLS SKLNESINKA
MININKFLNQ CSVSYLMNSM IPYGVKRLED FDASLKDALL KYIYDNRGTL IGQVDRLKDK
VNNTLSTDIP FQLSKYVDNQ RLLSTFTEYI KNIINTSILN LRYESNHLID LSRYASKINI
GSKVNFDPID KNQIQLFNLE SSKIEVILKN AIVYNSMYEN FSTSFWIRIP KYFNSISLNN
EYTIINCMEN NSGWKVSLNY GEIIWTLQDT QEIKQRVVFK YSQMINISDY INRWIFVTIT
NNRLNNSKIY INGRLIDQKP ISNLGNIHAS NNIMFKLDGC RDTHRYIWIK YFNLFDKELN
EKEIKDLYDN QSNSGILKDF WGDYLQYDKP YYMLNLYDPN KYVDVNNVGI RGYMYLKGPR
GSVMTTNIYL NSSLYRGTKF IIKKYASGNK DNIVRNNDRV YINVVVKNKE YRLATNASQA
GVEKILSALE IPDVGNLSQV VVMKSKNDQG ITNKCKMNLQ DNNGNDIGFI GFHQFNNIAK
LVASNWYNRQ IERSSRTLGC SWEFIPVDDG WGERPL

。

【００９６】

ＢｏＮＴ／Ｂプロペプチドは、下記のＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｘ７１３４３．１（配列番

号５３）に記載のアミノ酸配列を有する：

MVTNNNYNDD NDNMMARGTG RYYKAKTDRW RYTGYKDNKS SGNRDVCYYD
DYNTNDKKNT KNRKSKGKMN GYGDRRVNTN ASVTVNKSNG VRKKGANGGV
NNTDGNHASR GGGMMKCYVS VNNVNKGASN RRGYSDAMHH VHGYGKVDDV
NKKMSTDTAY TGGDSSSTDK SYDKVNRGVD RNKVVCSDNN NYKNKKDKYK
VDSGKYSDVS NKYKSMGTNA NYKKTRASYS DSVKKNDNYT GNSDKNMGKY
RGNKANKAYS KHAVYKMCKS VKVGCDVDNN ADKNSSDDSK NRVYNTNNYG
NDNDTDSKSN TSTDNVDVVY KAKKVTDNTY YSTNRDSTSS DDAVSSKVYS
SMDYKTANKV VAGAGWVKVD DVANKSSTMD KADSVYGANV GDTAKGNSAA
GSSVVGVSYD NKNKKTDNAT KRVKWDMYGV AWSTVNTYTK GMYKANYAAK
YKYNYSKSNN NNDNSKNDGN AMDNNDNCSV SYMKKMAVKK DDNTKKNNYD
NKYGSVDKSK VDKYKTDSTY SNKNKYNSNN NRYRDNNDSG YGAKVVYDGV
KNDKNKTSSA DSKRVTNNNS MDSVSWRKYR NDDNYHNYTN CMKNNSGWKS
RGNRWTDNGK TKSVYNRDSY NRWVTTNNDN AKYNGTSNMD KDGVVNGTKD
GDVDRTWMKY SNTNSNKYKS YSYKDWGNMY NKYYMNAGNK NSYKVKDSSV
GRSKYNNSNY NYRNYGKRRS NSSNDDVRKD YHDVHHWRVY AYKYKKSSDS
NYKTKYDSYS CKKDSTDDGG HRYSGVRKKY KDYCSKWYKV KRKYKSNGCN
WKDGWT

。

【００９７】

ＢｏＮＴ／Ｃプロペプチド（具体的には、ＢｏＮＴ血清型Ｃ１、本明細書においてはＢｏＮＴ／Ｃと呼ぶ）は、下記のＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＢＡＭ６５６９１．１（配列番号５４）に記載のアミノ酸配列を有する：

MPITINNFNYSDPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNPNLNKPPRVTSPKSG
YYDPNYLSTDSDKDTFLKEIIKLFKRINSREIGEELIYRLSTDIPFPGNNNTPINTFDFDVDFNSVDVKT
RQGNNWVKTGSINPSVIITGPRENIIDPETSTFKLTNNTFAAQEGFGALSIISISPRFMLTYSNATNDVG
EGRFSKSEFCMDPILILMH**E**LN**H**AMHNLYGIAIPNDQTISSVTSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPTIDL
IPKSARKYFEEKALDYYRSIAKRLNSITTANPSSFNKYIGEYKQKLIRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVEL
YNELTQIFTEFNYAKIYNVQNRKI**Y**LSNVYTPVTANILDDNVYDIQNGFNIPKSNLNVLFMGQNLSRNPA
LRKVNPENMLYLFTKFCHKAIDGRSLYNKTLDCRELLVKNTDLPFIGDISDVKTDIFLRKDINEETEVIY
YPDNVSVDQVILSKNTSEHGQLDLLYPSIDSESEILPGENQVFYDNRTQNVDYLNSYYYLESQKLSDNVE
DFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFPTLANKVNAGVQGGLFLMWANDVVEDFTTNILRKDTLDKISDVSAIIP
YIGPALNISNSVRRGNFTEAFAVTGVTILLEAFPEFTIPALGAFVIYSKVQERNEIIKTIDNCLEQRIKR
WKDSYEWMMGTWLSRIITQFNNISYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDV
KISEAMNNINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNIILVGEVDKLKAKVNNSF
QNTIPFNIFSYTNNSLLKDIINEYFNNINDSKILSLQNRKNTLVDTSGYNAEVSEEGDVQLNPIFPFDFK
LGSSGEDRGKVIVTQNENIVYNSMYESFSISFWIRINKWVSNLPGYTIIDSVKNNSGWSIGIISNFLVFT
LKQNEDSEQSINFSYDISNNAPGYNKWFFVTVTNNMMGNMKIYINGKLIDTIKVKELTGINFSKTITFEI
NKIPDTGLITSDSDNINMWIRDFYIFAKELDGKDINILFNSLQYTNVVKDYWGNDLRYNKEYYMVNIDYL
NRYMYANSRQIVFNTRRNNNDFNEGYKIIIKRIRGNTNDTRVRGGDILYFDMTINNKAYNLFMKNETMYA
DNHSTEDIYAIGLREQTKDINDNIIFQIQPMNNTYYYASQIFKSNFNGENISGICSIGTYRFRLGGDWYR
HNYLVPTVKQGNYASLLESTSTHWGFVPVSE

【００９８】

ＢｏＮＴ／Ｄプロペプチドは、下記のＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ‐Ｐｒｏｔ：Ｐ１９３２１．１（配列番号５５）に記載のアミノ酸配列を有する：

MTWVKDNYSD VNDNDYRNKT TVKAMTNWVR SSDTNSSKRT SKYSYYDSYS 50
TDKDTKGKKR NRDGKKNYVV GSMGDSSTDT DTRHTTNAVK NGSWKVTNTS 100
VGNDYTASTG SNSGGTSKVA TSDVTSNSSA VGKSCMDVAM HTHSHYGNSD 150
KRRVSGSDGN VYTGGDVRSR KAGHYKDAKR NNNKTSSWSN DKYKKSKYND 200
KDNTGNVVND KNSYSDTNVM SVVYSSYNVK NRTHYSRHYV ANDDNYTRDG 250
NTNKGNNSGN RNAKSSSVVD TKVCRTKNSR DDSTCKVKNN RYVADKDSSN 300
KTDTNVNYSD KSDSDGVNVD NVNMNGVYDD TKYVDYNSYY YSKSNNVNTT 350
TSVAGYSNKY TSAKVNKGVA GNWANVVDTT NMKKDTDKSD VSVYGANGNS 400
ARGNNAATAG VAGTAGVTYS SRKKTNCRVK RWKDSYWMVS NWSRTTNHNY 450
MYDSSYADAK AKDYKKYSGS DKNKSVNKNS DVKSAMNNNK RCSVTYKNMK 500
VDNKDRTKTN DSHNVGVDRK AKVNSNTMNS YTNNSKDNYN SNDSKSNKKN 550
AVDTSGYNAV RVGDNVNTYT NDKSSSGDKV NNNNYSAYNS SVSWKSKDTN 600
SHNYTNSNSG WKCRNGNWDV NRKYKSDYSS SHTGYTNKWV TTNNMGYMKY 650
NGKSKDDVKD KTVGDNDNMW RDNSKSNDNV YGRNVKDYWG NKDTYYNDNY 700
DRYASNVVVY DRSKYTGNTK SVSDKNYSRN GDNHMYNSRK YMRDTDTYAT 750
GGCSNCVYAK SNGNYGGSKN VSKNKYCSSS RNTMADYKWR SKNAYTVAVT 800
NYTKSTSSWK SRDGWV 816

。

【００９９】

ＢｏＮＴ／Ｅプロペプチドは、下記のＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＧＱ２４４３１４．１（配列番号５６）に記載のアミノ酸配列を有する：

MKNSNYNDVN DRTYKGGCYK SNMKNWRNVG TTDHTSKNGD SSYYDNYSDK
DRKVTKNRNN NSGGSKANYG NDNTDNHGDA SAVKSNGSDN VMGADTNSSN
SRNNYMSNHG GSAVTSYSRN DNSMNDATMH HSHGYGAKGT TKYTTKNTNR
GTNTGGTDNT SASNDYTNAD YKKASKSKVV SNNYKDVAKY GDKDASGYSV
NNKNDKKYST DATKVKCRTY GYKYKSNNDS YNSGYNNNKV NRGNANNRTT
GRGVKKRCKN VSVKGRKSCN NGVASNSYND DNNTKDDTVT SNNNYNDDVN
NSSAGSDKNT NDAYKYDSNG TSDHDVNNVY DAKVGNNVNT SSDTAKYTSS
NNVNKVAAVS WVVDTTANKS TVDKADSVVY GANGNAKGNK DAGAGTVTKS
GSSDNKNKVK ANNAKRDKWK VYSVSNWMTK NTNKRKMYAN VNAKTSKYNS
YTKNTNKYDK NNKVSAMNND RTSSSYMKNV KNKRYDNVKT YNYHGSGSNS
MVTDTNNSKS SYTDDKSYNK KRKSSSVNMR YKNDKYVDTS GYDSNNNGDV
YKYTNKNGYN DKSVNSNDYY DNKYKNSSWV RNYDNKVNVN NYTNCMRDNN
SGWKVSNHNW TDNAGNKANY GNANGSDYNK WVTTNDRGDS KYNGNDKSNG
NHVSDNKVNC SYTRYGRYND KDTTYSNNTN KDWGNYYDKY YNVKNNDRRK
DSTSNNRSTA NRYSGKVKRV NNSSTNDNVR KNDVYNVASK THYADTATTN
KKTKSSSGNR NVVVMNSVGN NCTMNKNNNG NNGGKADTVV ASTWYYTHMR
DHTNSNGCWN SHGWK

。

【０１００】

ＢｏＮＴ／Ｆプロペプチドは、下記のＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｘ８１７１４．１（配列番号５７）に記載のアミノ酸配列を有する：

MVVNSNYNDV NDDTYMYKSK KYYKAMRNVW RNTGTDSDDA SNGSSAYYDN
YTTDAKDRYK TTKKRNSNAG VSYAKYGNHT NHVTRTTSVN KSSTNVKSSN
VGAGDNSSYV RKMDSGGVYD SNDGGSNVTS YYTNDSGGYN SSTSADASAH
HAHGYGARGV TYKTKVKAMA KRTGGDNTSA MKKYNNANYK ATRSRVNSAY
DNYKDYWKYG DKNADGSYTV NNKNYKKYST DANKKVKCRN TYKYGKVNDD
DYTVSGNGNA VNNRGNKNKD SDKGVKVKCK SVRKGTKARC RVNNRVASSS
YNNDNTKDDT TNNNNYRNND VDYNSTSNTN TVDDSYVRYD SNGTSHNVVD
NVYHAKVGTN STSSDTASSV YTSSNTNKVH AASWNVRDTT ATKSTDKADS
VVYVGANGNV KNKAGAGVTV TKSGSSNKNK KANNSMRTKW KYSWVSNWTR
NTNKRKMYAN VDAKTVYKYN NYTSDRNRSY NNNRNKKVSA MNRTSSYMKN
AKVSKRYDGV KYDYSHRSGN SVNDVTSTNN SSSYTNDKYN KYKKKDNSDM
RYNNKDSGYG SNSNGDVYYS TNRNGYSSKS VNANNDYNGR YNSSWVRKYN
KVNNNYTDCR NNNSGWKSNY NKWTDTAGNN KVNYTMSSDY NKWVTTNNRG
NSRYNGNDKS SNGDHVSDNK VGCNDTRYVG RYKVDTGKTT YSDDSKDWGN
YYNKRYYNRT DKSTNSNNNR GVYKNSNTRY TGVVRKNGST DSNTDNVRKN
DAYNVVDRDV YRYADSAKKK RTSNSNNSGV MDSGNNCTMN NNNGGNGGHS
NNVASSWYYN NRKNTSSNGC WSSKHGWN

。

【０１０１】

ＢｏＮＴ／Ｇプロペプチドは、下記のＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｘ７４１６２．１（配列番号５８）に記載のアミノ酸配列を有する：

MVNKXNYNDN NDDMMNDGGT YYKARDRWVR TYGDNASTGV SKDVYYYDTY
KTDAKDKKTM KNRNSKSGRD MVDAYGNAST DKAANVANVS NKKGADKGMT
NGGVSDNTDS MMNGHSSGGA RMMRCSCNVN NVNKDTSSRR AYADATMHHV
HGYGKSNTNT KMHSDVAYTG GHDSVSSTDM NYNKANDANR NVSSAGSGDS
YKYKNKYDVD NGKYSVDKDK DKYKAMGTTN AGYGKTRYSY SYKTKDNTYT
NGNASKNKTN GNKAVNKAYS HVYRAMCKVM YKNTGKSCVN NDANKDSSKD
AKATAYNTNN TNNSDDNDSS GDNNTTNDDD VYKSAKKVDG DSYHATSNNT
NSNDARNNNK VYTSTNVKAN TVVGASVNWV KGVDDTSSTK STDKVSDVSY
GANVGNTAKN KNAGGAAMVV GTSYVGNKGH MTSNAKKRDK WTDMYGVSWS
TVNTYTKRMY NANNSAKDYN RYSDKMNNDN DDKNSNANND DNCSSYMNRM
AVKKKDDDNK RDYDTNYDVN KSKVNRHKDS DSYTKDTVNN YSNSSNASSY
RGGRDSSGYG ATMNVGSDVN DGNGKNNSNS NTAHSKVVYD SMDNSNWVRT
KYNNNDTYNY TSCKNDSGWK VSKGNRWTDV NAKSKSYSKD NSDYNKWSTT
NDRGNANYNG SKKSKNDRNS SNDDKNCTDT TKVWKDNGRN ATVSSYWSST
NTKDWGNRYD TYYNGMNYKY SKASMGTART NNNAANYNYG RKKASNSRNN
NDNVRGDYYN DNSDSYRVYV VNSKTANDDT YDVKKYYKTT YNCCKDTKTG
GGKVKDYGYV WDTYDNYCSW YRRSNNKRGC NWVDGWT

。

【０１０２】

８つのＢｏＮＴ血清型のすべてのプロペプチドは、ジスルフィド結合によって連結した軽鎖領域及び重鎖領域を有する。一つが軽鎖のＣ末端に隣接し、もう一つが重鎖のＮ末端に隣接する２つのシステイン（Ｃｙｓ）残基は、すべてのＢｏＮＴ血清型に存在する。これらの２つのＣｙｓ残基は、成熟神経毒においてＨＣ及びＬＣポリペプチドをともに保持する単一のジスルフィド結合を形成する。このジスルフィド結合によって、ＨＣ及びＬＣはそれらのそれぞれの生物学的役割を協調して実行することができ、それによって成熟神経毒はその天然の生理活性を発揮することができる。中間領域（すなわち、ＢｏＮＴ／Ａの
Ｌｙｓ４３８～Ｌｙｓ４４８：
KTKSLDKGYNK (配列番号:59)

は、野生型ＢｏＮＴ／Ａの成熟の過程で排除されるアミノ酸であり、宿主微生物の内在性プロテアーゼによって切除されると考えられる。この切断事象により、生物学的に活性なＢｏＮＴ／Ａ ＨＣ‐ＬＣ二量体が生成する。

【０１０３】

８つすべてのＢｏＮＴ血清型はまた、中間領域にＬｙｓまたはＡｒｇ残基を含み、これらの残基によって、プロペプチドはトリプシンによる活性化に対して感受性になる。早期の微生物培養物から回収した天然ＢｏＮＴ／Ａプロペプチドは、トリプシン分解によって活性化することができ、それとともにインタクトなＳ‐Ｓ結合軽鎖及び重鎖を産生する。プロペプチドには複数の追加的なトリプシン感受性部位が存在するが、それらは天然の毒素分子内のそれらの空間的位置が原因でタンパク質分解に対して耐性である（Ｄｅｋｌｅｖａ ｅｔ ａｌ．，“Ｎｉｃｋｉｎｇ ｏｆ Ｓｉｎｇｌｅ Ｃｈａｉｎ Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｔｙｐｅ Ａ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ ｂｙ ａｎ Ｅｎｄｏｇｅｎｏｕｓ Ｐｒｏｔｅａｓｅ，”Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ

ｕｎ．１６２：７６７‐７７２（１９８９）；Ｌａｃｙ ｅｔ ａｌ．，“Ｃｒｙｓｔａｌ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｔｙｐｅ Ａ ａｎｄ Ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ Ｔｏｘｉｃｉｔｙ，”Ｎａｔ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．５：８９８‐９０２（１９９８）、これらの文献は、その全体を参照として本明細書に援用する）。いくつかのＢｏＮＴ血清型の天然プロペプチドの第二の部位は、より高い酵素濃度またはインキュベーション時間に供した場合にはトリプシン切断に対して感受性になり得る（Ｃｈａｄｄｏｃｋ ｅｔ ａｌ．，“Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ａｎｄ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｃａｔａｌｙｔｉｃａｌｌｙ Ａｃｔｉｖｅ，Ｎｏｎ‐Ｔｏｘｉｃ Ｅｎｄｏｐｅｐｔｉｄａｓｅ Ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ ｏｆ Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｔｏｘｉｎ Ｔｙｐｅ Ａ，”Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒ．Ｐｕｒｉｆ．２５：２１９‐２２８（２００２）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。このトリプシン感受性部位は、毒素受容体結合ドメインに隣接する領域に位置する。３次元結晶構造の情報が利用可能なＢｏＮＴ血清型において、ＨＣペプチドのこの領域は溶媒に対して露出されることが判明している（Ｌａｃｙ ｅｔ ａｌ．，“Ｃｒｙｓｔａｌ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｔｙｐｅ Ａ ａｎｄ Ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ Ｔｏｘｉｃｉｔｙ，”Ｎａｔ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．５：８９８‐９０２（１９９８）；Ｓｗａｍｉｎａｔｈａｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｃａｔａｌｙｔｉｃ ａｎｄ Ｂｉｎｄｉｎｇ Ｓｉｔｅｓ ｏｆ Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｂ，”Ｎａｔ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．７：６９３‐６９９（２０００）、これらの文献は、その全体を参照として本明細書に援用する）。

【０１０４】

本明細書に記載のプロペプチド融合体は、軽鎖及び重鎖領域を連結する中間領域を有し、この中間領域は、高特異性プロテアーゼ切断部位を有し、低特異性プロテアーゼ切断部位を有していない（すなわち、野生型の神経毒に対し、本融合体の中間領域には変異が導入されている）。本発明の目的のために、高特異性プロテアーゼ切断部位（本明細書では「制限特異性プロテアーゼ」または「ＲＳＰ」部位とも呼ぶ）は、高特異性プロテアーゼが認識し、切断を可能とする３残基以上の特異的な隣接するアミノ酸残基（例えば、エンテロキナーゼ切断部位、ＴＥＶ認識配列、またはＴｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製のＷＥＬＱｕｔプロテアーゼ）を有する。対照的に、低特異性プロテアーゼ切断部位は、プロテアーゼが認識し、切断を可能とする２残基以下の隣接するアミノ酸残基（例えば、トリプシン切断部位）を有する。当業者であれば理解可能なように、切断を行う特定の条件に応じて、選択すべき、特に好適な高特異性プロテアーゼの種類は異なったものになる。１つの高特異性プロテアーゼは、１つの条件セットの下では最も効果的であり得るが、異なる条件セットの下では、別の高特異性プロテアーゼが最も効果的であり得る。

【０１０５】

ＢｏＮＴにおいて、重鎖のＮ末端に先行するアミノ酸は、トリプシンによるタンパク質分解に対して感受性のＬｙｓまたはＡｒｇ残基である。このトリプシン感受性部位は、重鎖のＮ末端の上流において、例えば５残基のアミノ酸からなるエンテロキナーゼ切断部位（すなわち、ＤＤＤＤＫ（配列番号６０））で置換することができる（Ｉｃｔｈｃｈｅｎｋｏ及びＢａｎｄの米国特許出願公開第２０１１／０２０６６１６号参照、前記文献は、８つのＢｏＮＴ血清型のうちの７つについてのアラインメントを示しており、その全体を参照として本明細書に援用する）。あるいは、トリプシン感受性部位は、重鎖のＮ末端の上流において、例えばＴＥＶ認識配列（すなわち、ＥＮＬＹＦＱ（配列番号６１））で置換することができる（Ｉｃｔｈｃｈｅｎｋｏ及びＢａｎｄの米国特許出願公開第２０１１／０２０６６１６号、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。これらの改変のいずれも、特異的な酵素による標準化された活性化を可能にする。ＢｏＮＴ血清型Ａ及びＣにおいて、この領域内のさらなるＬｙｓ残基を、ＧｌｎまたはＨｉｓのいずれかに突然変異させてもよく、それによって毒素の望ましくない非特異的活性化をもたらし得る

さらなるトリプシン感受性部位を排除してもよい。トリプシン感受性認識配列は、血清型Ａ、Ｅ、及びＦの重鎖の受容体結合ドメインの上流にも存在する。Ｘ線結晶構造解析に示されるように、この領域のタンパク質分解に対する感受性は、毒素の３次元構造における溶媒への露出と相関している。したがって、血清型Ａ、Ｅ、及びＦでは、感受性残基をＡｓｎに改変する。

【０１０６】

本明細書に記載のプロペプチド融合体は、軽鎖領域にアミノ酸置換を有し、この置換により、プロペプチドの成熟神経毒（すなわち、上記の本発明の融合タンパク質）は無毒性となる。一実施形態では、アミノ酸置換はＥ２２４＞Ａ及びＹ３６６＞Ａ（ＢｏＮＴ／Ａ ＬＣの）を含み、この置換は融合タンパク質を無毒化する。これに相当する突然変異を他のＢｏＮＴ血清型において作成し、同様にそれらを無毒化してもよい。別の実施形態によれば、プロペプチドは、これら２つの突然変異に加えて、配列番号５２のＢｏＮＴ Ａ／ＬＣの（ｉ）Ｑ１６２＞Ｙ、Ｌ２５６＞Ｙ、Ｒ２５７＞Ｅ、及びＬ３２２＞Ｅまたは（ｉｉ）Ｑ１６３＞Ｅ、Ｅ２６３＞Ｌ、及びＬ３２３＞Ｉのいずれかを有する。これらの追加の突然変異をＢｏＮＴ／Ａ（すなわち、配列番号５２）に施し、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１（以下の段落で定義）を作製し、残存ＳＮＡＰ‐２５切断活性を低下させ、不活性な薬物担体としての性能を向上させる。これに相当するアミノ酸置換を、他の７つのＢｏＮＴ血清型において行ってもよい。別の実施形態では、アミノ酸置換は、Ｅ２３０＞Ａ、Ｈ２３３＞Ｇ、及びＹ３７５＞Ａ（配列番号５４のＢｏＮＴ／Ｃ ＬＣの）を含む。これらの追加の突然変異を、ＢｏＮＴ／Ｃ（すなわち、配列番号５４）に対して施し、ＢｏＮＴ／Ｃａｄを作製する。

【０１０７】

ＳＮＡＰ‐２５切断活性を保持していると、例えば、「ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ」（ＢｏＮＴ／Ａの無毒性誘導体）を不活性の薬物担体として使用するうえで、制約があると考え得る。したがって、一実施形態によれば、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ触媒活性に関連する毒性をさらに減少させるために、第２世代のＢｏＮＴ／Ａ ａｄ分子を生物工学的に作製し、そのような一実施形態を「ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１」と命名する。ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１は、ＢｏＮＴ／Ａの無毒性軽鎖に追加のアミノ酸置換（例えば、ＢｏＮＴ／Ａ ＬＣのＱ１６２＞Ｙ、Ｌ２５６＞Ｙ、Ｒ２５７＞Ｅ、及びＬ３２２＞Ｅ）を有し、これにより残存ＳＮＡＰ‐２５切断活性を排除し、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１がより不活性な薬物担体として機能できるように設計した組換えボツリヌス神経毒の無毒性誘導体である。突然変異を、コンピュータモデリングによって特異的に同定するとともに、タンパク質の安定性に必要な構造的特徴（突然変異を加えた軽鎖と重鎖偽基質のベルト領域との間の相互作用に関して）、ならびにその全身的及び神経内輸送特性を維持する一方で、ＬＣプロテアーゼによるＳＮＡＰ‐２５の触媒的切断を破壊するように設計した。

【０１０８】

ＢｏＮＴ分子（または融合タンパク質）が基質切断活性を失っているかどうかの判定は、例えば、本明細書の実施例に記載のウェスタンブロット分析を用いて行うことができる。

【０１０９】

他方、本明細書に記載の融合タンパク質は、何らかの残存基質切断活性を有することが望ましい場合がある。なぜなら、その活性が細胞内部区画への融合タンパク質の送達（特に、一本鎖抗体の送達）に対するマーカーとして機能し得るためである。本実施形態は、以下の実施例２に記載する。

【０１１０】

一実施形態によれば、本明細書に記載のプロペプチド融合体は、軽鎖領域の上流に位置する第一検出タグ（ＤＴ１）及び第一アフィニティー精製タグ（ＡＰＴＮ）を有する。

【０１１１】

別の実施形態によれば、本明細書に記載のプロペプチド融合体は、重鎖領域の下流に位置する第二検出タグ（ＤＴ２）及び第二アフィニティー精製タグ（ＡＰＴＣ）を有する。

【０１１２】

一実施形態では、プロペプチド融合体は、ＬＣの上流にスペーサー配列（ＳＳ）、スペーサー配列（ＳＳ）の上流に位置する一本鎖抗体（ＶＨＨ）、一本鎖抗体の上流に位置する検出タグ（ＤＴ）、検出タグ（ＤＴ）の上流に位置する制限特異性プロテアーゼ（ＲＳＰ）部位及び制限特異性プロテアーゼ（ＲＳＰ）部位の上流に位置するアフィニティー精製タグ（$ＡＰＴ_{Ｎ}$）を含む。さらに、制限特異性（ＲＳＰ）部位は、ＬＣとＨＣとの間に位置する。別の制限特異性プロテアーゼ（ＲＳＰ）部位はＨＣの下流に位置し、アフィニティー精製タグ（$ＡＰＴ_{Ｃ}$）は制限特異性プロテアーゼ（ＲＳＰ）部位の下流に位置する。本実施形態を図４Ａに示す。プロペプチド融合体のこの実施形態のプロセシング時に、制限特異性プロテアーゼ（ＲＳＰ）部位での切断が生じ、図４Ｂに示すように、Ｓ‐Ｓ結合を除いてＬＣとＨＣが分けられ、アフィニティー精製タグ（$ＡＰＴ_{Ｎ}$及び$ＡＰＴ_{Ｃ}$）が排除される。

【０１１３】

別の実施形態では、図８Ａに示すように、プロペプチド融合体は、図４Ａに示すプロペプチド融合体の特徴を有するが、一本鎖抗体の上流に位置する検出タグを欠失している。一実施形態によれば、図８Ａのプロペプチド融合体の切断産物（すなわち、図８Ｂのタンパク質）は、医薬用途に適したタンパク質である。

【０１１４】

さらに別の実施形態によれば、図６Ａに示すように、プロペプチド融合体は、分解促進ドメイン（ＡＤＤ）ならびに、場合により、一本鎖抗体の上流及び制限特異性プロテアーゼ（ＲＳＰ）部位の下流に位置する別の検出タグ（ＤＴ）、及びアフィニティー精製タグ（$ＡＰＴ_{Ｎ}$）を含む。図６Ｂに示すように、高特異性プロテアーゼでプロセシングした後、得られる融合タンパク質は、アフィニティー精製タグを切除されているが、依然として分解促進ドメイン（ＡＤＤ）を有している。

【０１１５】

さらに別の実施形態によれば、プロペプチド融合体は、ＲＳＰによってＮ末端のＡＰＴを除去した後に、ＡＤＤの上流のＮ末端アミノ酸が、リジン（Ｋ）のような塩基性アミノ酸または任意の他の正に荷電したアミノ酸になり、それによって融合タンパク質及び融合タンパク質が結合する任意の抗原の分解をさらに促進するように設計される。これを図７Ａ及び図７Ｂに示し、以下の実施例に記載する。図７Ａ及び図７Ｂ（または１つ以上のＲＳＰを含む本明細書に記載の任意の他のプロペプチド融合体）における$ＲＳＰ_{１}$及び$ＲＳＰ_{２}$は、同じ認識配列であってもなくてもよい。プロペプチド融合体中の任意の１つ以上のＲＳＰは、随伴的または連続的であってもよい。

【０１１６】

一実施形態によれば、検出タグ（ＤＴ）は、神経細胞の細胞質への一本鎖抗体の送達を検出することができる。適切な検出タグとして、ｃ‐ｍｙｃ、ＯＬＬＡＳタグ、ＨＡタグ、Ｅタグ、Ｈｉｓタグ、及びＳｔｒｅｐタグが挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。検出タグはまた、検出手段を提供するとともに、スペーサー配列を創出することによって、二重の目的を果たし得る。同様に、本明細書に記載のスペーサー配列（ＳＳ）もまた、検出タグとして機能し得る。別の実施形態では、検出タグ（ＤＴ）はオプションであるか、または非常に小さい（すなわち、配列が短い）。例えば、検出タグ（ＤＴ）がリジン残基または他の正に荷電したアミノ酸とＡＤＤ部位とを分離する場合、ＡＤＤが適切に機能するためには、短い検出タグ（ＤＴ）を有することが望ましい場合がある。

【０１１７】

一実施形態によれば、アフィニティー精製タグ（ＡＰＴ）は、非切断型の組換え発現タンパク質の効率的なアフィニティー精製を可能にする。適切なアフィニティー精製タグとして、Ｈｉｓタグ、Ｓｔｒｅｐタグ、及び上記のものが挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。

【０１１８】

一実施形態では、制限特異性プロテアーゼ（ＲＳＰ）部位は、例えば、エンテロキナーゼ切断部位、ＴＥＶ認識配列、またはＷＥＬＱｕｔプロテアーゼ認識配列（これらの全ては

上に記載されている）から選択される。しかしながら、これらの配列、及びプロペプチド融合体を成熟させるために使用する特異的プロテアーゼは、必ずしもプロペプチド融合体におけるすべての意図する切断部位に対して同一である必要はない。

【０１１９】

その全体を参照として本明細書に援用するＩｃｈｔｃｈｅｎｋｏ及びＢａｎｄの米国特許第８，８６５，１８６号に記載されているように、本明細書に記載のプロペプチド融合体に、必要に応じてシグナルペプチドを導入し、分泌及び回収をできるようにしてもよい。一実施形態では、シグナルペプチドは、図９Ａ～Ｌ、１１Ａ～Ｌ、及び１７Ａ～Ｌに示すように、ＡＰＴの上流に配置される。特定の一実施形態によれば、シグナルペプチドは、ｇｐ６４シグナルペプチド及びヘキサヒスチジン・アフィニティータグ：

MPMLSAIVLYVLLAAAAHSAFAAMVHHHHHHSAS (配列番号:62)

をコードするＤＮＡ配列である。

【０１２０】

本明細書に記載のプロペプチド融合体は、積荷の部位特異的付着を可能にする積荷付着ペプチド配列（すなわち、積荷付着ペプチド配列または積荷付着ペプチド）をさらに有してもよい。積荷（例えば、治療用原薬、脂質部分、マーカー分子、標的化剤など）は、本明細書に記載の融合タンパク質に結合し得る。そのような付着は、例えば、Ｉｃｈｔｃｈｅｎｋｏ及びＢａｎｄの米国特許出願公開第２０１１／０２０６６１６号に記載されており、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する。

【０１２１】

一実施形態によれば、積荷付着ペプチドは軽鎖領域の上流（一本鎖抗体の下流または上流のいずれか）に位置し、アミノ酸スペーサー配列によって軽鎖領域のＮ末端（または一本鎖抗体のＮ末端）から分けられる。本明細書に記載するこの及び他のアミノ酸スペーサー（またはリンカー）配列は、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１～２５、２６～３０、３１～３５、または３６～４０個またはそれ以上のアミノ酸残基を含んでもよい。アミノ酸スペーサー（またはリンカー）配列は、積荷付着ペプチド及び／または融合タンパク質の構造的独立性を保存及び保護し、抗体活性を妨害しないように機能し得る。アミノ酸スペーサー（またはリンカー）配列の一例は、７残基のアミノ酸スペーサーＡＲＧＧＡＳＧ（配列番号６３）である。リンカーの適切な配列を検討する際に、発現系に新たな制限部位または他の不安定性を生じさせないことが望ましい場合がある。適切なリンカーはまた、一本鎖抗体部分をポリペプチド構造の残りの部分とは独立に保ち、抗原結合が可能となるように設計してもよい。いくつかの様々な特異的スペーサー（またはリンカー）を図に示す。

【０１２２】

適切な積荷付着ペプチドの一例は、Ｓ６配列、すなわち

GDSLSWLLRLLN (配列番号:64)

である。Ｓ６配列は、基質としてＳ６配列のＳ３アミノ酸を標的とする枯草菌（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）由来のＳｆｐホスホパンテテイニルトランスフェラーゼを用いて、積荷が部位特異的に付着できるようにする（Ｚｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，“Ｇｅｎｅｔｉｃａｌｌｙ Ｅｎｃｏｄｅｄ Ｓｈｏｒｔ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｔａｇｓ ｆｏｒ Ｏｒｔｈｏｇｏｎａｌ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｌａｂｅｌｉｎｇ ｂｙ Ｓｆｐ ａｎｄ ＡｃｐＳ Ｐｈｏｓｐｈｏｐａｎｔｅｔｈｅｉｎｙｌ Ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅｓ，”ＡＣＳ Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．２（５）：３３７‐３４６（２００７）、前記文献は、その全体を参照として本明細書に援用する）。他の適切な積荷付着ペプチドは公知であり、またそれらを使用することもできる。

【０１２３】

一実施形態では、本明細書に記載のプロペプチド融合体は、上記で論じたように、切断されていない軽鎖及び重鎖を有する。

【０１２４】
本発明の別の態様は、本明細書に記載のプロペプチド融合体をコードする単離核酸分子に関する。
【０１２５】
野生型ＢｏＮＴ／Ａ核酸分子は、下記のＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＥＦ５０６５７３．１（配列番号６５）に記載のヌクレオチド配列を有する：

atgccatttg ttaataaaca atttaattat aaagatcctg taaatggtgt 50
tgatattgct tatataaaaa ttccaaatgc aggacaaatg caaccagtaa 100
aagcttttaa aattcataat aaaatatggg ttattccaga aagagataca 150
tttacaaatc ctgaagaagg agatttaaat ccaccaccag aagcaaaaca 200
agttccagtt tcatattatg attcaacata tttaagtaca gataatgaaa 250
aagataatta tttaaaggga gttacaaaat tatttgagag aatttattca 300
actgatcttg gaagaatgtt gttaacatca atagtaaggg gaataccatt 350
ttggggtgga agtacaatag atacagaatt aaaagttatt gatactaatt 400
gtattaatgt gatacaacca gatggtagtt atagatcaga agaacttaat 450
ctagtaataa taggaccctc agctgatatt atacagtttg aatgtaaaag 500
ctttggacat gaagttttga atcttacgcg aaatggttat ggctctactc 550
aatacattag atttagccca gattttacat ttggttttga ggagtcactt 600
gaagttgata caaatcctct tttaggtgca ggcaaatttg ctacagatcc 650
agcagtaaca ttagcacatg aacttataca tgctggacat agattatatg 700
gaatagcaat taatccaaat agggttttta aagtaaatac taatgcctat 750
tatgaaatga gtgggttaga agtaagcttt gaggaactta gaacatttgg 800
gggacatgat gcaaagttta tagatagttt acaggaaaac gaatttcgtc 850
tatattatta taataagttt aaagatatag caagtacact taataaagct 900
aaatcaatag taggtactac tgcttcatta cagtatatga aaaatgtttt 950
taaagagaaa tatctcctat ctgaagatac atctggaaaa ttttcggtag 1000

ataaattaaa atttgataag ttatacaaaa tgttaacaga gatttacaca 1050
gaggataatt ttgttaagtt ttttaaagta cttaacagaa aaacatattt 1100
gaattttgat aaagccgtat ttaagataaa tatagtacct aaggtaaatt 1150
acacaatata tgatggattt aatttaagaa atacaaattt agcagcaaac 1200
tttaatggtc aaaatacaga aattaataat atgaatttta ctaaactaaa 1250
aaatttttact ggattgtttg aattttataa gttgctatgt gtaagaggga 1300
taataacttc taaaactaaa tcattagata aaggatacaa taaggcatta 1350
aatgatttat gtatcaaagt taataattgg gacttgtttt ttagtccttc 1400
agaagataat tttactaatg atctaaataa aggagaagaa attacatctg 1450
atactaatat agaagcagca gaagaaaata ttagtttaga tttaatacaa 1500
caatattatt taacctttaa ttttgataat gaacctgaaa atatttcaat 1550
agaaaatctt tcaagtgaca ttataggcca attagaactt atgcctaata 1600
tagaaagatt tcctaatgga aaaaagtatg agttagataa atatactatg 1650
ttccattatc ttcgtgctca agaatttgaa catggtaaat ctaggattgc 1700
tttaacaaat tctgttaacg aagcattatt aaatcctagt cgtgtttata 1750
catttttttc ttcagactat gtaaagaaag ttaataaagc tacggaggca 1800
gctatgtttt taggctgggt agaacaatta gtatatgatt ttaccgatga 1850
aactagcgaa gtaagtacta cggataaaat tgcggatata actataatta 1900
ttccatatat aggacctgct ttaaatatag gtaatatgtt atataaagat 1950
gattttgtag gtgctttaat attttcagga gctgttattc tgttagaatt 2000
tataccagag attgcaatac ctgtattagg tacttttgca cttgtatcat 2050
atattgcgaa taaggttcta accgttcaaa caatagataa tgctttaagt 2100
aaaagaaatg aaaaatggga tgaggtctat aaatatatag taacaaattg 2150
gttagcaaag gttaatacac agattgatct aataagaaaa aaaatgaaag 2200
aagctttaga aaatcaagca gaagcaacaa aggctataat aaactatcag 2250
tataatcaat atactgagga agagaaaaat aatattaatt ttaatattga 2300
tgatttaagt tcgaaactta atgagtctat aaataaagct atgattaata 2350
taaataaatt tttgaatcaa tgctctgttt catatttaat gaattctatg 2400
atcccttatg gtgttaaacg gttagaagat tttgatgcta gtcttaaaga 2450
tgcattatta aagtatatat atgataatag aggaacttta attggtcaag 2500
tagatagatt aaaagataaa gttaataata cacttagtac agatatacct 2550
tttcagcttt ccaaatacgt agataatcaa agattattat ctacatttac 2600
tgaatatatt aagaatatta ttaatacttc tatattgaat ttaagatatg 2650
aaagtaatca tttaatagac ttatctaggt atgcatcaaa aataaatatt 2700
ggtagtaaag taaattttga tccaatagat aaaaatcaaa ttcaattatt 2750

taatttagaa agtagtaaaa ttgaggtaat tttaaaaaat gctattgtat 2800
ataatagtat gtatgaaaat tttagtacta gcttttggat aagaattcct 2850
aagtatttta acagtataag tctaaataat gaatatacaa taataaattg 2900
tatggaaaat aattcaggat ggaaagtatc acttaattat ggtgaaataa 2950
tctggacttt acaggatact caggaaataa aacaaagagt agtttttaaa 3000
tacagtcaaa tgattaatat atcagattat ataaacagat ggatttttgt 3050
aactatcact aataatagat taaataactc taaaatttat ataaatggaa 3100
gattaataga tcaaaaacca atttcaaatt taggtaatat tcatgctagt 3150
aataatataa tgtttaaatt agatggttgt agagatacac atagatatat 3200
ttggataaaa tattttaatc tttttgataa ggaattaaat gaaaaagaaa 3250
tcaaagattt atatgataat caatcaaatt caggtatttt aaaagacttt 3300
tggggtgatt atttacaata tgataaacca tactatatgt taaatttata 3350
tgatccaaat aaatatgtcg atgtaaataa tgtaggtatt agaggttata 3400
tgtatcttaa agggcctaga ggtagcgtaa tgactacaaa catttattta 3450
aattcaagtt tgtatagggg gacaaaattt attataaaaa aatatgcttc 3500
tggaaataaa gataatattg ttagaaataa tgatcgtgta tatattaatg 3550
tagtagttaa aaataaagaa tataggttag ctactaatgc atcacaggca 3600
ggcgtagaaa aaatactaag tgcattagaa atacctgatg taggaaatct 3650
aagtcaagta gtagtaatga agtcaaaaaa tgatcaagga ataacaaata 3700
aatgcaaaat gaatttacaa gataataatg ggaatgatat aggctttata 3750
ggatttcatc agtttaataa tatagctaaa ctagtagcaa gtaattggta 3800
taatagacaa atagaaagat ctagtaggac tttgggttgc tcatgggaat 3850
ttattcctgt agatgatgga tggggagaaa ggccactgta a

。

【０１２６】

一実施形態では、本発明の単離核酸分子は、この野生型ＢｏＮＴ／Ａ核酸分子をもとにして、遺伝子コードに従って本明細書に記載のプロペプチド融合体をコードするように改変する。そのような改変の非限定的な例として、ポリペプチドの産生に使用する宿主のコドン使用バイアスに関する最適化、転写及び翻訳に影響を及ぼす望ましくない遺伝的特徴の排除、及び制限部位の導入または除去が挙げられる。したがって、本発明の核酸分子は、少なくともクロストリジウム神経毒軽鎖領域及びクロストリジウム神経毒重鎖領域に関して、野生型ＢｏＮＴ／Ａ核酸分子と極めて相同性の高い核酸配列を有し得る。例えば、クロストリジウム神経毒軽鎖領域とクロストリジウム神経毒重鎖領域との組み合わせは、下記のＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｘ７１３４３．１（配列番号６６）のＢｏＮＴ／Ｂ：

gataataata atataataat gatgacaata tacctaaagc tgcacattta
tggacattaa aagggatata aacttaaaat aaggaggaga atatttatgc
cagttacaat aaataatttt aattataatg atcctattga taatgacaat
attattatga tggaacctcc atttgcaagg ggtacgggga gatattataa
agcttttaaa atcacagatc gtatttggat aatacccgaa agatatactt
ttggatataa acctgaggat tttaataaaa gttccggtat ttttaataga
gatgtttgtg aatattatga tccagattac ttaaatacca atgataaaaa
gaatatattt ttccaaacat tgatcaagtt atttaataga atcaaatcaa
aaccattggg tgaaaagtta ttagagatga ttataaatgg tataccttat
cttggagata gacgtgttcc actcgaagag tttaacacaa acattgctag
tgtaactgtt aataaattaa ttagtaatcc aggagaagtg gagcgaaaaa
aaggtatttt cgcaaattta ataatatttg gacctgggcc agttttaaat
gaaaatgaga ctatagatat aggtatacaa aatcattttg catcaaggga
aggctttggg ggtataatgc aaatgaaatt ttgtccagaa tatgtaagcg
tatttaataa tgttcaagaa aacaaaggcg caagtatatt taatagacgt
ggatattttt cagatccagc cttgatatta atgcatgaac ttatacatgt
tttgcatgga ttatatggca ttaaagtaga tgatttacca attgtaccaa
atgaaaaaaa atttttttatg caatctacag atactataca ggcagaagaa
ctatatacat ttggaggaca agatcccagc atcatatctc cttctacaga
taaaagtatc tatgataaag ttttgcaaaa ttttaggggg atagttgata
gacttaacaa ggttttagtt tgcatatcag atcctaacat taacattaat
atatataaaa ataaatttaa agataaatat aaattcgttg aagattctga
aggaaaatat agtatagatg tagaaagttt caataaatta tataaaagct
taatgttagg ttttacagaa attaatatag cagaaaatta taaaataaaa
actagagctt cttattttag tgattcctta ccaccagtaa aaataaaaaa
tttattagat aatgaaatct atactataga ggaagggttt aatatatctg
ataaaaatat gggaaaagaa tataggggtc agaataaagc tataaataaa
caagcttatg aagaaatcag caaggagcat ttggctgtat ataagataca
aatgtgtaaa agtgttaaag ttccaggaat atgtattgat gtcgataatg
aaaatttgtt ctttatagct gataaaaata gtttttcaga tgatttatct

aaaaatgaaa gagtagaata taatacacag aataattata taggaaatga
ctttcctata aatgaattaa ttttagatac tgatttaata agtaaaatag
aattaccaag tgaaaataca gaatcactta ctgattttaa tgtagatgtt
ccagtatatg aaaaacaacc cgctataaaa aaagttttta cagatgaaaa
taccatcttt caatatttat actctcagac atttcctcta aatataagag
atataagttt aacatcttca tttgatgatg cattattagt ttctagcaaa
gtttattcat ttttttctat ggattatatt aaaactgcta ataaagtagt
agaagcagga ttatttgcag gttgggtgaa acagatagta gatgattttg
taatcgaagc taataaaagc agtactatgg ataaaattgc agatatatct
ctaattgttc cttatatagg attagcttta aatgtaggag atgaaacagc
taaaggaaat tttgaaagtg cttttgagat tgcaggatcc agtattttac
tagaatttat accagaactt ttaatacctg tagttggagt ctttttatta
gaatcatata ttgacaataa aaataaaatt attaaaacaa tagataatgc
tttaactaaa agagtggaaa aatggattga tatgtacgga ttaatagtag
cgcaatggct ctcaacagtt aatactcaat tttatacaat aaaagaggga
atgtataagg ctttaaatta tcaagcacaa gcattggaag aaataataaa
atacaaatat aatatatatt ctgaagagga aaagtcaaat attaacatca
attttaatga tataaattct aaacttaatg atggtattaa ccaagctatg
gataatataa atgattttat aaatgaatgt tctgtatcat atttaatgaa
aaaaatgatt ccattagctg taaaaaaatt actagacttt gataatactc
tcaaaaaaaa tttattaaat tatatagatg aaaataaatt atatttaatt
ggaagtgtag aagatgaaaa atcaaaagta gataaatact tgaaaaccat
tataccattt gatctttcaa cgtattctaa tattgaaata ctaataaaaa
tatttaataa atataatagc gaaattttaa ataatattat cttaaattta
agatatagag ataataattt aatagattta tcaggatatg gagcaaaggt
agaggtatat gatggggtca agcttaatga taaaaatcaa tttaaattaa
ctagttcagc agatagtaag attagagtca ctcaaaatca gaatattata
tttaatagta tgttccttga ttttagcgtt agcttttgga taaggatacc
taaatatagg aatgatgata tacaaaatta tattcataat gaatatacga
taattaattg tatgaaaaat aattcaggct ggaaaatatc tattaggggt
aataggataa tatggacctt aattgatata aatggaaaaa ccaaatcagt
atttttttgaa tataacataa gagaagatat atcagagtat ataaatagat
ggtttttttgt aactattact aataatttgg ataatgctaa aatttatatt
aatggcacgt tagaatcaaa tatggatatt aaagatatag gagaagttat

tgttaatggt gaaataacat ttaaattaga tggtgatgta gatagaacac
aatttatttg gatgaaatat tttagtattt ttaatacgca attaaatcaa
tcaaatatta aagagatata taaaattcaa tcatatagcg aatacttaaa
agatttttgg ggaaatcctt taatgtataa taaagaatat tatatgttta
atgcggggaa taaaaattca tatattaaac tagtgaaaga ttcatctgta
ggtgaaatat taatacgtag caaatataat cagaattcca attatataaa
ttatagaaat ttatatattg gagaaaaatt tattataaga agagagtcaa
attctcaatc tataaatgat gatatagtta gaaaagaaga ttatatacat
ctagatttgg tacttcacca tgaagagtgg agagtatatg cctataaata
ttttaaggaa caggaagaaa aattgttttt atctattata agtgattcta
atgaatttta taagactata gaaataaaag aatatgatga acagccatca
tatagttgtc agttgctttt taaaaaagat gaagaaagta ctgatgatat
aggattgatt ggtattcatc gtttctacga atctggagtt ttacgtaaaa
agtataaaga ttatttttgt ataagtaaat ggtacttaaa agaggtaaaa
aggaaaccat ataagtcaaa tttgggatgt aattggcagt ttattcctaa
agatgaaggg tggactgaat aatataacta tatgctcagc aaacctattt
tatataagaa aagtttaagt ttataaaatc ttaagtttaa ggatgtagct
a

下記のＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＡＢ７４５６５８．１のＢｏＮＴ／Ｃ（配列番号６７）：

tatgatatgt aatgacaata acaaggtgcc taaaggtgca catttgtgga 50
tattagaaag ttaggagatg ttagtattat gccaataaca attaacaact 100
ttaattattc agatcctgtt gataataaaa atattttata tttagatact 150
catttaaata cactagctaa tgagcctgaa aaagcctttc gcattacagg 200
aaatatatgg gtaatacctg atagattttc aagaaattct aatccaaatt 250
taaataaacc tcctcgagtt acaagcccta aaagtggtta ttatgatcct 300
aattatttga gtactgattc tgacaaagat acatttttaa aagaaattat 350
aaagttattt aaaagaatta attctagaga aataggagaa gaattaatat 400
atagactttc gacagatata ccctttcctg ggaataacaa tactccaatt 450
aatacttttg attttgatgt agattttaac agtgttgatg ttaaaactag 500
acaaggtaac aactgggtta aaactggtag cataaatcct agtgttataa 550
taactggacc tagagaaaac attatagatc cagaaacttc tacgtttaaa 600
ttaactaaca atacttttgc ggcacaagaa ggatttggtg ctttatcaat 650
aatttcaata tcacctagat ttatgctaac atatagtaat gcaactaatg 700

atgtaggaga gggtagattt tctaagtctg aattttgcat ggatccaata 750
ctaattttaa tgcatgaact taatcatgca atgcataatt tatatggaat 800
agctatacca aatgatcaaa caatttcatc tgtaactagt aatatttttt 850
attctcaata taatgtgaaa ttagagtatg cagaaatata tgcatttgga 900
ggtccaacta tagaccttat tcctaaaagt gcaaggaaat attttgagga 950
aaaggcattg gattattata gatctatagc taaaagactt aatagtataa 1000
ctactgcaaa tccttcaagc tttaataaat atatagggga atataaacag 1050
aaacttatta gaaagtatag attcgtagta gaatcttcag gtgaagttac 1100
agtaaatcgt aataagtttg ttgagttata taatgaactt acacaaatat 1150
ttacagaatt taactacgct aaaatatata atgtacaaaa taggaaaata 1200
tatctttcaa atgtatatac tccggttacg gcaaatatat tagacgataa 1250
tgtttatgat atacaaaatg gatttaatat acctaaaagt aatttaaatg 1300
tactatttat gggtcaaaat ttatctcgaa atccagcatt aagaaaagtc 1350
aatcctgaaa atatgcttta tttatttaca aaattttgtc ataaagcaat 1400
agatggtaga tcattatata ataaaacatt agattgtaga gagcttttag 1450
ttaaaaatac tgacttaccc tttataggtg atattagtga tgttaaaact 1500
gatatatttt taagaaaaga tattaatgaa gaaactgaag ttatatacta 1550
tccggacaat gtttcagtag atcaagttat tctcagtaag aatacctcag 1600
aacatggaca actagattta ttataccta gtattgacag tgagagtgaa 1650
atattaccag gggagaatca agtcttttat gataatagaa ctcaaaatgt 1700
tgattatttg aattcttatt attacctaga atctcaaaaa ctaagtgata 1750
atgttgaaga ttttacttt acgagatcaa ttgaggaggc tttggataat 1800
agtgcaaaag tatatactta ctttcctaca ctagctaata aagtaaatgc 1850
gggtgttcaa ggtggtttat ttttaatgtg ggcaaatgat gtagttgaag 1900
attttactac aaatattcta agaaaagata cattagataa aatatcagat 1950
gtatcagcta ttattcccta tataggaccc gcattaaata taagtaattc 2000
tgtaagaaga ggaaatttta ctgaagcatt tgcagttact ggtgtaacta 2050
ttttattaga agcatttcct gaatttacaa tacctgcact tggtgcattt 2100
gtgatttata gtaaggttca agaaagaaac gagattatta aaactataga 2150
taattgttta gaacaaagga ttaagagatg gaaagattca tatgaatgga 2200
tgatgggaac gtggttatcc aggattatta ctcaatttaa taatataagt 2250
tatcaaatgt atgattcttt aaattatcag gcaggtgcaa tcaaagctaa 2300
aatagattta gaatataaaa aatattcagg aagtgataaa gaaaatataa 2350
aaagtcaagt tgaaaattta aaaaatagtt tagatgtaaa aatttcggaa 2400
gcaatgaata atataaataa atttatacga gaatgttccg taacatattt 2450

atttaaaaat atgttaccta aagtaattga tgaattaaat gagtttgatc 2500
gaaatactaa agcaaaatta attaatctta tagatagtca taatattatt 2550
ctagttggtg aagtagataa attaaaagca aaagtaaata atagctttca 2600
aaatacaata ccctttaata ttttttcata tactaataat tctttattaa 2650
aagatataat taatgaatat ttcaataata ttaatgattc aaaaattttg 2700
agcctacaaa acagaaaaaa tactttagtg gatacatcag gatataatgc 2750
agaagtgagt gaagaaggcg atgttcagct taatccaata tttccatttg 2800
actttaaatt aggtagttca ggggaggata gaggtaaagt tatagtaacc 2850
cagaatgaaa atattgtata taattctatg tatgaaagtt ttagcattag 2900
tttttggatt agaataaata aatgggtaag taatttacct ggatatacta 2950
taattgatag tgttaaaaat aactcaggtt ggagtatagg tattattagt 3000
aatttttag tatttacttt aaaacaaaat gaagatagtg aacaaagtat 3050
aaattttagt tatgatatat caaataatgc tcctggatac aataaatggt 3100
tttttgtaac tgttactaac aatatgatgg gaaatatgaa gatttatata 3150
aatggaaaat taatagatac tataaaagtt aaagaactaa ctggaattaa 3200
ttttagcaaa actataacat ttgaaataaa taaaattcca gataccggtt 3250
tgattacttc agattctgat aacatcaata tgtggataag agatttttat 3300
atatttgcta aagaattaga tggtaaagat attaatatat tatttaatag 3350
cttgcaatat actaatgttg taaaagatta ttggggaaat gatttaagat 3400
ataataaaga atattatatg gttaatatag attatttaaa tagatatatg 3450
tatgcgaact cacgacaaat tgtttttaat acacgtagaa ataataatga 3500
cttcaatgaa ggatataaaa ttataataaa aagaatcaga ggaaatacaa 3550
atgatactag agtacgagga ggagatattt tatattttga tatgacaatt 3600
aataacaaag catataattt gtttatgaag aatgaaacta tgtatgcaga 3650
taatcatagt actgaagata tatatgctat aggtttaaga gaacaaacaa 3700
aggatataaa tgataatatt atatttcaaa tacaaccaat gaataatact 3750
tattattacg catctcaaat atttaaatca aattttaatg gagaaaatat 3800
ttctggaata tgttcaatag gtacttatcg ttttagactt ggaggtgatt 3850
ggtatagaca caattatttg gtgcctactg tgaagcaagg aaattatgct 3900
tcattattag aatcaacatc aactcattgg ggttttgtac ctgtaagtga 3950
ataaataatg attaataata taaattatgt taaatatttt aata 3994

下記のＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｘ５４２５４．１のＢｏＮＴ／Ｄ（配列番号６８）：
AAGGTGCACA CTTGTGGATA TTAGAAAGTT AGGAGATGTT AGTATTATGA 50

CATGGCCAGT AAAAGATTTT AATTATAGTG ATCCTGTTAA TGACAATGAT 100
ATATTATATT TAAGAATACC ACAAAATAAG TTAATTACTA CACCTGTAAA 150
AGCTTTTATG ATTACTCAAA ATATTTGGGT AATACCAGAA AGATTTTCAT 200
CAGATACTAA TCCAAGTTTA AGTAAACCGC CCAGACCTAC TTCAAAGTAT 250
CAAAGTTATT ATGATCCTAG TTATTTATCT ACTGATGAAC AAAAAGATAC 300
ATTTTTAAAA GGGATTATAA AATTATTTAA AAGAATTAAT GAAAGAGATA 350
TAGGAAAAAA ATTAATAAAT TATTTAGTAG TTGGTTCACC TTTTATGGGA 400
GATTCAAGTA CGCCTGAAGA TACATTTGAT TTTACACGTC ATACTACTAA 450
TATTGCAGTT GAAAAGTTTG AAAATGGTAG TTGGAAAGTA ACAAATATTA 500
TAACACCAAG TGTATTGATA TTTGGACCAC TTCCTAATAT ATTAGACTAT 550
ACAGCATCCC TTACATTGCA AGGACAACAA TCAAATCCAT CATTTGAAGG 600
GTTTGGAACA TTATCTATAC TAAAAGTAGC ACCTGAATTT TTGTTAACAT 650
TTAGTGATGT AACATCTAAT CAAAGTTCAG CTGTATTAGG CAAATCTATA 700
TTTTGTATGG ATCCAGTAAT AGCTTTAATG CATGAGTTAA CACATTCTTT 750
GCATCAATTA TATGGAATAA ATATACCATC TGATAAAAGG ATTCGTCCAC 800
AAGTTAGCGA GGGATTTTTC TCTCAAGATG GACCCAACGT ACAATTTGAG 850
GAATTATATA CATTTGGAGG ATTAGATGTT GAAATAATAC CTCAAATTGA 900
AAGATCACAA TTAAGAGAAA AAGCATTAGG TCACTATAAA GATATAGCGA 950
AAAGACTTAA TAATATTAAT AAAACTATTC CTTCTAGTTG GATTAGTAAT 1000
ATAGATAAAT ATAAAAAAAT ATTTTCTGAA AAGTATAATT TTGATAAAGA 1050
TAATACAGGA AATTTTGTTG TAAATATTGA TAAATTCAAT AGCTTATATT 1100
CAGACTTGAC TAATGTTATG TCAGAAGTTG TTTATTCTTC GCAATATAAT 1150
GTTAAAAACA GGACTCATTA TTTTTCAAGG CATTATCTAC CTGTATTTGC 1200
AAATATATTA GATGATAATA TTTATACTAT AAGAGATGGT TTTAATTTAA 1250
CAAATAAAGG TTTTAATATA GAAAATTCGG GTCAGAATAT AGAAAGGAAT 1300
CCTGCACTAC AAAAGCTTAG TTCAGAAAGT GTAGTAGATT TATTTACAAA 1350
AGTATGTTTA AGATTAACAA AAAATAGTAG AGATGATTCA ACATGTATTA 1400
AAGTTAAAAA TAATAGATTA CCTTATGTAG CTGATAAAGA TAGCATTTCA 1450
CAAGAAATAT TTGAAAATAA AATTATTACA GATGAGACTA ATGTACAAAA 1500
TTATTCAGAT AAATTTTCAT TAGATGAATC TATTTTAGAT GGGCAAGTTC 1550
CTATTAATCC TGAAATAGTA GATCCACTAT TACCCAATGT TAATATGGAA 1600
CCTTTAAATC TTCCAGGTGA AGAAATAGTA TTTTATGATG ATATTACTAA 1650
ATATGTTGAT TATTTAAATT CTTATTATTA TTTGGAATCT CAAAAATTAA 1700
GTAATAATGT TGAAAATATT ACTCTTACAA CTTCAGTTGA AGAAGCATTA 1750
GGTTATAGCA ATAAGATATA CACATTTTTA CCTAGCTTAG CTGAAAAAGT 1800

GAATAAAGGT GTTCAAGCAG GTTTATTCTT AAATTGGGCG AATGAAGTAG 1850
TTGAGGATTT TACTACAAAT ATTATGAAGA AAGATACATT GGATAAAATA 1900
TCAGATGTAT CAGTAATAAT TCCATATATA GGACCTGCCT TAAATATAGG 1950
AAATTCAGCA TTAAGGGGAA ATTTTAATCA AGCATTTGCA ACAGCTGGTG 2000
TAGCTTTTTT ATTAGAGGGA TTTCCAGAGT TTACTATACC TGCACTCGGT 2050
GTATTTACCT TTTATAGTTC TATTCAAGAA AGAGAGAAAA TTATTAAAAC 2100
TATAGAAAAT TGTTTGGAAC AAAGAGTTAA GAGATGGAAA GATTCATATC 2150
AATGGATGGT ATCAAATTGG TTGTCAAGAA TTACTACTCA ATTTAATCAT 2200
ATAAATTATC AAATGTATGA TTCTTTAAGT TATCAGGCAG ATGCAATCAA 2250
AGCTAAAATA GATTTAGAAT ATAAAAAATA CTCAGGAAGT GATAAAGAAA 2300
ATATAAAAAG TCAAGTTGAA AATTTAAAAA ATAGTTTAGA TGTAAAAATT 2350
TCGGAAGCAA TGAATAATAT AAATAAATTT ATACGAGAAT GTTCTGTAAC 2400
ATACTTATTT AAAAATATGC TCCCTAAAGT AATTGACGAA TTAAATAAGT 2450
TTGATTTAAG AACTAAAACA GAATTAATTA ATCTTATAGA TAGTCATAAT 2500
ATTATTCTAG TTGGTGAAGT AGATAGATTA AAAGCAAAAG TAAATGAGAG 2550
TTTTGAAAAT ACAATGCCTT TTAATATTTT TTCATATACT AATAATTCTT 2600
TATTAAAAGA TATAATTAAT GAATATTTCA ATAGTATTAA TGATTCAAAA 2650
ATTTTGAGCT TACAAAACAA AAAAAATGCT TTAGTGGATA CATCAGGATA 2700
TAATGCAGAA GTGAGGGTAG GAGATAATGT TCAACTTAAT ACGATATATA 2750
CAAATGACTT TAAATTAAGT AGTTCAGGAG ATAAAATTAT AGTAAATTTA 2800
AATAATAATA TTTTATATAG CGCTATTTAT GAGAACTCTA GTGTTAGTTT 2850
TTGGATTAAG ATATCTAAAG ATTTAACTAA TTCTCATAAT GAATATACAA 2900
TAATTAACAG TATAGAACAA AATTCTGGGT GGAAATTATG TATTAGGAAT 2950
GGCAATATAG AATGGATTTT ACAAGATGTT AATAGAAAGT ATAAAAGTTT 3000
AATTTTTGAT TATAGTGAAT CATTAAGTCA TACAGGATAT ACAAATAAAT 3050
GGTTTTTTGT TACTATAACT AATAATATAA TGGGGTATAT GAAACTTTAT 3100
ATAAATGGAG AATTAAAGCA GAGTCAAAAA ATTGAAGATT TAGATGAGGT 3150
TAAGTTAGAT AAAACCATAG TATTTGGAAT AGATGAGAAT ATAGATGAGA 3200
ATCAGATGCT TTGGATTAGA GATTTTAATA TTTTTTCTAA AGAATTAAGT 3250
AATGAAGATA TTAATATTGT ATATGAGGGA CAAATATTAA GAAATGTTAT 3300
TAAAGATTAT TGGGGAAATC CTTTGAAGTT TGATACAGAA TATTATATTA 3350
TTAATGATAA TTATATAGAT AGGTATATAG CACCTGAAAG TAATGTACTT 3400
GTACTTGTTC AGTATCCAGA TAGATCTAAA TTATATACTG GAAATCCTAT 3450
TACTATTAAA TCAGTATCTG ATAAGAATCC TTATAGTAGA ATTTTAAATG 3500
GAGATAATAT AATTCTTCAT ATGTTATATA ATAGTAGGAA ATATATGATA 3550

ATAAGAGATA CTGATACAAT ATATGCAACA CAAGGAGGAG AGTGTTCACA 3600
AAATTGTGTA TATGCATTAA AATTACAGAG TAATTTAGGT AATTATGGTA 3650
TAGGTATATT TAGTATAAAA AATATTGTAT CTAAAAATAA ATATTGTAGT 3700
CAAATTTTCT CTAGTTTTAG GGAAAATACA ATGCTTCTAG CAGATATATA 3750
TAAACCTTGG AGATTTTCTT TTAAAAATGC ATACACGCCA GTTGCAGTAA 3800
CTAATTATGA AACAAAACTA TTATCAACTT CATCTTTTTG GAAATTTATT 3850
TCTAGGGATC CAGGATGGGT AGAGTAATAC AATAAAAATT TAATATAAAC 3900
TATTAAATTA TATTACAAGT TTTAGAAATT TATCGTATAA AATGTTGAAT 3950
TC 3952

下記のＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＧＱ２４４３１４．１のＢｏＮＴ／Ｅ（配列番号６９）：

ATGCCAAAAA TTAATAGTTT TAATTATAAT GATCCTGTTA ATGATAGAAC 50
AATTTTATAT ATTAAACCAG GCGGTTGTCA AGAATTTTAT AAATCATTTA 100
ATATTATGAA AAATATTTGG ATAATTCCAG AGAGAAATGT AATTGGTACA 150
ACCCCCCAAG ATTTTCATCC GCCTACTTCA TTAAAAAATG GAGATAGTAG 200
TTATTATGAC CCTAATTATT TACAAAGTGA TGAAGAAAAG GATAGATTTT 250
TAAAAATAGT CACAAAAATA TTTAATAGAA TAAATAATAA TCTTTCAGGA 300
GGGATTTTAT TAGAAGAACT GTCAAAAGCT AATCCATATT TAGGGAATGA 350
TAATACTCCA GATAATCAAT TCCATATTGG TGATGCATCA GCAGTTGAGA 400
TTAAATTCTC AAATGGTAGC CAAGACATAC TATTACCTAA TGTTATTATA 450
ATGGGAGCAG AGCCTGATTT ATTTGAAACT AACAGTTCCA ATATTTCTCT 500
AAGAAATAAT TATATGCCAA GCAATCACGG TTTTGGATCA ATAGCTATAG 550
TAACATTCTC ACCTGAATAT TCTTTTAGAT TTAATGATAA TAGTATGAAT 600
GAATTTATTC AAGATCCTGC TCTTACATTA ATGCATGAAT TAATACATTC 650
ATTACATGGA CTATATGGGG CTAAAGGGAT TACTACAAAG TATACTATAA 700
CACAAAAACA AAATCCCCTA ATAACAAATA TAAGAGGTAC AAATATTGAA 750
GAATTCTTAA CTTTTGGAGG TACTGATTTA AACATTATTA CTAGTGCTCA 800
GTCCAATGAT ATCTATACTA ATCTTCTAGC TGATTATAAA AAAATAGCGT 850
CTAAACTTAG CAAAGTACAA GTATCTAATC CACTACTTAA TCCTTATAAA 900
GATGTTTTTG AAGCAAAGTA TGGATTAGAT AAAGATGCTA GCGGAATTTA 950
TTCGGTAAAT ATAAACAAAT TTAATGATAT TTTTAAAAAA TTATACAGCT 1000
TTACGGAATT TGATTTAGCA ACTAAATTTC AAGTTAAATG TAGGCAAACT 1050
TATATTGGAC AGTATAAATA CTTCAAACTT TCAAACTTGT TAAATGATTC 1100

TATTTATAAT ATATCAGAAG GCTATAATAT AAATAATTTA AAGGTAAATT 1150
TTAGAGGACA GAATGCAAAT TTAAATCCTA GAATTATTAC ACCAATTACA 1200
GGTAGAGGAC TAGTAAAAAA AATCATTAGA TTTTGTAAAA ATATTGTTTC 1250
TGTAAAAGGC ATAAGGAAAT CAATATGTAT CGAAATAAAT AATGGTGAGT 1300
TATTTTTTGT GGCTTCCGAG AATAGTTATA ATGATGATAA TATAAATACT 1350
CCTAAAGAAA TTGACGATAC AGTAACTTCA AATAATAATT ATGAAAATGA 1400
TTTAGATCAG GTTATTTTAA ATTTTAATAG TGAATCAGCA CCTGGACTTT 1450
CAGATGAAAA ATTAAATTTA ACTATCCAAA ATGATGCTTA TATACCAAAA 1500
TATGATTCTA ATGGAACAAG TGATATAGAA CAACATGATG TTAATGAACT 1550
TAATGTATTT TTCTATTTAG ATGCACAGAA AGTGCCCGAA GGTGAAAATA 1600
ATGTCAATCT CACCTCTTCA ATTGATACAG CATTATTAGA ACAACCTAAA 1650
ATATATACAT TTTTTTCATC AGAATTTATT AATAATGTCA ATAAACCTGT 1700
GCAAGCAGCA TTATTTGTAA GCTGGATACA ACAAGTGTTA GTAGATTTTA 1750
CTACTGAAGC TAACCAAAAA AGTACTGTTG ATAAAATTGC AGATATTTCT 1800
ATAGTTGTTC CATATATAGG TCTTGCTTTA AATATAGGAA ATGAAGCACA 1850
AAAAGGAAAT TTTAAAGATG CACTTGAATT ATTAGGAGCA GGTATTTTAT 1900
TAGAATTTGA ACCCGAGCTT TTAATTCCTA CAATTTTAGT ATTCACGATA 1950
AAATCTTTTT TAGGTTCATC TGATAATAAA AATAAAGTTA TTAAAGCAAT 2000
AAATAATGCA TTGAAAGAAA GAGATGAAAA ATGGAAAGAA GTATATAGTT 2050
TTATAGTATC GAATTGGATG ACTAAAATTA ATACACAATT TAATAAAAGA 2100
AAAGAACAAA TGTATCAAGC TTTACAAAAT CAAGTAAATG CAATTAAAAC 2150
AATAATAGAA TCTAAGTATA ATAGTTATAC TTTAGAGGAA AAAAATGAGC 2200
TTACAAATAA ATATGATATT AAGCAAATAG AAAATGAACT TAATCAAAAG 2250
GTTTCTATAG CAATGAATAA TATAGACAGG TTCTTAACTG AAAGTTCTAT 2300
ATCCTATTTA ATGAAATTAA TAAATGAAGT AAAAATTAAT AAATTAAGAG 2350
AATATGATGA GAATGTCAAA ACGTATTTAT TGAATTATAT TATACAACAT 2400
GGATCAATCT TGGGAGAGAG TCAGCAAGAA CTAAATTCTA TGGTAACTGA 2450
TACCCTAAAT AATAGTATTC CTTTTAAGCT TTCTTCTTAT ACAGATGATA 2500
AAATTTTAAT TTCATATTTT AATAAATTCT TTAAGAGAAT TAAAAGTAGT 2550
TCAGTTTTAA ATATGAGATA TAAAAATGAT AAATACGTAG ATACTTCAGG 2600
ATATGATTCA AATATAAATA TTAATGGAGA TGTATATAAA TATCCAACTA 2650
ATAAAAATCA ATTTGGAATA TATAATGATA AACTTAGTGA AGTTAATATA 2700
TCTCAAAATG ATTACATTAT ATATGATAAT AAATATAAAA ATTTTAGTAT 2750
TAGTTTTTGG GTAAGAATTC CTAACTATGA TAATAAGATA GTAAATGTTA 2800
ATAATGAATA CACTATAATA AATTGTATGA GAGATAATAA TTCAGGATGG 2850

AAAGTATCTC TTAATCATAA TGAAATAATT TGGACATTGC AAGATAATGC 2900
AGGAATTAAT CAAAAATTAG CATTTAACTA TGGTAACGCA AATGGTATTT 2950
CTGATTATAT AAATAAGTGG ATTTTTGTAA CTATAACTAA TGATAGATTA 3000
GGAGATTCTA AACTTTATAT TAATGGAAAT TTAATAGATC AAAAATCAAT 3050
TTTAAATTTA GGTAATATTC ATGTTAGTGA CAATATATTA TTTAAAATAG 3100
TTAATTGTAG TTATACAAGA TATATTGGTA TTAGATATTT TAATATTTTT 3150
GATAAAGAAT TAGATGAAAC AGAAATTCAA ACTTTATATA GCAATGAACC 3200
TAATACAAAT ATTTTGAAGG ATTTTTGGGG AAATTATTTG CTTTATGACA 3250
AAGAATACTA TTTATTAAAT GTGTTAAAAC CAAATAACTT TATTGATAGG 3300
AGAAAAGATT CTACTTTAAG CATTAATAAT ATAAGAAGCA CTATTCTTTT 3350
AGCTAATAGA TTATATAGTG GAATAAAAGT TAAAATACAA AGAGTTAATA 3400
ATAGTAGTAC TAACGATAAT CTTGTTAGAA AGAATGATCA GGTATATATT 3450
AATTTTGTAG CCAGCAAAAC TCACTTATTT CCATTATATG CTGATACAGC 3500
TACCACAAAT AAAGAGAAAA CAATAAAAAT ATCATCATCT GGCAATAGAT 3550
TTAATCAAGT AGTAGTTATG AATTCAGTAG GAAATAATTG TACAATGAAT 3600
TTTAAAAATA ATAATGGAAA TAATATTGGG TTGTTAGGTT TCAAGGCAGA 3650
TACTGTAGTT GCTAGTACTT GGTATTATAC ACATATGAGA GATCATACAA 3700
ACAGCAATGG ATGTTTTTGG AACTTTATTT CTGAAGAACA TGGATGGCAA 3750
GAAAAATAA 3759

下記のＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｘ８１７１４．１のＢｏＮＴ／Ｆ（配列番号７０）：

AAATGGCGCA AAGAAGATGA TAATTAGTAA TAATATATTT ATTTCCAATT 50
GTTTAACTCT ATCTTGTGGC GGTAAATATA TATGTTTATC TATGAAAGAT 100
GAAAACTATA ATTGGATGAT ATGTAATAAT GAAAGCAACA TACCTAAAAA 150
GGCATATTTA TGGACATTGA AAGAAGTATA GGGGGGATTT TATGCCAGTT 200
GTAATAAATA GTTTTAATTA TAATGACCCT GTTAATGATG ATACAATTTT 250
ATACATGCAG ATACCATATG AAGAAAAAAG TAAAAAATAT TATAAAGCTT 300
TTGAGATTAT GCGTAATGTT TGGATAATTC CTGAGAGAAA TACAATAGGA 350
ACGGATCCTA GTGATTTTGA TCCACCGGCT TCATTAGAGA ACGGAAGCAG 400
TGCTTATTAT GATCCTAATT ATTTAACCAC TGATGCTGAA AAAGATAGAT 450
ATTTAAAAAC AACGATAAAA TTATTTAAGA GAATTAATAG TAATCCTGCA 500
GGGGAAGTTT TGTTACAAGA AATATCATAT GCTAAACCAT ATTTAGGAAA 550
TGAACACACG CCAATTAATG AATTCCATCC AGTTACTAGA ACTACAAGTG 600

TTAATATAAA ATCATCAACT AATGTTAAAA GTTCAATAAT ATTGAATCTT 650
CTTGTATTGG GAGCAGGACC TGATATATTT GAAAATTCTT CTTACCCCGT 700
TAGAAAACTA ATGGATTCAG GTGGAGTTTA TGACCCAAGT AATGATGGTT 750
TTGGATCAAT TAATATCGTG ACATTTTCAC CTGAATATGA ATATACTTTT 800
AATGATATTA GTGGAGGGTA TAACAGTAGT ACAGAATCAT TTATTGCAGA 850
TCCTGCAATT TCACTAGCTC ATGAATTGAT ACATGCACTG CATGGATTAT 900
ACGGGGCTAG GGGAGTTACT TATAAAGAGA CTATAAAAGT AAAGCAAGCA 950
CCTCTTATGA TAGCCGAAAA ACCCATAAGG CTAGAAGAAT TTTTAACCTT 1000
TGGAGGTCAG GATTTAAATA TTATTACTAG TGCTATGAAG GAAAAAATAT 1050
ATAACAATCT TTTAGCTAAC TATGAAAAAA TAGCTACTAG ACTTAGTAGA 1100
GTTAATAGTG CTCCTCCTGA ATATGATATT AATGAATATA AAGATTATTT 1150
TCAATGGAAG TATGGGCTAG ATAAAAATGC TGATGGAAGT TATACTGTAA 1200
ATGAAAATAA ATTTAATGAA ATTTATAAAA AATTATATAG CTTTACAGAG 1250
ATTGACTTAG CAAATAAATT TAAAGTAAAA TGTAGAAATA CTTATTTTAT 1300
TAAATATGGA TTTTTAAAAG TTCCAAATTT GTTAGATGAT GATATTTATA 1350
CTGTATCAGA GGGGTTTAAT ATAGGTAATT TAGCAGTAAA CAATCGCGGA 1400
CAAAATATAA AGTTAAATCC TAAAATTATT GATTCCATTC CAGATAAAGG 1450
TCTAGTGGAA AAGATCGTTA AATTTTGTAA GAGCGTTATT CCTAGAAAAG 1500
GTACAAAGGC GCCACCGCGA CTATGCATTA GAGTAAATAA TAGGGAGTTA 1550
TTTTTTGTAG CTTCAGAAAG TAGCTATAAT GAAAATGATA TTAATACACC 1600
TAAAGAAATT GACGATACAA CAAATCTAAA TAATAATTAT AGAAATAATT 1650
TAGATGAAGT TATTTTAGAT TATAATAGTG AGACAATACC TCAAATATCA 1700
AATCAAACAT TAAATACACT TGTACAAGAC GATAGTTATG TGCCAAGATA 1750
TGATTCTAAT GGAACAAGTG AAATAGAGGA ACATAATGTT GTTGACCTTA 1800
ATGTATTTTT CTATTTACAT GCACAAAAAG TACCAGAAGG TGAAACTAAT 1850
ATAAGTTTAA CTTCTTCAAT TGATACGGCA TTATCAGAAG AATCGCAAGT 1900
ATATACATTC TTTTCTTCAG AGTTTATTAA TACTATCAAT AAACCTGTAC 1950
ACGCAGCACT ATTTATAAGT TGGATAAATC AAGTAATAAG AGATTTTACT 2000
ACTGAAGCTA CACAAAAAAG TACTTTTGAT AAGATTGCAG ACATATCTTT 2050
AGTTGTACCA TATGTAGGTC TTGCTTTAAA TATAGGTAAT GAGGTACAAA 2100
AAGAAAATTT TAAGGAGGCA TTTGAATTAT TAGGAGCGGG TATTTTATTA 2150
GAATTTGTGC CAGAGCTTTT AATTCCTACA ATTTTAGTGT TTACAATAAA 2200
ATCCTTTATA GGTTCATCTG AGAATAAAAA TAAAATCATT AAAGCAATAA 2250
ATAATTCATT AATGGAAAGA GAAACAAAGT GGAAAGAAAT ATATAGTTGG 2300
ATAGTATCAA ATTGGCTTAC TAGAATTAAT ACACAATTTA ATAAAAGAAA 2350

AGAACAAATG TATCAAGCTT TGCAAAATCA AGTAGATGCA ATAAAAACAG 2400
TAATAGAATA TAAATATAAT AATTATACTT CAGATGAGAG AAATAGACTT 2450
GAATCTGAAT ATAATATCAA TAATATAAGA GAAGAATTGA ACAAAAAAGT 2500
TTCTTTAGCA ATGGAAAATA TAGAGAGATT TATAACAGAG AGTTCTATAT 2550
TTTATTTAAT GAAGTTAATA AATGAAGCCA AAGTTAGTAA ATTAAGAGAA 2600
TATGATGAAG GCGTTAAGGA ATATTTGCTA GACTATATTT CAGAACATAG 2650
ATCAATTTTA GGAAATAGTG TACAAGAATT AAATGATTTA GTGACTAGTA 2700
CTCTGAATAA TAGTATTCCA TTTGAACTTT CTTCATATAC TAATGATAAA 2750
ATTCTAATTT TATATTTTAA TAAATTATAT AAAAAAATTA AAGATAACTC 2800
TATTTTAGAT ATGCGATATG AAAATAATAA ATTTATAGAT ATCTCTGGAT 2850
ATGGTTCAAA TATAAGCATT AATGGAGATG TATATATTTA TTCAACAAAT 2900
AGAAATCAAT TTGGAATATA TAGTAGTAAG CCTAGTGAAG TTAATATAGC 2950
TCAAAATAAT GATATTATAT ACAATGGTAG ATATCAAAAT TTTAGTATTA 3000
GTTTCTGGGT AAGGATTCCT AAATACTTCA ATAAAGTGAA TCTTAATAAT 3050
GAATATACTA TAATAGATTG TATAAGGAAT AATAATTCAG GATGGAAAAT 3100
ATCACTTAAT TATAATAAAA TAATTTGGAC TTTACAAGAT ACTGCTGGAA 3150
ATAATCAAAA ACTAGTTTTT AATTATACAC AAATGATTAG TATATCTGAT 3200
TATATAAATA AATGGATTTT TGTAACTATT ACTAATAATA GATTAGGCAA 3250
TTCTAGAATT TACATCAATG GAAATTTAAT AGATGAAAAA TCAATTTCGA 3300
ATTTAGGTGA TATTCATGTT AGTGATAATA TATTATTTAA AATTGTTGGT 3350
TGTAATGATA CAAGATATGT TGGTATAAGA TATTTTAAAG TTTTTGATAC 3400
GGAATTAGGT AAAACAGAAA TTGAGACTTT ATATAGTGAT GAGCCAGATC 3450
CAAGTATCTT AAAAGACTTT TGGGGAAATT ATTTGTTATA TAATAAAAGA 3500
TATTATTTAT TGAATTTACT AAGAACAGAT AAGTCTATTA CTCAGAATTC 3550
AAACTTTCTA AATATTAATC AACAAAGAGG TGTTTATCAG AAACCAAATA 3600
TTTTTTCCAA CACTAGATTA TATACAGGAG TAGAAGTTAT TATAAGAAAA 3650
AATGGATCTA CAGATATATC TAATACAGAT AATTTTGTTA GAAAAAATGA 3700
TCTGGCATAT ATTAATGTAG TAGATCGTGA TGTAGAATAT CGGCTATATG 3750
CTGATATATC AATTGCAAAA CCAGAGAAAA TAATAAAATT AATAAGAACA 3800
TCTAATTCAA ACAATAGCTT AGGTCAAATT ATAGTTATGG ATTCAATAGG 3850
AAATAATTGC ACAATGAATT TTCAAAACAA TAATGGGGGC AATATAGGAT 3900
TACTAGGTTT TCATTCAAAT AATTTGGTTG CTAGTAGTTG GTATTATAAC 3950
AATATACGAA AAAATACTAG CAGTAATGGA TGCTTTTGGA GTTTTATTTC 4000
TAAAGAGCAT GGATGGCAAG AAAACTAATA TAATAATTCA AAAAATAGGT 4050
ATTAAAATAG AGGTAATATA TATTACCCTC TATTTTGGAA TAATTTTAAT 4100

ATATTATATG AAACATATAT AAATTTAAAG ATAATATTAA ATCAAGACAC 4150
AAATTCAAAT TAGAAATATA AAATGAAGTA AATGAAAAGT GTAAAAAGTC 4200
ATTAAATAA 4209

下記のＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｘ７４１６２．１のＢｏＮＴ／Ｇ（配列番号７１）：

ATGCCAGTTA ATATAAAAAN CTTTAATTAT AATGACCCTA TTAATAATGA 50
TGACATTATT ATGATGGAAC CATTCAATGA CCCAGGGCCA GGAACATATT 100
ATAAAGCTTT TAGGATTATA GATCGTATTT GGATAGTACC AGAAAGGTTT 150
ACTTATGGAT TTCAACCTGA CCAATTTAAT GCCAGTACAG GAGTTTTTAG 200
TAAAGATGTC TACGAATATT ACGATCCAAC TTATTTAAAA ACCGATGCTG 250
AAAAAGATAA ATTTTTAAAA ACAATGATTA AATTATTTAA TAGAATTAAT 300
TCAAAACCAT CAGGACAGAG ATTACTGGAT ATGATAGTAG ATGCTATACC 350
TTATCTTGGA AATGCATCTA CACCGCCCGA CAAATTTGCA GCAAATGTTG 400
CAAATGTATC TATTAATAAA AAAATTATCC AACCTGGAGC TGAAGATCAA 450
ATAAAAGGTT TAATGACAAA TTTAATAATA TTTGGACCAG GACCAGTTCT 500
AAGTGATAAT TTTACTGATA GTATGATTAT GAATGGCCAT TCCCCAATAT 550
CAGAAGGATT TGGTGCAAGA ATGATGATAA GATTTTGTCC TAGTTGTTTA 600
AATGTATTTA ATAATGTTCA GGAAAATAAA GATACATCTA TATTTAGTAG 650
ACGCGCGTAT TTTGCAGATC CAGCTCTAAC GTTAATGCAT GAACTTATAC 700
ATGTGTTACA TGGATTATAT GGAATTAAGA TAAGTAATTT ACCAATTACT 750
CCAAATACAA AAGAATTTTT CATGCAACAT AGCGATCCTG TACAAGCAGA 800
AGAACTATAT ACATTCGGAG GACATGATCC TAGTGTTATA AGTCCTTCTA 850
CGGATATGAA TATTTATAAT AAAGCGTTAC AAAATTTTCA AGATATAGCT 900
AATAGGCTTA ATATTGTTTC AAGTGCCCAA GGGAGTGGAA TTGATATTTC 950
CTTATATAAA CAAATATATA AAAATAAATA TGATTTTGTT GAAGATCCTA 1000
ATGGAAAATA TAGTGTAGAT AAGGATAAGT TTGATAAATT ATATAAGGCC 1050
TTAATGTTTG GCTTTACTGA AACTAATCTA GCTGGTGAAT ATGGAATAAA 1100
AACTAGGTAT TCTTATTTTA GTGAATATTT GCCACCGATA AAAACTGAAA 1150
AATTGTTAGA CAATACAATT TATACTCAAA ATGAAGGCTT TAACATAGCT 1200
AGTAAAAATC TCAAAACGGA ATTTAATGGT CAGAATAAGG CGGTAAATAA 1250
AGAGGCTTAT GAAGAAATCA GCCTAGAACA TCTCGTTATA TATAGAATAG 1300
CAATGTGCAA GCCTGTAATG TACAAAAATA CCGGTAAATC TGAACAGTGT 1350
ATTATTGTTA ATAATGAGGA TTTATTTTTC ATAGCTAATA AAGATAGTTT 1400
TTCAAAAGAT TTAGCTAAAG CAGAAACTAT AGCATATAAT ACACAAAATA 1450

ATACTATAGA AAATAATTTT TCTATAGATC AGTTGATTTT AGATAATGAT 1500
TTAAGCAGTG GCATAGACTT ACCAAATGAA AACACAGAAC CATTTACAAA 1550
TTTTGACGAC ATAGATATCC CTGTGTATAT TAAACAATCT GCTTTAAAAA 1600
AAATTTTTGT GGATGGAGAT AGCCTTTTTG AATATTTACA TGCTCAAACA 1650
TTTCCTTCTA ATATAGAAAA TCTACAACTA ACGAATTCAT TAAATGATGC 1700
TTTAAGAAAT AATAATAAAG TCTATACTTT TTTTTCTACA AACCTTGTTG 1750
AAAAAGCTAA TACAGTTGTA GGTGCTTCAC TTTTTGTAAA CTGGGTAAAA 1800
GGAGTAATAG ATGATTTTAC ATCTGAATCC ACACAAAAAA GTACTATAGA 1850
TAAAGTTTCA GATGTATCCA TAATTATTCC CTATATAGGA CCTGCTTTGA 1900
ATGTAGGAAA TGAAACAGCT AAAGAAAATT TTAAAAATGC TTTTGAAATA 1950
GGTGGAGCCG CTATCTTAAT GGAGTTTATT CCAGAACTTA TTGTACCTAT 2000
AGTTGGATTT TTTACATTAG AATCATATGT AGGAAATAAA GGGCATATTA 2050
TTATGACGAT ATCCAATGCT TTAAAGAAAA GGGATCAAAA ATGGACAGAT 2100
ATGTATGGTT TGATAGTATC GCAGTGGCTC TCAACGGTTA ATACTCAATT 2150
TTATACAATA AAAGAAAGAA TGTACAATGC TTTAAATAAT CAATCACAAG 2200
CAATAGAAAA AATAATAGAA GATCAATATA ATAGATATAG TGAAGAAGAT 2250
AAAATGAATA TTAACATTGA TTTTAATGAT ATAGATTTTA AACTTAATCA 2300
AAGTATAAAT TTAGCAATAA ACAATATAGA TGATTTTATA AACCAATGTT 2350
CTATATCATA TCTAATGAAT AGAATGATTC CATTAGCTGT AAAAAAGTTA 2400
AAAGACTTTG ATGATAATCT TAAGAGAGAT TTATTGGAGT ATATAGATAC 2450
AAATGAACTA TATTTACTTG ATGAAGTAAA TATTCTAAAA TCAAAAGTAA 2500
ATAGACACCT AAAAGACAGT ATACCATTTG ATCTTTCACT ATATACCAAG 2550
GACACAATTT TAATACAAGT TTTTAATAAT TATATTAGTA ATATTAGTAG 2600
TAATGCTATT TTAAGTTTAA GTTATAGAGG TGGGCGTTTA ATAGATTCAT 2650
CTGGATATGG TGCAACTATG AATGTAGGTT CAGATGTTAT CTTTAATGAT 2700
ATAGGAAATG GTCAATTTAA ATTAAATAAT TCTGAAAATA GTAATATTAC 2750
GGCACATCAA AGTAAATTCG TTGTATATGA TAGTATGTTT GATAATTTTA 2800
GCATTAACTT TTGGGTAAGG ACTCCTAAAT ATAATAATAA TGATATACAA 2850
ACTTATCTTC AAAATGAGTA TACAATAATT AGTTGTATAA AAAATGACTC 2900
AGGATGGAAA GTATCTATTA AGGGAAATAG AATAATATGG ACATTAATAG 2950
ATGTTAATGC AAAATCTAAA TCAATATTTT TCGAATATAG TATAAAAGAT 3000
AATATATCAG ATTATATAAA TAAATGGTTT TCCATAACTA TTACTAATGA 3050
TAGATTAGGT AACGCAAATA TTTATATAAA TGGAAGTTTG AAAAAAAGTG 3100
AAAAAATTTT AAACTTAGAT AGAATTAATT CTAGTAATGA TATAGACTTC 3150
AAATTAATTA ATTGTACAGA TACTACTAAA TTTGTTTGGA TTAAGGATTT 3200

TAATATTTTT GGTAGAGAAT TAAATGCTAC AGAAGTATCT TCACTATATT 3250
GGATTCAATC ATCTACAAAT ACTTTAAAAG ATTTTTGGGG GAATCCTTTA 3300
AGATACGATA CACAATACTA TCTGTTTAAT CAAGGTATGC AAAATATCTA 3350
TATAAAGTAT TTTAGTAAAG CTTCTATGGG GGAAACTGCA CCACGTACAA 3400
ACTTTAATAA TGCAGCAATA AATTATCAAA ATTTATATCT TGGTTTACGA 3450
TTTATTATAA AAAAAGCATC AAATTCTCGG AATATAAATA ATGATAATAT 3500
AGTCAGAGAA GGAGATTATA TATATCTTAA TATTGATAAT ATTTCTGATG 3550
AATCTTACAG AGTATATGTT TTGGTGAATT CTAAAGAAAT TCAAACTCAA 3600
TTATTTTTAG CACCCATAAA TGATGATCCT ACGTTCTATG ATGTACTACA 3650
AATAAAAAAA TATTATGAAA AAACAACATA TAATTGTCAG ATACTTTGCG 3700
AAAAAGATAC TAAAACATTT GGGCTGTTTG GAATTGGTAA ATTTGTTAAA 3750
GATTATGGAT ATGTTTGGGA TACCTATGAT AATTATTTTT GCATAAGTCA 3800
GTGGTATCTC AGAAGAATAT CTGAAAATAT AAATAAATTA AGGTTGGGAT 3850
GTAATTGGCA ATTCATTCCC GTGGATGAAG GATGGACAGA ATAATATAAT 3900
TAAATATTTA TTAAAGCTAC TTTGATAGGA AAATCAA 3937

を含む、配列番号６５の核酸分子または任意の他のクロストリジウム神経毒分子と少なくとも約８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、またはそれ以上同一である。

【０１２７】

クロストリジウム神経毒の無毒性誘導体をコードし、本明細書に記載のプロペプチド融合体をコードするようにさらに改変し得る単離核酸分子は、Ｉｃｈｔｃｈｅｎｋｏ及びＢａｎｄの米国特許第７，７８５，６０６号に記載されており、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する。ＢｏＮＴ／Ｃの無毒性誘導体（検出タグ及びアフィニティー精製タグを有する）をコードし、本発明のプロペプチド融合体をコードするようにさらに改変し得る核酸分子の１つの具体例を、図１７Ａ～Ｌに示す。

【０１２８】

核酸分子は、宿主におけるコドン最適化、制限部位の容易な配置、及び構築物中の他の場所に不明瞭な部位が存在しないことを考慮に入れた他の改変、ならびにそれらが発現及び精製中における何らかの内部不安定性を確実に生じないようにするために設計した制限特異性プロテアーゼ部位を有してもよい。他の改変として、コードするプロペプチドに低特異性タンパク質分解への耐性を付与する突然変異、推定上の内部ＤＮＡ調節エレメントを不活性化する１つ以上のサイレント突然変異、及び／または１つ以上のユニークな制限部位を挙げ得るが、必ずしもこれらに限定するものではない。成熟神経毒の安定性及び収率を、プロペプチドの中間領域内の残基のアミノ酸置換によって最適化し、それによって、成熟神経毒の発現に使用する宿主生物の非特異的タンパク質分解及び中毒に対する感受性を低減してもよい。また、選択した発現系において、プロペプチド融合体のＲＮＡ転写または発現に影響し得るサイレント突然変異をＤＮＡ調節エレメントに導入する。

【０１２９】

一実施形態では、核酸分子は、クロストリジウム神経毒（ＢｏＮＴ／Ａ）の軽鎖領域に、以下の突然変異の１つ以上をコードする：Ｅ２２４＞Ａ、Ｙ３６６＞Ａ、Ｋ４３８＞Ｈ、Ｋ４４０＞Ｑ、Ｋ４４４＞Ｑ、Ｋ８７１＞Ｎ、Ｑ１６２＞Ｙ、Ｌ２５６＞Ｙ、Ｒ２５７＞Ｅ、Ｌ３２２＞Ｅ、Ｑ１６３＞Ｅ、Ｅ２６３＞Ｌ、及びＬ３２３＞Ｉ。

【０１３０】

別の実施形態では、核酸分子は、クロストリジウム神経毒（ＢｏＮＴ／Ｃ、図１７Ａ～Ｌに示すアミノ酸番号を有する）の軽鎖領域に、以下の突然変異の１つ以上をコードする：Ｅ４４６＞Ａ、Ｈ４４９＞Ｇ、Ｙ５９１＞Ａ。

【０１３１】

ボツリヌス神経毒の発現レベルは、ＶＨＨ、ＲＳＰ、ＤＴ、ＡＰＴ、タグ、リンカー、もしくはスペーサーの、数、タイプもしくは間隔を含むが必ずしもこれらに限定されない特定の構築物の長さ及び／または組成に影響を受ける場合がある。具体例として、構築物がＶＨＨドメインをコードする配列を２つ以上含む場合、ＶＨＨドメインをコードする配列の間のリンカーの長さは発現レベルに影響を与え得る。

【０１３２】

さらに別の実施形態では、モジュラー型ＤＮＡ構築物を設計して、多様かつ幅広い種類のタンパク質融合体を作製しやすくする。これらのモジュラー型ＤＮＡ構築物は、ＤＮＡ構築物内に特定の制限酵素部位認識配列（「ＲＳ」）を含ませることにより、クローニングによって容易に交換可能な要素または領域の組み合わせを含む。したがって、本実施形態によれば、モジュラー型ＤＮＡ構築物は、「アクセプター」構築物及び「ドナー」構築物の両方として作製される。アクセプター構築物は、ドナー構築物を「受容」し、アクセプター構築物がコードする融合タンパク質の活性／機能を改変する。一実施形態では、それは、本明細書においてユニークな制限酵素部位（「ＵＲＳ」）と呼ぶ、ＤＮＡ構築物がもともと保有していなかった特異的制限酵素部位の組み込み、使用、または配置によって行う。これらの制限酵素部位は、コードされた融合タンパク質の機能的または構造的エレメントをコードするＤＮＡ配列の間（例えば、ＢｏＮＴ　ＬＣとタグとの間）の接合部またはその近傍にあってもよい。制限酵素消化、及びドナー構築物とレシピエント構築物との間の相補的な一本鎖突出末端配列のライゲーションを用いて、これらの構築物のエレメントを、構築物内のＵＲＳの位置に応じて全体的または部分的に交換してもよい（例えば、アクセプター構築物はドナー構築物を受け取ってもよい）。

【０１３３】

モジュラー型ＤＮＡ構築物が、ＢｏＮＴ　ＬＣ及びＢｏＮＴ　ＨＣを含むが、必ずしもこれらに限定されないＢｏＮＴ配列に相同な領域を含む場合、配列は、任意のＢｏＮＴ血清型またはその混合物に由来してもよく、及び配列番号６５の分子または他の任意のクロストリジウム神経毒分子に対し、少なくとも約８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、またはそれ以上の相同性を有する。

【０１３４】

構築物がコードする融合タンパク質内のエレメントまたは領域をコードするＤＮＡ配列の接合部の近くにＵＲＳを配置してもよいが、配列内のＲＳの正確な位置は、エレメントまたは領域をコードする配列内で様々に異なっていてもよく、さらにこれを用いて、前記エレメントもしくは領域をコードする配列を、機能を失わせずに交換するか、または機能を失わせずにレシピエントエレメントもしくは領域をコードするＤＮＡ配列の一部を、ドナーエレメントもしくは領域をコードする配列と置換してもよい。

【０１３５】

融合タンパク質をコードするヌクレオチド構築物のモジュラー構築の一実施形態において、構築物は、ＢｏＮＴ　ＬＣとＢｏＮＴ　ＨＣとの間及びその隣接部にＲＳＰ部位を含む。この構築物は、必要に応じてタグ配列及びスペーサー配列も含む。タグ配列として、ＡＰＴ、ＤＴ、リンカー、及びスペーサーが挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。構築物は、多数のユニークな制限酵素部位（ＵＲＳ）を含んでもよく、これを用いて構築物を断片化し、分子クローニングを介して融合タンパク質のエレメントをコードする新規配列を容易に組み込むことができる。この実施形態を図３２に示す。この実施形態の具体例は、図３３（ＢｏＮＴ／Ａ）及び図３４（ＢｏＮＴ／Ｃ）を含み、これを模式的に図３２に示す。

【０１３６】

図３６Ａ～Ｆ及び図３７Ａ～Ｅに示す特定の実施形態によれば、ＲＳＰは、ＷＥＬＱｕｔ（黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）由来のＳｐｌＢプロテアーゼ）などのプロテアーゼ切断部位であり、プロペプチドのタンパク質分解活性化の後に、正に荷電したアミノ酸（リジン、アルギニン、またはヒスチジンなどであり、図３５においてＸ＋で示す）がＮ末端に位置することを可能にする。この特定の構造は利点を有し得る。特に、図３９Ａ～Ｏ及び図３７Ａ～Ｅに示す特定の実施形態のＡＤＤコード配列は、ＶＨＨの上流に温度感受性デグロンを生成する。温度感受性デグロンは、昆虫細胞の細胞質において３３℃で安定であるが、哺乳動物の神経細胞の温度（３７℃）では、不安定化Ｎ末端残基（例えば、正に荷電したアミノ酸アルギニン）は、神経細胞のプロテアソーム機構によるユビキチン化と分解の増強を引き起こし、タンパク質のｉｎ　ｖｉｖｏでの半減期は劇的に減少する（図３６Ａ～Ｆ、図３７Ａ～Ｅ）。

【０１３７】

一実施形態では、モジュラー型構築物は、ＢｏＮＴ　ＬＣコード配列の上流にＲＳＰ及びＡＤＤをコードする配列を含み、必要に応じて、ＡＰＴ及びＤＴまたはヌクレオチドリンカー及び／またはスペーサーを含むが必ずしもこれらに限定されないタグコード配列を含む。構築物は、多数のユニークな制限酵素部位（ＵＲＳ）を含み、これらの制限酵素部位を用いて構築物を断片化するとともに、分子クローニングを介して融合タンパク質のエレメントをコードするドナー構築物を容易に組み込む（または受け入れる）ことができる。そのような実施形態を図３５に示す。本実施形態の特定の非限定的な例は、図３６Ａ～Ｆ（ＢｏＮＴ／Ａ）及び図３７Ａ～Ｅ（ＢｏＮＴ／Ｃ）を含み、これを模式的に図３５に示す。

【０１３８】

図３６Ａ～Ｆ及び図３７Ａ～Ｅに示す特定の実施形態によれば、ＲＳＰは、ＷＥＬＱｕｔ（黄色ブドウ球菌由来のＳｐｌＢプロテアーゼ）などのプロテアーゼ切断部位であり、正に荷電したアミノ酸（リジン、アルギニン、またはヒスチジンなどであり、図３５においてＸ＋で示す）がＮ末端に位置することを可能にする。この特定の構造は利点を有し得る。特に、図３９Ａ～Ｏ及び図３７Ａ～Ｅに示す特定の実施形態のＡＤＤコード配列は、温度感受性デグロンである。温度感受性デグロンは、ユビキチン、アルギニン、及びジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）の融合タンパク質であって、チミジンの合成において機能する熱不安定性のマウス由来酵素であり、不安定化Ｎ末端残基（例えば、正に荷電したアミノ酸であるアルギニン）を有する。３７℃において、プロテアソームによって温度感受性デグロンの分解が促進され、タンパク質のｉｎ　ｖｉｖｏでの半減期が劇的に減少する（図３６Ａ～Ｆ、図３７Ａ～Ｅ）。

【０１３９】

特異的ＶＨＨが標的とするタンパク質の分解によって治療的有用性が生じる場合、ヒトの体温下において分解が促進されると、プロペプチド融合体のｉｎ　ｖｉｖｏでの治療的有用性は高まると考えられる。

【０１４０】

図３６Ａ～Ｆ及び図３７Ａ～Ｅに示す特定の実施形態は、ＢｏＮＴ　ＬＣコード配列のＮ末端領域の近くに位置する２つの異なるＵＲＳを含む。図３５（図３６Ａ～Ｆ、図３７Ａ～Ｅ）の構築物を図３２（図３３Ａ～Ｎ、図３４Ａ～Ｎ）の構築物にクローニングすることができ、ここで、（ｉ）図３８Ａに記載のレシピエント構築物は、ＵＲＳを有し、これは構築物を消化する場合に、（ｉｉ）図３８Ｂに記載のドナー構築物を、対応するＵＲＳ（点線、図３８Ａ～３８Ｂ）において消化することによって生成する末端領域に相補的な一本鎖「粘着性」突出末端領域を生成し、（ｉｉｉ）ＢｏＮＴ　ＬＣコード配列の上流にＲＳＰ及びＡＤＤコード配列、ＢｏＮＴ　ＬＣコード配列とＢｏＮＴ　ＨＣコード配列との間にＲＳＰ、ＢｏＮＴ　ＨＣコード配列の下流にＲＳＰ、ならびに任意のタグ及びスペーサー配列を有する構築物が生じる。図３８Ｃに示す実施形態の特定の非限定的な例は、図３９Ａ～Ｏ（ＢｏＮＴ／Ａ）及び図４０Ａ～Ｏ（ＢｏＮＴ／Ｃ）を含む。

【０１４１】

ＶＨＨコード配列、またはＢｏＮＴ　ＬＣコード配列の上流に複数のＶＨＨコード配列を含むさらなる構築物を作製してもよい（図４１）。本実施形態によれば、１つ以上のＶＨＨドメイン（複数可）コード配列を、必要に応じてヌクレオチドリンカーもしくはスペーサー、またはタグのコード配列と共に、構築物に含めてもよい。そのような構築物の特定の非限定的な実施形態を図４２Ａ～Ｂ、図４３、図４４Ａ～Ｂ、及び図４５Ａ～Ｂに示す。これらの特定の非限定的な実施形態では、ＶＨＨコード配列（複数可）の上流にＲＳＰエレメントを含め、さらに必要に応じてＲＳＰコード配列とＶＨＨコード配列との間に、タグコード配列及びヌクレオチドスペーサーまたはリンカーを含めてもよい。

【０１４２】

図３５に示す構築物の１つの特定の実施形態では、構築物は、ＲＳＰコード配列とＶＨＨコード配列との間のタグコード配列またはヌクレオチドスペーサー配列内にＵＲＳを含む。このＵＲＳを使用して、追加のＶＨＨドメインコード配列（複数可）を含む追加的なエレメントを、分子クローニングによるモジュラー構築を介して容易に導入することができる。

【０１４３】

図４１に示す一般的な構築物の構造を有する特定の構築物（すなわち、図４２Ａ～Ｂ、図４３Ａ～Ｂ、図４４Ａ～Ｂ、及び図４５Ａ～Ｂ）は、図３８Ｃの構築物（図３９Ａ～Ｏ、図４０Ａ～Ｏ）にクローニングすることができ、ここで、（ｉ）図４６Ａに記載のレシピエント構築物は、ＵＲＳを有し、これは構築物を消化する場合に、（ｉｉ）図４６Ｂに記載のドナー構築物の消化によって産生するものに相補的な一本鎖「粘着性」突出末端を、対応するＵＲＳ（点線、図３８Ａ～３８Ｂ）上で産生し、（ｉｉｉ）ＶＨＨドメイン（複数可）コード配列（複数可）でＮ末端ＲＳＰコード配列及びＡＤＤコード配列を置換した構築物（図４６Ｃ）を生じる。

【０１４４】

別の実施形態では、図４６Ａ～Ｃに記載の構築物の異なるＵＲＳは、ＶＨＨドメイン（複数可）をＡＤＤの下流及びＢｏＮＴ　ＬＣの上流に挿入した融合タンパク質をコードする構築物を分子クローニングにおいて作製することを目的とする（図４７Ａ～Ｃ）。

【０１４５】

ＲＳＰ切断活性は、特定の構築物の長さ及び／または組成、切断環境、またはそれらの組み合わせから影響を受ける場合がある。具体例として、ＴＥＶプロテアーゼを用いた切断には還元的（または少なくとも非酸化的）環境が必要である。しかしながら、組換えＢｏＮＴ誘導体の生理学的活性に必須となるジスルフィド結合は、還元的環境下では不安定であり、それゆえに迅速かつ完全なタンパク質分解性の活性化を果たすうえで必ずしも最適とはいえないやり方で、ＴＥＶタンパク質分解工程の間の酸化還元環境を改変する必要がある。したがって、ＴＥＶタンパク質分解に用いる条件は、グルタチオンとグルタチオンジスルフィドを併用することにより、ＴＥＶ作用に必要な還元環境と、組換えＢｏＮＴ誘導体中の必須のジスルフィド結合の維持に必要な非還元環境との間の妥協点を提供する。別の具体例は、ＲＳＰ部位におけるリンカー長の改変を含む。ＲＳＰ部位でのリンカーの長さを延ばすと、立体障害が減少し、プロテアーゼへの露出は増大すると考えられる。非酸化条件下でのＲＳＰ部位でのリンカー長の改変に起因する切断活性への影響は、他の環境における影響よりもいくぶん顕著である場合がある。切断活性は、任意の量で向上可能である。一実施形態では、切断は約５０％向上する。他の実施形態では、切断は約１０％、約２０％、約３０％または約４０％向上する。このような切断活性は、還元及び非還元条件下でのゲル電気泳動及びウェスタンブロッティングを用いた切断の時間経過を評価することによって測定してもよい。

【０１４６】

本明細書に記載の構築物中に不安定化残基が存在する場合があり、いくつかの特定の実施形態では、これらの不安定化残基（正電荷アミノ酸など）を除去または置換することが有益である場合がある。例えば、正に荷電したアミノ酸を有するＶＨＨコード配列に関連するリンカーは、治療的積荷の切断をもたらす場合があり、そのような正に荷電したアミノ

酸を排除することは有益であり得る。逆に、ＬＣをその治療用積荷から分離するために、ＶＨＨとＬＣとの間の領域が、正に荷電したアミノ酸を含むことが望ましい状況があり得る。

【０１４７】

図４６Ｃ及び図４７Ｃに例示する構築物は、プロペプチド融合体を作製するための基礎を提供し、これを用いて抗体を送達する一方で、排除のためにこれを用いてタンパク質を標識することができる。したがって、これらの構築物は、抗体及び場合によっては抗体に結合した任意のタンパク質の、送達及び排除の制御の両方のために重要である。

【０１４８】

本発明のさらなる態様は、異種ベクター中の核酸分子を含む発現系及び宿主細胞に関する。本発明は、本明細書に記載の組換え融合タンパク質の発現方法にも関する。本方法は、本明細書に記載の核酸分子、核酸分子に機能的に連結した異種プロモーター、及び核酸分子に機能的に連結した３′調節領域を含む核酸構築物を提供することを含む。核酸構築物を、融合タンパク質を発現させるのに効果的な条件下で宿主細胞に導入する。

【０１４９】

融合タンパク質を発現させるための適切な発現系及び宿主細胞は、Ｉｃｈｔｃｈｅｎｋｏ及びＢａｎｄの米国特許第７，７８５，６０６号に記載されており、その全体を参照として本明細書に援用する。

【０１５０】

一実施形態では、中間領域での切断に影響を与えるのに有効な条件下で、発現させた神経毒を、高特異性プロテアーゼと接触させる。好ましくは、プロペプチド融合体の中間領域は、発現系または宿主細胞の内在性プロテアーゼによって切断されない。

【０１５１】

本明細書に記載の融合タンパク質の発現は、従来の組換え技術を用いて選択した発現系に本明細書に記載の核酸分子を導入することによって行うことができる。一般的に、これは、分子が異種である（すなわち、通常は存在しない）発現系に核酸分子を挿入することを含む。哺乳類宿主への特定の外来遺伝子または天然遺伝子の導入は、その遺伝子配列を最初に適切な核酸ベクターに導入することによって行いやすくなる。「ベクター」は、本明細書中では、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、ウイルス、ビリオンなどの任意の遺伝子エレメントを意味しており、これは適切な制御エレメントと関連づけた場合に複製することができ、かつ細胞間で遺伝子配列を伝達することができる。したがって、この用語は、クローニングベクター及び発現ベクター、ならびにウイルスベクターを含む。適切なセンス（５′→３′）配向及び正しいリーディングフレームで、発現系またはベクターに異種核酸分子を挿入する。ベクターは、挿入するプロペプチド融合体コード配列の転写及び翻訳に必要なエレメントを保有している。

【０１５２】

Ｃｏｈｅｎ及びＢｏｙｅｒの米国特許第４，２３７，２２４号（その全体を参照として本明細書に援用する）は、制限酵素切断及びＤＮＡリガーゼによるライゲーションを用いた組換えプラスミド形態の発現系の構築を記載する。次いで、これらの組換えプラスミドを形質転換によって導入し、原核生物及び組織培養で増殖させた真核細胞を含む単細胞培養物中で複製する。

【０１５３】

組換え遺伝子を、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、及び例えばレンチウイルスなどのレトロウイルスをはじめとするウイルスに導入してもよい。組換えウイルスは、ウイルスに感染した細胞へプラスミドを遺伝子移入することによって生成することができる。

【０１５４】

適切なベクターとして、以下のようなウイルスベクター、例えばラムダベクター系ｇｔ１１、ｇｔ ＷＥＳ．ｔＢ、Ｃｈａｒｏｎ ４など、及び以下のようなプラスミドベクター、例えばｐＢＲ３２２、ｐＢＲ３２５、ｐＡＣＹＣ１７７、ｐＡＣＹＣ１８４、ｐＵＣ８、ｐＵＣ９、ｐＵＣ１８、ｐＵＣ１９、ｐＬＧ３３９、ｐＲ２９０、ｐＫＣ３７、ｐＫＣ１

０１、ＳＶ４０、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ ＋／－またはＫＳ＋／－（“Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍｓ”Ｃａｔａｌｏｇ（１９９３） ｆｒｏｍ Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ，ＣＡ参照、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）、ｐＱＥ、ｐＩＨ８２１、ｐＧＥＸ、ｐＦａｓｔＢａｃシリーズ（インビトロジェン社）、ｐＥＴシリーズ（Ｓｔｕｄｉｅｒ ｅｔ．ａｌ．，“Ｕｓｅ ｏｆ Ｔ７ ＲＮＡ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｔｏ Ｄｉｒｅｃｔ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ Ｃｌｏｎｅｄ Ｇｅｎｅｓ，”Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｖｏｌ．１８５（１９９０）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）、ならびにそれらの任意の誘導体が挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。組換え分子は、形質転換、特に形質導入、接合、可動化、または電気穿孔法によって細胞に導入することができる。Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇｓ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇｓ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８９）に記載され、その全体を参照として本明細書に援用する、当該技術分野の標準的なクローニング手順を用いて、ＤＮＡ配列をベクターにクローニングする。

【０１５５】

様々な宿主‐ベクター系を利用して、細胞内でプロペプチド融合体コード配列を発現させることができる。第一に、ベクター系は使用する宿主細胞に適合している必要がある。宿主‐ベクター系として：バクテリオファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、またはコスミドＤＮＡで形質転換した細菌；酵母ベクターを保有する酵母などの微生物；ウイルス（例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルスなど）に感染した哺乳類細胞系；ウイルス（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；細菌に感染した植物細胞が挙げられる。これらのベクターの発現エレメントは、その強度及び特異性が様々に異なる。使用する宿主‐ベクター系に応じて、多数の適切な転写及び翻訳エレメントのうちの任意の１つを使用することができる。

【０１５６】

異なる遺伝子シグナル及びプロセシング事象が、遺伝子発現の多くの段階（例えば、ＤＮＡ転写及びメッセンジャーＲＮＡ（「ｍＲＮＡ」）の翻訳）を制御する。

【０１５７】

ＤＮＡ転写は、ＲＮＡポリメラーゼの結合を指示し、それによってｍＲＮＡ合成を促進するＤＮＡ配列であるプロモーターの存在に依存する。真核生物プロモーターのＤＮＡ配列は、原核生物プロモーターのＤＮＡ配列とは異なる。さらに、真核生物のプロモーター及び付随する遺伝子シグナルは、原核生物系においては認識されないか、または機能しない可能性があり、さらに、原核生物プロモーターは、真核細胞においては認識されず、機能することもない。

【０１５８】

同様に、原核生物におけるｍＲＮＡの翻訳は、真核生物のそれとは異なる適切な原核生物シグナルの存在に依存する。原核生物におけるｍＲＮＡの効率的な翻訳には、ｍＲＮＡ上のシャイン・ダルガーノ（「ＳＤ」）配列と呼ばれるリボソーム結合部位が必要である。この配列は、タンパク質のＮ末端メチオニンをコードする、通常はＡＵＧである開始コドンの前に位置するｍＲＮＡの短いヌクレオチド配列である。ＳＤ配列は、１６Ｓ ｒＲＮＡ（リボソームＲＮＡ）の３′末端に相補的であり、おそらくはｒＲＮＡとの二重鎖形成によってリボソームへのｍＲＮＡの結合を促進し、リボソームの正しい位置付けを可能にする。遺伝子発現の最大化に関する総説については、Ｒｏｂｅｒｔｓ ａｎｄ Ｌａｕｅｒ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ ６８：４７３（１９７９）を参照されたく、前記文献は、その全体を参照として本明細書に援用する。

【０１５９】

プロモーターは、その「強さ」（すなわち、転写を促進するそれらの能力）が異なる。クローニングした遺伝子を発現するうえで、強力なプロモーターを使用して、高レベルの転写、したがって高レベルの遺伝子発現を得ることが望ましい。利用する宿主細胞系に応じ

て、多数の適切なプロモーターのうちの任意の１つを用いてもよい。例えば、大腸菌、そのバクテリオファージ、またはプラスミド中にクローニングする場合、ＰＨプロモーター、Ｔ７ファージプロモーター、ｌａｃプロモーター、ｔｒｐプロモーター、ｒｅｃＡプロモーター、リボソームＲＮＡプロモーター、大腸菌ファージλのＰ$_R$及びＰ$_L$プロモーター、ならびにｌａｃＵＶ５、ｏｍｐＦ、ｂｌａ、ｌｐｐなどを含むが必ずしもこれらに限定されない他のプロモーターを使用して、隣接するＤＮＡセグメントの高レベルの転写を指示してもよい。さらに、組換えＤＮＡ技術または他の合成ＤＮＡ技術によって産生したハイブリッドｔｒｐ‐ｌａｃＵＶ５（ｔａｃ）プロモーターまたは他の大腸菌プロモーターを用いて、挿入した遺伝子の転写を提供してもよい。

【０１６０】

特異的に誘導する場合を除いてはプロモーターの働きを阻害する細菌宿主細胞株及び発現ベクターを選択してもよい。特定のオペロンでは、挿入したＤＮＡを効率的に転写するために、特異的誘導物質の添加が必要となる。例えば、ｌａｃオペロンは、ラクトースまたはＩＰＴＧ（イソプロピルチオ‐β‐Ｄ‐ガラクトシド）の添加によって誘導される。ｔｒｐ、ｐｒｏなどの様々な他のオペロンは、別種の制御下にある。

【０１６１】

原核細胞における効率的な遺伝子転写及び翻訳のためには、特異的開始シグナルもまた必要である。これらの転写及び翻訳開始シグナルは、遺伝子特異的メッセンジャーＲＮＡ及び合成されたタンパク質それぞれの量によって測定される「強度」の点において様々に異なる場合がある。プロモーターを保有するＤＮＡ発現ベクターはまた、「強力な」転写及び／または翻訳開始シグナルを任意の様々な組み合わせで有してもよい。例えば、大腸菌での効率的な翻訳には、リボソーム結合部位を提供するために、開始コドン（ＡＴＧ）の５′側約７～９塩基のシャイン・ダルガーノ（ＳＤ）配列が必要である。したがって、宿主細胞リボソームが利用可能な任意のＳＤとＡＴＧとの組合せを用いてもよい。このような組合せとして、大腸菌ファージλのｃｒｏ遺伝子もしくはＮ遺伝子由来、または大腸菌トリプトファンＥ、Ｄ、Ｃ、Ｂ、もしくはＡ遺伝子由来のＳＤとＡＴＧとの組合せが挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。さらに、組換えＤＮＡまたは合成ヌクレオチドの取込みを含む他の技術によって産生する任意のＳＤとＡＴＧとの組合せを用いてもよい。

【０１６２】

利用するベクター系及び宿主に応じて、構成的、誘導性、及び抑制性プロモーター、ならびに最小５′プロモーターエレメントを含む任意の数の適切な転写及び／または翻訳エレメントを用いてもよい。

【０１６３】

その全体を参照として本明細書に援用するＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｔｈｉｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（２００１）に記載されるようなプロペプチド融合体コード核酸、選択したプロモーター分子、適切な３′調節領域、及び必要に応じてレポーター遺伝子を、当該技術分野で公知の標準的なクローニング手順を用いて、選択したベクター発現系に組み込み、核酸構築物を調製する。

【０１６４】

プロペプチド融合体をコードする核酸分子を、センス（すなわち、５′→３′）方向でベクターに挿入し、それによって、コードするプロペプチド融合体の、選択したプロモーター制御下での発現に対し、オープンリーディングフレームを適切に配向する。このようにして、適切なプロモーターの制御下で、単一または複数の核酸を適切なベクターに連結して、核酸構築物を調製してもよい。

【０１６５】

プロペプチド融合体をコードする単離核酸分子を発現ベクターに挿入すると、宿主細胞に組み込む準備が整う。組換え分子は、形質転換、特に形質導入、接合、リポフェクション

、プロトプラスト融合、可動化、微粒子銃、または電気穿孔法によって細胞に導入することができる。その全体を参照として本明細書に援用するＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇｓ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇｓ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８９）に記載されているように、当該技術分野で公知の標準的なクローニング手順を用いてＤＮＡ配列を宿主細胞に組み込む。適切な宿主として、細菌、ウイルス、酵母、真菌、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞などが挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。一実施形態では、本発明の宿主細胞として、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、昆虫細胞、及びピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）細胞が挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。

【０１６６】

一般的には、形質転換した細胞のみを選択的に増殖するのに有用な抗生物質または他の化合物を、培地への添加物として加える。使用する化合物は、宿主細胞を形質転換するプラスミド中に存在する選択用マーカーエレメントによって規定される。適切な遺伝子は、ゲンタマイシン、Ｇ４１８、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコールなどへの耐性を付与する遺伝子である。同様に、識別可能な化合物を産生する酵素をコードする「レポーター遺伝子」、または遺伝子送達の結果に関する関連情報を示す他のマーカーも適している。例えば、様々な発光または燐光性レポーター遺伝子も好適であり、これによって異種遺伝子の存在を視覚的に確認してもよい。

【０１６７】

一実施形態では、発現するプロペプチド融合体を、プロペプチド融合体の中間領域での切断を可能にするのに有効な条件下で、高特異性プロテアーゼ（例えば、エンテロキナーゼ、ＴＥＶ配列、またはＷＥＬＱｕｔプロテアーゼ）と接触させる。この手段により、中間領域は、宿主細胞の内在性プロテアーゼによって切断されることがない。発現するプロペプチド融合体は、１つ以上のジスルフィド架橋を有する。

【０１６８】

本発明の別の態様は、本明細書に記載のプロペプチド融合体を、軽鎖領域と重鎖領域がジスルフィド結合によって連結している高特異性プロテアーゼ切断部位において切断することによって産生する融合タンパク質に関する。

【実施例】

【０１６９】

以下の実施例は、本発明の実施形態を例示するために提供するが、いかなる意味においてもその範囲を限定することを意図するものではない。

【０１７０】

実施例１ ― 神経細胞の細胞質ゾルに一本鎖抗体を送達するためのＳＮＡＰ‐２５活性を有さない無毒性誘導体

材料及び方法

ボツリヌス神経毒Ａ無毒性誘導体の発現

以下に述べるＢｏＮＴ／Ａの全長単一形態をバイオエンジニアリングし、発現させ、精製し、その後、前述したようにＴＥＶプロテアーゼによる処理により二本鎖に変換した（Ｉｃｈｔｃｈｅｎｋｏ及びＢａｎｄの米国特許第８，９８０，２８４号、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。

【０１７１】

Ｅ１９ラット海馬神経細胞の調製及び維持

同期妊娠ＳＤ（Sprague-Dawley）系ラット（タコニック社）を用いて、胎生期１９日目（「Ｅ１９」）の海馬神経細胞を単離した。Ｖｉｃａｒｉｏ‐Ａｂｅｊｏｎ（Ｖｉｃａｒｉｏ‐Ａｂｅｊｏｎ，“Ｌｏｎｇ‐ｔｅｒｍ Ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ Ｈｉｐｐｏｃａｍｐａｌ Ｎｅｕｒｏｎｓ，”Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔｏｃ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ． Ｃｈａｐｔｅｒ

３：Ｕｎｉｔ ３２（２００４）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）のプロトコールに従って、海馬からＥ１９ラット海馬神経細胞を調製した。両側海馬を胎児脳から切り出し、解剖用緩衝液（１５ｍＭ ＨＥＰＥＳ ｐＨ７．２（カタログ番号１５６３００８０、ライフテクノロジーズ社）、Ｃａ２＋及びＭｇ２＋フリーの０．５％グルコース／ＤＰＢＳ（カタログ番号１４１９０‐２５０、ライフテクノロジーズ社））に浸漬し、１×トリプシン／ＥＤＴＡ（１０×トリプシン／ＥＤＴＡは０．５％トリプシン／０．２％ＥＤＴＡである（カタログ番号１５４０００５４、ライフテクノロジーズ社））を添加した解剖用緩衝液１０ｍＬ中での、３７℃、１５分間のインキュベーションにより解離させた。先端熱加工パスツールガラスピペットを用いて組織を磨砕し、細胞数を計測した。単一細胞懸濁液を、播種用培地（１×最小必須培地‐Ｇｌｕｔａｍａｘ（商標）（１×ＭＥＭ‐Ｇｌｕｔａｍａｘ（商標）、カタログ番号４１０９００３６、ライフテクノロジーズ社）、１０％ＦＢＳ（ウシ胎仔血清；カタログ番号１６０００００４４、ライフテクノロジーズ社）、１×ピルビン酸ナトリウム（１００ｍＭピルビン酸ナトリウム；カタログ番号１１３６０‐０７０、ライフテクノロジーズ社）、１×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ（１００×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐは１０，０００Ｕ／ｍＬのペニシリン、１０ｍｇ／ｍＬストレプトマイシンである；カタログ番号１５２４００６２、ライフテクノロジーズ社））中、ポリ‐Ｌ‐リジン臭化水素酸塩被覆プレートまたはカバースリップ上にプレーティングした。２時間後、播種用培地を維持培地（１×Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ培地（カタログ番号２１１０３０４９、ライフテクノロジーズ社）、１×Ｂ２７サプリメント（カタログ番号１７５０４０４４、ライフテクノロジーズ社）、及び１×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ）で置き換えた。プレーティングの３日後、２μｇ／ｍＬのシトシンβ‐Ｄ‐アラビノフラノシド（ＡｒａＣ、カタログ番号Ｃ１７６８、シグマ社）を維持培地に添加して、グリアの増殖を防止した。３日ごとに培地の半量を新鮮な維持培地に交換した。

【０１７２】

ウェスタンブロットによるタンパク質定量に関連する実験では、１００ｍｍプレート上に、１～４×１０^{6}個／１０ｍＬ培地で細胞を播種した。免疫細胞化学的研究では、６×３５ｍｍ／ウェルのプレートに挿入したカバースリップ上に、１０，０００～１５０，０００個の細胞を３ｍＬ培地／ウェルで播種した。

【０１７３】

ウェスタンブロット分析

ＢｏＮＴ／Ａ無毒性誘導体（ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ）を、図の説明文及び／または結果に示す時間の間、神経細胞とともにインキュベートした。神経細胞を採取し、氷上で２７ゲージのニードルに試料を数回通過させることによって、プロテアーゼ阻害剤を含有する３００μＬの溶解緩衝液（０．５％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ‐１００、１００ｍＭ ＮａＣｌ、２５ｍＭ ＨＥＰＥＳ ｐＨ７．５、１０ｍＭ ６‐アミノカプロン酸、２ｍＭベンズアミジン、５ｍＭ ４‐（２‐アミノエチル）ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩（ＡＥＢＳＦ）、２．５ｍＭ ＥＤＴＡ、３２５μＭベスタチン、３５μＭ Ｅ‐６４、２．５μＭロイペプチン、０．７５μＭアプロチニン）に溶解した。可溶性タンパク質溶解物を、１８，０００ｇで４℃、３０分間遠心分離することによってペレットから分離した。溶解後、各試料中の総タンパク質濃度を測定し、溶解緩衝液で各試料の体積を調整し、プロテアーゼ阻害剤を補充して濃度を等しくした。可溶化試料中の全タンパク質濃度は、Ｍｉｃｒｏ ＢＣＡキット（カタログ番号２３２３５、サーモサイエンティフィック社）を用い、製造元の取扱説明書に従って測定した。各レーンにおよそ等量（１５μｇ）の総タンパク質を添加し、還元ＳＤＳ ＰＡＧＥで分離し、０．２μｍニトロセルロース膜（バイオラッド社）に転写した。転写後、ＴＢＳＴ（１５０ｍＭ ＮａＣｌ、１０ｍＭトリス塩酸 ｐＨ８．０、０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０）中の１０％無脂肪乳＋５％ＮＧＳ（ヤギ正常血清、カタログ番号１００００Ｃ、ライフテクノロジーズ社）を用いて、室温、１時間、膜をブロッキングした。一次及び二次抗体を、３％ＮＧＳを含有するＴＢＳＴで希釈した。ブロット膜を一次抗体の存在下、４℃で一晩インキュベートし、次いで二次抗体の存在下、室温で４５分間インキュベートした。インキュベーション後、ブロット膜をＴＢＳＴ

で５分間×３回洗浄した。Ｓｕｐｅｒ Ｓｉｇｎａｌ Ｗｅｓｔ Ｐｉｃｏ化学発光基質（カタログ番号３４０８０、サーモサイエンティフィック社）を用いて、オートラジオグラフィーによる可視化を行った。ウェスタンブロットのオートラジオグラフを、エプソン社のＥｘｐｒｅｓｓｉｏｎ １６８０スキャナー上で、Ｓｉｌｖｅｒ Ｆａｓｔ ＡＩ ｖ．６．４．４ｒ７ａソフトウェアを用いてフィルター変更を避けて３００ｄｐｉでスキャンした。既知のＬＣ‐ａｄ含量（ｎｇ／レーン）で還元ＳＤＳ ＰＡＧＥにロードしたＢｏＮＴ／Ａ無毒性誘導体試料を用いて標準曲線を作成した。

【０１７４】

免疫蛍光分析

ＢｏＮＴ／Ａ無毒性誘導体（ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ）を神経細胞と共に１６時間インキュベートした。インキュベーションの直後に、細胞を氷冷ＤＰＢＳで３回洗浄し、４％ホルムアルデヒドで１５分間固定し、０．１％Ｔｒｉｔｏｎ（商標）Ｘ‐１００で５分間透過処理した。固定後、透過性にした細胞をＤＰＢＳで３回洗浄し、室温で１時間、ＤＰＢＳ中の１０％ＢＳＡでブロッキングし、抗ＳＮＡＰ‐２５（カタログ番号１１１０１１、シナプティックシステムズ社、最終濃度０．１ｎｇ／ｍＬ）、抗ＶＡＭＰ‐２（カタログ番号１０４２１１、シナプティックシステムズ社、最終濃度０．１ｎｇ／ｍＬ）、または抗ＥＡ１（カタログ番号６１０４５７、ＢＤバイオサイエンス社、最終濃度１０ｎｇ／ｍＬ）で４℃、一晩インキュベートした。一次抗体をＤＰＢＳ‐３％ＮＧＳで希釈した。細胞をＤＰＢＳ‐３％ＮＧＳで３回洗浄し、ＤＰＢＳ‐３％ＮＧＳで希釈した適切な二次抗体の存在下、室温で４５分間インキュベートした。細胞をＤＰＢＳで３回洗浄し、封入剤を用いてスライド上にカバースリップを封入した。画像スキャンは、４８８及び５６８ｎｍの励起線を生成するアルゴン及びＨｅＮｅレーザーを備えたニコンＬＳＭ５１０共焦点顕微鏡で行い、画像は、Ｚｅｉｓｓ ＬＳＭ共焦点顕微鏡ソフトウェア（ｖ．４．２）を用いて分析した。

【０１７５】

結果

ＢｏＮＴ／Ａ ａｄの産生

ＢｏＮＴ／Ａ ａｄに認められるＳＮＡＰ‐２５に対する残存活性（Ｖａｓｑｕｅｚ‐Ｃｉｎｔｒｏｎらの米国特許出願公開第２０１４／０２１２４５６号におけるＢｏＮＴ／Ａａｄ‐０に関する議論参照、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）を排除するために、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄの軽鎖の触媒ドメインに追加の４つのアミノ酸置換（Ｑ１６２＞Ｙ、Ｌ２５６＞Ｙ、Ｒ２５７＞Ｅ、Ｌ３２２＞Ｅ）を作成して、ＢｏＮＴ／Ａａｄ‐１を構築した。これらの置換は、ＢｏＮＴ／Ａの３次元結晶構造のコンピュータモデルを用いて設計した。ボツリヌス神経毒の第２世代の無毒性誘導体である本例を、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１と命名した。一実施形態によれば、図１Ａ～Ｂは、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１完全長一本鎖発現産物（すなわち、プロペプチド、図１Ａ）、ならびにアフィニティー精製及び制限特異性プロテアーゼによるプロセシング後に得られるジスルフィド結合ヘテロダイマー（すなわち、成熟神経毒、図１Ｂ）を示す。アフィニティー精製用に全長構築物に組み込むタグ（ＡＰＴ$_N$及びＡＰＴ$_C$）に加えて、検出タグ（ＤＴ$_1$及びＤＴ$_2$）を、実験室評価時の検出用に、構築物の成熟重鎖及び軽鎖領域にそれぞれ組み込む。

【０１７６】

ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１軽鎖はＳＮＡＰ‐２５切断を誘導しない

ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１の取込みは、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１ ＬＣの受容体への結合とそれに続く細胞質への移送を含む細胞表面受容体媒介プロセスである（Ｍｏｎｔｅｃｕｃｃｏ ｅｔ ａｌ．，“Ｍｅｃｈａｎｉｓｍ ｏｆ Ａｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｔｅｔａｎｕｓ ａｎｄ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎｓ，”Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１３：１‐８（１９９４）；Ｍａｈｒｈｏｌｄ ｅｔ ａｌ．，“Ｔｈｅ Ｓｙｎａｐｔｉｃ Ｖｅｓｉｃｌｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ ２Ｃ Ｍｅｄｉａｔｅｓ ｔｈｅ Ｕｐｔａｋｅ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ａ ｉｎｔｏ Ｐｈｒｅｎｉｃ Ｎｅｒｖｅｓ，”ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．５８０：２０１１‐２０１４（２００６）、これらの文献はそ

の全体を参照として本明細書に援用する）。神経細胞培養物を、５０ｎＭのＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１で、３７℃、１、２４、及び４８時間処理した（図２）。次いで、細胞を、プロテアーゼ阻害剤を補充した氷冷ＤＰＢＳで洗浄し、可溶化し、溶解緩衝液で抽出した。ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１ ＨＣドメインのＣ末端に融合したヘマグルチニン・エピトープタグ（ＨＡタグ）、及びＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１ ＬＣのＮ末端に融合した大腸菌 ＯｍｐＦリンカー及びマウスランゲリン融合配列タグ（ＯＬＬＡＳタグ）（それぞれ、ＤＴ$_2$及びＤＴ$_1$）に対する抗体を用いてＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１の重鎖及び軽鎖を同定した。

【０１７７】

ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１ ＬＣの蓄積を定量するために、精製した還元ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１の標準曲線を作成し、ウェスタンブロットによって分析した。図２は、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１ ＨＣ及びＬＣが、培養後の神経細胞において内部移行し、Ｔｒｉｔｏｎ（商標）Ｘ‐１００で抽出して生成した神経細胞培養物の抽出物中において、ＤＴ$_1$及びＤＴ$_2$を用いて検出されることを示す。ＶＡＭＰ‐２に対する抗体を内部対照として含ませ、細胞内ＳＮＡＲＥタンパク質がインタクトであることを決定した。ＳＮＡＰ‐２５に対する抗体は、ＳＮＡＰ‐２５切断の欠失を示す。

【０１７８】

ＳＮＡＰ‐２５及びＶＡＭＰ‐２は、シナプス小胞エキソサイトーシスのための分子機構の必須成分であり、神経細胞の細胞質区画に露出するＳＮＡＲＥタンパク質である。ＶＡＭＰ‐２は、小型シナプス小胞と独占的に構造的に会合している。ＳＮＡＰ‐２５は、野生型ＢｏＮＴ／ＡのＬＣプロテアーゼの分子標的である（Ｂｌａｓｉ ｅｔ ａｌ．，“Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ａ Ｓｅｌｅｃｔｉｖｅｌｙ Ｃｌｅａｖｅｓ ｔｈｅ Ｓｙｎａｐｔｉｃ Ｐｒｏｔｅｉｎ ＳＮＡＰ‐２５，”Ｎａｔｕｒｅ ３６５：１６０‐１６３（１９９３）、その全体を参照として本明細書に援用する）。内部移行したＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１ ＬＣが、ＳＮＡＰ‐２５切断がなくても同様にＳＮＡＲＥタンパク質を標的化するかどうかを判定するために、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１処理細胞の免疫細胞化学分析を行い、その結果を図３Ａ～Ｃに示す。ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１ ＬＣは、ＳＮＡＰ‐２５（図３Ａ）及びＶＡＭＰ‐２（図３Ｂ）と特異的に共局在化した。ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１のいくつかのＬＣ画分がエンドソームマーカーと共局在していたかどうかを判定するために、初期エンドソーム抗原１（「ＥＥＡ１」）を用いて共免疫染色を行った。ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１ ＬＣと共局在化したＥＥＡ１のスポットはほとんどなかった（図３Ｃ）。これらの実験から、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１ ＬＣが実際に細胞内区画に局在することを確認した。

【０１７９】

一本鎖抗体の送達のためのＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１

積荷送達の第二の例は、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１のＮ末端に挿入したスペーサードメインの上流に挿入した非中和型抗ＬＣ‐ＢｏＮＴ／Ｂ ＶＨＨ（Ｂ‐１０ ＶＨＨ）ドメインを有するプロトタイプのＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１融合タンパク質である。ＶＨＨドメインのＮ末端にはｃ‐ｍｙｃが隣接し、神経細胞の細胞質へのＶＨＨ‐ＬＣ融合タンパク質の送達を検出する。Ｈｉｓタグ及びＳｔｒｅｐタグはそれぞれ、全長発現構築物のＮ末端（ＡＰＴ$_N$）及びＣ末端（ＡＰＴ$_C$）に位置し、両方ともＴＥＶプロテアーゼ切断部位（ＲＳＰ）に隣接する。これらの工程により、全長一本鎖発現産物のアフィニティー精製、及び任意の切断型発現変異体の排除が可能になる。図４Ａ～Ｂに概して示すように、一本鎖発現産物のプロセシング中にＴＥＶプロテアーゼで処理することにより後者のタグを除去し、医薬用途に適した活性ジスルフィド結合ヘテロ二量体を形成する。「ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１ ＶＨＨ」と呼ぶこの構築物のヌクレオチド配列（配列番号１）及びアミノ酸配列（配列番号２）の一実施形態を、図９Ａ～Ｌに示す。図５Ａ～Ｂは、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１ ＬＣのＮ末端に融合したＶＨＨドメインが海馬神経細胞に内部移行し、ＳＮＡＰ‐２５（図５Ａ）ならびにシナプスサイクル機構の別の構成要素であるＶＡＭＰ‐２（図５Ｂ）と共局在することを示す。

【０１８０】

プロテアソーム分解を介して神経細胞から迅速に排除するためのＶＨＨ標的化抗原を標識する分解促進ドメイン（ＡＤＤ）の使用
図４Ａ～Ｂに概して示し、図５Ａ～Ｂ（すなわち、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐１　ＶＨＨ）において評価するように、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐１媒体に融合した抗ＬＣ‐ＢｏＮＴ／Ｂ　Ｂ‐１０　ＶＨＨは、非中和抗体である。すなわち、Ｂ‐１０　ＶＨＨは、野生型ＢｏＮＴ／ＢのＬＣに高い親和性で結合するが、野生型ＢｏＮＴ／Ｂがその基質であるＶＡＭＰ‐２を切断することを妨げることはない。高親和性のメタロプロテアーゼ中和抗体を使用したとしても、ＶＨＨと野生型ＬＣとの間の複合体の時間的運命が、適時に野生型毒素の細胞内活性を完全に排除することを保証するものではない。したがって、このＶＨＨ‐ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐１融合タンパク質が神経細胞の細胞質から野生型ＢｏＮＴ／ＬＣを除去する（すなわち、内部移行後の解毒剤として機能する）ためには、さらなる特異的配列が必要である場合がある。これは、図６Ａ～Ｂに示すように、ＶＨＨフラグメントのＮ末端に分解促進ドメイン（ＡＤＤ）を配置する（必要に応じてスペーサー配列または検出タグをその間に含んで）ことによって達成される。「ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐１　ＶＨＨデグロン‐１」と呼ぶ、この構築物のヌクレオチド配列（配列番号５）及びアミノ酸配列（配列番号６）の一実施形態を図１１Ａ～Ｌに記載する。
【０１８１】
図６Ａ～Ｂは、抗体‐抗原複合体をプロテアソーム分解へと導くＡＤＤの実施例としてデグロン‐１配列を用いた、得られる融合タンパク質の一般的な模式図を示す。この原理は一般的であり、プロテアソーム分解シグナル伝達ドメインの操作によって一本鎖ＶＨＨに結合した所望の抗原を排除するように設計することができる。
【０１８２】
アフィニティー精製に使用するＮ末端アフィニティータグの除去のための代替プロテアーゼの使用
プロテアソーム経路による排除を最適化するために、リジン残基のような正に荷電した側鎖を有するＮ末端アミノ酸を最終融合タンパク質産物に含めて、ユビキチン化のためのＶＨＨ‐抗原複合体の標的化、及びその結果として生じるプロテオソームの経路を介した分解を増強することができる。しかしながら、アルギニンまたはリジンなどのＮ末端正電荷アミノ酸を有するネイティブに発現するタンパク質は、本質的に不安定である。これらのタンパク質の安定性に関する問題を克服するために、安定に発現するタンパク質前駆体（ＢｏＮＴ誘導体）を、精製後に、ＷＥＬＱｕｔプロテアーゼ（黄色ブドウ球菌由来のＳｐｌＢプロテアーゼ）のような高特異性組換えプロテアーゼを用いて、あらかじめ組み込んでおいた認識配列で切断した。高特異性認識配列ＷＥＬＱにより、このプロテアーゼは、切断産物のＮ末端（この配列に続く）を解放することが可能であり、この場合では、分解の加速を目的として、Ｎ末端にリジン残基が位置する融合タンパク質となるであろう。
【０１８３】
Ｎ末端にリジン残基を有するタンパク質はプロテアソームによってより迅速に分解されることから、ＷＥＬＱｕｔプロテアーゼ系によってプロタンパク質が成熟し、その結果としてＮ末端にリジン残基を含む成熟ヘテロ二量体が生成するように、無毒性プロペプチドを設計する。
【０１８４】
考察
本明細書に提示するデータは、天然のクロストリジウム神経毒の輸送機構（複数可）を介して薬物（治療剤）を神経細胞の細胞質に送達するための組換えクロストリジウム神経毒を改変するための継続的な努力の一部である。すべてのＢｏＮＴ血清型は、それらのＬＣプロテアーゼを神経細胞の細胞質及び標的、具体的にはＳＮＡＲＥタンパク質に送達する。本アプローチは、天然の毒素の構造及び輸送特性を保持しているが、それを現代の分子生物学のツールを用いて望ましい方法で改変可能なＢｏＮＴの組換え誘導体の発現及び精製方法の開発を想定している。
【０１８５】

本実施例では、プロトタイプの媒体ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１の神経細胞への内部移行及び細胞内輸送を記載する。アイデアは、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１を「トロイの木馬」として利用し、治療用積荷、特に単一ドメイン抗体を提供することである。このアイデアを、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１ ＶＨＨ及びＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１ ＶＨＨデグロン‐１という２つの融合タンパク質を用いて例示する。これらの２つの誘導体は、細胞内エピトープを標的とする単一ドメイン抗体を首尾よく送達する。

【０１８６】

ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１ ＬＣ及びＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１ ＶＨＨは、いずれも細胞質ゾルタンパク質及びＳＮＡＲＥ複合体のメンバーであるＳＮＡＰ‐２５及びＶＡＭＰ‐２と広範に共局在化していた。ＬＣとエンドソームマーカーとの共局在がほとんどなかったことは特筆に値する点であり、このことは、エンドソーム区画がＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１誘導体を用いる目的地ではなく内部移行の一時的な段階に過ぎないことを示唆している（Ｍｏｎｔｅｃｕｃｃｏ ｅｔ ａｌ．，“Ｍｅｃｈａｎｉｓｍ ｏｆ Ａｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｔｅｔａｎｕｓ ａｎｄ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎｓ，”Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１３：１‐８（１９９４）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。これは、エンドソーム局在化を示し、シナプス小胞マーカーとほとんど共局在しないクロストリジウム毒素の改変誘導体に基づく送達媒体を記載する他の研究室からの報告とは対照的である（Ｈｏ ｅｔ ａｌ．，“Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ａ Ｈｅａｖｙ Ｃｈａｉｎ‐ｂａｓｅｄ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｖｅｈｉｃｌｅｓ ｆｏｒ Ｎｅｕｒｏｎａｌ Ｃｅｌｌ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，”Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．Ｄｅｓ．Ｓｅｌ．２４：２４７‐２５３（２０１１）；Ｓｉｎｇｈ ｅｔ ａｌ．，“Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉａｌ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎｓ ａｓ ａ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｖｅｈｉｃｌｅ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ Ｎｅｒｖｏｕｓ Ｓｙｓｔｅｍ，”Ｂｉｏｃｈｉｍｉｅ ９２：１２５２‐１２５９（２０１０）；Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，“Ａｎ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｖｅｈｉｃｌｅ ｆｏｒ Ｂｏｔｕｌｉｓｍ Ｃｏｕｎｔｅｒｍｅａｓｕｒｅ，”ＢＭＣ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．９：１２（２００９）；Ｂｒｕｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，“Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｈｅａｖｙ Ｃｈａｉｎ Ｂｅｌｔ ａｓ ａｎ Ｉｎｔｒａｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｈａｐｅｒｏｎｅ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｌｉｇｈｔ Ｃｈａｉｎ，”ＰＬｏＳ Ｐａｔｈｏｇ．３：１１９１‐１１９４（２００７）；Ｋｏｒｉａｚｏｖａ ｅｔ ａｌ．，“Ｔｒａｎｓｌｏｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｌｉｇｈｔ Ｃｈａｉｎ Ｐｒｏｔｅａｓｅ ｔｈｒｏｕｇｈ ｔｈｅ Ｈｅａｖｙ Ｃｈａｉｎ Ｃｈａｎｎｅｌ，”Ｎａｔ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．１０：１３‐１８（２００３）、これらの文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。

【０１８７】

要約すると、本明細書で報告するデータは、本技術プラットフォームにより、野生型ＢｏＮＴ／Ａの構造及び輸送特性を維持する組換えボツリヌス神経毒誘導体をバイオエンジニアリングして産生できることを示す以前の研究を追認するものである。本プラットフォームは、特定の用途に合わせたＢｏＮＴの生成手段を提供する。本実施例では、神経細胞の細胞質ゾルへの無毒性誘導体軽鎖の送達を例証し、このことは、この融合体を「トロイの木馬」として利用して、薬物を神経細胞の細胞質ゾルに送達できる可能性があることを示している。ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１は、神経細胞を特異的に標的とし、高レベルのＬＣを神経細胞の細胞質に移行させる能力を保有しており、細胞質内でＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐１ＬＣは、蓄積及び存続することができ、同時に、細胞毒性が存在する明白な形跡はない。神経細胞の細胞質から回収したＢｏＮＴ／Ａ ＬＣ‐Ｂ‐１０（Ｃｙｔｏ‐３０２）は、以下に記載の免疫沈降実験によって、及び図１８に示すように、ＬＣ／Ｂに結合する能力を依然として保持している。この新規技術は、すべてのＢｏＮＴ血清型に対して機能するように設計することができ、これを適用して、重要な神経疾患の原因となる広範囲の病原性タンパク質に結合し、及びその機能を中和することができる。

【０１８８】

実施例２　－　神経細胞の細胞質へ一本鎖抗体を送達する送達媒体としてのＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０

序論

ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０は、ｉｎ　ｖｉｖｏ全身投与後の神経筋接合部におけるシナプス前領域に見出されることが従前に示されている。ｉｎ　ｖｉｔｒｏで、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０は、神経細胞の細胞質ゾルにマイクロモル濃度で内部移行し、細胞質ゾル内でＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０軽鎖はシナプスタンパク質と共局在する。ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０の局所筋肉内投与は、野生型ＢｏＮＴ／Ａの特徴である筋衰弱／麻痺をもたらし、このことは、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０の神経調節物質としての薬理学的特性を示すものである。

【０１８９】

本実施例では、残存ＳＮＡＰ－２５触媒活性を有するボツリヌス神経毒無毒性誘導体（ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０）を用いた一本鎖抗体の送達の達成に関する経験的実証を示す。ＳＮＡＰ－２５に対するＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ－０軽鎖の触媒活性を、積荷物質の送達の達成度を定量化するための測定値として用い；本実施例においては、ａｄ－０軽鎖に融合した重鎖抗体の可変ドメイン（ＶＨＨ）の、神経細胞の細胞質ゾルへの送達について示す。ＶＨＨまたは一本鎖抗体を用いることにより、神経細胞の細胞質に存在する病原性タンパク質の標的化、中和、及び排除が可能になり、これらを多数の神経症状の治療薬として役立てることができる。いくつかの状況では、残存ＳＮＡＰ－２５切断活性は、抗体によって付与される治療活性と相乗作用し、両者の個別の活性よりも高い治療結果をもたらすことができる。

【０１９０】

材料及び方法

ボツリヌス神経毒Ａ無毒性誘導体の発現

以下に述べるＢｏＮＴ／Ａ無毒性誘導体（ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ）の全長一本鎖形態をバイオエンジニアリングし、発現させ、及び精製し、次いで、上記のようにＴＥＶプロテアーゼで処理することにより二本鎖に変換した（Ｂａｎｄ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　Ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ　ｏｆ　Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ　Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ　Ａ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ　ｆｏｒ　Ｔｒａｆｆｉｃｋｉｎｇ　Ｓｔｕｄｉｅｓ　ａｎｄ　Ｎｅｕｒｏｎａｌ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，”Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐ．Ｐｕｒｉｆ．７１：６２－７３（２０１０）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。

【０１９１】

Ｅ１９ラット海馬神経細胞の調製及び維持

同期妊娠ＳＤ（Sprague-Dawley）系ラット（タコニック社）を用いて、胎生期１９日目（Ｅ１９）の海馬神経細胞を単離した。Ｖｉｃａｒｉｏ－Ａｂｅｊｏｎ（Ｖｉｃａｒｉｏ－Ａｂｅｊｏｎ，“Ｌｏｎｇ－ｔｅｒｍ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　ｏｆ　Ｈｉｐｐｏｃａｍｐａｌ　Ｎｅｕｒｏｎｓ，”Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔｏｃ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．　Ｃｈａｐｔｅｒ　３：Ｕｎｉｔ　３２（２００４）、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）のプロトコールに従って、海馬からＥ１９ラット海馬神経細胞を調製した。両側海馬を胎児脳から切り出し、解剖緩衝液（１５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．２（カタログ番号１５６３００８０、ライフテクノロジーズ社）、Ｃａ２＋及びＭｇ２＋フリーの０．５％グルコース／ＤＰＢＳ（カタログ番号１４１９０－２５０、ライフテクノロジーズ社））中に浸漬し、１×トリプシン／ＥＤＴＡ（１０×トリプシン／ＥＤＴＡは０．５％トリプシン／０．２％ＥＤＴＡである、カタログ番号１５４０００５４、ライフテクノロジーズ社）を添加した解剖緩衝液１０ｍＬ中での３７℃、１５分間のインキュベーションにより解離させた。先端熱加工したパスツールガラスピペットを用いて組織を磨砕し、細胞数を計測した。単一細胞懸濁液を、播種用培地（１×最小必須培地－Ｇｌｕｔａｍａｘ（商標）（１×ＭＥＭ－Ｇｌｕｔａｍａｘ（商標）、カタログ番号４１０９００３６、ライフテクノロジーズ社）、１０％ＦＢＳ（ウシ胎仔血清；カタログ番号１６０００００４４、ライフテクノロジーズ社）、１×ピルビン酸ナトリウム（１００ｍＭピルビン酸ナトリウム；カタログ番号１１３６０－０７０、ライフテクノロジーズ社）、１×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ（１００

×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐは１０，０００Ｕ／ｍＬのペニシリン、１０ｍｇ／ｍＬストレプトマイシンである；カタログ番号１５２４００６２、ライフテクノロジーズ社））中、ポリ‐Ｌ‐リジン臭化水素酸塩被覆プレートまたはカバースリップ上にプレーティングした。２時間後、播種用培地を維持培地（１×Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ培地（カタログ番号２１１０３０４９、ライフテクノロジーズ社）、１×Ｂ２７サプリメント（カタログ番号１７５０４０４４、ライフテクノロジーズ社）、及び１×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ）で置き換えた。プレーティングの３日後、２μｇ／ｍＬのシトシンβ‐Ｄ‐アラビノフラノシド（ＡｒａＣ、カタログ番号Ｃ１７６８、シグマ社）を維持培地に添加して、グリアの増殖を防止した。３日ごとに培地の半量を新鮮な維持培地に交換した。

【０１９２】

ウェスタンブロットによるタンパク質定量に関連する実験では、１００mmプレート上に、１～４×１０^{6}個／１０ｍＬ培地で細胞を播種した。免疫細胞化学的研究では、６×３５mm／ウェルのプレートに挿入したカバースリップ上に、５０，０００～１００，０００個の細胞を３ｍＬ培地／ウェルで播種した。

【０１９３】

ウェスタンブロット研究

ＢｏＮＴ／Ａ無毒性誘導体（ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ）を、図の説明文及び／または結果に示す時間の間、神経細胞とともにインキュベートした。神経細胞を採取し、氷上で２７ゲージのニードルに試料を数回通過させることによって、プロテアーゼ阻害剤を含有する３００μＬの溶解緩衝液（０．５％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ‐１００、１００mＭ　ＮａＣｌ、２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、１０mＭ　６‐アミノカプロン酸、２mＭベンズアミジン、５mＭ　４‐（２‐アミノエチル）ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩（ＡＥＢＳＦ）、２．５mＭ　ＥＤＴＡ、３２５μＭベスタチン、３５μＭ　Ｅ‐６４、２．５μＭロイペプチン、０．７５μＭアプロチニン）に溶解した。可溶性タンパク質溶解物を、１８，０００ｇで４℃、３０分間遠心分離することによってペレットから分離した。溶解後、各試料中の総タンパク質濃度を測定し、溶解緩衝液で各試料の体積を調整し、プロテアーゼ阻害剤を補充して濃度を等しくした。可溶化試料中の全タンパク質濃度は、Ｍｉｃｒｏ　ＢＣＡキット（カタログ番号２３２３５、サーモサイエンティフィック社）を用い、製造元の取扱説明書に従って測定した。各レーンにおよそ等量（１５μｇ）の総タンパク質を添加し、還元ＳＤＳ　ＰＡＧＥで分離し、０．２μmニトロセルロース膜（バイオラッド社）に転写した。転写後、ＴＢＳＴ（１５０mＭ　ＮａＣｌ、１０mＭトリス塩酸　ｐＨ８．０、０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０）中の１０％無脂肪乳＋５％ＮＧＳ（ヤギ正常血清、カタログ番号１００００Ｃ、ライフテクノロジーズ社）を用いて、室温、１時間、膜をブロッキングした。一次及び二次抗体を、３％ＮＧＳを含有するＴＢＳＴで希釈した。ブロット膜を一次抗体の存在下、４℃で一晩インキュベートし、次いで二次抗体の存在下、室温で４５分間インキュベートした。インキュベーション後、ブロット膜をＴＢＳＴで５分間×３回洗浄した。Ｓｕｐｅｒ　Ｓｉｇｎａｌ　Ｗｅｓｔ　Ｐｉｃｏ化学発光基質（カタログ番号３４０８０、サーモサイエンティフィック社）を用いて、オートラジオグラフィーによる可視化を行った。ウェスタンブロットのオートラジオグラフを、エプソン社のＥｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　１６８０スキャナー上で、Ｓｉｌｖｅｒ　Ｆａｓｔ　ＡＩ　ｖ．６．４．４ｒ７ａソフトウェアを用いてフィルター変更を避けて３００ｄｐｉでスキャンした。既知のＬＣ‐ａｄ含量（ｎｇ／レーン）で還元ＳＤＳ　ＰＡＧＥにロードしたＢｏＮＴ／Ａ無毒性誘導体試料を用いて標準曲線を作成した。

【０１９４】

指外転アッセイ

参照としてその全体を本明細書に援用するＡｏｋｉ，“Ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｕｐｄａｔｅ　ｏｎ　ＢＯＴＯＸ（登録商標）（Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ　Ｔｏｘｉｎ　Ｔｙｐｅ　Ａ）‐Ｐｕｒｉｆｉｅｄ　Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ　Ｃｏｍｐｌｅｘ　Ｒｅｌａｔｉｖｅ　ｔｏ　Ｏｔｈｅｒ　Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ　Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ　Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎｓ，”Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ（１９９９）に記載されて

いるように、古典的な指外転スコアリング（「ＤＡＳ」）アッセイを改変した方法を用いて、局所的な筋力低下効果の測定を行った。ＤＡＳアッセイでは、マウスを短時間吊るして特徴的な驚愕反応を誘発し、反応において動物は後肢を伸ばしてその後肢の指を外転させる。マウスＤＡＳアッセイは、筋力低下効果を比較するうえで特に有用である（Ａｏｋｉ，“Ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ Ｕｐｄａｔｅ ｏｎ ＢＯＴＯＸ（登録商標）（Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｔｏｘｉｎ Ｔｙｐｅ Ａ）‐Ｐｕｒｉｆｉｅｄ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｃｏｍｐｌｅｘ Ｒｅｌａｔｉｖｅ ｔｏ Ｏｔｈｅｒ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎｓ，”Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ（１９９９）及びＡｏｋｉ，“Ａ Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｓａｆｅｔｙ Ｍａｒｇｉｎｓ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｓｅｒｏｔｙｐｅｓ Ａ，Ｂ，ａｎｄ Ｆ Ｉｎ Ｍｉｃｅ，”Ｔｏｘｉｃｏｎ ３９：１８１５‐１８２０（２００１）、これらの文献は参照としてその全体を本明細書に援用する）。

【０１９５】

指外転を評価するために、３１ゲージ／ポイントスタイルカスタムのＲＮ針を備えたハミルトン７０１　ＲＮシリンジを用いて、５匹のＣＤ‐１雌（８週齢）マウスの群に対し、その右腓腹筋にＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０　ＶＨＨを最終容量３μｌで注射した。参照としてその全体を本明細書に援用するＡｏｋｉ，“Ａ Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｓａｆｅｔｙ Ｍａｒｇｉｎｓ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｓｅｒｏｔｙｐｅｓ Ａ，Ｂ，ａｎｄ Ｆ Ｉｎ Ｍｉｃｅ，”Ｔｏｘｉｃｏｎ ３９：１８１５‐１８２０（２００１）に記載のスコアリングシステムを用いて、指外転を採点することができる。マウスＤＡＳアッセイは、ボツリヌス神経毒産物の筋力低下効果を比較するために使用する最も一般的なアッセイである。参照としてその全体を本明細書に援用するＡｏｋｉ，“Ａ Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｓａｆｅｔｙ Ｍａｒｇｉｎｓ ｏｆ Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ Ｓｅｒｏｔｙｐｅｓ Ａ，Ｂ，ａｎｄ Ｆ Ｉｎ Ｍｉｃｅ，”Ｔｏｘｉｃｏｎ ３９：１８１５‐１８２０（２００１）は、マウスＤＡＳアッセイを用いて、ＢｏＮＴ／Ａ製剤の用量応答効果の比較を行った。この試験を利用して、マウスにおけるＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０　ＶＨＨの薬理学的活性を定義した。４８時間における指外転を評価した。

【０１９６】

結果

ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０のｉｎ　ｖｉｔｒｏでの薬理学的活性

ＳＮＡＰ‐２５に対する残存活性を測定するために、Ｅ１９ラット海馬神経細胞を１４日間培養し、次いで異なる濃度のＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０に７２時間曝露した。ウェスタンブロット分析の結果は、濃度依存的なＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０誘導性ＳＮＡＰ‐２５切断を示している（図１４）。

【０１９７】

ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０はＶＨＨまたは一本鎖抗体を神経細胞の細胞質ゾルへ効果的に送達する

プロトタイプのＢｏＮＴ／Ａ無毒性誘導体（ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ）を用いる積荷送達の第一の例は、野生型ＢｏＮＴ／Ｂの軽鎖に対して産生した重鎖抗体（ＶＨＨ）または一本鎖抗体の可変ドメインを送達するように設計した（ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０　ＶＨＨ）。アルパカ由来の一本鎖ＶＨＨは約１１ｋＤａの分子量を有し、高い親和性で特異的抗原に結合することができる。試験した特異的ＶＨＨは、非中和性抗ＬＣ‐ＢｏＮＴ／Ｂ　ＶＨＨ（ＶＨＨ　Ｂ‐１０）であって、そのアミノ酸配列は、チャールズ・シューメイカー博士（タフツ大学獣医学部）によって提供され、その後、これを本発明に準ずるように改変し、その発現を最適化した。ＶＨＨドメインの配置に関するいくつかのバリエーションを考案し、図１３Ａ～Ｂに示す設計に到達し、これらの図は、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０のＮ末端に挿入した非中和性抗ＬＣ‐ＢｏＮＴ／Ｂ　ＶＨＨドメインを保有するＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０プロペプチド融合体及び成熟融合タンパク質の模式図を示す。ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐０は残存ＳＮＡＰ‐２５切断活性を保持しているため（図１４）、ＢｏＮＴ／Ａ　ａｄ‐

０軽鎖の触媒活性を測定し、これを神経細胞の細胞質ゾルへの軽鎖及びＶＨＨの送達の成功に対する読み出し情報とすることができる。したがって、１４日間のｉｎ ｖｉｔｒｏ（１４‐ＤＩＶ）Ｅ１９ラット海馬神経細胞培養物を、異なる時点において５０ｎＭのＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０ ＶＨＨに曝露した。５０ｎＭのＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０ ＶＨＨで２４、４８、及び７２時間処理した細胞においてＳＮＡＰ‐２５切断が観察され（図１５）、これは、神経細胞の細胞質へのＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０のＬＣ及びＶＨＨの移送の成功を示している。βアクチンを添加対照として使用し、各レーンに等量の総タンパク質を添加したことを示した（図１５）。

【０１９８】

ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０‐ＶＨＨは局所的筋麻痺を誘発し、神経細胞の細胞質ゾルへの積荷の輸送の成功を示す

ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０誘発性の筋力低下は、従前に、マウスにおけるＤＡＳアッセイを用いてｉｎ ｖｉｖｏにおいて測定された（ＰＣＴ公開ＷＯ２０１４／１１７１４８参照、前記文献はその全体を参照として本明細書に援用する）。神経細胞の細胞質ゾルへのＶＨＨ抗体の送達の成功をさらに検証するために、融合タンパク質の送達の成功に関するｉｎ ｖｉｖｏでの読み出し情報として、ＤＡＳアッセイを利用した。１μｇのＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０ ＶＨＨを３μｌの生理食塩水に含ませて左腓腹筋に注入すると、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０に対する薬学的応答に匹敵する指外転反射の確定的な麻痺が生じ、このことは、図１６に認められるように、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０の軽鎖に融合したＶＨＨが運動神経細胞の細胞質ゾル区画にうまく送達されたことを示している。ＶＨＨを含まないＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０を注入したマウスを、対照として用いた。

【０１９９】

図１８は、免疫沈降実験の結果を示しており、ここでは、上記及び図１９Ａ～Ｌに記載の、非中和性抗ＬＣ‐ＢｏＮＴ／Ｂ ＶＨＨ（Ｂ‐１０ ＶＨＨ）を保有するプロトタイプのＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０融合タンパク質を、プロセシング後のジスルフィド結合ヘテロ二量体の形態で用いて、海馬神経細胞培養物を処理している。図１８のレーン４と５の比較は、ＬＣ／Ｂに対してＢｏＮＴ融合ＶＨＨで処理した神経細胞由来の細胞質ゾル抽出物中で、ＬＣ／Ｂ抗原結合活性を回復させ、ｃ‐ｍｙｃタグを用いて融合タンパク質を免疫沈降することができることを示す。このことはまた、神経細胞への送達後に回収したプロトタイプのＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０融合体がＬＣ／Ｂ抗原結合活性を保持していたということも示しており、これは、細胞の細胞質ゾル画分から回収したＶＨＨ、すなわち構築物をエンドソーム外へ移送した後のＶＨＨが、免疫沈降においてＬＣ／Ｂを特異的に沈降させる能力を依然として保持していることによるものである。

【０２００】

考察

本実施例において、神経細胞の細胞質ゾルに一本鎖抗体を送達するための分子媒体としてのＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０の使用を記載した。アイデアは、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０を「トロイの木馬」として用いて神経細胞の細胞質ゾルを標的とし、その一方で、ＳＮＡＰ‐２５に対するＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０軽鎖の触媒活性を治療用積荷送達の読み取り情報として利用することである。ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０とＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０ ＶＨＨとの間の効力（用量の使用）の相違は、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０の軽鎖に融合したＶＨＨがＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０軽鎖の薬理学的特性を低下させることを示している。にもかかわらず、ｉｎ ｖｉｔｒｏでＳＮＡＰ‐２５切断が検出され、ｉｎ ｖｉｖｏで指外転が測定されるという事実は、ＢｏＮＴ／Ａ ａｄ‐０軽鎖に融合したＶＨＨが神経細胞の細胞質区画に到達しているという具体的な経験的証拠として役立つ。

【０２０１】

実施例３ ― 神経細胞の細胞質への標的送達のための分子媒体としてのボツリヌス神経毒Ｃの無毒性誘導体（ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄ）

序論

野生型（ｗｔ）ＢｏＮＴの構造及び輸送特性を保持する、ボツリヌス神経毒（ＢｏＮＴ）

の組換え誘導体の容易な産生を可能にする方法を開発した。ｗｔのＢｏＮＴ／Ａの無毒性誘導体は、上記に記載した。本実施例では、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄと呼ぶ、軽鎖の触媒ドメインに３つのアミノ酸置換（Ｅ４４６＞Ａ；Ｈ４４９＞Ｇ；Ｙ５９１＞Ａ）を有するＢｏＮＴ／Ｃ１の無毒性誘導体を設計し、発現させ、精製し、及び評価する。

【０２０２】

方法

ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄのコード配列を、タンパク質ヘテロダイマー内の軽鎖／重鎖の相互作用の破壊を最小限に留めながら軽鎖プロテアーゼを不活性化するように設計した。組換えタンパク質を、可溶性プロペプチドとして培地中に分泌させた。このタンパク質を、ＢｏＮＴ／Ａの無毒性誘導体に対するＢａｎｄ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　Ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ　ｏｆ　Ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ　Ｎｅｕｒｏｔｏｘｉｎ　Ａ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ　ｆｏｒ　Ｔｒａｆｆｉｃｋｉｎｇ　Ｓｔｕｄｉｅｓ　ａｎｄ　Ｎｅｕｒｏｎａｌ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，”Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐ．Ｐｕｒｉｆ．７１：６２‐７３（２０１０）に記載の方法のように、タンデムアフィニティークロマトグラフィーにより均一に精製し、ＴＥＶプロテアーゼでプロセシングして、ジスルフィド結合ヘテロ二量体を形成させた（図２１Ａ～Ｃ）。

【０２０３】

Ｅ１９胚性ラット皮質ニューロンの初代培養物中で精製ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄについての検討を行い、ウェスタンブロット及び免疫細胞化学を用いて、酵素活性、神経細胞への内部移行、及び輸送パターンを評価した。ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄのマウス腹腔内ＬＤ５０（ＭＩＰＬＤ５０）を、マウス致死アッセイによって測定した。ｉｎ　ｖｉｖｏでの神経筋接合部へのＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄの標的化は、マウス横隔膜におけるαブンガロトキシンとの共局在を評価することによって判定した。

【０２０４】

Ｅ１９ラット皮質神経細胞の調製及び維持

同期妊娠ＳＤ（Sprague-Dawley）系ラット（タコニック社）を用いて、胎生期１９日目（Ｅ１９）の皮質神経細胞を単離した。両側皮質を胎児脳から切り出し、解剖緩衝液（１５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．２（カタログ番号１５６３００８０、ライフテクノロジーズ社）、Ｃａ２＋及びＭｇ２＋フリーの０．５％グルコース／ＤＰＢＳ（カタログ番号１４１９０‐２５０、ライフテクノロジーズ社）に浸漬し、１×トリプシン／ＥＤＴＡ（１０×トリプシン／ＥＤＴＡは０．５％トリプシン／０．２％ＥＤＴＡである、カタログ番号１５４０００５４、ライフテクノロジーズ社）を補充した１０ｍＬの解剖緩衝液中で、３７℃、１０分間のインキュベーションにより解離させた。先端熱加工したパスツールガラスピペットを用いて組織を磨砕し、細胞数を計測した。単一細胞懸濁液を、播種用培地（１×最小必須培地‐Ｇｌｕｔａｍａｘ（商標）（１×ＭＥＭ‐Ｇｌｕｔａｍａｘ（商標）、カタログ番号４１０９００３６、ライフテクノロジーズ社）、１０％ＦＢＳ（ウシ胎仔血清；カタログ番号１６０００００４４、ライフテクノロジーズ社）、１×ピルビン酸ナトリウム（１００ｍＭピルビン酸ナトリウム；カタログ番号１１３６０‐０７０、ライフテクノロジーズ社）、１×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ（１００×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐは１０，０００Ｕ／ｍＬのペニシリン、１０ｍｇ／ｍＬストレプトマイシンである；カタログ番号１５２４００６２、ライフテクノロジーズ社）中、ポリ‐Ｌ‐リジン臭化水素酸塩被覆プレートまたはカバースリップ上にプレーティングした。２時間後、播種用培地を維持培地（１×Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ培地（カタログ番号２１１０３０４９、ライフテクノロジーズ社）、１×Ｂ２７サプリメント（カタログ番号１７５０４０４４、ライフテクノロジーズ社）、及び１×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ）で置き換えた。プレーティングの３日後、２ｍｇ／ｍＬのシトシンｂ‐Ｄ‐アラビノフラノシド（ＡｒａＣ、カタログ番号Ｃ１７６８、シグマ社）を維持培地に添加して、グリアの増殖を防止した。３～５日ごとに培地の半量を新鮮な維持培地に交換した。

【０２０５】

ウェスタンブロット分析

神経細胞を採取し、氷上で２５ゲージのニードルに試料を数回通過させることによって、プロテアーゼ阻害剤を含有する２００ｍＬの溶解緩衝液（０．５％Ｔｒｉｔｏｎ（商標）Ｘ‐１００、１００ｍＭ ＮａＣｌ、２５ｍＭ ＨＥＰＥＳ ｐＨ７．５、１０ｍＭ ６‐アミノカプロン酸、２ｍＭベンズアミジン、５ｍＭ ４‐（２‐アミノエチル）ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩（ＡＥＢＳＦ）、２．５ｍＭ ＥＤＴＡ、３２５ｍＭベスタチン、３５ｍＭ Ｅ‐６４、２．５ｍＭロイペプチン、０．７５ｍＭアプロチニン）に溶解した。可溶性タンパク質溶解物を、１８，０００ｇで４℃、２０分間遠心分離することによってペレットから分離した。溶解後、各試料中の総タンパク質濃度を測定し、溶解緩衝液で各試料の体積を調整し、プロテアーゼ阻害剤を補充して濃度を等しくした。各レーンにおよそ３０μｇの総タンパク質を添加し、還元ＳＤＳ ＰＡＧＥで分離し、０．２ｍｍニトロセルロース膜（バイオラッド社）に転写した。転写後、ＴＢＳＴ（１５０ｍＭ ＮａＣｌ、１０ｍＭトリス塩酸 ｐＨ８．０、０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０）中の１０％無脂肪乳＋５％ＮＧＳ（ヤギ正常血清、カタログ番号１０００００Ｃ、ライフテクノロジーズ社）を用いて、室温、２時間、膜をブロッキングした。ブロット膜を一次抗体の存在下、４℃で一晩インキュベートし、次いで二次抗体の存在下、室温で４５分間インキュベートした。インキュベーション後、ブロット膜をＴＢＳＴで５分間×３回洗浄した。Ｓｕｐｅｒ Ｓｉｇｎａｌ Ｗｅｓｔ Ｐｉｃｏ化学発光基質（カタログ番号３４０８０、サーモサイエンティフィック社）を用いて、オートラジオグラフィーによる可視化を行った。

【０２０６】

免疫細胞化学分析

ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄまたは ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄ Ｂ８（Ｂ８一本鎖抗体との融合タンパク質）を、図の説明に示すように異なる時間、神経細胞とともにインキュベートした。インキュベーションの直後に、細胞を氷冷ＤＰＢＳで３回洗浄し、４％ホルムアルデヒドで１５分間固定し、０．１％Ｔｒｉｔｏｎ（商標）Ｘ‐１００で５分間透過処理した。固定後、透過性にした細胞をＤＰＢＳで３回洗浄し、１０％ＢＳＡ／ＤＰＢＳ中で室温、１時間ブロッキングし、一次抗体の存在下、４℃で一晩インキュベートした。一次抗体をＤＰＢＳ‐ＮＧＳで希釈した。一次抗体インキュベーション後、細胞をＤＰＢＳ‐ＮＧＳ（３％ＮＧＳを含む１×ＤＰＢＳ）で３回洗浄し、二次抗体（ＤＰＢＳ‐ＮＧＳ中）の存在下、室温で４５分間インキュベートした。二次抗体インキュベーション後、細胞をＤＰＢＳで３回洗浄し、封入剤を用いてスライド上にカバースリップを封入した。画像スキャンは、ニコンＬＳＭ５１０共焦点顕微鏡で行い、画像は、Ｚｅｉｓｓ ＬＳＭ共焦点顕微鏡ソフトウェアを用いて解析した。

【０２０７】

細胞ベースのアッセイにおけるＢｏＮＴ／Ｃ ａｄ触媒活性の検出

野生型ＢｏＮＴ／Ｃの天然基質シンタキシン‐１及びＳＮＡＰ‐２５に対してＢｏＮＴ／Ｃ ａｄが酵素活性を有するかどうかを検出するために、１４‐ＤＩＶ Ｅ１９ラット皮質神経細胞を異なる濃度のＢｏＮＴ／Ｃ ａｄに９６時間曝露した。インキュベーション時間後、細胞を洗浄し、ウェスタンブロット分析のために調製した（図２２Ａ）。細胞を、培地のみ（陰性対照）、０．５ｎＭ ＢｏＮＴ／Ｃ（陽性対照）、または５、２５、もしくは１００ｎＭのＢｏＮＴ／Ｃ ａｄに９６時間曝露した。ウェスタンブロット分析をパーフロム（ｐｅｒｆｒｏｍ）し、シンタキシン‐１及びＶＡＭＰ‐２の検出を行い；この際、ＶＡＭＰ‐２は内部添加対照として用いた。図２２Ｂにおいて、細胞を１、５、２５、または１００ｎＭのＢｏＮＴ／Ｃ ａｄに９６時間曝露した。ウェスタンブロット分析を行い、シンタキシン‐１、ＳＮＡＰ‐２５、ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄ ＬＣ、及びＶＡＭＰ‐２をそれぞれ検出した。ＶＡＭＰ‐２は、内部添加対照として機能する。

【０２０８】

ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄの神経細胞への内部移行の検出

ＢｏＮＴ／Ｃ ａｄの神経細胞への内部移行を検出するために、１４‐ＤＩＶ Ｅ１９ラット海馬培養物を２５ｎＭのＢｏＮＴ／Ｃ ａｄに１６時間曝露した。インキュベーション

後、ＶＡＭＰ‐２、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ　ＬＣ、ＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣ、及びＥＥＡ‐１を検出するモノクローナル抗体を用いた免疫細胞化学のために細胞を調製し、共焦点顕微鏡法を用いて分析した。

【０２０９】

ＢｏＮＴ／Ｃの神経筋接合部への輸送

ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄの輸送パターンを調べるために、６週齢のＣＤ‐１雌マウスに、０．４ｍｇ／ｋｇのＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄを腹腔内注射した。全身注入の２４時間後、マウスを安楽死させ、横隔膜を単離し、免疫染色のために調製した。片側横隔膜を、シンタキシン、ＢｏＮＴ／Ｃ　ＨＣ、及びαブンガロトキシンに対するモノクローナル抗体で染色し、共焦点顕微鏡法で分析した。

【０２１０】

マウスにおけるＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄの毒性

マウスにおけるＢｏＮＴ／Ｃの毒性を測定するために、０．０４、０．２、０．４、２、または４ｍｇ／ｋｇのＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄを腹腔内注射した８週齢のＣＤ‐１雌マウスの生存率を測定した。ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄを、０．０２％ゼラチンを補充したＤＰＢ‐Ｓで希釈した。０．２５０ｍｌの最終容量でマウス腹腔内に注射した。

【０２１１】

結果

１Ｌ培養物からの精製タンパク質の最終収量はおよそ５０ｍｇであった。ＢｏＮＴ／Ｃがシナプスタンパク質ＳＮＡＰ‐２５及びＶＡＭＰ‐２と共局在することを見出した（図２３Ａ～Ｂ）；初期／後期エンドソームマーカーとのわずかな共局在もまた観察された（図２４）。最大１００ｎＭのＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄを用いて神経細胞培養物を９６時間処理したが、ＳＮＡＲＥタンパク質の切断を検出することはできなかった（図２２Ａ～Ｂ）。ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄのＭＩＰＬＤ５０は４ｍｇ／ｋｇを上回ると判定された（表１）。２ｍｇ／ｋｇ以上のＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ用量を注入したマウスは、ワスピー様の老廃物（ｗａｓｐｙ‐ｌｉｋｅ　ｗａｓｔｅ）、全身の衰弱及び呼吸困難を含む有害な臨床症状を示した。動物に腹腔内注射した後、重鎖がマウス横隔膜上のαブンガロトキシンに局在化したことから、全身投与後にＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄが神経筋接合部へ輸送されることを実証した（図２５Ａ～Ｂ）。

【０２１２】

（表１）ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄマウス致死アッセイ

マウス投与量(mg/kg)	生存率 (n=10)
0.04	100%
0.2	100%
0.4	100%
2	90%
4	70%

【０２１３】

結論

ＢｏＮＴ／Ｃは、全身投与後の神経‐筋肉接合部への輸送、及びシナプス前性タンパク質と共局在する能力によって示される天然構造を維持する。ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄの極めて低い毒性、触媒活性の欠如、及びその神経細胞標的化特性は、神経細胞の細胞質への薬物送達のための分子媒体としてのＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄの有用性を示している。

【０２１４】

実施例４　―　無毒性組換え神経毒媒体（ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ）を介して送達するボツリヌス神経毒に対する一本鎖抗体の曝露後の有効性

序論

ボツリヌス中毒に対する現在の治療は、抗毒素の投与に依存する。これらの抗毒素は抗体

または抗体断片であり、ボツリヌス神経毒（ＢｏＮＴ）に対してのみ有効であり、その一方で毒素は循環器中に残る。ボツリヌス中毒患者においては、患者が診断されるまでに多くの毒素が神経細胞内に蓄積し、抗毒素治療が部分的にしか有効にならないため、死を防ぐために長期間の人工呼吸がしばしば必要となる。ＢｏＮＴを毒物投与した神経細胞のシナプス前区画に一本鎖抗体を直接送達するためのＢｏＮＴ／Ｃの組換え無毒性誘導体を開発した。一本鎖抗体は、ＢｏＮＴ／Ａの軽鎖をブロックすることによって、毒物投与された神経細胞内のボツリヌス中毒症状を打ち消す。本実施例では、Ｃ／Ｂ８と呼ぶ、無毒性ＢｏＮＴ／Ｃ１誘導体（ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ）を介して一本鎖ＶＨＨラクダ科動物抗体（Ｂ８）を送達することを含む細胞内治療法を記載し、この治療法は、毒素が神経細胞内に既に進入した後に有効であるように設計されている。

【０２１５】

これらの研究の第一の目的は、ＢｏＮＴ／Ａによる中毒に関連する臨床的呼吸器症状から回復させるＣ／Ｂ８解毒剤の有効性を、特に標準的な抗体ベースの抗毒素と比較して評価することであった。ボツリヌス中毒のマウスモデルにおいて、マウスに、腹腔内（ｉｐ）注射により１．２または４ＭＩＰＬＤ５０ユニットのＢｏＮＴ／Ａ１でチャレンジを行い、その後、Ｃ／Ｂ８解毒剤または抗体ベースの抗毒素を、様々な回数で腹腔内投与することにより、処置した。

【０２１６】

方法

Ｅ１９ラット皮質神経細胞の調製及び維持

同期妊娠ＳＤ（Sprague-Dawley）系ラット（タコニック社）を用いて、胎生期１９日目（Ｅ１９）の皮質神経細胞を単離した。両側皮質を胎児脳から切り出し、解剖緩衝液（１５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．２（カタログ番号１５６３００８０、ライフテクノロジーズ社）、Ｃａ２＋及びＭｇ２＋フリーの０．５％グルコース／ＤＰＢＳ（カタログ番号１４１９０‐２５０、ライフテクノロジーズ社）に浸漬し、１×トリプシン／ＥＤＴＡ（１０×トリプシン／ＥＤＴＡは０．５％トリプシン／０．２％ＥＤＴＡである、カタログ番号１５４０００５４、ライフテクノロジーズ社）を補充した１０ｍＬの解剖緩衝液中で、３７℃、１０分間のインキュベーションにより解離させた。先端熱加工したパスツールガラスピペットを用いて組織を磨砕し、細胞数を計測した。単一細胞懸濁液を、播種用培地（１×最小必須培地‐Ｇｌｕｔａｍａｘ（商標）（１×ＭＥＭ‐Ｇｌｕｔａｍａｘ（商標）、カタログ番号４１０９００３６、ライフテクノロジーズ社）、１０％ＦＢＳ（ウシ胎仔血清；カタログ番号１６０００００４４、ライフテクノロジーズ社）、１×ピルビン酸ナトリウム（１００ｍＭピルビン酸ナトリウム；カタログ番号１１３６０‐０７０、ライフテクノロジーズ社）、１×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ（１００×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐは１０，０００Ｕ／ｍＬのペニシリン、１０ｍｇ／ｍＬストレプトマイシンである；カタログ番号１５２４００６２、ライフテクノロジーズ社）中、ポリ‐Ｌ‐リジン臭化水素酸塩被覆プレートまたはカバースリップ上にプレーティングした。２時間後、播種用培地を維持培地（１×Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ培地（カタログ番号２１１０３０４９、ライフテクノロジーズ社）、１×Ｂ２７サプリメント（カタログ番号１７５０４０４４、ライフテクノロジーズ社）、及び１×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ）で置き換えた。プレーティングの３日後、２ｍｇ／ｍＬのシトシンｂ‐Ｄ‐アラビノフラノシド（ＡｒａＣ、カタログ番号Ｃ１７６８、シグマ社）を維持培地に添加して、グリアの増殖を防止した。３～５日ごとに培地の半量を新鮮な維持培地に交換した。

【０２１７】

ウェスタンブロット分析

神経細胞を採取し、氷上で２５ゲージのニードルに試料を数回通過させることによって、プロテアーゼ阻害剤を含有する２００ｍＬの溶解緩衝液（０．５％Ｔｒｉｔｏｎ（商標）Ｘ‐１００、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、１０ｍＭ　６‐アミノカプロン酸、２ｍＭベンズアミジン、５ｍＭ　４‐（２‐アミノエチル）ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩（ＡＥＢＳＦ）、２．５ｍＭ　ＥＤＴＡ、３２５ｍＭベス

タチン、３５ｍＭ　Ｅ‐６４、２．５ｍＭロイペプチン、０．７５ｍＭアプロチニン）に溶解した。可溶性タンパク質溶解物を、１８，０００ｇで４℃、２０分間遠心分離することによってペレットから分離した。溶解後、各試料中の総タンパク質濃度を測定し、溶解緩衝液で各試料の体積を調整し、プロテアーゼ阻害剤を補充して濃度を等しくした。各レーンにおよそ３０μｇの総タンパク質を添加し、還元ＳＤＳ　ＰＡＧＥで分離し、０．２ｍｍニトロセルロース膜（バイオラッド社）に転写した。転写後、ＴＢＳＴ（１５０ｍＭＮａＣｌ、１０ｍＭトリス塩酸　ｐＨ８．０、０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０）中の１０％無脂肪乳＋５％ＮＧＳ（ヤギ正常血清、カタログ番号１００００Ｃ、ライフテクノロジーズ社）を用いて、室温、２時間、膜をブロッキングした。ブロット膜を一次抗体の存在下、４℃で一晩インキュベートし、次いで二次抗体の存在下、室温で４５分間インキュベートした。インキュベーション後、ブロット膜をＴＢＳＴで５分間×３回洗浄した。Ｓｕｐｅｒ　Ｓｉｇｎａｌ　Ｗｅｓｔ　Ｐｉｃｏ化学発光基質（カタログ番号３４０８０、サーモサイエンティフィック社）を用いて、オートラジオグラフィーによる可視化を行った。

【０２１８】

免疫細胞化学分析

ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄまたは ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ　Ｂ８（Ｂ８一本鎖抗体との融合タンパク質）を、図の説明に示すように異なる時間、神経細胞とともにインキュベートした。インキュベーションの直後に、細胞を氷冷ＤＰＢＳで３回洗浄し、４％ホルムアルデヒドで１５分間固定し、０．１％Ｔｒｉｔｏｎ（商標）Ｘ‐１００で５分間透過処理した。固定後、透過性にした細胞をＤＰＢＳで３回洗浄し、１０％ＢＳＡ／ＤＰＢＳ中で室温、１時間ブロッキングし、一次抗体の存在下、４℃で一晩インキュベートした。一次抗体をＤＰＢＳ‐ＮＧＳで希釈した。一次抗体インキュベーション後、細胞をＤＰＢＳ‐ＮＧＳ（３％ＮＧＳを含む１×ＤＰＢＳ）で３回洗浄し、二次抗体（ＤＰＢＳ‐ＮＧＳ中）の存在下、室温で４５分間インキュベートした。二次抗体インキュベーション後、細胞をＤＰＢＳで３回洗浄し、封入剤を用いてスライド上にカバースリップを封入した。画像スキャンは、ニコンＬＳＭ５１０共焦点顕微鏡で行い、画像は、Ｚｅｉｓｓ　ＬＳＭ共焦点顕微鏡ソフトウェアを用いて解析した。

【０２１９】

Ｃ／Ｂ８とシナプスタンパク質との共局在

Ｃ／Ｂ８がシナプスタンパク質と共局在するかどうかを判定するために、１４‐ＤＩＶＥ１９ラット海馬培養物を２５ｎＭのＣ／Ｂ８で２４時間処理した。シナプシン‐１、ＶＡＭＰ‐２、及びＢｏＮＴ／Ｃ　ＬＣを検出するモノクローナル抗体を用いた免疫細胞化学のために細胞を調製し、共焦点顕微鏡法を用いて分析した（図２６）。

【０２２０】

毒物投与された神経細胞内のＢｏＮＴ／Ａ　ＬＣ活性に対するＣ／Ｂ８の影響

ＢｏＮＴ／Ａ　ＬＣ活性に対するＣ／Ｂ８の影響を調べるために、１４‐ＤＩＶ　Ｅ１９ラット皮質神経細胞を、５ｐＭのＢｏＮＴ／Ａ、及び５０ｎＭのＣ／Ｂ８、５０ｎＭのＢ８単独、５０ｎＭのＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ（分子媒体のみ）、５０ｎＭのＪＬＪＧ３単独（ＢｏＮＴ／Ｂに対するＶＨＨ）、または５０ｎＭのＪＬＪＧ３／Ｃ（ＪＬＪＧ３を有するＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ）のいずれかに対し、共曝露した。インキュベーション直後に、細胞を氷冷ＤＰＢＳで洗浄し、タンパク質を０．５％Ｔｒｉｔｏｎ（商標）Ｘ‐１００緩衝液で可溶化した。タンパク質を、ＳＮＡＰ‐２５及びβアクチンに対する抗体を用いたウェスタンブロット分析によって分析した（図２７）。

【０２２１】

毒物への曝露後モデルにおけるＢｏＮＴ／Ａ　ＬＣ活性へのＣ／Ｂ８の影響及びＳＮＡＰ‐２５回復

ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの曝露後モデルにおけるＢｏＮＴ／Ａ　ＬＣ活性へのＣ／Ｂ８の影響を調べるために、１４‐ＤＩＶ　Ｅ１９ラット皮質神経細胞を５ｐＭのＢｏＮＴ／Ａで９０分間毒物と接触させた。細胞を細胞培養培地で２回洗浄し、５０ｎＭ　Ｃ／Ｂ８またはＢ

ｏＮＴ／Ｃ　ａｄ（Ｃ‐ａｄ）の存在下で追跡した。処理後の異なる日にＳＮＡＰ‐２５のモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットにより試料を分析した（図２８）。

【０２２２】

分子媒体と比較したＣ／Ｂ８のｉｎ　ｖｉｖｏ効力

Ｃ／Ｂ８の効力を分子媒体（ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ）と比較するために、ｉｎ　ｖｉｖｏでの有効性マウス試験を行った。この盲検試験では、マウスに対し、２ＭＩＰＬＤ５０でのチャレンジを行い、毒物投与の３時間後に、プラセボ、０．４ｍｇ／ｋｇ　ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ、または０．４ｍｇ／ｋｇ　Ｃ／Ｂ８で処置した（図２９）。

【０２２３】

毒物投与後の異なる時点におけるＣ／Ｂ８及び抗毒素のｉｎ　ｖｉｖｏ有効性

Ｃ／Ｂ８の有効性を判定するために、マウスに対し、１．２または４ＭＩＰＬＤ５０ユニットでのチャレンジを行い、毒物投与後の異なる時間に、プラセボ、０．４ｍｇ／ｋｇのＣ／Ｂ８、または１Ｕのヒツジポリクローナル血清（抗毒素）で処置した。

【０２２４】

結果

初代神経細胞培養において、ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄ　Ｂ８は、シナプスタンパク質、シナプシン‐１及びＶＡＭＰ‐２と共局在する。ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの有効性試験の結果は、前記Ｃ／Ｂ８によるＳＮＡＰ‐２５切断の部分的な阻害を示している。さらに、Ｃ／Ｂ８で処置した細胞は、非処置群（ｎ／ｔ）またはＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄと比較して、７日目までＳＮＡＰ‐２５の回収を示した（図２８）。

【０２２５】

ｉｎ　ｖｉｖｏでの有効性試験は、プラセボ及びＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄで処置した動物が３０時間以内に死亡したのに対し、Ｃ／Ｂ８で処置したマウスの８０％が回復し、１０日目までに無症状になったことを示している（群当たりｎ＝１０のマウス）。このことは、延命効果がＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄによって送達したＢ８　ＶＨＨに起因することを示している。

【０２２６】

Ｃ／Ｂ８の有効性を、抗体ベースの抗毒素治療と直接比較した。マウスに対し、１．２ＭＩＰＬＤ５０ユニットを用いて腹腔内へのチャレンジを行い、毒物投与後４、１２、または２０時間において、プラセボ、０．４ｍｇ／ｋｇのＣ／Ｂ８、または１Ｕのヒツジポリクローナル血清（抗毒素）で処置した（群当たりｎ＝１０マウス）。毒物投与後４時間の治療群では、治療介入時にボツリヌス中毒の臨床症状は記録されなかった。毒物投与後１２時間の治療群では、マウスは、正常なマウスと比較して、遅い呼吸パターン、細い腰、及び運動性の低下を含むボツリヌス毒素血症の臨床徴候を示した。毒物投与後２０時間後の治療群では、立毛、呼吸雑音を伴う呼吸困難、四肢の衰弱、及び運動性の低下を含む、毒素血症の臨床徴候を示した。４時間治療群の生存率は、Ｃ／Ｂ８群で１００％、抗毒素群で７０％であった（図３０Ａ）。１２時間治療群の生存率は、Ｃ／Ｂ８については９０％、抗毒素については１０％であった（図３０Ｂ）。２０時間治療群の生存率は、Ｃ／Ｂ８群で８０％、抗毒素群で１０％であった（図３０Ｃ）。研究の１０日目までに、生存マウスは、ボツリヌス中毒の臨床症状がなくなり、体重の増加を記録した。各治療群において、Ｃ／Ｂ８で処置したマウスは、抗毒素で処置したマウスと比較して生存率が高かった。これは、すべての動物がボツリヌス中毒の重度の臨床症状を示した毒物投与後２０時間時点で処置した動物において最も顕著であった。

【０２２７】

Ｃ／Ｂ８及び標準的抗毒素の有効性に対する中毒用量の効果

マウスに対し、４ＭＩＰＬＤ５０のＢｏＮＴ／Ａの腹腔内注射でチャレンジを行い、続いて毒物投与後６、８、または１０時間において、０．４ｍｇ／ｋｇのＣ／Ｂ８または１Ｕの抗毒素（ヒツジポリクローナル血清）を用いて介入を行った（群あたりｎ＝５）。毒物投与後６時間では、マウスは、呼吸変化及び細い腰を含む、ボツリヌス毒素血症の臨床徴候を示した。６時間治療群の１０日生存率は、Ｃ／Ｂ８群で４０％、抗毒素群で２０％であった（図３１Ａ）。毒物投与後８時間では、マウスは、呼吸困難、体の衰弱、及び細い

腰を含む、ボツリヌス毒素血症の重度の臨床徴候を示した。８時間治療群の１０日生存率は、Ｃ／Ｂ８群で２０％、抗毒素群で０％であった（図３１Ｂ）。毒物投与後１０時間では、マウスは、呼吸困難、体の衰弱及び細い腰を含む、ボツリヌス毒素血症の重度の臨床徴候を示した。抗毒素群に比べてＣ／Ｂ８群では、致死に４日の遅延があるものの、研究の６日目以降の生存率は０であった（図３１Ｃ）。

【０２２８】

結論

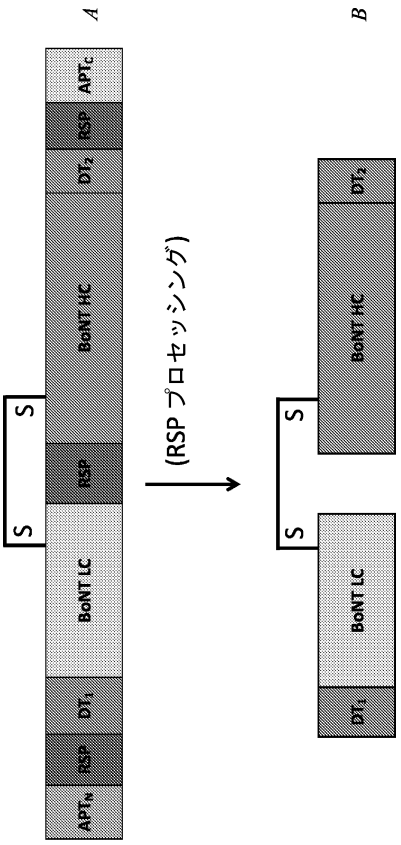
ＢｏＮＴ／Ｃ　ａｄは、有用な分子媒体を提供し、ＢｏＮＴ／Ａに対する治療用一本鎖抗体を中毒状態の神経細胞へ送達し、これによって既にボツリヌス中毒の臨床徴候を示している動物を回復させることができる。

【０２２９】

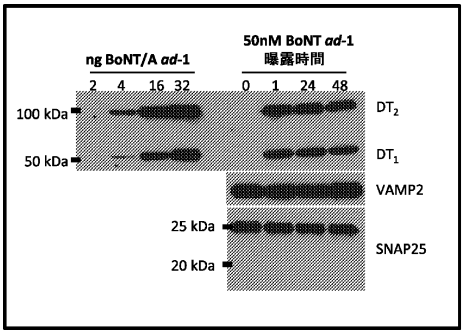
本明細書において、好ましい実施形態を詳細に記載したが、本発明の精神から逸脱することなく様々な修正、追加、置換などを行い得ることは当業者には明らかであり、したがってそれらは添付の特許請求の範囲に定義する本発明の範囲内にあるものとみなされる。

【図面】

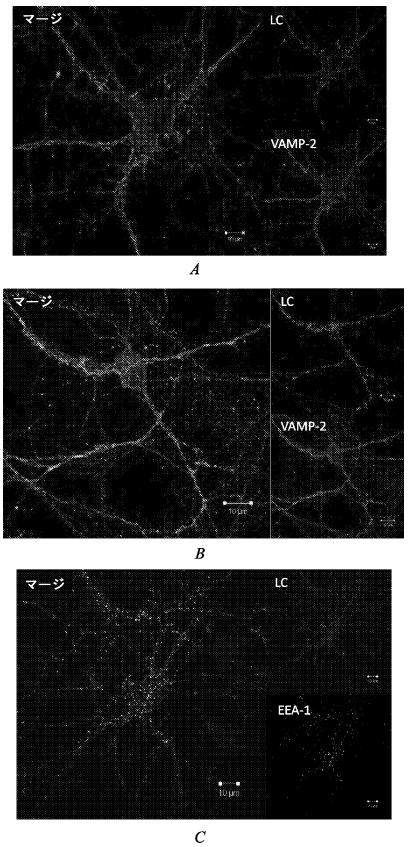
【図１】


A
B
APTC
RSP
DT2
BoNT HC
RSP
BoNT LC
DT1
RSP
APTN
S
S
(RSP プロセッシング)
DT2
BoNT HC
S
S
BoNT LC
DT1

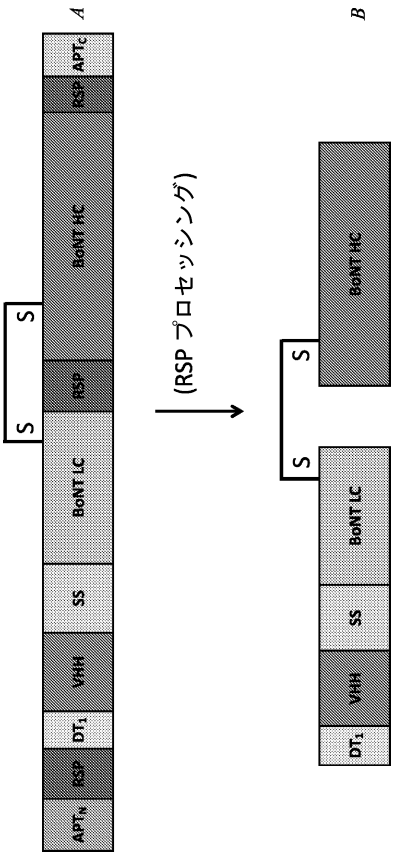
【図２】


ng BoNT/A ad-1
2 4 16 32
50nM BoNT ad-1
曝露時間
0 1 24 48
100 kDa
50 kDa
DT2
DT1
VAMP2
25 kDa
20 kDa
SNAP25

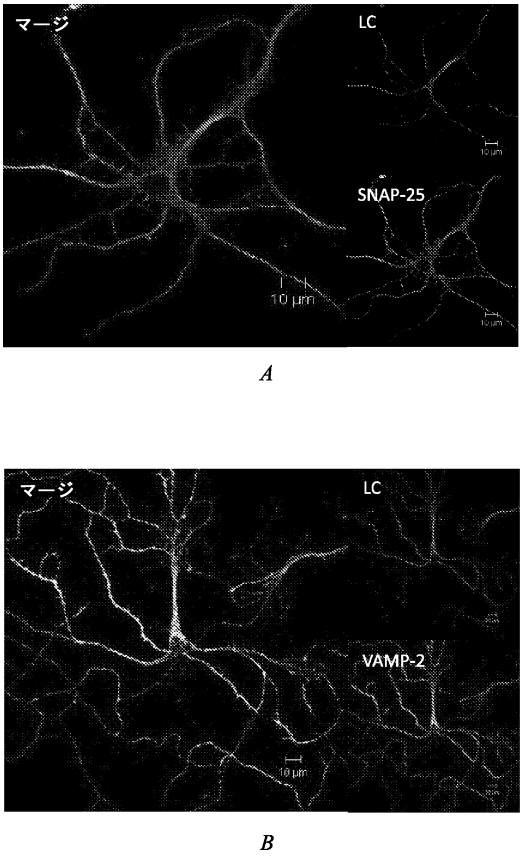
【図３】


マージ
LC
VAMP-2
A
マージ
LC
VAMP-2
B
マージ
LC
EEA-1
C

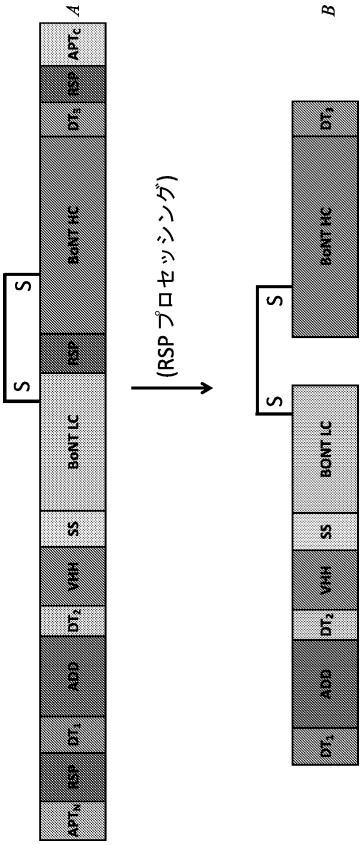
【図４】


A
B
APTC
RSP
BoNT HC
RSP
BoNT LC
SS
VHH
DT1
RSP
APTN
S
S
(RSP プロセッシング)
BoNT HC
S
S
BoNT LC
SS
VHH
DT1

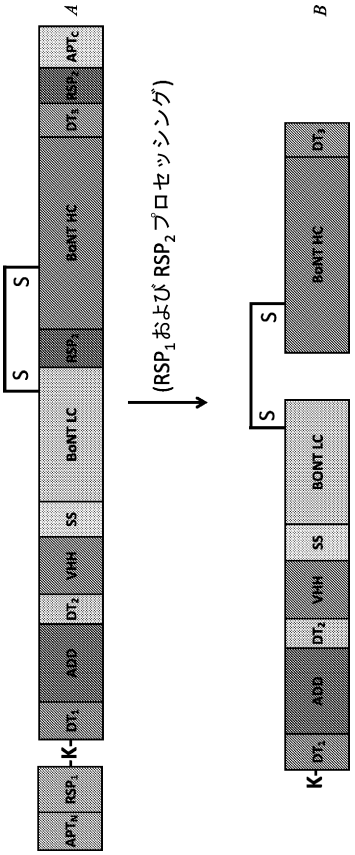
【図５】


マージ
LC
SNAP-25
10 μm
A
マージ
LC
VAMP-2
10 μm
B

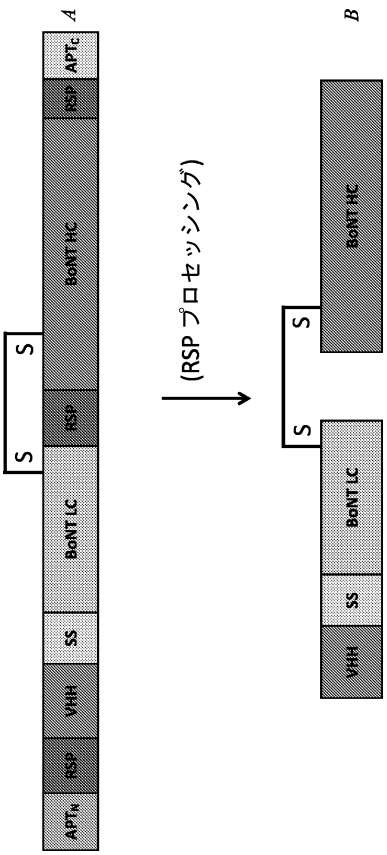
【図６】


A
APTC
RSP
DT3
BoNT HC
S
S
RSP
BoNT LC
SS
VHH
DT2
ADD
DT1
RSP
APTN
(RSP プロセッシング)
B
DT3
BoNT HC
S
S
BONT LC
SS
VHH
DT2
ADD
DT1

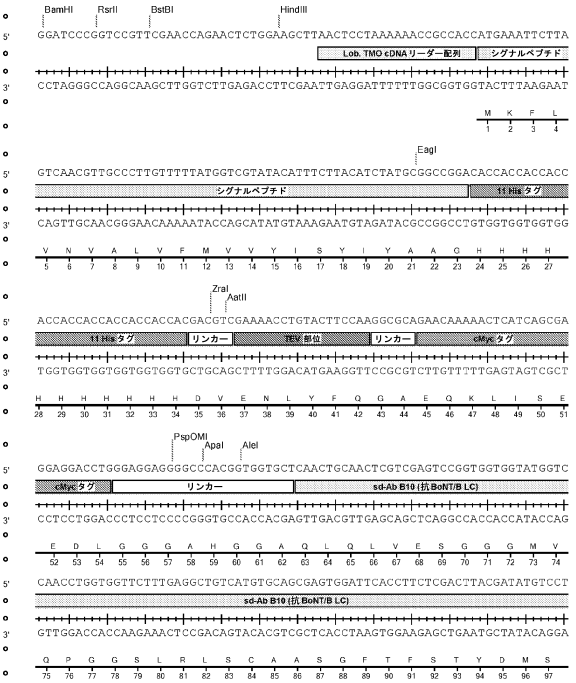
【図７】


A
APTC
RSP2
DT3
BoNT HC
S
S
RSP1
BoNT LC
SS
VHH
DT2
ADD
DT1
K
APTN
RSP1
(RSP1およびRSP2プロセッシング)
B
DT3
BoNT HC
S
S
BONT LC
SS
VHH
DT2
ADD
DT1
K

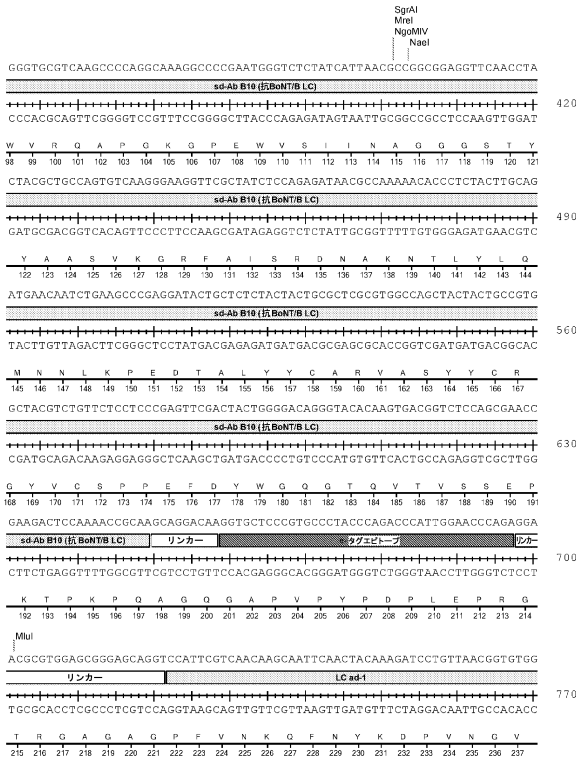
【図８】


A
APTC
RSP
BoNT HC
S
S
RSP
BoNT LC
SS
VHH
RSP
APTN
(RSP プロセッシング)
B
BoNT HC
S
S
BoNT LC
SS
VHH

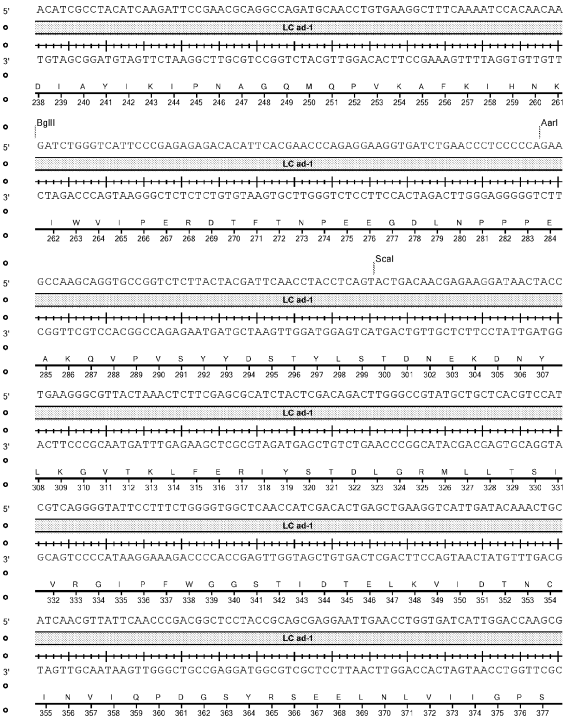
【図９Ａ】



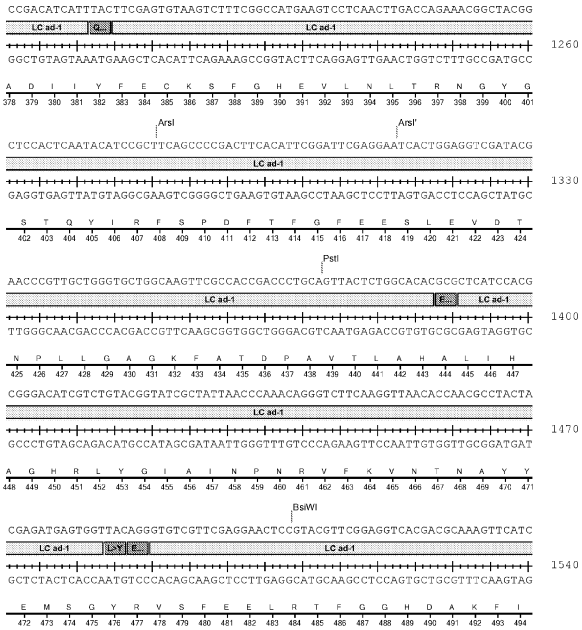
【図９Ｂ】



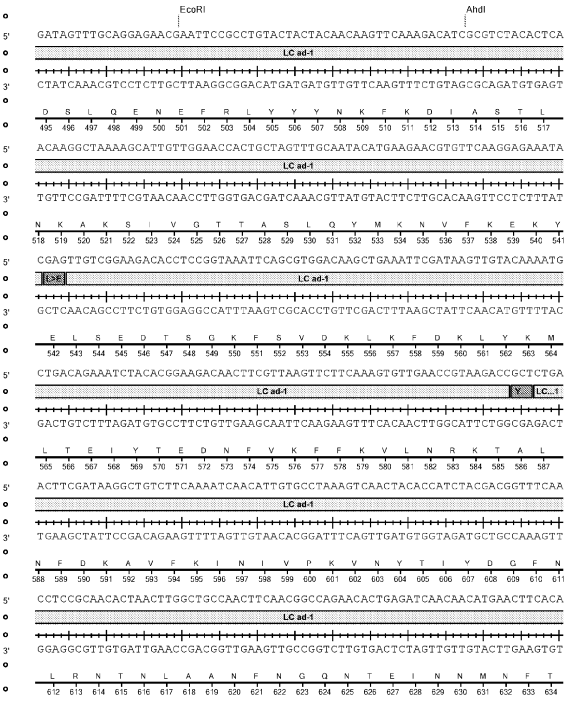
【図９Ｃ】



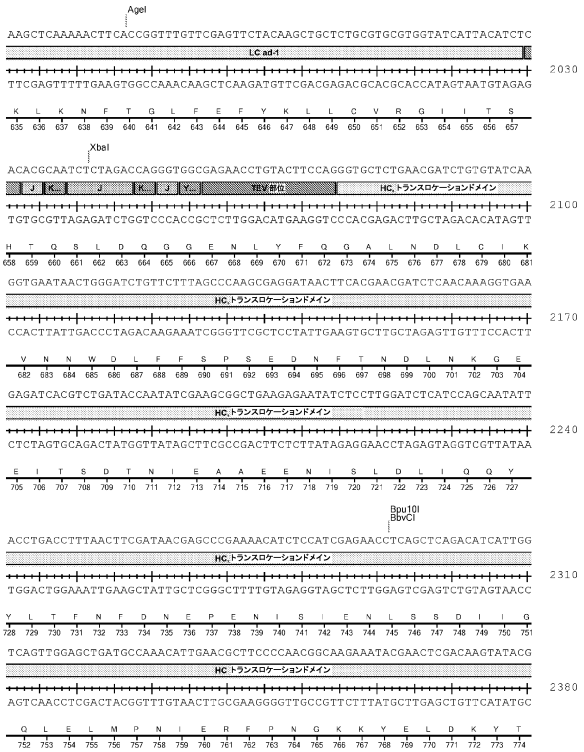
【図９Ｄ】



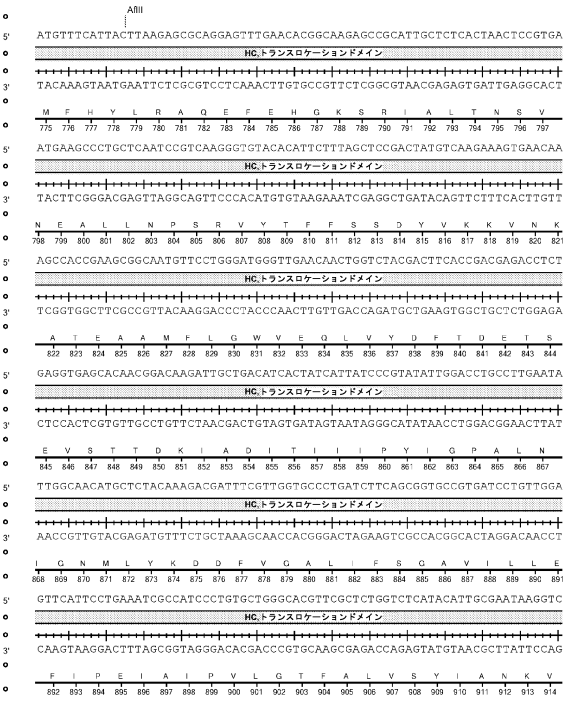
【図９Ｅ】



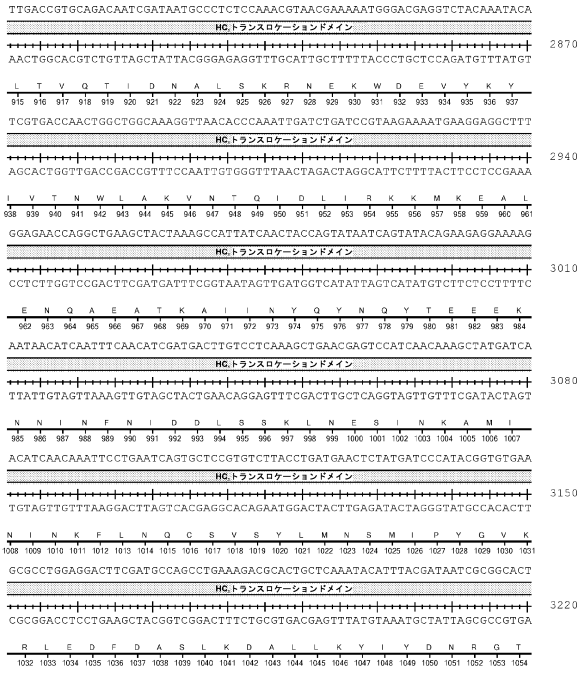
【図９Ｆ】



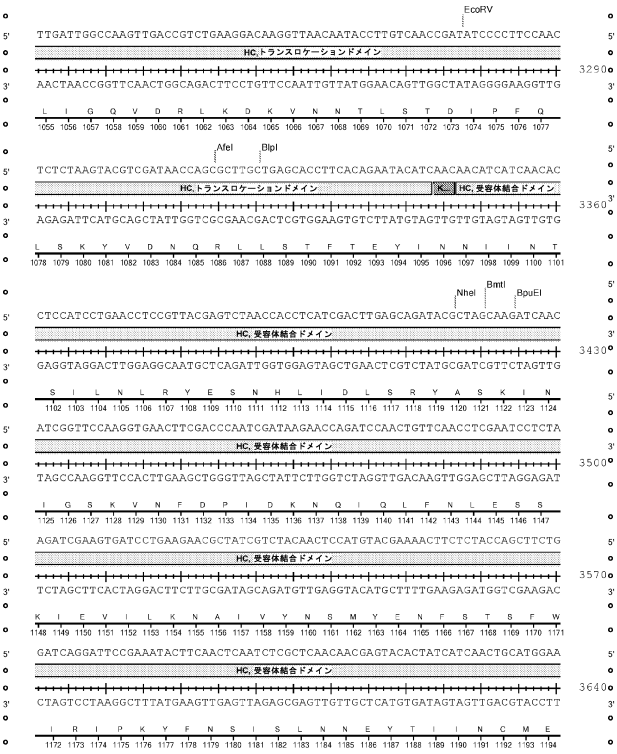
【図９Ｇ】



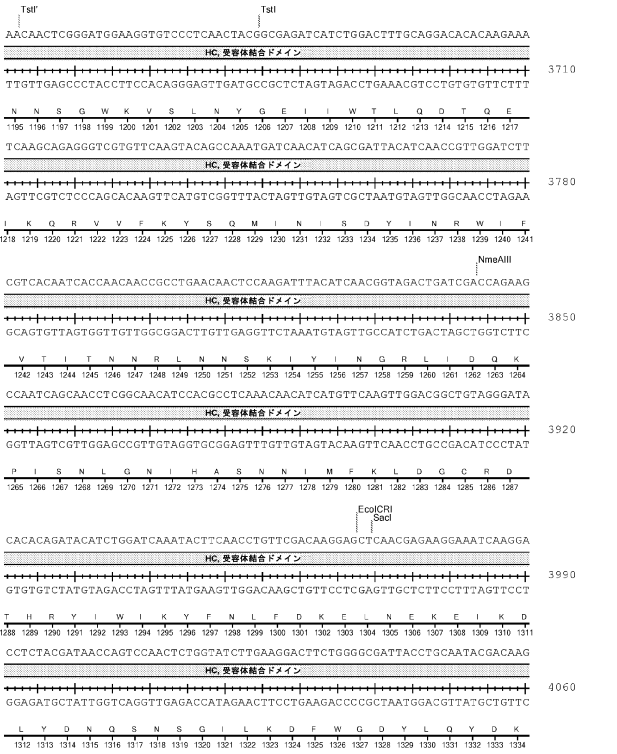
【図９Ｈ】



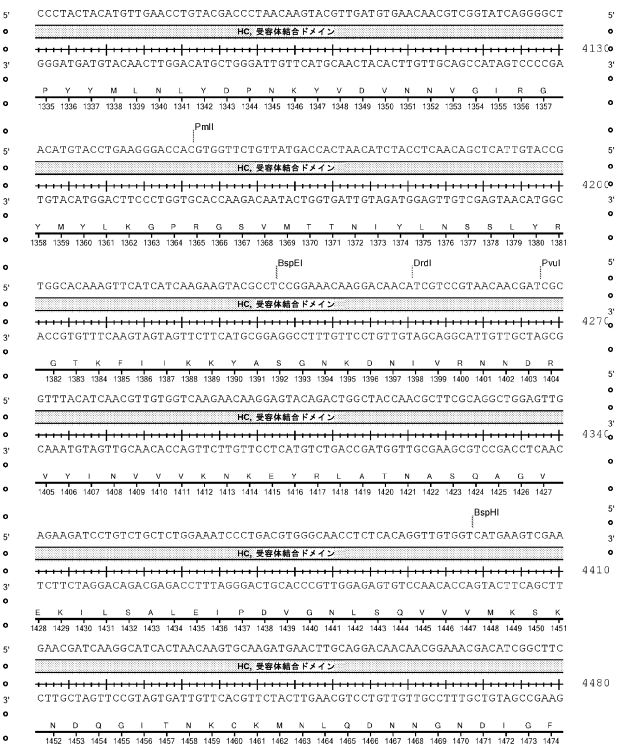
【図９Ｉ】



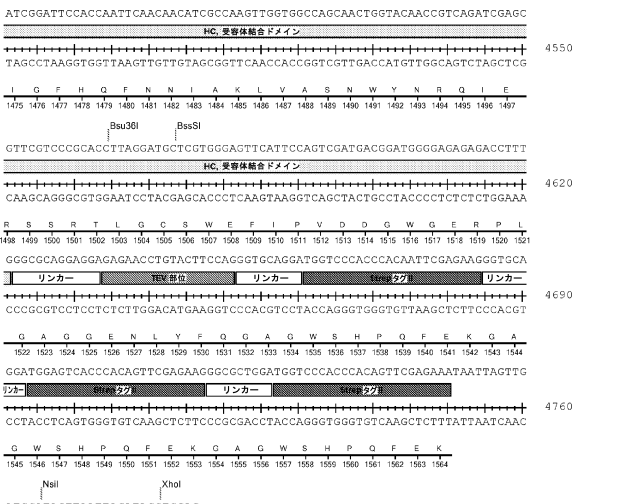
【図９Ｊ】



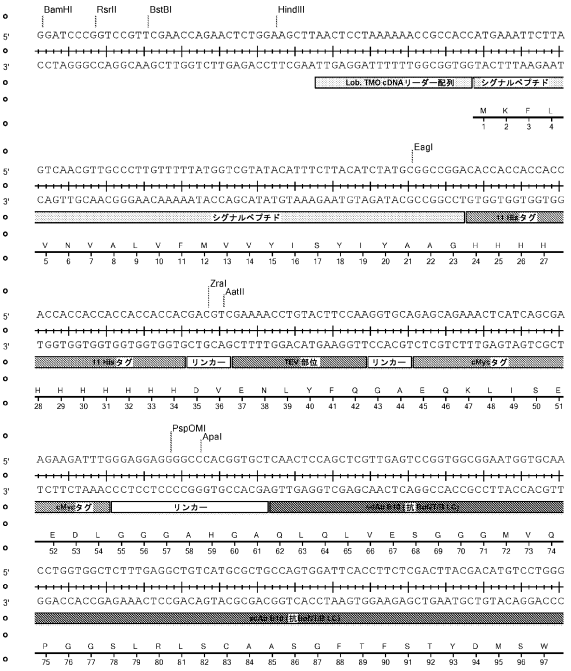
【図９Ｋ】



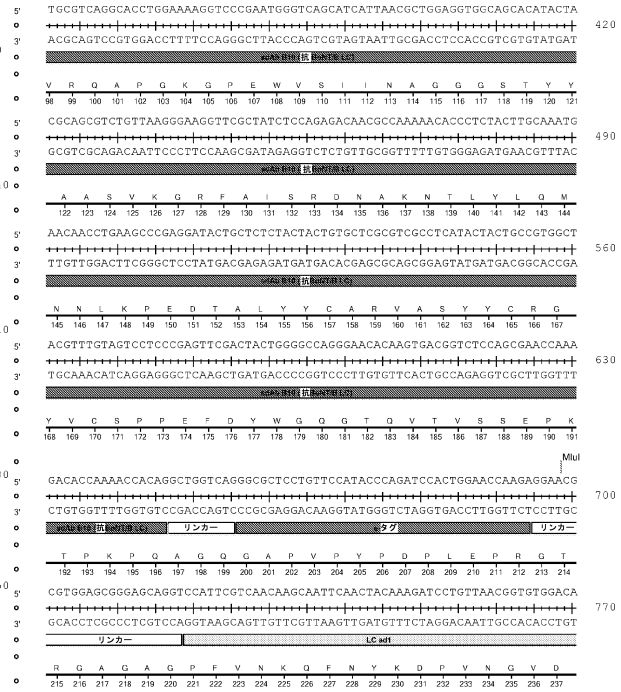
【図９Ｌ】



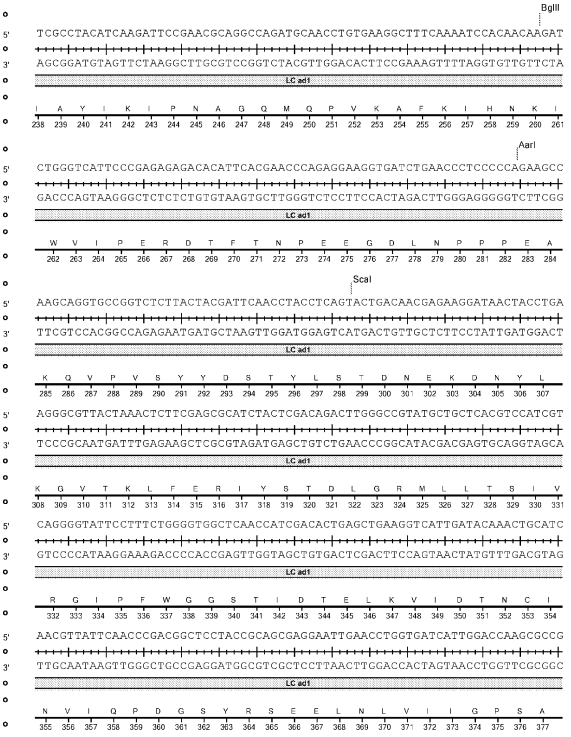
【図１０Ａ】



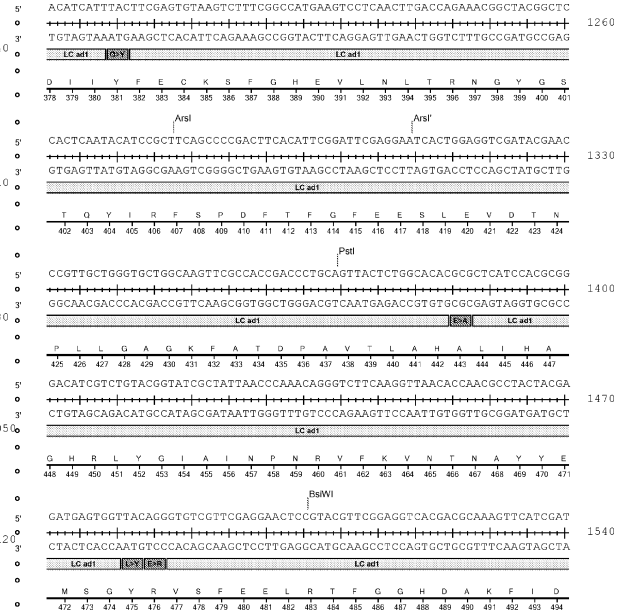
【図１０Ｂ】



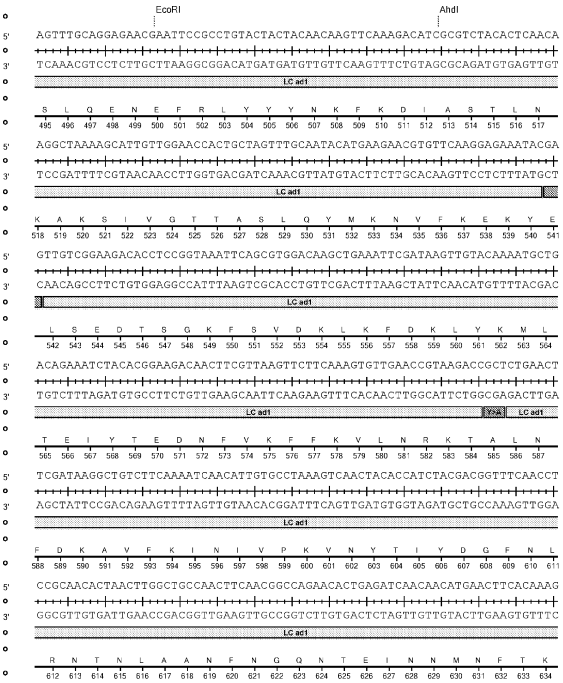
【図１０Ｃ】



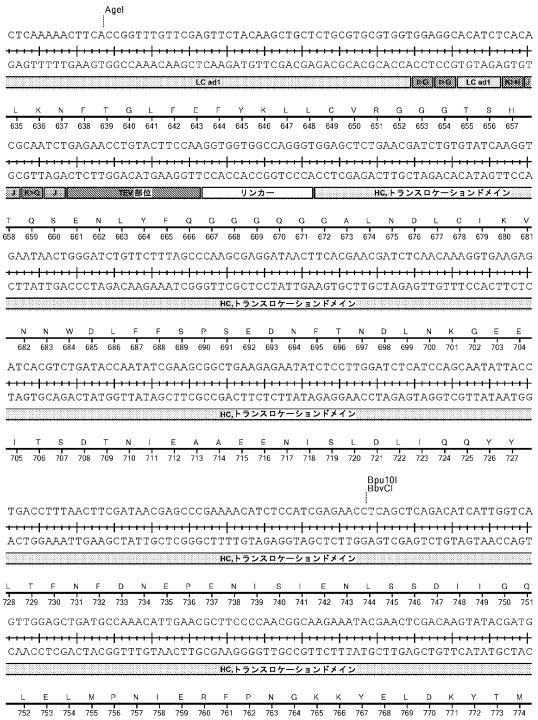
【図１０Ｄ】



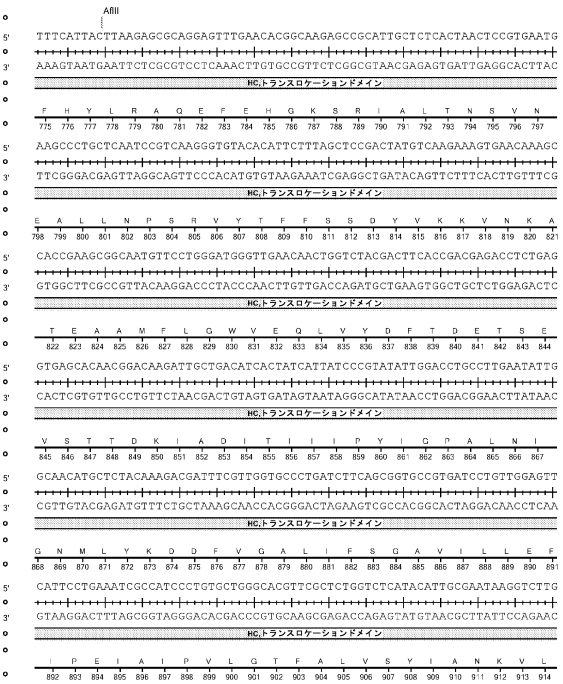
【図１０Ｅ】



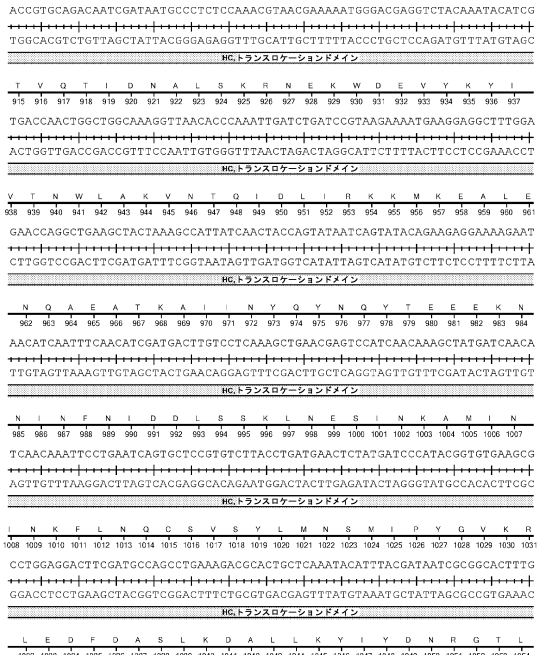
【図１０Ｆ】



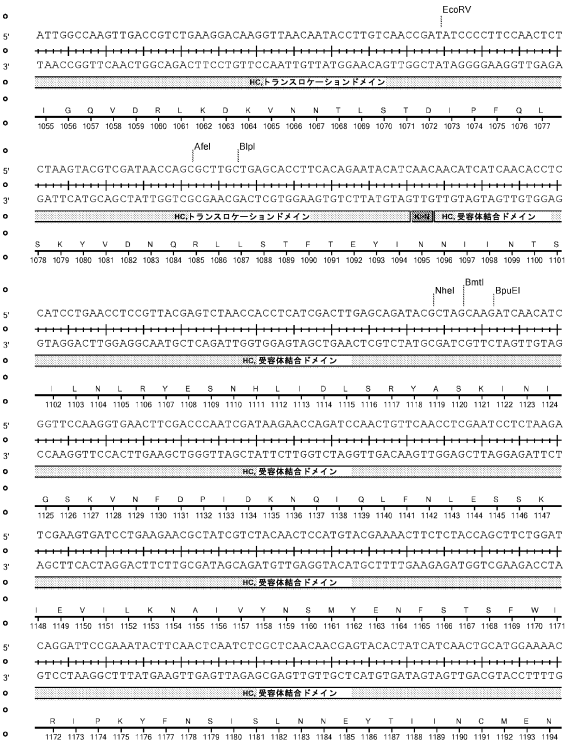
【図１０Ｇ】



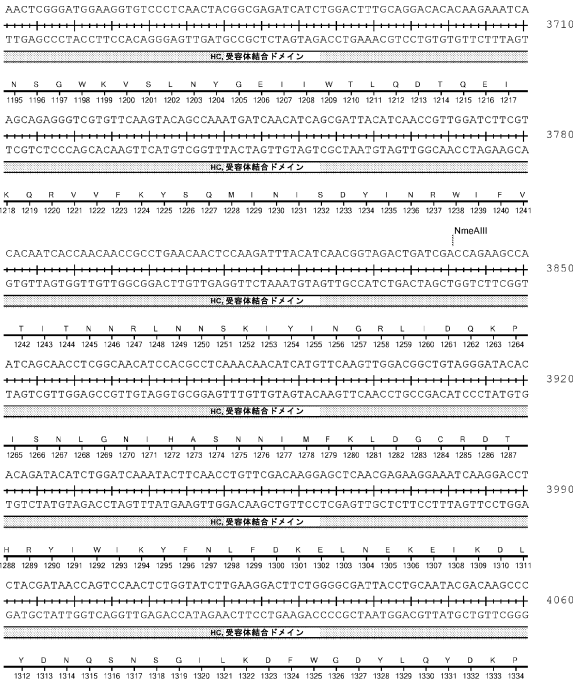
【図１０Ｈ】



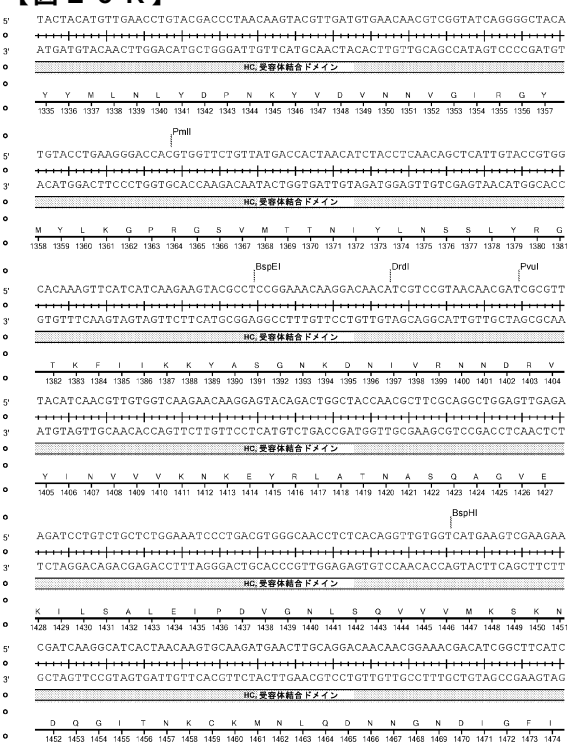
【図１０Ｉ】



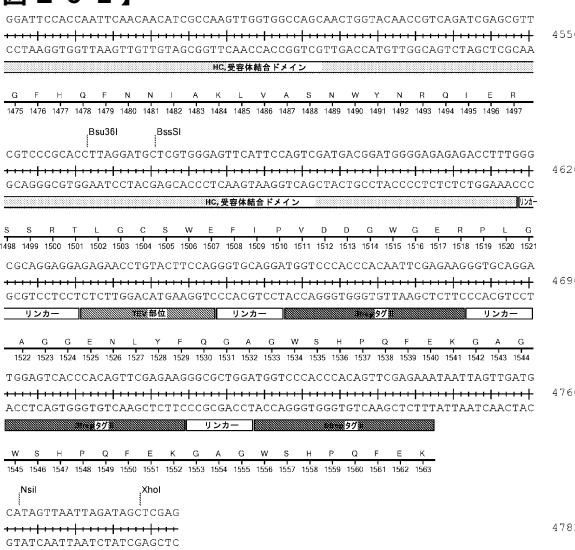
【図１０Ｊ】



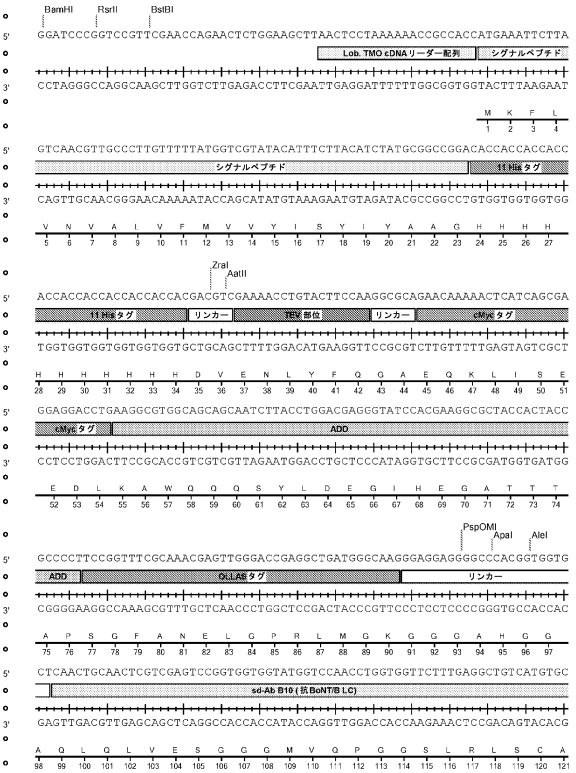
【図１０Ｋ】



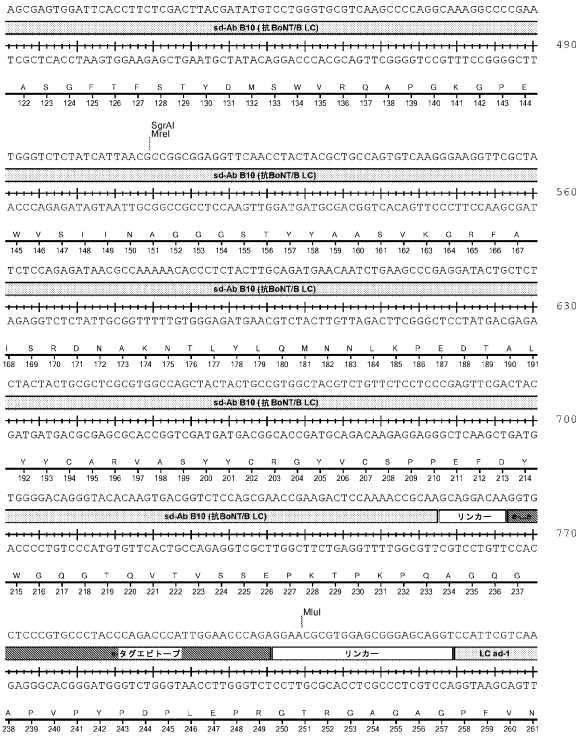
【図１０Ｌ】



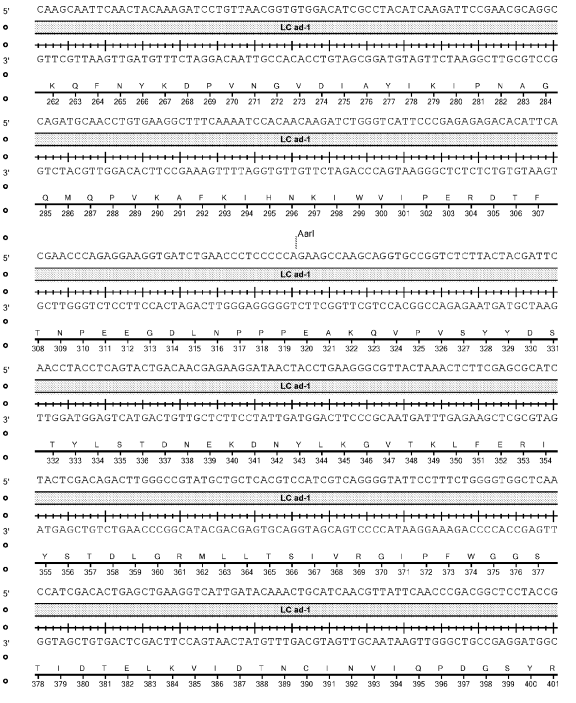
【図１１Ａ】



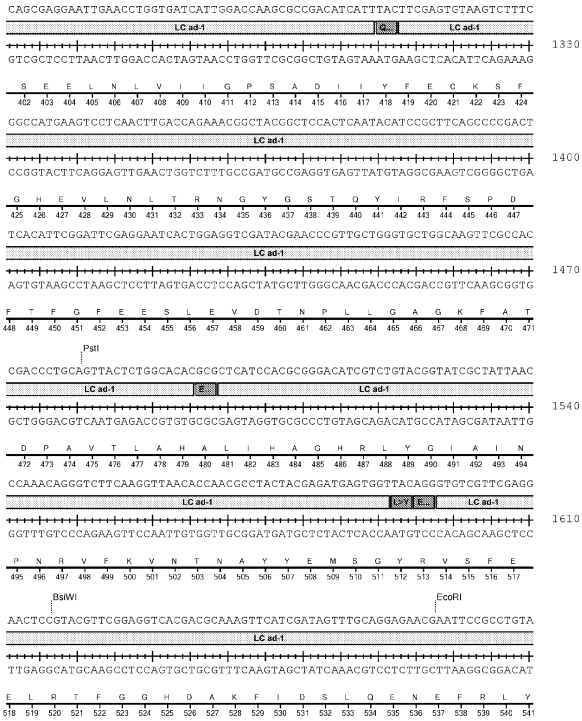
【図１１Ｂ】



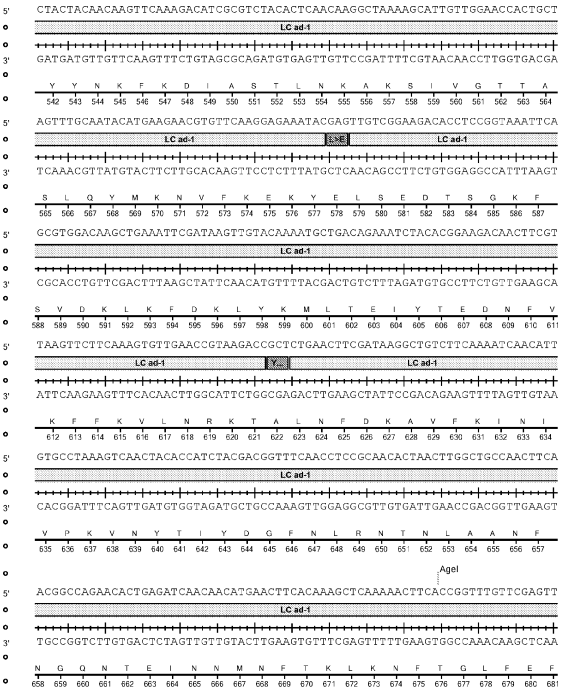
【図１１Ｃ】



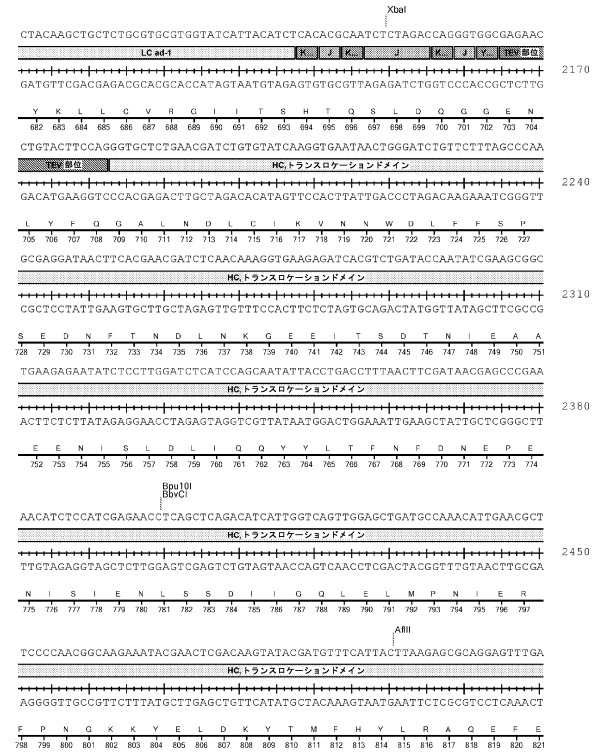
【図１１Ｄ】



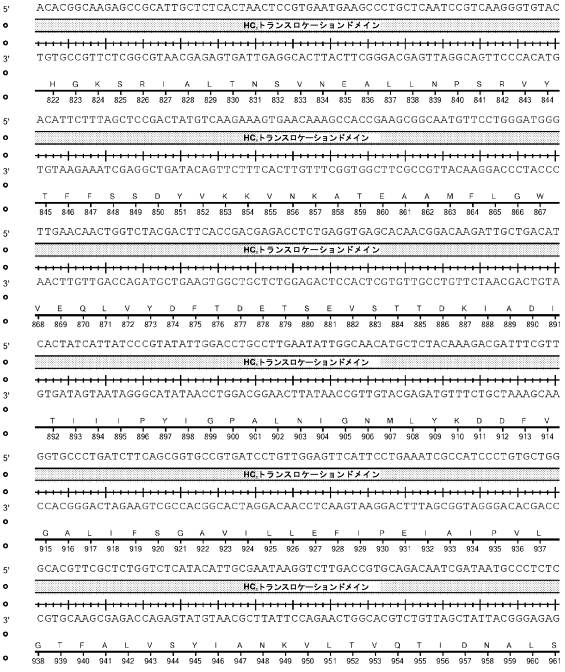
【図１１Ｅ】



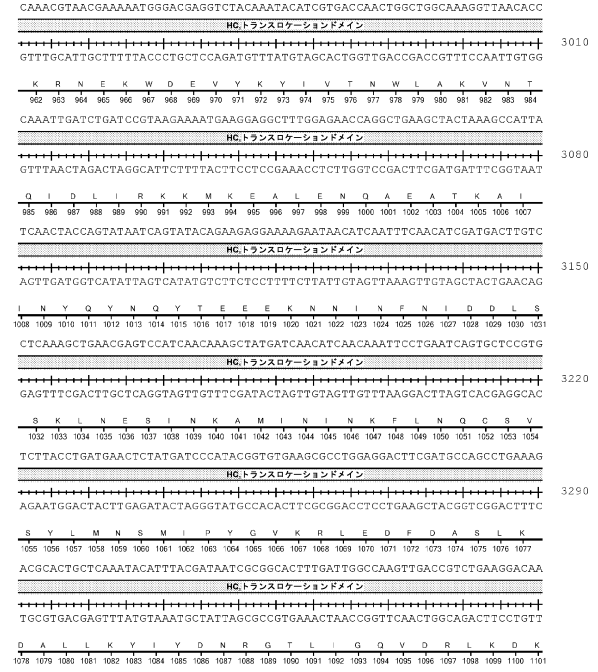
【図１１Ｆ】



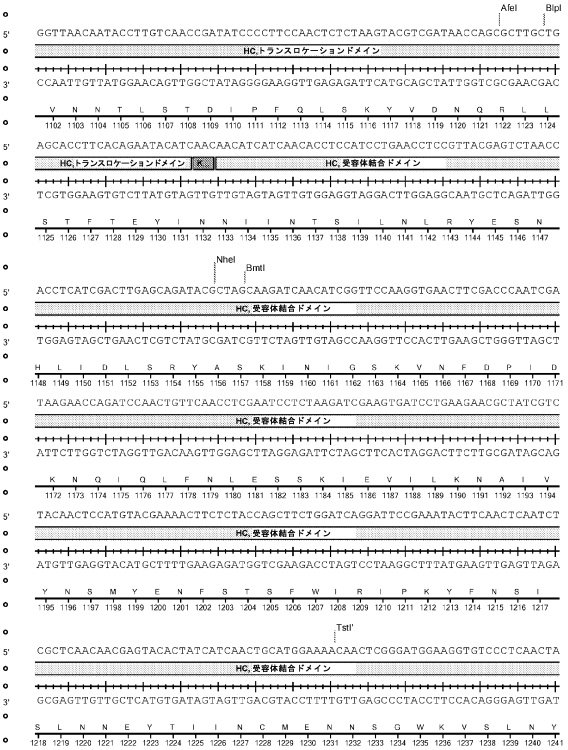
【図１１Ｇ】



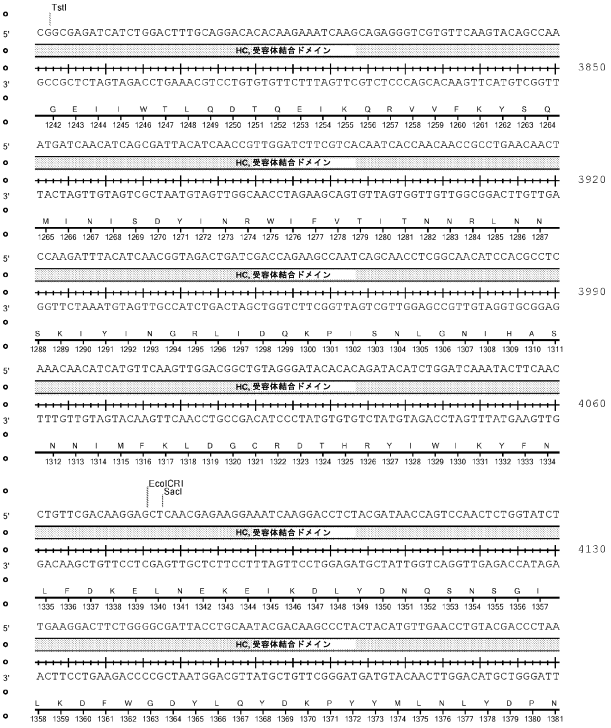
【図１１Ｈ】



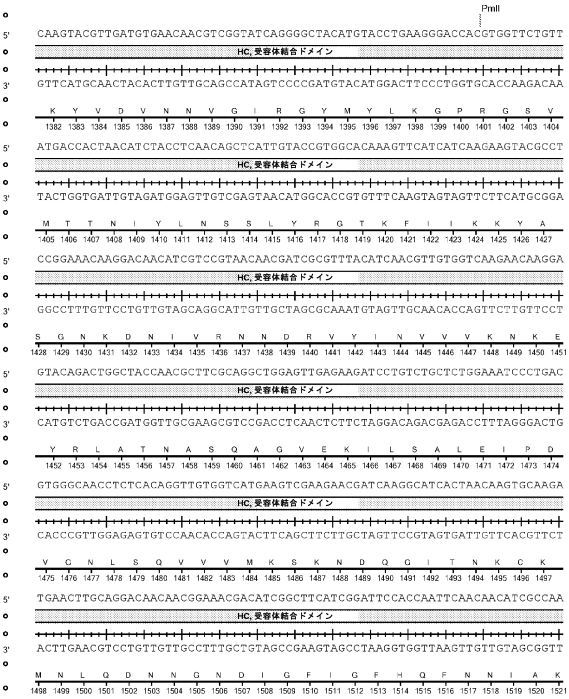
【図１１Ｉ】



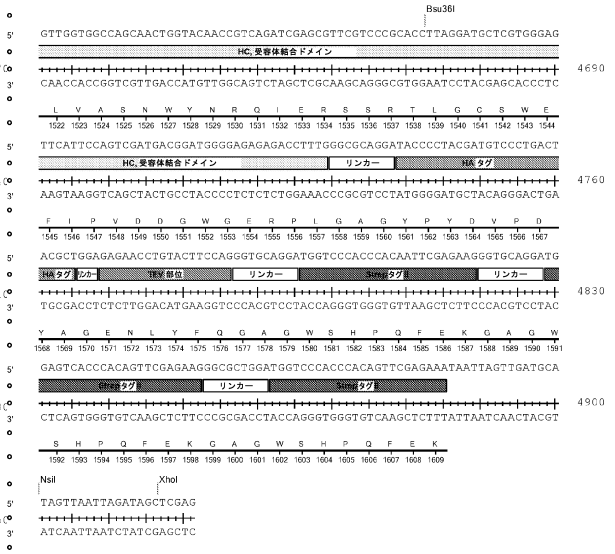
【図１１Ｊ】



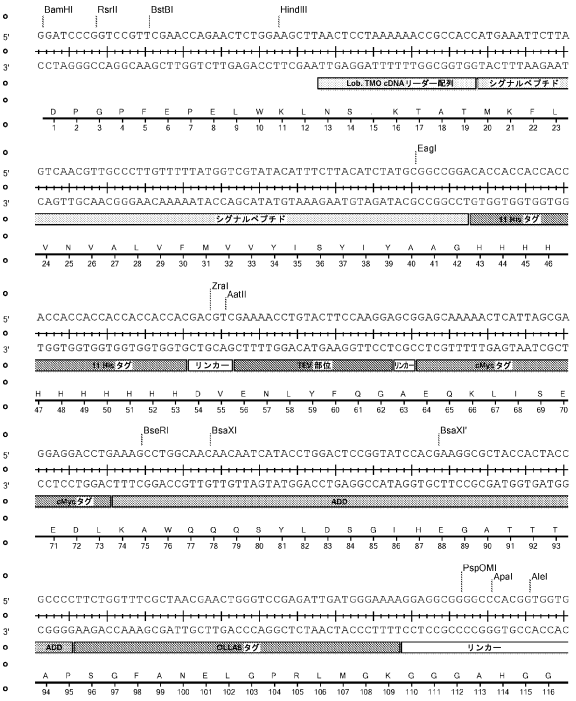
【図１１Ｋ】



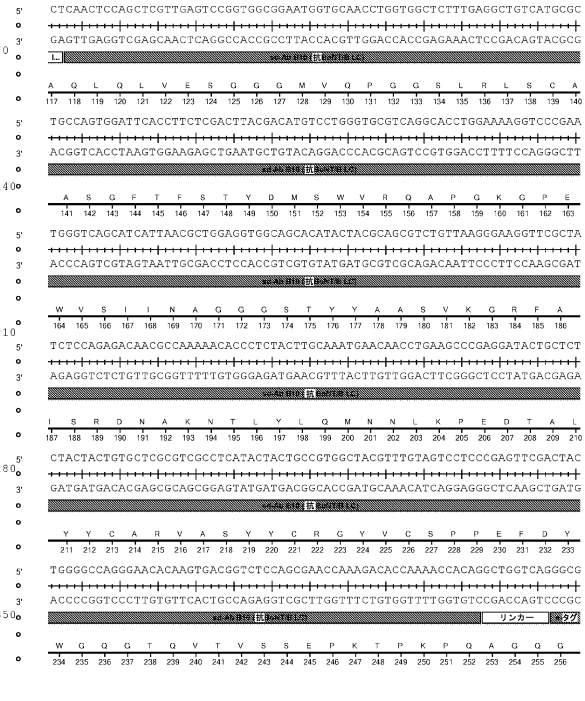
【図１１Ｌ】



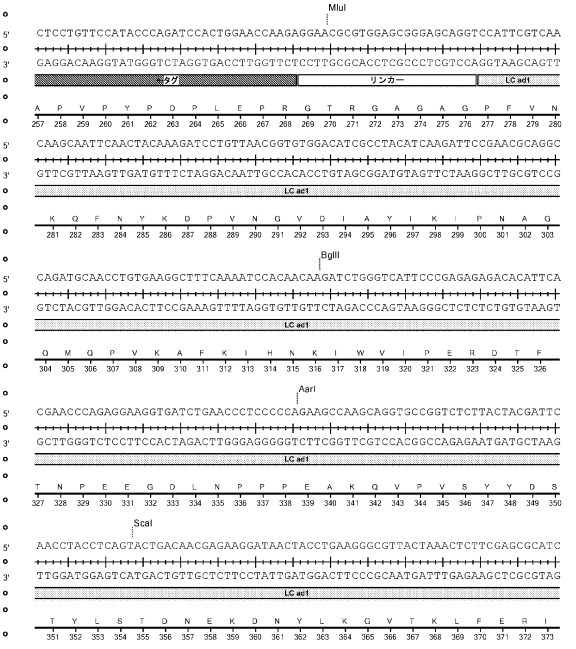
【図１２Ａ】



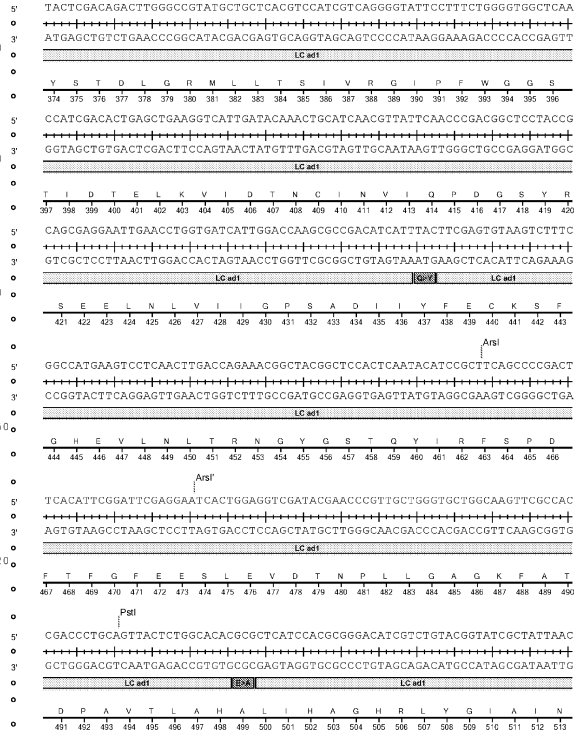
【図１２Ｂ】



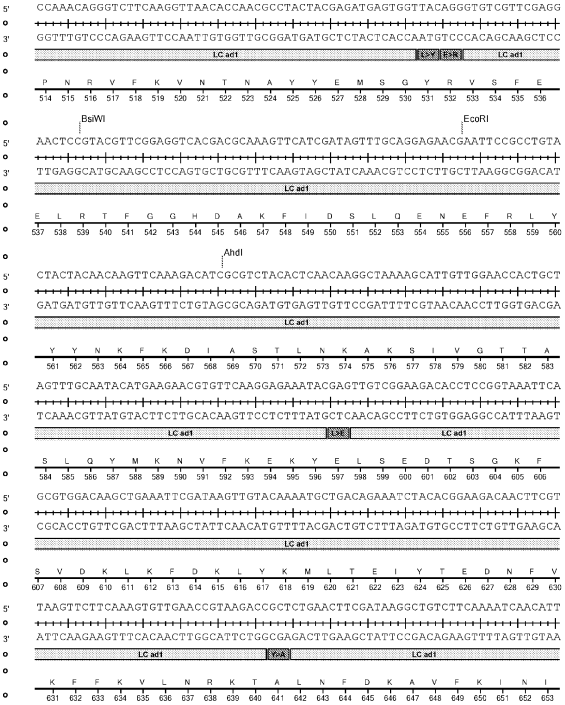
【図１２Ｃ】



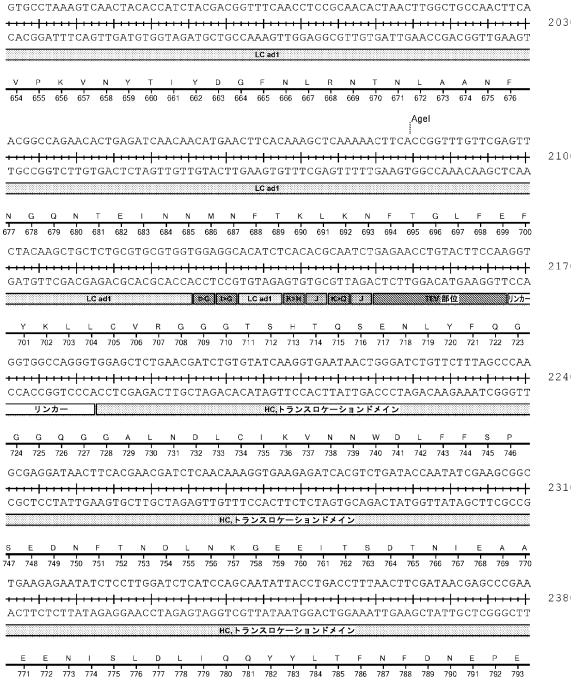
【図１２Ｄ】



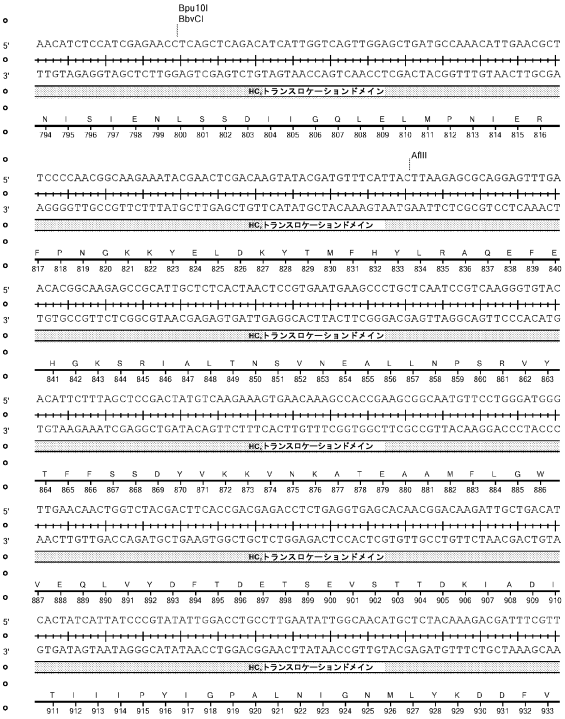
【図１２Ｅ】



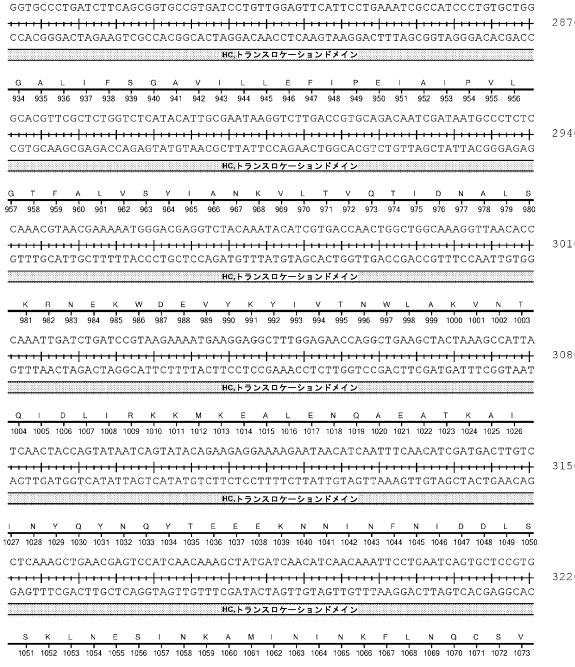
【図１２Ｆ】



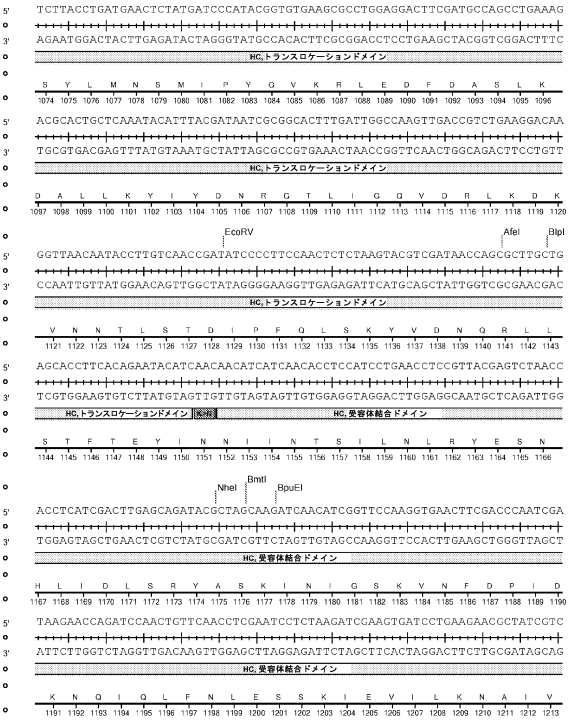
【図１２Ｇ】



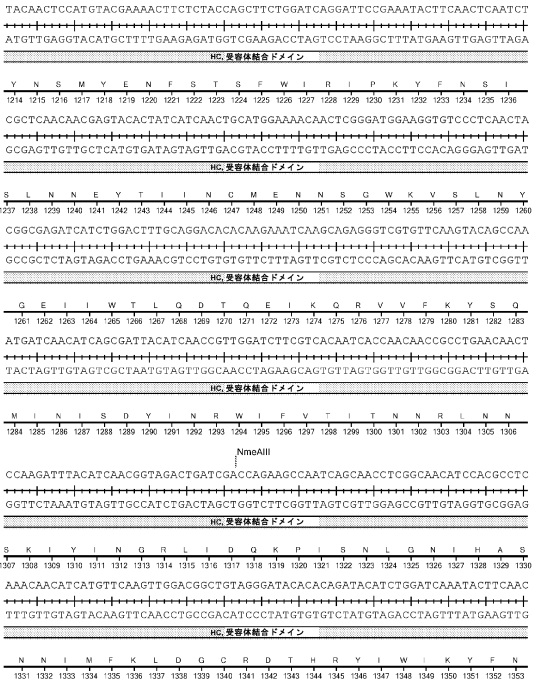
【図１２Ｈ】



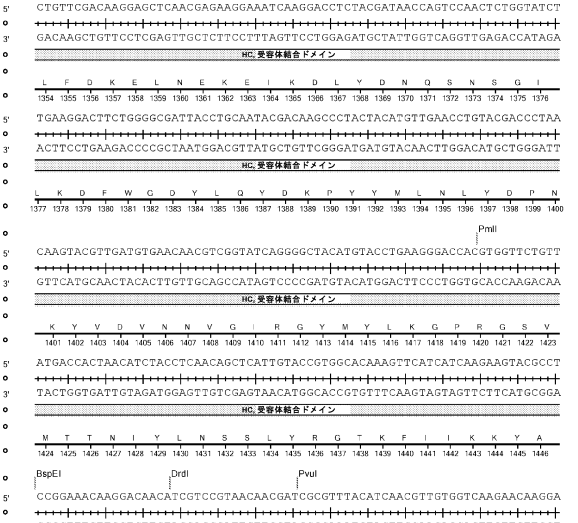
【図１２Ｉ】



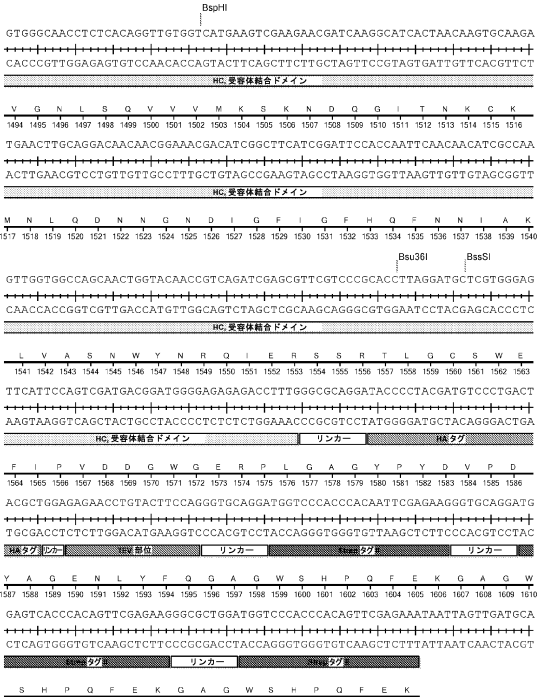
【図１２Ｊ】



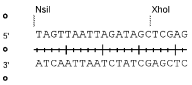
【図１２Ｋ】



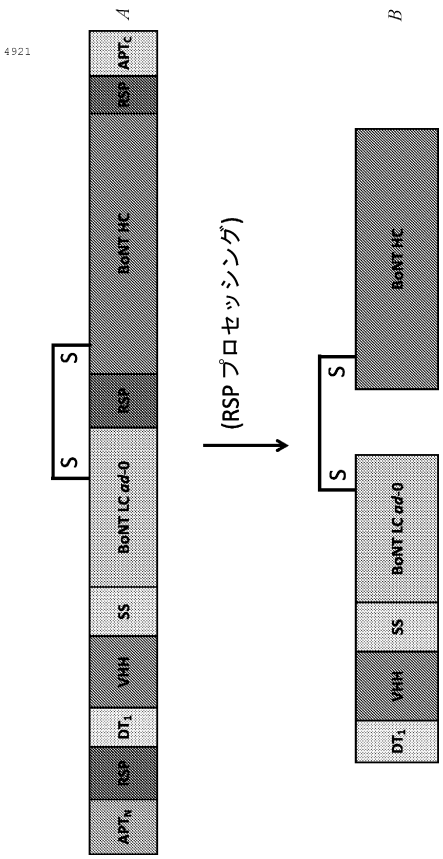
【図１２Ｌ】



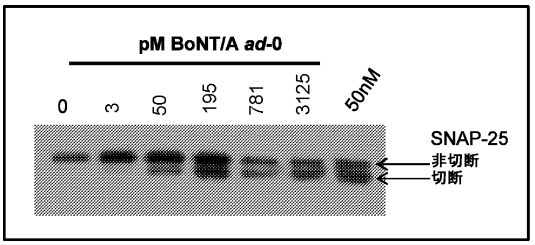
【図１２Ｍ】



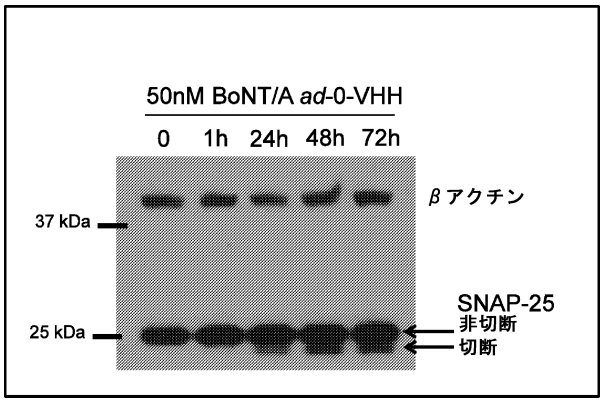
【図１３】



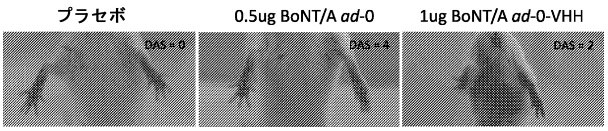
【図１４】



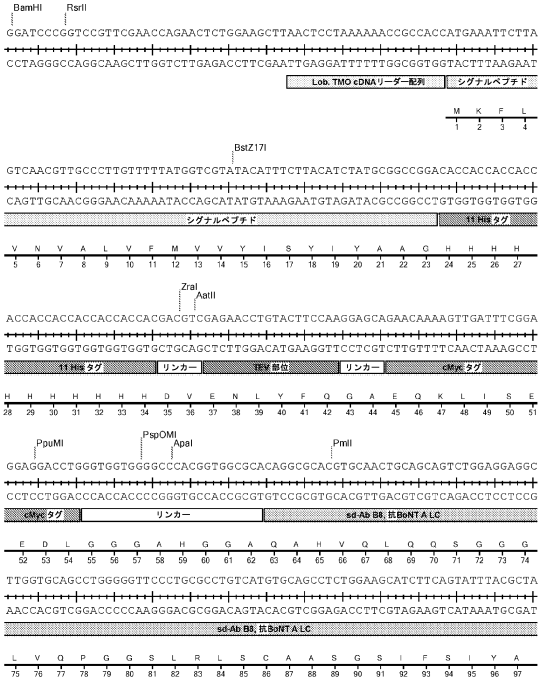
【図１５】



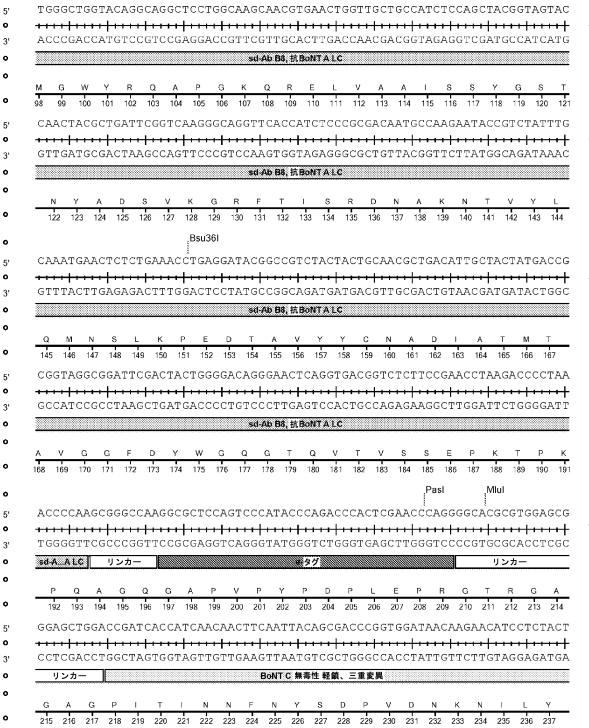
【図１６】



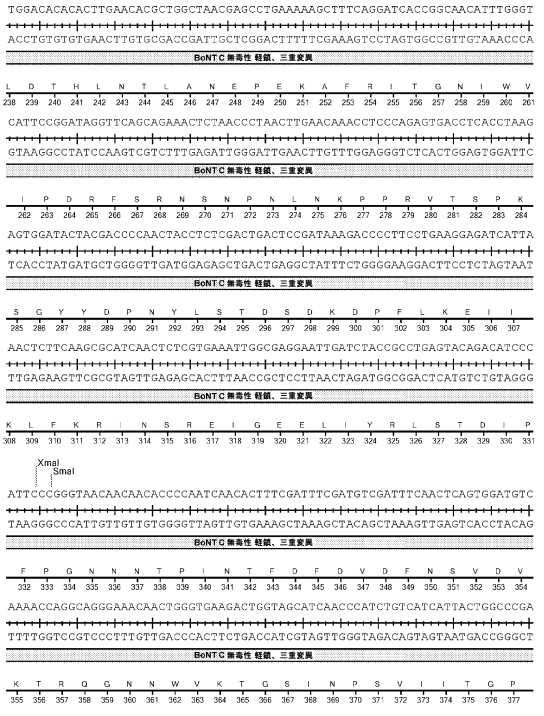
【図１７Ａ】



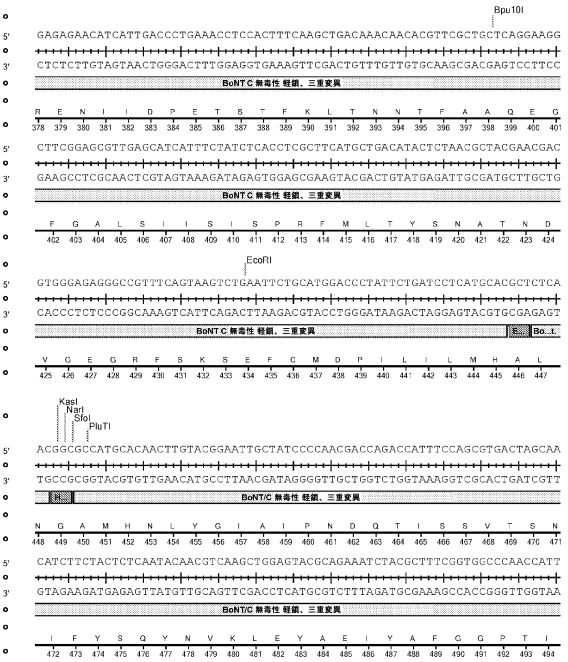
【図１７Ｂ】



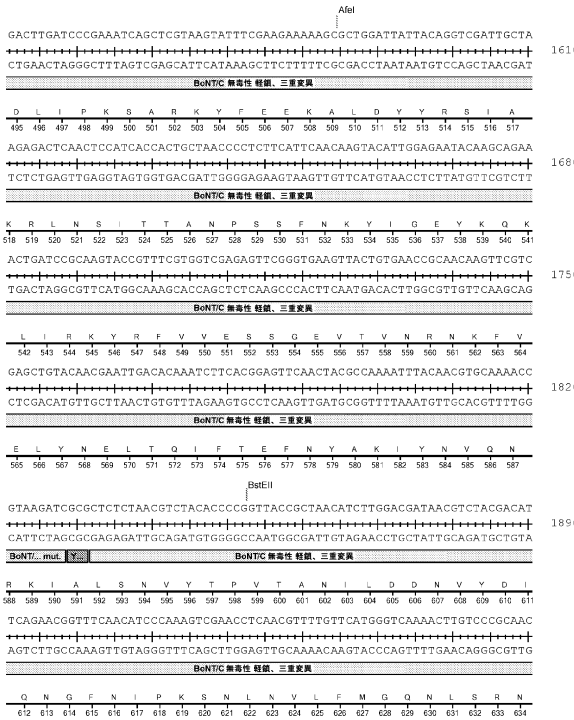
【図１７Ｃ】



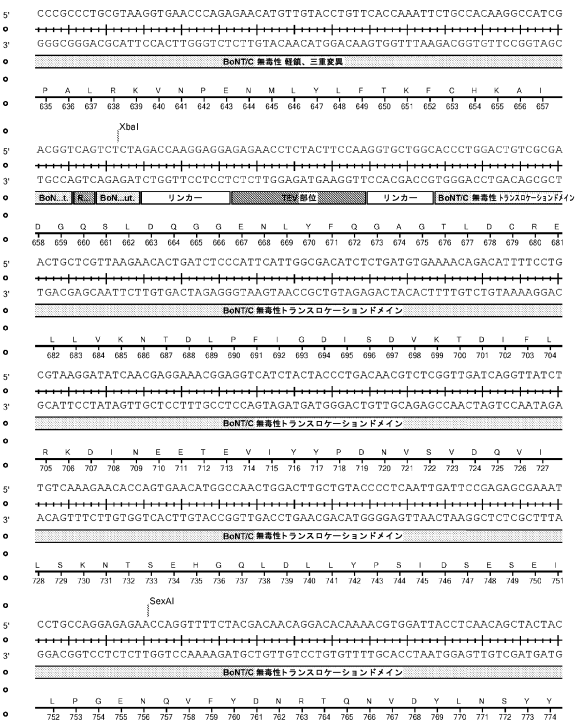
【図１７Ｄ】



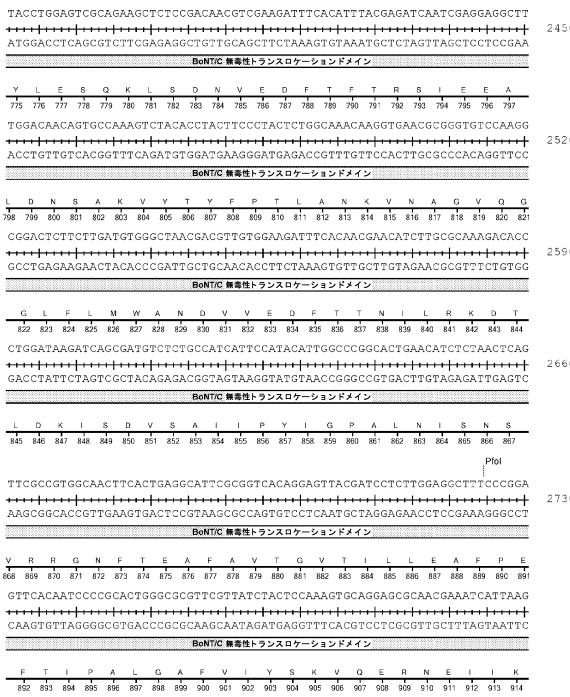
【図１７Ｅ】



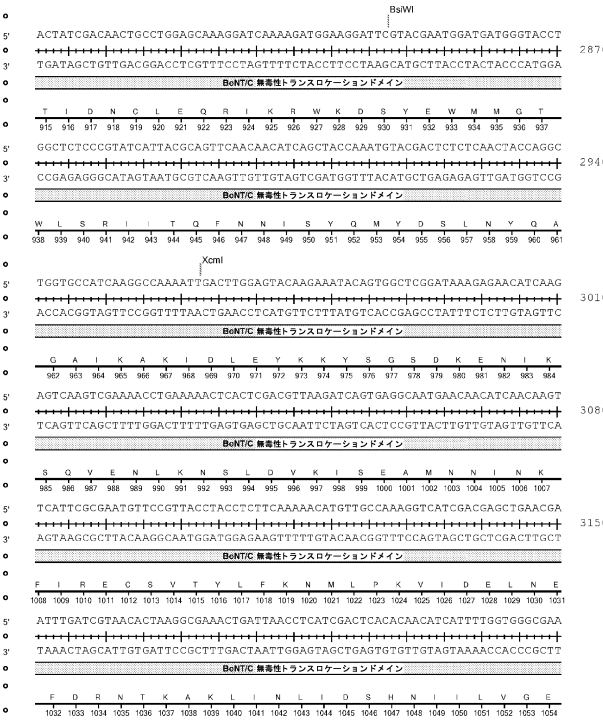
【図１７Ｆ】



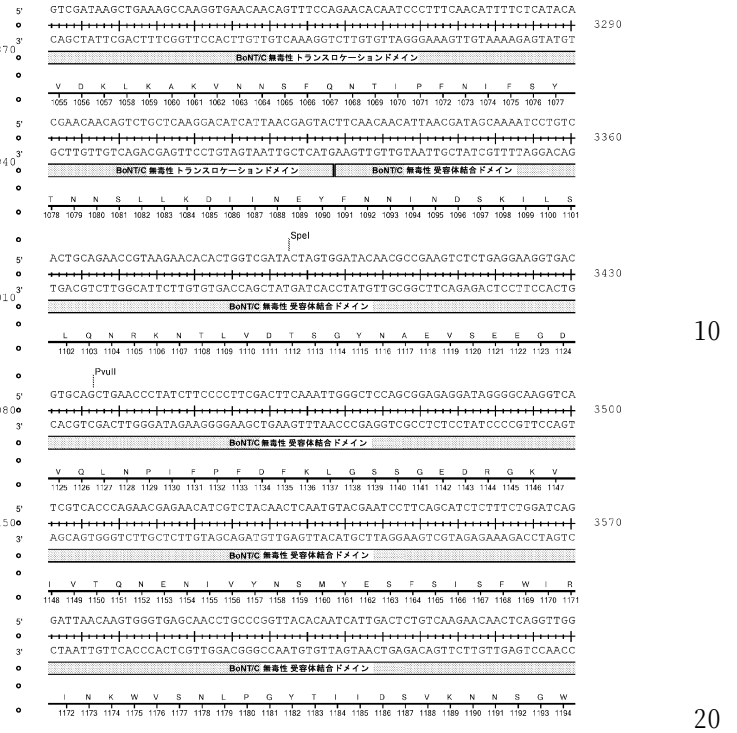
【図１７Ｇ】



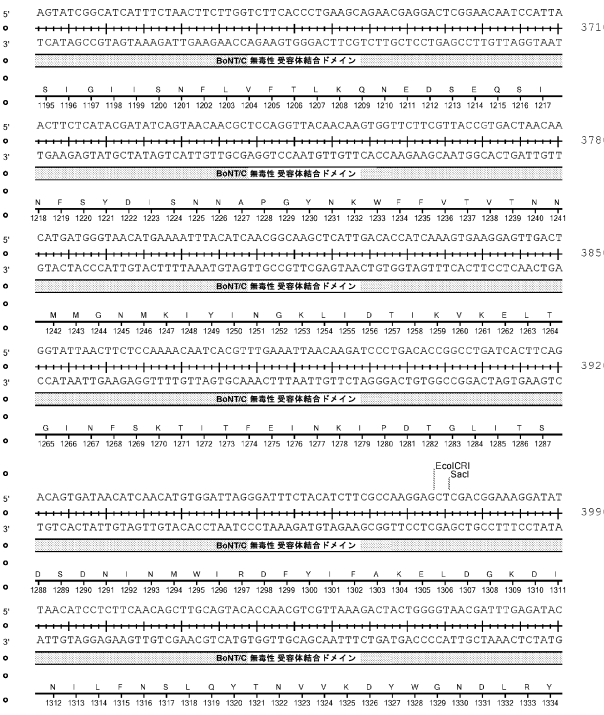
【図１７Ｈ】



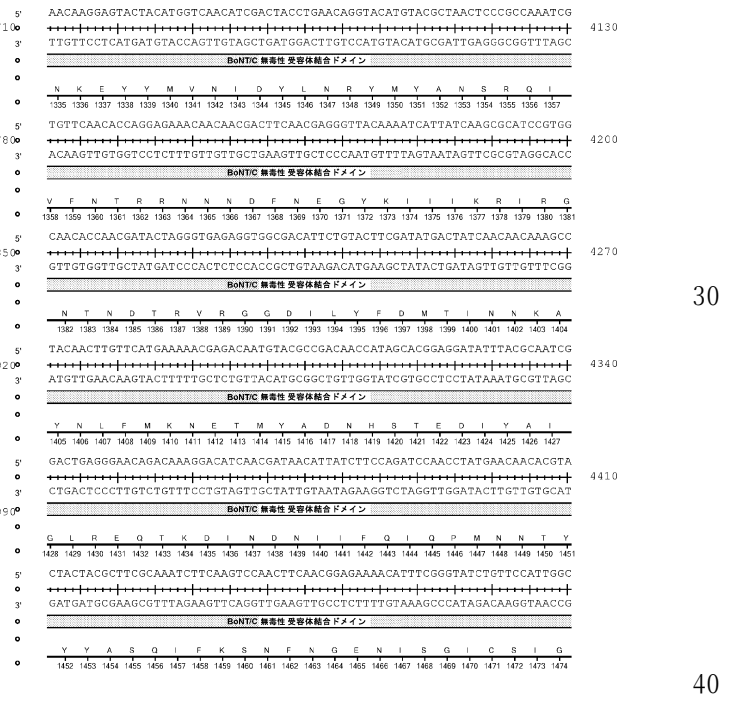
【図１７Ｉ】



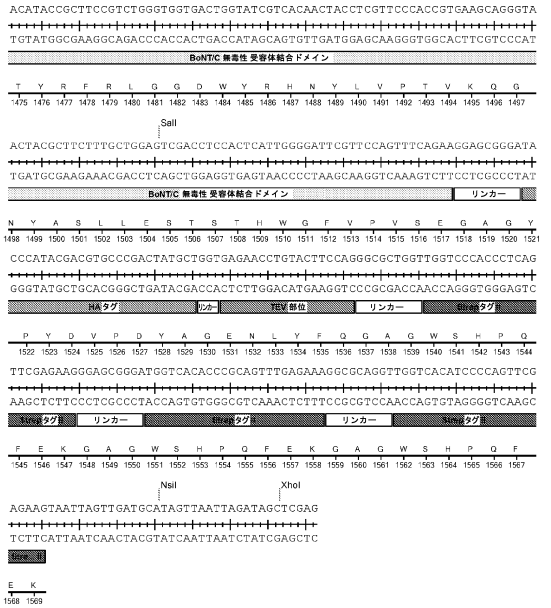
【図１７Ｊ】



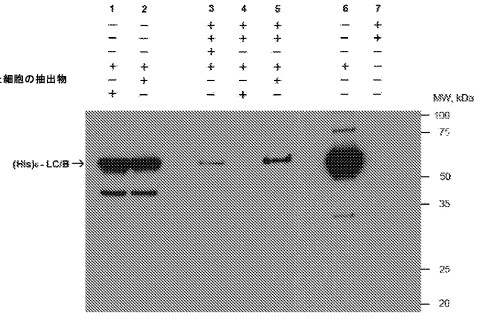
【図１７Ｋ】



【図１７Ｌ】

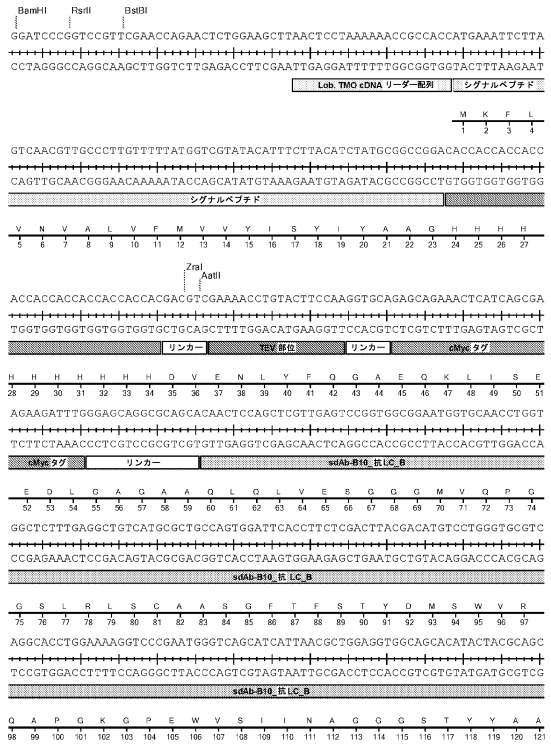


【図１８】

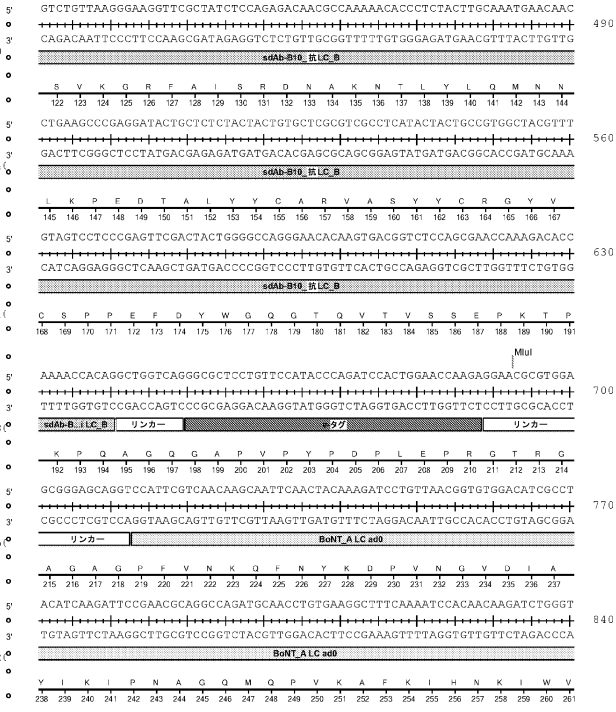


抗(His)6 HRP結合 mAbを用いて行ったウエスタンブロット

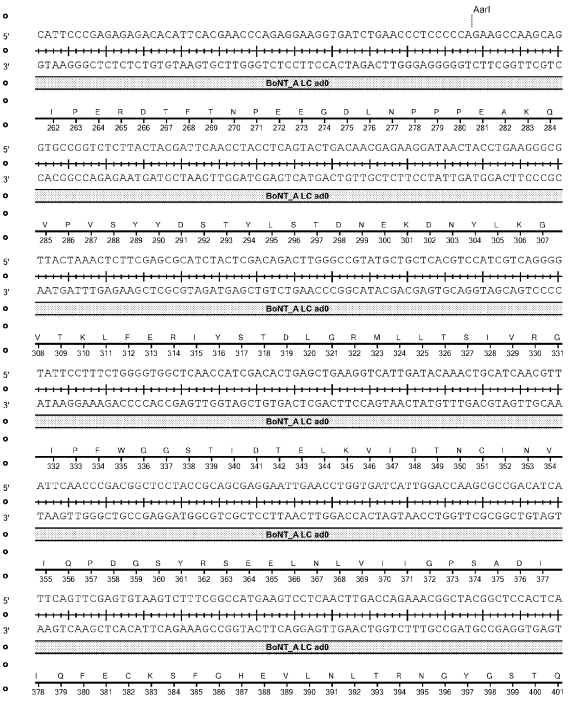
【図１９Ａ】



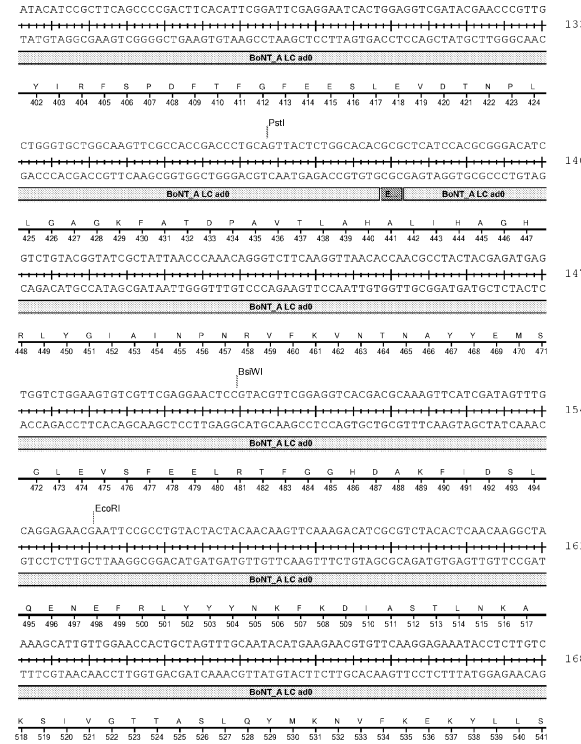
【図１９Ｂ】



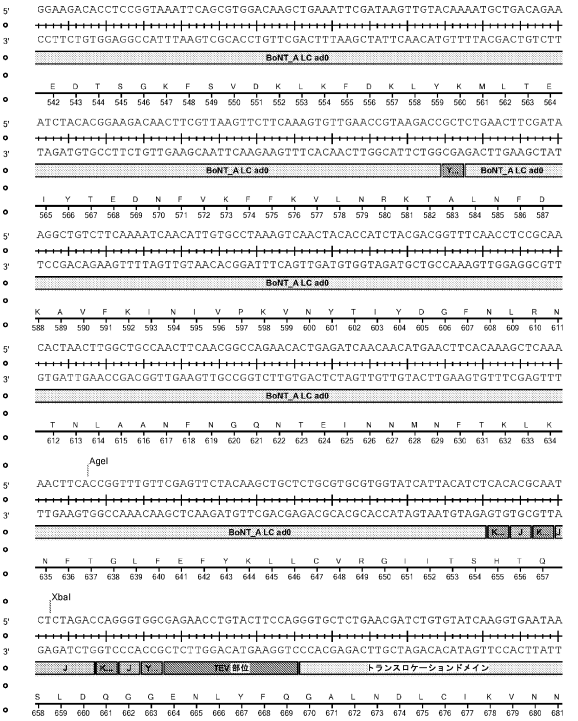
【図１９Ｃ】



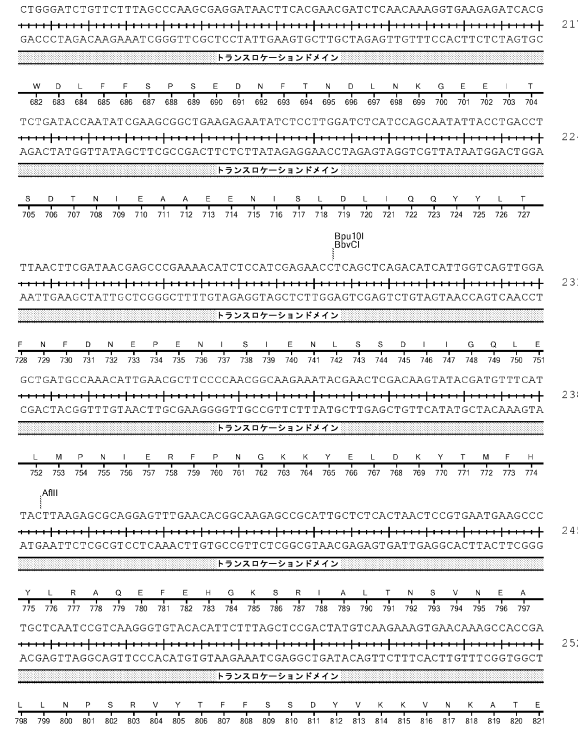
【図１９Ｄ】



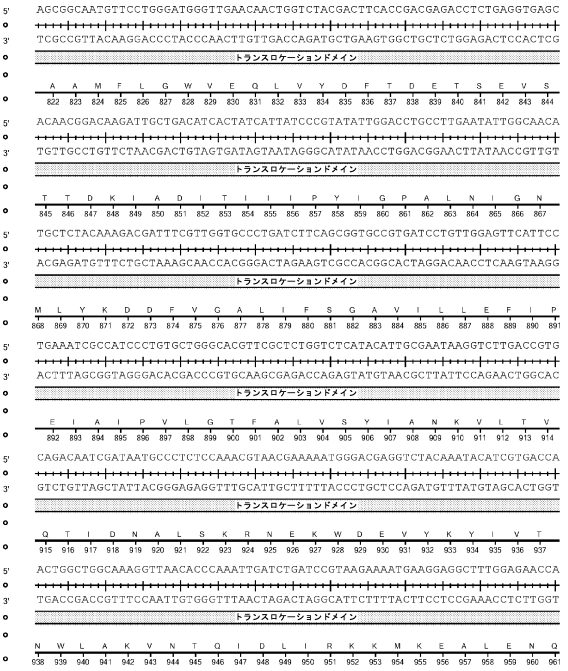
【図１９Ｅ】



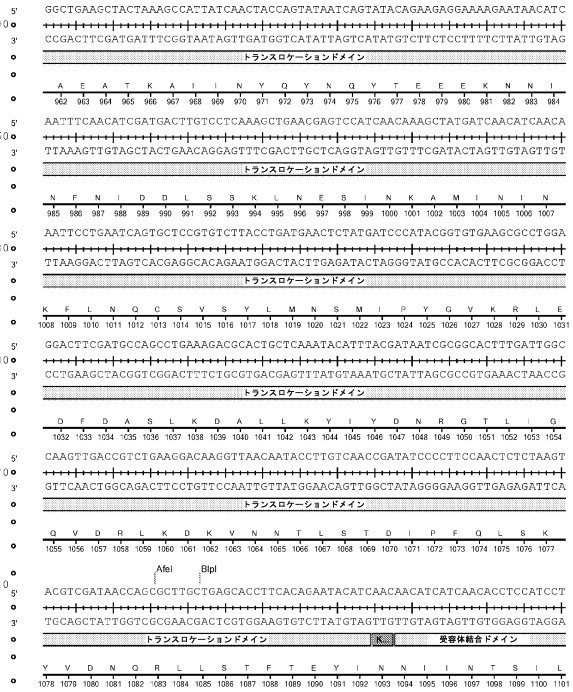
【図１９Ｆ】



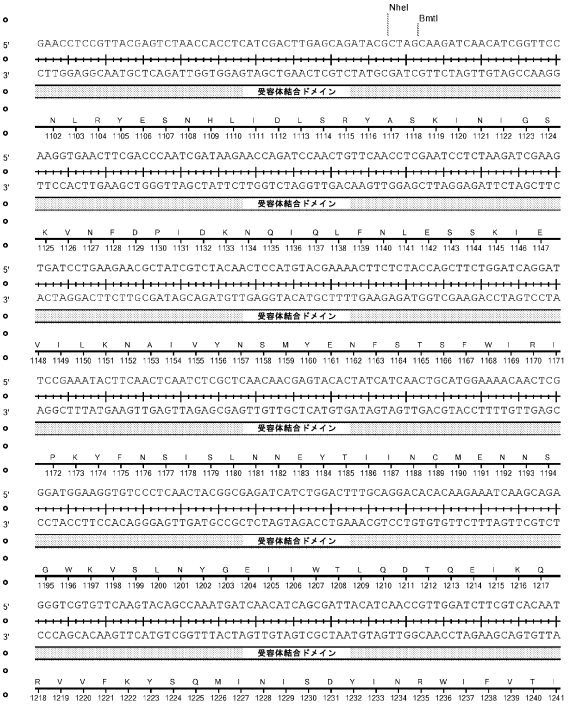
【図１９Ｇ】



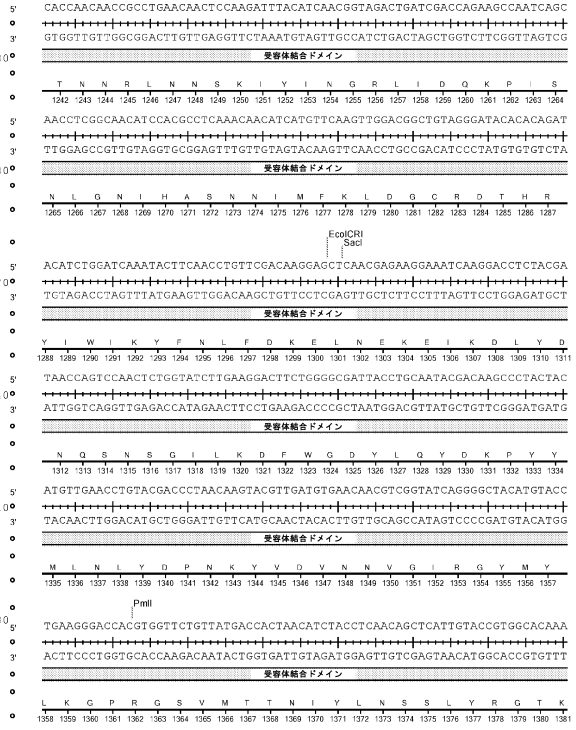
【図１９Ｈ】



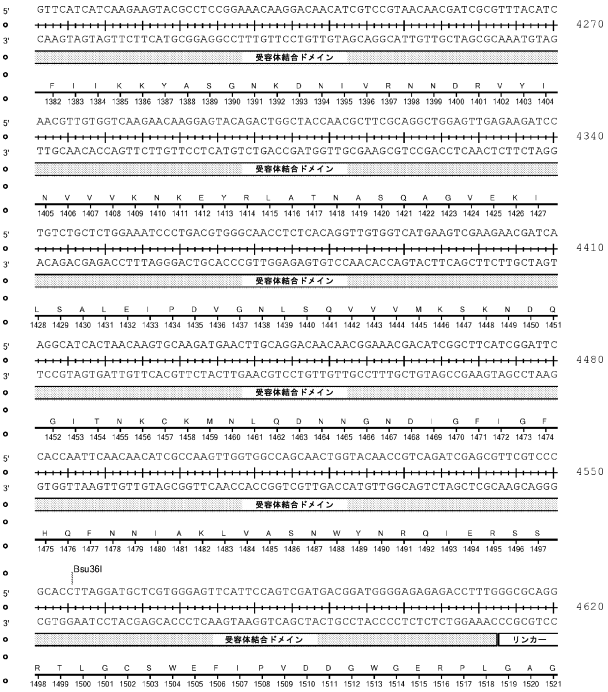
【図１９Ｉ】



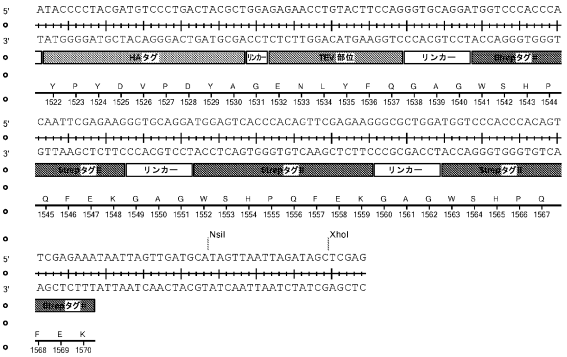
【図１９Ｊ】



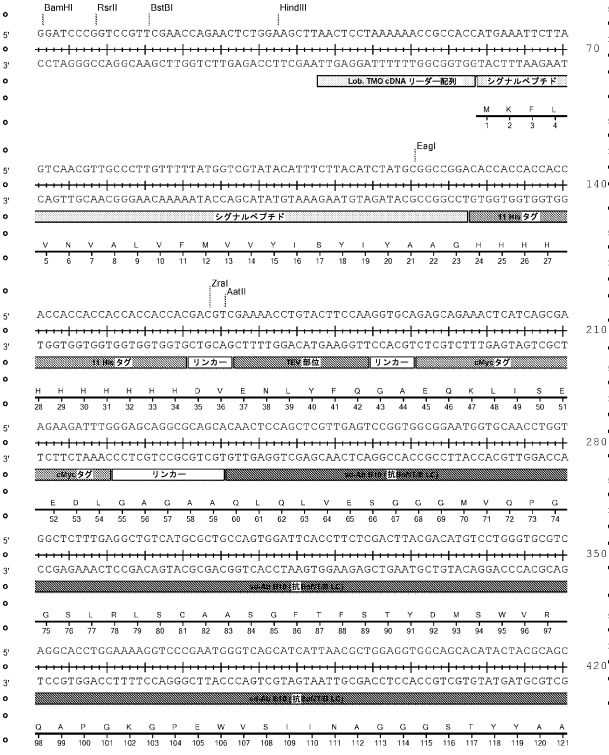
【図１９Ｋ】



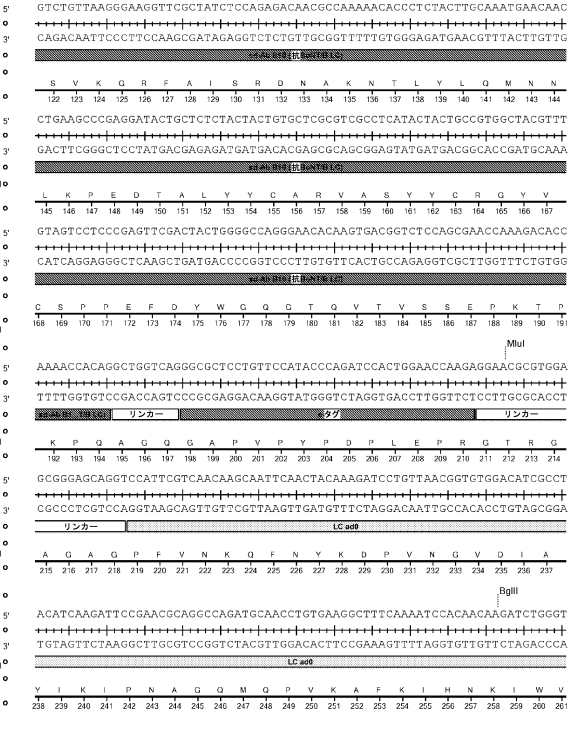
【図１９Ｌ】



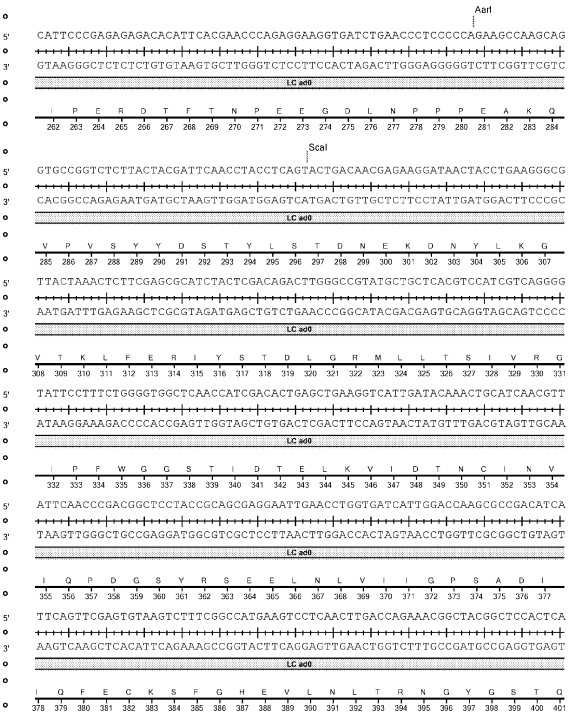
【図２０Ａ】



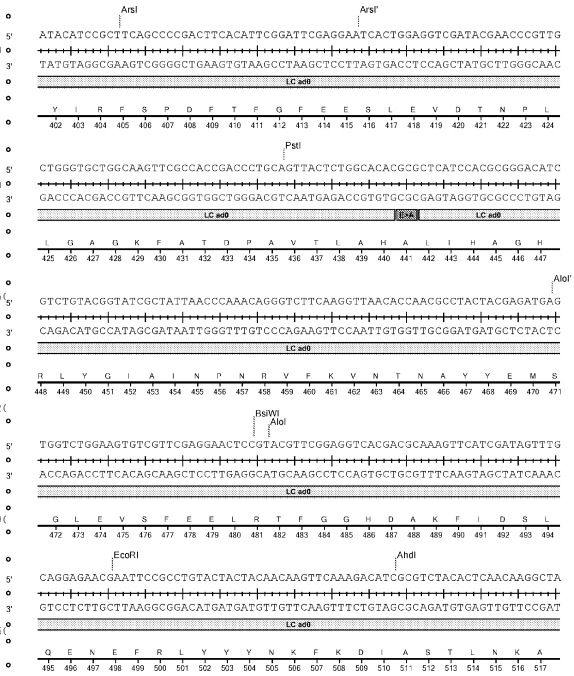
【図２０Ｂ】



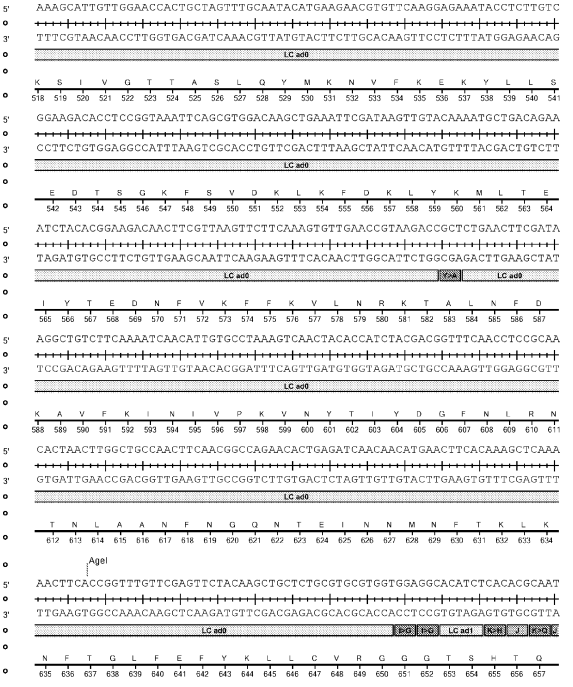
【図２０Ｃ】



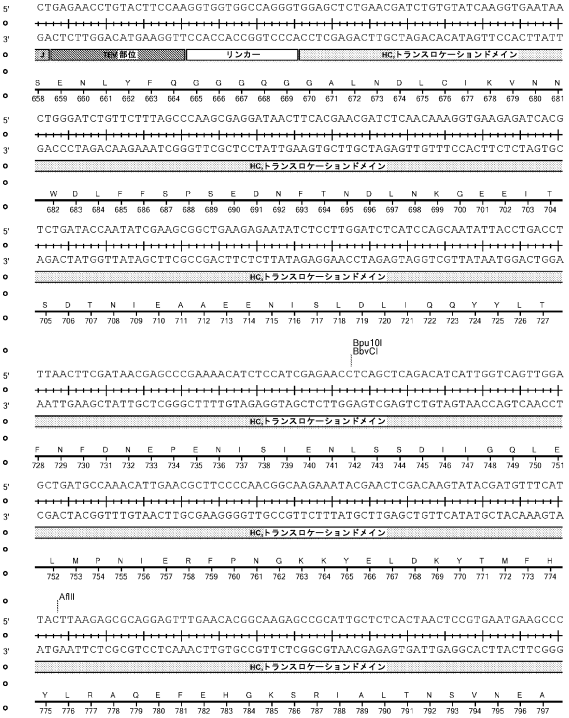
【図２０Ｄ】



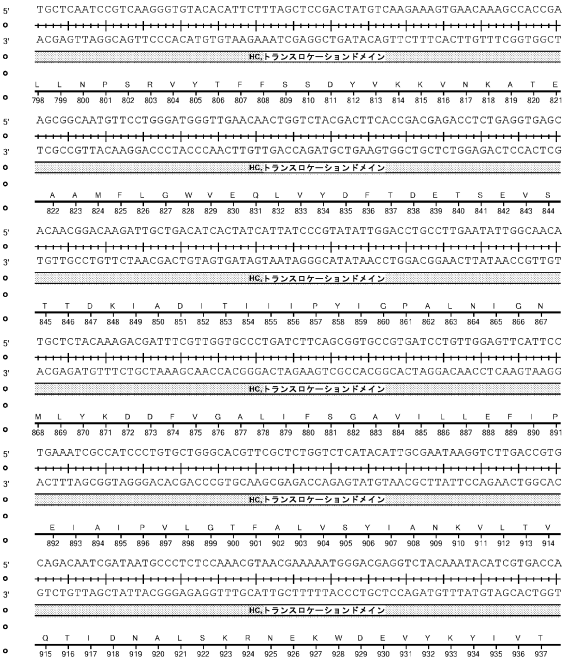
【図２０Ｅ】



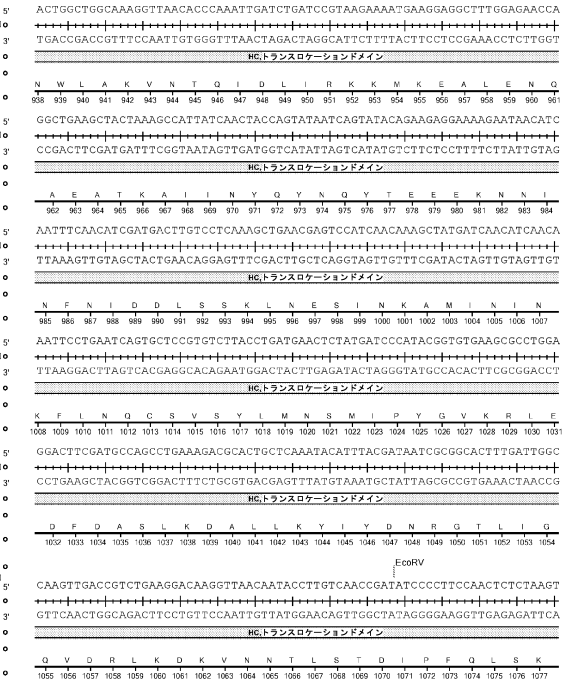
【図２０Ｆ】



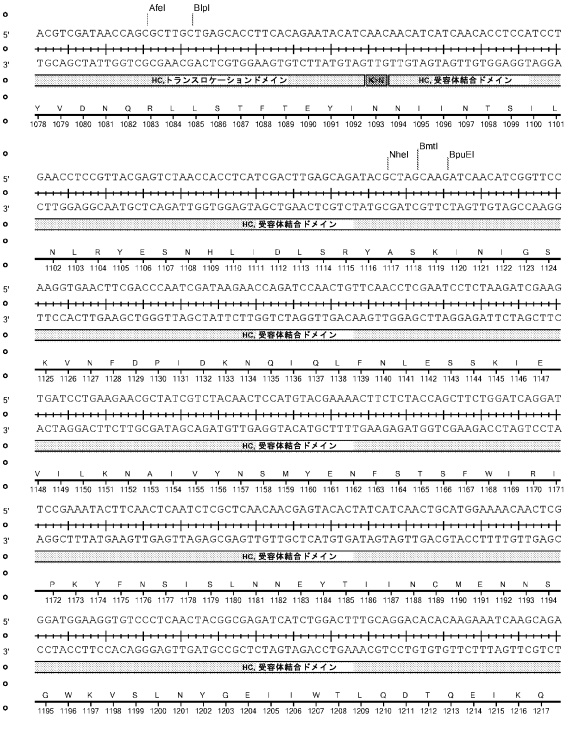
【図２０Ｇ】



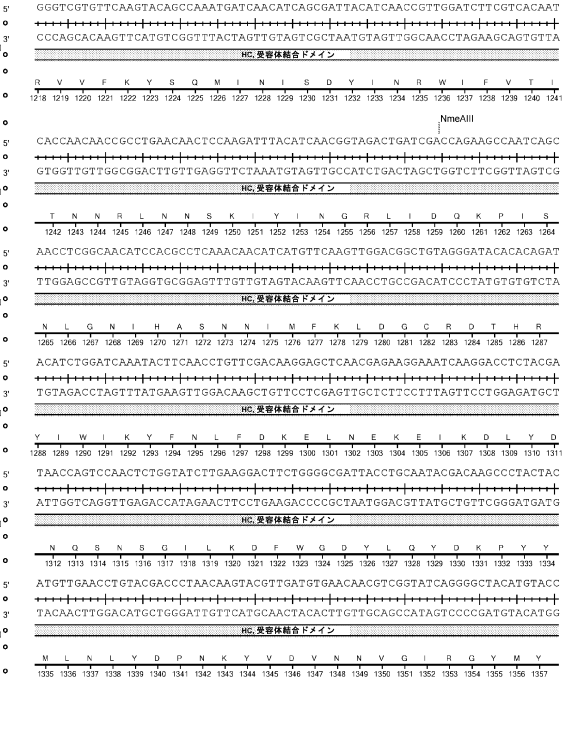
【図２０Ｈ】



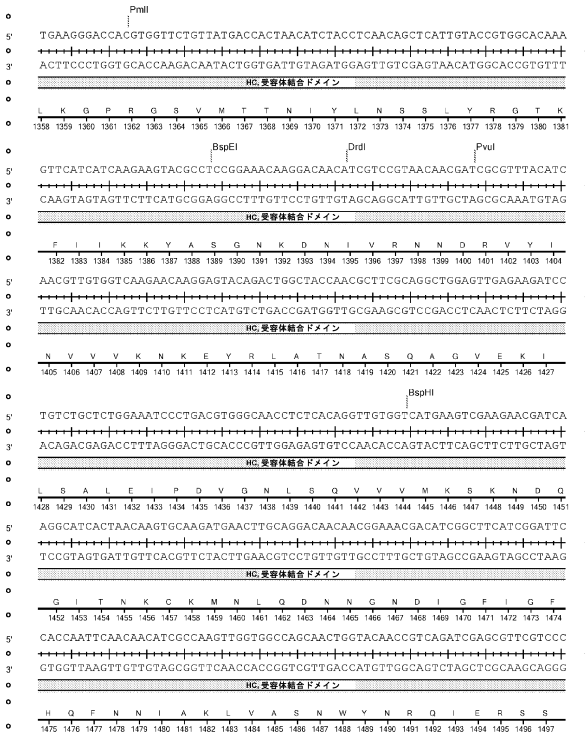
【図２０Ｉ】



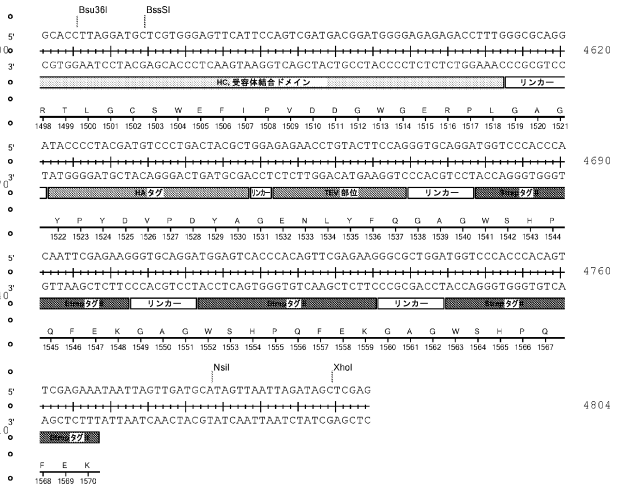
【図２０Ｊ】



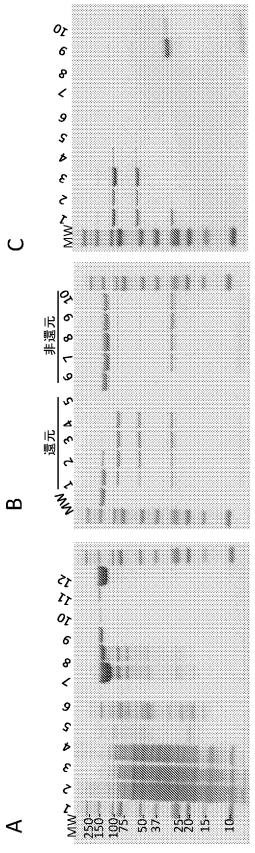
【図２０Ｋ】



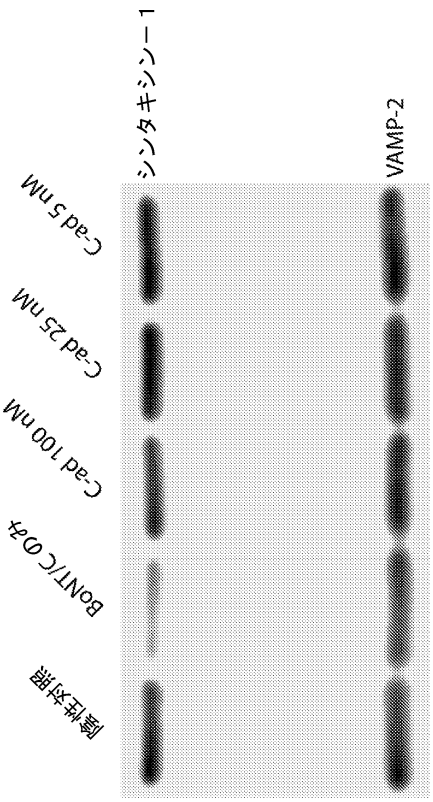
【図２０Ｌ】



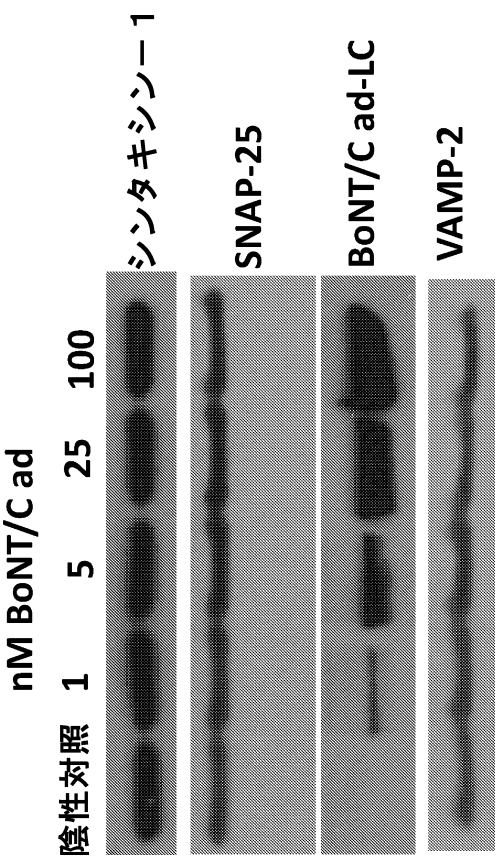
【図２１】



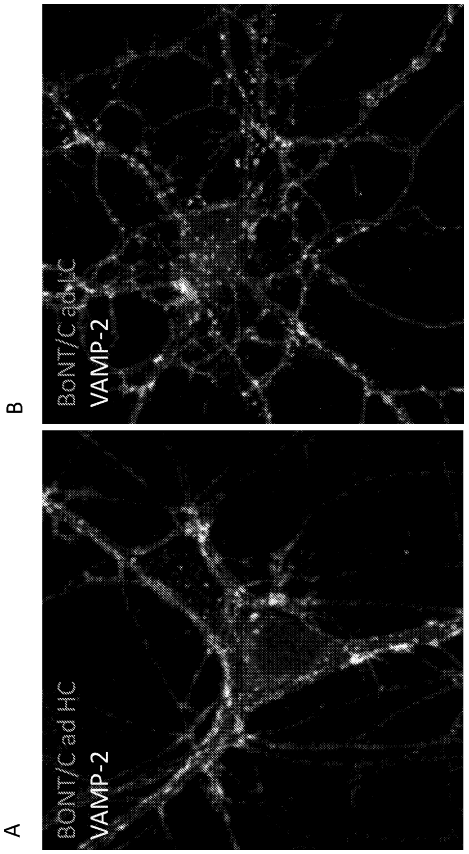
【図２２Ａ】



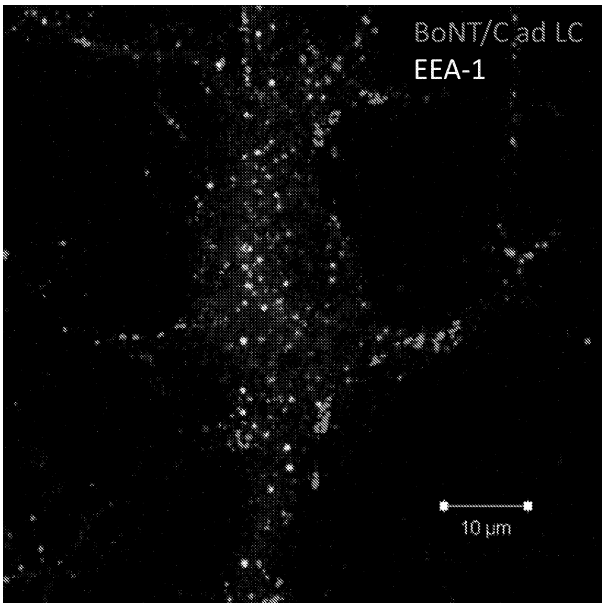
【図２２Ｂ】



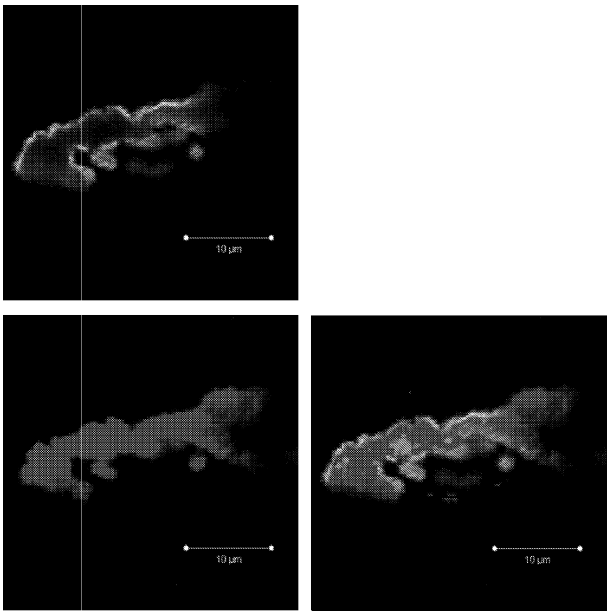
【図２３】



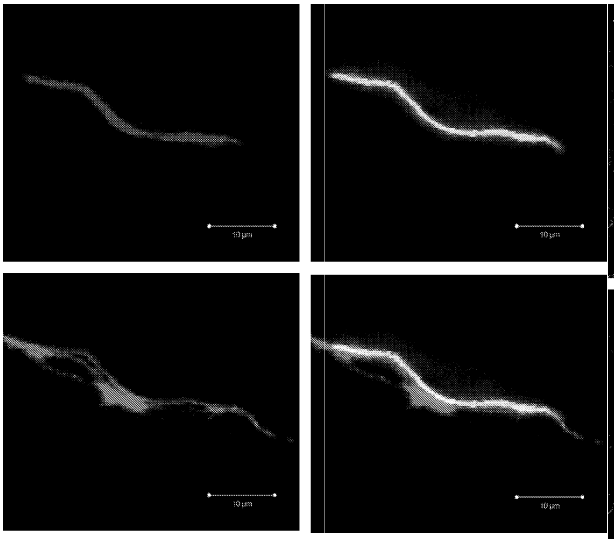
【図２４】



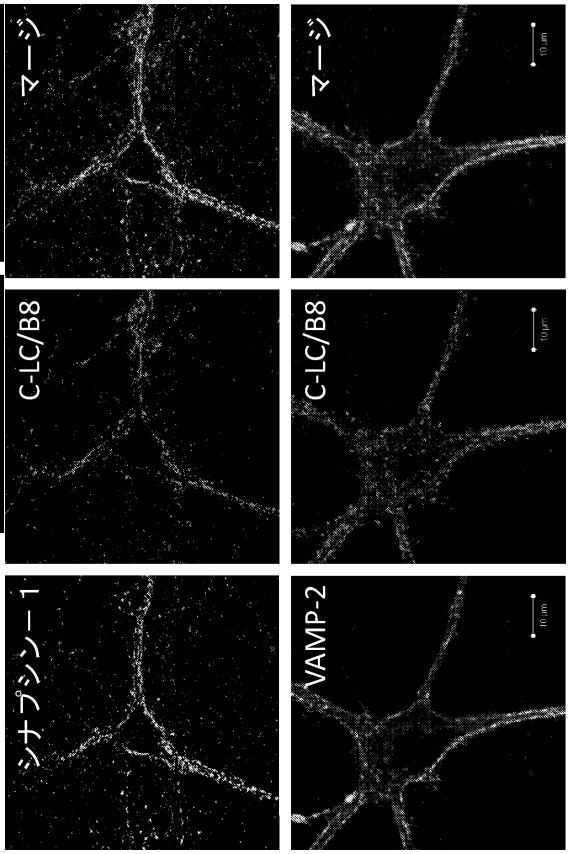
【図２５Ａ】



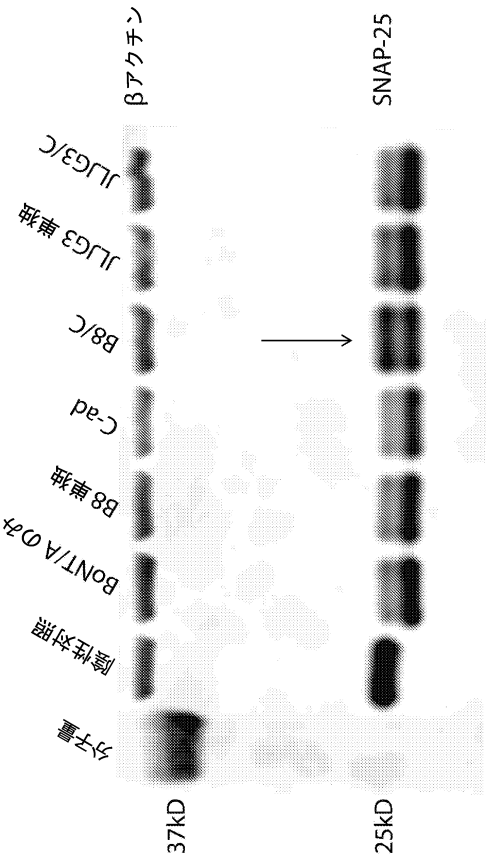
【図２５Ｂ】



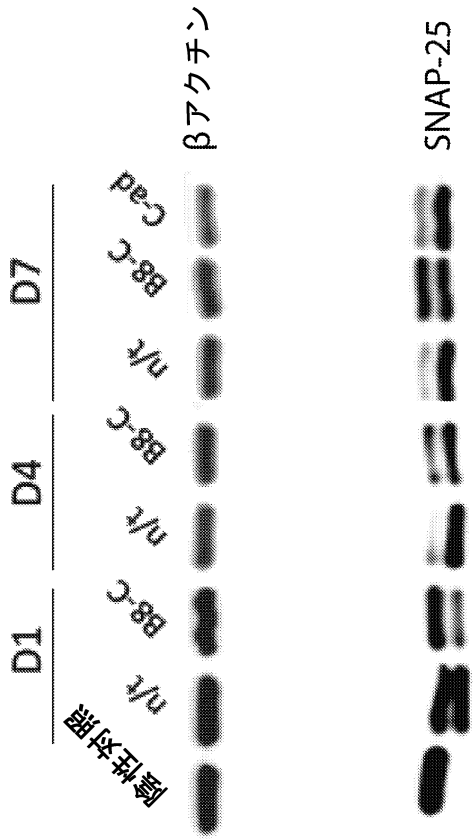
【図２６】



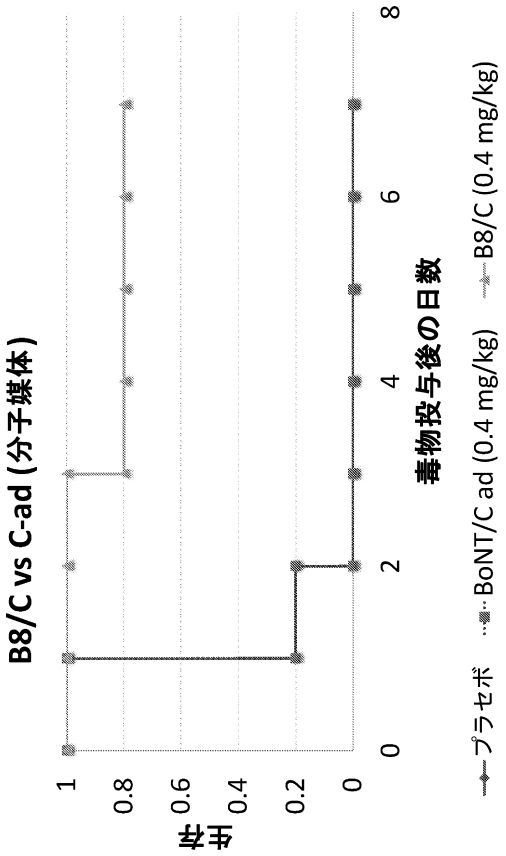
【図２７】



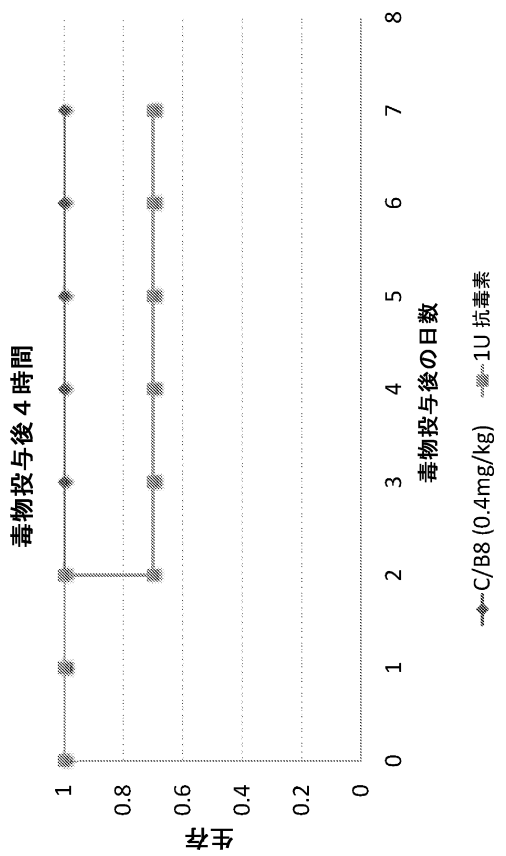
【図２８】



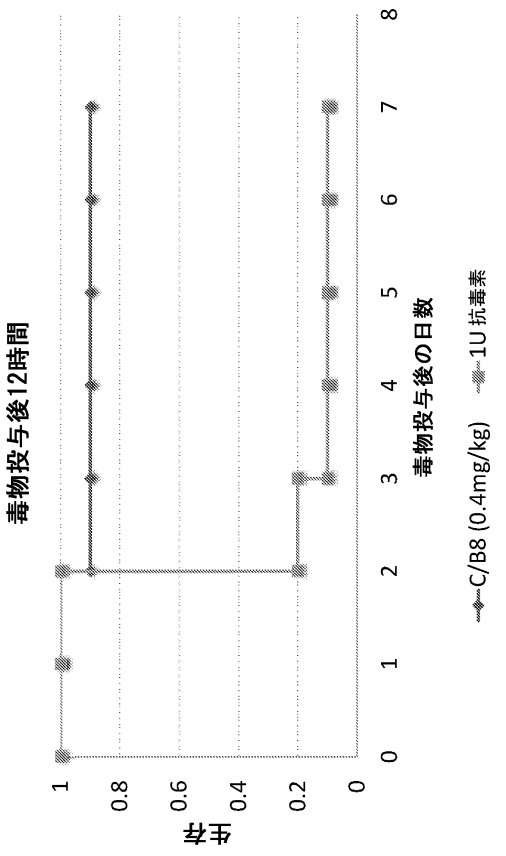
【図２９】



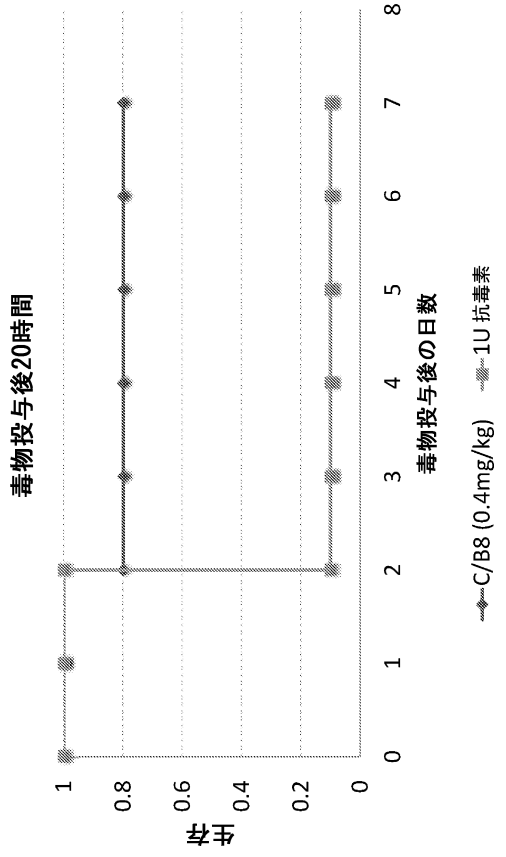
【図３０Ａ】



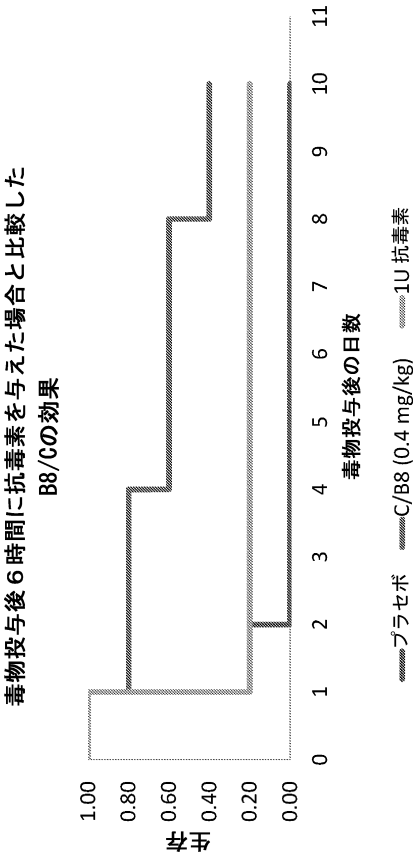
【図３０Ｂ】



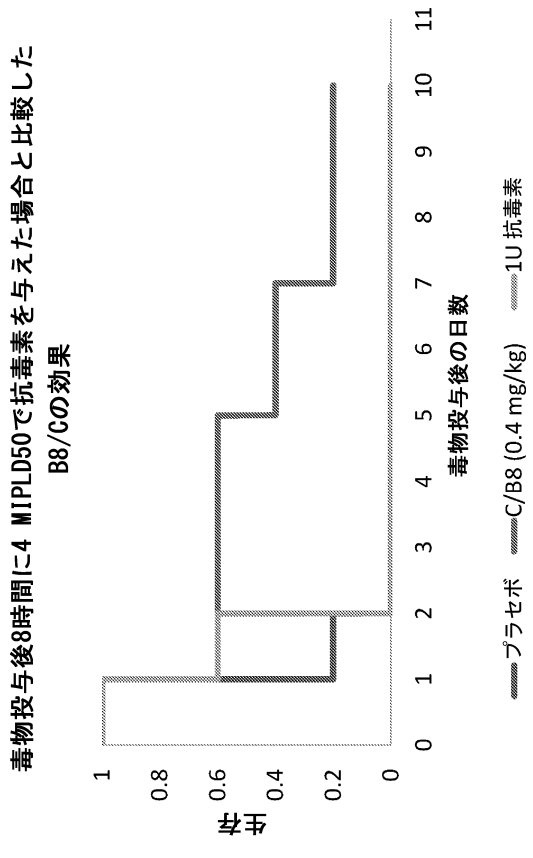
【図３０Ｃ】



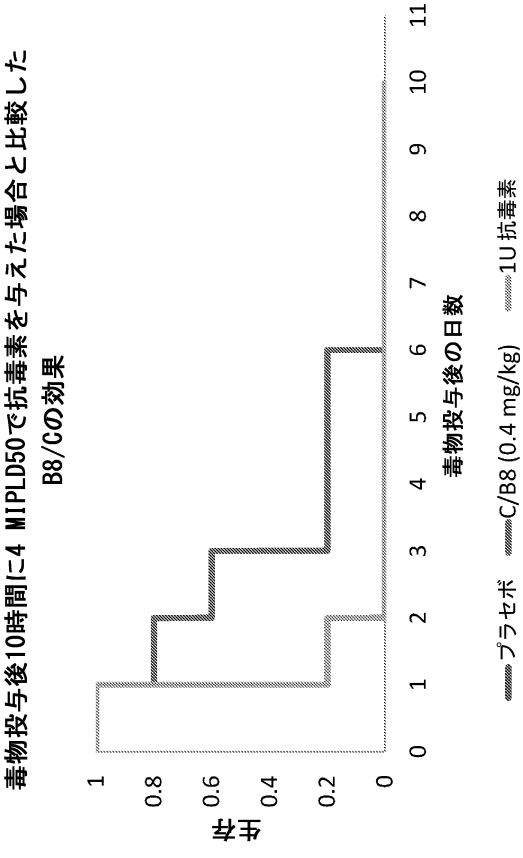
【図３１Ａ】



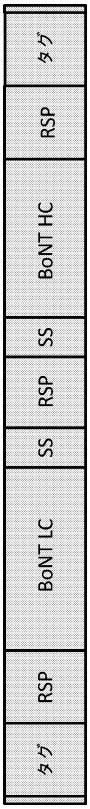
【図３１Ｂ】



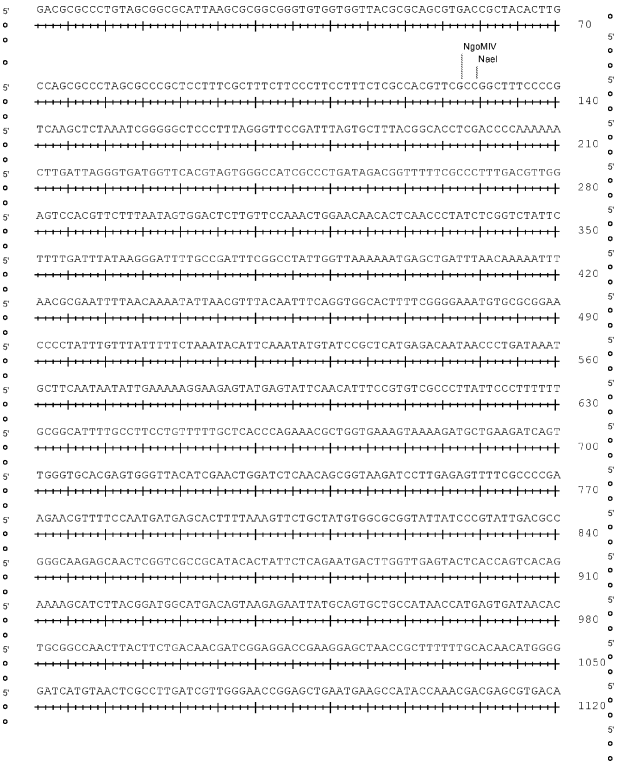
【図３１Ｃ】



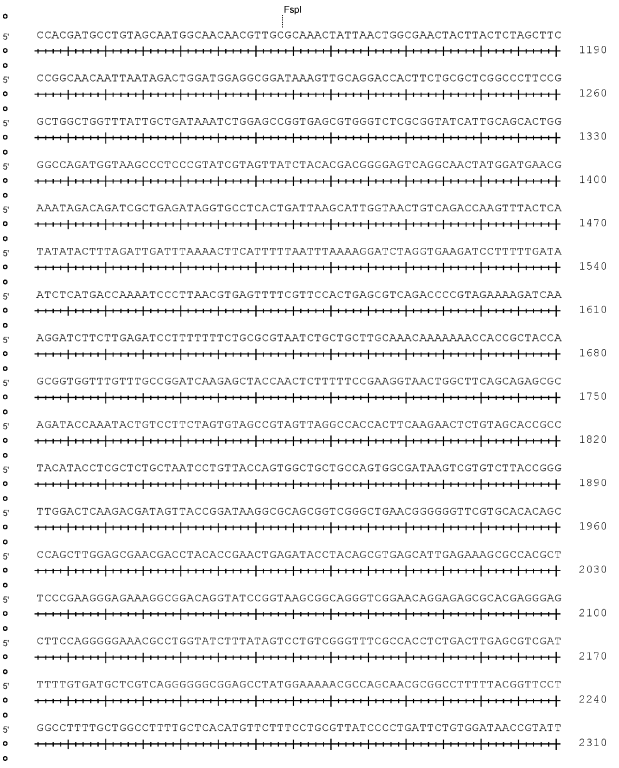
【図３２】



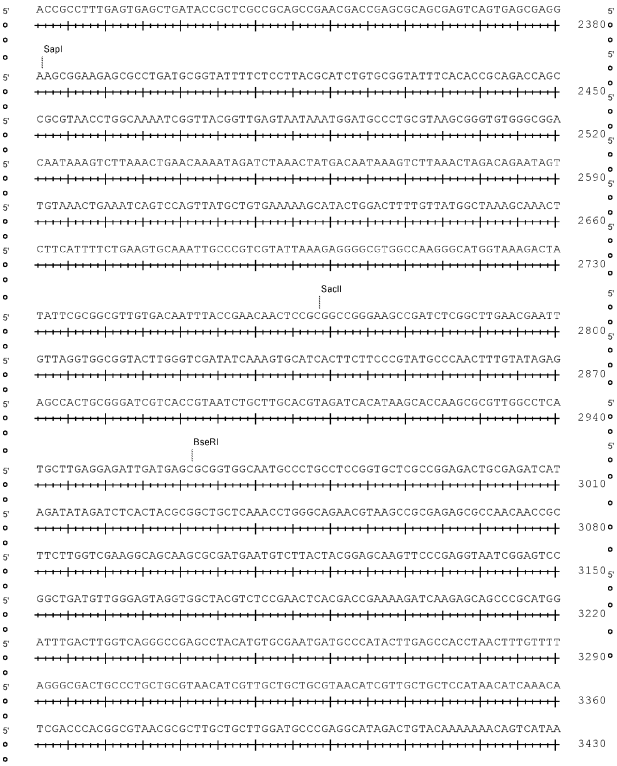
【図３３Ａ】



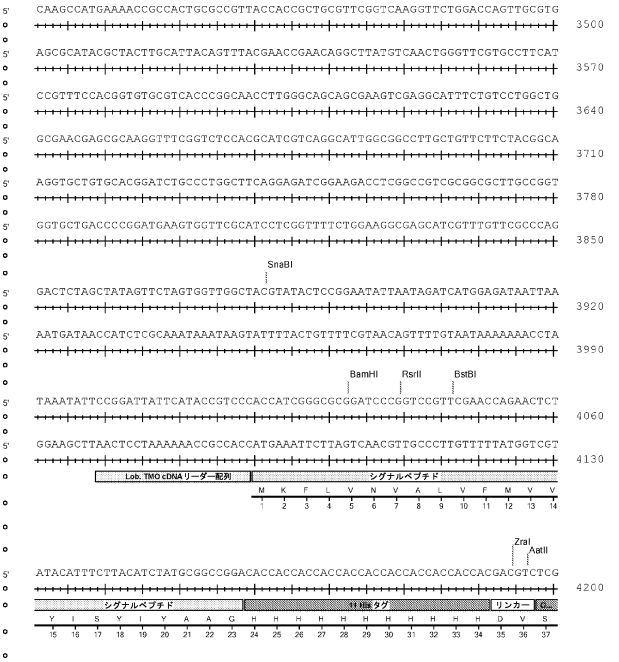
【図３３Ｂ】



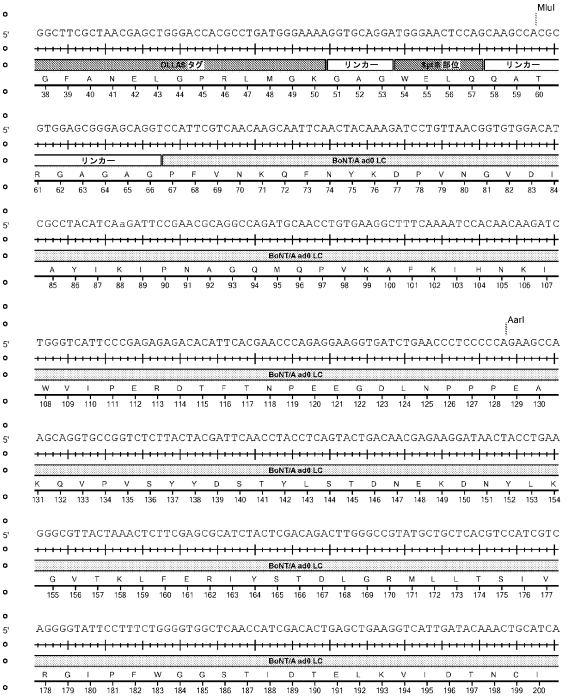
【図３３Ｃ】



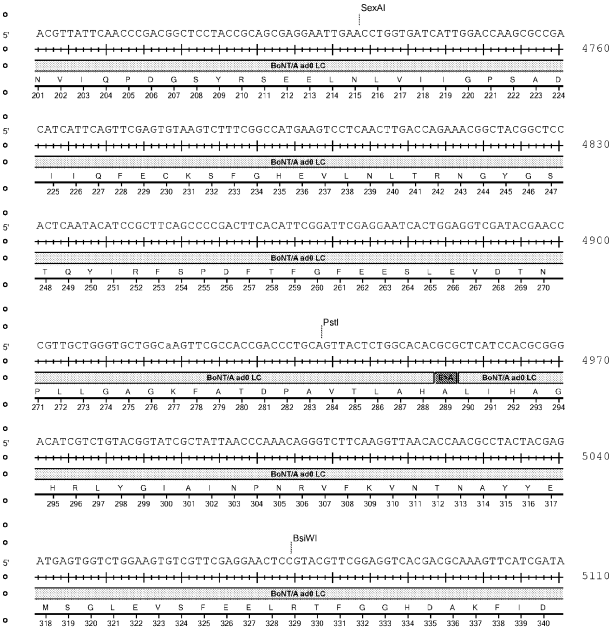
【図３３Ｄ】



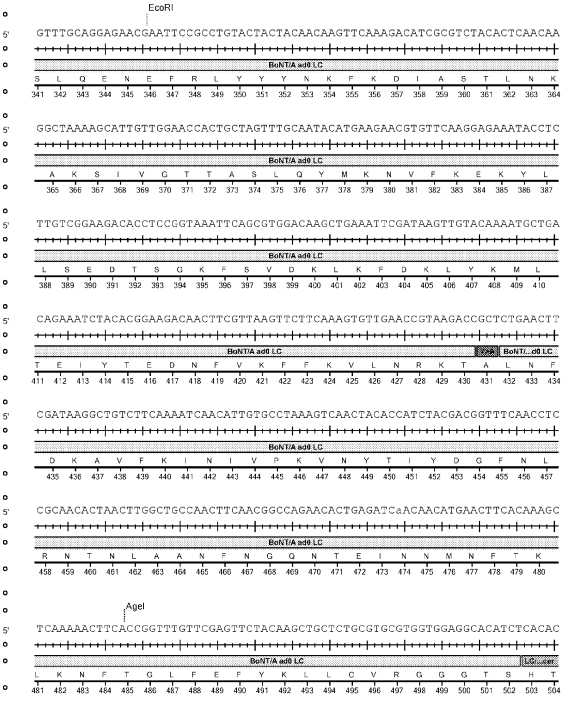
【図３３Ｅ】



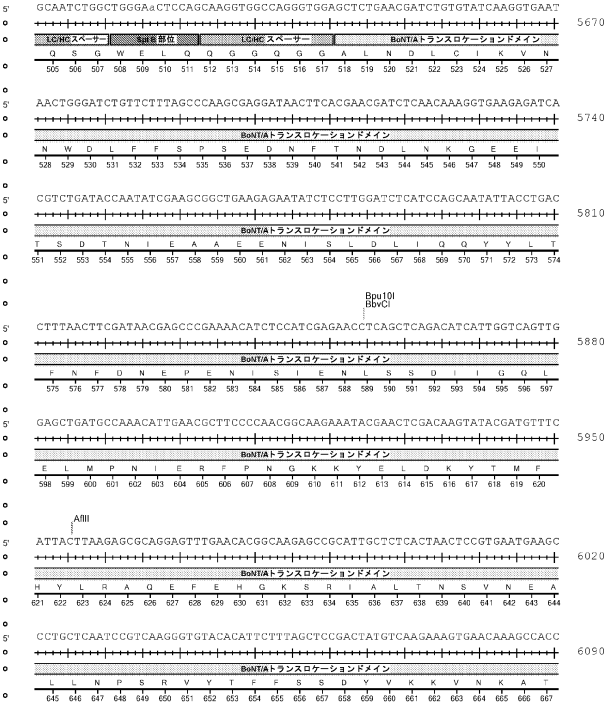
【図３３Ｆ】



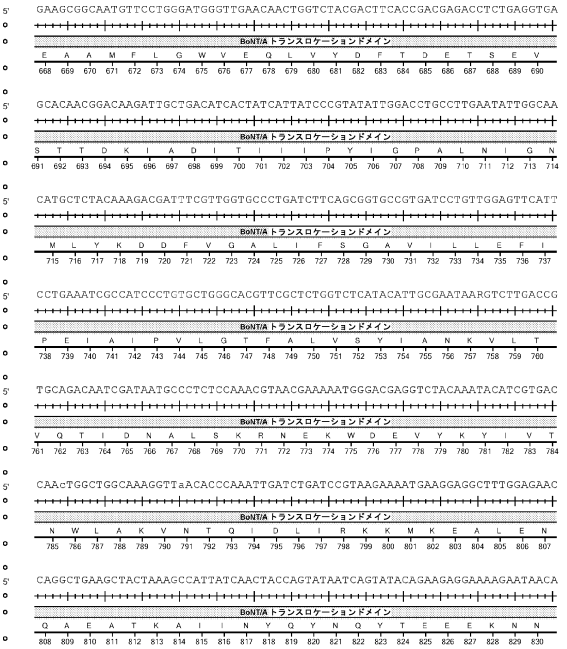
【図３３Ｇ】



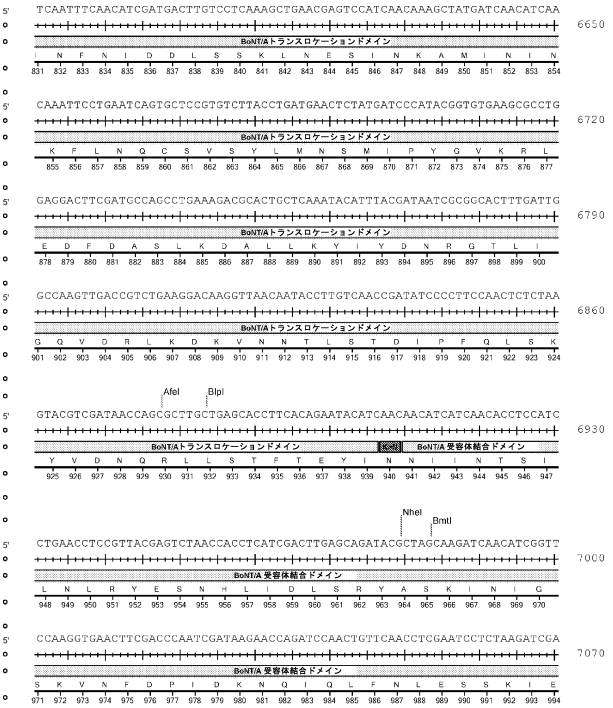
【図３３Ｈ】



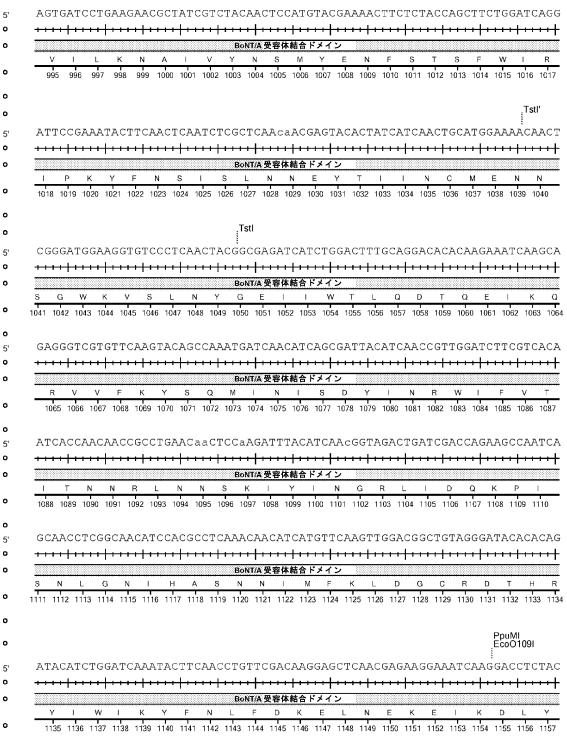
【図３３Ｉ】



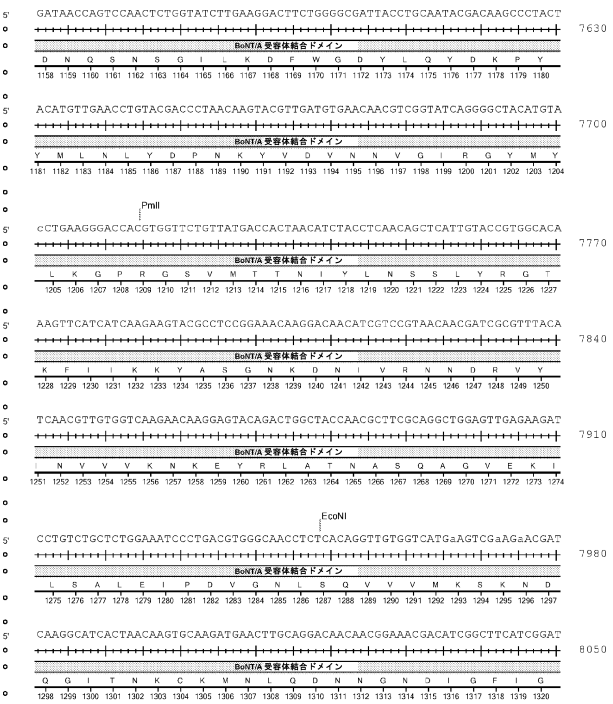
【図３３Ｊ】



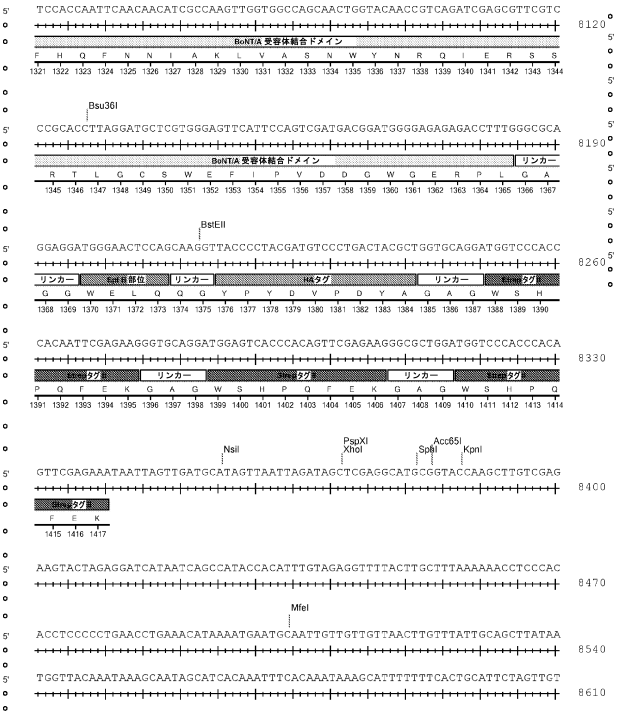
【図３３Ｋ】



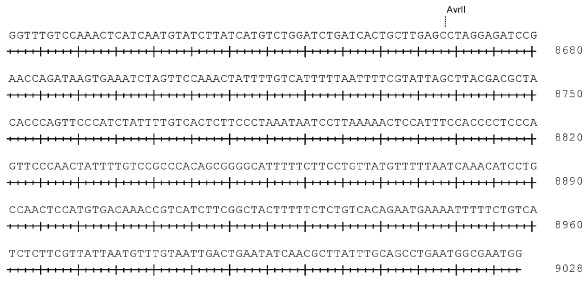
【図３３Ｌ】



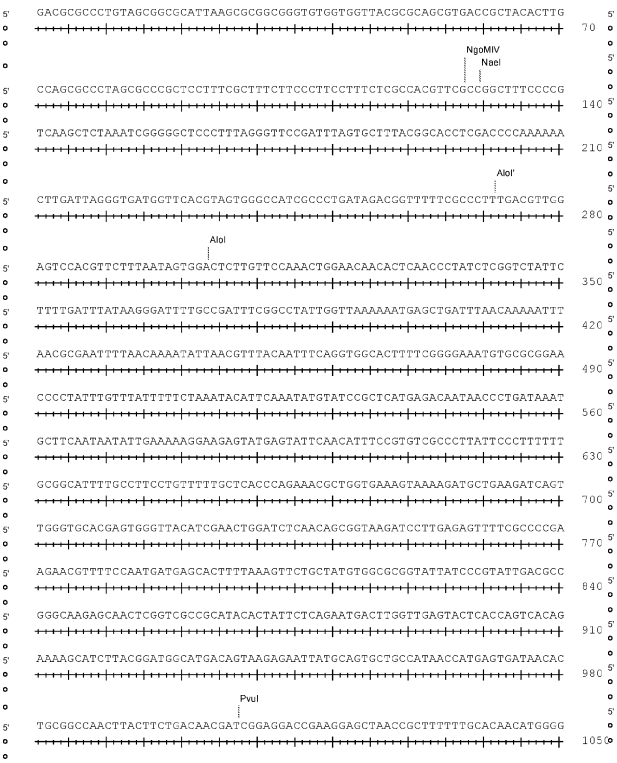
【図３３Ｍ】



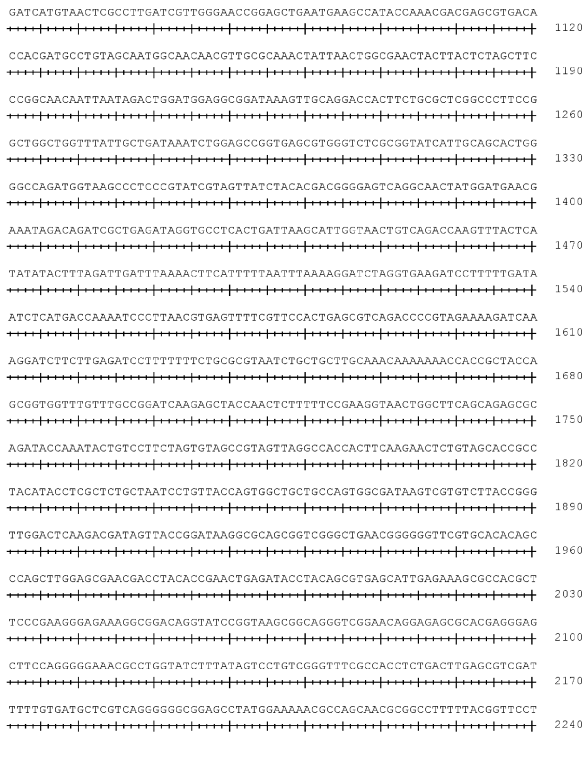
【図３３Ｎ】



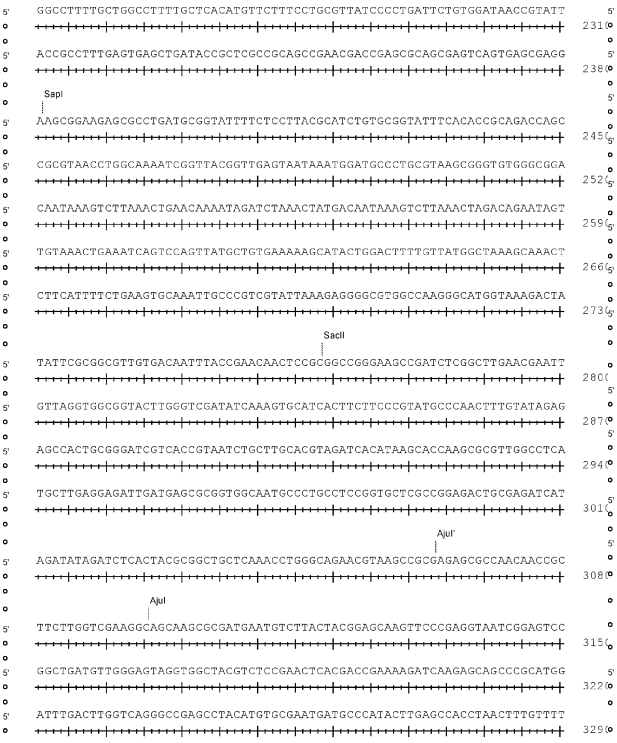
【図３４Ａ】



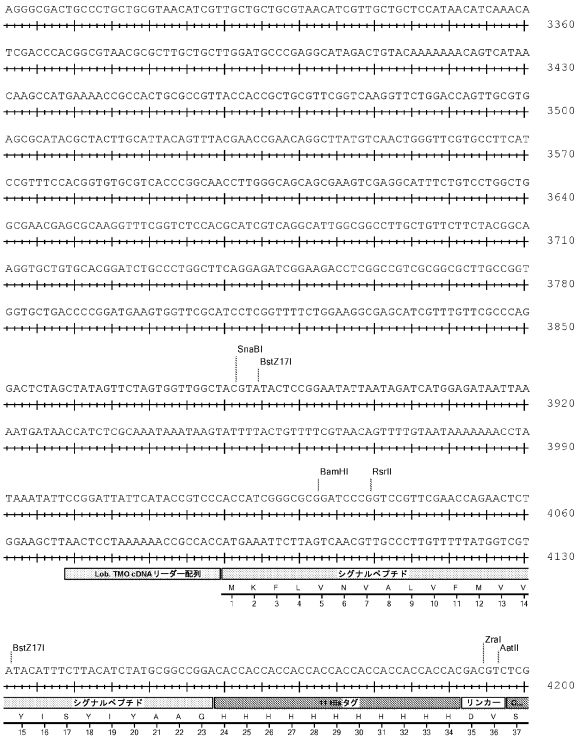
【図３４Ｂ】



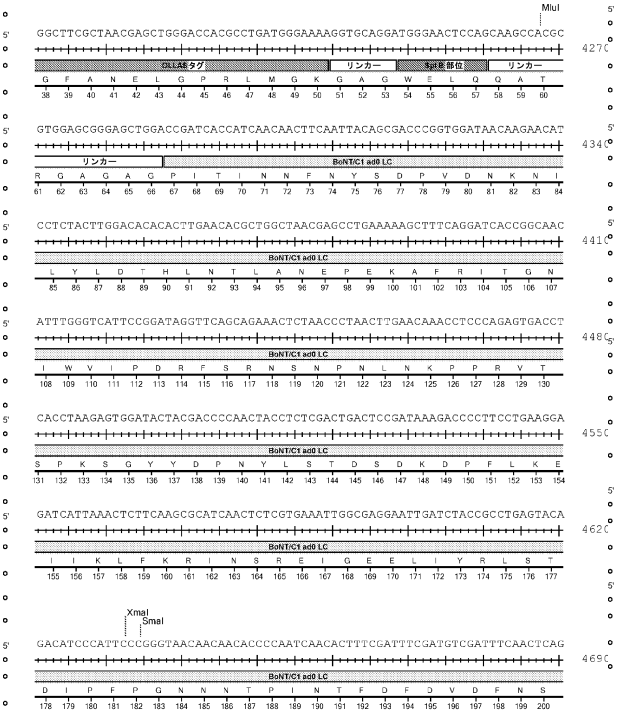
【図３４Ｃ】



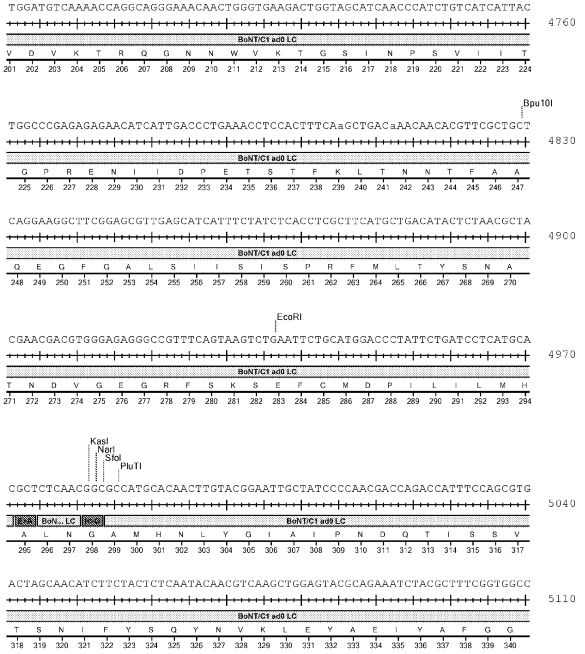
【図３４Ｄ】



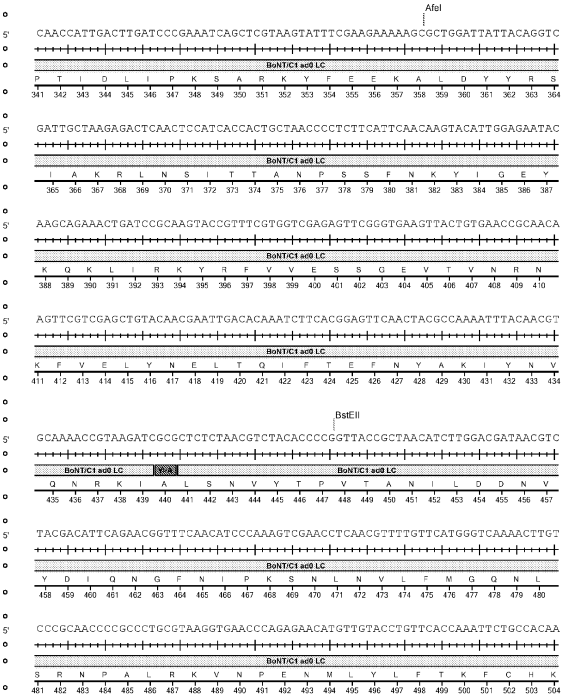
【図３４Ｅ】



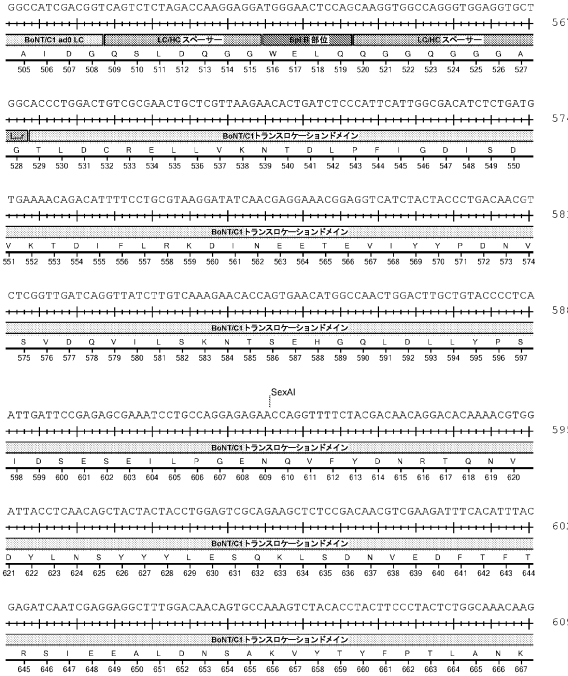
【図３４Ｆ】



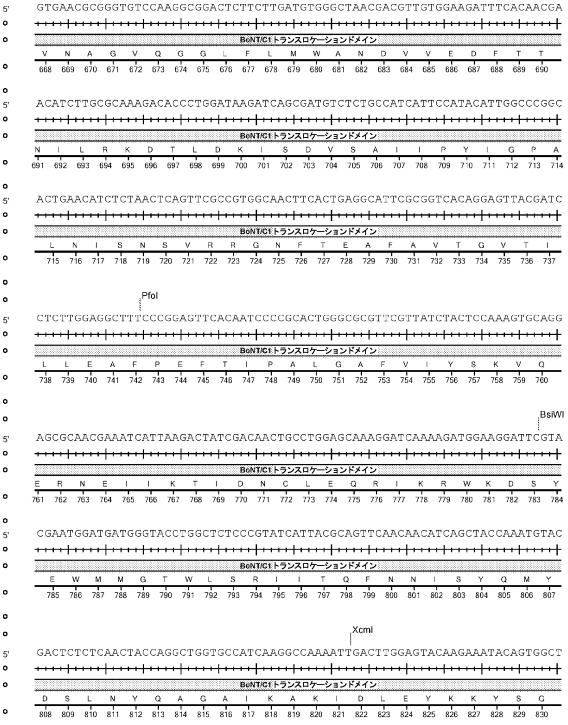
【図３４Ｇ】



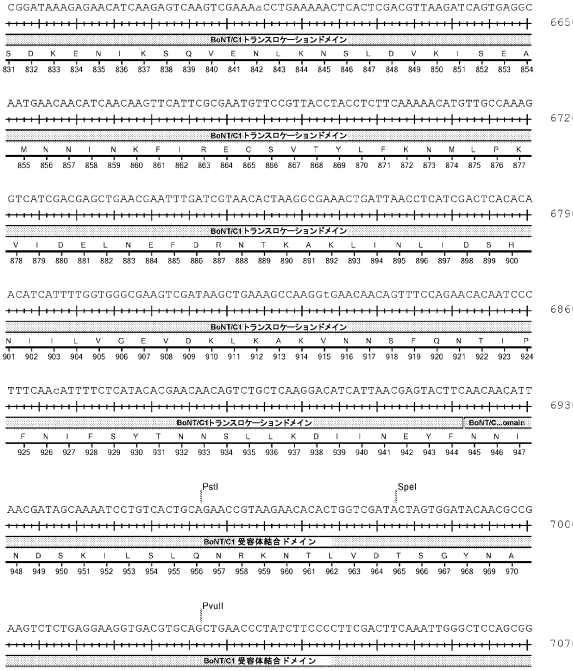
【図３４Ｈ】



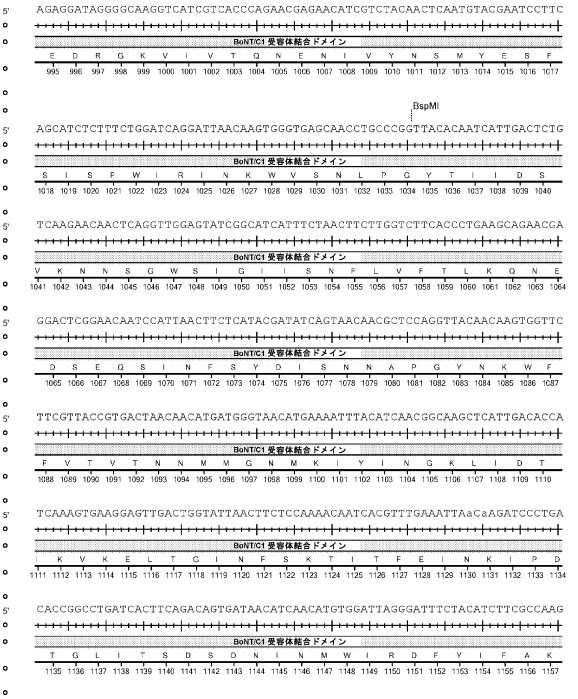
【図３４Ｉ】



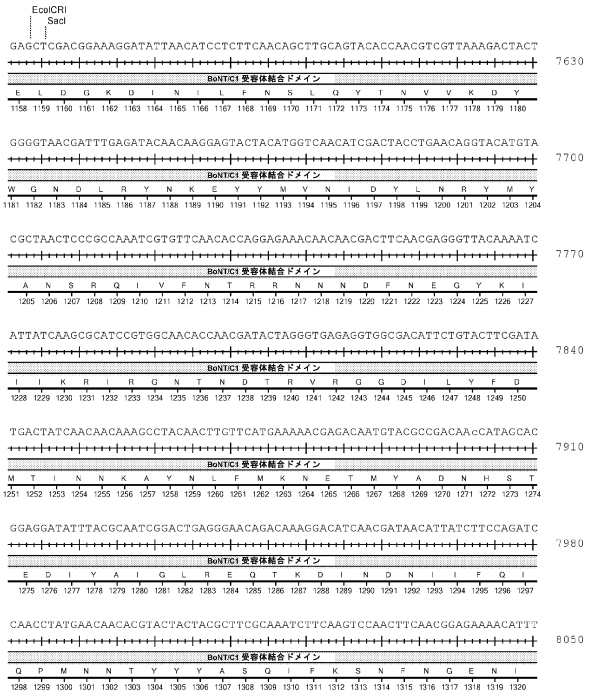
【図３４Ｊ】



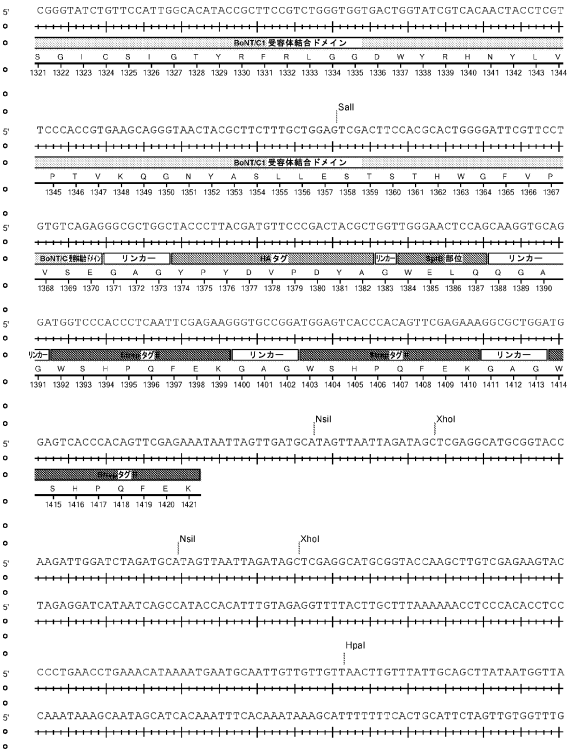
【図３４Ｋ】



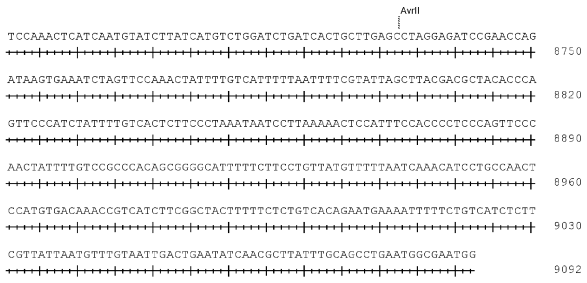
【図３４Ｌ】



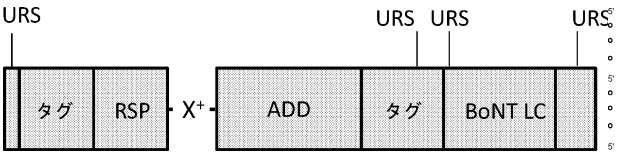
【図３４Ｍ】



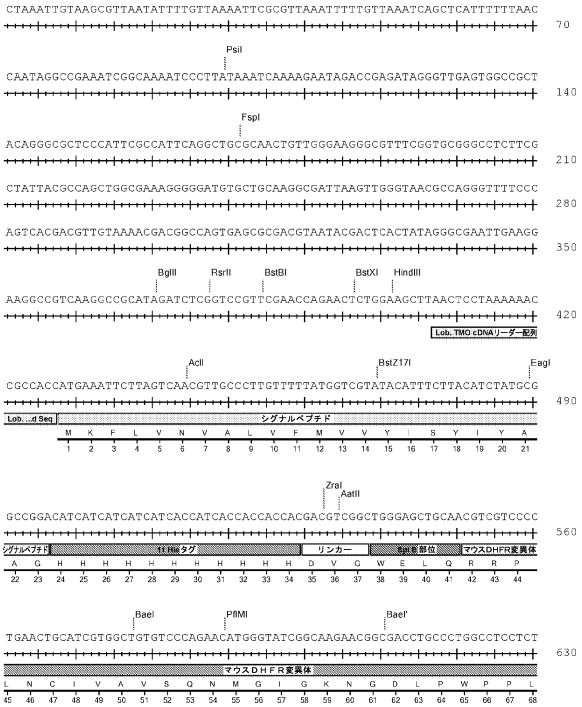
【図３４Ｎ】



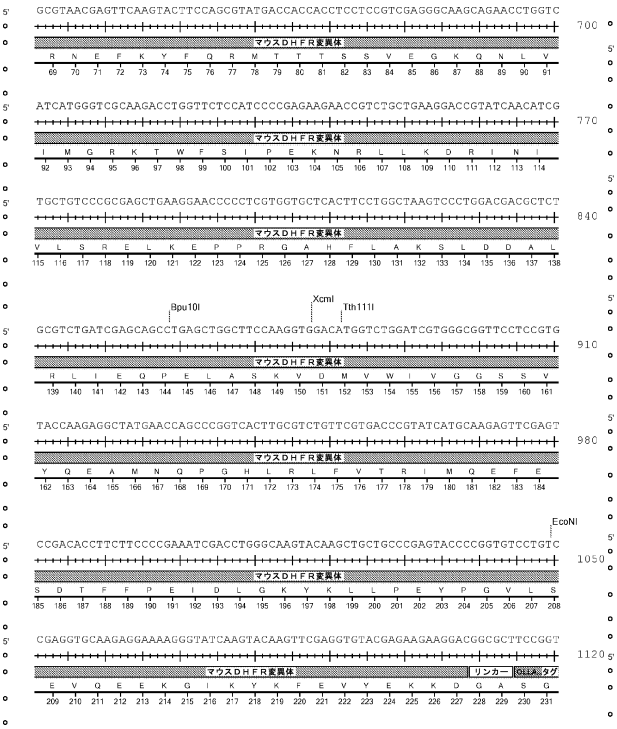
【図３５】



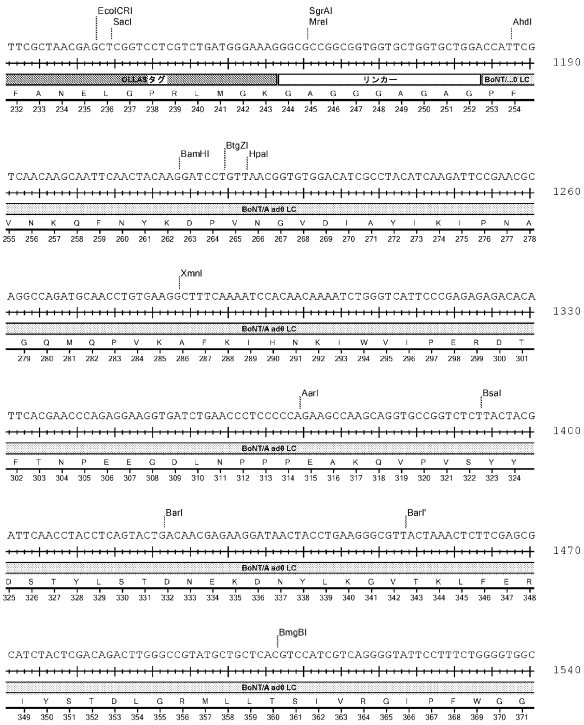
【図３６Ａ】



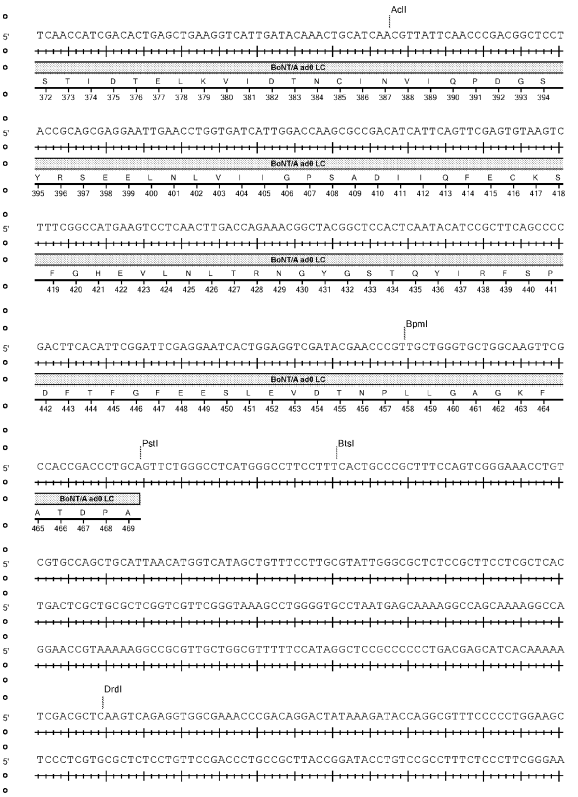
【図３６Ｂ】



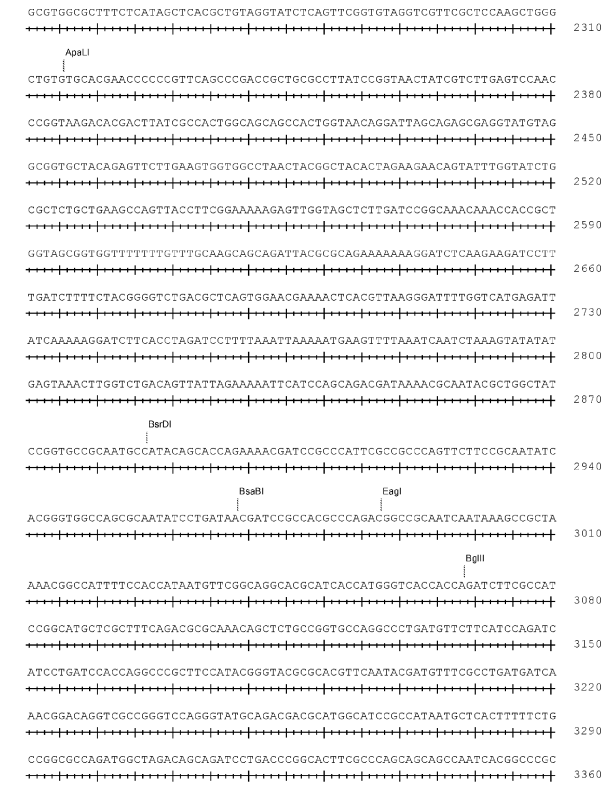
【図３６Ｃ】



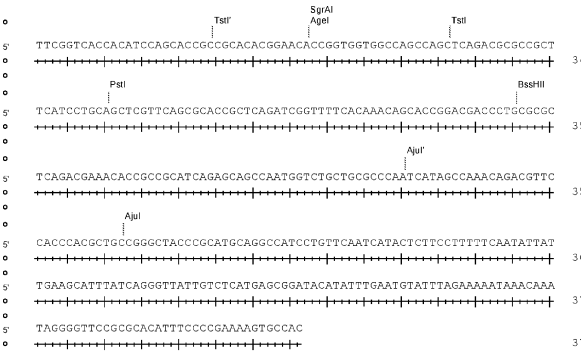
【図３６Ｄ】



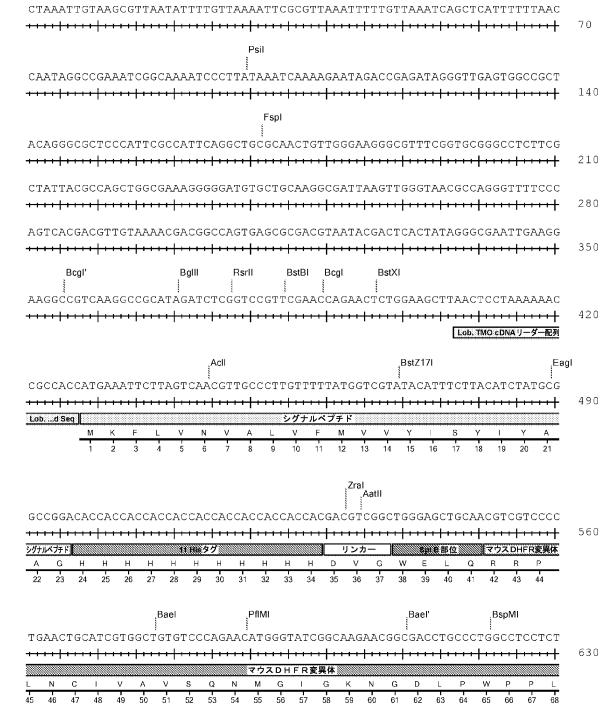
【図３６Ｅ】



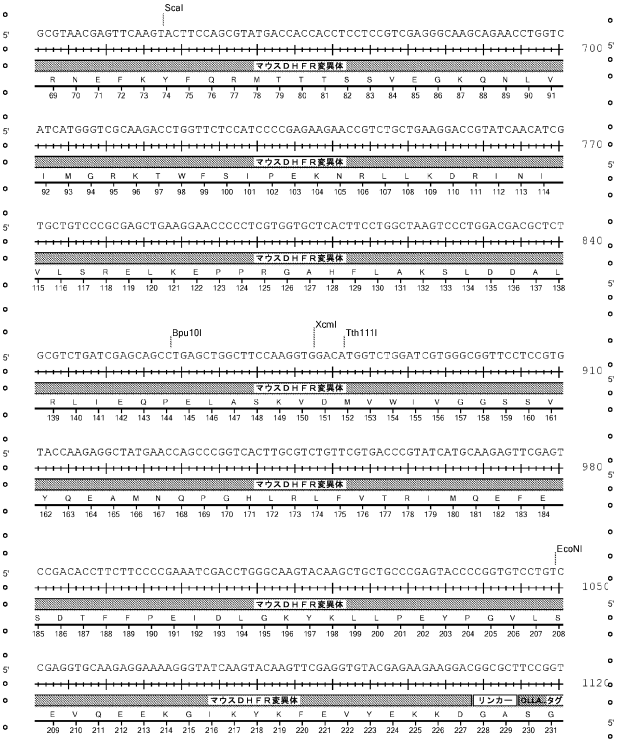
【図３６Ｆ】



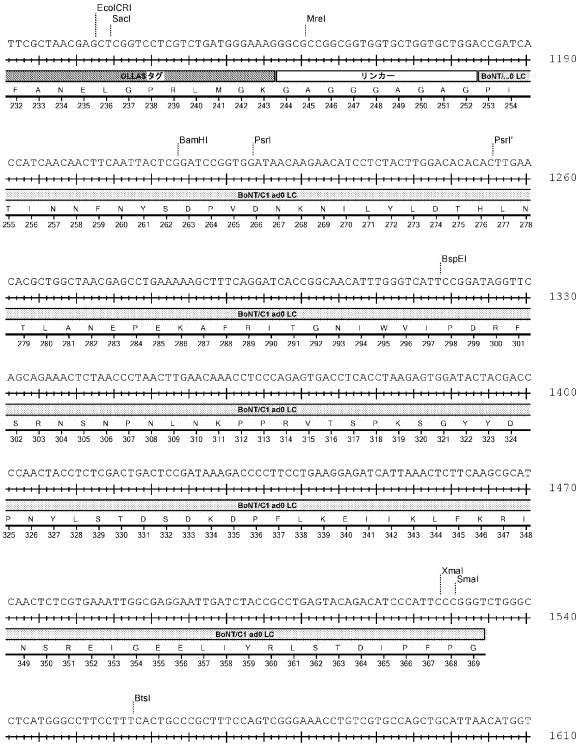
【図３７Ａ】



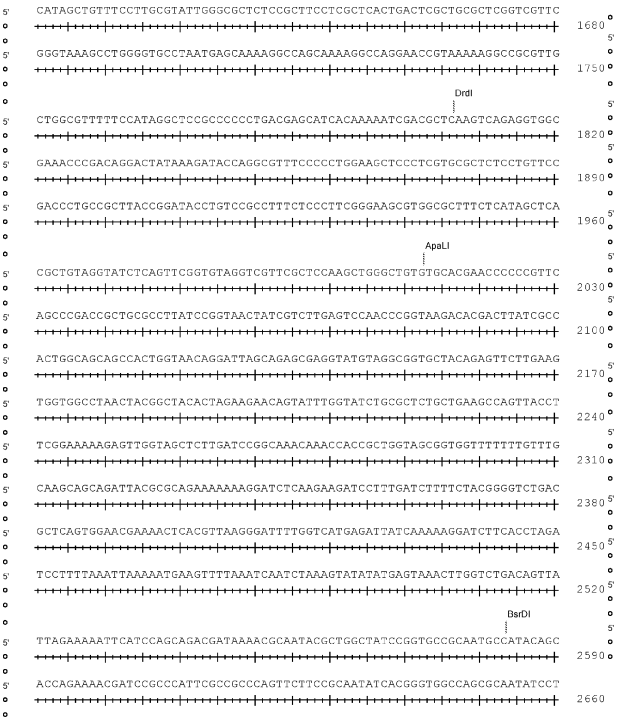
【図３７Ｂ】



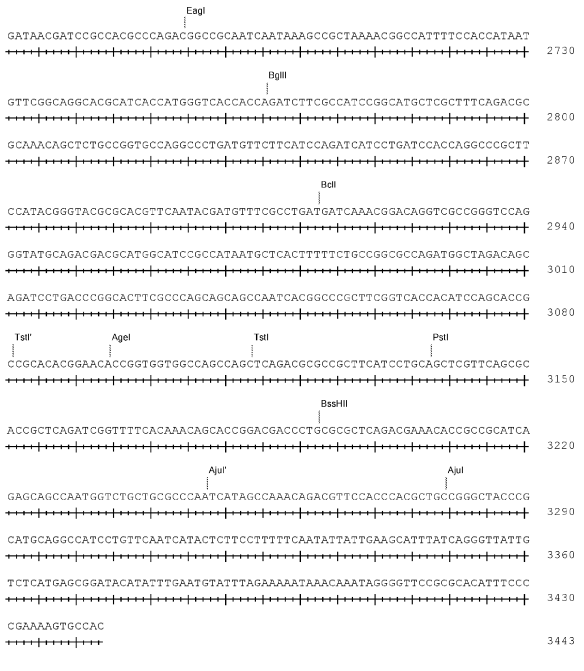
【図３７Ｃ】



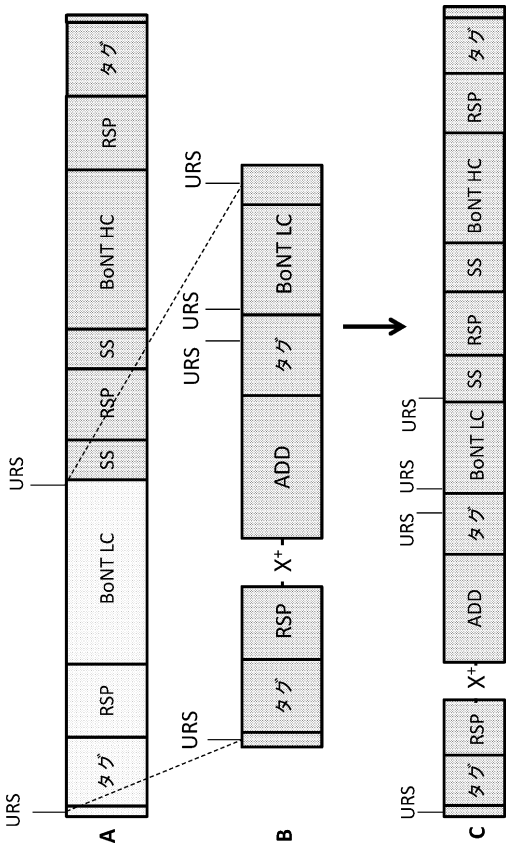
【図３７Ｄ】



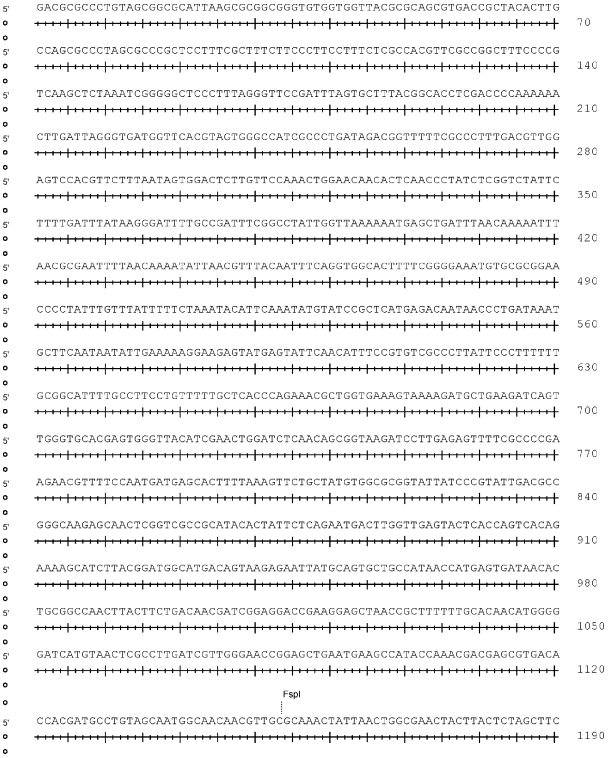
【図３７Ｅ】



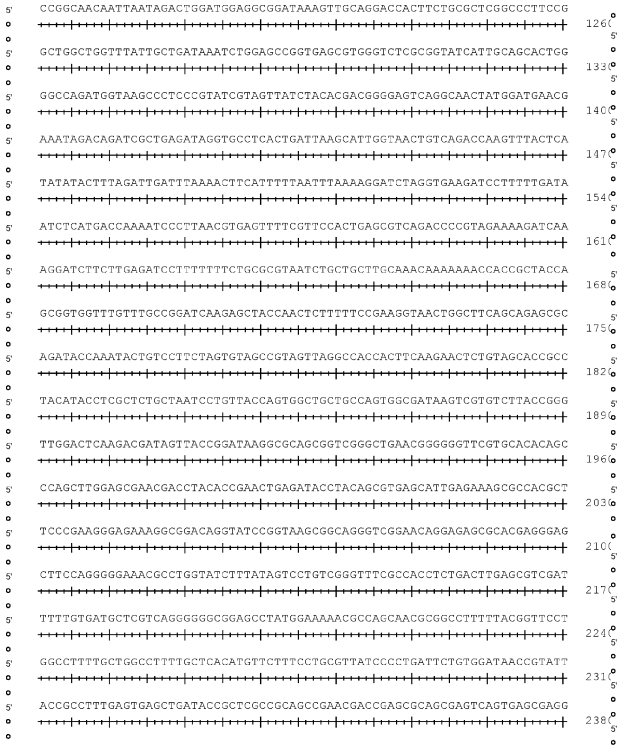
【図３８】



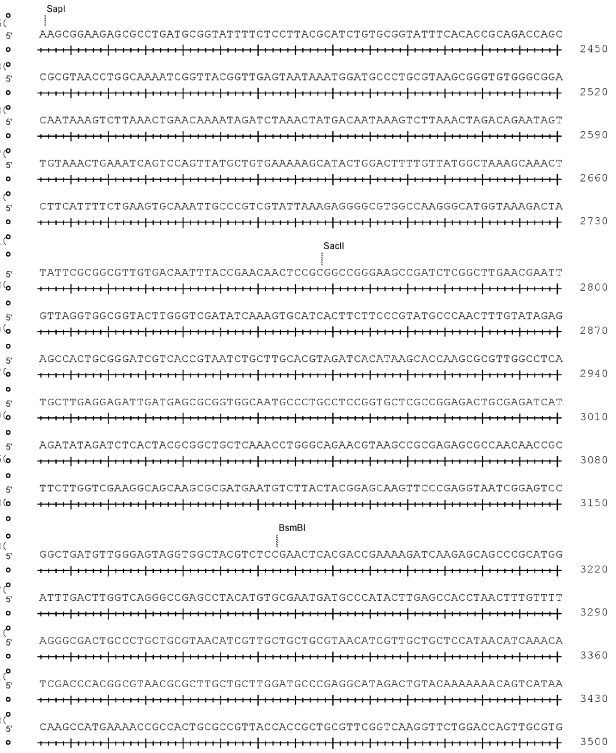
【図３９Ａ】



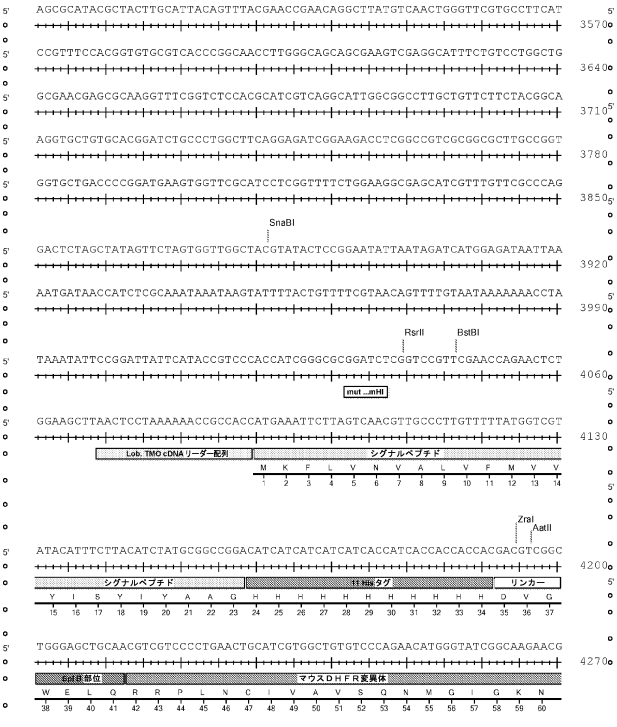
【図３９Ｂ】



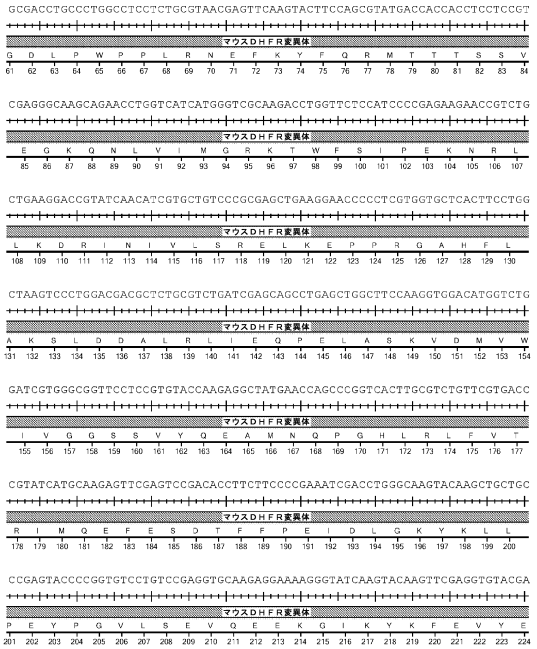
【図３９Ｃ】



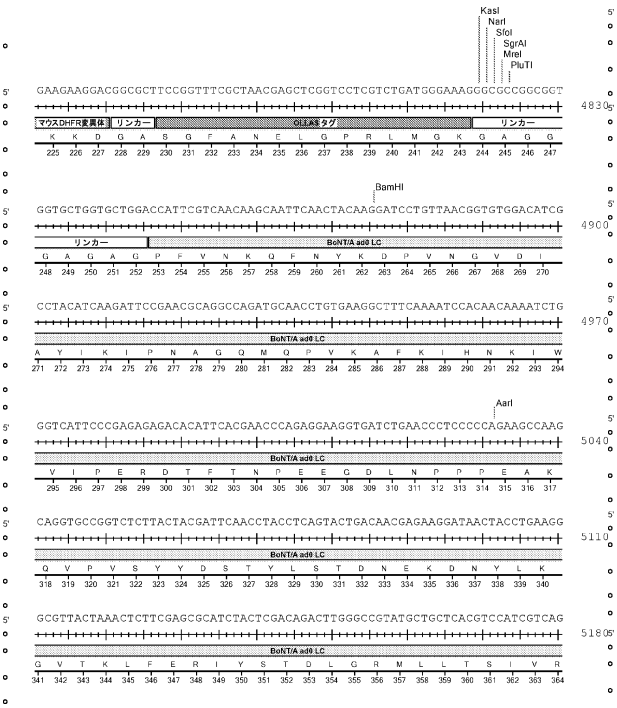
【図３９Ｄ】



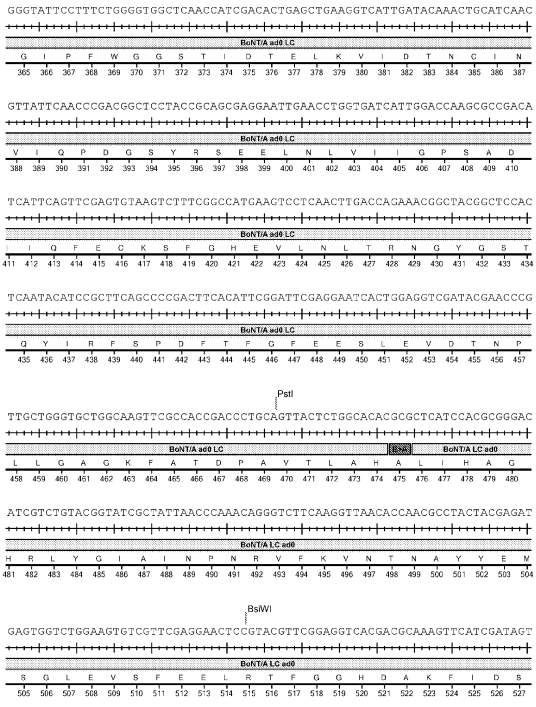
【図３９Ｅ】



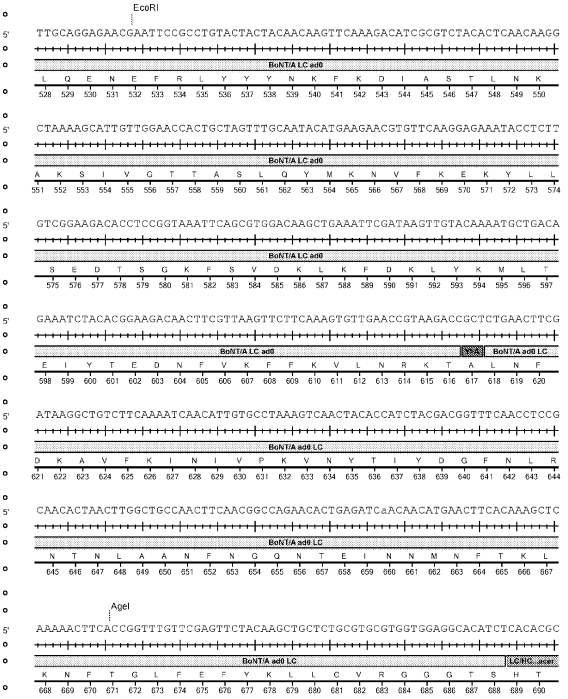
【図３９Ｆ】



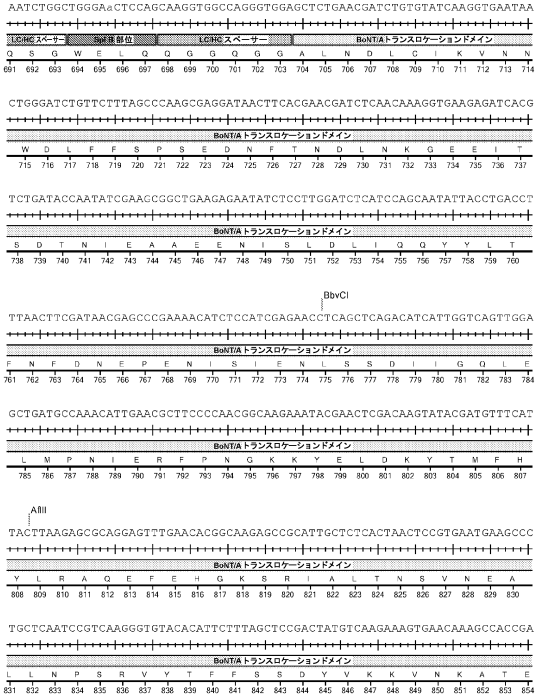
【図３９Ｇ】



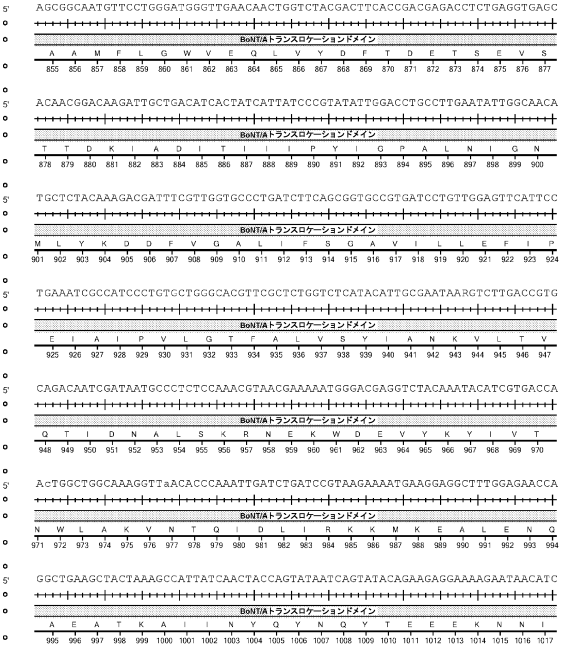
【図３９Ｈ】



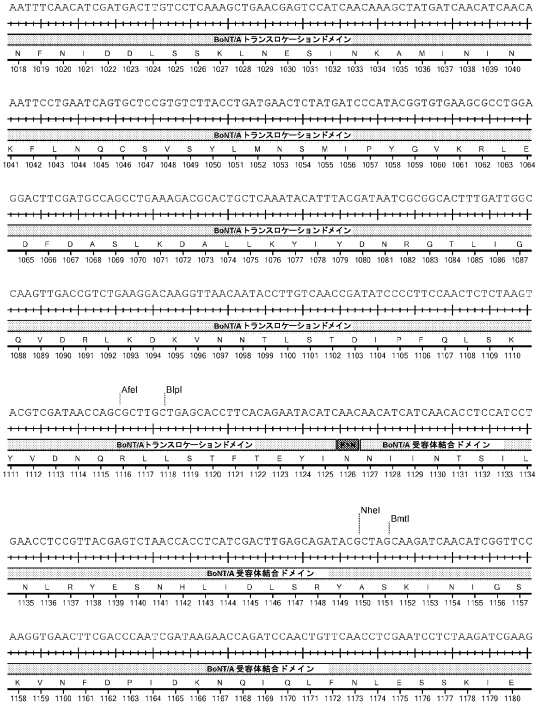
【図３９Ｉ】



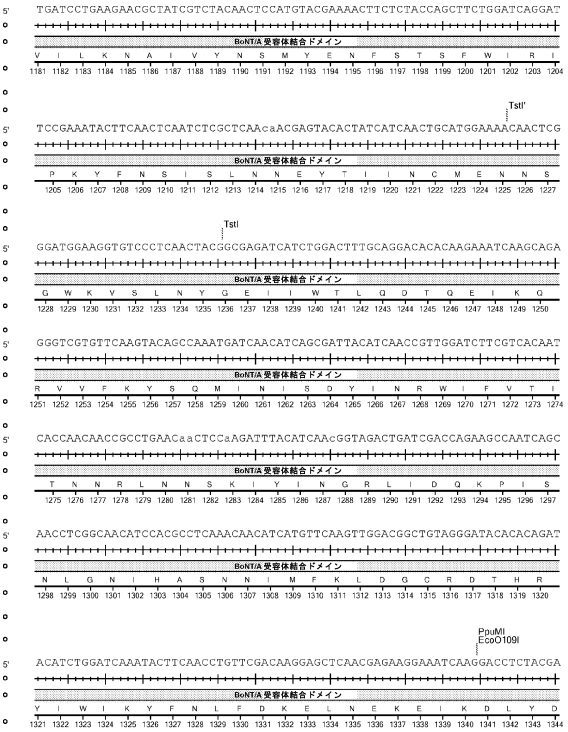
【図３９Ｊ】



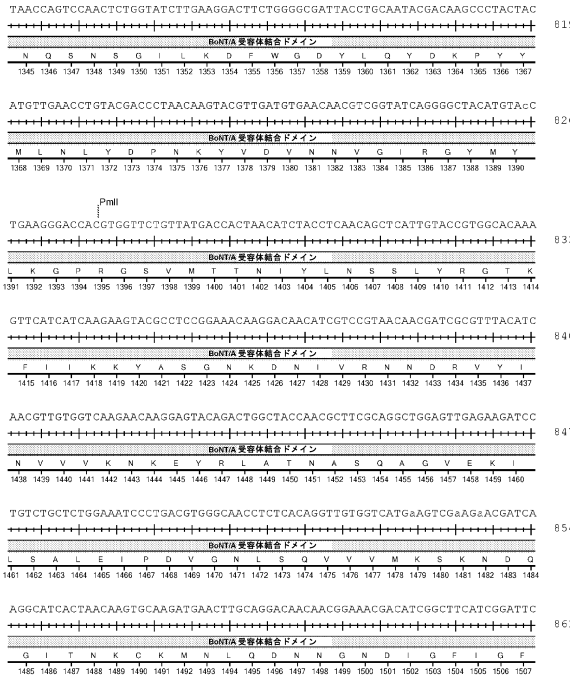
【図３９Ｋ】



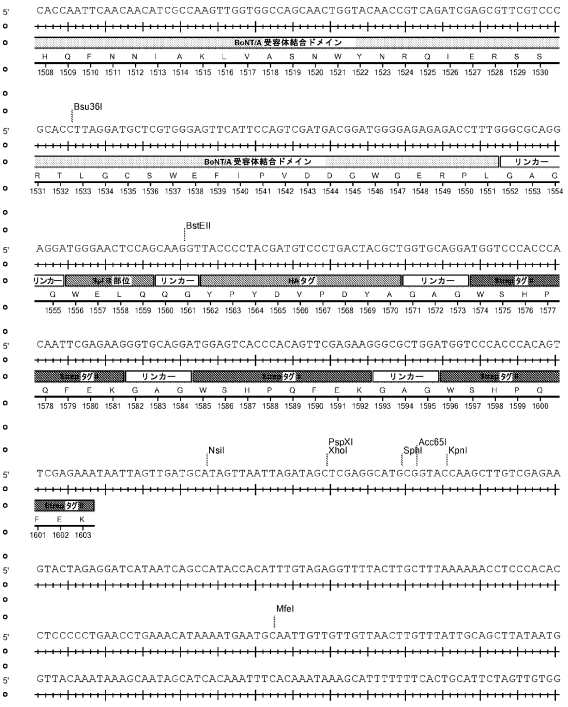
【図３９Ｌ】



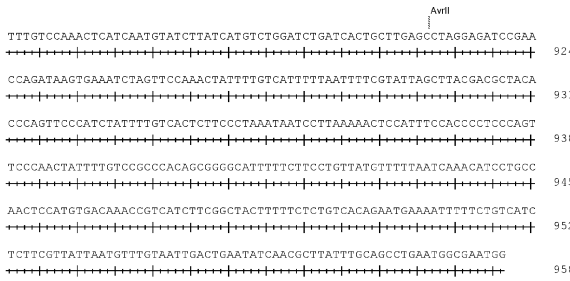
【図３９Ｍ】



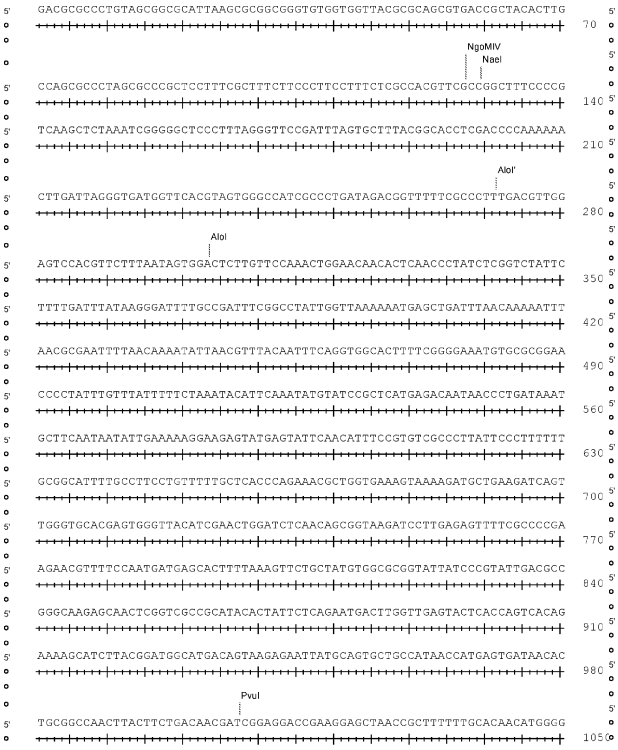
【図３９Ｎ】



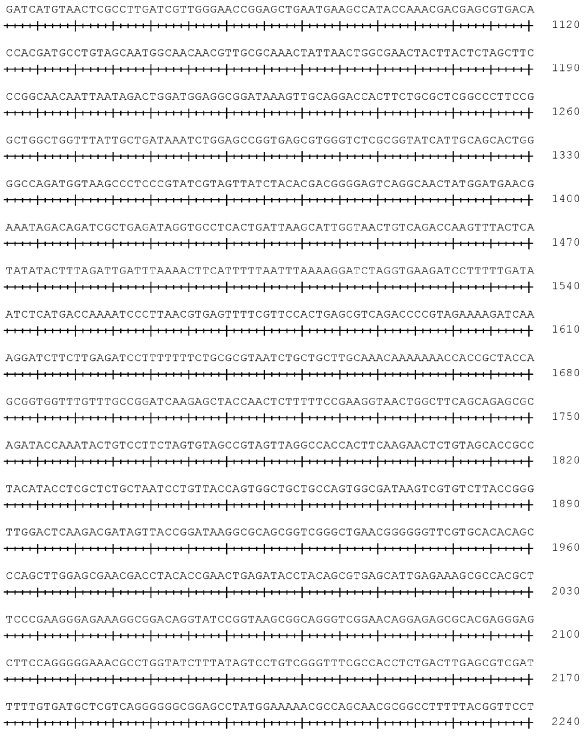
【図３９Ｏ】



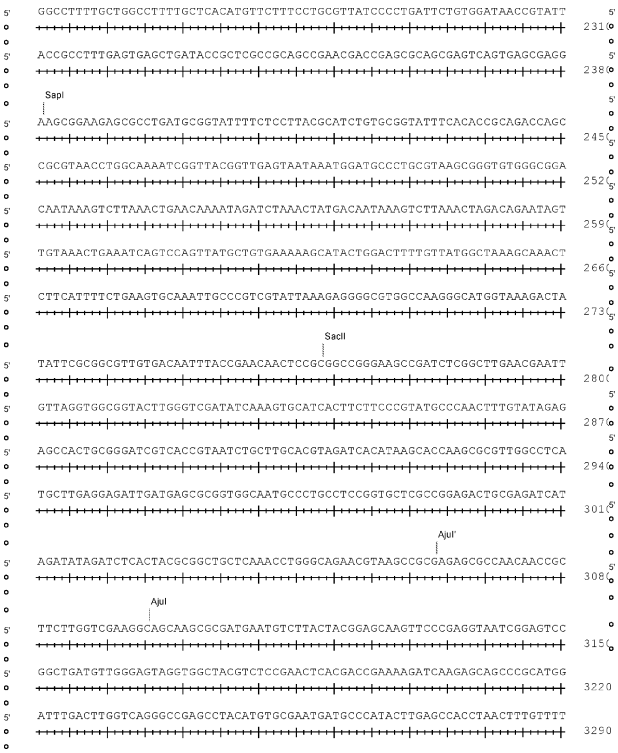
【図４０Ａ】



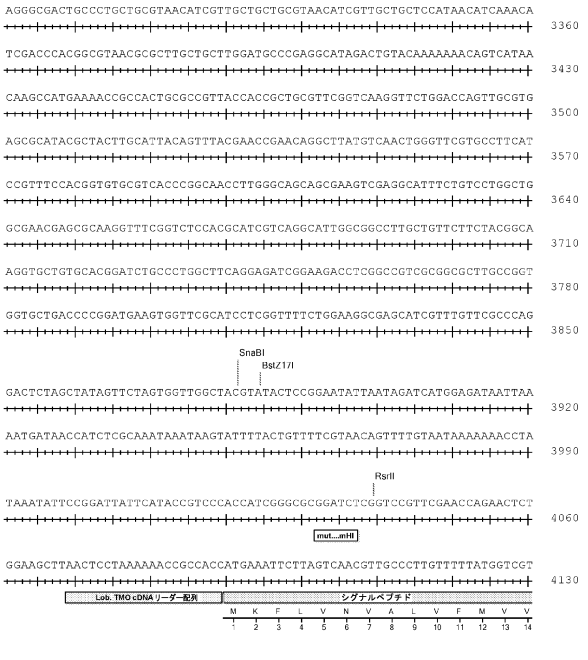
【図４０Ｂ】



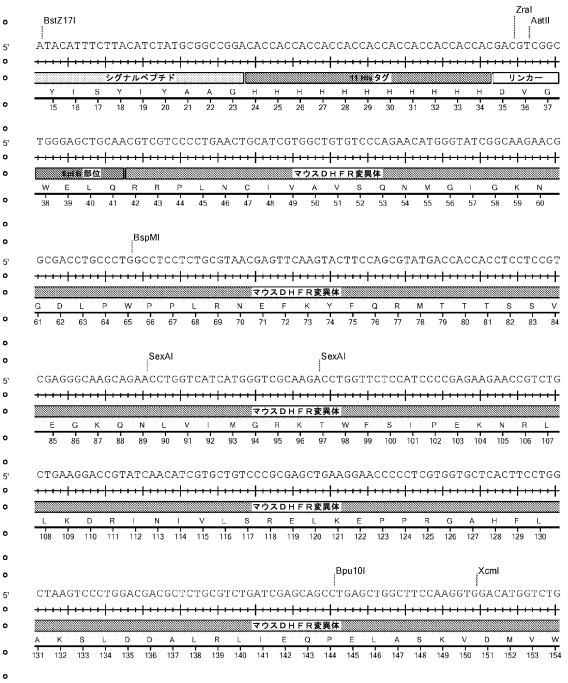
【図４０Ｃ】



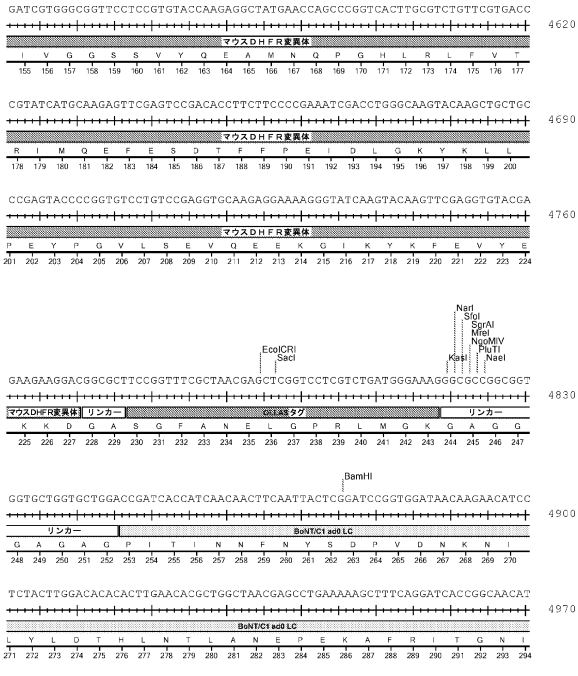
【図４０Ｄ】



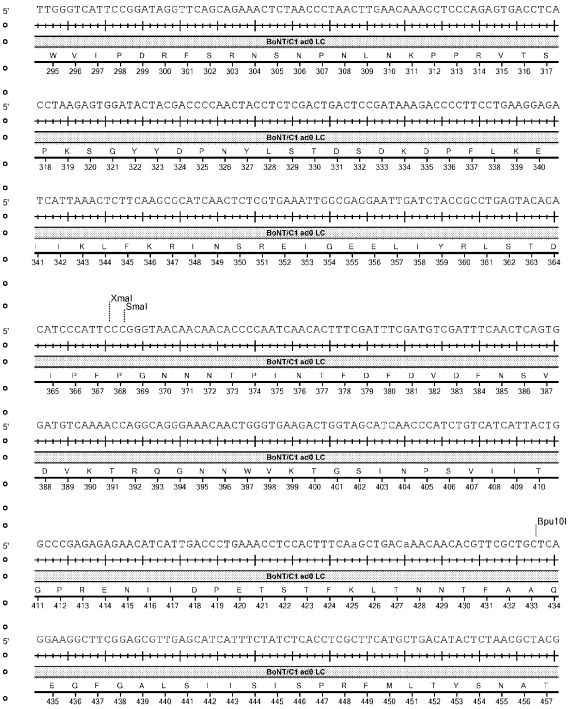
【図４０Ｅ】



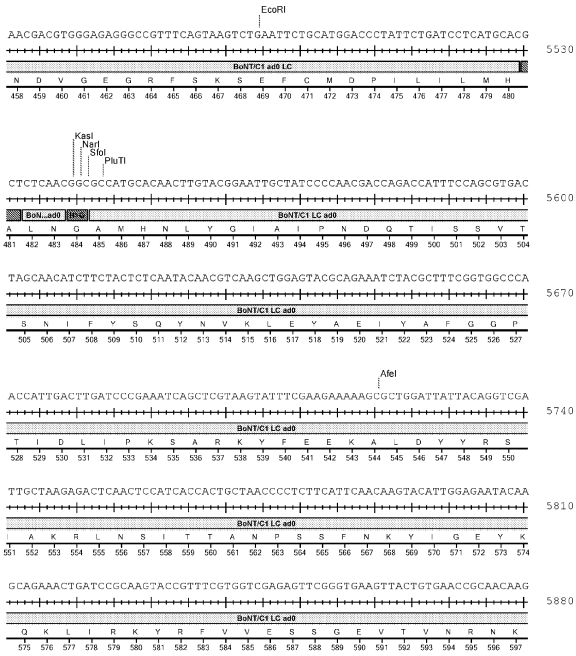
【図４０Ｆ】



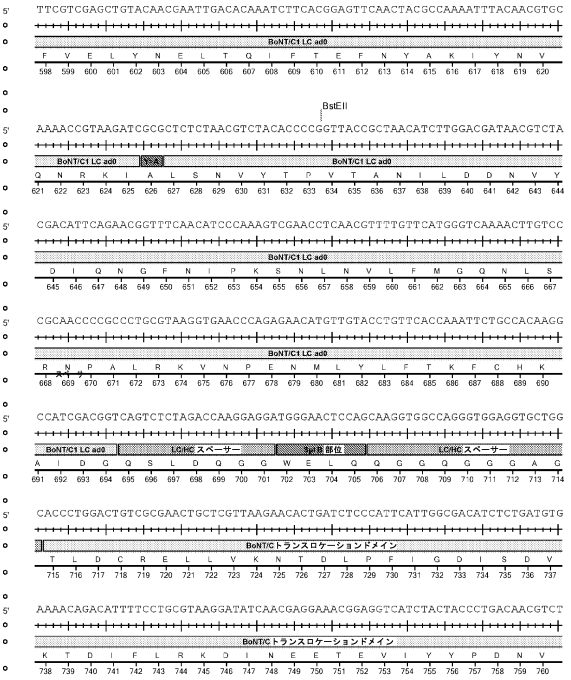
【図４０Ｇ】



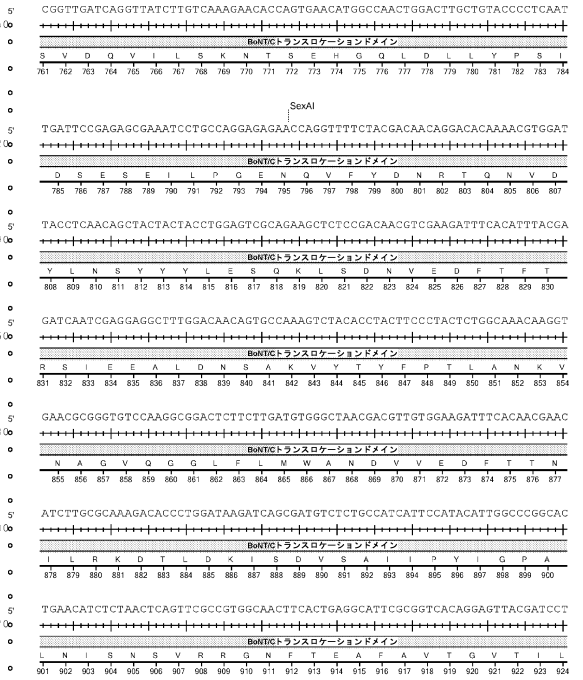
【図４０Ｈ】



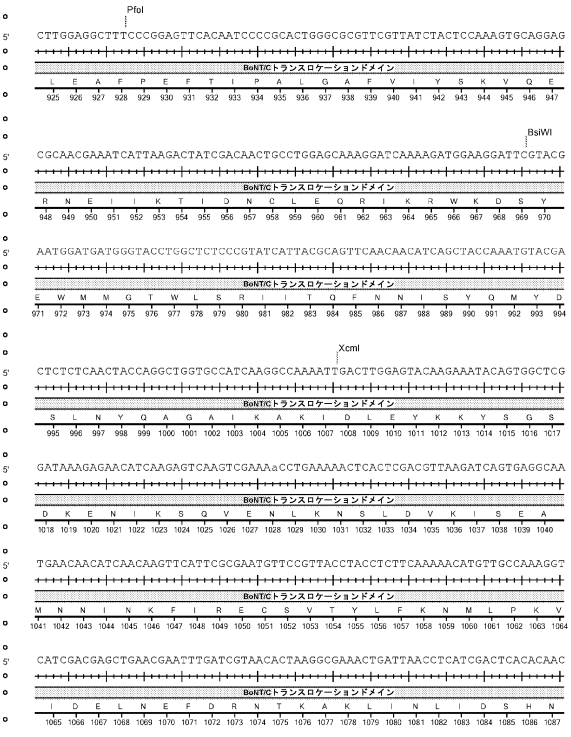
【図４０Ｉ】



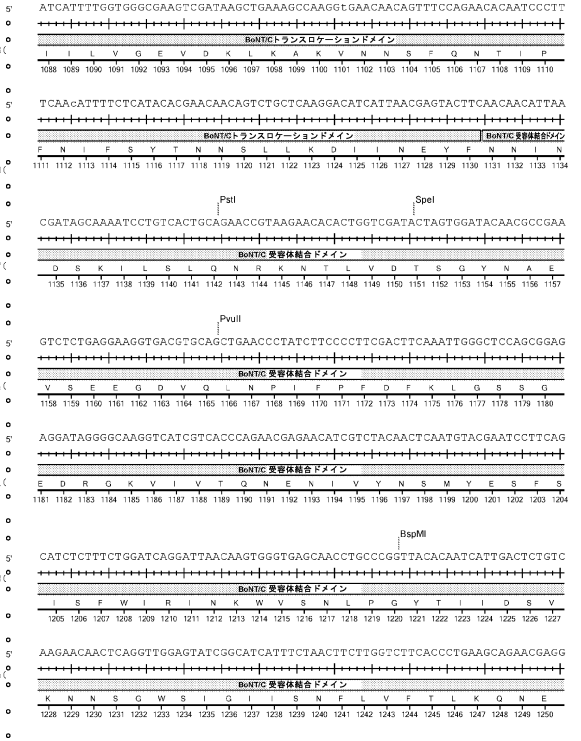
【図４０Ｊ】



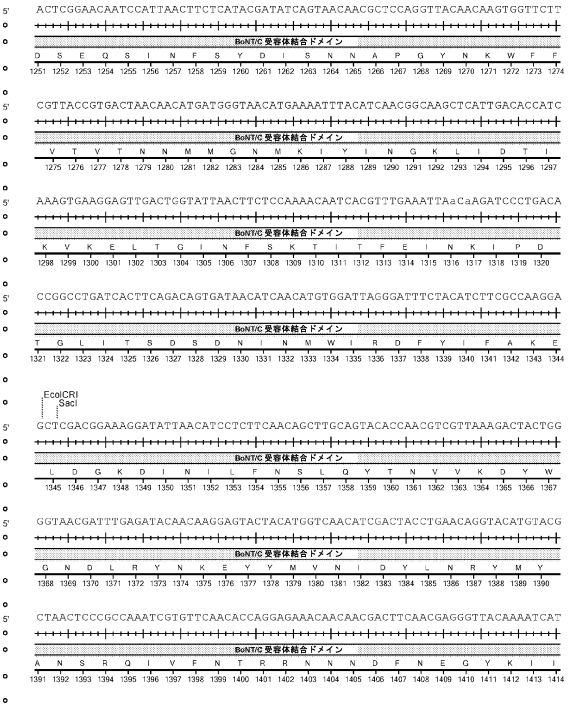
【図４０Ｋ】



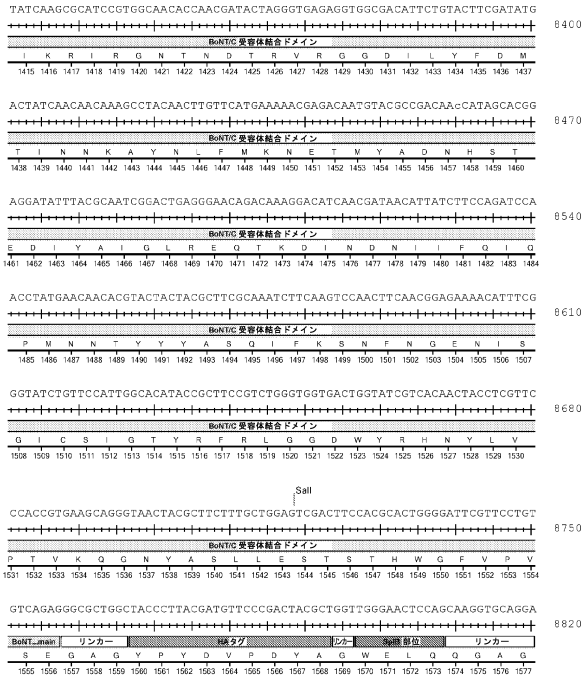
【図４０Ｌ】



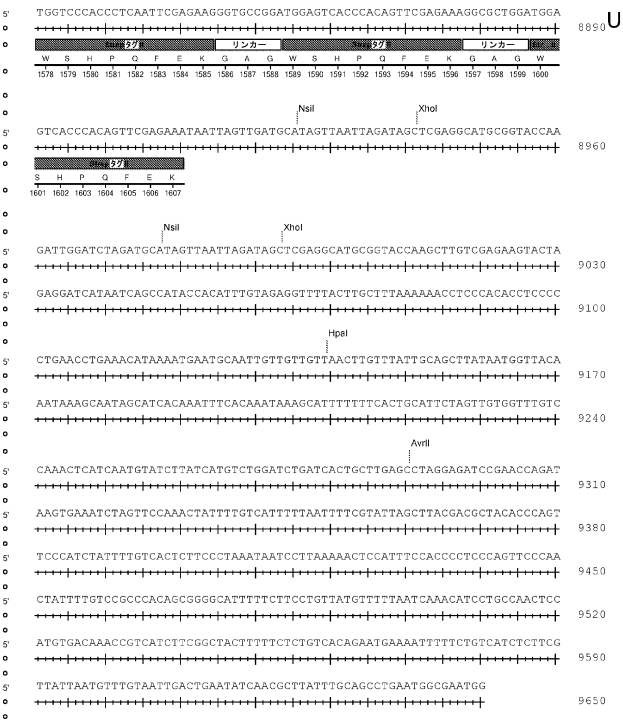
【図４０Ｍ】



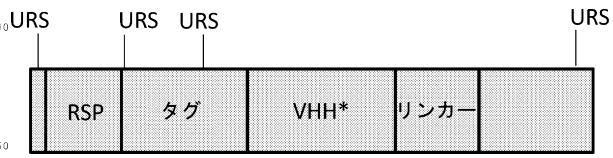
【図４０Ｎ】



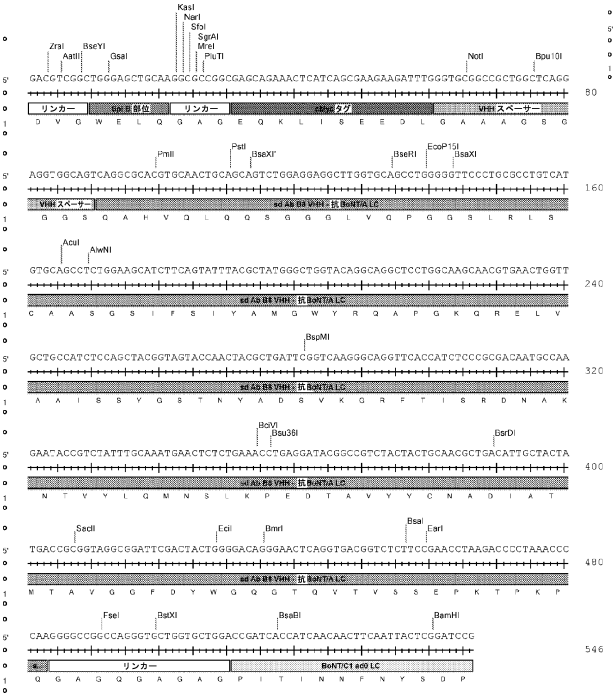
【図４０Ｏ】



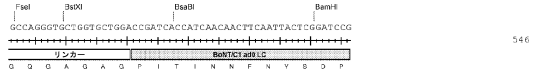
【図４１】



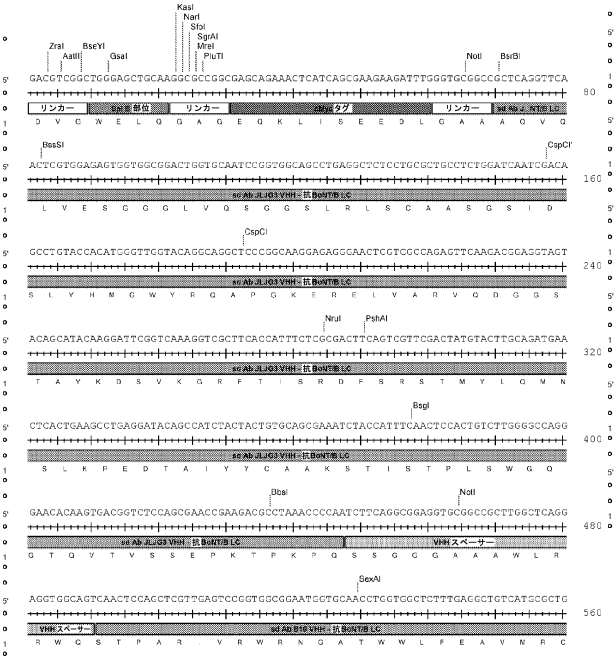
【図４２Ａ】



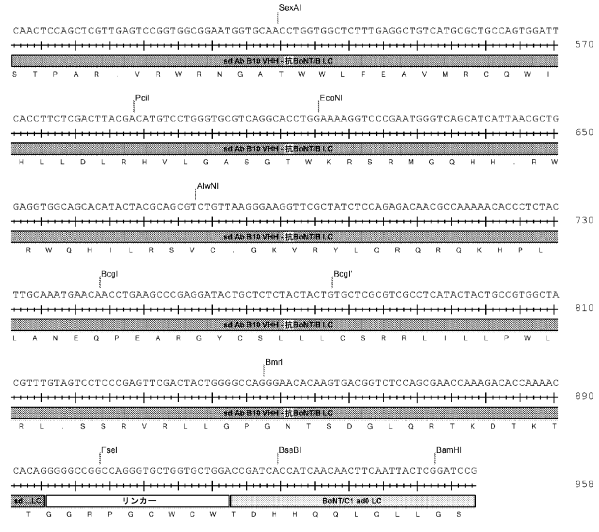
【図４２Ｂ】



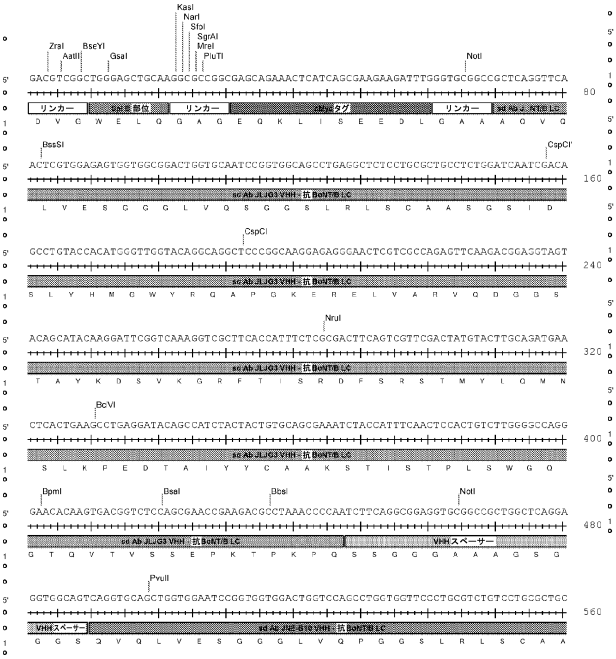
【図４３Ａ】



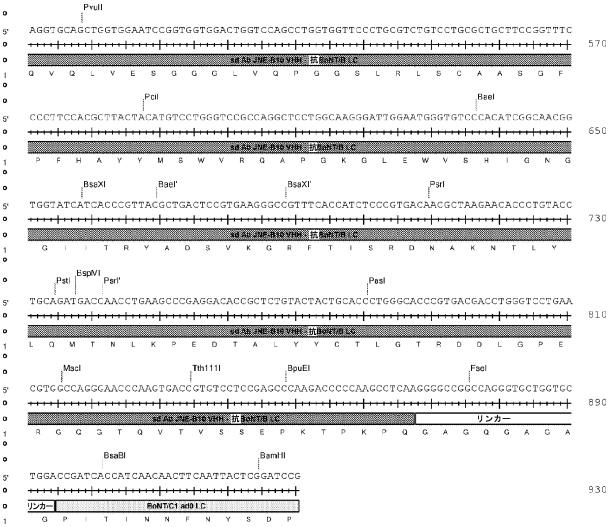
【図４３Ｂ】



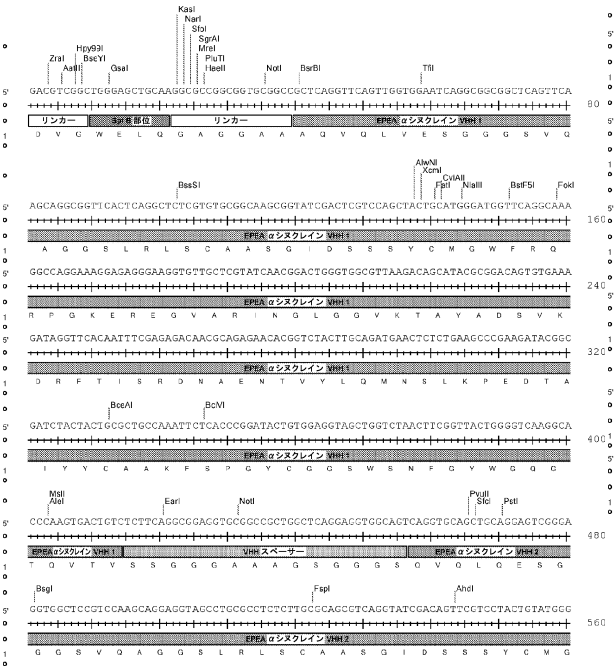
【図４４Ａ】



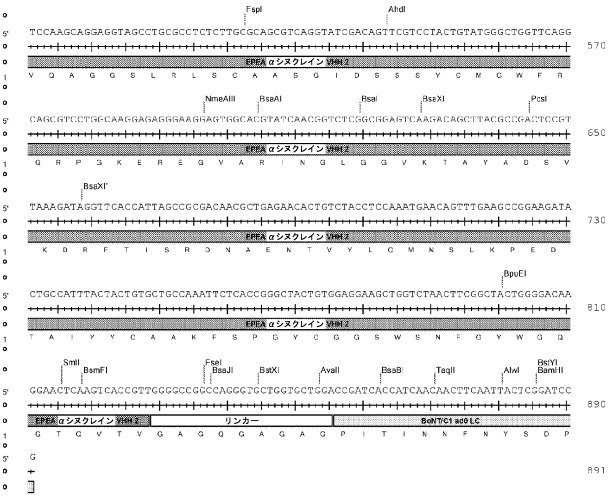
【図４４Ｂ】



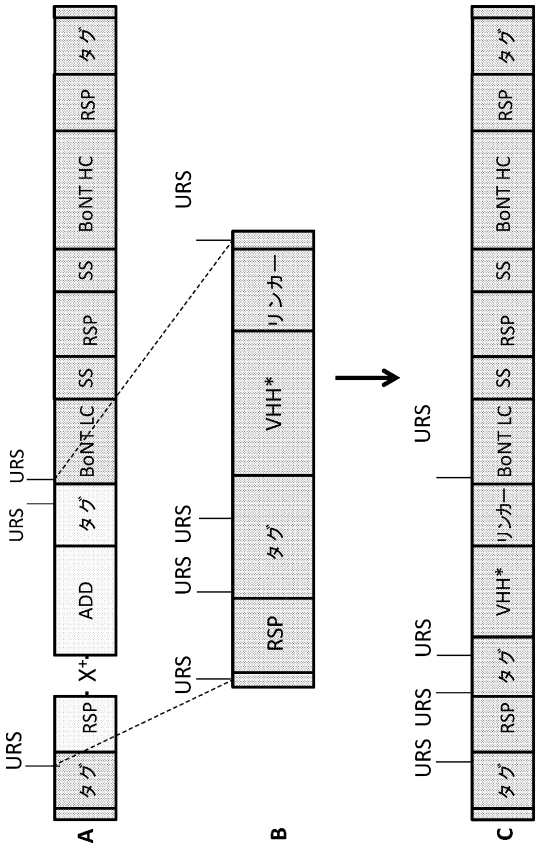
【図４５Ａ】



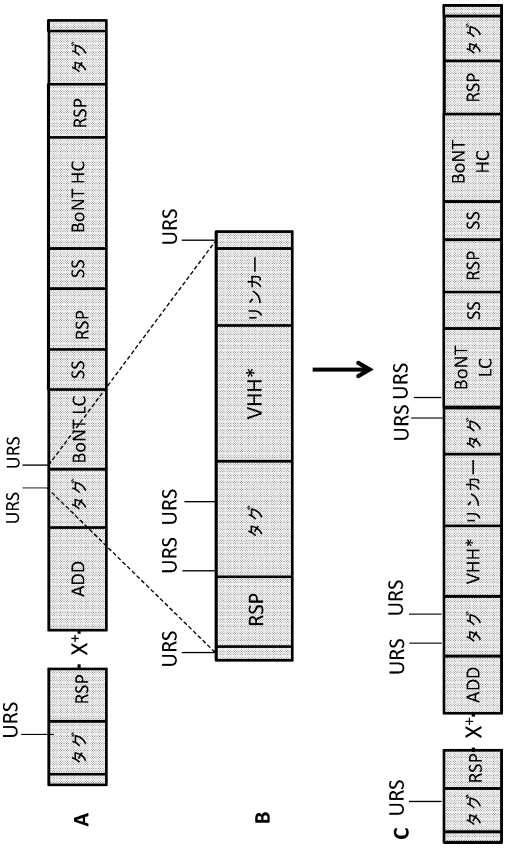
【図４５Ｂ】



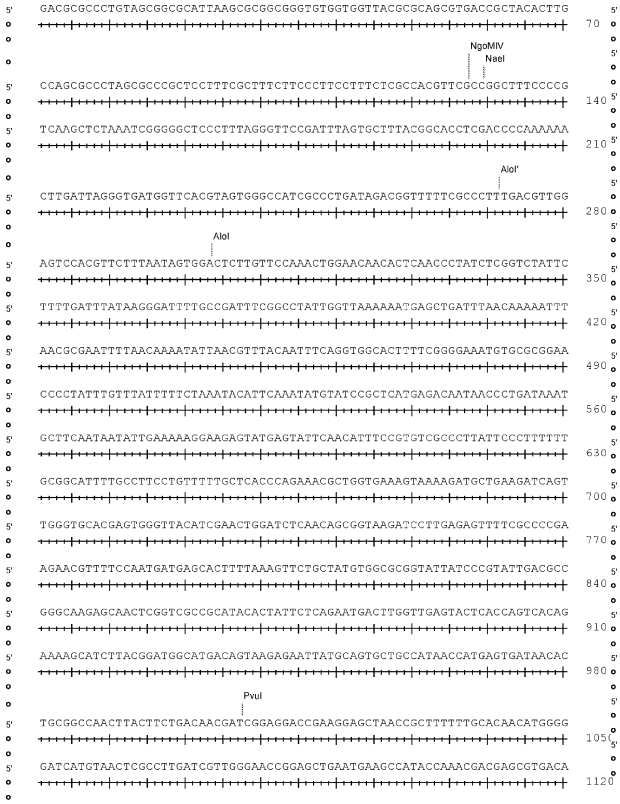
【図４６】



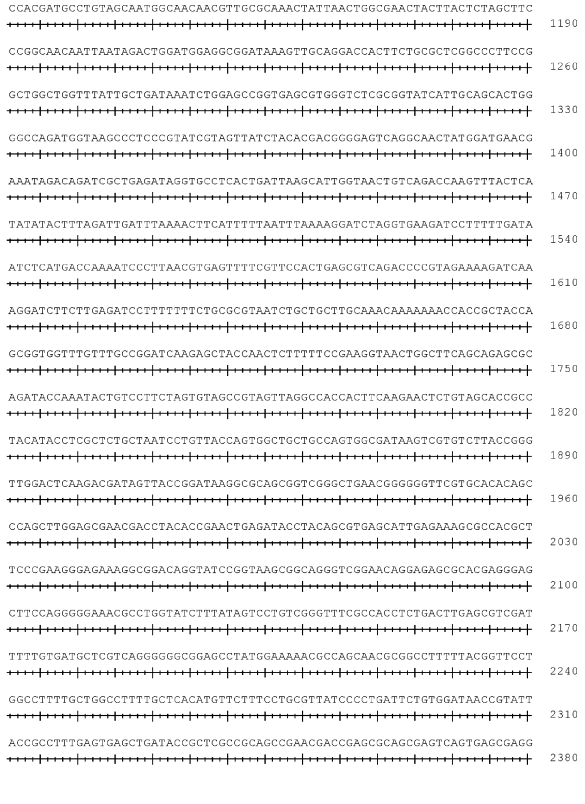
【図４７】



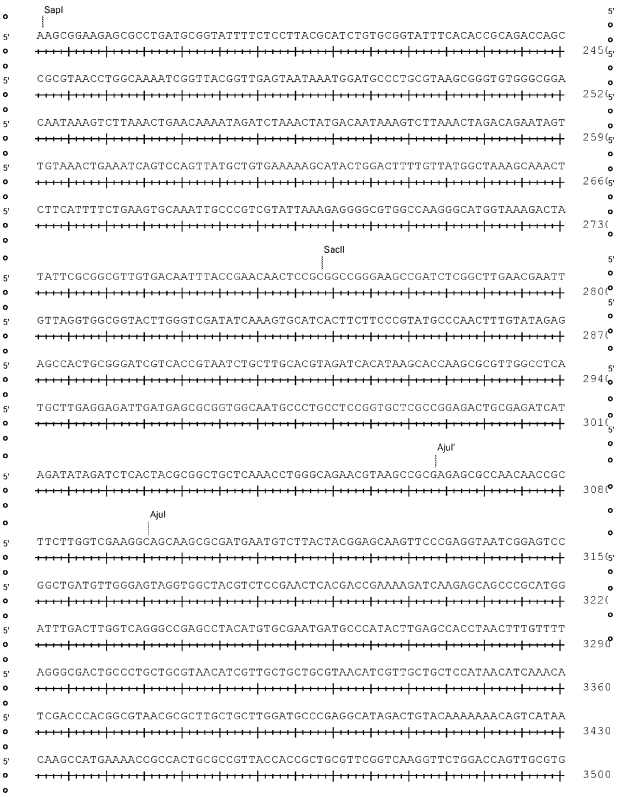
【図４８Ａ】



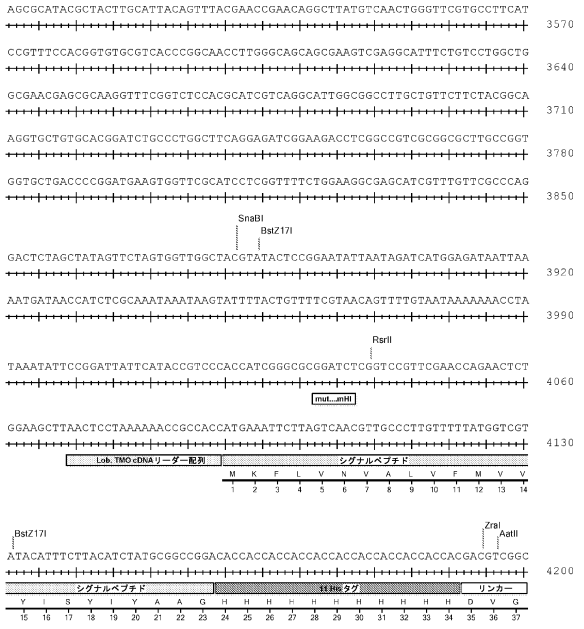
【図４８Ｂ】



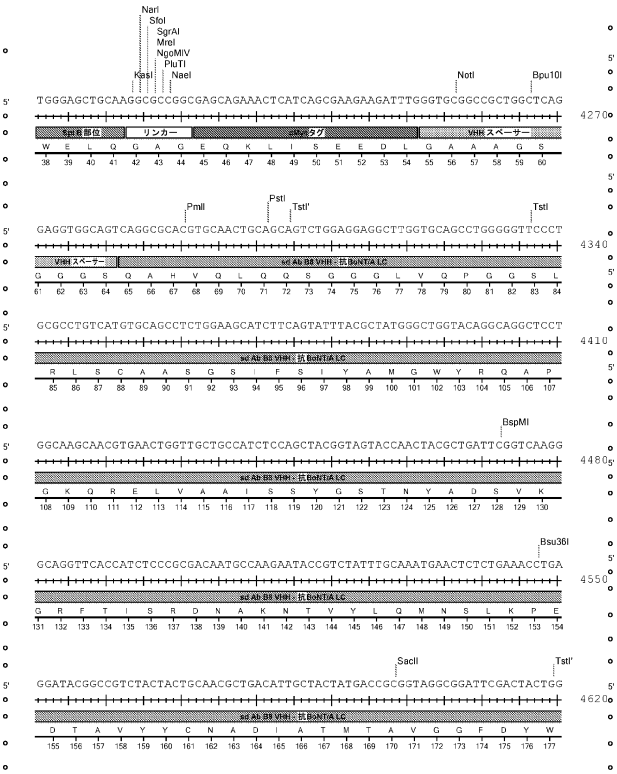
【図４８Ｃ】



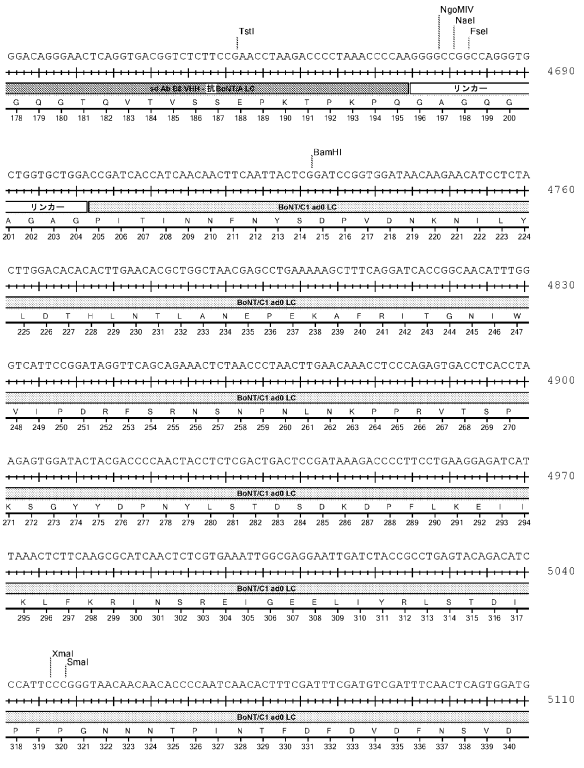
【図４８Ｄ】



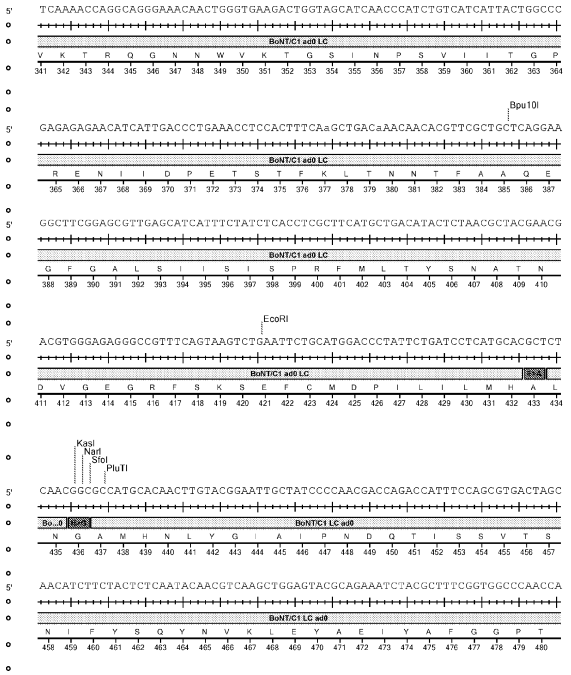
【図４８Ｅ】



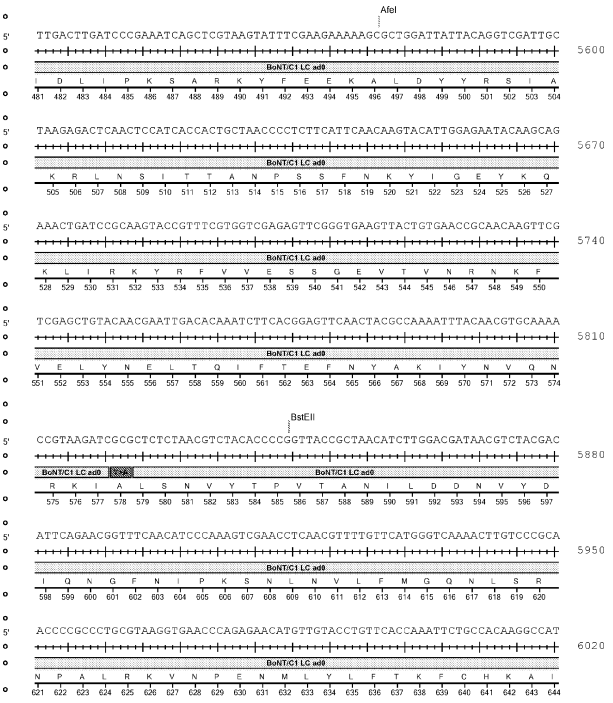
【図４８Ｆ】



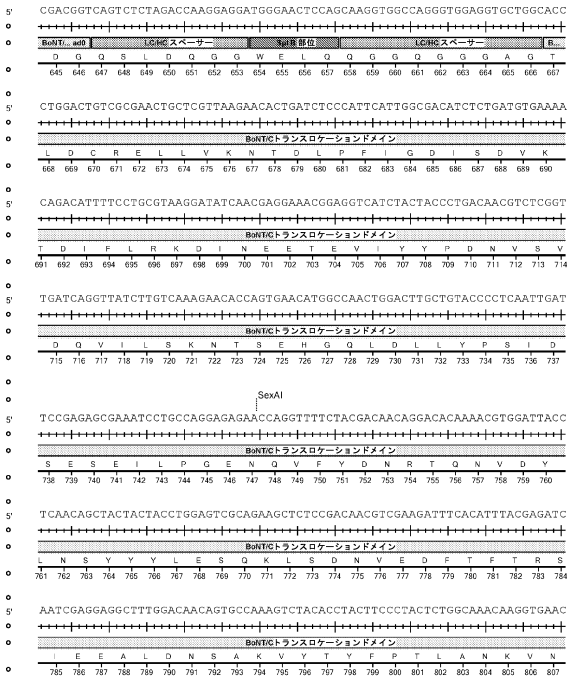
【図４８Ｇ】



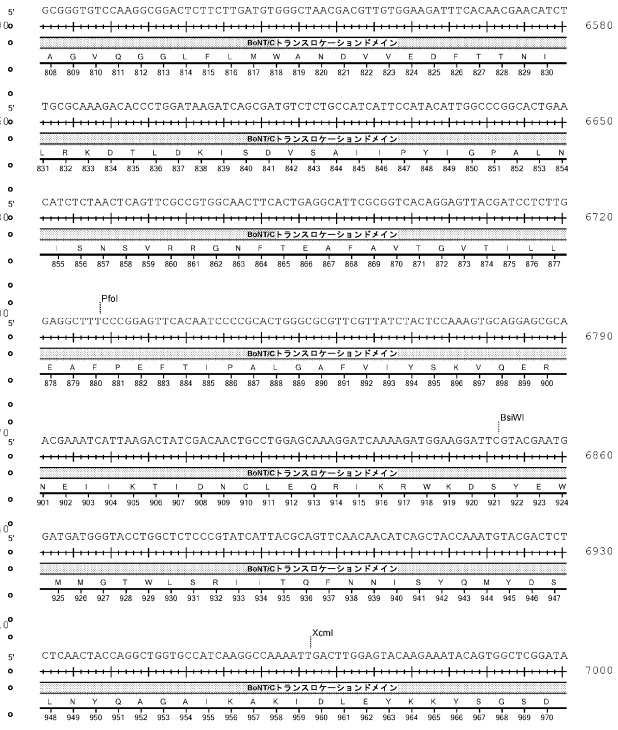
【図４８Ｈ】



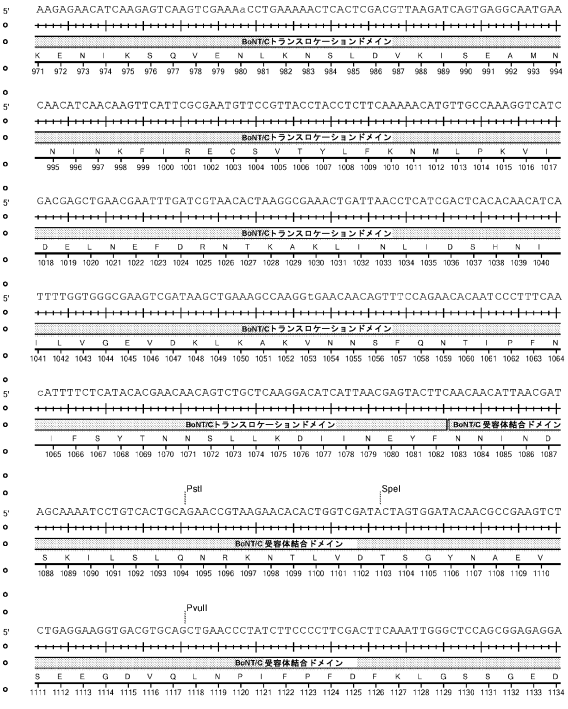
【図４８Ｉ】



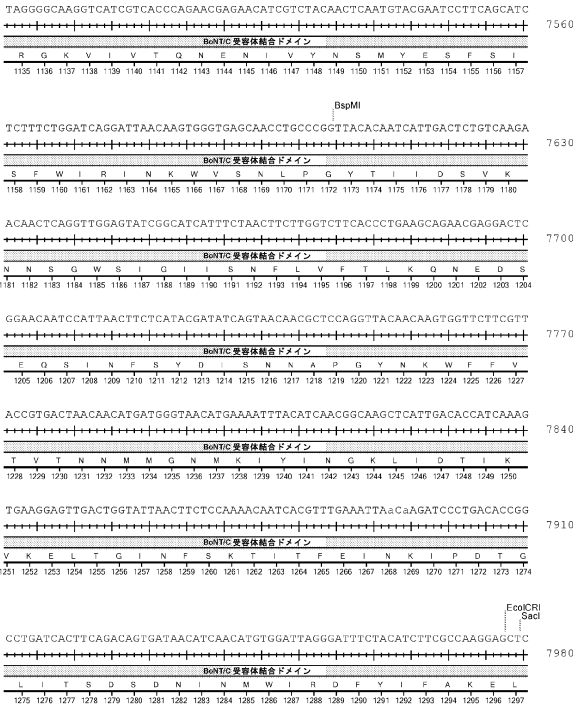
【図４８Ｊ】



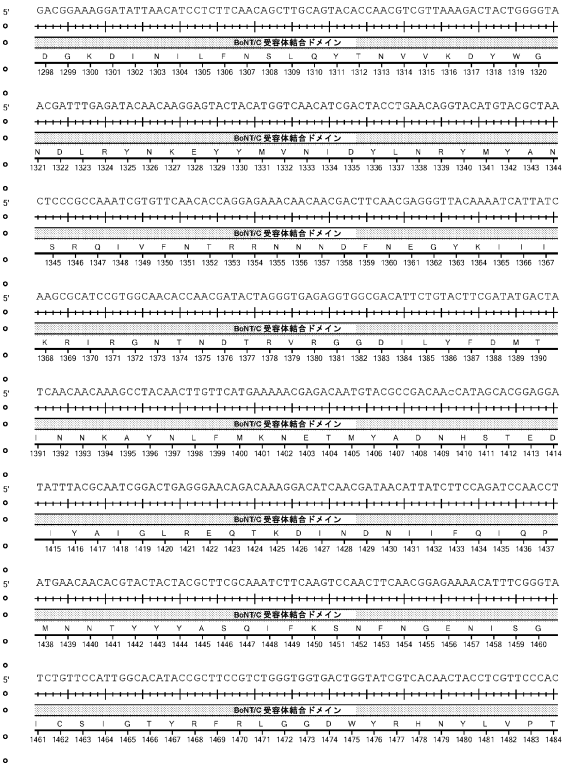
【図４８Ｋ】



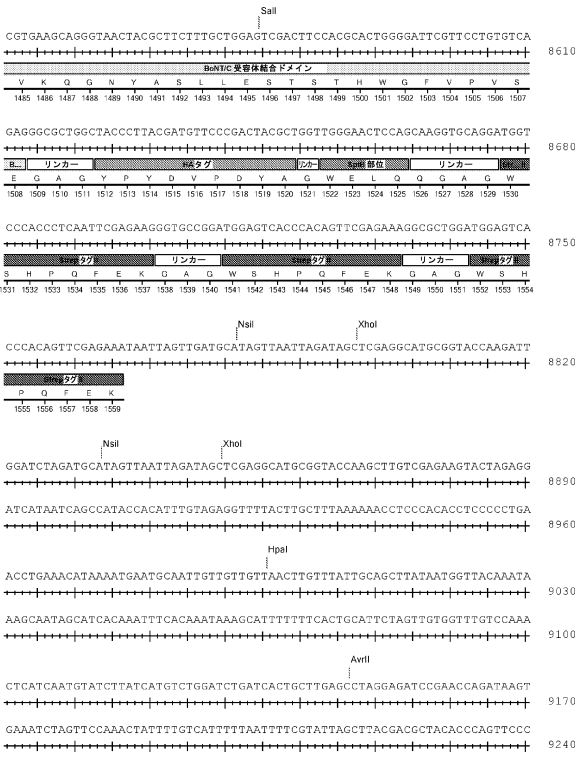
【図４８Ｌ】



【図４８Ｍ】

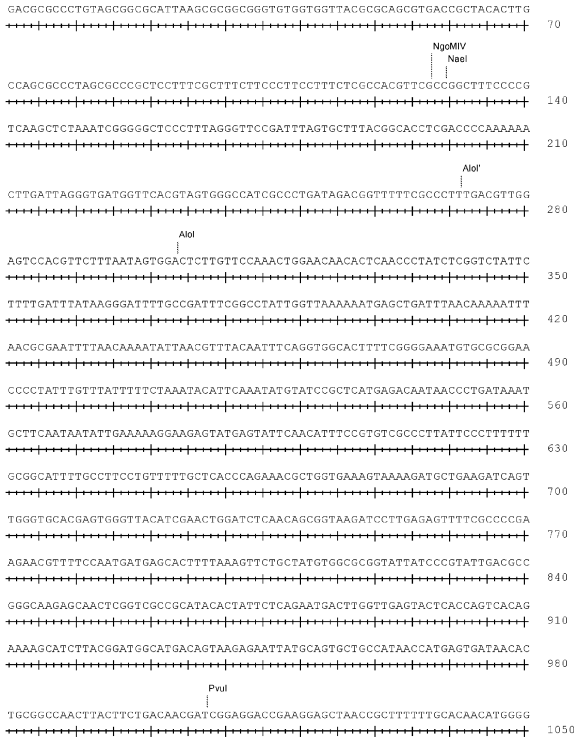


【図４８Ｎ】

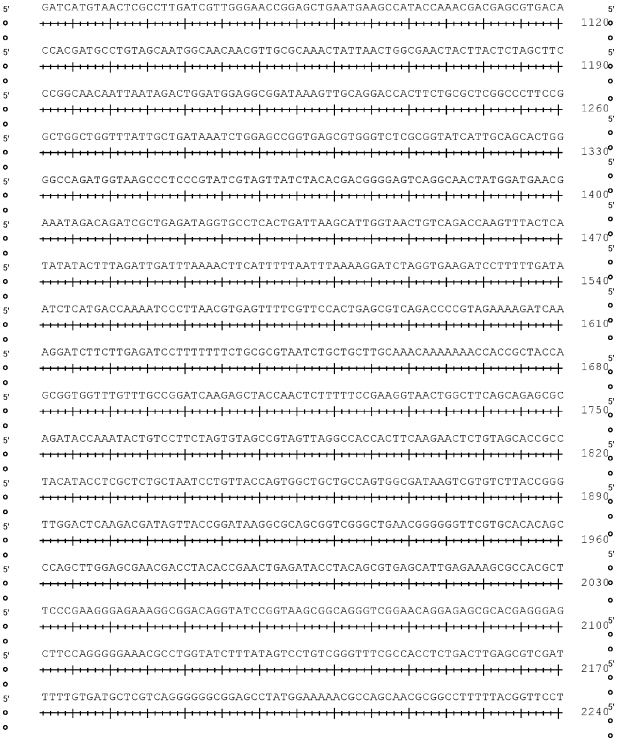


【図４８Ｏ】

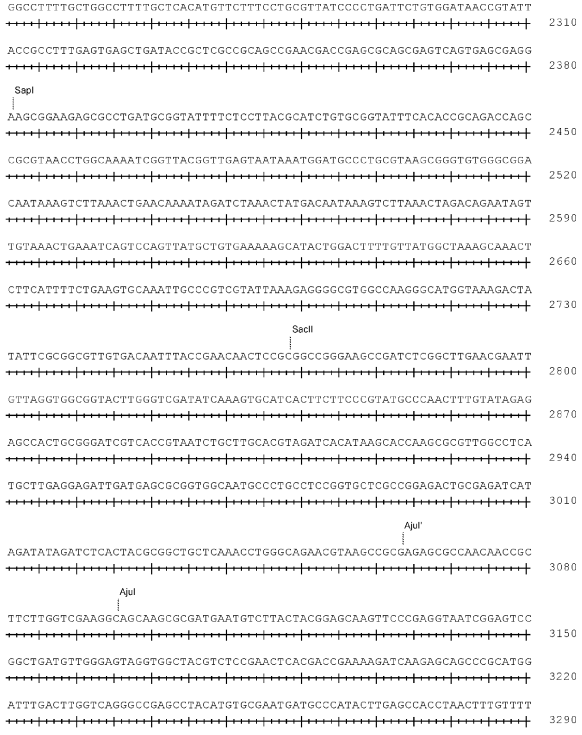
【図４９Ａ】



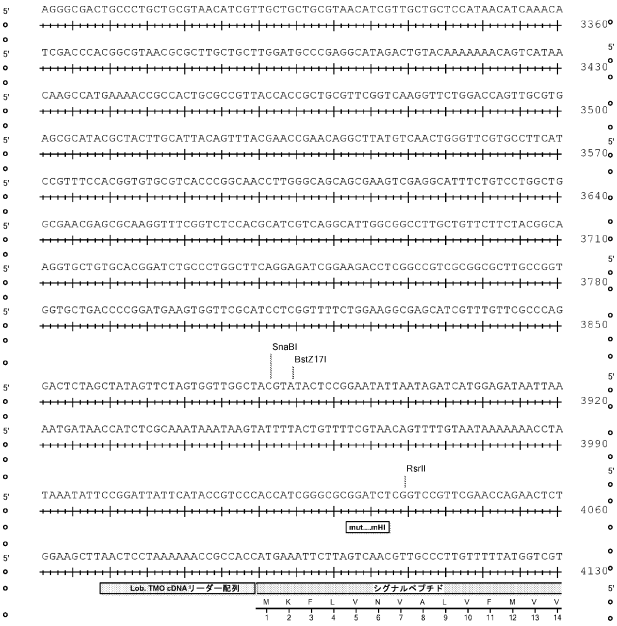
【図４９Ｂ】



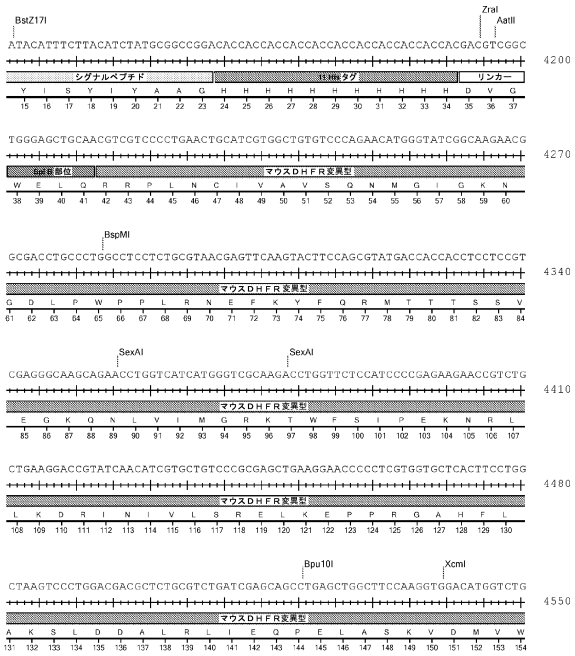
【図４９Ｃ】



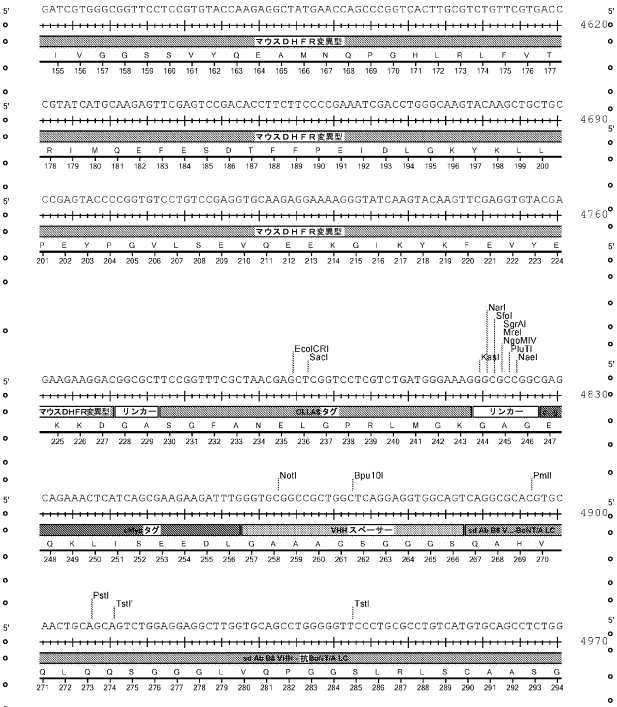
【図４９Ｄ】



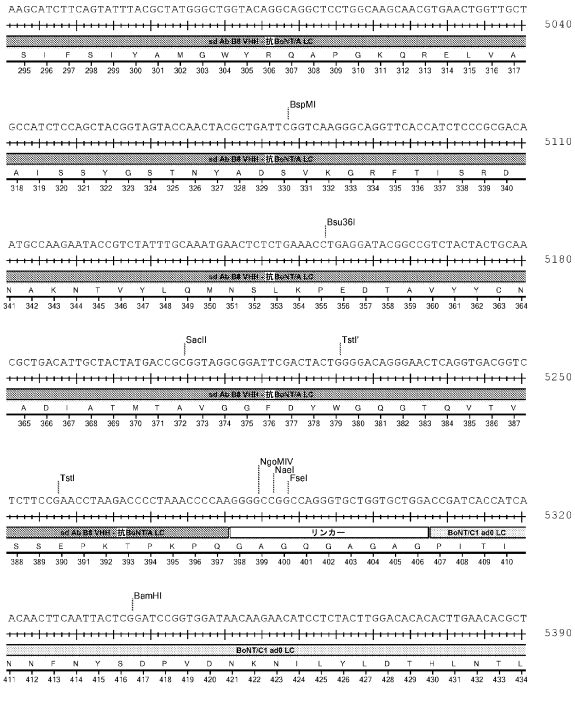
【図４９Ｅ】



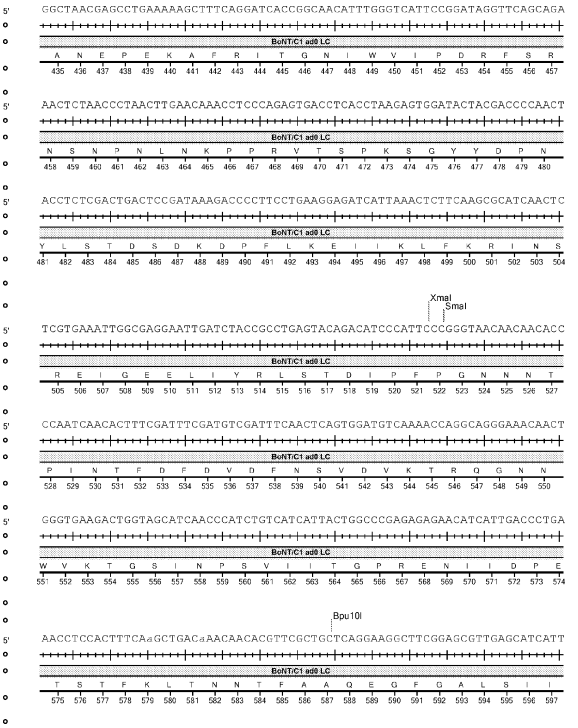
【図４９Ｆ】



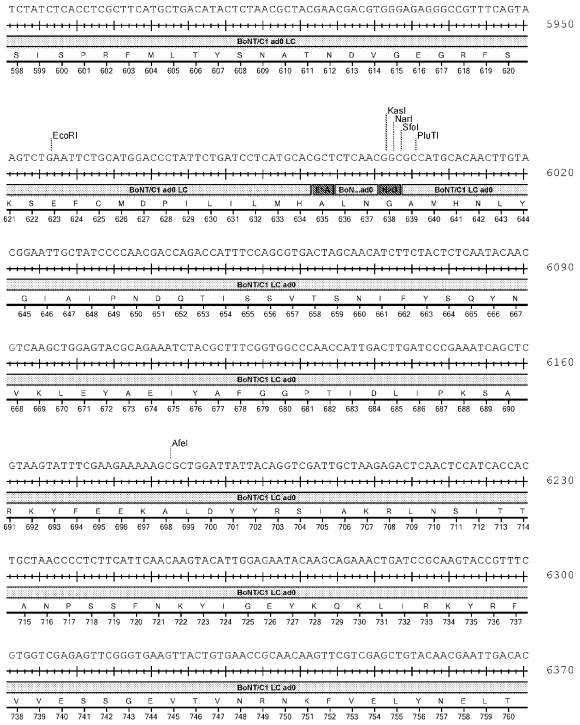
【図４９Ｇ】



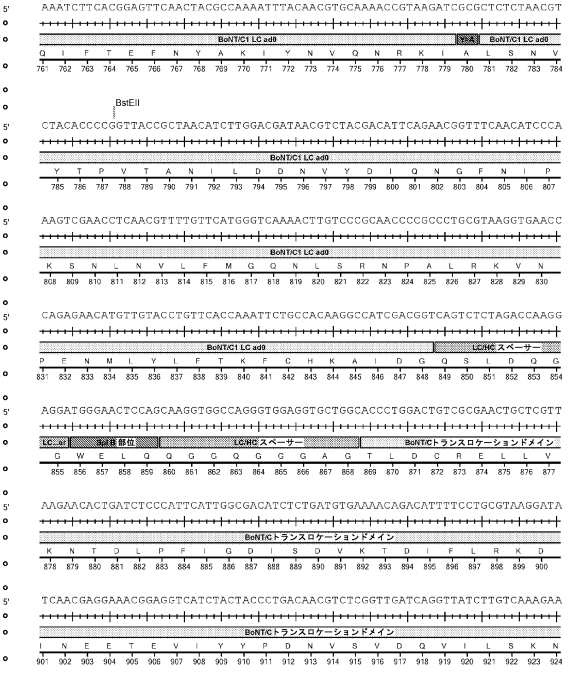
【図４９Ｈ】



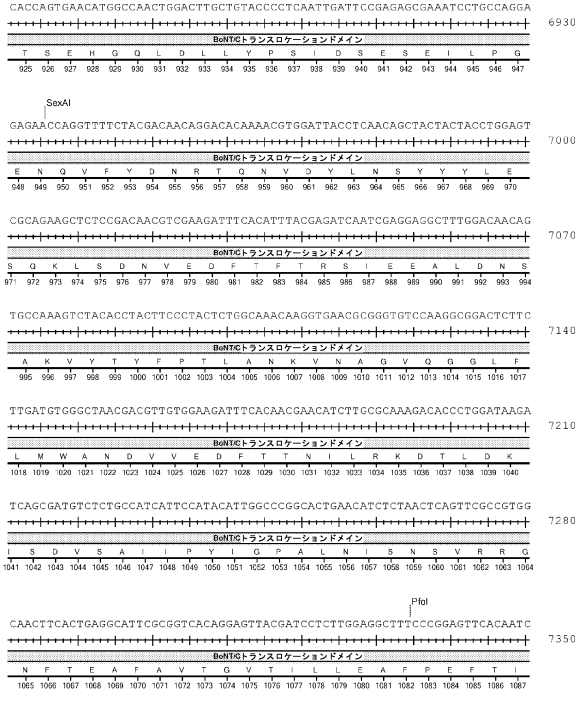
【図４９Ｉ】



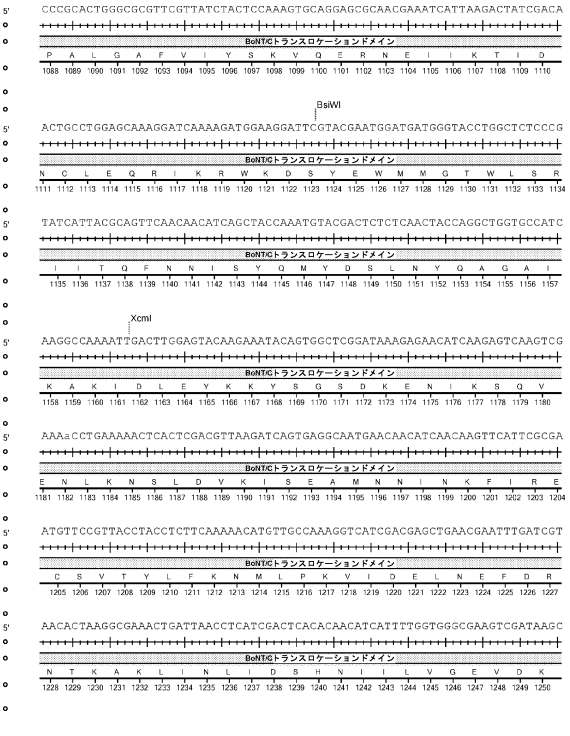
【図４９Ｊ】



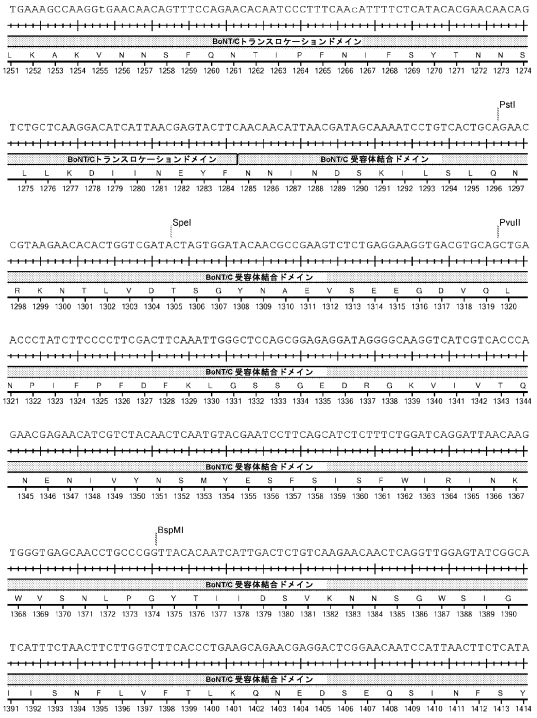
【図４９Ｋ】



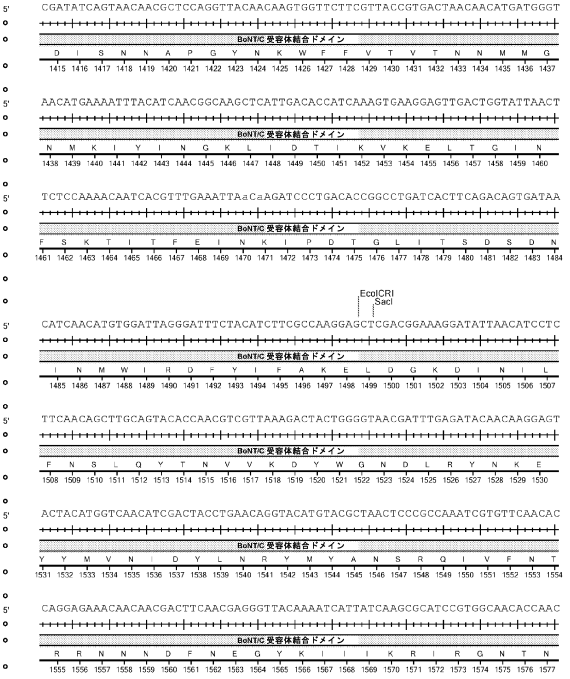
【図４９Ｌ】



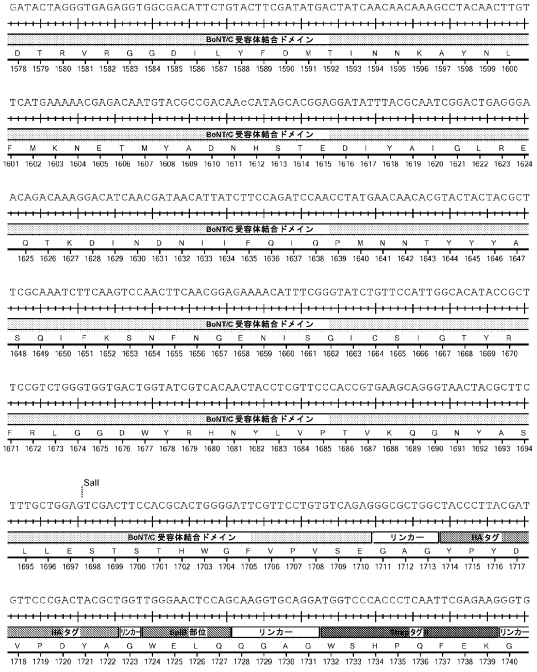
【図４９Ｍ】



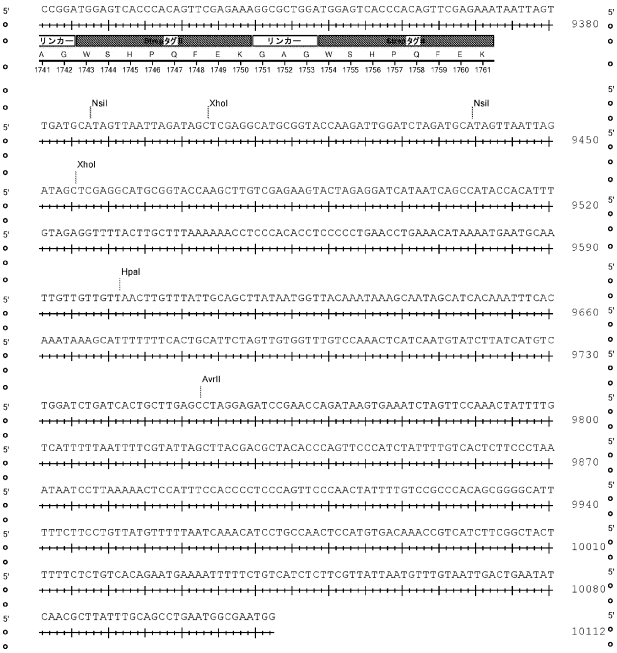
【図４９Ｎ】



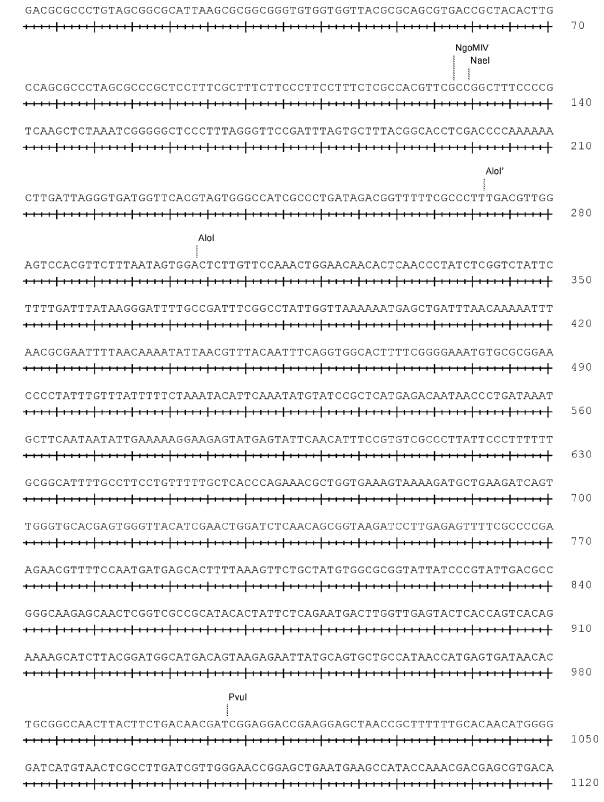
【図４９Ｏ】



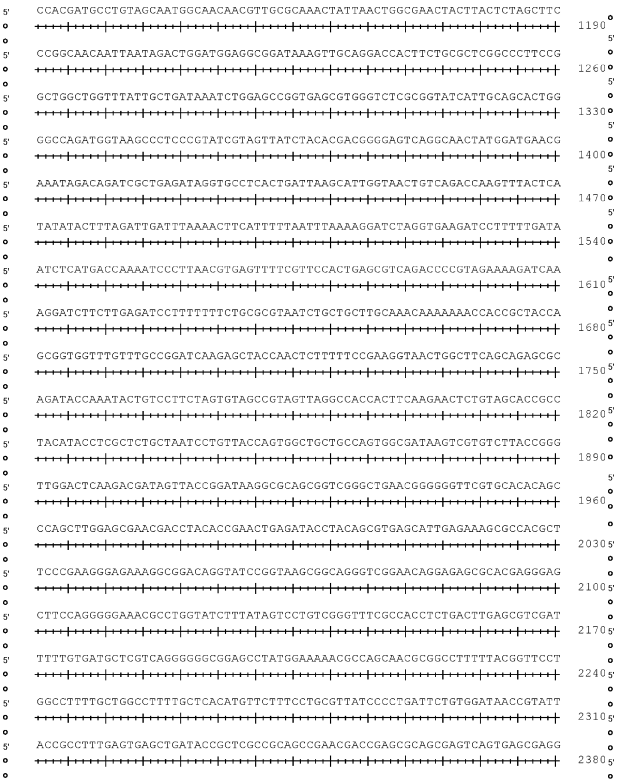
【図４９Ｐ】



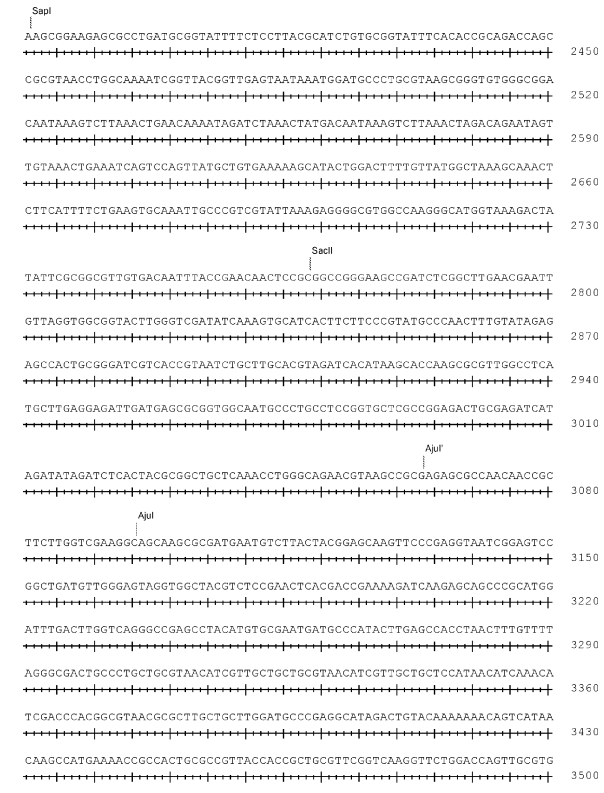
【図５０Ａ】



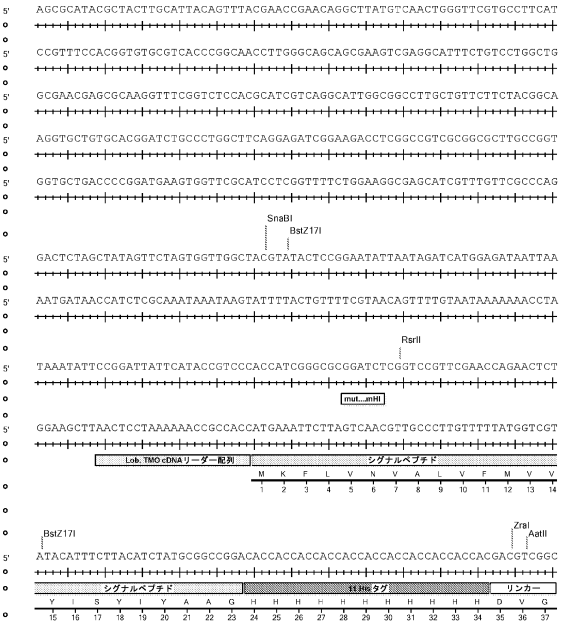
【図５０Ｂ】



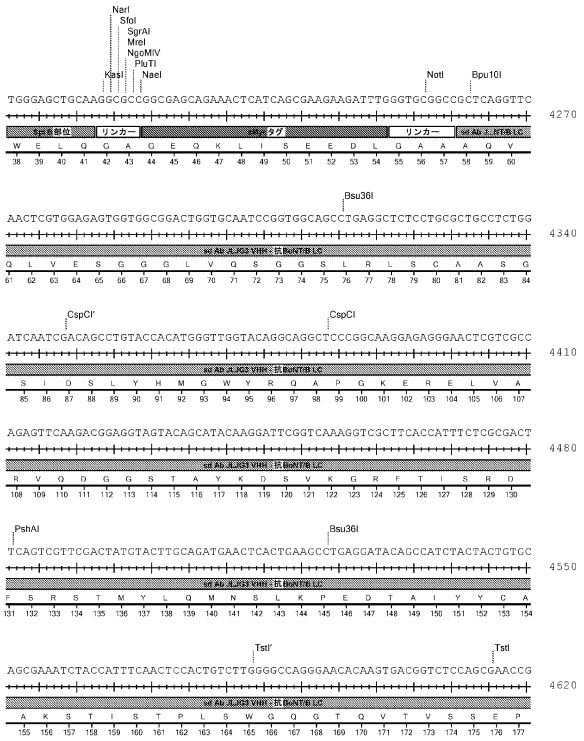
【図５０Ｃ】



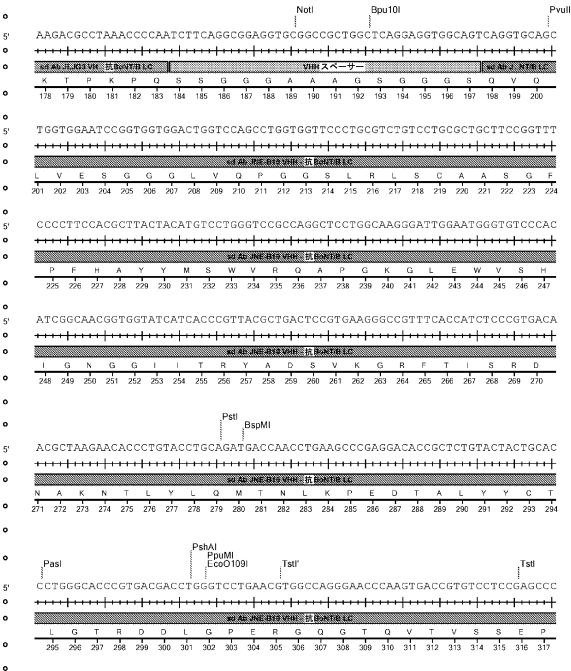
【図５０Ｄ】



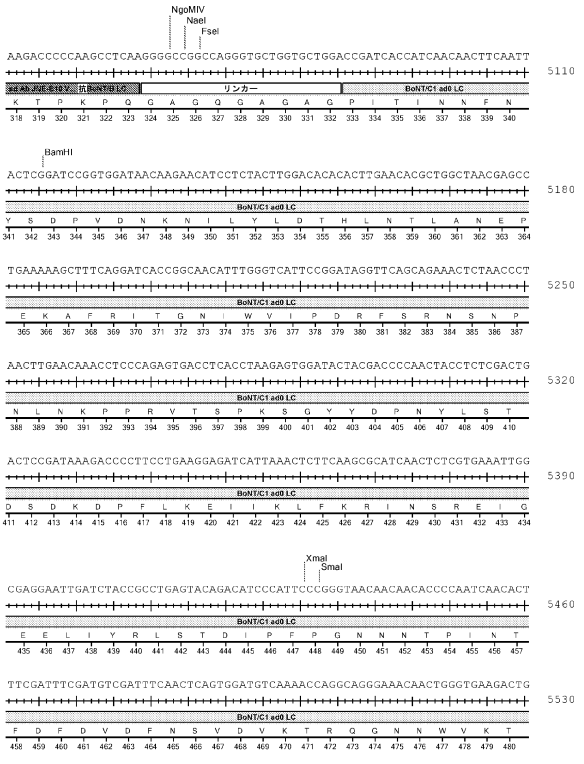
【図５０Ｅ】



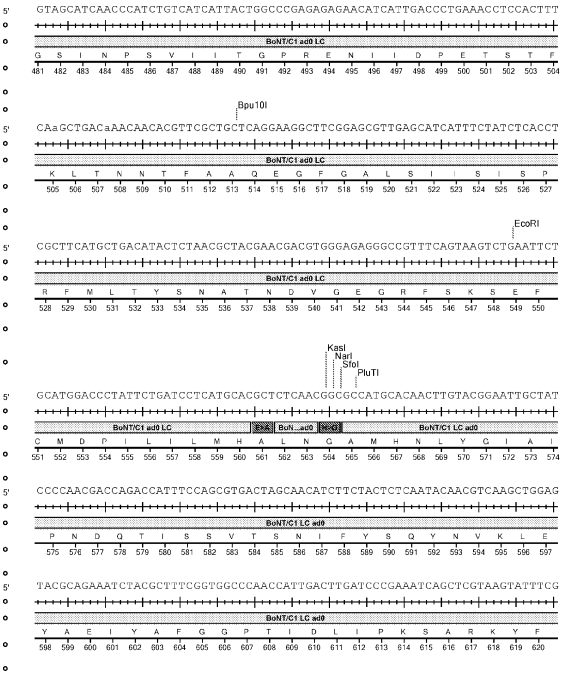
【図５０Ｆ】



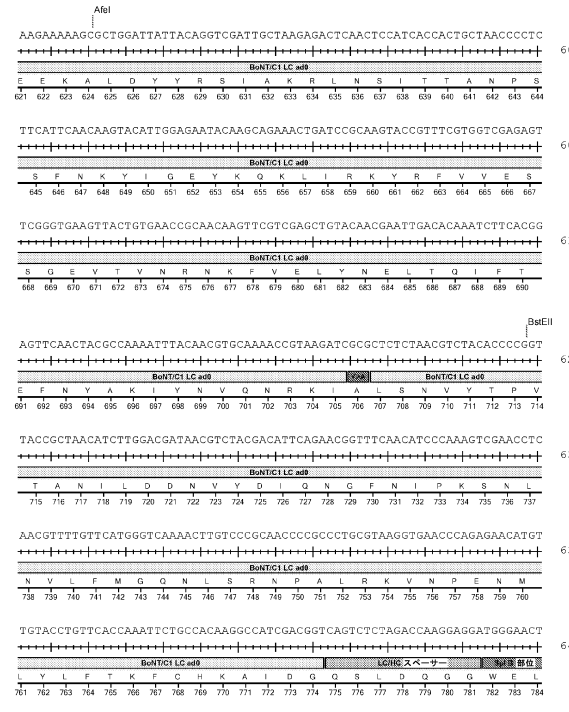
【図５０Ｇ】



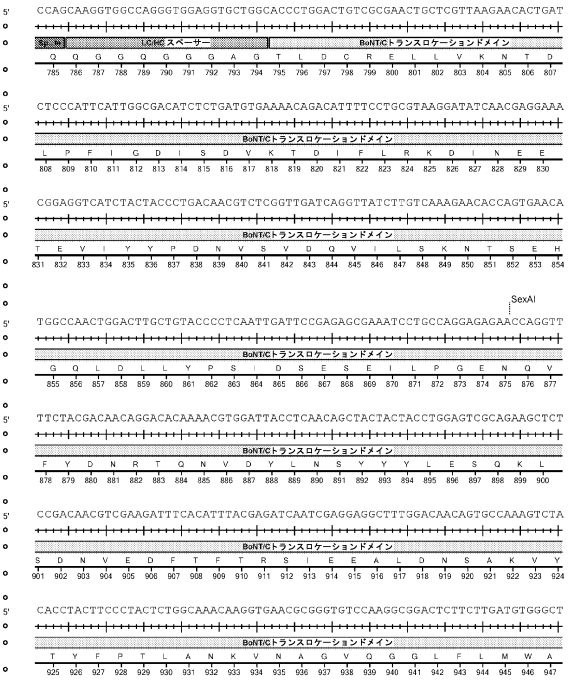
【図５０Ｈ】



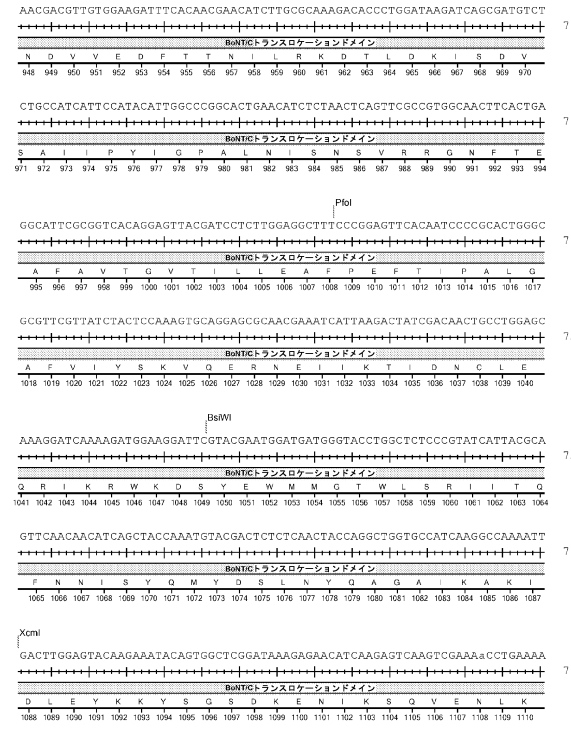
【図５０Ｉ】



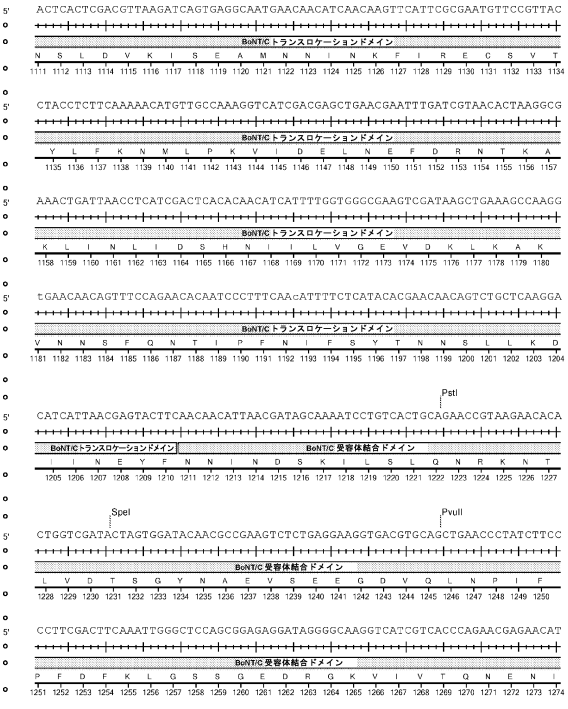
【図５０Ｊ】



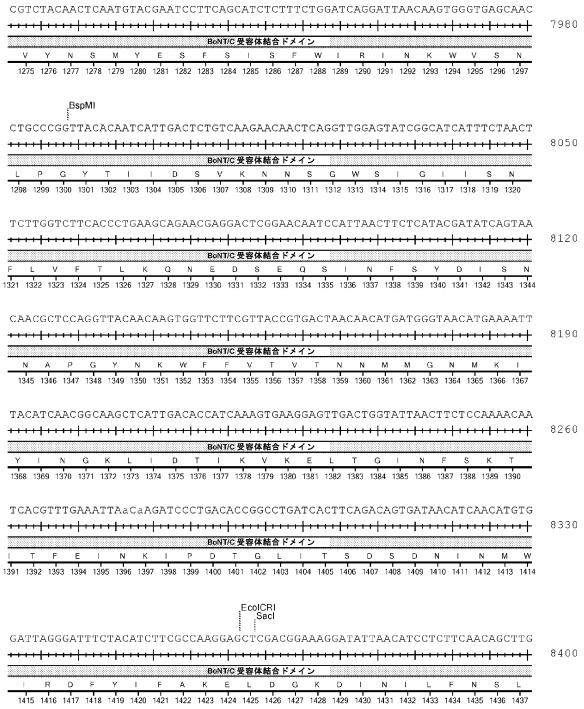
【図５０Ｋ】



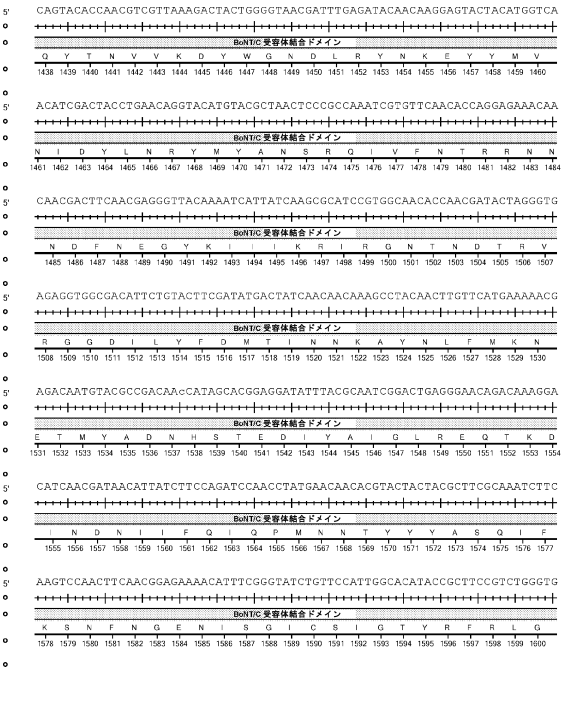
【図５０Ｌ】



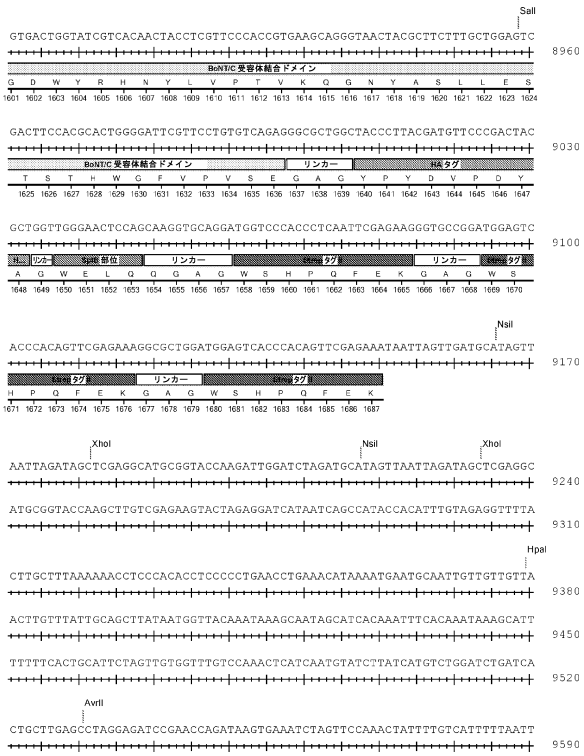
【図５０Ｍ】



【図５０Ｎ】

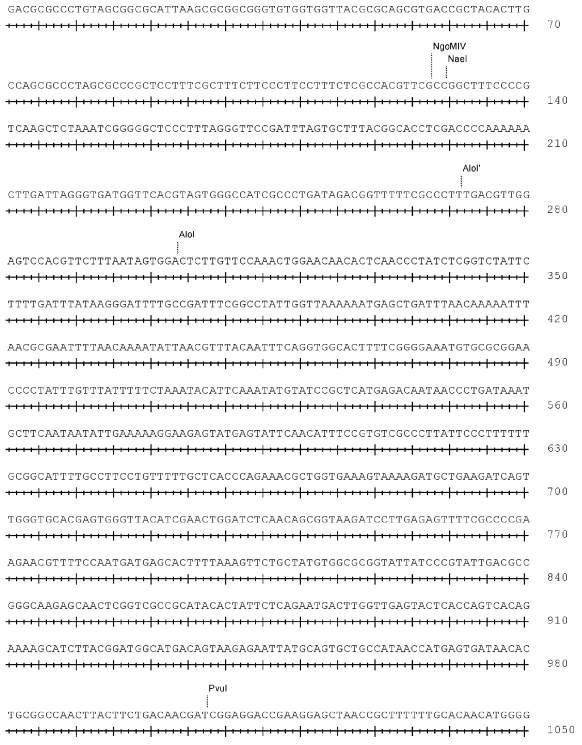


【図５０Ｏ】

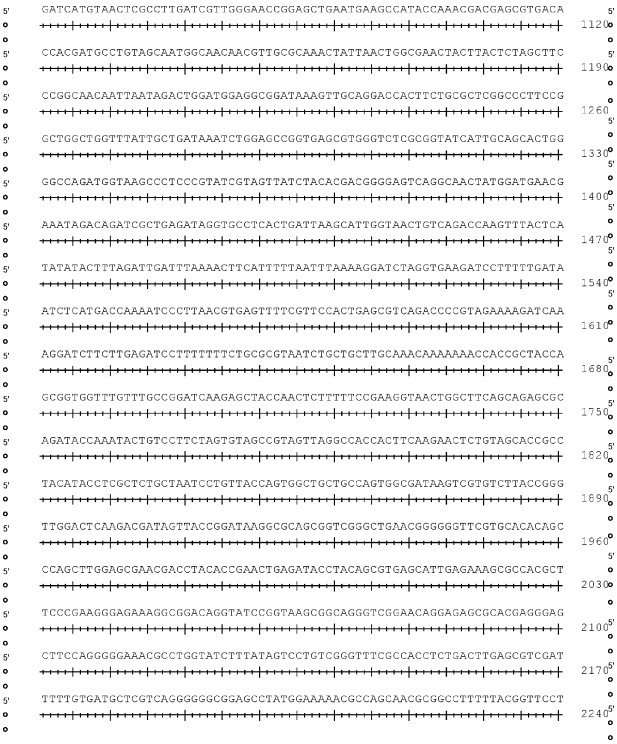


【図５０Ｐ】

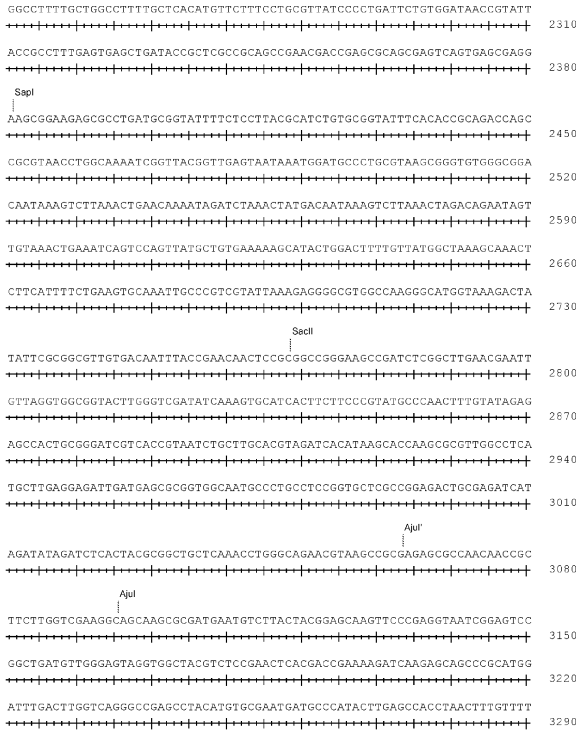
【図５１Ａ】



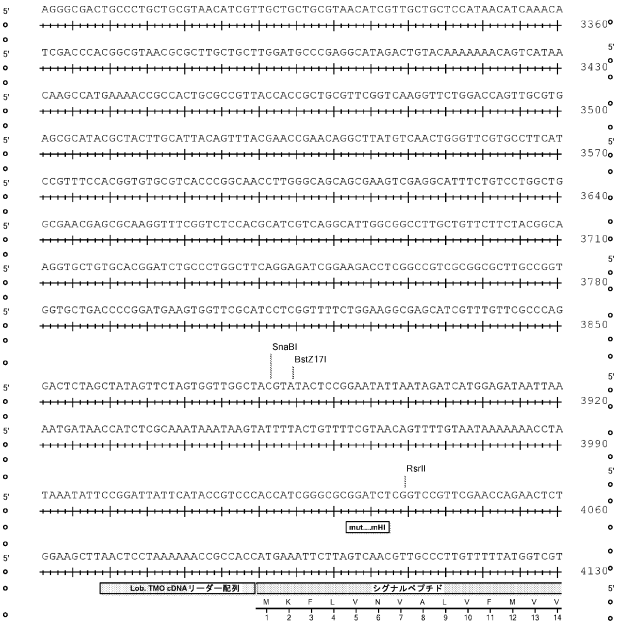
【図５１Ｂ】



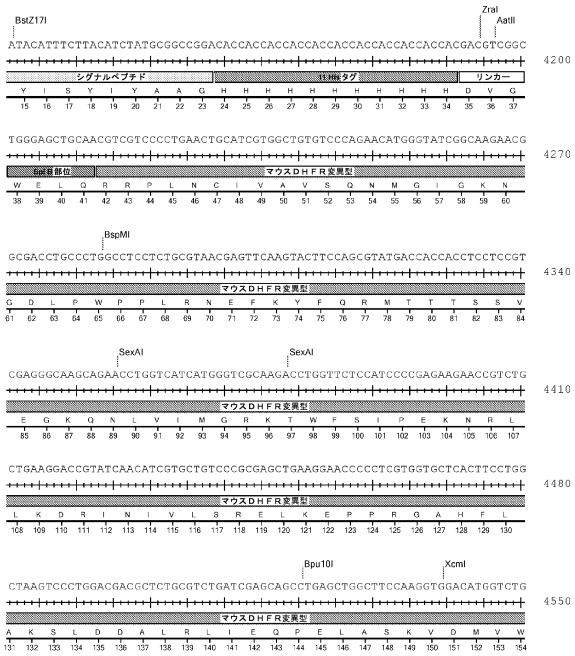
【図５１Ｃ】



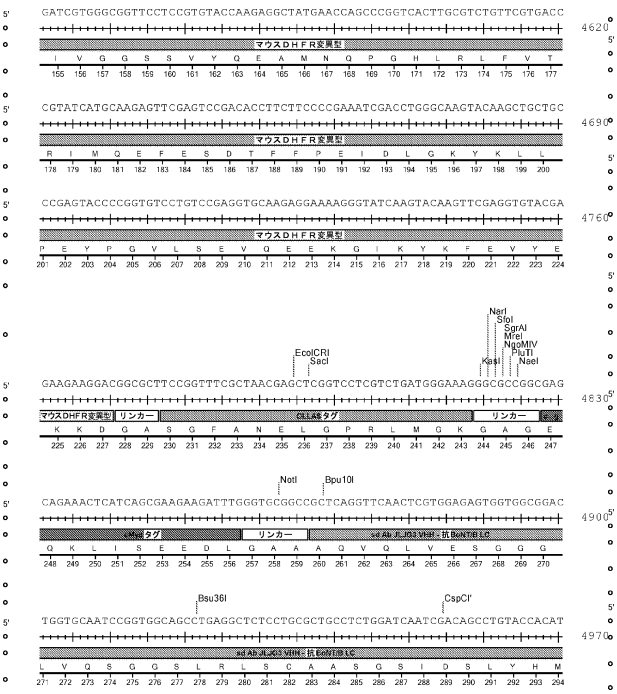
【図５１Ｄ】



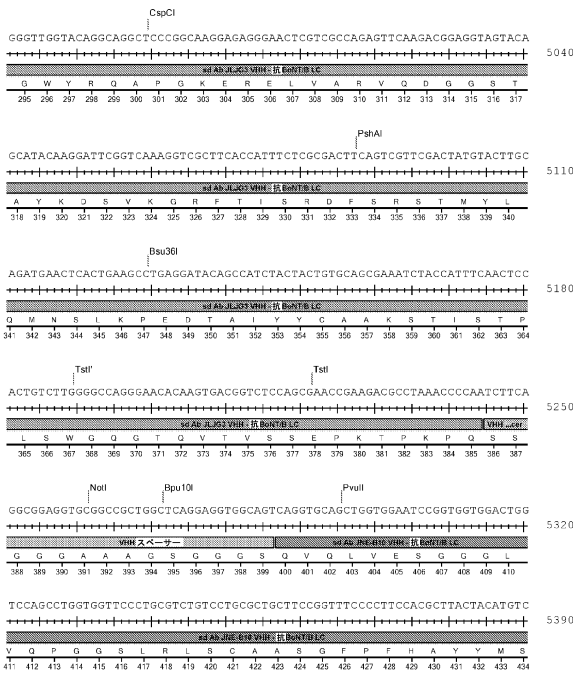
【図５１Ｅ】



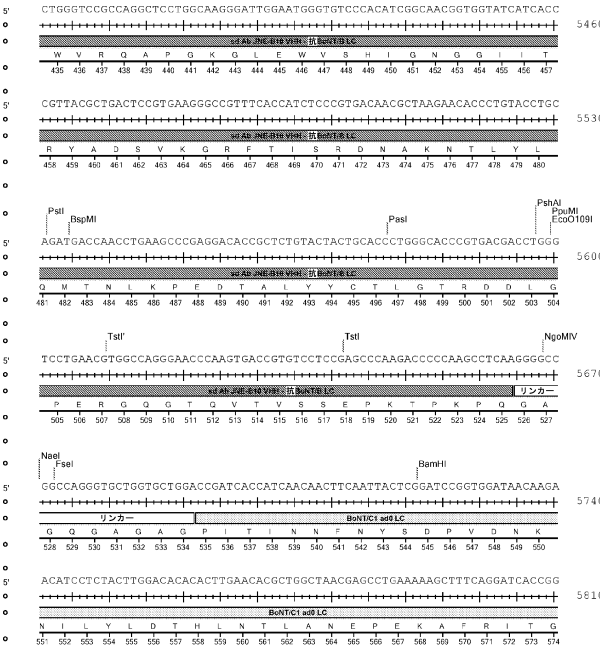
【図５１Ｆ】



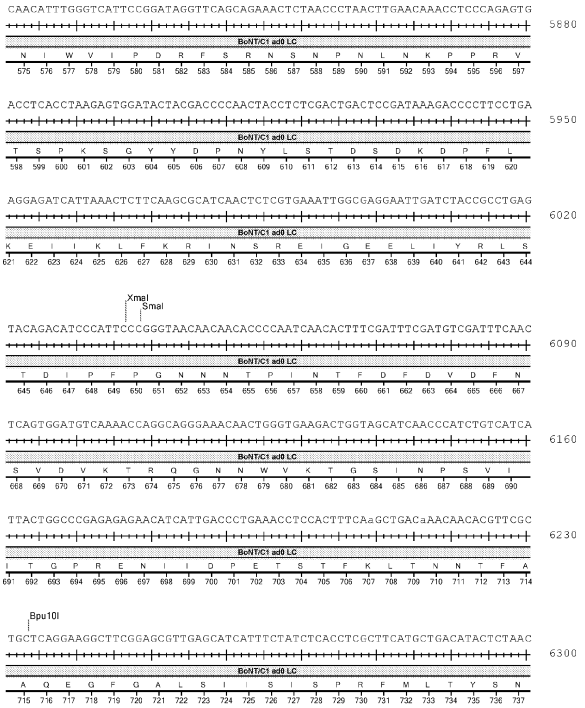
【図５１Ｇ】



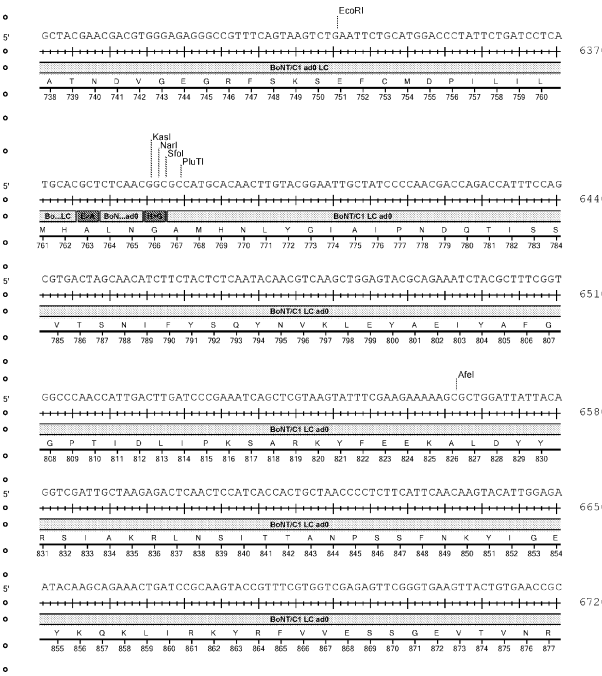
【図５１Ｈ】



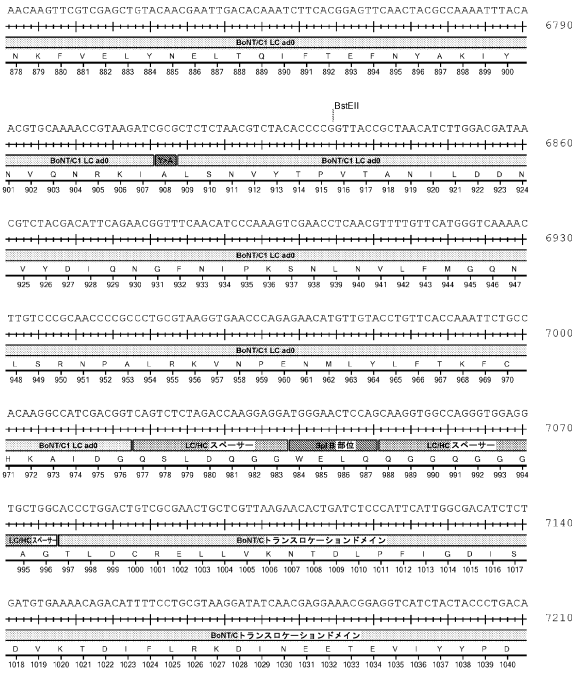
【図５１Ｉ】



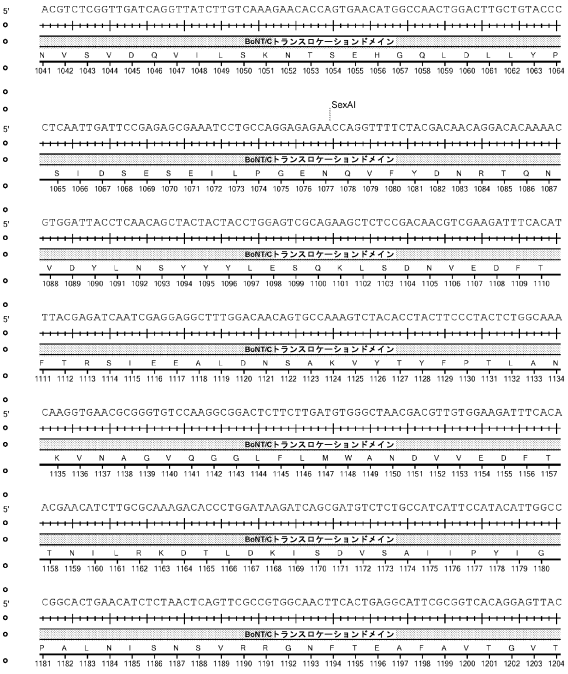
【図５１Ｊ】



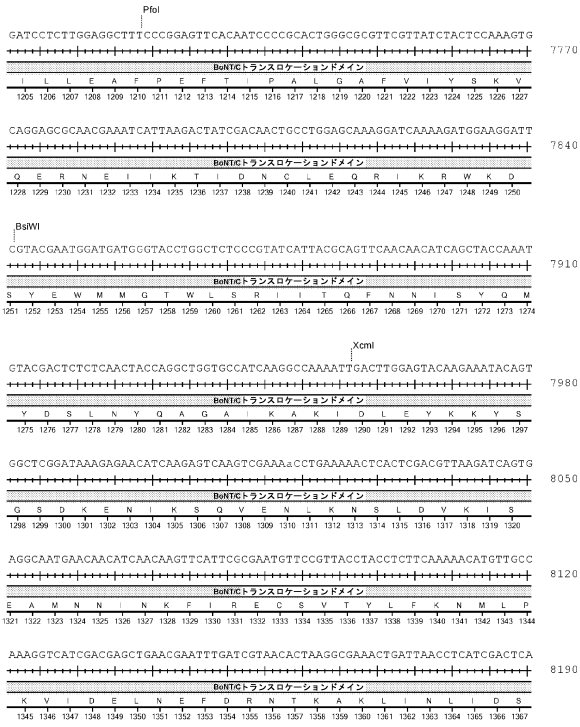
【図５１Ｋ】



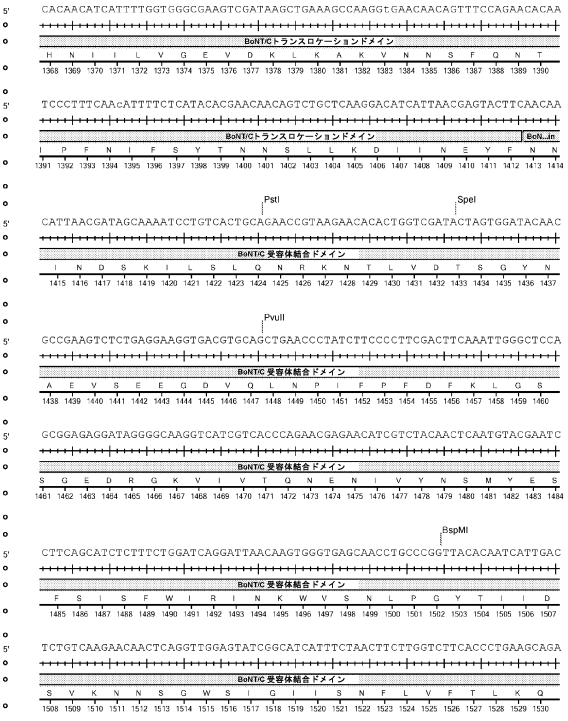
【図５１Ｌ】



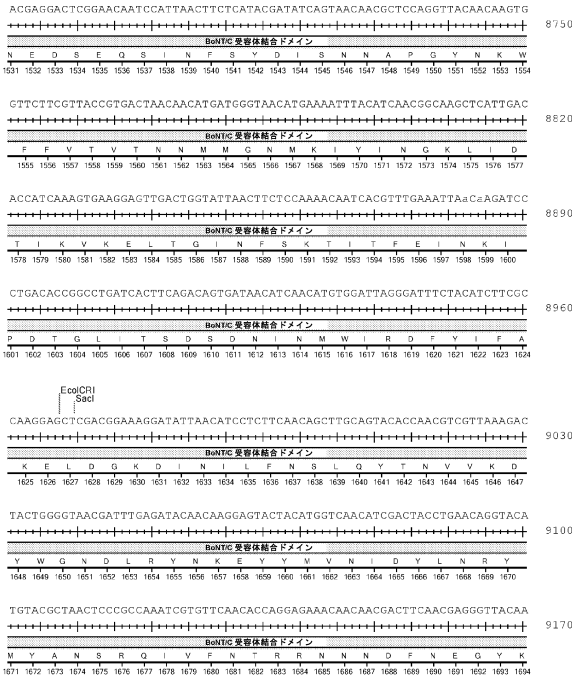
【図５１Ｍ】



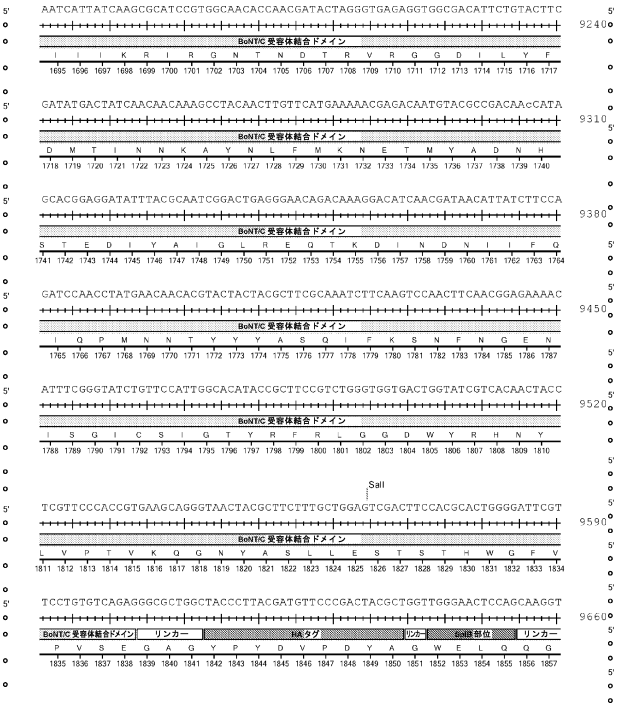
【図５１Ｎ】



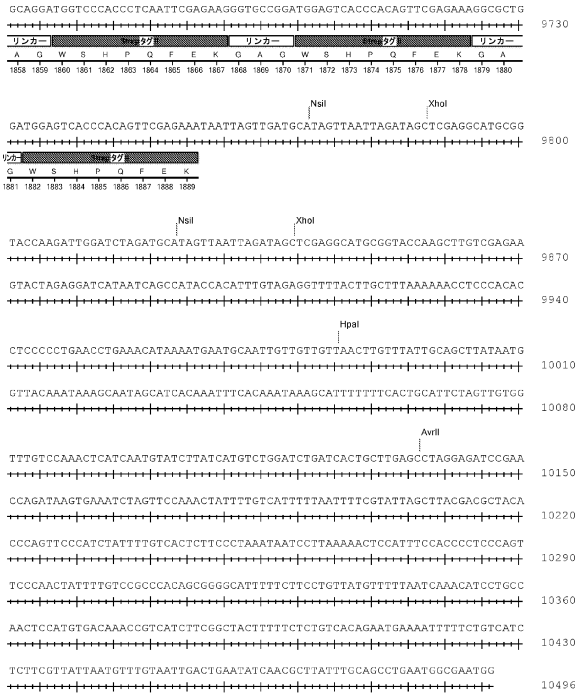
【図５１Ｏ】



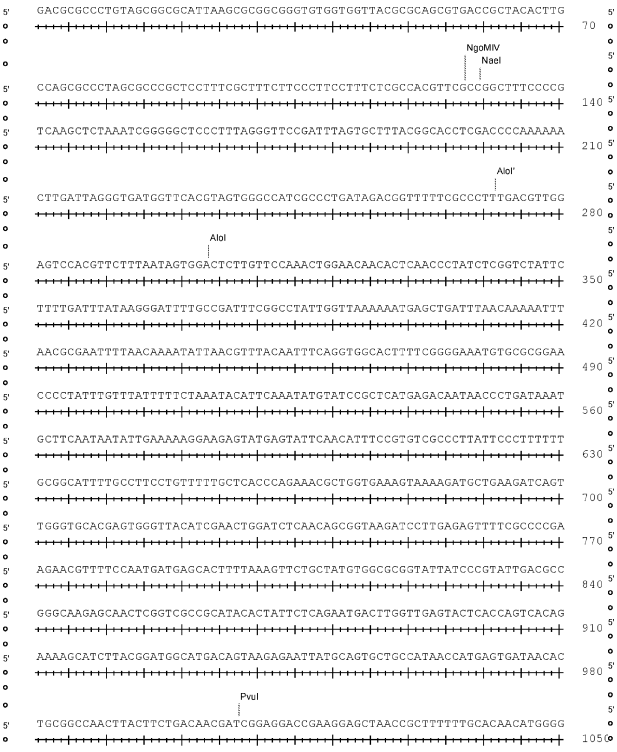
【図５１Ｐ】



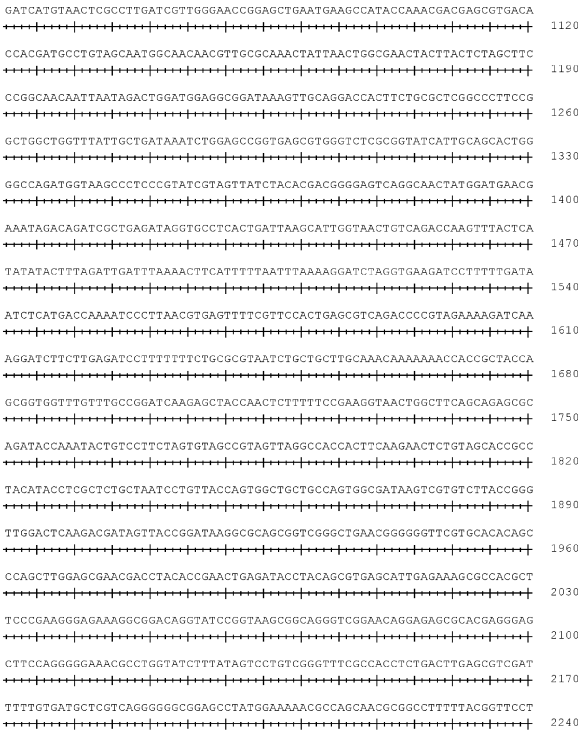
【図５１Ｑ】



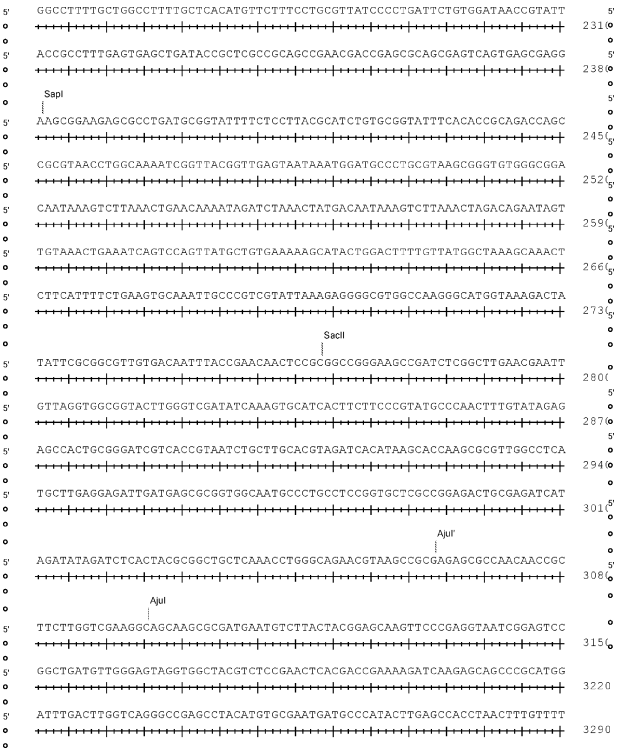
【図５２Ａ】



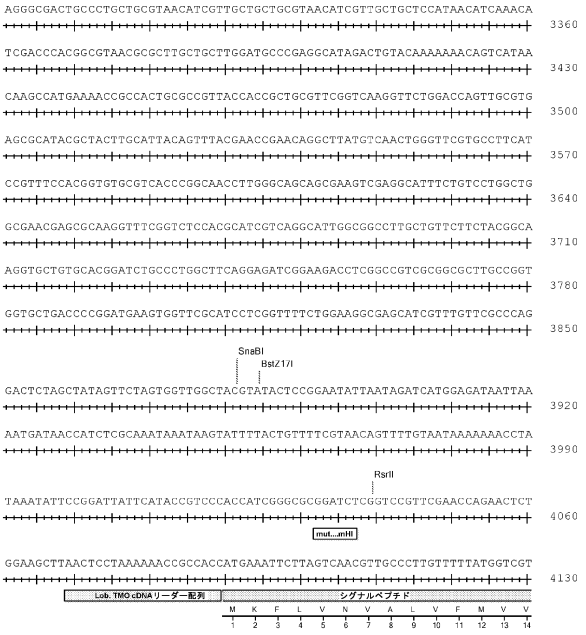
【図５２Ｂ】



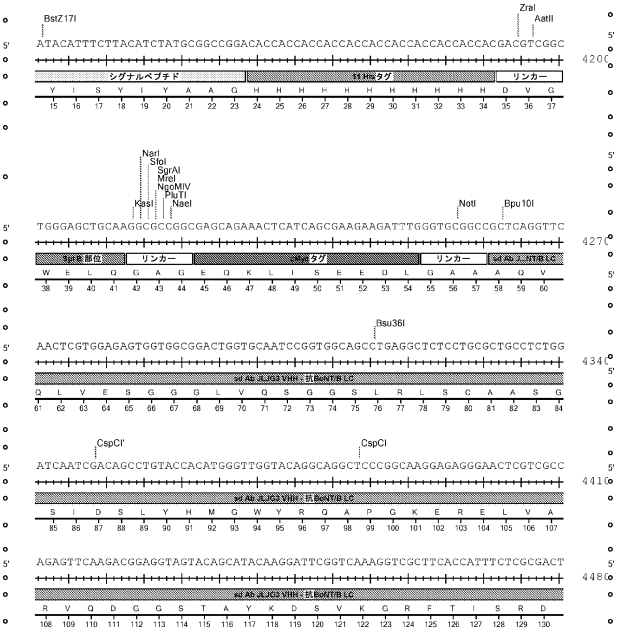
【図５２Ｃ】



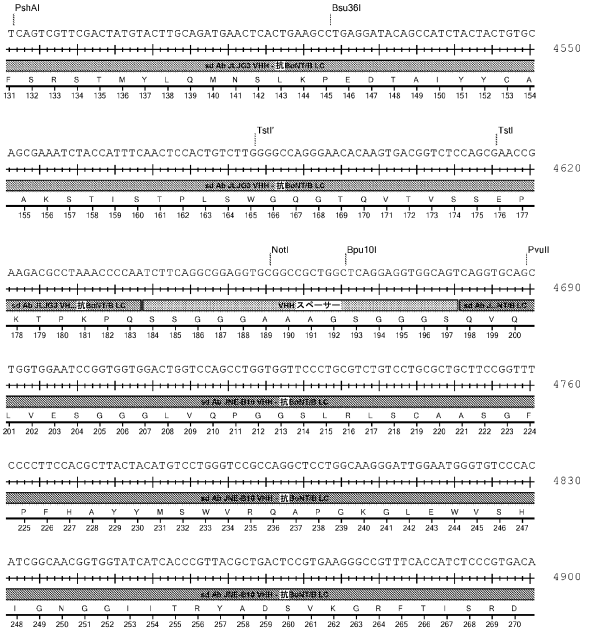
【図５２Ｄ】



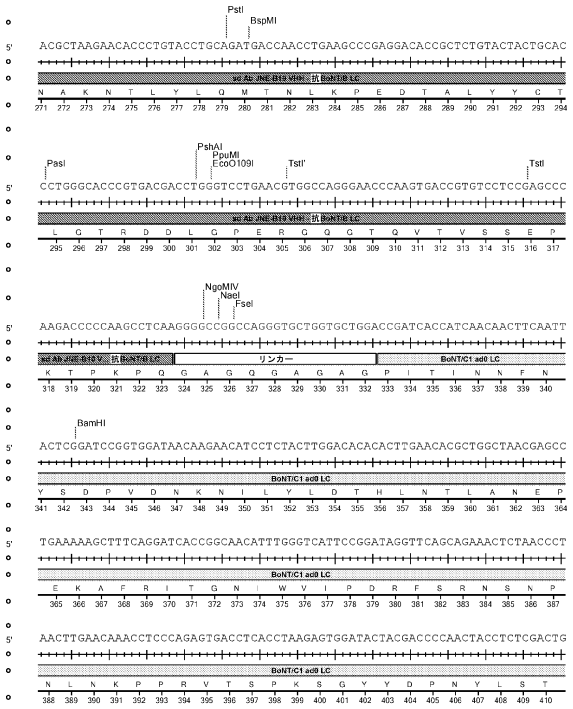
【図５２Ｅ】



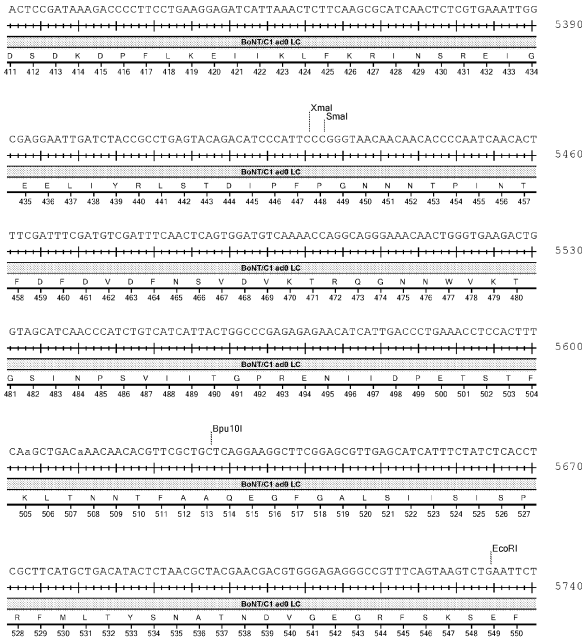
【図５２Ｆ】



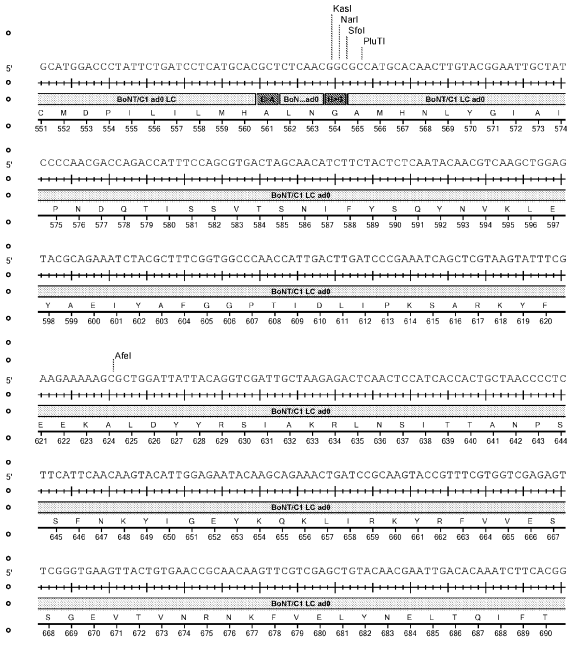
【図５２Ｇ】



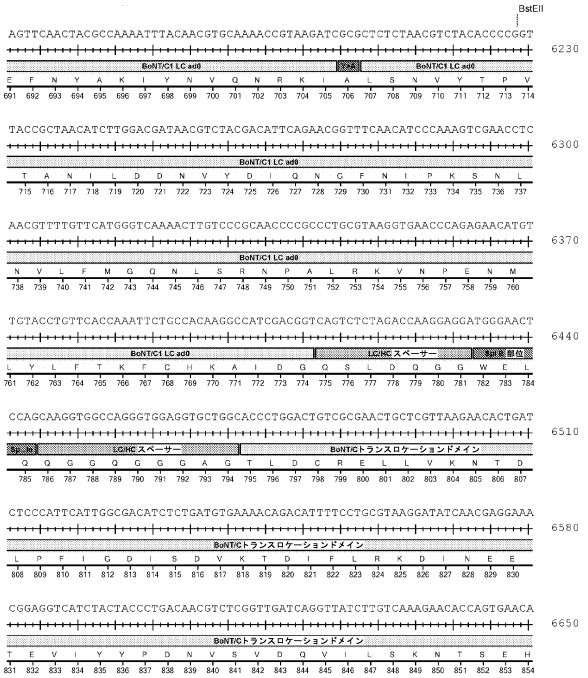
【図５２Ｈ】



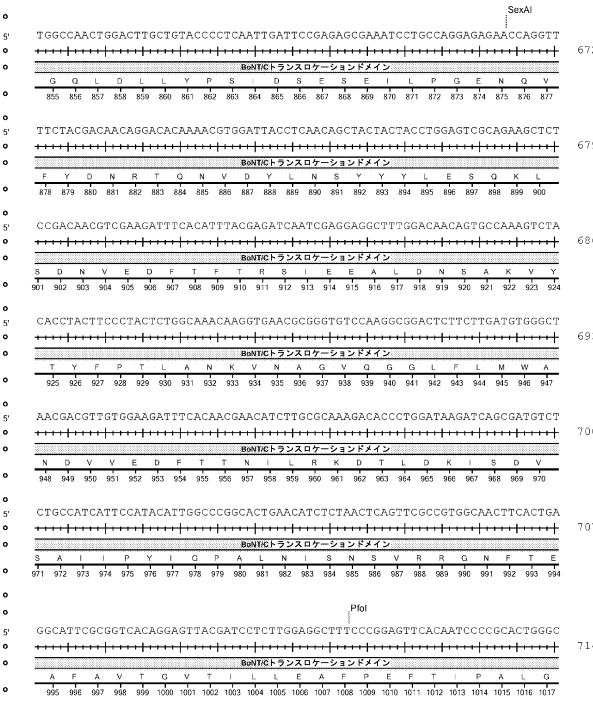
【図５２Ｉ】



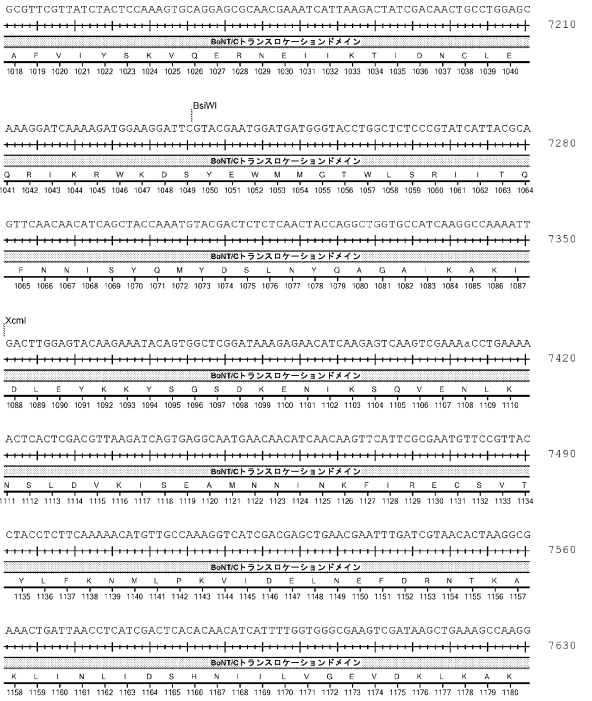
【図５２Ｊ】



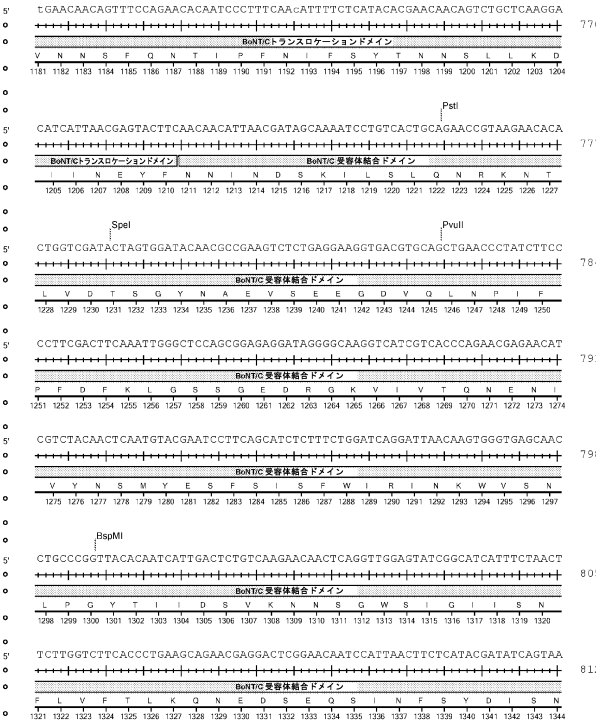
【図５２Ｋ】



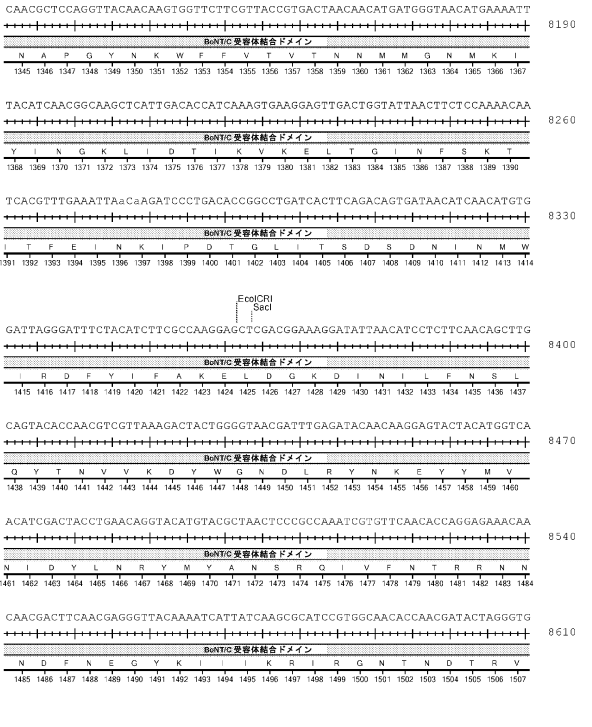
【図５２Ｌ】



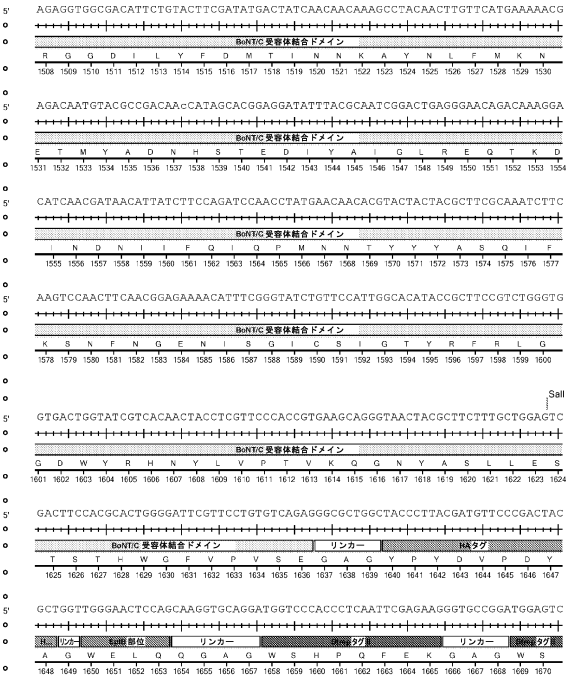
【図５２Ｍ】



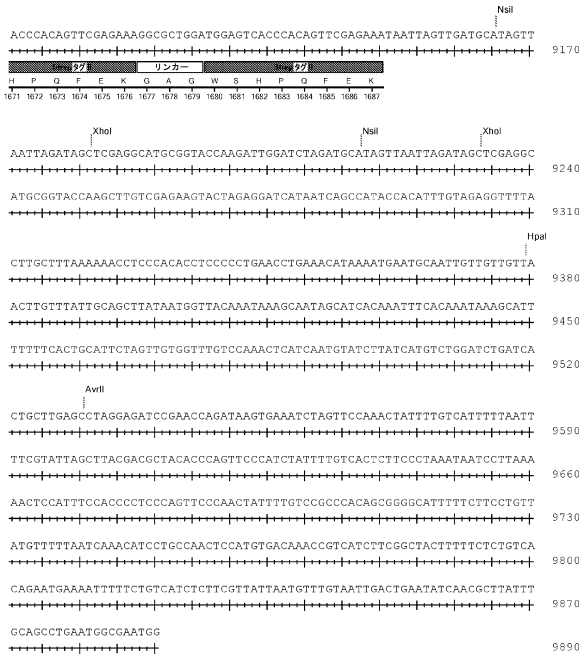
【図５２Ｎ】



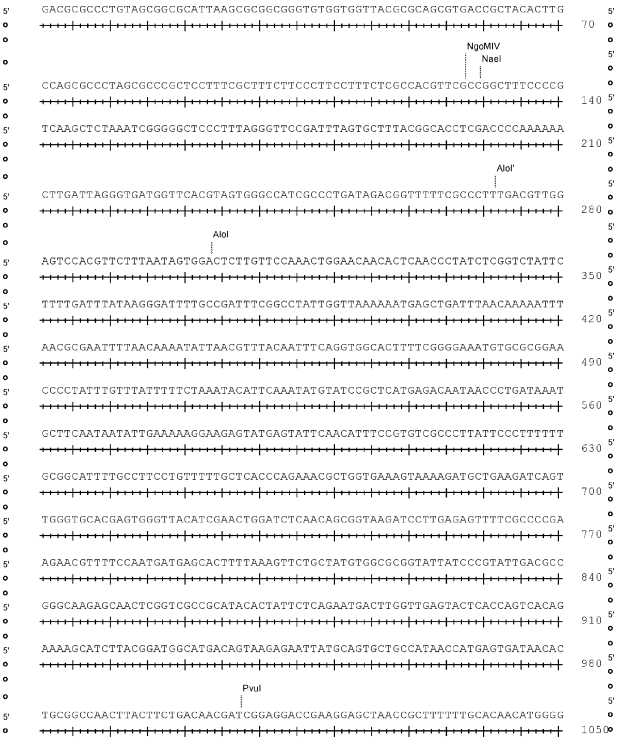
【図５２Ｏ】



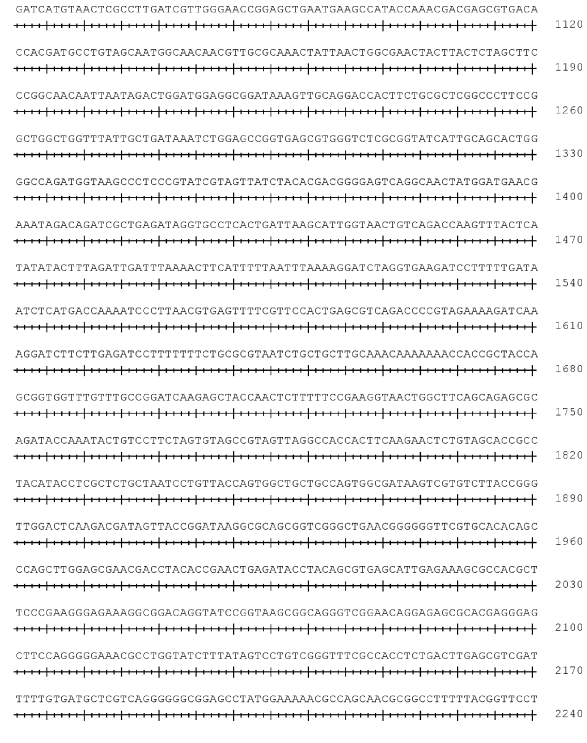
【図５２Ｐ】



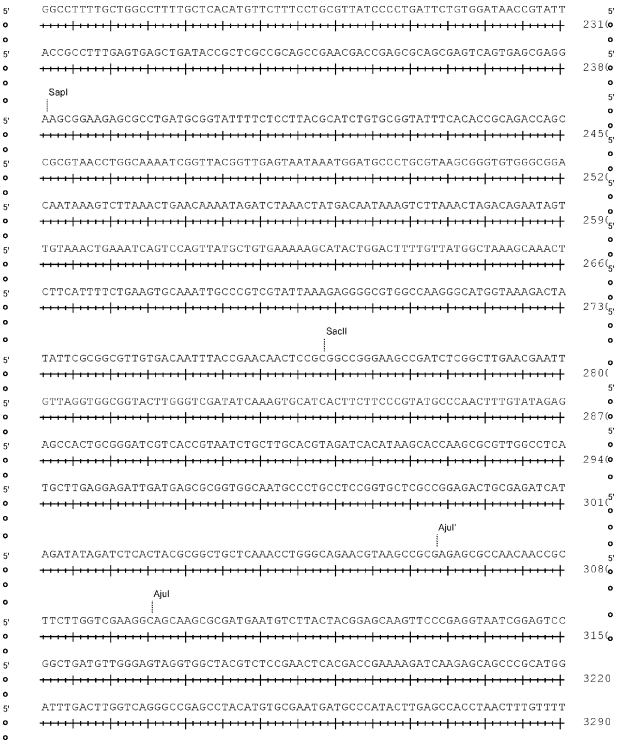
【図５３Ａ】



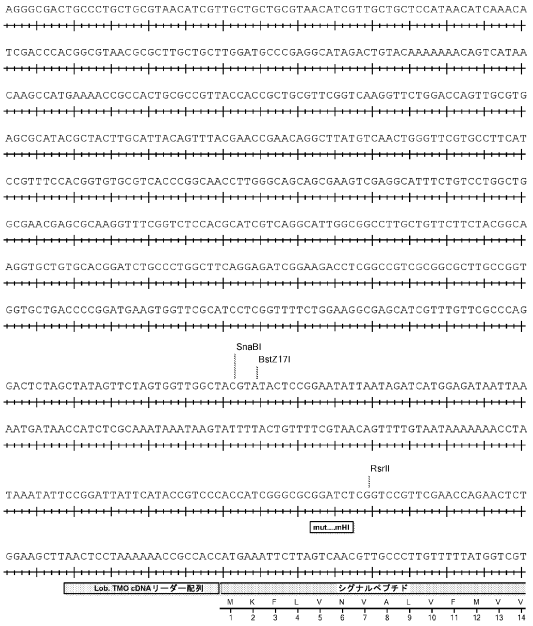
【図５３Ｂ】



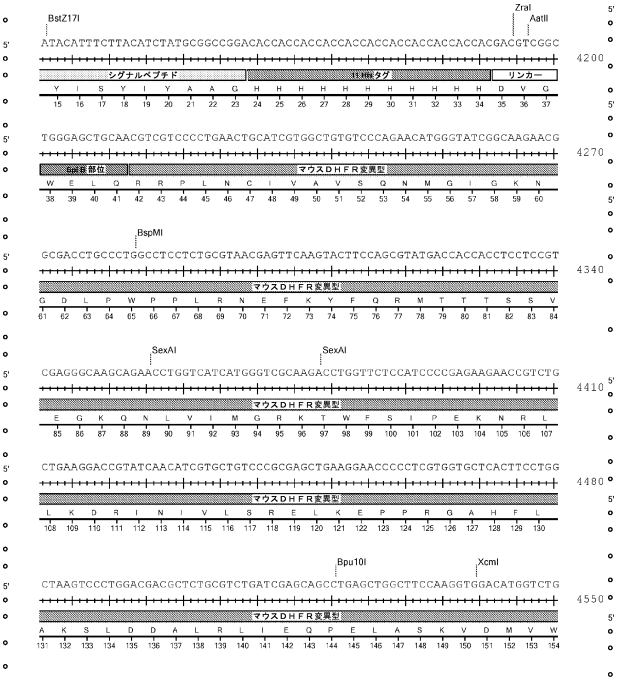
【図５３Ｃ】



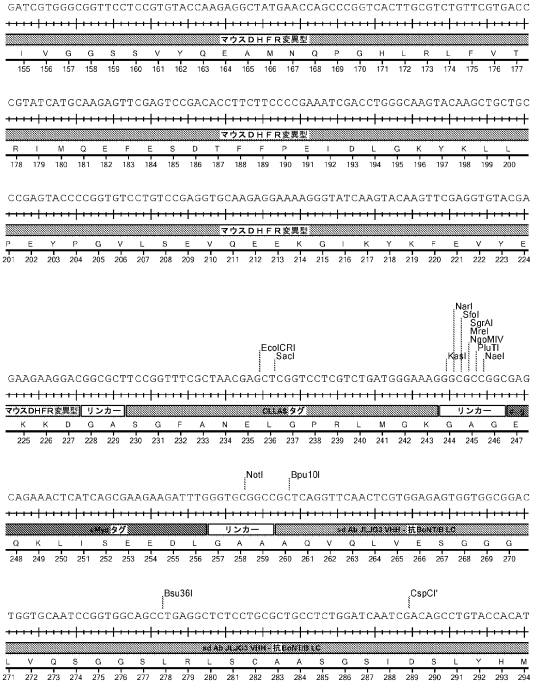
【図５３Ｄ】



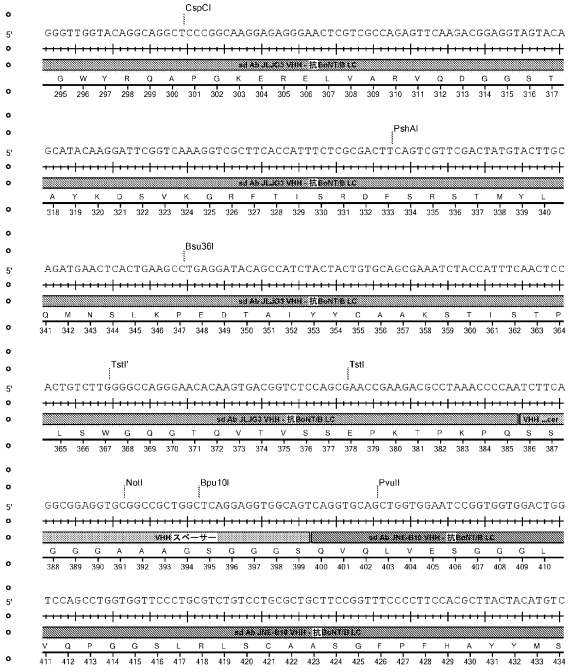
【図５３Ｅ】



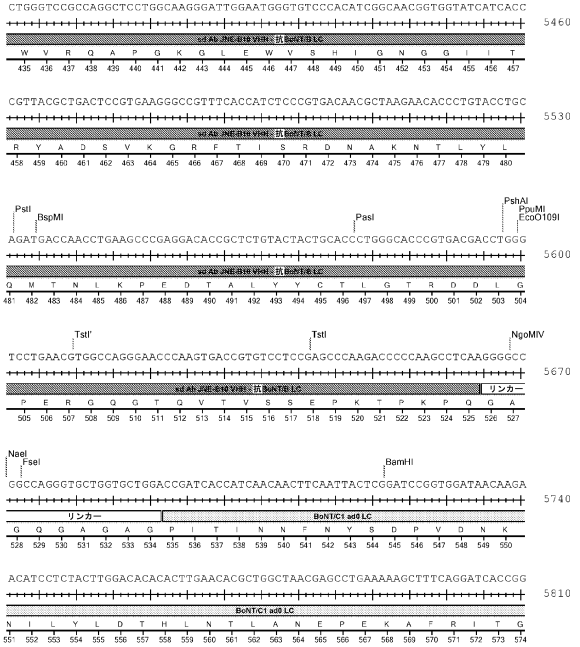
【図５３Ｆ】



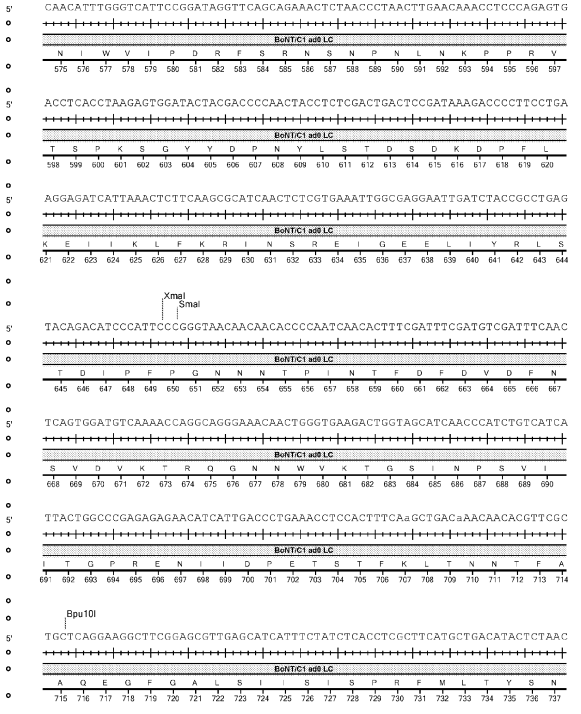
【図５３Ｇ】



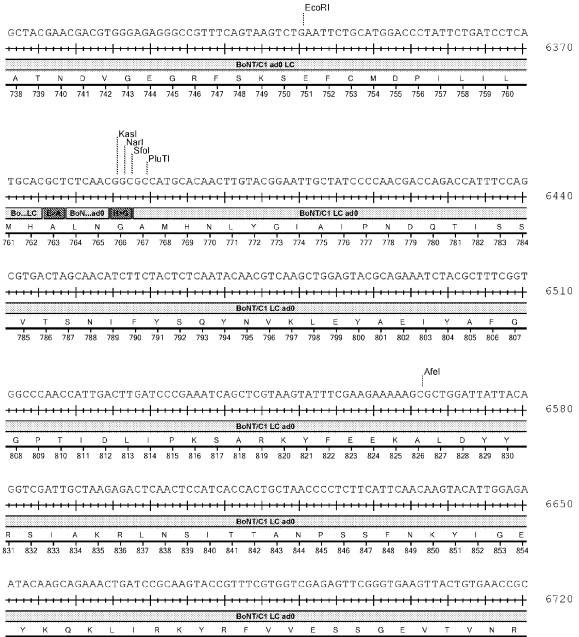
【図５３Ｈ】



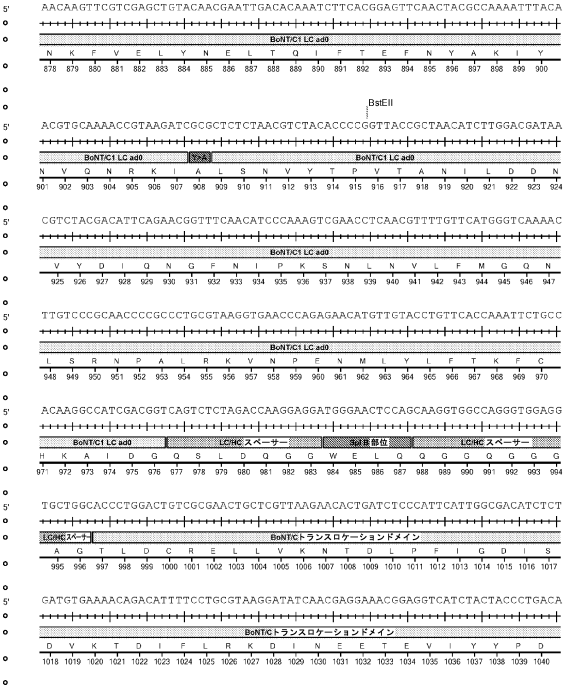
【図５３Ｉ】



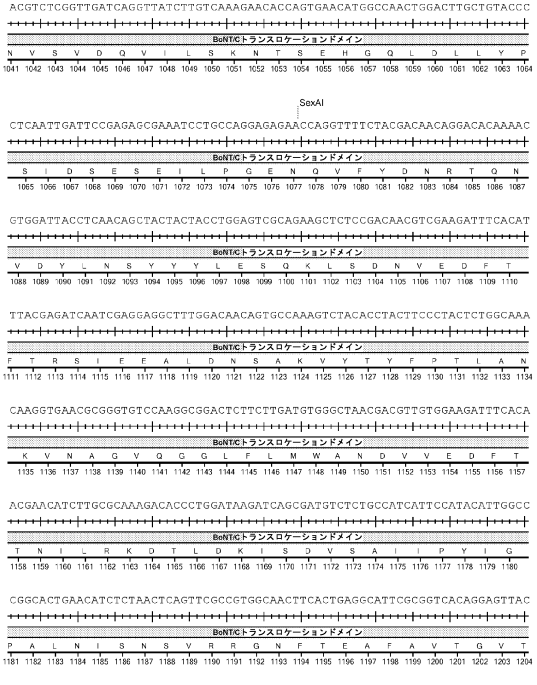
【図５３Ｊ】



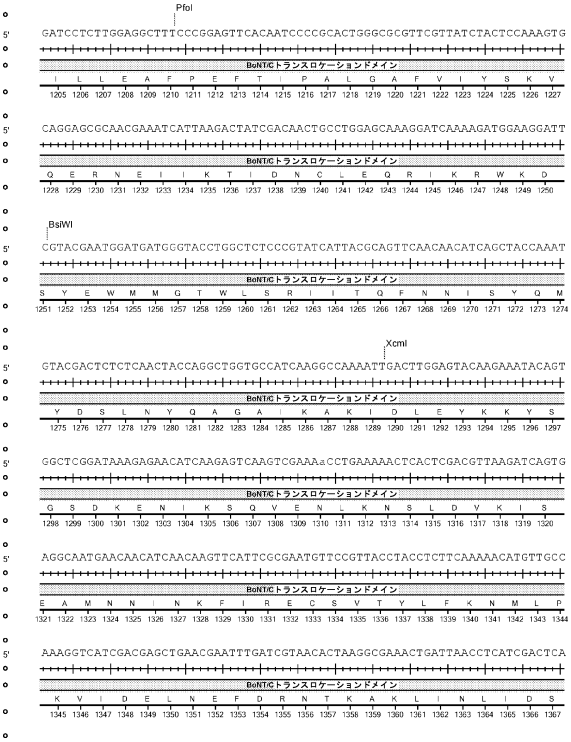
【図５３Ｋ】



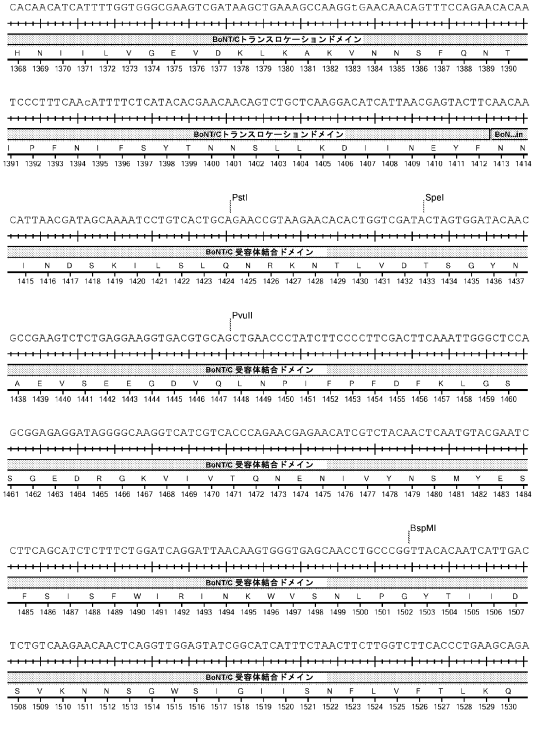
【図５３Ｌ】



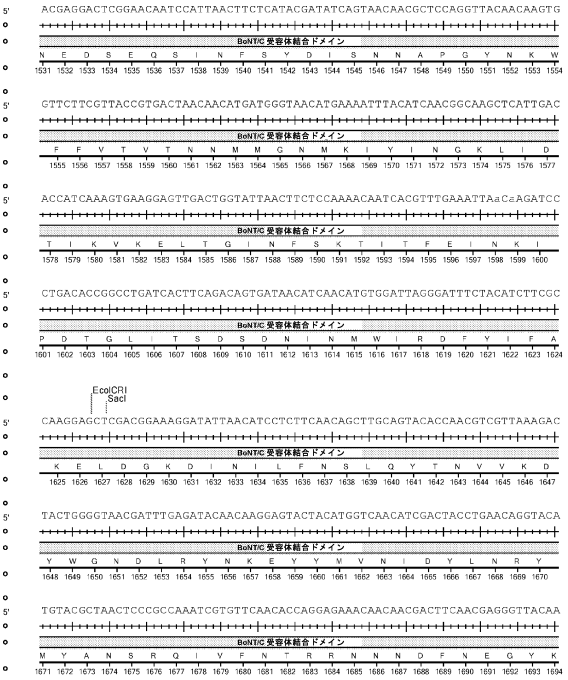
【図５３Ｍ】



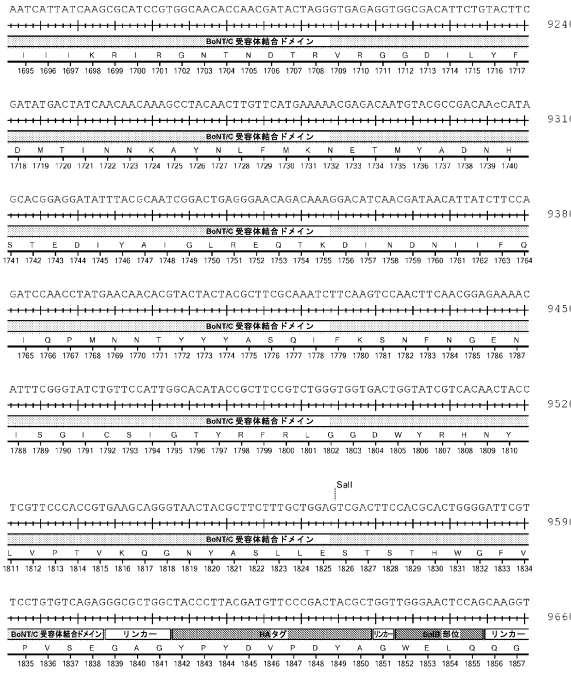
【図５３Ｎ】



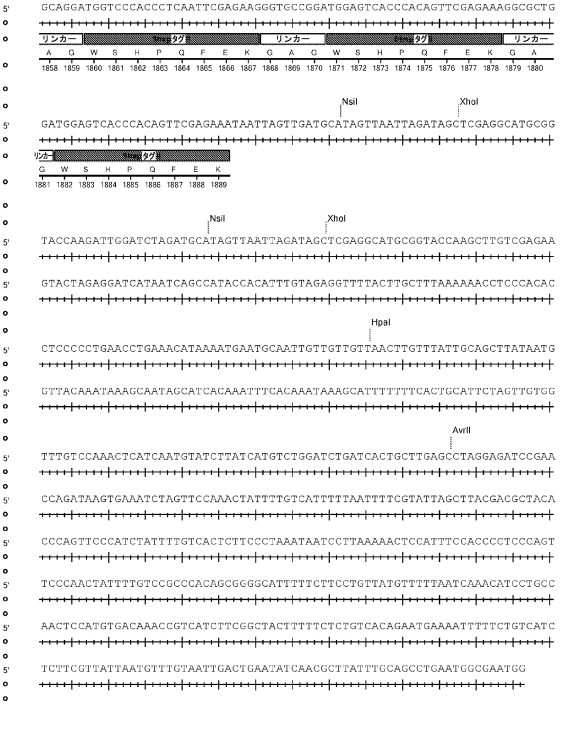
【図５３Ｏ】



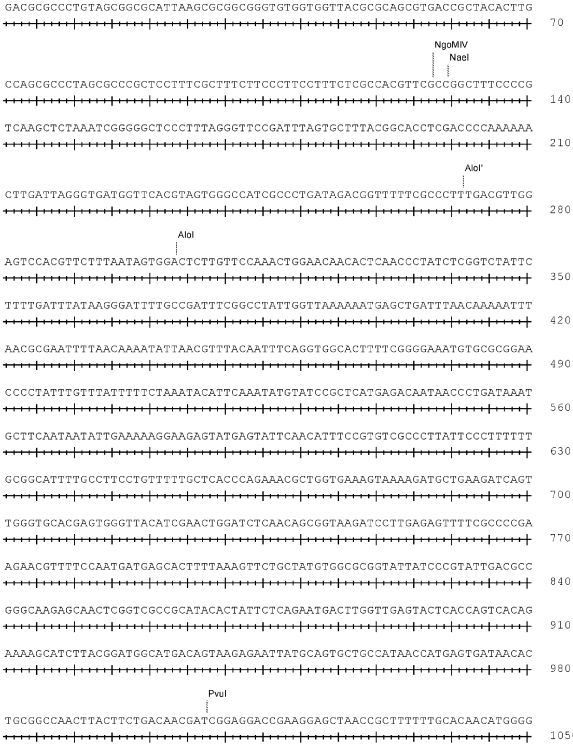
【図５３Ｐ】



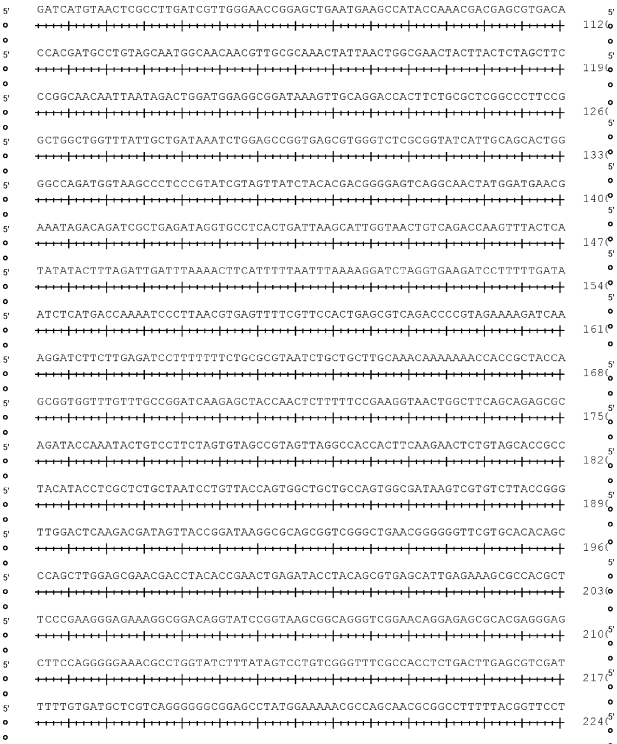
【図５３Ｑ】



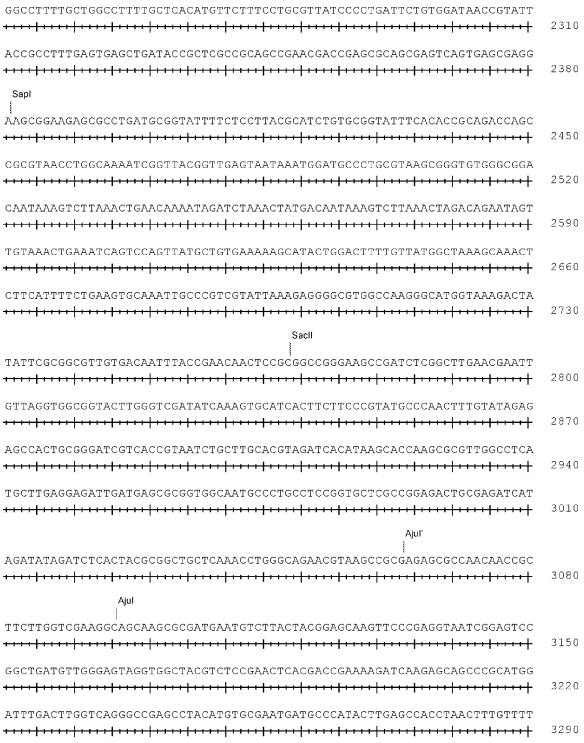
【図５４Ａ】



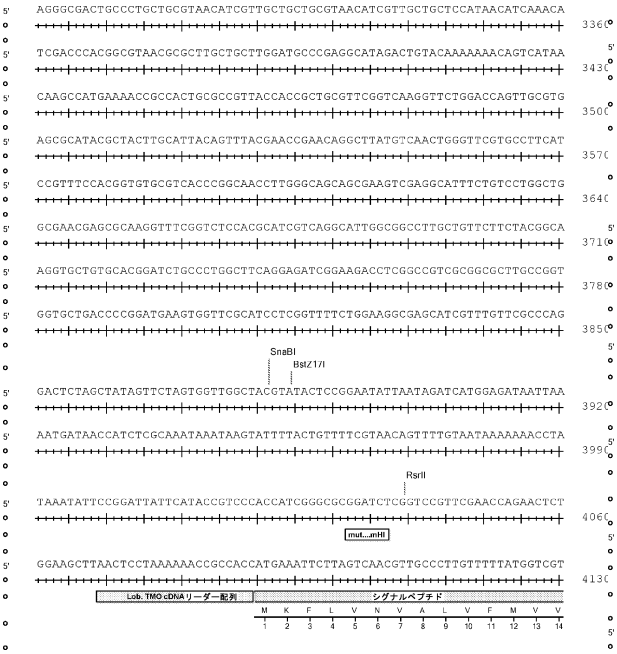
【図５４Ｂ】



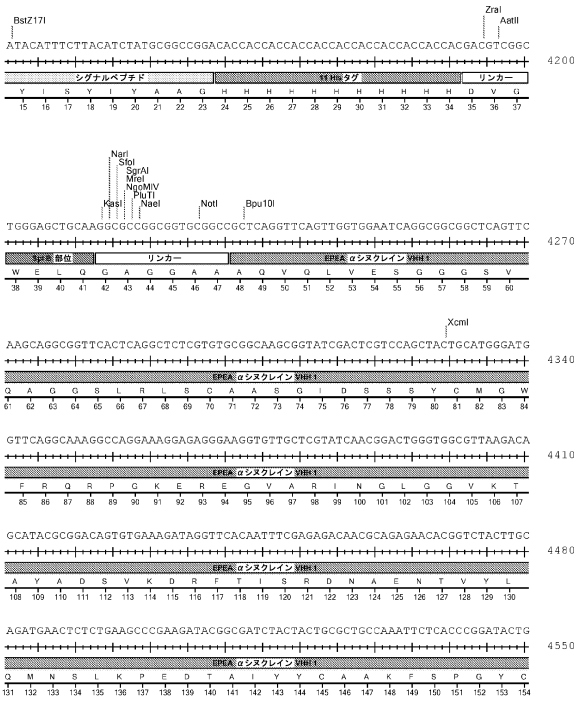
【図５４Ｃ】



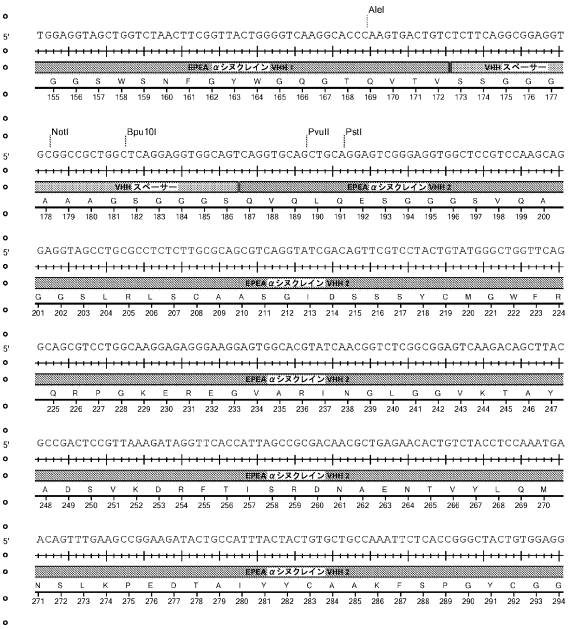
【図５４Ｄ】



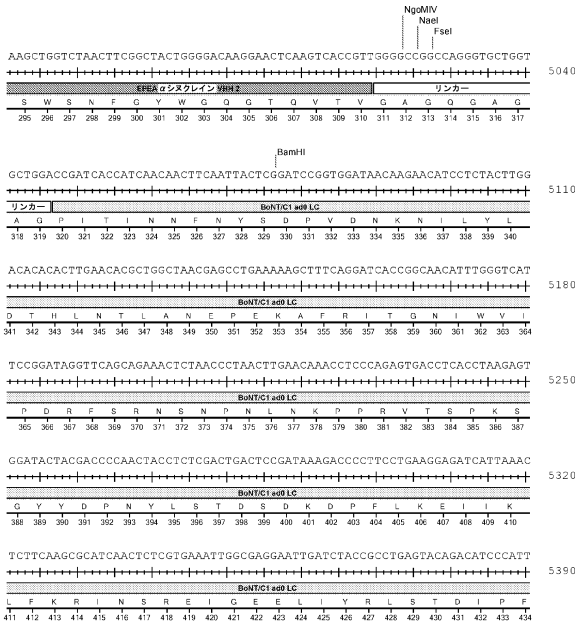
【図５４Ｅ】



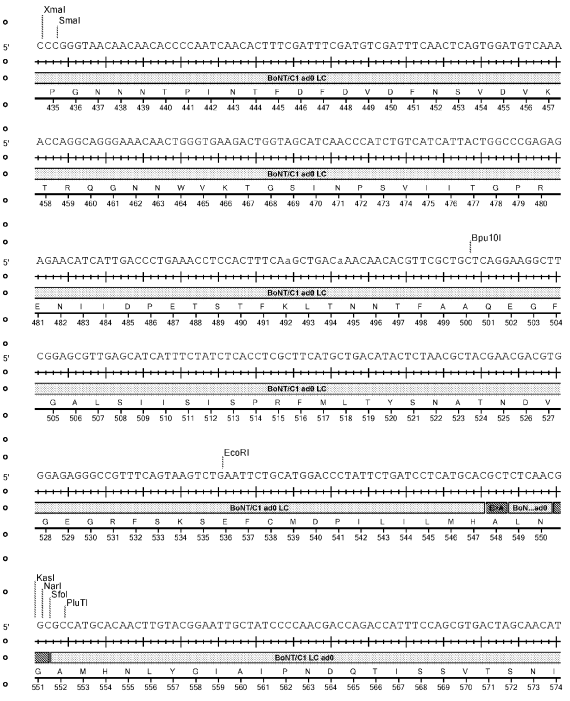
【図５４Ｆ】



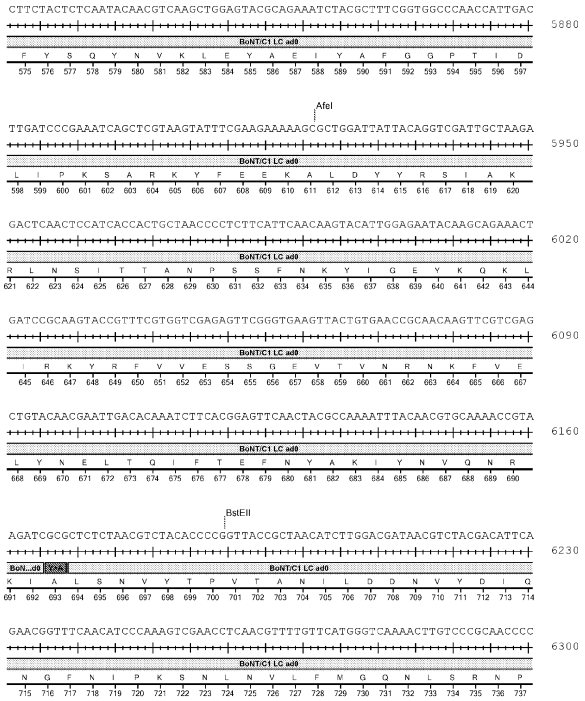
【図５４Ｇ】



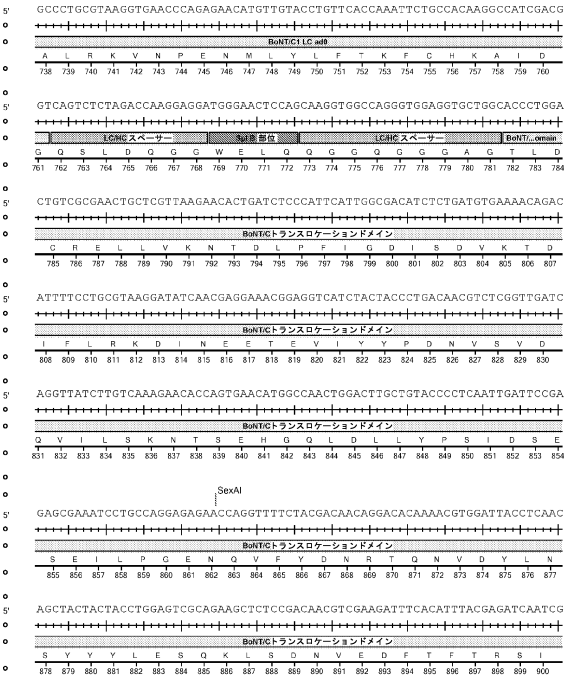
【図５４Ｈ】



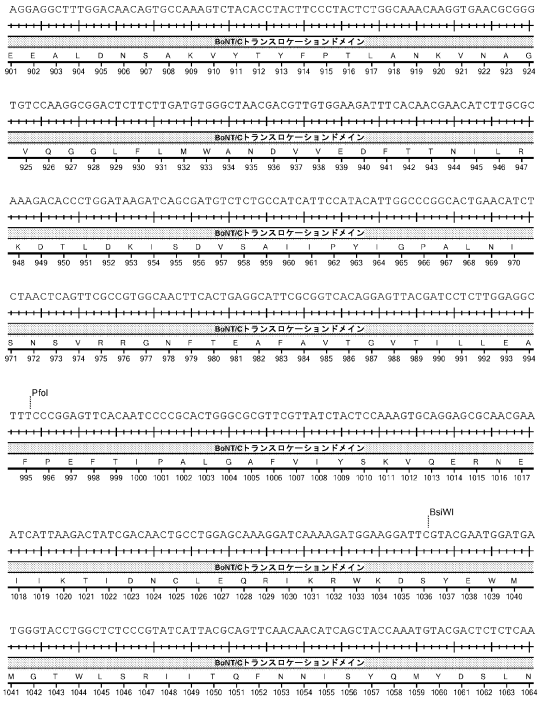
【図５４Ｉ】



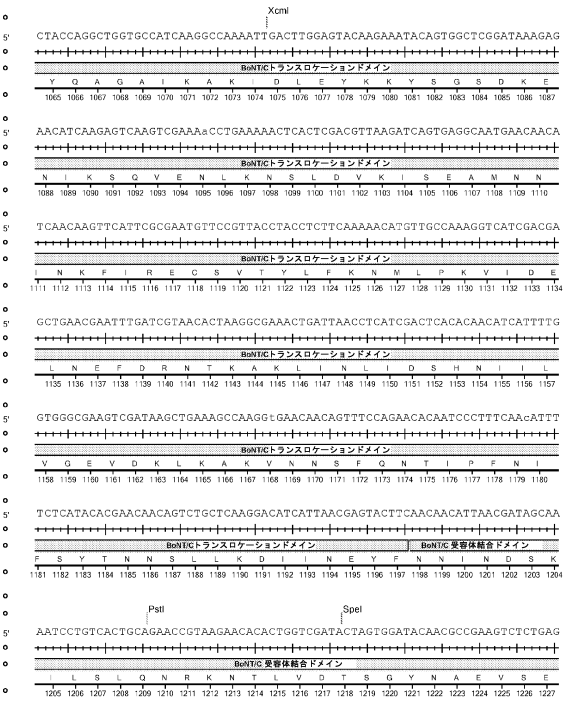
【図５４Ｊ】



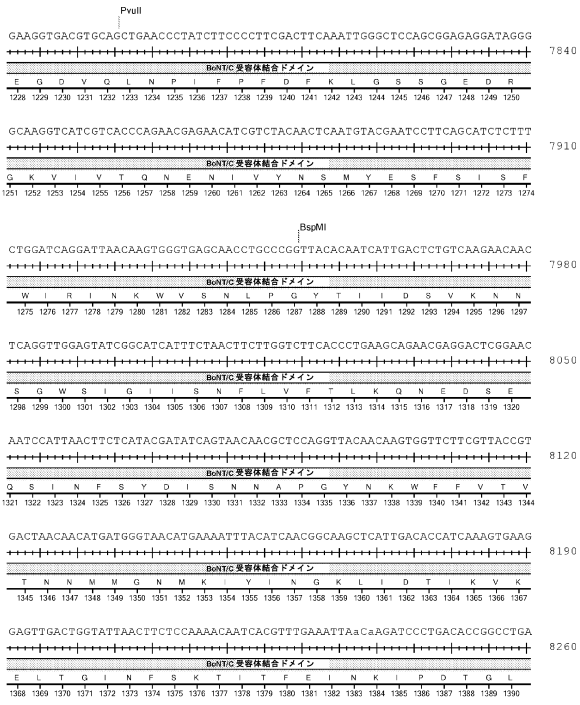
【図５４Ｋ】



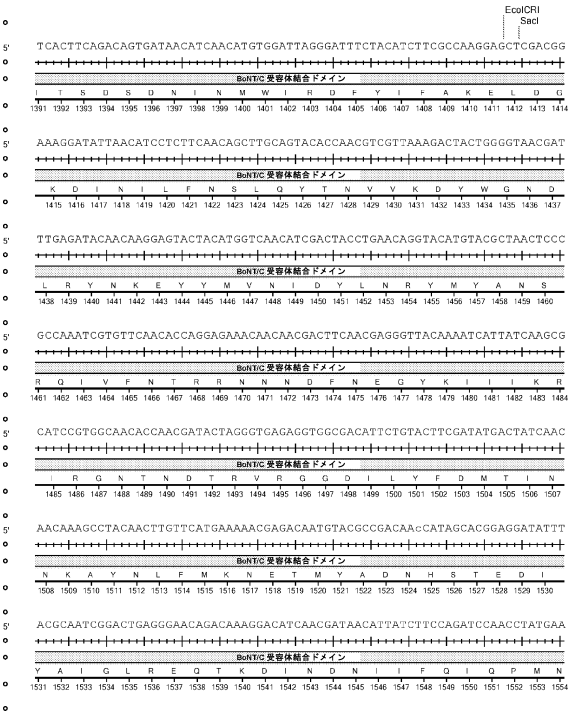
【図５４Ｌ】



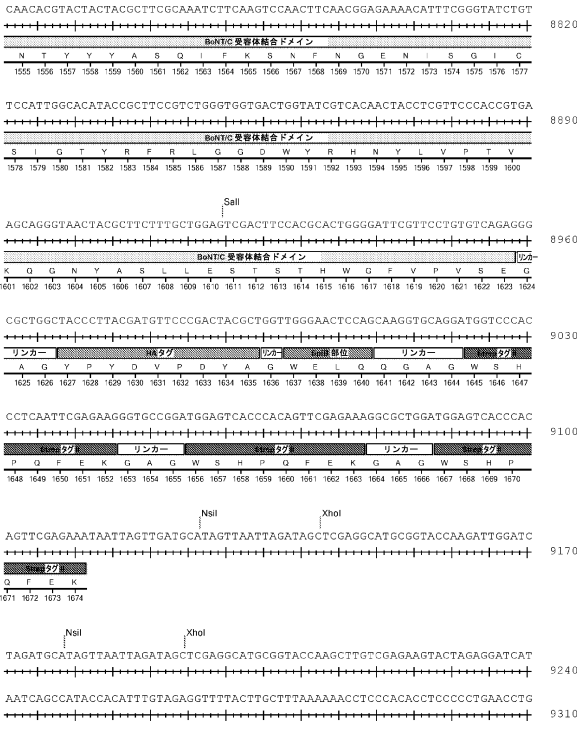
【図５４Ｍ】



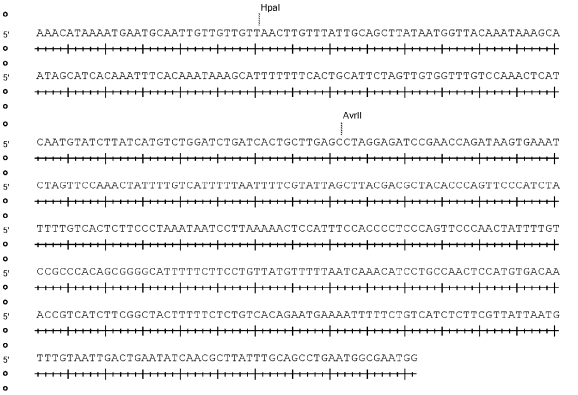
【図５４Ｎ】



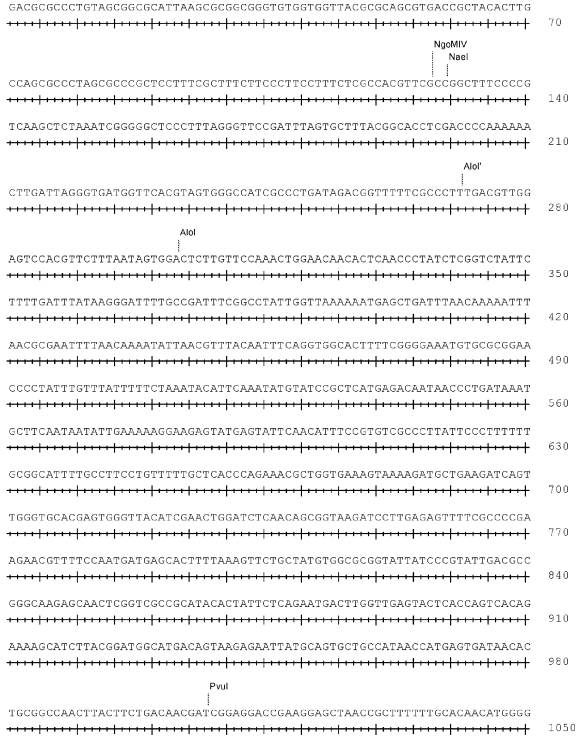
【図５４Ｏ】



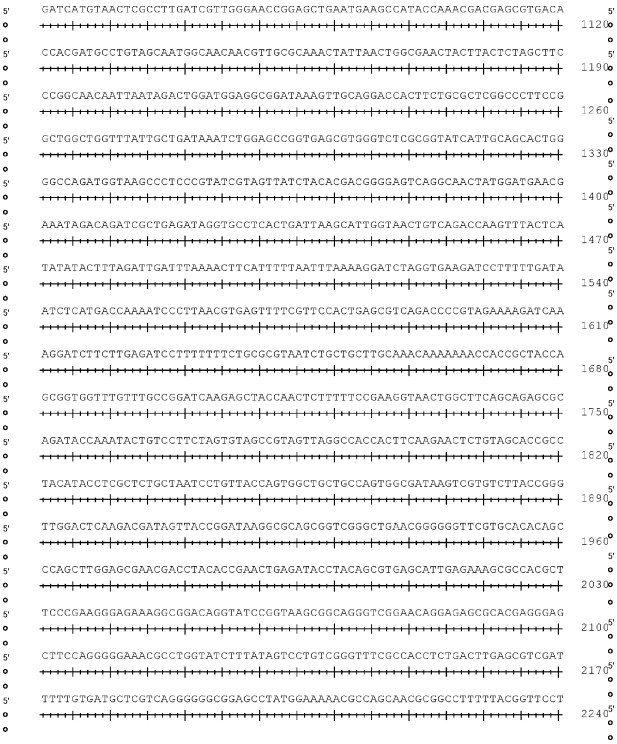
【図５４Ｐ】



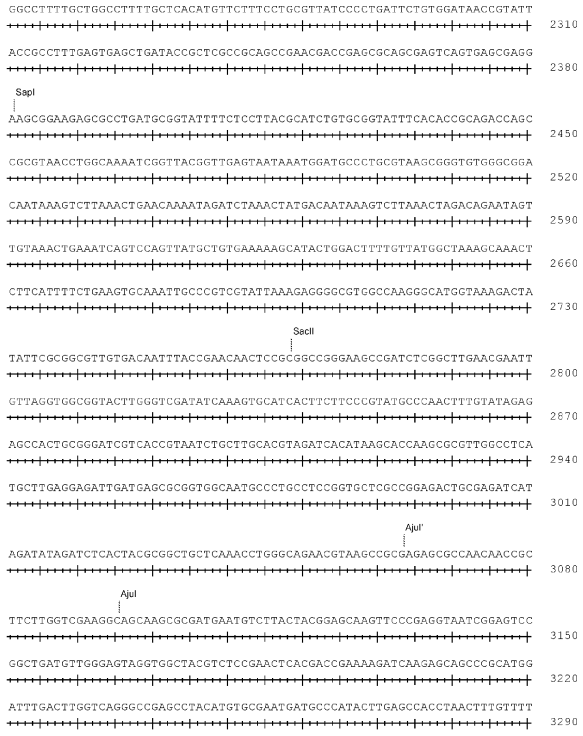
【図５５Ａ】



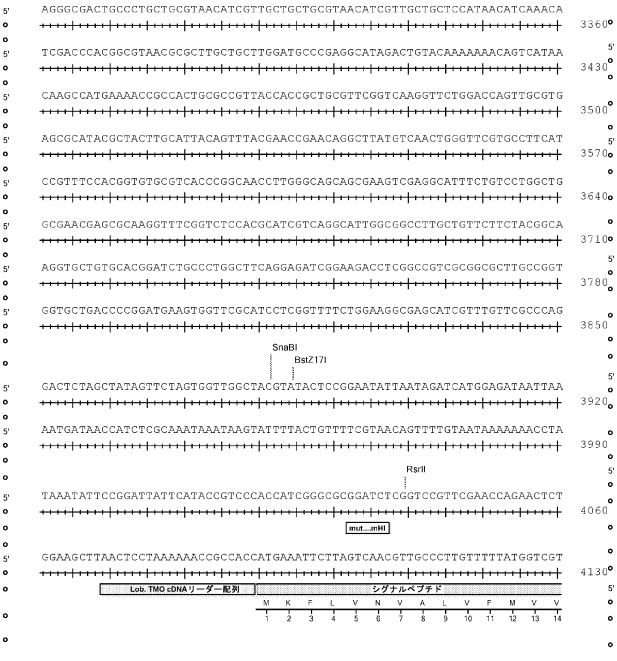
【図５５Ｂ】



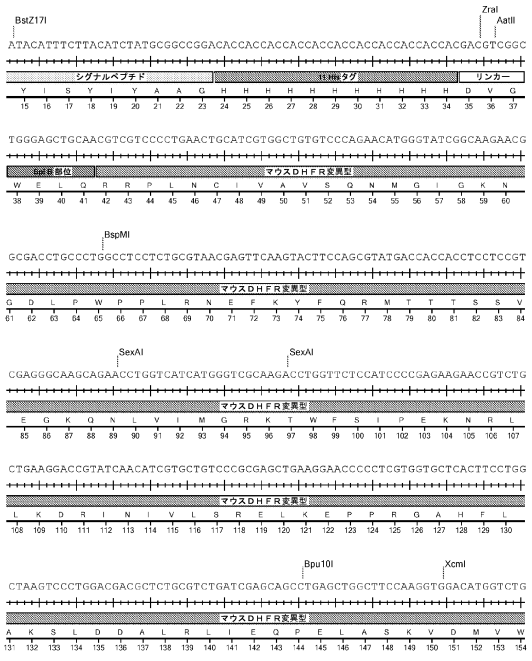
【図５５Ｃ】



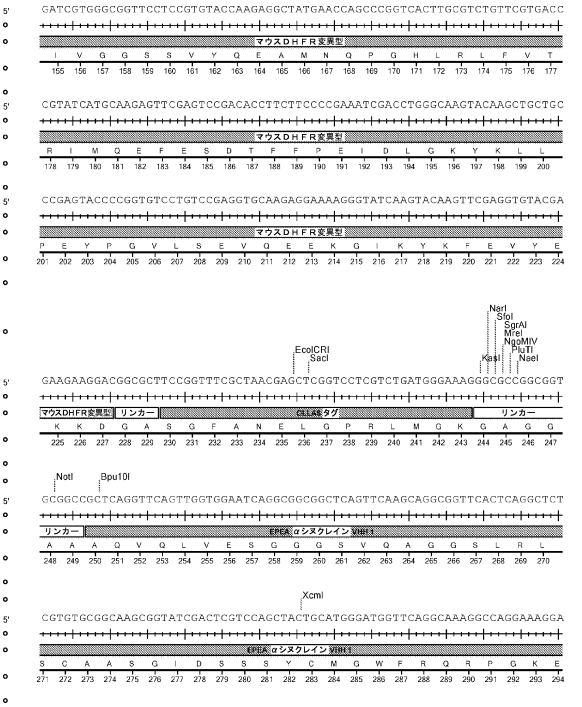
【図５５Ｄ】



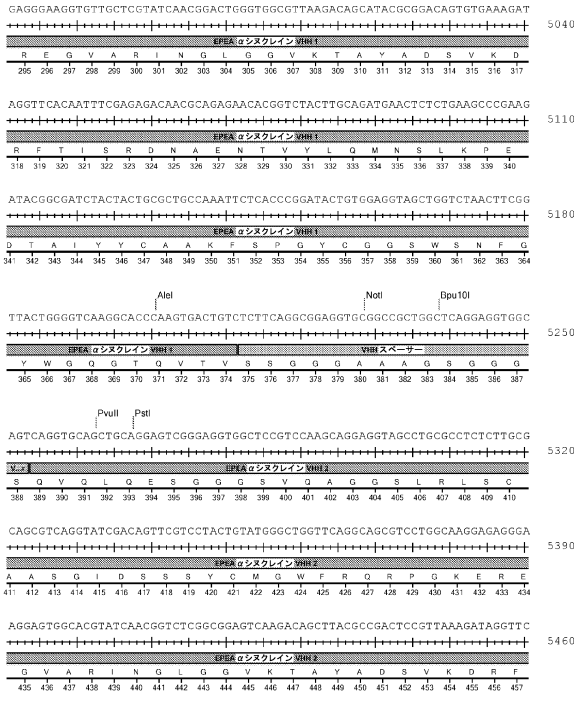
【図５５Ｅ】



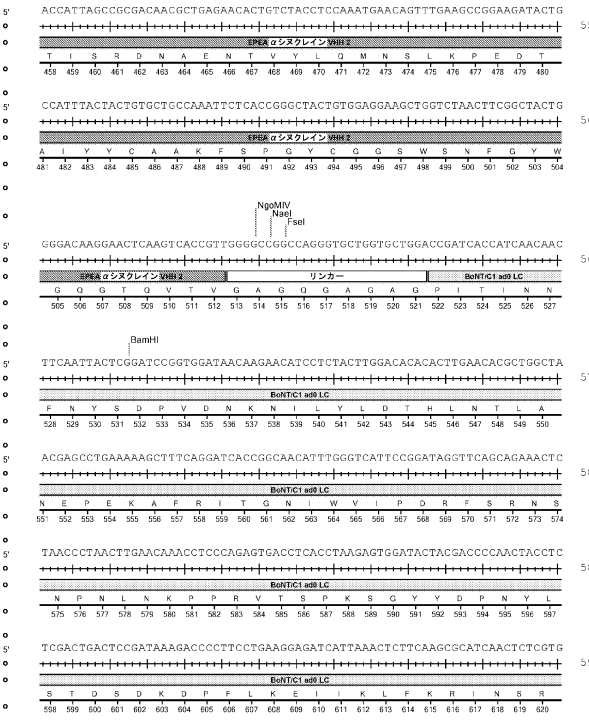
【図５５Ｆ】



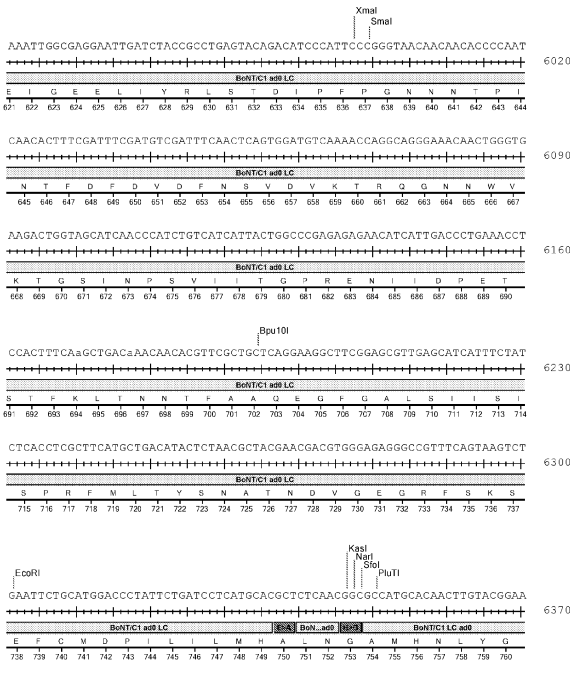
【図５５Ｇ】



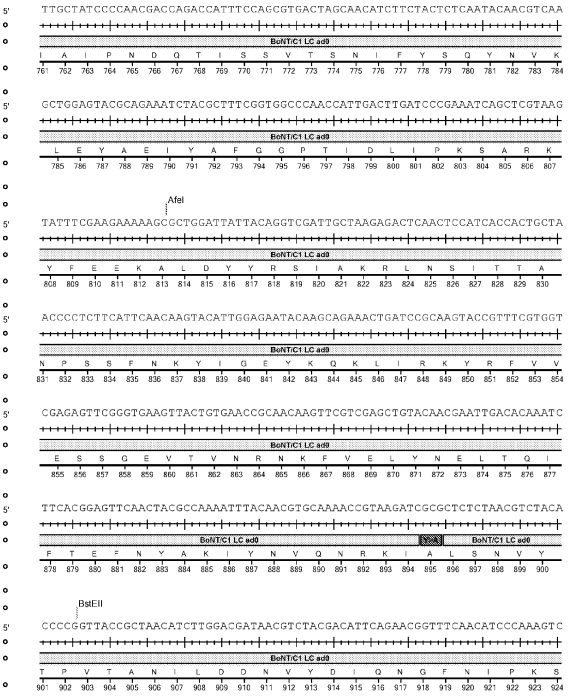
【図５５Ｈ】



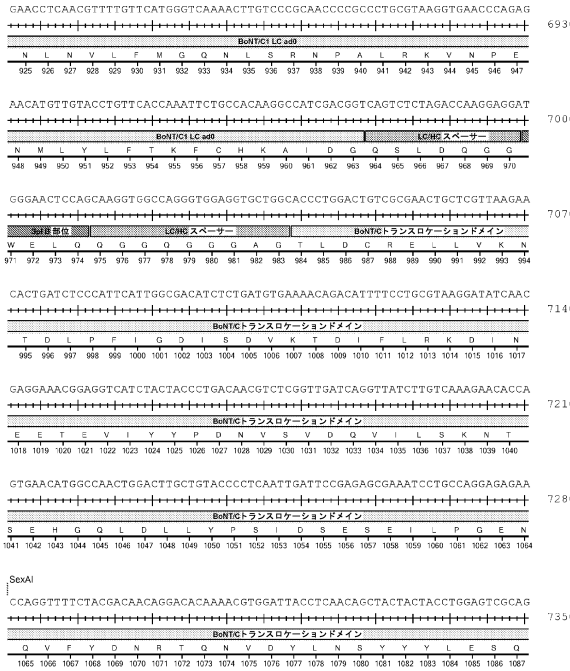
【図５５Ｉ】



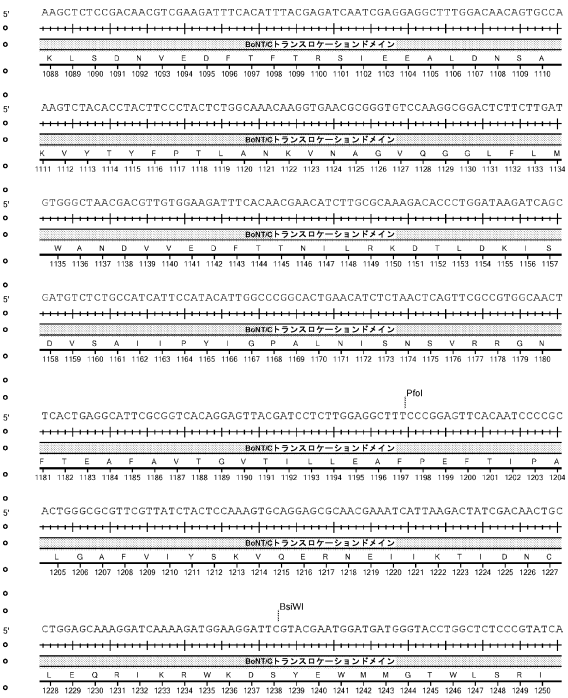
【図５５Ｊ】



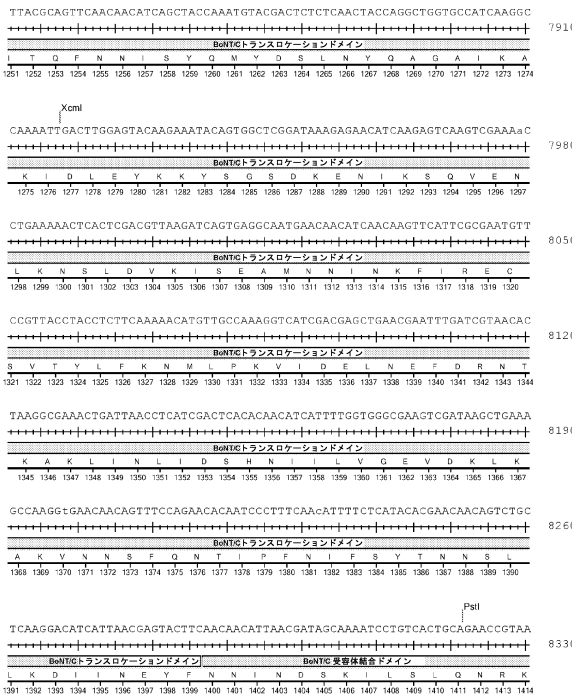
【図５５Ｋ】



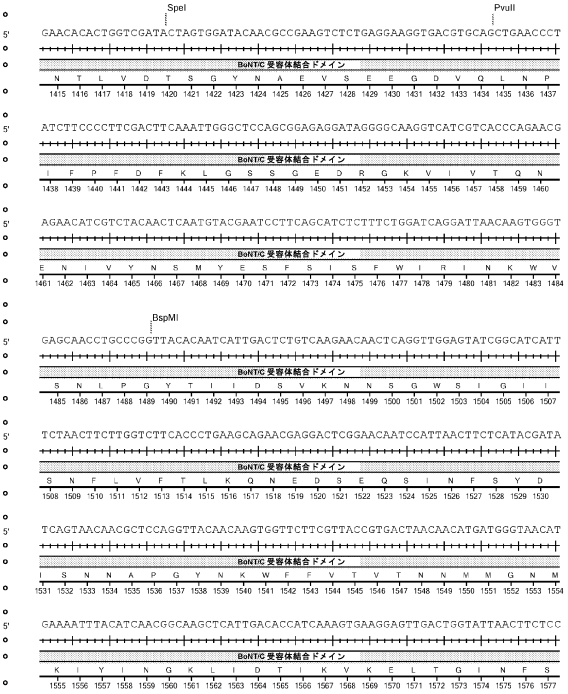
【図５５Ｌ】



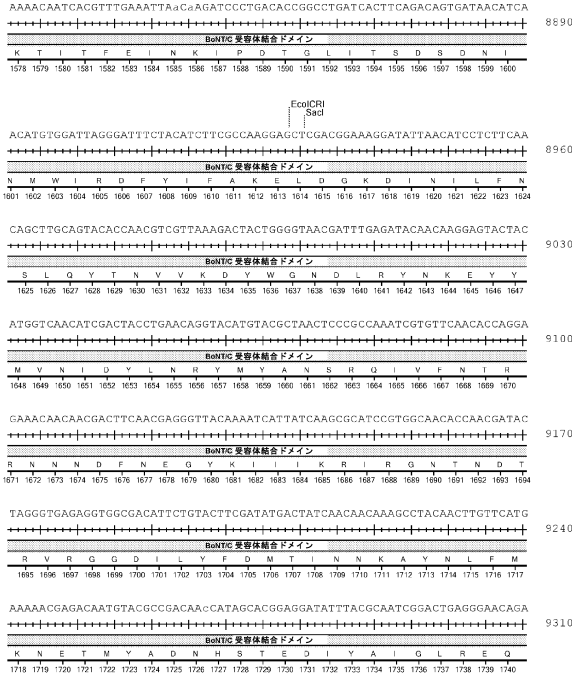
【図５５Ｍ】



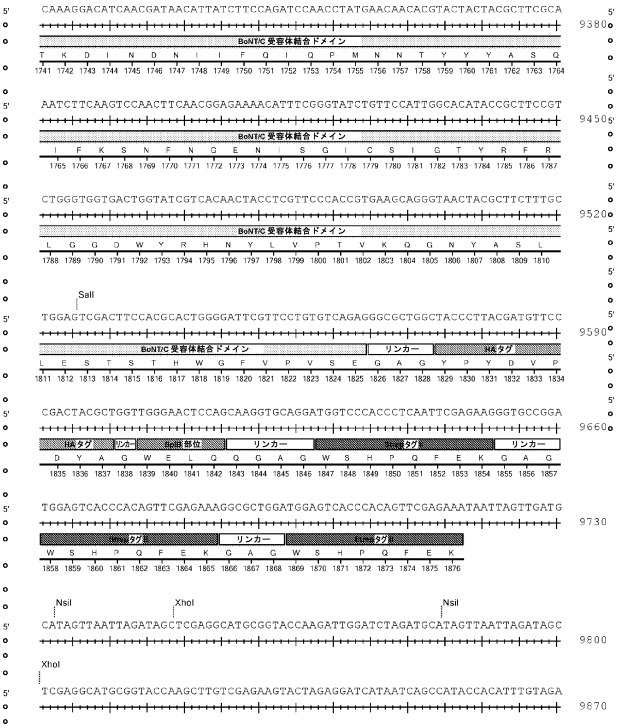
【図５５Ｎ】



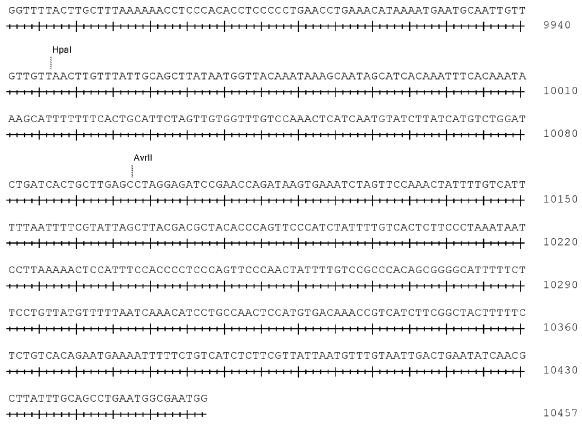
【図５５Ｏ】



【図５５Ｐ】



【図５５Ｑ】



【配列表】

0007017932000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		
C07K	*14/33*	*(2006.01)*	A61P	39/06	
C07K	*16/18*	*(2006.01)*	C07K	14/33	
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	C07K	16/18	
C12N	*1/15*	*(2006.01)*	C07K	19/00	
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/15	
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/19	
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	1/21	
C12P	*21/00*	*(2006.01)*	C12N	5/10	
			C12P	21/00	C

米国(US)
(31)優先権主張番号 62/118,970
(32)優先日 平成27年2月20日(2015.2.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 イクチェンコ コンスタンチン
アメリカ合衆国 １１２０９ ニューヨーク州 ブルックリン セブンティ サード ストリート １８１ アパートメント ４２６
(72)発明者 バスケス‐シントロン エドウィン
アメリカ合衆国 １００１０ ニューヨーク州 ニューヨーク イースト トウェンティ フィフス ストリート ３３４ アパートメント １０９
(72)発明者 バンク フィリップ エイ.
アメリカ合衆国 ０７０５２ ニュージャージー州 ウエスト オレンジ マリオン ドライブ １５１
(72)発明者 カードーゾ ティモシー
アメリカ合衆国 １００１６ ニューヨーク州 ニューヨーク イースト サーティース １３９ ＃２エー
合議体
審判長 長井 啓子
審判官 中島 庸子
吉森 晃
(56)参考文献 米国特許出願公開第２０１１／０２０６６１６号明細書
国際公開第２０１４／０３４１２７号
特表２０１１－５２７１９３号公報
(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
IPC C12N 15/00-15/90
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＥＭＢＡＳＥ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）