

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4991073号  
(P4991073)

(45) 発行日 平成24年8月1日(2012.8.1)

(24) 登録日 平成24年5月11日(2012.5.11)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48 Z N A
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 37/48

請求項の数 12 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-558083 (P2001-558083)  
 (86) (22) 出願日 平成12年12月4日(2000.12.4)  
 (65) 公表番号 特表2003-522199 (P2003-522199A)  
 (43) 公表日 平成15年7月22日(2003.7.22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2000/004644  
 (87) 国際公開番号 W02001/058936  
 (87) 国際公開日 平成13年8月16日(2001.8.16)  
 審査請求日 平成19年12月3日(2007.12.3)  
 (31) 優先権主張番号 9928530.6  
 (32) 優先日 平成11年12月2日(1999.12.2)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)  
 (31) 優先権主張番号 0008658.7  
 (32) 優先日 平成12年4月7日(2000.4.7)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 509039046  
 シンタキシン リミテッド  
 イギリス国 オックスフォードシャー オ  
 ーエックス14 3ワイエス, アビングド  
 ン, パートン レーン, ザ クアドラント  
 , ユニッツ 4-10  
 (74) 代理人 100163647  
 弁理士 進藤 卓也  
 (72) 発明者 ショーン, クリフォード チャールズ  
 イギリス国 エスピー4 Oジェイジ  
 ウィルトシャー, ソールズベリー, ポート  
 ン ダウン (番地なし), シーエイエムア  
 ール, マイクロバイオリジカル リサーチ  
 オーソリティ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経細胞への治療薬の送達のための構築物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリペプチドに連結された治療薬を含む組成物であって、該ポリペプチドが、神経細胞への治療薬の送達のためのものであり、

該神経細胞に結合する結合ドメインであって、ボツリヌス菌神経毒素のH<sub>C</sub>ドメインを含む、結合ドメイン、および

該神経細胞に該治療薬をトランスロケートするトランスロケーションドメインであって、ジフテリア菌毒素のH<sub>N</sub>ドメインを含む、トランスロケーションドメインを含む、組成物。

【請求項2】

ボツリヌス菌B型フラグメント(残基859~1291)またはA型フラグメント(残基872~1296)またはF型フラグメント(残基862~1278)に基づく、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記治療薬が、前記ポリペプチドに化学的に結合されている、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】

前記治療薬が、前記ポリペプチドのトランスロケーションドメインに連結されている、請求項1から3のいずれかに記載の組成物。

【請求項5】

前記治療薬が、酵素、増殖因子、タンパク質、またはペプチドである、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 6】

前記治療薬が、組換え技法によって融合タンパク質として生成される、請求項 4 または 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記治療薬が、遺伝子治療薬またはアンチセンス薬物として有用な核酸である、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 8】

前記核酸が、リボソーム内に含まれるか、あるいはペプチドもしくはタンパク質を介して凝縮しているかまたは化学的カップリング剤を用いる凝縮によって凝縮されている、請求項 7 に記載の組成物。

10

【請求項 9】

前記核酸が、組換えウイルスの形態で存在する、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記ウイルスが、改変された向性を有し、そしてクロストリジウム菌毒素レセプターを介して細胞に形質導入し得る、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

請求項 1 から 10 のいずれかに記載の組成物の製造方法であって、該組成物をコードする核酸を非ヒト宿主細胞中で発現させる工程を含む、方法。

20

【請求項 12】

神経細胞に関連する疾患状態の治療において用いられる組成物であって、請求項 1 から 10 のいずれかに記載の組成物を含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、神経細胞へ治療物質を送達するための構築物、その製造および使用、ならびに、特に、クロストリジウム菌神経毒素に基づく構築物に関する。

【0002】

現在、中枢神経系の主な障害に対して有効な治療法はほとんどない。このような障害には、神経変性疾患、発作、てんかん、脳腫瘍、感染症、および HIV 脳症が含まれ、これらの疾患の罹患者は癌および心臓疾患の罹患者よりはるかに多数である。発作および神経変性疾患のような CNS 障害の罹患者数は、特に人口の平均年齢が上昇している発展途上国において、増加している。脳薬理学の知識が増加し、そしてその基礎となる病理学が解明されるにつれて、可能性のある治療方法が明らかになる。しかし、これらの治療はすべて、関連する種々の神経細胞集団への治療剤の効率的な送達についての膨大な問題に直面する。したがって、薬物、酵素、増殖因子、治療ペプチド、および遺伝子を含む広範囲の治療物質について、神経細胞に効率的に送達し得るベクターが必要とされる。

30

【0003】

発作または損傷によって誘導される虚血/再灌流損傷は、1つの顕著な例であり、治療薬の迅速かつ効率的な送達は、かなり有益である。外傷または虚血によって損傷したニューロンは、上昇したレベルの酸素フリーラジカルを生じ、そして大量のグルタミン酸塩を放出する。これらの物質は、高濃度では、ニューロンおよび周辺細胞の両方に毒性であり、傷害プロセスを強化および増幅する。これらの毒性物質のレベルを減少させるスーパーオキシドジスムターゼまたはグルタミンシンターゼのような薬剤は、種々のインビトロおよびインビボ虚血モデルにおいて神経細胞死を減少させることが示されている (Gorovits ら, PNAS (1997) 94, 7024-7029; Francis ら, Experimental Neurology (1997) 146, 435-443; Lim ら, Ann. Thorac. Surg. (1986) 42, 282-286; Cuevas ら, Acta Anat. (1990) 137, 303-310)。このような治療の使用における主な問題は、外傷部位への有用な濃度の活性薬剤の送達である。したがって、特異的な神経ベクターは、神経細胞にこのような化合物をターゲティングすることに重要な役割を果たし得る。

40

50

## 【 0 0 0 4 】

運動ニューロン疾患のような末梢神経系障害は、治療薬のターゲティングされた送達に有益である疾患のさらなる例である。このような治療は、遺伝子治療方法による薬物送達またはDNA送達の形態を取り得る。

## 【 0 0 0 5 】

遺伝子治療は、パーキンソン病およびアルツハイマー病のような神経変性疾患の治療にかなり有望である。現在利用可能なウイルスおよび非ウイルス遺伝子送達ベクターのほとんどは組織特異性がなく、使用の効率および安全性の両方を減少させる。したがって、発現される神経疾患に対する有効な治療を可能にするために、広範囲の遺伝子ベクターに適切な神経細胞特異的のターゲティングリガンドが、必要とされる。

10

## 【 0 0 0 6 】

ボツリヌス菌神経毒素は、タンパク質毒素のファミリーであり、その一次作用部位は神経筋接合部であり、その部位で伝達物質であるアセチルコリンの放出をブロックする。ヒトおよび動物の末梢神経系におけるこれらの毒素の作用は、ボツリヌス中毒症候群を引き起こし、これは広範な弛緩性筋肉麻痺によって特徴づけられる (Shone (1986) 「Natural Toxicants in Foods」, D. Watson編, Ellis Harwood, UK)。各ボツリヌス菌神経毒素は、2つのジスルフィド結合したサブユニットからなる；神経毒素の最初の結合および神経終末へのインターナライゼーションに役割を果たす100kDaの重いサブユニット (Dollyら (1984) Nature, 307, 457-460) およびエキソサイトーシス過程をブロックするように細胞内で作用する50kDaの軽いサブユニット (McInnesおよびDolly (1990) Febs Lett., 261, 323-326 ; de PaivaおよびDolly (1990) Febs Lett., 277, 171-174)。

20

## 【 0 0 0 7 】

クロストリジウム菌神経毒素は、神経細胞におけるカルシウム依存的神経伝達物質分泌の強力なインヒビターである。これらは、現在、神経伝達物質分泌の小胞ドッキングおよび膜融合事象の中心にある、3つの小胞またはシナプス前膜結合タンパク質であるVAMP、シンタキシン、またはSNAP-25の少なくとも1つの特異的なタンパク質内切断によってこの活性を媒介すると考えられる。破傷風菌神経毒素およびボツリヌス菌神経毒素の神経細胞ターゲティングは、レセプター媒介事象であると考えられ、その後、毒素は、インターナライズされ、そして続いて適切な細胞内コンパートメントに移り、そこでエンドペプチダーゼ活性を発揮する。

30

## 【 0 0 0 8 】

クロストリジウム菌神経毒素は、レセプター結合およびトランスロケーションH鎖 (HC、約100kDa) にジスルフィド結合した触媒L鎖 (LC、約50kDa) の共通の構成物を有する。HCポリペプチドは、2つの異なる機能的ドメインのすべてまたは一部を含むと考えられる。HCドメインと命名したHCのカルボキシ末端半分 (約50kDa) は、標的ニューロンにおける細胞表面レセプターへの神経毒素の高親和性の神経特異的結合に関連し、一方、HNドメインと命名したアミノ末端半分 (約50kDa) は、神経毒素の少なくともいくつかの部分の細胞膜を横切るトランスロケーションを媒介すると考えられ、そのためLCの機能的活性がターゲット細胞内で発現される。HNドメインはまた、低pH条件下で脂質膜においてイオン透過性チャネルを形成する特性を有し、そしてこれは、いくつかの様式で、そのトランスロケーション機能に関連し得る。ボツリヌス菌神経毒素A型 (BoNT/A) については、これらのドメインは、HCについてはアミノ酸残基872~1296、HNについてはアミノ酸残基449~871、およびLCについては残基1~448内にあると考えられる。

40

## 【 0 0 0 9 】

したがって、神経毒素分子内のドメインの機能的定義を、以下のように提供することができる：

## 【 0 0 1 0 】

(A) クロストリジウム菌神経毒素軽鎖：

エキソサイトーシス過程に関連する小胞および/または形質膜結合タンパク質に高い基質

50

特異性を示す、メタロプロテアーゼ。特に、これは、SNAP-25、VAMP (シナプトブレビン / セルブレビン)、およびシンタキシンの1つ以上を切断する。

【0011】

(B) クロストリジウム菌神経毒素重鎖 $H_N$ ドメイン:

軽鎖活性の機能的発現が標的細胞内で起きるような、神経毒素分子の一部のトランスロケーションを可能にする重鎖の一部。

【0012】

結合ドメインを介して神経毒素がその特異的細胞表面レセプターへ結合した後、標的細胞へのエンドペプチダーゼ活性のトランスロケーションの原因となるドメイン。

【0013】

低pH条件下で脂質膜においてイオン透過性孔の形成の原因となるドメイン。

【0014】

(C) クロストリジウム菌神経毒素重鎖 $H_C$ ドメイン:

細胞への毒素のインターナリゼーションの前の、クロストリジウム菌毒素の中毒作用に関連する細胞表面レセプターへの天然のホロ毒素の結合の原因である重鎖の一部。

【0015】

これらの毒素に対する細胞認識マーカーの同一性は、現在理解されておらず、そして特異的レセプター種はまだ同定されていないが、Kozakiらは、シナプトタグミンがボツリヌス菌神経毒素B型に対するレセプターであり得ることを報告している。神経毒素のそれぞれが異なるレセプターを有するようである。

【0016】

破傷風菌毒素は、ボツリヌス菌神経毒素と構造的に非常に類似するが、その一次作用部位は中枢神経系であり、そこで中枢シナプス(レンショウ細胞)からの抑制性神経伝達物質の放出をブロックする。

【0017】

7つの血清型のほとんどに由来する破傷風菌神経毒素およびボツリヌス菌神経毒素は、それらに由来する重鎖とともに、nMの範囲の高い親和性で多様な神経細胞型、例えば、ボツリヌス菌B型神経毒素と結合することが示されている(Evansら, (1986) Eur. J. Biochem. 154, 409-416)。

【0018】

しかし、送達ベクターとしての天然のクロストリジウム菌重鎖フラグメントの使用のための主な障害は、溶液中での非常に凝集した状態が、生体組織中への適切な拡散を抑制し、そのためターゲティングベクターとしての効率を減少させることである。治療剤用の神経ターゲティングリガンドとしての天然の破傷風菌毒素フラグメントの提案されたあらゆる臨床的使用でのさらに重大な問題は、破傷風に対して免疫されている集団の大多数における毒素に対する循環抗体の存在である。これらの抗体の存在は、破傷風菌毒素フラグメントに基づく構築物の有効性を減少させるようである。したがって、クロストリジウム菌神経毒素フラグメントは、確認された問題に対する解決を提供しない。

【0019】

本発明は、クロストリジウム菌神経毒素に基づく治療組成物を使用することにおける実際の困難性の発見、および上記の欠点を避けるクロストリジウム菌神経毒素フラグメントに基づく改変ポリペプチドおよびハイブリッドポリペプチドの発明に基づく。

【0020】

したがって、本発明の第1の局面は、神経細胞への治療薬の送達のための、非毒性ポリペプチドを提供し、これは、

該神経細胞に結合する結合ドメイン、および

該神経細胞に該治療薬をトランスロケートするトランスロケーションドメインを含み、該トランスロケーションドメインは、クロストリジウム菌神経毒素の $H_N$ ドメインではなく、そしてクロストリジウム菌毒素の $H_N$ ドメインのフラグメントまたは誘導体ではない。

【0021】

10

20

30

40

50

結合ドメインは、クロストリジウム菌重鎖フラグメントまたは改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントを適切に含むまたはこれらに由来する。本明細書では、用語「改変クロストリジウム菌重鎖フラグメント」とは、ボツリヌス菌神経毒素または破傷風菌神経毒素の対応する重鎖に類似の生物学的機能を保持するが、対応する重鎖と比較してそのアミノ酸配列および他の特性が異なる、ポリペプチドフラグメントを意味する。本発明は、より詳細には、ボツリヌス菌神経毒素および破傷風菌神経毒素に由来するフラグメントに基づくこのような構築物を提供する。

【0022】

さらなる局面では、本発明はまた、神経細胞への治療薬の送達のための、ポリペプチドを提供し、これは、

10

該神経細胞に結合する結合ドメイン、および

該神経細胞に該治療薬をトランスロケートするトランスロケーションドメインを含み、該得られるポリペプチド構築物は非凝集性である。

【0023】

構築物が凝集性のものであるかどうかは、通常、構築物の溶解性の欠如から明らかであり、そしてこれは、水性媒体中での構築物の簡単な目視検査によってわかり得る：非凝集性ドメインは、部分的にまたは好ましくは全体的に可溶性の本発明の構築物を生じるが、凝集性ドメインは、単一のポリペプチドのサイズの数十倍または数百倍の見かけのサイズを有するポリペプチドの非可溶性凝集体を生じる。一般的に、構築物は、ゲル電気泳動でのサイズによって測定される場合に非凝集性であるべきであり、そして測定が生理学的条件を用いて天然PAGE上で適切に行われる場合、測定される構築物のサイズまたは見かけのサイズは、好ましくは、 $5.0 \times 10^5$  ダルトンより小さく、より好ましくは  $1.5 \times 10^5$  ダルトンより小さい。

20

【0024】

本発明のさらなる局面は、神経細胞への治療薬の送達のための、ポリペプチドを提供し、これは、

該神経細胞に結合する結合ドメイン、および

該神経細胞に該治療薬をトランスロケートするトランスロケーションドメインを含み、該トランスロケーションドメインは、(1)ジフテリア菌毒素のH<sub>N</sub>ドメイン、(2)ジフテリア菌毒素のH<sub>N</sub>ドメインのトランスロケーション活性を実質的に保持する(1)のフラグメントまたは誘導体、(3)融合性ペプチド、(4)膜破壊ペプチド、(5)ボツリヌス菌毒素C<sub>2</sub>由来のH<sub>N</sub>、および(6)(3)、(4)、および(5)のトランスロケーションフラグメントおよび誘導体から選択される。

30

【0025】

ボツリヌス菌毒素C<sub>2</sub>は、神経特異性を有さないので神経毒素ではなく、その代わりにエンテロトキシンでありそして非凝集性トランスロケーションドメインを提供するために本発明における使用に適切であることに留意すべきである。

【0026】

本発明のよりさらなる局面は、神経細胞への治療薬の送達のための、ポリペプチドを提供し、これは、

40

該神経細胞に結合する結合ドメイン、および

該神経細胞に該治療薬をトランスロケートするトランスロケーションドメインを含み、該ポリペプチドは、天然の破傷風菌毒素重鎖の中和抗体への親和性と比較して破傷風菌毒素に対する中和抗体への親和性が減少している。

【0027】

上記の局面は、本発明のポリペプチドによって単一でまたはいくつか組み合わせて示され得、したがって、本発明の代表的な好ましいポリペプチドは、(i)ボツリヌス菌毒素および破傷風菌毒素の神経毒性活性がなく、(ii)クロストリジウム菌神経毒素の神経細胞への親和性に対応する神経細胞の高い親和性を提示し、(iii)細胞膜を横切ってトランスロケーションをもたらし得るドメインを含み、そして(iv)生理学的緩衝液中でボツリ

50

ヌス菌毒素または破傷風菌毒素由来の対応する重鎖よりも凝集していない状態で存在する。

【0028】

本発明のポリペプチドの顕著な利点は、それらの非凝集状態であり、したがって、従来技術の構築物になし得なかった可溶性ポリペプチドとして使用可能になり、そしてクロストリジウム菌神経毒素に基づく従来の構築物の欠点を全部ではないとしてもほとんど克服している。

【0029】

本発明のポリペプチドには、一般的に、ボツリヌス菌神経毒素および破傷風菌神経毒素のH<sub>c</sub>ドメインに由来する配列が含まれ、そしてこれらは、他のタンパク質由来の機能的ドメインと組み合わせられ、そのため、神経細胞に結合する、天然の重鎖の必須の機能が保持される。したがって、例えば、ボツリヌス菌F型神経毒素のH<sub>c</sub>ドメインは、ジフテリア菌毒素由来のトランスロケーションドメインに融合されて、改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントを得る。驚くべきことに、このようなポリペプチドは、天然のクロストリジウム菌重鎖よりも、神経細胞に物質を送達するための構築物として有用である。

【0030】

したがって、本発明の好ましい局面によれば、(a)ボツリヌス菌神経毒素または破傷風菌神経毒素のH<sub>c</sub>フラグメントに基づくサブ配列、および(b)例えば、ジフテリア菌毒素に由来するトランスロケーションドメインに基づく、クロストリジウム菌神経毒素に由来しない、サブ配列、を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドが提供され、そして、このポリペプチドは、(i)ボツリヌス菌毒素および破傷風菌毒素の神経毒素活性がなく、(ii)神経細胞に対して高親和性を提示し、(iii)細胞膜を横切ってトランスロケーションをもたらし得るドメインを含み、そして(iv)生理学的緩衝液中でボツリヌス菌毒素または破傷風菌毒素の対応する重鎖よりも凝集していない状態で存在する。

【0031】

改変クロストリジウム菌重鎖は、クロストリジウム菌神経毒素の結合ドメイン(H<sub>c</sub>ドメイン)と非クロストリジウム菌トランスロケーションドメインとを組み合わせることによって、適切に生成される。したがって、例えば、改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントは、ボツリヌス菌毒素のH<sub>c</sub>ドメイン(例えば、F型H<sub>c</sub>フラグメント、残基865~1278; A型H<sub>c</sub>フラグメント、残基872~1296)に融合したジフテリア菌毒素のトランスロケーションドメイン(残基194~386)から構築され得る。

【0032】

本発明の他の実施態様では、改変クロストリジウム菌重鎖は、クロストリジウム菌神経毒素のH<sub>c</sub>ドメインとトランスロケーションドメインとして機能する膜破壊ペプチド、適切にはウイルスペプチドとを組み合わせることによって生成される。したがって、例えば、改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントは、ボツリヌス菌毒素のH<sub>c</sub>ドメインとインフルエンザウイルス血球凝集素HA2に基づくペプチド(残基1~23)とを組み合わせることによって構築され得る。

【0033】

本発明のポリペプチドは、神経ターゲティングリガンドとして有用にする特性を有し;これらは、非毒性であるがボツリヌス菌毒素または破傷風菌毒素によって提示される神経細胞への特異的な高親和性結合を保持する。しかし、天然のクロストリジウム菌重鎖とは異なって、改変クロストリジウム菌重鎖は、溶液中であまり凝集していない状態で存在し、神経細胞への接近を改善する。好ましい構築物は、従来技術の構築物の非常に凝集した状態とは反対に、水溶液に可溶性である。

【0034】

本発明の他の局面では、改変破傷風菌重鎖フラグメントが提供され、これは、上で定義された改変重鎖の特性の他に、抗破傷風菌接種の結果として存在する中和抗体に対する親和性が、天然の破傷風菌毒素重鎖と比較して減少するという利点が付加されている。本発明のこの局面によれば、ポリペプチドは、一般的に、破傷風菌毒素の重鎖に由来するサブ配

10

20

30

40

50

列（残基 458 ~ 1315）を含み、そして、破傷風菌毒素の免疫原性の原因であるエピトープが、必要に応じて減少または除去されている。したがって、例えば、H<sub>C</sub>ドメインと関連した免疫原性エピトープならびにH<sub>N</sub>ドメインのエピトープを排除することが所望される。少数のアミノ酸（例えば、20未満または好ましくは10未満のアミノ酸）を欠失することによってエピトープを排除することが可能であるが、破傷風菌毒素重鎖の免疫原性に関連するエピトープが、多数のアミノ酸残基（例えば、少なくとも100、少なくとも200、および好ましくは400以上の残基）を他の毒素由来のアミノ酸配列に置換することによってより大きく減少され得ることが見出されている。

【0035】

したがって、改変破傷風菌重鎖に関する本発明の好ましい局面によれば、（a）非クロストリジウム菌ソース（例えば、ジフテリア菌毒素）由来のH<sub>N</sub>ドメイン、（b）ボツリヌス菌H<sub>C</sub>の配列に由来する1以上のサブ配列、および（c）破傷風菌毒素H<sub>C</sub>の配列に由来する1以上のサブ配列、を含む、アミノ酸配列を有するポリペプチドが提供され、そして、このポリペプチドは、（i）ボツリヌス菌毒素および破傷風菌毒素の神経毒素活性がなく、（ii）破傷風菌神経毒素の神経結合に対応する神経細胞への高親和性を提示し、（iii）細胞膜を横切ってトランスロケーションをもたらす得るドメインを含み、そして（iv）抗破傷風菌接種の結果として存在する破傷風菌毒素に対する中和抗体への低親和性を有する。

10

【0036】

この後者の改変破傷風菌重鎖フラグメントは、破傷風菌神経毒素の結合ドメイン（H<sub>C</sub>ドメイン）と非クロストリジウム菌トランスロケーションドメインとを組み合わせることによって生成され得る。したがって、例えば、改変破傷風菌重鎖フラグメントは、破傷風菌毒素のH<sub>C</sub>ドメイン（残基 865 ~ 1315）に融合したジフテリア菌毒素のトランスロケーションドメイン（残基 194 ~ 386）から構築され得る。

20

【0037】

本発明の他の実施態様では、改変破傷風菌重鎖は、ボツリヌス菌毒素のH<sub>C</sub>ドメインに融合した非クロストリジウム菌トランスロケーションドメインに由来し、そこに、破傷風菌毒素の最小ドメインが挿入されて、生じたハイブリッド上に破傷風菌毒素様結合活性を与える。したがって、例えば、改変破傷風菌重鎖は、ボツリヌス菌F型フラグメントのH<sub>C</sub>ドメイン（残基 865 ~ 1278）に融合したジフテリア菌毒素のトランスロケーションドメイン（残基 194 ~ 386）から構築され得、そこで、H<sub>C</sub>ドメインの残基 1097 ~ 1273は、破傷風菌毒素由来の相同配列によって置換されている。

30

【0038】

改変破傷風菌重鎖は、神経ターゲティングリガンドとして有用にする特性を有し；これらは、非毒性であるが破傷風菌毒素によって提示される神経細胞への特異的な高親和性結合を保持する。しかし、天然の破傷風菌毒素結合フラグメントとは異なって、改変クロストリジウム菌結合フラグメントは、より臨床的に有用にする種々の免疫原性特性を有する。詳細には、本発明の改変クロストリジウム菌結合フラグメントの異なる免疫原性特性は、天然の破傷風菌毒素配列に対する現存する抗体によって引き起こされる問題を顕著に減少させる。

40

【0039】

ボツリヌス菌神経毒素に基づく改変重鎖を神経ターゲティングリガンドとして使用することは、予め存在する循環抗体の問題にわずらわされないが、破傷風菌毒素は、抑制性ニューロン（例えば、レンショウ細胞）に対して選択性を有するという点で、クロストリジウム菌毒素の中でも独特であり、そしてこのように、改変破傷風菌毒素重鎖は、このクラスのニューロンに対して価値のあるターゲティングリガンドである。破傷風菌毒素はまた、末梢から中枢神経系まで輸送を逆行し得るという特性を有する。

【0040】

本発明の他の実施態様では、改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントは、トランスロケーションドメインのN末端を介してリンカーペプチドに融合され、そこにポリペプチドペ

50

イロードが付着され得る。このようなリンカーペプチドの1例は、配列CGLVPAGSGP（配列番号1）であり、これは、トロンビンプロテアーゼ切断部位およびジスルフィド架橋形成のためのシステイン残基を含む。このようなペプチドリンカーは、リンカーペプチドによって改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントのN末端に融合されたポリペプチド治療分子を含む組換え融合タンパク質を生成させる。次いで、後者の一本鎖融合タンパク質は、二本鎖タンパク質を得るためにトロンビンで処理され得、そこでポリペプチド治療剤は、ジスルフィド結合によって改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントのトランスロケーションドメインに連結される。例えば、トランスロケーションドメインが融合性ペプチドである場合のように、トランスロケーションドメインがそのC末端近くの遊離のシステイン残基を含まないリンカーペプチドの他の例では、リンカーペプチドは、ジスルフィド架橋に必要とされる両方のシステイン残基を含む。後者のリンカーペプチドの1例は、アミノ酸配列：CGLVPAGSGPSAGSSAC（配列番号2）である。

10

**【0041】**

本発明の他の実施態様では、改変クロストリジウム菌重鎖は、神経細胞に送達される場合に治療的有益性を有する、酵素、増殖因子、タンパク質、またはペプチドであり得るポリペプチドに連結される。ポリペプチドは、化学的手段によって改変クロストリジウム菌重鎖に連結され得る。あるいは、ポリペプチドは、上記のようにリンカーペプチドを使用する組換え技法によって、改変クロストリジウム菌結合フラグメントに連結された融合タンパク質として生成され得る。このような例では、構築物は、以下の成分を含む：

20

ポリペプチド治療物質；

リンカーペプチド；および

改変クロストリジウム菌重鎖。

**【0042】**

ポリペプチド治療ペイロードの1例は、スーパーオキシドジスムターゼである。

**【0043】**

本発明のさらに他の実施態様では、改変クロストリジウム菌重鎖は、DNAに直接的または間接的に連結され、そのため、構築物は、例えば、破傷風菌毒素に対するレセプターを介して、神経細胞にDNAを送達し得る。このような構築物は、遺伝子治療適用性を有し、そして細胞で選択された遺伝子のスイッチを入れるまたは切るために使用される。DNAは、リボソーム内に含まれ得るか、あるいはペプチドまたはタンパク質を介して凝縮され得る。改変クロストリジウム菌重鎖は、化学的カップリング剤によってDNA凝縮をもたらすタンパク質に化学的に連結され得る。あるいは、改変クロストリジウム菌重鎖は、組換え技法によって、DNAの凝縮をもたらし得るペプチドとの融合タンパク質として生成され得る。

30

**【0044】**

本発明のさらに他の実施態様では、改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントは、組換えウイルスに連結され得、そのため、改変されたウイルスは、改変された向性を有し、そして破傷風菌毒素レセプターを介して細胞に形質導入し得る。このような構築物は、神経細胞内で選択された遺伝子のスイッチを入れるまたは切ることによって遺伝子欠失を修正するために使用される。改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントは、化学架橋剤を用いてウイルスの表面に直接的に連結され得る。あるいは、改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントは、ウイルスに特異的に結合する抗体を介して組換えウイルスに連結され得る。この場合、改変クロストリジウム菌結合フラグメントは、ウイルス表面上のマーカースを特異的に認識するポリクローナルまたはモノクローナル抗体に化学的にカップリングされる。類似の改変クロストリジウム菌結合フラグメント - 抗体融合タンパク質は、組換え技法によって生成され得、そこでは、抗体成分は、組換え一本鎖抗体である。

40

**【0045】**

本発明のさらに他の実施態様では、改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントは、適切なポリマーから構築され得るマイクロパーティクルなどの薬物放出システムに連結される。これらのポリマーとしては、例えば、ラクチド - グリコリド共重合体、ポリヒドロキシル

50



アルコネート、コラーゲン、ジビニルエーテル - 無水マレイン酸共重合体、スチレン - 無水マレイン酸共重合体) またはこのようなマイクロパーティクルに有用な他のポリマーが挙げられる。改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントは、共有化学結合、または静電もしくは疎水力によって、薬物放出システムに連結され得る。改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントはまた、改変クロストリジウム菌結合フラグメントの一部が表面で露出されるならば、治療ペイロードとともに放出ベヒクル内にカプセルで包まれ得る。あるいは、改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントは、NまたはC末端のいずれかで、ペプチドまたはタンパク質に連結されて、薬物放出システムへのフラグメントのカップリングを容易にし得る。

【 0 0 4 6 】

他の方法が公知であり、それにより、種々の確立された化学的架橋技法を用いて、改変重鎖結合フラグメントがある範囲の治療物質に連結され得、そして改変クロストリジウム菌結合フラグメントおよび他のポリペプチドを含む種々の融合タンパク質が生成され得る。これらの技法を用いて、種々の物質が、改変クロストリジウム菌結合フラグメントを用いて神経細胞にターゲティングされ得る。神経送達ベクターとしての改変クロストリジウム菌結合フラグメントの可能性のある使用の例を、以下の表 1 に詳細に示す。

【 0 0 4 7 】

【 表 1 】

改変クロストリジウム菌結合フラグメントの可能性のある治療使用の例

治療物質またはエフェクター	作用の部位およびメカニズム	可能性のある臨床効果	
<b>(a) 酵素:</b>			
スーパーオキシドジスムターゼ	脳または脊髄の発作／損傷後に酸化ストレスを減少させる	虚血／再灌流後の神経傷害の減少	10
グルタミンシンセターゼ	脳または脊髄の発作／損傷後に過剰のグルタミン酸による傷害を減少させる	虚血／再灌流後の神経傷害の減少	
<b>(b) 抗体:</b>			
抗破傷風菌毒素	脊髄での破傷風菌毒素の作用を中和する	破傷風菌毒素による中毒の効果を逆転させる	
抗SNAREタンパク質(例えば、SNAP-25、VAMP、シンタキシン)	神経伝達物質放出を調節する	分泌亢進障害	20
<b>(c) ウイルス/DNA</b>			
ウイルス遺伝子治療ベクター(例えば、アデノウイルス、単純ヘルペスなど)	CNS内の欠損遺伝子の置換	神経変性疾患(パーキンソン病、アルツハイマー病、ALSなど)および他の神経疾患の治療	
遺伝子治療のための非ウイルスベクター(例えば、リポソーム)	CNS内の欠損遺伝子の置換	神経変性疾患および他の神経疾患の治療	30
<b>(d) 増殖因子</b>			
例えば、BDNF、CTNF、NGF	増殖因子を脳および脊髄に送達する	神経変性疾患の治療、傷害後の神経増殖の促進	
<b>(e) 抗ウイルス剤</b>			
	抗ウイルス剤を脳または脊髄ニューロンに送達する	神経細胞内の潜在的ウイルス感染、例えば、HIV、単純ヘルペス感染の治療	
<b>(f) 抗癌剤</b>			
	細胞傷害性薬剤をCNSの腫瘍性細胞に送達する	神経腫瘍形成の治療	40

【 0 0 4 8 】

本発明の構築物は、当該技術分野で公知の方法を用いて神経組織または非神経組織のいずれかに導入され得る。神経細胞組織へのその後の特異的結合によって、ターゲティングされた構築物は、その治療効果を発揮する。理想的には、構築物は、治療介入を必要とする部位の近くに注入される。

【 0 0 4 9 】

本発明の構築物は、治療物質の適応および特性に依存して、懸濁液、乳化液、溶液、または凍結乾燥粉末として生成され得る。本発明の構築物は、適応に応じて種々の薬学的に受

容可能な液体に再懸濁または希釈され得る。

【0050】

「クロストリジウム菌神経毒素」とは、破傷風菌神経毒素または7つのボツリヌス菌神経毒素のうちの一つのいずれかを意味し、後者は、血清型A型、B型、C<sub>1</sub>型、D型、E型、F型、またはG型と命名されている。

【0051】

「改変クロストリジウム菌重鎖フラグメント」とは、ボツリヌス菌毒素または破傷風菌毒素に由来する対応する重鎖と同様に神経細胞レセプターに結合するが、破傷風菌毒素由来の対応するフラグメントと比較してそのアミノ酸配列および特性が異なるポリペプチドフラグメントを意味する。

【0052】

ボツリヌス菌および破傷風菌の重鎖フラグメントに関して「結合する」とは、クロストリジウム菌フラグメントと、細胞表面上の結合フラグメントの局在化を生じる1以上の細胞表面レセプターまたはマーカ-との間の特異的相互作用を意味する。クロストリジウム菌神経毒素の場合、所定の血清型のフラグメントと同様に「結合」し得るフラグメントの特性は、リガンドと天然の毒素との間の神経細胞レセプターに対する競合によって証明され得る。

【0053】

「クロストリジウム菌神経毒素に対応する神経細胞に特異的な高親和性結合」とは、所定の神経毒素の特異的結合に関連する神経細胞の細胞表面レセプターに、リガンドが強力に結合する能力をいう。所定のリガンドがこれらの細胞表面レセプターに強力に結合する能力は、従来の競合結合アッセイを用いて評価され得る。このようなアッセイにおいては、放射標識されたクロストリジウム菌神経毒素を、種々の濃度の非放射標識リガンドの存在下で神経細胞と接触させる。リガンド混合物を、低温(0~3℃)で細胞とインキュベートして、リガンドインターナリゼーションを抑制し、その間、放射標識されたクロストリジウム菌神経毒素と非標識リガンドとの競合が起こり得る。このようなアッセイにおいて、使用される非標識リガンドが標識された神経毒素と同じ場合、非標識神経毒素の濃度が上昇するにつれて、放射標識されたクロストリジウム菌神経毒素は、神経細胞レセプターから置換される。したがって、この場合に得られる競合曲線は、リガンドの行動を代表し、これは、本明細書で使用されるように、「クロストリジウム菌神経毒素に対応する神経細胞への高親和性結合特異性」を示す。

【0054】

「トランスロケーションドメイン」とは、膜または脂質二重層を横切って、それ自体および/または他のタンパク質および物質を輸送する、タンパク質のドメインまたはフラグメントを意味する。脂質二重層の膜は、レセプター媒介されるエンドサイトーシスのプロセス中にトランスロケーションが起こるエンドソームの膜であり得る。トランスロケーションドメインは、低pHで脂質膜中に測定可能な孔を形成し得る特性によってしばしば同定され得る(Shoneら, Eur J. Biochem. 167, 175-180)。トランスロケーションドメインの例を、以下の図1により詳細に記載する。本出願において、トランスロケーションドメインは、しばしば「H<sub>N</sub>ドメイン」という。

【0055】

トランスロケーションドメインに関して「トランスロケーション」とは、細胞表面への結合後に起こるインターナリゼーション事象を意味する。これらの事象は、神経細胞のサイトゾルへ物質を輸送させる。

【0056】

「治療物質」または「治療薬」とは、改変クロストリジウム菌結合フラグメントによって送達される場合、神経疾患の治療に有益である、任意の物質、薬剤、またはそれらの混合物を意味する。これらの例としては、薬物、増殖因子、酵素、および種々の形態にパッケージされたDNA(例えば、改変されたウイルス、カチオン性リポソーム、および凝縮されたDNA)が挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 7 】

本発明では、宿主中でポリペプチドをコードする核酸を発現することによって本発明のポリペプチドを製造する方法、ならびに神経細胞に関連する疾患状態の治療における本発明によるポリペプチドまたは組成物の使用も提供される。

## 【 0 0 5 8 】

本発明は、以下の特定の実施態様および添付の図面で説明される。

## 【 0 0 5 9 】

より詳細には、図 1 は、改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントを組み込む本発明の実施態様の例を示す。

## 【 0 0 6 0 】

結合ドメインは、クロストリジウム菌神経毒素の配列に由来する：

- ( a ) H<sub>c</sub> ドメイン、例えば、
- B o N T / A 残基 8 7 2 ~ 1 2 9 6
- B o N T / B 残基 8 5 9 ~ 1 2 9 1
- B o N T / C 残基 8 6 7 ~ 1 2 9 1
- B o N T / D 残基 8 6 3 ~ 1 2 7 6
- B o N T / E 残基 8 4 6 ~ 1 2 5 2
- B o N T / F 残基 8 6 5 ~ 1 2 7 8
- B o N T / G 残基 8 6 4 ~ 1 2 9 7
- 破傷風菌残基 8 8 0 ~ 1 3 1 5

- ( b ) ハイブリッド H<sub>c</sub> ドメイン、例えば、
- B o N T / F の H<sub>c</sub> ドメインと破傷風菌とのハイブリッド
- ( c ) 短縮型 H<sub>c</sub> ドメイン。

## 【 0 0 6 1 】

トランスロケーションドメインは、多くのソースに由来し得る：

- ( a ) 細菌毒素、例えば、ジフテリア菌毒素フラグメント B ( 残基 1 9 4 ~ 3 8 6 )
- ( b ) ウイルス融合性ペプチド、例えば、インフルエンザウイルス血球凝集素 H A - 2 由来
- ( c ) 合成の膜破壊ペプチド ( 例えば、Plankら, J. Biol. Chem., 269, 12918-12924 )

## 【 0 0 6 2 】

図 2 は、精製ペプチドタグおよび特異的プロテアーゼ切断部位の位置を示す組換え改変クロストリジウム菌重鎖フラグメント融合タンパク質の例を示す ( 適切なプロテアーゼでの処理によって、精製ペプチドタグは、改変クロストリジウム菌結合フラグメントから除去され得る ) 。

## 【 0 0 6 3 】

精製ペプチドタグの例は、以下のとおりである：

- H i s 6
- S ペプチド
- T 7 ペプチド
- カルモジュリン結合ペプチド
- マルトース結合タンパク質。

## 【 0 0 6 4 】

特異的プロテアーゼ切断部位の例は以下のとおりである：

- トロンピン
- エンテロキナーゼ
- 第 X 因子。

## 【 0 0 6 5 】

## 【 実施例 1 】

組換え改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントの調製および精製

10

20

30

40

50

標準的な分子生物学プロトコルを、すべての遺伝子操作に用いた（例えば、Sambrookら、1989、Molecular Cloning a Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York）。C. botulinum F型由来のボツリヌス菌毒素のH<sub>C</sub>領域（残基865～1278）および破傷風菌毒素のH<sub>C</sub>領域（残基880～1315）をコードする完全合成遺伝子を、所望の配列を含む自己プライミングオリゴヌクレオチドを用いる回帰PCR反応（ProdromouおよびPearl 1992、Protein Engineering、5: 827-829）を使用して生成した。コドンバイアスとGC/A/T塩基との比を、E. coliにおける発現を容易にするために調整した。フラグメントを、pLitmus 38（New England Biolabs、Inc.、Beverly、MA）中に連続的にクローニングして、遺伝子全体をアセンブルした。発現用の構築物をpMALc2（NEB）にサブクローニングしてBamH1-EcoR1フラグメントを置換した。ライゲーション反応物を、E. coli JM109（Promega）中に形質転換した。

10

## 【0066】

プラスミドDNAを増幅し、精製し、そして適切な配列の存在についてスクリーニングした（Ausubelら、1989、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、New York）。正確な配列を有することが確認された遺伝子構築物を、次いで、発現宿主E. coli BL21（DE3）に形質転換した（StudierおよびMoffatt 1986、Journal of Molecular Biology、189: 113-130）。

## 【0067】

アフィニティー精製タグおよびこれらのアフィニティータグのその後の除去のための1以上の特異的プロテアーゼ部位を付加するための追加の配列も、遺伝子産物のリーディングフレームに含んだ。

20

## 【0068】

pMALで発現される、アミノ末端マルトース結合タンパク質タグを有する組換えタンパク質を生成して、アミロース樹脂でのアフィニティークロマトグラフィーによってタンパク質を精製した。簡単にいえば、E. coli BL21（DE3）pMALc2-H<sub>C</sub>の培養物を、Terrificプロス-アンピシリン（100 μg/ml）-カナマイシン（30 μg/ml）中で2.5～3.8のOD<sub>600</sub>まで増殖し、そしてタンパク質発現を、1 mM IPTGの添加によって約2時間誘導した。細胞を、凍結/融解、次いで超音波処理によって溶解し、ライセートを遠心分離によって澄清にし、そして上清をアミロース樹脂カラムにロードし、そしてマルトースで溶出した。使用したすべての緩衝液は、製造業者が記載したとおりであった。トロンピンまたは第Xa因子プロテアーゼ部位がタンパク質内に含まれており、これらの精製タグはその後除去された。

30

## 【0069】

所望のタンパク質の発現を可能にする他のコード配列も使用可能である。他のタグまたは連結部位も、配列中に組み込まれ得る。これらの選択肢のいくつかの例を、図2にまとめる。

## 【0070】

## [実施例2]

改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントの生成

実施例1に記載の技法を用いて、改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントを、ボツリヌス菌F型神経毒素または破傷風菌神経毒素のいずれかのH<sub>C</sub>フラグメントのドメインとジフテリア菌毒素のトランスロケーションドメインとを融合させることによって構築した。実施例のアミノ酸配列を、配列番号8～17に示し、これはまた、H<sub>C</sub>フラグメントが、破傷風菌神経毒素とボツリヌス菌F型神経毒素とのハイブリッドである、改変破傷風菌重鎖の例を示す。

40

## 【0071】

## [実施例3]

タンパク質または酵素への改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントのカップリング  
改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントに連結されるべきポリペプチド、タンパク質、または酵素を、まず、適切な架橋剤で誘導体化する。Mn-スーパーオキシドジスムター

50

ゼ ( S O D ) を、0.15M NaClを含む0.05M Hepes緩衝液pH 7.0中の15モル過剰の S P D P (Pierce)を用いて25℃にて60分間の処理によって改変した。過剰の S P D P を、同じ緩衝液に対する4℃にて16時間の透析によって除去した。次いで、置換された S O D を、ジフテリア菌毒素に由来するトランスロケーションドメインに融合された改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントと、1:5のモル比で混合し(図3を参照のこと)、そして25℃にて16時間インキュベートした。インキュベーション後、S O D 改変クロストリジウム菌結合フラグメント結合体を、Sephadex G200でのゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した。

【0072】

[実施例4]

改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントと凝縮されたDNAとのカップリング  
DNAの凝縮に使用されるポリ-L-リジン(M<sub>r</sub>1000~4000)(10mg)を、0.15M NaClを含む2mlの20mM Hepes緩衝液pH 7.4(HBS)に溶解した。この溶液に、0.6mgのスルホ-LC-SPDP(Pierce and Warriner, UK Ltd.)を添加し、そしてこの混合物を25℃にて30分間インキュベートした。次いで、活性化したポリ-L-リジンを、1000分子量カットオフの透析チューブを用いて、HBSに対して4℃にて透析し、次いでHBSを用いて1mg/mlまで希釈した。

【0073】

DNAの凝縮を、ガラスチューブ中で行った。適切なプロモーター(例えば、CMV前初期プロモーター、または神経特異的プロモーター(例えば、ニューロン特異的エノラーゼプロモーター))の制御下に治療タンパク質をコードする遺伝子(またはリポーター遺伝子)を含む精製されたプラスミドDNAを、HBS中で1mg/mlに作成し、そしてガラスチューブに入れ、上記のように調製した活性化したポリ-L-リジンを添加した。活性化したポリ-L-リジンを、種々の割合でこのDNAに添加し(表2を参照のこと)、そして25℃にて90分間インキュベートした。

【0074】

【表2】

活性化ポリ-L-リジンでのDNAの凝縮

試料番号	DNA(μg)	活性化ポリ-L-リジン	HBS
1	750	250	1500
2	1500	500	500
3	500	250	1750
4	1000	500	1000

【0075】

インキュベーション後、凝縮したDNAパーティクルのサイズを、Brookhaven BI90 particle sizerを用いて評価した。100nM未満の直径の凝縮したDNAパーティクルを最高の割合で得るインキュベーション条件を用いて、DNA-改変クロストリジウム菌結合フラグメント結合体を生成した。改変クロストリジウム菌重鎖を、HBSに対して透析した。

【0076】

次いで、透析したフラグメント(100μg)を、1mlの凝縮したDNAに加え、そして25℃にて18時間インキュベートして、改変クロストリジウム菌結合タンパク質-凝縮したDNA構築物を形成した(図4を参照のこと)。

【0077】

## 〔実施例 5〕

改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントレセプターを介する神経細胞へのDNAの送達  
 実施例 4 に記載の改変クロストリジウム菌重鎖 - 凝縮したDNA構築物を、2mlのMEM  
 無血清培地で希釈した。12ウェルディッシュ中で増殖したNG108由来の増殖培地を  
 取り出し、そして1mlの希釈した構築物を加え、そして5%CO<sub>2</sub>の存在下で37℃にて2  
 時間インキュベートした。次いで、増殖培地(1ml)を各ウェルに加え、そしてインキュ  
 ベーションを同じ条件下で24~48時間続けた。この時間の後、細胞を検査した。

## 【0078】

実験において、凝縮したDNAは、グリーン蛍光タンパク質をコードするリポーター遺伝  
 子を含んでおり、いくつかの細胞がリポータータンパク質の可視発現を示し、これは、神  
 経細胞へのDNAの送達が成功したことを示した。種々のコントロール実験を行って、N  
 G108細胞において観察されたトランスフェクションがレセプターで媒介されることを  
 確認した。

10

## 【0079】

NG108細胞のトランスフェクションが、結合体内の改変クロストリジウム菌重鎖フラ  
 グメントの存在に依存的であることがわかった(凝縮したパーティクルDNA単独ではト  
 ランスフェクションは観察されなかった)。

## 【0080】

重鎖 - DNA 結合体を用いる非神経細胞 (Vero細胞) においては、トランスフェクション  
 は観察されなかった。

20

## 【0081】

## 〔実施例 6〕

改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントとラクチド - グリコリド共重合体からなるマイ  
 クロパーティクルとの結合体の調製

398mgの低内部粘性のラクチド - グリコリド共重合体 (3000MW) (Beohringer Mannheim)  
 を、4mlのジクロロメタンに溶解した。これを、酵素および/または薬物のような治療物  
 質を含む1mlの緩衝溶液とともに、2000rpmにて150秒間ホモジナイズした。Mnスーパー  
 オキシドジスムターゼの場合、10mgの酵素を、100mM NaClを含む10mM Hepes緩衝液pH 8.0  
 に溶解した。次いで、混合物を、50mlの8%ポリビニルアルコールに加え、そして2000rp  
 mにてさらに150秒間乳化した。エマルジョンを、300mlの超純粋蒸留水に37℃で注ぎ、そ  
 して37℃にて30分間攪拌した。マイクロパーティクルを、20℃で10000×gにて25分間の遠  
 心分離によって回収し、次いで、300mlの水に再懸濁し、そして上記のように遠心分離し  
 た。この洗浄手順を、さらに4回繰り返した。最終の遠心分離の後、水上清液を除去し、  
 そしてマイクロパーティクルを凍結乾燥した。

30

## 【0082】

2mgのラクチド - グリコリド共重合体マイクロパーティクルを、1mlの活性化緩衝液 (0.  
 5M NaClを含む0.1M MES緩衝液、pH 6.0) に再懸濁した。固体の1-エチル-3-[3-ジメチル  
 アミノプロピル]カルボジイミド (EDC) およびN-ヒドロキシスルホスクシンイミド (ス  
 ルホNHS) をそれぞれ2mMおよび5mM加え、そして混合物を25℃にて15分間インキュベ  
 ートした。マイクロパーティクルを、10000×gで1分間の遠心分離によって洗浄し、そし  
 て1mlの活性化緩衝液に再懸濁した。洗浄工程を4回繰り返し、次いで、マイクロパーテ  
 ィクルを、33μMの改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントを含む1mlの活性化緩衝液  
 に再懸濁し、そして25℃にて2時間インキュベートした。次いで、反応を、10mMのヒドロ  
 キシルアミンで停止した。25℃にて20分後、マイクロパーティクルを上記のように遠心分  
 離によって適切な緩衝液で洗浄した。

40

## 【0083】

## 〔実施例 7〕

改変重鎖フラグメントによって提示される神経細胞組織への高親和性結合の証明  
 クロストリジウム菌神経毒素を、クロラミンTを用いて125-ヨウ素で標識し得、そして種  
 々の細胞への結合を、Evansら 1986, Eur J. Biochem., 154, 409またはWadsworthら 199

50

0, Biochem. J. 268, 123に記載のような標準的方法によって評価し得る。これらの実験において、改変クロストリジウム菌重鎖構築物が神経細胞または脳シナプトソームに存在するレセプターに対して天然のクロストリジウム菌神経毒素と競合する能力を評価した。すべての結合実験を、結合緩衝液中で行った。ボツリヌス菌神経毒素については、この緩衝液は、50mM hepes pH 7.0、30mM NaCl、0.25%スクロース、0.25%ウシ血清アルブミンからなつた。破傷風菌毒素については、結合緩衝液は、0.6%ウシ血清アルブミンを含む0.05M MES緩衝液pH 6.0であつた。代表的な結合実験では、放射標識されたクロストリジウム菌神経毒素を、1~10nMの間の固定濃度に保持した。反応混合物を、放射標識された毒素と種々の濃度の非標識神経毒素または改変クロストリジウム菌重鎖構築物とを混合することによって調製した。次いで、反応混合物を、神経細胞またはラット脳シナプトソームに加え、次いで0~3にて2時間インキュベートした。この時間の後、神経細胞またはシナプトソームを、氷冷結合緩衝液で2回洗浄し、そして細胞またはシナプトソームに結合した標識されたクロストリジウム菌神経毒素の量を、カウンティングによって評価した。

10

## 【0084】

破傷風菌毒素由来の結合ドメインおよびジフテリア菌毒素由来のトランスロケーションドメインからなる改変クロストリジウム菌重鎖構築物を用いる実験において、構築物が、非標識の天然の破傷風菌神経毒素と同様の様式で、神経細胞レセプターに対して<sup>125</sup>I-標識された破傷風菌神経毒素と競合することがわかつた(図6を参照のこと)。これらのデータは、この構築物が、天然の神経毒素の結合特性を保持していることを示した。

20

## 【0085】

改変クロストリジウム菌重鎖としてジフテリア菌H<sub>N</sub>-BoNT/F H<sub>C</sub>を用いるさらなる実験では、この構築物が、神経シナプス膜上のレセプターに対して<sup>125</sup>I-標識されたBoNT/Fと競合することがわかつた(図7)。これらのデータは、改変クロストリジウム菌重鎖が、BoNT/Fの神経レセプター結合特性を保持することを示す。

## 【0086】

## [実施例8]

天然のボツリヌス菌毒素重鎖(A型)のサイズと改変クロストリジウム菌重鎖(組換えジフテリア菌H<sub>N</sub>-BoNT/F H<sub>C</sub>)のサイズとを比較するための非変性ゲル電気泳動ボツリヌス菌A型重鎖を、既述のように精製し(Shoneら1985 Eur J. Biochemistry 151, 75-82)、そして組換えジフテリア菌H<sub>N</sub>-BoNT/F H<sub>C</sub>を、実施例1および2に記載のように精製した。改変クロストリジウム菌重鎖を、マルトース結合タンパク質融合物として精製し、次いで、融合タンパク質を、第Xa因子での処理によって取り出した。A型重鎖(20μg)およびジフテリア菌H<sub>N</sub>-BoNT/F H<sub>C</sub>(10μg)の試料を、Tris-グリシン緩衝液中4~20%Tris-グリシンポリアクリルアミドゲル上にロードした。試料を、平衡まで電気泳動し(Novexゲルシステム;43ボルト、16時間)、そしてゲルをクーマシーブルーで染色した。結果を図8に示す。ジフテリア菌H<sub>N</sub>-BoNT/F/H<sub>C</sub>についての主バンドは、約70kDaの予測分子量の非常に近くに移動して現れる。逆に、天然のA型重鎖は、推定分子量の100kDaと比べると、約500kDaに拡散したバンドとして現れ、これは、大きなタンパク質凝集体の形成を示唆する。

30

40

## 【0087】

## [実施例9]

組換え改変重鎖 - スーパーオキシドジスムターゼ結合体

以下の成分の組み合わせを含む、組換え改変重鎖 - スーパーオキシドジスムターゼ結合体を調製した:

Bacillus stearothermophilus由来の細菌スーパーオキシドジスムターゼ;

スーパーオキシドジスムターゼとトランスロケーションドメインとの間のジスルフィド結合の形成を可能にし、そして二本鎖分子を形成させるために第Xa因子またはトロンピンによる切断のための独特のプロテアーゼ切断部位も含む、リンカー領域;

ジフテリア菌毒素由来のトランスロケーションドメインまたはインフルエンザウイルス血

50



球凝集素由来のエンドソーム溶解性（融合性）ペプチド；および破傷風菌神経毒素またはボツリヌス菌神経毒素F型由来の神経細胞特異的結合ドメイン。

【0088】

これらの組換え改変重鎖 - スーパーオキシドジスムターゼ結合体の配列を、配列番号3～7に示す。

【0089】

これらの構造の性質を確認するために、組換えクロストリジウム菌改変重鎖 - スーパーオキシドジスムターゼ結合体を、リンカー領域内の切断部位配列に対応する独特のプロテアーゼでの処理によって二本鎖形態に変換した。トロンピン切断部位を含む結合体を、37にて20時間トロンピン（1mgの結合体あたり20μg）で処理し；第Xa因子切断部位を含む結合体を22にて20分間第Xa因子（1mgの結合体あたり20μg）で処理した。

10

【0090】

非還元条件下でのSDS-PAGEゲルにおいて、結合体は、分子量約120kDaのバンドとして現れた。還元剤（ジチオトレイトール）の存在下では、2つのバンドが、それぞれ改変クロストリジウム菌重鎖およびスーパーオキシドジスムターゼに対応する分子量約70および30kDaに観察された。これらのデータは、独特のプロテアーゼでの処理後、結合体が、ジスルフィド架橋によって連結される後者の2つの成分からなることを示す。

【図面の簡単な説明】

【図1】 融合タンパク質として組換え技法によって生成された改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントを示す。

20

【図2】 組換え技法によって生成された改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントを示す；融合タンパク質は、タンパク質の精製において補助するために1以上の精製ペプチドタグを含み得る；1以上のプロテアーゼ切断部位も精製ペプチドタグの除去を可能にするために含まれ得る；類似の精製方法も、トランスロケーションドメインを含む改変クロストリジウム菌結合フラグメントについて用いられ得る。

【図3】 治療物質への改変クロストリジウム菌結合フラグメントの連結を示す；改変クロストリジウム菌重鎖は、遊離のチオール基（この特性を有するトランスロケーションドメインの1例は、ジフテリア菌毒素のアミノ酸配列194～386である）を有するトランスロケーションドメインを含み、治療物質上の遊離のアミノ基は、その後、改変クロストリジウム菌結合フラグメントに存在する遊離のチオール基を用いて結合体形成を可能にする架橋試薬（例えば、SPDP；Pierce & Warriner, UK Ltd.）で改変される。

30

【図4】 実施例4に記載されるように、改変クロストリジウム菌重鎖フラグメントとオリゴヌクレオチドとの間の結合体の形成を示す。

【図5】 ポリペプチド治療物質との融合タンパク質としての組換え改変クロストリジウム菌重鎖を生成するための方法を示す。ポリペプチド治療物質は、リンカーペプチドによって改変クロストリジウム菌重鎖に融合される。リンカーペプチドは、独特のプロテアーゼ切断部位（例えば、トロンピンによって認識される部位）およびシステイン残基を含む。リンカーペプチドの例は、（a）CGLVPAGSGPおよび（b）CGIEGRAPGP（配列番号18）である。システイン残基は、改変重鎖フラグメントのトランスロケーションドメイン上の他の利用可能なシステイン残基とジスルフィド架橋を形成する。所望であれば、次いでトロンピン処理によって、ポリペプチド治療物質がジスルフィド架橋によって重鎖に連結される二本鎖産物が生成され得る。

40

【図6】 神経シナプス膜への改変重鎖の結合と天然の神経毒素の結合との比較を示し、改変重鎖は、実施例7に記載の方法によって評価されるように、破傷風菌神経毒素に特徴的な結合を提示する。

【図7】 ボツリヌス菌F型神経毒素の結合ドメインに基づく改変クロストリジウム菌重鎖の神経膜への結合を示す；この例において、改変重鎖は、ジフテリア菌毒素のトランスロケーション（ $H_N$ ）ドメインおよびF型神経毒素の結合（ $H_C$ ）ドメインを含む。

【図8】 天然の重鎖と比較して、非変性条件下での、改変クロストリジウム菌重鎖の分

50

子サイズの比較を示す；改変クロストリジウム菌重鎖（ジフテリア菌  $H_N - B o N T / F H_C$ ）は、約 70 kDa のモノマーとして泳動され、一方、天然の重鎖（ $B o N T / A$  由来）は、500 kDa より大きい凝集体として泳動される。

【配列表】

SEQUENCES OF MODIFIED CLOSTRIDIAL HEAVY CHAIN - SUPEROXIDE  
DISMUTASE CONJUGATES

10

SEQ ID NO: 3

Construct containing:

MnSOD from *B.stearothermophilus*

a linker that can be cleaved by thrombin

a translocation domain derived from diphtheria toxin

a binding domain from tetanus toxin

MPFELPALPYPYDALEPHIDKETMNIHHTKHHNTYVTNLNAALEGHPDLQNKSLLELL  
SNLEALPESIRTA VRNNGGGHANHSLFWTILSPNGGGEPTGELADAINKKFGSFTAFK  
DEFSKAAAGRFGSGWAWLVVNNGELEITSTPNQDSPIMEGKTPILGLDVWEHAYYL  
KYQNRPEYIAAFWNVNWDEVAKRYSEAKPKSGSCGLVPRGSGPGSSVGSLSLSCI  
NLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPINKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELS  
ELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIAD  
GAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPVGLVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYN  
RSAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVRSKNLDCWVDNEEDIDVILKKSTILNLDINNDI  
ISDISGFNSSVITYPDAQLVPGINGKAIHLVNNESSEVIVHKAMDIEYNDMFNNFTVSF  
WLRVPKVSASHLEQYGTNEYSIISSMKKHLSLSIGSGWSVSLKGNNLIWTLKDSAGEV  
RQITFRDLDPKFNAYLANKWVFITITNDRSSANLYINGVLMGSAEITGLGAIRDNNIT  
LKLDRCNNNNQYVSIDKFRIFCKALNPKEIEKLYTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYLI  
PVASSSKDVQLKNITDYMILTNPASYTNGKLNIIYRRLYNGLKFKIIRYTPNNEIDSFV  
KSGDFIKLYVSYNNNEHIVGYPKDGNAFNLDRLRVGYNAPGIPLYKKMEAVKLRDL  
KTYSVQLKLYDDKNASLGLVGTHNGQIGNDPNRDILIASNWYFNHLKDKILGCDWYF  
VPTDEGWTNDLQ

20

30

SEQ ID NO: 4

Construct containing:

- MnSOD from *B.stearothermophilus*
- a linker that can be cleaved by factor Xa
- a translocation domain derived from diphtheria toxin
- a binding domain from botulinum type F toxin

MPFELPALPYPYDALEPHIDKETMNIHHTKHHNTYVTNLNAALEGHPDLQNKSLLELL  
 SNLEALPESIRTA VRNNGGGHANHSLFWTILSPNGGGEPTGELADAINKKFGSFTAFK  
 DEFSKAAAGRFGSGWAWLVVNNGELEITSTPNQDSPIMEGKTPILGLDVWEHAYYL  
 KYQNRREPEYIAAFWNVNVWDEVAKRYSEAKPKSGSCGIEGRAPGPGSSVGSLSLSCI  
 NLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELS  
 ELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIAD  
 GAVHHNTEEIVAQSIALLSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYN  
 RSAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVRSTMSYTNDKILILYFNKLYKKIKDNSILDMRY  
 ENNKFIDISGYGSNISINGDVYIYSTNRNQFGIYSSKPSEVNIAQNNNDIYNGRYQNFSS  
 FWVRIPKYFNKVNLNNEYTIIDCIRNNNSGWKISLNYNKIWTLODTAGNNQKLVFNY  
 TOMISISDYINKWIFVTITNRLGNSRIYINGNLIDEKSISNLGDIHVSDNILFKIVGCNDT  
 RYVGIRYFKVFDTELKTEIETLYSDEPDPSILKDFWGNLYLNKRYLLNLLRTDKSIT  
 QNSNFLNINQQRGVYQKPNIFSNTRLYTGVEVIIRKNGSTDISNTDNFVRKNDLAYINV  
 VDRDVEYRLYADISIAKPEKIKLIRTSNSNNSLGQIIVMDSIGNNCTMNFQNNNGGNI  
 GLLGFHSNNLVASSWYNNIRKNTSSNGCFWSFISKEHGWQEN

SEQ ID NO: 5

Construct containing:

- a mitochondrial leader sequence from human MnSOD
- MnSOD from *B.stearothermophilus*
- a linker that can be cleaved by factor Xa
- a translocation domain derived from diphtheria toxin
- a binding domain from tetanus toxin

MLSRVCGTSRQLAPALGYLGSRQKHSRGSPALPYPYDALEPHIDKETMNIHHTKHH  
 NTYVTNLNAALEGHPDLQNKSLLELLSNLEALPESIRTA VRNNGGGHANHSLFWTILS  
 PNGGGEPTGELADAINKKFGSFTAFKDEFSKAAAGRFGSGWAWLVVNNGELEITSTP  
 NQDSPIMEGKTPILGLDVWEHAYYLKYQNRREPEYIAAFWNVNVWDEVAKRYSEAKP  
 KSGSCGIEGRAPGPGSSVGSLSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPN  
 KTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDS  
 ETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALLSSLMVAQAIPLVGEL  
 VDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRSAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVRSKNLD  
 CWVDNEEDIDVILKSTILNLDINNDIISDISGFNSSVITYPDAQLVPGINGKAIHLVNNE  
 SSEVIVHKAMDIEYNDMFNFTVSWFLRVPKVSASHLEQYGTNEYSIISMMKKHLSLSI  
 GSGWSVSLKGNLIWTLKDSAGEVRQITFRDLPDKFNAYLANKWVFITITNDRLSSA  
 NLYINGVLMGSAEITGLGAIREDNITLKLDRCNNNNQYVSIDKFRIFCKALNPKEIEKL  
 YTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYLIPVASSSKDVQLKNITDYMYLTNAPSYTNGKL  
 NIYYRRLYNGLKFIIKRYTPNEIDSFVKSGDFIKLYVSYNNNEHIVGYPKDGNFNNLD  
 RILRVGYNAPGIPLYKKMEAVKLRDLKTYSVQLKLYDDKNASLGLVGTHNGQIGNDP  
 NRDILIASNWFNHLKDKILGCDWYFVPTDEGWTDNLQ

SEQ ID NO: 6

Construct containing:

- a mitochondrial leader sequence from human MnSOD
- MnSOD from *B.stearothermophilus*
- a linker that can be cleaved by thrombin
- a translocation domain derived from diphtheria toxin
- a binding domain from botulinum type F toxin

MLSRVAVCGTSRQLAPALGYLGSRQKHSRGSALPYPYDALEPHIDKETMNIHHTKHH  
 NTYVVTNLNAALEGHPDLQNKSLLELLSNLEALPESIRTA VRNNGGGHANHSLFWTILS  
 PNGGGGEPTGELADAINKKFGSFTAFKDEFKAAAGRFGSGWAWLVVNNGELEITSTP  
 NQDSPIMEGKTPILGLDVWEHAYYLKYQNRPEYIAAFWNVWNWDEVAKRYSEAKP  
 KSGSCGLVPRGSGPGSSVGSLSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPKNKMSESPN  
 KTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSEKTVTGTPNFAGANYAAWAVNVAQVIDS  
 ETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPVGLGEL  
 VDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRSAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVRSTMS  
 YTNDKILILYFNKLYKKIKDNSILDMRYENNKFIDISGYGSNISINGDVYIYSTNRNQFGI  
 YSSKPSEVNIAQNNDIYNGRYQNFSISFWVRIPKYFNKVNLNNEYTIIDCIRNNNSGW  
 KISLNYNKIIWTLQDTAGNNQKLVFNQYQMSISDYINKWIFVTITNNRLGNSRIYINGN  
 LIDEKSISNLGDIHVSDNILFKIVGCNDTRYVGIYFKVFDTELKTEIETLYSDEPDPSIL  
 KDFWGNLYLLYNKRYLLNLLRTDKSITQNSNFLNINQQRGVYQKPNIFSNTRLYTGVE  
 VIIRKNGSTDISNTDNFVRKNDLAYINVVDRDVEYRLYADISIAKPEKIIKLIRTSNSNNS  
 LGQIIVMDSIGNNCTMNFQNNNGGNIGLLGFHSNNLVASSWYYNNIRKNTSSNGCF  
 WSFISKEHGWQEN

10

20

SEQ ID NO: 7

Construct containing:

- MnSOD from *B.stearothermophilus*
- a linker that can be cleaved by factor Xa
- a translocation peptide from influenza virus
- a binding domain from botulinum type F toxin

MPFELPALPYPYDALEPHIDKETMNIHHTKHHNTYVVTNLNAALEGHPDLQNKSLLELL  
 SNLEALPESIRTA VRNNGGGHANHSLFWTILSPNGGGGEPTGELADAINKKFGSFTAFK  
 DEFKAAAGRFGSGWAWLVVNNGELEITSTPNQDSPIMEGKTPILGLDVWEHAYYL  
 KYQNRPEYIAAFWNVWNWDEVAKRYSEAKPKSGSCGIEGRAPGPGSSVGSLSLSCI  
 NGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGTMSYNTNDKILILYFNKLYKKIKDNSILDMRYENN  
 KFIDISGYGSNISINGDVYIYSTNRNQFGIYSSKPSEVNIAQNNDIYNGRYQNFSISFW  
 VRIPKYFNKVNLNNEYTIIDCIRNNNSGWKISLNYNKIIWTLQDTAGNNQKLVFNQYQ  
 MISISDYINKWIFVTITNNRLGNSRIYINGNLIIDEKSISNLGDIHVSDNILFKIVGCNDTRY  
 VGIRYFKVFDTELKTEIETLYSDEPDPSILKDFWGNLYLLYNKRYLLNLLRTDKSITQ  
 SNFLNINQQRGVYQKPNIFSNTRLYTGVEVIIRKNGSTDISNTDNFVRKNDLAYINVV  
 RDVEYRLYADISIAKPEKIIKLIRTSNSNNSLGQIIVMDSIGNNCTMNFQNNNGGNIGLL  
 GFHSNNLVASSWYYNNIRKNTSSNGCFWSFISKEHGWQEN

30

40

Protein sequence for Diphtheria toxin translocation domain with BoNT/F-H<sub>c</sub>

SEQ ID NO: 8

GSSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEF  
 HQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSIL  
 PGIGSVMGIADGAVHHNTEEIQAQSIALLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIIN  
 LFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVRSTMSYTNKILILYFNKLYKK  
 IKDNSILDMRYENNKFDISGYGSNISINGDVYIYSTNRNQFGIYSSKPSEVNIAQNNDII  
 YNGRYQNFSISFWVRIPKYFNKVNLNNEYTIIDCIRNNNSGWKISLNYNKIHWTLQDTA  
 GNNQKLVFNYSQMSISDYINKWIFVTITNNRLGNSRIYINGNLIDEKSISNLGDIHVSD  
 NILFKIVGCNDTRYVGIYFKVFDTELKTEIETLYSDEPDPSILKDFWGNVLLYNKRY  
 LLNLLRTDKSITQNSNFLNINQQRGVYQKPNIFSNTRLYTGVVEVIIRKNGSTDISNTDNF  
 VRKNDLAYINVVDRDVEYRLYADISIAKPEKIIKLIRTSNSNNSLGOIIVMDSIGNNCTM  
 NFONNNGGNIIGLLGFHSNNLVASSWYYNNIRKNTSSNGCFWSFISKEHGWQEN

10

Protein sequence for Diphtheria toxin translocation domain with TeNT-H<sub>c</sub>

SEQ ID NO: 9

GSSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEF  
 HQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSIL  
 PGIGSVMGIADGAVHHNTEEIQAQSIALLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIIN  
 LFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVRSKNLDCWVDNEEDIDVILKK  
 STILNLDINNDIISDISGFNSSVITYPDAQLVPGINGKAIHLVNNESSEVIVHKAMDIEYN  
 DMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQYGTNEYSIISSMKKHLSLSIGSGWSVSLKGNLI  
 WTLKDSAGEVRQITFRDLPDKFNAYLANKWVFITITNDRLLSSANLYINGVLMGSAEIT  
 GLGAIREDNITLKLDRCNQYVVSIDKFRIFCKALNPKEIEKLYTSYLSITFLRDFWG  
 NPLRYDTEYYLIPVASSSKDVQLKNITDYMILTANPSYTNGLNIIYRRLYNGLKFIK  
 RYTPNNEIDSFVKSGDFIKLYVSYNNNEHIVGYPKDGNAFNNLDRILRVGYNAPGIPLY  
 KKMEAVKLRDLKTYSVQLKLYDDKNASLGLVGTHTNGQIGNDPNRDILIASNWFYFHL  
 KDKILGCDWYFVPTDEGWTNDLQ

20

Protein sequence for Diphtheria toxin translocation domain TeNT-H<sub>c</sub> domain II

SEQ ID NO: 10

GSSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEF  
HQTALEHPELSELKTVTGTPNFVAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSIL  
PGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIIN  
LFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVRSVYVSDKFRIFCKALNPKEI  
EKLYTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYLIPVASSSKDVQLKNITDYMILTANAPSYTN  
GKLNIIYRRLYNGLKFKIIRYTPNNEIDSFVKSGDFIKLYVSYNNNEHIVGYPKDGNAFN  
NLDRILRVGYNAPGIPLYKKMEAVKLRDLKTYSVQLKLYDDKNASLGLVGTHTNGQIG  
NDPNRDILIASNWFNHLKDKILGCDWYFVPTDEGWTNDLQ

10

Protein sequence for Diphtheria toxin translocation domain with truncated TeNT-H<sub>c</sub>

SEQ ID NO: 11

GSSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEF  
HQTALEHPELSELKTVTGTPNFVAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSIL  
PGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIIN  
LFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVRSVYNNESSEVIVHKAMDIEY  
NDMFNNFTVSFWRVPKVSASHLEQYGTNEYSISSMKKHSLSIGSGWSVSLKGNNL  
IWTLKDSAGEVRQITFRDLPDKFNAYLANKWVFITITNDRLSSANLYINGVLMGSAEIT  
GLGAIREDDNITLKLDRCNNNNQYVSDKFRIFCKALNPKEIEKLYTSYLSITFLRDFWG  
NPLRYDTEYYLIPVASSSKDVQLKNITDYMILTANAPSYTNGLNIIYRRLYNGLKFKIIR  
RYTPNNEIDSFVKSGDFIKLYVSYNNNEHIVGYPKDGNAFNLDLILRVGYNAPGIPLY  
KKMEAVKLRDLKTYSVQLKLYDDKNASLGLVGTHTNGQIGNDPNRDILIASNWFNHL  
KDKILGCDWYFVPTDEGWTNDLQ

20

Protein sequence for Diphtheria toxin translocation domain BoNT/F-H<sub>c</sub> domain I  
TeNT-H<sub>c</sub> domain II

SEQ ID NO: 12

GSSVGSLSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEF  
HQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSIL  
PGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIIN  
LFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVRSTMSYTNDKILILYFNKLYKK  
IKDNSILDMRYENNKFDISGYGSNISINGDVYIYSTNRNQFGIYSSKPSEVNIAQNNDII  
YNGRYQNFISISFWVRIPKYFNKVNLNNEYTIIDCIRNNNSGWKISLNYNKIHWTLQDTA  
GNNQKLVFNQYTMISISDYINKWIFVTITNNRNLGNSRIYINGNLIDEKSISNLGDIHVSD  
NILFKIVGCNDTRYVVIDKFRIFCKALNPKEIEKLYTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYLI  
PVASSSKDVQLKNITDYMILTNAPSYTNGLNIIYRRLYNGLKFIKRYTPNNEIDSFV  
KSGDFIKLYVSYNNNEHIVGYPKDGNAFNNLDRLRVGYNAPGIPLYKKMEAVKLRDL  
KTYSVOLKLYDDKNASLGLVGTHTNGOIGNDPNRDILIASNWYFNHLKDKILGCDWYF  
VPTDEGWTNDLQ

10

Protein sequence for Diphtheria toxin translocation domain

SEQ ID NO: 13

SVGSSLSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFH  
QTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILP  
GIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINL  
FQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVRS

20

Protein sequence for Clostridium botulinum C2 enterotoxin translocation domain  
with BoNT/F-H<sub>c</sub>

SEQ ID NO: 14

(a)

LVSKFENSVKNSNKNYFTINGLMGYFFENDFFNLNIIISPTLDGNLTFKEDINSILGNKII  
KSARWIGLIKPSITGEYILSTNSPNCRVELNGEIFNLSLNTSNTVNLIQGNVYDIRIEQLM  
SENQLLKNYEGIKLYWETSIIKEIIPSEVLLKPNYSNTNEKSKFIPNNTLFSNAKLKANA  
NRDTRDRGIPDEWEINGYTMNQKAVAWDDKFAANGYKKYVSNPFKPCCTANDPYT  
DFEKVSGQIDPSVSMVARDPMISAYPIVGVOMERLVVSKSETITGDSTKSMKSTSH  
SSTNINTVGAEVSGSLQLAGGIFPVFSMSASANYSHWTWQNTSTVDDTTGESFSQGL  
SINTGESAYINPNIRYNTGTAPVYNVTPTTTVIDKQSVATIKGOESLIGDYLNPGGT  
YPIIGEPPMALNTMDQFSSRLIPINYNQLKSIDNGGTVMMLSTSQFTGNFAKYNSNGNL  
VTDGNNWGPYLGTIKSTTASLTLSFSGQTTQVAVVAPNFSDPEDKTPKLTLEQALVK  
AFALEKKNGKFYFHGLEISKNEKIQVFLDSNTNDFENQLKNTADKDIMHCIKRNMNI  
LVKVITFKENISSINIINDTNFGVQSMTGLSNRSGQDGIYRAATTAFSFKSKELKYPE  
GRYRMRFVIOQSYEPFTTMSYTNDKILILYFNKLYKKIKDNSILDMRYENNKFDISGYGS  
NISINGDVYIYSTNRNQFGIYSSKPSEVNIAQNNDIYNGRYQNFISISFWVRIPKYFNKV  
NLNNEYTIIDCIRNNNSGWKISLNYNKIHWTLQDTAGNNQKLVFNQYTMISISDYINKW  
IFVTITNNRNLGNSRIYINGNLIDEKSISNLGDIHVSDNILFKIVGCNDTRYVGIYRKYVFDT  
ELGKTEIETLYSDEPDPSILKDFWGNLYLLNRYLLNLLRTDKSITQNSNFLNINQQRG  
VYQKPNIFSNTRLYTGVVEIIRKNGSTDISNTDNFVRKNDLAYINVVDRDVEYRLYADI  
SIAKPEKIIKLIRTSNSNNSLQIIVMDSIGNNCTMNFQNNNGGNIIGLLGFHSNNLVA  
SWYYNNIRKNTSSNGCFWSFISKEHWQEN

30

40

SEQ ID NO: 15

(b)

LVSKFENSVKNSNKNYFTINGLMGYFFENDDFNLIISPTLDGNLTFSKEDINSILGNKII  
 KSARWIGLIKPSITGEYILSTNSPNCRVELNGEIFNLSLNTSNTVNLIOGNVYDIRIEQLM  
 SENQLLKNYEGIKLYWETSIIKEIIPSEVLLKPNYSNTNEKSKFIPNNTLFSNAKLNKANA  
 NRDTDRDGIPDEWEINGYTVMNQKAVAWDDKFAANGYKKYVSNPFKPCANDPYT  
 DFEKVSQIDPSVSMVARDPMISAYPIVGVQMERLVVSKSETITGDSTKSMKSTSH  
 SSTNINTVGAEVSGSLQLAGGIFPVFSMSASANYSHTWQNTSTVDDTTGESFSQGL  
 SINTGESAYINPNIRYYNTGTAPVYNVTPTTTIVIDKQSVATIKGQESLIGDYLNPGGT  
 YPIIGEPMALNTMDQFSSRLIPINYNLKSIDNGGTVMMLSTSQFTGNFAKYNSNGNL  
 VTDGNNWGPYLGTIKSTTASLTLSFSGQTTQAVVAPNFSDPEDKTPKLTLEQALVK  
 AFALEKKNKGFYFHGLEISKNEKIQVFLDSNTNDFENQLKNTADKDIMHCIIKRNMI  
 LVKVITFKENISSINTMSYTNDKILILYFNKLYKKIKDNSILDMRYENKFKIDISGYGSNIS  
 INGDEVYIYSTNRNQFGIYSSKPEVNIAQNNDIYNGRYQNFISFWVRIPKYFNKVNL  
 NNEYTIIDCIRNNNSGWKISLNYNKIIWTLQDTAGNNQKLVFNQYTMISISDYINKWIF  
 VTITNNRLGNSRIYINGNLIDEKSINLGDHIVSDNILFKIVGCNDTRYVGIYFKVFDTE  
 LGKTEIETLYSDEPDPSILKDFWGNLYLLYKRYLLNLLRDKSITQNSNFLNINQORG  
 VYQKPNIFSNTRLYTGVVEIIRKNGSTDISNTDNFVRKNDLAYINVVDRDVEYRLYADI  
 SIAKPEKIKLIRTSNSNNSLGQIIVMDSIGNNCTMNFQNNNGGNIGLLGFHSNNLVAS  
 SWYYNNIRKNTSSNGCFWSFISKEHGWQEN

10

Protein sequence for Clostridium botulinum C2 enterotoxin translocation domain with Tetanus-H<sub>c</sub>

20

SEQ ID NO: 16

(a)

LVSKFENSVKNSNKNYFTINGLMGYFFENDDFNLIISPTLDGNLTFSKEDINSILGNKII  
 KSARWIGLIKPSITGEYILSTNSPNCRVELNGEIFNLSLNTSNTVNLIOGNVYDIRIEQLM  
 SENQLLKNYEGIKLYWETSIIKEIIPSEVLLKPNYSNTNEKSKFIPNNTLFSNAKLNKANA  
 NRDTDRDGIPDEWEINGYTVMNQKAVAWDDKFAANGYKKYVSNPFKPCANDPYT  
 DFEKVSQIDPSVSMVARDPMISAYPIVGVQMERLVVSKSETITGDSTKSMKSTSH  
 SSTNINTVGAEVSGSLQLAGGIFPVFSMSASANYSHTWQNTSTVDDTTGESFSQGL  
 SINTGESAYINPNIRYYNTGTAPVYNVTPTTTIVIDKQSVATIKGQESLIGDYLNPGGT  
 YPIIGEPMALNTMDQFSSRLIPINYNLKSIDNGGTVMMLSTSQFTGNFAKYNSNGNL  
 VTDGNNWGPYLGTIKSTTASLTLSFSGQTTQAVVAPNFSDPEDKTPKLTLEQALVK  
 AFALEKKNKGFYFHGLEISKNEKIQVFLDSNTNDFENQLKNTADKDIMHCIIKRNMI  
 LVKVITFKENISSINIINDTNFGVQSMTGLSNRSKGQDGIYRAATTAFSFKSKELKYPE  
 GRYSRMRVFIQSYEPFTKNLDCWVDNEEDIVILKSTILNLDINNDIISDISGFNSSVITY  
 PDAQLVPGINGKAIHLVNNESSEVIVHKAMDIEYNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHL  
 EQYGTNEYSIISSMKKHSLSIGSGWSVSLKGNLIWTLKDSAGEVRQITFRDLDPDKFN  
 AYLANKWVFITITNDRLSSANLYINGVLMGSAEITGLGAIREDNITLKLDRCNNNNQ  
 YVSDKFRIFCKALNPKEIEKLYTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYLIPVASSSKDVQL  
 KNITDYMYLTNAPSNTNGKLNIIYRRLYNGLKFIIKRYTPNNEIDSFVKSGDFIKLYVSY  
 NNNEHIVGYPKDGNAFNLDRLRVGYNAPGIPLYKKMEAVKLRDLKTYSVQLKLYD  
 DKNASLGLVGTHTNGQIGNDPNRDILIASNWYFNHLKDKILGCDWYFVPTDEGWTDLQ

30

40



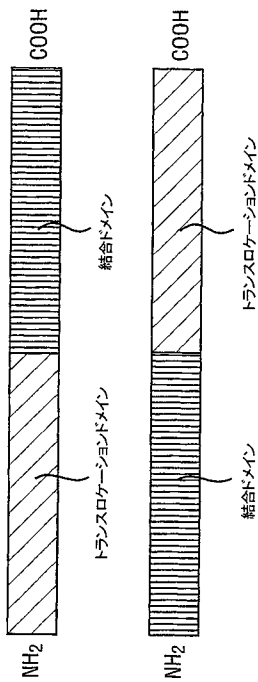
SEQ ID NO: 17

(b)

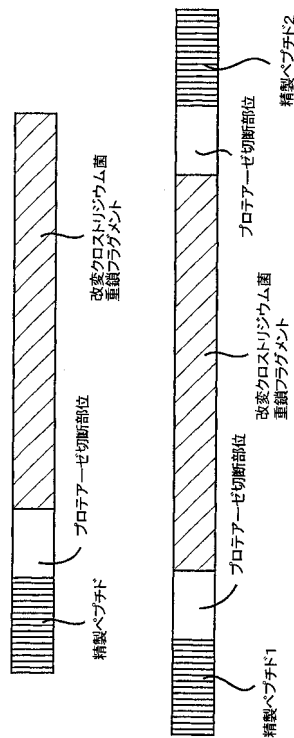
LVSKFENSVKNSNKNYFTINGLMGYFENDFFNLNIIISPTLDGNLTFSKEDINSILGNKII  
 KSARWIGLIKPSITGEYILSTNSPNCRVELNGEIFNLSLNTSNTVNLIQGNVYDIRIEQLM  
 SENQLLKNYEGIKLYWETSIIKEIIPSEVLLKPNYSNTNEKSKFIPNNTLFSNAKLLKANA  
 NRD TDRDGIPDEWEINGYTVMNQKAVAWDDKFAANGYKKYVSNPFKPC TANDPYT  
 DFEKVSGQIDPSVSMVARDPMISAYPIVGVQMERLVVSKSETITGDSTKSMKSTSH  
 SSTNINTVGAEVSGSLQLAGGIFPVFSMSASANYSH TWQNTSTVDDTTGESFSQGL  
 SINTGESAYINPNIRYYNTGTAPVYNV TPTTTIVIDKQSVATIKGQESLIGDYLNPGGT  
 YPIIGEPPMALNTMDQFSSRLIPINYQLKSIDNGGTVM LSTSQFTGNFAKYNSNGNL  
 VTDGNNWGPYLGTIKSTTASLTLSFSGQTTQVAVVAPNFSDPEDKTPKLTLEQALVK  
 AFALEKKNKGFYFHGLEISKNEKIQVFLDSNTNNDFENQLKNTADKDIMHCCI KRNMNI  
 LVKVITFKENISSINKNLDCWVDNEEDIDVILK KSTILNLDINNDIISDISGFNSSVITYPD  
 AQLVPGINGKAIHLVNNESSSEVIVHKAMDIEYNDMFNFTV SFWLRVPKVSASHLEQ  
 YGTNEYYSISSMKKHSLSIGSGWSVSLKGNLIWTLKDSAGEVROITFRDL PDKFNAY  
 LANKWVFITITNDRLSSANLYINGVLMGSAEITGLGAIREDN NITLKLDRCNNNNQYV  
 SIDKFRIFCKALNPKEIEKLYTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYLIPVASSSKDVQLKNI  
 TDYMYLTNAPSYTNGKLNIIYRRLYNGLKFIKRYTPNNEIDSFVKSGDFIKLYVSYNN  
 NEHIVGYPKDGNAFNNDRLRVLGYNAPGIPLYKKMEAVKLRDLKTYSVQLKLYDDK  
 NASLGLVGTHNGOIGNDPNRDILIASNWYFNHLKDKILGCDWYFVPTDEGWTNDLQ

10

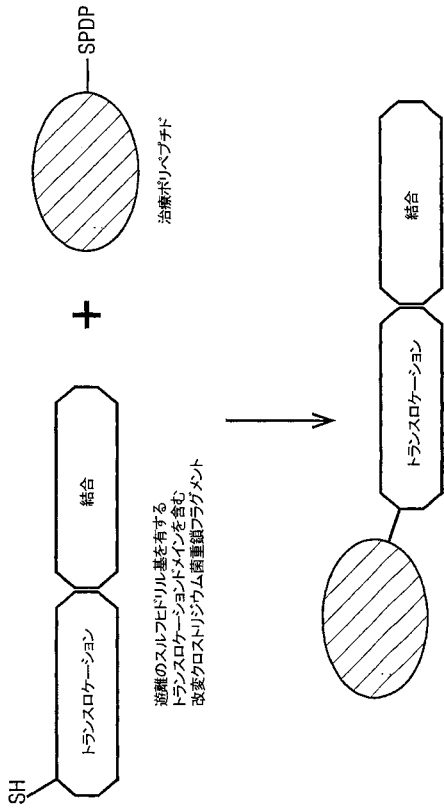
【 図 1 】



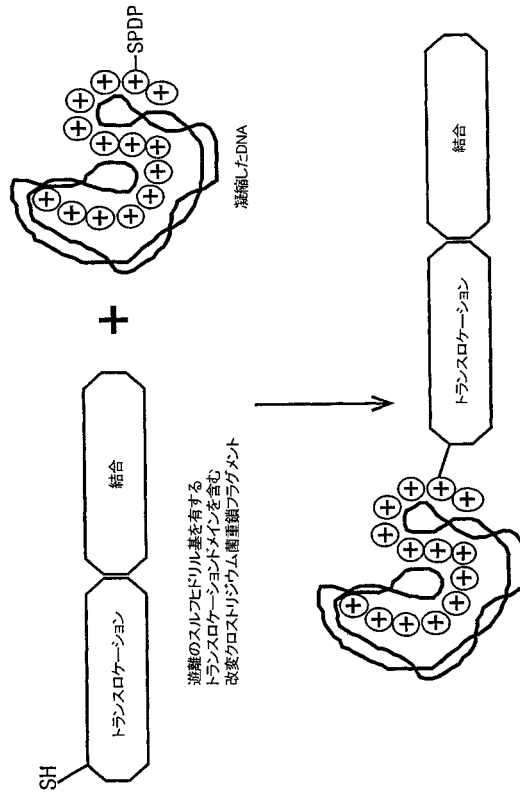
【 図 2 】



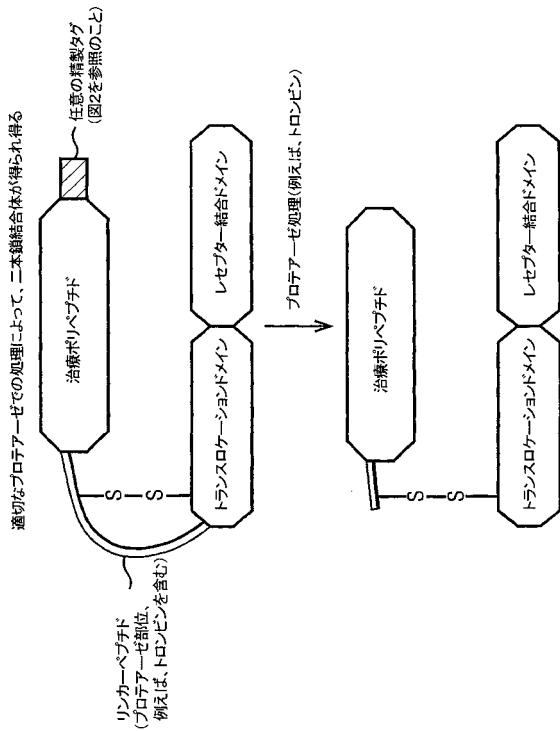
【 図 3 】



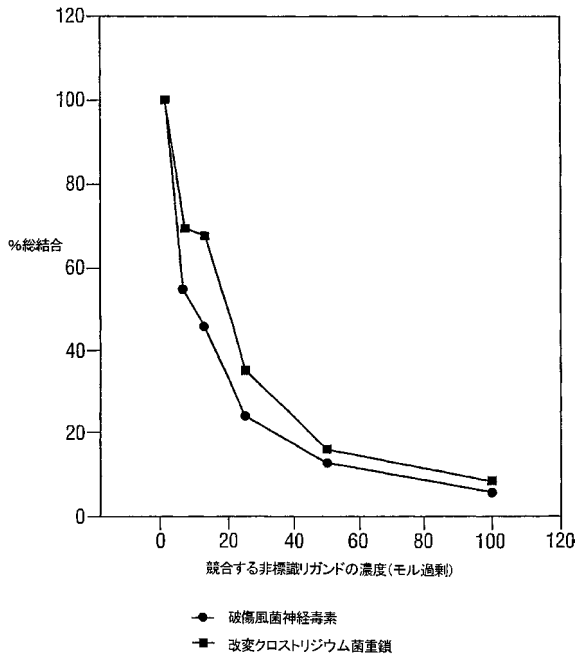
【 図 4 】



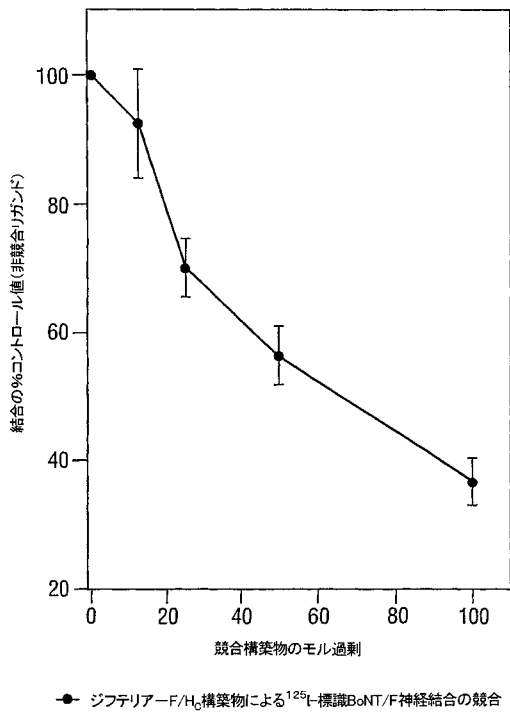
【 図 5 】



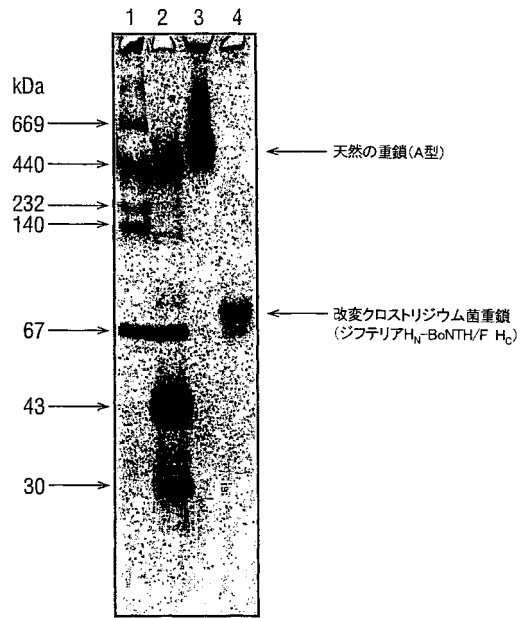
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



凡例:

レーン1:高分子量天然マーカー;Pharmacia

レーン2:低分子量マーカー;Pharmacia

レーン3:天然のボツリヌス菌重鎖(A型)

レーン4:改変クロストリジウム菌重鎖(ジフテリア菌H<sub>N</sub>-BoNTH/F H<sub>C</sub>)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/08	(2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/18	(2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

- (72)発明者 サットン, ジョン マーク  
イギリス国 エスピー4 0ジェイジー ウィルトシャー, ソールズベリー, ポートン ダウン (番地なし), シーエイエムアール, マイクロバイオロジカル リサーチ オーソリティ
- (72)発明者 シルマン, ニゲル  
イギリス国 エスピー4 0ジェイジー ウィルトシャー, ソールズベリー, ポートン ダウン (番地なし), シーエイエムアール, マイクロバイオロジカル リサーチ オーソリティ

審査官 遠藤 広介

- (56)参考文献 特表平05-502880(JP, A)  
FRANCIS, J.W. et al, CuZn superoxide dismutase (SOD-1): tetanus toxin fragment C hybrid protein for targeted delivery of SOD-1 to neuronal cells, J Biol Chem, 1995年, Vol. 270, No.25, p.15434-15442  
COEN, L. et al, Construction of hybrid proteins that migrate retrogradely and transynaptically into the central nervous system, Proc Natl Acad Sci U S A, 1997年, Vol.94, No.17, p.9400-9405  
FIGUEIREDO, D.M. et al, Delivery of recombinant tetanus-superoxide dismutase proteins to central nervous system neurons by retrograde axonal transport, Exp Neurol, 1997年, Vol.145, No.2 Pt 1, p.546-554

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 47/48  
A61K 31/711  
A61K 35/76  
A61K 38/00  
A61K 38/43  
A61K 47/42  
A61K 48/00  
BIOSIS(STN)  
CAplus(STN)  
EMBASE(STN)  
MEDLINE(STN)