

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3914484号

(P3914484)

(45) 発行日 平成19年5月16日(2007.5.16)

(24) 登録日 平成19年2月9日(2007.2.9)

(51) Int. Cl.	F I	
<b>C07K 14/33</b> (2006.01)	C O 7 K 14/33	Z N A
<b>A61K 38/00</b> (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
<b>A61P 31/04</b> (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
<b>C07K 19/00</b> (2006.01)	C O 7 K 19/00	
<b>C12N 15/09</b> (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

請求項の数 10 (全 87 頁)

(21) 出願番号	特願2002-238940 (P2002-238940)	(73) 特許権者	591018268
(22) 出願日	平成14年8月20日(2002.8.20)		アラージェン、インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願平8-514127の分割		ALLERGAN, INCORPORATED
原出願日	平成7年10月23日(1995.10.23)		アメリカ合衆国92612カリフォルニア
(65) 公開番号	特開2003-137897 (P2003-137897A)		州アーヴィン、デュボン・ドライブ252
(43) 公開日	平成15年5月14日(2003.5.14)		5番
審査請求日	平成14年8月20日(2002.8.20)	(73) 特許権者	503111078
(31) 優先権主張番号	08/329,154		アラージェン ボトクス リミテッド
(32) 優先日	平成6年10月24日(1994.10.24)		アメリカ合衆国 92612 カリフォル
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ニア州 アーヴィン、デュボン・ドライブ
(31) 優先権主張番号	08/405,496		2525番
(32) 優先日	平成7年3月16日(1995.3.16)	(74) 代理人	100091096
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	08/422,711		
(32) 優先日	平成7年4月14日(1995.4.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 可溶性組換えボツリヌス毒素タンパク

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

実質的にエンドトキシンを含まない可溶性融合タンパク質として精製した、ポリヒスチジンアフィニティタグ配列と配列番号4に示されるクロストリジウム・ボツリヌス毒素配列とを含む、可溶性組換えタンパク質、

但し、前記可溶性組換えタンパク質は配列番号2に示されるクロストリジウムボツリヌスA型毒素由来の全長配列を含むものではない。

## 【請求項2】

配列番号7に示される配列を含むものである、請求項1に記載の可溶性組換えタンパク質。

## 【請求項3】

ポリヒスチジンアフィニティタグ配列がクロストリジウム・ボツリヌス毒素配列に共有結合している、請求項1に記載の可溶性組換えタンパク質。

## 【請求項4】

大腸菌から取得された組換え発現タンパク質を含むものである、請求項1に記載の可溶性組換えタンパク質。

## 【請求項5】

水溶液環境下において可溶性である、請求項1に記載の可溶性組換えタンパク質。

## 【請求項6】

細菌の細胞質内の溶液中に存在するものである、請求項1に記載の可溶性組換えタンパク

質。

【請求項 7】

イオン性界面活性剤や変性剤を含まない溶液中に可溶化している、請求項 1 に記載の可溶性組換えタンパク質。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の可溶性組換えタンパク質を含む組成物。

【請求項 9】

組換え発現ベクターを含む宿主細胞であって、前記ベクターが請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の可溶性組換えタンパク質をコードする配列を含み、コードされた可溶性組換えタンパク質を宿主細胞中において全細胞タンパク質の 0.75% 以上のレベルで発現することを特徴とする宿主細胞。

10

【請求項 10】

大腸菌細胞において、ポリヒスチジンアフィニティタグ配列と配列番号 4 に示されるクロストリジウム・ボツリヌス毒素配列を融合タンパク質として組換え発現させ、実質的にエンドトキシンを含まない可溶性融合タンパク質として精製し、当該大腸菌細胞より可溶性融合タンパク質を取得する工程を含む、請求項 1 に記載の可溶性組換えタンパク質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本願は平成 7 年 10 月 23 日に国際出願された特願平 8-514127 からの分割出願である。親出願は既に特表 2002-514886 として公表済みであるので、その全部を参照して本分割出願の開示に含めるものとする。なお、同公表の開示中の比較的関連が薄い部分は、本願の限定された特許請求対象に鑑みこの明細書では記載を省略したが、かかる部分も必要あれば参照できるものとする。

20

【0002】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒト及びその他の動物のクロストリジウム抗毒素及びワクチン治療に関する。クロストリジウム毒素の病理学上の効果を中和する抗毒素を提供する。クロストリジウム疾患と関連する病的状態及び死亡を防ぐワクチンを提供する。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

クロストリジウム属はグラム陽性の嫌気性有芽胞桿菌である。この生物の天然での住処は環境中、及びヒトやその他の動物の消化管である。実際、クロストリジウム菌は至る所におり、土、ほこり、糞尿、海洋沈殿物、腐食する草木、及び泥などによく見られる（例えば、P.H.A. Sneathら, "Clostridium", Bergey's Manual<sup>TM</sup> of Systematic Bacteriology, Vol. 2, pp. 1141-1200, Williams & Wilkins, 1986 を参照）。クロストリジウム属には約 100 種が同定されているが、医学及び獣医学的病原体として重要であると認識されたものは少数である。しかしながら、これらの種はボツリヌス中毒症、破傷風、嫌気性蜂巣炎、ガス壊疽、菌血症、偽膜性大腸炎及びクロストリジウム胃腸炎を含む非常に深刻な病気と関連する。表 1 に、医学及び獣医学的に重要な種とそれに関連する病気とを列挙する。実際にはこれらの種は全て、一見健康なヒトの糞から単離されたので、これらの単離物のいくつかはコロニー相の永久的にというよりも一過的に住みついたものである。

30

40

【0004】

【表 1】

## 医学及び獣医学的に重要なクロストリジウム種\*

種	疾患
<i>C. aminovalericum</i>	細菌尿症(妊娠中の女性)
<i>C. argentinense</i>	感染創;菌血症;ボツリヌス中毒;羊水の感染
<i>C. baratii</i>	感染戦創;腹膜炎;目、耳及び前立腺の感染性過程

C. beijerinckii	感染創	
C. bifermentans	感染創;膿傷;ガス壊疽;菌血症	
C. botulinum	食中毒;ボツリヌス中毒(創傷、食品、幼児)	
C. butyricum	尿路、下部呼吸管、胸膜洞及び腹部感染;感染創;膿傷; 菌血症	
C. cadaveris	膿傷;感染創	10
C. carnis	柔組織感染;菌血症	
C. chauvoei	黒脚症	
C. clostridioforme	腹部、頸部、陰囊、胸膜洞及びその他の感染;敗血症; 腹膜炎;虫垂炎	
C. cochlearium	ヒトの疾患過程から単離されているが、疾患における 役割はわかっていない	
C. difficile	抗生物質関連の下痢;偽膜性小腸結腸炎;菌血症; 化膿性感染	20
C. fallax	柔組織感染	
C. ghnouii	柔組織感染	
C. glycolicum	創傷感染症;膿傷;腹膜炎	
C. hastiforme	感染創;菌血症;膿症	
C. histolyticum	感染創;ガス壊疽;歯肉斑単離物	
C. indolis	消化管感染	30
C. innocuum	消化管感染;蓄膿	
C. irregulare	陰茎病変	
C. leptum	ヒトの疾患過程から単離されているが、疾患における 役割はわかっていない	
C. limosum	菌血症;腹膜炎;肺感染	
C. malenominatum	各種感染過程	
C. novyi	感染創;ガス壊疽;黒脚症;巨大頭(ヒツジ); 羊炭疽症(ウシ)	40
C. oroticum	尿路感染症;直腸膿症	

<i>C. paraputrificum</i>	菌血症;腹膜炎;感染創;虫垂炎	
<i>C. perfringens</i>	ガス壊疽;嫌気性蜂巣炎;腹部内膿症;柔組織感染; 食中毒;壊死性肺炎;蓄膿;髄膜炎;菌血症;尿感染; 壊疽性腸炎;小羊赤痢;struck(羊の胃腸症); 壊疽性腸炎	
<i>C. putrefaciens</i>	細菌尿症(菌血症をもつ妊娠中の女性)	10
<i>C. putrificum</i>	膿症;感染創;菌血症	
<i>C. ramosum</i>	腹腔洞、生殖管、肺及び胆嚢管の感染;菌血症	
<i>C. sartagoforme</i>	ヒトの疾患過程から単離されているが、疾患における 役割はわかっていない	
<i>C. septicum</i>	ガス壊疽;菌血症;化膿性感染症;壊死性小腸結腸炎; ブラクシー	
<i>C. sordellii</i>	ガス壊疽;創傷感染;陰茎病変;菌血症;膿症; 腹部及び陰感染	20
<i>C. sphenoides</i>	虫垂炎;菌血症;骨及び柔組織感染;腹腔内感染; 感染戦創;内臓ガス壊疽;腎臓膿症	
<i>C. sporogenes</i>	ガス壊疽;菌血症;心内膜炎;中枢神経系及び肺胸膜 感染;陰茎病変;感染戦創;その他の化膿性感染	
<i>C. subterminale</i>	菌血症;蓄膿;胆嚢管、柔組織及び骨感染	30
<i>C. symbiosum</i>	肝臓膿傷;菌血症;腸菌相による感染	
<i>C. tertium</i>	ガス壊疽;虫垂炎;脳膿傷;腸管及び柔組織感染; 感染戦創;歯根膜炎;菌血症	
<i>C. tetani</i>	破傷風;感染歯肉及び歯;角膜潰瘍形成;乳突及び中耳 感染;腹腔内感染;新生児破傷風;分娩後子宮感染; 柔組織感染、特に外傷に関するもの(搔爬及び裂傷を 含む);汚染された針の使用による感染	40
<i>C. thermosaccharolyticum</i>	ヒトの疾患過程から単離されているが、疾患における 役割はわかっていない	

\* P.G. Engelkirchら, "分類", Principles and Practice of Clinical Anaerobic Bacteriology, pp.22-23, Star Publishing Co., Belmont, CA (1992); J. Stephenと R.A. Petrowski, "膜を通過し、細胞を脱制御するトキシン", Bacterial Toxins, 第2版, pp.66-67, American Society for Microbiology (1986); R. Berkowと A.J. Fletcher編, "細菌疾患", Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 第16版, pp.116-126, Merck Research Laboratories, Rahway, N.J. (1992); O.H. Sigmundと C.M. Fraser編, "クロストリジ

ウム感染", Merck Veterinary Manual, 第5版, pp.396-409, Merck & Co., Rahway, N.J. (1979) から編集。

多くの場合、これらの生物の病原性は強力なエキソトキシン又は非常に破壊的な酵素の放出と関連する。実際、クロストリジウム属のいくつかの種は医学的及び獣医学的に重要なトキシン及びその他の酵素を産生する (C.L. Hatheway, Clin. Microbiol. Rev. 3:66-98, 1990)。

【0005】

ヒト及び動物薬における重要性のために、これらのトキシン、特にクロストリジウム・ボツリヌス及びクロストリジウム・ディフィシルについては多くの研究が行われてきた。

【0006】

クロストリジウム・ボツリヌス クロストリジウム・ボツリヌス (Clostridium botulinum) のいくつかの株はヒト及び動物の健康に重要なトキシンを産生する (C.L. Hatheway, Clin. Microbiol. Rev. 3:66-98, 1990)。これらのトキシンの影響は腸の破壊を引き起こしうる下痢症状から死を引き起こしうる麻痺効果までと広い。特にクロストリジウム疾患を発生する危険があるのは、新生児及び健康状態の悪いヒト及び動物 (例えば、老年又は免疫不全疾患に関連する疾患に苦しむヒト及び動物) である。

【0007】

クロストリジウム・ボツリヌスは知られているうちで最も毒性の強い生物学的トキシンを産生する。ヒトの致死量は血流中のトキシンがたったの  $10^{-9}$  mg / kg 体重である。ボツリヌストキシンは筋肉への神経伝達をブロックし、弛緩性麻痺を引き起こす。トキシンが気道や呼吸筋に入ると、死を引き起こしうる呼吸障害を引き起こす (S. Arnon, J. Infect. Dis. 154:201-206, 1986)。

【0008】

クロストリジウム・ボツリヌスの胞子はほこりによって運ばれ、また土から取られた野菜、新鮮な果物、及び蜂蜜などの農産物に見られる。この生物に好適な条件下で、胞子は発芽して栄養細胞となり、これがトキシンを産生する (S. Arnon, Ann. Rev. Med. 31:541, 1980)。

【0009】

ボツリヌス中毒は血流中へのトキシンの導入の仕方に基づいて4つのタイプに分けられる。食品から生じるボツリヌス中毒は、ボツリヌストキシンを含む、正しく保存されなかつ十分に加熱されなかった食品を食べることによって発生する。1976年から1984年の間にアメリカ合衆国では355件の食品によるボツリヌス中毒があった (K.L. MacDonaldら, Am. J. Epidemiol. 124:794, 1986)。クロストリジウム・ボツリヌス中毒による死亡率は12%であり、特定のリスクグループではもっと高くなる (C.O. Tacketら, Am. J. Med. 76:794, 1984)。創傷によるボツリヌス中毒は、外傷を受けた組織にクロストリジウム・ボツリヌスが侵入してトキシンを産生し、血流中に吸収されることによって生じる。1950年以来、30件の創傷ボツリヌス中毒が報告されている (M.N. Swartz, "嫌気性胞子形成バチルス: クロストリジウム属", pp.633-646, B.D. Davisら (編集), Microbiology, 第4版 J.B. Lippincott Co., 1990)。トキシンを吸入すると吸入ボツリヌス中毒が起こる。吸入ボツリヌス中毒は実験室で偶発的にさらされることによって生じると報告されており (E. Holzer, Med. Klin. 42:1735, 1962)、またトキシンが生物戦の兵器として用いられるときに生じ得る (D.R. Franzら, Botulinum and Tetanus Neurotoxins, B.R. DaGupta編集, Plenum Press, New York, 1993, pp.473-476)。感染性幼児ボツリヌス中毒は、クロストリジウム・ボツリヌスが幼児の腸にすみつき、トキシンを産生し、これが血流に吸収されることによって生じる。胞子が吸い込まれ発芽することにより細菌が侵入すると思われる (S. Arnon, J. Infect. Dis. 154:201, 1986)。1976年に最初に認識されて以来、500件が報告されている (M.N. Swartz, 前出)。

【0010】

幼児ボツリヌス中毒は、3週から11ヶ月齢の幼児に起きる (90%以上が6ヶ月未満の幼児である) (S. Arnon, J. Infect. Dis. 154:201, 1986)。幼児は、成人の腸内微生物

10

20

30

40

50

物相が十分に備わっていないために感受性になるのが大きな原因であると考えられている。成人の腸に存在する老成の微生物相がクロストリジウム・ボツリヌスによる定着に好ましくない酸性環境を提供する。幼児は滅菌状態の腸で生まれ、徐々に微生物相が定着する。幼児初期には存在する微生物相が限られているので、腸内環境は酸性ではなく、クロストリジウム・ボツリヌスの孢子が発芽、成長し、トキシンを産生するのを許してしまう。この点において、腸内微生物相を変える抗生物質治療を受けている成人がボツリヌス中毒に感受性となることがある。

【0011】

感染性ボツリヌス中毒に対する幼児の感受性を説明するもう1つの要因は、幼児の免疫系が未熟なことである。成熟した免疫系は細菌抗原に対して感受性であり、防御的抗体を産生する。成人の腸内で産生される分泌性IgAは、クロストリジウム・ボツリヌスの栄養細胞を凝集する能力を有する(S. Arnon, J. Infect. Dis. 154:201, 1986)。分泌性IgAは腸内細菌及びその産物が腸内の細胞を横切るのを防ぐことによって作用する(S. Arnon, Epidemiol. Rev. 3:45, 1981)。幼児の免疫系はこれを行うように初回免疫を受けていない。

10

【0012】

幼児ボツリヌス中毒の臨床症状は軽い麻痺から、入院を要する中程度及び重い麻痺、さらには突然死に至る劇症麻痺まで様々である(S. Arnon, Epidemiol. Rev. 3:45, 1981)。

【0013】

重症の幼児ボツリヌス中毒に対する主な治療は、機械的呼吸器を用いる呼吸補助と同時に下剤、浣腸、及び消化管洗浄を用いるトキシンの除去である。カリフォルニアでは1年間に幼児ボツリヌス中毒で68人が入院したが、治療に要した費用の合計は400万ドル以上であった(T.L. FrankovichとS. Arnon, West. J. Med. 154:103, 1991)。

20

【0014】

クロストリジウム・ボツリヌスの種々の株はA-Gの文字で呼ばれる抗原的に異なるトキシンをそれぞれ産生する。血清型Aトキシンは食品ボツリヌス中毒の26%に関与しており；血清型B、E及びFは食品ボツリヌス中毒により低い割合で関与している(H. Sugiyama, Microbiol. Rev. 44:419, 1980)。創傷ボツリヌス中毒はA型又はB型トキシンによってのみ引き起こされることが報告されている(H. Sugiyama, 前出)。幼児ボツリヌス中毒のほとんど全てのケースがA型又はB型トキシンを産生する細菌によって引き起こされてきた(例外的に、ニューメキシコでの1件はF型トキシンを産生するクロストリジウム・ボツリヌスによるものであり、別の1件はB型-F型ハイブリッドを産生するクロストリジウム・ボツリヌスによって引き起こされた)(S. Arnon, Epidemiol. Rev. 3:45, 1981)。C型トキシンは水鳥、ウシ、ウマ及びミンクに影響する。D型トキシンはウシに影響し、E型トキシンはヒト及び鳥の両方に影響する。

30

【0015】

ウマ血清由来の三価の抗トキシンは、トキシンA、B及びE型の治療としてConnaught Industries Ltd. から入手できる。しかしながら、この抗トキシンにはいくつかの欠点がある。第1に、極めて大量の用量を静脈内及び/又は筋肉内に注射しなければならない。第2に、抗トキシンには急性アナフィラキシーなどの深刻な副作用があり、死亡や血清病に至ることがある。最後に、抗トキシンの効果は確実でなく治療費用は高い(C.O. Tacketら, Am. J. Med. 76:794, 1984)。

40

【0016】

抗体分子のF(ab')<sub>2</sub>部分のみを用いる七価のウマボツリヌス抗トキシンを米国軍が試験した(M. Balady, USAMRDC Newsletter, p.6, 1991)。この抗トキシンはこれら的大型動物において精製されていないトキソイドを用いて作製されたものであり、力価は高くない。

【0017】

幼児ボツリヌス中毒の治療用として免疫したヒト被験者から五価のヒト抗トキシンが回収された。この抗トキシンの供給は限られており、ボツリヌス中毒に襲われた全ての患者の

50

必要を満たすことはできない。さらに、ヒト血清からの回収には、H I V やその他の深刻なヒト病原体を除くスクリーニングを行わなければならない ( P. J. Schwarz and Arnon , Western J. Med . 156:197 , 1992 ) 。

【 0 0 1 8 】

幼児ボツリヌス中毒は幼児突然死症候群 ( S I D S 、 ベッド死としても知られている ) のいくつかのケースの死因であることが示唆されている。 S I D S は突然で予期できず、かつ死後の完全な検査にもかかわらず説明できない幼児の死亡であると公式には認識されている。 S I D S と幼児ボツリヌス中毒との関連は、 S I D S の幼児からの剖検で採取された便又は血液試料において、分析したケースの 3 - 4 % にクロストリジウム・ボツリヌス及び / 又はトキシンが含まれていることが判明したことから問題となった ( D. R. Peterso 10 n ら , Rev. Infect. Dis. 1:630 , 1979 ) 。これとは対照的に、健康な幼児では 1 6 0 人中に 1 人だけ ( 0 . 6 % ) 便の中にクロストリジウム・ボツリヌスが見られ、ボツリヌストキシンは全く見られなかった ( S. Arnon ら , Lancet , pp.1273-76 , June 17 , 1978 ) 。

【 0 0 1 9 】

先進国では、 S I D S は 1 カ月から 1 歳までの子供の死因の 1 位を占める ( S. Arnon ら , Lancet , pp.1273-77 , June 17 , 1978 ) 。生後 1 4 年間のいかなる単独の死因よりも最初の 1 年間における S I D S で死ぬ子供の方が多い。米国では、毎年 8 0 0 0 - 1 0 0 0 0 人の S I D S による犠牲者がいる ( 同上 ) 。

【 0 0 2 0 】

危険な副作用がなく、妥当な価格で大量供給でき、しかも幼児への予防投与ができるよう 20 に安全かつ穏やかに投与しうる幼児ボツリヌス中毒に対する有効な治療が必要とされている。

【 0 0 2 1 】

ボツリヌストキシンに対する免疫を誘導する試みとして、トキシン調製物による被験者の免疫感作が行われてきた。化学的に不活性化した ( すなわち、ホルムアルデヒド処理した ) A、B、C、D 及び E 型トキシンを含むクロストリジウム・ボツリヌスワクチンがヒト用に市販されている。しかしながら、このワクチン調製物はいくつかの欠点をもっている。第 1 に、このワクチンの有効性は様々である ( 特に、初回接種の後、接種を受けた 7 8 % のみが防御的レベルの抗 B 型抗体を生産した ) 。第 2 に、免疫感作は苦痛を伴う ( 投与には深部の皮下接種を必要とする ) とともに、一般的に副作用を伴う ( 初回接種で約 6 % 30 が中程度から重い局部反応を示し、この数字は追加接種を受けたヒトでは約 1 1 % に上昇した ) [ 五価 ( A B C D E ) ボツリヌストキソイドのための情報パンフレット、Centers for Disease Control ] 。第 3 に、活性トキシンを実験従事者が扱わねばならないので、ワクチン調製は危険である。

【 0 0 2 2 】

クロストリジウム・ボツリヌストキシンにさらされる危険性のあるヒトに投与するための安全かつ有効なワクチン調製物が必要とされている。

【 0 0 2 3 】

【 課題を解決するための手段 】

定義 本発明を理解しやすくするために、多くの用語を以下で定義する。 40

【 0 0 2 4 】

本明細書中で用いる「中和」とは、抗トキシン、特にトキシン ( このトキシンに対して抗トキシンが誘導される ) の病理学的作用を抑制する能力がある抗体からなる抗トキシンに関して用いられる。

【 0 0 2 5 】

本明細書中で用いる「過剰生産」とは、宿主細胞におけるクロストリジウムトキシンポリペプチドの生産に関して用いられ、宿主細胞がクロストリジウムトキシンポリペプチドをコードする核酸配列を導入されたことによって、該核酸配列が導入されていない宿主細胞から発現されるよりも多くクロストリジウムトキシンを生産することを示す。宿主細胞により生産されたトキシンポリペプチドの精製を容易にするために、宿主細胞は該トキシン 50



ポリペプチドを宿主細胞培養物 1 リットルにつき 1 mg より多いレベルで該トキシンポリペプチドを発現または過剰生産することが望ましい。

【0026】

本明細書中で用いる「融合タンパク質」とは、外因性タンパク質断片（無毒性タンパク質からなる融合相手）に結合された対象のタンパク質を含むキメラタンパク質をいう。融合相手は宿主細胞において発現されたクロストリジウムタンパク質の溶解度を高めるものであっても、宿主細胞または培養上清からの組換え融合タンパク質の精製を可能にするアフィニティータグを提供するものであっても、その両方であってもよい。所望により、融合タンパク質は当技術分野で知られた種々の酵素的または化学的手段によって免疫感作の前に対象のタンパク質（すなわち、トキシンタンパク質またはその断片）から分離することができる。

10

【0027】

本明細書中で用いる「無毒性タンパク質」または「無毒性タンパク質配列」とは、細菌のトキシンタンパク質に由来するものではないタンパク質またはタンパク質配列からなる融合タンパク質の一部を指す。

【0028】

本明細書中で用いる「対象のタンパク質」とは、その発現が望まれる融合タンパク質内のタンパク質を指す。融合タンパク質において、対象のタンパク質の溶解度を高めかつ/または融合タンパク質の精製を容易にするために、対象のタンパク質は別のタンパク質またはタンパク質ドメイン、つまり融合相手、と結合または融合される。

20

【0029】

本明細書中で用いる「マルトース結合タンパク質」とは、大腸菌のマルトース結合タンパク質を指す。マルトース結合タンパク質の一部は融合タンパク質を得るために対象のタンパク質に付加され得る。マルトース結合タンパク質の一部は細菌宿主において発現された融合タンパク質の溶解度を高める一方で、アミロース樹脂上での融合タンパク質のアフィニティータグ精製を可能にする。

【0030】

融合タンパク質に関して本明細書中で用いる「ポリヒスチジン配列」(polyhistidine tract)とは、対象のタンパク質または融合相手のアミノ末端もしくはカルボキシ末端のいずれか、または両末端に 2 ~ 10 個のヒスチジン残基が存在することを意味する。6 ~ 10 個の残基のポリヒスチジン配列が好適である。ポリヒスチジン配列は、ニッケルキレートカラムでの融合タンパク質のアフィニティータグ精製を可能にする、対象のタンパク質に付加された多数の連続したヒスチジン残基である、と機能的に定義することもできる。

30

【0031】

融合タンパク質に関して本明細書中で用いる「チオレドキシタンパク質」とは、大腸菌のチオレドキシタンパク質を指す。本発明はチオレドキシタンパク質の供給源により制限されず、大腸菌のチオレドキシタンパク質が特に好ましいものの、チオレドキシタンパク質はいくつかの供給源から得ることができることに留意されたい。チオレドキシタンパク質の一部は融合タンパク質を得るために対象のタンパク質に付加され得る。チオレドキシタンパク質の一部は細菌宿主において発現された融合タンパク質の溶解度を上げることができる。

40

【0032】

本明細書中で用いる「精製された」または「精製する」とは、サンプルからの汚染物質の除去を意味する。例えば、抗トキシンは混入している非免疫グロブリンタンパク質の除去により精製される。また、それらはトキシンと結合しない免疫グロブリンの除去によっても精製される。非免疫グロブリンタンパク質の除去および/またはトキシンと結合しない免疫グロブリンの除去は、サンプル中のトキシン反応性免疫グロブリンの比率を増加させる。抗トキシンの精製は、ポリエチレングリコールを用いて卵からトリ抗トキシンを抽出・精製することを含めて種々の方法により行うことができる。また、抗クロストリジウム抗トキシンの精製は、クロストリジウムトキシンタンパク質の一部を含む樹脂上でのアフ

50

イニティークロマトグラフィーにより行うことも可能である。別の例では、組換えトキシンポリペプチドを細菌宿主細胞において発現させ、該トキシンポリペプチドを宿主細胞タンパク質の除去により精製する。これにより、サンプル中の組換えトキシンポリペプチドの比率が増加する。さらに、組換えトキシンポリペプチドはリポ多糖（例：エンドトキシン）のような宿主細胞成分の除去により精製される。

【0033】

本明細書中で用いる「組換えDNA分子」とは、分子生物学的手法により一緒に結合されたDNAのセグメントから成るDNA分子をいう。

【0034】

本明細書中で用いる「組換えタンパク質」とは、組換えDNA分子から発現されるタンパク質分子のことである。

【0035】

本明細書中で用いる「天然のタンパク質」とは、組換え法によるタンパク質の生産とは対照的に天然の供給源から単離されるタンパク質のことである。

【0036】

本明細書中でタンパク質に関して（「所定のタンパク質の一部」のように）用いる「一部」とは、そのタンパク質の断片を指す。かかる断片は4個のアミノ酸残基から全アミノ酸配列マイナス1アミノ酸までの大きさでありうる。

【0037】

組換えDNA法により宿主細胞において産生されたタンパク質に関して本明細書中で用いる「可溶性」とは、宿主細胞の細胞質中に溶解状態で存在するタンパク質を指す。このタンパク質がシグナル配列を含むのであれば、可溶性タンパク質は細菌宿主の周辺腔に輸送され、そして分泌能のある真核細胞によりまたは適当な遺伝子（すなわち、*kil*遺伝子）を保持する細菌宿主により培地中に分泌される。これに対して、不溶性タンパク質は宿主細胞の（封入体と呼ばれる）細胞質顆粒内に変性形態で存在するものである。組換えタンパク質の高レベル発現（すなわち、細菌培養物1リットルあたり組換えタンパク質が10~20mg以上）は、しばしば細菌宿主細胞の封入体中に発現タンパク質を存在させる。可溶性タンパク質は宿主細胞内の封入体中に存在しないか、または細胞質と封入体の両方に存在する（この場合にはタンパク質が細胞質中に高レベルまたは低レベルで存在しうる）タンパク質である。

【0038】

可溶性タンパク質（すなわち、宿主細胞において発現されたとき可溶性形態で産生されるタンパク質）と「可溶化」タンパク質とは区別される。封入体中に存在する不溶性の組換えタンパク質は、精製された封入体を塩酸グアニジン、尿素、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）などの変性剤で処理することで可溶化する（すなわち、可溶性形態にする）ことができる。その後、これらの変性剤を可溶化タンパク質調製物から除去し、回収されたタンパク質を還元（再生）させる必要がある。変性剤による可溶化および変性剤の除去後に、すべてのタンパク質が活性型のコンフォメーションに再生されとは限らない。多くのタンパク質は変性剤の除去の際に沈殿する。SDSは封入体の可溶化に用いられ、タンパク質を低濃度の溶解状態に維持するだろう。しかし、透析によってSDSがすべて除去されるとは限らない（SDSは透析で除去されないミセルを形成しうる）。それゆえ、SDSで可溶化した封入体タンパク質は可溶性であるが、再生されない。

【0039】

多量のイオン性界面活性剤（例：SDS）または変性剤（例：尿素、塩酸グアニジン）を含まない溶液に可溶性である（すなわち、溶解する）タンパク質と、該溶液中に分散された不溶性タンパク質分子の懸濁体として存在するタンパク質とは区別される。可溶性タンパク質は、液体媒質中に存在する細菌を除去するのに十分な条件下での遠心分離（すなわち、5000×g、4~5分の遠心）により、該タンパク質を含有する溶液から分離されないだろう。例えば、2種類のタンパク質、タンパク質Aとタンパク質Bが溶液中に可溶か不溶かを試験するためには、PBS-NaCl(0.5M NaClを含むPBS)、0.2% Tween 20を含むPBS-NaC

10

20

30

40

50

I、PBS、0.2% Tween 20を含むPBS、PBS-C(2mM CaCl<sub>2</sub>を含むPBS)、0.1または0.5% Tween 20を含むPBS-C、0.1または0.5% NP-40を含むPBS-C、0.1または0.5% Triton X-100を含むPBS-C、0.1%デオキシコール酸ナトリウムを含むPBS-Cより成る群から選ばれる溶液中に2種類のタンパク質を入れる。その後、タンパク質AおよびBを含む混合物を5000×gで5分遠心する。続いて、遠心により形成されたペレットと上清にタンパク質AおよびBが存在するかを調べる。タンパク質Aが上清に存在してペレットに含まれない〔捕捉の結果としての少量(すなわち、10%未満)を除く〕場合、該タンパク質は試験した溶液に可溶性であるといえる。タンパク質Bの大部分がペレット中に存在する(すなわち、90%以上)場合は、タンパク質Bは試験した溶液中に懸濁状態で存在しているといえる。

【0040】

本明細書中で用いる「治療的量」とは、被検者における1以上のクロストリジウムトキシンの病理学的作用を中和するのに必要とされる抗トキシンの量のことである。

【0041】

抗トキシンの混合物に関して用いるときの「治療用混合物」とは、被検者における1以上のクロストリジウムトキシンの病理学的作用を中和するのに必要とされる量の抗トキシンをいう。

【0042】

1以上の組換えクロストリジウムトキシン融合タンパク質を含有するワクチンに関して用いるときの「治療用ワクチン」とは、該ワクチンが免疫的に有効な量の融合タンパク質(すなわち、免疫原)を含んでいることを意味する。

【0043】

本明細書中で用いる「免疫原として有効な量」とは、ワクチンを接種した際に宿主(すなわち、被検者)において防御レベルの抗体の産生を引き出すのに必要な免疫原の量をいう。

【0044】

本明細書中で用いる「発熱物質」とは、発熱を誘導する物質を指す。発熱物質は宿主に内因性のもの(例:プロスタグランジン)であったり、外因性の化合物(例:細菌のエンドトキシンおよびエキソトキシン、抗原やある種のステロイド化合物のような非細菌性の化合物など)であったりする。医薬用の溶液中の発熱物質の存在は米国薬局方(USP)ウサギ発熱試験を用いて検出できる(米国薬局方第XXII巻(1990)United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, p. 151)。

【0045】

本明細書中で用いる「エンドトキシン」とは、グラム陰性細菌の外膜と関連した高分子量の複合体を指す。未精製のエンドトキシンは脂質とタンパク質と炭水化物を含んでいる。高度に精製されたエンドトキシンはタンパク質を含まず、リポ多糖(LPS)と呼ばれる。未精製のエンドトキシンは医薬用化合物(例えば、組換えDNA法を用いて大腸菌で産生されるタンパク質)の生産と重要な関係にあるので、ここで用いるエンドトキシンという用語は未精製のエンドトキシンを指す。細菌のエンドトキシンは公知の発熱物質である。

【0046】

宿主に非経口投与(髄腔内投与を除く)される組成物に関して本明細書中で用いる「エンドトキシンを含まない」とは、送達される用量が5EU/kg(体重)未満を含むことを意味する〔非経口薬剤に関するFDAガイドライン(1987年12月)〕。成人の体重を70kgと仮定すると、非経口投与のFDAガイドラインを満たすためには投薬量が350EU未満を含まなければならない。エンドトキシンのレベルは本明細書ではリムルス・アメーバ様細胞分解産物(LAL)試験を用いて測定される(Limulus Amebocyte Lysate Pyrochrome<sup>TM</sup>, Associates of Cape Cod, Inc., Woods Hole, MA)。組換えタンパク質の調製物中に含まれるエンドトキシンのレベルを測定するには、50mM NaPO<sub>4</sub>, pH7.0, 0.3M NaClおよび10%グリセロール中に精製組換えタンパク質0.5mgを含む溶液0.5mlを用いて、ジアゾカップリング法なしで色素を生じるエンドポイントを製造業者の説明書に従ってLALアッセイで測定す

10

20

30

40

50

る。精製組換えタンパク質 1 mgあたり450エンドトキシン単位(EU)以下を含む組成物を本明細書では「実質的にエンドトキシンを含まない」と定義する。一般的に、ワクチン接種の目的で成人に細菌トキシンまたはトキシドを投与する場合、1回につき約10~500 $\mu$ gのタンパク質が必要である。したがって、精製組換えタンパク質調製物が450EU/mg(タンパク質)を含むとすると、70kgのヒトに10~500 $\mu$ gの精製組換えタンパク質を投与することは、結果的に4.5~225EU(すなわち、1回の非経口投与につき最大許容エンドトキシシ量の1.3~64.5%)ほどを導入することとなる。

#### 【0047】

LAL試験は細菌のエンドトキシン検出法として米国FDAにより認可されている(21 C.F.R. § 660.100-105)。LAL試験はエンドトキシン検出用のUSPウサギ発熱物質試験と同等であるかまたはそれより優れており、かくして動物における発熱物質研究の代替法として使用できることが研究により示された[F.C. Perason, Pyrogens: endotoxins, LAL testing and depyrogenation, Marcel Dekker, New York(1985), pp.150-155]。用いるLALアッセイがウサギ発熱物質試験と同程度にまたはそれ以上に感受性であることが明らかであるから、FDA生物学局はUSPウサギ発熱物質試験の代わりにLALアッセイを認可している[Fed. Reg., 38, 26130(1980)]。

10

#### 【0048】

クロストリジウムワクチンに関して用いるときの「1価」とは、宿主動物(すなわち、被検者)においてただ1つの型のクロストリジウムトキシンに対する免疫応答を誘発することができるワクチンを指す。例えば、C. difficile A型トキシンワクチンによる宿主の免疫感作が、免疫した宿主をA型トキシンによるチャレンジから防御するがB型トキシンによるチャレンジから防御しない抗体を誘導するのであれば、そのA型ワクチンは1価であるとされる。これに対して、「多価」ワクチンは数種類(すなわち、1種類より多い)クロストリジウムトキシンに対する免疫応答を宿主動物において引き出す。例えば、C. difficile A型およびB型トキシンを含むワクチンによる宿主の免疫感作が、A型とB型の両トキシンによるチャレンジから宿主を防御する抗体の産生を誘導する場合、そのワクチンは多価であるといえる(特に、この仮想的ワクチンは2価である)。

20

#### 【0049】

本明細書中で用いる「凝集する」および「凝集」とは、物質の集合体、群または塊を形成することを意味する。この用語は特定のタイプの集合に限定されるものではない。むしろ、この用語は、多数の物質が一緒に集まって密着するようなあらゆる状況を包含すべく最も広い意味で用いられる。かくして、この用語はあらゆるタイプの凝集(ラテックス凝集、赤血球凝集反応、または凝集させるために免疫学的反応が用いられる他の方法を含むが、これらに限らない)を包含する。この用語はまた非免疫学的方法にも適用され、多数の成分間の非特異的關係をも包含する。要求されることは個々の成分が一緒に集合することだけである。

30

#### 【0050】

抗トキシンまたはワクチンを含有する組成物の投与に関して用いるときの「被検者」とは、抗トキシンまたはワクチンが投与される受容動物のことである。被検者は哺乳動物を含めたどのような動物であってもよく、特に該組成物をヒトに投与することが望ましい。

40

#### 【0051】

本明細書および請求の範囲中の「サンプル」とは、最も広い意味で用いられる。一方では、それは検体または培養物(例:微生物学的培養物)を含むものである。他方では、それは生物学的サンプルと環境サンプルの両方を含むものである。

#### 【0052】

生物学的サンプルはヒトを含めた動物、体液、固形物(例:糞便)または組織、ならびに乳製品、野菜、肉および肉加工品、廃物などの液体および固体の食物および食料品でありうる。生物学的サンプルはさまざまな科の家畜、および有蹄動物、クマ、魚類、ウサギ、げっ歯類などの動物を含むがこれらに限らない食用または野生動物のすべてから得ることができる。

50

## 【0053】

環境サンプルは表面物質、土壌、水、産業上のサンプルなどの環境物質、ならびに食品および乳製品の加工器具、装置、設備、用具、使い捨ておよび使い捨てでない物品を含むものである。これらの例は本発明に適用できるサンプルの種類を制限するものと解釈されるべきでない。

## 【0054】

本明細書中で用いる「培養」とは、細菌を含むがこれのみに限らない生物の *in vivo* または *in vitro* 成長に関して用いられる。この用語は微生物培養のあらゆる形態を包含するものである。この用語は成長を助ける環境および培地での微生物または他の生細胞の増殖を包含する。かかる培養物は寒天プレート、ブロス、半固形培地を含むがこれらに限らない任意の様式で成長させてよく、また、培養すべき生物に適したどのような環境（すなわち、好気性、嫌気性、微好気性など）で成長させてもよい。

10

## 【0055】

本明細書中で用いる「上清」という用語は液体または流体のあらゆる溶液に対して用いられる。この液体または流体はタンパク質（例：抗体またはトキシン分子）のような可溶性粒子を含んでいてもいなくてもよい。この用語は沈殿した不溶性物質の上にある液体のみならず、微生物または細胞の培養物から回収される液体培地のような液体をも包含する。これはまた、遠心中に溶液中に残存し得る粒子から遠心中に溶液中に残存し得ない不溶性粒子を分離するために遠心されたサンプルの液体部分をも包含する。しかし、この用語は遠心分離を採用する場合に限定されるものではない。

20

## 【0056】

細菌トキシンを含む免疫原で宿主を免疫した際に誘導される抗体のレベルに関して用いるときの「防御レベル」とは、致死量のトキシンによるチャレンジから宿主を防御するのに十分な循環抗体のレベルを意味する。

## 【0057】

本明細書中で用いる「タンパク質」および「ポリペプチド」とは、ペプチド結合で連結されたアミノ酸からなる化合物をいい、これらの用語は相互交換可能に用いられる。

## 【0058】

クロストリジウム属のメンバー（すなわち、種および株）により産生されたトキシンに関して用いられる「毒素（トキシン）」とは、組織に対して有毒なタンパク質のことである。例えば、*C. difficile* により産生されるトキシンは腸の組織に有毒であり、*C. botulinum*（ボツリヌス菌）により産生されるトキシンは神経組織に対して有毒である。

30

## 【0059】

「カプセル化」または「カプセル化する」という用語は、抗トキシンの固体形態（例えば、凍結乾燥形態）の被覆を意味する。被覆は腸溶コーティングまたはカプセルを含みうる。「腸溶コーティング」または「腸溶剤皮」は相互交換可能に用いられ、胃の中の pH のような酸性 pH に抵抗性の物質または化合物（すなわち、酸抵抗性化合物）を指す。固体に腸溶コーティングをかけると、胃の中での該固体の溶解が防止される。

## 【0060】

固体組成物をカプセル化するための標準的な技法は当技術分野で公知である。こうした技法として、腸溶コーティングを固体組成物にかけると、固体組成物のマイクロカプセル化がある。当技術分野で公知の医薬用懸濁溶液中にマイクロカプセル化粒子を懸濁すると、コーティングした物質を被検者に経口投与することができる。

40

## 【0061】

固体の抗トキシンを腸溶コーティングでカプセル化しようとする場合、固体の抗トキシニンに腸溶剤皮を直接かける 1 工程コーティング法を用いて腸溶コーティングをかけることができる。コーティングされた抗トキシンは腸溶剤皮でオーバーコーティングされたことになる。また、2 工程コーティング法を用いることもでき、この場合は、最初に固体の抗トキシニンをノン-パリアル（non-pariel、すなわち約 40~60 メッシュのサイズの砂糖粒子）でオーバーコーティングし、続いて抗トキシニンをコーティングしたノン-パリアルを腸溶

50

剤皮でオーバーコーティングする。抗トキシンの投与に適した腸溶剤皮としてポリメタクリレート類、例えばEudragit (R) L300 (Rohm Tech, Inc.)がある。

【0062】

固体の抗トキシンは、所望量の抗トキシンをカプセル内に挿入することにより経口投与用に製剤化することができ、そのカプセルは好ましくは胃の中で溶解に抵抗するが腸の中で溶解する性質をもつだろう。多数の適当なカプセル製剤が当技術分野で入手可能であり、さらに、固体の治療用組成物をカプセルに充填するときの十分なかさ（容積）を得るための不活性充填剤の使用を含めて、カプセル充填のための標準的な技法が利用可能である。マイクロカプセル化抗トキシンおよびカプセル内に保持させた抗トキシンの使用に加えて、固体の抗トキシンは錠剤または丸剤の剤形で経口的に投与することもできる。固体の抗トキシンを不活性物質と混合して、錠剤や丸剤に圧縮するのに十分なかさとする。成型した後、胃の中での溶解を防止しかつ腸の中での溶解を高める腸溶剤皮でその錠剤または丸剤をコーティングする。

10

【0063】

「経口投与」という用語は、抗トキシンを含有する組成物のような組成物を口から投与することを意味する。

【0064】

「非経口投与」という用語は、抗トキシンまたはワクチンを含有する組成物のような組成物を胃腸管経路（例えば、経口投与）または肺経路以外の経路で投与することを意味する。特に、非経口投与は静脈内、皮下、筋肉内または髄内（すなわち、髄腔内）注射により行われる。

20

【0065】

本発明は、トキシン（毒素）に由来するポリペプチドの生産に関する。一実施態様において、本発明はポリヒスチジン配列とトキシンの一部とを含んでなる融合タンパク質を提供する。本発明は該トキシンの型または性質により制限されるものではない。例として、クロストリジウム属のメンバーにより産生されるトキシンの一部が、ポリヒスチジン配列を含む融合タンパク質として発現される。

【0066】

好適な実施態様では、トキシンポリペプチドがクロストリジウム・ボツリヌス (*Clostridium botulinum*) の神経毒からなる。本発明はワクチンおよび抗トキシン生産用の免疫原としての *C. botulinum* トキシン由来のポリペプチドの使用を意図している。 *C. botulinum* のワクチンおよび抗トキシンはヒトや他の動物に用いられる。一実施態様において、本発明は非トキシンタンパク質配列と *Clostridium botulinum* A 型トキシンの一部を含んでなる融合タンパク質を提供する。好適な実施態様では、 *C. botulinum* A 型トキシン配列が配列番号 2 の配列の一部からなる。さらに他の好適な実施態様では、 *C. botulinum* A 型トキシン配列が配列番号 4 の配列の一部からなる。本発明は融合タンパク質の性質により制限されるものではない。例えば、融合タンパク質は配列番号 4 に示した *Clostridium botulinum* A 型トキシン配列とポリヒスチジン配列とを含んでなる。

30

【0067】

また、本発明は組換え発現ベクターを含有する宿主細胞を提供し、ここで該ベクターは非トキシンタンパク質配列および配列番号 2 の *Clostridium botulinum* A 型トキシン配列の一部を含んでなる融合タンパク質をコードしている。この実施態様では、宿主細胞はコード化された *Clostridium botulinum* A 型トキシンタンパク質を可溶性タンパク質として全細胞タンパク質の 0.25~10% のレベルで、好ましくは全細胞タンパク質の 0.75% 以上のレベルで発現することができる。本発明は宿主細胞内の組換えベクターにより発現される融合タンパク質の性質により制限されるものではない。例えば、融合タンパク質は配列番号 4 に示した *Clostridium botulinum* A 型トキシン配列とポリヒスチジン配列とを含んでなる。

40

【0068】

本発明はさらに、配列番号 2 の *Clostridium botulinum* A 型トキシン配列に由来するタン

50

パク質をコードしている組換え発現ベクターを含有する宿主細胞を提供する。この実施態様では、宿主細胞はコード化されたClostridium botulinum A型トキシンタンパク質を全細胞タンパク質の10~40%のレベルで、好ましくは全細胞タンパク質の20%以上のレベルで発現することができる。本発明は宿主細胞内の組換えベクターにより発現される融合タンパク質の性質により制限されるものではない。例えば、融合タンパク質は配列番号4に示したClostridium botulinum A型トキシン配列とポリヒスチジン配列とを含んでなる。

**【0069】**

一実施態様において、本発明は、非トキシンタンパク質配列および配列番号2のClostridium botulinum A型トキシン配列の一部を含んでなる精製された可溶性融合タンパク質を得、この精製された融合タンパク質で宿主を免疫して天然のClostridium botulinum A型トキシンを中和しうる抗体を産生させることを含んでなる、Clostridium botulinum A型トキシンに対する中和抗トキシンの産生方法を提供する。単なる例として、該融合タンパク質は配列番号4に示したClostridium botulinum A型トキシン配列の一部とポリヒスチジン配列とを含んでなる。この方法はさらに宿主から抗体を採集する追加の工程を含むことができる。また、採集した抗体を精製することも意図される。本発明は上記の方法により誘導された、組成物としての、抗体を提供する。

**【0070】**

さらに、本発明は、Clostridium botulinum A型トキシンから誘導された組換え融合タンパク質の精製方法を提供する。この実施態様では、組換え融合タンパク質はポリヒスチジン配列を含み、ポリヒスチジン配列と配列番号2のClostridium botulinum A型トキシン配列の一部を含んでなる融合タンパク質を含有する溶液、および固相支持体に共有結合された2価カチオンを含むクロマトグラフィー樹脂を(任意の順序で)用意する。この実施態様では、融合タンパク質をクロマトグラフィー樹脂に結合させるため、該溶液をクロマトグラフィー樹脂に添加する。この実施態様はさらに、融合タンパク質を結合させたクロマトグラフィー樹脂を洗浄してクロマトグラフィー樹脂から非融合タンパク質を除き、洗浄したクロマトグラフィー樹脂から融合タンパク質を溶出する工程を含みうる。

**【0071】**

好適な実施態様において、クロマトグラフィー樹脂は固相支持体に固定化されたニッケルイオンを含むものである。市販されているニッケルイオンカラムの例として、His・Bind R樹脂(Novagen)およびNi-NTAアガロース樹脂(Qiagen)がある。Ni-NTAアガロース樹脂はポリヒスチジン配列を含む結合タンパク質に対して非常に高い親和性を有するので、好ましいクロマトグラフィー樹脂である。

**【0072】**

本発明は、ポリヒスチジン配列と配列番号2のClostridium botulinum A型トキシン配列の一部を含んでなる融合タンパク質を含有する溶液の性質によって制限されるものではない。一実施態様において、この溶液は組換え融合タンパク質を含む宿主細胞の細胞ペレットから誘導される可溶性の抽出物を含有する。さらに他の実施態様において、この可溶性抽出物を細胞ペレットから生成させるために、細胞ペレットを結合緩衝液中に懸濁し、該懸濁液を破碎して宿主細胞の膜を破壊させることにより可溶性タンパク質と不溶性細胞破片を含む混合物を生成させる。別の実施態様において、Clostridium botulinum A型トキシンから誘導される組換え融合タンパク質(ポリヒスチジン配列を含む)の精製方法はさらに、破碎した細胞懸濁液から不溶性の細胞破片を除いて澄明な可溶性溶解物を生成させる追加の工程を含む。さらに別の実施態様において、組換え融合タンパク質の精製方法は澄明な可溶性溶解物への非イオン界面活性剤の添加を伴う。好ましい非イオン界面活性剤はノニデット(Nonidet) P-40である。組換え融合タンパク質の精製方法の他の好適な実施態様は、非イオン界面活性剤を含む澄明な可溶性溶解物をクロマトグラフィー樹脂とともに4で1時間以上インキュベートして、融合タンパク質をクロマトグラフィー樹脂に結合させる追加の工程を含む。約3時間のインキュベーション工程が特に好適である。

**【0073】**

本発明は、実質的にエンドトキシンを含まないC. botulinum神経毒から誘導されたヒトお

10

20

30

40

50

よび他の動物のポリペプチドをワクチン接種することを意図している。これらのボツリヌスペプチドは抗トキシンの産生にも有用である。抗ボツリヌストキシン抗トキシンは*C. botulinum*トキシンの作用による症状を示したまたは該症状を示す危険のある患者を治療するのに有用である。これらの生物、トキシンおよび本発明の個々の工程を以下に別々に記載する。

【0074】

I. クロストリジウム種、クロストリジウム疾患および関連トキシン

本発明の好適な実施態様は、クロストリジウム種、それらのトキシン、酵素もしくは他の代謝産物、細胞壁成分、またはこれらの化合物の合成物もしくは組換え体に対する抗体を得ることに向けられる。こうした抗体をヒトまたは他の動物の免疫感作によって作ることが意図される。本発明はいかなる特定のトキシンまたは生物種にも制限されない。一実施態様において、すべてのクロストリジウム種由来のトキシンが免疫原として意図される。こうしたトキシンの例として、*C. botulinum*のノイラミニダーゼトキシン、*C. botulinum*のトキシンA、B、C、D、E、Fの多数のトキシン類がある。以下の表2に数種のクロストリジウム種、それらのトキシン類および疾病と関連した抗原のいくつかを示してある。

10

【0075】

【表2】

クロストリジウムトキシン

20

生物	トキシンおよび疾病関連抗原
<i>C. botulinum</i>	A, B, C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub> , D, E, F, G
<i>C. butyricum</i>	ノイラミニダーゼ
<i>C. difficile</i>	A, B, エンテロトキシン (非A 非B), 運動性変更因子, 低分子量トキシン, その他
<i>C. perfringens</i>	$\alpha$ , $\beta$ , $\epsilon$ , $\iota$ , $\gamma$ , $\delta$ , $\nu$ , $\theta$ , $\kappa$ , $\lambda$ , $\mu$ , $\upsilon$
<i>C. sordelli</i> /	HT, LT, $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$
<i>C. bifermentans</i>	
<i>C. novyi</i>	$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ , $\epsilon$ , $\zeta$ , $\nu$ , $\theta$
<i>C. septicum</i>	$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$
<i>C. histolyticum</i>	$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ , $\epsilon$ および追加の酵素
<i>C. chauvoei</i>	$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$

30

40

一つのトキシンに対して産生された抗体はそのトキシンに対してのみ使用されるものではない。一つのトキシンに対する抗体は、クロストリジウム属の他のメンバーまたは他のトキシン産生物（例えば、*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas aeruginosa* と他のシュードモナス種など）により産生された1以上のトキシンに対して有効な治療薬として使用できると考えられる。これらの膜結合ドメインを合成的に製造して免疫原として使用することが意図される。

【0076】

II. 非哺乳動物から抗体を得ること

抗体を得るための本発明方法の好適な実施態様は免疫感作を含む。しかし、免疫感作なし

50



で非哺乳動物から抗体を得ることも意図される。免疫感作を行わない場合には、本発明は、トキシンに対する既存の抗体を有する非哺乳動物および投与抗原との反応のおかげで全生物に対する抗体を有する非哺乳動物を使用することができる。後者の例は全生物の構成成分とエピトープを共有する合成ペプチドまたは組換えタンパク質による免疫感作を伴う。

【0077】

特に好適な実施態様は、分子生物学的手段により産生された細菌のトキシンタンパク質（すなわち、組換えトキシンタンパク質）またはトキシンタンパク質の断片の使用を伴う。

【0078】

免疫感作を用いる場合、好適な非哺乳動物はトリ綱（Aves）からのものである。あらゆるトリが意図される（例：アヒル、ダチョウ、エミュー、シチメンチョウなど）。好ましいトリはニワトリである。重要なことだが、ニワトリの抗体は哺乳動物の補体と結合しない [H.N. Benson ら, J. Immunol. 87:616 (1961) 参照]。したがって、ニワトリの抗体は通常は補体依存的反応を引き起こさないだろう [A.A. Benedict と K. Yamagaによる「トリ種における免疫グロブリンおよび抗体産生」, Comparative Immunology (J.J. Marchaloni 編), pp.335-375, Blackwell, Oxford (1966)]。こうして、本発明の好適な抗トキシンは既知の抗トキシンを用いたときに観察される補体関連副作用を示さないだろう。

10

【0079】

トリを用いる場合、抗体はトリの血清または卵から得られると予想される。好適な実施態様では、卵から抗体が採集される。産卵するニワトリは免疫グロブリンを血清濃度またはそれを越える濃度で卵黄（IgY）に輸送する [R. Pattersonら, J. Immunol. 89:272 (1962); および S.B. Carroll と B.D. Stollar, J. Biol. Chem. 258:24 (1983) 参照]。その上、莫大な量で生産された大量の卵黄は、所定の期間にわたってトリから安全に得ることができる血清の量を越えている。最後に、卵から得られる抗体はより純粋で、より均質である。すなわち、（血清と比べて）非免疫グロブリンタンパク質がはるかに少なく、ただ一つのクラスの免疫グロブリンが卵黄に輸送されるだけである。

20

【0080】

トキシンによる免疫感作を考慮するとき、毒性を低下させるために該トキシンを修飾することが考えられる。この点に関して、本発明は修飾トキシンを用いた免疫感作により制限されない。未修飾（天然）トキシンも免疫源として意図される。

30

【0081】

また、修飾が用いられる場合、本発明はその修飾のタイプにより制限されない。本発明はトキシンの化学的および熱処理を含めてあらゆる種類のトキシン修飾を意図している。しかし、好適な修飾はホルムアルデヒド処理である。

【0082】

本発明は特定の免疫感作様式に制限されるものではない。本発明は免疫原の経口投与のみならず皮下、筋肉内、腹腔内および静脈内または脈管内注射を含めてあらゆる免疫感作様式を意図している。

【0083】

本発明はさらにアジュバントを用いたまたは用いない免疫感作を意図している。（アジュバントは他の抗原とともに投与するとき他の抗原に対する免疫応答を増強することが知られた物質と定義される。）アジュバントを用いる場合、本発明は特定のタイプのアジュバントに制限されず、また、同一のアジュバント（一回使用したもの）をその間ずっと用いるものでもない。本発明は、別個に用いようと組み合わせ用いようと、あらゆるタイプのアジュバントを意図しているが、アジュバントの好適な使用は完全フロイントアジュバントの使用である（あとで時々、不完全フロイントアジュバントを用いる）。アジュバントの他の好適な使用はGerbu アジュバントの使用である。本発明はまたRIBIトリアジュバントとQuil Aアジュバントの使用も考えられる。

40

【0084】

免疫感作を用いる場合、本発明には多種多様な免疫感作計画が含まれる。一実施態様では

50

、0日目にニワトリにトキシン（類）を投与し、その後ニワトリは間隔を置いてトキシン（類）を受け取る。本発明は特定の間隔または投与回数により制限されるものではない。同様に、本発明は抗体を採集するための特定の計画に制限されるものではない。好適な採集時期は100日以後のいつかである。

【0085】

トリを使用して、抗体の採集を卵から行う場合、抗体の処理を行う前に卵を貯蔵することができる。卵は4で1年未満貯蔵することが好ましい。

【0086】

この方法で産生されたニワトリの抗体を緩衝液で抽出し、分析に使用する。この調製物は未精製のままで該抗体の活性の基準として、その後の操作（例えば、イムノアフィニティ 10  
精製）に先立って使用することができる。

【0087】

### III. 抗体の有効性を高めること

精製を行う場合、本発明は非哺乳動物の抗トキシンと哺乳動物の抗トキシンの両方の有効性を高めるように精製することを意図している。とりわけ、本発明はトキシン反応性免疫グロブリンの割合を増加させようとするものである。トリ抗体の好適な精製法はポリエチレングリコール（PEG）分離である。

【0088】

本発明は、簡便で安価な方法を使ってトリ抗体を初めに精製することを意図している。一実施態様において、卵からのニワトリ抗体はPEGを用いた抽出・沈殿により精製される 20  
。PEG精製は、高濃度のPEG8000への脂質（卵黄に豊富に存在する）と卵黄タンパク質の溶解度が異なっていることを利用するものである [Polsonら, Immunol. Comm. 9:495 (1980)]。この手法は迅速、簡便で、比較的安価であり、哺乳動物血清およびウマ抗体の同様の硫酸アンモニウム画分よりも非免疫グロブリンタンパク質による汚染の点で著しく純化された免疫グロブリン画分をもたらす。PEGの大部分は沈殿したニワトリ免疫グロブリンからエタノール処理により分離される。実際、PEG精製抗体は、本発明が中毒したヒトや動物の受動免疫感作においてPEG精製抗トキシンの使用を考慮するほど十分に純粋である。

【0089】

本発明はさらに、第IV(C)節で後述するように、抗トキシンの固体形態を腸溶的にコーティングして胃腸管での抗トキシンの残存（すなわち、腸管安定性）を向上させることによって抗トキシンを含有する組成物の有効性を高めることを意図している。 30

【0090】

### IV. 治療

本発明は、細菌トキシンで中毒を起こしたヒトおよび他の動物の抗トキシンによる治療を意図している。好適な治療法は抗トキシンの経口投与によるものである。別の好適な治療法は抗トキシンの非経口投与によるものである。

【0091】

#### A. 治療用製剤および組合せ剤

本発明は抗トキシンの治療用組成物を用いることを意図している。抗トキシン組成物は固体または液体形態の抗トキシンを含みうる。 40

【0092】

本発明は治療用製剤の特定の性質によって制限されるものではない。例えば、この種の組成物は生理学的に許容される液体、ゲルまたは固体の担体、希釈剤、アジュバントおよび賦形剤とともに提供され得る。さらに、抗トキシンは抗生物質を含めた他の治療薬と一緒に用いてもよい。

【0093】

上述したとおり、これらの治療用製剤は、家畜などの獣医学的使用とヒトへの臨床的使用のために他の治療薬と同様の方法で哺乳動物に投与され得る。一般的に、治療効果にとって必要な投薬量は、各宿主の詳細な要件のみならず使用のタイプと投与方法により変化する 50

るだろう。

【0094】

投与方法に関して、抗トキシンは経口、静脈内、腹腔内、筋肉内または髄腔内投与のために使用される。かかる投与に適した製剤は滅菌水または生理食塩溶液中に有効量の抗トキシンを含みうる。

【0095】

一方、製剤は結合剤、充填剤、担体、防腐剤、安定剤、乳化剤、緩衝剤、賦形剤、例えば医薬品級のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの普通に用いられる添加剤を含むことができる。これらの組成物は一般に1～95%、好ましくは2～70%の有効成分を含有する。

10

【0096】

本組成物は好ましくは経口投与用の溶液または懸濁液として調製され、また、投与前に液体中に溶解もしくは懸濁するのに適した固体剤形を含めた固体剤形としても調製され得る。抗トキシンの固体剤形は腸溶コーティングをさらに含んでいてよい。本組成物はまた注射可能な溶液または懸濁液として調製され、さらに、投与前に液体中に溶解もしくは懸濁するのに適した固体剤形としても調製され得る。

【0097】

本発明の抗トキシンはしばしば生理学的に許容される相溶性の希釈剤または賦形剤と混合される。適当な希釈剤および賦形剤は例えば水、食塩水、栄養処方物（例：Ensure（R）、Enfamil（R）など）、デキストロース、グリセロールなど、およびこれらの組合せである。さらに、所望により、この組成物は湿潤剤、乳化剤、安定剤、pH緩衝剤といった補助物質を少量含んでいてもよい。

20

【0098】

B. 抗トキシンの投与量

通常、ウマのような大型動物から産生される現在入手可能な抗トキシンを投与する場合はバランスをとる必要があることがバックグラウンドからわかる。すなわち、トキシンを中和するのに十分な抗トキシンを投与しなければならないが、望ましくない副作用の危険を増すほど多量の抗トキシンを投与してはならない。こうした副作用は、i) 外来（例：ウマ）タンパク質に対する患者の感受性、ii) 非免疫グロブリンタンパク質のアナフィラキシー特性または免疫原性、iii) 哺乳動物抗体の補体結合特性、および/またはiv) 投与された外来タンパク質の全体的な量によって引き起こされる。上記したように、中毒の程度（それゆえ、必要とされる抗トキシン治療のレベル）のおおよその見当がつくにすぎないとき、このバランスをとることは非常に難しいことである。

30

【0099】

本発明はこのバランスがもっと容易に達成されるように副作用を著しく低減させることを意図している。本発明による治療はトリから得られたPEG精製抗トキシンを用いることによって副作用を減らそうとするものである。

【0100】

一実施態様において、本発明の治療はトリから得られたPEG精製抗トキシンを使用する。卵黄由来のPEG精製抗体の抗トキシンとしての使用は、1) 非（哺乳動物）補体結合性のトリ抗体、2) それほど不均質でない非免疫グロブリンタンパク質の混合物、および3) 現在入手できる抗トキシン中に存在する活性抗体の等量を投与するための総タンパク質のより少ない量、の投与を可能にする。抗トキシンの非哺乳動物源はウマや他の哺乳動物の血清に対して敏感な患者を治療するのに有用である。

40

【0101】

抗トキシンを非経口的に投与しようとする場合、患者への抗トキシンの投与には約10ml量の免疫グロブリン（約1g以下の総タンパク質）の初回注射が必要であると予想される。好適な実施態様では、初回注射の少なくとも50%が免疫グロブリンからなるだろう。また、より精製された免疫グロブリンも治療に使用でき、その場合は初回注射の約90

50

%が免疫グロブリンからなるだろう。より精製された免疫グロブリン(例:精製IgY)を用いる場合、総タンパク質は約100mg以下であると予想される。

【0102】

抗トキシンを経口的に投与しようとする場合、患者への抗トキシンの投与には約50gの抗トキシン、より好ましくは約4~5gの抗トキシンを含有する治療用組成物を投与することからなる治療法(すなわち、初回および後続の投薬)が必要であると予想される。

【0103】

C. 抗トキシンの投与

本発明は、投与経路を限定するものではないが、抗トキシンを非経口または経口投与する細菌性中毒の抗トキシンによる治療法を意図している。

10

【0104】

一実施態様では、抗トキシンを水溶液として被検者に非経口投与する。非経口投与は特定の経路に制限されるものではない。実際、あらゆる非経口投与経路を使用することができる。一実施態様では、非経口投与が筋肉内注射により行われる。別の実施態様では、非経口投与が静脈内注射により行われる。

【0105】

一実施態様において、抗トキシンは固体剤形(例:錠剤、カプセル剤)で投与される。別の実施態様では、抗トキシンが水溶液として投与される。水溶液を用いる場合、該溶液は抗体タンパク質を可溶化するのに十分なイオン強度を有するが、経口投与に適するような味にされる。また、デリバリー溶液は緩衝化され(例えば、炭酸塩緩衝液 pH 9.5)、これにより胃酸を中和しかつ経口投与された抗体を安定化することができる。一実施態様において、デリバリー溶液は水溶液である。別の実施態様において、デリバリー溶液は栄養処方物である。好ましくは、デリバリー溶液は小児用処方物である。さらに別の実施態様は、酸抵抗性化合物内にカプセル化またはマイクロカプセル化された凍結乾燥抗体の投与を含む。

20

【0106】

医薬化合物に腸溶コーティングを施す方法は当技術分野で公知である[医薬化合物のコーティングを専門に行っている会社を利用できる;例えば、The Coating Place (Verona, WI)および AAI (Wilmington, NC)]。胃液に抵抗性で、その放出(すなわち、コーティングの溶解による医薬化合物の放出)がpH依存性である腸溶コーティングが市販されている[例えば、ポリメタクリレート、Eudragit(R) LおよびEudragit(R) S (Rohm GmbH)]。Eudragit(R) SはpH 7.0からの腸液に可溶で、このコーティングを用いて凍結乾燥抗トキシン抗体をマイクロカプセル化することができ、それらの粒子を経口投与用のpH 7.0より高いまたは低いpHの溶液に懸濁させる。マイクロカプセルはそれらが腸に達するまで溶解せずに完全なままで存在し、腸において腸pHがそれらを溶解させ、それにより抗トキシンを放出させる。

30

【0107】

本発明は治療用抗トキシンの腸管安定性を高めることに向けられる[腸管安定性は胃腸管を通過する間の抗トキシンの安定性として定義され、腸管安定性は所望の部位(すなわち、腸)に機能的または活性形態で運搬される経口投与された抗トキシンの量が増えることにより向上する)。抗体、特にトリ抗体は酸性溶液(例えば、胃液)にさらされたとき著しく変性することが知られている。抗体の変性は機能性の低下(すなわち、特異的ターゲットと結合する能力の低下)にむすびつく。胃腸管のある部分に見られる低pHによる抗体の変性に加えて、酵素による消化のために抗トキシンの加水分解切断が起こりうる。本発明は腸溶コーティングを抗トキシンにかけることにより治療用抗トキシンの腸管安定性を向上させるものである。腸溶コーティングは抗トキシンの酸による変性を防止し、かつ胃腸管の上方部分に存在する酵素と抗トキシンとの接触を防止する。

40

【0108】

酸抵抗性の腸溶コーティングをかけると、模擬胃液へのマイクロカプセル化抗トキシン(例えば、腸溶コーティングを施した抗トキシン)の放出が防止される一方で、模擬腸液へ

50

の抗トキシンの放出が可能となる。また、治療用抗トキシンの腸管残存は賦形剤（希釈剤としての、または治療用化合物が錠剤の形で提供されるときは形状または稠度を与えるために該化合物に添加されるほぼ不活性の物質）の使用によっても改善されうる。約pH 9.5の炭酸塩緩衝液や栄養処方物（例：Ensure（R）、Enfamil（R）など）のような賦形剤は、胃のpHを上げることによって、または胃の酵素による分解について競合する追加のタンパク質を供給することによって、胃での抗トキシンの変性を間接的に少なくすることができる。これに対して、抗トキシン組成物への腸溶コーティングの使用は、腸溶コーティングを施した粒子が塩基性pHをもつ腸液に達するまで該粒子からの抗トキシンの放出を防止することによって、胃での抗トキシンの変性または消化を直接防止する。腸溶コーティングの使用は本発明の治療用抗トキシンの酸安定性を高めるための特に好適な手段である。

10

## 【0109】

本発明は急性中毒の治療のために投与され得る治療方法を意図している。一実施態様において、抗トキシンはデリバリー溶液か錠剤のいずれかで、細菌トキシン（抗トキシン生産用の免疫原として使用されたもの）による中毒を起こした被検者に治療的量で経口投与される。

## 【0110】

本発明はまた予防的に投与され得る治療方法を意図している。一実施態様において、抗トキシンは、細菌トキシン（抗トキシン生産用の免疫原として使用されたもの）による被検者の中毒を予防するために、デリバリー溶液にて治療的量で被検者に経口投与される。別の実施態様において、抗トキシンは錠剤のような固体剤形でまたはマイクロカプセル化粒子として経口投与される。広範囲のpH単位で溶解するEudragit（R）（Rohm Tech. Inc.）やポリエチレングリコールなどの化合物を用いる凍結乾燥抗体のマイクロカプセル化は、錠剤の投与に耐えられない患者（例：子供または栄養管をつけた患者）に液体剤形（すなわち、懸濁液の剤形）で固体の抗トキシンを経口投与することを可能にする。好適な実施態様では、凍結乾燥抗体がEudragit（R）L30D（Rohm Tech. Inc.）でコーティングされ、被検者が子供である。別の実施態様では、全細菌に対して誘導された抗体がデリバリー溶液にて治療的量で被検者に経口投与される。

20

## 【0111】

V. クロストリジウム種に対するワクチン

本発明は数種類のクロストリジウム種から動物（特にヒト）を防御するための1価および多価ワクチンの製造を意図している。特に、ヒトにおいて*C. botulinum*に対する体液性免疫応答の出現を刺激するワクチンは興味もてる。ワクチン製剤を構成する抗原は、上に列挙したクロストリジウム種由来の天然トキシタンパク質または組換え的に産生されたトキシタンパク質でありうる。トキシタンパク質が免疫原として用いられる場合、一般的にそれらは毒性を低下させるように修飾される。この修飾は化学的または遺伝子的（すなわち、組換えDNA法）手段により行うことができる。一般的に、宿主細胞での無毒性断片の発現は最終調製物における完全な活性トキシンの存在を排除するので、遺伝子的解毒（すなわち、宿主細胞における無毒性断片の発現）が好適である。しかしながら、化学的修飾が望まれる場合、好適なトキシン修飾はホルムアルデヒド処理である。

30

40

## 【0112】

一般的に、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、過酸化水素などの薬剤を用いた細菌トキシンの化学的解毒は、ワクチンや抗トキシンの生産にとって最適とはいえない。過度の化学的修飾と過少の化学的修飾との間でデリケートなバランスをとる必要がある。処理が不十分であると、ワクチンは残留毒性を保持する。処理があまりに過度であると、ワクチンは天然の免疫原性決定基の破壊のため効力を失う。抗トキシンまたはワクチン製造用にポツリヌストキソイドを用いることのもう一つの主な制限は製造コストが高いことである。こうした理由のために、無毒性でありしかも免疫原性のあるトキシタンパク質の製造方法の開発が望まれている。

## 【0113】

50

グラム陰性細菌（例：大腸菌）において産生された組換えクロストリジウムトキシンタンパク質をワクチンとして用いる場合、それらは宿主動物への投与に先立ってエンドトキシンを除くべく精製される。宿主にワクチンを接種するためには、免疫原として有効な量の、実質的にエンドトキシンを含まない、精製された組換えクロストリジウムトキシンタンパク質を、当技術分野で公知の生理学的に許容される多数の担体のいずれかと共に投与する。ワクチン接種の目的で投与する場合、実質的にエンドトキシンを含まない精製された組換えクロストリジウムトキシンタンパク質は単独で、あるいはミョウバンカリウム、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、Gerbu アジュバント (GM DP; C.C. Biotech Corp.)、RIBI アジュバント (MPL; RIBI Immunochemical Research, Inc.)、QS21 (Cambridge Biotech) を含めた公知のアジュバントとともに使用することができる。ワクチンをヒト

10

#### 【0114】

#### VI. トキシンの検出

本発明はサンプル中の細菌トキシンを検出することを意図するものである。本明細書および請求の範囲にでてくる「サンプル」という用語は最も広い意味で用いられる。その意味は、一方では検体または培養物を含み、他方では生物学的サンプルと環境サンプルを含む。

#### 【0115】

生物学的サンプルはヒトを含めた動物、体液、固形物（例：糞便）または組織、ならびに乳製品、野菜、肉および肉加工品、廃物などの液体および固体の食品および成分でありうる。環境サンプルは表面物質、土壌、水、産業上のサンプルなどの環境物質、ならびに食品および乳製品の加工器具、装置、設備、使い捨てできるまたはできない物品を含むものである。これらの例は本発明に適用できるサンプルの種類を制限するものと解釈されるべきでない。

20

#### 【0116】

本発明は、組換えトキシン A および B タンパク質、組換え細菌トキシンタンパク質に対する抗体を使用する競合イムノアッセイ法により細菌トキシンを検出することを意図している。一定量の組換えトキシンタンパク質を固相支持体（例：マイクロタイタープレート）に固定し、その後細菌トキシンを含む疑いのある生物学的サンプルを添加する。生物学的

サンプルは最初にアフィニティー精製されたまたは PEG で分画化された組換えトキシンタンパク質に特異的な抗体と混合する。次いで、固定化トキシンタンパク質に結合した抗体の存在を検出し得るリポーター試薬を添加する。リポーター物質は抗トキシンに対する結合特異性を有する抗体で、該リポーター物質の存在を同定するために用いられる分子が結合されている。トキシンがサンプル中に存在すると、このトキシンは抗組換え抗体との結合に関して固定化組換えトキシンタンパク質と競合し、それによりリポーター試薬の添加後に得られるシグナルが低下する。抗体がサンプルと混合されない対照を使用し、これが最高（または基準）のシグナルを与える。

30

#### 【0117】

本発明はまた、組換え細菌トキシンタンパク質に対する抗体を使用する「サンドイッチ」イムノアッセイ法により細菌トキシンを検出することを意図している。組換え細菌トキシンタンパク質に特異的なアフィニティー精製抗体を固相支持体（例：マイクロタイタープレート）に固定する。その後、細菌トキシンを含む疑いのある生物学的サンプルを添加し、次に洗浄して実質的にすべての未結合抗トキシンを除去する。続いて、生物学的サンプルを抗トキシンに結合するリポーター物質にさらし、その後洗浄して実質的にすべての未結合リポーター物質を除く。リポーター物質は、そのリポーター物質の存在を同定するために用いられる分子に結合された、抗トキシンに対する結合特異性を有する抗体でありうる。生物学的組織中でのリポーター物質の同定が細胞トキシンの存在を示す。

40

#### 【0118】

さらに、細菌トキシンに特異的な固定化抗体に液体（例えば、ヒトや他の動物用の栄養補

50

給物質を含めたスープおよび他の流動食品)を注入することにより細菌トキシンを検出することも意図される。固定化抗体はカートリッジ、カラム、ビーズ、他の固相支持体のような担体中または担体上に存在しうる。一実施態様では、固定化抗体に該液体をさらした後、洗浄により未結合トキシンを実質的に除く。続いて、結合トキシンの存在を検出するリポーター物質にさらす。好適な実施態様では、リポーター物質はトキシンに特異的な抗体に結合された(すなわち、「サンドイッチ」イムノアッセイにおける)酵素、蛍光色素または放射性化合物である。検出系は適宜に発現されるだろう(例えば、酵素系では酵素基質の添加; 蛍光色素系では蛍光光線を用いた観察; および放射系では放射能の定量)。

【0119】

【実施例】

実施例1~2 削除

実施例3 メンドリにおけるC. botulinumA型抗トキシンの産生

クロストリジウム疾患の治療に有効なクロストリジウム病原体によって生産されるトキシンに対して抗体が産生されるかを決定するために、C. botulinumA型トキシンに対する抗トキシンを作製した。この実施例には、(a)トキシンの修飾;(b)免疫感作;(c)抗トキシンの回収;(d)抗原性の評価;及び(e)抗トキシン力価のアッセイを含む。

【0120】

a)トキシンの修飾 C. botulinumA型トキソイドはB. R. DasGuptaから得た。これから活性A型ニューロトキシン(分子量が約150kD)を文献記載の方法に従って99%純度以上に精製した(B. R. DasGupta & V. Sathyamoorthy, Toxicon, 22:415, 1984)。このニューロトキシンを文献記載の方法に従ってホルムアルデヒドで脱毒化した(B. R. Singh & DasGupta, Toxicon, 27:403, 1989)。

【0121】

b)免疫感作 免疫感作用C. botulinumトキソイドをPBSに溶解(1mg/ml)し、初回免疫用には約等容量のCFA(GIBC0)で、または追加免疫用にはIFAで乳化した。地方の交配業者から入手した2羽の白色レグホン種のメンドリのそれぞれに、0日目にCFA1ml中に乳化した不活化トキソイド1mlを複数部位(筋肉内及び皮下)に注射した。次いで以下の日数とトキソイド量のスケジュールに従い追加免疫感作を行った:14日及び21日-0.5mg;171日-0.75mg;394日、401日、409日-0.25mg。1羽のメンドリには544日目に0.150mgの追加免疫をさらに行った。

【0122】

c)抗トキシンの回収 特表2002-514866実施例1(c)に記載のようにして全卵黄免疫グロブリン(IgY)を抽出し、IgYペレットを元の卵黄量のチメロサル含有PBS中に溶解した。

【0123】

d)抗原性の評価 トキソイドが抗体産生に十分なほどに抗原性であるかを評価するために、409日から423日までの卵を回収した。2羽のメンドリからの卵を集めて、標準PEGプロトコール(特表2002-514866実施例1(c))に記載した方法で抗体を回収した。ボツリヌストキシンの抗原性をウエスタンブロットで評価した。150kDの脱毒化A型ニューロトキシンと未修飾の毒性300kDボツリヌスA型複合体(動物の消化管の中和実験で消化管経路に投与したトキシン:実施例6参照)とをSDS-ポリアクリルアミド還元ゲルで分離した。ウエスタンブロットはTowbinの方法により行った(H. Towbinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:4350, 1979)。

【0124】

C. botulinum複合体とトキソイドとの試料10μgをSDS還元試料バッファー(1%SDS、0.5%2-メルカプトエタノール、50mM Tris, pH6.8、10%グリセロール、0.025%w/vプロモフェノールブルー、10%β-メルカプトエタノール)に溶解し、95°Cで10分加熱し、1mm厚さの5%SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離した(K. WeberとM. Osborn, "タンパク質及びドデシル硫酸ナトリウム:ポリ

10

20

30

40

50

アクリルアミドゲルでの分子量決定及び関連技術"、The Proteins, 第3版, H. Neurath & R.L. Hill, 編集, pp. 179-223, Academic Press, NY, 1975)。ゲルの一部を切り取り、タンパク質をクーマシーブルーで染色した。ゲルに残ったタンパク質を Millipore - S D E 電気プロテイングシステム (Millipore) を用いて製造者の指示に従いニトロセルロースに移した。ニトロセルロースを 10% ボンソー S で一時的に染色してレーンを可視化し (S.B. Carroll と A. Laughon, " - ガラクトシダーゼ融合タンパク質の外來セグメントに対するポリクローナル抗体の産生と精製", DNA Cloning: A Practical Approach, Vol. III, D. Glover 編集, pp. 89-111, IRL Press, Oxford, 1987)、次いでプロット上に蒸留水を数分穏やかに流して脱染色した。ニトロセルロースを 3% B S A を含む P B S 中に 4 時間で一晚浸けて残っているタンパク質結合部位をブロックした。

10

## 【0125】

プロットをストリップ状に切り、各ストリップを適当な一次抗体とインキュベートした。トリ抗 C. botulinum 抗体 (c) に記載) 及び免疫前ニワトリ抗体 (対照) を室温で 2 時間、1 mg / ml B S A を含む P B S に 1 : 125 で希釈した。プロットをそれぞれ大量の P B S、B B S - T w e e n 及び P B S で順次 2 回洗浄 (10 分 / 洗浄) した。ヤギ抗ニワトリ I g G アルカリホスファターゼを結合した二次抗体 (Fisher Biotech) を 1 mg / ml B S A を含む P B S に 1 : 500 で希釈し、室温で 2 時間プロットとともにインキュベートした。プロットをそれぞれ大量の P B S 及び B B S - T w e e n で 2 回洗浄し、次いで P B S 及び 0.1 M T r i s - H C l, pH 9.5 で 1 回洗浄した。プロットを新たに調製したアルカリホスファターゼ基質バッファー (50 mM N a<sub>2</sub>C O<sub>3</sub>, pH 9.5 中の 100 µg / ml ニトロブルーテトラゾリウム (Sigma)、50 µg / ml 5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルホスフェート (Sigma)、5 mM M g C l<sub>2</sub>) 中で発色させた。

20

## 【0126】

ウエスタンプロットを図 1 に示す。抗 C. botulinum I g Y はトキシドと反応して還元ゲル上に約 145 - 150 k D の幅広の免疫反応性バンドを与えた。このトキシドはホルマリン架橋のために還元剤によるジスルフィド切断に対して抵抗性である。免疫 I g Y は活性トキシン複合体である 97 k D の C. botulinum A 型の H 鎖及び 53 k D の L 鎖と反応した。免疫前 I g Y はウエスタンプロットで C. botulinum 複合体又はトキシドと反応しなかった。

30

## 【0127】

e) 抗トキシンの抗体力価 409 日から 423 日の間に回収された卵の C. botulinum A 型トキシドに対する I g Y 抗体の力価を以下の方法による E L I S A で評価した。96 ウェルの Falcon Pro-bind プレートを、0.005% チメロサル含有 P B S、pH 7.5 中に 2.5 µg / ml のトキシド 100 µL / ウェルを用いて 4 時間、一晚コーティングした (B.R. Singh & B.R. DasGupta, Toxicon 27:403, 1989)。翌日ウェルを 1% B S A 含有 P B S で 37 °C、1 時間ブロックした。免疫卵又は免疫前卵からの I g Y を 1% B S A 及び 0.05% T w e e n 20 含有 P B S 中で希釈し、プレートを 37 °C、1 時間インキュベートした。プレートを 0.05% T w e e n 20 含有 P B S で 3 回、P B S のみで 3 回洗浄した。アルカリホスファターゼを結合したヤギ抗ニワトリ I g G (Fisher Bio 40 tech) を 1% B S A 及び 0.05% T w e e n 20 含有 P B S 中に 1 : 750 で希釈し、プレートに加えて 37 °C、1 時間インキュベートした。プレートを上述のように洗浄し、0.05 M N a<sub>2</sub>C O<sub>3</sub>, pH 9.5、10 mM M g C l<sub>2</sub> 中に p - ニトロフェニルホスフェート (Sigma) を 1 mg / ml で加えた。

## 【0128】

結果を図 2 に示す。トキシドで免疫したニワトリは免疫原に対して高い力価の抗体を産生した。重要なことは、どちらの免疫したメンドリから回収した卵も免疫前の対照卵と比較して、有意な抗免疫原抗体力価をもっていたことである。

## 【0129】

抗 C. botulinum I g Y は 1 : 93750 又はそれ以上の希釈でも有意な活性をもっていた

50



## 【 0 1 3 0 】

## 実施例 4 ~ 5 削除

実施例 6 トリ抗トキシン抗体によるC.botulinum型 A 型ノイロトキシンの in vivo中和

この実施例は実施例 3 に記載されたようにして回収された PEG 精製抗トキシンのマウス中で C.botulinum ノイロトキシン A 型の致死効果を中和する能力を実証した。トキシン A の経口致死量 (LD<sub>100</sub>) を測定するために、BALB/c マウスのグループに単位体重 (24 グラムの平均体重) 当たり異なる用量のトキシンを投与した。経口投与について、トキシン A 複合体 (これはその他の無毒タンパク質と混在したノイロトキシンを含む) を使用した。この複合体は経口経路により投与された時に精製ノイロトキシンよりも著しく毒性である [ I. Ohishi ら, Infect. Immun., 16:106 (1977) ]。Eric Johnson (University Of Wisconsin, Madison) から得られた C.botulinum 毒素 A 型複合体は 50mM クエン酸ナトリウム、pH5.5 中 250 μg/ml、非経口投与で比毒性 3 × 10<sup>7</sup> マウス LD<sub>50</sub>/mg であった。約 40-50ng/gm 体重が通常のおよび水で管理したマウスでは 48 時間以内に通常致死性であった。マウスに Enfamil (登録商標) のみの随時の食事を与えた時、致死性を生じるのに必要とされた濃度は約 2.5 倍高かった (125ng/gm 体重)。約 200ng/gm 体重の Botulinal 毒素濃度が前免疫 IgY (初期の卵黄容積で Enfamil (登録商標) 中に再度懸濁された) を含む Enfamil (登録商標) で給餌されたマウスで致死性であった。

10

## 【 0 1 3 1 】

また、C.botulinum 毒素の経口 LD<sub>100</sub> を、給餌ニードルを通して経口的に送りこんだ既知量の 20 前免疫 IgY-Ensure (登録商標) の混合物を受けたマウス中で測定した。22 ゲージ給餌ニードルを使用して、botulinal 毒素を投与する 1 時間前およびその投与の 0.5 時間後および 5 時間後に前免疫 IgY-Ensure (登録商標) 混合物 (前免疫 IgY を初期の 1/4 の卵黄容積に溶解した) それぞれ 250 μl をマウスに投与した。経口投与した毒素濃度は約 12 ~ 312ng/gm 体重 (マウス当たり 0.3 ~ 7.5 μg) の範囲であった。約 40ng/gm 体重 (マウス当たり 1 μg) の Botulinal 毒素複合体濃度が 36 時間未満で全てのマウスで致死性であった。

## 【 0 1 3 2 】

BALB/c マウスの二つのグループ、グループ当たり 10 匹に 50mM クエン酸ナトリウム pH5.5 10 0 μl 中 botulinal 毒素複合体それぞれ 1 μg の単一用量をそれぞれ経口投与した。マウスは botulinal 毒素投与の 1 時間前および 0.5 時間後、4 時間後、および 8 時間後に Ensure (登録商標) 中の前免疫または免疫 IgY の混合物 (初期の卵黄容積の 1/4) 250 μl の処理を受けた。マウスは 2 日以上にわたって毎日 3 回の処理を受けた。マウスを 96 時間観察した。生存度および死亡率を表 11 に示す。

30

## 【 0 1 3 3 】

前免疫 IgY-Ensure (登録商標) 混合物で処理した全てのマウスは毒素投与後 46 時間以内に死亡した。マウスの平均死亡時間は毒素投与後 32 時間であった。前免疫 IgY-Ensure (登録商標) 混合物の処理は、このグループのマウスの口の広範囲の麻痺のために 24 時間を越えては続かなかった。対照的に、免疫抗 botulinal 毒素 IgY-Ensure (登録商標) 混合物で処理した 10 匹の全てのマウスが 96 時間経過して生存した。このグループ中の 4 匹のマウスのみが botulism 毒性の症候を示した (毒素投与の約 2 日後に 2 匹のマウスおよび 4 日後に 2 匹のマウス)。これらのマウスは最終的に 5 日後および 6 日後に死亡した。この免疫グループ中のマウスの 6 匹が毒素に対し副作用を示さず、長期間生存して残り、健康であった。こうして、トリ抗 botulinal トキシン抗体は実験マウスで毒素の致死作用からの非常に良好な保護を示した。

40

## 【 0 1 3 4 】

## 実施例 7 ~ 2 1 削除

実施例 2 2 C.botulinum C断片融合タンパク質の構築と発現

C.botulinum A 型ニューロトキシン遺伝子はクローン化され、配列が決定されている [ Thompson ら, Eur.J.Biochem., 189:73(1990) ]。トキシン遺伝子のヌクレオチド配列は登録番号 X52066 で EMBL/GenBank 配列データベースから入手しうる。コーディング領域のヌクレオ

50

チド配列を配列番号 1 に示す。C.botulinumA 型トキシンのアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。A 型ニューロトキシン遺伝子は単一のポリペプチド鎖として合成され、ジスルフィド結合でつながれた重鎖と軽鎖からなる二量体を形成するようにプロセスされる。重鎖のカルボキシ末端の 50 kD の部分を C 断片又は Hc ドメインという。

【 0 1 3 5 】

C.botulinumA 型トキシンの C 断片を含むポリペプチドを天然型ポリペプチドとして(例えば融合タンパク質としてではなく)大腸菌で発現させようと、他の人々によって以前に試みられたがうまく行かなかった [H.F.LaPenotiereら, Botulinum and Tetanus Neurotoxins, DasGupta編, Plenum Press. New York(1993), pp.463-466]。大腸菌のMBPと融合させた形での C 断片の発現は不溶性タンパク質の産生をもたらしたと報告された(H.F.LaPenotiereら, 同上文献)。

10

【 0 1 3 6 】

可溶性の組換え C 断片タンパク質を大腸菌中で産生させるために、C.botulinumA 型トキシン由来の合成 C 断片遺伝子及びC. difficileトキシンタンパク質の一部又はMBPのどちらかを含む融合タンパク質を構築した。この実施例はa) C 断片融合タンパク質をコードするプラスミドの構築及びb) C.botulinumC 断片融合タンパク質の大腸菌中での発現を含む。

【 0 1 3 7 】

a) C 断片融合タンパク質をコードするプラスミドの構築 特表2002-514866実施例 1 1 において、C. difficileトキシンAリピートドメインは大腸菌中で天然型(クローンpMA1870-2680中のpET 23aベクター中に発現)又は融合タンパク質(クローンpMA1870-2680中で大腸菌MBPとの融合物としてpMALcベクター中で発現)として効率的に発現し精製されうることを示した。MBP、C. difficileトキシンAリピートドメインの一部(可溶性融合タンパク質として発現されることが示されている)、及びC.botulinumA 型トキシンの C 断片を含む融合タンパク質が構築された。C.botulinumA 型トキシンの C 断片及びMBPを含む融合タンパク質も構築された。

20

【 0 1 3 8 】

図 3 はボツリヌス融合タンパク質を産生させるために用いたC. difficileトキシンA配列又はC.botulinumC 断片配列を含むドナー構築物と共に、ボツリヌス融合タンパク質を図示している。図 3 において、黒四角はC. difficileトキシンAの遺伝子配列を示し、白四角はC.botulinumC 断片の配列を、黒楕円は大腸菌MBPを示している。制限酵素の名称がカッコ内に記載されているものは制限酵素切断部位が構築中に壊されていたことを示す。制限酵素の名称にアスタリスクを付したものは、その制限酵素切断部位がクローニング結合部(junction)で再生されたことを示す。

30

【 0 1 3 9 】

図 3 はC. difficileトキシンAリピートドメイン由来の配列を含むpMA1870-2680及びpPA1100-2680構築物(特表2002-514866実施例 1 1 に記載)の制限酵素地図を示す:これらの構築物は、C.botulinumC 断片遺伝子とC. difficileトキシンA遺伝子との融合物をコードするプラスミドの構築のためのC. difficileトキシンA遺伝子配列のソースとして用いられた。pMA1870-2680発現構築物は高レベルの可溶性でインタクトな融合タンパク質(20mg/リットル培養液)を発現し、そのタンパク質はアミロースカラムでアフィニティー精製しうる(特表2002-514866実施例 1 1 d に精製法を記載)。

40

【 0 1 4 0 】

pAlterBot構築物(図 3)は、ボツリヌス融合タンパク質産生のためのC.botulinumC 断片遺伝子配列のソースとして用いられた。pAlterBotは米国国防総省のJ.MiddlebrookとR.Lemleyから得られた。pAlterBotは合成C.botulinumC 断片をpALTER-1(登録商標)ベクター(Promega)に挿入したものを含む。この合成 C 断片遺伝子は天然の C 断片遺伝子と同じアミノ酸をコードする。天然の C 断片配列は他の大多数のクロストリディウムの遺伝子と同様 A/T 含量が極めて高い(Thompsonら、同上文献)。この高い A/T 含有量のため大腸菌及び酵母中での発現がコドン使用頻度の変化及び偶発性のポリアデニル化部位にそれぞれ起因して

50

困難となる。

【 0 1 4 1 】

C断片タンパク質の大腸菌中での発現を改善するため、好ましくないコドン为好ましいコドンと置き換えた合成遺伝子を作製した。

【 0 1 4 2 】

pAlterBot中に含まれる、C.botulinumC断片遺伝子配列のヌクレオチド配列を配列番号3に記載している。最初の6個のヌクレオチド(ATGGCT)はメチオニン及びアラニン残基をそれぞれコードしている。これら2個のアミノ酸は、C.botulinumC断片配列をpALTER(R)ベクターに挿入したために生じた。pAlterBot中に含まれる配列によってコードされるC.botulinumC断片のアミノ酸配列を配列番号4に示す。最初の2個のアミノ酸(Met Ala)はベクター由来の配列によりコードされている。第3番目のアミノ酸残基(Arg)から先のアミノ酸配列はC.botulinumA型トキシン遺伝子中に見出される配列と同一である。

10

【 0 1 4 3 】

C.difficileトキシンAリピートドメインの断片が、C.botulinumC断片遺伝子との遺伝子融合物として、pMAL-c発現ベクター(New England BioLabs)を用いて発現されている発現構築物を作製するために、pMA1870-2680、pPA1100-2680、及びpAlterBot構築物は元となる(progenitor)プラスミドとして用いられた。そのpMAL-c発現ベクターはMBPをタンパク質のアミノ末端に含む融合タンパク質を産生する。C.botulinumC断片遺伝子がMBPのみの融合物として発現されている構築物pMBotを構築した(図3)。融合タンパク質の発現は上記のプラスミドをその内部に含んでいる大腸菌株から誘導され、その誘導されたタンパク質はアミロース樹脂カラムでアフィニティーで精製した。

20

【 0 1 4 4 】

i) pBlueBotの構築 C.botulinumC断片遺伝子配列の多数の望ましい構築物へのクローニングを容易とするため、ボツリヌス遺伝子配列をpAlterBotから除去して、pBluescriptプラスミド(Stratagene)に挿入してpBlueBotを作成した(図3)。pBlueBotは次のように構築した。pAlterBotプラスミドを有するバクテリアをテトラサイクリンを含む培地で増殖させ、QIAprep-spin Plasmid Kit(Qiagen)を用いてプラスミドDNAを単離した。1µgのpAlterBot DNAをNcoIで消化し、その結果できた3'で引っ込んでいる付着末端(3' recessed sticky end)をDNAポリメラーゼIのクレノウ断片(以下単にクレノウ断片と呼ぶ)で平滑末端とした。次いでpAlterBot DNAをHindIIIで消化してボツリヌス遺伝子配列(Botインサート)を平滑(NcoI部位を満たした)HindIII断片として放出させた。pBluescriptベクターDNAは200ngのpBluescript DNAをSmaI及びHindIIIで消化して調製した。2種のプラスミドの消化産物をアガロースゲル上で分析した。適当な断片をゲルから除き、混合し、Prep-a-Geneキット(BioRad)を用いて精製した。溶出したDNAをT4DNAリガーゼで連結し、コンピテントDH5細胞(Gibco-BRL)を形質転換するために用いた。宿主細胞はSambrookら(同上文献)の塩化カルシウムプロトコル(1.82-1.83)を用いて形質転換のためにコンピテントとした。標準的な組換え分子生物学的技法(Sambrookら、同上文献)を用いて、組換えクローンを単離し、制限酵素消化によって確認した。その結果得られたクローン、pBlueBotは図3に示すようにいくつかの有用かつユニークなBotインサート(すなわちpAlterBot由来のC.botulinumC断片配列)と隣り合う制限酵素切断部位を含んでいる。

30

40

【 0 1 4 5 】

ii) C.difficile/C.botulinum/MBP融合タンパク質の構築 C.difficileトキシンA遺伝子、C.botulinumC断片遺伝子、及びMBP間の融合物の構築は上述したと同様な組換えDNA技法を用いて行った。これらの融合タンパク質は種々の量のC.difficileトキシンAリピートドメインを含んでいた。

【 0 1 4 6 】

pMABotクローンはBotインサート(すなわちpAlterBot由来のC.botulinumC断片配列)に融合させたC.difficileトキシンA遺伝子に由来する2.4kbインサートを含んでいる。pMABot(図3)はNotI/HindIIIで消化したpBlueBot(1.2kbBot断片)、SpeI/NotI消化pPA1100-2680

50

(2.4kb *C. difficile*トキシンAリピート断片)、及びXbaI/HindIII消化pMAL-cベクターからゲルで精製したDNAを混合することにより構築した。組換えクローンを単離し、制限酵素消化で確認し、QIaprep-spin Plasmid Kit(Qiagen)で精製した。このクローンはトキシンAリピート及びボツリヌスC断片タンパク質をMBPとのフレーム内融合物として発現している。

【0147】

pMCABot構築物はBotインサート(すなわちpAlterBot由来の*C. botulinum*C断片配列)に融合させた*C. difficile*トキシンA遺伝子由来の1.0kbインサートを含んでいる。pMCABotは、*C. difficile*トキシンAのリピートの5'末端を除去するために、pMABotクローンをEcoRIで消化することにより構築した(図3参照、このpMAL-cベクターはpMABotクローン中に5'から*C. difficile*インサートへ向かうEcoRI部位を含む)。制限酵素切断部位はゲル精製後ふさがり、再連結させた。この結果できたクローン(pMCABot, 図3)はBot遺伝子に融合した*C. difficile*トキシンAリピートドメインの残存する3'部分とMBPとのフレーム内融合物を作り出した。

10

【0148】

pMNABotクローンは*C. difficile*トキシンAリピートドメイン(クローンpPA1100-2680由来)からの1kb SpeI/EcoRI(ふさがれた)及び1.2kb *C. botulinum*C断片遺伝子をNcoI(ふさがれた)/HindIII断片(pAlterBot由来)として含んでいる。これらの2種の断片はXbaI/HindIIIで消化したpMAL-cベクターに挿入した。この2種の挿入断片は適当なプラスミドをEcoRI(pPA1100-2680)又はNcoI(pAlterBot)で消化した後、クレノウ断片で処理することにより作製した。クレノウ断片で処理した後、プラスミドを第2番目の酵素(SpeI又はHindIIIのどちらか)で消化した。3種の断片全てをゲルで精製し、混合し、連結前にPrep-a-Geneで精製した。連結及び形質転換後、組換え体と推定されるものを制限酵素分析で分析した。EcoRI部位は、ふさがれたEcoRI部位及びNcoI部位間の融合物で予測されていたとおり、融合物の結合部に再形成されていたことがわかった。

20

【0149】

ボツリヌスC断片及びMBP遺伝子間の融合タンパク質をコードする構築物(すなわちこの融合物は*C. difficile*トキシンAの遺伝子配列を全く欠除する)を構築し、pMBotと名付けた。pMBot構築物はpMABot構築物から*C. difficile*トキシンA配列を除去し、C断片遺伝子配列をMBPに融合させることにより作製した。これはpMABotDNAをStuI(pMALcポリリンカーの5'からXbaI部位に位置している)及びXbaI(3'からトキシンA-Bot融合物結合部NotI部位に位置している)で消化し、クレノウ断片を用いてXbaI部位をふさがり、目的の制限酵素切断断片をゲルで精製し、平滑末端を連結してプラスミドを環状とすることで作製した。連結と形質転換の後、組換え体と推定されるものをBotインサート(すなわち*C. botulinum*C断片配列)の制限酵素地図で分析した。

30

【0150】

b) 大腸菌中での*C. botulinum*C断片融合タンパク質の発現 pMAL-cベクター、及び上記(a)に述べた各組換え構築物を大規模(1リットル)培養で増殖させ、誘導し、可溶性タンパク質画分を特表2002-514866実施例18に述べたとおりに単離した。組換え融合タンパク質を単離するため、可溶性タンパク質抽出物をアミロースアフィニティーカラムでクロマトグラフィーした。精製した組換え融合タンパク質をSDS-PAGEゲルに試料を流し、次いでクーマシー染色及びウエスタンブロット分析を文献(Williamsら、(1994)同上文献)に記載されているように行うことにより分析した。簡単に記せば、抽出物を調製し、アミロース樹脂(New England Biolabs)でカラム緩衝液(10mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5M NaCl, 10mM β-メルカプトエタノールpH7.2)中でクロマトグラフィーし、10mMのマルトース含有のカラム緩衝液で文献(Williamsら、(1994)同上文献)記載のとおり溶出させた。クーマシーブルーで染色した精製タンパク質試料を含むSDS-PAGEゲルを図4に示す。

40

【0151】

図4では、次の試料をロードした。レーン1-6は、それぞれpMAL-c、pPA1870-2680、pMABot、pMNABot、pMCABot、及びpMBotプラスミドを含む大腸菌から精製したタンパク質を含む

50

。レーン7は広範囲分子量タンパク質マーカー (BioRad)を含む。

【 0 1 5 2 】

5 $\mu$ lの溶出タンパク質を5 $\mu$ lの2 $\times$  SDS-PAGE試料緩衝液 (0.125mM Tris-HCl、pH6.8、2mM EDTA、6%SDS、20%グリセロール、0.025%プロモフェノールブルー； $\beta$ -メルカプトエタノールを使用前に5%となるように加える)と混合することにより、タンパク質試料を電気泳動用に調製した。試料は95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱し、冷却し、7.5%アガロースSDS-PAGEゲルにロードした。広範囲分子量タンパク質マーカーも同定した融合タンパク質の分子量を見積もるためにロードした。電気泳動後、タンパク質の検出は通常はゲルをクーマシーブルーで染色することによって行った。

【 0 1 5 3 】

全ての場合において、収率は培養液1リットルあたり融合タンパク質20mgを超えており (表3参照)、pMCABotタンパク質を除き、溶出した融合タンパク質の高比率 (総溶出タンパク質の20-50%以上)が完全長の融合タンパク質の分子量と予測される分子量をもつものであった (図4)。肉眼観察によれば、10%未満のpMCABot融合タンパク質が完全長の融合タンパク質として発現されているものと見積もられた。

【 0 1 5 4 】

【表3】

アフィニティーで精製した*C. botulinum* C断片/MBP融合タンパク質の収率

構築物	収率 (mg/培養液1L)	可溶性タンパク質の 総量の比率
pMABot	2.4	5.0
pMCABot	3.4	5.0
pMNABot	4.0	5.5
pMBot	2.2	5.0
pMA1870-2680	4.0	4.8

これらの結果はpMAL-c発現系を用いて大腸菌中での高レベルのインタクトな*C. botulinum* C断片/*C. difficile*トキシンA融合タンパク質の発現が可能であることを示している。これらの結果はH.F.LaPenotiereら (1993)、同上文献、の報告した結果と対照的である。さらに、これらの結果は可溶性の融合タンパク質をpMAL-c系を用いて大腸菌中で産生させるために、ボツリヌスC断片遺伝子と*C. difficile*トキシンA遺伝子を融合させる必要のないことも示している。

【 0 1 5 5 】

上記のボツリヌス融合タンパク質が抗*C. botulinum*トキシンA抗体に認識されるか調べるために、ウエスタンブロット法を行った。pMABot、pMCABot、pMNABot、pMBot、pMA1870-2680又はpMAL-cプラスミドを含む大腸菌から得た、アフィニティーで精製したタンパク質を含む試料を分析した。SDS-PAGEゲル (7.5%アクリルアミド)に各発現構築物から精製したタンパク質試料をロードした。電気泳動後、ゲルをブロットしタンパクの転移をボンソ-S染色で確認した (特表2002-514866実施例12bに記載の方法による)。

【 0 1 5 6 】

タンパク質転移後、ブロットをブロッキング緩衝液 [PBST (0.1%Tween 20及び5%ドライミルク含有のPBS)] 中で20 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートしてブロックした。ブロットを一次抗体を含む溶液10ml中でインキュベートした。この溶液はブロッキング緩衝液中に1/500希釈の抗*C. botulinum*トキシンA IgY PEG prep (実施例3に記載)を含むものである。ブロットを一次抗体存在下で室温で1時間インキュベートした。ブロットを洗い、ウサギ抗ニワ

10

20

30

40

50

トリアルカリホスファターゼコンジュゲート(Boehringer Mannheim)を二次抗体として使用して次のように発色させた。ウサギ抗ニワトリ抗体をブロッキング緩衝液で1 $\mu$ g/mlとなるように希釈し(プロットあたりの最終容量は10ml)、プロットを二次抗体存在下で室温で1時間インキュベートした。次いで、プロットをPBST、BBS-Tween、及び50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH9.5で順次洗った。次いでプロットを新たに調製したアルカリホスファターゼ基質緩衝液(100 $\mu$ g/mlニトロブルーテトラゾリウム、50 $\mu$ g/mlリン酸5-プロモ-クロロ-インドリル、5mM MgCl<sub>2</sub>を50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH9.5中に含む)中で展開した。発色の停止はプロットを蒸留水で溢れさせて行い、プロットを空気乾燥した。

【0157】

このウエスタンプロット分析でpMABot、pMCABot、pMNABot及びpMBotタンパク質試料(図4においてクーマシー染色によって上記のように同定された完全長のタンパク質からの予測に対応している)中ではC.botulinumトキシンに反応性のタンパク質が検出されたが、pMA1100-2680又はpMAL-cタンパク質試料では検出されなかった。

10

【0158】

これらの結果は上記のa)節に記載された、アミロース樹脂で精製された関連の融合タンパク質が、免疫反応性のC.botulinumC断片タンパク質を予測されたとおり含んでいたことを示している。

【0159】

実施例23 pMBotタンパク質の経鼻投与による中和抗体の産生

実施例22で産生させた組換えボツリヌストキシンタンパク質のボツリヌストキシンエプトープに対する全身的免疫応答を刺激する能力について調べた。本実施例は、a)ボツリヌストキシン含有C.difficileトキシンA融合タンパク質の経鼻又は経口投与による血清IgG抗体価の誘導の評価、及びb)抗組換えC.botulinumC断片抗体によるC.botulinumA型ニューロトキシンのin vivoでの中和を含む。

20

【0160】

a)ボツリヌストキシン含有C.difficileトキシンA融合タンパク質の経鼻又は経口投与による血清IgG力価の誘導の評価 1群あたり5匹の6週令CFラット(雌、Charles River)、6群を実施例22で調製したタンパク質を用いた下記の3種の組み合わせの内の1種で、経鼻又は経口的に免疫した。(1)ラット1匹あたり250 $\mu$ gのpMBotタンパク質(経鼻又は経口)(2)ラット1匹あたり250 $\mu$ gのpMABotタンパク質(経鼻又は経口)(3)ラット1匹あたり125 $\mu$ gのpMA1870-2680を混合した125 $\mu$ gのpMBot(経鼻又は経口)。第2番目の5群のセットは1群あたり3匹のCFラット(雌)で、次の組み合わせの内の1つで経鼻又は経口的に免疫した。(4)ラット1匹あたり250 $\mu$ gのpMNABotタンパク質(経鼻又は経口)または(5)ラット1匹あたり250 $\mu$ gのpMAL-cタンパク質(経鼻又は経口)。

30

【0161】

免疫用の融合タンパク質は次のとおり調製した。タンパク質(10mMマルトース含有のカラム緩衝液中)を0.1M炭酸塩緩衝液pH9.5で希釈し、200 $\mu$ l容量を経口的あるいは経鼻的に投与した。投与前にラットをエーテルで軽く鎮静させた。経口投与は20ゲージの給餌針で行った。経鼻投与はp-200マイクロピペッター(Gilson)を用いて行った。初回免疫の14日後、上述の方法でラットをブーストし、その7日後に採血した。各群のラットを軽くエーテル麻酔し、尾から採血した。採取した血液を37 $^{\circ}$ Cで1時間凝固させ、血清を採取した。

40

【0162】

個々のラットの血清の抗C.botulinumA型トキシンIgG血清力価をELISAを用いて分析した。ここで用いたELISAのプロトコールは特表2002-514866実施例13cに記載した方法を改変したものである。簡単に述べれば、C.botulinumA型トキソイド(2.5 $\mu$ g/ml、0.005%チメロサル含有のPBS中)を各ウエルに100 $\mu$ l入れ、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートすることにより、96ウエルのマイクロタイタープレート(Falcon, Pro-Bind Assay Plates)をC.botulinumA型トキソイド(特表2002-514866実施例13aの記載のとおり調製)でコートした。翌朝、コーティング懸濁液を傾斜して除き、全ウエルをPBSで3回洗った。

【0163】

50

非特異的結合部位をブロックするため、ブロッキング液(PBS中に0.5%BSAを含有)を100 $\mu$ l、各ウエルに加え、プレート $37^{\circ}$ で1時間インキュベートした。ブロッキング液を傾斜して除き、希釈ラット血清150 $\mu$ l(重複試料)を希釈シリーズの第1番目のウエルに添加した。初回試験血清希釈は0.5%Tween20含有のブロッキング液で1:30の希釈とし、次いでこの液で順次5倍希釈とした。これは30 $\mu$ lを取り、順次120 $\mu$ lの0.5%Tween20含有のブロッキング液に移し、混合し、この希釈をさらに新しいウエルに反復することによって行った。最終希釈後、ウエルから30 $\mu$ lを除去して全ウエルの最終液量が120 $\mu$ lとなるようにした。このような希釈を計3回行った(計4ウエル)。プレート $37^{\circ}$ で1時間インキュベートした。このインキュベート後、段階希釈した試料を傾斜して棄て、ウエルを0.5%Tween20含有のPBS(PBST)で6回洗った。0.5%Tween20含有ブロッキング緩衝液中のウサギ抗ラットIgGアルカリホスファターゼ(Sigma)100 $\mu$ lを各ウエルに加え、プレート $37^{\circ}$ で1時間インキュベートした。コンジュゲート液を傾斜して除き、プレートを上述のやり方で洗った。最終洗浄においてはPBSTに替えて50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH9.5を用いて行った。プレートの発色は1mg/mlの濃度でリン酸パラニトロフェニル(Sigma)を50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>, pH9.5に溶解した液を各ウエルに100 $\mu$ l加え、室温暗所で5-45分間インキュベートすることによって行った。各ウエルの吸光度は410nmでDynatech MR700プレートリーダーを用いて測定した。結果は表4及び5に要約されており、個々のマウスの血清の反応性を平均値を表示してある。

【0164】

【表4】

### C. botulinum C断片含有融合タンパク質で免疫した後の

#### 抗C. botulinum A型トキシン血清IgG力価の測定

免疫経路	経鼻			経口			
	免疫前	pMBot	pMBot及び pMA1870- 2680	pMABot	pMBot	pMBot及び pMA1870- 2680	pMABot
希釈率							
1:30	0.080	1.040	1.030	0.060	0.190	0.080	0.120
1:150	0.017	0.580	0.540	0.022	0.070	0.020	0.027
1:750	0.009	0.280	0.260	0.010	0.020	0.010	0.014
1:3750	0.007	0.084	0.090	0.009	0.009	0.010	0.007
供試ラット数		5	5	5	5	2	2

\*数字は2枚のELISAプレートから得られた値の平均値、免疫前の対照値を用いて標準化したもの

【表5】

C. botulinumC断片含有融合タンパク質で免疫した後の  
抗C. botulinumA型トキシン血清IgG力価の測定

免疫経路	経鼻				経口	
	免疫前	pMBot	pMABot	pMBot	pMABot	
希釈率						
1:30	0.040	0.557	0.010	0.015	0.010	
1:150	0.009	0.383	0.001	0.003	0.002	
1:750	0.001	0.140	0.000	0.000	0.000	
1:3750	0.000	0.040	0.000	0.000	0.000	
供試ラット数		1	1	3	3	

10

上記のELISAの結果は、投与経路が経鼻の場合ポツリヌス融合タンパク質に対する反応性は最も強く、経口的に投与した場合には弱い応答性しか見られないことを示している。経鼻的に送達されたpMBot、及びpMA1870-2680を混合したpMBotは最も大きな血清IgG応答を引き起こした。これらの結果は、この応答を誘発するためにはpMBotタンパク質のみが必要であることを示している。何故ならばpMA1870-2680の添加は抗体応答を増強させなかったからである(表4)。C. difficileトキシンA断片をMBPとC. botulinumC断片タンパク質の間に置くことは、抗botIgG力価を劇的に低下させる(pMABot、pMCABot及びpMNABotタンパク質を用いたときの結果を参照)。

20

## 【0165】

この研究は、pMBotタンパク質は経鼻投与したときC. botulinumA型トキシンに対する強い血清IgG応答を誘起することを示している。

## 【0166】

b) 抗組換えC. botulinumC断片抗体によるC. botulinum A型ニューロトキシンのin vivoでの中和 組換えポツリヌス融合タンパク質(実施例22、ラット中)の経鼻投与で産生された抗C. botulinumA型トキシン抗体のC. botulinumA型トキシンを中和する能力をマウス中和モデルで調べた。マウスモデルは体液中のポツリヌス毒素の検出及び抗ポツリヌス抗体の評価に受け入れられている方法である[E. J. Schantz and D. A. Kautter, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 61:96(1990)、及び陸軍省軍医総監から米国食品医薬品局へのIND(BB-IND-3703)申請]。抗C. botulinumA型トキシン抗体は下記のように調製した。

30

## 【0167】

経鼻的にpMBotタンパク質を投与した群のラットに、1匹あたり250µgのpMBotタンパク質で2回目のブーストを行い、その7日後に血清を集めた。この群のラットの内の1匹と免疫前のラットの1匹から血清を採取し、抗C. botulinumA型トキシン中和活性を下記のマウス中和モデルで調べた。

40

## 【0168】

Dr. Eric Johnson(University of Wisconsin, Madison, USA)から入手した精製C. botulinumA型トキシン複合体のLD<sub>50</sub>をSchatz and Kautterの腹腔内投与法[J. Assoc. Off. Anal. Chem., 61:96(1978)]で18-22gの雌ICRマウスを用いて測定したところ3500LD<sub>50</sub>/mlであった。LD<sub>50</sub>の決定は次のとおり行った。精製A型トキシン複合体を25mMのリン酸ナトリウム緩衝液pH6.8に溶解し、3.15×10<sup>7</sup>LD<sub>50</sub>/mgのストックトキシン溶液を作ることにより、A型トキシン標準品を調製した。その溶液のOD<sub>278</sub>を測定し、濃度を10-20µg/mlに調整した。トキシン溶液はゲル-リン酸塩(30mMリン酸塩、pH6.4:0.2%ゼラチン)で1:100に希釈し

50



た。トキシン溶液を下記の表 6 に示すとおりさらに希釈した。2 匹のマウスに各希釈を 0.5ml 腹腔内投与し、ボツリヌス症の症状を 72 時間観察した。

【 0 1 6 9 】

【表 6】

### 精製 C. botulinum A 型トキシン複合体の LD<sub>50</sub> の決定

希釈率	72 時間後の死亡数
1:320	2/2
1:640	2/2
1:1280	2/2
1:2560	0/2(72 時間以降に発病)
1:5120	0/2(症状なし)

10

表 6 に示した結果からトキシン力価は 2560LD<sub>50</sub>/ml と 5120LD<sub>50</sub>/ml の間 (又は約 3840LD<sub>50</sub>/ml) と推定される。この値は計算の都合上、小さい数を切り捨て 3500LD<sub>50</sub>/ml とする。

20

【 0 1 7 0 】

pMBot タンパク質で経鼻的に免疫したラットの血清中の中和抗体の量を測定した。上述のやり方で pMBot タンパク質でブーストしたラット 2 匹の血清及び免疫前の 1 匹のラットの血清を次のとおり試験した。トキシン標準品をゲル-リン酸塩で 1:100 に希釈して最終濃度を 350LD<sub>50</sub>/ml とした。希釈したトキシン標準品 1ml を 3 匹の各ラットの各々の血清 25µl、及びゲル-リン酸塩 0.2ml と混合した。混合物を室温で 30 分間時々混合しながらインキュベートした。2 匹のマウスそれぞれに混合物 0.5ml を腹腔内に注射した。マウスのボツリヌス症の徴候を 72 時間観察した。pMBot タンパク質で免疫したラットから得た血清の投与を受けたマウスはこのチャレンジ投与を中和した。免疫前のラットの血清を投与されたマウスは 24 時間以内に死亡した。

30

【 0 1 7 1 】

pMBot タンパク質で免疫したラットの血清中に存在する抗トキシン中和抗体の量を定量した。血清抗体の力価測定は、各抗体希釈液 0.1ml を (表 7 参照) 0.1ml の 1:10 希釈のストックトキシン溶液 ( $3.5 \times 10^4$  LD<sub>50</sub>/ml) 及び 1.0ml のゲル-リン酸塩と混合し、1 希釈あたり 0.5ml を 2 匹のマウスに腹腔内投与することによって行った。マウスのボツリヌス症の徴候を 3 日間 (72 時間) 観察した。結果は表 6 にまとめた。

【 0 1 7 2 】

表 7 に示すとおり、pMBot 血清は 1:320 又はそれ未満の希釈で用いた場合は C. botulinum A 型トキシン複合体を中和した。pMBot 血清での平均中和値は 168IU/ml であった (1IU は 10,000 マウス LD<sub>50</sub> と定義される)。この値は循環血清力価としては 3.7IU/mg 血清タンパク質と換算される。この中和力価は市販の瓶入り濃縮ウマ抗 C. botulinum 抗血清 (Connaught Laboratories, Ltd.) に比肩しうるものである。Connaught 社の 10ml パイアルの抗血清は約 200mg/ml のタンパク質を含有し、その 1ml は 750IU の C. botulinum A 型トキシンを中和することができる。1パイアルをヒトに投与した後、Connaught 社製品の循環血清力価は平均血清量を 3リットルと仮定すると約 25IU/ml となる。このように、pMBot タンパク質で経鼻的に免疫したラットで見られた循環抗 C. botulinum 力価 (168IU/ml) は、ヒトの防御のために必要な抗 C. botulinum 抗体の循環力価より 6.7 倍高い。

40

【 0 1 7 3 】

【表 7】

## pMBot血清中の中和抗体価の定量

希釈率	pMBot <sup>a</sup>	
	ラット1	ラット2
1:20	2/2	2/2
1:40	2/2	2/2
1:80	2/2	2/2
1:160	2/2	2/2
1:320	2/2 <sup>b</sup>	2/2 <sup>b</sup>
1:640	0/2	0/2
1:1280	0/2	0/2
1:2560	0/2	0/2

10

<sup>a</sup> 数値はpMBotタンパク質で免疫したラットから採取した血清の投与を受け、72時間後に生存していたマウスの数を示す。

20

<sup>b</sup> これらのマウスは生存していたが72時間目以降に発病した。

これらの結果は、大腸菌で産生させた組換えC.botulinumC断片融合タンパク質を免疫原として用いたとき、C.botulinumA型トキシンを中和できる抗体が誘導されることを示している。

## 【0174】

## 実施例24 実質的にエンドトキシン汚染のない可溶性C.botulinumC断片の産生

実施例23は、大腸菌中で発現させたpMBotタンパク質での免疫によって中和抗体が産生されることを示している。これらの結果は、pMBot融合タンパク質がワクチンの良い候補であることを示している。しかし、ワクチンとしての使用に適した免疫原は中和抗体を誘導する能力に加え、実質的に発熱性物質のないものでなければならない。ワクチンとして用いるためのC.botulinumC断片タンパク質の生産を容易にする発現クローン及び発現条件を開発した。

30

## 【0175】

本実施例は(a) pMBotタンパク質中の発熱性物質含量の測定、(b) MBP不含のC.botulinumC断片タンパク質の産生、(c) C.botulinumC断片タンパク質の種々の発現ベクターを用いた発現、及び(d)顕著なエンドトキシン汚染が実質的にない可溶性C.botulinumC断片の精製を含む。

## 【0176】

40

a) pMBotタンパク質の発熱性物質含量の測定 組換え抗原をヒトあるいはその他の動物のワクチンとして用いるためには、その抗原調製品が発熱性物質を持たないことを示さねばならない。大腸菌のようなグラム陰性菌中で組み換えタンパク質を産生させて調製するとき最も重要な発熱性物質はエンドトキシンである(F.C.Pearson, Pyrogens: endotoxins, LAL testing and depyrogenation(1985) Marcel Dekker, New York, pp.23-56)。pMBotタンパク質のワクチン候補品としての有用性を評価するため、MBP融合タンパク質中のエンドトキシン含量を測定した。

## 【0177】

組換えタンパク質試料中のエンドトキシン含量はLimulusアッセイ(LAL kit: Associates of Cape Cod)を用い、製造者の使用説明書に従って行った。アフィニティーで精製したpMa

50

I-cタンパク質及びpMA1870-2680の試料は高レベルのエンドトキシン [ > 50,000EU/mgタンパク質 ; EU(エンドトキシンユニット) ] を含有していた。このことはMBP又はトキシンAリピート含有のポツリヌスC断片との融合物も高レベルのエンドトキシンを含んでいるはずであることを示唆している。

【 0 1 7 8 】

このため、アフィニティー精製pMal-c及びpMBotタンパク質調製品からのエンドトキシンの除去を次のように試みた。

【 0 1 7 9 】

pMal-c及びpMBotタンパク質試料をポリミキシンで脱発熱性物質処理しエンドトキシンが容易に除去しうるか調べた。次の量のタンパク質を処理した ; pMal-cは4.8 OD<sub>280</sub>/mlの濃度のものを29ml、pMBotは1.44 OD<sub>280</sub>/mlのものを19ml。タンパク質試料はPBSに対して十分透析し、50ml試験管(Falcon)中で0.5ml PBS平衡化ポリミキシンB(Affi-Prep Polymyxin, BioRad)と混合した。試料は試験管を一晩4 で回転させながら混合した。ポリミキシンを小型ベンチトップ遠心機の最高速度(約2000×g)で30分間遠心してベレットとし、上清は除いた。回収されたタンパク質(上清中)は、OD<sub>280</sub>で定量し、エンドトキシン活性をLALでアッセイした。どちらの場合も投入したタンパク質の約1/3が回収されたに過ぎずポリミキシン処理したタンパク質は依然としてエンドトキシン汚染が著しい状態であった(約7000EU/mg pMBot)。

【 0 1 8 0 】

発熱性物質を取り除く実験を、上記とは別に精製したpMal-cタンパク質調製品を用いて繰り返したが結果は同様であった。これらの研究結果から、アミロース樹脂を用いると多量のエンドトキシンがMBP融合タンパク質と共に精製されてしまうことが結論された。さらにこのエンドトキシンはポリミキシン処理では容易に除去し得ない。

【 0 1 8 1 】

これらの結果は、融合タンパク質上のMBP配列の存在がpMBotタンパク質調製品からのエンドトキシンの除去を面倒なものとしていることを示唆している。

【 0 1 8 2 】

b) MBPを含まないC.botulinumC断片タンパク質の産生 上記a)節においてpMBot融合タンパク質を、汚染しているエンドトキシンから精製することは容易でないことが示された。発熱性物質を含まない(例えばエンドトキシンを含まない)、可溶性ポツリヌスC断片タンパク質(MBPタグを含有していない)を産生する能力を調べた。pMBot発現構築物は、MBPとポツリヌスC断片との間に存在する加工した因子Xa切断部位を用いて融合タンパク質の切断を行うことによってMBPタグからポツリヌスC断片を精製するのが容易となるように設計した。因子Xa切断は次のように行った。

【 0 1 8 3 】

各種の緩衝液条件で [ 例えばPBS-NaCl(0.5M NaClを含有するPBS)、0.2% Tween20含有のPBS-NaCl、PBS、0.2% Tweenを含有のPBS、PBS-C(2mM CaCl<sub>2</sub>含有PBS)、0.1又は0.5%Tween20含有のPBS-C、.1又は0.5%NP-40含有のPBS-C、0.1又は0.5%Triton X-100含有のPBS-C、0.1%デオキシコール酸ナトリウム含有のPBS-C、0.1%SDS含有のPBS-C ] pMBotタンパク質に、因子Xa(New England Biolabs)を、0.1-1.0 % 因子Xa/pMBotタンパク質の比となるように加えた。因子Xa消化物は室温で12-72時間インキュベートした。

【 0 1 8 4 】

切断の程度は実施例2に記載の方法で変性SDS-PAGEゲルで電気泳動した後、ウエスタンブロット法又はクーマシーブルーによるタンパク質染色で調べた。切断反応物(及び非切断pMBotタンパク質の対照試料)を2分間マイクロ遠心機で遠心して、ゲルに試料をロードする前に不溶性タンパク質を除去した。因子Xaで処理した試料を非切断、非遠心のpMBot試料と同じゲル上で比較した。この分析の結果は下記に要約している。

【 0 1 8 5 】

1) 大部分の(約90%)pMBotタンパク質は、非切断の対照試料を用いた場合でも、遠心によ

10

20

30

40

50

って除去し得た。このことはpMBot融合タンパク質が完全には可溶性でないこと(すなわちそれが溶液ではなく懸濁液として存在していること)を示している。[この結果は、大部分のアフィニティー精製pMBotタンパク質が長期間(2週間以上)4 で保管すると沈殿するという観察結果と符合する。さらに、誘導されたpMBotタンパク質の大きな割合(すなわち75%)が、誘導された大腸菌の超音波処理及び清澄化の後にできるペレット中に残存する。PBS中にこれらの不溶性のペレットを再懸濁した後、超音波処理するとペレット中の不溶性pMBotタンパク質の部分的可溶化が起こる。)

2) 完全に溶液中にあるpMBotタンパク質の一部pMBotタンパク質の約10%は因子Xaにより完全に切断されるが、切断された(放出された)ボツリヌスC断片は比較的不溶性で切断されたMBPのみが十分に溶液中に残る。

10

【0186】

3) 上記の反応条件のどれもが、効果的な切断を減少させることなく溶解性を向上し得なかった。切断されたボツリヌスC断片を効果的に可溶化させる条件は見出せなかった。

【0187】

4) 因子Xa切断に用いる緩衝液中に0.1%SDSを用いることによりpMBotタンパク質の溶解性が向上した(pMBotタンパク質は全て可溶性であった)。しかし、SDSの存在は融合タンパク質の因子Xaによるいかなる切断も妨害する。

【0188】

5) 切断反応で生じたペレット化したタンパク質の分析から、完全長のpMBot(すなわち非切断)及び切断ボツリヌスC断片タンパクの双方ともインキュベーション中に沈殿したことが示された。

20

【0189】

これらの結果はpMBot融合タンパク質の切断後の可溶性ボツリヌスC断片タンパク質の精製は、pMBotタンパク質及び切断ボツリヌスC断片タンパク質の双方の不溶性によって面倒になっていることを示唆している。

【0190】

c) 各種の発現ベクターを用いた*C. botulinum* C断片の発現 ボツリヌスC断片の溶解性が、C断片タンパクを天然型の、N末端ヒスチジンタグ付きのタンパク質として、又はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として発現させることにより増加するか調べるため、別の発現プラスミドを構築した。これらの発現用構築物は実施例22に記載の方法を用いて作製した。図5は下記のベクターを図で表したものである。

30

【0191】

図5においては、次の略語を用いている。pPIはpET23ベクター、pHisはpETHisaベクター、pBlueはpBluescriptベクター、pMはpMAL-cベクター及びpGはpGEX3Tベクター(特表2002-514866実施例11に記載)を表す。黒の実線は*C. botulinum* C断片の遺伝子配列を示し、黒の楕円はMBPを示し、平行斜線を引いた楕円はGSTを示し、HHHHHはポリヒスチジンタグを示す。図5において、制限酵素名がカッコ内にあるときは制限酵素切断部位が構築中に壊されていることを示している。制限酵素にアスタリスクを付したものは制限酵素切断部位がクローニング結合部に再形成されたものであることを示している。

【0192】

40

i) pPBotの構築 *C. botulinum* C断片を天然型(すなわち非融合型として)タンパク質として発現させるために、pPBotプラスミド(図5に図式的に示す)を下記のとおり構築した。pAlterBotをNcoI及びHindIIIで消化することにより、pAlterBot中に存在するC断片配列を除去した。NcoI/HindIIIC断片インサートを、NcoI及びHindIIIで消化したpETHisaベクター(特表2002-514866実施例18bに記載)に連結した。この連結によって、ボツリヌスC断片のNcoIによってコードされたメチオニンが開始コドンで、天然型のボツリヌスC断片を直接発現する発現構築物が創出される。この連結産物はコンピテントなBL21(DE3)pLysS細胞(Novagen)を形質転換するために用いた。

【0193】

組換えクローンは制限酵素地図により同定した。

50

## 【 0 1 9 4 】

ii) pHisBotの構築 組換えタンパク質のアミノ末端にポリヒスチジンタグを含むC.botulinum C断片を発現させるため、pHisBotプラスミド(図5で図式的に示している)を下記のように調製した。pAlterBotからのNcoI/HindIIIボツリヌスC断片インサートを、NheI及びHindIIIで消化したpETHisaベクターに連結した。NcoI(C断片インサート上)及びNheI(pETHisaベクター上)部位を連結前にクレノウ断片を用いて塞いだ。これらの部位は平滑末端で連結された(予測どおり、NdeI部位はクローン接合部で再形成された)。連結してできた産物を、コンピテントなBL21(DE3)pLysSを形質転換するために用い、組換えクローンは制限酵素地図で同定した。

## 【 0 1 9 5 】

この結果得られたpHisBotクローンは以下の配列をもつヒスチジンタグ付きN末端拡張部(extension)を有するボツリヌスC断片タンパク質を発現する。

## 【 0 1 9 6 】

MetGlyHisHisHisHisHisHisHisHisHisSerSerGlyHisIleGluGlyArgHisMetAla(配列番号5)。ボツリヌスC断片遺伝子によってコードされるアミノ酸に下線を引き、ベクターがコードするアミノ酸をplain typeで示した。pHisBot融合タンパク質をコードするpETHisaベクターに存在するヌクレオチド配列を配列番号6に示す。pHisBotのアミノ酸配列は配列番号7に示している。

## 【 0 1 9 7 】

iii) pGBotの構築 ボツリヌスC断片タンパク質を、pGBotプラスミド(図5に模式的に示す)を構築することによって、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタンパク質との融合体として発現させた。この発現構築物は、pBlueBot(実施例22)中に存在しているNotI/SalI C挿入断片を、SmaIならびにXhoIで消化しておいたpGEX3Tベクターにクローニングすることによって作出した。NotI部位(ボツリヌス断片上に存在)は、ライゲーションの前に、クレノウ断片を使用して平滑化しておいた。ライゲーション生成物を使用して、コンピテントなBL21細胞を形質転換した。

## 【 0 1 9 8 】

上記発現構築物のそれぞれを、制限消化によって調べ、構築物の完全性を確認した。

## 【 0 1 9 9 】

pPBot[BL21(DE3)pLysS宿主]、pHisBot[BL21(DE3)pLysS宿主]、ならびにpGBot(BL21宿主)の大量培養物(1リットル)を、2×YT培養液で生育させ、実施例22に記載したようにして、(0.8-1.0mMのIPTGを使用して)3時間にわたって誘導した。各大量培養物のうちの1mlから、全タンパク質調製物、可溶性タンパク質調製物、ならびに不溶性タンパク質調製物を調製し(Williamsら、(1994)、上掲)、SDS-PAGEで分析した。クーマシー染色を行ったところ、pPBotならびにpHisBotの試料では、はっきりとした誘導バンドが検出されなかったのに対し、pGBotの試料では、はっきりとした推定分子量の不溶性バンドが検出された。pGBotの大量培養物(PBSに再懸濁)、あるいはpHisBotの大量培養物[Novagen 1×結合緩衝液(5mMイミダゾール、0.5M NaCl、20mM Tris-HCl、pH 7.9)に再懸濁]の可溶性溶解産物を調製し、これらの溶解産物を、以下のようにして、可溶性アフィニティタグ付きタンパク質をアフィニティ精製する際に使用した。

## 【 0 2 0 0 】

pGBot溶解産物は、グルタチオン-アガロース樹脂(Pharmacia)上で、SmithおよびCorcoran[Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 28(1994). pp. 16.7.1-16.7.7]の記載に正確にしたがってアフィニティ精製した。pHisBotタンパク質は、His-bind緩衝液キット(Novagen)を製造業者の記載に正確にしたがって使用することにより、His-Bind樹脂(Novagen)上で精製した。

## 【 0 2 0 1 】

pGBotならびにpHisBotタンパク質(非誘導タンパク質、誘導タンパク質、全タンパク質、可溶性タンパク質、ならびにアフィニティ精製溶離タンパク質を含む)の精製物の試料を、SDS-PAGEゲル上で展開した。電気泳動の後、タンパク質を、クーマシー染色、あるいは

10

20

30

40

50

ニワトリ抗クロストリジウム・ボツリヌス (C.botulinum) A型トキソイド抗体 (実施例 22 に記載) を使用したウェスタンブロット法によって分析した。

【0202】

こうした研究によって、実施条件下では、pGBotタンパク質がほぼ全面的に不溶性であるのに対し、pHisBotタンパク質は可溶性であることがわかった。この第一の試みでのpHisBotタンパク質のアフィニティ精製は、収量の点からも (免疫反応性ボツリヌスタンパク質の大半が、His-Bind樹脂に結合しなかったこと)、純度の点からも (ボツリヌスタンパク質が、全溶離タンパク質の約20%であると推定されたこと)、非効率的であった。

【0203】

d) エンドトキシンが実質的に非混入である可溶性クロストリジウム・ボツリヌス (C.botulinum) C断片タンパク質の精製 上記の研究から、pHisBotタンパク質が、E. Coli中では、可溶性タンパク質として発現されていることがわかった。しかし、His-Bind樹脂でのこのタンパク質のアフィニティ精製は、極めて非効率的であった。可溶性pHisBotタンパク質のアフィニティ精製を (収量に関しても、純度に関しても) 改善する目的で、His-Bind樹脂でなく、ポリヒスチジン結合アフィニティ樹脂 (Ni-NTA樹脂、Qiagen) を使用した。このNi-NTA樹脂は、His-Bind樹脂よりも優れた結合アフィニティ (pH 8.0 で、 $K_d = 1 \times 10^{-13}$ ; Qiagenのユーザーマニュアル) を有することが報告されている。

【0204】

誘導を行った1リットルの2x YT培養物の可溶性溶解産物 (Novagen 1X結合緩衝液) を、上述のようにして調製した。略述すると、pHisBot[B121(DE3)pLysS宿主]の培養物を、1000 µg/mlのアmpiシリン、34 µg/mlのクロラムフェニコール、及び0.2%のグルコースを含有する2x YT培養液1リットル中で、37 °Cにて、OD<sub>600</sub>が0.7となるまで生育させた。IPTGを1.0 mMとなるまで加えることによって、タンパク質の発現を誘導した。IPTG添加の3時間後に、細胞を氷浴中で15分間冷却し、JA10ロータ (Beckman) 中で、4 °Cにて、5000 rpmで、10分間にわたって遠心分離した。ペレットを、合計容積で40 mlのNovagen 1x結合緩衝液 (5 mMイミダゾール、0.5 M NaCl、20 mM Tris-HCl、pH 7.9) に再懸濁し、35 mlのOakridgeチューブ2本に移し、-70 °Cで1時間以上凍らせた。このチューブを溶かし、細胞を超音波処理 (Branson Sonifier 450 を、パワー設定6-7で使用し、4x20秒で破壊) によって氷浴上で破壊した。懸濁液を、JA17ロータ (Beckman) 中で、9000 rpm (10,000 x g) で20分間にわたって遠心分離することによって、清澄化した。

【0205】

可溶性溶解産物を、0.1% NP40とし、4 °Cで1時間にわたって攪拌することによって、7 mlのNi-NTA樹脂: 結合緩衝液の1:1スラリーにバッチ吸収させた。このスラリーを、内径が1又は2.5 cm (BioRad) カラムに注いだ。次に、カラムを、0.1% NP40含有Novagen 1x結合緩衝液15 ml、Novagen 1X結合緩衝液15 ml、洗浄緩衝液 (60 mMイミダゾール、0.5 M NaCl、20 mM Tris-HCl、pH 7.9) 15 ml、ならびにNaHPO<sub>4</sub>洗浄緩衝液 (50 mM NaHPO<sub>4</sub>、pH 7.0、0.3 M NaCl、10%グリセロール) 15 mlで逐次洗浄した。結合タンパク質は、溶離緩衝液 (50 mM NaHPO<sub>4</sub>、pH 4.0、0.3 M NaCl、10%グリセロール) を使用した樹脂のプロトン化によって溶離した。溶離タンパク質を4 °Cで保存した。

【0206】

全タンパク質、可溶性タンパク質、および溶離タンパク質の試料を、SDS-PAGEによって展開した。タンパク質試料は、実施例22bに記載したようにして、電気泳動用に調製した。2枚のゲルをクーマシーブルーで染色して、展開したタンパク質を可視化し、実施例22bに記載したようにしてウェスタンブロット分析を行うことによって、クロストリジウム・ボツリヌスA型トキシン反応性のタンパク質を検出した。代表的なクーマシー染色ゲルを、図6に示す。図6は、12.5%のアクリルアミドゲルに、以下の試料をローディングしたものである。レーン1-4は、それぞれ、全タンパク質、可溶性タンパク質、Ni-NTAカラムの流出液中に存在する可溶性タンパク質、ならびにアフィニティ精製pHisBot

10

20

30

40

50

タンパク質（すなわち、プロトン化によってNi-NTA樹脂から溶離されたタンパク質）を含んでいる。レーン5は、高分子量タンパク質マーカー（BioRad）を含んでいる。

#### 【0207】

pHisBotタンパク質の精製によって、pHisBotプラスミドを含むBL21(DE3)pLysS細胞の出発培養物1リットルから、7mgのアフィニティ精製タンパク質が得られた。精製pHisBotタンパク質の収量は、誘導培養物中の全可溶性タンパク質の約0.4%であった。精製pHisBotタンパク質をSDS-PAGEで分析したところ、90-95%以上のタンパク質が、推定分子量(50kD)を有する単一のバンド(図6)として存在していた。この50kDのタンパク質のバンドは、抗クロストリジウム・ボツリヌスA型トキシン抗体に対して免疫反応性であった。タンパク質調製物の吸光係数を測定したところ、1mg/mlの溶液あたりのOD<sub>280</sub>が、1.4(ピアスBCAアッセイ)あるいは1.45(ローリーアッセイ)であった。

10

#### 【0208】

pHを中和した溶離pHisBotタンパク質の試料を、KB 803HPLCカラム(Shodex)で展開した。Hisタグ付きタンパク質は、このサイズ分離カラムによって保持されたもの(おそらく、このタンパク質が本来有している金属結合能力によるものと考えられる)、pHisBotタンパク質の相対的な移動度は、溶液中の非凝集タンパク質について予測されるものの一一致していた。誘導pHisBotタンパク質の大半は、上記過程で使用した生育条件ならびに可溶化条件で、可溶性であると判定された(すなわち、pHisBotプラスミドを含むBL21(DE3)pLysS細胞から調製した全タンパク質ならびに可溶性タンパク質の試料で観察されるpHisBotタンパク質レベルの比較によって判定したところ、pHisBotタンパク質の90%以上が可溶性であることが見いだされた)。遠心分離、-20℃での長期保存、少なくとも2サイクルの凍結・解凍を行った後に得られた試料をSDS-PAGEで分析したところ、(沈殿による)タンパク質の損失は検出されず、pHisBotタンパク質が溶離緩衝液(すなわち、50mM NaHPO<sub>4</sub>、pH4.0、0.3M NaCl、10%グリセロール)に可溶性であることが示唆された。

20

#### 【0209】

アフィニティ精製pHisBot調製物(pH中和後)へのエンドトキシンの混入を、LALアッセイ(Associates of Cape Cod)で調べたところ、エンドトキシンの有意な混入は検出されなかった。このアッセイは、製造業者の指示にしたがって、終点発色法(endpoint chromogenic method)(ジアゾカップリングなし)を使用して行った。この方法で検出可能なのは、濃度が0.03EU/ml(EUは、エンドトキシン単位(endotoxin unit))以上のエンドトキシンである。LALアッセイは、0.5mgのpHisBotタンパク質を50mMNaHPO<sub>4</sub>、pH7.0、0.3M NaCl、10%グリセロールに溶解してなる0.5mlの溶液を使用して行った。0.5mlの試料中で30-60EUが検出された。したがって、アフィニティ精製したpHisBot調製物は、タンパク質1mgあたり60-120EUを含有していることとなる。非経口薬剤の投与について定めたFDAのガイドラインでは、ヒト投与用組成物の含量が、体重1kgあたり5EU未満であることが要求されている(ヒトの平均体重は70kgなので、非経口投与1回あたり349EU単位までが許容含量だということになる)。ワクチン製剤で投与されるタンパク質の量は極めて少ないので(通常、タンパク質10-500μgの範囲)、タンパク質1mgあたり60-120EUを含有するアフィニティ精製pHisBotを投与しても、エンドトキシンの許容ローディング量のうちのごくわずかな割合が投与されるだけである。たとえば、10-500μgの精製pHisBotを70kgのヒトに導入した場合(タンパク質製剤は、60EU/mgのタンパク質を含有)、ヒトに導入されるエンドトキシンは、0.6-30EU[すなわち、エンドトキシンの非経口投与の場合の最大許容負荷量の0.2-8.6%(体重1kgあたり5EU未満)]のみということになる。

30

40

#### 【0210】

上述の結果から、上記精製スキームを使用した場合、エンドトキシン(LPS)がpHisBotタンパク質と同時に精製されることはないことが実証された。エンドトキシンの含有レベルがさらに低い(組換え型タンパク質1mgあたり2EU未満)組換え生成pHisBotタンパ

50

ク質製剤は、Ni-NTAカラムを、洗浄緩衝液で、 $OD_{280}$ が基底レベルに復帰するまで、(すなわち、紫外線吸収性物質が、それ以上カラムから流出しなくなるまで、)洗浄することによって生成することができる。

#### 【0211】

上述の結果によって、エンドトキシンを実質的に含有しない可溶性のポツリヌスC断片タンパク質の生成ならびに精製方法が例示されるものである。

#### 【0212】

##### 実施例25 pHisBotタンパク質の発現ならびに精製の最適化

実施例24dの結果から、pHisBotタンパク質は、E. coli内で可溶性タンパク質として製造することができ、精製によって発熱物質活性のない状態とすることができるので、ワクチンとして使用するにあたっての優れた候補となりうることが実証された。pHisBotタンパク質の発現ならびに精製を最適化するために、各種の生育ならびに精製条件を調べた。

#### 【0213】

##### a) 生育のパラメータ

i) 宿主の系統 使用する宿主の系統が、可溶性pHisBotタンパク質の生成に及ぼす影響を調べた。BL21(DE3)pLysS宿主でなく、BL21(DE3)宿主(Novagen)を使用して、[上記実施例24dに記載したようにして]pHisBotの大量精製を行った。BL21(DE3)宿主からpLysSプラスミドを欠失させた結果、プラスミドのT7-lacプロモーターが抑制解除されることにより、発現レベルが上昇した。しかし、上記実施例24dに記載したのと同じ条件下で精製した場合には、アフィニティ精製可溶性組換え型タンパク質の収量は、極めて低かった(培養物1リットルあたり、約600 $\mu$ g)。こうした結果となったのは、BL21(DE3)宿主での発現の結果、pHisBotタンパク質が不溶性の封入体として極めて高レベルで発現したことによるものであり、このことは、誘導を行ったBL21(DE3)培養物から調製したタンパク質のSDS-PAGEでの分析結果に示されている(図7、レーン1-7、後述)。こうした結果から、pHisBotタンパク質がE. coli細胞にとって本来毒性というわけではなく、適切なプロモーター/宿主の組み合わせを使用すれば、高レベルでの発現が可能であることが実証された。

#### 【0214】

図7は、pHisBotプラスミドを含むBL21(DE3)細胞から調製した抽出物をローディングしたSDS-PAGEのゲル(12.5%のアクリルアミド)をクーマシーブルーで染色したものを示す。各レーンには、2.5 $\mu$ lのタンパク質試料を2.5 $\mu$ lの2 $\times$ SDS試料緩衝液と混ぜたものをローディングした。試料は、実施例22bに記載したようにして取り扱った。ゲルには、以下の試料を加えた。レーン1-7は、BL21(DE3)宿主から単離したタンパク質を含む。レーン8-14は、BL21(DE3)pLysS宿主から単離したタンパク質を含む。全タンパク質を、レーン1、2、4、6、8、10、及び12にローディングした。可溶性タンパク質を、レーン3、5、7、9、11、及び13にローディングした。レーン1は、非誘導宿主細胞から得たタンパク質を含む。レーン2-13は、3時間にわたって誘導した宿主細胞から得たタンパク質を含む。IPTGは、最終濃度が0.1mM(レーン6-7)、0.3mM(レーン4-5)、1.0mM(レーン2、3、8-13)となるまで加えた。培養物は、LBブロス(レーン8-9)、2X YTブロス(レーン10-11)、あるいはテリフィックブロス(レーン1-7、12-13)中で生育させた。レーン3、5、及び7に見られるpHisBotタンパク質は、それぞれレーン2、4、及び6からまぎれ込んだ不溶性タンパク質である。レーン14には、高分子量タンパク質マーカー(BioRad)をローディングした。

#### 【0215】

BL21(DE3)宿主を利用して、十分に高レベル(すなわち、約10mg/ml)の可溶性pHisBotタンパク質を発現させることができるかどうかを判定する目的で、各種の発現条件を調べた。変更した条件は、温度(37又は30での生育)、培養液(2 $\times$ YTブロス、LBブロス、又はテリフィックブロス)、ならびに誘導物質のレベル(0.1、0.3、又は1.0mMのIPTG)である。これらの変数についての全ての組み合わせを調べ、次に、[上

10

20

30

40

50



掲のWilliamsら(1994)に記載されたようにして、1 mlの試料から調製した]全抽出物ならびに可溶性抽出物をSDS-PAGEで分析することによって、誘導レベルならびに可溶性を評価した。

#### 【0216】

培養物は、いずれも、15 mlのチューブ(Falcon #2057)で生育させた。培養液は、いずれも、適当な温度であらかじめ一晩暖め、100 µg/mlのアンピシリンと0.2%のグルコースを加えておいた。テリフィックブ罗斯は、12 g/lのバクト-トリプトン、24 g/lのバクト-酵母抽出物、及び100 ml/lの、0.17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>および0.72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>を含有する溶液を含有している。培養物は、(確実に空気が混入するように)回転ホイールに載置して、インキュベータ中で、OD<sub>600</sub>が約0.4となるまで生育させ、IPTGを添加することによって誘導した。いずれの場合も、温度、培養液、誘導物質の濃度にかかわらずなく、不溶性pHisBotタンパク質が高レベルで発現するのが観察された。

10

#### 【0217】

次に、23 で生育させた2x YTの培養物で、IPTGの濃度を変化させた場合の効果を調べた。IPTGは、最終濃度が、1 mM、0.1 mM、0.05 mM、あるいは0.01 mMのいずれかとなるまで加えた。この温度では、1 mMのIPTGが存在しても、0.1 mMのIPTGが存在しても、同様のレベルのpHisBotタンパク質が誘導され、この発現レベルは、さらに高温の場合に観察されるレベルよりは低かった。(23 にて、1.0 mMならびに0.1 mMのIPTGで誘導した場合と比べると、)誘導されるタンパク質のレベルは、IPTGを0.05 mMとすると低減し、0.01 mMとすると、誘導が生じなくなった。しかし、この宿主中で、誘導されたpHisBotタンパク質が可溶性となるような条件は観察されなかった。このように、BL21(DE3)宿主を使用すると、(BL21(DE3)pLysS宿主の場合と比較して、)発現レベルが上昇するものの、この宿主中では、可溶性タンパク質がうまく生成するような条件を特定することができなかった。

20

#### 【0218】

こうした結果から、可溶性pHisBotタンパク質の生成は、T7-lacプロモーターとともにBL21(DE3)pLysS宿主を使用することによって達成されていることが実証された。

#### 【0219】

ii) 温度、培養液、IPTG濃度、誘導時間の変化によって生じる効果 [BL21(DE3)pLysS宿主中での] pHisBot発現構築物からの、組換え型ボツリヌスタンパク質の発現に、各種培養液中で宿主細胞を生育させることが及ぼす効果を調べた。pHisBotプラスミドを含むBL21(DE3)pLysS細胞を、LBブ罗斯、2x YTブ罗斯、又はテリフィックブ罗斯のうちのいずれかの中で、37 にて生育させた。1 mMのIPTGを3時間の誘導時間にわたって使用することによって、細胞を誘導した。pHisBotタンパク質の発現は、細胞を2x YTブ罗斯中で生育させた場合に、最も高いことが見いだされた(図7、レーン8-13を参照されたい)。

30

#### 【0220】

次に細胞を、2x YTブ罗斯中で30 にて生育させ、IPTGの濃度を1.0 mM、0.3 mM、0.1 mMと変化させ、誘導時間を3時間あるいは5時間とした。pHisBotタンパク質の発現は、誘導物質の3種の使用濃度のいずれでも同様であり、誘導タンパク質のレベルは、3時間の誘導を行った場合より、5時間の誘導を行った場合の方が高かった。

40

#### 【0221】

pHisBotタンパク質の発現について最適であることが見いだされた条件を使用して、大量培養を行い、pHisBotタンパク質の大量精製を行ううえで十分な材料を得た。1リットルの培養物3つを、100 µg/mlのアンピシリン、34 µg/mlのクロラムフェニコール、0.2%のグルコースを含有する2x YT培養液で生育させた。培養物は、30 で生育させ、1.0 mMのIPTGで5時間にわたって誘導した。培養物を集め、特表2002-514866実施例18に記載したようにして可溶性の溶解産物を調製した。可溶性溶解産物のバッチ吸収を1時間でなく3時間にわたって行った以外は、実施例24dに記載したようにして大量精製を行った。最終的に、培養物1リットルあたり13 mgのpHisBotタンパク質が得ら

50

れた。このpHisBotタンパク質は、全可溶性タンパク質の0.75%であった。

#### 【0222】

上記結果によって、可溶性のpHisBotタンパク質が生成する生育条件が実証された。(すなわち、BL21(DE3)pLysS宿主、2×YT培養液、30、5時間にわたる1.0mMのIPTGの使用。)

b) 精製パラメータの最適化 精製条件の最適化のために、上述のようにして、大量培養物(3×1リットル)を30で生育させ、1mMのIPTGで5時間にわたって誘導した。実施例24dに記載されたようにして、培養物をプールし、遠心用ボトルに分注し、冷却し、ペレット化した。細胞ペレットは、使用時まで-70で凍結したままとした。各細胞ペレットは、1リットルの出発培養物の1/3に相当するものとし、各ボトルを、以下に記載する最適化実験のそれぞれで使用した。こうすることにより、各実験で使用する細菌が標準化され、アフィニティ精製pHisBotタンパク質の収量を各種最適化実験間で比較することが可能となった。

10

#### 【0223】

i) 結合特異性(pHプロトン化)

pHisBot培養物の溶解産物をPBS(pH8.0)中で調製し、Econoクロマトグラフィシステム(BioRad)を使用し、流量を0.2ml/分(3-4カラム容積/時)として、PBS(pH8.0)で平衡化しておいた3mlのNi-NTAカラムに加えた。溶出液の吸光度( $OD_{280}$ )が基底レベルに復帰するまで、カラムをPBS(pH8.0)で洗浄した。次に、流量を2ml/分に増やし、カラムをPBS(pH7.0)で平衡化した。pH勾配(pH7.0から4.0へ、PBSを使用)をかけ、結合したpHisBotタンパク質をカラムから溶離させた。分画を集め、その一部をSDS-PAGEゲルで展開した。PAGEゲルをウェスタンブロッティングし、実施例22に記載したようにして、ニワトリ抗クロストリジウム・ボツリヌスA型トキソイド抗体を使用して、pHisBotタンパク質を検出した。

20

#### 【0224】

ウェスタンブロット分析によって、pHisBotタンパク質は、pH6.0で、Ni-NTAカラムから溶離しはじめると判定された。この結果は、Hisタグ付きタンパク質モノマーの推定溶離pHである5.9と符合する。

#### 【0225】

こうした結果から、PBS中でNi-NTA樹脂からpHisBotタンパク質がプロトン化(溶離)されるのがpH6.0であることが実証された。

30

#### 【0226】

ii) 結合特異性(イミダゾール競合)

未変性のE.coliタンパク質をNi-NTAカラムから除去し、なおかつ、pHisBotタンパク質はカラムに結合したまま残しうるような精製条件を決定するために、以下の実験を行った。pHisBot培養物の溶解産物を、50mM NaHPO<sub>4</sub>、0.5M NaCl、8mMイミダゾール(pH7.0)中で調製した。この溶解産物を、Econoクロマトグラフィシステム(BioRad)を使用し、50mM NaHPO<sub>4</sub>、0.5M NaCl(pH7.0)で平衡化しておいた3mlのNi-NTAカラムに加えた。0.2ml/分(3-4カラム容積/時)の流量を使用した。溶出液の吸光度が基底レベルに復帰するまで、50mM NaHPO<sub>4</sub>、0.5M NaCl(pH7.0)でカラムを洗浄した。次に、流量を2ml/分に増やした。

40

#### 【0227】

イミダゾールのステップ勾配[50mM NaHPO<sub>4</sub>、0.5M NaCl(pH7.0)への溶液]を使用して、カラムを溶離させた。イミダゾールの溶離ステップは、20mM、40mM、60mM、80mM、100mM、200mM、1.0Mとし、溶離後は、(カラムからニッケルを取り除き、残りのタンパク質をすべて除去するために)0.1mM EDTAで洗浄を行った。各ステップとも、 $OD_{280}$ が基底レベルに復帰するまで、洗浄を行った。画分をSDS-PAGEゲルで展開し、ウェスタンブロッティングし、pHisBotタンパク質の検出を、ニワトリ抗クロストリジウム・ボツリヌスA型トキソイド抗体を使用し、実施例22に記載したようにして行った。2枚のゲルをクーマシーブルーで染色して、各画分中の溶離タンパク質を検

50

出した。

【0228】

PAGE分析の結果に示されているように、非特異的に結合している細菌タンパク質の大半が、20 mMのイミダゾールによる洗浄によって除去され、残りの細菌タンパク質が、40 mMならびに60 mMのイミダゾールによる洗浄によって除去されている。pHisBotタンパク質は、イミダゾール濃度が100 mMの時点で溶離しはじめ、イミダゾール濃度が200 mMのときに定量的に溶離した。

【0229】

こうした結果によって、E. coliタンパク質がカラムから最適なかたちで除去され、しかも、pHisBotタンパク質がこの緩衝液中に特異的に保持されるようなイミダゾール洗浄強度の範囲を正確に特定することができた。こうした結果から、pHisBotタンパク質の精製を、宿主タンパク質の混入なしに行いうる条件が判明した。

10

【0230】

iii) 精製用緩衝液、及び最適化した精製プロトコール 可溶性pHisBotタンパク質のバッチ精製に際しての最適化したプロトコールを開発するにあたって、各種の精製パラメータについて調べた。分析結果を、以下にまとめて示す。

【0231】

数種の緩衝液を使用して（実施例24dに記載されたようにして）バッチ精製を行い、pHisBotタンパク質をNi-NTAカラムに結合する際に、もっと別の緩衝液を使用できるか否かを判定した。その結果、Tris-HCl (pH 7.9) 又はNaHPO<sub>4</sub> (pH 8.0) 緩衝液を用いた場合でも、pHisBotタンパク質をNi-NTA樹脂に定量的に結合させることが判明した。NaHPO<sub>4</sub> 緩衝液中のpHisBotタンパク質の結合は、5 mM、8 mM、あるいは60 mMのイミダゾールを使用しても阻害されることはなかった。50 mM NaHPO<sub>4</sub>、0.3 M NaCl (pH 3.5 - 4.0) を含有し、10%グリセロールも含有する/しない緩衝液中では、結合したpHisBotタンパク質を定量的に溶離させることができた。しかし、凍結・解凍（アフィニティ精製溶離液を-20℃で数週間保存後）の前後に可溶性のアフィニティ精製pHisBotタンパク質を定量したところ、グリセロール含有緩衝液を使用した場合には、タンパク質の94%が回収されるのに対し、グリセロール非含有緩衝液を使用した場合には、68%のタンパク質しか回収されないことが明らかとなった。このことは、溶離タンパク質を冷凍温度（たとえば、-20℃）で保存した場合、こうした低pHの緩衝液中では、グリセロールが、pHisBotタンパク質の可溶性を増強していることを実証するものである。NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 緩衝液を加えてpHを中和しても、タンパク質の明らかな沈殿は生じなかった。

20

30

【0232】

バッチ形式を使用した場合、pHisBotタンパク質が定量的に結合し始めるのは、4時間で結合（結合の間は樹脂を攪拌）してから1時間後ではなく、3時間後であることがわかった（図8）。図8は、BL21(DE3)pLysS宿主で調製した溶解産物からpHisBotタンパク質を精製する間に単離したタンパク質試料を含むSDS-PAGEゲル（7.5%アクリルアミド）をクーマシーブルーで染色したものを示す。各レーンには、5 µlのタンパク質試料を5 µlの2×試料緩衝液と混ぜたものをローディングし、実施例22bに記載したようにして処理を行った。レーン1は、高分子量タンパク質マーカー（BioRad）を含む。レーン2および3は、Ni-NTA樹脂から溶離したタンパク質を含む。レーン4は、Ni-NTA樹脂とともに3時間のバッチインキュベーションを行った可溶性タンパク質を含む。レーン5および6は、それぞれ、可溶性タンパク質と全タンパク質を含む。図8からは、pHisBotタンパク質が完全に可溶性であることがわかる〔レーン5とレーン6を比較のこと。双方のレーンに、同じような量の50 kDのpHisBotタンパク質が認められる。もし、実質的な量（20%以上）のpHisBotタンパク質が宿主中で部分的に不溶性であったとすれば、レーン6（全タンパク質）には、レーン5（可溶性タンパク質）より多量のpHisBotタンパク質が認められるはずである〕。図8からは、Ni-NTA樹脂で3時間にわたってバッチ吸収を行った後は、pHisBotタンパク質が溶解産物から完全に除去されていることもわかる（レーン4とレーン5を比較のこと）。

40

50

## 【0233】

すでに報告されているように、Ni-NTA樹脂とHisタグ付きタンパク質とが、高アフィニティ (pH 8.0 で、 $K_d = 1 \times 10^{13}$ ) の相互作用を生じることから、樹脂 - タンパク質複合体を、結合タンパク質の有意な溶離を生じることなく扱いはずであることが示唆された。実際、組換え型タンパク質をNi-NTA樹脂に結合させた後は、この樹脂 - pHisBotタンパク質複合体は高度に安定で、 $1600 \times g$  で2分間の遠心を繰り返しても、結合が維持されることが示された。この遠心分離過程を50 mlのチューブ (Falcon) 中で実施すると、密な樹脂ペレットが生成し、用済みの可溶性溶解産物を上清を捨てることによって除去し、ペレットを洗浄緩衝液に再懸濁することが可能となった。遠心分離によって、さらに洗浄を行うことも可能である。このように、さらに洗浄を行うことが可能なので、組換え型タンパク質を樹脂に結合させておいてから遠心分離を行うだけで溶解産物を除去できる、大量の溶解産物のバッチ吸収用のプロトコルを開発することが可能となる。

10

## 【0234】

以下のような簡略化された統合プロトコルを開発した。誘導を行った細胞のペレットを結合緩衝液 [ 50 mM NaHPO<sub>4</sub>、0.5 M NaCl、60 mM イミダゾール (pH 8.0) ] に再懸濁し、 $4 \times 20$  秒間超音波処理し、 $10,000 \times g$  で20分間遠心分離することによって、可溶性溶解産物を調製した。NP-40を0.1%となるまで加え、(結合緩衝液で平衡化しておいた) Ni-NTA樹脂を加えた。出発培養物1リットルあたり、1:1 スラリー (樹脂: 結合緩衝液) 8 mlを使用した。

## 【0235】

混合物を、4 で3時間にわたって攪拌した。スラリーを、内径1 cmのカラム (BioRad) に加え、0.1%のNP-40を含有する結合緩衝液で洗浄し、さらに、基底レベルとなるまで結合緩衝液で洗浄した (これらの過程のかわりに、樹脂を遠心し、NP-40を含有する結合緩衝液に再懸濁し、さらに遠心分離ならびに結合緩衝液への再懸濁を行うことも可能である)。50 mM NaHPO<sub>4</sub>、0.3 M NaCl (pH 7.0) で樹脂を洗浄することにより、イミダゾールを除去した。pHが低い (pH 3.5 - 4.0) 以外は同一の緩衝液 (50 mM NaHPO<sub>4</sub>、0.3 M NaCl) を使用して、樹脂に結合したタンパク質を溶離した。

20

## 【0236】

このプロトコルに従って、パイロット精製を実施したところ、18 mg/lのアフィニティ精製pHisBotが得られた。SDS-PAGEゲルのクーマシーブルー染色によって推定したところ、pHisBotタンパク質の純度は90%以上であった。この値は、アフィニティ精製した可溶性pHisBotタンパク質の収量の観察値としてはもっとも高く、また、このプロトコルを用いると、イミダゾール含有結合緩衝液ならびに洗浄緩衝液を別途用いる必要がなくなる。上記結果は、組換え型pHisBotタンパク質をアフィニティ精製する際の簡潔かつ高効率のプロトコルばかりでなく、そうしたpHisBotタンパク質の単離に際して使用しうる各種精製条件も示している。

30

## 【0237】

実施例 26 pHisBotタンパク質は有効な免疫原である

実施例 23 では、pMBotタンパク質で鼻から免疫感作を行うと、マウス血清中で中和抗体が生成されることが明らかとなった。しかし、pMBotタンパク質を精製すると、有意量のエンドトキシンも同時に精製されてしまい、このエンドトキシンの除去が容易ではないことも見いだされた。その点、pHisBotタンパク質は、エンドトキシンの有意な混入を生じることなく単離することができるので、ワクチン生成用候補物質として、pMBotタンパク質より優れている。pHisBotのワクチンとしての適性をさらに調べるために、pHisBotタンパク質の免疫原性を以下のようにして判定し、マウスでのpMBotタンパク質とpHisBotタンパク質の相対的な免疫原性を比較した。

40

## 【0238】

GerbuGMDPアジュバント (CC Biotech) を使用して、pMBotタンパク質又はpHisBotタンパク質で、2群の8匹のBALBcマウスを免疫感作した。pMBotタンパク質 (10 mMのマルトースを含有するPBSへの溶液) 又はpHisBotタンパク質 (50 mM NaHPO<sub>4</sub>、0.3 M NaCl、

50

10%グリセロール(pH4.0)への溶液)は、Gerbuアジュバントと混合してから、マウスの免疫感作に用いた。各マウスは、0日目に、100 $\mu$ lの抗原/アジュバント混合物(50 $\mu$ gの抗原+1 $\mu$ gのアジュバント)の腹腔内注射を受けた。マウスは、14日目ならびに28日目に、投与経路を筋肉内注射とした以外は上述のようにして、追加免疫を行った。これらのマウスを、77日目に出血させ、各群の個々のマウスから採取した血清を使用して、抗クロストリジウム・ボツリヌスA型トキソイドの力価を(実施例23に記載したようにして)測定した。結果を表8に示す。

【0239】

【表8】

pMBotタンパク質又はpHisBotタンパク質で免疫感作した個々のマウスの  
抗クロストリジウム・ボツリヌスA型トキソイド血清IgG力価

マウス No.	前免疫 <sup>1</sup>				pMBot <sup>2</sup>				pHisBot <sup>2</sup>			
	試料の希釈度				試料の希釈度				試料の希釈度			
	1:50	1:250	1:1250	1:6250	1:50	1:250	1:1250	1:6250	1:50	1:250	1:1250	1:6250
1					0.678	0.190	0.055	0.007 <sup>2</sup>	1.574	0.799	0.320	0.093
2					1.161	0.931	0.254	0.075	1.513	0.829	0.409	0.134
3					1.364	0.458	0.195	0.041	1.596	1.028	0.453	0.122
4					1.622	1.189	0.334	0.067	1.552	0.840	0.348	0.090
5					1.612	1.030	0.289	0.067	1.629	1.580	0.895	0.233
6					0.913	0.242	0.069	0.013	1.485	0.952	0.477	0.145
7					0.910	0.235	0.058	0.014	1.524	0.725	0.269	0.069
8					0.747	0.234	0.058	0.014	1.274	0.427	0.116	0.029
平均 力価	0.048	0.021	0.011	0.002	1.133	0.564	0.164	0.037	1.518	0.896	0.411	0.114

<sup>1</sup> 前免疫試料は、組換え型スタヒロコッカス(Staphylococcus)エンテロトキシンB(SEB)抗原で免疫感作した各マウスから採取した血清の入った2つのウェル2組の平均である。この抗原は、クロストリジウム・ボツリヌスのトキシンとは、免疫学上関連を有しておらず、対照血清となる。

<sup>2</sup> 2つのウェルの平均。

上記表8に示された結果によって、各群の100%のマウス(8/8)が、非免疫状態から免疫状態へのセロコンバージョンを示したことに見られるように、pMBotタンパク質及びpHisBotタンパク質のいずれも、マウスに対して免疫原性を有することが実証された。この結果からは、抗クロストリジウム・ボツリヌスA型トキソイドIgGの平均力価が、pHisBotタンパク質による免疫感作を行った場合の方が、pMBotタンパク質による免疫感作を行った場合より、2-3倍高いことも示された。このことから、pHisBotタンパク質の

方が、pMBotタンパク質より免疫原として優れている可能性が示唆された。

【0240】

実施例27 組換え型pHisBotタンパク質による免疫感作により、中和抗体が生成する  
実施例26で示された結果から、pHisBotタンパク質及びpMBotタンパク質のいずれも、免疫感作を行った宿主中で、高力価の抗クロストリジウム・ボツリヌスA型トキソイド反応性抗体を誘導しうることが実証された。pHisBotタンパク質又はpMBotタンパク質のどちらかで免疫感作したマウス由来の免疫血清が、クロストリジウム・ボツリヌスA型トキソイドをin vivoで中和する能力を、実施例23bに記載されたマウス中和アッセイを使用し判定した。

【0241】

実施例26で、pMBotタンパク質又はpHisBotタンパク質で免疫感作した8匹のBALBcマウス2群に、77日目に出血させてから1週間の経過後に、追加免疫を行った。追加免疫は、実施例26に記載したようにして、pMBotタンパク質(10mMのマルトースを含有するPBSへの溶液)又はpHisBotタンパク質(50mMNaHPO<sub>4</sub>、0.3M NaCl、10%グリセロール(pH4.0)への溶液)をGerbuアジュバントと混合することによって行った。各マウスは、100μlの抗原/アジュバント混合物(50μgの抗原+1μgのアジュバント)の腹腔内注射を受けた。各マウスは、この追加免疫の6日後に出血させ、同一グループ内のマウスの血清をプールした。前免疫マウスからの血清も集めた(この血清は、表7の脚注に記載したのと同じ血清である。)

プール血清、あるいは前免疫血清中に中和抗体が存在するか否かは、マウスに、5LD<sub>50</sub>単位のA型トキシンを100μlのプール血清と混合したものを投与してみることによって調べた。すなわち、(投与対象マウス1匹について、)各プールの血清100μlを、精製したA型トキシン標準(50LD<sub>50</sub>/ml、実施例23bに記載されたとおりに調製)100μlならびにゲルリン酸塩500μlと混ぜることによって調べた。混合物を、ときどきかきまぜながら、室温で30分間インキュベートした。4匹のマウスのそれぞれに、混合物(0.7ml/匹)を腹腔内注射した。マウスは、72時間にわたって、ボツリヌス中毒の徴候に関して観察を行った。トキシンを、pHisBotタンパク質又はpMBotタンパク質のいずれかで免疫感作したマウスから採取した血清と混ぜたものの投与を受けたマウスは、ボツリヌス中毒症状を示さなかったのに対し、前免疫血清の投与を受けたマウスは、24時間以内に死亡した。

【0242】

こうした結果から、組換え型クロストリジウム・ボツリヌスC断片タンパク質であるpHisBotならびにpMBotのいずれかを免疫原として使用した場合、クロストリジウム・ボツリヌスA型トキシンを中和しうる抗体が誘導されることが実証された。

【0243】

実施例28~53 削除

【0244】

【配列表】

10

20

30

## SEQUENCE LISTING

<110> Promega Corporation

<120> Soluble recombinant Botulinum toxin protein

10

<130> PA01-045

<140>

<141> 2002-08-20

<150> US08/329,154

<151> 1994-10-24

20

<150> US08/405,496

<151> 1995-03-16

<150> US08/422,711

<151> 1995-04-14

30

<150> US08/480,604

<151> 1995-06-07

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.0

40

<210> 1

<211> 3891

<212> DNA

<213> Clostridium botulinum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3888)

10

<400> 1

atg caa ttt gtt aat aaa caa ttt aat tat aaa gat cct gta aat ggt 48  
 Met Gln Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly  
           1                  5                  10                  15

gtt gat att gct tat ata aaa att cca aat gta gga caa atg caa cca 96  
 Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Val Gly Gln Met Gln Pro  
                   20                  25                  30

20

gta aaa gct ttt aaa att cat aat aaa ata tgg gtt att cca gaa aga 144  
 Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg  
                   35                  40                  45

30

gat aca ttt aca aat cct gaa gaa gga gat tta aat cca cca cca gaa 192  
 Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu  
           50                  55                  60

gca aaa caa gtt cca gtt tca tat tat gat tca aca tat tta agt aca 240  
 Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr  
           65                  70                  75                  80

40



gat aat gaa aaa gat aat tat tta aag gga gtt aca aaa tta ttt gag	288	
Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu		
85 90 95		
aga att tat tca act gat ctt gga aga atg ttg tta aca tca ata gta	336	
Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val		
100 105 110		10
agg gga ata cca ttt tgg ggt gga agt aca ata gat aca gaa tta aaa	384	
Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys		
115 120 125		
gtt att gat act aat tgt att aat gtg ata caa cca gat ggt agt tat	432	
Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr		20
130 135 140		
aga tca gaa gaa ctt aat cta gta ata ata gga ccc tca gct gat att	480	
Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile		
145 150 155 160		
ata cag ttt gaa tgt aaa agc ttt gga cat gaa gtt ttg aat ctt acg	528	30
Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr		
165 170 175		
cga aat ggt tat ggc tct act caa tac att aga ttt agc cca gat ttt	576	
Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe		
180 185 190		40
aca ttt ggt ttt gag gag tca ctt gaa gtt gat aca aat cct ctt tta	624	

Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu		
195	200	205
ggg gca ggc aaa ttt gct aca gat cca gca gta aca tta gca cat gaa	672	
Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu		
210	215	220
ctt ata cat gct gga cat aga tta tat gga ata gca att aat cca aat	720	10
Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn		
225	230	235
agg gtt ttt aaa gta aat act aat gcc tat tat gaa atg agt ggg tta	768	
Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu		
245	250	255
gaa gta agc ttt gag gaa ctt aga aca ttt ggg gga cat gat gca aag	816	
Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys		
260	265	270
ttt ata gat agt tta cag gaa aac gaa ttt cgt cta tat tat tat aat	864	
Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn		30
275	280	285
aag ttt aaa gat ata gca agt aca ctt aat aaa gct aaa tca ata gta	912	
Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val		
290	295	300
ggg act act gct tca tta cag tat atg aaa aat gtt ttt aaa gag aaa	960	40
Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys		

305	310	315	320	
tat ctc cta tct gaa gat aca tct gga aaa ttt tcg gta gat aaa tta				1008
Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu				
	325	330	335	
aaa ttt gat aag tta tac aaa atg tta aca gag att tac aca gag gat				1056
Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp				10
	340	345	350	
aat ttt gtt aag ttt ttt aaa gta ctt aac aga aaa aca tat ttg aat				1104
Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn				
	355	360	365	
				20
ttt gat aaa gcc gta ttt aag ata aat ata gta cct aag gta aat tac				1152
Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr				
	370	375	380	
aca ata tat gat gga ttt aat tta aga aat aca aat tta gca gca aac				1200
Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn				
	385	390	395	400
				30
ttt aat ggt caa aat aca gaa att aat aat atg aat ttt act aaa cta				1248
Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu				
	405	410	415	
aaa aat ttt act gga ttg ttt gaa ttt tat aag ttg cta tgt gta aga				1296
Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg				40
	420	425	430	

ggg ata ata act tct aaa act aaa tca tta gat aaa gga tac aat aag	1344	
Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys		
435 440 445		
gca tta aat gat tta tgt atc aaa gtt aat aat tgg gac ttg ttt ttt	1392	
Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe		10
450 455 460		
agt cct tca gaa gat aat ttt act aat gat cta aat aaa gga gaa gaa	1440	
Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu		
465 470 475 480		
att aca tct gat act aat ata gaa gca gca gaa gaa aat att agt tta	1488	20
Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu		
485 490 495		
gat tta ata caa caa tat tat tta acc ttt aat ttt gat aat gaa cct	1536	
Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro		
500 505 510		30
gaa aat att tca ata gaa aat ctt tca agt gac att ata ggc caa tta	1584	
Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu		
515 520 525		
gaa ctt atg cct aat ata gaa aga ttt cct aat gga aaa aag tat gag	1632	
Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu		40
530 535 540		

tta gat aaa tat act atg ttc cat tat ctt cgt gct caa gaa ttt gaa	1680	
Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu		
545	550	555
560		
cat ggt aaa tct agg att gct tta aca aat tct gtt aac gaa gca tta	1728	
His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu		
	565	570
		575
		10
tta aat cct agt cgt gtt tat aca ttt ttt tct tca gac tat gta aag	1776	
Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys		
	580	585
		590
aaa gtt aat aaa gct acg gag gca gct atg ttt tta ggc tgg gta gaa	1824	
Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu		
	595	600
		605
		20
caa tta gta tat gat ttt acc gat gaa act agc gaa gta agt act acg	1872	
Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr		
	610	615
		620
gat aaa att gcg gat ata act ata att att cca tat ata gga cct gct	1920	
Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala		
	625	630
		635
		640
		30
tta aat ata ggt aat atg tta tat aaa gat gat ttt gta ggt gct tta	1968	
Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu		
	645	650
		655
		40
ata ttt tca gga gct gtt att ctg tta gaa ttt ata cca gag att gca	2016	

Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala		
660	665	670
ata cct gta tta ggt act ttt gca ctt gta tca tat att gcg aat aag	2064	
Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys		
675	680	685
gtt cta acc gtt caa aca ata gat aat gct tta agt aaa aga aat gaa	2112	10
Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu		
690	695	700
aaa tgg gat gag gtc tat aaa tat ata gta aca aat tgg tta gca aag	2160	
Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys		
705	710	715
720		20
gtt aat aca cag att gat cta ata aga aaa aaa atg aaa gaa gct tta	2208	
Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu		
725	730	735
gaa aat caa gca gaa gca aca aag gct ata ata aac tat cag tat aat	2256	
Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn		30
740	745	750
caa tat act gag gaa gag aaa aat aat att aat ttt aat att gat gat	2304	
Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp		
755	760	765
tta agt tcg aaa ctt aat gag tct ata aat aaa gct atg att aat ata	2352	40
Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile		

770	775	780		
aat aaa ttt ttg aat caa tgc tct gtt tca tat tta atg aat tct atg			2400	
Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met				
785	790	795	800	
atc cct tat ggt gtt aaa cgg tta gaa gat ttt gat gct agt ctt aaa			2448	10
Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys				
	805	810	815	
gat gca tta tta aag tat ata tat gat aat aga gga act tta att ggt			2496	
Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly				
	820	825	830	
				20
caa gta gat aga tta aaa gat aaa gtt aat aat aca ctt agt aca gat			2544	
Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp				
	835	840	845	
ata cct ttt cag ctt tcc aaa tac gta gat aat caa aga tta tta tct			2592	
Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser				
	850	855	860	30
aca ttt act gaa tat att aag aat att att aat act tct ata ttg aat			2640	
Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn				
865	870	875	880	
tta aga tat gaa agt aat cat tta ata gac tta tct agg tat gca tca			2688	
Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser				
	885	890	895	40

aaa ata aat att ggt agt aaa gta aat ttt gat cca ata gat aaa aat	2736	
Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn		
900                                  905                                  910		
caa att caa tta ttt aat tta gaa agt agt aaa att gag gta att tta	2784	
Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu		10
915                                  920                                  925		
aaa aat gct att gta tat aat agt atg tat gaa aat ttt agt act agc	2832	
Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser		
930                                  935                                  940		
ttt tgg ata aga att cct aag tat ttt aac agt ata agt cta aat aat	2880	20
Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn		
945                                  950                                  955                                  960		
gaa tat aca ata ata aat tgt atg gaa aat aat tca gga tgg aaa gta	2928	
Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val		
965                                  970                                  975		30
tca ctt aat tat ggt gaa ata atc tgg act tta cag gat act cag gaa	2976	
Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu		
980                                  985                                  990		
ata aaa caa aga gta gtt ttt aaa tac agt caa atg att aat ata tca	3024	
Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser		
995                                  1000                                  1005		40



gat tat ata aac aga tgg att ttt gta act atc act aat aat aga tta	3072	
Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu		
1010 1015 1020		
aat aac tct aaa att tat ata aat gga aga tta ata gat caa aaa cca	3120	
Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro		
1025 1030 1035 1040		10
att tca aat tta ggt aat att cat gct agt aat aat ata atg ttt aaa	3168	
Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile Met Phe Lys		
1045 1050 1055		
tta gat ggt tgt aga gat aca cat aga tat att tgg ata aaa tat ttt	3216	
Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp Ile Lys Tyr Phe		20
1060 1065 1070		
aat ctt ttt gat aag gaa tta aat gaa aaa gaa atc aaa gat tta tat	3264	
Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr		
1075 1080 1085		
gat aat caa tca aat tca ggt att tta aaa gac ttt tgg ggt gat tat	3312	30
Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asp Tyr		
1090 1095 1100		
tta caa tat gat aaa cca tac tat atg tta aat tta tat gat cca aat	3360	
Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn		
1105 1110 1115 1120		40
aaa tat gtc gat gta aat aat gta ggt att aga ggt tat atg tat ctt	3408	

Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu		
1125	1130	1135
aaa ggg cct aga ggt agc gta atg act aca aac att tat tta aat tca	3456	
Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser		
1140	1145	1150
agt ttg tat agg ggg aca aaa ttt att ata aaa aaa tat gct tct gga	3504	10
Ser Leu Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly		
1155	1160	1165
aat aaa gat aat att gtt aga aat aat gat cgt gta tat att aat gta	3552	
Asn Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val		
1170	1175	1180
gta gtt aaa aat aaa gaa tat agg tta gct act aat gca tca cag gca	3600	
Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala		
1185	1190	1195
ggc gta gaa aaa ata cta agt gca tta gaa ata cct gat gta gga aat	3648	
Gly Val Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn		30
1205	1210	1215
cta agt caa gta gta gta atg aag tca aaa aat gat caa gga ata aca	3696	
Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr		
1220	1225	1230
aat aaa tgc aaa atg aat tta caa gat aat aat ggg aat gat ata ggc	3744	40
Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly		

1235	1240	1245		
ttt ata gga ttt cat cag ttt aat aat ata gct aaa cta gta gca agt			3792	
Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser				
1250	1255	1260		
aat tgg tat aat aga caa ata gaa aga tct agt agg act ttg ggt tgc			3840	10
Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu Gly Cys				
1265	1270	1275	1280	
tca tgg gaa ttt att cct gta gat gat gga tgg gga gaa agg cca ctg			3888	
Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Arg Pro Leu				
1285	1290	1295		
taa			3891	20
<210> 2				
<211> 1296				
<212> PRT				
<213> Clostridium botulinum				30
<400> 2				
Met Gln Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly				
1	5	10	15	
Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Val Gly Gln Met Gln Pro				
20	25	30		40

Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg  
 35 40 45

Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu  
 50 55 60

Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr 10  
 65 70 75 80

Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu  
 85 90 95

Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val  
 100 105 110 20

Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys  
 115 120 125

Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr  
 130 135 140 30

Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile  
 145 150 155 160

Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr  
 165 170 175

Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe 40  
 180 185 190

Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu  
 195 200 205

Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu  
 210 215 220

Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn  
 225 230 235 240

Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu  
 245 250 255

Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys  
 260 265 270

Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn  
 275 280 285

Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val  
 290 295 300

Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys  
 305 310 315 320

Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu  
 325 330 335

Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp

10

20

30

40

	340		345		350												
Asn	Phe	Val	Lys	Phe	Phe	Lys	Val	Leu	Asn	Arg	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn		
	355						360					365					
Phe	Asp	Lys	Ala	Val	Phe	Lys	Ile	Asn	Ile	Val	Pro	Lys	Val	Asn	Tyr		
	370					375					380						10
Thr	Ile	Tyr	Asp	Gly	Phe	Asn	Leu	Arg	Asn	Thr	Asn	Leu	Ala	Ala	Asn		
385					390				395						400		
Phe	Asn	Gly	Gln	Asn	Thr	Glu	Ile	Asn	Asn	Met	Asn	Phe	Thr	Lys	Leu		
				405					410					415			20
Lys	Asn	Phe	Thr	Gly	Leu	Phe	Glu	Phe	Tyr	Lys	Leu	Leu	Cys	Val	Arg		
		420						425						430			
Gly	Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Lys	Ser	Leu	Asp	Lys	Gly	Tyr	Asn	Lys		
	435						440					445					
Ala	Leu	Asn	Asp	Leu	Cys	Ile	Lys	Val	Asn	Asn	Trp	Asp	Leu	Phe	Phe		30
	450					455					460						
Ser	Pro	Ser	Glu	Asp	Asn	Phe	Thr	Asn	Asp	Leu	Asn	Lys	Gly	Glu	Glu		
465					470					475					480		
Ile	Thr	Ser	Asp	Thr	Asn	Ile	Glu	Ala	Ala	Glu	Glu	Asn	Ile	Ser	Leu		40
				485					490					495			

Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro  
 500 505 510

Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu  
 515 520 525

Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu  
 530 535 540

10

Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu  
 545 550 555 560

His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu  
 565 570 575

20

Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys  
 580 585 590

Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu  
 595 600 605

30

Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr  
 610 615 620

Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala  
 625 630 635 640

Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu  
 645 650 655

40

Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala  
 660 665 670

Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys  
 675 680 685

Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu  
 690 695 700

Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys  
 705 710 715 720

Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu  
 725 730 735

Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn  
 740 745 750

Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp  
 755 760 765

Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile  
 770 775 780

Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met  
 785 790 795 800

Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys

10

20

30

40



	805	810	815	
Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly				
	820	825	830	
Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp				
	835	840	845	10
Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser				
	850	855	860	
Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn				
	865	870	875	20
Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser				
	885	890	895	
Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn				
	900	905	910	
Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu				
	915	920	925	30
Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser				
	930	935	940	
Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn				
	945	950	955	40

Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val  
 965 970 975

Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu  
 980 985 990

Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser  
 995 1000 1005

10

Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu  
 1010 1015 1020

Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro  
 1025 1030 1035 1040

20

Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile Met Phe Lys  
 1045 1050 1055

Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp Ile Lys Tyr Phe  
 1060 1065 1070

30

Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr  
 1075 1080 1085

Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asp Tyr  
 1090 1095 1100

Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn  
 1105 1110 1115 1120

40

Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu  
 1125 1130 1135

Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser  
 1140 1145 1150

Ser Leu Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly  
 1155 1160 1165

Asn Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val  
 1170 1175 1180

Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala  
 1185 1190 1195 1200

Gly Val Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn  
 1205 1210 1215

Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr  
 1220 1225 1230

Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly  
 1235 1240 1245

Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser  
 1250 1255 1260

Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu Gly Cys

10

20

30

40

1265                      1270                      1275                      1280

Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Arg Pro Leu

                            1285                      1290                      1295

<210> 3 10

<211> 1330

<212> DNA

<213> Clostridium difficile

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1314) 20

<400> 3

atg gct cgt ctg ctg tct acc ttc act gaa tac atc aag aac atc atc 48

Met Ala Arg Leu Leu Ser Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile

1                      5                      10                      15

aat acc tcc atc ctg aac ctg cgc tac gaa tcc aat cac ctg atc gac 96 30

Asn Thr Ser Ile Leu Asn Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp

                            20                      25                      30

ctg tct cgc tac gct tcc aaa atc aac atc ggt tct aaa gtt aac ttc 144

Leu Ser Arg Tyr Ala Ser Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe

                            35                      40                      45

40

gat ccg atc gac aag aat cag atc cag ctg ttc aat ctg gaa tct tcc 192

Asp	Pro	Ile	Asp	Lys	Asn	Gln	Ile	Gln	Leu	Phe	Asn	Leu	Glu	Ser	Ser			
50						55					60							
aaa	atc	gaa	ggt	atc	ctg	aag	aat	gct	atc	gta	tac	aac	tct	atg	tac		240	
Lys	Ile	Glu	Val	Ile	Leu	Lys	Asn	Ala	Ile	Val	Tyr	Asn	Ser	Met	Tyr			
65					70					75					80			
																	10	
gaa	aac	ttc	tcc	acc	tcc	ttc	tgg	atc	cgt	atc	cgc	aaa	tac	ttc	aac		288	
Glu	Asn	Phe	Ser	Thr	Ser	Phe	Trp	Ile	Arg	Ile	Pro	Lys	Tyr	Phe	Asn			
				85					90						95			
tcc	atc	tct	ctg	aac	aat	gaa	tac	acc	atc	atc	aac	tgc	atg	gaa	aac		336	
Ser	Ile	Ser	Leu	Asn	Asn	Glu	Tyr	Thr	Ile	Ile	Asn	Cys	Met	Glu	Asn			
			100					105						110			20	
aat	tct	ggg	tgg	aaa	gta	tct	ctg	aac	tac	ggg	gaa	atc	atc	tgg	act		384	
Asn	Ser	Gly	Trp	Lys	Val	Ser	Leu	Asn	Tyr	Gly	Glu	Ile	Ile	Trp	Thr			
		115					120					125						
ctg	cag	gac	act	cag	gaa	atc	aaa	cag	cgt	ggt	gta	ttc	aaa	tac	tct		432	
Leu	Gln	Asp	Thr	Gln	Glu	Ile	Lys	Gln	Arg	Val	Val	Phe	Lys	Tyr	Ser			30
	130						135				140							
cag	atg	atc	aac	atc	tct	gac	tac	atc	aat	cgc	tgg	atc	ttc	ggt	acc		480	
Gln	Met	Ile	Asn	Ile	Ser	Asp	Tyr	Ile	Asn	Arg	Trp	Ile	Phe	Val	Thr			
145					150					155					160			
atc	acc	aac	aat	cgt	ctg	aat	aac	tcc	aaa	atc	tac	atc	aac	ggc	cgt		528	40
Ile	Thr	Asn	Asn	Arg	Leu	Asn	Asn	Ser	Lys	Ile	Tyr	Ile	Asn	Gly	Arg			

165	170	175		
ctg atc gac cag aaa ccg atc tcc aat ctg ggt aac atc cac gct tct			576	
Leu Ile Asp Gln Lys Pro Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser				
180	185	190		
aat aac atc atg ttc aaa ctg gac ggt tgt cgt gac act cac cgc tac			624	10
Asn Asn Ile Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr				
195	200	205		
atc tgg atc aaa tac ttc aat ctg ttc gac aaa gaa ctg aac gaa aaa			672	
Ile Trp Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys				
210	215	220		20
gaa atc aaa gac ctg tac gac aac cag tcc aat tct ggt atc ctg aaa			720	
Glu Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys				
225	230	235	240	
gac ttc tgg ggt gac tac ctg cag tac gac aaa ccg tac tac atg ctg			768	
Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu				
245	250	255		30
aat ctg tac gat ccg aac aaa tac gtt gac gtc aac aat gta ggt atc			816	
Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile				
260	265	270		
cgc ggt tac atg tac ctg aaa ggt ccg cgt ggt tct gtt atg act acc			864	
Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val Met Thr Thr				40
275	280	285		

aac atc tac ctg aac tct tcc ctg tac cgt ggt acc aaa ttc atc atc	912	
Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile		
290 295 300		
aag aaa tac gcg tct ggt aac aag gac aat atc gtt cgc aac aat gat	960	
Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp		10
305 310 315 320		
cgt gta tac atc aat gtt gta gtt aag aac aaa gaa tac cgt ctg gct	1008	
Arg Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala		
325 330 335		
acc aat gct tct cag gct ggt gta gaa aag atc ttg tct gct ctg gaa	1056	20
Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu		
340 345 350		
atc ccg gac gtt ggt aat ctg tct cag gta gtt gta atg aaa tcc aag	1104	
Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys		
355 360 365		30
aac gac cag ggt atc act aac aaa tgc aaa atg aat ctg cag gac aac	1152	
Asn Asp Gln Gly Ile Thr Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn		
370 375 380		
aat ggt aac gat atc ggt ttc atc ggt ttc cac cag ttc aac aat atc	1200	
Asn Gly Asn Asp Ile Gly Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile		
385 390 395 400		40

gct aaa ctg gtt gct tcc aac tgg tac aat cgt cag atc gaa cgt tcc 1248  
 Ala Lys Leu Val Ala Ser Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser  
                   405                  410                  415

tct cgc act ctg ggt tgc tct tgg gag ttc atc ccg gtt gat gac ggt 1296  
 Ser Arg Thr Leu Gly Cys Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly  
                   420                  425                  430

10

tgg ggt gaa cgt ccg ctg taaccggga aagctt 1330  
 Trp Gly Glu Arg Pro Leu  
                   435

<210> 4

20

<211> 438

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 4

Met Ala Arg Leu Leu Ser Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile  
   1                  5                  10                  15

30

Asn Thr Ser Ile Leu Asn Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp  
                   20                  25                  30

Leu Ser Arg Tyr Ala Ser Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe  
                   35                  40                  45

40

Asp Pro Ile Asp Lys Asn Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser



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

Ile Trp Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys  
 210 215 220

Glu Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys  
 225 230 235 240

Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu  
 245 250 255

10

Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile  
 260 265 270

Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val Met Thr Thr  
 275 280 285

20

Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile  
 290 295 300

Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp  
 305 310 315 320

30

Arg Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala  
 325 330 335

Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu  
 340 345 350

Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys  
 355 360 365

40

Asn Asp Gln Gly Ile Thr Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn  
 370 375 380

Asn Gly Asn Asp Ile Gly Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile  
 385 390 395 400

10

Ala Lys Leu Val Ala Ser Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser  
 405 410 415

Ser Arg Thr Leu Gly Cys Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly  
 420 425 430

Trp Gly Glu Arg Pro Leu  
 435

20

<210> 5

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 5

Met Gly His His His His His His His His His His Ser Ser Gly His  
 1 5 10 15

40

Ile Glu Gly Arg His Met Ala

20

<210> 6

<211> 1402

<212> DNA

10

<213> Artificial: Synthetic

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1386)

<400> 6

20

atg ggc cat cat cat cat cat cat cat cat cac agc agc ggc cat 48

Met Gly His His His His His His His His His His Ser Ser Gly His

1

5

10

15

atc gaa ggt cgt cat atg gct agc atg gct cgt ctg ctg tct acc ttc 96

Ile Glu Gly Arg His Met Ala Ser Met Ala Arg Leu Leu Ser Thr Phe

20

25

30

30

act gaa tac atc aag aac atc atc aat acc tcc atc ctg aac ctg cgc 144

Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn Leu Arg

35

40

45

tac gaa tcc aat cac ctg atc gac ctg tct cgc tac gct tcc aaa atc 192

Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser Lys Ile

50

55

60

40

aac atc ggt tct aaa gtt aac ttc gat ccg atc gac aag aat cag atc	240		
Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn Gln Ile			
65	70	75	80
cag ctg ttc aat ctg gaa tct tcc aaa atc gaa gtt atc ctg aag aat	288		
Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu Lys Asn		10	
	85	90	95
gct atc gta tac aac tct atg tac gaa aac ttc tcc acc tcc ttc tgg	336		
Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser Phe Trp			
	100	105	110
atc cgt atc ccg aaa tac ttc aac tcc atc tct ctg aac aat gaa tac	384	20	
Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn Glu Tyr			
	115	120	125
acc atc atc aac tgc atg gaa aac aat tct ggt tgg aaa gta tct ctg	432		
Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu			
	130	135	140
aac tac ggt gaa atc atc tgg act ctg cag gac act cag gaa atc aaa	480		
Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu Ile Lys			
145	150	155	160
cag cgt gtt gta ttc aaa tac tct cag atg atc aac atc tct gac tac	528		
Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser Asp Tyr		40	
	165	170	175

atc aat cgc tgg atc ttc gtt acc atc acc aac aat cgt ctg aat aac	576	
Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu Asn Asn		
180 185 190		
tcc aaa atc tac atc aac ggc cgt ctg atc gac cag aaa ccg atc tcc	624	
Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro Ile Ser		
195 200 205		10
aat ctg ggt aac atc cac gct tct aat aac atc atg ttc aaa ctg gac	672	
Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile Met Phe Lys Leu Asp		
210 215 220		
ggt tgt cgt gac act cac cgc tac atc tgg atc aaa tac ttc aat ctg	720	
Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp Ile Lys Tyr Phe Asn Leu		20
225 230 235 240		
ttc gac aaa gaa ctg aac gaa aaa gaa atc aaa gac ctg tac gac aac	768	
Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn		
245 250 255		
cag tcc aat tct ggt atc ctg aaa gac ttc tgg ggt gac tac ctg cag	816	
Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln		30
260 265 270		
tac gac aaa ccg tac tac atg ctg aat ctg tac gat ccg aac aaa tac	864	
Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Tyr		
275 280 285		40
gtt gac gtc aac aat gta ggt atc cgc ggt tac atg tac ctg aaa ggt	912	

Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly		
290	295	300
ccg cgt ggt tct gtt atg act acc aac atc tac ctg aac tct tcc ctg	960	
Pro Arg Gly Ser Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu		
305	310	315 320
tac cgt ggt acc aaa ttc atc atc aag aaa tac gcg tct ggt aac aag	1008	10
Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys		
	325	330 335
gac aat atc gtt cgc aac aat gat cgt gta tac atc aat gtt gta gtt	1056	
Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val Val Val		
	340	345 350
aag aac aaa gaa tac cgt ctg gct acc aat gct tct cag gct ggt gta	1104	
Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val		
	355	360 365
gaa aag atc ttg tct gct ctg gaa atc ccg gac gtt ggt aat ctg tct	1152	
Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser		30
	370	375 380
cag gta gtt gta atg aaa tcc aag aac gac cag ggt atc act aac aaa	1200	
Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr Asn Lys		
	385	390 395 400
tgc aaa atg aat ctg cag gac aac aat ggt aac gat atc ggt ttc atc	1248	40
Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly Phe Ile		

405

410

415

ggt ttc cac cag ttc aac aat atc gct aaa ctg gtt gct tcc aac tgg 1296

Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser Asn Trp

420

425

430

tac aat cgt cag atc gaa cgt tcc tct cgc act ctg ggt tgc tct tgg 1344

Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu Gly Cys Ser Trp

435

440

445

10

gag ttc atc ccg gtt gat gac ggt tgg ggt gaa cgt ccg ctg 1386

Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Arg Pro Leu

450

455

460

20

taaccggga aagctt 1402

<210> 7

<211> 462

<212> PRT

<213> Artificial: Synthetic

30

<400> 7

Met Gly His His His His His His His His His His Ser Ser Gly His

1

5

10

15

Ile Glu Gly Arg His Met Ala Ser Met Ala Arg Leu Leu Ser Thr Phe

20

25

30

40



Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn Leu Arg  
 35 40 45

Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser Lys Ile  
 50 55 60

Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn Gln Ile  
 65 70 75 80

10

Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu Lys Asn  
 85 90 95

Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser Phe Trp  
 100 105 110

20

Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn Glu Tyr  
 115 120 125

Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu  
 130 135 140

30

Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu Ile Lys  
 145 150 155 160

Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser Asp Tyr  
 165 170 175

Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu Asn Asn  
 180 185 190

40

Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro Ile Ser  
 195 200 205

Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile Met Phe Lys Leu Asp  
 210 215 220

Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp Ile Lys Tyr Phe Asn Leu  
 225 230 235 240

Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn  
 245 250 255

Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln  
 260 265 270

Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Tyr  
 275 280 285

Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly  
 290 295 300

Pro Arg Gly Ser Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu  
 305 310 315 320

Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys  
 325 330 335

Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val Val Val

10

20

30

40

340	345	350	
Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val			
355	360	365	
Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser			
370	375	380	10
Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr Asn Lys			
385	390	395	400
Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly Phe Ile			
405	410	415	20
Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser Asn Trp			
420	425	430	
Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu Gly Cys Ser Trp			
435	440	445	
Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Arg Pro Leu			
450	455	460	30

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、ウエスタンブロットによる抗クロストリジウム・ボツリヌスI g Yの反応性を示す。

【図2】 図2は、E L I S Aで測定した卵中のクロストリジウム・ボツリヌスA型トキソイドに対するI g Y抗体の力価を示す。

【図3】 図3は、クロストリジウム・ボツリヌスA型トキシンの発現構築体であり；クロストリジウム・ボツリヌス又はクロストリジウム・ディフィシル配列を提供するのに用いた構築体も示す。 40

【図4】 図4は、組換えクロストリジウム・ボツリヌスA型トキシン融合タンパク質の精製を示す、クマシーブルーで染色したS D S - P A G Eゲルである。

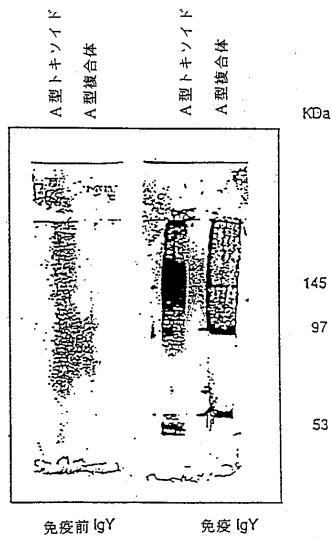
【図5】 図5は、クロストリジウム・ボツリヌスA型トキシンの発現構築体であり；クロストリジウム・ボツリヌス配列を提供するのに用いた構築体も示す。

【図6】 図6は、N i - N T A樹脂を用いたp H i s B o tタンパク質の精製を示す、クマシーブルーで染色したS D S - P A G Eゲルである。

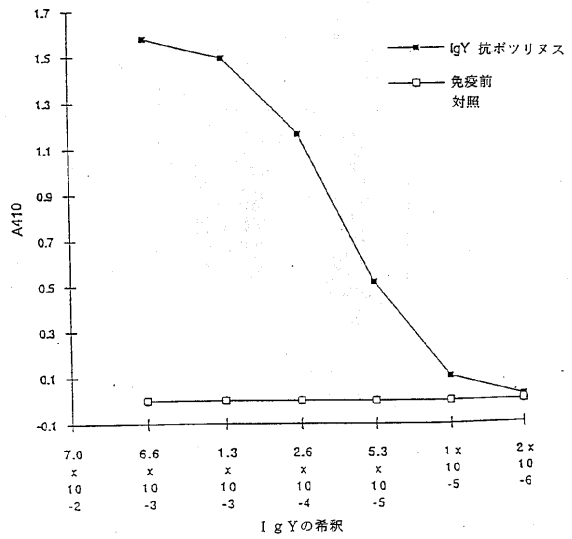
【図7】 図7は、B L 2 1 ( D E 3 ) [ 及び B L 2 1 ( D E 3 ) p L y s S 宿主細胞中におけるp H i s B o tタンパク質の発現を示す、クマシーブルーで染色したS D S - P A G Eゲルである。 50

【図8】 図8は、バッチ吸収法を用いたpH is Botタンパク質の精製を示す、クマシーブルーで染色したSDS-PAGEである。

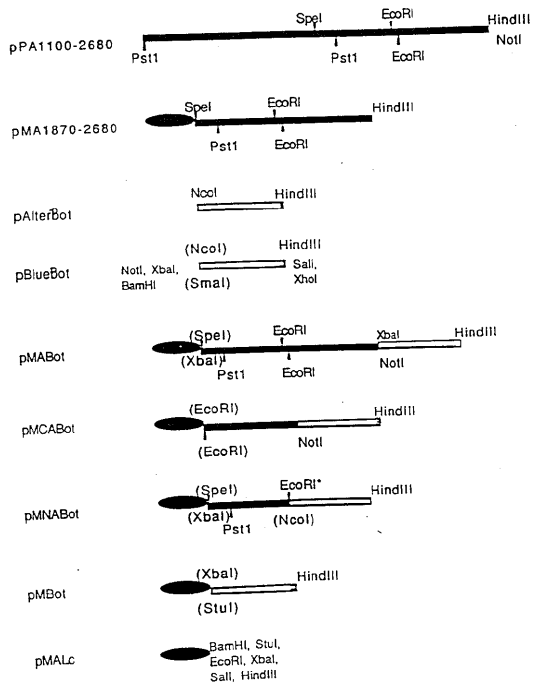
【図1】



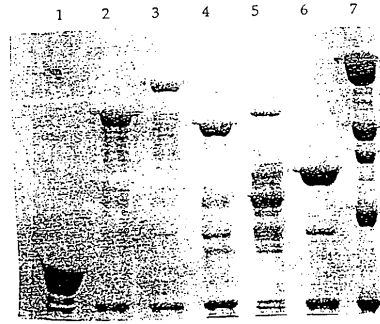
【図2】



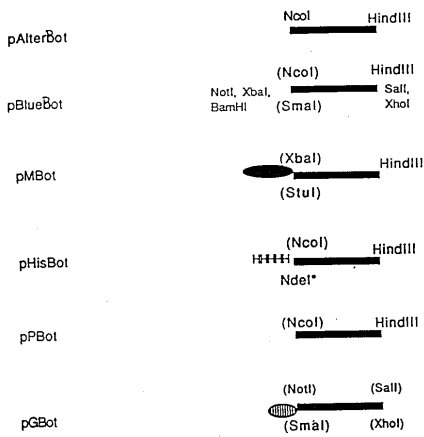
【 3 】



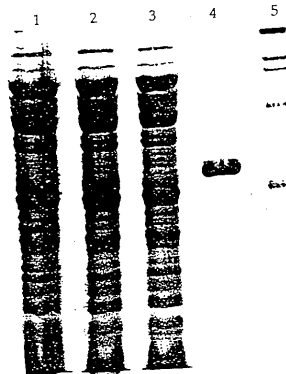
【 4 】



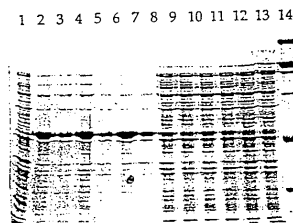
【 5 】



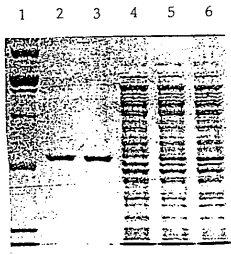
【 6 】



【 7 】



【 図 8 】



## フロントページの続き

(31)優先権主張番号 08/480,604

(32)優先日 平成7年6月7日(1995.6.7)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(74)代理人 100080403

弁理士 中村 至

(72)発明者 ウィリアムズ, ジェームズ, エイ.

アメリカ合衆国 53713 ウィスコンシン州 マディソン, グリーンウェイ クロス 201  
3, アpartment #6

(72)発明者 パッドハイ, ニシャ, ブイ.

アメリカ合衆国 53719 ウィスコンシン州 マディソン, ララミー コート 21

(72)発明者 キンク, ジョン, エイ.

アメリカ合衆国 53717 ウィスコンシン州 マディソン, ウルフ ストリート 110

(72)発明者 サリー, ブルース, エス.

アメリカ合衆国 53705 ウィスコンシン州 マディソン, マリネット トレイル 126

(72)発明者 スタッフォード, ダグラス, シー.

アメリカ合衆国 53711 ウィスコンシン州 マディソン, ティンバー ビュー コート 5  
743

(72)発明者 フィルカ, ジョセフ, アール.

アメリカ合衆国 60061 イリノイ州 ヴァーノン ヒルズ, ディアパス ドライブ 123

審査官 西 剛志

(56)参考文献 特表平08-502410(JP,A)

特表平08-502163(JP,A)

特開昭62-209097(JP,A)

Blasi, J., et al., Nature, 1993年, Vol.365, No.6442, p.160-163

Lee, H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1993年, Vol.90, No.6, p.2266-2270

Silva, S.V., et al., Can. J. Vet. Res., 1990年, Vol.54, No.3, p.326-330

Foulaki, K., et al., Infect. Immun., 1989年, Vol.57, No.5, p.1399-1404

Niemann, H., Toxicon, 1992年, Vol.30, No.3, p.223-225

Makoff, A.J., et al., BIO/TECHNOLOGY, 1989年, Vol.7, p.1043-1046

Thompson, D.E., et al., Eur. J. Biochem., 1990年, Vol.189, No.1, p.73-81

Makoff, A.J., et al., Nucleic Acids Res., 1989年, Vol.17, No.24, p.10191-10202

Romanos, M.A., et al., Nucleic Acids Res., 1991年, Vol.19, No.7, p.1461-1467

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 14/00-14/825

C12N 15/00-15/90

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed

JSTPlus(JDream2)