

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】令和2年5月28日(2020.5.28)

【公開番号】特開2019-206582(P2019-206582A)

【公開日】令和1年12月5日(2019.12.5)

【年通号数】公開・登録公報2019-049

【出願番号】特願2019-147451(P2019-147451)

【国際特許分類】

C 07 K 14/33 (2006.01)

【F I】

C 07 K 14/33 Z N A

【手続補正書】

【提出日】令和2年4月10日(2020.4.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の改変クロストリジウム毒素：

a. N5、Q7、N9、D12、N15、Q31、D58、N60、D74、N82、T122、D124、E126、Q139、D141、E281、L284、S295、Q311、D326、D334、N377、Y387、N394、N396、N410、M411、N418、D474、N476、D484、N486、I487、E488、A489、A490、E491、D546、E558、E560、H561、S564、I566、L568、N570、S571、L577、N578、A597、E599、A601、E620、V621、T623、D625、T631、N645、L647、D650、D651、I668、E670、A672、V675、S683、I685、A686、N687、N752、Q753、T755、E756、E757、E758、N760、N761、I762、N763、D825、I831、G832、T847、D848、I849、およびD858から選択される少なくとも1つのアミノ酸の置換を含み、かつ、少なくとも6.6の等電点(pI)を有する改変ボツリヌス毒素血清型A(BoNT/A)；または

b. N6、N7、N9、N11、D12、N16、N17、N18、D41、E48、E57、N60、D75、D77、N80、E127、N130、N144、E147、E149、E185、N216、D245、E253、N316、D333、E335、D341、N385、D388、N389、E390、E395、E396、D402、D404、E406、E408、Q419、E423、E427、V443、G444、D453、S468、D533、E534、N535、T545、L548、D549、I550、D552、S557、L564、S566、N582、V584、N609、L619、N632、E633、G637、A646、I655、E657、V662、E669、S670、I672、D673、N739、I740、N748、N750、I818、G819、T834、I842、N845、およびS858から選択される少なくとも1つのアミノ酸の置換を含み、かつ、少なくとも5.5のpIを有する改変ボツリヌス毒素血清型B(BoNT/B)；または

c. N6、N7、N9、D12、D15、N18、N31、E32、N55、N59、N75、N120、N121、N125、D128、Q142、N145、N177、N178、Q183、E184、D208、E211、Q247、N255、N311、E335、E339、N343、N368、N386、D389、D390、N391、Q396、N405、N407、N425、E427、D442、N448、L451、D452、C453、E455、V472、T474、D475、L478、N483、E484、E485、E487、I489、L555、S556、D557、N558、E560、D561、E569、N574、S575、T584、G592、Q594、G596、D617、N640、S641、V642、G645、N646、E661、E665、T667、A670、S678、V680、Q681、E682、S750、G751、S759、Q760、V826、G827、N842、T843、N847、およびN853から選択される少なくとも1つのアミノ酸の置換を含み、かつ、少なくとも5.7のpIを有する改変ボツリヌス毒素血清型C(BoNT/C₁)；または

d. D7、N9、D12、N15、D16、N17、D53、D73、D119、E124、E139、E142、N143、Q177、Q178、N180、E184、E255、N308、D335、N336、N339、N343、N368、N386、D389、D390、N39

1、D397、N403、N407、E409、E416、N443、Q469、E470、E473、N474、D479、E480、N482、V483、Q484、N485、S487、D488、S552、N553、N554、V555、E556、N557、I558、L560、T562、S563、V564、G569、S571、N572、G588、Q590、T614、D616、S619、S622、N636、S637、L639、G641、N642、E657、E661、T663、A666、V669、S674、I676、Q677、E678、S746、G747、D749、E751、N752、I753、Q756、N818、V822、G823、E837、N838、T839、N843、N849、およびN850から選択される少なくとも1つのアミノ酸の置換を含み、かつ、少なくとも5.7のpIを有する改変ボツリヌス毒素血清型D(BoNT/D)；または

e. N5、N8、N10、D11、N14、D15、Q27、E28、Q53、N72、Q75、D117、N118、D121、N122、Q123、N138、N169、N170、N195、Q237、ILE244、Q290、N293、N297、D312、Q344、N362、N365、D366、N370、E373、N378、N379、N383、N390、T397、D474、N476、E479、E480、D484、N486、I487、E488、A489、A490、E491、E492、L496、D497、Q500、Q501、L504、N507、D509、N510、N514、S516、E518、Q527、L530、N533、I534、E535、N539、Y548、I566、L568、D589、A597、E599、A601、L604、Y612、E620、N645、L647、Y648、D651、E737、E741、Y803、Y824、D825、G828、I831、G832、およびD835から選択される少なくとも1つのアミノ酸の置換を含み、かつ、少なくとも6.2のpIを有する改変ボツリヌス毒素血清型E(BoNT/E)；または

f. N6、N9、N11、D12、N15、D16、D17、E28、D55、D60、D74、N76、E105、E121、N126、E127、N144、D185、N211、Q252、N305、E310、D312、N314、N329、D331、N379、D382、D383、D384、E390、N396、N400、D414、D418、N463、E464、N468、T469、D474、D475、T476、T477、N478、N482、N485、N495、I499、Q501、I502、Q505、T506、N508、T509、V511、D513、D521、S522、S526、E527、I528、E529、V534、D535、L536、E549、G550、T552、N553、S558、E566、E567、S568、V586、H587、Q608、D613、A616、D617、S619、N630、N633、N639、E654、V656、E658、L660、T663、L665、V666、S671、I673、G674、S675、S676、E677、N678、T746、N751、L753、E754、E756、N758、I759、N760、N761、S799、S821、I822、N840、S841、E845、L846、S847、S848、T850、N851、D852、I854、L855、およびI856から選択される少なくとも1つのアミノ酸の置換を含み、かつ、少なくとも5.8のpIを有する改変ボツリヌス毒素血清型F(BoNT/F)；または

g. N4、N7、N9、N11、D12、N15、D17、E48、Q55、D57、N60、D75、D127、Q144、E148、D149、Q150、N178、E185、E208、D211、E255、D315、D332、N334、D340、E383、D387、N388、Q393、N394、E395、N403、E407、E418、E422、E426、N443、N480、Q482、N483、N484、T485、E487、D540、N562、N570、N571、N572、T588、V589、T615、D621、N637、E638、E642、N643、I660、E662、I667、E674、S675、V677、G678、N679、S747、N755、D757、L823、D839、I841、D844、S846、およびL847から選択される少なくとも1つのアミノ酸の置換を含み、かつ、少なくとも5.4のpIを有する改変ボツリヌス毒素血清型G(BoNT/G)；または

h. N6、N7、N15、N16、D17、D31、E51、E57、N60、N76、N101、D126、D143、N167、D179、N180、E251、Q257、N313、N316、D318、D335、N337、Q339、N368、N387、D390、D391、N395、D396、E403、D406、E410、N421、D427、E450、A457、S458、L459、D461、L462、E486、E487、Q490、D491、N497、N504、D557、T571、T572、L573、Q574、N580、S581、N588、S589、T590、S598、Q605、G606、Q608、T631、I633、S640、Q655、E658、G659、N660、E675、I677、E679、T681、V684、A691、E692、S694、T695、Q696、A772、D773、E774、S862、N866、L867およびD868から選択される少なくとも1つのアミノ酸の置換を含み、かつ、少なくとも6.0のpIを有する改変破傷風毒素(TeNT)；

ここで、

前記置換は、改変クロストリジウム毒素のpIを、前記置換を欠く、その他の点においては同一のクロストリジウム毒素のpIよりも、少なくとも0.2pI単位高い値に増大し；

前記置換は、改変クロストリジウム毒素軽鎖中にE3リガーゼ認識モチーフを導入せず；

前記置換は、表面露出アミノ酸残基の置換であり；かつ

前記少なくとも1つのアミノ酸が酸性アミノ酸残基の場合、塩基性アミノ酸残または非荷電アミノ酸残基により置換され、前記少なくとも1つのアミノ酸が非荷電アミノ酸残基

の場合、塩基性アミノ酸残基により置換される。

【請求項 2】

N5、Q7、N9、D12、N15、Q31、D58、N60、E126、Q139、D141、E281、L284、S295、Q311、D326、D334、N377、N394、N396、M411、D474、N476、D484、N486、I487、E488、A489、A490、E491、D546、E558、E560、H561、S564、I566、L568、N570、S571、L577、N578、A597、E599、A601、E620、V621、T623、D625、T631、N645、L647、D650、D651、I668、E670、A672、V675、S683、I685、A686、N687、N752、Q753、T755、E756、E757、E758、N760、N761、I762、N763、D825、I831、G832、T847、D848、I849、及びD858から選択される少なくとも1つのアミノ酸の置換を含み、かつ、少なくとも6.6のpIを有する改変ボツリヌス毒素血清型A(BoNT/A)である、請求項1に記載の改変クロストリジウム毒素。

【請求項 3】

N476、S564、N578、E599、L647、D650、D651、V675、I685、N687、T755、E757、N761、N763、I831、T847、及びI849から選択される少なくとも1つのアミノ酸のリジンまたはアルギニンでの置換を含み、かつ、少なくとも6.6のpIを有する改変ボツリヌス毒素血清型A(BoNT/A)である、請求項1または2に記載の改変クロストリジウム毒素。

【請求項 4】

前記改変クロストリジウム毒素が：

- a. 配列番号2、4、6、および8から選択される核酸配列に対して少なくとも90%、95%、又は99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる；および/または
- b. 配列番号1、3、5、および7から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、95%、又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；

請求項1から3のいずれか一項に記載の改変クロストリジウム毒素。

【請求項 5】

前記改変クロストリジウム毒素が：

a. 配列番号2に示される核酸配列に対して少なくとも90%、95%、又は99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされ、かつ/または、配列番号1に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、95%、又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、アミノ酸位置564、647、650、651、847、および849の少なくとも1つにおいてリジンまたはアルギニンを含む；または

b. 配列番号4に示される核酸配列に対して少なくとも90%、95%、又は99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされ、かつ/または、配列番号3に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、95%、又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、アミノ酸位置476、763、687、599、831、および761の少なくとも1つにおいてリジンまたはアルギニンを含む；または

c. 配列番号6に示される核酸配列に対して少なくとも90%、95%、又は99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされ、かつ/または、配列番号5に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、95%、又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、アミノ酸位置578、675、685、755、および757の少なくとも1つにおいてリジンまたはアルギニンを含む；または

d. 配列番号8に示される核酸配列に対して少なくとも90%、95%、又は99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされ、かつ/または、配列番号7に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、95%、又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、アミノ酸位置123、138、および237の少なくとも1つにおいてリジンまたはアルギニンを含む。

【請求項 6】

N5、N8、N10、D11、N14、D15、Q27、E28、N72、Q75、D117、N118、D121、N122、Q123、N138、N169、N170、N195、Q237、I244、Q290、N293、N297、D312、Q344、N362、N365、D366、N370、E373、N378、N379、N383、T397、D474、N476、E479、E480、D484、N486、I487、E488、A489、A490、E491、E492、L496、D497、Q500、Q501、L504、N507、D509、N510、N514、S516、E518、Q527、L530、N533、I534、E535、N539、Y548、I566、L568、D589、A5

97、E599、A601、L604、Y612、E620、N645、L647、Y648、D651、E737、E741、Y803、Y824、D825、G828、I831、G832、およびD835から選択される少なくとも1つのアミノ酸の置換を含み、かつ、少なくとも6.2のpIを有する改変ボツリヌス毒素血清型Eである、請求項1に記載の改変クロストリジウム毒素。

【請求項7】

前記置換は、改変クロストリジウム毒素のpIを、前記置換を欠く、その他の点においては同一のクロストリジウム毒素のpIよりも、少なくとも0.5pI単位高い値、少なくとも1pI単位高い値、または少なくとも2pI単位高い値に増大する、請求項1から6のいずれか一項に記載の改変クロストリジウム毒素。

【請求項8】

前記置換は、改変クロストリジウム毒素のpIを、前記置換を欠く、その他の点においては同一のクロストリジウム毒素のpIよりも、2から5の間のpI単位高い値に増大する、請求項1から7のいずれか一項に記載の改変クロストリジウム毒素。

【請求項9】

少なくとも3つのアミノ酸置換を含む、好ましくは、4箇所から40箇所の間のアミノ酸置換を含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の改変クロストリジウム毒素。

【請求項10】

前記置換は、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、ヒスチジン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、スレオニン残基、アラニン残基、グリシン残基、バリン残基、ロイシン残基、およびイソロイシン残基から選択されるアミノ酸残基の置換を含む、請求項1から9のいずれか一項に記載の改変クロストリジウム毒素。

【請求項11】

前記置換は、リジン残基またはアルギニン残基での置換である、請求項1から10のいずれか一項に記載の改変クロストリジウム毒素。

【請求項12】

請求項1から10のいずれか一項に記載の改変クロストリジウム毒素をコードする核酸配列を含む、核酸。

【請求項13】

軽鎖および重鎖を有する単鎖改変クロストリジウム毒素タンパク質を製造する方法であって、請求項12に記載の核酸を、適した宿主細胞内で発現させることと、宿主細胞を溶解して、単鎖改変クロストリジウム毒素タンパク質を含有する宿主細胞ホモジネートを提供することと、単鎖改変クロストリジウム毒素タンパク質を単離することとを含む、方法。

【請求項14】

改変クロストリジウム毒素を活性化する方法であって、請求項13に記載の方法によって得られる単鎖改変クロストリジウム毒素タンパク質を提供することと、ポリペプチドを、ポリペプチドを軽鎖と重鎖の間に位置する認識部位(切断部位)で切断するプロテアーゼと接触させることと、ポリペプチドを、軽鎖および重鎖がジスルフィド結合によって一緒に連結している二本鎖ポリペプチドに変換することとを含む、方法。

【請求項15】

請求項1から11のいずれか一項に記載の改変クロストリジウム毒素を含む医薬。

【請求項16】

斜視(strabismus)、眼瞼痙攣、斜視(squint)、ジストニア(例えば、痙性ジストニア、頸口腔ジストニア、限局性ジストニア、遅発性ジストニア、喉頭ジストニア、四肢ジストニア、頸部ジストニア)、斜頸(例えば、痙性斜頸)、細胞/筋肉を無能力にすること(SNARE下方制御または不活性化による)から恩恵を受ける美容療法(美容)適用、眼球運動の神経筋障害または状態(例えば、共同性斜視(concomitant strabismus)、上下斜視(vertical strabismus)、外直筋麻痺、眼振、甲状腺異常筋疾患)、書痙、眼瞼痙攣、歯ぎしり、ウィルソン病、振戦、チック、分節性ミオクロヌス、痙攣、慢性多発性硬化症による痙縮、異常な膀胱制御をもたらす痙縮、憎悪、背中の痙攣、脚の痙攣、緊張性頭痛、拳筋骨盤症候群、二分脊椎症、遅発性ジスキネジア、パーキンソン病、吃音、片側顔面痙攣、眼瞼障害

、脳性麻痺、限局性痙攣、痙性大腸炎、神経性膀胱、アニスムス、四肢痙攣、チック、振戦、歯ぎしり、裂肛、アカラシア、嚥下障害、流涙、多汗症、過剰な唾液分泌、過剰な胃腸分泌、筋肉疼痛(例えば、筋肉痙攣からの疼痛)、頭痛疼痛(例えば、緊張性頭痛)、額の深いしわ、皮膚の細かいしわ、癌、子宮障害、泌尿生殖器障害、泌尿生殖器神経疾患、慢性神経性炎症および平滑筋障害から選択される疾患または状態の予防または治療において使用するための、請求項1から11のいずれか一項に記載の改変クロストリジウム毒素を含む医薬。