

【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1部門第1区分

【発行日】平成30年3月15日(2018.3.15)

【公表番号】特表2018-502580(P2018-502580A)

【公表日】平成30年2月1日(2018.2.1)

【年通号数】公開・登録公報2018-004

【出願番号】特願2017-536513(P2017-536513)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 P	21/02	(2006.01)
C 0 7 K	14/33	(2006.01)
A 6 1 K	38/16	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)
A 6 1 P	25/02	(2006.01)
A 6 1 P	27/02	(2006.01)
A 6 1 P	25/14	(2006.01)
A 6 1 P	11/04	(2006.01)
A 6 1 P	21/02	(2006.01)
A 6 1 P	21/00	(2006.01)
A 6 1 P	5/14	(2006.01)
A 6 1 P	25/08	(2006.01)
A 6 1 P	13/10	(2006.01)
A 6 1 P	25/04	(2006.01)
A 6 1 P	19/08	(2006.01)
A 6 1 P	25/16	(2006.01)
A 6 1 P	1/04	(2006.01)
A 6 1 P	1/10	(2006.01)
A 6 1 P	17/00	(2006.01)
A 6 1 P	15/00	(2006.01)
A 6 1 P	13/00	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	29/00	(2006.01)
A 6 1 K	8/99	(2017.01)
A 6 1 K	8/64	(2006.01)
A 6 1 Q	19/08	(2006.01)
A 6 1 Q	19/00	(2006.01)
A 6 1 K	35/742	(2015.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 P	21/02	C
C 0 7 K	14/33	
A 6 1 K	38/16	
A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	25/02	
A 6 1 P	25/02	1 0 1
A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P	11/04	
A 6 1 P	21/02	

A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	5/14	
A 6 1 P	25/08	
A 6 1 P	13/10	
A 6 1 P	25/04	
A 6 1 P	19/08	
A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	1/10	
A 6 1 P	25/02	1 0 5
A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	13/00	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	29/00	
A 6 1 K	8/99	
A 6 1 K	8/64	
A 6 1 Q	19/08	
A 6 1 Q	19/00	
A 6 1 K	35/742	

**【手続補正書】****【提出日】**平成29年12月21日(2017.12.21)**【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】**

クロストリジウム毒素の少なくとも1つのアミノ酸を修飾して改変クロストリジウム毒素を提供する工程を含み、前記修飾は、前記改変クロストリジウム毒素の等電点(pI)を、前記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、

前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾が、クロストリジウム毒素転位置ドメイン(H<sub>N</sub>ドメイン)中に位置する、または、前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾が、クロストリジウム毒素軽鎖中に位置する、但し、前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾が、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しない、かつ、前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾は、クロストリジウム毒素結合ドメイン(H<sub>C</sub>ドメイン)中に位置しない、かつ

前記改変クロストリジウム毒素は、前記クロストリジウム毒素と比較して、増大した組織保持、増大した効力、および/または増大した作用期間を示し、かつ、

前記改変クロストリジウム毒素は、前記クロストリジウム毒素の標的細胞結合能力、転位置能力、および標的SNAREタンパク質(単数または複数)の切断の能力を保持する、

改変クロストリジウム毒素を产生する方法。

**【請求項2】**

前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾が、改変クロストリジウム毒素の等電点(pI)を、前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾を欠く、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単位高い値に増大する、請求項1に記載の方法。

**【請求項3】**

前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾が、改変クロストリジウム毒素の等電点(pI)を、

前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾を欠く、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1pI単位高い値に増大する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾が、改変クロストリジウム毒素の等電点(pI)を、前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾を欠く、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2pI単位高い値に増大する、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾が、改変クロストリジウム毒素の等電点(pI)を、前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾を欠く、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1~4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記改変クロストリジウム毒素が少なくとも6.5のpIを有する、請求項1~5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記改変クロストリジウム毒素が6.5から9.5の間のpIを有する、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記改変クロストリジウム毒素が6.5から7.5の間のpIを有する、請求項1~7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

少なくとも1つのアミノ酸修飾が、アミノ酸置換、アミノ酸挿入およびアミノ酸欠失から選択される、請求項1~8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

少なくとも1つのアミノ酸置換が、酸性アミノ酸残基の塩基性アミノ酸残基による置換、酸性アミノ酸残基の非荷電アミノ酸残基による置換および非荷電アミノ酸残基の塩基性アミノ酸残基による置換から選択される、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記改変クロストリジウム毒素が1箇所から90箇所の間のアミノ酸修飾を含む、請求項1~10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記改変クロストリジウム毒素が少なくとも3つのアミノ酸修飾を含む、請求項1~11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記改変クロストリジウム毒素が4箇所から40箇所の間のアミノ酸修飾を含む、請求項1~12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

少なくとも1つのアミノ酸修飾が、表面露出アミノ酸残基の修飾である、請求項1~13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

少なくとも1つのアミノ酸修飾が、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、トレオニン残基、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修飾を含む、請求項1~14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

アミノ酸残基が、リジン残基またはアルギニン残基で置換される、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記改変クロストリジウム毒素が:

a. 配列番号2、4および6から選択される核酸配列に対して少なくとも70%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる; かつ/または

b. 配列番号1、3および5から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む;

請求項1~16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項1~8】

a. 以下から選択される少なくとも1つのアミノ酸の修飾を含むボツリヌス神経毒A(BoNT/A): N5、Q7、N9、D12、N15、Q31、D58、N60、D74、N82、T122、D124、E126、Q139、D141、E281、L284、S295、Q311、D326、D334、N377、TYR387、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; または

b. 以下から選択される少なくとも1つのアミノ酸の修飾を含むBoNT/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; または

c. 以下から選択される少なくとも1つのアミノ酸の修飾を含むBoNT/C<sub>1</sub>: 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; または

d. 以下から選択される少なくとも1つのアミノ酸の修飾を含むBoNT/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、N391、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; または

e. 以下から選択される少なくとも1つのアミノ酸の修飾を含むBoNT/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; または

f. 以下から選択される少なくとも1つのアミノ酸の修飾を含むBoNT/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、N3

96、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；または

g. 以下から選択される少なくとも1つのアミノ酸の修飾を含むBoNT/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；または

h. 以下から選択される少なくとも1つのアミノ酸の修飾を含む破傷風神経毒(TeNT): 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；であって、

前記修飾は、前記改変クロストリジウム毒素の等電点(pI)を、前記少なくとも1つのアミノ酸の前記修飾を欠く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、かつ、

前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾がクロストリジウム毒素軽鎖中に位置する場合に、前記少なくとも1つのアミノ酸修飾は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しない、かつ、

前記改変クロストリジウム毒素は、前記少なくとも1つのアミノ酸の前記修飾を欠く前記クロストリジウム毒素と比較して、増大した組織保持、増大した効力、および/または増大した作用期間を示し、かつ、

前記改変クロストリジウム毒素は、前記少なくとも1つのアミノ酸の前記修飾を欠く前記クロストリジウム毒素の標的細胞結合能力、転位置能力、および標的SNAREタンパク質(単数または複数)の切断の能力を保持する、

改変クロストリジウム毒素。

【請求項19】

前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾が、改変クロストリジウム毒素の等電点(pI)を、前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾を欠く、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単位高い値に増大する、請求項18に記載の改変クロストリジウム毒素。

【請求項20】

前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾が、改変クロストリジウム毒素の等電点(pI)を、前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾を欠く、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1pI単位高い値に増大する、請求項18または19に記載の改変クロストリジウム毒素。

【請求項21】

前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾が、改変クロストリジウム毒素の等電点(pI)を、前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾を欠く、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2pI単位高い値に増大する、請求項18～20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 2 2】**

前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾が、改変クロストリジウム毒素の等電点(pI)を、前記の少なくとも1つのアミノ酸修飾を欠く、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18～21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 2 3】**

少なくとも6.5のpIを有する、請求項18～22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 2 4】**

6.5から9.5の間のpIを有する、請求項18～23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 2 5】**

6.5から7.5の間のpIを有する、請求項18～24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 2 6】**

少なくとも1つのアミノ酸修飾が、アミノ酸置換、アミノ酸挿入およびアミノ酸欠失から選択される、請求項18～25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 2 7】**

少なくとも1つのアミノ酸置換が、酸性アミノ酸残基の塩基性アミノ酸残基による置換、酸性アミノ酸残基の非荷電アミノ酸残基による置換および非荷電アミノ酸残基の塩基性アミノ酸残基による置換から選択される、請求項26に記載の改変クロストリジウム毒素。

**【請求項 2 8】**

1箇所から90箇所の間のアミノ酸修飾を含む、請求項18～27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 2 9】**

少なくとも3つのアミノ酸修飾を含む、請求項18～28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 3 0】**

4箇所から40箇所の間のアミノ酸修飾を含む、請求項18～29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 3 1】**

少なくとも1つのアミノ酸修飾が、表面露出アミノ酸残基の修飾である、請求項18～30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 3 2】**

少なくとも1つのアミノ酸修飾が、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、トレオニン残基、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修飾を含む、請求項18～31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 3 3】**

アミノ酸残基が、リジン残基またはアルギニン残基で置換される、請求項32に記載の改変クロストリジウム毒素。

**【請求項 3 4】**

前記改変クロストリジウム毒素が：

a. 配列番号2、4および6から選択される核酸配列に対して少なくとも70%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる；かつ/または

b. 配列番号1、3および5から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；

請求項18～33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 3 5】**

(i) 請求項1～17のいずれか一項に記載の方法によって得られる改変クロストリジウム毒素又は(ii)請求項18～34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36】

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35に記載の核酸を、適した宿主細胞中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37】

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36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38】

(i) 請求項1～17のいずれか一項に記載の方法によって得られる改変クロストリジウム毒素又は(ii)請求項18～34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39】

斜視(strabismus)、眼瞼痙攣、斜視(squint)、ジストニア、痙性ジストニア、顎口腔ジストニア、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、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、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、限局性痙縮、痙性大腸炎、神経性膀胱、アニスムス、四肢痙縮、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、筋肉痙攣からの疼痛、頭痛疼痛、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、(i) 請求項1～17のいずれか一項に記載の方法によって得られる改変クロストリジウム毒素または(ii)請求項18～34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。