



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201718627 A

(43) 公開日：中華民國 106 (2017) 年 06 月 01 日

(21) 申請案號：105118055 (22) 申請日：中華民國 105 (2016) 年 06 月 08 日

(51) Int. Cl. : C07K14/33 (2006.01) A61K38/48 (2006.01)
C12N9/52 (2006.01)

(30) 優先權：2015/06/11 歐洲專利局 15 001 733.3

(71) 申請人：梅茲製藥有限兩合公司 (德國) MERZ PHARMA GMBH & CO. KGAA (DE)
德國

(72) 發明人：佛維德 白卷 FREVERT, JUERGEN (DE)；霍夫曼 佛瑞德 HOFMANN, FRED
(DE)；訓密德 麥可 SCHMIDT, MICHAEL (DE)；羅佩茲德拉裴斯 曼紐拉
LOPEZ DE LA PAZ, MANUELA (ES)；訓培斯 丹尼爾 SCHEPS, DANIEL (DE)

(74) 代理人：祁明輝；林素華；涂綺玲

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：5 共 71 頁

(54) 名稱

重組梭菌神經毒素及其使用與形成方法、包括其之醫藥組合物及對應其之前驅物、編碼前驅物之核酸序列及其獲得方法與前驅物之形成方法、載體與包括核酸序列之重組宿主細胞

RECOMBINANT CLOSTRIDIAL NEUROTOXIN, A USE THEREOF, AND A METHOD FOR GENERATING THE SAME, A PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING THE SAME AND A PRECURSOR CORRESPONDING TO THE SAME, A NUCLEIC ACID SEQUENCE ENCODING THE PRECURSOR AND A METHOD FOR OBTAINING THE NUCLEIC ACID SEQUENCE, A METHOD FOR PRODUCING THE PRECURSOR, A VECTOR AND A RECOMBINANT HOST CELL COMPRISING THE NUCLEIC ACID SEQUENCE

(57) 摘要

本發明是有關於一種呈現增加的效果作用時間之新型重組梭菌神經毒素，以及此類重組梭菌神經毒素的製造方法。這些新型重組梭菌神經毒素包括一隨機螺旋區塊，且此方法包括將用於編碼一隨機螺旋區塊的核酸序列插入於用於編碼一親代梭菌神經毒素之核酸序列中的步驟，以及在宿主細胞中表現包括此隨機螺旋區塊編碼序列之重組核酸序列的步驟。本發明更有關於使用在這類方法中之新型重組單鏈前驅物梭菌神經毒素，編碼此類重組單鏈前驅物梭菌神經毒素的核酸序列，以及包括具有增加的效果作用時間之重組梭菌神經毒素的醫藥組合物。

This invention relates to novel recombinant clostridial neurotoxins exhibiting increased duration of effect and to methods for the manufacture of such recombinant clostridial neurotoxins. These novel recombinant clostridial neurotoxins comprise a random coil domain, and the methods comprise the steps of inserting a nucleic acid sequence coding for a random coil domain into a nucleic acid sequence coding for a parental clostridial neurotoxin and expression of the recombinant nucleic acid sequence comprising the random coil domain-coding sequence in a host cell. The invention further relates to novel recombinant single-chain precursor clostridial neurotoxins used in such methods, nucleic acid sequences encoding such recombinant single-chain precursor clostridial neurotoxins, and pharmaceutical compositions comprising the recombinant clostridial neurotoxin with increased duration of effect.

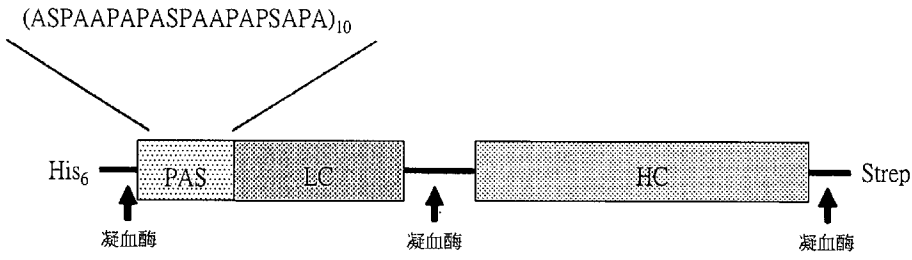
指定代表圖：

符號簡單說明：

HC . . . 重鏈

LC . . . 輕鏈

PAS . . . 隨機螺旋
區塊



第 1 圖



201718627

【發明摘要】

申請日: 105.6.8

IPC分類: C07K 14/33 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

【中文發明名稱】重組梭菌神經毒素及其使用與形成方法、包括其之醫藥組合物及對應其之前驅物、編碼前驅物之核酸序列及其獲得方法與前驅物之形成方法、載體與包括核酸序列之重組宿主細胞

a2N 9/2 (2006.01)

【英文發明名稱】 RECOMBINANT CLOSTRIDIAL NEUROTOXIN,

A USE THEREOF, AND A METHOD FOR GENERATING THE SAME, A PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING THE SAME AND A PRECURSOR CORRESPONDING TO THE SAME, A NUCLEIC ACID SEQUENCE ENCODING THE PRECURSOR AND A METHOD FOR OBTAINING THE NUCLEIC ACID SEQUENCE, A METHOD FOR PRODUCING THE PRECURSOR, A VECTOR AND A RECOMBINANT HOST CELL COMPRISING THE NUCLEIC ACID SEQUENCE

【中文】

本發明是有關於一種呈現增加的效果作用時間之新型重組梭菌神經毒素，以及此類重組梭菌神經毒素的製造方法。這些新型重組梭菌神經毒素包括一隨機螺旋區塊，且此方法包括將用於編碼一隨機螺旋區塊的核酸序列插入於用於編碼一親代梭菌神經毒素之核酸序列中的步驟，以及在宿主細胞中表現包括此隨機螺旋區塊編碼序列之重組核酸序列的步驟。本發明更有關於使用在這類方法中之新型重組單鏈前驅物梭菌神經毒素，編碼此類重

組單鏈前驅物梭菌神經毒素的核酸序列，以及包括具有增加的效果作用時間之重組梭菌神經毒素的醫藥組合物。

【英文】

This invention relates to novel recombinant clostridial neurotoxins exhibiting increased duration of effect and to methods for the manufacture of such recombinant clostridial neurotoxins. These novel recombinant clostridial neurotoxins comprise a random coil domain, and the methods comprise the steps of inserting a nucleic acid sequence coding for a random coil domain into a nucleic acid sequence coding for a parental clostridial neurotoxin and expression of the recombinant nucleic acid sequence comprising the random coil domain-coding sequence in a host cell. The invention further relates to novel recombinant single-chain precursor clostridial neurotoxins used in such methods, nucleic acid sequences encoding such recombinant single-chain precursor clostridial neurotoxins, and pharmaceutical compositions comprising the recombinant clostridial neurotoxin with increased duration of effect.

【指定代表圖】：第(1)圖。

【代表圖之符號簡單說明】：

HC：重鏈

LC：輕鏈

PAS：隨機螺旋區塊

【特徵化學式】：

無



【發明說明書】

【中文發明名稱】重組梭菌神經毒素及其使用與形成方法、包括其之醫藥組合物及對應其之前驅物、編碼前驅物之核酸序列及其獲得方法與前驅物之形成方法、載體與包括核酸序列之重組宿主細胞

【英文發明名稱】RECOMBINANT CLOSTRIDIAL NEUROTOXIN, A USE THEREOF, AND A METHOD FOR GENERATING THE SAME, A PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING THE SAME AND A PRECURSOR CORRESPONDING TO THE SAME, A NUCLEIC ACID SEQUENCE ENCODING THE PRECURSOR AND A METHOD FOR OBTAINING THE NUCLEIC ACID SEQUENCE, A METHOD FOR PRODUCING THE PRECURSOR, A VECTOR AND A RECOMBINANT HOST CELL COMPRISING THE NUCLEIC ACID SEQUENCE

【技術領域】

【0001】 本發明是有關於一種呈現增加的效果作用時間之新型重組梭菌神經毒素(recombinant clostridial neurotoxin)以及此種重組梭菌神經毒素的製造方法。這些新型重組梭菌神經毒素包括一隨機螺旋區塊(random coil domain)，且製造方法包括將編碼一隨機螺旋區塊之核酸序列插入編碼一親代梭菌神經毒素之核酸序列的步驟，以及包括隨機螺旋區塊編碼序列之重組核酸序列在宿主細胞中的表現。本發明更有關於使用在此種方法中的新型重組單鏈前驅物梭菌神經毒素，以及具有增加的效果作用時間之包括重組梭菌神經毒素的醫藥組合物。

【先前技術】

【0002】 梭菌屬(*Clostridium*)是厭氧性葛蘭氏陽性細菌的一個屬別，屬於厚壁菌門(*Firmicutes*)。梭菌屬大約是由 100 個種(*species*)所組成，包括常見的游離性細菌(*free-living bacteria*)以及重要的病原體，例如是肉毒桿菌(*Clostridium botulinum*)及破傷風梭菌(*Clostridium tetani*)。這兩種菌分別產肉毒桿菌毒素及破傷風毒素的神經毒素。這些神經毒素為神經細胞之鈣依存型神經傳導物質分泌(*calcium-dependent neurotransmitter secretion*)的有效抑制劑，且在已知對於人類最強力的毒素之中。對於人類的致死劑量係在 0.1 奈克(*ng*)每公斤體重及 1 奈克每公斤體重之間。

【0003】 透過被汙染的食物口服肉毒桿菌毒素或在傷口產生肉毒桿菌毒素可能會導致肉毒桿菌中毒(*botulism*)。肉毒桿菌中毒的特徵為各種肌肉的癱瘓。呼吸肌肉的癱瘓可能導致被感染的個體死亡。

【0004】 雖然肉毒桿菌神經毒素(*BoNT*)及破傷風梭菌神經毒素(*TxNT*)的功能是透過類似的起始病理機轉的作用，抑制神經傳導物質由被感染的神經的軸突釋放至突觸中，兩者的臨床反應卻有所不同。肉毒桿菌毒素作用於周邊神經系統中的神經肌肉連接(*neuromuscular junction*)及其他膽鹼素突觸(*cholinergic synapse*)，抑制神經傳導物質乙醯膽鹼(*acetylcholine*)的釋放，因而導致鬆弛性癱瘓(*flaccid paralysis*)；而破傷風毒素主要作用於中樞神經系統，藉由小突觸小泡蛋白(*synaptobrevin*)的降解防止抑

制性神經傳導物質伽馬-胺基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)及甘胺酸(glycine)的釋放。肌肉中所造成的過度反應導致促效劑(agonist)及拮抗劑(antagonist)肌系(musculature)的全身性收縮，稱為破傷風性痙攣(tetanic spasm)(劇烈的癱瘓)。

【0005】 破傷風神經毒素存在於一免疫相異的類型中；而肉毒桿菌神經毒素已知為發生於 7 種不同的免疫類型中，稱為 A 型肉毒桿菌神經毒素(BoNT/A)至 G 型肉毒桿菌神經毒素 BoNT/G。大部分肉毒桿的品系產生一種神經毒素，然亦曾經有品系產生多種毒素的文獻描述。

【0006】 肉毒桿菌及破傷風神經毒素具有高度的同源胺基酸序列，且顯示相似的區塊(domain)結構。兩者的生物活性形式包括 2 個肽鏈(藉由雙硫鍵(disulfide bond)所鏈接的約 50 kDa 的輕鏈(light chain)及約 100 kDa 的重鏈(heavy chain))。長度在不同的梭菌毒素中有所不同的鏈接區(linker region)或環區(loop region)是位於形成雙硫鍵之 2 個半胱胺酸基(cysteine residue)之間。此環區是藉由未知的梭菌蛋白質內切酶進行蛋白質水解所切割，以獲得具有生物活性的毒素。

【0007】 肉毒桿菌神經毒素及破傷風梭菌神經毒素造成中毒的分子機轉亦類似：進入標的神經是藉由重鏈的 C 端部分結合於特定的細胞表面受體。毒素接著藉由受體媒介式胞吞作用(receptor-mediated endocytosis)所接受。所形成的胞內體(endosome)中的低 pH 值接著引發梭菌毒素中的構型改變，使得梭

菌毒素本身能夠嵌入胞內體膜，並透過胞內體膜轉移至細胞質中，其中接合重鏈及輕鏈的雙硫鍵係減少。輕鏈可接著切割所謂的 SNARE 蛋白，SNARE 蛋白對於神經傳導物質釋放於突觸間隙中的不同步驟是必須的(例如是以細胞膜進行含有神經傳導物質之泡囊(vesicle)的辨識、對接(docking)及融合(fusion))。破傷風梭菌神經毒素、B 型肉毒桿菌神經毒素(BoNT/B)、D 型肉毒桿菌神經毒素(BoNT/D)、F 型肉毒桿菌神經毒素(BoNT/F)、G 型肉毒桿菌神經毒素(BoNT/G)造成小突觸小泡蛋白或泡囊相關膜蛋白 (vesicle-associated membrane protein, VAMP)的蛋白水解切割。A 型肉毒桿菌神經毒素及 E 型肉毒桿菌神經毒素切割細胞膜相關蛋白 -25(plasma membrane-associated protein-25, SNAP-25)，且 C 型肉毒桿菌神經毒素(BoNT/C)切割整體的膜蛋白 syntaxin 及 SNAP-25。

【0008】 梭菌神經毒素依據血清型呈現不同的效果作用時間。

A 型肉毒桿菌神經毒素的臨床治療效果對於神經肌肉疾病持續約 3 個月，對於多汗症(hyperhidrosis)持續 6 至 12 個月。另一方面，E 型肉毒桿菌神經毒素的效果持續小於 4 週。A 型肉毒桿菌神經毒素維持較長的治療效果，相較於其他血清型(例如是血清型 B、C₁、D、E、F 及 G)而言更偏好於臨床上使用。對於效果作用時間不同之可能的一個解釋為肉毒桿菌神經毒素之血清型的不同的次細胞定位(subcellular localization)。A 型肉毒桿菌神經毒素之輕鏈的蛋白酶區塊是以點狀方式(punctate manner)位在神經細胞的

細胞膜，與基質 SNAP-25 共位。相對地，效果作用時間短的 E 型肉毒桿菌神經毒素係位於細胞質。膜之相關性可能保護 A 型肉毒桿菌神經毒素免於受到細胞質的降解機制，使得 A 型肉毒桿菌毒素在神經細胞中能夠持續較久。

【0009】 在肉毒桿菌中，肉毒桿菌毒素係形成為蛋白質複合體，包括神經毒性組成及非毒性蛋白。輔助蛋白(accessory protein) 嵌有神經毒性組成，因而保護神經毒性組成免於受到胃腸道中消化酵素的降解。因此，大部分血清型的肉毒桿菌神經毒素在口服的情況下仍具有毒性。複合體(例如是 450 kDa 或 900 kDa)可藉由肉毒桿菌的培養所獲得。

【0010】 近年來，肉毒桿菌神經毒素已作為緊張不全(dystonia)及痙攣(spasm)的治療藥劑。包括肉毒桿菌毒素複合體的製備在商業上係可獲得，例如是由益普生股份有限公司(Ipsen Ltd)(麗舒妥(Dysport®))或愛力根藥品股份有限公司(Allergan Inc.)(保妥適(Botox®))所獲得。不具任何複合蛋白之高純度的神經毒性組成可例如是由法蘭克福(Frankfurt)的梅茲製藥有限兩合公司(Merz Pharmaceuticals GmbH)(Xeomin®)所獲得。

【0011】 梭菌神經毒素通常係注入於受到影響的肌肉組織中，將藥劑帶到接近於神經肌肉終板(end plate)，亦即是接近於引導接受至控制此受影響之肌肉的神經細胞之中的細胞受體。不同程度的神經毒素的散布(spread)已受到關注。神經毒素的散布被認為是取決於注入的量及特別的神經毒素製備。神經毒素可能造成劇烈

的副作用(例如是附近肌肉組織中的癱瘓)，而這大部分可藉由降低注射量至治療上相應的程度所避免。劑量過量亦可引發免疫系統產生中和抗體(neutralizing antibody)，中和抗體使神經毒素失去活性，防止不隨意肌之活性的緩解。對於肉毒桿菌毒素的免疫耐受度已顯示為關聯於累積的劑量。

● **【0012】** 目前，梭菌神經毒素主要仍使用合適的梭菌品係藉由發酵過程所產生。然而，由厭氧的梭菌培養的梭菌神經毒素之工業製造是難處理(cumbersome)且耗時的過程。由於最終產物的高度毒性，過程必須是在嚴格的控制之下所進行。在發酵過程期間，單鏈前驅物係藉由未知的梭菌蛋白酶所水解切割，以獲得具有生物活性的雙鏈梭菌神經毒素。藉由蛋白酶水解切割所形成的神經毒素活性的程度係由於不同的品系及神經毒素之血清型所變化，由於神經毒素之製備需要具有明確定義的生物活性，神經毒素活性的程度在製造上是主要的考量。再者，在使用梭菌品系進行發酵過程的期間，是產生為蛋白質複合體的梭菌神經毒素，其中神經毒性組成是藉由輔助蛋白所嵌入。這些輔助蛋白對於生物活性或效果作用時間並不具有有益的效果。然這些輔助蛋白可引發患者的免疫反應，造成對抗於梭菌神經毒素的免疫。沒有藉由輔助蛋白所嵌入的重組梭菌神經毒素的製造可因而具有優點。

【0013】 本領域中已知在大腸桿菌(*E. coli*)中梭菌神經毒素之重組表現的方法(請參照例如是 WO 00/12728、WO 01/14570 或

WO 2006/076902)。又，梭菌神經毒素已表現於真核表現系統中，例如是嗜甲醇酵母菌(*Pichia pastoris*)、嗜甲醇畢赤氏酵母(*Pichia methanolica*)、釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、昆蟲細胞及哺乳類細胞(請參照 WO 2006/017749)。

【0014】 重組的梭菌神經毒素可表現為單鏈前驅物，接著須受到蛋白水解切割以獲得最終的生物活性梭菌毒素。因此，梭菌神經毒素可以高產率於快速生長的細菌中表現為相對非毒性的單鏈多肽類。

【0015】 又，依據生物活性、細胞特異性、抗原潛力及效果作用時間藉由基因工程修飾梭菌神經毒素之特徵，以在特定的臨床領域中獲得具有新的治療特性的重組神經毒素可能是有益的。梭菌神經毒素的基因修飾可改變作用的模式或擴展治療標的的範圍。

【0016】 WO 96/39166 揭露肉毒桿菌毒素的同功異構物，包括對於神經肌肉組織的降解具有更高持久性的胺基酸基。

【0017】 基於 WO 02/08268 之專利家族(包括專利家族 US 6,903,187)揭露一種梭菌神經毒素，包括選自於白胺酸基之模體(leucine-based motif)的加成(addition)或刪除(deletion)的結構修飾，這改變神經毒素之生物持久性(請參照: Fernández-Salas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (2004) 3208-3213; Wang et al., J. Biol. Chem. 286 (2011) 6375-6385)。Fernández-Salas 等人起初假設增加之持久性係由於白胺酸模體之膜結合特性所致(請參照上

文 Fernández-Salas 等人的文獻所引用之處第 3211 及 3213 頁)。
Wang 等人提到這理論(請參照上文所引用之 Wang 等人的文獻第 6376 頁左欄最後整個段落，以及第 6383 頁「討論」的第一個整個段落)，然較偏好於其他的理論：保護藉由蛋白質水解的降解(請參照上文 Wang 等人的文獻所引用之處第 6384 頁左欄第 27ff 行)。

● 【0018】 US 2002/0127247 描述梭菌神經毒素，包括在第二修飾位置(secondary modification site)的修飾及呈現改變的生物持久性。

● 【0019】 由於對於肉毒桿菌毒素的免疫耐受性係有關於累積的劑量，為了降低給藥頻率及產生中和抗體的情況，相較於自然產生的肉毒桿菌毒素，變異之肉毒桿菌毒素在神經肌肉組織中呈現更長的半衰期可能是有利的。

● 【0020】 又，若自然呈現短期作用之肉毒桿菌神經毒素的血清型能夠增加其生物持久性，可有潛力地使用在臨床應用上。經修飾的 E 型肉毒桿菌神經毒素具有增長的作用時期，能夠有潛力地使用於對於 A 型肉毒桿菌神經毒素呈現免疫反應的患者中。再者，E 型肉毒桿菌神經毒素相較於 A 型肉毒桿菌神經毒素顯示為誘發更多由感測神經神經元(sensory neuron)所釋放的一群嚴重的疼痛介質。在 A 型肉毒桿菌神經毒素僅在部分子集的病患中提供僅有部分疼痛緩解(例如是在頭痛的治療中)的臨床應用中，或者是在已發現 E 型肉毒桿菌神經毒素較 A 型肉毒桿菌神經毒素有效

但僅給予短期的治療(例如是治療癲癇)的臨床應用中，具有增長的效果作用時間之 E 型肉毒桿菌神經毒素可證實為有效的。

【0021】 為了能夠給藥頻率的降低以及肉毒桿菌神經毒素之血清型之治療潛力的開發，對於具有增長的效果作用時間之梭菌神經毒素具有強烈的需求，由於個別臨床有關效果之半衰期，目前對於臨床應用是被視為不實際的。理想地，特定的梭菌肉毒桿菌神經毒素之效果作用時間可以量身訂製之方式(*tailor-made fashion*)被調整，以提出所給指示(例如是神經毒素的用量，給藥的頻率等等)之任何特定的特徵及需求。至今，這些方面還沒獲得令人滿意解決方式。

【發明內容】

【0022】 本發明的目的是提供一呈現增加的效果作用時間之重組梭菌神經毒素，以及建立此種重組梭菌神經毒素之可靠且準確的製造方法。此方法及使用於此方法中新型前驅物梭菌神經毒素可滿足對於呈現增加之效果作用時間之重組梭菌神經毒素的大量需求。

【0023】 天然的不同血清型的肉毒桿菌毒素呈現高度相異的效果作用時間，這可能是由於他們不同的次細胞定位所致。BoNT/A 呈現最長的持續性，且位在神經細胞的細胞膜的鄰近處，而短期的 BoNT/E 血清型是位於細胞質。然而，另外的因子(例如是降解、擴散(*diffusion*)及/或轉移(*translocation*)速率可能是造成個別的肉毒桿菌神經血清型在效果作用時間上有所不同的決定

性影響。

【0024】 目前，並沒有修飾梭菌神經毒素以增加其效果作用時間的通用方法。令人驚訝的是，現已發現具有此種效果的重組梭菌神經毒素可藉由將編碼一隨機螺旋區塊(random coil domain)的序列選殖(clone)進入親代梭菌神經毒素(parental clostridial neurotoxin)的基因中，並接續在重組的宿主細胞中進行所產生的構成物(construct)之異源表現(heterologous expression)。

● 【0025】 因此，在一方面，本發明是有關於包括一隨機螺旋區塊的重組梭菌神經毒素。

【0026】 在一特別的實施例中，本發明是有關於包括一隨機螺旋區塊的重組梭菌神經毒素，其中(i)此隨機螺旋區塊是由 $(Xaa)_x \cdot [(P,A,S)_y \cdot (Xaa)-]_z \cdot (P,A,S)_y \cdot (Xaa)_x$ 的胺基酸序列所組成，其中 Xaa 是獨立選自於任何天然之胺基酸基的胺基酸基，提供於 $[(P,A,S)_y \cdot (Xaa)-]_z$ 中之至少一 Xaa 是不同於丙胺酸(alanine)、絲氨酸(serine)、脯胺酸(proline)基。特別是，其中 Xaa 是纈胺酸(valine)。(P,A,S)代表獨立選自於丙胺酸(A)、絲氨酸(S)、脯胺酸(P)基的胺基酸基。x 是獨立選自於 0 及 1 的數字。y 是獨立選自於 3 及 4 的數字。z 是 9 或大於 9。特別是，z 是介於 9 與 750 之間的數字。

● 【0027】 在另一方面，本發明是有關於包括本發明之重組梭菌神經毒素的醫藥組合物。

【0028】 在另一方面，本發明是有關於本發明之組合物於美容治療的使用。

【0029】 在另一方面，本發明是有關於本發明之重組梭菌神經毒素的形成方法，包括藉由將編碼此隨機螺旋區塊(特別是根據本發明的隨機螺旋區塊)的核酸序列之插入於編碼一親代梭菌神經毒素的核酸序列之中所獲得之編碼一重組單鏈前驅物梭菌神經毒素的重組核酸序列的步驟。

【0030】 在另一方面，本發明是有關於包括一隨機螺旋區塊(特別是根據本發明之一隨機螺旋區塊)的重組單鏈前驅物梭菌神經毒素。

【0031】 在另一方面，本發明是有關於獲得本發明之核酸序列的方法，包括將編碼一隨機螺旋區塊(特別是根據本發明之隨機螺旋區塊)之核酸序列插入於編碼一親代梭菌神經毒素的核酸序列中的步驟。

【0032】 在另一方面，本發明是有關於包括本發明之核酸序列的載體，或者是藉由本發明之方法所能獲得的核酸序列。

【0033】 在另一方面，本發明是有關於包括本發明之核酸序列的重組宿主細胞，藉由本發明之方法所能獲得的核酸序列，或本發明之載體。

【0034】 在另一方面，本發明是有關於產生本發明之重組單鏈前驅物梭菌神經毒素的方法，包括表現本發明之核酸序列的步驟，或者是藉由本發明之方法所能獲得的核酸序列，或在重組宿主細胞中的本發明之載體，或在導致核酸序列表現的情況之下培養本發明之重組宿主細胞。

【圖式簡單說明】**【0035】**

第 1 圖繪示呈現 PAS 化之 A 型肉毒桿菌毒素(PAS·rBoNT/A) 的示意圖。

第 2 圖繪示純化之 PAS-rBoNT/A 的聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE)。在將樣品加於膠體之前，先加入貝他-巰基乙醇 (β -mercaptoethanol)。「v.A.」道：純化之未活化的單鏈 PAS-rBoNT/A，分子量約 175 kDa。「n.A.」(活化之後)道及「n.R.」(純化之後)道顯示在還原的情況之下藉由凝血酶(thrombin)活化之後所獲得的輕鏈(PAS-Lc)及重鏈(Hc)。輕鏈顯然是跑在約 75 kDa 之理論分子量之上的約 110 kDa 的分子量。

第 3 圖繪示使用 PAS200-rBoNT/A 之小鼠跑步檢測(mouse running assay)，■：PAS200-rBoNT/A；●：來自標準品 Xeomin 81208 (0.6U)的平均值(54 個檢測)。

第 4 圖繪示使用 PAS100-rBoNT/A 之小鼠跑步檢測，■：PAS100-rBoNT/A；●：來自標準品 Xeomin 81208 (0.6U)的平均值(54 個檢測)。

第 5 圖繪示使用 VPASA100 rBoNT/A 之小鼠跑步檢測，■：VPASA100 rBoNT/A；●：來自標準品 Xeomin 81208 (0.6U)的平均值(54 個檢測)。

【實施方式】

【0036】 本發明可藉由參照下列本發明之詳細的說明及本文所包括之範例而更容易地理解。

【0037】 在一方面中，本發明係有關於包括一隨機區塊之重組梭菌神經毒素。

【0038】 在本發明之內容中，「梭菌神經毒素」之用語表示可由梭菌綱(Clostridia)之細菌(包括破傷風梭菌(*Clostridium tetani*)及肉毒桿菌(*Clostridium botulinum*))所獲得之自然的神經毒素或由其他來源所獲得的神經毒素(包括由重組技術或由基因或化學修飾)。特別地，梭菌神經毒素具有內肽酶活性。

【0039】 梭菌神經毒素係產生為單鏈前驅物，藉由未知的梭菌內肽酶在環區(loop region)中進行蛋白質水解切割，以獲得具有生物活性之雙硫鍵鏈接雙鏈形式的神經毒素，包括 2 個鏈元素(一個具有功能活性的輕鏈及一具有功能活性的重鏈)，其中輕鏈之一端係藉由肽鍵鏈接於重鏈的一端，並非是藉由雙硫鍵。

【0040】 在本發明的內容中，「梭菌神經毒素輕鏈」之用語表示包括內肽酶活性之梭菌神經毒素的部分。此內肽酶活性負責切割一或多個關於在造成神經傳導物質釋放至突觸間隙中之過程的所謂的可溶性-N-乙基馬來亞醯胺敏感融合蛋白附著蛋白受體(SNARE)-複合體之部分的蛋白質。在天然梭菌神經毒素中，輕鏈的分子量大約為 50 kDa。

【0041】 在本發明的內容中，「梭菌神經毒素重鏈」之用語表示負責使神經毒素進入神經細胞中的部分。在天然梭菌神經毒素中，重鏈的分子量大約為 100 kDa。

【0042】 在本發明的內容中，「具有功能活性的梭菌神經毒素

鏈」表示重組梭菌神經毒素鏈能夠進行天然的肉毒桿菌神經毒素鏈之至少約 50%、特別是至少約 60%、至少約 70%、至少約 80%、及最特別是至少約 90%的生物功能。其中，梭菌神經毒素鏈的生物功能包括(但不限制於)重鏈對於神經細胞的結合、神經毒素進入神經細胞、輕鏈由雙鏈神經毒素的釋放，以及輕鏈之內肽酶活性。確認神經毒性活性之方法可在例如是 WO 95/32738 中所找到，此描述破傷風菌毒素及肉毒桿菌毒素之分別獲得的輕鏈與重鏈的再結合(reconstitution)。

【0043】 在本發明之內容中，「約」或「大約」的用語表示所給的數值或範圍的 20%之內、或者 10%之內、包括 5%之內。或者，特別是在生物系統中，「約」之用語表示約在一對數(log)中(亦即是一量值等級(order of magnitude))，包括在所給 2 個數值的一因子(factor)之中。

【0044】 在本發明的內容中，「重組梭菌神經毒素」的用語表示包括梭菌神經毒素的組成。梭菌神經毒素係藉由在異源細胞(例如是大腸桿菌)中之神經毒素的表現所獲得，且包括(但非限制於)由發酵過程(上清液，細胞溶解之後的組成)所獲得的原料、由純化過程中分離此原料之成分所獲得之包括梭菌神經毒素之部分、單離的且基本上為純的蛋白質，以及用於醫藥及/或美容使用之包括梭菌神經毒素且另外包括醫藥上可接受之溶劑及/或賦形劑的配方。

【0045】 在本發明的內容中，「重組梭菌神經毒素」更表示基

於親代梭菌神經毒素另外包括異源隨機螺旋區塊的梭菌神經毒素，亦即是非自然產生於所述親代梭菌神經毒素中的隨機螺旋區塊，特別是合成的隨機螺旋區塊，或來自其他肉毒桿菌的種類的隨機螺旋區塊，特別是來自人類蛋白質的隨機螺旋區塊。

【0046】 在本發明之內容中，「包括」的用語表示「包括，但非限制於」。此用語意指為開放式，指定任何所述的特徵、元素、整體、步驟或組成，但沒有排除一或多個其他特徵、元素、整體、步驟、組成或群體的存在或添加。「包括」的用語因而包括更限制的用語「由...所組成」及「實質上由...所組成」。

【0047】 在本發明的用語中，「隨機螺旋區塊」之用語表示實質上缺乏次級結構之蛋白質片段。隨機螺旋區塊可使用多種方法偵測，包括光譜法(例如是圓振二向色性(circular dichroism)或核磁共振 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)法，包括多維核磁共振實驗或結晶結構的確認方式。

【0048】 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊是由 $(Xaa)_x \cdot [(P,A,S)_y \cdot (Xaa)]_z \cdot (P,A,S)_y \cdot (Xaa)_x$ 的胺基酸序列所組成，其中 Xaa 是獨立選自於任何天然之胺基酸基的胺基酸基，提供於 $[(P,A,S)_y \cdot (Xaa)]_z$ 中之至少一 Xaa 是不同於丙胺酸(alanine)、絲氨酸(serine)、脯胺酸(proline)基。特別是，其中 Xaa 是纈胺酸(valine)。(P,A,S)代表獨立選自於丙胺酸(A)、絲氨酸(S)、或脯胺酸(P)基的胺基酸基。x 是獨立選自於 0 及 1 的數字。y 是獨立選自於 3 及 4 的數字。z 是 9 或大於 9。特別是，z 是介於 9 與 750 之間的數字。

【0049】 在特別的此類實施例中， y 是 3， z 是 11 或大於 11。特別是， z 是介於 11 與 749 之間的數字，更特別是介於 14 與 124 之間，更特別是介於 16 與 67 之間，更特別是介於 19 與 59 之間，更特別是 21 與 54 之間，更特別是 23、24、或 25、或 35、36、或 37、或 48、49、或 50。在其他特別的此種實施例中， y 是 4，且 z 是 9 或大於 9，特別是 z 是介於 9 與 599 之間，更特別是介於 11 與 99 之間，更特別是介於 13 與 51 之間，更特別是介於 15 與 47 之間，更特別是介於 17 與 43 之間，或更特別是 18、19、或 20、或 28、29、或 30、或 38、39、或 40 的數字。

【0050】 為了延長醫藥活性蛋白的血漿半衰期(plasma half-life)，所謂的「PAS」序列(請參照例如是 Schlapschy 等人於 2013 年在蛋白質工程，設計與選擇的著作(Schlapschy et al., Protein Engineering, Design and Selection 26 (2013) 489-501); EP 2 369 005; WO 2011/144756)已有所發展。具有爭議的是，使用此種構形失序的多肽序列的基因融合提供以大量的流體動力學體積的溶化隨機鏈附加於融合對象(例如是生藥興趣之蛋白質)的簡單方式，使得所得的融合蛋白尺寸係顯著地增加，且藉由這些方法，典型上經由腎臟過濾所快速清除生物活性成分係延遲 1 至 2 個量值等級。

【0051】 特別是由於肉毒桿菌毒素之血漿半衰期目前並不被視為其效果作用時間的關鍵重點，令人驚訝的是，現已發現基於 PAS 區塊之隨機螺旋區塊(包括 P、A 或 S 之外之胺基酸基，特別

是纈胺酸)的附加(attachment)，亦能夠延長具細胞內活性之蛋白質的效果作用時間。由於對於大分子側鏈(例如是 PAS(Xaa)序列或聚乙烯乙二醇基的序列)防止細胞攝入(uptake)有所爭論，作用時間之延長更特別令人驚訝，因此這種血管內蛋白質固定的方式可能僅應用於具有細胞表面標識或受體之蛋白質的治療處理(請參照位於德國之美因河畔法蘭克福的約翰·沃爾夫岡·歌德大學之 2013 年的博士論文-韋伯的 Stat5 的抑制腫瘤 RNA 干擾和特異性相互作用之肽類適體構建的 DNA 結合區塊，第 220 頁的最後整句)。

【0052】 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊係由丙胺酸、絲氨酸、脯氨酸所組成。

【0053】 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊包括多個胺基酸的重複，其中此重複係由丙胺酸、絲氨酸、及脯氨酸所組成，且其中不大於 6 個連續的胺基酸基係相同的。

【0054】 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊包括由至少 50 個胺基酸基所形成之隨機螺旋構形的胺基酸序列，特別是介於 50 與 3000 個之間的胺基酸基，更特別是介於 60 與 500 個之間的胺基酸基，更特別是介於 70 與 260 個之間的胺基酸基，更特別是介於 80 與 240 個之間的胺基酸基，更特別是介於 90 與 220 個之間的胺基酸基，特別是 100 個胺基酸基，150 個胺基酸基，或 200 個胺基酸基。

【0055】 在特別的實施例中，包括在此隨機螺旋區塊中的脯

胺酸基構成此隨機螺旋區塊之大於 4%及小於 40%的胺基酸。

【0056】 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊包括選自於由 (VPASA)₂₀ (序列識別號：12(序列識別號: 12))及(VAPSA)₂₀ (序列識別號: 13)所組成之群組的至少一胺基酸序列。

【0057】 在特別的其他實施例中，至少 20%的此胺基酸基 (Xaa)係不同於丙胺酸、絲胺酸、及脯胺酸基。在特別的此實施例中，各個基(Xaa)係相同，亦即是此隨機螺旋區塊係由 4 個不同的胺基酸基所組成。在特別的此實施例中，各個(Xaa)係纈胺酸。在特別的此實施例中，此隨機螺旋區塊係選自於 (VPASA)₂₀ (序列識別號: 12)及(VAPSA)₂₀ (序列識別號: 13)。

【0058】 令人驚訝地，(VPASA)₂₀ 與(VAPSA)₂₀ 類型的隨機螺旋區塊所形成之肉毒桿菌神經毒素融合區塊，不僅顯示增加的生物持久性時間(如僅由脯胺酸(P)、丙胺酸(A)及絲胺酸(S)所組成的 PAS 化的序列(pasylated sequences))，卻亦呈現類似於野生型肉毒桿菌神經毒素之快速的生物活性的開始(請參照第 6 圖)，這相對於僅由脯胺酸、丙胺酸及絲胺酸所組成的 PAS 化的序列的表現，呈現延遲的生物活性之開始(請參照第 4 及 5 圖)。

【0059】 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊係插入於(i)此重組梭菌神經毒素之輕鏈的 N 端；(ii)此重組梭菌神經毒素之輕鏈的 C 端；(iii)此重組梭菌神經毒素之重鏈的 N 端；或(iv)此重組梭菌神經毒素之重鏈的 C 端，特別是在此重組梭菌神經毒素之輕鏈的 N 端。

【0060】 在特別的實施例中，此梭菌神經毒素之序列係選自於(i)A、B、C、D、E、F及G血清型的肉毒桿菌神經毒素，特別是A、C、及E血清型的肉毒桿菌神經毒素，特別是A血清型的肉毒桿菌神經毒素之序列，或(ii)由(i)之肉毒桿菌神經毒素之功能變異體(functional variant)的序列，或(iii)嵌合肉毒桿菌神經毒素的序列，其中梭菌神經毒素之輕鏈及重鏈係來自不同的親代梭菌神經毒素的血清型。

【0061】 在本發明的內容中，「A、B、C、D、E、F及G型肉毒桿菌神經毒素」的用語表示由肉毒桿菌所發現並可獲得的神經毒素。最近，已知標記為A、B、C、D、E、F及G血清型的7種血清不同的類別包括一些次類別(例如是A1、A2、A3及A5)。

【0062】 在特別的實施例中，梭菌神經毒素係選自於A、C及E型肉毒桿菌神經毒素，特別是選自於A型肉毒桿菌神經毒素，或選自於任何此種肉毒桿菌神經毒素的功能變異體。

【0063】 在特別的實施例中，此重組梭菌神經毒素具有輕鏈及重鏈，包括在序列識別號: 8、序列識別號: 10、序列識別號: 14或序列識別號: 15中所發現的胺基酸序列。

【0064】 在本發明的內容中，「梭菌神經毒素之功能變異體」的用語表示與梭菌神經毒素的胺基酸序列及/或編碼胺基酸序列的核酸序列有所不同的神經毒素，但仍為具有功能活性的。在本發明的內容中，「具有功能活性」之用語表示重組梭菌神經毒素的特質呈現為天然的親代梭菌神經毒素(亦即是不具有隨機螺旋

區塊的親代梭菌神經毒素)之生物活性的至少約 50%、特別是至少約 60%、至少約 70%、至少約 80%，及最特別是至少約 90%。其中，生物功能包括(但不限定於)結合於神經毒素受體、神經毒素進入神經細胞、由雙鏈神經毒素釋放輕鏈、及輕鏈之內肽酶活性、及抑制由所影響的神經細胞釋放的神經傳導物質。

【0065】 在蛋白質的層次上，功能變異體將維持對應於梭菌神經毒素的主要特徵，例如是在輕鏈中的內肽酶活性的主要基、或附加於神經毒素受體或在重鏈中透過胞內體膜轉移的主要基，但可包括一或多個突變，包括對應的梭菌神經毒素之一或多個胺基酸的刪除、對應的梭菌神經毒素之一或多個胺基酸的加成、及/或對應的梭菌神經毒素之一或多個胺基酸的取代(substitution)。特別是，此刪除、加成及/或取代的胺基酸為連續的胺基酸。根據本發明的教示，只要功能變異體維持生物活性，任何數量的胺基酸可被加成、刪除及/或取代。例如，1、2、3、4、5、上達至 10、上達至 15、上達至 25、上達至 50、上達至 100、上達至 200、上達至 400、上達至 500 的胺基酸或甚至是更多的胺基酸可被加成、刪除及/或取代。因此，神經毒素的功能變異體可以是天然的神經毒素之生物活性片段。此神經毒素片段可包括 N 端、C 端、及/或一或多個內部刪除。

【0066】 在另一實施例中，梭菌神經毒素之功能變異體另外包括訊息肽(signal peptide)。通常，此訊息肽將位於神經毒素的 N 端。許多此訊息肽係習知且包括於本發明。特別是，訊息肽造成

神經毒素運送穿過生物膜(例如是內質網膜、高基氏體膜或真核或原核細胞的細胞膜)。現已發現當訊息肽附加於神經毒素時，將導介神經毒素分泌至細胞的上清液中。在某些實施例中，訊息肽將在分泌的過程中或接續於分泌過程而被切除，使得所分泌的蛋白缺乏 N 端訊息肽(由雙硫鍵共價鏈接的分開的輕鏈及重鏈所組成)，並具有蛋白質水解活性。

【0067】 在特別的實施例中，功能變異體在其神經毒素部分中，對於親帶梭菌神經毒素的對應部分具有至少約 40%、至少約 50%、至少約 60%、至少約 70%或最特別是至少約 80%的序列相似度(sequence identity)，以及至少約 60%、至少約 70%、至少約 80%、至少約 90%或最特別是至少約 95%的序列同源性(sequence homology)。本領域中具有通常知識者已知確認序列相似度及/或同源性的方法及演算法，包括具有刪除、加成及/或取代的變異體對於親代序列的比對。在 DNA 的層次上，由於基因密碼的退化性(degeneracy)，編碼功能同系物及親代梭菌神經毒素的核酸序列可能有較大程度的不同。目前已知原核及真核生物之間的密碼子(codon)的使用並不相同。因此，當在原核表現系統中進行原核蛋白(例如是梭菌神經毒素)的表現時，可能需要(或至少是有益於)採用表現宿主細胞所使用的密碼子的核酸序列，表示序列相似度或同源性可能在核酸序列層次上較低。

【0068】 在本發明的內容中，「變異體」的用語表示對應於梭菌神經毒素之化學、酵素、或基因修飾之衍生物的神經毒素，包

括來自肉毒桿菌的化學或基因修飾的神經毒素，特別是 A、C 或 E 血清型肉毒桿菌神經毒素。化學修飾之衍生物可以是藉由丙酮酸化(pyruvation)、磷酸化(phosphorylation)、硫酸化(sulfatation)、脂化(lipidation)、聚乙二醇化(pegylation)、醣化(glycosylation)之其中一者的修飾，及/或一胺基酸或包括 2 及約 100 個胺基酸之間的多肽類的化學加成，包括發生在用於表現衍生物之真核宿主細胞中的修飾。酵素修飾的衍生物是藉由酵素(例如是內或外切蛋白質水解酶)之活性所修飾的一者，包括藉由用於表現衍生物之真核宿主細胞之酵素的修飾。如上文所指出，基因修飾之衍生物是已對於此梭菌神經毒素之胺基酸序列藉由其中包含的一或多個胺基酸進行刪除或取代、或藉由一或多個胺基酸進行加成(包括多肽類(包括 2 及約 100 個之間的胺基酸))。本領域中任何的通常知識者已清楚知道此類化學或基因修飾的衍生物之設計及建造的方法、及此種變異體的功能性測試方法。

● **【0069】** 在特別的實施例中，此重組梭菌神經毒素相對於不具有隨機螺旋區塊之相同的梭菌神經毒素而言顯示增加的效果作用時間。

● **【0070】** 在本發明的內容中，「增加的效果作用時間」或「增加的作用時間」之用語表示藉由本發明之梭菌神經毒素之較持久的神經阻斷作用(denervation)。例如，如本揭露所示，相對於不具有隨機螺旋區塊之雙硫鍵鏈接雙鏈的梭菌神經毒素的給藥，包括一隨機螺旋區塊之雙硫鍵鏈接雙鏈的梭菌神經毒素的給藥造

成更長時期的局部癱瘓(localized paralysis)。

【0071】 在本發明的內容中，「增加的效果/作用時間」是定義為相對於不具有隨機螺旋區塊之相同的神經毒素而言，本發明之重組神經毒素的增加的效果作用時間是大於約 20%、特別是大於約 50%、更特別是大於約 90%。

【0072】 在本發明之內容中，「神經阻斷作用」的用語表示化學神經阻斷藥劑(chemodenerivating agent)(例如是神經毒素)的給予所導致的神經阻斷作用。

【0073】 在本發明之內容中，「局部神經阻斷作用」或「局部癱瘓」的用語表示一特定的解剖區域(通常是一肌肉或一群解剖及/或生理相關的肌肉)的神經阻斷作用，是由化學神經阻斷藥劑(例如是神經毒素)施加於特定的解剖區域所導致。

【0074】 在不預期結合於理論的情況之下，在相對於不具有隨機螺旋區塊之相同的親代梭菌神經毒素的每個情況中，本發明之重組梭菌神經毒素可顯示增加的生物半衰期、降低的降解速率、減低的融合速率、增加的神經細胞的攝入、及/或修飾的細胞內轉移速率。

【0075】 在特別的實施例中，增加的效果作用時間是由於增加的生物半衰期。

【0076】 在本發明的內容中，「生物半衰期」的用語特別指的是在活體中(*in vivo*)之蛋白質(例如是梭菌神經毒素)的壽命(lifespan)。在本發明的內容中，「生物半衰期」的用語表示在活體

中一半的蛋白質池(protein pool)被降解的時間，例如是一給藥劑量之一半數量的梭菌神經毒素被降解的時間。

【0077】 在本發明的內容中，「增加的生物半衰期」之用語係定義為相對於不具有隨機螺旋區塊的相同的神經毒素而言，本發明之重組神經毒素的增加的生物半衰期是大於約 20%、特別是大於約 50%、更特別是大於約 90%。

● 【0078】 在本發明的內容中，「減低的降解速率」之用語表示隨機螺旋區塊(PAS 序列)保護輕鏈在神經細胞溶質中遭受降解過程(例如是受到蛋白酶或修飾酵素(例如 E3 連接酶(ligase))的攻擊)。由於這種保護，神經中的輕鏈的半衰期係延長，造成更長的治療效果時間。

● 【0079】 在特別的實施例中，重組梭菌神經毒素是用於需要改善之化學神經阻斷作用的疾病的治療，其中相對於不具有隨機螺旋區塊的相同的梭菌神經毒素而言，重組的梭菌神經毒素造成持續較長的神經阻斷作用。

● 【0080】 在特別的其他實施例中，重組梭菌神經毒素是用於治療(a)對於 BoNT/A 顯示免疫反應的病患或(b)頭痛或癲癇，其中重組梭菌神經毒素的血清型是 E。

● 【0081】 在另外的方面中，本發明是有關於包括本發明之重組梭菌神經毒素的醫藥組成。

● 【0082】 在特別的實施例中，本發明的重組梭菌神經毒素或本發明之醫藥組合物是用於治療疾病或下列情況：肌張力不全

(cervical dystonia)(痙攣性斜頸(spasmodic torticollis))、瞼痙攣(blepharospasm)、嚴重原發性腋窩多汗症(severe primary axillary hyperhidrosis)、遲緩不能(achalasia)、下背痛、良性前列腺肥大(benign prostate hypertrophy)、慢性局部疼痛神經病變(chronic focal painful neuropath)偏頭痛、及其他頭痛病症。

【0083】 另外使用肉毒桿菌神經毒素之治療的用藥指示近來是受到研究且可使用本發明的醫藥組成，包括兒童尿失禁(pediatric incontinence)、過度活化膀胱因尿失禁(incontinence due to overactive bladder)、神經性膀胱因尿失禁(incontinence due to neurogenic bladder)、肛裂(anal fissure)、關於受傷之痙攣性疾病、或中樞神經系統疾病(包括創傷(trauma)、中風、多發性硬化症(multiple sclerosis)、帕金森氏症(Parkinson's disease)或腦性麻痺(cerebral palsy))、影響四肢、臉、顎或聲帶之局部肌張不全、顳顎關節(temporomandibular joint, TMJ)疼痛症、糖尿病神經病變(diabetic neuropathy)、傷口療癒、過度流涎症(excessive salivation)、聲帶失能、嚼肌(Masseter muscle)減少以降低下顎尺寸、防止慢性頭痛及慢性肌肉骨骼疼痛(chronic musculoskeletal pain)之治療、治療打鼾的噪音、藉由增加胃排空時間幫助體重之減少。

【0084】 近來，梭菌神經毒素已被評估為其他新的用藥指示的治療，例如疼痛性蟹足腫(painful keloid)、糖尿病神經性病變疼痛、難治癒的膝蓋疼痛(refractory knee pain)、三叉神經痛(trigeminal neuralgia)誘發區域之應用以控制疼痛、裂唇手術之後

的疤痕、癌症及憂鬱症。

【0085】 另一方面，本發明是有關於本發明之組成物對於美容治療之使用。

【0086】 在本發明的內容中，「美容治療」的用語係有關於美容或美學應用的使用，例如是皺紋、魚尾紋(crow's feet)、皺眉紋(frown line)等等。

【0087】 在另一方面，本發明是有關於產生本發明之重組梭菌神經毒素的方法，包括藉由將編碼隨機螺旋區塊(特別是根據本發明的隨機螺旋區塊)之核酸序列插入編碼親代梭菌神經毒素的核酸序列中，獲得編碼重組單鏈前驅物梭菌神經毒素的重組核酸序列。

【0088】 在本發明的內容中，「重組核酸序列」的用語表示已藉由加入來自 2 種不同來源的基因物質所產生的核酸。

【0089】 在本發明之內容中，「單鏈前驅物梭菌神經毒素」表示雙硫鍵鏈接雙鏈的梭菌神經毒素的單鏈前驅物，包括具有功能活性的梭菌神經毒素輕鏈、具有功能活性的神經毒素重鏈、用重鏈之 N-端鏈接輕鏈之 C-端的環區。

【0090】 在本發明的內容中，「重組單鏈前驅物梭菌神經毒素」的用語表示包括異源隨機螺旋區塊(亦即是來自於不同於肉毒桿菌之種別的隨機螺旋區塊)的單鏈前驅物梭菌神經毒素。

【0091】 在特別的實施例中，重組單鏈前驅物梭菌神經毒素包括此環區中的蛋白酶切割位置。

【0092】 單鏈前驅物梭菌神經毒素已被蛋白水解切割，以獲得最終具有生物活性的梭菌神經毒素。蛋白水解切割可發生於藉由宿主細胞酵素進行異源表現的期間，或者是藉由添加蛋白酶酵素至異源表現之後所單離的原蛋白質材料。天然的梭菌神經毒素通常包括一或多個對於蛋白酶的切割訊號，後轉譯地切割單鏈前驅物分子，因而可形成最終的雙聚複合體或多聚複合體。目前，梭菌神經毒素仍主要藉由使用合適的梭菌品系進行發酵過程所產生。在發酵過程中，單鏈前驅物是藉由未知的梭菌蛋白酶進行蛋白水解切割，以獲得具生物活性之雙鏈梭菌神經毒素。在單鏈前驅物分子是蛋白酶之前驅物的情況中，可能發生自催化切割 (autocatalytic cleavage)。或者，蛋白酶可以是表現在相同細胞中的不同的非梭菌酵素。WO 2006/076902 描述藉由在大腸桿菌宿主細胞溶解產物 (cell lysate) 的培養，位於異源辨識及切割位置的重組梭菌神經毒素單鏈前驅物之蛋白水解切割。此蛋白水解切割是藉由未知的大腸桿菌蛋白酶所進行。在重組表現的某些應用中，修飾的蛋白酶切割位置已重組地導入於梭菌毒素之輕鏈及重鏈之間的鏈間區域中，例如是人類凝血酶 (thrombin) 或其他的人類蛋白酶或非人類蛋白酶的蛋白酶切割位置 (請參照 WO 01/14570)。

【0093】 在特別的實施例中，蛋白酶切割位置是藉由選自於下列之蛋白酶所切割的位置：凝血酶、胰蛋白酶 (trypsin)、腸激酶 (enterokinase)、因子 Xa (factor Xa)、植物木瓜酶 (plant papain)、昆蟲木瓜酶 (insect papain)、甲殼類木瓜酶 (crustacean papain)、人

類鼻病毒 3C 蛋白酶(human rhinovirus 3C protease)、人類腸病毒 3C 蛋白酶(human enterovirus 3C protease)、菸草蝕刻病毒蛋白酶(tobacco etch virus protease)、菸草脈斑駁病毒酶(Tobacco Vein Mottling Virus protease)、枯草桿菌蛋白酶(subtilisin)及凋亡蛋白酶(caspase 3)。

【0094】 在特別的實施例中，重組單鏈前驅物梭菌神經毒素更包括一結合標記(binding tag)，特別是選自於包括下列的群組：
● 麩胺基硫轉移酶(glutathione-S-transferase, GST)、麥芽糖結合蛋白(Maltose Binding Protein, MBP)、His-tag、StrepTag 或 FLAG-tag。

【0095】 在本發明之內容中，「親代梭菌神經毒素」的用語表示不具有異源隨機螺旋區塊的選自於自然梭菌神經毒素、自然梭菌神經毒素之功能變異體、或嵌合梭菌神經毒素之初始梭菌神經毒素，其中梭菌神經毒素的輕鏈及重鏈係來自不同血清型的梭菌神經毒素。

● 【0096】 在特別的實施例中，產生本發明之重組梭菌神經毒素的方法更包括在宿主細胞中異源地表達此重組核酸序列的步驟，特別是在細菌的宿主細胞中，更特別是在大腸桿菌的宿主細胞中。

【0097】 在某些實施例中，大腸桿菌(*E. coli*)細胞係選自於 *E. coli* XL1-Blue、Nova Blue、TOP10、XL10-Gold、BL21 及 K12

【0098】 在特別的實施例中，產生本發明之重組梭菌神經毒

素的方法另外包括下列至少其一步驟：(i)藉由形成或允許重組單鏈前驅物梭菌神經毒素接觸於內肽酶產生包括隨機螺旋區塊之雙硫鍵鏈接雙鏈的重組梭菌神經毒素及(ii)藉由色層分析法純化此重組單鏈前驅物梭菌神經毒素或此雙硫鍵鏈接雙鏈的重組梭菌神經毒素。

【0099】 在特別的實施例中，重組單鏈前驅物梭菌神經毒素或重組雙硫鍵鏈接雙鏈的梭菌神經毒素係在表現之後進行純化，或者在重組雙硫鍵鏈接雙鏈的梭菌神經毒素的情況中，是在切割反應之後進行純化。在特別的此類實施例中，蛋白質是藉由色層分析法所純化，特別是藉由免疫親和層析法(immunoaffinity chromatography)、或藉由離子交換基質上的色層分析法、疏水性反應基質(hydrophobic interaction matrix)、或多形色層分析基質(multimodal chromatography matrix)、特別是強離子交換基質(strong ion exchange matrix)、更特別是強陽離子交換基質(strong cation exchange matrix)。

【0100】 在本發明的內容中，「形成...重組單鏈前驅物梭菌神經毒素接觸於內肽酶...」表示帶來此神經毒素及此內肽酶接觸的活性及/或直接步驟，而「...允許重組單鏈前驅物梭菌神經毒素接觸於內肽酶...」的用語表示建立使此神經毒素及此內肽酶彼此接觸之情況的間接步驟。

【0101】 在本發明的內容中，「內肽酶」之用語表示分解非終端之胺基酸(亦即是在多肽鏈之中)的蛋白酶。由於內肽酶不會攻

擊終端胺基酸，內肽酶不會將肽類分解為單體(monomer)。

【0102】 在特別的實施例中，重組單鏈前驅物梭菌神經毒素之切割是幾近完全的。

【0103】 在本發明的內容中，「幾近完全」的用語係定義為，使用聚丙烯醯胺膠體電泳(SDS-PAGE)及接續的西方點墨法(Western Blot)或逆向色層分析法(reversed phase chromatography)所確認之大於約 95%的切割，特別是大於約 97.5%，更特別是大於約 99%。

【0104】 在特別的實施例中，重組單鏈前驅物梭菌神經毒素之切割發生於位在重組前驅物梭菌神經毒素之環區中的異源切割訊號。

【0105】 在特別的實施例中，切割反應是與含有單鏈前驅物蛋白的原宿主細胞溶解產物進行。

【0106】 在其他特別的實施例中，單鏈前驅物蛋白是在切割反應之前，特別是藉由第一色層分析富集步驟(first chromatographic enrichment step)所純化或部分純化。

【0107】 在本發明的內容中，「純化」是關於大於約 90%的純度。在本發明的內容中，「部分純化」之用語是有關於小於約 90%的純度以及大於約 2 倍的富集(enrichment)。

【0108】 在另一方面，本發明是有關於本發明之重組梭菌神經毒素之前驅物的重組單鏈梭菌神經毒素。因此，在此方面，本發明是有關於包括隨機螺旋區塊(特別是根據本發明之隨機螺旋

區塊)之重組單鏈前驅物梭菌神經毒素。

【0109】 在特別的實施例中，對於雙硫鍵鏈接雙鏈的梭菌神經毒素的此重組單鏈梭菌神經毒素前驅物包括一具有功能活性的梭菌神經毒素輕鏈、一具有功能活性的梭菌神經毒素重鏈、一鏈接輕鏈之 C 端及重鏈之 N 端的環區、及一根據本發明的隨機區塊。

【0110】 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊是由 $(Xaa)_x \cdot [(P,A,S)_y \cdot (Xaa)\text{-}]_z (P,A,S)_y \cdot (Xaa)_x$ 的胺基酸序列所組成，其中 Xaa 是獨立選自於任何天然之胺基酸基的胺基酸基，提供於 $[(P,A,S)_y \cdot (Xaa)\text{-}]_z$ 中之至少一 Xaa 是不同於丙胺酸(alanine)、絲氨酸(serine)、脯胺酸(proline)基。特別是，其中 Xaa 是纈胺酸。(P,A,S) 代表獨立選自於丙胺酸(A)、絲氨酸(S)、脯胺酸(P)基的胺基酸基。x 是獨立選自於 0 及 1 的數字。y 是獨立選自於 3 及 4 的數字。z 是 9 或大於 9。特別是，z 是介於 9 與 750 之間的數字。

【0111】 在特別的此類實施例中，y 是 3，z 是 11 或大於 11。特別是，z 是介於 11 與 749 之間的數字，更特別是介於 14 與 124 之間，更特別是介於 16 與 67 之間，更特別是介於 19 與 59 之間，更特別是 21 與 54 之間，更特別是 23、24、或 25、或 35、36、或 37、或 48、49、或 50。在其他特別的此種實施例中，y 是 4，且 z 是 9 或大於 9，特別是 z 是介於 9 與 599 之間，更特別是介於 11 與 99 之間，更特別是介於 13 與 51 之間，更特別是介於 15 與 47 之間，更特別是介於 17 與 43 之間，或更特別是 18、19、

或 20、或 28、29、或 30、或 38、39、或 40 的數字。

● **【0112】** 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊包括由至少 50 個胺基酸基所組成的胺基酸序列以形成隨機螺旋構形，特別是介於 50 與 3000 個胺基酸基之間，更特別是介於 60 與 500 個胺基酸基之間，更特別是介於 70 與 260 個胺基酸基之間，更特別是介於 80 與 240 個胺基酸基之間，更特別是介於 90 與 220 個胺基酸基之間，特別是 100 個胺基酸基，150 個胺基酸基、或 200 個胺基酸基。

● **【0113】** 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊是由丙胺酸、絲氨酸、及脯胺酸基所組成。

【0114】 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊包括多個胺基酸重複，其中此重複是由丙胺酸、絲氨酸、及脯胺酸基所組成，且其中並沒有大於 6 個連續的胺基酸基是相同的。

● **【0115】** 在特別的實施例中，包括在此隨機螺旋區塊中的脯胺酸基構成大於 4%且小於 40%的此隨機螺旋區塊之胺基酸基。

【0116】 在特別的實施方式中，此隨機螺旋區塊包括選自由 (VPASA)₂₀ (序列識別號: 12)及 (VAPSA)₂₀ (序列識別號: 13)所組成之群組的至少一胺基酸序列，或者是以這些序列作為整體或部分之這些序列的環狀置換形式或多聚體(multimer)(特別是 (VPASA)₂₀ (序列識別號: 12))。

【0117】 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊是插入於(i)此重組梭菌神經毒素的輕鏈的 N 端；(ii)此重組梭菌神經毒素的輕

鏈的 C 端；(iii)此重組梭菌神經毒素的重鏈的 N 端；或(iv)此重組梭菌神經毒素的重鏈的 C 端。

【0118】 在特別的實施例中，此梭菌神經毒素的序列是選自於下列的序列：(i)A、B、C、D、E、F 及 G 血清型肉毒桿菌神經毒素，特別是 A、C 及 E 血清型肉毒桿菌神經毒素，更特別是 A 血清型肉毒桿菌神經毒素，或(ii)來自(i)之肉毒桿菌神經毒素的功能變異體的序列，或(iii)來自嵌合梭菌神經毒素的序列，其中梭菌神經毒素的輕鏈及重鏈是來自於不同血清型的梭菌神經毒素。

【0119】 在特別的實施例中，此重組單鏈梭菌神經毒素具有如序列識別號: 14 或序列識別號: 15(請參照表 1)所示的胺基酸序列。

【0120】 在另一方面，本發明是有關於編碼本發明之重組單鏈梭菌神經毒素的核酸序列。

【0121】 在另一方面，本發明是有關於獲得本發明之核酸序列的方法，包括將編碼一隨機螺旋區塊(特別是根據本發明的隨機螺旋區塊)的核酸序列插入於編碼一親代梭菌神經毒素的核酸序列中。

【0122】 在另一方面，本發明是有關於包括本發明之核酸序列或藉由本發明之方法所獲得的核酸序列的載體。

【0123】 在另一方面，本發明是有關於包括本發明之核酸序列、藉由本發明之方法所獲得的核酸序列、或本發明之載體的重

組宿主細胞。

【0124】 在某些實施例中，此重組宿主細胞是選自於 *E. coli* XL1-Blue、Nova Blue、TOP10、XL10-Gold、BL21 及 K12。

【0125】 在另一方面，本發明是有關於產生本發明之重組單鏈前驅物梭菌神經毒素的方法，包括表現本發明之核酸序列的步驟、或藉由本發明之方法所獲得的核酸序列、或在重組宿主細胞中之本發明的載體、或在造成此核酸序列的表現的情況之下培養本發明的重組宿主細胞。

【0126】 範例

【0127】 比較例 1：PAS 化之 A 型肉毒桿菌的生成與純化 (PAS200-rBoNT/A)

【0128】 「PAS」模組(module)包括 200 個由脯胺酸、絲氨酸及丙胺酸之胺基酸所合成產生的胺基酸基，且在使用酶 SapI 切割(digestion)之後插入於重組 BoNT/A (rBoNT/A)的 N 端(第 1 圖)。正確的轉殖(cloning)是藉由定序進行驗證。

【0129】 表現是在大腸桿菌 BI21 的表現品係中進行。純化是使用親和性及尺寸排除層析的結合所完成，接著使用凝血酶進行活化。第 2 圖概述純化及活化的結果。

【0130】 比較例 2：在半橫膈膜檢測(Hemidiaphragma Test, HDA Test)中量測生物活性

【0131】 此離體(*ex vivo*)測試進行中毒所需的所有步驟(標的細胞結合、內化(internalization)、及轉移至細胞質中)。為此，包

括半橫膈膜及膈神經(Nervus phrenicus)的鼠類神經肌肉製備是藉由 1 Hz 的連續頻率在器官浴(organ bath)中進行刺激。所得的肌肉收縮的幅度(amplitude)係對於時間繪示於圖中。在添加毒素樣品於器官浴中之後，確認見到無毒素之減少 50%之幅度的所需時間。此所謂的癱瘓半衰期(paralytic half-time)是指對於生物活性的直接量測。在 PAS200-rBoNT/A 的情況中，在濃度 0.35 ng/ml 的器官浴中，癱瘓半衰期是 157 分鐘。藉由與野生型 BoNT/A 所建立的校準曲線比對，可計算出特定的 60 pg/U 之生物活性。

【0132】 比較例 3:使用指間外展分數(Digit Abduction Score, DAS)檢測確認活體之生物活性

【0133】 在此活體的檢測中，確認出樣品的生物活性。基於在半橫膈膜檢測(請參照範例 2)中所獲得的特定生物活性之結果，相較於平行呈現之標準樣品所見效果應造成的次最大效果(sub-maximum effect)的劑量可被計算出。這些劑量(在每個例子中 20 μ l 體積)於每個例子中係注入於 4 隻小鼠的右後肢腓腸肌(M. gastrocnemius)之中。所得效果是藉由隨著時間測量舉起小鼠時所確認，並藉由 0 至 4 的分數定量(Aoki, K.R.; Toxicon 39 (2001) 1815-1820)。0 的分數是對應於指間外展的最大值，而 4 的分數是對應於完全不具有指間外展之癱瘓的最大值。分數 1、2 或 3 描述這 2 個極值之間的中間狀態。在第 3 圖中，顯示使用 PAS200-rBoNT/A 之指間外展分數檢測的結果。

【0134】 比較例 4:在「小鼠跑步檢測(Mouse Running Assay)」

中的 PAS200-rBoNT/A 之效果作用時間

● 【0135】 基於指間外展分數檢測(請參照範例 3)中所獲得的活性結果，適於相較於呈現平行之標準品(Xeomin[®])的效果作用時間的劑量可被計算出。這是為了應用一等效劑量(亦即是樣品的最大效果)，且標準品(Xeomin[®])應相同。等效劑量的 PAS200-rBoNT/A 或 Xeomin[®]是注入於 8 隻小鼠的腓腸肌中，每隻小鼠已經受過跑步機的訓練。使用這些劑量僅觀察到癱瘓的次

● 最大值，以儘可能排除可能會對於效果作用時間有所影響潛在的全身性效果。滾輪中每天的跑步距離是量測超過 15 天。藉由毒素所導致的癱瘓是以注射前的當日作為 100%，對於時間繪示跑步距離的百分比(請參照第 3 圖)。

● 【0136】 對應於使用 Xeomin 的控制組，PAS200-rBoNT/A 的注射在 4 天之後形成癱瘓的最大值。接續於癱瘓的最大值時期的復原期期間，控制組的跑步距離在 8 天之後達到起始值的 25%，而使用 PAS200-rBoNT/A 的組別僅在 11 天之後達到此數值。因此，癱瘓的效果作用時間係顯著地延長了。

● 【0137】 比較例 5: PAS 化之 A 型肉毒桿菌(PAS100-rBoNT/A)的生成及純化

● 【0138】 PAS100-rBoNT/A 包括一「PAS」模組，「PAS」模組包括 100 個由脯胺酸、絲氨酸及丙胺酸之胺基酸的胺基酸基，如範例 1 之 PAS200-rBoNT/A 所述的方式生成及純化。

● 【0139】 比較例 6: 在「小鼠跑步檢測」中的 PAS100-rBoNT/A

之效果作用時間

【0140】 使用 PAS100-rBoNT/A 的小鼠跑步檢測是如範例 4 所述的方式進行。等效劑量的 PAS100-rBoNT/A 或 Xeomin[®] 是注入於 8 隻小鼠的腓腸肌中，且滾輪中每天的跑步距離是量測超過 15 天。藉由毒素所導致的癱瘓是以注射前的當日作為 100%，對於時間繪示跑步距離的百分比(請參照第 4 圖)。

【0141】 PAS100-rBoNT/A 的注射在 6 天之後形成癱瘓的最大值，使用 Xeomin 處理的控制組在 4 天之後形成癱瘓的最大值。在復原期期間，控制組的跑步距離在觀察到癱瘓之最大值之後(8 天)，於 4 天之後達到起始值的 40%，而使用 PAS100-rBoNT/A 的組別在癱瘓之最大值(11 天)的 5 天之後達到此數值。因此，癱瘓的效果作用時間係顯著地延長了。

【0142】 範例 7：VPASA100 之 A 型肉毒桿菌
(VPASA100-rBoNT/A)的生成及純化

【0143】 VPASA100-rBoNT/A 包括一「VPASA」模組，「VPASA」模組包括 100 個由纈胺酸、脯胺酸、絲氨酸及丙胺酸之胺基酸 20 次重複的胺基酸基(VPASA)₂₀-rBoNT/A)，如範例 1 之 PAS200-rBoNT/A 所述的方式生成及純化。

【0144】 範例 8：VAPSA100 之 A 型肉毒桿菌
(VAPSA100-rBoNT/A)的生成及純化

【0145】 VAPSA100-rBoNT/A 包括一「VAPSA」模組，「VAPSA」模組包括 100 個由纈胺酸、脯胺酸、絲氨酸及丙胺酸之胺基酸 20

次重複的胺基酸基(VAPSA)₂₀-rBoNT/A)，如範例 1 之 PAS200-rBoNT/A 所述的方式生成及純化。

【0146】 範例 9：在「小鼠跑步檢測」中的 VPASA 100-rBoNT/A 之效果作用時間

【0147】 使用 VPASA100-rBoNT/A 的小鼠跑步檢測是如範例 4 所述的方式進行。等效劑量的 VPASA100-rBoNT/A 或 Xeomin[®] 是注入於 8 隻小鼠的腓腸肌中，且滾輪中每天的跑步距離是量測超過 15 天。藉由毒素所導致的癱瘓是以注射前的當日作為 100%，對於時間繪示跑步距離的百分比(請參照第 5 圖)。

【0148】 在復原期期間，使用 VPASA100-rBoNT/A 的組別到達 40%的數值係顯著地晚於控制組。

【符號說明】

【0149】

HC：重鏈

LC：輕鏈

PAS：隨機螺旋區塊

【序列表】

表 1：序列

序列識別號 1:

ASPAAPAPASPAAPAPSAPA

序列識別號 2:

AAPASPAPAAPSAPAPAAPS

序列識別號 3:

APSSPSPSAPSSPSPASPSS

序列識別號 4:

SAPSSPSPSAPSSPSPASPS

序列識別號 5:

SSPSAPSPSSPASPSPPA

序列識別號 6:

AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA

序列識別號 7:

ASAAAPAAASAAASAPSAAA

序列識別號 8: PAS200 rBoNT/A (胺基酸序列)

MGSSHHHHHGS�VPRSSSASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAP
 APASPAAPAPSAPAA
 SPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAP
 ASPAAPAPSAPAA
 SPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAP
 ASPAAPAPSAPAA
 SPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAAPFVNKQ
 FNYKDPVNGVDIAY
 IKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAK
 QVPVSYYDSTYLSTD
 NEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTE
 LKVIDTNCINVIQPD
 GSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIR
 FSPDFTFGFEESLE
 VDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAINPNRVFKVN
 TNAYYEMSGLEVSFE
 ELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIASTLNKAKSIVGT
 TASLQYMKNVFKEKY
 LLS EDTSGKFSVDKLFKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKT
 YLNFDKAVFKINIVPK
 VNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTTEINNMNFTKLKNFTGLFEEF
 YKLLCVRGIITSKAGA
 GKSLVPRGSAGAGALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKG

EEITSDTNIEAAEENIS

LDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGK

KYELDKYTMFHLYR

AQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATE

AAMFLGWVEQLVYDFT

DETSEVSTTDKIADITIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAV

ILLEFIPEIAIPV

LGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSQRNEKWDEVYKYIVTNWL

AKVNTQIDLIRKKMKEA

LENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKA

MININKFLNQCSVSY

LMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRK

DKVNNTLSTDIPFQLSK

YVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGS

KVNFDPIDKNQIQ

LFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNISLNNE

YTIINCMENNSGWK

VSLNYGEIHWTLQDTQEIKQRVVKYSQMINISDYINRWIFVTITN

NRLNNSKIYINGRL

IDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELN

EKEIKDLYDNQSNSG

ILKDFWGDYQLQYDKPYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLK

GPRGSVMTTNIYLNSSLY

RGTKFIIKKYASGNKDNIVRNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQ

AGVEKILSALEIPDVG

NLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNI

AKLVASNWYNRQIERSS

RTLGCSEWEIFVDDGWGERPLGDLVPRGSANSSSVDKLWSHPQF

EK

序列識別號 9: PAS100 rBoNT/A (胺基酸序列)

MGSSHHHHHGS�VPRSSSASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAP

APASPAAPAPSAPAA

SPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAP

ASPAAPAPSAPAA

PFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWI

PERDTFTNPEEGDLNP

PPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGR

MLLTSIVRGIPFWGGS

TIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIHQFECKSF

GHEVLNLTRNGYG

STQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIIH

AGHRLYGIAINPNR

VFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLY

YYNKFKDIASTLNKAK

SIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSKGKFSVDKLFKFDKLYKML

TEIYTEDNFVKFFKVL

NRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQN

TEINNMNFTKLKNFTG
LFEFYKLLCVRGIITSKAGAGKSLVPRGSAGAGALNDLCIKVNN
WDLFFSPSEDNFTNDL
NKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSS
DIIGQLELMPNIE
RFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNP
SRVYTFSSDYVKKVN
KATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITHIIPYIGPAL
NIGNMLYKDDFVGA
LIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSQR
NEKWDEVYKYIVT
NWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEE
KNNINFNIDDLSSKLNE
SINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDAL
LKYIYDNRGTLIGQVD
RLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNL
RYESNHLIDLSRYA
SKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENF
STSFWIRIPKYFNS
ISLNNEYTIINCMENNSGWKVSLNYGEEIWTLQDTQEIKQRVVK
YSQMINISDYINRWI
FVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCR
DTHRYIWIKYFNLF
DKELNEKEIKDLYDNQSNISGILKDFWGDYLYDKPYMLNLYD

PNKYVDVNNVGIRGYMY
 LKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIKKYASGNKDNIVRNDR
 VYINVVVKNKEYRLAT
 NASQAGVEKILSALEIPDVGNSQVVVMKSKNDQGITNKCKMN
 LQDNNGNDIGFIGFHQF
 NNIAKLVASNWYNRQIERSSRTLGCSEFIPVDDGWGERPLGDL
 VPRGSANSSSVDKLWS
 HPQFEK

序列識別號 10: PAS200 rBoNT/A (核酸序列)

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCACCATCATGGTAGCCTGGTTC
 CGCGTAGCTCTTCTGCA
 AGTCCGGCAGCACCGGCACCGGCTTACCAGCTGCACCAGCA
 CCTAGCGCACCGGCAGCA
 TCTCCAGCAGCCCCTGCACCGGCAAGCCCTGCAGCTCCAGCA
 CCGTCAGCACCCAGCAGCA
 AGCCCAGCTGCTCCTGCTCCAGCGAGCCCAGCAGCGCCAGCT
 CCTAGTGCCCCTGCTGCC
 TCTCCTGCTGCTCCGGCACCCAGCAAGTCCTGCTGCGCCTGCAC
 CGAGTGCTCCGGCTGCT
 AGTCCTGCCGCACCAGCTCCGGCTAGTCCAGCTGCTCCAGCC
 CCTTCAGCTCCGGCAGCT
 TCCCCTGCAGCGCCTGCCCTGCCAGTCCAGCGGCTCCTGCA
 CCTAGTGCGCCTGCAGCT

TCACCGGCTGCCCCTGCGCCAGCTTCTCCTGCGGGCTCCAGCTC
CATCTGCCCCAGCCGCA
TCCCCAGCGGCACCAGCTCCAGCTTCTCCGGCAGCGCCAGCA
CCTTCTGCGCCTGCCGCA
TCTCCTGCAGCACCAGCGCCTGCGAGTCCTGCAGCTCCTGCTC
CTTCAGCCCCTGCGGCA
AGTCCAGCAGCACCAGCCCCAGCAAGCCCAGCCGCACCAGC
ACCATCTGCCCCTGCAGCA
CCATTTGTGAACAAGCAGTTTAACTATAAGGACCCGGTGAACG
GTGTGGATATCGCGTAT
ATCAAATCCCGAATGCGGGCCAGATGCAACCAGTCAAGGCG
TTCAAGATTCATAACAAG
ATTTGGGTTATTCCGGAACGTGATACCTTCACCAATCCGGAAG
AAGGCGACTTAAACCCG
CCGCCAGAAGCCAAACAAGTGCCGGTGAGCTACTATGATAGC
ACGTATCTTAGCACCGAT
AATGAAAAAGACAATTACCTGAAGGGCGTGACCAAGTTGTTC
GAGCGCATCTACAGTACC
GACTTAGGCCGCATGTTGTTGACGAGCATCGTTCGCGGTATCC
CGTTCTGGGGCGGCTCG
ACCATTGATACCGAGTTGAAAGTCATTGACACGAACTGTATCA
ATGTTATCCAACCGGAC
GGCAGTTATCGCAGCGAGGAGTTAAATTTGGTCATCATCGGTC
CAAGCGCAGATATTATT

CAGTTCGAATGCAAGAGCTTCGGCCATGAGGTCTTGAATTTGA
CGCGCAACGGTTACGGC
AGCACCCAATACATCCGCTTTAGCCCGGATTTACCTTTGGCT
TCGAGGAGAGCTTGGAG
GTGGACACCAACCCGCTGTTAGGTGCCGGCAAATTCGCAACC
GACCCGGCAGTGACGTTG
GCGCACGAATTGATTCATGCGGGTCACCGCTTATACGGTATCG
CGATCAATCCGAATCGC
GTCTTTAAAGTCAATACCAACGCGTACTACGAAATGAGCGGCT
TAGAGGTTAGCTTTGAA
GAATTACGCACCTTCGGTGGCCACGACGCCAAGTTCATCGAC
AGCCTGCAGGAAAATGAG
TTCCGCTTGTACTATTACAATAAATTCAAGGACATCGCGAGCA
CCTTAAATAAAGCAAAG
AGCATTGTGGGCACCACCGCAAGCTTGCAGTACATGAAGAAC
GTATTTAAGGAAAATAT
TTGTTGTCGGAGGATAACCAGCGGGAAATTCAGCGTCGATAAGC
TGAAATTCGACAAATTG
TATAAAATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGATAACTTCGTCA
AGTTTTTTAAGGTGTTA
AATCGTAAGACCTATTTAAACTTTGATAAAGCGGTGTTTAAA
TTAATATCGTGCCGAAG
GTGAATTACACCATCTACGATGGTTTCAATTTACGCAACACGA
ATCTGGCGGCGAATTTT

AATGGCCAAAACACCGAAATTAACAACATGAACTTTACGAAG
TTAAAGAATTTACGGGC
TTATTCGAATTCTACAAGTTATTATGCGTGCGCGGCATCATTAC
CAGCAAGGCAGGTGCG
GGCAAGTCCTTGGTTCCGCGTGGCAGCGCCGGCGCCGGCGCG
CTCAATGATCTGTGTATT
AAAGTCAATAACTGGGACCTGTTCTTCAGCCCGAGCGAGGAT
AACTTTACCAACGACTTA
AACAAAGGCGAGGAGATCACGAGCGATACGAACATCGAGGCG
GCGGAGGAAAATATTAGC
CTGGACCTCATTACAGCAGTACTATCTGACGTTCAATTTTGACA
ATGAGCCGGAGAACATC
AGCATTGAAAATCTCAGCAGCGACATCATCGGTCAGTTGGAA
CTGATGCCGAACATTGAA
CGCTTTCGGAACGGCAAAAATATGAACTGGACAAGTATACCA
TGTTCCATTACTIONACGC
GCACAGGAATTTGAGCACGGCAAGAGCCGCATTGCGCTGACC
AATAGCGTTAACGAGGCC
TTGTAAATCCGAGCCGTGTCTACACGTTCTTCAGCAGCGATT
ATGTCAAAAAGTGAAC
AAGGCGACCGAAGCCGCGATGTTTTTGGGCTGGGTTCGAGCAA
TTGGTTTACGATTTTACC
GACGAAACCAGCGAGGTGAGCACGACCGACAAAATTGCAGAT
ATCACCATCATCATTCCG

TACATCGGTCCGGCGCTCAATATCGGCAATATGTTATAACAAGGA
CGACTTTGTGGGCGCG
CTGATCTTTAGCGGCGCGGTTATCTTATTAGAATTCATCCCGGA
GATCGCAATCCCGGTC
TTGGGCACCTTTGCGTTGGTGAGCTATATCGCGAATAAAGTGC
TCACGGTCCAAACCATC
GATAACGCGCTCAGCAAGCGTAATGAGAAATGGGACGAGGTT
TATAAGTATATCGTGACC
AACTGGTTAGCAAAAGTCAATACGCAGATCGATCTCATCCGCA
AAAAAATGAAAGAAGCC
TTGGAAAATCAAGCGGAGGCAACCAAAGCCATCATTATTACC
AGTATAACCAATATACC
GAAGAAGAAAAACAATATCAACTTCAATATCGATGATTTGA
GCAGCAAACCTGAACGAG
AGCATTAAACAAGCGATGATTAACATCAACAAGTTCTTGAATC
AATGCAGCGTGAGCTAT
CTCATGAACAGCATGATCCCGTATGGCGTCAAACGCTTGGAAG
ATTTTGACGCCAGCCTG
AAAGATGCGCTCCTCAAGTATATTTATGACAACCGCGGCACCC
TCATTGGCCAGGTGGAC
CGCTTGAAGGATAAAGTGAACAATACGCTCAGCACGGATATCC
CGTTCCAGCTGAGCAAG
TACGTCGACAACCAGCGCTTACTGAGCACCTTTACCGAGTATA
TCAAGAACATCATTAAAT

ACCAGCATCCTCAACTTGCGCTATGAGAGCAATCACCTGATCG
ACCTCAGCCGCTACGCC
AGCAAGATCAACATCGGCAGCAAGGTCAATTTTCGACCCGATC
GATAAGAATCAGATCCAA
TTGTTTAACTGGAAAGCAGCAAGATCGAGGTTATCTTGAAGA
ACGCGATTGTGTACAAC
AGCATGTACGAGAACTTTAGCACGAGCTTCTGGATTCGTATCC
CGAAGTATTTCAATAGC
ATTAGCCTGAATAACGAATATAACCATTATCAACTGCATGGAAAA
TAATAGCGGCTGGAAG
GTGAGCTTAAATTACGGCGAGATCATTGGACCTTACAGGATA
CCCAAGAAATCAAACAG
CGCGTCGTCTTTAAGTATAGCCAGATGATCAACATCAGCGATT
ACATCAACCGCTGGATC
TTCGTGACCATCACCAATAATCGCTTGAATAATAGCAAGATTTA
CATCAATGGTCGCTTG
ATTGATCAAAAACCGATCAGCAATCTCGGTAATATCCATGCCA
GCAATAACATCATGTTT
AAGTTAGACGGTTGCCGCGATACCCACCGCTATATCTGGATCA
AGTATTTTAACTTATTT
GATAAGGAACTCAACGAAAAGGAAATTAAGACTTATATGAC
AATCAGAGCAATAGCGGC
ATCCTGAAGGATTTCTGGGGCGACTACCTGCAGTACGATAAGC
CGTACTATATGTTGAAC

TTGTATGACCCGAACAAATATGTCGATGTGAACAATGTGGGTA
TTCGTGGCTATATGTAC
TTAAAGGGCCCGCGTGGTAGCGTGATGACCACGAATATTTACT
TAAACAGCAGCTTATAC
CGCGGCACGAAGTTTATTATCAAGAAGTATGCCAGCGGCAAC
AAGGACAATATCGTCCGC
ACAACGACCGTGTGTATATTAACGTGGTGGTGAAGAATAAAG
AGTACCGCTTGGCCACG
AATGCGAGCCAGGCGGGCGTGGAAAAATCTTGAGCGCGTTG
GAGATCCCGGACGTCGGC
AACCTCAGCCAGGTTGTGGTGAAGTCTAAAACGACCAG
GGCATCACGAACAAGTGC
AAAATGAATTTGCAAGATAACAACGGCAACGACATCGGCTTTA
TTGGTTTTACAGTTC
AATAACATCGCCAACTCGTGGCCAGCAATTGGTATAACCGCC
AAATTGAACGCAGCAGC
CGCACGCTCGGCTGTAGCTGGGAGTTCATCCCGGTGGACGAT
GGCTGGGGCGAGCGCCCG
CTCGGAGATCTGGTGCCACGCGGTTCCGCGAATTCGAGCTCC
GTCGACAAGCTTTGGAGC
CACCCGCAGTTCGAAAAATAA

序列識別號 11: PAS100 rBoNT/A (核酸序列)

ATGGGTAGCAGCCATCATCATCACCATCATGGTAGCCTGGTTC

CGCGTAGCTCTTCTGCA
AGTCCGGCAGCACCGGCACCGGCTTCACCAGCTGCACCAGCA
CCTAGCGCACCGGCAGCA
TCTCCAGCAGCCCCTGCACCGGCAAGCCCTGCAGCTCCAGCA
CCGTCAGCACCCAGCAGCA
AGCCCAGCTGCTCCTGCTCCAGCGAGCCCAGCAGCGCCAGCT
CCTAGTGCCCCTGCTGCC
TCTCCTGCTGCTCCGGCACCAGCAAGTCCTGCTGCGCCTGCAC
CGAGTGCTCCGGCTGCT
AGTCCTGCCGCACCAGCTCCGGCTAGTCCAGCTGCTCCAGCC
CCTTCAGCCCCTGCAGCA
CCATTTGTGAACAAGCAGTTTAACTATAAGGACCCGGTGAACG
GTGTGGATATCGCGTAT
ATCAAAATCCCGAATGCGGGCCAGATGCAACCAGTCAAGGCG
TTCAAGATTCATAACAAG
ATTTGGGTTATTCCGGAACGTGATACCTTCACCAATCCGGAAG
AAGGCGATTTAAATCCG
CCGCCAGAAGCCAAACAAGTGCCGGTGAGCTACTATGATAGC
ACGTATCTTAGCACCGAT
AATGAAAAAGACAATTACCTGAAGGGCGTGACCAAGTTGTTC
GAGCGCATCTACAGTACC
GACTTAGGCCGCATGTTGTTGACGAGCATCGTTCGCGGTATCC
CGTTCTGGGGCGGCTCG
ACCATTGATACCGAGTTGAAAGTCATTGACACGAACTGTATCA

ATGTTATCCAACCGGAC
GGCAGTTATCGCAGCGAGGAGTTAAATTTGGTCATCATCGGTC
CAAGCGCAGATATTATT
CAGTTCGAATGCAAGAGCTTCGGCCATGAGGTCTTGAATTTGA
CGCGCAACGGTTACGGC
AGCACCCAATACATCCGCTTTAGCCCGGATTTACCTTTGGCT
TCGAGGAGAGCTTGGAG
GTGGACACCAACCCGCTGTTAGGTGCCGGCAAATTCGCAACC
GACCCGGCAGTGACGTTG
GCGCACGAATTGATTCATGCGGGTCACCGCTTATACGGTATCG
CGATCAATCCGAATCGC
GTCTTTAAAGTCAATACCAACGCGTACTACGAAATGAGCGGCT
TAGAGGTTAGCTTTGAA
GAATTACGCACCTTCGGTGGCCACGACGCCAAGTTCATCGAC
AGCCTGCAGGAAAATGAG
TTCCGCTTGTACTATTACAATAAATTCAAGGACATCGCGAGCA
CCTTAAATAAAGCAAAG
AGCATTGTGGGCACCACCGCAAGCTTGCAGTACATGAAGAAC
GTATTTAAGGAAAAATAT
TTGTTGTCGGAGGATACCAGCGGGAAATTCAGCGTCGATAAGC
TGAAATTCGACAAATTG
TATAAAATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGATAACTTCGTCA
AGTTTTTTAAGGTGTTA
AATCGTAAGACCTATTTAAACTTTGATAAAGCGGTGTTTAAAA

TTAATATCGTGCCGAAG
GTGAATTACACCATCTACGATGGTTTCAATTTACGCAACACGA
ATCTGGCGGGCGAATTTT
AATGGCCAAAACACCGAAATTAACAACATGAACTTTACGAAG
TTAAAGAATTTACGGGC
TTATTCTGAATTCTACAAGTTATTATGCGTGCGCGGCATCATTAC
CAGCAAGGCAGGTGCG
GGCAAGTCCTTGGTTCCGCGTGGCAGCGCCGGCGCCGGCGCG
CTCAATGATCTGTGTATT
AAAGTCAATAACTGGGACCTGTTCTTCAGCCCGAGCGAGGAT
AACTTTACCAACGACTTA
AACAAAGGCGAGGAGATCACGAGCGATACGAACATCGAGGCG
GCGGAGGAAAATATTAGC
CTGGACCTCATTACAGCAGTACTATCTGACGTTCAATTTTGACA
ATGAGCCGGAGAACATC
AGCATTGAAAATCTCAGCAGCGACATCATCGGTCAGTTGGAA
CTGATGCCGAACATTGAA
CGCTTTCCGAACGGCAAAAAATATGAACTGGACAAGTATACCA
TGTTCCATTACTTACGC
GCACAGGAATTTGAGCACGGCAAGAGCCGCATFGCGCTGACC
AATAGCGTTAACGAGGCC
TTGTTAAATCCGAGCCGTGTCTACACGTTCTTCAGCAGCGATT
ATGTCAAAAAAGTGAAC
AAGGCGACCGAAGCCGCGATGTTTTTGGGCTGGGTCGAGCAA

TTGGTTTACGATTTTACC
GACGAAACCAGCGAGGTGAGCACGACCGACAAAATTGCAGAT
ATCACCATCATCATTCCG
TACATCGGTCCGGCGCTCAATATCGGCAATATGTTATAACAAGGA
CGACTTTGTGGGCGCG
CTGATCTTTAGCGGCGCGGTTATCTTATTAGAATTCATCCCGGA
GATCGCAATCCCGGTC
TTGGGCACCTTTGCGTTGGTGAGCTATATCGCGAATAAAGTGC
TCACGGTCCAAACCATC
GATAACGCGCTCAGCAAGCGTAATGAGAAATGGGACGAGGTT
TATAAGTATATCGTGACC
AACTGGTTAGCAAAAGTCAATACGCAGATCGATCTCATCCGCA
AAAAAATGAAAGAAGCC
TTGGAAAATCAAGCGGAGGCAACCAAAGCCATCATTAAATTACC
AGTATAACCAATATAACC
GAAGAAGAAAAAACAATATCAACTTCAATATCGATGATTTGA
GCAGCAAACCTGAACGAG
AGCATTAAACAAAGCGATGATTAACATCAACAAGTTCTTGAATC
AATGCAGCGTGAGCTAT
CTCATGAACAGCATGATCCCGTATGGCGTCAAACGCTTGGAAG
ATTTTGACGCCAGCCTG
AAAGATGCGCTCCTCAAGTATATTTATGACAACCGCGGCACCC
TCATTGGCCAGGTGGAC
CGCTTGAAGGATAAAGTGAACAATACGCTCAGCACGGATATCC

CGTTCCAGCTGAGCAAG
TACGTCGACAACCAGCGCTTACTGAGCACCTTTACCGAGTATA
TCAAGAACATCATTAAT
ACCAGCATCCTCAACTTGCGCTATGAGAGCAATCACCTGATCG
ACCTCAGCCGCTACGCC
AGCAAGATCAACATCGGCAGCAAGGTCAATTTCGACCCGATC
GATAAGAATCAGATCCAA
TTGTTTAACCTGGAAAGCAGCAAGATCGAGGTTATCTTGAAGA
ACGCGATTGTGTACAAC
AGCATGTACGAGAACTTTAGCACGAGCTTCTGGATTCGTATCC
CGAAGTATTTCAATAGC
ATTAGCCTGAATAACGAATATAACCATTATCAACTGCATGGAAAA
TAATAGCGGCTGGAAG
GTGAGCTTAAATTACGGCGAGATCATTGGACCTTACAGGATA
CCCAAGAAATCAAACAG
CGCGTCGTCTTTAAGTATAGCCAGATGATCAACATCAGCGATT
ACATCAACCGCTGGATC
TTCGTGACCATCACCAATAATCGCTTGAATAATAGCAAGATTTA
CATCAATGGTCGCTTG
ATTGATCAAAAACCGATCAGCAATCTCGGTAATATCCATGCCA
GCAATAACATCATGTTT
AAGTTAGACGGTTGCCGCGATACCCACCGCTATATCTGGATCA
AGTATTTTAACTTATTT
GATAAGGAACTCAACGAAAAGGAAATTAAGACTTATATGAC

AATCAGAGCAATAGCGGC
ATCCTGAAGGATTTCTGGGGCGACTACCTGCAGTACGATAAGC
CGTACTATATGTTGAAC
TTGTATGACCCGAACAAATATGTTCGATGTGAACAATGTGGGTA
TTCGTGGCTATATGTAC
TTAAAGGGCCCGCGTGGTAGCGTGATGACCACGAATATTTACT
TAAACAGCAGCTTATAC
CGCGGCACGAAGTTTATTATCAAGAAGTATGCCAGCGGCAAC
AAGGACAATATCGTCCGC
AACAACGACCGTGTGTATATTAACGTGGTGGTGAAGAATAAAG
AGTACCGCTTGGCCACG
AATGCGAGCCAGGCGGGCGTGGA AAAAATCTTGAGCGCGTTG
GAGATCCCGGACGTCGGC
AACCTCAGCCAGGTTGTGGTGATGAAGTCTAAAAACGACCAG
GGCATCACGAACAAGTGC
AAAATGAATTTGCAAGATAACAACGGCAACGACATCGGCTTTA
TTGGTTTTTCACCAGTTC
AATAACATCGCCAAACTCGTGGCCAGCAATTGGTATAACCGCC
AAATTGAACGCAGCAGC
CGCACGCTCGGCTGTAGCTGGGAGTTCATCCCGGTGGACGAT
GGCTGGGGCGAGCGCCCG
CTCGGAGATCTGGTGCCACGCGGTTCCGCGAATTCGAGCTCC
GTCGACAAGCTTTGGAGC
CACCCGCAGTTCGAAAAATAA

序列識別號 12: VPASA100

VPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAV
PASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVP
ASAVPASA

序列識別號 13: VAPSA100

VAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAV
PSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSA
AVAPSA

序列識別號 14: VPASA100-rBoNT/A (胺基酸序列)

MGSSHHHHHGGSLVPRSVPASAVPASAVPASAVPASAVPA
SAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPAS
AVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAPFVNKQFNKDPVNGVDIA
YIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEA
KQVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLT
SIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGP
SADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEV
DTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAINPNRVFKVNT
NAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKF
DIASLTKAKSIVGTTASLQYMKNVFKKYLKLLSEDTSGKFSV
DKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVP

KVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFTKLKNFTGLF
 EFYKLLCVRGIITSKAGAGKSLVPRGSAGAGALNDLCIKVNNWD
 LFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFN
 FDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFH
 YLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNK
 ATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALN
 IGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKV
 LTVQTIIDNALSQRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKM
 KEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESI
 NKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLDFDASLKDALL
 KYIIDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLS
 TFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDK
 NQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISL
 NNEYTIINCMENNSGWKVSLNYGEIIWTLQDTQEIKQRVVFKYS
 QMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIH
 ASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQS
 NSGILKDFWGDYLQYDKPYYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYM
 YLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNND
 RVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNSLQVVV
 MKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNAKLVASN
 WYNRQIERSSRTLGCSEFIPVDDGWGERPLGDLVPRGSANSSS
 VDKLWSHPQFEK

序列識別號 15: VAPSA100-rBoNT/A (胺基酸序列)

NNEYTIINCMENNSGWKVSLSNYGEIHWTLQDTQEIKQRVVKYS
QMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIH
ASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQS
NSGILKDFWGDYLQYDKPYYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYM
YLGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNND
RVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVV
MKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNIAKLVASN
WYNRQIERSSRTLGCSEFIPVDDGWGERPLGDLVPRGSANSSS
VDKLWSHPQFEK

【發明申請專利範圍】

【第 1 項】一種重組梭菌神經毒素，包括一隨機螺旋區塊，其中 (i) 該隨機螺旋區塊是由 $(\text{Xaa})_x \cdot [(\text{P,A,S})_y \cdot (\text{Xaa})\text{-}]_z (\text{P,A,S})_y \cdot (\text{Xaa})_x$ 的胺基酸序列所組成，其中 Xaa 是獨立選自於任何天然之胺基酸基的胺基酸基，提供於 $[(\text{P,A,S})_y \cdot (\text{Xaa})\text{-}]_z$ 中之至少一 Xaa 是不同於丙胺酸(alanine)、絲氨酸(serine)、脯胺酸(proline)基；特別是，其中 Xaa 是纈胺酸(valine)；(P,A,S)代表獨立選自於丙胺酸(A)、絲氨酸(S)、脯胺酸(P)基的胺基酸基；x 是獨立選自於 0 及 1 的數字；y 是獨立選自於 3 及 4 的數字；z 是 9 或大於 9；特別是，z 是介於 9 與 750 之間的數字；或者

其中(ii)該隨機螺旋區塊是由丙胺酸、絲氨酸、及脯胺酸基所組成；或者

其中(iii)該隨機螺旋區塊包括複數個胺基酸重複，其中該些胺基酸重複是由丙胺酸、絲氨酸、及脯胺酸基所組成，且其中不大於 6 個連續的胺基酸基是相同的。

【第 2 項】如申請專利範圍第 1 項所述之重組梭菌神經毒素，其中該隨機螺旋區塊包括由至少 50 個胺基酸基所組成的形成隨機螺旋構形之胺基酸序列，特別是介於 50 與 3000 個胺基酸基之間，更特別是介於 60 與 500 個胺基酸基之間，更特別是介於 70 與 260 個胺基酸基之間，更特別是介於 80 與 240 個胺基酸基之間，更特別是介於 90 與 220 個胺基酸基之間，特別是 100 個胺

氨基酸，150 個胺基酸基，或 200 個胺基酸基。

【第 3 項】如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之重組梭菌神經毒素，其中包括在該隨機螺旋區塊中的脯胺酸基構成該隨機螺旋區塊之胺基酸的大於 4%且小於 40%。

【第 4 項】如申請專利範圍第 1 至 3 項之任一項所述之重組梭菌神經毒素，其中該隨機螺旋區塊包括選自由(VPASA)₂₀ (序列識別號: 12)及(VAPSA)₂₀ (序列識別號: 13)所組成之群組的至少一胺基酸序列，或者是以該至少一胺基酸序列作為整體或部分之該至少一胺基酸序列的環狀置換形式(circular permuted version)或多聚體(multimer)(特別是(VPASA)₂₀ (SEQ ID NO: 12))。

【第 5 項】如申請專利範圍第 1 至 4 項之任一項所述之重組梭菌神經毒素，其中該隨機螺旋區塊是插入於(i)該重組梭菌神經毒素之輕鏈的 N 端；(ii)該重組梭菌神經毒素之輕鏈的 C 端；(iii)該重組梭菌神經毒素之重鏈的 N 端；或(iv)該重組梭菌神經毒素之重鏈的 C 端，特別是在該重組梭菌神經毒素的輕鏈的 N 端。

【第 6 項】如申請專利範圍第 1 至 5 項之任一項所述之重組梭菌神經毒素，其中該梭菌神經毒素的序列是選自於下列的序列：
(i)A、B、C、D、E、F 及 G 血清型肉毒桿菌(*Clostridium botulinum*)神經毒素，特別是 A、C 及 E 血清型肉毒桿菌神經毒素，更特別是 A 血清型肉毒桿菌神經毒素，或者是(ii)來自(i)之肉毒桿菌神經毒素之功能變異體(functional variant)的序列，或者是(iii)來自嵌合肉毒桿菌神經毒素的序列，其中該重組梭菌神經毒素的輕鏈

及重鏈是來自於不同血清型的梭菌神經毒素；特別是其中該重組梭菌神經毒素具有包括在 SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15 所找到的胺基酸序列的輕鏈及重鏈。

【第 7 項】如申請專利範圍第 1 至 6 項之任一項所述之重組梭菌神經毒素，其中該重組梭菌神經毒素相對於不具有該隨機螺旋區塊之相同的梭菌神經毒素而言顯示增加的效果作用時間，例如是其中增加的效果作用時間是由於增加的生物半衰期。

【第 8 項】如申請專利範圍第 1 至 7 項之任一項所述之重組梭菌神經毒素，用於需要改善的神經阻斷作用的疾病的治療，其中該重組梭菌神經毒素相對於不具有該隨機螺旋區塊之相同的梭菌神經毒素而言造成較延長的神經阻斷作用。

【第 9 項】一種包括如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述之重組梭菌神經毒素的醫藥組合物。

【第 10 項】一種包括如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述之重組梭菌神經毒素於美容治療的使用。

【第 11 項】一種根據如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述之重組梭菌神經毒素的形成方法，包括藉由將編碼該隨機區塊之核酸序列插入於編碼一親代梭菌神經毒素的核酸序列中所獲得之編碼一重組單鏈前驅物梭菌神經毒素的一重組核酸序列的步驟，特別是其中該方法更包括在宿主細胞中異源表現該重組核酸序列的步驟，更特別是在細菌的宿主細胞中，最特別是在大腸桿菌的宿主細胞中。

【第 12 項】一種雙硫鍵鏈接雙鏈的梭菌神經毒素之重組單鏈梭菌神經毒素前驅物，包括一具有功能活性之梭菌神經毒素的輕鏈，一具有功能活性之神經毒素的重鏈，一使用重鏈的 N 端鏈接輕鏈的 C 端的環區，以及如申請專利範圍第 1 項所定義的隨機螺旋區塊，特別是其中該梭菌神經毒素的序列是選自於下列的序列：(i)A、B、C、D、E、F 及 G 血清型肉毒桿菌神經毒素，特別是 A、C 及 E 血清型肉毒桿菌神經毒素，更特別是 A 血清型肉毒桿菌神經毒素，或者是(ii)來自(i)之肉毒桿菌神經毒素之功能變異體(functional variant)的序列，或者是(iii)來自嵌合肉毒桿菌神經毒素的序列，其中該梭菌神經毒素的輕鏈及重鏈是來自於不同血清型的梭菌神經毒素；特別是其中該重組梭菌神經毒素具有包括在 SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15 所找到的胺基酸序列的輕鏈及重鏈。

【第 13 項】一種編碼如申請專利範圍第 12 項所述之重組單鏈梭菌神經毒素前驅物之核酸序列。

【第 14 項】一種獲得如申請專利範圍第 13 項之核酸序列的方法，包括將編碼該隨機螺旋區塊的核酸序列插入於編碼一親代梭菌神經毒素的核酸序列中的步驟。

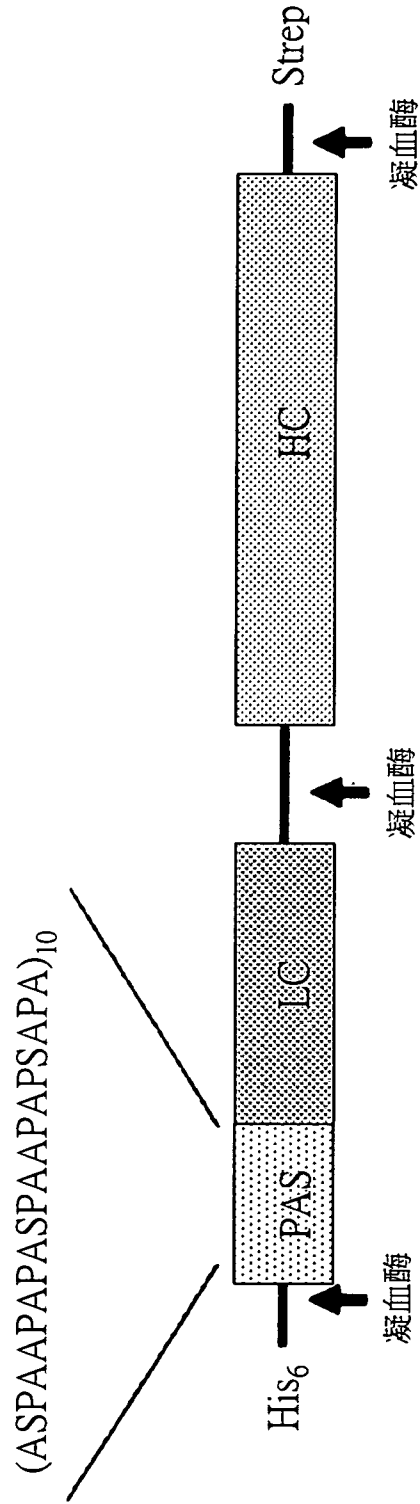
【第 15 項】一種載體，包括如申請專利範圍第 13 項所述之核酸序列，或如申請專利範圍第 14 項之方法所獲得的核酸序列。

【第 16 項】一種重組宿主細胞，包括如申請專利範圍第 13 項所述之核酸序列、藉由申請專利範圍第 14 項之方法所獲得的

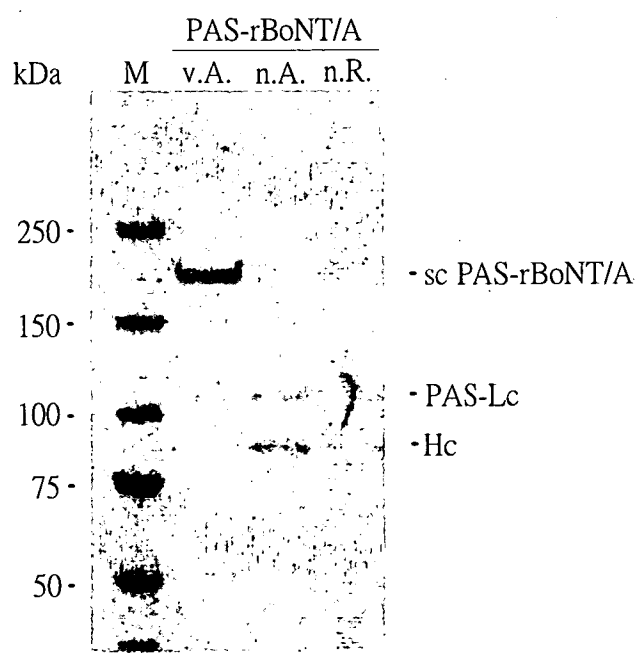
核酸序列、或申請專利範圍第 15 項的載體。

【第 17 項】一種如申請專利範圍第 12 項所述之重組單鏈前驅物梭菌神經毒素的形成方法，包括表現如申請專利範圍第 13 項所述之核酸序列的步驟，或藉由如申請專利範圍第 14 項所述之方法所獲得的核酸序列，或在一重組宿主細胞中之如申請專利範圍第 15 項所述的載體，或在造成該核酸序列表現的情況之下培養如申請專利範圍第 16 項所述之重組宿主細胞。

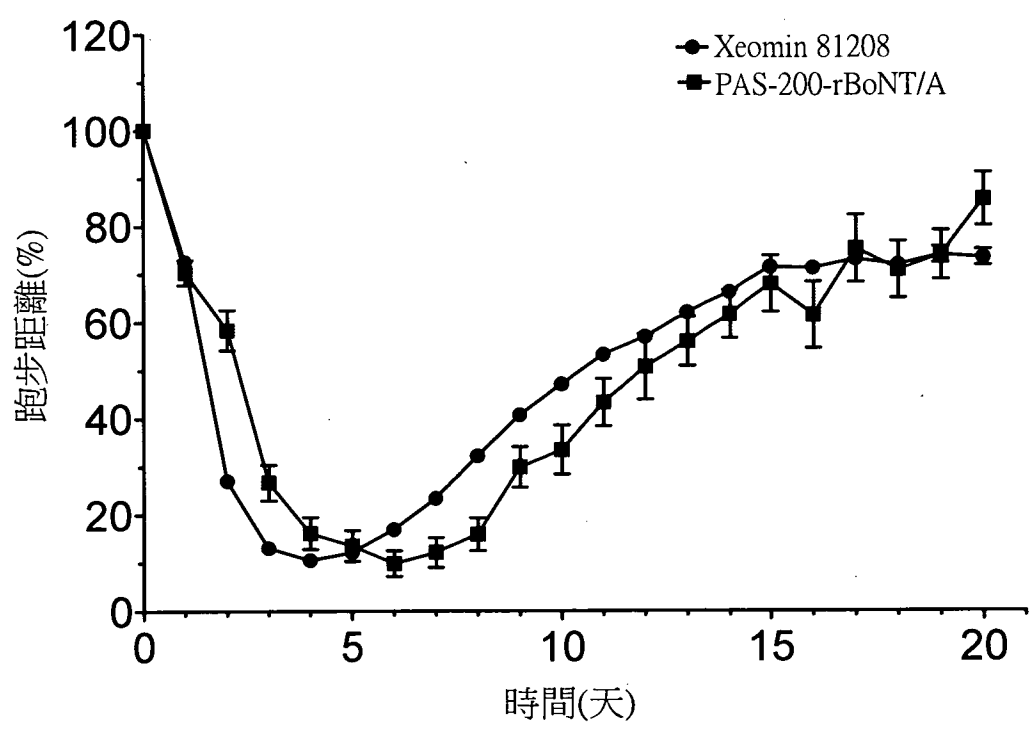
【發明圖式】



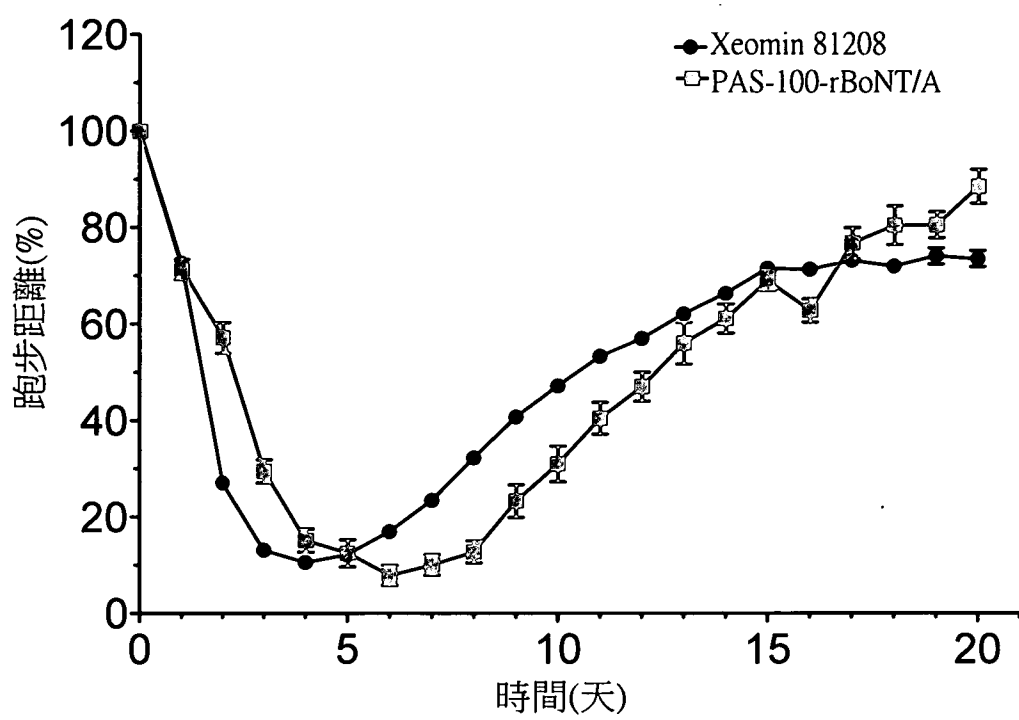
第1圖



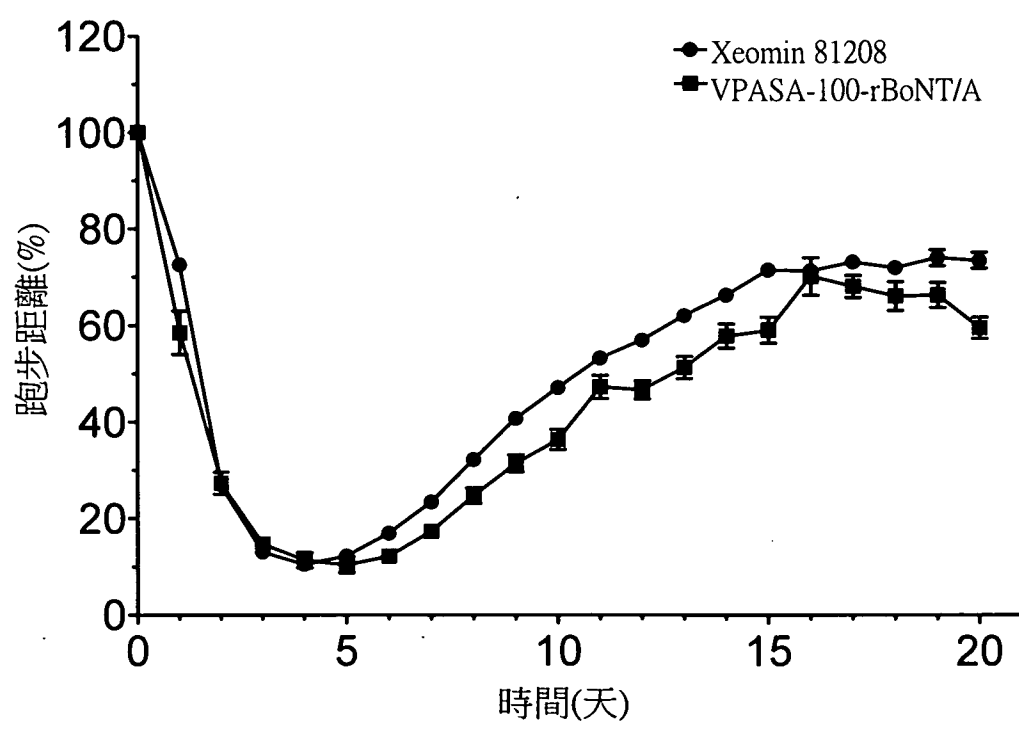
第 2 圖



第 3 圖



第 4 圖



第 5 圖

發明摘要

※ 申請案號：105118055

※ 申請日：

※IPC 分類：

C07K 14/33 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

重組梭菌神經毒素及其使用與形成方法、包括其之醫藥組合物及對應其之前驅物、編碼前驅物之核酸序列及其獲得方法與前驅物之形成方法、載體與包括核酸序列之重組宿主細胞

/RECOMBINANT CLOSTRIDIAL NEUROTOXIN, A USE THEREOF, AND A METHOD FOR GENERATING THE SAME, A PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING THE SAME AND A PRECURSOR CORRESPONDING TO THE SAME, A NUCLEIC ACID SEQUENCE ENCODING THE PRECURSOR AND A METHOD FOR OBTAINING THE NUCLEIC ACID SEQUENCE, A METHOD FOR PRODUCING THE PRECURSOR, A VECTOR AND A RECOMBINANT HOST CELL COMPRISING THE NUCLEIC ACID SEQUENCE

【中文】

本發明是有關於一種呈現增加的效果作用時間之新型重組梭菌神經毒素，以及此類重組梭菌神經毒素的製造方法。這些新型重組梭菌神經毒素包括一隨機螺旋區塊，且此方法包括將用於編碼一隨機螺旋區塊的核酸序列插入於用於編碼一親代梭菌神經毒素之核酸序列中的步驟，以及在宿主細胞中表現包括此隨機

螺旋區塊編碼序列之重組核酸序列的步驟。本發明更有關於使用在這類方法中之新型重組單鏈前驅物梭菌神經毒素，編碼此類重組單鏈前驅物梭菌神經毒素的核酸序列，以及包括具有增加的效果作用時間之重組梭菌神經毒素的醫藥組合物。

【英文】

This invention relates to novel recombinant clostridial neurotoxins exhibiting increased duration of effect and to methods for the manufacture of such recombinant clostridial neurotoxins. These novel recombinant clostridial neurotoxins comprise a random coil domain, and the methods comprise the steps of inserting a nucleic acid sequence coding for a random coil domain into a nucleic acid sequence coding for a parental clostridial neurotoxin and expression of the recombinant nucleic acid sequence comprising the random coil domain-coding sequence in a host cell. The invention further relates to novel recombinant single-chain precursor clostridial neurotoxins used in such methods, nucleic acid sequences encoding such recombinant single-chain precursor clostridial neurotoxins, and pharmaceutical compositions comprising the recombinant clostridial neurotoxin with increased duration of effect.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

HC：重鏈

LC：輕鏈

PAS：隨機螺旋區塊



【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

重組梭菌神經毒素及其使用與形成方法、包括其之醫藥組合物及對應其之前驅物、編碼前驅物之核酸序列及其獲得方法與前驅物之形成方法、載體與包括核酸序列之重組宿主細胞

/RECOMBINANT CLOSTRIDIAL NEUROTOXIN, A USE

THEREOF, AND A METHOD FOR GENERATING THE SAME, A PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING THE SAME AND A PRECURSOR CORRESPONDING TO THE SAME, A NUCLEIC ACID SEQUENCE ENCODING THE PRECURSOR AND A METHOD FOR OBTAINING THE NUCLEIC ACID SEQUENCE, A METHOD FOR PRODUCING THE PRECURSOR, A VECTOR AND A RECOMBINANT HOST CELL COMPRISING THE NUCLEIC ACID SEQUENCE

【技術領域】

【0001】 本發明是有關於一種呈現增加的效果作用時間之新型重組梭菌神經毒素(recombinant clostridial neurotoxin)以及此種重組梭菌神經毒素的製造方法。這些新型重組梭菌神經毒素包括一隨機螺旋區塊(random coil domain)，且製造方法包括將編碼一隨機螺旋區塊之核酸序列插入編碼一親代梭菌神經毒素之核酸序列的步驟，以及包括隨機螺旋區塊編碼序列之重組核酸序列在

宿主細胞中的表現。本發明更有關於使用在此種方法中的新型重組單鏈前驅物梭菌神經毒素，以及具有增加的效果作用時間之包括重組梭菌神經毒素的醫藥組合物。

【先前技術】

【0002】 梭菌屬(*Clostridium*)是厭氧性葛蘭氏陽性細菌的一個屬別，屬於厚壁菌門(*Firmicutes*)。梭菌屬大約是由 100 個種(*species*)所組成，包括常見的游離性細菌(*free-living bacteria*)以及重要的病原體，例如是肉毒桿菌(*Clostridium botulinum*)及破傷風梭菌(*Clostridium tetani*)。這兩種菌分別產肉毒桿菌毒素及破傷風毒素的神經毒素。這些神經毒素為神經細胞之鈣依存型神經傳導物質分泌(*calcium-dependent neurotransmitter secretion*)的有效抑制劑，且在已知對於人類最強力的毒素之中。對於人類的致死劑量係在 0.1 奈克(*ng*)每公斤體重及 1 奈克每公斤體重之間。

【0003】 透過被汙染的食物口服肉毒桿菌毒素或在傷口產生肉毒桿菌毒素可能會導致肉毒桿菌中毒(*botulism*)。肉毒桿菌中毒的特徵為各種肌肉的癱瘓。呼吸肌肉的癱瘓可能導致被感染的個體死亡。

【0004】 雖然肉毒桿菌神經毒素(*BoNT*)及破傷風梭菌神經毒素(*TxNT*)的功能是透過類似的起始病理機轉的作用，抑制神經傳導物質由被感染的神經的軸突釋放至突觸中，兩者的臨床反應卻有所不同。肉毒桿菌毒素作用於周邊神經系統中的神經肌肉連接(*neuromuscular junction*)及其他膽鹼素突觸(*cholinergic*)

synapse)，抑制神經傳導物質乙醯膽鹼(acetylcholine)的釋放，因而導致鬆弛性癱瘓(flaccid paralysis)；而破傷風毒素主要作用於中樞神經系統，藉由小突觸小泡蛋白(synaptobrevin)的降解防止抑制性神經傳導物質伽馬-胺基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA)及甘胺酸(glycine)的釋放。肌肉中所造成的過度反應導致促效劑(agonist)及拮抗劑(antagonist)肌系(musculature)的全身性收縮，稱為破傷風性痙攣(tetanic spasm)(劇烈的癱瘓)。

● 【0005】 破傷風神經毒素存在於一免疫相異的類型中；而肉毒桿菌神經毒素已知為發生於 7 種不同的免疫類型中，稱為 A 型肉毒桿菌神經毒素(BoNT/A)至 G 型肉毒桿菌神經毒素 BoNT/G。大部分肉毒桿的品系產生一種神經毒素，然亦曾經有品系產生多種毒素的文獻描述。

● 【0006】 肉毒桿菌及破傷風神經毒素具有高度的同源胺基酸序列，且顯示相似的區塊(domain)結構。兩者的生物活性形式包括 2 個肽鏈(藉由雙硫鍵(disulfide bond)所鏈接的約 50 kDa 的輕鏈(light chain)及約 100 kDa 的重鏈(heavy chain))。長度在不同的梭菌毒素中有所不同的鏈接區(linker region)或環區(loop region)是位於形成雙硫鍵之 2 個半胱胺酸基(cysteine residue)之間。此環區是藉由未知的梭菌蛋白質內切酶進行蛋白質水解所切割，以獲得具有生物活性的毒素。

【0007】 肉毒桿菌神經毒素及破傷風梭菌神經毒素造成中毒的分子機轉亦類似：進入標的神經是藉由重鏈的 C 端部分結合於

特定的細胞表面受體。毒素接著藉由受體媒介式胞吞作用 (receptor-mediated endocytosis) 所接受。所形成的胞內體 (endosome) 中的低 pH 值接著引發梭菌毒素中的構型改變，使得梭菌毒素本身能夠嵌入胞內體膜，並透過胞內體膜轉移至細胞質中，其中接合重鏈及輕鏈的雙硫鍵係減少。輕鏈可接著切割所謂的 SNARE 蛋白，SNARE 蛋白對於神經傳導物質釋放於突觸間隙中的不同步驟是必須的(例如是以細胞膜進行含有神經傳導物質之泡囊(vesicle)的辨識、對接(docking)及融合(fusion))。破傷風梭菌神經毒素、B 型肉毒桿菌神經毒素(BoNT/B)、D 型肉毒桿菌神經毒素(BoNT/D)、F 型肉毒桿菌神經毒素(BoNT/F)、G 型肉毒桿菌神經毒素(BoNT/G)造成小突觸小泡蛋白或泡囊相關膜蛋白 (vesicle-associated membrane protein, VAMP) 的蛋白水解切割。A 型肉毒桿菌神經毒素及 E 型肉毒桿菌神經毒素切割細胞膜相關蛋白-25(plasma membrane-associated protein-25, SNAP-25)，且 C 型肉毒桿菌神經毒素(BoNT/C)切割整體的膜蛋白 syntaxin 及 SNAP-25。

【0008】 梭菌神經毒素依據血清型呈現不同的效果作用時間。A 型肉毒桿菌神經毒素的臨床治療效果對於神經肌肉疾病持續約 3 個月，對於多汗症(hyperhidrosis)持續 6 至 12 個月。另一方面，E 型肉毒桿菌神經毒素的效果持續小於 4 週。A 型肉毒桿菌神經毒素維持較長的治療效果，相較於其他血清型(例如是血清型 B、C₁、D、E、F 及 G)而言更偏好於臨床上使用。對於效果作用時間

不同之可能的一個解釋為肉毒桿菌神經毒素之血清型的不同的次細胞定位(subcellular localization)。A型肉毒桿菌神經毒素之輕鏈的蛋白酶區塊是以點狀方式(punctate manner)位在神經細胞的細胞膜，與基質 SNAP-25 共位。相對地，效果作用時間短的 E 型肉毒桿菌神經毒素係位於細胞質。膜之相關性可能保護 A 型肉毒桿菌神經毒素免於受到細胞質的降解機制，使得 A 型肉毒桿菌毒素在神經細胞中能夠持續較久。

● 【0009】 在肉毒桿菌中，肉毒桿菌毒素係形成為蛋白質複合體，包括神經毒性組成及非毒性蛋白。輔助蛋白(accessory protein)嵌有神經毒性組成，因而保護神經毒性組成免於受到胃腸道中消化酵素的降解。因此，大部分血清型的肉毒桿菌神經毒素在口服的情況下仍具有毒性。複合體(例如是 450 kDa 或 900 kDa)可藉由肉毒桿菌的培養所獲得。

● 【0010】 近年來，肉毒桿菌神經毒素已作為緊張不全(dystonia)及痙攣(spasm)的治療藥劑。包括肉毒桿菌毒素複合體的製備在商業上係可獲得，例如是由益普生股份有限公司(Ipsen Ltd)(麗舒妥(Dysport®))或愛力根藥品股份有限公司(Allergan Inc.)(保妥適(Botox®))所獲得。不具任何複合蛋白之高純度的神經毒性組成可例如是由法蘭克福(Frankfurt)的梅茲製藥有限兩合公司(Merz Pharmaceuticals GmbH)(Xeomin®)所獲得。

● 【0011】 梭菌神經毒素通常係注入於受到影響的肌肉組織中，將藥劑帶到接近於神經肌肉終板(end plate)，亦即是接近於引導接

受至控制此受影響之肌肉的神經細胞之中的細胞受體。不同程度的神經毒素的散布(spread)已受到關注。神經毒素的散布被認為是取決於注入的量及特別的神經毒素製備。神經毒素可能造成劇烈的副作用(例如是附近肌肉組織中的癱瘓)，而這大部分可藉由降低注射量至治療上相應的程度所避免。劑量過量亦可引發免疫系統產生中和抗體(neutralizing antibody)，中和抗體使神經毒素失去活性，防止不隨意肌之活性的緩解。對於肉毒桿菌毒素的免疫耐受度已顯示為關聯於累積的劑量。

【0012】 目前，梭菌神經毒素主要仍使用合適的梭菌品係藉由發酵過程所產生。然而，由厭氧的梭菌培養的梭菌神經毒素之工業製造是難處理(cumbersome)且耗時的過程。由於最終產物的高度毒性，過程必須是在嚴格的控制之下所進行。在發酵過程期間，單鏈前驅物係藉由未知的梭菌蛋白酶所水解切割，以獲得具有生物活性的雙鏈梭菌神經毒素。藉由蛋白酶水解切割所形成的神經毒素活性的程度係由於不同的品系及神經毒素之血清型所變化，由於神經毒素之製備需要具有明確定義的生物活性，神經毒素活性的程度在製造上是主要的考量。再者，在使用梭菌品系進行發酵過程的期間，是產生為蛋白質複合體的梭菌神經毒素，其中神經毒性組成是藉由輔助蛋白所嵌入。這些輔助蛋白對於生物活性或效果作用時間並不具有有益的效果。然這些輔助蛋白可引發患者的免疫反應，造成對抗於梭菌神經毒素的免疫。沒有藉由輔助蛋白所嵌入的重組梭菌神經毒素的製造可因而具有優

點。

【0013】 本領域中已知在大腸桿菌(*E. coli*)中梭菌神經毒素之重組表現的方法(請參照例如是 WO 00/12728、WO 01/14570 或 WO 2006/076902)。又，梭菌神經毒素已表現於真核表現系統中，例如是嗜甲醇酵母菌(*Pichia pastoris*)、嗜甲醇畢赤氏酵母(*Pichia methanolica*)、釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、昆蟲細胞及哺乳類細胞(請參照 WO 2006/017749)。

● 【0014】 重組的梭菌神經毒素可表現為單鏈前驅物，接著須受到蛋白水解切割以獲得最終的生物活性梭菌毒素。因此，梭菌神經毒素可以高產率於快速生長的細菌中表現為相對非毒性的單鏈多肽類。

● 【0015】 又，依據生物活性、細胞特異性、抗原潛力及效果作用時間藉由基因工程修飾梭菌神經毒素之特徵，以在特定的臨床領域中獲得具有新的治療特性的重組神經毒素可能是有益的。梭菌神經毒素的基因修飾可改變作用的模式或擴展治療標的的範圍。

● 【0016】 WO 96/39166 揭露肉毒桿菌毒素的同功異構物，包括對於神經肌肉組織的降解具有更高持久性的胺基酸基。

● 【0017】 基於 WO 02/08268 之專利家族(包括專利家族 US 6,903,187)揭露一種梭菌神經毒素，包括選自於白胺酸基之模體(leucine-based motif)的加成(addition)或刪除(deletion)的結構修飾，這改變神經毒素之生物持久性(請參照: Fernández-Salas et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (2004) 3208-3213; Wang et al., J. Biol. Chem. 286 (2011) 6375-6385)。Fernández-Salas 等人起初假設增加之持久性係由於白胺酸模體之膜結合特性所致(請參照上文 Fernández-Salas 等人的文獻所引用之處第 3211 及 3213 頁)。Wang 等人提到這理論(請參照上文所引用之 Wang 等人的文獻第 6376 頁左欄最後整個段落，以及第 6383 頁「討論」的第一個整個段落)，然較偏好於其他的理論：保護藉由蛋白質水解的降解(請參照上文 Wang 等人的文獻所引用之處第 6384 頁左欄第 27ff 行)。

【0018】 US 2002/0127247 描述梭菌神經毒素，包括在第二修飾位置(secondary modification site)的修飾及呈現改變的生物持久性。

【0019】 由於對於肉毒桿菌毒素的免疫耐受性係有關於累積的劑量，為了降低給藥頻率及產生中和抗體的情況，相較於自然產生的肉毒桿菌毒素，變異之肉毒桿菌毒素在神經肌肉組織中呈現更長的半衰期可能是有利的。

【0020】 又，若自然呈現短期作用之肉毒桿菌神經毒素的血清型能夠增加其生物持久性，可有潛力地使用在臨床應用上。經修飾的 E 型肉毒桿菌神經毒素具有增長的作用時期，能夠有潛力地使用於對於 A 型肉毒桿菌神經毒素呈現免疫反應的患者中。再者，E 型肉毒桿菌神經毒素相較於 A 型肉毒桿菌神經毒素顯示為誘發更多由感測神經神經元(sensory neuron)所釋放的一群嚴重的

疼痛介質。在 A 型肉毒桿菌神經毒素僅在部分子集的病患中提供僅有部分疼痛緩解(例如是在頭痛的治療中)的臨床應用中，或者是在已發現 E 型肉毒桿菌神經毒素較 A 型肉毒桿菌神經毒素有效但僅給予短期的治療(例如是治療癲癇)的臨床應用中，具有增長的效果作用時間之 E 型肉毒桿菌神經毒素可證實為有效的。

● **【0021】** 為了能夠給藥頻率的降低以及肉毒桿菌神經毒素之血清型之治療潛力的開發，對於具有增長的效果作用時間之梭菌神經毒素具有強烈的需求，由於個別臨床有關效果之半衰期，目前對於臨床應用是被視為不實際的。理想地，特定的梭菌肉毒桿菌神經毒素之效果作用時間可以量身訂製之方式(*tailor-made fashion*)被調整，以提出所給指示(例如是神經毒素的用量，給藥的頻率等等)之任何特定的特徵及需求。至今，這些方面還沒獲得令人滿意解決方式。

● **【發明內容】**

● **【0022】** 本發明的目的是提供一呈現增加的效果作用時間之重組梭菌神經毒素，以及建立此種重組梭菌神經毒素之可靠且準確的製造方法。此方法及使用於此方法中新型前驅物梭菌神經毒素可滿足對於呈現增加之效果作用時間之重組梭菌神經毒素的大量需求。

【0023】 天然的不同血清型的肉毒桿菌毒素呈現高度相異的效果作用時間，這可能是由於他們不同的次細胞定位所致。

BoNT/A 呈現最長的持續性，且位在神經細胞的細胞膜的鄰近處，而短期的 BoNT/E 血清型是位於細胞質。然而，另外的因子(例如是降解、擴散(diffusion)及/或轉移(translocation)速率可能是造成個別的肉毒桿菌神經血清型在效果作用時間上有所不同的決定性影響。

【0024】 目前，並沒有修飾梭菌神經毒素以增加其效果作用時間的通用方法。令人驚訝的是，現已發現具有此種效果的重組梭菌神經毒素可藉由將編碼一隨機螺旋區塊(random coil domain)的序列選殖(clone)進入親代梭菌神經毒素(parental clostridial neurotoxin)的基因中，並接續在重組的宿主細胞中進行所產生的構成物(construct)之異源表現(heterologous expression)。

【0025】 因此，在一方面，本發明是有關於包括一隨機螺旋區塊的重組梭菌神經毒素。

【0026】 在一特別的實施例中，本發明是有關於包括一隨機螺旋區塊的重組梭菌神經毒素，其中(i)此隨機螺旋區塊是由 $(Xaa)_x-[(P,A,S)_y-(Xaa)-]_z-(P,A,S)_y-(Xaa)_x$ 的胺基酸序列所組成，其中 Xaa 是獨立選自於任何天然之胺基酸基的胺基酸基，提供於 $[(P,A,S)_y-(Xaa)-]_z$ 中之至少一 Xaa 是不同於丙胺酸(alanine)、絲氨酸(serine)、脯胺酸(proline)基。特別是，其中 Xaa 是纈胺酸(valine)。(P,A,S)代表獨立選自於丙胺酸(A)、絲氨酸(S)、脯胺酸(P)基的胺基酸基。x 是獨立選自於 0 及 1 的數字。y 是獨立選自於 3 及 4 的數字。z 是 9 或大於 9。特別是，z 是介於 9 與 750 之間的數字。

【0027】 在另一方面，本發明是有關於包括本發明之重組梭菌神經毒素的醫藥組合物。

【0028】 在另一方面，本發明是有關於本發明之組合物於美容治療的使用。

【0029】 在另一方面，本發明是有關於本發明之重組梭菌神經毒素的形成方法，包括藉由將編碼此隨機螺旋區塊(特別是根據本發明的隨機螺旋區塊)的核酸序列之插入於編碼一親代梭菌神經毒素的核酸序列之中所獲得之編碼一重組單鏈前驅物梭菌神經毒素的重組核酸序列的步驟。

【0030】 在另一方面，本發明是有關於包括一隨機螺旋區塊(特別是根據本發明之一隨機螺旋區塊)的重組單鏈前驅物梭菌神經毒素。

【0031】 在另一方面，本發明是有關於獲得本發明之核酸序列的方法，包括將編碼一隨機螺旋區塊(特別是根據本發明之隨機螺旋區塊)之核酸序列插入於編碼一親代梭菌神經毒素的核酸序列中的步驟。

【0032】 在另一方面，本發明是有關於包括本發明之核酸序列的載體，或者是藉由本發明之方法所能獲得的核酸序列。

【0033】 在另一方面，本發明是有關於包括本發明之核酸序列的重組宿主細胞，藉由本發明之方法所能獲得的核酸序列，或本發明之載體。

【0034】 在另一方面，本發明是有關於產生本發明之重組單

鏈前驅物梭菌神經毒素的方法，包括表現本發明之核酸序列的步驟，或者是藉由本發明之方法所能獲得的核酸序列，或在重組宿主細胞中的本發明之載體，或在導致核酸序列表現的情況之下培養本發明之重組宿主細胞。

【圖式簡單說明】

【0035】

第 1 圖繪示呈現 PAS 化之 A 型肉毒桿菌毒素(PAS·rBoNT/A)的示意圖。

第 2 圖繪示純化之 PAS-rBoNT/A 的聚丙烯醯胺膠體電泳(SDS-PAGE)。在將樣品加於膠體之前，先加入貝他-巰基乙醇(β -mercaptoethanol)。「v.A.」道：純化之未活化的單鏈 PAS-rBoNT/A，分子量約 175 kDa。「n.A.」(活化之後)道及「n.R.」(純化之後)道顯示在還原的情況之下藉由凝血酶(thrombin)活化之後所獲得的輕鏈(PAS-Lc)及重鏈(Hc)。輕鏈顯然是跑在約 75 kDa 之理論分子量之上的約 110 kDa 的分子量。

第 3 圖繪示使用 PAS200-rBoNT/A 之小鼠跑步檢測(mouse running assay)，■：PAS200-rBoNT/A；●：來自標準品 Xeomin 81208 (0.6U)的平均值(54 個檢測)。

第 4 圖繪示使用 PAS100-rBoNT/A 之小鼠跑步檢測，■：PAS100-rBoNT/A；●：來自標準品 Xeomin 81208 (0.6U)的平均值(54 個檢測)。

第 5 圖繪示使用 VPASA100 rBoNT/A 之小鼠跑步檢測，■：VPASA100 rBoNT/A；●：來自標準品 Xeomin 81208 (0.6U)的平均

值(54 個檢測)。

【實施方式】

【0036】 本發明可藉由參照下列本發明之詳細的說明及本文所包括之範例而更容易地理解。

【0037】 在一方面中，本發明係有關於包括一隨機區塊之重組梭菌神經毒素。

【0038】 在本發明之內容中，「梭菌神經毒素」之用語表示可由梭菌綱(Clostridia)之細菌(包括破傷風梭菌(*Clostridium tetani*)及肉毒桿菌(*Clostridium botulinum*))所獲得之自然的神經毒素或由其他來源所獲得的神經毒素(包括由重組技術或由基因或化學修飾)。特別地，梭菌神經毒素具有內肽酶活性。

【0039】 梭菌神經毒素係產生為單鏈前驅物，藉由未知的梭菌內肽酶在環區(loop region)中進行蛋白質水解切割，以獲得具有生物活性之雙硫鍵鏈接雙鏈形式的神經毒素，包括 2 個鏈元素(一個具有功能活性的輕鏈及一具有功能活性的重鏈)，其中輕鏈之一端係藉由肽鍵鏈接於重鏈的一端，並非是藉由雙硫鍵。

【0040】 在本發明的內容中，「梭菌神經毒素輕鏈」之用語表示包括內肽酶活性之梭菌神經毒素的部分。此內肽酶活性負責切割一或多個關於在造成神經傳導物質釋放至突觸間隙中之過程的所謂的可溶性-N-乙基馬來亞醯胺敏感融合蛋白附著蛋白受體(SNARE)-複合體之部分的蛋白質。在天然梭菌神經毒素中，輕

鏈的分子量大約為 50 kDa。

【0041】 在本發明的內容中，「梭菌神經毒素重鏈」之用語表示負責使神經毒素進入神經細胞中的部分。在天然的梭菌神經毒素中，重鏈的分子量大約為 100 kDa。

【0042】 在本發明的內容中，「具有功能活性的梭菌神經毒素鏈」表示重組梭菌神經毒素鏈能夠進行天然的肉毒桿菌神經毒素鏈之至少約 50%、特別是至少約 60%、至少約 70%、至少約 80%、及最特別是至少約 90%的生物功能。其中，梭菌神經毒素鏈的生物功能包括(但不限制於)重鏈對於神經細胞的結合、神經毒素進入神經細胞、輕鏈由雙鏈神經毒素的釋放，以及輕鏈之內肽酶活性。確認神經毒性活性之方法可在例如是 WO 95/32738 中所找到，此描述破傷風菌毒素及肉毒桿菌毒素之分別獲得的輕鏈與重鏈的再結合(reconstitution)。

【0043】 在本發明之內容中，「約」或「大約」的用語表示所給的數值或範圍的 20%之內、或者 10%之內、包括 5%之內。或者，特別是在生物系統中，「約」之用語表示約在一對數(log)中(亦即是一量值等級(order of magnitude))，包括在所給 2 個數值的一因子(factor)之中。

【0044】 在本發明的內容中，「重組梭菌神經毒素」的用語表示包括梭菌神經毒素的組成。梭菌神經毒素係藉由在異源細胞(例如是大腸桿菌)中之神經毒素的表現所獲得，且包括(但非限制於)由發酵過程(上清液，細胞溶解之後的組成)所獲得的原料、由純

化過程中分離此原料之成分所獲得之包括梭菌神經毒素之部分、單離的且基本上為純的蛋白質，以及用於醫藥及/或美容使用之包括梭菌神經毒素且另外包括醫藥上可接受之溶劑及/或賦形劑的配方。

【0045】 在本發明的內容中，「重組梭菌神經毒素」更表示基於親代梭菌神經毒素另外包括異源隨機螺旋區塊的梭菌神經毒素，亦即是非自然產生於所述親代梭菌神經毒素中的隨機螺旋區塊，特別是合成的隨機螺旋區塊，或來自其他肉毒桿菌的種類的隨機螺旋區塊，特別是來自人類蛋白質的隨機螺旋區塊。

【0046】 在本發明之內容中，「包括」的用語表示「包括，但非限制於」。此用語意指為開放式，指定任何所述的特徵、元素、整體、步驟或組成，但沒有排除一或多個其他特徵、元素、整體、步驟、組成或群體的存在或添加。「包括」的用語因而包括更限制的用語「由...所組成」及「實質上由...所組成」。

【0047】 在本發明的用語中，「隨機螺旋區塊」之用語表示實質上缺乏次級結構之蛋白質片段。隨機螺旋區塊可使用多種方法偵測，包括光譜法(例如是圓振二向色性(circular dichroism)或核磁共振 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)法，包括多維核磁共振實驗或結晶結構的確認方式。

【0048】 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊是由 $(Xaa)_x \cdot [(P,A,S)_y \cdot (Xaa) \cdot]_z \cdot (P,A,S)_y \cdot (Xaa)_x$ 的胺基酸序列所組成，其中 Xaa 是獨立選自於任何天然之胺基酸基的胺基酸基，提供於

$[(P,A,S)_y-(Xaa)-]_z$ 中之至少一 Xaa 是不同於丙胺酸(alanine)、絲氨酸(serine)、脯胺酸(proline)基。特別是，其中 Xaa 是纈胺酸(valine)。(P,A,S)代表獨立選自於丙胺酸(A)、絲氨酸(S)、或脯胺酸(P)基的胺基酸基。x 是獨立選自於 0 及 1 的數字。y 是獨立選自於 3 及 4 的數字。z 是 9 或大於 9。特別是，z 是介於 9 與 750 之間的數字。

【0049】 在特別的此類實施例中，y 是 3，z 是 11 或大於 11。特別是，z 是介於 11 與 749 之間的數字，更特別是介於 14 與 124 之間，更特別是介於 16 與 67 之間，更特別是介於 19 與 59 之間，更特別是 21 與 54 之間，更特別是 23、24、或 25、或 35、36、或 37、或 48、49、或 50。在其他特別的此種實施例中，y 是 4，且 z 是 9 或大於 9，特別是 z 是介於 9 與 599 之間，更特別是介於 11 與 99 之間，更特別是介於 13 與 51 之間，更特別是介於 15 與 47 之間，更特別是介於 17 與 43 之間，或更特別是 18、19、或 20、或 28、29、或 30、或 38、39、或 40 的數字。

【0050】 為了延長醫藥活性蛋白的血漿半衰期(plasma half-life)，所謂的「PAS」序列(請參照例如是 Schlapschy 等人於 2013 年在蛋白質工程，設計與選擇的著作(Schlapschy et al., Protein Engineering, Design and Selection 26 (2013) 489-501); EP 2 369 005; WO 2011/144756)已有所發展。具有爭議的是，使用此種構形失序的多肽序列的基因融合提供以大量的流體動力學體積的溶化隨機鏈附加於融合對象(例如是生藥興趣之蛋白質)的簡單方式，使得所得的融合蛋白尺寸係顯著地增加，且藉由這些方法，

典型上經由腎臟過濾所快速清除生物活性成分係延遲 1 至 2 個量值等級。

● **【0051】** 特別是由於肉毒桿菌毒素之血漿半衰期目前並不被視為其效果作用時間的關鍵重點，令人驚訝的是，現已發現基於 PAS 區塊之隨機螺旋區塊(包括 P、A 或 S 之外之胺基酸基，特別是纈胺酸)的附加(attachment)，亦能夠延長具細胞內活性之蛋白質的效果作用時間。由於對於大分子側鏈(例如是 PAS(Xaa)序列或聚乙烯乙二醇基的序列)防止細胞攝入(uptake)有所爭論，作用時間之延長更特別令人驚訝，因此這種血管內蛋白質固定的方式可能僅應用於具有細胞表面標識或受體之蛋白質的治療處理(請參照位於德國之美因河畔法蘭克福的約翰·沃爾夫岡·歌德大學之 2013 年的博士論文-韋伯的 Stat5 的抑制腫瘤 RNA 干擾和特異性相互作用之肽類適體構建的 DNA 結合區塊，第 220 頁的最後整句)。

● **【0052】** 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊係由丙胺酸、絲氨酸、脯胺酸基所組成。

【0053】 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊包括多個胺基酸的重複，其中此重複係由丙胺酸、絲氨酸、及脯胺酸基所組成，且其中不大於 6 個連續的胺基酸基係相同的。

【0054】 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊包括由至少 50 個胺基酸基所形成之隨機螺旋構形的胺基酸序列，特別是介於 50 與 3000 個之間的胺基酸基，更特別是介於 60 與 500 個之間的胺

氨基酸，更特別是介於 70 與 260 個之間的胺基酸基，更特別是介於 80 與 240 個之間的胺基酸基，更特別是介於 90 與 220 個之間的胺基酸基，特別是 100 個胺基酸基，150 個胺基酸基，或 200 個胺基酸基。

【0055】 在特別的實施例中，包括在此隨機螺旋區塊中的脯胺酸基構成此隨機螺旋區塊之大於 4%及小於 40%的胺基酸。

【0056】 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊包括選自於由 (VPASA)₂₀ (序列識別號：12(序列識別號: 12))及(VAPSA)₂₀ (序列識別號: 13)所組成之群組的至少一胺基酸序列。

【0057】 在特別的其他實施例中，至少 20%的此胺基酸基 (Xaa)係不同於丙胺酸、絲胺酸、及脯胺酸基。在特別的此實施例中，各個基(Xaa)係相同，亦即是此隨機螺旋區塊係由 4 個不同的胺基酸基所組成。在特別的此實施例中，各個(Xaa)係纈胺酸。在特別的此實施例中，此隨機螺旋區塊係選自於 (VPASA)₂₀ (序列識別號: 12)及(VAPSA)₂₀ (序列識別號: 13)。

【0058】 令人驚訝地，(VPASA)₂₀ 與(VAPSA)₂₀ 類型的隨機螺旋區塊所形成之肉毒桿菌神經毒素融合區塊，不僅顯示增加的生物持久性時間(如僅由脯胺酸(P)、丙胺酸(A)及絲胺酸(S)所組成的 PAS 化的序列(pasylated sequences))，卻亦呈現類似於野生型肉毒桿菌神經毒素之快速的生物活性的開始(請參照第 6 圖)，這相對於僅由脯胺酸、丙胺酸及絲胺酸所組成的 PAS 化的序列的表現，呈現延遲的生物活性之開始(請參照第 4 及 5 圖)。

【0059】 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊係插入於(i)此重組梭菌神經毒素之輕鏈的 N 端；(ii)此重組梭菌神經毒素之輕鏈的 C 端；(iii)此重組梭菌神經毒素之重鏈的 N 端；或(iv)此重組梭菌神經毒素之重鏈的 C 端，特別是在此重組梭菌神經毒素之輕鏈的 N 端。

【0060】 在特別的實施例中，此梭菌神經毒素之序列係選自於(i)A、B、C、D、E、F 及 G 血清型的肉毒桿菌神經毒素，特別是 A、C、及 E 血清型的肉毒桿菌神經毒素，特別是 A 血清型的肉毒桿菌神經毒素之序列，或(ii)由(i)之肉毒桿菌神經毒素之功能變異體(functional variant)的序列，或(iii)嵌合肉毒桿菌神經毒素的序列，其中梭菌神經毒素之輕鏈及重鏈係來自不同的親代梭菌神經毒素的血清型。

【0061】 在本發明的內容中，「A、B、C、D、E、F 及 G 型肉毒桿菌神經毒素」的用語表示由肉毒桿菌所發現並可獲得的神經毒素。最近，已知標記為 A、B、C、D、E、F 及 G 血清型的 7 種血清不同的類別包括一些次類別(例如是 A1、A2、A3 及 A5)。

【0062】 在特別的實施例中，梭菌神經毒素係選自於 A、C 及 E 型肉毒桿菌神經毒素，特別是選自於 A 型肉毒桿菌神經毒素，或選自於任何此種肉毒桿菌神經毒素的功能變異體。

【0063】 在特別的實施例中，此重組梭菌神經毒素具有輕鏈及重鏈，包括在序列識別號: 8、序列識別號: 10、序列識別號: 14 或序列識別號: 15 中所發現的胺基酸序列。

【0064】 在本發明的內容中，「梭菌神經毒素之功能變異體」的用語表示與梭菌神經毒素的胺基酸序列及/或編碼胺基酸序列的核酸序列有所不同的神經毒素，但仍為具有功能活性的。在本發明的內容中，「具有功能活性」之用語表示重組梭菌神經毒素的特質呈現為天然的親代梭菌神經毒素(亦即是不具有隨機螺旋區塊的親代梭菌神經毒素)之生物活性的至少約 50%、特別是至少約 60%、至少約 70%、至少約 80%，及最特別是至少約 90%。其中，生物功能包括(但不限定於)結合於神經毒素受體、神經毒素進入神經細胞、由雙鏈神經毒素釋放輕鏈、及輕鏈之內肽酶活性、及抑制由所影響的神經細胞釋放的神經傳導物質。

【0065】 在蛋白質的層次上，功能變異體將維持對應於梭菌神經毒素的主要特徵，例如是在輕鏈中的內肽酶活性的主要基、或附加於神經毒素受體或在重鏈中透過胞內體膜轉移的主要基，但可包括一或多個突變，包括對應的梭菌神經毒素之一或多個胺基酸的刪除、對應的梭菌神經毒素之一或多個胺基酸的加成、及/或對應的梭菌神經毒素之一或多個胺基酸的取代(substitution)。特別是，此刪除、加成及/或取代的胺基酸為連續的胺基酸。根據本發明的教示，只要功能變異體維持生物活性，任何數量的胺基酸可被加成、刪除及/或取代。例如，1、2、3、4、5、上達至 10、上達至 15、上達至 25、上達至 50、上達至 100、上達至 200、上達至 400、上達至 500 的胺基酸或甚至是更多的胺基酸可被加成、刪除及/或取代。因此，神經毒素的功能變異體可以是天然的神經

毒素之生物活性片段。此神經毒素片段可包括 N 端、C 端、及/或一或多個內部刪除。

● **【0066】** 在另一實施例中，梭菌神經毒素之功能變異體另外包括訊息肽(signal peptide)。通常，此訊息肽將位於神經毒素的 N 端。許多此訊息肽係習知且包括於本發明。特別是，訊息肽造成神經毒素運送穿過生物膜(例如是內質網膜、高基氏體膜或真核或原核細胞的細胞膜)。現已發現當訊息肽附加於神經毒素時，將導介神經毒素分泌至細胞的上清液中。在某些實施例中，訊息肽將在分泌的過程中或接續於分泌過程而被切除，使得所分泌的蛋白缺乏 N 端訊息肽(由雙硫鍵共價鏈接的分開的輕鏈及重鏈所組成)，並具有蛋白質水解活性。

● **【0067】** 在特別的實施例中，功能變異體在其神經毒素部分中，對於親帶梭菌神經毒素的對應部分具有至少約 40%、至少約 50%、至少約 60%、至少約 70%或最特別是至少約 80%的序列相似度(sequence identity)，以及至少約 60%、至少約 70%、至少約 80%、至少約 90%或最特別是至少約 95%的序列同源性(sequence homology)。本領域中具有通常知識者已知確認序列相似度及/或同源性的方法及演算法，包括具有刪除、加成及/或取代的變異體對於親代序列的比對。在 DNA 的層次上，由於基因密碼的退化性(degeneracy)，編碼功能同系物及親代梭菌神經毒素的核酸序列可能有較大程度的不同。目前已知原核及真核生物之間的密碼子(codon)的使用並不相同。因此，當在原核表現系統中進行原核蛋

白(例如是梭菌神經毒素)的表現時，可能需要(或至少是有益於)採用表現宿主細胞所使用的密碼子的核酸序列，表示序列相似度或同源性可能在核酸序列層次上較低。

【0068】 在本發明的內容中，「變異體」的用語表示對應於梭菌神經毒素之化學、酵素、或基因修飾之衍生物的神經毒素，包括來自肉毒桿菌的化學或基因修飾的神經毒素，特別是 A、C 或 E 血清型肉毒桿菌神經毒素。化學修飾之衍生物可以是藉由丙酮酸化(pyruvation)、磷酸化(phosphorylation)、硫酸化(sulfatation)、脂化(lipidation)、聚乙二醇化(pegylation)、醣化(glycosylation)之其中一者的修飾，及/或一胺基酸或包括 2 及約 100 個胺基酸之間的多肽類的化學加成，包括發生在用於表現衍生物之真核宿主細胞中的修飾。酵素修飾的衍生物是藉由酵素(例如是內或外切蛋白質水解酶)之活性所修飾的一者，包括藉由用於表現衍生物之真核宿主細胞之酵素的修飾。如上文所指出，基因修飾之衍生物是已對於此梭菌神經毒素之胺基酸序列藉由其中包含的一或多個胺基酸進行刪除或取代、或藉由一或多個胺基酸進行加成(包括多肽類(包括 2 及約 100 個之間的胺基酸)。本領域中任何的通常知識者已清楚知道此類化學或基因修飾的衍生物之設計及建造的方法、及此種變異體的功能性測試方法。

【0069】 在特別的實施例中，此重組梭菌神經毒素相對於不具有隨機螺旋區塊之相同的梭菌神經毒素而言顯示增加的效果作用時間。

【0070】 在本發明的內容中，「增加的效果作用時間」或「增加的作用時間」之用語表示藉由本發明之梭菌神經毒素之較持久的神經阻斷作用(denervation)。例如，如本揭露所示，相對於不具有隨機螺旋區塊之雙硫鍵鏈接雙鏈的梭菌神經毒素的給藥，包括一隨機螺旋區塊之雙硫鍵鏈接雙鏈的梭菌神經毒素的給藥造成更長時期的局部癱瘓(localized paralysis)。

● 【0071】 在本發明的內容中，「增加的效果/作用時間」是定義為相對於不具有隨機螺旋區塊之相同的神經毒素而言，本發明之重組神經毒素的增加的效果作用時間是大於約 20%、特別是大於約 50%、更特別是大於約 90%。

【0072】 在本發明之內容中，「神經阻斷作用」的用語表示化學神經阻斷藥劑(chemodenervating agent)(例如是神經毒素)的給予所導致的神經阻斷作用。

● 【0073】 在本發明之內容中，「局部神經阻斷作用」或「局部癱瘓」的用語表示一特定的解剖區域(通常是一肌肉或一群解剖及/或生理相關的肌肉)的神經阻斷作用，是由化學神經阻斷藥劑(例如是神經毒素)施加於特定的解剖區域所導致。

【0074】 在不預期結合於理論的情況之下，在相對於不具有隨機螺旋區塊之相同的親代梭菌神經毒素的每個情況中，本發明之重組梭菌神經毒素可顯示增加的生物半衰期、降低的降解速率、減低的融合速率、增加的神經細胞的攝入、及/或修飾的細胞內轉移速率。

【0075】 在特別的實施例中，增加的效果作用時間是由於增加的生物半衰期。

【0076】 在本發明的內容中，「生物半衰期」的用語特別指的是在活體中(*in vivo*)之蛋白質(例如是梭菌神經毒素)的壽命(lifespan)。在本發明的內容中，「生物半衰期」的用語表示在活體中一半的蛋白質池(*protein pool*)被降解的時間，例如是一給藥劑量之一半數量的梭菌神經毒素被降解的時間。

【0077】 在本發明的內容中，「增加的生物半衰期」之用語係定義為相對於不具有隨機螺旋區塊的相同的神經毒素而言，本發明之重組神經毒素的增加的生物半衰期是大於約 20%、特別是大於約 50%、更特別是大於約 90%。

【0078】 在本發明的內容中，「減低的降解速率」之用語表示隨機螺旋區塊(PAS 序列)保護輕鏈在神經細胞溶質中遭受降解過程(例如是受到蛋白酶或修飾酵素(例如 E3 連接酶(*ligase*))的攻擊)。由於這種保護，神經中的輕鏈的半衰期係延長，造成更長的治療效果時間。

【0079】 在特別的實施例中，重組梭菌神經毒素是用於需要改善之化學神經阻斷作用的疾病的治療，其中相對於不具有隨機螺旋區塊的相同的梭菌神經毒素而言，重組的梭菌神經毒素造成持續較長的神經阻斷作用。

【0080】 在特別的其他實施例中，重組梭菌神經毒素是用於治療(a)對於 BoNT/A 顯示免疫反應的病患或(b)頭痛或癲癇，其中

重組梭菌神經毒素的血清型是 E。

【0081】 在另外的方面中，本發明是有關於包括本發明之重組梭菌神經毒素的醫藥組成。

【0082】 在特別的實施例中，本發明的重組梭菌神經毒素或本發明之醫藥組合物是用於治療疾病或下列情況：肌張力不全(cervical dystonia)(痙攣性斜頸(spasmodic torticollis))、臉痙攣(blepharospasm)、嚴重原發性腋窩多汗症(severe primary axillary hyperhidrosis)、遲緩不能(achalasia)、下背痛、良性前列腺肥大(benign prostate hypertrophy)、慢性局部疼痛神經病變(chronic focal painful neuropath)偏頭痛、及其他頭痛病症。

【0083】 另外使用肉毒桿菌神經毒素之治療的用藥指示近來是受到研究且可使用本發明的醫藥組成，包括兒童尿失禁(pediatric incontinence)、過度活化膀胱因尿失禁(incontinence due to overactive bladder)、神經性膀胱因尿失禁(incontinence due to neurogenic bladder)、肛裂(anal fissure)、關於受傷之痙攣性疾病、或中樞神經系統疾病(包括創傷(trauma)、中風、多發性硬化症(multiple sclerosis)、帕金森氏症(Parkinson's disease)或腦性麻痺(cerebral palsy))、影響四肢、臉、顎或聲帶之局部肌張不全、顳顎關節(temporomandibular joint, TMJ)疼痛症、糖尿病神經病變(diabetic neuropathy)、傷口療癒、過度流涎症(excessive salivation)、聲帶失能、嚼肌(Masseter muscle)減少以降低下顎尺寸、防止慢性頭痛及慢性肌肉骨骼疼痛(chronic musculoskeletal pain)之治療、

治療打鼾的噪音、藉由增加胃排空時間幫助體重之減少。

【0084】 近來，梭菌神經毒素已被評估為其他新的用藥指示的治療，例如疼痛性蟹足腫(painful keloid)、糖尿病神經性病變疼痛、難治癒的膝蓋疼痛(refractory knee pain)、三叉神經痛(trigeminal neuralgia)誘發區域之應用以控制疼痛、裂唇手術之後的疤痕、癌症及憂鬱症。

【0085】 另一方面，本發明是有關於本發明之組成物對於美容治療之使用。

【0086】 在本發明的內容中，「美容治療」的用語係有關於美容或美學應用的使用，例如是皺紋、魚尾紋(crow's feet)、皺眉紋(frown line)等等。

【0087】 在另一方面，本發明是有關於產生本發明之重組梭菌神經毒素的方法，包括藉由將編碼隨機螺旋區塊(特別是根據本發明的隨機螺旋區塊)之核酸序列插入編碼親代梭菌神經毒素的核酸序列中，獲得編碼重組單鏈前驅物梭菌神經毒素的重組核酸序列。

【0088】 在本發明的內容中，「重組核酸序列」的用語表示已藉由加入來自 2 種不同來源的基因物質所產生的核酸。

【0089】 在本發明之內容中，「單鏈前驅物梭菌神經毒素」表示雙硫鍵鏈接雙鏈的梭菌神經毒素的單鏈前驅物，包括具有功能活性的梭菌神經毒素輕鏈、具有功能活性的神經毒素重鏈、用重鏈之 N-端鏈接輕鏈之 C-端的環區。

【0090】 在本發明的內容中，「重組單鏈前驅物梭菌神經毒素」的用語表示包括異源隨機螺旋區塊(亦即是來自於不同於肉毒桿菌之種別的隨機螺旋區塊)的單鏈前驅物梭菌神經毒素。

【0091】 在特別的實施例中，重組單鏈前驅物梭菌神經毒素包括此環區中的蛋白酶切割位置。

【0092】 單鏈前驅物梭菌神經毒素已被蛋白水解切割，以獲得最終具有生物活性的梭菌神經毒素。蛋白水解切割可發生於藉由宿主細胞酵素進行異源表現的期間，或者是藉由添加蛋白酶酵素至異源表現之後所單離的原蛋白質材料。天然的梭菌神經毒素通常包括一或多個對於蛋白酶的切割訊號，後轉譯地切割單鏈前驅物分子，因而可形成最終的雙聚複合體或多聚複合體。目前，梭菌神經毒素仍主要藉由使用合適的梭菌品系進行發酵過程所產生。在發酵過程中，單鏈前驅物是藉由未知的梭菌蛋白酶進行蛋白水解切割，以獲得具生物活性之雙鏈梭菌神經毒素。在單鏈前驅物分子是蛋白酶之前驅物的情況中，可能發生自催化切割 (autocatalytic cleavage)。或者，蛋白酶可以是表現在相同細胞中的不同的非梭菌酵素。WO 2006/076902 描述藉由在大腸桿菌宿主細胞溶解產物(cell lysate)的培養，位於異源辨識及切割位置的重組梭菌神經毒素單鏈前驅物之蛋白水解切割。此蛋白水解切割是藉由未知的大腸桿菌蛋白酶所進行。在重組表現的某些應用中，修飾的蛋白酶切割位置已重組地導入於梭菌毒素之輕鏈及重鏈之間的鏈間區域中，例如是人類凝血酶(thrombin)或其他的人類蛋

白酶或非人類蛋白酶的蛋白酶切割位置(請參照 WO 01/14570)。

【0093】 在特別的實施例中，蛋白酶切割位置是藉由選自於下列之蛋白酶所切割的位置：凝血酶、胰蛋白酶(trypsin)、腸激酶(enterokinase)、因子 Xa(factor Xa)、植物木瓜酶(plant papain)、昆蟲木瓜酶(insect papain)、甲殼類木瓜酶(crustacean papain)、人類鼻病毒 3C 蛋白酶(human rhinovirus 3C protease)、人類腸病毒 3C 蛋白酶(human enterovirus 3C protease)、菸草蝕刻病毒蛋白酶(tobacco etch virus protease)、菸草脈斑駁病毒酶(Tobacco Vein Mottling Virus protease)、枯草桿菌蛋白酶(subtilisin)及凋亡蛋白酶(caspase 3)。

【0094】 在特別的實施例中，重組單鏈前驅物梭菌神經毒素更包括一結合標記(binding tag)，特別是選自於包括下列的群組：麩胺基硫轉移酶(glutathione-S-transferase, GST)、麥芽糖結合蛋白(Maltose Binding Protein, MBP)、His-tag、StrepTag 或 FLAG-tag。

【0095】 在本發明之內容中，「親代梭菌神經毒素」的用語表示不具有異源隨機螺旋區塊的選自於自然梭菌神經毒素、自然梭菌神經毒素之功能變異體、或嵌合梭菌神經毒素之初始梭菌神經毒素，其中梭菌神經毒素的輕鏈及重鏈係來自不同血清型的梭菌神經毒素。

【0096】 在特別的實施例中，產生本發明之重組梭菌神經毒素的方法更包括在宿主細胞中異源地表達此重組核酸序列的步

驟，特別是在細菌的宿主細胞中，更特別是在大腸桿菌的宿主細胞中。

【0097】 在某些實施例中，大腸桿菌(*E. coli*)細胞係選自於 *E. coli* XL1-Blue、Nova Blue、TOP10、XL10-Gold、BL21 及 K12

【0098】 在特別的實施例中，產生本發明之重組梭菌神經毒素的方法另外包括下列至少其一步驟：(i)藉由形成或允許重組單鏈前驅物梭菌神經毒素接觸於內肽酶產生包括隨機螺旋區塊之雙硫鍵鏈接雙鏈的重組梭菌神經毒素及(ii)藉由色層分析法純化此重組單鏈前驅物梭菌神經毒素或此雙硫鍵鏈接雙鏈的重組梭菌神經毒素。

【0099】 在特別的實施例中，重組單鏈前驅物梭菌神經毒素或重組雙硫鍵鏈接雙鏈的梭菌神經毒素係在表現之後進行純化，或者在重組雙硫鍵鏈接雙鏈的梭菌神經毒素的情況中，是在切割反應之後進行純化。在特別的此類實施例中，蛋白質是藉由色層分析法所純化，特別是藉由免疫親和層析法(immunoaffinity chromatography)、或藉由離子交換基質上的色層分析法、疏水性反應基質(hydrophobic interaction matrix)、或多形色層分析基質(multimodal chromatography matrix)、特別是強離子交換基質(strong ion exchange matrix)、更特別是強陽離子交換基質(strong cation exchange matrix)。

【00100】 在本發明的內容中，「形成...重組單鏈前驅物梭菌神經毒素接觸於內肽酶...」表示帶來此神經毒素及此內肽酶接觸的

活性及/或直接步驟，而「...允許重組單鏈前驅物梭菌神經毒素接觸於內肽酶...」的用語表示建立使此神經毒素及此內肽酶彼此接觸之情況的間接步驟。

【00101】在本發明的內容中，「內肽酶」之用語表示分解非終端之胺基酸(亦即是在多肽鏈之中)的蛋白酶。由於內肽酶不會攻擊終端胺基酸，內肽酶不會將肽類分解為單體(monomer)。

【00102】在特別的實施例中，重組單鏈前驅物梭菌神經毒素之切割是幾近完全的。

【00103】在本發明的內容中，「幾近完全」的用語係定義為，使用聚丙烯醯胺膠體電泳(SDS-PAGE)及接續的西方點墨法(Western Blot)或逆向色層分析法(reversed phase chromatography)所確認之大於約 95%的切割，特別是大於約 97.5%，更特別是大於約 99%。

【00104】在特別的實施例中，重組單鏈前驅物梭菌神經毒素之切割發生於位在重組前驅物梭菌神經毒素之環區中的異源切割訊號。

【00105】在特別的實施例中，切割反應是與含有單鏈前驅物蛋白的原宿主細胞溶解產物進行。

【00106】在其他特別的實施例中，單鏈前驅物蛋白是在切割反應之前，特別是藉由第一色層分析富集步驟(first chromatographic enrichment step)所純化或部分純化。

【00107】在本發明的內容中，「純化」是關於大於約 90%的純

度。在本發明的內容中，「部分純化」之用語是有關於小於約 90% 的純度以及大於約 2 倍的富集(enrichment)。

【00108】在另一方面，本發明是有關於本發明之重組梭菌神經毒素之前驅物的重組單鏈梭菌神經毒素。因此，在此方面，本發明是有關於包括隨機螺旋區塊(特別是根據本發明之隨機螺旋區塊)之重組單鏈前驅物梭菌神經毒素。

【00109】在特別的實施例中，對於雙硫鍵鏈接雙鏈的梭菌神經毒素的此重組單鏈梭菌神經毒素前驅物包括一具有功能活性的梭菌神經毒素輕鏈、一具有功能活性的梭菌神經毒素重鏈、一鏈接輕鏈之 C 端及重鏈之 N 端的環區、及一根據本發明的隨機區塊。

【00110】在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊是由 $(Xaa)_x \cdot [(P,A,S)_y \cdot (Xaa)-]_z (P,A,S)_y \cdot (Xaa)_x$ 的胺基酸序列所組成，其中 Xaa 是獨立選自於任何天然之胺基酸基的胺基酸基，提供於 $[(P,A,S)_y \cdot (Xaa)-]_z$ 中之至少一 Xaa 是不同於丙胺酸(alanine)、絲氨酸(serine)、脯胺酸(proline)基。特別是，其中 Xaa 是纈胺酸。(P,A,S) 代表獨立選自於丙胺酸(A)、絲氨酸(S)、脯胺酸(P)基的胺基酸基。x 是獨立選自於 0 及 1 的數字。y 是獨立選自於 3 及 4 的數字。z 是 9 或大於 9。特別是，z 是介於 9 與 750 之間的數字。

【00111】在特別的此類實施例中，y 是 3，z 是 11 或大於 11。特別是，z 是介於 11 與 749 之間的數字，更特別是介於 14 與 124 之間，更特別是介於 16 與 67 之間，更特別是介於 19 與 59 之間，

更特別是 21 與 54 之間，更特別是 23、24、或 25、或 35、36、或 37、或 48、49、或 50。在其他特別的此種實施例中， y 是 4，且 z 是 9 或大於 9，特別是 z 是介於 9 與 599 之間，更特別是介於 11 與 99 之間，更特別是介於 13 與 51 之間，更特別是介於 15 與 47 之間，更特別是介於 17 與 43 之間，或更特別是 18、19、或 20、或 28、29、或 30、或 38、39、或 40 的數字。

【00112】 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊包括由至少 50 個胺基酸基所組成的胺基酸序列以形成隨機螺旋構形，特別是介於 50 與 3000 個胺基酸基之間，更特別是介於 60 與 500 個胺基酸基之間，更特別是介於 70 與 260 個胺基酸基之間，更特別是介於 80 與 240 個胺基酸基之間，更特別是介於 90 與 220 個胺基酸基之間，特別是 100 個胺基酸基，150 個胺基酸基、或 200 個胺基酸基。

【00113】 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊是由丙胺酸、絲氨酸、及脯胺酸基所組成。

【00114】 在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊包括多個胺基酸重複，其中此重複是由丙胺酸、絲氨酸、及脯胺酸基所組成，且其中並沒有大於 6 個連續的胺基酸基是相同的。

【00115】 在特別的實施例中，包括在此隨機螺旋區塊中的脯胺酸基構成大於 4% 且小於 40% 的此隨機螺旋區塊之胺基酸基。

【00116】 在特別的實施方式中，此隨機螺旋區塊包括選自由 (VPASA)₂₀ (序列識別號: 12) 及 (VAPSA)₂₀ (序列識別號: 13) 所組成

之群組的至少一胺基酸序列，或者是以這些序列作為整體或部分之這些序列的環狀置換形式或多聚體(multimer)(特別是(VPASA)₂₀ (序列識別號: 12))。

【00117】在特別的實施例中，此隨機螺旋區塊是插入於(i)此重組梭菌神經毒素的輕鏈的 N 端；(ii)此重組梭菌神經毒素的輕鏈的 C 端；(iii)此重組梭菌神經毒素的重鏈的 N 端；或(iv)此重組梭菌神經毒素的重鏈的 C 端。

● 【00118】在特別的實施例中，此梭菌神經毒素的序列是選自於下列的序列：(i)A、B、C、D、E、F 及 G 血清型肉毒桿菌神經毒素，特別是 A、C 及 E 血清型肉毒桿菌神經毒素，更特別是 A 血清型肉毒桿菌神經毒素，或(ii)來自(i)之肉毒桿菌神經毒素的功能變異體的序列，或(iii)來自嵌合梭菌神經毒素的序列，其中梭菌神經毒素的輕鏈及重鏈是來自於不同血清型的梭菌神經毒素。

● 【00119】在特別的實施例中，此重組單鏈梭菌神經毒素具有如序列識別號: 14 或序列識別號: 15(請參照表 1)所示的胺基酸序列。

【00120】在另一方面，本發明是有關於編碼本發明之重組單鏈梭菌神經毒素的核酸序列。

【00121】在另一方面，本發明是有關於獲得本發明之核酸序列的方法，包括將編碼一隨機螺旋區塊(特別是根據本發明的隨機螺旋區塊)的核酸序列插入於編碼一親代梭菌神經毒素的核酸序

列中。

【00122】在另一方面，本發明是有關於包括本發明之核酸序列或藉由本發明之方法所獲得的核酸序列的載體。

【00123】在另一方面，本發明是有關於包括本發明之核酸序列、藉由本發明之方法所獲得的核酸序列、或本發明之載體的重組宿主細胞。

【00124】在某些實施例中，此重組宿主細胞是選自於 *E. coli* XL1-Blue、Nova Blue、TOP10、XL10-Gold、BL21 及 K12。

【00125】在另一方面，本發明是有關於產生本發明之重組單鏈前驅物梭菌神經毒素的方法，包括表現本發明之核酸序列的步驟、或藉由本發明之方法所獲得的核酸序列、或在重組宿主細胞中之本發明的載體、或在造成此核酸序列的表現的情況之下培養本發明的重組宿主細胞。

【00126】 範例

【00127】 比較例 1：PAS 化之 A 型肉毒桿菌的生成與純化 (PAS200-rBoNT/A)

【00128】 「PAS」模組(module)包括 200 個由脯胺酸、絲氨酸及丙胺酸之胺基酸所合成產生的胺基酸基，且在使用酶 SapI 切割(digestion)之後插入於重組 BoNT/A (rBoNT/A)的 N 端(第 1 圖)。正確的轉殖(cloning)是藉由定序進行驗證。

【00129】表現是在大腸桿菌 BI21 的表現品係中進行。純化是使用親和性及尺寸排除層析的結合所完成，接著使用凝血酶進行

活化。第 2 圖概述純化及活化的結果。

【00130】 比較例 2：在半橫膈膜檢測(Hemidiaphragma Test, HDA Test)中量測生物活性

【00131】 此離體(*ex vivo*)測試進行中毒所需的所有步驟(標的細胞結合、內化(internalization)、及轉移至細胞質中)。為此，包括半橫膈膜及膈神經(Nervus phrenicus)的鼠類神經肌肉製備是藉由 1 Hz 的連續頻率在器官浴(organ bath)中進行刺激。所得的肌肉收縮的幅度(amplitude)係對於時間繪示於圖中。在添加毒素樣品於器官浴中之後，確認見到無毒素之減少 50%之幅度的所需時間。此所謂的癱瘓半衰期(paralytic half-time)是指對於生物活性的直接量測。在 PAS200-rBoNT/A 的情況中，在濃度 0.35 ng/ml 的器官浴中，癱瘓半衰期是 157 分鐘。藉由與野生型 BoNT/A 所建立的校準曲線比對，可計算出特定的 60 pg/U 之生物活性。

【00132】 比較例 3: 使用指間外展分數(Digit Abduction Score, DAS)檢測確認活體之生物活性

【00133】 在此活體的檢測中，確認出樣品的生物活性。基於在半橫膈膜檢測(請參照範例 2)中所獲得的特定生物活性之結果，相較於平行呈現之標準樣品所見效果應造成的次最大效果(sub-maximum effect)的劑量可被計算出。這些劑量(在每個例子中 20 μ l 體積)於每個例子中係注入於 4 隻小鼠的右後肢腓腸肌(M. gastrocnemius)之中。所得效果是藉由隨著時間測量舉起小鼠時所確認，並藉由 0 至 4 的分數定量(Aoki, K.R.; Toxicon 39 (2001))

1815-1820)。0 的分數是對應於指間外展的最大值，而 4 的分數是對應於完全不具有指間外展之癱瘓的最大值。分數 1、2 或 3 描述這 2 個極值之間的中間狀態。在第 3 圖中，顯示使用 PAS200-rBoNT/A 之指間外展分數檢測的結果。

【00134】 比較例 4: 在「小鼠跑步檢測(Mouse Running Assay)」中的 PAS200-rBoNT/A 之效果作用時間

【00135】 基於指間外展分數檢測(請參照範例 3)中所獲得的活性結果，適於相較於呈現平行之標準品(Xeomin[®])的效果作用時間的劑量可被計算出。這是為了應用一等效劑量(亦即是樣品的最大效果)，且標準品(Xeomin[®])應相同。等效劑量的 PAS200-rBoNT/A 或 Xeomin[®]是注入於 8 隻小鼠的腓腸肌中，每隻小鼠已經受過跑步機的訓練。使用這些劑量僅觀察到癱瘓的次最大值，以儘可能排除可能會對於效果作用時間有所影響潛在的全身性效果。滾輪中每天的跑步距離是量測超過 15 天。藉由毒素所導致的癱瘓是以注射前的當日作為 100%，對於時間繪示跑步距離的百分比(請參照第 3 圖)。

【00136】 對應於使用 Xeomin 的控制組，PAS200-rBoNT/A 的注射在 4 天之後形成癱瘓的最大值。接續於癱瘓的最大值時期的復原期期間，控制組的跑步距離在 8 天之後達到起始值的 25%，而使用 PAS200-rBoNT/A 的組別僅在 11 天之後達到此數值。因此，癱瘓的效果作用時間係顯著地延長了。

【00137】 比較例 5: PAS 化之 A 型肉毒桿菌(PAS100-rBoNT/A)

的生成及純化

【00138】 PAS100-rBoNT/A 包括一「PAS」模組，「PAS」模組包括 100 個由脯胺酸、絲氨酸及丙胺酸之胺基酸的胺基酸基，如範例 1 之 PAS200-rBoNT/A 所述的方式生成及純化。

【00139】 比較例 6：在「小鼠跑步檢測」中的 PAS100-rBoNT/A 之效果作用時間

【00140】 使用 PAS100-rBoNT/A 的小鼠跑步檢測是如範例 4 所述的方式進行。等效劑量的 PAS100-rBoNT/A 或 Xeomin[®]是注入於 8 隻小鼠的腓腸肌中，且滾輪中每天的跑步距離是量測超過 15 天。藉由毒素所導致的癱瘓是以注射前的當日作為 100%，對於時間繪示跑步距離的百分比(請參照第 4 圖)。

【00141】 PAS100-rBoNT/A 的注射在 6 天之後形成癱瘓的最大值，使用 Xeomin 處理的控制組在 4 天之後形成癱瘓的最大值。在復原期期間，控制組的跑步距離在觀察到癱瘓之最大值之後(8 天)，於 4 天之後達到起始值的 40%，而使用 PAS100-rBoNT/A 的組別在癱瘓之最大值(11 天)的 5 天之後達到此數值。因此，癱瘓的效果作用時間係顯著地延長了。

【00142】 範例 7：VPASA100 之 A 型肉毒桿菌 (VPASA100-rBoNT/A)的生成及純化

【00143】 VPASA100-rBoNT/A 包括一「VPASA」模組，「VPASA」模組包括 100 個由纈胺酸、脯胺酸、絲氨酸及丙胺酸之胺基酸 20 次重複的胺基酸基(VPASA)₂₀-rBoNT/A)，如範例 1 之

PAS200-rBoNT/A 所述的方式生成及純化。

【00144】 範例 8：VAPSA100 之 A 型肉毒桿菌
(VAPSA100-rBoNT/A)的生成及純化

【00145】 VAPSA100-rBoNT/A 包括一「VAPSA」模組，「VAPSA」
模組包括 100 個由纈胺酸、脯胺酸、絲氨酸及丙胺酸之胺基酸 20
次重複的胺基酸基(VAPSA)₂₀-rBoNT/A)，如範例 1 之
PAS200-rBoNT/A 所述的方式生成及純化。

【00146】 範例 9：在「小鼠跑步檢測」中的 VPASA
100-rBoNT/A 之效果作用時間

【00147】 使用 VPASA100-rBoNT/A 的小鼠跑步檢測是如範例
4 所述的方式進行。等效劑量的 VPASA100-rBoNT/A 或 Xeomin[®]
是注入於 8 隻小鼠的腓腸肌中，且滾輪中每天的跑步距離是量測
超過 15 天。藉由毒素所導致的癱瘓是以注射前的當日作為 100%，
對於時間繪示跑步距離的百分比(請參照第 5 圖)。

【00148】 在復原期期間，使用 VPASA100-rBoNT/A 的組別到
達 40%的數值係顯著地晚於控制組。

【符號說明】

【00149】

HC：重鏈

LC：輕鏈

PAS：隨機螺旋區塊

【序列表】

表 1：序列

序列識別號 1:

ASPAAPAPASPAAPAPSAPA

序列識別號 2:

AAPASPAPAAPSAPAPAAPS

序列識別號 3:

APSSPSPSAPSSPSPASPSS

序列識別號 4:

SAPSSPSPSAPSSPSPASPS

序列識別號 5:

SSPSAPSPSSPASPSPPSPA

序列識別號 6:

AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA

序列識別號 7:

ASAAAPAAASAAASAPSAAA

序列識別號 8: PAS200 rBoNT/A (胺基酸序列)

MGSSHHHHHHGSLVPRSSSASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAP
APASPAAPAPSAPAA
SPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAP
ASPAAPAPSAPAA
SPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAP
ASPAAPAPSAPAA
SPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAAPFVNKQ
FNYKDPVNGVDIAY
IKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAK
QVPVSYYDSTYLSTD
NEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTE
LKVIDTNCINVIQPD
GSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIR
FSPDFTFGFEESLE
VDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGIAINPNRVFKVN
TNAYYEMSGLEVSFE
ELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKAKSIVGT
TASLQYMKNVFKEY
LLEDTSGKFSVDKLFKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKT
YLNFDKAVFKINIVPK
VNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTTEINNMNFTKLKNFTGLFEF
YKLLCVRGIITSKAGA
GKSLVPRGSAGAGALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKG

EEITSDTNIEAAEENIS

LDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGK

KYELDKYTMFHLYR

AQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATE

AAMFLGWVEQLVYDFT

DETSEVSTTDKIADITHIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAV

ILLEFIPEIAIPV

LGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSQRNEKWDEVYKYIVTNWL

AKVNTQIDLIRKKMKEA

LENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKA

MININKFLNQCSVSY

LMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIIDNRGTLIGQVDRLK

DKVNNTLSTDIPFQLSK

YVDNQRLLSSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLRSRYASKINIGS

KVNFPIDKNQIQ

LFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNISLNNE

YTIINCMENNSGWK

VSLNYGEIIWTLQDTQEIKQRVVFVKYSQMINISDYINRWIFVTITN

NRLNNSKIYINGRL

IDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELN

EKEIKDLYDNQSNSG

ILKDFWGDYLQYDKPYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLK

GPRGSVMTTNIYLNSSLY

RGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQ

AGVEKILSALEIPDVG

NLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNI

AKLVASNWYNRQIERSS

RTLGCSEWEIFVDDGWGERPLGDLVPRGSANSSSVDKLWSHPQF

EK

序列識別號 9: PAS100 rBoNT/A (胺基酸序列)

MGSSHHHHHGLVPRSSSASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAP

APASPAAPAPSAPAA

SPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAP

ASPAAPAPSAPAA

PFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWVI

PERDTFTNPEEGDLNP

PPEAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTCLFERIYSTDLGR

MLLTSIVRGIPFWGGS

TIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSF

GHEVLNLTRNGYG

STQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIIH

AGHRLYGIAINPNR

VFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLY

YINKFKDIASTLNKAK

SIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSKGKFSVDKLLKFDKLYKML

TEIYTEDNFVKFFKVL

NRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQN

TEINNMNFTKLNFTG
 LFEFYKLLCVRGIITSKAGAGKSLVPRGSAGAGALNDLCIKVNN
 WDLFFSPSEDNFTNDL
 NKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSS
 DIIGQLELMPNIE
 RFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNP
 SRVYTFSSDYVKKVN
 KATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIPYIGPAL
 NIGNMLYKDDFVGA
 LIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSQR
 NEKWDEVYKYIVT
 NWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAATKAIINYQYNQYTEEE
 KNNINFNIDDLSSKLNE
 SINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDAL
 LKYIYDNRGTLIGQVD
 RLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNL
 RYESNHLIDLSRYA
 SKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENF
 STSFWIRIPKYFNS
 ISLNNEYTIINCMENNSGWKVSLNYGEEIWTLQDTQEIKQRVVK
 YSQMINISDYINRWI
 FVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCR
 DTHRYIWIKYFNLF
 DKELNEKEIKDLYDNQSNISGILKDFWGDYLYQYDKPYMLNLYD

PNKYVDVNNVGIRGYMY
LKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNDR
VYINVVVKNKEYRLAT
NASQAGVEKILSALEIPDVGNSQVVVMKSKNDQGITNKCKMN
LQDNNGNDIGFIGFHQF
NNIAKLVASNWYNRQIERSRTLGCSEFIPVDDGWGERPLGDL
VPRGSANSSSVDKLWS
HPQFEK

序列識別號 10: PAS200 rBoNT/A (核酸序列)

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCACCATCATGGTAGCCTGGTTC
CGCGTAGCTCTTCTGCA
AGTCCGGCAGCACCGGCACCGGCTTCACCAGCTGCACCAGCA
CCTAGCGCACCGGCAGCA
TCTCCAGCAGCCCCTGCACCGGCAAGCCCTGCAGCTCCAGCA
CCGTCAGCACCCAGCAGCA
AGCCCAGCTGCTCCTGCTCCAGCGAGCCCAGCAGCGCCAGCT
CCTAGTGCCCCTGCTGCC
TCTCCTGCTGCTCCGGCACCCAGCAAGTCCTGCTGCGCCTGCAC
CGAGTGCTCCGGCTGCT
AGTCCTGCCGCACCAGCTCCGGCTAGTCCAGCTGCTCCAGCC
CCTTCAGCTCCGGCAGCT
TCCCCTGCAGCGCCTGCCCTGCCAGTCCAGCGGCTCCTGCA
CCTAGTGCGCCTGCAGCT

TCACCGGCTGCCCCTGCGCCAGCTTCTCCTGCGGGCTCCAGCTC
CATCTGCCCCAGCCGCA
TCCCCAGCGGCACCAGCTCCAGCTTCTCCGGCAGCGCCAGCA
CCTTCTGCGCCTGCCGCA
TCTCCTGCAGCACCAGCGCCTGCGAGTCCTGCAGCTCCTGCTC
CTTCAGCCCCTGCGGCA
AGTCCAGCAGCACCAGCCCCAGCAAGCCCAGCCGCACCAGC
ACCATCTGCCCCTGCAGCA
CCATTTGTGAACAAGCAGTTTAACTATAAGGACCCGGTGAACG
GTGTGGATATCGCGTAT
ATCAAATCCCGAATGCGGGCCAGATGCAACCAGTCAAGGCG
TTCAAGATTCATAACAAG
ATTTGGGTTATTCCGGAACGTGATACCTTCACCAATCCGGAAG
AAGGCGACTTAAACCCG
CCGCCAGAAGCCAAACAAGTGCCGGTGAGCTACTATGATAGC
ACGTATCTTAGCACCGAT
AATGAAAAGACAATTACCTGAAGGGCGTGACCAAGTTGTTC
GAGCGCATCTACAGTACC
GACTTAGGCCGCATGTTGTTGACGAGCATCGTTCGCGGTATCC
CGTTCTGGGGCGGCTCG
ACCATTGATACCGAGTTGAAAGTCATTGACACGAACTGTATCA
ATGTTATCCAACCGGAC
GGCAGTTATCGCAGCGAGGAGTTAAATTTGGTCATCATCGGTC
CAAGCGCAGATATTATT

CAGTTCGAATGCAAGAGCTTCGGCCATGAGGTCTTGAATTTGA
CGCGCAACGGTTACGGC
AGCACCCAATACATCCGCTTTAGCCCGGATTTACCTTTGGCT
TCGAGGAGAGCTTGGAG
GTGGACACCAACCCGCTGTTAGGTGCCGGCAAATTCGCAACC
GACCCGGCAGTGACGTTG
GCGCACGAATTGATTCATGCGGGTCACCGCTTATACGGTATCG
CGATCAATCCGAATCGC
GTCTTTAAAGTCAATACCAACGCGTACTACGAAATGAGCGGCT
TAGAGGTTAGCTTTGAA
GAATTACGCACCTTCGGTGGCCACGACGCCAAGTTCATCGAC
AGCCTGCAGGAAAATGAG
TTCCGCTTGTACTATTACAATAAATTCAAGGACATCGCGAGCA
CCTTAAATAAAGCAAAG
AGCATTGTGGGCACCACCGCAAGCTTGCAGTACATGAAGAAC
GTATTTAAGGAAAATAT
TTGTTGTCGGAGGATAACCAGCGGGAAATTCAGCGTCGATAAGC
TGAAATTCGACAAATTG
TATAAAATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGATAACTTCGTCA
AGTTTTTTAAGGTGTTA
AATCGTAAGACCTATTTAAACTTTGATAAAGCGGTGTTTAAAA
TTAATATCGTGCCGAAG
GTGAATTACACCATCTACGATGGTTTCAATTTACGCAACACGA
ATCTGGCGGCGAATTTT

AATGGCCAAAACACCGAAATTAACAACATGAACTTTACGAAG
TTAAAGAATTTACGGGC
TTATTCGAATTCTACAAGTTATTATGCGTGCGCGGCATCATTAC
CAGCAAGGCAGGTGCG
GGCAAGTCCTTGGTTCCGCGTGGCAGCGCCGGCGCCGGCGCG
CTCAATGATCTGTGTATT
AAAGTCAATAACTGGGACCTGTTCTTCAGCCCGAGCGAGGAT
AACTTTACCAACGACTTA
AACAAAGGCGAGGAGATCACGAGCGATACGAACATCGAGGCG
GCGGAGGAAAATATTAGC
CTGGACCTCATTACAGCAGTACTATCTGACGTTCAATTTTGACA
ATGAGCCGGAGAACATC
AGCATTGAAAATCTCAGCAGCGACATCATCGGTCAGTTGGAA
CTGATGCCGAACATTGAA
CGCTTTCCGAACGGCAAAAAATATGAACTGGACAAGTATACCA
TGTTCCATTACTTACGC
GCACAGGAATTTGAGCACGGCAAGAGCCGCATTGCGCTGACC
AATAGCGTTAACGAGGCC
TTGTTAAATCCGAGCCGTGTCTACACGTTCTTCAGCAGCGATT
ATGTCAAAAAGTGAAC
AAGGCGACCGAAGCCGCGATGTTTTTGGGCTGGGTCGAGCAA
TTGGTTTACGATTTTACC
GACGAAACCAGCGAGGTGAGCACGACCGACAAAATTGCAGAT
ATCACCATCATCATTCCG

TACATCGGTCCGGCGCTCAATATCGGCAATATGTTATAACAAGGA
CGACTTTGTGGGCGCG
CTGATCTTTAGCGGCGCGGTTATCTTATTAGAATTCATCCCGGA
GATCGCAATCCCGGTC
TTGGGCACCTTTGCGTTGGTGAGCTATATCGCGAATAAAGTGC
TCACGGTCCAAACCATC
GATAACGCGCTCAGCAAGCGTAATGAGAAATGGGACGAGGTT
TATAAGTATATCGTGACC
AACTGGTTAGCAAAAAGTCAATACGCAGATCGATCTCATCCGCA
AAAAAATGAAAGAAGCC
TTGGAAAATCAAGCGGAGGCAACCAAAGCCATCATTAAATTACC
AGTATAACCAATATACC
GAAGAAGAAAAACAATATCAACTTCAATATCGATGATTTGA
GCAGCAAACCTGAACGAG
AGCATTAAACAAAGCGATGATTAACATCAACAAGTTCTTGAATC
AATGCAGCGTGAGCTAT
CTCATGAACAGCATGATCCCGTATGGCGTCAAACGCTTGGAAG
ATTTTGACGCCAGCCTG
AAAGATGCGCTCCTCAAGTATATTTATGACAACCGCGGCACCC
TCATTGGCCAGGTGGAC
CGCTTGAAGGATAAAGTGAACAATACGCTCAGCACGGATATCC
CGTTCCAGCTGAGCAAG
TACGTCGACAACCAGCGCTTACTGAGCACCTTTACCGAGTATA
TCAAGAACATCATTAAAT

ACCAGCATCCTCAACTTGCGCTATGAGAGCAATCACCTGATCG
ACCTCAGCCGCTACGCC
AGCAAGATCAACATCGGCAGCAAGGTCAATTTTCGACCCGATC
GATAAGAATCAGATCCAA
TTGTTTAACTGGAAAGCAGCAAGATCGAGGTTATCTTGAAGA
ACGCGATTGTGTACAAC
AGCATGTACGAGA ACTTTAGCACGAGCTTCTGGATTCGTATCC
CGAAGTATTTCAATAGC
ATTAGCCTGAATAACGAATATAACCATTATCAACTGCATGGAAAA
TAATAGCGGCTGGAAG
GTGAGCTTAAATTACGGCGAGATCATTGGACCTTACAGGATA
CCCAAGAAATCAAACAG
CGCGTCGTCTTTAAGTATAGCCAGATGATCAACATCAGCGATT
ACATCAACCGCTGGATC
TTCGTGACCATCACCAATAATCGCTTGAATAATAGCAAGATTTA
CATCAATGGTCGCTTG
ATTGATCAAAAACCGATCAGCAATCTCGGTAATATCCATGCCA
GCAATAACATCATGTTT
AAGTTAGACGGTTGCCGCGATACCCACCGCTATATCTGGATCA
AGTATTTTAACTTATTT
GATAAGGAACTCAACGAAAAGGAAATTAAGACTTATATGAC
AATCAGAGCAATAGCGGC
ATCCTGAAGGATTTCTGGGGCGACTACCTGCAGTACGATAAGC
CGTACTATATGTTGAAC

TTGTATGACCCGAACAAATATGTCGATGTGAACAATGTGGGTA
TTCGTGGCTATATGTAC
TTAAAGGGCCCGCGTGGTAGCGTGATGACCACGAATATTTACT
TAAACAGCAGCTTATAC
CGCGGCACGAAGTTTATTATCAAGAAGTATGCCAGCGGCAAC
AAGGACAATATCGTCCGC
ACAACGACCGTGTGTATATTAACGTGGTGGTGAAGAATAAAG
AGTACCGCTTGGCCACG
AATGCGAGCCAGGCGGGCGTGGAAAAAATCTTGAGCGCGTTG
GAGATCCCGGACGTCGGC
AACCTCAGCCAGGTTGTGGTGTGAAGTCTAAAAACGACCAG
GGCATCACGAACAAGTGC
AAAATGAATTTGCAAGATAACAACGGCAACGACATCGGCTTTA
TTGGTTTTACACAGTTC
AATAACATCGCCAAACTCGTGGCCAGCAATTGGTATAACCGCC
AAATTGAACGCAGCAGC
CGCACGCTCGGCTGTAGCTGGGAGTTCATCCCGGTGGACGAT
GGCTGGGGCGAGCGCCCG
CTCGGAGATCTGGTGCCACGCGGTTCCGCGAATTCGAGCTCC
GTCGACAAGCTTTGGAGC
CACCCGCAGTTCGAAAAATAA

序列識別號 11: PAS100 rBoNT/A (核酸序列)

ATGGGTAGCAGCCATCATCATCACCATCATGGTAGCCTGGTTC

CGCGTAGCTCTTCTGCA
AGTCCGGCAGCACCGGCACCGGCTTCACCAGCTGCACCAGCA
CCTAGCGCACCGGCAGCA
TCTCCAGCAGCCCCTGCACCGGCAAGCCCTGCAGCTCCAGCA
CCGTCAGCACCCAGCAGCA
AGCCCAGCTGCTCCTGCTCCAGCGAGCCCAGCAGCGCCAGCT
CCTAGTGCCCCTGCTGCC
TCTCCTGCTGCTCCGGCACCCAGCAAGTCCTGCTGCGCCTGCAC
CGAGTGCTCCGGCTGCT
AGTCCTGCCGCACCAGCTCCGGCTAGTCCAGCTGCTCCAGCC
CCTTCAGCCCCTGCAGCA
CCATTTGTGAACAAGCAGTTTAACTATAAGGACCCGGTGAACG
GTGTGGATATCGCGTAT
ATCAAAATCCCGAATGCGGGCCAGATGCAACCAGTCAAGGCG
TTCAAGATTCATAACAAG
ATTTGGGTTATTCCGGAACGTGATACCTTCACCAATCCGGAAG
AAGGCGATTAAATCCG
CCGCCAGAAGCCAAACAAGTGCCGGTGAGCTACTATGATAGC
ACGTATCTTAGCACCGAT
AATGAAAAGACAATTACCTGAAGGGCGTGACCAAGTTGTTC
GAGCGCATCTACAGTACC
GACTTAGGCCGCATGTTGTTGACGAGCATCGTTCGCGGTATCC
CGTTCTGGGGCGGCTCG
ACCATTGATACCGAGTTGAAAGTCATTGACACGAACTGTATCA

ATGTTATCCAACCGGAC
GGCAGTTATCGCAGCGAGGAGTTAAATTTGGTCATCATCGGTC
CAAGCGCAGATATTATT
CAGTTCGAATGCAAGAGCTTCGGCCATGAGGTCTTGAATTTGA
CGCGCAACGGTTACGGC
AGCACCCAATACATCCGCTTTAGCCCGGATTTACCTTTGGCT
TCGAGGAGAGCTTGGAG
GTGGACACCAACCCGCTGTTAGGTGCCGGCAAATTCGCAACC
GACCCGGCAGTGACGTTG
GCGCACGAATTGATTCATGCGGGTCACCGCTTATACGGTATCG
CGATCAATCCGAATCGC
GTCTTTAAAGTCAATACCAACGCGTACTACGAAATGAGCGGCT
TAGAGGTTAGCTTTGAA
GAATTACGCACCTTCGGTGGCCACGACGCCAAGTTCATCGAC
AGCCTGCAGGAAAATGAG
TTCCGCTTGTACTATTACAATAAATTCAAGGACATCGCGAGCA
CCTTAAATAAAGCAAAG
AGCATTGTGGGCACCACCGCAAGCTTGCAGTACATGAAGAAC
GTATTTAAGGAAAAATAT
TTGTTGTCGGAGGATACCAGCGGGAAATTCAGCGTCGATAAGC
TGAAATTCGACAAATTG
TATAAAATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGATAACTTCGTCA
AGTTTTTTAAGGTGTTA
AATCGTAAGACCTATTTAAACTTTGATAAAGCGGTGTTTAAAA

TTAATATCGTGCCGAAG
GTGAATTACACCATCTACGATGGTTTCAATTTACGCAACACGA
ATCTGGCGGCGAATTTT
AATGGCCAAAACACCGAAATTAACAACATGAACTTTACGAAG
TTAAAGAATTTACGGGC
TTATTCGAATTCTACAAGTTATTATGCGTGCGCGGCATCATTAC
CAGCAAGGCAGGTGCG
GGCAAGTCCTTGGTTCCGCGTGGCAGCGCCGGCGCCGGCGCG
CTCAATGATCTGTGTATT
AAAGTCAATAACTGGGACCTGTTCTTCAGCCCGAGCGAGGAT
AACTTTACCAACGACTTA
AACAAAGGCGAGGAGATCACGAGCGATACGAACATCGAGGGC
GCGGAGGAAAATATTAGC
CTGGACCTCATTACAGCAGTACTATCTGACGTTCAATTTTGACA
ATGAGCCGGAGAACATC
AGCATTGAAAATCTCAGCAGCGACATCATCGGTCAGTTGGAA
CTGATGCCGAACATTGAA
CGCTTTCCGAACGGCAAAAATATGAACTGGACAAGTATACCA
TGTTCCATTACTTACGC
GCACAGGAATTTGAGCACGGCAAGAGCCGCATTGCGCTGACC
AATAGCGTTAACGAGGCC
TTGTAAATCCGAGCCGTGTCTACACGTTCTTCAGCAGCGATT
ATGTCAAAAAAGTGAAC
AAGGCGACCGAAGCCGCGATGTTTTTGGGCTGGGTCGAGCAA

TTGGTTTACGATTTTACC
GACGAAACCAGCGAGGTGAGCACGACCGACAAAATTGCAGAT
ATCACCATCATCATTCCG
TACATCGGTCCGGCGCTCAATATCGGCAATATGTTATAACAAGGA
CGACTTTGTGGGCGCG
CTGATCTTTAGCGGCGCGGTTATCTTATTAGAATTCATCCCGGA
GATCGCAATCCCGGTC
TTGGGCACCTTTGCGTTGGTGAGCTATATCGCGAATAAAGTGC
TCACGGTCCAAACCATC
GATAACGCGCTCAGCAAGCGTAATGAGAAATGGGACGAGGTT
TATAAGTATATCGTGACC
AACTGGTTAGCAAAAGTCAATACGCAGATCGATCTCATCCGCA
AAAAAATGAAAGAAGCC
TTGGAAAATCAAGCGGAGGCAACCAAAGCCATCATTAATTACC
AGTATAACCAATATACC
GAAGAAGAAAAACAATATCAACTTCAATATCGATGATTTGA
GCAGCAAACCTGAACGAG
AGCATTAACAAAGCGATGATTAACATCAACAAGTTCTTGAATC
AATGCAGCGTGAGCTAT
CTCATGAACAGCATGATCCCGTATGGCGTCAAACGCTTGGAAG
ATTTGACGCCAGCCTG
AAAGATGCGCTCCTCAAGTATATTTATGACAACCGCGGCACCC
TCATTGGCCAGGTGGAC
CGCTTGAAGGATAAAGTGAACAATACGCTCAGCACGGATATCC

CGTTCCAGCTGAGCAAG
TACGTCGACAACCAGCGCTTACTGAGCACCTTTACCGAGTATA
TCAAGAACATCATTAAAT
ACCAGCATCCTCAACTTGCGCTATGAGAGCAATCACCTGATCG
ACCTCAGCCGCTACGCC
AGCAAGATCAACATCGGCAGCAAGGTCAATTTTCGACCCGATC
GATAAGAATCAGATCCAA
TTGTTTAACTGGAAAGCAGCAAGATCGAGGTTATCTTGAAGA
ACGCGATTGTGTACAAC
AGCATGTACGAGAACTTTAGCACGAGCTTCTGGATTCGTATCC
CGAAGTATTTCAATAGC
ATTAGCCTGAATAACGAATATAACCATTATCAACTGCATGGAAAA
TAATAGCGGCTGGAAG
GTGAGCTTAAATTACGGCGAGATCATTGGACCTTACAGGATA
CCCAAGAAATCAAACAG
CGCGTCGTCTTTAAGTATAGCCAGATGATCAACATCAGCGATT
ACATCAACCGCTGGATC
TTCGTGACCATCACCAATAATCGCTTGAATAATAGCAAGATTTA
CATCAATGGTCGCTTG
ATTGATCAAAAACCGATCAGCAATCTCGGTAATATCCATGCCA
GCAATAACATCATGTTT
AAGTTAGACGGTTGCCGCGATACCCACCGCTATATCTGGATCA
AGTATTTTAACTTATTT
GATAAGGAACTCAACGAAAAGGAAATTAAGACTTATATGAC

AATCAGAGCAATAGCGGC
ATCCTGAAGGATTTCTGGGGCGACTACCTGCAGTACGATAAGC
CGTACTATATGTTGAAC
TTGTATGACCCGAACAAATATGTCGATGTGAACAATGTGGGTA
TTCGTGGCTATATGTAC
TTAAAGGGCCCGCGTGGTAGCGTGATGACCACGAATATTTACT
TAAACAGCAGCTTATAC
CGCGGCACGAAGTTTATTATCAAGAAGTATGCCAGCGGCAAC
AAGGACAATATCGTCCGC
AACACGACCGTGTGTATATTAACGTGGTGGTGAAGAATAAAG
AGTACCGCTTGGCCACG
AATGCGAGCCAGGCGGGCGTGGAAAAATCTTGAGCGCGTTG
GAGATCCCGGACGTCGGC
AACCTCAGCCAGGTTGTGGTGTGATGAAGTCTAAAAACGACCAG
GGCATCACGAACAAGTGC
AAAATGAATTTGCAAGATAACAACGGCAACGACATCGGCTTTA
TTGGTTTTTCACCAGTTC
AATAACATCGCCAAACTCGTGGCCAGCAATTGGTATAACCGCC
AAATTGAACGCAGCAGC
CGCACGCTCGGCTGTAGCTGGGAGTTCATCCCGGTGGACGAT
GGCTGGGGCGAGCGCCCG
CTCGGAGATCTGGTGCCACGCGGTTCCGCGAATTCGAGCTCC
GTCGACAAGCTTTGGAGC
CACCCGCAGTTCGAAAAATAA

序列識別號 12: VPASA100

VPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAV
PASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVP
ASAVPASA

序列識別號 13: VAPSA100

VAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAV
PSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSA
AVAPSA

序列識別號 14: VPASA100-rBoNT/A (胺基酸序列)

MGSSHHHHHGGSLVPRSVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPA
SAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPAS
AVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPAS
YIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEA
KQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLT
SIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGP
SADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEV
DTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGIAINPNRVFKVNT
NAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFK
DIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKKEYLLSEDTSGKFSVDK
LKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVP

KVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTTEINNMNFTKLKNFTGLF
EFYKLLCVRGIITSKAGAGKSLVPRGSAGAGALNDLCIKVNNWD
LFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFN
FDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFH
YLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNK
ATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALN
IGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKV
LTVQTIDNALS KRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKM
KEALENQA EATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESI
NKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALL
KYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLS
TFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDL SRYASKINIGSKVNFDPIDK
NQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFN SISL
NNEYTIINCMENNSGWKVSLNYGEIHWTLQDTQEIKQRVVF KY S
QMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIH
ASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQS
NSGILKDFWGDYLQYDKPYMLNLYDPNKYVDVNNV GIRGYM
YLGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRND
RVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVG NLSQVVV
MKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFN NIAKLVASN
WYNRQIERSSRTLGC SWEFIPVDDGWGERPLGDLVPRGSANSSS
VDKLWSHPQFEK

序列識別號 15: VAPSA100-rBoNT/A (胺基酸序列)

MGSSHHHHHGS LVP RSVAPS AVAPS AVAPS AVAPS AVAPS AVA
 PS AVAPS AVAPS AVAPS AVAPS AVAPS AVAPS AVAPS AVAPS AVAPS
 AVAPS AVAPS AVAPS AVAPS AVAPS AVAPS AVAPS AVAPS AVAPS AVAPS
 YIKIPNAGQM QPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEA
 KQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKL FERIYSTD LGRMLLT
 SIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDG SYRSEELNLVIIGP
 SADI IQFECKSFGHEVLNLTRNGY GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEV
 DTNPLL GAGKFATDPAVTLAHEL IHAGHRLYGIAINPNRVFKVNT
 NAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKF
 DIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNV FKEKYLLSEDTSGKFSVDK
 LKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVP
 KVN YTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNT EINN MNFTKLKNFTGLF
 EFYKLLCVRGIITSKAGAGKSLVPRGSAGAGALNDLCIKVNNWD
 LFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFN
 FDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFH
 YLRAQEFEGHKSRIALTNSVNEALLNPSRVY TFFSSDYVKKVNK
 ATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALN
 IGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKV
 LTVQTIDNALS KRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKM
 KEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESI
 NKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALL
 KYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLS
 TFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDL SRYASKINIGSKVNFDPIDK
 NQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISL

NNEYTIINCMENNSGWKVSLSNYGEEIWTLQDTQEIKQRVVKYS
QMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIH
ASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQS
NSGILKDFWGDYLQYDKPYYMLNLYDPNKYVDVNNVVGIRGYM
YKLGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNND
RVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNSLSQVVV
MKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNAKLVASN
WYNRQIERSSRTLGCSEFIPVDDGWGERPLGDLVPRGSANSSS
VDKLWSHPQFEK

申請專利範圍

1. 一種重組梭菌神經毒素，包括一隨機螺旋區塊，

其中 (i) 該隨機螺旋區塊是由 $(Xaa)_x \cdot [(P,A,S)_y \cdot (Xaa)-]_z \cdot (P,A,S)_y \cdot (Xaa)_x$ 的胺基酸序列所組成，其中 Xaa 是獨立選自於任何天然之胺基酸基的胺基酸基，提供於 $[(P,A,S)_y \cdot (Xaa)-]_z$ 中之至少一 Xaa 是不同於丙胺酸(alanine)、絲氨酸(serine)、脯胺酸(proline)基；(P,A,S)代表獨立選自於丙胺酸(A)、絲氨酸(S)、脯胺酸(P)基的胺基酸基；x 是獨立選自於 0 及 1 的數字；y 是獨立選自於 3 及 4 的數字；z 是 9 或大於 9；或者

其中(ii)該隨機螺旋區塊是由丙胺酸、絲氨酸、及脯胺酸基所組成；或者

其中(iii)該隨機螺旋區塊包括複數個胺基酸重複，其中該些胺基酸重複是由丙胺酸、絲氨酸、及脯胺酸基所組成，且其中不大於 6 個連續的胺基酸基是相同的。

2.如申請專利範圍第 1 項所述之重組梭菌神經毒素，其中該隨機螺旋區塊包括由至少 50 個胺基酸基所組成的形成隨機螺旋構形之胺基酸序列。

3.如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之重組梭菌神經毒素，其中包括在該隨機螺旋區塊中的脯胺酸基構成該隨機螺旋區塊之胺基酸的大於 4%且小於 40%。

4.如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之重組梭菌神經毒素，其中該隨機螺旋區塊包括選自由 $(VPASA)_{20}$ (序列識別號：12)及

(VAPSA)₂₀ (序列識別號: 13)所組成之群組的至少一胺基酸序列，或者是以該至少一胺基酸序列作為整體或部分之該至少一胺基酸序列的環狀置換形式(circular permuted version)或多聚體(multimer)。

5.如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之重組梭菌神經毒素，其中該隨機螺旋區塊是插入於(i)該重組梭菌神經毒素之輕鏈的 N 端；(ii)該重組梭菌神經毒素之輕鏈的 C 端；(iii)該重組梭菌神經毒素之重鏈的 N 端；或(iv)該重組梭菌神經毒素之重鏈的 C 端。

6.如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之重組梭菌神經毒素，其中該重組梭菌神經毒素的序列是選自於下列的序列：(i)A、B、C、D、E、F 及 G 血清型肉毒桿菌(*Clostridium botulinum*)神經毒素，或者是(ii)來自(i)之肉毒桿菌神經毒素之功能變異體(functional variant)的序列，或者是(iii)來自嵌合肉毒桿菌神經毒素的序列，其中該重組梭菌神經毒素的輕鏈及重鏈是來自於不同血清型的梭菌神經毒素。

7.如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之重組梭菌神經毒素，其中該重組梭菌神經毒素相對於不具有該隨機螺旋區塊之相同的梭菌神經毒素而言顯示增加的效果作用時間。

8.如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之重組梭菌神經毒素，用於需要改善的神經阻斷作用的疾病的治療，其中該重組梭菌神經毒素相對於不具有該隨機螺旋區塊之相同的梭菌神經毒素而言造成較延長的神經阻斷作用。

9.一種包括如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述之重組梭菌神經毒素的醫藥組合物。

10.一種包括如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述之重組梭菌神經毒素於美容治療的使用。

11.一種根據如申請專利範圍第 1 至 8 項之任一項所述之重組梭菌神經毒素的形成方法，包括藉由將編碼該隨機區塊之核酸序列插入於編碼一親代梭菌神經毒素的核酸序列中所獲得之編碼一重組單鏈前驅物梭菌神經毒素的一重組核酸序列的步驟。

12.一種雙硫鍵鏈接雙鏈的梭菌神經毒素之重組單鏈梭菌神經毒素前驅物，包括一具有功能活性之梭菌神經毒素的輕鏈，一具有功能活性之神經毒素的重鏈，一使用重鏈的 N 端鏈接輕鏈的 C 端的環區，以及如申請專利範圍第 1 項所定義的隨機螺旋區塊，其中該梭菌神經毒素的序列是選自於下列的序列：(i)A、B、C、D、E、F 及 G 血清型肉毒桿菌神經毒素，或者是(ii)來自(i)之肉毒桿菌神經毒素之功能變異體(functional variant)的序列，或者是(iii)來自嵌合肉毒桿菌神經毒素的序列，其中該梭菌神經毒素的輕鏈及重鏈是來自於不同血清型的梭菌神經毒素。

13. 一種編碼如申請專利範圍第 12 項所述之重組單鏈梭菌神經毒素前驅物之核酸序列。

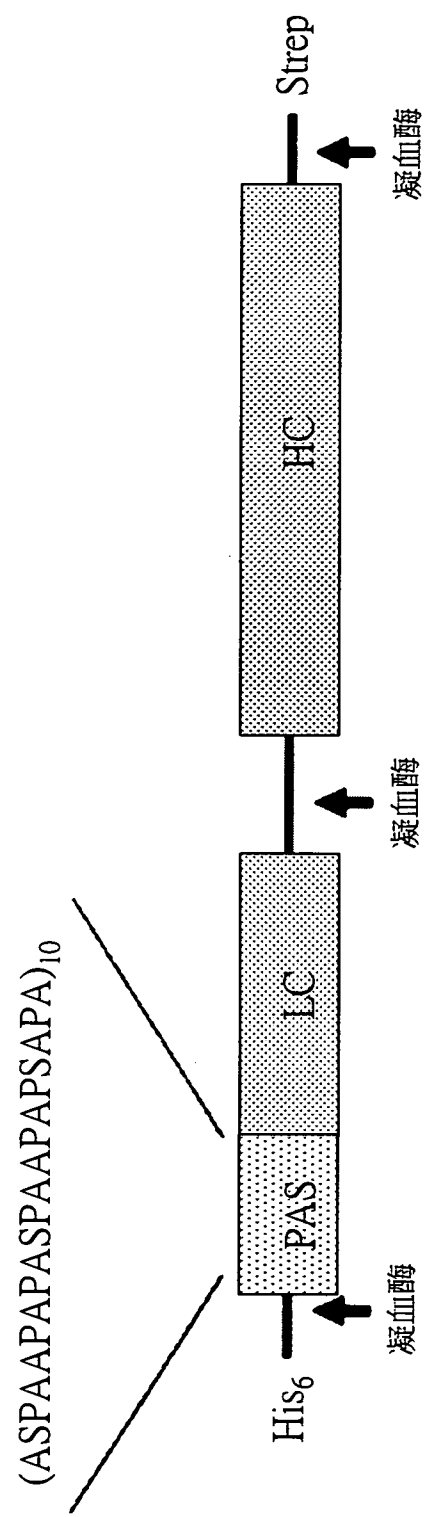
14. 一種獲得如申請專利範圍第 13 項之核酸序列的方法，包括將編碼該隨機螺旋區塊的核酸序列插入於編碼一親代梭菌神經毒素的核酸序列中的步驟。

15. 一種載體，包括如申請專利範圍第 13 項所述之核酸序列，或如申請專利範圍第 14 項之方法所獲得的核酸序列。

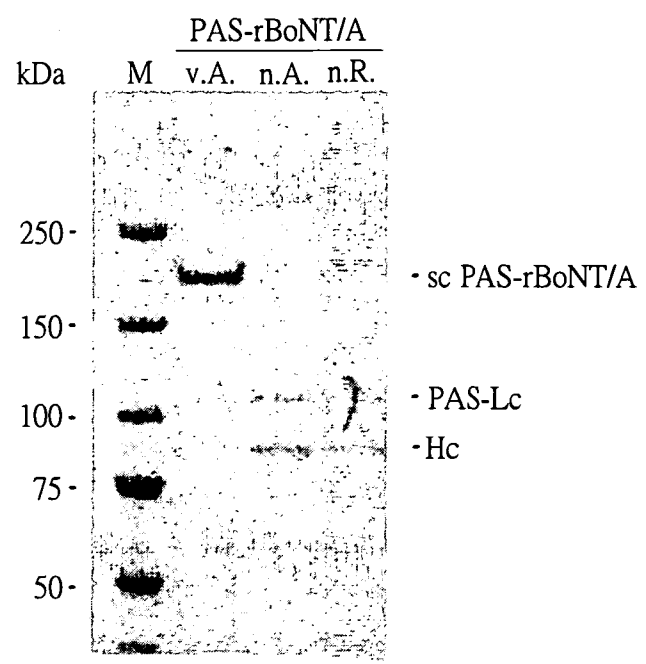
16. 一種重組宿主細胞，包括如申請專利範圍第 13 項所述之核酸序列、藉由申請專利範圍第 14 項之方法所獲得的核酸序列、或申請專利範圍第 15 項的載體。

17. 一種如申請專利範圍第 12 項所述之重組單鏈前驅物梭菌神經毒素的形成方法，包括表現如申請專利範圍第 13 項所述之核酸序列的步驟，或藉由如申請專利範圍第 14 項所述之方法所獲得的核酸序列，或在一重組宿主細胞中之如申請專利範圍第 15 項所述的載體，或在造成該核酸序列表現的情況之下培養如申請專利範圍第 16 項所述之重組宿主細胞。

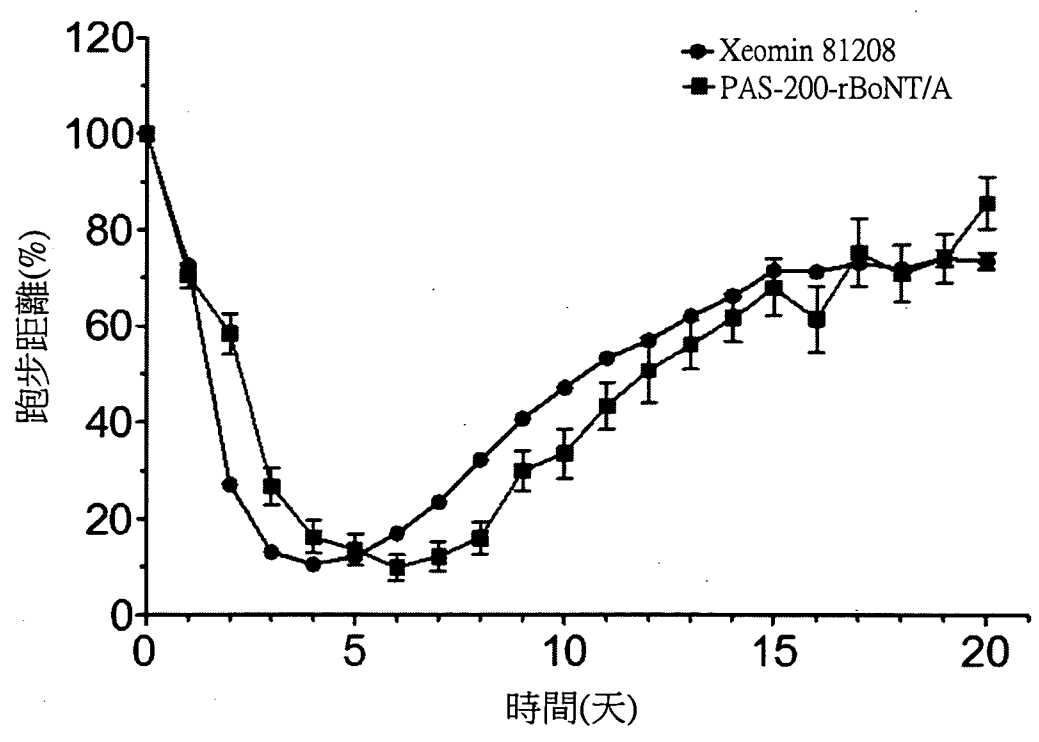
【發明圖式】



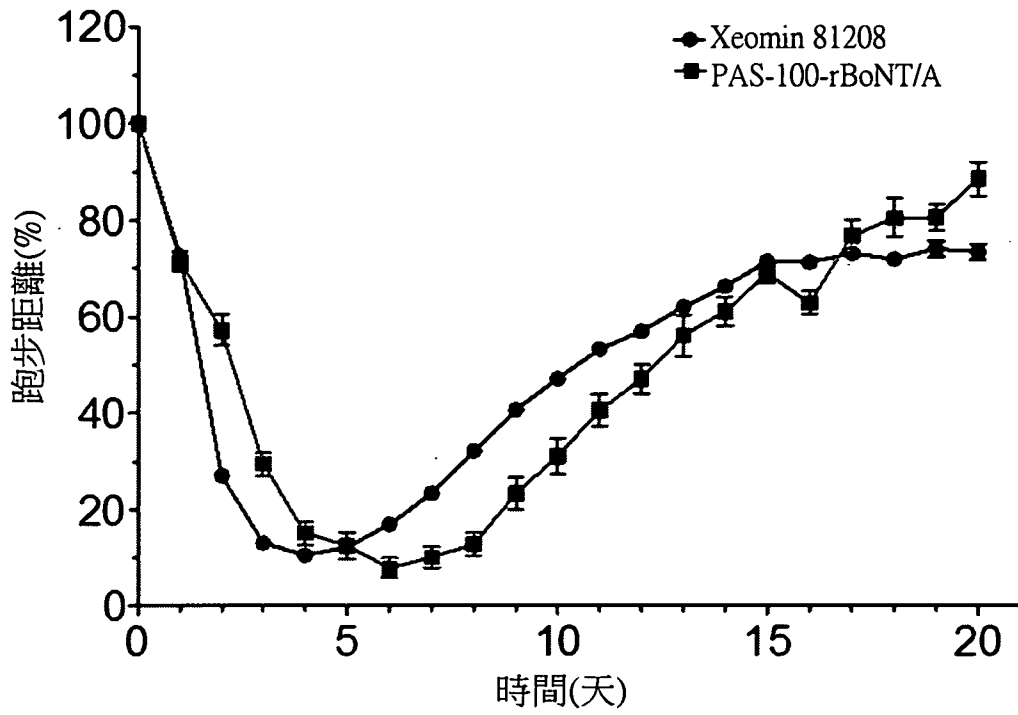
第1圖



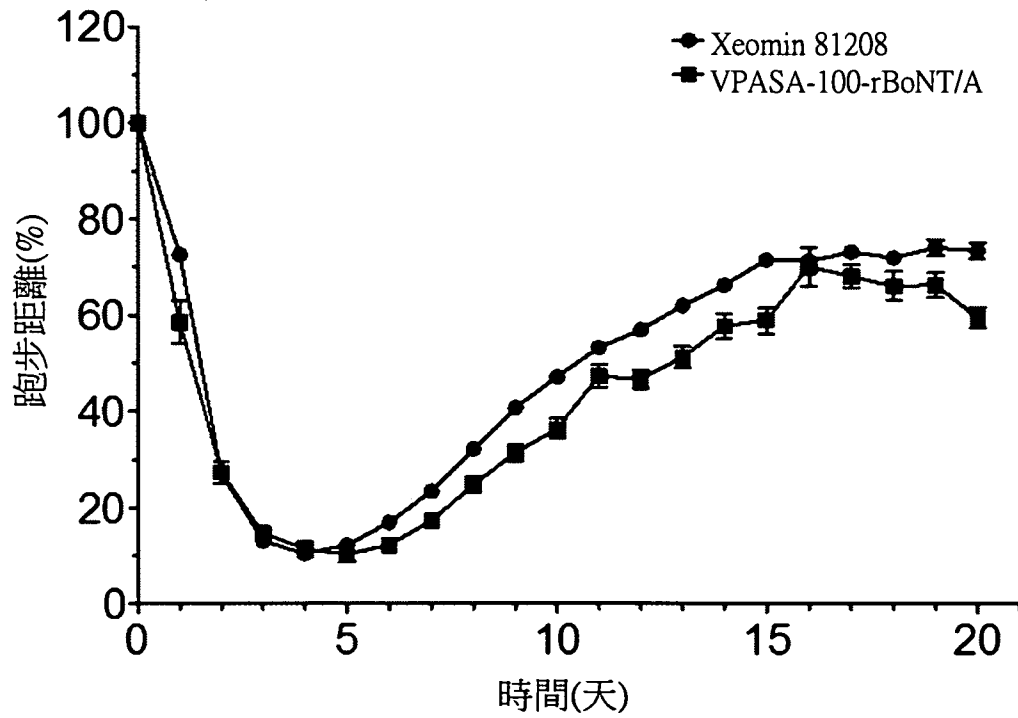
第 2 圖



第 3 圖



第 4 圖



第 5 圖