

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-514278
(P2025-514278A)

(43)公表日 令和7年5月2日(2025.5.2)

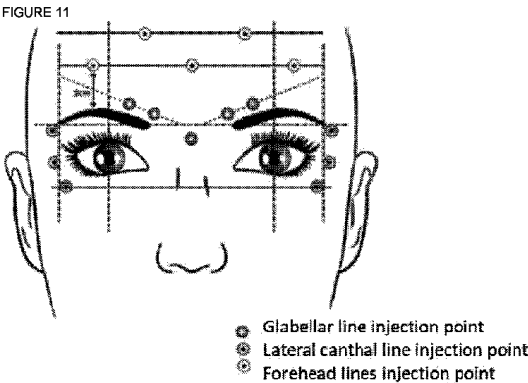
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	14/33 (2006.01)	C 0 7 K	14/33	Z N A	4 C 0 8 1
A 6 1 K	39/08 (2006.01)	A 6 1 K	39/08		4 C 0 8 5
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00		4 H 0 4 5
A 6 1 L	27/54 (2006.01)	A 6 1 L	27/54		
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31		
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全85頁)					
(21)出願番号 特願2024-563506(P2024-563506)				(71)出願人	517340507
(86)(22)出願日 令和5年4月28日(2023.4.28)				イプセン バイオファーム リミテッド	
(85)翻訳文提出日 令和6年11月26日(2024.11.26)				I P S E N B I O P H A R M L I M I	
(86)国際出願番号 PCT/GB2023/051152				T E D	
(87)国際公開番号 WO2023/209403				イギリス, エルエル13 9ユーエフ レ	
(87)国際公開日 令和5年11月2日(2023.11.2)				クサム, レクサム インダストリアル エ	
(31)優先権主張番号 2206362.2				ステート, ユニット 9 アッシュ ロード	
(32)優先日 令和4年4月29日(2022.4.29)				(74)代理人	110000774
(33)優先権主張国・地域又は機関				弁理士法人 もえぎ特許事務所	
(81)指定国・地域				(72)発明者	グリゴール, ニコラエ
英国(GB)				イギリス, エルエル13 9ユーエフ レ	
AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ				クサム, レクサム インダストリアル エ	
,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),				ステート, ユニット 9 アッシュ ロード,	
EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(				イプセン バイオファーム リミテッ	
AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,				ド内	
FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV				最終頁に続く	
最終頁に続く				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 上部顔面の皺線の処置

(57)【要約】

本発明は、顔面の皺線の処置において使用するための
改変BoNT/Aを提供し、ここで、改変BoNT/Aは、対象
の顔面の複数の部位での筋肉内注射によって投与され、
ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり1754pgよりも多
い(例えば、1800pgよりも多い)改変BoNT/Aの単位用量
によって投与され、ここで、複数の部位は、以下から選
択される:眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2
つの部位および鼻根筋の1つの部位、額の皺線を処置す
るための、前頭筋の最大5つの部位ならびに外眼角の皺
線を処置するための、眼輪筋の最大3つの部位、ここで
、処置の際に投与される改変BoNT/Aの総用量は、最大
88,000pgであり、ここで、改変BoNT/Aは、BoNT/A軽
鎖および転位置ドメイン(H_Nドメイン)ならびにBoNT/B
受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含む。

【選択図】 図11



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

顔面の皺線の処置において使用するための改変BoNT/Aであって、ここで、改変BoNT/Aは、対象の顔面の複数の部位での筋肉内注射によって投与され、

改変BoNT/Aは、部位あたり1754pgよりも多い(例えば、1800pgよりも多い)改変BoNT/Aの単位用量によって投与され、

複数の部位は、以下から選択され:

眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位、

額の皺線を処置するための、前頭筋の最大5つの部位、ならびに

外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の最大3つの部位、

10

ここで、処置の際に投与される改変BoNT/Aの総用量は、最大88,000pgであり、かつ改変BoNT/Aは、BoNT/A軽鎖および転位置ドメイン(H_Nドメイン)ならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含む。

【請求項 2】

改変BoNT/Aの単位用量が、1754pgより多く、改変BoNT/Aの単位用量が、最大8,000pgの改変BoNT/Aである、請求項1に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項 3】

改変BoNT/Aの単位用量が、1754pgより多く、改変BoNT/Aの単位用量が、最大7,500pgの改変BoNT/Aである、請求項1または請求項2に記載の使用のための改変BoNT/A。

20

【請求項 4】

改変BoNT/Aの単位用量が、1754pgより多く、改変BoNT/Aの単位用量が、最大5,000pgの改変BoNT/Aである、前記の請求項のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項 5】

単位用量が、2000~3500pgの改変BoNT/Aであり、好ましくは、単位用量が、2250pg~3250pgの改変BoNT/Aである、前記の請求項のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項 6】

単位用量が、約2500pgの改変BoNT/Aであり、好ましくは、単位用量が、2500pgの改変BoNT/Aである、前記の請求項のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

30

【請求項 7】

単位用量が、3500~5500pgの改変BoNT/Aである、好ましくは、単位用量が、3800pg~4200pgの改変BoNT/Aである、請求項1から4のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項 8】

単位用量が、約4000pgの改変BoNT/Aである、好ましくは、単位用量が、4000pgの改変BoNT/Aである、請求項1から4または7のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

40

【請求項 9】

処置の際に投与される改変BoNT/Aの総用量が、最大80,000pgである、前記の請求項のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項 10】

改変BoNT/Aが、7より大きい安全率を有し、ここで、安全率が、pg/マウスとして測定されたDAS ED₅₀によって除された、pg/マウスとして測定された-10%の体重変化に必要な毒素の用量として算出され、ここで、ED₅₀は、2のDASスコアをもたらすために必要な用量である、前記の請求項のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項 11】

改変BoNT/Aが、眉間の皺線の処置において使用するためのものであり、好ましくは

50

、前記改変BoNT/Aが、皺眉筋の2つの部位および鼻根筋の1つの部位で投与される、より好ましくは、前記改変BoNT/Aが、合計5つの部位で投与される、前記の請求項のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項12】

改変BoNT/Aが、眉間の皺線の処置において使用するためのものであり、好ましくは、前記改変BoNT/Aが、皺眉筋あたり2つの部位および鼻根筋の1つの部位で投与される、より好ましくは、前記改変BoNT/Aが、合計5つの部位で投与される、前記の請求項のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項13】

眉間の皺線のために投与される総用量が、12,000pg～13,000pgの改変BoNT/Aであり、好ましくは、単位用量が、2000pg～3000pgの改変BoNT/Aである、より好ましくは、単位用量が2500pgの改変BoNT/Aである、請求項11または請求項12に記載の使用のための改変BoNT/A。 10

【請求項14】

眉間の皺線のために投与される総用量が、約12,500pgの改変BoNT/Aである、好ましくは、眉間の皺線のために投与される総用量が、12,500pgの改変BoNT/Aである、請求項11から13のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項15】

眉間の皺線のために投与される総用量が、19,000pg～21,000pgの改変BoNT/Aであり、好ましくは、単位用量が、3500～4500pgの改変BoNT/Aである、より好ましくは、単位用量が、4000pgの改変BoNT/Aである、請求項11または請求項12に記載の使用のための改変BoNT/A。 20

【請求項16】

眉間の皺線のために投与される総用量が、約20,000pgの改変BoNT/Aである、好ましくは、眉間の皺線のために投与される総用量が、20,000pgの改変BoNT/Aである、請求項11～12または15のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項17】

改変BoNT/Aが、額の皺線の処置のためのものであり、好ましくは、前記改変BoNT/Aが、前頭筋の5つの部位で投与される、請求項1から10のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。 30

【請求項18】

額の皺線のために投与される総用量が、12,000pg～13,000pgの改変BoNT/Aであり、好ましくは、単位用量が、2000pg～3000pgの改変BoNT/Aである、より好ましくは、単位用量が、2500pgの改変BoNT/Aである、請求項17に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項19】

額の皺線のために投与される総用量が、約12,500pgの改変BoNT/Aである、好ましくは、額の皺線のために投与される総用量が、12,500pgの改変BoNT/Aである、請求項17から18のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項20】

額の皺線のために投与される総用量が、19,000pg～21,000pgの改変BoNT/Aであり、好ましくは、単位用量が、3500pg～4500pgの改変BoNT/Aである、より好ましくは、単位用量が、4000pgの改変BoNT/Aである、請求項17に記載の使用のための改変BoNT/A。 40

【請求項21】

額の皺線のために投与される総用量が、約20,000pgの改変BoNT/Aである、好ましくは、額の皺線のために投与される総用量が、20,000pgの改変BoNT/Aである、請求項17または20のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項22】

改変BoNT/Aが、外眼角の皺線の処置において使用するためのものであり、好ましく 50

は、前記改変BoNT/Aが、外眼角の皺線を処置するために、眼輪筋(例えば、その外部部分の)の3つの部位で投与される、より好ましくは、前記改変BoNT/Aが、合計6つの部位で投与される、請求項1から10のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項23】

改変BoNT/Aが、外眼角の皺線の処置において使用するためのものであり、好ましくは、前記改変BoNT/Aが、外眼角の皺線を処置するために眼輪筋(例えば、各眼輪筋の外部部分の)あたり3つの部位で投与される、請求項1から10または22のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項24】

外眼角の皺線のために投与される総用量が、14,000pg~16,000pgの改変BoNT/Aであり、好ましくは、単位用量が、2000~3000pgの改変BoNT/Aである、より好ましくは、単位用量が、2500pgの改変BoNT/Aである、請求項22または23に記載の使用のための改変BoNT/A。

10

【請求項25】

外眼角の皺線のために投与される総用量が、約15,000pgの改変BoNT/Aである、好ましくは、外眼角の皺線のために投与される総用量が、15,000pgの改変BoNT/Aである、請求項22から24のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項26】

外眼角の皺線のために投与される総用量が、23,000pg~25,000pgの改変BoNT/Aであり、好ましくは、単位用量が、3500pg~4500pgの改変BoNT/Aである、より好ましくは、単位用量が、4000pgの改変BoNT/Aである、請求項22から23のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

20

【請求項27】

外眼角の皺線のために投与される総用量が、約24,000pgの改変BoNT/Aである、好ましくは、外眼角の皺線のために投与される総用量が、24,000pgの改変BoNT/Aである、請求項22から23のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項28】

改変BoNT/Aが、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線の処置において使用するためのものであり、好ましくは、

- 前記改変BoNT/Aが、眉間の皺線を処置するために皺眉筋の2つの部位および鼻根筋の1つの部位で投与される、
- 前記改変BoNT/Aが、前頭筋の5つの部位で投与される、ならびに
- 前記改変BoNT/Aが、外眼角の皺線を処置するために眼輪筋の外部部分の3つの部位で投与される、請求項1から10のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

30

【請求項29】

改変BoNT/Aが、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線の処置において使用するためのものであり、好ましくは、

- 前記改変BoNT/Aが、眉間の皺線を処置するために皺眉筋あたり2つの部位および鼻根筋の1つの部位で投与される、
- 前記改変BoNT/Aが、前頭筋の5つの部位で投与される、ならびに
- 前記改変BoNT/Aが、外眼角の皺線を処置するために眼輪筋(好ましくは、各眼輪筋の外部部分の)あたり3つの部位で投与される、前記の請求項のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

40

【請求項30】

眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するための総用量が、43,000~44,000pgの改変BoNT/Aであり、好ましくは、単位用量が、2000pg~3000pgの改変BoNT/Aである、より好ましくは、単位用量が、2500pgの改変BoNT/Aである、請求項28または請求項29に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項31】

眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するための総用量が、約44,000の改

50

変BoNT/Aである、好ましくは、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するための総用量が、44,000pgの改変BoNT/Aである、請求項28から30のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項32】

眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するための総用量が、63,000～65,000pgの改変BoNT/Aであり、好ましくは、単位用量が、3500pg～4500pgの改変BoNT/Aである、より好ましくは、単位用量が、4000pgの改変BoNT/Aである、請求項28または請求項29に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項33】

眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するための総用量が、約64,000pgの改変BoNT/Aである、好ましくは、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するための総用量が、64,000pgの改変BoNT/Aである、請求項28、29または32に記載の使用のための改変BoNT/A。

10

【請求項34】

前記改変BoNT/Aが、8、10、12、14または16の部位に投与される、前記の請求項のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項35】

前記改変BoNT/Aが、7、9、11、13または15の部位に投与される、前記の請求項のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項36】

改変BoNT/Aが、配列番号6に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%または95%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む、好ましくは、改変BoNT/Aが、配列番号6に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む、前記の請求項のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

20

【請求項37】

改変BoNT/Aが、BoNT/A軽鎖および転位置ドメインならびにBoNT/B H_Cドメインを含み、ここで、24.04pgの改変BoNT/Aが、マウスにおける算出された半致死量(LD₅₀)に対応する(例えば、ここで、1単位は、マウスにおける算出された半致死量(LD₅₀)に対応する改変BoNT/Aの量である)、前記の請求項のいずれか一項に記載の使用のための改変BoNT/A。

30

【請求項38】

改変ボツリヌス神経毒A(BoNT/A)の単位投与形であって、単位投与形は、以下を含む:

a. 73単位よりも多い改変BoNT/A、ここで、1単位は、マウスにおける算出された半致死量(LD₅₀)に対応する改変BoNT/Aの量である、または

b. 1754pgよりも多い(好ましくは、1800pgよりも多い)改変BoNT/A、ならびに

c. 任意選択で、薬学的に許容される担体、賦形剤、アジュバントおよび/または塩、

ここで、改変BoNT/Aは、BoNT/A軽鎖および転位置ドメイン(H_Nドメイン)ならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含む。

【請求項39】

a. 73単位より多く、最大332.8単位の改変BoNT/A、または

b. 1754pgより多く(好ましくは、1800pgより多く)、最大8000pgの改変BoNT/Aを含む、請求項38に記載の単位投与形。

40

【請求項40】

2000pg～3500pgの改変BoNT/A、好ましくは、2250pg～3250pgの改変BoNT/Aを含む、請求項38または請求項39に記載の単位投与量。

【請求項41】

約2500pgの改変BoNT/Aを含む、好ましくは、2500pgの改変BoNT/Aを含む、請求項38または請求項39のいずれか一項に記載の単位投与形。

【請求項42】

3500pg～5500pgの改変BoNT/A、好ましくは、3800pg～4200pgの改変BoNT/A

50

Aを含む、請求項38または請求項39に記載の単位投与形。

【請求項43】

約4000pgの改変BoNT/Aを含む、好ましくは、4000pgの改変BoNT/Aを含む、請求項38、39または42のいずれか一項に記載の単位投与形。

【請求項44】

以下を含むキット：

- a. 請求項38から43のいずれか一項に記載の単位投与形、および
- b. 顔面の皺線(例えば、眉間の皺線、額の皺線および/または外眼角の皺線)の処置においてそれを使用するための使用説明書、ならびに
- c. 任意選択で、希釈剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、美容的処置(例えば、過機能性の顔面の皺線を処置するための)に関する。より詳細には、本発明は、長期間作用型の神経毒の投与を含む美容的処置の方法、より詳しくは、長期間作用型のボツリヌス神経毒を使用して美容的不規則性を処置する方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

過機能性の顔面の皺線は、一般的な審美的な不規則性であり、これらとして、それだけには限らないが、眉間の皺線、外眼角の皺線、額の皺線および皺、カラスの足跡、眉の皺線、ほうれい線、唇の皺線およびマリオネットラインを挙げることができる。上部顔面の皺線は、額の、眉間のおよび外側眼窩の領域において生じる可能性がある。皺もまた、洗面の表情により眉間および額の領域において現れる場合があり、一方で、皺は、笑顔の表情により外眼角の領域において現れる場合がある。この領域における極端に顕著な皺線は、疲労と誤解されることが多く、これは、対象をその外見に関して相当に悩ませる。そうではなく、極端に顕著な顔面の皺線は、根底にある筋肉の機能的な引っ張りからの結果として現れ、これは、皮膚に最終的に皺を作る。眉間の複合体では、これらの筋肉は、皺眉筋、鼻根筋および眉毛下制筋を含み、一方で、眼輪筋は、外眼角の皺線の生成に関与する。

【0003】

過去数十年にわたって、高齢集団が増加し続けるにつれ、特に顔面の領域において、進行する年齢の現れを逆転させるための美容的手順に対する需用が増大してきた。身体的外観に関するこのますます増大する関心事によって、手術、種々の種類のリサーフェシングおよび充填剤の使用などの、多数の異なる製品および手順が開発された。これらの方法のうち完全にリスクのないものはないので、加齢顔の処置のための安全な最も有効な方法を提供するために継続的な研究が必要である。

【0004】

加齢顔として知られるものの生成において相互に影響する5つの因子があるが、皺と対照的に、より顕著な皺線およびひだを生成するように相互作用する主な2つの因子(皮膚および基礎をなす筋肉)がある。皺ならびに皺線およびひだの皮膚因子を処置するために多数の療法、中でも、種々の種類のリサーフェシング、皮膚科用製品および軟部組織増強のための注射が進化した。

【0005】

顔面の皺線の現れを処置するための代替美容的手順として、顔面皮膚の根底にある筋肉への神経毒、具体的には、ボツリヌス神経毒の投与がある。ディスポート(Dysport)(登録商標)は、クロストリジウム・ボツリヌム(*Clostridium botulinum*)A型株から単離および精製された原薬BoNT/A血球凝集素複合体(BTX-A-HAC)を含有する医薬品である。クロストリジウム・ボツリヌムによって天然に産生されるいくつかの他の医薬用BoNT/A製品も、市販されている。

10

20

30

40

50

【0006】

BoNT/Aは、シナプス前神経終末からのアセチルコリンの放出を選択的に阻害し、したがって、神経筋接合部でコリン作動性伝達を遮断し、筋肉収縮および筋緊張の低減を誘導し、注射された筋肉を弛緩させる。

【0007】

ディスポート(登録商標)は、皺眉筋および鼻根筋にわたって投与されるべき最大50単位の最大総用量を用いる眉間の皺線の処置のために承認されている(図1を参照されたい)。ディスポートの臨床効果は、最大4ヶ月持続し得る。臨床研究における反復投薬によって、最大4回の反復投与を用いた場合の継続有効性が実証された。しかし、ディスポートは、3ヶ月毎よりも頻繁に投与されなくてはならない。ディスポートは、今までのところ、額の皺線および外眼角の皺線の処置のためにFDA承認されていない。

10

【0008】

全身的な神経学的効果为了避免のために、多数のクロストリジウム毒素をベースとする美容的処置は、所与の標的部位(例えば、標的組織)に対して治療的なクロストリジウム毒素の直接投与を利用する。この様式でクロストリジウム毒素ベースの治療薬を投与する場合の問題は、投与部位から離れ、周囲組織または全身循環への毒素の広がりである。標的組織から離れた毒素の拡散は、望ましくない副作用に関与すると考えられており、極端な場合には、命を脅かすものである場合がある。これは、クロストリジウム毒素治療薬(例えば、BoNT治療薬)を高用量、濃度および注射体積で使用する場合に特に懸念され得る。市販のBoNT/A治療薬について報告されているこの問題と関連する有害効果として、無力症、全身筋力低下、複視、眼瞼下垂、嚥下障害、発声障害、構音障害、尿失禁および呼吸困難が挙げられる。嚥下および呼吸困難は、命を脅かす可能性があり、毒素効果の広がりに関連する死亡が報告されている。

20

【0009】

本発明は、上記の問題のうち1以上を克服する。

【発明の概要】

【0010】

本発明者らは、驚くべきことに、改変BoNT/Aが、顔面の皺線の美容的処置において特に有用性を見出すことを見出した。改変BoNT/Aは、BoNT/A軽鎖および転位置ドメインならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(Hcドメイン)を含む場合があり、これは、投与部位での保持の増大(そこからの拡散の低減)および作用持続期間の増大(例えば、6~9か月)を示す改変BoNT/Aをもたらす。有利なことに、改変BoNT/Aは、未改変BoNT/A(例えば、ディスポート(登録商標))と比較した場合に改善されている安全性プロファイルを有する。この改善された安全性プロファイルは、改変BoNT/Aについて本明細書で記載される高い安全率によって表現され得る。改変BoNT/Aは、正味の正電荷の増大をもたらす、表面露出アミノ酸残基のうち1以上の改変を含み得る。増大した電荷によって、ポリペプチドとアニオン性細胞外構成成分の間の静電相互作用が促進され、それによって、ポリペプチドと細胞表面の間の結合が促進される。順に、これは、投与部位での保持を増大し(そこからの拡散を低減し)、作用の持続期間の増大をもたらす(例えば、6~9か月)。

30

40

【0011】

本明細書における前臨床データに基づいて(実施例11を参照されたい)、改変BoNT/Aのより高い総量を対象に投与でき、このような高用量での未改変BoNT/A(例えば、ディスポート(登録商標))と同様の安全性プロファイルを達成することが示されている。したがって、改変BoNT/Aを、最大総用量に達する前に顔面の皺線の美容的処置においてより多数の筋肉/部位に注射できる。これは、重要な、有利な知見であり、臨床医により大きな範囲の処置選択肢を提供しながら、顔面の皺線の美容的処置の改善をもたらす。処置は、未改変BoNT/A(例えば、ディスポート(登録商標))を用いる処置と比較した場合により長く持続する処置を提供する(より少ない頻度の投与をもたらす)および/または対象に合わせて調整可能である、例えば、臨床医が、対象の審美的な必要性にしたがって特定の

50

部位に投与することを可能にするという点で改善され得る。本発明の処置は、従来の処置レジメンと比較して改善されている。

【0012】

さらに、本発明は、好都合な、安全な、有効な単一用量単位ならびに単一処置で安全に投与できる総(最大)投与量を提供する。本発明はまた、結果として生じる患者毒性を伴わずに前記用量単位を筋肉に投与できる回数(筋肉あたりの注射部位数を含む)に対応するガイドを提供する。本発明に一致する処置は、従って、臨床医にとってあまり複雑なものではなく、過少量投薬および/または過剰量投薬を避けるのに役立つ。

【発明を実施するための形態】

【0013】

一態様では、本発明は、顔面の皺線の処置(例えば、未改変BoNT/A(例えば、配列番号2)によって処置されるものよりも長い期間)において使用するための改変BoNT/Aを提供し、ここで、改変BoNT/Aは、対象の顔面の複数の部位での筋肉内注射によって投与され、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり73単位よりも多い改変BoNT/Aの単位用量によって投与され、ここで、1単位は、マウスにおける算出された半致死量(LD₅₀)に対応する改変BoNT/Aの量であり、

ここで、複数の部位は、以下から選択され:

眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位、
額の皺線を処置するための、前頭筋の最大5つの部位、ならびに

外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の最大3つの部位(例えば、外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の外部部分の最大3つの部位)、

ここで、処置の際に投与される改変BoNT/Aの総用量は、最大3,661単位であり、ならびに

ここで、改変BoNT/Aは、BoNT/A軽鎖および転位置ドメインならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(Hcドメイン)を含む。

【0014】

顔面の皺線の処置の対応する使用(医薬の製造における)および方法も提供される。

【0015】

関連態様では、本発明は、顔面の皺線を(例えば、未改変BoNT/A(例えば、配列番号2)によって処置されるものよりも長い期間)処置する方法を提供し、方法は、改変ボツリヌス神経毒A(BoNT/A)を、対象の顔面の複数の部位での筋肉内注射によって投与することを含み、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり73単位よりも多い改変BoNT/Aの単位用量によって投与され、ここで、1単位は、マウスにおける算出された半致死量(LD₅₀)に対応する改変BoNT/Aの量であり、

ここで、複数の部位は、以下から選択され:

眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位、
額の皺線を処置するための、前頭筋の最大5つの部位、ならびに

外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の最大3つの部位(例えば、外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の外部部分の最大3つの部位)、

ここで、処置の際に投与される改変BoNT/Aの総用量は、最大3,661単位であり、ならびに

ここで、改変BoNT/Aは、BoNT/A軽鎖および転位置ドメインならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(Hcドメイン)を含む。

【0016】

別の関連態様では、本発明は、顔面の皺線を(例えば、未改変BoNT/A(例えば、配列番号2)によって処置されるものよりも長い期間)処置する医薬の製造における、改変ボツリヌス神経毒A(BoNT/A)の使用を提供し、ここで、改変BoNT/Aは、対象の顔面の複数の部位での筋肉内注射によって投与され、

10

20

30

40

50

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり73単位よりも多い改変BoNT/Aの単位用量によって投与され、ここで、1単位は、マウスにおける算出された半致死量(LD₅₀)に対応する改変BoNT/Aの量であり、

ここで、複数の部位は、以下から選択され:

眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位、額の皺線を処置するための、前頭筋の最大5つの部位、および

外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の最大3つの部位(例えば、外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の外部部分の最大3つの部位)、

ここで、処置の際に投与される改変BoNT/Aの総用量は、最大3,661単位であり、ならびに

ここで、改変BoNT/Aは、BoNT/A軽鎖および転位置ドメインならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含む。

【0017】

一態様では、本発明は、顔面の皺線の処置(例えば、未改変BoNT/A(例えば、配列番号2)によって処置されるものよりも長い期間)において使用するための改変BoNT/Aを提供し、ここで、改変BoNT/Aは、対象の顔面の複数の部位での筋肉内注射によって投与され、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり73単位よりも多い改変BoNT/Aの単位用量によって投与され、ここで、1単位は、マウスにおける算出された半致死量(LD₅₀)に対応する改変BoNT/Aの量であり、

ここで、複数の部位は、以下から選択され:

眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位、額の皺線を処置するための、前頭筋の最大5つの部位、ならびに

外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の最大3つの部位(例えば、外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の外部部分の最大3つの部位)、

好ましくは、ここで、複数の部位は、眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位を含み(またはそれからなり)、

ここで、処置の際に投与される改変BoNT/Aの総用量は、最大1144単位(例えば、最大1019単位)であり、ならびに

ここで、改変BoNT/Aは、BoNT/A軽鎖および転位置ドメインならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含む。

【0018】

関連態様では、本発明は、顔面の皺線を(例えば、未改変BoNT/A(例えば、配列番号2)によって処置されるものよりも長い期間)処置する方法を提供し、方法は、改変ボツリス神経毒A(BoNT/A)を対象の顔面の複数の部位での筋肉内注射によって投与することを含み、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり73単位よりも多い改変BoNT/Aの単位用量によって投与され、ここで、1単位は、マウスにおける算出された半致死量(LD₅₀)に対応する改変BoNT/Aの量であり、

ここで、複数の部位は、以下から選択され:

眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位、額の皺線を処置するための、前頭筋の最大5つの部位、ならびに

外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の最大3つの部位(例えば、外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の外部部分の最大3つの部位)、

好ましくは、ここで、複数の部位は、眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位を含み(またはそれからなり)、

ここで、処置の際に投与される改変BoNT/Aの総用量は、最大1144単位(例えば、最大1019単位)であり、ならびに

ここで、改変BoNT/Aは、BoNT/A軽鎖および転位置ドメインならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含む。

10

20

30

40

50

【0019】

別の関連態様では、本発明は、顔面の皺線を(例えば、未改変BoNT/A(例えば、配列番号2)によって処置されるものよりも長い期間)処置するために医薬の製造における改変ボツリヌス神経毒A(BoNT/A)の使用を提供し、ここで、改変BoNT/Aは、対象の顔面の複数の部位での筋肉内注射によって投与され、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり73単位よりも多い改変BoNT/Aの単位用量によって投与され、ここで、1単位は、マウスにおける算出された半致死量(LD₅₀)に対応する改変BoNT/Aの量であり、

ここで、複数の部位は、以下から選択され:

眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位、
額の皺線を処置するための、前頭筋の最大5つの部位、ならびに

外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の最大3つの部位(例えば、外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の外部部分の最大3つの部位)、

好ましくは、ここで、複数の部位は、眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位を含み(またはそれからなり)、

ここで、処置の際に投与される改変BoNT/Aの総用量は、最大1144単位(例えば、最大1019単位)であり、ならびに

ここで、改変BoNT/Aは、BoNT/A軽鎖および転位置ドメインならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含む。

【0020】

別の態様では、本発明は、顔面の皺線の処置(例えば、未改変BoNT/A(例えば、配列番号2)によって処置されるものよりも長い期間)において使用するための改変BoNT/Aを提供し、ここで、改変BoNT/Aは、対象の顔面の複数の部位での筋肉内注射によって投与され、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり1754pgよりも多い(例えば、1800pgよりも多い)改変BoNT/Aの単位用量によって投与され、

ここで、複数の部位は、以下から選択され:

眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位、
額の皺線を処置するための、前頭筋の最大5つの部位、ならびに

外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の最大3つの部位(例えば、外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の外部部分の最大3つの部位)、

ここで、処置の際に投与される改変BoNT/Aの総用量は、最大88,000(例えば、最大80,000pg)であり、ならびに

ここで、改変BoNT/Aは、BoNT/A軽鎖および転位置ドメインならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含む。

【0021】

関連態様では、本発明は、顔面の皺線を(例えば、未改変BoNT/A(例えば、配列番号2)によって処置されるものよりも長い期間)処置する方法を提供し、方法は、改変ボツリヌス神経毒A(BoNT/A)を対象の顔面の複数の部位での筋肉内注射によって投与することを含み、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり1754pgよりも多い(例えば、1800pgよりも多い)改変BoNT/Aの単位用量によって投与され、

ここで、複数の部位は、以下から選択され:

眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位、
額の皺線を処置するための、前頭筋の最大5つの部位、ならびに

外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の最大3つの部位(例えば、外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の外部部分の最大3つの部位)、

ここで、処置の際に投与される改変BoNT/Aの総用量は、最大88,000(例えば、最大80,000pg)であり、ならびに

ここで、改変BoNT/Aは、BoNT/A軽鎖および転位置ドメインならびにBoNT/B受容

10

20

30

40

50

体結合ドメイン(Hcドメイン)を含む。

【0022】

別の関連態様では、本発明は、顔面の皺線を(例えば、未改変BoNT/A(例えば、配列番号2)によって処置されるものよりも長い期間)処置するための医薬の製造における改変ボツリヌス神経毒A(BoNT/A)の使用を提供し、ここで、改変BoNT/Aは、対象の顔面の複数の部位での筋肉内注射によって投与され、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり1754pgより多い(好ましくは、1800pgより多い、より好ましくは、2555pgより多い)改変BoNT/Aの単位用量によって投与され、

ここで、複数の部位は、以下から選択され:

眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位、
額の皺線を処置するための、前頭筋の最大5つの部位、ならびに

外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の最大3つの部位(例えば、外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の外部部分の最大3つの部位)、

ここで、処置の際に投与される改変BoNT/Aの総用量は、最大88,000(例えば、最大80,000pg)であり、ならびに

ここで、改変BoNT/Aは、BoNT/A軽鎖および転位置ドメインならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(Hcドメイン)を含む。

【0023】

別の態様では、本発明は、顔面の皺線の処置(例えば、未改変BoNT/A(例えば、配列番号2)によって処置されるものよりも長い期間)において使用するための改変BoNT/Aを提供し、ここで、改変BoNT/Aは、対象の顔面の複数の部位での筋肉内注射によって投与され、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり1754pgよりも多い(例えば、1800pgよりも多い)改変BoNT/Aの単位用量によって投与され、

ここで、複数の部位は、以下から選択され:

眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位、
額の皺線を処置するための、前頭筋の最大5つの部位、ならびに

外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の最大3つの部位(例えば、外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の外部部分の最大3つの部位)、

好ましくは、ここで、複数の部位は、眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位を含み(またはそれからなり)、

ここで、処置の際に投与される改変BoNT/Aの総用量は、最大27,500(例えば、最大25,000pg)であり、ならびに

ここで、改変BoNT/Aは、BoNT/A軽鎖および転位置ドメインならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(Hcドメイン)を含む。

【0024】

関連態様では、本発明は、顔面の皺線を(例えば、未改変BoNT/A(例えば、配列番号2)によって処置されるものよりも長い期間)処置する方法を提供し、方法は、改変ボツリヌス神経毒A(BoNT/A)を対象の顔面の複数の部位での筋肉内注射によって投与することを含み、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり1754pgよりも多い(例えば、1800pgよりも多い)改変BoNT/Aの単位用量によって投与され、

ここで、複数の部位は、以下から選択され:

眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位、
額の皺線を処置するための、前頭筋の最大5つの部位、ならびに

外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の最大3つの部位(例えば、外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の外部部分の最大3つの部位)、

好ましくは、ここで、複数の部位は、眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位を含み(またはそれからなり)、

ここで、処置の際に投与される改変BoNT/Aの総用量は、最大27,500(例えば、最大

10

20

30

40

50

25,000pg)であり、ならびに

ここで、改変BoNT/Aは、BoNT/A軽鎖および転位置ドメインならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含む。

【0025】

別の関連態様では、本発明は、顔面の皺線を(例えば、未改変BoNT/A(例えば、配列番号2)によって処置されるものよりも長い期間)処置するための医薬の製造における、改変ボツリヌス神経毒A(BoNT/A)の使用を提供し、ここで、改変BoNT/Aは、対象の顔面の複数の部位での筋肉内注射によって投与され、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり1754pgよりも多い(好ましくは、1800pgよりも多い、より好ましくは、2555pgよりも多い)改変BoNT/Aの単位用量によって投与され、

10

ここで、複数の部位は、以下から選択され:

眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位、
額の皺線を処置するための、前頭筋の最大5つの部位、ならびに、

外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の最大3つの部位(例えば、外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の外部部分の最大3つの部位)、

好ましくは、複数の部位は、眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位を含み(またはそれからなり)、

ここで、処置の際に投与される改変BoNT/Aの総用量は、最大27,500pg(例えば、最大25,000pg)であり、ならびに

20

ここで、改変BoNT/Aは、BoNT/A軽鎖および転位置ドメインならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含む。

【0026】

前記顔面の皺線は、最も好ましくは、「上部顔面の皺線」と呼ばれる場合があり、(上記の態様によって反映されるように)眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を含む。本発明は、前記顔面の皺線(例えば、上部顔面の皺線)のいずれか1つまたはそれらの任意の組合せを処置することを含み得る。例えば、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線のうち3つすべてが、本発明の方法によって処置され得る。それはそれとして、特定の種類の顔面の皺線が標的化される場合がある。例えば、処置される顔面の皺線は、眉間の皺線であり得る。さらにまたはあるいは、処置される顔面の皺線は、額の皺線であり得る。さらにまたはあるいは、処置される顔面の皺線は、外眼角の皺線であり得る。

30

【0027】

顔面の皺線の特定の組合せが、本発明によって処置され得る。顔面の皺線の組合せの例として、以下が挙げられる:

眉間の皺線および額の皺線、

眉間の(glabbear)皺線および外眼角の皺線、

額の皺線および外眼角の皺線。

【0028】

本発明によって処置される顔面の皺線の好ましい組合せは、眉間の皺線および外眼角の皺線であり得る。

40

【0029】

「筋肉」への言及は、本発明が取り組む基礎をなす審美的な状態に寄与する(例えば、過度のこわばり、張力または緊張によって)悪影響を受けた筋肉を意味する。

【0030】

筋肉の第1の群は、鼻根筋によって定義され、筋肉の第2の群は、皺眉筋によって定義され、筋肉の第3の群は、眼輪筋によって定義され、筋肉の第4の群は、前頭筋によって定義される。

【0031】

本開示を通じて、「皺眉筋の最大2つの部位」という用語は、「皺眉筋あたり最大2つの部位」という用語と交換可能に使用される場合があり、2つの皺眉筋があることを注記

50

する。そのようなものとして、例えば、改変BoNT/Aが、皺眉筋あたり最大2つの部位に投与されるという条件で、改変BoNT/Aは、皺眉筋の最大4つの部位で投与され得る。

【0032】

皺眉筋(corrugator)はまた、皺眉筋(corrugator supercilli)としても知られている。

【0033】

眼輪筋(orbicularis oculi)の部位(改変BoNT/Aの単位用量が投与される)は、好ましくは、眼輪筋の外部部分にある。「眼輪筋の外部部分」という用語は、「外側上部眼輪筋」という用語と同義的に使用され得る。

【0034】

「眼輪筋の最大3つの部位」に投与することは、以下を含み得る:

- a) 改変BoNT/Aの単位用量を外側上部眼輪筋(例えば、対象の第1の眼の近位の)に投与すること、
- b) 改変BoNT/Aの単位用量を内側上部眼輪筋(例えば、対象の第1の眼の近位の)に投与すること、および
- c) 改変BoNT/Aの単位用量を外側下部眼輪筋(例えば、対象の第1の眼の近位の)に投与すること。

【0035】

「眼輪筋の最大3つの部位」に投与することは、以下を含み得る:

- a) 改変BoNT/Aの単位用量を外側上部眼輪筋(例えば、対象の第1の眼の近位の)に投与すること、
- b) 改変BoNT/Aの単位用量を外側下部眼輪筋(例えば、対象の第1の眼の近位の)の第1の部位に投与すること、および
- c) 改変BoNT/Aの単位用量を外側下部眼輪筋(例えば、対象の第1の眼の近位の)の第2の(異なる)部位に投与すること。

【0036】

本開示を通じて、「眼輪筋の最大3つの部位」という用語は、「眼輪筋あたり最大3つの部位」という用語と同義的に使用される場合があり、2つの眼輪筋があることを注記する。同様に、本開示を通じて、「眼輪筋の外部部分の最大3つの部位」という用語は、「眼輪筋の外部部分の、眼輪筋あたり最大3つの部位」という用語と同義的に使用される場合があり、2つの眼輪筋があることを注記する。そのようなものとして、例えば、改変BoNT/Aが、眼輪筋あたり最大3つの部位に投与されるという条件で、改変BoNT/Aは、眼輪筋の最大6つの部位で投与され得る。

【0037】

「眼輪筋の最大3つの部位」に投与することは、以下を含み得る:

- a) 外側上部眼輪筋につき改変BoNT/Aの単位用量を投与すること、
- b) 内側上部眼輪筋につき改変BoNT/Aの単位用量を投与すること、および
- c) 外側下部眼輪筋につき改変BoNT/Aの単位用量を投与すること。

「眼輪筋の最大3つの部位」に投与することは、以下を含み得る:

- a) 外側上部眼輪筋(例えば、対象の第1の眼の近位の)につき改変BoNT/Aの単位用量を投与すること、
- b) 改変BoNT/Aの単位用量を外側下部眼輪筋(例えば、対象の第1の眼の近位の)につき第1の部位に投与すること、および
- c) 改変BoNT/Aの単位用量を外側下部眼輪筋(例えば、対象の第1の眼の近位の)につき第2の(異なる)部位に投与すること。

【0038】

「上部」眼輪筋への言及は、上部眼瞼の眼輪筋を指す。同様に、「下部」眼輪筋への言及は、下部眼瞼の眼輪筋を指す。

【0039】

当業者ならば、「内側」(例えば、解剖学の観点から)という用語は、身体の正中線に向

10

20

30

40

50

けてを意味することを理解する。同様に、当業者ならば、「外側」(例えば、解剖学の観点から)とは、身体の中線から離れてを意味することを理解する。したがって:

- 「外側」上部眼輪筋とは、身体の中線から離れて位置する上部眼瞼の眼輪筋の部位を指し、
- 「内側」上部眼輪筋とは、身体の中線に向けて位置する上部眼瞼の眼輪筋の部位を指し、
- 「外側下部眼輪筋とは、身体の中線から離れて位置する下部眼瞼の眼輪筋の部位を指す。

【0040】

「外側上部眼輪筋」という用語は、「上部眼瞼の眼輪筋の外部部分」という用語と同義的に使用され得る。「内側上部眼輪筋」という用語は、「上部眼瞼の眼輪筋の内部部分」という用語と同義的に使用され得る。「外側下部眼輪筋」という用語は、「下部眼瞼の眼輪筋の外部部分」という用語と同義的に使用され得る。

10

【0041】

眼輪筋は、「瞼板前部部分」および「隔膜前部部分」(それらのいずれかに注入できる)を含む。眼輪筋は、「眼窩部分」を含む。

【0042】

好ましくは、眼輪筋に投与される単位用量は、前記筋肉の眼窩(orbital)部分に、より好ましくは、眼輪筋の外部部分(例えば、外側部分)の眼窩部分に投与され得る。したがって、複数の部位は、外眼角の皺線を処置するために、眼輪筋の外部部分(例えば、外側部分)の眼窩部分の最大3つの部位を含む(またはそれからなる)。

20

【0043】

外側上部眼輪筋への投与は、外側「瞼板前部」上部眼輪筋へ、または外側「隔膜前部」上部眼輪筋へ投与することを意味する場合がある。

【0044】

内側上部眼輪筋への投与は、内側上部「瞼板前部」眼輪筋への、または内側上部「隔膜前部」眼輪筋への投与を意味する場合がある。

【0045】

外側下部眼輪筋への投与は、外側下部「瞼板前部」眼輪筋への、または外側下部「隔膜前部」眼輪筋への投与を意味する場合がある。

30

【0046】

外側上部眼輪筋へ投与する場合には、前記単位用量は、隔膜前部部分へ(言い換えれば、外側「隔膜前部」上部眼輪筋へ)投与され得る。内側上部眼輪筋へ投与する場合には、前記単位用量は、隔膜前部部分へ(言い換えれば、内側上部「隔膜前部」眼輪筋へ)投与され得る。外側下部眼輪筋へ投与する場合には、前記単位用量は、隔膜前部部分へ(言い換えれば、外側下部「隔膜前部」眼輪筋へ)投与され得る。

【0047】

改変BoNT/Aが投与される部位数は、処置されるべき顔面の皺線に応じて変わり得る。

【0048】

例えば、処置されるべき顔面の皺線は、眉間の皺線である場合があり、「複数の部位」という用語は、最大3つの部位を意味する場合があり、ここで、複数の部位は、眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位を含む(またはそれからなる)。眉間の皺線を処置するために、改変BoNT/Aの2つの単位用量が皺眉筋の2つの異なる部位に、1つの単位用量が鼻根筋の1つの部位に投与される(例えば、その結果、3つの単位用量が3つの異なる部位で投与される)ことが好ましい。顔面の一方の側の眉間の皺線が処置される場合があり、「複数の部位」が、上記で定義されるように最大3つの部位を意味する場合があり、その結果、対象は、改変BoNT/Aの最大3つの単位用量を受け取る。

40

【0049】

処置されるべき顔面の皺線は、眉間の皺線である場合があり、「複数の部位」という用

50

語は、最大6つの部位を意味する場合があります、ここで、改変BoNT/Aの単位用量は、眉間の皺線を処置するために、皺眉筋につき最大2つの部位および鼻根筋につき1つの部位である。眉間の皺線を処置するために、改変BoNT/Aの2つの単位用量が、皺眉筋につき2つの異なる部位に投与され、1つの単位用量が、鼻根筋の1つの部位に投与される(例えば、その結果、5つの単位用量が5つの異なる部位に投与される)ことが好ましい。顔面の両側の眉間の皺線が処置される場合があります、「複数の部位」は、上記で定義されるように最大6つの部位を意味する場合があります、その結果、対象は、改変BoNT/Aの最大6つの単位用量を受け取る。

【0050】

処置されるべき顔面の皺線は、額の皺線である場合があります、「複数の部位」という用語は、額の皺線を処置するための、前頭筋の最大で2、3、4または5つの部位を意味する場合があります。額の皺線を処置するために、5つの単位用量が前頭の5つの異なる部位に投与される(例えば、その結果、5つの単位用量が5つの異なる部位に投与される)ことが好ましい。

10

【0051】

処置されるべき顔面の皺線は、外眼角の皺線である場合があります、「複数の部位」という用語は、眼輪筋の最大で2つまたは3つの部位(例えば、眼輪筋の外部部分の最大で2つまたは3つの部位)を意味する場合があります。外眼角の皺線を処置するために、改変BoNT/Aの3つの単位用量は、眼輪筋の3つの異なる部位に投与される(例えば、その結果、3つの単位用量が3つの異なる部位で投与される)ことが好ましい。顔面の一方の側の外眼角の皺線が処置される場合があります、「複数の部位」が、上記で定義されるように最大3つの部位を意味する場合があります、その結果、対象は、改変BoNT/Aの最大3つの単位用量を受け取る。

20

【0052】

処置されるべき顔面の皺線は、外眼角の皺線である場合があります、「複数の部位」という用語は、眼輪筋につき最大2つまたは3つの部位(例えば、眼輪筋の外部部分の、眼輪筋につき最大2つまたは3つの部位)を意味する場合があります。外眼角の皺線を処置するために、改変BoNT/Aの3つの単位用量が眼輪筋につき3つの異なる部位に投与される(例えば、その結果、6つの単位用量が6つの異なる部位に投与される)ことが好ましい。顔面の両側の外眼角の皺線が処置される場合があります、「複数の部位」は、上記で定義されるように最大6つの部位を意味する場合があります、その結果、対象は、改変BoNT/Aの最大6つの単位用量を受け取る。

30

【0053】

処置されるべき顔面の皺線は、眉間の皺線および額の皺線である場合があります、「複数の部位」という用語は、最大8の部位を意味する場合があります、ここで、複数の部位は、眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位ならびに額の皺線を処置するための、前頭筋の最大5つの部位を含む(またはそれからなる)。改変BoNT/Aの2つの単位用量が、眉間の皺線を処置するために、皺眉筋の2つの異なる部位で投与され、1つの単位用量が鼻根筋の1つの部位に投与され、額の皺線を処置するために、5つの単位用量が、前頭筋の5つの異なる部位に投与される(例えば、その結果、8の単位用量が8の異なる部位に投与される)ことが好ましい。

40

【0054】

処置されるべき顔面の皺線は、眉間の皺線および額の皺線である場合があります、「複数の部位」という用語は、最大10部位を意味する場合があります、ここで、複数の部位は、眉間の皺線を処置するための、皺眉筋につき最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位ならびに額の皺線を処置するための、前頭筋の最大5つの部位を含む(またはそれからなる)。眉間の皺線を処置するために、改変BoNT/Aの2つの単位用量が、皺眉筋につき2つの異なる部位で投与され、1つの単位用量が鼻根筋の1つの部位に投与され、額の皺線を処置するために、5つの単位用量が前頭筋の5つの異なる部位に投与される(例えば、その結果、10の単位用量が10の異なる部位に投与される)ことが好ましい。

50

【0055】

処置されるべき顔面の皺線は、眉間の皺線および外眼角の皺線である場合があり、「複数の部位」という用語は、最大で3、4、5または6つの部位を意味する場合があり、ここで、複数の部位は、眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位ならびに外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の最大で2つまたは3つの部位(例えば、眼輪筋の外側部分の最大で2つまたは3つの部位)を含む(またはそれからなる)。眉間の皺線を処置するために、改変BoNT/Aの2つの単位用量が皺眉筋の2つの異なる部位に投与され、1つの単位用量が鼻根筋の1つの部位に投与され、外眼角の皺線を処置するために、改変BoNT/Aの3つの単位用量が眼輪筋の3つの異なる部位に投与される(例えば、その結果、6つの単位用量が6つの異なる部位で投与される)ことが好ましい。

10

【0056】

処置されるべき顔面の皺線は、眉間の皺線および外眼角の皺線である場合があり、「複数の部位」という用語は、最大で3、4、5、6、7、8、9、10または11の部位を意味する場合があり、ここで、複数の部位は、眉間の皺線を処置するために、皺眉筋につき最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位ならびに外眼角の皺線を処置するために、眼輪筋につき最大で2つまたは3つの部位(例えば、眼輪筋の外部部分に、眼輪筋につき最大で2つまたは3つの部位)を含む(またはそれからなる)。眉間の皺線を処置するために、改変BoNT/Aの2つの単位用量が皺眉筋につき2つの異なる部位に投与され、1つの単位用量が鼻根筋の1つの部位に投与され、外眼角の皺線を処置するために、改変BoNT/Aの3つの単位用量が眼輪筋につき3つの異なる部位に投与される(例えば、その結果、11の単位用量が11の異なる部位に投与される)ことが好ましい。

20

【0057】

処置されるべき顔面の皺線は、額の皺線および外眼角の皺線である場合があり、「複数の部位」という用語は、最大で4、5、6、7または8つの部位を意味する場合があり、ここで、複数の部位は、額の皺線を処置するために、前頭筋の最大で2、3、4または5つの部位ならびに外眼角の皺線を処置するために、眼輪筋の最大で2つまたは3つの部位(例えば、眼輪筋の外部部分の最大で2つまたは3つの部位)を含む(またはそれからなる)。額の皺線を処置するために、5つの単位用量が前頭筋の5つの異なる部位に投与され、外眼角の皺線を処置するために、改変BoNT/Aの3つの単位用量が眼輪筋の3つの異なる部位に投与される(例えば、その結果、8つの単位用量が8つの異なる部位に投与される)ことが好ましい。

30

【0058】

処置されるべき顔面の皺線は、額の皺線および外眼角の皺線である場合があり、「複数の部位」という用語は、最大で4、5、6、7、8、9、10または11の部位を意味する場合があり、ここで、複数の部位は、額の皺線の処置のための、前頭筋の最大で2、3、4または5つの部位および外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋につき最大で2つまたは3つの部位(例えば、眼輪筋につき外部部分の最大で2つまたは3つの部位)を含む(またはそれからなる)。額の皺線を処置するために5つの単位用量が前頭筋の5つの異なる部位に投与され、外眼角の皺線を処置するために、改変BoNT/Aの3つの単位用量が眼輪筋につき3つの異なる部位に投与される(例えば、その結果11の単位用量が11の異なる部位に投与される)ことが好ましい。

40

【0059】

処置されるべき顔面の皺線は、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線である場合があり、「複数の部位」という用語は、最大で4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16の部位を意味する場合があり、ここで、複数の部位は、以下を含む(またはそれからなる)

- 眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位、
- 額の皺線を処置するための、前頭筋の最大で2、3、4または5つの部位、ならびに
- 外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の最大で2つまたは3つの部位(例えば、眼輪筋の外部部分の最大で2つまたは3つの部位)。

50

【0060】

以下が好ましい:

- 眉間の皺線を処置するために、改変BoNT/Aの2つの単位用量が皺眉筋の2つの異なる部位に投与され、1つの単位用量が鼻根筋の1つの部位に投与されること、
- 額の皺線を処置するために、5つの単位用量が前頭筋の5つの異なる部位に投与されること、ならびに
- 外眼角の皺線を処置するために、改変BoNT/Aの3つの単位用量が、眼輪筋(例えば、その外部部分)の3つの異なる部位に投与されること、
- (例えば、その結果、11の単位用量が11の異なる部位に投与される)こと。

【0061】

処置されるべき顔面の皺線は、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線である場合があり、「複数の部位」という用語は、最大で4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16の部位を意味する場合があります、ここで、複数の部位は、以下を含む(またはそれからなる):

- 眉間の皺線を処置するための、皺眉筋につき最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位、
- 額の皺線を処置するための、前頭筋の最大で2、3、4または5つの部位、ならびに
- 外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋につき最大で2つまたは3つの部位(例えば、眼輪筋につき外部部分の最大で2つまたは3つの部位)

以下が好ましい:

- 眉間の皺線を処置するために、改変BoNT/Aの2つの単位用量が、皺眉筋につき2つの異なる部位に投与され、1つの単位用量が鼻根筋の1つの部位に投与されること、
- 額の皺線を処置するために、5つの単位用量が前頭筋の5つの異なる部位に投与されること、ならびに
- 外眼角の皺線を処置するために、改変BoNT/Aの3つの単位用量が眼輪筋(例えば、その外部部分)につき3つの異なる部位に投与されること。

【0062】

- (例えば、その結果、16の単位用量が11の異なる部位で投与されること)。

【0063】

したがって、「複数の部位」という用語は、最大で2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16の部位を意味する場合があります。好ましくは、「複数の部位」という用語は、「最大16の部位」を指す場合があります。

【0064】

「複数の部位」という用語は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16の部位を意味する場合があります。好ましくは、「複数の部位」という用語は、16の部位を指す場合がある。

【0065】

したがって、改変BoNT/Aは、対象の顔面の最大16の部位で筋肉内注射によって投与される場合がある、例えば

- 眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大4つの部位(例えば、改変BoNT/Aが皺眉筋につき最大2つの部位に投与されるという条件で)および鼻根筋の1つの部位、
- 額の皺線を処置するための、前頭筋の最大5つの部位、ならびに
- 外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の最大6つの部位(例えば、改変BoNT/Aが、眼輪筋につき最大で3つの部位に投与されるという条件で)。

【0066】

複数の部位は、同一筋肉群(例えば、右および左皺眉筋、右および左眼輪筋)上にある場合がある。同様に、複数の部位は、同一の筋肉(例えば、右皺眉筋もしくは左皺眉筋または右眼輪筋もしくは左眼輪筋)上にある場合がある。同様に、複数の部位は、前記筋肉および筋肉群の組合せ上にある場合がある。したがって、個別化された処置レジメンが提供され得る。

【0067】

本発明に従って使用するための改変BoNT/Aの効力は、好ましくは、標準技術に従うマウスLD₅₀アッセイによって決定される。前記アッセイでは、1単位は、マウスにおける算出された半致死量(LD₅₀)に対応する改変BoNT/Aの量として定義される。好ましくは、マウスにおける算出された半致死腹膜内用量。

【0068】

特に、前記アッセイにおいて1単位に対応する改変BoNT/Aの量は、好ましくは、24.04pgである。

【0069】

「最大」という用語は、値に関連して使用される場合(例えば、最大3661単位)、最大で列挙された値を意味し、列挙された値を含む。したがって、例として、改変BoNT/Aの「最大3661単位」を投与することへの言及は、改変BoNT/Aの3661単位の投与ならびに改変BoNT/Aの3661単位未満の投与を包含する。別の例として、改変BoNT/Aの「最大80,000pg」を投与することへの言及は、改変BoNT/Aの80,000pgの投与ならびに改変BoNT/Aの80,000pg未満の投与を包含する。

【0070】

改変BoNT/Aの用量は、複数の部位での筋肉内注射によって投与される。部位につき、単一単位用量が投与される。「(単一)単位用量が投与される」という用語は、(単一)単位用量の実質的にすべてが投与されることを意味する。好ましくは、(単一)単位用量の多くとも残存量(例えば、最大1%、0.1%または0.01%)のみが、改変BoNT/Aが再構成されたバイアル中に残存する場合がある。しかし、好ましくは、(単一)単位用量のすべてが投与される。筋肉群に応じて、(単一)単位用量が通常、第1の群(本明細書で記載される)筋肉に投与され、2×単位が通常、第2の群(本明細書で記載される)から選択される筋肉に投与され、3×単位が通常、第3の群(本明細書で記載される)から選択される筋肉に投与され、5×単位が通常、第4の群(本明細書で記載される)から選択される筋肉に投与される。

【0071】

単位用量は、改変BoNT/Aの単位に換算して表現され得る。例えば、24.04pgは、1単位の改変BoNT/Aに相当し得る。例として、2404pgのBoNT/Aは、100単位の改変BoNT/Aと呼ばれる場合がある。

【0072】

単位用量は、73単位より多い改変BoNT/Aであり得る。単位用量範囲の上限は、3,661、3000、2500、2000、1500、1000、500または100単位の改変BoNT/Aであり得る。単位用量範囲の下限は、75、100、150、200、300または500単位の改変BoNT/Aであり得る。好ましくは、改変BoNT/Aの単位用量は、73単位より多く～3000単位、100単位～2500単位、より好ましくは、200単位～2000単位である。

【0073】

上記のように、改変BoNT/Aの単位用量は、73単位より多い場合がある。単位用量範囲の上限は、300、250、200、150、100または50単位の改変BoNT/Aである場合があり、好ましくは、上限は、300単位である。単位用量範囲の下限は、75、100、150、200、300単位である場合があり、好ましくは、下限は、100単位である。好ましくは、改変BoNT/Aの単位用量は、100～300単位の改変BoNT/A、例えば、150単位～250単位である。

【0074】

改変BoNT/Aの単位用量は、100単位～300単位、150～250単位および175単位～225単位から選択され得る。

【0075】

単位用量は、1754pgより多く～8000pgの改変BoNT/Aであり得る。言い換えれば、単位用量は、1754pgより多く、最大8000pgの改変BoNT/Aであり得る。単位用量範囲の上限は、8,000、7,000、6,000、5,000、4,000、3,000、2,000または1,0

00pgの改変BoNT/Aである場合があり、好ましくは、上限は、5,000pgである。単位用量範囲の下限は、1,800、2,000、2,500、3000または4,000pgの改変BoNT/Aである場合があり、好ましくは、下限は、1,800である。改変BoNT/Aの単位用量は、1,800~8,000pg、2,000~6,000pg、最も好ましくは、3,000~6,000pgから選択され得る。改変BoNT/Aの単位用量は、4,500~5,500pgの改変BoNT/A、例えば、4,900~5,100pgであり得る。

【0076】

単位用量は、1800pgより多い改変BoNT/Aであり得る。単位用量は、1800pgより多く、最大7000pgの改変BoNT/A、例えば、1800pgより多く、最大6000pgの改変BoNT/Aであり得る。単位用量は、2000pgより多く、最大5000pgの改変BoNT/Aであり得る。

10

【0077】

単位用量は、2555pgより多くであり得る。例えば、単位用量は、2555pgより多く、最大8000pgの改変BoNT/A、例えば、2555pgより多く、最大6000pgであり得る。

【0078】

単位用量は、2000pg、2500pg、3000pg、4000pg、4500pg、5000pg、5500pg、6000pg、6500pg、7000pg、7500pgまたは8000pgの改変BoNT/Aであり得る。

【0079】

単位用量は、2000~3500pgの改変BoNT/Aであることがより好ましい。例えば、単位用量は、2250pg~3250pgの改変BoNT/Aであり得る。特に好ましい単位用量は、約2500pg(例えば、2500pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、単位用量は、好ましくは、2500pgの改変BoNT/Aであり得る。別の好ましい単位用量は、約3000pg(例えば、3000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、単位用量は、3000pgの改変BoNT/Aであり得る。

20

【0080】

単位用量は、3500~5500pgの改変BoNT/Aであり得る。例えば、単位用量は、3800pg~4200pgの改変BoNT/Aであり得る。単位用量は、4800~5200pgの改変BoNT/Aであり得る。特に好ましい単位用量は、約4000pg(例えば、4000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、単位用量は、4000pgの改変BoNT/Aであり得る。別の特に好ましい単位用量は、約5000pg(例えば、5000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、単位用量は、5000pgの改変BoNT/Aであり得る。

30

【0081】

単位用量は、「単位」に換算して、また、pgでの量に換算して上記で表現され得る。改変BoNT/Aの単位用量はまた、単位および量(pg)の両方で同時に表現され得る。

【0082】

顔面の皺線を処置する場合には、改変BoNT/Aは、眉間の皺線を処置するための、皺眉筋の最大2つの部位および鼻根筋の1つの部位、額の皺線を処置するための前頭筋の最大5つの部位ならびに外眼角の皺線を処置するための、眼輪筋の外部部分の最大3つの部位から選択される複数の部位に投与され得る。

40

【0083】

本発明の処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、最大3661単位であり得る。言い換えれば、所与の処置セッションで投与される改変BoNT/Aの総量は、最大3661単位であり得る。総用量は、最大3500、3000、2500、2000、1500または1000単位の改変BoNT/Aであり得る。好ましくは、総用量は、最大3327.8単位の改変BoNT/Aであり得る。

【0084】

本発明の処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、最大88000、85000、80000、75000、70000、65000、60000、55000、50000、45000、40000、35000または30000pgの改変BoNT/A、好ましくは、最大80000pgの改変BoNT/

50

Aであり得る。したがって、総用量の上限は、88000、85000、80000、75000、70000、65000、60000、55000、50000、45000、40000、35000または30000 pgの改変BoNT/A、好ましくは、80000 pgの改変BoNT/Aであり得る。総用量の下限は、25000、20000、15000、10000、5000 pg、2000 pg、1000 pg、500 pgまたは50 pgの改変BoNT/Aであり得る。例えば、総用量の下限は、25000、20000、15000、10000または5000 pgの改変BoNT/Aであり得る。

【0085】

本発明の処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、7,000 pg～8,000 pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、7,000 pg～8,000 pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。特に好ましい総用量は、約7,500 pg(例えば、7,500 pg±10%)の改変BoNT/Aである場合があり、例えば、総用量は、7,500 pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、約7,500 pg(例えば、7,500 pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、7,500 pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

10

【0086】

本発明の処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、10,000 pg～20,000 pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、10,000 pg～20,000 pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。例えば、総用量は、11,500 pg～12,500 pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、11,500 pg～12,500 pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。特に好ましい総用量は、約12,000 pg(例えば、12,000 pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、総用量は、12,000 pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、約12,000 pg(例えば、12,000 pg±10%)の改変BoNT/Aが対象に投与され得る、例えば、12,000 pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

20

【0087】

例えば、総用量は、12,000 pg～13,000 pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、12,000 pg～13,000 pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば本明細書で記載される複数の単位用量によって)。特に好ましい総用量は、約12,500 pg(例えば、12,500 pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、総用量は、12,500 pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、約12,500 pg(例えば、12,500 pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、12,500 pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

30

【0088】

対象に投与される総用量は、14,000 pg～16,000 pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、14,000 pg～16,000 pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。特に好ましい総用量は、約15,000 pg(例えば、15,000 pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、総用量は、15,000 pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、約15,000 pg(例えば、15,000 pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、15,000 pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

40

【0089】

本発明の処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、18,000 pg～26,000 pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、18,000 pg～26,000 pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。例えば、総用量は、19,000 pg～21,000 pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、19,000 pg～21,000 pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。特に好ましい総用量は、約20,000 pg(例えば、20,000 pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、総用量は、20,000 pgの改変BoNT/Aで

50

あり得る。したがって、約20,000pg(例えば、20,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、20,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

【0090】

本発明の処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、22,000pg $\sim$ 23,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、22,000pg $\sim$ 23,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。特に好ましい総用量は、約22,500pg(例えば、22,500pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、総用量は、22,500pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、約22,500pg(例えば、22,500pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、22,500pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

10

【0091】

対象に投与される総用量は、23,000pg $\sim$ 25,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、23,000pg $\sim$ 25,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。特に好ましい総用量は、約24,000pg(例えば、24,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、総用量は、24,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、約24,000pg(例えば、24,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、24,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

20

【0092】

対象に投与される総用量は、24,000pg $\sim$ 26,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、24,000pg $\sim$ 26,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。特に好ましい総用量は、約25,000pg(例えば、24,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、総用量は、25,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、約25,000pg(例えば、25,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、25,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

【0093】

対象に投与される総用量は、27,000pg $\sim$ 28,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、27,000pg $\sim$ 28,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。特に好ましい総用量は、約27,500pg(例えば、27,500pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、総用量は、27,500pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、約27,500pg(例えば、27,500pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、27,500pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

30

【0094】

対象に投与される総用量は、31,000pg $\sim$ 33,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、31,000pg $\sim$ 33,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。特に好ましい総用量は、約32,000pg(例えば、32,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、総用量は、32,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、約32,000pg(例えば、32,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、32,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

40

【0095】

対象に投与される総用量は、35,000pg $\sim$ 37,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、35,000pg $\sim$ 37,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。特に好ましい総用量は、約36,000pg(例えば、36,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、総用量は、36,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、約36,000pg(例えば、36,000pg $\pm$ 10%)

50

の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、36,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

【0096】

本発明の処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、35,000~45,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、35,000~45,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。特に好ましい総用量は、約40,000pg(例えば、40,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、総用量は、40,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、約40,000pg(例えば、40,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、40,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

10

【0097】

本発明の処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、43,000~44,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、43,000~44,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。特に好ましい総用量は、約44,000pg(例えば、44,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、総用量は、44,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、約44,000pg(例えば、44,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、44,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

20

【0098】

本発明の処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、60,000~70,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、60,000~70,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。本発明の処置レジメンを実施する場合に投与される好ましい総用量は、63,000~65,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、63,000~65,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。特に好ましい総用量は、約64,000pg(例えば、64,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、総用量は、64,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、約64,000pg(例えば、64,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、64,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

30

【0099】

総用量は、12,000pg~13,000pgの改変BoNT/Aである場合があり、単位用量は、2000~3500pgの改変BoNT/Aである場合がある。したがって、12,000pg~13,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与される場合があり、ここで、単位用量は、2000~3500pgの改変BoNT/Aである。

【0100】

特に好ましい総用量は、約12,500pg(例えば、12,500pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、総用量は、12,500pgの改変BoNT/Aである場合があり、ここで、単位用量は、2000~3500pgの改変BoNT/Aである。好ましい総用量は、12,500pgの改変BoNT/Aであり、ここで、単位用量は、2000~3500pgの改変BoNT/Aである。より好ましい総用量は、12,500pgの改変BoNT/Aであり、ここで、単位用量は、2500pgの改変BoNT/Aである。したがって、12,500pgの改変BoNT/Aが対象に投与される場合があり、ここで、単位用量は、2500pgの改変BoNT/Aである。

40

【0101】

総用量は、14,000pg~16,000pgの改変BoNT/Aである場合があり、単位用量は、2000~3500pgの改変BoNT/Aである場合がある。したがって、14,000pg~16,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与される場合があり、ここで、単位用量は、2000~3500pgの改変BoNT/Aである。

50

【0102】

特に好ましい総用量は、約15,000pg(例えば、15,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、総用量は、15,000pgの改変BoNT/Aである場合があり、ここで、単位用量は、2000~3500pgの改変BoNT/Aである。好ましい総用量は、15,000pgの改変BoNT/Aであり、ここで、単位用量は、2000~3500pgの改変BoNT/Aである。より好ましい総用量は、15,000pgの改変BoNT/Aであり、ここで、単位用量は、2500pgの改変BoNT/Aである。したがって、15,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与される場合があり、ここで、単位用量は、2500pgの改変BoNT/Aである。

【0103】

本発明の処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、18,000pg~26,000pgの改変BoNT/Aである場合があり、ここで、単位用量は、3500~5500pgの改変BoNT/Aである。したがって、18,000pg~26,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与される場合があり、ここで、単位用量は、3500~5500pgの改変BoNT/Aである。

10

【0104】

特に好ましい総用量は、約20,000pg(例えば、20,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aである場合があり、例えば、総用量は、20,000pgの改変BoNT/Aである場合があり、ここで、単位用量は、3500~5500pgの改変BoNT/Aである。好ましい総用量は、20,000pgの改変BoNT/Aであり、ここで、単位用量は、3500~5500pgの改変BoNT/Aである。より好ましい総用量は、20,000pgの改変BoNT/Aであり、ここで、単位用量は、4000pgの改変BoNT/Aである。したがって、20,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与される場合があり、ここで、単位用量は、4000pgの改変BoNT/Aである。

20

【0105】

本発明の処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、23,000pg~25,000pgの改変BoNT/Aである場合があり、ここで、単位用量は、3500~5500pgの改変BoNT/Aである。したがって、23,000pg~25,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与される場合があり、ここで、単位用量は、3500~5500pgの改変BoNT/Aである。

【0106】

特に好ましい総用量は、約24,000pg(例えば、24,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aである場合があり、例えば、総用量は、24,000pgの改変BoNT/Aである場合があり、ここで、単位用量は、3500~5500pgの改変BoNT/Aである。好ましい総用量は、24,000pgの改変BoNT/Aであり、ここで、単位用量は、3500~5500pgの改変BoNT/Aである。より好ましい総用量は、24,000pgの改変BoNT/Aであり、ここで、単位用量は、4000pgの改変BoNT/Aである。したがって、24,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与される場合があり、ここで、単位用量は、4000pgの改変BoNT/Aである。

30

【0107】

本発明の処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、43,000~44,000pgの改変BoNT/Aである場合があり、ここで、単位用量は、2000~3500pgの改変BoNT/Aである。したがって、43,000~44,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与される場合があり、ここで、単位用量は、2000~3500pgの改変BoNT/Aである。特に好ましい総用量は、約44,000pg(例えば、44,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aである場合があり、ここで、単位用量は、2000~3500pgの改変BoNT/Aであり、例えば、総用量は、44,000pgの改変BoNT/Aである場合があり、ここで、単位用量は、2000~3500pgの改変BoNT/Aである。したがって、約44,000pg(例えば、44,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与される場合があり、ここで、単位用量は、2000~3500pgの改変BoNT/Aであることが好ましい。例えば、約44,000pg(例えば、44,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aが対象に投与される場合があり、ここで、単位用量は、約2500pg(例えば、2500pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aである。44,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与される場合があり、ここで、単位用量は、2500pgの改変BoNT/Aであることがより好ましい。

40

50

【0108】

本発明の処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、60,000～70,000pgの改変BoNT/Aである場合があり、ここで、単位用量は、3500～5500pgの改変BoNT/Aである。したがって、60,000～70,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与される場合があり、ここで、単位用量は、3500～5500pgの改変BoNT/Aである。本発明の処置レジメンを実施する場合に投与される好ましい総用量は、63,000～65,000pgの改変BoNT/Aである場合があり、ここで、単位用量は、3500～5500pgの改変BoNT/Aである。特に好ましい総用量は、約64,000pg(例えば、64,000pg±10%)の改変BoNT/Aである場合があり、ここで、単位用量は、3500～5500pgの改変BoNT/Aである。例えば、総用量は、64,000pgの改変BoNT/Aである場合があり、ここで、単位用量は、3500～5500pgの改変BoNT/Aである。したがって、約64,000pg(例えば、64,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与される場合があり、ここで、単位用量は、3500～5500pgの改変BoNT/Aである。約64,000pg(例えば、64,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与される場合があり、ここで、単位用量が、約4000pg(例えば、4,000pg±10%)の改変BoNT/Aであることが好ましい。64,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与される場合があり、ここで、単位用量が、4000pgの改変BoNT/Aであることがより好ましい。

10

【0109】

総用量は、処置されるべき顔面の皺線または顔面の皺線の組合せに応じて変わり得る。任意の所与の顔面の皺線のための好ましい総用量の例は、以下により詳細に論じられる。

20

【0110】

眉間の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、最大で30000、25000、20000、15000、10000または5000pgの改変BoNT/A、好ましくは、最大で25000pgの改変BoNT/Aであり得る。眉間の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与され得る特に好ましい総用量は、約12,500pg(例えば、12,500pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、単位用量は、12,500pgの改変BoNT/Aであり得る。眉間の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与され得る別の特に好ましい総用量は、約20,000pg(例えば、20,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、単位用量は、20,000pgの改変BoNT/Aであり得る。

30

【0111】

眉間の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、7,000pg～8,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の(glabeller)皺線を処置するために、7,000pg～8,000pgの改変BoNT/Aが対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。眉間の(glabeller)皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約7,500pg(例えばm7,500pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、眉間の(glabeller)皺線を処置するために、総用量は、7,500pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の(glabeller)皺線を処置するために、約7,500pg(例えば、7,500pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、眉間の(glabeller)皺線を処置するために、7,500pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

40

【0112】

眉間の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、10,000pg～20,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線を処置するために、10,000pg～20,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。例えば、眉間の皺線を処置するために、総用量は、11,500pg～12,500pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線を処置するために、11,500pg～12,500pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。特に好ましい総用量は、約12,000pg(例えば、12,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、眉間の皺線を処置する

50

ために、総用量は、12,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線を処置するために、約12,000pg(例えば、12,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、眉間の皺線を処置するために、12,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

【0113】

眉間の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、12,000pg～13,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線を処置するために、12,000pg～13,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。眉間の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約12,500pg(例えば、12,500pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、眉間の皺線を処置するために、総用量は、12,500pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線を処置するために、約12,500pg(例えば、12,500pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、眉間の皺線を処置するために、12,500pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

10

【0114】

眉間の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、18,000pg～26,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線を処置するために、18,000pg～26,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば本明細書で記載される複数の単位用量によって)。例えば、眉間の皺線を処置するために、総用量は、19,000pg～21,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線を処置するために、19,000pg～21,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。眉間の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約20,000pg(例えば、20,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、眉間の皺線を処置するために、総用量は、20,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線を処置するために、約20,000pg(例えば、20,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、眉間の皺線を処置するために、20,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

20

【0115】

額の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、最大で30000、25000、20000、15000、10000または5000pgの改変BoNT/A、好ましくは、最大で25000pgの改変BoNT/Aであり得る。

30

【0116】

額の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、12,000pg～13,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、額の皺線を処置するために、12,000pg～13,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。額の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約12,500pg(例えば、12,500pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、額の皺線を処置するために、総用量は、12,500pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、額の皺線を処置するために、約12,500pg(例えば、12,500pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、額の皺線を処置するために、12,500pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

40

【0117】

額の皺線を処置するために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、18,000pg～26,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、額の皺線を処置するために、18,000pg～26,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。例えば、額の皺線を処置するために、総用量は、19,000pg～21,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、額の皺線を処置するために、19,000pg～21,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明

50

細書で記載される複数の単位用量によって)。額の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約20,000pg(例えば、20,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、額の皺線を処置するために、総用量は、20,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、額の皺線を処置するために、約20,000pg(例えば、20,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、額の皺線を処置するために、20,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

【0118】

外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、最大30000、25000、20000、15000、10000または5000pgの改変BoNT/A、好ましくは、最大25000pgの改変BoNT/Aであり得る。

10

【0119】

外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、7,000pg $\sim$ 8,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、外眼角の皺線を処置するために、7,000pg $\sim$ 8,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば本明細書で記載される複数の単位用量によって)。外眼角の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約7,500pg(例えば、7,500pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、外眼角の皺線を処置するために、総用量は、7,500pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、外眼角の皺線を処置するために、約7,500pg(例えば、7,500pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、外眼角の皺線を処置するために、7,500pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

20

【0120】

外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、10,000pg $\sim$ 20,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、外眼角の皺線を処置するために、10,000pg $\sim$ 20,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。例えば、外眼角の皺線を処置するために、総用量は、11,500pg $\sim$ 12,500pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、外眼角の皺線を処置するために、11,500pg $\sim$ 12,500pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。特に好ましい総用量は、約12,000pg(例えば、12,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、外眼角の皺線を処置するために、総用量は、12,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、外眼角の皺線を処置するために、約12,000pg(例えば、12,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、外眼角の皺線を処置するために、12,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

30

【0121】

外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、14,000pg $\sim$ 16,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、外眼角の皺線を処置するために、14,000pg $\sim$ 16,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。外眼角の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約15,000pg(例えば、15,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、外眼角の皺線を処置するために、総用量は、15,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、外眼角の皺線を処置するために、約15,000pg(例えば、15,000pg $\pm$ 10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、外眼角の皺線を処置するために、15,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

40

【0122】

外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、23,000pg $\sim$ 25,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、外眼角の皺線を処置するために

50

、23,000pg~25,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。外眼角の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約24,000pg(例えば、24,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、外眼角の皺線を処置するために、総用量は、24,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、外眼角の皺線を処置するために、約24,000pg(例えば、24,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、外眼角の皺線を処置するために、24,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

【0123】

眉間の皺線および額の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、18,000pg~26,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および額の皺線を処置するために、18,000pg~26,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。例えば、眉間の皺線および額の皺線を処置するために、総用量は、19,000pg~21,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および額の皺線を処置するために、19,000pg~21,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。眉間の皺線および額の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約20,000pg(例えば、20,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、眉間の皺線および額の皺線を処置するために、総用量は、20,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および額の皺線を処置するために、約20,000pg(例えば、20,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、眉間の皺線および額の皺線を処置するために20,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

【0124】

眉間の皺線および額の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、24,000pg~26,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および額の皺線を処置するために、24,000pg~26,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。眉間の皺線および額の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約25,000pg(例えば、24,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、眉間の皺線および額の皺線を処置するために、総用量は、25,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および額の皺線を処置するために、約25,000pg(例えば、25,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、眉間の皺線および額の皺線を処置するために、25,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

【0125】

眉間の皺線および額の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、31,000pg~33,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および額の皺線を処置するために、31,000pg~33,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。眉間の皺線および額の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約32,000pg(例えば、32,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、眉間の皺線および額の皺線を処置するために、総用量は、32,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および額の皺線を処置するために、約32,000pg(例えば、32,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、眉間の皺線および額の皺線を処置するために、32,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

【0126】

眉間の皺線および額の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、35,000~45,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および額

の皺線を処置するために、35,000~45,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。眉間の皺線および額の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約40,000pg(例えば、40,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、眉間の皺線および額の皺線を処置するために、総用量は、40,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および額の皺線を処置するために、約40,000pg(例えば、40,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、眉間の皺線および額の皺線を処置するために、40,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

【0127】

眉間の皺線および外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、14,000pg~16,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、14,000pg~16,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約15,000pg(例えば、15,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、総用量は、15,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、約15,000pg(例えば、15,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、15,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

【0128】

眉間の皺線および外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、18,000pg~26,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、18,000pg~26,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。例えば、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、総用量は、19,000pg~21,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、19,000pg~21,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約20,000pg(例えば、20,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、総用量は、20,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、約20,000pg(例えば、20,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、20,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

【0129】

眉間の皺線および外眼角の皺線のための処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、22,000pg~23,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、22,000pg~23,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約22,500pg(例えば、22,500pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、総用量は、22,500pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、約22,500pg(例えば、22,500pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、22,500pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

【0130】

眉間の皺線および外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、23,000pg~25,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、23,000pg~25,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約24,000pg(例えば、24,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、総用量は、24,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、約24,000pg(例えば、24,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、外眼角の皺線を処置するために、24,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

10

【0131】

眉間の皺線および外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、27,000pg~28,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、27,000pg~28,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約27,500pg(例えば、27,500pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、総用量は、27,500pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、約27,500pg(例えば、27,500pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、27,500pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

20

【0132】

眉間の皺線および外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、31,000pg~33,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、31,000pg~33,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約32,000pg(例えば、32,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、総用量は、32,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、約32,000pg(例えば、32,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、32,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

30

【0133】

眉間の皺線および外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、35,000pg~37,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、35,000pg~37,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約36,000pg(例えば、36,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、総用量は、36,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、約36,000pg(例えば、36,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、36,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

40

【0134】

眉間の皺線および外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、43,000~44,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線およ

50

び外眼角の皺線を処置するために、43,000pg～44,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約44,000pg(例えば、44,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、総用量は、44,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、約44,000pg(例えば、44,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、眉間の皺線および外眼角の皺線を処置するために、44,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

【0135】

額の皺線および外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、18,000pg～26,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、18,000pg～26,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。例えば、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、総用量は、19,000pg～21,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、19,000pg～21,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約20,000pg(例えば、20,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、総用量は、20,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、約20,000pg(例えば、20,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、20,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

【0136】

額の皺線および外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、27,000pg～28,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、27,000pg～28,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約27,500pg(例えば、27,500pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、総用量は、27,500pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、約27,500pg(例えば、27,500pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、27,500pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

【0137】

額の皺線および外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、31,000pg～33,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、31,000pg～33,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約32,000pg(例えば、32,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、総用量は、32,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、約32,000pg(例えば、32,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、32,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

【0138】

額の皺線および外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量

10

20

30

40

50

は、43,000～44,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、43,000～44,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約44,000pg(例えば、44,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、総用量は、44,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、約44,000pg(例えば、44,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために44,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

10

【0139】

眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、43,000～44,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、43,000～44,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約44,000pg(例えば、44,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、総用量は、44,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、約44,000pg(例えば、44,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、44,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

20

【0140】

眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、60,000～70,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、60,000～70,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される好ましい総用量は、63,000～65,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、63,000～65,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約64,000pg(例えば、64,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、総用量は、64,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、約64,000pg(例えば、64,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に投与され得る、例えば、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、64,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

30

40

【0141】

眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線のために処置レジメンを実施する場合に投与される総用量は、75,000pg～88,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、75,000pg～88,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、特に好ましい総用量は、約80,000pg(例えば、80,000pg±10%)の改変BoNT/Aであり得る、例えば、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、総用量は、80,000pgの改変BoNT/Aであり得る。したがって、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、約80,000pg(例えば、80,000pg±10%)の改変BoNT/Aが、対象に

50

投与され得る、例えば、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置するために、80,000pgの改変BoNT/Aが、対象に投与され得る(例えば、本明細書で記載される複数の単位用量によって)。

【0142】

眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線の各々が処置される場合には、総用量は、最大(up)88,000pg(例えば、最大80,000pg)であり得る。

【0143】

当業者は、対象が、例えば、美容的処置または異なる適応症のための処置の一部としてクロストリジウム神経毒(例えば、BoNT)を用いる追加の処置を最近受けていた(またはその後に受ける)場合を考慮するであろう。当業者は、当技術分野で日常的な技術を使用して、本処置レジメンを適切に適応させるであろう。

【0144】

本発明に従う複数の筋肉への投与は、同一処置セッションにおいて起こることが好ましい。

【0145】

本発明の改変BoNT/Aは、未改変BoNT/A(例えば、ディスポート(登録商標))と比較した場合により長い作用持続期間を有することが好ましい。「未改変BoNT/Aによって処置されるものよりも長い期間、顔面の皺線を処置すること」という用語は、顔面の皺線が、本発明の改変BoNT/Aの投与後、未改変BoNT/Aの投与と比較した場合により長い期間低減されることを意味する場合がある。前記の作用持続期間は、少なくとも1.25×、1.5×、1.75×、2.0×または2.25×長い場合がある。改変BoNT/Aの作用持続期間は、6から9か月の間であり得る。例えば、作用持続期間は、少なくとも4.5ヶ月(開始から)、5.0ヶ月、5.5ヶ月、6ヶ月、6.5ヶ月、7.0ヶ月、7.5ヶ月、8.0ヶ月、8.5ヶ月または9.0ヶ月であり得る。特定の実施形態では、作用持続期間は、9.0ヶ月より長い場合がある。好ましくは、作用持続期間は、9.0ヶ月より長い場合がある。前記低減は、未改変BoNT/Aを用いて処置された同等の症状を示す同等の対照対象に対する比較によって決定してもよい。対照対象の1つ以上の症状の重症度が、未改変BoNT/A処置前と実質的に同一である(例えば、同一である)期間で、本発明に従う改変BoNT/Aを用いて処置された対象は、改変BoNT/Aを用いる処置前の1つ以上の症状の重症度と比較した場合に少なくとも5%、10%、25%または50%の、同等の1以上の症状における改善を示す場合がある。未改変BoNT/Aは、好ましくは、二鎖形態で存在する配列番号2である。言い換えれば、本明細書で記載される未改変BoNT/Aは、好ましくは、配列番号2の二鎖形態である。

【0146】

処置は、改変BoNT/Aの投与後、適切な期間で反復される場合がある。作用持続期間が、未改変BoNT/A(例えば、ディスポート(登録商標))のもののおよそ2倍であることを考慮すると、対象が未改変BoNT/A(例えば、ディスポート(登録商標))を用いて処置される場合よりも、その後の投与の間の期間をより長くとることが適切である。対象は、先の投与の少なくとも18、20、25または30週間後に、本発明に従う改変BoNT/Aを再投与される場合がある。例えば、対象は、先の投与の少なくとも18~45週間後、好ましくは、20~35週間後に、本発明に従う改変BoNT/Aを再投与される場合がある。

【0147】

「対象」とは、本明細書で使用される場合、哺乳動物、例えば、ヒトまたは他の哺乳動物であり得る。好ましくは、「対象」とは、ヒト対象を意味する。対象は、好ましくは、改変BoNT/Aが投与される筋肉に関連する病状のない対象である。例えば、対象が、眼瞼痙攣または片側顔面痙攣(例えば、典型的な片側顔面痙攣)を有さないことが好ましい。対象が、眼瞼痙攣を有さないことが特に好ましい。

【0148】

本発明に従う処置の対象は、未改変BoNT/Aを用いる、および/または別のクロストリジウム神経毒を用いる処置にとって不適である対象である場合がある。前記対象は、未改変BoNT/Aを用いる、および/または別のクロストリジウム神経毒を用いる処置に対して

耐性である対象であり得る。耐性は、対象による抗クロストリジウム神経毒抗体の生成を含む、クロストリジウム神経毒に対する免疫応答の発生のために生じる場合がある。

【0149】

「処置する」または「処置すること」という用語は、本明細書で使用される場合、顔面の皺線の美容的処置を指し、予防的処置(例えば、顔面の皺線の発生を防ぐための)ならびに修正的処置(顔面の皺線をすでに有している対象の処置)を包含する。したがって、任意の方法、使用するための改変BoNT/Aまたは本明細書で記載される使用は、「前記顔面の皺線を前記改変BoNT/Aを用いて処置するための美容的方法」として適宜記載され得る。さらにまたはあるいは、任意の方法、使用するための改変BoNT/Aまたは本明細書で記載される使用は、前記顔面の皺線を処置するための前記改変BoNT/Aの非治療的使用」として適宜記載され得る。

10

【0150】

好ましくは、「処置する」または「処置すること」は、本明細書で使用される場合、修正的処置を意味する。「処置する」または「処置すること」という用語は、本明細書で使用される場合、顔面の皺線および/またはその症状を指す。本明細書で記載される処置は、処置前の眉間の皺線のレベルに対する少なくとも5%、10%、25%または50%の、眉間の皺線のレベルの低減を提供し得る。本明細書で記載される処置は、処置前の額の皺線のレベルに対する少なくとも5%、10%、25%または50%の、額の皺線のレベルの低減を提供し得る。本明細書で記載される処置は、処置前の外眼角の皺線のレベルに対する少なくとも5%、10%、25%または50%の、外眼角の皺線のレベルの低減を提供し得る。本明細書で記載される処置は、処置前の眉間の皺線および外眼角の皺線のレベルに対する少なくとも5%、10%、25%または50%の、眉間の皺線および外眼角の皺線のレベルの低減を提供し得る。本明細書で記載される処置は、処置前の眉間の皺線および額の皺線のレベルに対する少なくとも5%、10%、25%または50%の、眉間の皺線および額の皺線のレベルの低減を提供し得る。本明細書で記載される処置は、処置前の外眼角の皺線および額の皺線のレベルに対する少なくとも5%、10%、25%または50%の、外眼角の皺線および額の皺線のレベルの低減を提供し得る。本明細書で記載される処置は、処置前の眉間の皺線、外眼角の皺線および額の皺線のレベルに対する少なくとも5%、10%、25%または50%の、眉間の皺線、外眼角の皺線および額の皺線のレベルの低減を提供し得る。

20

【0151】

BoNT/Aは、クロストリジウム属(*Clostridia*)の細菌によって産生されるクロストリジウム神経毒の一例である。このようなクロストリジウム神経毒の他の例として、C.テタニ(*tetani*)によって、およびC.ボツリヌム(*botulinum*)(BoNT)血清型B~GおよびXによって産生されるもの(WO2018/009903 A2を参照されたい)ならびにC.バラティ(*baratii*)およびC.ブチリカム(*butyricum*)によって産生されるものが挙げられる。前記神経毒は、高度に強力であり、特異的であり、それらが送達されるニューロンおよび他の細胞を毒することができる。クロストリジウム毒素は、既知の最も強力な毒素の一部である。例として、ボツリヌス神経毒は、血清型に応じて0.5~5 ng/kgの範囲のマウスの半致死量(LD₅₀)値を有する。テタヌスおよびボツリヌス毒素の両方とも、冒されたニューロンの機能、具体的には、神経伝達物質の放出を阻害することによって作用する。ボツリヌス毒素は、神経筋接合部で作用し、末梢神経系においてコリン作動性伝達を阻害するが、テタヌス毒素は、中枢神経系において作用する。

30

40

【0152】

天然では、クロストリジウム神経毒(BoNT/Aを含む)は、単鎖ポリペプチドとして合成され、これがタンパク質分解による切断事象によって翻訳後修飾されて、ジスルフィド結合によって一緒につながられた2つのポリペプチド鎖を形成する。切断は、鎖間ジスルフィド結合を提供するシステイン残基間に位置する、活性化部位(例えば、活性化ループ)と呼ばれることが多い特定の切断部位で起こる。毒素の活性形態は、この二鎖形態である。2つの鎖は、およそ100 kDaの分子量を有する重鎖(H鎖)およびおよそ50 kDaの分子量を有する軽鎖(L鎖)と呼ばれる。H鎖は、N末端転位成分(H_Nドメイン)およびC末端標的

50

化成分(H_Cドメイン)を含む。切断部位は、L鎖と転位置ドメイン成分の間に位置する。H_Cドメインのその標的ニューロンへの結合およびエンドソームによる結合された毒素の細胞への内部移行後、H_Nドメインは、L鎖をエンドソーム膜を越えてサイトゾル中に転位置し、L鎖は、プロテアーゼ機能を提供する(非細胞傷害性プロテアーゼとしても知られる)。

【0153】

非細胞傷害性プロテアーゼは、SNAREタンパク質(例えば、SNAP-25、VAMPまたはシンタキシン)として知られる細胞内輸送タンパク質をタンパク質分解性に切断することによって作用する-Gerald K (2002) "Cell and Molecular Biology" (4th edition) John Wiley & Sons, Inc.を参照されたい。頭字語SNAREは、可溶性NSF付着受容体(Soluble NSF Attachment Receptor)という用語に由来し、ここで、NSFは、N-エチルマレイミド感受性因子(N-ethylmaleimide-Sensitive Factor)を意味する。SNAREタンパク質は、細胞内小胞融合にとって、ひいては、細胞からの小胞輸送を介した分子の分泌にとって不可欠である。プロテアーゼ機能は、亜鉛依存性エンドペプチダーゼ活性であり、SNAREタンパク質に対して高い基質特異性を示す。したがって、ひとたび所望の標的細胞に送達されると、非細胞傷害性プロテアーゼは、標的細胞からの細胞性分泌を阻害可能である。クロストリジウム毒素のL鎖プロテアーゼは、SNAREタンパク質を切断する非細胞傷害性プロテアーゼである。

10

【0154】

SNAREタンパク質の遍在性を考慮して、ボツリヌス毒素などのクロストリジウム神経毒は、広範な療法において成功裏に使用されている。

20

【0155】

クロストリジウム・ボツリヌムおよびC.テタニにおける毒素生成の遺伝学的基礎に関するさらなる詳細については、Henderson et al (1997) in The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis, Academic pressを参照されたい。

【0156】

上記で論じられるように、クロストリジウム神経毒は、2つのポリペプチド鎖、およそ100kDaの分子量を有する重鎖(H鎖)、およびおよそ50kDaの分子量を有する軽鎖(L鎖)から形成される。H鎖はC末端標的化構成成分(受容体結合ドメインまたはH_Cドメイン)およびN末端転位置構成成分(H_Nドメイン)を含む。

30

【0157】

クロストリジウム神経毒ドメインは、以下により詳細に記載されている。

【0158】

軽鎖参照配列の例として以下が挙げられる:

ボツリヌスA型神経毒:アミノ酸残基1~448

ボツリヌスB型神経毒:アミノ酸残基1~440

【0159】

亜血清型に従ってわずかな変動が生じ得るので、上記で同定された参照配列はガイドと考えられなければならない。例として、US2007/0166332(参照によりその全文で本明細書に組み込まれる)では、わずかに異なるクロストリジウム配列を引用している:

40

ボツリヌスA型神経毒:アミノ酸残基M1~K448

ボツリヌスB型神経毒:アミノ酸残基M1~K441

【0160】

転位置ドメインは、H鎖のアミノ末端の半分とほぼ同等のクロストリジウム神経毒のH鎖の断片または無処置のH鎖中のその断片に対応するドメインである。

【0161】

参照転位置ドメインの例として、以下が挙げられる:

ボツリヌスA型神経毒 - アミノ酸残基(449~871)

ボツリヌスB型神経毒 - アミノ酸残基(441~858)

【0162】

50

亜血清型に従ってわずかな変動が生じ得るので、上記で同定された参照配列は、ガイドと考えられなければならない。例として、US2007/0166332(参照により本明細書に組み込まれる)は、わずかに異なるクロストリジウム配列を引用している:

ボツリヌスA型神経毒 - アミノ酸残基(A449~K871)

ボツリヌスB型神経毒 - アミノ酸残基(A442~S858)

【0163】

本発明の観点から、転位置ドメインを含むさまざまなBoNT/A H_N領域が、本発明の態様において有用であり得る。BoNT/Aの重鎖に由来するH_N領域は、およそ410~430個のアミノ酸の長さであり、転位置ドメインを含む。クロストリジウム神経毒重鎖に由来するH_N領域の全長は、転位置ドメインの転位置活性にとって必須ではないという研究が示されている。したがって、この実施形態の態様は、例えば、少なくとも350個のアミノ酸、少なくとも375個のアミノ酸、少なくとも400個のアミノ酸または少なくとも425個のアミノ酸の長さを有する転位置ドメインを含むBoNT/A H_N領域を含み得る。この実施形態の他の態様は、例えば、多くとも350個のアミノ酸、多くとも375個のアミノ酸、多くとも400個のアミノ酸または多くとも425個のアミノ酸の長さを有する転位置ドメインを含むBoNT/A H_N領域を含み得る。

【0164】

H_Nという用語は、天然に生じるBoNT/A H_N部分ならびに天然では生じないアミノ酸配列および/または合成アミノ酸残基を有する改変BoNT/A H_N部分を包含する。好ましくは、前記改変BoNT/A H_N部分は依然として、上記の転位置機能を実証する。

【0165】

クロストリジウム神経毒受容体結合ドメイン(H_C)参照配列の例として、以下が挙げられる:

BoNT/A - N872~L1296

BoNT/B - E859~E1291

【0166】

クロストリジウム神経毒(例えば、BoNT)の約50kDaのH_Cドメインは、H_{CC}およびH_{CN}ドメインと呼ばれ、各々通常約25kDaの2つの別個の構造的特徴を含む。受容体結合に関与するアミノ酸残基は、主にH_{CC}ドメイン中に位置すると考えられている。天然クロストリジウム神経毒のH_Cドメインは、およそ400~440個のアミノ酸残基を含み得る。この事実は、各々、その全文で参照により本明細書に組み込まれる以下の刊行物によって確認されている:Umland TC (1997) Nat. Struct. Biol. 4: 788-792; Herreros J (2000) Biochem. J. 347: 199-204; Halpern J (1993) J. Biol. Chem. 268: 15, pp. 11188-11192; Rummel A (2007) PNAS 104: 359-364; Lacey D B (1998) Nat. Struct. Biol. 5: 898-902; Knapp (1998) Am. Cryst. Assoc. Abstract Papers 25: 90; Swaminathan and Eswaramoorthy (2000) Nat. Struct. Biol. 7: 1751-1759;およびRummel A (2004) Mol. Microbiol. 51(3), 631-643。

【0167】

(参照)H_{CN}ドメインの例として以下が挙げられる:

ボツリヌスA型神経毒 - アミノ酸残基(872~1110)

ボツリヌスB型神経毒 - アミノ酸残基(859~1097)

【0168】

上記の配列位置は、血清型/亜型に従ってわずかに変わる場合があり、(参照)H_{CN}ドメインのさらなる例として、以下が挙げられる:

ボツリヌスA型神経毒 - アミノ酸残基(874~1110)

ボツリヌスB型神経毒 - アミノ酸残基(861~1097)

【0169】

(参照)H_{CC}ドメインの例として、以下が挙げられる:

ボツリヌスA型神経毒 - アミノ酸残基(Y1111~L1296)

ボツリヌスB型神経毒 - アミノ酸残基(Y1098~E1291)

【0170】

WO2017/191315A1(参照により本明細書に組み込まれる)は、改変BoNT/A(例えば、「キメラクロストリジウム神経毒」)およびそれを調製および製造する方法を教示している。したがって、本発明において使用するためのボツリヌス神経毒A(BoNT/A)軽鎖および転位置ドメイン(BoNT/A H_N)ならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含む改変BoNT/Aは、WO2017/191315A1において教示されるものであり得る。

【0171】

改変BoNT/Aは、「キメラクロストリジウム神経毒」と呼ばれる場合がある。「キメラクロストリジウム神経毒」または「キメラ神経毒」という用語は、本明細書で使用される場合、第1のクロストリジウム神経毒血清型に由来するクロストリジウム神経毒軽鎖および転位置ドメイン(H_Nドメイン)ならびに第2の異なるクロストリジウム神経毒血清型に起因する受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含む(好ましくは、からなる)神経毒を意味する。具体的には、本発明において使用するための改変BoNT/A(例えば、キメラクロストリジウム神経毒)は、ボツリヌス神経毒A(BoNT/A)軽鎖および転位置ドメイン(H_Nドメイン)ならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含む。改変BoNT/A(例えば、キメラクロストリジウム神経毒)のBoNT/A L H_Nドメインは、BoNT/B H_Cドメインに共有結合によって連結されている。本発明の改変BoNT/A(例えば、キメラクロストリジウム神経毒)は、キメラボツリヌス神経毒と呼ばれる場合がある。前記キメラクロストリジウム神経毒はまた、本明細書において「BoNT/AB」、「mrBoNT/AB」または「BoNT/ABキメラ」とも呼ばれる。

【0172】

L鎖およびH_Nドメイン(任意選択で、完全または部分活性化ループ、例えば、改変BoNT/Aが単鎖形態である場合には完全活性化ループおよび二鎖形態である場合には切断された/部分活性化ループを含む)はまとめて、L H_Nドメインと呼ばれる場合がある。L H_Nドメインはしたがって、L H_Cドメインをさらに含まない。

【0173】

改変BoNT/Aは、本質的にボツリヌス神経毒A(BoNT/A)軽鎖および転位置ドメイン(H_Nドメイン)ならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)からなり得る。

【0174】

「本質的にからなる」という用語は、この文脈において使用される場合、改変BoNT/Aは、例えば、対象に投与される場合に、ポリペプチドに追加の機能を付与する1つ以上のアミノ酸残基をさらに含まないということの意味する。言い換えれば、ボツリヌス神経毒A(BoNT/A)軽鎖および転位置ドメイン(H_Nドメイン)ならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)「から本質的になる」ポリペプチドは、(ボツリヌス神経毒A(BoNT/A)軽鎖および転位置ドメイン(H_Nドメイン)ならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)のものに)1つ以上のアミノ酸残基をさらに含み得るが、前記の1つ以上のさらなるアミノ酸残基は、例えば、対象に投与される場合にポリペプチドに追加の機能を付与しない。追加の機能には、酵素活性、結合活性および/またはどんなものであれ任意の生理学的活性が含まれ得る。

【0175】

改変BoNT/Aは、非クロストリジウム神経毒配列が、改変BoNT/A(例えば、キメラクロストリジウム神経毒)のその治療効果を達成する能力を攪乱しない限り、任意のクロストリジウム神経毒配列に加えて非クロストリジウム神経毒配列を含み得る。好ましくは、非クロストリジウム神経毒配列は、触媒活性、例えば、酵素活性を有するものではない。一実施形態では、本発明の改変BoNT/Aは、非クロストリジウム触媒活性ドメインを含まない。一実施形態では、改変BoNT/Aは、さらなる触媒活性ドメインを含まない。一実施形態では、非クロストリジウム配列は、細胞受容体に結合するものではない。言い換えれば、一実施形態では、非クロストリジウム配列は、細胞受容体のリガンドではない。細胞受容体は、タンパク質性細胞受容体、例えば、膜内在性タンパク質であり得る。細胞

10

20

30

40

50

受容体の例は、https://www.guidetopharmacology.org/download.jsp#db_reportsで入手可能な、IUPHAR Guide to Pharmacology Database、2019年4月版に見出すことができる。非クロストリジウム神経毒配列は、精製において役立つタグ、例えば、His-タグを含む場合がある。一実施形態では、本発明の改変BoNT/Aは、標識または標識、例えば、ソルターゼアクセプターまたはドナー部位を追加するための部位を含まない。

【0176】

好ましくは、改変BoNT/Aは、ボツリヌス神経毒A(BoNT/A)軽鎖および転位置ドメイン(H_Nドメイン)ならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)からなる場合がある。

10

【0177】

改変BoNT/Aは、非細胞傷害性プロテアーゼ活性を示すことが可能であり、標的ニューロンのサイトソルにおいてSNAREタンパク質を切断することが可能である軽鎖を含む。細胞ベースのおよびin vivoアッセイを使用して、L鎖ならびに機能性細胞結合および転位置ドメインを含むクロストリジウム神経毒が、非細胞傷害性プロテアーゼ活性を有するか否かを決定してもよい。指外転スコア(Digit Abduction Score)(DAS)アッセイ、後根神経節(DRG)アッセイ、脊髄ニューロン(SCN)アッセイおよびマウス横隔神経半横隔膜(PNHD)アッセイ等のアッセイは、当技術分野で日常的である。非細胞傷害性プロテアーゼ活性を決定するための適したアッセイとして、参照により本明細書に組み込まれる、Aoki KR, Toxicon 39: 1815-1820; 2001またはDonald et al (2018), Pharmacol Res Perspect, e00446, 1-14に記載されるものであり得る。

20

【0178】

対象に投与される場合には、改変BoNT/Aは、好ましくは、その活性な二鎖形態であり、ここで、軽鎖および重鎖は、ジスルフィド結合によって一緒につながられている。BoNT/A(例えば、改変BoNT/A)は、ポリペプチド配列(配列番号)によって本明細書で定義され、配列のL鎖部分(配列番号)は、二鎖クロストリジウム神経毒(例えば、二鎖の改変BoNT/A)の第1の鎖を構成する場合があり、H_NおよびH_Cドメインは一緒に、二鎖クロストリジウム神経毒(例えば、二鎖の改変BoNT/A)の第2の鎖を構成する場合があり、ここで、第1および第2の鎖は、ジスルフィド結合によって一緒につながられている。当業者は、プロテアーゼは、クロストリジウム神経毒(例えば、改変BoNT/A)の活性化ループ内の1つ以上の位置で、好ましくは、活性化ループ内の2つの位置で切断し得ることを理解するであろう。切断が、活性化ループ内の1つより多い位置で(好ましくは、2つの位置で)起こる場合には、配列のC末端L鎖部分の小断片は、二鎖クロストリジウム神経毒配列(例えば、二鎖の改変BoNT/A)に存在しない場合がある。これを鑑みて、二鎖クロストリジウム神経毒(例えば、二鎖の改変BoNT/A)の配列は、対応する単鎖クロストリジウム神経毒(例えば、単鎖改変BoNT/A)のものに対してわずかに異なっている場合がある。小断片は、1~15個のアミノ酸であり得る。特に、一実施形態では、単鎖改変BoNT/Aを二鎖の改変BoNT/Aに変換するためにLys-Cが使用される場合には、存在しない配列のC末端L鎖部分の小断片は、配列番号9または10であり得る。

30

【0179】

最も好ましくは、本発明において使用するための改変BoNT/Aは、BoNT/A軽鎖および転位置ドメイン(BoNT/A L_{H_N}ドメイン)ならびにBoNT/B H_Cドメインを含み得る。BoNT/A L_{H_N}ドメインは、BoNT/B H_Cドメインに共有結合によって連結される。前記改変BoNT/Aはまた、「BoNT/AB」または「BoNT/ABキメラ」とも呼ばれる。

40

【0180】

L_{H_N}ドメインのC末端アミノ酸残基は、BoNT/AのL_{H_N}およびH_Cドメインを分ける3₁₀ヘリックスの第1のアミノ酸残基に対応する場合があり、H_CドメインのN末端アミノ酸残基は、BoNT/BにおけるL_{H_N}およびH_Cドメインを分ける3₁₀ヘリックスの第2のアミノ酸残基に対応する場合がある。

【0181】

50

BoNT/Aポリペプチド配列の一例は、配列番号2として提供されている。

【0182】

BoNT/Bポリペプチド配列の一例は、配列番号8(UniProt受託番号B1INP5)として提供されている。

【0183】

「BoNT/AのLH_NおよびH_Cドメインを分ける3₁₀ヘリックスの第1のアミノ酸残基」への本明細書における言及は、LH_NおよびH_Cドメインを分ける3₁₀ヘリックスのN末端残基を意味する。

【0184】

「BoNT/BのLH_NおよびH_Cドメインを分ける3₁₀ヘリックスの第2のアミノ酸残基」への本明細書における言及は、LH_NおよびH_Cドメインを分ける3₁₀ヘリックスのN末端残基に続くアミノ酸残基を意味する。

【0185】

「3₁₀ヘリックス」は、α-ヘリックス、β-シートおよび逆向ターンとともにタンパク質およびポリペプチドに見られる二次構造の1種である。3₁₀ヘリックス中のアミノ酸は、右巻きのらせん構造に配置されており、各完全回転は3つの残基と、それらの間の分子内水素結合を分離する10個の原子によって完了する。各アミノ酸は、ヘリックス中の120°の回転(すなわち、ヘリックスは、回転あたり3個の残基を有する)、およびらせん軸に沿った2.0 Å (=0.2 nm)の移動に対応し、水素結合を形成することによって形成された環内に10個の原子を有する。最も重要なことに、アミノ酸のN-H基は、3残基前のアミノ酸のC=O基と水素結合を形成し、この繰り返されるi+3→i水素結合が3₁₀ヘリックスを規定する。3₁₀ヘリックスは、構造生物学における標準的な概念であり、当業者は精通している。

【0186】

この3₁₀ヘリックスは、実際のヘリックスを形成する4個の残基およびこれら4個の残基の各末端に1個ずつある2個のキャップ(または遷移)残基に対応する。「LH_NおよびH_Cドメインを分ける3₁₀ヘリックス」という用語は、本明細書で使用される場合、それらの6個の残基からなる。

【0187】

構造分析および配列アラインメントを実施することによって、LH_NおよびH_Cドメインを分ける3₁₀ヘリックスを同定した。この3₁₀ヘリックスは、そのN末端で(すなわち、LH_NドメインのC末端部分で)α-ヘリックスによって、またそのC末端で(すなわち、H_CドメインのN末端部分で)βストランドによって囲まれている。3₁₀ヘリックスの第1の(N末端)残基(キャップまたは遷移残基)はまた、このα-ヘリックスのC末端残基に対応する。

【0188】

LH_NおよびH_Cドメインを分ける3₁₀ヘリックスは、例えば、ボツリヌス神経毒の公的に入手可能な結晶構造、例えば、それぞれボツリヌス神経毒A1およびB1の3BTA(<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3BTA>)および1EPW(<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1EPW>)から決定できる。

【0189】

また、公的に入手可能なインシリコモデリングおよびアラインメントツールを使用して、他の神経毒においてLH_NおよびH_Cドメインを分ける3₁₀ヘリックスの位置を決定できる、例えば、相同性モデリングサーバーLOOPP(Learning, Observing and Outputting Protein Patterns, <http://loopp.org>)、PHYRE(Protein Homology/analogy Recognition Engine, <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>)およびRoseTTa(<https://www.rosettacommons.org/>)、タンパク質重ね合わせサーバーSuperPose(<http://wishart.biology.ualberta.ca/superpose/>)、アラインメントプログラムClustal Omega(<http://www.clustal.org/omega/>)およびInternet Resour

ces for Molecular and Cell Biologists(<http://molbiol-tools.ca/>)で収載されるいくつかの他のツール/サービス。特に、「H_N/H_{CN}」接合部の周囲の領域は構造的に高度に保存されており、そのため、異なる血清型を重ねるための理想的な領域となる。

【0190】

例えば、以下の方法論を使用して、他の神経毒においてこの3₁₀ヘリックスの配列を決定できる:

1. 構造的相同性モデリングツールLOOP(<http://loopp.org>)を使用して、BoNT/A1結晶構造(3BTA.pdb)に基づいて他のBoNT血清型の予測される構造を得てもよい。

2. このように得られた構造(pdb)ファイルを、H_{CN}ドメインのN末端およびその前の約80残基(H_Nドメインの一部である)のみを含み、それによって、構造的に高度に保存されている「H_N/H_{CN}」領域を保持するように編集してもよい;

3. タンパク質重ね合わせサーバーSuperPose(<http://wishart.biology.ualberta.ca/superpose/>)を使用して、3BTA.pdb構造に各血清型を重ねてもよい;

4. 重ねられたpdbファイルを調査して、3₁₀ヘリックスをBoNT/A1のH_Cドメインの開始部分に位置付け、次いで他の血清型中の対応する残基を同定してもよい;

5. 他のBoNT血清型配列をClustal Omegaを用いてアラインし、対応する残基が正しいことを調べることができる。

【0191】

この方法によって決定されたLH_N、H_Cおよび3₁₀ヘリックスドメインの例を以下に示す:

10

20

30

40

50

【表 A】

神経毒	受託番号 (および小数点以下の配列バージョン)	LH _N	H _C	3 ₁₀ ヘリックス
BoNT/A1 (配列番号 2)	A5HZZ9.1	1-872	873-1296	⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷
BoNT/A2	X73423.3	1-872	873-1296	⁸⁷² NIVNTS ⁸⁷⁷
BoNT/A3	DQ185900.1 (別名 Q3LRX9.1)	1-872	873-1292	⁸⁷² NIVNTS ⁸⁷⁷
BoNT/A4	EU341307.1 (別名 Q3LRX8.1)	1-872	873-1296	⁸⁷² NITNAS ⁸⁷⁷
BoNT/A5	EU679004.1 (別名 C1IPK2.1)	1-872	873-1296	⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷
BoNT/A6	FJ981696.1	1-872	873-1296	⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷
BoNT/A7	JQ954969.1 (別名 K4LN57.1)	1-872	873-1296	⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷
BoNT/A8	KM233166.1	1-872	873-1297	⁸⁷² NITNTS ⁸⁷⁷
BoNT/B1 (配列番号 8)	B1INP5.1	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴
BoNT/B2	AB084152.1 (別名 Q8GR96.1)	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴
BoNT/B3	EF028400.1 (別名 A2I2S2.1)	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴
BoNT/B4	EF051570.1 (別名 A2I2W0.1)	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴
BoNT/B5	EF033130.1 (別名 A2I2U6.1)	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ DILNNI ⁸⁶⁴
BoNT/B6	AB302852.1 (別名 A8R089.1)	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴
BoNT/B7	JQ354985.1 (別名 H9CNK9.1)	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴
BoNT/B8	JQ964806.1 (別名 I6Z8G9.1)	1-859	860-1292	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴

10

20

30

40

【0192】

構造分析および配列アラインメントを使用して、LH_NおよびH_Cドメインを分ける3₁₀ヘリックス後のβストランドは、すべてのボツリヌスおよびテタヌス神経毒において保存された構造であり、LH_NおよびH_Cドメインを分ける3₁₀ヘリックスの第1の残基から出発した場合に8番目の残基で始まる(例えば、BoNT/A1の残基879で)ことがわかった。

【0193】

BoNT/ABキメラは、BoNT/B由来のH_Cドメインに共有結合によって連結されたBoNT/A由来のLH_Nドメインを含む場合があり、ここで、LH_NドメインのC末端アミノ酸残基は、BoNT/AのH_Cドメインの始まり(N末端)に位置するβストランドのN末端の8番目の

50

アミノ酸残基に対応し、H_CドメインのN末端アミノ酸残基は、BoNT/BのH_Cドメインの始まり(N末端)に位置するβストランドのN末端の7番目のアミノ酸残基に対応する。

【0194】

BoNT/ABキメラは、BoNT/B由来のH_Cドメインに共有結合によって連結されたBoNT/A由来のLH_Nドメインを含む場合があり、ここで、LH_NドメインのC末端アミノ酸残基は、BoNT/AのLH_Nドメインの末端(C末端)に位置するα-ヘリックスのC末端アミノ酸残基に対応し、H_CドメインのN末端アミノ酸残基は、BoNT/BのLH_Nドメインの末端(C末端)に位置するα-ヘリックスのC末端アミノ酸残基のすぐC末端のアミノ酸残基に対応する。

【0195】

BoNT/ABキメラの設計プロセスの理論的根拠は、二次構造が損なわれず、それによって三次構造への、および各ドメインの機能への何らかの変化を最小にすることを確実にしようとするのであった。理論に捉われようとは思わないが、BoNT/ABキメラ中の3₁₀ヘリックスの4個の中心のアミノ酸残基を破壊しないことによって、改変BoNT/A(キメラ神経毒)の最適なコンホメーションが確保され、それによって、改変BoNT/A(キメラ神経毒)がその機能をその完全能力まで発揮することが可能になると仮定される。

【0196】

実際、驚くべきことに、BoNT/Aの3₁₀ヘリックスの第1のアミノ酸残基およびBoNT/Bの3₁₀ヘリックス以降の第2のアミノ酸残基のみを保持することによって、可溶性で、機能的なBoNT/ABキメラの生成が可能になるだけでなく、さらに、他のBoNT/ABキメラを上回る改善された特性、特に、抗力の増大、安全率の増大および/またはより長い作用持続期間(ならびに、未改変BoNT/A-例えば、配列番号2、例えば、二鎖形態の配列番号2と比較した場合の安全率の増大および/または作用持続期間の増大)につながる。

【0197】

BoNT/A軽鎖、BoNT/A転位置ドメインおよび/もしくはBoNT/B H_Cドメインは、改変BoNT/A軽鎖、BoNT/A転位置ドメインおよび/もしくはBoNT/B H_Cドメインもしくはその誘導体である場合があり、それだけには限らないが、以下に記載されるものを含む。改変BoNT/A軽鎖、BoNT/A転位置ドメインおよび/もしくはBoNT/B H_Cドメインもしくは誘導体は、BoNT/A軽鎖、BoNT/A転位置ドメインおよび/もしくはBoNT/B H_Cドメインの天然(未改変)形態と比較して改変されている1個以上のアミノ酸を含有する場合がある、またはBoNT/A軽鎖、BoNT/A転位置ドメインおよび/もしくはBoNT/B H_Cドメインの天然(未改変)形態中に存在しない1個以上の挿入されたアミノ酸を含有する場合がある。例として、改変BoNT/A軽鎖、BoNT/A転位置ドメインおよび/もしくはBoNT/B H_Cドメインは、天然(未改変)BoNT/A軽鎖、BoNT/A転位置ドメインおよび/もしくはBoNT/B H_Cドメイン配列に対して、改変されたアミノ酸配列を1つ以上のドメイン中に有する場合がある。このような改変は、その機能的態様、例えば、生物活性または残留性を改変する場合がある。したがって、一実施形態では、BoNT/A軽鎖、BoNT/A転位置ドメインおよび/またはBoNT/B H_Cドメインは、改変BoNT/A軽鎖、BoNT/A転位置ドメインおよび/またはBoNT/B H_Cドメインまたは改変BoNT/A軽鎖、BoNT/A転位置ドメインおよび/またはBoNT/B H_Cドメイン誘導体である。

【0198】

改変BoNT/B H_Cドメインは、標的神経細胞への結合を改変する、例えば、天然(未改変)BoNT/B H_Cドメインと比較した場合により高いまたはより低い親和性結合を提供する1つ以上の改変を有する場合がある。BoNT/B H_Cドメインにおけるこのような改変は、標的神経細胞のガングリオシド受容体および/またはタンパク質受容体への結合を変更する、H_Cドメインのガングリオシド結合部位中またはタンパク質(例えば、シナプトタグミン)結合部位中の残基を改変することを含み得る。このような改変神経毒の例は、WO2006/027207およびWO2006/114308に記載されており、両方ともその全文で参照により本明細書に組み込まれる。

【0199】

改変軽鎖は、そのアミノ酸配列中に1つ以上の改変を有し得る、例えば、好ましくは、前記改変が前記軽鎖を触媒的に不活化しないという条件で、改変軽鎖のSNAREタンパク質特異性を変更または改変し得る、基質結合または触媒ドメイン中の改変を有し得る。このような改変神経毒の例は、WO2010/120766およびUS2011/0318385に記載されており、両方ともその全文で参照により本明細書に組み込まれる。

【0200】

BoNT/A由来のLH_Nドメインは、配列番号2のアミノ酸残基1～872、またはそれに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応する場合がある。BoNT/A由来のLH_Nドメインは、配列番号2のアミノ酸残基1～872、またはそれに対して少なくとも80%、90%もしくは95%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応する

10

【0201】

BoNT/B由来のH_Cドメインは、配列番号8のアミノ酸残基860～1291、またはそれに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応する場合がある。BoNT/B由来のH_Cドメインは、配列番号8のアミノ酸残基860～1291、またはそれに対して少なくとも80%、90%もしくは95%の配列同一性を有するポリペプチド配列に対応する

20

【0202】

好ましくは、BoNT/ABキメラは、BoNT/A1 LH_NドメインおよびBoNT/B1 H_Cドメインを含む。より好ましくは、LH_Nドメインは、BoNT/A1のアミノ酸残基1～872(配列番号2)に対応し、H_Cドメインは、BoNT/B1のアミノ酸残基860～1291(配列番号8)に対応する。

【0203】

最も好ましくは、BoNT/B H_Cドメインは、H_{CC}サブドメイン中に少なくとも1つのアミノ酸残基置換、挿入、挿入欠失または欠失をさらに含み、これは、天然BoNT/B配列と比較して、ヒトSyt IIに対するBoNT/B神経毒の結合親和性を増大する効果を有する。BoNT/B H_{CC}サブドメイン中の適したアミノ酸残基置換、挿入、挿入欠失または欠失は、WO2013/180799に、およびWO2016/154534に開示されている(両方とも参照により本明細書に組み込まれる)。

30

【0204】

BoNT/B H_{CC}サブドメイン中の適したアミノ酸残基置換、挿入、挿入欠失または欠失には、V1118M、Y1183M、E1191M、E1191I、E1191Q、E1191T、S1199Y、S1199F、S1199L、S1201V、E1191C、E1191V、E1191L、E1191Y、S1199W、S1199E、S1199H、W1178Y、W1178Q、W1178A、W1178S、Y1183C、Y1183Pおよびそれらの組合せからなる群から選択される置換突然変異が含まれ得る。

【0205】

BoNT/B H_{CC}サブドメイン中の適したアミノ酸残基置換、挿入、挿入欠失または欠失には、E1191MおよびS1199L、E1191MおよびS1199Y、E1191MおよびS1199F、E1191QおよびS1199L、E1191QおよびS1199Y、E1191QおよびS1199F、E1191MおよびS1199W、E1191MおよびW1178Q、E1191CおよびS1199W、E1191CおよびS1199Y、E1191CおよびW1178Q、E1191QおよびS1199W、E1191VおよびS1199W、E1191VおよびS1199YまたはE1191VおよびW1178Qからなる群から選択される2つの置換突然変異の組合せがさらに含まれ得る。

40

【0206】

BoNT/B H_{CC}サブドメイン中の適したアミノ酸残基置換、挿入、挿入欠失または欠失にはまた、E1191M、S1199WおよびW1178Qである3つの置換突然変異の組合せが含まれ得る。

【0207】

50

好ましくは、BoNT/B H_{CC}サブドメイン中のアミノ酸残基置換、挿入、挿入欠失または欠失には、E1191MおよびS1199Yである2つの置換突然変異の組合せが含まれる。このような改変は、例えば、配列番号5および配列番号6の改変BoNT/A(例えば、BoNT/ABキメラ)中に存在する。E1191Mは、配列番号6の1204位に対応する場合があります、S1199Yは、1212位に対応する場合があります。したがって、配列番号6は、1204Mおよび1212Yを含む場合があります。

【0208】

改変は、配列番号8として示される未改変BoNT/Bと比較した場合の改変である場合があります、ここで、アミノ酸残基番号付けは、配列番号8とのアラインメントによって決定される。配列番号8(ならびに、本明細書で記載される改変BoNT/Aポリペプチドに対応する配列番号)の1位にメチオニン残基が存在することは任意であるので、当業者は、アミノ酸残基番号付けを決定する場合にはメチオニン残基の存在/非存在を考慮するであろう。例えば、配列番号8がメチオニンを含む場合には、位置番号付けは上記で定義されたとおりとなる(例えば、E1191は、配列番号8のE1191となる)。あるいは、メチオニンが配列番号8に存在しない場合には、アミノ酸残基番号付けは、-1だけ改変されなければならない(例えば、E1191は、配列番号8のE1190となる)。したがって、改変BoNT/Aのポリペプチド配列の最初のメチオニンアミノ酸残基は、任意である、または存在しない場合がある。同様に、本明細書に記載される他のポリペプチド配列の1位にメチオニンが存在する/存在しない場合に同様の考慮が適用され、当業者は、当技術分野で日常的な技術を使用して正確なアミノ酸残基番号付けを容易に決定するであろう。

【0209】

本発明において使用するための改変BoNT/Aは、配列番号3~7から選択されるポリペプチド配列に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得る。例えば、配列番号3~7から選択されるポリペプチド配列に対して少なくとも80%、90%、95%または99.9%の配列同一性を有するポリペプチド配列。好ましくは、本発明において使用するための改変BoNT/Aは、配列番号3~7から選択されるポリペプチド配列を含み得る(より好ましくは、からなり得る)。

【0210】

改変BoNT/Aが、配列番号6に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含むことが好ましい。例えば、配列番号6に対して少なくとも80%、90%、95%または99.9%の配列同一性を有するポリペプチド配列。最も好ましくは、本発明において使用するための改変BoNT/Aは、配列番号6を含み得る(より好ましくは、からなり得る)。

【0211】

「欠失」という用語は、本明細書で使用される場合、欠失の部位での1個以上のアミノ酸残基の置換を伴わない、ポリペプチドの1個以上のアミノ酸残基の除去を指す。したがって、x個のアミノ酸残基数を有する(例えば)ポリペプチド配列から1個のアミノ酸残基が欠失している場合は、得られたポリペプチドは、x-1個のアミノ酸残基数を有する。

【0212】

「挿入欠失」という用語は、本明細書で使用される場合、ポリペプチドの1個以上のアミノ酸残基の欠失および欠失されたアミノ酸残基数と比較した場合に異なる数のアミノ酸残基(より多いまたはより少ないアミノ酸残基)の欠失部位での挿入を指す。したがって、x個の数のアミノ酸残基数を有する(例えば)ポリペプチド配列から2個のアミノ酸残基が欠失されている挿入欠失について、得られたポリペプチドは、x-1個のアミノ酸残基または $x+1$ 個のアミノ酸残基数を有する。挿入および欠失は、任意の順序で、逐次または同時に行うことができる。

【0213】

「置換」という用語は、本明細書で使用される場合、同一部位で1個以上のアミノ酸残基の同数のアミノ酸残基との置き換えを指す。したがって、x個のアミノ酸残基数を有する(例えば)ポリペプチド配列の置換について、得られたポリペプチドもまた、x個のアミ

ノ酸残基を有する。好ましくは、置換は、単一アミノ酸位置での置換である。

【0214】

「挿入」という用語は、本明細書で使用される場合、挿入の部位でのポリペプチドの1個以上のアミノ酸残基の欠失を伴わないポリペプチドの1個以上のアミノ酸残基の付加を指す。したがって、x個の数のアミノ酸残基数を有する(例えば)ポリペプチド配列中に1個のアミノ酸残基が挿入されている場合には、得られたポリペプチドは、x+1個のアミノ酸残基を有する。

【0215】

アミノ酸残基の置換、挿入または欠失によってタンパク質を改変する方法は、当技術分野で公知である。例として、アミノ酸改変は、BoNT/Aをコードする(例えば、未改変BoNT/Aをコードする)DNA配列の改変によって導入してもよい。これは、標準的な分子クローニング技術を使用して、例えば、ポリメラーゼ酵素を使用して元のコード配列を置き換えるために所望のアミノ酸(複数可)をコードするDNAの短い鎖(オリゴヌクレオチド)が使用される位置指定突然変異誘発によって、または種々の酵素(例えば、リガーゼおよび制限エンドヌクレアーゼ)を用いて遺伝子の部分を挿入/欠失することによって達成できる。あるいは、改変遺伝子配列を化学的に合成できる。通常、改変は、天然クロストリジウム神経毒(またはその一部)をコードする核酸を改変し、その結果、核酸によってコードされる改変BoNT/A(またはその一部)が、改変(複数可)を含むことによって実施できる。あるいは、改変(複数可)を含む改変されたクロストリジウム神経毒(またはその一部)をコードする核酸を合成できる。

10

20

【0216】

本明細書で記載される改変BoNT/Aのポリペプチド配列が、例えば、精製のためのタグ、例えば、His-タグを含む場合には、前記タグは任意である。好ましくは、前記タグは、本発明に従う改変BoNT/Aの使用の前に除去される。

【0217】

上記で論じられたように、本明細書で記載される改変BoNT/Aは、組織保持特性の増大を有し、これはまた、作用の効力および/または持続期間の増大も提供し、何らかの追加の負の作用を伴わない投与量の増大を可能にできる。これらの有利な特性を定義してもよい1つの方法は、改変BoNT/Aの安全率の観点である。この関連で、関連動物モデル(例えば、体重の減少が投与の7日以内に検出されるマウス)において体重減少パーセンテージを測定することによって、クロストリジウム毒素の望まれない効果(投与の部位から離れた毒素の拡散によって引き起こされる)を実験的に評価できる。逆に、クロストリジウム毒素の所望のオンターゲット効果は、筋肉麻痺の尺度である指外転スコア(DAS)アッセイによって実験的に評価できる。DASアッセイは、マウス腓腹筋/ヒラメ筋複合体中への、ゼラチンリン酸バッファーで製剤化された20 μ lのクロストリジウム神経毒の注射と、それに続くAokiの方法(Aoki KR, Toxicon 39: 1815-1820; 2001)を使用する指外転スコアの評価によって実施できる。DASアッセイでは、マウスが後肢を伸ばし、後指を外転させる特徴的な驚愕反応を引き出すために、マウスを尾によって短時間吊り下げる。クロストリジウム神経毒注射後、様々な程度の指外転が5点スケール(指外転および脚伸長における、0=正常~4=最大の低減)でスコア化される。

30

40

【0218】

次いで、神経毒(例えば、本発明の改変BoNT/A(または比較のための未改変BoNT/A))の安全率を、体重の10%低下に必要な毒素の量(マウスにおいて投薬後最初の7日以内のピーク効果で測定される)と、2のDASスコアにとって必要な毒素の量の間の比として表してもよい。したがって、高い安全率スコアが所望され、望まれないオフターゲット効果をほとんど伴わずに標的筋肉を効果的に麻痺させることできる神経毒を示す。本発明の改変BoNT/Aは、同等の未改変(天然)BoNT/Aの安全率よりも高い安全率を有する。

【0219】

高い安全率は、治療係数の増大を表すので療法において特に有利である。言い換えれば、これは、代替クロストリジウム神経毒治療薬と比較して低減された投与量を使用できる

50

こと、および/または何らかの追加の(例えば、有害な)効果を伴わずに増大された投与量を使用できることを意味する。より高い用量は通常、神経毒のより長い作用持続期間につながるもので、追加の効果を伴わずに神経毒のより高い用量を使用する可能性は、特に有利である。

【0220】

改変BoNT/Aの効力は、マウス腓腹筋/ヒラメ筋複合体へ投与された場合の所与のDASスコア、例えば、2のDASスコア(ED₅₀用量)または4のDASスコアにつながる神経毒の最小用量として表してもよい。改変BoNT/Aの効力はまた、神経毒によるSNARE切断を測定する細胞アッセイにおけるEC₅₀用量、例えば、改変BoNT/AによるSNAP25切断を測定する細胞アッセイにおけるEC₅₀用量として表してもよい。

10

【0221】

改変BoNT/Aの作用持続期間は、マウス腓腹筋/ヒラメ筋複合体への神経毒の所与の用量、例えば、4のDASスコアにつながる神経毒の最小用量の投与後に0のDASスコアを回収するのに必要な時間として表してもよい。

【0222】

したがって、一実施形態では、本発明の改変BoNT/Aは、7より大きい(例えば、少なくとも8、9、10、15、20、25、30、35、40、45または50)安全率を有し、安全率は、DAS ED₅₀(pg/マウス)によって除された-10%の体重変化(pg/マウス)に必要な毒素の用量[ED₅₀=2のDASスコアをもたらすために必要な用量]として算出される。例えば、改変BoNT/Aは、少なくとも8、9、10、15、20、25、30、35、40、45または50の安全率を有する場合がある。

20

【0223】

一実施形態では、本発明の改変BoNT/Aは、少なくとも10の安全率を有する。一実施形態では、本発明の改変BoNT/Aは、少なくとも15の安全率を有する。

【0224】

好ましくは、改変BoNT/Aは、少なくとも10の安全率(例えば、10の安全率)、より好ましくは、少なくとも12または13(例えば、14~15)を有する。

【0225】

改変BoNT/Aは、7より大きい、最大50の、例えば、8~45、10~20または12~15の安全率を有する場合がある。

30

【0226】

使用では、本発明の改変BoNT/Aは、二鎖形態である。

【0227】

本発明において使用するための改変BoNT/Aは、配列番号3~7から選択されるポリペプチド配列に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得る。例えば、配列番号3~7から選択されるポリペプチド配列に対して少なくとも80%、90%、95%または99.9%の配列同一性を有するポリペプチド配列。好ましくは、本発明において使用するための改変BoNT/Aは、配列番号3~7から選択されるポリペプチド配列を含み得る(より好ましくは、からなり得る)。前記改変BoNT/A神経毒(例えば、キメラクロストリジウム神経毒)のうち、配列番号6が好ましい。

40

【0228】

したがって、改変BoNT/A(例えば、キメラクロストリジウム神経毒)が、配列番号6に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含むことが好ましい。より好ましくは、配列番号6に対して少なくとも80%、90%、95%または99.9%の配列同一性を有するポリペプチド配列。最も好ましくは、本発明において使用するための改変BoNT/A(例えば、キメラクロストリジウム神経毒)は、配列番号6を含み得る(より好ましくは、からなり得る)。

【0229】

本発明の二鎖改変BoNT/Aは、二鎖改変BoNT/Aの第1鎖を構成する配列番号3~7のいずれか1つに対して少なくとも70%、80%、90%、95%、99.9%または100%の配列

50

同一性を有するポリペプチド配列のL鎖部分を含む場合があり、二鎖改変BoNT/Aの第2鎖と一緒に構成する、配列番号3～7のいずれか1つに対して少なくとも70%、80%、90%、95%、99.9%または100%の配列同一性を有するポリペプチド配列のH_NおよびH_Cドメインを含む場合があり、ここで、第1鎖及び第2鎖はジスルフィド結合により結合されている。

【0230】

配列番号3～7のいずれか1つに対して少なくとも70%、80%、90%、95%、99.9%または100%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む改変BoNT/Aの活性化ループ内の1つより多い位置で(好ましくは、2つの位置で)切断が生じる場合には、配列番号3～7のいずれか1つに対して少なくとも70%、80%、90%、95%、99.9%または100%の配列同一性を有する配列のC末端L鎖部分の小断片が、二鎖改変BoNT/Aに存在しない場合がある。これを鑑みて、二鎖改変BoNT/Aの配列(例えば、配列番号3～7のいずれか1つに対して少なくとも70%、80%、90%、95%、99.9%または100%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む)は、配列番号3～7のいずれか1つに対して少なくとも70%、80%、90%、95%、99.9%または100%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む対応する単鎖改変BoNT/Aの配列に対してわずかに異なっている場合がある。小断片は、1～15個のアミノ酸であり得る。特に、一実施形態では、単鎖改変BoNT/Aを二鎖クロストリジウム神経毒に変換するためにLys-Cが使用される場合には、存在しない配列のC末端L鎖部分の小断片は、配列番号9または10であり得る。

【0231】

好ましくは、本発明の二鎖改変BoNT/Aは、二鎖改変BoNT/Aの第1鎖を構成する配列番号6に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、99.9%または100%の配列同一性を有するポリペプチド配列のL鎖部分を含む場合があり、二鎖改変BoNT/Aの第2鎖と一緒に構成する配列番号6に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、99.9%または100%の配列同一性を有するポリペプチド配列のH_NおよびH_Cドメインを含む場合があり、第1および第2鎖は、ジスルフィド結合によって一緒につなげられる。

【0232】

配列番号6に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、99.9%または100%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む改変BoNT/Aの活性化ループ内の1つより多い位置で(好ましくは、2つの位置で)切断が生じる場合には、配列番号6に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、99.9%または100%の配列同一性を有する配列のC末端L鎖部分の小断片が、二鎖改変BoNT/Aに存在しない場合がある。これを鑑みて、二鎖改変BoNT/Aの配列(例えば、配列番号6に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、99.9%または100%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む)は、配列番号6に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、99.9%または100%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む対応する単鎖改変BoNT/Aの配列に対してわずかに異なっている場合がある。小断片は、1～15個のアミノ酸であり得る。特に、一実施形態では、単鎖改変BoNT/Aを改変BoNT/Aに変換するためにLys-Cが使用される場合には、存在しない配列のC末端L鎖部分の小断片は、配列番号9または10であり得る。

【0233】

特に好ましい実施形態では、二鎖改変BoNT/Aは、配列番号11または12(好ましくは、配列番号11)に対して少なくとも70%、80%、90%、95%または99.9%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む軽鎖および配列番号13に対して少なくとも70%、80%、90%、95%または99.9%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含む重鎖を含み(またはそれからなり)、ここで、軽鎖および重鎖は、ジスルフィド結合によって一緒につなげられる。より好ましくは、二鎖改変BoNT/Aは、配列番号11または12(好ましくは、配列番号11)を含む軽鎖および配列番号13を含む重鎖を含み(またはそれからなり)、ここで、軽鎖および重鎖は、ジスルフィド結合によって一緒につなげられる。さらにより好ましくは、二鎖改変BoNT/Aは、配列番号11を有する軽鎖および配列番号13を有する重鎖を含み(またはそれからなり)、ここで、軽鎖および重鎖は、ジスルフィド結合によ

と一緒につながられる。ジスルフィド結合は、配列番号11または12のシステイン残基429と配列番号13のシステイン残基6によって好ましくは形成される、および/または配列番号11または12のシステイン残基429と配列番号13のシステイン残基6の間である。

【0234】

好ましい実施形態では、本発明の改変BoNT/A(例えば、キメラクロストリジウム神経毒)は、軽鎖および重鎖に加えて治療薬または診断薬(例えば、核酸、タンパク質、ペプチドまたは小分子治療薬または診断薬)を含まない。例えば、一実施形態では、改変BoNT/A(例えば、キメラクロストリジウム神経毒)は、共有結合によって、または非共有結合によって関連している治療薬または診断薬を含まない場合がある。したがって、本発明の改変BoNT/A(例えば、キメラクロストリジウム神経毒)は、好ましくは、さらなる治療薬または診断薬の送達媒体として機能しない。

10

【0235】

本明細書で記載される改変BoNT/A(例えば、キメラクロストリジウム神経毒)が、精製のためのタグ(例えば、His-タグ)および/またはリンカーを有する実施形態では、前記タグおよび/またはリンカーは、任意である。

【0236】

改変BoNT/Aは、好ましくは、非複合化形態である(すなわち、天然に存在するクロストリジウム神経毒複合体、例えば、BoNT/A複合体中に存在する複合体形成タンパク質を含まない場合がある)。このような複合体形成タンパク質の例として、神経毒関連タンパク質(NAP)および非毒性-非赤血球凝集素成分(NTNH)が挙げられる。しかし、改変BoNT/Aは、組換え改変BoNT/Aであることが好ましい。本発明の改変BoNT/Aは、組換え核酸技術を使用して生成できる。したがって、一実施形態では、改変BoNT/A(本明細書で記載されるような)は、組換え改変BoNT/A(例えば、キメラクロストリジウム神経毒)である。

20

【0237】

一実施形態では、改変BoNT/Aをコードする核酸配列を含む核酸(例えば、DNA)が提供される。一実施形態では、核酸配列は、プロモーターおよびターミネーターを含むDNAベクターの一部として調製される。核酸配列は、本明細書で記載される核酸配列のいずれかから選択され得る。

【0238】

好ましい実施形態では、ベクターは、以下から選択されるプロモーターを有する:

プロモーター / 誘導剤 / 通常の誘導条件

Tac(ハイブリッド) / IPTG / 0.2mM(0.05~2.0mM)

AraBAD / L-アラビノース / 0.2%(0.002~0.4%)

T7-lacオペレーター / IPTG / 0.2mM(0.05~2.0mM)

30

【0239】

別の好ましい実施形態では、ベクターは、以下から選択されるプロモーターを有する:

プロモーター / 誘導剤 / 通常の誘導条件

Tac(ハイブリッド) / IPTG / 0.2mM(0.05~2.0mM)

AraBAD / L-アラビノース / 0.2%(0.002~0.4%)

T7-lacオペレーター / IPTG / 0.2mM(0.05~2.0mM)

T5-lacオペレーター / IPTG / 0.2mM(0.05~2.0mM)

40

【0240】

核酸分子は、当技術分野で公知の任意の適したプロセスを使用して作製してもよい。したがって、核酸分子は、化学合成技術を使用して作製できる。あるいは、本発明の核酸分子を分子生物学技術を使用して作製してもよい。

【0241】

本発明のDNA構築物は、好ましくは、コンピュータで設計され、次いで、従来のDNA合成技術によって合成される。

【0242】

50

上記の核酸配列情報は、任意選択で、利用される予定の最終宿主細胞(例えば、大腸菌(*E. coli*))発現系に従うコドンバイアスのために改変される。

【0243】

「ヌクレオチド配列」および「核酸」という用語は、本明細書において同意語として使用される。好ましくは、ヌクレオチド配列は、DNA配列である。

【0244】

本発明の改変BoNT/Aは、単鎖として、または二鎖として存在し得る。しかし、改変BoNT/Aが、L鎖がジスルフィド結合を介してH鎖(またはその構成成分、例えば、H_Nドメイン)に連結されている二鎖として存在することが好ましい。

【0245】

軽鎖および重鎖を有する単鎖改変BoNT/Aの生成は、発現宿主において改変BoNT/Aをコードする核酸を発現させること、宿主細胞を溶解して単鎖改変BoNT/Aを含有する宿主細胞ホモジネートを提供することおよび単鎖改変BoNT/Aを単離することを含む方法を使用して達成してもよい。本明細書で記載される単鎖改変BoNT/Aは、改変BoNT/Aの活性化ループ中のペプチド結合を加水分解し、それによって、単鎖改変BoNT/Aを対応する二鎖改変BoNT/A(例えば、軽鎖および重鎖がジスルフィド結合によって一緒につながれた)に変換するプロテアーゼ(例えば、Lys-C)と、単鎖改変BoNT/Aを接触させることを含む方法を使用してタンパク質分解によって処理され得る。二鎖改変BoNT/Aは、好ましくは、このような方法によって得ることができる。

【0246】

「得ることができる」という用語はまた、本明細書で使用される場合、「得られた」という用語を包含する。一実施形態では、「得ることができる」という用語は、得られるを意味する。

【0247】

したがって、本発明において使用される改変BoNT/Aは、好ましくは、単鎖BoNT/Aが、本明細書で記載されるポリペプチド配列を含む、またはそれからなる、単鎖BoNT/Aから生成されている二鎖改変BoNT/Aである。例えば、本発明において使用される改変BoNT/Aが、配列番号6に対して少なくとも70%(例えば、少なくとも80%、90%、95%または99.9%)の配列同一性を有するポリペプチド配列を含むポリペプチドから生成されている二鎖改変BoNT/Aであることが好ましい。最も好ましくは、本発明において使用される改変BoNT/Aは、配列番号6を含む(さらにより好ましくは、それからなる)ポリペプチドから生成されている二鎖改変BoNT/Aである。したがって、一部の実施形態では、改変BoNT/Aは、軽鎖(L鎖)がジスルフィド結合を介して重鎖(H鎖)に連結されており、単鎖改変BoNT/Aを、その活性化ループ中のペプチド結合を加水分解し、それによって、単鎖改変BoNT/Aを対応する二鎖改変BoNT/Aに変換するプロテアーゼと接触させることを含む方法によって得ることができる、二鎖改変BoNT/Aである。したがって、一部の実施形態では、改変BoNT/Aは、軽鎖(L鎖)がジスルフィド結合を介して重鎖(H鎖)に連結されており、配列番号6を含む単鎖改変BoNT/Aを、その活性化ループ中のペプチド結合を加水分解し、それによって、単鎖改変BoNT/Aを対応する二鎖改変BoNT/Aに変換するプロテアーゼと接触させることを含む方法によって得ることができる二鎖改変BoNT/Aである。一部の実施形態では、改変BoNT/Aは、L鎖がジスルフィド結合を介してH鎖に連結されており、配列番号6からなる単鎖改変BoNT/Aを、その活性化ループ中のペプチド結合を加水分解し、それによって、単鎖改変BoNT/Aを対応する二鎖改変BoNT/Aに変換するプロテアーゼと接触させることを含む方法によって得ることができる二鎖改変BoNT/Aである。

【0248】

活性化ループを切断するために使用されるプロテアーゼは、好ましくは、Lys-Cである。二鎖クロストリジウム神経毒を生成するために活性化ループを切断するための適したプロテアーゼおよび方法は、WO2014/080206、WO2014/079495およびEP2677029A2において教示されており、それらは参照により本明細書に組み込まれる。Lys-Cは

10

20

30

40

50

、その中に存在する1つ以上のリシン残基の活性化ループC末端を切断し得る。Lys-Cが1回よりも多く活性化ループを切断する場合には、当業者は、二鎖改変BoNT/Aの活性化ループの小ペプチドが、本明細書に示される配列番号と比較した場合に存在しない場合があることを理解するであろう。

【0249】

「1以上の」という用語は、本明細書で使用される場合、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15または20を意味する場合がある。一実施形態では、「1以上の」がリストに先行する場合には、「1以上の」は、リストのメンバーのすべてを意味する場合がある。同様に、「少なくとも1つの」という用語は、本明細書で使用される場合、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15または20を意味する場合がある。一実施形態では、「少なくとも1つの」がリストに先行する場合には、「少なくとも1つの」は、リストのメンバーのすべてを意味する場合がある。

10

【0250】

「障害」という用語はまた、本明細書で使用される場合、「疾患」を包含する。一実施形態では、障害は疾患である。

【0251】

本発明の改変BoNT/Aは、対象への投与のために任意の適した方法で、例えば、医薬組成物の一部として製剤化してもよい。このような医薬組成物は、本発明の改変BoNT/Aおよび薬学的に許容される担体、賦形剤、アジュバント、噴射剤および/または塩を含む。

20

【0252】

液体投与形は、通常、改変BoNT/Aおよび発熱物質不含滅菌媒体を使用して調製される。改変BoNT/Aは、使用される媒体および濃度に応じて、媒体中に溶解するか、または懸濁することができる。溶液の調製では、改変BoNT/Aを媒体中に溶解することができ、溶液を、必要に応じて塩化ナトリウムの添加によって等張性にし、無菌技術を使用して滅菌フィルターを通して濾過することによって滅菌し、その後、適した滅菌バイアルまたはアンプル中に充填し、密閉する。あるいは、溶液安定性が十分である場合には、その密閉された容器中の溶液をオートクレーブ処理によって滅菌してもよい。有利なことに、緩衝剤、可溶化剤、安定化剤、保存料または殺菌剤、懸濁剤または乳化剤などの添加剤およびまたは局所麻酔剤を、媒体に溶解できる。

30

【0253】

無菌区域において事前滅菌された成分を無菌技術を使用して滅菌容器中に充填することによって、使用前に適した媒体中に溶解または懸濁される乾燥散剤を調製できる。あるいは、成分を、無菌区域において無菌技術を使用して適した容器中に溶解できる。次いで、製品を凍結乾燥し、容器を無菌的に密閉する。

【0254】

本明細書に記載される投与経路に適した非経口懸濁液は、滅菌構成成分を、滅菌媒体中に溶解する代わりに懸濁し、滅菌を濾過によって達成することができない点を除いて、実質的に同一の方法で調製する。構成成分は、滅菌状態で単離される場合も、あるいは、単離された後に、例えば、ガンマ照射によって滅菌される場合もある。

40

【0255】

有利なことに、構成成分の均一な分布を容易にするために、組成物(複数可)中に懸濁剤、例えば、ポリビニルピロリドンを含めることができる。

【0256】

一実施形態では、本発明は、上部顔面の皺線を処置するための改変ボツリヌス神経毒A(BoNT/A)の単位投与形を提供し、これは以下を含む:

- a. 73単位よりも多い改変BoNT/A、または
 - b. 1754pgよりも多い(例えば、1800pgよりも多い)改変BoNT/A、ならびに
 - c. 任意選択で、薬学的に許容される担体、賦形剤、アジュバントおよび/または塩、
- ここで、改変BoNT/Aは、BoNT/A軽鎖および転位置ドメインならびにBoNT/B受容

50

体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含む。

【0257】

一態様では、本発明は、上部顔面の皺線を処置するための改変ボツリヌス神経毒A(BoNT/A)の単位投与形を提供し、単位投与形は、以下を含む：

a. 73単位より多く～332.8単位の改変BoNT/A(ここで、1単位は、マウスにおける算出された半致死量(LD₅₀)に対応する改変BoNT/Aの量である)、または

b. 1754pより多く(好ましくは、1800pgより多く)～8000pgの改変BoNT/A、ならびに

c. 任意選択で、薬学的に許容される担体、賦形剤、アジュバントおよび/または塩、

d. ここで、改変BoNT/Aは、BoNT/A軽鎖および転位置ドメイン(H_Nドメイン)ならびにBoNT/B受容体結合ドメイン(H_Cドメイン)を含む。

10

【0258】

前記単位投与形は、以下を含み得る：

a. 100単位～200単位の改変BoNT/A、または

b. 4000pg～6000pgの改変BoNT/A。

【0259】

顔面の皺線を処置するための単位投与形は、73単位～332.8単位の改変BoNT/Aを含み得る。前記範囲の上限(upper limit said range)は、300、250、200、150または100単位の改変BoNT/Aである場合があり、好ましくは、上限は200単位である。前記範囲の下限は、80、90、100、150、200または250単位の改変BoNT/Aである場合があり、好ましくは、下限は100単位である。好ましくは、単位投与形は、90～250単位の改変BoNT/A、例えば、100単位～200単位を含む。

20

【0260】

顔面の皺線を処置するための単位投与形は、1755pg～8000pgの改変BoNT/Aを含み得る。前記範囲の上限は、7500、7000、6500、6000、5500、5000、4500、4000、3500または3000pgの改変BoNT/Aである場合があり、好ましくは、上限は7000pgである。前記範囲の下限は、1800、2000、2,500、3,000、3,500、4,000、4,500または5,000pgの改変BoNT/Aである場合があり、好ましくは、下限は2000pgである。好ましくは、単位投与形は、2000pg～7000pgの改変BoNT/A、例えば、4,000pg～6,000pgを含む。

30

【0261】

単位投与形は、1800～7000pg、2000～6500pg、2500～6000の改変BoNT/A、好ましくは、4000-5500pgの改変BoNT/Aを含み得る。

【0262】

単位投与形は、1754pgより多く～8000pgの改変BoNT/Aを含み得る。単位用量形の上限は、8,000、7,000、6,000、5,000、4,000、3,000、2,000または1,000pgの改変BoNT/Aである場合があり、好ましくは、上限は5,000pgである。単位用量形の下限は、1,800、2,000、2,500、3000または4,000pgの改変BoNT/Aである場合があり、好ましくは、下限は1,800pgの改変BoNT/Aである。単位用量形は、1,800～8,000pgまたは2,000～6,000pgの改変BoNT/A、より好ましくは、3,000～6,000pgの改変BoNT/Aを含み得る。単位用量形は、4,500～5,500pgの改変BoNT/A、例えば、4,900～5,100pgの改変BoNT/Aであり得る。

40

【0263】

単位投与形は、1800pgより多くの改変BoNT/Aを含み得る。単位投与形は、1800pgより多く、最大7000pgの改変BoNT/A、例えば、1800pgより多く、最大6000pgの改変BoNT/Aを含み得る。単位投与形は、2000pgより多く、最大5000pgの改変BoNT/Aを含み得る。

【0264】

単位投与形は、2555pgより多くを含み得る。例えば、単位投与形は、2555pgより多く、最大8000pgの改変BoNT/A、例えば、2555pgより多く、最大6000pgの改変

50

BoNT/Aを含み得る。

【0265】

単位投与形は、2000pg、2500pg、3000pg、4000pg、4500pg、5000pg、5500pg、6000pg、6500pg、7000pg、7500pgまたは8000pgの改変BoNT/Aを含み得る。

【0266】

単位投与形が、2000～3500pgの改変BoNT/Aを含み得ることがより好ましい。例えば、単位投与形は、2250pg～3250pgの改変BoNT/Aを含み得る。特に好ましい単位投与形は、約2500pg(例えば、2500pg±10%)の改変BoNT/Aを含む場合があり、例えば、単位投与形は、好ましくは、2500pgの改変BoNT/Aを含む場合がある。別の適した単位投与形は、約3000pg(例えば、3000pg±10%)の改変BoNT/Aを含む場合があり、例えば、単位投与形は、3000pgの改変BoNT/Aを含む場合がある。

【0267】

単位投与形は、3500～5500pgの改変BoNT/Aを含み得る。例えば、単位投与形は、3800pg～4200pgの改変BoNT/Aを含み得る。単位投与形は、4800～5200pgの改変BoNT/Aを含み得る。特に適した単位投与形は、約4000pg(例えば、4000pg±10%)の改変BoNT/Aを含む場合があり、例えば、単位投与形は、4000pgの改変BoNT/Aを含む場合がある。別の特に好ましい単位投与形は、約5000pg(例えば、5000pg±10%)の改変BoNT/Aを含む場合があり、例えば、単位投与形は、好ましくは、5000pgの改変BoNT/Aを含む場合がある。

【0268】

また、以下を含むキットが提供される：

- 本明細書において以前に定義されたような単位投与形、および
- 顔面の皺線の処置においてそれを使用するための使用説明書、および
- 任意選択で、希釈剤。

【0269】

また、以下を含むキットが提供される：

- 本明細書において以前に定義されたような単位投与形、および
- 眉間の皺線の処置においてそれを使用するための使用説明書、および
- 任意選択で、希釈剤。

【0270】

また、以下を含むキットが提供される：

- 本明細書において以前に定義されたような単位投与形、および
- 額の皺線の処置においてそれを使用するための使用説明書、および
- 任意選択で、希釈剤。

【0271】

また、以下を含むキットが提供される：

- 本明細書において以前に定義されたような単位投与形、および
- 外眼角の皺線の処置においてそれを使用するための使用説明書、および
- 任意選択で、希釈剤。

【0272】

また、以下を含むキットが提供される：

- 本明細書において以前に定義されたような単位投与形、および
- 眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線の処置においてそれを使用するための使用説明書、および
- 任意選択で、希釈剤。

【0273】

単位投与形の改変BoNT/Aは、配列番号3～7のいずれか1つに対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得る。例えば、配列番号3～7のいずれか1つに対して少なくとも80%、90%、95%または99.9%の配列同一性を有するポリペプ

チド配列。

【0274】

単位投与形の改変BoNT/Aが、配列番号6に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列を含むことが好ましい。例えば、配列番号6に対して少なくとも80%、90%、95%または99.9%の配列同一性を有するポリペプチド配列。最も好ましくは、改変BoNT/Aは、配列番号6を含み得る(より好ましくは、からなり得る)。

【0275】

本発明の種々の治療的使用と関連する実施形態を、本発明の方法、組成物(例えば、単位投与形)およびキットに適用できる、逆もまた同様である。

【0276】

配列相同性

【0277】

限定するものではないが、グローバル法、ローカル法およびハイブリッド法、例えば、セグメントアプローチ法などを含むさまざまな配列アラインメント方法のいずれも、同一性パーセントを決定するために使用できる。同一性パーセントを決定するためのプロトコールは、当業者の範囲内の常法である。グローバル法は、分子の開始から最後まで配列をアラインし、個々の残基対のスコアを合計することによって、およびギャップペナルティを課すことによって最良アラインメントを決定する。限定されない方法として、例えば、CLUSTAL W、例えば、Julie D. Thompson et al., CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22(22) Nucleic Acids Research 4673-4680 (1994)を参照されたい、および反復改良、例えば、Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) J. Mol. Biol. 823-838 (1996)を参照されたい、が挙げられる。ローカル法は、インプット配列のすべてによって共有される1以上の保存されたモチーフを同定することによって配列をアラインする。限定されない方法として、例えば、Match-box、例えば、Eric Depiereux and Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) CABIOS 501 - 509 (1992)を参照されたい、Gibbsサンプリング、例えば、C. E. Lawrence et al., Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262(5131) Science 208-214 (1993)を参照されたい、Align-M、例えば、Ivo Van Walle et al., Align-M-A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9) Bioinformatics:1428-1435 (2004)を参照されたい、が挙げられる。

【0278】

したがって、配列同一性パーセントは、従来法によって決定される。例えば、Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48: 603-16, 1986およびHenikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19, 1992を参照されたい。手短には、2つのアミノ酸配列が、10のギャップ開始ペナルティ、1のギャップ伸長ペナルティおよび以下に示されるようなHenikoff and Henikoff(同書)の「blosum 62」スコアリングマトリックス(アミノ酸は標準一文字コードによって示される)を使用してアラインメントスコアを最適化するようにアラインされる。

【0279】

2つ以上の核酸またはアミノ酸配列間の「配列同一性パーセント」は、配列によって共有される同一位置数の関数である。したがって、同一性%は、ヌクレオチド/アミノ酸の総数によって除され、100が乗じられた同一ヌクレオチド/アミノ酸数として算出され得る。配列同一性%の算出はまた、2つ以上の配列のアラインメントを最適化するために導入される必要があるギャップの数および各ギャップの長さも考慮する場合がある。2つ以

10

20

30

40

50

上の配列間の配列比較および同一性パーセントの決定は、当業者が精通するであろう特定の数学的アルゴリズム、例えば、BLASTを使用して実施できる。

【0280】

配列同一性を決定するためのアラインメントスコア

【数1】

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

10

20

30

40

【0281】

次いで、同一性パーセントは、以下として算出される：

〔同定されたマッチの総数×100〕 / 〔長い方の配列の長さおよび2つの配列をアラインするために長い方の配列中に導入されたギャップの数〕

【0282】

実質的に相同なポリペプチドは、1つ以上のアミノ酸置換、欠失または付加を有すると、特性決定される。これらの変化は、好ましくは、保存的アミノ酸置換(以下を参照された

50

い) およびポリペプチドのフォールディングもしくは活性に有意に影響を及ぼさない他の置換、通常1個～約30個のアミノ酸の小さい欠失、および小さいアミノ-もしくはカルボキシル-末端伸長、例えば、アミノ末端メチオニン残基、最大約20～25残基の小さいリンカーペプチドまたは親和性タグである小さい性質のものである。

【0283】

保存的アミノ酸置換

【0284】

塩基性:

アルギニン

リシン

ヒスチジン

酸性:

グルタミン酸

アスパラギン酸

極性:

グルタミン

アスパラギン

疎水性:

ロイシン

イソロイシン

バリン

芳香族:

フェニルアラニン

トリプトファン

チロシン

小さい:

グリシン

アラニン

セリン

トレオニン

メチオニン

【0285】

20個の標準アミノ酸に加えて、非標準アミノ酸(例えば、4-ヒドロキシプロリン、6-N-メチルリシン、2-アミノイソ酪酸、イソバリンおよび α -メチルセリン)が、本発明のポリペプチドのアミノ酸残基と置換され得る。限られた数の非保存的アミノ酸、遺伝暗号によってコードされないアミノ酸および非天然アミノ酸が、ポリペプチドアミノ酸残基と置換され得る。本発明のポリペプチドはまた、天然に存在しないアミノ酸残基を含み得る。

【0286】

天然に存在しないアミノ酸として、限定するものではないが、トランス-3-メチルプロリン、2,4-メタノ-プロリン、シス-4-ヒドロキシプロリン、トランス-4-ヒドロキシ-プロリン、N-メチルグリシン、アロ-トレオニン、メチル-トレオニン、ヒドロキシ-エチルシステイン、ヒドロキシエチルホモ-システイン、ニトロ-グルタミン、ホモグルタミン、ピペコリン酸、t-ロイシン、ノルバリン、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニル-アラニン、4-アザフェニル-アラニンおよび4-フルオロフェニルアラニンが挙げられる。天然に存在しないアミノ酸残基をタンパク質中に組み込むためのいくつかの方法が、当技術分野で公知である。例えば、ナンセンス突然変異が、化学的にアミノアシル化されたサブレッサー-tRNAを使用して抑制されるin vitro系が使用できる。アミノ酸を合成し、tRNAをアミノアシル化する方法は、当技術分野で公知である。ナンセンス突然変異を含有するプラスミドの転写および翻訳は、大腸菌S30抽出物および市販の酵素および他の試薬を含む無細胞系において実施される。タンパク質は、クロマトグラフィーによって精製さ

10

20

30

40

50

れる。例えば、Robertson et al., J. Am. Chem. Soc. 113:2722, 1991、Ellman et al., Methods Enzymol. 202:301, 1991、Chung et al., Science 259:806-9, 1993および Chung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10145-9, 1993)を参照のこと。第2の方法では、翻訳は、突然変異されたmRNAおよび化学的にアミノアシル化されたサプレッサー-tRNAのマイクロインジェクションによってアフリカツメガエル卵母細胞において実施される(Turcatti et al., J. Biol. Chem. 271:19991-8, 1996)。第3の方法内で、大腸菌細胞は、置き換えられるべき天然アミノ酸(例えば、フェニルアラニン)の不在下および所望の天然に存在しないアミノ酸(複数可)(例えば、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニンまたは4-フルオロフェニルアラニン)の存在下で培養される。天然に存在しないアミノ酸は、その天然の対応物の代わりにポリペプチド中に組み込まれる。Koide et al., Biochem. 33:7470-6, 1994を参照されたい。天然に存在するアミノ酸残基は、in vitro化学修飾によって天然に存在しない種に変換することができる。置換の範囲をさらに拡大するために、化学修飾が部位特異的突然変異誘発と組み合わせることができる(Wynn and Richards, Protein Sci. 2:395-403, 1993)。

10

【0287】

限られた数の非保存的アミノ酸、遺伝暗号によってコードされないアミノ酸、天然に存在しないアミノ酸および非天然アミノ酸が、本発明のポリペプチドのアミノ酸残基と置換され得る。

【0288】

本発明のポリペプチド中の必須アミノ酸は、当技術分野で公知の手順、例えば、部位特異的突然変異誘発またはアラニンスキャニング突然変異誘発に従って同定できる(Cunningham and Wells, Science 244: 1081-5, 1989)。推定接触部位アミノ酸の突然変異とともに、生物学的相互作用の部位も、核磁気共鳴、結晶学、電子回折または光親和性標識のような技術によって決定されるような構造の物理的分析によって決定できる。例えば、de Vos et al., Science 255:306-12, 1992、Smith et al., J. Mol. Biol. 224:899-904, 1992、Wlodaver et al., FEBS Lett. 309:59-64, 1992を参照されたい。必須アミノ酸の同一性はまた、本発明のポリペプチドの関連構成成分(例えば、転位置またはプロテアーゼ構成成分)との相同性の分析から推論できる。

20

【0289】

突然変異誘発およびスクリーニングの公知の方法、例えば、Reidhaar-Olson and Sauer (Science 241:53-7, 1988)またはBowie and Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-6, 1989)によって開示されるものを使用して、複数のアミノ酸置換を行い、試験できる。手短には、これらの著者は、ポリペプチド中の2つ以上の位置を同時にランダム化し、機能的ポリペプチドを選択し、次いで、突然変異誘発されたポリペプチドを配列決定して、各位置で許容可能な置換の範囲を決定する方法を開示している。使用できる他の方法として、ファージディスプレイ(例えば、Lowman et al., Biochem. 30:10832-7, 1991、Ladner et al., 米国特許第5,223,409号、Huse, WIPO公開W092/06204)および領域によって指示される突然変異誘発(Derbyshire et al., Gene 46:145, 1986、Ner et al., DNA 7:127, 1988)が挙げられる。

30

40

【0290】

別に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野における当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994)およびHale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991)は、当業者に、本開示において使用される用語の多くの一般的な辞書を提供する。

【0291】

本開示は、本明細書において開示される例示的方法および材料によって限定されず、本

50

明細書において記載されるものと同様または同等の任意の方法および材料が、本開示の実施形態の実施または試験において使用できる。数値範囲には、範囲を定義する数値が含まれる。特に断りのない限り、それぞれ、任意の核酸配列が、5'から3'配向で左から右に書かれ、アミノ酸配列は、アミノからカルボキシ配向で左から右に書かれる。

【0292】

本明細書において提供された見出しは、本開示の種々の態様または実施形態の制限ではない。

【0293】

アミノ酸は、アミノ酸の名称、三文字略語または一文字略語を使用して本明細書において参照される。「タンパク質」という用語は、本明細書において使用される場合、タンパク質、ポリペプチドおよびペプチドを含む。本明細書において使用される場合、「アミノ酸配列」という用語は、「ポリペプチド」という用語および/または「タンパク質」という用語と同義である。一部の例では、「アミノ酸配列」という用語は、「ペプチド」という用語と同義である。一部の例では、「アミノ酸配列」という用語は、「酵素」という用語と同義である。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、本明細書において同義的に使用される。本開示および特許請求の範囲では、従来のアミノ酸残基の一文字および三文字コードが使用され得る。生化学的命名法に関するIUPACIUB合同委員会(JC BN)に準拠して定義されたアミノ酸の3文字コード。また、ポリペプチドは、遺伝暗号の縮重のために1つより多いヌクレオチド配列によってコードされ得るということも理解される。

【0294】

用語の他の定義が、本明細書を通して現れる場合もある。例示的实施形態がより詳細に記載される前に、本開示は、記載される特定の实施形態に限定されず、そのようなものとして変わり得るということは理解されるべきである。本開示の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ定義されるので、本明細書において使用される技術用語は、単に特定の实施形態を説明するためであって、限定であることを意図しないということも理解されるべきである。

【0295】

値の範囲が提供される場合には、その範囲の上限と下限との間の、文脈が明確に別段の指示をしない限り下限の単位の10分の1までの各介在値もまた、具体的に開示されることは理解される。任意の記載された値または記載された範囲内の介在値と、その記載された範囲内の他の記載された値または介在する値との間のそれぞれのより小さい範囲は、本開示内に包含される。これらのより小さい範囲の上限および下限は独立に、範囲に含まれる場合も、除外される場合もあり、両限界の一方がより小さい範囲に含まれる、両方とも含まれない、または両方が含まれる場合の各範囲も、本開示内に包含され、記載された範囲中の任意の具体的に除外された限界次第である。記載された範囲が限界の一方または両方を含む場合には、それらの含まれる限界の一方または両方を除外する範囲も本開示に含まれる。

【0296】

本明細書において、および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈が明確に別に示さない限り複数の言及を含むということは注記されなければならない。したがって、例えば、「ボツリヌス神経毒A」への言及は、複数のこのような候補物質を含み、「ボツリヌス神経毒A」への言及は、1つ以上のクロストリジウム神経毒および当業者に公知のその等価物などへの言及を含む。

【0297】

本明細書において論じられた刊行物は、単に本出願の出願日より前のその開示のために提供されている。本明細書のいかなるものも、そのような刊行物が本明細書に添付された特許請求の範囲の先行技術を構成することを認めるものと解釈されるべきではない。

【0298】

本発明の実施形態を、以下の図および実施例を参照してここで単に例として記載する。

【図面の簡単な説明】

【0299】

【図1】図1は、成人において顔面の皺線を処置するためのディスポート(登録商標)のFDAによって承認された投与量を示す。

【図2】図2は、精製された組換えBoNT/ABキメラ1、2および3A(それぞれ、配列番号3~4)のSDS-PAGEを示す。レーンは、標識された「マーカ」(分子量マーカ)、「-DTT」(酸化型BoNT/ABキメラサンプル)および「+DTT」(還元型BoNT/ABキメラサンプル)である。

【図3】図3は、組換えBoNT/ABキメラ1、2および3A(それぞれ、二鎖形態に変換された配列番号3、4および5)による、ラット脊髄ニューロンにおけるSNAP-25の切断を示す。培養されたラット一次脊髄ニューロン(SCN)を、10%CO₂を含む加湿雰囲気中、37℃で種々の濃度の組換えBoNT/ABキメラ1、2または3Aに24時間曝露した。次いで、細胞を、DTTおよびベンゾナーゼを補給した1×NuPAGEバッファを用いて溶解した。サンプルを微量遠心管に移し、ヒートブロック上で90℃で5分間加熱し、-20℃で保存し、その後、ウエスタンブロットによってSNAP-25切断を分析した。SNAP-25を、全長および切断形態両方のSNAP-25を検出するポリクローナル抗体(Sigma #S9684)を使用して検出した。抗ウサギHRP(Sigma #A6154)を二次抗体として使用した。

【図4】図4は、マウス指外転スコア化アッセイを示す。マウスに、短時間の全身麻酔下で1つの後肢の腓腹筋-ヒラメ筋複合筋肉中に注射し、指外転スコア(DAS)を使用して筋肉衰弱を0~4スケールで測定した。各用量のDAS最高値を決定し、用量に対してプロットし、データを4パラメータロジスティック方程式に対してフィッティングし、ED50およびDAS 4につながる用量(DAS 4用量)値を決定した。

【図5】図5は、精製された組換えBoNT/ABキメラ3Bおよび3C(それぞれ、配列番号6および7)のSDS-PAGEを示す。レーンは、標識された「マーカ」(分子量マーカ)、「-DTT」(酸化型BoNT/ABキメラサンプル)および「+DTT」(還元型BoNT/ABキメラサンプル)である。

【図6】図6は、ヒト人工多能性幹細胞由来末梢ニューロン(PER1.4U-Axiogenesis, Germany)における未改変BoNT/AおよびBoNT/ABキメラ3Bおよび3C(それぞれ、配列番号2、6および7)によるSNAP-25の切断を示す。PER1.4U細胞を、5%CO₂を含有する加湿CO₂雰囲気中、37℃で種々の濃度の組換えBoNT/AまたはBoNT/ABキメラ3Bもしくは3Cに24時間曝露した。次いで、細胞を、DTTおよびベンゾナーゼを補給した1×NuPAGEバッファを用いて溶解した。サンプルを微量遠心管に移し、ヒートブロック上で90℃で5分間加熱し、-20℃で保存し、その後、ウエスタンブロットによってSNAP-25切断を分析した。SNAP-25を、全長および切断形態両方のSNAP-25を検出するポリクローナル抗体(Sigma #S9684)を使用して検出した。抗ウサギHRP(Sigma #A6154)を二次抗体として使用した。

【図7】図7は、マウス指外転スコア化アッセイにおける筋肉衰弱の持続期間を経時的に示す。マウスに、短時間の全身麻酔下で1つの後肢の腓腹筋-ヒラメ筋複合筋肉中に注射し、指外転スコア(DAS)を使用して筋肉衰弱を0~4スケールで測定した。注射の最初の4日間に4のDASを誘導した最低用量で注射された群の動物を、0のDAS(観察される筋力低下なし)への筋力低下の完全回復までモニタリングした。

【図8】図8は、眉間の皺線を処置する場合の改変BoNT/Aの筋肉内投与のための注射部位を示す。

【図9】図9は、眉間の皺線および額の皺線を処置する場合の改変BoNT/Aの筋肉内投与のための注射部位を示す。

【図10】図10は、外眼角の皺線のみを処置する場合の改変BoNT/Aの筋肉内投与のための注射部位を示す。

【図11】図11は、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を処置する場合の改変BoNT/Aの筋肉内投与のための注射部位を示す。

【0300】

配列表

【0301】

以下の配列番号のいずれかにおいて、最初のMetアミノ酸残基または対応する最初のコドンが示される場合には、前記残基/コドンは任意である。

【0302】

配列番号1(未改変BoNT/Aのヌクレオチド配列)

ATGCCATTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACAT
CGCATACATCAAGATTCGGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAGA
TCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAGAA
GGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCAGCTACTACGATTC
GACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGC
TGTTCGAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGTT
CGCGGTATCCCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACCGAACTGAAGGTTATCGA
CACTAACTGCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGA
ATCTGGTTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTTT
GGTCACGAGGTTCTGAATCTGACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTCG
TTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAATC
CGTTGCTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATGAA
CTGATCCACGCAGGCCACCGCCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGTT
CAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATGAGCGGCCTGGAAGTCAGCTTCGAAG
AACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACAGCTTGCAAGAGAAT
GAGTTCGCTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACAA
GGCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTTA
AAGAGAAGTACCTGCTGTCCGAGGATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTG
AAGTTTGACAAACTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGACAACCTTGT
GAAATTCTTCAAAGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTTT
TCAAGATTAACATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAACCTG
CGTAACACCAACCTGGCGGGCGAACTTTAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACAT
GAATTTACGAAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTTCGAGTTCTATAAGCTGCTGT
GCGTGCGCGGTATCATCACCAGCAAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAACAAG
GCGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATTGGGATCTGTTCTTTTCGCCATC
CGAAGATAATTTTACCAACGACCTGAACAAGGGTGAAGAAATCACCAGCGATACGA
ATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCTG
ACCTTTAACTTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGA
CATTATCGGTCAGCTGGAACCTGATGCCGAATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAAA
AGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCATTACCTGCGTGACAGGAGTTTGAA
CACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCCCTGCTGAACCC
GAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCCA
CTGAGGCCGCGATGTTCTTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGAC
GAGACGAGCGAAGTGAGCACTACCGACAAAATTGCTGATATTACCATCATTATCCC
GTATATTGGTCCGGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGACGATTTTGTGG
GTGCCCTGATCTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTCATTCCGGAGATTGCG
ATCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCTACATCGCGAATAAGGTTCTGAC
GGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCGAAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTTT
ACAAATACATTGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAGATCGACCTGATC
CGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAATTAT
CAACTACCAATACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAGATAACATTAACCTTCAATA
TCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATCAATATC
AACAAGTTTTTGAATCAGTGAGCGTTTTCGTACCTGATGAATAGCATGATTCGTA

10

20

30

40

50

TGGCGTCAAACGTCTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAAT
ACATTTACGACAATCGTGGTACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAAAGACAAA
GTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCATTTCAACTGAGCAAGTATGTTGATAA
TCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATCAATACTAGCA
TTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCAAGC
AAGATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCA
GCTGTTTAAATCTGGAATCGAGCAAAATTGAGGTTATCCTGAAAAACGCCATTGTCT
ACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTTCGCATCCCGAAATAC
TTCAACAGCATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACAA
CAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGACA
CCCAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAGTACTCTCAAATGATCAACATTTCC
GATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAATAACAG
CAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTA
ATATCCACGCAAGCAACAACATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCAT
CGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAATGAGAAGGA
GATCAAAGATTTGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGGG
GCGATTATCTGCAATACGATAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAAC
AAATATGTGGATGTCAATAATGTGGGTATTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCC
GCGTGCGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTGAACTCTAGCCTGTACCGTGGTA
CGAAATTCATCATTAAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAGATAACATTGTGCGTAAT
AACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGTGAAGAATAAAGAGTACCGTCTGGCGAC
CAACGCTTCGCAGGCGGGTGTTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATG
TCGGTAATCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACCAGGGTATCACT
AACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTTATTGG
TTTCCACCAGTTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGTC
AGATTGAGCGCAGCAGCCGTACTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGAT
GATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

【 0 3 0 3 】

配列番号2(未改変BoNT/Aのポリペプチド配列)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQM QP VKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEG
DLNPPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGI
PFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLN
LTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLL GAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRL
YGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNK
FKDIASTLNKAKSIVGTASLQYMKNVFKEKYLLEDTS GKFSVDKLFKFDKLYKMLT
EIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNG
QNTEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNW
DLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIEN
LSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEGHKSRIALTNSVNEALL
NPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIP
YIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTI
DNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQY
NQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLE
DFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDR LKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTF
TEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEV
ILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWKVS LNYGEII
WTLQDTQEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPIS
NLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSN SGILKD
FWGDY LQYDKPYM LNL YDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVM TTN IYLNSSL
YRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIP

10

20

30

40

50

DVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNNGNDIGFIGFHQFNNI AKLVASNWY
NRQIERSSRTLGCSEFIPVDDGWGERPL

【0304】

配列番号3(改変BoNT/「キメラ1」のポリペプチド配列)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQM QPVKAFKIH NKIWVIPERDTFTNPE
EGDLN

PPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIP
FWGG

STIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRN
GY

10

GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLL GAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGIAI
NPN

RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHD AKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIAS
LNKA

KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVK
FFKV

LNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNL RNTNLAANFNGQNT EINN MNFTK
LKNFT

GLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLN
KGEE

20

ITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENIS IENLSSDIIGQLELMPNIERFP
NG

KKYELDKYTMFHYLRAQEFEGHKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTF FSSDYVKKVN
KATEA

AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALI
FSG

AVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLT VQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNW
LAK

VNTQIDLIRKKMKEALENQA EATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESI
NKA

30

MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDR
LKDK

VNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKSEILNNIILNLRYKDNNLIDLSGYGA
KVE

VYDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGI
QNYI

HNEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWT LIDINGKTKSVFFEYNIREDIS EYINRWF
FVT

ITNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNT
EL

40

SQSNI EERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEIL
TRSK

YNQNSKYINYRDLYIG EKFIIRKSNSSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEW RVYTY
KYF

KKEEMKLFLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRF
YES

GIVFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTEHHHHHHHHH
H

【0305】

配列番号4(改変BoNT/「キメラ2」のポリペプチド配列)

50

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAAYIKIPNAGQM QP VKAFKIH NKIWVIPERDTFTNPE
EGDLN
PPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIP
FWGG
STIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRN
GY
GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLL GAGKFATDPAVTLAHEL IHAGHRLYGIAI
NPN
RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHD AKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIAS
LNKA
KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVK
FFKV
LNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNL RNTNLAANFNGQNT EINN MNFTK
LKNFT
GLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLN
KGEE
ITSDTNIEAAEENISLDLIQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFP
NG
KKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTTFFSSDYVKKVN
KATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALI
FSG
AVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLT VQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNW
LAK
VNTQIDLIRKKMKEALENQA EATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESI
NKA
MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLED FDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDR
LKDK
VNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFT EYIKNIIELGGGGSELSEILNNIILNLRYKD
NN
LIDLSGYGAKVEVYDGV ELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNII FNSVFLDFSVSF
WIRI
PKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNNSG WKISIRGNRIIWT LIDINGKTKSVFFEYNI
RED
ISEYINRWFFVTITNNLNNAKIYINGKLESNT DIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQ
FI
WMKYFSIFNTELSQSNIEERYKIQSYSEY LKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSY
IKLKK
DSPVGEILTRSKYNQNSKYINYRDLYIGE KFIIRKSNSSQSINDDIVRKEDYIYLDFF
NL
NQEW RVYTYKYFKKEEMKLFLAPIYDSDEFYNT IQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEE
STDE
IGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCISKWYL KEV KRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWT
EHHH
HHHHHHH
【0306】
配列番号5(改変BoNT/A「キメラ3A」のポリペプチド配列)
MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAAYIKIPNAGQM QP VKAFKIH NKIWVIPERDTFTNPE
EGDLN
PPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIP

10

20

30

40

50

FWGG

STIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRN
GYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGIAI
NPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIAS
LNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSKGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVK
FFKVLNRKTYLNFDAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTNINNMNFTK
LKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLN
KGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIERFP
NGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTTFFSSDYVKKVN
KATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALI
FSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTQVQIDNALSKEKWDDEVYKYIVTNW
LAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESI
NKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDR
LKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNILNNIILNRLRYKDNNLIDLSGYGAK
VEVYDGVLELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQ
NYIHNEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLIDINGKTKSVFFEYNIREDISSEYINRWFF
VTITNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIIDRTQFIWMKYFSIFNT
ELSQSNIEERYKIQSYSEYKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILT
RSKYNQNSKYINYRDLYIGEKFIRRKSNSQSINDDIVRKEDIYLDFFNLNQEWRVYTYK
YFKKEEMKLFLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYE
SGIVFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTEHHHHHHHHHH
【0307】

配列番号6(改変BoNT/A「キメラ3B」のポリペプチド配列)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMGPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEG
DLNPPPEAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGI
PFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLN
LTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELHAGHRL
YGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNK
FKDIASLTNKA KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSKGKFSVDKLFKDKLYKMLT
EIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNG
QNTNINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNW

10

20

30

40

50

DLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFFNFDNEPENISIE
LSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEGHKSRIALTNSVNEALL
NPSRVYTTFFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIP
YIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTQTI
DNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAATKAIINYQY
NQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLE
DFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRCLKDVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTF
TEYIKNILNNIILNRLRYKDNNLIDLSGYGAKVEVYDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRV
TQNQNIIFNSVFLDFSFSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNNSGWKISIRGN
RIIWTLIDINGKTKSVFFEYNIREDISEYINRWFFVTITNNLNNAKIYINGKLESNTDI
KDIREVIANGEIIFKLDGDIIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIEERYKIQSYSEYLKDF
WGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYINYRDLYIGEK
FIIRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEW RVYTYKYFKKEEMKLFLAPIYDSD
EFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCISK
WYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE

10

【0308】

配列番号7(改変BoNT/A「キメラ3C」のポリペプチド配列)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQM QPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPE
EGDLN

20

PPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIP
FWGG

STIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRN
GY

GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLL GAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGIAI
NPN

RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHD AKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIAS
LNKA

KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLFKLYKMLTEIYTEDNFVK
FFKV

30

LNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNL RNTNLAANFNGQNT EINN MNFTK
LKNFT

GLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLN
KGEE

ITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFFNFDNEPENISIE NLSSDIIGQLELMPNIERFP
NG

KKYELDKYTMFHYLRAQEFEGHKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTTFFSSDYVKKVN
KATEA

AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALI
FSG

40

AVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTQTI DNALSKRNEKWDEVYKYIVTNW
LAK

VNTQIDLIRKKMKEALENQAATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESI
NKA

MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLED F DASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDR
LKDK

VNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNILNNIILNRLRYKDNNLIDLSGYGAK
VEV

YDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSFSFWIRIPKYKNDGIQ
NYIH

50

NEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLIDINGKTKSVFFEYNIREDISEYINRWFF

VTI

TNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDDIDRTQFIWMKYFSIFNT
ELSQSNIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILT
RSKYNQNSKYINYRDLYIGEKFIIRRKSNSQSINDDIVRKEDIYLDFFNLNQEWRVYTYK
YFKKEEEKLFLAPISDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYE
SG

IVFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE

10

【0309】

配列番号8(BoNT/Bのポリペプチド配列)

MPVTINNFNYPIDNNNIIMMEPPFARGTGRIYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKP
EDFNKSSGIFNRDVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLLEMIINGIP
YLGDRRVPLEEFNTNIASVTVNKLISNPGEVERKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQ
NHFASREGFGGIMQMKFCPEYVSFNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALILMHელიHVL
HGLY

20

GIKVDDLPIVPNEKKFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNFR
GIVDRLNKVLVCISDPNININIKKFKDKYKFVEDSEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGFT
ETNIAENYKIKTRASVFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIEEGFNISDKDMEKEYRGQNKAIN
KQAYEEISKEHLAVYKIQMCKSVKAPGICIDVDNEDLFFIADKNSFSDDLKSKNERIEYNT
QSNYIENDFPINELILDIDLISKIELPSENTESLTDNFNDVPVYEKQPAIKKIFTDENTIF
QY

30

LYSQTFPLDIRDISLTSSFDALLFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQI
VNDFVIEANKSNTMDKIADISLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFEIAGASILLEFIPEL
LIPVVGAFLLSYIDNKNKIIKTIDNALTNRNEKWSDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIK
EGMYKALNYQAQALEEIIKYRYNIYSEKEKSNINIDFNDINSKLNEGINQAIDNINNFINGC
SVSYLMKKMIPLAVEKLLDFDNTLKKNLLNYIDENKLYLIGSAEYEKSKVNKYLKTIM
PFDL

40

SIYTNDTILIEFMFNKYNSEILNNIILNRLRYKDNNLIDLSGYGAKVEVYDGVELNDKN
QFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMK
NNSGWKISIRGNRIIWTLIDINGKTKSVFFEYNIREDISSEYINRWFFVTITNNLNNAKIYI
NGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIEERYKIQ
SYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYIN
YRDLY

50

IGEKFIIRKSNSSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEW RVYTYKYFKKEEKLFLAP
ISD

SDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFC
IS

KWYLKEVKRKPYNLKLG CNWQFIPKDEGWTE

【0310】

配列番号9 - C末端L鎖断片

TKSLDKGYNK

【0311】

配列番号10 - C末端L鎖断片2

SLDKGYNK

【0312】

配列番号11 - 二鎖L鎖1

PFV NKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQM QPVKAFKIH NKIWVIPERDTFTNPEEGD
LNPPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDN YLKGVT KLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIP
FWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNL
TRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVD TNPLL GAGKFATDPAVTLAHEL IHAGHRLY
GIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHD AKFIDSLQENEFRLYYYNKF
KDIAS TLNKA KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEI
YTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNL RNTNLAANFNGQN
TEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSK

【0313】

配列番号12 - 二鎖L鎖2

PFV NKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQM QPVKAFKIH NKIWVIPERDTFTNPEEGD
LNPPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDN YLKGVT KLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIP
FWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNL
TRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVD TNPLL GAGKFATDPAVTLAHEL IHAGHRLY
GIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHD AKFIDSLQENEFRLYYYNKF
KDIAS TLNKA KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEI
YTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNL RNTNLAANFNGQN
TEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTK

【0314】

配列番号13 - 二鎖H鎖

ALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITS DTNIEAAEENISLDLIQQYYLTF
NFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEGHGS
RIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEV
STTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALV
SYIANKVLT VQTIDNALS KRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALEN
QAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYL
MNSMIPYGVKRLED FDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQL
SKYVDNQ RLLSTFTEYIKNILNNIILN LRYKDNNLIDLSGYGAKVEVYDGV ELNDKNQ
FKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMK
NNSGWKISIRGNRIIWT LIDINGKTKSVFFEYNIREDIS EYINRWFFVTITNNLNNAKI
YINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQS NIEERY
KIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSK
YINYRDLYIGEKFIIRKSNSSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEW RVYTYKYFKKEE
MKLFLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIV
FEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLG CNWQFIPKDEGWTE

【実施例】

【0315】

[実施例1]

【0316】

BoNT/ABキメラのクローニング、発現および精製

【0317】

BoNT/ABキメラ構築物1、2、3A、3Bおよび3C(それぞれ、配列番号3~7)を、親血清型分子をコードするDNAおよび適切なオリゴヌクレオチドから標準分子生物学技術を使用して構築した。次いで、これらをC末端His₁₀-タグと共に、またはそれを伴わずに、pJ401発現ベクター中にクローニングし、過剰発現のためにBLR(DE3)大腸菌細胞に形質転換した。これらの細胞を、1Lの、適切な抗生物質を補給した改変テリフィックブロス(Terrific Broth)(mTB)を含有する、2Lのバッフル付き三角フラスコ中、37℃および225RPM振盪で増殖させた。A₆₀₀が> 0.5に到達すると、インキュベーター温度を16℃に低下させ、次いで、1時間後に1mM IPTGを用いて225RPM振盪で20時間誘導して、組換えBoNT/AB構築物を発現させた。

10

【0318】

回収した細胞を超音波処理によって溶解し、4℃、4500RPMで1時間の遠心分離によって清澄化した。次いで、組換えBoNT/ABキメラ分子を硫酸アンモニウム中で抽出し、標準的な迅速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)技術によって精製した。これは、捕捉のための疎水性相互作用樹脂および中間精製ステップのための陰イオン交換樹脂を使用することを含んでいた。次いで、部分精製分子をエンドプロテアーゼLys-Cを用いてタンパク質分解によって切断して、活性二鎖を得た。これを、第2の疎水性相互作用樹脂を用いてさらに精製して、最終BoNT/ABキメラを得た。

20

【0319】

デカヒスタジン(decahistadine)タグ(H₁₀)を有するBoNT/ABキメラ分子(キメラ1、2、3A)について、捕捉ステップでは、疎水性相互作用樹脂の代わりに固定化されたニッケル樹脂の使用が用いられた。

【0320】

各キメラの配列が、表1に示されている。

【表1】

分子	配列番号	配列
キメラ1	3	A1:1-871 + B1:858-1291 (E1191M/S1199Y) + His ₁₀ -タグ
キメラ2	4	A1:1-874 + ELGGGGSEL + B1:858-1291 (E1191M/S1199Y) + His ₁₀ -タグ
キメラ3A	5	A1:1-872 + B1: 860-1291 (E1191M/S1199Y) + His ₁₀ -タグ
キメラ3B	6	A1:1-872 + B1: 860-1291 (E1191M/S1199Y)
キメラ3C	7	A1:1-872 + B1: 860-1291

30

40

表1—キメラBoNT/AB構築物

【0321】

[実施例2]

【0322】

BoNT/ABキメラ1、2および3Aの比較

【0323】

C末端His₁₀タグおよびE1191M/S1199Y二重突然変異を有するBoNT/ABキメラ1

50

、2および3Aを実施例1(図2)に記載されるように精製し、機能活性について試験した。

【0324】

ラット脊髄ニューロンSNAP-25切断アッセイ

【0325】

ラット脊髄ニューロン(SCN)の一次培養物を調製し、96ウェル組織培養プレート中で3週間増殖させた(Masuyer et al., 2011, J. Struct. Biol. Structure and activity of a functional derivative of Clostridium botulinum neurotoxin Bに、およびChaddock et al., 2002, Protein Expr. Purif. Expression and purification of catalytically active, non-toxic endopeptidase derivatives of Clostridium botulinum toxin type Aに記載されるように)。SCNフィーディング培地でBoNT/ABの段階希釈を調製した。処置されるべきウェルから増殖培地を収集し、濾過した(0.2 μmフィルター)。125 μLの濾過培地を各試験ウェルに添加して戻した。次いで、125 μLの希釈毒素をプレートに添加した(3連のウェル)。処置された細胞を37℃、10% CO₂で24±1時間、インキュベートした。

【0326】

SNAP-25切断アッセイを使用するBoNT活性の分析

【0327】

処置後、BoNTを除去し、細胞をPBS(Gibco、UK)で1回洗浄した。細胞を0.1Mのジチオトレイトール(DTT)および250単位/mLのベンゾナーゼ(Sigma)を補給した1×NuPAGE溶解バッファー(Life Technologies)に溶解した。溶解液タンパク質をSDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロースメンブレンに移した。メンブレンを、未切断SNAP-25ならびにBoNT/Aエンドペプチダーゼによって切断されたSNAP-25を認識する、SNAP-25に特異的な一次抗体(Sigma #S9684)を用いてプローブした。使用した二次抗体は、HRPがコンジュゲートしている抗ウサギIgG(Sigma #A6154)であった。増強された化学発光によってバンドを検出し、pXi6 Access(Synoptics、UK)を使用して画像化した。GeneToolsソフトウェア(Syngene、Cambridge、UK)を使用してバンドの強度を決定し、BoNTの各濃度の切断されたSNAP-25のパーセンテージを算出した。データを4パラメータロジスティック方程式にフィッティングし、GraphPad Prismバージョン6(GraphPad)を使用してpEC₅₀を算出した。

【0328】

以下の表2は、ラットSCN SNAP-25切断アッセイにおいてキメラ1、2および3Aについて決定されたpEC₅₀値を提供する。これらの結果は、3種のBoNT/ABキメラが、ラット脊髄ニューロンに入り、その標的基質を切断する能力を保持していたことを示す。しかし、キメラ3Aは、このアッセイにおいてキメラ1および2よりも強力であった(図3も参照されたい)。

【表2】

	pEC ₅₀ ±平均値の標準誤差
キメラ 1	12.42 ±0.04
キメラ 2	12.57 ±0.01
キメラ 3A	12.89 ±0.04

表 2. pEC₅₀ 値.

【0329】

指外転スコア化(DAS)アッセイ

【0330】

DASアッセイにおいてBoNT/ABキメラ1、2および3Aの活性を測定する方法は、尾によって短時間吊り下げられた場合のマウスの驚愕反応である足指が広がる反射に基づいている。この反射が指外転スコア(DAS)としてスコア化され、後肢の腓腹筋-ヒラメ筋筋肉

へのBoNTの投与後阻害される。マウスは、動物がその後肢を伸ばし、その後指を外転させる特徴的な驚愕反応を誘発するために、尾によって短時間吊り下げられる。(Aoki et al. 1999, Eur. J. Neurol.; 6 (suppl. 4) S3-S10)。

【0331】

注射の当日、導入チャンバー中で酸素中のイソフラン3%を与えて、マウスに麻酔した。各マウスに、右後肢の腓腹筋-ヒラメ筋筋肉においてBoNT/ABキメラまたは媒体(0.2%ゼラチンを含有するリン酸バッファー)の筋肉内注射を与えた。

【0332】

神経毒注射後、指外転の変動する程度を、0~4のスケールでスコア化した、ここで、0=正常および4=指外転および脚伸長の最大の低減。各用量での最大効果の平均を使用する非線形調整分析によってED50を決定した。使用した数学的モデルは、4パラメータロジスティックモデルであった。

10

【0333】

DASを、投薬後第1日の間は2時間ごとに実施し、その後、1日につき3回、4日間実施した。

【0334】

図4は、キメラ1、2および3A(それぞれ、二鎖形態に変換された配列番号3、4および5)のフィッティングされた曲線を示す。キメラ3A曲線は、左にシフトし、これは、キメラ1および2と比較して、より低用量のキメラ3Aが同様のDAS応答を達成したことを意味し、したがって、キメラ3AがマウスDASアッセイにおいて他のものよりも強力であることを示し、各キメラの算出されたED50およびDAS 4(最高スコア)につながる用量の値を提供する以下の表(表3)も参照されたい。

20

【0335】

以下の表3は、マウスDASアッセイにおいて未改変組換えBoNT/A1(二鎖形態に変換されたrBoNT/A1 - 配列番号2)ならびにキメラ1、2および3Aについて決定されたED50およびDAS 4用量を提供する。これらの結果は、3種のキメラのうち、キメラ3Aが筋肉衰弱の誘導において最高のin vivo効力を有することを示す。図4および表3に示される研究は、Charles Riverラボラトリーズから入手したマウスで実施した。

【表3】

	ED ₅₀ (pg/マウス)	DAS 4 用量(pg/ マウス)
rBoNT/A1	1	5
キメラ1	23	200
キメラ2	89	>300
キメラ3A	18	133

30

表 3. ED₅₀ 値.

40

【0336】

【実施例3】

【0337】

BoNT/ABキメラ3B、3Cおよび未改変BoNT/A1の比較

【0338】

それぞれE1191M/S1199Y二重突然変異が存在する、および存在しないタグのないBoNT/ABキメラ3Bおよび3C(配列番号6および7)を、実施例1(図5)に記載されるように精製し、参照として未改変BoNT/A(二鎖形態に変換された配列番号2)を使用して機能活性について試験した。

【0339】

50

ヒト多能性幹細胞SNAP-25切断アッセイ

【0340】

低温保存PERI.4U-細胞を、Axiogenesis(Cologne, Germany)から購入した。細胞の解凍およびプレATINGを、製造業者によって推奨されるように実施した。手短には、細胞を含有するクライオバイアルを、37℃の水浴中で2分間解凍した。穏やかに懸濁した後、細胞を50mLのチューブに移した。クライオバイアルを1mLの、製造業者によって供給されたPeri.4U(登録商標)解凍培地で洗浄し、培地を細胞懸濁液に滴下して50mLのチューブに移し、その後、さらに2mLのPeri.4U(登録商標)解凍培地を50mLのチューブに滴下した。次いで、血球算定器を使用して細胞をカウントした。この後、さらに6mLのPeri.4U(登録商標)解凍培地を細胞懸濁液に添加した。細胞ペレットを260×g(例えば、1,100RPM)、室温で6分間の遠心分離によって得た。次いで、細胞を製造業者によって供給された完全Peri.4U(登録商標)培養培地に再懸濁した。細胞を、ポリ-L-オルニチンおよびラミニンでコーティングされた細胞培養プレート上に1cm²あたり50,000~150,000個細胞の密度でプレATINGした。細胞を加湿CO₂雰囲気中で37℃で培養し、培養の間、2~3日毎に培地を完全に変更した。

10

【0341】

毒素処置のために、Peri.4U(登録商標)培養培地でBoNTの段階希釈を調製した。処置されるべきウェルからの培地を収集し、濾過した(0.2μmフィルター)。125μLの濾過培地を各試験ウェルに添加して戻した。次いで、125μLの希釈毒素をプレートに添加した(3連のウェル)。処置された細胞を37℃、10%CO₂で48±1時間、インキュベートした。

20

【0342】

SNAP-25切断アッセイを使用するBoNT活性の分析

【0343】

処置後、BoNTを除去し、細胞をPBS(Gibco, UK)で1回洗浄した。細胞を0.1Mのジチオトレイトール(DTT)および250単位/mLのベンゾナーゼ(Sigma)を補給した1×NuPAGE溶解バッファー(Life Technologies)に溶解した。溶解液タンパク質をSDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロースメンブレンに移した。メンブレンを、未切断SNAP-25ならびにBoNT/Aエンドペプチダーゼによって切断されたSNAP-25を認識する、SNAP-25に特異的な一次抗体(Sigma #S9684)を用いてプローブした。使用した二次抗体は、HRPがコンジュゲートしている抗ウサギIgG(Sigma #A6154)であった。増強された化学発光によってバンドを検出し、pXi6 Access(Synoptics, UK)を使用して画像化した。GeneToolsソフトウェア(Syngene, Cambridge, UK)を使用してバンドの強度を決定し、BoNTの各濃度の切断されたSNAP-25のパーセンテージを算出した。データを4パラメータロジスティック方程式にフィッティングし、GraphPad Prismバージョン6(GraphPad)を使用してpEC₅₀を算出した。

30

【0344】

図6は、キメラ3Bおよび3Cが、人工ヒト多能性幹細胞におけるSNAP-25の切断においてrBoNT/A1よりも大きな効力を示したが、前者は有意により多かったことを示す。これは、これらの細胞中に存在するヒトシナプトタグミンIIタンパク質受容体に対するキメラ3Bの親和性を増大する二重突然変異によって説明できる(図6、表4)。

40

【表4】

	pEC ₅₀ ±平均値の標準誤差
rBoNT/A1	10.21 ±0.05
キメラ 3B	12.38 ±0.06
キメラ 3C	10.72 ±0.08

表 4. pEC₅₀ 値.

50

【0345】

指外転スコア化(DAS)アッセイ - 安全率

【0346】

DASアッセイにおいてBoNTの活性を測定する方法は、尾によって短時間吊り下げられた場合のマウスの驚愕反応である足指が広がる反射に基づいている。この反射が、指外転スコア(DAS)としてスコア化され、後肢の腓腹筋-ヒラメ筋筋肉へのBoNTの投与後阻害される。マウスは、動物がその後肢を伸ばし、その後指を外転させる特徴的な驚愕反応を誘発するために、尾によって短時間吊り下げられる。(Aoki et al. 1999, Eur. J. Neurol.; 6 (suppl. 4) S3-S10)。

【0347】

注射の当日、導入チャンバー中で酸素中のイソフラン3%を与えて、マウスに麻酔した。各マウスに、右後肢の腓腹筋-ヒラメ筋筋肉においてBoNTまたは媒体(0.2%ゼラチンを含むリン酸バッファー)の筋肉内注射を与えた。

【0348】

神経毒注射後、指外転の変動する程度を、0~4のスケールでスコア化した、ここで、0=正常および4=指外転および脚伸長の最大の低減。各用量での最大効果の平均を使用する非線形調整分析によってED50を決定した。使用した数学的モデルは、4パラメータロジスティックモデルであった。

【0349】

DASを、すべての用量について、投薬後第1日の間は2時間ごとに実施し、その後、1日につき3回、4日間実施した。その後、媒体および注射の最初の4日間に4のDASを誘導した最低用量で注射された群の動物を、0のDAS(観察される筋力低下なし)への筋力低下の完全回復までモニタリングした。

【0350】

安全率の算出のために、毒素注射(D0)の前日、その後、研究期間を通じて1日に1回、すべての動物を秤量した。各用量群について、平均体重、その標準偏差および標準誤差平均を毎日算出した。BoNTの安全率($-10\% \Delta BW / ED_{50}$)を得るために、研究の間の任意の時点で、用量群の平均体重がその同一用量群のD0での平均体重の10%より低い用量を、研究されているBoNTのED50によって除した。致死用量は、その用量群内の動物のうち1匹以上が死亡した用量と定義した。

【0351】

図7は、未改変BoNT/A、キメラ3Bおよびキメラ3C(二鎖形態に変換された配列番号2、6および7)の、マウス指外転スコア化アッセイにおける筋肉衰弱の持続期間を経時的に示し、キメラがより長い作用持続期間を有することを示す。

【0352】

以下の表5は、マウスDASアッセイにおいてrBoNT/A1ならびにキメラ3Bおよび3Cについて決定されたED50およびDAS 4用量を提供する。表はまた、0のDAS(観察される筋力低下なし)への筋力低下の完全回復までのDAS 4用量の作用の総持続期間を提供する。さらに、表は、上記の本文において定義されるような、マウス致死用量および安全率($-10\% \Delta BW / ED_{50}$)を示す。rBoNT/A1に対する比較では、キメラ3Bおよび3Cは、より長い作用持続期間、より良好な安全率およびより高い致死用量を有する。図7および表5に示される研究は、Janvierラボラトリーズから入手したマウスで実施した。

10

20

30

40

50

【表 5】

	ED ₅₀ (DAS 2) 用 量 (pg/マウ ス)	DAS 4 用 量 (pg/マウ ス)	最低 DAS4 用量を用い た場合の作用の総持続 期間(日)	マウス 致死用 量 (pg)	安全率 (-10%ΔBW/ED ₅₀)
rBoNT/A1	0.9	2.3	29	18	4.5
キメラ 3B	8.0	89	42	200	14.1
キメラ 3C	5.0	26	42	8.9	7.4

表 5. BoNT/AB キメラの DAS および安全率.

【0353】

[実施例4]

【0354】

眉間の皺線を処置するための投与レジメン

【0355】

改変 BoNT/A は、バイアルあたり 15 ng の改変 BoNT/A を含有する 2 mL の透明ガラスバイアル中の凍結乾燥粉末として提供される。凍結乾燥粉末は、滅菌塩化ナトリウム 0.9 % v/w 保存料不含溶液および希釈剤(改変 BoNT/A の賦形剤のみを含有する製剤化バッファ)の混合物で再構成される。再構成後、溶液を必要に応じてさらに希釈する。

【0356】

図 8 に示される注射レジメンに従って中等度～重度の眉間の皺線を処置する。

【0357】

単位用量は、20～300 pg (2～35 単位) である。

【0358】

筋肉内注射を、単位用量に従って最大で 5 つの部位で投与する。投与される最大総投与量は、1500 pg (177 単位) である。

【0359】

[実施例5]

【0360】

眉間の皺線および額の皺線を処置するための投与レジメン

【0361】

改変 BoNT/A は、バイアルあたり 15 ng の改変 BoNT/A を含有する 2 mL の透明ガラスバイアル中の凍結乾燥粉末として提供される。凍結乾燥粉末は、滅菌塩化ナトリウム 0.9 % v/w 保存料不含溶液および希釈剤(改変 BoNT/A の賦形剤のみを含有する製剤化バッファ)の混合物で再構成される。再構成後、溶液を必要に応じてさらに希釈する。

【0362】

図 9 に示される注射レジメンに従って中等度～重度の眉間のおよび額の皺線を処置する。

【0363】

単位用量は、20～300 pg (2～35 単位) である。

【0364】

筋肉内注射を、単位用量に従って最大で 10 の部位で投与する。投与される最大総投与量は、3000 pg (355 単位) である。

【0365】

[実施例6]

【0366】

外眼角の皺線を処置するための投与レジメン

【0367】

改変BoNT/Aは、バイアルあたり15ngの改変BoNT/Aを含有する2mLの透明ガラスバイアル中の凍結乾燥粉末として提供される。凍結乾燥粉末は、滅菌塩化ナトリウム0.9%v/w保存料不含溶液および希釈剤(改変BoNT/Aの賦形剤のみを含有する製剤化バッファ)の混合物で再構成される。再構成後、溶液を必要に応じてさらに希釈する。

【0368】

図10に示される注射レジメンに従って中等度～重度の外眼角の皺線を処置する。

【0369】

単位用量は、20～300pg(2～35単位)である。

【0370】

筋肉内注射を、単位用量に従って最大で6つの部位で投与する。投与される最大総投与量は、1800pg(213単位)である。

10

【0371】

[実施例7]

【0372】

眉間の、額のおよび外眼角の皺線を処置するための投与レジメン

【0373】

改変BoNT/Aは、バイアルあたり15ngの改変BoNT/Aを含有する2mLの透明ガラスバイアル中の凍結乾燥粉末として提供される。凍結乾燥粉末は、滅菌塩化ナトリウム0.9%v/w保存料不含溶液および希釈剤(改変BoNT/Aの賦形剤のみを含有する製剤化バッファ)の混合物で再構成される。再構成後、溶液を必要に応じてさらに希釈する。

20

【0374】

図11に示される注射レジメンに従って中等度～重度の眉間の、額のおよび外眼角の皺線を処置する。

【0375】

単位用量は、20～300pg(2～35単位)である。

【0376】

筋肉内注射を、単位用量に従って最大で16の部位で投与する。投与される最大総投与量は、4800pg(569単位)である。

【0377】

[実施例8]

30

【0378】

改変BoNT/A(二鎖形態に変換された配列番号6)のさらなる特性決定

【0379】

改変BoNT/A(例えば、BoNT/ABキメラ)二鎖形態に変換された配列番号6を、マウスLD₅₀アッセイにおいて処置し、1.202ng/kgの結果を得た。したがって、配列番号6の1単位は、このアッセイでは24.04pgにに対応する。

【0380】

さらに、前記BoNT/ABキメラをラットDASアッセイにおいて試験して、ディスポート(登録商標)と比較した場合にの作用持続期間(実施例6のように)を決定した。結果は、以下の表6に示されている:

40

【表6】

	Dysport® 3 U/ラット 15 U/kg	BoNT/AB 300 pg/ラット 1.5 ng/kg
作用持続期間(中央値日数)	21.9	47.7

表 6. 作用持続期間.

【0381】

結論として、BoNT/ABの作用持続期間は、ディスポート(登録商標)よりもかなり高く、配列番号6のものと同様であった。したがって、配列番号6のための単位用量および投

50

与レジメンを、BoNT/Aに同様に適用して、顔面の皺線の改善された処置を提供する可能性があると期待される。

【0382】

[実施例9]

【0383】

上部顔面の皺線のための改変BoNT/Aの単位用量(二鎖形態に変換された配列番号6)の算出

【0384】

前臨床薬理学データを考慮して、ヒトにおける改変BoNT/Aの投与のための適した単位用量範囲(UD)を算出した。

【0385】

配列番号6について、13pg/kgのDAS ED₅₀が算出された。ED₅₀は、最小の薬理的に活性な用量と考えられ、これは、同一動物種において4ng/kgの無毒性量(NOAEI)よりもおよそ300倍低い。ラットにおける配列番号6の13pg/kgのED₅₀は、60kgの体重のヒトについて0.8ng用量に相当する。

【0386】

したがって、20pgの単位用量の下限が選択された。1500pgの単位用量の上限が選択され、これは、両非臨床安全性種(ラットおよびサル)から得た4ng/kgのNOAEIを60kgの体重のヒト用量に変換されたものよりも低い。

【0387】

改善された安全性プロファイルを考慮して、上部顔面の皺線の処置のための1つの最大総用量が24,000pgで設定され、これは、両非臨床安全性種(ラットおよびサル)から得た4ng/kgのNOAEIを60kgの体重のヒト用量に変換されたものに由来する。

【0388】

[実施例10]

【0389】

改変BoNT/A(二鎖形態に変換された配列番号6)を使用して眉間の皺線を処置するための投与レジメン

【0390】

改変BoNT/Aは、バイアルあたり36ngの改変BoNT/Aを含有するバイアル中の凍結乾燥粉末として提供される。凍結乾燥粉末は再構成される。

【0391】

図8に示される注射レジメンに従って中等度～重度の眉間の皺線を処置する。

【0392】

単位用量は、20～1500pg(0.8～62単位)である。

【0393】

筋肉内注射を、単位用量に従って最大で5つの部位で投与する。投与される最大総投与量は、7500pg(312単位)である。

【0394】

[実施例11]

【0395】

改変BoNT/A(二鎖形態に変換された配列番号6)を使用して眉間の皺線および額の皺線を処置するための投与レジメン

【0396】

改変BoNT/Aは、バイアルあたり36ngの改変BoNT/Aを含有するバイアル中の凍結乾燥粉末として提供される。凍結乾燥粉末は再構成される。

【0397】

図9に示される注射レジメンに従って中等度～重度の眉間のおよび額の皺線を処置する。

【0398】

10

20

30

40

50

単位用量は、20～1500pg(0.8～62単位)である。

【0399】

筋肉内注射を、単位用量に従って最大で10位で投与する。投与される最大総投与量は、15,000pg(624単位)である。

【0400】

[実施例12]

【0401】

改変BoNT/A(二鎖形態に変換された配列番号6)を使用して外眼角の皺線を処置するための投与レジメン

【0402】

改変BoNT/Aは、バイアルあたり36ngの改変BoNT/Aを含有するバイアル中の凍結乾燥粉末として提供される。凍結乾燥粉末は再構成される。

【0403】

図10に示される注射レジメンに従って中等度～重度の外眼角の皺線を処置する。

【0404】

単位用量は、20～1500pg(0.8～62単位)である。

【0405】

筋肉内注射を、単位用量に従って最大で6の部位で投与する。投与される最大総投与量は、9000pg(374単位)である。

【0406】

[実施例13]

【0407】

改変BoNT/A(二鎖形態に変換された配列番号6)を使用して眉間の、額のおよび外眼角の皺線を処置するための投与レジメン

【0408】

改変BoNT/Aは、バイアルあたり36ngの改変BoNT/Aを含有するバイアル中の凍結乾燥粉末として提供される。凍結乾燥粉末は再構成される。

【0409】

図11に示される注射レジメンに従って中等度～重度の眉間の、額のおよび外眼角の皺線を処置する。

【0410】

単位用量は、20～1500pg(0.8～62単位)である。

【0411】

筋肉内注射を、単位用量に従って最大で16の部位で投与する。投与される最大総投与量は、24,000pg(998単位)である。

【0412】

[実施例14]

【0413】

ヒトにおける改変BoNT/A(二鎖形態に変換された配列番号6)の安全性&有効性

【0414】

成人のための、中等度～重度の上部顔面の皺線の処置における改変BoNT/A(二鎖形態に変換された配列番号6)の安全性および有効性を評価するための、一体化された第I/II相多施設、二重盲検、無作為化、ディスポートおよびプラセボ対照、用量漸増および用量設定研究を実施した。前記上部顔面の皺線は、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を含む。研究は、成人上部顔面の皺線を有する特有の患者のコホートにおけるヒト連続的用量漸増を含んでいた。前記上部顔面の皺線は、眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を含む。各筋肉に改変BoNT/A、ディスポートまたはプラセボの単位用量を注射した。6つのコホートに、異なる(漸増する)量の改変BoNT/A(二鎖形態に変換された配列番号6)を投与した。総用量範囲は、0.1～6.0ngとした。改変BoNT/Aを、上部顔面領域全体の最大16の部位に注射した(眉間の皺線中の5つの部位、額の皺線中の5つの部位お

10

20

30

40

50

よび外眼角の皺線中の各側に3つの部位-図11を参照されたい)。

【0415】

結果は、筋肉あたり例外的に高い投与量に関わらず、試験した改変BoNT/Aのすべての単位用量および総用量(すなわち、最大6,000pg)が、有効であり、安全に耐受性を示し、有害効果が観察されなかったことを示した。これは、改変BoNT/Aが注射部位から離れて拡散しないことを示し、改変BoNT/A(配列番号6)の例外的な安全性プロファイルを強調する。これらの知見に基づいて、有害効果が結果として生じることなく、筋肉あたりかなり高い単位用量を投与できることが信頼できると考えられる。さらに、毒素の全身拡散がないことを考慮すると、安全性の懸念を伴わずに、最大13~14×のより高い単位用量を投与できることが信頼できる。

10

【0416】

したがって、上部顔面領域全体で最大16×(例えば、眉間の皺線中の5つの部位、額の皺線中の5つの部位および外眼角の皺線中の各側に3つの部位)で投与される予定の各々最大5,000pg $\pm$ 10%の単位用量を、上部顔面の皺線の処置のために選択した。処置セッションの間に投与される総用量は、したがって、それぞれ、最大80,000(+/-10%)となる。

【0417】

例えば、両非臨床安全性種(ラットおよびサル)から得た4ng/kgのNOAELを60kgの体重のためのヒト用量に変換されたものよりもおよそ10倍低い、眉間の領域における最大25,000pgの総用量について、眉間の皺線の処置(皺眉筋あたり2回、鼻根筋において1回)のために最大5,000pg $\pm$ 10%の単位用量を選択した。

20

【0418】

実際、実施例21において説明されるように、5回の注射(皺眉筋あたり2回、鼻根筋において1回)、各々4,000pg単位用量(20,000pgの総用量を提供するために)は十分に耐受性を示した。

【0419】

[実施例15]

【0420】

改変BoNT/A(二鎖形態に変換された配列番号6)を使用して眉間の皺線を処置するための投与レジメン

30

【0421】

改変BoNT/Aは、バイアルあたり36ngの改変BoNT/Aを含有するバイアル中の凍結乾燥粉末として提供される。凍結乾燥粉末は再構成される。

【0422】

図11に示される注射レジメンに従って中等度~重度の眉間の皺線を処置する。すなわち、皺眉筋あたり最大2つの単位用量および鼻根筋において1つ。

【0423】

単位用量は、 $> 1754\text{pg} \sim 5,000\text{ng}$ である。処置の際に投与される改変BoNT/Aの総用量は、最大88,000pgである。これは、毒性限界に近づくことなく(従来の処置レジメンを用いる場合の懸念)、顔面の皺線の処置の際に投与できるディスポート(登録商標)の最大総投与量の14×余りである。したがって、臨床医は、総用量88,000pgを毒性の何らかの懸念を伴わずに投与できるという知識をもって処置を患者に合わせることができ、それによって、対象の追加の筋肉の処置が可能となる、ならびに/または各筋肉および/もしくはその部位が有効用量を受け取ることが確実になる。

40

【0424】

[実施例16]

【0425】

改変BoNT/A(二鎖形態に変換された配列番号6)を使用して眉間の皺線および額の皺線を処置するための投与レジメン

【0426】

50

改変BoNT/Aは、バイアルあたり36ngの改変BoNT/Aを含有するバイアル中の凍結乾燥粉末として提供される。凍結乾燥粉末は再構成される。

【0427】

図9に示される注射レジメンに従って中等度～重度の眉間のおよび額の皺線を処置する。すなわち、皺眉筋あたり最大2つの単位用量および鼻根筋における1つ、ならびに前頭筋における最大5つの単位用量。

【0428】

単位用量は、 $> 1754\text{pg} \sim 5,000\text{ng}$ である。処置の際に投与される改変BoNT/Aの総用量は、最大88,000pgである。これは、毒性限界に近づくことなく(従来の処置レジメンを用いる場合の懸念)顔面の皺線の処置の際に投与できるディスポート(登録商標)の最大総投与量の14×余りである。したがって、臨床医は、総用量88,000pgを毒性の何らかの懸念を伴わずに投与できるという知識をもって処置を患者に合わせることができ、それによって、対象の追加の筋肉の処置が可能となる、ならびに/または各筋肉および/もしくはその部位が有効用量を受け取ることが確実になる。

【0429】

[実施例17]

【0430】

改変BoNT/A(二鎖形態に変換された配列番号6)を使用して外眼角の皺線を処置するための投与レジメン

【0431】

改変BoNT/Aは、バイアルあたり36ngの改変BoNT/Aを含有するバイアル中の凍結乾燥粉末として提供される。凍結乾燥粉末は再構成される。

【0432】

図10に示される注射レジメンに従って中等度～重度の外眼角の皺線を処置する。すなわち、眼輪筋あたり最大3つの単位用量。

【0433】

単位用量は、 $> 1754\text{pg} \sim 5,000\text{ng}$ である。処置の際に投与される改変BoNT/Aの総用量は、最大88,000pgである。これは、毒性限界に近づくことなく(従来の処置レジメンを用いる場合の懸念)、顔面の皺線の処置の際に投与できるディスポート(登録商標)の最大総投与量の14×余りである。したがって、臨床医は、総用量88,000pgを毒性の何らかの懸念を伴わずに投与できるという知識をもって処置を患者に合わせることができ、それによって、対象の追加の筋肉の処置が可能となる、ならびに/または各筋肉および/もしくはその部位が有効用量を受け取ることが確実になる。

【0434】

[実施例18]

【0435】

改変BoNT/A(二鎖形態に変換された配列番号6)を使用する、眉間の、額のおよび外眼角の皺線を処置するための投与レジメン

【0436】

改変BoNT/Aは、バイアルあたり36ngの改変BoNT/Aを含有するバイアル中の凍結乾燥粉末として提供される。凍結乾燥粉末は再構成される。

【0437】

図11に示される注射レジメンに従って中等度～重度の眉間の、額のおよび外眼角の皺線を処置する。すなわち、皺眉筋あたり最大2つの単位用量および鼻根筋における1つ、ならびに前頭筋における最大5つの単位用量、眼輪筋あたり最大3つの単位用量。

【0438】

単位用量は、 $> 1754\text{pg} \sim 5,000\text{ng}$ である。処置の際に投与される改変BoNT/Aの総用量は、最大88,000pgである。これは、毒性限界に近づくことなく(従来の処置レジメンを用いる場合の懸念)、顔面の皺線の処置の際に投与できるディスポート(登録商標)の最大総投与量の14×余りである。したがって、臨床医は、総用量88,000pgを毒性の何

らかの懸念を伴わずに投与できるという知識をもって処置を患者に合わせることができ、それによって、対象の追加の筋肉の処置が可能となる、ならびに/または各筋肉および/もしくはその部位が有効用量を受け取ることが確実になる。

【0439】

[実施例19]

【0440】

上部顔面の皺線を有する患者の処置

【0441】

John、年齢55は、重度の眉間の皺線、額の皺線および外眼角の皺線を示す。改変BoNT/A(配列番号6)は、以下に示される以下の筋肉に1つ以上の単位用量(1×単位用量=5000pg)によって投与される:

- 眉間の皺線を処置するための、各皺眉筋への2つの単位用量(したがって、皺眉筋全体で4つの単位用量)および鼻根筋の1つの部位、
- 額の皺線を処置するための、前頭筋への5つの単位用量、ならびに
- 外眼角の皺線を処置するための、各眼輪筋の外部部分の3つの単位用量(したがって、眼輪筋全体で6つの単位用量)。

【0442】

投与される総用量は、80,000ng(+/-10%)の改変BoNT/A(二鎖形態に変換された配列番号6)である。

【0443】

すべての皺線(皺)が軽減され、透き通った、若々しい外観の皮膚が残り、長期間の改変BoNT/Aのために、Johnは、9ヶ月を超えるさらなる処置を必要としない。したがって、Johnは、未改変BoNT/Aを投与される同等の対象と比較した場合に、より頻度の低い注射を受ける(例えば、1年ごと)。さらに、Billは、改変BoNT/Aの改善された安全性プロファイルのために副作用を全く示さない。

【0444】

[実施例20]

【0445】

ヒトにおける改変BoNT/A(二鎖形態に変換された配列番号6)の安全性&有効性

【0446】

配列番号6(二鎖形態に変換された)を、筋肉内注射によってヒト対象に投与した。対象に2×の15,000pg単位用量(すなわち合計30,000pg)、2×の25,000pg単位用量(すなわち合計50,000pg)または2×の36,000pg単位用量(すなわち、合計72,000pg)の改変BoNT/A(二鎖形態に変換された配列番号6)を投与した。

【0447】

結果は、筋肉あたり例外的に高い投与量に関わらず(例えば、25,000pgおよび36,000pgの単位用量について)、試験した改変BoNT/Aのすべての単位用量が、筋肉麻痺で有効であり、安全に耐受性を示し、有害効果が観察されなかったことを示した。これは、改変BoNT/Aが注射部位から離れて拡散しないことを示し、改変BoNT/A(二鎖形態に変換された配列番号6)の例外的な安全性プロファイルを強調する。

【0448】

顔面の皺線との関連で、または顔面の皺線を処置する本明細書で記載される単位用量および総用量は、十分に、本明細書で記載されるこの有利な改変BoNT/A分子の安全で、かつ効果的であると示される用量範囲内であり、改変BoNT/A(例えば、二鎖形態に変換された配列番号6)の有利な特性および例外的な安全性プロファイルの利用を含む処置の選択肢の点で、臨床医に柔軟性を提供する。

【0449】

[実施例21]

【0450】

眉間の皺線の処置における改変BoNT/A(二鎖形態に変換された配列番号6)の安全性&

10

20

30

40

50

有効性

【0451】

配列番号6(二鎖形態に変換される)を、筋肉内注射によってヒト対象に投与した。

【0452】

対象の1つのコホートに、2,500pgの単位用量の5回の注射(各皺眉筋中に2回、鼻根筋中に1回)を投与して、12,500pgの総用量を提供した。対象の別のコホートに、4,000pgの単位用量の5回の注射(各皺眉筋中に2回、鼻根筋中に1回)を投与して、20,000pgの総用量を提供した。

【0453】

眉間の皺線は低減された。結果は、筋肉あたり例外的に高い投与量に関わらず、試験した改変BoNT/Aのすべての単位用量は、安全に耐受性を示し、有害効果が観察されなかったことを示した。これは、改変BoNT/Aが注射部位から離れて拡散しないことを示し、改変BoNT/A(二鎖形態に変換された配列番号6)の例外的な安全性プロファイルを強調する。

10

【0454】

上記の明細書において言及されたすべての刊行物が参照により本明細書に組み込まれる。本発明の記載された方法およびシステムの種々の改変および変法は、本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく当業者には明らかとなろう。本発明は、特定の好ましい実施形態に関連して説明されてきたが、特許請求される本発明は、そのような特定の実施形態に過度に限定されるべきではないことは理解されるべきである。実際、本発明を実施するための記載された様式の様々な改変は、生化学およびバイオテクノロジーまたは関連分野の当業者に明らかであり、以下の特許請求の範囲内にあると意図されている。

20

【符号の説明】

【0455】

[図1]

Indication: 適応症

Recommended Concentration: 推奨濃度

Recommended DYSPORT Dose: 推奨ディスポート用量

Glabellar Lines, Adults: 眉間の皺線、成人

12 Units/0.1 mL or 20 Units/0.1 mL: 12単位/0.1mLまたは20単位/0.1mL
50 Units, divided in five equal aliquots of 10 Units (0.08 mL) each or
50 Units, divided in five equal aliquots of 10 Units (0.05 mL) each: 50
単位、各10単位(0.08mL)の5つの等しいアリコートに分割されたもの又は50単位、各
10単位(0.05mL)の5つの等しいアリコートに分割されたもの

30

[図2及び5]

Marker: マーカー

[図2〜7]

SEQ ID NO: 配列番号

[図3及び6]

% SNAP-25 cleavage: SNAP-25切断百分率

40

in rat spinal cord neurones: ラット脊髄ニューロンにおける

Un-Tr: 未処置

[図4]

Mean DAS: 平均DAS

Dose (pg/mouse): 用量(pg/マウス)

[図6]

in human pluripotent stem cells: ヒト多能性幹細胞における

[図7]

Time (day): 時間(日)

[図8、9、及び11]

50

Glabellar line injection point: 眉間の皺線の注射点
[図 9 及び 11]
Forehead lines injection point: 額の皺線の注射点
[図 11]
Lateral canthal line injection point: 外眼角の皺線の注射点
[図 面]

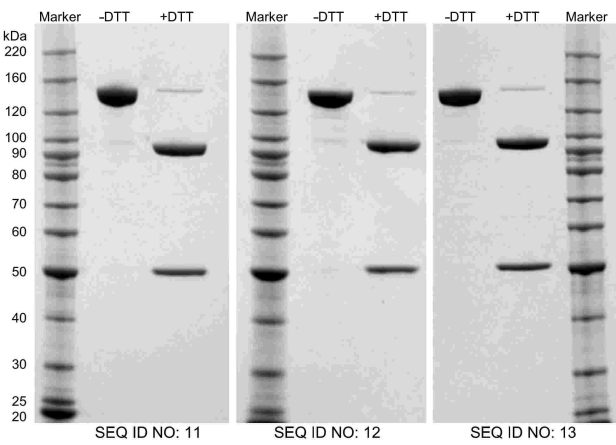
【 図 1 】

FIGURE 1

Indication	Recommended Concentration	Recommended DYSPORT Dose
Glabellar Lines, Adults	12 Units/0.1 mL	50 Units, divided in five equal aliquots of 10 Units (0.08 mL) each
	or 20 Units/0.1 mL	or 50 Units, divided in five equal aliquots of 10 Units (0.05 mL) each

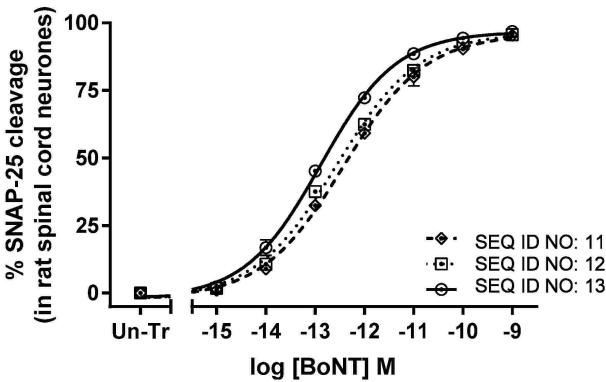
【 図 2 】

FIGURE 2



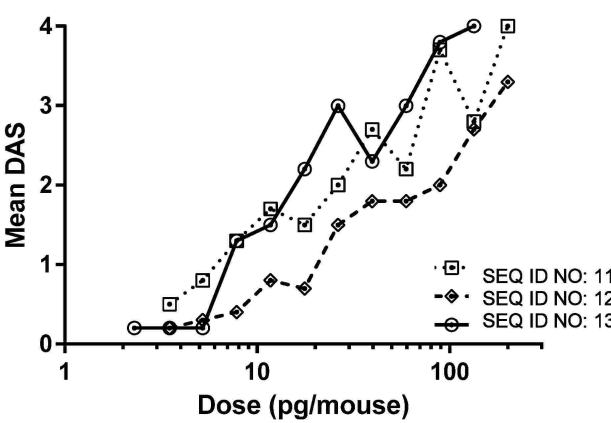
【 図 3 】

FIGURE 3



【 図 4 】

FIGURE 4



10

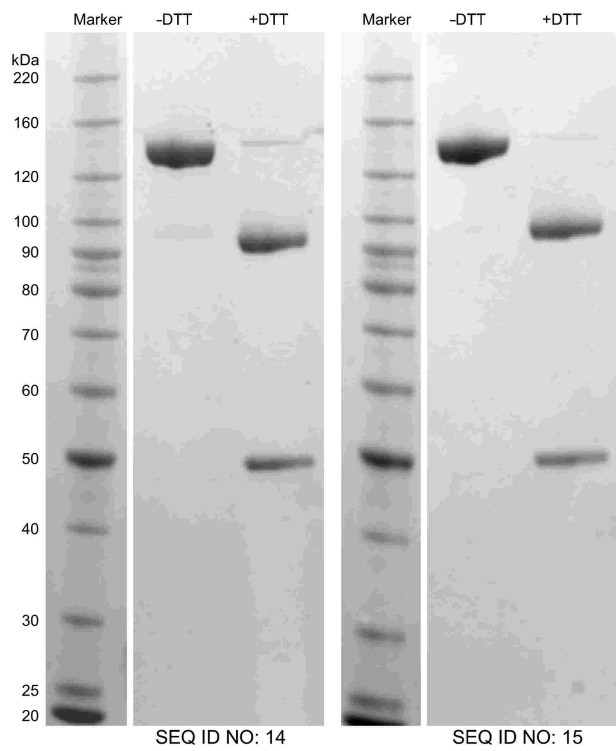
20

30

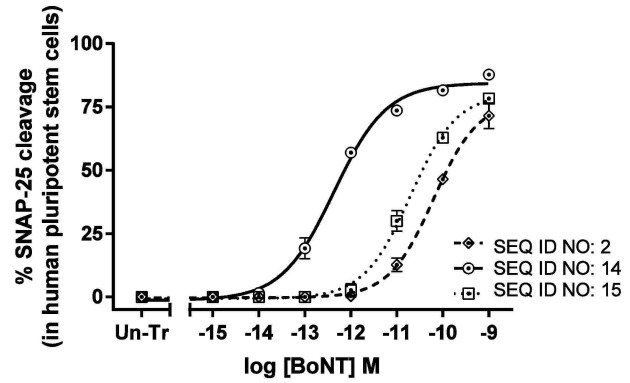
40

50

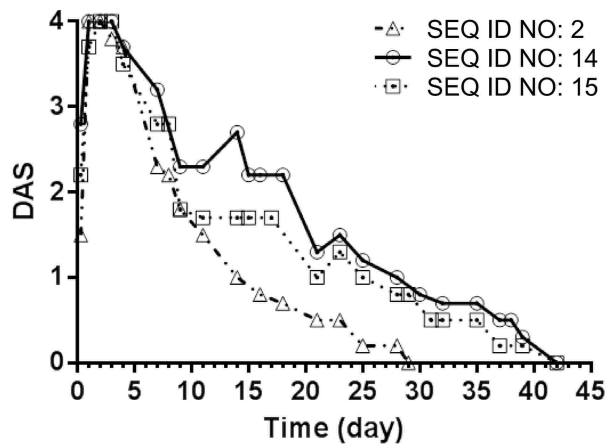
【 図 5 】
FIGURE 5



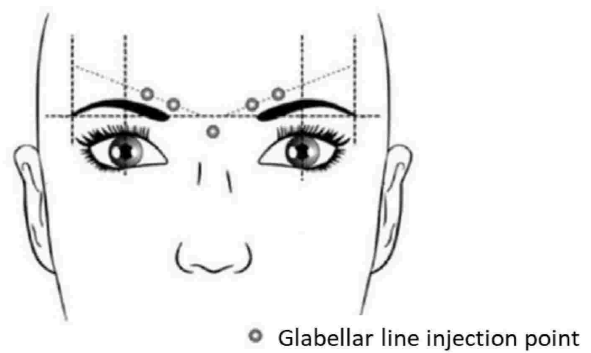
【 図 6 】
FIGURE 6



【 図 7 】
FIGURE 7



【 図 8 】
FIGURE 8



10

20

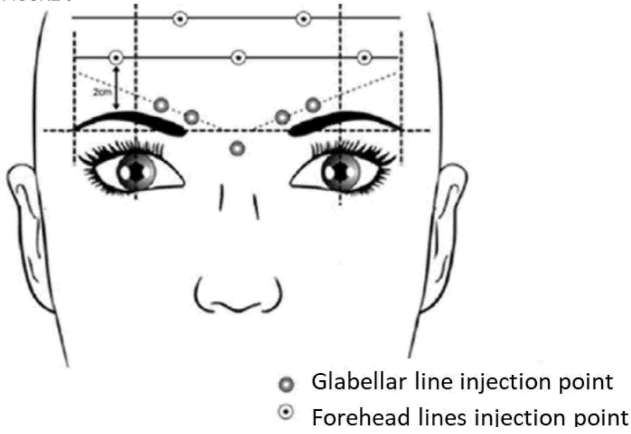
30

40

50

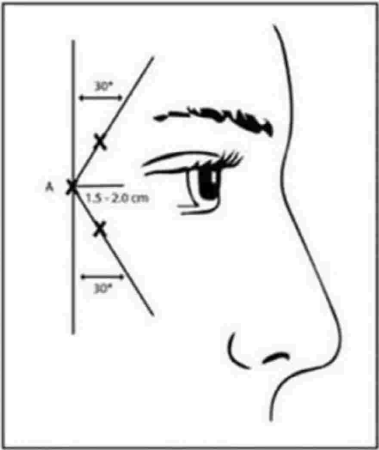
【図 9】

FIGURE 9



【図 10】

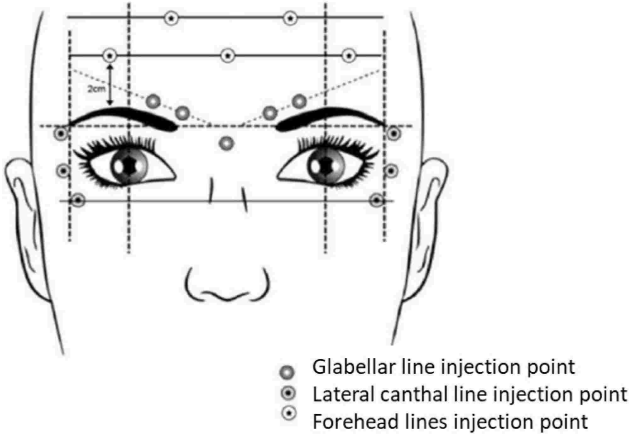
FIGURE 10



10

【図 11】

FIGURE 11



20

【配列表】

2025514278000001.xml

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2023/051152

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. **A61K8/64 A61Q19/08**
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2021/186167 A1 (IPSEN BIOPHARM LTD [GB]) 23 September 2021 (2021-09-23) claims -----	1-44
Y	WO 2018/175688 A1 (BONTI INC [US]) 27 September 2018 (2018-09-27) claims; -----	1-44

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 July 2023

Date of mailing of the international search report

27/07/2023

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040,

Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pilch, Bartosz

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB2023/051152

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2023/051152

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021186167 A1	23-09-2021	AU 2021238928 A1	01-09-2022
		BR 112022018457 A2	01-11-2022
		CA 3166944 A1	23-09-2021
		CN 115279337 A	01-11-2022
		EP 4120997 A1	25-01-2023
		JP 2023517727 A	26-04-2023
		KR 20220154739 A	22-11-2022
		TW 202140522 A	01-11-2021
		WO 2021186167 A1	23-09-2021
WO 2018175688 A1	27-09-2018	AU 2018237198 A1	31-10-2019
		AU 2022215253 A1	01-09-2022
		BR 112019019743 A2	14-04-2020
		CA 3057302 A1	27-09-2018
		CN 110691579 A	14-01-2020
		EP 3600221 A1	05-02-2020
		JP 2020511548 A	16-04-2020
		JP 2023076463 A	01-06-2023
		KR 20190126894 A	12-11-2019
		RU 2019132648 A	22-04-2021
		RU 2022102750 A	28-03-2022
		US 2020046814 A1	13-02-2020
		US 2023027850 A1	26-01-2023
		WO 2018175688 A1	27-09-2018

フロントページの続き

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ボンス, ローラン
イギリス, エルエル13 9ユーエフ レクサム, レクサム インダストリアル エステート, ユニ
ット 9 アッシュ ロード, イプセン バイオフィーム リミテッド内

(72)発明者 ラッフル, ケイティー
イギリス, エルエル13 9ユーエフ レクサム, レクサム インダストリアル エステート, ユニ
ット 9 アッシュ ロード, イプセン バイオフィーム リミテッド内

(72)発明者 ピコー, フィリップ
イギリス, エルエル13 9ユーエフ レクサム, レクサム インダストリアル エステート, ユニ
ット 9 アッシュ ロード, イプセン バイオフィーム リミテッド内

F ターム (参考) 4C081 AB11 AB19 AB37 BA12 CD11
4C085 AA27 BA12 CC07 EE01 GG03
4H045 AA10 AA30 BA10 CA11 DA83 EA20 FA74