



(51) МПК
C07K 14/33 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2017128211, 09.01.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 09.01.2015

(43) Дата публикации заявки: 11.02.2019 Бюл. № 05

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 09.08.2017

(86) Заявка РСТ:
 GB 2015/050043 (09.01.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2016/110662 (14.07.2016)

Адрес для переписки:
 129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
 "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры"

(71) Заявитель(и):
**ИПСЕН БАЙОИННОВЕЙШН
 ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Автор(ы):
**АНДЕРСОН Дайна Брэди (GB),
 ХАКЕТТ Гэйвин Стефан (GB),
 ЛЮ Сай Ман (GB)**

(54) КАТИОННЫЕ НЕЙРОТОКСИНЫ

(57) Формула изобретения

1. Способ конструирования клостридиального токсина, включающий модификацию по меньшей мере одной аминокислоты клостридиального токсина для получения сконструированного клостридиального токсина, где указанная модификация повышает изоэлектрическую точку (рI) сконструированного клостридиального токсина до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 единицы рI больше, чем рI указанного клостридиального токсина,

где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты локализуется в транслокационном домене клостридиального токсина (домене HN), или

где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты локализуется в легкой цепи клостридиального токсина, при условии, что указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты не приводит к встраиванию в легкую цепь клостридиального токсина мотива распознавания лигазы E3; и где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты не локализуется в связывающем домене клостридиального токсина (домене Hc); и где указанный сконструированный клостридиальный токсин демонстрирует повышенное удержание в ткани, активность и/или длительность действия по сравнению с указанным клостридиальным токсином; и

где указанный сконструированный клостридиальный токсин сохраняет способности

A
 1 1 2 8 2 1 2 0 1 7 1 2 8 2 1 1
 RU

R U
 2 0 1 7 1 2 8 2 1 1

А
1
1
1
2
8
2
1
1
2
0
1
7
1
2
R
U

R
U
2
0
1
7
1
2
8
2
1
1
A

указанного клостродиального токсина, где указанными способностями являются связывание клетки-мишени, транслокация и расщепление целевых белков SNARE.

2. Сконструированный клостродиальный токсин, где указанный сконструированный клостродиальный токсин является:

а. ботулиническим нейротоксином А (BoNT/A), содержащим модификацию по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из: N5, Q7, N9, D12, N15, Q31, D58, N60, D74, N82, T122, D124, E126, Q139, D141, E281, L284, S295, Q311, D326, D334, N377, TYR387, N394, N396, N410, M411, N418, D474, N476, D484, N486, I487, E488, A489, A490, E491, D546, E558, E560, H561, S564, 1566, L568, N570, S571, L577, N578, E599, A597, E599, A601, E620, V621, T623, D625, T631, N645, L647, D650, D651, I668, E670, A672, V675, S683, I685, A686, N687, N752, Q753, T755, E756, E757, E758, N760, N761, I762, N763, D825, I831, G832, T847, D848, I849 и D858; или

б. BoNT/B, содержащим модификацию по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из: N6, N7, N9, N11, D12, N16, N17, N18, D41, E48, E57, E535, N539, Y548, I566, L568, D589, A597, E599, A601, L604, Y612, E620, N645, L647, Y648, D651, E737, E741, Y803, Y824, D825, G828, I831, G832 и D835; или

ф. BoNT/F, содержащим модификацию по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из: N6, N9, N11, D12, N15, D16, D17, E28, D55, D60, D74, N76, E105, E121, N126, E127, N144, D185, N211, Q252, N305, E310, D312, N314, N329, D331, N379, D382, D383, D384, E390, N396, N400, D414, D418, N463, E464, N468, T469, D474, D475, T476, T477, N478, N482, N485, N495, 1499, Q501, I502, Q505, T506, N508, T509, V511, D513, D521, S522, S526, E527, I528, E529, V534, D535, L536, E549, G550, T552, N553, S558, E566, E567, S568, V586, H587, Q608, D613, A616, D617, S619, N630, N633, N639, E654, V656, E658, L660, T663, L665, V666, S671, I673, G674, S675, S676, E677, N678, T746, N751, L753, E754, E756, N758, I759, N760, N761, S799, S821, I822, N840, S841, E845, L846, S847, S848, T850, N851, D852, I854, L855 и 1856;

или

г. BoNT/G, содержащим модификацию по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из: N4, N7, N9, N11, D12, N15, D17, E48, Q55, D57, N60, D75, D127, Q144, E148, D149, Q150, N178, E185, E208, D211, E255, D315, D332, N334, D340, E383, D387, N388, Q393, N394, E395, N403, E407, E418, E422, E426, N443, N480, Q482, N483, N484, T485, E487, D540, N562, N570, N571, N572, T588, V589, T615, D621, N637, E638, E642, N643, I660, E662, I667, E674, S675, V677, G678, N679, S747, N755, D757, L823, D839, I841, D844, S846 и L847; или

х. столбнячным нейротоксином (TeNT), содержащим модификацию по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из: N6, N7, N15, N16, D17, D31, E51, E57, N60, N76, N101, D126, D143, N167, D179, N180, E251, Q257, N313, N316, D318, D335, N337, Q339, N368, N387, D390, D391, N395, D396, E403, D406, E410, N421, D427, E450, A457, S458, L459, D461, L462, E486, E487, Q490, D491, N497, N504, D557, T571, T572, L573, Q574, N580, S581, N588, S589, T590, S598, Q605, G606, Q608, T631, I633, S640, Q655, E658, G659, N660, E675, I677, E679, T681, V684, A691, E692, S694, T695, Q696, A772, D773, E774, S862, N866, L867 и D868;

где указанная модификация повышает изоэлектрическую точку (pI) сконструированного клостродиального токсина до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 единицы pI больше, чем pI клостродиального токсина, в котором отсутствует указанная модификация указанной по меньшей мере одной аминокислоты; и

где, если по меньшей мере одна модификация аминокислоты находится в легкой цепи клостродиального токсина, указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты не приводит к встраиванию в легкую цепь клостродиального токсина мотива распознавания лигазы E3; и

где указанный сконструированный клострдиальный токсин демонстрирует повышенное удержание в ткани, активность и/или длительность действия по сравнению с клострдиальным токсином, в котором отсутствует указанная модификация указанной по меньшей мере одной аминокислоты; и

где указанный сконструированный клострдиальный токсин сохраняет способности указанного клострдиального токсина, в котором отсутствует указанная модификация указанной по меньшей мере одной аминокислоты, где указанными способностями являются связывание клетки-мишени, транслокация и расщепление целевых белков SNARE.

3. Способ или сконструированный клострдиальный токсин по п.1 или 2, где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты повышает изоэлектрическую точку (рI) сконструированного клострдиального токсина до значения, составляющего по меньшей мере на 0,5 единицы рI больше, чем рI в других отношениях идентичного клострдиального токсина, в котором отсутствует указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты.

4. Способ или сконструированный клострдиальный токсин по любому из предшествующих пунктов, где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты повышает изоэлектрическую точку (рI) сконструированного клострдиального токсина до значения, составляющего по меньшей мере на одну единицу рI больше, чем рI в других отношениях идентичного клострдиального токсина, в котором отсутствует указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты.

5. Способ или сконструированный клострдиальный токсин по любому из предшествующих пунктов, где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты повышает изоэлектрическую точку (рI) сконструированного клострдиального токсина до значения, составляющего по меньшей мере на две единицы рI больше, чем рI в других отношениях идентичного клострдиального токсина, в котором отсутствует указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты.

6. Способ или сконструированный клострдиальный токсин по любому из предшествующих пунктов, где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты повышает изоэлектрическую точку (рI) сконструированного клострдиального токсина до значения, составляющего на 2-5 единиц рI больше, чем рI в других отношениях идентичного клострдиального токсина, в котором отсутствует указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты.

7. Способ или сконструированный клострдиальный токсин по любому из предшествующих пунктов, где сконструированный клострдиальный токсин имеет рI по меньшей мере 6,5.

8. Способ или сконструированный клострдиальный токсин по любому из предшествующих пунктов, где сконструированный клострдиальный токсин имеет рI от 6,5 до 9,5.

9. Способ или сконструированный клострдиальный токсин по любому из предшествующих пунктов, где сконструированный клострдиальный токсин имеет рI от 6,5 до 7,5.

10. Способ или сконструированный клострдиальный токсин по любому из предшествующих пунктов, где по меньшей мере одна модификация аминокислоты выбрана из: замены аминокислоты, инсерции аминокислоты и делеции аминокислоты.

11. Способ или сконструированный клострдиальный токсин по п.10, где по меньшей мере одна замена аминокислоты выбрана из: замены кислого аминокислотного остатка основным аминокислотным остатком, замены кислого аминокислотного остатка незаряженным аминокислотным остатком и замены незаряженного аминокислотного остатка основным аминокислотным остатком.

12. Способ или сконструированный клострдиальный токсин по любому из предшествующих пунктов, где сконструированный клострдиальный токсин содержит от 1 до 90 модификаций аминокислот.
13. Способ или сконструированный клострдиальный токсин по любому из предшествующих пунктов, где сконструированный клострдиальный токсин содержит по меньшей мере три модификации аминокислот.
14. Способ или сконструированный клострдиальный токсин по любому из предшествующих пунктов, где сконструированный клострдиальный токсин содержит от 4 до 40 модификаций аминокислот.
15. Способ или сконструированный клострдиальный токсин по любому из предшествующих пунктов, где по меньшей мере одна модификация аминокислоты является модификацией экспонируемого на поверхности аминокислотного остатка.
16. Способ или сконструированный клострдиальный токсин по любому из предшествующих пунктов, где по меньшей мере одна модификация аминокислоты включает модификацию аминокислотного остатка, выбранного из: остатка аспарагиновой кислоты, остатка глутаминовой кислоты, остатка гистидина, остатка аспарагина, остатка глутамина, остатка серина, остатка треонина, остатка аланина, остатка глицина, остатка валина, остатка лейцина и остатка изолейцина.
17. Способ или сконструированный клострдиальный токсин по п.16, где аминокислотный остаток заменяют остатком лизина или остатком аргинина.
18. Способ или сконструированный токсин по любому из предшествующих пунктов, где указанный сконструированный токсин:
- а. кодируется последовательностью, нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 70% идентичности последовательности по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 2, 4 и 6; и/или
 - б. содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичности последовательности по отношению к аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 3 и 5.
19. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированный клострдиальный токсин по любому из пп.2-18, или получаемый способом по любому из пп. 1 или 3-18.
20. Способ получения одноцепочечного белка сконструированного клострдиального токсина, содержащего легкую цепь и тяжелую цепь, включающий экспрессию нуклеиновой кислоты по п.19 в подходящей клетке-хозяине, лизис клетки-хозяина для получения гомогената клетки-хозяина, содержащего одноцепочечный белок сконструированного клострдиального токсина, и выделение одноцепочечного белка сконструированного клострдиального токсина.
21. Способ активации сконструированного клострдиального токсина, включающий получение одноцепочечного белка сконструированного клострдиального токсина, получаемого способом по п.20, приведение полипептида в контакт с протеазой, расщепляющей полипептид по участку распознавания (участку расщепления), находящемуся между легкой цепью и тяжелой цепью, и преобразование полипептида в двухцепочечный полипептид, где легкая цепь и тяжелая цепь соединены дисульфидной связью.
22. Сконструированный клострдиальный токсин по любому из пп.2-18, или получаемый способом по любому из пп.1 или 3-18, для применения в медицине.
23. Сконструированный клострдиальный токсин по любому из пп.2-18, или получаемый способом по любому из пп.1 или 3-18, для применения в профилактике или лечении заболевания или состояния, выбранного из: косоглазия, блефароспазма, косоглазия, дистонии (например, спастической дистонии, оромандибулярной дистонии,

фокальной дистонии, тардивной дистонии, ларингеальной дистонии, дистонии конечности, спастической кривошеи), кривошеи (например, спастической кривошеи), в косметологии, когда будут получать пользу от ограничения способностей клеток/ мышц (посредством отрицательной регуляции или инактивации SNARE), нервно-мышечного нарушения или состояния подвижности глаз (например, содружественного косоглазие, вертикального косоглазия, паралича латеральной прямой мышцы, нистагма, дистириоидной миопатии), писчего спазма, блефароспазма, бруксизма, болезни Вильсона-Коновалова, тремора, тиков, сегментарного миоклонуса, спазмов, спастичности по причине хронического рассеянного склероза, спастичности, приводящей к нарушениям контроля мочевого пузыря, анизмуса, спазма спины, спазма конечности, головных болей напряжения, синдрома мышцы levator ani, расщепления позвоночника, тардивной дискинезии, болезни Паркинсона, заикания, гемифациального спазма, нарушения век, церебрального паралича, фокальной спастичности, спастического колита, нейрогенного мочевого пузыря, анизмуса, спастичности конечности, тиков, тремора, бруксизма, анальной трещины, ахалазии, дисфагии, слезотечения, гипергидроза, обильного слюноотделения, избыточной желудочно-кишечной секреции, мышечной боли (например, боли при мышечных спазмах), головной боли (например, головной боли напряжения), межбровной складки, морщин, злокачественного новообразования, нарушений матки, урогенитальных нарушений, урогенитальных неврологических нарушений, хронического нейрогенного воспаления и нарушений гладких мышц.