(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-517727
(P2023-517727A)
(43)公表日　令和5年4月26日(2023.4.26)

| (51)国際特許分類 | | FI | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|
| *C07K 14/33 (2006.01)* | | C07K | 14/33 | ZNA　4C083 |
| *A61K 38/16 (2006.01)* | | A61K | 38/16 | 4C084 |
| *A61K 8/64 (2006.01)* | | A61K | 8/64 | 4H045 |
| *A61Q 19/00 (2006.01)* | | A61Q | 19/00 | |
| *A61P 17/00 (2006.01)* | | A61P | 17/00 | |

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全79頁）　最終頁に続く

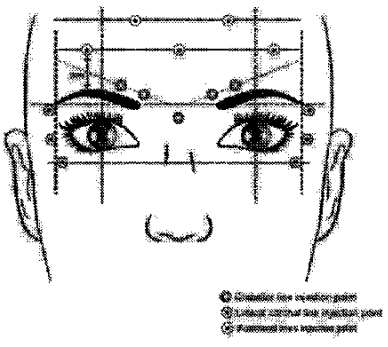
(21)出願番号　特願2022-555816(P2022-555816)
(86)(22)出願日　令和3年3月16日(2021.3.16)
(85)翻訳文提出日　令和4年10月27日(2022.10.27)
(86)国際出願番号　PCT/GB2021/050659
(87)国際公開番号　WO2021/186167
(87)国際公開日　令和3年9月23日(2021.9.23)
(31)優先権主張番号　2003813.9
(32)優先日　令和2年3月16日(2020.3.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　517340507
イプセン バイオファーム リミテッド
ＩＰＳＥＮ ＢＩＯＰＨＡＲＭ ＬＩＭＩＴＥＤ
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
(74)代理人　110000774
弁理士法人 もえぎ特許事務所
(72)発明者　グリゴール，ニコラエ
イギリス，レクサム エルエル１３ ９ユーエフ，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 バイオファーム リミテッド内
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　上顔面の皺の処置

(57)【要約】
本発明は、顔面の皺の処置に使用するための改変BoNT/Aに関し、ここで、改変BoNT/Aは筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与され、ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり改変BoNT/Aの1単位から41単位の単位用量として投与され、かつ、1単位はマウスにおける計算上の半数致死量($LD_{50}$)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:眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、ここで、処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で574単位までであり、かつ、改変BoNT/Aは以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)に改変を含み:ASN 886、ASN 905、GLN 915、ASN 918、GLU 920、ASN 930、ASN 954、SER 955、GLN 991、GLU 992、GLN 995、ASN 1006、ASN 1025、ASN 1026、ASN 1032、ASN 1043、ASN 1046、ASN 1052、ASP 1058、HIS 1064、ASN 1080、GLU 1081、GLU 1083、ASP

FIGURE 14



【特許請求の範囲】
【請求項１】
顔面の皺の処置に使用するための改変BoNT/A。
ここで、当該改変BoNT/Aは筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与され、
当該改変BoNT/Aは、部位あたり改変BoNT/Aの1単位から41単位の単位用量として投与され、かつ、1単位はマウスにおける計算上の半数致死量($LD_{50}$)に対応する当該改変BoNT/Aの量であり、
当該複数の部位は以下から選択され:
眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;
額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに
外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、
当該処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で574単位までであり、かつ、
当該改変BoNT/Aは、以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)に改変を含み: ASN 886、ASN 905、GLN 915、ASN 918、GLU 920、ASN 930、ASN 954、SER 955、GLN 991、GLU 992、GLN 995、ASN 1006、ASN 1025、ASN 1026、ASN 1032、ASN 1043、ASN 1046、ASN 1052、ASP 1058、HIS 1064、ASN 1080、GLU 1081、GLU 1083、ASP 1086、ASN 1188、ASP 1213、GLY 1215、ASN 1216、GLN 1229、ASN 1242、ASN 1243、SER 1274、およびTHR 1277、
当該改変は以下から選択される:
i. 塩基性アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;
ii. 非荷電アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;
iii. 塩基性アミノ酸残基による非荷電の表面露出アミノ酸残基の置換;
iv. 塩基性アミノ酸残基の挿入;および
v. 酸性の表面露出アミノ酸残基の欠失
【請求項２】
顔面の皺の処置に使用するための改変BoNT/A。
ここで、当該改変BoNT/Aは筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与され、
当該改変BoNT/Aは部位あたり改変BoNT/Aの8.4pgから344.4pgの単位用量として投与され、
当該複数の部位は以下から選択され:
眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;
額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに
外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、
当該処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で4821.6pgまでであり、かつ、
当該改変BoNT/Aは、以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)に改変を含み:ASN 886、ASN 905、GLN 915、ASN 918、GLU 920、ASN 930、ASN 954、SER 955、GLN 991、GLU 992、GLN 995、ASN 1006、ASN 1025、ASN 1026、ASN 1032、ASN 1043、ASN 1046、ASN 1052、ASP 1058、HIS 1064、ASN 1080、GLU 1081、GLU 1083、ASP 1086、ASN 1188、ASP 1213、GLY 1215、ASN 1216、GLN 1229、ASN 1242、ASN 1243、SER 1274、およびTHR 1277、
当該改変は以下から選択される:
i. 塩基性アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;
ii. 非荷電アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;
iii. 塩基性アミノ酸残基による非荷電の表面露出アミノ酸残基の置換;
iv. 塩基性アミノ酸残基の挿入;および

v. 酸性の表面露出アミノ酸残基の欠失

【請求項３】

改変BoNT/Aの5～10pg(好ましくは8.4pg)がマウスにおける計算上の半数致死量($LD_{50}$)に対応する、請求項1に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項４】

改変BoNT/Aの単位用量が以下から選択される、請求項1～3のいずれか1項に記載の使用のための改変BoNT/A: 2単位から35単位、6から35単位、12単位から35単位、12単位から24単位、最も好ましくは12単位から18単位。

【請求項５】

請求項4に記載の使用のための改変BoNT/A。

ここで、処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量が以下から選択され: 574単位、560単位、384単位、最も好ましくは288単位;

好ましくは、前記の総用量が16注射部位にわたる16単位用量の投与に基づく

【請求項６】

改変BoNT/Aの単位用量が以下から選択される、請求項1～5のいずれか1項に記載の使用のための改変BoNT/A: 18pgから350pg、20pgから300pg、最も好ましくは100pgから150pg。

【請求項７】

処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量が以下から選択される、請求項1～6のいずれか1項に記載の使用のための改変BoNT/A: 最高で4850pgまで、最高で4800pgまで、最も好ましくは最高で2400pgまで。

【請求項８】

顔面の皺の処置に使用するための改変BoNT/A。

ここで、当該改変BoNT/Aは筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与され、

当該改変BoNT/Aは部位あたり改変BoNT/Aの0.5単位から73単位の単位用量として投与され、かつ、1単位はマウスにおける計算上の半数致死量($LD_{50}$)に対応する当該改変BoNT/Aの量であり、

当該複数の部位は以下から選択され:

眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;

額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに

外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、

当該処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で1019単位までであり、かつ、

当該改変BoNT/AはBoNT/Aの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

【請求項９】

顔面の皺の処置に使用するための改変BoNT/A。

ここで、当該改変BoNT/Aは筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与され、

当該改変BoNT/Aは部位あたり改変BoNT/Aの12pgから1754pgの単位用量として投与され、

当該複数の部位は以下から選択され:

眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;

額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに

外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、

当該処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で24,500pgまでであり、かつ、

当該改変BoNT/AはBoNT/Aの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

【請求項１０】
請求項8に記載の使用のための改変BoNT/A。
ここで、改変BoNT/AはBoNT/Aの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、かつ、 改変BoNT/Aの20～30pg(好ましくは24.04pg)がマウスにおける計算上の半数致死量($LD_{50}$)に対応する
【請求項１１】
改変BoNT/Aの単位用量が以下から選択される、請求項8～10のいずれか1項に記載の使用のための改変BoNT/A: 0.5単位から62単位、3単位から62単位、10から62単位、10単位から42単位、最も好ましくは10単位から21単位。
【請求項１２】
請求項11に記載の使用のための改変BoNT/A。
処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量が以下から選択され: 1019単位、998単位、666単位、最も好ましくは333単位、
好ましくは、前記の総用量が16注射部位に対する16単位用量の投与に基づく
【請求項１３】
改変BoNT/Aの単位用量が以下から選択される、請求項8～12のいずれか1項に記載の使用のための改変BoNT/A: 12pgから1750pg、20pgから1500pg、最も好ましくは250pgから500pg。
【請求項１４】
処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量が以下から選択される、請求項8～13のいずれか1項に記載の使用のための改変BoNT/A: 最高で24,500pgまで、最高で24,000pgまで、最も好ましくは最高で8000pgまで。
【請求項１５】
請求項1～14のいずれか1項に記載の使用のための改変BoNT/A。
ここで、改変BoNT/Aが7よりも多大な安全率を有し、 当該安全率は以下として計算され: pg/マウスとして測定されるDAS $ED_{50}$によって除算されたpg/マウスとして測定される-10%の体重変化に要求される毒素の用量、 $ED_{50}$は、2のDASスコアを生成するために必要とされる用量である
【請求項１６】
請求項1～15のいずれか1項に記載の使用のための改変BoNT/A。
ここで、改変BoNT/Aは、眉間の皺の処置に使用するためのものであり、 好ましくは、前記の改変BoNT/Aが皺眉筋の2部位および鼻根筋の1部位において投与され、 より好ましくは、前記の改変BoNT/Aが総計で5部位において投与される
【請求項１７】
改変BoNT/Aが、額の皺の処置に使用するためのものであり、好ましくは、前記の改変BoNT/Aが前頭筋の5部位において投与される、請求項1～15に記載の使用のための改変BoNT/A。
【請求項１８】
請求項1～15に記載の使用のための改変BoNT/A。
ここで、改変BoNT/Aは、外眼角の皺の処置に使用するためのものであり、
好ましくは、前記の改変BoNT/Aは、外眼角の皺を処置するために眼輪筋の外側部の3部位において投与され、
より好ましくは、前記の改変BoNT/Aが総計で6部位において投与される
【請求項１９】
前記の改変BoNT/Aが8、10、12、14、または16部位に投与される、請求項16～18に記載の使用のための改変BoNT/A。
【請求項２０】
前記の改変BoNT/Aが7、9、11、13、または15部位に投与される、請求項16～18に記載の使用のための改変BoNT/A。
【請求項２１】

請求項1～7または15～20に記載の使用のための改変BoNT/A。
ここで、前記の改変は、以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)の改変を含み(好ましくは、からなり):
ASN 886、ASN 930、ASN 954、SER 955、GLN 991、ASN 1025、ASN 1026、ASN 1052、ASN 1188、ASP 1213、GLY 1215、ASN 1216、GLN 1229、ASN 1242、ASN 1243、SER 1274、またはTHR 1277、かつ、
改変BoNT/Aは、 配列番号3、5、7、および9から選択される核酸配列との少なくとも70%配列同一性を有する核酸配列によってコードされ、および/または 配列番号4、6、8、および10から選択されるポリペプチド配列との少なくとも70%配列同一性を有するポリペプチド配列を含む

【請求項２２】
請求項1～7または15～21に記載の使用のための改変BoNT/A。
ここで、前記の改変は、以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)の改変を含み(好ましくは、からなり):
ASN 886、ASN 930、SER 955、GLN 991、ASN 1026、ASN 1052、およびGLN 1229、かつ、 改変BoNT/Aは、 配列番号3との少なくとも70%配列同一性を有する核酸配列によってコードされ、および/または 配列番号4から選択されるアミノ酸配列との少なくとも70%配列同一性を有するポリペプチド配列を含む

【請求項２３】
改変が、置換、好ましくはリジンまたはアルギニンによる置換である、請求項1～7または15～22に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項２４】
改変BoNT/Aが配列番号14との少なくとも70%配列同一性を有するポリペプチド配列を含む、請求項8～20のいずれか1項に記載の使用のための改変BoNT/A。

【請求項２５】
改変ボツリヌス神経毒素A(BoNT/A)の単位剤形。
当該単位剤形は以下を含み:
a. 1単位から41単位の改変BoNT/A、ここで、1単位はマウスにおける計算上の半数致死量($LD_{50}$)に対応する当該改変BoNT/Aの量であり;または
b. 8.4pgから350pgの改変BoNT/A;および
c. 随意により、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、当該改変BoNT/Aは、以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)に改変を含み: ASN 886、ASN 905、GLN 915、ASN 918、GLU 920、ASN 930、ASN 954、SER 955、GLN 991、GLU 992、GLN 995、ASN 1006、ASN 1025、ASN 1026、ASN 1032、ASN 1043、ASN 1046、ASN 1052、ASP 1058、HIS 1064、ASN 1080、GLU 1081、GLU 1083、ASP 1086、ASN 1188、ASP 1213、GLY 1215、ASN 1216、GLN 1229、ASN 1242、ASN 1243、SER 1274、およびTHR 1277、
当該改変は以下から選択される:
i. 塩基性アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;
ii. 非荷電アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;
iii. 塩基性アミノ酸残基による非荷電の表面露出アミノ酸残基の置換;
iv. 塩基性アミノ酸残基の挿入;および
v. 酸性の表面露出アミノ酸残基の欠失

【請求項２６】
以下を含む、請求項25に記載の単位剤形:
a. 1単位から35単位の改変BoNT/A;または
b. 10pgから300pgの改変BoNT/A。

【請求項２７】
改変ボツリヌス神経毒素A(BoNT/A)の単位剤形。

当該単位剤形は以下を含み:
a．0.5単位から73単位の改変BoNT/A、ここで、1単位はマウスにおける計算上の半数致死量($LD_{50}$)に対応する当該改変BoNT/Aの量であり;または
b．12pgから1754pgの改変BoNT/A;および
c．随意により、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の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
【請求項２８】
以下を含む、請求項27に記載の単位剤形:
a．0.8単位から62単位の改変BoNT/A;または
b．20pgから1500pgの改変BoNT/A。
【請求項２９】
以下を含むキット:
a．請求項25～28のいずれか1項に記載の単位剤形;および
b．顔面の皺の処置における同単位剤形の使用についての説明書;および
c．随意により希釈剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は(例えば過緊張性の顔面の皺を処置するための)美容処置に関する。より詳細には、本発明は、より長く作用する神経毒素の投与を含む美容処置の方法、より具体的には、より長く作用するボツリヌス神経毒素を用いて美容不順を処置する方法を提供する。
【背景技術】
【０００２】
過緊張性の顔面の皺は普通の審美的不順であり、これらは眉間の皺、外眼角の皺、額の皺および皺寄せ、カラスの足跡、眉の皺、ほうれい線、唇の皺、ならびにマリオネットラインを包含し得るが、これらに限定されない。上顔面の皺は額、眉間、および外側眼窩エリアにおいて起こり得る。皺寄せは笑顔を原因として外眼角エリアに現れ得るが、皺寄せは渋面を原因として眉間および額エリアにもまた現れ得る。このエリアにおける過度に目立つ皺は多くの場合に疲労と誤解釈され、それらの外見についてのかなりの悩みを対象に引き起こす。代わりに、過度に目立つ顔面の皺が、基礎の筋肉の機能的な引っ張りからの結果として現れる。これは最終的に皮膚に皺形成する。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包含し、眼輪筋は外眼角の皺の生成を担う。
【０００３】
ここ数十年の間に、加齢人口が継続して増えるにつれて、特に顔面のエリアにおける進行して行く年齢の現れを後退させるための美容術に対する増大する需要がある。身体的外見についてのこの増大して行くこだわりは、多くの異なる製品および手続き、例えば手術、種々の型のリサーフェシング、およびフィラー剤の使用の開発に至った。これらの方法のいずれも全くのリスクフリーではないので、加齢顔の処置のための最も安全なかつ最も有効な方法を提供するための継続的研究が必要である。
【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、皺寄せではなく、より有意な皺およびひだを生成するように相互作用する主として2つの因子(皮膚および基礎の筋肉)がある。皺寄せならびに皺およびひだの皮膚因子を処置するための多くの治療、とりわけ、種々の型のリサーフェシング、皮膚科製品、および軟部組織増大のための注射が進化した。
【０００５】
顔面の皺の現れを処置するための代替的な美容術は、顔面の皮膚の基礎の筋肉への神経毒素、具体的にはボツリヌス神経毒素の投与である。Dysport(登録商標)は、クロストリジウム・ボツリナムA型株から単離および精製された原薬のBoNT/Aヘマグルチニン複

合体(BTX-A-HAC)を含有する薬用製品である。クロストリジウム・ボツリナムによって天然に生ずるいくつかの他の薬用BoNT/A製品もまた市販されている。

【０００６】

BoNT/Aは神経のシナプス前終末からのアセチルコリンの放出を選択的に阻害し、それゆえに、神経筋接合部におけるコリン作動性伝達をブロックし、筋肉収縮および筋緊張の縮減を誘導し、注射された筋肉が弛緩することを引き起こす。

【０００７】

Dysport(登録商標)は、皺眉筋および鼻根筋に投与されるために最高で50単位までという最大の総用量で、眉間の皺の処置について承認されている(図1を見よ)。Dysportの臨床的効果は最高で4ヶ月まで続き得る。臨床試験における繰り返しの投薬は、最高で4つまでの繰り返しの投与によって、継続した効力を実証した。しかしながら、Dysportは3ヶ月毎よりも頻繁に投与されるべきではない。Dysportは額の皺および外眼角の皺の処置については今のところFDA承認されていない。

【０００８】

全身性の神経学的効果を回避するために、多くのクロストリジウム毒素に基づく美容処置は、所与の標的部位(例えば、標的組織)へのクロストリジウム毒素治療薬の直接投与を利用する。クロストリジウム毒素に基づく治療薬をこの様式で投与するときの問題は、投与部位から取り巻く組織または全身循環への毒素の広がりである。標的組織からの毒素の拡散は、極端なケースでは生命を脅かし得る望ましくない副作用を担っていると思料される。これは、クロストリジウム毒素治療薬(例えばBoNT治療薬)を高い用量、濃度、および注射体積で用いるときには特に懸念であり得る。商業的なBoNT/A治療薬について報告されているこの問題に関連する有害作用は、無力症、全身筋力低下、複視、眼瞼下垂、嚥下障害、ジスフォニア、ディサースリア、尿失禁、および呼吸困難を包含する。嚥下および呼吸の困難は生命を脅かし得る。そして、毒素の効果の広がりに関係した死亡が報告されている。

【０００９】

本発明は上で挙げられた問題の1つ以上を克服する。

【発明の概要】

【００１０】

本発明者は、驚くべきことに、改変されたBoNT/Aが顔面の皺の美容処置に特別な有用性を見出すということを見出した。改変BoNT/Aは、増大した正味の正電荷をもたらす表面露出アミノ酸残基の1つ以上の改変を含み得る。増大した電荷はポリペプチドおよびアニオン性の細胞外コンポーネントの間の静電的相互作用を促進し、それによってポリペプチドおよび細胞表面の間の結合を促進する。翻って、これは、投与部位における保持を増大させ(からの拡散を縮減し)、増大した作用持続期間(例えば6～9ヶ月)をもたらす。代替的には、改変BoNT/Aは、BoNT/Aの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)を含み得る。これは、類似に、投与部位における増大した保持(からの縮減された拡散)および増大した作用持続期間(例えば6～9ヶ月)を見せる改変BoNT/Aをもたらす。有利には、改変BoNT/Aは、未改変のBoNT/A(例えばDysport(登録商標))と比較されるとき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について本明細書に記載される高い安全率によって表現され得る。

【００１１】

本明細書の前臨床データに基づくと(例6を見よ)、より高い総量の改変BoNT/Aが対象に投与されながら、かかる高い用量において、未改変のBoNT/A(例えばDysport(登録商標))に類似の安全性プロファイルを達成し得るということが示された。それゆえに、改変BoNT/Aは、最大の総用量に達する前に、顔面の皺の美容処置においてより多大な数の筋肉/部位において注射され得る。これは、有意なかつ有利な知見であり、より多大な範囲の処置オプションを臨床医に提供しながら、顔面の皺の改善された美容処置をもたらす。未改変のBoNT/A(例えばDysport(登録商標))による処置と比較されるときに、そ

れがより長く持続する処置(より頻繁でない投与をもたらす)を提供し、および/または対象のために仕立てられることができ、例えば、臨床医が対象の審美的要求に従って特定の部位において投与することを可能化するという点で、処置は改善され得る。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】

その上、本発明は、便利な安全なかつ有効な単一用量単位と、単回処置において安全に投与され得る総(最大)用量とを提供する。本発明は、もたらされる患者毒性なしに前記用量単位が筋肉に投与され得る回数の対応する目安(例えば、筋肉あたりの注射部位の数を包含する)をもまた提供する。本発明に従う処置は、それゆえに、臨床医にとってはあまり複雑ではなく、過少投薬および/または過量投薬を回避することを助ける。

【発明を実施するための形態】

【００１３】

1つの態様では、本発明は顔面の皺の処置に使用するための改変されたBoNT/Aを提供し、ここで、改変BoNT/Aは筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与され、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり改変BoNT/Aの1単位から41単位(2単位から41単位)の単位用量として投与され、かつ、1単位はマウスにおける計算上の半数致死量($LD_{50}$)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:

眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位、

額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに

外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、

ここで、処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で574単位までであり、かつ、

ここで、改変BoNT/Aは、以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)に改変を含み:ASN 886、ASN 905、GLN 915、ASN 918、GLU 920、ASN 930、ASN 954、SER 955、GLN 991、GLU 992、GLN 995、ASN 1006、ASN 1025、ASN 1026、ASN 1032、ASN 1043、ASN 1046、ASN 1052、ASP 1058、HIS 1064、ASN 1080、GLU 1081、GLU 1083、ASP 1086、ASN 1188、ASP 1213、GLY 1215、ASN 1216、GLN 1229、ASN 1242、ASN 1243、SER 1274、およびTHR 1277、ここで、改変は以下から選択される:

i. 塩基性アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;

ii. 非荷電アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;

iii. 塩基性アミノ酸残基による非荷電の表面露出アミノ酸残基の置換;

iv. 塩基性アミノ酸残基の挿入;および

v. 酸性の表面露出アミノ酸残基の欠失。

【００１４】

別の関係する態様において、本発明は、顔面の皺の処置に使用するための改変BoNT/Aを提供し、ここで、改変BoNT/Aは筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与され、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり改変BoNT/Aの8.4pgから344.4pgの単位用量として投与され、

ここで、複数の部位は以下から選択され:

眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;

額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに

外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、

ここで、処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で4821.6pgまでであり、かつ、

ここで、改変BoNT/Aは、以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)に改変を含み:ASN 886、ASN 905、GLN 915、ASN 918、GLU 920、ASN 93

0、ASN 954、SER 955、GLN 991、GLU 992、GLN 995、ASN 1006、ASN 1025、ASN 1026、ASN 1032、ASN 1043、ASN 1046、ASN 1052、ASP 1058、HIS 1064、ASN 1080、GLU 1081、GLU 1083、ASP 1086、ASN 1188、ASP 1213、GLY 1215、ASN 1216、GLN 1229、ASN 1242、ASN 1243、SER 1274、およびTHR 1277、ここで、改変は以下から選択される:

i. 塩基性アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;

ii. 非荷電アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;

iii. 塩基性アミノ酸残基による非荷電の表面露出アミノ酸残基の置換;

iv. 塩基性アミノ酸残基の挿入;および

v. 酸性の表面露出アミノ酸残基の欠失。

【００１５】

1つの態様では、本発明は、顔面の皺の処置に使用するための改変BoNT/Aを提供し、ここで、改変BoNT/Aは筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与され、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり改変BoNT/Aの2単位から41単位の単位用量として投与され、かつ、1単位はマウスにおける計算上の半数致死量($LD_{50}$)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:

眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;

額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに

外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、

ここで、処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で574単位までであり、かつ、

ここで、改変BoNT/AはBoNT/Aの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。

【００１６】

関係する態様において、本発明は顔面の皺を処置するための方法を提供し、方法は、改変ボツリヌス神経毒素A(BoNT/A)を筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与することを含み、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり改変BoNT/Aの1単位から41単位(2単位から41単位)の単位用量として投与され、かつ、1単位はマウスにおける計算上の半数致死量($LD_{50}$)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:

眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;

額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに

外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、

ここで、処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で574単位までであり、かつ、

ここで、改変BoNT/Aは、以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)に改変を含み:ASN 886、ASN 905、GLN 915、ASN 918、GLU 920、ASN 930、ASN 954、SER 955、GLN 991、GLU 992、GLN 995、ASN 1006、ASN 1025、ASN 1026、ASN 1032、ASN 1043、ASN 1046、ASN 1052、ASP 1058、HIS 1064、ASN 1080、GLU 1081、GLU 1083、ASP 1086、ASN 1188、ASP 1213、GLY 1215、ASN 1216、GLN 1229、ASN 1242、ASN 1243、SER 1274、およびTHR 1277、ここで、改変は以下から選択される:

i. 塩基性アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;

ii. 非荷電アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;

iii. 塩基性アミノ酸残基による非荷電の表面露出アミノ酸残基の置換;

iv. 塩基性アミノ酸残基の挿入;および

v. 酸性の表面露出アミノ酸残基の欠失。

【００１７】

関係する態様において、本発明は顔面の皺を処置するための方法を提供し、方法は、改変ボツリヌス神経毒素A(BoNT/A)を筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与することを含み、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり改変BoNT/Aの8.4pgから344.4pgの単位用量として投与され、

ここで、複数の部位は以下から選択され:

眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;

額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに

外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、

ここで、処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で574単位までであり、かつ、

ここで、改変BoNT/Aは、以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)に改変を含み:ASN 886、ASN 905、GLN 915、ASN 918、GLU 920、ASN 930、ASN 954、SER 955、GLN 991、GLU 992、GLN 995、ASN 1006、ASN 1025、ASN 1026、ASN 1032、ASN 1043、ASN 1046、ASN 1052、ASP 1058、HIS 1064、ASN 1080、GLU 1081、GLU 1083、ASP 1086、ASN 1188、ASP 1213、GLY 1215、ASN 1216、GLN 1229、ASN 1242、ASN 1243、SER 1274、およびTHR 1277、ここで、改変は以下から選択される:

i. 塩基性アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;

ii. 非荷電アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;

iii. 塩基性アミノ酸残基による非荷電の表面露出アミノ酸残基の置換;

iv. 塩基性アミノ酸残基の挿入;および

v. 酸性の表面露出アミノ酸残基の欠失。

【００１８】

関係する態様において、本発明は顔面の皺を処置するための方法を提供し、方法は、改変ボツリヌス神経毒素A(BoNT/A)を筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与することを含み、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり改変BoNT/Aの2単位から41単位の単位用量として投与され、かつ、1単位はマウスにおける計算上の半数致死量($LD_{50}$)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:

眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;

額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに

外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、

ここで、処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で574単位までであり、かつ、

ここで、改変BoNT/AはBoNT/Aの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。

【００１９】

別の関係する態様では、本発明は、顔面の皺を処置するための医薬の製造への改変ボツリヌス神経毒素A(BoNT/A)の使用を提供し、ここで、改変BoNT/Aは筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与され、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり改変BoNT/Aの1単位から41単位(2単位から41単位)の単位用量として投与され、かつ、1単位はマウスにおける計算上の半数致死量($LD_{50}$)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:

眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;

額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに

外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、

ここで、処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で574単位までであり、

かつ、
ここで、改変BoNT/Aは、以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)に改変を含み:ASN 886、ASN 905、GLN 915、ASN 918、GLU 920、ASN 930、ASN 954、SER 955、GLN 991、GLU 992、GLN 995、ASN 1006、ASN 1025、ASN 1026、ASN 1032、ASN 1043、ASN 1046、ASN 1052、ASP 1058、HIS 1064、ASN 1080、GLU 1081、GLU 1083、ASP 1086、ASN 1188、ASP 1213、GLY 1215、ASN 1216、GLN 1229、ASN 1242、ASN 1243、SER 1274、およびTHR 1277、ここで、改変は以下から選択される:
i. 塩基性アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;
ii. 非荷電アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;
iii. 塩基性アミノ酸残基による非荷電の表面露出アミノ酸残基の置換;
iv. 塩基性アミノ酸残基の挿入;および
v. 酸性の表面露出アミノ酸残基の欠失。

【００２０】

別の関係する態様では、本発明は、顔面の皺を処置するための医薬の製造への改変ボツリヌス神経毒素A(BoNT/A)の使用を提供し、ここで、改変BoNT/Aは筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与され、
ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり改変BoNT/Aの8.4pgから344.4pgの単位用量として投与され、
ここで、複数の部位は以下から選択され:
眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;
額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに
外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、
ここで、処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で574単位までであり、
かつ、
ここで、改変BoNT/Aは、以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)に改変を含み:ASN 886、ASN 905、GLN 915、ASN 918、GLU 920、ASN 930、ASN 954、SER 955、GLN 991、GLU 992、GLN 995、ASN 1006、ASN 1025、ASN 1026、ASN 1032、ASN 1043、ASN 1046、ASN 1052、ASP 1058、HIS 1064、ASN 1080、GLU 1081、GLU 1083、ASP 1086、ASN 1188、ASP 1213、GLY 1215、ASN 1216、GLN 1229、ASN 1242、ASN 1243、SER 1274、およびTHR 1277、ここで、改変は以下から選択される:
i. 塩基性アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;
ii. 非荷電アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;
iii. 塩基性アミノ酸残基による非荷電の表面露出アミノ酸残基の置換;
iv. 塩基性アミノ酸残基の挿入;および
v. 酸性の表面露出アミノ酸残基の欠失。

【００２１】

別の関係する態様では、本発明は、顔面の皺を処置するための医薬の製造への改変ボツリヌス神経毒素A(BoNT/A)の使用を提供し、ここで、改変BoNT/Aは筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与され、
ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり改変BoNT/Aの2単位から41単位の単位用量として投与され、かつ、1単位はマウスにおける計算上の半数致死量($LD_{50}$)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:
眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;
額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに
外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、
ここで、処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で574単位までであり、
かつ、

ここで、改変BoNT/AはBoNT/Aの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。

【００２２】

1つの態様では、本発明は、顔面の皺の処置に使用するための改変BoNT/Aを提供し、ここで、改変BoNT/Aは筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与され、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり改変BoNT/Aの0.5単位から73単位の単位用量として投与され、かつ、1単位はマウスにおける計算上の半数致死量(LD$_{50}$)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:

眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;

額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに

外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、

ここで、処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で1019単位までであり、かつ、

ここで、改変BoNT/AはBoNT/Aの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。

【００２３】

別の態様では、本発明は、顔面の皺の処置に使用するための改変BoNT/Aを提供し、ここで、改変BoNT/Aは筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与され、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり改変BoNT/Aの12pgから1754pgの単位用量として投与され、

ここで、複数の部位は以下から選択され:

眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;

額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに

外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、

ここで、処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で24,500pgまでであり、かつ、

ここで、改変BoNT/AはBoNT/Aの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。

【００２４】

関係する態様において、本発明は、顔面の皺を処置するための方法を提供し、方法は、改変ボツリヌス神経毒素A(BoNT/A)を筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与することを含み、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり改変BoNT/Aの0.5単位から73単位の単位用量として投与され、かつ、1単位はマウスにおける計算上の半数致死量(LD$_{50}$)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:

眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;

額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに

外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、

ここで、処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で1019単位までであり、かつ、

ここで、改変BoNT/AはBoNT/Aの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】

関係する態様において、本発明は、顔面の皺を処置するための方法を提供し、方法は、改変ボツリヌス神経毒素A(BoNT/A)を筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与することを含み、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり改変BoNT/Aの12pgから1754pgの単位用量として投与され、

ここで、複数の部位は以下から選択され:
眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;
額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに
外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、
ここで、処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で24,500pgまでであり、かつ、
ここで、改変BoNT/AはBoNT/Aの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】

別の関係する態様では、本発明は、顔面の皺を処置するための医薬の製造への改変ボツリヌス神経毒素A(BoNT/A)の使用を提供し、ここで、改変BoNT/Aは筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与され、
ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり改変BoNT/Aの0.5単位から73単位の単位用量として投与され、かつ、1単位はマウスにおける計算上の半数致死量($LD_{50}$)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:
眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;
額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに
外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、
ここで、処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で1019単位までであり、かつ、
ここで、改変BoNT/AはBoNT/Aの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。

【００２７】

別の関係する態様では、本発明は、顔面の皺を処置するための医薬の製造への改変ボツリヌス神経毒素A(BoNT/A)の使用を提供し、ここで、改変BoNT/Aは筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与され、
ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり改変BoNT/Aの12pgから1754pgの単位用量として投与され、
ここで、複数の部位は以下から選択され:
眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;
額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに
外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、
ここで、処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で24,500pgまでであり、かつ、
ここで、改変BoNT/AはBoNT/Aの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。

【００２８】

「筋肉」と言うことは、本発明が対処する根底にある審美的な状態に(例えば過度のタイトネス、張力、または緊張によって)寄与する患部筋肉を意味する。

【００２９】

筋肉の第1の群は鼻根筋によって定められ、筋肉の第2の群は皺眉筋によって定められ、筋肉の第3の群は眼輪筋によって定められ、筋肉の第4の群は前頭筋によって定められる。

【００３０】

複数の部位は同じ筋肉群にあり得る(例えば、右および左皺眉筋、右および左眼輪筋)。類似に、複数の部位は同じ筋肉にあり得る(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)。類似に、複数の部位は前記の筋肉および筋肉群の組み合わせにあり得る。それゆえに、個別化された処置レジメンが提供され得る。

【００３１】

本発明に使用するための改変BoNT/Aは、以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)に改変を含む改変BoNT/Aであって:ASN 886、ASN 905、GLN 915、ASN 918、GLU 920、ASN 930、ASN 954、SER 955、GLN 991、GLU 992、GLN 995、ASN 1006、ASN 1025、ASN 1026、ASN 1032、ASN 1043、ASN 1046、ASN 1052、ASP 1058、HIS 1064、ASN 1080、GLU 1081、GLU 1083、ASP 1086、ASN 1188、ASP 1213、GLY 1215、ASN 1216、GLN 1229、ASN 1242、ASN 1243、SER 1274、およびTHR 1277、ここで、改変は以下から選択されるか:塩基性アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;非荷電アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;塩基性アミノ酸残基による非荷電の表面露出アミノ酸残基の置換;塩基性アミノ酸残基の挿入;および酸性の表面露出アミノ酸残基の欠失、またはBoNT/Aの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)を含む改変BoNT/Aどちらかであり得る。

【００３２】

好ましくは、本発明に使用するための改変BoNT/Aは、以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)に改変を含む改変BoNT/Aであり:ASN 886、ASN 905、GLN 915、ASN 918、GLU 920、ASN 930、ASN 954、SER 955、GLN 991、GLU 992、GLN 995、ASN 1006、ASN 1025、ASN 1026、ASN 1032、ASN 1043、ASN 1046、ASN 1052、ASP 1058、HIS 1064、ASN 1080、GLU 1081、GLU 1083、ASP 1086、ASN 1188、ASP 1213、GLY 1215、ASN 1216、GLN 1229、ASN 1242、ASN 1243、SER 1274、およびTHR 1277、ここで、改変は以下から選択される:塩基性アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;非荷電アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;塩基性アミノ酸残基による非荷電の表面露出アミノ酸残基の置換;塩基性アミノ酸残基の挿入;および酸性の表面露出アミノ酸残基の欠失。

【００３３】

本発明の用途の改変BoNT/Aの力価は、好ましくは標準的な技術に従うマウス$LD_{50}$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、マウスにおける計算上の半数致死量($LD_{50}$)、好ましくは、マウスにおける計算上の腹腔内半数致死量に対応する改変BoNT/Aの量として定義される。前記アッセイにおける1単位に対応する改変BoNT/Aの量は、少なくとも1pg、2pg、3pg、4pg、5pg、6pg、7pg、8pg、または9pgであり得る。前記アッセイにおける1単位に対応する改変BoNT/Aの量は、≦45pg、≦40pg、≦30pg、≦25pg、≦20pg、≦19pg、≦18pg、≦17pg、≦16pg、≦15pg、≦14pg、≦13pg、≦12pg、≦11pg、≦10pg、≦9pg、≦8pg、≦7pg、または≦6pgであり得る。

【００３４】

本発明に使用するための改変BoNT/Aが、以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)に改変を含む改変BoNT/Aであり:ASN 886、ASN 905、GLN 915、ASN 918、GLU 920、ASN 930、ASN 954、SER 955、GLN 991、GLU 992、GLN 995、ASN 1006、ASN 1025、ASN 1026、ASN 1032、ASN 1043、ASN 1046、ASN 1052、ASP 1058、HIS 1064、ASN 1080、GLU 1081、GLU 1083、ASP 1086、ASN 1188、ASP 1213、GLY 1215、ASN 1216、GLN 1229、ASN 1242、ASN 1243、SER 1274、およびTHR 1277、ここで、改変が以下から選択されるところでは:塩基性のアミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換、非荷電アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換、塩基性のアミノ酸残基による非荷電の表面露出アミノ酸残基の置換、塩基性のアミノ酸残基の挿入、および酸性の表面露出アミノ酸残基の欠失、前記アッセイにおける1単位に対応する改変BoNT/Aの量は、1～15pg、例えば5～10pgであり得る。好ましくは、前記アッセイにおける1単位に対応する改変BoNT/Aの量は、8～9pg、より好ましくは8.4pgであり得る。

【００３５】

本発明に使用するための改変BoNT/Aが、BoNT/Aの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)を含む改変BoNT/Aであるところでは、前記アッセイにおける1単位に対応する改変BoNT/Aの量は、15～35pg、例えば20～30pgであり得る。好ましくは、前記アッセイにおける1単位に対応する改変BoNT/Aの量は、23～25pg、より好ましくは24.0pgであり得る。

【００３６】

値を参照して用いられるときの用語「最高で～まで」(例えば、最高で574単位まで)は、最高で記載される値までおよびそれを包含することを意味する。それゆえに、例として、「最高で574単位まで」の改変BoNT/Aを投与すると言うことは、574単位の改変BoNT/Aの投与および574単位未満の改変BoNT/Aの投与を包摂する。

【００３７】

改変BoNT/Aの用量は筋肉内注射によって複数の部位において投与される。単一の単位用量が部位あたり投与される。用語「単一の単位用量が投与される」は、単一の単位用量の実質的に全てが投与されるということを意味する。好ましくは、単位用量のせいぜい残留量(例えば、最高で1%、0.1%、または0.01%まで)のみが、改変BoNT/Aが水戻しされたバイアル中に留まり得る。しかしながら、好ましくは、単一の単位用量の全てが投与される。筋肉群に依存して、単一の単位用量が典型的には第1の群(本明細書に記載される)から選択される筋肉に投与され、2×単位が典型的には第2の群(本明細書に記載される)から選択される筋肉に投与され、3×単位が典型的には第3の群(本明細書に記載される)から選択される筋肉に投与され、5×単位が典型的には第4の群(本明細書に記載される)から選択される筋肉に投与される。

【００３８】

単位用量は改変BoNT/Aの単位に換算して表現され得る。

【００３９】

単位用量は改変BoNT/Aの2単位から41単位であり得る。単位用量範囲の上限は改変BoNT/Aの40、35、30、25、20、15、または10.単位であり得る。好ましくは、上限は35単位である。単位用量範囲の下限は5、10、15、20、25、30、または35であり得る。好ましくは、改変BoNT/Aの単位用量は12単位から35単位、12単位から24単位、より好ましくは12から18単位である。

【００４０】

代替的にまたは加えて、単位用量は、改変BoNT/Aの量に換算して表現され得る。それゆえに、1つの態様では、本発明は、顔面の皺の処置に使用するための改変ボツリヌス神経毒素A(BoNT/A)を提供し、ここで、改変BoNT/Aは筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与され、

ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり改変BoNT/Aの18pgから350pgの単位用量として投与され、

ここで、複数の部位は以下から選択され:

眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;

額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに

外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、

ここで、処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で4850pgまでであり、かつ、

ここで、改変BoNT/Aは、以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)に改変を含み:ASN 886、ASN 905、GLN 915、ASN 918、GLU 920、ASN 930、ASN 954、SER 955、GLN 991、GLU 992、GLN 995、ASN 1006、ASN 1025、ASN 1026、ASN 1032、ASN 1043、ASN 1046、ASN 1052、ASP 1058、HIS 1064、ASN 1080、GLU 1081、GLU 1083、ASP 1086、ASN 1188、ASP 1213、GLY 1215、ASN 1216、GLN 1229、ASN 1242、ASN 1243、SER 1274、およびTHR 1277、ここで、改変は以下から選択される:

i. 塩基性アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;

ii. 非荷電アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;

iii. 塩基性アミノ酸残基による非荷電の表面露出アミノ酸残基の置換;
iv. 塩基性アミノ酸残基の挿入;および
v. 酸性の表面露出アミノ酸残基の欠失。

【００４１】

別の態様では、本発明は、顔面の皺の処置に使用するための改変BoNT/Aを提供し、ここで、改変BoNT/Aは筋肉内注射によって対象の顔面の複数の部位において投与され、
ここで、改変BoNT/Aは、部位あたり改変BoNT/Aの18pgから350pgの単位用量として投与され、
ここで、複数の部位は以下から選択され:
眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;
額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに
外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで、
ここで、処置の間に投与される改変BoNT/Aの総用量は最高で4850pgまでであり、かつ、
ここで、改変BoNT/AはBoNT/Aの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。

【００４２】

対応する使用(医薬の製造への)および処置の方法もまた提供される。

【００４３】

単位用量は改変BoNT/Aの18pgから350pgであり得る。単位用量範囲の上限は改変BoNT/Aの325、300、275、250、225、200、175、150、125、100、または50pgであり得る。好ましくは、上限は300pgである。単位用量範囲の下限は改変BoNT/Aの20、25、30、35、40、45、50、60、65、70、75、80、85、90、100、125、150、175、200、250、または300pgであり得る。好ましくは、下限は20pgである。改変BoNT/Aの単位用量は以下から選択される:18pgから350pg、20pgから300pg、最も好ましくは100pgから150pg。好ましくは、改変BoNT/Aの単位用量は、改変BoNT/Aの20pgから300pg、例えば50pgから250pgである。

【００４４】

最も好ましくは、改変BoNT/Aの単位用量は80から180pg、例えば100pgから150pgである。

【００４５】

改変BoNT/Aの単位用量は2単位から41単位であり得る。単位用量範囲の上限は改変BoNT/Aの35、30、25、20、15、10、または5単位であり得る。好ましくは、上限は35単位である。単位用量範囲の下限は改変BoNT/Aの0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1.、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、または2単位であり得る。好ましくは、下限は2単位である。好ましくは、改変BoNT/Aの単位用量は、改変BoNT/Aの2単位から35単位、例えば15単位から25単位である。

【００４６】

改変BoNT/Aの単位用量は以下から選択される:2単位から35単位、6から35単位、12単位から35単位、12単位から24単位、最も好ましくは12単位から18単位。

【００４７】

最も好ましくは、改変BoNT/Aの単位用量は5から25単位、例えば12単位から18単位である。

【００４８】

単位用量は改変BoNT/Aの8.4pgから350pgであり得る。単位用量範囲の上限は、改変BoNT/Aの325、300、275、250、225、200、175、150、125、100、または50pgであり得る。好ましくは、上限は300pgである。単位用量範囲の下限は、改変BoNT/Aの5、10、20、25、30、35、40、45、50、60、65、70、75、80、85、90、100、125、150、175、200、250、または300pgであり得る。好ましくは、下限は10pgである。好ましくは、改変BoNT/Aの単位用量は、改変BoNT/Aの10pgから

300pg、より好ましくは10pgから200pg、例えば50pgから250pgである。
【００４９】
改変BoNT/Aの単位用量は以下から選択される:8.4pgから350pg、10pgから300pg、最も好ましくは60pgから120pg。
【００５０】
最も好ましくは、改変BoNT/Aの単位用量は80から180pg、例えば60pgから120pgである。
【００５１】
改変BoNT/Aの単位用量は1単位から41単位であり得る。単位用量範囲の上限は、改変BoNT/Aの35、30、25、20、15、10、または5単位であり得る。好ましくは、上限は35単位である。単位用量範囲の下限は、改変BoNT/Aの0.1、0.2、0.3、0.,4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、または1単位であり得る。好ましくは、下限は1単位である。好ましくは、改変BoNT/Aの単位用量は、改変BoNT/Aの1から35単位、例えば10から20単位である。
【００５２】
改変BoNT/Aの単位用量は以下から選択される:1単位から35単位、3.5から35単位、7単位から35単位、7単位から24単位、最も好ましくは7単位から14単位。
【００５３】
最も好ましくは、改変BoNT/Aの単位用量は5単位から20単位、例えば7単位から14単位である。
【００５４】
単位用量は改変BoNT/Aの0.5単位から73単位であり得る。単位用量範囲の上限は、改変BoNT/Aの70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、または5単位であり得る。好ましくは、上限は62単位である。単位用量範囲の下限は、改変BoNT/Aの0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、または9単位であり得る。好ましくは、下限は0.8単位である。好ましくは、改変BoNT/Aの単位用量は、改変BoNT/Aの0.8単位から62単位、例えば20から40単位である。
【００５５】
最も好ましくは、改変BoNT/Aの単位用量は5単位から25単位、例えば10単位から21単位である。
【００５６】
単位用量は改変BoNT/Aの12pgから1754pgであり得る。単位用量範囲の上限は、改変BoNT/Aの1700、1600、1500、1400、1300、1200、1100、1000、800、600、400、200、100、または50pgであり得る。好ましくは、上限は1000pgである。単位用量範囲の下限は、改変BoNT/Aの5、10、20、25、30、35、40、45、50、60、65、70、75、80、85、90、100、125、150、175、200、250、または300pgであり得る。好ましくは、下限は20pgである。好ましくは、改変BoNT/Aの単位用量は、改変BoNT/Aの20pgから1500pg、より好ましくは20pgから1000pg、例えば500pgから750pgである。
【００５７】
最も好ましくは、改変BoNT/Aの単位用量は200から750pg、例えば250pgから500pgである。
【００５８】
これらの単位用量は、改変BoNT/AがBoNT/Aの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)を含むところで特に(particular)該当し得る。
【００５９】
改変BoNT/Aの単位用量は、同時に単位および量(pg)両方によってもまた表現され得る。
【００６０】

顔面の皺を処置するときには、改変BoNT/Aは以下から選択される複数の部位に投与され得る:眉間の皺を処置するためには皺眉筋の最大で2部位までおよび鼻根筋の1部位;額の皺を処置するためには前頭筋の最大で5部位まで;ならびに外眼角の皺を処置するためには眼輪筋の外側部の最大で3部位まで。

【００６１】

本発明の処置レジメンを実施するときに投与される総用量は最高で５７４単位までであり得る。換言すると、所与の処置セッションにおいて投与される改変BoNT/Aの総量は最高で５７４単位までであり得る。総用量は最高で５７０、５６０、５５０、５４０、５３０、５２０、５１０、５００、４９０、４８０、４７０、４６０、４５０、または４４０単位までであり得る。好ましくは、総用量は、改変BoNT/Aの最高で２８８単位までであり得る。

【００６２】

本発明の処置レジメンを実施するときに投与される総用量は、最高で４８５０、４５００、４０００、３５５０、３０００、２７５０、２５００pgまで、好ましくは最高で２４００pgまでであり得る。

【００６３】

眉間の皺のための処置レジメンを実施するときに投与される総用量は、最高で１５００、１４００、１３００、１２００、１１００、１０００、８００、６００、４００、２００、１００、または５０まで、好ましくは最高で１０００pgまでであり得る。

【００６４】

額の皺のための処置レジメンを実施するときに投与される総用量は、最高で１５００、１４００、１３００、１２００、１１００、１０００、８００、６００、４００、２００、１００、または５０まで、好ましくは最高で１０００pgまでであり得る。

【００６５】

外眼角の皺のための処置レジメンを実施するときに投与される総用量は、最高で１８００、１７００、１６００、１５００、１４００、１３００、１２００、１１００、１０００、８００、６００、４００、２００、８０、６０、４０、または２０まで、好ましくは最高で１２００pgまでであり得る。

【００６６】

本発明の処置レジメンを実施するときに投与される総用量は最高で１０１９単位までであり得る。換言すると、所与の処置セッションにおいて投与される改変BoNT/Aの総量は最高で１０１９単位までであり得る。総用量は最高で１０００、９５０、９００、８５０、８００、７５０、７００、６５０、６００、５５０、５００、４５０、４００、または４００単位までであり得る。好ましくは、総用量は、改変BoNT/Aの最高で３３３単位までであり得る。

【００６７】

本発明の処置レジメンを実施するときに投与される総用量は、最高で２４,５００、２４,０００、２３,５００、２３,０００、２２,５００、２２,０００pgまで、好ましくは最高で８,０００pgまでであり得る。これらの総用量は、改変BoNT/AがBoNT/Aの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)を含むところで特に(particular)該当し得る。

【００６８】

眉間の皺のための処置レジメンを実施するときに投与される総用量は、最高で５０００、４５００、４０００、３５００、３０００、２５００、２０００、１５００、１０００、５００、４００、３００、２００、１００、または５０まで、好ましくは最高で５０００pgまでであり得る。

【００６９】

額の皺のための処置レジメンを実施するときに投与される総用量は、最高で５０００、４５００、４０００、３５００、３０００、２５００、２０００、１５００、１０００、５００、４００、３００、２００、１００、または５０まで、好ましくは最高で５０００pgまでであり得る。

【００７０】

外眼角の皺のための処置レジメンを実施するときに投与される総用量は、最高で６０００、５５００、４５００、４０００、３５００、３０００、２５００、２０００、１０００、５００、４００、３００、２００、１００、または５０まで、好ましくは最高で６０００pgまでであり得る。

【００７１】
これらの総用量は、改変BoNT/AがBoNT/Aの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)を含むところで特に(particular)該当し得る。
【００７２】
当業者は、対象が、クロストリジウム神経毒素(例えばBoNT)による追加の処置を、例えば美容処置または異なる適応症のための処置の一部として、最近に有した(または爾後に有しようとしている)ときを考えに入れるであろう。当分野においては定型的な技術を用いて、当業者は本処置レジメンを然るべく適合するであろう。
【００７３】
本発明に従う複数の筋肉への投与は好ましくは同じ処置セッションにおいて起こる。
【００７４】
処置は改変BoNT/Aの投与後の適当な時期において繰り返され得る。作用持続期間は未改変のBoNT/A(例えばDysport(登録商標))のもののおよそ二倍であるということから、好適には、対象が未改変のBoNT/A(例えばDysport(登録商標))によって処置されるときよりも長い期間が爾後の投与間にある。対象は、先の投与の少なくとも18、20、25、または30週後に、本発明に従う改変BoNT/Aを再投与され得る。例えば、対象は、先の投与の少なくとも18～45週、好ましくは20～35週後に、本発明に従う改変BoNT/Aを再投与され得る。
【００７５】
本明細書において用いられる「対象」は、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」はヒト対象を意味する。
【００７６】
本明細書において用いられる用語「処置する」または「処置すること」は、予防的処置(例えば、障害の始まりを防止するための)および修正的処置(既に障害を患っている対象の処置)を包摂する。好ましくは、本明細書において用いられる「処置する」または「処置すること」は修正的処置を意味する。本明細書において用いられる用語「処置する」または「処置すること」は、障害および/またはその症状を言う。
【００７７】
好適な改変BoNT/Aポリペプチド(および存在するところではそれをコードするヌクレオチド配列)はWO 2015/004461 A1およびWO 2017/191315に記載されている。これらの両方はそれらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる。
【００７８】
BoNT/Aは、クロストリジア属の細菌によって生ずるクロストリジウム神経毒素の1つの例である。かかるクロストリジウム神経毒素の他の例は、C.テタニ(TeNT)およびC.ボツリナム(BoNT)血清型B～Gによって生ずるもの、ならびにC.バラチおよびC.ブチリカムによって生ずるものを包含する。前記神経毒素は高度に強力かつ特異的であり、それらが送達されるニューロンおよび他の細胞を毒し得る。クロストリジウム毒素の中には公知の最も強力な毒素のいくつかがある。例として、ボツリヌス神経毒素は、血清型に依存して0.5から5ng/kgの範囲であるマウスの半数致死量($LD_{50}$)値を有する。テタヌスおよびボツリヌス毒素両方は、患部ニューロンの機能、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において作用し、末梢神経系における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。
【００７９】
天然では、クロストリジウム神経毒素(BoNT/Aを包含する)は一本鎖ポリペプチドとして合成され、これが蛋白質分解的な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繋がれた2つのポリペプチド鎖を形成する。切断は、多くの場合には活性化部位と言われる特異的な切断部位において起こり、これは、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づけられる。毒素の活性形態であるのはこの二本鎖形態である。2つの鎖は、およそ100kDaの分子質量を有する重鎖(H鎖)およびおよそ50kDaの分子質量を有する軽鎖(L鎖)と呼称される。H鎖はN末端の転位置コンポーネント($H_N$

ドメイン)およびC末端の標的化コンポーネント(HCドメイン)を含む。切断部位はL鎖と転位置ドメインコンポーネントとの間に位置づけられる。その標的ニューロンへのHCドメインの結合とエンドソームによる細胞内への結合した毒素の内在化との後に、HNドメインはL鎖をエンドソーム膜を通してサイトゾルへと転位置させ、L鎖はプロテアーゼ機能(非細胞毒性プロテアーゼとしてもまた公知)を提供する。

【００８０】

非細胞毒性プロテアーゼは、SNARE蛋白質として公知の細胞内輸送蛋白質(例えばSNAP-25、VAMP、またはシンタキシン)を蛋白質分解的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.を見よ。アクロニムのSNAREは用語の可溶性NSF接着受容体に由来し、ここでは、NSFはN-エチルマレイミド感受性因子を意味する。SNARE蛋白質は、細胞内小胞融合にとって、それゆえに細胞からの小胞輸送による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的なエンドペプチダーゼ活性であり、SNARE蛋白質に対する高い基質特異性を見せる。従って、ひとたび所望の標的細胞に送達されると、非細胞毒性プロテアーゼは標的細胞からの細胞性の分泌を阻害することができる。クロストリジウム毒素のL鎖プロテアーゼは、SNARE蛋白質を切断する非細胞毒性プロテアーゼである。

【００８１】

本明細書において用いられる用語「HCドメイン」は、標的細胞の表面に位置づけられた受容体に対する神経毒素の結合を可能化するおよそ50kDaの分子量を有する神経毒素重鎖の機能的に明確な領域を意味する。HCドメインは、2つの構造的に明確なサブドメインの「HCNサブドメイン」(HCドメインのN末端部)および「HCCサブドメイン」(HCドメインのC末端部)からなり、これらのそれぞれはおよそ25kDaの分子量を有する。

【００８２】

本明細書において用いられる用語「LHNドメイン」は、HCドメインを欠き、かつエンドペプチダーゼドメイン(「L」または「軽鎖」)と細胞質へのエンドペプチダーゼの転位置を担うドメイン(重鎖のHNドメイン)とからなる神経毒素を意味する。

【００８３】

上で論じられている通り、クロストリジウム毒素は、2つのポリペプチド鎖のおよそ100kDaの分子質量を有する重鎖(H鎖)とおよそ50kDaの分子質量を有する軽鎖(L鎖)とから形成される。H鎖はC末端の標的化コンポーネント(受容体結合ドメインまたはHCドメイン)およびN末端の転位置コンポーネント(HNドメイン)を含む。

【００８４】

軽鎖参照配列の例は以下を包含する:

ボツリヌスA型神経毒素:アミノ酸残基1～448

ボツリヌスB型神経毒素:アミノ酸残基1～440。

【００８５】

軽度のバリエーションが亜血清型に従って起こり得るので、上で同定されている参照配列は目安と考えられるべきである。例として、US 2007/0166332(その全体が参照によってここに組み込まれる)は軽度に異なる以下のクロストリジウム配列を引用している:

ボツリヌスA型神経毒素:アミノ酸残基M1～K448

ボツリヌスB型神経毒素:アミノ酸残基M1～K441。

【００８６】

好ましい改変BoNT/Aは、以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)に改変を含むものである:ASN 886、ASN 905、GLN 915、ASN 918、GLU 920、ASN 930、ASN 954、SER 955、GLN 991、GLU 992、GLN 995、ASN 1006、ASN 1025、ASN 1026、ASN 1032、ASN 1043、ASN 1046、ASN 1052、ASP 1058、HIS 1064、ASN 1080、GLU 1081、GLU 1083、ASP 1086、ASN 1188、ASP 1213、GLY 1215、ASN 1216、GLN 1229、ASN 1242、ASN 1243、SER 1274、およびTHR 1277。かかる改変BoNT/Aは、公知のBoNT/Aの使用と比較して副作用の縮減または不在を実証する。本発明の改変BoNT/Aの増大した組織保

持の特性は、増大した力価および/または作用持続期間をもまた提供し、公知のクロストリジウム毒素治療薬と比較して縮減された用量(またはいずれかの追加の有害作用なしに増大した用量)が用いられることを許し、それゆえにさらなる利点を提供し得る。

【００８７】

改変は、配列番号2として示されている未改変のBoNT/Aと比較されるときの改変であり得る。ここで、アミノ酸残基付番は配列番号2とのアラインメントによって決定される。配列番号2(および本明細書に記載される改変BoNT/Aポリペプチドに対応する配列番号)の位置1におけるメチオニン残基の存在は任意であるので、当業者はアミノ酸残基付番を決定するときにメチオニン残基の存在/不在を斟酌するであろう。例えば、配列番号2がメチオニンを包含するところでは、位置付番は上で定義されている通りであろう(例えばASN 886は配列番号2のASN 886であろう)。代替的には、メチオニンが配列番号2に不在であるところでは、アミノ酸残基付番は-1だけ改変されるべきである(例えばASN 886は配列番号2のASN 885であろう)。本明細書に記載される他のポリペプチド配列の位置1におけるメチオニンが存在する/不在であるときには、類似の考慮事項が適用され、当業者は当分野においては定型的な技術を用いて正しいアミノ酸残基付番を難なく決定するであろう。

【００８８】

改変を指示されるアミノ酸残基(単数または複数)は表面露出アミノ酸残基(単数または複数)である。

【００８９】

改変BoNT/Aは以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)に改変を含み得る:ASN 886、ASN 930、ASN 954、SER 955、GLN 991、ASN 1025、ASN 1026、ASN 1052、ASN 1188、ASP 1213、GLY 1215、ASN 1216、GLN 1229、ASN 1242、ASN 1243、SER 1274、およびTHR 1277。改変BoNT/Aは、配列番号3、5、7、および9から選択される核酸配列との少なくとも70%配列同一性を有する核酸配列、例えば、配列番号3、5、7、および9から選択される核酸配列との少なくとも80%、90%、95%、または99.9%配列同一性を有する核酸配列によってコードされ得る。好ましくは、本発明に使用するための改変BoNT/Aは、配列番号3、5、7、または9を含む(または、からなる)核酸によってコードされ得る。改変BoNT/Aは、配列番号4、6、8、および10から選択されるポリペプチド配列との少なくとも70%配列同一性を有するポリペプチド配列、例えば、配列番号4、6、8、および10から選択されるポリペプチド配列との少なくとも80%、90%、95%、または99.9%配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得る。好ましくは、本発明に使用するための改変BoNT/Aは、配列番号4、6、8、および10から選択されるポリペプチド配列を含み(より好ましくは、からなり)得る。

【００９０】

用語「1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)」は、改変BoNT/Aの文脈において用いられるときに、好ましくは、指示されているアミノ酸残基(単数または複数)の少なくとも2、3、4、5、6、または7つを意味する。それゆえに、改変BoNT/Aは、少なくとも2、3、4、5、6、または7つの(好ましくは7つの)改変を指示されているアミノ酸残基(単数または複数)に含み得る。改変BoNT/Aは、1～30、3～20、または5～10個のアミノ酸改変を含み得る。より好ましくは、用語「1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)」は、改変BoNT/Aの文脈において用いられるときに、指示されているアミノ酸残基(単数または複数)の全てを意味する。

【００９１】

好ましくは、指示されているアミノ酸残基(単数または複数)における1つ以上のアミノ酸改変(単数または複数)以外には、改変BoNT/Aは配列番号2と比較されるときにいずれかのさらなるアミノ酸改変を含有しない。

【００９２】

最も好ましくは、改変BoNT/Aは、以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数

または複数)に改変を含む(より好ましくは、からなる):ASN 886、ASN 930、SER 955、GLN 991、ASN 1026、ASN 1052、およびGLN 1229。改変BoNT/Aは、配列番号3との少なくとも70%配列同一性を有する核酸配列、例えば、配列番号3との少なくとも80%、90%、95%、または99.9%配列同一性を有する核酸配列によってコードされ得る。好ましくは、本発明に使用するための改変BoNT/Aは、配列番号3を含む(または、からなる)核酸によってコードされ得る。改変BoNT/Aは、配列番号4との少なくとも70%配列同一性を有するポリペプチド配列、例えば、配列番号4との少なくとも80%、90%、95%、または99.9%配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得る。好ましくは、本発明に使用するための改変BoNT/Aは、配列番号4を含み(より好ましくは、からなり)得る。

【００９３】

改変は以下から選択され得る:

i. 塩基性のアミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換、

ii. 非荷電アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換、

iii. 塩基性のアミノ酸残基による非荷電の表面露出アミノ酸残基の置換、

iv. 塩基性のアミノ酸残基の挿入、および

v. 酸性の表面露出アミノ酸残基の欠失。

【００９４】

上で指示されている改変は、対応する未改変のBoNT/Aと比較されるときに、増大した正の表面電荷および増大した等電点を有する改変BoNT/Aをもたらす。

【００９５】

等電点(pI)は所与の蛋白質の特異的な特性である。当分野において周知である通り、蛋白質はアミノ酸(蛋白質上のときにはアミノ酸残基ともまた言われる)の特異的な配列から作られる。20の標準的なセットの各アミノ酸は異なる側鎖(またはR基)を有し、蛋白質上の各アミノ酸残基が異なる化学的特性、例えば電荷および疎水性を呈するということを意味する。これらの特性は温度およびpHなどの取り巻く化学的環境によって影響され得る。蛋白質の総体的な化学的特徴はこれらの種々の因子の総計に依存するであろう。

【００９６】

ある種のアミノ酸残基(下で詳述される)は、取り巻くpHに依存して電荷を呈し得るイオン化可能な側鎖を所有する。かかる側鎖が所与のpHにおいて荷電するか否かは、該当するイオン化可能な部分のpKaに依存し、ここで、pKaは共役塩基からの所定のプロトンの酸解離定数(Ka)の負の対数である。

【００９７】

例えば、アスパラギン酸およびグルタミン酸などの酸性残基は、およそ4.1のpKa値を有する側鎖カルボン酸基を有する(正確なpKa値は温度、イオン強度、およびイオン化可能な基の微小環境に依存し得る)。それゆえに、これらの側鎖は7.4のpH(多くの場合には「生理的pH」と言われる)において負電荷を見せる。低いpH値においては、これらの側鎖はプロトン化されるようになり、それらの電荷を失うであろう。

【００９８】

反対に、リジンおよびアルギニンなどの塩基性の残基は、およそ10～12のpKa値を有する窒素含有側鎖基を有する。よって、これらの側鎖は7.4のpHにおいては正電荷を見せる。これらの側鎖は高いpH値においては脱プロトン化されるようになり、それらの電荷を失うであろう。

【００９９】

よって、蛋白質分子の総体的な(正味の)電荷は、蛋白質上に存在する酸性および塩基性残基の数(およびそれらの表面露出の度合い)ならびに取り巻くpHに依存する。取り巻くpHを変化させることは、蛋白質上の総体的な電荷を変化させる。従って、蛋白質毎に、正および負の電荷の数が等しく、蛋白質が総体的な正味電荷を呈さない所与のpHがある。この点は等電点(pI)として公知である。等電点は蛋白質生化学における標準的な概念であり、当業者はこれを熟知するであろう。

【０１００】
よって、等電点(pI)は蛋白質がゼロの正味電荷を呈するpH値として定義される。pIの増大は、より高いpH値が、ゼロの正味電荷を呈する蛋白質に要求されるということを意味する。それゆえに、pIの増大は、所与のpHにおける蛋白質の正味の正電荷の増大を表す。反対に、pIの減少は、より低いpH値が、ゼロの正味電荷を呈する蛋白質に要求されるということを意味する。それゆえに、pIの減少は、所与のpHにおける蛋白質の正味の正電荷の減少を表す。
【０１０１】
蛋白質のpIを決定する方法は当分野においては公知であり、当業者はこれを熟知するであろう。例として、蛋白質のpIは蛋白質上に存在する各アミノ酸の平均pKa値から計算され得る(「計算上のpI」)。かかる計算は、当分野において公知のコンピュータプログラム、例えばExPASyからのCompute pI/MWツール(https://web.expasy.org/compute_pi/)を用いて行われ得る。これは本発明に従ってpIを計算するための好ましい方法である。異なる分子間のpI値の比較は、同じ計算技術/プログラムを用いてなされるべきである。
【０１０２】
適当なところでは、蛋白質の計算上のpIは、等電点電気泳動の技術を用いて実験的に確認され得る(「観察上のpI」)。この技術は電気泳動を用いて蛋白質をそれらのpIに従って分離する。等電点電気泳動は、典型的には、固定されたpH勾配を有するゲルを用いて行われる。電場が印加されるときに、蛋白質は、それがゼロの正味電荷を有するpHに達するまでpH勾配中を移動する。この点は蛋白質のpIである。等電点電気泳動によって提供される結果は典型的には性質が比較的低分解度であり、それゆえに、本発明者は、計算上のpI(上に記載されている通り)によって提供される結果は用いることがより適当であると思料する。
【０１０３】
本明細書においては、「pI」は別様に申し立てられない限り「計算上のpI」を意味する。
【０１０４】
蛋白質のpIは、その表面に呈される塩基性および/または酸性基の数を変えることによって増大または減少させられ得る。これは蛋白質の1つ以上のアミノ酸を改変することによって達成され得る。例えば、pIの増大は酸性残基の数を縮減することまたは塩基性残基の数を増大させることによって提供され得る。
【０１０５】
本発明の改変BoNT/Aは、未改変のBoNT/A(例えば配列番号2)のものよりも少なくとも0.2、0.4、0.5、または1pI単位高いpI値を有し得る。好ましくは、改変BoNT/Aは少なくとも6.6、例えば少なくとも6.8のpIを有し得る。
【０１０６】
20個の標準アミノ酸の特性は下の表に指示されている。

【表Ａ】

| アミノ酸 | | | 側鎖 |
|---|---|---|---|
| アスパラギン酸 | Asp | D | 荷電(酸性) |
| グルタミン酸 | Glu | E | 荷電(酸性) |
| アルギニン | Arg | R | 荷電(塩基性) |
| リジン | Lys | K | 荷電(塩基性) |
| ヒスチジン | His | H | 非荷電(極性) |
| アスパラギン | Asn | N | 非荷電(極性) |
| グルタミン | Gln | Q | 非荷電(極性) |
| セリン | Ser | S | 非荷電(極性) |
| トレオニン | Thr | T | 非荷電(極性) |
| チロシン | Tyr | Y | 非荷電(極性) |
| メチオニン | Met | M | 非荷電(極性) |
| トリプトファン | Trp | W | 非荷電(極性) |
| システイン | Cys | C | 非荷電(極性) |
| アラニン | Ala | A | 非荷電(疎水性) |
| グリシン | Gly | G | 非荷電(疎水性) |
| バリン | Val | V | 非荷電(疎水性) |
| ロイシン | Leu | L | 非荷電(疎水性) |
| イソロイシン | Ile | I | 非荷電(疎水性) |
| プロリン | Pro | P | 非荷電(疎水性) |
| フェニルアラニン | Phe | F | 非荷電(疎水性) |

【０１０７】
次のアミノ酸は荷電アミノ酸と考えられる:アスパラギン酸(負)、グルタミン酸(負)、アルギニン(正)、およびリジン(正)。
【０１０８】
7.4のpHでは、アスパラギン酸(pKa 3.1)およびグルタミン酸(pKa 4.1)の側鎖は負電荷を有し、アルギニン(pKa 12.5)およびリジン(pKa 10.8)の側鎖は正電荷を有する。アスパラギン酸およびグルタミン酸は酸性のアミノ酸残基と言われる。アルギニンおよびリジンは塩基性のアミノ酸残基と言われる。
【０１０９】
次のアミノ酸は非荷電の極性の(それらが水素結合に関与し得るということを意味する)アミノ酸と考えられる:アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、メチオニン、およびトリプトファン。
【０１１０】
次のアミノ酸は非荷電の疎水性アミノ酸と考えられる:アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、プロリン、およびグリシン。

【０１１１】
アミノ酸挿入では、追加のアミノ酸残基(正常では存在しないもの)がBoNT/Aポリペプチド配列上に組み込まれ、それゆえに前記配列上のアミノ酸残基の総数を増大させる。アミノ酸欠失では、アミノ酸残基がクロストリジウム毒素アミノ酸配列から除去され、それゆえに前記配列上のアミノ酸残基の総数を縮減する。
【０１１２】
好ましくは、改変は置換であり、これは有利には改変BoNT/A上に同じ数のアミノ酸残基を維持する。アミノ酸置換では、BoNT/Aポリペプチド配列の一部を形成するアミノ酸残基が、異なるアミノ酸残基によって置き換えられる。置き換えアミノ酸残基は、上に記載されている20個の標準アミノ酸の1つであり得る。代替的には、アミノ酸置換の置き換えアミノ酸は非標準アミノ酸(上に記載されている20の標準的なセットの一部ではないアミノ酸)であり得る。例として、置き換えアミノ酸は、塩基性の非標準アミノ酸、例えばL-オルニチン、L-2-アミノ-3-グアニジノプロピオン酸、またはリジン、アルギニン、およびオルニチンのD異性体であり得る)。非標準アミノ酸を蛋白質上に導入するための方法は当分野において公知であり、E. coli栄養要求性発現ホストを用いる組み換え体蛋白質合成を包含する。
【０１１３】
1つの実施形態においては、置換は以下から選択される:塩基性のアミノ酸残基による酸性アミノ酸残基の置換、非荷電アミノ酸残基による酸性アミノ酸残基の置換、および塩基性のアミノ酸残基による非荷電アミノ酸残基の置換。置換が非荷電アミノ酸残基による酸性アミノ酸残基の置換である1つの実施形態においては、酸性アミノ酸残基はその対応する非荷電アミドアミノ酸残基によって置き換えられる(すなわち、アスパラギン酸がアスパラギンによって置き換えられ、グルタミン酸がグルタミンによって置き換えられる)。
【０１１４】
好ましくは、塩基性のアミノ酸残基はリジン残基またはアルギニン残基である。換言すると、置換はリジンまたはアルギニンによる置換である。最も好ましくは、改変はリジンによる置換である。
【０１１５】
本発明に従う改変後に、改変BoNT/Aは、未改変のBoNT/A(例えば配列番号2)が結合する標的細胞受容体に結合することができる。
【０１１６】
本発明に使用するための改変BoNT/Aは、BoNT/Aの軽鎖および転位置ドメイン(BoNT/A $LH_N$ドメイン)ならびにBoNT/B $H_C$ドメインを含み得る。BoNT/A $LH_N$ドメインはBoNT/B $H_C$ドメインに共有結合的に連結される。前記改変BoNT/Aは本明細書においては「BoNT/AB」または「BoNT/ABキメラ」ともまた言われる。
【０１１７】
$LH_N$ドメインのC末端アミノ酸残基は、BoNT/Aの$LH_N$および$H_C$ドメインを分離する$3_{10}$ヘリックスの第1のアミノ酸残基に対応し得る。そして、$H_C$ドメインのN末端アミノ酸残基は、BoNT/Bの$LH_N$および$H_C$ドメインを分離する$3_{10}$ヘリックスの第2のアミノ酸残基に対応し得る。
【０１１８】
BoNT/Bポリペプチド配列の例は配列番号16(UniProtアクセッション番号B1INP5)で提供される。
【０１１９】
本明細書において「BoNT/Aの$LH_N$および$H_C$ドメインを分離する$3_{10}$ヘリックスの第1のアミノ酸残基」と言うことは、$LH_N$および$H_C$ドメインを分離する$3_{10}$ヘリックスのN末端残基を意味する。
【０１２０】
本明細書において「BoNT/Bの$LH_N$および$H_C$ドメインを分離する$3_{10}$ヘリックスの第

2のアミノ酸残基」と言うことは、$LH_N$および$H_C$ドメインを分離する$3_{10}$ヘリックスのN末端残基の次のアミノ酸残基を意味する。

【０１２１】

「$3_{10}$ヘリックス」は、αヘリックス、βシート、およびリバースターンと併せて蛋白質およびポリペプチド上に見出される二次構造のある型である。$3_{10}$ヘリックス上のアミノ酸は右巻きのらせん構造で配置され、ここでは、各全ターンは、3つの残基と、それらの間の分子間水素結合を分離する10個の原子とによって完成する。各アミノ酸は、ヘリックス上の120°のターン(すなわち、ヘリックスはターンあたり3つの残基を有する)とらせん軸に沿って2.0Å(=0.2nm)の並進とに対応し、水素結合を作ることによって形成される環上に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基との水素結合を形成する。この繰り返されるi+3→i水素結合が$3_{10}$ヘリックスを定義する。$3_{10}$ヘリックスは構造生物学における標準的な概念であり、当業者はこれを熟知するであろう。

【０１２２】

この$3_{10}$ヘリックスは、実際のヘリックスを形成する4つの残基と、これらの4つの残基の各端に1つの2つのキャップ(または接続)残基とに対応する。本明細書において用いられる用語「$LH_N$および$H_C$ドメインを分離する$3_{10}$ヘリックス」はそれらの6残基からなる。

【０１２３】

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$H_C$ドメインを分離する$3_{10}$ヘリックスが同定された。この$3_{10}$ヘリックスは、そのN末端においては(すなわち$LH_N$ドメインのC末端部においては)αヘリックスによって、そのC末端においては(すなわち$H_C$ドメインのN末端部においては)βストランドによって取り巻かれている。$3_{10}$ヘリックスの第1の(N末端)残基(キャップまたは接続残基)もまたこのαヘリックスのC末端残基に対応する。

【０１２４】

$LH_N$および$H_C$ドメインを分離する$3_{10}$ヘリックスは、例えば、ボツリヌス神経毒素の公的に(publically)利用可能な結晶構造、例えば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)からそれぞれボツリヌス神経毒素A1およびB1について決定され得る。

【０１２５】

公的に(publically)利用可能であるインシリコモデリングおよびアラインメントツールもまた、他の神経毒素において$LH_N$および$H_C$ドメインを分離する$3_{10}$ヘリックスの位置づけを決定するために用いられ得る。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/)、蛋白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 Resources for Molecular and Cell Biologists(http://molbiol-tools.ca/)で列記されているいくつもの他のツール/サービスである。特に、「$H_N/H_{CN}$」接続部の周りの領域は構造的に高度に保存され、これは、それを異なる血清型を重ね合わせるための理想的な領域にする。

【０１２６】

例えば、次の方法論が、他の神経毒素においてこの$3_{10}$ヘリックスの配列を決定するために用いられた:

1.構造的相同性モデリングツールLOOP(http://loopp.org)は、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るために用いられた。

2.それゆえに得られた構造(pdb)ファイルは、$H_{CN}$ドメインのN末端の端およびそれの

前の約80残基(これらは$H_N$ドメインの一部である)のみを包含し、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された。

3.蛋白質重ね合わせサーバーSuperPose(http://wishart.biology.ualberta.ca/superpose/)が、各血清型を3BTA.pdb構造上に重ね合わせるために用いられた。

4.重ね合わせられたpdbファイルは、BoNT/A1の$H_C$ドメインの始まりの$3_{10}$ヘリックスを位置づけるために検分され、それから、他の血清型における対応する残基が同定された。

5.他のBoNT血清型配列は、対応する残基が正しいということをチェックするためにClustal Omegaによってアラインメントされた。

【０１２７】

この方法によって決定されたLH$_N$、H$_C$、および$3_{10}$ヘリックスドメインの例が下で提示されている。

【表Ｂ】

| 神経毒素 | 受入番号(プラス小数点後の配列バージョン) | $LH_N$ | $H_C$ | $3_{10}$ 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16) | 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$^{864}$ |

【０１２８】

構造分析および配列アラインメントを用いて、$LH_N$および$H_C$ドメインを分離する$3_{10}$ヘリックスの後のβストランドは、全てのボツリヌスおよびテタヌス神経毒素において保存された構造であり、$LH_N$および$H_C$ドメインを分離する$3_{10}$ヘリックスの第1の残基から始めるときには第8の残基において(例えば、BoNT/A1では残基879において)始まるということが見出された。

【０１２９】

BoNT/ABキメラは、BoNT/Bからの$H_C$ドメインに共有結合的に連結されたBoNT/Aからの$LH_N$ドメインを含み得る。

・ここで、$LH_N$ドメインのC末端アミノ酸残基は、BoNT/AのHCドメインの始め(N末)に位置づけられるβストランドのN末端の第8のアミノ酸残基に対応し、かつ、
・ここで、HCドメインのN末端アミノ酸残基は、BoNT/BのHCドメインの始め(N末)に位置づけられるβストランドのN末端の第7のアミノ酸残基に対応する。

【０１３０】

BoNT/ABキメラは、BoNT/BからのHCドメインに共有結合的に連結されたBoNT/Aからの$LH_N$ドメインを含み得る。
・ここで、$LH_N$ドメインのC末端アミノ酸残基は、BoNT/Aの$LH_N$ドメインの終わり(C末)に位置づけられるαヘリックスのC末端アミノ酸残基に対応し、かつ、
・ここで、HCドメインのN末端アミノ酸残基は、BoNT/Bの$LH_N$ドメインの終わり(C末)に位置づけられるαヘリックスのC末端アミノ酸残基の直ちにC末端のアミノ酸残基に対応する。

【０１３１】

BoNT/ABキメラの設計プロセスの原理は、二次構造が損なわれなかったということを保証し、それによって三次構造および各ドメインの機能のいずれかの変化を最小化しようと努めることである。理論によって拘束されることを欲することなしに、BoNT/ABキメラの$3_{10}$ヘリックスの4つの中心的アミノ酸残基を破壊しないことによるものは、キメラ神経毒素にとって最適な立体配座を保証し、それによって、キメラ神経毒素がそれらの全キャパシティまでその機能を行使することを許すということが仮定される。

【０１３２】

事実、驚くべきことに、単にBoNT/Aの$3_{10}$ヘリックスの第1のアミノ酸残基とBoNT/Bの以降の$3_{10}$ヘリックスの第2のアミノ酸残基とを保持することは、可溶性のかつ機能的なBoNT/ABキメラの生産を許すのみならず、さらに、他のBoNT/ABキメラと比べて改善された特性、特に増大した力価、増大した安全率、および/またはより長い作用持続期間(ならびに未改変のBoNT/Aと比較されるときに増大した安全率および/または作用持続期間)に至る。

【０１３３】

BoNT/Aからの$LH_N$ドメインは、配列番号2のアミノ酸残基1から872、またはそれとの少なくとも70%配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。BoNT/Aからの$LH_N$ドメインは、配列番号2のアミノ酸残基1から872、またはそれとの少なくとも80%、90%、もしくは95%配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。好ましくは、BoNT/Aからの$LH_N$ドメインは配列番号2のアミノ酸残基1から872に対応する。

【０１３４】

BoNT/BからのHCドメインは、配列番号16のアミノ酸残基860から1291、またはそれとの少なくとも70%配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。BoNT/BからのHCドメインは、配列番号16のアミノ酸残基860から1291、またはそれとの少なくとも80%、90%、もしくは95%配列同一性を有するポリペプチド配列に対応し得る。好ましくは、BoNT/BからのHCドメインは配列番号16のアミノ酸残基860から1291に対応する。

【０１３５】

好ましくは、BoNT/AB キメラはBoNT/A1 $LH_N$ドメインおよびBoNT/B1 HCドメインを含む。より好ましくは、$LH_N$ドメインはBoNT/A1(配列番号2)のアミノ酸残基1から872に対応し、HCドメインはBoNT/B1(配列番号16)のアミノ酸残基860から1291に対応する。

【０１３６】

好ましくは、BoNT/B HCドメインはさらに少なくとも1つのアミノ酸残基置換、追加、または欠失をHCCサブドメイン上に含み、これが、天然BoNT/B配列と比較してヒトSyt IIに対するBoNT/B神経毒素の結合親和性を増大させる効果を有する。BoNT/B HCCサブドメイン上の好適なアミノ酸残基置換、追加、または欠失はWO 2013/180799およびWO 2016/154534で開示されている(両方は参照によって本明細書に組み込まれ

る)。

【０１３７】

BoNT/B $H_{CC}$サブドメイン上の好適なアミノ酸残基置換、追加、または欠失は、以下からなる群から選択される置換変異を包含する:V1118M、Y1183M、E1191M、E1191I、E1191Q、E1191T、S1199Y、S1199F、S1199L、S1201V、E1191C、E1191V、E1191L、E1191Y、S1199W、S1199E、S1199H、W1178Y、W1178Q、W1178A、W1178S、Y1183C、Y1183P、およびそれらの組み合わせ。

【０１３８】

BoNT/B $H_{CC}$サブドメイン上の好適なアミノ酸残基置換、追加、または欠失は、さらに、以下からなる群から選択される2つの置換変異の組み合わせを包含する: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。

【０１３９】

BoNT/B $H_{CC}$サブドメイン上の好適なアミノ酸残基置換、追加、または欠失は、E1191M、S1199W、およびW1178Qである3つの置換変異の組み合わせをもまた包含する。

【０１４０】

好ましくは、BoNT/B $H_{CC}$サブドメイン上の好適なアミノ酸残基置換、追加、または欠失は、E1191MおよびS1199Yである2つの置換変異の組み合わせを包含する。かかる改変はBoNT/ABキメラ配列番号13および配列番号14に存在する。

【０１４１】

改変は、配列番号16で示される未改変のBoNT/Bと比較されるときの改変であり得る。ここで、アミノ酸残基付番は配列番号16とのアラインメントによって決定される。配列番号16(および本明細書に記載される改変BoNT/Aポリペプチドに対応する配列番号)の位置1におけるメチオニン残基の存在は任意であるので、当業者はアミノ酸残基付番を決定するときにメチオニン残基の存在/不在を斟酌するであろう。例えば、配列番号16がメチオニンを包含するところでは、位置付番は上で定義されている通りであろう(例えばE1191は配列番号16のE1191であろう)。代替的には、メチオニンが配列番号16に不在であるところでは、アミノ酸残基付番は-1だけ改変されるべきである(例えばE1191は配列番号16のE1190であろう)。本明細書に記載される他のポリペプチド配列の位置1におけるメチオニンが存在する/不在であるときには、類似の考慮事項が適用され、当業者は当分野においては定型的な技術を用いて正しいアミノ酸残基付番を難なく決定するであろう。

【０１４２】

本発明に使用するための改変BoNT/Aは、配列番号11～15から選択されるポリペプチド配列との少なくとも70%配列同一性を有するポリペプチド配列、例えば、配列番号11～15から選択されるポリペプチド配列との少なくとも80%、90%、95%、または99.9%配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得る。好ましくは、本発明に使用するための改変BoNT/Aは、配列番号11～15から選択されるポリペプチド配列を含み(より好ましくは、からなり)得る。

【０１４３】

改変BoNT/AがBoNT/ABキメラであるときに、改変BoNT/Aは、配列番号14との少なくとも70%配列同一性を有するポリペプチド配列、例えば、配列番号14との少なくとも80%、90%、95%、または99.9%配列同一性を有するポリペプチド配列を含むということが好ましい。好ましくは、本発明に使用するための改変BoNT/Aは配列番号14を含み(より好ましくは、からなり)得る。

【０１４４】

アミノ酸残基の置換、挿入、または欠失によって蛋白質を改変するための方法は当分野において公知である。例として、アミノ酸改変は、BoNT/Aをコードする(例えば未改変のBoNT/Aをコードする)DNA配列の改変によって導入され得る。これは標準的な分子クローニング技術を用いて達成され得る。例えば、所望のアミノ酸(単数または複数)をコードするDNA(オリゴヌクレオチド)の短いストランドが用いられてポリメラーゼ酵素を用いて元々のコード配列を置き換える部位特異的変異導入によるか、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)によって遺伝子の一部を挿入/欠失することによる。代替的には、改変された遺伝子配列が化学合成され得る。

【０１４５】

上で論じられている通り、本明細書に記載される改変BoNT/Aは、増大した力価および/または作用持続期間をもまた提供する増大した組織保持の特性を有し、いずれかの追加の負の効果なしに、増大した用量を許し得る。これらの有利な特性(これらは治療指数の増大を表す)が定義され得る1つのやり方は、改変BoNT/Aの安全率に換算してである。この点で、クロストリジウム毒素の望まれない効果(投与部位からの毒素の拡散によって引き起こされる)が、該当する動物モデル(例えば、体重減少が投与の7日以内に検出されるマウス)におけるパーセンテージの体重減少を測定することによって実験的に評価され得る。反対に、クロストリジウム毒素の所望のオンターゲット効果は、筋肉麻痺の測定の指外転スコア(DAS)アッセイによって実験的に評価され得る。DASアッセイは、マウス腓腹筋/ヒラメ筋複合体へのゼラチンリン酸緩衝液中に製剤された20μlのクロストリジウム毒素の注射、次にAokiの方法を用いる指外転スコアの評価によって行われ得る(Aoki KR, Toxicon 39: 1815-1820;2001)。DASアッセイでは、マウスは特徴的な驚愕反応を誘発するために尾で手短にぶら下げられる。これにおいては、マウスはその後肢を伸展し、その後肢指を外転する。クロストリジウム毒素注射後に、指外転の様々な度合いが5点スケールでスコア付けされる(指外転および足伸展の0=正常から4=最大の縮減)。

【０１４６】

それから、本発明の改変BoNT/A(または比較のための未改変のBoNT/A)の安全率が、体重の10%降下(マウスにおいて、投薬後の最初の7日以内のピークの効果において測定される)に要求される毒素の量と2のDASスコアに要求される毒素の量との間の比率として表現され得る。よって、高い安全率スコアが望まれ、望まれないオフターゲット効果ほとんどなしに標的筋肉を有効に麻痺させることができる毒素を指示する。本発明の改変BoNT/Aは、同等の未改変の(ネイティブな)BoNT/Aの安全率よりも高い安全率を有する。

【０１４７】

それゆえに、1つの実施形態においては、本発明の改変BoNT/Aは7よりも多大(例えば、少なくとも8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、または50)である安全率を有し、ここで、安全率は以下として計算される:DAS $ED_{50}$(pg/マウス)によって除算されたマイナス10%(-10%)の体重変化に要求される毒素の用量(pg/マウス)[$ED_{50}$=2のDASスコアを生ずるために必要とされる用量]。

【０１４８】

1つの実施形態においては、本発明の改変BoNT/Aは少なくとも10の安全率を有する。1つの実施形態においては、本発明の改変BoNT/Aは少なくとも15の安全率を有する。

【０１４９】

好ましくは、改変BoNT/Aが、本明細書に記載される通り、ASN 886、ASN 930、ASN 954、SER 955、GLN 991、ASN 1025、ASN 1026、ASN 1052、ASN 1188、ASP 1213、GLY 1215、ASN 1216、GLN 1229、ASN 1242、ASN 1243、SER 1274、およびTHR 1277から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)を含むものである場合には、前記改変BoNT/Aは少なくとも20、より好ましくは少なくとも22(例えば23～25)の安全率を有する。

【０１５０】

好ましくは、改変BoNT/Aが、BoNT/Aの軽鎖および転位置ドメインならびにBoNT/B

$H_C$ドメインを含むものである場合には、改変BoNT/Aは、少なくとも10、より好ましくは少なくとも12(例えば14～15)の安全率を有する。

【０１５１】

使用の際、本発明の改変BoNT/Aは二本鎖形態である。

【０１５２】

改変BoNT/Aは好ましくは複合体化していない形態である(すなわち、天然に存在するBoNT/Aに存在する複合体化蛋白質を不含)。かかる複合体化蛋白質の例は神経毒素関連蛋白質(NAP)および非毒非血球凝集素コンポーネント(NTNH)を包含する。改変BoNT/Aは組み換え体の改変BoNT/Aであるということが好ましい。

【０１５３】

改変BoNT/Aは、軽鎖および重鎖を有する一本鎖の改変BoNT/Aを生ずる方法によって生じ得る。方法は、核酸(前記核酸は上に記載されている通りである)を好適なホスト細胞で発現することと、ホスト細胞をリシスして、一本鎖の改変BoNT/Aを含有するホスト細胞ホモジネートを提供することと、一本鎖の改変BoNT/Aを単離することとを含む。それから、改変BoNT/Aは、上に記載されている一本鎖の改変BoNT/Aを生ずる方法によって得られ得る一本鎖の改変BoNT/A蛋白質を提供し、軽鎖および重鎖の間に位置づけられる認識部位(切断部位)においてポリペプチドを切断するプロテアーゼと改変BoNT/Aを接触させ、それによってポリペプチドを二本鎖の改変BoNT/Aに変換することを含む方法によって活性化され得る。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繋がれる。

【０１５４】

本発明の改変BoNT/Aは、対象への投与のためのいずれかの好適な様式で、例えば医薬組成物の一部として製剤され得る。それゆえに、1つの態様において、本発明は、本発明の改変BoNT/Aと薬学的に許容される担体、賦形剤、アジュバント、および/または塩とを含む医薬組成物を提供する。

【０１５５】

1つの態様では、本発明は、改変ボツリヌス神経毒素A(BoNT/A)の単位剤形を提供し、単位剤形は以下を含み:

a. 1単位から41単位(2単位から41単位)の改変BoNT/A、 ここで、1単位はマウスにおける計算上の半数致死量($LD_{50}$)に対応する改変BoNT/Aの量であり;または

b. 8.4pgから350pg(18pgから350pg)の改変BoNT/A;および

c. 随意により、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、以下から選択される1つ以上のアミノ酸残基(単数または複数)に改変を含み: ASN 886、ASN 905、GLN 915、ASN 918、GLU 920、ASN 930、ASN 954、SER 955、GLN 991、GLU 992、GLN 995、ASN 1006、ASN 1025、ASN 1026、ASN 1032、ASN 1043、ASN 1046、ASN 1052、ASP 1058、HIS 1064、ASN 1080、GLU 1081、GLU 1083、ASP 1086、ASN 1188、ASP 1213、GLY 1215、ASN 1216、GLN 1229、ASN 1242、ASN 1243、SER 1274、およびTHR 1277、 ここで、改変は以下から選択される:

i. 塩基性アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;

ii. 非荷電アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;

iii. 塩基性アミノ酸残基による非荷電の表面露出アミノ酸残基の置換;

iv. 塩基性アミノ酸残基の挿入;および

v. 酸性の表面露出アミノ酸残基の欠失。

【０１５６】

1つの実施形態では、本発明は以下を含む単位剤形を提供する:

a. 1単位から35単位の改変BoNT/A;または

b. 10pgから300pgの改変BoNT/A。

【０１５７】

1つの態様では、本発明は改変ボツリヌス神経毒素A(BoNT/A)の単位剤形を提供し、

単位剤形は以下を含み:
a. 2単位から41単位の改変BoNT/A、 ここで、1単位はマウスにおける計算上の半数致死量($LD_{50}$)に対応する改変BoNT/Aの量であり;または
b. 18pgから350pgの改変BoNT/A;および
c. 随意により、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の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。

【０１５８】

1つの態様では、本発明は、改変ボツリヌス神経毒素A(BoNT/A)の単位剤形を提供し、単位剤形は以下を含み:
a. 0.5単位から73単位の改変BoNT/A、ここで、1単位はマウスにおける計算上の半数致死量($LD_{50}$)に対応する改変BoNT/Aの量であり;または
b. 12pgから1754pgの改変BoNT/A;および
c. 随意により、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の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。

【０１５９】

本発明は、以下を含む単位剤形を提供する:
a. 0.8単位から62単位の改変BoNT/A;または
b. 20pgから1500pgの改変BoNT/A。

【０１６０】

単位剤形は、6単位から35単位、12単位から35単位、12単位から24単位、好ましくは12単位から18単位の改変BoNT/Aを含み得る。

【０１６１】

単位剤形は、50pgから300pg、100から300pg、100から200pg、好ましくは100から150pgの改変BoNT/Aを含み得る。

【０１６２】

キットであって、以下を含む:
a. 本明細書において前に定められた単位剤形;および
b. 顔面の皺の処置における同単位剤形の使用についての説明書;および
c. 随意により希釈剤。

【０１６３】

本発明の種々の治療学的使用に関係する実施形態は、本発明の方法、組成物(例えば単位剤形)、およびキットに適用され得る。逆もまた同様である。

【０１６４】

配列相同性

【０１６５】

種々の配列アラインメント法のいずれかが、同一性百分率を決定するために用いられ得る。限定なしに、グローバル法、ローカル法、およびハイブリッド法、例えば、例えばセグメントアプローチ法を包含する。同一性百分率を決定するためのプロトコールは当業者の範囲内の定型的な手続きである。グローバル法は、配列を分子の始めから終わりまでアラインメントし、個々の残基ペアのスコアを合計することおよびギャップペナルティを課すことによって最も良好なアラインメントを決定する。限定しない方法は例えば以下を包含する。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)を見よ;および反復改善法、例えばOsamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Proteins. Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) J. MoI. Biol. 823-838

(1996)を見よ。ローカル法は、入力配列の全てによって共有される1つ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メントする。限定しない方法は例えば以下を包含する。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)を見よ;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)を見よ;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)を見よ。

【０１６６】

それゆえに、配列同一性百分率は従来の方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を見よ。手短には、2つのアミノ酸配列が、下に示される通り、10のギャップオープンペナルティ、1のギャップ延長ペナルティ、およびHenikoff and Henikoff(同書)の「blosum 62」スコア付け行列を用いてアラインメントスコアを最適化するようにアラインメントされる(アミノ酸は標準的な1文字コードによって指示される)。

【０１６７】

2つ以上の核酸またはアミノ酸配列の間の「配列同一性百分率」は、配列によって共有される同一の位置の数の関数である。それゆえに、%同一性は、ヌクレオチド/アミノ酸の総数によって除算される100によって乗算された同一のヌクレオチド/アミノ酸の数として計算され得る。%配列同一性の計算は、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ことを必要とするギャップの数および各ギャップの長さをもまた斟酌し得る。2つ以上の配列間の配列比較および同一性百分率の決定は、具体的な数理アルゴリズム、例えばBLASTを用いて実施され得る。当業者はこれを熟知するであろう。

【０１６８】

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
```

【０１６９】

それから、同一性百分率が以下として計算される:

[(同一マッチの総数)/(より長い配列の長さプラス2つの配列をアラインメントするためにより長い配列上に導入されるギャップの数)]×１００

【０１７０】

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、または追加を有するとしてキャラクタリゼーションされる。これらの変化は、好ましくは、小規模な性質、つまり、ポリペプチドの折りたたみまたは活性に有意には影響しない保存的アミノ酸置換(下を見よ)および他の置換、典型的には1から約30アミノ酸の小さい欠失、ならびに小さいアミノもしくはカルボキシル末端延長、例えばアミノ末端メチオニン残基、最高で約20～25残基までの小さいリンカーペプチド、またはアフィニティータグである。

【０１７１】

保存的アミノ酸置換

塩基性:

アルギニン

リジン

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

【０１７２】

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-メチルリジン、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。限定された数の非保存的なアミノ酸、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天然に存在しないアミノ酸残基をもまた含み得る。

【０１７３】

天然に存在しないアミノ酸は、限定なしに、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、tert-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を包含する。天然に存在しないアミノ酸残基を蛋白質上に組み込むためのいくつかの方法が当分野において公知である。例えば、化学的にアミノアシル化されたサプレッサーtRNAを用いてナンセンス変異が抑圧されるインビトロ系が採用され得る。アミノ酸およびアミノアシル化tRNAを合成するための方法は当分野において公知である。ナンセンス変異を含有するプラスミドの転写ならびに翻訳は、E. coli S30抽出物ならびに商業的に利用可能な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。蛋白質はクロマトグラフィーによって精製される。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を見よ)。第2の方法では、翻訳が、変異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Xenopus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の方法においては、E. coli細胞が、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)の不在下においてかつ所望の天然に存在しないアミノ酸(単数または複数)(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)の存在下において培養される。天然に存在しないアミノ酸は、その天然のカウンターパートの代わりにポリペプチド上に組み込まれる。Koide et al., Biochem. 33: 7470-6, 1994を見よ。天然に存在するアミノ酸残基はインビトロ化学修飾によって天然に存在しない種に変換され得る。化学修飾は部位特異的変異導入と組み合わせられて置換の範囲をさらに拡張し得る(Wynn and Richards, Protein Sci. 2:395-403, 1993)。

【０１７４】

限定された数の非保存的なアミノ酸、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。

【０１７５】

本発明のポリペプチド上の必須アミノ酸は、当分野において公知の手続き、例えば部位特異的変異導入またはアラニンスキャン変異導入に従って同定され得る(Cunningham and Wells, Science 244: 1081-5, 1989)。生物学的相互作用部位もまた、推定上の接触部位アミノ酸の変異と共に、核磁気共鳴、結晶学、電子回折、または光親和性標識などの技術によって決定される構造の物理的分析によって決定され得る。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を見よ。必須アミノ酸のアイデンティティは、本発明のポリペプチドの関係するコンポーネント(例えば、転位置またはプロテアーゼコンポーネント)との相同性の分析からもまた推量され得る。

【０１７６】

複数のアミノ酸置換が、変異導入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)によって開示されているものを用いてなされ、試験され得る。手短には、これらの著者は、同時に、ポリペプチド上の2つ以上の位置をランダム化し、機能的なポリペプチドをセレクションし、それから変異導入されたポリペプチドをシーケンシングして各位置における許され得る置換のスペクトルを決定するための方法を開示している。用いられ得る他の方法は、ファージディスプレイ(例えば、Lowman et al., Biochem. 30:10832-7, 1991、Ladner et al., U.S. No. 5, 223,409、Huse, WIPO公開WO 92/06204)および領域特異的変異導入(Derbyshire et al., Gene 46:145, 1986、Ner et al., DNA 7:127, 1988)を包含する。

【０１７７】

別様に定義されない限り、本明細書において用いられる全ての技術および科学用語は、本開示が属する分野の業者によって普通に理解される同じ意味を有する。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、本開示に用いられる用語の多くの総合辞書を当業者に提供する。

【０１７８】

本開示は本明細書において開示される例示的な方法および材料によって限定されず、本明細書に記載されるものと類似または同等のいずれかの方法および材料は、本開示の実施形態の実施または試験に用いられ得る。数的範囲は範囲を定義する数を包含する。別様に指示されない限り、それぞれ、いずれかの核酸配列は左から右に5'から3'の向きで書かれ、アミノ酸配列は左から右にアミノからカルボキシの向きで書かれる。

【０１７９】

本明細書において提供される見出しは本開示の種々の態様または実施形態の限定ではない。

【０１８０】

アミノ酸は、本明細書においてはアミノ酸の名称、3文字略称、または1文字略称を用いて言われる。本明細書において用いられる用語「蛋白質」は、蛋白質、ポリペプチド、

およびペプチドを包含する。本明細書において用いられる用語「アミノ酸配列」は用語「ポリペプチド」および/または用語「蛋白質」と同意である。いくつかの場合には、用語「アミノ酸配列」は用語「ペプチド」と同意である。いくつかの場合には、用語「アミノ酸配列」は用語「酵素」と同意である。用語「蛋白質」および「ポリペプチド」は本明細書においては交換可能に用いられる。本開示および請求項においては、アミノ酸残基の従来の1文字および3文字コードが用いられ得る。アミノ酸の3文字コードはIUPACIUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature(JCBN)に従って定義される通りである。ポリペプチドは遺伝暗号の縮重を原因として1つ超の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また理解される。

【０１８１】

用語の他の定義が本明細書において現れ得る。例示的な実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実施形態に限定されず、そのため、変形し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される請求項のみによって定義されるので、本明細書において用いられる術語は特定の実施形態を記載する目的のためのみであり、限定しようということが意図されないということもまた理解されるべきである。

【０１８２】

値の範囲が提供されるところでは、その範囲の上および下限の間の各介在値もまた、文脈が明瞭に別様に述べない限り下限の単位の十分の一まで具体的に開示されるということが理解される。申し立てられる範囲内のいずれかの申し立てられる値または介在値とその申し立てられる範囲内のいずれかの他の申し立てられるまたは介在値との間のより小さい各範囲は本開示に包摂される。これらのより小さい範囲の上および下限は独立して範囲に包含または除外され得る。そして、申し立てられる範囲内のいずれかの具体的に除外される限度を条件として、どちらかもしくは両方の限度がより小さい範囲に包含されるかまたはどちらも包含されない各範囲もまた、本開示に包摂される。申し立てられる範囲が限度の1つまたは両方を包含するところでは、それらの包含される限度のどちらかまたは両方を除外する範囲もまた本開示に包含される。

【０１８３】

本明細書および添付される請求項において用いられる単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が明瞭に別様に述べない限り、複数のリファレントを包含するということは注記されなければならない。それゆえに、例えば、「ボツリヌス神経毒素A」と言うことは複数のかかる候補薬剤を包含し、「ボツリヌス神経毒素A」と言うことは、当業者に公知の1つ以上のクロストリジウム神経毒素およびそれらの同等物を言うことを包含するなどである。

【０１８４】

本明細書において論じられる公開は、単に本願の出願日に先立つそれらの開示のために提供されている。本明細書におけるいかなることも、かかる公開がそれに添付される請求項に対して先行技術に当たるという自認として解釈されるべきではない。

【０１８５】

ここで、本発明の実施形態が次の図および例の参照によって例としてのみ記載される。

【図面の簡単な説明】

【０１８６】

【図１】図1は、成人の顔面の皺を処置するためのDysport(登録商標)のFDA承認された用量を示す。

【図２】図2はカチオン性コンストラクトの等電点電気泳動(IEF)ゲルを示す。

【図３】図3は、Cat5v2(K1064H/N954K)(A)、Cat5v2(K1064H/N886K)(B)、およびCat5v2(K1064H/N1025K)(C)についてのラット胚脊髄ニューロン(eSCN)におけるパーセンテージのSNAP-25切断、ならびにnBoNT/A1に対して相対的なpEC50の概要を示す。(A、B、C)ラット胚脊髄ニューロンが3週に渡って培養され、SNAP-25特異的抗体によるウエスタンブロッティングの前に24hに渡ってCat5v4によって処置された。データは3重の3つの独立した実験からの平均±SEMである。(D)ラットeSCN SN

AP-25切断力価アッセイにおけるnBoNT/A1(List Biological Laboratories)に対するCat5v2(K1064H/N886K)、Cat5v2(K1064H/N954K)、およびCat5v2(K1064H/N1025K)の相対的力価。各点は個々のバッチに対応し、8点濃度反応曲線(CRC)に基づく3つの独立したpEC50決定の平均である。CRC上の各濃度は3重で評価された。力価比較はListバッチのプールされたデータn=24の平均に対してなされる。データはCat5v4あたりn=3バッチの平均±SEMである。

【図４】図4は、マウス横隔神経半横隔膜アッセイ(mPNHD)におけるnBoNT/A1およびCat5v4の力価($t_{50}$)を示す。マウス横隔神経半横隔膜組織が指示されている通りCat5v4またはネイティブなBoNT/A1とインキュベーションされた。横隔膜収縮力が、収縮がもはや検出可能ではなくなるまでまたは140分後に記録された。各点は独立した決定に対応する。$t_{50}$値は、マウス半横隔膜の収縮力を50%阻害するために要求される時間である。

【図５】図5は、精製された組み換え体のBoNT/ABキメラ1、2、および3A(それぞれ配列番号11、12、および13)のSDS-PAGEを示す。レーンは「マーカー」(分子量マーカー)、「-DTT」(酸化されたBoNT/ABキメラサンプル)、および「+DTT」(還元されたBoNT/ABキメラサンプル)と標識されている。

【図６】図6は、組み換え体のBoNT/ABキメラ1、2、および3A(それぞれ配列番号11、12、および13)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。培養ラット初代脊髄ニューロン(SCN)が、種々の濃度の組み換え体のBoNT/ABキメラ1、2、または3Aに24時間に渡って37℃で10%$CO_2$の加湿雰囲気において暴露された。それから、細胞はDTTおよびベンゾナーゼを補われた1×NuPAGE緩衝液によってリシスされた。サンプルは微量遠心管に移され、5minに渡って90℃においてヒートブロック上で加熱され、ウエスタンブロットによるSNAP-25切断の分析前に-20℃で保存された。SNAP-25は、SNAP-25の全長および切断形態両方を検出するポリクローナル抗体(Sigma #S9684)を用いて検出された。抗ウサギHRP(Sigma #A6154)が二次抗体として用いられた。

【図７】図7は、マウス指外転スコア付けアッセイを示す。マウスは短い全身麻酔下において1つの後肢の腓腹筋-ヒラメ筋複合体筋肉に注射された。筋力低下が指外転スコア(DAS)を用いて0～4スケールで測定された。DAS最大値が各用量について決定され、用量に対してプロットされ、データは4パラメータロジスティック方程式に当てはめられ、ED50およびDAS 4値に至る用量(DAS 4用量)が決定された。

【図８】図8は、精製された組み換え体のBoNT/ABキメラ3Bおよび3C(それぞれ配列番号14および15)のSDS-PAGEを示す。レーンは「マーカー」(分子量マーカー)、「-DTT」(酸化されたBoNT/ABキメラサンプル)、および「+DTT」(還元されたBoNT/ABキメラサンプル)と標識されている。

【図９】図9は、ヒト人工多能性幹細胞に由来する末梢ニューロン(PERI.4U-Axiogenesis、ドイツ)における未改変のBoNT/AならびにBoNT/ABキメラ3Bおよび3C(それぞれ配列番号2、14、および15)によるSNAP-25の切断を示す。PERI.4U細胞は、種々の濃度の組み換え体のBoNT/AまたはBoNT/ABキメラ3Bもしくは3Cに24時間に渡って37℃で5%$CO_2$を含有する加湿$CO_2$雰囲気において暴露された。それから、細胞はDTTおよびベンゾナーゼを補われた1×NuPAGE緩衝液によってリシスされた。サンプルは微量遠心管に移され、5minに渡って90℃においてヒートブロック上で加熱され、ウエスタンブロットによるSNAP-25切断の分析前に-20℃で保存された。SNAP-25は、SNAP-25の全長および切断形態両方を検出するポリクローナル抗体(Sigma #S9684)を用いて検出された。抗ウサギHRP(Sigma #A6154)が二次抗体として用いられた。

【図１０】図10は、マウス指外転スコア付けアッセイにおける経時的な筋力低下の持続期間を示す。マウスは短い全身麻酔下において1つの後肢の腓腹筋-ヒラメ筋複合体筋肉に注射された。筋力低下が指外転スコア(DAS)を用いて0～4スケールで測定された。注射の最初の4日間に4のDASを誘導する最も低い用量を注射された群の動物は、0のDAS(観察される筋力低下なし)への筋力低下の完全な回復までモニタリングされた。

【図１１】図11は、眉間の皺を処置するときの改変BoNT/Aの筋肉内投与のための注射部位を示す。
【図１２】図12は、眉間の皺および額の皺を処置するときの改変BoNT/Aの筋肉内投与のための注射部位を示す。
【図１３】図13は、外眼角の皺のみを処置するときの改変BoNT/Aの筋肉内投与のための注射部位を示す。
【図１４】図14は、眉間の皺、額の皺、および外眼角の皺を処置するときの改変BoNT/Aの筋肉内投与のための注射部位を示す。
【０１８７】
配列表
【０１８８】
最初のMetアミノ酸残基または対応する開始コドンが次の配列番号のいずれかにおいて指示されているところでは、前記残基/コドンは任意である。
【０１８９】
配列番号1(未改変のBoNT/Aのヌクレオチド配列)

ATGCCATTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACA
TCGCATACATCAAGATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAG
ATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAGA
AGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCAGCTACTACGATT
CGACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAG
CTGTTCGAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGT
TCGCGGTATCCCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACCGAACTGAAGGTTATCG
ACACTAACTGCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTG
AATCTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTT
TGGTCACGAGGTTCTGAATCTGACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTC
GTTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAAT
CCGTTGCTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATGA
ACTGATCCACGCAGGCCACCGCCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGT
TCAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATGAGCGGCCTGGAAGTCAGCTTCGAA
GAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACAGCTTGCAAGAGAA
TGAGTTCCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACA
AGGCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTT
AAAGAGAAGTACCTGCTGTCCGAGGATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCT
GAAGTTTGACAAACTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGACAACTTTG
TGAAATTCTTCAAAGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTT
TTCAAGATTAACATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAACCT
GCGTAACACCAACCTGGCGGCGAACTTTAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACA
TGAATTTCACGAAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTCGAGTTCTATAAGCTGCTG
TGCGTGCGCGGTATCATCACCAGCAAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAACAA
GGCGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATTGGGATCTGTTCTTTTCGCCAT
CCGAAGATAATTTTACCAACGACCTGAACAAGGGTGAAGAAATCACCAGCGATACG
AATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCT
GACCTTTAACTTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCG
ACATTATCGGTCAGCTGGAACTGATGCCGAATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAA
AAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCATTACCTGCGTGCACAGGAGTTTGA
ACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCCCTGCTGAACC
CGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCC
ACTGAGGCCGCGATGTTCCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGA
CGAGACGAGCGAAGTGAGCACTACCGACAAAATTGCTGATATTACCATCATTATCC
CGTATATTGGTCCGGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGACGATTTTGTG

GGTGCCCTGATCTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTCATTCCGGAGATTGC
GATCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCCTACATCGCGAATAAGGTTCTGA
CGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCGAAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTT
TACAAATACATTGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAGATCGACCTGAT
CCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAATTA
TCAACTACCAATACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAGAATAACATTAACTTCAAT
ATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATCAATAT
CAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATGATTCCGT
ATGGCGTCAAACGTCTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAA
TACATTTACGACAATCGTGGTACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAAAGACAA
AGTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCATTTCAACTGAGCAAGTATGTTGATA
ATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATCAATACTAGC
ATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCAAG
CAAGATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCC
AGCTGTTTAATCTGGAATCGAGCAAAATTGAGGTTATCCTGAAAAACGCCATTGTC
TACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTCGCATCCCGAAATA
CTTCAACAGCATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACA
ACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGAC
ACCCAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAGTACTCTCAAATGATCAACATTTC
CGATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAATAACA
GCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGT
AATATCCACGCAAGCAACAACATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCA
TCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAATGAGAAGG
AGATCAAAGATTTGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGG
GGCGATTATCTGCAATACGATAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAA
CAAATATGTGGATGTCAATAATGTGGGTATTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTC
CGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTGAACTCTAGCCTGTACCGTGGT
ACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATTGTGCGTAA
TAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGTGAAGAATAAAGAGTACCGTCTGGCGA
CCAACGCTTCGCAGGCGGGTGTTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGAT
GTCGGTAATCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACCAGGGTATCAC
TAACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTTATTG
GTTTCCACCAGTTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGT
CAGATTGAGCGCAGCAGCCGTACTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGA
TGATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

【０１９０】

配列番号２(未改変のＢｏＮＴ/Ａのポリペプチド配列)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPE
EGDLNPPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIV
RGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHE
VLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAG
HRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYY
YNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYK
MLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAAN
FNGQNTEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVN
NWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISI
ENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEA
LLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITII
IPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQ
TIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQ

YNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKR
LEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLS
TFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKI
EVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWKVSLNYGE
IIWTLQDTQEIKQRVVFKYSQMININSDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPI
SNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNSGILK
DFWGDYLQYDKPYYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSS
LYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEI
PDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNIAKLVASNW
YNRQIERSSRTLGCSWEFIPVDDGWGERPL

【0191】

配列番号3(改変BoNT/A「Cat-A」のヌクレオチド配列)

ATGCCATTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACA
TCGCATACATCAAGATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAG
ATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAGA
AGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCAGCTACTACGATT
CGACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAG
CTGTTCGAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGT
TCGCGGTATCCCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACCGAACTGAAGGTTATCG
ACACTAACTGCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTG
AATCTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTT
TGGTCACGAGGTTCTGAATCTGACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTC
GTTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAAT
CCGTTGCTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATGA
ACTGATCCACGCAGGCCACCGCCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGT
TCAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATGAGCGGCCTGGAAGTCAGCTTCGAA
GAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACAGCTTGCAAGAGAA
TGAGTTCCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACA
AGGCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTT
AAAGAGAAGTACCTGCTGTCCGAGGATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCT
GAAGTTTGACAAACTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGACAACTTTG
TGAAATTCTTCAAAGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTT
TTCAAGATTAACATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAACCT
GCGTAACACCAACCTGGCGGCGAACTTTAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACA
TGAATTTCACGAAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTCGAGTTCTATAAGCTGCTG
TGCGTGCGCGGTATCATCACCAGCAAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAACAA
GGCGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATTGGGATCTGTTCTTTTCGCCAT
CCGAAGATAATTTTACCAACGACCTGAACAAGGGTGAAGAAATCACCAGCGATACG
AATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCT
GACCTTTAACTTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCG
ACATTATCGGTCAGCTGGAACTGATGCCGAATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAA
AAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCATTACCTGCGTGCACAGGAGTTTGA
ACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCCCTGCTGAACC
CGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCC
ACTGAGGCCGCGATGTTCCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGA
CGAGACGAGCGAAGTGAGCACTACCGACAAAATTGCTGATATTACCATCATTATCC
CGTATATTGGTCCGGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGACGATTTTGTG
GGTGCCCTGATCTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTCATTCCGGAGATTGC
GATCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCCTACATCGCGAATAAGGTTCTGA
CGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCGAAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTT

TACAAATACATTGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAGATCGACCTGAT
CCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAATTA
TCAACTACCAATACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAGAATAACATTAACTTCAAT
ATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATCAATAT
CAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATGATTCCGT
ATGGCGTCAAACGTCTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAA
TACATTTACGACAATCGTGGTACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAAAGACAA
AGTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCATTTCAACTGAGCAAGTATGTTGATA
ATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATCAATACTAGC
ATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAAGCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCTAG
CAAGATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCC
AGCTGTTTAATCTGGAATCGAGCAAAATTGAGGTTATCCTGAAAAAGGCCATTGTC
TACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTCGCATCCCGAAATA
CTTCAACAAGATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACA
ACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGAC
ACCAAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAGTACTCTCAAATGATCAACATTTC
CGATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAATAAGA
GCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGT
AATATCCACGCAAGCAACAAGATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCA
TCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAATGAGAAGG
AGATCAAAGATTTGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGG
GGCGATTATCTGCAATACGATAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAA
CAAATATGTGGATGTCAATAATGTGGGTATTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTC
CGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTGAACTCTAGCCTGTACCGTGGT
ACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATTGTGCGTAA
TAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGTGAAGAATAAAGAGTACCGTCTGGCGA
CCAACGCTTCGCAGGCGGGTGTTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGAT
GTCGGTAATCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACAAGGGTATCAC
TAACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTTATTG
GTTTCCACCAGTTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGT
CAGATTGAGCGCAGCAGCcGTACTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGA
TGATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

【０１９２】

配列番号４(改変BoNT/A「Cat-A」のポリペプチド配列)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPE
EGDLNPPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIV
RGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHE
VLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAG
HRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYY
YNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYK
MLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAAN
FNGQNTEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVN
NWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISI
ENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEA
LLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITII
IPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQ
TIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQ
YNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKR
LEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLS
TFTEYIKNIINTSILNLRYESKHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKI

EVILKKAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNKISLNNEYTIINCMENNSGWKVSLNYGE
IIWTLQDTKEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNKSKIYINGRLIDQKPI
SNLGNIHASNKIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNSGILKD
FWGDYLQYDKPYYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSL
YRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIP
DVGNLSQVVVMKSKNDKGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNIAKLVASNWY
NRQIERSSRTLGCSWEFIPVDDGWGERPL

【０１９３】

配列番号5(改変BoNT/A「Cat-B」のヌクレオチド配列)

ATGCCATTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACA
TCGCATACATCAAGATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAG
ATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAGA
AGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCAGCTACTACGATT
CGACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAG
CTGTTCGAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGT
TCGCGGTATCCCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACCGAACTGAAGGTTATCG
ACACTAACTGCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTG
AATCTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTT
TGGTCACGAGGTTCTGAATCTGACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTC
GTTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAAT
CCGTTGCTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATGA
ACTGATCCACGCAGGCCACCGCCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGT
TCAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATGAGCGGCCTGGAAGTCAGCTTCGAA
GAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACAGCTTGCAAGAGAA
TGAGTTCCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACA
AGGCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTT
AAAGAGAAGTACCTGCTGTCCGAGGATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCT
GAAGTTTGACAAACTGTACaAGATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGACAACTTTG
TGAAATTCTTCAAAGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTT
TTCAAGATTAACATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAACCT
GCGTAACACCAACCTGGCGGCGAACTTTAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACA
TGAATTTCACGAAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTCGAGTTCTATAAGCTGCTG
TGCGTGCGCGGTATCATCACCAGCAAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAACAA
GGCGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATTGGGATCTGTTCTTTTCGCCAT
CCGAAGATAATTTTACCAACGACCTGAACAAGGGTGAAGAAATCACCAGCGATACG
AATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCT
GACCTTTAACTTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCG
ACATTATCGGTCAGCTGGAACTGATGCCGAATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAA
AAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCATTACCTGCGTGCACAGGAGTTTGA
ACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCCCTGCTGAACC
CGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCC
ACTGAGGCCGCGATGTTCCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGA
CGAGACGAGCGAAGTGAGCACTACCGACAAAATTGCTGATATTACCATCATTATCC
CGTATATTGGTCCGGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGACGATTTTGTG
GGTGCCCTGATCTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTCATTCCGGAGATTGC
GATCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCCTACATCGCGAATAAGGTTCTGA
CGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCGAAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTT
TACAAATACATTGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAGATCGACCTGAT
CCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAATTA
TCAACTACCAATACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAGAATAACATTAACTTCAAT

ATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATCAATAT
CAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATGATTCCGT
ATGGCGTCAAACGTCTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAA
TACATTTACGACAaTCGTGGTACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAAAGACAA
AGTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCATTTCAACTGAGCAAGTATGTTGATA
ATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATCAATACTAGC
ATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCTAG
CAAGATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCC
AGCTGTTTAATCTGGAATCGAGCAAAATTGAGGTTATCCTGAAAAAGGCCATTGTC
TACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTCGCATCCCGAAATA
CTTCAAGAAGATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACA
ACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGAC
ACCAAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAGTACTCTCAAATGATCAACATTTC
CGATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAATAAGA
GCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGT
AATATCCACGCAAGCAACAAGATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCA
TCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAATGAGAAGG
AGATCAAAGATTTGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGG
GGCGATTATCTGCAATACGATAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAA
CAAATATGTGGATGTCAATAATGTGGGTATTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTC
CGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTGAACTCTAGCCTGTACCGTGGT
ACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATTGTGCGTAA
TAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGTGAAGAATAAAGAGTACCGTCTGGCGA
CCAACGCTTCGCAGGCGGGTGTTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGAT
GTCGGTAATCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACAAGGGTATCAC
TAACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTTATTG
GTTTCCACCAGTTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGT
CAGATTGAGCGCAGCAGCCGTACTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGA
TGATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

【０１９４】

配列番号6(改変BoNT/A「Cat-B」のポリペプチド配列)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPE
EGDLNPPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIV
RGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHE
VLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAG
HRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYY
YNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYK
MLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAAN
FNGQNTEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVN
NWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISI
ENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEA
LLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITII
IPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQ
TIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQ
YNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKR
LEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLS
TFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKI
EVILKKAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFKKISLNNEYTIINCMENNSGWKVSLNYGE
IIWTLQDTKEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNKSKIYINGRLIDQKPI
SNLGNIHASNKIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNSGILKD

FWGDYLQYDKPYYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSL
YRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIP
DVGNLSQVVVMKSKNDKGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNIAKLVASNWY
NRQIERSSRTLGCSWEFIPVDDGWGERPL

【０１９５】

配列番号7(改変BoNT/A「Cat-C」のヌクレオチド配列)

ATGCCATTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACA
TCGCATACATCAAGATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAG
ATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAGA
AGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCAGCTACTACGATT
CGACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAG
CTGTTCGAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGT
TCGCGGTATCCCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACCGAACTGAAGGTTATCG
ACACTAACTGCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTG
AATCTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTT
TGGTCACGAGGTTCTGAATCTGACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTC
GTTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAAT
CCGTTGCTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATGA
ACTGATCCACGCAGGCCACCGCCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGT
TCAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATGAGCGGCCTGGAAGTCAGCTTCGAA
GAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACAGCTTGCAAGAGAA
TGAGTTCCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACA
AGGCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTT
AAAGAGAAGTACCTGCTGTCCGAGGATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCT
GAAGTTTGACAAACTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGACAACTTTG
TGAAATTCTTCAAAGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTT
TTCAAGATTAACATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAACCT
GCGTAACACCAACCTGGCGGCGAACTTTAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACA
TGAATTTCACGAAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTCGAGTTCTATAAGCTGCTG
TGCGTGCGCGGTATCATCACCAGCAAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAACAA
GGCGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATTGGGATCTGTTCTTTTCGCCAT
CCGAAGATAATTTTACCAACGACCTGAACAAGGGTGAAGAAATCACCAGCGATACG
AATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCT
GACCTTTAACTTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCG
ACATTATCGGTCAGCTGGAACTGATGCCGAATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAA
AAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCATTACCTGCGTGCACAGGAGTTTGA
ACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCCCTGCTGAACC
CGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCC
ACTGAGGCCGCGATGTTCCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGA
CGAGACGAGCGAAGTGAGCACTACCGACAAAATTGCTGATATTACCATCATTATCC
CGTATATTGGTCCGGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGACGATTTTGTG
GGTGCCCTGATCTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTCATTCCGGAGATTGC
GATCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCCTACATCGCGAATAAGGTTCTGA
CGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCGAAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTT
TACAAATACATTGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAGATCGACCTGAT
CCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAATTA
TCAACTACCAATACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAGAATAACATTAACTTCAAT
ATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATCAATAT
CAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATGATTCCGT
ATGGCGTCAAACGTCTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAA

TACATTTACGACAATCGTGGTACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAAAGACAA
AGTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCATTTCAACTGAGCAAGTATGTTGATA
ATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATCAATACTAGC
ATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCTAG
CAAGATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCC
AGCTGTTTAATCTGGAATCGAGCAAAATTGAGGTTATCCTGAAAAAGGCCATTGTC
TACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTCGCATCCCGAAATA
CTTCAACAAGATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACA
ACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGAC
ACCAAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAGTACTCTCAAATGATCAACATTTC
CGATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAAGAAGA
GCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGT
AATATCCACGCAAGCAACAAGATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCA
TCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAATGAGAAGG
AGATCAAAGATTTGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGG
GGCGATTATCTGCAATACGATAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAA
CAAATATGTGGATGTCAATAATGTGGGTATTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTC
CGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTGAACTCTAGCCTGTACCGTGGT
ACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATTGTGCGTAA
TAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGTGAAGAATAAAGAGTACCGTCTGGCGA
CCAACGCTTCGCAGGCGGGTGTTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGAT
GTCGGTAATCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACAAGGGTATCAC
TAACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTTATTG
GTTTCCACCAGTTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGT
CAGATTGAGCGCAGCAGCCGTACTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGA
TGATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

【０１９６】

配列番号8(改変BoNT/A「Cat-C」のポリペプチド配列)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPE
EGDLNPPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIV
RGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHE
VLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAG
HRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYY
YNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYK
MLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAAN
FNGQNTEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVN
NWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISI
ENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEA
LLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITII
IPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQ
TIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQ
YNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKR
LEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLS
TFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKI
EVILKKAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNKISLNNEYTIINCMENNSGWKVSLNYGE
IIWTLQDTKEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLKKSKIYINGRLIDQKPI
SNLGNIHASNKIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNSGILKD
FWGDYLQYDKPYYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSL
YRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIP
DVGNLSQVVVMKSKNDKGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNIAKLVASNWY

NRQIERSSRTLGCSWEFIPVDDGWGERPL

【０１９７】

配列番号９(改変BoNT/A「Cat-D」のヌクレオチド配列)

ATGCCATTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACA
TCGCATACATCAAGATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAG
ATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAGA
AGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCAGCTACTACGATT
CGACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAG
CTGTTCGAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGT
TCGCGGTATCCCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACCGAACTGAAGGTTATCG
ACACTAACTGCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTG
AATCTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTT
TGGTCACGAGGTTCTGAATCTGACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTC
GTTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAAT
CCGTTGCTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATGA
ACTGATCCACGCAGGCCACCGCCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGT
TCAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATGAGCGGCCTgGAAGTCAGCTTCGAA
GAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACAGCTTGCAAGAGAA
TGAGTTCCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACA
AGGCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTT
AAAGAGAAGTACCTGCTGTCCGAGGATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCT
GAAGTTTGACAAACTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGACAACTTTG
TGAAATTCTTCAAaGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTT
TTCaAGATTAACATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAACCT
GCGTAACACCAACCTGGCGGCGAACTTTAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACA
TGAATTTCACGAAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTCGAGTTCTATAAGCTGCTG
TGCGTGCGCGGTATCATCACCAGCAAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAACAA
GGCGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATTGGGATCTGTTCTTTTCGCCAT
CCGAAGATAATTTTACCAACGACCTGAACAAGGGTGAAGAAATCACCAGCGATACG
AATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCT
GACCTTTAACTTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCG
ACATTATCGGTCAGCTGGAACTGATGCCGAATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAA
AAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCATTACCTGCGTGCACAGGAGTTTGA
ACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCCCTGCTGAACC
CGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCC
ACTGAGGCCGCGATGTTCCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGA
CGAGACGAGCGAAGTGAGCACTACCGACAAAaTTGCTGATaTTACCATCATTATCC
CGTATATTGGTCCGGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGACGATTTTGTG
GGTGCCCTGATCTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTCATTCCGGAGATTGC
GATCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCCTACATCGCGAATAAGGTTCTGA
CGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCGAAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTT
TACAAATACATTGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCaATACCCAGATCGACCTGAT
CCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAATTA
TCAACTACCAATACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAGAATAACATTAACTTCAAT
ATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATCAATAT
CAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATGATTCCGT
ATGGCGTCAAACGTCTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAA
TACATTTACGACAATCGTGGTACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAAAGACAA
AGTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCATTTCAACTGAGCAAGTATGTTGATA
ATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATCAATACTAGC

ATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATtGATCTGAGCCGTTATGCAAGC
AAGATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCA
GCTGTTTAATCTGGAATCGAGCAAAATTGAGGTTATCCTGAAAAACGCCATTGTCT
ACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTCGCATCCCGAAATAC
TTCAACAGCATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACAA
CAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGACA
CCCAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAGTACTCTCAAATGATCAACATTTCC
GATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAATAACAG
CAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTA
ATATCCACGCAAGCAACAACATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCAT
CGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAATGAGAAGGA
GATCAAAGATTTGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGGG
GCGATTATCTGCAATACGATAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAAC
AAATATGTGGATGTCAATAATGTGGGTATTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCC
GCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTGAACTCTAGCCTGTACCGTGGTA
CGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATTGTGCGTAAT
AACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGTGAAGCGTAAAGAGTACCGTCTGGCGAC
CAACGCTTCGCAGGCGGGTGTTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTCGTG
TCCGTCGTCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACCAGGGTATCACT
AACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACCGTCGTGGTAACGACATCGGCTTTATTGG
TTTCCACCAGTTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGTC
AGATTGAGCGCCGTAGCCGTCGTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGAT
GATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

【０１９８】

配列番号１０(改変BoNT/A「Cat-D」のポリペプチド配列)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPE
EGDLNPPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIV
RGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHE
VLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAG
HRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYY
YNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYK
MLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAAN
FNGQNTEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVN
NWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISI
ENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEA
LLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITII
IPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQ
TIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQ
YNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKR
LEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLS
TFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKI
EVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWKVSLNYGE
IIWTLQDTQEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPI
SNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNSGILK
DFWGDYLQYDKPYYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSS
LYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKRKEYRLATNASQAGVEKILSALEI
PRVRRLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDRRGNDIGFIGFHQFNNIAKLVASNWY
NRQIERRSRRLGCSWEFIPVDDGWGERPL

【０１９９】

配列番号１１(改変BoNT/A「キメラ1」のポリペプチド配列)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPE
EGDLN
PPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIP
FWGG
STIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRN
GY
GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAI
NPN
RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIAST
LNKA
KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVK
FFKV
LNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFTK
LKNFT
GLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLN
KGEE
ITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFP
NG
KKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFSSDYVKKVN
KATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALI
FSG
AVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNW
LAK
VNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESI
NKA
MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDR
LKDK
VNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKSEILNNIILNLRYKDNNLIDLSGYGA
KVE
VYDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGI
QNYI
HNEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLIDINGKTKSVFFEYNIREDISEYINRWF
FVT
ITNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNT
EL
SQSNIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEIL
TRSK
YNQNSKYINYRDLYIGEKFIIRRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWRVYTY
KYF
KKEEMKLFLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRF
YES
GIVFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTEHHHHHHHHHH
H

【０２００】

配列番号１２(改変BoNT/A「キメラ２」のポリペプチド配列)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPE
EGDLN
PPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIP
FWGG

STIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRN
GY
GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAI
NPN
RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIAST
LNKA
KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVK
FFKV
LNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFTK
LKNFT
GLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLN
KGEE
ITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFP
NG
KKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFSSDYVKKVN
KATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALI
FSG
AVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNW
LAK
VNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESI
NKA
MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDR
LKDK
VNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNIIELGGGGSELSEILNNIILNLRYKD
NN
LIDLSGYGAKVEVYDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSF
WIRI
PKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLIDINGKTKSVFFEYNI
RED
ISEYINRWFFVTITNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQ
FI
WMKYFSIFNTELSQSNIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSY
IKLKK
DSPVGEILTRSKYNQNSKYINYRDLYIGEKFIIRRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFF
NL
NQEWRVYTYKYFKKEEMKLFLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEE
STDE
IGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWT
EHHH
HHHHHHH

【０２０１】

配列番号１３(改変BoNT/A「キメラ3A」のポリペプチド配列)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPE
EGDLN
PPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIP
FWGG
STIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRN
GY
GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAI

NPN
RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIAST
LNKA
KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVK
FFKV
LNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFTK
LKNFT
GLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLN
KGEE
ITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFP
NG
KKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFSSDYVKKVN
KATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALI
FSG
AVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNW
LAK
VNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESI
NKA
MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDR
LKDK
VNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNILNNIILNLRYKDNNLIDLSGYGAK
VEV
YDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQ
NYIH
NEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLIDINGKTKSVFFEYNIREDISEYINRWFF
VTI
TNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNT
ELS
QSNIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILT
RSKY
NQNSKYINYRDLYIGEKFIIRRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWRVYTYK
YFK
KEEMKLFLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYE
SG
IVFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTEHHHHHHHHHH
【０２０２】
配列番号１４(改変BoNT/A「キメラ３B」のポリペプチド配列)
MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPE
EGDLNPPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIV
RGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHE
VLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAG
HRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYY
YNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYK
MLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAAN
FNGQNTEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVN
NWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISI
ENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEA
LLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITII
IPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQ

TIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQ
YNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKR
LEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLS
TFTEYIKNILNNIILNLRYKDNNLIDLSGYGAKVEVYDGVELNDKNQFKLTSSANSKI
RVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNNSGWKISIR
GNRIIWTLIDINGKTKSVFFEYNIREDISEYINRWFFVTITNNLNNAKIYINGKLESNT
DIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIEERYKIQSYSEYLKD
FWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYINYRDLYIGE
KFIIRRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWRVYTYKYFKKEEMKLFLAPIYDS
DEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCISK
WYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE

【０２０３】

配列番号１５(改変BoNT/A「キメラ３C」のポリペプチド配列)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPE
EGDLN

PPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIP
FWGG

STIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRN
GY

GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAI
NPN

RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIAST
LNKA

KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVK
FFKV

LNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFTK
LKNFT

GLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLN
KGEE

ITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFP
NG

KKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFSSDYVKKVN
KATEA

AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALI
FSG

AVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNW
LAK

VNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESI
NKA

MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDR
LKDK

VNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNILNNIILNLRYKDNNLIDLSGYGAK
VEV

YDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQ
NYIH

NEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLIDINGKTKSVFFEYNIREDISEYINRWFF
VTI

TNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNT
ELS

QSNIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILT

RSKY
NQNSKYINYRDLYIGEKFIIRRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWRVYTYK
YFK
KEEEKLFLAPISDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYE
SG
IVFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE
【０２０４】
配列番号１６(BoNT/Bのポリペプチド配列)
MPVTINNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGRYYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKP
EDFN
KSSGIFNRDVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLLEMIINGIP
YLG
DRRVPLEEFNTNIASVTVNKLISNPGEVERKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQ
NH
FASREGFGGIMQMKFCPEYVSVFNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALILMHELIHVL
HGLY
GIKVDDLPIVPNEKKFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNFR
GIV
DRLNKVLVCISDPNININIYKNKFKDKYKFVEDSEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGFT
ETN
IAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIEEGFNISDKDMEKEYRGQNKAIN
KQA
YEEISKEHLAVYKIQMCKSVKAPGICIDVDNEDLFFIADKNSFSDDLSKNERIEYNT
QSN
YIENDFPINELILDTDLISKIELPSENTESLTDFNVDVPVYEKQPAIKKIFTDENTIF
QY
LYSQTFPLDIRDISLTSSFDDALLFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQI
VND
FVIEANKSNTMDKIADISLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFEIAGASILLEFIPEL
LI
PVVGAFLLESYIDNKNKIIKTIDNALTKRNEKWSDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIK
EGMY
KALNYQAQALEEIIKYRYNIYSEKEKSNINIDFNDINSKLNEGINQAIDNINNFINGC
SV
SYLMKKMIPLAVEKLLDFDNTLKKNLLNYIDENKLYLIGSAEYEKSKVNKYLKTIM
PFDL
SIYTNDTILIEMFNKYNSEILNNIILNLRYKDNNLIDLSGYGAKVEVYDGVELNDKN
QFK
LTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMK
NNS
GWKISIRGNRIIWTLIDINGKTKSVFFEYNIREDISEYINRWFFVTITNNLNNAKIYI
NG
KLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIEERYKIQ
SY
SEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYIN
YRDLY
IGEKFIIRRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWRVYTYKYFKKEEEKLFLAP
ISD
SDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFC
IS

KWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE

【実施例】

【０２０５】

実施例1

【０２０６】

クローニング、発現、および精製

【０２０７】

野生型BoNT/A(配列番号2)をコードするヌクレオチド配列配列番号1を変異させて次の置換を導入して、下の表1に示される4つのコンストラクトを形成した。

【表１】

| コンストラクト | 変異 | ヌクレオチド配列 | ポリペプチド配列 |
|---|---|---|---|
| Cat-A | N930K, S955K, Q991K, N1026K, N1052K, Q1229K, N886K | 3 | 4 |
| Cat-B | N930K, S955K, Q991K, N1026K, N1052K, Q1229K, N954K | 5 | 6 |
| Cat-C | N930K, S955K, Q991K, N1026K, N1052K, Q1229K, N1025K | 7 | 8 |
| Cat-D* | N1188R, D1213R, G1215R, N1216R, N1242R, N1243R, S1274R, T1277R | 9 | 10 |

表 1. コンストラクト.

*Cat-D は 7.45 の計算上の pI および 149,859 の分子量を有した。

【０２０８】

上の改変BoNT/A分子をコードするDNAコンストラクトを合成し、pJ401発現ベクターにクローニングし、それからBL21(DE3) E. coliに形質転換した。これはBL21(DE3) E. coliにおける組み換え体のCat-A、Cat-B、Cat-C、およびCat-D蛋白質の可溶性の過剰発現を許した。

【０２０９】

組み換え体の改変BoNTを古典的なクロマトグラフィー技術を用いてE. coliライセートから精製した。カチオン交換樹脂を用いる最初の精製ステップ、次に疎水性相互作用樹脂を用いる中間精製ステップを採用した。それから、組み換え体の改変BoNT一本鎖を蛋白質分解によって切断し、活性化された二本鎖の改変BoNTをもたらした。それから、残りのコンタミナントを除去するための最後の精製ステップを採用した。好適な技術はWO2015/166242、WO2017055274A1、EP2524963B1、EP2677029B1、およびUS10087432B2で教示されている。

【０２１０】

実施例2

【０２１１】

精製された改変BoNT/Aのキャラクタリゼーション

【０２１２】

上の例1に記載されている改変BoNTを次の通り実験的にキャラクタリゼーションした。

【０２１３】

pIの測定は、改変BoNTが未改変の(ネイティブな)BoNT/A1のものよりも多大な等電点を有するということを示した。下の図2および表2を見よ。

【表２】

| BoNT/A1 分子 | pI (計算) | pI (観察) |
|---|---|---|
| 改変, “Cat-A” [Cat5v2(K1064H/N886K] (配列番号 4) | 6.9 | ~8.0 |
| 改変, “Cat-B” [Cat5v2(K1064/N954K)] (配列番号 6) | 6.9 | ~8.0 |
| 改変, “Cat-C” [Cat5v2(K1064H/N1025K)] (配列番号 8) | 6.9 | 7.8-8.0 |
| 天然 BoNT/A1 [rBoNT/A1] (配列番号 2) | 6.05 | ~7.4 |

表 2. 改変 BoNT/A の pI 値.

【０２１４】

ニューロンに入りSNAP-25(BoNT/A1の標的)を切断する改変BoNTの能力を、ラット胚脊髄ニューロン(eSCN)を用いて評価した。図3は、改変BoNTがニューロンに入りSNAP-25を切断するネイティブなBoNT/A1と同じ能力を保持したということを示す。

【０２１５】

改変BoNTの力価を、マウス横隔神経半横隔膜アッセイ(mPNHD)を用いてさらに評価した。図4は、改変BoNTがマウス半横隔膜の収縮能力を阻害するネイティブなBoNT/A1と同じ能力を保持したということを示す。

【０２１６】

インビボマウス指外転(DAS)アッセイを用いて、ネイティブなBoNT/A1に対して相対的な力価および安全性を評価した。両方の分子(Cat-A[配列番号4]およびCat-B[配列番号6])は、ネイティブなBoNT/A1に対して、相対的に高い安全率を呈し、軽度に強力であった。これらのデータは下の表3で提示されている。

【表３】

| 分子 | DAS $ED_{50}$ (pg/マウス) | Dose DAS 4 (pg/マウス) | -10%ΔBW の用量 (pg/マウス) | 安全率 |
|---|---|---|---|---|
| 天然 BoNT/A1 (n=5) (配列番号 2) | 2 | 10–20 | 9.9–14.5 | 7 |
| 改変，“Cat-A” (配列番号 4) | 1.16 | 10–20 | 27.4 | 24 |
| 改変，“Cat-B” (配列番号 6) | 1.79 | 25 | 47.6 | 27 |

表 3. DAS アッセイおよび安全率.

DAS ED50: DAS 2 を誘導する計算上の用量

用量 DAS 4: DAS 4 を誘導する実験上の用量

BW: 体重

–10%ΔBW の用量: D0 の BW と比較して BW の 10%の減少を誘導する計算上の用量

安全率: -10%ΔBW の用量/DAS $ED_{50}$

【０２１７】

安全率は力価(半値指外転スコア(DAS))に対してのBoNT処置の負の効果(体重減少)の尺度である。それは-10%体重(BW)およびDAS $ED_{50}$の間の比率として計算され、ここでは、-10%BWは体重の10%減少に要求されるBoNTの量(pg/動物)を言い、$ED_{50}$は2のDASを生ずるであろうBoNTの量(pg/動物)を言う。

【０２１８】

DASアッセイは、マウス腓腹筋/ヒラメ筋複合体へのゼラチンリン酸緩衝液中に製剤された20μlの改変BoNT/Aの注射、次に、Aoki(Aoki KR, Toxicon 39: 1815-1820;2001)によって先に報告された通り指外転の評価によって行われる。

【０２１９】

実施例3

【０２２０】

BoNT/ABキメラのクローニング、発現、および精製

【０２２１】

BoNT/ABキメラコンストラクト1、2、3A、3B、および3C(それぞれ配列番号11から15)を、標準的な分子生物学技術を用いて、親の血清型の分子をコードするDNAおよび適当なオリゴヌクレオチドから構築した。それから、これらをC末端$His_{10}$タグありまたはなしのpJ401発現ベクターにクローニングし、過剰発現のためのBLR(DE3) E. coli細胞に形質転換した。これらの細胞を、37℃かつ225RPM振盪において適当な抗生物質を補った1L改変テリフィックブロス(mTB)を含有する2Lバッフル付き三角フラスコ中で育てた。ひとたび$A_{600}$が〉0.5に達すると、インキュベータ温度を16℃まで減少させ、それから、1時間後に1mM IPTGによって20hに渡って225RPM振盪で誘導して、組

み換え体のBoNT/ABコンストラクトを発現した。

【０２２２】

収穫された細胞を超音波処理によってリシスし、４５００RPMの遠心によって1hに渡って4℃で清澄化した。それから、組み換え体のBoNT/ABキメラ分子を硫酸アンモニウムによって抽出し、標準的な高速蛋白質液体クロマトグラフィー(FPLC)技術によって精製した。これには、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アニオン交換樹脂を用いることが関わった。それから、部分精製された分子をエンドプロテイナーゼLys-Cによって蛋白質分解的に切断して、活性な二本鎖をもたらした。これを第2の疎水性相互作用樹脂によってさらに精製して、最後のBoNT/ABキメラを得た。

【０２２３】

デカヒスチジンタグ($H_{10}$)を有するBoNT/ABキメラ分子では(キメラ1、2、3A)、捕捉ステップは疎水性相互作用樹脂の代わりに固定されたニッケル樹脂の使用を採用した。

【０２２４】

各キメラの配列は表4で提示されている。

【表４】

| 分子 | 配列番号 | 配列 |
|---|---|---|
| キメラ 1 | 11 | A1:1-871 + B1:858-1291 (E1191M/S1199Y) + $His_{10}$-タグ |
| キメラ 2 | 12 | A1:1-874 + ELGGGGSEL + B1:858-1291 (E1191M/S1199Y) + $His_{10}$-タグ |
| キメラ 3A | 13 | A1:1-872 + B1: 860-1291 (E1191M/S1199Y) + $His_{10}$-タグ |
| キメラ 3B | 14 | A1:1-872 + B1: 860-1291 (E1191M/S1199Y) |
| キメラ 3C | 15 | A1:1-872 + B1: 860-1291 |

表 4. キメラ BoNT/AB コンストラクト.

【０２２５】

実施例4

【０２２６】

BoNT/ABキメラ1、2、および3Aの比較

【０２２７】

C末端$His_{10}$タグおよびE1191M/S1199Y二重変異を有するBoNT/ABキメラ1、2、および3Aを、例3(図5)に記載されている通り精製し、機能活性について試験した。

【０２２８】

ラット脊髄ニューロンSNAP-25切断アッセイ

【０２２９】

ラット脊髄ニューロン(SCN)の初代培養を調製し、3週に渡って96ウェル組織培養プレート上で育てた(Masuyer et al., 2011, J. Struct. Biol. Structure and activity of a functional derivative of Clostridium botulinum neurotoxin B、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に記載されている通り)。BoNT/ABの段階希釈をSCNフィード培地によって調製した。処置されるべきウェルからの成長培地を収集し、濾過した(0.2μmフィルター)。125μLの濾過された培地を各試験ウェルに再度追加した。それから、125μLの希釈された毒素をプレートに追加した(3重のウェル)。処置され

た細胞を37℃、10％$CO_2$で24±1hに渡ってインキュベーションした)。

【０２３０】

SNAP-25切断アッセイを用いるBoNT活性の分析

【０２３１】

処置後に、BoNTを除去し、細胞をPBS(Gibco、UK)で1回洗浄した。細胞を、0.1Mジチオトレイトール(DTT)および250単位/mLベンゾナーゼ(Sigma)を補った1×NuPAGEリシス緩衝液(Life Technologies)によってリシスした。ライセート蛋白質をSDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロース膜にトランスファーした。膜を、未切断のSNAP-25および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)によって探索した。用いられた二次抗体はHRPコンジュゲート化抗ウサギIgG(Sigma #A6154)であった。バンドを増強化学発光によって検出し、pXi6 Access(Synoptics、UK)を用いてイメージングした。バンドの強度をGeneToolsソフトウェア(Syngene、ケンブリッジ、UK)を用いて決定し、BoNTの各濃度で切断されたSNAP-25のパーセンテージを計算した。データを4パラメータロジスティック方程式に当てはめ、$pEC_{50}$をGraphPad Prismバージョン6(GraphPad)を用いて計算した。

【０２３２】

下の表5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$pEC_{50}$値を提供する。これらの結果は、3つのBoNT/ABキメラがラット脊髄ニューロンに入りそれらの標的基質を切断する能力を保持したということを示す。しかしながら、キメラ3Aはこのアッセイではキメラ1および2よりも強力であった(図6をもまた見よ)。

【表５】

| | $pEC_{50}$ ±SEM |
|---|---|
| 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 5. $pEC_{50}$ 値.

【０２３３】

指外転スコア付け(DAS)アッセイ

【０２３４】

DASアッセイにおいてBoNT/ABキメラ1、2、および3Aの活性を測定するための方法は、尾で手短にぶら下げられたときのマウスの驚愕反応足趾広げ反射に基づく。この反射は指外転スコア(DAS)としてスコア付けされ、後肢の足の腓腹筋-ヒラメ筋の筋肉へのBoNTの投与後に阻害される。マウスは特徴的な驚愕反応を誘発するために尾で手短にぶら下げられる。これにおいては、動物はその後肢を伸展し、その後肢指を外転する(Aoki et al. 1999, Eur. J. Neurol.;6 (suppl. 4) S3-S10)。

【０２３５】

注射の日に、マウスを酸素中のイソフルラン3％を受ける導入チャンバー内で麻酔した。各マウスはBoNT/ABキメラまたは基剤(0.2％ゼラチンを含有するリン酸緩衝液)の筋肉内注射を右後肢の足の腓腹筋-ヒラメ筋の筋肉に受けた。

【０２３６】

神経毒素注射後に、様々な度合いの指外転を、指外転および足伸展の0=正常および4=最大の縮減であるゼロから4のスケールでスコア付けした。ED50を、各用量における最大の効果の平均を用いて非線形調整分析によって決定した。用いられた数理モデルは4パラメータロジスティックモデルであった。

【０２３７】
ＤＡＳを投薬後の第１日に２時間毎に行った。その後、それを４日に渡って１日３回行った。
【０２３８】
図７はキメラ１、２、および３Ａ(それぞれ配列番号１１、１２、および１３)の当てはめ曲線を示す。キメラ３Ａ曲線は左にシフトし、より低い用量のキメラ３Ａがキメラ１および２と比較して類似のＤＡＳ反応を達成したということを意味し、よって、キメラ３ＡがマウスＤＡＳアッセイにおいて他よりも強力であるということを示している。下の表(表６)をもまた見よ。これは、計算上のＥＤ５０およびＤＡＳ ４(最も高いスコア)に至る用量の値を各キメラについて提供する。
【０２３９】
下の表６は、未改変の組み換え体のＢｏＮＴ/Ａ１(ｒＢｏＮＴ/Ａ１-配列番号２)ならびにキメラ１、２、および３Ａについてマウスアッセイにおいて決定されたＥＤ$_{50}$およびＤＡＳ ４用量を提供する。これらの結果は、３つのキメラのうち、キメラ３Ａが筋力低下を誘導することにおいて最も高いインビボ力価を有するということを示す。図７および表６に示されている研究はチャールズ・リバー・ラボラトリーズから得られたマウスで行った。
【表６】

| | 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 |

表 6. ED$_{50}$ 値.

【０２４０】
実施例５
【０２４１】
ＢｏＮＴ/ＡＢキメラ３Ｂ、３Ｃ、および未改変のＢｏＮＴ/Ａ１の比較
【０２４２】
それぞれＥ１１９１Ｍ/Ｓ１１９９Ｙ二重変異の存在ありまたはなしのタグなしＢｏＮＴ/ＡＢキメラ３Ｂおよび３Ｃ(配列番号１４および１５)を、例３(図８)に記載されている通り精製し、機能活性について試験した。未改変のＢｏＮＴ/Ａ(配列番号２)を参照として用いた。
【０２４３】
ヒト多能性幹細胞ＳＮＡＰ-２５切断アッセイ
【０２４４】
凍結保存されたＰＥＲＩ.４Ｕ細胞をＡｘｉｏｇｅｎｅｓｉｓ(ケルン、ドイツ)から購入した。細胞の融解およびプレーティングを製造者によって推奨される通り行った。手短には、細胞を含有するクライオバイアルを２分の３７℃の水浴によって融解した。穏やかな再懸濁後に、細胞を５０ｍＬチューブに移した。クライオバイアルを製造者によって供給された１ｍＬのＰｅｒｉ.４Ｕ(登録商標)融解培地によって洗浄し、さらなる２ｍＬのＰｅｒｉ.４Ｕ(登録商標)融解培地を５０ｍＬチューブに滴下することに先立って、培地を細胞懸濁液に５０ｍＬチューブに滴加した。それから、細胞をヘモサイトメーターを用いてカウントした。これの後に、さらなる６ｍＬのＰｅｒｉ.４Ｕ(登録商標)融解培地を細胞懸濁液に追加した。細胞ペレットを室温での６分の２６０×ｇ(例えば１,１００ＲＰＭ)の遠心によって得た。それから、細胞を製造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、ｃｍ$^2$あたり５

0,000から150,000細胞の密度で、ポリL-オルニチンおよびラミニンによってコーティングされた細胞培養プレートにプレーティングした。細胞を37℃で加湿$CO_2$雰囲気において培養し、培地を培養の間に2～3日毎に完全に交換した。

【０２４５】

毒素処置のために、BoNTの段階希釈をPeri.4U(登録商標)培養培地によって調製した。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の濾過された培地を各試験ウェルに再度追加した。それから、125μLの希釈された毒素をプレートに追加した(3重のウェル)。処置された細胞を37℃、10%$CO_2$で48±1hに渡ってインキュベーションした)。

【０２４６】

SNAP-25切断アッセイを用いるBoNT活性の分析

【０２４７】

処置後に、BoNTを除去し、細胞をPBS(Gibco、UK)で1回洗浄した。細胞を、0.1Mジチオトレイトール(DTT)および250単位/mLベンゾナーゼ(Sigma)を補った1×NuPAGEリシス緩衝液(Life Technologies)によってリシスした。ライセート蛋白質をSDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロース膜にトランスファーした。膜を、未切断のSNAP-25および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)によって探索した。用いられた二次抗体はHRPコンジュゲート化抗ウサギIgG(Sigma #A6154)であった。バンドを増強化学発光によって検出し、pXi6 Access(Synoptics、UK)を用いてイメージングした。バンドの強度をGeneToolsソフトウェア(Syngene、ケンブリッジ、UK)を用いて決定し、BoNTの各濃度で切断されたSNAP-25のパーセンテージを計算した。データを4パラメータロジスティック方程式に当てはめ、$pEC_{50}$をGraphPad Prismバージョン6(GraphPad)を用いて計算した。

【０２４８】

図9は、キメラ3Bおよび3CがヒトiPS細胞においてSNAP-25を切断することにおいてrBoNT/A1よりも多大な力価を呈したが、前者は有意によりそうであったということを示す。これは、これらの細胞に存在するヒトシナプトタグミンII蛋白質受容体に対するキメラ3Bの親和性を増大させる二重変異によって説明され得る(図9、表7)。

【表７】

| | $pEC_{50}$ ±SEM |
|---|---|
| rBoNT/A1 | 10.21 ±0.05 |
| キメラ 3B | 12.38 ±0.06 |
| キメラ 3C | 10.72 ±0.08 |

表 7. $pEC_{50}$ 値.

【０２４９】

指外転スコア付け(DAS)アッセイ-安全率

【０２５０】

DASアッセイにおいてBoNTの活性を測定するための方法は、尾で手短にぶら下げられたときのマウスの驚愕反応足趾広げ反射に基づく。この反射は指外転スコア(DAS)としてスコア付けされ、後肢の足の腓腹筋-ヒラメ筋の筋肉へのBoNTの投与後に阻害される。マウスは特徴的な驚愕反応を誘発するために尾で手短にぶら下げられる。これにおいては、動物はその後肢を伸展し、その後肢指を外転する(Aoki et al. 1999, Eur. J. Neurol.;6 (suppl. 4) S3-S10)。

【０２５１】

注射の日に、マウスを酸素中のイソフルラン3%を受ける導入チャンバー内で麻酔した

。各マウスはBoNTまたは基剤(0.2%ゼラチンを含有するリン酸緩衝液)の筋肉内注射を右後肢の足の腓腹筋-ヒラメ筋に受けた。

【０２５２】

神経毒素注射後に、様々な度合いの指外転を、指外転および足伸展の0=正常および4=最大の縮減であるゼロから4のスケールでスコア付けした。ED50を、各用量における最大の効果の平均を用いて非線形調整分析によって決定した。用いられた数理モデルは4パラメータロジスティックモデルであった。

【０２５３】

DASを投薬後の第1日に2時間毎に行った。その後、それを全ての用量について4日に渡って1日3回行った。注射の最初の4日間に4のDASを誘導する最も低い用量および基剤を注射された群の動物は、その後、0のDAS(観察される筋力低下なし)への筋力低下の完全な回復までモニタリングされた。

【０２５４】

安全率の計算のために、全ての動物を毒素注射の前の日(D0)に、およびその後は研究の持続期間に渡って毎日1回秤量した。平均の体重、その標準偏差、および標準誤差の平均を各用量群について毎日計算した。BoNTの安全率(-10%ΔBW/$ED_{50}$)を得るために、研究の間のいずれかの時間において、ある用量群の平均体重がその同じ用量群のD0における平均体重の10%よりも低い用量を、研究されたBoNTの$ED_{50}$によって除算した。致死量はその用量群の動物の1匹以上が死んだ用量として定義された。

【０２５５】

図10は、マウス指外転スコア付けアッセイにおける経時的な筋力低下の持続期間を未改変のBoNT/A、キメラ3B、およびキメラ3C(配列番号2、14、および15)について示し、キメラがより長い作用持続期間を有するということを示している。

【０２５６】

下の表8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$ED_{50}$およびDAS 4用量を提供する。表は、0のDAS(観察される筋力低下なし)への筋力低下の完全な回復までのDAS 4用量の総計の作用持続期間をもまた提供する。加えて、表は、上の本文で定義される通り、マウス致死量および安全率(-10%ΔBW/$ED_{50}$)を示す。rBoNT/A1と比較して、キメラ3Bおよび3Cは長い作用持続期間、良好な安全率、および高い致死量を有する。図10および表8に示されている研究はJanvier laboratoriesから得られたマウスで行われた。

【表８】

| | $ED_{50}$ (DAS 2) 用量 (pg/マウス) | DAS 4 用量 (pg/マウス) | 最も低い DAS 4 用量による総計の作用持続期間(日) | マウス致死量 (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 8. BoNT/AB キメラの DAS および安全率.

【０２５７】

実施例6

【０２５８】

改変BoNT/A(配列番号4)の前臨床試験

【０２５９】

改変BoNT/A「Cat-A」(配列番号4)を追加の前臨床試験に付した。

【０２６０】

材料および方法

【０２６１】

ラット指外転スコア(DAS)アッセイ

【０２６２】

インビボの筋肉活動に対する改変BoNT/A(配列番号4)の効果を評価するために、ラットDASアッセイを用いる用量反応研究を実施した。ラットDASアッセイは、動物が手短に掴まれたときの特徴的な驚愕反応の足趾広げ反射に基づく。左の腓骨筋複合体への単回神経毒素注射後に、筋力低下は指外転の縮減をもたらす。指外転の様々な度合いは以下の5点スケールでスコア付けされる:指外転および足伸展の0=正常から4=最大の縮減(Broide RS, Rubino J, Nicholson GS, et al. The rat Digit Abduction Score (DAS) assay: A physiological model for assessing botulinum neurotoxin-induced skeletal muscle paralysis. Toxicon 2013;71:18-24)。DAS値を、毒素注射後の最初の連続5日に渡ってかつこれの後は2から3日のインターバルで、より低い用量では足趾広げ反射に対する改変BoNT/A(配列番号4)の効果の完全な消失まで、DAS4をもたらす用量ではDAS2への回復まで測定した。体重増加に対する一過的なBoNTによって誘導される用量依存的効果は、全身性の毒素効果の証拠と考えられる(Torii Y, Goto Y, Nakahira S, et al. Comparison of Systemic Toxicity between Botulinum Toxin Subtypes A1 and A2 in Mice and Rats. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2015;116:524-528.)。各評価時点において、ラットは最終的に秤量され、副作用が注記された。BoNTの投薬溶液は注射前にかつ研究の終わりまでマスキングされた(ランダムな文字を割り当てられた)。力価は効果の50%を誘導するために必要とされる用量として決定された($ED_{50}$:2のDAS値に至る用量)。$ED_{50}$および95%信頼区間(CI)を決定するために、2.5および750pg/kgの間の範囲である用量を試験した。1、1.5、2、2.4、3、4、および5ng/kgというより高い用量をもまた投与して、可能な副作用を評価した。

【０２６３】

改変BoNT/A(配列番号4)の作用持続期間を評価し、それを未改変のBoNT/A(配列番号2)の作用持続期間と比較するために、2のDAS2読み取りまで戻るために必要なメジアン時間を、両方の毒素の最大耐用量(無処置のラットと比較して体重の発達に対するインパクトなし)について2つの独立した直接的なヘッド・トゥ・ヘッド研究において評価した。

【０２６４】

ラット単一用量研究

【０２６５】

ラットは、右腓腹筋に投与された0、0.1、1、および3ng/kgの用量において、改変BoNT/A(配列番号4)の単回筋肉内(i.m.)注射を受けた。対照動物は配列番号4希釈剤を右腓腹筋に受けた。動物は処置の7日後に(群あたり10匹の雄および10匹の雌)または13もしくは26週の観察期間後に(用量あたり5匹の雄および5匹の雌)安楽死させた。中枢神経系機能の評価のためのIrwin試験観察を試験前(第-1日)、第8日、ならびに第13および27週に行った。評価された他の臨床的(有害)徴候は、跛行、小さい毒素注射された筋肉サイズ、および軟かい膨満した腹部であった。

【０２６６】

サル研究

【０２６７】

サルは、右腓腹筋に投与された改変BoNT/A(配列番号4)の0、0.1、0.25、および0.75ng/kgの単回i.m.用量を受けた。動物は処置の7日後に(群あたり3匹の雄および3匹の雌)または13もしくは26週の観察期間後に(用量あたり2匹の雄および2匹の雌)安楽死させた。血行力学、心電図、および呼吸器パラメータを包含する心血管検査を、体外テレメトリーによって試験前、第8および15日に行った。

【０２６８】

妊娠ラットにおける予備的な拡充型EFD

【０２６９】

研究の目的は、器官形成の期間に渡ってi.m.経路によって投与されるときに、ラットの胚および胎児発生に対する改変BoNT/A(配列番号4)の効果についての最初の情報を提供することであった。改変BoNT/A(配列番号4)を、毎日のi.m.注射(腓腹筋)によって、0.02、0.05、および0.1ng/kg/日の用量レベルで、9匹の交配した雌スプラーグドーリーラットの群に、それらを含めて妊娠の第6(G6)から17(G17)日まで投与した。臨床的状態、体重、および食物消費は研究の間モニタリングされた。雌をG21に帝王切開検査に付し、胎仔パラメータを記録した。剖検時に、雌を肉眼検査し、妊娠子宮を秤量し、小さい注射された腓腹筋を提示したものでは、この筋肉および反対側の筋肉を秤量した。全ての胎児は秤量された。それから、胎児を外観および内臓異常について検査し、性別判定した。胎児のおよそ半分の頭部を連続切片化による内科的検査のために固定した。全ての胎児の内臓摘出された死骸を骨格検査のために処理した。

【０２７０】

妊娠ウサギにおける予備的な拡充型(extended)EFD

【０２７１】

研究の目的は、i.m.経路によって器官形成の期間に渡って投与されるときに、ウサギの胚および胎児発生に対する改変BoNT/A(配列番号4)の効果についての最初の情報を提供することであった。改変BoNT/A(配列番号4)を、毎日のi.m.注射(腓腹筋)によって、0.002、0.005、および0.01ng/kg/日の用量レベルで、9匹の交配した雌ニュージーランドホワイトウサギの群に、それらを含めて妊娠の第6(G6)から19(G19)日まで投与した。臨床的状態、体重、および食物消費は研究の間モニタリングされた。雌をG29に帝王切開検査に付し、胎仔パラメータを記録した。剖検時に、雌を肉眼検査し、妊娠子宮を秤量し、小さい注射された腓腹筋を提示したものでは、この筋肉および反対側の筋肉を秤量した。全ての胎児は秤量された。それから、胎児を外観および内臓異常について検査し、性別判定した。胎児のおよそ半分の頭部を連続切片化による内科的検査のために固定した。

【０２７２】

結果

【０２７３】

上で指示されている研究を実施することによって、次の薬理学的データ(下の表9に指示されている)が、改変BoNT/Aを投与されたいくつもの異なる種について得られた。

【表９】

| 動物 | 研究の型 | 結果 |
|---|---|---|
| マウス | LD50 IP | 0.422 ng/kg |
| ラット | DAS | ED50 0.013 ng/kg<br>DAS4 0.125 pg/kg |
| | CMAP 単一用量<br>遠隔への広がり | 0.002 ng/kg: 広がりなし<br>0.3 ng/kg: -25%<br>0.8 ng/kg: -56% |
| | 単一用量 | 推定 NOAEL 1.5 ng/kg<br>推定 致死 3 ng/kg |

表 9. 前臨床結果.

【０２７４】

加えて、改変BoNT/A(配列番号4)をラットDASアッセイにおいて試験して、Dysport(登録商標)と比較されたときの作用持続期間を決定した。結果は下の表10で提示されている。

【表１０】

| | Dysport®<br>3 U/ラット<br>15 U/kg | 改変 BoNT/A<br>150 pg/ラット<br>0.750 ng/kg |
|---|---|---|
| 作用持続期間(メジアン日) | 21.9 | 46.4 |

表 10. 作用持続期間.

【０２７５】
これらのデータは、改変BoNT/AがDysport(登録商標)のものの二倍超の作用持続期間を有するということを示す。
【０２７６】
実施例7
【０２７７】
顔面の皺を処置するための改変BoNT/A(配列番号4)の単位用量の計算
【０２７８】
上の例6で得られた前臨床薬理学データから判断して、ヒトにおける改変BoNT/Aの投与のための好適な単位用量範囲(UD)が計算された。研究は、改変BoNT/Aが未改変のBoNT/Aよりも長い作用持続期間を提供しながら、同時に改善された安全性プロファイルを見せるということを示している。この改善された安全性プロファイルは、改変BoNT/Aについて本明細書に記載される高い安全率によって表現され得る。
【０２７９】
改変BoNT/Aは(その改変された特性を原因とする増大した治療指数(すなわち増大した安全率)にもかかわらず)Dysport(登録商標)と同じ作用機序を共有するので、顔面の皺を有する対象を処置するための改変BoNT/Aの最も低い用量は、同一の筋肉群におけるDysport(登録商標)の添付文書の用量に関連して文脈に位置付けられた。
・指外転スコアラットモデルにおいて、臨床使用を意図するバッチによる改変BoNT/A の $ED_{50}$ は13pg/kgであり、同じ動物種における1500pg/kgという推定無毒性量(NOAEL)よりも100倍超低い。対応するアロメトリック係数の適用後に、このED50は130pgというヒト等価用量(HED)に翻訳され得る。DASのラット知見に基づくと、100pgの改変BoNT/ABはおよそ4Uの市販Azzalure/Dysportの用量に匹敵する(eastimate to)であろう。同じアプローチが、Azzalure/Dysportの確定されたDASラットED50(すなわち、0.5U/kgというED50)を用いて初回用量の計算のために適用される場合には、これは5Uという総計の初回用量に等しいであろう。これは、中等症から重症のGLの一時的な改善のための50Uという総計の承認用量の1/10である。
・腹腔内マウスLD50は0.422ng/kg(8.44pg/匹)で確定された。これらの条件下では、改変BoNT/Aの0.84ngの用量は100U Dysport(登録商標)の用量に対応する。
【０２８０】
計算上の最も低い総計の初回用量はそれゆえに100pgである。いくらかの文脈を提供するために、上の腹腔内マウス $LD_{50}$ データを用いると、100pgの改変BoNT/Aはおよそ12U Dysport(登録商標)に等しく、それゆえに、顔面の皺の処置のために筋肉内投与されるときに活性であろう。
【０２８１】
それゆえに、単位用量の上限は、4800pgという対象に投与される総用量で、300pg(0.3ng)であると計算される。なぜなら、これはヒト用量に翻訳されたラットNOAELよりも下に留まるからである。
【０２８２】
それゆえに、改変BoNT/Aを用いる顔面の皺の処置のための好適な単位用量は20～300pgと計算された。得られた前臨床データに基づくと、これは、マウス腹腔内致死量アッセイを用いて決定されるマウスにおける計算上の腹腔内半数致死量( $LD_{50}$ )に基づく改

変BoNT/Aの2～35単位である。

【０２８３】

有利には、改変BoNT/Aは、顔面の皺の処置において、最大用量に達する前に、より多大な数の筋肉に注射され得る。これは、より多大な範囲の処置オプションを臨床医に提供しながら上顔面の皺の改善された処置に至る有意なかつ有利な知見である。

【０２８４】

実施例8

【０２８５】

眉間の皺を処置するための投与計画

【０２８６】

改変BoNT/Aが、バイアルあたり15ngの改変BoNT/Aを含有する2mL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、無菌塩化ナトリウム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緩衝液)の混合物によって水戻しされる。水戻し後に、溶液は必要に応じてさらに希釈される。

【０２８７】

中等症から重症の眉間の皺が、図11に示されている注射レジメンに従って処置される。

【０２８８】

単位用量は20～300pg(2～35単位)である。

【０２８９】

筋肉内注射が単位用量に従って最大で5部位において投与される。投与される最大の総用量は1500pg(177単位)である。

【０２９０】

実施例9

【０２９１】

眉間の皺および額の皺を処置するための投与計画

【０２９２】

改変BoNT/Aが、バイアルあたり15ngの改変BoNT/Aを含有する2mL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、無菌塩化ナトリウム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緩衝液)の混合物によって水戻しされる。水戻し後に、溶液は必要に応じてさらに希釈される。

【０２９３】

中等症から重症の眉間のおよび額の皺が、図12に示されている注射レジメンに従って処置される。

【０２９４】

単位用量は20～300pg(2～35単位)である。

【０２９５】

筋肉内注射が単位用量に従って最大で10部位において投与される。投与される最大の総用量は3000pg(355単位)である。

【０２９６】

実施例10

【０２９７】

外眼角の皺を処置するための投与計画

【０２９８】

改変BoNT/Aが、バイアルあたり15ngの改変BoNT/Aを含有する2mL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、無菌塩化ナトリウム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緩衝液)の混合物によって水戻しされる。水戻し後に、溶液は必要に応じてさらに希釈される。

【０２９９】

中等症から重症の外眼角の皺が、図13に示されている注射レジメンに従って処置される。

【０３００】
単位用量は20～300pg(2～35単位)である。
【０３０１】
筋肉内注射が単位用量に従って最大で6部位において投与される。投与される最大の総用量は1800pg(213単位)である。
【０３０２】
実施例11
【０３０３】
眉間の、額の、および外眼角の皺を処置するための投与計画
【０３０４】
改変BoNT/Aが、バイアルあたり15ngの改変BoNT/Aを含有する2mL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、無菌塩化ナトリウム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緩衝液)の混合物によって水戻しされる。水戻し後に、溶液は必要に応じてさらに希釈される。
【０３０５】
中等症から重症の眉間の、額の、および外眼角の皺が、図14に示されている注射レジメンに従って処置される。
【０３０６】
単位用量は20～300pg(2～35単位)である。
【０３０７】
筋肉内注射が単位用量に従って最大で16部位において投与される。投与される最大の総用量は4800pg(569単位)である。
【０３０８】
実施例12
【０３０９】
改変BoNT/A(配列番号14)のさらなるキャラクタリゼーション
【０３１０】
BoNT/ABキメラ配列番号14をマウス$LD_{50}$アッセイにおいて試験し、1.202ng/kgの結果をもたらした。よって、配列番号14の1単位はこのアッセイでは24.04pgに対応する。
【０３１１】
加えて、前記BoNT/ABキメラをラットDASアッセイにおいて試験して、Dysport(登録商標)と比較されるときの作用持続期間を決定した(例6に従う)。結果は下の表13で提示されている。
【表１３】

| | Dysport®<br>3 U/ラット<br>15 U/kg | BoNT/AB<br>300 pg/ラット<br>1.5 ng/kg |
|---|---|---|
| 作用持続期間(メジアン日) | 21.9 | 47.7 |

表 13. 作用持続期間.

【０３１２】
結論として、BoNT/ABの作用持続期間はDysport(登録商標)よりもかなり高く、配列番号4のものに類似であった。それゆえに、配列番号4の単位用量および投与計画は、類似にBoNT/ABに適用されて顔面の皺の改善された処置を提供し得るということが予想される。
【０３１３】
実施例13
【０３１４】
上顔面の皺のための改変BoNT/A(配列番号14)の単位用量の計算

【０３１５】
前臨床薬理学データから判断して、ヒトにおける改変BoNT/Aの投与のための好適な単位用量範囲(UD)が計算された。
【０３１６】
13pg/kgというDAS $ED_{50}$が配列番号14について計算された。$ED_{50}$は最小の薬理活性な用量と考えられ、これは同じ動物種における4ng/kgという無毒性量(NOAEL)よりもおよそ300倍低い。ラットにおける配列番号14の13pg/kgという$ED_{50}$は、60kgの体重のヒトでは0.8ng用量に対応する。
【０３１７】
それゆえに、20pgという単位用量の下限が選択された。1500pgという単位用量の上限が選択された。これは、60kgの体重のヒトの用量に変換された両方の非臨床安全性種(ラットおよびサル)からの4ng/kgのNOAELよりも低い。
【０３１８】
改善された安全性プロファイルから判断して、上顔面の皺の処置のための最大の総用量は24,000pgに設定された。これは、60kgの体重のヒトの用量に変換された両方の非臨床安全性種(ラットおよびサル)からの4ng/kgのNOAELに由来する。
【０３１９】
実施例14
【０３２０】
改変BoNT/A(配列番号14)を用いて眉間の皺を処置するための投与計画
【０３２１】
改変BoNT/Aが、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。凍結乾燥粉末は水戻しされる。
【０３２２】
中等症から重症の眉間の皺が、図11に示されている注射レジメンに従って処置される。
【０３２３】
単位用量は20～1500pg(0.8～62単位)である。
【０３２４】
筋肉内注射が単位用量に従って最大で5部位において投与される。投与される最大の総用量は7500pg(312単位)である。
【０３２５】
実施例15
【０３２６】
改変BoNT/A(配列番号14)を用いて眉間の皺および額の皺を処置するための投与計画
【０３２７】
改変BoNT/Aが、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。凍結乾燥粉末は水戻しされる。
【０３２８】
中等症から重症の眉間のおよび額の皺が、図12に示されている注射レジメンに従って処置される。
【０３２９】
単位用量は20～1500pg(0.8～62単位)である。
【０３３０】
筋肉内注射が単位用量に従って最大で10部位において投与される。投与される最大の総用量は15,000pg(624単位)である。
【０３３１】
実施例16
【０３３２】
改変BoNT/A(配列番号14)を用いて外眼角の皺を処置するための投与計画
【０３３３】

改変BoNT/Aが、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。凍結乾燥粉末は水戻しされる。

【０３３４】

中等症から重症の外眼角の皺が、図13に示されている注射レジメンに従って処置される。

【０３３５】

単位用量は20～1500pg(0.8～62単位)である。

【０３３６】

筋肉内注射が単位用量に従って最大で6部位において投与される。投与される最大の総用量は9000pg(374単位)である。

【０３３７】

実施例17

【０３３８】

改変BoNT/A(配列番号14)を用いて眉間の、額の、および外眼角の皺を処置するための投与計画

【０３３９】

改変BoNT/Aが、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。凍結乾燥粉末は水戻しされる。

【０３４０】

中等症から重症の眉間の、額の、および外眼角の皺が、図14に示されている注射レジメンに従って処置される。

【０３４１】

単位用量は20～1500pg(0.8～62単位)である。

【０３４２】

筋肉内注射が単位用量に従って最大で16部位において投与される。投与される最大の総用量は24,000pg(998単位)である。

【０３４３】

上の明細書において挙げられている全ての刊行物は参照によって本明細書に組み込まれる。本発明に記載される方法および系の種々の改変および変形は、本発明の範囲および趣旨から外れることなしに当業者には明らかであろう。本発明は具体的な好ましい実施形態とのつながりで記載されたが、請求される本発明はかかる具体的な実施形態に不当に限定されるべきではないということは理解されるべきである。実際に、生化学およびバイオテクノロジーまたは関係する分野の当業者には自明である本発明を実施するための記載された形態の種々の改変は、次の特許請求の範囲内であることが意図される。

【符号の説明】

【０３４４】

[図1]

Indication: 適応症

Recommended Concentration: 推奨濃度

Recommended DYSPORT Dose: 推奨DYSPORT用量

Glabellar Lines: 眉間の皺

Adults: 成人

Units: 単位

or: または

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、、または50単位, 各10単位(0.05mL)の5つの等しいアリコートに分割

[図2]

Marker: マーカー

[図3A,B,C]
% SNAP-25 cleavage: SNAP-25切断百分率
Basal: 基底
[図3D]
mean: 平均
log units: log単位
less potent: 強力でない
[図4]
min: 分
Batch: バッチ
mean min ± sem: 平均 分±平均値の標準誤差
[図5]
Marker: マーカー
SEQ ID NO: 配列番号
[図6]
% SNAP-25 cleavage: SNAP-25切断百分率
in rat spinal cord neurones: ラット脊髄ニューロン中
SEQ ID NO: 配列番号
[図7]
Mean DAS: 平均DAS
Dose: 用量
pg/mouse: pg/マウス
SEQ ID NO: 配列番号
[図8]
Marker: マーカー
SEQ ID NO: 配列番号
[図9]
% SNAP-25 cleavage: SNAP-25切断百分率
in human pluripotent stem cells: ヒト多能性幹細胞中
SEQ ID NO: 配列番号
[図10]
SEQ ID NO: 配列番号
Time (day): 時間(日)
[図11]
Glabellar line injection point: 眉間の皺注射点
[図12]
Glabellar line injection point: 眉間の皺注射点
Forehead lines injection point: 額の皺注射点
[図14]
Glabellar line injection point: 眉間の皺注射点
Lateral canthal line injection point: 外眼角の皺注射点
Forehead lines injection point: 額の皺注射点

【図面】

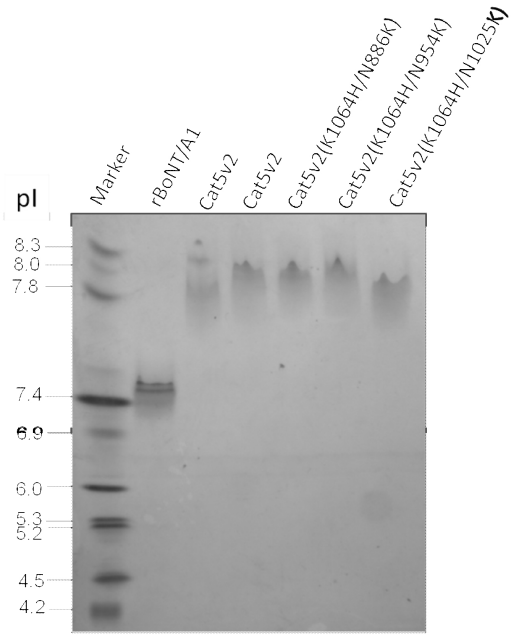
【図１】

FIGURE 1

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

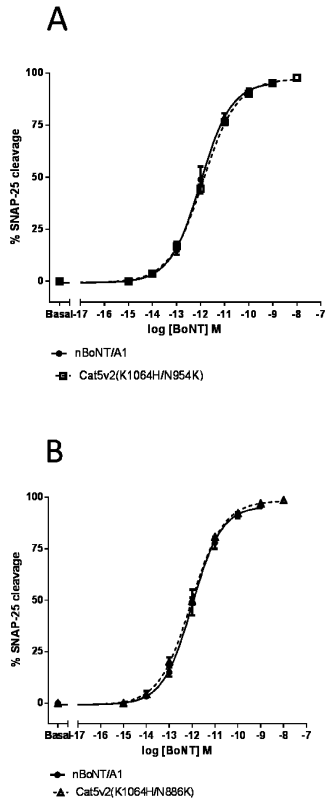
【図２】

FIGURE 2



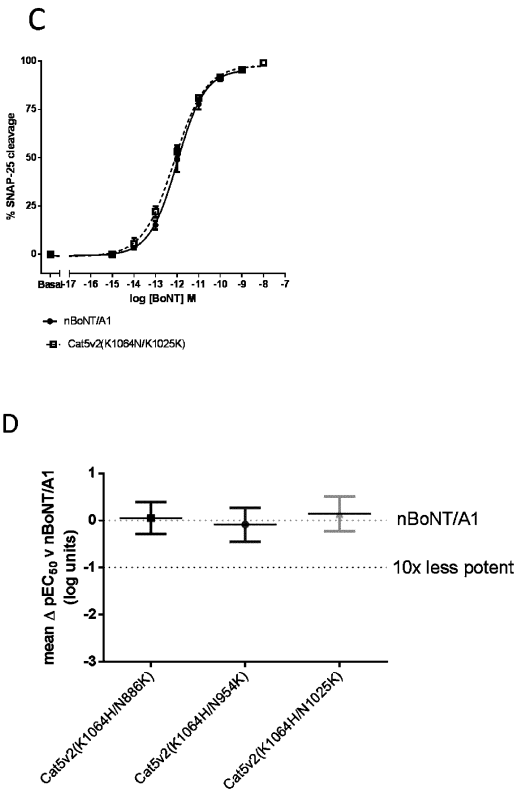

【図３Ａ Ｂ】

FIGURE 3



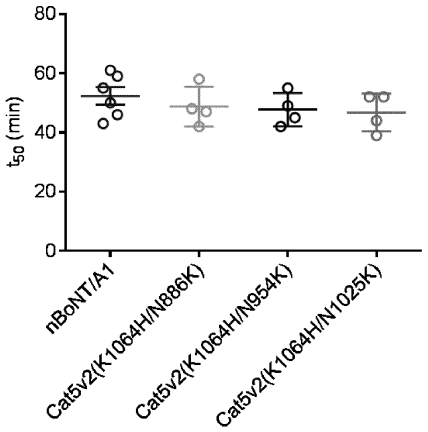

【図３Ｃ Ｄ】

FIGURE 3 (CONTINUED)



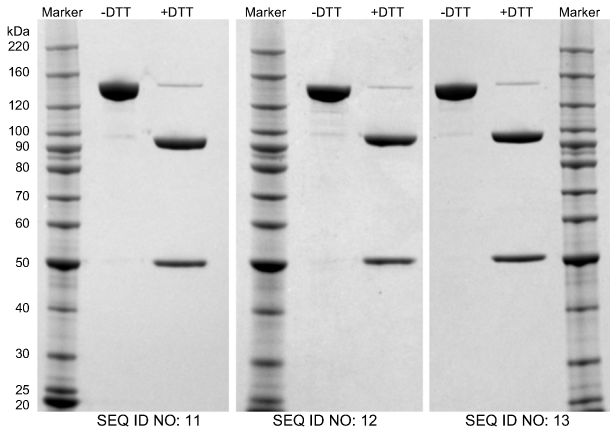
【図４】

FIGURE 4




【図５】

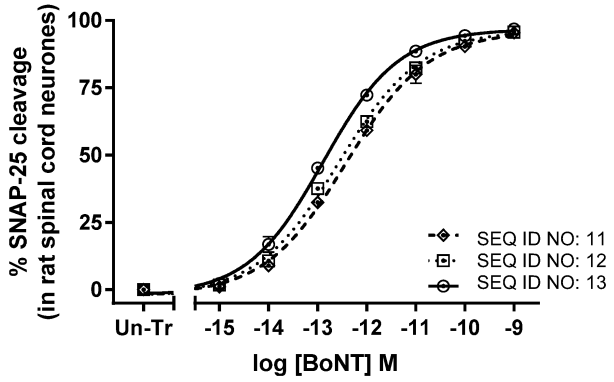
FIGURE 5




| SXN/Batch | $t_{50}$ (mean min ± sem) |
|---|---|
| nBoNT/A1 | 52 ± 3 |
| Cat5v2(K1064H/N886K) | 49 ± 3 |
| Cat5v2(K1064H/N954K) | 48 ± 3 |
| Cat5v2(K1064H/N1025K) | 47 ± 3 |

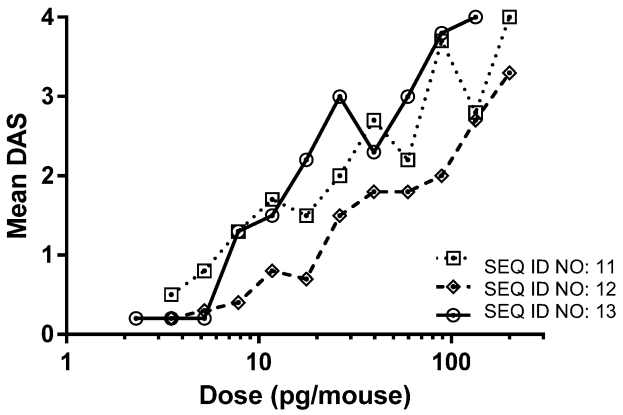
【図６】

FIGURE 6



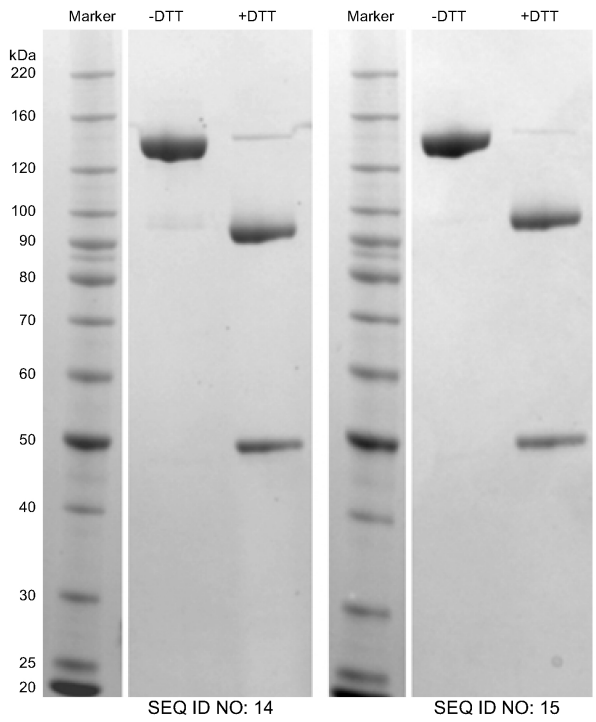

【図７】

FIGURE 7



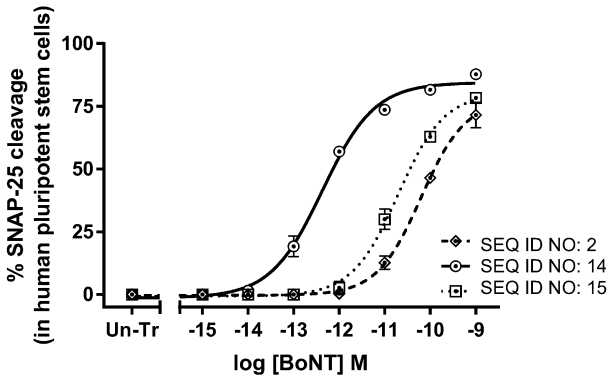
【図８】

FIGURE 8



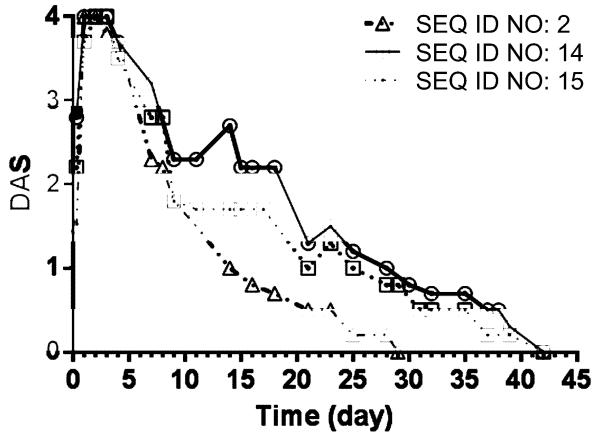

【図９】

FIGURE 9



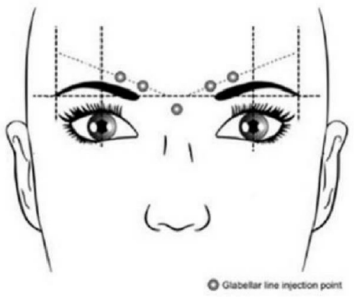

【図１０】

FIGURE 10



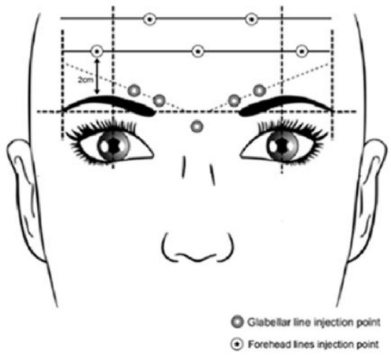

【図１１】

FIGURE 11



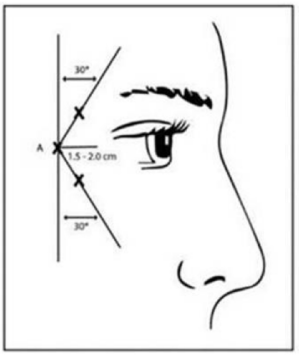
【図１２】

FIGURE 12



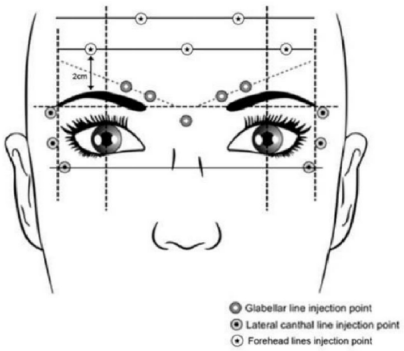

【図１３】

FIGURE 13




【図１４】

FIGURE 14




【配列表】

<u>２０２３５１７７２７０００００１.ａｐｐ</u>

【国際調査報告】

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/050659

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K8/66 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, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, EMBL, INSPEC, CHEM ABS Data, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | WO 2015/004461 A1 (SYNTAXIN LTD [GB])<br>15 January 2015 (2015-01-15)<br>cited in the application<br>pages 4-10, 20; claims; examples<br>pages 51-52 | 1-7,<br>15-29 |
| X | WO 2017/055274 A1 (IPSEN BIOPHARM LTD [GB]) 6 April 2017 (2017-04-06)<br>cited in the application<br>pages 4-6; claims; examples; sequences<br>15-22 | 1-7,<br>15-29 |
| X | WO 2017/191315 A1 (IPSEN BIOPHARM LTD [GB]) 9 November 2017 (2017-11-09)<br>cited in the application<br>pages 5,6; claims; examples | 8-29 |

☐ 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 | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 17 June 2021 | 25/06/2021 |

| Name and mailing address of the ISA/ | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Steffen, Pierre |

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/GB2021/050659

**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. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2021/050659

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| WO 2015004461 A1 | 15-01-2015 | AR 096869 A1 | 03-02-2016 |
| | | AU 2014288953 A1 | 11-02-2016 |
| | | CA 2917009 A1 | 15-01-2015 |
| | | CN 105492020 A | 13-04-2016 |
| | | CN 112961227 A | 15-06-2021 |
| | | EA 201690189 A1 | 30-06-2016 |
| | | EP 3019190 A1 | 18-05-2016 |
| | | HK 1222795 A1 | 14-07-2017 |
| | | IL 243330 A | 30-01-2020 |
| | | IL 270769 A | 25-03-2021 |
| | | JP 6850127 B2 | 31-03-2021 |
| | | JP 2016523555 A | 12-08-2016 |
| | | JP 2019129840 A | 08-08-2019 |
| | | KR 20160029110 A | 14-03-2016 |
| | | SG 10202005416P A | 29-07-2020 |
| | | SG 11201600150U A | 26-02-2016 |
| | | TW 201542587 A | 16-11-2015 |
| | | TW 202033539 A | 16-09-2020 |
| | | US 2016369256 A1 | 22-12-2016 |
| | | US 2018298366 A1 | 18-10-2018 |
| | | WO 2015004461 A1 | 15-01-2015 |
| | | ZA 201801413 B | 31-07-2019 |
| WO 2017055274 A1 | 06-04-2017 | AU 2016330322 A1 | 26-04-2018 |
| | | BR 112018006300 A2 | 16-10-2018 |
| | | CA 2996695 A1 | 06-04-2017 |
| | | CN 108137657 A | 08-06-2018 |
| | | DK 3356391 T3 | 03-02-2020 |
| | | EA 201890851 A1 | 31-08-2018 |
| | | EP 3356391 A1 | 08-08-2018 |
| | | EP 3650462 A1 | 13-05-2020 |
| | | ES 2769775 T3 | 29-06-2020 |
| | | HK 1255471 A1 | 16-08-2019 |
| | | HK 1257762 A1 | 25-10-2019 |
| | | HU E047489 T2 | 28-04-2020 |
| | | JP 2018537412 A | 20-12-2018 |
| | | KR 20180080205 A | 11-07-2018 |
| | | PL 3356391 T3 | 27-07-2020 |
| | | PT 3356391 T | 19-02-2020 |
| | | SG 10202001084V A | 30-03-2020 |
| | | US 2019100564 A1 | 04-04-2019 |
| | | WO 2017055274 A1 | 06-04-2017 |
| | | ZA 201801755 B | 30-01-2019 |
| WO 2017191315 A1 | 09-11-2017 | AR 108689 A1 | 19-09-2018 |
| | | AU 2017260389 A1 | 22-11-2018 |
| | | BR 112018072587 A2 | 19-02-2019 |
| | | CA 3020640 A1 | 09-11-2017 |
| | | CN 109069576 A | 21-12-2018 |
| | | DK 3452071 T3 | 07-06-2021 |
| | | EA 201892386 A1 | 30-04-2019 |
| | | EP 3452071 A1 | 13-03-2019 |
| | | JP 2019520799 A | 25-07-2019 |
| | | KR 20190003698 A | 09-01-2019 |
| | | PT 3452071 T | 31-05-2021 |
| | | SG 11201809064Q A | 29-11-2018 |
| | | TW 201808986 A | 16-03-2018 |
| | | US 2019127427 A1 | 02-05-2019 |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2021/050659

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| | | WO 2017191315 A1 | 09-11-2017 |

フロントページの続き

| (51)国際特許分類 | F I | テーマコード（参考） |
|---|---|---|
| *Ｃ１２Ｎ　15/31　(2006.01)* | Ｃ１２Ｎ　15/31 | |

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,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,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　ラッフル，ケイティー
イギリス，レクサム エルエル１３　９ユーエフ，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 バイオファーム リミテッド内
(72)発明者　ピコー，フィリップ
イギリス，レクサム エルエル１３　９ユーエフ，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 バイオファーム リミテッド内

Ｆターム（参考）　4C083　AD411 EE13
4C084　AA02 AA03 BA44 CA04 DA33 MA63 NA14 ZA89
4H045　AA10 AA30 CA11 DA83 EA20 EA60 FA74 GA06 GA21 GA23 GA26

【要約の続き】
80、GLU 1081、GLU 1083、ASP 1086、ASN 1188、ASP 1213、GLY 1215、ASN 1216、GLN 1229、ASN 1242、ASN 1243、SER 1274、およびTHR 1277、ここで、改変は以下から選択される:i.塩基性アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;ii.非荷電アミノ酸残基による酸性の表面露出アミノ酸残基の置換;iii.塩基性アミノ酸残基による非荷電の表面露出アミノ酸残基の置換;iv.塩基性アミノ酸残基の挿入;およびv.酸性の表面露出アミノ酸残基の欠失。処置および使用の対応する方法、ならびに単位剤形およびキットもまた提供される。