

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-506277

(P2005-506277A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

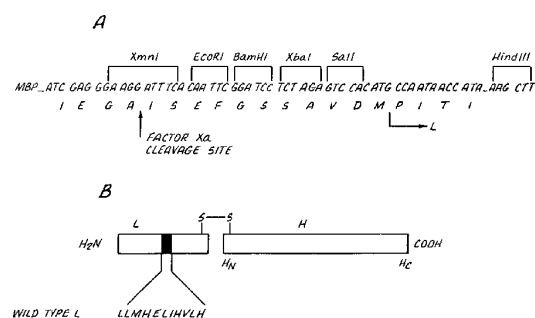
(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/06	A 6 1 K 45/06	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/17	A 6 1 K 31/17	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/4178	A 6 1 K 31/4178	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/496	A 6 1 K 31/496	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/506	A 6 1 K 31/506	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 123 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-554126 (P2002-554126)	(71) 出願人	591018268
(86) (22) 出願日	平成13年12月14日 (2001.12.14)		アラーガン、インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月30日 (2003.6.30)		ALLERGAN, INCORPORATED
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/048651		アメリカ合衆国92612カリフォルニア
(87) 国際公開番号	W02002/053177		州アーヴィン、デュポン・ドライブ252
(87) 国際公開日	平成14年7月11日 (2002.7.11)		5番
(31) 優先権主張番号	09/751,053	(74) 代理人	100062144
(32) 優先日	平成12年12月29日 (2000.12.29)		弁理士 青山 稔
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100083356
			弁理士 柴田 康夫
		(72) 発明者	ダニエル・ダブリュー・ジル
			アメリカ合衆国92625カリフォルニア
			州コロナ・デル・マー、ポイント・デル・
			マー2541番
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疼痛治療のための薬剤および方法

## (57) 【要約】

疼痛治療のための薬剤、該薬剤の製造方法、ならびに、治療有効量の該薬剤を患者に投与することによる疼痛の治療方法を開示する。この薬剤は、標的化成分に結合したクロストリジウム神経毒、そのフラグメントまたは誘導体を含むことができ、該標的化成分は、他の結合部位(例えば、-2Aアドレナリン作動性受容体サブタイプ)と比較して、-2Bまたは-2B/-2Cアドレナリン作動性受容体サブタイプにおいて選択的に結合する化合物からなる群から選択される。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

治療成分および標的化成分を含む薬剤であって、該標的化成分が、 $\alpha$ -2 A アドレナリン作動性受容体サブタイプと比較して、 $\alpha$ -2 B または  $\alpha$ -2 B /  $\alpha$ -2 C アドレナリン作動性受容体サブタイプにおいて選択的に結合する薬剤。

## 【請求項 2】

治療成分が、細胞からの神経伝達物質の放出またはそのプロセスを妨げる、請求項 1 に記載の薬剤。

## 【請求項 3】

治療成分が軽鎖成分を含む、請求項 2 に記載の薬剤。

10

## 【請求項 4】

軽鎖成分が、ボツリヌス毒素、ブチリカム毒素、破傷風毒素またはその変異体の軽鎖またはそのフラグメントを含む、請求項 2 に記載の薬剤。

## 【請求項 5】

軽鎖成分が、ボツリヌス毒素 A 型、B 型、C<sub>1</sub>型、D 型、E 型、F 型、G 型またはその変異体の軽鎖またはそのフラグメントを含む、請求項 2 に記載の薬剤。

## 【請求項 6】

軽鎖成分が、ボツリヌス毒素 A 型またはその変異体の軽鎖またはそのフラグメントを含む、請求項 2 に記載の薬剤。

## 【請求項 7】

治療成分が細胞リボソームを不活性化する、請求項 1 に記載の薬剤。

20

## 【請求項 8】

治療成分がサポリンである、請求項 7 に記載の薬剤。

## 【請求項 9】

移行成分をさらに含む、請求項 1 に記載の薬剤。

## 【請求項 10】

移行成分により、標的細胞の細胞質への少なくとも一部の薬剤の移動が促進される、請求項 9 に記載の薬剤。

## 【請求項 11】

移行成分により、標的細胞の細胞質への治療成分の移動が促進される、請求項 9 に記載の薬剤。

30

## 【請求項 12】

移行成分が重鎖成分を含む、請求項 9 に記載の薬剤。

## 【請求項 13】

重鎖成分が、ボツリヌス毒素、ブチリカム毒素、破傷風毒素またはその変異体の重鎖またはそのフラグメントを含む、請求項 12 に記載の薬剤。

## 【請求項 14】

重鎖成分が、ボツリヌス毒素 A 型、B 型、C<sub>1</sub>型、D 型、E 型、F 型、G 型またはその変異体の重鎖またはそのフラグメントを含む、請求項 12 に記載の薬剤。

## 【請求項 15】

重鎖成分が、ボツリヌス毒素 A 型またはその変異体の重鎖またはそのフラグメントを含む、請求項 12 に記載の薬剤。

40

## 【請求項 16】

重鎖フラグメントが、重鎖のアミノ末端フラグメントの少なくとも一部を含む、請求項 12 に記載の薬剤。

## 【請求項 17】

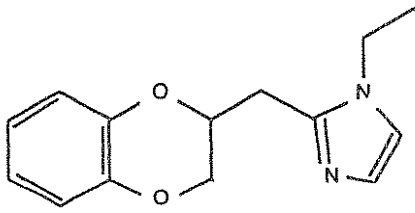
治療成分がボツリヌス毒素 A 型の軽鎖を含み、移行成分がボツリヌス毒素 A 型の重鎖フラグメントを含み、該重鎖フラグメントが、細胞質への少なくとも該治療成分の移行を補助することができる、請求項 1 に記載の薬剤。

## 【請求項 18】

50

標的化成分が、式：

【化 1】



イミロキサン

10

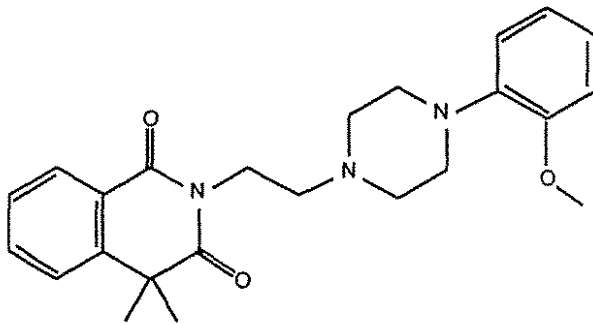
I.

によって示される、請求項 1 に記載の薬剤。

【請求項 19】

標的化成分が、式：

【化 2】



ARC 239

20

30

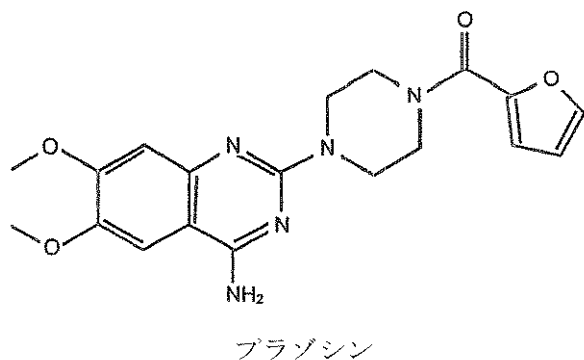
II.

によって示される化合物である、請求項 1 に記載の薬剤。

【請求項 20】

標的化成分が、式：

## 【化 3】



10

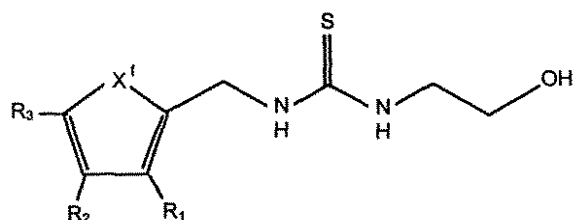
## III.

によって示される化合物である、請求項 1 に記載の薬剤。

## 【請求項 2 1】

標的化成分が、式：

## 【化 4】



## IV.

30

[式中、

X は、 $R_4 - C = C - R_5$  および  $R_4 - C$  からなる群から選択され、

X が  $R_4 - C = C - R_5$  である場合、6 員炭素環構造が形成され、

X が  $R_4 - C$  である場合、5 員炭素環構造が形成され、

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、および  $R_5$  は、それぞれ独立して、F、Cl、Br、I、 $OR_6$ 、および H からなる群から選択され、

$R_6$  は、H またはメチル、エチルもしくはプロピルを含むアルキルである]

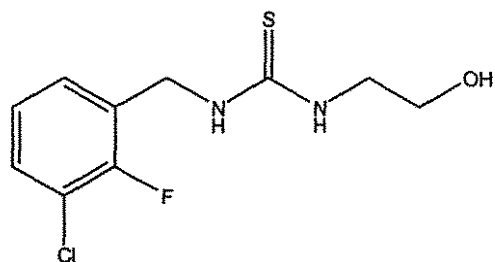
によって示される化合物である、請求項 1 に記載の薬剤。

## 【請求項 2 2】

標的化成分が、式：

40

## 【化 5】



V.

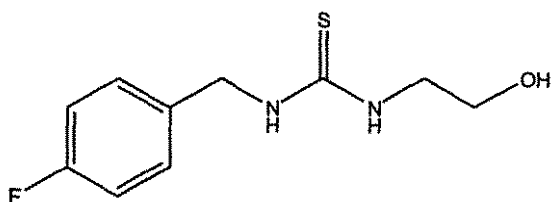
10

によって示される化合物である、請求項 1 に記載の薬剤。

## 【請求項 2 3】

標的化成分が、式：

## 【化 6】



VI.

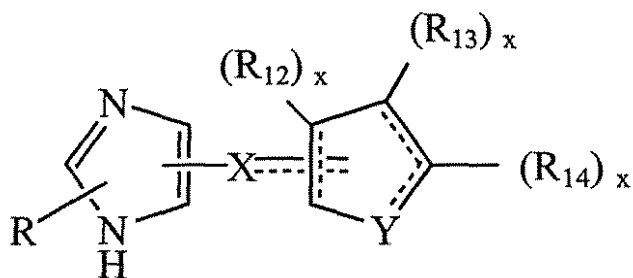
20

によって示される化合物である、請求項 1 に記載の薬剤。

## 【請求項 2 4】

標的化成分が、式：

## 【化 7】



VII.

30

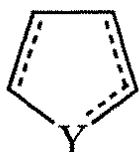
[式中、

点線は任意選択的な二重結合を示し；

R は H または低級アルキルであり；

X は S または C(H)R<sub>11</sub> であり、ここで R<sub>11</sub> は、H または低級アルキルであるか、あるいは、X が S である場合または X と式：

## 【化 8】



で示される環の間の結合が二重結合である場合、R<sub>11</sub> は存在せず；

Y は、O、N、S、(C(R<sub>11</sub>)X)<sub>y</sub> (y は 1 ~ 3 の整数である)、-CH=CH-、または -Y<sub>1</sub>CH<sub>2</sub>- (Y<sub>1</sub> は O、N または S である) であり；

50

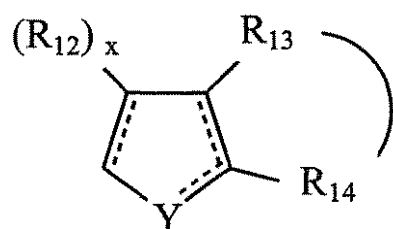
$x$  は 1 または 2 の整数であり、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$  または  $R_{14}$  が不飽和炭素原子に結合している場合、 $x$  は 1 であり、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$  または  $R_{14}$  が飽和炭素原子に結合している場合、 $x$  は 2 であり；

$R_{12}$  は、H、低級アルキル、ハロゲン、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アルケニル、アシルまたは低級アルキニルであるか、あるいは、飽和炭素原子に結合している場合、 $R_{12}$  はオキソであってよく；

$R_{13}$  および  $R_{14}$  は、それぞれ H、低級アルキル、ハロゲン、低級アルケニル、アシルまたは低級アルキニルであるか、あるいは、飽和炭素原子に結合している場合、 $R_{12}$  はオキソであってよく；

$R_{13}$  および  $R_{14}$  は、それぞれ H、低級アルキル、ハロゲン、低級アルケニル、アシル、低級アルキニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリールまたは置換ヘテロアリール(ここで該置換基は、ハロゲン、低級アルキル、低級アルコキシ、低級アルケニル、アシル、低級アルキニル、ニトロ、シアノ、トリフルオロメチル、ヒドロキシまたはフェニルである)であるか、または一緒になって、 $-(C(R_2)x)z-$ 、 $-Y_1(C(R_2)x)z'-$ 、 $-Y_1(C(R_2)x)yY_1-$ 、 $-(C(R_2)x)-Y_1-(C(R_2)x)-$ 、 $-(C(R_2)x)-Y_1-(C(R_2)x)-(C(R_2)x)-$  および  $-Y_1-(C(R_2)x)-Y_1-(C(R_2)x)-$  (ここで、 $z$  は 3 ~ 5 の整数であり、 $z'$  は 2 ~ 4 の整数であり、 $x$  および  $y$  は上記定義の通りである)であり、さらに、これら二価部分の各々のどちらかの末端がどちらかの  $R_{13}$  または  $R_{14}$  において結合して、縮合環構造；

【化 9】



を形成することができ、こうして形成される環は、環炭素が 4 価以下、窒素が 3 価以下、O および S が 2 価以下であるという条件のもと、完全に不飽和、部分的に不飽和、または完全に飽和であることができる]

によって示される、請求項 1 に記載の薬剤。

【請求項 25】

標的化成分がアミノ酸成分を含む、請求項 1 に記載の薬剤。

【請求項 26】

アミノ酸成分が抗体である、請求項 25 に記載の薬剤。

【請求項 27】

抗体が抗原成分から惹起され、該抗原成分が  $\alpha 2B$  受容体の第 2 細胞外ループを含む、請求項 26 に記載の薬剤。

【請求項 28】

第 2 細胞外ループがキーホールリンペットヘモシアニンに結合している、請求項 27 に記載の薬剤。

【請求項 29】

第 2 細胞外ループが、アミノ酸配列：K G D Q G P Q P R G R P Q C K L N Q E (配列番号 1) を含むペプチドフラグメントを含む、請求項 27 に記載の薬剤。

【請求項 30】

アミノ酸成分が、野生型ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、またはタンパク質複合体の変異ペプチド、変異ポリペプチド、変異タンパク質、または変異タンパク質複合体を含む、請求項 25 に記載の薬剤。

【請求項 31】

アミノ酸成分が変異ポリペプチドである、請求項 25 に記載の薬剤。

【請求項 32】

20

30

40

50

変異ポリペプチドが変異重鎖である、請求項 3 1 に記載の薬剤。

【請求項 3 3】

治療成分および標的化成分が、互いにスペーサー成分を介して結合している、請求項 1 に記載の薬剤。

【請求項 3 4】

治療成分、移行成分、および標的化成分が、互いにスペーサー成分を介して結合している、請求項 9 に記載の薬剤。

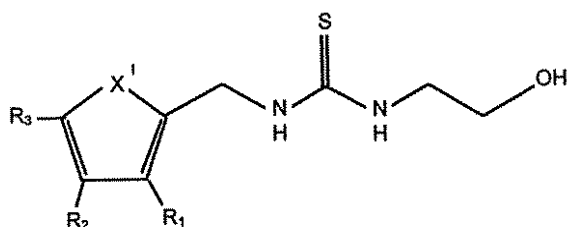
【請求項 3 5】

治療成分がボツリヌス毒素 A 型の軽鎖であり、移行成分が細胞質への少なくとも軽鎖の移行を促進することができるボツリヌス毒素 A 型の重鎖フラグメントであり、標的化成分が

10

式：

【化 1 0】



IV.

20

[式中、

X は、R<sub>4</sub>-C=C-R<sub>5</sub> および R<sub>4</sub>-C からなる群から選択され、

X が R<sub>4</sub>-C=C-R<sub>5</sub> である場合、6 員炭素環構造が形成され、

X が R<sub>4</sub>-C である場合、5 員炭素環構造が形成され、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、および R<sub>5</sub> は、それぞれ独立して、F、Cl、Br、I、OR<sub>6</sub>、および H からなる群から選択され、

R<sub>6</sub> は、H またはメチル、エチルもしくはプロピルを含むアルキルである]

によって示される、請求項 3 4 に記載の薬剤。

【請求項 3 6】

スペーサー成分が、炭化水素、免疫グロブリンヒンジ領域以外のポリペプチド、および免疫グロブリンヒンジ領域と同一または類似のプロリン含有ポリペプチドからなる群から選択される部分を含む、請求項 3 4 に記載の薬剤。

30

【請求項 3 7】

ヒトを含む哺乳動物の慢性疼痛の治療に有用である、請求項 1 に記載の薬剤。

【請求項 3 8】

慢性疼痛が、実質的に急性の痛覚または触覚に影響を与えることなく治療される、請求項 3 7 に記載の薬剤。

【請求項 3 9】

治療成分および標的化成分を含む薬剤であって、該標的化成分が、-2 A アドレナリン作動性受容体サブタイプと比較して、-2 B または -2 B / -2 C アドレナリン作動性受容体サブタイプにおいて選択的に結合する薬剤の、少なくとも 1 つの成分のためのコードを有する遺伝子からポリペプチドを製造する工程を含む、疼痛治療のための薬剤の製造方法。

40

【請求項 4 0】

薬剤が移行成分をさらに含む、請求項 3 9 に記載の薬剤の製造方法。

【請求項 4 1】

治療成分がボツリヌス毒素 A 型の軽鎖を含み、移行成分が標的細胞の細胞質への少なくとも軽鎖の移動を促進することができる重鎖フラグメントを含む、請求項 4 0 に記載の方法。

50

## 【請求項 4 2】

標的化成分がアミノ酸成分を含む、請求項 4 0 に記載の方法。

## 【請求項 4 3】

アミノ酸成分が、野生型ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、またはタンパク質複合体の変異ペプチド、変異ポリペプチド、変異タンパク質、または変異タンパク質複合体を含む、請求項 4 2 に記載の方法。

## 【請求項 4 4】

変異ペプチドが変異重鎖である、請求項 4 3 に記載の方法。

## 【請求項 4 5】

治療成分および標的化成分を含む薬剤であって、該標的化成分が、 $\alpha$ -2 A アドレナリン作用性受容体サブタイプと比較して、 $\alpha$ -2 B または  $\alpha$ -2 B /  $\alpha$ -2 C アドレナリン作用性受容体サブタイプにおいて選択的に結合する薬剤の治療有効量を哺乳動物に投与して疼痛を緩和する工程を含む、疼痛の治療方法。 10

## 【請求項 4 6】

緩和される疼痛が慢性疼痛である、請求項 4 5 に記載の方法。

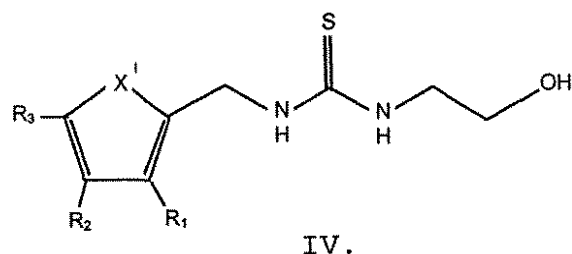
## 【請求項 4 7】

移行成分をさらに含む、請求項 4 5 に記載の治療方法。

## 【請求項 4 8】

治療成分がボツリヌス毒素 A 型の軽鎖を含み、  
移行成分が、標的細胞の細胞質への少なくとも軽鎖の移動を促進することができるボツリヌス毒素 A 型の重鎖フラグメントを含み、  
標的化成分が、一般式： 20

## 【化 1 1】



30

[式中、

X は、 $R_4 - C = C - R_5$  および  $R_4 - C$  からなる群から選択され、

X が  $R_4 - C = C - R_5$  である場合、6 員炭素環構造が形成され、

X が  $R_4 - C$  である場合、5 員炭素環構造が形成され、

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、および  $R_5$  は、それぞれ独立して、F、Cl、Br、I、OR<sub>6</sub>、および H からなる群から選択され、

R<sub>6</sub> は、H またはメチル、エチルもしくはプロピルを含むアルキルである]

によって示される、請求項 4 7 に記載の方法。

## 【請求項 4 9】

治療成分および移行成分がボツリヌス毒素の一部である、請求項 4 7 に記載の方法。 40

## 【請求項 5 0】

ボツリヌス毒素が A 型である、請求項 4 9 に記載の方法。

## 【請求項 5 1】

薬剤が約 1 単位 ~ 約 500 単位のボツリヌス毒素を含む、請求項 5 0 に記載の方法。

## 【請求項 5 2】

薬剤が約 10 単位 ~ 約 300 単位のボツリヌス毒素を含む、請求項 5 0 に記載の方法。

## 【請求項 5 3】

疼痛緩和が約 2 ~ 約 27 ヶ月持続する、請求項 5 0 に記載の方法。

## 【請求項 5 4】

50



薬剤を鞘内投与する、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 5 5】

薬剤を中枢神経系の頭蓋領域に鞘内投与する、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 5 6】

薬剤を中枢神経系の頸部領域に鞘内投与する、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

薬剤を中枢神経系の胸郭領域に鞘内投与する、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 5 8】

薬剤を中枢神経系の腰椎領域に鞘内投与する、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 5 9】

薬剤を中枢神経系の仙椎領域に鞘内投与する、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 6 0】

薬剤を筋肉内投与する、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 6 1】

薬剤を皮下投与する、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 6 2】

疼痛が慢性疼痛である、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 6 3】

疼痛が内臓痛である、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 6 4】

疼痛が神経痛である、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 6 5】

疼痛が関連痛である、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 6 6】

疼痛が異痛型疼痛である、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

異痛型疼痛が、実質的に急性の痛覚または触覚に影響を与えることなく緩和される、請求項 6 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、疼痛治療のための組成物および方法に関する。特に、本発明は、神経毒を含む薬剤、該薬剤の製造方法、および該薬剤を使用する疼痛の治療方法に関する。

【背景技術】

【0002】

「結局のところ、人類が得ることができる幸福は、快楽ではなく苦痛からの解放である」[John Dryden (1631 ~ 1700)]。

ヒトの疼痛を、2つの一般的なカテゴリー(急性および慢性)に分類するのが好都合である。任意の有害な刺激(例えば、高温または鋭利物体)により、急性疼痛を惹起することができる。このような刺激に起因する疼痛は、通常、比較的短期間で鎮静する。また、急性疼痛は、いずれかの疾患の過程においても存在することができる。しかし、このような疼痛は、自己限定的でもあり、時間または適切な治療により鎮静する。

【0003】

慢性疼痛は、第2の主カテゴリーの疼痛である。これは、数週間以上にわたって持続する有意な疼痛と定義することができ、根元的な問題の治療に利用可能な適切な治療法は存在しない。世界的に、現在無数の慢性疼痛患者が存在する。例えば、合衆国のみでも、国立衛生研究所は、9000万人のアメリカ人が片頭痛、背中の痛み、関節炎、外傷、異痛症、または災害的な疾病由来の慢性疼痛に罹患していると見積られている。

【0004】

一般に、末梢由来の急性または慢性疼痛シグナルの感覚それ自体への変換は、多ニューロ

10

20

30

40

50

ン経路および脳の情報処理中心によって行われる。感覚刺激の伝達に關与する経路の第1の神経細胞を、一次感覚求心と称する。頭部およびいくつかの内部器官に由来する一次感覚求心の細胞体は、脳神経、特に三叉神経核および孤束核に關連する種々の神経節に存在する。残りの身体の一次感覚求心の細胞体は、脊柱の背根神経節に存在する。一次感覚求心およびその突起(プロセス)は、組織学的に分類されており、細胞体は以下の2つのクラスに分類されている。即ち、A型は大きく(直径60~120 $\mu$ m)、B型は比較的小さく(直径14~30 $\mu$ m)、かつ比較的多数である。同様に、突起は、以下の2つのカテゴリーに分類されている。即ち、ミエリン鞘を欠くC線維とミエリン鞘を有するA線維である。さらにA線維は、十分に発達したミエリンを有する直径の大きいA線維および発達が不十分なミエリンを有する比較的小さいA線維に分類することができる。一般に、A線維はA型細胞体から生じ、A線維およびC線維はB型細胞体から生じると考えられている。

10

#### 【0005】

一次感覚求心の活性化に続く、次の感覚シグナル変換工程は、中枢神経系の高次部分(例えば視床核)に脊髄視床路を介してシグナルを運ぶ投射ニューロンの活性化である。これらニューロンの細胞体(脳神経に關連するもの以外)は、脊髄背角に存在する。またこれは、一次求心と投射ニューロンの間のシナプスが存在するところである。背角は、積重なった一連の層(最も背側の層I、それに続く層IIなど)に組織化される。異なるクラスの一次求心は、異なる層のシナプスを構成する。皮膚一次求心のために、C線維は層IおよびIIにおいてシナプスを構成し、A線維は層I、IIおよびVにおいてシナプスを構成し、A線維は層III、IVおよびVにおいてシナプスを構成する。より深い層(V~VII、X)は、より深い組織(例えば、筋肉および内臓)から到達する感覚経路に關与していると考えられている。

20

#### 【0006】

一次求心と投射ニューロンの間のシナプスにおける支配的な神経伝達物質は、サブスタンスP、グルタミン酸塩、カルシトニン-遺伝子関連ペプチド(CGRP)、および神経ペプチドYである。これらシナプスの伝達効率を、脊髄中の介在ニューロンによっておよび下行経路によって変化させることができる。これらの調節ニューロンは、阻害性(例えば、オピオイドペプチド、グリシン、ノルエピネフリン)または興奮性(例えば、酸化窒素、コレシストキニン、ノルエピネフリン)である多数の媒介伝達物質を放出して、感覚認識の増強または減少のための機構を与える。

30

#### 【0007】

現在利用可能な急性疼痛の治療法は一般に扱い易いが、慢性疼痛の治療法は、不適切かつ期待はずれである。例えば、オピオイド(モルヒネおよびフェンタニルなど)の脊髄内投与は、疼痛を緩和しうることが既知である。例えば、Gianno, J.らの「痙縮および疼痛の鞘内薬物療法」[Springer-Verlag, 1996](この刊行物は、その全体が本明細書中で参考として援用される)を参照。しかし、脊髄内または鞘内注射で使用されるこれらの薬物は、通常、短期間の抗侵害受容効果を有しているにすぎない。この結果、これらの薬物は、連続注入用ポンプを用いるなどにより、頻繁に投与しなければならない。例えば、よく使用されるポンプの1つは、Medtronic, Inc.(ミネアポリス、ミネソタ州)から販売されているプログラム可能な移植ポンプであるSynchroMed(登録商標)Infusion Systemである。しかし、ポンプ使用のためには外科手術移植が必要になるので合併症が伴われ、疼痛のための既知の鞘内投与薬物(オピオイドなど)は、依存性および呼吸低下の可能性という欠点を有する。

40

長期作用の鎮痛薬も知られている(例えば、フェノール注射による遮断)。しかし、このような治療法は、不可逆性の機能障害のリスクが大きくなる。

#### 【0008】

##### ボツリヌス毒素

嫌気性のグラム陽性細菌であるClostridium botulinum(ボツリヌス菌)は、ボツリヌス中毒と称されるヒトおよび動物の神経麻痺疾患を引き起こす強力なポリペプチド神経毒であ

50

るボツリヌス毒素を産生する。Clostridium botulinumの胞子は土壌中に見い出され、不適切に滅菌され密封された家庭用の食品容器において成長することができ、多くのボツリヌス中毒の原因となる。通常、ボツリヌス中毒の作用は、Clostridium botulinumの培養物または胞子に感染した食品を食して18～36時間後に現れる。ボツリヌス毒素は、腸内壁を弱毒化されずに通過することができ、末梢運動ニューロンを攻撃するようである。ボツリヌス毒素中毒の症状は、歩行、嚥下、および会話の困難から呼吸器筋肉の麻痺および死に至ることがある。

#### 【0009】

ボツリヌス毒素A型は、ヒトに対して知られている最も致命的な天然の生物学的物質であり、極めて強いLD<sub>50</sub>値を有する。ある種の動物種の集団の50%に対して致命的である特定の毒素量をLD<sub>50</sub>と言う。例えば、ヒトにおけるボツリヌス毒素A型[精製した神経毒複合体として、商標名BOTOX(登録商標)のもとでAllergan, Inc., Irvine、カリフォルニアから販売されている]のおよそのLD<sub>50</sub>は、約150,000ピコグラムまたは約3,000単位である。興味深いことに、モル濃度ベースでは、ボツリヌス毒素A型は、ジフテリア毒素の約18億倍、シアン化ナトリウムの約6億倍、コブラ毒の約3000万倍、およびコレラ毒素の約1200万倍致命的である。Singhの「細菌タンパク質毒素の危険性」[B.R.Singhら編の「天然毒素II」の第63～84頁(第4章)、Plenum Press、ニューヨーク、1996]。

10

#### 【0010】

7つの免疫学的に異なるボツリヌス神経毒が特徴付けられている。これらは、それぞれボツリヌス神経毒の血清型A、B、C<sub>1</sub>、D、E、F、Gであり、それぞれは、型特異的抗体による中和によって区別される。異なる血清型のボツリヌス毒素は、それらが作用する動物種およびそれらが引き起こす麻痺の重篤性および持続時間が異なる。例えば、ラットにおける麻痺の発症率で測定すると、ボツリヌス毒素A型は、ボツリヌス毒素B型よりも500倍強力であることが測定されている。ボツリヌス毒素は、高い親和性でコリン作動性運動ニューロンに結合し、ニューロン中に移行し、アセチルコリンの放出を遮断するようである。

20

#### 【0011】

本発明をいかなる理論または作用機構にも限定することを望むものではないが、毒素中毒の分子機構は、血清型に関係なく類似しており、少なくとも3つの工程または段階が含まれるようである。ボツリヌス毒素による中毒の可能性ある分子機構をここに記載するが、他の毒素(例えば、ブチリカム毒素、破傷風毒素、またはその変異体)も、同一または実質的に同じ機構を有するであろう。過程の第1工程において、毒素は、重鎖(H鎖)と細胞表面受容体の間の特異的相互作用を介して標的ニューロンのシナプス前膜に結合する(この受容体は、各ボツリヌス毒素型および破傷風毒素によって異なると考えられる)。H鎖のカルボキシ末端セグメント(H<sub>C</sub>)が、細胞表面への毒素の標的化に重要なようである。

30

#### 【0012】

第2工程において、毒素は、毒を与えられた細胞の原形質膜を通過する。毒素は、最初に受容体媒介エンドサイトーシスによって細胞に取り込まれ、毒素を含むエンドソームが形成される。次いで、毒素はエンドソームから細胞質に脱出する。この工程は、H鎖のアミノ末端セグメント(H<sub>N</sub>)によって媒介されると考えられる(これにより、約5.5またはそれ以下のpHに応答して毒素のコンホメーション変化が誘発される)。エンドソームは、エンドソーム内pHを低下させるプロトンポンプを有することが知られている。コンホメーション変化は、毒素中の疎水性残基を露出させ、これがエンドソーム膜中への毒素の埋め込みを可能にする。次いで、毒素(または最低でも軽鎖)が、エンドソーム膜を通過して細胞質に移行する。

40

#### 【0013】

ボツリヌス毒素活性の機構の最終工程は、重鎖(H鎖)および軽鎖(L鎖)を連結するジスルフィド結合の還元が関与するようである。ボツリヌス毒素および破傷風毒素の全毒性活性は、ホロトキシンのL鎖に含まれ、このL鎖は、亜鉛(Zn<sup>++</sup>)エンドペプチダーゼであり

50

、神経伝達物質含有小胞の認識およびそれと原形質膜の細胞質表面とのドッキングならびに小胞と原形質膜との融合に不可欠なタンパク質を選択的に切断する。破傷風神経毒、ボツリヌス毒素 / B / D / F および / G は、シナプトソーム膜タンパク質であるシナプトブレビン [小胞関連膜タンパク質 (VAMP) とも称される] の分解を引き起こす。シナプス小胞の細胞質表面に存在するほとんどの VAMP は、これらの切断現象のいずれかの結果として除去される。血清型 A および E は、SNAP-25 を切断する。血清型 C<sub>1</sub> は、当初はシンタキシンを切断すると考えられていたが、シンタキシンおよび SNAP-25 を切断することが見い出された。各毒素は、異なる結合を特異的に切断する (同一の結合を切断する破傷風および B 型を除く)。

【0014】

10

ボツリヌス毒素は、比較的長い神経毒作用を有することが発見されているので、疼痛 (特に慢性疼痛) の治療に適用されている [例えば、Foster らの米国特許第 5,989,545 号 (その開示全体が本明細書中で参考として援用される)]。

【0015】

しかし、疼痛 (例えば慢性疼痛) の治療に現在使用されているほとんどの薬物は、依然として不適當である。例えば、慢性疼痛の 1 つの型は異痛症である。異痛症は、正常な有害ではない刺激が疼痛を誘発する状態である。現在知られている化合物は、異痛症の症状を部分的に緩和することができるが、それと同時に、患者が全ての疼痛 (有害刺激によって引き起こされる急性疼痛など) を感じる能力を失わせる。有害刺激に起因する疼痛を検知する能力は重要であり、これにより自己保存が可能となる。また、多数の薬剤は、望ましくない副作用 (例えば、鎮静、気分の変化、および / または低血圧) を有する。最後に、このような薬剤のほとんどは、治療持続時間が短い。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

このように、疼痛 (好ましくは慢性疼痛) の治療に対して選択的および / または長期作用性の化合物が、依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明によれば、治療成分および標的化成分 (これは細胞表面において、 $\alpha$ -2 A アドレナリン作動性受容体サブタイプと比較して、 $\alpha$ -2 B または  $\alpha$ -2 B および  $\alpha$ -2 C アドレナリン作動性受容体サブタイプのいずれかにおいて選択的に結合する) を含む薬剤が提供される。好ましくは、このような細胞はニューロンである。1 つの態様において、この薬剤は、移行成分をさらに含む。

30

【0018】

さらに本発明によれば、本発明の薬剤は、ヒトを含む哺乳動物における疼痛 (特に慢性疼痛) の治療に有用であることができる。さらに、本発明の薬剤を使用して、実質的に急性の痛覚または触覚に影響を与えることなく、慢性疼痛 (例えば異痛症) を治療することができる。

【0019】

40

さらに本発明によれば、治療成分は、細胞からの神経伝達物質の放出またはそのプロセスを実質的に妨げる。例えば、1 つの態様において、治療成分は、細胞からの神経伝達物質の放出を阻害する軽鎖成分を含む。この軽鎖成分は、クロストリジウム毒素、例えばボツリヌス毒素 A 型、B 型、C<sub>1</sub> 型、D 型、E 型、F 型、G 型、ブチリカム毒素、破傷風毒素またはその変異体の軽鎖またはそのフラグメントであってよい。別の態様において、治療成分は、細胞リボソーム機能の不活性化を介する神経毒 (例えばサポリン) であってもよい。

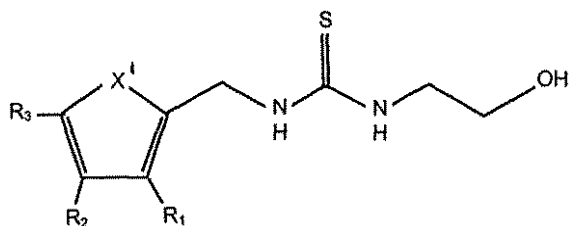
【0020】

さらに本発明によれば、標的化成分は、分子またはアミノ酸成分であってよい。アミノ酸成分には、例えば、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、タンパク質複合体、および抗

50

体が含まれる(これらの種が、 - 2 B または - 2 B / - 2 C アドレナリン作動性受容体サブタイプにおいて選択的に結合するとき)。1つの態様において、分子は、イミロキサソ、ARC239、プラゾシン、または式：

【化1】



IV.

10

[式中、Xは、 $R_4-C=C-R_5$ および $R_4-C$ からなる群から選択される]

で示される分子であってよい。Xが $R_4-C=C-R_5$ である場合には、6員の炭素環構造が形成される。Xが $R_4-C$ である場合には、5員の炭素環構造が形成される。 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、および $R_5$ は、それぞれ独立して、F、Cl、Br、I、 $OR_6$ 、およびHからなる群から選択され、ここで $R_6$ は、Hまたはメチル、エチルもしくはプロピルを含むアルキルである。1つの態様において、アミノ酸成分は、抗原成分から惹起した抗体であってよい。抗原成分は、 - 2 B 受容体の第2細胞外ループを含むことができ、これはさらにキーホールリンペットヘモシアニンに結合することができる。1つの態様において、第2細胞外ループは、アミノ酸配列：KGDQGPQPRGRPQC KLNQE (配列番号1)を含むペプチドフラグメントを含む。別の態様において、アミノ酸成分は、野生型の変異体であるペプチド、ポリペプチド、タンパク質、タンパク質複合体、または抗体を含むことができる。例えば、アミノ酸成分は、運動ニューロン細胞表面タンパク質に高親和性を有する野生型とは対照的に、 - 2 B 受容体に選択的に結合するボツリヌス毒素A型の突然変異H鎖であってよい。Goeddelらの米国特許第5,223,408号(その開示全体が本明細書中で参考として援用される)を参照。

20

【0021】

さらに本発明によれば、移行成分は、標的細胞の細胞質への治療成分(例えば、ボツリヌス毒素A型の軽鎖)の移動を促進することができる。1つの態様において、移行成分は、重鎖成分を含む。重鎖成分は、クロストリジウム毒素、例えばボツリヌス毒素A型、B型、 $C_1$ 型、D型、E型、F型、G型、ブチリカム毒素、破傷風毒素またはその変異体の重鎖またはそのフラグメントを含むことができる。重鎖フラグメントは、重鎖のアミノ末端フラグメントを含むことができる。別の態様において、重鎖成分は、2つの異なる神経毒の少なくともフラグメントを含むことができる。例えば、重鎖成分は、ボツリヌス毒素A型の重鎖のアミノ末端フラグメントおよびボツリヌス毒素B型の重鎖のカルボキシル末端フラグメントを含むことができる。

30

【0022】

さらに本発明によれば、治療成分、移行成分および標的化成分は、1つまたは複数のスペーサー成分によって連結される。例えば、治療成分を、スペーサー成分を介して移行成分に連結し、治療成分を、スペーサー成分を介して標的化成分に連結することができる。1つの態様において、スペーサー成分は、炭化水素、免疫グロブリンヒンジ領域以外のポリペプチド、および免疫グロブリンヒンジ領域と同一または類似のプロリン含有ポリペプチドからなる群から選択される部分を含む。別の態様において、治療成分を、スペーサー成分を介して移行成分に連結し、治療成分を、ジスルフィド架橋を介して標的化成分に連結することができる。

40

【0023】

さらに本発明によれば、本発明の薬剤の製造方法であって、少なくとも1つの薬剤成分(例えば、治療成分、移行成分、および/または標的化成分)をコードする遺伝子からポリペプチドを産生させる工程を含む方法が提供される。

50

## 【 0 0 2 4 】

さらに本発明によれば、疼痛の治療方法であって、哺乳動物(好ましくはヒト)に治療有効量の本発明の薬剤を投与する工程を含む方法が提供される。1つの態様において、薬剤の治療成分および移行成分は、共にボツリヌス毒素(例えば、ボツリヌス毒素A型)において見い出される。本発明の薬剤を、例えば、疼痛位置またはその近くに鞘内、筋肉内、または皮下投与することができる。

## 【 0 0 2 5 】

さらに本発明によれば、薬剤を使用して慢性疼痛を治療することができる。より好ましくは、薬剤を使用して異痛症を治療することができる。さらにより好ましくは、薬剤を使用して、実質的に急性の痛覚または触覚に影響を与えることなく、異痛症を治療することができる。本発明をいかなる特定の理論または作用機構にも限定することを望むものではないが、上記のような、急性の痛覚または触覚に影響を与えることのない異痛症治療の選択性は、2Bおよび/または2C受容体に対して選択的に作用する薬剤によるものと考えられる。

10

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【 0 0 2 6 】

本発明は、疼痛、好ましくは慢性疼痛、例えば異痛症および他の神経障害痛、内臓痛、癌に関連する疼痛、および過敏性腸症候群に関連する疼痛(これらに限定されない)を治療するための薬剤および方法を包含する。

## 【 0 0 2 7 】

20

定義

軽鎖成分は、クロストリジウム神経毒の軽鎖および/またはそのフラグメントを含む。軽鎖の分子量は約50kDaであり、L鎖またはLと称することもある。軽鎖またはそのフラグメントは、タンパク質分解活性を有することができる。

重鎖成分は、クロストリジウム神経毒の重鎖および/またはそのフラグメントを含む。重鎖全長の分子量は約100kDaであり、H鎖またはHと称することもある。重鎖フラグメントを、H<sub>C</sub>またはH<sub>N</sub>と称することもある。

## 【 0 0 2 8 】

H<sub>C</sub>は、H鎖のカルボキシル末端フラグメントまたは細胞表面への結合に関与する無傷H鎖中の該フラグメントに対応する部分にほぼ等価(例えば、機能的に等価)であるクロストリジウム神経毒のH鎖由来のフラグメントを意味する。

30

H<sub>N</sub>は、H鎖のアミノ末端セグメントまたは細胞内エンドソーム膜を通過する細胞質への少なくともL鎖の移行に関与する無傷H鎖中の該フラグメントに対応する部分にほぼ等価(例えば、機能的に等価)であるクロストリジウム神経毒のH鎖由来のフラグメントを意味する。

LH<sub>N</sub>は、H<sub>N</sub>ドメインに結合したL鎖またはその機能的フラグメントを含むクロストリジウム神経毒由来のフラグメントを意味する。これは、H<sub>C</sub>ドメインを除去または改変するためのタンパク質分解によって無傷クロストリジウム神経毒から得ることができる。

## 【 0 0 2 9 】

広い態様において、本発明の薬剤は、治療成分ならびに標的化成分(これは、-2Aアドレナリン作動性受容体サブタイプと比較して、-2Bおよび/または-2C、好ましくは-2Bアドレナリン作動性受容体サブタイプにおいて選択的に結合する)を含む。1つの態様において、標的化成分は、他の結合部位(例えば、-2A受容体)よりも-2Bおよび/または-2Cに対して、少なくとも約5倍高い選択性を示す。好ましい態様において、標的化成分は、他の結合部位よりも-2Bおよび/または-2Cに対して、少なくとも約10倍高い選択性を示す。より好ましい態様において、標的化成分は、他の結合部位よりも-2Bおよび/または-2Cに対して、少なくとも約50倍高い選択性を示す。別の態様において、標的化成分は、他の結合部位(例えば、-2C受容体)よりも-2Bに対して、少なくとも約5倍高い選択性を示す。好ましい態様において、標的化成分は、他の結合部位よりも-2Bに対して、少なくとも約10倍高い選択性を示す。より

40

50

好ましい態様において、標的化成分は、他の結合部位よりも -2 B に対して、少なくとも約 50 倍高い選択性を示す。本発明の薬剤は、疼痛(好ましくは慢性疼痛)の治療に有効である。

#### 【0030】

1つの態様において、治療成分は、神経細胞からの神経伝達物質(好ましくは、疼痛シグナル伝達に關与する神経伝達物質)の放出を実質的に妨げる。好ましい態様において、治療成分は軽鎖成分を含む。軽鎖成分は、ボツリヌス毒素、ブチリカム毒素、破傷風毒素、またはこれら毒素の生物活性変異体の軽鎖を含むことができる。また、軽鎖成分は、上記軽鎖のフラグメントを含むことができる(該フラグメントが生理学的環境下で生物学的に活性であるとき)。即ち、これらのフラグメントは、細胞からの神経伝達物質の放出またはそのプロセスを実質的に妨げることができる。好ましい態様において、軽鎖成分には、ボツリヌス毒素 A 型、B 型、C<sub>1</sub> 型、D 型、E 型、F 型、G 型、またはこれら血清型の生物活性変異体が含まれる。別の好ましい態様において、軽鎖成分は、ボツリヌス毒素 A 型、B 型、C<sub>1</sub> 型、D 型、E 型、F 型、G 型、またはこれら血清型の生物活性変異体のフラグメントであることもできる(該フラグメント自体が生物活性であるとき、例えば、該フラグメントが細胞からの神経毒の放出を妨げることができるとき)。本明細書中で使用される「変異ポリペプチド」(例えば、変異ポリペプチド)は、改変ポリペプチド(例えば改変軽鎖)を意味することもできる。

10

#### 【0031】

別の態様において、治療成分は、不利益に細胞機能を妨げる。例えば、治療成分は、細胞リボソームを不活性化し、タンパク質合成を妨げることができる。好ましい態様において、治療成分はサポリンを含む。

20

#### 【0032】

さらに別の態様において、治療成分は神経阻害剤である。ある種の神経阻害剤は神経伝達物質の産生を妨げることができ、一方、他の阻害剤は活動電位を実質的に妨げることができる。さらに、本発明の神経阻害剤は、細胞内部および/または細胞外部からその治療活性を発揮することができる。これら治療成分のいくつかの非限定的な例は、アコニチン、アデノシンアゴニスト/アンタゴニスト、アドレナリン作動薬、アナトキシン A、抗痙攣薬、バクロフェン、バトラコトキシン、ブレフェルジン A、ブレボトキシン、カプトプリル、クラレ、ダントロレン、ドキシソルピシン、ジアゼパム、グラヤノトキシン、リドカイン、メトカルバモール、メチルリカコニチン、ネオサキシトキシン、フィゾスチグミン、プシコシン、THA、テトロドトキシン、ベサミコール、ビガバタム、およびプロスタグランジン受容体アゴニストおよびアンタゴニストである。好ましくは、治療成分(例えば、上記の非限定的な例)は、疼痛(好ましくは慢性疼痛)の感覚に關与する細胞またはニューロンを妨げることができる。

30

#### 【0033】

広い態様において、本発明の薬剤は、治療成分および標的化成分を含む。1つの態様において、治療成分は、細胞またはニューロンの外部から、細胞またはニューロンに対して神経毒作用または阻害作用を発揮することができる。例えば、治療成分には、活動電位を妨げることによってニューロン小胞の放出を妨げる分子、ペプチド、または抗体が含まれる。1つの態様において、治療成分は、抗体またはその一部を含む。このような抗体は、ニューロン外部のナトリウムチャンネルを塞いで活動電位に必要なナトリウム流入を防止し、こうして疼痛シグナル伝達のための神経伝達物質の放出を妨げることができる。

40

#### 【0034】

好ましい態様において、治療成分は、細胞内部(例えば細胞質)からその効果を発揮することができる。例えば、L 鎖成分(治療成分)は、ニューロン内部からその治療効果を発揮する。このような場合、薬剤は移行成分をさらに含むのが好ましい。移行成分は、標的細胞の細胞質への薬剤の少なくとも一部の移動を促進することができる。好ましい態様において、移行成分は重鎖成分を含む。重鎖成分には、ボツリヌス毒素、ブチリカム毒素、破傷風毒素、またはその変異体の重鎖またはそのフラグメントが含まれる。好ましくは、重鎖

50

成分には、ボツリヌス毒素 A 型、B 型、C<sub>1</sub> 型、D 型、E 型、F 型、G 型、またはその変異体の重鎖またはそのフラグメントが含まれる。より好ましくは、重鎖成分は、ボツリヌス毒素 A 型の重鎖フラグメントを含む。さらに好ましくは、フラグメントは、小胞内部から細胞質への薬剤の少なくとも一部 (例えば治療成分) の移行を促進することができるボツリヌス毒素 A 型の重鎖のアミノ末端 (または末端) フラグメントである。

#### 【0035】

好ましい態様において、本発明の薬剤は、ボツリヌス毒素 A 型の軽鎖を含む治療成分およびボツリヌス毒素 A 型の重鎖 (好ましくはそのフラグメント) を含む移行成分を含み、重鎖 (またはそのフラグメント) は、細胞質への少なくとも治療成分の移行を補助することができる。別の好ましい態様において、本発明の薬剤は、破傷風毒素の軽鎖を含む治療成分および破傷風毒素の重鎖 (好ましくはそのフラグメント) を含む移行成分を含み、重鎖 (またはそのフラグメント) は、細胞質への少なくとも治療成分の移行を補助することができる。さらに別の態様において、本発明の薬剤は、ある型のボツリヌス毒素の軽鎖を含む治療成分および別のボツリヌス毒素の重鎖 (好ましくは、H<sub>N</sub> などの重鎖フラグメント) を含む移行成分を含み、キメラタンパク質を構成する。例えば、1 つの好ましい態様において、本発明の薬剤は L H<sub>N</sub> を含み、その L 鎖はボツリヌス毒素 B 型に由来し、H 鎖フラグメントのアミノ末端セグメントは、ボツリヌス毒素 A 型に由来する。ボツリヌス毒素 A 型の H<sub>N</sub> フラグメントは、Shone C.C., Hambleton, P. および Melling, J. [1987, Eur. J. Biochem., 167, 175 ~ 180] の方法に従って製造し、ボツリヌス毒素 B 型の L 鎖は、Sathyamoorthy, V. および DasGupta, B.R. [1985, J. Biol. Chem., 260, 10461 ~ 10466] の方法に従って製造する。次いで、ボツリヌス毒素 A 型の H 鎖フラグメントのアミノ末端セグメント上の遊離システインを、10 倍モル過剰のジピリジルジスルフィドの添加およびその後の 4 での一晩のインキュベーションによって誘導体化する。次いで、過剰のジピリジルジスルフィドおよびチオピリドン副生成物を、PD10 カラム (Pharmacia) でのタンパク質の脱塩によって P B S 中に除去する。次いで、この誘導体化した H<sub>N</sub> を、1 mg / ml を超えるタンパク質濃度まで濃縮し、等モル濃度のボツリヌス毒素 B 型由来の L 鎖部分 (> 1 mg / ml の P B S 溶液) と混合する。室温で一晩のインキュベーションの後、混合物を Superose 6 (Pharmacia) によるサイズ排除クロマトグラフィーによって分離し、分画を SDS-PAGE によって分析する。次いで、このキメラ L H<sub>N</sub> を使用して、標的化コンジュゲートを製造することができる。

#### 【0036】

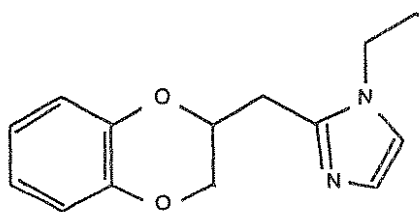
上記の L H または L H<sub>N</sub> をさらに標的化成分に結合させて、本発明の薬剤を形成させることができる。治療-移行成分 (例えば、L H<sub>N</sub>) への標的化成分のカップリングを、当業者に既知の試薬および技術を使用して化学的カップリングによって行う。即ち、PDPH / EDAC および Traut 試薬の化学を使用することができるが、当業者に既知である他の成分に薬剤の標的化成分を共有結合させうる任意の他のカップリング化学が、本発明の範囲内である。

#### 【0037】

1 つの態様において、標的化成分は分子またはアミノ酸成分である。アミノ酸成分には、例えば、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、タンパク質複合体、および抗体、またはその部分が含まれる (これらが、-2 B または -2 B および -2 C アドレナリン作動性受容体サブタイプにおいて選択的に結合するとき)。これらの分子、ペプチドまたはアミノ酸成分は、-2 B または -2 B / -2 C アドレナリン作動性受容体サブタイプのアゴニストまたはアンタゴニストであってよい。1 つの好ましい態様において、分子は、イミロキサン (式 I)、ARC 239 (式 II)、およびプラゾシン (式 III) であってよい。これらの分子は、以下の一般式によって示される：

#### 【化 2】



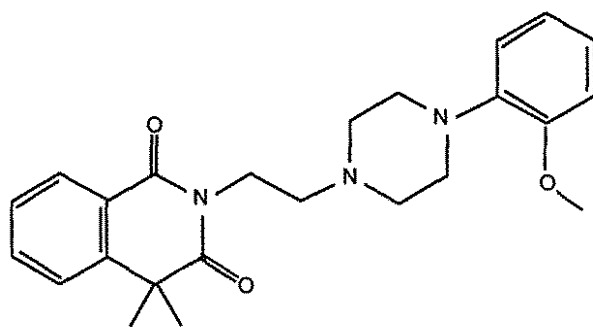


イミロキサン

I.

10

【化 3】

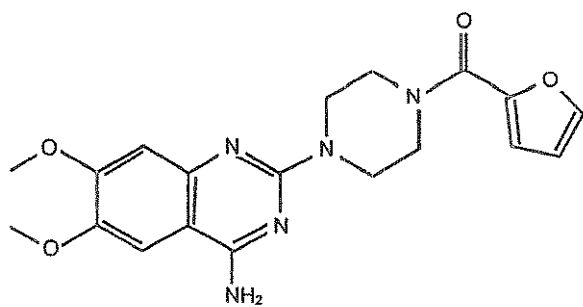


ARC 239

II.

20

【化 4】



プラゾシン

III.

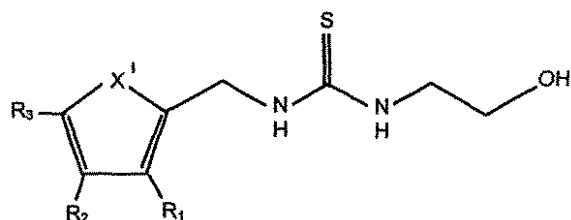
30

40

【 0 0 3 8 】

また、分子は、一般式 IV :

【化 5】



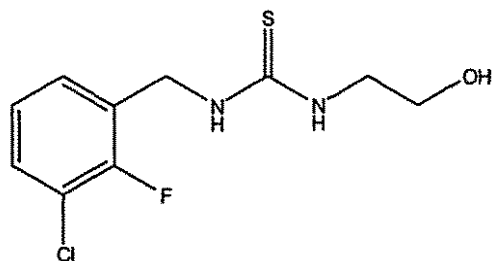
IV.

[式中、Xは、 $R_4-C=C-R_5$ および $R_4-C$ からなる群から選択される]

10

によって示される一群の化合物であってよい。Xが $R_4-C=C-R_5$ である場合には、6員の炭素環構造が形成される。Xが $R_4-C$ である場合には、5員の炭素環構造が形成される。R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、およびR<sub>5</sub>は、それぞれ独立して、F、Cl、Br、I、OR<sub>6</sub>、およびHからなる群から選択され、ここでR<sub>6</sub>は、Hまたはアルキル(メチル、エチルもしくはプロピルを含む)である。1つの好ましい態様において、標的化成分は、一般式V：

【化6】



V.

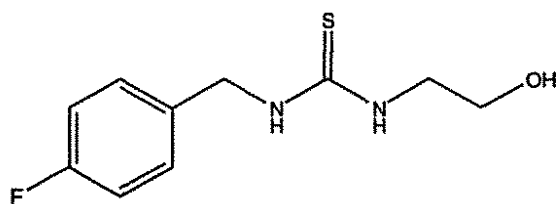
20

によって示される化合物である。

【0039】

別の好ましい態様において、標的化成分は、一般式VI：

【化7】



VI.

30

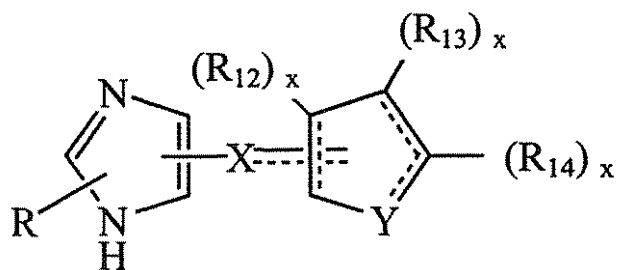
によって示される化合物である。

【0040】

40

さらに別の態様において、標的化成分は、米国特許出願番号09/548,315号(その開示全体が本明細書中で参考として援用される)中に見い出すことができる化合物(または分子)である。これらの化合物または分子には、分子が2Aアドレナリン作動性受容体サブタイプと比較して2Bまたは2B/2Cアドレナリン作動性受容体サブタイプにおいて選択的結合活性を有するならば、以下の一般式VIIで示されるものが含まれる：

【化8】



VII.

[式中、点線は、2つの二重結合が共通の炭素原子を共有することができない場合、任意選択的な結合を示し；

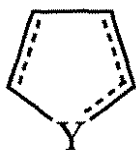
10

RはHまたは低級アルキルであり；

XはSまたはC(H)R<sub>11</sub>であり、ここでR<sub>11</sub>は、Hまたは低級アルキルであるが、Xと式

：

【化9】



20

で示される環の間の結合が二重結合である場合、R<sub>11</sub>は存在せず；

Yは、O、N、S、(C(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub>X)<sub>y</sub>(yは1～3の整数である)、-CH=CH-、または-Y<sub>1</sub>CH<sub>2</sub>-(Y<sup>1</sup>はO、NまたはSである)であり；

xは1または2の整数であり、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>またはR<sub>14</sub>が不飽和炭素原子に結合している場合、xは1であり、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>またはR<sub>14</sub>が飽和炭素原子に結合している場合、xは2であり；

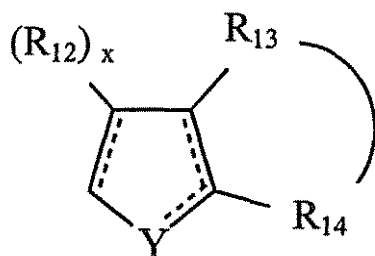
R<sub>12</sub>は、H、ハロゲン、ヒドロキシ、低級アルキル、アルコキシ、アルケニル、アシル、アルキニルであるか、あるいは、飽和炭素原子に結合している場合、R<sub>12</sub>はオキシであってよく；

30

R<sub>13</sub>およびR<sub>14</sub>は、それぞれH、ハロゲン、低級アルキル、アルケニル、アシル、アルキニル、アリール(例えば、フェニルまたはナフチル)、ヘテロアリール(例えば、フリル、チエニル、またはピリジル)、および置換されたアリールまたはヘテロアリール(ここで該置換基は、ハロゲン、低級アルキル、アルコキシ、アルケニル、アシル、アルキニル、ニトロ、シアノ、トリフルオロメチル、ヒドロキシなどである)であるか、または一緒になって、-(C(R<sub>12</sub>)<sub>x</sub>)<sub>z</sub>、-Y<sub>1</sub>(C(R<sub>12</sub>)<sub>x</sub>)<sub>z'</sub>、-Y<sub>1</sub>(C(R<sub>12</sub>)<sub>x</sub>)<sub>y</sub>Y<sub>1</sub>、-(C(R<sub>12</sub>)<sub>x</sub>)-Y<sub>1</sub>-(C(R<sub>12</sub>)<sub>x</sub>)-、-(C(R<sub>12</sub>)<sub>x</sub>)-Y<sub>1</sub>-(C(R<sub>12</sub>)<sub>x</sub>)-(C(R<sub>12</sub>)<sub>x</sub>)-(C(R<sub>12</sub>)<sub>x</sub>)-および-Y<sub>1</sub>-(C(R<sub>12</sub>)<sub>x</sub>)-Y<sub>1</sub>-(C(R<sub>12</sub>)<sub>x</sub>)- (ここで、zは3～5の整数であり、z'は2～4の整数であり、xおよびyは上記定義の通りである)であり、さらに、これら二価部分の各々のどちらかの末端がどちらかのR<sub>3</sub>またはR<sub>4</sub>において結合して、一般に、

40

【化10】



で示される縮合環構造を形成することができ、こうして形成される環は、環炭素が4個以

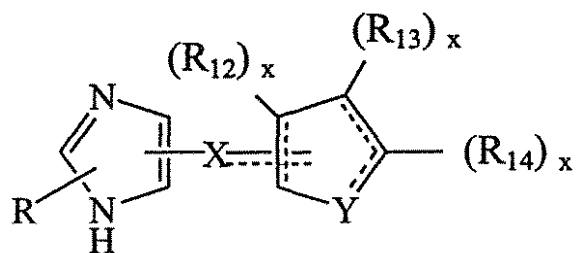
50

下、窒素が3価以下、OおよびSが2価以下であるという条件のもと、完全に不飽和、部分的に不飽和、または完全に飽和であることができる]。国際特許出願WO 98 / 256 69号(その開示全体が本明細書中で参考として援用される)を参照。

【0041】

別の態様において、標的化成分は、一般式：

【化11】



VIII.

10

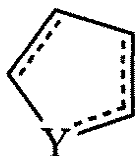
[式中、XはC(H)R<sub>11</sub>であってよく、R<sub>11</sub>はHである]によって示される。

【0042】

20

好ましくは、式VIIIのR<sub>12</sub>はHであってよく、式：

【化12】



はフラニル基であってよい。

【0043】

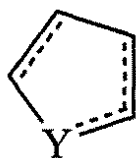
式IIのこのようなフラニル誘導体において、R<sub>13</sub>とR<sub>14</sub>が一緒になって(CH)<sub>4</sub>であることができるか、R<sub>13</sub>がHかつR<sub>14</sub>がt-ブチルであることができるか、R<sub>13</sub>およびR<sub>14</sub>がHであることができるか、あるいは、R<sub>13</sub>がHかつR<sub>14</sub>がメチルまたはエチルであることができる。

30

【0044】

また式VIIIにおいて、R<sub>11</sub>はメチルであってよく、式：

【化13】



40

はフラニル基であってよい。

【0045】

また式VIIIの化合物において、R<sub>12</sub>はHであってよく、式：

【化14】



はチエニル基であってよい。

【 0 0 4 6 】

式IIのこのようなチエニル誘導体において、 $R_{13}$ と $R_{14}$ が一緒になって $(CH_2)_4$ であることができるか、 $R_{13}$ がフェニルかつ $R_{14}$ がHであることができるか、 $R_{13}$ と $R_{14}$ が一緒になって $(CH_2)_3S$ であることができるか、 $R_{13}$ および $R_{14}$ がHであることができるか、 $R_{13}$ と $R_{14}$ が一緒になって $(CH)_4$ であることができるか、 $R_{13}$ がHかつ $R_{14}$ がメチルであることができるか、 $R_{13}$ がプロモかつ $R_{14}$ がHであることができるか、 $R_{13}$ が水素かつ $R_{14}$ がクロロであることができるか、あるいは、 $R_{13}$ がメチルかつ $R_{14}$ が水素であることができる。

10

【 0 0 4 7 】

また式VIIIの化合物において、式：

【 化 1 5 】



20

はシクロヘキシル基であってよい。

【 0 0 4 8 】

式VIIIのこのようなシクロヘキシル誘導体において、 $R_{12}$ が水素かつ $R_{13}$ と $R_{14}$ が一緒になって $(CH)_4$ であることができるか、 $R_{12}$ がオキソかつ $R_{13}$ と $R_{14}$ が一緒になって $(CH)_4$ であることができるか、 $R_{12}$ が水素またはオキソかつ $R_{13}$ と $R_{14}$ が一緒になって $(CH)_2S$ であることができるか、 $R_{12}$ が水素かつ $R_{13}$ と $R_{14}$ が一緒になって $(CH_2)_4$ である(オクタヒドロナフタレンを形成する)ことができるか、 $R_{12}$ がオキソかつ $R_{13}$ と $R_{14}$ が一緒になって $(CH_2)_4$ であることができるか、 $R_{12}$ がオキソかつ $R_{13}$ と $R_{14}$ が一緒になって $(CH)_2C(CH_3)(CH)$ であることができるか、 $R_{12}$ が水素かつ $R_{13}$ と $R_{14}$ が一緒になって $S(CH_2)_2$ であることができるか、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ および $R_{14}$ がHであることができるか、 $R_{12}$ がオキソかつ $R_{13}$ と $R_{14}$ が一緒になって $(CH)_2C(OCCH_3)CH$ であることができるか、あるいは、 $R_{13}$ と $R_{14}$ が一緒になって $-Y_1-C(R_2)_x-C(R_2)_x-Y_1-$ であることができる(ここで、 $Y_1$ はNであり、テトラヒドロキノキサリンを形成し、この場合、 $R_{12}$ は水素またはオキソであってよい)。

30

【 0 0 4 9 】

また式VIIIの化合物において、式：

40

【 化 1 6 】



はテトラヒドロキノリン基であることができる。この場合、 $R_{13}$ と $R_{14}$ は一緒になって $-Y_1-C(R_2)_x-C(R_2)_x-C(R_2)_x-$ であり、 $Y_1$ はNである。このようなテトラヒドロキノリン誘導体において、 $(R_{12})_x$ は水素またはオキソであってよい。また、テトラヒドロイ

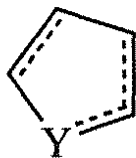
50

ソキノリン基であることもでき、この場合、 $R_{13}$ と $R_{14}$ は一緒になって $-C(R_2)_x-Y_1-C(R_2)_x-C(R_2)_x-$ であり、 $Y_1$ はNであり、 $(R_{12})_x$ は水素またはオキソであってよい。

【0050】

また式VIIIの化合物において、式：

【化17】



10

はシクロペンチル基であることができる。

【0051】

式VIIIのこのようなシクロペンチル誘導体において、 $R_{12}$ がHかつ $R_{13}$ と $R_{14}$ が一緒になって $(CH)_4$ であることができるか、 $R_{12}$ がオキソかつ $R_{13}$ と $R_{14}$ が一緒になって $(CH)_4$ であることができるか、あるいは、 $R_{12}$ が水素かつ $R_{13}$ と $R_{14}$ が一緒になって $(CH_2)_3$ であることができる。

【0052】

本発明の別の態様において、Yが $(CH_2)_3$ であり、XがCHかつ $R_{12}$ がオキソであることができるか、あるいは、Xが $CH_2$ かつ $R_{12}$ がHであることができ、 $R_{13}$ と $R_{14}$ が一緒になって $(CH)_4$ であることができる。また、 $R_{13}$ と $R_{14}$ が一緒になって $(CH)_4$ であることができ、Yが $CH_2C(C(R_{11})_2)_2$  [ここで $R_{11}$ は水素である] であることができるか、あるいは、Yが $-CH_2C(Me)-$ であることができ、 $R_{12}$ が水素またはオキソであることができる。

20

【0053】

最後に、式VIIIの化合物において、式：

【化18】



30

はフェニル基であることができる。

【0054】

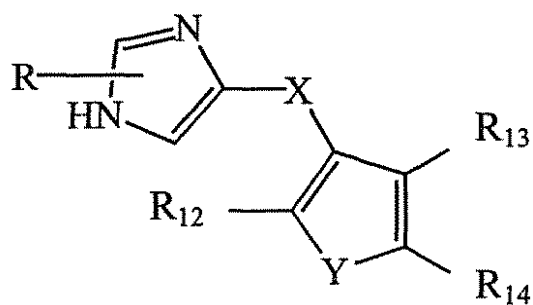
式VIIのこのようなフェニル誘導体において、Xは $CH_2$ であることができ、RはHまたは $CH_3$ であることができ、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ および $R_{14}$ はHであることができるか、あるいは、 $R_{13}$ と $R_{14}$ が一緒になって $O(CR_2)_2O$ であるか(1,4-ベンゾジオキサン誘導体を与える)、あるいは、XはSであることができ、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ および $R_{14}$ はHであることができる。

【0055】

本発明の別の態様において、化合物は、一般式IX：

40

【化19】



IX.

10

[式中、YはSまたはOである]

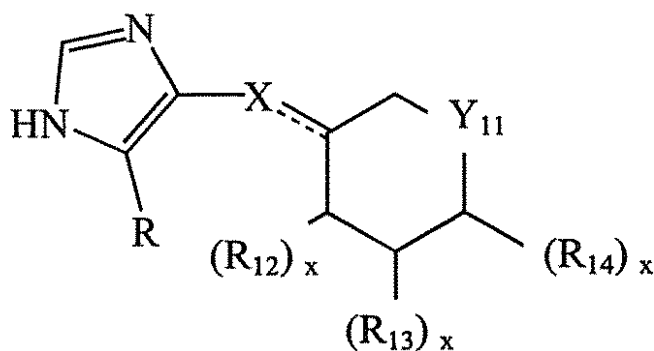
で示される。

式IIIのこのような化合物において、XはC(H)R<sub>11</sub>であってよく、R、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>13</sub>およびR<sub>14</sub>はHであってよく、YはOまたはSであってよい。

【0056】

本発明の別の態様において、化合物は、式X：

【化20】



X.

20

30

[式中、R<sub>13</sub>とR<sub>14</sub>は一緒になって(CH)<sub>4</sub>である]

で示される。

式Xのこのような化合物において、Y<sub>1</sub>はOであってよく、R<sub>12</sub>はオキソであってよく、XはCHまたはCH<sub>2</sub>であるか、またはR<sub>12</sub>の1つがヒドロキシであり、かつその他がHであってよい、またはR<sub>12</sub>がHであってよい。

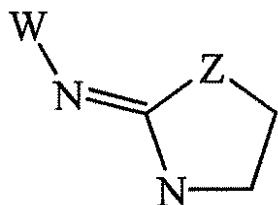
式IVのこのような化合物において、Y<sub>1</sub>はSであってよく、XはCH<sub>2</sub>であってよく、R<sub>12</sub>はオキソであってよい、またはR<sub>12</sub>はHであってよく、かつXはCHであってよく、かつR<sub>12</sub>はオキソであってよい。

40

【0057】

本発明の別の態様において、2Aアドレナリン作動性受容体サブタイプと比較して、2Bまたは2Bおよび2Cアドレナリン作動性受容体サブタイプにおいて選択的結合活性を有する化合物は、以下の式XIによって示される：

【化21】

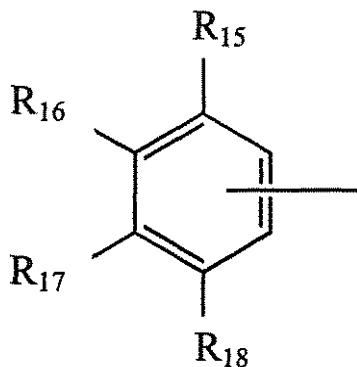


XI.

[式中、Wは、式：

10

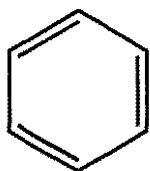
【化22】



20

(式中、 $R_{15}$ 、 $R_{16}$ 、 $R_{17}$ および $R_{18}$ は、Hおよび低級アルキルからなる群から選択される；ただし、 $R_{15}$ および $R_{16}$ または $R_{16}$ および $R_{17}$ の少なくとも1つは、 $OC(R_{19})C(R_{19})N(R)$  (式中、 $R_{19}$ はH、低級アルキルまたはオキソである)であって、式：

【化23】

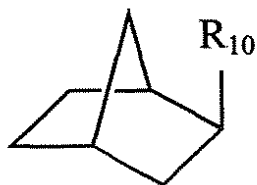


30

との縮合環を形成する)；

および式：

【化24】



40

(式中、 $R_{20}$ はH、低級アルキル、フェニル、または低級アルキル置換されたフェニルである)

からなる群から選択される二環式基であり、  
ZはOまたはNHである]。

Wがノルボルニルである化合物は、1998年1月7日提出の同一出願人の同時係属出願第09/003902号(その全体が本明細書中で参考として援用される)に開示され、特許請求されている。

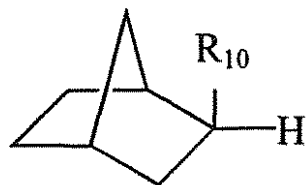
【0058】

本発明の1つの態様において、ZはOであってよく、Wは、式：

50



## 【化 2 5】



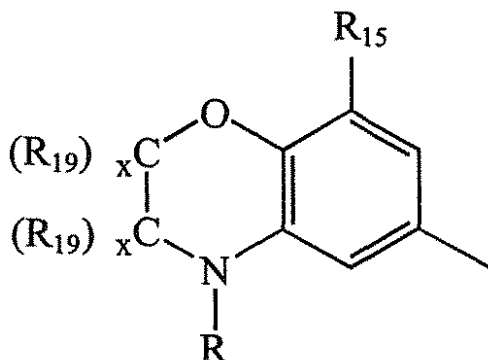
[ $R_{20}$ は、H、フェニル、および *o*-メチルフェニルからなる群から選択することができ、例えば、 $R_{20}$ は *o*-メチルフェニルであってよい]  
 であってよい。

10

## 【0059】

本発明の別の態様において、Wは、式：

## 【化 2 6】



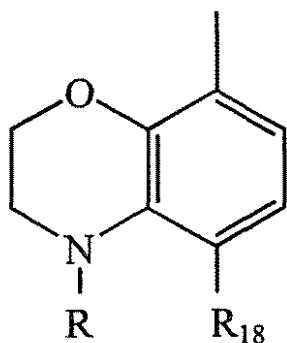
20

[式中、ZはNRであってよく、Rはメチルまたは水素であってよく、 $(R_{19})_x$ の1つはHであってよく、 $R_{15}$ はHであってよい]  
 であってよい。

## 【0060】

また、Wは、式：

## 【化 2 7】



30

[式中、RはHであってよく、 $R_{18}$ はメチルであってよい]  
 であってよい。

40

## 【0061】

上記において、低級アルキル、アルコキシ、アルケニル、またはアルキニルに言及が為されている場合、それは、1～8個の炭素原子、好ましくは1～4個の炭素原子を有する基を意味することが意図されているものと解される。上記においてアリールに言及が為されている場合、それは、6～14個の炭素原子、好ましくは6～10個の炭素原子の基を意味することが意図されている。ハロゲンに言及が為されている場合、フルオロおよびクロロが好ましい。

## 【0062】

1つの態様において、標的化成分はアミノ酸成分であることができる。アミノ酸成分は、

50

ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、タンパク質複合体、抗体、またはこれらの一部であることができる。アミノ酸成分は、好ましくはタンパク質、より好ましくは抗体、さらに好ましくは抗体の一部（-2 B および / または -2 C 受容体に選択的に結合する）である。1つの態様において、抗体の一部は F a b 部分であることができる。1つの態様において、アミノ酸成分は抗体であることができる。抗体は、抗原成分から惹起することができる。抗原成分には、-2 B または C 受容体の細胞外ループが含まれ、これをキーホールリンペットヘモシアニンにさらに結合することができる。1つの態様において、この細胞外ループは、アミノ酸配列：K G D Q G P Q P R G R P Q C K L N Q E（配列番号 1）を含むペプチドフラグメントを含んでなる。

#### 【0063】

別の態様において、アミノ酸成分は、対応する野生型の変異体ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、タンパク質複合体、抗体、またはその一部を含んでなる。例えば、天然のボツリヌス毒素の重鎖は、野生型ポリペプチドである。好ましくは、野生型の変異体を含んでなる標的化成分は、-2 B および / または C 受容体に選択的に結合することができ、野生型アミノ酸配列の少なくとも1つの望ましくない結合特性を欠いている。例えば、1つの態様において、野生型の変異体を含んでなる標的化成分は、-2 B および / または C 受容体に選択的に結合し、運動ニューロンの細胞表面に結合しない。

#### 【0064】

1つの態様において、本発明の薬剤あたり1つの標的化成分が存在する。別の態様において、本発明の薬剤あたり1つを越える標的化成分が存在する。例えば、軽鎖などの治療成分を含んでなる薬剤は、軽鎖に結合したペプチドフラグメントをさらに含むことができ、1つまたは複数の標的化成分を結合させることができる。本発明の単一の薬剤は、追加した標的化成分が薬剤の有効性を増強する（例えば、薬剤を、より選択的におよび / または高親和性で-2 B および / または C に結合させる）限り、任意の数の標的化成分を含むことができる。1つの態様において、単一の薬剤は、2つの標的化成分を含んでなる。別の態様において、単一の薬剤は、3つの標的化成分を含んでなる。

#### 【0065】

野生型の変異体を製造する方法は既知である。例えば、Goeddelらは米国特許第5,223,408号において、野生型タンパク質の少なくとも1つの所望の結合特性を保持し、少なくとも1つの望ましくない結合特性が排除された変異タンパク質の製造方法を開示している。Goeddelらの開示は、その全体が本明細書中で参考として援用される。一般に、Goeddelらの方法は、次の工程を含んでなる：(a)選択された野生型タンパク質上の異なるエピトープに結合することができる少なくとも第1および第2のレポーター分子を獲得する工程、(b)該選択された野生型タンパク質をコードするDNAを突然変異させて、関連の変異体DNA分子のライブラリーを創製する工程、(c)工程(b)で創製した各DNA分子を発現ベクターに挿入する工程（該ベクターは、膜貫通アンカードメインをコードするDNAを含み、これによりベクターのライブラリーを創製する）、(d)工程(c)のベクターで真核細胞（好ましくは哺乳動物細胞）をトランスフェクトする工程、(e)工程(d)の細胞を、DNAの発現を誘導する条件下で培養して、細胞膜上に固定されたキメラ融合タンパク質を産生させる工程、(f)工程(e)の培養細胞を、培養細胞の少なくとも一部が第1または第2のレポーター分子に結合する条件下で、第1および第2のレポーター分子と接触させる工程、(g)接触させた細胞を、第1または第2のレポーター分子との所望の結合パターンに基づいて、好ましくは蛍光活性化細胞選別(FACS)によって選別する工程、ならびに、(h)工程(g)の選別細胞から所望の結合パターンを有する変異タンパク質を得る工程。好ましい結合パターンは、細胞と第1レポーター分子との結合があること、および、細胞と第2レポーター分子との結合がないことを含んでなる。

#### 【0066】

第1および第2のレポーター分子は、一般に、野生型タンパク質に結合することができる抗体、リガンド、および可溶性受容体から選択される分子に結合した検出可能なマーカールを含んでなる。第1および第2のレポーター分子は、典型的には、異なる蛍光団（フルオ

10

20

30

40

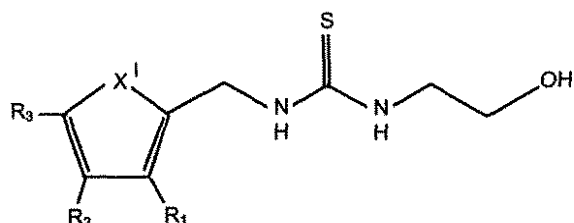
50

ロフォア)にそれぞれ結合したモノクローナル抗体(M a b)である。通常、蛍光団は、フルオレセインまたはフィコエリトリンである。

#### 【0067】

1つの態様において、薬剤の成分は、スペーサー成分によって連結されている。スペーサー成分は、本発明の範囲内で多数の機能を有する。例えば、スペーサー領域の機能の1つは、成分が実質的に内部立体障害を伴うことなく独立して自由に動くことができるように、種々の成分間に適切な距離を供することである。このようなスペーサーは、例えば、ボツリヌス毒素H<sub>C</sub>配列の一部(好ましくは、この部分は運動ニューロンまたは求心性感覚ニューロンに結合する能力を保持しない)、別のアミノ酸配列、または炭化水素部分を含むことができる。また、スペーサー成分は、プロリン、セリン、トレオニン、および/またはヒト免疫グロブリンヒンジ領域に類似または同一のシステインが豊富なアミノ酸配列を含むことができる。好ましい態様において、スペーサー領域は、免疫グロブリン 1 ヒンジ領域のアミノ酸配列を含む[このような配列は、配列(N末端からC末端の方向): E P K S C D K T H T C P P C P (配列番号2)を有する]。1つの態様において、治療成分は、スペーサー成分を介して移行成分に結合し、移行成分は、スペーサー成分を介して標的化成分に結合する。好ましい態様において、治療成分は、スペーサー成分を介して移行成分に結合し、治療成分は、スペーサー成分あるいはジスルフィド結合を介して標的化成分に結合する。さらに好ましい態様において、治療成分は、ボツリヌス毒素A型の軽鎖であり、移行成分は、細胞質への少なくとも軽鎖の移行を促進することができるボツリヌス毒素A型の重鎖またはそのフラグメントであり、標的化成分は、-2 Bおよび/またはC受容体に選択的に結合することができる分子である。例えば、このような選択的に結合する分子は、-2 Bおよび/またはC受容体のアゴニストまたはアンタゴニストであってよい。このような分子の例を、式:

#### 【化28】



#### IV.

[式中、XはR<sub>4</sub>-C=C-R<sub>5</sub>およびR<sub>4</sub>-Cからなる群から選択される]

によって示すことができる。XがR<sub>4</sub>-C=C-R<sub>5</sub>である場合には、6員の炭素環構造が形成される。XがR<sub>4</sub>-Cである場合には、5員の炭素環構造が形成される。R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、およびR<sub>5</sub>は、それぞれ独立して、F、Cl、Br、I、OR<sub>6</sub>、およびHからなる群から選択され、R<sub>6</sub>は、Hまたはアルキル(メチル、エチルもしくはプロピルを含む)である。

#### 【0068】

1つの態様において、治療成分および移行成分は、ボツリヌス毒素(例えば、ボツリヌス毒素A型)の一部である。このような場合、天然の、化学修飾した、組換えの、または部分的組換えのボツリヌス毒素A型を標的化成分に結合させて、本発明の薬剤を形成することができる。さらに、神経毒分子(例えばボツリヌス毒素A型)のH<sub>C</sub>を、H鎖の他のセグメント(H<sub>N</sub>)から、H<sub>N</sub>フラグメントが神経毒分子のL鎖にジスルフィド結合したままであるように除去して、LH<sub>N</sub>として知られているフラグメントを得ることができることが当該分野で既知である。従って、本発明の1つの態様において、クロストリジウム神経毒(例えばボツリヌス毒素A型)のLH<sub>N</sub>フラグメントを、スペーサー成分を使用して標的化成分に共有結合させて、本発明の薬剤を形成する。本発明の別の態様において、クロストリジウム神経毒(例えばボツリヌス毒素A型)のH<sub>C</sub>部分を、突然変異または修飾(例えば、化

学修飾)して、神経筋接合部での神経毒の受容体への結合能力を減少させるか、または好ましくは不能にすることができる。次いで、この改変クロストリジウム神経毒(例えばボツリヌス毒素A型)を、1つまたは複数のスペーサー成分を使用して標的化成分に共有結合させて、本発明の薬剤を形成する。1つの態様において、リンカーを使用して、種々の成分を互いに連結することができる。例えば、リンカーを使用して、治療成分にスペーサー成分を連結することができる。さらに、リンカーを使用して、治療成分を標的化成分と連結することができる。リンカーの使用を含む種々の非限定的な態様を、後記の実施例において示す。

#### 【0069】

本発明の別の広い態様によれば、組換え技術を使用して、少なくとも1つの薬剤成分を製造する。例えば、国際特許出願WO95/32738号(その開示全体が本明細書中で参考として援用される)を参照。この技術は、いずれかの成分(例えば、治療、移行、および/または標的化成分)のコードを有する、合成オリゴヌクレオチド配列または天然供給源からクローン化したDNAから遺伝物質を得る工程を包含する。初めに、この遺伝子構築物をクローニングベクター(例えば、ファージまたはプラスミド)と融合させることによって、遺伝子構築物を、増幅のため宿主細胞に導入する。次いで、クローニングベクターを、宿主(好ましくは大腸菌)中に挿入する。宿主細胞中での組換え遺伝子の発現の後、得られたタンパク質を、通常の技術を使用して単離することができる。発現させたタンパク質は、薬剤の3つ全ての成分を含むことができる。例えば、発現させたタンパク質は、ボツリヌス毒素A型の軽鎖(治療成分)、ボツリヌス毒素A型の重鎖、好ましくはH<sub>N</sub>(移行成分)、ならびに、生理学的条件下で $\alpha$ -2Bアドレナリン作動性受容体に選択的に結合する抗体のFab部分を含むことができる。1つの態様において、発現させたタンパク質は、薬剤の3つ全て未満の成分を含むことができる。このような場合、成分を、好ましくはスペーサー領域を介して化学的に連結することができる。

#### 【0070】

これらの薬剤を組換えによって製造することには多数の利点が存在する。例えば、嫌気性クロストリジウム培養物からの神経毒の製造は、面倒かつ時間のかかる方法であり、いくつかのタンパク質沈殿工程ならびに長時間および反復の毒素結晶化または数段階のカラムクロマトグラフィーのいずれかを必要とする多工程の精製プロトコルを包含する。特に、生成物の高毒性は、操作を厳格な封じ込め(BL-3)のもとで行わなければならないことを強制する。発酵過程に、折り畳まれた一本鎖神経毒が、ニッキングと称される過程により、内因性クロストリジウムプロテアーゼによって活性化される。これには、一本鎖から約10個のアミノ酸残基を除去して、二本鎖形態(2つの鎖が鎖内ジスルフィド結合によって共有結合したままである)を創製することが含まれる。

#### 【0071】

ニッキングされた神経毒は、ニッキングされていない形態よりも活性が高い。ニッキングの量および正確な位置は、毒素を産生する細菌の血清型または外側ループで行われる修飾によって変化する。一本鎖神経毒の活性化、即ち、ニッキングされた毒素の収率の相違は、所与の菌株によって産生されるタンパク質分解活性の種類および量の変動による。例えば、Clostridial botulinum A型の一本鎖神経毒の99%以上は、Clostridial botulinumのHall A菌株によって活性化されるが、B型およびE型菌株は、より低い活性化量で毒素を産生する(発酵時間に依存して0~75%)。即ち、成熟神経毒の高い毒性が、治療薬としての神経毒の商業生産で重要な部分を占める。

#### 【0072】

従って、操作されたクロストリジウム毒素の活性化の程度は、これらの物質の製造のための重要な検討項目である。神経毒(例えば、ボツリヌス毒素および破傷風毒素)を、安全であり、単離が容易であり、かつ完全活性形態への変換が簡単な比較的非毒性の一本鎖(または毒活性を減少させた一本鎖)として、迅速に増殖する細菌(例えば、異種の大腸菌細胞)において高収率で組換えにより発現させることができるなら、これは大きな利点となるであろう。

## 【 0 0 7 3 】

安全を第一に考慮して、従来の研究は、破傷風毒素およびボツリヌス毒素の個々のH鎖およびL鎖の大腸菌での発現および精製に集中していた[これらの単離した鎖自体は無毒である; Liら、Biochemistry、33、7014~7020 (1994)、Zhouら、Biochemistry、34、15175~15181 (1995)を参照(これらは、本明細書中で参考として援用される)]。これらペプチド鎖の個別の製造後、厳格に制御された条件下で、H鎖およびL鎖のサブユニットを、酸化的ジスルフィド結合によって組合わせて、神経麻痺性の二本鎖を形成することができる。

## 【 0 0 7 4 】

1つの態様において、治療成分および移行成分を含んでなる薬剤を、ニッキングされていない一本鎖として組換えによって製造する。Dollyらの米国特許出願09/648,692号(その開示全体が本明細書中で参考として援用される)を参照。好ましい態様において、薬剤は、一本鎖としての発現後にインビトロでの特異的切断に感受性であるアミノ酸配列を含む。このようなタンパク質には、クロストリジウム神経毒およびその誘導体、例えば米国特許第5,989,545号および国際特許出願WO95/32738号(これらは、本明細書中で参考として援用される)に開示されたタンパク質が含まれる。

## 【 0 0 7 5 】

本発明の1つの態様において、タンパク質は、単一のポリペプチド鎖中にクロストリジウム神経毒H鎖の機能的ドメインおよびクロストリジウム神経毒L鎖の機能の一部または全部を含み、HドメインとLドメインの間に位置する挿入タンパク質分解部位を有しており、これにより、一本鎖タンパク質を切断して個々の鎖(好ましくは、ジスルフィド結合によって共有結合した鎖)を製造することができる。タンパク質分解部位は、特定の酵素によって選択的に認識および切断されるアミノ酸配列を含んでなる。

## 【 0 0 7 6 】

本発明の好ましい態様において、発現させた一本鎖タンパク質は、クロストリジウム神経毒のH鎖およびL鎖の生物活性ドメインを含んでなる。従って、鎖ドメインを隔離する内部タンパク質分解部位の切断により、完全な活性を有する神経毒の活性化が得られる。

## 【 0 0 7 7 】

本発明の別の態様において、一本鎖タンパク質は、運動ニューロンによって生成される細胞受容体以外の細胞受容体に標的化された標的化成分を含んでなる。このような結合ドメインは、例えば、 $\alpha$ -2Bおよび/またはアドレナリン作動性受容体に特異的に結合することができる。一本鎖タンパク質は、クロストリジウム神経毒の移行成分に類似した移行成分および治療成分を含むであろう。治療成分は、クロストリジウム神経毒の軽鎖であるか、または異なる治療成分(例えば、酵素、転写可能なヌクレオチド配列、成長因子、アンチセンスヌクレオチド配列など)であることができる。

## 【 0 0 7 8 】

好ましくは、本発明の毒素および毒素ベースのタンパク質を加工して、毒素タンパク質の迅速な単離を促進するように、十分に高い効率で標的化合物に結合することができる結合タグを含む追加のアミノ酸配列を含有させる。このような結合部位を含むタンパク質は多数存在し、当業者に周知であり、モノクローナル抗体、マルトース結合タンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、プロテインA、His<sub>6</sub>タグなどを含み得るが、これらに限定されない。

## 【 0 0 7 9 】

神経毒の取扱いに付随する安全性リスクを最小にするために、本発明のこの態様の薬剤または毒素を、低活性(または不活性)の一本鎖プロ形態として発現させ、次いで、インビトロでの注意深く制御されたタンパク質分解反応によって、好ましくは元の天然神経毒と同レベルの効力に活性化する。タンパク質分解切断の効率および速度を改善するために、操作したタンパク質分解切断部位を、ホロトキシン基質へのプロテアーゼの接近性を促進する一本鎖アミノ酸鎖のH部分とL部分との間の特別に設計されたループ中に存在するように設計することができる。

10

20

30

40

50

## 【0080】

ヒトまたは通常のプロテアーゼによる毒素の意図しない活性化のリスクを減少させるために、切断部位のアミノ酸配列を、好ましくは、ヒトにおいて通常は存在しないタンパク質分解酵素に対して高い特異性を有するように設計する(ヒトプロテアーゼとして、または予知可能なヒト動物相および植物相の一部において存在するものとして)。このようなプロテアーゼの非限定的な例には、アミノ酸配列 D D D D K を切断するウシエンテロキナーゼ、配列 E X X Y X Q S / G を切断するタバコetchウイルス(T E V)プロテアーゼ、配列 H Y または Y H を切断する *Bacillus amyloliquefaciens* 由来の GENENASE(登録商標)、およびアミノ酸配列 L E V L F Q G P を切断するヒトライノウイルス 3 C 由来の PRESSION(登録商標)プロテアーゼが含まれる。上記で使用する文字 X は、任意のアミノ酸を示す。特

10

## 【0081】

本発明の別の態様において、ボツリヌス菌のサブタイプ E 神経毒の鎖間ループ領域(通常、これは細菌および哺乳動物におけるタンパク質分解ニッキングに耐性である)を修飾して、挿入タンパク質分解切断部位を含有させ、このループ領域を、本発明の一本鎖毒素または改変毒素分子中の鎖間ループ領域として使用する。ボツリヌス菌サブタイプ E 由来のループの使用により、ニッキングされていない毒素分子がインピボで安定化され、選択したプロテアーゼの使用によって活性化されるまで、望ましくない切断に対してそれを耐性にするものと考えられる。

20

## 【0082】

広い態様において、本発明の薬剤を使用して、哺乳動物(好ましくはヒト)の疼痛を治療することができる。本発明において記載した薬剤を、疼痛治療のために、直接配合するかまたは薬学的に許容しうる塩としてインピボで 사용할 ことができる。好ましくは、薬剤を使用して慢性疼痛を治療することができる。より好ましくは、薬剤を使用して異痛症を治療することができる。さらに好ましくは、薬剤を使用して、実質的に急性の痛覚または触覚に影響を与えることなく異痛症を治療することができる。本発明をいかなる特定の理論または作用機構にも限定することを望むものではないが、上記のような急性の痛覚または触覚に影響を与えることのない異痛症治療の選択性は、2 B および / または 2 C 受容体に選択的に作用する薬剤によると考えられる。

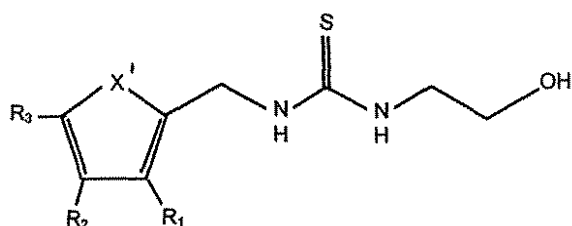
30

## 【0083】

1つの態様において、疼痛の治療方法は、哺乳動物(好ましくはヒト)に治療有効量の本発明の薬剤を投与する工程を含んでなる。本発明に従って治療することができる疼痛の種類

の種々の非限定的な例は、慢性疼痛、異痛症、内臓痛、神経痛、および関連痛である。好ましい態様において、投与される薬剤は、ボツリヌス毒素 A 型の軽鎖を含む治療成分、標的細胞の細胞質への少なくとも軽鎖の移動を促進することができるボツリヌス毒素 A 型の重鎖フラグメントを含む移行成分、および一般式 IV:

## 【化 29】



IV.

40

[式中、X は、 $R_4 - C = C - R_5$  および  $R_4 - C$  からなる群から選択される]

によって示される標的化成分を含有する。X が  $R_4 - C = C - R_5$  である場合には、6 員の炭素環構造が形成される。X が  $R_4 - C$  である場合には、5 員の炭素環構造が形成される。R

50

1、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、および $R_5$ は、それぞれ独立して、F、Cl、Br、I、OR<sub>6</sub>、およびHからなる群から選択され、 $R_6$ は、Hまたはアルキル(メチル、エチルもしくはプロピルを含む)である。

#### 【0084】

薬剤の投与量は多数の因子に依存する。例えば、各成分がそれぞれの機能を良好に発揮することができるほど、所望の治療効果を得るために必要な薬剤の用量が少なくなる。当業者は、それぞれの特定の薬剤のための特定の用量を容易に決定することができる。治療成分および移行成分として、天然、突然変異、または組換えのボツリヌス毒素を使用する薬剤については、薬剤の有効な投与量は、約1単位～約500単位のボツリヌス毒素であってよい。好ましい態様において、投与される薬剤は、約10単位～約300単位のボツリヌス毒素を含んでなる。

10

#### 【0085】

1つの態様において、本発明の投与の経路には、経皮、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、直腸内、および脊髄内投与が含まれるが、これらに限定はされない。本明細書中で使用する「脊髄内」は、硬膜外腔、鞘内腔、脊髄の白質もしくは灰質、または関連構造(例えば、背根および背根神経節)の内部または内側を意味する。脊髄内投与を鞘内によって行うのが好ましいが、これは、比較的大きな鞘内腔を利用するのが比較的容易であるため、ならびに、好ましい薬剤が一般に、脂質に富む硬膜外環境において低い溶解性を示すためである。さらに、本発明の薬剤の脊髄内投与を、カテーテル挿入または脊髄穿刺注射などの種々の経路で行うことができる。本発明の治療効果の長期持続性により、長期の抗侵害受容性薬物投与の必要性が実質的に無くなるので、本方法は、薬剤の低頻度の脊髄穿刺注射によって有利に実施される。さらに、鞘内脊髄穿刺薬剤投与経路は、他のCNSの位置に接近するためにカテーテルを動かすことと比較して、CNS損傷の危険性がより少ないまま、より正確かつ局所的な薬剤の供給を容易にする。例えば、薬剤を、中枢神経系の頭蓋領域、頸部領域、胸郭領域、腰椎領域、および/または仙椎領域に鞘内投与することができる。薬剤の投与の後、疼痛(好ましくは慢性疼痛、より好ましくは異痛症型の疼痛)の緩和は、約2～約27ヶ月間持続する。さらに好ましくは、異痛症型の疼痛が、実質的に急性の痛覚または触覚に影響を与えることなく緩和される。

20

#### 【0086】

本発明で開示した薬剤の投与のための脊髄内経路を、選択した薬剤の溶解性ならびに薬剤の投与量などの基準に基づいて選択することができる。薬剤の投与量は、治療を受ける特定の障害、その重症度、および他の種々の患者の変数(例えば、サイズ、体重、年齢、治療応答性)によって大きく変化することができる。例えば、影響を受ける求心性CNS疼痛ニューロン体細胞の領域の範囲は、注射した薬剤の体積に比例すると考えられ、一方、ほとんどの用量範囲について無痛覚の量は、注射した薬剤の濃度に比例すると考えられる。さらに、薬剤投与のための特定の脊髄内の位置は、治療を受ける疼痛のデルモソーム(dermosome)位置に依存することができる。一般に、適切な投与経路および投与量の決定方法は、担当医によって個別に決定される。このような決定は、当業者には日常的である[例えば、「ハリソンの内科学の原理(1998)」、Anthony Fauciら編、第14版、McGraw Hill出版を参照]。

30

40

#### 【0087】

以下の実施例は、治療成分(例えば、クロストリジウム毒素の軽鎖)を組換えによって製造し、移行成分(例えば、クロストリジウム毒素の重鎖)に再結合させる方法を説明するものである。また、これらの実施例は、本発明の薬剤の種々成分を互いに連結する方法を例示するものである。

#### 【実施例1】

#### 【0088】

#### BONT/A-L鎖遺伝子のサブクローニング

実施例1は、BONT/A-L鎖をコードするポリヌクレオチド配列をクローン化する方法を記載する。BONT/A-L鎖をコードするDNA配列を、配列：5'-A A A G G C

50

C T T T T G T T A A T A A A C A A - 3' (配列番号 3) および 5' - G G A A T T C T T A C T T A T T G T A T C C T T T A - 3' (配列番号 4) を有する合成オリゴヌクレオチドを使用する PCR プロトコルによって増幅することができる。これらプライマーの使用により、B o N T / A - L 鎖遺伝子フラグメントの 5' および 3' 末端に、それぞれ S t u I および E c o R I 制限部位を導入することができる。次いで、これらの制限部位を使用して、増幅生成物の一定方向のサブクローニングを容易にすることができる。さらに、これらのプライマーは、L 鎖コード配列の C 末端に終止コドンを導入する。ボツリヌス菌 (63 A 株) 由来の染色体 DNA を、増幅反応における鋳型として使用することができる。

#### 【0089】

PCR 増幅を、10 mM T r i s - H C l (p H 8.3)、50 mM K C l、1.5 mM M g C l<sub>2</sub>、0.2 mM の各デオキシヌクレオチド三リン酸 (d N T P)、50 p モルの各プライマー、200 ng のゲノム DNA、および 2.5 単位の T a q ポリメラーゼ (Promega) を含む 100  $\mu$  l の体積中で行う。反応混合物を、35 サイクルの変性 (94 で 1 分間)、アニーリング (37 で 2 分間)、および重合 (72 で 2 分間) に供した。最後に、反応物を 72 でさらに 5 分間伸長する。

#### 【0090】

PCR 増幅生成物を、S t u I および E c o R I で消化し、アガロースゲル電気泳動で精製し、S m a I および E c o R I 消化した p B l u e s c r i p t II S K\* にライゲートして、プラスミド p S A L を得ることができる。このプラスミドを保有する細菌形質転換体を、常法によって単離することができる。クローン化 L 鎖ポリヌクレオチドの同一性を、製造元の説明書に従って SEQUENASE (United States Biochemicals) を使用する二本鎖プラスミド配列決定によって確認する。必要に応じて、重複配列決定を行うために合成オリゴヌクレオチド配列決定プライマーを調製する。クローン化配列は、Binz ら [J. Biol. Chem., 265, 9153 (1990)] および Thompson ら [Eur. J. Biochem., 189, 73 (1990)] によって開示された配列と同一であることが見いだされる。

#### 【0091】

また、B o N T / A - L 鎖の酵素活性を損なうように設計した部位指向性の突然変異体を創製することもできる。

#### 【実施例 2】

#### 【0092】

#### ボツリヌス毒素 A - L 型 (B o N T / A - L) 鎖融合タンパク質の発現

実施例 2 は、p C A - L プラスミドを保有する細菌中での野生型 L 鎖 (これは治療成分として使用することができる) の発現を確認する方法を記載する。p C A L を保有する十分に単離した細菌コロニーを使用して、100  $\mu$  g / m l アンピシリンおよび 2 % (w / v) グルコースを含む L - プロスに接種し、震盪しながら 30 で一晩増殖させる。この一晩培養物を、100  $\mu$  g / m l アンピシリンを含む新鮮な L - プロスで 10 倍に希釈し、2 時間インキュベートする。融合タンパク質の発現を、最終濃度 0.1 mM への I P T G の添加によって誘導する。30 でさらに 4 時間のインキュベートの後、細菌を、6,000 x g で 10 分間の遠心によって集める。

#### 【0093】

小規模 SDS - P A G E 分析により、I P T G 誘導した細菌由来のサンプルにおいて、90 k D a のタンパク質バンドの存在を確認した。この M r は、M B P (約 40 k D a) 成分および B o N T / A - L 鎖 (約 50 k D a) 成分を有する融合タンパク質の推定サイズと一致する。さらに、対照培養物から単離したサンプルと比較すると、I P T G 誘導したクローンは、実質的により大量の融合タンパク質を含んでいた。

#### 【0094】

また、I P T G 誘導した細菌抽出物中の所望の融合タンパク質の存在も、Cenci di Bello ら [Eur. J. Biochem., 219, 161 (1993)] により記載されたポリクローナル抗 L 鎖プローブを使用するウェスタンブロットによって確認される。P V D F メンブラン (Pharmacia、Milton Keynes、英国) 上の反応性バンドを、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合させた抗ウ

10

20

30

40

50



サギ免疫グロブリン(Bio-Rad、Hemel Hempstead、英国)およびECL検出システム(Amersham、英国)を使用して視覚化する。ウェスタンブロットの結果により、支配的な融合タンパク質の存在が、完全サイズの融合タンパク質よりも低いMrのタンパク質に対応するいくつかのかすかなバンドと共に確認された。この観察により、融合タンパク質の限定的な分解が、細菌中または単離操作中に起こることが示唆された。単離操作中の1 mMおよび10 mMのベンズアミジン(Sigma、Poole、英国)のいずれによっても、このタンパク質分解は排除されなかった。

#### 【0095】

上記操作によって単離された無傷の融合タンパク質の収率は、本明細書中に記載した全ての操作に対して完全に当てはまった。染色されたSDS-PAGEゲルからの概算に基づく、IPTGで誘導された細菌クローンは、1リットルの培養物あたり5～10 mgの全MBP野生型または突然変異L鎖融合タンパク質を産生した。即ち、本明細書中に開示したBONT/A-L鎖融合タンパク質の製造方法は、限定的なタンパク質分解が起こるにもかかわらず、効率が高い。

10

#### 【0096】

pCALおよびpCAL-TyrU7発現プラスミドによってコードされるMBP-L鎖融合タンパク質を、アミロースアフィニティークロマトグラフィーによって細菌から精製する。次いで、組換え野生型または突然変異のL鎖を、 $X_2$ 因子による部位特異的な切断によって、融合タンパク質の糖結合ドメインから分離する。この切断操作により、遊離MBP、遊離L鎖、および少量の未切断融合タンパク質が得られた。このような混合物中に存在する得られたL鎖は、所望の活性を有することを示し、本発明者は追加の精製工程を使用した。即ち、切断生成物の混合物を、第2のアミロースアフィニティークラムに供する(このカラムはMBPおよび未切断融合タンパク質の両方を結合した)。遊離L鎖はアフィニティークラムに保持されず、これを実験において使用するために単離する。

20

#### 【実施例3】

#### 【0097】

##### 融合タンパク質の精製および組換えBONT/A-L鎖の単離

実施例3は、細菌クローンから野生型組換えBONT/A-L鎖を製造および精製する方法を記載する。野生型BONT/A-L鎖タンパク質を発現する細菌の1リットル培養物からのペレットを、1 mMフェニル-メタンスルホニルフロオリド(PMSF)および10 mMベンズアミジンを含むカラム緩衝液[10 mM Tris-HCl(pH 8.0)、200 mM NaCl、1 mM EGTA、および1 mM DTT]に再懸濁し、超音波処理によって溶解する。この溶解物を、4 における15,000 × gで15分間の遠心によって透明にする。この上清を、アミロースアフィニティークラム[2 × 10 cm、樹脂30 ml](New England Biolabs、Hitchin、英国)に適用する。280 nmでの安定な吸光度の読み値によって判定したときに溶出液がタンパク質を含まなくなるまで、未結合タンパク質を、カラム緩衝液により樹脂から洗浄する。次いで、結合したMBP-L鎖融合タンパク質を、10 mMマルトースを含むカラム緩衝液によって溶出させる。融合タンパク質を含む分画をプールし、150 mM NaCl、2 mM  $CaCl_2$ 、および1 mM DTTを補足した20 mM Tris-HCl(pH 8.0)に対して4 で72時間透析する。

30

40

#### 【0098】

融合タンパク質を、150 mM NaCl、2 mM  $CaCl_2$ 、および1 mM DTTを補足した20 mM Tris-HCl(pH 8.0)緩衝液に対して透析しながら、酵素：基質 = 1：100の比の $X_2$ 因子(Promega、Southampton、英国)で切断することができる。透析を4 で24時間行う。この切断工程で得られたMBPおよび野生型または突然変異L鎖のいずれかの混合物を、カラム緩衝液で平衡化した10 mlのアミロースカラムにかける。通過した分画の一部を、SDS-PAGE分析用に調製し、L鎖を含むサンプルを同定する。通過した分画の残りの部分を、-20 で保存する。全大腸菌抽出物または精製タンパク質を、SDSサンプル緩衝液に溶解し、常法に従ってPAGEに供する。この操作の結果は、サンプルの約90%のタンパク質が組換え毒素フラグメントであることを示

50

した。

#### 【0099】

上記の結果は、本明細書中に記載したMBP-L鎖融合タンパク質の創製アプローチを使用して、野生型および突然変異の組換えBONT/A-L鎖を有効に製造することができることを示す。さらに、これらの結果は、組換えL鎖を、融合タンパク質のマルトース結合ドメインから分離し、その後に精製しうることを示す。

#### 【0100】

組換えL鎖生成物およびその天然の対応物の酵素活性を比較するために、高感度の抗体に基づくアッセイを開発する。このアッセイは、BONT/A切断部位に対応するSNAP-25の無傷のC末端領域に特異性を有する抗体を使用した。SNAP-25のBONT/A切断の反応生成物のウェスタンブロットは、抗体がSNAP-25サブフラグメントに結合することができないことを示した。従って、以下の実施例において使用した抗体試薬は、無傷のSNAP-25のみを検出した。抗体結合がないことを、添加したBONT/A軽鎖およびその組換え誘導体によって媒介されるSNAP-25タンパク質分解の指標として使用した。

#### 【実施例4】

#### 【0101】

##### SNAP-25基質に対する組換えL鎖のタンパク質分解活性の評価

天然および組換えBONT/A-L鎖の両方は、SNAP-25基質をタンパク質分解することができる。定量アッセイを使用して、野生型およびその組換え類似体のSNAP-25基質の切断能力を比較することができる。このアッセイに使用する基質を、トロンビンの切断部位を含むグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)-SNAP-25融合タンパク質を調製することによって獲得し、pGEX-2Tベクターを使用して発現させ、グルタチオンアガロースにおけるアフィニティークロマトグラフィーによって精製する。次いで、SNAP-25を、酵素：基質の比 = 1 : 100において、150 mM NaClおよび2.5 mM CaCl<sub>2</sub>を含む50 mM Tris-HCl (pH 7.5)中のトロンビン[Smithら、Gene、67、31 (1988)]を使用して、融合タンパク質から切断した。未切断融合タンパク質および切断グルタチオン結合ドメインは、ゲルに結合した。組換えSNAP-25タンパク質を、後者の緩衝液で溶出させ、100 mM HEPES (pH 7.5)に対して4で24時間透析する。総タンパク質濃度を、常法によって測定する。

#### 【0102】

SNAP-25のC末端領域に特異的なウサギポリクローナル抗体を、アミノ酸配列：CANQRA TKMLGSG (配列番号7)を有する合成ペプチドに対して惹起する。このペプチドは、シナプス原形質膜タンパク質の残基195～206および天然SNAP-25において見い出されないN末端システイン残基に対応する。合成ペプチドを、架橋剤としてマレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)(Sigma、Poole、英国)を使用してウシ血清アルブミン(BSA)(Sigma、Poole、英国)に結合させて、抗原性を改良する[Liuら、Biochemistry、18、690 (1979)]。抗ペプチド抗体のアフィニティー精製を、架橋剤エチル3-(3-ジメチルプロピル)カルボジイミドを使用してヨード酢酸で活性化した、アミノアルキルアガロース樹脂(Bio-Rad、Hemel Hempstead、英国)にN末端システイン残基を介して結合させた抗原ペプチドを有するカラムを使用して行う。25 mM Tris-HCl (pH 7.4)および150 mM NaClを含む緩衝液でカラムを連続洗浄した後、ペプチド特異的な抗体を、100 mM グリシン (pH 2.5)および200 mM NaClの溶液を使用して溶出させ、0.2 mlの1 M Tris-HCl (pH 8.0)中和緩衝液を含む試験管に集める。

#### 【0103】

野生型L鎖を含む全ての組換え調製物を、0.02% Lubrolおよび10 μM 酢酸亜鉛を含む100 mM HEPES (pH 7.5)中に4で一晩透析し、次いで、その酵素活性を評価する。37で30分間、20 mM DTTで予め還元したBONT/Aならびにこれらの透析サンプルを、1 mM DTTを補足した後者のHEPES緩衝液で異なる濃度に

10

20

30

40

50

希釈する。

【0104】

反応混合物は、5  $\mu$ l の組換え SNAP-25 基質 (最終濃度 8.5  $\mu$ M) および 20  $\mu$ l の還元 BONT/A または組換え野生型 L 鎖のいずれかを含む。全サンプルを、37 で 1 時間インキュベートし、次いで 25  $\mu$ l の 2% トリフルオロ酢酸 (TFA) および 5 mM EDTA 水溶液により反応を停止させる [Foran ら、Biochemistry、33、15365 (1994)]。各サンプルの一部を、SDS-PAGE サンプル緩衝液の添加および煮沸によって SDS-PAGE およびポリクロナル SNAP-25 抗体を用いるウェスタンブロットのために調製する。抗 SNAP-25 抗体の反応性を、ECL 検出システムを使用してモニターし、デンシトメトリースキャンニングによって定量する。

10

【0105】

ウェスタンブロットの結果は、精製した突然変異 L 鎖および天然または組換えの野生型 BONT/A-L 鎖のいずれかのタンパク質分解活性の間の明らかな相違を示す。具体的には、組換え野生型 L 鎖は、SNAP-25 基質を切断するが、還元 BONT/A 天然 L 鎖 (この操作においてポジティブ対照として働く) よりも効率が若干低い。従って、BONT/A-L 鎖の酵素活性形態を、組換え法によって製造し、次いで単離する。さらに、L 鎖タンパク質中の 1 個のアミノ酸の置換により、シナプス終末タンパク質を分解する組換えタンパク質の能力がなくなる。

【0106】

野生型組換え BONT/A-L 鎖の生物活性の予備試験として、ジギトニン透過性にしたウシアドレノクロマフィン細胞からの  $Ca^{2+}$  誘発カテコールアミン放出を減少させる MBP-L 鎖融合タンパク質の能力を調べる。一致して、野生型組換え L 鎖融合タンパク質 (無傷であるか、または、 $X_2$  因子で切断して遊離 MBP および組換え L 鎖を含む混合物を生成させたかのいずれか) は、天然 BONT/A によって引き起こされる阻害と等価な  $Ca^{2+}$  刺激放出の用量依存的阻害を誘導した。

20

【実施例 5】

【0107】

天然 L 鎖、組換え野生型 L 鎖と精製 H 鎖との再構成

天然の H 鎖および L 鎖を、2 M 尿素を使用して BONT/A (List Biologicals Inc., Campbell, 米国) から解離させ、100 mM DTT で還元し、次いで、確立されたクロマトグラフィー法に従って精製する [Kozaki ら、Japan.J.Med.Sci.Biol., 34、61 (1981); Maisy ら、Eur.J.Biochem., 177、683 (1988)]。精製した H 鎖を、等モル量の天然 L 鎖または組換え野生型 L 鎖のいずれかと組み合わせる。25 mM Tris (pH 8.0)、50  $\mu$ M 酢酸亜鉛、および 150 mM NaCl を含む緩衝液に対してサンプルを 4 で 4 日間にわたり透析することによって再構成を行う。透析の後、ジスルフィド結合した 150 kDa の二本鎖を形成させるための組換え L 鎖および天然 H 鎖の会合を、SDS-PAGE によってモニターし、デンシトメトリースキャンニングによって定量する。組換え L 鎖を使用して形成された二本鎖分子の比率は、天然 L 鎖を使用したときに得られる分子よりも低い。実際のところ、約 30% の組換え野生型または変異 L 鎖のみが再構成され、一方、> 90% の天然 L 鎖が H 鎖と再会合した。この低い再構成効率にもかかわらず、組換え L 鎖を一体化した十分な材料が、その後の機能試験で使用するために容易に製造される。

30

40

【実施例 6】

【0108】

マルトース結合タンパク質-Tetx-L 鎖構築物の調製

本実施例は、野生型 L 鎖のマルトース結合融合タンパク質をコードする組換えプラスミドの創製方法を記載する。大腸菌 K-12 株 TG1 を、下記の全プラスミド構築物の増殖のための宿主として使用する。プラスミド pMAL-L (野生型 L 鎖遺伝子) を、Fairweather ら [FEBS Lett., 323、218 (1993)] が記載したプラスミド pTet87 由来の L 鎖をコードする 1417 bp フラグメントのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅によって構築する。この PCR 増幅に使用する 2 つのポリヌクレオチドプライマー (a および d と称する) は

50

、それぞれ配列：5'-AGATGGTCGACATGCCAATAACCAATAAATAAT-3'(配列番号5)および5'-ACGCGAAGCTTTTATCATGCAGTTCTATTATTA-3'(配列番号6)を有する。この反応の増幅生成物をSalIおよびHindIII(Promega)で消化し、同一の酵素で消化しておいたベクターpMAL-c2(New England BioLabs)にライゲートして(図1A)、野生型TeTx配列を保有するプラスミドpMAL-Lを創製する。MAGIC DNA CLEAN-UP SYSTEM(Promega)で精製した後、サンプルをSalIおよびHindIIIで切断しておいたpMAL-c2にライゲートして、突然変異TeTx配列を保有するプラスミドpMAL-LC-A1a2Uを創製する。

#### 【0109】

サブクロニングの後、プラスミドDNAを、アンピシリン耐性形質転換体の培養物から精製し、構築物の構造を、挿入体の制限マッピングおよびDNA配列決定を使用して確認する。SalIおよびHindIII消化により、アガロースゲル電気泳動によって測定したときに1417bpの予想長さを有するフラグメントが得られる。DNA配列決定により、L鎖遺伝子の5'末端、多クローニング部位(MCS)、X因子、切断部位、L鎖、およびMBP暗号配列の接合点におけるヌクレオチド配列が、全て正しい読み取り枠で存在することが確認される(図1A)。上記プラスミド構築物が利用可能であることにより、組換え野生型および突然変異L鎖融合タンパク質の製造が可能になる。具体的には、プラスミドpMAL-Lを保有する細菌クローンの培養物を、イソプロピル-D-チオガラクトシド(IPTG)で誘導して、組換え融合タンパク質の高レベル合成を刺激する。2つの融合タンパク質の大量精製を、細菌抽出物のアミロースアフィニティー樹脂でのアフィニティークロマトグラフィーによって行う。

#### 【実施例7】

#### 【0110】

#### TeTx融合タンパク質の発現および野生型L鎖タンパク質の精製

本実施例は、先の実施例Bに記載したプラスミド構築物によってコードされる組換えL鎖融合タンパク質を産生および精製するための方法を記載する。プラスミドpMAL-Lを保有する大腸菌クローンを、10g/mlアンピシリンおよび2mg/mlグルコースにしたLブロス中、37℃で約 $2 \times 10^8$ 細胞/ml( $A_{500nm}$ が約0.5)の密度まで増殖させる。誘導を、最終濃度0.3mMまでIPTGを添加することによって開始させる。細胞を、6000×gで30分間の遠心によって回収する。次いで、得られたペレットを、1mMフェニルメタンスルホニルフルオリド(PMSF)を含むカラム緩衝液[10mM Tris-HCl、200mM NaCl、1mMエチレングリコールビス(アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-四酢酸、および1mMジチオトレイトール(DTT)(pH7.4)]中に再懸濁し、超音波処理によって溶解する。遠心の後、粗抽出物をアミロースアフィニティークラム(2.5×10cm、樹脂40ml)に適用する。緩衝液での洗浄によって未結合タンパク質を除去した後、結合MBP-L融合タンパク質を、Mainaら[Gene、74、365(1998)]が記載した方法に従って、10mMマルトースを含むカラム緩衝液で溶出させる。単離した融合タンパク質を、AmiconのCENTRICONを使用して0.5~1mg/mlに濃縮する。次いで、タンパク質サンプルを、抗MBPポリクローナル抗体および抗L鎖モノクローナル抗体を使用して、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)およびウェスタンブロットによって分析する。両細胞抽出物のSDS-PAGEにより、未誘導培養物のクーマシー染色パターンでは存在しない誘導タンパク質バンド( $M_r$ は約90,000)の存在が示された。タンパク質バンドの分子量は、MBPとL鎖( $M_r$ がそれぞれ約40,000および50,000)の融合物から予想される分子量に一致する。pMAL-c2ベクター系を使用した組換えL鎖の発現用に確立された最適条件は、IPTGとの37℃で2時間の誘導である。誘導時間をより長くしてもプロテアーゼインヒビターを含有させても、生成物収率は増加しなかった。両融合タンパク質は水性緩衝液に可溶性(0.5mg/mlまで)であり、-20℃で保存したときに8ヶ月間まで安定である。

#### 【0111】

この最初の精製工程の後、両MBP-L鎖調製物を、酵素：タンパク質の比 = 0.5 ~ 1 : 100 (w/w)で、X因子により23で24時間切断する。SDS-PAGEで確認したところ、この切断により、融合タンパク質がそれぞれの野生型L鎖に、MBPの遊離を伴って完全に交換された。カラム緩衝液に対して徹底的に透析を行ってマルトースを除去した後、L鎖を、新しいアフィニティーカラムでの再吸着によってさらに精製する。この精製工程からの所望の生成物は、カラム洗浄分画において見い出される。カラム洗浄分画を、 $A_{280nm}$ でモニターし、SDS-PAGEおよびウェスタンブロットにより再度チェックする。

#### 【0112】

アミノ酸配列決定のために、Tousら[Anal.Biochem.、179、50 (1989)]の記載のように、組換え野生型をSDS-PAGEにかけ、ポリ(ビニリデンジフルオリド)メンブランに移し、モデル4000タンパク質シーケンサー(Chelsea Instruments、ロンドン)で自動化エドマン分解を行う。2つの生成物の微量配列決定により、図1Aに示すように、ベクターの多クローニング部位によってコードされる11個のアミノ酸によって先行される天然L鎖のN末端の残基と同一の4個の残基が明らかとなった。この所望の構造を有する組換えL鎖タンパク質の産生に成功して、次にこれら組成物の酵素活性を試験した。

10

#### 【0113】

天然L鎖の亜鉛依存性プロテアーゼ活性の測定を、組換えL鎖タンパク質の活性のためのアッセイとして使用する。2つの異なるタンパク質基質をこのアッセイにおいて使用する。第1の場合、ウシシナプス小胞(SSV)を使用する。基質のタンパク質分解切断のためのアッセイは、タンパク質ゲルのクーマシー染色およびウェスタンブロットに基づく。組換えL鎖タンパク質のタンパク質分解活性の評価方法および天然および組換えL鎖のインビトロ活性の定量方法は既知であり、これらを使用してこれら組換えL鎖を評価および定量することができる。

20

#### 【実施例8】

#### 【0114】

天然H鎖および組換えL鎖からのT e T xの再会合

実施例7は、天然L鎖または組換え野生型L鎖のいずれかを一体化したT e T x二本鎖の製造方法を記載する。Wellerら[Eur.J.Biochem.、182、649 (1989)]の記載のようにT e T xから精製した天然H鎖を、等モル量の天然L鎖または組換え野生型L鎖のいずれかと組み合わせる。この混合物を、2M尿素、20mM DTT、1M NaCl、および50mM Tris-HCl(pH 8.4)に対して攪拌しながら18時間透析し、50mM Tris-HClおよび600mMグリシン(pH 8.4)に対して攪拌せずに72時間さらに透析する。その一部(300g)を、25mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.4)中でHPLC DEAEカラムにかけ、同一緩衝液中のNaCl勾配(0 ~ 1M)で溶出させる。共有結合再構築の程度を、非還元性SDS-PAGEおよび銀染色によってチェックする。

30

#### 【0115】

二本鎖種の再会合を、天然T e T xと同時移動する染色された高Mrタンパク質バンドの存在によって確認する。組換え野生型および突然変異L鎖について、二本鎖種の相対量は、銀染色ゲルのデンストメトリースキャニングで測定したときに、それぞれ55.1%および56.8%である。天然のH鎖およびL鎖は、同等の再構成レベルを与えた。毒素として鎖間ジスルフィド形成に関与する後者は、DTTによる還元によって遊離のH鎖およびL鎖に元のように交換される。

40

#### 【実施例9】

#### 【0116】

標的化成分への治療成分の連結方法

本発明に従って、治療成分(例えば軽鎖)を、標的化成分に結合させることができる。標的化成分を結合させる軽鎖は、他の結合を含まなくてもよく、また、既に移行成分に結合されていてよい。多くのアプローチが、化合物をタンパク質鎖に連結するために知られている。例えば、リンカー分子を使用して、L鎖ペプチドから標的成分を隔離することがで

50

きる。11個のアミノ酸を、T e T x - L鎖のN末端に、実質的にその機能に影響を与えることなく結合させることが既知である。このために、ボツリヌス毒素または破傷風毒素のL鎖のいずれかのN末端部分が、標的化成分結合点として使用される。

#### 【0117】

基質または結合性分子(例えば標的化成分)として作用するほとんどの分子は、立体障害に感受性ではない位置を有することが知られている。さらに、結合過程は、標的化成分にキラリティを導入すべきではない。さらに、リンカーおよび標的化成分を、共有結合によって結合させるべきである。L鎖と標的化成分の間の距離を、スペーサー成分の挿入によって調整することができる。好ましいスペーサーは、リンカー、薬物およびL鎖に結合することができ、これらをコンジュゲート化するのに役立つことができる官能基を有する。好ましいスペーサー成分には、以下のものが含まれる：

- 1)  $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$  ( $n = 1 \sim 12$ )：これは、ペプチドのアミノ末端に挿入して、それを標的化成分上のリンカーと結合させるのに適する；
- 2)  $\text{HO}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$  ( $n > 10$ )：これは、ペプチドのアミノ末端に結合させて、L鎖を標的化成分上のリンカーと結合させるのに適する；
- 3)  $(\text{C}_5\text{H}_6)_n$  ( $n > 2$ )：これは、L鎖を標的化成分上のリンカーと結合させるのに適する。ベンゼン環は、標的化成分とL鎖の間の硬いスペーサーを与える。勿論、適当な官能基(例えば、以下のXによって示されるような官能基)が、薬物とL鎖を連結するためにベンゼン環上に存在するであろう。

#### 【0118】

種々のタイプのリンカーが想定される。例えば、1つのタイプにおいては、標的化成分-リンカー-L鎖分子は、細胞に導入された後に無傷のままである。別のタイプにおいては、標的化成分-リンカー-L鎖分子は、細胞に導入された後に代謝されて薬物を遊離する。さらに別のタイプにおいては、標的化成分-リンカー-L鎖分子は、細胞表面の外側で代謝されて薬物を遊離する。

#### 【0119】

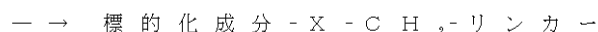
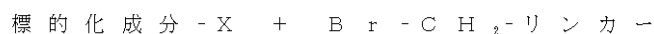
導入後に無傷のままであるリンカー

1つの態様において、当該分野で周知の方法によって、システイン残基をL鎖分子の末端に結合させる。例えば、L鎖分子を有する遺伝子構築物を、タンパク質のN末端部分にシステイン残基を含むように突然変異させることができる。次いで、マレイミドリンカーを、周知の方法によってシステイン残基に結合させる。

#### 【0120】

別の態様において、リンカーを標的化部分に直接結合させる。標的化成分-X部分は、以下の基を有することができる：Xは、OH、SH、NH<sub>2</sub>、CONH、CONH<sub>2</sub>、COOH、COOR<sub>30</sub>(R<sub>30</sub>はアルキル基である)であってよいが、これらに限定されない。勿論、適切な基は、活性部位中に存在せず、また、立体障害性でもない。以下に、標的化成分-Xをリンカー分子に連結する1つの反応例を挙げる。

#### 【化30】



#### 【0121】

標的化成分がリンカー結合されると、以下の反応を使用して、標的化成分を軽鎖(例えば、ボツリヌス毒素A型の軽鎖)に連結することができる。この反応において、軽鎖(好ましくは、ボツリヌス毒素A型の軽鎖)は、標的化成分の結合点として使用される接近可能なリジン基を有する。上記したように、余分のアミノ酸(例えばリジン)を、L鎖遺伝子のN末端部分に容易に付加することができ、標的化成分の結合点として使用することができる。以下の反応においては、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを使用して、L鎖分子上のリジ

10

20

30

40

50

ン基にリンカーを結合させる。

【化 3 1】

標的化成分-リンカー-CHO + NaCNBH<sub>3</sub> + 軽鎖-Lys

→ 標的化成分-リンカー-CH<sub>2</sub>-NH-軽鎖

本発明における使用が想定される標的化成分には、遊離の-XH基を有するもの、ならびに、-2B受容体に結合することができるものが含まれる。

【0122】

10

導入後に切断されるリンカー

細胞に導入した後に標的化成分がL鎖から放出されることは重要であり得る。この方法においては、標的化成分は、遊離の-XH基を有し、これがリンカーを用いる合成のための活性部位となる。-XH基は、アルコール、フェノール、アミン、カルボン酸、またはチオール基であることができる。

導入後に代謝されるように、標的化成分を毒素に連結するための一般式を以下に示す。

【化 3 2】

標的化成分-XH + リンカー + マレイミド

→ 標的化成分-X-リンカー-マレイミド + 軽鎖-SH

20

→ 標的化成分-X-リンカー-マレイミド-軽鎖

(XはO、N/NH、CO<sub>2</sub>、S、またはCONHであってよい)

【0123】

本発明を、ある種の好ましい方法に関連して詳しく記載したが、本発明の範囲内で他の態様、変形および修飾が可能である。例えば、本発明の薬剤は、-2Bアドレナリン作動性受容体によって調節される任意の他の障害の治療で有効であり得る。さらに、本発明を種々の特定の実施例および態様に関連して記載したが、本発明はこれらに限定されず、特許請求の範囲の範囲内で様々に実施できると理解すべきである。

30

【図面の簡単な説明】

【0124】

【図1】軽鎖およびマルトース結合タンパク質を含む融合タンパク質(本明細書中ではMBP-L鎖融合タンパク質と称する)の発現に使用した破傷風毒素(「TeTx」)およびDNA構築物(pMAL-L)を示す図である。図の第1部分の1文字コードは、N末端ミクロ配列決定によって決定した精製組換えL鎖の最初の数個の残基のアミノ酸配列を示すものである。図の第2部分は、L鎖にジスルフィド結合したH鎖を示すものである。亜鉛結合ドメインの位置も図に示す。

40

【 図 1 】

Fig. 1A.

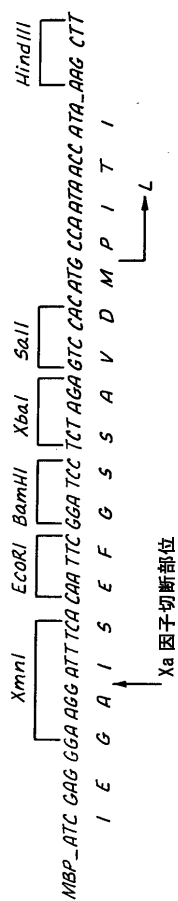
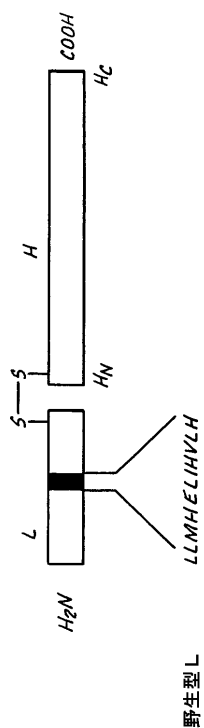


Fig. 1B.





## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
11 July 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/053177 A2**(51) International Patent Classification: **A61K 39/00**

(21) International Application Number: PCT/US01/48651

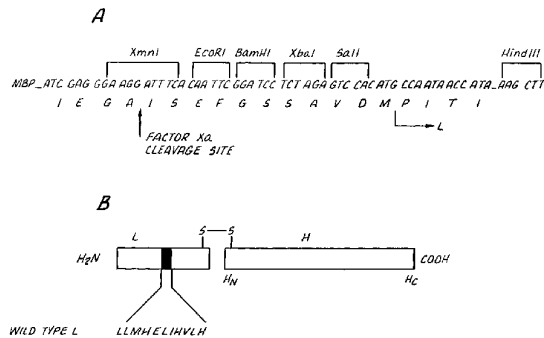
(22) International Filing Date:  
14 December 2001 (14.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
09/751,053 29 December 2000 (29.12.2000) US(71) Applicant: **ALLERGAN SALES, INC.** [US/US]; 2525  
Dupont Drive, Irvine, CA 92612 (US).(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MY, NZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,  
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,  
KI, LS, MW, MY, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent  
(BI, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NI, SN, TD, TG).**Published:**  
without international search report and to be republished  
upon receipt of that report(72) Inventors: **GIL, Daniel, W.**; 2541 Point Del Mar, Corona  
Del Mar, CA 92625 (US); **AOKI, Kei, Roger**; 2 Ginger  
Lilly Court, Coto de Caza, CA 92679 (US).(74) Agents: **FISHER, Carlos, A.** et al.; c/o Allergan Sales,  
Inc., 2525 Dupont Drive, Irvine, CA 92612 (US).For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance  
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning  
of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: AGENTS AND METHODS FOR TREATING PAIN



(57) Abstract: Agents for treating pain, methods for producing the agents and methods for treating pain by administration to a patient of a therapeutically effective amount of the agent are disclosed. The agent may include a clostridial neurotoxin, a fragment or a derivative thereof, attached to a targeting component, wherein the targeting component is selected from a group consisting of compounds which selectively binds at the alpha-2B or alpha-2B/alpha-2C adrenergic receptor subtype(s) as compared to other binding sites, for example, the alpha-2A adrenergic receptor subtype.

WO 02/053177 A2

WO 02/053177

PCT/US01/48651

AGENTS AND METHODS FOR TREATING PAINBackground of the Invention

5 The present invention relates to compositions and methods for treating pain. Particularly, the present invention relates to an agent comprising a neurotoxin, methods for making the agent and methods for treating pain using the agent.

10 "For all the happiness mankind can gain is not in pleasure, but rest from pain." John Dryden (1631-1700).

It is convenient to divide the human pain experience into two general categories, acute and chronic. Any noxious stimulus, for example extreme heat or sharp objects, may elicit an acute pain. The pain resulting from such a stimulus usually subsides in a relatively short period of time. Acute pain may also present itself in the course of any disease. However, such pain is also self-limited and subsides with time or adequate treatment.

20 Chronic pain is the second major category of pain experience. It can be defined as significant pain persisting for more than a few weeks for which there is no adequate therapy available to treat the underlying problem. Globally, there are countless numbers of people who presently are victims of chronic pain. For example, just in the United States alone, the National Institute of Health estimates that more than 90 million Americans suffer from chronic pain stemming from migraine headaches, back pain, arthritis, trauma, allodynia or catastrophic illness.

30 In general, the transduction of acute or chronic pain signals from the periphery to sensation itself is achieved by a multi-neuronal pathway and the information processing centers of the brain. The first nerve cells of the pathway involved in the transmission of sensory

WO 02/053177

PCT/US01/48651

2

stimuli are called primary sensory afferents. The cell bodies for the primary sensory afferents from the head and some of the internal organs reside in various ganglia associated with the cranial nerves, particularly the trigeminal nuclei and the nucleus of the solitary tract. The cell bodies for the primary sensory afferents for the remainder of the body lie in the dorsal root ganglia of the spinal column. The primary sensory afferents and their processes have been classified histologically; the cell bodies fall into two classes: A-types are large (60-120 micrometer in diameter) while B-types are smaller (14-30 micrometer) and more numerous. Similarly the processes fall into two categories: C-fibers lack the myelin sheath that A-fibers possess. A-fibers can be further sub-divided into A beta-fibers, that are large diameters with well-developed myelin, and A delta-fibers, that are thinner with less well developed myelin. It is generally believed that A beta-fibers arise from A-type cell bodies and that A delta- and C-fibers arise from B-type cell bodies.

After the activation of the primary sensory afferents the next step in the transduction of sensory signals is the activation of the projection neurons, which carry the signal, via the spinothalamic tract, to higher parts of the central nervous system such as the thalamic nuclei. The cell bodies of these neurons (other than those related to the cranial nerves) are located in the dorsal horn of the spinal cord. This is also where the synapses between the primary afferents and the projection neurons are located. The dorsal horn is organized into a series of laminae that are stacked, with lamina I being most dorsal followed by lamina II, etc. The different classes of primary afferents make synapses in different laminae. For cutaneous primary afferents, C-fibers make synapses in laminae I and II, A delta-fibers in laminae I, II, and V, and A beta-fibers

WO 02/053177

PCT/US01/48651

3  
in laminae III, IV, and V. Deeper laminae (V-VII, X) are thought to be involved in the sensory pathways arriving from deeper tissues such as muscles and the viscera.

5 The predominant neurotransmitters at the synapses between primary afferents and projection neurons are substance P, glutamate, calcitonin-gene related peptide (CGRP) and neuropeptide Y. The efficiency of transmission of these synapses can be altered via descending pathways and by local interneurons in the spinal cord. These  
10 modulatory neurons release a number of mediators that are either inhibitory (e.g. opioid peptides, glycine, norepinephrine) or excitatory (e.g. nitric oxide, cholecystokinin, norepinephrine), to provide a mechanism for enhancing or reducing awareness of sensations.

15 Although the present available treatments for acute pain are usually manageable, the treatments for chronic pain are inadequate and disappointing. For example, it is known that intraspinal administration of opioids, such as morphine and fentanyl can alleviate pain. See e.g.  
20 Gianno, J., et al., *Intrathecal Drug Therapy for Spasticity and Pain*, Springer-Verlag (1996) (which publication is incorporated herein by reference in its entirety). However, these drugs used in intraspinal, or intrathecal, injections typically have only short lived  
25 antinociceptive effects. As a result, these drugs have to be frequently administered, such as by the aid of a pump for continuous infusion. For example, one frequently used pump is the SynchroMed<sup>®</sup> Infusion System, a programmable, implanted pump available from Medtronic, Inc., of Minneapolis, Minnesota. However, complications  
30 can arise due to the required surgical implantation procedure for the use of the pump and the known intrathecally administered drugs for pain, such as opioids, have the disadvantages of dependency and  
35 potential respiratory depression.

WO 02/053177

PCT/US01/48651

4

Longer acting analgesics are also known, for example, blocks by phenol injection. However, such treatments raise a considerable risk of irreversible functional impairment.

#### Botulinum Toxin

The anaerobic, gram positive bacterium *Clostridium botulinum* produces a potent polypeptide neurotoxin, botulinum toxin, which causes a neuromuscular illness in humans and animals referred to as botulism. The spores of *Clostridium botulinum* are found in soil and can grow in improperly sterilized and sealed food containers of home based canneries, which are the cause of many of the cases of botulism. The effects of botulism typically appear 18 to 36 hours after eating the foodstuffs infected with a *Clostridium botulinum* culture or spores. The botulinum toxin can apparently pass unattenuated through the lining of the gut and attack peripheral motor neurons. Symptoms of botulinum toxin intoxication can progress from difficulty walking, swallowing, and speaking to paralysis of the respiratory muscles and death.

Botulinum toxin type A is the most lethal natural biological agent known to man and has a very potent LD<sub>50</sub>. A specific dose of a toxin that would be lethal to 50% of the population of a certain species of animal is called an LD<sub>50</sub>. For example, the estimated LD<sub>50</sub> of botulinum toxin type A (available from Allergan, Inc., of Irvine, California as a purified neurotoxin complex under the trade name BOTOX®) in humans is about 150,000 picograms or about 3,000 units. Interestingly, on a molar basis, botulinum toxin type A is about 1.8 billion times more lethal than diphtheria toxin, about 600 million times more lethal than sodium cyanide, about 30 million times more lethal than cobra toxin and about 12 million times

WO 02/053177

PCT/US01/48651

5

more lethal than cholera toxin. Singh, *Critical Aspects of Bacterial Protein Toxins*, pages 63-84 (chapter 4) of *Natural Toxins II*, edited by B.R. Singh et al., Plenum Press, New York (1996).

5       Seven immunologically distinct botulinum neurotoxins have been characterized, these being respectively botulinum neurotoxin serotypes A, B, C<sub>1</sub>, D, E, F and G, each of which is distinguished by neutralization with type-specific antibodies. The different serotypes of  
10       botulinum toxin vary in the animal species that they affect and in the severity and duration of the paralysis they evoke. For example, it has been determined that botulinum toxin type A is 500 times more potent, as measured by the rate of paralysis produced in the rat,  
15       than is botulinum toxin type B. Botulinum toxin apparently binds with high affinity to cholinergic motor neurons, is translocated into the neuron and blocks the release of acetylcholine.

      Without wishing to limit the invention to any theory  
20       or mechanism of operation, it is believed that the molecular mechanism of toxin intoxication appears to be similar and involve at least three steps or stages, regardless of the serotype. Although, a potential molecular mechanism of toxin intoxication of botulinum  
25       toxin is discussed here, other toxins, for example, butyricum toxins, tetani toxins or variants thereof may have the same or substantially similar mechanisms. In the first step of the process, the toxin binds to the presynaptic membrane of the target neuron through a  
30       specific interaction between the heavy chain, H chain, and a cell surface receptor; the receptor is thought to be different for each type of botulinum toxin and for tetanus toxin. The carboxyl end segment of the H chain, H<sub>C</sub>, appears to be important for targeting of the toxin to  
35       the cell surface.

WO 02/053177

PCT/US01/48651

6

In the second step, the toxin crosses the plasma membrane of the poisoned cell. The toxin is first engulfed by the cell through receptor-mediated endocytosis, and an endosome containing the toxin is formed. The toxin then escapes the endosome into the cytoplasm of the cell. This step is thought to be mediated by the amino end segment of the H chain, H<sub>N</sub>, which triggers a conformational change of the toxin in response to a pH of about 5.5 or lower. Endosomes are known to possess a proton pump, which decreases intracellular pH. The conformational shift exposes hydrophobic residues in the toxin, which permits the toxin to embed itself in the endosomal membrane. The toxin (or at a minimum the light chain) then translocates through the endosomal membrane into the cytoplasm of the cell.

The last step of the mechanism of botulinum toxin activity appears to involve reduction of the disulfide bond joining the heavy chain, H chain, and the light chain, L chain. The entire toxic activity of botulinum and tetanus toxins is contained in the L chain of the holotoxin; the L chain is a zinc (Zn<sup>++</sup>) endopeptidase, which selectively cleaves proteins essential for recognition and docking of neurotransmitter-containing vesicles with the cytoplasmic surface of the plasma membrane, and fusion of the vesicles with the plasma membrane. Tetanus neurotoxin, botulinum toxin /B/D/F, and /G cause degradation of synaptobrevin (also called vesicle-associated membrane protein (VAMP)), a synaptosomal membrane protein. Most of the VAMP present at the cytoplasmic surface of the synaptic vesicle is removed as a result of any one of these cleavage events. Serotype A and E cleave SNAP-25. Serotype C<sub>1</sub> was originally thought to cleave syntaxin, but was found to cleave syntaxin and SNAP-25. Each toxin specifically

WO 02/053177

PCT/US01/48651

7  
cleaves a different bond (except tetanus and type B, which cleave the same bond).

Botulinum toxins have been discovered to have relatively prolonged neurotoxic effects and, as such, have been adapted for use in the treatment of pain, particularly chronic pain, for example, Foster et al. in U.S. Patent No. 5,989,545, the disclosure of which is incorporated in its entirety herein by reference.

However, most drugs presently being used for treating pain, for example chronic pain, are still inadequate. For example, one type of chronic pain is allodynia. Allodynia is a condition wherein normal non-noxious stimuli elicit pain. Presently known compounds may partially alleviate the conditions of allodynia, but at the same time eliminate the ability of a patient to sense any pain altogether, such as acute pain caused by a noxious stimulus. The ability to detect pain resulting from a noxious stimulus is important--it allows for self-preservation. Also, many agents have undesired side effects, for example sedation, mood changes and/or hypotension. Finally, most such agents have a short therapeutic duration.

Therefore, there continues to be a need to have compounds which are selective and/or long acting for treating pain, preferably chronic pain.

#### Summary of the Invention

In accordance with the present invention, an agent is featured comprising a therapeutic component and a targeting component, which selectively binds at either the alpha-2B or the alpha-2B and alpha-2C adrenergic receptor subtype(s) as compared to the alpha-2A adrenergic receptor subtype at the cell surface. Preferably, such cell is a neuron. In one embodiment, the agent further comprises a translocation component.



WO 02/053177

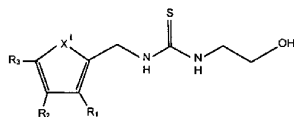
PCT/US01/48651

8

Further in accordance with the present invention, an agent according to this invention may be useful for treating pain, particularly chronic pain, in a mammal, including a human. Additionally, an agent according to this invention may be used to treat chronic pain, for example allodynia, without substantially affecting acute pain sensation or tactile sensation.

Still further in accordance with the present invention, the therapeutic component substantially interferes with the release of neurotransmitters from a cell or its processes. For example, in one embodiment, the therapeutic component comprises a light chain component, which may be able to inhibit the release of neurotransmitters from a cell. The light chain component may be a light chain or a fragment thereof of a Clostridial toxin such as a botulinum toxin type A, B, C<sub>1</sub>, D, E, F, G, a butyricum toxin, a tetani toxin or variants thereof. In another embodiment, the therapeutic component may be a neurotoxin, for example saporin, through inactivating cellular ribosome functions.

Still further in accordance with the invention, the targeting components may be molecules or amino acid components. Amino acid components include, for example, peptides, polypeptides, proteins, protein complexes, and antibodies, provided that these species selectively bind at the alpha-2B or alpha-2B/alpha-2C adrenergic receptor subtype(s). In one embodiment, the molecules may be imiloxan, ARC 239, prazosin or molecules represented by the formula:



IV.

WO 02/053177

PCT/US01/48651

9

wherein X is selected from the group consisting of  $R_4$ -C=C- $R_5$  and  $R_4$ -C. A six membered carbon ring structure is formed when X is  $R_4$ -C=C- $R_5$ . A five membered carbon ring is formed when X is  $R_4$ -C.  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  and  $R_5$  are each independently selected from the group consisting of F, Cl, Br, I,  $OR_6$  and H, wherein  $R_6$  is H or an alkyl, including a methyl, an ethyl or a propyl. In one embodiment, the amino acid component may be antibodies raised from an antigen component. The antigen component may include a second extracellular loop of an alpha-2B receptor, which may additionally be conjugated to a keyhole limpet hemocyanin. In one embodiment, the second extracellular loop comprises a peptide fragment comprising an amino acid sequence of KGDQGFQPRGRPQCKLNQE (SEQ ID#1). In another embodiment, the amino acid component may comprise a peptide, polypeptide, protein, protein complex or antibody, which is a variant of a wild type. For example, an amino acid component may be a mutated H chain of botulinum toxin type A which selectively binds to an alpha 2B receptor, as opposed to the wild type which has a higher affinity to motor neuron cell surface proteins. See Goeddel et al. U.S. Patent No. 5,223,408, the disclosure of which is incorporated in its entirety herein by reference.

Still further in accordance with the present invention, the translocation component is able to facilitate the transfer of a therapeutic component, such as a light chain of a botulinum toxin type A, into the cytoplasm of the target cell. In one embodiment, the translocation component comprises a heavy chain component. The heavy chain component may include a heavy chain or a fragment thereof of a Clostridial toxin such as a botulinum toxin type A, B, C<sub>1</sub>, D, E, F, G, a butyricum toxin, a tetani toxin or variants thereof. The fragment of the heavy chain may include an amino end

WO 02/053177

PCT/US01/48651

10

fragment of the heavy chain. In another embodiment, the heavy chain component may comprise at least a fragment of two different neurotoxins. For example, the heavy chain component may comprise an amino end fragment of heavy chain of a botulinum toxin type A, and a carboxyl end fragment of a heavy chain of botulinum toxin type B.

Still further in accordance with the invention, the therapeutic component, the translocation component and the targeting component are joined by one or more spacer component. For example, the therapeutic component may be joined to the translocation component through a spacer component, and the therapeutic component may be joined to the targeting component through a spacer component. In one embodiment, the spacer component comprises a moiety selected from the group consisting of a hydrocarbon, a polypeptide other than an immunoglobulin hinge region, and a proline-containing polypeptide identical or analogous to an immunoglobulin hinge region. In another embodiment, the therapeutic component may be joined to the translocation component through a spacer component, and the therapeutic component may be joined to the targeting component through a disulfide bridge.

Still further in accordance with the invention, there is provided a method for making an agent of the present invention comprising the step of producing a polypeptide from a gene, which encodes for at least one component of the agent, for example the therapeutic component, the translocation component and/or the targeting component.

Still further in accordance with the invention, there is provided a method for treating pain comprising the step of administering to a mammal, preferably a human, a therapeutically effective amount of an agent of the present invention. In one embodiment, the therapeutic component and the translocation component of the agent is found together in a botulinum toxin, for

WO 02/053177

PCT/US01/48651

11  
example botulinum toxin type A. An agent of the present invention may be administered intrathecally or intramuscularly or subcutaneously, for example at or near the location of pain.

5 Still further in accordance with the invention, the agent may be employed to treat chronic pain. More preferably, the agent may be employed to treat allodynia. Even more preferably the agent may be employed to treat allodynia without substantially affecting acute pain  
10 sensation or tactile sensation. Without wishing to limit the invention to any particular theory or mechanism of operation, it is believed that the selectivity of treating allodynia without affecting acute pain or tactile sensation, as described above, is due to the  
15 agent acting selectively on alpha 2B and/or alpha 2C receptors.

#### **Brief Description of the Figure**

Figure 1 is a schematic representation of the  
20 tetani toxin (hereinafter "TeTx") and the DNA construct (pMAL-L) used to express the fusion proteins comprising a light chain and a maltose binding protein, referred to herein as the MBP-L chain fusion proteins. The single-letter code in the first part of the figure represents  
25 the amino acid sequence of the first several residues of the purified recombinant L chain determined by N-terminal microsequencing. The second part of the figure shows the H chain is disulfide bonded to the L chain. The location of the zinc-binding domain is also  
30 diagrammed.

#### **Detailed Description of the Preferred Embodiments**

The present invention comprises agents and methods

WO 02/053177

PCT/US01/48651

12  
for treating pain, preferably chronic pain, such as,  
without limitation, allodynia and other neuropathic pain,  
visceral pain, pain associated with cancer and pain  
associated with irritable bowel syndrome.

5

#### Definitions

Light chain component comprises a light chain and/or  
a fragment thereof of a clostridial neurotoxin. The  
light chain has a molecular weight of about 50 kDa, and  
10 may be referred to as L chain or L. A light chain or a  
fragment thereof may have proteolytic activity.

Heavy chain component comprises a heavy chain and/or  
a fragment thereof of a clostridial neurotoxin. The full  
length heavy chain has a molecular weight of about 100  
15 kDa and can be referred to as H chain or as H. The  
fragment of the heavy chain may be referred to as H<sub>c</sub> or  
H<sub>n</sub>.

H<sub>c</sub> means a fragment derived from the H chain of a  
clostridial neurotoxin which is approximately equivalent,  
20 for example functionally equivalent, to the carboxyl end  
fragment of the H chain, or the portion corresponding to  
that fragment in the intact H chain involved in binding  
to cell surfaces.

H<sub>n</sub> means a fragment derived from the H chain of a  
clostridial neurotoxin which is approximately equivalent,  
25 for example functionally equivalent, to the amino end  
segment of the H chain, or the portion corresponding to  
that fragment in the intact in the H chain involved in  
the translocation of at least the L chain across an  
intracellular endosomal membrane into a cytoplasm of a  
30 cell.

LH<sub>n</sub> means a fragment derived from a clostridial  
neurotoxin that contains the L chain, or a functional  
fragment thereof coupled to the H<sub>n</sub> domain. It can be  
35 obtained from the intact clostridial neurotoxin by  
proteolysis, so as to remove or to modify the H<sub>c</sub> domain.

WO 02/053177

PCT/US01/48651

13

In a broad embodiment, an agent of this invention comprises a therapeutic component and a targeting component, which selectively binds at the alpha-2B and/or alpha-2C, preferably the alpha-2B, adrenergic receptor subtype(s) as compared to the alpha-2A adrenergic receptor subtype. In one embodiment, the targeting component is at least about 5 times more selective toward the alpha-2B and/or alpha-2C than other binding sites, for example alpha-2A receptors. In a preferred embodiment, the targeting component is at least about 10 times more selective toward the alpha-2B and/or alpha-2C than other binding sites. In a more preferred embodiment, the targeting component is at least about 50 times more selective toward the alpha-2B and/or alpha-2C than other binding sites. In another embodiment, the targeting component is at least about 5 times more selective toward the alpha-2B than other binding sites, for example alpha-2C receptors. In a preferred embodiment, the targeting component is at least about 10 times more selective toward the alpha-2B than other binding sites. In a more preferred embodiment, the targeting component is at least about 50 times more selective toward the alpha-2B than other binding sites. The agent according to this invention is effective as a treatment for pain, preferably chronic pain.

In one embodiment, the therapeutic component substantially interferes with the release of neurotransmitters, preferably neurotransmitters which are involved in pain-signal transmissions, from a neural cell. In a preferred embodiment, the therapeutic component comprises a light chain component. The light chain component may include a light chain of a botulinum toxin, a butyricum toxin, a tetani toxin or biologically active variants of these toxins. The light chain component may also include a fragment of the mentioned light chains, providing that the fragments are

WO 02/053177

PCT/US01/48651

14

biologically active in a physiological environment. That is, these fragments can substantially interfere with the release of neurotransmitters from a cell or its processes. In a preferred embodiment, the light chain component includes a light chain of a botulinum toxin type A, B, C<sub>1</sub>, D, E, F, G or biologically active variants of these serotypes. In another preferred embodiment, the light chain component may even be fragments of the botulinum toxin type A, B, C<sub>1</sub>, D, E, F, G or the biologically active variants of these serotypes, provided that the fragments themselves are biologically active, for example the fragment is able to interfere with the release of neurotoxins from a cell. As used herein, a variant polypeptide, for example a variant polypeptide, may also mean a modified polypeptide, for example modified light chain.

In another embodiment, the therapeutic component detrimentally interferes with cellular functions. For example, the therapeutic component may inactivate cellular ribosomes, preventing protein synthesis. In a preferred embodiment, the therapeutic component comprises saporin.

In yet another embodiment, the therapeutic components are neuroinhibitors. Some neuroinhibitors may interfere with the production of neurotransmitters, while other substantially prevent an action potential. Moreover, the neuroinhibitors of this invention may exert its therapeutic activity from inside a cell and/or outside a cell. Some non-limiting examples of these therapeutic components are aconitine, adenosine agonists/antagonists, adrenergics, anatoxin A, antiepileptics, baclofen, batrachotoxin, brefeldin A, brevetoxin, captopril, curare, dantrolene, doxorubicin, diazepam, grayanotoxin, lidocaine, methocarbamol,

WO 02/053177

PCT/US01/48651

15  
methyllcaconitine, neosaxitoxin, physostigmine,  
psychosine, THA, tetrodotoxin, vesamicol and vigabatam,  
prostaglandin receptor agonist, and antagonist.  
5 Preferably, the therapeutic component, for example, the  
non-limiting example above, may interfere with cells or  
neurons involved in the sensation of pain, preferably  
chronic pain.

In a broad embodiment, an agent according to this  
invention comprises a therapeutic component and a  
10 targeting component. In one embodiment, the therapeutic  
component can exert neurotoxic effects or inhibitory  
effects on the cell or neuron from the exterior of the  
cell or neuron. For example, the therapeutic component  
may include molecules, peptides or antibodies which  
15 prevent the release of neuronal vesicles by preventing an  
action potential. In one embodiment, the therapeutic  
component comprises an antibody, or a portion thereof.  
Such antibody may plug the sodium channel on the neuron's  
exterior to prevent the sodium influx necessary for an  
20 action potential, thus preventing the release of  
neurotransmitters for pain-signal transmission.

In a preferred embodiment, the therapeutic component  
can exert its effect from inside a cell, for example from  
the cytoplasm. For example, the L chain component, a  
25 therapeutic component, exerts its therapeutic effect from  
inside a neuron. In such a case, it is preferred that  
the agent further comprises a translocation component.  
The translocation component is able to facilitate the  
transfer of at least a part of the agent into the  
30 cytoplasm of the target cell. In a preferred embodiment,  
the translocation component comprises a heavy chain  
component. The heavy chain component includes a heavy  
chain or a fragment thereof of a botulinum toxin, a  
butyricum toxin, a tetani toxin or variants thereof.  
35 Preferably, the heavy chain component includes a heavy



WO 02/053177

PCT/US01/48651

16

chain or a fragment thereof of a botulinum toxin type A, B, C<sub>1</sub>, D, E, F, G or variants thereof. More preferably, the heavy chain component comprises a fragment of a heavy chain of a botulinum toxin type A. Even more preferably, the fragment is the amino end (or terminal) fragment of heavy chain of botulinum toxin type A which is capable of facilitating the translocation of at least part of the agent, for example the therapeutic component, from inside a vesicle into the cytoplasm of a cell.

10 In a preferred embodiment, an agent according to this invention comprises a therapeutic component comprising a light chain of a botulinum toxin type A and the translocation component comprising a heavy chain, preferably a fragment thereof, of a botulinum toxin type  
15 A, wherein the heavy chain (or the fragment thereof) can assist in the translocation of at least the therapeutic component into a cytoplasm of a cell. In another preferred embodiment, an agent according to this invention comprises a therapeutic component comprising a  
20 light chain of a tetani toxin and the translocation component comprising a heavy chain, preferably a fragment thereof, of a tetani toxin, wherein the fragment of a heavy chain (or the fragment thereof) can assist in the translocation of at least the therapeutic component into  
25 a cytoplasm of a cell. In yet another embodiment, an agent according to this invention comprises a therapeutic component comprising a light chain of one type of botulinum toxin and a translocation component comprising a heavy chain, preferably a fragment of the heavy chain  
30 such as the H<sub>4</sub>, of another botulinum toxin, constituting a chimeric protein. For example, in one preferred embodiment, an agent in accordance with the invention comprises LH<sub>4</sub> whereof the L chain is derived from botulinum toxin type B and the amine end segment of the H chain fragment is derived from botulinum toxin type A.  
35 The H<sub>4</sub> fragment of the botulinum toxin type A is produced

WO 02/053177

PCT/US01/48651

17  
according to the method described by Shone C. C.,  
Hambleton, P., and Melling, J. (1987, Eur. J. Biochem.  
167, 175-180) and the L chain of botulinum toxin type B  
according to the method of Sathyamoorthy, V. and  
5 DasGupta, B. R. (1985, J. Biol. Chem. 260, 10461-10466).  
The free cysteine on the amine end segment of the H chain  
fragment of botulinum toxin type A is then derivatized by  
the addition of a ten-fold molar excess of dipyridyl  
disulphide followed by incubation at 4 degree C.  
10 overnight. The excess dipyridyl disulphide and the  
thiopyridone by product are then removed by desalting the  
protein over a PD10 column (Pharmacia) into PBS. The  
derivatized H<sub>N</sub> is then concentrated to a protein  
concentration in excess of 1 mg/ml before being mixed  
15 with an equimolar portion of L chain from botulinum toxin  
type B (>1 mg/ml in PBS). After overnight incubation at  
room temperature the mixture is separated by size  
exclusion chromatography over Superose 6 (Pharmacia), and  
the fractions analyzed by SDS-PAGE. The chimeric LH<sub>N</sub> is  
20 then available for dramatization to produce a targeted  
conjugate.

The LH or LH<sub>N</sub> above may further be attached to a  
targeting component to form an agent of the present  
invention. The coupling of the targeting components to  
25 the therapeutic-translocation component, for example LH<sub>N</sub>,  
is achieved via chemical coupling using reagents and  
techniques known to those skilled in the art. Thus,  
although the PDPH/EDAC and Traut's reagent chemistry may  
be used, any other coupling chemistry capable of  
30 covalently attaching the targeting component of the  
agents to the other components known to those skilled in  
the art is covered by the scope of this invention.

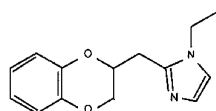
In one embodiment, the targeting components are  
molecules or amino acid components. The amino acid  
35 components may include, for example, peptides,  
polypeptides, proteins, protein complexes and antibodies

WO 02/053177

PCT/US01/48651

18  
or portions thereof, provided that they selectively bind  
at the alpha-2B or alpha-2B and alpha-2C adrenergic  
receptor subtype(s). These molecules, peptides or amino  
acid components may be agonists or antagonists of the  
5 alpha-2B or alpha-2B/alpha-2C adrenergic receptor  
subtype(s). In one preferred embodiment, the molecules  
may be imiloxan (Formula I), ARC 239 (Formula II), and  
prazosin (Formula III). These molecules are represented  
by the following general formulas:

10

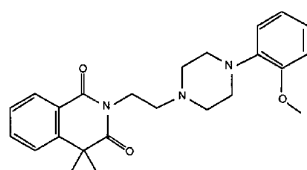


15

Imiloxan

I.

20



25

ARC 239

30

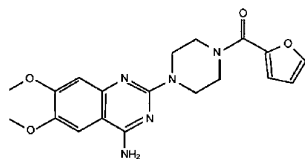
II.

WO 02/053177

PCT/US01/48651

19

5



Prazosin

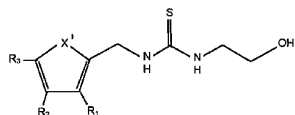
10

III.

The molecules may also be a class of compounds represented by the general Formula IV:

15

20



IV.

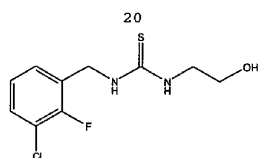
wherein X is selected from the group consisting of  $R_4-C=C-R_5$  and  $R_4-C$ . A six membered carbon ring structure is formed when X is  $R_4-C=C-R_5$ . A five membered carbon ring is formed when X is  $R_4-C$ .  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  and  $R_5$  are each independently selected from the group consisting of F, Cl, Br, I,  $OR_6$  and H, wherein  $R_6$  is H or an alkyl, including a methyl, an ethyl or a propyl. In one preferred embodiment, the targeting component is a compound represented by the general Formula V:

25

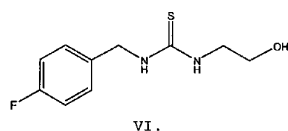
30

WO 02/053177

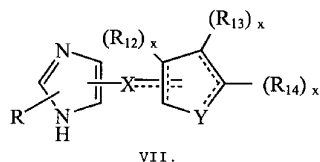
PCT/US01/48651



In another preferred embodiment, the targeting component  
 5 is a compound represented by the general Formula VI:



10 In yet another embodiment, the targeting components are  
 compounds (or molecules) which may be found in U.S.  
 application serial no. 09/548,315, the disclosure of  
 which is incorporated in its entirety by reference  
 herein. These compounds or molecules include ones with  
 15 the following general Formula VII, provided that the  
 molecules have selective binding activity at the  $\alpha 2B$  or  
 $\alpha 2B/2C$  adrenergic receptor subtype(s) as compared to the  
 $\alpha 2A$  adrenergic receptor subtype:



20

wherein the dotted lines represent optional bonds

WO 02/053177

PCT/US01/48651

21  
provided that two double bonds may not share a common carbon atom; R is H or lower alkyl; X is S or C(H)R<sub>11</sub>, wherein R<sub>11</sub> is H or lower alkyl, but R<sub>11</sub> is absent when the bond between X and the ring represented by

5



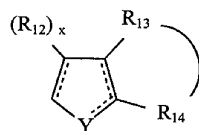
is a double bond; Y is O, N, S, (C(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub>)<sub>y</sub>, wherein y is an integer of from 1 to 3, -CH=CH- or -Y<sub>1</sub>CH<sub>2</sub>-, wherein Y<sub>1</sub> is O, N or S; x is an integer of 1 or 2, wherein x is 1 when R<sub>12</sub>, R<sub>13</sub> or R<sub>14</sub> is bound to an unsaturated carbon atom and x is 2 when R<sub>12</sub>, R<sub>13</sub> or R<sub>14</sub> is bonded to a saturated carbon atom; R<sub>12</sub> is H, halogen, hydroxy, lower alkyl, alkoxy, alkenyl, acyl, alkynyl, or, when attached to a saturated carbon atom, R<sub>12</sub> may be oxo; R<sub>13</sub> and R<sub>14</sub> are, each, H, halogen, lower alkyl, alkenyl, acyl, alkynyl, aryl, e.g. phenyl or naphthyl, heteroaryl, e.g. furyl, thienyl, or pyridyl, and substituted aryl or heteroaryl, wherein said substituent may be halogen, lower alkyl, alkoxy, alkenyl, acyl, alkynyl, nitro, cyano, trifluoromethyl, hydroxy, etc. or, together, are - (C(R<sub>12</sub>)x)z-; -Y<sub>1</sub>(C(R<sub>12</sub>)x)z'-; - Y<sub>1</sub> (C(R<sub>12</sub>)x)y Y<sub>1</sub>-; - (C(R<sub>12</sub>)x)- Y<sub>1</sub>-(C(R<sub>12</sub>)x)-; - (C(R<sub>12</sub>)x)- Y<sub>1</sub>-(C(R<sub>12</sub>)x)- (C(R<sub>12</sub>)x)- and - Y<sub>1</sub>-(C(R<sub>12</sub>)x)- Y<sub>1</sub>-(C(R<sub>12</sub>)x)- wherein z is an integer of from 3 to 5, z' is an integer of from 2 to 4 and x and y are as defined above, and further either end of each of these divalent moieties may attach at either R<sub>3</sub> or R<sub>4</sub> to form a condensed ring structure shown generally as

30

WO 02/053177

PCT/US01/48651

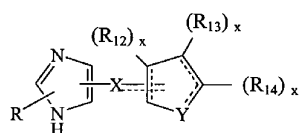
22



5

and the rings formed may be totally unsaturated, partially unsaturated, or totally saturated provided that a ring carbon has no more than 4 valences, nitrogen no more than three and O and S have no more than two. See International Patent Application No WO 98/25669, the disclosure of which is incorporated in its entirety herein by reference.

In another embodiment, the targeting component is represented by the general Formula:



20

VIII.

25

wherein X may be C(H)R<sub>11</sub> and R<sub>11</sub> is H.

Preferably, the, R<sub>12</sub> of Formula VIII may be H and



30

may represent a furanyl radical.

In such furanyl derivatives of Formula II, R<sub>13</sub> and R<sub>14</sub> together may be (CH)<sub>4</sub>, or R<sub>13</sub> may be H and R<sub>14</sub> may be t-butyl, or R<sub>13</sub> and R<sub>14</sub> may be H, or R<sub>13</sub> may be H and R<sub>14</sub> may be methyl or ethyl.

35

WO 02/053177

PCT/US01/48651

23  
Alternatively, in Formula VIII,  $R_{11}$  may be methyl and



may represent a furanyl radical.

Alternatively, in said compounds of Formula VIII,  $R_{12}$  may be H and



15 may represent a thienyl radical.

In such thienyl derivatives of Formula II,  $R_{13}$  and  $R_{14}$ , together, may represent  $(CH_2)_4$ , or  $R_{13}$  may be phenyl and  $R_{14}$  may be H, or  $R_{13}$  and  $R_{14}$ , together, may represent  $(CH_2)_3S$ , or  $R_{13}$  and  $R_{14}$  may be H, or  $R_{13}$  and  $R_{14}$ , together, may represent  $(CH)_4$ , or may be  $R_{13}$  may be H and  $R_{14}$  may be methyl, or  $R_{13}$  may be bromo and  $R_{14}$  may be H, or  $R_{13}$  may be hydrogen and  $R_{14}$  may be chloro, or  $R_{13}$  may be methyl and  $R_{14}$  may be hydrogen.

Alternatively, in the compounds of Formula VIII



may represent a cyclohexyl radical.

30 In such cyclohexyl derivatives of Formula VIII,  $R_{12}$  may be hydrogen and  $R_{13}$  and  $R_{14}$  may, together, represent  $(CH)_4$ , or  $R_{12}$  may be oxo and  $R_{13}$  and  $R_{14}$ , together, may be  $(CH)_4$ , or  $R_{12}$  may be hydrogen or oxo and  $R_{13}$  and  $R_{14}$ , together, may represent  $(CH)_2S$ , or  $R_{12}$  may be hydrogen and  $R_{13}$  and  $R_{14}$  may, together, represent  $(CH_2)_4$ , forming an



WO 02/053177

PCT/US01/48651

24  
 octahydronaphthalene, or  $R_{12}$  may be oxo and  $R_{13}$  and  $R_{14}$  may, together, represent  $(CH_2)_4$ , or  $R_{12}$  may be oxo and  $R_{13}$  and  $R_{14}$ , together, may represent  $(CH)_2 C(CH_3)(CH)$ , or  $R_{12}$  may be hydrogen and  $R_{13}$  and  $R_{14}$ , together, may represent  $S(CH_2)_2$ , or  $R_{12}$ ,  $R_{13}$  and  $R_{14}$  may be H, or  $R_{12}$  may be oxo and  $R_{13}$  and  $R_{14}$ , together, may represent  $(CH)_2 C(OCH_3)CH$ , or  $R_{13}$  and  $R_{14}$  together may represent  $-Y_1-C(R_2)_x-C(R_2)_x-$  wherein  $Y_1$  is N, forming a tetrahydroquinoxaline wherein  $R_{12}$  may be hydrogen or oxo.

10

Alternatively, in the compounds of Formula VIII

15



may represent a tetrahydroquinoline radical wherein  $R_{13}$  and  $R_{14}$  together are  $-Y_1-C(R_2)_x-C(R_2)_x-C(R_2)_x-$  wherein  $Y_1$  is N. In such tetrahydroquinoline derivatives  $(R_{12})_x$  may be hydrogen or oxo; or may represent a tetrahydroisoquinoline radical wherein  $R_{13}$  and  $R_{14}$  together are  $-C(R_2)_x-Y_1-C(R_2)_x-C(R_2)_x-$  wherein  $Y_1$  is N and  $(R_{12})_x$  may be hydrogen or oxo.

Alternatively, in the compounds of Formula VIII

25



may represent a cyclopentyl radical.

30 In such cyclopentyl derivatives of Formula VIII,  $R_{12}$  may be H and  $R_{13}$  and  $R_{14}$ , together, may represent  $(CH)_4$ , or  $R_{12}$  may be oxo and  $R_{13}$  and  $R_{14}$ , together, may represent  $(CH)_4$ , or  $R_{12}$  may be hydrogen and  $R_{13}$  and  $R_{14}$ , together, may represent  $(CH_2)_3$ .

35 In another aspect of the invention, Y is  $(CH_2)_3$  and X may be CH and  $R_{12}$  may be oxo or X may be  $CH_2$  and  $R_{12}$  may

WO 02/053177

PCT/US01/48651

25  
 be H and  $R_{13}$  and  $R_{14}$ , together, may represent  $(CH)_4$ .  
 Alternatively,  $R_{13}$  and  $R_{14}$ , together, may represent  $(CH)_4$ ,  
 Y may be  $CH_2C(C(R_{11})_2)_2$  wherein  $R_{11}$  is hydrogen, or Y may  
 be  $-CH_2C(Me)-$  and  $R_{12}$  may be hydrogen or oxo.

5 Finally, in the compounds of Formula VIII



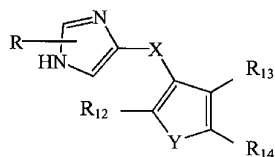
10

may represent a phenyl radical.

In such phenyl derivatives of Formula VII, X may be  
 $CH_2$ , R may be H or  $CH_3$ ,  $R_{12}$ ,  $R_{13}$  and  $R_{14}$  may be H, or  $R_{13}$  and  
 $R_{14}$ , together, represent  $O(CR_2)_2O$  to provide a 1,4-  
 15 benzodioxan derivative, or alternatively, X may be S and  
 $R_{12}$ ,  $R_{13}$  and  $R_{14}$  may be H.

In another aspect of the invention, said compound has the  
 general Formula IX:

20



25

IX.

wherein Y is S or O.

30

In such compound of Formula III, X may be  $C(H)R_{11}$ ,

$R$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,

$R_{13}$  and  $R_{14}$  may be H and Y may be O or S.

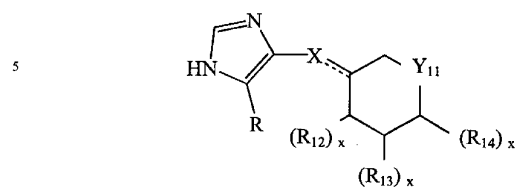
In another aspect of the invention, said compound  
 has the formula X.

35

WO 02/053177

PCT/US01/48651

26



X.

and  $R_{13}$  and  $R_{14}$ , together, represent  $(CH)_4$ .

In such compounds of Formula X,  $Y_1$  may be O,  $R_{12}$  may be oxo and X is CH or  $CH_2$ , or one of  $R_{12}$  is hydroxy and the other may be H, or  $R_{12}$  may be H.

In such compounds of Formula IV,  $Y_1$  may be S, X may be  $CH_2$  and  $R_{12}$  may be oxo, or  $R_{12}$  may be H and X may be CH and  $R_{12}$  may be oxo.

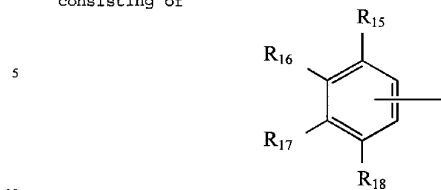
In another aspect of the invention, the compound having selective binding activity at the 2B or 2B and 2C adrenergic receptor subtype(s) as compared to the 2A adrenergic receptor subtype is represented by the formula XI.



WO 02/053177

PCT/US01/48651

wherein W is a bicyclic radical selected from the group consisting of



wherein  $R_{15}$ ,  $R_{16}$ ,  $R_{17}$  and  $R_{18}$  are selected from the group consisting of H and lower alkyl provided that at least one of  $R_{15}$  and  $R_{16}$  or  $R_{16}$  and  $R_{17}$  are  $OC(R_{19})C(R_{19})N(R)$  to form a condensed ring with



wherein  $R_{19}$  is H, lower alkyl or oxo;  
and



wherein  $R_{20}$  is H, lower alkyl, phenyl or lower alkyl substituted phenyl, and Z is O or NH. Compounds wherein W is norbornyl are disclosed and claimed in commonly assigned co-pending application 09/003902, filed on 7 January, 1998, which is hereby incorporated by reference in its entirety.

30

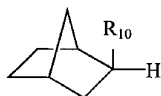
WO 02/053177

PCT/US01/48651

28

In one aspect of the invention Z may be O and W may be

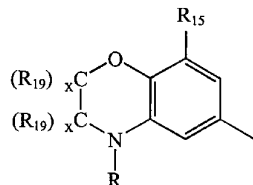
5



10

and  $R_{20}$  may be selected from the group consisting of H, phenyl and o-methylphenyl, e.g.  $R_{20}$  may be o-methylphenyl.

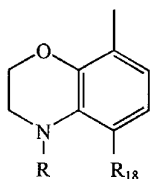
In another aspect of the invention W may be



15

wherein Z may be NR, R may be methyl or hydrogen, one of  $(R_{19})_x$  may be H and  $R_{15}$  may be H.

Alternatively, W may be



20

wherein R may be H and  $R_{18}$  may be methyl.

It is understood that wherein a reference to lower alkyl, alkoxy, alkenyl or alkynyl is made above, it is intended to mean radicals having from one to eight

WO 02/053177

PCT/US01/48651

29

carbons, preferably from one to four carbon atoms. Where reference to aryl is made above, it is intended to mean radicals of from six to fourteen carbon atoms, preferably from six to ten carbon atoms. Where reference is made to  
5 halogen, fluoro and chloro are preferred.

In one embodiment, the targeting component may be an amino acid component. An amino acid component may be a peptide, a polypeptide, a protein, a protein complex, an antibody or a portion thereof. Preferably the amino acid  
10 component is a protein, more preferably an antibody, even more preferably a portion of an antibody, which selectively binds to the alpha-2B and/or the alpha-2C receptor. In one embodiment, a portion of an antibody may be a Fab portion. In one embodiment the amino acid  
15 component may be an antibody. The antibody may be raised from an antigen component. The antigen component may include an extracellular loop of an alpha-2B or C receptor, which may additionally be conjugated to a keyhole limpet hemocyanin. In one embodiment, the  
20 extracellular loop comprises a peptide fragment comprising an amino acid sequence of KGDQGPQPRGRPQCKLNQE (SEQ ID#1).

In another embodiment, the amino acid component comprises a variant peptide, polypeptide, protein,  
25 protein complex, antibody or a portion thereof of a corresponding wild type. For example, a naturally existing heavy chain of a botulinum toxin is a wild type polypeptide. Preferably, the targeting component comprising a variant of a wild type is able to  
30 selectively bind to alpha-2B and/or C receptor and is free of at least one undesired binding property of the wild type sequence of amino acid. For example, in one embodiment, the targeting component comprising a variant of a wild type selectively binds to alpha-2B and/or C  
35 receptor and does not bind to a motor neuron cell surface.

WO 02/053177

PCT/US01/48651

30

In one embodiment, there is one targeting component per agent of the present invention. In another embodiment, there are more than one targeting components per agent of the present invention. For example, an agent comprising a therapeutic component, such as a light chain, may further include a peptide fragment attached to the light chain, wherein one or more targeting components may be attached. A single agent of the present invention may comprise any number of targeting components, as long as the added targeting component enhances the agent's effectiveness, for example, allow the agent to bind to the -2B and/or C more selectively and/or with higher affinity. In one embodiment, a single agent comprises two targeting components. In another embodiment, a single agent comprises three targeting components.

Methods for producing variants of wild type are known. For example, Goeddel et al. in U.S. Patent No. 5,223,408 disclose a method for producing variant proteins which retains at least one desired binding property and eliminating at least one undesired binding property of the wild type protein. The disclosure of Goeddel et al. is incorporated in its entirety herein by reference. In general, the method of Goeddel et al. comprises (a) obtaining at least a first and second reporter molecule capable of binding to different epitopes on the selected wild-type protein; (b) mutating DNA encoding the selected wild-type protein thereby creating a library of related variant DNA molecules; (c) inserting each DNA molecule created in step (b) into an expression vector, wherein the vector comprises DNA encoding a transmembrane anchor domain thereby creating a library of vectors; (d) transfecting eukaryotic cells, preferably mammalian, with the vectors of step (c); (e) culturing the cells of step (d) under conditions inducing the expression of the DNA to produce a chimeric fusion protein immobilized on the cell membrane; (f) contacting

WO 02/053177

PCT/US01/48651

31

the cultured cells of step (e) with the first and second reporter molecules under conditions for which at least a portion of the cultured cells bind to the first or second reporter molecules; (g) sorting the contacted cells, preferably by fluorescence activated cell sorting (FACS), based on a desired binding pattern with the first or second reporter molecules; and (h) obtaining the variant proteins having the desired binding pattern from the sorted cells from (g). The preferred binding pattern comprises binding the cells with the first reporter molecule and the absence of binding of the cells with the second reporter molecule.

The first and second reporter molecules generally comprise a detectable marker conjugated to a molecule selected from; antibodies, ligands, and soluble receptors that are capable of binding with the wild-type protein. The first and second reporter molecules are typically monoclonal antibodies (Mabs) each conjugated to a different fluorophore. Normally the fluorophores will be fluorescein or phycoerythrin.

In one embodiment, the components of the agents are joined by a spacer component. Spacer components have many functions within this invention. For example, one of the functions of the spacer regions is to provide for adequate distance between the various components so that the components can independently and freely move about, without substantial internal steric hindrance. Such a spacer may comprise, for example, a portion of the botulinum toxin H<sub>c</sub> sequence (preferably the portion does not retain the ability to bind to motor neurons or sensory afferent neurons), another sequence of amino acids, or a hydrocarbon moiety. The spacer component may also comprise a proline, serine, threonine and/or cysteine-rich amino acid sequence similar or identical to a human immunoglobulin hinge region. In a preferred embodiment, the spacer region comprises the amino acid

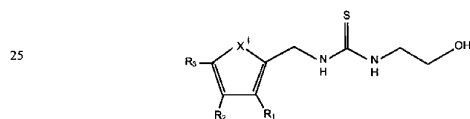


WO 02/053177

PCT/US01/48651

32

sequence of an immunoglobulin  $\gamma$ 1 hinge region; such a sequence has the sequence (from N terminus to C terminus):EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID#2). In one embodiment, the therapeutic component attaches to the translocation component through a spacer component, and the translocation component also attaches to the targeting component through a spacer component. In a preferred embodiment, the therapeutic component attaches to the translocation component through a spacer component, and the therapeutic component also attaches to the targeting component through a spacer component, or alternatively a disulfide bond. In a more preferred embodiment, the therapeutic component is a light chain of a botulinum toxin type A, the translocation component is a heavy chain, or a fragment thereof, of a botulinum toxin type A which can facilitate the translocation of at least the light chain into a cytoplasm of a cell, and the targeting component is a molecule which can selectively bind to the  $\alpha$ -2B and/or C receptors. For example, such a selectively binding molecule may be an agonist or antagonist of the  $\alpha$ -2B and/or C receptor. An example of such molecule may be represented by the formula:



IV.

30 wherein X is selected from the group consisting of  $R_4$ -C=C- $R_3$  and  $R_4$ -C. A six membered carbon ring structure is formed when X is  $R_4$ -C=C- $R_3$ . A five membered carbon ring is formed when X is  $R_4$ -C.  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  and  $R_5$  are each independently selected from the group consisting of F, Cl, Br, I,  $OR_6$  and H, wherein  $R_6$  is H or an alkyl, including a methyl, an ethyl or a propyl.

35

WO 02/053177

PCT/US01/48651

33

In one embodiment, the therapeutic component and the translocation component are part of a botulinum toxin, for example botulinum toxin type A. In such a case, a natural, a chemically modified, a recombinant or partially recombinant botulinum toxin type A may be attached to a targeting component, forming the agent of the present invention. Furthermore, it is known in the art that the  $H_c$  of the neurotoxin molecule, for example botulinum toxin type A, can be removed from the other segment of the H chain, the  $H_n$ , such that the  $H_n$  fragment remains disulphide linked to the L chain of the neurotoxin molecule to provide a fragment known as known as the  $LH_n$ . Thus, in one embodiment of the present invention the  $LH_n$  fragment of a Clostridial neurotoxin, for example botulinum toxin type A, is covalently coupled, using a spacer component to a targeting component forming an agent of the present invention. In another embodiment of the invention, the  $H_c$  part of the Clostridial neurotoxin, for example botulinum toxin type A, may be mutated or modified, e.g. by chemical modification, to reduce, or preferably incapacitate, its ability to bind the neurotoxin to receptors at the neuromuscular junction. This modified Clostridial neurotoxin, for example botulinum toxin type A, is then covalently coupled, using one or more spacer components, to a targeting component forming an agent of the present invention. In one embodiment, a linker may be employed to join various components together. For example, a linker may be used to join a spacer component to a therapeutic component. Additionally, a linker may be used to join a therapeutic component with a targeting component. Various non-limiting embodiments which include the use of linkers are provided in the examples below.

According to another broad aspect of this invention recombinant techniques are used to produce at least one

WO 02/053177

PCT/US01/48651

34

of the components of the agents. See, for example International Patent Application Publication WO 95/32738, the disclosure of which is incorporated in its entirety herein by reference. The technique includes steps of obtaining genetic materials from DNA cloned from natural sources, or synthetic oligonucleotide sequences, which have codes for one of the components, for example the therapeutic, translocation and/or targeting component(s). The genetic constructs are incorporated into host cells for amplification by first fusing the genetic constructs with a cloning vectors, such as phages or plasmids. Then the cloning vectors are inserted into hosts, preferably *E. coli*'s. Following the expressions of the recombinant genes in host cells, the resultant proteins can be isolated using conventional techniques. The protein expressed may comprise all three components of the agent. For example, the protein expressed may include a light chain of botulinum toxin type A (the therapeutic component), a heavy chain, preferably the H<sub>0</sub>, of a botulinum toxin type A (the translocation component), and a Fab portion of an antibody which selectively binds to an alpha-2B adrenergic receptor under physiological conditions. In one embodiment, the protein expressed may include less than all three components of the agent. In such case, the components may be chemically joined, preferably through a spacer region.

There are many advantages to producing these agents recombinantly. For example, production of neurotoxin from anaerobic *Clostridium* cultures is a cumbersome and time-consuming process including a multi-step purification protocol involving several protein precipitation steps and either prolonged and repeated crystallization of the toxin or several stages of column chromatography. Significantly, the high toxicity of the product dictates that the procedure must be performed under strict containment (BL-3). During the fermentation

WO 02/053177

PCT/US01/48651

35  
process, the folded single-chain neurotoxins are  
activated by endogenous Clostridial proteases through a  
process termed nicking. This involves the removal of  
approximately 10 amino acid residues from the single-  
chain to create the dichain form in which the two chains  
5 remain covalently linked through the intrachain disulfide  
bond.

The nicked neurotoxin is more active than the  
unnicked form. The amount and precise location of  
10 nicking varies with the serotypes of the bacteria  
producing the toxin or with the modification made in the  
outer loop. The differences in single-chain neurotoxin  
activation and, hence, the yield of nicked toxin, are due  
to variations in the type and amounts of proteolytic  
15 activity produced by a given strain. For example,  
greater than 99% of *Clostridial botulinum* type A single-  
chain neurotoxin is activated by the Hall A *Clostridial*  
*botulinum* strain, whereas type B and E strains produce  
toxins with lower amounts of activation (0 to 75%  
20 depending upon the fermentation time). Thus, the high  
toxicity of the mature neurotoxin plays a major part in  
the commercial manufacture of neurotoxins as therapeutic  
agents.

The degree of activation of engineered Clostridial  
25 toxins is, therefore, an important consideration for  
manufacture of these materials. It would be a major  
advantage if neurotoxins such as botulinum toxin and  
tetanus toxin could be expressed, recombinantly, in high  
yield in rapidly-growing bacteria (such as heterologous  
30 *E. coli* cells) as relatively non-toxic single-chains (or  
single chains having reduced toxic activity) which are  
safe, easy to isolate and simple to convert to the fully-  
active form.

With safety being a prime concern, previous work has  
35 concentrated on the expression in *E.coli* and purification

WO 02/053177

PCT/US01/48651

36

of individual H and L chains of tetanus and botulinum toxins; these isolated chains are, by themselves, non-toxic; see Li et al., *Biochemistry* 33:7014-7020 (1994); Zhou et al., *Biochemistry* 34:15175-15181 (1995), hereby  
5 incorporated by reference herein. Following the separate production of these peptide chains and under strictly controlled conditions the H and L subunits can be combined by oxidative disulphide linkage to form the neuroparalytic di-chains.

10 In one embodiment, an agent comprising a therapeutic component and a translocation component is recombinantly produced as an unnicked single chain. See Dolly et al. US 09/648,692, the disclosure of which is incorporated in its entirety by reference herein. In a preferred  
15 embodiment, the agent includes an amino acid sequence that is susceptible to specific cleavage in vitro following expression as a single chain. Such proteins may include clostridial neurotoxins and derivatives thereof, such as those proteins disclosed in U.S. Patent  
20 5,989,545 and International Patent Application WO95/32738, both incorporated by reference herein.

In one embodiment of the invention the protein comprises the functional domains of a clostridial neurotoxin H chain and some or all of the functions of a  
25 clostridial neurotoxin L chain in a single polypeptide chain, and having an inserted proteolytic cleavage site located between the H domain and the L domain by which the single chain protein may be cleaved to produce the individual chains, preferably covalently linked by a  
30 disulfide linkage. The proteolytic cleavage sites comprise amino acid sequences that are selectively recognized and cleaved by a specific enzyme.

In a preferred embodiment of the invention, the expressed single-chain proteins comprise the biologically  
35 active domains of the H chain and L chain of a clostridial neurotoxin. Scission at the internal

WO 02/053177

PCT/US01/48651

37

proteolytic cleavage site separating the chain domains thus results in the activation of a neurotoxin having full activity.

5 In another embodiment of the invention the single-chain proteins comprise a targeting component targeted to a cell receptor other than one borne by a motor neuron. Such a binding domain may specific bind to, for example, an alpha-2B and/or adrenergic receptor. The single-chain proteins will contain a translocation component similar  
10 to that of clostridial neurotoxins, and a therapeutic component. The therapeutic component may be a clostridial neurotoxin light chain, or may be a different therapeutic component such as an enzyme, a transcribable nucleotide sequence, growth factor, an antisense  
15 nucleotide sequence and the like.

Preferably, the toxins and toxin-based proteins of the present invention will be tailored to contain an additional amino acid sequence comprising a binding tag  
20 able to bind a target compound at sufficiently high efficiency to facilitate rapid isolation of the toxin protein. Proteins containing such binding sites are many and well known to those of skill in the art, and may comprise, without limitation, monoclonal antibodies, maltose binding protein, glutathione-S-transferase,  
25 protein A, a His<sub>6</sub> tag, and the like.

To minimize the safety risk associated with handling neurotoxin, the agents, or toxins of the this aspect of the present invention are expressed as their low activity (or inactive) single-chain proforms, then, by a carefully  
30 controlled proteolytic reaction *in vitro*, they are activated, preferably to the same potency level as the native neurotoxin from which they were derived. To improve the efficiency and rate of proteolytic cleavage the engineered proteolytic cleavage sites can be designed  
35 to occur in a specially-designed loop between the H and L portions of the single amino acid chain that promotes

WO 02/053177

PCT/US01/48651

38

accessibility of the protease to the holotoxin substrate.

To reduce the risk of unintentional activation of the toxin by human or commonly encountered proteases, the amino acid sequences of the cleavage site are preferably designed to have a high degree of specificity to proteolytic enzymes which do not normally occur in humans (as either human proteases or occurring in part of the foreseeable human fauna and flora). A non-exclusive list of examples of such proteases includes bovine enterokinase, which cleaves the amino acid sequence DDDDK; tobacco etch virus (TEV) protease, which cleaves the sequence EXXXYQS/G; GENENASE<sup>®</sup> from *Bacillus amyloliquifaciens*, which cleaves the sequence HY or YH; and PRESSION<sup>®</sup> protease from human rhinovirus 3C, which cleaves the amino acid sequence LEVLPQGP. As used above, the letter X indicates any amino acid. All amino acid sequences shown in the present specification are in the direction from amino terminus to carboxyl terminus, and all nucleotide sequences from 5' to 3', (from left to right) unless otherwise indicated.

In another aspect of the invention the interchain loop region of the *C. botulinum* subtype E neurotoxin, which is normally resistant to proteolytic nicking in the bacterium and mammals, is modified to include the inserted proteolytic cleavage site, and this loop region used as the interchain loop region in the single-chain toxin or modified toxin molecules of the present invention. It is believed that using the loop from *C. botulinum* subtype E will stabilize the unnicked toxin molecule in vivo, making it resistant to undesired cleavage until activated through the use of the selected protease.

In a broad embodiment, an agent according to this invention may be used to treat pain in a mammal, preferably a human. The agents described in this

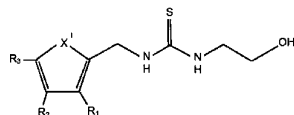
WO 02/053177

PCT/US01/48651

39

invention can be used in vivo, either directly formulated or as a pharmaceutically acceptable salt, for treatment of pain. Preferably, the agent may be employed to treat chronic pain. More preferably, the agent may be employed to treat allodynia. Even more preferably the agent may be employed to treat allodynia without substantially affecting acute pain sensation or tactile sensation. Without wishing to limit the invention to any particular theory or mechanism of operation, it is believed that the selectivity of treating allodynia without affecting acute pain or tactile sensation, as described above, is due to the agent acting selectively on alpha 2B and /or alpha 2C receptors.

In one embodiment, a method for treating pain comprises the step of administering to a mammal, preferably a human, a therapeutically effective amount of an agent according to this invention. Various non-limiting examples of the types of pain which may be treated in accordance with this invention are chronic pain, allodynic pain, visceral pain, neuropathic pain and referred pain. In a preferred embodiment, the agent to be administered includes a therapeutic component which comprises a light chain of botulinum toxin type A, a translocation component which comprises a fragment of the heavy chain of botulinum toxin type A which is able to facilitate the transfer of at least the light chain into the cytoplasm of the target cell, and a targeting component which is represented by the general Formula IV:



IV.



WO 02/053177

PCT/US01/48651

40  
wherein X is selected from the group consisting of  $R_4$ - $C=C-R_5$  and  $R_4-C$ . A six membered carbon ring structure is formed when X is  $R_4-C=C-R_5$ . A five membered carbon ring is formed when X is  $R_4-C$ .  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  and  $R_5$  are each  
5 independently selected from the group consisting of F, Cl, Br, I,  $OR_6$  and H, wherein  $R_6$  is H or an alkyl, including a methyl, an ethyl or a propyl.

The dose of the agent to be administered depends on many factors. For example, the better each one of the  
10 components is able to perform its respective function, the lower the dose of the agent is required to obtain a desired therapeutic effect. One of ordinary skill will be able to readily determine the specific dose for each specific agent. For agents employing a natural, mutated  
15 or recombinant botulinum toxin as the therapeutic and translocation component, an effective dose of an agent to be administered may be about 1 U to about 500 U of the botulinum toxin. In a preferred embodiment, the administered agent comprises about 10 U to about 300 U of  
20 the botulinum toxin.

In one embodiment, the routes of administration of the present invention include, but are not limited to, transdermal, parenteral, subcutaneous, intramuscular, intravenous, intrarectal and intraspinal administrations.  
25 As used herein "intraspinal" means into or within the epidural space, the intrathecal space, the white or gray matter of the spinal cord or affiliated structures such as the dorsal root and dorsal root ganglia. Preferably, the intraspinal administration is carried out  
30 intrathecally because of the greater ease in which the relatively larger intrathecal space is accessed and because the preferred agents generally exhibits low solubility in the lipid rich epidural environment. Additionally, intraspinal administration of the agents  
35 according to the present invention can be by various routes such as by catheterization or by spinal tap

WO 02/053177

PCT/US01/48651

41

injection. The long lasting nature of the therapeutic effects of the present invention substantially removes the need for chronic antinociceptive drug administration, so that the present methods are advantageously practiced by infrequent spinal tap injection of the agents. Furthermore, an intrathecal spinal tap agents administration route facilitates a more precise and localized delivery of agents with less danger of damage to the CNS, as compared to moving a catheter to access other CNS locations. For example, the agent may be administered intrathecally to the cranial region, the cervical region, the thoracic region, the lumbar region and/or the sacral region of the central nervous system. After the administration of the agent, the alleviation of pain, preferably chronic pain, more preferably allodynia type pain, persists from about 2 to about 27 months. Even more preferably, the allodynia type pain is alleviated without substantially affecting acute pain sensation or tactile sensation.

An intraspinal route for administration of an agent according to the present disclosed invention can be selected based upon criteria such as the solubility characteristics of the agents chosen as well as the amount of the agents to be administered. The amount of the agents administered can vary widely according to the particular disorder being treated, its severity and other various patient variables including size, weight, age, and responsiveness to therapy. For example, the extent of the area of CNS afferent pain neuron somata influenced is believed to be proportional to the volume of agents injected, while the quantity of the analgesia is, for most dose ranges, believed to be proportional to the concentration of agents injected. Furthermore, the particular intraspinal location for administration of an agent may depend upon the dermosome location of the pain to be treated. Methods for determining the appropriate

WO 02/053177

PCT/US01/48651

42

route of administration and dosage are generally determined on a case by case basis by the attending physician. Such determinations are routine to one of ordinary skill in the art (see for example, *Harrison's*  
5 *Principles of Internal Medicine* (1998), edited by Anthony Fauci et al., 14<sup>th</sup> edition, published by McGraw Hill).

The following examples illustrate how a therapeutic component, for example a light chain of a Clostridial toxin, may be recombinantly produced and reassociated  
10 with a translocation component, for example a heavy chain of a Clostridial toxin. The examples also illustrate how the various components of an agent according to this invention may be joined together.

15

**Example 1****Subcloning the BoNT/A-L Chain Gene**

Example 1 describes the methods to clone the polynucleotide sequence encoding the BoNT/A-L chain. The DNA sequence encoding the BoNT/A-L chain may be  
20 amplified by a PCR protocol that employs synthetic oligonucleotides having the sequences, 5'-AAAGGCCTTTTGTATAAACA-3' (SEQ ID#3) and 5'-GGAATTCCTTACTTATTGTATCCTTTA-3' (SEQ ID#4). Use of these primers allows the introduction of Stu I and EcoR I  
25 restriction sites into the 5' and 3' ends of the BoNT/A-L chain gene fragment, respectively. These restriction sites may be subsequently used to facilitate unidirectional subcloning of the amplification products. Additionally, these primers introduce a stop codon at  
30 the C-terminus of the L chain coding sequence. Chromosomal DNA from *C. botulinum* (strain 63 A) may serve as a template in the amplification reaction.

WO 02/053177

PCT/US01/48651

43

The PCR amplification is performed in a 100µl volume containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 50 pmol of each primer, 200 ng of genomic DNA and 2.5 units of Taq-polymerase (Promega). The reaction mixture is subjected to 35 cycles of denaturation (1 minute at 94° C), annealing (2 minutes at 37°C) and polymerization (2 minutes at 72°C). Finally, the reaction is extended for an additional 5 minutes at 72°C.

The PCR amplification product may be digested with Stu I and EcoR I, purified by agarose gel electrophoresis, and ligated into Sma I and EcoR I digested pBluescript II SK\* to yield the plasmid, pSAL. Bacterial transformants harboring this plasmid may be isolated by standard procedures. The identity of the cloned L chain polynucleotide is confirmed by double stranded plasmid sequencing using SEQUENASE (United States Biochemicals) according to the manufacturer's instructions. Synthetic oligonucleotide sequencing primers are prepared as necessary to achieve overlapping sequencing runs. The cloned sequence is found to be identical to the sequence disclosed by Binz, et al., in *J. Biol. Chem.* 265:9153 (1990), and Thompson et al., in *Eur. J. Biochem.* 189:73 (1990).

Site-directed mutants designed to compromise the enzymatic activity of the BoNT/A-L chain may also be created.

Example 2Expression of the Botulinum Toxin Type A-L (BoNT/A-L)Chain Fusion Proteins

5        Example 2 describes the methods to verify  
expression of the wild-type L chains, which may serve as  
a therapeutic component, in bacteria harboring the pCA-L  
plasmids. Well isolated bacterial colonies harboring  
either pCAL are used to inoculate L-broth containing  
10    100µg/ml ampicillin and 2% (w/v) glucose, and grown  
overnight with shaking at 30°C. The overnight cultures  
are diluted 1:10 into fresh L-broth containing 100µg/ml  
of ampicillin and incubated for 2 hours. Fusion protein  
expression is induced by addition of IPTG to a final  
15    concentration of 0.1 mM. After an additional 4 hour  
incubation at 30°C, bacteria are collected by  
centrifugation at 6,000 x g for 10 minutes.

A small-scale SDS-PAGE analysis confirmed the  
presence of a 90 kDa protein band in samples derived  
20    from IPTG-induced bacteria. This  $M_r$  is consistent with  
the predicted size of a fusion protein having MBP (~ 40  
kDa) and BoNT/A-L chain (~ 50 kDa) components.  
Furthermore, when compared with samples isolated from  
control cultures, the IPTG-induced clones contained  
25    substantially larger amounts of the fusion protein.

The presence of the desired fusion proteins in  
IPTG-induced bacterial extracts is also confirmed by  
Western blotting using the polyclonal anti-L chain probe  
described by Cenci di Bello et al., in *Eur. J. Biochem.*  
30    219:161 (1993). Reactive bands on PVDF membranes

WO 02/053177

PCT/US01/48651

45

(Pharmacia; Milton Keynes, UK) are visualized using an anti-rabbit immunoglobulin conjugated to horseradish peroxidase (Bio-Rad; Hemel Hempstead, UK) and the ECL detection system (Amersham, UK). Western blotting results confirmed the presence of the dominant fusion protein together with several faint bands corresponding to proteins of lower  $M_r$  than the fully sized fusion protein. This observation suggested that limited degradation of the fusion protein occurred in the bacteria or during the isolation procedure. Neither the use of 1 mM nor 10 mM benzamidine (Sigma; Poole, UK) during the isolation procedure eliminated this proteolytic breakdown.

The yield of intact fusion protein isolated by the above procedure remained fully adequate for all procedures described herein. Based on estimates from stained SDS-PAGE gels, the bacterial clones induced with IPTG yielded 5-10 mg of total MBP-wild-type or mutant L chain fusion protein per liter of culture. Thus, the method of producing BoNT/A-L chain fusion proteins disclosed herein is highly efficient, despite any limited proteolysis that did occur.

The MBP-L chain fusion proteins encoded by the pCAL and pCAL-TyrU7 expression plasmids are purified from bacteria by amylose affinity chromatography. Recombinant wild-type or mutant L chains are then separated from the sugar binding domains of the fusion proteins by site-specific cleavage with Factor X<sub>1</sub>. This cleavage procedure yielded free MBP, free L chains and a small amount of uncleaved fusion protein. While the

WO 02/053177

PCT/US01/48651

46

resulting L chains present in such mixtures have been shown to possess the desired activities, we have also employed an additional purification step. Accordingly, the mixture of cleavage products is applied to a second amylose affinity column that bound both the MBP and uncleaved fusion protein. Free L chains are not retained on the affinity column, and are isolated for use in experiments described below.

10

**Example 3****Purification of Fusion Proteins and Isolation of****Recombinant BoNT/A-L Chains**

Example 3 describes a method to produce and purify wild-type recombinant BoNT/A light chains from bacterial clones. Pellets from 1 liter cultures of bacteria expressing the wild-type BoNT/A-L chain proteins are resuspended in column buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 1 mM EGTA and 1 mM DTT] containing 1 mM phenyl-methanesulfonyl fluoride (PMSF) and 10 mM benzamidine, and lysed by sonication. The lysates are cleared by centrifugation at 15,000 x g for 15 minutes at 4°C. Supernatants are applied to an amylose affinity column [2x10 cm, 30 ml resin] (New England Biolabs; Hitchin, UK). Unbound proteins are washed from the resin with column buffer until the eluate is free of protein as judged by a stable absorbance reading at 280 nm. The bound MBP-L chain fusion protein is subsequently eluted with column buffer containing 10 mM maltose. Fractions containing the fusion protein are pooled and dialyzed against 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)

WO 02/053177

PCT/US01/48651

47

supplemented with 150 mM NaCl, 2 mM, CaCl<sub>2</sub> and 1 mM DTT for 72 hours at 4°C.

Fusion proteins may be cleaved with Factor X<sub>2</sub> (Promega; Southampton, UK) at an enzyme:substrate ratio of 1:100 while dialyzing against a buffer of 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) supplemented with 150 mM NaCl, 2 mM, CaCl<sub>2</sub> and 1 mM DTT. Dialysis is carried out for 24 hours at 4°C. The mixture of MBP and either wild-type or mutant L chain that resulted from the cleavage step is loaded onto a 10 ml amylose column equilibrated with column buffer. Aliquots of the flow through fractions are prepared for SDS-PAGE analysis to identify samples containing the L chains. Remaining portions of the flow through fractions are stored at -20°C. Total *E. coli* extract or the purified proteins are solubilized in SDS sample buffer and subjected to PAGE according to standard procedures. Results of this procedure indicated the recombinant toxin fragment accounted for roughly 90% of the protein content of the sample.

The foregoing results indicate that the approach to creating MBP-L chain fusion proteins described herein could be used to efficiently produce wild-type and mutant recombinant BoNT/A-L chains. Further, the results demonstrate that recombinant L chains could be separated from the maltose binding domains of the fusion proteins and purified thereafter.

A sensitive antibody-based assay is developed to compare the enzymatic activities of recombinant L chain products and their native counterparts. The assay employed an antibody having specificity for the intact



WO 02/053177

PCT/US01/48651

48

C-terminal region of SNAP-25 that corresponded to the BoNT/A cleavage site. Western Blotting of the reaction products of BoNT/A cleavage of SNAP-25 indicated an inability of the antibody to bind SNAP-25 sub-fragments. Thus, the antibody reagent employed in the following Example detected only intact SNAP-25. The loss of antibody binding served as an indicator of SNAP-25 proteolysis mediated by added BoNT/A light chain or recombinant derivatives thereof.

10

#### Example 4

##### Evaluation of the Proteolytic Activities of Recombinant

##### L Chains Against a SNAP-25 Substrate

Both native and recombinant BoNT/A-L chains can proteolyze a SNAP-25 substrate. A quantitative assay may be employed to compare the abilities of the wild-type and their recombinant analogs to cleave a SNAP-25 substrate. The substrate utilized for this assay is obtained by preparing a glutathione-S-transferase (GST)-SNAP-25 fusion protein, containing a cleavage site for thrombin, expressed using the pGEX-2T vector and purified by affinity chromatography on glutathione agarose. The SNAP-25 is then cleaved from the fusion protein using thrombin in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 150 mM NaCl and 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$  (Smith et al., Gene 67:31 (1988)) at an enzyme:substrate ratio of 1:100. Uncleaved fusion protein and the cleaved glutathione-binding domain bound to the gel. The recombinant SNAP-25 protein is eluted with the latter buffer and dialyzed against 100 mM HEPES (pH 7.5) for 24

WO 02/053177

PCT/US01/48651

49

hours at 4°C. The total protein concentration is determined by routine methods.

Rabbit polyclonal antibodies specific for the C-terminal region of SNAP-25 are raised against a synthetic peptide having the amino acid sequence, CANQRATKMLGSG (SEQ ID#7). This peptide corresponded to residues 195 to 206 of the synaptic plasma membrane protein and an N-terminal cysteine residue not found in native SNAP-25. The synthetic peptide is conjugated to bovine serum albumin (BSA) (Sigma; Poole, UK) using maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS) as a cross-linking agent (Sigma; Poole, UK) to improve antigenicity (Liu et al., *Biochemistry* 18:690 (1979)1. Affinity purification of the anti-peptide antibodies is carried out using a column having the antigenic peptide conjugated via its N-terminal cysteine residue to an aminoalkyl agarose resin (Bio-Rad; Hemel Hempstead, UK), activated with iodoacetic acid using the cross-linker ethyl 3-(3-dimethylpropyl) carbodiimide. After successive washes of the column with a buffer containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 150 mM NaCl, the peptide-specific antibodies are eluted using a solution of 100 mM glycine (pH 2.5) and 200 mM NaCl, and collected in tubes containing 0.2 ml of 1 M Tris-HCl (pH 8.0) neutralizing buffer.

All recombinant preparations containing wild-type L chain are dialyzed overnight at 4°C into 100 mM HEPES (pH 7.5) containing 0.02% Lubrol and 10 µM zinc acetate before assessing their enzymatic activities. BONT/A, previously reduced with 20 mM DTT for 30 minutes at

WO 02/053177

PCT/US01/48651

50

37°C, as well as these dialyzed samples, are then diluted to different concentrations in the latter HEPES buffer supplemented with 1 mM DTT.

Reaction mixtures include 5 µl recombinant SNAP-25 substrate (8.5 µM final concentration) and either 20 µl reduced BoNT/A or recombinant wild-type L chain. All samples are incubated at 37°C for 1 hour before quenching the reactions with 25 µl aqueous 2% trifluoroacetic acid (TFA) and 5 mM EDTA (Foran et al., *Biochemistry* 33:15365(1994)). Aliquots of each sample are prepared for SDS-PAGE and Western blotting with the polyclonal SNAP-25 antibody by adding SDS-PAGE sample buffer and boiling. Anti-SNAP-25 antibody reactivity is monitored using an ECL detection system and quantified by densitometric scanning.

Western blotting results indicate clear differences between the proteolytic activities of the purified mutant L chain and either native or recombinant wild-type BoNT/A-L chain. Specifically, recombinant wild-type L chain cleaves the SNAP-25 substrate, though somewhat less efficiently than the reduced BoNT/A native L chain that serves as the positive control in the procedure. Thus, an enzymatically active form of the BoNT/A-L chain is produced by recombinant means and subsequently isolated. Moreover, substitution of a single amino acid in the L chain protein abrogated the ability of the recombinant protein to degrade the synaptic terminal protein.

As a preliminary test of the biological activity of the wild-type recombinant BoNT/A-L chain, the ability of

WO 02/053177

PCT/US01/48651

51

the MBP-L chain fusion protein to diminish  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked catecholamine release from digitonin-permeabilized bovine adrenochromaffin cells is examined. Consistently, wild-type recombinant L chain fusion protein, either intact or cleaved with Factor  $X_2$  to produce a mixture containing free MBP and recombinant L chain, induced a dose-dependent inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated release equivalent to the inhibition caused by native BoNT/A.

10

#### Example 5

##### Reconstitution of Native L Chain, Recombinant Wild-Type

##### L Chain with Purified H Chain

Native H and L chains are dissociated from BoNT/A (List Biologicals Inc.; Campbell, USA) with 2 M urea, reduced with 100 mM DTT and then purified according to established chromatographic procedures (Kozaki et al., *Japan J. Med. Sci. Biol.* 34:61 (1981); Maisey et al., *Eur. J. Biochem.* 177:683 (1988)). Purified H chain is combined with an equimolar amount of either native L chain or recombinant wild-type L chain. Reconstitution is carried out by dialyzing the samples against a buffer consisting of 25 mM Tris (pH 8.0), 50  $\mu\text{M}$  zinc acetate and 150 mM NaCl over 4 days at 4°C. Following dialysis, the association of the recombinant L chain and native H chain to form disulfide-linked 150 kDa dichains is monitored by SDS-PAGE and quantified by densitometric scanning. The proportion of dichain molecules formed with the recombinant L chains is lower than that obtained when native L chain is employed. Indeed, only

30

WO 02/053177

PCT/US01/48651

52

about 30% of the recombinant wild-type or mutant L chain is reconstituted while >90% of the native L chain reassociated with the H chain. In spite of this lower efficiency of reconstitution, sufficient material

5 incorporating the recombinant L chains is easily produced for use in subsequent functional studies.

#### Example 6

##### Preparation of Maltose-Binding-Protein-TeTx-L Chain

10

##### Constructs

This Example describes a method to create recombinant plasmids that encodes maltose-binding fusion proteins of wild-type L chain. *E. coli* K-12 strain TG1 is used as a host for the propagation of all plasmid

15 constructs described below. Plasmid pMAL-L (wild-type L chain gene) is constructed by polymerase chain reaction (PCR) amplification of a 1417-bp fragment encoding L chain from plasmid pTet87 that has been described by Fairweather et al., in *FEBS Lett.* 323:218 (1993). The

20 two polynucleotide primers, called a and d, that are employed in this PCR amplification has the sequences 5'-AGATGGTCGACATGCCAATAACCATAAATAAT-3' (SEQ ID#5) and 5'-ACGCGAAGCTTTTATCATGCAGTTCTATTATA-3' (SEQ ID#6), respectively. The amplification product of this

25 reaction is digested with Sall and HindIII (Promega) and then ligated to vector pMAL-c2 (New England BioLabs) (Figure 1A) that had been digested with the same enzymes to create the plasmid, pMAL-L, which harbored wild-type TeTx sequences. After purification with the MAGIC DNA

30 CLEAN-UP SYSTEM (Promega), the samples are ligated to

WO 02/053177

PCT/US01/48651

53

pMAL-c2 that has been cleaved with *Sall* and *HindIII*, to create the plasmid, pMAL-LC-Ala2U, which harbors the mutated TeTx sequence.

After subcloning, plasmid DNA is purified from  
5 cultures of ampicillin-resistant transformants, and the structures of the constructs is confirmed using restriction mapping and DNA sequencing of the insert. A *Sall* and *HindIII* digest yields a fragment having the expected length of 1417 bp as determined by agarose gel  
10 electrophoresis. DNA sequencing confirms that the nucleotide sequence at the junction of the 5'-end of the L chain gene, the multiple cloning site (MCS), the factor X, cleavage site, the L chain and the MBP coding sequences are all in the correct reading frame (Figure  
15 1A). The availability of the plasmid constructs described above enables the production of recombinant wild-type and mutant L chain fusion proteins. Specifically, cultures of bacterial clones that harbored plasmids pMAL-L are induced with isopropyl -D-  
20 thiogalactoside (IPTG) to stimulate high level synthesis of the recombinant fusion proteins. Large-scale purification of the two fusion proteins is accomplished by affinity chromatography of bacterial extracts on amylose affinity resin.

25

#### Example 7

##### Expression of TeTx Fusion Proteins and Purification of Wild-Type L Chain Proteins

30 This Example describes the techniques to produce and purify recombinant L chain fusion proteins encoded

WO 02/053177

PCT/US01/48651

54

by the plasmid constructs described in the previous Example B. *E. coli* clones harboring plasmids pMAL-L is grown to densities of roughly  $2 \times 10^8$  cells/ml ( $A_{500nm} \sim 0.5$ ) at 37°C in L-broth that is made 10 g/ml ampicillin and 2 mg/ml glucose. Induction is initiated by the addition of IPTG to a final concentration of 0.3 mM. Cells are harvested 2 hours later by centrifugation at 6000 x g for 30 minutes. The resulting pellets are then resuspended in column buffer [10 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, and 1 mM dithiothreitol (DTT) (pH 7.4)] containing 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) and lysed by sonication. After centrifugation, crude extracts are applied to an amylose affinity column (2.5 x 10 cm, 40 ml of resin). Following the removal of nonbound proteins by washing with buffer, the bound MBP-L fusion proteins are eluted with column buffer containing 10 mM maltose according to the procedure described by Maina et al., in *Gene* 74:365 (1988). The isolated fusion proteins are concentrated to 0.5-1 mg/ml using an Amicon CENTRICON. Protein samples are then analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting, using anti-MBP polyclonal and anti-L chain monoclonal antibodies. SDS-PAGE of both cell extracts indicated the presence of an induced protein band ( $M_r \sim 90,000$ ) that is absent from the coomassie staining pattern of the noninduced cultures. The molecular weight of the protein band is in accordance with that expected from a fusion of MBP and L chain ( $M_r \sim$

WO 02/053177

PCT/US01/48651

55

40,000 and 50,000, respectively). The optimal conditions established for expressing recombinant L chain using the pMAL-c2 vector system are 2 hours of induction with IPTG at 37°C. Neither a longer induction  
5 time nor the inclusion of protease inhibitors increased the product yield. Both fusion proteins are soluble in aqueous buffer (up to 0.5 mg/ml) and stable for up to 8 months when stored at -20 °C.

After this initial purification step, both MBP-L  
10 chain preparations are cleaved at 23°C for 24 hours with factor X, at an enzyme:protein ratio of 0.5-1:100 (w/w). This cleavage gave complete conversion of the fusion proteins to the respective wild-type L chain with the liberation of MBP, as confirmed by SDS-PAGE. After  
15 extensive dialysis against the column buffer to remove maltose, L chain is further purified by reabsorption onto a new affinity column. The desired product from this purification step is found in the column wash fraction. Fractions of the column wash are monitored  
20 for  $A_{280nm}$  and checked again by SDS-PAGE and Western blotting.

For amino acid sequencing, recombinant wild-type is run on SDS-PAGE and transferred onto a poly(vinylidene difluoride) membrane as described by Tous et al. in  
25 *Anal. Biochem.* 179:50 (1989), with automated Edman degradation performed on a Model 4000 protein sequencer (Chelsea Instruments, London). Microsequencing of the two products revealed four residues identical to those of the N-terminus of native L chain preceded by the 11  
30 amino acids encoded by the multiple cloning site of the



WO 02/053177

PCT/US01/48651

56

vector as depicted in Figure 1 A. Given this success in producing recombinant L chain proteins having the desired structures, we next tested the enzymatic activities of these compositions.

5 Measurement of the zinc-dependent protease activity of native L chain is employed as an assay for the activity of the recombinant L chain proteins. Two different protein substrates are used in this assay. In the first case, bovine small synaptic vesicles (SSVs)  
10 are used. The assay for proteolytic cleavage of the substrate is based on coomassie staining and Western blotting of protein gels.

Methods of assessing the proteolytic activities of the recombinant L chain proteins and quantifying the in  
15 vitro activities of native and recombinant L chains are known and may be used to assess and quantify these recombinant L chains.

#### Example 8

##### Reassociation of TeTx from Native H Chain and 20 Recombinant L Chain

Example 7 describes a method to prepare TeTx dichains that incorporate either native L chain or recombinant wild-type L chain. Native H chain, purified from TeTx as detailed by Weller et al. in *Eur. J. Biochem.* 182:649 (1989), is combined with an equimolar  
25 amount of either native L chain or recombinant wild-type L. The mixtures are dialyzed against 2 M urea, 20 mM DTT, 1 M NaCl, and 50 mM Tris-HCl (pH 8.4) with stirring for 18 hours and then further dialyzed without agitation  
30 against 50 mM Tris-HCl and 600 mM glycine (pH 8.4) for

WO 02/053177

PCT/US01/48651

57

72 hours. An aliquot (300 g) is loaded onto an HPLC DEAE column in 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.4) and eluted with an NaCl gradient (0-1 M) in the same buffer. The extent of covalent reconstitution is checked by  
5 nonreducing SDS-PAGE and silver staining.

The reassociation of dichain species is confirmed by virtue of the presence of stained high  $M_r$  protein bands that comigrated with native TeTx. With respect to recombinant wild-type and mutant L chains, the relative  
10 amounts of the dichain species are 55.1 and 56.8%, respectively, as determined by densitometric scanning of the silver-stained gel. Native H chain and L chain gave similar levels of reconstitution. The latter involved interchain disulfide formation as the toxin is converted  
15 back to free H chain and L chain upon reduction by DTT.

#### Example 9

##### Methods of Linking a Therapeutic Component to a Targeting Component

20 In accordance with the invention, a therapeutic component, such as a light chain, may be attached to a targeting component. The light chain upon which the targeting component is to be attached may be free from other attachments or may already be attached to a  
25 translocation component. Many approaches are known for linking chemical compounds to protein chains. For example, a linker molecule may be used to separate the targeting component from the L chain peptide. It is known that 11 amino acids may be attached to the N-terminus of the TeTx-L chain without substantially  
30

WO 02/053177

PCT/US01/48651

58

affecting its functionality. For this reason, the N-terminal portion of either the botulinum toxin or tetanus toxin L chain will be used as the targeting component attachment point.

5 It is known that most molecules acting as substrates or binding molecules, such as the targeting component, have positions that are not sensitive to steric hindrance. In addition, the linkage process should not introduce chirality into the targeting  
10 component. Further, the linker and the targeting component should be attached through a covalent bond. The distance between the L chain and the targeting component may be adjusted by the insertion of spacer components. Preferable spacers have functional groups  
15 capable of binding to the linker, drug and L chain and serving to conjugate them. Preferred spacer components include:

1)  $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ , where  $n = 1-12$ , suitable for  
20 insertion at the amino terminal end of a peptide, to connect it with a linker on a targeting component.

2)  $\text{HO}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ , where  $n > 10$ , suitable for attachment at the amino terminal of a peptide to connect the L chain with a linker on a targeting component.

3)  $(\text{C}_6\text{H}_4)_n$ , where  $n > 2$ , suitable for attachment to  
25 join the L chain with a linker on the targeting component. The benzene rings provide a rigid spacer between the targeting component and L chain. Of course, appropriate functional groups, for example as identified by X below, will be present on the benzene rings to link  
30 the drug and the L chain.

WO 02/053177

PCT/US01/48651

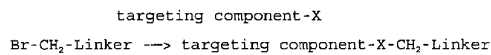
59

Various linker types are envisioned. For example, in one type the targeting component-linker-L chain molecule remains intact after introduction into cells. In another type, the targeting component-Linker-L chain molecule is metabolized to free the drug after introduction into cells. In yet another type, the component-Linker-L chain molecule is metabolized to free the drug outside the cell surfaces.

10 Linkers that remain intact after introduction

In one embodiment, a cysteine residue is attached to the end of the L chain molecule by methods well known in the art. For instance, the gene construct that carries the L chain molecule can be mutated to include a cysteine residue at the N-terminal portion of the protein. A maleimide linker is then attached to the Cysteine residue by well known means.

In another embodiment, the linker is attached directly to the targeting moiety. A targeting component-X moiety can have the following groups wherein X may be, without limitation, OH, SH, NH<sub>2</sub>, CONH, CONH<sub>2</sub>, COOH, COOR<sub>30</sub> (where R<sub>30</sub> is an alkyl group). Of course, the proper group would not be in an active site or be sterically hindering. The following is an example of one reaction which would link the targeting component-X to the linker molecule.



30

WO 02/053177

PCT/US01/48651

60

Once the targeting component has a linker attached, the following reaction can be used to link the targeting component to the light chain, for example the light chain of botulinum toxin type A. In this reaction, the light chain, preferably the light chain of botulinum toxin type A, has an accessible lysine group that is used as the attachment point for the targeting component. As discussed hereinabove, an extra amino acid, such as lysine, can be readily added to the N-terminal portion of the L chain gene and used as the attachment point for a targeting component. In the following reaction, sodium cyanoborohydride is used to attach the linker to the lysine group on the L chain molecule.

targeting component-linker-CHO + NaCNBH<sub>3</sub> + light chain-Lys →  
targeting component-linker-CH<sub>2</sub>-NH-light chain

Targeting component that are envisioned for use in the present invention include those that have a free -XH group and that can bind to alpha-2B receptors.

Linkers that cleave after introduction

It may be important for the targeting component to be released from the L chain after introduction into the cell. In this method, the targeting component has a free -XH group that is the active site for synthesis with a linker. The -XH group could be an alcohol, phenol, amine, carboxylic acid or thiol group.

WO 02/053177

PCT/US01/48651

61

The general formula for linking a targeting component to a toxin so that it will be metabolized after introduction is as follows:

5    targeting component-XH + Linker + Maleimide -->  
targeting component-X-linker-Maleimide +light chain-SH  
-->

targeting component-X-linker-Maleimide-light chain,

10

wherein X can be O, N/NH, CO<sub>2</sub>, S or CONH.

Although the present invention has been described in detail with regard to certain preferred methods, other embodiments, versions, and modifications within the scope of the present invention are possible. For example, an agent according to this invention may be effective in treating any other disorder modulated by alpha-2B adrenergic receptors. Furthermore, while this invention has been described with respect to various specific examples and embodiments, it is to be understood that the invention is not limited thereto and that it can be variously practiced with the scope of the following claims.

WO 02/053177

PCT/US01/48651

62

What is claimed is:

1. An agent comprising:  
a therapeutic component, and  
a targeting component,  
5 wherein the targeting component selectively binds at the  
alpha-2B or alpha-2B/alpha-2C adrenergic receptor  
subtype(s) as compared to the alpha-2A adrenergic  
receptor subtype.
- 10 2. An agent according to claim 1 wherein the  
therapeutic component interferes with the release of  
neurotransmitters from a cell or its processes.
3. An agent according to claim 2 wherein the  
15 therapeutic component comprises a light chain component.
4. An agent according to claim 2 wherein the light  
chain component comprises a light chain or a fragment  
thereof of a botulinum toxin, a butyricum toxin, a tetani  
20 toxin or variants thereof.
5. An agent according to claim 2 wherein the light  
chain component comprises a light chain or a fragment  
thereof of a botulinum toxin type A, B, C<sub>1</sub>, D, E, F, G or  
25 variants thereof.
6. An agent according to claim 2 wherein the light  
chain component comprises a light chain or a fragment  
thereof of a botulinum toxin type A or variants thereof.
- 30 7. An agent according to claim 1 wherein the  
therapeutic component inactivates cellular ribosomes.
8. An agent according to claim 7 wherein the  
35 therapeutic component is saporin.

WO 02/053177

PCT/US01/48651

- 63
9. An agent according to claim 1 which further comprises a translocation component.
10. An agent according to claim 9 wherein the translocation component facilitates the transfer of at least a part of the agent into the cytoplasm of the target cell.
11. An agent according to claim 9 wherein the translocation component facilitates the transfer of the therapeutic component into the cytoplasm of the target cell.
12. An agent according to claim 9 wherein the translocation component comprises a heavy chain component.
13. An agent according to claim 12 wherein the heavy chain component comprises a heavy chain or a fragment thereof of a botulinum toxin, a butyricum toxin, a tetani toxin or variants thereof.
14. An agent according to claim 12 wherein the heavy chain component comprises a heavy chain or a fragment thereof of a botulinum toxin type A, B, C<sub>1</sub>, D, E, F, G or variants thereof.
15. An agent according to claim 12 wherein the heavy chain component comprises a heavy chain or a fragment thereof of a botulinum toxin type A or variants thereof.
16. An agent according to claim 12 wherein the fragment of the heavy chain comprises at least a portion of the amino terminal fragment of the heavy chain.



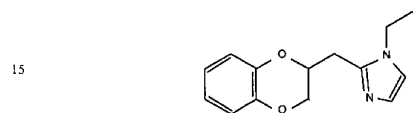
WO 02/053177

PCT/US01/48651

64

17. An agent according to claim 1 wherein the therapeutic component comprises a light chain of a botulinum toxin type A and the translocation component comprises a fragment of a heavy chain of a botulinum toxin type A, wherein the fragment of a heavy chain can assist in the translocation of at least the therapeutic component into a cytoplasm of a cell.

18. An agent according to claim 1 wherein the targeting component is represented by the formula:



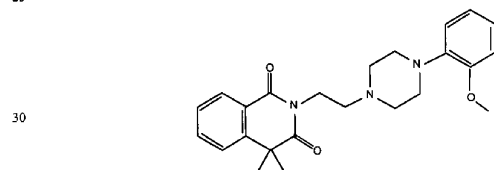
Imiloxan

20

I.

19. An agent according to claim 1 wherein the targeting component is a compound represented by the formula:

25



ARC 239

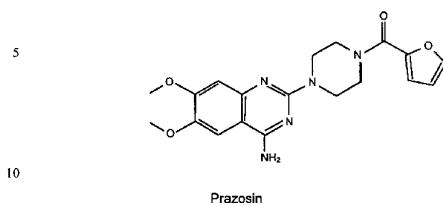
35

II.

WO 02/053177

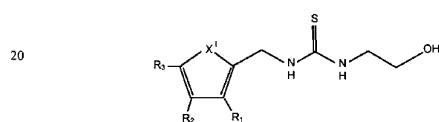
PCT/US01/48651

65  
20. An agent according to claim 1 wherein the targeting component is a compound represented by the formula



## III.

15 21. An agent according to claim 1 wherein the targeting component is a compound represented by the formula:



25 IV.

wherein X is selected from the group consisting of  
R<sub>4</sub>-C=C-R<sub>5</sub> and R<sub>4</sub>-C;

30 a six membered carbon ring structure is formed when  
X is R<sub>4</sub>-C=C-R<sub>5</sub>;

a five membered carbon ring is formed when X is R<sub>4</sub>-C;

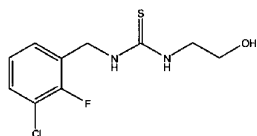
35 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> and R<sub>5</sub> are each independently selected from the group consisting of F, Cl, Br, I, OR<sub>6</sub> and H, wherein R<sub>6</sub> is H or an alkyl, including a methyl, an ethyl or a propyl.

WO 02/053177

PCT/US01/48651

66

22. An agent according to claim 1 wherein the targeting component is a compound represented by the formula:

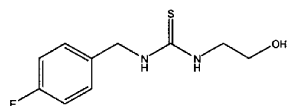


5

V.

23. An agent according to claim 1 wherein the targeting component is a compound represented by the formula:

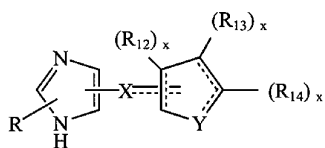
10



VI.

24. An agent according to claim 1 wherein the targeting component is represented by the formula

15



20

VII.

wherein the dotted lines represent optional double bonds;  
R is H or lower alkyl; X is S or C(H)R<sub>11</sub>, wherein R<sub>11</sub> is H  
or lower alkyl or R<sub>11</sub> is absent when X is S or when the  
bond between X and the ring represented by

25

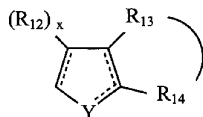
WO 02/053177

PCT/US01/48651

67



5 is a double bond; Y is O, N, S,  $(C(R_{11})X)_y$ , wherein y is an integer of from 1 to 3, -CH=CH- or  $-Y_1CH_2-$ , wherein  $Y_1$  is O, N or S; x is an integer of 1 or 2, wherein x is 1 when  $R_{12}$ ,  $R_{13}$  or  $R_{14}$  is bound to an unsaturated carbon atom and x is 2 when  $R_{12}$ ,  $R_{13}$  or  $R_{14}$  is bonded to a saturated carbon atom;  $R_{12}$  is H, lower alkyl, halogen, hydroxy, lower alkoxy, lower alkenyl, acyl or lower alkynyl or, when attached to a saturated carbon atom,  $R_{12}$  may be oxo;  $R_{13}$  and  $R_{14}$  are, each, H, lower alkyl, halogen, lower alkenyl, acyl or lower alkynyl, or, when attached to a saturated carbon atom,  $R_{12}$  may be oxo;  $R_{13}$  and  $R_{14}$  are, each, H, lower alkyl, halogen, lower alkenyl, acyl, lower alkynyl, aryl, heteroaryl, or substituted aryl or heteroaryl, wherein said substituent is halogen, lower alkyl, lower alkoxy, lower alkenyl, acyl, lower alkynyl, nitro, cyano, trifluoromethyl, hydroxy, or phenyl or, together, are - $(C(R_2)x)z-$ ; - $Y_1(C(R_2)x)z'-$ ; - $Y_1(C(R_2)x)y$   $Y_1-$ ; - $(C(R_2)x)-Y_1-(C(R_2)x)-$ ; - $(C(R_2)x)-Y_1-(C(R_2)x)-(C(R_2)x)-$  and - $Y_1-(C(R_2)x)-Y_1-(C(R_2)x)-$  wherein z is an integer of from 3 to 5, z' is an integer of from 2 to 4 and x and y are as defined above, and further either end of each of these divalent moieties may attach at either  $R_{13}$  or  $R_{14}$  to form the condensed ring structure



30

and the ring thus formed may be totally unsaturated, partially unsaturated, or totally saturated provided that

WO 02/053177

PCT/US01/48651

68  
a ring carbon has no more than 4 valences, nitrogen no more than three and O and S have no more than two.

25. An agent according to claim 1 wherein the targeting  
5 component comprises an amino acid component.

26. An agent according to claim 25 wherein the amino acid component is an antibody.

10 27. An agent according to claim 26 wherein the antibody is raised from an antigen component, the antigen component comprises a second extracellular loop of an alpha-2B receptor.

15 28. An agent according to claim 27 wherein the second extracellular loop is conjugated to a keyhole limpet hemocyanin.

20 29. An agent according to claim 27 wherein the second extracellular loop comprises a peptide fragment comprising an amino acid sequence of KGDQGPQPRGRPQCKLNQE (SEQ ID#1).

25 30. An agent according to claim 25 wherein the amino acid component comprises a variant peptide, a variant polypeptide, a variant protein or a variant protein complex of a wild type peptide, polypeptide, protein or protein complex, respectively.

30 31. An agent according to claim 25 wherein the amino acid component is a variant polypeptide.

32. An agent according to claim 31 wherein the variant polypeptide is a variant heavy chain.

35 33. An agent according to claim 1 wherein the

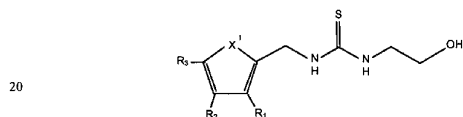
WO 02/053177

PCT/US01/48651

69  
therapeutic component and the targeting component are attached to each other through a spacer component.

34. An agent according to claim 9 wherein the therapeutic component, the translocation component and the targeting component are attached to each other through a spacer component.

35. An agent according to claim 34 wherein the therapeutic component is a light chain of a botulinum toxin type A, the translocation component is a fragment of a heavy chain of a botulinum toxin type A which can facilitate the translocation of at least the light chain into a cytoplasm of a cell, and the targeting component is represented by the formula:



IV.

25 wherein X is selected from the group consisting of  $R_4-C-C-R_5$  and  $R_4-C$ ;

a six membered carbon ring structure is formed when X is  $R_4-C-C-R_5$ ;

30 a five membered carbon ring is formed when X is  $R_4-C$ ;

$R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  and  $R_5$  are each independently selected from the group consisting of F, Cl, Br, I,  $OR_6$  and H, wherein  $R_6$  is H or an alkyl, including a methyl, an ethyl or a propyl.

35

WO 02/053177

PCT/US01/48651

70

36. An agent according to claim 34 wherein the spacer component comprises a moiety selected from the group consisting of a hydrocarbon, a polypeptide other than an immunoglobulin hinge region, and a proline-containing polypeptide identical or analogous to an immunoglobulin hinge region.

37. An agent according to claim 1 useful for treating chronic pain in a mammal, including a human.

38. An agent according to claim 37 wherein the chronic pain is treated without substantially affecting acute pain sensation or tactile sensation.

39. A method for making an agent for treating pain comprising the step of producing a polypeptide from a gene having codes for at least one component of the agent, wherein the agent comprises

a therapeutic component, and  
a targeting component,  
wherein the targeting component selectively binds at the alpha-2B or alpha-2B/alpha-2C adrenergic receptor subtype(s) as compared to the alpha-2A adrenergic receptor subtype.

40. A method for making an agent according to claim 39 wherein the agent further comprises a translocation component.

41. A method according to claim 40 wherein the therapeutic component comprises a light chain of botulinum toxin type A and the translocation component comprises a fragment of a heavy chain which is able to facilitate the transfer of at least the light chain into the cytoplasm of the target cell.

WO 02/053177

PCT/US01/48651

71

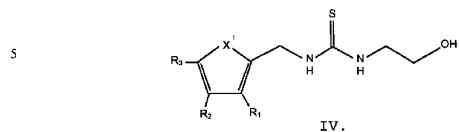
42. A method according to claim 40 wherein the targeting component comprises an amino acid component.
- 5 43. A method according to claim 42 wherein the amino acid component comprises a variant peptide, a variant polypeptide, a variant protein, or a variant protein complex of a wild type peptide, polypeptide, protein or protein complex.
- 10 44. A method according to claim 43 wherein the variant peptide is a variant heavy chain.
- 15 45. A method for treating pain comprising the step of administering to a mammal a therapeutically effective amount of an agent to alleviate pain, the agent comprises a therapeutic component, and a targeting component, wherein the targeting component selectively binds at the
- 20 alpha-2B or alpha-2B/alpha-2C adrenergic receptor subtype(s) as compared to the alpha-2A adrenergic receptor subtype.
- 25 46. A method according to claim 45 wherein the pain alleviated is chronic pain.
47. A method for treating pain according to claim 45 which further comprises a translocation component.
- 30 48. A method according to claim 47 wherein the therapeutic component comprises a light chain of botulinum toxin type A;
- 35 the translocation component comprises a fragment of the heavy chain of botulinum toxin type A which is able to facilitate the transfer of at least the light chain into the cytoplasm of the target cell; and



WO 02/053177

PCT/US01/48651

targeting component is represented by the general formula:



10 wherein X is selected from the group consisting of  
 $R_4-C=C-R_5$  and  $R_4-C$ ;  
 a six membered carbon ring structure is formed when  
 X is  $R_4-C=C-R_5$ ;  
 15 a five membered carbon ring is formed when X is  $R_4-C$ ;  
 $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  and  $R_5$  are each independently selected  
 from the group consisting of F, Cl, Br, I,  $OR_6$  and H,  
 wherein  $R_6$  is H or an alkyl, including a methyl, an ethyl  
 20 or a propyl.

49. A method according to claim 47 wherein the  
 therapeutic component and the translocation component are  
 25 part of a botulinum toxin.

50. A method according to claim 49 wherein the botulinum  
 toxin is type A.

30 51. A method according to claim 50 wherein the agent  
 comprises about 1 U to about 500 U of the botulinum  
 toxin.

52. A method according to claim 50 wherein the agent  
 35 comprises about 10 U to about 300 U of the botulinum  
 toxin.

WO 02/053177

PCT/US01/48651

73

53. A method according to claim 50 wherein the pain alleviation persists from about 2 to about 27 months.
- 5 54. A method according to claim 45 wherein the agent is administered intrathecally.
55. A method according to claim 45 wherein the agent is administered intrathecally to a cranial region of the  
10 central nervous system.
56. A method according to claim 45 wherein the agent is administered intrathecally to a cervical region of the central nervous system.
- 15 57. A method according to claim 45 wherein the agent is administered intrathecally to a thoracic region of the central nervous system.
- 20 58. A method according to claim 45 wherein the agent is administered intrathecally to a lumbar region of the central nervous system.
- 25 59. A method according to claim 45 wherein the agent is administered intrathecally to a sacral region of the central nervous system.
60. A method according to claim 45 wherein the agent is administered intramuscularly.
- 30 61. A method according to claim 45 wherein the agent is administered subcutaneously.
- 35 62. A method according to claim 45 wherein the pain is chronic pain.

WO 02/053177

PCT/US01/48651

74

63. A method according to claim 45 wherein the pain is visceral pain.
64. A method according to claim 45 wherein the pain is neuropathic pain.
65. A method according to claim 45 wherein the pain is referred pain.
66. A method according to claim 45 wherein the pain is a allodynia type pain.
67. A method according to claim 63 wherein the allodynia type pain is alleviated without substantially affecting acute pain sensation or tactile sensation.

WO 02/053177

PCT/US01/48651

1/1

Fig. 1A.

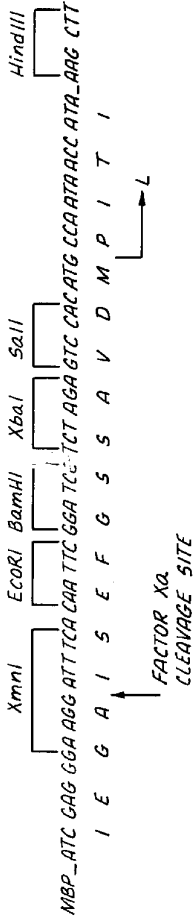
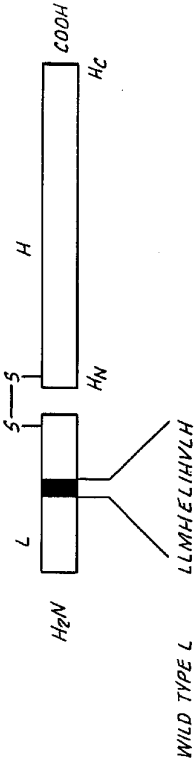


Fig. 1B.



## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
11 July 2002 (11.07.2002)

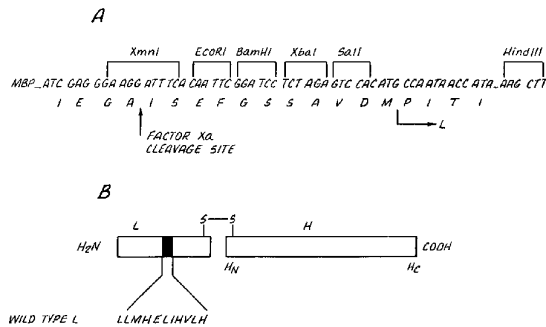
PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/053177 A3

- (51) International Patent Classification: **A61K 47/48** (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US01/48651
- (22) International Filing Date: 14 December 2001 (14.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/751,053 29 December 2000 (29.12.2000) US
- (71) Applicant: **ALLERGAN, INC.** [US/US]; 2525 Dupont Drive, Irvine, CA 92612 (US).
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: with international search report

- (72) Inventors: **GIL, Daniel, W.**; 2541 Point Del Mar, Corona Del Mar, CA 92625 (US); **AOKI, Kei, Roger**; 2 Ginger Lilly Court, Coto de Caza, CA 92679 (US).
- (88) Date of publication of the international search report: 18 September 2003
- (74) Agents: **FISHER, Carlos, A. et al.**; c/o Allergan, INC., 2525 Dupont Drive, Irvine, CA 92612 (US).
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: AGENTS AND METHODS FOR TREATING PAIN



(57) Abstract: Agents for treating pain, methods for producing the agents and methods for treating pain by administration to a patient of a therapeutically effective amount of the agent are disclosed. The agent may include a clostridial neurotoxin, a fragment or a derivative thereof, attached to a targeting component, wherein the targeting component is selected from a group consisting of compounds which selectively binds at the alpha-2B or alpha-2B/alpha-2C adrenergic receptor subtype(s) as compared to other binding sites, for example, the alpha-2A adrenergic receptor subtype.

WO 02/053177 A3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

onal Application No  
PCT/US 01/48651

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 A61K47/48

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)  
IPC 7 A61K

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 practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS, EPO-Internat

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95 32738 A (DOLLY JAMES OLIVER ;WHEELER LARRY ALLEN (US); ALLERGAN INC (US); A) 7 December 1995 (1995-12-07) cited in the application	1-67
X	claims -----	1
Y	WO 96 33273 A (DUGGAN MICHAEL JOHN ;FOSTER KEITH ALAN (GB); MICROBIOLOGICAL RES A) 24 October 1996 (1996-10-24) cited in the application	1-67
X	claims 1,3,5,6,38,53; table 1 & US 5 989 545 A 23 November 1999 (1999-11-23) ----- -/-	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in 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 document 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

\*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

\*† 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

\*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

\*8\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 April 2003

Date of mailing of the international search report

22/04/2003

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		oral Application No PCT/US 01/48651
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOLASA K ET AL: "alpha-1 Adrenergic antagonist effect on cholinergic muscarinic receptors." SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 27, no. 1, 2001, page 1458 XP001149567 31st Annual Meeting of the Society for Neuroscience; San Diego, California, USA; November 10-15, 2001 ISSN: 0190-5295 page 1458	1,7,8
P,Y	WO 01 78702 A (ALLERGAN SALES INC) 25 October 2001 (2001-10-25) cited in the application claims; table 1	1-67

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	national application No. PCT/US 01/48651
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 45-63 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 5.4(a).	
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	
<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	



International Application No. PCT/US 01 A8651

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claims 1-67 relate to an extremely large number of possible products. In fact, the claims contain so many variables that a lack of clarity (and/or conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear (and/or concise), namely products have been searched recited in the examples and closely related homologous compounds mentioned in the description.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/48651

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9532738	A	07-12-1995	AU 695623 B2	20-08-1998
			AU 2622295 A	21-12-1995
			CA 2191754 A1	07-12-1995
			DE 69511860 D1	07-10-1999
			DE 69511860 T2	10-02-2000
			DK 760681 T3	27-03-2000
			EP 0760681 A1	12-03-1997
			ES 2138740 T3	16-01-2000
			WO 9532738 A1	07-12-1995
			JP 10500988 T	27-01-1998
			US 6203794 B1	20-03-2001
WO 9633273	A	24-10-1996	AU 705924 B2	03-06-1999
			AU 5339896 A	07-11-1996
			BG 101984 A	31-07-1998
			BR 9609870 A	06-04-1999
			CA 2218857 A1	24-10-1996
			CZ 9703322 A3	18-03-1998
			EP 0826051 A1	04-03-1998
			WO 9633273 A1	24-10-1996
			HU 9802392 A2	01-02-1999
			JP 11504006 T	06-04-1999
			NO 974845 A	18-12-1997
			NZ 305411 A	29-11-1999
			PL 323006 A1	02-03-1998
			RU 2165976 C2	27-04-2001
			SG 52602 A1	28-09-1998
			SK 143597 A3	09-09-1998
			TR 9701215 T1	21-02-1998
			US 6395513 B1	28-05-2002
			US 5989545 A	23-11-1999
			ZA 9603129 A	22-10-1996
WO 0178702	A	25-10-2001	AU 5338301 A	30-10-2001
			EP 1280524 A2	05-02-2003
			WO 0178702 A2	25-10-2001
			US 2002058839 A1	16-05-2002

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 25/04	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,R O,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ケイ・ロジャー・アオキ

アメリカ合衆国 9 2 6 7 9 カリフォルニア州 コト・デ・カサ、ジンジャー・リリー・コート 2 番

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA17 AA20 AA27 BA01 BA02 BA08 BA23 BA41 BA42  
CA04 MA02 MA05 MA66 NA05 NA13 NA14 ZA081  
4C085 AA13 BB11 CC07 CC21 EE03 GG01 GG03  
4C086 AA01 AA02 BC38 BC42 BC50 GA02 GA07 MA02 MA03 MA04  
MA05 MA66 NA05 NA13 NA14 ZA08  
4C206 AA01 AA02 JA74 MA02 MA03 MA04 MA05 MA86 NA05 NA13  
NA14 ZA08