

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和1年10月3日(2019.10.3)

【公表番号】特表2018-530315(P2018-530315A)

【公表日】平成30年10月18日(2018.10.18)

【年通号数】公開・登録公報2018-040

【出願番号】特願2018-510813(P2018-510813)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/62	(2006.01)
C 1 2 N	15/63	(2006.01)
C 1 2 N	15/70	(2006.01)
C 1 2 N	15/86	(2006.01)
C 1 2 N	15/85	(2006.01)
C 1 2 N	15/81	(2006.01)
C 1 2 N	15/31	(2006.01)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)
C 0 7 K	14/32	(2006.01)
C 0 7 K	14/33	(2006.01)
C 1 2 N	15/57	(2006.01)
C 1 2 N	15/12	(2006.01)
C 0 7 K	14/21	(2006.01)
C 0 7 K	14/195	(2006.01)
C 0 7 K	14/25	(2006.01)
C 0 7 K	14/415	(2006.01)
C 0 7 K	14/435	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 P	21/02	(2006.01)
A 6 1 K	38/16	(2006.01)
A 6 1 K	39/02	(2006.01)
A 6 1 K	47/65	(2017.01)
A 6 1 K	47/68	(2017.01)
A 6 1 P	25/04	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/62	Z N A Z
C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	15/70	Z
C 1 2 N	15/86	Z
C 1 2 N	15/85	Z
C 1 2 N	15/81	Z
C 1 2 N	15/31	
C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	14/32	
C 0 7 K	14/33	
C 1 2 N	15/57	
C 1 2 N	15/12	

C 0 7 K	14/21
C 0 7 K	14/195
C 0 7 K	14/25
C 0 7 K	14/415
C 0 7 K	14/435
C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10
C 1 2 P	21/02
A 6 1 K	38/16
A 6 1 K	39/02
A 6 1 K	47/65
A 6 1 K	47/68
A 6 1 P	25/04
A 6 1 K	39/395

C                            L

**【手続補正書】****【提出日】**令和1年8月23日(2019.8.23)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**特許請求の範囲**【補正対象項目名】**全文**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】****【請求項1】**

(a) ボツリヌス神経毒素(BTx)または破傷風神経毒素(TTx)部分と、  
 (b) 炭疽毒素防御抗原(PA)、またはPAのC末端受容体結合ドメインと  
 を含む融合タンパク質であって、

(a)部分と(b)部分とが共に連結または融合される、前記融合タンパク質。

**【請求項2】**

前記BTxまたはTTx部分が、BTxまたはTTxの酵素部分及び転位ペプチドまたは  
 転位ドメインを含む、請求項1に記載の融合タンパク質。

**【請求項3】**

前記BTxの酵素部分または転位ペプチドもしくは転位ドメインが、BTx/A、BTx/B、BTx/C、BTx/D、BTx/E、BTx/F、BTx/G、及び非クロストリジウムのボツリヌス様毒素のうちのいずれか1つのBTx軽鎖ドメイン及びBTx重鎖ドメインから選択される、請求項2に記載の融合タンパク質。

**【請求項4】**

(a) 前記BTxもしくはTTxの酵素部分が、クロストリジウム神経毒素もしくは非クロストリジウムのボツリヌス様毒素に由来するN末端酵素ドメイン(LC)を含む；

(b) 前記BTxもしくはTTxの酵素部分が、クロストリジウム神経毒素もしくは非クロストリジウムのボツリヌス様毒素に由来するN末端酵素ドメイン(LC)を含み、表1に記載のLC酵素部分から選択される；

(c) 前記転位ペプチドもしくは転位ドメインが、クロストリジウム神経毒素もしくは非クロストリジウムのボツリヌス様毒素に由来するポア形成/転位ドメインを含む；

(d) 前記転位ペプチドもしくは転位ドメインが、クロストリジウム神経毒素もしくは非クロストリジウムのボツリヌス様毒素に由来するポア形成/転位ドメインを含み、表1に記載のHN転位ペプチドから選択される；かつ/または

(e) 前記LCと前記HNとの間の接合部に対応する残基が切断された、

請求項 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

前記酵素部分及び前記転位ペプチドもしくは転位ドメインが、リンカーペプチドによって連結される；または

前記酵素部分及び前記転位ペプチドもしくは転位ドメインが、リンカーペプチドによって連結され、前記リンカーペプチドが、

( i ) 1 ~ 20 アミノ酸長である；

( ii ) ヒト血清において少なくとも 1 分間安定である；

( iii ) Gly もしくは Ser であるアミノ酸を少なくとも 1 個含む；かつ／もしくは

( iv ) Lys 、 Arg 、もしくはその両方を含まない、

、請求項 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

前記 BTx もしくは TTx 部分及び前記 PA もしくは PA の前記 C 末端受容体結合ドメインが、リンカーペプチドによって連結される；または

前記 BTx もしくは TTx 部分及び前記 PA もしくは PA の前記 C 末端受容体結合ドメインが、リンカーペプチドによって連結され、前記リンカーペプチドが、

( i ) 1 ~ 20 アミノ酸長である；

( ii ) ヒト血清において少なくとも 1 分間安定である；

( iii ) Gly もしくは Ser であるアミノ酸を少なくとも 1 個含む；かつ／もしくは

( iv ) Lys 、 Arg 、もしくはその両方を含まない、

、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

( i ) 前記 PA もしくは PA の前記 C 末端受容体結合ドメインが、プロテアーゼによる切断に抵抗性である；または

( ii ) 前記 PA もしくは PA の前記 C 末端受容体結合ドメインが、フーリンによる切断もしくは Lys C による切断、もしくはそれらの両方に抵抗性である、

請求項 1 ~ 6 のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

PA の前記 C 末端受容体結合ドメインが、 Pad 4 ドメイン、 Pad 2 及び Pad 4 ドメイン、または PA 6 3 を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

( i ) 前記融合タンパク質が、 2 ~ 10 個の Pad 4 ドメインを直列で含む；

( ii ) 天然の Pad 4 ドメインの N 末端側隣接部に由来する 1 ~ 60 個の連続アミノ酸が、前記 BTx もしくは TTx 部分と前記 Pad 4 との間に組み込まれる；

( iii ) 配列番号 1 ( 配列番号 1 における 29 アミノ酸のシグナルペプチドを差し引いたもの ) の位置 594 、位置 613 、位置 633 、位置 637 、位置 653 、位置 673 、位置 679 、位置 680 、位置 684 、位置 695 、位置 703 、位置 722 、位置 723 、位置 729 、及び位置 730 で、前記 Pad 4 ドメインにおける Lys 残基の 1 つもしくは複数が Arg もしくは His によって交換されている；

( iv ) 配列番号 1 の位置 623 、位置 642 、位置 662 、位置 666 、位置 682 、位置 702 、位置 708 、位置 709 、位置 713 、位置 724 、位置 732 、位置 751 、位置 752 、位置 758 、及び位置 759 で、前記 Pad 4 ドメインにおける Lys 残基の 1 つもしくは複数 ( それぞれを含めた最大数を含む ) が Arg もしくは His に交換されている；または

( v ) 配列番号 1 ( 配列番号 1 における 29 アミノ酸のシグナルペプチドを差し引いたもの ) の位置 601 、位置 713 、位置 719 で、前記 Pad 4 ドメインにおける Asn 残基の 1 つもしくは複数が Asp によって交換されている、

請求項 8 に記載の融合タンパク質。

**【請求項 10】**

アミノ酸残基 R K K R を含むフーリン切断部位が、フーリン抵抗性のアミノ酸配列によって交換された全 P A タンパク質を含み、

R K K R が、配列番号 1 における 29 アミノ酸のシグナルペプチドを配列番号 1 から差し引いたものの残基 164 ~ 167 である；または

R K K R が、配列番号 1 における 29 アミノ酸のシグナルペプチドを配列番号 1 から差し引いたものの残基 164 ~ 167 であり、前記フーリン抵抗性のアミノ酸配列が、S S S R ( 配列番号 32 ) もしくは S S S S ( 配列番号 33 ) である、

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

**【請求項 11】**

( i ) 前記融合タンパク質の N 末端に少なくとも 1 個の D - アミノ酸を含む；かつ／または

( i i ) グリコシル化された、もしくはグリコシル化されていない、

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

**【請求項 12】**

( i ) 炭疽毒素防御抗原 ( P A ) 部分；または

( i i ) 侵害受容器の表面受容体を特異的に標的とする能力を有する分子と融合しており、その天然の受容体結合機能が遮断されるように改変された変異炭疽毒素防御抗原 ( m P A ) 部分

からなる群から選択されるポリペプチドを含む第 1 のドメインと、

細胞内作用毒素の触媒ドメインを含む第 2 のドメインと  
を含む、融合タンパク質。

**【請求項 13】**

( a ) 前記第 2 のドメインが、S N A R E タンパク質の 1 つもしくは複数を標的とする非細胞傷害性プロテアーゼを含む；

( b ) 前記細胞内作用毒素の触媒ドメインが、ボツリヌス毒素もしくは破傷風毒素の触媒ドメインである；

( c ) 前記侵害受容器の表面受容体が、エンドサイトーシスを受けることでエンドソームに取り込まれて侵害受容ニユーロンに入る能力を有し、前記侵害受容ニユーロンが、第 2 のドメインによって切斷される能力を有する S N A R E タンパク質を発現する；

( d ) 侵害受容器の表面受容体を特異的に標的とする能力を有する前記分子が、侵害受容ニユーロンで発現した A N T X R 2 ( C M G 2 ) 受容体に結合する抗体試薬もしくはアフィボディ ( a f f i b o d y ) である；

( e ) 前記 P A もしくは m P A が、オリゴマー形態である；

( f ) 前記第 1 のドメイン及び前記第 2 のドメインが、リンカーペプチドによって共に融合される；かつ／または

( g ) 前記第 1 のドメイン及び前記第 2 のドメインが、リンカーペプチドによって共に融合され、前記リンカーペプチドが、

( i ) 1 ~ 20 アミノ酸長である；

( i i ) ヒト血清において少なくとも 1 分間安定である；

( i i i ) G l y もしくは S e r であるアミノ酸を少なくとも 1 個含む；かつ／もしくは

( i v ) L y s 、 A r g 、もしくはその両方を欠失している、

請求項 12 に記載の融合タンパク質。

**【請求項 14】**

前記第 2 のドメインが、エンドソーム内からエンドソーム膜を横切って前記融合タンパク質を侵害受容ニユーロンのサイトゾルに転位させる能力を有する転位ドメイン ( T L ) を含む、請求項 12 または 13 に記載の融合タンパク質。

**【請求項 15】**

前記 T L が、炭疽毒素転位ペプチド、クロストリジウム神経毒素の転位ドメイン、非ケ

ロストリジウムのボツリヌス様毒素の転位ドメイン、またはKKK、KKKKKK(配列番号59)、KKKKKKKK(配列番号60)、HHH、HHHHHH(配列番号61)、HHHHHHHH(配列番号62)、RRR、RRRRRR(配列番号63)、もしくはRRRRRRRR(配列番号64)などのポリカチオン性配列からなる群から選択される、請求項14に記載の融合タンパク質。

【請求項16】

前記クロストリジウム神経毒素が、ボツリヌス神経毒素(BTx)または破傷風神経毒素(TTx)である、請求項15に記載の融合タンパク質。

【請求項17】

前記TLが、前記細胞内作用毒素の触媒ドメインと融合している、請求項14～16のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

【請求項18】

請求項1～17のいずれか1項に記載の融合タンパク質をコードする、核酸。

【請求項19】

請求項18に記載の核酸を含むベクター；または請求項18に記載の核酸を含み、プラスミド、バクテリオファージ、ファージミド、コスマド、ウイルス粒子、もしくはウイルスベクターであるベクター。

【請求項20】

請求項18に記載の核酸、または請求項19に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項21】

(a) ボツリヌス神経毒素(BTx)または破傷風神経毒素(TTx)部分と、  
(b) 炭疽毒素防御抗原(PA)、またはPAのC末端受容体結合ドメインとを含み、(a)部分と(b)部分とが共に連結または融合される、融合タンパク質の产生方法であって、

(i) 前記融合タンパク質が発現するような条件下での、請求項20に記載の細胞の培養段階と、

(ii) 前記融合タンパク質の回収段階とを含む、融合タンパク質の产生方法。

【請求項22】

請求項1～17のいずれか1項に記載の融合タンパク質；または請求項1～17のいずれか1項に記載の融合タンパク質及び医薬的に許容可能な担体、賦形剤、もしくは希釈剤を含む、組成物。

【請求項23】

(a) 侵害受容ニューロンにおけるイオンチャネルを遮断する能力を有するジスルフィド含有ペプチド毒素と、

(b) 前記イオンチャネルをそこで発現する前記侵害受容ニューロンの結合部位に結合する能力を有する標的指向化部分(TM)とを含む、融合タンパク質。

【請求項24】

(a) AB毒素と、

(b) 侵害受容ニューロンに発現した受容体に結合する炭疽毒素防御抗原(PA)またはその断片と、

(c) エンドソーム内からエンドソーム膜を横切って前記プロテアーゼを前記侵害受容ニューロンのサイトゾルに転位させる能力を有する転位ドメイン(TL)とを含む融合タンパク質。