

(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2016-513082

(P2016-513082A)

(43) 公表日 平成28年5月12日(2016.5.12)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
<b>A61K 38/00</b> (2006.01)	A 61 K	37/02	Z N A 4 C 0 8 4
<b>A61K 35/74</b> (2015.01)	A 61 K	35/74	G 4 C 0 8 7
<b>A61P 17/00</b> (2006.01)	A 61 P	17/00	4 H 0 4 5
<b>A61P 1/00</b> (2006.01)	A 61 P	1/00	
<b>A61P 13/02</b> (2006.01)	A 61 P	13/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-555409 (P2015-555409)	(71) 出願人	511060836 ニューヨーク・ユニバーシティ アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニューヨーク ワシントン スクエア サウス 70
(86) (22) 出願日	平成26年1月28日 (2014. 1. 28)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成27年8月6日 (2015. 8. 6)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/013385	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕季
(87) 國際公開番号	W02014/117148	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 國際公開日	平成26年7月31日 (2014. 7. 31)	(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(31) 優先権主張番号	61/757,478		
(32) 優先日	平成25年1月28日 (2013. 1. 28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

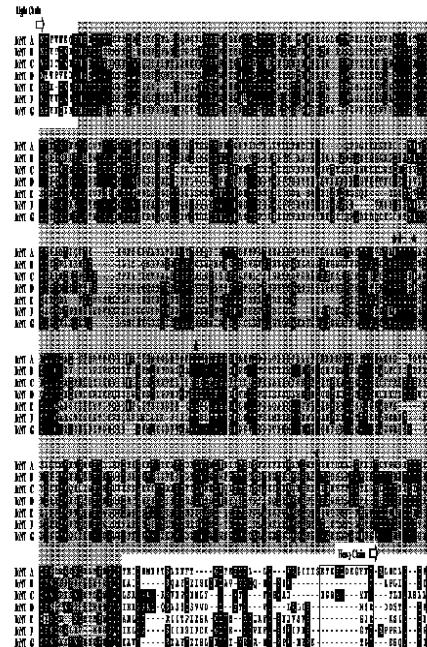
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】無毒性神経毒誘導体を用いる治療方法

## (57) 【要約】

本発明は治療方法に関する。本方法は、クロストリジウム神経毒の、単離された、生理学的に活性な無毒誘導体を対象に接触させることを伴う。接触は、対象を治療するために実行される。クロストリジウム神経毒の誘導体は、そのN末端にカーゴ付着ペプチド配列を持たない。

FIG. 1A



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

クロストリジウム神経毒の、単離された、生理学的に活性な無毒誘導体を対象に接触させる段階を含み、クロストリジウム神経毒の前記誘導体が、そのN末端にカーゴ付着ペプチド配列を持たないという条件で、前記接触させる段階が、前記対象を治療するために実行される、治療方法。

## 【請求項 2】

前記神経毒誘導体が、クロストリジウムボツリナム (*Clostridium botulinum*) 神経毒誘導体である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

クロストリジウムボツリナム神経毒誘導体が、クロストリジウムボツリナムセロタイプA、クロストリジウムボツリナムセロタイプB、クロストリジウムボツリナムセロタイプC、クロストリジウムボツリナムセロタイプD、クロストリジウムボツリナムセロタイプE、クロストリジウムボツリナムセロタイプF、及びクロストリジウムボツリナムセロタイプG からなる群より選択されるセロタイプを持つ、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

10

## 【請求項 4】

前記神経毒誘導体が、メタロプロテアーゼ無効化変異を持つ、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記神経毒誘導体が、組換えタンパク質である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

前記対象が、しわ、肥大性咬筋、及び局所多汗症からなる群より選択される皮膚科のあるいは美容的な状態に対して治療される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記対象が、食道運動障害、咽頭食道痙攣、及び裂肛からなる群より選択される胃腸病学的な状態に対して治療される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記対象が、尿路神経原性機能障害、過活動膀胱、及び切迫性尿失禁の神経調節からなる群より選択される尿生殖器学的な状態に対して治療される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 9】

前記対象が、トゥーレット症候群、局所の筋痙攣またはジストニア、痙性斜頸、原発性眼瞼痙攣、片側顔面痙攣、痙攣性発声障害、顔面神経障害、ラスマッセン症候群、切断痛、声の震え、ワニの涙症候群、辺縁性下顎神経麻痺、疼痛、食道由来の胸痛、頭痛、脳性麻痺、多発性硬化症の臀部内転筋機能障害、神経痛及び炎症、関節炎、医原性耳下腺唾液腺粘液腫、ならびに慢性T M J 疼痛及び転位からなる群より選択される神経学的な状態に対して治療される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記神経毒誘導体が、野生型クロストリジウム神経毒のLD<sub>50</sub>よりも少なくとも1,000倍高いLD<sub>50</sub>を持つ、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

40

## 【請求項 11】

前記神経毒誘導体が、神経細胞の細胞質ゾル内に、野生型クロストリジウム神経毒に比べ、より多量に蓄積する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 12】

クロストリジウム神経毒の前記誘導体が、以下のプロペプチドを切断することによって生成される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法であって：

前記プロペプチドが、

軽鎖領域と、

50

**重鎖領域と**

前記軽鎖及び重鎖領域を結合し、高度に特異的なプロテアーゼ切断部位を含む中間領域と  
を含み、

前記軽鎖及び重鎖領域がジスルフィド結合によって連結され、

前記高度に特異的なプロテアーゼ切断部位が、切断を可能にするために、高度に特異的なプロテアーゼによって認識される三つ以上の特異的近接アミノ酸残基を持つ、方法。

**【請求項13】**

前記高度に特異的なプロテアーゼ切断部位が、エンテロキナーゼ切断部位及びタバコエツチ病ウイルスプロテアーゼ認識（T E V）配列から選択される、請求項12に記載の方法。

**【請求項14】**

前記プロペプチドが、前記中間領域内に低度に特異的なプロテアーゼ切断部位を持たず、前記低度に特異的なプロテアーゼ切断部位が、切断を許容するために、プロテアーゼによって認識される二つ以下の近接アミノ酸残基を持つ、請求項12または請求項13に記載の方法。

**【請求項15】**

前記軽鎖及び重鎖領域が切断されていない、請求項12～14のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項16】**

前記プロペプチドが、前記軽鎖領域に結合されたシグナルペプチドをさらに含み、前記シグナルペプチドが、真核細胞から培地への前記神経毒プロペプチドの分泌を可能にするのに適切である、請求項12～15のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項17】**

前記シグナルペプチドが、g p 6 4シグナルペプチドである、請求項16に記載の方法。

**【請求項18】**

前記プロペプチドが、前記シグナルペプチドと前記軽鎖領域との間に位置する親和性タグをさらに含む、請求項16または請求項17に記載の方法。

**【請求項19】**

前記親和性タグが配列番号10の配列を持つ、請求項18に記載の方法。

**【請求項20】**

前記重鎖がトリプシン感受性の認識配列を持たない、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本出願は、参照によりその全体が本明細書に援用される2013年1月28日に出願のU.S. Provisional Patent Application Serial No. 61/757,478の利益を主張する。

**【0002】**

本出願の研究は、米国政府の国立衛生研究所助成金R01 AI093504の支援を受けて行われたものである。米国政府は特定の権利を持つ。

**【0003】****発明の分野**

本発明は、無毒性神経毒誘導体を用いる治療方法に関する。

**【背景技術】****【0004】****発明の背景**

クロストリジウム神経毒は、シナプス小胞の開口分泌のための神経細胞の仕組みを標的

10

20

30

40

50

とする、構造的に類似のタンパク質の群である。クロストリジウム (C l o s t r i d i u m) 属の嫌気性細菌によって生成されたボツリヌス神経毒 (「BoNT」、7種の免疫学的に異なる亜型、A～G) 及び破傷風神経毒 (「TeNT」) は、静脈あるいは筋肉注入で投与されると、0.5～2.5 ng / kg の範囲内で LD<sub>50</sub> を有する、重量当たり最も毒性の強い物質であることが知られている (National Institute of Occupational Safety and Health, "Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (R-TECS)", Cincinnati, Ohio: National Institute of Occupational Safety and Health (1996))。BoNTは、神経筋接合部のコリン作動性神経を標的とし、アセチルコリン放出を阻害し、そして末梢神経筋遮断を引き起こす (Simpson, "Identification of the Major Steps in Botulinum Toxin Action," Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 44: 167-193 (2004)) (非特許文献2))。

10

#### 【0005】

クロストリジウム毒素遺伝子に基づく治療薬の合理的なデザインを可能にする遺伝子工学の基盤は、I c h t c h e n k o 及びB a n d 米国特許No. 7,785,606 (特許文献1) で説明された。遺伝子工学スキームは、二段階アプローチに基づいていた。遺伝子構築物、発現系及び精製スキームは、生理学的に活性な組換えクロストリジウム神経毒誘導体を生成するように設計された。組換え毒素誘導体は、候補治療薬または有用な生物学的試薬を開発するための重要な構造的特徴を保持していた。このパラダイムによって開発された遺伝子の構築物及び発現系を用いることで、その後、選択的点突然変異が、組換え無毒性クロストリジウム神経毒誘導体を作製するために導入された。

20

#### 【0006】

単離された生理学的に活性な有毒性クロストリジウム神経毒誘導体を患者に接触させることを伴う治療方法が、B a n d 及びI c h t c h e n k o 米国特許No. 7,785,606 (特許文献1) に説明されている。また、S f p ホスホパンテイン転移酵素を用いるカーゴの部位特異的付着を可能にするための、タンパク質のN末端に融合させたS 6ペプチド配列を持つ、単離された生理学的に活性な、有毒性及び無毒性クロストリジウムボツリナム神経毒誘導体が、治療に適切であると説明されている (I c h t c h e n k o 及びB a n d 米国特許出願公開No. 2011/0206616 (特許文献2))。しかし、そのN末端にカーゴ付着配列を欠き、且つクロストリジウム神経毒または野生型クロストリジウム神経毒の有毒性誘導体よりも非常に高いLD<sub>50</sub>を持つクロストリジウム神経毒の無毒性誘導体での治療を伴う方法は、説明されていなかった。

30

#### 【0007】

本発明の目的は、本技術分野におけるこの課題及び他の限界を克服することである。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0008】

40

【特許文献1】米国特許No. 7,785,606

【特許文献2】米国特許出願公開No. 2011/0206616

#### 【非特許文献】

#### 【0009】

【非特許文献1】National Institute of Occupational Safety and Health, "Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (R-TECS)," Cincinnati, Ohio: National Institute of Occupational Safety and Health (1996)

【非特許文献2】Simpson, "Identification of the Major Steps in Botulinum Toxin Action," Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 44: 167-193 (2004)

50

Major Steps in Botulinum Toxin Action,"  
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 44: 167-193 (2004)

【発明の概要】

【0010】

本発明は治療方法に関する。この方法は、クロストリジウム神経毒の単離された生理学的に活性な無毒誘導体を対象に接触させることを伴う。この接触は、神経毒誘導体が、そのN末端にカーゴ付着ペプチド配列を持たないという条件で、対象を治療するために実行される。

【0011】

本明細書に説明する遺伝子構築物及び発現系は、野生型BoNT毒素に類似の構造的及び輸送的性質を有して、組換えBoNT誘導体の群を生成することが示されている。クロストリジウム神経毒のこれらの誘導体は、野生型毒素の毒性に相当するような有毒な形態で、または毒性の原因となるメタロプロテアーゼ活性を減少させる変異を持たせて（すなわち、無毒性誘導体）生成できる。無毒性神経毒誘導体のLD<sub>50</sub>は、野生型毒素のそれよりも非常に高い。

【0012】

本明細書で説明するように、無毒性神経毒誘導体（参照によりその全体が本明細書に援用されるIchtchenko et al. U.S. Patent No. 7,785,606を参照）は、予想外に、薬学的目的で使用される野生型神経毒に類似のインビボ活性を有する。しかも、本明細書に説明する無毒性神経毒誘導体は、培養によって生成される野生型神経毒の現在の薬学的調整物を超える有意な治療的利益を提供する。特に、本明細書に説明する無毒性誘導体は、より安全である。また、医療用途及び生成あるいは製造において、特異な利点を提供する。改善された治療指数は、安全性への懸念から野生型神経毒の毒性の適用が制限される状況にも適用を可能にする。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1A～1Cは、7つの野生型、ボツリヌス神経毒セロタイプのアミノ酸配列を比較配置したものであり、以下のものを含む。クロストリジウムボツリナムセロタイプA（wt BoNT A）（配列番号：1）、クロストリジウムボツリナムセロタイプB（wt BoNT B）（配列番号：2）、クロストリジウムボツリナムセロタイプC（wt BoNT C）（配列番号：3）、クロストリジウムボツリナムセロタイプD（wt BoNT D）（配列番号：4）、クロストリジウムボツリナムセロタイプE（wt BoNT E）（配列番号：5）、クロストリジウムボツリナムセロタイプF（wt BoNT F）（配列番号：6）、及びクロストリジウムボツリナムセロタイプG（wt BoNT G）（配列番号：7）。相同性を最大にするためにギャップが導入されている。比較配列の50%以上が同一であるアミノ酸は、黒枠で示されている。メタロプロテアーゼの触媒ドメインの活性部位を構成するアミノ酸を、星印で示している。軽鎖及び重鎖の神経毒システイン残基間のジスルフィド架橋を、長い横書きの括弧で示している。軽鎖の最小触媒ドメインを構成するアミノ酸残基には、網掛けが施されている。タンパク重鎖（BoNT AのN872）のC末端部の第一のアミノ酸は、受容体結合ドメインを構成すると考えられる第一のアミノ酸と同様、白い矢印で示している。成熟二本鎖（dichain）BoNT A分子に不在のアミノ酸は、他のBoNTセロタイプの位置合わせされたアミノ酸と一緒に、四角で囲んでいる。神経毒軽鎖の第一のアミノ酸にも白い矢印を記している。

【図2】3μlの0.9%NaCl内に0.5μg/マウスのBoNT A/ad-0（実験）を含めたもので側面腓腹筋への筋肉内注射を行うか、またはBoNT A/ad-0を含まない3μlの0.9%NaCl（対照標準）を注入することによって実行されたインビボ試験の結果を示す写真である。筋肉麻痺及び指の外転が、48時間後に記録された。2枚の上パネル写真が対照標準マウスを示す。右上写真内の矢印が注入部位を示して

10

20

30

40

50

いる。3枚の下パネル写真が実験マウスを示す。指の外転筋肉麻痺は、B o N T A / a d - 0 が注入されたマウスでのみ観察された。実験、n = 10。対照標準、n = 5。3枚の下パネル写真内に代表的結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

発明の詳細な説明

本発明は治療方法に関する。本方法は、対象に、クロストリジウム神経毒の、単離された生理学的に活性な無毒誘導体を接触させることを伴う。この接触は、神経毒誘導体がそのN末端にカーゴ付着ペプチド配列を持たないという条件で、対象を治療するために実行される。

10

【0015】

一つの実施形態によれば、本発明のクロストリジウム神経毒の誘導体は、クロストリジウムボツリナム神経毒の誘導体である。クロストリジウムボツリナムは、複数のセロタイプ(A ~ G)を持つ。クロストリジウム神経毒の適切な誘導体は、クロストリジウムボツリナムセロタイプの、いずれの誘導体でもよい。加えて、本発明のクロストリジウム神経毒の適切な誘導体は、複数のクロストリジウムボツリナムセロタイプの誘導体でもよい。例えば、クロストリジウム神経毒の誘導体を、一つのクロストリジウムボツリナムセロタイプ(例えば、セロタイプA、B o N T A)からの軽鎖(L C)領域と、別のクロストリジウムボツリナムセロタイプ(例えば、セロタイプB、B o N T B)からの重鎖(H C)領域で構築することが望まれることもある。また、本発明のクロストリジウム神経毒の適切な誘導体は、癌細胞へのL C送達のために、他の受容体リガンド、例えば上皮細胞成長因子('EGF')を用いるキメラを含む(参照によりその全体が本明細書に援用されるF o s t e r e t a l . U . S . P a t e n t A p p l i c a t i o n P u b l i c a t i o n N o . 2 0 1 2 / 0 0 6 4 0 5 9を参照)。

20

【0016】

「誘導体」は、クロストリジウム神経毒が、野生型毒素とかなり類似しているが、本明細書で説明するように僅かに改変されていることを意味する。例えば、誘導体は、野生型神経毒に少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるクロストリジウム神経毒を含む。

30

【0017】

クロストリジウム神経毒の単離された誘導体は、生理学的に活性である。この生理活性は、毒素免疫原性、細胞間輸送及び細胞内輸送、細胞認識及び細胞標的及び麻痺作用を含むが、これらに限定されるものではない。一つの実施形態において、クロストリジウム神経毒の誘導体は、全長クロストリジウム神経毒の誘導体である。

40

【0018】

呼称「ad - 0」を用いて本明細書中で示すクロストリジウム神経毒の無毒性誘導体は、参照によりその全体が本明細書に援用されるI c t h t c h e n k o 及びB a n d U . S . P a t e n t A p p l i c a t i o n P u b l i c a t i o n N o . 2 0 1 1 / 0 2 0 6 6 1 6 に説明されているように、神経毒誘導体のN末端に融合されるS 6ペプチド配列を含まない。

【0019】

クロストリジウム神経毒の細胞結合及び細胞内移行のメカニズムは、まだ完全には理解されていない。すべてのクロストリジウム神経毒の重鎖のC末端部は、G<sub>1</sub>~<sub>6</sub>シリーズのガングリオシドに対する選択性を持ち、ガングリオシド(シアル酸を含む糖脂質)に結合する(M o n t e c u c c o e t a l . , "S t r u c t u r e a n d F u n c t i o n o f T e t a n u s a n d B o t u l i n u m N e u r o t o x i n s , " Q . R e v . B i o p h y s . 2 8 : 4 2 3 - 4 7 2 ( 1 9 9 5 ) 、 M o n t e c u c c o , "H o w D o T e t a n u s a n d B o t u l i n u m T o x i n s B i n d t o N e u r o n a l M e m b r a n e s ? " T I B S 1 1 : 3 1 4 - 3 1 7 ( 1 9 8 6 ) 及び V a n H e y n i n g e n e t a l . , "T h e

50

Fixation of Tetanus Toxin by Ganglioside," J. Gen. Microbiol. 24: 107-119 (1961)、これらは、参照によりその全体が援用される)。 Ganglioside結合の原因となる配列は、構造的に類似の TeNT 分子に関して確認されており、その重鎖の C 末端アミノ酸 34 残基以内に位置する。 BoNT A、BoNT B、BoNT C、BoNT E 及び BoNT F は、この領域(図 1)内の TeNT と高度な相同意を共有する(Shapiro et al., "Identification of a Ganglioside Recognition Domain of Tetanus Toxin Using a Novel Ganglioside Photoaffinity Ligand," J. Biol. Chem. 272: 30380-30386 (1997)、これは、参照によりその全体が本明細書に援用される)。複数の種類の証拠は、クロストリジウム神経毒を神経細胞膜に結合する際に伴う、少なくとも一つの追加成分の存在を示唆する(Montecucco et al., "Structure and Function of Tetanus and Botulinum Neurotoxins," Q. Rev. Biophys. 28: 423-472 (1995)、Montecucco, "How Do Tetanus and Botulinum Toxins Bind to Neuronal Membranes?" TIBS 11: 314-317 (1986)、これらは、参照によりその全体が本明細書に援用される)。二つのレポート(Nishiki et al., "The High-Affinity Binding of Clostridium Botulinum Type B Neurotoxin to Synaptotagmin II Associated with Gangliosides G<sub>T1b</sub> / G<sub>D1a</sub>," FEBS Lett. 378: 253-257 (1996)、Dong et al., "Synaptotagmins I and II Mediate Entry of Botulinum Neurotoxin B into Cells," J. Cell Biol. 162: 1293-1303 (2003)、これらは、参照によりその全体が本明細書に援用される)に、シナプトタグミンは、補助的 BoNT B 受容体のための可能な候補と特定され、シナプトタグミン I 及び II は、BoNT G のための神経細胞受容体として関連づけされた(Rummel et al., "Synaptotagmins I and II Act as Nerve Cell Receptors for Botulinum Neurotoxin G," J. Biol. Chem. 279: 30865-30870 (2004)、これは、参照によりその全体が本明細書に援用される)。参照によりその全体が本明細書に援用される Dong et al., "SV2 is the Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin A," Science 312: 592-596 (2006) は、BoNT A が、シナプス小胞タンパク質 SV2 (イソ型 A、B 及び C) に結合することによって神経細胞に入ることを示した。しかし、クロストリジウム神経毒の推定受容体結合ドメインにおける構造類似性にもかかわらず、他の毒素亜型は、SV2 への親和性を全く示さず、その代わりに、シナプトタグミンまたはシナプトタグミン関連分子を標的とするのかも知れない。脂質ラフトは、TeNT 結合と神経細胞内への内部移行に関わる特定のドメインとして関連づけられた(Herreros et al., "Lipid Rafts Act as Specialized Domains for Tetanus Toxin Binding and Internalization into Neurons," Mol. Biol. Cell 12: 2947-2960 (2001)、これは、参照によりその全体が本明細書に援用される)。しかし、これらのドメインは、複数の細胞型に広く分布しているため、神経細胞に対する毒素の高度な特異性を単純に説明することはできない。

【0020】

クロストリジウム神経毒は、シナプス前膜を通して、エネルギー依存メカニズムによって内在化され(Montecucco et al., "Structure and

10

20

30

40

50

Function of Tetanus and Botulinum Neurotoxins," Q. Rev. Biophys. 28: 423 - 472 (1995)、Matteoli et al., "Synaptic Vesicle Endocytosis Mediates the Entry of Tetanus Neurotoxin into Hippocampal Neurons," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 13310 - 13315 (1996) 及び Mukherjee et al., "Endocytosis," Physiol. Rev. 77: 759 - 803 (1997)、これらは、参照によりその全体が本明細書に援用される)、そして小胞内に急速に現れる。そこでは、変質から少なくとも部分的に保護される (Dolly et al., "Acceptors for Botulinum Neurotoxin Reside on Motor Nerve Terminals and Mediate Its Internalization," Nature 307: 457 - 460 (1984)、Critchley et al., "Fate of Tetanus Toxin Bound to the Surface of Primary Neurons in Culture: Evidence for Rapid Internalization," J. Cell Biol. 100: 1499 - 1507 (1985)、これらは、参照によりその全体が本明細書に援用される)。軽鎖及び重鎖の BoNT 複合体は、シャペロンのような様式で細胞内小胞膜と相互作用するので、凝集を阻止し、滑面小胞体、ミトコンドリア及び葉緑体のチャネルを導くあるいは移行させるタンパク質に類似の様式で軽鎖の移行を促進する (Koriazova et al., "Translocation of Botulinum Neurotoxin Light Chain Protease through the Heavy Chain Channel," Nat. Struct. Biol. 10: 13 - 18 (2003)、これは、参照によりその全体が本明細書に援用される)。エンドソームの酸性化は、小孔形成を誘起すると思われる。そのことが、鎖間ジスルフィド結合の減少時に、軽鎖のサイトゾルへの移行を許容する (Hoch et al., "Channels Formed by Botulinum, Tetanus, and Diphtheria Toxins in Planar Lipid Bilayers: Relevance to Translocation of Proteins Across Membranes," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1692 - 1696 (1985)、これは、参照によりその全体が本明細書に援用される)。サイトゾル内において、軽鎖は、シナプス小胞の開口分泌機構のタンパク質成分に特有の亜鉛エンドペプチダーゼ活性を示す。TeNT 及び BoNT B、BoNT D、BoNT F 及び BoNT G は、VAMP / シナプトブレビンを認識する。シナプス小胞膜のこの細胞膜内タンパクは、単一のペプチド結合で切断される。これは、各神経毒に対して異なる。BoNT A、BoNT C 及び BoNT E は、カルボキシル末端セグメント内の異なる部位でシナプス前膜のタンパク質である SNAP-25 を認識して切断する。BoNT C も、神経終末形質膜の別のタンパク質であるシントキシンを切断する (Montecucco et al., "Structure and Function of Tetanus and Botulinum Neurotoxins," Q. Rev. Biophys. 28: 423 - 472 (1995)、Sutton et al., "Crystal Structure of a SNARE Complex Involved in Synaptic Exocytosis at 2.4 Resolution," Nature 395: 347 - 353 (1998)、これらは、参照によりその全体が本明細書に援用される)。シナプスリリース機構のそのような成分の切断は、運動神経におけるアセチルコリン放出の抑制という結果になり、最終的に神経筋麻痺に至る。

## 【0021】

本発明の方法に用いられるクロストリジウム神経毒の単離された誘導体は、生理学的に活性で無毒である。クロストリジウム神経毒の毒性の原因となるエンドペプチダーゼ活性

10

20

30

40

50

は、メタロプロテアーゼ(図1Aから1C)に特有の、軽鎖内におけるH E x x H x x H(配列番号:8)モチーフの存在に関係すると思われる。BoNT A軽鎖の突然変異発生の後、カリフォルニアアメフラシ(*Aplysia californica*)のシナプス前コリン作動性神経内へ、対応するmRNAを微量注入することにより、毒性の原因となる最小必須ドメインの確認が可能となった(Kurazono et al., "Minimal Essential Domains Specifying Toxicity of the Light Chains of *Tetanus Toxin* and *Botulinum Neurotoxin Type A*," *J. Biol. Chem.* 267: 14721-14729 (1992)、これは、参照によりその全体が本明細書に援用される)。BoNT A軽鎖の特定部位突然変異誘発は、Zn<sup>2+</sup>配位に関わるアミノ酸残基と、SNAP-25を切断する活性メタロエンドプロテアーゼコアの形成とを特定した(Rigoni et al., "Site-Directed Mutagenesis Identifies Active-Site Residues of the Light Chain of *Botulinum Neurotoxin Type A*," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 1231-1237 (2001)、これは、参照によりその全体が本明細書に援用される)。クロストリジウム神経毒及びそれらの誘導体の三次元構造は、突然変異の結果を確証するものであり、タンパク質ドメインの空間的構成が詳述された。BoNT Aホロ毒素に対しては、3.3の解像度で結晶構造が取得された(Lacy et al., "Crystal Structure of *Botulinum Neurotoxin Type A* and Implications for Toxicity," *Nat. Struct. Biol.* 5: 898-902 (1998)、これは、参照によりその全体が本明細書に援用される)。BoNT Bホロ毒素結晶構造は、1.8及び2.6の解像度で測定された(Swaminathan et al., "Structural Analysis of the Catalytic and Binding Sites of *Clostridium Botulinum Neurotoxin B*," *Nat. Struct. Biol.* 7: 693-699 (2000)、これは、参照によりその全体が本明細書に援用される)。近年、BoNT E触媒ドメインの結晶構造が、2.1の解像度で測定された(Agarwal et al., "Structural Analysis of *Botulinum Neurotoxin Type E* Catalytic Domain and Its Mutant Glu212>Gln Reveals the Pivotal Role of the Glu212 Carboxylate in the Catalytic Pathway," *Biochemistry* 43: 6637-6644 (2004)、これは、参照によりその全体が本明細書に援用される)。後の研究は、複数の興味深い構造詳細を提供し、BoNT E LC E212>Q変異体内のメタロエンドタンパク分解活性の完全な消失を説明する助けとなっている。クロストリジウム毒素のアミノ酸配列と生物学的活性度との関係についての、この詳細な情報の利用は、治療目的に向けて具体的に性質を変化させる改変毒素遺伝子のデザインを可能とする。

## 【0022】

したがって、一つの実施形態においては、クロストリジウム神経毒の生理学的に活性であって無毒性の誘導体は、メタロプロテアーゼ無効化変異を持つ。特定のメタロプロテアーゼ無効化変異は、参照によりその全体が本明細書に援用されるIchthchenko及びBand U.S. Patent No. 7,785,606に説明されている。無毒性誘導体の特徴をさらに改変するために、追加の点突然変異の導入が可能である。そのいくつかは、参照によりその全体が本明細書に援用されるIchthchenko及びBand U.S. Patent No. 7,785,606にも説明されている。

## 【0023】

クロストリジウム神経毒の、生理学的に活性であって無毒性の誘導体はまた、軽鎖領域

10

20

30

40

50

内に、有毒なクロストリジウム神経毒内の軽鎖メタロプロテアーゼ活性を不活性化可能な、さもなければ誘導体の作用を改変可能な、外来のモチーフ（例えば、SNAREモチーフ）を含んでもよい。アルファヘリックスドメインを置換させてもよい9つの外来のモチーフの配列は、参照によりその全体が本明細書に援用されるIchthchenko及びBand U.S. Patent No. 7,785,606に説明されている。他の細胞受容体を標的とするための配列を統合させた無毒性誘導体も可能である（例えば、EGFまたは癌細胞）（Foster et al. U.S. Patent Application Publication No. 2012/0064059を参照、これは、参照によりその全体が本明細書に援用される）。

## 【0024】

10

一つの実施形態においては、クロストリジウム神経毒の、生理学的に活性であって無毒性の誘導体は、野生型クロストリジウム神経毒のLD<sub>50</sub>よりも少なくとも1,000、2,000、5,000、7,000、9,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000または500,000倍高いLD<sub>50</sub>を持つ。特定の投与モードは、クロストリジウム神経毒の誘導体のLD<sub>50</sub>に影響を及ぼしてもよい。

## 【0025】

20

一つの実施形態においては、本発明のクロストリジウム神経毒の誘導体は、プロペプチドを切断することによって生成される。プロペプチドは、軽鎖及び重鎖を各々約50kD及び100kDの分子量で形成するよう、高度に特異的なプロテアーゼ切断部位で切断される。軽鎖及び重鎖領域は、ジスルフィド結合によって連結される。

## 【0026】

一つの実施形態において、プロペプチドを、本発明のプロペプチドの中間領域での切断を可能にするのに有効な条件の下で、高度に特異的なプロテアーゼ（例えば、エンテロキナーゼまたはTEVプロテアーゼ）と接触させる。発現したプロペプチドは、一つ以上のジスルフィド架橋を持つことが好ましい。

## 【0027】

30

以下に考察するように、本明細書に説明するクロストリジウム神経毒及びそれらの誘導体は、特定のタンパク質分解切断事象によって後に活性化される単鎖プロペプチドとして合成され、ジスルフィド結合によって結合されたダイマーを生じる。これらの構造的特徴は、一例としてBoNT Aを用いて説明可能であり、通常、すべてのクロストリジウムボツリナムセロタイプに適用可能である。成熟BoNT Aは、Mr約50,000の三つの機能ドメインからなる。そこでは、毒性の原因となる触媒機能が、軽鎖（残基1～437）に限定され、移行活性が、重鎖（残基448～872）のN末端側の半分と関係しており、細胞結合がそのC末端側の半分（残基873～1,295）に関連している（Johnson, "Clostridial Toxins as Therapeutic Agents: Benefits of Nature's Most Toxic Proteins," Annu. Rev. Microbiol. 53: 551-575 (1999)、Montecucco et al., "Structure and Function of Tetanus and Botulinum Neurotoxins," Q. Rev. Biophys. 28: 423-472 (1995)、これらは、参照によりその全体が本明細書に援用される）。

40

## 【0028】

天然で生理学的に活性な状態のBoNTセロタイプのための組換え神経毒の最適化された発現及び回収は、以下に考察するように、BoNTプロペプチドをコードしているヌクレオチド配列への、一つ以上の改変の導入によって達成される。これらの変異は、天然の毒素の構造と生物学的活性を保持しながら、クロストリジウム神経毒の組換え誘導体の収率を最大にするようデザインされる。

## 【0029】

50

野生型クロストリジウムボツリナム神経毒プロペプチドの一般的な構造的特徴を、図1

A～1Cに示す。これらの構造的特徴を、一例としてwt BoNT Aプロペプチドを用いて説明するが、すべてのクロストリジウムボツリナムセロタイプ間に共通するものである。wt BoNT Aプロペプチドは、二本の鎖、すなわちMr約50,000の軽鎖("LC")及びMr約100,000の重鎖("HC")を持ち、これらは、Cys<sub>42</sub><sub>9</sub>及びCys<sub>45</sub><sub>3</sub>間で、ジスルフィド結合によって連結されている。図1A～1Cに図示するように、全7つのBoNTセロタイププロペプチドは、ジスルフィド結合によって連結された軽鎖領域及び重鎖領域を持つ。二つの必須Cys残基、すなわち軽鎖のC末端に隣接した一つと重鎖のN末端に隣接したもう一つが、全7つのBoNTセロタイプ内に存在する。これらの二つのCys残基は、成熟神経毒内にHC及びLCポリペプチドと一緒に保持する単一のジスルフィド結合を形成する。このジスルフィド結合は、HC及びLCが協調して各々の生物学的役割を果たすことによって、成熟神経毒が、その天然生理活性を達成できるようにする。全7つのセロタイプのHC及びLCポリペプチド間のジスルフィド結合は、関与するCys残基を結ぶ実線によって、図1Aに図示されている。図1Aの枠線内は、wt BoNT Aのアミノ酸残基Lys<sub>438</sub>～Lys<sub>448</sub>によって定義される中間領域を示す。この中間領域は、wt BoNT Aの成熟中に除去されたアミノ酸を特定しており、宿主微生物に内在するプロテアーゼによって切除されると思われる。以下に説明するこの切断事象は、生物活性BoNT HC-LCダイマーを生じる。図1A～1Cにおいて枠線で示されたアミノ酸残基は、全7つのBoNTセロタイプに関する約420～450の範囲内にあるアミノ酸残基を表すもので、毒素の生理活性に「非必須な」領域と考えられるため、全7つのBoNTセロタイプの定方向突然変異誘発の標的となる。

### 【0030】

本明細書で言及する全7つのwt BoNTセロタイプは、図1Aに枠線で区画した中間領域内にLysまたはArg残基を含む。それらが、プロペプチドの、トリプシンによる活性化を受けやすくする。若い細菌培養から回収した天然のBoNT Aプロペプチドは、トリプシン分解によって活性化でき、無傷の、S-S結合した軽鎖及び重鎖の生成を伴う。他に複数の、トリプシン感受性部位がプロペプチド内には存在するが、それらには、天然毒素分子内における空間位置に起因する、タンパク質分解に対する抵抗性がある(Dekleva et al., "Nicking of Single Chain Clostridium botulinum Type A Neurotoxin by an Endogenous Protease," Biochem. Biophys. Res. Commun. 162: 767-772 (1989)、Lacy et al., "Crystal Structure of Botulinum Neurotoxin Type A and Implications for Toxicity," Nat. Struct. Biol. 5: 898-902 (1998)、これらは、参照によりその全体が本明細書に援用される)。複数のBoNTセロタイプの天然プロペプチド内の第二の部位は、より高い酵素濃度またはインキュベーション時間を与えると、トリプシン切断されやすくなる(Chaddock et al., "Expression and Purification of Catalytically Active, Non-Toxic Endopeptidase Derivatives of Clostridium botulinum Toxin Type A," Protein Expr. Purif. 25: 219-228 (2002)、これは、参照によりその全体が本明細書に援用される)。このトリプシン感受性部位は、毒素受容体結合ドメインに隣接する領域内に位置する。三次元結晶構造に関して情報が利用可能であるBoNTセロタイプにおいて、HCペプチドのこの領域は溶媒にさらされることが発見されている(Lacy et al., "Crystal Structure of Botulinum Neurotoxin Type A and Implications for Toxicity," Nat. Struct. Biol. 5: 898-902 (1998)、Swaminathan et al., "Structural Analysis of the Catalytic and Bi

10

20

30

40

50

nding Sites of Clostridium botulinum Neurotoxin B," Nat. Struct. Biol. 7: 693-699 (2000)、これらは、参照によりその全体が本明細書に援用される)。

【0031】

一つの実施形態において、プロペプチドは、高度に特異的なプロテアーゼ切断部位を持つが、低度に特異的なプロテアーゼ切断部位を全く持たない、軽鎖及び重鎖領域を結合する中間領域を含む。本発明の目的のために、高度に特異的なプロテアーゼ切断部位は、切断を可能にするために高度に特異的なプロテアーゼによって認識される三つ以上の特異的な近接するアミノ酸残基を持つ(例えば、エンテロキナーゼ切断部位またはTEV認識配列)。対照的に、低度に特異的なプロテアーゼ切断部位は、切断可能とするためにプロテアーゼによって認識される二つ以下の近接するアミノ酸残基を持つ(例えば、トリプシン切断部位)。

【0032】

全7つのBONTセロタイプにおける重鎖のN末端に先行するアミノ酸は、トリプシンでのタンパク質分解を受けやすいLysまたはArg残基である。このトリプシン感受性部位は、重鎖のN末端の上流域で、5つのアミノ酸エンテロキナーゼ切断部位(すなわち、DDDDK(配列番号:9))で置き換えることができる。代わりに、トリプシン感受性部位は、タバコエッチ病ウイルスプロテアーゼ認識("TEV")配列で置き換えることもできる。TEV配列の使用は、ワンステップヘテロ二量体形成切断事象を可能にする。

Ichikchenko et al. U.S. Patent Application

Publication No. 2011/0206616を参照。これは、参照によりその全体が本明細書に援用される。これらの改変のいずれも、特定酵素での標準化された活性化を可能にする。セロタイプA及びCにおいては、この領域内の追加のLys残基を、GlnまたはHisのいずれかに変異させてもよい。それによって、追加のトリプシン感受性部位を除く。トリプシン感受性認識配列は、セロタイプA、E及びF内の重鎖の受容体結合ドメインの上流にも現れる。タンパク質分解に対するこの領域の感受性は、X線結晶分析が示すように、毒素の三次元構造において、この領域が溶媒に曝されること一致している。したがって、セロタイプA、E及びFにおいて、感受性残基はAsnに変更される。これらの改変は、エンテロキナーゼまたはTEVのいずれでも標準化された活性化を可能にする。

【0033】

分泌及び回収を可能にし、また、切断された変異体を除くために、シグナルペプチド及びN末端の親和性タグも、必要に応じて導入されることが好ましい。親和性タグは、重鎖及び軽鎖の切断に使用したものと同じ特異的プロテアーゼを用いる切断によって、神経毒のN末端及びC末端から切り離すことができる。

【0034】

一つの実施形態においては、クロストリジウム神経毒の誘導体は、メタロプロテアーゼ無効化変異を持つプロペプチドからのものである。プロペプチドの軽鎖の最小触媒ドメインを構成するアミノ酸残基は、図1Aに網掛けで示されている。メタロプロテアーゼの触媒ドメインの活性部位を構成する特異的アミノ酸残基は、図1Aに星印で示す。

【0035】

種々のクロストリジウム神経毒プロペプチドを、表面アルファヘリックスドメインの代わりに外来のモチーフ(例えば、SNAREモチーフペプチド)を含む軽鎖領域を持つよう作製することも可能である。これらの外来のモチーフを含むプロペプチドは、プロペプチドをコードしている核酸のヌクレオチド配列を変えることによって生成される。

【0036】

一つの実施形態において、プロペプチドの軽鎖及び重鎖は、切断されていない。

【0037】

一つの実施形態において、プロペプチドは、軽鎖領域に結合されたシグナルペプチドをさらに含み、ここでシグナルペプチドは、真核細胞から培地へのプロペプチドの分泌を可

能にするのに適切である。適切なシグナルペプチドは、参照によりその全体が本明細書に援用される *Ichthchenko* 及び *Band U.S. Patent No. 7,785,606* に説明されている。適切なシグナルペプチドは、gp64シグナルペプチドである。

#### 【0038】

プロペプチドはまた、シグナルペプチドと軽鎖領域の間に、及び／またはプロペプチドのC末端に、親和性タグを持っててもよい。適切な親和性タグは、ヘキサヒスチジン親和性タグ

*MPMLSAIVLYVLLAAAAHSFAAMVHHHHHSAS... (SEQ ID NO:10)*

10

である。カーゴ付着ペプチド配列を持つ適切なクロストリジウム神経毒プロペプチドの構造バリエーションは、参照によりその全体を本明細書に援用する *Ichthchenko* 及び *Band U.S. Patent Application Publication No. 2011/0206616* に説明されている。本発明の方法に用いるのに適切なクロストリジウム神経毒の無毒性誘導体をコードするプロペプチドは、N末端でのカーゴ付着ペプチド配列以外の、参照によりその全体を本明細書に援用する *Ichthchenko* 及び *Band U.S. Patent Application Publication No. 2011/0206616* に説明があるプロペプチドの構造的特徴のいずれを含んでもよい。参照によりその全体を本明細書に援用する *Ichthchenko* 及び *Band U.S. Patent Application Publication No. 2011/0206616* で説明されているように、親和性タグの活性化及び除去のために、単一のプロテアーゼ切断ステップを用いることができる。

#### 【0039】

本発明の方法に用いるのに適切なクロストリジウム神経毒の無毒性誘導体をコードする単離された核酸分子は、参照によりその全体を本明細書に援用する *Ichthchenko* 及び *Band U.S. Patent No. 7,785,606* に説明されている。

#### 【0040】

一つの実施形態において、核酸分子は、上述のように、メタロプロテアーゼ無効化変異を持つ。

#### 【0041】

一つの実施形態においては、クロストリジウム神経毒の誘導体は、組換えタンパク質である。異種ベクター内におけるクロストリジウム神経毒の単離された生理学的に活性な無毒誘導体をコードする核酸分子を持つ発現系、及びクロストリジウム神経毒の単離された生理学的に活性な無毒誘導体をコードする異種核酸分子を持つ宿主細胞は、参照によりその全体が本明細書に援用される *Ichthchenko* 及び *Band U.S. Patent No. 7,785,606* に説明されている。

#### 【0042】

クロストリジウム神経毒の組換え型生理活性無毒誘導体の発現は、本明細書で説明するように、プロペプチドをコードする核酸分子を持つ核酸構築物を提供することによって実行される。核酸構築物は、核酸分子に機能的に連結した異種プロモーター及びその核酸分子に機能的に連結した3'制御領域を持つ。それから、核酸構築物は、クロストリジウム神経毒の生理学的に活性な無毒誘導体を発現するのに有効な条件下で、宿主細胞に導入される。

#### 【0043】

一つの実施形態においては、発現した神経毒誘導体を、中間領域での切断に有効な条件下で、高度に特異的なプロテアーゼに接触させる。プロペプチドの中間領域は、発現系または宿主細胞に内在するプロテアーゼによって切断されないことが好ましい。

#### 【0044】

クロストリジウム神経毒の誘導体の発現は、従来の組換技術を用いて、選択発現系内へ、プロペプチドをコードする核酸分子を導入することによって実行可能である。一般に、

20

30

40

50

これは、発現系内へ（通常は存在しない）異種分子である核酸分子を挿入することを伴う。哺乳類の宿主内への特定の外来あるいは天然遺伝子の導入は、最初に、遺伝子配列を適切な核酸ベクター内へ導入することで促進される。本明細書中で用いる「ベクター」は、適切な制御要素と関わらせると複製可能な、かつ細胞間で遺伝子配列を伝達可能な、遺伝因子を意味する。例えば、プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、コスミド、クロモソーム、ウイルス、ウイルス粒子等である。したがって、この用語は、クローニングベクター及び発現ベクターだけでなく、ウイルスベクターも含む。異種核酸分子は、適切なセンス（5' 3'）方向及び正しい読み枠で発現系またはベクター内へ挿入される。ベクターは、挿入されたクロストリジウム神経毒プロペプチドコード配列の転写及び翻訳に必要な要素を含む。

10

## 【0045】

参照によりその全体が本明細書に援用される Cohen 及び Boyer U.S. Patent No. 4,237,224 は、制限酵素切断と DNA リガーゼでのライゲーションを用いての、組換えプラスミドの形態での発現系の生成を説明する。これらの組換えプラスミドは、それから形質転換によって導入され、培養で成長させた原核生物および真核細胞を含む単細胞培養物において複製される。

20

## 【0046】

組換え遺伝子が、ウイルスに導入されてもよい。これらのウイルスは、ワクシニアウイルス、アデノウイルス及びレトロウイルス、及びレンチウイルスを含む。組換えウイルスは、ウイルスに感染した細胞内への、プラスミドの形質移入によって生成できる。

20

## 【0047】

適切なベクターは、次のウイルスベクターを含むが、これらに限定されるものではない。例えば、ラムダベクター系 gt11、gt WES.tB、Charon4、また、プラスミドベクター、例えば、pBR322、pBR325、pACYC177、pACYC184、pUC8、pUC9、pUC18、pUC19、pLG339、pR290、pKC37、pKC101、SV40、pBluescriptII SK± または KS± (Stratagene, La Jolla, CA のカタログ "Stratagene Cloning Systems" (1993) を参照、これは、参照によりその全体が本明細書に援用される)、pQE、pIHF821、pGEX、pFastBac シリーズ (インヴィトロゲン)、pET シリーズ (F.W. Studier et al., "Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes," Gene Expression Technology Vol. 185 (1990) を参照、これは、参照によりその全体が本明細書に援用される)、及び、それらの誘導体。組換え分子は、形質転換、特にトランスクレプション、接合、可動化またはエレクトロポーレーションを介して細胞に導入できる。DNA配列は、参照によりその全体が本明細書に援用される Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Laboratory, Cold Springs Harbor, New York (1989) に説明されているように、本技術分野における標準クローニング手技を用いて、ベクター内へクローニングする。

30

## 【0048】

プロペプチドをコードする配列を細胞内で発現させるために、種々の宿主-ベクター系を利用してもよい。第一に、ベクター系は、使用宿主細胞との互換性がなければならない。宿主-ベクター系は、以下を含むが、これらに限定されるものではない。バクテリオファージ DNA、プラスミド DNA またはコスミド DNA で形質転換させたバクテリア。酵母ベクターを含むイースト等の微生物。ウイルス（例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルス等）を感染させた哺乳類の細胞系。ウイルス（例えば、バキュロウイルス）を感染させた昆虫の細胞系。及び、バクテリアを感染させた植物細胞。これらベクターの発現要素は、それらの強さと特異性において異なる。利用する宿主-ベクター系次第で、多数の適切な転写及び翻訳要素のいずれをも使用可能である。

40

50

## 【0049】

異なる遺伝子シグナル及びプロセシング事象は、多くのレベルの遺伝子発現（例えば、DNA転写及びメッセンジャーRNA（「mRNA」）翻訳）をコントロールする。

## 【0050】

DNAの転写は、RNAポリメラーゼの結合を指示することによってmRNA合成を促進するDNA配列であるプロモーターの存在に依存する。真核生物プロモーターのDNA配列は、原核生物プロモーターのものとは異なる。さらに、真核生物プロモーターと付随する遺伝子シグナルは、原核生物系内では認識されない、あるいは原核生物系内では機能しない可能性がある。そして、さらに、原核生物プロモーターは、真核細胞内では認識されず機能しない。

10

## 【0051】

同様に、原核生物におけるmRNAの翻訳は、真核生物のそれとは異なる適切な原核生物シグナルの存在に依存する。原核生物内でのmRNAの効率的な翻訳には、そのmRNA上に、シャインダルガーノ（「SD」）配列と呼ばれるリボソーム結合部位が必要である。この配列は、タンパク質のアミノ末端メチオニンをコードする通常AUGである開始コドンの前に位置する、mRNAの短いヌクレオチド配列である。SD配列は、16SのrRNA（リボソームRNA）の3'-末端と相補的であり、おそらく、リボソームの正しい位置決めを可能にするよう、rRNAとの二本鎖形成によってmRNAのリボソームへの結合を促進する。遺伝子発現を最大にすることに関する概説は、参考によりその全体が本明細書に援用されるRoberts and Lauer, Methods in Enzymology 68: 473 (1979)を参照されたい。

20

## 【0052】

プロモーターは、それらの「強さ」（すなわち、転写を促進する能力）が異なる。クローニングした遺伝子を発現させるために、遺伝子の高レベルの転写、ゆえに発現を達成するためには、強いプロモーターを用いることが望ましい。利用宿主細胞系に応じて、多数の適切なプロモーターのいずれを用いてもよい。例えば、大腸菌、そのバクテリオファージまたはプラスミドにおいてクローニングする場合は、例えば、PHプロモーター、T7ファージプロモーター、lacプロモーター、trpプロモーター、recAプロモーター、リボソームRNAプロモーター、コリファージラムダ及び、lacUV5、ompF、bla、lpp等（これらに限定されない）を含む他のP<sub>R</sub>及びP<sub>L</sub>プロモーターなどのプロモーターを、近接DNAセグメントの高レベルの転写を促すために用いてもよい。加えて、組換えDNAまたは他の合成DNA技術によって生成したハイブリッドtrp-lacUV5(tac)プロモーターあるいは他の大腸菌プロモーターを、挿入遺伝子の転写を提供するために用いてもよい。

30

## 【0053】

特に誘導されない限りプロモーターの作用が抑制される細菌性宿主細胞株及び発現ベクターを選択してもよい。特定のオペロンでは、挿入DNAの効率的な転写のために、特異的インデューサーの付加が必要である。例えば、ラックオペロンは、乳糖またはIPTG（イソプロビルチオ-ベータ-D-ガラクトシド）の付加によって誘導される。種々の他のオペロン、例えばtrp、pro等は、異なるコントロールの下にある。

40

## 【0054】

原核細胞内における効率的な遺伝子転写及び翻訳のためには、特異的開始シグナルも必要である。これらの転写及び翻訳開始信号は、遺伝子特異的なメッセンジャーRNAと合成されるタンパク質との各々の量によって測定される「強さ」が異なってもよい。プロモーターを含むDNA発現ベクターは、種々の「強さ」の、転写及び/または翻訳開始シグナルのどの組合せを含んでもよい。例えば、大腸菌の効率的な翻訳には、リボソーム結合部位を提供するために、開始コドン(ATG)に対して約7~9塩基5'側にシャインダルガーノ（「SD」）配列が必要である。したがって、宿主細胞リボソームによって利用可能な、どんなSD-ATGの組合せを使用してもよい。そのような組合せは、cro遺伝子またはコリファージラムダのN遺伝子からの、あるいは大腸菌トリプトファンE、D

50

、C、BまたはA遺伝子からのSD-ATGの組合せを含むが、それに限定されるものではない。加えて、組換えDNAによって生成した、または合成ヌクレオチドの組み込みを伴う他の技術によって生成したSD-ATGのどのような組合せを用いてもよい。

【0055】

利用ベクター系及び宿主に応じて、構成、誘導、抑制プロモーターを含む適切な転写及び/または翻訳要素を幾つ用いてもよい。また、最小の5'プロモーター要素を用いてもよい。

【0056】

本技術分野において既知である標準クローニング手技を用いて、核酸構築物を準備するために、核酸、選択プロモーター分子、適切な3'制御領域、及び必要に応じて、レポーター遺伝子が、選択ベクター発現系内へ組み込まれる。標準クローニング手技は、例えば、参考によりその全体が本明細書に援用されるSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)に説明されている。

10

【0057】

読み取り枠が、選択プロモーターの制御下でのコードされたプロペプチドの発現のために適切な向きに置かれるように、クロストリジウム神経毒の誘導体をコードする核酸分子は、センス方向(すなわち、5' 3')でベクターに挿入される。核酸構築物を準備するために、適切なプロモーターの制御下で、このようにして、単一のあるいは複数の核酸が、適切なベクター内へ連結されてもよい。

20

【0058】

プロペプチドをコードする単離された核酸分子が発現ベクター内に挿入されたならば、宿主細胞内へ取り込む準備が整う。組換え分子は、形質転換を介して、特にトランスダクション、接合、リポフェクション、プロトプラスト融合、可動化、微粒子銃またはエレクトロポーレーションを介して細胞内へ導入できる。DNA配列は、本技術分野において既知である標準クローニング手技を用いて、宿主細胞内へ取り込まれる。標準クローニング手技は、例えば、参考によりその全体が本明細書に援用されるSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Springs Laboratory, Cold Springs Harbor, New York (1989)に説明されている。適切な宿主は、バクテリア、ウイルス、酵母、真菌、哺乳類の細胞、昆虫細胞、植物細胞などを含むが、これらに限定されるものではない。本発明の好適宿主細胞は、大腸菌(*Escherichia coli*)、昆虫細胞及びピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)細胞を含むが、これらに限定されるものではない。

30

【0059】

典型的に、形質転換細胞のみの選択的増殖に有用な抗生物質または他の化合物を、培地への補助剤として加える。使用すべき化合物は、宿主細胞が形質転換されたプラスミド内に存在する選択可能なマーカー要素によって決定される。適切な遺伝子は、ゲンタマイシン、G418、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール等への抵抗力を授けるものである。同様に、特定可能な化合物の生成のために提供される酵素をコードする「レポーター遺伝子」、または遺伝子送達の結果に関して関連情報を示す他のマーカーも適切である。例えば、異種遺伝子の存在が視覚的に確かめられるよう、種々の発光性または蛍光性レポーター遺伝子も適切である。

40

【0060】

本発明の方法を実行する際には、クロストリジウム神経毒の、単離された生理学的に活性な無毒誘導体を対象に接触させることを実行できる。例えば、吸入によって、あるいは皮下注入、静注、筋注、腹膜内注入などの非経口的に、鼻腔内滴下によって、または例え

50

ば、鼻、喉及び気管支の粘膜への適用によって、クロストリジウム神経毒の単離された誘導体を対象に投与する。神経毒誘導体は、単独で、あるいは適切な薬学的担体と共に投与されてもよい。また、例えば、錠剤、カプセル、粉末、溶液、懸濁液またはエマルジョン等の、固体または液体状態であってもよい。

#### 【0061】

神経毒誘導体は、例えば、不活性希釈剤と一緒に、または吸収可能な食用担体と一緒に、経口投与してもよい。または、堅いあるいは柔らかいシェルカプセルに封じ込めてよい。あるいは、与圧して錠剤にしてもよい。または、食事の食物に直接入れてもよい。治療的経口投与のために、神経毒誘導体は、賦形剤と統合されてもよく、錠剤、カプセル、エリキシル剤、懸濁液、シロップ等の形態で用いてもよい。一つの実施形態において、調合物は、胃腸管内で神経毒を保護するために、クロストリジウム属が生成するものに類似のヘマグルチニンタンパク質を含む。そのような組成物及び製剤は、少なくとも0.1%の活性化合物を含むべきである。それら組成物の化合物パーセンテージは、もちろん、変化に富んでもよく、単位重量につき簡便には約2%から約60%でもよい。そのような治療的に有用な組成物の活性化合物の量は、適切な投薬量が得られるものである。

10

#### 【0062】

錠剤、カプセル等は、例えばトラガカントガム、アカシア、トウモロコシ澱粉またはゼラチン等の結合剤、リン酸二カルシウム等の賦形剤、例えばトウモロコシ澱粉、ジャガイモ澱粉、アルギン酸などの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤、及び例えばショ糖、乳糖またはサッカリン等の甘味料を含んでもよい。単位投与形態がカプセルである場合は、上記タイプの物質に加えて、例えば脂肪油などの液体担体を含んでもよい。

20

#### 【0063】

他の様々な物質をコーティングとして、または投与単位の物理的形狀を改変するために存在させてもよい。例えば、錠剤は、シェラック、砂糖、またはこれらの両方で被覆してもよい。シロップは、活性成分に加えて、甘味料としてショ糖、防腐剤としてメチル及びプロピルパラベン、色素、及び例えばサクランボまたはオレンジ味などの香料を含んでもよい。

#### 【0064】

神経毒誘導体は、非経口的に投与されてもよい。例えばヒドロキシプロピルセルロース等の界面活性剤を水に適切に混ぜ合わせて、溶液または懸濁液を調製できる。また、グリセリン、液体ポリエチレングリコール及び油中のそれらの混合物においてディスパージョンも調製できる。油の例としては、石油、動物、植物または合成起源のものがあり、例えば、ピーナッツ油、大豆油または鉱物油もある。概して、水、食塩水、水性デキストロース及び関連糖溶液、例えばプロピレングリコールまたはポリエチレングリコール等のグリコールは、特に注射可能な溶液のための好適な液体担体である。通常の貯蔵及び使用条件下では、これらの製剤は、微生物の成長を阻止する防腐剤を含む。

30

#### 【0065】

注射使用に適切な薬学的形態は、無菌の注射可能な溶液またはディスパージョンの即座の製剤のための、滅菌水性溶液またはディスパージョン及び無菌粉末を含む。すべてのケースにおいて、その形態は、無菌でなければならない。また、注射可能である程度までの流体でなければならない。それは、製造及び貯蔵条件下で安定でなければならない。また、例えばバクテリア及び真菌などの微生物の汚染作用に対して保存が可能である。担体は、例えば、水、エチルアルコール、ポリオール（例えば、グリセリン、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコール）、植物油、ヒアルロン酸及びそれらの適切な混合物を含む溶媒または分散媒であってもよい。

40

#### 【0066】

神経毒誘導体はまた、エアロゾルの形態で、気道に直接投与してもよい。エアロゾルとしての用途のために、溶液または懸濁液の神経毒誘導体は、従来の補助剤と共に、適切な噴霧剤、例えば、プロパン、ブタンまたはイソブタン等の炭化水素噴霧剤と一緒に、加圧エアロゾル容器内に収納されてもよい。神経毒誘導体は、また、例えば、ネブライザーま

50

たはアトマイザーを用いて非加圧形態でも投与できる。

【0067】

BoNTは、破壊されることなく、あるいは局所毒性を生じることなく上皮表面を通過する。この上皮通過は、特異的結合及び経細胞輸送によって生ずると考えられる。無傷のBoNT-Aが肺上皮を通過しタンパク分解性不活化に抵抗する能力は、ラット初代肺胞上皮細胞で、また、不死化ヒト肺腺癌(Calu-3)細胞で実証された。輸送の速度は、基底側から頂端への方向よりも頂端から基底側への方向で大きく、また、セロタイプ特異性毒素抗体によって妨げられた(Park et al., "Inhalational Poisoning by Botulinum Toxin and Inhalation Vaccination with Its Heavy-Chain Component," Infect. Immun. 71: 1147-1154 (2003)、これは、参考によりその全体が本明細書に援用される)。

10

【0068】

CNSを対象とする場合は、髄腔内または心室内投与が必要な場合がある。投与は、直接CNSに実行してもよい。代わりに、CNSへの投与は、周縁神経細胞(運動神経、侵害受容体)から脊髄神経節への逆行性輸送が関与してもよい(Caleo et al., "A Reappraisal of the Central Effects of Botulinum Neurotoxin Type A: By What Mechanism?" Journal of Neurochemistry 109: 15-24 (2009)、これは、参考によりその全体が本明細書に援用される)。

20

【0069】

本発明のクロストリジウム神経毒の誘導体は、野生型クロストリジウム神経毒(例えば、BOTOX(登録商標))の内在性薬学的活性を増大させるために、例えば併用療法として使用できる。

【0070】

クロストリジウム神経毒の誘導体は、薬学的に許容可能な水溶性ポリマー部分とのコンジュゲートとして投与できる。実施例として、ポリエチレンギコールコンジュゲートは、治療化合物の循環中の半減期を増加させ、その分子の免疫原性を減少させるのに有用である。特異的PEGコンジュゲートは、参考によりその全体が本明細書に援用されるDaugs et al., U.S. Patent Application Publ. No. 2006/0074200に説明されている。他のコンジュゲートは、各々のその全体が参考により本明細書に援用されるTaylor U.S. Patent No. 7,879,341及びBlanda et al., U.S. Patent Application Publication No. 2012/0141532に説明されているHAを含む。液体形態は、リポソームカプセル剤を含み、注射可能な溶液及び懸濁液として説明される。代表的な固体形態は、カプセル、錠剤及び制御放出剤形、例えばミニ浸透圧ポンプまたはインプラント等を含む。他の剤形は、例えば、各々のその全体が参考により本明細書に援用されるAnsel and Popovich, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 5<sup>th</sup> Edition(Lea&Febiger 1990)、Genaro(ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19<sup>th</sup> Edition(Mack Publishing Company 1995)及びRanade and Hollinger, Drug Delivery Systems(CRC Press 1996)に示されているように、当業者が考案できる。

30

【0071】

一つの実施形態によれば、治療は、皮膚科的または美容的な処置(例えば、参考によりその全体が本明細書に援用されるCarruthers et al., "Botulinum Toxin A in the Mid and Lower Face and Neck," Dermatol. Clin. 22: 151-158 (2004)、

40

50

Lang, "History and Uses of BOTOX (Botulinum Toxin Type A)," Lippincott's Case Manager. 9: 109-112 (2004)、Naumann et al., "Safety of Botulinum Toxin Type A: A Systematic Review and Meta-Analysis," Curr. Med. Res. Opin. 20: 981-990 (2004)、Vartanian et al., "Facial Rejuvenation Using Botulinum Toxin A: Review and Updates," Facial Plast. Surg. 20: 11-19 (2004)を参照)ならびに治療的な処置(例えば、Bentsianov et al., "Noncosmetic Uses of Botulinum Toxin," Clin. Dermatol. 22: 82-88 (2004)、Carruthers et al., "Botox: Beyond Wrinkles," Clin. Dermatol. 22: 89-93 (2004)、Jankovic, "Botulinum Toxin In Clinical Practice," J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 75: 951-957 (2004)、Klein, "The Therapeutic Potential of Botulinum Toxin," Dermatol. Surg. 30: 452-455 (2004)、Schurch, "The Role of Botulinum Toxin in Neurology," Drugs Today (Barc.) 40: 205-212 (2004)を参照)を意味する。  
10

## 【0072】

本発明の方法に従う治療の対象は、ヒト及びヒト以外の霊長類、または他の動物、例えばイヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ウサギまたは齧歯動物(例えば、マウスまたはラット)を含むが、これらに限定されるものではない。

## 【0073】

本発明の好適な治療方法は、皮膚科的あるいは美容的な治療、胃腸科的治療、生殖器泌尿器科的治療、神経学的治療、腫瘍学的治療及び/またはシナプス病理学によって診断可能な症状の治療を含むが、これらに限定されない(例えば、参照によりその全体が本明細書に援用されるBrose et al., "Synaptopathies: Dysfunction of Synaptic Function," Biochem. Soc. Trans. 38: 443-444 (2010)、Yu&Lu, "Synapses and Dendritic Spines as Pathogenic Targets in Alzheimer's Disease," Neural Plasticity 2012: 1-8 (2012)、Siskova et al., "Reactive Hypertrophy of Synaptic Varicosities Within the Hippocampus of Prion-Infected Mice," Biochem Soc. Trans. 38: 471-475 (2010)、Warner et al., "Torsin A and DYT1 Dystonia: A Synaptopathy?" Biochem. Soc. Trans. 38: 452-456 (2010)、Rozas et al., "Presynaptic Dysfunction in Huntington's Disease," Biochem Soc. Trans. 38: 488-492 (2010)、及びJones, "Errant Ensembles: Dysfunctional Neuronal Network Dynamics in Schizophrenia," Biochem Soc. Trans. 38: 516-521 (2010)を参照)。シナプス病理学によって診断可能な症状の治療は、神経毒誘導体によるシナプスの神経調節を伴ってもよい。  
30  
40

## 【0074】

皮膚科的あるいは美容的な治療は、ライタイド(Rhytide、しわ)の治療(参照によりその全体が本明細書に援用されるSadick et al., "Compari

son of Botulinum Toxins A and B in the Treatment of Facial Rhytides," Dermatol. Clin. 22: 221-226 (2004))を含むが、これに限定されない。しわの治療は眉間(参照によりその全体が本明細書に援用されるCarruthers et al., "Botulinum Toxin type A for the Treatment of Glabellar Rhytides," Dermatol. Clin. 22: 137-144 (2004)、Ozsoy et al., "Two-Plane Injection of Botulinum Exotoxin A in Glabellar Frown Lines," Aesthetic Plast. Surg. 28: 114-115 (2004))、首筋(参照によりその全体が本明細書に援用されるBrandt et al., "Botulinum Toxin for the Treatment of Neck Lines and Neck Bands," Dermatol. Clin. 22: 159-166 (2004))、目じりの小じわ(参照によりその全体が本明細書に援用されるLevy et al., "Botulinum Toxin A: A 9-Month Clinical and 3D In Vivo Profilometric Crow's Feet Wrinkle Formation Study," J. Cosmet. Laser Ther. 6: 16-20 (2004))、及び額輪郭(参照によりその全体が本明細書に援用されるChen et al., "Altering Brow Contour with Botulinum Toxin," Facial Plast. Surg. Clin. North Am. 11: 457-464 (2003))を含む。他の皮膚科的治療は、肥大性咀嚼筋(参照によりその全体が本明細書に援用されるAhn et al., "Botulinum Toxin for Masseter Reduction in Asian Patients," Arch. Facial Plast. Surg. 6: 188-191 (2004))、局所多汗症(参照によりその全体が本明細書に援用されるGlogau, "Treatment of Hyperhidrosis with Botulinum Toxin," Dermatol. Clin. 22: 177-185, vii (2004))に対する治療を含む。局所多汗症は、腋の下(参照によりその全体が本明細書に援用される"Botulinum Toxin (Botox) for Axillary Hyperhidrosis," Med. Lett. Drugs Ther. 46: 76 (2004))及び生殖器(参照によりその全体が本明細書に援用されるLee et al., "A Case of Foul Genital Odor Treated with Botulinum Toxin A," Dermatol. Surg. 30: 1233-1235 (2004))を含む。

#### 【0075】

胃腸科的治療は、食道運動障害(参照によりその全体が本明細書に援用されるAchem, "Treatment of Spastic Esophageal Motility Disorders," Gastroenterol. Clin. North Am. 33: 107-124 (2004))、咽頭食道痙攣(参照によりその全体が本明細書に援用されるBayles et al., "Operative Prevention and Management of Voice-Limiting Pharyngoesophageal Spasm," Otolaryngol. Clin. North Am. 37: 547-558 (2004)、Chao et al., "Management of Pharyngoesophageal Spasm with Botox," Otolaryngol. Clin. North Am. 37: 559-566 (2004))、及び裂肛(参照によりその全体が本明細書に援用されるBrisinda et al., "Botulinum Neurotoxin to Treat Chronic Anal Fissure: Results of a Randomized 'Botox vs. Dysport' Control 10 20 30 40 50

ed Trial," Ailment Pharmacol. Ther. 19: 695-701 (2004)、Jost et al., "Botulinum Toxin A in Anal Fissure: Why Does it Work?" Dis. Colon Rectum 47: 257-258 (2004) )の治療を含むが、これらに限定されない。

#### 【0076】

生殖器泌尿器科的治療は、尿路の神経性機能障害（参照によりその全体が本明細書に援用される"Botulinic Toxin in Patients with Neurogenic Dysfunction of the Lower Urinary Tracts," Urologia Jul-Aug: 44-48 (2004)、Giannantoni et al., "Intravesical Resiniferatoxin Versus Botulinum-A Toxin Injections for Neurogenic Detrusor Overactivity: A Prospective Randomized Study," J. Urol. 172: 240-243 (2004)、Reitz et al., "Intravesical Therapy Options for Neurogenic Detrusor Overactivity," Spinal Cord 42: 267-272 (2004) )、過活動膀胱（参照によりその全体が本明細書に援用されるCruz, "Mechanisms Involved in New Therapies for Overactive Bladder," Urology 63: 65-73 (2004)）、及び切迫性尿失禁の神経調節（参照によりその全体が本明細書に援用されるAbrams, "The Role of Neuromodulation in the Management of Urinary Urge Incontinence," BJU Int. 93: 1116 (2004) ）のための治療を含むが、これらに限定されない。

#### 【0077】

神経学的治療は、トゥーレット症候群（参照によりその全体が本明細書に援用されるPorta et al., "Treatment of Phonic Tics in Patients with Tourette's Syndrome Using Botulinum Toxin Type A," Neurol. Sci. 24: 420-423 (2004) ）及び局所の筋肉痙攣またはジストニア（参照によりその全体が本明細書に援用されるMacKinnon et al., "Corticospinal Excitability Accompanying Ballistic Wrist Movements in Primary Dystonia," Mov. Disord. 19: 273-284 (2004) ）の治療を含むが、これらに限定されない。筋肉痙攣またはジストニアの治療は、痙性斜頸（参照によりその全体が本明細書に援用されるHaussermann et al., "Long-Term Follow-Up of Cervical Dystonia Patients Treated with Botulinum Toxin A," Mov. Disord. 19: 303-308 (2004) ）、原発性眼瞼痙攣（参照によりその全体が本明細書に援用されるDefazio et al., "Primary Blepharospasm: Diagnosis and Management," Drugs 64: 237-244 (2004) ）、片側顔面痙攣、脳卒中後（参照によりその全体が本明細書に援用されるBakheit, "Optimising the Methods of Evaluation of the Effectiveness of Botulinum Toxin Treatment of Post-Stroke Muscle Spasticity," J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 75: 665-666 (2004) ）、痙攣性発声障害（参照によりその全体が本明細書に援用されるBender et al., "Speech Intelligibility in Severe Adductor Spasmodi

c Dysphonia," J. Speech Lang. Hear. Res. 47: 21-32 (2004))、顔面神経障害(参照によりその全体が本明細書に援用される Finn, "Botulinum Toxin Type A: Fine-Tuning Treatment of Facial Nerve Injury," J. Drugs Dermatol. 3: 133-137 (2004))、及びラスムッセン症候群(参照によりその全体が本明細書に援用される Lozsadi et al., "Botulinum Toxin A Improves Involuntary Limb Movements in Rasmussen Syndrome," Neurology 62: 1233-1234 (2004))の治療を含むが、これらに限定されない。他の神経学的治療は、切断痛(参照によりその全体が本明細書に援用される Kern et al., "Effects of Botulinum Toxin Type B on Stump Pain and Involuntary Movements of the Stump," Am. J. Phys. Med. Rehabil. 83: 396-399 (2004))、声の震え(参照によりその全体が本明細書に援用される Adler et al., "Botulinum Toxin Type A for Treating Voice Tremor," Arch. Neurol. 61: 1416-1420 (2004))、ワニの涙症候群(参照によりその全体が本明細書に援用される Kyrmizakis et al., "The Use of Botulinum Toxin Type A in the Treatment of Frey and Crocodile Tears Syndrome," J. Oral Maxillofac. Surg. 62: 840-844 (2004))、辺縁性下顎神経麻痺、疼痛管理及び抗痛覚効果(参照によりその全体が本明細書に援用される Cui et al., "Subcutaneous Administration of Botulinum Toxin A Reduces Formalin-Induced Pain," Pain 107: 125-133 (2004) 及び Foster et al., U.S. Patent Application Publication No. 2012/0064059)の治療を含む。疼痛管理は、乳房切除術後の疼痛(参照によりその全体が本明細書に援用される Layeeque et al., "Botulinum Toxin Infiltration for Pain Control After Mastectomy and Expander Reconstruction," Ann. Surg. 240: 608-613 (2004))及び食道由来の胸痛(参照によりその全体が本明細書に援用される Schumulson et al., "Current and Future Treatment of Chest Pain of Presumed Esophageal Origin," Gastroenterol. Clin. North Am. 33: 93-105 (2004))の管理を含むが、これらに限らない。本発明の方法が有効な別の神経学的治療には、頭痛がある(参照によりその全体が本明細書に援用される Blumenfeld et al., "Botulinum Neurotoxin for the Treatment of Migraine and Other Primary Headache Disorders," Dermatol. Clin. 22: 167-175 (2004))。

#### 【0078】

本発明の方法は、脳性麻痺(参照によりその全体が本明細書に援用される Balkrishnan et al., "Longitudinal Examination of Health Outcomes Associated with Botulinum Toxin Use in Children with Cerebral Palsy," J. Surg. Orthop. Adv. 13: 76-80 (2004)、Berweck et al., "Use of Botulinum Toxin in Pediatric Spasticity (Cerebral Palsy)," Mov. Disord. 19: S162-S167 (2004)、Pidcock,"

The Emerging Role of Therapeutic Botulinum Toxin in the Treatment of Cerebral Palsy," *J. Pediatr.* 145: S33 - S35 (2004) )、多発性硬化症における臀部内転筋機能障害(参照によりその全体が本明細書に援用されるWiessel et al., "Botulinum Toxin Treatment of Hip Adductor Spasticity in Multiple Sclerosis," *Wien Klin Wochenschr* 4: 20 - 24 (2001) )、関節炎、医原性耳下腺唾液腺粘液腫を含む神経痛及び炎症(参照によりその全体が本明細書に援用されるCapaccio et al., "Diagnosis and Therapeutic Management of Iatrogenic Parotid Sialocele," *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 113: 562 - 564 (2004) )、ならびに慢性TMJの疼痛及び転位(参照によりその全体が本明細書に援用されるAquillina et al., "Reduction of a Chronic Bilateral Temporomandibular Joint Dislocation with Intermaxillary Fixation and Botulinum Toxin A," *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 42: 272 - 273 (2004) )の治療にも適切である。薬学的に活性な神経毒誘導体の局所制御送達によって治療できる他の症状は、関節炎の治療のための関節内投与(参照によりその全体が本明細書に援用されるMahowald et al., "Long Term Effects of Intra-Articular BONT A for Refractory Joint Pain," *Annual Meeting of the American College of Rheumatology* (2004) )、及び関節拘縮の治療のための局所投与(参照によりその全体が本明細書に援用されるRussman et al., "Cerebral Palsy: A Rational Approach to a Treatment Protocol, and the Role of Botulinum Toxin in Treatment," *Muscle Nerve Suppl.* 6: S181 - S193 (1997) )、Pucinelli et al., "Botulinic Toxin for the Rehabilitation of Osteoarthritis Fixed-Flexion Knee Deformity," *Annual Meeting of the Osteoarthritis Research Society International* (2004) )を含む。本発明の方法は、また、参照によりその全体が本明細書に援用される以下の文献に説明されるように、侵害受容体及び関連臨床症候群の増感によって特徴づけられる種々の状態に関わる痛みの治療に適切である。Bach-Rojecky et al., "Antinociceptive Effect of Botulinum Toxin Type A In Rat Model of Carrageenan and Capsaicin Induced Pain," *Croat. Med. J.* 46: 201 - 208 (2005) )、Aoki, "Evidence for Antinociceptive Activity of Botulinum Toxin Type A in Pain Management," *Headache* 43 Suppl 1: S9 - 15 (2003) )、Kramer et al., "Botulinum Toxin A Reduces Neurogenic Flare But Has Almost No Effect on Pain and Hyperalgesia in Human Skin," *J. Neurol.* 250: 188 - 193 (2003) )、Biersch et al., "Botulinum Toxin A and the Cutaneous Nociception in Humans: A Prospective, Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Study," *J. Neurorol. Sci.* 205: 59 - 63 (2002) )。

## 【0079】

神経毒誘導体は、治療性能を最適化するためにカスタマイズされてもよい（参照によりその全体が本明細書に援用される、例えば、Chaddock et al., "Retargeted Clostridial Endopeptidases: Inhibition of Nociceptive Neurotransmitter Release In Vitro, and Antinociceptive Activity in In Vivo Models of Pain," Mov. Disord. 8: S42 - S47 (2004)、Finn, "Botulinum Toxin Type A: Fine-Tuning Treatment of Facial Nerve Injury," J. Drugs Dermatol. 3: 133 - 137 (2004)、Eleopra et al., "Different Types of Botulinum Toxin in Humans," Mov. Disord. 8: S53 - S59 (2004)、Flynn, "Myobloc," Dermatol. Clin. 22: 207 - 211 (2004)、及びSampaio et al., "Clinical Comparability of Marketed Formulations of Botulinum Toxin," Mov. Disord. 8: S129 - S136 (2004)を参照）。

## 【0080】

クロストリジウム神経毒の誘導体は、シナプス構造内の活性依存変化によって影響を受ける病気（例えば、シナプス病）またはシナプス形成器官の活動過多（例えば、チューブリン重合）、及び微小管の増殖に関連する症状を治療するのに、本発明の治療方法に従って用いてもよい。例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病及び（神経及び神経膠由来の）神経細胞癌。本発明の方法によって治療可能な他の症状は、シナプス複合体が病気の標的である症状を含む。

## 【0081】

一つの実施形態においては、本発明の神経毒誘導体は、神経細胞の細胞質ゾル内に、野生型クロストリジウム神経毒に比べ、より多量に貯まる。

## 【実施例】

## 【0082】

## 実施例1 BONT A / ad - 0 に関するインビポでの薬学的活性実験

## 物質及び方法

（参照によりその全体を本明細書に援用する）Ichtchenko及びBand U. S. Patent No. 7,785,606に説明のクロストリジウムボツリナムセロタイプA（「BONT A / ad」）の無毒性誘導体を、説明に従い、発現させた。この神経毒誘導体は無毒であり、そのN末端にカーゴ付着ペプチド配列を有しないため、「BONT A / ad - 0」と呼ぶことにした。この場合、本明細書で説明するように、「ad - 0」は、カーゴ部位なし（0）の無毒性誘導体を意味する。BONT A / ad - 0は、参照によりその全体を本明細書に援用するBand et al., "Recombinant Derivatives of Botulinum Neurotoxin A Engineered for Trafficking Studies and Neuronal Delivery," Protein Expression & Purification 71: 62 (2010)に説明されているように、電気泳動で均一になるよう精製し、特異的プロテアーゼ切断によって活性化させた。精製タンパク質は、安定化のための40%グリセリンを含むPBS内に10mg/mlの濃度のストックとして調製した。下記に説明の試験は、組換え分子の毒性と薬理学的活性を評価するものである。

## 【0083】

## 動物

マウス：雌のBalb / Cマウス、5~7週齢、体重約19±3グラム。

## 【0084】

10

20

30

40

50

## 指外転評価 (DAS) アッセイ

筋肉虚弱効果によって測定される、筋肉における局所薬理学的活性を測定するために、古典的なマウス指外転評価(「DAS」)アッセイの改変を、参照によりその全体が本明細書に援用されるAoki, "Preclinical Update on BOTOX (登録商標) (Botulinum Toxin Type A) - Purified Neurotoxin Complex Relative to Other Botulinum Neurotoxin Preparations," European Journal of Neurology (1999)に説明されているように用いた。DASアッセイにおいては、特徴的驚愕反応を引き出すために短時間、マウスは尾でつるされる。その反応では、マウスは後足を伸ばして後指を外転させる。DASアッセイは、異なるBoNT製剤の筋肉虚弱効果を比較するために、特に有用である(参照によりその全体が本明細書に援用されるAoki, "Preclinical Update on BOTOX (登録商標) (Botulinum Toxin Type A) - Purified Neurotoxin Complex Relative to Other Botulinum Neurotoxin Preparations," European Journal of Neurology (1999)及びAoki, "A Comparison of the Safety Margins of Botulinum Neurotoxin Serotypes A, B, and F In Mice," Toxicon 39:1815-1820 (2001))。

10

20

30

## 【0085】

このテストは、マウスにおけるBoNT A/ad-0の薬理活性を定義するために利用した。マウスは、注入された脚のすべての指を完全に伸ばすことができない場合、陽性のDAS反応を持つとスコア付けされた。注入されていない脚と同じ程度に注入された脚の足指を広げるマウスには、陰性スコアが付与された。

## 【0086】

雌のBalb/Cマウスには、25 μlハミルトンシリンジを使って、3 μl量の0.9%NaClを、説明された濃度で、片側の腓腹筋に筋肉内注射を行った。注入後1日目から5日目まで、特徴的驚愕反応を引き出すためにマウスをつるし、そして注入された脚の足指が注入されていない脚に比べ広がっているかどうかを観察することによって、筋力低下を評価した。

## 【0087】

## 麻痺の測定

明確な麻痺を、二つの独立変数を使って表す。第一は、歩くのに注入された脚を使うことができない(麻痺)。第二は、注入された脚の足指を広げること(指の外転)ができない。

## 【0088】

結果: 毒性、LD<sub>50</sub>

上記説明のBoNT A/ad-0製剤は、次の毒性試験のために使用した。試験は、野生型BoNT A(「wt BoNT A」)のための標準的なマウスLD<sub>50</sub>テストに近似するようデザインされた。

40

## 【0089】

この試験には、合計30匹の雌のマウスを使用した。各マウスの腹膜内に、200 μlのPBS中のBoNT A/ad-0を、示した用量(表1)で注射し、24時間観察した。

## 【0090】

参照によりその全体が本明細書に援用されるPellett et al., "Neuronal Targeting, Internalization, and Biological Activity of a Recombinant Atoxic Derivative of Botulinum Neurotoxin A," B

50

iochemical & Biophysical Research Communications 405(4):673-677(2011)に公表されたLD<sub>50</sub>に基づき、0.5 µg/マウス～2 µg/マウスの範囲の用量で、BoNT A/ad(1.2 µg/マウス、すなわち50 µg/kg体重)を使用した。BoNT A/ad-0に関するLD<sub>50</sub>は、BoNT A/adに関するものと非常に類似していることが分かった(表1)。簡潔に述べれば、50 µg/kg体重の用量が注入された10匹のマウスの50%、すなわち5匹は、36時間までにボツリヌス菌中毒症状を示した。約83.3 µg/kg体重である2 µgの用量が注入されたすべてのマウスは、48時間以内に息絶えた。この試験からの結論は、50 µg/kg体重が、BoNT A/ad-0のおよそのLD<sub>50</sub>である。

10

## 【0091】

(表1) BoNT A/ad-0に関する毒性(LD<sub>50</sub>)試験の結果

注入量	マウスの数	死亡	生存
2 µg	10	10	0
1.2 µg	10	5	5
1 µg	5	1	4
0.5 µg	5	0	5

## 【0092】

wt BoNT AのLD<sub>50</sub>は、約0.5 ng/kgである(参照によりその全体が本明細書に援用されるAoki, "A Comparison of the Safety Margins of Botulinum Neurotoxin Serotypes A, B, and F In Mice," Toxicon 39:1815-1820(2001))、すなわちBoNT A/ad-0のそれよりも100,000倍の低さである。この毒性、非常に低い用量でのwt BoNT Aの効果、及び野生型細菌源から生成したBoNTの効力の不均一性のために、wt BoNT Aの薬理学的用量は、一般に、用語「活性単位」で明記され、wt BoNT Aのマウスでの1 LD<sub>50</sub>が、1活性単位、すなわち約0.5 ng/kgのwt BoNT Aであると見なされている(参照によりその全体が本明細書に援用されるAoki, "A Comparison of the Safety Margins of Botulinum Neurotoxin Serotypes A, B, and F In Mice,"

20

Toxicon 39:1815-1820(2001))。これは、製剤及びメーカー間での活性毒素レベルにおける濃度変動を考慮している。生産者間で同意した標準規格は、未決定のままである。これは、製造法の違い及びバッチ間変動の両方に原因があるが、マーケティング上の主張にも関連する。最終的な薬学的調整物は、アルブミン(BOTOX(登録商標))及び/または乳糖(Dysport(登録商標))で調製される。本明細書で説明するLD<sub>50</sub>結果からの結論は、BoNT A/ad-0の1 LD<sub>50</sub>単位(1U)は、約50 µg/kg、すなわちマウス1匹あたり約1.2 µgの用量に一致する。

30

## 【0093】

結果：インビボ薬理学的活性に関する筋肉麻痺試験/DASアッセイ

BoNT A/ad-0が、そのLD<sub>50</sub>をかなり下回る用量で薬理活性を持つかどうか、また、典型的な用量反応活性を示すかどうかを判定するために、上記説明のBoNT A/ad-0を、マウスDASでテストした。マウスの腓腹筋に、25 µlハミルトンシリンジを使用して、3 µlの、BoNT A/ad-0を含む0.9%NaClを注入した。投与用量は、マウスにつき投与されるµg、あるいはマウスにつき投与されるBoNT A/ad-0活性の単位で表す(表2)。

40

## 【0094】

BoNT A/ad-0の投与によって誘起される筋肉麻痺に陽性であるとしてマウスを分類するために、二つの観察点に注目する。第一は、マウスが注入された脚を歩くこと

50

に使えない（筋肉麻痺）。第二は、注入された脚の指が虚脱したように見える（指の外転）かどうかを観察。明確な筋肉麻痺が、初期投与の24時間後に初めて観察され、記録された。明確な筋肉麻痺について、最高5日間、マウスを毎日評価した。

【0095】

BONT A / ad - 0 のこの薬理学的試験の結果を、表2及び図2に示す。0.008 LD<sub>50</sub> 単位 (0.01 μg) ~ 0.42 LD<sub>50</sub> 単位 (0.5 μg) の範囲の用量で BONT A / ad - 0 を投与したマウスは、致死的な症状が現れずに、明確な筋肉麻痺及び指の外転を示した（図2及び表2）。実際、0.01 μg が注入された5匹の動物のうちの4匹は、筋肉麻痺と、ある程度の指の外転を呈した（表2）。このことは、BONT A / ad - 0 に関する ED<sub>50</sub>、すなわち、注入動物の50%が目的の薬理学的活性を現す最低用量が、0.01 μg 以下であることを示す。これは、0.008 LD<sub>50</sub> 単位以下に当たる。1日目に麻痺を提示したすべてのマウスは、試験の終わり（5日目）まで麻痺を提示し続けた。全身毒性の痕跡は、どのマウスにも、この試験では全く観察されなかった。

【0096】

これらのデータは、用量反応プロフィール、有意に増加した安全な治療的活性の範囲、それ故の改善された治療指数、及び改善された安全域と共にではあるが、BONT A / ad - 0 が、wt BONT A に類似の薬学的性質を持つことを確認する。wt BONT の薬学的調整物に関する BONT A / ad - 0 のこの比較を表3に示し、参考によりその全体が本明細書に援用される Aoki, "A Comparison of the Safety Margins of Botulinum Neurotoxin Serotypes A, B, and F In Mice," Toxicon 39: 1815 - 1820 (2001) で報告されているデータに対比させている。例えば、参考によりその全体が本明細書に援用される Aoki, "A Comparison of the Safety Margins of Botulinum Neurotoxin Serotypes A, B, and F In Mice," Toxicon 39: 1815 - 1820 (2001) は、BOTOX (登録商標) の安全域が、約 13.9 ± 1.7 であり、Dysport (登録商標) の安全域が、7.6 ± 0.9 であると報告している。本明細書は、試験した BONT A / ad - 0 の最低用量、0.01 μg で、明確な麻痺が、4/5 のマウスに観察されたことを示す。この用量は、ED<sub>50</sub> の控え目な推定と考察できる。したがって、BONT A / ad - 0 にとっての安全域は、約 120 である。別の表現をすれば、BOTOX (登録商標) または Dysport (登録商標) のものよりも約 10 倍も良い（表3）。

【0097】

（表2）BONT A / ad - 0 の薬理学的試験の結果

マウスあたりの注入用量	LD <sub>50</sub> 単位	マウスの数	明確な麻痺を示した数	死亡数
0 (プラセボ)	0	9	0	0
0.01 μg	0.008	5	4	0
0.1 μg	0.08	5	5	0
0.5 μg	0.42	10	10	0
1 μg	0.83	5	5	0
1.2 μg	1	5	2	3
1.5 μg	1.25	5	1	4

ナイスマウスの左腓腹筋内に、筋肉内注射により、BONT A / ad - 0 を、示した量または単位の BONT A / ad - 0 を含む 3 μl で投与した。

【0098】

（表3）BONT A / ad - 0 の LD<sub>50</sub> 及び ED<sub>50</sub>

10

20

30

40

50

LD <sub>50</sub> = 約1.2 μg
ED <sub>50</sub> = 約0.01 μg (ED <sub>50</sub> = 0.01 μg 以下)
LD <sub>50</sub> /ED <sub>50</sub> = 安全域 = 約120

## 【0099】

単位として表した場合、B o N T A / a d - 0 の ED<sub>50</sub> は、0.008 LD<sub>50</sub> 単位以下である。

## 【0100】

先行研究及び結論との比較

先行研究は、組換えB o N T A / a d の軽鎖に導入された変異（参照によりその全体が本明細書に援用されるIchtchenko及びBand U. S. Patent Application Publication No. 2011/0206616に説明されたカーゴ付着ペプチドを含む分子）が、毒素のLD<sub>50</sub>を100,000倍以上昇させることを発見した。特に、各動物に繰り返し用量投与を行う2カ月前に、（治療薬を含まない）B o N T A / a d の0.5 μg (n = 25) または1 μg (n = 15) を、脛骨筋に注射した。示した量のB o N T A / a d を含む3 μl からなる繰り返し用量、1 μg (n = 18) または2 μg (n = 20) を、脛骨筋に同じように注入した。これらのデータ（表4及び表5）は、繰り返し治療でB o N T A / a d への免疫耐性が発達しないことを示唆する。

## 【0101】

（表4）B o N T A / a d は麻痺を誘起する

用量	マウスの数	明確な麻痺を示した数	死亡数 (48時間以内)
0 (プラセボ)	21	0	0
0.5 μg	38	34	0
1 μg	15	12	1
1.2 μg	10	5	5

1.2 μg が、この実験から推定されるB o N T A / a d の筋肉内注射に関する明白な LD<sub>50</sub> である。

## 【0102】

（表5）B o N T A / a d の再注入後の麻痺効果

繰り返し用量	マウスの数	明確な麻痺を示した数	死亡数 (48時間以内)
1 μg	18	17	0
2 μg	20		15匹死亡 3匹が病気に見えた 2匹のマウスは48時間でも 正常に見えた

## 【0103】

今回の試験で、B o N T A / a d と同一の毒素不活化変異があるB o N T A / a d - 0 の LD<sub>50</sub> は、同様に、wt B o N T A に比べ、約100,000倍に上昇することが発見された。しかし、驚くべきことに、B o N T A / a d - 0 が、それでも、wt B o N T A で観察されるものと類似の薬理学的活性を持つこと、及び治療的効果を生じさせるために、治療薬を、B o N T A / a d のカーゴ部位を介して送達する必要がないことが観察された。B o N T A / a d - 0 の用量反応を、wt B o N T A の薬学的調整物に対して報告されているものと比較すると、B o N T A / a d - 0 は、薬学的治療に、wt B o N T A と同様に使用できるが、全身毒性の危険性を有意に減少させるため、臨床使用の安全性が有意に改善されるという利益を得る、と結論できる。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 4 】

説明目的で、本発明を詳述したが、そのような詳細は、単にその目的のためであるということは明らかである。それに対して当業者は、次の請求項によって定義される発明の主旨及び範囲から逸脱することなく、変更を加えることができる。

【 囮 1 A 】

輕鎖

```

BONT A S Q Y N M P R E K I L L S D E P Q C G S P D K I L D E I N I P D I V V F F F V L M R E P P E R A P F F I V P Y N V I I I
BONT B S Q Y N M P R E K I L L S D E P Q C G S P D K I L D E I N I P D I V V F F F V L M R E P P E R A P F F I V P Y N V I I I
BONT C M Q Y N M P R E K I L L S D E P Q C G S P D K I L D E I N I P D I V V F F F V L M R E P P E R A P F F I V P Y N V I I I
BONT D E Q Y N M P R E K I L L S D E P Q C G S P D K I L D E I N I P D I V V F F F V L M R E P P E R A P F F I V P Y N V I I I
BONT E L Q Y N M P R E K I L L S D E P Q C G S P D K I L D E I N I P D I V V F F F V L M R E P P E R A P F F I V P Y N V I I I
BONT F P Q Y N M P R E K I L L S D E P Q C G S P D K I L D E I N I P D I V V F F F V L M R E P P E R A P F F I V P Y N V I I I
BONT G D Q Y N M P R E K I L L S D E P Q C G S P D K I L D E I N I P D I V V F F F V L M R E P P E R A P F F I V P Y N V I I I

```

【 図 1 B 】

### 受容体結合ドメイン

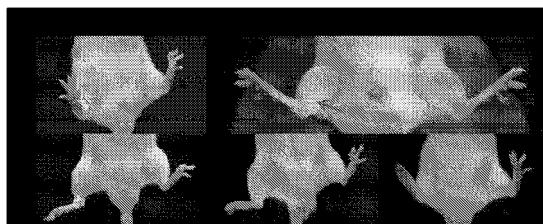
( 义 1 C )

```

BONT A  MYSQFESISFSPWLRPDKPSISL-  AYKIIIIICHECND  SWMSLNSYGLIILQDQIIRWVH  EQLQHQMIDY
BONT B  FQSVLDFPSWSPWLRPDKGIDQI-  AYKIIIIICHECND  SWMSLNSYGLIILQDQIIRWVH  EQLQHQMIDY
BONT C  FQSVLDFPSWSPWLRPDKGIDQI-  AYKIIIIICHECND  SWMSLNSYGLIILQDQIIRWVH  EQLQHQMIDY
BONT D  FQSVLDFPSWSPWLRPDKGIDQI-  AYKIIIIICHECND  SWMSLNSYGLIILQDQIIRWVH  EQLQHQMIDY
BONT E  FQSVLDFPSWSPWLRPDKGIDQI-  AYKIIIIICHECND  SWMSLNSYGLIILQDQIIRWVH  EQLQHQMIDY
BONT F  FQSVLDFPSWSPWLRPDKGIDQI-  AYKIIIIICHECND  SWMSLNSYGLIILQDQIIRWVH  EQLQHQMIDY
BONT G  FQSVLDFPSWSPWLRPDKGIDQI-  AYKIIIIICHECND  SWMSLNSYGLIILQDQIIRWVH  EQLQHQMIDY

```

〔 図 2 〕



BAT A	SRD-----	LGCSMRFPIPVWDGQWSPRL
BAT B	RKPYHHL-----	LGCMQHDFPDKPQEGVTE
BAT C	VIQGQHATSLISL-----	LGCSMRFPIPVWDGQWSPRL
BAT D	A VVYIYRLL-----	SSSPSPNPISPDQGIVS
BAT E	DEPN-----	SGCQFQFQFQFQFQFQFQX
BAT F	KXPS-----	SGCQFQFQFQFQFQFQFQY
BAT G	KLR-----	LGCMQHDFPDKPQEGVTE

## 【手続補正書】

【提出日】平成27年9月29日(2015.9.29)

## 【手続補正1】

### 【補正対象書類名】明細書

### 【補正対象項目名】配列表

### 【補正方法】追加

### 【補正の内容】

### 【配列表】

2016513082000001\_app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/013385
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 39/08 (2014.01) USPC - 424/239.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 39/08; C07K 14/33; C12N 15/31 (2014.01) USPC - 424/238.1, 238.1; 435/69.1; 530/350		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 38/00, 39/00, 47/48261; C07K 14/33 (2014.02)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar, Pub Med		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PELLETT et al. 'Neuronal targeting, internalization, and biological activity of a recombinant toxic derivative of botulinum neurotoxin A.' Biochem Biophys Res Commun. 405(4): 673-7 (Pg. 1-12). Epub 01 February 2011 (01.02.2011). entire document	1-3
A	BAND et al. 'Recombinant derivatives of botulinum neurotoxin A engineered for trafficking studies and neuronal delivery.' Protein Expr Purif. 71(1):62-73. 04 January 2010 (04.01.2010). entire document	1-3
A	US 7,785,606 B2 (ICHTCHENKO et al) 31 August 2010 (31.08.2010) entire document	1-3
A	US 2011/0206616 A1 (ICHTCHENKO et al) 325 August 2011 (25.08.2011) entire document	1-3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 April 2014	Date of mailing of the international search report 07 MAY 2014	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/013385
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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:		
<p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p>   <p>2. <input 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:</p>   <p>3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 4-20 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>		
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>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.:</p>   <p>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.:</p>		
<p><b>Remark on Protest</b></p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>		

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 13/10 (2006.01)	A 6 1 P 13/10	
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 25/06 (2006.01)	A 6 1 P 25/06	
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/02	1 0 1
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
C 0 7 K 14/33 (2006.01)	C 0 7 K 14/33	

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

(74)代理人 100148699	弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048	弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506	弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100114340	弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889	弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072	弁理士 川本 和弥
(72)発明者 バスケス - シントロン エド温イン ジエイ .	アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニューヨーク イースト トウウェンティフィフス ストリート 334 アパートメント 109
(72)発明者 イーシエンコ コンスタンチン	アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ブルックリン セブンティサード ストリート 181 アパートメント 426
(72)発明者 バンド フィリップ エイ .	アメリカ合衆国 ニュージャージー州 ウエスト オレンジ マリオン ドライブ 151
F ターム(参考) 4C084 AA01 AA02 BA02 BA44 CA04 DA33 MA52 MA56 MA59 MA66	NA14 ZA012 ZA082 ZA212 ZA302 ZA662 ZA812 ZA892 ZA962
	4C087 AA01 AA02 BC68 CA16 MA52 MA56 MA59 MA66 NA14 ZA01
	ZA08 ZA21 ZA30 ZA66 ZA81 ZA89 ZA96
	4H045 AA30 BA10 CA11 DA83 EA20 EA21 FA74

【要約の続き】

## 輕鎖

Bont A	MPFVVKOFNYKEDPVNQGDTAIIKIPNA	QOMQPKAFKIRHNIWVPERDTE	WPEEGDLNPPPERKQPVPSYDSTVLS	
Bont B	MPVTFNNFNYNDPVDNNN	DNMMEPFGARGCSGRVYKAFKNTDRIWVPERDTE	PGYKPEDVY-KSSGCIINRDVCEYDPLVLS	
Bont C	MPITFNNFNYSDPVNQDNNN	ILVLDTHLNTLANKPEPKAFKATITGNIWVPERDTE	PPRVTSPK-SGYYDPNWL	
Bont D	MTWPVKDFNYSDPVNQDNDILVLRIPQNLKLTTPKAFKATITGNIWVPERFSSD	WPSLSK-PPRPTSKYD-S-YDPLVLS		
Bont E	MPKJNSFNYNDPVNQDNTILVLIKPG	CCQCEVYKS	PPPTS1KNGDSSYDPLVLS	
Bont F	MPVVVINSFNYNDPVNQDNTILVMOI	VEEKSKKVYKAFKATITGNIWVPERDTE	PPASLNGSSAYDPLVLS	
Bont G	MPVVV1KNSFNYNDP	EDD1NNMPEPNDP	CGTINVYKAFKATITGNIWVPERDTE	STGVISRSVYDPLVLS

Bont A	TDNEKDNYLKGWVKLFPRIVSTDLEMILTSIVRGIPFWGGGSTIDTELKVIDTNCINVI	--- QPDGSYRSEEL	- NLV
Bont B	TNDEKNIIFDQTMKLFPRIKSKPGEKSLPEMIIINGIPYLGDORRVPIE	EFTNTNIAASVTWNKLISNP	CGVERKKGIFANL
Bont C	TDISBDAPLKEHMKLFPRIRNSREIGESEELIYRLSTDIPFPFGNANTPINKT	YDFDVFDFNSDNUVKTRQGRNWKIGS	ICGSV
Bont D	TDEQADTFPLKGHMKLFPRINERDICKXKLINTLVVGS	PEMGDSSTSPEDTFDTRETTNIAVEKIEEN	GSKWVNTNIAQGSV
Bont E	SDEDEKDRLKIVKLFPRIRINNLSSGGILLSEELSKANPYLGNNTDPDNGCHIGD	- SANLIEKPSNGSQD	--- ILDEN
Bont F	TDAEKDRYLKTHMKLFPRIRNSNPAGEVLTQEISIAKPYLGNBETP	PIEHEPVTRTSWNIKRSIN	--- VKSS
Bont G	TDAEKDRKLKTMKLFPRIRNSKPSGORLIDMIVDAPYPLGNASTPPDKR	IAANVANVSINKKIIQPGAEEDQIKGLMTNLLI	F

BONT A RLYGIAI - NPNNRPFVKVNTNAYIEMSGLEVSFEELIRTFGGHDIAKFDISLQNEFRLLYYNKFKDIASTLNKAKSI -- VGGTTA  
 BONT B GLYGIKV - DDL2IVPNEKK - FPMOSTDAIQAEELYTFFGGQDPSV1IPSTIDKS1NDKV1QNERGIVDRLNKV1LVCI - SDPNI  
 BONT C RLYGIAI PNDQTISSVTSN1D1S0QXNVKLEIA1E1MAFGGGPTIDLIPKSARKYFEEKA1D1YRESIA1ARLN1SITTANPSSENK  
 BONT D GLYGIN1P1PSDOKRIRPQSEG1F1S0QCPN1VQFEELYTFFGG1D1V1I1PQIERSQLREKALGHYK1IA1ARLN1NINKT1PSS1HIS  
 BONT E GLYGC1KG1TT1KTY1T1Q1Q1NPL1T1N1R1G1T1N1 1EE1V1T1F1G1G1D1N1I1T1S1A1Q1S1D1I1T1N1L1D1Y1K1I1A1S1K1S1K1Q1V1S1 -- NPI  
 BONT F GLYGRG1V1Y1K1T1K1V1Q1A1M1A1X - PIR1EE1V1T1F1G1G1D1N1I1T1S1A1M1K1I1V1N1L1A1Y1V1I1A1T1R1S1R1V1N1S1A1P1 - BY  
 BONT G GLYGIK1I1S1N1L1P1P1N1K1 - FPMQHSDPV1Q1E1LY1T1F1G1G1D1P1S1V1P1S1T1D1M1I1V1N1K1Q1F1D1I1A1R1N1I1N1S1A1Q1G1

BONT A SLOQIMKNNKEKEKYLISSEDTCKFSVDEKFKDLYKMLLIEITHECNFVKEFIVLNRKTLHNFORKA-WPKAIIIVPKVNTTYTKE  
BONT B MINIYKNNKEKEKDKYKIFWEDSEKGSYKSYLIVESDOKLYKS-TRFGFTETESEERVKRGRASYSFSDSLPPVRLKLNLDIYTTEKE  
BONT C HIGEYKQKLIRKIRKFVVESSCEVAVRNKKEVFLYNELTQKIFTEENSAKAKIVVONKKEITVSHVWTPVTA-NLDDDNVYKE  
BONT D NIDKUKKIESEKINFDRDNKGNFUVNIDKENSLSLDTNVNHSSEVVISSQINVKNRTHYFYSRHYLPVTA-NLDDDNVYKE  
BONT E LLYPKIKDUEEAKIGLDEADASGLYSVNNKXNDIFRKE-YSFTTEFDIATKFOVVKCRNTIGQKYY-PLNSNLNDSDIYNTSE  
BONT F DINEYKDYEQNKIGLDEKNAQGSYAVNENKENEKKE-YSFTTEIDIAKFKVKCRNTYFICIGE-LKVPNLLDDIYTTESE  
BONT G DISLIKQIYKNNKIDFEDPQKSYVDKDKFQDLYKALHFGFTETEINLAGEWTKRGRISYFSEXYLPIKTEKLDIYTTESE

重鎖

BONT A	G F N I L N I N L A A P I N Q Q N T E I N N M M F T K L K N F T - - -	G F E F Y K L - - - L C - - - V R G I I T S K T K S I D K G Y N K - A L N D L C - - - E V V
BONT B	G F N I S D K D M E K E I R Q N Q K A I N - - - - -	K Q A T E E I S K E H E A V - Y K I Q - M C - K S V - - - - -
BONT C	G F N I P K S N L N I V I M Q G Q N L S R N P A L - R K V N P E N M L Y - - - - -	- L - - - F T X - - - F C H K A I - - - - -
BONT D	G F N I L N K G H I N I E S Q G Q N I E R N P A L - Q K L S S E S V V D - - - - -	- L - - - F T X - - - V C - - - L R L T K - - - - -
BONT E	G T N I A I - - - N L I V N F R Q G N A N L N P - - - - -	R I I T P I T G R - G L V K - - - K I I R F C - K N I V S W K - - - - -
BONT F	G F N I Q G N L A V - - - M R Q G N Q I K L N P - - - - -	X I I D S I P D K - G L V E - - - K I V K F C - K S V I P R K - - - - -
BONT G	G F N I A T S K N K I T E I N Q Q N K A V N - - - - -	X E A V E E I S L E - H L V I - - - Y R I A - M C - K P V - M Y K N - - - - -