(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년12월21일
(11) 등록번호 10-2340476
(24) 등록일자 2021년12월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/33 (2006.01) *C12N 9/52* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/33 (2013.01)
C12N 9/52 (2021.08)
(21) 출원번호 10-2016-7003051
(22) 출원일자(국제) 2014년07월09일
심사청구일자 2019년07월02일
(85) 번역문제출일자 2016년02월03일
(65) 공개번호 10-2016-0029110
(43) 공개일자 2016년03월14일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2014/052097
(87) 국제공개번호 WO 2015/004461
국제공개일자 2015년01월15일
(30) 우선권주장
1312317.9 2013년07월09일 영국(GB)
(56) 선행기술조사문헌
WO2000067700 A2
WO2013068476 A1
M.P. Byrne, Infection and Immunity, vol.66, no.10, p.4817-4822 (1998)

(73) 특허권자
입센 바이오이노베이션 리미티드
영국 오엑스14 4알와이 옥스퍼드셔 애빙던 밀튼 파크 파크 드라이브 102
(72) 발명자
앤더슨, 디나 브래디
영국 오엑스14 3와이에스 옥스퍼드셔 애빙던 바튼 레인 유닛츠 4-10 더 콰드런트 신택신 리미티드
해켓, 개빈 스티븐
영국 오엑스14 3와이에스 옥스퍼드셔 애빙던 바튼 레인 유닛츠 4-10 더 콰드런트 신택신 리미티드
리우, 사이 만
영국 오엑스14 3와이에스 옥스퍼드셔 애빙던 바튼 레인 유닛츠 4-10 더 콰드런트 신택신 리미티드
(74) 대리인
양영준, 김영, 여호섭, 공성철

전체 청구항 수 : 총 25 항 심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 **양이온성 신경독소**

(57) 요 약

본 발명은 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하는 조작된 클로스트리디움 독소이며, 상기 적어도 하나의 아미노산 변형이 조작된 클로스트리디움 독소의 등전점 (pI)을 상기 적어도 하나의 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 클로스트리디움 독소의 pI보다 적어도 0.2 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시키는 것인 조작된 클로스트리디움 독소를 제공한다. 또한, 요법에서의 조작된 클로스트리디움 독소의 상응하는 용도가 제공된다.

명 세 서

청구범위

청구항 1

클로스트리디움 독소 H_{CN} 도메인에 위치하는 4 내지 40 개의 아미노산 변형을 포함하는 조작된 클로스트리디움 독소이며, 상기 4 내지 40개의 아미노산 변형이 조작된 클로스트리디움 독소의 등전점 (pI)을 상기 4 내지 40개의 아미노산 변형이 없고 그 외는 동일한 클로스트리디움 독소의 pI보다 적어도 0.2 pI 단위 더 높은 값으로 증가시키고;

상기 조작된 클로스트리디움 독소는 적어도 6.6의 pI를 가지는 조작된 보툴리눔 신경독소 A(BoNT/A)이고, 상기 4 내지 40개의 아미노산 변형은 ASN 886, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, ASN 1025, ASN 1026, 및 ASN 1052로부터 선택되는 적어도 4개의 아미노산의 변형을 포함하며, 상기 적어도 4개의 아미노산의 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함하고,

상기 조작된 클로스트리디움 독소는 적어도 8의 안전성 비율을 가지며, 여기서 안전성 비율은 -10% 체중 변화에 요구되는 독소의 용량 (pg/마우스)을 DAS ED_{50} (pg/마우스) [ED_{50} = 2의 DAS 점수를 생성하는 데 요구되는 용량]으로 나눈 것으로서 계산되고,

상기 조작된 클로스트리디움 독소는 서열 3, 5, 및 7로부터 선택되는 핵산 서열에 대해 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩되거나, 상기 조작된 클로스트리디움 독소는 서열 4, 6, 및 8로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인,

조작된 클로스트리디움 독소.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 4 내지 40개의 아미노산 변형이 조작된 클로스트리디움 독소의 등전점 (pI)을 상기 4 내지 40개의 아미노산 변형이 없고 그 외는 동일한 클로스트리디움 독소의 pI보다 적어도 0.5 pI 단위 더 높은 값으로 증가시키는 것인 조작된 클로스트리디움 독소.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 4 내지 40개의 아미노산 변형이 조작된 클로스트리디움 독소의 등전점 (pI)을 상기 4 내지 40개의 아미노산 변형이 없고 그 외는 동일한 클로스트리디움 독소의 pI보다 적어도 1 pI 단위 더 높은 값으로 증가시키는 것인 조작된 클로스트리디움 독소.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 4 내지 40개의 아미노산 변형이 조작된 클로스트리디움 독소의 등전점 (pI)을 상기 4 내지 40개의 아미노산 변형이 없고 그 외는 동일한 클로스트리디움 독소의 pI보다 적어도 2 pI 단위 더 높은 값으로 증가시키는 것인 조작된 클로스트리디움 독소.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 4 내지 40개의 아미노산 변형이 조작된 클로스트리디움 독소의 등전점 (pI)을 상기 4 내지 40개의 아미노산 변형이 없고 그 외는 동일한 클로스트리디움 독소의 pI보다 2 내지 5 pI 단위 더 높은 값으로 증가시키는 것인 조작된 클로스트리디움 독소.

청구항 6

제1항에 있어서, 조작된 클로스트리디움 독소가 7 내지 9, 또는 8 내지 9의 pI를 갖는 것인 조작된 클로스트리디움 독소.

청구항 7

제1항에 있어서, 클로스트리디움 독소 H_{CC} 도메인에 위치하는 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하는 것인, 조

작된 클로스트리디움 독소.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 930, SER 955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052, 및 GLN 1229의 7개 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 아미노산 변형을 포함하는 것인, 조작된 클로스트리디움 독소.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052, 및 GLN 1229의 7개 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 아미노산 변형을 포함하는 것인, 조작된 클로스트리디움 독소.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 930, SER 955, GLN 991, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1052, 및 GLN 1229의 7개 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 아미노산 변형을 포함하는 것인, 조작된 클로스트리디움 독소.

청구항 11

서열 3, 5, 7 또는 9로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩되거나, 또는

서열 4, 6, 8, 또는 10로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는,

조작된 클로스트리디움 독소.

청구항 12

제1항 또는 제11항에 따른 조작된 클로스트리디움 독소를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산.

청구항 13

제12항에 따른 핵산을 적합한 숙주 세포에서 발현시키고, 숙주 세포를 용해시켜 경쇄 및 중쇄를 갖는 단일-쇄 조작된 클로스트리디움 독소 단백질을 함유하는 숙주 세포 균질물을 제공하고, 상기 단일-쇄 조작된 클로스트리디움 독소 단백질을 단리하는 것을 포함하는, 경쇄 및 중쇄를 갖는 단일-쇄 조작된 클로스트리디움 독소 단백질의 제조 방법.

청구항 14

제13항의 방법에 의해 수득가능한 단일-쇄 조작된 클로스트리디움 독소 단백질을 제공하고, 경쇄와 중쇄 사이에 위치한 인식 부위 (절단 부위)에서 폴리펩티드를 절단하는 프로테아제와 폴리펩티드를 접촉시키고, 폴리펩티드를 경쇄 및 중쇄가 디술피드 결합에 의해 함께 연결된 2쇄 폴리펩티드로 전환시키는 것을 포함하는, 조작된 클로스트리디움 독소의 활성화 방법.

청구항 15

제14항의 방법에 의해 수득가능한 2쇄 조작된 클로스트리디움 독소.

청구항 16

제1항 또는 제11항에 있어서, 의료에 사용하기 위한 조작된 클로스트리디움 독소.

청구항 17

제15항에 있어서, 의료에 사용하기 위한 2쇄 조작된 클로스트리디움 독소.

청구항 18

제1항 또는 제11항에 따른 조작된 클로스트리디움 독소를 포함하고,

사시, 안검연축, 사팔눈, 이상긴장증, 사경, 안구 운동의 신경근육 장애 또는 상태, 서경, 이갈이, 윌슨병, 진전, 틱, 분절성 근간대성경련, 연축, 만성 다발성 경화증으로 인한 경직, 비정상적 방광 제어를 초래하는 경직, 항문 경직, 등 연축, 근육 경직, 긴장성 두통, 거근 골반 증후군, 척추 갈림증, 지연성 이상운동증, 파킨슨병, 말더듬, 편측안면 연축, 안검 장애, 뇌성 마비, 국소 경직, 연축성 결장염, 신경성 방광, 사지 경직, 치열, 무이완증, 연하곤란, 누루, 다한증, 과도한 타액분비, 과도한 위장 분비, 근육통, 두통, 암, 자궁 장애, 비뇨생식기 장애, 비뇨생식기-신경계 장애, 만성 신경성 염증 및 평활근 장애로부터 선택되는 질환 또는 상태의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 19

제15에 따른 2쇄 조작된 클로스트리디움 독소를 포함하고,

사시, 안검연축, 사팔눈, 이상긴장증, 사경, 안구 운동의 신경근육 장애 또는 상태, 서경, 이갈이, 윌슨병, 진전, 틱, 분절성 근간대성경련, 연축, 만성 다발성 경화증으로 인한 경직, 비정상적 방광 제어를 초래하는 경직, 항문 경직, 등 연축, 근육 경직, 긴장성 두통, 거근 골반 증후군, 척추 갈림증, 지연성 이상운동증, 파킨슨병, 말더듬, 편측안면 연축, 안검 장애, 뇌성 마비, 국소 경직, 연축성 결장염, 신경성 방광, 사지 경직, 치열, 무이완증, 연하곤란, 누루, 다한증, 과도한 타액분비, 과도한 위장 분비, 근육통, 두통, 암, 자궁 장애, 비뇨생식기 장애, 비뇨생식기-신경계 장애, 만성 신경성 염증 및 평활근 장애로부터 선택되는 질환 또는 상태의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서,

상기 이상긴장증은 연축성 이상긴장증, 구강하악 이상긴장증, 국소 이상긴장증, 지연성 이상긴장증, 후두 이상긴장증, 사지 이상긴장증, 또는 경부 이상긴장증이거나,

상기 사경은 연축성 사경이거나,

상기 안구 운동의 신경근육 장애 또는 상태는 공동 사시, 수직 사시, 측면 직근 마비, 안진, 또는 갑상선 근병증이거나,

상기 근육통은 근육 연축으로부터의 통증인,

제약 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서,

상기 이상긴장증은 연축성 이상긴장증, 구강하악 이상긴장증, 국소 이상긴장증, 지연성 이상긴장증, 후두 이상긴장증, 사지 이상긴장증, 또는 경부 이상긴장증이거나,

상기 사경은 연축성 사경이거나,

상기 안구 운동의 신경근육 장애 또는 상태는 공동 사시, 수직 사시, 측면 직근 마비, 안진, 또는 갑상선 근병증이거나,

상기 근육통은 근육 연축으로부터의 통증인,

제약 조성물.

청구항 22

제1항 또는 제11항에 따른 조작된 클로스트리디움 독소를 포함하고, 미용적 용도에 사용하기 위한 조성물.

청구항 23

제15항에 따른 2쇄 조작된 클로스트리디움 독소를 포함하고, 미용적 용도에 사용하기 위한 조성물.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 미용적 용도는 이마 주름 및/또는 피부 주름을 처리하는 것인, 조성물.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 미용적 용도는 이마 주름 및/또는 피부 주름을 처리하는 것인, 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하는 조작된 클로스트리디움 독소, 및 의료 및 요법에서의 이러한 조작된 클로스트리디움 독소의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 클로스트리디움 속의 박테리아는 매우 강력하고 특이적인 단백질 독소를 생성하며, 이는 이들이 전달되는 뉴런 및 다른 세포에 독성을 줄 수 있다. 이러한 클로스트리디움 독소의 예로는 씨. 테타니 (*C. tetani*)에 의해 (TeNT) 및 씨. 보툴리눔 (*C. botulinum*) (BoNT) 생성되는 신경독소 혈청형 A 내지 G, 뿐만 아니라 씨. 바라티이 (*C. baratii*) 및 씨. 부티리쿰 (*C. butyricum*)에 의해 생성되는 것들을 들 수 있다.

[0003] 클로스트리디움 독소 중에서 가장 강력한 독소의 일부가 공지되어 있다. 예를 들어, 보툴리눔 신경독소는 혈청형에 따라 0.5 내지 5 ng/kg 범위의 마우스에 대한 중앙 치사량 (LD_{50}) 값을 갖는다. 테타누스 및 보툴리눔 독소 둘 다는 이환된 뉴런의 기능, 특히 신경전달물질의 방출을 억제함으로써 작용한다. 보툴리눔 독소는 신경근육 연접부에서 작용하고, 말초 신경계에서 콜린성 전달을 억제하는 반면, 테타누스 독소는 중추 신경계에서 작용한다.

[0004] 사실상, 클로스트리디움 독소는 단일-쇄 폴리펩티드로서 합성되고, 단백질분해성 절단 사건에 의해 번역 후 변형되어 디술피드 결합에 의해 함께 연결된 2개의 폴리펩티드 쇄를 형성한다. 절단은 쇄간 디술피드 결합을 제공하는 시스테인 잔기 사이에 위치하는 종종 활성화 부위로서 지칭되는 특이적 절단 부위에서 일어난다. 독소의 활성 형태는 이 2쇄 형태이다. 2개의 쇄는 대략 100 kDa의 분자량을 갖는 중쇄 (H-쇄), 및 대략 50 kDa의 분자량을 갖는 경쇄 (L-쇄)로 지칭된다. H-쇄는 N-말단 전위 성분 (H_N 도메인) 및 C-말단 표적화 성분 (H_C 도메인)을 포함한다. 절단 부위는 L-쇄와 전위 도메인 성분 사이에 위치한다. H_C 도메인의 그의 표적 뉴런에의 결합 및 결합된 독소의 엔도솜을 통한 세포 내로의 내부화 후, H_N 도메인은 엔도솜 막을 가로질러 및 시토졸 내로 L-쇄를 전위시키고, L-쇄는 프로테아제 작용 (또한 비-세포독성 프로테아제로서 공지됨)을 제공한다.

[0005] 비-세포독성 프로테아제는 SNARE 단백질로서 공지된 세포내 수송 단백질 (예를 들어 SNAP-25, VAMP 또는 신탁신 (Syntaxin))을 단백질분해성으로 절단함으로써 작용한다 - 문헌 [Gerald K (2002) "Cell and Molecular Biology" (4th edition) *John Wiley & Sons, Inc.*] 참조. 두문자어 SNARE는 용어 가용성 NSF 부착 수용체 (Soluble NSF Attachment Receptor)로부터 유래하며, 여기서 NSF는 N-에틸말레이미드-민감성 인자 (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor)를 의미한다. SNARE 단백질은 세포내 비히클 융합에 필수적이며, 따라서 세포로부터의 비히클 수송을 통한 분자의 분비에 필수적이다. 프로테아제 작용은 아연-의존성 엔도펩티다제 활성이며, SNARE 단백질에 대한 높은 기질 특이성을 나타낸다. 따라서, 일단 목적하는 표적 세포로 전달되면, 비-세포독성 프로테아제는 표적 세포로부터의 세포 분비를 억제할 수 있다. 클로스트리디움 독소의 L-쇄 프로테아제는 SNARE 단백질을 절단하는 비-세포독성 프로테아제이다.

[0006] SNARE 단백질의 편재하는 성질의 관점에서, 보툴리눔 독소와 같은 클로스트리디움 독소는 광범위한 요법에 성공적으로 채용되었다.

[0007] 예를 들어, 본 발명자들은 문헌 [William J. Lipham, Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin (Slack, Inc., 2004)]을 언급하며, 여기에는 폭넓게 다양한 치료적 및 미용적 용도에서 신경 전달을 억제하는 클로스트리디움 독소, 예컨대 보툴리눔 신경독소 (BoNT), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C_1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F 및 BoNT/G, 및 테타누스 신경독소 (TeNT)의 용도가 기재되어 있다 - 예로서, 보톡스 (BOTOX)™는 현재 하기 징후에 대한 치료제로서 승인되어 있다: 무이완증, 성인 강직, 치열, 등 통증, 안검연축, 이갈이, 경부 이상긴장증, 본태성 진전, 미간선 또는 운동과잉 얼굴선, 두통, 편측안면 연축, 방광의 과다활동, 다한증, 소아 뇌성 마비, 다발성 경화증, 근육간대 장애, 코 입술선, 연축성 발성장애, 사시 및 VII 신경 장애. 또한, 클로스트리디

움 독소 요법은 신경근육 장애의 치료 (US 6,872,397 참조); 자궁 장애의 치료 (US 2004/0175399 참조); 궤양 및 위식도 역류 질환의 치료 (US 2004/0086531 참조); 이상긴장증의 치료 (US 6,319,505 참조); 눈 장애의 치료 (US 2004/0234532 참조); 안검연축의 치료 (US 2004/0151740 참조); 사시의 치료 (US 2004/0126396 참조); 통증의 치료 (US 6,869,610, US 6,641,820, US 6,464,986 및 US 6,113,915 참조); 섬유근육통의 치료 (US 6,623,742, US 2004/0062776 참조); 하부 등 통증의 치료 (US 2004/0037852 참조); 근육 손상의 치료 (US 6,423,319 참조); 부비동 두통의 치료 (US 6,838,434 참조); 긴장성 두통의 치료 (US 6,776,992 참조); 두통의 치료 (US 6,458,365 참조); 편두통 통증의 감소 (US 5,714,469 참조); 심혈관 질환의 치료 (US 6,767,544 참조); 파킨슨병과 같은 신경계 장애의 치료 (US 6,620,415, US 6,306,403 참조); 신경정신병 장애의 치료 (US 2004/0180061, US 2003/0211121 참조); 내분비 장애의 치료 (US 6,827,931 참조); 갑상선 장애의 치료 (US 6,740,321 참조); 콜린성 영향 땀샘 장애의 치료 (US 6,683,049 참조); 당뇨병의 치료 (US 6,337,075, US 6,416,765 참조); 췌장 장애의 치료 (US 6,261,572, US 6,143,306 참조); 골 종양과 같은 암의 치료 (US 6,565,870, US 6,368,605, US 6,139,845, US 2005/0031648 참조); 귀 장애의 치료 (US 6,358,926, US 6,265,379 참조); 위장관 근육 장애 및 다른 평활근 기능이상과 같은 자율신경 장애의 치료 (US 5,437,291 참조); 피부 세포-증식성 장애와 관련된 피부 병변의 치료 (US 5,670,484 참조); 신경성 염증성 장애의 관리 (US 6,063,768 참조); 탈모 및 자극성 모발 성장의 감소 (US 6,299,893 참조); 입 처짐의 치료 (US 6,358,917 참조); 식욕 감소 (US 2004/40253274 참조); 치과 요법 및 절차 (US 2004/0115139 참조); 신경근육 장애 및 상태의 치료 (US 2002/0010138 참조); 다양한 장애 및 상태 및 관련된 통증의 치료 (US 2004/0013692 참조); 천식 및 COPD와 같은 점액 과다분비로부터 초래되는 상태의 치료 (WO 00/10598 참조); 및 염증, 내분비 상태, 외분비 상태, 면역학적 상태, 심혈관 상태, 골 상태와 같은 비-신경 상태의 치료 (WO 01/21213 참조)에 대해 기재되어 있다. 상기 공보 모두는 그 전문이 본원에 참고로 도입된다.

[0008] 인간 및 다른 포유동물의 치료적 및 미용적 처치에서의 클로스트리디움 독소 (예를 들어 BoNT 및 TeNT)와 같은 비-세포독성 프로테아제의 용도는 이들 독소의 특성으로부터 이익을 얻을 수 있는 점점 커지는 범위의 질환 및 질병으로 확장될 것으로 예상된다.

[0009] 전신적 신경학적 효과를 피하기 위해, 많은 클로스트리디움 독소 요법은 주어진 표적 부위 (예컨대 표적 조직)에 대한 클로스트리디움 독소 치료제의 직접 투여를 이용한다. 이 방식으로 클로스트리디움 독소-기재 치료제를 투여할 경우의 문제는 투여 부위로부터의 및 주위 조직 또는 전신 순환으로의 독소의 퍼짐이다. 표적 조직으로부터의 독소의 확산은 극단적인 경우 생명을 위협할 수 있는 바람직하지 않은 부작용의 원인이 되는 것으로 믿어진다. 이는 클로스트리디움 독소 치료제 (예컨대 BoNT 치료제)를 고 용량, 농도 및 주사 부피로 사용할 경우 특히 문제가 될 수 있다. 시판되는 BoNT/A 치료제에 대해 보고된 이 문제와 관련된 부작용으로는 무력증, 일반적 근육 악화, 복시, 안검하수증, 연하곤란, 발성장애, 조음장애, 요실금 및 호흡 곤란을 들 수 있다. 연하 및 호흡 곤란은 생명을 위협할 수 있으며, 독소 효과의 퍼짐과 관련된 사망이 보고되었다.

발명의 내용

[0010] 따라서, 투여 부위에서 증가된 조직 체류의 특성을 가지며, 따라서 공지된 클로스트리디움 독소에 비해 투여 부위로부터의 확산의 감소를 나타내는 클로스트리디움 독소에 대한 관련 기술분야의 필요가 있다.

[0011] 본 발명은 청구범위에서 구체화된 바와 같은 조작된 클로스트리디움 독소를 제공함으로써 상기 문제를 해결한다.

[0012] 한 측면에서, 본 발명은 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하며, 상기 적어도 하나의 아미노산 변형이 조작된 클로스트리디움 독소의 등전점 (pI)을 상기 적어도 하나의 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 클로스트리디움 독소의 pI보다 적어도 0.2 (예를 들어, 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시키는 것인 조작된 클로스트리디움 독소를 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산 변형은 조작된 클로스트리디움 독소의 pI를 상기 적어도 하나의 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 클로스트리디움 독소의 pI보다 적어도 0.4 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산 변형은 조작된 클로스트리디움 독소의 pI를 상기 적어도 하나의 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 클로스트리디움 독소의 pI보다 적어도 0.5 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산 변형은 조작된 클로스트리디움 독소의 pI를 상기 적어도 하나의 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 클로스트리디움 독소의 pI보다 적어도 0.6 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산 변형은 조작된 클로스트리디움 독소의 pI를 상기 적어도 하나의 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 클로스트리디움

독소의 pI보다 적어도 0.8 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산 변형은 조작된 클로스트리디움 독소의 pI를 상기 적어도 하나의 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 클로스트리디움 독소의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다.

[0013] 한 측면에서, 본 발명은 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하며, 상기 적어도 하나의 아미노산 변형이 조작된 클로스트리디움 독소의 등전점 (pI)을 상기 적어도 하나의 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 클로스트리디움 독소의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시키는 것인 조작된 클로스트리디움 독소를 제공한다.

[0014] 특정 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소는 적어도 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 또는 80개의 아미노산 변형을 포함한다.

[0015] 특정 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산 변형은 조작된 클로스트리디움 독소의 pI를 상기 적어도 하나의 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 클로스트리디움 독소의 pI보다 적어도 2, 3, 4 또는 5 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다.

[0016] 본 발명자들은 클로스트리디움 독소의 pI를 (적어도 하나의 아미노산 변형의 클로스트리디움 독소 단백질 내로의 도입을 통해) 예를 들어 적어도 0.2 pI 단위, 또는 0.5 pI 단위, 또는 1 pI 단위만큼 증가시킴으로써, 생성된 조작된 클로스트리디움 독소는 유리하게는 표적 SNARE 단백질(들)의 표적 세포 결합, 전위 및 절단의 능력 유지하면서, 증가된 조직 체류 및 투여 부위로부터의 감소된 확산의 특성을 발휘함을 밝혀내었다. 따라서, 투여 부위로부터의 클로스트리디움 독소의 퍼짐은 상기 적어도 하나의 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 클로스트리디움 독소에 비해 유의하게 감소된다.

[0017] 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 상기 기재된 임의의 요법에 사용하기에 적합하며, 유리하게는 공지된 클로스트리디움 독소 치료제의 사용에 비해 부작용의 감소 또는 부재를 발휘할 수 있다.

[0018] 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소의 증가된 조직 체류 특성은 또한 증가된 효능 및/또는 작용 기간을 제공하며, 공지된 클로스트리디움 독소 치료제에 비해 감소된 투여량 (또는 임의의 추가의 부작용 없이 증가된 투여량)이 사용되는 것을 허용하고, 따라서 추가의 이점을 제공할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 하기에 보다 상세히 논의되는 바와 같이, 적어도 하나의 아미노산 변형에 의해 제공되는 pI의 증가는 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소가 주어진 pH에서 상기 적어도 하나의 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 클로스트리디움 독소의 순 전하보다 더 양성인 순 전하를 가짐을 의미한다. 임의의 한 이론에 구애되기를 원하는 것은 아니지만, 본 발명자들은 이 증가된 양전하는 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소가 투여 부위에서 조작된 클로스트리디움 독소와 음이온성 세포외 성분 (예컨대 세포막 및 헤파린 술페이트 프로테오글리칸) 사이의 호의적인 정전기적 상호작용으로 인해 투여 부위에서 보다 긴 조직 체류 시간을 나타내는 것을 허용한다고 믿고 있다. 이들 개선된 정전기적 상호작용은 투여 부위로부터의 조작된 클로스트리디움 독소의 확산을 감소시키는 기능을 하며, 따라서 조직 체류를 개선시킨다.

[0020] 예를 들어, 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소의 개선된 조직 체류 특성은 (i) 곤란한 연하를 유발하는 목에서의 인근 근육으로의 퍼짐 없이, 흉쇄유돌근과 같은 개별 근육으로의 보다 높은 용량, 및 (ii) 순환기로의 퍼짐 및 곤란한 호흡과 같은 전신적 효과를 유발하지 않고, 단일 치료에서의 (모든 근육으로의) 보다 높은 총 용량을 허용할 수 있다. 환자에 대한 이점으로는 흉쇄유돌근과 같은 큰 근육의 보다 효과적인 치료, 각각의 치료 동안 몇몇 상이한 근육으로 주사하는 증가된 기회, 및 보다 높은 투여량으로 인한 유효 치료의 가능한 보다 긴 기간 (재-치료 전에 보다 긴 시간이 필요함)을 들 수 있다.

[0021] 한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 사용시 양성 순 전하를 갖는다 (예를 들어, 조작된 클로스트리디움 독소가 사용시 조직의 목적하는 투여 부위에 위치할 경우).

[0022] 등전점 (pI)은 주어진 단백질의 특정 특성이다. 관련 기술분야에 널리 공지된 바와 같이, 단백질은 아미노산의 특정 서열 (또한 단백질의 경우 아미노산 잔기로 지칭됨)로 이루어진다. 20개의 표준 세트의 각각의 아미노산은 상이한 측쇄 (또는 R 기)를 가지며, 이는 단백질에서 각각의 아미노산 잔기가 전하 및 소수성과 같은 상이한 화학적 특성을 나타냄을 의미한다. 이들 특성은 온도 및 pH와 같은 주위의 화학적 환경에 의해 영향을 받을 수 있다. 단백질의 전체 화학적 특성은 이들 다양한 인자의 총합에 의존할 것이다.

[0023] 특정 아미노산 잔기 (하기에 상세화됨)는 주위의 pH에 따라 전기적 전하를 나타낼 수 있는 이온화가능한 측쇄를 갖는다. 이러한 측쇄가 주어진 pH에서 하전되는지 아닌지는 관련된 이온화가능한 모이어티의 pKa에 의존하며, 여기서 pKa는 컨쥬게이트 염기로부터의 특정 양성자에 대한 산 해리 상수 (Ka)의 음성 로그이다.

[0024] 예를 들어, 아스파르트산 및 글루탐산과 같은 산성 잔기는 대략 4.1의 pKa 값을 갖는 측쇄 카르복실산 기를 갖는다 (정확한 pKa 값은 온도, 이온 농도 및 이온화가능한 기의 미세환경에 의존할 수 있음). 따라서, 이들 측쇄는 7.4의 pH (종종 "생리학적 pH"로 지칭됨)에서 음전하를 나타낸다. 낮은 pH 값에서, 이들 측쇄는 양성자화되고, 그들의 전하를 잃을 것이다.

[0025] 반대로, 리신 및 아르기닌과 같은 염기성 잔기는 대략 10 내지 12의 pKa 값을 갖는 질소-함유 측쇄 기를 갖는다. 따라서, 이들 측쇄는 7.4의 pH에서 양전하를 나타낸다. 이들 측쇄는 높은 pH 값에서 탈-양성자화되고, 그들의 전하를 잃을 것이다.

[0026] 따라서, 단백질 분자의 전체 (순) 전하는 단백질에 존재하는 산성 및 염기성 잔기의 수 (및 그들의 표면 노출의 정도) 및 주위의 pH에 의존한다. 주위의 pH를 변화시키는 것은 단백질 상의 전체 전하를 변화시킨다. 따라서, 모든 단백질에 대해, 양전하 및 음전하의 수가 동일하고, 단백질이 전체 순 전하를 나타내지 않는 주어진 pH가 있다. 이 점은 등전점 (pI)으로 공지되어 있다. 등전점은 통상의 기술자에게 익숙할 것인 단백질 생화학의 표준 개념이다.

[0027] 따라서, 등전점 (pI)은 단백질이 0의 순 전하를 나타내는 pH 값으로 정의된다. pI의 증가는 단백질이 0의 순 전하를 나타내는 데 보다 높은 pH 값이 요구됨을 의미한다. 따라서, pI의 증가는 주어진 pH에서 단백질의 순 양전하의 증가를 나타낸다. 반대로, pI의 감소는 단백질이 0의 순 전하를 나타내는 데 보다 낮은 pH 값이 요구됨을 의미한다. 따라서, pI의 감소는 주어진 pH에서 단백질의 순 양전하의 감소를 나타낸다.

[0028] 단백질의 pI의 측정 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 통상의 기술자에게 익숙할 것이다. 예를 들어, 단백질의 pI는 단백질에 존재하는 각각의 아미노산의 평균 pKa 값으로부터 계산될 수 있다. 대안적으로, 단백질의 pI는 등전 집중의 기술을 사용하여 실험적으로 측정될 수 있다. 이 기술은 단백질을 그들의 pI에 따라 분리하는 전기영동을 사용한다. 등전 집중은 전형적으로 고정된 pH 구배를 갖는 겔을 사용하여 수행된다. 전기장이 인가될 경우, 단백질은 이것이 0의 순 전하를 갖는 pH에 도달할 때까지 pH 구배를 통해 이동하며, 이 점이 단백질의 pI이다.

[0029] 단백질의 pI는 그의 표면 상에 나타난 염기성 및/또는 산성 기의 수를 변화시킴으로써 증가 또는 감소될 수 있다. 이는 단백질의 하나 이상의 아미노산을 변형시킴으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, pI의 증가는 산성 잔기의 수를 감소시킴으로써, 또는 염기성 잔기의 수를 증가시킴으로써 제공될 수 있다. 이러한 아미노산 변형은 하기에 보다 상세하게 논의된다.

[0030] 천연 (비변형된) 클로스트리디움 독소는 대략 5 내지 6의 pI를 갖는다. 따라서, 7.4의 pH에서, 천연 보툴리눔 독소는 음의 순 전하를 갖는다. 예를 들어, BoNT/A의 pI는 6.4이고, BoNT/A 분자는 pH 7.4에서 -8의 순 전하를 갖는다. 이들 pI 값은 상기 기재된 바와 같이 계산된다.

표 1

클로스트리디움 독소	pI
BoNT/A	6.4
BoNT/B	5.3
BoNT/C_1	5.5
BoNT/D	5.5
BoNT/E	6.0
BoNT/F	5.6
BoNT/G	5.2
TeNT	5.8

[0031]

[0032] 상기 기재된 바와 같이, 한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하며, 상기 적어도 하나의 아미노산 변형은 조작된 클로스트리디움 독소의 등전점 (pI)을 상기 적어도 하나의 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 클로스트리디움 독소의 pI보다 적어도 0.2 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다.

[0033] 따라서, 본 발명의 내용에서, 조작된 BoNT/A 클로스트리디움 독소의 내용에서 0.2 단위의 pI의 증가는 6.4 내지 6.6의 pI의 증가일 것이다.

[0034] 상기 기재된 바와 같이, 한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하며, 상기 적어도 하나의 아미노산 변형은 조작된 클로스트리디움 독소의 등전점 (pI)을 상기 적어도 하나의 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 클로스트리디움 독소의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다.

[0035] 따라서, 본 발명의 내용에서, 조작된 BoNT/A 클로스트리디움 독소의 내용에서 1 단위의 pI의 증가는 6.4 내지 7.4의 pI의 증가일 것이다.

[0036] 한 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산 변형은 조작된 클로스트리디움 독소의 등전점 (pI)을 상기 적어도 하나의 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 클로스트리디움 독소의 pI보다 적어도 2 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다.

[0037] 한 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산 변형은 조작된 클로스트리디움 독소의 등전점 (pI)을 상기 적어도 하나의 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 클로스트리디움 독소의 pI보다 2 내지 5 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다.

[0038] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소는 적어도 6 (예를 들어, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8 또는 적어도 9)의 pI를 갖는다.

[0039] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소는 적어도 7의 pI를 갖는다.

[0040] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소는 6 내지 10의 pI (예를 들어 7 내지 9의 pI, 또는 8 내지 9의 pI)를 갖는다.

[0041] 상기 논의된 바와 같이, 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 또한 증가된 효능 및/또는 작용 기간을 제공하는 증가된 조직 체류 특성을 가지며, 공지된 클로스트리디움 독소 치료제에 비해 감소된 투여량 (또는 임의의 추가의 효과 없는 증가된 투여량)이 사용되는 것을 허용할 수 있다. (치료 지수의 증가를 나타내는) 이들 유리한 특성이 정의될 수 있는 한 가지 방식은 조작된 클로스트리디움 독소의 안전성 비율 (Safety Ratio)의 관점이다. 이와 관련하여, (투여 부위로부터의 독소의 확산에 의해 유발되는) 클로스트리디움 독소의 바람직하지 않은 효과는 관련 동물 모델 (예를 들어 체중의 감소가 투여 7일 내에 검출되는 마우스)에서 퍼센트 체중 감소를 측정함으로써 실험적으로 평가될 수 있다. 반대로, 클로스트리디움 독소의 바람직한 온-표적 (on-target) 효과는 근육 마비의 측정인 발가락 외전 점수 (Digital Abduction Score; DAS) 어세이에 의해 실험적으로 평가될 수 있다. DAS 어세이는 젤라틴 인산염 완충액에서 제제화된 클로스트리디움 독소 20 μl을 마우스 장딴지근/가자미근 복합체 내로 주사한 후, 아오키 (Aoki)의 방법 (Aoki KR, Toxicon 39: 1815-1820; 2001)을 사용하여 발가락 외전 점수를 평가함으로써 수행될 수 있다. DAS 어세이에서, 마우스가 그의 뒷다리를 연장하고, 그의 뒷발가락을 외전시키는 특징적인 경악 반응을 유발하기 위해, 마우스를 꼬리로 간략하게 매단다. 클로스트리디움 독소 주사 후, 발가락 외전의 변화 정도를 5-점 스케일로 점수화한다 (0=정상 내지 4=발가락 외전 및 다리 신전의 최대 감소).

[0042] 그 후, 클로스트리디움 독소의 안전성 비율은 체중의 10% 하강에 요구되는 독소의 양 (마우스에서 투여 후 첫 번째 7일 내의 피크 효과에서 측정됨)과 2의 DAS 점수에 요구되는 독소의 양 사이의 비율로서 표현될 수 있다. 따라서, 높은 안전성 비율 점수가 바람직하며, 이는 바람직하지 않은 오프-표적 (off-target) 효과를 거의 갖지 않고 표적 근육을 효과적으로 마비시킬 수 있는 독소를 나타낸다. 본 발명의 조작된 독소는 동등한 비변형된 (천연) 보툴리눔 독소의 안전성 비율보다 높은 안전성 비율을 갖는다.

[0043] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 적어도 8 (예를 들어, 적어도 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50)의 안전성 비율을 가지며, 여기서 안전성 비율은 -10% 체중 변화에 요구되는 독소의 용량 (pg/마우스)을 DAS ED_{50} (pg/마우스) [ED_{50} = 2의 DAS 점수를 생성하는 데 요구되는 용량)으로

나눈 것으로서 계산된다.

[0044] 한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 적어도 10의 안전성 비율을 갖는다. 한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 적어도 15의 안전성 비율을 갖는다.

[0045] 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함한다. 상기 적어도 하나의 아미노산 변형은 상기 논의된 바와 같이 클로스트리디움 독소의 pI를 증가시킨다. 본 발명의 내용에서, 아미노산 변형은 클로스트리디움 독소의 아미노산 서열의 변형이다. 이러한 변형은 서열 중의 하나의 아미노산을 또다른 것으로 대체함으로써 (즉, 치환), 새로운 아미노산을 서열 내로 삽입함으로써, 또는 서열의 아미노산을 결실시킴으로써 수행될 수 있다. 단백질에서 아미노산 서열 내로 혼입된 아미노산은 또한 아미노산 잔기로 지칭된다.

[0046] 단백질에서 발견되는 20개의 표준 아미노산은 하기와 같다:

표 2

아미노산			측쇄
아스파르트산	Asp	D	하전됨 (산성)
글루탐산	Glu	E	하전됨 (산성)
아르기닌	Arg	R	하전됨 (염기성)
리신	Lys	K	하전됨 (염기성)
히스티딘	His	H	비하전됨 (극성)
아스파라긴	Asn	N	비하전됨 (극성)
글루타민	Gln	Q	비하전됨 (극성)
세린	Ser	S	비하전됨 (극성)
트레오닌	Thr	T	비하전됨 (극성)
티로신	Tyr	Y	비하전됨 (극성)
메티오닌	Met	M	비하전됨 (극성)
트립토판	Trp	W	비하전됨 (극성)
시스테인	Cys	C	비하전됨 (극성)
알라닌	Ala	A	비하전됨 (소수성)
글리신	Gly	G	비하전됨 (소수성)
발린	Val	V	비하전됨 (소수성)
류신	Leu	L	비하전됨 (소수성)
이소류신	Ile	I	비하전됨 (소수성)
프롤린	Pro	P	비하전됨 (소수성)
페닐알라닌	Phe	F	비하전됨 (소수성)

[0047]

[0048] 하기 아미노산은 하전된 아미노산으로 간주된다: 아스파르트산 (음성), 글루탐산 (음성), 아르기닌 (양성) 및 리신 (양성).

[0049] 7.4의 pH에서, 아스파르트산 (pKa 3.1) 및 글루탐산 (pKa 4.1)의 측쇄는 음전하를 갖는 반면, 아르기닌 (pKa 12.5) 및 리신 (pKa 10.8)의 측쇄는 양전하를 갖는다. 아스파르트산 및 글루탐산은 산성 아미노산 잔기로 지칭된다. 아르기닌 및 리신은 염기성 아미노산 잔기로 지칭된다.

[0050] 하기 아미노산은 비하전된, 극성 (이들이 수소 결합에 참여할 수 있음을 의미함) 아미노산으로 간주된다: 아스파라긴, 글루타민, 히스티딘, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 메티오닌, 트립토판.

[0051] 하기 아미노산은 비하전된, 소수성 아미노산으로 간주된다: 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 페닐알라닌, 프롤린

및 글리신.

[0052] 클로스트리디움 독소의 pI의 증가는 클로스트리디움 독소에서 양전하 대 음전하의 비율을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 변형을 클로스트리디움 독소 내로 도입함으로써 수행될 수 있다.

[0053] 한 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 변형은 아미노산 치환, 아미노산 삽입 및 아미노산 결실로부터 선택된다.

[0054] 아미노산 치환에서, 클로스트리디움 독소 아미노산 서열의 일부를 형성하는 아미노산 잔기는 상이한 아미노산 잔기로 대체된다. 대체 아미노산 잔기는 상기 기재된 바와 같은 20개의 표준 아미노산 잔기 중 하나일 수 있다.

[0055] 대안적으로, 아미노산 치환에서 대체 아미노산은 비-표준 아미노산 (상기 기재된 20개의 표준 세트의 일부가 아닌 아미노산)일 수 있다. 예를 들어, 대체 아미노산은 염기성 비-표준 아미노산, 예를 들어 L-오르니틴, L-2-아미노-3-구아니디노프로피온산, 또는 리신, 아르기닌 및 오르니틴의 D-이성질체일 수 있다. 비-표준 아미노산의 단백질 내로의 도입 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 이. 콜라이 (*E. coli*) 영양요구성 발현 숙주를 사용한 재조합 단백질 합성을 들 수 있다.

[0056] 아미노산 삽입에서, 추가의 아미노산 잔기 (정상적으로 존재하지 않는 것)는 클로스트리디움 독소 아미노산 서열 내로 혼입되어, 상기 서열에서의 아미노산 잔기의 총 수를 증가시킨다. 아미노산 결실에서, 아미노산 잔기는 클로스트리디움 독소 아미노산 서열로부터 제거되어, 상기 서열에서의 아미노산 잔기의 총 수를 감소시킨다.

[0057] 아미노산 잔기의 치환, 삽입 또는 결실에 의한 단백질의 변형 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 아미노산 변형은 클로스트리디움 독소를 코딩하는 DNA 서열의 변형에 의해 도입될 수 있다. 이는 표준 분자 클로닝 기술을 사용하여, 예를 들어 목적하는 아미노산(들)을 코딩하는 DNA (올리고뉴클레오티드)의 짧은 가닥을 폴리머라제 효소를 사용하여 원래 코딩 서열을 대체하는 데 사용하는 부위-지정 돌연변이유발법에 의해, 또는 다양한 효소 (예를 들어, 리가제 및 제한 엔도뉴클레아제)를 갖는 유전자의 일부를 삽입/결실시킴으로써 달성될 수 있다. 대안적으로, 변형된 유전자 서열은 화학적으로 합성될 수 있다.

[0058] 한 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 변형은 산성 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환; 산성 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환; 비하전된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환; 염기성 아미노산 잔기의 삽입; 및 산성 아미노산 잔기의 결실로부터 선택된다.

[0059] 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 변형은 유리하게는 클로스트리디움 독소 중의 아미노산 잔기의 동일한 수를 유지하는 치환이다. 한 실시양태에서, 치환은 산성 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환, 산성 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환, 및 비하전된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 염기성 아미노산 잔기는 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기이다. 한 실시양태에서, 염기성 아미노산 잔기는 리신 잔기이다. 한 실시양태에서, 염기성 아미노산 잔기는 아르기닌 잔기이다. 한 실시양태에서, 치환이 산성 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환인 경우, 산성 아미노산 잔기는 그의 상응하는 비하전된 아미드 아미노산 잔기로 대체된다 (즉, 아스파르트산은 아스파라긴으로 대체되고, 글루탐산은 글루타민으로 대체됨).

[0060] 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 하나 초과의 아미노산 변형을 포함할 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소 (상기 기재된 바와 같음)는 1 내지 80개의 아미노산 변형 (예를 들어, 1 내지 70개, 1 내지 60개, 1 내지 50개, 4 내지 40개, 4 내지 30개, 5 내지 40개, 5 내지 30개, 또는 10 내지 25개의 아미노산 변형)을 포함한다. 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소 (상기 기재된 바와 같음)는 4 내지 40개의 아미노산 변형을 포함한다. 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 또는 적어도 10개의 아미노산 변형을 포함한다. 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소는 적어도 4개의 아미노산 변형 (예를 들어, 적어도 4개의 아미노산 치환)을 포함한다. 각각의 상기 아미노산 변형은 상기 기재된 바와 같은 아미노산 변형이다. 따라서, 각각의 상기 아미노산 변형은 (상기 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 클로스트리디움 독소의 pI에 비해) 조작된 클로스트리디움 독소의 pI의 증가에 기여한다.

[0061] 임의의 클로스트리디움 독소 아미노산 (즉, 아미노산 잔기)은 상기 변형의 결과가 클로스트리디움 독소 pI의 증가인 한 (상기 기재된 바와 같음), 상기 기재된 바와 같이 변형될 수 있다. 그러나, 본 발명자들은 변형에 특히 적합한 표적인 클로스트리디움 독소 아미노산의 하위집합을 확인하였다.

[0062] 바람직한 표적 아미노산은 특정 품질을 가질 수 있다. 예를 들어, 바람직한 표적 아미노산은 (i) 표면 노출된 아미노산; (ii) 클로스트리디움 독소 단백질 2차 구조의 외부에 위치; (iii) 단백질 기능에 비-필수적인 클로스트리디움 독소 단백질 영역에 위치; (iv) 클로스트리디움 독소 유형, 하위형 또는 혈청형 사이에 그의 동일성이 보존되지 않는 아미노산; (iv) 그의 변형이 예상된 유비퀴틴화 부위를 생성하지 않는 아미노산; 또는 (v) 상기의 임의의 조합일 수 있다.

[0063] 상기 논의된 바와 같이, 클로스트리디움 독소는 2개의 폴리펩티드 쇄, 즉 대략 100 kDa의 분자 질량을 갖는 중쇄 (H-쇄), 및 대략 50 kDa의 분자 질량을 갖는 경쇄 (L-쇄)로부터 형성된다. H-쇄는 C-말단 표적화 성분 (수용체 결합 도메인 또는 H_C 도메인) 및 N-말단 전위 성분 (H_N 도메인)을 포함한다.

[0064] 한 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 변형 (상기 기재된 바와 같음)은 클로스트리디움 독소 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)에 위치한다.

[0065] 경쇄 참조 서열의 예로는

[0066] 보툴리눔 유형 A 신경독소: 아미노산 잔기 1-448

[0067] 보툴리눔 유형 B 신경독소: 아미노산 잔기 1-440

[0068] 보툴리눔 유형 C_1 신경독소: 아미노산 잔기 1-441

[0069] 보툴리눔 유형 D 신경독소: 아미노산 잔기 1-445

[0070] 보툴리눔 유형 E 신경독소: 아미노산 잔기 1-422

[0071] 보툴리눔 유형 F 신경독소: 아미노산 잔기 1-439

[0072] 보툴리눔 유형 G 신경독소: 아미노산 잔기 1-441

[0073] 테타누스 신경독소: 아미노산 잔기 1-457

[0074] 을 들 수 있다.

[0075] 상기-확인된 참조 서열은 가이드로서 간주되어야 하며, 하위-혈청형에 따라 약간의 변형이 일어날 수 있다. 예를 들어, US 2007/0166332 (그 전문이 본원에 참고로 도입됨)는 약간 상이한 클로스트리디움 서열:

[0076] 보툴리눔 유형 A 신경독소: 아미노산 잔기 M1-K448

[0077] 보툴리눔 유형 B 신경독소: 아미노산 잔기 M1-K441

[0078] 보툴리눔 유형 C_1 신경독소: 아미노산 잔기 M1-K449

[0079] 보툴리눔 유형 D 신경독소: 아미노산 잔기 M1-R445

[0080] 보툴리눔 유형 E 신경독소: 아미노산 잔기 M1-R422

[0081] 보툴리눔 유형 F 신경독소: 아미노산 잔기 M1-K439

[0082] 보툴리눔 유형 G 신경독소: 아미노산 잔기 M1-K446

[0083] 테타누스 신경독소: 아미노산 잔기 M1-A457

[0084] 을 인용한다.

[0085] 클로스트리디움 독소 H_C 도메인 참조 서열의 예로는

[0086] BoNT/A - N872-L1296

[0087] BoNT/B - E859-E1291

[0088] BoNT/C_1 - N867-E1291

[0089] BoNT/D - S863-E1276

[0090] BoNT/E - R846-K1252

[0091] BoNT/F - K865-E1274

[0092] BoNT/G - N864-E1297

[0093] TeNT - I880-D1315

[0094] 를 들 수 있다.

[0095] 클로스트리디움 독소 (예컨대 BoNT)의 H_C 도메인은 H_{CC} 및 H_{CN} 도메인으로 지칭되는 2개의 분리된 구조 특징을 포함한다. 수용체 결합에 관련된 아미노산 잔기는 H_{CC} 도메인에 주로 위치하는 것으로 믿어진다.

[0096] 한 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 변형 (상기 기재된 바와 같음)이 클로스트리디움 독소 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)에 위치하는 경우, 상기 적어도 하나의 아미노산 변형은 클로스트리디움 독소 H_{CN} 도메인 (또한 전위 용이화 도메인으로 지칭됨)에 위치한다. 한 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 변형 (상기 기재된 바와 같음)이 클로스트리디움 독소 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)에 위치하는 경우, 상기 적어도 하나의 아미노산 변형은 클로스트리디움 독소 H_{CC} 도메인에 위치한다.

[0097] 클로스트리디움 독소 H_{CN} 도메인 참조 서열의 예로는

[0098] 보툴리눔 유형 A 신경독소: 아미노산 잔기 872-1110

[0099] 보툴리눔 유형 B 신경독소: 아미노산 잔기 859-1097

[0100] 보툴리눔 유형 C_1 신경독소: 아미노산 잔기 867-1111

[0101] 보툴리눔 유형 D 신경독소: 아미노산 잔기 863-1098

[0102] 보툴리눔 유형 E 신경독소: 아미노산 잔기 846-1085

[0103] 보툴리눔 유형 F 신경독소: 아미노산 잔기 865-1105

[0104] 보툴리눔 유형 G 신경독소: 아미노산 잔기 864-1105

[0105] 테타누스 신경독소: 아미노산 잔기 880-1127

[0106] 을 들 수 있다.

[0107] 상기 서열 위치는 혈청형/하위형에 따라 약간 다를 수 있으며, 적합한 (참조) 클로스트리디움 독소 H_{CN} 도메인의 추가의 예로는

[0108] 보툴리눔 유형 A 신경독소: 아미노산 잔기 874-1110

[0109] 보툴리눔 유형 B 신경독소: 아미노산 잔기 861-1097

[0110] 보툴리눔 유형 C_1 신경독소: 아미노산 잔기 869-1111

[0111] 보툴리눔 유형 D 신경독소: 아미노산 잔기 865-1098

[0112] 보툴리눔 유형 E 신경독소: 아미노산 잔기 848-1085

[0113] 보툴리눔 유형 F 신경독소: 아미노산 잔기 867-1105

[0114] 보툴리눔 유형 G 신경독소: 아미노산 잔기 866-1105

[0115] 테타누스 신경독소: 아미노산 잔기 882-1127

[0116] 을 들 수 있다.

[0117] 한 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 변형 (상기 기재된 바와 같음)은 표면 노출된 아미노산 잔기의 변형이다. 표면 노출된 아미노산 잔기는 폴딩된 단백질의 외부에 존재하며, 따라서 폴딩된 단백질의 내부에 위치하는 그러한 아미노산 잔기에 비해, 주위의 용매에 접근가능한 것들이다. 아미노산 잔기의 표면 노출 및 그에 따른 주위의 용매에 대한 그의 노출의 정도는 폴딩된 단백질 내의 그의 위치, 및 또한 단백질에 의해 채택된 형태에 의존한다. 따라서, 높은 정도의 표면 노출을 갖는 아미노산 잔기의 변형은 낮은 정도의 표면 노출을 갖는

아미노산 잔기의 변형보다 단백질의 등전점에 보다 큰 효과를 갖는다. 아미노산 잔기의 표면 노출의 정도를 측정하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 컴퓨터 프로그램 AreaIMol (컴퓨터 프로그램의 CCP4 스위트의 일부)을 사용하여 주어진 단백질 중의 아미노산 잔기의 표면 노출의 정도를 계산할 수 있다. 표면 노출된 아미노산 잔기는 또한 단백질 결정 구조의 육안 조사 (X-선 결정법에 의해 제공된 바와 같음)에 의해 확인될 수 있다. 한 실시양태에서, 표면 노출된 아미노산 잔기는 적어도 40의 합계 AreaIMol 값을 갖는다.

[0118] 한 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 변형은 아스파르트산 잔기, 글루탐산 잔기, 히스티딘 잔기, 세린 잔기, 트레오닌 잔기, 아스파라긴 잔기, 글루타민 잔기, 시스테인 잔기 또는 티로신 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기의 변형을 포함한다. 본 발명자들은 이 군으로부터의 아미노산 잔기 (음으로 하전된 잔기 또는 극성 잔기)가 본 발명에 따른 변형에 특히 적합한 표적을 나타냄을 확인하였다. 임의의 한 이론에 구애되기를 원하는 것은 아니지만, 본 발명자들은 이 군 중의 아미노산 잔기가 열거되지 않은 소수성 잔기보다 더 큰 빈도로 클로스트리디움 독소의 표면에 나타나는 것으로 믿고 있다.

[0119] 한 실시양태에서, 아미노산 변형이 아스파르트산 잔기, 글루탐산 잔기, 히스티딘 잔기, 세린 잔기, 트레오닌 잔기, 아스파라긴 잔기, 글루타민 잔기, 시스테인 잔기 또는 티로신 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기의 변형 (상기 기재된 바와 같음)을 포함하는 경우, 아미노산 잔기는 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로 치환된다. 따라서, 한 실시양태에서, 음으로 하전된 잔기 또는 극성 잔기는 양으로 하전된 잔기로 치환되어, 양전하 대 음전하의 비율을 증가시키고, 클로스트리디움 독소의 pI를 증가시킨다.

[0120] 한 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 변형 (상기 기재된 바와 같음)은 아스파라긴 아미노산 잔기 또는 글루타민 아미노산 잔기 (둘 다 비하전된, 극성 잔기)의 변형을 포함한다. 한 실시양태에서, 아스파라긴 또는 글루타민 아미노산 잔기는 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기 (둘 다 양으로 하전된 잔기)로 치환된다. 한 실시양태에서, 아스파라긴 또는 글루타민 아미노산 잔기는 리신 잔기로 치환된다. 한 실시양태에서, 아스파라긴 또는 글루타민 아미노산 잔기는 아르기닌 잔기로 치환된다.

[0121] 아스파라긴 및 글루타민 잔기는 이들이 극성이고, 다른 잔기와 단지 약한 쌍극자 상호작용을 형성하고, 전형적인 클로스트리디움 독소 (예컨대 BoNT/A)의 14%를 구성하기 때문에, 변형에 유리하게 적합하다.

[0122] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소는 BoNT/A이다. 참조 BoNT/A 서열은 UniProtKB 수탁 번호 P10845를 갖는다.

[0123] 본 발명자들은 BoNT/A 클로스트리디움 독소에서 아미노산 변형을 위한 바람직한 표적을 나타내는 특정 아미노산을 확인하였다.

[0124] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086 및 GLN 1229로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 또는 25개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.2 (예를 들어, 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0125] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086 및 GLN 1229로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 또는 25개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.5 (예를 들어, 적어도 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0126] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN

1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086 및 GLN 1229로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 또는 25개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0127] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083 및 ASP 1086으로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 또는 20개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0128] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274 및 THR 1277로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 또는 30개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.2 (예를 들어, 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0129] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274 및 THR 1277로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 또는 30개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.5 (예를 들어, 적어도 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0130] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274 및 THR 1277로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 또는 30개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0131] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 930, SER 955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052 또는 GLN 1229로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을

상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.2 (예를 들어, 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0132] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 930, SER 955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052 또는 GLN 1229로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.5 (예를 들어, 적어도 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0133] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 930, SER 955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052 또는 GLN 1229로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0134] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 하기 7개의 아미노산: ASN 886, ASN 930, SER 955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052 또는 GLN 1229의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.2 (예를 들어, 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0135] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 하기 7개의 아미노산: ASN 886, ASN 930, SER 955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052 또는 GLN 1229의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.5 (예를 들어, 적어도 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0136] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 하기 7개의 아미노산: ASN 886, ASN 930, SER 955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052 또는 GLN 1229의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0137] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052 또는 GLN 1229로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.2 (예를 들어, 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0138] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 930, ASN 954, SER

955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052 또는 GLN 1229로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.5 (예를 들어, 적어도 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0139] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052 또는 GLN 1229로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0140] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 하기 7개의 아미노산: ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052 또는 GLN 1229의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.2 (예를 들어, 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0141] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 하기 7개의 아미노산: ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052 또는 GLN 1229의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.5 (예를 들어, 적어도 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0142] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 하기 7개의 아미노산: ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052 또는 GLN 1229의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0143] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 930, SER 955, GLN 991, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1052 또는 GLN 1229로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.2 (예를 들어, 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0144] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 930, SER 955, GLN 991, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1052 또는 GLN 1229로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.5 (예를 들어, 적어도 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0145] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 930, SER 955, GLN 991, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1052 또는 GLN 1229로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0146] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 하기 7개의 아미노산: ASN 930, SER 955, GLN 991, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1052 또는 GLN 1229의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.2 (예를 들어, 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0147] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 하기 7개의 아미노산: ASN 930, SER 955, GLN 991, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1052 또는 GLN 1229의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.5 (예를 들어, 적어도 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0148] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 하기 7개의 아미노산: ASN 930, SER 955, GLN 991, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1052 또는 GLN 1229의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0149] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, THR 1277로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.2 (예를 들어, 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0150] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, THR 1277로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.5 (예를 들어, 적어도 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0151] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, THR 1277로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치

환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0152] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 하기 8개의 아미노산: ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, THR 1277의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.2 (예를 들어, 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0153] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 하기 8개의 아미노산: ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, THR 1277의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 0.5 (예를 들어, 적어도 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0154] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 하기 8개의 아미노산: ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, THR 1277의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0155] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 930, SER 955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052, HIS 1064 및 GLN 1229로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 모든 7개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0156] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052, HIS 1064, ASN 1080, ASN 1147 및 GLN 1229로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 모든 11개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0157] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/A인 경우, 상기 조작된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1052, HIS 1064, ASN 1080, ASN 1147 및 GLN 1229로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 모든 13개)의 아미노산(들)의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/A의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/A의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0158] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소는 BoNT/B이다. 참조 BoNT/B 서열은 UniProtKB 수탁 번호 P10844를 갖는다.

[0159] 본 발명자들은 BoNT/B 클로스트리디움 독소에서 아미노산 변형을 위한 바람직한 표적을 나타내는 특정 아미노산

을 확인하였다.

[0160] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/B인 경우, 상기 조작된 BoNT/B는 ASN 873, ASN 874, GLU 892, ASP 895, ASN 906, ASP 940, ASN 948, GLU 949, ASN 958, ASN 959, ASN 979, ASN 990, GLU 993, ASP 994, GLU 997, ASN 1012, ASN 1019, ASP 1030, ASP 1047, ASP 1049, GLU 1065, GLU 1072, GLN 1176, GLU 1189, GLU 1252 및 ASN 1273으로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 또는 25개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/B의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/B의 pI보다 적어도 0.2 (예를 들어, 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0161] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/B인 경우, 상기 조작된 BoNT/B는 ASN 873, ASN 874, GLU 892, ASP 895, ASN 906, ASP 940, ASN 948, GLU 949, ASN 958, ASN 959, ASN 979, ASN 990, GLU 993, ASP 994, GLU 997, ASN 1012, ASN 1019, ASP 1030, ASP 1047, ASP 1049, GLU 1065, GLU 1072, GLN 1176, GLU 1189, GLU 1252 및 ASN 1273으로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 또는 25개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/B의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/B의 pI보다 적어도 0.5 (예를 들어, 적어도 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0162] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/B인 경우, 상기 조작된 BoNT/B는 ASN 873, ASN 874, GLU 892, ASP 895, ASN 906, ASP 940, ASN 948, GLU 949, ASN 958, ASN 959, ASN 979, ASN 990, GLU 993, ASP 994, GLU 997, ASN 1012, ASN 1019, ASP 1030, ASP 1047, ASP 1049, GLU 1065, GLU 1072, GLN 1176, GLU 1189, GLU 1252 및 ASN 1273으로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 또는 25개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/B의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/B의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0163] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소는 BoNT/C_1이다. 참조 BoNT/C_1 서열은 UniProtKB 수탁 번호 P18640을 갖는다.

[0164] 본 발명자들은 BoNT/C_1 클로스트리디움 독소에서 아미노산 변형을 위한 바람직한 표적을 나타내는 특정 아미노산을 확인하였다.

[0165] 따라서, 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/C_1인 경우, 상기 조작된 BoNT/C_1은 ASN 881, ASP 898, GLU 916, GLU 927, ASN 952, ASN 964, ASN 965, ASN 984, GLU 985, ASP 986, ASP 996, ASN 1000, GLU 1036, ASN 1041, ASP 1062, ASP 1064, GLU 1079 및 ASP 1081로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10 또는 15개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/C_1의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/C_1의 pI보다 적어도 0.2 (예를 들어, 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0166] 따라서, 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/C_1인 경우, 상기 조작된 BoNT/C_1은 ASN 881, ASP 898, GLU 916, GLU 927, ASN 952, ASN 964, ASN 965, ASN 984, GLU 985, ASP 986, ASP 996, ASN 1000, GLU 1036, ASN 1041, ASP 1062, ASP 1064, GLU 1079 및 ASP 1081로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10 또는 15개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/C_1의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/C_1의 pI보다 적어도 0.5 (예를 들어,

적어도 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0167] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/C_1인 경우, 상기 조작된 BoNT/C_1은 ASN 881, ASP 898, GLU 916, GLU 927, ASN 952, ASN 964, ASN 965, ASN 984, GLU 985, ASP 986, ASP 996, ASN 1000, GLU 1036, ASN 1041, ASP 1062, ASP 1064, GLU 1079 및 ASP 1081로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10 또는 15개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/C_1의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/C_1의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0168] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소는 BoNT/D이다. 참조 BoNT/D 서열은 UniProtKB 수탁 번호 P19321을 갖는다.

[0169] 본 발명자들은 BoNT/D 클로스트리디움 독소에서 아미노산 변형을 위한 바람직한 표적을 나타내는 특정 아미노산을 확인하였다.

[0170] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/D인 경우, 상기 조작된 BoNT/D는 ASN 877, ASP 893, ASN 894, ASN 898, ASN 920, ASN 945, ASN 948, GLU 957, GLN 958, ASN 959, ASN 968, ASN 979, GLU 1030, ASP 1031, ASP 1033, GLU 1047, GLU 1051, ASN 1052, GLU 1066 및 GLN 1122로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 또는 20개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/D의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/D의 pI보다 적어도 0.2 (예를 들어, 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0171] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/D인 경우, 상기 조작된 BoNT/D는 ASN 877, ASP 893, ASN 894, ASN 898, ASN 920, ASN 945, ASN 948, GLU 957, GLN 958, ASN 959, ASN 968, ASN 979, GLU 1030, ASP 1031, ASP 1033, GLU 1047, GLU 1051, ASN 1052, GLU 1066 및 GLN 1122로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 또는 20개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/D의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/D의 pI보다 적어도 0.5 (예를 들어, 적어도 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0172] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/D인 경우, 상기 조작된 BoNT/D는 ASN 877, ASP 893, ASN 894, ASN 898, ASN 920, ASN 945, ASN 948, GLU 957, GLN 958, ASN 959, ASN 968, ASN 979, GLU 1030, ASP 1031, ASP 1033, GLU 1047, GLU 1051, ASN 1052, GLU 1066 및 GLN 1122로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 또는 20개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/D의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/D의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0173] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소는 BoNT/E이다. 참조 BoNT/E 서열은 UniProtKB 수탁 번호 Q00496을 갖는다.

[0174] 본 발명자들은 BoNT/E 클로스트리디움 독소에서 아미노산 변형을 위한 바람직한 표적을 나타내는 특정 아미노산을 확인하였다.

[0175] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/E인 경우, 상기 조작된 BoNT/E는 ASN 859, ASP 860, ASN 892, ASP 893, ASP 904, ASP 909, ASN 928, ASN 932, ASN 934, ASN 935, GLU 936, ASP 945, ASN 946, ASN 947, ASN 966, ASN 976, ASN 979, ASN 981, ASP 985, GLN 1014, ASN 1019, ASN 1022, ASP 1027, ASN 1035 및 ASN 1140으로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 또는 25개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/E의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/E의 pI보다 적어도 0.2 (예를 들어, 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0176] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/E인 경우, 상기 조작된 BoNT/E는 ASN 859, ASP 860, ASN 892, ASP 893, ASP 904, ASP 909, ASN 928, ASN 932, ASN 934, ASN 935, GLU 936, ASP 945, ASN 946, ASN 947, ASN 966, ASN 976, ASN 979, ASN 981, ASP 985, GLN 1014, ASN 1019, ASN 1022, ASP 1027, ASN 1035 및 ASN 1140으로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 또는 25개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/E의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/E의 pI보다 적어도 0.5 (예를 들어, 적어도 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0177] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/E인 경우, 상기 조작된 BoNT/E는 ASN 859, ASP 860, ASN 892, ASP 893, ASP 904, ASP 909, ASN 928, ASN 932, ASN 934, ASN 935, GLU 936, ASP 945, ASN 946, ASN 947, ASN 966, ASN 976, ASN 979, ASN 981, ASP 985, GLN 1014, ASN 1019, ASN 1022, ASP 1027, ASN 1035 및 ASN 1140으로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 또는 25개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/E의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/E의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0178] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소는 BoNT/F이다. 참조 BoNT/F 서열은 UniProtKB 수탁 번호 YP_001390123을 갖는다.

[0179] 본 발명자들은 BoNT/F 클로스트리디움 독소에서 아미노산 변형을 위한 바람직한 표적을 나타내는 특정 아미노산을 확인하였다.

[0180] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/F인 경우, 상기 조작된 BoNT/F는 ASN 879, ASP 896, ASN 922, ASN 923, ASN 928, ASN 947, ASN 950, ASN 952, ASN 953, GLU 954, ASN 963, ASN 964, ASN 965, ASN 987, GLN 997, ASN 1037, ASP 1040, ASP 1045, ASN 1055 및 ASP 1056으로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 또는 20개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/F의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/F의 pI보다 적어도 0.2 (예를 들어, 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0181] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/F인 경우, 상기 조작된 BoNT/F는 ASN 879, ASP 896, ASN 922, ASN 923, ASN 928, ASN 947, ASN 950, ASN 952, ASN 953, GLU 954, ASN 963, ASN 964, ASN 965, ASN 987, GLN 997, ASN 1037, ASP 1040, ASP 1045, ASN 1055 및 ASP 1056으로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 또는 20개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/F의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/F의 pI보다 적어도 0.5 (예를 들어, 적어도 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔

기로의 치환을 포함한다.

[0182] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/F인 경우, 상기 조작된 BoNT/F는 ASN 879, ASP 896, ASN 922, ASN 923, ASN 928, ASN 947, ASN 950, ASN 952, ASN 953, GLU 954, ASN 963, ASN 964, ASN 965, ASN 987, GLN 997, ASN 1037, ASP 1040, ASP 1045, ASN 1055 및 ASP 1056으로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 또는 20개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/F의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/F의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0183] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소는 BoNT/G이다. 참조 BoNT/G 서열은 UniProtKB 수탁 번호 Q60393을 갖는다.

[0184] 본 발명자들은 BoNT/G 클로스트리디움 독소에서 아미노산 변형을 위한 바람직한 표적을 나타내는 특정 아미노산을 확인하였다.

[0185] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/G인 경우, 상기 조작된 BoNT/G는 ASP 900, ASN 909, ASN 910, GLU 912, ASN 913, ASN 945, ASN 947, GLU 956, ASN 965, ASP 966, ASN 986, ASN 1001, ASN 1038, ASP 1040, ASN 1046, ASP 1057, GLU 1073, ASN 1075 및 ASN 1090으로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10 또는 15개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/G의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/G의 pI보다 적어도 0.2 (예를 들어, 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0186] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/G인 경우, 상기 조작된 BoNT/G는 ASP 900, ASN 909, ASN 910, GLU 912, ASN 913, ASN 945, ASN 947, GLU 956, ASN 965, ASP 966, ASN 986, ASN 1001, ASN 1038, ASP 1040, ASN 1046, ASP 1057, GLU 1073, ASN 1075 및 ASN 1090으로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10 또는 15개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/G의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/G의 pI보다 적어도 0.5 (예를 들어, 적어도 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0187] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 BoNT/G인 경우, 상기 조작된 BoNT/G는 ASP 900, ASN 909, ASN 910, GLU 912, ASN 913, ASN 945, ASN 947, GLU 956, ASN 965, ASP 966, ASN 986, ASN 1001, ASN 1038, ASP 1040, ASN 1046, ASP 1057, GLU 1073, ASN 1075 및 ASN 1090으로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10 또는 15개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 BoNT/G의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 BoNT/G의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0188] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소는 TeNT이다. 참조 TeNT 서열은 UniProtKB 수탁 번호 P04958을 갖는다.

[0189] 본 발명자들은 TeNT 클로스트리디움 독소에서 아미노산 변형을 위한 바람직한 표적을 나타내는 특정 아미노산을 확인하였다.

[0190] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 TeNT인 경우, 상기 조작된 TeNT는 ASN 893, ASP 894, ASP 911, ASN 919, ASN 927, ASN 928, GLU 929, GLN 968, ASN 972, GLU 973, GLU 1010, ASP 1018, ASN 1079, ASN 1080, ASN 1081 및 ASN 1097로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10 또는 15개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 TeNT의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)

이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 TeNT의 pI보다 적어도 0.2 (예를 들어, 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0191] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 TeNT인 경우, 상기 조작된 TeNT는 ASN 893, ASP 894, ASP 911, ASN 919, ASN 927, ASN 928, GLU 929, GLN 968, ASN 972, GLU 973, GLU 1010, ASP 1018, ASN 1079, ASN 1080, ASN 1081 및 ASN 1097로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10 또는 15개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 TeNT의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 TeNT의 pI보다 적어도 0.5 (예를 들어, 적어도 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1) pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0192] 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소가 TeNT인 경우, 상기 조작된 TeNT는 ASN 893, ASP 894, ASP 911, ASN 919, ASN 927, ASN 928, GLU 929, GLN 968, ASN 972, GLU 973, GLU 1010, ASP 1018, ASN 1079, ASN 1080, ASN 1081 및 ASN 1097로부터 선택되는 적어도 하나 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10 또는 15개)의 아미노산의 변형을 포함하며; 상기 아미노산 변형(들)은 조작된 TeNT의 등전점 (pI)을 상기 아미노산 변형(들)이 없는 (그렇지 않다면) 동일한 TeNT의 pI보다 적어도 1 pI 단위만큼 더 높은 값으로 증가시킨다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 리신 잔기로의 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 변형은 아미노산의 아르기닌 잔기로의 치환을 포함한다.

[0193] 본 발명은 많은 여러가지 다양한 클로스트리디움 독소에 적용하기에 적합하다. 따라서, 본 발명의 내용에서, 용어 "클로스트리디움 독소"는 씨. 보툴리눔 (보툴리눔 신경독소 혈청형 A, B, C_1, D, E, F 및 G), 씨. 테타니 (테타누스 신경독소), 씨. 부티리쿰 (보툴리눔 신경독소 혈청형 E), 및 씨. 바라티이 (보툴리눔 신경독소 혈청형 F)에 의해 생성되는 독소, 뿐만 아니라 변형된 클로스트리디움 독소 또는 임의의 상기의 것으로부터 유래된 유도체를 포함한다. 용어 "클로스트리디움 독소"는 또한 보툴리눔 신경독소 혈청형 H를 포함한다.

[0194] 보툴리눔 신경독소 (BoNT)는 다수의 부속 단백질에 복합체화된 BoNT 그 자체로 이루어진 거대 단백질 복합체의 형태로 씨. 보툴리눔에 의해 생성된다. 현재 8개의 상이한 부류의 보툴리눔 신경독소, 즉 보툴리눔 신경독소 혈청형 A, B, C_1, D, E, F, G 및 H가 있으며, 이들 모두는 유사한 구조 및 작용 방식을 공유한다. 상이한 BoNT 혈청형은 특정 중화 항-혈청에 의한 불활성화를 기초로 구분될 수 있으며, 이러한 혈청형에 의한 분류는 아미노산 수준에서 퍼센트 서열 동일성과 상관된다. 주어진 혈청형의 BoNT 단백질은 아미노산 퍼센트 서열 동일성을 기초로 상이한 하위형으로 더 나누어진다.

[0195] BoNT는 위장관에서 흡수되고, 일반 순환으로 유입된 후, 콜린성 신경 말단의 시냅스전 막에 결합하고, 그들의 신경전달물질 아세틸콜린의 방출을 방지한다. BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F 및 BoNT/G는 시냅토브레빈/비히클-회합된 막 단백질 (VAMP)을 절단하고; BoNT/C_1, BoNT/A 및 BoNT/E는 25 kDa의 시냅토솜-회합된 단백질 (SNAP-25)을 절단하고; BoNT/C_1은 신탁신을 절단한다.

[0196] 테타누스 독소는 씨. 테타니에 의해 단일 혈청형으로 생성된다. 씨. 부티리쿰은 BoNT/E를 생성하는 반면, 씨. 바라티이는 BoNT/F를 생성한다.

[0197] 용어 "클로스트리디움 독소"는 또한 하기 기재된 것들을 포함하나 이에 제한되지 않는 변형된 클로스트리디움 독소 및 그의 유도체를 포함하는 것으로 의도된다. 변형된 클로스트리디움 독소 또는 유도체는 클로스트리디움 독소의 천연 (비변형된) 형태에 비해 변형된 1종 이상의 아미노산을 함유할 수 있거나, 클로스트리디움 독소의 천연 (비변형된) 형태에 존재하지 않는 1종 이상의 삽입된 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 변형된 클로스트리디움 독소는 천연 (비변형된) 클로스트리디움 독소 서열에 대해 하나 이상의 도메인에 변형된 아미노산 서열을 가질 수 있다. 이러한 변형은 독소의 기능적 측면, 예를 들어 생물학적 활성 또는 존속성을 변형시킬 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 조작된 변형된 클로스트리디움 독소, 또는 조작된 변형된 클로스트리디움 독소 유도체, 또는 조작된 클로스트리디움 독소 유도체이다.

[0198] 변형된 클로스트리디움 독소는 중쇄의 아미노산 서열에 하나 이상의 변형 (예컨대 변형된 H_C 도메인)을 가질 수

있으며, 상기 변형된 중쇄는 천연 (비변형된) 클로스트리디움 독소보다 높거나 낮은 친화도로 표적 신경 세포에 결합한다. 이러한 H_C 도메인의 변형은 H_C 도메인의 갱글리오시드 결합 부위 중의 또는 표적 신경 세포의 갱글리오시드 수용체 및/또는 단백질 수용체에 대한 결합을 변경하는 단백질 (SV2 또는 시냅토타그민) 결합 부위 중의 잔기를 변형시키는 것을 포함할 수 있다. 이러한 변형된 클로스트리디움 독소의 예는 WO 2006/027207 및 WO 2006/114308에 기재되어 있으며, 이들 둘 다는 그 전문이 본원에 참고로 도입된다.

[0199] 변형된 클로스트리디움 독소는 경쇄의 아미노산 서열에 하나 이상의 변형, 예를 들어 변형된 LC의 SNARE 단백질 특이성을 변경 또는 변형시킬 수 있는 기질 결합 또는 촉매 도메인 중의 변형을 가질 수 있다. 이러한 변형된 클로스트리디움 독소의 예는 WO 2010/120766 및 US 2011/0318385에 기재되어 있으며, 이들 둘 다는 그 전문이 본원에 참고로 도입된다.

[0200] 변형된 클로스트리디움 독소는 변형된 클로스트리디움 독소의 생물학적 활성 및/또는 생물학적 존속성을 증가 또는 감소시키는 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 변형된 클로스트리디움 독소는 류신- 또는 티로신-기재 모티프를 포함할 수 있으며, 상기 모티프는 변형된 클로스트리디움 독소의 생물학적 활성 및/또는 생물학적 존속성을 증가 또는 감소시킨다. 적합한 류신-기재 모티프로는 xDxxxLL, xExxxLL, xExxxIL 및 xExxxLM (여기서, x는 임의의 아미노산임)을 들 수 있다. 적합한 티로신-기재 모티프로는 Y-x-x-Hy (여기서, Hy는 소수성 아미노산임)를 들 수 있다. 류신- 및 티로신-기재 모티프를 포함하는 변형된 클로스트리디움 독소의 예는 WO 2002/08268에 기재되어 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참고로 도입된다.

[0201] 용어 "클로스트리디움 독소"는 하이브리드 및 키메라 클로스트리디움 독소를 포함하는 것으로 의도된다. 하이브리드 클로스트리디움 독소는 하나의 클로스트리디움 독소 또는 그의 하위형으로부터의 경쇄의 적어도 일부, 및 또다른 클로스트리디움 독소 또는 클로스트리디움 독소 하위형으로부터의 중쇄의 적어도 일부를 포함한다. 한 실시양태에서, 하이브리드 클로스트리디움 독소는 하나의 클로스트리디움 독소 하위형으로부터의 경쇄의 전체 경쇄 및 또다른 클로스트리디움 독소 하위형으로부터의 중쇄를 함유할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 키메라 클로스트리디움 독소는 하나의 클로스트리디움 독소 하위형의 중쇄의 일부 (예를 들어 결합 도메인)를 함유할 수 있으며, 중쇄의 또다른 부분은 또다른 클로스트리디움 독소 하위형으로부터의 것이다. 유사하게 또는 대안적으로, 치료 요소는 상이한 클로스트리디움 독소로부터의 경쇄 부분을 포함할 수 있다. 이러한 하이브리드 또는 키메라 클로스트리디움 독소는 예를 들어 주어진 클로스트리디움 독소 하위형에 면역학적으로 내성인 환자에게, 주어진 클로스트리디움 독소 중쇄 결합 도메인에 대한 수용체의 평균 농도 미만을 가질 수 있는 환자에게, 또는 막 또는 비히클 독소 기질 (예를 들어, SNAP-25, VAMP 및 신탁신)의 프로테아제-내성 변이체를 가질 수 있는 환자에게 이러한 클로스트리디움 독소의 치료적 이익을 전달하는 수단으로서 유용하다. 하이브리드 및 키메라 클로스트리디움 독소는 US 8,071,110에 기재되어 있으며, 이 공보는 그 전문이 본원에 참고로 도입된다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 조작된 하이브리드 클로스트리디움 독소, 또는 조작된 키메라 클로스트리디움 독소이다.

[0202] 용어 "클로스트리디움 독소"는 재-표적화된 클로스트리디움 독소를 포함하는 것으로 의도된다. 재-표적화된 클로스트리디움 독소에서, 클로스트리디움 독소는 표적화 모이어티 (Targeting Moiety; TM)으로서 공지된 외인성 리간드를 포함하도록 변형된다. TM은 목적하는 표적 세포에 대한 결합 특이성을 제공하도록 선택되며, 재-표적화 공정의 일부로서, 클로스트리디움 독소의 천연 결합 부분 (예를 들어 H_C 도메인 또는 H_{CC} 도메인)은 제거될 수 있다. 재-표적화 기술은 예를 들어 EP-B-0689459; WO 1994/021300; EP-B-0939818; US 6,461,617; US 7,192,596; WO 1998/007864; EP-B-0826051; US 5,989,545; US 6,395,513; US 6,962,703; WO 1996/033273; EP-B-0996468; US 7,052,702; WO 1999/017806; EP-B-1107794; US 6,632,440; WO 2000/010598; WO 2001/21213; WO 2006/059093; WO 2000/62814; WO 2000/04926; WO 1993/15766; WO 2000/61192; 및 WO 1999/58571에 기재되어 있으며; 이들 모두는 그 전문이 본원에 참고로 도입된다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 조작된 재-표적화된 클로스트리디움 독소이다.

[0203] 본 발명은 또한 비-천연 프로테아제 절단 부위를 갖는 클로스트리디움 독소를 포함한다. 이러한 클로스트리디움 독소에서, 천연 프로테아제 절단 부위 (또한 상기 기재된 바와 같이 활성화 부위로도 공지됨)는 그 클로스트리디움 독소에 천연이 아닌 프로테아제 절단 부위 (즉, 외인성 절단 부위)로 변형 또는 대체된다. 이러한 부위는 절단을 위한 외인성 프로테아제를 요구할 것이며, 이는 절단 사건의 시기 및 위치에 대한 개선된 제어를 허용한다. 클로스트리디움 독소에 채용될 수 있는 비-천연 프로테아제 절단 부위는

[0204] 엔테로키나제 (DDDDK↓)

[0205] 인자 Xa (IEGR↓/IDGR↓)

[0206] TEV (담배 식각 바이러스) (ENLYFQ↓G)

[0207] 트롬빈 (LVPR↓GS)

[0208] 프리시션 (LEVLFQ↓GP)

[0209] 을 포함한다.

[0210] 추가의 프로테아제 절단 부위는 비-세포독성 프로테아제에 의해, 예를 들어 클로스트리디움 신경독소의 경쇄에 의해 절단되는 인식 서열을 포함한다. 이들은 클로스트리디움 신경독소의 경쇄와 같은 비-세포독성 프로테아제에 의해 절단되는 SNARE (예를 들어 SNAP-25, 신탁신, VAMP) 단백질 인식 서열을 포함한다. 비-천연 프로테아제 절단 부위를 포함하는 클로스트리디움 독소는 US 7,132,259, EP 1206554-B2 및 US 2007/0166332에 기재되어 있으며, 이들 모두는 그 전문이 본원에 참고로 도입된다. 또한, 용어 프로테아제 절단 부위에 의해 포함되는 것은 자가-절단 서열인 인테인이다. 자가-스플라이싱 반응은 예를 들어 존재하는 환원제의 농도를 변화시킴으로써 제어가능하다.

[0211] 본 발명은 또한 "파괴적 절단 부위"를 포함하는 클로스트리디움 독소를 포함한다. 상기 클로스트리디움 독소에서, 비-천연 프로테아제 절단 부위는 상기 부위에서의 절단이 클로스트리디움 독소의 활성을 감소시키거나, 이를 불활성화시키도록 선택된 위치에서 클로스트리디움 독소 내로 혼입된다. 파괴적 프로테아제 절단 부위는 클로스트리디움 독소가 투여 후 비-표적 위치로 이동하는 사건에서, 국소적 프로테아제에 의한 절단에 감수성일 수 있다. 적합한 비-천연 프로테아제 절단 부위는 상기 기재된 것들을 포함한다. 파괴적 절단 부위를 포함하는 클로스트리디움 독소는 WO 2010/094905 및 WO 2002/044199에 기재되어 있으며, 이들 둘 다는 그 전문이 본원에 참고로 도입된다.

[0212] 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소, 특히 그의 경쇄 성분은 PEG화될 수 있다 - 이는 안정성, 예를 들어 경쇄 성분의 작용 기간을 증가시키는 것을 도울 수 있다. PEG화는 경쇄가 BoNT/A, B 또는 C_1 프로테아제를 포함하는 경우 특히 바람직하다. PEG화는 바람직하게는 경쇄 성분의 N-말단에의 PEG의 첨가를 포함한다. 예를 들어, 경쇄의 N-말단은 동일하거나 상이할 수 있는 1종 이상의 아미노산 (예를 들어 시스테인) 잔기로 연장될 수 있다. 1종 이상의 상기 아미노산 잔기는 그에 부착된 (예를 들어 공유 부착된) 그 자신의 PEG 분자를 가질 수 있다. 이 기술의 예는 WO2007/104567에 기재되어 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참고로 도입된다.

[0213] 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 천연 발생 클로스트리디움 독소 복합체에 존재하는 복합화 단백질이 없을 수 있다.

[0214] 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 또한 제한된 수의 비-표준 아미노산을 포함할 수 있다. 따라서, 20개의 표준 아미노산 외에, 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소의 아미노산 잔기는 비-표준 아미노산 (예컨대 4-히드록시프롤린, 6-N-메틸 리신, 2-아미노이소부티르산, 이소발린 및 α-메틸 세린)으로 치환될 수 있다. 클로스트리디움 폴리펩티드 아미노산 잔기는 제한된 수의 비-보존적 아미노산, 유전 암호에 의해 코딩되지 않는 아미노산, 및 비천연 아미노산으로 치환될 수 있다. 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 또한 비-천연 발생 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

[0215] 비-천연 발생 아미노산으로는 트랜스-3-메틸프롤린, 2,4-메타노-프롤린, 시스-4-히드록시프롤린, 트랜스-4-히드록시-프롤린, N-메틸글리신, 알로-트레오닌, 메틸-트레오닌, 히드록시-에틸시스테인, 히드록시에틸호모-시스테인, 니트로-글루타민, 호모글루타민, 피페콜산, tert-류신, 노르발린, 2-아자페닐알라닌, 3-아자페닐알라닌, 4-아자페닐알라닌 및 4-플루오로페닐알라닌을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 비-천연 발생 아미노산 잔기를 단백질 내로 혼입시키는 몇몇 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 넌센스 돌연변이가 화학적으로 아미노아실화된 서프레서 tRNA를 사용하여 억제되는 시험관내 시스템을 채용할 수 있다. 아미노산의 합성 및 tRNA의 아미노아실화 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 넌센스 돌연변이를 함유하는 플라스미드의 전사 및 번역은 이. 콜라이 S30 추출물 및 시판되는 효소 및 다른 시약을 포함하는 세포 무함유 시스템에서 수행된다. 단백질은 크로마토그래피에 의해 정제된다. 예를 들어, 문헌 [Robertson et al., J. Am. Chem. Soc. 113:2722. 1991]; [Ellman et al., Methods Enzymol. 202:301, 1991]; [Chung et al., Science 259:806-9, 1993]; 및 [Chung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10145-9, 1993]을 참조한다. 두번째 방법에서, 번역은 돌연변이화된 mRNA 및 화학적으로 아미노아실화된 서프레서 tRNA의 미세주입에 의해 크세노푸스 (Xenopus) 난모세포에서 수행된다 (Turcatti et al., J. Biol. Chem. 271:19991-8, 1996). 세번째 방법 내에

서, 이. 콜라이 세포를 대체되어야 할 천연 아미노산 (예를 들어, 페닐알라닌)의 부재 하에서 및 목적하는 비-천연 발생 아미노산(들) (예를 들어, 2-아자페닐알라닌, 3-아자페닐알라닌, 4-아자페닐알라닌 또는 4-플루오로페닐알라닌)의 존재 하에서 배양한다. 비-천연 발생 아미노산을 그의 천연 대응물 대신 폴리펩티드 내로 혼입시킨다. 문헌 [Koide et al., Biochem. 33:7470-6, 1994]을 참조한다.

[0216] 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 재조합 핵산 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 조작된 클로스트리디움 독소 (상기 기재된 바와 같음)는 재조합 조작된 클로스트리디움 독소이다.

[0217] 또다른 측면에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 조작된 클로스트리디움 독소를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 (예를 들어, DNA)을 제공한다. 한 실시양태에서, 핵산 서열은 프로모터 및 종결자를 포함하는 DNA 벡터의 일부로서 제조된다.

[0218] 바람직한 실시양태에서, 벡터는 하기로부터 선택되는 프로모터를 갖는다:

프로모터	유도제	전형적인 유도 조건
Tac (하이브리드)	IPTG	0.2 mM (0.05-2.0mM)
AraBAD	L-아라비노스	0.2% (0.002-0.4%)
T7-lac 오퍼레이터	IPTG	0.2 mM (0.05-2.0mM)

[0219]

[0220] 또다른 바람직한 실시양태에서, 벡터는 하기로부터 선택되는 프로모터를 갖는다:

프로모터	유도제	전형적인 유도 조건
Tac (하이브리드)	IPTG	0.2 mM (0.05-2.0mM)
AraBAD	L-아라비노스	0.2% (0.002-0.4%)
T7-lac 오퍼레이터	IPTG	0.2 mM (0.05-2.0mM)
T5-lac 오퍼레이터	IPTG	0.2 mM (0.05-2.0mM)

[0221]

[0222] 본 발명의 핵산 분자는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 공정을 사용하여 제조될 수 있다. 따라서, 핵산 분자는 화학적 합성 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 핵산 분자는 분자 생물학 기술을 사용하여 제조될 수 있다.

[0223] 본 발명의 DNA 구축물은 바람직하게는 인 실리코 설계되고, 그 후 통상적인 DNA 합성 기술에 의해 합성된다.

[0224] 상기-언급된 핵산 서열 정보는 채용되어야 할 최후의 숙주 세포 (예를 들어 이. 콜라이) 발현 시스템에 따라 코돈-바이어싱을 위해 임의로 변형된다.

[0225] 한 실시양태에서, 상기 기재된 바와 같은 조작된 클로스트리디움 독소를 코딩하는 핵산 서열은 서열 3, 5, 7 및 9로부터 선택되는 핵산 서열에 대해 적어도 70% (예를 들어, 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 또는 99%) 서열 동일성을 갖는 핵산 서열이다.

[0226] 한 측면에서, 본 발명은 서열 3, 5, 7 및 9로부터 선택되는 핵산 서열에 대해 적어도 적어도 70% (예를 들어, 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 또는 99%) 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 제공한다. 한 실시양태에서, 핵산 서열은 서열 3, 5, 7 및 9로부터 선택되는 핵산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는다.

[0227] 본 발명은 또한 상기 기재된 바와 같은 핵산 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 제공한다. 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 서열 4, 6, 8 및 10으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 70% (예를 들어, 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 또는 99%) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. 한 실시양태에서, 아미노산 서열은 서열 4, 6, 8 및 10으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는다.

[0228] 한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 상기 기재된 바와 같은 조작된 BoNT/A이며, 상기 조작된 BoNT/A는 서열 4, 6, 8 및 10으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 70% (예를 들어, 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99, 99.5 또는 99.9%) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다 (또는 이로 이루어진다).

[0229] 한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 상기 기재된 바와 같은 조작된 BoNT/A이며, 상기 조

작된 BoNT/A는 서열 4, 6, 8 또는 10의 아미노산 서열을 포함한다 (또는 이로 이루어진다).

[0230] 한 측면에서, 본 발명은 서열 4, 6, 8 또는 10의 아미노산 서열을 포함하는 (또는 이로 이루어지는) 폴리펩티드를 제공한다.

[0231] 한 측면에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 조작된 클로스트리디움 독소를 코딩하는 핵산을 제공하며, 상기 핵산은 서열 3, 5, 7 및 9로부터 선택되는 핵산 서열에 대해 적어도 70% (예를 들어, 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99, 99.5 또는 99.9%) 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 핵산은 서열 3, 5, 7 또는 9의 핵산 서열을 포함한다 (또는 이로 이루어진다).

[0232] 한 측면에서, 본 발명은 서열 3, 5, 7 또는 9의 핵산 서열을 포함하는 (또는 이로 이루어지는) 핵산을 제공한다.

[0233] 2개 이상의 핵산 또는 아미노산 서열 사이의 "퍼센트 서열 동일성"은 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이다. 따라서, % 동일성은 동일한 뉴클레오티드/아미노산의 수를 뉴클레오티드/아미노산의 총 수로 나누고, 여기에 100을 곱한 것으로서 계산될 수 있다. % 서열 동일성의 계산은 또한 간격의 수, 및 2개 이상의 서열의 정렬을 최적화하기 위해 도입되어야 할 필요가 있는 각각의 간격의 길이를 고려할 수 있다. 2개 이상의 서열 사이의 서열 비교 및 퍼센트 동일성의 측정은 BLAST와 같은 특정 수학적 알고리듬을 사용하여 수행될 수 있으며, 이는 통상의 기술자에게 익숙할 것이다.

[0234] 한 측면에서, 본 발명은 핵산 (상기 핵산은 상기 기재된 바와 같음)을 적합한 숙주 세포에서 발현시키고, 숙주 세포를 용해시켜 단일-쇄 조작된 클로스트리디움 독소 단백질을 함유하는 숙주 세포 균질물을 제공하고, 단일-쇄 조작된 클로스트리디움 독소 단백질을 단리하는 것을 포함하는, 경쇄 및 중쇄를 갖는 단일-쇄 조작된 클로스트리디움 독소 단백질의 제조 방법을 제공한다.

[0235] 또다른 측면에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 단일-쇄 조작된 클로스트리디움 독소 단백질의 제조 방법에 의해 수득가능한 단일-쇄 조작된 클로스트리디움 독소 단백질을 제공하고, 경쇄와 중쇄 사이에 위치한 인식 부위 (절단 부위)에서 폴리펩티드를 절단하는 프로테아제와 폴리펩티드를 접촉시킴으로써, 폴리펩티드를 경쇄 및 중쇄가 디술피드 결합에 의해 함께 연결된 2쇄 폴리펩티드로 전환시키는 것을 포함하는, 조작된 클로스트리디움 독소의 활성화 방법을 제공한다.

[0236] 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 특정 의학적 또는 미용적 질환 및 상태의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 따라서, 추가의 측면에서, 본 발명은 의료에 사용하기 위한 상기 기재된 바와 같은 조작된 클로스트리디움 독소를 제공한다.

[0237] 관련된 측면에서, 본 발명은 사시, 안검연축, 사팔눈, 이상긴장증 (예를 들어 연축성 이상긴장증, 구강하악 이상긴장증, 국소 이상긴장증, 지연성 이상긴장증, 후두 이상긴장증, 사지 이상긴장증, 경부 이상긴장증), 사경 (예를 들어 연축성 사경), (SNARE 하향조절 또는 불활성화를 통한) 세포/근육 무력화로부터 이익을 얻는 미용 요법 (미용적) 용도, 안구 운동의 신경근육 장애 또는 상태 (예를 들어 공동 사시, 수직 사시, 측면 직근 마비, 안진, 갑상선 근병증), 서경, 안검연축, 이갈이, 윌슨병, 진전, 틱, 분절성 근간대성경련, 연축, 만성 다발성 경화증으로 인한 경직, 비정상적 방광 제어를 초래하는 경직, 항문 경직, 등 연축, 근육 경직, 긴장성 두통, 거근 골반 증후군, 척추 갈림증, 지연성 이상운동증, 파킨슨병, 말더듬, 편측안면 연축, 안검 장애, 뇌성 마비, 국소 경직, 연축성 결장염, 신경성 방광, 항문 경직, 사지 경직, 틱, 진전, 이갈이, 치열, 무이완증, 연하곤란, 누루, 다한증, 과도한 타액분비, 과도한 위장 분비, 근육통 (예를 들어 근육 연축으로부터의 통증), 두통 (예를 들어 긴장성 두통), 이마 주름, 피부 주름, 암, 자궁 장애, 비뇨생식기 장애, 비뇨생식기-신경계 장애, 만성 신경성 염증 및 평활근 장애로부터 선택되는 질환 또는 상태의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 상기 기재된 바와 같은 조작된 클로스트리디움 독소를 제공한다.

[0238] 사용시, 본 발명은 조작된 클로스트리디움 독소와 함께, 제약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 아주반트, 추진제 및/또는 염으로부터 선택되는 적어도 1종의 성분을 포함하는 제약 조성물을 채용한다.

[0239] 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 경구, 비경구, 연속 주입, 흡입 또는 국소 적용을 위해 제제화될 수 있다. 주사에 적합한 조성물은 용액, 현탁액 또는 에멀전, 또는 사용 전에 적합한 비히클에 용해 또는 현탁되는 건조 분말의 형태일 수 있다.

[0240] 국소적으로 전달되어야 하는 조작된 클로스트리디움 독소의 경우, 조작된 클로스트리디움 독소는 크림 (예를 들어 국소 도포용)으로서, 또는 피하 주시용으로 제제화될 수 있다.

[0241] 국소 전달 수단은 에어로졸, 또는 다른 스프레이 (예를 들어 네불라이저)를 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 조작된 클로스트리디움 독소의 에어로졸 제제는 폐 및/또는 다른 코 및/또는 기관지 또는 기도 통로로의 전달을 가능하게 한다.

[0242] 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소는 질환에 걸린 기관의 신경분포에 관련된 척수 분절의 수준에서 척추 중의 경막내 또는 경막외 주사에 의해 환자에게 투여될 수 있다.

[0243] 바람직한 투여 경로는 복강경 및/또는 국소화된, 특히 근육내 주사를 통해서이다.

[0244] 본 발명의 조작된 클로스트리디움 독소의 투여를 위한 투여량 범위는 바람직한 치료 효과를 생성하는 것이다. 요구되는 투여량 범위는 조작된 클로스트리디움 독소 또는 조성물의 정확한 성질, 투여 경로, 제제의 성질, 환자의 연령, 환자의 상태의 성질, 정도 또는 중증도, 존재할 경우 사용금지사유, 및 주치의 의사의 판단에 의존함이 이해될 것이다. 이들 투여량 수준의 변화는 최적화를 위한 표준 경험적 방법을 사용하여 조정될 수 있다.

[0245] 적합한 일일 투여량 (환자의 체중 kg 당)은 0.0001 내지 1 ng/kg, 바람직하게는 0.0001 내지 0.5 ng/kg, 보다 바람직하게는 0.002 내지 0.5 ng/kg, 특히 바람직하게는 0.004 내지 0.5 ng/kg 범위이다. 단위 투여량은 1 피코그램 미만 내지 30 ng으로 다양할 수 있지만, 전형적으로 매일 또는 바람직하게는 보다 덜 빈번히, 예컨대 매주 또는 6개월마다 투여될 수 있는 용량 당 0.01 내지 1 ng의 영역일 것이다.

[0246] 특히 바람직한 투여 처방은 IX 용량으로서 조작된 클로스트리디움 독소 0.05 ng에 기초한다. 이와 관련하여, 바람직한 투여량은 1X 내지 100X (즉, 0.05 내지 5 ng) 범위이다.

[0247] 유체 투여 형태는 전형적으로 조작된 클로스트리디움 독소 및 피로겐-무함유 멸균 비히클을 사용하여 제조된다. 사용되는 비히클 및 농도에 따라, 조작된 클로스트리디움 독소는 비히클에 용해 또는 현탁될 수 있다. 용액의 제조에서, 조작된 클로스트리디움 독소를 비히클에 용해하고, 용액을 필요할 경우 염화나트륨의 첨가에 의해 등장성으로 만들고, 무균 기술을 사용하여 멸균 필터를 통해 여과에 의해 멸균한 후, 적합한 멸균 바이알 또는 앰풀 내로 충전하고, 밀봉한다. 대안적으로, 용액 안정성이 적당한 경우, 그의 밀봉된 용기 내의 용액을 오토클레이빙에 의해 멸균할 수 있다. 유리하게는, 완충제, 가용화제, 안정화제, 보존제 또는 살균제, 현탁화제 또는 유화제 및 국소 마취제와 같은 첨가제를 비히클에 용해할 수 있다.

[0248] 사용 전에 적합한 비히클에 용해 또는 현탁되는 건조 분말은 예비-멸균된 성분을 멸균 분야의 무균 기술을 사용하여 멸균 용기 내로 충전함으로써 제조될 수 있다. 대안적으로, 성분을 멸균 분야의 무균 기술을 사용하여 적합한 용기 내로 용해시킬 수 있다. 그 후, 생성물을 동결 건조하고, 용기를 무균적으로 밀봉한다.

[0249] 근육내, 피하 또는 피내 주사에 적합한 비경구 현탁액은 멸균 성분이 멸균 용기에 용해되는 대신 현탁되고, 멸균이 여과에 의해 수행될 수 없는 것을 제외하고는 실질적으로 동일한 방식으로 제조된다. 성분은 멸균 상태로 단리될 수 있거나, 대안적으로 이는 단리 후, 예를 들어 감마 조사에 의해 멸균될 수 있다.

[0250] 유리하게는, 현탁화제, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈을 조성물(들)에 포함시켜 성분의 균일한 분포를 용이하게 한다.

[0251] 본 발명에 따른 투여는 미세입자 캡슐화, 바이러스 전달 시스템 또는 고압 에어로졸 충돌을 포함하는 다양한 전달 기술을 이용할 수 있다.

[0252] [도면 목록]

[0253] **도 1**

[0254] 양이온성 구축물의 등전 집중 (IEF)

[0255] **도 2**

[0256] **Cat5v2(K1064H/N954K) (a), Cat5v2(K1064H/N886K) (b) 및 Cat5v2(K1064H/ N1025K) (c)에 대한 래트 배아 척수 뉴런 (eSCN)에서의 퍼센트 SNAP-25 절단, 및 nBoNT/A1에 대한 pEC50의 요약.** (a, b, c) 래트 배아 척수 뉴런을 3주 동안 배양하고, Cat5v4로 24시간 동안 처리한 후, SNAP-25 특이적 항체로 웨스턴 블롯팅하였다. 데이터는 3번의 독립적 실험으로부터의 3회의 평균±SEM이다. (d) 래트 eSCN SNAP-25 절단 효능 어세이에서의 nBoNT/A1 (리스트 바이올로지컬 래버러토리즈 (List Biological Laboratories)에 대한 Cat5v2(K1064H/N886K), Cat5v2(K1064H/N954K) 및 Cat5v2(K1064H/ N1025K)의 상대적 효능. 각각의 점은 개별 배치에 상응하며, 8-점 농도 반응 곡선 (CRC)에 기초한 3번의 독립적 pEC50 측정의 평균이다. CRC에서 각각의 농도는 3회 평가하였다.

효능 비교는 풀링된 데이터 n=24의 리스트 배치의 평균에 대해 이루어졌다. 데이터는 Cat5v4 당 n=3 배치의 평균±SEM이다.

[0257] **도 3**

[0258] **마우스 횡격막 신경 편측-횡격막 어세이 (mPNHD)에서의 nBoNT/A1 및 Cat5v4의 효능 (t_{50}).** 마우스 횡격막 신경 편측-횡격막 조직을 지시된 바와 같이 Cat5v4 또는 천연 BoNT/A1과 함께 배양하였다. 횡격막 수축력을 수축이 더이상 검출되지 않을 때까지 또는 140분 후에 기록하였다. 각각의 점은 독립적인 실험에 상응한다. t_{50} 값은 마우스 편측-횡격막의 수축력을 50%로 억제하는 데 요구되는 시간이다.

[0259] **서열**

[0260] 서열 1. BoNT/A1 핵산 서열.

ATGCCATTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATACATCAAG
ATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAGATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCG
GAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAGAAGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCT
GTCAGCTACTACGATTCGACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACC
AAGCTGTTCGAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGTTCGCGGTATC
CCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACCGAACTGAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTATT
CAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAATCTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATC
CAATTCGAGTGCAAGAGCTTTGGTCACGAGGTTCTGAATCTGACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAG
TACATTCGTTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAATCCGTTG
CTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATGAACTGATCCACGCAGGCCAC
CGCCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATG
AGCGGCCTGGAAGTCAGCTTCGAAGAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACAGC
TTGCAAGAGAATGAGTTCCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACAAG
GCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTTAAAGAGAAGTACCTG
CTGTCCGAGGATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAAACTGTACAAGATGCTG
ACCGAGATTTACACCGAGGACAACTTTGTGAAATTCTTCAAAGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAAT
TTTGACAAAGCGGTTTTCAAGATTAACATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAAC
CTGCGTAACACCAACCTGGCGGCGAACTTTAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACATGAATTTCACG
AAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTCGAGTTCTATAAGCTGCTGTGCGTGCGCGGTATCATCACCAGC
AAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAACAAGGCGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATTGG
GATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAAGATAATTTTACCAACGACCTGAACAAGGGTGAAGAAATCACCAGC
GATACGAATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCTGACCTTT
AACTTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATTATCGGTCAGCTGGAA
CTGATGCCGAATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCAT
TACCTGCGTGCACAGGAGTTTGAACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCC
CTGCTGAACCCGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCCACT
GAGGCCGCGATGTTCCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGAGACGAGCGAAGTG
AGCACTACCGACAAAATTGCTGATATTACCATCATTATCCCGTATATTGGTCCGGCACTGAACATTGGC
AACATGCTGTACAAAGACGATTTTGTGGGTGCCCTGATCTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTC
ATTCCGGAGATTGCGATCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCCTACATCGCGAATAAGGTTCTG
ACGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCGAAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTTTACAAATACATT
GTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAGATCGACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTG
GAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAATTATCAACTACCAATACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAG
AATAACATTAACTTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATC
AATATCAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATGATTCCGTATGGCGTC
AAACGTCTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGACAATCGTGGT
ACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAAAGACAAAGTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCATTT
CAACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATC
AATACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCAAGCAAG
ATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTGTTTAATCTGGAA
TCGAGCAAAATTGAGGTTATCCTGAAAAACGCCATTGTCTACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACC
AGCTTCTGGATTCGCATCCCGAAATACTTCAACAGCATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCAAC
TGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGAC
ACCCAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAGTACTCTCAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAAT
CGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAATAACAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTG
ATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCACGCAAGCAACAACATTATGTTCAAATTGGAC
GGTTGCCGCGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAATGAG
AAGGAGATCAAAGATTTGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGGGGCGATTAT
CTGCAATACGATAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAATATGTGGATGTCAATAAT
GTGGGTATTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTG
AACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATT
GTGCGTAATAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGTGAAGAATAAAGAGTACCGTCTGGCGACCAAC
GCTTCGCAGGCGGGTGTTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTCGGTAATCTGAGCCAA
GTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACCAGGGTATCACTAACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACAAC
AATGGTAACGACATCGGCTTTATTGGTTTCCACCAGTTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAAT
TGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGCCGTACTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGAT
GATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

[0261]

[0262] 서열 2. BoNT/A1 아미노산 서열.

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVP
VSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVI
QPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPL
LGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDS
LQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKML
TEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFT
KLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITS
DTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFH
YLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEV
STTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVL
TVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEK
NNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRG
TLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASK
INIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIIN
CMENNSGWKVSLNYGEIIWTLQDTQEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRL
IDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNSGILKDFWGDY
LQYDKPYYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNI
VRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDN
NGNDIGFIGFHQFNNIAKLVASNWYNRQIERSSRTLGCSWEFIPVDDGWGERPL

[0263]

[0264] 서열 3. 조작된 BoNT/A1 "Cat-A" 핵산 서열.

ATGCCATTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATACATCAAG
ATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAGATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCG
GAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAGAAGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCT
GTCAGCTACTACGATTCGACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACC
AAGCTGTTCGAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGTTCGCGGTATC
CCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACCGAACTGAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTATT
CAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAATCTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATC
CAATTCGAGTGCAAGAGCTTTGGTCACGAGGTTCTGAATCTGACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAG
TACATTCGTTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAATCCGTTG
CTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATGAACTGATCCACGCAGGCCAC
CGCCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATG
AGCGGCCTGGAAGTCAGCTTCGAAGAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACAGC
TTGCAAGAGAATGAGTTCCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACAAG
GCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTTAAAGAGAAGTACCTG
CTGTCCGAGGATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAAACTGTACAAGATGCTG
ACCGAGATTTACACCGAGGACAACTTTGTGAAATTCTTCAAAGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAAT
TTTGACAAAGCGGTTTTCAAGATTAACATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAAC
CTGCGTAACACCAACCTGGCGGCGAACTTTAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACATGAATTTCACG
AAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTCGAGTTCTATAAGCTGCTGTGCGTGCGCGGTATCATCACCAGC
AAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAACAAGGCGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATTGG
GATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAAGATAATTTTACCAACGACCTGAACAAGGGTGAAGAAATCACCAGC
GATACGAATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCTGACCTTT
AACTTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATTATCGGTCAGCTGGAA
CTGATGCCGAATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCAT
TACCTGCGTGCACAGGAGTTTGAACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCC
CTGCTGAACCCGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCCACT
GAGGCCGCGATGTTCCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGAGACGAGCGAAGTG
AGCACTACCGACAAAATTGCTGATATTACCATCATTATCCCGTATATTGGTCCGGCACTGAACATTGGC
AACATGCTGTACAAAGACGATTTTGTGGGTGCCCTGATCTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTC
ATTCCGGAGATTGCGATCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCCTACATCGCGAATAAGGTTCTG
ACGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCGAAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTTTACAAATACATT
GTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAGATCGACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTG
GAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAATTATCAACTACCAATACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAG
AATAACATTAACTTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATC
AATATCAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATGATTCCGTATGGCGTC
AAACGTCTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGACAATCGTGGT
ACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAAAGACAAAGTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCATTT
CAACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATC
AATACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAAGCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCTAGCAAG
ATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTGTTTAATCTGGAA
TCGAGCAAAATTGAGGTTATCCTGAAAAAGGCCATTGTCTACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACC
AGCTTCTGGATTCGCATCCCGAAATACTTCAACAAGATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCAAC
TGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGAC
ACCAAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAGTACTCTCAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAAT
CGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAATAAGAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTG
ATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCACGCAAGCAACAAGATTATGTTCAAATTGGAC
GGTTGCCGCGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAATGAG
AAGGAGATCAAAGATTTGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGGGGCGATTAT
CTGCAATACGATAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAATATGTGGATGTCAATAAT
GTGGGTATTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTG
AACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATT
GTGCGTAATAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGTGAAGAATAAAGAGTACCGTCTGGCGACCAAC
GCTTCGCAGGCGGGTGTTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTCGGTAATCTGAGCCAA
GTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACAAGGGTATCACTAACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACAAC
AATGGTAACGACATCGGCTTTATTGGTTTCCACCAGTTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAAT
TGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGCcGTACTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGAT
GATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

[0265]

[0266] 서열 4. 조작된 BoNT/A1 "Cat-A" 아미노산 서열.

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVP
VSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVI
QPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPL
LGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDS
LQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKML
TEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFT
KLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITS
DTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFH
YLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEV
STTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVL
TVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEK
NNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRG
TLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESKHLIDLSRYASK
INIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKKAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNKISLNNEYTIIN
CMENNSGWKVSLNYGEIIWTLQDTKEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNKSKIYINGRL
IDQKPISNLGNIHASNKIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNSGILKDFWGDY
LQYDKPYYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNI
VRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDKGITNKCKMNLQDN
NGNDIGFIGFHQFNNIAKLVASNWYNRQIERSSRTLGCSWEFIPVDDGWGERPL

[0267]

[0268] 서열 5. 조작된 BoNT/A1 "Cat-B" 핵산 서열.

ATGCCATTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATACATCAAG
ATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAGATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCG
GAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAGAAGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCT
GTCAGCTACTACGATTCGACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACC
AAGCTGTTCGAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGTTCGCGGTATC
CCGTTCTGGGGGTGGTAGCACGATTGACACCGAACTGAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTATT
CAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAATCTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATC
CAATTCGAGTGCAAGAGCTTTGGTCACGAGGTTCTGAATCTGACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAG
TACATTCGTTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAATCCGTTG
CTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATGAACTGATCCACGCAGGCCAC
CGCCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATG
AGCGGCCTGGAAGTCAGCTTCGAAGAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACAGC
TTGCAAGAGAATGAGTTCCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACAAG
GCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTTAAAGAGAAGTACCTG
CTGTCCGAGGATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAAACTGTACaAGATGCTG
ACCGAGATTTACACCGAGGACAACTTTGTGAAATTCTTCAAAGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAAT
TTTGACAAAGCGGTTTTCAAGATTAACATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAAC
CTGCGTAACACCAACCTGGCGGCGAACTTTAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACATGAATTTCACG
AAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTCGAGTTCTATAAGCTGCTGTGCGTGCGCGGTATCATCACCAGC
AAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAACAAGGCGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATTGG
GATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAAGATAATTTTACCAACGACCTGAACAAGGGTGAAGAAATCACCAGC
GATACGAATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCTGACCTTT
AACTTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATTATCGGTCAGCTGGAA
CTGATGCCGAATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCAT
TACCTGCGTGCACAGGAGTTTGAACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCC
CTGCTGAACCCGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCCACT
GAGGCCGCGATGTTCCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGAGACGAGCGAAGTG
AGCACTACCGACAAAATTGCTGATATTACCATCATTATCCCGTATATTGGTCCGGCACTGAACATTGGC
AACATGCTGTACAAAGACGATTTTGTGGGTGCCCTGATCTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTC
ATTCCGGAGATTGCGATCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCCTACATCGCGAATAAGGTTCTG
ACGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCGAAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTTTACAAATACATT
GTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAGATCGACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTG
GAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAATTATCAACTACCAATACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAG
AATAACATTAACTTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATC
AATATCAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATGATTCCGTATGGCGTC
AAACGTCTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGACAaTCGTGGT
ACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAAAGACAAAGTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCATTT
CAACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATC
AATACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCTAGCAAG
ATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTGTTTAATCTGGAA
TCGAGCAAAATTGAGGTTATCCTGAAAAAGGCCATTGTCTACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACC
AGCTTCTGGATTCGCATCCCGAAATACTTCAAGAAGATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCAAC
TGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGAC
ACCAAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAGTACTCTCAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAAT
CGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAATAAGAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTG
ATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCACGCAAGCAACAAGATTATGTTCAAATTGGAC
GGTTGCCGCGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAATGAG
AAGGAGATCAAAGATTTGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGGGGCGATTAT
CTGCAATACGATAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAATATGTGGATGTCAATAAT
GTGGGTATTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTG
AACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATT
GTGCGTAATAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGTGAAGAATAAAGAGTACCGTCTGGCGACCAAC
GCTTCGCAGGCGGGTGTTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTCGGTAATCTGAGCCAA
GTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACAAGGGTATCACTAACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACAAC
AATGGTAACGACATCGGCTTTATTGGTTTCCACCAGTTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAAT
TGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGCCGTACTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGAT
GATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

[0269]

[0270] 서열 6. 조작된 BoNT/A1 "Cat-B" 아미노산 서열.

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVP
VSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVI
QPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPL
LGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDS
LQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKML
TEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFT
KLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITS
DTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFH
YLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEV
STTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVL
TVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEK
NNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRG
TLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASK
INIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKKAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFKKISLNNEYTIIN
CMENNSGWKVSLNYGEIIWTLQDTKEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNKSKIYINGRL
IDQKPISNLGNIHASNKIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNSGILKDFWGDY
LQYDKPYYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNI
VRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDKGITNKCKMNLQDN
[0271] NGNDIGFIGFHQFNNIAKLVASNWYNRQIERSSRTLGCSWEFIPVDDGWGERPL

[0272] 서열 7. 조작된 BoNT/A1 "Cat-C" 핵산 서열.

ATGCCATTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATACATCAAG
ATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAGATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCG
GAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAGAAGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCT
GTCAGCTACTACGATTCGACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACC
AAGCTGTTCGAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGTTCGCGGTATC
CCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACCGAACTGAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTATT
CAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAATCTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATC
CAATTCGAGTGCAAGAGCTTTGGTCACGAGGTTCTGAATCTGACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAG
TACATTCGTTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAATCCGTTG
CTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATGAACTGATCCACGCAGGCCAC
CGCCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATG
AGCGGCCTGGAAGTCAGCTTCGAAGAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACAGC
TTGCAAGAGAATGAGTTCCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACAAG
GCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTTAAAGAGAAGTACCTG
CTGTCCGAGGATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAAACTGTACAAGATGCTG
ACCGAGATTTACACCGAGGACAACTTTGTGAAATTCTTCAAAGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAAT
TTTGACAAAGCGGTTTTCAAGATTAACATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAAC
CTGCGTAACACCAACCTGGCGGCGAACTTTAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACATGAATTTCACG
AAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTCGAGTTCTATAAGCTGCTGTGCGTGCGCGGTATCATCACCAGC
AAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAACAAGGCGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATTGG
GATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAAGATAATTTTACCAACGACCTGAACAAGGGTGAAGAAATCACCAGC
GATACGAATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCTGACCTTT
AACTTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATTATCGGTCAGCTGGAA
CTGATGCCGAATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCAT
TACCTGCGTGCACAGGAGTTTGAACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCC
CTGCTGAACCCGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCCACT
GAGGCCGCGATGTTCCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGAGACGAGCGAAGTG
AGCACTACCGACAAAATTGCTGATATTACCATCATTATCCCGTATATTGGTCCGGCACTGAACATTGGC
AACATGCTGTACAAAGACGATTTTGTGGGTGCCCTGATCTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTC
ATTCCGGAGATTGCGATCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCCTACATCGCGAATAAGGTTCTG
ACGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCGAAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTTTACAAATACATT
GTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAGATCGACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTG
GAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAATTATCAACTACCAATACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAG
AATAACATTAACTTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATC
AATATCAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATGATTCCGTATGGCGTC
AAACGTCTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGACAATCGTGGT
ACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAAAGACAAAGTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCATTT
CAACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATC
AATACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCTAGCAAG
ATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTGTTTAATCTGGAA
TCGAGCAAAATTGAGGTTATCCTGAAAAAGGCCATTGTCTACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACC
AGCTTCTGGATTCGCATCCCGAAATACTTCAACAAGATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCAAC
TGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGAC
ACCAAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAGTACTCTCAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAAT
CGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAAGAAGAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTG
ATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCACGCAAGCAACAAGATTATGTTCAAATTGGAC
GGTTGCCGCGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAATGAG
AAGGAGATCAAAGATTTGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGGGGCGATTAT
CTGCAATACGATAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAATATGTGGATGTCAATAAT
GTGGGTATTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTG
AACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATT
GTGCGTAATAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGTGAAGAATAAAGAGTACCGTCTGGCGACCAAC
GCTTCGCAGGCGGGTGTTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTCGGTAATCTGAGCCAA
GTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACAAGGGTATCACTAACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACAAC
AATGGTAACGACATCGGCTTTATTGGTTTCCACCAGTTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAAT
TGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGCCGTACTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGAT
[0273] GATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

[0274] 서열 8. 조작된 BoNT/A1 "Cat-C" 아미노산 서열.

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVP
VSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVI
QPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPL
LGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDS
LQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKML
TEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFT
KLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITS
DTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFH
YLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEV
STTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVL
TVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEK
NNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRG
TLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASK
INIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKKAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNKISLNNEYTIIN
CMENNSGWKVSLNYGEIIWTLQDTKEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLKKSKIYINGRL
IDQKPISNLGNIHASNKIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNSGILKDFWGDY
LQYDKPYYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNI
VRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDKGITNKCKMNLQDN
[0275] NGNDIGFIGFHQFNNIAKLVASNWYNRQIERSSRTLGCSWEFIPVDDGWGERPL

[0276] 서열 9. 조작된 BoNT/A1 "Cat-D" 핵산 서열.

ATGCCATTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATACATCAAG
ATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAGATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCG
GAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAGAAGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCT
GTCAGCTACTACGATTCGACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACC
AAGCTGTTCGAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGTTCGCGGTATC
CCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACCGAACTGAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTATT
CAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAATCTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATC
CAATTCGAGTGCAAGAGCTTTGGTCACGAGGTTCTGAATCTGACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAG
TACATTCGTTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAATCCGTTG
CTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATGAACTGATCCACGCAGGCCAC
CGCCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATG
AGCGGCCTgGAAGTCAGCTTCGAAGAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACAGC
TTGCAAGAGAATGAGTTCCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACAAG
GCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTTAAAGAGAAGTACCTG
CTGTCCGAGGATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAAACTGTACAAGATGCTG
ACCGAGATTTACACCGAGGACAACTTTGTGAAATTCTTCAAaGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAAT
TTTGACAAAGCGGTTTTCaAGATTAACATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAAC
CTGCGTAACACCAACCTGGCGGCGAACTTTAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACATGAATTTCACG
AAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTCGAGTTCTATAAGCTGCTGTGCGTGCGCGGTATCATCACCAGC
AAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAACAAGGCGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATTGG
GATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAAGATAATTTTACCAACGACCTGAACAAGGGTGAAGAAATCACCAGC
GATACGAATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCTGACCTTT
AACTTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATTATCGGTCAGCTGGAA
CTGATGCCGAATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCAT
TACCTGCGTGCACAGGAGTTTGAACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCC
CTGCTGAACCCGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCCACT
GAGGCCGCGATGTTCCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGAGACGAGCGAAGTG
AGCACTACCGACAAAaTTGCTGATaTTACCATCATTATCCCGTATATTGGTCCGGCACTGAACATTGGC
AACATGCTGTACAAAGACGATTTTGTGGGTGCCCTGATCTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTC
ATTCCGGAGATTGCGATCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCCTACATCGCGAATAAGGTTCTG
ACGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCGAAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTTTACAAATACATT
GTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCaATACCCAGATCGACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTG
GAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAATTATCAACTACCAATACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAG
AATAACATTAACTTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATC
AATATCAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATGATTCCGTATGGCGTC
AAACGTCTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGACAATCGTGGT
ACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAAAGACAAAGTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCATTT
CAACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATC
AATACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATtGATCTGAGCCGTTATGCAAGCAAG
ATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTGTTTAATCTGGAA
TCGAGCAAAATTGAGGTTATCCTGAAAAACGCCATTGTCTACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACC
AGCTTCTGGATTCGCATCCCGAAATACTTCAACAGCATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCAAC
TGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGAC
ACCCAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAGTACTCTCAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAAT
CGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAATAACAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTG
ATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCACGCAAGCAACAACATTATGTTCAAATTGGAC
GGTTGCCGCGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAATGAG
AAGGAGATCAAAGATTTGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGGGGCGATTAT
CTGCAATACGATAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAATATGTGGATGTCAATAAT
GTGGGTATTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTG
AACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATT
GTGCGTAATAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGTGAAGCGTAAAGAGTACCGTCTGGCGACCAAC
GCTTCGCAGGCGGGTGTTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTCGTGTCCGTCGTCTGAGCCAA
GTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACCAGGGTATCACTAACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACCGT
CGTGGTAACGACATCGGCTTTATTGGTTTCCACCAGTTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAAT
TGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCCGTAGCCGTCGTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGAT
[0277] GATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

[0278] 서열 10. 조작된 BoNT/A1 "Cat-D" 아미노산 서열.

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVP
VSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVI
QPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPL
LGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDS
LQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKML
TEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFT
KLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITS
DTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFH
YLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEV
STTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVL
TVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEK
NNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRG
TLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASK
INIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIIN
CMENNSGWKVSLNYGEIIWTLQDTQEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRL
IDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNSGILKDFWGDY
LQYDKPYYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNI
VRNNDRVYINVVVKRKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPRVRRLSQVVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDR
[0279] RGNDIGFIGFHQFNNIAKLVASNWYNRQIERRSRRLGCSWEFIPVDDGWGERPL

[0280] **실시예**

[0281] 하기 실시예는 본 발명의 특정 실시양태를 예시하는 기능을 하며, 청구범위에서 정의된 본 발명의 범위를 어떠한 식으로도 제한하지 않는다.

[0282] **실시예 1**

[0283] 본 발명에 따른 조작된 BoNT/A1 분자의 3가지 상이한 예를 제조하였다.

[0284] 변형을 위해 선택된 아미노산 (돌연변이 부위)은 다수의 상이한 범주를 사용하여 선택하였다.

[0285] 잔기 대체를 위한 범주는 하기와 같다:

[0286] 1. 잔기의 유형;

[0287] 2. 표면 노출의 정도;

[0288] 3. 2차/3차 구조에 관한 위치;

[0289] 4. BoNT의 공지된 기능적 도메인에 관한 위치;

[0290] 5. BoNT/A 또는 BoNT/E 하위형에 걸친 서열 보존의 정도;

[0291] 6. 추가의 유비퀴틴화 부위를 도입하는 확률.

[0292] 이 실시예에서, 아스파라긴 (Asn, N) 및 글루타민 (Gln, Q)은, 그들이 극성이고, Lys와 크기가 유사하고, 단지 다른 잔기와의 보다 약한 쌍극자 상호작용을 형성하고, 14%의 분자가 이들 2개의 잔기로 구성되기 때문에 선택되었다.

[0293] 분자의 표면에서 볼 수 있는 Asn 및 Gln 잔기를 BoNT/A1의 결정 구조 (PDB ID: 3BTA)로부터 확인하였다. 이는 모든 대체된 잔기가 그들의 전하를 외부적으로 나타낼 수 있을 것임을 보장한다. 이 목록으로부터, 상기 선택 범주 중 점 3 내지 5개를 적용함으로써 대체에 덜 적합한 것들을 배제할 수 있었다 (반복 공정).

[0294] BoNT/A1 내의 비-보존된 잔기를 BoNT/A의 다른 하위형과의 및 기능적으로 유사한 BoNT/E 혈청형의 정렬로부터 확인하였다. 다른 서열에서 염기성 잔기로서 나타난 것들을 대체를 위한 유력한 후보로서 선택하였다.

[0295] 상기 섹션에서 언급된 선택 범주를 통한 연속적인 반복적 라운드 후, 후보 잔기의 최종 목록을 확인하였다. 이들을 추가의 유비퀴틴화 컨센서스 서열의 잠재적 생성을 위해 스크리닝하였다 (CKSAAP UbSite 서버를 사용함). 확인된 소수를 대체 리신을 아르기닌으로 변경함으로써 제거하였다.

[0296] BoNT/A1 서열에 대해 합성된 최종 예의 양이온성 구축물, 즉 Cat-A, Cat-B 및 Cat-C은 하기에 열거되어 있다. 각각의 구축물은 149,637 달톤의 분자량을 가졌다.

[0297] Cat-A: N930K, S955K, Q991K, N1026K, N1052K, Q1229K, N886K.

[0298] Cat-B: N930K, S955K, Q991K, N1026K, N1052K, Q1229K, N954K.

[0299] Cat-C: N930K, S955K, Q991K, N1026K, N1052K, Q1229K, N1025K.

[0300] **실시예 2**

[0301] BoNT/B, F 및 E 아미노산 서열을 Lys 또는 Arg로 치환될 수 있는 잠재적 잔기에 대해 평가하였다. 이 초기 평가는 치환되어 증가된 pI를 갖는 BoNT/B, E 또는 F 단백질을 생성할 수 있는 잔기를 확인하였다.

[0302] BoNT/B (Ac: P10844), BoNT/E (Ac: Q00496) 및 BoNT/F (Ac: P30996)의 일차 서열을 분석하고, 아미노산 조성을 하기 표에 요약하였다:

표 3

[0303]

혈청형	이론적 pI	pH 7.4 에서 순 전하	Asn 및Gln의 수	Asp 및Glu의 수
BoNT/B	5.3	-23	179	156
BoNT/E	6.2	-7	160	132
BoNT/F	5.4	-22	169	161

[0304] 표로부터, 유사하게 많은 수의 극성 Asn/Gln 잔기가 BoNT/A1에 대해 관찰된 바와 같이 아미노산 서열에 존재하였다. 또한, 그들의 상응하는 중성 잔기 (Asn/Gln) 또는 염기성 잔기 (Lys 또는 Arg)로 잠재적으로 변경될 수 있는 상대적으로 많은 수의 산성 (Asp/Glu) 잔기가 있었다.

[0305] **실시예 3**

[0306] 변형을 위한 바람직한 클로스트리디움 독소 아미노산의 확인.

[0307] 전장 구조 데이터는 BoNT/A, BoNT/B 및 BoNT/E에 대해 이용가능하였지만, 나머지 4개의 혈청형에 대해, 이론적 모델을 LOOPP 컴퓨터 프로그램을 사용하여 서열 및 관련된 구조적 상동성에 기초하여 생성하였다.

[0308] 각각의 구조를 AreaIMol (CCP4 스위트)에 의해 분석하고, 노출된 잔기를 40 초과의 합계 값을 갖는 것으로서 확인하였다. 극성-측쇄를 갖는 잔기를 이 목록으로부터 선택하고, 이로부터 바람직한 것을 산성이거나 (Asp 및 Glu), H-결합 수용체 측쇄를 갖는 (Asn 및 Gln) 잔기 상에 놓았다. 최종 컴퓨터를 사용한 단계는 스트라이드 (Stride) 서버로부터의 분석적 데이터에 기초한 α-나선과 β-가닥 사이의 잔기를 선택하는 것을 포함하였다. 각각의 분자의 구조를 육안으로 조사하여 인터페이스 영역 내에 위치한 잔기를 확인하였다 - 이들은 피하였다.

[0309] BoNT/A1에 대해, 바람직한 잔기의 목록을 모든 정렬된 서열의 적어도 90%에서 기능적으로 비-보존된 잔기로 보충하였다 [대형 비-극성 측쇄 (Met, Pro, Phe, Trp)는 동등한 것으로 간주되었고, 소형 비-극성 측쇄 (Gly, Ala, Val, Leu, Ile)는 동등한 것으로 간주되었고, 산성 측쇄 (Asp, Glu)는 동등한 것으로 간주되었고, 염기성 측쇄 (Arg, Lys)는 동등한 것으로 간주되었음]. 보다 구체적으로, 서열의 적어도 10%에서 염기성 잔기로서 나타난 비-보존된 잔기 및 참조 서열에서 비-보존된 Asn, Gln, Asp 또는 Glu를 후보로서 선택하였다.

[0310] 나머지 혈청형에 대해, 하위형 사이의 다중 서열 정렬을 수행하여 서열의 적어도 10%에서 염기성 잔기로서 나타난 기능적으로 비-보존된 잔기를 확인하였다.

[0311] 변형을 위한 바람직한 클로스트리디움 독소 아미노산:

BoNT/A:
ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086.

BoNT/B:
ASN 873, ASN 874, GLU 892, ASP 895, ASN 906, ASP 940, ASN 948, GLU 949, ASN 958, ASN 959, ASN 979, ASN 990, GLU 993, ASP 994, GLU 997, ASN 1012, ASN 1019, ASP 1030, ASP 1047, ASP 1049, GLU 1065, GLU 1072, GLN 1176, GLU 1189, GLU 1252, ASN 1273.

BoNT/C_1:
ASN 881, ASP 898, GLU 916, GLU 927, ASN 952, ASN 964, ASN 965, ASN 984, GLU 985, ASP 986, ASP 996, ASN 1000, GLU 1036, ASN 1041, ASP 1062, ASP 1064, GLU 1079, ASP 1081.

BoNT/D:
ASN 877, ASP 893, ASN 894, ASN 898, ASN 920, ASN 945, ASN 948, GLU 957, GLN 958, ASN 959, ASN 968, ASN 979, GLU 1030, ASP 1031, ASP 1033, GLU 1047, GLU 1051, ASN 1052, GLU 1066, GLN 1122.

BoNT/E:
ASN 859, ASP 860, ASN 892, ASP 893, ASP 904, ASP 909, ASN 928, ASN 932, ASN 934, ASN 935, GLU 936, ASP 945, ASN 946, ASN 947, ASN 966, ASN 976, ASN 979, ASN 981, ASP 985, GLN 1014, ASN 1019, ASN 1022, ASP 1027, ASN 1035, 및 ASN 1140.

BoNT/F:
ASN 879, ASP 896, ASN 922, ASN 923, ASN 928, ASN 947, ASN 950, ASN 952, ASN 953, GLU 954, ASN 963, ASN 964, ASN 965, ASN 987, GLN 997, ASN 1037, ASP 1040, ASP 1045, ASN 1055, ASP 1056.

BoNT/G:
ASP 900, ASN 909, ASN 910, GLU 912, ASN 913, ASN 945, ASN 947, GLU 956, ASN 965, ASP 966, ASN 986, ASN 1001, ASN 1038, ASP 1040, ASN 1046, ASP 1057, GLU 1073, ASN 1075, ASN 1090.

TeNT:
ASN 893, ASP 894, ASP 911, ASN 919, ASN 927, ASN 928, GLU 929, GLN 968, ASN 972, GLU 973, GLU 1010, ASP 1018, ASN 1079, ASN 1080, ASN 1081, ASN 1097.

[0312]

[0313] **사용된 서열**

수탁 번호:

BoNT/A: P10845

BoNT/B: P10844

BoNT/C_1: P18640

BoNT/D: P19321

BoNT/E: Q00496

BoNT/F: YP_001390123

BoNT/G: Q60393

TeNT: P04958

[0314]

[0315] **구조 데이터 소스**

[0316] RCSB로부터 얻어진 BoNT/A (3BTA.pdb), BoNT/B (1EPW) 및 BoNT/E (3FFZ.pdb)의 결정 구조.

[0317] LOOPP를 사용하여 수행된 BoNT/C_1, BoNT/D, BoNT/F, BoNT/G 및 TeNT 및 하기 서열, 각각 P18640, P19321, YP_001390123, Q60393 및 P04958의 상동성 모델링.

[0318] **구조 분석**

[0319] CCP4 스위트로부터의 AreaIMol을 사용하여 측정된 노출된 잔기.

[0320] 스트라이드를 사용하여 측정된 2차 구조 정렬.

[0321] RasMol을 사용한 육안 조사에 의해 측정된 인터페이스 잔기.

[0322] **서열 분석**

[0323] NCBI로부터 얻어진 전장 BoNT 서열.

[0324] 클러스탈X (ClustalX)로 수행된 정렬.

[0325] **실시예 4**

[0326] 클로닝, 발현 및 정제

[0327] 실시예 1에 기재된 조작된 BoNT/A 분자를 코딩하는 DNA 구축물을 합성하고, pJ401 발현 벡터 내로 클로닝한 후, BL21 (DE3) 이. 콜라이 내로 형질전환시켰다. 이는 BL21 (DE3) 이. 콜라이에서 재조합 Cat-A, Cat-B 및 Cat-C 단백질의 가용성 과발현을 허용하였다.

[0328] 재조합 조작된 BoNT를 전형적인 크로마토그래피 기술을 사용하여 이. 콜라이 용해물로부터 정제하였다. 양이온-교환 수지를 사용한 초기 정제 단계 후, 소수성 상호작용 수지를 사용한 중간 정제 단계를 채용하였다. 그 후, 재조합 조작된 BoNT 단일-쇄를 단백질분해에 의해 절단하여 활성화된 2쇄 조작된 BoNT를 생성하였다. 그 후, 최종 정제 단계를 채용하여 잔류의 오염물을 제거하였다.

[0329] **실시예 5**

[0330] 정제된 조작된 BoNT의 특성화

[0331] 상기 실시예 1에 기재된 조작된 BoNT를 하기와 같이 실험적으로 특성화하였다.

[0332] pI의 측정은 조작된 BoNT가 비변형된 (천연) BoNT/A1보다 높은 등전점을 가졌음을 나타내었다 - 도 1 및 하기 표 참조.

표 4

BoNT/A1 분자	**pI (계산치)**	**pI (관측치)**
조작된, "Cat-A" [Cat5v2(K1064H/N886K]	6.9	~8.0
조작된, "Cat-B" [Cat5v2(K1064/N954K)]	6.9	~8.0
조작된, "Cat-C" [Cat5v2(K1064H/N1025K)]	6.9	7.8-8.0
천연 BoNT/A1 [rBoNT/A1]	6.05	~7.4

[0333]

[0334] 뉴런에 유입되고 SNAP-25 (BoNT/A1의 표적)를 절단하는 조작된 BoNT의 능력을 래트 배아 척수 뉴런 (eSCN)을 사용하여 평가하였다. 도 2는 조작된 BoNT가 뉴런에 유입되고 SNAP-25를 절단하는 데 있어서 천연 BoNT/A1과 동일한 능력을 보유하였음을 나타낸다.

[0335] 조작된 BoNT의 효능을 마우스 횡격막 신경 편측-횡격막 어세이 (mPNHD)를 사용하여 추가로 평가하였다. 도 3은 조작된 BoNT가 마우스 편측-횡격막의 수축 능력을 억제하는 데 있어서 천연 BoNT/A1과 동일한 능력을 보유하였음을 나타낸다.

[0336] 생체내 마우스 발가락 외전 점수 (DAS) 어세이를 사용하여 천연 BoNT/A1에 비한 효능 및 안전성을 평가하였다. 둘 다의 분자는 천연 BoNT/A1에 비해 높은 안전성 비율을 나타내었으며, 약간 더 강력하였다. 이들 데이터를 하기에 제시한다 (표 4).

[0337] <표 4>

분자	DAS ED_{50} (pg/ 마우스)	DAS 4 **용량** (pg/마우스)	-10% ΔBW **에 대한 용량** (pg/마우스)	**안전성 비율**
천연 BoNT/A1 (n=5)	2	10-20	9.9-14.5	7
조작된, "Cat-A"	1.16	10-20	27.4	24
조작된, "Cat-B"	1.79	25	47.6	27

[0338]

[0339] - DAS ED_{50}: DAS 2를 유도하는 계산된 용량

[0340] - DAS 4 용량: DAS 4를 유도하는 실험적 용량

[0341] - BW: 체중

[0342] - -10% ΔBW에 대한 용량: D0에서의 BW에 비해 BW에 대한 10%의 감소를 유도하는 계산된 용량

[0343] - 안전성 비율: -10% ΔBW/DAS ED_{50}에 대한 용량

[0344] 안전성 비율은 효능 (반 최대 발가락 외전 점수 (DAS))에 관한 BoNT 처리의 부정적 효과 (체중 감소)의 측정이

다. 이는 -10% 체중 (BW)과 DAS ED_{50} 사이의 비율로서 계산되며, 여기서 -10% BW는 체중의 10% 감소에 요구되는 BoNT의 양 (pg/동물)을 지칭하고, ED_{50}은 2의 DAS를 생성하게 되는 BoNT의 양 (pg/동물)을 지칭한다.

[0345] DAS 어세이는 젤라틴 인산염 완충액 중에서 제제화된 조작된 클로스트리디움 독소 20 μl를 마우스 장딴지근/가자미근 복합체 내로 주사한 후, 아오키에 의해 이전에 보고된 바와 같이 (Aoki KR, Toxicon 39: 1815-1820; 2001) 발가락 외전을 평가함으로써 수행한다.

[0346] **실시예 6**

[0347] 본 발명에 따른 추가의 조작된 클로스트리디움 독소를 상기 실시예 1에서 설명된 바와 같은 범주를 사용하여 설계하였다.

[0348] 이 양이온성 구축물은 또한 BoNT/A1로부터 유래되었으며, 7.4의 pI 및 149,859의 분자량을 가졌다. 구축물을 Cat-D로 지칭하였다. 구축물 Cat-A, Cat-B 및 Cat-C는 리신으로 돌연변이된 잔기를 포함한 반면, Cat-D는 아르기닌으로 돌연변이된 잔기를 포함하였다.

[0349] Cat-D: N1188R, D1213R, G1215R, N1216R, N1242R, N1243R, S1274R, T1277R.

[0350] **실시예 7**

[0351] 경부 이상긴장증을 앓고 있는 환자의 치료

[0352] 연축성 사경을 앓고 있는 50세의 여성이 임상에 제공되었으며, 이는 이전에 경부 근육 내로 표준 BoNT/A 제조물의 치료적 유효량으로 처치되었으나, 환자는 입인두 내로의 독소의 퍼짐으로 인해 연하곤란을 겪었다. 환자를 본 발명의 조작된 BoNT/A 대략 1.5 ng (또는 그 이상)의 경부 근육의 주사로 처치하였다. 환자의 사경은 연하곤란의 발달 없이 3 내지 7일 후 유의하게 개선되었으며, 환자는 적어도 5개월 동안 그녀의 머리 및 어깨를 정상적인 위치로 유지할 수 있었다. 조작된 BoNT/A 분자의 향상된 조직 체류 및 감소된 퍼짐으로 인해, 의사는 부작용의 두려움 없이 보다 많은 생성물을 주사할 수 있었고, 향상된 용량은 작용 기간의 연장을 초래하였다.

[0353] **실시예 8**

[0354] 안검연축을 앓고 있는 환자의 치료

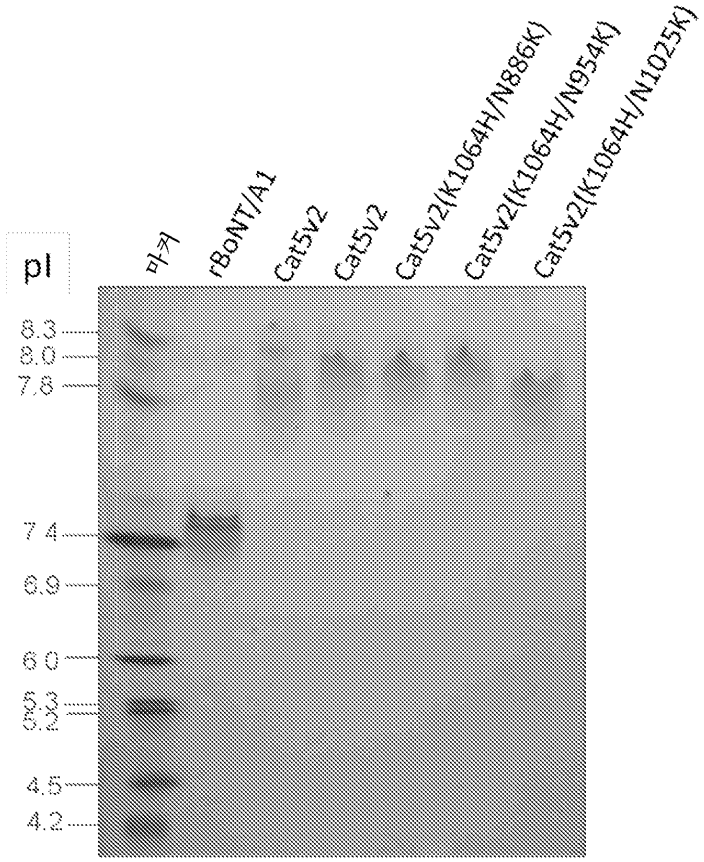
[0355] 안검연축을 갖는 47세의 남성이 임상에 제공되었다. 환자는 상부 눈꺼풀의 측면 눈꺼풀앞 눈둘레근 및 하부 눈꺼풀의 측면 눈꺼풀앞 눈둘레근 내로 본 발명의 조작된 BoNT/A 5 pg 내지 25 pg의 주사에 의해 처치되었다. 환자의 증상의 경감은 약 1주에 일어났으며, 눈 안검하수증 없이 적어도 5개월 동안 지속되었다. 본 발명의 폴리펩티드의 증가된 안전성은 의사가 용량을 증가할 수 있도록 하였고, 따라서 임상 효과의 기간을 연장하였다.

[0356] **실시예 9**

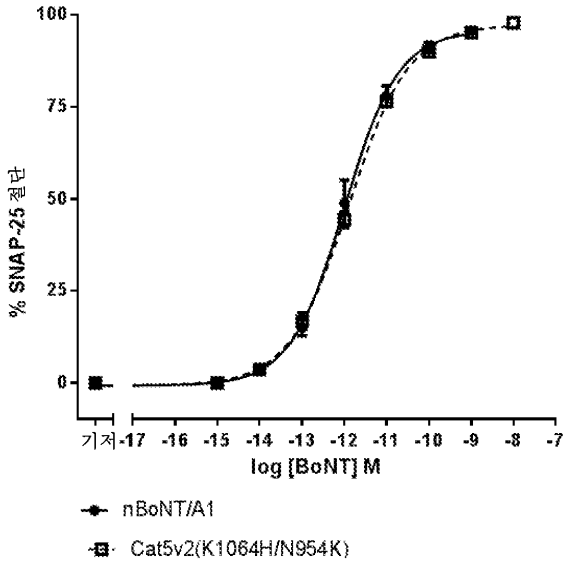
[0357] 쇠약한 첨족을 갖고 걷기가 어려운 뇌성마비를 앓고 있는 27세의 남성이 임상에 제공되었다. 환자는 이전에 BoNT/A의 치료적 유효량으로 처치되었으며, 그의 걸음걸이의 경감 개선은 근육 약화 및 그의 사지의 통증을 동반하였다. 환자를 질환에 걸린 하부 팔다리(들)의 장딴지근의 중앙 및 측면 헤드 중의 각각의 2개의 부위 내로의 본 발명의 조작된 BoNT/A 약 20 pg/kg의 주사에 의해 처치하였다. 1주 내에, 환자의 걸음걸이는 이전에 나타난 부작용 없이 개선되었으며, 증상 완화는 적어도 4개월 동안 지속되었다. 약품의 보다 높은 양을 투여하는 능력은 작용 기간의 연장을 초래하는 치료를 초래하였다.

도면

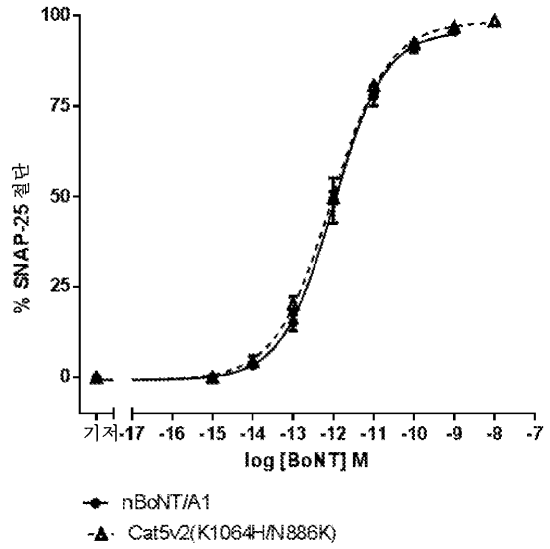
도면1


pI
마커
rBoNT/A1
Cat5v2
Cat5v2
Cat5v2(K1064H/N886K)
Cat5v2(K1064H/N954K)
Cat5v2(K1064H/N1025K)
8.3
8.0
7.8
7.4
6.9
6.0
5.3
5.2
4.5
4.2

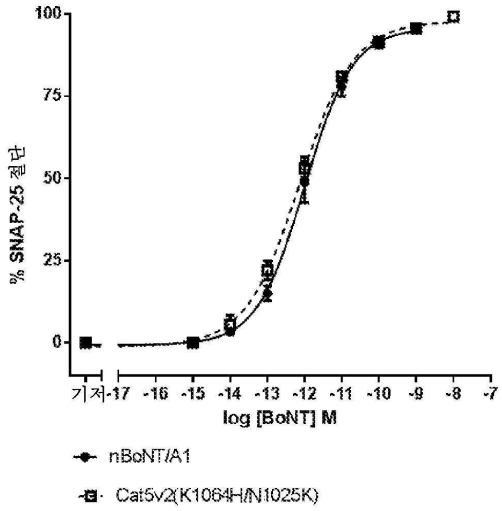
도면2a


100
75
50
25
0
% SNAP-25 절단
기저
-17
-16
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log [BoNT] M
nBoNT/A1
Cat5v2(K1064H/N954K)

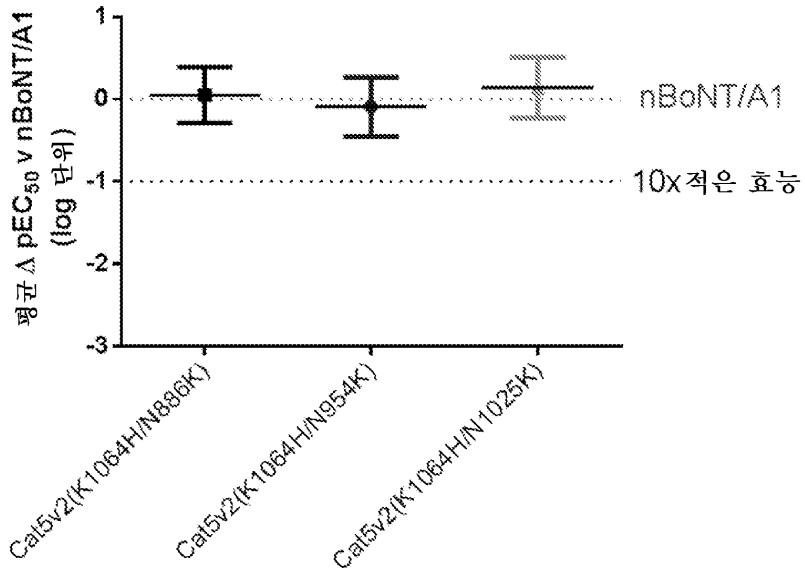
도면2b


100
75
50
25
0
% SNAP-25 절단
기저 -17 -16 -15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7
log [BoNT] M
nBoNT/A1
Cat5v2(K1064H/N886K)

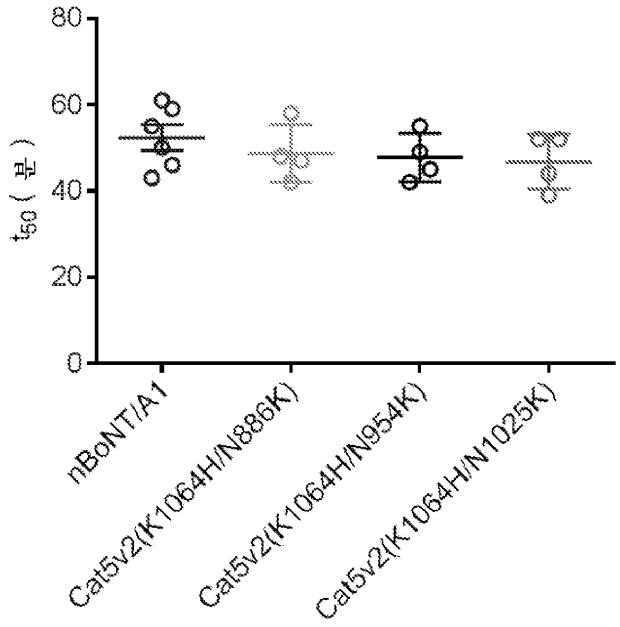
도면2c


100
75
50
25
0
% SNAP-25 절단
기저 -17 -16 -15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7
log [BoNT] M
nBoNT/A1
Cat5v2(K1064H/N1025K)

도면2d


평균 Δ pEC50 v nBoNT/A1 (log 단위)
1
0
-1
-2
-3
nBoNT/A1
10x적은 효능
Cal5v2(K1064H/N886K)
Cal5v2(K1064H/N954K)
Cal5v2(K1064H/N1025K)

도면3



SXN/ 배치	t_{50} (평균 분 ± sem)
nBoNT/A1	52 ± 3
Cat5v2(K1064H/N886K)	49 ± 3
Cat5v2(K1064H/N954K)	48 ± 3
Cat5v2(K1064H/N1025K)	47 ± 3

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> SYNTAXIN LIMITED

<120> CATIONIC NEUROTOXINS

<130> P40989WO

<150> GB 1312317.9

<151> 2013-07-09

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3888

<212> DNA

<213> Clostridium botulinum

<400> 1

atgccattcg tcaacaagca attcaactac aaagacccag tcaacggcgt cgacatcgca 60

tacatcaaga ttccgaacgc cggtcaaatg cagccggtta aggcttttaa gatccacaac 120

aagatttggg ttatcccgga gcgtgacacc ttcacgaacc cggaagaagg cgatctgaac 180

ccgccaccgg aagcgaagca agtccctgtc agctactacg attcgacgta cctgagcacg 240

gataacgaaa aagataacta cctgaaaggt gtgaccaagc tgttcgaacg tatctacagc 300

acggatctgg gtcgcatgct gctgactagc attgttcgcg gtatcccgtt ctggggtggt 360

agcacgattg acaccgaact gaaggttatc gacactaact gcattaacgt tattcaaccg 420

gatggtagct atcgtagcga agagctgaat ctggtcatca ttggcccgag cgcagacatt 480

atccaattcg agtgcaagag ctttggtcac gaggttctga atctgacccg caatggctat 540

ggtagcaccc agtacattcg tttttcgccg gattttacct tcggctttga agagagcctg 600

gaggttgata ccaatccgtt gctgggtgcg ggcaaattcg ctaccgatcc ggctgtcacg 660

ctggcccatg aactgatcca cgcaggccac cgcctgtacg gcattgccat caacccaaac 720

cgtgtgttca aggttaatac gaatgcatac tacgagatga gcggcctgga agtcagcttc 780

gaagaactgc gcaccttcgg tggccatgac gctaaattca ttgacagctt gcaagagaat 840

gagttccgtc tgtactacta taacaaattc aaagacattg caagcacgtt gaacaaggcc 900

aaaagcatcg ttggtactac cgcgtcgttg cagtatatga agaatgtgtt taaagagaag 960

tacctgctgt ccgaggatac ctccggcaag tttagcgttg ataagctgaa gtttgacaaa 1020

ctgtacaaga tgctgaccga gatttacacc gaggacaact ttgtgaaatt cttcaaagtg 1080

ttgaatcgta aaacctatct gaattttgac aaagcggttt tcaagattaa catcgtgccg 1140

aaggtgaact acaccatcta tgacggtttt aacctgcgta acaccaacct ggcggcgaac 1200

tttaacggtc agaatacgga aatcaacaac atgaatttca cgaagttgaa gaacttcacg 1260

ggtctgttcg agttctataa gctgctgtgc gtgcgcggta tcatcaccag caaaaccaaa 1320

agcctggaca aaggctacaa caaggcgctg aatgacctgt gcattaaggt aaacaattgg 1380

gatctgttct tttcgccatc cgaagataat tttaccaacg acctgaacaa gggtgaagaa 1440

atcaccagcg atacgaatat tgaagcagcg gaagagaata tcagcctgga tctgatccag 1500

cagtactatc tgacctttaa cttcgacaat gaaccggaga acattagcat tgagaatctg 1560

agcagcgaca ttatcggtca gctggaactg atgccgaata tcgaacgttt cccgaacggc 1620

aaaaagtacg agctggacaa gtacactatg ttccattacc tgcgtgcaca ggagtttgaa 1680

cacggtaaaa gccgtatcgc gctgaccaac agcgttaacg aggccctgct gaacccgagc 1740

cgtgtctata ccttcttcag cagcgactat gttaagaaag tgaacaaagc cactgaggcc 1800

gcgatgttcc tgggctgggt ggaacagctg gtatatgact tcacggacga gacgagcgaa 1860

gtgagcacta ccgacaaaat tgctgatatt accatcatta tcccgtatat tggtccggca 1920

ctgaacattg gcaacatgct gtacaaagac gattttgtgg gtgccctgat cttctccggt 1980

gccgtgattc tgctggagtt cattccggag attgcgatcc cggtgttggg taccttcgcg 2040

ctggtgtcct acatcgcgaa taaggttctg acggttcaga ccatcgataa cgcgctgtcg 2100

aaacgtaatg aaaaatggga cgaggtttac aaatacattg ttacgaattg gctggcgaaa 2160

gtcaataccc agatcgacct gatccgtaag aaaatgaaag aggcgctgga gaatcaggcg 2220

gaggccacca aagcaattat caactaccaa tacaaccagt acacggaaga agagaagaat 2280

aacattaact tcaatatcga tgatttgagc agcaagctga atgaatctat caacaaagcg 2340

atgatcaata tcaacaagtt tttgaatcag tgtagcgttt cgtacctgat gaatagcatg 2400

attccgtatg gcgtcaaacg tctggaggac ttcgacgcca gcctgaaaga tgcgttgctg 2460

aaatacattt acgacaatcg tggtacgctg attggccaag ttgaccgctt gaaagacaaa 2520

gttaacaata ccctgagcac cgacatccca tttcaactga gcaagtatgt tgataatcaa 2580

cgtctgttga gcactttcac cgagtatatc aaaaacatca tcaatactag cattctgaac 2640

ctgcgttacg agagcaatca tctgattgat ctgagccgtt atgcaagcaa gatcaacatc 2700

ggtagcaagg tcaattttga cccgatcgat aagaaccaga tccagctgtt taatctggaa 2760

tcgagcaaaa ttgaggttat cctgaaaaac gccattgtct acaactccat gtacgagaat 2820

ttctccacca gcttctggat tcgcatcccg aaatacttca acagcattag cctgaacaac 2880

gagtatacta tcatcaactg tatggagaac aacagcggtt ggaaggtgtc tctgaactat 2940

ggtgagatca tttggacctt gcaggacacc caagagatca agcagcgcgt cgtgttcaag 3000

tactctcaaa tgatcaacat ttccgattac attaatcgtt ggatcttcgt gaccattacg 3060

aataaccgtc tgaataacag caagatttac atcaatggtc gcttgatcga tcagaaaccg 3120

attagcaacc tgggtaatat ccacgcaagc aacaacatta tgttcaaatt ggacggttgc 3180

cgcgataccc atcgttatat ctggatcaag tatttcaacc tgtttgataa agaactgaat 3240

gagaaggaga tcaaagattt gtatgacaac caatctaaca gcggcatttt gaaggacttc 3300

tggggcgatt atctgcaata cgataagccg tactatatgc tgaacctgta tgatccgaac 3360

aaatatgtgg atgtcaataa tgtgggtatt cgtggttaca tgtatttgaa gggtccgcgt 3420

ggcagcgtta tgacgaccaa catttacctg aactctagcc tgtaccgtgg tacgaaattc 3480

atcattaaga aatatgccag cggcaacaaa gataacattg tgcgtaataa cgatcgtgtc 3540

tacatcaacg tggtcgtgaa gaataaagag taccgtctgg cgaccaacgc ttcgcaggcg 3600

ggtgttgaga aaattctgag cgcgttggag atccctgatg tcggtaatct gagccaagtc 3660

gtggttatga agagcaagaa cgaccagggt atcactaaca agtgcaagat gaacctgcaa 3720

gacaacaatg gtaacgacat cggctttatt ggtttccacc agttcaacaa tattgctaaa 3780

ctggtagcga gcaattggta caatcgtcag attgagcgca gcagccgtac tttgggctgt 3840

agctgggagt ttatcccggt cgatgatggt tggggcgaac gtccgctg 3888

<210> 2

<211> 1296

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 2

Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly

1 5 10 15

Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro

20 25 30

Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg

35 40 45

Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu

50 55 60

Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr

65 70 75 80

Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu

85 90 95

Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val

100 105 110

Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys

115 120 125

Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr

130 135 140

Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile

145 150 155 160

Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr
165 170 175
Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
180 185 190
Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu

195 200 205
Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu
210 215 220
Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn
225 230 235 240
Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu
245 250 255
Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys

260 265 270
Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn
275 280 285
Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val
290 295 300
Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
305 310 315 320
Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu

325 330 335
Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp
340 345 350
Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
355 360 365
Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr
370 375 380
Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn

385 390 395 400
Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu

405 410 415

Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg

420 425 430

Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys

435 440 445

Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe

450 455 460

Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu

465 470 475 480

Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu

485 490 495

Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro

500 505 510

Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu

515 520 525

Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu

530 535 540

Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu

545 550 555 560

His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu

565 570 575

Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys

580 585 590

Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu

595 600 605

Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr

610 615 620

Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala

625 630 635 640

Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu

645 650 655

Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
660 665 670
Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
675 680 685
Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu
690 695 700
Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys

705 710 715 720
Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu
725 730 735
Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn
740 745 750
Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
755 760 765
Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile

770 775 780
Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
785 790 795 800
Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys
805 810 815
Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
820 825 830
Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp

835 840 845
Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser
850 855 860
Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn
865 870 875 880
Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser
885 890 895
Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn

900 905 910

Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu

915 920 925

Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser

930 935 940

Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn

945 950 955 960

Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val

965 970 975

Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu

980 985 990

Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser

995 1000 1005

Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg

1010 1015 1020

Leu Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln

1025 1030 1035

Lys Pro Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile

1040 1045 1050

Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp

1055 1060 1065

Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu

1070 1075 1080

Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys

1085 1090 1095

Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met

1100 1105 1110

Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val

1115 1120 1125

Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val

1130 1135 1140

Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Thr

1145 1150 1155

Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp Asn Ile

1160 1165 1170

Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys Asn

1175 1180 1185

Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Glu

1190 1195 1200

Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser

1205 1210 1215

Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr Asn

1220 1225 1230

Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly

1235 1240 1245

Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala

1250 1255 1260

Ser Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu

1265 1270 1275

Gly Cys Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu

1280 1285 1290

Arg Pro Leu

1295

<210> 3

<211> 3888

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered BoNT/A1

<400> 3

atgccattcg tcaacaagca attcaactac aaagacccag tcaacggcgt cgacatcgca 60

tacatcaaga ttccgaacgc cggtcaaatg cagccggtta aggcttttaa gatccacaac 120

aagatttggg ttatcccgga gcgtgacacc ttcacgaacc cggaagaagg cgatctgaac 180

ccgccaccgg aagcgaagca agtccctgtc agctactacg attcgacgta cctgagcacg 240

gataacgaaa aagataacta cctgaaaggt gtgaccaagc tgttcgaacg tatctacagc 300

acggatctgg gtcgcatgct gctgactagc attgttcgcg gtatcccgtt ctggggtggt 360

agcacgattg acaccgaact gaaggttatc gacactaact gcattaacgt tattcaaccg 420

gatggtagct atcgtagcga agagctgaat ctggtcatca ttggcccgag cgcagacatt 480

atccaattcg agtgcaagag ctttggtcac gaggttctga atctgacccg caatggctat 540

ggtagcaccc agtacattcg tttttcgccg gattttacct tcggctttga agagagcctg 600

gaggttgata ccaatccgtt gctgggtgcg ggcaaattcg ctaccgatcc ggctgtcacg 660

ctggcccatg aactgatcca cgcaggccac cgcctgtacg gcattgccat caacccaaac 720

cgtgtgttca aggttaatac gaatgcatac tacgagatga gcggcctgga agtcagcttc 780

gaagaactgc gcaccttcgg tggccatgac gctaaattca ttgacagctt gcaagagaat 840

gagttccgtc tgtactacta taacaaattc aaagacattg caagcacgtt gaacaaggcc 900

aaaagcatcg ttggtactac cgcgtcgttg cagtatatga agaatgtgtt taaagagaag 960

tacctgctgt ccgaggatac ctccggcaag tttagcgttg ataagctgaa gtttgacaaa 1020

ctgtacaaga tgctgaccga gatttacacc gaggacaact ttgtgaaatt cttcaaagtg 1080

ttgaatcgta aaacctatct gaattttgac aaagcggttt tcaagattaa catcgtgccg 1140

aaggtgaact acaccatcta tgacggtttt aacctgcgta acaccaacct ggcggcgaac 1200

tttaacggtc agaatacgga aatcaacaac atgaatttca cgaagttgaa gaacttcacg 1260

ggtctgttcg agttctataa gctgctgtgc gtgcgcggta tcatcaccag caaaaccaaa 1320

agcctggaca aaggctacaa caaggcgctg aatgacctgt gcattaaggt aaacaattgg 1380

gatctgttct tttcgccatc cgaagataat tttaccaacg acctgaacaa gggtgaagaa 1440

atcaccagcg atacgaatat tgaagcagcg gaagagaata tcagcctgga tctgatccag 1500

cagtactatc tgacctttaa cttcgacaat gaaccggaga acattagcat tgagaatctg 1560

agcagcgaca ttatcggtca gctggaactg atgccgaata tcgaacgttt cccgaacggc 1620

aaaaagtacg agctggacaa gtacactatg ttccattacc tgcgtgcaca ggagtttgaa 1680

cacggtaaaa gccgtatcgc gctgaccaac agcgttaacg aggccctgct gaacccgagc 1740

cgtgtctata ccttcttcag cagcgactat gttaagaaag tgaacaaagc cactgaggcc 1800

gcgatgttcc tgggctgggt ggaacagctg gtatatgact tcacggacga gacgagcgaa 1860

gtgagcacta ccgacaaaat tgctgatatt accatcatta tcccgtatat tggtccggca 1920

ctgaacattg gcaacatgct gtacaaagac gattttgtgg gtgccctgat cttctccggt 1980

gccgtgattc tgctggagtt cattccggag attgcgatcc cggtgttggg taccttcgcg 2040

ctggtgtcct acatcgcgaa taaggttctg acggttcaga ccatcgataa cgcgctgtcg 2100

aaacgtaatg aaaaatggga cgaggtttac aaatacattg ttacgaattg gctggcgaaa 2160

gtcaataccc agatcgacct gatccgtaag aaaatgaaag aggcgctgga gaatcaggcg 2220

gaggccacca aagcaattat caactaccaa tacaaccagt acacggaaga agagaagaat 2280

aacattaact tcaatatcga tgatttgagc agcaagctga atgaatctat caacaaagcg 2340

atgatcaata tcaacaagtt tttgaatcag tgtagcgttt cgtacctgat gaatagcatg 2400

attccgtatg gcgtcaaacg tctggaggac ttcgacgcca gcctgaaaga tgcgttgctg 2460

aaatacattt acgacaatcg tggtacgctg attggccaag ttgaccgctt gaaagacaaa 2520

gttaacaata ccctgagcac cgacatccca tttcaactga gcaagtatgt tgataatcaa 2580

cgtctgttga gcactttcac cgagtatatc aaaaacatca tcaatactag cattctgaac 2640

ctgcgttacg agagcaagca tctgattgat ctgagccgtt atgctagcaa gatcaacatc 2700

ggtagcaagg tcaattttga cccgatcgat aagaaccaga tccagctgtt taatctggaa 2760

tcgagcaaaa ttgaggttat cctgaaaaag gccattgtct acaactccat gtacgagaat 2820

ttctccacca gcttctggat tcgcatcccg aaatacttca acaagattag cctgaacaac 2880

gagtatacta tcatcaactg tatggagaac aacagcggtt ggaaggtgtc tctgaactat 2940

ggtgagatca tttggacctt gcaggacacc aaagagatca agcagcgcgt cgtgttcaag 3000

tactctcaaa tgatcaacat ttccgattac attaatcgtt ggatcttcgt gaccattacg 3060

aataaccgtc tgaataagag caagatttac atcaatggtc gcttgatcga tcagaaaccg 3120

attagcaacc tgggtaatat ccacgcaagc aacaagatta tgttcaaatt ggacggttgc 3180

cgcgataccc atcgttatat ctggatcaag tatttcaacc tgtttgataa agaactgaat 3240

gagaaggaga tcaaagattt gtatgacaac caatctaaca gcggcatttt gaaggacttc 3300

tggggcgatt atctgcaata cgataagccg tactatatgc tgaacctgta tgatccgaac 3360

aaatatgtgg atgtcaataa tgtgggtatt cgtggttaca tgtatttgaa gggtccgcgt 3420

ggcagcgtta tgacgaccaa catttacctg aactctagcc tgtaccgtgg tacgaaattc 3480

atcattaaga aatatgccag cggcaacaaa gataacattg tgcgtaataa cgatcgtgtc 3540

tacatcaacg tggtcgtgaa gaataaagag taccgtctgg cgaccaacgc ttcgcaggcg 3600

ggtgttgaga aaattctgag cgcgttggag atccctgatg tcggtaatct gagccaagtc 3660

gtggttatga agagcaagaa cgacaagggt atcactaaca agtgcaagat gaacctgcaa 3720

gacaacaatg gtaacgacat cggctttatt ggtttccacc agttcaacaa tattgctaaa 3780

ctggtagcga gcaattggta caatcgtcag attgagcgca gcagccgtac tttgggctgt 3840

agctgggagt ttatcccggt cgatgatggt tggggcgaac gtccgctg 3888

<210> 4

<211> 1296

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered BoNT/A1

<400> 4

Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly
1 5 10 15

Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro
20 25 30

Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg
35 40 45

Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu
50 55 60

Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr
65 70 75 80

Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu
85 90 95

Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val
100 105 110

Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys
115 120 125

Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr
130 135 140

Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile
145 150 155 160

Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr
165 170 175

Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
180 185 190

Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu

195 200 205

Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu

210 215 220

Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn

225 230 235 240

Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu

245 250 255

Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys

260 265 270

Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn

275 280 285

Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val

290 295 300

Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys

305 310 315 320

Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu

325 330 335

Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp

340 345 350

Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn

355 360 365

Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr

370 375 380

Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn

385 390 395 400

Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu

405 410 415

Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg

420 425 430

Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys

435 440 445

Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe
450 455 460
Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu
465 470 475 480
Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
485 490 495
Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro
500 505 510

Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
515 520 525
Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
530 535 540
Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu
545 550 555 560
His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu
565 570 575

Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys
580 585 590
Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu
595 600 605
Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr
610 615 620
Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala
625 630 635 640

Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu
645 650 655
Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
660 665 670
Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
675 680 685
Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu

690 695 700

Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys
705 710 715 720
Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu
725 730 735
Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn
740 745 750
Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
755 760 765

Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
770 775 780
Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
785 790 795 800
Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys
805 810 815
Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
820 825 830

Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
835 840 845
Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser
850 855 860
Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn
865 870 875 880
Leu Arg Tyr Glu Ser Lys His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser
885 890 895

Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn
900 905 910
Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu
915 920 925
Lys Lys Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser
930 935 940

Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Lys Ile Ser Leu Asn Asn
945 950 955 960

Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val
965 970 975
Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Lys Glu
980 985 990
Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser
995 1000 1005
Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg
1010 1015 1020

Leu Asn Lys Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln
1025 1030 1035
Lys Pro Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Lys Ile
1040 1045 1050
Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp
1055 1060 1065
Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu
1070 1075 1080

Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys
1085 1090 1095
Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met
1100 1105 1110
Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val
1115 1120 1125
Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val
1130 1135 1140

Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Thr
1145 1150 1155
Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp Asn Ile
1160 1165 1170
Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys Asn

1175 1180 1185

Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Glu

1190 1195 1200

Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser

1205 1210 1215

Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Lys Gly Ile Thr Asn

1220 1225 1230

Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly

1235 1240 1245

Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala

1250 1255 1260

Ser Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu

1265 1270 1275

Gly Cys Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu

1280 1285 1290

Arg Pro Leu

1295

<210> 5

<211> 3888

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered BoNT/A1

<400> 5

atgccattcg tcaacaagca attcaactac aaagacccag tcaacggcgt cgacatcgca 60

tacatcaaga ttccgaacgc cggtcaaatg cagccggtta aggcttttaa gatccacaac 120

aagatttggg ttatcccgga gcgtgacacc ttcacgaacc cggaagaagg cgatctgaac 180

ccgccaccgg aagcgaagca agtccctgtc agctactacg attcgacgta cctgagcacg 240

gataacgaaa aagataacta cctgaaaggt gtgaccaagc tgttcgaacg tatctacagc 300

acggatctgg gtcgcatgct gctgactagc attgttcgcg gtatcccgtt ctggggtggt 360

agcacgattg acaccgaact gaaggttatc gacactaact gcattaacgt tattcaaccg 420

gatggtagct atcgtagcga agagctgaat ctggtcatca ttggcccgag cgcagacatt 480

atccaattcg agtgcaagag ctttggtcac gaggttctga atctgacccg caatggctat 540

ggtagcaccc agtacattcg tttttcgccg gattttacct tcggctttga agagagcctg 600

gaggttgata ccaatccgtt gctgggtgcg ggcaaattcg ctaccgatcc ggctgtcacg 660

ctggcccatg aactgatcca cgcaggccac cgcctgtacg gcattgccat caacccaaac 720

cgtgtgttca aggttaatac gaatgcatac tacgagatga gcggcctgga agtcagcttc 780

gaagaactgc gcaccttcgg tggccatgac gctaaattca ttgacagctt gcaagagaat 840

gagttccgtc tgtactacta taacaaattc aaagacattg caagcacgtt gaacaaggcc 900

aaaagcatcg ttggtactac cgcgtcgttg cagtatatga agaatgtgtt taaagagaag 960

tacctgctgt ccgaggatac ctccggcaag tttagcgttg ataagctgaa gtttgacaaa 1020

ctgtacaaga tgctgaccga gatttacacc gaggacaact ttgtgaaatt cttcaaagtg 1080

ttgaatcgta aaacctatct gaattttgac aaagcggttt tcaagattaa catcgtgccg 1140

aaggtgaact acaccatcta tgacggtttt aacctgcgta acaccaacct ggcggcgaac 1200

tttaacggtc agaatacgga aatcaacaac atgaatttca cgaagttgaa gaacttcacg 1260

ggtctgttcg agttctataa gctgctgtgc gtgcgcggta tcatcaccag caaaaccaaa 1320

agcctggaca aaggctacaa caaggcgctg aatgacctgt gcattaaggt aaacaattgg 1380

gatctgttct tttcgccatc cgaagataat tttaccaacg acctgaacaa gggtgaagaa 1440

atcaccagcg atacgaatat tgaagcagcg gaagagaata tcagcctgga tctgatccag 1500

cagtactatc tgacctttaa cttcgacaat gaaccggaga acattagcat tgagaatctg 1560

agcagcgaca ttatcggtca gctggaactg atgccgaata tcgaacgttt cccgaacggc 1620

aaaaagtacg agctggacaa gtacactatg ttccattacc tgcgtgcaca ggagtttgaa 1680

cacggtaaaa gccgtatcgc gctgaccaac agcgttaacg aggccctgct gaacccgagc 1740

cgtgtctata ccttcttcag cagcgactat gttaagaaag tgaacaaagc cactgaggcc 1800

gcgatgttcc tgggctgggt ggaacagctg gtatatgact tcacggacga gacgagcgaa 1860

gtgagcacta ccgacaaaat tgctgatatt accatcatta tcccgtatat tggtccggca 1920

ctgaacattg gcaacatgct gtacaaagac gattttgtgg gtgccctgat cttctccggt 1980

gccgtgattc tgctggagtt cattccggag attgcgatcc cggtgttggg taccttcgcg 2040

ctggtgtcct acatcgcgaa taaggttctg acggttcaga ccatcgataa cgcgctgtcg 2100

aaacgtaatg aaaaatggga cgaggtttac aaatacattg ttacgaattg gctggcgaaa 2160

gtcaataccc agatcgacct gatccgtaag aaaatgaaag aggcgctgga gaatcaggcg 2220

gaggccacca aagcaattat caactaccaa tacaaccagt acacggaaga agagaagaat 2280

aacattaact tcaatatcga tgatttgagc agcaagctga atgaatctat caacaaagcg 2340

atgatcaata tcaacaagtt tttgaatcag tgtagcgttt cgtacctgat gaatagcatg 2400

attccgtatg gcgtcaaacg tctggaggac ttcgacgcca gcctgaaaga tgcgttgctg 2460

aaatacattt acgacaatcg tggtacgctg attggccaag ttgaccgctt gaaagacaaa 2520

gttaacaata ccctgagcac cgacatccca tttcaactga gcaagtatgt tgataatcaa 2580

cgtctgttga gcactttcac cgagtatatc aaaaacatca tcaatactag cattctgaac 2640

ctgcgttacg agagcaatca tctgattgat ctgagccgtt atgctagcaa gatcaacatc 2700

ggtagcaagg tcaattttga cccgatcgat aagaaccaga tccagctgtt taatctggaa 2760

tcgagcaaaa ttgaggttat cctgaaaaag gccattgtct acaactccat gtacgagaat 2820

ttctccacca gcttctggat tcgcatcccg aaatacttca agaagattag cctgaacaac 2880

gagtatacta tcatcaactg tatggagaac aacagcggtt ggaaggtgtc tctgaactat 2940

ggtgagatca tttggacctt gcaggacacc aaagagatca agcagcgcgt cgtgttcaag 3000

tactctcaaa tgatcaacat ttccgattac attaatcgtt ggatcttcgt gaccattacg 3060

aataaccgtc tgaataagag caagatttac atcaatggtc gcttgatcga tcagaaaccg 3120

attagcaacc tgggtaatat ccacgcaagc aacaagatta tgttcaaatt ggacggttgc 3180

cgcgataccc atcgttatat ctggatcaag tatttcaacc tgtttgataa agaactgaat 3240

gagaaggaga tcaaagattt gtatgacaac caatctaaca gcggcatttt gaaggacttc 3300

tggggcgatt atctgcaata cgataagccg tactatatgc tgaacctgta tgatccgaac 3360

aaatatgtgg atgtcaataa tgtgggtatt cgtggttaca tgtatttgaa gggtccgcgt 3420

ggcagcgtta tgacgaccaa catttacctg aactctagcc tgtaccgtgg tacgaaattc 3480

atcattaaga aatatgccag cggcaacaaa gataacattg tgcgtaataa cgatcgtgtc 3540

tacatcaacg tggtcgtgaa gaataaagag taccgtctgg cgaccaacgc ttcgcaggcg 3600

ggtgttgaga aaattctgag cgcgttggag atccctgatg tcggtaatct gagccaagtc 3660

gtggttatga agagcaagaa cgacaagggt atcactaaca agtgcaagat gaacctgcaa 3720

gacaacaatg gtaacgacat cggctttatt ggtttccacc agttcaacaa tattgctaaa 3780

ctggtagcga gcaattggta caatcgtcag attgagcgca gcagccgtac tttgggctgt 3840

agctgggagt ttatcccggt cgatgatggt tggggcgaac gtccgctg 3888

<210> 6

<211> 1296

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered BoNT/A1

<400> 6

Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly
1 5 10 15

Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro
20 25 30

Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg
35 40 45

Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu
50 55 60

Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr
65 70 75 80

Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu
85 90 95

Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val
100 105 110

Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys
115 120 125

Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr
130 135 140

Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile
145 150 155 160

Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr
165 170 175

Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
180 185 190

Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
195 200 205

Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu
210 215 220

Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn

225 230 235 240

Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu

245 250 255

Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys

260 265 270

Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn

275 280 285

Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val

290 295 300

Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys

305 310 315 320

Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu

325 330 335

Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp

340 345 350

Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn

355 360 365

Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr

370 375 380

Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn

385 390 395 400

Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu

405 410 415

Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg

420 425 430

Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys

435 440 445

Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe

450 455 460

Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu

465 470 475 480

Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
485 490 495
Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro

500 505 510
Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
515 520 525
Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
530 535 540
Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu
545 550 555 560
His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu

565 570 575
Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys
580 585 590
Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu
595 600 605
Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr
610 615 620
Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala

625 630 635 640
Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu
645 650 655
Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
660 665 670
Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
675 680 685
Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu

690 695 700
Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys
705 710 715 720
Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu

725 730 735

Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn

740 745 750

Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp

755 760 765

Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile

770 775 780

Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met

785 790 795 800

Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys

805 810 815

Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly

820 825 830

Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp

835 840 845

Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser

850 855 860

Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn

865 870 875 880

Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser

885 890 895

Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn

900 905 910

Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu

915 920 925

Lys Lys Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser

930 935 940

Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Lys Lys Ile Ser Leu Asn Asn

945 950 955 960

Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val

965 970 975

Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Lys Glu

980 985 990

Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser

995 1000 1005

Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg

1010 1015 1020

Leu Asn Lys Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln

1025 1030 1035

Lys Pro Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Lys Ile

1040 1045 1050

Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp

1055 1060 1065

Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu

1070 1075 1080

Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys

1085 1090 1095

Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met

1100 1105 1110

Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val

1115 1120 1125

Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val

1130 1135 1140

Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Thr

1145 1150 1155

Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp Asn Ile

1160 1165 1170

Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys Asn

1175 1180 1185

Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Glu

1190 1195 1200

Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser

1205 1210 1215

Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Lys Gly Ile Thr Asn

1220 1225 1230

Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly

1235 1240 1245

Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala

1250 1255 1260

Ser Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu

1265 1270 1275

Gly Cys Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu

1280 1285 1290

Arg Pro Leu

1295

<210> 7

<211> 3888

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered BoNT/A1

<400> 7

atgccattcg tcaacaagca attcaactac aaagacccag tcaacggcgt cgacatcgca 60

tacatcaaga ttccgaacgc cggtcaaatg cagccggtta aggcttttaa gatccacaac 120

aagatttggg ttatcccgga gcgtgacacc ttcacgaacc cggaagaagg cgatctgaac 180

ccgccaccgg aagcgaagca agtccctgtc agctactacg attcgacgta cctgagcacg 240

gataacgaaa aagataacta cctgaaaggt gtgaccaagc tgttcgaacg tatctacagc 300

acggatctgg gtcgcatgct gctgactagc attgttcgcg gtatcccgtt ctggggtggt 360

agcacgattg acaccgaact gaaggttatc gacactaact gcattaacgt tattcaaccg 420

gatggtagct atcgtagcga agagctgaat ctggtcatca ttggcccgag cgcagacatt 480

atccaattcg agtgcaagag ctttggtcac gaggttctga atctgacccg caatggctat 540

ggtagcaccc agtacattcg tttttcgccg gattttacct tcggctttga agagagcctg 600

gaggttgata ccaatccgtt gctgggtgcg ggcaaattcg ctaccgatcc ggctgtcacg 660

ctggcccatg aactgatcca cgcaggccac cgcctgtacg gcattgccat caacccaaac 720

cgtgtgttca aggttaatac gaatgcatac tacgagatga gcggcctgga agtcagcttc 780

gaagaactgc gcaccttcgg tggccatgac gctaaattca ttgacagctt gcaagagaat 840

gagttccgtc tgtactacta taacaaattc aaagacattg caagcacgtt gaacaaggcc 900

aaaagcatcg ttggtactac cgcgtcgttg cagtatatga agaatgtgtt taaagagaag 960

tacctgctgt ccgaggatac ctccggcaag tttagcgttg ataagctgaa gtttgacaaa 1020

ctgtacaaga tgctgaccga gatttacacc gaggacaact ttgtgaaatt cttcaaagtg 1080

ttgaatcgta aaacctatct gaattttgac aaagcggttt tcaagattaa catcgtgccg 1140

aaggtgaact acaccatcta tgacggtttt aacctgcgta acaccaacct ggcggcgaac 1200

tttaacggtc agaatacgga aatcaacaac atgaatttca cgaagttgaa gaacttcacg 1260

ggtctgttcg agttctataa gctgctgtgc gtgcgcggta tcatcaccag caaaaccaaa 1320

agcctggaca aaggctacaa caaggcgctg aatgacctgt gcattaaggt aaacaattgg 1380

gatctgttct tttcgccatc cgaagataat tttaccaacg acctgaacaa gggtgaagaa 1440

atcaccagcg atacgaatat tgaagcagcg gaagagaata tcagcctgga tctgatccag 1500

cagtactatc tgacctttaa cttcgacaat gaaccggaga acattagcat tgagaatctg 1560

agcagcgaca ttatcggtca gctggaactg atgccgaata tcgaacgttt cccgaacggc 1620

aaaaagtacg agctggacaa gtacactatg ttccattacc tgcgtgcaca ggagtttgaa 1680

cacggtaaaa gccgtatcgc gctgaccaac agcgttaacg aggccctgct gaacccgagc 1740

cgtgtctata ccttcttcag cagcgactat gttaagaaag tgaacaaagc cactgaggcc 1800

gcgatgttcc tgggctgggt ggaacagctg gtatatgact tcacggacga gacgagcgaa 1860

gtgagcacta ccgacaaaat tgctgatatt accatcatta tcccgtatat tggtccggca 1920

ctgaacattg gcaacatgct gtacaaagac gattttgtgg gtgccctgat cttctccggt 1980

gccgtgattc tgctggagtt cattccggag attgcgatcc cggtgttggg taccttcgcg 2040

ctggtgtcct acatcgcgaa taaggttctg acggttcaga ccatcgataa cgcgctgtcg 2100

aaacgtaatg aaaaatggga cgaggtttac aaatacattg ttacgaattg gctggcgaaa 2160

gtcaataccc agatcgacct gatccgtaag aaaatgaaag aggcgctgga gaatcaggcg 2220

gaggccacca aagcaattat caactaccaa tacaaccagt acacggaaga agagaagaat 2280

aacattaact tcaatatcga tgatttgagc agcaagctga atgaatctat caacaaagcg 2340

atgatcaata tcaacaagtt tttgaatcag tgtagcgttt cgtacctgat gaatagcatg 2400

attccgtatg gcgtcaaacg tctggaggac ttcgacgcca gcctgaaaga tgcgttgctg 2460

aaatacattt acgacaatcg tggtacgctg attggccaag ttgaccgctt gaaagacaaa 2520

gttaacaata ccctgagcac cgacatccca tttcaactga gcaagtatgt tgataatcaa 2580

cgtctgttga gcactttcac cgagtatatc aaaaacatca tcaatactag cattctgaac 2640
ctgcgttacg agagcaatca tctgattgat ctgagccgtt atgctagcaa gatcaacatc 2700
ggtagcaagg tcaattttga cccgatcgat aagaaccaga tccagctgtt taatctggaa 2760
tcgagcaaaa ttgaggttat cctgaaaaag gccattgtct acaactccat gtacgagaat 2820
ttctccacca gcttctggat tcgcatcccg aaatacttca acaagattag cctgaacaac 2880
gagtatacta tcatcaactg tatggagaac aacagcggtt ggaaggtgtc tctgaactat 2940
ggtgagatca tttggacctt gcaggacacc aaagagatca agcagcgcgt cgtgttcaag 3000

tactctcaaa tgatcaacat ttccgattac attaatcgtt ggatcttcgt gaccattacg 3060
aataaccgtc tgaagaagag caagatttac atcaatggtc gcttgatcga tcagaaaccg 3120
attagcaacc tgggtaatat ccacgcaagc aacaagatta tgttcaaatt ggacggttgc 3180
cgcgataccc atcgttatat ctggatcaag tatttcaacc tgtttgataa agaactgaat 3240
gagaaggaga tcaaagattt gtatgacaac caatctaaca gcggcatttt gaaggacttc 3300
tggggcgatt atctgcaata cgataagccg tactatatgc tgaacctgta tgatccgaac 3360
aaatatgtgg atgtcaataa tgtgggtatt cgtggttaca tgtatttgaa gggtccgcgt 3420

ggcagcgtta tgacgaccaa catttacctg aactctagcc tgtaccgtgg tacgaaattc 3480
atcattaaga aatatgccag cggcaacaaa gataacattg tgcgtaataa cgatcgtgtc 3540
tacatcaacg tggtcgtgaa gaataaagag taccgtctgg cgaccaacgc ttcgcaggcg 3600
ggtgttgaga aaattctgag cgcgttggag atccctgatg tcggtaatct gagccaagtc 3660
gtggttatga agagcaagaa cgacaagggt atcactaaca agtgcaagat gaacctgcaa 3720
gacaacaatg gtaacgacat cggctttatt ggtttccacc agttcaacaa tattgctaaa 3780
ctggtagcga gcaattggta caatcgtcag attgagcgca gcagccgtac tttgggctgt 3840

agctgggagt ttatcccggt cgatgatggt tggggcgaac gtccgctg 3888

<210> 8

<211> 1296

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered BoNT/A1

<400> 8

Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly
1 5 10 15

Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro

20 25 30

Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg

35 40 45

Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu

50 55 60

Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr

65 70 75 80

Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu

85 90 95

Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val

100 105 110

Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys

115 120 125

Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr

130 135 140

Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile

145 150 155 160

Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr

165 170 175

Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe

180 185 190

Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu

195 200 205

Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu

210 215 220

Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn

225 230 235 240

Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu

245 250 255

Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys

260 265 270

Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn

275 280 285

Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val

290 295 300

Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys

305 310 315 320

Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu

325 330 335

Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp

340 345 350

Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn

355 360 365

Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr

370 375 380

Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn

385 390 395 400

Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu

405 410 415

Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg

420 425 430

Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys

435 440 445

Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe

450 455 460

Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu

465 470 475 480

Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu

485 490 495

Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro

500 505 510

Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
515 520 525
Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
530 535 540
Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu

545 550 555 560
His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu
565 570 575
Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys
580 585 590
Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu
595 600 605
Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr

610 615 620
Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala
625 630 635 640
Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu
645 650 655
Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
660 665 670
Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys

675 680 685
Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu
690 695 700
Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys
705 710 715 720
Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu
725 730 735
Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn

740 745 750
Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp

```
        755                 760                 765
Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
    770                 775                 780
Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
785                 790                 795                 800
Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys

                805                 810                 815
Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
            820                 825                 830
Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
        835                 840                 845
Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser
    850                 855                 860
Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn

865                 870                 875                 880
Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser
                885                 890                 895
Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn
            900                 905                 910
Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu
        915                 920                 925
Lys Lys Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser

    930                 935                 940
Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Lys Ile Ser Leu Asn Asn
945                 950                 955                 960
Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val
                965                 970                 975
Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Lys Glu
            980                 985                 990
Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys  Tyr Ser Gln Met Ile  Asn Ile Ser

        995                 1000                1005
```

Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg
1010 1015 1020
Leu Lys Lys Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln
1025 1030 1035
Lys Pro Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Lys Ile
1040 1045 1050
Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp

1055 1060 1065
Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu
1070 1075 1080
Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys
1085 1090 1095
Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met
1100 1105 1110
Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val

1115 1120 1125
Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val
1130 1135 1140
Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Thr
1145 1150 1155
Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp Asn Ile
1160 1165 1170
Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys Asn

1175 1180 1185
Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Glu
1190 1195 1200
Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser
1205 1210 1215
Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Lys Gly Ile Thr Asn
1220 1225 1230
Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly

1235 1240 1245

Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala

1250 1255 1260

Ser Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu

1265 1270 1275

Gly Cys Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu

1280 1285 1290

Arg Pro Leu

1295

<210> 9

<211> 3888

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered BoNT/A1

<400> 9

atgccattcg tcaacaagca attcaactac aaagacccag tcaacggcgt cgacatcgca 60

tacatcaaga ttccgaacgc cggtcaaatg cagccggtta aggcttttaa gatccacaac 120

aagatttggg ttatcccgga gcgtgacacc ttcacgaacc cggaagaagg cgatctgaac 180

ccgccaccgg aagcgaagca agtccctgtc agctactacg attcgacgta cctgagcacg 240

gataacgaaa aagataacta cctgaaaggt gtgaccaagc tgttcgaacg tatctacagc 300

acggatctgg gtcgcatgct gctgactagc attgttcgcg gtatcccgtt ctggggtggt 360

agcacgattg acaccgaact gaaggttatc gacactaact gcattaacgt tattcaaccg 420

gatggtagct atcgtagcga agagctgaat ctggtcatca ttggcccgag cgcagacatt 480

atccaattcg agtgcaagag ctttggtcac gaggttctga atctgacccg caatggctat 540

ggtagcaccc agtacattcg tttttcgccg gattttacct tcggctttga agagagcctg 600

gaggttgata ccaatccgtt gctgggtgcg ggcaaattcg ctaccgatcc ggctgtcacg 660

ctggcccatg aactgatcca cgcaggccac cgcctgtacg gcattgccat caacccaaac 720

cgtgtgttca aggttaatac gaatgcatac tacgagatga gcggcctgga agtcagcttc 780

gaagaactgc gcaccttcgg tggccatgac gctaaattca ttgacagctt gcaagagaat 840

gagttccgtc tgtactacta taacaaattc aaagacattg caagcacgtt gaacaaggcc 900

aaaagcatcg ttggtactac cgcgtcgttg cagtatatga agaatgtgtt taaagagaag 960

tacctgctgt ccgaggatac ctccggcaag tttagcgttg ataagctgaa gtttgacaaa 1020

ctgtacaaga tgctgaccga gatttacacc gaggacaact ttgtgaaatt cttcaaagtg 1080

ttgaatcgta aaacctatct gaattttgac aaagcggttt tcaagattaa catcgtgccg 1140

aaggtgaact acaccatcta tgacggtttt aacctgcgta acaccaacct ggcggcgaac 1200

tttaacggtc agaatacgga aatcaacaac atgaatttca cgaagttgaa gaacttcacg 1260

ggtctgttcg agttctataa gctgctgtgc gtgcgcggta tcatcaccag caaaaccaaa 1320

agcctggaca aaggctacaa caaggcgctg aatgacctgt gcattaaggt aaacaattgg 1380

gatctgttct tttcgccatc cgaagataat tttaccaacg acctgaacaa gggtgaagaa 1440

atcaccagcg atacgaatat tgaagcagcg gaagagaata tcagcctgga tctgatccag 1500

cagtactatc tgacctttaa cttcgacaat gaaccggaga acattagcat tgagaatctg 1560

agcagcgaca ttatcggtca gctggaactg atgccgaata tcgaacgttt cccgaacggc 1620

aaaaagtacg agctggacaa gtacactatg ttccattacc tgcgtgcaca ggagtttgaa 1680

cacggtaaaa gccgtatcgc gctgaccaac agcgttaacg aggccctgct gaacccgagc 1740

cgtgtctata ccttcttcag cagcgactat gttaagaaag tgaacaaagc cactgaggcc 1800

gcgatgttcc tgggctgggt ggaacagctg gtatatgact tcacggacga gacgagcgaa 1860

gtgagcacta ccgacaaaat tgctgatatt accatcatta tcccgtatat tggtccggca 1920

ctgaacattg gcaacatgct gtacaaagac gattttgtgg gtgccctgat cttctccggt 1980

gccgtgattc tgctggagtt cattccggag attgcgatcc cggtgttggg taccttcgcg 2040

ctggtgtcct acatcgcgaa taaggttctg acggttcaga ccatcgataa cgcgctgtcg 2100

aaacgtaatg aaaaatggga cgaggtttac aaatacattg ttacgaattg gctggcgaaa 2160

gtcaataccc agatcgacct gatccgtaag aaaatgaaag aggcgctgga gaatcaggcg 2220

gaggccacca aagcaattat caactaccaa tacaaccagt acacggaaga agagaagaat 2280

aacattaact tcaatatcga tgatttgagc agcaagctga atgaatctat caacaaagcg 2340

atgatcaata tcaacaagtt tttgaatcag tgtagcgttt cgtacctgat gaatagcatg 2400

attccgtatg gcgtcaaacg tctggaggac ttcgacgcca gcctgaaaga tgcgttgctg 2460

aaatacattt acgacaatcg tggtacgctg attggccaag ttgaccgctt gaaagacaaa 2520

gttaacaata ccctgagcac cgacatccca tttcaactga gcaagtatgt tgataatcaa 2580

cgtctgttga gcactttcac cgagtatatc aaaaacatca tcaatactag cattctgaac 2640

ctgcgttacg agagcaatca tctgattgat ctgagccgtt atgcaagcaa gatcaacatc 2700

ggtagcaagg tcaattttga cccgatcgat aagaaccaga tccagctgtt taatctggaa 2760

tcgagcaaaa ttgaggttat cctgaaaaac gccattgtct acaactccat gtacgagaat 2820

ttctccacca gcttctggat tcgcatcccg aaatacttca acagcattag cctgaacaac 2880

gagtatacta tcatcaactg tatggagaac aacagcggtt ggaaggtgtc tctgaactat 2940
ggtgagatca tttggacctt gcaggacacc caagagatca agcagcgcgt cgtgttcaag 3000
tactctcaaa tgatcaacat ttccgattac attaatcgtt ggatcttcgt gaccattacg 3060
aataaccgtc tgaataacag caagatttac atcaatggtc gcttgatcga tcagaaaccg 3120
attagcaacc tgggtaatat ccacgcaagc aacaacatta tgttcaaatt ggacggttgc 3180
cgcgataccc atcgttatat ctggatcaag tatttcaacc tgtttgataa agaactgaat 3240
gagaaggaga tcaaagattt gtatgacaac caatctaaca gcggcatttt gaaggacttc 3300

tggggcgatt atctgcaata cgataagccg tactatatgc tgaacctgta tgatccgaac 3360
aaatatgtgg atgtcaataa tgtgggtatt cgtggttaca tgtatttgaa gggtccgcgt 3420
ggcagcgtta tgacgaccaa catttacctg aactctagcc tgtaccgtgg tacgaaattc 3480
atcattaaga aatatgccag cggcaacaaa gataacattg tgcgtaataa cgatcgtgtc 3540
tacatcaacg tggtcgtgaa gcgtaaagag taccgtctgg cgaccaacgc ttcgcaggcg 3600
ggtgttgaga aaattctgag cgcgttggag atccctcgtg tccgtcgtct gagccaagtc 3660
gtggttatga agagcaagaa cgaccagggt atcactaaca agtgcaagat gaacctgcaa 3720

gaccgtcgtg gtaacgacat cggctttatt ggtttccacc agttcaacaa tattgctaaa 3780
ctggtagcga gcaattggta caatcgtcag attgagcgcc gtagccgtcg tttgggctgt 3840
agctgggagt ttatcccggt cgatgatggt tggggcgaac gtccgctg 3888

<210> 10

<211> 1296

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered BoNT/A1

<400> 10

Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly
1 5 10 15
Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro

20 25 30
Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg
35 40 45
Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu

50 55 60

Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr

65 70 75 80

Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu

85 90 95

Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val

100 105 110

Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys

115 120 125

Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr

130 135 140

Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile

145 150 155 160

Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr

165 170 175

Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe

180 185 190

Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu

195 200 205

Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu

210 215 220

Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn

225 230 235 240

Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu

245 250 255

Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys

260 265 270

Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn

275 280 285

Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val

290 295 300

Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
305 310 315 320
Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu
325 330 335
Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp

340 345 350
Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
355 360 365
Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr
370 375 380
Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
385 390 395 400
Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu

405 410 415
Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
420 425 430
Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys
435 440 445
Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe
450 455 460
Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu

465 470 475 480
Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
485 490 495
Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro
500 505 510
Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
515 520 525
Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu

530 535 540
Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu

545 550 555 560

His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu

565 570 575

Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys

580 585 590

Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu

595 600 605

Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr

610 615 620

Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala

625 630 635 640

Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu

645 650 655

Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala

660 665 670

Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys

675 680 685

Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu

690 695 700

Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys

705 710 715 720

Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu

725 730 735

Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn

740 745 750

Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp

755 760 765

Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile

770 775 780

Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met

785 790 795 800

Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys
805 810 815
Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
820 825 830
Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
835 840 845
Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser

850 855 860
Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn
865 870 875 880
Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser
885 890 895
Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn
900 905 910
Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu

915 920 925
Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser
930 935 940
Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn
945 950 955 960
Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val
965 970 975
Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu

980 985 990
Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser
995 1000 1005
Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg
1010 1015 1020
Leu Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln
1025 1030 1035
Lys Pro Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile

1040 1045 1050

Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp

1055 1060 1065

Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu

1070 1075 1080

Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys

1085 1090 1095

Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met

1100 1105 1110

Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val

1115 1120 1125

Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val

1130 1135 1140

Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Thr

1145 1150 1155

Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp Asn Ile

1160 1165 1170

Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys Arg

1175 1180 1185

Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Glu

1190 1195 1200

Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Arg Val Arg Arg Leu Ser

1205 1210 1215

Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr Asn

1220 1225 1230

Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Arg Arg Gly Asn Asp Ile Gly

1235 1240 1245

Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala

1250 1255 1260

Ser Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Arg Ser Arg Arg Leu

1265 1270 1275

Gly Cys Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu

1280 1285 1290

Arg Pro Leu

1295