



(51) МПК
C07K 14/33 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 14/33 (2020.05); *C12Y 304/24069* (2020.05); *A61K 38/4893* (2020.05); *A61K 8/99* (2020.05); *C07K 2319/50* (2020.05)

(21)(22) Заявка: 2017128211, 09.01.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 09.01.2015Дата регистрации:
 02.10.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 09.01.2015

(43) Дата публикации заявки: 11.02.2019 Бюл. № 5

(45) Опубликовано: 02.10.2020 Бюл. № 28

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
 национальной фазе: 09.08.2017(86) Заявка РСТ:
 GB 2015/050043 (09.01.2015)(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2016/110662 (14.07.2016)Адрес для переписки:
 129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
 "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры"

(72) Автор(ы):

АНДЕРСОН Дайна Брэди (GB),
 ХАКЕТТ Гэйвин Стефан (GB),
 ЛЮ Сай Ман (GB)

(73) Патентообладатель(и):

ИПСЕН БАЙОИННОВЕЙШН
 ЛИМИТЕД (GB)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: BYRNE M.P. et al. Purification,
 potency, and efficacy of the botulinum neurotoxin
 type A binding domain from *Pichia pastoris* as a
 recombinant vaccine candidate, *Infection and
 immunity*, 1998, V. 66, N. 10, p.4817-4822. LACY
 D.B. et al. Sequence homology and structural
 analysis of the clostridial neurotoxins, *Journal of
 molecular biology*, 1999, V. (см. прод.)

RU 2733493 C2

RU 2733493 C2

(54) КАТИОННЫЕ НЕЙРОТОКСИНЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к получению сконструированных ботулинических токсинов, содержащих по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты повышает изоэлектрическую точку (рI) сконструированного клостридиального токсина до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 единицы

рI больше, чем рI в других отношениях идентичного немодифицированного ботулинического токсина, и может быть использовано в медицине. Полученные токсины могут быть эффективно использованы в лечении заболеваний, при которых показана терапия ботулиническим токсином. 12 н. и 20 з.п. ф-лы, 10 ил., 4 табл., 5 пр.

(56) (продолжение):

291, N. 5, p.1091-1104. WO 2000067700 (US ARMY MEDICAL RES & MATERIEL), 16.11.2000. СУПОТНИЦКИЙ
 М.В. Бактериальные токсины. Их природа, механизмы действия, возможности конструирования гибридных

и 6 модифицированных токсинов, Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение, 2011, N. 1, с.6-15.
TOKURIKI N. ET AL. Stability effects of mutations and protein evolvability, Curr. Opin. Struct. Biol., 2009, v.19, n.5, p.596-604.

R U 2 7 3 3 4 9 3 C 2

R U 2 7 3 3 4 9 3 C 2



(51) Int. Cl.
C07K 14/33 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C07K 14/33 (2020.05); *C12Y 304/24069* (2020.05); *A61K 38/4893* (2020.05); *A61K 8/99* (2020.05); *C07K 2319/50* (2020.05)

(21)(22) Application: 2017128211, 09.01.2015

(24) Effective date for property rights:
09.01.2015

Registration date:
02.10.2020

Priority:

(22) Date of filing: 09.01.2015

(43) Application published: 11.02.2019 Bull. № 5

(45) Date of publication: 02.10.2020 Bull. № 28

(85) Commencement of national phase: 09.08.2017

(86) PCT application:
GB 2015/050043 (09.01.2015)

(87) PCT publication:
WO 2016/110662 (14.07.2016)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

LIU, Sai Man (GB),
HACKETT, Gavin Stephen (GB),
ANDERSON, Dina Brady (GB)

(73) Proprietor(s):

IPSEN BIOINNOVATION LIMITED (GB)

RU 2733493 C2

RU 2733493 C2

(54) CATIONIC NEUROTOXINS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to production of engineered botulinum toxins containing at least one amino acid modification, wherein said at least one amino acid modification increases isoelectric point (pI) of the engineered clostridial toxin to a value which is at least 0.2 pI units greater than pI in other respects

identical unmodified botulinum toxin, and can be used in medicine.

EFFECT: obtained toxins can be effectively used in treating diseases in which therapy with botulinum toxin is indicated.

32 cl, 10 dwg, 4 tbl, 5 ex

Настоящее изобретение относится к сконструированным клостридиальным токсинам, содержащим по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, и применению таких сконструированных клостридиальных токсинов в медицине и терапии.

Бактерии рода *Clostridia* производят сильнодействующие и специфические белковые токсины, которые могут отравлять нейроны и другие клетки, к которым они доставляются. Примеры таких клостридиальных токсинов включают нейротоксины, производимые *C. tetani* (TeNT) и *C. botulinum* (BoNT) серотипов A-G, а также производимые *C. baratii* и *C. butyricum*.

Среди клостридиальных токсинов есть некоторые из наиболее сильных известных токсинов. В качестве примера, ботулинические нейротоксины имеют значения средней летальной дозы (LD_{50}) для мышей в диапазоне от 0,5 до 5 нг/кг в зависимости от серотипа. Столбнячный и ботулинические токсины действуют, ингибируя функцию пораженных нейронов, в частности, высвобождение нейромедиаторов. В то время как ботулинический токсин действует на нейромышечное соединение и ингибирует 15 холинергическую передачу в периферической нервной системе, столбнячный токсин действует в центральной нервной системе.

В природе клостридиальные токсины синтезируются в виде одноцепочечного полипептида, посттрансляционно модифицируемого посредством протеолитического расщепления с образованием двух полипептидных цепей, соединенных дисульфидной связью. Расщепление происходит по конкретному участку расщепления, часто обозначаемому как участок активации, локализующемуся между остатками цистеина, обеспечивающими образование межцепочечной дисульфидной связи. Это представляет собой двухцепочечную форму, являющуюся активной формой токсина. Две цепи обозначают как тяжелую цепь (H-цепь), имеющую молекулярную массу приблизительно 20 100 кДа, и легкую цепь (L-цепь), имеющую молекулярную массу приблизительно 50 кДа. H-цепь содержит N-концевой компонент транслокации (домен H_N) и C-концевой направляющий компонент (H_C домен). Участок расщепления локализован между L-цепью и компонентами транслокационного домена. После связывания домена H_C с 25 нейроном-мишенью и интегризации связанного токсина в клетку с помощью эндосомы домен H_N транслоцирует L-цепь через эндосомальную мембрану и в цитозоль, и L-цепь выполняет функцию протеазы (также известной как нецитотоксическая протеаза).

Некитотоксические протеазы действуют, протеолитически расщепляя 30 внутриклеточные транспортные белки, известные как белки SNARE (например, SNAP-25, VAMP или синтаксин) - см. Gerald K (2002) "Cell and Molecular Biology" (4th edition) 35 *John Wiley & Sons, Inc.* Акроним SNARE происходит от термина "растворимый рецептор прикрепления NSF", где "NSF" означает N-этилмалеинимид-чувствительный фактор. Белки SNARE важны для слияния внутриклеточных везикул и, таким образом, для 40 секреции молекул посредством везикулярного транспорта из клетки. Протеазная функция является цинк-зависимой эндопептидазной активностью и демонстрирует высокую субстратную специфичность для белков SNARE. Таким образом, после доставки в желаемую клетку-мишень некитотоксическая протеаза способна 45 ингибировать клеточную секрецию из клетки-мишени. Протеазы L-цепи клостридиальных токсинов являются некитотоксическими протеазами, расщепляющими белки SNARE.

В свете распространенной природы белков SNARE, клостридиальные токсины, такие как ботулинический токсин, успешно используют в широком спектре терапевтических средств.

В качестве примера, авторы настоящего изобретения ссылаются на William J. Lipham, Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin (Slack, Inc., 2004), где описывают использование клостридиальных токсинов, таких как ботулинические нейротоксины (BoNT), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C₁, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F и BoNT/G и столбнячный нейротоксин (TeNT), для ингибиования нейронной передачи при терапевтическом и косметическом или эстетическом применении, например, продаваемые продукты ботулинического токсина в настоящее время одобрены в качестве терапевтических средств по показаниям, включающим фокальную спастичность, спастичность верхней конечности, спастичность нижней конечности, спастическую кривошею, блефароспазм, гемифациальный спазм, гипергидроз подмышек, хроническую мигрень, нейрогенную гиперактивность детрузора, глабеллярные морщины и тяжелые боковые периорбитальные морщины. Кроме того, терапевтические средства на основе клостридиального токсина описывают для лечения нервно-мышечных нарушений (см. US 6872397); для лечения нарушений матки (см. US 2004/0175399); для лечения язвы и гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (см. US 2004/0086531); для лечения дистонии (см. US 6319505); для лечения глазных нарушений (см. US 2004/0234532); для лечения блефароспазма (см. US 2004/0151740); для лечения косоглазия (см. US 2004/0126396); для лечения боли (см. US 6869610, US 6641820, US 6464986 и US 6113915); для лечения фибромиалгии (см. US 6623742, US 2004/0062776); для лечения боли в нижних отделах позвоночника (см. US 2004/0037852); для лечения мышечных повреждений (см. US 6423319); для лечения синусовой головной боли (см. US 6838434); для лечения головной боли напряжения (см. US 6776992); для лечения головной боли (см. US 6458365); для уменьшения мигренозной головной боли (см. US 5714469); для лечения сердечно-сосудистых заболеваний (см. US 6767544); для лечения неврологических нарушений, таких как болезнь Паркинсона (см. US 6620415, US 6306403); для лечения психоневрологических нарушений (см. US 2004/0180061, US 2003/0211121); для лечения эндокринных нарушений (см. US 6827931); для лечения нарушений щитовидной железы (см. US 6740321); для лечения нарушений потовых желез под влиянием холинергической передачи сигнала (см. US 6683049); для лечения диабета (см. US 6337075, US 6416765); для лечения нарушений поджелудочной железы (см. US 6261572, US 6143306); для лечения злокачественных новообразований, таких как опухоли костей (см. US 6565870, US 6368605, US 6139845, US 2005/0031648); для лечения ушных нарушений (см. US 6358926, US 6265379); для лечения вегетативных нарушений, таких как нарушения мышц желудочно-кишечного тракта и дисфункция других гладких мышц (см. US 5437291); для лечения кожных повреждений, связанных с пролиферативными нарушениями клеток кожи (см. US 5670484); для лечения нейрогенных воспалительных нарушений (см. US 6063768); для снижения выпадения волос и стимуляции роста волос (см. US 6299893); для лечения опущенных углов рта (см. US 6358917); для снижения аппетита (см. US 2004/40253274); для стоматологических терапевтических средств и процедур (см. US 2004/0115139); для лечения нервно-мышечных нарушений и состояний (см. US 2002/0010138); для лечения различных нарушений и состояний и связанной с ними боли (см. US 2004/0013692); для лечения состояний, являющихся результатом гиперсекреции слизи, таких как астма и COPD (см. WO 00/10598); и для лечения не-нервных состояний, таких как воспаления, эндокринные состояния, экзокринные состояния, иммунологические состояния, сердечно-сосудистые состояния, состояния костной ткани (см. WO 01/21213). Все из указанных выше публикаций включены, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

Ожидают, что использование нецитотоксических протеаз, таких как клостридиальные

токсины (например, BoNT и TeNT), в терапевтическом и косметическом лечении людей и других млекопитающих распространится на постоянно расширяющийся диапазон заболеваний, при которых можно получать пользу из свойств этих токсинов.

Для избежания системных неврологических эффектов в случае многих

5 терапевтических средств на основе клострдиальных токсинов используют прямое введение терапевтического средства на основе клострдиального токсина в указанный целевой участок (такой как ткань-мишень). Проблемой при введении терапевтических средств на основе клострдиальных токсинов таким способом является распространение токсина из участка введения в окружающую ткань или системный кровоток. Считают, 10 что диффузия токсина из ткани-мишени отвечает за нежелательные побочные эффекты, которые в крайних случаях могут угрожать жизни. Это может быть особой проблемой при использовании терапевтических средств на основе клострдиальных токсинов (таких как терапевтические средства на основе BoNT) в высоких дозах, концентрациях 15 и объемах инъекции. Побочные эффекты, ассоциированные с этой проблемой, о которых сообщают в случае коммерческих терапевтических средств на основе BoNT/A, включают астению, общую мышечную слабость, диплопию, птоз, дисфагию, дисфонию, дизартрию, недержание мочи и затруднения дыхания. Затруднения глотания и дыхания могут угрожать жизни, и есть сообщения о смертях, связанных с эффектами распространения токсина.

20 Таким образом, в этой области существует потребность в клострдиальных токсинах, обладающих свойствами повышенного удержания в ткани в участке введения и, таким образом, демонстрирующих снижение диффузии из участка введения по сравнению с известными клострдиальными токсинами.

Настоящее изобретение решает указанную выше проблему посредством

25 предоставления сконструированных клострдиальных токсинов, указанных в формуле изобретения.

В одном из аспектов изобретение относится к сконструированному клострдиальному токсину, содержащему по меньшей мере одну (например, по меньшей мере одну, две или три) модификацию аминокислоты, где указанная по меньшей мере одна модификация 30 аминокислоты повышает изоэлектрическую точку (pI) сконструированного клострдиального токсина до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере на 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного клострдиального токсина, в котором отсутствует указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты, и где 35 указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты не локализуется в связывающем домене клострдиального токсина (домене H_C).

В одном из вариантов осуществления термин "не локализуется в связывающем домене клострдиального токсина (H_C)" означает, что указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты локализуется в домене H_N клострдиального токсина или 40 в легкой цепи клострдиального токсина.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к сконструированному клострдиальному токсину, содержащему по меньшей мере одну (например, по меньшей мере одну, две или три) модификацию аминокислоты, где указанная по меньшей мере 45 одна модификация аминокислоты повышает изоэлектрическую точку (pI) сконструированного клострдиального токсина до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере на 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI выше, чем pI в других отношениях идентичного клострдиального токсина, в котором

отсутствует указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты, и где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты локализуется в транслокационном домене клостридиального токсина (домене H_N).

5 В другом варианте осуществления изобретение относится к сконструированному клостридиальному токсину, содержащему по меньшей мере одну (например, по меньшей мере одну, две или три) модификацию аминокислоты, где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты повышает изоэлектрическую точку (pI) сконструированного клостридиального токсина до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере на 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы 10 pI выше, чем pI в других отношениях идентичного клостридиального токсина, в котором отсутствует указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты, и где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты локализуется в легкой цепи клостридиального токсина.

15 В одном из вариантов осуществления, где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты локализуется в легкой цепи клостридиального токсина, указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты не приводит к встраиванию в легкую цепь клостридиального токсина мотива распознавания лигазы E3. Таким образом, в одном из вариантов осуществления легкая цепь сконструированного клостридиального токсина по изобретению не содержит мотив 20 распознавания лигазы E3.

25 Как указано выше, термин "мотив распознавания лигазы E3" относится к модификации легкой цепи, приводящей к ускоренной деградации полипептида нейротоксина с помощью эндогенных протеасомных путей деградации, присутствующих у индивидуума, которому вводят нейротоксин. Мотив "распознавания лигазы E3" является структурным мотивом, делающим возможным распознавание мотива и связывание с мотивом лигазы E3 (также известной как убиквитинлигаза E3; таким образом, "мотив распознавания лигазы E3" также можно обозначать как "мотив распознавания убиквитинлигазы E3"). Мотивы распознавания лигазы E3 известны специалисту в этой области.

30 Примеры мотивов распознавания лигазы E3 включают следующие последовательности (где "X" может представлять собой любую из природных аминокислот):

Убиквитинлигаза E3	Мотив распознавания (консенсусный)
VBCCul2	ALAPYIP (SEQ ID NO: 9)
MDM2	XXFXXXWXXLXX (SEQ ID NO: 10)
MNM2	RFMDYWEGL (SEQ ID NO: 11) FXXXLWXXL (SEQ ID NO: 12)
Smurf2	ELESPPPPYSRYPM (SEQ ID NO: 13)
RN181	KVGFFKR (SEQ ID NO: 14)
E3alpha	LLVRGRTLVV (SEQ ID NO: 15)
SCF	DRHDSGLDSM (SEQ ID NO: 16)
Siah	PPAXVXP (SEQ ID NO: 17)
Itch	PPXYXXM (SEQ ID NO: 18)
Nedd4-2	PPXY (SEQ ID NO: 19)

45 Дополнительные примеры мотивов распознавания лигазы E3 включают: ETFSDLWKLLPE (SEQ ID NO: 20), TSFAEYWNLLSP (SEQ ID NO: 21), LTFEHYWAQLTS (SEQ ID NO: 22), LTFEHWWAQLTS (SEQ ID NO: 23), LTFEHSWAQLTS (SEQ ID NO: 24), ETFEHNWAQLTS (SEQ ID NO: 25), LTFEHNWAQLTS (SEQ ID NO: 26), LTFEHWASLTS (SEQ ID NO: 27), LTFEHWSSLTS (SEQ ID NO: 28), LTFTHWWAQLTS (SEQ ID NO: 29),

ETFEHWWAQLTS (SEQ ID NO: 30), LTFEHWWSQLTS (SEQ ID NO: 31), LTFEHWWAQLLS (SEQ ID NO: 32), ETFEHWWSQLLS (SEQ ID NO: 33), RFMDYWEGL (SEQ ID NO: 34), MPRFMDYWEGLN (SEQ ID NO: 35), SQETFSDLWKLLPEN (SEQ ID NO: 36) и LTFEHNWAQLEN (SEQ ID NO: 37).

- 5 В одном из вариантов осуществления, где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты локализуется в легкой цепи клостридиального токсина, указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты не приводит к встраиванию в легкую цепь клостридиального токсина мотива распознавания лигазы MDM2 E3. Таким образом, в одном из вариантов осуществления легкая цепь 10 сконструированного клостридиального токсина по изобретению не содержит мотив распознавания лигазы MDM2 E3.

В одном из вариантов осуществления, где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты локализуется в легкой цепи клостридиального токсина, сконструированный клостридиальный токсин не содержит модификацию аминокислоты 15 на N-концевом пролине.

В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/E, и где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты локализуется в легкой цепи клостридиального токсина, указанный сконструированный BoNT/E не содержит замену лизином в любом из следующих 20 положений аминокислот: Q53, N72, N378, N379, R394, T400.

В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/E, и где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты локализуется в легкой цепи клостридиального токсина, указанный сконструированный BoNT/E не содержит замену лизином в любом из следующих 25 положений аминокислот: Q53, N72, N378, N379, T400.

В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/E, и где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты локализуется в легкой цепи клостридиального токсина, указанный сконструированный BoNT/E не содержит замену лизином в любых трех из следующих 30 положений аминокислот: Q53, N72, N378, N379, R394, T400.

В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/E, и где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты локализуется в легкой цепи клостридиального токсина, указанный сконструированный BoNT/E не содержит замену лизином в любых трех из следующих 35 положений аминокислот: Q53, N72, N378, N379, T400.

В одном из вариантов осуществления необязательно, где по меньшей мере одна модификация аминокислоты локализуется в легкой цепи клостридиального токсина, сконструированный клостридиальный токсин не является BoNT/E.

Сконструированные клостридиальные токсины по изобретению не содержат какие-40 либо модификации аминокислот, локализованные в домене H_C клостридиального токсина. Таким образом, в сконструированном клостридиальном токсине по изобретению, указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты не локализуется в домене H_C клостридиального токсина.

В одном из вариантов осуществления, где указанная по меньшей мере одна 45 модификация аминокислоты локализуется в легкой цепи клостридиального токсина, указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты не содержит замену аминокислотного остатка остатком лизина.

В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный

токсин является сконструированным клострдиальным токсином, как описано выше, указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты содержит замену кислого аминокислотного остатка или незаряженного аминокислотного остатка остатком лизина или аргинина.

5 В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клострдиальный токсин является сконструированным клострдиальным токсином, как описано выше, указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты содержит замену кислого аминокислотного остатка или незаряженного аминокислотного остатка остатком аргинина.

10 В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клострдиальный токсин является сконструированным клострдиальным токсином, как описано выше, указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты повышает рI сконструированного клострдиального токсина до значения, составляющего по меньшей мере на 0,4 единицы рI больше, чем рI в других отношениях идентичного

15 клострдиального токсина, в котором отсутствует указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты. В одном из вариантов осуществления указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты повышает рI сконструированного клострдиального токсина до значения, составляющего по меньшей мере на 0,5 единицы рI выше, чем рI в других отношениях идентичного клострдиального токсина, в котором

20 отсутствует указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты. В одном из вариантов осуществления указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты повышает рI сконструированного клострдиального токсина до значения, составляющего по меньшей мере на 0,6 единицы рI больше, чем рI в других отношениях идентичного клострдиального токсина, в котором отсутствует указанная по меньшей

25 мере одна модификация аминокислоты. В одном из вариантов осуществления указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты повышает рI сконструированного клострдиального токсина до значения, составляющего по меньшей мере на 0,8 единицы рI больше, чем рI в других отношениях идентичного клострдиального токсина, в котором отсутствует указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты. В

30 одном из вариантов осуществления указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты повышает рI сконструированного клострдиального токсина до значения, составляющего по меньшей мере на 1 единицу рI больше, чем рI в других отношениях идентичного клострдиального токсина, в котором отсутствует указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты.

35 В определенных вариантах осуществления сконструированный клострдиальный токсин содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90 модификаций аминокислот.

В определенных вариантах осуществления указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты повышает рI сконструированного клострдиального токсина до значения, составляющего по меньшей мере на 2, 3, 4 или 5 единиц рI больше, чем рI в других отношениях идентичного клострдиального токсина, в котором отсутствует указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты.

40 В определенных вариантах осуществления сконструированный клострдиальный токсин содержит по меньшей мере 3 модификации аминокислот, и указанные по меньшей мере 3 модификации аминокислот повышают рI сконструированного клострдиального токсина до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 единицы рI больше, чем рI в других отношениях идентичного клострдиального токсина, в котором отсутствуют указанные по меньшей мере 3 модификации аминокислот.

В определенных вариантах осуществления сконструированный клострдиальный токсин содержит по меньшей мере 5 модификаций аминокислот, и указанные по меньшей мере 5 модификаций аминокислот повышают рН сконструированного клострдиального токсина до значения, составляющего по меньшей мере на 0,5 единицы рН больше, чем рН в других отношениях идентичного клострдиального токсина, в котором отсутствуют указанные по меньшей мере 5 модификации аминокислот.

Авторы настоящего изобретения обнаруживали, что при повышении рН клострдиального токсина, например, по меньшей мере на 0,2 единицы рН, или 0,5 единицы рН или одну единицу рН (встраивая в белок клострдиального токсина по меньшей мере одну модификацию аминокислоты), полученный сконструированный клострдиальный токсин преимущественно проявляется свойства повышенного удержания в ткани и сниженную диффузию из участков введения, одновременно сохраняя способности к связыванию клетки-мишени, транслокации и расщеплению белков-мишней SNARE. Таким образом, значительно снижают распространение клострдиального токсина из участка введения по сравнению с в других отношениях идентичным клострдиальным токсином, в котором отсутствует указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты.

Сконструированные клострдиальные токсины по изобретению пригодны для использования в любой терапии, описываемой выше, и преимущественно могут демонстрировать снижение или отсутствие побочных эффектов по сравнению с использованием известных терапевтических средств на основе клострдиальных токсинов. Свойства повышенного удержания в ткани сконструированных клострдиальных токсинов по изобретению также обеспечивают повышенную активность и/или длительность действия и могут сделать возможным снижение доз, подлежащих использованию, по сравнению с известными терапевтическими средствами на основе клострдиальных токсинов (или повышение доз без каких-либо дополнительных побочных эффектов), таким образом, обеспечивая дополнительные преимущества.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления сконструированный клострдиальный токсин по изобретению имеет повышенную активность, повышенное удержание в ткани и/или повышенную длительность действия, по сравнению с соответствующим немодифицированным клострдиальным токсином.

Как более подробно описано ниже, повышение рН, обеспечиваемое посредством по меньшей мере одной модификации аминокислоты, означает, что сконструированный клострдиальный токсин по изобретению имеет при указанном рН суммарный заряд, более положительный, чем суммарный заряд на в других отношениях идентичном клострдиальном токсине, в котором отсутствует указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, авторы настоящего изобретения считают, что этот повышенный положительный заряд позволяет сконструированным клострдиальным токсинам по настоящему изобретению проявлять большее время удержания в ткани в участке введения в результате благоприятных электростатических взаимодействий между сконструированным клострдиальным токсином и анионными внеклеточными компонентами (такими как клеточные мембранны и гепарансульфатные протеогликаны) в участке введения. Эти улучшенные электростатические взаимодействия служат для снижения диффузии сконструированного клострдиального токсина из участка введения, таким образом, улучшая удержание в ткани.

В качестве примера, свойства улучшенного удержания в ткани сконструированного

клостридиального токсина по изобретению могут делать возможными (i) более высокие дозы в отдельных мышцах, таких как грудино-ключично-сосцевидная мышца, без распространения в близлежащие мышцы шеи с вызыванием затруднений глотания, и (ii) более высокие общие дозы (во всех мышцах) при однократном введении без

5 распространения в кровоток и вызывания системных эффектов, таких как затруднения дыхания. Преимущества для пациентов могут включать более эффективное лечение крупных мышц, таких как грудино-ключично-сосцевидная мышца, повышение возможности инъектирования в несколько отдельных мышц при каждом введении и возможно большая длительность эффективного лечения (больший период времени 10 перед тем, как потребуется повторное лечение) по причине более высоких доз.

В одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин по изобретению при использовании имеет положительный суммарный заряд (например, если сконструированный клостридиальный токсин при использовании локализуется в желаемом участке введения в ткани).

15 Изоэлектрическая точка (pI) является специфическим свойством указанного белка. Как хорошо известно в этой области, белки состоят из конкретной последовательности аминокислот (также обозначаемых в белке как аминокислотные остатки). Каждая аминокислота из стандартного набора из двадцати имеет разную боковую цепь (или R-группу), что означает, что каждый аминокислотный остаток в белке проявляет разные 20 химические свойства, такие как заряд и гидрофобность. На эти свойства может влиять химическая среда, например, температура и pH. Общие химические характеристики белка будут зависеть от суммы этих различных факторов.

25 Конкретные аминокислотные остатки (подробно описанные ниже) обладают ионизируемыми боковыми цепями, которые могут проявлять электрический заряд, зависящий от pH окружающей среды. Является ли такая боковая цепь заряженной или нет при указанном pH, зависит от pKa соответствующего ионизируемого остатка, где pKa является отрицательным логарифмом кислой константы диссоциации (Ka) для определенного протона из сопряженного основания.

30 Например, кислые остатки, такие как аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота, имеют группы боковой цепи карбоновых кислот со значениями pKa приблизительно 4,1 (точные значения pKa могут зависеть от температуры, ионной силы и микроокружения ионизируемой группы). Таким образом, эти боковые цепи проявляют отрицательный заряд при pH 7,4 (часто обозначаемом как "физиологический pH"). При низких значениях pH эти боковые цепи протонируются и теряют свой заряд.

35 И наоборот, основные остатки, такие как лизин и аргинин, имеют азотсодержащие группы боковой цепи со значениями pKa приблизительно 10-12. Таким образом, эти боковые цепи проявляют положительный заряд при pH 7,4. Эти боковые цепи депротонируются и теряют свой заряд при высоких значениях pH.

40 Таким образом, общий (суммарный) заряд молекулы белка зависит от количества кислых и основных остатков, присутствующих в белке (и их степени экспонирования на поверхности), и pH окружающей среды. Изменения pH окружающей среды изменяют общий заряд на белке. Таким образом, для каждого белка есть определенный pH, при котором количество положительных и отрицательных зарядов является равным, и белок демонстрирует отсутствие общего суммарного заряда. Эта точка известна как 45 изоэлектрическая точка (pI). Изоэлектрическая точка является стандартной концепцией в биохимии белка, которая будет знакома специалисту в этой области.

Изоэлектрическую точку (pI), таким образом, определяют как значение pH, при котором белок проявляет нулевой суммарный заряд. Повышение pI означает, что

необходимо более высокое значение рН, чтобы белок проявлял нулевой суммарный заряд. Таким образом, повышение рI представляет собой повышение суммарного положительного заряда белка при определенном рН. И наоборот, снижение рI означает, что необходимо более низкое значение рН, чтобы белок проявлял нулевой суммарный заряд. Таким образом, снижение рI представляет собой снижение суммарного положительного заряда белка при определенном рН.

Способы определения рI белка известны в этой области и будут знакомы специалисту в этой области. В качестве примера, рI белка можно вычислять из средних значений рKa каждой аминокислоты в белке ("вычисленная рI"). Такие вычисления можно осуществлять с использованием компьютерных программ, известных в этой области; предпочтительный пример компьютерных программ для вычисления значений рI включает Protein Calculator от Scripps Research Institute и Compute pI/MW Tool от ExPASy. Сравнения значений рI между разными молекулами следует осуществлять с использованием одного и того же способа вычисления/программы.

При необходимости, вычисленную рI белка можно подтверждать экспериментально способом изоэлектрофокусирования ("наблюдаемая рI"). В этом способе используют электрофорез для разделения белков по их рI. Изоэлектрофокусирование, как правило, осуществляют с использованием геля с иммобилизованным градиентом рН. При использовании электрического поля белок мигрирует через градиент рН до достижения рН, при котором он имеет нулевой суммарный заряд, эта точка представляет собой рI белка. Результаты, полученные при изоэлектрофокусировании, как правило, имеют относительно низкое разрешение по своей природе, и, таким образом, авторы настоящего изобретения считают, что результаты, полученные с помощью вычисленной рI (как описано выше) больше подходят для использования.

На всем протяжении настоящего описания "рI" означает "вычисленную рI", если не указано иначе.

Можно повышать или снижать рI белка, изменяя количество основных и/или кислых групп, экспонируемых на его поверхности. Этого можно достигать, модифицируя одну или более аминокислот белка. Например, можно обеспечивать повышение рI, снижая количество кислых остатков или повышая количество основных остатков. Такие модификации аминокислот более подробно описаны ниже.

Нативные (немодифицированные) клостридиальные токсины имеют рI приблизительно 5-6. Таким образом, при рН 7,4 нативные ботулинические токсины обладают отрицательным суммарным зарядом. В качестве примера, рI BoNT/A составляет 6,4, и молекула BoNT/A имеет суммарный заряд -8 при рН 7,4. Эти значения рI вычисляют как описано выше.

ТАБЛИЦА 1:

КЛОСТРИДИАЛЬНЫЙ ТОКСИН	рI
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

Как описано выше, в одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну

5 модификацию аминокислоты, где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты повышает изоэлектрическую точку (pI) сконструированного клострдиального токсина до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного клострдиального токсина, в котором отсутствует указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты.

Таким образом, в контексте настоящего изобретения повышение pI на 0,2 единицы в отношении сконструированного клострдиального токсина BoNT/A будет являться повышением pI с 6,4 до 6,6.

Как описано выше, в одном из вариантов осуществления сконструированный

10 клострдиальный токсин по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты повышает изоэлектрическую точку (pI) сконструированного клострдиального токсина до значения, составляющего по меньшей мере на одну единицу pI больше, чем pI в других отношениях идентичного клострдиального токсина, 15 в котором отсутствует указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты.

Таким образом, в контексте настоящего изобретения повышение pI на 1 единицу в отношении сконструированного клострдиального токсина BoNT/A будет являться повышением pI с 6,4 до 7,4.

В одном из вариантов осуществления сконструированный клострдиальный токсин

20 имеет pI по меньшей мере 5,5.

В одном из вариантов осуществления сконструированный клострдиальный токсин имеет pI по меньшей мере 6 (например, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9).

В одном из вариантов осуществления сконструированный клострдиальный токсин

25 имеет pI по меньшей мере 6,5.

В одном из вариантов осуществления сконструированный клострдиальный токсин имеет pI по меньшей мере 7.

В одном из вариантов осуществления сконструированный клострдиальный токсин имеет pI от 6,5 до 9,5 (например, pI от 6,5 до 7,5).

30 Как указано выше, сконструированные клострдиальные токсины по настоящему изобретению имеют свойства повышенного удержания в ткани, также обеспечивающие повышенную активность и/или длительность действия, и могут позволять снижать дозы, подлежащие использованию, по сравнению с известными терапевтическими средствами на основе клострдиальных токсинов (или повышать дозы без каких-либо

35 дополнительных эффектов). Один из путей, которым можно определять эти предпочтительные свойства (представляющие повышение терапевтического индекса), относится к соотношению безопасности сконструированного клострдиального токсина. В связи с этим, нежелательные эффекты клострдиального токсина (вызываемые диффузией токсина из участка введения) можно оценивать экспериментально

40 посредством измерения процента потери массы тела в соответствующей модели на животных (например, мыши, где потерю массы тела определяют в течение семи дней после введения). И наоборот, желаемые точные эффекты клострдиального токсина можно оценивать экспериментально посредством анализа Digital Abduction Score (DAS), измерения паралича мышц. Анализ DAS можно осуществлять посредством инъекции

45 20 мкл клострдиального токсина, составленного в желатиновом фосфатном буфере, в комплекс икроножной/камбаловидной мышцы мыши с последующей оценкой Digital Abduction Score с использованием способа Aoki (Aoki KR, Toxicon 39: 1815-1820; 2001). В анализе DAS мышей ненадолго подвешивали для вызывания характерной реакции

испуга, при которой мышь вытягивает свои задние конечности и отводит пальцы задних конечностей. После инъекции клостридиального токсина различные степени отведения пальцев оценивают по пятибалльной шкале (от 0=норма до 4=максимальное снижение отведения пальцев и вытягивания ног).

5 Затем Соотношение безопасности клостридиального токсина можно выражать как соотношение количества токсина, необходимого для 10%-ного снижения массы тела (измеряемого как пик-эффект в первые семь дней после введения дозы мыши), и количества токсина, необходимого для 2 баллов по DAS. Таким образом, желательными являются высокие баллы соотношения безопасности, и они означают, что токсин 10 способен эффективно парализовать целевую мышцу с небольшими нежелательными побочными эффектами. Сконструированный токсин по настоящему изобретению имеет соотношение безопасности, более высокое, чем соотношение безопасности эквивалентного немодифицированного (нативного) ботулинического токсина.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления сконструированный 15 клостридиальный токсин по настоящему изобретению имеет соотношение безопасности по меньшей мере 8 (например, по меньшей мере 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50), где соотношение безопасности вычисляют следующим образом: доза токсина, необходимая для изменения массы тела на -10% (пг/мышь), разделенная на DAS ED₅₀ (пг/мышь) [ED₅₀=доза, необходимая для достижения 2 баллов по DAS].

20 В одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин по настоящему изобретению имеет соотношение безопасности по меньшей мере 10. В одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин по настоящему изобретению имеет соотношение безопасности по меньшей мере 15.

Сконструированный клостридиальный токсин по настоящему изобретению содержит 25 по меньшей мере одну модификацию аминокислоты. Указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты повышает рI клостридиального токсина, как указано выше. В контексте настоящего изобретения модификация аминокислоты является модификацией аминокислотной последовательности клостридиального токсина. Такую модификацию можно осуществлять, заменяя одну аминокислоту в последовательности другой (т.е. осуществляя замену), осуществляя инсерцию новой аминокислоты в последовательность или делецию аминокислоты из последовательности. Аминокислоты, встроенные в аминокислотную последовательность белка, также обозначают как аминокислотные остатки.

30 20 стандартных аминокислот, обнаруживаемых в белках, являются следующими:
35 ТАБЛИЦА 2:

АМИНОКИСЛОТА			БОКОВАЯ ЦЕПЬ
Аспарагиновая кислота	Asp	D	Заряженная (кислая)
Глутаминовая кислота	Glu	E	Заряженная (кислая)
Аргинин	Arg	R	Заряженная (основная)
Лизин	Lys	K	Заряженная (основная)
Гистидин	His	H	Незаряженная (полярная)
Аспарагин	Asn	N	Незаряженная (полярная)
Глутамин	Gln	Q	Незаряженная (полярная)
Серин	Ser	S	Незаряженная (полярная)
Тreonин	Thr	T	Незаряженная (полярная)
Тирозин	Tyr	Y	Незаряженная (полярная)
Метионин	Met	M	Незаряженная (полярная)
Триптофан	Trp	W	Незаряженная (полярная)
Цистein	Cys	C	Незаряженная (полярная)

Аланин	Ala	A	Незаряженная (гидрофобная)
Глицин	Gly	G	Незаряженная (гидрофобная)
Валин	Val	V	Незаряженная (гидрофобная)
Лейцин	Leu	L	Незаряженная (гидрофобная)
Изолейцин	Ile	I	Незаряженная (гидрофобная)
Пролин	Pro	P	Незаряженная (гидрофобная)
Фенилаланин	Phe	F	Незаряженная (гидрофобная)

Следующие аминокислоты считают заряженными аминокислотами: аспарагиновая кислота (отрицательная), глутаминовая кислота (отрицательная), аргинин (положительная) и лизин (положительная).

При pH 7,4 боковые цепи аспарагиновой кислоты (pKa 3,1) и глутаминовой кислоты (pKa 4,1) имеют отрицательный заряд, в то время как боковые цепи аргинина (pKa 12,5) и лизина (pKa 10,8) имеют положительный заряд. Аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту обозначают как кислые аминокислотные остатки. Аргинин и лизин обозначают как основные аминокислотные остатки.

Следующие аминокислоты считают незаряженными, полярными аминокислотами (что означает, что они могут участвовать в образовании водородных связей): аспарагин, глутамин, гистидин, серин, треонин, тирозин, цистеин, метионин, триптофан.

Следующие аминокислоты считают незаряженными, гидрофобными аминокислотами: аланин, валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, пролин и глицин.

Повышение рI клостридиального токсина можно осуществлять посредством включения в клостридиальный токсин одной или более модификаций аминокислот, повышающих соотношение положительного и отрицательного зарядов в клостридиальном токсине.

В одном из вариантов осуществления по меньшей мере одна модификация аминокислоты выбрана из: замены аминокислоты, инсерции аминокислоты и делеции аминокислоты.

При замене аминокислоты, аминокислотный остаток, образующий часть аминокислотной последовательности клостридиального токсина, заменяют другим аминокислотным остатком. Заменителем аминокислотного остатка может являться одна из 20 стандартных аминокислот, как описано выше.

Альтернативно, заменитель аминокислоты при замене аминокислоты может являться нестандартной аминокислотой (аминокислотой, не являющейся частью стандартного набора из 20, описываемых выше). В качестве примера, заменителем аминокислоты может являться основная нестандартная аминокислота, например, L-орнитин, L-2-амино-3-гуанидинопропионовая кислота или D-изомеры лизина, аргинина и орнитина. Способы включения нестандартных аминокислот в белки известны в этой области и включают синтез рекомбинантного белка с использованием ауксотрофного экспрессирующего хозяина *E. coli*.

При инсерции аминокислоты дополнительный аминокислотный остаток (не присутствующий в норме) включают в аминокислотную последовательность клостридиального токсина, таким образом, повышая общее количество аминокислотных остатков в указанной последовательности. При делеции аминокислоты аминокислотный остаток удаляют из аминокислотной последовательности клостридиального токсина, таким образом, снижая общее количество аминокислотных остатков в указанной последовательности.

Способы модификации белков посредством замены, инсерции или делеции аминокислотных остатков известны в этой области. В качестве примера, модификации аминокислот можно включать посредством модификации последовательности ДНК,

кодирующей клостридиальный токсин. Этого можно достигать стандартными способами молекулярного клонирования, например, посредством сайт-специфического мутагенеза, при котором короткие цепи ДНК (олигонуклеотиды), кодирующие желаемые

5 аминокислоты, используют для замены исходной кодирующей последовательности с использованием фермента полимеразы, или посредством инсерции/делеции частей гена с помощью различных ферментов (например, лигазы и рестрикционных эндонуклеаз). Альтернативно модифицированные последовательности генов можно модифицировать химически.

В одном из вариантов осуществления по меньшей мере одна модификация

10 аминокислоты выбрана из: замены кислого аминокислотного остатка основным аминокислотным остатком; замены кислого аминокислотного остатка незаряженным аминокислотным остатком; замены незаряженного аминокислотного остатка основным аминокислотным остатком; инсерции основного аминокислотного остатка и делеции кислого аминокислотного остатка.

15 В предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере одна модификация аминокислоты является заменой, при которой преимущественно сохраняется то же количество аминокислотных остатков в клостридиальном токсине. В одном из вариантов осуществления замена выбрана из: замены кислого аминокислотного остатка основным аминокислотным остатком, замены кислого аминокислотного остатка незаряженным

20 аминокислотным остатком и замены незаряженного аминокислотного остатка основным аминокислотным остатком. В одном из вариантов осуществления основный аминокислотный остаток является остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления основный аминокислотный остаток является остатком лизина. В одном из вариантов осуществления основный аминокислотный остаток

25 является остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления, где замена является заменой кислого аминокислотного остатка незаряженным аминокислотным остатком, кислый аминокислотный остаток заменяют соответствующим ему незаряженным амидным аминокислотным остатком (т.е. аспарагиновую кислоту заменяют аспарагином и глутаминовую кислоту заменяют глутамином).

30 В другом предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере одна модификация аминокислоты является заменой кислого аминокислотного остатка основным аминокислотным остатком или заменой незаряженного аминокислотного остатка основным аминокислотным остатком. В одном из вариантов осуществления основный аминокислотный остаток является остатком лизина. В одном из вариантов осуществления основный аминокислотный остаток является остатком аргинина.

35 Сконструированный клостридиальный токсин по изобретению может содержать несколько модификаций аминокислот. Таким образом, в одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин (как описано выше) содержит от 1 до 90 модификаций аминокислот (например, от 1 до 80, от 1 до 70, от 1 до 60, от 1 до 50, от 1 до 40, от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 10, от 3 до 50, от 3 до 40, от 3 до 30, от 4 до 40, от 4 до 30, от 5 до 40, от 5 до 30 или от 10 до 25 модификаций аминокислот). В одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин (как описано выше) содержит от 1 до 20 модификаций аминокислот. В одном из вариантов осуществления сконструированный 40 клостридиальный токсин (как описано выше) содержит от 1 до 10 модификаций аминокислот. В одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин (как описано выше) содержит от 2 до 20 модификаций аминокислот. В одном из вариантов осуществления сконструированный 45

клостридиальный токсин (как описано выше) содержит от 2 до 15 модификаций аминокислот. В одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин (как описано выше) содержит от 2 до 10 модификаций аминокислот. В одном из вариантов осуществления сконструированный 5 клостридиальный токсин (как описано выше) содержит от 3 до 20 модификаций аминокислот. В одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин (как описано выше) содержит от 3 до 15 модификаций аминокислот. В одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин (как описано выше) содержит от 3 до 10 модификаций 10 аминокислот. В одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин (как описано выше) содержит от 4 до 40 модификаций аминокислот. В одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, 15 по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 модификаций аминокислот. В одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин содержит, по меньшей мере 3 модификации аминокислот (например, по меньшей мере 3 замены аминокислот). В одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин содержит по меньшей мере 4 модификации аминокислот 20 (например, по меньшей мере 4 замены аминокислот). Каждая из указанных модификаций аминокислот является модификацией аминокислоты, как описано выше. Таким образом, каждая из указанных модификаций аминокислот вносит вклад в повышение рI сконструированного клостридиального токсина (по сравнению с рI в других отношениях идентичного клостридиального токсина, в котором отсутствуют указанные модификации 25 аминокислот).

Любую аминокислоту клостридиального токсина (т.е. аминокислотный остаток), не локализующуюся в связывающем домене клостридиального токсина (домене H_C) можно модифицировать, как описано выше, при условии, что исходом указанной модификации является повышение рI клостридиального токсина (как описано выше). 30 Однако авторы настоящего изобретения идентифицировали подгруппы аминокислот клостридиального токсина, являющихся особенно подходящими мишениями модификации.

Предпочтительные целевые аминокислоты могут обладать конкретными качествами. В качестве примера, предпочтительная целевая аминокислота может являться: (i) 35 поверхностной аминокислотой; (ii) аминокислотой, локализованной вне вторичной структуры белка клостридиального токсина; (iii) локализованной в области белка клостридиального токсина, не важной для функции белка; (iv) аминокислотой, не являющейся консервативной среди типов, подтипов или серотипов клостридиальных токсинов; (iv) аминокислотой, модификация которой не приводит к образованию 40 предполагаемого участка убиквитинилирования; или (v) любой комбинацией указанного выше.

Как описано выше, сконструированные клостридиальные токсины по изобретению имеют одну или более модификаций аминокислот, локализованных в транслокационном домене H_N клостридиального токсина или легкой цепи клостридиального токсина. 45

Примеры референсных последовательностей легкой цепи клостридиального токсина включают:

Ботулинический нейротоксин типа А: аминокислотные остатки 1-448

Ботулинический нейротоксин типа В: аминокислотные остатки 1-440

Ботулинический нейротоксин типа С₁: аминокислотные остатки 1-441

Ботулинический нейротоксин типа D: аминокислотные остатки 1-445

Ботулинический нейротоксин типа E: аминокислотные остатки 1-422

Ботулинический нейротоксин типа F: аминокислотные остатки 1-439

Ботулинический нейротоксин типа G: аминокислотные остатки 1-441

Столбнячный нейротоксин: аминокислотные остатки 1-457

Примеры референсных последовательностей домена H_N клостридиального токсина

включают:

Ботулинический нейротоксин типа А: аминокислотные остатки 449-871

Ботулинический нейротоксин типа В: аминокислотные остатки 443-862

Ботулинический нейротоксин типа С₁: аминокислотные остатки 450-866

Ботулинический нейротоксин типа D: аминокислотные остатки 449-871

Ботулинический нейротоксин типа Е: аминокислотные остатки 455-845

Ботулинический нейротоксин типа F: аминокислотные остатки 450-864

Ботулинический нейротоксин типа G: аминокислотные остатки 449-871

Столбнячный нейротоксин: аминокислотные остатки 456-879

Примеры референсных последовательностей домена H_C клостридиального токсина

включают:

Ботулинический нейротоксин типа А: аминокислотные остатки 872-1278

Ботулинический нейротоксин типа В: аминокислотные остатки 863-1291

Ботулинический нейротоксин типа С₁: аминокислотные остатки 867-1291

Ботулинический нейротоксин типа D: аминокислотные остатки 872-1276

Ботулинический нейротоксин типа Е: аминокислотные остатки 846-1252

Ботулинический нейротоксин типа F: аминокислотные остатки 865-1278

Ботулинический нейротоксин типа G: аминокислотные остатки 872-1297

Столбнячный нейротоксин: аминокислотные остатки 880-1315

Указанные выше референсные последовательности следует считать руководством, т.к. в подсеротипах могут иметь место небольшие изменения. В качестве примера, в US

2007/0166332 (включенном, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме) цитируют немного другие клостридиальные последовательности:

Легкая цепь:

Ботулинический нейротоксин типа А: аминокислотные остатки M1-K448

Ботулинический нейротоксин типа В: аминокислотные остатки M1-K441

Ботулинический нейротоксин типа С₁: аминокислотные остатки M1-K449

Ботулинический нейротоксин типа D: аминокислотные остатки M1-R445

Ботулинический нейротоксин типа Е: аминокислотные остатки M1-R422

Ботулинический нейротоксин типа F: аминокислотные остатки M1-K439

Ботулинический нейротоксин типа G: аминокислотные остатки M1-K446

Столбнячный нейротоксин: аминокислотные остатки M1-A457

Домен H_N:

Ботулинический нейротоксин типа А: аминокислотные остатки A449-K871

Ботулинический нейротоксин типа В: аминокислотные остатки A442-S858

Ботулинический нейротоксин типа С₁: аминокислотные остатки T450-N866

Ботулинический нейротоксин типа D: аминокислотные остатки D446-N862

Ботулинический нейротоксин типа Е: аминокислотные остатки K423-K845

Ботулинический нейротоксин типа F: аминокислотные остатки A440-K864

Ботулинический нейротоксин типа G: аминокислотные остатки S447-S863

Столбнячный нейротоксин: аминокислотные остатки S458-V879

Домен H_C:

Ботулинический нейротоксин типа А: аминокислотные остатки N872-L1296

Ботулинический нейротоксин типа В: аминокислотные остатки E859-E1291

Ботулинический нейротоксин типа C₁: аминокислотные остатки N867-E1291

Ботулинический нейротоксин типа D: аминокислотные остатки S863-E1276

Ботулинический нейротоксин типа Е: аминокислотные остатки R846-K1252

Ботулинический нейротоксин типа F: аминокислотные остатки K865-E1274

Ботулинический нейротоксин типа G: аминокислотные остатки N864-E1297

Столбнячный нейротоксин: аминокислотные остатки I880-D1315

В одном из вариантов осуществления, где указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты локализуется в транслокационном домене

клостридиального токсина (домене H_N), указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты не локализуется в поясной области клостридиального токсина. Поясную область клостридиального токсина (определенную посредством визуального осмотра структур и моделей) определяют следующим образом:

Ботулинический нейротоксин типа А: аминокислотные остатки 492-545

Ботулинический нейротоксин типа В: аминокислотные остатки 472-532

Ботулинический нейротоксин типа C₁: аминокислотные остатки 494-543

Ботулинический нейротоксин типа D: аминокислотные остатки 489-539

Ботулинический нейротоксин типа Е: аминокислотные остатки 466-515

Ботулинический нейротоксин типа F: аминокислотные остатки 485-536

Ботулинический нейротоксин типа G: аминокислотные остатки 489-538

Столбнячный нейротоксин: аминокислотные остатки 506-556

В одном из вариантов осуществления по меньшей мере одна модификация аминокислоты (как описано выше) является модификацией поверхностного аминокислотного остатка. Поверхностные аминокислотные остатки являются

аминокислотными остатками, присутствующими на внешней части свернутого белка и, таким образом, доступными для окружающего растворителя, в отличие от аминокислотных остатков, локализующихся внутри свернутого белка. Степень экспонирования аминокислотного остатка на поверхности и, таким образом, воздействия на него окружающего растворителя зависит от его положения в свернутом белке, а

также от конформации, принимаемой белком. Модификация аминокислотного остатка с высокой степенью экспонирования на поверхности, таким образом, может иметь более значительный эффект в отношении изоэлектрической точки белка, чем модификация аминокислотного остатка с низкой степенью экспонирования на поверхности. В этой области известны способы определения экспонирования

аминокислотного остатка на поверхности. В качестве примера, для вычисления степени экспонирования аминокислотных остатков на поверхности в указанном белке можно использовать компьютерную программу AreaIMol (часть пакета программ CCP4).

Экспонируемые на поверхности аминокислотные остатки также можно определять посредством визуального осмотра кристаллической структуры белка (например,

полученной посредством рентгеноструктурной кристаллографии). В одном из вариантов осуществления экспонируемый на поверхности аминокислотный остаток имеет суммарное значение AreaIMol по меньшей мере 40.

В одном из вариантов осуществления по меньшей мере одна модификация

аминокислоты включает модификацию аминокислотного остатка, выбранного из: остатка аспарагиновой кислоты, остатка глутаминовой кислоты, остатка гистидина, остатка аспарагина, остатка глутамина, остатка серина, остатка треонина, остатка аланина, остатка глицина, остатка валина, остатка лейцина и остатка изолейцина.

5 Авторы настоящего изобретения определяли, что аминокислотные остатки из этой группы представляют собой особенно подходящие мишени для модификации по настоящему изобретению.

В одном из вариантов осуществления, где модификация аминокислоты включает модификацию аминокислотного остатка, выбранного из остатка аспарагиновой кислоты, 10 остатка глутаминовой кислоты, остатка гистидина, остатка аспарагина, остатка глутамина, остатка серина, остатка треонина, остатка аланина, остатка глицина, остатка валина, остатка лейцина и остатка изолейцина (как описано выше), аминокислотный остаток заменяют остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления аминокислотный остаток заменяют остатком аргинина. Таким образом, 15 в одном из вариантов осуществления отрицательно заряженный остаток, полярный остаток или незаряженный остаток заменяют положительно заряженным остатком, таким образом, повышая соотношение положительного и отрицательного заряда и повышая рI клостридиального токсина.

В одном из вариантов осуществления по меньшей мере одна модификация 20 аминокислоты (как описано выше) включает модификацию аминокислотного остатка аспарагина или аминокислотного остатка глутамина (незаряженные, полярные остатки). В одном из вариантов осуществления аминокислотный остаток аспарагина или глутамина заменяют остатком лизина или остатком аргинина (положительно заряженные остатки). В одном из вариантов осуществления аминокислотный остаток 25 аспарагина или глутамина заменяют остатком лизина. В одном из вариантов осуществления аминокислотный остаток аспарагина или глутамина заменяют остатком аргинина.

В одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/A. Референсная последовательность BoNT/A имеет регистрационный 30 номер UniProtKB P10845. В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/A, сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/A1.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали конкретные аминокислоты, представляющие собой предпочтительные мишени для модификации аминокислоты в 35 домене H_N клостридиального токсина BoNT/A.

В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/A, указанный сконструированный BoNT/A содержит модификацию по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или всех 55) аминокислоты, выбранной из: 40 D474, N476, D484, N486, I487, E488, A489, A490, E491, D546, E558, E560, H561, I566, L568, N570, S571, L577, N578, A597, E599, A601, E620, V621, T623, D625, T631, N645, L647, D650, D651, I668, E670, A672, V675, S683, I685, A686, N687, N752, Q753, T755, E756, E757, E758, N760, N761, I762, N763, D825, I831, G832, T847, D848 и D858; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (рI) сконструированного 45 BoNT/A до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы рI больше, чем рI в других отношениях идентичного BoNT/A, в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает

замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

- 5 В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/A, указанный сконструированный BoNT/A содержит модификацию по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или всех 17) аминокислоты, выбранной из: N476, S564, N578, E599, L647, D650, D651, V675, I685, N687, T755, E757, N761, N763, I831, T847 и I849; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/A до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/A, в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

- 20 В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/A, указанный сконструированный BoNT/A содержит модификацию по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или всех 6) аминокислоты, выбранной из: S564, L647, D650, D651, T847 и I849; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/A до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/A, в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

- 25 В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/A, указанный сконструированный BoNT/A содержит модификацию по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или всех 6) аминокислоты, выбранной из: N476, N763, N687, E599, I831 и N761; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/A до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/A, в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

- 30 40 45 В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/A, указанный сконструированный BoNT/A содержит модификацию по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или всех 5) аминокислоты, выбранной из: N578, V675, I685, T755 и E757; и указанные модификации аминокислот

повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/A до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/A, в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В одном из

5 вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

10 В одном из вариантов осуществления сконструированный клострдиальный токсин является BoNT/B. Референсная последовательность BoNT/B имеет регистрационный номер UniProtKB P10844.

15 Авторы настоящего изобретения идентифицировали конкретные аминокислоты, представляющие собой предпочтительные мишени для модификации аминокислоты в домене H_N клострдиального токсина BoNT/B.

20 В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клострдиальный токсин является BoNT/B, указанный сконструированный BoNT/B содержит модификацию по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или всех 40) аминокислоты, выбранной из: V443, G444, D453, S468, D533, E534, N535, T545, L548, D549, I550, D552, S557, L564, S566, N582, V584, N609, L619, N632, E633, G637, A646, I655, E657, V662, E669, S670, I672, D673, N739, I740, N748, N750, I818, G819, T834, I842, N845 и S858; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/B до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI

25 больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/B, в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

30

В одном из вариантов осуществления сконструированный клострдиальный токсин является BoNT/C₁. Референсная последовательность BoNT/C₁ имеет регистрационный номер UniProtKB P18640.

35 Авторы настоящего изобретения идентифицировали конкретные аминокислоты, представляющие собой предпочтительные мишени для модификации аминокислоты в домене H_N клострдиального токсина BoNT/C₁.

40 В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клострдиальный токсин является BoNT/C₁, указанный сконструированный BoNT/C₁ содержит модификацию по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или всех 50) аминокислоты, выбранной из: L451, D452, C453, E455, V472, T474, D475, L478, N483, E484, E485, E487, I489, L555, S556, D557, N558, E560, D561, E569, N574, S575, T584, G592, Q594, G596, D617, N640, S641, V642, G645, N646, E661, E665, T667, A670, S678, V680, Q681, E682, S750, G751, S759, Q760, V826, G827, N842, T843,

45 N847 и N853; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/C₁ до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/C₁, в котором отсутствуют

указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная 5 модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

В одном из вариантов осуществления сконструированный клострдиальный токсин является BoNT/D. Референсная последовательность BoNT/D имеет регистрационный номер UniProtKB P19321.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали конкретные аминокислоты,

10 представляющие собой предпочтительные мишени для модификации аминокислоты в домене H_N клострдиального токсина BoNT/D.

В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клострдиальный токсин является BoNT/D, указанный сконструированный BoNT/D содержит модификацию по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35,

15 40, 45, 50, 55, 60 или всех 62) аминокислоты, выбранной из: Q469, E470, E473, N474, D479, E480, N482, V483, Q484, N485, S487, D488, S552, N553, N554, V555, E556, N557, I558, L560, T562, S563, V564, G569, S571, N572, G588, Q590, T614, D616, S619, S622, N636, S637, L639, G641, N642, E657, E661, T663, A666, V669, S674, I676, Q677, E678, S746, G747, D749, E751, N752, I753, Q756, N818, V822, G823, E837, N838, T839, N843, N849 и N850; и

20 указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/D до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/B, в котором отсутствуют указанные 25 модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина.

В одном из вариантов осуществления сконструированный клострдиальный токсин является BoNT/E. Референсная последовательность BoNT/E имеет регистрационный 30 номер UniProtKB Q00496. В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клострдиальный токсин является BoNT/E, сконструированный клострдиальный токсин является BoNT/E3.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали конкретные аминокислоты, 35 представляющие собой предпочтительные мишени для модификации аминокислоты в домене H_N клострдиального токсина BoNT/E.

В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клострдиальный токсин является BoNT/E, указанный сконструированный BoNT/E содержит модификацию по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35,

40 40, 45, 50 или всех 52) аминокислоты, выбранной из: D474, N476, E479, E480, D484, N486, I487, E488, A489, A490, E491, E492, L496, D497, Q500, Q501, L504, N507, D509, N510, N514, S516, E518, Q527, L530, N533, I534, E535, N539, Y548, I566, L568, D589, A597, E599, A601, L604, Y612, E620, N645, L647, Y648, D651, E737, E741, Y803, Y824, D825, G828, I831, G832 и D835; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/E до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, 45 чем pI в других отношениях идентичного BoNT/E, в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная

модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

5 В одном из вариантов осуществления сконструированный клострдиальный токсин является BoNT/F. Референсная последовательность BoNT/F имеет регистрационный номер UniProtKB YP_001390123.

10 Авторы настоящего изобретения идентифицировали конкретные аминокислоты, представляющие собой предпочтительные мишени для модификации аминокислоты в домене H_N клострдиального токсина BoNT/F.

15 В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клострдиальный токсин является BoNT/F, указанный сконструированный BoNT/F содержит модификацию по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или всех 86) аминокислоты, выбранной из: N463, E464, N468, T469, D474, D475, T476, T477, N478, N482, N485, N495, I499, Q501, I502, Q505, T506, N508, T509, V511, D513, D521, S522, S526, E527, I528, E529, V534, D535, L536, E549, G550, T552, N553, S558, E566, E567, S568, V586, H587, Q608, D613, A616, D617, S619, N630, N633, N639, E654, V656, E658, L660, T663, L665, V666, S671, I673, G674, S675, S676, E677, N678, T746, N751, L753, E754, E756, N758, I759, N760, N761, S799, S821, I822, N840, S841, E845, L846, S847, S848, T850, N851, D852, I854, L855 и I856; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/F до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/F в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В 20 одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

25 30 В одном из вариантов осуществления сконструированный клострдиальный токсин является BoNT/G. Референсная последовательность BoNT/G имеет регистрационный номер UniProtKB Q60393.

35 Авторы настоящего изобретения идентифицировали конкретные аминокислоты, представляющие собой предпочтительные мишени для модификации аминокислоты в домене H_N клострдиального токсина BoNT/G.

40 В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клострдиальный токсин является BoNT/G, указанный сконструированный BoNT/G содержит модификацию по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или всех 36) аминокислоты, выбранной из: N480, Q482, N483, N484, T485, E487, D540, N562, N570, N571, N572, T588, V589, T615, D621, N637, E638, E642, N643, I660, E662, I667, E674, S675, V677, G678, N679, S747, N755, D757, L823, D839, I841, D844, S846 и L847; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/G до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/G, в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену

аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

В одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин является TeNT. Референсная последовательность TeNT имеет регистрационный номер 5 UniProtKB P04958.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали конкретные аминокислоты, представляющие собой предпочтительные мишени для модификации аминокислоты в домене H_N клостридиального токсина TeNT.

В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является TeNT, указанный сконструированный TeNT содержит модификацию 10 по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или всех 49) аминокислоты, выбранной из: A457, S458, L459, D461, L462, E486, E487, Q490, D491, N497, N504, D557, T571, T572, L573, Q574, N580, S581, N588, S589, T590, S598, Q605, G606, Q608, T631, I633, S640, Q655, E658, G659, N660, E675, I677, E679, 15 T681, V684, A691, E692, S694, T695, Q696, A772, D773, E774, S862, N866, L867 и D868; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного TeNT до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 20 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного TeNT в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная 25 модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали конкретные аминокислоты, представляющие собой предпочтительные мишени для модификации аминокислоты в легкой цепи клостридиального токсина BoNT/A.

В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/A, указанный сконструированный BoNT/A содержит модификацию 30 по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 или всех 28) аминокислоты, выбранной из: N5, Q7, N9, D12, N15, Q31, D58, N60, D74, N82, T122, D124, E126, Q139, D141, E281, L284, S295, Q311, D326, D334, N377, TYR387, N394, N396, N410, M411 и N418; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую 35 точку (pI) сконструированного BoNT/A до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/A, в котором отсутствуют 40 указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная 45 модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали конкретные аминокислоты, представляющие собой предпочтительные мишени для модификации аминокислоты в легкой цепи клостридиального токсина BoNT/B.

В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/B, указанный сконструированный BoNT/B содержит модификацию 50 по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или всех 41, аминокислоты, выбранной из: N6, N7, N9, N11, D12, N16, N17, N18, D41,

E48, E57, N60, D75, D77, N80, E127, N130, N144, E147, E149, E185, N216, D245, E253, N316, D333, E335, D341, N385, D388, N389, E390, E395, E396, D402, D404, E406, E408, Q419, E423 и E427; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/B до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2

5 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/B, в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену 10 аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали конкретные аминокислоты, представляющие собой предпочтительные мишени для модификации аминокислоты в легкой цепи клостридиального токсина BoNT/C₁.

15 В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/C₁, указанный сконструированный BoNT/C₁ содержит модификацию по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40 или всех 41) аминокислоты, выбранной из: N6, N7, N9, D12, D15, N18, N31, E32, N55, N59, N75, N120, N121, N125, D128, Q142, N145, N177, N178, Q183, E184, D208, 20 E211, Q247, N255, N311, E335, E339, N343, N368, N386, D389, D390, N391, Q396, N405, N407, N425, E427, D442 и N448; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/C₁ до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 25 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/C₁, в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная 30 модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали конкретные аминокислоты, представляющие собой предпочтительные мишени для модификации аминокислоты в легкой цепи клостридиального токсина BoNT/D.

35 В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/D, указанный сконструированный BoNT/D содержит модификацию по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30 или всех 34) аминокислоты, выбранной из: D7, N9, D12, N15, D16, N17, D53, D73, D119, E124, E139, E142, N143, Q177, Q178, N180, E184, E255, N308, D335, N336, N339, N343, N368, N386, D389, D390, N391, D397, N403, N407, E409, E416 и N443; и указанные модификации 40 аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/D до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/D, в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену 45 аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали конкретные аминокислоты, представляющие собой предпочтительные мишени для модификации аминокислоты в легкой цепи клостридиального токсина BoNT/E.

В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный

5 токсин является BoNT/E, указанный сконструированный BoNT/E содержит модификацию по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 35 или всех 37) аминокислоты, выбранной из: N5, N8, N10, D11, N14, D15, Q27, E28, Q53, N72, Q75, D117, N118, D121, N122, Q123, N138, N169, N170, N195, Q237, ILE244, Q290, N293, N297, D312, Q344, N362, N365, D366, N370, E373, N378, N379, N383, N390 и T397; и

10 указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/E до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/E, в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная

15 модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный

20 токсин является BoNT/E, указанный сконструированный BoNT/E содержит модификацию по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20) аминокислоты, выбранной из: N5, N8, N10, D11, N14, D15, Q27, E28, N72, Q75, N118, D121, N122, Q123, N138, Q237, Q290, N297, N362, N365, D366, N378 и N379; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного

25 BoNT/E до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/E, в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов

30 осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/E, указанный сконструированный BoNT/E содержит модификацию

35 по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или всех 19) аминокислоты, выбранной из: N5, N8, N10, D11, N14, D15, N72, Q75, N118, N122, Q123, N138, Q237, Q290, Q297, N362, D366, N378 и N379; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/E до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5,

40 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/E, в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов

45 осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/E, указанный сконструированный BoNT/E содержит модификацию

по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или всех 6) аминокислоты, выбранной из: N8, N10, Q75, Q123, N138 и Q237; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/E до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/E, в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/E, указанный сконструированный BoNT/E содержит модификацию по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2 или всех 3) аминокислоты, выбранной из: Q123, N138 и Q237; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/E до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/E, в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали конкретные аминокислоты, представляющие собой предпочтительные мишени для модификации аминокислоты в легкой цепи клостридиального токсина BoNT/F.

В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/F, указанный сконструированный BoNT/F содержит модификацию по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, или всех 35) аминокислоты, выбранной из: N6, N9, N11, D12, N15, D16, D17, E28, D55, D60, D74, N76, E105, E121, N126, E127, N144, D185, N211, Q252, N305, E310, D312, N314, N329, D331, N379, D382, D383, D384, E390, N396, N400, D414 и D418; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/F до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/F, в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали конкретные аминокислоты, представляющие собой предпочтительные мишени для модификации аминокислоты в легкой цепи клостридиального токсина BoNT/G.

В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является BoNT/G, указанный сконструированный BoNT/G содержит модификацию по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 35 или всех 38) аминокислоты, выбранной из: N4, N7, N9, N11, D12, N15, D17, E48, Q55, D57,

N60, D75, D127, Q144, E148, D149, Q150, N178, E185, E208, D211, E255, D315, D332, N334, D340, E383, D387, N388, Q393, N394, E395, N403, E407, E418, E422, E426 и N443; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI)

5 сконструированного BoNT/G до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/G, в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену 10 аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали конкретные аминокислоты, представляющие собой предпочтительные мишени для модификации аминокислоты в легкой цепи TeNT.

15 В одном из вариантов осуществления, где сконструированный клостридиальный токсин является TeNT, указанный сконструированный TeNT содержит модификацию по меньшей мере одной (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 35 или всех 36) аминокислоты, выбранной из: N6, N7, N15, N16, D17, D31, E51, E57, N60, N76, N101, D126, D143, N167, D179, N180, E251, Q257, N313, N316, D318, D335, N337, Q339, 20 N368, N387, D390, D391, N395, D396, E403, D406, E410, N421, D427 и E450; и указанные модификации аминокислот повышают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного TeNT до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного TeNT, в котором отсутствуют указанные модификации аминокислот. В 25 одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина или остатком аргинина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком лизина. В одном из вариантов осуществления указанная модификация включает замену аминокислоты остатком аргинина.

30 Настоящее изобретение подходит для использования по отношению ко многим разновидностям клостридиального токсина. Таким образом, в контексте настоящего изобретения термин "клостридиальный токсин" включает токсины, продуцируемые *C. botulinum* (ботулинический нейротоксин серотипов A, B, C₁, D, E, F и G), *C. tetani* (столбнячный нейротоксин), *C. butyricum* (ботулинический нейротоксин серотипа E) и 35 *C. baratii* (ботулинический нейротоксин серотипа F), а также модифицированные клостридиальные токсины или производные, полученные из любых из изложенных выше. Термин "клостридиальный токсин" также включает ботулинический нейротоксин серотипа H.

40 Ботулинический нейротоксин (BoNT) продуцируется *C. botulinum* в форме крупного белкового комплекса, состоящего из самого BoNT, в комплексе с рядом аксессорных белков. В настоящее время существует восемь различных классов ботулинического нейротоксина, а именно: ботулинический нейротоксин серотипов A, B, C₁, D, E, F, G и H, все из которых обладают схожими структурами и механизмами действия. Различные серотипы BoNT можно различать с учетом инактивации специфическими 45 нейтрализующими антисыворотками, при этом такая классификация по серотипу коррелирует с процентом идентичности последовательности на уровне аминокислот. Белки BoNT указанного серотипа дополнитель но разделяют на различные подтипы с учетом процента идентичности аминокислотной последовательности.

BoNT абсорбируются в желудочно-кишечном тракте, после поступления в общий кровоток связываются с пресинаптической мембраной окончаний холинергических нервов и предотвращают высвобождение их нейромедиатора ацетилхолина. BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F и BoNT/G расщепляют синаптобревин/везикуло-ассоциированный мембранный белок (VAMP); BoNT/C₁, BoNT/A и BoNT/E расщепляют синаптосомально-ассоциированный белок массой 25 кДа (SNAP-25); и BoNT/C₁ расщепляет синтаксин.

Столбнячный токсин продуцируется одним серотипом *C. tetani*. *C. butyricum* продуцирует BoNT/E, в то время как *C. barattii* продуцирует BoNT/F.

Термин "клостридиальный токсин" также предназначен для включения 10 модифицированных клостридиальных токсинов и их производных, включая, в качестве неограничивающих примеров, описываемые ниже. Модифицированный клостридиальный токсин или производное может содержать одну или более 15 аминокислот, модифицированных по сравнению с нативной (немодифицированной) формой клостридиального токсина или может содержать одну или более встроенных аминокислот, не присутствующих в нативной (немодифицированной) форме 20 клостридиального токсина. В качестве примера, модифицированный клостридиальный токсин может иметь модифицированные аминокислотные последовательности в одном или более доменах относительно нативной (немодифицированной) последовательности клостридиального токсина. С помощью таких модификаций можно модифицировать 25 функциональные аспекты токсина, например, биологическую активность или устойчивость. Таким образом, в одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин по изобретению является сконструированным модифицированным клостридиальным токсином, или производным сконструированного модифицированного клостридиального токсина, или производным сконструированного 30 клостридиального токсина.

Модифицированный клостридиальный токсин может иметь одну или более 35 модификаций в аминокислотной последовательности тяжелой цепи (такой как модифицированный домен H_C), где указанная модифицированная тяжелая цепь связывается с нейронами-мишениями с более высокой или более низкой аффинностью, чем нативный (немодифицированный) клостридиальный токсин. Такие модификации в домене H_C могут включать модифицированные остатки в участке связывания ганглиозида домена H_C или участке связывания белка (SV2 или синаптотагмина), изменяющие связывание с рецептором ганглиозида и/или рецептором белка нейрона-40 мишени. Примеры таких модифицированных клостридиальных токсинов описывают в WO 2006/027207 и WO 2006/114308, включенных, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

Модифицированный клостридиальный токсин может иметь одну или более 45 модификаций в аминокислотной последовательности легкой цепи, например, модификации в связывающем субстрат или катализическом домене, которые могут изменять или модифицировать специфичность модифицированной LC в отношении белка SNARE. Примеры таких модифицированных клостридиальных токсинов описывают в WO 2010/120766 и US 2011/0318385, включенных, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

Модифицированный клостридиальный токсин может содержать одну или более 50 модификаций, повышающих или снижающих биологическую активность и/или биологическую устойчивость модифицированного клостридиального токсина. Например, модифицированный клостридиальный токсин может содержать лейциновый или

тиrozиновый мотив, где указанный мотив повышает или снижает биологическую активность и/или биологическую устойчивость модифицированного клострдиального токсина. Подходящие лейциновые мотивы включают xDxxxLL, xExxxLL, xExxxIL и xExxxLM (где x является любой аминокислотой). Подходящие тирозиновые мотивы

5 включают Y-x-x-Hу (где Ну является гидрофобной аминокислотой). Примеры модифицированных клострдиальных токсинов, содержащих лейциновые и тирозиновые мотивы, описывают в WO 2002/08268, таким образом, включенном в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Термин "клострдиальный токсин" предназначен для включения гибридных и

10 химерных клострдиальных токсинов. Гибридный клострдиальный токсин содержит, по меньшей мере, часть легкой цепи из одного клострдиального токсина или его подтипа и, по меньшей мере, часть тяжелой цепи из другого клострдиального токсина или подтипа клострдиального токсина. В одном из вариантов осуществления гибридный клострдиальный токсин может содержать целую легкую цепь из одного

15 подтипа клострдиального токсина и тяжелую цепь из другого подтипа клострдиального токсина. В другом варианте осуществления химерный клострдиальный токсин может содержать часть (например, связывающий домен) тяжелой цепи одного подтипа клострдиального токсина с другой частью тяжелой цепи из другого подтипа клострдиального токсина. Аналогично или альтернативно,

20 терапевтический элемент может содержать части легкой цепи из разных клострдиальных токсинов. Такие гибридные или химерные клострдиальные токсины применимы, например, в качестве средств достижения терапевтических благоприятных эффектов таких клострдиальных токсинов у пациентов, иммунологически резистентных к указанному подтипу клострдиального токсина, пациентов, которые могут иметь

25 концентрацию рецепторов к указанному связывающему домену тяжелой цепи клострдиального токсина ниже средней, или пациентов, которые могут иметь протеаза-резистентный вариант мембранныго или везикулярного субстрата токсина (например, SNAP-25, VAMP и синтаксина). Гибридные и химерные клострдиальные токсины описывают в US 8071110, включенном, таким образом, в настоящее описание в качестве

30 ссылки в полном объеме. Таким образом, в одном из вариантов осуществления сконструированный клострдиальный токсин по изобретению является сконструированным гибридным клострдиальным токсином или сконструированным химерным клострдиальным токсином.

Термин "клострдиальный токсин" предназначен для включения перенаправленных

35 клострдиальных токсинов. В перенаправленном клострдиальном токсине клострдиальный токсин модифицируют так, чтобы он включал экзогенный лиганд, известный как направляющий фрагмент (TM). TM выбирают так, чтобы он обеспечивал специфичность связывания для желаемой клетки-мишени, и в качестве части процесса перенаправления можно удалять нативную связывающую часть клострдиального

40 токсина (например, домен H_C или домен H_{CC}). Технологию перенаправления описывают, например, в: EP-B-0689459; WO 1994/021300; EP-B-0939818; US 6461617; US 7192596; WO 1998/007864; EP-B-0826051; US 5989545; US 6395513; US 6962703; WO 1996/033273; EP-B-0996468; US 7052702; WO 1999/017806; EP-B-1107794; US 6632440; WO 2000/010598; WO 2001/21213; WO 2006/059093; WO 2000/62814; WO 2000/04926; WO 1993/15766; WO

45 2000/61192 и WO 1999/58571; все из которых включены, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. Таким образом, в одном из вариантов осуществления сконструированный клострдиальный токсин по изобретению является сконструированным перенаправленным клострдиальным токсином.

Настоящее изобретение также включает клостридиальные токсины, имеющие ненативный участок расщепления протеазой. В таких клостридиальных токсинах нативный участок расщепления протеазой (также известный как участок активации, как описано выше) модифицируют или заменяют участком расщепления протеазой, не являющимся нативными для этого клостридиального токсина (т.е. экзогенным участком расщепления). Для такого участка потребуется экзогенная протеаза для расщепления, что делает возможным улучшенный контроль времени и локализации расщепления. Ненативные участки расщепления протеазой, которые можно использовать в клостридиальных токсинах, включают:

- 10 Энтерокиназа (DDDDK↓)
- Фактор Xa (IEGR↓/IDGR↓)
- TEV (Вирус гравировки табака) (ENLYFQ↓G)
- Тромбин (LVPR↓GS)
- PreScission (LEVLFQ↓GP).

15 Дополнительные участки расщепления протеазой включают последовательности распознавания, расщепляемые нецитотоксической протеазой, например, легкой цепью клостридиального нейротоксина. Они включают последовательности распознавания белка SNARE (например, SNAP-25, синтаксина, VAMP), расщепляемые нецитотоксическими протеазами, такими как легкая цепь клостридиального 20 нейротоксина. Клостридиальные токсины, содержащие ненативные участки расщепления протеазой, описывают в US 7132259, EP 1206554-B2 и US 2007/0166332, все из которых включены, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Термин "участок расщепления протеазой" также включает интейн, являющийся саморасщепляющейся последовательностью. Реакция автономного сплайсинга является 25 контролируемой, например, посредством варьирования концентрации присутствующего восстановителя.

Настоящее изобретение также включает клостридиальные токсины, содержащие "деструктивный участок расщепления". В указанных клостридиальных токсинах ненативный участок расщепления протеазой встраивают в клостридиальный токсин в 30 место, выбранное таким образом, что расщепление в указанном участке будет снижать активность или инактивировать клостридиальный токсин. Деструктивный участок расщепления протеазой может быть восприимчивым к расщеплению локальной протеазой в случае, если клостридиальный токсин после введения мигрирует в нецелевой участок. Подходящие ненативные участки расщепления протеазой включают 35 описываемые выше. Клостридиальные токсины, содержащие деструктивный участок расщепления, описывают в WO 2010/094905 и WO 2002/044199, включенных, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

Сконструированные клостридиальные токсины по настоящему изобретению, в частности, их компонент легкой цепи, можно пегилировать, это может способствовать 40 повышению стабильности, например, длительности действия компонента легкой цепи. Пегилирование является особенно предпочтительным, если легкая цепь содержит протеазу BoNT/A, B или C₁. Пегилирование, предпочтительно, включает добавление PEG на N-конец компонента легкой цепи. В качестве примера, N-конец легкой цепи можно удлинять на один или более аминокислотных остатков (например, цистеина), 45 которые могут быть одинаковыми или разными. Один или более указанных аминокислотных остатков могут иметь свою собственную молекулу PEG, прикрепленную к нему (например, ковалентно прикрепленную). Пример этой технологии описывают в WO2007/104567, таким образом, включенном в настоящее описание в

качестве ссылки в полном объеме.

Сконструированные клострдиальные токсины по настоящему изобретению могут не содержать комплексированные белки, присутствующие в природном комплексе клострдиального токсина.

5 Сконструированный клострдиальный токсин по настоящему изобретению также может содержать ограниченное количество нестандартных аминокислот. Таким образом, в дополнение к 20 стандартным аминокислотам, нестандартные аминокислоты (такие как 4-гидроксипролин, 6-N-метиллизин, 2-аминоизомасляная кислота, изовалин и α -метилсерин) можно заменять аминокислотными остатками сконструированных 10 клострдиальных токсинов по настоящему изобретению. Аминокислотные остатки клострдиального полипептида можно заменять ограниченным количеством неконсервативных аминокислот, аминокислот, не кодируемых генетическим кодом, и неприродных аминокислот. Сконструированные клострдиальные токсины по настоящему изобретению также могут содержать неприродные аминокислотные остатки.

15 Неприродные аминокислоты включают, в качестве неограничивающих примеров, транс-3-метилпролин, 2,4-метанпролин, цис-4-гидроксипролин, транс-4-гидроксипролин, N-метилглицин, аллотреонин, метилтреонин, гидроксизтилцистеин, гидроксизтилгомоцистеин, нитроглутамин, гомоглутамин, пипеколиновую кислоту, трет-лейцин, норвалин, 2-азафенилаланин, 3-азафенилаланин, 4-азафенилаланин и 4-20 фторфенилаланин. В этой области известно несколько способов включения неприродных аминокислотных остатков в белки. Например, можно использовать систему *in vitro*, где нонсенс-мутации супрессируют с использованием химически аминоацилированных супрессорных тРНК. В этой области известны способы синтеза аминокислот и аминоацилирования тРНК. Транскрипцию и трансляцию плазмид, содержащих нонсенс-25 мутации, осуществляют в бесклеточной системе, содержащей экстракт *E. coli* S30 и коммерчески доступные ферменты и другие реагенты. Белки очищают посредством хроматографии. См., например, 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; и Chung et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10145-9, 1993). Во втором способе трансляцию осуществляют 30 в ооцитах *Xenopus* посредством микроинъекции мутантной мРНК и химически аминоацилированных супрессорных тРНК (Turcatti et al., *J. Biol. Chem.* 271:19991-8, 1996). В третьем способе клетки *E. coli* культивируют в отсутствие природной аминокислоты, подлежащей замене (например, фенилаланина), и в присутствие желаемых неприродных аминокислот (например, 2-азафенилаланина, 3-азафенилаланина, 4-35 азафенилаланина или 4-фторфенилаланина). Неприродная аминокислота встраивается в полипептид вместо природной. См., Koide et al., *Biochem.* 33:7470-6, 1994.

Сконструированные клострдиальные токсины по настоящему изобретению можно получать с использованием технологий рекомбинантных нуклеиновых кислот. Таким образом, в одном из вариантов осуществления сконструированный клострдиальный 40 токсин (как описано выше) является рекомбинантным сконструированным клострдиальным токсином.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте (например, ДНК), содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированный клострдиальный токсин, как описано выше. В одном из вариантов 45 осуществления последовательность нуклеиновой кислоты получают как часть ДНК-вектора, содержащего промотор и терминатор.

В предпочтительном варианте осуществления вектор имеет промотор, выбранный из:

Промотор	Средство индукции	Типичные условия индукции
Tac (гибридный)	IPTG	0,2 мМ (0,05-2,0 мМ)
AraBAD	L-арabinоза	0,2% (0,002-0,4%)
Оператор T7-lac	IPTG	0,2 мМ (0,05-2,0 мМ)

5 В другом предпочтительном варианте осуществления вектор имеет промотор, выбранный из:

Промотор	Средство индукции	Типичные условия индукции
Tac (гибридный)	IPTG	0,2 мМ (0,05-2,0 мМ)
AraBAD	L-арабиноза	0,2% (0,002-0,4%)
Оператор T7-lac	IPTG	0,2 мМ (0,05-2,0 мМ)
Оператор T5-lac	IPTG	0,2 мМ (0,05-2,0 мМ)

10 Молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению можно получать любым подходящим способом, известным в этой области. Таким образом, молекулы нуклеиновой кислоты можно получать способами химического синтеза. Альтернативно, 15 молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению можно получать способами молекулярной биологии.

Конструкцию ДНК по настоящему изобретению, предпочтительно, конструируют *in silico*, а затем синтезируют общепринятыми способами синтеза ДНК.

20 Указанную выше информацию о последовательности нуклеиновой кислоты, необязательно, модифицируют в зависимости от отклонения от равномерности использования кодона с учетом конечной системы экспрессии клетки-хозяина (например, *E. coli*), подлежащей использованию.

25 В одном из вариантов осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая сконструированный клостридиальный токсин, как описано выше, является последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99%) идентичности последовательности по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 2, 4 и 6. В одном из вариантов осуществления последовательность нуклеиновой кислоты имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности по отношению к 30 последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 2, 4 и 6.

35 Настоящее изобретение также относится к полипептидам, кодируемым последовательностями нуклеиновой кислоты, как описано выше. Таким образом, в одном из аспектов настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99%) идентичности последовательности по отношению к аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 3 и 5. В одном из вариантов осуществления аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности по отношению к аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 3 и 5.

40 В одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин по изобретению является сконструированным BoNT/A, как описано выше, и указанный сконструированный BoNT/A содержит (или состоит из) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9%) идентичности последовательности по отношению к аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 3 и 5.

45 В одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин по изобретению является сконструированным BoNT/A, как описано выше, и указанный сконструированный BoNT/A содержит (или состоит из) аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 1, 3 или 5.

В одном из аспектов изобретение относится к полипептиду, содержащему (или состоящему из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 3 или 5.

В одном из аспектов изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей

- 5 сконструированный клостридиальный токсин, как описано выше, где указанная нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9%) идентичности последовательности по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 2, 4 и 6. В одном из вариантов 10 осуществления нуклеиновая кислота содержит (или состоит из) последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 2, 4 или 6.

В одном из аспектов изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей (или состоящей из) последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 2, 4 или 6.

В одном из вариантов осуществления сконструированный клостридиальный токсин

- 15 по изобретению является сконструированным BoNT/E, как описано выше, и указанный сконструированный BoNT/E содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9%) идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 7.

В одном из аспектов изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей

- 20 сконструированный клостридиальный токсин, как описано выше, где указанная нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9%) идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 8.

"Процент идентичность последовательности" между двумя или более

- 25 последовательностями нуклеиновой кислоты или аминокислотными последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей. Таким образом, % идентичности можно вычислять как количество идентичных нуклеотидов/аминокислот, разделенное на общее количество нуклеотидов/аминокислот, умноженное на 100. При вычислениях % идентичности 30 последовательности также можно принимать во внимание количество пропусков и длину каждого пропуска, который необходимо включать для оптимизации выравнивания двух или более последовательностей. Сравнения последовательностей и определение процента идентичности между двумя или более последовательностями можно осуществлять с использованием специальных математических алгоритмов, таких как 35 BLAST, известных специалисту в этой области.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения одноцепочечного белка сконструированного клостридиального токсина, имеющего легкую цепь и тяжелую цепь, включающему экспрессию нуклеиновой кислоты (указанной нуклеиновой кислоты, описываемой выше) в подходящей клетке-хозяине, лизис клетки-хозяина для получения гомогената клетки-хозяина, содержащего одноцепочечный белок сконструированного клостридиального токсина, и выделение одноцепочечного белка сконструированного клостридиального токсина.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу активации сконструированного клостридиального токсина, включающему получение

- 45 одноцепочечного белка сконструированного клостридиального токсина, получаемого способом получения одноцепочечного белка сконструированного клостридиального токсина, как описано выше, приведение полипептида в контакт с протеазой, расщепляющей полипептид по участку распознавания (участку расщепления),

локализованному между легкой цепью и тяжелой цепью, таким образом, преобразование полипептида в двухцепочечный полипептид, где легкая цепь и тяжелая цепь соединены дисульфидной связью.

Сконструированные клостридиальные токсины по изобретению можно использовать

- 5 для профилактики или лечения конкретного медицинских или косметических заболеваний и состояний. Таким образом, в дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к сконструированному клостридиальному токсину, как описано выше, для применения в медицине.

В связанным аспекте настоящее изобретение относится к сконструированному

- 10 клостридиальному токсину, как описано выше, для применения в профилактике или лечении заболевания или состояния, выбранного из: косоглазия, блефароспазма, косоглазия, дистонии (например, спастической дистонии, оромандибулярной дистонии, фокальной дистонии, тардивной дистонии, ларингеальной дистонии, дистонии конечностей, спастической кривошеи), кривошеи (например, спастической кривошеи),

- 15 в косметологии, когда будут получать пользу от ограничения способностей клеток/ мышц (посредством отрицательной регуляции или инактивации SNARE), нервно-мышечного нарушения или состояния подвижности глаз (например, содружественного косоглазия, вертикального косоглазия, паралича латеральной прямой мышцы, нистагма, дистироидной миопатии), писчего спазма, блефароспазма, бруксизма, болезни Вильсона-

- 20 Коновалова, тремора, тиков, сегментарного миоклонуса, спазмов, спастичности по причине хронического рассеянного склероза, спастичности, приводящей к нарушениям контроля мочевого пузыря, анизмуса, спазма спины, спазма конечности, головных болей напряжения, синдрома мышцы levator ani, расщепления позвоночника, тардивной дискинезии, болезни Паркинсона, заикания, гемифациального спазма, нарушения век,

- 25 церебрального паралича, фокальной спастичности, спастического колита, нейрогенного мочевого пузыря, анизмуса, спастичности конечности, тиков, тремора, бруксизма, анальной трещины, ахалазии, дисфагии, слезотечения, гипергидроза, обильного слюноотделения, избыточной желудочно-кишечной секреции, мышечной боли (например, боли при мышечных спазмах), головной боли (например, головной боли напряжения),

- 30 межбровной складки, морщин, злокачественного новообразования, нарушений матки, урогенитальных нарушений, урогенитальных неврологических нарушений, хронического нейрогенного воспаления и нарушений гладких мышц.

- При применении в настоящем изобретении используют фармацевтическую композицию, содержащую сконструированный клостридиальный токсин по меньшей мере с одним компонентом, выбранным из фармацевтически приемлемого носителя, эксципиента, вспомогательного вещества, пропеллента и/или соли.

- Сконструированные клостридиальные токсины по настоящему изобретению можно составлять для перорального, парентерального введения, непрерывной инфузии, ингаляции или местного введения. Композиции, подходящие для инъекции, могут 40 находиться в форме растворов, суспензий или эмульсий или сухих порошков, растворяемых или суспендируемых в подходящем наполнителе перед использованием.

- В случае сконструированного клостридиального токсина, подлежащего местному введению, сконструированный клостридиальный токсин можно составлять в виде крема (например, для местного введения) или для подкожной инъекции.

- 45 Средства для местного введения могут включать аэрозоль или другой спрей (например, небулайзер). В связи с этим, аэрозольный состав сконструированного клостридиального токсина делает возможным введение в легкие и/или другие назальные, и/или бронхиальные, или дыхательные пути.

Сконструированные клострдиальные токсины по изобретению можно вводить пациенту посредством интратрахеальной или эпидуральной инъекции в позвоночник на уровне сегмента спинного мозга, участвующего в иннервации пораженного органа.

Предпочтительным путем введения является лапароскопическая и/или

5 локализованная, в частности внутримышечная, инъекция.

Диапазоны доз для введения сконструированных клострдиальных токсинов по настоящему изобретению являются такими, чтобы достигать желаемого терапевтического эффекта. Следует понимать, что необходимый диапазон доз зависит от конкретной природы сконструированного клострдиального токсина или

10 композиции, пути введения, природы состава, возраста пациента, природы, степени или тяжести состояния пациента, противопоказаний, если такие есть, и решения лечащего врача. Варианты этих уровней доз можно корректировать с использованием стандартных эмпирических способов оптимизации.

Подходящие суточные дозы (на кг массы пациента) находятся в диапазоне 0,0001-1

15 нг/кг, предпочтительно - 0,0001-0,5 нг/кг, более предпочтительно - 0,002-0,5 нг/кг, и особенно предпочтительно - 0,004-0,5 нг/кг. Единица дозирования может варьироваться от менее 1 пикограмм на 30 нг, но, как правило, будет находиться в диапазоне от 0,01 до 1 нг на дозу, которую можно вводить ежедневно или, предпочтительно, реже, например, еженедельно или раз в шесть месяцев.

20 Особенno предпочтительная схема дозирования основана на 0,05 нг сконструированного клострдиального токсина в виде однократной дозы. В связи с этим предпочтительные дозы находятся в диапазоне 1-100-кратной дозы (т.е. 0,05-5 нг).

Жидкие лекарственные формы, как правило, получают с использованием сконструированного клострдиального токсина и стерильного наполнителя, не содержащего пирогены. Сконструированный клострдиальный токсин, в зависимости от используемого наполнителя и концентрации, можно растворять или супензировать в наполнителе. При получении растворов сконструированный клострдиальный токсин можно растворять в наполнителе, растворе, сделанном изотоническим, при необходимости, посредством добавления хлорида натрия и стерилизованном посредством фильтрации через стерильный фильтр асептическими способами перед наполнением подходящих стерильных сосудов или ампул и запаиванием. Альтернативно, если стабильность раствора является подходящей, раствор в закрытых контейнерах можно стерилизовать посредством автоклавирования. Преимущественно, в наполнителе можно растворять добавки, такие как буфер, солюбилизатор, стабилизатор, консервант или бактерицидное средство, супензирующее средство или эмульгаторы и/или местные анестетики.

Сухие порошки, растворяемые или супензируемые в подходящем наполнителе перед использованием, можно получать посредством наполнения стерильного контейнера предварительно стерилизованными ингредиентами асептическим способом в стерильной зоне. Альтернативно, ингредиенты можно растворять в подходящих контейнерах асептическим способом в стерильной зоне. Затем продукт лиофилизируют и контейнеры асептически закрывают.

Парентеральные супензии, подходящие для внутримышечной, подкожной или 45 внутрикожной инъекций, получают, по существу, тем же образом, за исключением того, что стерильные компоненты супензируют в стерильном наполнителе вместо растворения, и стерилизацию нельзя осуществлять посредством фильтрации. Компоненты можно выделять в стерильном состоянии, или, альтернативно, их можно

стерилизовать после выделения, например, посредством гамма-облучения.

Преимущественно, сусpendирующее средство например, поливинилпирролидон включают в композиции для облегчения однородного распределения компонентов.

Введение по настоящему изобретению может обладать преимуществом разнообразия 5 технологий введения, включая инкапсуляцию микрочастиц, вирусные системы доставки или использование аэрозоля высокого давления.

Краткое описание чертежей

Фигура 1.

Очистка CatH_N-v1 (фиг. 1А), CatH_N-v2 (фиг. 1В) и CatH_N-v3 (фиг. 1С) с помощью

10 SDS-PAGE.

Фигура 2.

Процентная доля расщепления SNAP-25 в эмбриональных нейронах спинного мозга крысы (eSCN) в случае CatH_N-v1. Эмбриональные нейроны спинного мозга крысы 15 культивировали в течение трех недель и обрабатывали CatH_N-v1 в течение 24 ч. перед вестерн-блоттингом с SNAP-25-специфическим антителом. Данные представляют собой среднее \pm SEM для трех независимых экспериментов в трех параллелях.

Фигура 3.

Активность (t_{50}) BoNT/A и CatH_N-v1 в анализе диафрагмального нерва и купола

20 диафрагмы мыши (mPNHD). Точки данных представляют собой отдельные препараты купола диафрагмы и среднее \pm SEM. CatH_N-v1 был статистически значимо более медленным, чем референсный белок BoNT/A (List Biological Laboratories). Односторонний ANOVA и критерий множественного сравнения Даннета. ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ (односторонний ANOVA и критерий множественного сравнения Даннета).

Фигура 4.

Процентная доля расщепления SNAP-25 в эмбриональных нейронах спинного мозга крысы (eSCN) в случае CatH_N-v2. Эмбриональные нейроны спинного мозга крысы 30 культивировали в течение трех недель и обрабатывали CatH_N-v2 в течение 24 ч. перед вестерн-блоттингом с SNAP-25-специфическим антителом. Данные представляют собой среднее \pm SEM для трех независимых экспериментов в трех параллелях.

Фигура 5.

Активность (t_{50}) BoNT/A и CatH_N-v2 в анализе диафрагмального нерва и купола 35 диафрагмы мыши (mPNHD). Точки данных представляют собой отдельные препараты купола диафрагмы и среднее \pm SEM. CatH_N-v2 являлся статистически эквивалентным референсному белку BoNT/A (List Biological Laboratories). Односторонний ANOVA и критерий множественного сравнения Даннета. ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ (Односторонний ANOVA и критерий множественного сравнения Даннета).

Фигура 6.

Процентная доля расщепления SNAP-25 в эмбриональных нейронах спинного мозга крысы (eSCN) в случае CatH_N-v3. Эмбриональные нейроны спинного мозга крысы 40 культивировали в течение трех недель и обрабатывали CatH_N-v3 в течение 24 ч. перед вестерн-блоттингом с SNAP-25-специфическим антителом. Данные представляют собой среднее \pm SEM для трех независимых экспериментов в трех параллелях.

Фигура 7.

Активность (t_{50}) BoNT/A и CatH_N-v3 в анализе диафрагмального нерва и купола 45 диафрагмы мыши (mPNHD). Точки данных представляют собой отдельные препараты

куполя диафрагмы и среднее \pm SEM. CatH_N_v3 был статистически значимо более медленным, чем референсный белок BoNT/A (List Biological Laboratories). Односторонний ANOVA и критерий множественного сравнения Даннета. ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001 (Односторонний ANOVA и критерий множественного сравнения Даннета).

⁵ **Фигура 8.**

Анализ изоэлектрофокусирования. Все три конструкции CatH_N обладали повышенной наблюдаемой рI по сравнению с немодифицированным BoNT/A.

¹⁰ **Фигура 9.**

Очистка конструкции CatLC посредством SDS-PAGE.

¹⁵ **Фигура 10.**

Каталитическая активность CatLC по сравнению с референсном LC BoNT/E, при этом значения рЕ₅₀ получали с помощью набора для детекции BoTest A/E BoNT (BioSentinel кат. № A1004) по инструкциям производителя. Данные представляют собой среднее \pm стандартное отклонение для одного независимого эксперимента в трех параллелях.

Последовательности

SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность сконструированного BoNT/A "CatH_N_v1".

²⁰ SEQ ID NO: 2. Последовательность нукleinовой кислоты сконструированного BoNT/A "CatH_N_v1".

SEQ ID NO: 3. Аминокислотная последовательность сконструированного BoNT/A "CatH_N_v2".

²⁵ SEQ ID NO: 4. Последовательность нукleinовой кислоты сконструированного BoNT/A "CatH_N_v2".

SEQ ID NO: 5. Аминокислотная последовательность сконструированного BoNT/A "CatH_N_v3".

³⁰ SEQ ID NO: 6. Последовательность нукleinовой кислоты сконструированного BoNT/A "CatH_N_v3".

SEQ ID NO: 7. Аминокислотная последовательность сконструированного легкой цепи BoNT/E "CatLC".

SEQ ID NO: 8. Последовательность нукleinовой кислоты сконструированного легкой цепи BoNT/E "CatLC".

³⁵ SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность сконструированного BoNT/A "CatH_N_v1".

MPFVNQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNIWVIPERDTFTNPEEG
DL NPPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNLYKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPF
WGGSTI DTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNVIIGPSADIIQFECKSFGHEVNLTRNG

⁴⁰ YGSTQYIR FSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIAGHRRLYGIAINP
NRVFKVNTNAYY EMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFDIASTLN
KAKSIVGTTASLQYMKN VFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVK
FFKVLRNRTYLNFDKAVFKINIV PKVNYTIYDGFNLRNTLAAANFNGQNTIEINNMNFT

⁴⁵ KLKNFTGLFEFYKLLCVRGIIITSKTSLD KGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTN
DLNKGEETSDTNIEAAEENISLDLIQQYLYTFN FDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIER
FPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKRRIALTNS VNEALLNPSRVYTFSSDYVKKV

NKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIP YIGPALNIGNMRYKRRFVG
ALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTQVTIDNAL SKRNEKWDEVYKYIVT

NWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNIN FNIDDLSSKLN
 ESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALKYIYDNR GTLIGQ
 VDRLKDKVNNTLSRDRPQLSKYVDNQRLLSTFEYIKNIINTSILNRLYESNHLIDL SRY
 ASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTFWIRIPKYFNS IS
 5 LNNEYTIINCMENNSGWKVSLNYGEIWTLQDTQEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFV
 TI TNNRLNNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKE
 LNEKE IKDLYDNQSNSGILKDFWDYLQYDKPYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYM
 YLGPRGSVMTTN IYLNSSLYRGTKFIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVKNKEYR
 LATNASQAGVEKILSALEI PDVGNLSQVVVMKSNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFI
 10 GFHQFNNIAKLVASNWYNRQIERSS RTLGCSWEFIPVDDGWGERPL

SEQ ID NO: 2. Последовательность нуклеиновой кислоты сконструированного BoNT/A "CatH_N_v1".

ATGCCATTCTGTCAACAAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGAC
 ATCGC ATACATCAAGATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTAA
 15 GATCCACAACAAG ATTTGGGTTATCCCGAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAG
 AAGGCATCTGAACCCGCCAC CGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCACTACGAT
 TCGACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAA AGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCA
 AGCTGTTCGAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTCGC ATGCTGCTGACTAGCATT
 GTTCGCGGTATCCGTTCTGGGTTAGCACGATTGACACCGAAC TGAAGGTTAT
 20 CGACACTAACTGCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAC GC
 TGAATCTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATCCAATTGAGTGCAAGAGC
 TTTGGT CACGAGGTTCTGAATCTGACCCGAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACAT
 TCGTTTCGCCGG ATTTTACCTTCGGCTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAA
 TCCGTTGCTGGGTGCGGGCAA ATTGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCATG
 25 AACTGATCCACGCAGGCCACCGCCCTGTAC GGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTG
 TTCAAGGTTAACGAAATGCATACTACGAGATGAGCG GCCTGGAAGTCAGCTTCGA
 AGAACTGCGCACCTCGGTGGCCATGACGCTAAATTGACAG CTTGCAAGAGA
 ATGAGTTCCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGGT AAC
 AAGGCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGGTAGTATATGAAGAATGTGTT
 30 TAAAG AGAAGTACCTGCTGTCGAGGATACCTCCGGCAAGTTAGCGTTGATAAGC
 TGAAGTTGACAA ACTGTACAAGATGCTGACCGAGATTACACCGAGGACAACCTT
 GTGAAATTCTTCAAAGTGTG AATCGAAAACCTATCTGAATTGACAAAGCGGT
 TTTCAAGATTAACATCGTGGCAAGGTGA ACTACACCCTATGACGGTTAACCT
 GCGTAACACCAACCTGGCGCGAACCTAACGGTCA GAATACGGAAATCAACAAAC
 35 ATGAATTTCACGAAGTTGAAGAACATTACGGGCTGTTGAGTT TATAAGCTGCTG
 TCGTGCAGCGGTATCATCACCAGCAAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACA ACA
 AGGCAGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAACAATTGGGATCTGTTCTTCGCCAT
 CCGA AGATAATTACCAACGACCTGAACAAGGGTGAAGAAATCACCAGCGATAC
 GAATATTGAAGCA GCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATC
 40 TGACCTTAACCTCGACAATG AACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGC
 GACATTATCGGTCACTGGAACTGATGCC GAATATCGAACGTTCCCGAACGGCAA
 AAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCATTAC CTGCGTGCACAGGAGTTG
 AACACGGTAAAGtCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGG CCCTGCTGAACC
 CGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAA AGCC
 45 ACTGAGGCCGCGATGTTCTGGGCTGGGTTAACAGCTGGTATATGACTTCACCGA
 CGAG ACGAGCGAAGTGAGCACTACCGACAAATTGCTGATATTACCATCATTATCC
 CGTATATTGGTC CGGCAGTGAACATTGGCAACATGCgtTACAAAGtgcgTTTGAGTT
 GCCCTGATCTTCTCCGG TGCCGTGATTCTGCTGGAGTTCAATTCCGGAGATTGCGATC

CCGGTGTTGGGTACCTCGCGCTG GTGTCCTACATCGCGAATAAGGTTCTGACGGTT
 CAGACCATCGATAACCGCGCTGCGAAACGTA ATGAAAAATGGGACGAGGTTACA
 AATACATTGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCA GATCGACCTGATCCGT
 AAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGCCAGGCCACCAAAGCA ATTATCA
 5 ACTACCAATACAACCAGTACACCGAAGAAGAGAAGAATAACATTAACCTCAATAT
 CG ATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATCAATATCA
 ACAAGTTTT GAATCAGTGTAGCGTTCGTACCTGATGAATAGCATGATTCCGTATG
 GCGTCAAACGCTGGAG GACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATAC
 ATTTACGACAATCGTGGTACGCTGA TTGGCCAAGTTGACCGCTGAAAGACAAAGT
 10 TAACAATACCCTGAGCgtGACgtCCATTCA ACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAAC
 GTCTGTTGAGCACTTCACCGAGTATATCAAAAACATC ATCAATACTAGCATTCTGA
 ACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATG CAAGCAAGATC
 AACATCGGTAGCAAGGTCAATTGACCCGATCGATAAGAACCAAGATCCAGCT GTT
 TAATCTGGAATCGAGAAAATTGAGGTTATCCTGAAAAACGCCATTGTCTACAACCTC
 15 CATG TACGAGAATTCTCCACCAGCTTCTGGATTGCGATCCCGAAATACCTCAACAG
 CATTAGCCTGA ACAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACAAACAGCGGTT
 GGAAGGTGTCTCTGAACTA TGGTGAGATCATTGGACCTTGCAGGACACCCAAGAG
 ATCAAGCAGCGCGTCGTCAAGTAC TCTCAAATGATCAACATTCCGATTACATT
 AATCGTTGGATCTCGTGACCAATTACGAATAACC GTCTGAATAACAGCAAGATTAA
 20 CATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCT GGGTAATATCCACG
 CAAGCAACAACATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCATCGT TATATC
 TGGATCAAGTATTCAACCTGTTGATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGATCAAAGA
 TT TGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTGAGGACTTCTGGGGCGATTATCT
 GCAATACGA TAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAATATGTGG
 25 ATGTCAATAATGTGGGT ATTCGTGGTTACATGTATTGAAGGGTCCCGTGGCAGC
 GTTATGACGACCAACATTACCTGA ACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCACTC
 ATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAA CATTGTGCGTAATAACGATCGTGT
 CTACATCAACGTGGTCGTGAAGAATAAGAGTACCGTCTG GCGACCAACGCTTCGC
 AGGCGGGTGTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTCG GTAATCTG
 30 AGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACCAAGGGTATCACTAACAAAGTCAA
 GATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTATTGGTTCCACCAAGTT
 CAACAAT ATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATGTCAGATTGAGCGCA
 GCAGCCGTACTTGG GCTGTAGCTGGAGTTATCCCGTCATGATGATGGTTGGGGC
 GAACGTCCGCTG

35 SEQ ID NO: 3. Аминокислотная последовательность сконструированного BoNT/A
 "CatH_N_v2".

MPFVNQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNIWVIPERDTFTNPEEG
 DL NPPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPF
 WGGSTI DTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNVIIGPSADIIQFECKSFGHEVNLTRNG
 40 YGSTQYIR FSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAINP
 NRVFKVNTNAYY EMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFDIASTLN
 KAKSIVGTTASLQYMKN VFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVK
 FFKVLRNRTYLNFDKAVFKINIV PKVNYTIYDGFNLRNTLAAANFNGQNTIEINNMNFT
 KLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTSLD KGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTN
 45 DLKKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYLYTFN FDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIER
 FPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNS VNEALLNPSRVYTFSSDYVKKV
 NKATKAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIP YIGPALNIGNMLYKDDFVG
 ALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIAKKVLTQVTIDNAL SKRNEKWDEVYKYIVT

NWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNKIK FNIDDLSSKLN
 ESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALKYIYDNR GTLKG
 QVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNRLYESNHLIDL SR
 YASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTFWIRIPKYFNS
 5 ISLNNEYTIINCMENNNSGWKVSLNYGEIWTLQDTQEIKQRVVFYSQMINISDYINRWIF
 VTI TNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDK
 ELNEKE IKDLYDNQSNSGILKDFWDYLQYDKPYYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYM
 YLGPRGSVMTTN IYLNSSLYRGTIFIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVKNKEYR
 LATNASQAGVEKILSALEI PDVGNLSQVVVMKSNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFI
 10 GFHQFNNIAKLVASNWYNRQIERSS RTLGCSWEFIPVDDGWGERPL

SEQ ID NO: 4. Последовательность нуклеиновой кислоты сконструированного BoNT/A "CatH_N_v2".

ATGCCATTCTGCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGAC
 ATCGC ATACATCAAGATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTAA
 15 GATCCACAACAAG ATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAG
 AAGGCATCTGAACCCGCCAC CGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCAGCTACTACGAT
 TCGACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAA AGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCA
 AGCTGTTCGAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTCGC ATGCTGCTGACTAGCATT
 GTTCGCGGTATCCGTTCTGGGGTGGTAGCAGCATTGACACCGAAC TGAAGGTTAT
 20 CGACACTAATGCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAC GC
 TGAATCTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATCCAATTGAGTGCAAGAGC
 TTTGGT CACGAGGTTCTGAATCTGACCCGAATGGCTATGGTAGCAGCACCAGTACAT
 TCGTTTCGCCGG ATTTTACCTTCGGCTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAA
 TCCGTTGCTGGGTGCGGGCAA ATTGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCATG
 25 AACTGATCCACGCAGGCCACCGCCCTGTAC GGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTG
 TTCAAGGTTAACGAAATGCATACTACGAGATGAGCG GCCTGGAAGTCAGCTTCGA
 AGAACTGCGCACCTCGGTGGCCATGACGCTAAATTGACAG CTTGCAAGAGA
 ATGAGTTCCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGGT AAC
 AAGGCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTT
 30 TAAAG AGAAGTACCTGCTGTCGAGGATACCTCCGGCAAGTTAGCGTTGATAAGC
 TGAAGTTGACAA ACTGTACAAGATGCTGACCGAGATTACACCGAGGACAACCTT
 GTGAAATTCTTCAAAGTGTG AATCGAAAACCTATCTGAATTGACAAAGCGGT
 TTTCAAGATTAACATCGTGGCAAGGTGA ACTACACCCTATGACGGTTAACCT
 GCGTAACACCAACCTGGCGCGAACCTAACGGTCA GAATACGGAAATCAACAAAC
 35 ATGAATTTCACGAAGTTGAAGAACATTACGGGCTGTTGAGTT TATAAGCTGCTG
 TCGTGCAGCGGTATCATCACCAGCAAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACA ACA
 AGGCAGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAACAATTGGGATCTGTTCTTCGCCAT
 CCGA AGATAATTACCAACGACCTGAAgAAGGGTGAAGAAATCACCAGCGATACG
 AATATTGAAGCA GCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCT
 40 GACCTTAACCTCGACAATG AACCGGAGAACATTAGCATTGAGAACATTGAGCAGCG
 ACATTATCGGTAGCTGAACTGATGCC GAATATCGAACGTTCCGAACGGCAAA
 AAGTACCGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCATTAC CTGCGTGCACAGGAGTTGA
 ACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGG CCCTGCTGAACC
 CGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAA AGCC
 45 ACTaAGGCCGCGATGTTCTGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGAC
 GAG ACGAGCGAAGTGAGCACTACCGACAAAATTGCTGATATTACCATCATTATCCC
 GTATATTGGTC CGGCAGTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGACGATTGTGG
 GTGCCCTGATCTCTCCGG TGCCGTGATTCTGCTGGAGITCATTCCGGAGATTGCGA

TCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTG GTGTCCTACATCGCGAAgAAGGTTCTGACGG
 TTCAGACCATCGATAACCGCGCTGCGAAACGTA ATGAAAAATGGGACGAGGTTAC
 AAATACATTGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCA GATCGACCTGATCCG
 TAAGAAAATGAAAGAGGCCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCA ATTATC
 5 AACTACCAATACAACCAGTACACCGAAGAAGAGAAGAATAAgATTAAGTTCAATAT
 CG ATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATCAATATCA
 ACAAGTTTT GAATCAGTGTAGCGTTCTGACCTGATGAATAGCATGATTCCGTATG
 GCGTCAAACGCTCTGGAG GACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATAC
 ATTACGACAATCGTGGTACGCTGA agGCCAAGTTGACCGCTTGAAAGACAAAGT
 10 TAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCATTCA ACTGAGCAAGTATGTTGATAATC
 AACGTCTGTTGAGCACTTCACCGAGTATATCAAAAACATC ATCAATACTAGCATT
 CTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATG CAAGCAA
 GATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTGACCCGATCGATAAGAACCCAGATCCAGCT
 GTTTAATCTGGAATCGAGCAAAATTGAGGTTATCCTGAAAACGCCATTGTCTACAA
 15 CTCCATG TACGAGAATTCTCCACCAAGCTTCTGGATTGCGATCCGAAATACCTCAA
 CAGCATTAGCCTGA ACAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACAAACAGCG
 GTTGGAAAGGTGTCCTGAACTA TGGTGAGATCATTGGACCTTGCAGGACACCCAA
 GAGATCAAGCAGCGCGTGTCAAGTAC TCTCAAATGATCAACATTTCCGATT
 CATTAACTCGTTGGATCTCGTGACCAATTACGAATAACC GTCTGAATAACAGCAAGA
 20 TTTACATCAATGGTCGCTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCT GGGTAATATC
 CACGCAAGCAACAACATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCATCGT TA
 TATCTGGATCAAGTATTCAACCTGTTGATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGATCA
 AAGATT TGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTGAGGACTTCTGGGGCGAT
 TATCTGCAATACGA TAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAATA
 25 TGTGGATGTCAATAATGTGGGT ATTCTGTTGACATGTATTGAAGGGTCCCGTGG
 CAGCGTTATGACGACCAACATTACCTGA ACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAAT
 TCATCATTAAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAA CATTGTGCGTAATAACGAT
 CGTGTCTACATCAACGTGGTGTGAAGAATAAAAGAGTACCGTCTG GCGACCAACGC
 TTCGCAGGCAGGGTGTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTCG GTA
 30 ATCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACCAGGGTATCACTAACAAAG
 TGCAA GATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTATTGGTTCCA
 CCAGTTCAACAAT ATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGTCAGATTG
 AGCGCAGCAGCCGTACTTGG GCTGTAGCTGGGAGTTATCCCGTCATGATGGT
 TGGGGCGAACGTCCGCTG

35 SEQ ID NO: 5. Аминокислотная последовательность сконструированного BoNT/A
 "CatH_N_v3".

MPFVNQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNIWVIPERDTFTNPEEG
 DL NPPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKNDYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPF
 WGGSTI DTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNVIIGPSADIIQFECKSFGHEVNLTRNG
 40 YGSTQYIR FSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGRRLYGIAINP
 NRVFKVNTNAYY EMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFDIASTLN
 KAKSIVGTTASLQYMKN VFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVK
 FFKVLRNRTYLNFDKAVFKINIV PKVNYTIYDGFNLRNTLAAANFNGQNTIEINNMNFT
 KLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTSLD KGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPEDNFTN
 45 DLNKGEETSDTNEAAEENISLDLIQQYLYTFN FDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIER
 FPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNS VNEALLKPSRVYTFSSDYVKKV
 NKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIP YIGPALNIGNMLYKDDFVG
 ALIFSGAVILLEFIPEIAIPKLGTFALVSYKANKVLTQVTIDNAL SKRNEKWDEVYKYIYT

NWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYKEKEKNNIN FNIDDLSSKL
 NESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKLEDFDASLKDALKYIYDNR GTLIG
 QVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNIINTSILNRLYESNHLIDL SR
 YASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTFWIRIPKYFNS
 5 ISLNNEYTIINCMENNNSGWKVSLNYGEIWTLQDTQEIKQRVVFYSQMINISDYINRWIF
 VTI TNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDK
 ELNEKE IKDLYDNQSNSGILKDFWDYLQYDKPYYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYM
 YLGPRGSVMTTN IYLNSSLYRGTIFIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVKNKEYR
 LATNASQAGVEKILSALEI PDVGNLSQVVVMKSNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFI
 10 GFHQFNNIAKLVASNWYNRQIERSS RTLGCSWEFIPVDDGWGERPL

SEQ ID NO: 6. Последовательность нуклеиновой кислоты сконструированного BoNT/A "CatH_N_v3".

ATGCCATTCTGTCAACAAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGAC
 ATCGC ATACATCAAGATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTAA
 15 GATCCACAACAAG ATTTGGGTTATCCCGAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAG
 AAGGCATCTGAACCCGCCAC CGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCACTACGAT
 TCGACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAA AGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCA
 AGCTGTTCGAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTCGC ATGCTGCTGACTAGCATT
 GTTCGCGGTATCCGTTCTGGGTTAGCACGATTGACACCGAAC TGAAGGTTAT
 20 CGACACTAACTGCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAC GC
 TGAATCTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATCCAATTGAGTGCAAGAGC
 TTTGGT CACGAGGTTCTGAATCTGACCCGAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACAT
 TCGTTTCGCCGG ATTTTACCTTCGGCTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAA
 TCCGTTGCTGGGTGCGGGCAA ATTGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCATG
 25 AACTGATCCACGCAGGCCACCGCCCTGTAC GGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTG
 TTCAAGGTTAACGAAATGCATACTACGAGATGAGCG GCCTGGAAGTCAGCTTCGA
 AGAACTGCGCACCTCGGTGGCCATGACGCTAAATTGACAG CTTGCAAGAGA
 ATGAGTTCCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGGT AAC
 AAGGCCAAAAGCATCGTGGTACTACCGCGTGGTAGCAGTATATGAAGAATGTGTT
 30 TAAAG AGAAGTACCTGCTGTCGAGGATACCTCCGGCAAGTTAGCGTTGATAAGC
 TGAAGTTGACAA ACTGTACAAGATGCTGACCGAGATTACACCGAGGACAACCTT
 GTGAAATTCTTCAAAGTGTG AATCGAAAACCTATCTGAATTGACAAAGCGGT
 TTTCAAGATTAACATCGTGGCAAGGTGA ACTACACCCTATGACGGTTAACCT
 GCGTAACACCAACCTGGCGCGAACCTAACGGTCA GAATACGGAAATCAACAAAC
 35 ATGAATTTCACGAAGTTGAAGAACATTACGGGCTGTTGAGTT TATAAGCTGCTG
 TCGTGCAGCGGTATCATCACCAGCAAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACA ACA
 AGGCAGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAACAAATTGGGATCTGTTCTTCGCCAT
 CCGA AGATAATTACCAACGACCTGAACAAGGGTGAAGAAATCACCAGCgAtACG
 AATATTGAAGCA GCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCT
 40 GACCTTAACCTCGACAATG AACCGGAGAACATTAGCATTGAGAACATTGAGCAGCG
 ACATTATCGGTAGCTGAACTGATGCC GAATATCGAACGTTCCGAACGGCAAA
 AAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCATTAC CTGCGTGCACAGGAGTTGA
 ACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGG CCCTGCTGAAaC
 CGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAACGAAAGTGAACAA AGCC
 45 ACTGAGGCCGCGATGTTCTGGCTGGGTTAACAGCTGGTATATGACTTCACCGA
 CGAG ACGAGCGAAGTGAGCACTACCGACAAATTGCTGATATTACCATCATTATCC
 CGTATATTGGTC CGGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGACGATTGCG
 GGTGCCCTGATCTTCTCCGG TGCCGTGATTCTGCTGGAGTTATTCCGGAGATTGCG

ATCCCGaaGTTGGGTACCTCGCGCTG GTGTCCTACAgGCGAATAAGGTTCTGACGG
 TTCAGACCATCGATAACCGCGCTGCGAAACGTA ATGAAAAATGGACGAGGTTAC
 AAATACATTGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCA GATCGACCTGATCCG
 TAAGAAAATGAAAGAGGCCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCA ATTATC
 5 AACTACCAATACAACCAGTACAaGGAAaAAGAGAAGAATAACATTAACCTCAATAT
 CG ATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATCAATATCA
 ACAAGTTTT GAATCAGTGTAGCGTTCTGACCTGATGAATAGCATGATTCCGTATG
 GCGTCAAACGCTCTGGAG GACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATAC
 ATTACGACAATCGTGGTACGCTGA TTGGCCAAGTTGACCGCTGAAAGACAAAGT
 10 TAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCATTCA ACTGAGCAAGTATGTTGATAATC
 AACGTCTGTTGAGCACTTCACCGAGTATATCAAAAACATC ATCAATACTAGCATT
 CTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATG CAAGCAA
 GATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTGACCCGATCGATAAGAACCCAGATCCAGCT
 GTTTAATCTGGAATCGAGCAAAATTGAGGTTATCCTGAAAAACGCCATTGTCTACAA
 15 CTCCATG TACGAGAATTCTCCACCAAGCTTCTGGATTGCGATCCGAAATACCTCAA
 CAGCATTAGCCTGA ACAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACAAACAGCG
 GTTGGAAAGGTGTCCTGAACTA TGTTGAGATCATTGGACCTTGCAGGACACCCAA
 GAGATCAAGCAGCGCGTGTCAAGTAC TCTCAAATGATCAACATTTCCGATT
 CATTAACTCGTTGGATCTCGTGACCATTACGAATAACC GTCTGAATAACAGCAAGA
 20 TTTACATCAATGGTCGCTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCT GGGTAATATC
 CACGCAAGCAACAACATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCATCGT TA
 TATCTGGATCAAGTATTCAACCTGTTGATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGATCA
 AAGATT TGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTGAGGACTTCTGGGGCGAT
 TATCTGCAATACGA TAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAATA
 25 TGTGGATGTCAATAATGTGGGT ATTCTGTTGACATGTATTGAAGGGTCCCGTGG
 CAGCGTTATGACGACCAACATTACCTGA ACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAAT
 TCATCATTAAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAA CATTGTGCGTAATAACGAT
 CGTGTCTACATCAACGTGGTGTGAAGAATAAAAGAGTACCGTCTG GCGACCAACGC
 TTGCGAGCGGGTGTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTCG GTA
 30 ATCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACCAGGGTATCACTAACAAAG
 TGCAA GATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTATTGGTTCCA
 CCAGTTCAACAAT ATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGTCAGATTG
 AGCGCAGCAGCCGTACTTGG GCTGTAGCTGGGAGTTATCCCGTCATGATGGT
 TGGGGCGAACGTCCGCTG

35 SEQ ID NO: 7. Аминокислотная последовательность сконструированного легкой цепи BoNT/E "CatLC".

MKIEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGD
 GPD IIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLKPFTWDARVYNGKLIYPIAVEALS
 LIYNKDLL PNPPKTWEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYE
 40 NGKYDIKVGVVDNA GAKAGLTFVLDFIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGP
 WAWSNIDTSKVNYGVTVLPTF KGQPSKPFVGVLISAGINAASPNKELAKEFLENYLLTD
 EGLEAVNVDKPLGAVALKSYEEELAKD PRIAATMENAQKGEIMPNIPQMSAFWYAVR
 TAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSSNNNNNNNN NNLGIEGRISEFGSMPKINSFNYN
 DPVNDRTILYIKPGGCQEFYKSFNIMKNIWIIPERNVIGT TPQDFHPPTSLKNGDSSYYDP
 45 NYLQSDEEKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANPYL GNDNTPDNKFHIGDASA
 VEIKFSKGSQHILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISLRNNYMPSNHGF GSIAIVTFSPEYSFR
 FNDNSINEFIQDPALTLMHELIHSLHGLYAKGITTCTIITQQKNPLIT NRKGINIEEFLTF
 GGNDLNIITVAQYNDIYTNLLNDYRKIASLKVQVSNPQLNPYKDIFQEKGLDKDA

SGIYSVNINKFDDILKKLYSFTEFDLATKFQVKCRETYIGQYKFKLSNLLNDSIYN ISEG
YNINNLKVNFRGQNANLPRIIKPITGRGLVKIIRFAVDKLAALEHHHHHH

SEQ ID NO: 8. Последовательность нуклеиновой кислоты сконструированного легкой цепи BoNT/E "CatLC".

5 ATGAAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCTAT
AACGG TCTCGCTGAAGTCGGTAAGAAATTGAGAAAGATAACCGGAATTAAAGTCA
CCGTTGAGCATCCG GATAAACTGGAAGAGAAATTCCCACAGGTTGCGGCACTGGC
GATGGCCCTGACATTATCTTCT GGGCACACGACCCTGGTGGCTACGCTCAATCT
GGCCTGTTGGCTGAAATCACCCCGGACAA AGCGTCCAGGACAAGCTGATCCGTT
10 TACCTGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATT GCTTACCCGATCGCTGTTG
AAGCGTTATCGCTGATTATAACAAAGATCTGCTGCCGAACCCGC CAAAAAACCTGG
GAAGAGATCCCGCGCTGGATAAAGAACTGAAAGCGAAAGGTAAAGAGCGCGCT GA
TGTTCACCTGCAAGAACCGTACTTCACCTGGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGTT
ATGCG TTCAAGTATGAAAACGGCAAGTACGACATTAAAGACGTGGCGTGGATAA
15 CGCTGGCGCGAAAG CGGGTCTGACCTCCTGGTTGACCTGATTAAAAACAAACACA
TGAATGCAGACACCGATTACTC CATCGCAGAAGCTGCCTTAATAAAAGGCGAAACA
GCGATGACCATCAACGGCCGTGGCATGG TCCAACATCGACACCAGCAAAGTGA
ATTATGGTGTAAACGGTACTGCCGACCTCAAGGGTCAAC CATCCAAACCGTTGCTT
GGCGTGCTGAGCGCAGGGTATTACGCCAGTCCGAACAAAGAGCT GGCAAAAG
20 AGTCCTCGAAAACATCTGCTGACTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAGAC
AAACCGCTGGGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGCGAAAGATCC
ACGTATTG CCGCCACTATGGAAAACGCCAGAAAGGTGAAATCATGCCAACATCC
CGCAGATGTCCGCTT CTGGTATGCCGTGCGTACTGCCGTGATCAACGCCGCCAGC
GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC CTGAAAGACGCGCAGACTAATTGAGCTCGAA
25 CAACAACAACAATAACAATAACAACACCTCG GGATCGAGGGAAGGATTCAGAA
TTCGGATCCATGCCAAAAATCAACAGCTTAATTACAATGA CCCTGTAAACGATCG
TACCATCCTATACATAAGCCGGTGGGTGTCAAGAGTTCTACAAATCT TTCAATA
TTATGAAGAATATATGGATTATACCTGAGCGTAACGTTATTGGTACGACACCGCAAG
ATTTCATCCACCTACTTCGTTGAAGAACGGTGAACGACTCTTCTTATTACGACCCCCATT
30 TCTCCA GTCGGATGAAGAGAAGGACAGATTCTTAAAGTAGTAACCAAAATCTTAA
ACAGGATTAATAAC AATCTATCCGGAGGTATTGCTGTTGAAGAGCTTAGTAAAGCT
AATCCTTACCTAGGTAAACGATA ATACACCAGACAACAAAGTTCATATAGGCATG
ATCCGCCGTGGAAATCAAATTAGCAAGGG ATCACAGCATATTCTCTGCCAACG
TTATTATAATGGGGCGGAACCAGATTATTGAAACA AATTGAGTAATATTAGC
35 CTGAGAAATAACTATATGCCGTCAAACCATGGGTTGCGTAGCATAG CGATCGTTAC
TTTTCTCCCGAATACAGTTTCGCTTCAATGATAATAGTATAATGAGTTAT CCA
AGACCCCGCACTCACGCTTATGCACGAACTCATACACTCTTACACGGCCTGTATGG
CGCT AAGGGGATAACCAACTACGTGTATCATTACTCAGCAAAGAACCCATTGATAA
CGAACAGGAAGG GCATTAACATCGAGGAATTCTTACATTGGAGGCAACGATCTG
40 AACATTATAACTGTCGCACA GTACAATGACATCTATACCAACTTACTAAATGATTA
TAGAAAAAATCGCTTCTAAGTTATCCAAG GTTCAAGTCTCAAACCCCTCAACTGAATC
CGTATAAGGACATATTCCAAGAGAAATATGGATTAG ACAAAAGACGCGTCAGGAAT
CTATTGGTAAACATTAACAAATTGACGATATTGAAAGAAACT TTACAGCTTCAC
GGAGTTCGACTGGCCACCAAATTCCAGGTCAAATGCCGAGAGACATACATC GGAC
45 AGTATAAGTATTCAAGCTGCGAATCTCCTGAATGATTCCATATACAACATTAGT
AGG GTTACAATATAAATAACCTAAAGGTGAATTCCGAGGCCAAACGCCAACCTA
AATCCGCGCAT CATTAAACCCATCACAGGACGGGGTTAGTGAAGAAAATAATCCG
GTTTGCCTGCGACAAGCTT GCGGCCGCACTCGAGCACCACCAACCCAC

Примеры

Следующие примеры служат для иллюстрирования конкретных вариантов осуществления изобретения и не ограничивают объем изобретения, определенный в формуле изобретения, каким-либо образом.

Пример 1

Идентификация предпочтительных аминокислот клостридиального токсина для модификации.

Аминокислоты, идентифицированные в качестве подходящих кандидатов для модификации (участки мутаций), выбирали с использованием ряда различных критериев.

- 10 1. Локализация остатка в молекуле BoNT (в H_N , за исключением поясной области)
2. Локализация с учетом вторичной/третичной структуры;
3. Тип остатка;
4. Степень экспонирования на поверхности.

При селекции рассматривали кислые, нейтральные, полярные и гидрофобные остатки.

15 Экспонируемые остатки определяли с использованием AreaIMol из пакета CCP4.

Каждую структуру анализировали с помощью AreaIMol, и экспонируемые остатки идентифицировали как имеющие суммарное значение выше 55.

Вторичные структуры в H_N каждого подтипа и TeNT идентифицировали с использованием программы для определения вторичной структуры (Stride Web Interface).

20 Области, описываемые как образующие α -спираль, β -тяж или β ₁₀-спираль, исключали.

Используемые последовательности

Регистрационные номера:

BoNT/A: P10845

BoNT/B: P10844

BoNT/C₁: P18640

BoNT/D: P19321

BoNT/E: Q00496

BoNT/F: YP_001390123

BoNT/G: Q60393

Источник структурных данных

Кристаллические структуры BoNT/A (3BTA.pdb), BoNT/B (1EPW) и BoNT/E (3FFZ.pdb) получали из RCSB.

Моделирование гомологии BoNT/C₁, BoNT/D, BoNT/F и BoNT/G осуществляли с

35 использованием LOOPP и следующих последовательностей, соответственно: P18640, P19321, YP_001390123, и Q60393.

Предпочтительные аминокислотные остатки клостридиального токсина для модификации в домене H_N клостридиального токсина:

BoNT/A:

40 D474, N476, D484, N486, I487, E488, A489, A490, E491, D546, E558, E560, H561, I566, L568, N570, S571, L577, N578, A597, E599, A601, E620, V621, T623, D625, T631, N645, L647, D650, D651, I668, E670, A672, V675, S683, I685, A686, N687, N752, Q753, T755, E756, E757, E758, N760, N761, I762, N763, D825, I831, G832, T847, D848 и D858

BoNT/B:

45 V443, G444, D453, S468, D533, E534, N535, T545, L548, D549, I550, D552, S557, L564, S566, N582, V584, N609, L619, N632, E633, G637, A646, I655, E657, V662, E669, S670, I672, D673, N739, I740, N748, N750, I818, G819, T834, I842, N845 и S858

BoNT/C₁:

L451, D452, C453, E455, V472, T474, D475, L478, N483, E484, E485, E487, I489, L555, S556, D557, N558, E560, D561, E569, N574, S575, T584, G592, Q594, G596, D617, N640, S641, V642, G645, N646, E661, E665, T667, A670, S678, V680, Q681, E682, S750, G751, S759, Q760, V826, G827, N842, T843, N847 и N853

⁵ BoNT/D:

Q469, E470, E473, N474, D479, E480, N482, V483, Q484, N485, S487, D488, S552, N553, N554, V555, E556, N557, I558, L560, T562, S563, V564, G569, S571, N572, G588, Q590, T614, D616, S619, S622, N636, S637, L639, G641, N642, E657, E661, T663, A666, V669, S674, I676, Q677, E678, S746, G747, D749, E751, N752, I753, Q756, N818, V822, G823, E837, N838, T839,

¹⁰ N843, N849 и N850

BoNT/E:

D474, N476, E479, E480, D484, N486, I487, E488, A489, A490, E491, E492, L496, D497, Q500, Q501, L504, N507, D509, N510, N514, S516, E518, Q527, L530, N533, I534, E535, N539, Y548, I566, L568, D589, A597, E599, A601, L604, Y612, E620, N645, L647, Y648, D651, E737,

¹⁵ E741, Y803, Y824, D825, G828, I831, G832 и D835

BoNT/F:

N463, E464, N468, T469, D474, D475, T476, T477, N478, N482, N485, N495, I499, Q501, I502, Q505, T506, N508, T509, V511, D513, D521, S522, S526, E527, I528, E529, V534, D535, L536, E549, G550, T552, N553, S558, E566, E567, S568, V586, H587, Q608, D613, A616, D617,

²⁰ S619, N630, N633, N639, E654, V656, E658, L660, T663, L665, V666, S671, I673, G674, S675, S676, E677, N678, T746, N751, L753, E754, E756, N758, I759, N760, N761, S799, S821, I822, N840, S841, E845, L846, S847, S848, T850, N851, D852, I854, L855 и I856

BoNT/G:

N480, Q482, N483, N484, T485, E487, D540, N562, N570, N571, N572, T588, V589, T615,

²⁵ D621, N637, E638, E642, N643, I660, E662, I667, E674, S675, V677, G678, N679, S747, N755, D757, L823, D839, I841, D844, S846 и L847

TeNT:

A457, S458, L459, D461, L462, E486, E487, Q490, D491, N497, N504, D557, T571, T572, L573, Q574, N580, S581, N588, S589, T590, S598, Q605, G606, Q608, T631, I633, S640, Q655,

³⁰ E658, G659, N660, E675, I677, E679, T681, V684, A691, E692, S694, T695, Q696, A772, D773, E774, S862, N866, L867 и D868

Предпочтительные аминокислотные остатки клостридиального токсина для модификации в легкой цепи BoNT/E:

N5, N8, N10, D11, N14, D15, Q27, E28, N72, Q75, N118, D121, N122, Q123, N138, Q237,

³⁵ Q290, N297, N362, N365, D366, N378 и N379.

Пример 2

Дизайн сконструированных молекул BoNT/A

Получали три различных примера сконструированной молекулы BoNT/A по настоящему изобретению.

⁴⁰ Используя способ, описываемый в примере 1, всего 55 остатков идентифицировали в качестве кандидатов для мутации в домене H_N BoNT/A. Пригодность остатков дополнительно оценивали посредством визуального осмотра кристаллической структуры BoNT/A для получения списка из 11 предпочтительных кандидатов (N476, N763, N687, E599, I831, N761, N578, V675, I685, T755, E757). Дополнительные шесть остатков

⁴⁵ выбирали с учетом функциональных данных, свидетельствующих о том, что эти остатки поддаются мутации без неблагоприятного воздействия на функцию белка. Четыре из этих остатков находились в списке кандидатов (L647, D650, D651, T847), а два - нет (S564, I849). Учитывая 11 остатков из списка кандидатов и шесть из функциональных

данных, всего для мутации выбирали 17 остатков.

Учитывая выбранные 17 остатков, получали 3 конструкции: CatH_N_v1, CatH_N_v2 и CatH_N_v3. Мутации для конструкций CatH_N представлены в таблице 3 ниже:

5 **Таблица 3:** Конструкции CatH_N с указанными мутациями и вычисленной рI.

	Мутации	Количество мутаций	Вычисленная рI	Вычисленная ΔрI относительно BoNT/A (рI 6,4)
	CatH _N _v1 S564R, L647R, D650R, D651R, T847R, I849R	6	7,4	1,0
10	CatH _N _v2 N476K, N763K, N687K, E599K, I831K, N761K	6	7,3	0,9
	CatH _N _v3 N578K, V675K, I685K, T755K, E757K	5	7,1	0,7

[ΔрI=изменение изоэлектрической точки]

15 Очистка CatH_N_v1, CatH_N_v2 и CatH_N_v3 представлена на фиг. 1А, 1В и 1С,

соответственно.

Пример 3

Клонирование, экспрессия и очистка

Конструкции ДНК, кодирующие сконструированные молекулы BoNT/A, описываемые

20 в примере 2, синтезировали, клонировали в экспрессирующий вектор pJ401, а затем трансформировали в BL21 (DE3) *E. coli*. Это делало возможной гиперэкспрессию растворимой формы рекомбинантных сконструированных молекул BoNT/A в *E. coli*.

Рекомбинантные сконструированные BoNT очищали классическими способами хроматография из лизатов *E. coli*. Использовали исходную стадию очистки с 25 использованием катионообменной смолы, а затем промежуточную стадию очистки с использованием смолы с гидрофобными взаимодействиями. Затем рекомбинантный сконструированный одноцепочный BoNT расщепляли посредством протеолиза, получая активированный двухцепочный сконструированный BoNT. Затем использовали конечную стадию очистки для удаления оставшихся загрязнений.

Пример 4

Характеризация очищенных сконструированных BoNT

Сконструированные BoNT, описываемые в примере 2 выше, охарактеризовывали экспериментально.

Способность сконструированных BoNT проникать в нейроны и расщеплять SNAP-

35 (мишень BoNT/A) оценивали с использованием эмбриональных нейронов спинного мозга крысы (eSCN). Активность сконструированных BoNT дополнительно оценивали с использованием анализа диафрагмального нерва и купола диафрагмы мыши (mPNHD).

CatH_N_v1:

Первым набором добавляемых мутаций являлись замены аргинином:

40 S564R, L647R, D650R, D651R, T847R, I849R

Молекулу CatH_N_v1 тестировали в анализе расщепления SNAP-25 в эмбриональных нейронах спинного мозга крысы (eSCN) и обнаруживали, что она имеет активность, равносильную BoNT/A (BoNT/A) (фигура 2).

Положительный результат также получен в анализе диафрагмального нерва и купола 45 диафрагмы мыши (mPNHD) (фигура 3).

CatH_N_v2:

Вторым набором добавляемых мутаций являлись замены лизином:

N476K, N763K, N687K, E599K, I831K, N761K

Белок CatH_N-v2 тестировали в анализе расщепления SNAP-25 eSCN и обнаруживали, что он сохранял способность проникать в клетки и расщеплять SNAP-25. В анализе mPNHD CatH_N-v2 имел активность, равносильную BoNT/A (фигуры 4 и 5).

CatH_N-v3:

Третьим набором добавляемых мутаций являлись замены лизином: N578K, V675K, I685K, T755K, E757K

Молекулу CatH_N-v3 тестировали в анализе расщепления SNAP-25 eSCN и

обнаруживали, что она сохраняла способность проникать в клетки и расщеплять SNAP-

25. Аналогично, в анализе mPNHD также получали положительный результат (фигуры 6 и 7).

Изоэлектрофокусирование

Все три конструкции CatH_N обладали повышенной рI по сравнению с немодифицированным BoNT/A (фигура 8).

Пример 5

Модификации легкой цепи BoNT/E

По причине модульной организации ботулинического токсина конструкцию легкой цепи BoNT/E с N-концевой меткой мальтозо-связывающего белка (МВР) и С-концевой 6-гистидиновой меткой (6НТ) использовали в качестве суррогата для анализа активности

20 BoNT/E в случае мутации и его характеризации.

Получали конструкцию легкой цепи BoNT/E ("CatLC"), имеющую мутации, представленные в таблице ниже.

Таблица 4: Конструкция с указанными мутациями, вычисленной рI и вычисленной ΔpI .

	Мутации	Количество мутаций	Вычисленная рI	Вычисленная ΔpI относительно МВР-LC/E (рI 6,3)
CatLC	Q123K N138K Q237K	3	6,6	0,3

30 Конструкцию экспрессировали в клетках BL21 DE3 и очищали с использованием аффинной хроматографии. Очистка представлена на фигуре 9.

Оценка конструкции на каталитическую активность показала, что модифицированная легкая цепь сохраняла каталитическую активность немодифицированной легкой цепи (фигура 10).

(57) Формула изобретения

1. Способ получения модифицированного ботулинического нейротоксина А (BoNT/A), включающий замену аминокислоты BoNT/A лизином или аргинином с получением модифицированного BoNT/A, где указанная аминокислота выбрана из: N476, S564, N578, E599, L647, D650, D651, V675, I685, N687, T755, E757, N761, N763, I831, T847 и I849;

40 где указанная замена повышает изоэлектрическую точку (рI) модифицированного BoNT/A до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 единицы рI больше, чем указанная рI указанного BoNT/A, и

где указанный модифицированный BoNT/A, полученный указанным способом, сохраняет способности указанного BoNT/A, где указанными способностями являются связывание клетки-мишени, транслокация и расщепление целевых белков SNARE, и

где указанный модифицированный BoNT/A:

45 а. кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ

ID NO: 2, 4 и 6; и/или

б. содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 3 и 5.

5. 2. Способ по п.1, где указанная замена аминокислоты повышает изоэлектрическую точку (pI) модифицированного BoNT/A до значения, составляющего по меньшей мере на 0,5 единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/A, в котором отсутствует указанная замена.

3. Способ по п.1 или 2, где указанная замена аминокислоты повышает

10 изоэлектрическую точку (pI) модифицированного BoNT/A до значения, составляющего по меньшей мере на одну единицу pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/A, в котором отсутствует указанная замена.

15 4. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанная замена аминокислоты повышает изоэлектрическую точку (pI) модифицированного BoNT/A до значения, составляющего по меньшей мере на две единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/A, в котором отсутствует указанная замена.

20 5. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанная замена аминокислоты повышает изоэлектрическую точку (pI) модифицированного BoNT/A до значения, составляющего на 2-5 единиц pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/A, в котором отсутствует указанная замена.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, где модифицированный BoNT/A содержит по меньшей мере три замены аминокислот.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный модифицированный BoNT/A:

25 а. кодируется последовательностью нукleinовой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности нукleinовой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 2, 4 и 6; и/или

б. содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 3 и 5.

30 8. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный модифицированный BoNT/A:

а. кодируется последовательностью нукleinовой кислоты, имеющей по меньшей мере 98% идентичности последовательности нукleinовой кислоты, выбранной из SEQ

35 ID NO: 2, 4 и 6; и/или

б. содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 3 и 5.

40 9. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный модифицированный BoNT/A:

а. кодируется последовательностью нукleinовой кислоты, имеющей по меньшей мере 99% идентичности последовательности нукleinовой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 2, 4 и 6; и/или

45 б. содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 3 и 5.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный модифицированный BoNT/A:

а. кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 2, 4 и 6; и/или

б. содержит аминокислотную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 3 и 5.

5 11. Сконструированный ботулинический нейротоксин А (BoNT/A), содержащий: замену аминокислоты, выбранной из: N476, S564, N578, E599, L647, D650, D651, V675, I685, N687, T755, E757, N761, N763, I831, T847 и I849 лизином или аргинином;

где указанная замена повышает изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/A до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 единицы pI больше, чем

10 pI BoNT/A, в котором отсутствует указанная замена; и

pI по меньшей мере 6,6; и

где указанный сконструированный BoNT/A сохраняет способности указанного BoNT/A, в котором отсутствует указанная замена, где указанными способностями являются связывание клетки-мишени, транслокация и расщепление целевых белков SNARE; и

15 где указанный модифицированный BoNT/A:

а. кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 2, 4 и 6; и/или

б. содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%

20 идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 3 и 5.

25 12. Сконструированный BoNT/A по п.11, где указанная замена повышает изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/A до значения, составляющего по меньшей мере на 0,5 единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/A, в котором отсутствует указанная замена.

13. Сконструированный BoNT/A по п.11 или 12, где указанная замена повышает изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/A до значения, составляющего по меньшей мере на одну единицу pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/A, в котором отсутствует указанная замена.

30 14. Сконструированный BoNT/A по любому из пп.11-13, где указанная замена повышает изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/A до значения, составляющего по меньшей мере на две единицы pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/A, в котором отсутствует указанная замена.

35 15. Сконструированный BoNT/A по любому из пп.11-14, где указанная замена повышает изоэлектрическую точку (pI) сконструированного BoNT/A до значения, составляющего на 2-5 единиц pI больше, чем pI в других отношениях идентичного BoNT/A, в котором отсутствует указанная замена.

16. Сконструированный BoNT/A по любому из пп.11-15, где сконструированный BoNT/A содержит по меньшей мере три замены аминокислот.

40 17. Сконструированный BoNT/A по любому из пп.11-16, где указанный сконструированный BoNT/A:

а. кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 2, 4 и 6; и/или

45 б. содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 3 и 5.

18. Сконструированный BoNT/A по любому из пп.11-17, где указанный

сконструированный BoNT/A:

а. кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 98% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 2, 4 и 6; и/или

5 б. содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 3 и 5.

19. Сконструированный BoNT/A по любому из пп.11-18, где указанный сконструированный BoNT/A:

10 а. кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 99% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 2, 4 и 6; и/или

б. содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 3 и

15 5.

20. Сконструированный BoNT/A по любому из пп.11-19, где указанный сконструированный BoNT/A:

а. кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 2, 4 и 6; и/или

20 б. содержит аминокислотную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 3 и 5.

21. Нуклеиновая кислота, кодирующая сконструированный BoNT/A по любому из пп.11-20 или получаемый способом по любому из пп.1-10.

22. Способ получения одноцепочечного белка сконструированного BoNT/A,

25 содержащего легкую цепь и тяжелую цепь, включающий экспрессию нуклеиновой кислоты по п.21, содержащейся в ДНК-векторе в подходящей клетке-хозяине, лизис клетки-хозяина для получения гомогената клетки-хозяина, содержащего одноцепочечный белок сконструированного BoNT/A, и выделение одноцепочечного белка сконструированного BoNT/A, где указанная клетка-хозяин не является

30 эмбриональной клеткой человека.

23. Способ активации сконструированного BoNT/A, включающий получение одноцепочечного белка сконструированного BoNT/A, получаемого способом по п.22, приведение полипептида в контакт с протеазой, расщепляющей полипептид по участку распознавания (участку расщепления), находящемуся между легкой цепью и тяжелой 35 цепью, и преобразование полипептида в двухцепочечный полипептид, где легкая цепь и тяжелая цепь соединены дисульфидной связью.

24. Применение сконструированного BoNT/A по любому из пп.11-20 или получаемого способом по любому из пп.1-10 или 23 в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания или состояния, при которых показана терапия 40 ботулиническим токсином.

25. Применение по п.24, где заболевание или состояние выбраны из: косоглазия, блефароспазма, косоглазия, дистонии (например, спастической дистонии, оромандибулярной дистонии, фокальной дистонии, тардивной дистонии, ларингеальной дистонии, дистонии конечности, спастической кривошееи), кривошееи (например,

45 спастической кривошееи), в косметологии, когда будут получать пользу от ограничения способностей клеток/мышц (посредством отрицательной регуляции или инактивации SNARE), нервно-мышечного нарушения или состояния подвижности глаз (например, содружественного косоглазия, вертикального косоглазия, паралича латеральной прямой

мышцы, нистагма, дистироидной миопатии), писчего спазма, бруксизма, болезни Вильсона-Коновалова, трепора, тиков, сегментарного миоклонуса, спазмов, спастичности по причине хронического рассеянного склероза, спастичности, приводящей к нарушениям контроля мочевого пузыря, анизмуса, спазма спины, спазма конечности, 5 головных болей напряжения, синдрома мышцы levator ani, расщепления позвоночника, тардивной дискинезии, болезни Паркинсона, заикания, гемифациального спазма, нарушения век, церебрального паралича, фокальной спастичности, спастического колита, нейрогенного мочевого пузыря, анизмуса, спастичности конечности, анальной трещины, ахалазии, дисфагии, слезотечения, гипергидроза, обильного слюноотделения, 10 избыточной желудочно-кишечной секреции, мышечной боли (например, боли при мышечных спазмах), головной боли (например, головной боли напряжения), межбровной складки, морщин, злокачественного новообразования, нарушений матки, урогенитальных нарушений, урогенитальных неврологических нарушений, хронического нейрогенного воспаления и нарушений гладких мышц.

15 26. Способ получения модифицированного ботулинического нейротоксина Е (BoNT/Е), включающий замену аминокислоты BoNT/Е лизином или аргинином с получением модифицированного BoNT/Е, где указанная аминокислота выбрана из: Q123, N138 и Q237,

где указанная замена повышает изоэлектрическую точку (рI) модифицированного 20 BoNT/Е до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 единицы рI больше, чем указанная рI указанного BoNT/Е, и

где указанный модифицированный BoNT/Е, полученный указанным способом, сохраняет способности указанного BoNT/Е, где указанными способностями являются связывание клетки-мишени, транслокация и расщепление целевых белков SNARE, и

25 где указанный модифицированный BoNT/Е:

а. содержит аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 8; и/или

б. содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%

30 идентичности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7.

27. Сконструированный ботулинический нейротоксин Е (BoNT/Е), содержащий:

замену аминокислоты, выбранной из: Q123, N138 и Q237, лизином или аргинином;

где указанная замена повышает изоэлектрическую точку (рI) сконструированного BoNT/Е до значения, составляющего по меньшей мере на 0,2 единицы рI больше, чем

35 рI BoNT/Е, в котором отсутствует указанная замена; и

рI по меньшей мере 6,2; где указанный сконструированный BoNT/Е сохраняет способности указанного BoNT/Е, в котором отсутствует указанная замена, где указанными способностями являются связывание клетки-мишени, транслокация и расщепление целевых белков SNARE; и

40 где указанный BoNT/Е:

а. содержит аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 8; и/или

б. содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%

45 идентичности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7.

28. Нуклеиновая кислота, кодирующая сконструированный BoNT/Е по п.27 или получаемый способом по п.26.

29. Способ получения одноцепочечного белка сконструированного BoNT/Е,

содержащего легкую цепь и тяжелую цепь, включающий экспрессию нуклеиновой кислоты по п.28, содержащейся в ДНК-векторе в подходящей клетке-хозяине, лизис клетки-хозяина для получения гомогената клетки-хозяина, содержащего одноцепочечный белок сконструированного BoNT/E, и выделение одноцепочечного 5 белка сконструированного BoNT/E, где указанная клетка-хозяин не является эмбриональной клеткой человека.

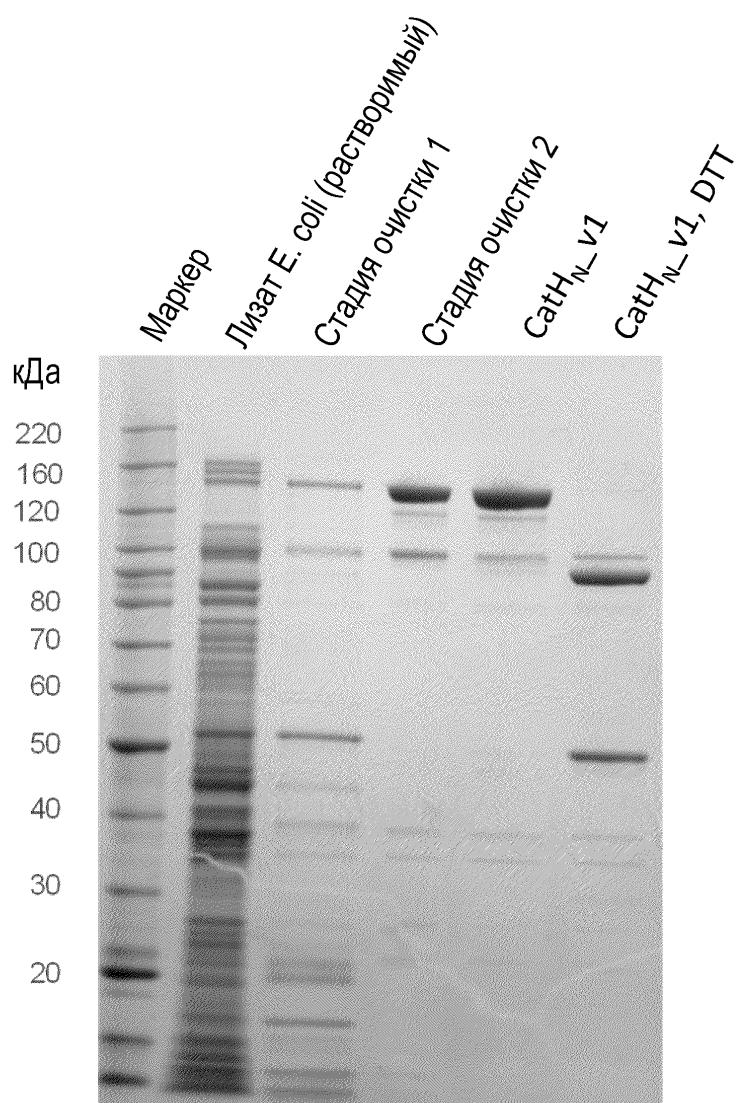
30. Способ активации сконструированного BoNT/E, включающий получение одноцепочечного белка сконструированного BoNT/E, получаемого способом по п.29, приведение полипептида в контакт с протеазой, расщепляющей полипептид по участку 10 распознавания (участку расщепления), находящемуся между легкой цепью и тяжелой цепью, и преобразование полипептида в двухцепочечный полипептид, где легкая цепь и тяжелая цепь соединены дисульфидной связью.

31. Применение сконструированного BoNT/E по п.27, или получаемого способом по п.26 или 30, в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики 15 заболевания или состояния, при которых показана терапия ботулиническим токсином.

32. Применение по п.31, где заболевание или состояние выбраны из: косоглазия, блефароспазма, косоглазия, дистонии (например, спастической дистонии, оромандибулярной дистонии, фокальной дистонии, тардивной дистонии, ларингеальной дистонии, дистонии конечности, спастической кривошеи), кривошеи (например, 20 спастической кривошеи), в косметологии, когда будут получать пользу от ограничения способностей клеток/мышц (посредством отрицательной регуляции или инактивации SNARE), нервно-мышечного нарушения или состояния подвижности глаз (например, содружественного косоглазия, вертикального косоглазия, паралича латеральной прямой мышцы, нистагма, дистироидной миопатии), писчего спазма, бруксизма, болезни 25 Вильсона-Коновалова, тремора, тиков, сегментарного миоклонуса, спазмов, спастичности по причине хронического рассеянного склероза, спастичности, приводящей к нарушениям контроля мочевого пузыря, анизмуса, спазма спины, спазма конечности, головных болей напряжения, синдрома мышцы levator ani, расщепления позвоночника, тардивной дискинезии, болезни Паркинсона, заикания, гемифациального спазма, 30 нарушения век, церебрального паралича, фокальной спастичности, спастического колита, нейрогенного мочевого пузыря, анизмуса, спастичности конечности, анальной трещины, ахалазии, дисфагии, слезотечения, гипергидроза, обильного слюноотделения, избыточной желудочно-кишечной секреции, мышечной боли (например, боли при мышечных спазмах), головной боли (например, головной боли напряжения), 35 межбровной складки, морщин, злокачественного новообразования, нарушений матки, урогенитальных нарушений, урогенитальных неврологических нарушений, хронического нейрогенного воспаления и нарушений гладких мышц.

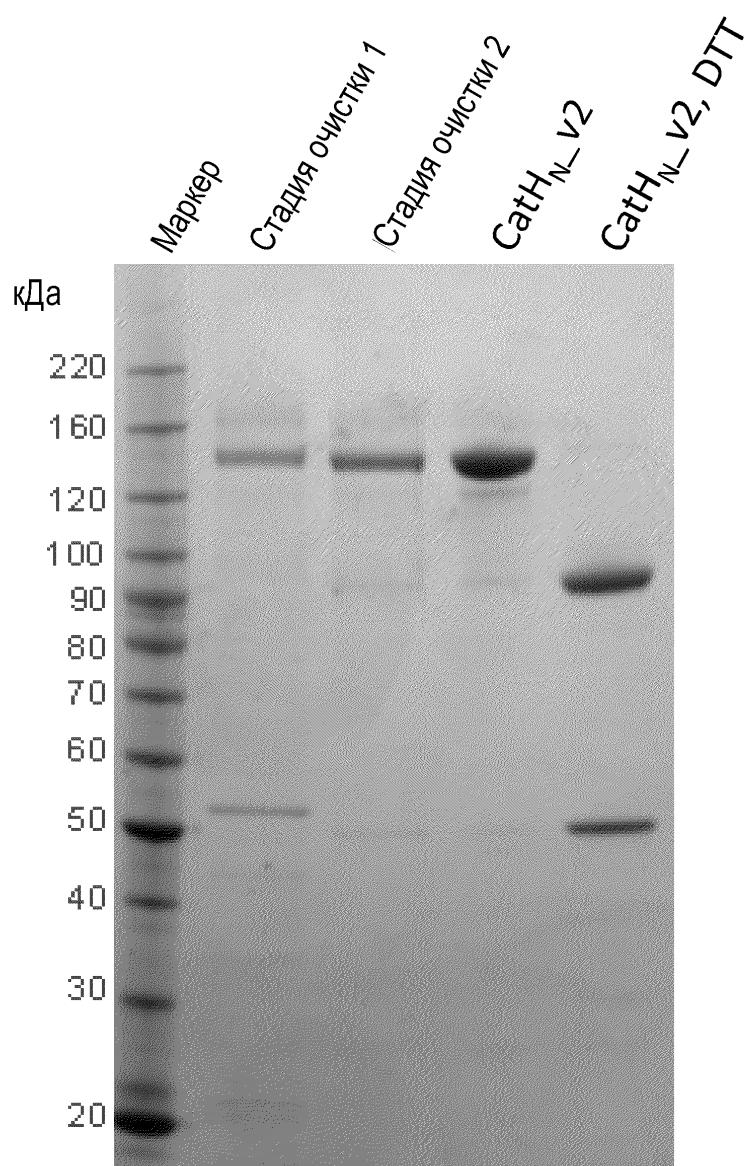
1/12

ФИГ. 1А



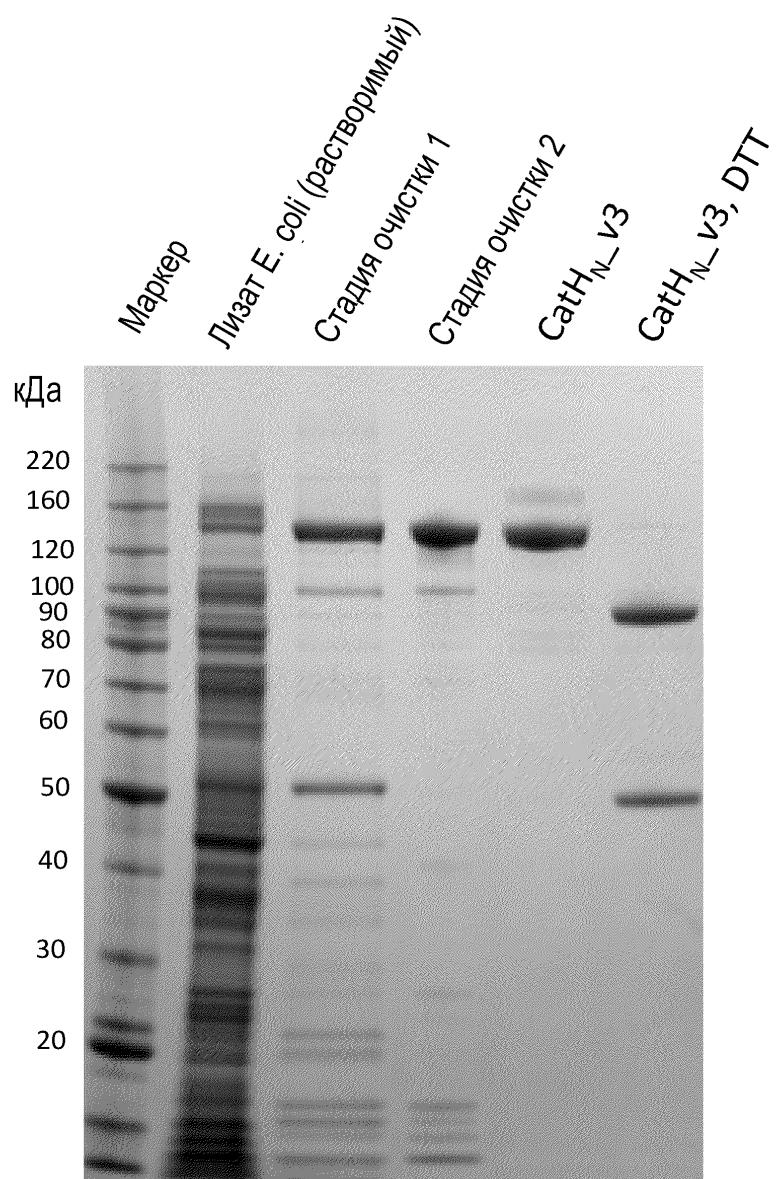
2/12

ФИГ. 1В



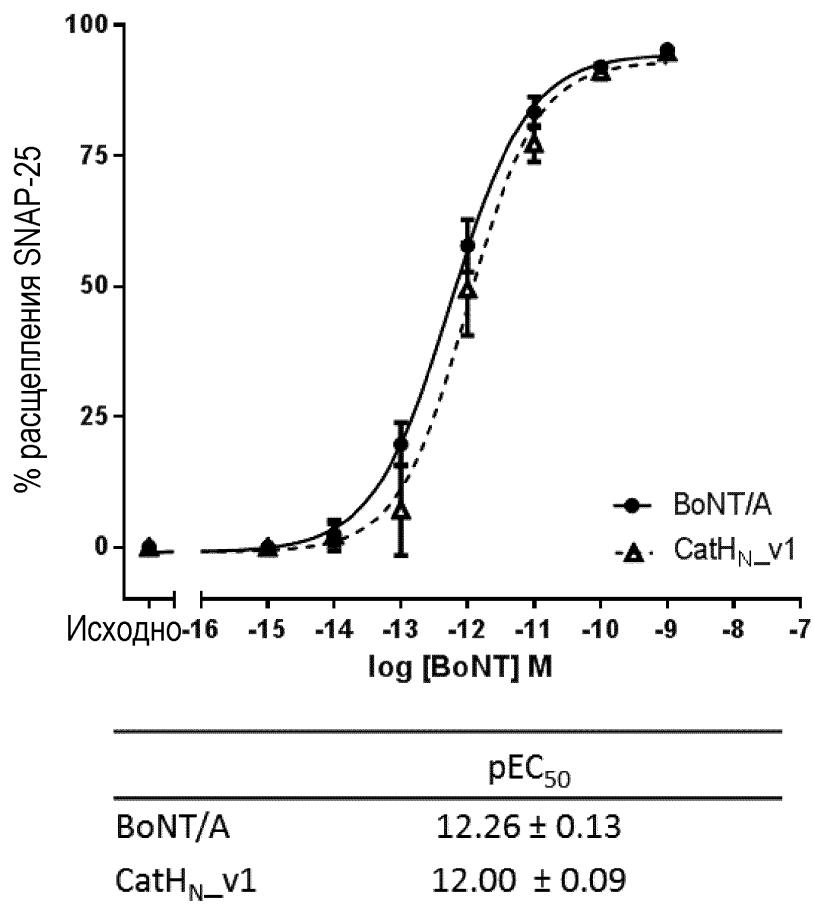
3/12

ФИГ. 1С



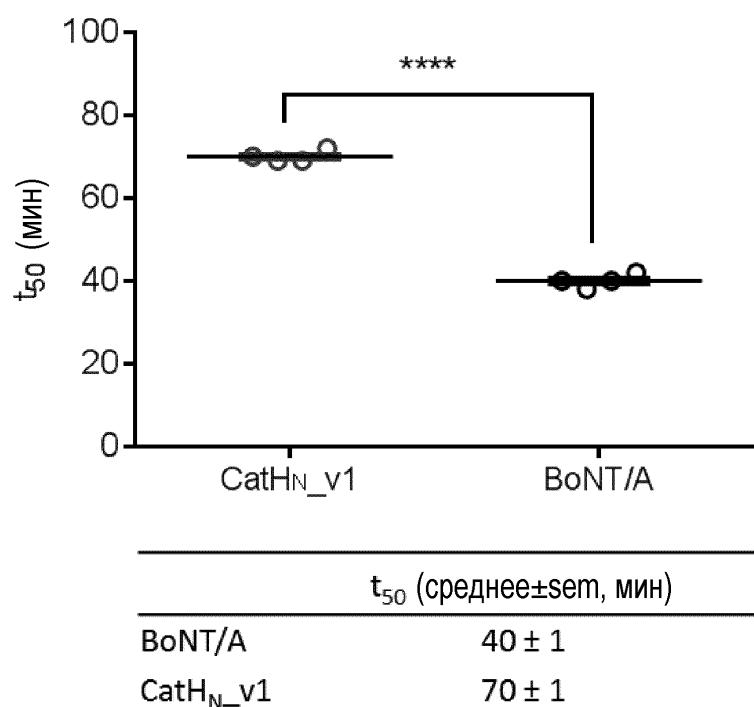
4/12

ФИГ. 2



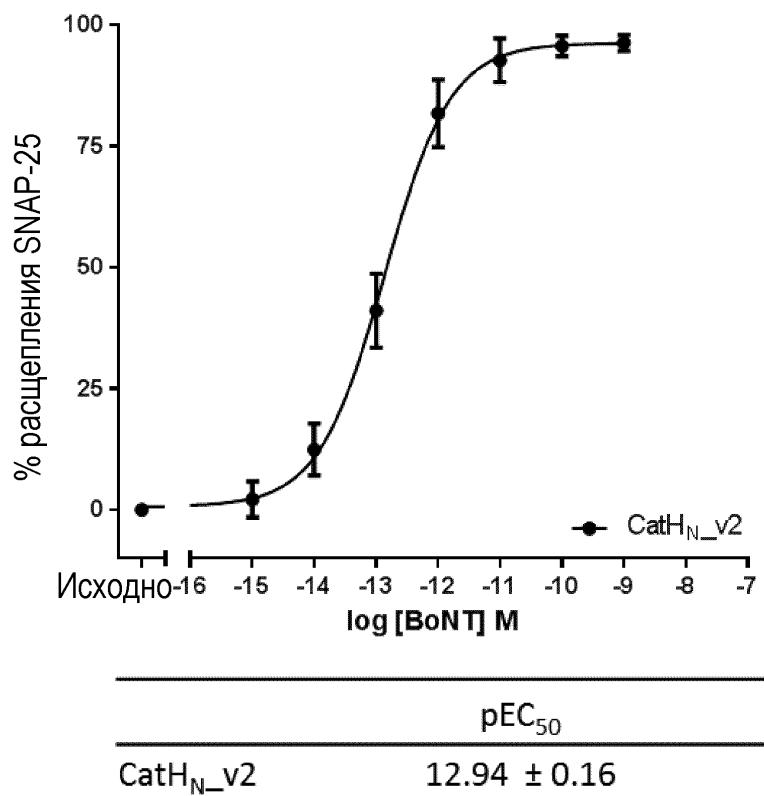
5/12

ФИГ. 3



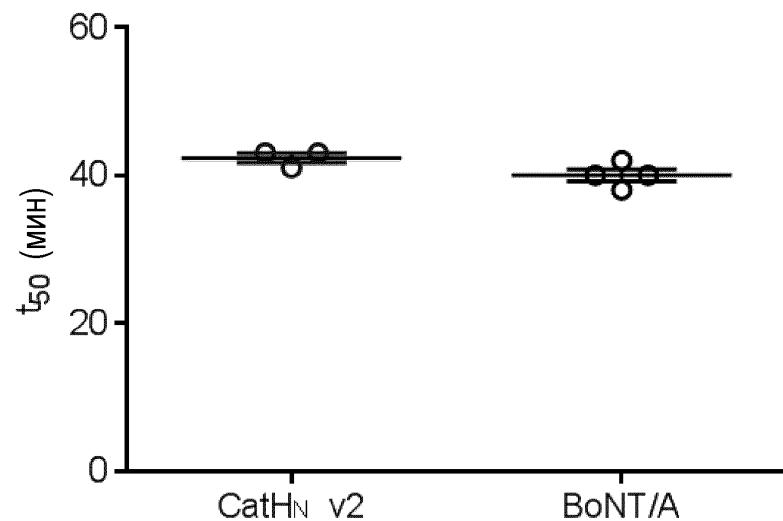
6/12

ФИГ. 4



7/12

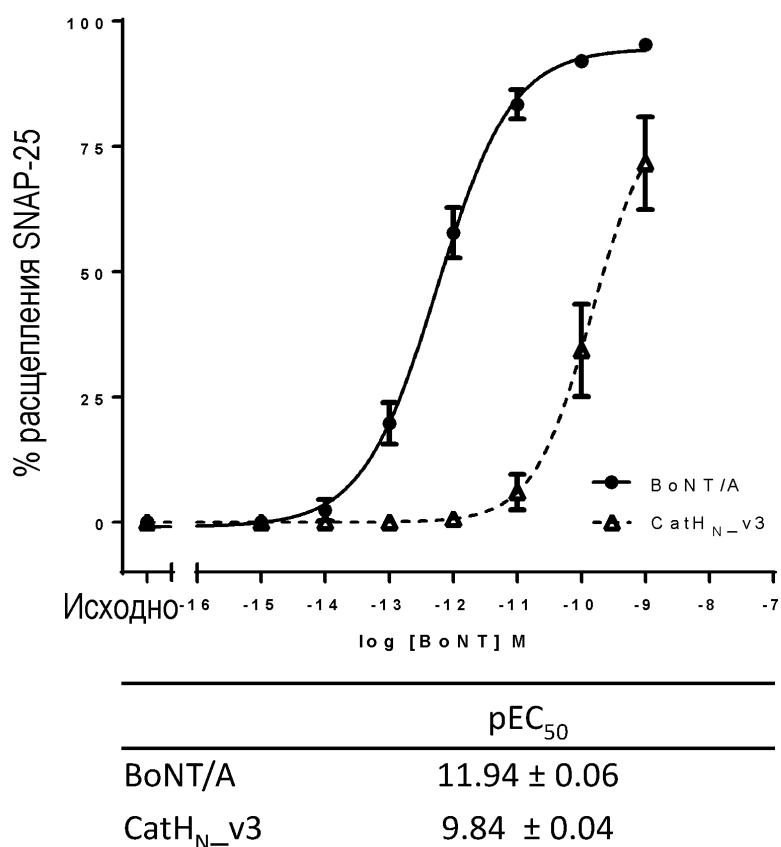
ФИГ. 5



t_{50} (среднее \pm sem, мин)	
BoNT/A	40 ± 1
CatH _N _v2	42 ± 1

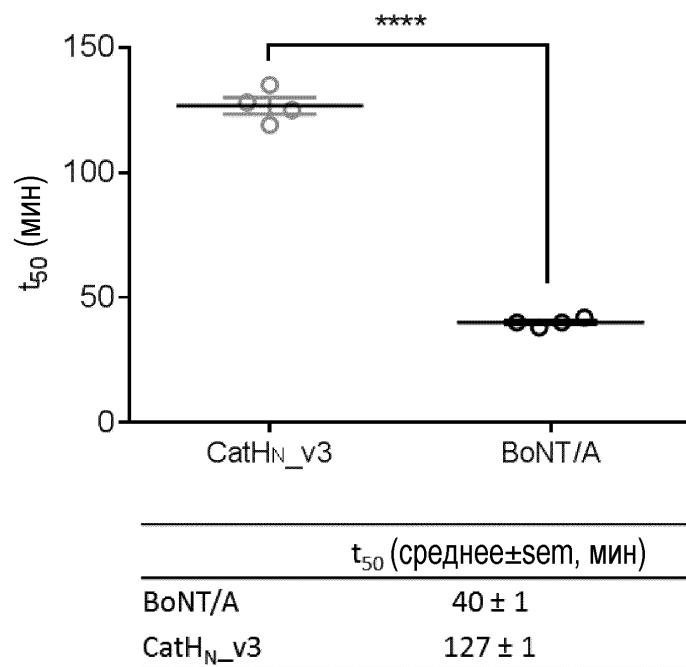
8/12

ФИГ. 6



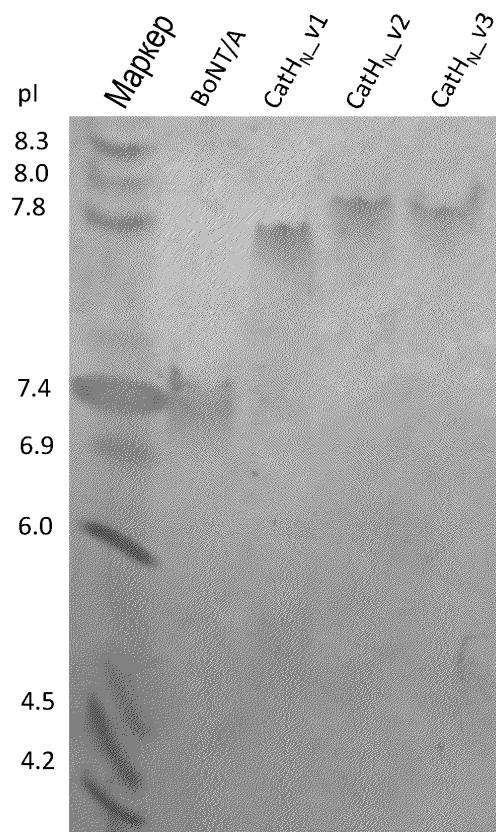
9/12

ФИГ. 7



10/12

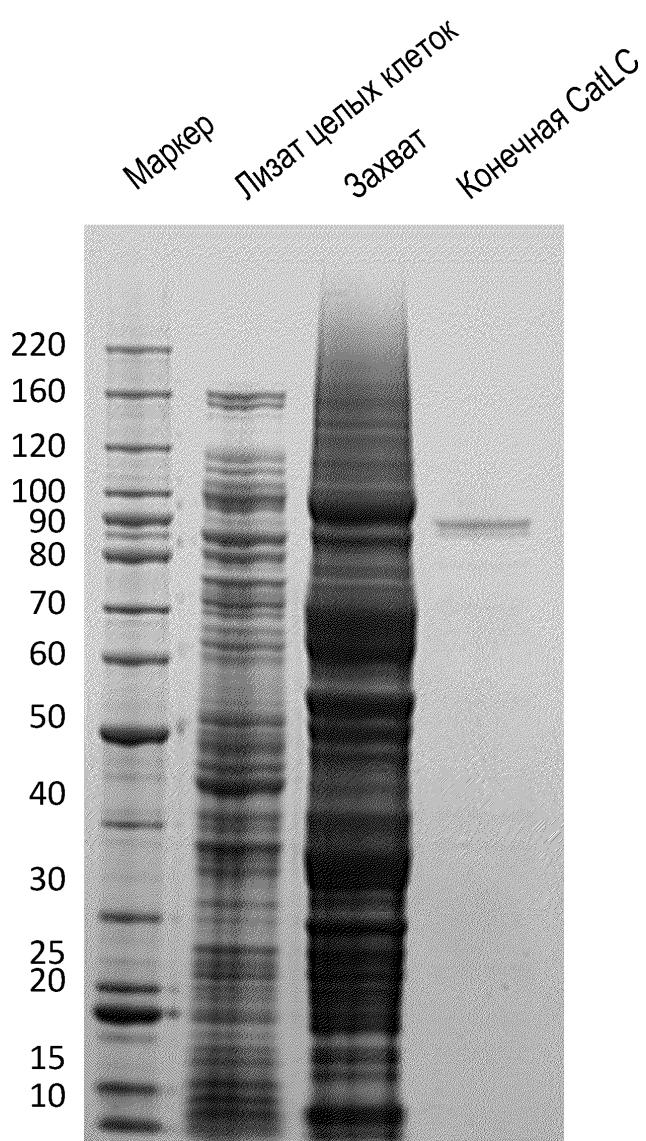
ФИГ. 8



Дорожка	Конструкция	Вычисленная pl	Наблюдаемая pl
1	BoNT/A	6.4	7.4
2	CatH _N _v1	7.4	7.8
3	CatH _N _v2	7.3	7.8-8.0
4	CatH _N _v3	7.1	7.8-8.0

11/12

ФИГ. 9



12/12

ФИГ. 10

