(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0154739
(43) 공개일자 2022년11월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/66 (2006.01) *A61Q 19/08* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/66 (2013.01)
A61Q 19/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7035398
(22) 출원일자(국제) 2021년03월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년10월12일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2021/050659
(87) 국제공개번호 WO 2021/186167
국제공개일자 2021년09월23일
(30) 우선권주장
2003813.9 2020년03월16일 영국(GB)

(71) 출원인
입센 바이오팜 리미티드
영국, 렉스햄 엘엘(LL)13 9UF, 렉스햄 인더스트리얼 에스테이트,에쉬 로드
(72) 발명자
그리고레, 니콜라에
영국 엘엘13 9유에프 렉스햄 렉스햄 인더스트리얼 에스테이트 애쉬 로드 유닛 9 입센 바이오팜 리미티드
러플, 케이티
영국 엘엘13 9유에프 렉스햄 렉스햄 인더스트리얼 에스테이트 애쉬 로드 유닛 9 입센 바이오팜 리미티드
피카우트, 필립
영국 엘엘13 9유에프 렉스햄 렉스햄 인더스트리얼 에스테이트 애쉬 로드 유닛 9 입센 바이오팜 리미티드
(74) 대리인
양영준, 이윤기

전체 청구항 수 : 총 29 항

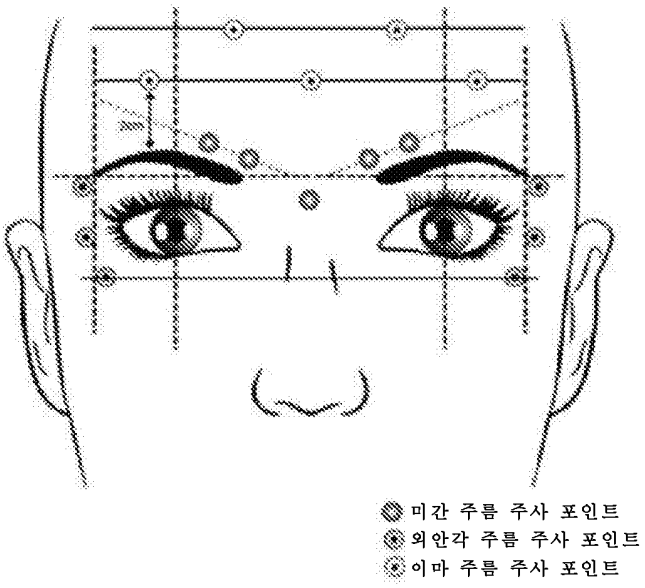
(54) 발명의 명칭 **상부 얼굴 주름의 치료**

(57) 요 약

본 발명은 얼굴 주름을 치료하는데 사용하기 위한 변형된 BoNT/A에 관한 것이며, 여기서 변형된 BoNT/A는 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여되고, 여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 1 단위 내지 41 단위의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고, 여기서 1 단위는 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도14



변형된 BoNT/A의 양이고, 여기서 복수의 부위는 미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위, 이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위로부터 선택되고, 여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 574 단위이고, 여기서 변형된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, 및 THR 1277로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함하며, 여기서 변형은 하기로부터 선택된다: i. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환; ii. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환; iii. 비하전된 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환; iv. 염기성 아미노산 잔기의 삽입; 및 v. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 결실. 또한 상응하는 치료 방법 및 용도, 뿐만 아니라 단위 투여 형태 및 키트가 제공된다.

명 세 서

청구범위

청구항 1

얼굴 주름을 치료하는데 사용하기 위한 변형된 BoNT/A로서, 여기서 변형된 BoNT/A는 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여되고,

여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 1 단위 내지 41 단위의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고, 여기서 1 단위는 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양이고,

여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 574 단위이고,

여기서 변형된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, 및 THR 1277로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함하며, 여기서 변형은

i. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

ii. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환;

iii. 비하전된 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

iv. 염기성 아미노산 잔기의 삽입; 및

v. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 결실

로부터 선택되는 것인,

얼굴 주름을 치료하는데 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 2

얼굴 주름을 치료하는데 사용하기 위한 변형된 BoNT/A로서, 여기서 변형된 BoNT/A는 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여되고,

여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 8.4 pg 내지 344.4 pg의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고,

여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 4821.6 pg이고,

여기서 변형된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, 및 THR 1277로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함

하며, 여기서 변형은

i. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

ii. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환;

iii. 비하전된 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

iv. 염기성 아미노산 잔기의 삽입; 및

v. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 결실

로부터 선택되는 것인,

얼굴 주름을 치료하는데 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 3

제1항에 있어서, 5-10 pg (바람직하게는 8.4 pg)의 변형된 BoNT/A가 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는 것인, 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 BoNT/A의 단위 용량이 2 단위 내지 35 단위, 6 내지 35 단위, 12 단위 내지 35 단위, 12 단위 내지 24 단위, 가장 바람직하게는 12 단위 내지 18 단위로부터 선택되는 것인, 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 5

제4항에 있어서, 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량이 574 단위, 560 단위, 384 단위, 가장 바람직하게는 288 단위로부터 선택되고;

바람직하게는 여기서 상기 총 용량이 16개 주사 부위에 걸친 16개 단위 용량의 투여에 기초한 것인,

사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 BoNT/A의 단위 용량이 18 pg 내지 350 pg, 20 pg 내지 300 pg, 가장 바람직하게는 100 pg 내지 150 pg으로부터 선택되는 것인, 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량이 최대 4850 pg, 4800 pg, 가장 바람직하게는 2400 pg으로부터 선택되는 것인, 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 8

얼굴 주름을 치료하는데 사용하기 위한 변형된 BoNT/A로서, 여기서 변형된 BoNT/A는 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여되고,

여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 0.5 단위 내지 73 단위의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고, 여기서 1 단위는 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양이고,

여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 1019 단위이고,

여기서 변형된 BoNT/A는 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함하는 것인,

얼굴 주름을 치료하는데 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 9

얼굴 주름을 치료하는데 사용하기 위한 변형된 BoNT/A로서, 여기서 변형된 BoNT/A는 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여되고,

여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 12 pg 내지 1754 pg의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고,

여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 24,500 pg이고,

여기서 변형된 BoNT/A는 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함하는 것인,

얼굴 주름을 치료하는데 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 10

제8항에 있어서, 변형된 BoNT/A가 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B H_C 도메인을 포함하며, 여기서 20-30 pg (바람직하게는 24.04 pg)의 변형된 BoNT/A가 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는 것인, 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 BoNT/A의 단위 용량이 0.5 단위 내지 62 단위, 3 단위 내지 62 단위, 10 내지 62 단위, 10 단위 내지 42 단위, 가장 바람직하게는 10 단위 내지 21 단위로부터 선택되는 것인, 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 12

제11항에 있어서, 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량이 1019 단위, 998 단위, 666 단위, 가장 바람직하게는 333 단위로부터 선택되고;

바람직하게는 여기서 상기 총 용량이 16개 주사 부위에 걸친 16개 단위 용량의 투여에 기초한 것인,

사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 13

제8항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 BoNT/A의 단위 용량이 12 pg 내지 1750 pg, 20 pg 내지 1500 pg, 가장 바람직하게는 250 pg 내지 500 pg으로부터 선택되는 것인, 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 14

제8항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량이 최대 24,500 pg, 24,000 pg, 가장 바람직하게는 8000 pg으로부터 선택되는 것인, 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 BoNT/A가 7 초과의 안전성 비율을 갖고, 여기서 안전성 비율이 pg/마우스로서 측정된 -10% 체중 변화에 필요한 독소의 용량을 pg/마우스로서 측정된 DAS ED_{50}으로 나눈 값

으로서 계산되고, 여기서 ED_{50} = 2의 DAS 스코어를 생성하는데 필요한 용량인, 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 BoNT/A가 미간 주름을 치료하는데 사용하기 위한 것이고, 바람직하게는 여기서 상기 변형된 BoNT/A가 추근의 2개 부위 및 비근근의 1개 부위에 투여되고, 보다 바람직하게는 여기서 상기 변형된 BoNT/A가 총 5개 부위에 투여되는 것인, 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 BoNT/A가 이마 주름을 치료하는데 사용하기 위한 것이고, 바람직하게는 여기서 상기 변형된 BoNT/A는 전두근의 5개 부위에 투여되는 것인, 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 18

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 BoNT/A가 외안각 주름을 치료하는데 사용하기 위한 것이고, 바람직하게는 여기서 상기 변형된 BoNT/A가 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 3개 부위에 투여되고, 보다 바람직하게는 여기서 상기 변형된 BoNT/A가 총 6개 부위에 투여되는 것인, 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 BoNT/A가 8, 10, 12, 14 또는 16개 부위에 투여되는 것인, 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 20

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 BoNT/A가 7, 9, 11, 13 또는 15개 부위에 투여되는 것인, 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 21

제1항 내지 제7항 및 제15항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 ASN 886, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1052, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274 또는 THR 1277로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함하고 (바람직하게는 이로 이루어지고), 여기서 변형된 BoNT/A가 서열식별번호: 3, 5, 7 및 9로부터 선택된 핵산 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩되고/거나, 서열식별번호: 4, 6, 8 및 10으로부터 선택된 폴리펩티드 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인, 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 22

제1항 내지 제7항 및 제15항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 ASN 886, ASN 930, SER 955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052, 및 GLN 1229로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함하고 (바람직하게는 이로 이루어지고), 여기서 변형된 BoNT/A가 서열식별번호: 3과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩되고/거나, 서열식별번호: 4로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인, 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 23

제1항 내지 제7항 및 제15항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 변형이 치환, 바람직하게는 리신 또는 아르기닌으로의 치환인, 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 24

제8항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 BoNT/A가 서열식별번호: 14와 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인, 사용하기 위한 변형된 BoNT/A.

청구항 25

변형된 보툴리눔 신경독소 A (BoNT/A)의 단위 투여 형태로서, 단위 투여 형태는 하기를 포함하며:

a. 1 단위 내지 41 단위의 변형된 BoNT/A, 여기서 1 단위는 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양임; 또는

b. 8.4 pg 내지 350 pg의 변형된 BoNT/A; 및

c. 임의로 제약상 허용되는 담체, 부형제, 아주반트 및/또는 염,

d. 여기서 변형된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, 및 THR 1277로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함하며, 여기서 변형은

i. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

ii. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환;

iii. 비하전된 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

iv. 염기성 아미노산 잔기의 삽입; 및

v. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 결실

로부터 선택되는 것인,

변형된 보툴리눔 신경독소 A (BoNT/A)의 단위 투여 형태.

청구항 26

제25항에 있어서, 하기를 포함하는 단위 투여 형태:

a. 1 단위 내지 35 단위의 변형된 BoNT/A; 또는

b. 10 pg 내지 300 pg의 변형된 BoNT/A.

청구항 27

변형된 보툴리눔 신경독소 A (BoNT/A)의 단위 투여 형태로서, 단위 투여 형태는 하기를 포함하며:

a. 0.5 단위 내지 73 단위의 변형된 BoNT/A, 여기서 1 단위는 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양임; 또는

b. 12 pg 내지 1754 pg의 변형된 BoNT/A; 및

c. 임의로 제약상 허용되는 담체, 부형제, 아주반트 및/또는 염,

d. 여기서 변형된 BoNT/A는 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함하는 것인,

변형된 보툴리눔 신경독소 A (BoNT/A)의 단위 투여 형태.

청구항 28

제27항에 있어서, 하기를 포함하는 단위 투여 형태:

a. 0.8 단위 내지 62 단위의 변형된 BoNT/A; 또는

b. 20 pg 내지 1500 pg의 변형된 BoNT/A.

청구항 29

하기를 포함하는 키트:

a. 제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 단위 투여 형태; 및

b. 얼굴 주름 치료에서의 그의 사용 지침; 및

c. 임의로 희석제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미용 치료 (예를 들어, 과다기능성 얼굴 주름을 치료하기 위한 것)에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 장기간 작용하는 신경독소의 투여를 포함하는 미용 치료 방법, 및 보다 구체적으로 장기간 작용하는 보툴리눔 신경독소를 사용하여 미용 불규칙성을 치료하는 방법을 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 과다기능성 얼굴 주름은 하기를 포함할 수 있지만 이에 제한되지는 않는 일반적인 미적 불규칙성이다: 미간 주름, 외안각 주름, 이마 주름 및 주름살, 눈가의 잔주름, 눈썹 주름, 코입술 주름, 입술 주름 및 마리오네트 주름. 상부 얼굴 주름은 이마, 미간 및 측면 안와 구역에서 발생할 수 있다. 찡그린 표정으로 인해 미간 및 이마 구역에도 주름형성이 나타날 수 있으며, 웃는 표정으로 인해 외안각 구역에도 주름형성이 나타날 수 있다. 이 구역에서 과도하게 두드러진 주름은 종종 피로로 잘못 해석되어, 대상체가 이들의 외모에 대해 상당한 고통을 유발한다. 대신, 기저 근육의 기능적 당김으로 인해 과도하게 두드러진 얼굴 주름이 나타나며, 이는 결국 피부를 주름지게 한다. 미간 복합체에서, 이들 근육은 추미근, 비근근 및 미모하체근을 포함하며, 안륜근은 외안각 주름의 생성을 담당한다.

[0003] 지난 수십 년 동안, 고령화 인구가 계속 증가함에 따라, 특히 얼굴 구역에서 노령화의 외모를 반전시키기 위한 미용 절차에 대한 수요가 증가하고 있다. 이러한 물리적 외모에 대한 관심의 증가는 많은 상이한 제품 및 절차, 예컨대 수술의 개발, 다양한 유형의 재포장 및 충전제의 사용으로 이어졌다. 이들 방법 중 어느 것도 완전히 위험이 없지 않기 때문에, 노화된 얼굴을 치료하기 위한 가장 안전하고 가장 효과적인 방법을 제공하기 위해서는 지속적인 연구가 필요하다.

[0004] 노화된 얼굴로 공지된 것을 생성하는데 상호작용하는 5개의 인자가 있지만, 주름살과는 대조적으로 더 유의한 주름 및 접힘을 생성하기 위해 상호작용하는 2개의 인자 (피부 및 기저 근육)가 주로 있다. 주름살 및 주름 및 접힘의 피부 인자를 치료하기 위해 많은 요법, 그 중 다양한 유형의 재포장, 피부과 제품 및 연조직 증대를 위한 주사가 발전하였다.

[0005] 얼굴 주름의 외관을 치료하기 위한 대안적인 미용 절차는 신경독소, 구체적으로 보툴리눔 신경독소의 얼굴 피부의 기저 근육으로의 투여이다. 디스포트(Dysport)®는 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*) 유형 A 균주로부터 단리 및 정제된 원료의약품 BoNT/A 헤마글루티닌 복합체 (BTX-A-HAC)를 함유하는 의약품이다. 클로스트리디움 보툴리눔에 의해 자연적으로 생산되는 여러 다른 BoNT/A 의약품이 또한 판매되고 있다.

[0006] BoNT/A는 시냅스전 신경 말단으로부터 아세틸콜린의 방출을 선택적으로 억제하며, 그러므로 신경근 연접부에서 콜린성 전달을 차단하여 근육 수축 및 근육 긴장도의 감소를 유도하여, 주사된 근육을 이완시킨다.

[0007] 디스포트®는 미간 주름 치료용으로 승인되었으며, 최대 50 단위의 최대 총 용량이 추근 및 비근근에 걸쳐 투여된다 (도 1 참조). 디스포트의 임상 효과는 최대 4개월까지 지속될 수 있다. 임상 연구에서 반복 투여는 최대 4회의 반복된 투여로 지속적인 효능을 입증하였다. 그러나, 디스포트는 3개월마다보다 더 빈번하게 투여해서는 안된다. 디스포트는 지금까지 이마 주름 및 외안각 주름의 치료에 대해 FDA 승인을 받지 못하였다.

[0008] 전신 신경학적 효과를 회피하기 위해, 많은 클로스트리디움 독소 기반 미용 치료는 클로스트리디움 독소 치료제의 주어진 표적 부위 (예컨대 표적 조직)로의 직접 투여를 사용한다. 이러한 방식으로 클로스트리디움 독소-기반 치료제를 투여할 때의 문제는 투여 부위로부터 독소가 주변 조직 또는 전신 순환으로 확산된다는 것이다. 표적 조직으로부터 독소의 확산은 극단적인 경우 생명을 위협할 수 있는 원치않는 부작용의 원인이 되는 것으로 믿어진다. 이는 클로스트리디움 독소 치료제 (예컨대 BoNT 치료제)를 높은 용량, 농도 및 주사 부피로 사용할 때 특히 문제가 될 수 있다. 상업적 BoNT/A 치료제에 대해 보고된 이 문제와 연관된 유해 효과는 무력증, 전신 근육 약화, 복시, 안검하수, 연하곤란, 발성장애, 구음장애, 요실금, 및 호흡 곤란을 포함한다. 삼킴 및 호흡

곤란은 생명을 위협할 수 있으며, 독소 효과의 확산과 관련된 사망이 보고되었다.

[0009] 본 발명은 상기 언급된 문제점 중 하나 이상을 극복한다.

발명의 내용

[0010] 발명의 요약

[0011] 본 발명자들은 놀랍게도 변형된 BoNT/A가 얼굴 주름의 미용 치료에서 특정 유용성을 발견한다는 것을 발견하였다. 변형된 BoNT/A는 증가된 순 양전하를 초래하는 표면 노출된 아미노산 잔기의 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 증가된 전하는 폴리펩티드 및 음이온성 세포외 구성요소 사이의 정전기적 상호작용을 촉진하여, 이에 의해 폴리펩티드 및 세포 표면 사이의 결합을 촉진한다. 결국 이것은 투여 부위에서의 체류를 증가시키고 (이로부터의 확산을 감소시킴) 증가된 작용 지속기간 (예를 들어, 6-9개월)을 초래한다. 대안적으로, 변형된 BoNT/A는 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함할 수 있으며, 이는 유사하게 투여 부위에서의 증가된 체류 (이로부터의 감소된 확산) 및 증가된 작용 지속기간 (예를 들어, 6-9개월)을 나타내는 변형된 BoNT/A를 초래한다. 유리하게, 변형된 BoNT/A는 비변형된 BoNT/A (예를 들어, 디스포트®)와 비교할 때 개선된 안전성 프로파일을 갖는다. 이러한 개선된 안전성 프로파일은 변형된 BoNT/A에 대해 본원에 기재된 높은 안전성 비율로 표현될 수 있다.

[0012] 본원의 전임상 데이터 (실시예 6 참조)에 기초하여, 이러한 높은 용량에서 비변형된 BoNT/A (예를 들어, 디스포트®)와 유사한 안전성 프로파일을 달성하면서 더 많은 총량의 변형된 BoNT/A를 대상체에게 투여할 수 있는 것으로 나타났다. 그러므로, 변형된 BoNT/A는 최대 총 용량에 도달하기 전에 얼굴 주름의 미용 치료에서 더 많은 수의 근육/부위에 주사될 수 있다. 이는 유의하고 유리한 발견이며, 임상의에게 더 넓은 범위의 치료 옵션을 제공하면서 얼굴 주름의 개선된 미용 치료를 제공한다. 치료는 비변형된 BoNT/A (예를 들어, 디스포트®)를 사용한 치료와 비교할 때 더 오래 지속되는 치료 (덜 빈번한 투여를 초래함)를 제공하고/거나 대상체에 맞춤화될 수 있고/거나, 예를 들어 임상의가 대상체의 미적 요구사항에 따라 특정 부위에 투여하는 것을 가능하게 한다는 점에서 개선될 수 있다. 본 발명의 치료는 통상적인 치료 레지멘과 비교하여 개선된다.

[0013] 더욱이, 본 발명은 편리하고 안전하며 효과적인 단일 용량 단위 뿐만 아니라 단일 치료로 안전하게 투여될 수 있는 총 (최대) 투여량을 제공한다. 본 발명은 또한 결과적인 환자 독성 없이 상기 용량 단위가 근육에 투여될 수 있는 횟수 (예를 들어, 근육당 주사 부위의 수 포함)에 대한 상응하는 가이드를 제공한다. 그러므로, 본 발명에 따른 치료는 임상의에게 훨씬 덜 복잡하고, 과소-투여 및/또는 과다-투여를 회피하는데 도움이 된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 상세한 설명

[0015] 한 측면에서 본 발명은 얼굴 주름을 치료하는데 사용하기 위한 변형된 BoNT/A를 제공하며, 여기서 변형된 BoNT/A는 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여되고,

[0016] 여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 1 단위 내지 41 단위 (2 단위 내지 41 단위)의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고, 여기서 1 단위는 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양이고,

[0017] 여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

[0018] 미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

[0019] 이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

[0020] 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

[0021] 여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 574 단위이고,

[0022] 여기서 변형된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, 및 THR 1277로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함하며, 여기서 변형은 하기로부터 선택된다:

[0023] i. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

[0024] ii. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환;

[0025] iii. 비하전된 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

[0026] iv. 염기성 아미노산 잔기의 삽입; 및

[0027] v. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 결실.

[0028] 또 다른 관련된 측면에서, 본 발명은 얼굴 주름을 치료하는데 사용하기 위한 변형된 BoNT/A를 제공하며, 여기서 변형된 BoNT/A는 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여되고,

[0029] 여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 8.4 pg 내지 344.4 pg의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고,

[0030] 여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

[0031] 미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

[0032] 이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

[0033] 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

[0034] 여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 4821.6 pg이고,

[0035] 여기서 변형된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, 및 THR 1277로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함하며, 여기서 변형은 하기로부터 선택된다:

[0036] i. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

[0037] ii. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환;

[0038] iii. 비하전된 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

[0039] iv. 염기성 아미노산 잔기의 삽입; 및

[0040] v. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 결실.

[0041] 한 측면에서 본 발명은 얼굴 주름을 치료하는데 사용하기 위한 변형된 BoNT/A를 제공하며, 여기서 변형된 BoNT/A는 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여되고,

[0042] 여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 2 단위 내지 41 단위의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고, 여기서 1 단위는 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양이고,

[0043] 여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

[0044] 미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

[0045] 이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

[0046] 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

[0047] 여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 574 단위이고,

[0048] 여기서 변형된 BoNT/A는 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함한다.

[0049] 관련된 측면에서 본 발명은 얼굴 주름을 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 변형된 보툴리눔 신경독소 A (BoNT/A)를 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하고,

[0050] 여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 1 단위 내지 41 단위 (2 단위 내지 41 단위)의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고, 여기서 1 단위는 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양이고,

[0051] 여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

[0052] 미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

[0053] 이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

[0054] 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

[0055] 여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 574 단위이고,

[0056] 여기서 변형된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, 및 THR 1277로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함하며, 여기서 변형은 하기로부터 선택된다:

[0057] i. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

[0058] ii. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환;

[0059] iii. 비하전된 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

[0060] iv. 염기성 아미노산 잔기의 삽입; 및

[0061] v. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 결실.

[0062] 관련된 측면에서 본 발명은 얼굴 주름을 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 변형된 보툴리눔 신경독소 A (BoNT/A)를 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하고,

[0063] 여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 8.4 pg 내지 344.4 pg의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고,

[0064] 여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

[0065] 미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

[0066] 이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

[0067] 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

[0068] 여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 574 단위이고,

[0069] 여기서 변형된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, 및 THR 1277로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함하며, 여기서 변형은 하기로부터 선택된다:

[0070] i. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

[0071] ii. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환;

[0072] iii. 비하전된 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

[0073] iv. 염기성 아미노산 잔기의 삽입; 및

[0074] v. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 결실.

[0075] 관련된 측면에서, 본 발명은 얼굴 주름을 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 변형된 보툴리눔 신경독소 A (BoNT/A)를 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하고,

[0076] 여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 2 단위 내지 41 단위의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고, 여기서 1 단위는 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양이고,

[0077] 여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

[0078] 미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

[0079] 이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

[0080] 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

[0081] 여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 574 단위이고,

[0082] 여기서 변형된 BoNT/A는 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함한다.

[0083] 또 다른 관련된 측면에서, 본 발명은 얼굴 주름을 치료하기 위한 의약의 제조에서의 변형된 보툴리눔 신경독소 A (BoNT/A)의 용도를 제공하며, 여기서 변형된 BoNT/A는 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여되고,

[0084] 여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 1 단위 내지 41 단위 (2 단위 내지 41 단위)의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고, 여기서 1 단위는 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양이고,

[0085] 여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

[0086] 미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

[0087] 이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

[0088] 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

[0089] 여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 574 단위이고,

[0090] 여기서 변형된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, 및 THR 1277로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함하며, 여기서 변형은 하기로부터 선택된다:

[0091] i. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

[0092] ii. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환;

[0093] iii. 비하전된 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

[0094] iv. 염기성 아미노산 잔기의 삽입; 및

[0095] v. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 결실.

[0096] 또 다른 관련된 측면에서, 본 발명은 얼굴 주름을 치료하기 위한 의약의 제조에서의 변형된 보툴리눔 신경독소 A (BoNT/A)의 용도를 제공하며, 여기서 변형된 BoNT/A는 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여되고,

[0097] 여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 8.4 pg 내지 344.4 pg의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고,

[0098] 여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

[0099] 미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

[0100] 이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

[0101] 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

[0102] 여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 574 단위이고,

[0103] 여기서 변형된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, 및 THR 1277로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함하며, 여기서 변형은 하기로부터 선택된다:

[0104] i. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

[0105] ii. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환;

[0106] iii. 비하전된 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

[0107] iv. 염기성 아미노산 잔기의 삽입; 및

[0108] v. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 결실.

[0109] 또 다른 관련된 측면에서, 본 발명은 얼굴 주름을 치료하기 위한 의약의 제조에서의 변형된 보툴리눔 신경독소 A (BoNT/A)의 용도를 제공하며, 여기서 변형된 BoNT/A는 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여되고,

[0110] 여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 2 단위 내지 41 단위의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고, 여기서 1 단위는 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양이고,

[0111] 여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

[0112] 미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

[0113] 이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

[0114] 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

[0115] 여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 574 단위이고,

[0116] 여기서 변형된 BoNT/A는 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함한다.

[0117] 한 측면에서, 본 발명은 얼굴 주름을 치료하는데 사용하기 위한 변형된 BoNT/A를 제공하며, 여기서 변형된 BoNT/A는 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여되고,

[0118] 여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 0.5 단위 내지 73 단위의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고, 여기서 1 단위는 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양이고,

[0119] 여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

[0120] 미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

[0121] 이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

[0122] 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

[0123] 여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 1019 단위이고,

[0124] 여기서 변형된 BoNT/A는 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함한다.

[0125] 또 다른 측면에서, 본 발명은 얼굴 주름을 치료하는데 사용하기 위한 변형된 BoNT/A를 제공하며, 여기서 변형된 BoNT/A는 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여되고,

[0126] 여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 12 pg 내지 1754 pg의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고,

[0127] 여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

[0128] 미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

[0129] 이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

[0130] 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

[0131] 여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 24,500 pg이고,

[0132] 여기서 변형된 BoNT/A는 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함한다.

[0133] 관련된 측면에서, 본 발명은 얼굴 주름을 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 변형된 보툴리눔 신경독소 A (BoNT/A)를 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하고,

[0134] 여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 0.5 단위 내지 73 단위의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고, 여기서 1 단위는 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양이고,

[0135] 여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

[0136] 미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

[0137] 이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

[0138] 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

[0139] 여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 1019 단위이고,

[0140] 여기서 변형된 BoNT/A는 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함한다.

[0141] 관련된 측면에서, 본 발명은 얼굴 주름을 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 변형된 보툴리눔 신경독소 A (BoNT/A)를 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하고,

[0142] 여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 12 pg 내지 1754 pg의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고,

[0143] 여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

[0144] 미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

[0145] 이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

[0146] 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

[0147] 여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 24,500 pg이고,

[0148] 여기서 변형된 BoNT/A는 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함한다.

[0149] 또 다른 관련된 측면에서, 본 발명은 얼굴 주름을 치료하기 위한 의약의 제조에서의 변형된 보툴리눔 신경독소 A (BoNT/A)의 용도를 제공하며, 여기서 변형된 BoNT/A는 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여되고,

[0150] 여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 0.5 단위 내지 73 단위의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고, 여기서 1 단위는 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양이고,

[0151] 여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

[0152] 미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

[0153] 이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

[0154] 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

[0155] 여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 1019 단위이고,

[0156] 여기서 변형된 BoNT/A는 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함한다.

[0157] 또 다른 관련된 측면에서, 본 발명은 얼굴 주름을 치료하기 위한 의약의 제조에서의 변형된 보툴리눔 신경독소 A (BoNT/A)의 용도를 제공하며, 여기서 변형된 BoNT/A는 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여되고,

[0158] 여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 12 pg 내지 1754 pg의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고,

[0159] 여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

[0160] 미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

[0161] 이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

[0162] 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

[0163] 여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 24,500 pg이고,

[0164] 여기서 변형된 BoNT/A는 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함한다.

[0165] "근육"에 대한 언급은 본 발명이 다루는 근본적인 미적 상태에 (예를 들어, 과도한 경색, 장력 또는 긴장도를

통해) 기여하는 이환된 근육을 의미한다.

[0166] 제1 근육 그룹은 비근근에 의해 정의되고, 제2 근육 그룹은 추근에 의해 정의되고, 제3 근육 그룹은 안륜근에 의해 정의되고, 제4 근육 그룹은 전두근에 의해 정의된다.

[0167] 복수의 부위는 동일한 근육 그룹 (예를 들어, 오른쪽 및 왼쪽 추근, 오른쪽 및 왼쪽 안륜근) 상에 있을 수 있다. 유사하게, 복수의 부위는 동일한 근육 (예를 들어, 오른쪽 추근 또는 왼쪽 추근; 또는 오른쪽 안륜근 또는 왼쪽 안륜근) 상에 있을 수 있다. 유사하게, 복수의 부위는 상기 근육 및 근육 그룹의 조합 상에 있을 수 있다. 그러므로, 개인맞춤형 치료 레지멘이 제공될 수 있다.

[0168] 본 발명에 사용하기 위한 변형된 BoNT/A는 하기로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함하는 변형된 BoNT/A, 또는 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함하는 변형된 BoNT/A일 수 있다: ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, 및 THR 1277, 여기서 변형은 하기로부터 선택된다: 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환; 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환; 비하전된 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환; 염기성 아미노산 잔기의 삽입; 및 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 결실.

[0169] 바람직하게는, 본 발명에 사용하기 위한 변형된 BoNT/A는 하기로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함하는 변형된 BoNT/A이다: ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, 및 THR 1277, 여기서 변형은 하기로부터 선택된다: 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환; 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환; 비하전된 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환; 염기성 아미노산 잔기의 삽입; 및 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 결실.

[0170] 본 발명에 따라 사용하기 위한 변형된 BoNT/A의 효력은 바람직하게는 표준 기술에 따른 마우스 LD_{50} 검정에 의해 결정된다. 상기 검정에서, 1 단위는 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양으로서 정의된다. 바람직하게는, 마우스에서 계산된 중앙값 치사 복강내 용량. 상기 검정에서 1 단위에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양은 적어도 1 pg, 2 pg, 3 pg, 4 pg, 5 pg, 6 pg, 7 pg, 8 pg 또는 9 pg일 수 있다. 상기 검정에서 1 단위에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양은 ≤45 pg, ≤40 pg, ≤30 pg, ≤25 pg, ≤20 pg, ≤19 pg, ≤18 pg, ≤17 pg, ≤16 pg, ≤15 pg, ≤14 pg, ≤13 pg, ≤12 pg, ≤11 pg, ≤10 pg, ≤9 pg, ≤8 pg, ≤7 pg 또는 ≤6 pg일 수 있다.

[0171] 본 발명에 사용하기 위한 변형된 BoNT/A가 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, 및 THR 1277로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함하는 변형된 BoNT/A인 경우 (여기서 변형은 하기로부터 선택된다: 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환; 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환; 비하전된 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환; 염기성 아미노산 잔기의 삽입; 및 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 결실), 상기 검정에서 1 단위에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양은 1-15 pg, 예컨대 5-10 pg일 수 있다. 바람직하게는, 상기 검정에서 1 단위에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양은 8-9 pg, 보다 바람직하게는 8.4 pg일 수 있다.

[0172] 본 발명에 사용하기 위한 변형된 BoNT/A가 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함하는 변형된 BoNT/A인 경우, 상기 검정에서 1 단위에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양은 15-35 pg, 예컨대 20-30 pg일 수 있다. 바람직하게는, 상기 검정에서 1 단위에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양은 23-25 pg, 보다 바람직하게는 24.0 pg일 수 있다.

[0173] 값과 관련하여 사용될 때 용어 "최대" (예를 들어, 최대 574 단위)는 최대 인용된 값 및 인용된 값 포함을 의미

한다. 그러므로, 예로서, 변형된 BoNT/A의 "최대 574 단위"를 투여하는 것에 대한 언급은 574 단위의 변형된 BoNT/A의 투여 뿐만 아니라 574 단위 미만의 변형된 BoNT/A의 투여를 포함한다.

[0174] 변형된 BoNT/A의 용량은 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여된다. 단일 단위 용량이 부위당 투여된다. 용어 "단일 단위 용량이 투여된다"는 실질적으로 모든 단일 단위 용량이 투여됨을 의미한다. 바람직하게는 최대 한으로 단위 용량의 잔류량 (예를 들어, 최대 1%, 0.1% 또는 0.01%)만이 변형된 BoNT/A가 재구성된 바이알에 남아있을 수 있다. 그러나, 바람직하게는 모든 단일 단위 용량이 투여된다. 근육 그룹에 따라, 단일 단위 용량이 전형적으로 제1 그룹으로부터 선택된 근육 (본원에 기재된)에 투여되고, 2x 단위가 전형적으로 제2 그룹으로부터 선택된 근육 (본원에 기재된)에 투여되고, 3x 단위가 전형적으로 제3 그룹으로부터 선택된 근육 (본원에 기재된)에 투여되고, 5x 단위가 전형적으로 제4 그룹으로부터 선택된 근육 (본원에 기재된)에 투여된다.

[0175] 단위 용량은 변형된 BoNT/A의 단위로 표현될 수 있다.

[0176] 단위 용량은 2 단위 내지 41 단위의 변형된 BoNT/A일 수 있다. 단위 용량 범위의 상한은 40, 35, 30, 25, 20, 15 또는 10일 수 있다. 변형된 BoNT/A의 단위, 바람직하게는 상한은 35 단위이다. 단위 용량 범위의 하한은 5, 10, 15, 20, 25, 30 또는 35일 수 있다. 바람직하게는, 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 12 단위 내지 35 단위, 12 단위 내지 24 단위, 보다 바람직하게는 12 내지 18 단위이다.

[0177] 대안적으로 또는 추가적으로, 단위 용량은 변형된 BoNT/A의 양으로 표현될 수 있다. 그러므로, 한 측면에서 본 발명은 얼굴 주름을 치료하는데 사용하기 위한 변형된 보툴리눔 신경독소 A (BoNT/A)를 제공하며, 여기서 변형된 BoNT/A는 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여되고,

[0178] 여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 18 pg 내지 350 pg의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고,

[0179] 여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

[0180] 미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

[0181] 이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

[0182] 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

[0183] 여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 4850 pg이고,

[0184] 여기서 변형된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, 및 THR 1277로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함하며, 여기서 변형은 하기로부터 선택된다:

[0185] i. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

[0186] ii. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환;

[0187] iii. 비하전된 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

[0188] iv. 염기성 아미노산 잔기의 삽입; 및

[0189] v. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 결실.

[0190] 또 다른 측면에서, 본 발명은 얼굴 주름을 치료하는데 사용하기 위한 변형된 BoNT/A를 제공하며, 여기서 변형된 BoNT/A는 대상체 얼굴의 복수의 부위에 근육내 주사에 의해 투여되고,

[0191] 여기서 변형된 BoNT/A는 부위당 18 pg 내지 350 pg의 변형된 BoNT/A의 단위 용량으로 투여되고,

[0192] 여기서 복수의 부위는 하기로부터 선택되고:

[0193] 미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위,

[0194] 이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및

[0195] 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위,

[0196] 여기서 치료 동안 투여되는 변형된 BoNT/A의 총 용량은 최대 4850 pg이고,

[0197] 여기서 변형된 BoNT/A는 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함한다.

[0198] 상응하는 용도 (의약의 제조에서) 및 치료 방법이 또한 제공된다.

[0199] 단위 용량은 18 pg 내지 350 pg의 변형된 BoNT/A일 수 있다. 단위 용량 범위의 상한은 325, 300, 275, 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100 또는 50 pg의 변형된 BoNT/A일 수 있고, 바람직하게는 상한은 300 pg이다. 단위 용량 범위의 하한은 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250 또는 300 pg의 변형된 BoNT/A일 수 있고, 바람직하게는 하한은 20 pg이다. 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 18 pg 내지 350 pg, 20 pg 내지 300 pg, 가장 바람직하게는 100 pg 내지 150 pg으로부터 선택된다. 바람직하게는, 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 20 pg 내지 300 pg의 변형된 BoNT/A, 예를 들어 50 pg 내지 250 pg이다.

[0200] 가장 바람직하게는 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 80 내지 180 pg, 예컨대 100 pg 내지 150 pg이다.

[0201] 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 2 단위 내지 41 단위일 수 있다. 단위 용량 범위의 상한은 35, 30, 25, 20, 15, 10, 또는 5 단위의 변형된 BoNT/A일 수 있고, 바람직하게는 상한은 35 단위이다. 단위 용량 범위의 하한은 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1., 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 또는 2 단위의 변형된 BoNT/A일 수 있고, 바람직하게는 하한은 2 단위이다. 바람직하게는, 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 2 단위 내지 35 단위의 변형된 BoNT/A, 예를 들어 15 단위 내지 25 단위이다.

[0202] 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 하기로부터 선택된다: 2 단위 내지 35 단위, 6 내지 35 단위, 12 단위 내지 35 단위, 12 단위 내지 24 단위, 가장 바람직하게는 12 단위 내지 18 단위.

[0203] 가장 바람직하게는 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 5 내지 25 단위, 예컨대 12 단위 내지 18 단위이다.

[0204] 단위 용량은 8.4 pg 내지 350 pg의 변형된 BoNT/A일 수 있다. 단위 용량 범위의 상한은 325, 300, 275, 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100 또는 50 pg의 변형된 BoNT/A일 수 있고, 바람직하게는 상한은 300 pg이다. 단위 용량 범위의 하한은 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250 또는 300 pg의 변형된 BoNT/A일 수 있고, 바람직하게는 하한은 10 pg이다. 바람직하게는, 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 10 pg 내지 300 pg의 변형된 BoNT/A, 보다 바람직하게는 10 pg 내지 200 pg, 예를 들어 50 pg 내지 250 pg이다.

[0205] 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 하기로부터 선택된다: 8.4 pg 내지 350 pg, 10 pg 내지 300 pg, 가장 바람직하게는 60 pg 내지 120 pg.

[0206] 가장 바람직하게는 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 80 내지 180 pg, 예컨대 60 pg 내지 120 pg이다.

[0207] 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 1 단위 내지 41 단위일 수 있다. 단위 용량 범위의 상한은 35, 30, 25, 20, 15, 10, 또는 5 단위의 변형된 BoNT/A일 수 있고, 바람직하게는 상한은 35 단위이다. 단위 용량 범위의 하한은 0.1, 0.2, 0.3, 0.,4 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 또는 1 단위의 변형된 BoNT/A일 수 있고, 바람직하게는 하한은 1 단위이다. 바람직하게는, 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 1 내지 35 단위의 변형된 BoNT/A, 예를 들어 10 내지 20 단위이다.

[0208] 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 하기로부터 선택된다: 1 단위 내지 35 단위, 3.5 내지 35 단위, 7 단위 내지 35 단위, 7 단위 내지 24 단위, 가장 바람직하게는 7 단위 내지 14 단위.

[0209] 가장 바람직하게는 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 5 단위 내지 20 단위, 예컨대 7 단위 내지 14 단위이다.

[0210] 단위 용량은 0.5 단위 내지 73 단위의 변형된 BoNT/A일 수 있다. 단위 용량 범위의 상한은 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 또는 5 단위의 변형된 BoNT/A일 수 있고, 바람직하게는 상한은 62 단위이다. 단위 용량 범위의 하한은 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 또는 9 단위의 변형된 BoNT/A일 수 있고, 바람직하게는 하한은 0.8 단위이다. 바람직하게는, 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 0.8 단위 내지 62 단위의 변형된 BoNT/A, 예를 들어 20 내지 40 단위이다.

[0211] 가장 바람직하게는 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 5 단위 내지 25 단위, 예컨대 10 단위 내지 21 단위이다.

[0212] 단위 용량은 12 pg 내지 1754 pg의 변형된 BoNT/A일 수 있다. 단위 용량 범위의 상한은 1700, 1600, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 800, 600, 400, 200, 100 또는 50 pg의 변형된 BoNT/A일 수 있고, 바람직하게는 상한은 1000 pg이다. 단위 용량 범위의 하한은 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250 또는 300 pg의 변형된 BoNT/A일 수 있고, 바람직하게는 하한은 20 pg이

다. 바람직하게는, 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 20 pg 내지 1500 pg, 보다 바람직하게는 20 pg 내지 1000 pg의 변형된 BoNT/A, 예를 들어 500 pg 내지 750 pg이다.

[0213] 가장 바람직하게는 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 200 내지 750 pg, 예컨대 250 pg 내지 500 pg이다.

[0214] 이들 단위 투여량은 변형된 BoNT/A가 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함하는 경우 특히 관련이 있을 수 있다.

[0215] 변형된 BoNT/A의 단위 용량은 또한 단위 및 양 (pg) 둘 다로 동시에 표현될 수 있다.

[0216] 얼굴 주름을 치료하는 경우, 변형된 BoNT/A는 하기로부터 선택된 복수의 부위에 투여될 수 있다: 미간 주름을 치료하기 위한 추근의 최대 2개 부위 및 비근근의 1개 부위, 이마 주름을 치료하기 위한 전두근의 최대 5개 부위; 및 외안각 주름을 치료하기 위한 안륜근의 외부 부분에 최대 3개 부위.

[0217] 본 발명의 치료 레지멘을 수행할 때 투여되는 총 용량은 최대 574 단위일 수 있다. 다시 말해서, 주어진 치료 세션에서 투여되는 변형된 BoNT/A의 총량은 최대 574 단위일 수 있다. 총 용량은 최대 570, 560, 550, 540, 530, 520, 510, 500, 490, 480, 470, 460, 450 또는 440 단위일 수 있다. 바람직하게는, 총 용량은 최대 288 단위의 변형된 BoNT/A일 수 있다.

[0218] 본 발명의 치료 레지멘을 수행할 때 투여되는 총 용량은 최대 4850, 4500, 4000, 3550, 3000, 2750, 2500 pg, 바람직하게는 최대 2400 pg일 수 있다.

[0219] 미간 주름에 대한 치료 레지멘을 수행할 때 투여되는 총 용량은 최대 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 800, 600, 400, 200, 100, 또는 50, 바람직하게는 최대 1000 pg일 수 있다.

[0220] 이마 주름에 대한 치료 레지멘을 수행할 때 투여되는 총 용량은 최대 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 800, 600, 400, 200, 100, 또는 50, 바람직하게는 최대 1000 pg일 수 있다.

[0221] 외안각 주름에 대한 치료 레지멘을 수행할 때 투여되는 총 용량은 최대 1800, 1700, 1600, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 800, 600, 400, 200, 80, 60, 40 또는 20, 바람직하게는 최대 1200 pg일 수 있다.

[0222] 본 발명의 치료 레지멘을 수행할 때 투여되는 총 용량은 최대 1019 단위일 수 있다. 다시 말해서, 주어진 치료 세션에서 투여되는 변형된 BoNT/A의 총량은 최대 1019 단위일 수 있다. 총 용량은 최대 1000, 950, 900, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400 또는 400 단위일 수 있다. 바람직하게는, 총 용량은 최대 333 단위의 변형된 BoNT/A일 수 있다.

[0223] 본 발명의 치료 레지멘을 수행할 때 투여되는 총 용량은 최대 24,500, 24,000, 23,500, 23,000, 22,500, 22,000 pg, 바람직하게는 최대 8,000 pg일 수 있다. 이들 총 투여량은 변형된 BoNT/A가 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함하는 경우 특히 관련이 있을 수 있다.

[0224] 미간 주름에 대한 치료 레지멘을 수행할 때 투여되는 총 용량은 최대 5000, 4500, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 500, 400, 300, 200, 100, 또는 50, 바람직하게는 최대 5000 pg일 수 있다.

[0225] 이마 주름에 대한 치료 레지멘을 수행할 때 투여되는 총 용량은 최대 5000, 4500, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 500, 400, 300, 200, 100, 또는 50, 바람직하게는 최대 5000 pg일 수 있다.

[0226] 외안각 주름에 대한 치료 레지멘을 수행할 때 투여되는 총 용량은 최대 6000, 5500, 4500, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1000, 500, 400, 300, 200, 100, 또는 50, 바람직하게는 최대 6000 pg일 수 있다.

[0227] 이들 총 투여량은 변형된 BoNT/A가 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함하는 경우 특히 관련이 있을 수 있다.

[0228] 통상의 기술자는 대상체가 최근에 클로스트리디움 신경독소 (예를 들어, BoNT)로 추가 치료를 받은 경우 (또는 후속적으로 받고 있는 경우), 예를 들어 미용 치료 또는 상이한 적응증에 대한 치료의 일부로서 고려할 것이다. 관련 기술분야의 일상적인 기술을 사용하여, 통상의 기술자는 이에 따라 본 치료 레지멘을 조정할 것이다.

[0229] 본 발명에 따른 복수의 근육에 대한 투여는 바람직하게는 동일한 치료 세션에서 발생한다.

[0230] 변형된 BoNT/A의 투여 후 적절한 기간에 치료를 반복할 수 있다. 작용 지속기간이 비변형된 BoNT/A (예를 들어, 디스포트®)의 대략 2배라는 점을 감안할 때, 대상체가 비변형된 BoNT/A (예를 들어, 디스포트®)로 치료

될 때보다 후속 투여 사이에 적합하게 더 긴 기간이 있다. 대상체는 이전 투여 후 적어도 18, 20, 25 또는 30주에 본 발명에 따른 변형된 BoNT/A를 재투여받을 수 있다. 예를 들어, 대상체는 이전 투여 후 적어도 18-45주, 바람직하게는 20-35주에 본 발명에 따른 변형된 BoNT/A를 재투여받을 수 있다.

[0231] 본원에서 사용된 바와 같은 "대상체"는 포유동물, 예컨대 인간 또는 다른 포유동물일 수 있다. 바람직하게는 "대상체"는 인간 대상체를 의미한다.

[0232] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "치료하다" 또는 "치료하는"은 예방적 치료 (예를 들어, 장애의 발병을 예방하기 위한) 뿐만 아니라 교정적 치료 (이미 장애를 앓고 있는 대상체의 치료)를 포함한다. 바람직하게는 본원에서 사용된 바와 같은 "치료하다" 또는 "치료하는"은 교정적 치료를 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "치료하다" 또는 "치료하는"은 장애 및/또는 그의 증상을 지칭한다.

[0233] 적합한 변형된 BoNT/A 폴리펩티드 (및 존재하는 경우 이를 코딩하는 뉴클레오티드 서열)는 WO 2015/004461 A1 및 WO 2017/191315에 기재되어 있으며, 이들 둘 다는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0234] BoNT/A는 클로스트리디아 속의 박테리아에 의해 생성되는 클로스트리디움 신경독소의 한 예이다. 이러한 클로스트리디움 신경독소의 다른 예는 씨. 테타니(*C. tetani*) (TeNT) 및 씨. 보툴리눔(*C. botulinum*) (BoNT) 혈청형 B-G에 의해 생성된 것들, 뿐만 아니라 씨. 바라티이(*C. baratii*) 및 씨. 부티리쿰(*C. butyricum*)에 의해 생성된 것들을 포함한다. 상기 신경독소는 매우 강력하고 특이적이며 전달되는 뉴런 및 기타 세포를 중독시킬 수 있다. 클로스트리디움 독소 중에는 공지된 가장 강력한 독소가 있다. 예로서, 보툴리눔 신경독소는 혈청형에 따라 0.5 내지 5 ng/kg 범위의 마우스에 대한 중앙값 치사 용량 (LD_{50}) 값을 갖는다. 파상풍 및 보툴리눔 독소 둘 다는 이환된 뉴런의 기능, 구체적으로 신경전달물질의 방출을 억제함으로써 작용한다. 보툴리눔 독소는 신경근 연접부에서 작용하여 말초 신경계에서 콜린성 전달을 억제하는 반면, 파상풍 독소는 중추 신경계에서 작용한다.

[0235] 자연에서, 클로스트리디움 신경독소 (BoNT/A 포함)는 디술피드 결합에 의해 함께 연결된 2개의 폴리펩티드 쇄를 형성하기 위해 단백질분해 절단 사건에 의해 번역후 변형되는 단일쇄 폴리펩티드로서 합성된다. 절단은 쇄간 디술피드 결합을 제공하는 시스테인 잔기 사이에 위치된 활성화 부위로 종종 지칭되는 특이적 절단 부위에서 발생한다. 이는 독소의 활성 형태인 이러한 이중쇄 형태이다. 2개 쇄는 대략 100 kDa의 분자 질량을 갖는 중쇄 (H-쇄) 및 대략 50 kDa의 분자 질량을 갖는 경쇄 (L-쇄)라고 불린다. H-쇄는 N-말단 전위 구성요소 (H_N 도메인) 및 C-말단 표적화 구성요소 (H_C 도메인)를 포함한다. 절단 부위는 L-쇄 및 전위 도메인 구성요소 사이에 위치된다. H_C 도메인이 그의 표적 뉴런에 결합하고 결합된 독소가 엔도솜을 통해 세포로 내재화된 후, H_N 도메인은 엔도솜 막을 가로질러 시토졸 내로 L-쇄를 전위시키고, L-쇄는 프로테아제 기능 (비세포독성 프로테아제로도 공지됨)을 제공한다.

[0236] 비세포독성 프로테아제는 SNARE 단백질 (예를 들어, SNAP-25, VAMP, 또는 신탁신)로 공지된 세포내 수송 단백질을 단백질분해적으로 절단함으로써 작용한다 - 문헌 [Gerald K (2002) "Cell and Molecular Biology" (4th edition) John Wiley & Sons, Inc.]을 참조한다. 두문자어 SNARE는 NSF가 N-에틸말레이미드-민감성 인자를 의미하는 용어 가용성 NSF 부착 수용체에서 파생된다. SNARE 단백질은 세포내 소포 융합체에 필수적이며, 그러므로 세포로부터 소포 수송을 통한 분자의 분비에 필수적이다. 프로테아제 기능은 아연-의존적 엔도펩티다제 활성이며 SNARE 단백질에 대한 높은 기질 특이성을 나타낸다. 따라서, 일단 원하는 표적 세포에 전달되면, 비세포독성 프로테아제는 표적 세포로부터의 세포 분비를 억제할 수 있다. 클로스트리디움 독소의 L-쇄 프로테아제는 SNARE 단백질을 절단하는 비세포독성 프로테아제이다.

[0237] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "H_C 도메인"은 표적 세포의 표면에 위치된 수용체에 신경독소의 결합을 가능하게 하는 대략 50 kDa의 분자량을 갖는 신경독소 중쇄의 기능적으로 구별되는 영역을 의미한다. H_C 도메인은 2개의 구조적으로 구별되는 서브도메인, "H_{CN} 서브도메인" (H_C 도메인의 N-말단 부분) 및 "H_{CC} 서브도메인" (H_C 도메인의 C-말단 부분)으로 이루어지며, 이들 각각은 대략 25 kDa의 분자량을 갖는다.

[0238] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "LH_N 도메인"은 H_C 도메인이 없고 엔도펩티다제 도메인 ("L" 또는 "경쇄") 및 엔도펩티다제의 세포질 내로의 전위를 담당하는 도메인 (중쇄의 H_N 도메인)으로 이루어진 신경독소를 의미한다.

[0239] 상기 논의된 바와 같이, 클로스트리디움 독소는 2개의 폴리펩티드 쇄, 대략 100 kDa의 분자 질량을 갖는 중쇄 (H-쇄) 및 대략 50 kDa의 분자 질량을 갖는 경쇄 (L-쇄)로부터 형성된다. H-쇄는 C-말단 표적화 구성요소 (수

용체 결합 도메인 또는 H_C 도메인) 및 N-말단 전위 구성요소 (H_N 도메인)를 포함한다.

[0240] 경쇄 참조 서열의 예에는 하기가 포함된다:

[0241] 보툴리눔 유형 A 신경독소: 아미노산 잔기 1-448

[0242] 보툴리눔 유형 B 신경독소: 아미노산 잔기 1-440

[0243] 상기 식별된 참조 서열은 하위혈청형에 따라 약간의 변이가 발생할 수 있기 때문에 가이드로서 간주되어야 한다. 예로서, US 2007/0166332 (그 전문이 본원에 참조로 포함됨)는 약간 상이한 클로스트리디움 서열을 인용한다:

[0244] 보툴리눔 유형 A 신경독소: 아미노산 잔기 M1-K448

[0245] 보툴리눔 유형 B 신경독소: 아미노산 잔기 M1-K441

[0246] 바람직한 변형된 BoNT/A는 하기로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함하는 것이다: ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, 및 THR 1277. 이러한 변형된 BoNT/A는 공지된 BoNT/A의 사용과 비교하여 부작용의 감소 또는 부재를 나타낸다. 본 발명의 변형된 BoNT/A의 증가된 조직 체류 특성은 증가된 효력 및/또는 작용 지속기간을 또한 제공하고 공지된 클로스트리디움 독소 치료제와 비교하여 사용되는 감소된 투여량 (또는 임의의 추가 유해 효과 없이 증가된 투여량)을 허용하여, 그러므로 추가 장점을 제공할 수 있다.

[0247] 변형은 서열식별번호: 2로 표시된 비변형된 BoNT/A와 비교할 때 변형일 수 있으며, 여기서 아미노산 잔기 넘버링은 서열식별번호: 2와의 정렬에 의해 결정된다. 서열식별번호: 2 (뿐만 아니라 본원에 기재된 변형된 BoNT/A 폴리펩티드에 상응하는 서열식별번호)의 위치 1에 메티오닌 잔기의 존재는 임의적이기 때문에, 통상의 기술자는 아미노산 잔기 넘버링을 결정할 때 메티오닌 잔기의 존재/부재를 고려할 것이다. 예를 들어, 서열식별번호: 2가 메티오닌을 포함하는 경우, 위치 넘버링은 상기 정의된 바와 같을 것이다 (예를 들어, ASN 886은 서열식별번호: 2의 ASN 886일 것임). 대안적으로, 메티오닌이 서열식별번호: 2에 부재하는 경우, 아미노산 잔기 넘버링은 -1만큼 변형되어야 한다 (예를 들어, ASN 886은 서열식별번호: 2의 ASN 885일 것임). 본원에 기재된 다른 폴리펩티드 서열의 위치 1에 메티오닌이 존재/부재하는 경우 유사한 고려가 적용되고, 통상의 기술자는 관련 기술분야의 일상적인 기술을 사용하여 올바른 아미노산 잔기 넘버링을 쉽게 결정할 것이다.

[0248] 변형을 위해 표시된 아미노산 잔기(들)는 표면 노출된 아미노산 잔기(들)이다.

[0249] 변형된 BoNT/A는 하기로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함할 수 있다: ASN 886, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1052, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274 및 THR 1277. 변형된 BoNT/A는 서열식별번호: 3, 5, 7 및 9로부터 선택된 핵산 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다. 예를 들어, 서열식별번호: 3, 5, 7 및 9로부터 선택된 핵산 서열과 적어도 80%, 90%, 95% 또는 99.9% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열. 바람직하게는, 본 발명에 사용하기 위한 변형된 BoNT/A는 서열식별번호: 3, 5, 7 또는 9를 포함하는 (또는 이로 이루어진) 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 변형된 BoNT/A는 서열식별번호: 4, 6, 8 및 10으로부터 선택된 폴리펩티드 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 서열식별번호: 4, 6, 8 및 10으로부터 선택된 폴리펩티드 서열과 적어도 80%, 90%, 95% 또는 99.9% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열. 바람직하게는, 본 발명에 사용하기 위한 변형된 BoNT/A는 서열식별번호: 4, 6, 8 및 10으로부터 선택된 폴리펩티드 서열을 포함할 수 있다 (보다 바람직하게는 이로 이루어진다).

[0250] 변형된 BoNT/A의 맥락에서 사용될 때 용어 "하나 이상의 아미노산 잔기(들)"는 바람직하게는 표시된 아미노산 잔기(들) 중 적어도 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개를 의미한다. 그러므로, 변형된 BoNT/A는 표시된 아미노산 잔기(들)에 적어도 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 (바람직하게는 7)개의 변형을 포함할 수 있다. 변형된 BoNT/A는 1-30, 3-20, 또는 5-10개의 아미노산 변형을 포함할 수 있다. 보다 바람직하게는, 변형된 BoNT/A의 맥락에서 사용될 때 용어 "하나 이상의 아미노산 잔기(들)"는 표시된 아미노산 잔기(들) 모두를 의미한다.

[0251] 바람직하게는, 표시된 아미노산 잔기(들)에서 하나 이상의 아미노산 변형(들)을 넘어, 변형된 BoNT/A는 서열식별번호: 2와 비교할 때 어떠한 추가 아미노산 변형도 함유하지 않는다.

[0252] 가장 바람직하게는, 변형된 BoNT/A는 하기로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함한다 (보다 바람직하게는 이로 이루어진다): ASN 886, ASN 930, SER 955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052, 및 GLN 1229. 변형된 BoNT/A는 서열식별번호: 3과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다. 예를 들어, 서열식별번호: 3과 적어도 80%, 90%, 95% 또는 99.9% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열. 바람직하게는, 본 발명에 사용하기 위한 변형된 BoNT/A는 서열식별번호: 3을 포함하는 (또는 이로 이루어진) 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 변형된 BoNT/A는 서열식별번호: 4와 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 서열식별번호: 4와 적어도 80%, 90%, 95% 또는 99.9% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열. 바람직하게는, 본 발명에 사용하기 위한 변형된 BoNT/A는 서열식별번호: 4를 포함할 수 있다 (보다 바람직하게는 이로 이루어진다).

[0253] 변형은 하기로부터 선택될 수 있다:

[0254] i. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

[0255] ii. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환;

[0256] iii. 비하전된 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

[0257] iv. 염기성 아미노산 잔기의 삽입; 및

[0258] v. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 결실.

[0259] 상기 표시된 바와 같은 변형은 상응하는 비변형된 BoNT/A와 비교할 때 증가된 양성 표면 전하 및 증가된 등전점을 갖는 변형된 BoNT/A를 초래한다.

[0260] 등전점 (pI)은 주어진 단백질의 특정 특성이다. 관련 기술분야에 널리 공지된 바와 같이, 단백질은 아미노산의 특정 서열로 만들어진다 (단백질에서 아미노산 잔기로도 지칭됨). 20개의 표준 세트의 각 아미노산은 상이한 측쇄 (또는 R 기)를 가지며, 이는 단백질의 각 아미노산 잔기가 상이한 화학적 특성, 예컨대 전하 및 소수성을 나타낸다는 것을 의미한다. 이들 특성은 주변 화학적 환경, 예컨대 온도 및 pH의 영향을 받을 수 있다. 단백질의 전반적인 화학적 특징은 이들 다양한 인자의 합에 의존할 것이다.

[0261] 특정 아미노산 잔기 (하기 자세히 설명됨)는 주변 pH에 따라 전하를 나타낼 수 있는 이온화가능한 측쇄를 보유한다. 이러한 측쇄가 주어진 pH에서 하전되는지 여부는 관련 이온화가능한 모이어티의 pKa에 의존하며, 여기서 pKa는 짝염기로부터의 특정된 양성자에 대한 산 해리 상수 (Ka)의 음의 대수이다.

[0262] 예를 들어, 산성 잔기, 예컨대 아스파르트산 및 글루탐산은 대략 4.1의 pKa 값을 갖는 측쇄 카르복실산 기를 갖는다 (정확한 pKa 값은 온도, 이온 강도 및 이온화가능한 기의 미세환경에 의존할 수 있음). 그러므로, 이들 측쇄는 pH 7.4 (종종 "생리학적 pH"로 지칭됨)에서 음전하를 나타낸다. 낮은 pH 값에서, 이들 측쇄는 양성자화되고 이들의 전하를 잃을 것이다.

[0263] 반대로, 염기성 잔기, 예컨대 리신 및 아르기닌은 대략 10-12의 pKa 값을 갖는 질소-함유 측쇄 기를 갖는다. 따라서, 이들 측쇄는 pH 7.4에서 양전하를 나타낸다. 이들 측쇄는 높은 pH 값에서 탈양성자화되고 이들의 전하를 잃을 것이다.

[0264] 따라서, 단백질 분자의 전체 (순) 전하는 단백질에 존재하는 산성 및 염기성 잔기의 수 (및 이들의 표면 노출 정도) 및 주변 pH에 의존한다. 주변 pH의 변화는 단백질 상의 전체 전하를 변화시킨다. 따라서, 모든 단백질에는 양전하 및 음전하의 수가 동일하고 단백질이 전체 순 전하를 나타내지 않는 주어진 pH가 있다. 이 포인트는 등전점 (pI)으로 공지되어 있다. 등전점은 통상의 기술자에게 친숙할 단백질 생화학의 표준 개념이다.

[0265] 따라서, 등전점 (pI)은 단백질이 0의 순 전하를 나타내는 pH 값으로 정의된다. pI의 증가는 단백질이 0의 순 전하를 나타내기 위해 더 높은 pH 값이 필요함을 의미한다. 그러므로, pI의 증가는 주어진 pH에서 단백질의 순 양전하의 증가를 나타낸다. 반대로, pI의 감소는 단백질이 0의 순 전하를 나타내기 위해 더 낮은 pH 값이 필요함을 의미한다. 그러므로, pI의 감소는 주어진 pH에서 단백질의 순 양전하의 감소를 나타낸다.

[0266] 단백질의 pI를 결정하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있으며 통상의 기술자에게 친숙할 것이다. 예로서, 단백질의 pI는 단백질에 존재하는 각 아미노산의 평균 pKa 값으로부터 계산될 수 있다 ("계산된 pI"). 이러한 계산은 관련 기술분야에 공지된 컴퓨터 프로그램, 예컨대 ExPASy로부터의 Compute pI/MW 도구 (https://web.expasy.org/compute_pi/)를 사용하여 수행될 수 있으며, 이는 본 발명에 따라 pI를 계산하기 위한 바람직한 방법이다. 상이한 분자 간의 pI 값의 비교는 동일한 계산 기술/프로그램을 사용하여 수행되어야

한다.

[0267] 적절한 경우, 단백질의 계산된 pI는 등전점 집속 기술을 사용하여 실험적으로 확인될 수 있다 ("관찰된 pI"). 이 기술은 전기영동을 사용하여 이들의 pI에 따라 단백질을 분리한다. 등전점 집속은 전형적으로 고정화된 pH 구배를 갖는 겔을 사용하여 수행된다. 전기장이 적용될 때, 단백질은 0의 순 전하를 갖는 pH에 도달할 때까지 pH 구배를 통해 이동하며, 이 포인트가 단백질의 pI이다. 등전점 집속에 의해 제공되는 결과는 전형적으로 본질적으로 상대적으로 저해상도이며, 그러므로 본 발명자들은 계산된 pI (상기 기재된 바와 같이)에 의해 제공되는 결과가 사용하기에 더 적절하다고 생각한다.

[0268] 본 명세서 전반에 걸쳐, "pI"는 달리 언급되지 않는 한 "계산된 pI"를 의미한다.

[0269] 단백질의 pI는 그의 표면에 표시되는 염기성 및/또는 산성 기의 수를 변경함으로써 증가 또는 감소될 수 있다. 이는 단백질의 하나 이상의 아미노산을 변형시킴으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, pI의 증가는 산성 잔기의 수를 감소시킴으로써, 또는 염기성 잔기의 수를 증가시킴으로써 제공될 수 있다.

[0270] 본 발명의 변형된 BoNT/A는 비변형된 BoNT/A (예를 들어, 서열식별번호: 2)의 것보다 적어도 0.2, 0.4, 0.5 또는 1 pI 단위 더 높은 pI 값을 가질 수 있다. 바람직하게는, 변형된 BoNT/A는 적어도 6.6, 예를 들어 적어도 6.8의 pI를 가질 수 있다.

[0271] 20개의 표준 아미노산의 특성은 하기 표에 표시되어 있다:

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

[0272]

[0273] 하기 아미노산은 하전된 아미노산으로 간주된다: 아스파르트산 (음성), 글루탐산 (음성), 아르기닌 (양성) 및 리신 (양성).

[0274] pH 7.4에서, 아스파르트산 (pKa 3.1) 및 글루탐산 (pKa 4.1)의 측쇄는 음전하를 갖는 반면, 아르기닌 (pKa 12.5) 및 리신 (pKa 10.8)의 측쇄는 양전하를 갖는다. 아스파르트산 및 글루탐산은 산성 아미노산 잔기로 지칭

된다. 아르기닌 및 리신은 염기성 아미노산 잔기로 지칭된다.

[0275] 하기 아미노산은 비하전된 극성 (수소 결합에 참여할 수 있음을 의미함) 아미노산으로 간주된다: 아스파라긴, 글루타민, 히스티딘, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 메티오닌 및 트립토판.

[0276] 하기 아미노산은 비하전된 소수성 아미노산으로 간주된다: 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 페닐알라닌, 프롤린 및 글리신.

[0277] 아미노산 삽입에서, 추가 아미노산 잔기 (일반적으로 존재하지 않는 것)가 BoNT/A 폴리펩티드 서열에 혼입되며, 그러므로 상기 서열에서 아미노산 잔기의 총 수를 증가시킨다. 아미노산 결실에서, 아미노산 잔기는 클로스트리디움 독소 아미노산 서열로부터 제거되며, 그러므로 상기 서열에서 아미노산 잔기의 총 수를 감소시킨다.

[0278] 바람직하게는, 변형은 변형된 BoNT/A에서 동일한 수의 아미노산 잔기를 유리하게 유지하는 치환이다. 아미노산 치환에서, BoNT/A 폴리펩티드 서열의 일부를 형성하는 아미노산 잔기는 상이한 아미노산 잔기로 대체된다. 대체 아미노산 잔기는 상기 기재된 바와 같이 20개의 표준 아미노산 중 하나일 수 있다. 대안적으로, 아미노산 치환에서 대체 아미노산은 비표준 아미노산 (상기 기재된 20개의 표준 세트의 일부가 아닌 아미노산)일 수 있다. 예로서, 대체 아미노산은 염기성 비표준 아미노산, 예를 들어 L-오르니틴, L-2-아미노-3-구아니디노프로피온산, 또는 리신, 아르기닌 및 오르니틴의 D-이성질체)일 수 있다. 비표준 아미노산을 단백질에 도입하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 이. 콜라이 영양요구성 발현 숙주를 사용한 재조합 단백질 합성을 포함한다.

[0279] 한 실시양태에서, 치환은 하기로부터 선택된다: 산성 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환, 산성 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환, 및 비하전된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환. 한 실시양태에서, 여기서 치환이 산성 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환인 경우, 산성 아미노산 잔기는 그의 상응하는 비하전된 아미드 아미노산 잔기로 대체된다 (즉, 아스파르트산은 아스파라긴으로 대체되고, 글루탐산은 글루타민으로 대체됨).

[0280] 바람직하게는, 염기성 아미노산 잔기는 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기이다. 다시 말해서, 치환은 리신 또는 아르기닌으로의 치환이다. 가장 바람직하게는, 변형은 리신으로의 치환이다.

[0281] 본 발명에 따른 변형 후, 변형된 BoNT/A는 비변형된 BoNT/A (예를 들어, 서열식별번호: 2)가 결합하는 표적 세포 수용체에 결합할 수 있다.

[0282] 본 발명에 사용하기 위한 변형된 BoNT/A는 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인 (BoNT/A LH_N 도메인), 및 BoNT/B H_C 도메인을 포함할 수 있다. BoNT/A LH_N 도메인은 BoNT/B H_C 도메인에 공유결합적으로 연결되어 있다. 상기 변형된 BoNT/A는 또한 본원에서 "BoNT/AB" 또는 "BoNT/AB 키메라"로 지칭된다.

[0283] LH_N 도메인의 C-말단 아미노산 잔기는 BoNT/A의 LH_N 및 H_C 도메인을 분리하는 3_{10} 나선의 제1 아미노산 잔기에 상응할 수 있고, H_C 도메인의 N-말단 아미노산 잔기는 BoNT/B에서 LH_N 및 H_C 도메인을 분리하는 3_{10} 나선의 제2 아미노산 잔기에 상응할 수 있다.

[0284] BoNT/B 폴리펩티드 서열의 예는 서열식별번호: 16 (유니프롯(UniProt) 수탁 번호 B1INP5)으로서 제공된다.

[0285] 본원에서 "BoNT/A의 LH_N 및 H_C 도메인을 분리하는 3_{10} 나선의 제1 아미노산 잔기"에 대한 언급은 LH_N 및 H_C 도메인을 분리하는 3_{10} 나선의 N-말단 잔기를 의미한다.

[0286] 본원에서 "BoNT/B의 LH_N 및 H_C 도메인을 분리하는 3_{10} 나선의 제2 아미노산 잔기"에 대한 언급은 LH_N 및 H_C 도메인을 분리하는 3_{10} 나선의 N-말단 잔기 다음의 아미노산 잔기를 의미한다.

[0287] "3_{10} 나선"은 α-나선, β-시트 및 역회전과 함께 단백질 및 폴리펩티드에서 발견되는 2차 구조의 한 유형이다. 3_{10} 나선의 아미노산은 각각의 완전한 회전이 이들 사이의 분자내 수소 결합을 분리하는 3개의 잔기 및 10개의 원자에 의해 완료되는 우선성 나선 구조로 배열된다. 각 아미노산은 나선의 120° 회전 (즉, 나선은 회전당 3개의 잔기를 가짐) 및 나선 축을 따라 2.0 Å (= 0.2 nm)의 번역에 상응하고, 수소 결합을 만들어서 형성된 고리에 10개의 원자를 갖는다. 가장 중요하게는, 아미노산의 N-H 기가 3개의 잔기보다 먼저 아미노산의 C = O 기와 수소 결합을 형성하며; 이러한 반복된 i + 3 → i 수소 결합은 3_{10} 나선을 정의한다. 3_{10} 나선은 통상의 기

술자에게 친숙한 구조적 생물학의 표준 개념이다.

[0288] 이러한 3_{10} 나선은 실제 나선을 형성하는 4개의 잔기 및 2개의 캡 (또는 전이) 잔기 (하나는 이들 4개의 잔기의 각 종결부에 있음)에 상응한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "LH_N 및 H_C 도메인을 분리하는 3_{10} 나선"은 이들 6개 잔기로 이루어진다.

[0289] 구조적 분석 및 서열 정렬의 수행을 통해, LH_N 및 H_C 도메인을 분리하는 3_{10} 나선을 식별하였다. 이러한 3_{10} 나선은 그의 N-말단 (즉, LH_N 도메인의 C-말단 부분)에서 α-나선에 의해, 및 그의 C-말단 (즉, H_C 도메인의 N-말단 부분)에서 β-가닥에 의해 둘러싸여 있다. 3_{10} 나선의 제1 (N-말단) 잔기 (캡 또는 전이 잔기)는 또한 이러한 α-나선의 C-말단 잔기에 상응한다.

[0290] LH_N 및 H_C 도메인을 분리하는 3_{10} 나선은 예를 들어 보툴리눔 신경독소의 공개적으로 이용가능한 결정 구조, 예를 들어 보툴리눔 신경독소 A1 및 B1 각각에 대한 3BTA (http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3BTA) 및 1EPW (http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1EPW)로부터 결정될 수 있다.

[0291] 공개적으로 이용가능한 인실리코 모델링 및 정렬 도구, 예를 들어 상동성 모델링 서버 LOOPP (단백질 패턴의 학습, 관찰 및 출력(Learning, Observing and Outputting Protein Patterns), http://loopp.org), PHYRE (단백질 상동성/유사체Y 인식 엔진, http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/) 및 Rosetta (https://www.rosettacommons.org/), 단백질 중첩 서버 SuperPose (http://wishart.biology.ualberta.ca/superpose/), 정렬 프로그램 클러스탈 오메가(Clustal Omega) (http://www.clustal.org/omega/), 및 분자 및 세포 생물학자를 위한 인터넷 리소스에 나열된 수많은 기타 도구/서비스 (http://molbiol-tools.ca/)가 또한 다른 신경독소에서 LH_N 및 H_C 도메인을 분리하는 3_{10} 나선의 위치를 결정하는데 사용될 수 있다. 특히 "H_N/H_{CN}" 연접부 주변의 영역은 구조적으로 고도로 보존되어 있어, 상이한 혈청형을 중첩하기에 이상적인 영역이 되게 한다.

[0292] 예를 들어, 하기 방법론은 다른 신경독소에서 이러한 3_{10} 나선의 서열을 결정하는데 사용되었다:

[0293] 1. 구조적 상동성 모델링 도구 LOOP (http://loopp.org)를 사용하여 BoNT/A1 결정 구조 (3BTA.pdb)에 기초하여 다른 BoNT 혈청형의 예측된 구조를 수득하였다;

[0294] 2. 이렇게 수득된 구조적 (pdb) 파일은 오직 H_{CN} 도메인의 N-말단 종결부 및 그 앞의 약 80개 잔기 (H_N 도메인의 일부임)만을 포함하도록 편집되어, 이에 의해 구조적으로 고도로 보존된 "H_N/H_{CN}" 영역을 유지한다;

[0295] 3. 단백질 중첩 서버 SuperPose (http://wishart.biology.ualberta.ca/superpose/)를 사용하여 각 혈청형을 3BTA.pdb 구조에 중첩하였다;

[0296] 4. 중첩된 pdb 파일을 점검하여 BoNT/A1의 H_C 도메인의 시작에서 3_{10} 나선을 위치시킨 후, 다른 혈청형의 상응하는 잔기를 식별하였다.

[0297] 5. 다른 BoNT 혈청형 서열은 상응하는 잔기가 올바른 것인지 체크하기 위해 클러스탈 오메가로 정렬되었다.

[0298] 이 방법에 의해 결정된 LH_N, H_C 및 3_{10} 나선 도메인의 예는 하기 제시된다:

신경독소	수탁 번호 (소수점 뒤 서열 버전 부가)	LH_N	H_C	3_{10} 나선
BoNT/A1 (SEQ ID NO: 2)	A5HZZ9.1	1-872	873-1296	^{872}NIINTS^{877}
BoNT/A2	X73423.3	1-872	873-1296	^{872}NIVNTS^{877}
BoNT/A3	DQ185900.1 (일명 Q3LRX9.1)	1-872	873-1292	^{872}NIVNTS^{877}
BoNT/A4	EU341307.1 (일명 Q3LRX8.1)	1-872	873-1296	^{872}NITNAS^{877}
BoNT/A5	EU679004.1 (일명 C1IPK2.1)	1-872	873-1296	^{872}NIINTS^{877}
BoNT/A6	FJ981696.1	1-872	873-1296	^{872}NIINTS^{877}
BoNT/A7	JQ954969.1 (일명 K4LN57.1)	1-872	873-1296	^{872}NIINTS^{877}
BoNT/A8	KM233166.1	1-872	873-1297	^{872}NITNTS^{877}
BoNT/B1 (SEQ ID NO: 16)	B1INP5.1	1-859	860-1291	^{859}EILNNI^{864}
BoNT/B2	AB084152.1 (일명 Q8GR96.1)	1-859	860-1291	^{859}EILNNI^{864}
BoNT/B3	EF028400.1 (일명 A2I2S2.1)	1-859	860-1291	^{859}EILNNI^{864}
BoNT/B4	EF051570.1 (일명 A2I2W0.1)	1-859	860-1291	^{859}EILNNI^{864}
BoNT/B5	EF033130.1 (일명 A2I2U6.1)	1-859	860-1291	^{859}DILNNI^{864}
BoNT/B6	AB302852.1 (일명 A8R089.1)	1-859	860-1291	^{859}EILNNI^{864}
BoNT/B7	JQ354985.1 (일명 H9CNK9.1)	1-859	860-1291	^{859}EILNNI^{864}
BoNT/B8	JQ964806.1 (일명 I6Z8G9.1)	1-859	860-1292	^{859}EILNNI^{864}

[0299]

[0300] 구조적 분석 및 서열 정렬을 사용하여, LH_N 및 H_C 도메인을 분리하는 3_{10} 나선 다음의 β-가닥이 모든 보툴리눔 및 파상풍 신경독소에서 보존된 구조이며, LH_N 및 H_C 도메인을 분리하는 3_{10} 나선의 제1 잔기로부터 시작하는 경우 8번째 잔기 (예를 들어, BoNT/A1의 경우 잔기 879)에서 시작한다는 것이 밝혀졌다.

[0301] BoNT/AB 키메라는 BoNT/B로부터의 H_C 도메인에 공유결합적으로 연결된 BoNT/A로부터의 LH_N 도메인을 포함할 수 있으며,

[0302] · 여기서 LH_N 도메인의 C-말단 아미노산 잔기는 BoNT/A의 H_C 도메인의 시작 (N-말단)에 위치된 β-가닥에 N-말단적으로 8번째 아미노산 잔기에 상응하고,

[0303] · 여기서 H_C 도메인의 N-말단 아미노산 잔기는 BoNT/B의 H_C 도메인의 시작 (N-말단)에 위치된 β-가닥에 N-말단적으로 7번째 아미노산 잔기에 상응한다.

[0304] BoNT/AB 키메라는 BoNT/B로부터의 H_C 도메인에 공유결합적으로 연결된 BoNT/A로부터의 LH_N 도메인을 포함할 수

있으며,

[0305] · 여기서 LH_N 도메인의 C-말단 아미노산 잔기는 BoNT/A의 LH_N 도메인의 종결부 (C-말단)에 위치된 α-나선의 C-말단 아미노산 잔기에 상응하고,

[0306] · 여기서 H_C 도메인의 N-말단 아미노산 잔기는 BoNT/B의 LH_N 도메인의 종결부 (C-말단)에 위치된 α-나선의 C-말단 아미노산 잔기의 바로 옆의 C-말단의 아미노산 잔기에 상응한다.

[0307] BoNT/AB 키메라의 설계 프로세스의 근거는 2차 구조가 손상되지 않았음을 보장하고 이에 의해 3차 구조 및 각 도메인의 기능에 대한 임의의 변화를 최소화하려는 것이다. 이론에 구속되는 것을 원하는 것은 아니지만, BoNT/AB 키메라에서 3_{10} 나선의 4개의 중심 아미노산 잔기를 파괴하지 않음으로써 키메라 신경독소에 대한 최적의 입체형태를 보장하며, 이에 의해 키메라 신경독소가 그의 기능을 이들의 최대 용량까지 발휘하도록 허용하는 것으로 가정된다.

[0308] 사실, 놀랍게도, BoNT/A의 3_{10} 나선의 제1 아미노산 잔기 및 BoNT/B 이후의 3_{10} 나선의 제2 아미노산 잔기만을 보유하는 것은 가용성 및 기능적 BoNT/AB 키메라의 생성을 허용할 뿐만 아니라, 그러나 추가로 다른 BoNT/AB 키메라에 비해 개선된 특성, 특히 증가된 효력, 증가된 안전성 비율 및/또는 더 긴 작용 지속기간 (뿐만 아니라 비변형된 BoNT/A와 비교할 때 증가된 안전성 비율 및/또는 작용 지속기간)을 유발한다.

[0309] BoNT/A로부터의 LH_N 도메인은 서열식별번호: 2의 아미노산 잔기 1 내지 872, 또는 이와 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열에 상응할 수 있다. BoNT/A로부터의 LH_N 도메인은 서열식별번호: 2의 아미노산 잔기 1 내지 872, 또는 이와 적어도 80%, 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열에 상응할 수 있다. 바람직하게는, BoNT/A로부터의 LH_N 도메인은 서열식별번호: 2의 아미노산 잔기 1 내지 872에 상응한다.

[0310] BoNT/B로부터의 H_C 도메인은 서열식별번호: 16의 아미노산 잔기 860 내지 1291, 또는 이와 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열에 상응할 수 있다. BoNT/B로부터의 H_C 도메인은 서열식별번호: 16의 아미노산 잔기 860 내지 1291, 또는 이와 적어도 80%, 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열에 상응할 수 있다. 바람직하게는, BoNT/B로부터의 H_C 도메인은 서열식별번호: 16의 아미노산 잔기 860 내지 1291에 상응한다.

[0311] 바람직하게는, BoNT/AB 키메라는 BoNT/A1 LH_N 도메인 및 BoNT/B1 H_C 도메인을 포함한다. 보다 바람직하게는, LH_N 도메인은 BoNT/A1 (서열식별번호: 2)의 아미노산 잔기 1 내지 872에 상응하고, H_C 도메인은 BoNT/B1 (서열식별번호: 16)의 아미노산 잔기 860 내지 1291에 상응한다.

[0312] 바람직하게는, BoNT/B H_C 도메인은 천연 BoNT/B 서열과 비교하여 인간 Syt II에 대한 BoNT/B 신경독소의 결합 친화성을 증가시키는 효과를 갖는 H_{CC} 서브도메인에 적어도 하나의 아미노산 잔기 치환, 부가 또는 결실을 추가로 포함한다. BoNT/B H_{CC} 서브도메인에서 적합한 아미노산 잔기 치환, 부가 또는 결실은 WO 2013/180799 및 WO 2016/154534 (둘 다 본원에 참조로 포함됨)에 개시되어 있다.

[0313] BoNT/B H_{CC} 서브도메인에서 적합한 아미노산 잔기 치환, 부가 또는 결실은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 치환 돌연변이를 포함한다: V1118M; Y1183M; E1191M; E1191I; E1191Q; E1191T; S1199Y; S1199F; S1199L; S1201V; E1191C, E1191V, E1191L, E1191Y, S1199W, S1199E, S1199H, W1178Y, W1178Q, W1178A, W1178S, Y1183C, Y1183P 및 이들의 조합.

[0314] BoNT/B H_{CC} 서브도메인에서 적합한 아미노산 잔기 치환, 부가 또는 결실은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 2개의 치환 돌연변이의 조합을 추가로 포함한다: E1191M 및 S1199L, E1191M 및 S1199Y, E1191M 및 S1199F, E1191Q 및 S1199L, E1191Q 및 S1199Y, E1191Q 및 S1199F, E1191M 및 S1199W, E1191M 및 W1178Q, E1191C 및 S1199W, E1191C 및 S1199Y, E1191C 및 W1178Q, E1191Q 및 S1199W, E1191V 및 S1199W, E1191V 및 S1199Y, 또는 E1191V 및 W1178Q.

[0315] BoNT/B H_{CC} 서브도메인에서 적합한 아미노산 잔기 치환, 부가 또는 결실은 또한 E1191M, S1199W 및 W1178Q인 3개의 치환 돌연변이의 조합을 포함한다.

[0316] 바람직하게는, BoNT/B H_{CC} 서브도메인에서 적합한 아미노산 잔기 치환, 부가 또는 결실은 E1191M 및 S1199Y인 2개의 치환 돌연변이의 조합을 포함한다. 이러한 변형은 BoNT/AB 키메라 서열식별번호: 13 및 서열식별번호: 14에 존재한다.

[0317] 변형은 서열식별번호: 16으로 표시된 비변형된 BoNT/B와 비교할 때 변형일 수 있으며, 여기서 아미노산 잔기 넘버링은 서열식별번호: 16과의 정렬에 의해 결정된다. 서열식별번호: 16의 위치 1에 메티오닌 잔기의 존재 (뿐만 아니라 본원에 기재된 변형된 BoNT/A 폴리펩티드에 상응하는 서열식별번호)는 임의적이기 때문에, 통상의 기술자는 아미노산 잔기 넘버링을 결정할 때 메티오닌 잔기의 존재/부재를 고려할 것이다. 예를 들어, 서열식별번호: 16이 메티오닌을 포함하는 경우, 위치 넘버링은 상기 정의된 바와 같을 것이다 (예를 들어, E1191은 서열식별번호: 16의 E1191일 것임). 대안적으로, 메티오닌이 서열식별번호: 16에 부재하는 경우, 아미노산 잔기 넘버링은 -1만큼 변형되어야 한다 (예를 들어, E1191은 서열식별번호: 16의 E1190일 것임). 본원에 기재된 다른 폴리펩티드 서열의 위치 1에 메티오닌이 존재/부재하는 경우 유사한 고려가 적용되고, 통상의 기술자는 관련 기술분야의 일상적인 기술을 사용하여 올바른 아미노산 잔기 넘버링을 쉽게 결정할 것이다.

[0318] 본 발명에 사용하기 위한 변형된 BoNT/A는 서열식별번호: 11-15로부터 선택된 폴리펩티드 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 서열식별번호: 11-15로부터 선택된 폴리펩티드 서열과 적어도 80%, 90%, 95% 또는 99.9% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열. 바람직하게는, 본 발명에 사용하기 위한 변형된 BoNT/A는 서열식별번호: 11-15로부터 선택된 폴리펩티드 서열을 포함할 수 있다 (보다 바람직하게는 이로 이루어진다).

[0319] 변형된 BoNT/A가 BoNT/AB 키메라인 경우, 변형된 BoNT/A는 서열식별번호: 14와 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 서열식별번호: 14와 적어도 80%, 90%, 95% 또는 99.9% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열. 바람직하게는, 본 발명에 사용하기 위한 변형된 BoNT/A는 서열식별번호: 14를 포함할 수 있다 (보다 바람직하게는 이로 이루어진다).

[0320] 아미노산 잔기의 치환, 삽입 또는 결실에 의해 단백질을 변형시키는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예로서, 아미노산 변형은 BoNT/A를 코딩하는 (예를 들어 비변형된 BoNT/A를 코딩하는) DNA 서열의 변형에 의해 도입될 수 있다. 이는 표준 분자 클로닝 기술을 사용하여, 예를 들어 원하는 아미노산(들)을 코딩하는 DNA의 짧은 가닥 (올리고뉴클레오티드)을 사용하여 폴리머라제 효소를 사용하여 원래의 코딩 서열을 대체하는 부위-지정 돌연변이유발에 의해, 또는 다양한 효소 (예를 들어, 리가제 및 제한 엔도뉴클레아제)를 사용하여 유전자의 일부를 삽입/결실시킴으로써 달성될 수 있다. 대안적으로, 변형된 유전자 서열은 화학적으로 합성될 수 있다.

[0321] 상기 논의된 바와 같이, 본원에 기재된 변형된 BoNT/A는 증가된 효력 및/또는 작용 지속기간을 또한 제공하고 임의의 추가의 부정적인 효과 없이 증가된 투여량을 허용할 수 있는 증가된 조직 체류 특성을 갖는다. 이들 유리한 특성 (치료 지수의 증가를 나타냄)이 정의될 수 있는 한 가지 방식은 변형된 BoNT/A의 안전성 비율에 관한 것이다. 이와 관련하여, 클로스트리디움 독소의 원치않는 효과 (투여 부위로부터 독소의 확산에 의해 유발됨)는 관련 동물 모델에서 백분율 체중 손실을 측정함으로써 실험적으로 평가될 수 있다 (예를 들어 마우스, 투여 7일 이내에 체중 손실이 검출된 경우). 반대로, 클로스트리디움 독소의 원하는 온타겟 효과는 근육 마비의 척도인 발가락 외전 스코어 (DAS) 검정에 의해 실험적으로 평가될 수 있다. DAS 검정을 젤라틴 포스페이트 완충제에서 제형화된 20㎕의 클로스트리디움 독소의 마우스 비복근/가자미근 복합체로의 주사에 의해 수행한 후, Aoki 방법 (Aoki KR, Toxicon 39: 1815-1820; 2001)을 사용하여 발가락 외전 스코어를 평가할 수 있다. DAS 검정에서, 마우스는 마우스가 그의 뒷다리를 연장하고 그의 뒷발가락를 외전하는 특징적인 놀람 반응을 유발하기 위해 꼬리로 잠시 매달린다. 클로스트리디움 독소 주사 후, 발가락 외전의 다양한 정도는 5-포인트 스케일로 스코어링된다 (0=정상 내지 4=발가락 외전 및 다리 연장의 최대 감소).

[0322] 그 후, 본 발명의 변형된 BoNT/A (또는 비교용 비변형된 BoNT/A)의 안전성 비율은 체중의 10% 감소에 필요한 독소의 양 (마우스에 투여 후 처음 7일 이내에 피크 효과에서 측정됨) 및 2의 DAS 스코어에 필요한 독소의 양 사이의 비율로서 표현될 수 있다. 따라서, 높은 안전성 비율 스코어가 바람직하며, 이는 원치않는 오프타겟 효과가 거의 없이 표적 근육을 효과적으로 마비시킬 수 있는 독소를 나타낸다. 본 발명의 변형된 BoNT/A는 등가의 비변형된 (천연) BoNT/A의 안전성 비율보다 더 높은 안전성 비율을 갖는다.

[0323] 그러므로, 한 실시양태에서, 본 발명의 변형된 BoNT/A는 7 초과 (예를 들어, 적어도 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50)의 안전성 비율을 가지며, 여기서 안전성 비율은 하기와 같이 계산된다: -10% 체중 변화에 필요한 독소의 용량 (pg/마우스)을 DAS ED_{50} (pg/마우스)으로 나눈 값 [ED_{50} = 2의 DAS 스코어를 생성하는

데 필요한 용량].

[0324] 한 실시양태에서, 본 발명의 변형된 BoNT/A는 적어도 10의 안전성 비율을 갖는다. 한 실시양태에서, 본 발명의 변형된 BoNT/A는 적어도 15의 안전성 비율을 갖는다.

[0325] 바람직하게는, 변형된 BoNT/A가 본원에 기재된 바와 같이 ASN 886, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1052, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274 및 THR 1277로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)를 포함하는 것인 경우, 상기 변형된 BoNT/A는 적어도 20, 보다 바람직하게는 적어도 22 (예를 들어, 23-25)의 안전성 비율을 갖는다.

[0326] 바람직하게는, 변형된 BoNT/A가 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B H_C 도메인을 포함하는 것인 경우, 변형된 BoNT/A는 적어도 10, 보다 바람직하게는 적어도 12 (예를 들어, 14-15)의 안전성 비율을 갖는다.

[0327] 사용시, 본 발명의 변형된 BoNT/A는 이중쇄 형태이다.

[0328] 변형된 BoNT/A는 바람직하게는 비-복합체화된 형태 (즉, 자연 발생 BoNT/A에 존재하는 복합체화 단백질이 없음)이다. 이러한 복합체화 단백질의 예에는 신경독소-연관 단백질 (NAP) 및 비독성-비헤마글루티닌 구성요소 (NTNH)가 포함된다. 변형된 BoNT/A는 재조합 변형된 BoNT/A인 것이 바람직하다.

[0329] 변형된 BoNT/A는 경쇄 및 중쇄를 갖는 단일쇄 변형된 BoNT/A를 생산하는 방법에 의해 생산될 수 있으며, 방법은 적합한 숙주 세포에서 핵산 (상기 핵산은 상기 기재된 바와 같음)을 발현하는 단계, 단일쇄 변형된 BoNT/A를 함유하는 숙주 세포 균질물을 제공하기 위해 숙주 세포를 용해시키는 단계, 및 단일쇄 변형된 BoNT/A를 단리하는 단계를 포함한다. 그 후, 변형된 BoNT/A는 상기 기재된 바와 같은 단일쇄 변형된 BoNT/A를 생산하는 방법에 의해 수득가능한 단일쇄 변형된 BoNT/A 단백질을 제공하는 단계, 변형된 BoNT/A를 경쇄 및 중쇄 사이에 위치된 인식 부위 (절단 부위)에서 폴리펩티드를 절단하는 프로테아제와 접촉시켜, 이에 의해 폴리펩티드를 디술피드 결합에 의해 경쇄 및 중쇄가 함께 연결된 이중쇄 변형된 BoNT/A로 전환시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 활성화될 수 있다.

[0330] 본 발명의 변형된 BoNT/A는 예를 들어 제약 조성물의 일부로서 대상체에게 투여하기 위한 임의의 적합한 방식으로 제형화될 수 있다. 그러므로, 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 변형된 BoNT/A 및 제약상 허용되는 담체, 부형제, 아주반트 및/또는 염을 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0331] 한 측면에서, 본 발명은 변형된 보툴리눔 신경독소 A (BoNT/A)의 단위 투여 형태를 제공하며, 단위 투여 형태는 하기를 포함하며:

[0332] a. 1 단위 내지 41 단위 (2 단위 내지 41 단위)의 변형된 BoNT/A, 여기서 1 단위는 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양임; 또는

[0333] b. 8.4 pg 내지 350 pg (18 pg 내지 350 pg)의 변형된 BoNT/A; 및

[0334] c. 임의로 제약상 허용되는 담체, 부형제, 아주반트 및/또는 염,

[0335] 여기서 변형된 BoNT/A는 ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086, ASN 1188, ASP 1213, GLY 1215, ASN 1216, GLN 1229, ASN 1242, ASN 1243, SER 1274, 및 THR 1277로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 변형을 포함하며, 여기서 변형은 하기로부터 선택된다:

[0336] i. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

[0337] ii. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 비하전된 아미노산 잔기로의 치환;

[0338] iii. 비하전된 표면 노출된 아미노산 잔기의 염기성 아미노산 잔기로의 치환;

[0339] iv. 염기성 아미노산 잔기의 삽입; 및

[0340] v. 산성 표면 노출된 아미노산 잔기의 결실.

[0341] 한 실시양태에서, 본 발명은 하기를 포함하는 단위 투여 형태를 제공한다:

[0342] a. 1 단위 내지 35 단위의 변형된 BoNT/A; 또는

[0343] b. 10 pg 내지 300 pg의 변형된 BoNT/A.

[0344] 한 측면에서, 본 발명은 변형된 보툴리눔 신경독소 A (BoNT/A)의 단위 투여 형태를 제공하며, 단위 투여 형태는 하기를 포함하며:

[0345] a. 2 단위 내지 41 단위의 변형된 BoNT/A, 여기서 1 단위는 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양임; 또는

[0346] b. 18 pg 내지 350 pg의 변형된 BoNT/A; 및

[0347] c. 임의로 제약상 허용되는 담체, 부형제, 아주반트 및/또는 염,

[0348] 여기서 변형된 BoNT/A는 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함한다.

[0349] 한 측면에서, 본 발명은 변형된 보툴리눔 신경독소 A (BoNT/A)의 단위 투여 형태를 제공하며, 단위 투여 형태는 하기를 포함하며:

[0350] a. 0.5 단위 내지 73 단위의 변형된 BoNT/A, 여기서 1 단위는 마우스에서 계산된 중앙값 치사 용량 (LD_{50})에 상응하는 변형된 BoNT/A의 양임; 또는

[0351] b. 12 pg 내지 1754 pg의 변형된 BoNT/A; 및

[0352] c. 임의로 제약상 허용되는 담체, 부형제, 아주반트 및/또는 염,

[0353] 여기서 변형된 BoNT/A는 BoNT/A 경쇄 및 전위 도메인, 및 BoNT/B 수용체 결합 도메인 (H_C 도메인)을 포함한다.

[0354] 본 발명은 하기를 포함하는 단위 투여 형태를 제공한다:

[0355] a. 0.8 단위 내지 62 단위의 변형된 BoNT/A; 또는

[0356] b. 20 pg 내지 1500 pg의 변형된 BoNT/A.

[0357] 단위 투여 형태는 6 단위 내지 35 단위, 12 단위 내지 35 단위, 12 단위 내지 24 단위, 바람직하게는 12 단위 내지 18 단위의 변형된 BoNT/A를 포함할 수 있다.

[0358] 단위 투여 형태는 50 pg 내지 300 pg, 100 내지 300 pg, 100 내지 200 pg, 바람직하게는 100 내지 150 pg의 변형된 BoNT/A를 포함할 수 있다.

[0359] 하기를 포함하는 키트:

[0360] a. 본원에 상기 정의된 바와 같은 단위 투여 형태; 및

[0361] b. 얼굴 주름 치료에서의 그의 사용 지침; 및

[0362] c. 임의로 희석제.

[0363] 본 발명의 다양한 치료적 용도와 관련된 실시양태는 본 발명의 방법, 조성물 (예를 들어, 단위 투여 형태) 및 키트에 적용될 수 있으며, 그 반대도 마찬가지이다.

[0364] 서열 상동성

[0365] 제한 없이 전역 방법, 국소 방법 및 하이브리드 방법, 예컨대, 예를 들어, 세그먼트 접근법 방법을 포함하는 다양한 서열 정렬 방법 중 임의의 방법이 퍼센트 동일성을 결정하는데 사용될 수 있다. 퍼센트 동일성을 결정하기 위한 프로토콜은 관련 기술분야의 통상의 기술자의 범주 내에서 일상적인 절차이다. 전역 방법은 분자의 시작부터 끝까지 서열을 정렬하고 개별 잔기 쌍의 스코어를 합산하고 갭 패널티를 부과함으로써 최상의 정렬을 결정한다. 비제한적인 방법은 예를 들어, 클러스탈 W (예를 들어, 문헌 [Julie D. Thompson et al., CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position- Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22(22) Nucleic Acids Research 4673-4680 (1994)] 참조); 및 반복적 정련 (예를 들어, 문헌 [Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein. Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) J. MoI. Biol. 823-838 (1996)] 참조)를 포함한다. 국소 방법은 모든 입력 서열에 의해 공유되는 하나 이상의 보존된 모티프를 식별함으로써 서열을 정렬한다. 비제한적인 방법은 예를 들어, 매치-박

스 (예를 들어, 문헌 [Eric Depiereux and Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) CABIOS 501 -509 (1992)] 참조); 깁스 (Gibbs) 샘플링 (예를 들어, 문헌 [C. E. Lawrence et al., Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262(5131) Science 208-214 (1993)] 참조); Align-M (예를 들어, 문헌 [Ivo Van WaIle et al., Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9) Bioinformatics:1428-1435 (2004)] 참조)을 포함한다.

[0366] 그러므로, 퍼센트 서열 동일성은 통상적인 방법에 의해 결정된다. 예를 들어, 문헌 [Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48: 603-16, 1986] 및 문헌 [Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19, 1992]을 참조한다. 간단히 말해서, 2개의 아미노산 서열은 하기 나타낸 바와 같이 10의 갭 개방 패널티, 1의 갭 연장 패널티, 및 문헌 [Henikoff and Henikoff] (상기와 동일한 문헌)의 "blosum 62" 스코어링 매트릭스를 사용하여 정렬 스코어를 최적화하도록 정렬된다 (아미노산은 표준 1-글자 코드에 의해 표시됨).

[0367] 2개 이상의 핵산 또는 아미노산 서열 간의 "퍼센트 서열 동일성"은 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이다. 그러므로, % 동일성은 동일한 뉴클레오티드/아미노산의 수를 뉴클레오티드/아미노산의 총 수로 나누고, 100을 곱하여 계산될 수 있다. % 서열 동일성의 계산은 또한 갭의 수, 및 2개 이상의 서열의 정렬을 최적화하기 위해 도입되어야 하는 각 갭의 길이를 고려할 수 있다. 서열 비교 및 2개 이상의 서열 간의 퍼센트 동일성의 결정은 특정 수학적 알고리즘, 예컨대 BLAST를 사용하여 수행될 수 있으며, 이는 통상의 기술자에게 친숙할 것이다.

[0368] 서열 동일성을 결정하기 위한 정렬 스코어

```
   A R N D C Q E G H I L K M F P S T W Y V
A  4
R -1  5
N -2  0  6
D -2 -2  1  6
C  0 -3 -3 -3  9
Q -1  1  0  0 -3  5
E -1  0  0  2 -4  2  5
G  0 -2  0 -1 -3 -2 -2  6
H -2  0  1 -1 -3  0  0 -2  8
I -1 -3 -3 -3 -1 -3 -3 -4 -3  4
L -1 -2 -3 -4 -1 -2 -3 -4 -3  2  4
K -1  2  0 -1 -3  1  1 -2 -1 -3 -2  5
M -1 -1 -2 -3 -1  0 -2 -3 -2  1  2 -1  5
F -2 -3 -3 -3 -2 -3 -3 -3 -1  0  0 -3  0  6
P -1 -2 -2 -1 -3 -1 -1 -2 -2 -3 -3 -1 -2 -4  7
S  1 -1  1  0 -1  0  0  0 -1 -2 -2  0 -1 -2 -1  4
T  0 -1  0 -1 -1 -1 -1 -2 -2 -1 -1 -1 -1 -2 -1  1  5
W -3 -3 -4 -4 -2 -2 -3 -2 -2 -3 -2 -3 -1  1 -4 -3 -2 11
Y -2 -2 -2 -3 -2 -1 -2 -3  2 -1 -1 -2 -1  3 -3 -2 -2  2  7
V  0 -3 -3 -3 -1 -2 -2 -3 -3  3  1 -2  1 -1 -2 -2  0 -3 -1  4
```

[0369]

[0370] 그 후, 퍼센트 동일성은 하기와 같이 계산된다:

[0371] 동일한 매치의 총 수

[0372] ———————————————————— x 100

[0373] [더 긴 서열의 길이 + 2개의 서열을

[0374] 정렬하기 위해 더 긴 서열에 도입된 갭의 수]

[0375] 실질적으로 상동성인 폴리펩티드는 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 것으로 특징화된다. 이들 변화는 바람직하게는 사소한 성질, 즉 보존적 아미노산 치환 (하기 참조) 및 폴리펩티드의 폴딩 또는 활성에 유의한 영향을 미치지 않는 다른 치환; 전형적으로 1 내지 약 30개 아미노산의 작은 결실; 및 작은 아미노- 또는 카르복실-말단 연장, 예컨대 아미노-말단 메티오닌 잔기, 최대 약 20-25개 잔기의 작은 링커 펩티드, 또는 친화성 태그이다.

[0376] 보존적 아미노산 치환

[0377] 염기성: 아르기닌

[0378] 리신

[0379] 히스티딘

[0380] 산성: 글루탐산

[0381] 아스파르트산

[0382] 극성: 글루타민

[0383] 아스파라긴

[0384] 소수성: 류신

[0385] 이소류신

[0386] 발린

[0387] 방향족: 페닐알라닌

[0388] 트립토판

[0389] 티로신

[0390] 작은: 글리신

[0391] 알라닌

[0392] 세린

[0393] 트레오닌

[0394] 메티오닌

[0395] 20개의 표준 아미노산 외에도, 본 발명의 폴리펩티드의 아미노산 잔기가 비표준 아미노산 (예컨대 4-히드록시프롤린, 6-N-메틸 리신, 2-아미노이소부티르산, 이소발린 및 α-메틸 세린)으로 치환될 수 있다. 폴리펩티드 아미노산 잔기가 제한된 수의 비보존적 아미노산, 유전자 코드에 의해 코딩되지 않는 아미노산, 및 비천연 아미노산으로 치환될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드는 또한 비-자연 발생 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

[0396] 비-자연 발생 아미노산은 제한 없이 트랜스-3-메틸프롤린, 2,4-메타노-프롤린, 시스-4-히드록시프롤린, 트랜스-4-히드록시-프롤린, N-메틸글리신, 알로-트레오닌, 메틸-트레오닌, 히드록시-에틸시스테인, 히드록시에틸호모-시스테인, 니트로-글루타민, 호모글루타민, 피페콜산, tert-류신, 노르발린, 2-아자페닐알라닌, 3-아자페닐-알라닌, 4-아자페닐-알라닌, 및 4-플루오로페닐알라닌을 포함한다. 비-자연 발생 아미노산 잔기를 단백질에 혼입하기 위한 여러 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 화학적으로 아미노아실화된 서프레서 tRNA를 사용하여 넌센스 돌연변이가 저해되는 시험관내 시스템이 사용될 수 있다. 아미노산을 합성하고 tRNA를 아미노아실화하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 넌센스 돌연변이를 함유하는 플라스미드의 전사 및 번역은 이. 콜라이 S30 추출물 및 상업적으로 이용가능한 효소 및 다른 시약을 포함하는 무세포 시스템에서 수행된다. 단백질은 크로마토그래피에 의해 정제된다. 예를 들어, 문헌 [Robertson et al., J. Am. Chem. Soc. 113:2722, 1991]; [Ellman et al., Methods Enzymol. 202:301, 1991]; [Chung et al., Science 259:806-9, 1993]; 및 [Chung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10145-9, 1993]을 참조한다. 제2 방법에서, 번역은 돌연변이된 mRNA 및 화학적으로 아미노아실화된 서프레서 tRNA의 미세주입에 의해 제노푸스(Xenopus) 난모세포

에서 수행된다 (Turcatti et al., J. Biol. Chem. 271:19991-8, 1996). 제3 방법 내에서, 이. 콜라이 세포는 대체될 천연 아미노산 (예를 들어, 페닐알라닌)의 부재 하에 및 원하는 비-자연 발생 아미노산(들) (예를 들어, 2-아자페닐알라닌, 3-아자페닐알라닌, 4-아자페닐알라닌, 또는 4-플루오로페닐알라닌)의 존재 하에 배양된다. 비-자연 발생 아미노산은 그의 천연 대응물 대신에 폴리펩티드에 혼입된다. 문헌 [Koide et al., Biochem. 33:7470-6, 1994]을 참조한다. 자연 발생 아미노산 잔기는 시험관내 화학적 변형에 의해 비-자연 발생 종으로 전환될 수 있다. 화학적 변형은 치환 범위를 추가로 확장하기 위해 부위-지정 돌연변이유발과 조합될 수 있다 (Wynn and Richards, Protein Sci. 2:395-403, 1993).

[0397] 본 발명의 폴리펩티드의 아미노산 잔기가 제한된 수의 비보존적 아미노산, 유전자 코드에 의해 코딩되지 않는 아미노산, 비-자연 발생 아미노산, 및 비천연 아미노산으로 치환될 수 있다.

[0398] 본 발명의 폴리펩티드의 필수 아미노산은 관련 기술분야에 공지된 절차, 예컨대 부위-지정 돌연변이유발 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이유발에 따라 식별될 수 있다 (Cunningham and Wells, Science 244: 1081-5, 1989). 생물학적 상호작용 부위는 또한 추정 접촉 부위 아미노산의 돌연변이와 함께 핵 자기 공명, 결정학, 전자 회절 또는 광친화성 표지화와 같은 기술에 의해 결정된 바와 같은 구조의 물리적 분석에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [de Vos et al., Science 255:306-12, 1992]; [Smith et al., J. Mol. Biol. 224:899-904, 1992]; [Wlodaver et al., FEBS Lett. 309:59-64, 1992]을 참조한다. 필수 아미노산의 동일성은 또한 본 발명의 폴리펩티드의 관련 구성요소 (예를 들어 전위 또는 프로테아제 구성요소)와의 상동성의 분석으로부터 추론될 수 있다.

[0399] 돌연변이유발 및 스크리닝의 공지된 방법, 예컨대 문헌 [Reidhaar-Olson and Sauer (Science 241:53-7, 1988)] 또는 문헌 [Bowie and Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-6, 1989)]에 의해 개시된 방법을 사용하여 다중 아미노산 치환이 이루어지고 시험될 수 있다. 간단히 말해서, 이들 저자는 폴리펩티드에서 2개 이상의 위치를 동시에 무작위화하고, 기능적 폴리펩티드를 선택한 후, 돌연변이유발된 폴리펩티드를 시퀀싱하여 각 위치에서 허용가능한 치환의 스펙트럼을 결정하는 방법을 개시한다. 사용될 수 있는 다른 방법은 파지 디스플레이 (예를 들어, 문헌 [Lowman et al., Biochem. 30:10832-7, 1991]; Ladner et al., 미국 특허 번호 5,223,409; Huse, WIPO 공개 WO 92/06204) 및 영역-지정 돌연변이유발 (Derbyshire et al., Gene 46:145, 1986; Ner et al., DNA 7:127, 1988)을 포함한다.

[0400] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시내용이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 문헌 [Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994)] 및 [Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991)]은 본 개시내용에서 사용된 많은 용어의 일반 사전을 통상의 기술자에게 제공한다.

[0401] 본 개시내용은 본원에 개시된 예시적인 방법 및 재료에 의해 제한되지 않으며, 본원에 기재된 것과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료는 본 개시내용의 실시양태의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있다. 숫자 범위는 범위를 정의하는 숫자를 포함한다. 달리 표시되지 않는 한, 임의의 핵산 서열은 5'에서 3' 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 작성되며; 아미노산 서열은 각각 아미노에서 카르복시 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 작성된다.

[0402] 본원에 제공된 표제는 본 개시내용의 다양한 측면 또는 실시양태의 제한이 아니다.

[0403] 아미노산은 아미노산의 명칭, 3 글자 약어 또는 단일 글자 약어를 사용하여 본원에서 언급된다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "단백질"은 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "아미노산 서열"은 용어 "폴리펩티드" 및/또는 용어 "단백질"과 동의어이다. 일부 예에서, 용어 "아미노산 서열"은 용어 "펩티드"와 동의어이다. 일부 예에서, 용어 "아미노산 서열"은 용어 "효소"와 동의어이다. 용어 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 본 개시내용 및 청구범위에서, 아미노산 잔기에 대한 통상적인 1-글자 및 3-글자 코드가 사용될 수 있다. 아미노산에 대한 3-글자 코드는 IUPACIUB 생화학적 명명법에 관한 공동위원회 (JCBN)에 따라 정의된 바와 같다. 폴리펩티드는 유전자 코드의 축퇴성으로 인해 하나 초과의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있음이 또한 이해된다.

[0404] 용어의 다른 정의는 명세서 전반에 걸쳐 나타날 수 있다. 예시적인 실시양태가 더 상세하게 설명되기 전에, 본 개시내용은 기재된 특정 실시양태에 제한되지 않고, 이와 같이 변경될 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 본원에서 사용된 용어는 단지 특정 실시양태를 설명하기 위한 것이며, 본 개시내용의 범주가 첨부된 청구범위에 의해서만 정의될 것이기 때문에 제한하려는 의도가 아님을 이해해야 한다.

[0405] 값의 범위가 제공되는 경우, 문맥에서 명확하게 달리 지시하지 않는 한, 해당 범위의 상한 및 하한 사이의 각 개재 값이 하한 단위의 10분의 1까지 구체적으로 개시되는 것으로 이해된다. 언급된 범위의 임의의 언급된 값 또는 개재 값 및 해당 언급된 범위의 임의의 임의의 다른 언급된 또는 개재 값 사이의 각각의 더 작은 범위는 본 개시내용 내에 포함된다. 이들 더 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 범위에 포함 또는 배제될 수 있으며, 더 작은 범위에 한계 중 어느 하나가 포함되거나 둘 다 포함되지 않거나 둘 다 포함되는 각 범위는 또한 본 개시내용 내에 포함되며, 언급된 범위에 임의의 구체적으로 배제된 한계가 적용된다. 언급된 범위가 한계 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우, 포함된 한계 중 하나 또는 둘 다를 배제한 범위가 또한 본 개시내용에 포함된다.

[0406] 본원 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥에서 명확하게 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다는 점에 주목해야 한다. 그러므로, 예를 들어, "보툴리눔 신경독소 A"에 대한 언급은 복수의 이러한 후보 작용제를 포함하고, "보툴리눔 신경독소 A"에 대한 언급은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 하나 이상의 클로스트리디움 신경독소 및 이의 등가물 등에 대한 언급을 포함한다.

[0407] 본원에서 논의된 간행물은 본 출원의 출원일 이전의 이들의 개시를 위해서만 제공된다. 본원의 어떤 것도 이러한 간행물이 본원에 첨부된 청구범위에 대한 선행 기술을 구성한다는 것을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0408] 도면의 간단한 설명

[0409] 본 발명의 실시양태는 이제 하기 도면 및 실시예를 참조하여 단지 예로서 설명될 것이다.

[0410] 도 1은 성인에서 얼굴 주름의 치료를 위해 디스포트®의 FDA 승인된 투여량을 보여준다.

[0411] 도 2는 양이온성 구축물의 등전점 집속 (IEF) 겔을 보여준다.

[0412] 도 3은 Cat5v2(K1064H/N954K) (A), Cat5v2(K1064H/N886K) (B) 및 Cat5v2(K1064H/ N1025K) (C)에 대한 래트 배아 척수 뉴런 (eSCN)에서 백분율 SNAP-25 절단, 및 nBoNT/A1에 대한 pEC50의 요약을 보여준다. (A, B, C) 래트 배아 척수 뉴런을 3주 동안 배양하고, SNAP-25 특이적 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅 전에 24시간 동안 Cat5v4로 처리하였다. 데이터는 삼중으로 3개의 독립적 실험으로부터의 평균 ±SEM이다. (D) 래트 eSCN SNAP-25 절단 효력 검정에서 nBoNT/A1 (리스트 바이올로지칼 래보러토리즈(List Biological Laboratories))에 대한 Cat5v2(K1064H/N886K), Cat5v2(K1064H/N954K) 및 Cat5v2(K1064H/ N1025K)의 상대적 효력. 각 포인트는 개별 배치에 상응하고, 8-포인트 농도 반응 곡선 (CRC)에 기초한 3개의 독립적 pEC50 결정의 평균이다. CRC의 각 농도는 삼중으로 평가되었다. 목록 배치의 평균에 대한 효력 비교가 이루어지며, 풀링된 데이터 n=24이다. 데이터는 Cat5v4당 n=3 배치의 평균 ±SEM이다.

[0413] 도 4는 마우스 격막 신경 반횡격막 검정 (mPNHD)에서 nBoNT/A1 및 Cat5v4의 효력 (t_{50})을 보여준다. 마우스 격막 신경 반횡격막 조직을 표시된 바와 같이 Cat5v4 또는 천연 BoNT/A1과 함께 인큐베이션하였다. 수축이 더 이상 검출가능하지 않을 때까지 또는 140분 후에 횡격막 수축력을 기록하였다. 각 포인트는 독립적 결정에 상응한다. t_{50} 값은 마우스 반횡격막의 수축력을 50%만큼 억제하는데 필요한 시간이다.

[0414] 도 5는 정제된 재조합 BoNT/AB 키메라 1, 2 및 3A (각각 서열식별번호: 11, 12 및 13)의 SDS-PAGE를 보여준다. 레인은 "마커" (분자량 마커), "-DTT" (산화된 BoNT/AB 키메라 샘플) 및 "+DTT" (환원된 BoNT/AB 키메라 샘플)로 표시되어 있다.

[0415] 도 6은 재조합 BoNT/AB 키메라 1, 2 및 3A (각각 서열식별번호: 11, 12 및 13)에 의한 래트 척수 뉴런에서의 SNAP-25의 절단을 보여준다. 배양된 래트 1차 척수 뉴런 (SCN)은 10% CO_2가 포함된 가습 분위기에서 37℃에서 24시간 동안 재조합 BoNT/AB 키메라 1, 2 또는 3A의 다양한 농도에 노출되었다. 그 후, DTT 및 벤조나제로 보충된 1x NuPAGE 완충제로 세포를 용해시켰다. 샘플을 미세원심분리기 튜브로 옮기고, 90℃에서 5분 동안 가열 블록에서 가열하고 -20℃에서 저장한 후, 웨스턴 블롯에 의한 SNAP-25 절단을 분석하였다. SNAP-25는 전장 및 절단된 형태의 SNAP-25 (시그마(Sigma) #S9684) 둘 다를 검출하는 폴리클로날 항체를 사용하여 검출되었다. 항-토끼 HRP (시그마 #A6154)를 2차 항체로 사용하였다.

[0416] 도 7은 마우스 발가락 외전 스코어링 검정을 보여준다. 마우스는 짧은 전신 마취 하에 한쪽 뒷다리의 비복근-가자미근 복합 근육에 주사받았으며; 근육 약화는 발가락 외전 스코어 (DAS)를 사용하여 0-4 스케일로 측정되었다. DAS 최대값을 각 용량에 대해 결정하고 용량에 대해 플롯팅하고, 데이터를 4-파라미터 로지스틱 방정식에

피팅하고, ED50 및 DAS 4 (DAS 4 용량) 값으로 이어지는 용량을 결정하였다.

[0417] 도 8은 정제된 재조합 BoNT/AB 키메라 3B 및 3C (각각 서열식별번호: 14 및 15)의 SDS-PAGE를 보여준다. 레인은 "마커" (분자량 마커), "-DTT" (산화된 BoNT/AB 키메라 샘플) 및 "+DTT" (환원된 BoNT/AB 키메라 샘플)로 표시되어 있다.

[0418] 도 9는 인간 유도된 만능 줄기 세포 유래된 말초 뉴런 (PERI.4U - 악시오제네시스(Axiogenesis), 독일)에서 비변형된 BoNT/A 및 BoNT/AB 키메라 3B 및 3C (각각 서열식별번호: 2, 14 및 15)에 의한 SNAP-25의 절단을 보여준다. PERI.4U 세포는 5% CO_2를 함유하는 가습 CO_2 분위기에서 37℃에서 24시간 동안 재조합 BoNT/A, 또는 BoNT/AB 키메라 3B 또는 3C의 다양한 농도에 노출되었다. 그 후, DTT 및 벤조나제로 보충된 1x NuPAGE 완충제로 세포를 용해시켰다. 샘플을 미세원심분리기 튜브로 옮기고, 90℃에서 5분 동안 가열 블록에서 가열하고 -20℃에서 저장한 후, 웨스턴 블롯에 의한 SNAP-25 절단을 분석하였다. SNAP-25는 전장 및 절단된 형태의 SNAP-25 (시그마 #S9684) 둘 다를 검출하는 폴리클로날 항체를 사용하여 검출되었다. 항-토끼 HRP (시그마 #A6154)를 2차 항체로 사용하였다.

[0419] 도 10은 마우스 발가락 외전 스코어링 검정에서 시간 경과에 따른 근육 약화의 지속기간을 보여준다. 마우스는 짧은 전신 마취 하에 한쪽 뒷다리의 비복근-가자미근 복합 근육에 주사받았으며; 근육 약화는 발가락 외전 스코어 (DAS)를 사용하여 0-4 스케일로 측정되었다. 주사 첫 4일 동안 4의 DAS를 유도한 최저 용량으로 주사된 그룹의 동물은 0의 DAS (근육 약화 관찰되지 않음)로 근육 약화의 완전한 회복까지 모니터링되었다.

[0420] 도 11은 미간 주름을 치료할 때 변형된 BoNT/A의 근육내 투여를 위한 주사 부위를 보여준다.

[0421] 도 12는 미간 주름 및 이마 주름을 치료할 때 변형된 BoNT/A의 근육내 투여를 위한 주사 부위를 보여준다.

[0422] 도 13은 외안각 주름만을 치료할 때 변형된 BoNT/A의 근육내 투여를 위한 주사 부위를 보여준다.

[0423] 도 14는 미간 주름, 이마 주름 및 외안각 주름을 치료할 때 변형된 BoNT/A의 근육내 투여를 위한 주사 부위를 보여준다.

[0424] 서열 목록

[0425] 초기 Met 아미노산 잔기 또는 상응하는 초기 코돈이 하기 서열식별번호 중 임의의 것으로 표시되는 경우, 상기 잔기/코돈은 임의적이다.

SEQ ID NO: 1 (비변형된 BoNT/A의 뉴클레오티드 서열)

ATGCCATTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATACATCAAGATTCCG
AACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAGATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACC
TTCACGAACCCGGAAGAAGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCAGCTACTACGATTCG
ACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTCGAACGTATCTACAGC
ACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGTTCGCGGTATCCCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACC
GAACTGAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAAT
CTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTTTGGTCACGAGGTTCTGAATCTG
ACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTCGTTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTG
GAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATGAACTG
ATCCACGCAGGCCACCGCCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATAC
TACGAGATGAGCGGCCTGGAAGTCAGCTTCGAAGAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGAC
AGCTTGCAAGAGAATGAGTTCCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACAAGGCC
AAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTTAAAGAGAAGTACCTGCTGTCCGAG
GATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAAACTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACC
GAGGACAACTTTGTGAAATTCTTCAAAGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTTTTCAAG
ATTAACATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAACCTGCGTAACACCAACCTGGCGGCGAAC
TTTAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACATGAATTTCACGAAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTCGAGTTC
TATAAGCTGCTGTGCGTGCGCGGTATCATCACCAGCAAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAACAAGGCGCTG
AATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATTGGGATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAAGATAATTTTACCAACGACCTG
AACAAGGGTGAAGAAATCACCAGCGATACGAATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAG
CAGTACTATCTGACCTTTAACTTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATTATC
GGTCAGCTGGAACTGATGCCGAATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATG
TTCCATTACCTGCGTGCACAGGAGTTTGAACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCC
CTGCTGAACCCGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCCACTGAGGCC
GCGATGTTCCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGAGACGAGCGAAGTGAGCACTACCGAC
AAAATTGCTGATATTACCATCATTATCCCGTATATTGGTCCGGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGAC
GATTTTGTGGGTGCCCTGATCTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTCATTCCGGAGATTGCGATCCCGGTG
TTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCCTACATCGCGAATAAGGTTCTGACGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCG
AAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTTTACAAATACATTGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAGATC
GACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAATTATCAACTACCAA
TACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAGAATAACATTAACTTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAA
TCTATCAACAAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATG
ATTCCGTATGGCGTCAAACGTCTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGAC
AATCGTGGTACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAAAGACAAAGTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCA
TTTCAACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATCAAT
ACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCAAGCAAGATCAACATC
GGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTGTTTAATCTGGAATCGAGCAAAATTGAG
GTTATCCTGAAAAACGCCATTGTCTACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTCGCATCCCG
AAATACTTCAACAGCATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAG
GTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGACACCCAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAG
TACTCTCAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAAT
AACAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCACGCAAGC
AACAACATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTT
GATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGATCAAAGATTTGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTC
TGGGGCGATTATCTGCAATACGATAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAATATGTGGATGTC
AATAATGTGGGTATTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTG
AACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATTGTGCGT
AATAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGTGAAGAATAAAGAGTACCGTCTGGCGACCAACGCTTCGCAGGCG
GGTGTTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTCGGTAATCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGC
AAGAACGACCAGGGTATCACTAACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTTATT
GGTTTCCACCAGTTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGC
CGTACTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGATGATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

SEQ ID NO: 2 (비변형된 BoNT/A의 폴리펩티드 서열)

[0426]

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYYDS
TYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELN
LVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHEL
IHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKA
KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFK
INIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKAL
NDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDII
GQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPV
LGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQ
YNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYD
NRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINI
GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWK
VSLNYGEIIWTLQDTQEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHAS
NNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNSGILKDFWGDYLQYDKPYYMLNLYDPNKYVDV
NNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQA
GVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNIAKLVASNWYNRQIERSS
RTLGCSWEFIPVDDGWGERPL

SEQ ID NO: 3 (변형된 BoNT/A "Cat-A"의 뉴클레오티드 서열)

ATGCCATTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATACATCAAGATTCCG
AACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAGATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACC
TTCACGAACCCGGAAGAAGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCAGCTACTACGATTCG
ACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTCGAACGTATCTACAGC
ACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGTTCGCGGTATCCCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACC
GAACTGAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAAT
CTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTTTGGTCACGAGGTTCTGAATCTG
ACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTCGTTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTG
GAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATGAACTG
ATCCACGCAGGCCACCGCCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATAC
TACGAGATGAGCGGCCTGGAAGTCAGCTTCGAAGAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGAC
AGCTTGCAAGAGAATGAGTTCCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACAAGGCC
AAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTTAAAGAGAAGTACCTGCTGTCCGAG
GATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAAACTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACC
GAGGACAACTTTGTGAAATTCTTCAAAGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTTTTCAAG
ATTAACATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAACCTGCGTAACACCAACCTGGCGGCGAAC
TTTAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACATGAATTTCACGAAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTCGAGTTC
TATAAGCTGCTGTGCGTGCGCGGTATCATCACCAGCAAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAACAAGGCGCTG
AATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATTGGGATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAAGATAATTTTACCAACGACCTG
AACAAGGGTGAAGAAATCACCAGCGATACGAATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAG
CAGTACTATCTGACCTTTAACTTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATTATC
GGTCAGCTGGAACTGATGCCGAATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATG
TTCCATTACCTGCGTGCACAGGAGTTTGAACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCC
CTGCTGAACCCGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCCACTGAGGCC
GCGATGTTCCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGAGACGAGCGAAGTGAGCACTACCGAC
AAAATTGCTGATATTACCATCATTATCCCGTATATTGGTCCGGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGAC
GATTTTGTGGGTGCCCTGATCTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTCATTCCGGAGATTGCGATCCCGGTG
TTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCCTACATCGCGAATAAGGTTCTGACGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCG
AAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTTTACAAATACATTGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAGATC
GACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAATTATCAACTACCAA
TACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAGAATAACATTAACTTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAA
TCTATCAACAAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATG
ATTCCGTATGGCGTCAAACGTCTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGAC
AATCGTGGTACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAAAGACAAAGTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCA
TTTCAACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATCAAT
ACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAAGCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCTAGCAAGATCAACATC
GGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTGTTTAATCTGGAATCGAGCAAAATTGAG

[0427]

GTTATCCTGAAAAAGGCCATTGTCTACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTCGCATCCCG
AAATACTTCAACAAGATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAG
GTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGACACCAAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAG
TACTCTCAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAAT
AAGAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCACGCAAGC
AACAAGATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTT
GATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGATCAAAGATTTGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTC
TGGGGCGATTATCTGCAATACGATAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAATATGTGGATGTC
AATAATGTGGGTATTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTG
AACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATTGTGCGT
AATAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGTGAAGAATAAAGAGTACCGTCTGGCGACCAACGCTTCGCAGGCG
GGTGTTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTCGGTAATCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGC
AAGAACGACAAGGGTATCACTAACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTTATT
GGTTTCCACCAGTTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGC
cGTACTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGATGATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

SEQ ID NO: 4 (변형된 BoNT/A "Cat-A"의 폴리펩티드 서열)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYYDS
TYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELN
LVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHEL
IHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKA
KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFK
INIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKAL
NDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDII
GQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPV
LGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQ
YNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYD
NRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESKHLIDLSRYASKINI
GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKKAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNKISLNNEYTIINCMENNSGWK
VSLNYGEIIWTLQDTKEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNKSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHAS
NKIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNSGILKDFWGDYLQYDKPYYMLNLYDPNKYVDV
NNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQA
GVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDKGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNIAKLVASNWYNRQIERSS
RTLGCSWEFIPVDDGWGERPL

SEQ ID NO: 5 (변형된 BoNT/A "Cat-B"의 뉴클레오티드 서열)

ATGCCATTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATACATCAAGATTCCG
AACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAGATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACC
TTCACGAACCCGGAAGAAGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCAGCTACTACGATTCG
ACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTCGAACGTATCTACAGC
ACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGTTCGCGGTATCCCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACC
GAACTGAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAAT
CTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTTTGGTCACGAGGTTCTGAATCTG
ACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTCGTTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTG
GAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATGAACTG
ATCCACGCAGGCCACCGCCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATAC
TACGAGATGAGCGGCCTGGAAGTCAGCTTCGAAGAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGAC
AGCTTGCAAGAGAATGAGTTCCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACAAGGCC
AAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTTAAAGAGAAGTACCTGCTGTCCGAG
GATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAAACTGTACaAGATGCTGACCGAGATTTACACC
GAGGACAACTTTGTGAAATTCTTCAAAGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTTTTCAAG
ATTAACATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAACCTGCGTAACACCAACCTGGCGGCGAAC
TTTAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACATGAATTTCACGAAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTCGAGTTC
TATAAGCTGCTGTGCGTGCGCGGTATCATCACCAGCAAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAACAAGGCGCTG
AATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATTGGGATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAAGATAATTTTACCAACGACCTG

[0428]

AACAAGGGTGAAGAAATCACCAGCGATACGAATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAG
CAGTACTATCTGACCTTTAACTTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATTATC
GGTCAGCTGGAACTGATGCCGAATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATG
TTCCATTACCTGCGTGCACAGGAGTTTGAACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCC
CTGCTGAACCCGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCCACTGAGGCC
GCGATGTTCCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGAGACGAGCGAAGTGAGCACTACCGAC
AAAATTGCTGATATTACCATCATTATCCCGTATATTGGTCCGGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGAC
GATTTTGTGGGTGCCCTGATCTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTCATTCCGGAGATTGCGATCCCGGTG
TTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCCTACATCGCGAATAAGGTTCTGACGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCG
AAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTTTACAAATACATTGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAGATC
GACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAATTATCAACTACCAA
TACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAGAATAACATTAACTTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAA
TCTATCAACAAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATG
ATTCCGTATGGCGTCAAACGTCTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGAC
AaTCGTGGTACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAAAGACAAAGTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCA
TTTCAACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATCAAT
ACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCTAGCAAGATCAACATC
GGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTGTTTAATCTGGAATCGAGCAAAATTGAG
GTTATCCTGAAAAAGGCCATTGTCTACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTCGCATCCCG
AAATACTTCAAGAAGATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAG
GTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGACACCAAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAG
TACTCTCAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAAT
AAGAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCACGCAAGC
AACAAGATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTT
GATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGATCAAAGATTTGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTC
TGGGGCGATTATCTGCAATACGATAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAATATGTGGATGTC
AATAATGTGGGTATTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTG
AACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATTGTGCGT
AATAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGTGAAGAATAAAGAGTACCGTCTGGCGACCAACGCTTCGCAGGCG
GGTGTTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTCGGTAATCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGC
AAGAACGACAAGGGTATCACTAACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTTATT
GGTTTCCACCAGTTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGC
CGTACTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGATGATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

SEQ ID NO: 6 (변형된 BoNT/A "Cat-B"의 폴리펩티드 서열)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYYDS
TYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELN
LVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHEL
IHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKA
KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFK
INIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKAL
NDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDII
GQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPV
LGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQ
YNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYD
NRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINI
GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKKAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFKKISLNNEYTIINCMENNSGWK
VSLNYGEIIWTLQDTKEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNKSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHAS
NKIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNSGILKDFWGDYLQYDKPYYMLNLYDPNKYVDV
NNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQA
GVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDKGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNIAKLVASNWYNRQIERSS
RTLGCSWEFIPVDDGWGERPL

SEQ ID NO: 7 (변형된 BoNT/A "Cat-C"의 뉴클레오티드 서열)

[0429] ATGCCATTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATACATCAAGATTCCG

AACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAGATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACC
TTCACGAACCCGGAAGAAGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCAGCTACTACGATTCG
ACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTCGAACGTATCTACAGC
ACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGTTCGCGGTATCCCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACC
GAACTGAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAAT
CTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTTTGGTCACGAGGTTCTGAATCTG
ACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTCGTTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTG
GAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATGAACTG
ATCCACGCAGGCCACCGCCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATAC
TACGAGATGAGCGGCCTGGAAGTCAGCTTCGAAGAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGAC
AGCTTGCAAGAGAATGAGTTCCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACAAGGCC
AAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTTAAAGAGAAGTACCTGCTGTCCGAG
GATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAAACTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACC
GAGGACAACTTTGTGAAATTCTTCAAAGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTTTTCAAG
ATTAACATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAACCTGCGTAACACCAACCTGGCGGCGAAC
TTTAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACATGAATTTCACGAAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTCGAGTTC
TATAAGCTGCTGTGCGTGCGCGGTATCATCACCAGCAAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAACAAGGCGCTG
AATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATTGGGATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAAGATAATTTTACCAACGACCTG
AACAAGGGTGAAGAAATCACCAGCGATACGAATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAG
CAGTACTATCTGACCTTTAACTTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATTATC
GGTCAGCTGGAACTGATGCCGAATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATG
TTCCATTACCTGCGTGCACAGGAGTTTGAACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCC
CTGCTGAACCCGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCCACTGAGGCC
GCGATGTTCCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGAGACGAGCGAAGTGAGCACTACCGAC
AAAATTGCTGATATTACCATCATTATCCCGTATATTGGTCCGGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGAC
GATTTTGTGGGTGCCCTGATCTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTCATTCCGGAGATTGCGATCCCGGTG
TTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCCTACATCGCGAATAAGGTTCTGACGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCG
AAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTTTACAAATACATTGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAGATC
GACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAATTATCAACTACCAA
TACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAGAATAACATTAACTTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAA
TCTATCAACAAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATG
ATTCCGTATGGCGTCAAACGTCTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGAC
AATCGTGGTACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAAAGACAAAGTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCA
TTTCAACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATCAAT
ACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCTAGCAAGATCAACATC
GGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTGTTTAATCTGGAATCGAGCAAAATTGAG
GTTATCCTGAAAAAGGCCATTGTCTACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTCGCATCCCG
AAATACTTCAACAAGATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAG
GTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGACACCAAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAG
TACTCTCAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAAG
AAGAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCACGCAAGC
AACAAGATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTT
GATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGATCAAAGATTTGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTC
TGGGGCGATTATCTGCAATACGATAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAATATGTGGATGTC
AATAATGTGGGTATTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTG
AACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATTGTGCGT
AATAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGTGAAGAATAAAGAGTACCGTCTGGCGACCAACGCTTCGCAGGCG
GGTGTTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTCGGTAATCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGC
AAGAACGACAAGGGTATCACTAACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTTATT
GGTTTCCACCAGTTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGC
CGTACTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGATGATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

SEQ ID NO: 8 (변형된 BoNT/A "Cat-C"의 폴리펩티드 서열)

[0430]

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYYDS
TYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELN
LVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHEL
IHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKA

KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFK
INIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKAL
NDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDII
GQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPV
LGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQ
YNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYD
NRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINI
GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKKAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNKISLNNEYTIINCMENNSGWK
VSLNYGEIIWTLQDTKEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLKKSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHAS
NKIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNSGILKDFWGDYLQYDKPYYMLNLYDPNKYVDV
NNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQA
GVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDKGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNIAKLVASNWYNRQIERSS
RTLGCSWEFIPVDDGWGERPL

SEQ ID NO: 9 (변형된 BoNT/A "Cat-D"의 뉴클레오티드 서열)

ATGCCATTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATACATCAAGATTCCG
AACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAGATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACC
TTCACGAACCCGGAAGAAGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCAGCTACTACGATTCG
ACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTCGAACGTATCTACAGC
ACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGTTCGCGGTATCCCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACC
GAACTGAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAAT
CTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTTTGGTCACGAGGTTCTGAATCTG
ACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTCGTTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTG
GAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATGAACTG
ATCCACGCAGGCCACCGCCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATAC
TACGAGATGAGCGGCCTgGAAGTCAGCTTCGAAGAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGAC
AGCTTGCAAGAGAATGAGTTCCGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACAAGGCC
AAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTTAAAGAGAAGTACCTGCTGTCCGAG
GATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAAACTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACC
GAGGACAACTTTGTGAAATTCTTCAAaGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTTTTCaAG
ATTAACATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAACCTGCGTAACACCAACCTGGCGGCGAAC
TTTAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACATGAATTTCACGAAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTCGAGTTC
TATAAGCTGCTGTGCGTGCGCGGTATCATCACCAGCAAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAACAAGGCGCTG
AATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATTGGGATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAAGATAATTTTACCAACGACCTG
AACAAGGGTGAAGAAATCACCAGCGATACGAATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAG
CAGTACTATCTGACCTTTAACTTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATTATC
GGTCAGCTGGAACTGATGCCGAATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATG
TTCCATTACCTGCGTGCACAGGAGTTTGAACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCC
CTGCTGAACCCGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCCACTGAGGCC
GCGATGTTCCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGAGACGAGCGAAGTGAGCACTACCGAC
AAAaTTGCTGATaTTACCATCATTATCCCGTATATTGGTCCGGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGAC
GATTTTGTGGGTGCCCTGATCTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTCATTCCGGAGATTGCGATCCCGGTG
TTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCCTACATCGCGAATAAGGTTCTGACGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCG
AAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTTTACAAATACATTGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCaATACCCAGATC
GACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAATTATCAACTACCAA
TACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAGAATAACATTAACTTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAA
TCTATCAACAAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATG
ATTCCGTATGGCGTCAAACGTCTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGAC
AATCGTGGTACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAAAGACAAAGTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCA
TTTCAACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATCAAT
ACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATtGATCTGAGCCGTTATGCAAGCAAGATCAACATC
GGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTGTTTAATCTGGAATCGAGCAAAATTGAG
GTTATCCTGAAAAACGCCATTGTCTACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTCGCATCCCG
AAATACTTCAACAGCATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAG
GTGTCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGACACCCAAGAGATCAAGCAGCGCGTCGTGTTCAAG
[0431] TACTCTCAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAAT

AACAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCACGCAAGC
AACAACATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTT
GATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGATCAAAGATTTGTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTC
TGGGGCGATTATCTGCAATACGATAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAATATGTGGATGTC
AATAATGTGGGTATTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTG
AACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATTGTGCGT
AATAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGTGAAGCGTAAAGAGTACCGTCTGGCGACCAACGCTTCGCAGGCG
GGTGTTGAGAAAATTCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTCGTGTCCGTCGTCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGC
AAGAACGACCAGGGTATCACTAACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACCGTCGTGGTAACGACATCGGCTTTATT
GGTTTCCACCAGTTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCCGTAGC
CGTCGTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGATGATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

SEQ ID NO: 10 (변형된 BoNT/A "Cat-D"의 폴리펩티드 서열)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYYDS
TYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELN
LVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHEL
IHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKA
KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFK
INIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKAL
NDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDII
GQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPV
LGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQ
YNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYD
NRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINI
GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWK
VSLNYGEIIWTLQDTQEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHAS
NNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNSGILKDFWGDYLQYDKPYYMLNLYDPNKYVDV
NNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKRKEYRLATNASQA
GVEKILSALEIPRVRRLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDRRGNDIGFIGFHQFNNIAKLVASNWYNRQIERRS
RRLGCSWEFIPVDDGWGERPL

SEQ ID NO: 11 (변형된 BoNT/A "키메라 1"의 폴리펩티드 서열)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLN
PPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGG
STIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGY
GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAINPN
RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKA
KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKV
LNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFTKLKNFT
GLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEE
ITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNG
KKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSG
AVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAK
VNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKA
MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDK
VNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKSEILNNIILNLRYKDNNLIDLSGYGAKVE
VYDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYI
HNEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLIDINGKTKSVFFEYNIREDISEYINRWFFVT
ITNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTEL
SQSNIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSK
YNQNSKYINYRDLYIGEKFIIRRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWRVYTYKYF
KKEEMKLFLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYES

[0432]

GIVFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTEHHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 12 (변형된 BoNT/A "키메라 2"의 폴리펩티드 서열)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLN
PPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGG
STIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGY
GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAINPN
RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKA
KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKV
LNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFTKLKNFT
GLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEE
ITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNG
KKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSG
AVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAK
VNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKA
MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDK
VNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNIIELGGGGSELSEILNNIILNLRYKDNN
LIDLSGYGAKVEVYDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRI
PKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLIDINGKTKSVFFEYNIRED
ISEYINRWFFVTITNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQFI
WMKYFSIFNTELSQSNIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKK
DSPVGEILTRSKYNQNSKYINYRDLYIGEKFIIRRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNL
NQEWRVYTYKYFKKEEMKLFLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDE
IGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTEHHH
HHHHHHH

SEQ ID NO: 13 (변형된 BoNT/A "키메라 3A"의 폴리펩티드 서열)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLN
PPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGG
STIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGY
GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAINPN
RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKA
KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKV
LNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFTKLKNFT
GLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEE
ITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNG
KKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSG
AVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAK
VNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKA
MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDK
VNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNILNNIILNLRYKDNNLIDLSGYGAKVEV
YDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIH
NEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLIDINGKTKSVFFEYNIREDISEYINRWFFVTI
TNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELS
QSNIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKY
NQNSKYINYRDLYIGEKFIIRRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWRVYTYKYFK
KEEMKLFLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESG
IVFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTEHHHHHHHHHH

[0433]

SEQ ID NO: 14 (변형된 BoNT/A "키메라 3B"의 폴리펩티드 서열)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYYDS
TYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELN
LVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHEL
IHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKA
KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFK
ININVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKAL
NDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDII
GQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPV
LGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQ
YNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYD
NRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNILNNIILNLRYKDNNLIDLSGYGAKVEV
YDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNNSGW
KISIRGNRIIWTLIDINGKTKSVFFEYNIREDISEYINRWFFVTITNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIAN
GEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKL
KKDSPVGEILTRSKYNQNSKYINYRDLYIGEKFIIRRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWRVYTYKYFK
KEEMKLFLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCISKW
YLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE

SEQ ID NO: 15 (변형된 BoNT/A "키메라 3C"의 폴리펩티드 서열)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLN
PPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGG
STIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGY
GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAINPN
RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKA
KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKV
LNRKTYLNFDKAVFKININVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFTKLKNFT
GLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEE
ITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNG
KKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFSSDYVKKVNKATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSG
AVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAK
VNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKA
MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDK
VNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNILNNIILNLRYKDNNLIDLSGYGAKVEV
YDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIH
NEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLIDINGKTKSVFFEYNIREDISEYINRWFFVTI
TNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELS
QSNIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKY
NQNSKYINYRDLYIGEKFIIRRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWRVYTYKYFK
KEEEKLFLAPISDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESG
IVFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE

SEQ ID NO: 16 (BoNT/B의 폴리펩티드 서열)

MPVTINNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGRYYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKPEDFN
KSSGIFNRDVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLLEMIINGIPYLG
DRRVPLEEFNTNIASVTVNKLISNPGEVERKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQNH
FASREGFGGIMQMKFCPEYVSVFNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALILMHELIHVLHGLY
GIKVDDLPIVPNEKKFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNFRGIV
DRLNKVLVCISDPNININIYKNKFKDKYKFVEDSEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGFTETN
IAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIEEGFNISDKDMEKEYRGQNKAINKQA
YEEISKEHLAVYKIQMCKSVKAPGICIDVDNEDLFFIADKNSFSDDLSKNERIEYNTQSN
YIENDFPINELILDTDLISKIELPSENTESLTDFNVDVPVYEKQPAIKKIFTDENTIFQY
LYSQTFPLDIRDISLTSSFDDALLFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVND
[0434]

FVIEANKSNTMDKIADISLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFEIAGASILLEFIPELLI
PVVGAFLLESYIDNKNKIIKTIDNALTKRNEKWSDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMY
KALNYQAQALEEIIKYRYNIYSEKEKSNINIDFNDINSKLNEGINQAIDNINNFINGCSV
SYLMKKMIPLAVEKLLDFDNTLKKNLLNYIDENKLYLIGSAEYEKSKVNKYLKTIMPFDL
SIYTNDTILIEMFNKYNSEILNNIILNLRYKDNNLIDLSGYGAKVEVYDGVELNDKNQFK
LTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNNS
GWKISIRGNRIIWTLIDINGKTKSVFFEYNIREDISEYINRWFFVTITNNLNNAKIYING
KLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIEERYKIQSY
SEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYINYRDLY
IGEKFIIRRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWRVYTYKYFKKEEEKLFLAPISD
SDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCIS
KWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE
[0435]

[0436] 실시예

[0437] 실시예 1

[0438] 클로닝, 발현 및 정제

[0439] 야생형 BoNT/A (서열식별번호: 2)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 서열식별번호: 1을 돌연변이시켜 하기 치환을 도입하여 하기 표 1에 표시된 4개의 구축물을 형성하였다:

구축물	돌연변이	뉴클레오티드 서열	폴리펩티드 서열
Cat-A	N930K, S955K, Q991K, N1026K, N1052K, Q1229K, N886K	3	4
Cat-B	N930K, S955K, Q991K, N1026K, N1052K, Q1229K, N954K	5	6
Cat-C	N930K, S955K, Q991K, N1026K, N1052K, Q1229K, N1025K	7	8
Cat-D*	N1188R, D1213R, G1215R, N1216R, N1242R, N1243R, S1274R, T1277R	9	10

[0440]

[0441] 표 1. 구축물.

[0442] *Cat-D는 7.45의 계산된 pI 및 149,859의 분자량을 가졌다.

[0443] 상기 변형된 BoNT/A 분자를 코딩하는 DNA 구축물을 합성하고, pJ401 발현 벡터로 클로닝한 후, BL21 (DE3) 이. 콜라이로 형질전환하였다. 이는 BL21(DE3) 이. 콜라이에서 재조합 Cat-A, Cat-B, Cat-C 및 Cat-D 단백질의 가용성 과발현을 허용하였다.

[0444] 재조합 변형된 BoNT를 이. 콜라이 용해물로부터 고전적인 크로마토그래피 기술을 사용하여 정제하였다. 양이온-교환 수지를 사용한 초기 정제 단계를 사용한 후, 소수성 상호작용 수지를 사용한 중간 정제 단계를 사용하였다. 그 후, 재조합 변형된 BoNT 단일쇄를 단백질분해에 의해 절단하여, 활성화된 이중쇄 변형된 BoNT를 생성하였다. 그 후, 최종 정제 단계를 사용하여 남아있는 오염물질을 제거하였다. 적합한 기술은 WO2015/166242, WO2017055274A1, EP2524963B1, EP2677029B1 및 US10087432B2에 교시되어 있다.

[0445] 실시예 2

[0446] 정제된 변형된 BoNT/A의 특징화

[0447] 상기 실시예 1에 기재된 변형된 BoNT를 하기와 같이 실험적으로 특징화하였다.

[0448] pI의 측정은 변형된 BoNT가 비변형된 (천연) BoNT/A1보다 더 큰 등전점을 갖는다는 것을 보여주었다 (도 2 및 하기 표 2 참조).

BoNT/A1 분자	**pI (계산치)**	**pI (관찰치)**
변형된, "Cat-A" [Cat5v2(K1064H/N886K] (SEQ ID NO: 4)	6.9	~8.0
변형된, "Cat-B" [Cat5v2(K1064/N954K)] (SEQ ID NO: 6)	6.9	~8.0
변형된, "Cat-C" [Cat5v2(K1064H/N1025K)] (SEQ ID NO: 8)	6.9	7.8-8.0
천연 BoNT/A1 [rBoNT/A1] (SEQ ID NO: 2)	6.05	~7.4

[0449]

[0450] 표 2. 변형된 BoNT/A pI 값.

[0451] 뉴런에 진입하고 SNAP-25 (BoNT/A1의 표적)를 절단하는 변형된 BoNT의 능력을 래트 배아 척수 뉴런 (eSCN)을 사용하여 평가하였다. 도 3은 변형된 BoNT가 천연 BoNT/A1과 뉴런에 진입하고 SNAP-25를 절단하는 동일한 능력을 보유하였음을 보여준다.

[0452] 변형된 BoNT의 효력을 마우스 격막 신경 반횡격막 검정 (mPNHD)을 사용하여 추가로 평가하였다. 도 4는 변형된 BoNT가 천연 BoNT/A1과 마우스 반횡격막의 수축성 능력을 억제하는 동일한 능력을 보유하였음을 보여준다.

[0453] 생체내 마우스 발가락 외전 스코어 (DAS) 검정을 사용하여 천연 BoNT/A1에 비해 안전성 뿐만 아니라 효력을 평가하였다. 두 분자 모두 (Cat-A [서열식별번호: 4] 및 Cat-B [서열식별번호: 6])는 천연 BoNT/A1에 비해 더 높은 안전성 비율을 나타내었고 약간 더 강력하였다. 이들 데이터는 하기 표 3에 제시된다.

[0454]

분자	DAS ED_{50} (pg/마우스)	용량 DAS 4 (pg/마우스)	-10% ΔBW에 대한 용량 (pg/마우스)	안전성 비율
천연 BoNT/A1 (n=5) (SEQ ID NO: 2)	2	10-20	9.9-14.5	7
변형된, "Cat-A" (SEQ ID NO: 4)	1.16	10-20	27.4	24
변형된, "Cat-B" (SEQ ID NO: 6)	1.79	25	47.6	27

[0455] 표 3. DAS 검정 및 안전성 비율.

[0456] - DAS ED_{50}: DAS 2를 유도하는 계산된 용량

[0457] - 용량 DAS 4: DAS 4를 유도하는 실험적 용량

[0458] - BW: 체중

[0459] - -10% ΔBW에 대한 용량: D0에서의 BW와 비교하여 BW에서 10% 감소를 유도하는 계산된 용량

[0460] - 안전성 비율: -10% ΔBW에 대한 용량 / DAS ED_{50}

[0461] 안전성 비율은 효력 (최대 발가락 외전 스코어 (DAS)의 절반)에 대한 BoNT 치료의 부정적인 효과 (체중 손실)의 척도이다. 이는 -10% 체중 (BW) 및 DAS ED_{50} 사이의 비율로서 계산되며, 여기서 -10%BW는 체중의 10% 감소에 필요한 BoNT의 양 (pg/동물)을 지칭하고, ED_{50}은 DAS 2를 생성하는 BoNT의 양 (pg/동물)을 지칭한다.

[0462] DAS 검정을 젤라틴 포스페이트 완충제에서 제형화된 20 μl의 변형된 BoNT/A의 마우스 비복근/가자미근 복합체로의 주사에 의해 수행한 후, 문헌 [Aoki (Aoki KR, Toxicon 39: 1815-1820; 2001)]에 이전에 보고된 바와 같이 발가락 외전을 평가한다.

[0463] 실시예 3

[0464] BoNT/AB 키메라의 클로닝, 발현 및 정제

[0465] BoNT/AB 키메라 구축물 1, 2, 3A, 3B 및 3C (각각 서열식별번호: 11 내지 15)를, 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 모체 혈청형 분자 및 적절한 올리고뉴클레오티드를 코딩하는 DNA로부터 구축하였다. 그 후, 이들을 C-말단 His_{10}-태그가 있거나 없는 pJ401 발현 벡터로 클로닝하고, 과발현을 위해 BLR (DE3) 이. 콜라이 세포로 형질전환하였다. 이들 세포를 적절한 항생제로 보충된 1 L 변형된 테리픽 브로쓰(Terrific Broth) (mTB)를 함유하는 2 L 배플형 코니칼 플라스크에서 37℃에서 및 225 RPM 진탕하여 성장시켰다. A_{600}이 >0.5에 도달하면, 인큐

베이터 온도를 16℃로 감소시키고, 이어서 1 mM IPTG로 유도하고 1시간 후에 20시간 동안 225 RPM 진탕하여 재조합 BoNT/AB 구축물을 발현시켰다.

[0466] 수확된 세포를 초음파처리에 의해 용해시키고, 4℃에서 1시간 동안 4500 RPM에서 원심분리에 의해 청징화하였다. 그 후, 재조합 BoNT/AB 키메라 분자를 황산암모늄에서 추출하고, 표준 고속 단백질 액체 크로마토그래피 (FPLC) 기술에 의해 정제하였다. 이는 포획을 위한 소수성 상호작용 수지 및 중간 정제 단계를 위한 음이온-교환 수지를 사용하는 것을 수반하였다. 그 후, 부분적으로 정제된 분자를 엔도프로테이나제 Lys-C로 단백질분해적으로 절단하여 활성 이중쇄를 수득하였다. 이를 제2 소수성 상호작용 수지로 추가로 정제하여 최종 BoNT/AB 키메라를 수득하였다.

[0467] 데카히스타딘 태그 (H_{10})를 갖는 BoNT/AB 키메라 분자 (키메라 1, 2, 3A)의 경우, 포획 단계는 소수성 상호작용 수지 대신에 고정화된 니켈 수지의 사용을 이용하였다.

[0468] 각 키메라의 서열은 표 4에 제시된다.

[0469]

분자	SEQ ID NO	서열
키메라 1	11	A1:1-871 + B1:858-1291 (E1191M/S1199Y) + His_{10}-태그
키메라 2	12	A1:1-874 + ELGGGGSEL + B1:858-1291 (E1191M/S1199Y) + His_{10}-태그
키메라 3A	13	A1:1-872 + B1: 860-1291 (E1191M/S1199Y) + His_{10}-태그
키메라 3B	14	A1:1-872 + B1: 860-1291 (E1191M/S1199Y)
키메라 3C	15	A1:1-872 + B1: 860-1291

[0470] 표 4 - 키메라 BoNT/AB 구축물

[0471] 실시예 4

[0472] BoNT/AB 키메라 1, 2 및 3A의 비교

[0473] C-말단 His_{10} 태그 및 E1191M/S1199Y 이중 돌연변이를 갖는 BoNT/AB 키메라 1, 2 및 3A를 실시예 3에 기재된 바와 같이 정제하고 (도 5), 기능적 활성에 대해 시험하였다.

[0474] 래트 척수 뉴런 SNAP-25 절단 검정

[0475] 래트 척수 뉴런 (SCN)의 1차 배양물을 96 웰 조직 배양 플레이트에서 제조하고 3주 동안 성장시켰다 (문헌 [Masuyer et al., 2011, J. Struct. Biol. Structure and activity of a functional derivative of Clostridium botulinum neurotoxin B]; 및 [Chaddock et al., 2002, Protein Expr. Purif. Expression and purification of catalytically active, non-toxic endopeptidase derivatives of Clostridium botulinum toxin type A]에 기재된 바와 같음). BoNT/AB의 연속 희석물을 SCN 공급 배지에서 제조하였다. 처리될 웰로부터의 성장 배지를 수집하고 여과하였다 (0.2 μm 필터). 125 μL의 여과된 배지를 각각의 시험 웰에 다시 첨가하였다. 그 후, 125 μL의 희석된 독소를 플레이트 (삼중 웰)에 첨가하였다. 처리된 세포를 24 ± 1시간 동안, 37℃, 10% CO_2에서 인큐베이션하였다.

[0476] SNAP-25 절단 검정을 사용한 BoNT 활성의 분석

[0477] 처리 후에, BoNT를 제거하고, 세포를 PBS (깁코(Gibco), 영국)에서 1회 세척하였다. 세포를 0.1 M 디티오트레이톨 (DTT) 및 250 단위/mL 벤조나제 (시그마)로 보충된 1x NuPAGE 용해 완충제 (라이프 테크놀로지스(Life Technologies))에 용해시켰다. 용해물 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 막을 비절단된 SNAP-25 뿐만 아니라 BoNT/A 엔도펩티다제에 의해 절단된 SNAP-25를 인식하는 SNAP-25에 특이적인 1차 항체 (시그마 #S9684)로 프로빙하였다. 사용된 2차 항체는 HRP-접합된 항-토끼 IgG (시그마 #A6154)였다. 밴드를 향상된 화학발광에 의해 검출하고, pXi6 액세스 (시놉틱스(Synoptics), 영국)를 사용하여 영상화하였다. 밴드의 강도를 진툴스(GeneTools) 소프트웨어 (신젠(Syngene), 영국 캠브리지) 및 계산된 BoNT의 각 농도에서 절단된 SNAP-25의 백분율을 사용하여 결정하였다. 데이터를 4-파라미터 로지스틱 방정식 및 그래프패드

프리즘 버전 6 (그래프패드(GraphPad))을 사용하여 계산된 pEC_{50}에 피팅하였다.

[0478] 하기 표 5는 래트 SCN SNAP-25 절단 검정에서 키메라 1, 2 및 3A에 대해 결정된 pEC_{50} 값을 제공한다. 이들 결과는 3개의 BoNT/AB 키메라가 래트 척수 뉴런에 진입하고 이들의 표적 기질을 절단하는 능력을 보유하였다는 것을 나타낸다. 그러나, 키메라 3A는 이러한 검정에서 키메라 1 및 2보다 더 강력하였다 (또한 도 6 참조).

[0479]

	pEC_{50} ±SEM
키메라 1	12.42 ±0.04
키메라 2	12.57 ±0.01
키메라 3A	12.89 ±0.04

[0480] 표 5. pEC_{50} 값.

[0481] 발가락 외전 스코어링 (DAS) 검정

[0482] DAS 검정에서 BoNT/AB 키메라 1, 2 및 3A의 활성을 측정하는 방법은, 꼬리로 잠시 매달릴 때, 마우스의 놀람 반응 발가락 펴짐 반사에 기초한다. 이러한 반사는 발가락 외전 스코어 (DAS)로서 스코어링되고, 뒷발의 비복근-가자미근 근육 내로 BoNT의 투여 후에 억제된다. 마우스는 동물이 그의 뒷다리를 연장하고 그의 뒷발가락을 외전하는 특징적인 놀람 반응을 유발하도록 꼬리로 잠시 매달린다. (Aoki et al. 1999, Eur. J. Neurol.; 6 (suppl. 4) S3-S10).

[0483] 주사 당일에, 마우스를 산소 중 이소플루란 3%를 수용하는 유도 챔버에서 마취시켰다. 각각의 마우스는 오른쪽 뒷발의 비복근-가자미근 근육에 BoNT/AB 키메라 또는 비히클 (0.2% 젤라틴을 함유하는 포스페이트 완충제)의 근육내 주사를 받았다.

[0484] 신경독소 주사 후에, 발가락 외전의 다양한 정도를 0 내지 4의 스케일로 스코어링하였으며, 여기서 0= 정상 및 4= 발가락 외전 및 다리 연장의 최대 감소. ED50을 각 용량에서의 최대 효과의 평균을 사용하여 비선형 조정 분석에 의해 결정하였다. 사용된 수학적 모델은 4 파라미터 로지스틱 모델이었다.

[0485] DAS를 투여 후에 제1일 동안 2시간마다 수행하였으며; 그 후에 이를 4일 동안 하루에 3회 수행하였다.

[0486] 도 7은 키메라 1, 2 및 3A (각각 서열식별번호: 11, 12 및 13)에 대한 피팅된 곡선을 보여준다. 키메라 3A 곡선은 왼쪽으로 이동하며, 이는 더 낮은 용량의 키메라 3A가 키메라 1 및 2와 비교하여 유사한 DAS 반응을 달성하였다는 것을 의미하며, 따라서 키메라 3A는 마우스 DAS 검정에서 다른 것보다 더 강력하다는 것을 나타내며; 또한 각 키메라에 대하여 계산된 ED50 및 DAS 4 (최고 스코어)로 이어지는 용량에 대한 값을 제공하는 하기 표 (표 6)를 참조한다.

[0487] 하기 표 6은 마우스 DAS 검정에서 비변형된 재조합 BoNT/A1 (rBoNT/A1 - 서열식별번호: 2) 및 키메라 1, 2 및 3A에 대해 결정된 ED_{50} 및 DAS 4 용량을 제공한다. 이들 결과는, 3개의 키메라 중에서, 키메라 3A가 근육 약화를 유도하는데 있어서 최고 생체내 효력을 갖는다는 것을 나타낸다. 도 7 및 표 6에 나타낸 연구는 찰스 리버 래보러토리즈(Charles River laboratories)로부터 수득된 마우스에서 수행하였다.

[0488]

	ED_{50} (pg/마우스)	DAS 4 용량 (pg/마우스)
rBoNT/A1	1	5
키메라 1	23	200
키메라 2	89	>300
키메라 3A	18	133

[0489] 표 6. ED_{50} 값.

[0490] 실시예 5

[0491] BoNT/AB 키메라 3B, 3C 및 비변형된 BoNT/A1의 비교

[0492] 태그부착되지 않은 BoNT/AB 키메라 3B 및 3C (서열식별번호: 14 및 15)를 각각 E1191M/S1199Y 이중 돌연변이의 존재 및 부재 하에 실시예 3에 기재된 바와 같이 정제하고 (도 8), 참조로서 비변형된 BoNT/A (서열식별번호: 2)를 사용하여 기능적 활성에 대해 시험하였다.

[0493] 인간 만능 줄기 세포 SNAP-25 절단 검정

[0494] 동결보존된 PERI.4U-세포를 악시오제네시스 (독일 쾰른)로부터 구입하였다. 세포의 해동 및 플레이팅을 제조업체에 의해 권장된 바와 같이 수행하였다. 간단히 말해서, 세포를 함유하는 크리오바이알을 2분 동안 37℃에서 수조에서 해동시켰다. 완만한 재현탁 후에 세포를 50 mL 튜브로 옮겼다. 크리오바이알을 제조업체에 의해 공급된 Peri.4U® 해동 배지 1 mL로 세척하고, 배지를 세포 현탁액에 적가하여 50 mL 튜브로 옮긴 후, 추가의 Peri.4U® 해동 배지 2 mL를 50 mL 튜브에 적가하였다. 그 후, 세포를 혈구계를 사용하여 카운팅하였다. 그 후, 추가의 Peri.4U® 해동 배지 6 mL를 세포 현탁액에 첨가하였다. 세포 펠릿을 실온에서 6분 동안 260 xg (예를 들어, 1,100 RPM)으로 원심분리에 의해 수득하였다. 그 후, 세포를 제조업체에 의해 공급된 완전 Peri.4U® 배양 배지에 재현탁하였다. 세포를 폴리-L-오르니틴 및 라미닌으로 코팅된 세포 배양 플레이트 상에 ㎠당 50,000 내지 150,000개 세포의 밀도로 플레이팅하였다. 세포를 가습 CO_2 분위기 하에 37℃에서 배양하고, 배지를 배양 동안 2-3일마다 완전히 교체하였다.

[0495] 독소 처리를 위해, BoNT의 연속 희석물을 Peri.4U® 배양 배지에서 제조하였다. 처리될 웰로부터의 배지를 수집하고 여과하였다 (0.2 μm 필터). 125 μL의 여과된 배지를 각각의 시험 웰에 다시 첨가하였다. 그 후, 125 μL의 희석된 독소를 플레이트 (삼중 웰)에 첨가하였다. 처리된 세포를 48 ± 1시간 동안, 37℃, 10% CO_2에서 인큐베이션하였다.

[0496] SNAP-25 절단 검정을 사용한 BoNT 활성의 분석

[0497] 처리 후에, BoNT를 제거하고, 세포를 PBS (깁코, 영국)에서 1회 세척하였다. 세포를 0.1 M 디티오트레이톨 (DTT) 및 250 단위/mL 벤조나제 (시그마)로 보충된 1x NuPAGE 용해 완충제 (라이프 테크놀로지스)에 용해시켰다. 용해물 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 막을 비절단된 SNAP-25 뿐만 아니라 BoNT/A 엔도펩티다제에 의해 절단된 SNAP-25를 인식하는 SNAP-25에 특이적인 1차 항체 (시그마 #S9684)로 프로빙하였다. 사용된 2차 항체는 HRP-접합된 항-토끼 IgG (시그마 #A6154)였다. 밴드를 향상된 화학발광에 의해 검출하고, pXi6 액세스 (시놉틱스, 영국)를 사용하여 영상화하였다. 밴드의 강도를 진툴스 소프트웨어 (신젠, 영국 캠브리지) 및 계산된 BoNT의 각 농도에서 절단된 SNAP-25의 백분율을 사용하여 결정하였다. 데이터를 4-파라미터 로지스틱 방정식 및 그래프패드 프리즘 버전 6 (그래프패드)을 사용하여 계산된 pEC_{50}에 피팅하였다.

[0498] 도 9는 키메라 3B 및 3C가 유도된 인간 만능 줄기 세포에서 SNAP-25를 절단하는데 있어서 rBoNT/A1보다 더 큰 효력을 나타내었지만 전자가 상당히 더 그렇다는 것을 나타낸다. 이는 이들 세포에 존재하는 인간 시냅토태그민 II 단백질 수용체에 대한 키메라 3B의 친화성을 증가시키는 이중 돌연변이에 의해 설명될 수 있다 (도 9, 표 7).

[0499]

	pEC_{50} ±SEM
rBoNT/A1	10.21 ±0.05
키메라 3B	12.38 ±0.06
키메라 3C	10.72 ±0.08

[0500] 표 7. pEC_{50} 값.

[0501] 발가락 외전 스코어링 (DAS) 검정 - 안전성 비율

[0502] DAS 검정에서 BoNT의 활성을 측정하는 방법은, 꼬리로 잠시 매달릴 때, 마우스의 놀람 반응 발가락 펴짐 반사에 기초한다. 이러한 반사는 발가락 외전 스코어 (DAS)로서 스코어링되고, 뒷발의 비복근-가자미근 근육 내로 BoNT의 투여 후에 억제된다. 마우스는 동물이 그의 뒷다리를 연장하고 그의 뒷발가락을 외전하는 특징적인 놀람 반응을 유발하도록 꼬리로 잠시 매달린다. (Aoki et al. 1999, Eur. J. Neurol.; 6 (suppl. 4) S3-S10).

[0503] 주사 당일에, 마우스를 산소 중 이소플루란 3%를 수용하는 유도 챔버에서 마취시켰다. 각각의 마우스는 오른쪽 뒷발의 비복근-가자미근 근육에 BoNT 또는 비히클 (0.2% 젤라틴을 함유하는 포스페이트 완충제)의 근육내 주사를 받았다.

[0504] 신경독소 주사 후에, 발가락 외전의 다양한 정도를 0 내지 4의 스케일로 스코어링하였으며, 여기서 0= 정상 및 4= 발가락 외전 및 다리 연장의 최대 감소. ED50을 각 용량에서의 최대 효과의 평균을 사용하여 비선형 조정 분석에 의해 결정하였다. 사용된 수학적 모델은 4 파라미터 로지스틱 모델이었다.

[0505] DAS를 투여 후에 제1일 동안 2시간마다 수행하였으며; 그 후에 이를 모든 용량에 대해 4일 동안 하루에 3회 수행하였다. 그후에 비히클 및 주사의 처음 4일 동안 4의 DAS를 유도한 최저 용량으로 주사된 그룹의 동물을 0의 DAS (근육 약화 관찰되지 않음)로의 근육 약화의 회복이 완료될 때까지 모니터링하였다.

[0506] 안전성 비율의 계산을 위해 모든 동물을 독소 주사 전날 (D0) 및 그후에 연구의 지속기간 전반에 걸쳐 매일 1회 칭량하였다. 평균 체중, 그의 표준 편차, 및 표준 오차 평균을 각 용량-그룹에 대해 매일 계산하였다. BoNT에 대한 안전성 비율 ($-10\% \Delta BW/ED_{50}$)를 수득하기 위해, 연구 동안 임의의 시간에서 용량-그룹의 평균 체중이 동일한 용량-그룹의 D0에서 평균 체중의 10% 미만이었던 용량을 연구된 BoNT에 대한 ED_{50}으로 나누었다. 치사 용량은 해당 용량-그룹 내의 하나 이상의 동물이 사망한 용량으로 정의하였다.

[0507] 도 10은 비변형된 BoNT/A, 키메라 3B 및 키메라 3C (서열식별번호: 2, 14 및 15)에 대한 마우스 발가락 외전 스코어링 검정에서의 시간 경과에 따른 근육 약화의 지속기간을 나타내며, 이는 키메라가 더 긴 작용 지속기간을 갖는다는 것을 나타낸다.

[0508] 하기 표 8은 마우스 DAS 검정에서 rBoNT/A1 및 키메라 3B 및 3C에 대해 결정된 ED_{50} 및 DAS 4 용량을 제공한다. 표는 또한 0의 DAS (근육 약화 관찰되지 않음)로의 근육 약화의 회복이 완료될 때까지 DAS 4 용량에 대한 총 작용 지속기간을 제공한다. 또한, 표는 상기 텍스트에 정의된 바와 같은, 마우스 치사 용량 및 안전성 비율 ($-10\% \Delta BW/ED_{50}$)을 나타낸다. rBoNT/A1과 비교하여, 키메라 3B 및 3C는 더 긴 작용 지속기간, 더 우수한 안전성 비율, 및 더 높은 치사 용량을 갖는다. 도 10 및 표 8에 표시된 연구는 장비에 래보러토리즈(Janvier laboratories)로부터 수득된 마우스에서 수행하였다.

[0509]

	ED_{50} (DAS 2) 용량 (pg/마우스)	DAS 4 용량 (pg/마우스)	최저 DAS 4 용량으로의 총 작용 지속기간 (일)	마우스 치사 용량 (pg)	안전성 비율 ($-10\% \Delta BW/ED_{50}$)
rBoNT/A1	0.9	2.3	29	18	4.5
키메라 3B	8.0	89	42	200	14.1
키메라 3C	5.0	26	42	8.9	7.4

[0510] 표 8. BoNT/AB 키메라의 DAS 및 안전성 비율.

[0511] 실시예 6

[0512] 변형된 BoNT/A (서열식별번호: 4)의 전임상 시험

[0513] 변형된 BoNT/A "Cat-A" (서열식별번호: 4)는 추가의 전임상 시험을 거쳤다.

[0514] 재료 & 방법

[0515] 래트 발가락 외전 스코어 (DAS) 검정

[0516] 생체내 근육 활성에 대한 변형된 BoNT/A (서열식별번호: 4)의 효과를 평가하기 위해, 용량-반응 연구를 래트 DAS 검정을 사용하여 수행하였다. 래트 DAS 검정은 동물을 잠시 움켜잡을 때 특징적인 놀람 반응인 발가락 펴짐 반사에 기초한다. 왼쪽 비골 근육 복합체에 단일 신경독소 주사 후, 근육 약화는 발가락 외전의 감소를 초래한다. 발가락 외전의 다양한 정도는 5-포인트 스케일로 스코어링된다: 0=정상 내지 4=발가락 외전 및 다리 연장의 최대 감소 (Broide RS, Rubino J, Nicholson GS, et al. The rat Digit Abduction Score (DAS) assay: A physiological model for assessing botulinum neurotoxin-induced skeletal muscle paralysis. Toxicon 2013;71:18-24). 독소 주사 후 처음 연속 5일 동안 및 그 후 2 내지 3일 간격으로 더 낮은 용량에 대한 발가락 펴짐 반사에 대한 변형된 BoNT/A (서열식별번호: 4)의 효과가 완전히 사라질 때까지 및 DAS4를 초래하는 용량에

대해 DAS2로 회복될 때까지 DAS 값을 측정하였다. 체중 증가에 대한 일시적인 BoNT-유도된 용량-의존적 효과는 일반화된 독소 효과의 증거로 간주된다 (Torii Y, Goto Y, Nakahira S, et al. Comparison of Systemic Toxicity between Botulinum Toxin Subtypes A1 and A2 in Mice and Rats. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2015;116:524-528.). 결과적으로 각 평가 시점에서 래트를 칭량하고 부작용을 기록하였다. BoNT의 투여 용액을 주사 전 및 연구가 종료될 때까지 마스킹하였다 (무작위 글자 할당). 효과의 50%를 유도하는데 필요한 용량으로 효력을 결정하였다 (ED_{50}: 2의 DAS 값을 유발하는 용량). ED_{50} 및 95% 신뢰 구간 (CI)을 결정하기 위해, 2.5 내지 750 pg/kg 범위의 용량을 시험하였다. 가능한 부작용을 평가하기 위해 1, 1.5, 2, 2.4, 3, 4 및 5 ng/kg의 더 높은 용량을 또한 투여하였다.

[0517] 변형된 BoNT/A (서열식별번호: 4)의 작용 지속기간을 평가하고 이를 비변형된 BoNT/A (서열식별번호: 2)의 작용 지속기간과 비교하기 위해, 2개의 독립적인 직접 일대일 연구에서 독소 둘 다에 대한 최고 허용 용량 (미처리 래트와 비교하여 체중 진전에 영향 없음)에 대해 2의 DAS2 판독값으로 복귀하는데 필요한 중앙값 시간을 평가하였다.

[0518] 래트 단일 용량 연구

[0519] 래트는 오른쪽 비복근 근육에 투여된 0, 0.1, 1 및 3 ng/kg의 용량으로 변형된 BoNT/A (서열식별번호: 4)의 단일 근육내 (i.m.) 주사를 받았다. 대조군 동물은 오른쪽 비복근에 서열식별번호: 4 희석제를 받았다. 처리 7일 후 (그룹당 수컷 10마리 및 암컷 10마리) 또는 13주 또는 26주의 관찰 기간 후 (용량당 수컷 5마리 및 암컷 5마리) 동물을 안락사시켰다. 중추 신경계 기능의 평가를 위한 어윈(Irwin) 시험 관찰을 시험전 (-1일차), 8일차에 및 13주차 및 27주차 동안 수행하였다. 평가된 다른 임상 (유해) 징후는 절뚝거림, 작은 독소 주사된 근육 크기 및 무른 팽창된 복부였다.

[0520] 원숭이 연구

[0521] 원숭이는 오른쪽 비복근 근육에 투여된 0, 0.1, 0.25 및 0.75 ng/kg 변형된 BoNT/A (서열식별번호: 4)의 단일 i.m. 용량을 받았다. 처리 7일 후 (그룹당 수컷 3마리 및 암컷 3마리) 또는 13주 또는 26주의 관찰 기간 후 (용량당 수컷 2마리 및 암컷 2마리) 동물을 안락사시켰다. 혈역학, 심전도 및 호흡 파라미터를 포함한 심혈관 검사를 시험전, 8일차 및 15일차에 외부 원격측정에 의해 수행하였다.

[0522] 임신한 래트에서 예비 향상된 EFD

[0523] 연구의 목적은 기관형성 기간 전반에 걸쳐 i.m. 경로에 의해 투여될 때 래트의 배아 및 태아 발달에 대한 변형된 BoNT/A (서열식별번호: 4)의 효과에 대한 초기 정보를 제공하는 것이었다. 변형된 BoNT/A (서열식별번호: 4)를 임신 6일차 (G6)부터 17일차 (G17)까지 9마리의 교미된 암컷 스프라그-돌리 래트의 그룹에 0.02, 0.05 및 0.1 ng/kg/일의 용량 수준으로 매일 i.m. 주사 (비복근)에 의해 투여하였다. 임상 상태, 체중 및 음식 소비를 연구 전반에 걸쳐 모니터링하였다. 암컷을 G21에 제왕절개 검사에 적용하였고, 한배새끼 파라미터를 기록하였다. 부검시 암컷을 육안으로 검사하고, 임신 자궁을 칭량하고, 작은 주사된 비복근 근육을 제시한 래트의 경우, 이 근육 및 반대측성 근육을 칭량하였다. 모든 태아를 칭량하였다. 그 후, 태아를 외부 및 내장 이상에 대해 검사하고 성별을 구분하였다. 내부 검사를 위해 대략 절반의 태아의 머리를 연속 섹셔닝에 의해 고정하였다. 모든 태아의 내장제거된 사체를 골격 검사를 위해 프로세싱하였다.

[0524] 임신한 토끼에서 예비 연장된 EFD

[0525] 연구의 목적은 기관형성 기간 전반에 걸쳐 i.m. 경로에 의해 투여될 때 토끼의 배아 및 태아 발달에 대한 변형된 BoNT/A (서열식별번호: 4)의 효과에 대한 초기 정보를 제공하는 것이었다. 변형된 BoNT/A (서열식별번호: 4)를 임신 6일차 (G6)부터 19일차 (G19)까지 9마리의 교미된 암컷 뉴질랜드 백색 토끼의 그룹에 0.002, 0.005 및 0.01 ng/kg/일의 용량 수준으로 매일 i.m. 주사 (비복근)에 의해 투여하였다. 임상 상태, 체중 및 음식 소비를 연구 전반에 걸쳐 모니터링하였다. 암컷을 G29에 제왕절개 검사에 적용하였고, 한배새끼 파라미터를 기록하였다. 부검시 암컷을 육안으로 검사하고, 임신 자궁을 칭량하고, 작은 주사된 비복근 근육을 제시한 래트의 경우, 이 근육 및 반대측성 근육을 칭량하였다. 모든 태아를 칭량하였다. 그 후, 태아를 외부 및 내장 이상에 대해 검사하고 성별을 구분하였다. 내부 검사를 위해 대략 절반의 태아의 머리를 연속 섹셔닝에 의해 고정하였다.

[0526] 결과

[0527] 상기 표시된 바와 같은 연구를 수행함으로써, 변형된 BoNT/A가 투여된 다수의 상이한 종에 대해 하기 약리학적

데이터 (하기 표 9에 표시됨)를 수득하였다.

[0528]

동물	연구 유형	결과
마우스	LD50 IP	0.422 ng/kg
래트	DAS	ED50 0.013 ng/kg DAS4 0.125 pg/kg
	CMAP 단일 용량 원위 퍼짐	0.002 ng/kg: 퍼짐 없음 0.3 ng/kg: -25% 0.8 ng/kg: -56%
	단일 용량	추정된 NOAEL 1.5 ng/kg 추정된 치사 3 ng/kg

[0529] 표 9. 전임상 결과.

[0530] 추가적으로, 변형된 BoNT/A (서열식별번호: 4)를 디스포트®와 비교할 때 작용 지속기간을 결정하기 위해 래트 DAS 검정에서 시험하였다. 결과는 하기 표 10에 제시된다:

[0531]

	디스포트® 3 U/래트 15 U/kg	변형된 BoNT/A 150 pg/래트 0.750 ng/kg
작용 지속기간 (중앙값 일)	21.9	46.4

[0532] 표 10. 작용 지속기간.

[0533] 이들 데이터는 변형된 BoNT/A가 디스포트®보다 2배 이상의 작용 지속기간을 가지고 있음을 보여준다.

[0534] 실시예 7

[0535] 얼굴 주름을 치료하기 위한 변형된 BoNT/A (서열식별번호: 4)의 단위 용량의 계산

[0536] 상기 실시예 6에서 수득된 전임상 약리학 데이터의 관점에서, 인간에서 변형된 BoNT/A의 투여에 적합한 단위 용량 범위 (UD)를 계산하였다. 연구는 변형된 BoNT/A가 비변형된 BoNT/A보다 더 긴 작용 지속기간을 제공하는 동시에 개선된 안전성 프로파일을 나타냄을 나타낸다. 이러한 개선된 안전성 프로파일은 변형된 BoNT/A에 대해 본원에 기재된 높은 안전성 비율로 표현될 수 있다.

[0537] 변형된 BoNT/A는 디스포트®와 동일한 작용 메커니즘을 공유하기 때문에 (그의 변형된 특성으로 인해 증가된 치료 지수 (즉, 증가된 안전성 비율)를 가짐에도 불구하고), 얼굴 주름을 갖는 대상체를 치료하기 위한 변형된 BoNT/A의 최저 용량은 동일한 근육 그룹에서 디스포트®의 표지된 용량에 비해 맥락에 따라 배치되었다:

[0538] · 발가락 외전 스코어 래트 모델에서, 임상 사용으로 의도된 배치로 생성된 변형된 BoNT/A의 ED_{50}은 13 pg/kg이고, 동일한 동물 종에서 1500 pg/kg의 추정된 유해 효과가 관찰되지 않는 수준 (NOAEL)보다 100배 이상 더 낮다. 상응하는 알로메트릭 인자의 적용 후, 이러한 ED50은 130 pg의 인간 등가 용량 (HED)으로 번역될 수 있다. DAS 래트 결과에 기초하여, 100 pg의 변형된 BoNT/AB는 대략 4 U의 시판되는 아잘루어(Azzalure)/디스포트의 용량으로 추정될 것이다. 아잘루어/디스포트에 대해 확립된 DAS 래트 ED50 (즉, 0.5 U/kg의 ED50)을 사용하여 시작 용량의 계산에 동일한 접근법이 적용되는 경우, 이는 중등도 내지 중증 GL의 일시적 개선을 위한 50 U의 총 등록된 용량 중 1/10인 5 U의 총 시작 용량과 동일할 것이다.

[0539] · 복강내 마우스 LD_{50}은 0.422 ng/kg (8.44 pg/동물)에서 확립되었다. 이들 조건 하에, 0.84 ng의 변형된 BoNT/A의 용량은 100 U 디스포트®의 용량에 상응한다.

[0540] 그러므로, 계산된 최저 시작 총 용량은 100 pg이다. 일부 맥락을 제공하고 상기 복강내 마우스 LD_{50} 데이터를 사용하기 위해, 100 pg 변형된 BoNT/A는 대략 12 U 디스포트®에 해당하며, 그러므로 얼굴 주름의 치료를 위해 근육내로 투여될 때 활성일 것이다.

[0541] 그러므로, 단위 용량의 상한은 300 pg (0.3 ng)으로 계산되고, 대상체에게 투여되는 총 용량은 4800 pg인데, 이는 이것이 인간 용량으로 번역된 래트 NOAEL 미만으로 유지되기 때문이다.

[0542] 그러므로, 변형된 BoNT/A를 사용하여 얼굴 주름의 치료를 위한 적합한 단위 용량은 20-300 pg에서 계산되었다. 수득된 전임상 데이터에 기초하여, 이것은 마우스 복강내 치사 용량 검정 사용하여 결정된 바와 같이 마우스에

서 계산된 중앙값 치사 복강내 용량 (LD_{50})에 기초하여 2-35 단위의 변형된 BoNT/A이다.

[0543] 유리하게, 변형된 BoNT/A는 최대 용량에 도달하기 전에 얼굴 주름의 치료에서 더 많은 수의 근육에 주사될 수 있다. 이는 유의하고 유리한 발견이며, 이는 임상의에게 더 넓은 범위의 치료 옵션을 제공하면서 상부 얼굴 주름의 개선된 치료로 이어진다.

[0544] 실시예 8

[0545] 미간 주름 치료를 위한 투여량 레지멘

[0546] 변형된 BoNT/A는 바이알당 15 ng의 변형된 BoNT/A를 함유하는 2mL 투명 유리 바이알에 동결건조된 분말로 제공된다. 동결건조된 분말을 멸균 염화나트륨 0.9% v/w 보존제 비함유 용액 및 희석제 (변형된 BoNT/A의 부형제만을 함유하는 제형 완충제)의 혼합물로 재구성한다. 재구성 후, 필요에 따라 용액을 추가로 희석한다.

[0547] 중등도 내지 중증 미간 주름을 도 11에 표시된 주사 레지멘에 따라 치료한다.

[0548] 단위 용량은 20-300 pg (2-35 단위)이다.

[0549] 근육내 주사를 단위 용량에 따라 최대 5개 부위에 투여한다. 투여된 최대 총 투여량은 1500 pg (177 단위)이다.

[0550] 실시예 9

[0551] 미간 주름 및 이마 주름 치료를 위한 투여량 레지멘

[0552] 변형된 BoNT/A는 바이알당 15 ng의 변형된 BoNT/A를 함유하는 2mL 투명 유리 바이알에 동결건조된 분말로 제공된다. 동결건조된 분말을 멸균 염화나트륨 0.9% v/w 보존제 비함유 용액 및 희석제 (변형된 BoNT/A의 부형제만을 함유하는 제형 완충제)의 혼합물로 재구성한다. 재구성 후, 필요에 따라 용액을 추가로 희석한다.

[0553] 중등도 내지 중증 미간 및 이마 주름을 도 12에 표시된 주사 레지멘에 따라 치료한다.

[0554] 단위 용량은 20-300 pg (2-35 단위)이다.

[0555] 근육내 주사를 단위 용량에 따라 최대 10개 부위에 투여한다. 투여된 최대 총 투여량은 3000 pg (355 단위)이다.

[0556] 실시예 10

[0557] 외안각 주름 치료를 위한 투여량 레지멘

[0558] 변형된 BoNT/A는 바이알당 15 ng의 변형된 BoNT/A를 함유하는 2mL 투명 유리 바이알에 동결건조된 분말로 제공된다. 동결건조된 분말을 멸균 염화나트륨 0.9% v/w 보존제 비함유 용액 및 희석제 (변형된 BoNT/A의 부형제만을 함유하는 제형 완충제)의 혼합물로 재구성한다. 재구성 후, 필요에 따라 용액을 추가로 희석한다.

[0559] 중등도 내지 중증 외안각 주름을 도 13에 표시된 주사 레지멘에 따라 치료한다.

[0560] 단위 용량은 20-300 pg (2-35 단위)이다.

[0561] 근육내 주사를 단위 용량에 따라 최대 6개 부위에 투여한다. 투여된 최대 총 투여량은 1800 pg (213 단위)이다.

[0562] 실시예 11

[0563] 미간, 이마 및 외안각 주름 치료를 위한 투여량 레지멘

[0564] 변형된 BoNT/A는 바이알당 15 ng의 변형된 BoNT/A를 함유하는 2mL 투명 유리 바이알에 동결건조된 분말로 제공된다. 동결건조된 분말을 멸균 염화나트륨 0.9% v/w 보존제 비함유 용액 및 희석제 (변형된 BoNT/A의 부형제만을 함유하는 제형 완충제)의 혼합물로 재구성한다. 재구성 후, 필요에 따라 용액을 추가로 희석한다.

[0565] 중등도 내지 중증 미간, 이마 및 외안각 주름을 도 14에 표시된 주사 레지멘에 따라 치료한다.

[0566] 단위 용량은 20-300 pg (2-35 단위)이다.

[0567] 근육내 주사를 단위 용량에 따라 최대 16개 부위에 투여한다. 투여된 최대 총 투여량은 4800 pg (569 단위)이다.

[0568] 실시예 12

[0569] 변형된 BoNT/A (서열식별번호: 14)의 추가 특징화

[0570] BoNT/AB 키메라 서열식별번호: 14를 마우스 LD_{50} 검정에서 시험하여 1.202 ng/kg의 결과를 산출하였다. 따라서 서열식별번호: 14의 1 단위는 이러한 검정에서 24.04 pg에 상응한다.

[0571] 추가적으로, 상기 BoNT/AB 키메라를 디스포트®와 비교할 때 작용 지속기간을 결정하기 위해 래트 DAS 검정 (실시예 6에 따라)에서 시험하였다. 결과는 하기 표 13에 제시된다:

[0572]

	디스포트® 3 U/래트 15 U/kg	BoNT/AB 300 pg/래트 1.5 ng/kg
작용 지속기간 (중앙값 일)	21.9	47.7

[0573] 표 13. 작용 지속기간.

[0574] 결론적으로, BoNT/AB의 작용 지속기간은 디스포트®보다 훨씬 더 길었고 서열식별번호: 4의 것과 유사하였다. 그러므로, 서열식별번호: 4에 대한 단위 용량 및 투여량 레지멘이 얼굴 주름의 개선된 치료를 제공하기 위해 BoNT/AB에 유사하게 적용될 수 있을 것으로 예상된다.

[0575] 실시예 13

[0576] 상부 얼굴 주름을 위한 변형된 BoNT/A (서열식별번호: 14)의 단위 용량의 계산

[0577] 전임상 약리학 데이터의 관점에서, 인간에서 변형된 BoNT/A의 투여에 적합한 단위 용량 범위 (UD)를 계산하였다.

[0578] 13 pg/kg의 DAS ED_{50}을 서열식별번호: 14에 대해 계산하였다. ED_{50}은 최소 약리학적 활성 용량으로 간주되며, 이는 동일한 동물 종에서 4 ng/kg의 유해 효과가 관찰되지 않는 수준 (NOAEL)보다 대략 300배 더 낮다. 래트에서 서열식별번호: 14의 13 pg/kg의 ED_{50}은 60 kg 체중의 인간에 대한 0.8 ng 용량에 상응한다.

[0579] 그러므로, 20 pg의 단위 용량의 하한이 선택되었다. 1500 pg의 단위 용량의 상한이 선택되었으며, 이는 60 kg 체중의 경우 인간 용량으로 전환된 두 비임상 안전성 종 (래트 및 원숭이) 모두로부터의 4 ng/kg의 NOAEL보다 더 낮다.

[0580] 개선된 안전성 프로파일의 관점에서, 상부 얼굴 주름 치료를 위한 최대 총 용량은 24,000 pg으로 설정되었으며, 이는 60 kg 체중의 경우 인간 용량으로 전환된 두 비임상 안전성 종 (래트 및 원숭이) 모두로부터의 4 ng/kg의 NOAEL로부터 파생된다.

[0581] 실시예 14

[0582] 변형된 BoNT/A (서열식별번호: 14)를 사용한 미간 주름 치료를 위한 투여량 레지멘

[0583] 변형된 BoNT/A는 바이알당 36 ng의 변형된 BoNT/A를 함유하는 바이알에 동결건조된 분말로 제공된다. 동결건조된 분말을 재구성한다.

[0584] 중등도 내지 중증 미간 주름을 도 11에 표시된 주사 레지멘에 따라 치료한다.

[0585] 단위 용량은 20-1500 pg (0.8-62 단위)이다.

[0586] 근육내 주사를 단위 용량에 따라 최대 5개 부위에 투여한다. 투여된 최대 총 투여량은 7500 pg (312 단위)이다.

[0587] 실시예 15

[0588] 변형된 BoNT/A (서열식별번호: 14)를 사용한 미간 주름 및 이마 주름 치료를 위한 투여량 레지멘

[0589] 변형된 BoNT/A는 바이알당 36 ng의 변형된 BoNT/A를 함유하는 바이알에 동결건조된 분말로 제공된다. 동결건조된 분말을 재구성한다.

[0590] 중등도 내지 중증 미간 및 이마 주름을 도 12에 표시된 주사 레지멘에 따라 치료한다.

[0591] 단위 용량은 20-1500 pg (0.8-62 단위)이다.

[0592] 근육내 주사를 단위 용량에 따라 최대 10개 부위에 투여한다. 투여된 최대 총 투여량은 15,000 pg (624 단위)이다.

[0593] 실시예 16

[0594] 변형된 BoNT/A (서열식별번호: 14)를 사용한 외안각 주름 치료를 위한 투여량 레지멘

[0595] 변형된 BoNT/A는 바이알당 36 ng의 변형된 BoNT/A를 함유하는 바이알에 동결건조된 분말로 제공된다. 동결건조된 분말을 재구성한다.

[0596] 중등도 내지 중증 외안각 주름을 도 13에 표시된 주사 레지멘에 따라 치료한다.

[0597] 단위 용량은 20-1500 pg (0.8-62 단위)이다.

[0598] 근육내 주사를 단위 용량에 따라 최대 6개 부위에 투여한다. 투여된 최대 총 투여량은 9000 pg (374 단위)이다.

[0599] 실시예 17

[0600] 변형된 BoNT/A (서열식별번호: 14)를 사용한 미간, 이마 및 외안각 주름 치료를 위한 투여량 레지멘

[0601] 변형된 BoNT/A는 바이알당 36 ng의 변형된 BoNT/A를 함유하는 바이알에 동결건조된 분말로 제공된다. 동결건조된 분말을 재구성한다.

[0602] 중등도 내지 중증 미간, 이마 및 외안각 주름을 도 14에 표시된 주사 레지멘에 따라 치료한다.

[0603] 단위 용량은 20-1500 pg (0.8-62 단위)이다.

[0604] 근육내 주사를 단위 용량에 따라 최대 16개 부위에 투여한다. 투여된 최대 총 투여량은 24,000 pg (998 단위)이다.

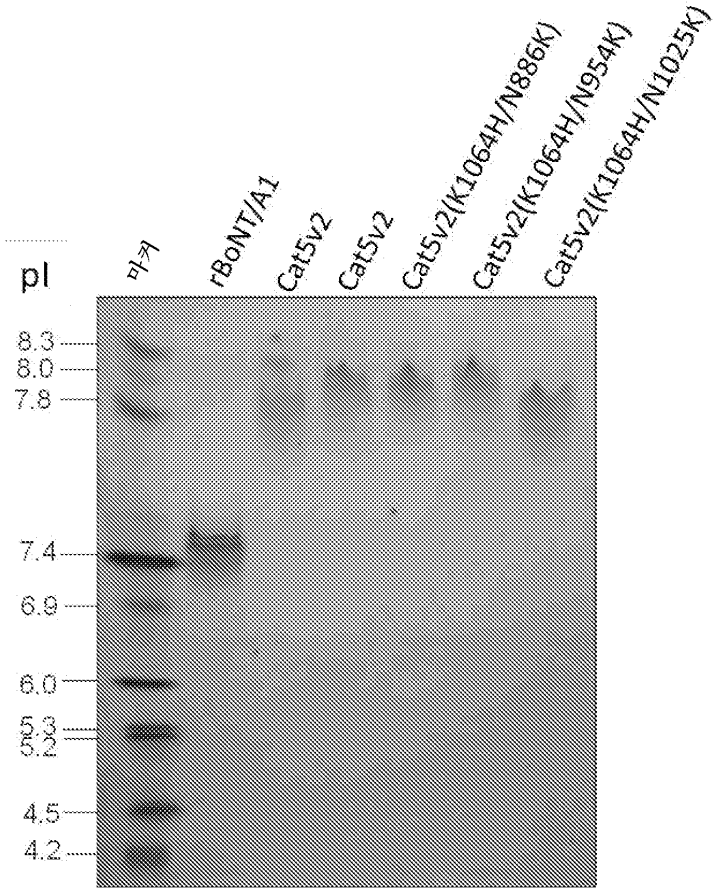
[0605] 상기 명세서에서 언급된 모든 간행물은 본원에 참조로 포함된다. 본 발명의 기재된 방법 및 시스템의 다양한 변형 및 변경은 본 발명의 범주 및 취지를 벗어나지 않고 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 본 발명이 특정 바람직한 실시양태와 관련하여 설명되었지만, 청구된 바와 같은 본 발명이 이러한 특정 실시양태에 과도하게 제한되어서는 안된다는 것을 이해해야 한다. 실제로, 생화학 및 생명공학 또는 관련 분야의 통상의 기술자에게 자명한 본 발명을 수행하기 위한 기재된 모드의 다양한 변형은 하기 청구범위의 범주 내에 있는 것으로 의도된다.

도면

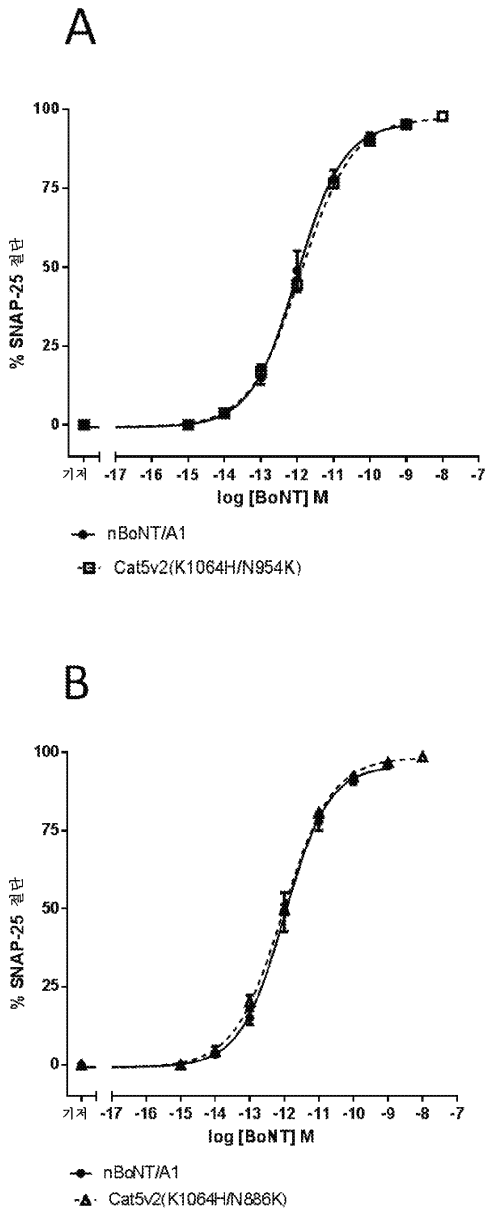
도면1

적응증	권장 농도	권장 디스포트 용량
미간 주름, 성인	12 단위/0.1 mL 또는 20 단위/0.1 mL	50 단위, 각각 10 단위 (0.08 mL)의 5개의 동일한 분취액으로 나눔 또는 50 단위, 각각 10 단위 (0.05 mL)의 5개의 동일한 분취액으로 나눔

도면2

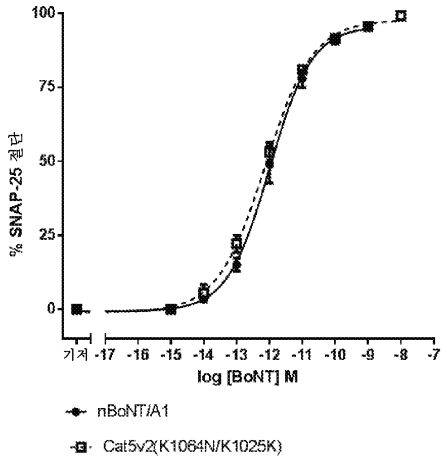

pI
마커
rBoNT/A1
Cat5v2
Cat5v2
Cat5v2(K1064H/N886K)
Cat5v2(K1064H/N954K)
Cat5v2(K1064H/N1025K)
8.3
8.0
7.8
7.4
6.9
6.0
5.3
5.2
4.5
4.2

도면3i

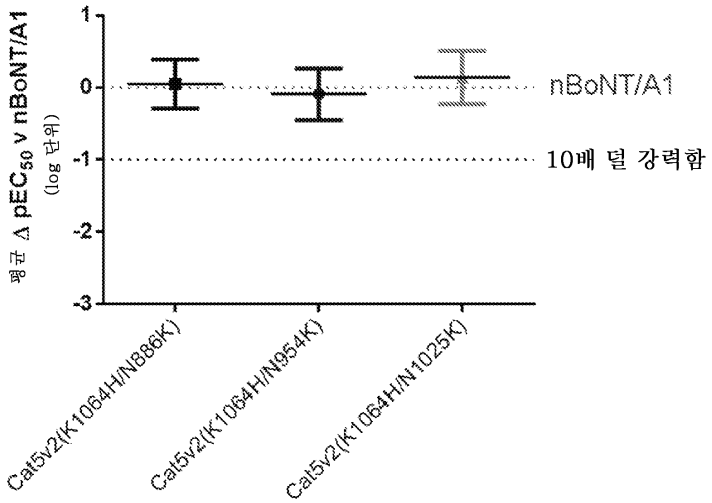

A
100
75
50
25
0
% SNAP-25 절단
기저 -17 -16 -15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7
log [BoNT] M
nBoNT/A1
Cat5v2(K1064H/N954K)
B
100
75
50
25
0
% SNAP-25 절단
기저 -17 -16 -15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7
log [BoNT] M
nBoNT/A1
Cat5v2(K1064H/N886K)

도면3ii

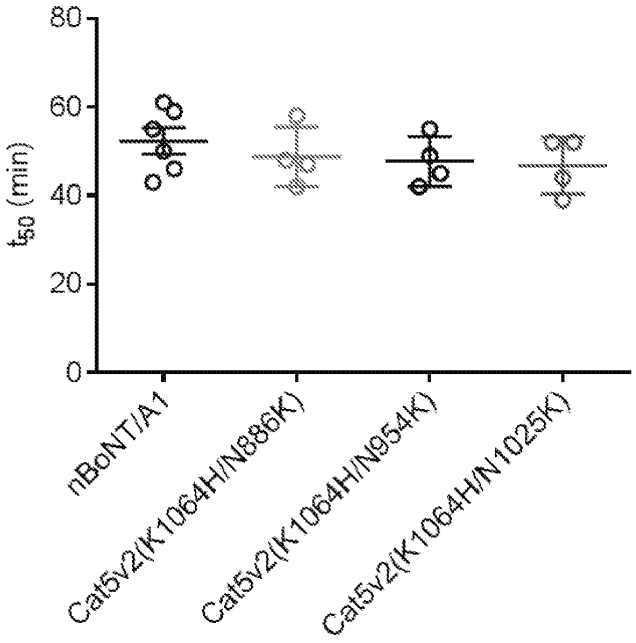
C


100
75
50
25
0
% SNAP-25 절단
기저 -17 -16 -15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7
log [BoNT] M
nBoNT/A1
Cat5v2(K1064N/K1025K)

D

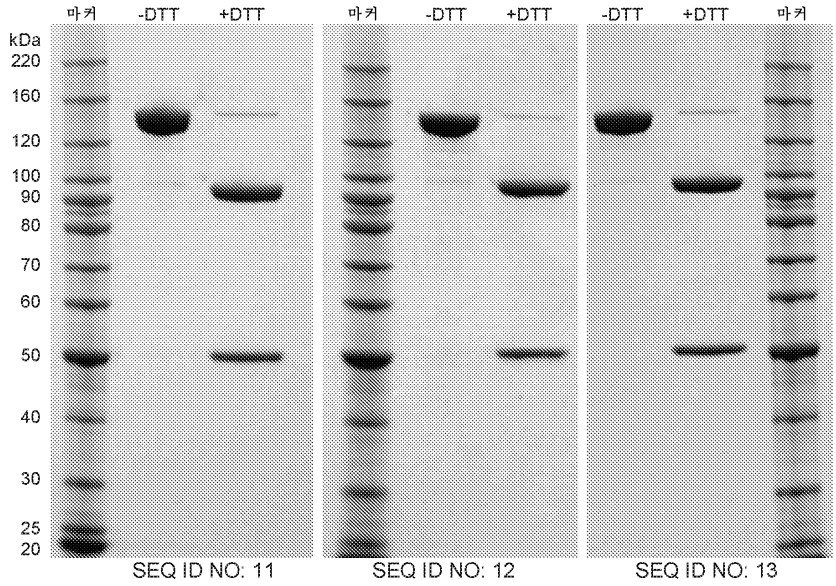

1
0
-1
-2
-3
평균 Δ pEC50 v nBoNT/A1
(log 단위)
nBoNT/A1
10배 덜 강력함
Cat5v2(K1064H/N886K)
Cat5v2(K1064H/N954K)
Cat5v2(K1064H/N1025K)

도면4

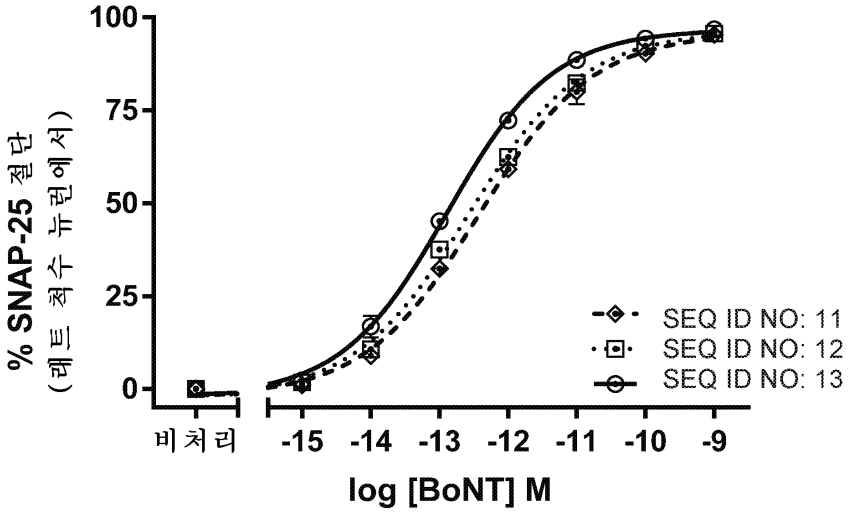


SXN/배치	t_{50} (평균 min ± sem)
nBoNT/A1	52 ± 3
Cat5v2(K1064H/N886K)	49 ± 3
Cat5v2(K1064H/N954K)	48 ± 3
Cat5v2(K1064H/N1025K)	47 ± 3

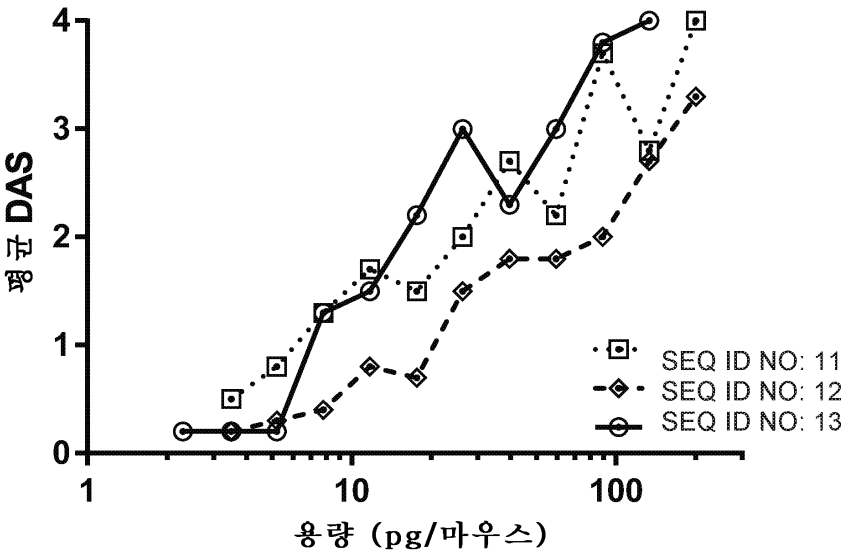
도면5


마커
-DTT
+DTT
마커
-DTT
+DTT
-DTT
+DTT
마커
kDa
220
160
120
100
90
80
70
60
50
40
30
25
20
SEQ ID NO: 11
SEQ ID NO: 12
SEQ ID NO: 13

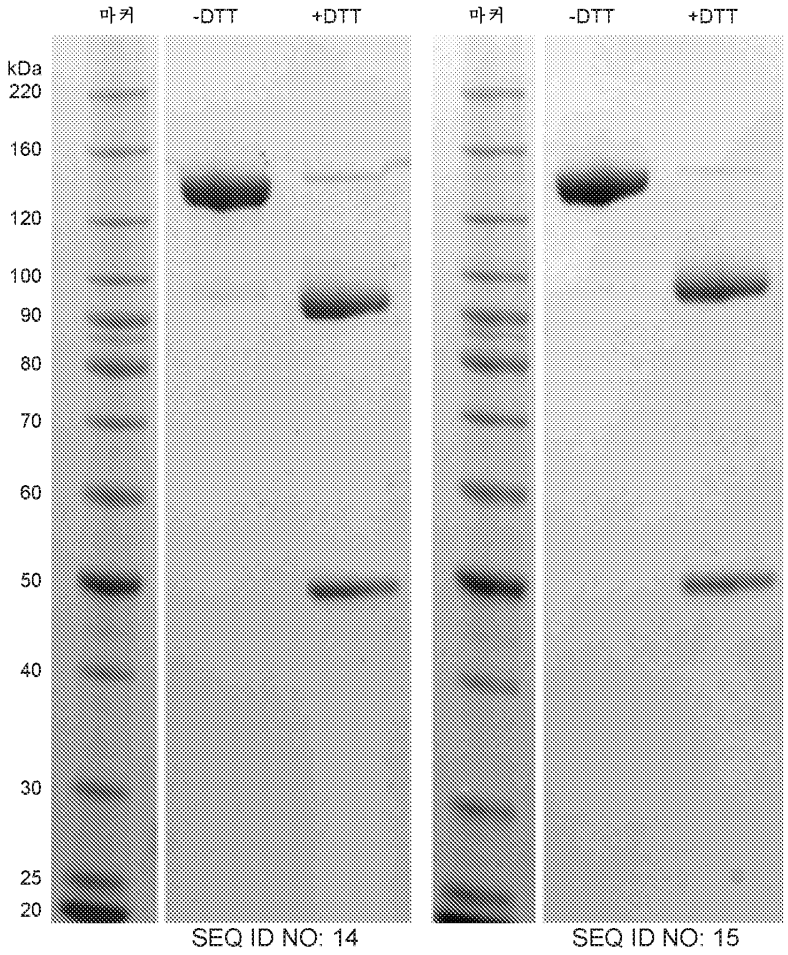
도면6


% SNAP-25 절단
(레트 척수 뉴런에서)
100
75
50
25
0
비처리
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
log [BoNT] M
SEQ ID NO: 11
SEQ ID NO: 12
SEQ ID NO: 13

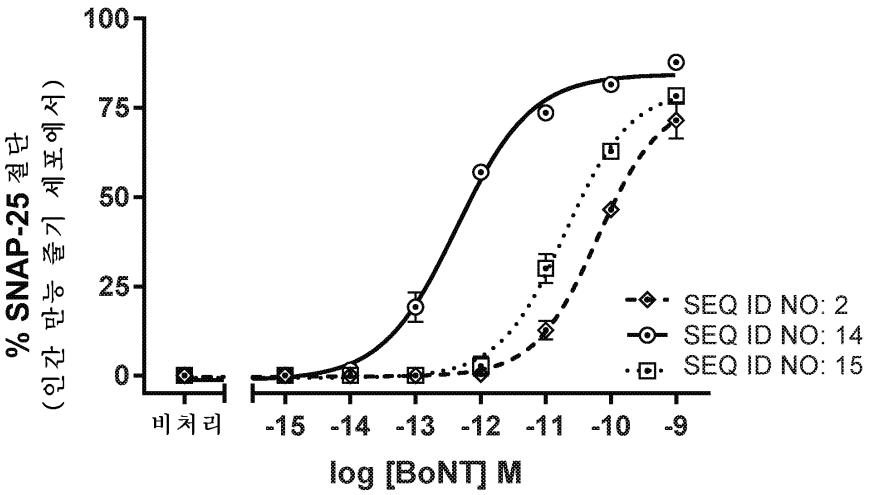
도면7


4
3
2
1
0
평균 DAS
1
10
100
용량 (pg/마우스)
SEQ ID NO: 11
SEQ ID NO: 12
SEQ ID NO: 13

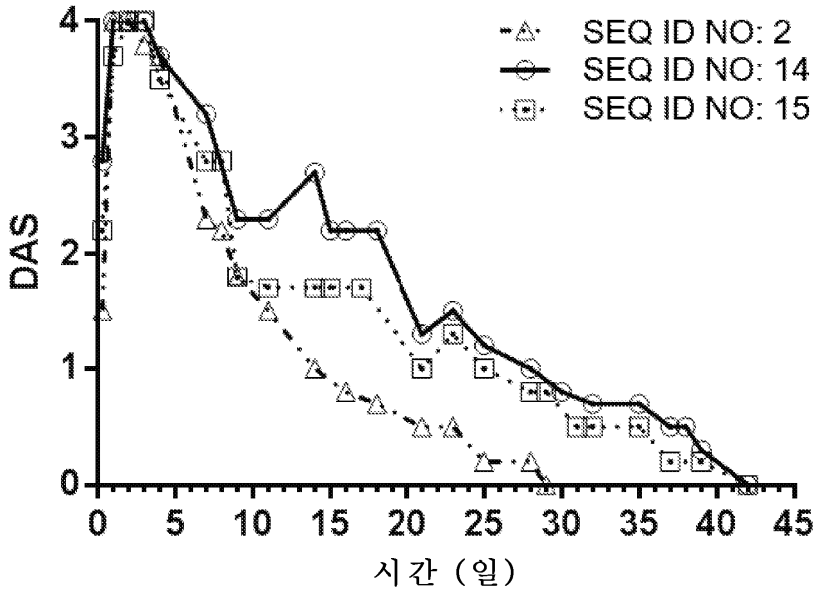
도면8


마커
-DTT
+DTT
마커
-DTT
+DTT
kDa
220
160
120
100
90
80
70
60
50
40
30
25
20
SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 15

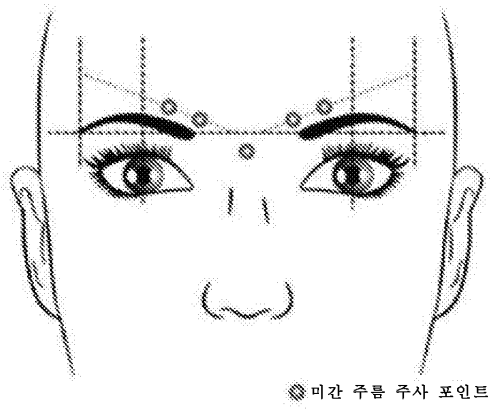
도면9



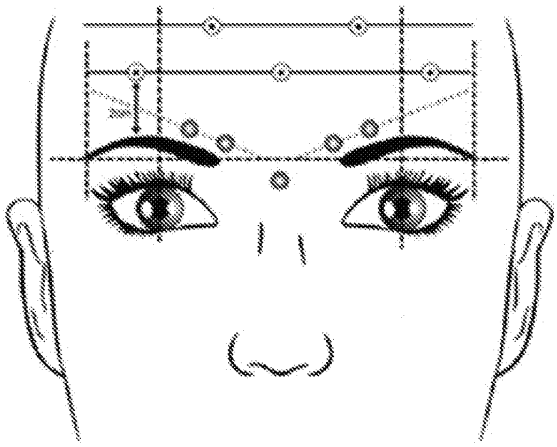
도면10



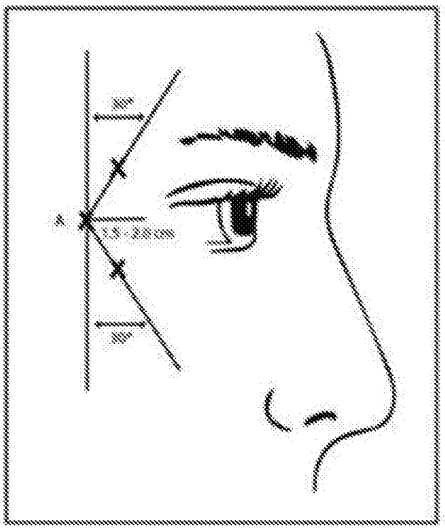
도면11



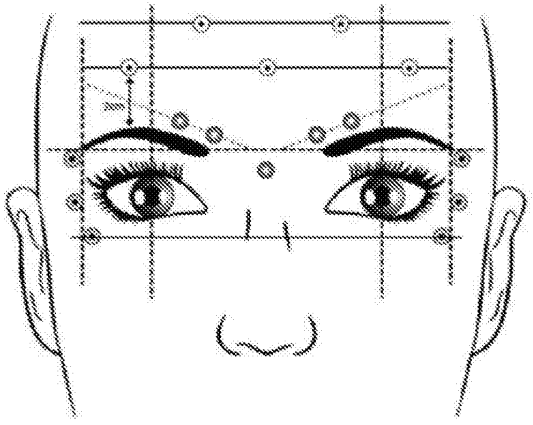
도면12



도면13



도면14



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> IPSEN BIOPHARM LIMITED

<120> TREATMENT OF UPPER FACIAL LINES

<130> P66420WO

<150> GB2003813.9

<151> 2020-03-16

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3888

<212> DNA

<213> Clostridium botulinum

<400> 1

atgccattcg tcaacaagca attcaactac aaagacccag tcaacggcgt cgacatcgca 60

tacatcaaga ttccgaacgc cggtcaaatg cagccggtta aggcttttaa gatccacaac 120

aagatttggg ttatcccgga gcgtgacacc ttcacgaacc cggaagaagg cgatctgaac 180

ccgccaccgg aagcgaagca agtccctgtc agctactacg attcgacgta cctgagcacg 240

gataacgaaa aagataacta cctgaaaggt gtgaccaagc tgttcgaacg tatctacagc 300

acggatctgg gtcgcatgct gctgactagc attgttcgcg gtatcccgtt ctggggtggt 360

agcacgattg acaccgaact gaaggttatc gacactaact gcattaacgt tattcaaccg 420

gatggtagct atcgtagcga agagctgaat ctggtcatca ttggcccgag cgcagacatt 480

atccaattcg agtgcaagag ctttggtcac gaggttctga atctgacccg caatggctat 540

ggtagcaccc agtacattcg tttttcgccg gattttacct tcggctttga agagagcctg 600

gaggttgata ccaatccgtt gctgggtgcg ggcaaattcg ctaccgatcc ggctgtcacg 660

ctggcccatg aactgatcca cgcaggccac cgcctgtacg gcattgccat caacccaaac 720

cgtgtgttca aggttaatac gaatgcatac tacgagatga gcggcctgga agtcagcttc 780

gaagaactgc gcaccttcgg tggccatgac gctaaattca ttgacagctt gcaagagaat 840

gagttccgtc tgtactacta taacaaattc aaagacattg caagcacgtt gaacaaggcc 900

aaaagcatcg ttggtactac cgcgtcgttg cagtatatga agaatgtgtt taaagagaag 960

tacctgctgt ccgaggatac ctccggcaag tttagcgttg ataagctgaa gtttgacaaa 1020

ctgtacaaga tgctgaccga gatttacacc gaggacaact ttgtgaaatt cttcaaagtg 1080

ttgaatcgta aaacctatct gaattttgac aaagcggttt tcaagattaa catcgtgccg 1140
aaggtgaact acaccatcta tgacggtttt aacctgcgta acaccaacct ggcggcgaac 1200
tttaacggtc agaatacgga aatcaacaac atgaatttca cgaagttgaa gaacttcacg 1260
ggtctgttcg agttctataa gctgctgtgc gtgcgcggta tcatcaccag caaaaccaaa 1320
agcctggaca aaggctacaa caaggcgctg aatgacctgt gcattaaggt aaacaattgg 1380
gatctgttct tttcgccatc cgaagataat tttaccaacg acctgaacaa gggtgaagaa 1440
atcaccagcg atacgaatat tgaagcagcg gaagagaata tcagcctgga tctgatccag 1500

cagtactatc tgacctttaa cttcgacaat gaaccggaga acattagcat tgagaatctg 1560
agcagcgaca ttatcggtca gctggaactg atgccgaata tcgaacgttt cccgaacggc 1620
aaaaagtacg agctggacaa gtacactatg ttccattacc tgcgtgcaca ggagtttgaa 1680
cacggtaaaa gccgtatcgc gctgaccaac agcgttaacg aggccctgct gaacccgagc 1740
cgtgtctata ccttcttcag cagcgactat gttaagaaag tgaacaaagc cactgaggcc 1800
gcgatgttcc tgggctgggt ggaacagctg gtatatgact tcacggacga gacgagcgaa 1860
gtgagcacta ccgacaaaat tgctgatatt accatcatta tcccgtatat tggtccggca 1920

ctgaacattg gcaacatgct gtacaaagac gattttgtgg gtgccctgat cttctccggt 1980
gccgtgattc tgctggagtt cattccggag attgcgatcc cggtgttggg taccttcgcg 2040
ctggtgtcct acatcgcgaa taaggttctg acggttcaga ccatcgataa cgcgctgtcg 2100
aaacgtaatg aaaaatggga cgaggtttac aaatacattg ttacgaattg gctggcgaaa 2160
gtcaataccc agatcgacct gatccgtaag aaaatgaaag aggcgctgga gaatcaggcg 2220
gaggccacca aagcaattat caactaccaa tacaaccagt acacggaaga agagaagaat 2280
aacattaact tcaatatcga tgatttgagc agcaagctga atgaatctat caacaaagcg 2340

atgatcaata tcaacaagtt tttgaatcag tgtagcgttt cgtacctgat gaatagcatg 2400
attccgtatg gcgtcaaacg tctggaggac ttcgacgcca gcctgaaaga tgcgttgctg 2460
aaatacattt acgacaatcg tggtacgctg attggccaag ttgaccgctt gaaagacaaa 2520
gttaacaata ccctgagcac cgacatccca tttcaactga gcaagtatgt tgataatcaa 2580
cgtctgttga gcactttcac cgagtatatc aaaaacatca tcaatactag cattctgaac 2640
ctgcgttacg agagcaatca tctgattgat ctgagccgtt atgcaagcaa gatcaacatc 2700
ggtagcaagg tcaattttga cccgatcgat aagaaccaga tccagctgtt taatctggaa 2760

tcgagcaaaa ttgaggttat cctgaaaaac gccattgtct acaactccat gtacgagaat 2820

ttctccacca gcttctggat tcgcatcccg aaatacttca acagcattag cctgaacaac 2880

gagtatacta tcatcaactg tatggagaac aacagcggtt ggaaggtgtc tctgaactat 2940

ggtgagatca tttggacctt gcaggacacc caagagatca agcagcgcgt cgtgttcaag 3000

tactctcaaa tgatcaacat ttccgattac attaatcgtt ggatcttcgt gaccattacg 3060

aataaccgtc tgaataacag caagatttac atcaatggtc gcttgatcga tcagaaaccg 3120

attagcaacc tgggtaatat ccacgcaagc aacaacatta tgttcaaatt ggacggttgc 3180

cgcgataccc atcgttatat ctggatcaag tatttcaacc tgtttgataa agaactgaat 3240

gagaaggaga tcaaagattt gtatgacaac caatctaaca gcggcatttt gaaggacttc 3300

tggggcgatt atctgcaata cgataagccg tactatatgc tgaacctgta tgatccgaac 3360

aaatatgtgg atgtcaataa tgtgggtatt cgtggttaca tgtatttgaa gggtccgcgt 3420

ggcagcgtta tgacgaccaa catttacctg aactctagcc tgtaccgtgg tacgaaattc 3480

atcattaaga aatatgccag cggcaacaaa gataacattg tgcgtaataa cgatcgtgtc 3540

tacatcaacg tggtcgtgaa gaataaagag taccgtctgg cgaccaacgc ttcgcaggcg 3600

ggtgttgaga aaattctgag cgcgttggag atccctgatg tcggtaatct gagccaagtc 3660

gtggttatga agagcaagaa cgaccagggt atcactaaca agtgcaagat gaacctgcaa 3720

gacaacaatg gtaacgacat cggctttatt ggtttccacc agttcaacaa tattgctaaa 3780

ctggtagcga gcaattggta caatcgtcag attgagcgca gcagccgtac tttgggctgt 3840

agctgggagt ttatcccggt cgatgatggt tggggcgaac gtccgctg 3888

<210> 2

<211> 1296

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu
565 570 575
Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys

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

645 650 655
Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
660 665 670
Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
675 680 685
Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu
690 695 700
Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys

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

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

805 810 815

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

820 825 830

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

835 840 845

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

850 855 860

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

865 870 875 880

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

885 890 895

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

900 905 910

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

915 920 925

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

930 935 940

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

945 950 955 960

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

965 970 975

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

980 985 990

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

995 1000 1005

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

1010 1015 1020

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

1025 1030 1035

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

1040 1045 1050

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

1055 1060 1065

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

1070 1075 1080

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

1085 1090 1095

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

1100 1105 1110

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

1115 1120 1125

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

1130 1135 1140

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

1145 1150 1155

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

1160 1165 1170

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

1175 1180 1185

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

1190 1195 1200

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

1205 1210 1215

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

1220 1225 1230

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

1235 1240 1245

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

1250 1255 1260

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

1265 1270 1275

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

1280 1285 1290

Arg Pro Leu

1295

<210> 3

<211> 3888

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Modified BoNT/A "Cat-A"

<400> 3

atgccattcg tcaacaagca attcaactac aaagacccag tcaacggcgt cgacatcgca 60

tacatcaaga ttccgaacgc cggtcaaatg cagccggtta aggcttttaa gatccacaac 120

aagatttggg ttatcccgga gcgtgacacc ttcacgaacc cggaagaagg cgatctgaac 180

ccgccaccgg aagcgaagca agtccctgtc agctactacg attcgacgta cctgagcacg 240

gataacgaaa aagataacta cctgaaaggt gtgaccaagc tgttcgaacg tatctacagc 300

acggatctgg gtcgcatgct gctgactagc attgttcgcg gtatcccgtt ctggggtggt 360

agcacgattg acaccgaact gaaggttatc gacactaact gcattaacgt tattcaaccg 420

gatggtagct atcgtagcga agagctgaat ctggtcatca ttggcccgag cgcagacatt 480

atccaattcg agtgcaagag ctttggtcac gaggttctga atctgacccg caatggctat 540

ggtagcaccc agtacattcg tttttcgccg gattttacct tcggctttga agagagcctg 600

gaggttgata ccaatccgtt gctgggtgcg ggcaaattcg ctaccgatcc ggctgtcacg 660

ctggcccatg aactgatcca cgcaggccac cgcctgtacg gcattgccat caacccaaac 720

cgtgtgttca aggttaatac gaatgcatac tacgagatga gcggcctgga agtcagcttc 780

gaagaactgc gcaccttcgg tggccatgac gctaaattca ttgacagctt gcaagagaat 840

gagttccgtc tgtactacta taacaaattc aaagacattg caagcacgtt gaacaaggcc 900

aaaagcatcg ttggtactac cgcgtcgttg cagtatatga agaatgtgtt taaagagaag 960

tacctgctgt ccgaggatac ctccggcaag tttagcgttg ataagctgaa gtttgacaaa 1020

ctgtacaaga tgctgaccga gatttacacc gaggacaact ttgtgaaatt cttcaaagtg 1080

ttgaatcgta aaacctatct gaattttgac aaagcggttt tcaagattaa catcgtgccg 1140

aaggtgaact acaccatcta tgacggtttt aacctgcgta acaccaacct ggcggcgaac 1200

tttaacggtc agaatacgga aatcaacaac atgaatttca cgaagttgaa gaacttcacg 1260

ggtctgttcg agttctataa gctgctgtgc gtgcgcggta tcatcaccag caaaaccaaa 1320

agcctggaca aaggctacaa caaggcgctg aatgacctgt gcattaaggt aaacaattgg 1380

gatctgttct tttcgccatc cgaagataat tttaccaacg acctgaacaa gggtgaagaa 1440

atcaccagcg atacgaatat tgaagcagcg gaagagaata tcagcctgga tctgatccag 1500
cagtactatc tgacctttaa cttcgacaat gaaccggaga acattagcat tgagaatctg 1560
agcagcgaca ttatcggtca gctggaactg atgccgaata tcgaacgttt cccgaacggc 1620
aaaaagtacg agctggacaa gtacactatg ttccattacc tgcgtgcaca ggagtttgaa 1680
cacggtaaaa gccgtatcgc gctgaccaac agcgttaacg aggccctgct gaacccgagc 1740
cgtgtctata ccttcttcag cagcgactat gttaagaaag tgaacaaagc cactgaggcc 1800
gcgatgttcc tgggctgggt ggaacagctg gtatatgact tcacggacga gacgagcgaa 1860

gtgagcacta ccgacaaaat tgctgatatt accatcatta tcccgtatat tggtccggca 1920
ctgaacattg gcaacatgct gtacaaagac gattttgtgg gtgccctgat cttctccggt 1980
gccgtgattc tgctggagtt cattccggag attgcgatcc cggtgttggg taccttcgcg 2040
ctggtgtcct acatcgcgaa taaggttctg acggttcaga ccatcgataa cgcgctgtcg 2100
aaacgtaatg aaaaatggga cgaggtttac aaatacattg ttacgaattg gctggcgaaa 2160
gtcaataccc agatcgacct gatccgtaag aaaatgaaag aggcgctgga gaatcaggcg 2220
gaggccacca aagcaattat caactaccaa tacaaccagt acacggaaga agagaagaat 2280

aacattaact tcaatatcga tgatttgagc agcaagctga atgaatctat caacaaagcg 2340
atgatcaata tcaacaagtt tttgaatcag tgtagcgttt cgtacctgat gaatagcatg 2400
attccgtatg gcgtcaaacg tctggaggac ttcgacgcca gcctgaaaga tgcgttgctg 2460
aaatacattt acgacaatcg tggtacgctg attggccaag ttgaccgctt gaaagacaaa 2520
gttaacaata ccctgagcac cgacatccca tttcaactga gcaagtatgt tgataatcaa 2580
cgtctgttga gcactttcac cgagtatatc aaaaacatca tcaatactag cattctgaac 2640
ctgcgttacg agagcaagca tctgattgat ctgagccgtt atgctagcaa gatcaacatc 2700

ggtagcaagg tcaattttga cccgatcgat aagaaccaga tccagctgtt taatctggaa 2760
tcgagcaaaa ttgaggttat cctgaaaaag gccattgtct acaactccat gtacgagaat 2820
ttctccacca gcttctggat tcgcatcccg aaatacttca acaagattag cctgaacaac 2880
gagtatacta tcatcaactg tatggagaac aacagcggtt ggaaggtgtc tctgaactat 2940
ggtgagatca tttggacctt gcaggacacc aaagagatca agcagcgcgt cgtgttcaag 3000
tactctcaaa tgatcaacat ttccgattac attaatcgtt ggatcttcgt gaccattacg 3060
aataaccgtc tgaataagag caagatttac atcaatggtc gcttgatcga tcagaaaccg 3120

attagcaacc tgggtaatat ccacgcaagc aacaagatta tgttcaaatt ggacggttgc 3180

cgcgataccc atcgttatat ctggatcaag tatttcaacc tgtttgataa agaactgaat 3240

gagaaggaga tcaaagattt gtatgacaac caatctaaca gcggcatttt gaaggacttc 3300

tggggcgatt atctgcaata cgataagccg tactatatgc tgaacctgta tgatccgaac 3360

aaatatgtgg atgtcaataa tgtgggtatt cgtggttaca tgtatttgaa gggtccgcgt 3420

ggcagcgtta tgacgaccaa catttacctg aactctagcc tgtaccgtgg tacgaaattc 3480

atcattaaga aatatgccag cggcaacaaa gataacattg tgcgtaataa cgatcgtgtc 3540

tacatcaacg tggtcgtgaa gaataaagag taccgtctgg cgaccaacgc ttcgcaggcg 3600

ggtgttgaga aaattctgag cgcgttggag atccctgatg tcggtaatct gagccaagtc 3660

gtggttatga agagcaagaa cgacaagggt atcactaaca agtgcaagat gaacctgcaa 3720

gacaacaatg gtaacgacat cggctttatt ggtttccacc agttcaacaa tattgctaaa 3780

ctggtagcga gcaattggta caatcgtcag attgagcgca gcagccgtac tttgggctgt 3840

agctgggagt ttatcccggt cgatgatggt tggggcgaac gtccgctg 3888

<210> 4

<211> 1296

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Modified BoNT/A "Cat-A"

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
355 360 365
Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr

370 375 380
Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
385 390 395 400
Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu
405 410 415
Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
420 425 430
Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys

435 440 445
Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe
450 455 460
Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu
465 470 475 480
Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
485 490 495
Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro

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

565 570 575
Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys
580 585 590
Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

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

740 745 750

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

755 760 765

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

770 775 780

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

785 790 795 800

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

805 810 815

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

820 825 830

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

835 840 845

Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser
850 855 860
Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn
865 870 875 880
Leu Arg Tyr Glu Ser Lys His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser

885 890 895
Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn
900 905 910
Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu
915 920 925
Lys Lys Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser
930 935 940
Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Lys Ile Ser Leu Asn Asn

945 950 955 960
Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val
965 970 975
Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Lys Glu
980 985 990
Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser
995 1000 1005
Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg

1010 1015 1020
Leu Asn Lys Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln
1025 1030 1035
Lys Pro Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Lys Ile
1040 1045 1050
Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp
1055 1060 1065
Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu

1070 1075 1080
Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys

1085 1090 1095

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

1100 1105 1110

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

1115 1120 1125

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

1130 1135 1140

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

1145 1150 1155

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

1160 1165 1170

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

1175 1180 1185

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

1190 1195 1200

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

1205 1210 1215

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

1220 1225 1230

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

1235 1240 1245

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

1250 1255 1260

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

1265 1270 1275

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

1280 1285 1290

Arg Pro Leu

1295

<210> 5

<211> 3888

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Modified BoNT/A "Cat-B"

<400> 5

atgccattcg tcaacaagca attcaactac aaagacccag tcaacggcgt cgacatcgca 60

tacatcaaga ttccgaacgc cggtcaaatg cagccggtta aggcttttaa gatccacaac 120

aagatttggg ttatcccgga gcgtgacacc ttcacgaacc cggaagaagg cgatctgaac 180

ccgccaccgg aagcgaagca agtccctgtc agctactacg attcgacgta cctgagcacg 240

gataacgaaa aagataacta cctgaaaggt gtgaccaagc tgttcgaacg tatctacagc 300

acggatctgg gtcgcatgct gctgactagc attgttcgcg gtatcccgtt ctggggtggt 360

agcacgattg acaccgaact gaaggttatc gacactaact gcattaacgt tattcaaccg 420

gatggtagct atcgtagcga agagctgaat ctggtcatca ttggcccgag cgcagacatt 480

atccaattcg agtgcaagag ctttggtcac gaggttctga atctgacccg caatggctat 540

ggtagcaccc agtacattcg tttttcgccg gattttacct tcggctttga agagagcctg 600

gaggttgata ccaatccgtt gctgggtgcg ggcaaattcg ctaccgatcc ggctgtcacg 660

ctggcccatg aactgatcca cgcaggccac cgcctgtacg gcattgccat caacccaaac 720

cgtgtgttca aggttaatac gaatgcatac tacgagatga gcggcctgga agtcagcttc 780

gaagaactgc gcaccttcgg tggccatgac gctaaattca ttgacagctt gcaagagaat 840

gagttccgtc tgtactacta taacaaattc aaagacattg caagcacgtt gaacaaggcc 900

aaaagcatcg ttggtactac cgcgtcgttg cagtatatga agaatgtgtt taaagagaag 960

tacctgctgt ccgaggatac ctccggcaag tttagcgttg ataagctgaa gtttgacaaa 1020

ctgtacaaga tgctgaccga gatttacacc gaggacaact ttgtgaaatt cttcaaagtg 1080

ttgaatcgta aaacctatct gaattttgac aaagcggttt tcaagattaa catcgtgccg 1140

aaggtgaact acaccatcta tgacggtttt aacctgcgta acaccaacct ggcggcgaac 1200

tttaacggtc agaatacgga aatcaacaac atgaatttca cgaagttgaa gaacttcacg 1260

ggtctgttcg agttctataa gctgctgtgc gtgcgcggta tcatcaccag caaaaccaaa 1320

agcctggaca aaggctacaa caaggcgctg aatgacctgt gcattaaggt aaacaattgg 1380

gatctgttct tttcgccatc cgaagataat tttaccaacg acctgaacaa gggtgaagaa 1440

atcaccagcg atacgaatat tgaagcagcg gaagagaata tcagcctgga tctgatccag 1500

cagtactatc tgacctttaa cttcgacaat gaaccggaga acattagcat tgagaatctg 1560

agcagcgaca ttatcggtca gctggaactg atgccgaata tcgaacgttt cccgaacggc 1620

aaaaagtacg agctggacaa gtacactatg ttccattacc tgcgtgcaca ggagtttgaa 1680

cacggtaaaa gccgtatcgc gctgaccaac agcgttaacg aggccctgct gaacccgagc 1740

cgtgtctata ccttcttcag cagcgactat gttaagaaag tgaacaaagc cactgaggcc 1800
gcgatgttcc tgggctgggt ggaacagctg gtatatgact tcacggacga gacgagcgaa 1860
gtgagcacta ccgacaaaat tgctgatatt accatcatta tcccgtatat tggtccggca 1920
ctgaacattg gcaacatgct gtacaaagac gattttgtgg gtgccctgat cttctccggt 1980
gccgtgattc tgctggagtt cattccggag attgcgatcc cggtgttggg taccttcgcg 2040
ctggtgtcct acatcgcgaa taaggttctg acggttcaga ccatcgataa cgcgctgtcg 2100
aaacgtaatg aaaaatggga cgaggtttac aaatacattg ttacgaattg gctggcgaaa 2160

gtcaataccc agatcgacct gatccgtaag aaaatgaaag aggcgctgga gaatcaggcg 2220
gaggccacca aagcaattat caactaccaa tacaaccagt acacggaaga agagaagaat 2280
aacattaact tcaatatcga tgatttgagc agcaagctga atgaatctat caacaaagcg 2340
atgatcaata tcaacaagtt tttgaatcag tgtagcgttt cgtacctgat gaatagcatg 2400
attccgtatg gcgtcaaacg tctggaggac ttcgacgcca gcctgaaaga tgcgttgctg 2460
aaatacattt acgacaatcg tggtacgctg attggccaag ttgaccgctt gaaagacaaa 2520
gttaacaata ccctgagcac cgacatccca tttcaactga gcaagtatgt tgataatcaa 2580

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

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

ggcagcgtta tgacgaccaa catttacctg aactctagcc tgtaccgtgg tacgaaattc 3480

atcattaaga aatatgccag cggcaacaaa gataacattg tgcgtaataa cgatcgtgtc 3540

tacatcaacg tggtcgtgaa gaataaagag taccgtctgg cgaccaacgc ttcgcaggcg 3600

ggtgttgaga aaattctgag cgcgttggag atccctgatg tcggtaatct gagccaagtc 3660

gtggttatga agagcaagaa cgacaagggt atcactaaca agtgcaagat gaacctgcaa 3720

gacaacaatg gtaacgacat cggctttatt ggtttccacc agttcaacaa tattgctaaa 3780

ctggtagcga gcaattggta caatcgtcag attgagcgca gcagccgtac tttgggctgt 3840

agctgggagt ttatcccggt cgatgatggt tggggcgaac gtccgctg 3888

<210> 6

<211> 1296

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Modified BoNT/A "Cat-B"

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile
145 150 155 160
Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr

165 170 175
Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
180 185 190
Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
195 200 205
Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu
210 215 220
Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn

225 230 235 240
Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu
245 250 255
Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys
260 265 270
Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn
275 280 285
Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val

290 295 300
Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
305 310 315 320
Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu
325 330 335
Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp
340 345 350
Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn

355 360 365
Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr
370 375 380
Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

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

740 745 750
Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
755 760 765
Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
770 775 780
Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
785 790 795 800
Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys

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

865 870 875 880
Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser

885 890 895

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

900 905 910

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

915 920 925

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

930 935 940

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

945 950 955 960

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

965 970 975

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

980 985 990

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

995 1000 1005

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

1010 1015 1020

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

1025 1030 1035

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

1040 1045 1050

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

1055 1060 1065

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

1070 1075 1080

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

1085 1090 1095

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

1100 1105 1110

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

1115 1120 1125

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

1130 1135 1140

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

1145 1150 1155

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

1160 1165 1170

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

1175 1180 1185

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

1190 1195 1200

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

1205 1210 1215

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

1220 1225 1230

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

1235 1240 1245

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

1250 1255 1260

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

1265 1270 1275

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

1280 1285 1290

Arg Pro Leu

1295

<210> 7

<211> 3888

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Modified BoNT/A "Cat-C"

<400> 7

atgccattcg tcaacaagca attcaactac aaagacccag tcaacggcgt cgacatcgca 60

tacatcaaga ttccgaacgc cggtcaaatg cagccggtta aggcttttaa gatccacaac 120

aagatttggg ttatcccgga gcgtgacacc ttcacgaacc cggaagaagg cgatctgaac 180

ccgccaccgg aagcgaagca agtccctgtc agctactacg attcgacgta cctgagcacg 240

gataacgaaa aagataacta cctgaaaggt gtgaccaagc tgttcgaacg tatctacagc 300

acggatctgg gtcgcatgct gctgactagc attgttcgcg gtatcccgtt ctggggtggt 360

agcacgattg acaccgaact gaaggttatc gacactaact gcattaacgt tattcaaccg 420

gatggtagct atcgtagcga agagctgaat ctggtcatca ttggcccgag cgcagacatt 480

atccaattcg agtgcaagag ctttggtcac gaggttctga atctgacccg caatggctat 540

ggtagcaccc agtacattcg tttttcgccg gattttacct tcggctttga agagagcctg 600

gaggttgata ccaatccgtt gctgggtgcg ggcaaattcg ctaccgatcc ggctgtcacg 660

ctggcccatg aactgatcca cgcaggccac cgcctgtacg gcattgccat caacccaaac 720

cgtgtgttca aggttaatac gaatgcatac tacgagatga gcggcctgga agtcagcttc 780

gaagaactgc gcaccttcgg tggccatgac gctaaattca ttgacagctt gcaagagaat 840

gagttccgtc tgtactacta taacaaattc aaagacattg caagcacgtt gaacaaggcc 900

aaaagcatcg ttggtactac cgcgtcgttg cagtatatga agaatgtgtt taaagagaag 960

tacctgctgt ccgaggatac ctccggcaag tttagcgttg ataagctgaa gtttgacaaa 1020

ctgtacaaga tgctgaccga gatttacacc gaggacaact ttgtgaaatt cttcaaagtg 1080

ttgaatcgta aaacctatct gaattttgac aaagcggttt tcaagattaa catcgtgccg 1140

aaggtgaact acaccatcta tgacggtttt aacctgcgta acaccaacct ggcggcgaac 1200

tttaacggtc agaatacgga aatcaacaac atgaatttca cgaagttgaa gaacttcacg 1260

ggtctgttcg agttctataa gctgctgtgc gtgcgcggta tcatcaccag caaaaccaaa 1320

agcctggaca aaggctacaa caaggcgctg aatgacctgt gcattaaggt aaacaattgg 1380

gatctgttct tttcgccatc cgaagataat tttaccaacg acctgaacaa gggtgaagaa 1440

atcaccagcg atacgaatat tgaagcagcg gaagagaata tcagcctgga tctgatccag 1500

cagtactatc tgacctttaa cttcgacaat gaaccggaga acattagcat tgagaatctg 1560

agcagcgaca ttatcggtca gctggaactg atgccgaata tcgaacgttt cccgaacggc 1620

aaaaagtacg agctggacaa gtacactatg ttccattacc tgcgtgcaca ggagtttgaa 1680

cacggtaaaa gccgtatcgc gctgaccaac agcgttaacg aggccctgct gaacccgagc 1740

cgtgtctata ccttcttcag cagcgactat gttaagaaag tgaacaaagc cactgaggcc 1800

gcgatgttcc tgggctgggt ggaacagctg gtatatgact tcacggacga gacgagcgaa 1860

gtgagcacta ccgacaaaat tgctgatatt accatcatta tcccgtatat tggtccggca 1920

ctgaacattg gcaacatgct gtacaaagac gattttgtgg gtgccctgat cttctccggt 1980

gccgtgattc tgctggagtt cattccggag attgcgatcc cggtgttggg taccttcgcg 2040

ctggtgtcct acatcgcgaa taaggttctg acggttcaga ccatcgataa cgcgctgtcg 2100
aaacgtaatg aaaaatggga cgaggtttac aaatacattg ttacgaattg gctggcgaaa 2160
gtcaataccc agatcgacct gatccgtaag aaaatgaaag aggcgctgga gaatcaggcg 2220
gaggccacca aagcaattat caactaccaa tacaaccagt acacggaaga agagaagaat 2280
aacattaact tcaatatcga tgatttgagc agcaagctga atgaatctat caacaaagcg 2340
atgatcaata tcaacaagtt tttgaatcag tgtagcgttt cgtacctgat gaatagcatg 2400
attccgtatg gcgtcaaacg tctggaggac ttcgacgcca gcctgaaaga tgcgttgctg 2460

aaatacattt acgacaatcg tggtacgctg attggccaag ttgaccgctt gaaagacaaa 2520
gttaacaata ccctgagcac cgacatccca tttcaactga gcaagtatgt tgataatcaa 2580
cgtctgttga gcactttcac cgagtatatc aaaaacatca tcaatactag cattctgaac 2640
ctgcgttacg agagcaatca tctgattgat ctgagccgtt atgctagcaa gatcaacatc 2700
ggtagcaagg tcaattttga cccgatcgat aagaaccaga tccagctgtt taatctggaa 2760
tcgagcaaaa ttgaggttat cctgaaaaag gccattgtct acaactccat gtacgagaat 2820
ttctccacca gcttctggat tcgcatcccg aaatacttca acaagattag cctgaacaac 2880

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

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

gacaacaatg gtaacgacat cggctttatt ggtttccacc agttcaacaa tattgctaaa 3780

ctggtagcga gcaattggta caatcgtcag attgagcgca gcagccgtac tttgggctgt 3840

agctgggagt ttatcccggt cgatgatggt tggggcgaac gtccgctg 3888

<210> 8

<211> 1296

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Modified BoNT/A "Cat-C"

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

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

740 745 750

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

755 760 765

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

770 775 780

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

785 790 795 800

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

805 810 815

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

820 825 830

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

835 840 845

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

850 855 860

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

865 870 875 880

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

885 890 895

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

900 905 910

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

915 920 925

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

930 935 940

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

945 950 955 960

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

965 970 975

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

980 985 990

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

995 1000 1005

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

1010 1015 1020

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

1025 1030 1035

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

1040 1045 1050

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

1055 1060 1065

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

1070 1075 1080

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

1085 1090 1095

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

1100 1105 1110

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

1115 1120 1125

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

1130 1135 1140

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

1145 1150 1155

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

1160 1165 1170

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

1175 1180 1185

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

1190 1195 1200

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

1205 1210 1215

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

1220 1225 1230

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

1235 1240 1245

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

1250 1255 1260

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

1265 1270 1275

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

1280 1285 1290

Arg Pro Leu

1295

<210> 9

<211> 3888

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Modified BoNT/A "Cat-D"

<400> 9

atgccattcg tcaacaagca attcaactac aaagacccag tcaacggcgt cgacatcgca 60

tacatcaaga ttccgaacgc cggtcaaatg cagccggtta aggcttttaa gatccacaac 120

aagatttggg ttatcccgga gcgtgacacc ttcacgaacc cggaagaagg cgatctgaac 180

ccgccaccgg aagcgaagca agtccctgtc agctactacg attcgacgta cctgagcacg 240

gataacgaaa aagataacta cctgaaaggt gtgaccaagc tgttcgaacg tatctacagc 300

acggatctgg gtcgcatgct gctgactagc attgttcgcg gtatcccgtt ctggggtggt 360

agcacgattg acaccgaact gaaggttatc gacactaact gcattaacgt tattcaaccg 420

gatggtagct atcgtagcga agagctgaat ctggtcatca ttggcccgag cgcagacatt 480

atccaattcg agtgcaagag ctttggtcac gaggttctga atctgacccg caatggctat 540

ggtagcaccc agtacattcg tttttcgccg gattttacct tcggctttga agagagcctg 600

gaggttgata ccaatccgtt gctgggtgcg ggcaaattcg ctaccgatcc ggctgtcacg 660

ctggcccatg aactgatcca cgcaggccac cgcctgtacg gcattgccat caacccaaac 720

cgtgtgttca aggttaatac gaatgcatac tacgagatga gcggcctgga agtcagcttc 780

gaagaactgc gcaccttcgg tggccatgac gctaaattca ttgacagctt gcaagagaat 840

gagttccgtc tgtactacta taacaaattc aaagacattg caagcacgtt gaacaaggcc 900

aaaagcatcg ttggtactac cgcgtcgttg cagtatatga agaatgtgtt taaagagaag 960

tacctgctgt ccgaggatac ctccggcaag tttagcgttg ataagctgaa gtttgacaaa 1020

ctgtacaaga tgctgaccga gatttacacc gaggacaact ttgtgaaatt cttcaaagtg 1080

ttgaatcgta aaacctatct gaattttgac aaagcggttt tcaagattaa catcgtgccg 1140

aaggtgaact acaccatcta tgacggtttt aacctgcgta acaccaacct ggcggcgaac 1200

tttaacggtc agaatacgga aatcaacaac atgaatttca cgaagttgaa gaacttcacg 1260

ggtctgttcg agttctataa gctgctgtgc gtgcgcggta tcatcaccag caaaaccaaa 1320

agcctggaca aaggctacaa caaggcgctg aatgacctgt gcattaaggt aaacaattgg 1380

gatctgttct tttcgccatc cgaagataat tttaccaacg acctgaacaa gggtgaagaa 1440

atcaccagcg atacgaatat tgaagcagcg gaagagaata tcagcctgga tctgatccag 1500

cagtactatc tgacctttaa cttcgacaat gaaccggaga acattagcat tgagaatctg 1560

agcagcgaca ttatcggtca gctggaactg atgccgaata tcgaacgttt cccgaacggc 1620

aaaaagtacg agctggacaa gtacactatg ttccattacc tgcgtgcaca ggagtttgaa 1680

cacggtaaaa gccgtatcgc gctgaccaac agcgttaacg aggccctgct gaacccgagc 1740

cgtgtctata ccttcttcag cagcgactat gttaagaaag tgaacaaagc cactgaggcc 1800

gcgatgttcc tgggctgggt ggaacagctg gtatatgact tcacggacga gacgagcgaa 1860

gtgagcacta ccgacaaaat tgctgatatt accatcatta tcccgtatat tggtccggca 1920

ctgaacattg gcaacatgct gtacaaagac gattttgtgg gtgccctgat cttctccggt 1980

gccgtgattc tgctggagtt cattccggag attgcgatcc cggtgttggg taccttcgcg 2040

ctggtgtcct acatcgcgaa taaggttctg acggttcaga ccatcgataa cgcgctgtcg 2100

aaacgtaatg aaaaatggga cgaggtttac aaatacattg ttacgaattg gctggcgaaa 2160

gtcaataccc agatcgacct gatccgtaag aaaatgaaag aggcgctgga gaatcaggcg 2220

gaggccacca aagcaattat caactaccaa tacaaccagt acacggaaga agagaagaat 2280

aacattaact tcaatatcga tgatttgagc agcaagctga atgaatctat caacaaagcg 2340

atgatcaata tcaacaagtt tttgaatcag tgtagcgttt cgtacctgat gaatagcatg 2400

attccgtatg gcgtcaaacg tctggaggac ttcgacgcca gcctgaaaga tgcgttgctg 2460

aaatacattt acgacaatcg tggtacgctg attggccaag ttgaccgctt gaaagacaaa 2520

gttaacaata ccctgagcac cgacatccca tttcaactga gcaagtatgt tgataatcaa 2580

cgtctgttga gcactttcac cgagtatatc aaaaacatca tcaatactag cattctgaac 2640

ctgcgttacg agagcaatca tctgattgat ctgagccgtt atgcaagcaa gatcaacatc 2700

ggtagcaagg tcaattttga cccgatcgat aagaaccaga tccagctgtt taatctggaa 2760

tcgagcaaaa ttgaggttat cctgaaaaac gccattgtct acaactccat gtacgagaat 2820

ttctccacca gcttctggat tcgcatcccg aaatacttca acagcattag cctgaacaac 2880

gagtatacta tcatcaactg tatggagaac aacagcggtt ggaaggtgtc tctgaactat 2940

ggtgagatca tttggacctt gcaggacacc caagagatca agcagcgcgt cgtgttcaag 3000

tactctcaaa tgatcaacat ttccgattac attaatcgtt ggatcttcgt gaccattacg 3060

aataaccgtc tgaataacag caagatttac atcaatggtc gcttgatcga tcagaaaccg 3120

attagcaacc tgggtaatat ccacgcaagc aacaacatta tgttcaaatt ggacggttgc 3180

cgcgataccc atcgttatat ctggatcaag tatttcaacc tgtttgataa agaactgaat 3240

gagaaggaga tcaaagattt gtatgacaac caatctaaca gcggcatttt gaaggacttc 3300

tggggcgatt atctgcaata cgataagccg tactatatgc tgaacctgta tgatccgaac 3360

aaatatgtgg atgtcaataa tgtgggtatt cgtggttaca tgtatttgaa gggtccgcgt 3420

ggcagcgtta tgacgaccaa catttacctg aactctagcc tgtaccgtgg tacgaaattc 3480

atcattaaga aatatgccag cggcaacaaa gataacattg tgcgtaataa cgatcgtgtc 3540

tacatcaacg tggtcgtgaa gcgtaaagag taccgtctgg cgaccaacgc ttcgcaggcg 3600

ggtgttgaga aaattctgag cgcgttggag atccctcgtg tccgtcgtct gagccaagtc 3660

gtggttatga agagcaagaa cgaccagggt atcactaaca agtgcaagat gaacctgcaa 3720

gaccgtcgtg gtaacgacat cggctttatt ggtttccacc agttcaacaa tattgctaaa 3780

ctggtagcga gcaattggta caatcgtcag attgagcgcc gtagccgtcg tttgggctgt 3840

agctgggagt ttatcccggt cgatgatggt tggggcgaac gtccgctg 3888

<210> 10

<211> 1296

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Modified BoNT/A "Cat-D"

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
485 490 495
Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro
500 505 510
Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
515 520 525

Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
530 535 540
Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu
545 550 555 560
His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu
565 570 575
Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys
580 585 590

Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu
595 600 605
Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr
610 615 620
Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala
625 630 635 640
Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu
645 650 655

Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
660 665 670
Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
675 680 685
Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu
690 695 700
Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys
705 710 715 720

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

725 730 735

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

740 745 750

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

755 760 765

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

770 775 780

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

785 790 795 800

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

805 810 815

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

820 825 830

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

835 840 845

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

850 855 860

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

865 870 875 880

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

885 890 895

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

900 905 910

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

915 920 925

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

930 935 940

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

945 950 955 960

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

965 970 975

Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu
980 985 990

Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser
995 1000 1005

Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg
1010 1015 1020

Leu Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln
1025 1030 1035

Lys Pro Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile
1040 1045 1050

Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp
1055 1060 1065

Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu
1070 1075 1080

Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys
1085 1090 1095

Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met
1100 1105 1110

Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val
1115 1120 1125

Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val
1130 1135 1140

Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Thr
1145 1150 1155

Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp Asn Ile
1160 1165 1170

Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys Arg
1175 1180 1185

Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Glu
1190 1195 1200

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

1205 1210 1215

Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr Asn
1220 1225 1230
Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Arg Arg Gly Asn Asp Ile Gly
1235 1240 1245
Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala
1250 1255 1260
Ser Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Arg Ser Arg Arg Leu
1265 1270 1275

Gly Cys Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu
1280 1285 1290
Arg Pro Leu
1295

<210> 11
<211> 1315
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Modified BoNT/A "Chimera 1"
<400> 11
Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly
1 5 10 15
Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro
20 25 30

Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg
35 40 45
Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu
50 55 60
Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr
65 70 75 80
Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu
85 90 95

Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val
100 105 110
Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys
115 120 125
Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr
130 135 140
Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile
145 150 155 160

Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr
165 170 175
Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
180 185 190
Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
195 200 205
Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu
210 215 220

Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn
225 230 235 240
Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu
245 250 255
Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys
260 265 270
Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn
275 280 285

Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val
290 295 300
Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
305 310 315 320
Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu
325 330 335
Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp

340 345 350

Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
355 360 365
Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr
370 375 380
Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
385 390 395 400
Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu
405 410 415

Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
420 425 430
Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys
435 440 445
Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe
450 455 460
Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu
465 470 475 480

Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
485 490 495
Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro
500 505 510
Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
515 520 525
Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
530 535 540

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

Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu
595 600 605

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

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

Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn
740 745 750
Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
755 760 765
Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
770 775 780
Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
785 790 795 800

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

835 840 845

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

850 855 860

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

865 870 875 880

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

885 890 895

Ala Lys Val Glu Val Tyr Asp Gly Val Glu Leu Asn Asp Lys Asn Gln

900 905 910

Phe Lys Leu Thr Ser Ser Ala Asn Ser Lys Ile Arg Val Thr Gln Asn

915 920 925

Gln Asn Ile Ile Phe Asn Ser Val Phe Leu Asp Phe Ser Val Ser Phe

930 935 940

Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Lys Asn Asp Gly Ile Gln Asn Tyr Ile

945 950 955 960

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

965 970 975

Lys Ile Ser Ile Arg Gly Asn Arg Ile Ile Trp Thr Leu Ile Asp Ile

980 985 990

Asn Gly Lys Thr Lys Ser Val Phe Phe Glu Tyr Asn Ile Arg Glu Asp

995 1000 1005

Ile Ser Glu Tyr Ile Asn Arg Trp Phe Phe Val Thr Ile Thr Asn

1010 1015 1020

Asn Leu Asn Asn Ala Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Lys Leu Glu Ser

1025 1030 1035

Asn Thr Asp Ile Lys Asp Ile Arg Glu Val Ile Ala Asn Gly Glu

1040 1045 1050

Ile Ile Phe Lys Leu Asp Gly Asp Ile Asp Arg Thr Gln Phe Ile

1055 1060 1065

Trp Met Lys Tyr Phe Ser Ile Phe Asn Thr Glu Leu Ser Gln Ser

1070 1075 1080

Asn Ile Glu Glu Arg Tyr Lys Ile Gln Ser Tyr Ser Glu Tyr Leu
1085 1090 1095
Lys Asp Phe Trp Gly Asn Pro Leu Met Tyr Asn Lys Glu Tyr Tyr
1100 1105 1110

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

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

Ser Cys Gln Leu Leu Phe Lys Lys Asp Glu Glu Ser Thr Asp Glu
1235 1240 1245
Ile Gly Leu Ile Gly Ile His Arg Phe Tyr Glu Ser Gly Ile Val
1250 1255 1260
Phe Glu Glu Tyr Lys Asp Tyr Phe Cys Ile Ser Lys Trp Tyr Leu
1265 1270 1275
Lys Glu Val Lys Arg Lys Pro Tyr Asn Leu Lys Leu Gly Cys Asn
1280 1285 1290

Trp Gln Phe Ile Pro Lys Asp Glu Gly Trp Thr Glu His His His
1295 1300 1305
His His His His His His His

1310 1315

<210> 12

<211> 1327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified BoNT/A "Chimera 2"

<400> 12

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

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

20 25 30

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

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

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

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

85 90 95

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

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

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

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

145 150 155 160

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

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

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

```
Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe
    450                 455                 460
Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu

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

    530                 535                 540
Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu
545                 550                 555                 560
His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu
                565                 570                 575
Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys
            580                 585                 590
Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu

        595                 600                 605
Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr
    610                 615                 620
Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala
625                 630                 635                 640
Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu
                645                 650                 655
Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

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

740 745 750

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

755 760 765

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

770 775 780

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

785 790 795 800

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

805 810 815

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

820 825 830

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

835 840 845

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

850 855 860

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

865 870 875 880

Ser Glu Leu Ser Glu Ile Leu Asn Asn Ile Ile Leu Asn Leu Arg Tyr

885 890 895

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

900 905 910

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

915 920 925

Ser Ser Ala Asn Ser Lys Ile Arg Val Thr Gln Asn Gln Asn Ile Ile

930 935 940

Phe Asn Ser Val Phe Leu Asp Phe Ser Val Ser Phe Trp Ile Arg Ile
945 950 955 960
Pro Lys Tyr Lys Asn Asp Gly Ile Gln Asn Tyr Ile His Asn Glu Tyr
965 970 975
Thr Ile Ile Asn Cys Met Lys Asn Asn Ser Gly Trp Lys Ile Ser Ile

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

1040 1045 1050
Ile Lys Asp Ile Arg Glu Val Ile Ala Asn Gly Glu Ile Ile Phe
1055 1060 1065
Lys Leu Asp Gly Asp Ile Asp Arg Thr Gln Phe Ile Trp Met Lys
1070 1075 1080
Tyr Phe Ser Ile Phe Asn Thr Glu Leu Ser Gln Ser Asn Ile Glu
1085 1090 1095
Glu Arg Tyr Lys Ile Gln Ser Tyr Ser Glu Tyr Leu Lys Asp Phe

1100 1105 1110
Trp Gly Asn Pro Leu Met Tyr Asn Lys Glu Tyr Tyr Met Phe Asn
1115 1120 1125
Ala Gly Asn Lys Asn Ser Tyr Ile Lys Leu Lys Lys Asp Ser Pro
1130 1135 1140
Val Gly Glu Ile Leu Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Gln Asn Ser Lys
1145 1150 1155
Tyr Ile Asn Tyr Arg Asp Leu Tyr Ile Gly Glu Lys Phe Ile Ile

1160 1165 1170
Arg Arg Lys Ser Asn Ser Gln Ser Ile Asn Asp Asp Ile Val Arg

1175 1180 1185

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

1190 1195 1200

Trp Arg Val Tyr Thr Tyr Lys Tyr Phe Lys Lys Glu Glu Met Lys

1205 1210 1215

Leu Phe Leu Ala Pro Ile Tyr Asp Ser Asp Glu Phe Tyr Asn Thr

1220 1225 1230

Ile Gln Ile Lys Glu Tyr Asp Glu Gln Pro Thr Tyr Ser Cys Gln

1235 1240 1245

Leu Leu Phe Lys Lys Asp Glu Glu Ser Thr Asp Glu Ile Gly Leu

1250 1255 1260

Ile Gly Ile His Arg Phe Tyr Glu Ser Gly Ile Val Phe Glu Glu

1265 1270 1275

Tyr Lys Asp Tyr Phe Cys Ile Ser Lys Trp Tyr Leu Lys Glu Val

1280 1285 1290

Lys Arg Lys Pro Tyr Asn Leu Lys Leu Gly Cys Asn Trp Gln Phe

1295 1300 1305

Ile Pro Lys Asp Glu Gly Trp Thr Glu His His His His His His

1310 1315 1320

His His His His

1325

<210> 13

<211> 1314

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified BoNT/A "Chimera 3A"

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val
290 295 300
Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
305 310 315 320
Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu

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

385 390 395 400
Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu
405 410 415
Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
420 425 430
Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys
435 440 445
Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe

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

515 520 525
Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

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

740 745 750

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

755 760 765

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

770 775 780

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

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

900 905 910
Lys Leu Thr Ser Ser Ala Asn Ser Lys Ile Arg Val Thr Gln Asn Gln
915 920 925
Asn Ile Ile Phe Asn Ser Val Phe Leu Asp Phe Ser Val Ser Phe Trp
930 935 940
Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Lys Asn Asp Gly Ile Gln Asn Tyr Ile His
945 950 955 960
Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Lys Asn Asn Ser Gly Trp Lys

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

1025 1030 1035

Thr Asp Ile Lys Asp Ile Arg Glu Val Ile Ala Asn Gly Glu Ile

1040 1045 1050

Ile Phe Lys Leu Asp Gly Asp Ile Asp Arg Thr Gln Phe Ile Trp

1055 1060 1065

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

1070 1075 1080

Ile Glu Glu Arg Tyr Lys Ile Gln Ser Tyr Ser Glu Tyr Leu Lys

1085 1090 1095

Asp Phe Trp Gly Asn Pro Leu Met Tyr Asn Lys Glu Tyr Tyr Met

1100 1105 1110

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

1115 1120 1125

Ser Pro Val Gly Glu Ile Leu Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Gln Asn

1130 1135 1140

Ser Lys Tyr Ile Asn Tyr Arg Asp Leu Tyr Ile Gly Glu Lys Phe

1145 1150 1155

Ile Ile Arg Arg Lys Ser Asn Ser Gln Ser Ile Asn Asp Asp Ile

1160 1165 1170

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

1175 1180 1185

Gln Glu Trp Arg Val Tyr Thr Tyr Lys Tyr Phe Lys Lys Glu Glu

1190 1195 1200

Met Lys Leu Phe Leu Ala Pro Ile Tyr Asp Ser Asp Glu Phe Tyr

1205 1210 1215

Asn Thr Ile Gln Ile Lys Glu Tyr Asp Glu Gln Pro Thr Tyr Ser

1220 1225 1230

Cys Gln Leu Leu Phe Lys Lys Asp Glu Glu Ser Thr Asp Glu Ile

1235 1240 1245

Gly Leu Ile Gly Ile His Arg Phe Tyr Glu Ser Gly Ile Val Phe

1250 1255 1260

Glu Glu Tyr Lys Asp Tyr Phe Cys Ile Ser Lys Trp Tyr Leu Lys

1265 1270 1275

Glu Val Lys Arg Lys Pro Tyr Asn Leu Lys Leu Gly Cys Asn Trp

1280 1285 1290

Gln Phe Ile Pro Lys Asp Glu Gly Trp Thr Glu His His His His

1295 1300 1305

His His His His His His

1310

<210> 14

<211> 1304

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified BoNT/A "Chimera 3B"

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

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

740 745 750

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

755 760 765

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

770 775 780

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

785 790 795 800

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

805 810 815

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

820 825 830

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

835 840 845

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

850 855 860

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

865 870 875 880

Leu Arg Tyr Lys Asp Asn Asn Leu Ile Asp Leu Ser Gly Tyr Gly Ala
885 890 895
Lys Val Glu Val Tyr Asp Gly Val Glu Leu Asn Asp Lys Asn Gln Phe

900 905 910
Lys Leu Thr Ser Ser Ala Asn Ser Lys Ile Arg Val Thr Gln Asn Gln
915 920 925
Asn Ile Ile Phe Asn Ser Val Phe Leu Asp Phe Ser Val Ser Phe Trp
930 935 940
Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Lys Asn Asp Gly Ile Gln Asn Tyr Ile His
945 950 955 960
Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Lys Asn Asn Ser Gly Trp Lys

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

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

1085 1090 1095
Asp Phe Trp Gly Asn Pro Leu Met Tyr Asn Lys Glu Tyr Tyr Met
1100 1105 1110
Phe Asn Ala Gly Asn Lys Asn Ser Tyr Ile Lys Leu Lys Lys Asp

1115 1120 1125

Ser Pro Val Gly Glu Ile Leu Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Gln Asn

1130 1135 1140

Ser Lys Tyr Ile Asn Tyr Arg Asp Leu Tyr Ile Gly Glu Lys Phe

1145 1150 1155

Ile Ile Arg Arg Lys Ser Asn Ser Gln Ser Ile Asn Asp Asp Ile

1160 1165 1170

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

1175 1180 1185

Gln Glu Trp Arg Val Tyr Thr Tyr Lys Tyr Phe Lys Lys Glu Glu

1190 1195 1200

Met Lys Leu Phe Leu Ala Pro Ile Tyr Asp Ser Asp Glu Phe Tyr

1205 1210 1215

Asn Thr Ile Gln Ile Lys Glu Tyr Asp Glu Gln Pro Thr Tyr Ser

1220 1225 1230

Cys Gln Leu Leu Phe Lys Lys Asp Glu Glu Ser Thr Asp Glu Ile

1235 1240 1245

Gly Leu Ile Gly Ile His Arg Phe Tyr Glu Ser Gly Ile Val Phe

1250 1255 1260

Glu Glu Tyr Lys Asp Tyr Phe Cys Ile Ser Lys Trp Tyr Leu Lys

1265 1270 1275

Glu Val Lys Arg Lys Pro Tyr Asn Leu Lys Leu Gly Cys Asn Trp

1280 1285 1290

Gln Phe Ile Pro Lys Asp Glu Gly Trp Thr Glu

1295 1300

<210> 15

<211> 1304

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified BoNT/A "Chimera 3C"

<400> 15

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

1 5 10 15

Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro
20 25 30
Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg
35 40 45
Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu
50 55 60
Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr
65 70 75 80

Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu
85 90 95
Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val
100 105 110
Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys
115 120 125
Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr
130 135 140

Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile
145 150 155 160
Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr
165 170 175
Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
180 185 190
Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
195 200 205

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

Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys
260 265 270

Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn
275 280 285

Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val
290 295 300

Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
305 310 315 320

Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu
325 330 335

Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp
340 345 350

Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
355 360 365

Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr
370 375 380

Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
385 390 395 400

Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu
405 410 415

Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
420 425 430

Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys
435 440 445

Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe
450 455 460

Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu
465 470 475 480

Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

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

740 745 750

Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
755 760 765

Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
770 775 780

Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
785 790 795 800

Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys
805 810 815

Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
820 825 830

Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
835 840 845

Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser
850 855 860

Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Leu Asn Asn Ile Ile Leu Asn
865 870 875 880

Leu Arg Tyr Lys Asp Asn Asn Leu Ile Asp Leu Ser Gly Tyr Gly Ala
885 890 895

Lys Val Glu Val Tyr Asp Gly Val Glu Leu Asn Asp Lys Asn Gln Phe
900 905 910

Lys Leu Thr Ser Ser Ala Asn Ser Lys Ile Arg Val Thr Gln Asn Gln
915 920 925

Asn Ile Ile Phe Asn Ser Val Phe Leu Asp Phe Ser Val Ser Phe Trp
930 935 940

Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Lys Asn Asp Gly Ile Gln Asn Tyr Ile His
945 950 955 960

Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Lys Asn Asn Ser Gly Trp Lys
965 970 975

Ile Ser Ile Arg Gly Asn Arg Ile Ile Trp Thr Leu Ile Asp Ile Asn
980 985 990

Gly Lys Thr Lys Ser Val Phe Phe Glu Tyr Asn Ile Arg Glu Asp Ile

995 1000 1005

Ser Glu Tyr Ile Asn Arg Trp Phe Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn

1010 1015 1020

Leu Asn Asn Ala Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Lys Leu Glu Ser Asn

1025 1030 1035

Thr Asp Ile Lys Asp Ile Arg Glu Val Ile Ala Asn Gly Glu Ile

1040 1045 1050

Ile Phe Lys Leu Asp Gly Asp Ile Asp Arg Thr Gln Phe Ile Trp

1055 1060 1065

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

1070 1075 1080

Ile Glu Glu Arg Tyr Lys Ile Gln Ser Tyr Ser Glu Tyr Leu Lys

1085 1090 1095

Asp Phe Trp Gly Asn Pro Leu Met Tyr Asn Lys Glu Tyr Tyr Met

1100 1105 1110

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

1115 1120 1125

Ser Pro Val Gly Glu Ile Leu Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Gln Asn

1130 1135 1140

Ser Lys Tyr Ile Asn Tyr Arg Asp Leu Tyr Ile Gly Glu Lys Phe

1145 1150 1155

Ile Ile Arg Arg Lys Ser Asn Ser Gln Ser Ile Asn Asp Asp Ile

1160 1165 1170

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

1175 1180 1185

Gln Glu Trp Arg Val Tyr Thr Tyr Lys Tyr Phe Lys Lys Glu Glu

1190 1195 1200

Glu Lys Leu Phe Leu Ala Pro Ile Ser Asp Ser Asp Glu Phe Tyr

1205 1210 1215

Asn Thr Ile Gln Ile Lys Glu Tyr Asp Glu Gln Pro Thr Tyr Ser

1220 1225 1230

Cys Gln Leu Leu Phe Lys Lys Asp Glu Glu Ser Thr Asp Glu Ile
1235 1240 1245
Gly Leu Ile Gly Ile His Arg Phe Tyr Glu Ser Gly Ile Val Phe
1250 1255 1260
Glu Glu Tyr Lys Asp Tyr Phe Cys Ile Ser Lys Trp Tyr Leu Lys
1265 1270 1275

Glu Val Lys Arg Lys Pro Tyr Asn Leu Lys Leu Gly Cys Asn Trp
1280 1285 1290
Gln Phe Ile Pro Lys Asp Glu Gly Trp Thr Glu
1295 1300

<210> 16
<211> 1291
<212> PRT
<213> Clostridium botulinum
<400> 16
Met Pro Val Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asp Asn
1 5 10 15
Asn Asn Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Phe Ala Arg Gly Thr Gly Arg
20 25 30

Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Ile Pro Glu
35 40 45
Arg Tyr Thr Phe Gly Tyr Lys Pro Glu Asp Phe Asn Lys Ser Ser Gly
50 55 60
Ile Phe Asn Arg Asp Val Cys Glu Tyr Tyr Asp Pro Asp Tyr Leu Asn
65 70 75 80
Thr Asn Asp Lys Lys Asn Ile Phe Leu Gln Thr Met Ile Lys Leu Phe
85 90 95

Asn Arg Ile Lys Ser Lys Pro Leu Gly Glu Lys Leu Leu Glu Met Ile
100 105 110
Ile Asn Gly Ile Pro Tyr Leu Gly Asp Arg Arg Val Pro Leu Glu Glu
115 120 125
Phe Asn Thr Asn Ile Ala Ser Val Thr Val Asn Lys Leu Ile Ser Asn

130 135 140

Pro Gly Glu Val Glu Arg Lys Lys Gly Ile Phe Ala Asn Leu Ile Ile
145 150 155 160

Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Glu Asn Glu Thr Ile Asp Ile Gly
165 170 175

Ile Gln Asn His Phe Ala Ser Arg Glu Gly Phe Gly Gly Ile Met Gln
180 185 190

Met Lys Phe Cys Pro Glu Tyr Val Ser Val Phe Asn Asn Val Gln Glu
195 200 205

Asn Lys Gly Ala Ser Ile Phe Asn Arg Arg Gly Tyr Phe Ser Asp Pro
210 215 220

Ala Leu Ile Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr
225 230 235 240

Gly Ile Lys Val Asp Asp Leu Pro Ile Val Pro Asn Glu Lys Lys Phe
245 250 255

Phe Met Gln Ser Thr Asp Ala Ile Gln Ala Glu Glu Leu Tyr Thr Phe
260 265 270

Gly Gly Gln Asp Pro Ser Ile Ile Thr Pro Ser Thr Asp Lys Ser Ile
275 280 285

Tyr Asp Lys Val Leu Gln Asn Phe Arg Gly Ile Val Asp Arg Leu Asn
290 295 300

Lys Val Leu Val Cys Ile Ser Asp Pro Asn Ile Asn Ile Asn Ile Tyr
305 310 315 320

Lys Asn Lys Phe Lys Asp Lys Tyr Lys Phe Val Glu Asp Ser Glu Gly
325 330 335

Lys Tyr Ser Ile Asp Val Glu Ser Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Ser Leu
340 345 350

Met Phe Gly Phe Thr Glu Thr Asn Ile Ala Glu Asn Tyr Lys Ile Lys
355 360 365

Thr Arg Ala Ser Tyr Phe Ser Asp Ser Leu Pro Pro Val Lys Ile Lys
370 375 380

Asn Leu Leu Asp Asn Glu Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Gly Phe Asn Ile
385 390 395 400
Ser Asp Lys Asp Met Glu Lys Glu Tyr Arg Gly Gln Asn Lys Ala Ile
405 410 415

Asn Lys Gln Ala Tyr Glu Glu Ile Ser Lys Glu His Leu Ala Val Tyr
420 425 430
Lys Ile Gln Met Cys Lys Ser Val Lys Ala Pro Gly Ile Cys Ile Asp
435 440 445
Val Asp Asn Glu Asp Leu Phe Phe Ile Ala Asp Lys Asn Ser Phe Ser
450 455 460
Asp Asp Leu Ser Lys Asn Glu Arg Ile Glu Tyr Asn Thr Gln Ser Asn
465 470 475 480

Tyr Ile Glu Asn Asp Phe Pro Ile Asn Glu Leu Ile Leu Asp Thr Asp
485 490 495
Leu Ile Ser Lys Ile Glu Leu Pro Ser Glu Asn Thr Glu Ser Leu Thr
500 505 510
Asp Phe Asn Val Asp Val Pro Val Tyr Glu Lys Gln Pro Ala Ile Lys
515 520 525
Lys Ile Phe Thr Asp Glu Asn Thr Ile Phe Gln Tyr Leu Tyr Ser Gln
530 535 540

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

Asn Thr Met Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Leu Ile Val Pro Tyr Ile
610 615 620
Gly Leu Ala Leu Asn Val Gly Asn Glu Thr Ala Lys Gly Asn Phe Glu

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

Asp Asn Lys Asn Lys Ile Ile Lys Thr Ile Asp Asn Ala Leu Thr Lys

675 680 685

Arg Asn Glu Lys Trp Ser Asp Met Tyr Gly Leu Ile Val Ala Gln Trp

690 695 700

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

705 710 715 720

Lys Ala Leu Asn Tyr Gln Ala Gln Ala Leu Glu Glu Ile Ile Lys Tyr

725 730 735

Arg Tyr Asn Ile Tyr Ser Glu Lys Glu Lys Ser Asn Ile Asn Ile Asp

740 745 750

Phe Asn Asp Ile Asn Ser Lys Leu Asn Glu Gly Ile Asn Gln Ala Ile

755 760 765

Asp Asn Ile Asn Asn Phe Ile Asn Gly Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met

770 775 780

Lys Lys Met Ile Pro Leu Ala Val Glu Lys Leu Leu Asp Phe Asp Asn

785 790 795 800

Thr Leu Lys Lys Asn Leu Leu Asn Tyr Ile Asp Glu Asn Lys Leu Tyr

805 810 815

Leu Ile Gly Ser Ala Glu Tyr Glu Lys Ser Lys Val Asn Lys Tyr Leu

820 825 830

Lys Thr Ile Met Pro Phe Asp Leu Ser Ile Tyr Thr Asn Asp Thr Ile

835 840 845

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

850 855 860

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

865 870 875 880

Tyr Gly Ala Lys Val Glu Val Tyr Asp Gly Val Glu Leu Asn Asp Lys
885 890 895
Asn Gln Phe Lys Leu Thr Ser Ser Ala Asn Ser Lys Ile Arg Val Thr
900 905 910
Gln Asn Gln Asn Ile Ile Phe Asn Ser Val Phe Leu Asp Phe Ser Val
915 920 925

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

Glu Asp Ile Ser Glu Tyr Ile Asn Arg Trp Phe Phe Val Thr Ile Thr
995 1000 1005
Asn Asn Leu Asn Asn Ala Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Lys Leu Glu
1010 1015 1020
Ser Asn Thr Asp Ile Lys Asp Ile Arg Glu Val Ile Ala Asn Gly
1025 1030 1035
Glu Ile Ile Phe Lys Leu Asp Gly Asp Ile Asp Arg Thr Gln Phe
1040 1045 1050

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

Lys Asp Ser Pro Val Gly Glu Ile Leu Thr Arg Ser Lys Tyr Asn

1115 1120 1125

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

1130 1135 1140

Lys Phe Ile Ile Arg Arg Lys Ser Asn Ser Gln Ser Ile Asn Asp

1145 1150 1155

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

1160 1165 1170

Leu Asn Gln Glu Trp Arg Val Tyr Thr Tyr Lys Tyr Phe Lys Lys

1175 1180 1185

Glu Glu Glu Lys Leu Phe Leu Ala Pro Ile Ser Asp Ser Asp Glu

1190 1195 1200

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

1205 1210 1215

Tyr Ser Cys Gln Leu Leu Phe Lys Lys Asp Glu Glu Ser Thr Asp

1220 1225 1230

Glu Ile Gly Leu Ile Gly Ile His Arg Phe Tyr Glu Ser Gly Ile

1235 1240 1245

Val Phe Glu Glu Tyr Lys Asp Tyr Phe Cys Ile Ser Lys Trp Tyr

1250 1255 1260

Leu Lys Glu Val Lys Arg Lys Pro Tyr Asn Leu Lys Leu Gly Cys

1265 1270 1275

Asn Trp Gln Phe Ile Pro Lys Asp Glu Gly Trp Thr Glu

1280 1285 1290