



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 14/33 (2006.01); C12N 9/50 (2006.01); C12P 21/06 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015107240, 21.11.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.11.2012

Дата регистрации:
03.12.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 21.11.2012

(43) Дата публикации заявки: 27.09.2016 Бюл. № 27

(45) Опубликовано: 03.12.2018 Бюл. № 34

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 02.03.2015

(86) Заявка РСТ:
EP 2012/073283 (21.11.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/079495 (30.05.2014)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

РУММЕЛЬ Андреас (DE)

(73) Патентообладатель(и):

ИПСЕН БАЙОИННОВЕЙШН
ЛИМИТЕД (GB)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2009014854 A1, 29.01.2009.
KOZAKI S ET AL. "Activation of Clostridium
botulinum type B and E derivative toxins with
lysine-specific proteases", FEMS
MICROBIOLOGY LETTERS, 1985, v.27, no.2,
p.149-154. GIMENEZ J A ET AL. "Botulinum
neurotoxin type E fragmented with
endoproteinase Lys-C reveals the site trypsin
nicks and homology with tetanus (см. прод.)

(54) СПОСОБ ПРОИЗВОДСТВА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИ ПРОЦЕССИРОВАННОГО ПОЛИПЕПТИДА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии, а именно к применению Lys-C и способу протеолитического процессинга одноцепочечного ботулинического нейротоксина серотипа А (BoNT/A) для образования активного двухцепочечного ботулинического нейротоксина серотипа А (BoNT/A). Lys-C гидролизует одноцепочечный ботулинический нейротоксин

серотипа А (BoNT/A) с образованием активного двухцепочечного ботулинического нейротоксина серотипа А (BoNT/A). Изобретения позволяют получать активный двухцепочечный BoNT/A без нежелательных вторичных продуктов расщепления. 2 н. и 7 з.п. ф-лы, 11 ил., 2 табл., 8 пр.

(56) (продолжение):

neurotoxin", BIOCHIMIE, 1990, v.72, no.4, p.213-217. KIM J ET AL. "Characterization of a unique IgG1 mAb CEX profile by limited Lys-C proteolysis/CEX separation coupled with mass spectrometry and

R U 2 6 7 3 9 1 0 C 2

R U 2 6 7 3 9 1 0 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 14/33 (2006.01)*C12N 9/50* (2006.01)*C12P 21/06* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 14/33 (2006.01); *C12N 9/50* (2006.01); *C12P 21/06* (2006.01)(21)(22) Application: **2015107240, 21.11.2012**(24) Effective date for property rights:
21.11.2012Registration date:
03.12.2018

Priority:

(22) Date of filing: **21.11.2012**(43) Application published: **27.09.2016** Bull. № 27(45) Date of publication: **03.12.2018** Bull. № 34(85) Commencement of national phase: **02.03.2015**(86) PCT application:
EP 2012/073283 (21.11.2012)(87) PCT publication:
WO 2014/079495 (30.05.2014)Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

RUMMEL Andreas (DE)

(73) Proprietor(s):

IPSEN BAJOINNOVEJSHN LIMITED (GB)**(54) METHOD OF PRODUCING PROTEOLYTICALLY PROCESSED POLYPEPTIDE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: group of inventions relates to biotechnology, specifically to the use of Lys-C and a method for proteolytic processing of single-stranded botulinum neurotoxin serotype A (BoNT/A) to form an active, double-stranded botulinum neurotoxin serotype A (BoNT/A). Lys-C hydrolyses a single-stranded

botulinum neurotoxin serotype A (BoNT/A) to form an active double-stranded botulinum neurotoxin serotype A (BoNT/A).

EFFECT: invention makes it possible to obtain active double-stranded BoNT/A without undesirable secondary cleavage products.

9 cl, 11 dwg, 8 ex, 2 tbl

Настоящее изобретение относится к новому протеолитически активному полипептиду и разным применениям полипептида в способах скрининга и производства.

Clostridium botulinum и *Clostridium tetani* продуцируют сильнодействующие нейротоксины, т.е. ботулинические нейротоксины (BoNT) и столбнячный нейротоксин (TeNT), соответственно. Эти клостридиальные нейротоксины (CNT) специфично связываются с нервными клетками и нарушают высвобождение нейротрансмиттеров. *Clostridium botulinum* секретирует семь антигенных вариантов серотипов ботулинического нейротоксина (BoNT), обозначаемых буквами от А до G. Все серотипы вместе с родственным столбнячным нейротоксином (TeNT), секретируемым *Clostridium tetani*, являются Zn^{2+} -эндопротеазами, которые блокируют синаптический экзоцитоз, расщепляя белки, участвующие в образовании комплекса SNARE, который контролирует слияние клеточных мембран. CNT вызывают периферический паралич мышц, наблюдаемый при ботулизме и столбняке. При этом было показано, что активность CNT влияет на секрецию желез. Эти физиологические эффекты CNT на активность мышц и желез все чаще применяют в различных терапевтических и косметических целях. Ботулинический нейротоксин серотипа А (BoNT/A) был одобрен для применения у людей в США в 1989 г. для лечения косоглазия, блефароспазма и других нарушений. Он доступен коммерчески в виде белкового препарата ботулинического нейротоксина А, например, под торговым названием BOTOX (Allergan Inc.) и под торговым названием DYSPORT (Ipsen Ltd.). В терапевтическом применении комплекс, включающий нейротоксин и дополнительные бактериальные белки, инъецируют напрямую в мышцу, подлежащую лечению. При физиологическом рН токсин высвобождается из белкового комплекса (Eisele *et al.* 2011, Toxicon 57(4):555-65.), и развивается желаемый фармакологический эффект. Улучшенный препарат BoNT/A без комплексообразующих белков доступен под торговыми названиями XEOMIN или Vocouture (Merz Pharmaceuticals GmbH, Франкфурт/Германия). Эффект BoNT является лишь временным, что является причиной повторного введения BoNT, которое обычно требуется для поддержания терапевтического эффекта.

Каждый CNT исходно синтезируется в виде неактивного одноцепочечного полипептида. В случае BoNT полипептид нейротоксина имеет молекулярный вес, равный приблизительно 150 кДа. Посттрансляционный процессинг этого одноцепочечного полипептида включает ограниченный протеолиз выступающей области, называемой петлей (см. Таблицу 1), и образование рядом дисульфидного мостика. Активный двухцепочечный нейротоксин состоит из двух продуктов расщепления, получающихся в результате протеолитического гидролиза одноцепочечного полипептида-предшественника: N-концевой легкой цепи примерно 50 кДа и тяжелой цепи примерно 100 кДа, связанных дисульфидной связью. Структура CNT состоит из трех доменов, т.е. каталитической легкой цепи, тяжелой цепи, включающей транслокационный домен (N-концевую половину) и домен связывания рецептора (C-концевую половину) (ср. Krieglstein 1990, Eur J Biochem 188: 39; Krieglstein 1991, Eur J Biochem 202: 41; Krieglstein 1994, J Protein Chem 13: 49; Lacy *et al.*, 1998, Nat. Struct. Biol. 5(10):898-902). В зависимости от количества сайтов расщепления в одной цепи между аминокислотными остатками, образующими каталитический домен, и аминокислотными остатками, образующими транслокационный домен, эндопептидазная активность может привести к образованию двух крупных продуктов расщепления, т.е. легкой и тяжелой цепей, и, кроме того, характерных коротких пептидов, представляющих бывшую область петли, соединяющей в одноцепочечном нейротоксине участки, которые станут легкой и тяжелой цепями (ср. Таблицу 1, ниже).

Очистка CNT из раствора для ферментации представляет собой особенную сложность,

поскольку нейротоксины содержатся в нем в виде смеси непротессированных, частично протессированных и полностью протессированных полипептидов, которые обладают схожими биохимическими и физическими свойствами. Обычно частично протессированные нейротоксины образуются, если эндопротеолитическая активность гидролизует пептидную связь между легкой цепью и петлей, а при этом пептидная связь между петлей и N-концом тяжелой цепи остается интактной. Более того, частично протессированный нейротоксин также может образоваться, если эндопротеолитическая активность привела к отделению пептида петли от тяжелой цепи, в то время как пептидная связь между пептидом петли и C-концом легкой цепи еще не была гидролизована. В зависимости от условий ферментации и типа нейротоксина полностью протессированный полипептид, лишенный пептида петли, может быть значительно загрязнен от 5% до 90% частично протессированным или непротессированным пептидами. Однако в некоторых случаях нейротоксин в основном является непротессированным и перед терапевтическим применением нуждается в обработке эндопептидазой, чтобы стать биологически активным.

Известный уровень техники описывает разные попытки обработки клостридиальных нейротоксинов гетерологичными протеазами в целях снижения количества непротессированных или частично протессированных белков-предшественников.

Протеаза, наиболее часто применяемая для активации клостридиальных нейротоксинов, трипсин, будучи полезной для активации клостридиальных нейротоксинов серотипов В (BoNT/B) и Е (BoNT/E) (DasGupta & Sugiyama 1972, Biochem. Biophys. Res. Commun. 48: 108-112; Kozaki *et al.*, 1974, Infect. Immun. 10: 750-756), вероятно, образует вторичные продукты, возможно посредством протеолитического действия около C-конца тяжелой субъединицы BoNT/A, и, таким образом, вероятно, нарушает связывание токсина с его клеточным рецептором (Shone *et al.*, 1985, Eur. J. Biochem. 151: 75-82). Образование более специфичных продуктов расщепления теоретически ожидают от эндогенных протеаз, выделенных из естественного хозяина, такого как *C. botulinum*, образующего BoNT/A. Соответственно, предпринимают разные попытки выделения из естественной клетки-хозяина эндогенных протеаз, участвующих в протеолитической активации

клостридиальных нейротоксинов. Dekleva и DasGupta (Dekleva & DasGupta, 1989, Biochem. Biophys. Res. Commun. 162: 767-772) очищали из культур *C. botulinum*, образующих BoNT/A, фракцию, способную протеолитически расщеплять BoNT/A на тяжелую и легкую субъединицы. Более поздние исследования тех же авторов дальше характеризовали эндогенную протеазу, выделенную из *C. botulinum* (Dekleva & DasGupta 1990, J. Bact. 172: 2498-2503) и выявили 62 кДа белок, состоящий из 15,5 кДа полипептида и 48 кДа полипептида. Однако наблюдение значительной фрагментации CNT после ограниченного воздействия 62 кДа белка, обнаруженного Dekleva и DasGupta, позволяет предположить, что выделенная протеаза может не быть тем самым неидентифицированным протеолитическим ферментом, отвечающим за активацию CNT в культурах клеток клостридий и во время заражения. Фактически, другие авторы недавно предположили, что клострипаин, также называемый клостридиопептидазой В (Mitchel & Harrington, 1968, JBC 243: 4683-4692), может принимать участие в специфичной активации CNT (Sebahia *et al.*, 2007, Genome Res. 17(7):1082-1092; WO2009/014854). Интересно, что структура и субстратная специфичность данного фермента напоминают таковые у секретируемого альфа-клострипаина из *Clostridium histolyticum* (Dargatz *et al.* 1993), гомолог (74% аминокислотная идентичность) которого присутствует в *C. botulinum* (CBO1920). Альфа-клострипаин *C. histolyticum* является цистеиновой эндопептидазой со строгой специфичностью к аргинильным связям. Она синтезируется

в виде неактивного препрофермента, который подвергается автокаталитическому расщеплению с образованием 15,4 и 43 кДа полипептидов, которые объединяются с образованием гетеродимерного активного фермента (Dargatz et al. 1993). И альфа-кlostрипаин *C. histolyticum*, и 62 кДа протеаза *C. botulinum* нуждаются в

восстанавливающем агенте и кальции для полной активности и подвержены действию одних и тех же ингибиторов протеаз. Эти данные дают веские основания предполагать, что ортолог альфа-кlostрипаина из *C. botulinum* (CBO1920) является эндогенной протеазой, отвечающей за протеолитическое разрезание нейротоксина *C. botulinum*. Ген, кодирующий кlostрипаин (CPE0846), также присутствует в *C. perfringens* и, как было показано, положительно регулируется двухкомпонентной системой VirR/VirS (Shimizu et al. 2002b).

На сегодняшний день, однако, дальнейшие убедительные доказательства отсутствуют, и протеаза, способная эффективно превратить одноцепочечный предшественник CNT в настоящие зрелые продукты расщепления, т.е. двухцепочечный нейротоксин, все еще недоступна в данной области техники. Настоящее изобретение решает одну или более вышеописанных проблем.

Средства и способы снижения количества непроцессированных и/или частично процессированных полипептидов нейротоксина и улучшения таким образом качества препаратов нейротоксина являются востребованными, но все еще недоступными. Таким образом, техническую проблему, лежащую в основе настоящего изобретения, можно рассматривать как представление средств и способов улучшения производства полипептидов нейротоксинов путем удовлетворения описанных выше требований. Техническая проблема решается посредством вариантов применения изобретения, охарактеризованных в формуле изобретения и ниже.

Соответственно, настоящее изобретение относится в одном аспекте к протеолитически активному полипептиду, который включает полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1. В другом аспекте настоящее изобретение относится к протеолитически активному полипептиду, состоящему из полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1. В другом аспекте настоящее изобретение относится к протеолитически активному полипептиду, состоящему из полипептидной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 1.

Термин «протеолитически активный полипептид» в данном контексте относится к каталитической функции полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, и означает, что полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, способен гидролизовать пептидную связь. В одном аспекте «протеолитически активный полипептид» относится к полипептиду, который способен гидролизовать полипептид, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: с 4 по 25. Термин «протеолитически неактивный полипептид» в данном контексте относится к каталитической функции полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, и означает, что полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, не способен гидролизовать пептидную связь.

Специалист может определить, является ли полипептид, в соответствии с упомянутым в настоящем описании определением последовательности, полипептидом в соответствии с настоящим изобретением, с помощью тестирования протеолитической активности вышеуказанного полипептида. Исследование или тест-система для определения протеолитической активности включает приведение полипептида, который включает

полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1, в контакт с тестовым субстратом. Тестовым субстратом обычно является полипептид, о котором известно, что он расщепляется полипептидом, являющимся предметом настоящего изобретения.

Предпочтительно, чтобы тестовый субстрат был CNT, таким как BoNT, или его фрагментом. Тестовый субстрат может быть, например, нерасщепленным/непроцессированным BoNT, обозначаемым в настоящем описании как scBoNT, и может быть, например, серотипов A, B, C1, D, E, F или G (например, «scBoNT/A», «scBoNT/B» и т.п.), или тестовый субстрат может быть столбнячным нейротоксином. В качестве альтернативы, тестовый субстрат может быть фрагментом клостридиального нейротоксина, вышеуказанным фрагментом, включающим аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: с 4 по 25. Фрагмент может быть полипептидом из 50 или более аминокислотных остатков или пептидом длиной до 49 аминокислотных остатков. Как применяется на протяжении всего настоящего технического описания, термин «полипептид» относится к молекуле из 50 или более аминокислотных остатков, в то время как термин «пептид» относится к молекуле из 2-49 аминокислотных остатков. В одном аспекте тестовый субстрат является растворимым фрагментом нейротоксина, называемым LH_N, включающим полипептид легкой цепи, выступающую область пептида петли и N-концевую половину полипептида тяжелой цепи, домен транслокации H_N. В другом аспекте тестовый субстрат является пептидом или включает пептид, выбранный из любой из SEQ ID NO: с 4 по 25 (ср. Таблицу 1). В еще одном аспекте тестовый субстрат является химерным нейротоксином, включающим аминокислотные остатки, полученные из двух или более серотипов.

Исследование для определения протеолитической активности обычно будет включать стадию определения уровня превращения тестового субстрата в продукт(-ы) его расщепления. Наблюдение одного или более продуктов расщепления, образованных после контакта полипептида с тестовым субстратом, или наблюдение увеличения количества продукта(-ов) расщепления, является показателем протеолитической активности полипептида. Вышеуказанная стадия определения может включать сравнения субстрата с продуктом(-ами) расщепления. Вышеуказанное сравнение может включать определение количества субстрата и/или количества одного или более продуктов расщепления и может также включать подсчет соотношения субстрата и продуктов расщепления. Кроме того, исследование для определения протеолитической активности может включать стадию сравнения тестового образца с образцом сравнения, в котором образец сравнения обычно включает (а) полипептид, который включает полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1, и о котором известно, что он обладает протеолитической активностью, и (b) тестовый субстрат, о котором известно, что он расщепляется полипептидом по п.(а). В одном аспекте исследование для определения протеолитической активности включает разделение субстрата и продукта(продуктов) расщепления посредством электрофореза или колоночной хроматографии и, если необходимо, спектрометрический анализ. Может быть удобным метить тестовый субстрат одной или более метками для облегчения детектирования снижения количества тестового субстрата и/или увеличения количества продукта(-ов). Термин «метка» в данном контексте обозначает детектируемый маркер и включает, например, радиоактивную метку, антитело, флуоресцентную метку. Количество тестового субстрата и/или продукта распада можно определить, например, способами автордиографии или спектрометрии, включая способы, основанные на переносе

резонансной энергии между по меньшей мере двумя метками. В качестве альтернативы, для детектирования можно применять иммунологические способы, такие как Вестерн-блот или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Предпочтительное исследование для определения протеолитической активности полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, описано ниже в примерах, иллюстрирующих изобретение. В особенно предпочтительном варианте применения настоящего изобретения полипептид является протеолитически активным, если более 20%, предпочтительно более 95% тестового субстрата превращается в продукты расщепления, такие как легкие цепи и тяжелые цепи, за 120 мин при 37°C при применении буфера, выбранного из 100 мМ Трис-НCl, pH 8,0 или фосфатно-солевого раствора (50 мМ Na₂PO₄, 150 мМ NaCl, pH 7,4). Те же условия применяют, если тестовый субстрат представляет собой не полноразмерный нейротоксин, а, например, фрагмент полноразмерного нейротоксина или производное нейротоксина. Очевидно, что в данном случае продукты расщепления будут отличаться. Однако специалист в данной области техники может определить количество соответствующих продуктов расщепления. В другом аспекте обычно в исследовании применяют 100 нг протеолитически активного полипептида и молярное соотношение 1:100 относительно субстрата. В еще одном аспекте образец можно отбирать через определенные интервалы для наблюдения за каталитической активностью в течение времени. Исследование можно модифицировать, например, применяя разные количества протеолитически активного полипептида.

SEQ ID NO: 2 показывает полипептидную последовательность протеолитически неактивного полипептида, полученного из *Clostridium botulinum* штамма ATCC 3502, номер в GenBank "CAL82988.1", длина которого составляет 581 аминокислотных остатков. SEQ ID NO: 1 показывает протеолитически активное производное SEQ ID NO: 2, лишенное аминокислотных остатков в положениях с 1 по 248 последовательности SEQ ID NO: 2.

Термин «полипептид, который включает полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 50% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1» относится к полипептиду, который имеет по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1. Кроме того, термин относится к полипептиду, который включает полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1. Вышеуказанный полипептид может содержать дополнительные аминокислоты, например, во внутреннем положении или на N- или C-конце в последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1, или во внутреннем положении или к N- или C-концу от последовательности, имеющей по меньшей мере 50% идентичность с последовательностью SEQ ID NO: 1, в которой на N-конце полипептида может присутствовать метионин. Кроме того, термин относится к полипептиду, в котором отсутствует один или более аминокислотных остатки, например, во внутреннем положении или на N- или C-конце последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1, или во внутреннем положении или на N- или C-конце последовательности, имеющей по меньшей мере 50% идентичность с последовательностью SEQ ID NO: 1.

Термин «идентичность последовательности» в данном контексте относится к определению идентичности между аминокислотной последовательностью сравнения и анализируемой последовательностью, в которой последовательности выравнивают таким образом, чтобы получить максимальное совпадение, и которую можно рассчитать с помощью техник или способов, закодированных в компьютерных программах, таких как, например, BLASTP, BLASTN, FASTA (Altschul 1990, J Mol Biol 215: 403). Значения

процента идентичности в одном аспекте рассчитывают для всей аминокислотной последовательности. В другом аспекте идентичность последовательности рассчитывают для длины последовательности до 50 а.к. (аминокислотных) остатков, до 100 а.к., до 150 а.к., до 250 а.к., 300 а.к., 350 а.к., 400 а.к., 450 а.к., 500 а.к. или 550 а.к. остатков. В другом аспекте идентичность последовательности рассчитывают для по меньшей мере 50 а.к. остатков, по меньшей мере 100 а.к., по меньшей мере 150 а.к. или по меньшей мере 250 а.к. остатков. В предпочтительных вариантах применения изобретения идентичность последовательности определяют для всей длины SEQ ID NO: 1 или 2, т.е. для длины 333 а.к. или 581 а.к., соответственно. Серия программ на основе разных алгоритмов доступна специалистам для сравнения разных последовательностей. В данном контексте алгоритмы Нидлмана и Вунша или Смита и Уотермана дают особенно надежные результаты. Для проведения выравнивания последовательностей и расчета значений идентичности последовательности, перечисленных в настоящем описании, применяли коммерчески доступную программу DNASTAR Lasergene MegAlign версии 7.1.0, основанную на алгоритме Clustal W, для всей области последовательности со следующими настройками: параметры парного выравнивания: штраф за пропуск последовательности: 10,00; штраф за удлинение щели: 0,10; матрица сравнения аминокислот по Gonnet 250, которые, если иное не оговорено, всегда следует применять как стандартные настройки для выравнивания последовательностей.

Термин «по меньшей мере 50% идентичность последовательности» в данном контексте означает по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%.

Протеолитически активный полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, может содержать то же количество аминокислот, что и полипептидная последовательность сравнения, как показано в SEQ ID NO: 1. Также в настоящее изобретение включены полипептиды, имеющие дополнительные аминокислотные остатки или имеющие меньше аминокислотных остатков. В одном аспекте протеолитически активный полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, представляет собой или включает укороченный мутант SEQ ID NO: 1 или 2 или полипептида, имеющего по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2. У укороченного мутанта SEQ ID NO: 2 может, например, не быть одного или более аминокислотных остатков, расположенных к N-концу от аминокислоты в положении 249. Укороченный мутант может быть N- или C-концевым укороченным мутантом и/или внутренним укороченным мутантом, который является протеолитически активным. В одном аспекте вышеуказанный укороченный мутант SEQ ID NO: 2 лишен с 1 по 248 аминокислотные позиции SEQ ID NO: 2. В другом аспекте укороченный мутант SEQ ID NO: 2 является C-концевым укороченным мутантом. В одном аспекте у вышеуказанного укороченного мутанта последовательности SEQ ID NO: 2 отсутствуют до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 50, 100, 150 или до 170 последовательных аминокислотных остатков. В другом аспекте длина протеолитически активного полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, составляет по меньшей мере 200 а.к. остатков, по меньшей мере 250 а.к. остатков, по меньшей мере 300 а.к. остатков или по меньшей мере 333 а.к. остатка. В другом аспекте протеолитически активный полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, содержит до 333 а.к. остатков, до 350 а.к. остатков, до 573 а.к. остатков, до 592 а.к. остатков, до 600 а.к. остатков или до 617 а.к. остатков.

В другом аспекте протеолитически активный полипептид, являющийся предметом

настоящего изобретения, включает полипептид, содержащий дополнительные аминокислотные остатки на N- или C-конце и/или во внутреннем положении полипептидной цепи SEQ ID NO: 1 или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1. Эти дополнительные аминокислотные остатки могут включать до 5, до 10 или даже до 200, 300 или до 400 последовательных аминокислотных остатков. В одном аспекте дополнительные аминокислотные остатки действуют как ингибитор протеолитической активности. В другом аспекте дополнительные аминокислотные остатки можно удалить протеазой. В другом аспекте дополнительные остатки, ингибирующие протеолитическую активность полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, удалены. Дополнительные аминокислотные остатки могут быть фланкированы одним или более сайтами расщепления протеаз. В другом аспекте дополнительная аминокислотная последовательность действует как детектируемый маркер и/или обеспечивает связывание с твердой подложкой.

В другом аспекте полипептидная цепь SEQ ID NO:1 или полипептидная последовательность, имеющая по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1, модифицирована посредством замены одного или более аминокислотных остатков. Термин «замена» в данном контексте обозначает замещение аминокислоты другой аминокислотой. Например, до 1 а.к., 2 а.к., 3 а.к., 4 а.к., 5 а.к., 6 а.к., 7 а.к., 8 а.к., 9 а.к., 10 а.к., 15 а.к., 20 а.к. или до 50 а.к. можно заменить внутри полипептидной последовательности. Замены могут включать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, сделанные с целью, например, повышения или снижения связывания субстрата или протеолитической активности полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения.

В одном аспекте протеолитически активный полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, включает полипептид, который способен гидролизовать субстрат до двух или более нативных продуктов расщепления. В другом аспекте полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, гидролизует субстрат до двух или более продуктов расщепления, которые отличаются от нативных продуктов расщепления. Термин «нативные продукты расщепления» или «нативные продукты» в данном контексте относится к продуктам, которые идентичны по аминокислотной последовательности при сравнении с продуктами, образованными из того же субстрата в культурах дикого типа, из которых происходит субстрат. В одном аспекте продукт расщепления является двухцепочечным нейротоксином ботулинического нейротоксина или столбнячного нейротоксина, в другом аспекте двухцепочечный нейротоксин является нейротоксином, выделенным из *C. botulinum* серотипа A, B, C1, D, E, F или G. В еще одном аспекте вышеуказанный двухцепочечный нейротоксин является нативным двухцепочечным нейротоксином.

Таблица 1 показывает предшественника, нативного двухцепочечного нейротоксина TeNT и BoNT/A-G, и идентифицирует выступающую петлю, включающую аминокислотную последовательность, расщепляемую полипептидом, являющимся предметом настоящего изобретения

Таблица 1

5

10

15

20

25

30

35

Токсин	Выступающая петля	LC	H _N	H _{CN}	H _{CC}
BoNT/A1	SEQ ID NO: 4	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A2	SEQ ID NO: 5	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A3	SEQ ID NO: 6	M1-K434	A445-N868	I869-S1088	N1089-L1292
BoNT/A3	SEQ ID NO: 7	M1-K434	A445-N868	I869-S1088	N1089-L1292
BoNT/A4	SEQ ID NO: 8	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A5	SEQ ID NO: 9	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A6	SEQ ID NO: 5	M1-K438	A449-N872	I873-S1093	N1094-L1297
BoNT/A7	SEQ ID NO: 10	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/B1	SEQ ID NO: 11	M1-K441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B2	SEQ ID NO: 12	M1-R441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B3	SEQ ID NO: 12	M1-R441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B4bv	SEQ ID NO: 11	M1-K441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B5nP	SEQ ID NO: 13	M1-K441	V442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B6	SEQ ID NO: 11	M1-K441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/C1	SEQ ID NO: 14	M1-R444	T450-I868	N869-L1092	Q1093-E1291
BoNT/CD	SEQ ID NO: 14	M1-R444	T450-I868	N869-Q1083	I1084-E1280
BoNT/D	SEQ ID NO: 15	M1-K442	D446-I864	N865-Q1079	I1080-E1276
BoNT/DC	SEQ ID NO: 16	M1-R442	D446-I864	N865-L1088	Q1089-E1285
BoNT/E1-E5	SEQ ID NO: 17	M1-K419	S424-I847	K848-P1067	N1068-K1252
BoNT/E6	SEQ ID NO: 18	M1-K419	S424-I847	K848-P1067	N1068-K1252
BoNT/F1	SEQ ID NO: 19	M1-R435	A440-I866	K867-P1085	D1086-N1278

40

45

BoNT/F2	SEQ ID NO: 20	M1-R435	Q440-I866	K867-P1088	D1089-E1280
BoNT/F3	SEQ ID NO: 20	M1-R435	Q440-I866	K867-P1088	D1089-E1279
BoNT/F4	SEQ ID NO: 21	M1-R435	A440-I866	K867-P1085	D1086-E1277
BoNT/F5	SEQ ID NO: 22	M1-K434	P440-I863	K864-P1085	D1086-E1277
BoNT/F6	SEQ ID NO: 19	M1-R435	A440-I866	K867-P1088	D1089-E1275
BoNT/F7	SEQ ID NO: 23	M1-K427	N432-I857	I858-P1076	D1077-E1268
BoNT/G	SEQ ID NO: 24	M1-K442	S447-I865	S866-S1086	S1087-E1297
TeNT	SEQ ID NO: 25	M1-R449	T456-K883	S884-L1109	S1110-D1315

BoNT/F2	SEQ ID NO: 20	M1-R435	Q440-I866	K867-P1088	D1089-E1280
BoNT/F3	SEQ ID NO: 20	M1-R435	Q440-I866	K867-P1088	D1089-E1279
BoNT/F4	SEQ ID NO: 21	M1-R435	A440-I866	K867-P1085	D1086-E1277
BoNT/F5	SEQ ID NO: 22	M1-K434	P440-I863	K864-P1085	D1086-E1277
BoNT/F6	SEQ ID NO: 19	M1-R435	A440-I866	K867-P1088	D1089-E1275
BoNT/F7	SEQ ID NO: 23	M1-K427	N432-I857	I858-P1076	D1077-E1268
BoNT/G	SEQ ID NO: 24	M1-K442	S447-I865	S866-S1086	S1087-E1297
TeNT	SEQ ID NO: 25	M1-R449	T456-K883	S884-L1109	S1110-D1315

Следует понимать, что определения и объяснения терминов, приведенные выше и ниже, относятся с учетом необходимых изменений ко всем аспектам, описанным в данном описании изобретения, если иное не оговорено.

Протеолитически активный полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, подходит для различных применений. Коммерчески релевантным применением является их применение в производстве терапевтических нейротоксинов, таких как выделенные из *C. botulinum*. В настоящее время клеточные культуры *C. botulinum*, применяемые для получения коммерчески доступных препаратов ботулинического нейротоксина, загрязнены значительным количеством частично процессированного и/или непроцессированного нейротоксина, которые оказывают негативное действие, т.е. снижают специфическую активность данных фармацевтических композиций. С применением протеолитически активного или активированного полипептида, являющихся предметом настоящего изобретения, например, после лизиса *C. botulinum*, станет возможным обрабатывать композиции, включающие непроцессированный и/или частично процессированный нейротоксин, и таким образом превратить эти загрязняющие компоненты в полностью процессированный нейротоксин. Вследствие этого можно изготовить коммерческие продукты с повышенной специфической активностью нейротоксина, в которых можно снизить общее количество бактериального белка, далее уменьшая риск образования антител у пациента.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, включающей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, и, в некоторых случаях, регуляторные элементы. Термин «регуляторные элементы» в данном контексте относится к регуляторным элементам генной экспрессии, включая транскрипцию и трансляцию, и включает элементы, такие как ТАТА-бокс, промотор, энхансер, сайт связывания рибосом, последовательность Шаина-Дальгарно, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), сигнал полиаденилирования, концевая кэппирующая структура и подобные. Вышеуказанный регуляторный элемент может включать один или более гетерологичных регуляторных элементов или один или более гомологичных регуляторных элементов. «Гомологичный регуляторный элемент» является регуляторным элементом клетки дикого типа, из которой получают молекулу нуклеиновой кислоты, являющуюся предметом настоящего изобретения, который вовлечен в регуляцию экспрессии гена молекулы нуклеиновой кислоты или полипептида в вышеуказанной клетке дикого типа. Настоящее изобретение также включает молекулы нуклеиновой кислоты, включающие гетерологичные регуляторные элементы. Термин «гетерологичный регуляторный

элемент» является регуляторным элементом, который не участвует в регуляции экспрессии гена молекулы нуклеиновой кислоты или полипептида в вышеуказанной клетке дикого типа. Также включены регуляторные элементы для индуцируемой экспрессии, такие как индуцируемые промоторы. Молекулой нуклеиновой кислоты может быть, например, гяРНК, мРНК, РНК, ДНК, РНА, LNA и/или модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты. Молекула нуклеиновой кислоты может быть цикличной, линейной, интегрированной в геном или эписомальной. Также включены конкатемеры, кодирующие слитые белки, включающие три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять полипептидов, являющихся предметом настоящего изобретения. Более того, молекула нуклеиновой кислоты может содержать последовательности, кодирующие сигнальные последовательности для внутриклеточного транспорта, такие как сигналы для транспорта во внутриклеточный компартмент или для транспорта через клеточную мембрану.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к вектору, включающему молекулу нуклеиновой кислоты, в соответствии с молекулой нуклеиновой кислоты, являющейся предметом настоящего изобретения. Вектор может подходить для *in vitro* и/или *in vivo* экспрессии полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения. Вектор может быть вектором для транзientной и/или стабильной экспрессии гена. В одном варианте применения настоящего изобретения вектор дополнительно содержит регуляторные элементы и/или селективные маркеры. Вышеуказанный вектор в одном варианте применения настоящего изобретения имеет вирусное происхождение, в другом варианте применения настоящего изобретения имеет фаговое происхождение, в еще одном варианте применения настоящего изобретения имеет бактериальное происхождение.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, являющиеся предметом настоящего изобретения. Термин «клетка» в данном контексте включает прокариотические и/или эукариотические клетки, подходящие для экспрессии вышеуказанной молекулы нуклеиновой кислоты или вышеуказанного вектора, и в частности, полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения. Вышеуказанная клетка может быть хозяйской клеткой, не экспрессирующей полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, или его гомолог. Термин «гомолог» в данном контексте относится к полипептиду, включающему полипептидную последовательность, имеющую 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1. Однако в настоящее изобретение также включены клетки, в частности клетки дикого типа, экспрессирующие полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, или его гомолог. В частном аспекте клетку, являющуюся предметом настоящего изобретения, выбирают из *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. baratii* и *C. tetani*. В предпочтительном аспекте клетка является *C. botulinum* серотипа А, В или F. В другом аспекте вышеуказанная клетка является штаммом Hall (ATCC 3502) *C. botulinum*. В другом аспекте вышеуказанная клетка является образующим BoNT/A штаммом ATCC 19397, также известным как NCTC 4587 и NCTC 7272 *C. botulinum*. В другом аспекте вышеуказанная клетка является образующим BoNT/A штаммом NCTC 2916 *C. botulinum*. В другом аспекте вышеуказанные клетки являются образующими BoNT/A2 штаммами Kyoto-F и Mauritius/ NCTC 9837 *C. botulinum*. В другом аспекте вышеуказанная клетка является образующим BoNT/A3 штаммом A254 Loch Maree/NCTC 2012 *C. botulinum*. В другом аспекте вышеуказанная клетка является образующим BoNT/A4 и В штаммом CDC657 *C. botulinum*. В другом аспекте вышеуказанная клетка является образующим BoNT/A5 и

ВЗ' штаммом H04402 065 *C. botulinum*. В другом аспекте вышеуказанная клетка является образующим BoNT/B1 штаммом Okra/NCTC 7273 *C. botulinum*. В другом аспекте вышеуказанная клетка является образующим BoNT/B и F штаммом CDC4013/NCTC 12265 *C. botulinum*. В другом аспекте вышеуказанная клетка является образующим

5 BoNT/F1 штаммом Langeland/NCTC 10281 *C. botulinum*. В другом аспекте вышеуказанная клетка является *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium acetobutylicum*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoidis*, *B. thermoproteolyticus*, *B. anthracis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. coli* или дрожжевой клеткой. В одном аспекте полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, модифицируется внутри клетки (т.е.

10 гликозилируется, фосфорилируется, процессируется протеазами и т.п.). Модификация также включает добавление небелковых кофакторов, включая ионы металлов. Клетки, включающие протеолитически неактивный полипептид, описанный выше, любой промежуточный полипептидный продукт, а также конечный протеолитически активный полипептид, раскрытый в настоящем описании, включены в настоящее изобретение.

15 Также в настоящее изобретение включены клетки, содержащие индуктор экспрессии полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения. Такой индуктор экспрессии может быть молекулой нуклеиновой кислоты, полипептидом или химическим структурным элементом, включая малые химические структурные элементы, оказывающими эффект повышения количества или активности протеолитически

20 активного полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, в клеточных культурах или их лизатах. Индуктор экспрессии может, например, увеличивать транскрипцию или трансляцию молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения. В качестве альтернативы, индуктор экспрессии может быть соединением, способным активировать

25 протеолитически неактивный полипептид SEQ ID NO: 2 или полипептид, включающий полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 2. В одном аспекте вышеуказанная клетка включает индуктор, который является протеолитически активным полипептидом, способным удалять ингибирующие аминокислотные остатки с N-конца

30 вышеуказанного полипептида. Индуктор можно, например, экспрессировать рекомбинантными средствами, известными специалистам в данной области техники. В качестве альтернативы, индуктор можно выделить из клетки, например, клетки клостридий.

Настоящее изобретение также относится к применению молекулы нуклеиновой

35 кислоты, являющейся предметом настоящего изобретения, для производства протеолитически активного полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения.

В родственном аспекте настоящее изобретение относится к способу производства протеолитически активного полипептида, включающему стадии: (а) химического синтеза

40 или трансляции с нуклеотидной последовательности полипептида, включающего полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1; и (b) очистки полипептида со стадии (а).

Термин «химический синтез» обозначает синтез полипептидов химическими

45 способами. Такие способы рассматривают, например, в Nilsson et al., Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2005. 34:91-118. Термин «очистка полипептида» обозначает удаление из смеси, содержащей полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, соединений, отличных от вышеуказанного полипептида. Термин также обозначает

удаление полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, из смеси, включающей соединения, отличные от вышеуказанного полипептида. В частном аспекте термин обозначает отделение протеолитически активного полипептида от его протеолитически неактивного предшественника.

5 Нуклеиновую кислоту можно транслировать в клетке или в бесклеточной системе. Разные системы бесклеточной трансляции доступны специалистам в данной области техники. Настоящее изобретение включает, например, трансляцию в бесклеточной системе трансляции белка, включающей лизат ретикулоцитов кролика, лизат проростков пшеницы, лизат *E. coli* или другие клеточные лизаты, например, лизаты, полученные
10 из *C. botulinum*, и подобные. Также включена трансляция полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, с нуклеотидной последовательности, являющейся предметом настоящего изобретения, или с вектора, являющегося предметом настоящего изобретения. Транскрипцию можно регулировать или контролировать одним или более гетерологичными регуляторными элементами или гомологичными регуляторными
15 элементами. Также в этот аспект настоящего изобретения включена трансляция в клетках дикого типа, т.е. клетках, выделенных из природных источников, таких как любые известные изоляты *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. baratii* и *C. tetani*. В частном аспекте вышеуказанные клетки являются *C. botulinum* штамма Hall (ATCC 3502). Разные стандартные средства и способы доступны специалистам в данной области техники
20 для доставки молекул нуклеиновой кислоты или вектора в клетку и для экспрессии полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, в качестве рекомбинантного белка в клетке. Более того, специалисту известны многие стандартные техники выделения полипептидов из клеток или клеточных лизатов или из бесклеточных систем экспрессии (например, Recombinant DNA Principles and Methodologies, J. Green, Marcel Dekker Inc., 1998; The Condensed Protocols: From Molecular Cloning: A Laboratory
25 Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 2006; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 2000). Любые из этих средств и способов можно применять в способах, являющихся предметом настоящего изобретения.

Первый полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, можно
30 транслировать с молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей протеолитически активный полипептид. SEQ ID NO: 26 является примером такой молекулы нуклеиновой кислоты. В качестве альтернативы, вышеуказанная молекула нуклеиновой кислоты может кодировать полипептид-предшественник, который является протеолитически неактивным, но который можно превратить в протеолитически активный полипептид,
35 являющийся предметом настоящего изобретения. SEQ ID NO: 27 является примером такой молекулы нуклеиновой кислоты. Протеолитически неактивный предшественник также называется «неактивной BoNT гидролазой», сокращенно обозначаемой iBN. Этот протеолитически неактивный полипептид можно, например, активировать во время или после трансляции или при контакте, например, вышеуказанного
40 протеолитически неактивного полипептида с протеазой, способной удалять инактивирующие аминокислотные остатки с N-конца протеолитически неактивного полипептида. Примером протеолитически неактивного полипептида является полипептид, представленный последовательностью SEQ ID NO: 2. Другим примером является полипептид, включающий полипептидную последовательность, имеющую по
45 меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 2. Термин «инактивирующие аминокислотные остатки на N-конце» в одном аспекте относится к первым 248 а.к. остаткам вышеуказанного полипептида. В другом аспекте этот термин относится к фрагменту до 10 а.к., 50 а.к., 100 а.к., 150 а.к., 200 а.к., 250 а.к.

остатков вышеуказанного полипептида. Любые из этих полипептидов применимы в способе, являющемся предметом настоящего изобретения, для производства протеолитически активного полипептида. В одном аспекте протеазы, способную удалять инактивирующие аминокислотные остатки с N-конца данного полипептида, выделяют, например, из *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium baratii* и *Clostridium tetani*. В другом аспекте протеазы, способную удалять вышеуказанную инактивирующую аминокислоту, получают, получая фракционированный или нефракционированный лизат вышеуказанных клеток. Инактивирующие аминокислотные остатки можно удалить посредством приведения протеолитически неактивного полипептида в контакт с вышеуказанным лизатом и инкубации до превращения протеолитически неактивного полипептида в протеолитически активный полипептид.

В другом аспекте способа, являющегося предметом настоящего изобретения, полипептид транслируют в клетке. Клетка может быть прокариотической или эукариотической клеткой. В одном аспекте клетку выбирают из *E. coli*, *B. subtilis* или дрожжей. Также в настоящее изобретение включена трансляция полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, в клетке дикого типа, т.е. в клетке, выделенной из естественных источников, такой как любой известный изолят *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium baratii* и *Clostridium tetani*. В частном аспекте вышеуказанная клетка является *C. botulinum* штамма Hall (ATCC 3502). В другом частном аспекте вышеуказанная клетка является клеткой, являющейся предметом настоящего изобретения, описанной выше.

Продукты трансляции, полученные способом, являющимся предметом настоящего изобретения, можно очистить разными средствами, которые известны специалистам в данной области техники (например, Recombinant DNA Principles and Methodologies, J. Green, Marcel Dekker Inc., 1998; The Condensed Protocols: From Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 2006; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 2000). Типичные способы очистки полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, могут включать центрифугирование клеточного лизата, осаждение белков сульфатом аммония, ресуспендирование белков, центрифугирование ресуспендированных белков, ионообменную хроматографию, гель-фильтрационную хроматографию, гидрофобную хроматографию и подобные. Несколько комбинаций таких стадий в разном порядке могут быть полезным для очистки полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения. Предпочтительный способ очистки полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, описан в Примерах, которые иллюстрируют изобретение.

В одном аспекте стадия очистки включает связывание полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, с твердой подложкой. Термин «твердая подложка» относится к матриксу, включающему, например, силикон, сшитый поперечными связями декстран, сшитый поперечными связями полиакриламид или сшитая поперечными связями агароза и подобные. Также включены, в частности, полипептиды, стекло, полистирол, полипропилен, полиэтилен, полиэтиленгликоль (ПЭГ), декстран, нейлон, амилазы, натуральные и модифицированные целлюлозы, полиакриламиды, габбро и магнетит. Твердая подложка в аспекте изобретения является полисахаридным матриксом, выбранным из группы, состоящей из сефарозы, сефадекса, агарозы, сефацела, микроцеллюлозы и альгинатных шариков. В другом аспекте вышеуказанная твердая подложка может состоять из стеклянных шариков и/или полипептидных матриц.

В одном аспекте твердая подложка связана с антителом, являющимся предметом настоящего изобретения. Термин «связанный» обозначает в одном аспекте стабильно

связанный или стабильно ассоциированный. В другом аспекте «связанный» включает взаимодействия, такие как не прямые и прямые, необратимые и обратимые, физические и химические, электростатические и/или ковалентные связи. В одном аспекте антитело ковалентно связано, либо напрямую, либо через линкерную молекулу, с твердой подложкой. Антитело может быть связано с вышеуказанной твердой подложкой через линкер, включая низкомолекулярные соединения и пептидные (или полипептидные) линкерные молекулы. Твердая подложка на самом деле может иметь любую возможную структурную конфигурацию или организацию при условии, что она обеспечивает способность связанного антитела связываться со своим антигеном. Таким образом, матрикс или твердая подложка могут быть сферическими, как в шариках, или цилиндрическими, как на внутренней поверхности пробирки или на наружной поверхности палочки. В качестве альтернативы, поверхность может быть нерегулярной или плоской, такой как лист или тест-полоска.

Вышеуказанное антитело, связанное с твердой подложкой, можно применять, например, в способе производства, являющемся предметом настоящего изобретения, или в диагностическом способе. В одном аспекте вышеуказанный способ производства может включать стадию аффинной хроматографии, в котором вышеуказанная аффинная хроматография основана на антителе, связанном с твердой подложкой. В одном варианте применения настоящего изобретения вышеуказанное антитело является антителом, специфично связывающимся с протеолитически активным полипептидом, являющимся предметом настоящего изобретения. В другом варианте применения настоящего изобретения вышеуказанное антитело является антителом, специфично связывающимся с протеолитически неактивным полипептидом, являющимся предметом настоящего изобретения.

В другом аспекте способ производства протеолитически активного полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, включает очистку полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, из смеси, содержащей дополнительные компоненты. Очистка может быть основана, например, на полярности, электрическом заряде и размере. Таким образом, способ может в одном аспекте включать одну или более стадии разделения, выбираемые из группы, состоящей из нормально-фазовой ВЭЖХ, обращенно-фазовой ВЭЖХ, гидрофильной хроматографии (HILIC), гидрофобной хроматографии (HIC), ионообменной хроматографии (IEC), включая анионообменную хроматографию и катионообменную хроматографию, гель-фильтрационную хроматографию (SEC), гель-проникающую хроматографию (GPC).

В другом аспекте вышеуказанная очистка включает стадии (a) разделения посредством анионообменной хроматографии, (b) разделение посредством гель-фильтрационной хроматографии, (c) разделение посредством гидрофобной хроматографии и (d) разделение посредством гель-фильтрационной хроматографии.

Одну или более фракции, отобранные с хроматографической колонки, можно сконцентрировать, например, посредством преципитации или ультрафильтрации.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к композиции, включающей протеолитически активный полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения. Применяя раскрытый в настоящем описании способ, можно получить протеолитически активный полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, в котором по существу полностью отсутствует протеолитически неактивный полипептид. Иными словами способ, являющийся предметом настоящего изобретения, представляет протеолитически активный полипептид и композицию, не включающую значительное количество примесей неактивного белка-предшественника

полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения. Предполагается, что композиция не содержит значительного количества примесей или не содержит значительного количества протеолитически неактивного предшественника полипептида, если при применения способа детектирования, основанного на Вестерн-блоте, можно
 5 определить менее 5% протеолитически неактивного предшественника, в то время как вышеуказанные 5% относятся к количеству протеолитически неактивного предшественника относительно суммарного количества протеолитически активного и неактивного полипептида. В другом аспекте вышеуказанная композиция является в значительной степени очищенной и включает по меньшей мере 50% протеолитически
 10 активного полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, в то время как вышеуказанные 50% относятся к количеству протеолитически активного предшественника относительно общего количества белка, содержащегося в композиции. В другом аспекте вышеуказанная композиция является в значительной степени очищенной и включает по меньшей мере 75%, 80%, 90% или по меньшей мере 98%
 15 протеолитически активного полипептида.

В другом аспекте настоящее изобретение также относится к полипептиду, который можно получить способом производства протеолитически активного полипептида, как описано выше в настоящем описании и проиллюстрировано в Примерах.

Вышеуказанный протеолитически активный полипептид в одном аспекте является
 20 протеолитически активным полипептидом с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 1. В другом аспекте протеолитически активный полипептид является полипептидом, имеющим по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1. В еще одном аспекте протеолитически активный полипептид является полипептидом, который включает полипептидную
 25 последовательность, имеющую по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1. Термин «полипептид, который получают» в данном контексте относится в одном аспекте к полипептиду, который транслируется с нуклеиновой кислоты, являющейся предметом настоящего изобретения. Полипептид может последовательно подвергаться посттрансляционным модификациям, таким как
 30 ацетилирование, алкилирование, амидирование, добавление аминокислот, удаление аминокислот, гликозилирование, окисление, S-глутатионилирование, фосфорилирование, сульфатирование, протеолитический процессинг и подобные. Более того, полипептид может связывать ион металла, такой как Li^+ , Na^+ , K^+ , Ag^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} ,
 35 Mn^{2+} , Cu^{2+} или Zn^{2+} . Предпочтительно, чтобы ион металла был Zn^{2+} , Mn^{2+} или Co^{2+} .

Настоящее изобретение также относится в одном аспекте к антителу, специфично связывающемуся с полипептидом, являющимся предметом настоящего изобретения. Термин «антитело» в данном контексте включает моноклональное антитело, поликлональное антитело, одноцепочечное антитело, человеческое, гуманизированное,
 40 приматизированное или химеризированное антитело, биспецифичное антитело, синтетическое антитело, химические или ферментативно модифицированные производные, фрагмент любого из вышеуказанных антител или аптамеров, состоящих из встречающихся в естественных условиях и/или химически модифицированных нуклеиновых кислот. Фрагменты вышеуказанных антител включают фрагменты F(ab')
 45 2, F(ab), Fv или scFv или химически или ферментативно модифицированные производные любого из этих фрагментов.

В одном аспекте антитело, являющееся предметом настоящего изобретения, будет специфично связываться с протеолитически активным полипептидом, являющимся предметом настоящего изобретения, или его протеолитически неактивным

предшественником. В одном аспекте антитело, специфичное к протеолитически активному полипептиду, являющемуся предметом настоящего изобретения, перекрестно реагирует с протеолитически неактивным полипептидом, описанным в настоящем описании. В другом аспекте антитело способно различать протеолитически активный полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, и его неактивный предшественник. В другом аспекте эпитоп, к которому специфично антитело, расположен в аминокислотной области, присутствующей в протеолитически неактивном полипептиде, но не в протеолитически активном полипептиде. Например, вышеуказанный эпитоп может быть эпитопом из области полипептида, содержащей аминокислотные остатки с 1 по 248 полипептида, включающего полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 2.

В другом аспекте эпитоп образован аминокислотными остатками, расположенными к N-концу от аминокислоты 249 полипептида, включающего полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 2. В другом аспекте вышеуказанный эпитоп удален из протеолитически неактивного полипептида, описанного в настоящем описании, посредством протеолитического процессинга.

В другом аспекте эпитоп, к которому специфично антитело, являющееся предметом настоящего изобретения, является эпитопом, расположенным на N-конце полипептида, включающего полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1. Термин «N-конец» в данном аспекте изобретения относится к области полипептида, включающей 50 N-концевых аминокислотных остатков вышеуказанной полипептидной последовательности, предпочтительно 25 N-концевых аминокислотных остатков вышеуказанной полипептидной последовательности. В частном аспекте термин относится к 14 N-концевым аминокислотным остаткам. Термин «эпитоп» в данном контексте относится к антигенной детерминанте, которая распознается антителом, являющимся предметом настоящего изобретения. В одном аспекте эпитоп является линейным эпитопом, в другом аспекте эпитоп является конформационным эпитопом. В частном аспекте антигенная детерминанта состоит из пептида, имеющего аминокислотную последовательность N-конца протеолитически активного полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, в котором вышеуказанный пептид может иметь длину от 7 до 14, предпочтительно 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 аминокислотных остатков.

Термин «специфично связывает» или «специфичное связывающееся с» в одном аспекте обозначает, что антитело, являющееся предметом настоящего изобретения, не реагирует перекрестно в значительной степени с другими эпитопами на полипептиде, являющемся предметом настоящего изобретения, или на других полипептидах в целом.

Специфичность к эпитопу является важной характеристикой антитела, являющегося предметом настоящего изобретения. Специфичность антитела по отношению к протеолитически активному полипептиду по сравнению с протеолитически неактивным составит в одном аспекте по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%. Специфичное связывание можно исследовать разными хорошо известными техниками, включая, например, конкурентные исследования. Другой важной характеристикой является чувствительность антитела. Чувствительность в одном аспекте настоящего изобретения составит по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% эпитопа,

включенного в связанный образец. Чувствительность можно исследовать хорошо известными техниками. Специалисты в данной области техники смогут определить рабочие и оптимальные условия исследования для каждого определения посредством рутинных экспериментов. Общепринятые техники исследования связывания включают радиоиммунное исследование, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), равновесный диализ, изотермическую микрокалориметрию, исследования BIACORE® (поверхностный плазмонный резонанс, SPR) или другие способы поверхностной адсорбции. Система BIACORE® SPR измеряет взаимодействие антиген-антитело. SPR ответ отражает изменение концентрации масс на поверхности детектора при связывании или диссоциации анализируемых веществ. На основе SPR измерения BIACORE® в реальном времени напрямую отслеживают взаимодействия по мере их возникновения, см. BIAApplications Handbook, version AB (переиздание 1998), BIACORE® code No: BR-1001-86; BIAtechnology Handbook, version AB (переиздание 1998), BIACORE® code No: BR-1001-84. Свойства связывания, такие как чувствительность антитела, являющегося предметом настоящего изобретения, можно в основном определить в исследованиях связывания с помощью иммобилизованного антигена (лиганда), присутствующего на поверхности сенсора. Антитело, подлежащее анализу (анализируемое вещество), будет представлено в подвижной фазе, т.е. в растворе. В некоторых случаях антиген опосредованно прикреплен к поверхности через связывание с другой иммобилизованной молекулой, которая называется захватывающей молекулой. При инъекции антитела прерывистыми порциями через поверхность с иммобилизованными антигенами можно в целом выделить три фазы: (i) ассоциация антитела с антигеном во время инъекции образца; (ii) равновесное или стабильное состояние во время инъекции образца, при котором уровень связывания антитела уравновешен диссоциацией из комплекса антитело-антиген; (iii) диссоциация антитела от поверхности при протекании буфера. Следует понимать, что такое исследование альтернативно можно провести с иммобилизованными антителами, подлежащими исследованию, и антигеном, содержащим раствор в качестве подвижной фазы. Фазы ассоциации и диссоциации представляют информацию о кинетике взаимодействий анализируемого вещества с лигандом (k_a и k_d , скорости формирования комплекса и диссоциации, $k_d/k_a = K_D$). Фаза равновесия представляет информацию об аффинности взаимодействий анализируемого вещества с лигандом (K_D). В аспекте изобретения антитело, являющееся объектом настоящего изобретения, имеет K_D менее 0,5 мкМ, в другом аспекте - менее 0,05 мкМ, в другом аспекте - менее 0,02 мкМ.

Антитело в контексте настоящего изобретения можно произвести, применяя способы, описанные, например, в Harlow and Lane, 1988 (Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988). Моноклональные антитела можно изготовить с помощью техник, исходно описанных в Kohler & Milstein, 1975 (Kohler & Milstein 1975, Nature 256: 495) и Galfre & Milstein, 1981 (Galfre & Milstein 1981, Meth Enzymol 73: 3). Вышеуказанные техники включают слияние мышиных миеломных клеток с клетками селезенки, полученными от иммунизированных млекопитающих. Антитела можно впоследствии улучшить с помощью техник, хорошо известных специалистам в данной области техники. Например, поверхностный плазмонный резонанс в том виде, в котором его применяют в системе BIACORE®, можно применять для повышения эффективности фаговых антител, которые связываются с вышеуказанным эпитопом внутри полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения (ср. Schier et al., 1996, Human Antibodies Hybridomas 7: 97; Malmberg et al., 1995, J. Immunol Methods 183:

7).

В одном аспекте изобретения антитело производят, применяя пептид, включающий или стоящий из вышеуказанного эпитопа. Пептид можно произвести, например, синтетическим способом или с помощью рекомбинантной экспрессии. В качестве альтернативы, антитело, являющееся предметом изобретения, можно произвести, применяя встречающийся в естественных условиях протеолитически активный или неактивный полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения. В последнем случае следует понимать, что образующиеся в результате антитела необходимо в дальнейшем исследовать на специфичность к полипептиду, являющемуся предметом настоящего изобретения. В другом аспекте изобретения моноклональное антитело, являющееся предметом изобретения, производят, применяя полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, который можно обработать детергентом, чтобы сделать эпитоп иммунологически доступным. Однако следует понимать, что в том случае, когда антитело должно быть направлено на конформационный эпитоп, не следует проводить подобную обработку детергентом. В следующем аспекте можно также применять иммуностимулирующие агенты, такие как гемоцианин лимфы улитки (KLH), в таком процессе, особенно при применении синтетического пептида.

Антитело, являющееся предметом настоящего изобретения, можно применять, например, для аффинной хроматографии, иммунопреципитации и иммунолокализации полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, а также для наблюдения за наличием вышеуказанного полипептида в образцах или в рекомбинантных организмах. Более того, антитело, являющееся предметом настоящего изобретения, можно применять в способе детектирования или в способе диагностики. В частном аспекте антитело, являющееся предметом настоящего изобретения, применяют в Вестерн-блоте или в твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA). Также антитело, являющееся предметом настоящего изобретения, можно применять в терапевтических целях. В частности, антитело можно применять для ингибирования активности протеолитически активного полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения. Таким образом, антитело, являющееся предметом настоящего изобретения, также имеет разнообразные применения в терапевтических целях, описанных ниже.

Настоящее изобретение также относится к применению протеолитически активного полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, в способе протеолитического процессинга полипептида. В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу производства протеолитически процессированного полипептида, включающему стадию приведения (a) первого полипептида, указанного первого полипептида, являющегося полипептидом, который является предметом настоящего изобретения, в контакт с (b) вторым полипептидом, указанным вторым полипептидом, который подвержен протеолизу указанным первым полипептидом, при котором указанный контакт приводит к протеолитическому процессингу указанного второго полипептида до по меньшей мере двух продуктов расщепления.

Настоящее изобретение также относится к применению Lys-N, и/или Lys-C, и/или аргинилэндопептидазы (эндопротеазы Arg-C, LeR) из *Lysobacter enzymogenes* (ATCC 29487) (Wright DS, Graham LD, Jennings PA. Biochim Biophys Acta. 1998 Dec 22;1443(3): 369-74). Более того, также включено применение плазмина и/или омпитина (OmpT), связанной с мембраной сериновой протеазы, которая расщепляет мотивы (Arg/Lys)-(Arg/Lys) (K. Sugimura and T. Nishihara. J. Bacteriol. 170 (1988), pp. 5625-5632) в способе протеолитического процессинга CNT, такого как BoNT/A. В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу производства протеолитически процессированного

полипептида, включающему стадию приведения (а) первого полипептида, указанного первого полипептида, являющегося Lys-C или Lys-N, в контакт с (b) вторым полипептидом, указанным вторым полипептидом, который подвержен протеолизу указанным первым полипептидом, при этом указанный контакт приводит к протеолитическому процессингу указанного второго полипептида до по меньшей мере двух продуктов расщепления, и в котором второй полипептид является одноцепочечным BoNT/A. Термин «Lys-C» относится к 33 кДа сериновой эндопротеазе Lys-C из *Lysobacter enzymogenes* (лизилэндопептидаза, LeK, номер в Genbank Q7M135), которая специфично расщепляет пептидные связи, расположенные к С-концу от лизина, или ее гомологу, имеющему по меньшей мере 60% идентичность последовательности. Термин «Lys-N» относится к металлоэндопептидазе Lys-N, выделенной из *Grifola frondosa* и *Pleurotis ostreatus* (Nonaka T et al., 1997, J Biol Chem. 272:30032-30039; Nonaka T et al., 1998, J Biochem. 1998 124:157-162; Hori T et al., 2001, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 57:361-368). Также термин включает гомологи вышеуказанной протеазы, имеющие по меньшей мере 60% идентичность последовательности.

Этот способ можно применять, например, для производства протеолитически процессированного нейротоксина (CNT) или ботулинического нейротоксина (BoNT). Термин «BoNT», применяемый на протяжении данного изобретения, обозначает ботулинический нейротоксин и относится к нейротоксину, который можно получить из *C. botulinum*, такому как BoNT серотипа A, B, C1, D, E, F или G. Также термины «CNT» и «BoNT» включают рекомбинантный и модифицированный нейротоксин, включающий одну или более модификаций, включая химические модификации или генетические модификации. Термин «генетическая модификация» обозначает делецию, замену или добавление одного или более аминокислотных остатков. Применяя способ, являющийся предметом настоящего изобретения, сейчас становится возможным получать композиции нейротоксинов со значительно меньшим количеством примесей непротесированного или частично процессированного нейротоксина, поскольку эти примеси эффективно процессируются до двухцепочечного нейротоксина. В одном аспекте двухцепочечный нейротоксин является нативным двухцепочечным нейротоксином, в котором С-конец легкой цепи и N-конец тяжелой цепи идентичны соответствующему полностью процессированному двухцепочечному нейротоксину, выделенному из клостридий дикого типа.

Термин «контакт» в данном контексте относится к приведению по меньшей мере двух разных соединений в физическую близость, чтобы обеспечить физическое и/или химическое взаимодействие вышеуказанных соединений. В соответствии со способом, являющимся предметом настоящего изобретения, два разных указанных соединения являются, в одном аспекте, первым и вторым полипептидом, которые включены в раствор. Контакт осуществляется в условиях и в течение времени, достаточного для обеспечения взаимодействия первого и второго полипептидов. Термин «протеолитически процессированный полипептид» в данном контексте относится в одном аспекте к полипептиду, полипептидная цепь которого была гидролизована или расщеплена по одной или более пептидным связям. В другом аспекте термин относится к полипептиду, который был протеолитически расщеплен эндопротеазой или эндопептидазой. В другом аспекте термин относится к полипептиду, который был расщеплен до уровня по меньшей мере 50%. В другом аспекте вышеуказанный протеолитически процессированный полипептид является вторым полипептидом. В другом аспекте по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90% или 95% являются протеолитически процессированными.

Термин «первый полипептид» в данном контексте относится к полипептиду,

являющемуся предметом настоящего изобретения, т.е. протеолитически активному или активированному полипептиду, также называемому «активной BoNT-гидролазой».

Поскольку активную BoNT-гидролазу можно получить из супернатанта *C. botulinum*, она исходно была названа нативной BoNT-гидролазой, сокращенно «nBH».

термин «первый полипептид» и «nBH» также относится к BoNT-гидролазам, которые можно получать из других источников. Термин «второй полипептид» в данном контексте относится к субстрату вышеуказанного первого полипептида. Термин «подверженный протеолизу» относится к свойству или требованию ко второму полипептиду и применяется в настоящем описании, обозначая, что второй полипептид может

протеолитически расщепляться вышеуказанным первым полипептидом. Иными словами термин «подверженный протеолизу» обозначает, что второй полипептид включает сайт распознавания и расщепления протеазой, позволяющий ему выступать в роли субстрата для первого полипептида. «Второй полипептид» является субстратом первого полипептида и протеолитически процессируется до двух или более продуктов

расщепления. Применяя исследование, описанное выше, специалист в данной области техники может проверить, является ли данный полипептид субстратом первого полипептида и, таким образом, «вторым полипептидом» в соответствии с определением настоящего изобретения. Термин «по меньшей мере два продукта расщепления» включает, например, до двух, трех, четырех, пяти и до шести продуктов расщепления.

Данный способ можно применять, например, для получения фармацевтической композиции, включающей клостридиальный нейротоксин, или для образования полипептидных фрагментов, применяемых в способе масс-спектрометрии. Первый полипептид и второй полипептид могут контактировать на разных стадиях в процессе производства протеолитически процессированного полипептида. В одном аспекте стадия приведения в контакт первого полипептида и второго полипептида происходит внутри клетки. В частном аспекте данного варианта применения настоящего изобретения первый и второй полипептиды экспрессируются в вышеуказанной клетке.

В другом аспекте вышеуказанная стадия приведения в контакт происходит в клеточном лизате или в очищенном клеточном лизате. Этот аспект включает добавление первого полипептида к лизату или к очищенному лизату. Первый полипептид можно добавлять на разных стадиях во время очистки второго полипептида из клеточного лизата. Например, первый полипептид можно добавить до или после осаждения белка, ионообменной хроматографии, гидрофобной хроматографии и/или гель-фильтрационной хроматографии. Более того, также включено добавление первого полипептида к

фармацевтической композиции. В этом аспекте полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, применяют, например, для протеолитического расщепления второго полипептида, например, для активации второго полипептида, который является терапевтическим агентом, содержащимся в фармацевтической композиции. Также предусмотрено введение первого полипептида объекту для протеолитического

процессинга второго полипептида у объекта. Введение также включает совместное введение первого и второго полипептидов. Также способ включает стадию инкубации в условиях и в течение времени, достаточного для расщепления второго полипептида. В одном аспекте условия могут включать добавление буфера, выбранного из группы, состоящей из 100 mM Трис-HCl, pH 8,0 или фосфатно-солевого раствора (50 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, pH 7,4). Предпочтительные буферные условия включают 100

mM Трис-HCl, pH 8,0. «Время, достаточное для расщепления» можно определить с помощью исследования, описанного выше. В одном аспекте вышеуказанное «время, достаточное для расщепления» зависит от уровня расщепления, которое должен иметь

протеолитически процессированный полипептид или включающая его композиция. В одном аспекте способ включает стадию инкубации первого и второго полипептида в течение по меньшей мере 30 мин, 60 мин, 120 мин или по меньшей мере 240 мин. В другом аспекте первый и второй полипептиды инкубируют до 30 мин, 60 мин, 120 мин, 240 мин, 480 мин или до 600 мин. В другом аспекте способ включает стадию инкубации первого и второго полипептида при 4°C или при 37°C. В другом аспекте способ включает стадию инкубации до 1 ч, до 2 ч, 4 ч, 6 ч, 10 ч или до 16 ч.

В одном аспекте полипептидная цепь вышеуказанного второго полипептида включает последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: с 4 по 25. В более частном аспекте полипептидная цепь вышеуказанного второго полипептида включает последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: с 4 по 25, и в которой второй полипептид расщепляется к С-концу от остатка основной аминокислоты внутри вышеуказанной последовательности из любой из SEQ ID NO: с 4 по 25. Вышеуказанные последовательности представляют собой аминокислотные последовательности известных субстратов протеолитически активного полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения. Также в настоящем описании показано, что вышеуказанные субстраты расщепляются к С-концу от остатка основной аминокислоты, содержащейся в последовательности, сравните Таблицу 1, колонки LC и H_N. В предпочтительном аспекте вышеуказанный второй полипептид включает последовательность, выбранную из SEQ ID NO: с 4 по 10. В другом предпочтительном аспекте вышеуказанный второй полипептид является BoNT/A или его производным, включая, например, полипептид SEQ ID NO: 3 и его производные. Термин «производное», применяемый в соответствии с этим и другими аспектами изобретения, включает аминокислотные мутации, такие как добавление, замену, делецию или укорочение одного или более аминокислотных остатков.

В одном аспекте второй полипептид включает производное любой из SEQ ID NO: с 4 по 25 или SEQ ID NO: 3, при этом вышеуказанное производное содержит одну или более точечных мутаций и/или один или более дополнительных аминокислотных остатков. В другом аспекте вышеуказанное производное содержит до 1, до 2, до 3, до 4, до 5, до 6, до 7, до 8, до 9, до 10, до 15 точечных мутаций. Применяя исследование активности для определения протеазной активности, как описано в настоящем описании, специалист может определить, процессируется ли вышеуказанное производное протеолитически активным полипептидом, являющимся предметом настоящего изобретения. В другом аспекте производное содержит точечную мутацию, меняющую остаток основной аминокислоты на остаток неосновной аминокислоты. В другом аспекте производное имеет по меньшей мере 50% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: с 4 по 25. В другом аспекте названное производное или полипептид, содержащий производное, является субстратом первого полипептида и протеолитически расщепляется первым полипептидом. Типичным примером является производное SEQ ID NO: 3, включающее, например, одну или более точечных мутаций в легкой или тяжелой цепи.

В другом аспекте вышеуказанный полипептид включает (а) полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 30% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 3 [(BoNT/A ATCC 3502, номер в Genbank AAA23262)]; или (б) полипептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из столбнячного эндотоксина, белка каскада свертывания крови фактора X или протромбина (фактора II), пищеварительных ферментов поджелудочной железы, таких как трипсин, химотрипсин, пепсин, папаин. По меньшей мере 30% означает по меньшей

мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 85%. В частном аспекте идентичность последовательности вышеуказанной последовательности второго полипептида, имеющей по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 3 определяют на основании аминокислотных

5 положений с 420 по 466 SEQ ID NO: 3, в другом аспекте вышеуказанную идентичность последовательности определяют на основании любой из SEQ ID NO: с 4 по 25. Иными словами, вышеуказанный аспект относится ко второму полипептиду, включающему полипептидную последовательность, которая имеет, например, 30% идентичность последовательности с полипептидной последовательностью, находящейся между

10 аминокислотными положениями с 420 по 466 SEQ ID NO: 3, или по меньшей мере 30% идентичность последовательности с полипептидной последовательностью любой из SEQ ID NO: с 4 по 25. Полипептид, в соответствии с данным определением, можно, например, получить из *C. botulinum*, *C. tetani* или *C. sporogenes*. Вышеуказанный второй полипептид может быть, например, встречающимся в природе нейротоксином, таким

15 как BoNT/A, B, C1, D, E, F или G, или их производным, включающим одну или более аминокислотных мутаций, таких как добавление, замена, делеция или укорочение одного или более аминокислотных остатков. Включены, например, производные, лишенные, например, H_C домена нативного нейротоксина или его частей, или производные с другими аминокислотными остатками, замещающими H_C домен, а также производные с

20 с дополнительной легкой цепью или другой белковой молекулой-грузом, присоединенной к N-концу легкой цепи BoNT.

В другом аспекте второй полипептид может содержать дополнительные аминокислотные остатки на N- или C-конце или во внутреннем положении.

25 Дополнительные аминокислотные остатки могут быть фланкированы одним или более сайтами расщепления протеаз. В другом аспекте дополнительная аминокислотная последовательность функционирует как детектируемый маркер и/или обеспечивает связывание с твердой подложкой. Примером является глутатионовый маркер или GST (glutathione-S-transferase, глутатион-S-трансфераза) маркер. Другим примером является аминокислотная последовательность VPPTPGSAWSHPQFEK, содержащая Streptag

30 (streptavidin tag, стрептавидиновый маркер), предпочтительно присоединенный к C-концу.

В другом частном аспекте вышеуказанный полипептид является полипептидом, включающим полипептидную последовательность, такую как показанная в GenBank с номерами CBZ04958.1, YP_002805603.1, ZP_02994746.1, YP_001788403.1, YP_001782718.1,

35 ZP_02616437.1, ZP_02614241.1, YP_001392361.1, YP_001255575.1, или ее гомолог, имеющий по меньшей мере 50% идентичность последовательности.

В другом аспекте биологическая активность вышеуказанного второго полипептида модулируется протеолитическим расщеплением. Специалистам хорошо известно, что функцию многих полипептидов можно модулировать посредством протеолитического процессинга. «Модулировать» в данном контексте означает повышать или понижать, активировать или инактивировать. Например, биологическая активность многих нейротоксинов бактерий повышается или стимулируется протеолитическим процессингом одноцепочечного нейротоксина до двухцепочечного нейротоксина, в котором двухцепочечный нейротоксин состоит из легкой и тяжелой полипептидной

40 цепей, которые ковалентно связаны через дисульфидный мостик. Биологическая активность нейротоксина охватывает по меньшей мере три отдельных активности: первая активность - это «протеолитическая активность», присущая легкой цепи нейротоксина и отвечающая за гидролиз пептидной связи одного или более

45

полипептидов, участвующих в регуляции слияния клеточных мембран. Вторая активность - это «транслокационная активность», присущая N-концу тяжелой цепи процессированного нейротоксина и участвующая в транспорте легкой цепи через мембрану лизосом в цитоплазму. Третья активность - это «рецептор-связывающая активность», присущая C-концу тяжелой цепи процессированного нейротоксина и участвующая в связывании и захвате нейротоксина клеткой-мишенью. В предпочтительном аспекте термин «биологическая активность» в данном контексте обозначает протеолитическую активность. В более предпочтительном аспекте термин обозначает повышенную протеолитическую активность.

Биологическую активность клостридиального нейротоксина можно измерить с помощью разных тестов, которые известны специалистам в данной области техники. Эти тесты позволяют определить одну или более активностей, упомянутых выше. Например, исследование 50% летальной дозы (LD₅₀) на мышах или *ex vivo* исследование диафрагмального нерва правого или левого купола диафрагмы у мышей (MPN), как описано Pearce et al., 1994 (Pearce LB, Borodic GE, First ER, MacCallum RD (1994), *Toxicol Appl Pharmacol* 128: 69-77) и Habermann et al., 1980 (Habermann E, Dreyer F, Bigalke H. (1980), *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 311:33-40), позволяют определить токсический эффект исследуемого препарата нейротоксина на живой организм или изолированный нервно-мышечный препарат. Для установления токсического эффекта в исследовании LD₅₀ нейротоксин должен быть биологически активным и обладать каждой из вышеуказанных активностей, упомянутых выше. Более того, доступны различные другие исследования, позволяющие, например, определить, является ли нейротоксин или легкая цепь нейротоксина протеолитически активными. Такие исследования, например, основаны на контакте BoNT/A с SNAP-25. В качестве альтернативы, можно применять пептид, представляющий сайт расщепления SNAP-25, в котором пептид можно пометить для облегчения детектирования. В предпочтительном аспекте биологическую активность определяют, применяя исследование MPN, описанное ниже.

В другом аспекте вышеуказанный первый полипептид активируется посредством протеолитического процессинга неактивного полипептида-предшественника, вышеуказанного неактивного полипептида-предшественника, включающего полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 2. Этот аспект основан на наблюдении того факта, что полипептид, имеющий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2, является протеолитически неактивным, в то время как его укороченные с N-конца варианты являются протеолитически активными. Также настоящее изобретение предусматривает применение протеолитически неактивного полипептида в описанных в настоящем описании способах. Протеолитически неактивный полипептид, описанный в настоящем описании, можно активировать, например, посредством удаления фрагмента с N-конца или всего N-конца, включающего аминокислотные остатки с 1 по 248 SEQ ID NO: 2. В одном аспекте N-конец удаляют протеазой, в другом аспекте N-конец удаляют автопротеолизом SEQ ID NO: 2. 60% идентичность последовательности относится к выравниванию последовательности относительно полноразмерной NT02CB1447.

В другом аспекте являющийся предметом настоящего изобретения способ производства протеолитически процессированного полипептида включает стадию очистки протеолитически процессированного второго полипептида или по меньшей мере одного или более продуктов его расщепления. Очистку *C. botulinum*,

экспрессирующих BoNT/A, можно выполнить, например, как в основном описано в предшествующем уровне техники (DasGuppa 1984, Toxicon 22, 415; Sathyamoorthy 1985, J Biol Chemistry 260, 10461). В частности, очистка нейротоксина может включать одну или более стадии преципитации и экстракции, одну или более стадий концентрирования и другие определенные хроматографические стадии. Рекомбинантный одноцепочечный BoNT/A и его очистка описаны в предшествующем уровне техники (Rummel et al., 2004, Mol Microbiol. 51:631-43).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения штаммом клостридий является *C. botulinum*, например, образующий BoNT/A или его производное. Для ферментации можно применять процесс, описанный DasGuppa B. R. et al. в Toxicon, vol. 22, No.3, p. 414-424, 1984. Таким образом, 0,5% дрожжевого экстракта и 0,6% автоклавированной дрожжевой массы добавляют к 2% среде N-Z-аминa типа А и доводят рН до 7,2 с помощью 4N NaOH, а затем полученную таким способом среду автоклавируют. К этой среде можно добавить отдельно проавтоклавированную глюкозу (30% по весу на объем), чтобы достичь конечной концентрации глюкозы в среде, равной 0,5%. Инкубацию можно проводить, например, при 37°C без перемешивания, при этом ферментацию прерывают, например, через 96 часов. В рамках настоящего изобретения помимо периодической ферментации, описанной ранее, также можно проводить полунепрерывную ферментацию, повторную периодическую ферментацию или непрерывную ферментацию.

После окончательной ферментации и отделения среды для ферментации от клеток со средой для ферментации можно провести первую преципитацию с целью удаления крупных белков. Предпочтительно, чтобы преципитация была кислотной преципитацией. Условия реакции для такой кислотной преципитации известны специалистам в данной области техники. Обычно можно применять 1,5 М H₂SO₄ для подкисления супернатанта до рН 3,5. Центрифугирование обычно проводят в течение 20 минут при 2400×g при 4°C. Осадок, полученный в результате центрифугирования, можно промыть водой, предпочтительно повторно. Затем осадок можно экстрагировать 0,1 М буфером, состоящим из лимонной кислоты и трехзамещенного цитрата натрия, рН 5,5, например, в течение часа. Затем можно провести еще одну стадию центрифугирования, например, при 9800×g в течение 20 минут при 4°C. Полученный осадок при необходимости можно снова экстрагировать, как описано ранее. Супернатант после экстракции и оба супернатанта в случае повторении экстракции можно затем подвергнуть протаминсульфатной преципитации. Преципитация может продолжаться в течение ночи, например, при 8°C. Затем преципитат можно центрифугировать, например, в течение 20 минут при 4°C и 12000×g. Супернатант после центрифугирования можно подвергнуть преципитации, такой как преципитация сульфатом аммония, во время которой будут удалены другие крупные белки. После стадии преципитации сульфатом аммония можно добавить стадию центрифугирования и затем можно вновь растворить полученный таким образом осадок и, при необходимости, провести диализ. С экстрактом, предпочтительно диализованным и вновь центрифугированным, можно провести серию хроматографических стадий с целью очистки нейротоксина. Каждая хроматографическая стадия служит для удаления примесей, таких как протаминсульфат, оставшаяся ДНК, части более мелких белков и белков среднего размера, а также гемагглютининов из белкового комплекса ботулинического нейротоксина. Для этой цели можно применять одну или несколько хроматографических стадий в предпочтительном варианте осуществления изобретения. При необходимости элюат, например, из последней хроматографической стадии, можно отфильтровать и добавить

подходящие адъюванты. В одном аспекте фильтрацию проводят в реакционных контейнерах, с которыми затем можно провести стадию лиофилизации.

Настоящее изобретение также относится к композиции, которую можно получить являющимся предметом настоящего изобретения способом производства протеолитически процессированного полипептида. В одном аспекте вышеуказанная композиция включает смесь процессированного и непроцессированного второго полипептида, в которой вышеуказанная смесь может содержать менее 5%, 4%, 3%, 2% или менее 1% непроцессированного второго полипептида. В аспекте вышеуказанной композиции вышеуказанный второй полипептид является BoNT или его производным. BoNT может быть, например, выбран из группы, состоящей из BoNT серотипа A, B, C, D, E, F и G, включая их производные. Композиция может быть, например, жидкой или твердой композицией и может содержать один или более носителей, адъювантов и/или вспомогательных веществ.

В другом аспекте настоящее изобретение также относится к способу производства лекарственного средства, т.е. фармацевтической композиции, включающему стадии вышеупомянутого способа и дальнейшую стадию выпуска очищенного двухцепочечного нейротоксина в качестве лекарственного средства. В одном аспекте вышеуказанное лекарственное средство включает смесь процессированного и непроцессированного второго полипептида, в которой вышеуказанная смесь содержит менее 5% непроцессированного второго полипептида. В предпочтительных вариантах применения изобретения смесь содержит менее 4%, 3%, 2% или менее 1% непроцессированного второго полипептида.

Настоящее изобретение также относится к разным медицинским применениям соединений, раскрытых в настоящем описании:

В одном аспекте настоящее изобретение относится к протеолитически активному полипептиду в соответствии с настоящим изобретением для применения в качестве лекарственного средства или в фармацевтической композиции.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, в соответствии с настоящим изобретением, для применения в качестве лекарственного средства или в фармацевтической композиции.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, в соответствии с настоящим изобретением, для применения в качестве лекарственного средства или в фармацевтической композиции.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к ингибитору, в соответствии с настоящим изобретением, для применения в качестве лекарственного средства или в фармацевтической композиции.

В частности, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, антитело, являющееся предметом настоящего изобретения, композицию, являющуюся предметом настоящего изобретения, или ингибитор, являющийся предметом настоящего изобретения.

Термин «композиция» в данном контексте относится к любой композиции, выпускаемой в твердой, жидкой, аэрозольной (газообразной) форме и подобных. Вышеуказанная композиция включает, например, терапевтически активное соединение, являющееся предметом настоящего изобретения, при необходимости вместе с подходящими вспомогательными веществами, такими как растворители или носители или другие ингредиенты. В одном аспекте терапевтически активное соединение является протеолитически активным полипептидом, являющимся предметом настоящего

изобретения. В другом аспекте терапевтическое соединение является протеолитически процессированным вторым полипептидом, как описано выше, таким как двухцепочечный нейротоксин. В другом аспекте терапевтически активное соединение является антителом, являющимся предметом настоящего изобретения. В другом аспекте

5 терапевтически активное соединение является ингибитором протеолитически активного полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения.

В данном контексте для настоящего изобретения различают вспомогательные соединения, т.е. соединения, которые не влияют на эффекты соединения, являющегося предметом настоящего изобретения, при применении композиции в заданных целях, и

10 прочие ингредиенты, т.е. соединения, которые оказывают дополнительный эффект или модулируют эффект соединения, являющегося предметом настоящего изобретения. Подходящие растворители и/или носители зависят от цели, с которой следует применять композицию, и от прочих ингредиентов. Специалист в данной области техники сразу может определить такие подходящие растворители и/или носители.

15 Носитель(-и) должен быть приемлемым с точки зрения совместимости с прочими ингредиентами формулы и должен быть неврежденным для его реципиента. Применяемый фармацевтический носитель может включать твердый носитель, гель или жидкость. Примерами твердых носителей являются лактоза, сульфат кальция, сахароза, тальк, желатин, агар, пектин, камедь, стеарат магния, стеариновая кислота и подобные.

20 Примерами жидких носителей являются раствор фосфатно-солевого раствора, сироп, масло, вода, эмульсии, разные типы увлажняющих агентов и подобные. Аналогично, носитель или растворитель могут включать задерживающие материалы, хорошо известные в данной области техники, такие как моностеарат глицерина или дистеарат глицерина по отдельности или с воском. Вышеуказанные подходящие носители

25 включают упомянутые выше и прочие носители, хорошо известные в данной области техники, см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

Растворитель(-и) выбирают так, чтобы не нарушить биологическую активность комбинации. Примерами таких растворителей являются дистиллированная вода,

30 физиологический раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и раствор Хэнкса, кроме того, фармацевтическая композиция или формула могут также включать другие носители, адъюванты или нетоксичные, нетерапевтические, неиммуногенные стабилизаторы и подобные.

В одном аспекте фармацевтическая композиция в данном контексте включает

35 биологически активный нейротоксин, полученный способом, являющимся предметом настоящего изобретения, при необходимости, один или более фармацевтически приемлемых носителей. Активный нейротоксин может присутствовать в жидкой или лиофилизованной форме. В одном аспекте вышеуказанное соединение может присутствовать вместе с глицерином, белковыми стабилизаторами (например,

40 человеческим сывороточным альбумином (HSA)) или небелковыми стабилизаторами, такими как поливинилпирролидон или гиалуроновая кислота. Фармацевтическую композицию в одном аспекте вводят местно. Применяемым обычно способом введения лекарственных средств является внутримышечное, подкожное (около желез) введение. Однако в зависимости от природы и механизма действия соединения фармацевтическую

45 композицию можно также вводить другими способами. Двухцепочечный полипептид нейротоксина является активным ингредиентом композиции, и в одном аспекте его вводят в обычных формах выпуска, приготовленных путем комбинации лекарственного средства со стандартными фармацевтическими носителями в соответствии с обычными

процедурами. Данные процедуры могут включать смешивание, гранулирование и компрессию или растворение ингредиентов в соответствии с целевым препаратом. Следует понимать, что форму и характер фармацевтически приемлемого носителя или растворителя диктует количество активного ингредиента, с которым он будет

комбинирован, способ введения и другие хорошо известные переменные. Терапевтически эффективная доза относится к количеству соединения, нейротоксина, которое будут применять в фармацевтической композиции, являющейся предметом настоящего изобретения, которое предотвращает, улучшает или лечит симптомы, сопровождающие заболевание или состояние, указанные в данном описании изобретения. Терапевтическую эффективность и токсичность соединения можно определить посредством стандартных фармацевтических процедур в клеточных культурах или экспериментальных животных, например, 50% эффективную дозу (ED₅₀, 50% efficient dose) (дозу, терапевтически эффективную в 50% популяции) и LD₅₀ (дозу, летальную для 50% популяции). Отношение доз терапевтического и токсического эффектов является терапевтическим индексом, и его можно выразить как отношение LD₅₀/ED₅₀.

Схему приема лекарственного средства определит лечащий врач и другие клинические факторы. Как хорошо известно в медицине, доза для любого пациента зависит от многих факторов, включая вес пациента, площадь поверхности тела, возраст, то соединение, которое подлежит введению, пол, время и способ введения, общее состояние здоровья и другие лекарственные средства, которые вводят совместно. За прогрессом можно следить с помощью периодических оценок. Фармацевтические композиции и формулы, указанные в настоящем описании, вводят по меньшей мере однократно с целью лечения или улучшения или предотвращения заболевания или состояния, перечисленных в данном описании изобретения. Однако названные фармацевтические композиции можно вводить более одного раза.

В следующем аспекте изобретения вышеуказанная композиция является лекарственным средством или косметической композицией. В одном аспекте вышеуказанное лекарственное средство, включающее биологически активный нейротоксин, можно применять для предотвращения и/или лечения по меньшей мере одного из следующих заболеваний и нарушений: произвольной мышечной силы, фокальной дистонии, включая цервикальную, краниальную дистонию, и доброкачественного идиопатического блефароспазма, гемифациального спазма и фокальной спастичности, желудочно-кишечных расстройств, повышенного потоотделения, и косметической коррекции морщин, в следующем аспекте также блефароспазма, оромандибулярной дистонии, дистонии размыкания челюсти, дистонии смыкания челюсти, бруксизма, синдрома Мейжа, лингвальной дистонии, апраксии века, открытой цервикальной дистонии, антеколлиса, ретроколлиса, латероколлиса, тортиколлиса, фарингеальной дистонии, ларингиальной дистонии, спастической дистонии/аддукторного типа, спастической дистонии/абдукторного типа, спастической одышки, дистонии конечностей, дистонии плеча, профессиональной дистонии, писчего спазма, спазма музыканта, спазма игрока в гольф, дистонии ног, аддукции бедра, сгибания колена при абдукции бедра, разгибания колена, сгибания стопы, разгибания стопы, эквиноваруса, дистонии деформированной стопы, спонтанного тонического разгибания большого пальца стопы, сгибания пальца стопы, разгибания пальца стопы, аксиальной дистонии, синдрома «Пизанской башни», дистонии брюшной стенки, сегментной дистонии, односторонней дистонии, генерализованной дистонии, X-сцепленной дистонии-паркинсонизма, дистонии при кортико-базальной дегенерации,

Х-сцепленной дистонии-паркинсонизма, поздней дистонии, дистонии при спинально-церебеллярной атаксии, дистонии при паркинсонизме, дистонии при хорее Хантингтона, дистонии при болезни Галлевордена-Шпатца, ДОФА-индуцированных дискинезий/ДОФА-индуцированной дистонии, поздних дискинезий/поздней дистонии,

- 5 пароксизмальных дискинезий/дистоний, кинезиогенного, некинезиогенного вызванного действиями нистагма мягкого неба, миоклонической миокимии, ригидности, слабых мышечных судорог, наследственного тремора подбородка, парадоксальной активности жевательных мышц, односторонних спазмов жевательных мышц, гипертрофической бронхиальной миопатии, гипертрофии жевательной мышцы, гипертрофии передней
- 10 большеберцовой мышцы, нистагма, осциллопсийного надъядерного паралича взора, эпилепсии парциальной непрерывной, планирования операции спастической кривошеи, паралича абдуктора голосовых связок, не поддающейся лечению мутантной дисфории, дисфункции верхнего сфинктера пищевода, гранулемы голосовых связок, синдрома Жилия де ла Туретта с заиканием, миоклонии среднего уха, защитного закрывания
- 15 глотки, постларингэктомии, нарушения речи, защитного опущения верхнего века, энтропиона, дисфункции сфинктера Одди, псевдоахалазии, не связанного с ахалазией расстройства пищевода, моторных расстройств пищевода, вагинизма, послеоперационной иммобилизации, тремора, дисфункции мочевого пузыря, детрузорно-сфинктерной диссинергии, спазма сфинктера мочевого пузыря, гемифациального спазма,
- 20 реиннервационных дискинезий, морщин в уголках глаз из-за применения косметики, асимметрии мимических мышц, ямочек на подбородке, синдрома мышечной скованности, столбняка, гиперплазии предстательной железы, ожирения, лечения косоглазия при детском церебральном параличе, сопутствующего смешанного паралича, состояния после операции по поводу отслоения сетчатки, состояния после операции
- 25 катаракты, афакии с миозитным косоглазием, миопатического косоглазия, диссоциированного вертикального смещения, в качестве вспомогательного средства при операции косоглазия, эзотропии, экзотропии, ахалазии, анальных трещин, гиперактивности экзокринных желез, синдрома Фрея, парадоксального слезотечения, усиленного потоотделения, аксиллярного, ладонного, подошвенного, ринореи,
- 30 относительной гиперсаливации при инсульте, при паркинсонизме, при спастических состояниях при боковом амиотрофическом склерозе, при аутоиммунных процессах при энцефалите и миелите, множественном склерозе, поперечном миелите, болезни Девика, вирусных инфекций, бактериальных инфекций, паразитарных инфекций, грибковых инфекций, при наследственном спастическом парапарезном
- 35 постапоплектическом синдроме, полушарном инфаркте, инфаркте ствола мозга, инфаркте спинного мозга, мигрени, при травме центральной нервной системы, поражении полушарий, поражении ствола мозга, поражении спинного мозга, кровоизлиянии в центральной нервной системе, кровоизлиянии в мозг, субарахноидальном кровоизлиянии, субдуральном кровоизлиянии, интраспинальном
- 40 кровоизлиянии, при неоплазиях, опухолях полушарий, опухолях ствола мозга, опухолях спинного мозга, храпе (WO 2000/033863). Подробности и симптомы см., например, Jost 2007, Drugs 67(5), 669 или Dressler 2000 в Botulinum Toxin Therapy, Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

- В другом аспекте изобретения композиция является косметической композицией,
- 45 которую можно составлять, как описано для фармацевтической композиции выше. Для косметической композиции, аналогично, предусмотрено, что соединение, являющееся предметом настоящего изобретения, в одном аспекте применяют в по существу чистой форме. Косметические композиции в следующем аспекте следует применять

внутримышечно. В следующем аспекте изобретения косметические композиции, включающие нейротоксин, можно составлять в качестве раствора против морщин.

В другом аспекте фармацевтическая композиция включает антитело или ингибитор, являющиеся предметом настоящего изобретения. Поскольку полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, отвечает за активацию клостридиальных нейротоксинов, антитело будет полезным для снижения токсического эффекта, наблюдаемого во время заражения клостридиями. Таким образом, антитело, являющееся предметом настоящего изобретения, можно в одном аспекте применять для лечения инфекции, вызванной клостридиями, включая *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium baratii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* и *Clostridium oedematiens*. Более того, антитело, являющееся предметом настоящего изобретения, в другом аспекте можно применять для лечения симптомов, ассоциированных с вышеуказанной инфекцией. Более того, вышеуказанное антитело можно применять в лечении состояния или симптома, ассоциированного с состоянием, в котором состояние выбирают из ботулизма, столбняка, псевдомембранного колита, гангрены, пищевого отравления и подобного.

В другом аспекте фармацевтическая композиция включает протеолитически активный полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения. Вышеуказанную фармацевтическую композицию можно применять в одном аспекте для протеолитического расщепления полипептидов, участвующих в коагуляции, в частности, для лечения пациентов с гипокоагуляцией. В другом аспекте фармацевтическую композицию можно применять в качестве фибринолитика, в частности, для лечения пациентов с инфарктом миокарда, легочной эмболией, тромбозом глубоких вен, т.е. для удаления кровяных сгустков. Также предполагают применение фармацевтической композиции в лечении инсульта. Более того, в других аспектах фармацевтическую композицию можно применять в лечении экзокринной панкреатической недостаточности для замещения трипсина, химотрипсина или пепсина. Более того, в других аспектах фармацевтическую композицию можно применять в лечении пациентов с воспалительными реакциями, в лечении пациентов с раком, в частности, для протеолитического расщепления экспонированных на поверхность опухолевых антигенов. Более того, в другом аспекте фармацевтическую композицию можно применять в лечении папилломы.

Настоящее изобретение также относится к способу скрининга ингибитора, включающему стадию (a) приведения протеолитически активного полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, в контакт с известным субстратом и, необязательно, с предполагаемым ингибитором; и (b) определения эффекта предполагаемого ингибитора на превращение субстрата в продукт расщепления, в котором снижение количества продукта расщепления является показателем ингибирующего эффекта предполагаемого ингибитора. В одном аспекте предполагаемый ингибитор является пептидом, включающим аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: с 4 по 25, в которой по меньшей мере одна основная аминокислота из вышеуказанной аминокислотной последовательности заменена неосновной аминокислотой. В следующем аспекте вышеуказанный пептид включает одну или более химических модификаций. В другом аспекте ингибитор является пептидомиметиком вышеуказанного пептида. В другом аспекте предполагаемый ингибитор является частью микрочипа химических соединений, т.е. группы органических химических соединений. В еще одном аспекте ингибитор является антителом,

являющимся предметом настоящего изобретения. Данный способ применим для идентификации соединений, способных ингибировать протеолитически активный полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения. Первоначальный скрининг может быть основан, например, на пептиде, содержащем аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: с 4 по 25. Пептиды, способные ингибировать полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, можно модифицировать с целью усиления ингибирования. Модификации включают аминокислотные замены или химические модификации. Обычно данный способ осуществляют посредством приведения полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, в контакт с известным субстратом в присутствии и в отсутствие предполагаемого ингибитора (стадия (а) способа) и посредством сравнения эффекта предполагаемого ингибитора на преобразование субстрата в продукт расщепления. Снижение скорости преобразования в присутствии предполагаемого ингибитора является показателем ингибирующего эффекта.

Настоящее изобретение также относится к ингибитору протеолитически активного полипептида, являющегося предметом настоящего изобретения, в котором вышеуказанный ингибитор является (а) ингибитором, содержащим аминокислотную последовательность, такую как показанная в любой из SEQ ID NO: с 4 по 25, в которой содержащаяся в ней основная аминокислота заменена неосновной аминокислотой; или (b) антителом, являющимся предметом настоящего изобретения.

Все ссылки, процитированные в данном описании изобретения включены в настоящее описание посредством ссылки во всей полноте раскрытия их содержания и раскрытия содержания, специально упомянутого в данном описании изобретения.

Чертежи показывают:

Фигура 1: Исследование активности фракций, собранных с HiPrep 16/10 Q FF

5 мкл фракций, собранных из опыта с HiPrep 16/10 Q FF, анализировали на предмет ферментативной активности путем инкубации 2 мкг scBoNTA (дорожка 2) в течение 1 ч при 37°C и последующего электрофореза в 10% SDS-PAGE (додецилсульфатом натрия). Дорожка 1: маркеры низкомолекулярного веса (LMW): 116 кДа, 66 кДа, 45 кДа, 35 кДа.

Фигура 2: Анализ собранных фракций гель-фильтрационной хроматографии (SEC) (HiLoad 16/60 Superdex 75) на предмет содержания пВН с молекулярным весом ~37,3 кДа посредством электрофореза в 12,5% SDS-PAGE.

Фракции с 9 до 11 содержат основную часть пВН. (Дорожка 1: LMW: 116 кДа, 66 кДа, 45 кДа, 35 кДа, 25 кДа, 18,4 кДа, 14,4 кДа).

Фигура 3: Электрофоретический анализ в 12,5% SDS-PAGE для определения чистоты и концентрации белка из трех серий очистки пВН.

Дорожка 1, LMW (116 кДа, 66 кДа, 45 кДа, 35 кДа, 25 кДа, 18,4 кДа, 14,4 кДа); дорожка 2, пВН партия TE311206 (192 нг/мкл зрелого NT02CB1446/CBO1444, аминокислоты 254-594 номер в Genbank CAL82987.1, молекулярный вес 38,6 кДа); дорожка 3, пВН партия TIK301009 (130 нг/мкл зрелого NT02CB1447/CBO1445, SEQ ID NO: 1, аминокислоты 249-581 номер в Genbank CAL82988.1, молекулярный вес: 37,3 кДа); дорожка 4, пВН партия TIK280509 (114 нг/мкл зрелого NT02CB1447/CBO1445, SEQ ID NO: 1, аминокислоты 249-581 номер в Genbank CAL82988.1, молекулярный вес 37,3 кДа).

Фигура 4: Отчет об анализе спектра, полученного с помощью тандемной масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением.

38,6 кДа белковую полосу пВН партии TE311206 идентифицировали как NT02CB1446/CBO1444 с показателем Mascot, равным 725, и покрытием пептидной последовательности

тандемной масс-спектрометрии, равным 29,6%, на протяжении всей открытой рамки считывания (ORF). Не идентифицировали ни одного пептида (серый прямоугольник, идентифицированный МС пептид; красные квадраты, идентифицированные аминокислотные у-/b-ионы пептида после тандемной масс-спектрометрической фрагментации), полученного из 253 N-концевых аминокислот. Анализ тандемной масс-спектрометрией партии TE311206 показал покрытие последовательности, равное 52%, что соответствует С-концевым и аминокислотам 254-594, образующим пВН.

Фигура 5: Отчет об анализе спектра, полученного с помощью тандемной масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением.

37,3 кДа белковую полосу пВН партии TIK301009 идентифицировали как NT02CB1447/SBO1445 с показателем Mascot, равным 555, и покрытием пептидной последовательности тандемной масс-спектрометрии, равным 28,4%, на протяжении всей открытой рамки считывания (ORF). Кроме одного, все идентифицированные пептиды (серый прямоугольник, идентифицированный МС пептид; красные квадраты, идентифицированные аминокислотные у-/b-ионы пептида после тандемной масс-спектрометрической фрагментации), получены из 333 С-концевых аминокислот. Анализ тандемной масс-спектрометрией партии TIK301009 показал покрытие последовательности равное 49,5%, что соответствует С-концевым аминокислотам 249-581, образующим пВН.

Фигура 6: Сравнение зависящей от концентрации протеолитической активности пВН, полученной из трех серий очистки.

А. Электрофорез в 12,5% SDS-PAGE при исследовании активности, анализирующем пВН, полученную из серий TIK301009, TIK280509 и TE311206, с применением следующих разведений концентрированной пВН: 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000. Исследование проводили посредством инкубации 1 мкг scBoNT/A и 2 мкл дистиллированной воды и 1 мкл соответствующим образом разведенной пВН в течение 60 мин при 37°C. Для электрофоретического анализа в SDS-PAGE 3 мкл восстанавливающего 4× буфера Лэммли с ДСН добавляли до конечного объема 10 мкл. 150 кДа scBoNT/A расщепляли до 100 кДа тяжелой цепи и 50 кДа легкой цепи.

В. Проводили количественную оценку оптической плотности белковых полос тяжелой цепи, легкой цепи и scBoNT/A, и сумму полос продуктов легкой и тяжелой цепей делили на сумму белковых полос легкой цепи, тяжелой цепи и scBoNT/A. Более сильное разведение первого полипептида снижает скорость расщепления. Специфичная протеолитическая активность трех разных серий почти идентична.

Фигура 7: Зависящее от времени расщепление scBoNT/A дикого типа и мутантов, содержащих модифицированную петлю, посредством пВН.

А. Модификация последовательности петли. В scBoNTAS Throm удалены все остатки лизина, и вставлена последовательность узнавания тромбина LVPRGS, в то время как в scBoNT Res петля лишена каких-либо основных аминокислотных остатков. Укорочение петли до восьми небольших остатков или пяти аминокислот с объемными боковыми цепями приводит к образованию scBoNTAS (GGSG)₂ и scBoNTAS FQWYI, соответственно. В scBoNTAS CGS-C удалена вся петля, и образующие дисульфидный мостик цистеины заменены глицином и серином.

В. Электрофоретический анализ в SDS-PAGE зависимо от времени расщепления scBoNT/A дикого типа и мутантов.

С. scBoNTAS дикого типа активируется пВН в зависимой от времени манере до легкой цепи и тяжелой цепи за 120 мин. Отсутствие лизинов и вставка единственного остатка аргинина удлиняет время расщепления петли (scBoNTAS Throm). Петля, лишенная

любого основного остатка, все еще может расщепляться (scBoNTAS Res). Укорочение петли до 8-мерного пептида, введение пяти аминокислот с объемными боковыми цепями или удаление всей петли приводит к образованию нерасщепляемого scBoNT/A.

Фигура 8: Тандемный масс-спектрометрический анализ 50 кДа и 100 кДа продуктов расщепления при расщеплении scBoNT/A с помощью пВН.

А. Анализ 50 кДа продукта расщепления, который был идентифицирован как легкая цепь scBoNT/A с показателем Mascot, равным 1460. Самый С-концевой приписываемый пептид покрывает аминокислоты с G433 по K438, что соответствует физиологически наблюдаемому С-концу scBoNT/A легкой цепи.

В. Анализ 100 кДа продукта расщепления, который был идентифицирован как тяжелая цепь scBoNT/A с показателем Mascot, равным 96. Самый N-концевой приписываемый пептид покрывает аминокислоты с A449 по K456, что соответствует физиологически наблюдаемому N-концу scBoNT/A тяжелой цепи.

Фигура 9: А. Содержание белка (мг/мл) анти-пВН-IgY из трех последовательных пулов анализировали электрофорезом в 12,5% SDS-PAGE. **В. ELISA:** Планшеты для микротитрования Nunc Maxisorp F96 покрывали пВН из разных партий (500 нг/мл) в фосфатно-солевом растворе в течение ночи при 4°C и затем блокировали в течение 1 ч блокирующим буфером из фосфатно-солевого раствора, содержащего 0,1% Tween-20 и 2% обезжиренного снятого молока. После промывания разведение IgY из каждого пула (10 мкг/мл в блокирующем буфере) добавляли в течение 1 ч и детектировали с помощью меченных биотином ослиных иммуноглобулинов Y против иммуноглобулинов курицы, слитой со стрептавидином пероксидазы хрена (оба от Dianova, Гамбург, Германия) и 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (Sigma).

Фигура 10: А. Рекombинантная экспрессия и выделение неактивной ВН 1-581 (63 кДа) с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металла Talon (IMAC). Электрофоретический анализ в 10% SDS-PAGE фракций аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металла Talon (LMW: 116 кДа, 66 кДа, 45 кДа, 35 кДа, 25 кДа; SS34, осветленный лизат; TD, не связавшаяся фракция; W, фракция промывки; E1-E7, элюированные имидазолом фракции с 1 по 7). **В.** Не наблюдается эндопротеолиз scBoNT/A до легкой цепи (50 кДа) и тяжелой цепи (100 кДа) с рекombинантной пВН (SEQ ID NO: 2, «Е»; 63 кДа) при 37°C через 1 ч (дорожка 6) (LMW: 116 кДа, 66 кДа, 45 кДа, 35 кДа, 25 кДа).

Фигура 11: Применение очищенной активной BoNT-гидролазы (пВН) для получения протеолитически процессированного полипептида

А. 200 мкг рекombинантного очищенного scBoNT/A инкубируют с 350 нг очищенной активной BoNT-гидролазы в течение 12 мин при 37°C. Для остановки реакции пВН удаляют посредством гель-фильтрационной хроматографии (колонок Superdex 200 10/300 GL, буфер: 50 mM NaP pH 7,5, 150 mM NaCl, объем образца = 0,3 мл, скорость потока = 0,25 мл/мин), и уровень расщепления анализируют посредством электрофореза в 10% SDS-PAGE. **В.** Фракцию 1 (1800 мкл), содержащую ~40% процессированного BoNT/A, инкубируют с 350 нг очищенной активной BoNT-гидролазы в течение 15 мин при 37°C и концентрируют до 300 мкл посредством ультрафильтрации. Для окончательной остановки реакции пВН удаляют посредством гель-фильтрационной хроматографии (колонок Superdex 200 10/300 GL, буфер: 50 mM NaP pH 7,5, 150 mM NaCl, объем образца = 0,3 мл, скорость потока = 0,25 мл/мин), и уровень расщепления анализируют посредством электрофореза в 10% SDS-PAGE. **С.** Фракции 1 и 2 (1800 мкл), содержащие ~80% процессированного BoNT/A, объединяют и инкубируют с 120 нг очищенной активной BoNT-гидролазы в течение 25 мин при 37°C и концентрируют до 300 мкл

посредством ультрафильтрации. Для окончательной остановки реакции pH удаляют посредством гель-фильтрационной хроматографии (колонка Superdex 200 10/300 GL, буфер: 50 mM NaP pH 7,5, 150 mM NaCl, объем образца = 0,3 мл, скорость потока = 0,25 мл/мин), и уровень расщепления анализируют посредством электрофореза в 10% SDS-PAGE. Получают >95% процессированного BoNT/A (SEQ ID NO. 3).

Список последовательностей показывает:

SEQ ID NO: 1: протеолитически активный полипептид, полученный из *Clostridium botulinum* штамма ATCC 3502, номер в GenBank CAL82988.1, лишенный 248 N-концевых аминокислотных остатков

SEQ ID NO: 2: протеолитически неактивный полипептид, полученный из *Clostridium botulinum* штамма ATCC 3502, номер в GenBank CAL82988.1

SEQ ID NO: 3: BoNT/A ATCC 3502, номер в GenBank AAA23262

SEQ ID NO: 4: Петля BoNT/A1

SEQ ID NO: 5: Петля BoNT/A2/A6

SEQ ID NO: 6: Петля BoNT/A3

SEQ ID NO: 7: Петля BoNT/A3

SEQ ID NO: 8: Петля BoNT/A4

SEQ ID NO: 9: Петля BoNT/A5

SEQ ID NO: 10: Петля BoNT/A7

SEQ ID NO: 11: Петля BoNT/B1/B4bv/B6

SEQ ID NO: 12: Петля BoNT/B2/B3

SEQ ID NO: 13: Петля BoNT/B5np

SEQ ID NO: 14: Петля BoNT/C/CD

SEQ ID NO: 15: Петля BoNT/D

SEQ ID NO: 16: Петля BoNT/DC

SEQ ID NO: 17: Петля BoNT/E1-E5

SEQ ID NO: 18: Петля BoNT/E6

SEQ ID NO: 19: Петля BoNT/F1/F6

SEQ ID NO: 20: Петля BoNT/F2/F3

SEQ ID NO: 21: Петля BoNT/F4

SEQ ID NO: 22: Петля BoNT/F5

SEQ ID NO: 23: Петля BoNT/F7

SEQ ID NO: 24: Петля BoNT/G

SEQ ID NO: 25: Петля TeNT

SEQ ID NO: 26: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SEQ ID NO:

1

SEQ ID NO: 27: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SEQ ID NO:

2

Следующие примеры иллюстрируют изобретение и никак не должны быть растолкованы как ограничивающие его объем.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Очистка и характеристика нативной BoNT-гидролазы (pH), которая специфично расщепляет одноцепочечный BoNT/A до его активной двухцепочечной формы

(1) Система считывания/исследование активности: Для специфичного детектирования и очистки ферментативной активности, гидролизующей ботулинический нейротоксин А (BoNT/A) до 50 кДа легкой цепи (LC) и 100 кДа тяжелой цепи (HC) в культуральных супернатантах *C. botulinum* и между хроматографическими стадиями мы экспрессировали 150 кДа BoNT/A в виде одноцепочечного (sc) полипептида в *E. coli*. Инкубация

рекомбинантного scBoNT/A с подходящей ферментативной активностью (nBH) должна приводить к образованию 50 кДа LC и 100 кДа HC, визуализируемых посредством восстанавливающего электрофореза в 10-13% SDS-PAGE.

(2) Экспрессия протеазы клостридий: Одну колонию *C. botulinum* штамма ATCC 3502 инокулировали в 100 мл среды с сердечно-мозговым экстрактом (ВНІ) и инкубировали культуру в течение ночи при 37°C в анаэробных условиях. 10 мл ночной культуры инокулировали в 1 л среды ВНІ и инкубировали в анаэробных условиях в течение 48-72 ч.

(3) Преципитация сульфатом аммония: 1 л культурального супернатанта собирали центрифугированием (4°C, 6500×g, 25 мин). Сульфат аммония добавляли до конечной концентрации 85% (здесь 575 г), суспензию перемешивали в течение 6 часов при 4°C и впоследствии центрифугировали (4°C, 6500×g, 30 мин). Осажденный преципитат сульфата аммония растворяли в небольшом объеме (здесь 5 мл) 50 мМ NaP pH 7,5 и диализовали против 50 мМ NaP, 150 мМ NaCl pH 7,5. В конце диализат центрифугировали (4°C, 40000×g, 60 мин) и супернатант применяли для ионообменной хроматографии.

(4) Ионообменная хроматография (ИЕС, колонка HiPrep 16/10 Q FF): супернатант из (3) (Фигура 1, дорожка 3) наносили на уравновешенную анионообменную колонку HiPrep 16/10 Q FF и промывали буфером, содержащим 50 мМ NaP pH 7,5, 150 мМ NaCl. Опыт проводили при скорости потока, равной 1 мл/мин. Исследование активности проводили посредством инкубации 5 мкл каждой второй фракции с 2 мкг scBoNTA в течение 1 ч при 37°C и последующего электрофоретического анализа в SDS-PAGE (Фигура 1). Фракции 6-24 объединяли и объем концентрировали до 3,5 мл посредством ультрафильтрации (Amicon-Ultra MWCO 10,000).

(5) Гель-фильтрационная хроматография (SEC, HiLoad 16/60 Superdex 200):

Впоследствии раствор концентрированного белка из стадии (4) наносили на колонку HiLoad 16/60 Superdex 200, уравновешенную 50 мМ NaP pH 7,5, 150 мМ NaCl. Разделение проводили при скорости потока, равной 1 мл/мин. Фракции с удерживаемым объемом между 80 мл и 100 мл анализировали с помощью исследования активности (1), и подходящие фракции, содержащие ферментативную активность (nBH), объединяли (~10 мл) и концентрировали до 3 мл посредством ультрафильтрации. Впоследствии добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 12,5% = 500 мМ (+0,2 г).

(6) Гидрофобная хроматография (HIC, HiTrap Phenyl Sepharose): nBH связывали с фенилсефарозой в буфере А (50 мМ NaP pH 7,5, 500 мМ сульфата аммония). Связанную nBH элюировали, понижая количество сульфата аммония по линейному возрастающему градиенту буфером В (50 мМ NaP pH 7,5) при скорости потока, равной 1 мл/мин. Все содержащие белок фракции анализировали, применяя исследование активности (1), и подходящие фракции объединяли и концентрировали посредством ультрафильтрации до 3,5 мл. Буфер раствора подвели до 50 мМ NaP pH 7,5; 150 мМ NaCl.

(7) SEC (HiLoad 16/60 Superdex 75): В конце nBH очищали посредством SEC, применяя колонку HiLoad 16/60 Superdex 75 в 50 мМ NaP pH 7,5; 150 мМ NaCl и скорости потока, равной 1 мл/мин. Фракции с удерживаемым объемом между 70 мл и 80 мл анализировали с помощью электрофореза в 12,5% SDS-PAGE (Фигура 2), и фракции 8-12, содержащие nBH, которая мигрирует на уровне ~37,3 кДа, объединяли (~10 мл) и концентрировали до 1 мл посредством ультрафильтрации.

(8) Основной белок, мигрирующий приблизительно на уровне 37,3 кДа (nBH), анализировали посредством N-концевого секвенирования в соответствии с протоколом деградации по Эдману. Последовательность идентифицированного пептида: V Q G Q S V K G V G соответствует первым десяти остаткам SEQ ID NO: 1.

(9) Две партии nВН (NT02CB1447, 37,3 кДа, Фигура 3, дорожка 3: ТИК301009, дорожка 4: ТИК280509) воспроизводимо выделяли в соответствии с процедурой, описанной выше. Следующие модификации процедуры выделения приводят к образованию nВН изоформы NT02CB1446 (38,6 кДа, Фигура 3, дорожка 2, партия TE311206): (i) выращивание культуры *C. botulinum*: 18 ч вместо 48 ч - 72 ч; (ii) вариация хроматографических стадий: IEC → SEC Superdex 75 → НИС фенилсефароза вместо IEC → SEC Superdex 200 → НИС фенилсефароза → SEC Superdex 75.

Пример 2: Идентификация последовательности nВН из *C. botulinum* посредством масс-спектрометрии (МС)

(1) Триптическое расщепление: белковые полосы примерно 38 кДа (nВН) в электрофорезе в SDS-PAGE вырезали для триптического расщепления и обесцвечивали аккуратным перемешиванием в 50 mM Na₄HCO₃, 50% ацетонитриле в течение 30 мин при 37°C. Обесцвечивание повторяли, пока пятна в геле не становились прозрачными. Ацетонитрил (100%) добавляли и удаляли через 3 мин. Затем пятна высушивали в скоростной вакуумной системе (Eppendorf, Германия). Трипсин (10 нг/мкл) в 50 mM NH₄HCO₃ добавляли и инкубировали на льду в течение 1 ч. Затем оставшийся раствор трипсина удаляли, добавляли небольшой объем 50 mM NH₄HCO₃ и проводили расщепление при 37°C в течение ночи. Собирали супернатант, и кусочки геля экстрагировали, дважды применяя 5% трифторуксусную кислоту, 10% ацетонитрил. Все жидкости объединяли, высушивали в скоростном вакууме и экстрагированные пептиды хранили при 4°C.

(2) Тандемная времяпролетная масс-спектрометрия с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF/TOF MS): образцы анализировали в масс-спектрометре для времяпролетной MALDI масс-спектрометрии (Ultraflex 1 Bruker Daltonik GmbH) в линейном режиме с ускоряющим напряжением 25 кВ. Массы детектировали от 700 m/z до 4500 m/z. Образцы (2 мкл) сокристаллизовали с 2 мкл раствора синапиновой кислоты, содержащего 50% ацетонитрила и 0,2% трифторуксусной кислоты (TFA), напрямую на стальной подложке для MALDI. 500 лазерных импульсов собирали для каждого образца.

(3) Разделение пептидов обращенно-фазовой хроматографией: Разделение пептидов проводили посредством обращенно-фазовой хроматографии, применяя нано-ВЭЖХ систему (Agilent Technologies, Вальдброн, Германия), которая состоит из автоматического дозатора и градиентного насоса. Образец растворяли в буфере А (5% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота) и аликвоту до 10 мкл инъецировали в колонку C18 (Zorbax SB-C18, 5 мкл, 300 А, 0,5 мм внутренний диаметр, длина 15 см) при скорости потока 5 мкл/мин. После нанесения колонку промывали в течение 15 мин буфером А, и элюировали пептиды, применяя градиент элюента А и элюента В (70% (объем/объем) ацетонитрила в 0,1% (объем/объем) муравьиной кислоты) от 0% до 100% элюента В за 75 мин.

(4) Интерфейс с ионизацией электрораспылением (ESI) и масс-спектрометрия с ионной ловушкой: выход ВЭЖХ напрямую соединяли с источником наноESI масс-спектрометра с ионной ловушкой и применяли коаксиальный проточно-жидкостной распылитель Agilent (Agilent Technologies). Выходной капилляр удерживался прилегающей стальной иглой и выдавался на 0,1-0,2 мм из нее. Распыление стабилизировали N₂ в качестве небулайзерного газа (5 л/мин). Напряжение ионизации устанавливали на уровне 4500 В и сухой газ применяли при 5 psi (34,47 кПа) и 250°C. Спектры снимали с помощью Esquire3000+ масс-спектрометра с ионной ловушкой (Bruker Daltonik) при скорости

сканировании 13000 m/z в секунду. Применяя ESI в режиме регистрации положительных ионов, получали масс-спектры от 50 до 1600 m/z в режиме сканирования и зависящего от данных переключения между МС и tandemным МС анализом. Для повышения качества tandemных МС спектров выбирали только два иона-предшественника из одного спектра для tandemного МС анализа и устанавливали активную эксклюзию на 2 мин для исключения ионов-предшественников, которые уже были измерены.

(4) **Обработка данных:** обработку данных проводили с помощью пакетов программ Data Analysis (версия 3.0) и BioTools (версия 3.0) (Bruker Daltonik). Идентификацию белков проводили, применяя программное обеспечение MASCOT (версия 2.1) и базу данных MSDB (Matrix Science, Лондон, Великобритания).

(5) **Результаты:**

Таблица 2 пВН, идентифицированные с помощью МС							
Дорожка	Партия пВН	Концентрация белка	Название ORF	Номер Genbank	А.к. в ORF	Молекулярный вес [кДа]	Показатель Mascot
2	TE311206	192 нг/мкл	NT02CB1446 CBO1444	CAL82987.1	254-594	38,6	725
3	ТІК301009	130 нг/мкл	NT02CB1447 CBO1445	CAL82988.1	249-581	37,3	555
4	ТІК280509	114 нг/мкл	NT02CB1447 CBO1445	CAL82988.1	249-581	37,3	609

38,6 кДа белковую полосу с дорожки 2 (пВН партия TE311206) идентифицировали как NT02CB1446/CBO1444 с показателем Mascot, равным 725, и покрытием пептидной последовательности tandemной МС, равным 29,6%, на протяжении всей открытой рамки считывания (ORF). Не идентифицировали ни одного пептида, полученного из 253 N-концевых аминокислот (Фигура 4). Анализ tandemной МС партии TE311206 показал покрытие последовательности, равное 52%, что соответствует C-концевым аминокислотам 254-594, образующим пВН.

37,3 кДа белковые полосы с дорожки 3 (пВН партия ТІК301009) и дорожки 4 (пВН партия ТІК280509) идентифицировали как NT02CB1447/CBO1445 с показателем Mascot, равным 555 и 609, соответственно. Кроме одного, все идентифицированные пептиды получены из 333 C-концевых аминокислот (Фигура 5). Анализ tandemной МС партии ТІК301009 показал покрытие последовательности, равное 49,5%, что соответствует C-концевым аминокислотам 249-581, образующим пВН.

Пример 3: Характеристика ферментативной специфичности пВН

(1) Сравнивали зависящую от концентрации протеолитическую активность пВН, полученных из трех серий очистки (Фигура 6). Исследование активности, анализирующее пВН, полученную из серий ТІК301009, ТІК280509 и TE311206, с применением разных разведений пВН, показывает, что более высокие разведения снижают скорость расщепления. Протеолитическая активность трех разных серий является практически идентичной, что указывает на то, что зрелая изоформа NT02CB1446 (TE311206) демонстрирует специфическую активность, схожую со зрелой NT02CB1447 (SEQ ID NO: 1).

(2) Зависящее от времени расщепление scBoNT/A дикого типа и мутантов пВН анализировали с помощью теста активности (Фигура 7). scBoNT/A дикого типа активируется пВН в зависящей от времени манере до легкой цепи и тяжелой цепи за 120 мин более чем на 95%. Последовательность петли модифицировали для характеристики сайта расщепления. В scBoNT/A Throm все остатки лизина удалены, и вставлена последовательность распознавания тромбина LVPRGS, которая удлиняет ход расщепления. В scBoNT Res петля лишена каких-либо основных аминокислотных

остатков, что очень задерживает полный гидролиз, указывая на сильное предпочтение основных остатков, подобных лизину и аргинину, для распознавания nBH в сайте расщепления. Более того, доступность nBH для петли нарушена укорочением петли до восьми небольших остатков или пяти аминокислот с объемными боковыми цепями (scBoNTAS (GGSG)₂ и scBoNTAS FQWYI).

(3) Тандемный МС анализ 50 кДа продукта расщепления при переваривании scBoNT/A nBH показал, что самый С-концевой приписываемый пептид покрывает аминокислоты с G433 по K438, что соответствует физиологически наблюдаемому С-концу легкой цепи scBoNT/A (Фигура 8А). Анализ 100 кДа продукта расщепления, который идентифицировали как тяжелую цепь BoNT/A, показал, что самый N-концевой приписываемый пептид покрывает аминокислоты с A449 по K456, что соответствует физиологически наблюдаемому N-концу тяжелой цепи scBoNT/A (Фигура 8В). Таким образом, выделенная nBH приводит к образованию физиологически процессированного BoNT/A и предпочтительно гидролизует пептидные связи к С-концу от остатков лизина и аргинина.

Пример 4: Эволюционная консервативность BoNT-гидролазы и ее изоформ

Анализ белковой последовательности SEQ ID NO: 2 (номер Genbank CAL82988.1/YP_001253958.1) выявил три консервативных домена. Остатки 18-573 соответствуют цинковой металлопротеазе (эластазе) или LasB, участвующей в транспорте и метаболизме аминокислот, с показателем Blast, равным 738. Остатки 148-212 соответствуют пропептиду пептидазы и домену YPEB или PepSY (показатель Blast 97). Остатки 336-573 являются частью пептидазы семейства M4, включающего термолизин, протеализин, ауреолизин и нейтральные протеазы (показатель Blast 803).

Секвенирование генома *C. botulinum* ATCC 3502 выявило существование шести ORF, кодирующих изоформы nBH (Sebahia et al., 2007, Genome Res. 17(7):1082-1092). Последующие геномные данные доступны для 10 штаммов группы I *C. botulinum*, а также для не секретирующих BoNT *C. sporogenes*, которые содержат между пятью и семью ORF, кодирующих iBH. nBH (SEQ ID NO: 1) имеет минимум 64% идентичность аминокислотной последовательности и другими 63 изоформами.

Пример 5: Образование антител, специфичных к BoNT-гидролазе

(1) **Образование IgY:** шестнадцатинедельных кур [ISA Brown Lohmann Selected Leghorn (LSL), Spreenhagener Vermehrungsbetrieb fur Legehennen GmbH, Бестензее, Германия] содержали в индивидуальных клетках, специально сконструированных для содержания кур (Ebeco, Кастроп-Пауксель, Германия). Корм (ssniff Leghuhner-Zucht 1 и 2; ssniff Spezialitaten GmbH, Зост, Германия) и вода были доступны без ограничений, и куры начали нести яйца в возрасте между 23 и 25 неделями. Яйца собирали ежедневно, метили и хранили при 4°C до последующего применения. Весь уход за животными, и все эксперименты проводили в соответствии с руководством местных властей, Берлин (№ H0069/03). Кур иммунизировали, и проводили повторную иммунизацию внутримышечно (грудная мышца, левая и правая сторона) всего 10 раз за 1 год, с интервалами 4 и 8 недель. Применяемый интервал был основан на предыдущей работе, которая показала отсутствие в явном виде клеток памяти до по меньшей мере 3 недель после иммунизации (Pei and Collisson, 2005). Применяемая концентрация антигена составляла приблизительно 20 мкг на инъекцию (nBH). Не более 500 мкл раствора антигена инъецировали за одну иммунизацию. Полный адъювант Фрейнда применяли для первой иммунизации, а неполный адъювант Фрейнда применяли для последующих повторных инъекций. Способ очистки IgY адаптировали из Polson et al. (1980). Кратко, яичный желток растворяли 1:2 стерильным фосфатно-солевым раствором (pH 7,4, Roche, Мангейм,

Германия). Для удаления липидов и липопротеина добавляли 3,5% (вес/объем) полиэтиленгликоля (ПЭГ) 6000 (Roth, Карлсруэ, Германия). После аккуратного перемешивания с последующим центрифугированием (10000 g в течение 20 мин при 4°C) удаляли супернатант и добавляли твердый ПЭГ 6000 до конечной концентрации 12% (вес/объем). Затем эту смесь центрифугировали, как описано выше. Преципитат растворяли в 10 мл фосфатно-солевого раствора, добавляли ПЭГ до 12% (вес/объем) и центрифугировали раствор. В конце преципитат растворяли в 1,2 мл фосфатно-солевого раствора, переносили в прибор для микродиализа (QuixSep, Рот, Германия) и диализовали против фосфатно-солевого раствора при 4°C. Содержание белка (мг/мл) анализировали электрофорезом в 12,5% SDS-PAGE (Фигура 9А) и измеряли фотометрически при 280 нм и рассчитывали в соответствии с законом Ламберта-Бера с коэффициентом экстинкции, равным 1,33, для IgY.

(2) Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA): Планшеты для микротитрования Nunc Maxisorp F96 (VWR International GmbH, Дармштадт, Германия) покрывали пВН из разных партий (500 нг/мл) в фосфатно-солевом растворе при 4°C и затем блокировали в течение 1 ч блокирующим буфером из фосфатно-солевого раствора, содержащего 0,1% Tween-20 и 2% обезжиренного снятого молока (Merck, Дармштадт, Германия). После промывания разведение IgY (10 мкг/мл в блокирующем буфере) добавляли в течение 1 ч и детектировали с помощью меченных биотином ослиных IgY против иммуноглобулинов курицы, слитой со стрептавидином пероксидазы хрена (оба от Dianova, Гамбург, Германия) и 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (Sigma). Детектируемая пВН показана на Фигуре 9В.

(3) Вестерн блот: пВН разделяли электрофорезом в 12,5% SDS-PAGE и переносили на поливинилиденфторидную мембрану (Invitrogen GmbH, Карлсруэ, Германия), применяя стандартные техники иммуноблота. Мембрану блокировали в течение ночи при 4°C и инкубировали с IgY (1:5000 в блокирующем буфере) в течение 1 ч. После промывки мембрану исследовали мечеными биотином ослиными IgY против иммуноглобулинов курицы в течение 30 мин и проявляли, применяя щелочную фосфатазу и CDP-Star (Perkin Elmer, Уолтем, штат Массачусетс).

Пример 6: Рекомбинантная экспрессия BoNT-гидролазы

(1) Плазмидные конструкции: части гена, кодирующие нативную ВН (SEQ ID NO: 1) и ее пропептид (SEQ ID NO: 2), амплифицировали с помощью ПЦР, применяя подходящие олигонуклеотиды и геномную ДНК *C. botulinum* ATCC 3502, слитую с олигонуклеотидом, кодирующим His6Tag, и вставляли в pQE3 (Qiagen), приводя к экспрессии плазмиды pQ-VN1445N6-249-581 и pQ-VN1445N6-1-581, соответственно. Нуклеотидные последовательности проверяли с помощью секвенирования ДНК.

(2) Очистка рекомбинантных белков: пВН и iВН, слитые с карбоксиконцевым His6Tag, получали с помощью штамма *E. coli* M15pREP4 (Qiagen) за десять часов инкубации при комнатной температуре и очищали на бусинах Talon-сефарозы (Clontech Inc.), следуя инструкциям производителя. Фракции, содержащие желаемые белки, объединяли, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C. iВН выделяли как рекомбинантный белок с молекулярным весом 63 кДа (Фигура 10А). Отсутствие активности iВН демонстрировали, применяя исследование активности: через 1 ч при 37°C scBoNT/A дикого типа не гидролизовался до легкой цепи и тяжелой цепи (Фигура 10В).

Пример 7: Ингибирование BoNT-гидролазы

(1) Скрининг пептидных ингибиторов ВН: пептиды, основанные на SEQ ID NO: с 4 по 25, синтезируют без одной или более основных остатков. Каждый пептид добавляют к смеси, в соответствии с исследованием активности. Пептид, способный снижать

количество процессированного scBoNT/A, удлинять время, необходимое для полного процессинга scBoNT/A, или блокировать процессинг scBoNT/A, считается ингибитором nBH.

- (2) Скрининг ингибиторов на основе антител: антитела, полученные против эпитопов, полученных из nBH, как IgY из Примера 5, инкубируют с nBH и впоследствии проводят исследование активности. Антитело, способное снижать количество процессированного scBoNT/A, удлинять время, необходимое для полного процессинга scBoNT/A, или блокировать процессинг scBoNT/A, считается ингибитором nBH.

Пример 8: Применение очищенной активной BoNT-гидролазы (nBH) для получения протеолитически процессированного полипептида

- (1) 200 мкг рекомбинантного очищенного scBoNT/A инкубируют с 350 нг очищенной активной BoNT-гидролазы в течение 12 мин при 37°C. Для остановки реакции nBH удаляют посредством SEC (колонка Superdex 200 10/300 GL, буфер: 50 mM NaP pH 7,5, 150 mM NaCl, объем образца = 0,3 мл, скорость потока = 0,25 мл/мин), и количественный анализ расщепления проводят посредством электрофореза в 10% SDS-PAGE (Фигура 11A).

- (2) Фракцию 1 (1800 мкл), содержащую ~40% процессированного BoNT/A, инкубируют с 350 нг очищенной активной BoNT-гидролазы в течение 15 мин при 37°C и концентрируют до 300 мкл посредством ультрафильтрации. Для окончательной остановки реакции nBH удаляют посредством SEC (колонка Superdex 200 10/300 GL, буфер: 50 mM NaP pH 7,5, 150 mM NaCl, объем образца = 0,3 мл, скорость потока = 0,25 мл/мин), и количественный анализ расщепления проводят посредством электрофореза в 10% SDS-PAGE (Фигура 11B).

- (2) Фракции 1 и 2 (1800 мкл), содержащие ~80% процессированного BoNT/A, комбинируют и инкубируют с 120 нг очищенной активной BoNT-гидролазы в течение 25 мин при 37°C и концентрируют до 300 мкл посредством ультрафильтрации. Для окончательной остановки реакции nBH удаляют посредством SEC (колонка Superdex 200 10/300 GL, буфер: 50 mM NaP pH 7,5, 150 mM NaCl, объем образца = 0,3 мл, скорость потока = 0,25 мл/мин), и количественный анализ расщепления проводят посредством электрофореза в 10% SDS-PAGE (Фигура 11C). Получают >95% процессированного BoNT/A (SEQ ID NO: 3). Идентичный полностью процессированный второй полипептид (>95% процессированного BoNT/A) получают, если второй полипептид процессируется в одну стадию в течение 50 мин при 37°C (200 мкг scBoNT/A инкубировали с 350 нг nBH). После инкубации в течение 1 ч при 37°C более чем 97% BoNT/A является процессированным.

(57) Формула изобретения

1. Применение Lys-C для протеолитического процессинга одноцепочечного ботулинического нейротоксина серотипа А (BoNT/A) с помощью гидролиза для образования активного двухцепочечного ботулинического нейротоксина серотипа А (BoNT/A).

2. Применение по п.1, где одноцепочечный ботулинический нейротоксин серотипа А (BoNT/A) является встречающимся в естественных условиях нейротоксином, рекомбинантным нейротоксином или модифицированным нейротоксином, таким как нейротоксин, лишенный нативного Н_С домена, или его части, или производные с другими аминокислотными остатками, заменяющими Н_С домен нейротоксина.

3. Применение по п.2, где одноцепочечный ботулинический нейротоксин серотипа А (BoNT/A) включает аминокислотную последовательность, выбранную из любой из

SEQ ID NO: с 3 по 10;

предпочтительно где протеолитически активный полипептид гидролизует одноцепочечный ботулинический нейротоксин серотипа А (BoNT/A) по положению сразу к С-концу от основного аминокислотного остатка внутри указанной

5 последовательности из любой из SEQ ID NO: с 3 по 10.

4. Применение по любому из пп.1-3, где С-конец L-цепи и N-конец H-цепи двухцепочечного ботулинического нейротоксина серотипа А (BoNT/A) идентичны соответствующему двухцепочечному ботулиническому нейротоксину серотипа А (BoNT/A), выделенному из клостридий дикого типа.

10 5. Применение по любому из пп.1-3, где двухцепочечный клостридиальный нейротоксин серотипа А (BoNT/A) имеет идентичную аминокислотную последовательность при сравнении с соответствующим двухцепочечным полипептидом ботулинического нейротоксина серотипа А (BoNT/A), образованным из такого же одноцепочечного полипептида ботулинического нейротоксина серотипа А (BoNT/A)

15 в клостридиях дикого типа.

6. Способ производства протеолитически процессированного полипептида, включающий стадию приведения в контакт:

(а) первого полипептида, являющегося Lys-C, со

(b) вторым полипептидом, который подвержен протеолизу указанным первым

20 полипептидом,

где указанный контакт приводит к протеолитическому процессингу указанного второго полипептида до по меньшей мере двух продуктов расщепления;

где второй полипептид является одноцепочечным ботулиническим нейротоксином серотипа А (BoNT/A) и где указанный первый полипептид гидролизует одноцепочечный ботулинический нейротоксин серотипа А (BoNT/A) для образования активного

25 двухцепочечного ботулинического нейротоксина серотипа А (BoNT/A).

7. Способ по п.6, где указанный одноцепочечный ботулинический нейротоксин серотипа А (BoNT/A) является встречающимся в естественных условиях нейротоксином, рекомбинантным нейротоксином или модифицированным нейротоксином, таким как

30 нейротоксин, лишенный нативного Н_С домена, или его части, или производные с другими аминокислотными остатками, заменяющими Н_С домен нейротоксина.

8. Способ по п.7, где второй полипептид включает аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: с 3 по 10;

предпочтительно где первый полипептид протеолитически расщепляет второй полипептид в положении сразу к С-концу от основного аминокислотного остатка внутри указанной последовательности из любой из SEQ ID NO: с 3 по 10.

35

9. Способ по любому из пп.6-8, где указанный контакт происходит внутри клетки, в клеточном лизате, в очищенном клеточном лизате или в объекте.

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> toxogen GmbH
 <120> СПОСОБЫ ПРОИЗВОДСТВА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИ ПРОЦЕССИРОВАННЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ
 <130> 757-1
 <160> 27
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 333
 <212> БЕЛОК
 <213> Clostridium Botulinum
 <400> 1

Val Gln Gly Gln Ser Val Lys Gly Val Gly Lys Thr Ser Leu Asp Gly
 1 5 10 15

Leu Val Asn Ile Asp Val Thr Tyr Gly Asn Gly Lys Tyr Tyr Leu Lys
 20 25 30

Asp Ser Asn Lys Asn Ile Tyr Leu Tyr Asp Leu Lys Asn Gln Val Asp
 35 40 45

Glu Tyr Asp Leu Tyr Asn Tyr Leu Ser Arg Pro Asn Tyr Lys Gln Ile
 50 55 60

Leu Met Ser Lys Ser Glu Leu Ile Ser Asn Tyr Asn Asn Asn Phe Ile
 65 70 75 80

Ala Asn Asn Gln Val Asn Ser Val Asp Ala Tyr Val Asn Thr Asn Lys
 85 90 95

Thr Tyr Asp Tyr Tyr Lys Asn Lys Leu Asn Arg Asn Ser Ile Asp Asn
 100 105 110

Lys Gly Met Asn Ile Asn Gly Phe Val His Val Gly Arg Asn Tyr Gly
 115 120 125

Asn Ala Phe Trp Tyr Gly Pro Tyr Asp Gly Met Phe Phe Gly Asp Gly
 130 135 140

Asp Gly Ile Tyr Phe Ser Ser Leu Ala Lys Ser Leu Asp Val Val Gly
 145 150 155 160

His Glu Leu Ser His Gly Val Thr Asn Lys Glu Ser Asn Leu Lys Tyr
 165 170 175

Glu Asn Glu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Ser Phe Ser Asp Ile Met Gly

2

180 185 190

Val Ala Val Glu Gly Lys Asn Phe Val Leu Gly Glu Asp Cys Trp Val
195 200 205

Ala Gly Gly Val Met Arg Asp Met Glu Asn Pro Ser Arg Gly Gly Gln
210 215 220

Pro Ala His Met Lys Asp Tyr Lys Tyr Lys Thr Met Asn Asp Asp Asn
225 230 235 240

Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly Ile Ile Asn His Ala Ala Tyr Leu
245 250 255

Val Ala Asp Gly Ile Glu Lys Thr Gly Ala Lys Asn Ser Lys Asp Ile
260 265 270

Met Gly Lys Ile Phe Tyr Thr Ala Asn Cys Tyr Lys Trp Asp Glu Thr
275 280 285

Thr Asn Phe Ala Lys Cys Arg Asn Asp Val Val Gln Val Thr Lys Glu
290 295 300

Leu Tyr Gly Glu Asn Ser Asn Tyr Val Lys Ile Val Glu Lys Ala Phe
305 310 315 320

Asp Gln Val Gly Ile Thr Ala Thr Pro Gln Leu Pro Leu
325 330

<210> 2
<211> 581
<212> БЕЛОК
<213> Clostridium Botulinum

<400> 2

Met Lys Ser Lys Lys Leu Leu Ala Thr Val Leu Ser Ala Val Ile Thr
1 5 10 15

Phe Ser Thr Val Ser Ala Val Tyr Ala Ala Pro Val Gly Lys Glu Ser
20 25 30

Lys Val Glu Pro Lys Thr Thr Thr Ile Thr Trp Glu Lys Asn Glu Gln
35 40 45

Asn Thr Lys Lys Ala Ala Thr Asp Ile Thr Glu Lys Lys Phe Asn Asn
50 55 60

Ser Glu Glu Ile Thr Lys Phe Phe Glu Lys Asn Ile Ser Lys Phe Gly
65 70 75 80

4

Asp Ala Tyr Val Asn Thr Asn Lys Thr Tyr Asp Tyr Tyr Lys Asn Lys
 340 345 350
 Leu Asn Arg Asn Ser Ile Asp Asn Lys Gly Met Asn Ile Asn Gly Phe
 355 360 365
 Val His Val Gly Arg Asn Tyr Gly Asn Ala Phe Trp Tyr Gly Pro Tyr
 370 375 380
 Asp Gly Met Phe Phe Gly Asp Gly Asp Gly Ile Tyr Phe Ser Ser Leu
 385 390 395 400
 Ala Lys Ser Leu Asp Val Val Gly His Glu Leu Ser His Gly Val Thr
 405 410 415
 Asn Lys Glu Ser Asn Leu Lys Tyr Glu Asn Glu Ser Gly Ala Leu Asn
 420 425 430
 Glu Ser Phe Ser Asp Ile Met Gly Val Ala Val Glu Gly Lys Asn Phe
 435 440 445
 Val Leu Gly Glu Asp Cys Trp Val Ala Gly Gly Val Met Arg Asp Met
 450 455 460
 Glu Asn Pro Ser Arg Gly Gly Gln Pro Ala His Met Lys Asp Tyr Lys
 465 470 475 480
 Tyr Lys Thr Met Asn Asp Asp Asn Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly
 485 490 495
 Ile Ile Asn His Ala Ala Tyr Leu Val Ala Asp Gly Ile Glu Lys Thr
 500 505 510
 Gly Ala Lys Asn Ser Lys Asp Ile Met Gly Lys Ile Phe Tyr Thr Ala
 515 520 525
 Asn Cys Tyr Lys Trp Asp Glu Thr Thr Asn Phe Ala Lys Cys Arg Asn
 530 535 540
 Asp Val Val Gln Val Thr Lys Glu Leu Tyr Gly Glu Asn Ser Asn Tyr
 545 550 555 560
 Val Lys Ile Val Glu Lys Ala Phe Asp Gln Val Gly Ile Thr Ala Thr
 565 570 575
 Pro Gln Leu Pro Leu
 580

<210> 3
 <211> 1296
 <212> БЕЖОК
 <213> Clostridium Botulinum

<400> 3

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

10

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> 4
 <211> 25
 <212> БЕЛОК
 <213> Clostridium Botulinum

<220>
 <221> Петля BoNT/A1
 <222> (1)..(25)

<400> 4

Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly
 1 5 10 15

Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys
 20 25

<210> 5
 <211> 25
 <212> БЕЛОК
 <213> Clostridium Botulinum

<220>
 <221> Петля BoNT/A2/A6
 <222> (1)..(25)

<400> 5

Cys Val Arg Gly Ile Ile Pro Phe Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly
 1 5 10 15

Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys
 20 25

<210> 6
 <211> 25
 <212> БЕЛОК

11

<213> Clostridium Botulinum

<220>

<221> Петля BoNT/A3

<222> (1)..(25)

<400> 6

Cys Val Arg Gly Ile Ile Pro Phe Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly
1 5 10 15

Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys
20 25

<210> 7

<211> 25

<212> БЕЛОК

<213> Clostridium Botulinum

<220>

<221> Петля BoNT/A3

<222> (1)..(25)

<400> 7

Cys Val Arg Gly Ile Ile Pro Phe Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly
1 5 10 15

Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Tyr Leu Cys
20 25

<210> 8

<211> 25

<212> БЕЛОК

<213> Clostridium Botulinum

<220>

<221> Петля BoNT/A4

<222> (1)..(25)

<400> 8

Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly
1 5 10 15

Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Glu Leu Cys
20 25

<210> 9

<211> 25

<212> БЕЛОК

<213> Clostridium Botulinum

<220>

12

<221> Петля BoNT/A5
 <222> (1)..(25)

<400> 9

Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly
 1 5 10 15

Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys
 20 25

<210> 10
 <211> 25
 <212> БЕЛОК
 <213> Clostridium Botulinum

<220>
 <221> Петля BoNT/A7
 <222> (1)..(25)

<400> 10

Trp Val Arg Gly Ile Ile Pro Phe Lys Pro Lys Ser Leu Asp Glu Gly
 1 5 10 15

Ser Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys
 20 25

<210> 11
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Clostridium Botulinum

<220>
 <221> Петля BoNT/B1/B4bv/B6
 <222> (1)..(10)

<400> 11

Cys Lys Ser Val Lys Ala Pro Gly Ile Cys
 1 5 10

<210> 12
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Clostridium Botulinum

<220>
 <221> Петля BoNT/B2/B3
 <222> (1)..(10)

<400> 12

Cys Lys Ser Val Arg Ala Pro Gly Ile Cys
 1 5 10

13

<210> 13
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Clostridium Botulinum

<220>
 <221> Петля BoNT/B5np
 <222> (1)..(10)

<400> 13

Cys Lys Ser Val Lys Val Pro Gly Ile Cys
 1 5 10

<210> 14
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Clostridium Botulinum

<220>
 <221> Петля BoNT/C/CD
 <222> (1)..(17)

<400> 14

Cys His Lys Ala Ile Asp Gly Arg Ser Leu Tyr Asn Lys Thr Leu Asp
 1 5 10 15

Cys

<210> 15
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Clostridium Botulinum

<220>
 <221> Петля BoNT/D
 <222> (1)..(14)

<400> 15

Cys Leu Arg Leu Thr Lys Asn Ser Arg Asp Asp Ser Thr Cys
 1 5 10

<210> 16
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Clostridium Botulinum

<220>
 <221> Петля BoNT/DC
 <222> (1)..(14)

<400> 16

14

Cys Leu Arg Leu Thr Arg Asn Ser Arg Asp Asp Ser Thr Cys
 1 5 10

<210> 17
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Clostridium Botulinum

<220>
 <221> Петля BoNT/E1-E5
 <222> (1)..(15)

<400> 17

Cys Lys Asn Ile Val Ser Val Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys
 1 5 10 15

<210> 18
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Clostridium Botulinum

<220>
 <221> Петля BoNT/E6
 <222> (1)..(15)

<400> 18

Cys Lys Asn Ile Val Phe Ser Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Clostridium Botulinum

<220>
 <221> Петля BoNT/F1/F6
 <222> (1)..(17)

<400> 19

Cys Lys Ser Val Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Ala Pro Pro Arg Leu
 1 5 10 15

Cys

<210> 20
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Clostridium Botulinum

<220>

15

<221> Петля BoNT/F2/F3
<222> (1)..(17)

<400> 20

Cys Lys Ser Ile Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Gln Ser Pro Ser Leu
1 5 10 15

Cys

<210> 21
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Clostridium Botulinum

<220>
<221> Петля BoNT/F4
<222> (1)..(17)

<400> 21

Cys Lys Ser Ile Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Ala Pro Pro Arg Leu
1 5 10 15

Cys

<210> 22
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Clostridium Botulinum

<220>
<221> Петля BoNT/F5
<222> (1)..(15)

<400> 22

Cys Leu Asn Ser Ser Phe Lys Lys Asn Thr Lys Lys Pro Leu Cys
1 5 10 15

<210> 23
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Clostridium Botulinum

<220>
<221> Петля BoNT/F7
<222> (1)..(15)

<400> 23

Cys Lys Ser Ile Val Ser Lys Lys Gly Thr Lys Asn Ser Leu Cys
1 5 10 15

16

<210> 24
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Clostridium Botulinum

<220>
 <221> Петля BoNT/G
 <222> (1)..(15)

<400> 24

Cys	Lys	Pro	Val	Met	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gly	Lys	Ser	Glu	Gln	Cys
1				5					10					15

<210> 25
 <211> 29
 <212> БЕЛОК
 <213> Clostridium Tetani

<220>
 <221> Петля TeNT
 <222> (1)..(29)

<400> 25

Cys	Lys	Lys	Ile	Ile	Pro	Pro	Thr	Asn	Ile	Arg	Glu	Asn	Leu	Tyr	Asn
1				5					10					15	

Arg	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Asp	Leu	Gly	Gly	Glu	Leu	Cys
			20					25				

<210> 26
 <211> 1005
 <212> ДНК
 <213> C. Botulinum

<400> 26

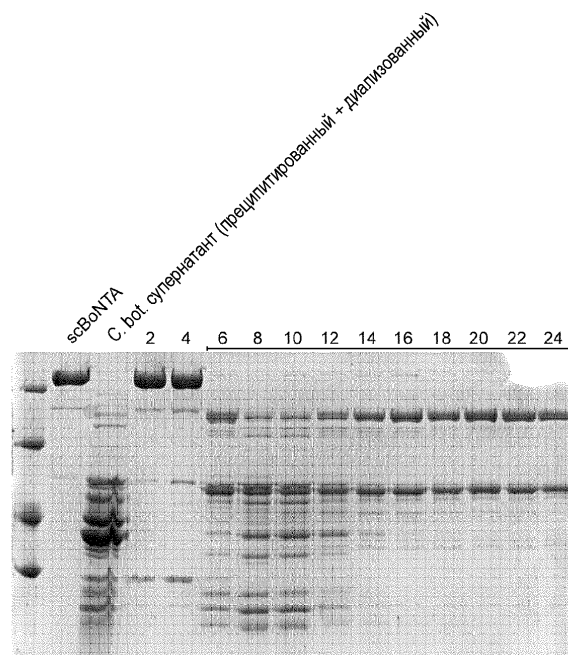
atggttcaag gtcaaagcgt taaaggagta ggaaaaacta gcttggatgg actagtaaat	60
attgatgtaa cttatggaaa tggaaaatac tatttaaaag atagcaacaa aaatatttat	120
ctatatgact taaaaaatca agttgatgaa tatgatctat acaattatct tagtagacct	180
aactataaac aaatattaat gagcaaatct gaattaatat ctaattacaa taataatatt	240
atagccaaca atcagggttaa ttctgtagat gcttatgtaa acacaaataa aacctatgat	300
tattataaaa acaaattaaa tagaaacagt attgataata agggatatgaa tattaatggg	360
tttgttcatg taggtagaaa ttatggtaat gctttttggt acgggtccata tgatgggatg	420
ttctttggcg atggcgacgg aatatacttc tcttcccttg caaaatcttt agatgttgta	480
ggccacgaat taagtcatgg tgtaacaaat aaagagtcta atcttaataa tgaaaatgaa	540
tctggtgccc taaatgaatc tttctcagat attatgggag tagctgttga gggtaaaaac	600
tttgtactag gtgaagattg ctgggttgct ggaggagtaa tgagagatat ggaaaatcca	660

tccagaggag gcccaaccagc tcatatgaaa gattataaat acaaaactat gaatgacgat	720
aacgggtggtg ttcatacaaaa ttcaggtata ataaaccatg ctgcttattt agttgcagat	780
ggaatagaaa aaactggtgc aaaaaatagt aaagatatata tgggaaaaat attctataca	840
gctaattgct ataaatggga tgaacaaca aattttgcta agtgcagaaa tgatgtagtc	900
caagttacta aagaacttta tggcgaaaat agcaactatg taaaaattgt tgaaaaagct	960
tttgaccaag ttggaataac tgctacacct caattacat tataa	1005

<210> 27
 <211> 1746
 <212> ДНК
 <213> Clostridium Botulinum

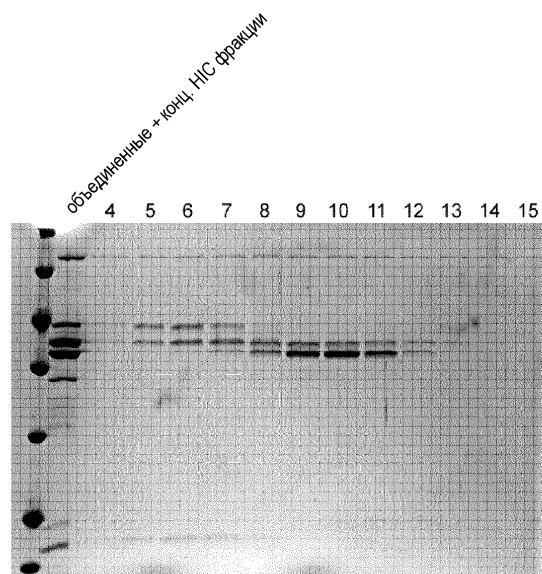
<400> 27	
atgaaaagta aaaaattatt agctacagtg ctaagtgcg tgatcacttt ttctactggt	60
tctgcagttt atgctgcgcc tgtaggaaaa gaaagtaag ttgaaccaa aactacaaca	120
ataacttggg aaaaaatga acaaaactact aaaaagctg ctactgatat aactgaaaag	180
aaatttaaca attctgagga gataactaaa ttctttgaaa aaaatatatc taaatttggt	240
gtacaaaaag gttctcttaa aaacaccaag actgtaaaag acgaaaaagg taaaactaac	300
tatcatatga tttatgaagt agaaggtata cctgtatact atggaagaat tgtttttaca	360
actgaaaaag actcctccat ggattctata aacggtagaa ttgatactgt ttttgaaaat	420
gggaattgga aaaacaaaat caaactatca aaagaagatg ctatagcaaa agctaaaaat	480
gatattaaag atgaaaaagc aactagtaaa aagaccgatt tatatctgta taattttgag	540
ggcaaacctt atgtagttta tttagtagat ctaattacag acaacgggag ttggacgggt	600
ttcgtaaatg ctgaggatgg ttctatagta aataaattta ataatactcc tactttaatt	660
gatactaaag atcaaaaatt acccaatgct aaaaaatta aagatgaagc taaaaaagct	720
agtaatgcaa ataatgtaat tgatgttcaa ggtcaaagcg ttaaaggagt aggaaaaact	780
agcttgatg gactagtaaa tattgatgta acttatggaa atggaaaata ctatttaaaa	840
gatagcaaca aaaatattta tctatatgac ttaaaaaatc aagttgatga atatgatcta	900
tacaattatc ttagtagacc taactataaa caaatattaa tgagcaaatc tgaattaata	960
tctaattaca ataataattt tatagccaac aatcagggtta attctgtaga tgcttatgta	1020
aacacaaata aaacctatga ttattataaa aacaaattaa atagaaacag tattgataat	1080
aagggatga atattaatgg gtttggtcat gtaggtagaa attatggtaa tgctttttgg	1140
tacgggccat atgatgggat gttctttggc gatggcgacg gaatatactt ctcttcctt	1200
gcaaaatctt tagatgttgt aggccacgaa ttaagtcatg gtgtaacaaa taaagagtct	1260
aatcttaaat atgaaaatga atctggtgcc ctaaatgaat ctttctcaga tattatggga	1320

gtagctgttg agggtaaaaa ctttgacta ggtgaagatt gctgggttgc tggaggagta	1380
atgagagata tggaaaatcc atccagagga ggccaaccag ctcatatgaa agattataaa	1440
tacaaaacta tgaatgacga taacggtggt gttcatacaa attcaggtat aataaaccat	1500
gctgcttatt tagttgcaga tggaatagaa aaaactggtg caaaaaatag taaagatatt	1560
atgggaaaaa tattctatac agctaattgc tataaatggg atgaaacaac aaattttgct	1620
aagtcagaaa atgatgtagt ccaagttact aaagaacttt atggcgaaaa tagcaactat	1680
gtaaaaattg ttgaaaaagc ttttgaccaa gttggaataa ctgctacacc tcaattacca	1740
ttataa	1746



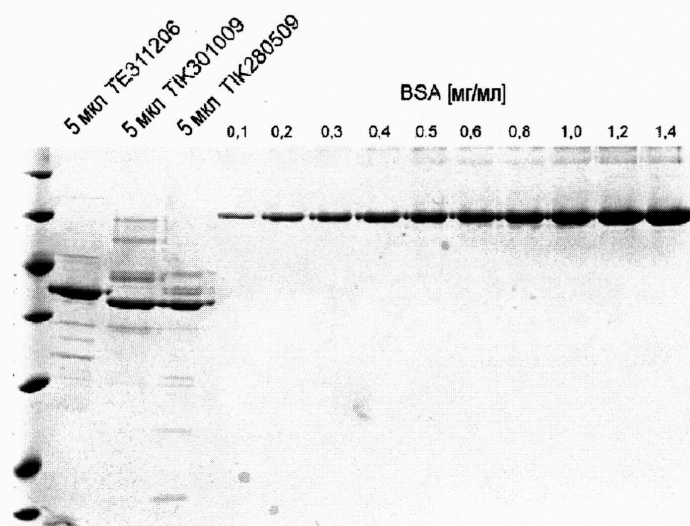
ФИГ.1

2/14



ФИГ.2

3/14



ФИГ.3

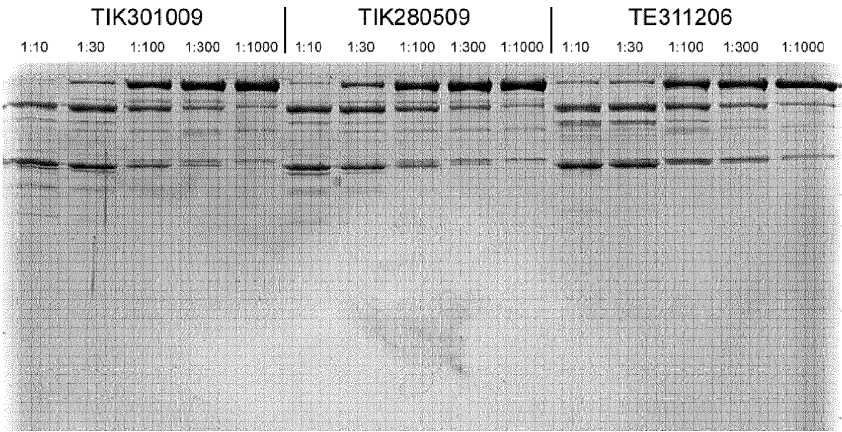
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
HKSKLLATV	LSAVITFSKV	SAVSAAPVGV	ESKSDPKTTT	ISMOKSEQNA	KKATTDIKQK	KFDNAQELTK	FFENNISRFG	VKKGTUNSTK	TLKDDKGRTH	YHTIVEVEGI
120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
PVYVGRIVFT	TEKDSIMDSI	NGRVDUTVFEN	GNTENKIKLS	KEDALAKAKA	DIKNEKSNKE	KAEIYLYTNE	GKPVVVLVN	SITUSGNMUI	FVNAEDGSIV	NKFNNTPTLL
230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
DTKAEK.PNA	KKIKDEAEKN	EAKKANNNNN	LIIVQOQSVK	GLGRTSLDGL	VMTNITTYDNG	RYVLYDMNKK	ITLYDLKNQV	DIDDLNDFTD	SPEGGHNEEL	MRSEIIVSNS
340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440
NNNPFVDNQV	NSVDAYANHA	KSYDYTRQKL	SRNSLDNKGH	NIRGVHFDK	MIGNAPHVGE	YDSMTFGDGO	GVRLSLPLAKA	LDVVGHGELSH	GVTNFQGDLE	YERESGALNE
450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550
SFSDINGTAL	EGRNFEIGED	CUIPSORYGE	IMRDHEDSR	GNQPAHKDF	ROLFVDEDDH	UGGVHTNSGI	INHAAVLIAD	GPEKNGEKDS	KDINAKIFYI	ANCYVUDQIT
560	570	580	590	600						
DfSKCNDVW	KVAKDLVGDN	SKEVQIVKQA	FDOVGITATP	OLPL						

Фиг.4

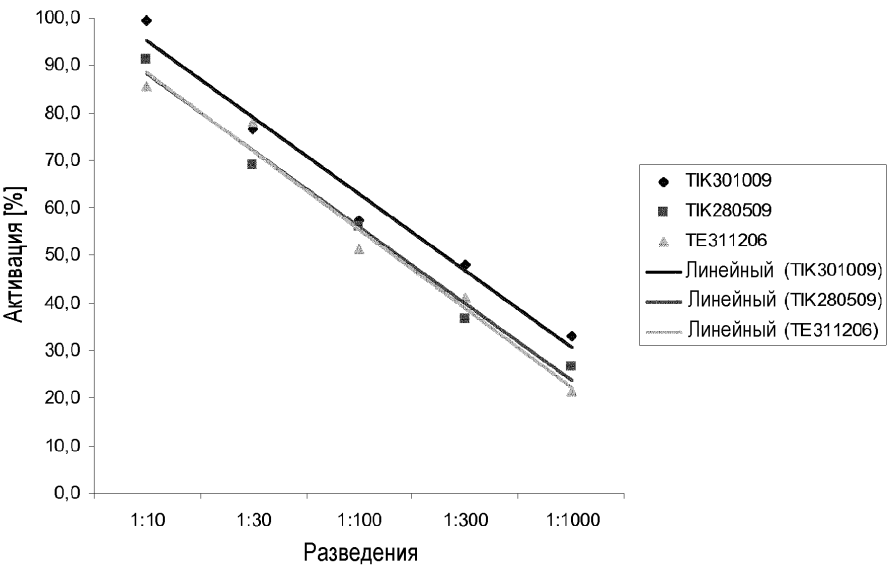
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
MSKELLATV	LSAVITFTV	SAVYAPVCK	ESKVEPKITT	ITWKKOEONT	KKAAUTITEK	KINNSEEITK	FFERMLISFG	VOKGSLRNTK	IVKDERKKN	YHNIYEVIGI
120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
PVYGRIVFT	TERDSMSDSI	NGRIDTVFN	GNWKNIKLS	KEDALAKAEN	DIKEKATSK	KTDLYLVNFE	GRPYVVYLVQ	LITDNGSWTV	FVNAEDGSIV	NRFNNTPTLI
230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
DTEDQLPNA	EKIKDEAKKA	SNANNVIDVQ	QOSVEGVGKT	SLDGLWNIDV	TYGNGKTYLK	DSNKIYIYLD	LKNQYDFVDI	VNYLSRPYK	QILNISESELI	SNWNNFIAN
340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440
NQVNSVDATV	NTWKTYDIYK	NKLNPNISIM	KGNNINGFVH	VGNKYCNAPW	YGPTYGHPFG	DGDDGIYFSSL	AKSLDYWGHE	LSHGVTINKES	NKYNESGA	LNESFSDING
450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550
VAVEGHNFVL	GEDCWVAGGV	MRDHENPSRG	GOPAHNKDYK	YKTMNDMDGG	VHINSGLINH	AAYLVDAGIE	KTGAKUSKDI	MGRIFYIANG	YKEDETTNTA	KRMNDVQVNT
560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660
KELYGHSNTY	VKIYEFAPDO	VGITATFOLP	I							

Фиг.5

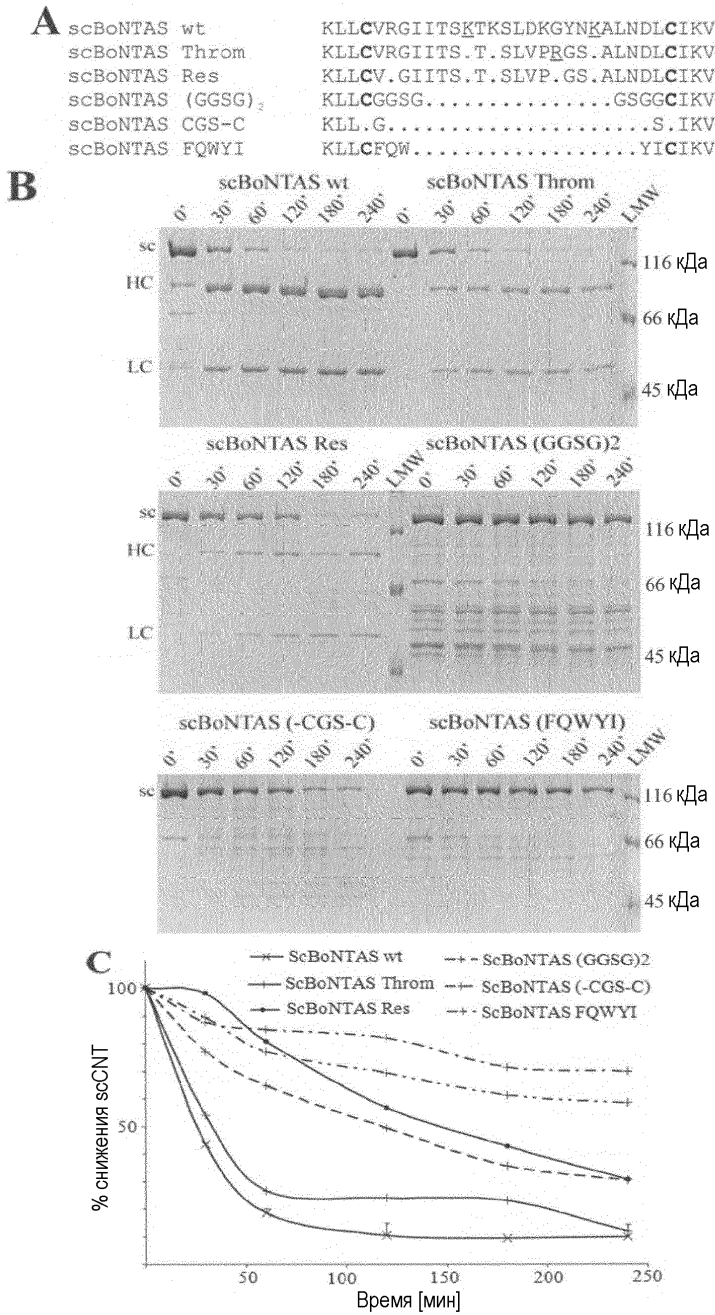
6/14



ФИГ.6А



ФИГ.6В



ФИГ.7

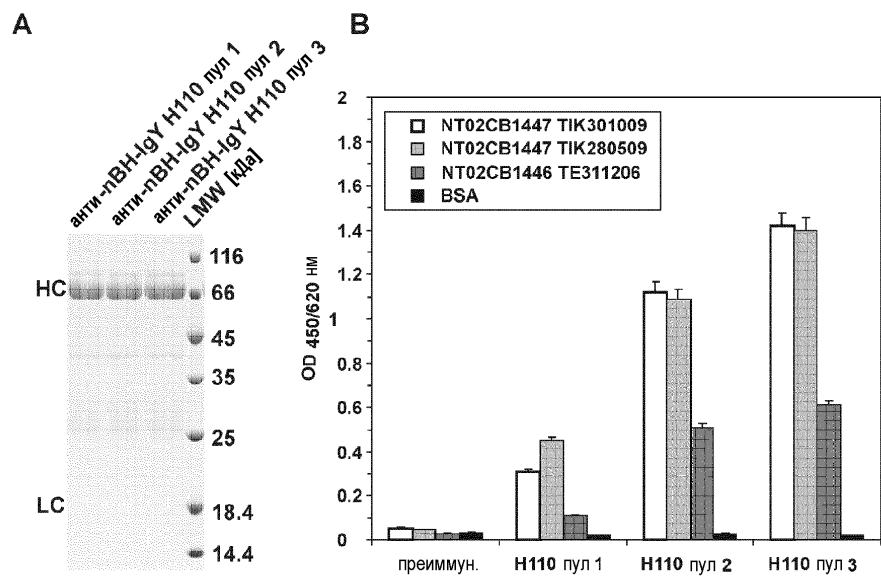
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
MPVNRQFNY	KDPVNGVDIA	YIKIPNAGQM	QFVIAFKIN	KIUVIPEDT	FTNPEQGLN	PPEAKQVPV	STYDSTLST	IKERKNTLKG	VTKLFRFVYS	TDLGRMLITS	IVRGIFPUGG	STIDTELKVI
140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
DTNGLNVICP	DGSTRSEELN	LVILIGPSADI	IQFECKSTGH	EVALILTRQY	GSTOVLNPS	DFTFGFELS	EVDINPLGA	QKFAIDPVT	LAHELHACH	ELVGIAMPN	KVIVNTHAY	YERKOLEVSY
270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
ELKPTFGQHD	ARFIDSLQEN	EPRLVYTRNF	KDIASTLQKA	KSIUVGTIASL	QYHNVWFREK	YLSIEDTSRK	FSDVLEKLPDR	LYKNTLTIIT	ENMFVVFPRV	LNRKTHLPD	KAMPKINIVP	KVNYTVYDGF
400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
NLENTNLAM	PNGQNTIENN	MNPTLKNFT	GLPEFYKLC	VRGIITSKTR	SLDKGYNKAL	NDLICRVNNU	DLFFSPSEDN	FTNDLNGEE	ITSOTNIEAA	PENISDLIQ	QVYLTNTDN	EPENISIELN
530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
SSDIIGQLEL	MPNIERFNG	KVYELDKYTM	PHYLAQEF	HGRSRIALTN	SVNEALLNPS	RVYTFSSDY	VKKVINKATEA	ANFLGWVEQL	VYDFTDESE	VSTTDKIADI	TILIPYIGPA	LNIGNMLYKO
660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
DFVGALIFSG	AVILLEFIPE	IAIPWLCTPA	LVSYLAMKVL	TVOQIDMALS	KPKNEKQDEVY	KYIVTMHLAK	VMTQIDLILK	EKKEALENQA	EATKALINVO	VNOVTEEPAN	NINFINIDOLS	SKLNEISINKA
790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
MINDINKELNQ	CSVSYLNSGM	IPYGVYALID	FDASLIDALL	KYIVONKSTL	IGQVDELKDK	VMTLSTIDIP	FOLSKTYDNOQ	ELLSTFTTEVI	KNIINTSILN	LEYESNHLID	LSRYASKXINI	GSKWDFPID
920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
KNOIOLFNE	SSKIEVILGN	ALVNSNETHN	PSTSFWRIP	KYFNSISLNN	EYTLINCHEN	NSGMYKSLNY	GELIUTLODT	QEIKNRVFK	YSOMINISDY	INRUIFVIT	MNRLNLSKIY	INGRLIDORF
1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
ISNLGNHAS	NNIMFKLOGC	ROTHRVINIK	YFMIFDKELN	EKEIRDLYDN	QSNSGILKDF	WGDYLOYDKP	YTHMLLYDPR	KYVDVNNVGI	RGYMYLKGR	GSMVTINIYL	NSSLYFGTKF	TIRKYASGNK
1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
DNIVNNDRV	YINTVWNEE	YELATNASQA	QVERILSALE	IPDVGNLSQV	WTKKRNQOG	ITMKCKMLQ	DNDGNDIGFI	QPHOFNNIAK	LVASNWNVNO	IERSSTLGC	SWEIFIVDDG	WGERPL

Фиг.8А

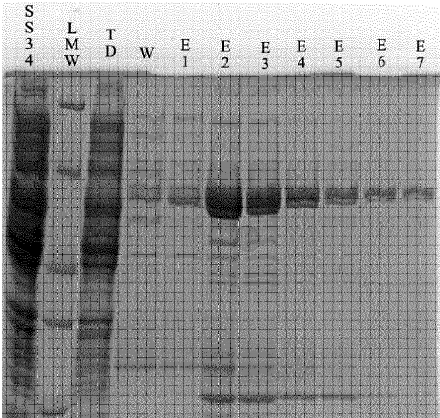
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MPVNRQFNY	ROPVNRQVDA	YKIPNACQM	QPVKAFKHN	KIWIPIREDTI	FTMPREGDLN	PPPEAKQPVV	SYDSTYIST	DNKEDNYLKG	VIKLFFERYIS
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
IDLGRMLTS	IVRCIPRMC	STIDTELKVI	DYMCINWIOP	DGSTRSRRLN	LVIICPSADI	IOFECKSPCH	EVLMLTFCY	CSTOYITRSP	DFTGCFERSL
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
EVDNELLGA	GRYATDPAVT	LAHELHACH	ELVCIATPNW	RVKYNINAY	YENSLEUSF	BEIRFGCHD	AKYISLQEN	KFRLTYTNKF	KDIASILNKA
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
RSIGVITABL	QYHRGVFKER	YLLSEDTSCR	FSVDLRKFDK	LYHMLTEIYT	EDNFVKPFKV	LNBRITYLNF	KAVFKINIVP	KVNYITVDGF	NLRNTLALAN
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
PNGQNTENN	ENPTELKNT	GLFEYTKLC	VNGCITSETK	SIDRCYNKAL	NDLCIKYNNW	DLFFSPSEDN	PTNDLNGKEE	ITSDTNIEAA	BENISDLDIQ
510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
QYLTENFDM	EPENISERNL	SSDIIGQLEL	HPNIRFPFG	KRYELDKTYM	FHYLRQAFE	HGKSRIALTN	SVNRALLMPS	KVYTFPSSDY	VKKVNEAKTRA
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
AMFLCWVEQL	VYDFTDETSE	VSTDEIADI	TIIPYITCPA	LNICNNLYED	DPVGCALIFSC	AVILLEFIPE	IAPVLCITFA	LVSYLEANVYL	TVQITDINALS
710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
KDNRHEDVY	KYIVINBLAK	VNTQIDLIRK	KMKKALENOA	EATKALINYO	YMOYTEREN	MINFIDOLS	SKLARSINKA	MININEFLNQ	CSVSYLNRSM
810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
IPYGVHLEL	PDASIKDALL	KYIVONRCIL	IGQVDRKDK	VNNTISTEIP	FOLSKYTDNQ	PLISFTFYI	KVLIYTSILN	LYVESHLID	LSQVASKINI
910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
CSRWNEPDID	ENQIOLFRLE	SKIEVILRN	AIUVNSMYEN	FSTSPWIRIDP	KYPNSISLNN	EYTIINCHEN	MSCURVSLNY	CEIINTLQDT	QRIHQVWVFR
1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
YSGHINTESDY	INRWIFVTIT	NNRLNNSKIY	INCRILIDQRP	ISHLGNTHAS	NNIMPFLDGC	PDTHRYITIK	YFNLPRKELN	RKEIHDLTN	QSNSCILKDF
1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
WGDYLCYDKP	YTHMLNVDPN	KYVDVNRVGI	RGYTLKQPR	GSYTTNTIYL	NSSLVPGTKF	LIIRKVASGNK	DNIVVNNDRV	YIMVVPNKE	YPLATNASQA
1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
CYRKILSALE	IPDVUNLSQV	VYHRSKWDQC	LIBKCKHMLQ	DNNCHDIGCFI	CFHQFNNIAK	LVASWVTRQ	IERSSSTGCC	SMEFIPVDDC	WCEPPL

Фиг.8В

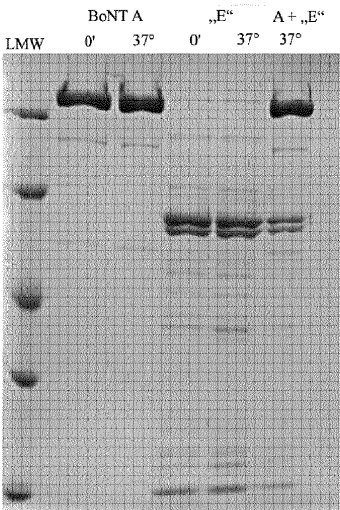
10/14



ФИГ.9

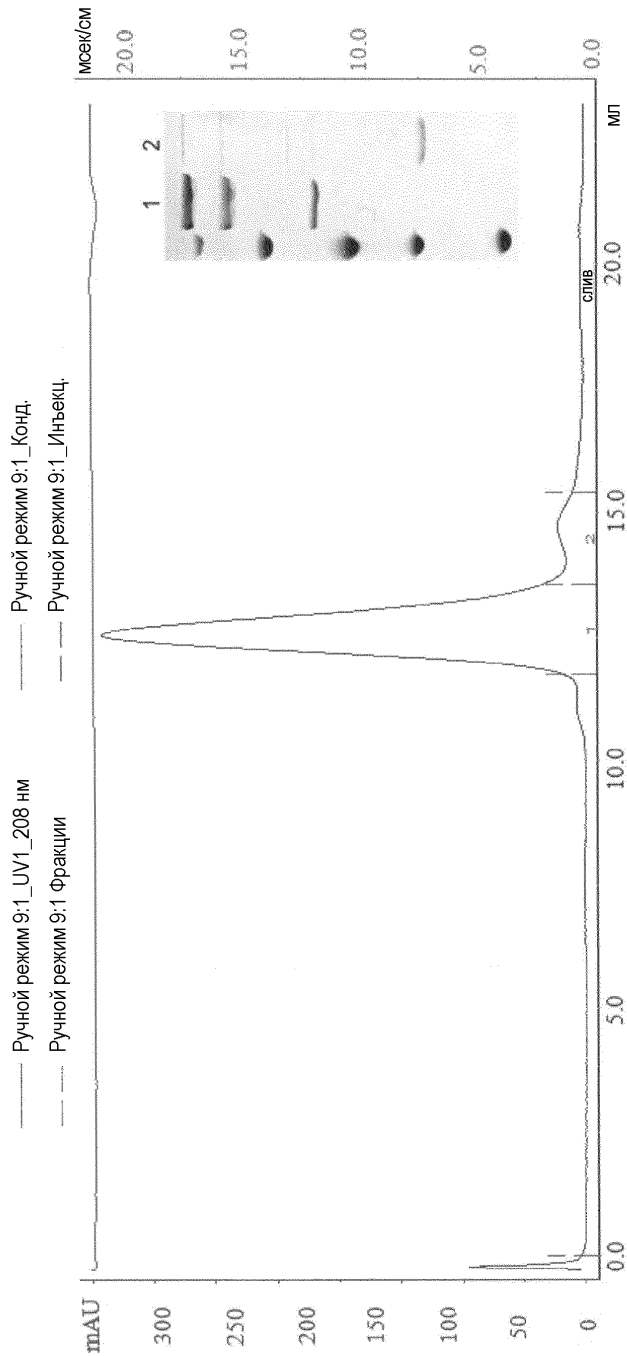


ФИГ.10А

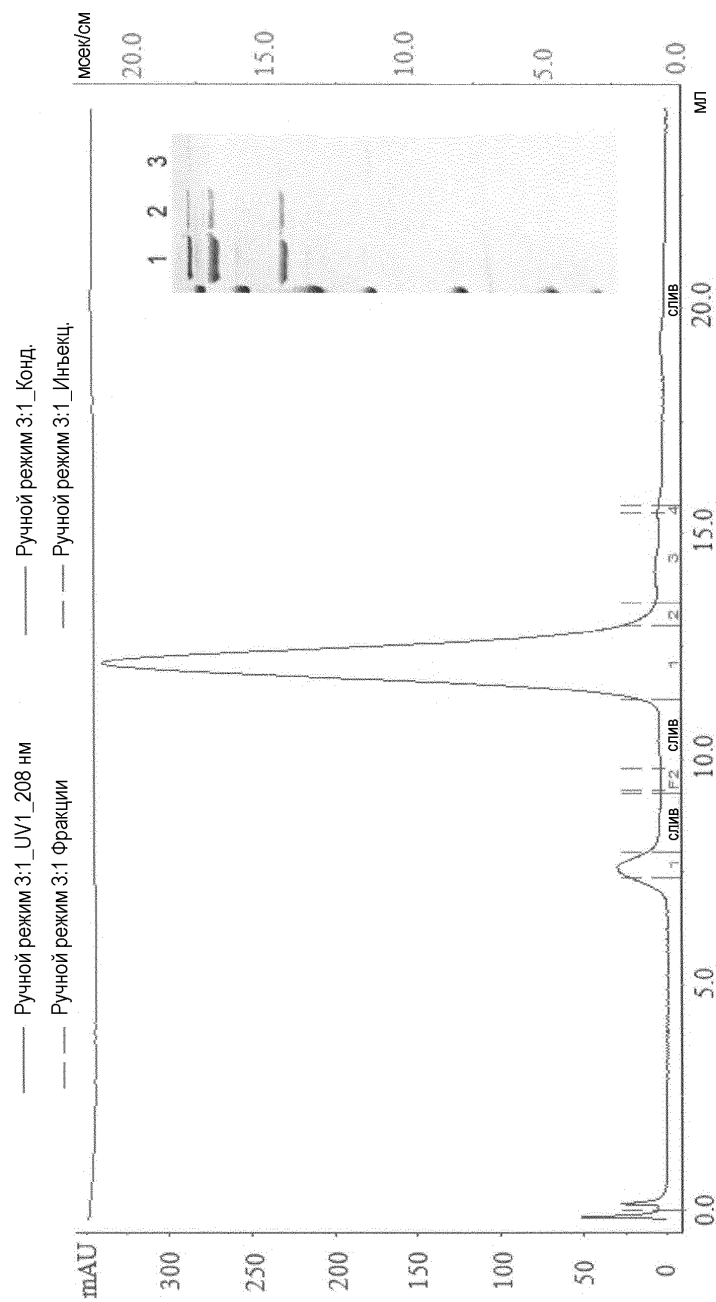


ФИГ.10В

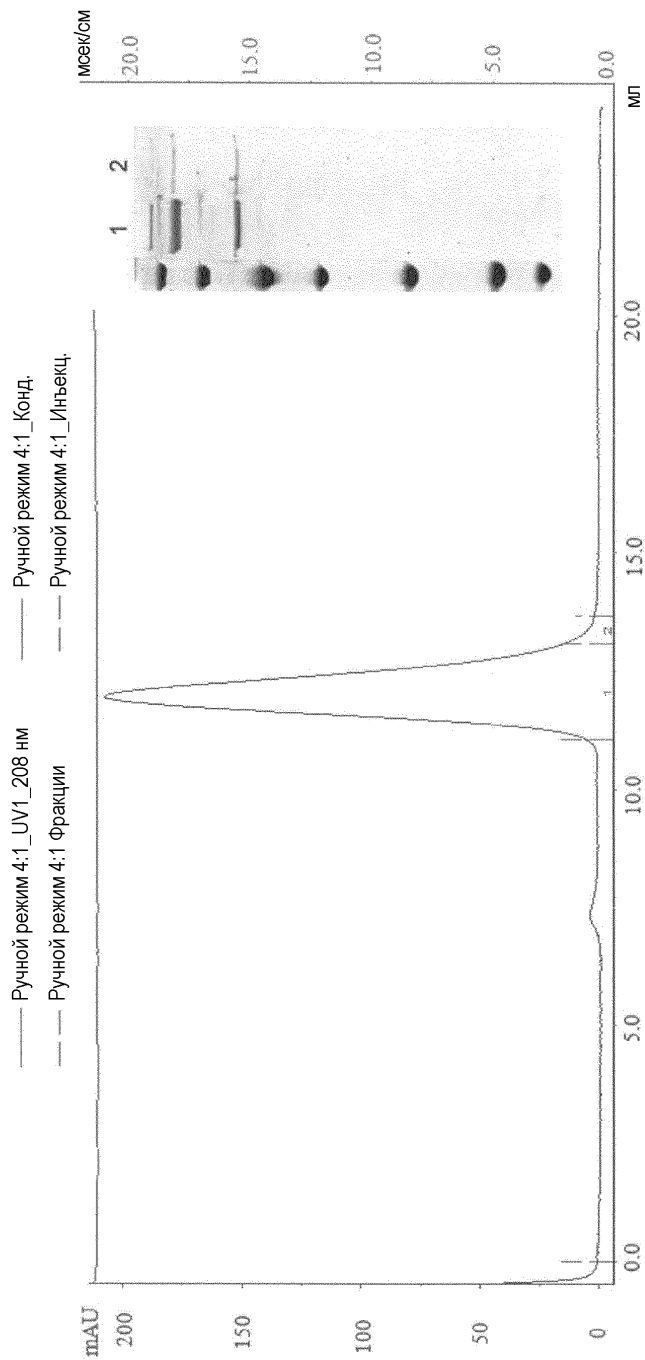
12/14



ФИГ.11А



ФИГ.11В



ФИГ.11С