

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091527 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.09.11

(51) Int. Cl. A61K 38/48 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.12.20

(54) ЛЕЧЕНИЕ АВТОНОМНЫХ НАРУШЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ БОТУЛИНОВОГО
ТОКСИНА

(31) 17306840.4

(72) Изобретатель:

(32) 2017.12.20

Крупп Йоханнес, Мэньель-Людоль
Жаки, Пиньоль Бернадетт (GB)

(33) EP

(86) PCT/EP2018/086261

(74) Представитель:

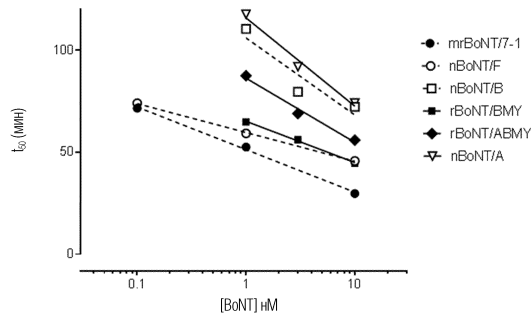
(87) WO 2019/122166 2019.06.27

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

ИПСЕН БИОФАРМ ЛИМИТЕД (GB)

(57) Настоящее изобретение относится к лечению нарушений автономной нервной системы с использованием клостридиального нейротоксина, содержащего H_{CC}-домен из BoNT/B, BoNT/D, BoNT/D-C, BoNT/F или BoNT/G, где доза клостридиального нейротоксина, подлежащая введению пациенту, эквивалентна или ниже дозы BoNT/A, которую использовали бы для лечения того же нарушения автономной нервной системы.



A1

202091527

202091527

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 561835EA/072

ЛЕЧЕНИЕ АВТОНОМНЫХ НАРУШЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ БОТУЛИНОВОГО ТОКСИНА

Настоящее изобретение относится к лечению нарушений автономной нервной системы с использованием нейротоксинов.

Бактерии рода *Clostridia* продуцируют высокоэффективные и специфические белковые токсины, которые могут отравлять нейроны и другие клетки, в которые доставляются. Примеры таких клостридиальных токсинов включают нейротоксины, продуцируемые *C. tetani* (TeNT) и *C. botulinum* (BoNT) серотипов A-G, а также нейротоксины, продуцируемые *C. baratii* и *C. butyricum*.

Клостридиальные нейротоксины вызывают мышечный паралич посредством ингибирования холинэргической передачи в периферической нервной системе, в частности, в нервномышечном соединении, и, таким образом, они могут быть летальными. В природе клостридиальные нейротоксины синтезируются в качестве одноцепочечного полипептида, который модифицируется посттрансляционно посредством события протеолитического расщепления с образованием двух полипептидных цепей, связанных вместе дисульфидной связью. Расщепление происходит в определенном участке расщепления, часто называемом участком активации, который находится между остатками цистеина, которые обеспечивают межцепочечную дисульфидную связь. Именно эта двухцепочечная форма является активной формой токсина. Эти две цепи называются тяжелой цепью (H-цепь), которая имеет молекулярную массу приблизительно 100 кДа, и легкой цепью (L-цепь), которая имеет молекулярную массу приблизительно 50 кДа. H-цепь содержит N-концевой компонент транслокации (H_N-домен) и C-концевой нацеливающий компонент (H_C-домен). Участок расщепления находится между L-цепью и H_N-доменом.

Способ действия клостридиальных нейротоксинов основан на пяти отдельных стадиях: (1) связывание H_C-домена с клеточной мембраной их нейрона-мишени, затем (2) интернализация связавшегося токсина в клетку посредством эндосомы, (3) транслокация L-цепи H_N-домена через эндосомальную мембрану и в цитозоль, (4) протеолитическое расщепление внутриклеточных транспортных белков, известных как белки SNARE, посредством L-цепи, которая обеспечивает нетоксическую протеазную функцию, и (5) ингибирование клеточной секреции из клетки-мишени.

В этом каскаде событий белки SNARE (растворимый рецептор белка присоединения N-этилмалеинимид-чувствительного фактора) являются необходимыми для внутриклеточного слияния везикул и, таким образом, для секреции молекул посредством везикулярного транспорта из клетки. Примеры белков SNARE, присутствующих в нейронах, включают, среди прочих, SNAP-25, VAMP или синтаксин. С другой стороны, не цитотоксическая протеазная функция L-цепи представляет собой активность цинк-зависимой эндопептидазы, которая демонстрирует высокую субстратную

специфичность в отношении белков SNARE. Таким образом, после доставки в нейрональную клетку-мишень не цитотоксическая протеаза клостридиальных нейротоксинов посредством расщепления ее белка-субстрата SNARE ингибирует высвобождение нейротрансмиттера, что затем приводит к нейропараличу.

Благодаря их уникальным свойствам, клостридиальные нейротоксины, такие как ботулиновый токсин, успешно используются в широком диапазоне терапевтических применений, в частности, при двигательных и нарушениях автономной нервной системы, для восстановления, например, активности гиперактивных нервных окончаний до нормальных уровней. На сегодняшний день описано по меньшей мере семь антигенно отличающихся серотипов BoNT, а именно, BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G (Rossetto, O. et al., "Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights". *Nature Reviews Microbiology* 12,8 (2014): 535-549). Несмотря на это разнообразие BoNT/A остается предпочтительным для выбора серотипом в терапии с тремя широко распространенными коммерческими препаратами (Botox®, Dysport® и Xeomin®), в то время как на рынке доступен только один продукт BoNT/B (Neurobloc®/Myobloc®). На сегодняшний день эти продукты BoNT/A и BoNT/B, которые представляют собой токсины, очищенные из клостридиальных штаммов, представляют собой единственные два серотипа BoNT, которые в настоящее время одобрены для использования у человека для применения в диапазоне, среди прочих, от спастичности, дисфункции мочевого пузыря или гипергидроза (для BoNT/A) (см., например, <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/112>, <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/870>, <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/2162>, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме) до дистонии шейки матки (для BoNT/B) (см., например, <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/20568>, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

Однако существующие в настоящее время ограничения их терапевтических применений состоят в образовании нейтрализующих антител у пациентов, что делает дальнейшее лечение неэффективным. Несмотря на то, что было мало сообщений о проблемах антигенности с Neurobloc®/Myobloc®, такие антительные ответы на сегодняшний день были описаны для продуктов BoNT/A, которые остаются предпочитаемым для выбора ботулиновым токсином. Было идентифицировано, что эти иммунологические ответы прямо коррелируют с дозами токсинов (Lange, O., et al., *neutralizing antibodies and secondary therapy failure after treatment with botulinum toxin type A: much ado about nothing?* *Clin Neuropharmacol*, 2009, 32, 213-218). Неблагоприятные эффекты также могут быть результатом диффузии токсинов в другие области организма и возможность диффузии токсина прямо связана с инъецируемыми дозами.

Поскольку как образование нейтрализующих антител, так и диффузия токсинов прямо связаны с инъецируемыми дозами, в данной области существует потребность в лечении пациентов продуктами, такими как альтернативные серотипы BoNT, которые способны достигать того же уровня терапевтического эффекта при более низких дозах.

Проблемой в этом случае является отличие механизмов действия различных серотипов BoNT, которое, по-видимому, переходит в отличие терапевтической эффективности для одного и того же нарушения.

Действительно, для демонстрации клинической активности ботулиновый токсин должен проникнуть в окончание нейрона, являющегося его клеткой-мишенью. Для этого BoNT нацеливаются на нейроны и проникают в них посредством связывания с их специфическими рецепторами через их рецептор-связывающие домены (BoNT-H_C), которые хорошо описаны в литературе (Schiavo, G., Matteoli, M. & Montecucco, S. Neurotoxins affecting neuroexocytosis, *Physiol Rev*, 2000, 80, 717-766). Связывание рецептора в общем определяет эффективность и специфичность BoNT в отношении распознавания нейронов. BoNT/B, D-C и G имеют два гомологичных синаптических везикулярных белка синаптоагмин I и II (Syt I/II) в качестве их рецепторов, в то время как BoNT/A, E, D и F используют другой синаптический везикулярный белок SV2. В этом отношении следует отметить, что аффинность связывания серотипов BoNT в отношении их белковых рецепторов также может варьироваться от вида к виду: например, BoNT/B, /D-C и /G демонстрируют значительно более высокую аффинность в отношении SytII, чем в отношении SytI в окончаниях двигательных нервов у грызунов, в то время как у человека они имеют более высокую аффинность в отношении SytI, чем в отношении SytII - это отличие является следствием уникальной аминокислотной замены между последовательностями SytII грызуна и человека. В результате этой аминокислотной замены SytII человека является значительно менее эффективным в отношении опосредования вхождения BoNT/B, /D-C и /G, по сравнению с SytII мыши. Это также означает, что у человека высокоаффинный рецептор для BoNT/B, /D-C и /G, по-видимому, ограничивается минорным рецептором SytI, по меньшей мере в мотонейронах. Все эти данные могут объяснить клинические наблюдения, что более высокая доза BoNT/B, чем BoNT/A (который связывается с отличным рецептором), по-видимому, необходима для достижения тех же уровней терапевтических эффектов у пациентов с цервикальной дистонией (Brashear A. et al., Safety and efficacy of NeuroBloc (botulinum toxin type B) in type A-resistant cervical dystonia, 1999, *Neurology* 53, 1431-1438; Pappert, E.J. & Germanson, T. Botulinum toxin type B vs. type A in toxin-naïve patients with cervical dystonia: Randomized, double-blind, noninferiority trial, 2008 *Mov Disord* 23, 510-517). В частности, для применения для нервномышечного соединения, был предложен коэффициент пересчета между BOTOX® и MyoBloc™ 1:40 (Dressler et al., Botulinum toxin type B for treatment of axillar hyperhidrosis., 2002, *J. Neurol.* 249,1729-1732; Comella et al., 2005).

В дополнение к рецепторам белков, все серотипы BoNT требуют липидных корецепторных ганглиозидов, которые широко представлены на нейрональных поверхностях и могут различаться между серотипами и расщепляют различные белковые субстраты SNARE, которые могут далее влиять на их терапевтическую эффективность в зависимости от типа клеток, на который они нацелены. Действительно, протеазы L-цепи BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F и BoNT/G расщепляют VAMP, в то время как протеазы L-цепи

BoNT/A и BoNT/E расщепляют SNAP25, и протеаза L-цепи BoNT/C расщепляет как SNAP25, так и синтаксин.

Даже несмотря на то, что первоначальные терапевтические применения ботулиновых нейротоксинов были основаны на ингибировании высвобождения ацетилхолина в нервномышечных соединениях скелетных мышц для лечения нервномышечных состояний, таких как дистонии и спастичность, позднее было обнаружено, что эти нейротоксины также были эффективными в отношении желез и гладких мышц посредством ингибирования высвобождения ацетилхолина в автономных нервных окончаниях, и, таким образом, их можно использовать для лечения различных нарушений автономной нервной системы, таких как гипергидроз, сиалорея или гиперактивный мочевой пузырь.

Рекомендованная доза Botox® (также известного как онаботулиnumтоксин А) для лечения гипергидроза составляет 50 единиц на подмышечную область (<https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/112>), что соответствует дозе приблизительно 0,365 нг токсина BoNT/A массой 150 кДа. Neurobloc®/Myobloc® (также известный как римаботулиnumтоксин В) не одобрен для лечения гипергидроза; однако в литературе описаны дозы в диапазоне от 2000 единиц до 4000 единиц, т.е. дозы в диапазоне приблизительно 4-40 нг токсина BoNT/A массой 150 кДа. Однако такие высокие дозировки не обходятся без побочных эффектов, как на регионарном, так и на системном уровне, таких как сухость в рту, дисфагия, изжога и т.д. (Dressler D. and Eleopra R., *Clinical use of non-A botulinum toxins: botulinum toxin type B.*, *Neurotoxicity research* 9,2-3 (2006): 121-125; Tintner R. et al., *Autonomic function after botulinum toxin type A or B: a double-blind, randomized trial.*, *Neurology* 65,5 (2005): 765-767; Birklein F. et al. *Botulinum toxin type B blocks sudomotor function effectively: a 6 month follow up.*, *Journal of investigative dermatology* 121,6 (2003): 1312-1316). Тем не менее, не было проведено исследования, может ли терапевтическая эффективность быть достигнута в отношении нарушений автономной нервной системы при более низкой дозе токсина.

Настоящее изобретение нацелено на предоставление усовершенствованного способа лечения нарушений автономной нервной системы, который не сталкивается с клиническими проблемами, в настоящее время наблюдаемыми у пациентов, такими как продуцирование нейтрализующих антител против токсина, а также регионарные и/или системные побочные эффекты.

В одном аспекте изобретение относится к клостридиальному нейротоксину для применения для лечения нарушения автономной нервной системы у пациента-человека, где клостридиальный нейротоксин содержит N_{CC}-домен из BoNT/B, BoNT/D, BoNT/D-C, BoNT/F или BoNT/G, и где доза клостридиального нейротоксина, подлежащая введению пациенту, эквивалентна или ниже дозы BoNT/A при лечении указанного нарушения автономной нервной системы. Иными словами, изобретение относится к способу лечения нарушения автономной нервной системы у пациента-человека, нуждающегося в этом, включающему стадию введения указанному пациенту клостридиального нейротоксина,

содержащего Н_{СС}-домен из VoNT/B, VoNT/D, VoNT/D-C, VoNT/F или VoNT/G, в дозе, эквивалентной или меньшей чем доза VoNT/A при лечении указанного нарушения автономной нервной системы. Точнее изобретение относится к применению клостридиального нейротоксина, содержащего Н_{СС}-домен из VoNT/B, VoNT/D, VoNT/D-C, VoNT/F или VoNT/G, для изготовления лекарственного средства для лечения нарушения автономной нервной системы у пациента-человека, где доза клостридиального нейротоксина, подлежащая введению пациенту, эквивалентна или ниже дозы VoNT/A при лечении указанного нарушения автономной нервной системы.

В одном конкретном аспекте изобретение относится к клостридиальному нейротоксину для применения для лечения нарушения автономной нервной системы у пациента-человека, где указанный клостридиальный нейротоксин содержит Н_{СС}-домен из VoNT/B, VoNT/D, VoNT/D-C, VoNT/F или VoNT/G, и где доза указанного клостридиального нейротоксина, подлежащая введению пациенту, в от приблизительно 1,1 раза до приблизительно 100 раз, предпочтительно в от приблизительно 1,3 раза до приблизительно 90 раз ниже дозы VoNT/A при лечении указанного нарушения автономной нервной системы. Иными словами, изобретение относится к способу лечения нарушения автономной нервной системы у пациента-человека, нуждающегося в этом, включающему стадию введения указанному пациенту клостридиального нейротоксина, содержащего Н_{СС}-домен из VoNT/B, VoNT/D, VoNT/D-C, VoNT/F или VoNT/G, в дозе в от приблизительно 1,1 раза до приблизительно 100 раз, предпочтительно в от приблизительно 1,3 раза до приблизительно 90 раз ниже дозы VoNT/A при лечении указанного нарушения автономной нервной системы. Точнее изобретение относится к применению клостридиального нейротоксина, содержащего Н_{СС}-домен из VoNT/B, VoNT/D, VoNT/D-C, VoNT/F или VoNT/G, для изготовления лекарственного средства для лечения нарушения автономной нервной системы у пациента-человека, где доза клостридиального нейротоксина, подлежащая введению пациенту в от приблизительно 1,1 раза до приблизительно в 100 раз, предпочтительно в от приблизительно 1,3 раза до приблизительно 90 раз ниже дозы VoNT/A при лечении указанного нарушения автономной нервной системы. Указанная доза предпочтительно исчисляется в нанограммах.

В одном конкретном аспекте изобретение относится к клостридиальному нейротоксину для применения для лечения нарушения автономной нервной системы у пациента-человека, где указанный клостридиальный нейротоксин содержит Н_{СС}-домен из VoNT/B, VoNT/D, VoNT/D-C, VoNT/F или VoNT/G, и где доза, подлежащая введению пациенту, находится в диапазоне от приблизительно 0,00025 нг до приблизительно 3 нг указанного клостридиального нейротоксина. Иными словами, изобретение относится к способу лечения нарушения автономной нервной системы у пациента-человека, нуждающегося в этом, включающему введение пациенту клостридиального нейротоксина, содержащего Н_{СС}-домен из VoNT/B, VoNT/D, VoNT/D-C, VoNT/F или VoNT/G, в дозе в диапазоне от приблизительно 0,00025 нг до приблизительно 3 нг.

Точнее, изобретение относится к применению клостридиального нейротоксина, содержащего H_{CC}-домен из BoNT/B, BoNT/D, BoNT/D-C, BoNT/F или BoNT/G, для производства лекарственного средства для лечения нарушения автономной нервной системы у пациента-человека, где доза клостридиального нейротоксина, подлежащая введению пациенту, находится в диапазоне от приблизительно 0,00025 нг до приблизительно 3 нг.

Во-первых, настоящее изобретение основано на неожиданном открытии авторов изобретения, что BoNT/B является по меньшей мере настолько же эффективным, как и BoNT/A, в гладкомышечной ткани человека.

Это открытие является неожиданным, поскольку, как упоминалось выше, значительно более высокие дозы BoNT/B (Neurobloc®/Myobloc®) требуются для лечения нарушений скелетных мышц по сравнению с BoNT/A (например Botox®). Вероятно, оно основано на клиническом наблюдении, что только более высокие дозы BoNT/B (Neurobloc®/Myobloc®), чем BoNT/A (например, Botox®) были до настоящего изобретения протестированы и описаны в литературе для лечения, например, гипергидроза, который вовлекает гладкие мышцы.

Было предположено, что это различие эффективности BoNT/B в этих двух тканях является следствием того факта, что нарушения гладких и скелетных мышц в действительности не зависят от одних и тех же нервных путей. Сокращения гладких мышц в действительности запускаются автономной нервной системой, в то время как сокращения скелетных мышц запускаются соматической нервной системой. Цервикальная дистония и многие другие нарушения, которые лечат ботулиновыми нейротоксинами, вызываются избыточными сокращениями скелетных мышц, в то время как другие нарушения, такие как гиперактивный мочевой пузырь (OAB) или неврологическая гиперактивность детрузора (NDO), вызываются чрезмерными сокращениями гладких мышц.

Соматическая нервная система (SoNS или произвольная нервная система) является частью периферической нервной системы, ассоциированной с произвольным контролем движений тела посредством скелетных мышц. SoNS состоит из афферентных нервов и эфферентных нервов. Афферентные нервы SoNS ответственны за передачу ощущения от организма в центральную нервную систему (ЦНС) и эфферентные нервы SoNS ответственны за отправку команд из ЦНС в организм, стимулирующих сокращение мышц; они включают все не чувствительные нейроны, связанные со скелетными мышцами и кожей.

Автономная нервная система (АНС) является другим компонентом периферической нервной системы и также состоит из афферентных нервов и эфферентных нервов. АНС состоит из двух звеньев: симпатическая нервная система (СНС) и парасимпатическая нервная система (ПНС). СНС контролирует более активные ответы, такие как повышение частоты сердцебиений и кровяного давления. В дополнение к гладким мышцам, АНС также контролирует секреты, такие как пот, слюна и слезная

жидкость.

Гладкие мышцы присутствуют в мочеполовой системе (например, мочевого пузыря, мочеточник), в пищеварительной системе (например, стенки желудка, желудочно-кишечный тракт, кишечник, сфинктер Одди, анальный сфинктер, трахея, желчный проток), в репродуктивной системе (например, предстательная железа, матка), в дыхательных путях, в сосудистой системе (например, стенки кровеносных сосудов, аорта, артерии, артериолы, вены) и в радужной оболочке глаза. Сокращения гладких мышц ответственны за широкий набор функций организма, такой как высвобождение мочи из мочевого пузыря, продвижение пищи по пищеварительному тракту, регуляция воздушного потока в легких, регуляция кровяного давления в артериях и венах и уменьшение размера зрачка.

На синаптические нервные окончания холинэргических нейронов, снабжающих экзокринные потовые железы, слюнные железы и слезные железы, можно осуществлять нацеливание с помощью ботулиновых нейротоксинов. Нейрогенные нарушения, ассоциированные с судомоторной или секретомоторной гиперактивностью, включают гипергидроз, в частности, очаговый гипергидроз ладоней, подмышек или ступней, аурикулотемпоральный синдром (синдром Фрея), увеличение слезоотделения в ходе приема пищи (синдром крокодиловых слез), повышение слюноотделения (сиалорея, слюнотечение), и т.д.

Без связи с теорией было предположено, что отличие эффективности, наблюдаемое между BoNT/A и BoNT/B, в отношении соматической нервной системы против автономной системы связано с тем фактом, что BoNT/A и BoNT/B различаются их белковыми рецепторами (SV2 и Syt I/II, соответственно), и/или являющимся их мишенью SNARE (SNAP25 и VAMP соответственно).

Исходя из этого предположения, далее было предположено, что другие серотипы BoNT, которые также используют Syt I/II в качестве белкового рецептора и/или расщепляют VAMP, такие как BoNT/D, BoNT/D-C, BoNT/F или BoNT/G, будут демонстрировать сходную эффективность с BoNT/B или даже лучшую эффективность в отношении гладких мышц/автономной системы по меньшей мере у человека.

Таким образом, аспектом настоящего изобретения является предоставление кластридиального нейротоксина для применения для лечения нарушения автономной нервной системы у пациента-человека, где кластридиальный нейротоксин содержит H_{CC}-домен из BoNT/B, BoNT/D, BoNT/D-C, BoNT/F или BoNT/G, и где доза кластридиального нейротоксина, подлежащая введению пациенту, эквивалентна или ниже дозы BoNT/A при лечении указанного нарушения автономной нервной системы. Иными словами, изобретение относится к способу лечения нарушения автономной нервной системы у пациента-человека, нуждающегося в этом, включающему стадию введения указанному пациенту кластридиального нейротоксина, содержащего H_{CC}-домен из BoNT/B, BoNT/D, BoNT/D-C, BoNT/F или BoNT/G, в дозе, которая эквивалентна или ниже дозы BoNT/A при лечении указанного нарушения автономной нервной системы. Точнее изобретение

относится к применению клостридиального нейротоксина, содержащего Н_{СС}-домен из BoNT/B, BoNT/D, BoNT/D-C, BoNT/F или BoNT/G, для изготовления лекарственного средства для лечения нарушения автономной нервной системы у пациента-человека, где доза клостридиального нейротоксина, подлежащая введению пациенту, эквивалентна или ниже дозы BoNT/A при лечении нарушения автономной нервной системы.

В одном варианте осуществления нарушение автономной нервной системы, подлежащее лечению посредством клостридиального нейротоксина по изобретению, выбрано из группы, состоящей из нарушений гладких мышц, гиперсекреторных нарушений, респираторных нарушений, воспалительных нарушений с автономным компонентом, нейроэндокринных нарушений и других автономных нарушений, прямо ассоциированных с центральным неврологическим нарушением.

Примеры таких автономных нарушений включают, но не ограничиваются ими:

- нарушения гладких мышцы, которые, в частности, вызываются чрезмерными, аномальными и/или пролонгированными мышечными сокращениями (спастические нарушения), включая, например:

- нарушения мочеотделительной системы, такие как нейрогенная гиперактивность детрузора (NDO), гиперактивный мочевого пузыря (OAB), в частности, идиопатический OAB (iOAB), спазмы мочевого пузыря, детрузорно-сфинктерная диссинергия (DSD), недержание мочи, задержка мочи, ночные позывы, императивное недержание, частое мочеиспускание; желудочно-кишечные нарушения, такие как дисфункция сфинктера Одди, спазм пищевода, кишечные спазмы, ахалазия, гастропарез, спастический колит, анальные трещины, запор, эпизодическую диарею, дисфагия, орофарингеальная дисфазия, нарушения глотания;

- сосудистые и сердечно-сосудистые нарушения, такие как болезнь Рейно, анастомозный тромбоз, фибрилляция предсердий после хирургической операции, ортостатическая гипотензия, нарушение кровяного давления;

- нарушения предстательной железы, такие как доброкачественная гиперплазия предстательной железы (BPH), простатит, простодиния, увеличение предстательной железы; и

- половые нарушения: эректильная дисфункция, приапизм, эякуляторный несостоятельность, вагинизм;

- гиперсекреторные нарушения, такие как гипергидроз (подмышечный, ладонный, подошвенный гипергидроз, диффузное потение, синдром Фрея, и т.д.), повышение слюноотделения (слюнотечение, сиалорея), аурикулотемпоральный синдром, избыточное слезоотделение, синдром крокодиловых слез, избыточная секреция слизи, бромгидроз, секрецию кислоты в желудке, угревая сыпь;

- респираторные нарушения, которые имеют гиперсекреторный и/или мышечный компонент, такие как ринорея, хронический ринит, астма, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), бронхиальная гиперреактивность, свистящее дыхание, непроизвольная инспираторная одышка, эпизоды апноэ;

- воспалительные нарушения, которые имеют автономный компонент, такие как отит среднего уха, зуд, прурит, синдром воспаленного кишечника;
- нейроэндокринные нарушения: диабет, гиперинсулинизм, гипергликокагонические нарушения поджелудочной железы, нарушения щитовидной железы, гипокальцемиа, гипертиреозидизм, метаболические нарушения, чрезмерный липолиз; и
- другие автономные нарушения, прямо ассоциированные с центральными неврологическими нарушениями, такими как паркинсонические и мозжечковые/пирамидальные признаки.

В предпочтительном варианте осуществления нарушение автономной нервной системы, подлежащее лечению согласно изобретению, представляет собой нарушение гладких мышц, выбранное из группы, состоящей из нарушений мочевых путей, желудочно-кишечных нарушений, сосудистых и сердечно-сосудистых нарушений, нарушений предстательной железы и половых расстройств.

Термин "кlostридиальный нейротоксин", как используют в рамках изобретения, означает любой полипептид, который проникает в нейрон и ингибирует высвобождение нейротрансмиттера. Этот процесс охватывает связывание нейротоксина с низкоаффинным или высокоаффинным рецептором, интернализацию нейротоксина, транслокацию эндопептидазной части нейротоксина в цитоплазму и ферментативную модификацию субстрата нейротоксина. Более конкретно, термин "нейротоксин" охватывает любой полипептид, продуцируемый бактериями *Clostridium* (кlostридиальные нейротоксины), который проникает в нейрон и ингибирует высвобождение нейротрансмиттера, и такие полипептиды, полученные с использованием рекомбинантных технологий и химических способов. Именно эта двухцепочечная форма является активной формой токсина. Две цепи называются тяжелой цепью (H-цепь), которая имеет молекулярную массу приблизительно 100 кДа, и легкой цепью (L-цепь), которая имеет молекулярную массу приблизительно 50 кДа. Предпочтительно, кlostридиальный нейротоксин представляет собой ботулиновый нейротоксин (BoNT).

Серотипы BoNT A-G можно различить на основе инактивации посредством специфической нейтрализующей антисывороткой, причем такая классификация по серотипу коррелирует с процентной идентичностью последовательностей на уровне аминокислот. Белки BoNT данного серотипа далее подразделяют на различные серотипы, исходя из процентной идентичности аминокислотных последовательностей.

Пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/A приведен в качестве SEQ ID NO: 1 (номер доступа UniProt A5HZZ9). Пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/B приведен в качестве SEQ ID NO: 2 (номер доступа UniProt B1INP5). Пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/C приведен в качестве SEQ ID NO: 3 (номер доступа UniProt P18640). Пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/D приведен в качестве SEQ ID NO: 4 (номер доступа UniProt P19321). Пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/E приведен в качестве SEQ ID NO: 5 (номер доступа WP_003372387).

Пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/F приведен в качестве SEQ ID NO: 6 (номер доступа UniProt Q57236) или в качестве SEQ ID NO: 11 (номер доступа UniProt/UniParc UPI0001DE3DAC). Пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/G приведен в качестве SEQ ID NO: 7 (номер доступа WP_039635782). Пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/D-C приведен в качестве SEQ ID NO: 8 (номер доступа BAM65681).

Термин "H_C-домен", как используют в рамках изобретения, относится к функционально обособленной тяжелой цепи нейротоксина с молекулярной массой приблизительно 50 кДа, которая позволяет связывание нейротоксина с рецептором, расположенным на поверхности клетки-мишени. H_C-домен состоит из двух структурно обособленных субдоменов, "субдомена H_{CN}" (N-концевая часть H_C-домена) и "субдомена H_{CC}" (C-концевая часть H_C-домена, также называемая H_{CC}-доменом), каждый из которых имеет молекулярную массу приблизительно 25 кДа. H_{CC}-домен способен связываться с белковым рецептором клостридиального нейротоксина.

Термин "LH_N-домен", как используют в рамках изобретения, относится к области нейротоксина, обособленной от H_C-домена, которая состоит из эндопептидазного домена ("L" или "легкая цепь") и домена, ответственного за транслокацию эндопептидазы в цитоплазму (H_N-домен тяжелой цепи). Эндопептидазный домен ("L" или "легкая цепь") способен расщеплять белок SNARE.

Иллюстративные домены L, H_N, H_{CN} и H_{CC} представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Иллюстративные домены L, H_N, H_{CN} и H_{CC}

BoNT	Номер доступа	SEQ ID NO:	L	H _N	H _{CN}	H _{CC}
BoNT/A1	A5HZZ9	1	1-448	449-872	873-1094	1095-1296
BoNT/B1	B1INP5	2	1-441	442-859	860-1081	1082-1291
BoNT/C1	P18640	3	1-449	450-867	868-1095	1096-1291
BoNT/D	P19321	4	1-442	443-863	864-1082	1083-1276
BoNT/E1	WP_003372387	5	1-423	424-846	847-1069	1070 -1252
BoNT/F1	Q57236	6	1-439	440-865	866-1087	1088-1278
BoNT/F7	UPI0001DE3DAC	11	1-508	509-862	863-1076	1077-1268
BoNT/G	WP_039635782	7	1-446	447-864	865-1089	1090-1297
BoNT/DC	BAM65681	8	1-442	443-863	864-1091	1092-1285

Указанные выше эталонные последовательности следует рассматривать в качестве ориентировочных, поскольку могут существовать небольшие вариации в зависимости от подсеротипа. В качестве примера в US 2007/0166332 (включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме) цитированы несколько различающиеся клостридиальные последовательности.

Термин "активационная петля" относится к полипептидному домену, содержащему

участок протеолитического расщепления. Активационные петли нейротоксинов описаны в данной области, например, в WO2016156113 (включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

В одном варианте осуществления изобретения H_{CC}-домен кластридиального нейротоксина состоит из или содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- аминокислотных остатков 1082-1291 SEQ ID NO: 2 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1083-1276 SEQ ID NO: 4 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1088-1278 SEQ ID NO: 6 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1077-1268 SEQ ID NO: 11 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1090-1297 SEQ ID NO: 7 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней, и

- аминокислотных остатков 1092-1285 SEQ ID NO: 8 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

Как используют в описании, термин "процентная идентичность последовательностей" между двумя или более аминокислотными последовательностями означает функцию количества идентичных аминокислот в идентичных положениях, которыми обладают выровненные аминокислотные последовательности. Таким образом, % идентичность, как используют в рамках изобретения, может быть вычислена как количество идентичных аминокислот в каждом положении при выравнивании, деленное на общее количество аминокислот в выровненной последовательности, умноженное на 100. Вычисление % идентичности последовательностей также может учитывать количество пропусков, и длину каждого пропуска, который необходимо вносить для оптимизации выравнивания двух или более последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности между двумя или более последовательностями можно проводить с использованием специальных математических алгоритмов, в частности, математического алгоритма глобального выравнивания (такого как алгоритм, описанный Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48(3), 443-453, 1972), который известен специалисту в данной области.

В предпочтительном варианте осуществления H_{CC}-домен состоит из или содержит

аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- аминокислотных остатков 1082-1291 SEQ ID NO: 2 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1088-1278 SEQ ID NO: 6 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней, и

- аминокислотных остатков 1077-1268 SEQ ID NO: 11 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В предпочтительном варианте осуществления H_{CC}-домен состоит из или содержит аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотным остаткам 1082-1291 SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В предпочтительном варианте осуществления H_{CC}-домен состоит из или содержит аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотным остаткам 1088-1278 SEQ ID NO: 6, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В предпочтительном варианте осуществления H_{CC}-домен состоит из или содержит аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотным остаткам 1077-1268 SEQ ID NO: 11, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В одном варианте осуществления кластридиальный нейротоксин состоит из или содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11.

В предпочтительном варианте осуществления кластридиальный нейротоксин состоит из или содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 11.

В предпочтительном варианте осуществления кластридиальный нейротоксин состоит из или содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2.

В предпочтительном варианте осуществления кластридиальный нейротоксин

состоит из или содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6.

В предпочтительном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин состоит из или содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 11.

В более предпочтительном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин представляет собой нейротоксин VoNT/B. Предпочтительно, клостридиальный нейротоксин VoNT/B состоит из или содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2.

В более предпочтительном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин представляет собой нейротоксин VoNT/F. Предпочтительно, клостридиальный нейротоксин VoNT/F состоит из или содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6 или с SEQ ID NO: 11.

В одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин представляет собой химерный нейротоксин.

Термин "химерный нейротоксин", как используют в рамках изобретения, означает нейротоксин, содержащий один или более доменов, происходящих из первого нейротоксина, и один или более доменов, происходящих из второго нейротоксина. Например, химерный нейротоксин может содержать домен LH_N, происходящий из первого серотипа или подтипа нейротоксина, и домен H_C, происходящий из второго серотипа или подтипа нейротоксина. Другим примером химерного нейротоксина является нейротоксин, содержащий домен LH_N H_{CN}, происходящий из первого серотипа или подтипа нейротоксина, и домен H_{CC}, происходящий из второго серотипа или подтипа нейротоксина. Следующим примером химерного нейротоксина является нейротоксин, содержащий домен LH_N из первого серотипа или подтипа нейротоксина и активационную петлю из второго серотипа или подтипа нейротоксина. Примеры химерных нейротоксинов приведены в WO2017191315 и WO2016156113, обе из которых включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин представляет собой химерный нейротоксин, который содержит H_C-домен из VoNT/B и LH_N-домен из VoNT/A, VoNT/C, VoNT/D, VoNT/E, VoNT/F, VoNT/G или VoNT/D-C.

В одном варианте осуществления химерного токсина согласно изобретению H_C-домен состоит из или содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- аминокислотных остатков 860-1291 SEQ ID NO: 2 или последовательности,

- аминокислотных остатков 1-864 SEQ ID NO: 7 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней, и

- аминокислотных остатков 1-863 SEQ ID NO: 8, или полипептидной последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В предпочтительном варианте осуществления H_C-домен состоит из или содержит аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотным остаткам 860-1291 SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней, и L_{H_N}-домен состоит из или содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- аминокислотных остатков 1-872 SEQ ID NO: 1 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1-867 SEQ ID NO: 3 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1-863 SEQ ID NO: 4 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1-846 SEQ ID NO: 5 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1-865 SEQ ID NO: 6 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1-862 SEQ ID NO: 11 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1-864 SEQ ID NO: 7 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней, и

- аминокислотных остатков 1-863 SEQ ID NO: 8 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В более предпочтительном варианте осуществления кластридиальный нейротоксин представляет собой химерный нейротоксин, который содержит H_C-домен из VoNT/B и L_{H_N}-домен из VoNT/A.

В более предпочтительном варианте осуществления H_C-домен состоит из или

содержит аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотным остаткам 860-1291 SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней, и LH_N -домен содержит аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотным остаткам 1-872 SEQ ID NO: 1, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В одном варианте осуществления кластридальный нейротоксин представляет собой химерный нейротоксин, который содержит H_{CC} -домен из $BoNT/V$ и $LH_N H_{CN}$ -домен из $BoNT/A$, $BoNT/C$, $BoNT/D$, $BoNT/E$, $BoNT/F$, $BoNT/G$ или $BoNT/D-C$.

В одном варианте осуществления химерного нейротоксина согласно изобретению H_{CC} -домен состоит из или содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- аминокислотных остатков 1082-1291 SEQ ID NO: 2 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1083-1276 SEQ ID NO: 4 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1088-1278 SEQ ID NO: 6 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1077-1268 SEQ ID NO: 11 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1090-1297 SEQ ID NO: 7 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней, и

- аминокислотных остатков 1092-1285 SEQ ID NO: 8 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

и $LH_N H_{CN}$ -домен состоит из или содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- аминокислотных остатков 1-1094 SEQ ID NO: 1 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1-1081 SEQ ID NO: 2 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1-1095 SEQ ID NO: 3 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1-1082 SEQ ID NO: 4 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1-1069 SEQ ID NO: 5 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1-1087 SEQ ID NO: 6 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1-1076 SEQ ID NO: 11 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1-1089 SEQ ID NO: 7 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней, и

- аминокислотных остатков 1-1091 SEQ ID NO: 8 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В предпочтительном варианте осуществления H_{CC}-домен состоит из или содержит аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотным остаткам 1082-1291 SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней, и L_HN_HC_N-домен состоит или содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- аминокислотных остатков 1-1094 SEQ ID NO: 1 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1-1095 SEQ ID NO: 3 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1-1082 SEQ ID NO: 4 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1-1069 SEQ ID NO: 5 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1-1087 SEQ ID NO: 6 или последовательности,

обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1-1076 SEQ ID NO: 11 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней,

- аминокислотных остатков 1-1089 SEQ ID NO: 7 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней, и

- аминокислотных остатков 1-1091 SEQ ID NO: 8 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В одном варианте осуществления кластридиальный нейротоксин представляет собой химерный нейротоксин, который содержит L_N-домен из первого подтипа VoNT/F и активационную петлю из второго подтипа VoNT/F, где указанный второй подтип VoNT/F отличается от указанного первого подтипа VoNT/F. Такие подтипы VoNT/F и химерные нейротоксины VoNT/F описаны в данной области, например, в WO2016156113 (включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

В предпочтительном варианте осуществления указанный L_N-домен представляет собой L_N-домен подтипа VoNT/F7 и/или указанная активационная петля представляет собой активационную петлю подтипа VoNT/F1.

В предпочтительном варианте осуществления указанная активационная петля содержит (или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

В предпочтительном варианте осуществления химерный нейротоксин содержит (или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

Кластридиальный нейротоксин может представлять собой модифицированный нейротоксин или его производное, включая, но не ограничиваясь ими, нейротоксины, описанные ниже. Модифицированный нейротоксин или производное может содержать одну или более аминокислот, которые модифицированы по сравнению с нативной формой нейротоксина. Примеры такой модификации, также известной как мутация, включают, но не ограничиваются ими, замену, вставку или делецию аминокислотных остатков. В контексте настоящего изобретения модифицированный кластридиальный нейротоксин может, например, иметь модифицированную аминокислотную последовательность(и) в одном или более доменах относительно аминокислотной последовательности нативного кластридиального нейротоксина. Термины "нативный", "немодифицированный", "природный", "встречающийся в природе" или "дикий тип" могут использоваться в настоящем описании взаимозаменяемо.

Такие модификации могут влиять на функциональные аспекты нейротоксина,

например, на биологическую активность или персистенцию. Однако в контексте настоящего изобретения модифицированный нейротоксин называют функциональным. Иными словами, модифицированный нейротоксин по изобретению сохраняет функцию(и) нейротоксина, выбранную из способности связываться с низкоаффинным или высокоаффинным рецептором нейротоксина на клетке-мишени, способности транслоцировать эндопептидазную часть нейротоксина (легкая цепь) в цитоплазму клеток и способности расщеплять белок SNARE.

Модифицированный нейротоксин согласно изобретению может иметь одну или более модификаций в аминокислотной последовательности тяжелой цепи (например, в N_C-домене), где указанная модифицированная тяжелая цепь связывается с нервными клетками, являющимися мишенями, с более высокой или более низкой аффинностью, чем нативный нейротоксин. Такие модификации N_C-домена могут включать модификации аминокислотных остатков в ганглиозидном участке связывания N_{CC}-домена, которые могут изменять связывание с ганглиозидом нервной клетки, являющейся мишенью, и/или модификации аминокислотных остатков участка связывания белкового рецептора N_{CC}-домена, которые могут изменять связывание с белковым рецептором нервной клетки, являющейся мишенью. Примеры таких модифицированных нейротоксинов описаны в WO2006027207 и WO2006114308, обе из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

В одном варианте осуществления модифицированного клостридиального нейротоксина согласно изобретению N_{CC}-домен из VoNT/B, VoNT/D, VoNT/D-C, VoNT/F или VoNT/G является модифицированным по сравнению с природным N_{CC}-доменом указанных серотипов VoNT.

В предпочтительном варианте осуществления N_{CC}-домен из нейротоксина VoNT/B, VoNT/D, VoNT/D-C, VoNT/F или VoNT/G содержит по меньшей мере одну мутацию аминокислотного остатка, которая повышает аффинность связывания указанного N_{CC}-домена в отношении Syt II человека по сравнению с природным N_{CC}-доменом VoNT/B, VoNT/D, VoNT/F, VoNT/G или VoNT/D-C. Авторы изобретения в действительности открыли, что такая мутация аминокислотного остатка может повышать эффективность нейротоксина в отношении гладких мышц человека.

В более предпочтительном варианте осуществления N_{CC}-домен из нейротоксина VoNT/B содержит по меньшей мере одну мутацию аминокислотного остатка, которая повышает аффинность связывания указанного N_{CC}-домена в отношении Syt II человека по сравнению с природным N_{CC}-доменом VoNT/B. Тем не менее, предпочтительно, чтобы указанная по меньшей мере одна мутация аминокислотного остатка повышала аффинность связывания указанного N_{CC}-домена в отношении Syt II человека по меньшей мере на 50% по сравнению с природным N_{CC}-доменом VoNT/B.

Такие подходящие мутации аминокислотных остатков в N_{CC}-домене VoNT/B описаны в данной области в WO2013180799 и WO2016154534, обе из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

В частности, указанная по меньшей мере одна мутация аминокислотного остатка, пригодная для повышения аффинности связывания H_{CC} -домена VoNT/B в отношении Syt II человека по меньшей мере на 50% по сравнению с природным H_{CC} -доменом VoNT/B, представляет собой замену, вставку или делецию аминокислотного остатка, выбранную из группы, состоящей из: 1118M, 1183M, 1191M, 1191I, 1191Q, 1191T, 1199Y, 1199F, 1199L, 1201V, 1191C, 1191V, 1191L, 1191Y, 1199W, 1199E, 1199H, 1178Y, 1178Q, 1178A, 1178S, 1183C, 1183P и любых их комбинаций. Предпочтительно, указанная по меньшей мере одна мутация аминокислотного остатка в H_{CC} -домене VoNT/B состоит из двух замен, вставок или делеций аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из: 1191M и 1199L, 1191M и 1199Y, 1191M и 1199F, 1191Q и 1199L, 1191Q и 1199Y, 1191Q и 1199F, 1191M и 1199W, 1191M и 1178Q, 1191C и 1199W, 1191C и 1199Y, 1191C и 1178Q, 1191Q и 1199W, 1191V и 1199W, 1191V и 1199Y, или 1191V и 1178Q. Еще более предпочтительно, указанная по меньшей мере одна мутация аминокислотного остатка в H_{CC} -домене VoNT/B состоит из трех замен, вставок или делеций аминокислотных остатков: 1191M, 1199W и 1178Q. Более предпочтительно, указанная по меньшей мере одна мутация аминокислотного остатка в H_{CC} -домене VoNT/B состоит из двух замен, вставок или делеций аминокислотных остатков: 1191M и 1199Y.

В более предпочтительном варианте осуществления указанная по меньшей мере одна мутация аминокислотного остатка, пригодная для повышения аффинности связывания H_{CC} -домена VoN/B в отношении Syt II человека по меньшей мере на 50% по сравнению с природным H_{CC} -доменом VoNT/B представляет собой замену аминокислотного остатка, выбранную из группы, состоящей из: V1118M, Y1183M, E1191M, E1191I, E1191Q, E1191T, S1199Y, S1199F, S1199L, S1201V, E1191C, E1191V, E1191L, E1191Y, S1199W, S1199E, S1199H, W1178Y, W1178Q, W1178A, W1178S, Y1183C, Y1183P и любых их комбинаций. Предпочтительно, указанная по меньшей мере одна мутация аминокислотного остатка в H_{CC} -домене VoNT/B состоит из двух замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из: E1191M и S1199L, E1191M и S1199Y, E1191M и S1199F, E1191Q и S1199L, E1191Q и S1199Y, E1191Q и S1199F, E1191M и S1199W, E1191M и W1178Q, E1191C и S1199W, E1191C и S1199Y, E1191C и W1178Q, E1191Q и S1199W, E1191V и S1199W, E1191V и S1199Y, или E1191V и W1178Q. Еще более предпочтительно указанная по меньшей мере одна мутация аминокислотного остатка в H_{CC} -домене VoNT/B состоит из трех замен аминокислотных остатков: E1191M, S1199W и W1178Q. Более предпочтительно, указанная по меньшей мере одна мутация аминокислотного остатка в H_{CC} -домене VoNT/B состоит из двух замен аминокислотных остатков: E1191M и S1199Y.

В предпочтительном варианте осуществления H_{CC} -домен VoNT/B, подлежащий модификации, соответствует аминокислотным остаткам 1082-1291 SEQ ID NO: 2 (природным H_{CC} -домен VoNT/B), или аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В более предпочтительном варианте осуществления модифицированный клостридиальный нейротоксин по настоящему изобретению содержит (или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В предпочтительном варианте осуществления Н_{СС}-домен из нейротоксина VoNT/B, VoNT/D, VoNT/D-C VoNT/F или VoNT/G содержит по меньшей мере одну мутацию аминокислотного остатка, которая повышает аффинность связывания указанного Н_{СС}-домена в отношении одного или более ганглиозидов по сравнению с природным Н_{СС}-доменом VoNT/B, VoNT/D, VoNT/D-C, VoNT/F или VoNT/G.

В более предпочтительном варианте осуществления указанный Н_{СС}-домен из VoNT/F содержит по меньшей мере одну мутацию аминокислотного остатка, повышающую аффинность связывания указанного Н_{СС}-домена в отношении одного или более ганглиозидов по сравнению с природным Н_{СС}-доменом VoNT/F.

В предпочтительном варианте осуществления указанные ганглиозиды выбраны из GD1a и/или GM1a.

Подходящие мутации аминокислотных остатков для повышения аффинности связывания Н_{СС}-домена VoNT/F в отношении ганглиозидов, таких как GD1a и/или GM1a, по сравнению с природным Н_{СС}-доменом VoNT/F, включают, но не ограничиваются ими, аминокислотную мутацию 1241К, такую как замена, вставка или делеция аминокислоты. Более предпочтительно, указанная по меньшей мере одна мутация аминокислотного остатка, повышающая аффинность связывания указанного Н_{СС}-домена VoNT/F по сравнению с природным Н_{СС}-доменом VoNT/F, представляет собой аминокислотную замену Н1241К.

В предпочтительном варианте осуществления Н_{СС}-домен VoNT/F, подлежащий модификации, соответствует аминокислотным остаткам 1088-1278 SEQ ID NO: 6 или аминокислотным остаткам 1077-1268 SEQ ID NO: 11 (природные Н_{СС}-домены VoNT/F), или аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В предпочтительном варианте осуществления химерный клостридиальный нейротоксин по настоящему изобретению содержит (или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин по настоящему изобретению может быть как химерным, так и модифицированным, как описано выше. Например, в предпочтительном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин содержит (или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70%,

предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

Клостридиальный нейротоксин по настоящему изобретению можно получать с использованием рекомбинантных технологий. Таким образом, в одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин по изобретению представляет собой рекомбинантный клостридиальный нейротоксин.

В одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин ассоциирован с комплексообразующими белками BoNT, также известными как нетоксичные ассоциированные с нейротоксином белки (NAP). Иными словами, клостридиальный нейротоксин вводят пациенту-человеку совместно с или в комбинации с комплексообразующими белками BoNT. Таким образом, в одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин находится в комплексе с одним или более комплексообразующими белками BoNT.

В другом варианте осуществления клостридиальный нейротоксин свободен (или не связан с или не комбинирован с) от комплексообразующих белков BoNT. Иными словами, клостридиальный нейротоксин вводят пациенту-человека не связанным или не комбинированным с комплексообразующими белками BoNT.

Предпочтительно, клостридиальный нейротоксин (например, для применения, как описано в настоящем описании) является частью фармацевтической композиции вместе с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым носителем. Под "фармацевтически приемлемым носителем" подразумевают в настоящем описании любой компонент, совместимый с другими ингредиентами фармацевтической композиции, в частности, с клостридиальным нейротоксином, и который не является вредоносным для пациента-человека. Фармацевтически приемлемый носитель может быть выбран, исходя из желаемого пути введения в соответствии со стандартной фармацевтической практикой и включает, но не ограничивается ими, эксципиенты, разбавители, адъюванты, пропелленты и соли.

Таким образом, настоящее изобретение, кроме того, относится к фармацевтической композиции для применения для лечения нарушения автономной нервной системы у пациента-человека, где указанная композиция содержит клостридиальный нейротоксин по изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, и доза клостридиального нейротоксина, подлежащая введению пациенту, является такой, как описано выше. Также предусматриваются соответствующие применения и способы лечения нарушения автономной нервной системы, включающие введение фармацевтической композиции по изобретению пациенту-человеку.

Клостридиальный нейротоксин по настоящему изобретению может быть составлен для пероральной, парентеральной (т.е. инъекция), непрерывной инфузии, ингаляции или местного введения. Фармацевтические композиции, пригодные для инъекции, могут иметь форму растворов, суспензий или эмульсий, или сухих порошков, которые растворяют или суспендируют в подходящем носителе перед применением.

В случае нейротоксина, подлежащего локальной доставке, нейротоксин может быть составлен в качестве крема (например, для местного применения) или для подкожной инъекции.

Локальные средства доставки могут включать аэрозоль или другой спрей (например, небулайзер). В этом отношении состав аэрозоля нейротоксина позволяет доставку в легкие, и/или другие носовые и/или бронхиальные или дыхательные пути.

Клостридиальные нейротоксины по изобретению также можно вводить пациенту посредством интратекальной или эпидуральной инъекции в позвоночник на уровне сегмента спинного мозга, вовлеченного в иннервацию пораженного органа.

В одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин или фармацевтическая композиция предназначены для внутримышечного, внутрикожного или подкожного введения.

В одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин или фармацевтическая композиция предназначены для местного введения, например, путем вливания.

Предпочтительным путем введения является введение посредством внутримышечной инъекции.

Тем не менее, также является возможным введение клостридиального нейротоксина в мышцу без использования какой-либо инъекции. Например, для лечения нарушений мочевых путей клостридиальный нейротоксин можно вводить в мочевой пузырь путем инфузии в мочевой пузырь пациентов жидкого или полутвердого состава клостридиального нейротоксина; депонирования состава геля, содержащего клостридиальный нейротоксин, в соответствующей области мочевого пузыря пациентов; распыления состава спрея, содержащего клостридиальный нейротоксин, в соответствующей области мочевого пузыря пациентов; или местного нанесения твердого (например, лиофилизированного), полутвердого или жидкого состава ботулинового токсина, который помещают или распределяют на наружных стенках баллона, который затем надувают в мочевом пузыре, чтобы он контактировал со стенкой мочевого пузыря, как описано в WO2005053733, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Как указано выше, доза клостридиального нейротоксина, которая является пригодной для достижения желаемого терапевтического эффекта у пациента-человека, страдающего от нарушения автономной нервной системы, или, иными словами, терапевтическая доза указанного клостридиального нейротоксина эквивалентна или ниже дозы BoNT/A при лечении того же нарушения автономной нервной системы.

Предпочтительно, указанный BoNT/A для лечения того же нарушения автономной нервной системы представляет собой очищенный BoNT/A. Как используют в рамках изобретения, термин "очищенный BoNT/A" означает ботулиновый нейротоксин типа А, очищенный из штамма клостридий, который естественным образом продуцирует его (встречающийся в природе штамм клостридий). Очищенный BoNT/A может быть

ассоциирован с комплексообразующими белками или может быть свободен от комплексообразующих белков. Примеры коммерчески доступного очищенного BoNT/A включают Botox®, Dysport® и Xeomin®.

В одном варианте осуществления доза клостридиального нейротоксина, подлежащая введению для лечения нарушения автономной нервной системы у пациента-человека (терапевтическая доза) в от приблизительно 1,1 раза до приблизительно 100 раз, предпочтительно в от приблизительно 1,3 раза до приблизительно 90 раз ниже, чем доза BoNT/A при лечении указанного нарушения автономной нервной системы.

В предпочтительном варианте осуществления, когда клостридиальный нейротоксин содержит Н_{СС}-домен из BoNT/B, терапевтическая доза указанного клостридиального нейротоксина в от приблизительно 1,1 раза до приблизительно в 20 раз, предпочтительно в от приблизительно 1,3 раза до приблизительно 19,8 раза ниже дозы BoNT/A при лечении того же нарушения автономной нервной системы. Например, когда клостридиальный нейротоксин по изобретению представляет собой природный нейротоксин BoNT/B, такой как нейротоксин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, терапевтическая доза указанного клостридиального нейротоксина в от приблизительно 1,1 раза до приблизительно в 1,5 раза, предпочтительно приблизительно в 1,3 раза ниже дозы BoNT/A при лечении того же нарушения автономной нервной системы. В качестве дальнейшего примера, когда клостридиальный нейротоксин по изобретению представляет собой модифицированный нейротоксин BoNT/B, имеющий увеличенную аффинность связывания в отношении рецептора SytII человека (по сравнению с природным BoNT/B), такой как нейротоксин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, терапевтическая доза указанного клостридиального нейротоксина является в от приблизительно 15 раз до приблизительно 20 раз, предпочтительно в приблизительно 19,8 раза более низкой, чем доза BoNT/A при лечении того же нарушения автономной нервной системы. Тем не менее, в качестве другого примера, когда клостридиальный нейротоксин по изобретению представляет собой модифицированный химерный нейротоксин BoNT/B, имеющий увеличенную аффинность связывания в отношении рецептора SytII человека, такой как нейротоксин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, терапевтическая доза указанного клостридиального нейротоксина в от приблизительно 2 раз до приблизительно 5 раз, предпочтительно приблизительно в 3,5 раза ниже, чем доза BoNT/A при лечении того же нарушения автономной нервной системы.

В предпочтительном варианте осуществления, когда клостридиальный нейротоксин содержит Н_{СС}-домен из BoNT/F, терапевтическая доза указанного клостридиального нейротоксина в от приблизительно 60 раз до приблизительно 100 раз, предпочтительно в от приблизительно 61,2 раза до приблизительно 90 раз ниже, чем доза BoNT/A при лечении того же нарушения автономной нервной системы. Например, когда клостридиальный нейротоксин по изобретению представляет собой натуральный нейротоксин BoNT/F, такой как нейротоксин, имеющий аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 11, терапевтическая доза указанного клостридиального нейротоксина в от приблизительно 60 раз до приблизительно 65 раз, предпочтительно в приблизительно 61,2 раза ниже, чем доза BoNT/A при лечении того же нарушения автономной нервной системы. В качестве следующего примера, когда клостридиальный нейротоксин по изобретению представляет собой модифицированный нейротоксин BoNT/F, имеющий увеличенную аффинность связывания в отношении одного или более ганглиозидов (по сравнению с природным BoNT/F), такой как нейротоксин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, терапевтическая доза указанного клостридиального нейротоксина в от приблизительно 60 раз до приблизительно 65 раз, предпочтительно приблизительно 61,2 раза ниже, чем доза BoNT/A при лечении того же нарушения автономной нервной системы. Тем не менее, в качестве другого примера, когда клостридиальный нейротоксин по изобретению представляет собой химерный нейротоксин BoNT/F, такой как нейротоксин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, терапевтическая доза указанного клостридиального нейротоксина в от приблизительно 85 раз до приблизительно 100 раз, предпочтительно приблизительно в 90 раз ниже, чем доза BoNT/A при лечении того же нарушения автономной нервной системы.

Как указано выше дозы BoNT/A для лечения автономных нарушений хорошо известны в данной области (<https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/112>).

Дозы клостридиального нейротоксина предпочтительно выражаются в настоящем описании в нанограммах.

Под дозами клостридиального нейротоксина согласно изобретению подразумевают дозы активного двухцепочечного клостридиального нейротоксина, т.е. не включая количество комплексообразующих белков, с которыми может быть ассоциирован нейротоксин. Иными словами, они относятся к дозам активного двухцепочечного клостридиального нейротоксина, независимо от введения указанного нейротоксина пациенту совместно с комплексообразующими белками или без них. Как хорошо известно специалисту в данной области, активный двухцепочечный клостридиальный нейротоксин способен связываться с нейрональным рецептором, транслоцировать легкую цепь в цитоплазму и расщеплять белок SNARE, в то время как комплексообразующие белки не проявляют такую биологическую активность (т.е. не являются "активными"). В случае ботулиновых нейротоксинов общий размер активной двойной цепи обычно составляет приблизительно 150 кДа.

Действительно, как хорошо известно специалисту в данной области, эффективность клостридиального нейротоксина связана с количеством (например, в нанограммах) нейротоксина, требуемым для достижения единицы LD50 (летальная доза 50); одну единицу LD50 определяют как срединную летальную внутрибрюшинную дозу (при определении у мышей). Однако фармацевтические препараты BoNT, в настоящее время выпускаемые в продажу, содержат различные количества нейротоксина массой 150 кДа, а также имеют различные единицы LD50. Помимо этого, в этих препаратах

нейротоксин может быть ассоциирован или может не быть ассоциирован (т.е. комбинирован) с нетоксичными ассоциированными с нейротоксином белками (NAP), также известными как комплексообразующие белки. Для простоты перевода:

- 100 единиц Botox® (также известного как онаботулиnumтоксин А) содержат приблизительно 0,73 нг BoNT/A массой 150 кДа, а также комплексообразующие белки;
- 100 единиц Dysport® (также известного как аботулиnumтоксин А) содержит приблизительно 0,65 нг BoNT/A массой 150 кДа, а также комплексообразующие белки;
- 100 единиц Xeomin® (также известного как инкоботулиnumтоксин А) содержат приблизительно 0,44 нг BoNT/A массой 150 кДа без комплексообразующих белков;
- 100 единиц Neurobloc/Myobloc® (также известного как римаботулиnumтоксин В) содержат от приблизительно 0,2 нг до приблизительно 1 нг BoNT/B массой 150 кДа, а также комплексообразующие белки.

Количество клостридиального нейротоксина может определять специалист в данной области способами, обычно используемыми в данной области для количественного определения белков предпочтительно на уровне нанограмм, включая, среди прочих, масс-спектроскопию, такую как масс-спектропия с изотопным разбавлением Muñoz et al., Quantification of protein calibrants by amino acid analysis using isotope dilution mass spectrometry, Anal. Biochem. 2011, 408, 124-131), или флуориметрический анализ (Poras et al., Detection and Quantification of Botulinum Neurotoxin Type A by a Novel Rapid In Vitro Fluorimetric Assay, Appl Environ Microbiol. 2009 Jul; 75(13): 4382-4390).

Когда в настоящем описании предоставлен диапазон величин, следует понимать, что, если контекст явно не указывает на иное, также конкретно предусматривается каждая входящая в него величина до одной десятой единицы между верхним и нижним пределами диапазона. Изобретение охватывает каждый меньший диапазон между любой указанной величиной или промежуточной величиной указанного диапазона и любой другой указанной или промежуточной величиной этого указанного диапазона. Кроме того, следует понимать, что любой диапазон числовых величин, указанный в настоящем описании посредством выражения "от а до b", означает диапазон числовых величин от а до b (т.е. включая конкретные конечные точки а и b).

Помимо этого, термин "приблизительно" следует понимать в настоящем описании как плюс или минус (\pm) 5%, предпочтительно \pm 4%, \pm 3%, \pm 2%, \pm 1%, \pm 0,5%, \pm 0,1%, числовой величины, с которой его используют.

В предпочтительном варианте осуществления доза клостридиального нейротоксина по изобретению, подлежащая введению для лечения нарушения автономной нервной системы у пациента-человека (т.е. терапевтическая доза) находится в диапазоне от приблизительно 0,00025 нг до приблизительно 3 нг.

В предпочтительном варианте осуществления терапевтическая доза клостридиального нейротоксина находится в диапазоне от приблизительно 0,0003 нг до приблизительно 2 нг, предпочтительно от приблизительно 0,0004 нг до приблизительно

1,5 нг, от приблизительно 0,0005 нг до приблизительно 1 нг, еще более предпочтительно от приблизительно 0,0006 нг до приблизительно 0,5 нг указанного кластридиального нейротоксина.

В предпочтительном варианте осуществления кластридиальный нейротоксин содержит Н_{СС}-домен ВоNT/В или Н_{СС}-домен ВоNT/Ф, и также подлежит введению пациенту-человеку в любой дозе указанного кластридиального нейротоксина, описанной в настоящем описании, для применения для лечения нарушения автономной нервной системы, как описано выше.

В более предпочтительном варианте осуществления кластридиальный нейротоксин содержит Н_{СС}-домен ВоNT/В или Н_{СС}-домен ВоNT/Ф, и подлежит введению пациенту-человеку в любой дозе указанного кластридиального нейротоксина, описанной в настоящем описании, для применения для лечения нарушений гладких мышц, как описано выше. Более предпочтительно, указанное нарушение гладких мышц выбрано из группы, состоящей из нарушений мочевых путей, желудочно-кишечных нарушений, сосудистых и сердечно-сосудистых нарушений, нарушений предстательной железы и половых расстройств.

Например, терапевтическая доза кластридиального нейротоксина, содержащего Н_{СС}-домен ВоNT/В, предпочтительно находится в диапазоне от приблизительно 0,001 нг до приблизительно 2 нг.

Тем не менее, например, терапевтическая доза кластридиального нейротоксина, содержащего Н_{СС}-домен ВоNT/В, предпочтительно находится в диапазоне от приблизительно 0,0003 нг до приблизительно 0,05 нг.

Тем не менее, должно быть понятно, что требуемый диапазон доз зависит от точной природы кластридиального нейротоксина, нарушения автономной нервной системы, пути введения, природы состава, возраста пациента, природы, степени или тяжести состояния пациента, противопоказаний, при их наличии, и мнения лечащего врача. Изменения этих уровней дозировок можно проводить с использованием стандартных эмпирических способов оптимизации.

В качестве эталона, примеры подходящих доз природного ВоNT/А (такого как нейротоксин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1), для лечения некоторых конкретных нарушений автономной нервной системы, приведены ниже:

- NDO (нейрогенная гиперактивность детрузора): 1,46 нг природного ВоNT/А в мышцу-детрузор;
- OAB (гиперактивный мочевой пузырь): 0,73 нг природного ВоNT/А в мышцу-детрузор;
- гипергидроз подмышек: 0,365 нг природного ВоNT/А в каждую подмышечную область;
- сиалорея у взрослых пациентов, в частности у пациентов с болезнью Паркинсона: 0,146 нг природного ВоNT/А на поднижнечелюстную и/или околоушную железу;
- сиалорея у педиатрических пациентов с церебральным параличом: 0,073 нг

природного VoNT/A на поднижнечелюстную и/или околоушную железу.

Примеры подходящих диапазонов доз природного VoNT/B (такого как нейротоксин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2), для лечения вышеупомянутых нарушений согласно изобретению, представляют собой:

- NDO (нейрогенная гиперактивность детрузора): от 0,5 нг до 2 нг природного VoNT/B в мышцу-детрузор;
- OAB (гиперактивный мочевого пузыря): от 0,25 нг до 1 нг природного VoNT/B в мышцу-детрузор;
- гипергидроз подмышек: от 0,125 нг до 0,5 нг природного VoNT/B в каждую подмышечную область;
- сиалорея у взрослых пациентов, в частности у пациентов с болезнью Паркинсона: от 0,05 нг до 0,2 нг природного VoNT/B на поднижнечелюстную и/или околоушную железу;
- сиалорея у педиатрических пациентов с церебральным параличом: от 0,025 нг до 0,1 нг природного VoNT/B на поднижнечелюстную и/или околоушную железу.

Примеры подходящих диапазонов доз модифицированного VoNT/B, имеющего увеличенную аффинность связывания с рецептором SytII человека (такого как нейротоксин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9), для лечения вышеупомянутых нарушений согласно изобретению, представляют собой:

- NDO (нейрогенная гиперактивность детрузора): от 0,025 нг до 0,2 нг модифицированного VoNT/B в мышцу-детрузор;
- OAB (гиперактивный мочевого пузыря): от 0,0125 нг до 0,1 нг модифицированного VoNT/B в мышцу-детрузор;
- гипергидроз подмышек: от 0,0075 нг до 0,05 нг модифицированного VoNT/B в каждую подмышечную область;
- сиалорея у взрослых пациентов, в частности у пациентов с болезнью Паркинсона: от 0,0025 нг до 0,02 нг модифицированного VoNT/B на поднижнечелюстную и/или околоушную железу;
- сиалорея у педиатрических пациентов с церебральным параличом: от 0,001 нг до 0,01 нг модифицированного VoNT/B на поднижнечелюстную и/или околоушную железу.

Примеры подходящих диапазонов доз химерного модифицированного VoNT/B, имеющего увеличенную аффинность связывания в отношении рецептора SytII человека (такого как нейротоксин, имеющий аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 10), для лечения вышеупомянутых нарушений согласно изобретению представляют собой:

- NDO (нейрогенная гиперактивность детрузора): от 0,2 нг до 1 нг химерного модифицированного VoNT/B в мышцу-детрузор;
- OAB (гиперактивный мочевого пузыря): от 0,1 нг до 0,5 нг химерного модифицированного VoNT/B в мышцу-детрузор;
- гипергидроз подмышек: от 0,05 нг до 0,2 нг химерного модифицированного VoNT/B в каждую подмышечную область;

- сиалоррея у взрослых пациентов, в частности, у пациентов с болезнью Паркинсона: от 0,02 нг до 0,1 нг химерного модифицированного VoNT/V на поднижнечелюстную и/или околоушную железу;

- сиалоррея у педиатрических пациентов с церебральным параличом: от 0,01 нг до 0,05 нг химерного модифицированного VoNT/V на поднижнечелюстную и/или околоушную железу.

Примеры подходящих диапазонов доз природного VoNT/F (такого как нейротоксин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 11), для лечения вышеупомянутых нарушений согласно изобретению представляют собой:

- NDO (нейрогенная гиперактивность детрузора): от 0,01 нг до 0,05 нг природного VoNT/F в мышцу-детрузор;

- OAB (гиперактивный мочевой пузырь): от 0,005 нг до 0,025 нг природного VoNT/F в мышцу-детрузор;

- гипергидроз подмышек: от 0,0025 нг до 0,01 нг природного VoNT/F в каждую подмышечную область;

- сиалоррея у взрослых пациентов, в частности, у пациентов с болезнью Паркинсона: от 0,001 нг до 0,005 нг природного VoNT/F на поднижнечелюстную и/или околоушную железу;

- сиалоррея у педиатрических пациентов с церебральным параличом: от 0,0005 нг до 0,0025 нг природного VoNT/F на поднижнечелюстную и/или околоушную железу.

Примеры подходящих диапазонов доз модифицированного VoNT/F, имеющего увеличенную аффинность связывания в отношении одного или более ганглиозидов (такого как нейротоксин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12) для лечения вышеупомянутых нарушений согласно изобретению представляют собой:

- NDO (нейрогенная гиперактивность детрузора): от 0,01 до 0,05 нг модифицированного VoNT/F в мышцу-детрузор;

- OAB (гиперактивный мочевой пузырь): от 0,005 нг до 0,025 нг модифицированного VoNT/F в мышцу-детрузор;

- гипергидроз подмышек: от 0,0025 нг до 0,01 нг модифицированного VoNT/F в каждую подмышечную область;

- сиалоррея у взрослых пациентов, в частности, у пациентов с болезнью Паркинсона: от 0,001 нг до 0,005 нг модифицированного VoNT/F на поднижнечелюстную и/или околоушную железу;

- сиалоррея у педиатрических пациентов с церебральным параличом: от 0,0005 нг до 0,0025 нг модифицированного VoNT/F на поднижнечелюстную и/или околоушную железу.

Примеры подходящих диапазонов доз химерного VoNT/F (такого как нейротоксин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13) для лечения вышеупомянутых нарушений согласно изобретению представляют собой:

- NDO (нейрогенная гиперактивность детрузора): от 0,007 нг до 0,03 нг химерного BoNT/F в мышцу-детрузор;

- OAB (гиперактивный мочевого пузыря): от 0,003 нг до 0,0015 нг химерного BoNT/F в мышцу-детрузор;

- гипергидроз подмышек: от 0,001 нг до 0,007 нг химерного BoNT/F в каждую подмышечную область;

- сиалорея у взрослых пациентов, в частности, у пациентов с болезнью Паркинсона: от 0,0007 нг до 0,003 нг химерного BoNT/F на поднижнечелюстную и/или околоушную железу;

- сиалорея у педиатрических пациентов с церебральным параличом: от 0,0003 нг до 0,0015 нг химерного BoNT/F на поднижнечелюстную и/или околоушную железу.

Настоящее изобретение не ограничивается иллюстративными способами и материалами, описанными в настоящем описании, и при применении на практике и тестировании вариантов осуществления изобретения можно использовать любые способы и материалы, сходные или эквивалентные способам и материалам, описанным в настоящем описании. Если нет иных указаний, любая аминокислотная последовательность указана слева направо в ориентации от amino к карбокси, соответственно.

Кроме того, следует отметить, что, как используют в рамках изобретения и в прилагаемой формуле изобретения, форма единственного числа включает форму множественного числа, если контекст явно не указывает на иное. Таким образом, например, указание на "кlostридиальный нейротоксин" включает множество таких средств-кандидатов и указание на "кlostридиальный нейротоксин" включает указание на один или более кlostридиальных нейротоксинов и их эквивалентов, известных специалистам в данной области, и т.д.

Изобретение далее описано только в качестве примера с помощью следующих чертежей и примеров.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг.1 - Сократительная реакция полос мочевого пузыря при EFS-индуцируемых сокращениях после 3 стимуляций, примененных с интервалом 1 мин, за которыми следовали 3 мин покоя.

Фиг.2A - Время 50% (T50) ингибирования максимального сокращения EFS в значениях амплитуды при 1, 3, 5 или 10 нМ nBoNT/A, nBoNT/B, rBoNT/B_{MY} и rBoNT/AB_{MY}.

Фиг.2B - Время 50% (T50) ингибирования максимального сокращения EFS в значениях амплитуды при 0,1, 1 или 10 нМ nBoNT/F, mrBoNT/F и mrBoNT/F7-1.

Фиг.3 - Кривые концентрация-эффект для nBoNT/A, nBoNT/B, rBoNT/B_{MY}, rBoNT/AB_{MY}, nBoNT/F и mrBoNT/F7-1. Время 50% (T50) ингибирования наносили на график против концентрации белка ботулинового токсина, и проводили аппроксимацию логарифмических функций с получением отличительных величин R².

АМИНОКИСЛОТНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO: 1 - BoNT/A1, 6 номер доступа A5HZZ9, аминокислотная последовательность

MPFVNKQFNKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWWIPERDTFTNPE
EGDLNPPPEAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNLYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGI
PFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFSGHEVLNLTR
NGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGIAN
PNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASLTL
NKAKSIVGTTASLQYMKNVFKKEYLLSEDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFV
KFFKVLNRKTYLNFDAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTTEINNMNFT
KLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTND
LNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFP
NGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNK
ATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDDFVGALI
FSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTQVTDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWL
AKVNTQIDLIRKKMKEALENQAATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESIN
KAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRL
KDKVNNLSTLSTIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINI
GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWRIPKYFNSISLNNEY
TIINCMENNSGWKVSLNYGEIHWLQDTQEIKQRVVFYKYSQMINISDYINRWIFVTITNNR
LNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEI
KDLYDNQSNNGILKDFWGDYLDQYDKPYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPR
GSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQ
AGVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNI
AKLVASNWYNRQIERSRRTLGCSEWEIFVDDGWGERPL

SEQ ID NO: 2 - BoNT/B1, номер доступа B1INP5, аминокислотная последовательность

MPVTINNFNYNDPIDNINIIMMEPPFARGTGRYYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKP
EDFNKSSGIFNRDVCEYYDPDYLNNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLEMIINGIP
YLGDRRVPLEEFNTNIASVTVNKLISNPGEVERKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQN
HFASREGFGGIMQMKFCPEYVSFVNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALILMHელიHVLHG
LYGIKVDDLPIVPNEKKFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNFRGIV
DRLNKVLVCISDPNININIKKFKDKYKFVEDSEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGFTETNI
AENYKIKTRASYSFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIIEEGFNISDKDMEKEYRGQNKAINKQAY
EEISKEHLAVYKIQMCKSVKAPGICIDVDNEDLFFIADKNSFSDDLKNERIEYNTQSNIYI
ENDFPINELILDTLISKIELPSENTESLTDNFVDVPVYEKQPAIKKIFTDENTIFQYLYSQT
FPLDIRDISLTSFDDALLFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAAGWVKQIVNDFVIEA
NKSNTMDKIADISLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFEIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLL
LESYIDNKNKIIKTIDNALTKRNEKWSDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNYQ
AQALEEIIKYRYNIYSEKEKSNINIDFNDINSKLNENINQAINNINNFINGCSVSYLMKKMI

PLAVEKLLDFDNTLKKNLLNYIDENKLYLIGSAEYEKSKVKNKYLKTIMPFDLSIYTNDTI
 LIEMFNKYNSEILNINILNRLRYKDNNLIDLSGYGAKVEVYDGVELNDKNQFKLTSSANSK
 IRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNNSGWKISIRGNR
 IIWTLIDINGKTKSVFFEYNIREDISSEYINRWFFVTITNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIRE
 VIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMY
 NKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYINYRDLYIGEKFIIIRKSNNSQ
 SINDDIVRKEDIYIYLDFFNLNQEWVYTYKYFKKEEEKLFLAPISDSDEFYNTIQIKEYDE
 QPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKL
 GCNWQFIPKDEGWTE

SEQ ID NO: 3 - BoNT/C1, номер доступа P18640, аминокислотная
 последовательность

MPITINNFNYSDPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNP
 NLNKPPRVTSPKSGYYDPNYLSTDSKDPFLKEIKLFRKINSREIGEELIYRLSTDIPFPGN
 NNTPIINTFDVDFNSVDVKTRQGNNWVKTGSINPSVIITGPRENIIIDPETSTFKLTNNTF
 AAQEGFGALSIIISIPRMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILILMHELNHAMHNLGYI
 AIPNDQTISSVTSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKALDYRYSIAKR
 LNSITTANPSSFNKYIGEYKQKLIRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVELYNELTQIFTEFNYA
 KIYNVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDNVYDIQNGFNIPKSNLNVLFMGQNLSRNPALRK
 VNPENMLYLFTKFCHKAIDGRSLYNKTLDCRELLVKNTDLPFIGDISDVKTDFLTKDIN
 EETEVIYYPDNVSDQVILSKNTSEHGQLDLLYPSIDSESEILPGENQVFYDNRTQNVDY
 LNSYYYLESQKLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFPTLANKVNAGVQGGLFLMW
 ANDVVEDFTTNILRKDTLTKISDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFTEAFAVTGVTILLEAF
 PEFTIPALGAFVIYSKVQERNEIITIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGTWLSRIITQFNNIS
 YQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNNINKFI
 RECSVTYLFKNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNIIIVGEVDKLLKAVNNSFQNT
 IPFNIFSYTNNLLKDIINEYFNNINDSKILSLQNRKNTLVDTSGYNAEVSEEGDVQLNPIF
 PFDFKLGSSGEDRGKVVITQENENIVNSMYESFSISFWIRINKWVSNLPGYTIIDSVKNS
 GWSIGIISNFLVFTLKQNEDESEQSINFSYDISNAPGYNKWFFVTVTNNMMGNMKIYING
 KLIDTIKVKELTGINFSKTITFEINKIPDTGLITSDSDNINMWIRDFYIFAKELDGKDINILFN
 SLQYTNVVKDYWGNDLRYNKEYYMVNIDYLNRYMYANSRQIVFNTRRNNDFNEGY
 KIIKRIKRGNTNDTRVRGGDILYFDMTINNKAYNLFMKNETMYADNHSTEDIYAIGLREQ
 TKDINDNIIFQIQPMNNTYYYASQIFKSNFNGENISGICSIGTYRFRLGGDWYRHNYLVPT
 VKQGNYSALLESTSTHWGFVPVSE

SEQ ID NO: 4 - BoNT/D, номер доступа P19321, аминокислотная
 последовательность

MTWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRIPQNKLITTPVKAAMITQNIWVIPERFSSDTNP
 SLSKPPRPTSKYQSYDPSYLSSTDEQKDTFLKGIKLFKRINERDIGKLLINYL VVGSPFM
 GDSSTPEDTFDFTRHTTNI AVEKFENGSWKVTNIITPSVLIFGPLNILDYASLT LQGQQS
 NPSFEGFGTLSILKVAPEFLTFSVDVTSNQSSAVLGKSIFCMDPVIALMHELTHSLHQLYG
 INIPSDKRIRPQVSEGGFSQDGPVNVQFEELYTFGGLDVEIIPQIERSQLREKALGHYKDIK

RLNNINKTIPSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKDNFTGNFVVNIDKFNSLYSDLTNVMSEVV
 YSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIRDFNLTKGFNIENSGQNIERNPALQ
 KLSSESVDLFTKVCLRLTKNSRDDSTCIKVKNRRLPYVADKDSISQEIFENKIITDETNV
 QNYSDFSLDESILDGQVPINPEIVDPLLPNVNMEPLNLPGEEIVFYDDITKYVDYLNSSY
 YLESQKLSNNVENITLTSVEEALGYSNKIYTFLPSLAEKVNKGVQAGLFLNWANEVVE
 DFTTNIMKKDTLTKISDVSVIIPYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTIP
 ALGVFTFYSSIQEREKIITKTIENCLEQRVWRKDSYQWMVSNWLSRITTQFNHINYQMY
 DSLSYQADAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNNINKFIRECSV
 TYLFKNMLPKVIDELNKFIDLRTKTELINLIDSHNIIIVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNIF
 SYTNNLLKDIINEYFNSINDSKILSLQNKKNALVDTSGYNAEVRVGDNVQLNTIYTNDP
 KLSSSGDKIIVNLNNNILYSAIYENSSVFWIKISKDLTNSHNEYTIINSIEQNSGWKLCIRN
 GNIEWILQDVNRKYKSLIFDYSELSHTGYTNKWWFVTITNNIMGYMKLYINGELKQSQ
 KIEDLDEVKLDKTIVFGIDENIDENQMLWIRDFNIFSKELSNEDINIVYEGQILRNVIKDY
 WGNPLKFDTEYYIINDNYIDRYIAPESNVLVLVQYPDRSKLYTGNPITIKSVSDKNPYSRI
 LNGDNILHMLYNSRKYMIIRDTDTIYATQGGECSSQNCVYALKLQSNLGNYGIGIFSIKNI
 VSKNKYCSQIFSSFRENTMLLADIYKPWRFSFKNAYTPVAVTNYETKLLSTSSFWKFISR
 DPGWVE

SEQ ID NO: 5 - BoNT/E1, номер доступа WP 003372387, аминокислотная
 последовательность

MPKINSFNYNPVDNDRITLYIKPGGCQEFYKSFNIMKNIWIIPERNVIGTTPQDFHP
 PTLKNGDSSYYDPNYLQSDEEKDRFLKIVTKIFNRINNLSGGILLEELSKANPYLGND
 NTPDNQFHIGDASAVEIKFSNGSQDILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISLRNNYMPSNHGF
 GSIAIVTFSPEYSFRFNDNSMNEFIQDPALTMHELIHSLHGLYGAKGITTKYTITQKQNP
 LITNIRGTNIEEFLTFGGTDLNIITSAQSNDIYTNULLADYKKIASKLSKVQVSNPLLNPYKD
 VFEAKYGLDKDASGIYSVNINKFNDIFKKLYSFTEFDLATKFQVKCRQTYIGQYKYFKLS
 NLLNDSIYNISEGYNINNLKVNFRGQANLNPRIITPITGRGLVKKIIRFCKNIVSVKGIRK
 SICIEINNGELFFVASSENSYNDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLDQVILNFNSESAPGLSD
 EKLNLTIQNDAYIPKYDSNGTSDIEQHVDNELNVFFYLDAQKVPEGENNVNLTSSIDTAL
 LEQPKIYTFSSSEFINNVNKPVQAALFVSWIQQVLVDFTEANQKSTVDKIADISIVVPI
 GLALNIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFEPPELLIPTILVFTIKSFLGSSDNKNKVIKAIN
 NALKERDEKWKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNAIKTIIESKYSY
 TLEEKNELTNKYDIKQIENELNQKVSAMNNIDRFLTESSISYLMKLINEVKINKLREYDE
 NVKTYLLNYIIHQHSILGESQQELNSMVTDTLNN SIPFKLSSYTDDKILISYFNKFFKRIKS
 SSVLNMRYKNDKYVDTSGYDSNININGDVYKYPTNKNQFGIYNDKLSEVNISQNDYIY
 DNKYKNFSISFWVRIPNYDNKIVNVNNEYTIINC MRDNNSGWKVS LNHNIEIWTLQDNA
 GINQKLA FN YGNANGISDYINKWIFVTITNDR LGDSKLYINGNLIDQKSILNLGNIHVSDN
 ILFKIVNCSYTRYIGIRYFNIFDKELDETEIQTLYSNEPNTNILKDFWGNLYLLYDKEYYLL
 NVLKPNNFIDRRKDS TL S INNIRSTILLANRLYSGIKVKIQRVNNSS TNDNLVRKNDQVYI
 NFVASKTHLFLYADTATTNKEKTIKISSSGNRFNQVVVMNSVGNNTMNFKNNGNN
 IGLLGFKADTVVASTWYYTHMRDHTNSNGCFWNFISEEHGWQEK

SEQ ID NO: 6 - BoNT/F1, номер доступа Q57236, аминокислотная последовательность

MPVVINSFNYPVNDPVDITILYMQIPYEEKSKKYYKAFEIMRNVWIIPERTIGTDP
 SDFDPPASLENGSSAYYDPNYLTTDAEKDRYLKTTIKLFRINSNPAGEVLLQEISYAKP
 YLGNEHTPINEFHPVTRTTSVNIKSSSTNVKSSIILNLLVLGAGPDIFENSYPVRKLMDSG
 GYYDPSNDGFGSINIVTFSPEYEYTFNDISGGYNSSTESFIADPAISLAHELIALHGLYGA
 RGVTYKETIKVKQAPLMIAEKPIRLEEFITFGGQDLNIITSAMKEKIYNLLANYEKIATR
 LSRVNSAPPEYDINEYKDYFQWKYGLDKNADGSYTVNENKFNEIYKKLYSFTEIDLANK
 FKVKCRNTYFIKYGFLKVPNLLDDDIYTVSEGFNIGNLAVNNRGQNIKLNPKIIDSIPDKG
 LVEKIVKFKSVIPRKGTKAPRLCIRVNNRELFVASESSYNENDINTPKEIDDTNLNN
 NYRNNLDEVILDYNSETIPQISNQLNTLVQDDSYVPRYDSNGTSEIEEHNVDLNVFFY
 LHAQKVPEGETNISLTSSIDTALSEESQVYTFSSSEFINTINKPVHAALFISWINQVIRDFTT
 EATQKSTFDKIADISLVVPYVGLALNIGNEVQKENFKEAFELLGAGILLEFVPELLIPTILV
 FTIKSFIGSSENKNKIIKAINNSLMERETKWKIYSWIVSNWLTRINTQFNKRKEQMYQAL
 QNQVDAIKTVIEYKYNNYTSDERNRLESEYNINNIREELNKKVSLAMENIERFITESSIFY
 LMKLINEAKVSKLREYDEGVKEYLLDYISEHRSILGNSVQELNDLVTSTLNNSIPFELSSY
 TNDKILILYFNKLYKKIKDNSILDMRYENNKFIDISGYGSNISINGDVYIYSTNRNQFGIYS
 SKPSEVNIAQNNDIYNGRYQNFSISFWVRIPKYFNKVNLNNEYTIIDCIRNNNSGWKISL
 NYNKIHWTLQDTAGNNQKLVFNQYTMISISDYINKWIFVTITNNRLGNSRIYINGNLIDEK
 SISNLGDIHVSDNILFKIVGCNDTRYVGIRYFKVFDTELGKTEIETLYSDEPDPSILKDFWG
 NYLLYNKRYLLNLLRTDKSITQNSNFLNINQQRGVYQKPNIFSNTRLYTGVVEIIRKNG
 STDISNTDNFVRKNDLAYINVVDRDVEYRLYADISIAKPEKIIKLIRTSNSNSLQIIVMD
 SIGNNCTMNFQNNNGGNIGLLGFHSSNLVASSWYNNIRKNTSSNGCFWSFISKEHGW
 QEN

SEQ ID NO: 7 - BoNT/G, номер доступа WP 039635782, аминокислотная последовательность

MPVNIKNFNYPINDDIIMMEPFNDPGPGTYKAFRIIDRIWIVPERFTYGFQP
 DQFNASTGVFSKDVYEYDPTYLKTDAEKDKFLKTMIKLFNRINSKPSGQRLLDMIVDA
 IPYLGNASTPPDKFAANVANVSINKKIIQPGAEDQIKGLMTNLIIFGPGPVLSDNFTDSMI
 MNGHSPISEGFGARMIRFCPSCLNVFNQENKDTISFRRAYFADPALTMHELIVL
 HGLYGIKISNLPITPNTKEFFMQHSDPVQAEELYTFGGHDPSVISPSTDMNIYNKALQNFQ
 DIANRLNIVSSAQSGIDISLYKQIYKNKYDFVEDPNGKYSVDKDKFDKLYKALMFGFT
 ETNLAGEYGIKTRYSYFSEYLPPIKTEKLLDNTIYQNEGFNIASKNLKTEFNGQNKA
 VNKAYEYISLEHLVIYRIAMCKPVMYKNTGKSEQCIIVNNEDLFFIANKDSFSKDLAKAETI
 AYNTQNNTIENNFSIDQLILDNDLSSGIDLPNENTEPTNFDDIDIPVYIKQSALKKIFVDG
 DSLFEYLHAQTFPSNIENLQLTNSLNDALRNNNKVYTFSTNLVEKANTVVGASLNVNW
 VKGVIDDFTSESTQKSTIDKVSIVSIIPIYIGPALNVGNETAKENFKNAFEIGGAAILMEFIP
 ELIVPIVGGFTLESYVGNKGHIIMTISNALKKRQKWTDMYGLIVSQWLSTVNTQFYTIK
 ERMYNALNNQSQAIEKIIDQYNYRYSEEDKMNINIDFNDIDFKLNQSNLAINNIDDFINQ
 CSISYLMNRMIPLAVKCLKDFDDNLKRDLLLEYIDTNELYLLDEVNILKSKVNRHLKDSIP

FDLSLYTKDTILIQVFNNYISNISSNAILSLSYRGGRLIDSSGYGATMNVGSDVIFNDIGNG
 QFKLNSENSENITAHQSKFVVYDSMFDNFSINFWVRTPKYNNNDIQTYLQNEYTIISCIK
 NDSGWKVSIIKGNRIIWTLDVNAKSKSIFFEYSIKDNISDYINKWFSITITNDR LGNANIYI
 NGLSKKSEKILNLDRLINSSNDIDFKLINCTDTTKFVWIKDFNIFGRELNATEVSSLYWIQSS
 TNTLKDFWGNPLRYDTQYYLNFQGMQNIYIKYFSKASMGETAPRTNFNNAAINYQONLY
 LGLRFIIKKASNSRNINNDNIVREGDYIYLNIDNISDES YRVYVLVNSKEIQTQLFLAPIND
 DPTFYDVLQIKKYYEKTTCYNCQILCEKDTKTFGLFGIGKFKDYGYVWDTYDNYFCISQ
 WYLRRISENINKLRLGCMWQFIPVDEGWTE

SEQ ID NO: 8 - BoNT/DC, номер доступа BАM65681, аминокислотная
 последовательность

MTWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRIQNKLITTPVKA FMITQNIWVIPERFSSDTNP
 SLSKPPRPTSKYQSYDPSYLSSTDEQKDTFLKGIKLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFM
 GDSSTPEDTFDFTRHTTNI AVEKFENG SWKVTNIITPSVLIFGPLNILDYASLT LQGQSS
 NPSFEGFGTLSILKVAPEFLTFSDVTSNQSSAVLGKSIFC MDPVIALMHELTS LHQLYG
 INIPSDKRIRPQVSEGGFFSQDGNVQFEELYTFGGSDVEIIPQIERLQLREKALGHYKDIK
 RLNNINKTIPSSWSSNIDKYKKIFSEKYNFDKDN TGNFVVNIDKFNSLYSDLTNVMSEVV
 YSSQYNVKNRTHYFSKHYPVFANILDDNIYTIINGFNLT TKGFNIESGQNIERNPALQK
 LSSESVDLFTKVCLRLTRNSRDDSTCIQVKNN TLPYVADKDSISQEIFESQITDET NVEN
 YSDNFSLDESILDAKVPTNPEAVDPLLPNVNMEPLNVP GEEEFYDDITKDVDYLN SYY
 YLEAQKLSNNVENITLTSVEEALGYSNKIYTF LPSLAEKVNKGVQAGLFLN WANEVVE
 DFTTNIMKKDTLKDISDVSAIIPYIGPALNIGNSALRGNFKQAFATAGVAFLLEGFP EFTIP
 ALGVFTFYSSIQEREKI IKTIENTCLEQRVKRWKDSYQWMVSNWLSRIT TQFNHISYQMY
 DSLSYQADAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKS QVENLKNSLDVKISEAMNNINKFIRECSV
 TYLFKNMLPKVIDELNKFDLKTTELINLIDSHN IILVGEVDRLKAKVNESFENTIPFNIFS
 YTNNLLKDMINEYFNSINDSKILSLQNKKN TLMDSGYNAEVRVEGNVQLNPIFPDFK
 LGSSGDDR GKVIVTQENIVYNAMYESF SIFWIRINKWVSNLPGYTIIDSVKNNSGWSI
 GIISNFLVFTLQKQENSEQDINFSYDISKNAAGY NKWFFVTITTNMMGNMMIYINGKLID
 TIKVKELTGINF SKTITFQMKNKIPNTGLITSDSDNINMWIRDFYIFAKELDDKDINILFNSL
 QYTNVVKDYWGNDLR YDKEYYMINVNYMNR YMSKKGN GIVFNTRKNNNDFNEGYKI
 IIKRIIGNTNDTRVRGENVLYFN TTDNKQYSLGMYKPSRNLGTDLVPLGALDQPMDEIR
 KYGSFIIQPCNTFDYYASQLFLSSNATTNRIGILSIGSYSFKLGDDYWFNHEYLIPV KIEH
 YASLLESTSTHWVFPASE

SEQ ID NO: 9 - BoNT/B_{My}, аминокислотная последовательность

MPVTINNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGRYYKAFKITDRIWIIPER 49
 YTFGYKPEDFNKSSGIFNRDVCEYYDPDYLN TNDKKNIFLQTMIKLFNRI 99
 KSKPLGEKLEMIINGIPYLGDRRVPLEEFNTN IASVTVNKLISNPGEVE 149
 RKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQNH FASREGFGGIMQMKFCPEY 199
 VSVFN NVQENKGASIFNRRGYFSDPALILMH ELIHVLHGLYGIVKVDLPI 249
 VPNEK KFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNF RGI 299
 VDRLNKVLVCISDPNININIKYKFKDKYKFVEDSE GKYSIDVESFDKLY 349

KSLMFGFTETNIAENYKIKTRASYSFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIEEGFN 399
 ISDKDMEKEYRGQNKAINKQAYEEISKEHLAVYKIQMCKSVKAPGICIDV 449
 DNEDLFFIADKNSFSDLSKNERIEYNTQSNYIENDFPINELILDITDLIS 499
 KIELPSENTESLTDFNVDVPVYEEKQPAIKKIFTDENTIFQYLYSQTFFLD 549
 IRDISLTSSFDALLFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVN 599
 DFMVIEANKSNTMDKIADISLIVPYIGLALNVGNETAAGNFENAFEIAGAS 649
 ILLEFIPELLIPVVGAFLLSYIDNKNKIIKTIDNALTKRNEKWSDMYGL 699
 IVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEEIIKYRYNIYSEKEKSNI 749
 NIDFNDINSKLNENINQAIDNINNFINGCSVSYLMKKMIPLAVEKLLDFD 799
 NTLKKNLLNYIDENKLYLIGSAEYEEKSKVNKYLKTIMPFDLSIYTNDTIL 849
 IEMFNKYNSEILNNIILNLRYPKDNLLIDLSGYGAKVEVYDGVELNDKNQF 899
 KLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNE 949
 YTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLLIDINGKTKSVFFEYNIREDISEYI 999
 NRWFFVTITNNLNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDID 1049
 RTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYY 1099
 MFMAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYINYRDLYIGEKFIIR 1149
 KSNSQSINDDIVRKEDIYLDFFNLNQEWVYTYKYFKKEEMKFLAPIY 1199
 DSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIV 1249
 FEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE 1291
SEQ ID NO: 10 - BoNT/AB_{MY}, аминокислотная последовательность
 MPFVNKQFNKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWVIPERD 49
 TFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNLYLKGVTCLFERIY 99
 STDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEEL 149
 NLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEES 199
 LEVDTNPLLGAAGKFAVDPAVTLAHELHAGHRLYGIAPNPRVFKVNTNA 249
 YYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNK 299
 AKSIVGTTASLQYMKNVFKKEYLLSEDTSGKFSVDKLFKDFKLYKMLTEIY 349
 TEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAA 399
 NFNGQNTNINNMNFTKLNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKA 449
 LNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLI 499
 QQYYLTFNFDNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYT 549
 MFHYLRAQEFEGHKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATE 599
 AAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYK 649
 DDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVTQIDNAL 699
 SKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKMKKEALENQAATKAIINY 749
 QYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNS 799
 MIPYGVKRLDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRKDKVNNTLSTDI 849
 PFQLSKYVDNQRLSSTFTEYIKNILNNIILNLRYPKDNLLIDLSGYGAKVE 899
 VYDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPK 949
 YKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLLIDINGKTKSVF 999

FEYNIRE DISEYINRWFFVTITNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIA 1049
 NGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIEERYKIQSYSEYLKD 1099
 FWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYINY 1149
 RDLYIGEKFIIIRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWVYTYKYF 1199
 KKEEMKFLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFFKKDEESTDEIG 1249
 LIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKD 1299
 EGWTE 1304

SEQ ID NO: 11 - BoNT/F7, аминокислотная последовательность

MPVNINNFNYNDPINNTTILYMKMPYYEDSNKYKAFEIMDNVWIIPERNIIGKK
 PSDFYPPISLDSGSSAYYDPNYLTTDAEKDRFLKTVIKLFNRINSNPAGQVLLLEEIKNGKP
 YLGNDHTAVNEFCANNRSTSVEIKESKGTTSMLLNLVILGPGPNILECSTFPVRIFPNNI
 AYDPSEKGFSGSIQLMSFSTEY EYAFNDNTDLFIADPAISLAHELIVLHGLYGAKGVTNK
 KVIEVDQ GALMAAEKD IKIEEFITFGGQDLNIITNSTNQKIYDNLLSNYTAIASRLSQVNN
 NSALNTTYK NFFQWKYGLDQDSNGNYTVNISKFNAIYKKLFSFTECDLAQKFQVKNR
 SNYLFHFKPFRLDLLDDNIYSISEGFNIGSLRVNNGQNINLNSRIVGPIPDNGLVERFVG
 LCKSIVSKKGTKNSLCIKVNNRDLFFVASESSYNENGINSPKEIDDTITNNNYKKNLDEV
 ILDYNSDAIPNLSSRLLNTTAQNDSYVPKYDSNGTSEIKEYTVDKLNVFFYLYAQKAPEG
 ESAISLTSSVNTALLDASKVYTFSSDFINTVNKPVQAALFISWIQQVINDFTTEATQKSTI
 DKIADISLVVPYVGLALNIGNEVQKGNFKEAIELLGAGILLEFVPELLIPTILVFTIKSFINS
 DDSKNKIIKAINNALRERELKWKEVYSWIVSNWLTRINTQFNKRKEQMYQALQNQVDG
 IKKII EYKYNNTLDEKNRLKAEYNIYSIKEELNKKVSLAMQNIDRFLTESSISYLMKLIN
 EAKINKLSEYDKRVNQYLLNYILENSSTLGTSSVQELNNLVSNLNN SIPFELSEYTNDKI
 LISYFNRFYKRIIDSSILNMKYENNRFDSSGYGSNISINGDIYIYSTNRNQFGIYSSRLSEV
 NITQNNTHIYNSRYQNFSVSFWVRIPKYNNLKNLNNEYTIINCMRNNNSGWKISLNYNNII
 WTLQD TTGNQKLVFN YTMIDISDYINKWTFVTITNNRLGH SKLYINGNLTDQKSILN
 LGNIHVDDNILFKIVGCNDTRYVGIRYFKIFNMELDKTEIETLYHSEPDSTILKDFWGNYL
 LYNKKYLLNLLKPNMSVTKNSDILNINRQRGIYSKTNIFSNARLYTGVEVIIRKVGSTD
 TSNTDNFVRKNDTVYINVVDGNSEYQLYADVSTSAVEKTIKLRISNSNYNSNQMIIMD
 SIGDNCTMNFKTNNGNDIGLLGFHLNNLVASSWYYKNIRNNTRNNGCFWSFISKEHW
 QE

SEQ ID NO: 12 - BoNT/F1 (H1241K), аминокислотная последовательность

MPVVINSFNYPVNDPVDITILYMQIPYEEKSKKYKAFEIMRNVWIIPERNITIGTDP
 SDFDPPASLENGSSAYYDPNYLTTDAEKDRYLKTTIKLFRINSNPAGEVLLQEISYAKP
 YLGNEHTPINEFHPVTRTTSVNIKSSTNVKSSIILNLLVLGAGPDIFENSSYPVRKLMDSG
 GVYDPSNDGFGSINIVTFSPEY EYTFNDISGGYNSSTESFIADPAISLAHELIALHGLYGA
 RGVTYKETIKVKQAPLMIAEKPIRLEEFLTFGGQDLNIITSAMKEKIYNNLLANYEKIATR
 LSRVNSAPPEYDINEYKDYFQWKYGLDKNADGSYTVNENKFNEIYKLYSFTEIDLANK
 FKVKCRNTYFIKYGFLKVPNLLDDDIYTVSEGFNIGNLAVNNRGQNIKLNPKIIDSIPDKG
 LVEKIVKFKSVIPRKGTKAPRLCIRVNNRELFVASESSYNENDINTPKEIDDTNLNN
 NYRNNLDEVILDYNSETIPQISNQLNLTLVQDDSYVPRYDSNGTSEIEEHNVDLNVFFY

LHAQKVPEGETNISLTSSIDTALSEESQVYTFSSSEFINTINKPVHAALFISWINQVIRDFTT
 EATQKSTFDKIADISLVVPYVGLALNIGNEVQKENFKEAFELLGAGILLEFVPELLIPTILV
 FTIKSFIGSSENKNKIIKAINNSLMERETKWKEIYSWIVSNWLTRINTQFNKRKEQMYQAL
 QNQVDAIKTVIEYKYNNYTSDERNRLESEYNINNIREELNKKVSLAMENIERFITESSIFY
 LMKLINEAKVSKLREYDEGVKEYLLDYISEHRSILGNSVQELNDLVTSTLNNNSIPFELSSY
 TNDKILILYFNKLYKKIKDNSILDMRYENNKFIDISGYGSNISINGDVYIYSTNRNQFGIYS
 SKPSEVNIAQNNDIYNGRYQNFSISFWVRIPKYFNKVNLNNEYTIIDCIRNNNSGWKISL
 NYNKIIWTLQDTAGNNQKLVFNQYTMISISDYINKWIFVTITNNRLGNSRIYINGNLIDEK
 SISNLGDIHVSDNILFKIVGCNDTRYVGIRYFKVFDTELGKTEIETLYSDEPDPSILKDFWG
 NYLLYNKRYLLNLLRTDKSITQNSNFLNINQQRGVYQKPNIFSNTRLYTGVEVIIRKNG
 STDISNTDNFVRKNDLAYINVVDRDVEYRLYADISIAKPEKIIKLIRTSNSNSNLGQIIVMD
 SIGNNCTMNFQNNNGGNIGLLGFKSNNLVASSWYYNNIRKNTSSNGCFWSFISKEHGW
 QEN

SEQ ID NO: 13 - BoNT/F7-1, аминокислотная последовательность

MPVNINNFNYNDPINNTTILYMKMPYYEDSNKYKAFEIMDNVWIIPERNIIGKK
 PSDFYPPISLDSGSSAYYDPNYLTTDAEKDRFLKTVIKLFNRINSNPAGQVLLEEIKNGKP
 YLGNDHTAVNEFCANNRSTSVEIKESKGTTSMLLNLVILGPGPNILECSTFPVRIFPNNI
 AYDPSEKGFQSIQLMSFSTEYEAFAFNDNTDLFIADPAISLAHELIVLHGLYGAKGVTNK
 KVIEVDQGALMAAEKDIIKEEFITFGGQDLNIITNSTNQKIYDNLLSNYTAIASRLSQVNIN
 NSALNTTYKYNFFQWKYGLDQDSNGNYTVNISKFNAIYKKLFSFTECDLAQKFQVKNR
 SNYLFHFKPFRLDLLDDNIYSISEGFNIGSLRVNNGQNINLNSRIVGPIPDNGLVERFVG
 LCKSVIPRKGTKAPPRLCIKVNNRDLFFVASESSYNENGINSPKEIDDTITNNNYKKNLD
 EVILDYNSDAIPNLSSRLLNTTAQNDSYVPKYDSNGTSEIKEYTVDKLNVFFYLYAQKAP
 EGESAIHLTSSVNTALLDASKVYTFSSDFINTVNKPVQAALFISWIQQVINDFTTEATQK
 STIDKIADISLVVPYVGLALNIGNEVQKGNFKEAIELLGAAGILLEFVPELLIPTILVFTIKSFI
 NSDDSKNKIIKAINNALRERELKWKEVYSWIVSNWLTRINTQFNKRKEQMYQALQNVQV
 DGIKKIIEYKYNNYTLDEKNRLKAEYNIYSIKEELNKKVSLAMQNIDRFLTESSISYLMKL
 INEAKINKLSEYDKRVNQYLLNYILENSSTLGTSSVQELNNLVSNTLNNNSIPFELSEYTND
 KILISYFNRFYKRIIDSSILNMKYENNRFDSSGYGSNISINGDIYIYSTNRNQFGIYSSRLSE
 VNITQNNTHIYNSRYQNFSVSFWVRIPKYNNLKNLNNEYTIINCMRNNNSGWKISLNYNN
 IIWTLQDTTGNNQKLVFNQYTMIDISDYINKWTFVTITNNRLGHSKLYINGNLTDQKSIL
 NLGNIHVDDNILFKIVGCNDTRYVGIRYFKIFNMELDKTEIETLYHSEPDSTILKDFWGN
 LLYNKKYLLNLLKPNMSVTKNSDILNINRQRGIYSKTNIFSARLYTGVEVIIRKVGST
 DTSNTDNFVRKNDTVYINVVDGNSEYQLYADVSTSAVEKTIKLRISNSNYNSNQMIIM
 DSIGDNCTMNFKTNNGNDIGLLGFHLNNLVASSWYYKNIRNNTRNNGCFWSFISKEHGW
 WQE

SEQ ID NO: 14 - активационная петля, аминокислотная последовательность

KSVIPRKGTKAPPRL

ПРИМЕРЫ

Приведенный ниже пример(ы) служит для иллюстрации конкретных вариантов

осуществления изобретения и не ограничивает объем изобретения, определяемый формулой изобретения, никоим образом.

Пример 1 - Исследование образцов ткани мочевого пузыря человека

В кратком изложении, образцы ткани мочевого пузыря человека получали от пациентов, которым проводили цистэктомию по поводу рака мочевого пузыря без известной дисфункции мочевого пузыря в соответствии с их медицинской картой, убедившись, что сбор и применение какой-либо ткани или других образцов проводили в соответствии со всеми правовыми нормами, инструкциями и правилами практики, включая получение информированного согласия пациентов в письменной форме (с упоминанием обязательств по неразглашению личной информации), а также медицинского анамнеза пациента.

После хирургической процедуры образцы сразу транспортировали из операционной в патологоанатомическое отделение, где для экспериментов выбирали нормальный фрагмент купола мочевого пузыря, т.е. без макроскопической опухолевой ткани. Сразу после извлечения образцы тканей хранили при 4°C в буфере Krebs-HEPES (имеющем следующий состав в мМ: NaCl 118,0; KCl 4,7; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 4,2; глюкоза 11,1; HEPES 20,8; pH 7,4), содержащем пенициллин (100 МЕ/мл) и стрептомицин (0,1 мг/мл) для оптимальной консервации до применения (в пределах максимум 24 часов) и транспортировали в научно-исследовательский центр.

Для получения полосок уротелий осторожно удаляли и восемь срезов детрузора (4×2×2 мм) вырезали из мочевого пузыря каждого донора для каждого эксперимента. Оставшуюся ткань мочевого пузыря взвешивали, разделяли на 2 криопробирки и сразу замораживали в жидком азоте, а затем хранили при -80°C для последующего анализа.

Эксперименты *ex vivo* проводили с использованием установки, помещенной под лабораторный вытяжной шкаф (Captair Chem Filtair XL1346A), состоящей из камер для органов, заполненных буфером Krebs-HEPES, поддерживаемых при 37°C и непрерывно барботируемых посредством 95% O₂ и 5% CO₂ для поддержания pH при 7,4. Полоски мочевого пузыря помещали в 5-мл камеры для органов, и их подсоединяли к преобразователям усилия для регистрации изометрического натяжения (Pioden controls Ltd, *Великобритания*). Применяли первоначальное натяжение 1 г. После амплификации изменения натяжения оцифровывали посредством Mac Lab TM/8 с использованием программного обеспечения Chart TM 5 (AD Instruments Ltd). После тщательных промываний полоски подвергали сокращению посредством стимуляции электрическим полем (EFS) с использованием двух платиновых электродов, расположенных с каждой стороны полосок, подсоединенных к стимулятору (Bionic System Nozay, *Франция*).

Натяжение корректировали в ходе периода уравнивания 60 мин для достижения натяжения покоя 1 г, время обновления буферного раствора составляло каждые 15 мин.

После периода уравнивания гладкомышечные полоски детрузора предварительно обрабатывали последовательным добавлением в баню для органов KCl

(100 мМ, 10 мин), затем карбахола ($3,10^{-6}$ М, 10 мин) со стадиями промывания между добавлениями соединений в каждом случае. Затем проводили инжектирование 0,5% желатина в баню для органов перед применением последовательностей EFS.

Последовательности EFS (20 Гц, длительность импульса 1 мс, длительность последовательности 5 с, 300 мА) непрерывно выполнялись посредством 3 групп стимуляций, примененных с интервалом 1 мин, за которыми следовал период покоя в течение 3 мин (условия стимуляции, основанные на опыте авторов изобретения работы с тканью мочевого пузыря человека и выбранные для обеспечения сильных и стабильных сокращений полосок мочевого пузыря человека). Стимуляцию продолжали до тех пор, пока не достигали стабильных ответов (ответ считался стабильным, когда процентное варьирование амплитуды сокращений EFS, вычисленной для последних трех групп сокращений EFS в ходе периода стабилизации, составляло $\geq 90\%$ или $\leq 110\%$).

Индивидуальные полоски инкубировали с носителем (Krebs с 0,5% желатином), 0,1, 1, 3, 5 или 10 нМ ботулиновым нейротоксином, и стимуляции посредством EFS продолжали в течение 3 часов. В конце эксперимента полоски мочевого пузыря подвергали сокращению посредством прямой активации мускаринового рецептора добавлением карбахола ($3,10^{-6}$ М, 10 мин) в баню для органов. Сравнение индуцированных карбахолом полосок до и после инкубации с ботулиновыми нейротоксинами выступает в качестве теста жизнеспособности полосок в ходе эксперимента.

Таблица 2 - Протокол испытаний образцов тканей мочевого пузыря человека

Полоска 1	Полоска 2	Полоска 3	Полоска 4	Полоска 5	Полоска 6	Полоска 7, когда это было возможно	Полоска 8, когда это было возможно
Уравновешивание 60 мин							
КСІ (100 мМ, 10 мин)							
Промывание							
Карбахол ($3,10^{-6}$ М, 10 мин)							
Промывание							
Инжектирование желатина** в баню: 25 мкл/5 мл							
Повторяющаяся EFS (20 Гц - 1 мс, длительность последовательности 5 с, 300 мА, интервал 3 мин) до достижения стабильных ответов							
Инкубация в течение 3 ч с носителем, ВоNT (1, 3, 5, 10 нМ)							
Повторяющаяся EFS (20 Гц - 1 мс, длительность последовательности 5 с, 300 мА, интервал 3 мин) в течение 3 ч							

Карбахол ($3 \cdot 10^{-6}$ М, 10 мин)

** Желатин Priorex®, в высокой степени очищенный, типа А.

Тестировали восемь некомплексных ботулиновых токсинов:

- nBoNT/A, природный ботулиновый токсин типа А, полученный от List Biological Laboratories, Inc. (SEQ ID NO: 1);

- nBoNT/B, природный ботулиновый нейротоксин типа В, полученный от List Biological Laboratories, Inc. (SEQ ID NO: 2);

- rBoNT/B_{MY}, рекомбинантный ботулиновый нейротоксин типа В, содержащий две мутации в Н_С-домене: E1191M и S1199Y (SEQ ID NO: 9);

- rBoNT/AB_{MY}, рекомбинантный химерный ботулиновый нейротоксин (LH_N-домен из BoNT/A и Н_С-домен из BoNT/B), содержащий две мутации в Н_С-домене: E1191M и S1199Y (SEQ ID NO: 10);

- nBoNT/F, природный ботулиновый нейротоксин подтипа F1, полученный от Metabionics Inc. (SEQ ID NO: 6);

- mrBoNT/F, рекомбинантный ботулиновый нейротоксин подтипа F1, содержащий единичную точковую мутацию в Н_{СС}-домене, H1241K (SEQ ID NO: 12);

- mrBoNT/F7-1, рекомбинантный химерный ботулиновый нейротоксин подтипа F7, в котором нативная активационная петля BoNT/F7 заменена активационной петлей BoNT/F1 (SEQ ID NO: 13).

Инкубацию ботулиновых нейротоксинов в бане для органов проводили добавлением 0,75 мкл, 7,5 мкл, 22,5 мкл, 37,5 мкл или 75 мкл исходных растворов ботулинового токсина (в концентрации 666 нМ) к 5 мл буфера Krebs-HEPES с 0,5% желатином с получением 0,1, 1, 3, 5 или 10 нМ, соответственно, в качестве конечной концентрации в бане для органов.

Сократительные реакции на фармакологические средства количественно определяли в значениях сформировавшегося натяжения. Среднее сформировавшееся натяжение (мг, соответствующее среднему значению точек данных в выбранном отслеживании) определяли в ходе 1-минутного сегмента и в конце стабилизированного ответа каждой полоски после добавления либо KCl, либо карбахола.

Сократительные реакции на EFS-индуцированные сокращения количественно определяли следующим образом. В общем, применяли 3 стимуляции с интервалом 1 мин, за которыми следовали 3 мин покоя, как показано на фиг. 1.

Каждый EFS-индуцированный ответ анализировали в ходе временных рамок между 2 последовательными стимуляциями т.е. в течение 60 секунд. Этот анализ проводили для последних двух ответов в каждой группе стимуляций в течение 3 часов.

Для каждой группы стимуляций величины, полученные для последних двух ответов (пик 2 и 3), усредняли.

Для количественного определения EFS-индуцированных ответов амплитуду EFS-индуцированного сокращения (мг) вычисляли в качестве разности между сформировавшимся натяжением до стимуляции и максимальным сформировавшимся

натяжением в ходе ответа на EFS, т.е. разности между наибольшими (Max) и наименьшими (Min) точками данных в выбранном сегменте.

Эти величины амплитуд выражали в качестве процента величины, соответствующей максимальному сокращению EFS, измеренной в ходе последней последовательности стимуляции в ходе периода стабилизации перед добавлением ботулиновых нейротоксинов.

Ингибиторные эффекты ботулиновых нейротоксинов оценивали путем определения величин времени паралича 50 (T50) (мин) т.е. времени, необходимого для ингибирования 50% максимального ответа. Эти величины вычисляли с использованием модели переменного наклона GraphPad Prism 6.05 ($Y = \text{низ} + (\text{верх} - \text{низ}) / (1 + 10^{((\text{LogIC50} - X) * \text{наклон кривой}))}$). Она также называется четырехпараметрической логистической кривой доза-эффект.

Результаты представлены в таблице 3 и на фиг.2.

Таблица 3 - Ингибиторные эффекты ботулиновых нейротоксинов на сокращение ткани мочевого пузыря человека при оценке посредством T50 (мин) на основе ингибирования амплитуды сокращения

BoNT	Концентрация (нМ)	T50 (мин) на основе N ингибирования амплитуды сокращений	N
nBoNT/F	0,1	73,0 ± 10,0	4
mrBoNT/F7-1	0,1	71,4 ± 3,2	6
nBoNT/A	1	117,8 ± 6,3	6
nBoNT/B	1	108,8 ± 5,8	6
rBoNT/B _{MY}	1	64,9 ± 1,9*	6
rBoNT/AB _{MY}	1	85,8 ± 3,0	6
nBoNT/F	1	58,9 ± 7,1*; \$	6
mrBoNT/F	1	58,0 ± 4,0** ; \$\$	5
mrBoNT/F7-1	1	48,5 ± 1,5*** ; \$\$\$	6
nBoNT/A	3	87,0 ± 10.	6
nBoNT/B	3	79,6 ± 5,2	6
rBoNT/B _{MY}	3	56,2 ± 8,1*	6
rBoNT/AB _{MY}	3	68,9 ± 5,5	6
nBoNT/A	5	93,5 ± 4,0	6
nBoNT/B	5	85,6 ± 5,9	4
rBoNT/B _{MY}	5	55,5 ± 8,6*	6
rBoNT/AB _{MY}	5	53,8 ± 4,8*	5

BoNT	Концентрация (нМ)	T50 (мин) на основе N ингибирования сокращений амплитуды	N
nBoNT/A	10	72,5 ± 8,7	6
nBoNT/B	10	71,3 ± 7,7	6
rBoNT/B _{МУ}	10	44,7 ± 2,9	5
rBoNT/AB _{МУ}	10	53,1 ± 6,6	6
nBoNT/F	10	43,1 ± 2,4	6
mrBoNT/F	10	42,5 ± 3,1	6
mrBoNT/F7-1	10	29,0 ± 2,2***; \$\$\$	6

Критерий Крускала-Уоллиса: *, **, *** = $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ против nBoNT/A.

Критерий Крускала-Уоллиса: \$, \$\$, \$\$\$ = $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ против BoNT/B.

nBoNT/A, nBoNT/B, rBoNT/B_{МУ}, rBoNT/AB_{МУ}, nBoNT/F, mrBoNT/F и mrBoNT/F7-1 демонстрировали зависимое от концентрации ингибирование EFS-индуцируемой сократительной реакции в значениях амплитуды. nBoNT/A и nBoNT/B индуцировали сравнимые эффекты на EFS-индуцируемые сокращения полосок мочевого пузыря человека в той же концентрации. Кроме того, во всех дозах rBoNT/B_{МУ}, rBoNT/AB_{МУ}, nBoNT/F, mrBoNT/F и mrBoNT/F7-1 индуцировали более высокое уменьшение EFS-индуцированных сокращений полосок мочевого пузыря человека по сравнению либо с nBoNT/A, и/либо с nBoNT/B. Оказалось, что все протестированные BoNT/F, а также rBoNT/B_{МУ} и rBoNT/AB_{МУ} требовали более низкой концентрации для достижения того же снижения сокращений, чем nBoNT/A или nBoNT/B. Из всех протестированных BoNT mrBoNT/F7-1 индуцировал наибольшее снижение сокращений.

Исходя из описанных выше наблюдений, эффективность протестированных ботулиновых токсинов в отношении ткани мочевого пузыря человека количественно определяли способом, описанным Weisemann et al. (Generation and Characterization of Six Recombinant Botulinum Neurotoxins as Reference Material to Serve in an International Proficiency Test, Toxins, 2015, 7(12): 5035-5054; doi:10.3390/toxins7124861), в частности, путем нанесения на график T50 против концентрации белка ботулинового токсина, и проводили аппроксимацию логарифмических функций с получением отличительных величин R^2 , как показано в таблице 4 ниже и на фиг.3.

Таблица 4 - Нормализованная эффективность ботулиновых нейротоксинов

BoNT	Y_{int}	Наклон	R²	Вычисленная [BoNT] (нМ), обеспечиваю щая T50 70 мин	Относитель ная эффективно сть против nBoNT/A	Относитель ная эффективно сть против nBoNT/B

BoNT	Yint	Наклон	R²	Вычисленная [BoNT] (нМ), обеспечиваю	Относительная эффективность	Относительная эффективность
nBoNT/A	116	-43,35	0,8669	11,511	1,0	0,8
nBoNT/B	106	-37,82	0,9529	8,951	1,3	1,0
mrBoNT/B	65,23	-20,23	0,9971	0,581	19,8	15,4
mrBoNT/AB	86,37	-31,49	0,9836	3,310	3,5	2,7
nBoNT/F	59,73	-14,15	0,9993	0,188	61,2	47,6
mrBoNT/F7-1	51,33	-20,9	0,9973	0,128	90,0	70,0

Результаты демонстрируют, что эффективность BoNT/F была наибольшей в отношении ткани мочевого пузыря человека, а за ним следовал BoNT/B, а затем BoNT/A. В частности, nBoNT/B был приблизительно в 1,5 раза более эффективным, чем nBoNT/A; mrBoNT/B был приблизительно в 20 раз более эффективным, чем nBoNT/A, и приблизительно в 15 раз более эффективным, чем nBoNT/B; mrBoNT/AB был приблизительно в 4 раза более эффективным, чем nBoNT/A, и приблизительно в 3 раза более эффективным, чем nBoNT/B; nBoNT/F был приблизительно в 60 раз более эффективным, чем nBoNT/A, и приблизительно в 50 раз более эффективным, чем nBoNT/B; и mrBoNT/F7-1 был приблизительно в 90 раз более эффективным, чем nBoNT/A, и приблизительно в 70 раз более эффективным, чем nBoNT/B. Кроме того, mrBoNT/F демонстрировал те же величины T50 в концентрации 1 нМ и 10 нМ, что и nBoNT/F: можно обоснованно сделать заключение, что mrBoNT/F является настолько же эффективным, как и nBoNT/F.

Таким образом, исходя из неожиданных данных, описанных в настоящем описании, нейротоксины BoNT/B и BoNT/F, а также клостридиальные нейротоксины, которые демонстрируют сходное связывание, захват, транслокацию и/или свойства расщепления SNARE, такие как BoNT/D, BoNT/D-C или BoNT/G, можно использовать для лечения нарушений автономной системы у человека, таких как нарушения гладких мышц, в частности, нарушения мочевых путей (NOD, OAB, и т.д.), в дозе, ниже или эквивалентной дозе BoNT/A, используемой для лечения тех же нарушений. Величины относительной эффективности, указанные в таблице 4, могут быть в значительной степени быть основаны на определении терапевтического количества клостридиального нейротоксина BoNT/B, BoNT/F, BoNT/D, BoNT/D-C или BoNT/G для введения указанным индивидуумам, исходя из известных доз BoNT/A, которые способны лечить то же нарушение автономной нервной системы.

Все публикации, упомянутые в приведенном выше описании, включены в настоящее описание в качестве ссылок. Различные модификации и изменения описанных способов и систем по настоящему изобретению будут очевидны специалистам в данной области без отклонения от объема и сущности настоящего изобретения. Хотя настоящее изобретение описано применительно к конкретным предпочтительным вариантам

осуществления, следует понимать, что заявленное изобретение не должно чрезмерно ограничиваться такими конкретными вариантами осуществления. Действительно, подразумевается, что различные модификации описанных способов осуществления изобретения, которые очевидны специалистам в области биохимии и биотехнологии, или родственных областях входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Клостридиальный нейротоксин для применения для лечения нарушения автономной нервной системы у пациента-человека, где клостридиальный нейротоксин содержит Н_{СС}-домен из VoNT/B, VoNT/F, VoNT/D, VoNT/D-C или VoNT/G, и где доза указанного клостридиального нейротоксина, подлежащая введению пациенту, ниже или эквивалентна дозе VoNT/A при лечении указанного нарушения автономной нервной системы.

2. Применение клостридиального нейротоксина для производства лекарственного средства для лечения нарушения автономной нервной системы у пациента-человека, где клостридиальный нейротоксин содержит Н_{СС}-домен из VoNT/B, VoNT/F, VoNT/D, VoNT/D-C или VoNT/G, и где доза указанного клостридиального нейротоксина, подлежащая введению пациенту, ниже или эквивалентна дозе VoNT/A при лечении указанного нарушения автономной нервной системы.

3. Способ лечения нарушения автономной нервной системы у пациента-человека, нуждающегося в этом, причем способ включает введение пациенту клостридиального нейротоксина, содержащего Н_{СС}-домен из VoNT/B, VoNT/F, VoNT/D, VoNT/D-C или VoNT/G, в дозе, которая ниже или эквивалентна дозе VoNT/A при лечении указанного нарушения автономной нервной системы.

4. Клостридиальный нейротоксин для применения по п.1, применение по п.2 или способ по п.3, где доза указанного клостридиального нейротоксина в от приблизительно 1,1 раза до приблизительно 100 раз ниже дозы VoNT/A при лечении указанного нарушения автономной нервной системы, причем указанную дозу предпочтительно выражают в нанограммах.

5. Клостридиальный нейротоксин для применения, применение или способ по любому из предшествующих пунктов, где доза указанного клостридиального нейротоксина находится в диапазоне от приблизительно 0,00025 нг до приблизительно 3 нг.

6. Клостридиальный нейротоксин для применения, применение или способ по любому из предшествующих пунктов, где указанное нарушение автономной нервной системы выбрано из нарушений гладких мышц, гиперсекреторных нарушений, респираторных нарушений, воспалительных нарушений с автономным компонентом, нейроэндокринных нарушений и других нарушений автономной нервной системы, прямо ассоциированных с центральным неврологическим нарушением.

7. Клостридиальный нейротоксин для применения, применение или способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный Н_{СС}-домен представляет собой Н_{СС}-домен VoNT/B или Н_{СС}-домен VoNT/F.

8. Клостридиальный нейротоксин для применения, применение или способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный Н_{СС}-домен VoNT/B содержит по меньшей мере одну мутацию аминокислотного остатка, повышающую его аффинность связывания с рецептором Syt II человека по меньшей мере на 50% по сравнению с

природным H_{CC}-доменом VoNT/B.

9. Клостридиальный нейротоксин для применения, применение или способ по п.8, где указанная по меньшей мере одна мутация аминокислотного остатка выбрана из группы, состоящей из 1118M, 1183M, 1191M, 1191I, 1191Q, 1191T, 1199Y, 1199F, 1199L, 1201V, 1191C, 1191V, 1191L, 1191Y, 1199W, 1199E, 1199H, 1178Y, 1178Q, 1178A, 1178S, 1183C, 1183P и любых их комбинаций.

10. Клостридиальный нейротоксин для применения, применение или способ по п.8 или 9, где указанная по меньшей мере одна мутация аминокислотного остатка состоит из двух мутаций аминокислот: 1191M и 1199Y.

11. Клостридиальный нейротоксин для применения, применение или способ по любому из пп.1-7, где указанный H_{CC}-домен VoNT/F содержит по меньшей мере одну мутацию аминокислотного остатка, повышающую его аффинность связывания с одним или более ганглиозидами по сравнению с природным H_{CC}-доменом VoNT/F.

12. Клостридиальный нейротоксин для применения, применение или способ по п.11, где указанные ганглиозиды выбраны из GD1a и/или GM1a, и/или указанная мутация аминокислотного остатка представляет собой 1241K.

13. Клостридиальный нейротоксин для применения, применение или способ по любому из пп.1-10, где указанный клостридиальный нейротоксин представляет собой нейротоксин VoNT/B.

14. Клостридиальный нейротоксин для применения, применение или способ по любому из пп.1-7, 11 или 12, где указанный клостридиальный нейротоксин представляет собой нейротоксин VoNT/F.

15. Клостридиальный нейротоксин для применения, применение или способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный клостридиальный нейротоксин представляет собой химерный нейротоксин.

16. Клостридиальный нейротоксин для применения, применение или способ по п.15, где указанный химерный нейротоксин содержит H_C-домен VoNT/B и LH_N-домен VoNT/A.

17. Клостридиальный нейротоксин для применения, применение или способ по п.15, где указанный химерный нейротоксин содержит LH_N-домен из первого подтипа VoNT/F и активационную петлю из второго подтипа VoNT/F, и где указанный второй подтип VoNT/F отличается от указанного первого подтипа VoNT/F.

18. Клостридиальный нейротоксин для применения, применение или способ по п.17, где указанный LH_N-домен представляет собой LH_N-домен VoNT/F7 и/или указанная активационная петля представляет собой активационную петлю VoNT/F1.

19. Клостридиальный нейротоксин для применения, применение или способ по любому из предшествующих пунктов, где клостридиальный нейротоксин содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 2-13, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно по меньшей мере 90% или 95%

идентичностью последовательности с ней.

20. Клостридиальный нейротоксин для применения, применение или способ по любому из предшествующих пунктов, где клостридиальный нейротоксин содержит:

a. аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% идентичностью последовательности с ней; или

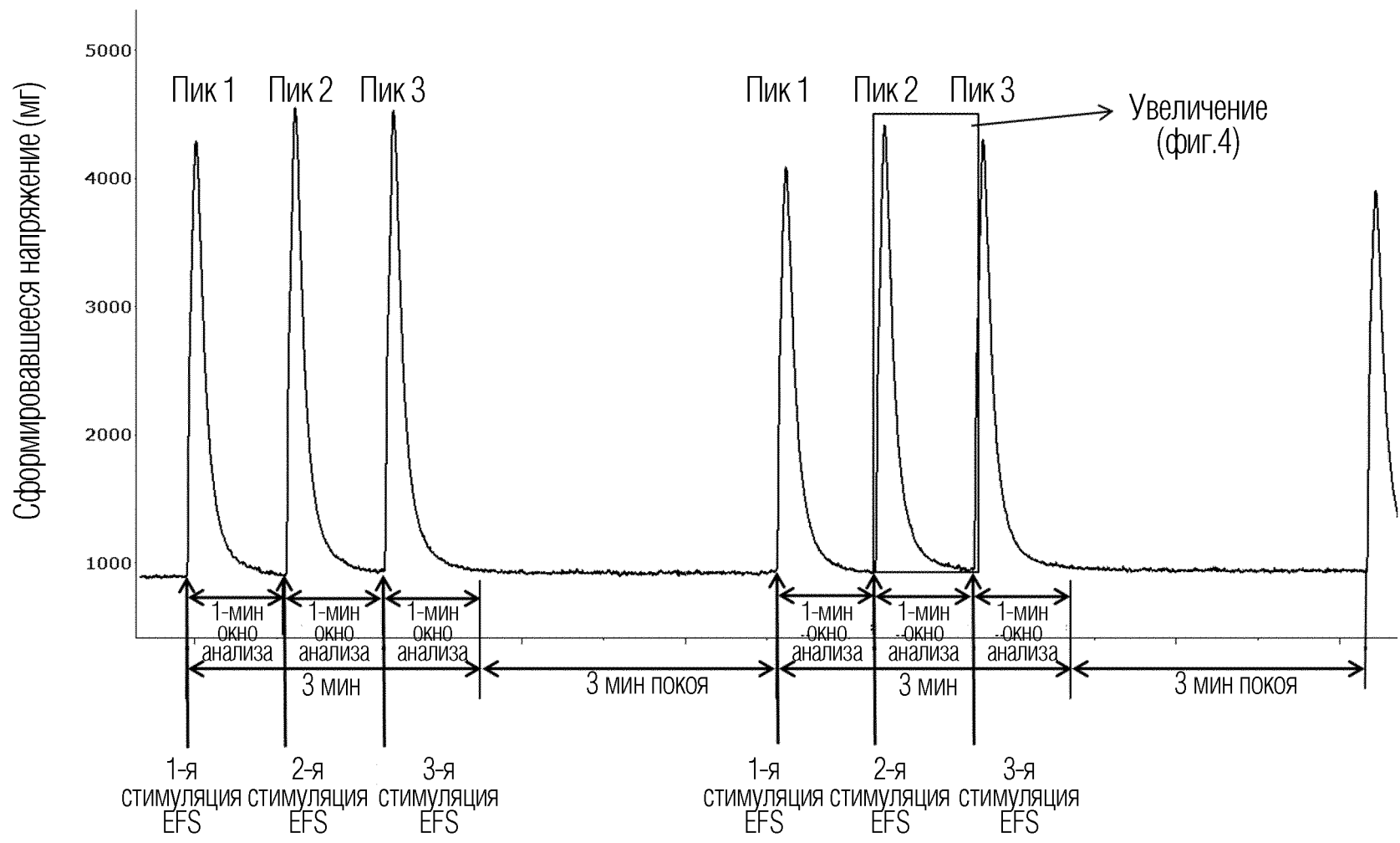
b. аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% идентичностью последовательности с ней; или

c. аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% идентичностью последовательности с ней; или

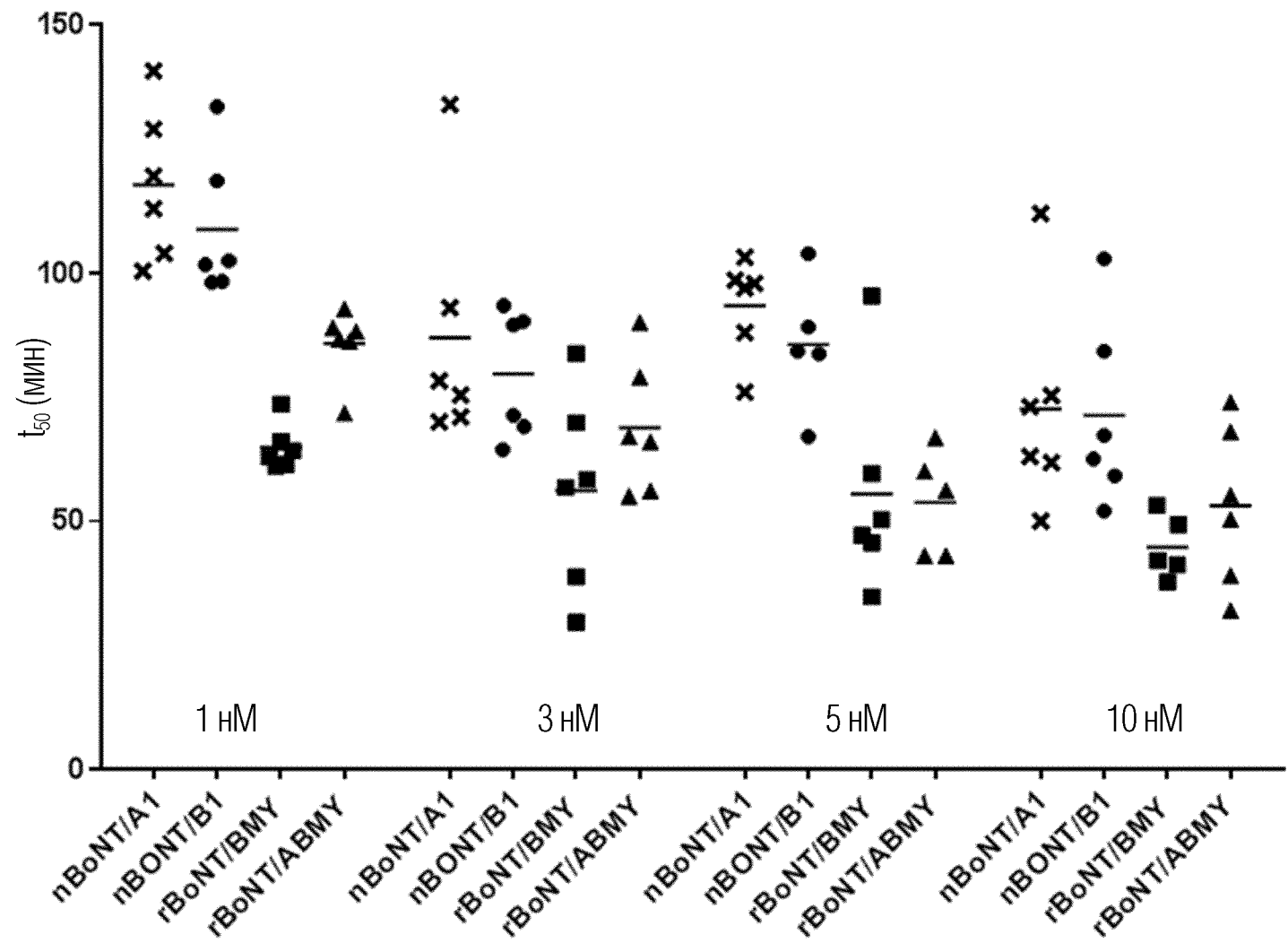
d. аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% идентичностью последовательности с ней; или

e. аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно по меньшей мере 90% или 95% идентичностью последовательности с ней.

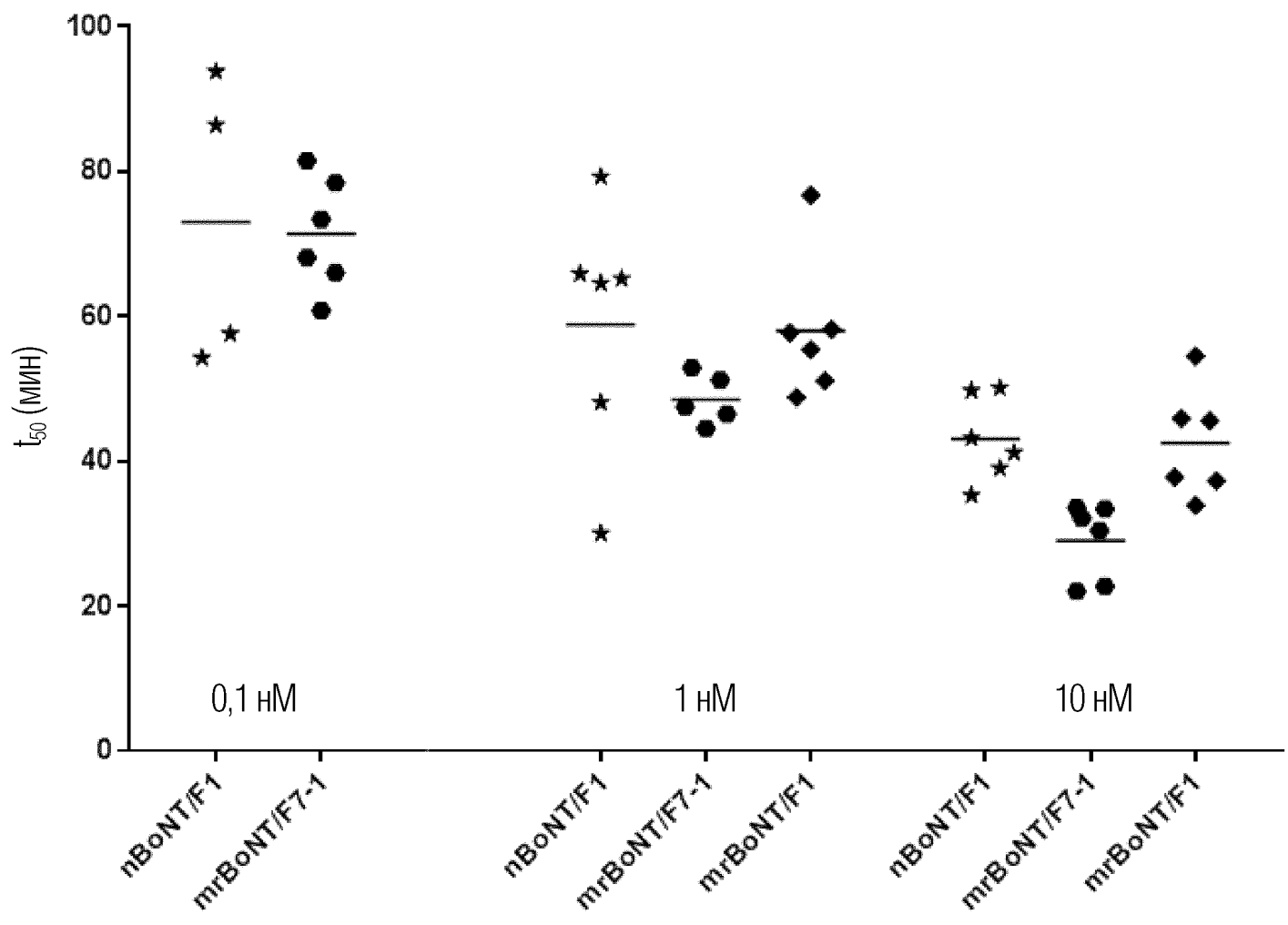
По доверенности



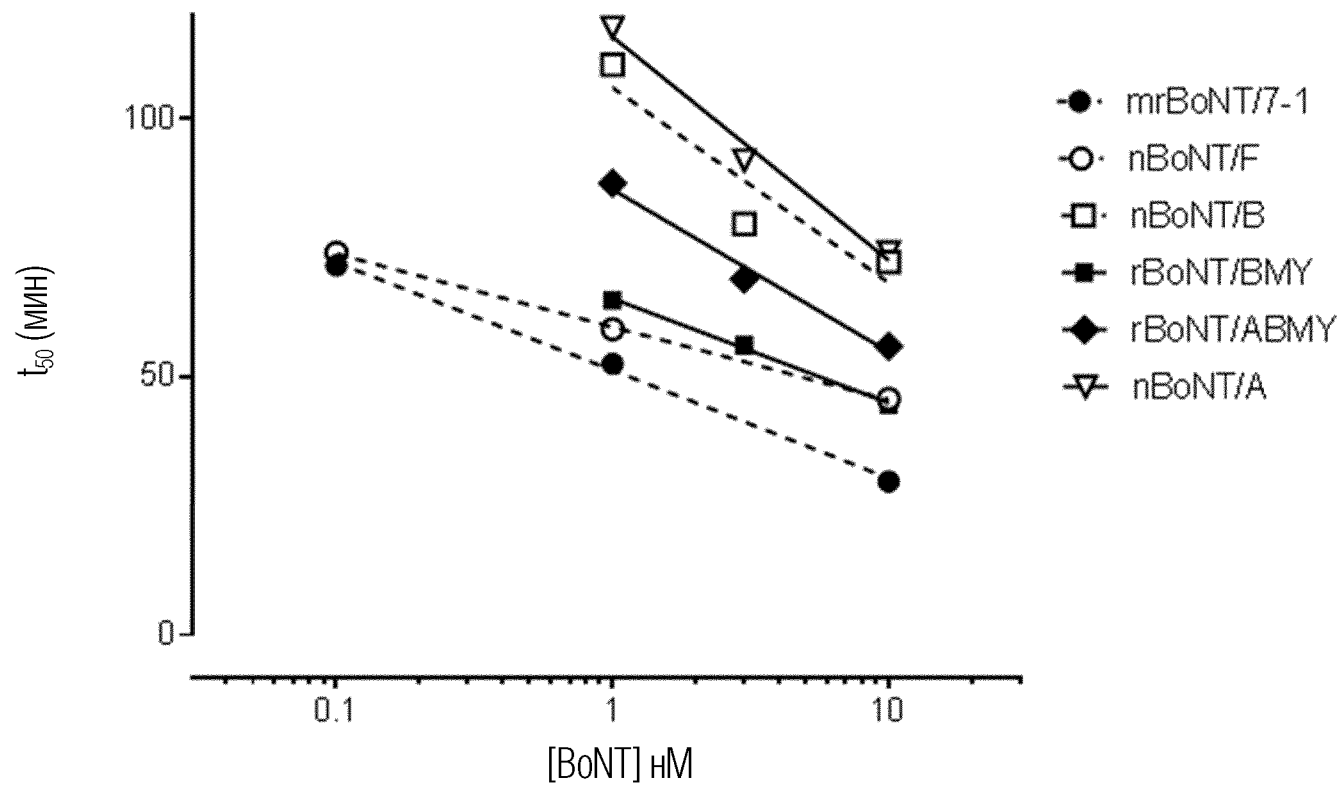
ФИГ. 1



ФИГ. 2А



ФИГ. 2В



ФИГ. 3