

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039105**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.12.03

(51) Int. Cl. **A61K 39/08** (2006.01)
C07K 14/33 (2006.01)

(21) Номер заявки
201690189

(22) Дата подачи заявки
2014.07.09

(54) **КАТИОННЫЕ НЕЙРОТОКСИНЫ**

(31) **1312317.9**

(32) **2013.07.09**

(33) **GB**

(43) **2016.06.30**

(86) **PCT/GB2014/052097**

(87) **WO 2015/004461 2015.01.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИПСЕН БАЙОИННОВЕЙШН
ЛИМИТЕД (GB)**

(56) BYRNE M. P. ET AL.: "Purification, potency, and efficacy of the botulinum neurotoxin type A binding domain from Pichia pastoris as a recombinant vaccine candidate", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 66, no. 10, 1 October 1998 (1998-10-01), pages 4817-4822, XP002301389, ISSN: 0019-9567, abstract, page 4821, figure 1
WO-A2-0067700
WO-A1-2013068476

(72) Изобретатель:
**Андерсон Дайна Брэди, Хакетт
Гэйвин Стефен, Лю Сай Ман (GB)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к сконструированному токсину клостридий, включающему по меньшей мере одну аминокислотную модификацию, где по меньшей мере одна указанная аминокислотная модификация способствует увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного токсина клостридий до величины, которая по меньшей мере на 0,2 единицы выше, чем pI какого-либо другого идентичного токсина клостридий, не содержащего по меньшей мере одну указанную аминокислотную модификацию. Настоящее изобретение также относится к применению соответствующего сконструированного токсина клостридий в терапии.

B1

039105

**039105
B1**

Настоящее изобретение относится к сконструированным токсинам клостридий, включающим по меньшей мере одну аминокислотную модификацию, а также к применению таких сконструированных токсинов клостридий в медицине и терапии.

Бактерии рода *Clostridia* продуцируют в высокой степени активные и специфические белковые токсины, обладающие способностью повреждать нейроны и другие клетки, в которые они проникают. Примерами таких токсинов клостридий являются нейротоксины, продуцируемые *C. tetani* (TeNT) и *C. botulinum* (BoNT) серотипов А-Г, а также нейротоксины, продуцируемые *C. baratii* и *C. butyricum*.

Некоторыми из наиболее известных активных токсинов являются токсины клостридий. Так, например, средняя летальная доза (LD_{50}) ботулинических нейротоксинов для мышей составляет в пределах от 0,5 до 5 нг/кг, в зависимости от серотипа. Столбнячные и ботулинические токсины действуют посредством ингибирования функции поврежденных нейронов, а в частности высвобождения специфических нейромедиаторов. Ботулинические токсины действуют на нервномышечный синапс и ингибируют холинергическую передачу сигнала в периферической нервной системе, а столбнячные токсины действуют в центральной нервной системе.

По своей природе токсины клостридий синтезируются как одноцепочечный полипептид, который подвергается посттрансляционной модификации посредством протеолитического расщепления с образованием двух полипептидных цепей, связанных друг с другом дисульфидной связью. Расщепление происходит в специфическом сайте расщепления, часто называемом сайтом активации, который локализуется между цистеиновыми остатками, образующими межцепевую дисульфидную связь. В результате этого образуется двухцепочечная молекула, которая представляет собой активную форму токсина. Двухцепочечная молекула состоит из тяжелой цепи (Н-цепи), которая имеет молекулярную массу приблизительно 100 кДа, и легкой цепи (L-цепи), которая имеет молекулярную массу приблизительно 50 кДа. Н-цепь содержит N-концевой компонент транслокации (Н_N-домен) и C-концевой нацеливающий компонент (Н_C-домен). Сайт расщепления находится L-цепью и компонентами домена транслокации. После связывания Н_C-домена с его нейроном-мишенью и интернализации связанного токсина в клетку посредством эндосомы Н_N-домен перемещает L-цепь через мембрану эндосомы и цитозоль и эта L-цепь обеспечивает протеазную функцию (также известную как нецитотоксическая протеаза).

Нецитотоксические протеазы действуют посредством протеолитического расщепления внутриклеточных транспортных белков, известных как белки SNARE (например, SNAP-25, VAMP или синтаксин) - см. Gerald K (2002) "Cell and Molecular Biology" (4th edition) John Wiley & Sons, Inc. Акроним SNARE происходит от термина "Растворимый рецептор, связывающийся с NSF" (Soluble NSF Attachment Receptor), где NSF означает фактор восприимчивости к N-этилмалеимиду. Белки SNARE представляют собой интегральные белки внутриклеточных везикул, которые секретируют молекулы посредством транспорта везикулы из клетки. Протеазной функцией является цинкзависимая эндопептидазная активность, где такая протеазная функция обеспечивает высокую степень специфичности белков SNARE к субстрату. В соответствии с этим, нецитотоксическая протеаза, после ее проникновения в нужную клетку-мишень, обладает способностью ингибировать клеточную секрецию из клетки-мишени. L-цепевые протеазы токсинов клостридий представляют собой не-цитотоксические протеазы, расщепляющие белки SNARE.

Поскольку белки SNARE широко распространены в природе, то токсины клостридий, такие как ботулинический токсин, с успехом применяются в способах терапии широкого ряда.

Так, например, авторы ссылаются на публикацию William J. Lipham, *Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin* (Slack, Inc., 2004), в которой описано применение токсинов клостридий в различных терапевтических и косметических целях, например, таких токсинов, как ботулинические нейротоксины (BoNTs), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F и BoNT/G и столбнячный нейротоксин (TeNT), используемые для ингибирования трансмиссии нейронов, например применение BO-TOX™, который в настоящее время используется как терапевтическое средство для лечения таких заболеваний, как ахалазия, спазмы у взрослых, трещины в анальной области, боли в спине, блефароспазм, бруксизм, цервикальная дистония, эссенциальный тремор, образование глабеллярных складок или гиперкинетических лицевых складок, головная боль, спазмы в гемифациальной области, гиперактивность мочевого пузыря, гипергидроз, ювенильный церебральный паралич, рассеянный склероз, болезнь "плавающих глаз", образование морщин в области переносицы, спастическая дисфония, косоглазие и нервное расстройство VII. Кроме того, описано терапевтическое применение токсинов клостридий для лечения нервномышечных расстройств (см. патент США 6872397); для лечения заболеваний матки (см. заявку США 2004/0175399); для лечения язв и гастроэзофагального рефлюкса (см. заявку США 2004/0086531); для лечения дистонии (см. патент США 6319505); для лечения глазных болезней (см. заявку США 2004/0234532); для лечения блефароспазма (см. заявку США 2004/0151740); для лечения косоглазия (см. заявку США 2004/0126396); для купирования болей (см. патенты США 6869610, 6641820, 6464986 и 6113915); для лечения фибромиалгии (см. патент США 6623742, заявку США 2004/0062776); для купирования болей в нижней части спины (см. заявку США 2004/0037852); для лечения мышечных повреждений (см. патент США 6423319); для купирования головной боли в области синуса (см. патент США 6838434); для купирования головной боли напряжения (см. патент США 6776992); для купирования головной боли (см. патент США 6458365); для головной боли при мигрени (см. патент США 5714469); для

лечения сердечно-сосудистых заболеваний (см. патент США 6767544); для лечения нервных расстройств, таких как болезнь Паркинсона (см. патенты США 6620415 и 6306403); для лечения невропсихических расстройств (см. заявки США 2004/0180061 и 2003/0211121); для лечения эндокринных заболеваний (см. патент США 6827931); для лечения заболеваний щитовидной железы (см. патент США 6740321); для лечения заболеваний потовых желез, вызываемых действием холинэргических рецепторов (см. патент США 6683049); для лечения диабета (см. патенты США 6337075 и 6416765); для лечения заболевания поджелудочной железы (см. патенты США 6261572 и 6143306); для лечения рака, такого как рак кости (см. патенты США 6565870, 6368605 и 6139845, и заявку США 2005/0031648); для лечения ушных болезней (см. патенты США 6358926 и 6265379); для лечения вегетативных расстройств, таких как расстройства мышц желудочно-кишечного тракта и других дисфункций гладких мышц (см. патент США 5437291); для лечения кожных поражений, ассоциированных с кожными клеточно-пролиферирующими заболеваниями (см. патент США 5670484); для лечения нейрогенных воспалительных расстройств (см. патент США 6063768); для снижения потери волос и стимуляции роста волос (см. патент США 6299893); для лечения косоротия (см. патент США 6358917); для снижения аппетита (см. заявку США 2004/40253274); для лечения и удаления зубов (см. заявку США 2004/0115139); для лечения нервно-мышечных расстройств и патологий (см. заявку США 2002/0010138); для лечения различных расстройств и состояний и для купирования боли, вызываемой такими расстройствами и состояниями (см. заявку США 2004/0013692); для лечения состояний, вызываемых гиперсекрецией слизистой, таких как астма и ХОБЛ (см. заявку WO 00/10598); и для лечения состояний, не относящихся к нервным расстройствам, таких как воспаление, эндокринные расстройства, экзокринные расстройства, иммунологические расстройства, сердечно-сосудистые заболевания, заболевания костей (см. заявку WO 01/21213). Все вышеуказанные публикации во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

Предполагается, что нецитотоксические протеазы, такие как токсины клостридий (например, BoNT и TeNT), могут быть использованы для терапевтического лечения человека и других млекопитающих, а также в косметике, и кроме того, эти протеазы могут быть использованы для лечения заболеваний и расстройств широкого ряда, которые могут поддаваться лечению под действием полезных свойств этих токсинов.

Во избежание системных неврологических эффектов во многих способах лечения, проводимого с использованием токсинов клостридии, терапевтические токсины клостридии непосредственно вводят в данный участок-мишень (такой как ткань-мишень). Способ терапии, проводимый путем введения токсинов клостридии, связан с проблемами, заключающимися в распространении токсина за пределы участка введения и его попадания в окружающую ткань или в кровоток. Очевидно, что диффузия токсина из ткани-мишени может приводить к нежелательным побочным эффектам, которые, в исключительных случаях, могут представлять угрозу для жизни пациента. Это, в частности, касается применения терапевтических токсинов клостридии (таких как терапевтические средства BoNT) в высоких дозах, концентрациях и объемах инъекций. Побочными эффектами, связанными с проблемами, возникающими при введении коммерчески доступных терапевтических средств BoNT/A, являются астения, общая мышечная слабость, диплопия, блефароптоз, дисфагия, дисфония, дисартрия, недержание мочи и затруднение дыхания. Затруднение глотания и дыхания могут представлять угрозу для жизни и, как сообщалось, могут приводить к летальному исходу в результате распространения токсинов с цитотоксическим действием.

Поэтому необходимо получить такие токсины клостридии, которые в отличие от известных токсинов клостридии обладали бы повышенной способностью удерживаться в ткани на участке их введения и пониженной способностью диффундировать из участка введения.

Настоящее изобретение позволяет решить вышеуказанные проблемы путем конструирования токсинов клостридии, заявленных в настоящем изобретении.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к сконструированному токсину клостридии, включающему по меньшей мере одну аминокислотную модификацию, где по меньшей мере одна указанная аминокислотная модификация способствует увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного токсина клостридий до величины, которая по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере на 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы выше, чем pI какого-либо другого идентичного токсина клостридии, не содержащего по меньшей мере одной указанной аминокислотной модификации. В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна указанная аминокислотная модификация способствует увеличению pI сконструированного токсина клостридий до величины, которая по меньшей мере на 0,4 единицы выше, чем pI какого-либо другого идентичного токсина клостридий, не содержащего по меньшей мере одной указанной аминокислотной модификации. В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна указанная аминокислотная модификация способствует увеличению pI сконструированного токсина клостридий до величины, которая по меньшей мере на 0,5 единицы выше, чем pI какого-либо другого идентичного токсина клостридий, не содержащего по меньшей мере одной указанной аминокислотной модификации. В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна указанная аминокислотная модификация способствует увеличению pI сконструированного токсина клостридий до величины, которая по меньшей мере на 0,6 единицы выше, чем pI

какого-либо другого идентичного токсина клостридий, не содержащего по меньшей мере одной указанной аминокислотной модификации. В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна указанная аминокислотная модификация способствует увеличению рI сконструированного токсина клостридий до величины, которая по меньшей мере на 0,8 единицы выше, чем рI какого-либо другого идентичного токсина клостридий, не содержащего по меньшей мере одной указанной аминокислотной модификации. В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна указанная аминокислотная модификация способствует увеличению рI сконструированного токсина клостридий до величины, которая по меньшей мере на 1 единицу выше, чем рI какого-либо другого идентичного токсина клостридий, не содержащего по меньшей мере одной указанной аминокислотной модификации.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к сконструированному токсину клостридий, включающему по меньшей мере одну аминокислотную модификацию, где по меньшей мере одна указанная аминокислотная модификация способствует увеличению изоэлектрической точки (рI) сконструированного токсина клостридий до величины, которая по меньшей мере на одну единицу рI выше, чем рI какого-либо другого идентичного токсина клостридий, не содержащего по меньшей мере одной указанной аминокислотной модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения сконструированный токсин клостридий содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80 аминокислотных модификаций.

В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одна указанная аминокислотная модификация способствует увеличению рI сконструированного токсина клостридий до величины, которая по меньшей мере на 2, 3, 4 или 5 единиц рI выше, чем рI какого-либо другого идентичного токсина клостридий, не содержащего по меньшей мере одной указанной аминокислотной модификации.

Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что при увеличении рI токсина клостридий, например, по меньшей мере на 0,2 единицы рI или на 0,5 единицы рI или на одну единицу рI (посредством введения в белковый токсин клостридий по меньшей мере одной аминокислотной модификации), способность полученного сконструированного токсина клостридий к удерживанию в ткани преимущественно повышается, а его способность диффундировать из участков введения снижается, при сохранении способности клеток-мишеней к связыванию с белком(ами)-мишенью(ями) SNARE, а также способность к транспорту этого(их) белка(ов) и к его (их) расщеплению. Таким образом, степень распространения токсина клостридий из участка введения значительно снижается по сравнению со степенью распространения какого-либо другого идентичного токсина клостридий, не содержащего по меньшей мере одной указанной аминокислотной модификации.

Сконструированные токсины клостридий согласно изобретению могут быть применены в любом из описанных выше способов лечения, и эти токсины, по сравнению с известными терапевтическими токсинами клостридий дают преимущественно меньше побочных эффектов, или вообще не дают побочных эффектов.

Повышенная способность сконструированных токсинов клостридий согласно изобретению к удерживанию в ткани также обеспечивает их повышенную активность и/или более продолжительное действие, а поэтому эти токсины, по сравнению с известными терапевтическими токсинами клостридий, могут быть использованы в более низких дозах (или в более высоких дозах без каких-либо других побочных эффектов), что указывает на их дополнительные преимущества.

Как подробно обсуждается ниже, увеличение рI, достигаемое путем введения по меньшей мере одной аминокислотной модификации, означает, что сконструированный токсин клостридий согласно изобретению имеет, при данном рН, суммарный заряд, превышающий суммарный заряд какого-либо другого идентичного токсина клостридий, не содержащего по меньшей мере одной указанной аминокислотной модификации. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что такой повышенный положительный заряд сообщает сконструированным токсинам клостридий согласно изобретению способность удерживаться в ткани на участке введения в течение более длительного периода времени, что обусловлено благоприятными электростатическими взаимодействиями между сконструированным токсином клостридий и анионными внеклеточными компонентами (такими как клеточные мембраны и протеогликаны на основе сульфата гепарина) на участке введения. Такие благоприятные электростатические взаимодействия снижают способность сконструированного токсина клостридий диффундировать из участка введения и, тем самым, увеличивают время удерживания в ткани.

Так, например, повышенная способность сконструированного токсина клостридий согласно изобретению удерживаться в ткани позволяет вводить (i) более высокие дозы этого токсина в отдельные мышцы, такие как грудино-ключично-сосцевидные мышцы, без опасения распространения этого токсина на участки, находящиеся рядом с шейными мышцами, которое приводит к затруднению глотания, и (ii) более высокие общие дозы (во все мышцы) за один курс терапии, без опасения распространения этого токсина в кровотока, которое вызывает системные побочные эффекты, такие как затруднение дыхания. Для пациентов, преимущество такого введения токсина заключается в том, что оно обеспечивает более эффективное лечение заболеваний крупных мышц, таких как грудино-ключично-сосцевидные мышцы, и позволяет вводить инъекции в несколько различных мышц в каждом отдельном курсе лечения, а также,

благодаря введению более высоких доз, проводить, по возможности, более продолжительное эффективное лечение (в течение более длительного периода времени до проведения повторного цикла лечения, если в нем возникнет необходимость).

В одном из вариантов осуществления изобретения сконструированный токсин клостридий, используемый в настоящем изобретении, имеет положительный суммарный заряд (например, если указанный сконструированный токсин клостридий локализуется в нужном участке введения в ткань).

Изоэлектрическая точка (pI) является специфическим параметром данного белка. Как хорошо известно специалистам, белки состоят из специфической аминокислотной последовательности (также называемой аминокислотными остатками белка). Каждая аминокислота стандартного набора из двадцати аминокислот имеет конкретную боковую цепь (или группу R), а это означает, что каждый аминокислотный остаток в белке обладает различными химическими свойствами, такими как зарядовые свойства и гидрофобность. На эти свойства могут влиять химическое окружение белка, такое как его температура и pH. Общие химические свойства белка зависят от суммы этих различных факторов.

Некоторые аминокислотные остатки (подробно описанные ниже) имеют ионизируемые боковые цепи, которые могут нести определенный электрический заряд в зависимости от pH окружающей среды. Является ли боковая цепь заряженной или незаряженной при данном pH, зависит от pKa релевантной ионизируемой группы, где pKa представляет собой отрицательный логарифм константы диссоциации кислоты (Ka) для конкретного протона, происходящего от сопряженного основания.

Так, например, кислотные остатки, такие как остатки аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты, имеют карбоксильные группы боковой цепи с величинами pKa приблизительно 4,1 (точные величины pKa могут зависеть от температуры, ионной силы и микроокружения ионизируемой группы). Таким образом, эти боковые цепи имеют отрицательный заряд при pH 7,4 (часто называемым "физиологическим pH"). При низких значениях pH эти боковые цепи становятся протонированными и теряют свой заряд.

В противоположность этому основные остатки, такие как лизин и аргинин, имеют азотсодержащие группы боковой цепи с величинами pKa приблизительно 10-12. Следовательно, эти боковые цепи имеют положительный заряд при pH=7,4. Такие боковые цепи становятся депротонированными и теряют свой заряд при высоких значениях pH.

Поэтому общий (суммарный) заряд белковой молекулы зависит от числа кислотных и основных остатков, присутствующих в белке (и от степени их доступности на поверхности белка), и от pH окружающей среды. Изменение pH окружающей среды приводит к изменению общего заряда белка. В соответствии с этим, для каждого белка существует определенный pH, при котором величины положительного и отрицательного зарядов равны, а поэтому данный белок является незаряженным. Этот параметр известен как изоэлектрическая точка (pI). Изоэлектрическая точка представляет собой стандартный параметр, который используется в биохимии белков и известен специалистам в данной области.

Следовательно, изоэлектрическая точка (pI) определена как величина pH, при которой белок имеет суммарный заряд, равный нулю. Увеличение pI означает, что белку, для достижения суммарного заряда, равного нулю, требуется более высокое значение pH. Таким образом, увеличение pI означает увеличение суммарного положительного заряда белка при данном pH. И наоборот, снижение pI означает, что в данном случае, белку, для достижения суммарного заряда, равного нулю, требуется более низкое значение pH. Таким образом, снижение pI означает снижение суммарного положительного заряда белка при данном pH.

Методы определения pI белка описаны в литературе и известны специалистам в данной области. Так, например, pI может быть вычислена, исходя из средних величин pKa для каждой аминокислоты, присутствующей в белке. Альтернативно, pI может быть определена экспериментально методом изоэлектрического фокусирования. В этом методе применяется электрофорез для разделения белков по их pI. Изоэлектрическое фокусирование обычно осуществляют с использованием геля, имеющего постоянный градиент pH. После приложения электрического поля белки мигрируют в направлении градиента pH до тех пор, пока pH не достигнет значения, при котором суммарный заряд будет равен нулю, и такое значение называется pI белка.

Изоэлектрическая точка белка может быть увеличена или снижена путем изменения числа основных и/или кислотных групп, представленных на поверхности белка. Это может быть достигнуто путем модификации одной или более аминокислот белка. Так, например, увеличение pI может быть достигнуто путем уменьшения числа кислотных остатков или увеличения числа основных остатков. Такие аминокислотные модификации более подробно обсуждаются ниже.

Нативные (немодифицированные) токсины клостридий имеют pI приблизительно 5-6. Таким образом, при pH 7,4, нативные ботулинические токсины имеют суммарный отрицательный заряд. Так, например, pI для BoNT/A составляет 6,4, а молекула BoNT/A имеет суммарный заряд при pH 7,4, равный -8. Эти величины pI вычисляются как описано выше.

Таблица 1

Токсин клостридий	pI
BoNT/A	6, 4
BoNT/B	5, 3
BoNT/C ₁	5, 5
BoNT/D	5, 5
BoNT/E	6, 0
BoNT/F	5, 6
BoNT/G	5, 2
TeNT	5, 8

Как описано выше, в одном из вариантов осуществления изобретения, сконструированный токсин клостридий согласно изобретению включает по меньшей мере одну аминокислотную модификацию, где по меньшей мере одна указанная аминокислотная модификация способствует увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного токсина клостридий до величины, которая по меньшей мере на 0,2 единицы pI выше, чем pI какого-либо другого идентичного токсина клостридий, не содержащего по меньшей мере одной указанной аминокислотной модификации.

Таким образом, в контексте настоящего изобретения, увеличение pI сконструированного токсина клостридий BoNT/A на 0,2 единицы означает увеличение pI от 6,4 до 6,6.

Как описано выше, в одном из вариантов осуществления изобретения сконструированный токсин клостридий согласно изобретению включает по меньшей мере одну аминокислотную модификацию, где по меньшей мере одна указанная аминокислотная модификация способствует увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного токсина клостридий до величины, которая по меньшей мере на одну единицу pI выше, чем pI какого-либо другого идентичного токсина клостридий, не содержащего по меньшей мере одной указанной аминокислотной модификации.

Таким образом, в контексте настоящего изобретения увеличение pI сконструированного токсина клостридий BoNT/A на 1 единицу означает увеличение pI от 6,4 до 7,4.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанная по меньшей мере одна аминокислотная модификация способствует увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного токсина клостридий до величины, которая по меньшей мере на две единицы pI выше, чем pI какого-либо другого идентичного токсина клостридий, не содержащего по меньшей мере одной указанной аминокислотной модификации.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанная по меньшей мере одна аминокислотная модификация способствует увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного токсина клостридий до величины, которая по меньшей мере на 2-5 единиц pI выше, чем pI какого-либо другого идентичного токсина клостридий, не содержащего по меньшей мере одной указанной аминокислотной модификации.

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

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

В одном из вариантов осуществления изобретения сконструированный токсин клостридий имеет pI от 6 до 10 (например, от 7 до 9 или от 8 до 9).

Как обсуждалось выше, сконструированные токсины клостридий согласно изобретению обладают повышенной способностью удерживаться в ткани, что также обеспечивает их повышенную активность и/или более продолжительное действие, а поэтому эти токсины могут быть использованы в более низких дозах (или в более высоких дозах без каких-либо других побочных эффектов) по сравнению с известными терапевтическими токсинами клостридий. Один из показателей таких преимущественных свойств (которым является увеличение терапевтического индекса) может быть определен как "коэффициент безопасности" сконструированного токсина клостридий. С этой точки зрения, нежелательные эффекты токсина клостридий (вызываемые диффузией токсина из участка введения) могут быть экспериментально оценены путем измерения процента потери массы тела у релевантного животного-модели (например, у мыши, где потерю массы тела детектируют на 7-й день после введения). В противоположность этому желательные эффекты нацеливания токсина клостридий на мишень могут быть экспериментально оценены с помощью анализа методом оценки абдукции пальцев задних конечностей (DAS), то есть, измерения степени паралича мышц. Анализ DAS может быть осуществлен путем инъекции 20 мкл токсина клостридий, приготовленного в желатин-фосфатном буфере, в икроножную мышцу/солнечное сплетение мышцей, с последующей оценкой абдукции пальцев задних конечностей методом Aoki (Aoki KR, Toxicon 39: 1815-1820; 2001). При проведении анализа DAS мышцей на короткое время подвешивали за хвост в целях регистрации характерного для них старт-рефлекса, при котором наблюдается удлинение задних

конечностей мышей и абдукция пальцев задних конечностей. После инъекции токсина клостридий, различные степени абдукции пальцев задних конечностей вычисляются по пятибалльной шкале (0 = нормальная абдукция - 4 = максимальное снижение абдукции пальцев задних конечностей и удлинение стопы).

Коэффициент безопасности токсина клостридий может быть затем выражен как отношение количества токсина, необходимого для 10% снижения массы тела (измеренной при максимальном эффекте за первые семь дней после введения дозы мышам), к количеству токсина, необходимому для получения оценки по DAS, равной 2. Поэтому желательно получить высокое значение коэффициента безопасности, которое указывает на то, что данный токсин будет эффективно парализовать мышцу-мишень с минимальными нежелательными побочными эффектами. Сконструированный токсин согласно изобретению имеет коэффициент безопасности, превышающий коэффициент безопасности эквивалентного немодифицированного (нативного) ботулинического токсина.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения сконструированный токсин клостридий согласно изобретению имеет коэффициент безопасности, равный по меньшей мере 8 (например, по меньшей мере 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50), где коэффициент безопасности вычисляют как дозу токсина, необходимую для -10% изменения массы тела (пг/мышь) и деленную на ED₅₀ (пг/мышь) по DAS [ED₅₀ = доза, необходимая для получения оценки по DAS, равной 2].

В одном из вариантов осуществления изобретения сконструированный токсин клостридий согласно изобретению имеет коэффициент безопасности, равный по меньшей мере 10. В одном из вариантов осуществления изобретения сконструированный токсин клостридий согласно изобретению имеет коэффициент безопасности, равный по меньшей мере 15.

Сконструированный токсин клостридий согласно изобретению имеет по меньшей мере одну аминокислотную модификацию. По меньшей мере одна указанная аминокислотная модификация способствует увеличению рI токсина клостридий как обсуждалось выше. В контексте настоящего изобретения, аминокислотной модификацией является модификация аминокислотной последовательности токсина клостридий. Такая модификация может быть осуществлена путем замены одной аминокислоты в последовательности на другую аминокислоту (то есть, аминокислотной замены), путем введения новой аминокислоты в последовательность или путем делеции аминокислоты в этой последовательности. Аминокислоты, вводимые в аминокислотную последовательность белка, также называются аминокислотными остатками.

20 стандартных аминокислот, присутствующих в белках, представлены ниже:

Таблица 2

Аминокислота			Боковая цепь
Аспарагиновая кислота	Asp	D	Заряженная (кислотная)
Глутаминовая кислота	Glu	E	Заряженная (кислотная)
Аргинин	Arg	R	Заряженная (кислотная)
Лизин	Lys	K	Заряженная (основная)
Гистидин	His	H	Незаряженная (полярная)
Аспарагин	Asn	N	Незаряженная (полярная)
Глутамин	Gln	Q	Незаряженная (полярная)
Серин	Ser	S	Незаряженная (полярная)
Треонин	Thr	T	Незаряженная (полярная)
Тирозин	Tyr	Y	Незаряженная (полярная)
Метионин	Met	M	Незаряженная (полярная)
Триптофан	Trp	W	Незаряженная (полярная)
Цистеин	Cys	C	Незаряженная (полярная)
Аланин	Ala	A	Незаряженная (гидрофобная)
Глицин	Gly	G	Незаряженная (гидрофобная)
Валин	Val	V	Незаряженная (гидрофобная)
Лейцин	Leu	L	Незаряженная (гидрофобная)
Изолейцин	Ile	I	Незаряженная (гидрофобная)
Пролин	Pro	P	Незаряженная (гидрофобная)
Фенилаланин	Phe	F	Незаряженная (гидрофобная)

Заряженными аминокислотами являются следующие аминокислоты:

аспарагиновая кислота (отрицательно заряженная), глутаминовая кислота (отрицательно заряженная), аргинин (положительно заряженный) и лизин (положительно заряженный).

При pH 7,4, боковые цепи аспарагиновой кислоты (pKa 3,1) и глутаминовой кислоты (pKa 4,1) имеют отрицательный заряд, а боковые цепи аргинина (pKa 12,5) и лизина (pKa 10,8) имеют положительный заряд. Аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота называются кислотными аминокислотными остатками. Аргинин и лизин называются основными аминокислотными остатками.

Незаряженными полярными аминокислотами (которые могут участвовать в образовании водородных связей) являются следующие аминокислоты: аспарагин, глутамин, гистидин, серин, треонин, тиро-

зин, цистеин, метионин, триптофан.

Незаряженными гидрофобными аминокислотами являются следующие аминокислоты: аланин, валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, пролин и глицин.

Увеличение рI токсина клостридий может быть достигнуто путем введения в токсин клостридий одной или более аминокислотных модификаций, способствующих увеличению отношения положительного заряда к отрицательному заряду токсина клостридий.

В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна аминокислотная модификация выбрана из аминокислотной замены, аминокислотной инсерции и аминокислотной делеции.

При аминокислотной замене аминокислотный остаток, образующий часть аминокислотной последовательности токсина клостридий, заменяют другим аминокислотным остатком. Замещающим аминокислотным остатком может быть один из остатков 20 стандартных аминокислот, описанных выше.

Альтернативно, при осуществлении аминокислотной замены, замещающей аминокислотой может быть нестандартная аминокислота (аминокислота, которая не входит в ряд 20 стандартных аминокислот, описанных выше). Так, например, замещающей аминокислотой может быть основная нестандартная аминокислота, например L-орнитин, L-2-амино-3-гуанидинопропионовая кислота или D-изомеры лизина, аргинина и орнитина. Методы введения нестандартных аминокислот в белки известны специалистам и включают синтез рекомбинантных белков с использованием ауксотрофных хозяев *E. coli*, в которых экспрессируются эти белки.

При осуществлении аминокислотной инсерции дополнительную аминокислоту (аминокислоту, которая обычно не присутствует в данной последовательности) вводят в аминокислотную последовательность токсина клостридий, что приводит к увеличению общего числа аминокислотных остатков в указанной последовательности. При осуществлении аминокислотной делеции аминокислотный остаток удаляют из аминокислотной последовательности токсина клостридий, что приводит к снижению общего числа аминокислотных остатков в указанной последовательности.

Методы модификации белков путем замены, инсерции или делеции аминокислотных остатков известны специалистам. Так, например, аминокислотные модификации могут быть введены путем модификации последовательности ДНК, кодирующей токсин клостридий. Это может быть достигнуто стандартными методами молекулярного клонирования, например путем сайт-направленного мутагенеза, где короткие цепи ДНК (олигонуклеотидов), кодирующие нужную(ые) аминокислоту(ы), вводят вместо исходной кодирующей последовательности с использованием фермента полимеразы, или путем инсерции/делеции частей гена с использованием различных ферментов (например, лигаз и рестриктирующих эндонуклеаз). Альтернативно, модифицированная генная последовательность может быть химически синтезированной.

В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна из аминокислотных модификаций выбрана из замены кислотного аминокислотного остатка основным аминокислотным остатком; замены кислотного аминокислотного остатка незаряженным аминокислотным остатком; замены незаряженного аминокислотного остатка основным аминокислотным остатком; инсерции основного аминокислотного остатка и делеции кислотного аминокислотного остатка.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одной из аминокислотных модификаций являются замена, при которой преимущественно сохраняется одно и то же число аминокислотных остатков в токсине клостридий. В одном из вариантов осуществления изобретения замена выбрана из замены кислотного аминокислотного остатка основным аминокислотным остатком; замены кислотного аминокислотного остатка незаряженным аминокислотным остатком и замены незаряженного аминокислотного остатка основным аминокислотным остатком. В одном из вариантов осуществления изобретения основным аминокислотным остатком является лизин или аргинин. В одном из вариантов осуществления изобретения основным аминокислотным остатком является лизин. В одном из вариантов осуществления изобретения основным аминокислотным остатком является аргинин. В одном из вариантов осуществления изобретения, если указанной заменой является замена кислотного аминокислотного остатка незаряженным аминокислотным остатком, то это означает, что кислотный аминокислотный остаток заменяют соответствующий незаряженным амидным аминокислотным остатком (то есть, аспарагиновую кислоту заменяют аспарагином, а глутаминовую кислоту заменяют глутамином).

Сконструированный токсин клостридий согласно изобретению может иметь более, чем одну аминокислотную модификацию. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения сконструированный токсин клостридий (описанный выше) имеет от 1 до 80 аминокислотных модификаций (например, от 1 до 70, от 1 до 60, от 1 до 50, от 4 до 40, от 4 до 30, от 5 до 40, от 5 до 30 или от 10 до 25 аминокислотных модификаций). В одном из вариантов осуществления изобретения сконструированный токсин клостридий (описанный выше) имеет от 4 до 40 аминокислотных модификаций. В одном из вариантов осуществления изобретения сконструированный токсин клостридий имеет по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 10 аминокислотных модификаций. В одном из вариантов осуществления изобретения сконструированный токсин клостридий имеет по меньшей мере 4 аминокислотных модификации (например, по меньшей мере 4 аминокислотных замены). Каждая из указанных аминокислотных модификаций представляет собой аминокислотную

модификацию, описанную выше. Таким образом, каждая из указанных аминокислотных модификаций способствует увеличению rI сконструированного токсина клостридий (по сравнению с rI какого-либо другого идентичного токсина клостридий, не содержащего указанных аминокислотных модификаций).

Любая аминокислота токсина клостридий (то есть, аминокислотный остаток) может быть модифицирована, как описано выше, при условии, что такая модификация будет приводить к увеличению rI токсина клостридий (как описано выше). Однако авторами настоящего изобретения были идентифицированы субсерии аминокислот токсина клостридий, которые являются особенно подходящими мишенями для модификации.

Предпочтительные аминокислоты-мишени могут обладать некоторыми ценными свойствами. Так, например, предпочтительной аминокислотой-мишенью может быть: (i) аминокислота, присутствующая на поверхности; (ii) аминокислота, расположенная за пределами вторичной структуры белка токсина клостридий; (iii) аминокислота, расположенная в области белка токсина клостридий, которая не играет важной роли в функционировании белка; (iv) аминокислота, которая не является консервативной для различных типов, подтипов или серотипов токсина клостридий; (v) аминокислота, модификация которой не приводит к образованию предсказанного сайта убихитинизации; или (vi) любая комбинация из вышеуказанных аминокислот.

Как обсуждалось выше, токсины клостридий состоят из двух полипептидных цепей, а именно тяжелой цепи (H-цепи), которая имеет молекулярную массу приблизительно 100 кДа, и легкой цепи (L-цепи), которая имеет молекулярную массу приблизительно 50 кДа. H-цепь содержит C-концевой нацеливающий компонент (домен, связывающийся с рецептором, или H_C -домен) и N-концевой компонент транслокации (H_N -домен).

В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна аминокислотная модификация (описанная выше) присутствует в рецептор-связывающем домене токсина клостридий (H_C -домене).

Примерами исходных последовательностей легкой цепи являются
 Ботулинический нейротоксин типа А: аминокислотные остатки 1-448
 Ботулинический нейротоксин типа В: аминокислотные остатки 1-440
 Ботулинический нейротоксин типа C_1 : аминокислотные остатки 1-441
 Ботулинический нейротоксин типа D: аминокислотные остатки 1-445
 Ботулинический нейротоксин типа E: аминокислотные остатки 1-422
 Ботулинический нейротоксин типа F: аминокислотные остатки 1-439
 Ботулинический нейротоксин типа G: аминокислотные остатки 1-441
 Столбнячный нейротоксин: аминокислотные остатки 1-457

Вышеупомянутые исходные последовательности должны рассматриваться как последовательности "гиды", поскольку в последовательностях различных субсеротипов могут присутствовать небольшие изменения. Так, например, в заявке США 2007/0166332 (которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки) кратко описаны различные последовательности клостридий:

Ботулинический нейротоксин типа А: аминокислотные остатки M1-K448
 Ботулинический нейротоксин типа В: аминокислотные остатки M1-K441
 Ботулинический нейротоксин типа C_1 : аминокислотные остатки M1-K449
 Ботулинический нейротоксин типа D: аминокислотные остатки M1-R445
 Ботулинический нейротоксин типа E: аминокислотные остатки M1-R422
 Ботулинический нейротоксин типа F: аминокислотные остатки M1-K439
 Ботулинический нейротоксин типа G: аминокислотные остатки M1-K446
 Столбнячный нейротоксин: аминокислотные остатки M1-A457

Примерами исходных последовательностей H_C -домена токсина клостридий являются

BoNT/A - N872-L1296
 BoNT/B - E859-E1291
 BoNT/ C_1 - N867-E1291
 BoNT/D - S863-E1276
 BoNT/E - R846-K1252
 BoNT/F - K865-E1274
 BoNT/G - N864-E1297
 TeNT - I880-D1315

H_C -домен токсина клостридий (такой как BoNT) имеет два характерных структурных признака, называемых H_{CC} - и H_{CN} -доменами. Аминокислотные остатки, участвующие в связывании с рецептором, очевидно локализируются, главным образом, в H_{CC} -домене.

В одном из вариантов осуществления изобретения, где по меньшей мере одна аминокислотная модификация (описанная выше) присутствует в рецепторсвязывающем домене токсина клостридий (H_C -домене), указанная по меньшей мере одна аминокислотная модификация присутствует в H_{CN} -домене токсина клостридий (также называемом доменом, стимулирующим транслокацию). В одном из вариан-

тов осуществления изобретения, где по меньшей мере одна аминокислотная модификация (описанная выше) присутствует в рецепторсвязывающем домене токсина клостридий (H_C -домене), указанная по меньшей мере одна аминокислотная модификация присутствует в H_{CC} -домене токсина клостридий.

Примерами исходных последовательностей H_{CN} -домена токсина клостридий являются

Ботулинический нейротоксин типа А: аминокислотные остатки 872-1110

Ботулинический нейротоксин типа В: аминокислотные остатки 859-1097

Ботулинический нейротоксин типа C_1 : аминокислотные остатки 867-1111

Ботулинический нейротоксин типа D: аминокислотные остатки 863-1098

Ботулинический нейротоксин типа E: аминокислотные остатки 846-1085

Ботулинический нейротоксин типа F: аминокислотные остатки 865-1105

Ботулинический нейротоксин типа G: аминокислотные остатки 864-1105

Столбнячный нейротоксин: аминокислотные остатки 880-1127

Положения вышеуказанных последовательностей могут несколько отличаться в зависимости от серотипа/подтипа, и другими примерами подходящих (исходных) последовательностей H_{CN} -домена токсина клостридий являются

Ботулинический нейротоксин типа А: аминокислотные остатки 874-1110

Ботулинический нейротоксин типа В: аминокислотные остатки 861-1097

Ботулинический нейротоксин типа C_1 : аминокислотные остатки 869-1111

Ботулинический нейротоксин типа D: аминокислотные остатки 865-1098

Ботулинический нейротоксин типа E: аминокислотные остатки 848-1085

Ботулинический нейротоксин типа F: аминокислотные остатки 867-1105

Ботулинический нейротоксин типа G: аминокислотные остатки 866-1105

Столбнячный нейротоксин: аминокислотные остатки 882-1127.

В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна аминокислотная модификация (описанная выше) представляет собой модификацию аминокислотного остатка, расположенного на поверхности. Поверхностные аминокислотные остатки присутствуют во внешней части укладки белка, а поэтому они доступны для окружающего растворителя по сравнению с аминокислотными остатками, расположенными внутри укладки белка. Степень доступности аминокислотного остатка на поверхности, а значит и его доступность для окружающего растворителя зависит от положения в укладке белка, а также от конформации, которую может принимать данный белок. Поэтому модификация аминокислотного остатка с высокой степенью его доступности на поверхности может оказывать большее влияние на изоэлектрическую точку белка, чем модификация аминокислотного остатка, имеющего низкую степень доступности на поверхности. Методы определения степени доступности аминокислотного остатка на поверхности известны специалистам. Так, например, для вычисления степени доступности аминокислотных остатков на поверхности данного белка может быть использована компьютерная программа AreaMol (которая входит в пакет компьютерных программ CCP4). Поверхностные аминокислотные остатки могут быть также идентифицированы путем визуальной оценки кристаллической структуры белка (например, с помощью рентгеновской кристаллографии). В одном из вариантов осуществления изобретения, поверхностный аминокислотный остаток имеет суммарную величину по AreaMol, равную по меньшей мере 40.

В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна аминокислотная модификация включает модификацию аминокислотного остатка, выбранного из остатка аспарагиновой кислоты, остатка глутаминовой кислоты, остатка гистидина, остатка серина, остатка треонина, остатка аспарагина, остатка глутамин, остатка цистеина или остатка тирозина. Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что аминокислотные остатки, входящие в эту группу (отрицательно заряженные остатки и полярные остатки), являются особенно подходящими мишенями для модификации согласно изобретению. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что аминокислотные остатки, входящие в эту группу, присутствуют на поверхности токсина клостридий чаще, чем гидрофобные остатки, не входящие в этот список.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если аминокислотная модификация включает модификацию аминокислотного остатка, выбранного из аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, гистидина, серина, треонина, аспарагина, глутамин, цистеина или тирозина (описанных выше), то такой аминокислотный остаток заменяют лизином или аргинином. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения отрицательно заряженный остаток или полярный остаток заменяют положительно заряженным остатком, что приводит к увеличению отношения положительного заряда к отрицательному заряду и к увеличению pI токсина клостридий.

В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна аминокислотная модификация (описанная выше) включает модификацию аминокислотного остатка, такого как аспарагин или глутамин (где оба эти остатка являются незаряженными и полярными). В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотный остаток, такой как аспарагин или глутамин, заменяют лизином или аргинином (где оба эти остатка являются положительно заряженными). В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотный остаток, такой как аспарагин или глутамин, заменяют лизином. В

одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотный остаток, такой как аспарагин или глутамин, заменяют аргинином.

Такие остатки, как аспарагин и глутамин, являются особенно предпочтительными для модификации, поскольку они являются полярными, образуют только слабые дипольные связи с другими остатками и составляют 14% от всей молекулы типичного токсина клостридий (такого как BoNT/A).

В одном из вариантов осуществления изобретения сконструированным токсином клостридий является BoNT/A. Исходная последовательность BoNT/A имеет регистрационный номер UniProtKB P10845.

Авторами настоящего изобретения были идентифицированы некоторые аминокислоты, которые являются предпочтительными мишенями для аминокислотной модификации в токсине клостридий BoNT/A.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является BoNT/A, то указанный сконструированный BoNT/A имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25), выбранных из: ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086 и GLN 1229; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного BoNT/A до величины, которая по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере на 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного BoNT/A, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения, указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является BoNT/A, то указанный сконструированный BoNT/A имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25), выбранных из ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086 и GLN 1229; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного BoNT/A до величины, которая по меньшей мере на 0,5 (например, по меньшей мере на 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного BoNT/A, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является BoNT/A, то указанный сконструированный BoNT/A имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25), выбранных из ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083, ASP 1086 и GLN 1229; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного BoNT/A до величины, которая по меньшей мере на одну единицу pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного BoNT/A, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является BoNT/A, то указанный сконструированный BoNT/A имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20), выбранных из: ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, GLU 920, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLU 992, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, ASP 1058, HIS 1064, ASN 1080, GLU 1081, GLU 1083 и ASP 1086; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного BoNT/A до величины, которая по меньшей мере на одну единицу pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного BoNT/A, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

чины, которая по меньшей мере на одну единицу pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного BoNT/A, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является BoNT/A, то указанный сконструированный BoNT/A имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или всех 11), выбранных из ASN 886, ASN 905, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1052, HIS 1064, ASN 1080, ASN 1147 и GLN 1229; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного BoNT/A до величины, которая по меньшей мере на одну единицу pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного BoNT/A, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является BoNT/A, то указанный сконструированный BoNT/A имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или всех 13), выбранных из ASN 886, ASN 905, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1052, HIS 1064, ASN 1080, ASN 1147 и GLN 1229; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного BoNT/A до величины, которая по меньшей мере на одну единицу pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного BoNT/A, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения, указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения сконструированным токсином клостридий является BoNT/B. Исходная последовательность BoNT/B имеет регистрационный номер UniProtKB P10844.

Авторами настоящего изобретения были идентифицированы некоторые аминокислоты, которые являются предпочтительными мишенями для аминокислотной модификации в токсине клостридий BoNT/B.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является BoNT/B, то указанный сконструированный BoNT/B имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25), выбранных из ASN 873, ASN 874, GLU 892, ASP 895, ASN 906, ASP 940, ASN 948, GLU 949, ASN 958, ASN 959, ASN 979, ASN 990, GLU 993, ASP 994, GLU 997, ASN 1012, ASN 1019, ASP 1030, ASP 1047, ASP 1049, GLU 1065, GLU 1072, GLN 1176, GLU 1189, GLU 1252 и ASN 1273; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного BoNT/B до величины, которая по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере на 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного BoNT/B, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является BoNT/B, то указанный сконструированный BoNT/B имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25), выбранных из ASN 873, ASN 874, GLU 892, ASP 895, ASN 906, ASP 940, ASN 948, GLU 949, ASN 958, ASN 959, ASN 979, ASN 990, GLU 993, ASP 994, GLU 997, ASN 1012, ASN 1019, ASP 1030, ASP 1047, ASP 1049, GLU 1065, GLU 1072, GLN 1176, GLU 1189, GLU 1252 и ASN 1273; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного BoNT/B до величины, которая по меньшей мере на 0,5 (например, по меньшей мере на 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного BoNT/B, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является BoNT/B, то указанный сконструированный BoNT/B имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25), выбранных из ASN 873, ASN 874, GLU 892, ASP 895, ASN 906, ASP 940, ASN 948, GLU 949, ASN 958, ASN 959, ASN 979, ASN 990, GLU 993, ASP 994, GLU 997, ASN 1012, ASN 1019, ASP 1030, ASP 1047, ASP 1049, GLU 1065, GLU 1072, GLN 1176, GLU 1189, GLU 1252 и ASN 1273; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного BoNT/B до величины, которая по меньшей мере на одну единицу pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного BoNT/B, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения сконструированным токсином клостридий является BoNT/C₁. Исходная последовательность BoNT/C₁ имеет регистрационный номер UniProtKB P18640.

Авторами настоящего изобретения были идентифицированы некоторые аминокислоты, которые являются предпочтительными мишенями для аминокислотной модификации в токсине клостридий BoNT/C₁.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является BoNT/C₁, то указанный сконструированный BoNT/C₁ имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10 или 15), выбранных из ASN 881, ASP 898, GLU 916, GLU 927, ASN 952, ASN 964, ASN 965, ASN 984, GLU 985, ASP 986, ASP 996, ASN 1000, GLU 1036, ASN 1041, ASP 1062, ASP 1064, GLU 1079 и ASP 1081; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного BoNT/B до величины, которая по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере на 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного BoNT/C₁, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является BoNT/C₁, то указанный сконструированный BoNT/C₁ имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10 или 15), выбранных из ASN 881, ASP 898, GLU 916, GLU 927, ASN 952, ASN 964, ASN 965, ASN 984, GLU 985, ASP 986, ASP 996, ASN 1000, GLU 1036, ASN 1041, ASP 1062, ASP 1064, GLU 1079 и ASP 1081; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного BoNT/C₁ до величины, которая по меньшей мере на 0,5 (например, по меньшей мере на 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного BoNT/C₁, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является BoNT/C₁, то указанный сконструированный BoNT/C₁ имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10 или 15), выбранных из ASN 881, ASP 898, GLU 916, GLU 927, ASN 952, ASN 964, ASN 965, ASN 984, GLU 985, ASP 986, ASP 996, ASN 1000, GLU 1036, ASN 1041, ASP 1062, ASP 1064, GLU 1079 и ASP 1081; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного BoNT/C₁ до величины, которая по меньшей мере на одну единицу pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного BoNT/C₁, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения сконструированным токсином клостридий является BoNT/D. Исходная последовательность BoNT/D имеет регистрационный номер UniProtKB P19321.

Авторами настоящего изобретения были идентифицированы некоторые аминокислоты, которые являются предпочтительными мишенями для аминокислотной модификации в токсине клостридий BoNT/D.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий

является VoNT/D, то указанный сконструированный VoNT/D имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20), выбранных из ASN 877, ASP 893, ASN 894, ASN 898, ASN 920, ASN 945, ASN 948, GLU 957, GLN 958, ASN 959, ASN 968, ASN 979, GLU 1030, ASP 1031, ASP 1033, GLU 1047, GLU 1051, ASN 1052, GLU 1066 и GLN 1122; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного VoNT/D до величины, которая по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере на 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного VoNT/D, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения, указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения, указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения, указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является VoNT/D, то указанный сконструированный VoNT/D имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20), выбранных из: ASN 877, ASP 893, ASN 894, ASN 898, ASN 920, ASN 945, ASN 948, GLU 957, GLN 958, ASN 959, ASN 968, ASN 979, GLU 1030, ASP 1031, ASP 1033, GLU 1047, GLU 1051, ASN 1052, GLU 1066 и GLN 1122; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного VoNT/D до величины, которая по меньшей мере на 0,5 (например, по меньшей мере на 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного VoNT/D, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является VoNT/D, то указанный сконструированный VoNT/D имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20), выбранных из ASN 877, ASP 893, ASN 894, ASN 898, ASN 920, ASN 945, ASN 948, GLU 957, GLN 958, ASN 959, ASN 968, ASN 979, GLU 1030, ASP 1031, ASP 1033, GLU 1047, GLU 1051, ASN 1052, GLU 1066 и GLN 1122; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного VoNT/D до величины, которая по меньшей мере на одну единицу pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного VoNT/D, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения сконструированным токсином клостридий является VoNT/E. Исходная последовательность VoNT/E имеет регистрационный номер UniProtKB Q00496.

Авторами настоящего изобретения были идентифицированы некоторые аминокислоты, которые являются предпочтительными мишенями для аминокислотной модификации в токсине клостридий VoNT/E.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является VoNT/E, то указанный сконструированный VoNT/E имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25), выбранных из ASN 859, ASP 860, ASN 892, ASP 893, ASP 904, ASP 909, ASN 928, ASN 932, ASN 934, ASN 935, GLU 936, ASP 945, ASN 946, ASN 947, ASN 966, ASN 976, ASN 979, ASN 981, ASP 985, GLN 1014, ASN 1019, ASN 1022, ASP 1027, ASN 1035 и ASN 1140; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного VoNT/E до величины, которая по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере на 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного VoNT/E, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является VoNT/E, то указанный сконструированный VoNT/E имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25), выбранных из ASN 859, ASP 860, ASN 892, ASP 893, ASP 904, ASP 909, ASN 928, ASN 932, ASN 934, ASN 935, GLU 936, ASP 945, ASN 946, ASN 947, ASN 966, ASN 976, ASN 979, ASN 981, ASP 985, GLN 1014, ASN 1019, ASN 1022, ASP 1027, ASN 1035 и ASN 1140; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного VoNT/E до величины, которая по

меньшей мере на 0,5 (например, по меньшей мере на 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного VoNT/E, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является VoNT/E, то указанный сконструированный VoNT/E имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25), выбранных из: ASN 859, ASP 860, ASN 892, ASP 893, ASP 904, ASP 909, ASN 928, ASN 932, ASN 934, ASN 935, GLU 936, ASP 945, ASN 946, ASN 947, ASN 966, ASN 976, ASN 979, ASN 981, ASP 985, GLN 1014, ASN 1019, ASN 1022, ASP 1027, ASN 1035 и ASN 1140; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного VoNT/E до величины, которая по меньшей мере на одну единицу pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного VoNT/E, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения сконструированным токсином клостридий является VoNT/F. Исходная последовательность VoNT/F имеет регистрационный номер UniProtKB YP 001390123.

Авторами настоящего изобретения были идентифицированы некоторые аминокислоты, которые являются предпочтительными мишенями для аминокислотной модификации в токсине клостридий VoNT/F.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является VoNT/F, то указанный сконструированный VoNT/F имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20), выбранных из ASN 879, ASP 896, ASN 922, ASN 923, ASN 928, ASN 947, ASN 950, ASN 952, ASN 953, GLU 954, ASN 963, ASN 964, ASN 965, ASN 987, GLN 997, ASN 1037, ASP 1040, ASP 1045, ASN 1055 и ASP 1056; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного VoNT/F до величины, которая по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере на 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного VoNT/F, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является VoNT/F, то указанный сконструированный VoNT/F имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20), выбранных из ASN 879, ASP 896, ASN 922, ASN 923, ASN 928, ASN 947, ASN 950, ASN 952, ASN 953, GLU 954, ASN 963, ASN 964, ASN 965, ASN 987, GLN 997, ASN 1037, ASP 1040, ASP 1045, ASN 1055 и ASP 1056; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного VoNT/E до величины, которая по меньшей мере на 0,5 (например, по меньшей мере на 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного VoNT/F, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является VoNT/F, то указанный сконструированный VoNT/F имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20), выбранных из ASN 879, ASP 896, ASN 922, ASN 923, ASN 928, ASN 947, ASN 950, ASN 952, ASN 953, GLU 954, ASN 963, ASN 964, ASN 965, ASN 987, GLN 997, ASN 1037, ASP 1040, ASP 1045, ASN 1055 и ASP 1056; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного VoNT/F до величины, которая по меньшей мере на одну единицу pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного VoNT/F, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения

ния указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения сконструированным токсином клостридий является BoNT/G. Исходная последовательность BoNT/G имеет регистрационный номер UniProtKB Q60393.

Авторами настоящего изобретения были идентифицированы некоторые аминокислоты, которые являются предпочтительными мишенями для аминокислотной модификации в токсине клостридий BoNT/G.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является BoNT/G, то указанный сконструированный BoNT/G имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10 или 15), выбранных из ASP 900, ASN 909, ASN 910, GLU 912, ASN 913, ASN 945, ASN 947, GLU 956, ASN 965, ASP 966, ASN 986, ASN 1001, ASN 1038, ASP 1040, ASN 1046, ASP 1057, GLU 1073, ASN 1075 и ASN 1090; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного BoNT/E до величины, которая по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере на 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного BoNT/G, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является BoNT/G, то указанный сконструированный BoNT/G имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10 или 15), выбранных из ASP 900, ASN 909, ASN 910, GLU 912, ASN 913, ASN 945, ASN 947, GLU 956, ASN 965, ASP 966, ASN 986, ASN 1001, ASN 1038, ASP 1040, ASN 1046, ASP 1057, GLU 1073, ASN 1075 и ASN 1090; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного BoNT/E до величины, которая по меньшей мере на 0,5 (например, по меньшей мере на 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного BoNT/G, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является BoNT/G, то указанный сконструированный BoNT/G имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10 или 15), выбранных из ASP 900, ASN 909, ASN 910, GLU 912, ASN 913, ASN 945, ASN 947, GLU 956, ASN 965, ASP 966, ASN 986, ASN 1001, ASN 1038, ASP 1040, ASN 1046, ASP 1057, GLU 1073, ASN 1075 и ASN 1090; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного BoNT/E до величины, которая по меньшей мере на одну единицу pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного BoNT/G, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения, сконструированным токсином клостридий является TeNT. Исходная последовательность TeNT имеет регистрационный номер UniProtKB P04958.

Авторами настоящего изобретения были идентифицированы некоторые аминокислоты, которые являются предпочтительными мишенями для аминокислотной модификации в токсине клостридий TeNT.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является TeNT, то указанный сконструированный BoNT/G имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10 или 15), выбранных из ASN 893, ASP 894, ASP 911, ASN 919, ASN 927, ASN 928, GLU 929, GLN 968, ASN 972, GLU 973, GLU 1010, ASP 1018, ASN 1079, ASN 1080, ASN 1081 и ASN 1097; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного BoNT/E до величины, которая по меньшей мере на 0,2 (например, по меньшей мере на 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного TeNT, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является TeNT, то указанный сконструированный TeNT имеет модификацию по меньшей мере одной из

аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10 или 15), выбранных из ASN 893, ASP 894, ASP 911, ASN 919, ASN 927, ASN 928, GLU 929, GLN 968, ASN 972, GLU 973, GLU 1010, ASP 1018, ASN 1079, ASN 1080, ASN 1081 и ASN 1097; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного TeNT до величины, которая по меньшей мере на 0,5 (например, по меньшей мере на 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1) единицы pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного TeNT, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В одном из вариантов осуществления изобретения, если сконструированным токсином клостридий является TeNT, то указанный сконструированный TeNT имеет модификацию по меньшей мере одной из аминокислот (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10 или 15), выбранных из ASN 893, ASP 894, ASP 911, ASN 919, ASN 927, ASN 928, GLU 929, GLN 968, ASN 972, GLU 973, GLU 1010, ASP 1018, ASN 1079, ASN 1080, ASN 1081 и ASN 1097; и такая(ие) аминокислотная(ые) модификация(и) способствует(ют) увеличению изоэлектрической точки (pI) сконструированного TeNT до величины, которая по меньшей мере на одну единицу pI выше, чем величина pI какого-либо другого идентичного TeNT, не имеющего указанной(ых) аминокислотной(ых) модификации(й). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином или аргинином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты лизином. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация включает замену аминокислоты аргинином.

В настоящем изобретении могут быть использованы токсины клостридий различных видов широкого ряда. Таким образом, в контексте настоящего изобретения, термин "токсин клостридий" охватывает токсины, продуцируемые бактерией *C. botulinum* (ботулинический нейротоксин серотипов A, B, C₁, D, E, F и G), *C. tetani* (столбнячный нейротоксин), *C. butyricum* (ботулинический нейротоксин серотипа E) и *C. baratii* (ботулинический нейротоксин серотипа F), а также модифицированные токсины клостридий или их производные, происходящие от любых вышеуказанных токсинов. Термин "токсин клостридий" также охватывает ботулинический нейротоксин серотипа H.

Ботулинический нейротоксин (BoNT) продуцируется бактерией *C. botulinum* в форме крупного белкового комплекса, состоящего из самого BoNT, образующего комплекс с различными вспомогательными белками. В настоящее время известно восемь различных классов ботулинических нейротоксинов, а именно ботулинических нейротоксинов серотипов A, B, C₁, D, E, F, G и H, и все эти токсины имеют сходные структуры и механизмы действия. BoNT различных серотипов могут быть идентифицированы по их инактивации специфическими нейтрализующими антисыворотками, причем такая классификация по серотипам коррелирует с процентом идентичности последовательностей на аминокислотном уровне. Белки BoNT данного серотипа также подразделяются на различные подтипы по проценту идентичности аминокислотных последовательностей.

BoNT абсорбируются в желудочно-кишечном тракте и после попадания в общий кровоток они связываются с пресинаптической мембраной холинергических нервных окончаний, что способствует предупреждению высвобождения нейромедиатора ацетилхолина. BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F и BoNT/G расщепляют синаптобrevин/мембранный белок, ассоциированный с везикулой (VAMP); BoNT/C₁, BoNT/A и BoNT/E расщепляют ассоциированный с синапсом белок размером 25 кДа (SNAP-25), а BoNT/C₁ расщепляет синтаксин.

Столбнячный токсин продуцируется бактерией *C. tetani* одного серотипа. *C. butyricum* продуцирует BoNT/E, а *C. baratii* продуцирует BoNT/F.

Термин "токсин клостридий" также охватывает модифицированные токсины клостридий и их производные, включая, но не ограничиваясь ими, токсины, описанные ниже. Модифицированный токсин клостридий или его производное могут содержать одну или более аминокислот, которые были модифицированы по сравнению с аминокислотами нативной (немодифицированной) формы токсина клостридий, либо они могут содержать одну или более встроенных аминокислот, которые отсутствуют в нативной (немодифицированной) форме токсина клостридий. Так, например, модифицированный токсин клостридий может иметь модифицированные аминокислотные последовательности в одном или более доменах по сравнению с последовательностями нативного (немодифицированного) токсина клостридий. Такие модификации могут способствовать изменению функциональных свойств токсина, например, его биологической активности или персистентности. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения сконструированный токсин клостридий согласно изобретению представляет собой сконструированный модифицированный токсин клостридий или сконструированное модифицированное производное токсина клостридий или сконструированное производное токсина клостридий.

Модифицированный токсин клостридий может иметь одну или более модификаций в аминокислотной последовательности тяжелой цепи (такой как модифицированный H_c-домен), где указанная модифицированная тяжелая цепь связывается с нервными клетками-мишенями с более высокой или более низ-

кой аффинностью, чем нативный (немодифицированный) токсин клостридий. Такие модификации в N_C -домене могут включать модификацию остатков в ганглиозидсвязывающем сайте N_C -домена или в сайте связывания с белком (SV2 или синаптоагмином), где указанная модификация приводит к изменению уровня связывания с рецептором ганглиозида и/или с белковым рецептором нервных клеток-мишеней. Примеры таких модифицированных токсинов клостридий описаны в заявках WO 2006/027207 и WO 2006/114308, которые во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

Модифицированный токсин клостридий может иметь одну или более модификаций в аминокислотной последовательности легкой цепи, например модификации в субстратсвязывающем домене или в каталитическом домене, где указанные модификации могут изменять или модифицировать специфичность модифицированной LC к белку SNARE. Примеры таких модифицированных токсинов клостридий описаны в заявке WO 2010/120766 и в заявке США 2011/0318385, которые во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

Модифицированный токсин клостридий может иметь одну или более модификаций, которые повышают или снижают биологическую активность и/или биологическую персистенцию модифицированного токсина клостридий. Так, например, модифицированный токсин клостридий может содержать мотив на основе лейцина или тирозина, где указанный мотив стимулирует повышение или снижение биологической активности и/или биологической персистенции модифицированного токсина клостридий. Подходящими мотивами на основе лейцина являются $xDxxxLL$, $xExxxLL$, $xExxxIL$ и $xExxxLM$ (где x означает любую аминокислоту). Подходящим мотивом на основе тирозина является $Y-x-x-Hu$ (где Hu означает собой гидрофобную аминокислоту). Примеры модифицированных токсинов клостридий, содержащих мотивы на основе лейцина и тирозина, описаны в заявке WO 2002/08268, которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Термин "токсин клостридий" охватывает гибридные и химерные токсины клостридий. Гибридный токсин клостридий содержит по меньшей мере часть легкой цепи, происходящей от одного токсина клостридий или его подтипа, и по меньшей мере часть тяжелой цепи, происходящей от другого токсина клостридий или его подтипа. В одном из вариантов осуществления изобретения гибридный токсин клостридий может содержать полноразмерную легкую цепь, происходящую от токсина клостридий одного подтипа, и тяжелую цепь, происходящую от токсина клостридий другого подтипа. В другом варианте осуществления изобретения химерный токсин клостридий может содержать часть (например, связывающий домен) тяжелой цепи токсина клостридий одного подтипа и часть тяжелой цепи, происходящей от токсина клостридий другого подтипа. Аналогично или альтернативно, терапевтический элемент может содержать части легкой цепи, происходящие от различных токсинов клостридий. Такие гибридные или химерные токсины клостридий могут быть использованы, например, в качестве средств для доставки терапевтически ценных элементов этих токсинов клостридий пациентам с иммунологической резистентностью к токсину клостридий данного подтипа; пациентам, у которых концентрация рецепторов для домена, связывающегося с тяжелой цепью данного токсина клостридий, может составлять ниже средней величины; или пациентам, у которых может присутствовать резистентный к протеазе вариант субстрата мембранного или везикулярного токсина (например, SNAP-25, VAMP и синтаксин). Гибридные и химерные токсины клостридий описаны в публикации заявки США 8071110, которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения сконструированный токсин клостридий согласно изобретению представляет собой сконструированный гибридный токсин клостридий или сконструированный химерный токсин клостридий.

Термин "токсин клостридий" охватывает ретаргетированные токсины клостридий. Ретаргетированный токсин клостридий представляет собой токсин клостридий, который был модифицирован так, чтобы он включал экзогенный лиганд, известный как "таргетирующая молекула" (TM). TM выбирают так, чтобы она обеспечивала специфичность связывания с нужной клеткой-мишенью, и в процессе ретаргетинга нативная связывающая часть токсина клостридий (например, N_C -домен или N_{CC} -домен) могла быть удалена. Технология ретаргетинга описана, например, в EP-B-0689459; WO 1994/021300; EP-B-0939818; US 6461617; US 7192596; WO 1998/007864; EP-B-0826051; US 5989545; US 6395513; US 6962703; WO 1996/033273; EP-B-0996468; US 7052702; WO 1999/017806; EP-B-1107794; US 6632440; WO 2000/010598; WO 2001/21213; WO 2006/059093; WO 2000/62814; WO 2000/04926; WO 1993/15766; WO 2000/61192 и WO 1999/58571, где все указанные публикации во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения сконструированный токсин клостридий согласно изобретению представляет собой сконструированный ретаргетированный токсин клостридий.

Настоящее изобретение также относится к токсинам клостридий, которые имеют не-нативный сайт расщепления протеазой. В таких токсинах клостридий нативный сайт расщепления протеазой (также известный как сайт активации, описанный выше) был модифицирован или заменен сайтом расщепления протеазой, который не является нативным для данного токсина клостридий (то есть, экзогенным сайтом расщепления). Для расщепления этого сайта требуется экзогенная протеаза, которая позволяет лучше регулировать продолжительность и локализацию событий расщепления. Не-нативными сайтами расщеп-

ления протеазой, которые могут быть использованы в токсинах клостридий, являются

Энтерокиназа (DDDDK↓)

Фактор Ха (IEGR↓ / IDGR↓)

TEV (вирус гравировки табака) (ENLYFQ↓G)

Тромбин (LVPR↓GS)

PreScission (LEVLFQ↓GP).

Другими сайтами расщепления протеазой являются последовательности распознавания, которые расщепляются нецитотоксической протеазой, например, легкой цепью нейротоксина клостридий. Такими сайтами являются последовательности, распознающие белки SNARE (например, SNAP-25, синтаксин, VAMP), которые расщепляются нецитотоксическими протеазами, такими как легкая цепь нейротоксина клостридий. Токсины клостридий, содержащие не-нативные сайты расщепления протеазой, описаны в патенте США 7132259, патенте EP 1206554-B2 и в заявке США 2007/0166332, которые во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки. Термин "сайт расщепления протеазой" также охватывает интеин, который представляет собой саморасщепляющуюся последовательность. Реакция аутосплайсинга регулируется, например, путем изменения концентрации присутствующего восстановителя.

Настоящее изобретение также охватывает токсины клостридий, содержащие "сайт деструктивного расщепления". В указанных токсинах клостридий, не-нативный сайт расщепления протеазой вводят в токсин клостридий в положение, выбранное так, чтобы расщепление в указанном сайте приводило к снижению активности или к инактивации токсина клостридий. Сайт деструктивного расщепления протеазой может быть восприимчивым к расщеплению локальной протеазой, в результате чего токсин клостридий, после его введения, может мигрировать в положение, не являющееся мишенью. Подходящими не-нативными сайтами расщепления протеазой являются сайты, описанные выше. Токсины клостридий, содержащие сайт деструктивного расщепления, описаны в заявках WO 2010/094905 и WO 2002/044199, которые во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

Сконструированные токсины клостридий согласно изобретению, особенно их компонент, такой как легкая цепь, могут быть ПЭГилированы для повышения стабильности, например, увеличения продолжительности действия такого компонента, как легкая цепь. ПЭГилирование является особенно предпочтительным, если легкая цепь содержит протеазу BoNT/A, B или C₁. ПЭГилирование предпочтительно включает присоединение ПЭГ к N-концу такого компонента, как легкая цепь. Так, например, N-конец легкой цепи может быть удлинен за счет присоединения одного или более аминокислотных остатков (например, цистеина), которые могут быть одинаковыми или различными. Один или более из указанных аминокислотных остатков могут иметь свою собственную молекулу ПЭГ, присоединенную к этим остаткам (например, ковалентно связанную молекулу). Пример такой технологии описан в заявке WO 2007/104567, которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Сконструированные токсины клостридий согласно изобретению могут не содержать комплексообразующих белков, которые обычно присутствуют в природном комплексе токсина клостридий.

Сконструированный токсин клостридий согласно изобретению может также содержать ограниченное число нестандартных аминокислот. Таким образом, в сконструированных токсинах клостридий согласно изобретению, аминокислоты могут быть заменены, не только 20 стандартными аминокислотами, но и нестандартными аминокислотами (такими как 4-гидроксипролин, 6-N-метиллизин, 2-аминоизомаляновая кислота, изовалин и α-метилсерин). Аминокислотные остатки полипептида клостридий могут быть заменены ограниченным числом неконсервативных аминокислот; аминокислот, которые не кодируются генетическим кодом; и неприродных аминокислот. Сконструированные токсины клостридий согласно изобретению могут также содержать неприродные аминокислотные остатки.

Неприродными аминокислотами являются, но не ограничиваются ими, транс-3-метилпролин, 2,4-метанопронин, цис-4-гидроксипролин, транс-4-гидроксипролин, N-метилглицин, аллотреонин, метилтреонин, гидроксиэтилцистеин, гидроксиэтилгомоцистеин, нитроглутамин, гомоглутамин, пипеколиновая кислота, трет-лейцин, норвалин, 2-азафенилаланин, 3-азафенилаланин, 4-азафенилаланин и 4-фторфенилаланин. Специалистам известно несколько методов введения неприродных аминокислотных остатков в белки. Так, например, может быть использована *in vitro* система, в которой нонсенс-мутации были ингибированы посредством химически аминоацелированных супрессорных тРНК. Методы синтеза аминокислот и методы аминоацелирования тРНК известны специалистам. Транскрипцию и трансляцию плазмид, содержащих нонсенс-мутации, осуществляют в бесклеточной системе, содержащей экстракт S30 *E. coli* и коммерчески доступные ферменты, а также другие реагенты. Белки очищают с помощью хроматографии. См., например, Robertson et al., *J. Am. Chem. Soc.* 113: 2722, 1991; Ellman et al, *Methods Enzymol.* 202:3 01, 1991; Chung et al, *Science* 259: 806-9, 1993; и Chung et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10145-9, 1993). Во втором методе трансляцию осуществляют в ооцитах *Xenopus* путем микроинъекции мутированной мРНК и химически аминоацелированных супрессорных тРНК (Turcatti et al, *J. Biol. Chem.* 271: 19991-8, 1996). В третьем методе клетки *E. coli* культивируют в отсутствие природной аминокислоты, которая должна быть заменена (например, фенилаланина), и в присутствии нужной(ых) неприрод-

ной(ых) аминокислоты (аминокислот) (например, 2-азафенилаланина, 3-азафенилаланина, 4-азафенилаланина и 4-фторфенилаланина). Неприродную аминокислоту вводят в полипептид вместо ее природного аналога. См., Koide et al, Biochem. 33: 7470-6, 1994.

Сконструированные токсины клостридий согласно изобретению могут быть получены с применением методов рекомбинантных нуклеиновых кислот. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения, сконструированный токсин клостридий (описанный выше) представляет собой рекомбинантно сконструированный токсин клостридий.

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

В предпочтительном варианте осуществления изобретения вектор имеет промотор, выбранный из промоторов, индуцируемых агентом в типичных условиях индуцирования:

<u>Промотор</u>	<u>Индущуруемый агент</u>	<u>Типичные условия</u> <u>индуцирования</u>
Tac (гибрид)	IPTG	0,2 мМ (0,05-2,0 мМ)
AraBAD	L-арабиноза	0,2% (0,002-0,4%)
T7-lac-оператор	IPTG	0,2 мМ (0,05-2,0 мМ)

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, вектор имеет промотор, выбранный из промоторов, индуцируемых агентом в типичных условиях индуцирования:

<u>Промотор</u>	<u>Индущуруемый агент</u>	<u>Типичные условия</u> <u>индуцирования</u>
Tac (гибрид)	IPTG	0,2 мМ (0,05-2,0 мМ)
AraBAD	L-арабиноза	0,2% (0,002-0,4%)
T7-lac-оператор	IPTG	0,2 мМ (0,05-2,0 мМ)
T5-lac-оператор	IPTG	0,2 мМ (0,05-2,0 мМ)

Молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению могут быть получены любым подходящим способом, известным специалистам. Таким образом, молекулы нуклеиновой кислоты могут быть получены методами химического синтеза. Альтернативно, молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению могут быть получены методами молекулярной биологии.

ДНК-конструкцию согласно изобретению, предпочтительно, конструируют *in silico*, а затем синтезируют стандартными методами синтеза ДНК.

Данные, полученные для вышеупомянутой последовательности нуклеиновой кислоты, модифицируют, но необязательно, путем смещения кодонов в соответствии с используемой экспрессионной системой конечных клеток-хозяев (например, *E. coli*).

В одном из вариантов осуществления изобретения последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей сконструированный токсин клостридий, описанной выше, является последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70% (например, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99%) идентична последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NN: 3, 5, 7 и 9.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70% (например, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99%) идентична последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NN: 3, 5, 7 и 9. В одном из вариантов осуществления изобретения последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NN: 3, 5, 7 и 9.

Настоящее изобретение также относится к полипептидам, кодируемым последовательностями нуклеиновой кислоты, описанными выше. Таким образом, в одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70% (например, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NN: 4, 6, 8 и 10. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная последовательность по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NN: 4, 6, 8 и 10.

В одном из вариантов осуществления изобретения сконструированным токсином клостридий согласно изобретению является сконструированный BoNT/A, описанный выше, где указанный сконструированный BoNT/A включает аминокислотную последовательность которая по меньшей мере на 70% (например, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9%) идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NN: 4, 6, 8 и 10.

В одном из вариантов осуществления изобретения сконструированным токсином клостридий согласно изобретению является сконструированный BoNT/A, описанный выше, где указанный сконструированный BoNT/A включает аминокислотную последовательность (или состоит из нее) SEQ ID NO: 4, 6, 8 или 10.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к полипептиду, который включает аминокислотную последовательность (или состоит из нее) SEQ ID NO: 4, 6, 8 или 10.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей сконструированный токсин клостридий, описанный выше, где указанная нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70% (например, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9%) идентична последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NN: 3, 5, 7 и 9. В одном из вариантов осуществления изобретения, нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновой кислоты (или состоит из нее) SEQ ID NO: 3, 5, 7 или 9.

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты (или состоящей из нее) SEQ ID NO: 3, 5, 7 или 9.

"Процент идентичности последовательностей" двух или более нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей зависит от числа идентичных положений в этих последовательностях. Так, например, % идентичности может быть вычислен как отношение числа идентичных нуклеотидов/аминокислот к общему числу нуклеотидов/аминокислот, умноженное на 100. Процент идентичности последовательностей может быть также вычислен с учетом числа пробелов и общей длины каждого пробела, который необходимо ввести для оптимизации выравнивания двух или более последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности двух или более последовательностей может быть осуществлено с помощью специально разработанных математических алгоритмов, хорошо известных специалистам, таких как BLAST.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу получения одноцепочечного сконструированного белкового токсина клостридий, имеющего легкую цепь и тяжелую цепь, где указанный способ включает экспрессию нуклеиновой кислоты (нуклеиновой кислоты, описанной выше) в подходящей клетке-хозяине; лизис клетки-хозяина с получением гомогената клетки-хозяина, содержащего одноцепочечный сконструированный белковый токсин клостридий; и выделение указанного одноцепочечного сконструированного белкового токсина клостридий.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу активации сконструированного токсина клостридий, где указанный способ включает получение одноцепочечного сконструированного белкового токсина клостридий как описано выше; контактирование полипептида с протеазой, расщепляющей полипептида в сайте распознавания (сайте расщепления), расположенном между легкой цепью и тяжелой цепью; и превращение полипептида в двухцепочечный полипептид, в котором легкая цепь и тяжелая цепь связаны друг с другом дисульфидной связью.

Сконструированные токсины клостридий согласно изобретению могут быть использованы для предупреждения или лечения некоторых заболеваний и состояний, а также в косметических целях. Таким образом, в другом своем аспекте настоящее изобретение относится к применению сконструированного токсина клостридий, описанного выше, в медицине.

В своем родственном аспекте настоящее изобретение относится к применению сконструированного токсина клостридий, описанного выше, в целях предупреждения или лечения заболевания или состояния, выбранного из косоглазия; блефароспазма; гетеротропии; дистонии (например, спастической дистонии, нижнечелюстной дистонии, очаговой дистонии, поздней дистонии, дистонии ротоглотки, дистонии конечностей, шейной дистонии); кривошеи (например, спастической кривошеи); снижения клеточной/мышечной активности (посредством ингибирования или инактивации SNARE), которое может быть предотвращено методами, применяемыми в косметологии (с использованием косметических средств); нервномышечного заболевания или нарушения моторики глазного яблока (например, сопутствующего косоглазия, вертикального косоглазия, паралича расположенной сбоку прямой мышцы глаза, нистагма, дистиреоидной миопатии); писчего спазма; блефароспазма; бруксизма; болезни Вильсона; тремора; тиков; сегментарного синдрома "пляшущих глаз"; спазмов; спастичности, вызываемой хроническим рассеянным склерозом; спастичности, приводящей к нарушению функции мочевого пузыря; анимуса; спазмов в области спины; судорог икроножной мышцы ("болезни всадников"); головной боли напряжения; синдрома поднимающей мышцы таза; синдрома расщепленного позвоночника; поздней дискинезии; болезни Паркинсона; тугоподвижности; спазмов в гемифациальной области; поражения век; церебрального паралича; фокальной спастичности; спастического колита; нейрогенного мочевого пузыря; анизма; спастичности конечностей; тиков; треморов; бруксизма; трещин в анальной области; ахалазии; дисфагии; слезливости; гипергидроза; избыточного слюноотделения; избыточной секреции желудочного сока; боли в мышцах (например, боли, вызываемой мышечными спазмами); головной боли (например, головной боли напряжения); глубоких морщин в области бровей; рака; заболеваний матки; расстройств мочеполовых путей; мочеполовых-нервных расстройств; хронического нейрогенного воспаления и расстройств гладких мышц.

В настоящем изобретении используется фармацевтическая композиция, содержащая сконструированный токсин клостридий в комбинации по меньшей мере с одним компонентом, выбранным из фармацевтически приемлемого носителя, наполнителя, адьюванта, пропеллента и/или фармацевтически приемлемой соли.

Сконструированные токсины клостридий согласно изобретению могут быть введены перорально, парентерально, путем непрерывного вливания, путем ингаляции или путем местного применения. Композиции для инъекций могут быть введены в форме растворов, суспензий или эмульсий, или в форме сухих порошков, которые, перед их применением, растворяют или суспендируют в подходящем носителе.

В случае местного применения сконструированного токсина клостридий, такой сконструированный токсин клостридий может быть приготовлен в виде крема (например, для местного нанесения) или субдермальной инъекции.

Методы местной доставки могут включать применение аэрозоля или другого спрея (например, введение с помощью ингалятора). В соответствии с этим, аэрозольная композиция, включающая сконструированный токсин клостридий, обеспечивает доставку токсина в легкие и/или в другие носовые и/или бронхиальные или дыхательные пути.

Сконструированные токсины клостридий согласно изобретению могут быть введены пациенту путем интратекальной или эпидуральной инъекции в позвоночный столб на уровне сегмента позвоночника, ответственного за иннервацию пораженного органа.

Предпочтительным способом введения является лапароскопия и/или местная, а в частности, внутримышечная инъекция.

Сконструированные токсины клостридий согласно изобретению вводят в дозах, достаточных для достижения желаемого терапевтического эффекта. Следует отметить, что необходимый интервал доз зависит от конкретной природы сконструированного токсина клостридий или его состава; от способа введения и свойства композиции; от возраста пациента; от характера, степени или тяжести состояния пациента; от противопоказаний, если они имеются, и от назначения лечащего врача. Эти дозы могут варьироваться, и они могут быть скорректированы с применением стандартных эмпирических рутинных методов оптимизации.

Подходящие суточные дозы (на кг массы тела пациента) составляют в пределах 0,0001-1 нг/кг, предпочтительно 0,0001-0,5 нг/кг, более предпочтительно 0,002-0,5 нг/кг, а особенно предпочтительно 0,004-0,5 нг/кг. Унифицированная доза может варьироваться от менее чем 1 пг до 30 нг, а обычно, она составляет в пределах от 0,01 до 1 нг, и такая доза может быть введена ежедневно или, предпочтительно, реже, например, раз в неделю или раз в шесть месяцев.

Особенно предпочтительной схемой введения доз является введение 0,05 нг сконструированного токсина клостридий в 1X-дозе. В этом случае, предпочтительные дозы составляют в пределах 1X-100X (то есть, 0,05-5 нг).

Жидкие лекарственные формы обычно содержат сконструированный токсин клостридий и апирогенный стерильный носитель. Сконструированный токсин клостридий, в зависимости от используемого носителя и его концентрации, может быть растворен или суспендирован в этом носителе. При получении растворов сконструированный токсин клостридий может быть растворен в носителе, а затем полученный раствор может быть сделан изотоничным, если это необходимо, путем добавления хлорида натрия с последующей стерилизацией путем фильтрации через стерильный фильтр в асептических условиях, после чего, полученным раствором заполняют подходящие стерильные емкости или ампулы и эти емкости или ампулы герметично запаивают. Альтернативно, если стабильность раствора является приемлемой, то этот раствор, находящийся в герметично запаиваемых контейнерах, может быть стерилизован путем автоклавирования. Предпочтительно в носителе могут быть растворены добавки, такие как забуферивающие агенты, солюбилизаторы, стабилизаторы, консерванты или бактерицидные, суспендирующие или эмульгирующие агенты и/или местные анестетики.

Сухие порошки, которые перед их применением растворяют или суспендируют в подходящем носителе, могут быть получены путем заполнения стерильного контейнера предварительно стерилизованными ингредиентами с применением методов стерилизации в стерильных условиях. Альтернативно, эти ингредиенты могут быть растворены в подходящих контейнерах с применением методов стерилизации в стерильных условиях. Затем продукт подвергают сушке вымораживанием и контейнеры герметично запаивают в асептических условиях.

Суспензии для парентерального введения, подходящие для внутримышечной, подкожной или интрадермальной инъекции, готовят, в основном, тем же самым способом, за исключением того, что стерильные компоненты вместо их растворения суспендируют в стерильном носителе, причем в данном случае стерилизация не может быть осуществлена путем фильтрации. Эти компоненты могут быть выделены в стерильном состоянии, или, альтернативно, они могут быть стерилизованы после их выделения, например, путем гамма-облучения.

Для обеспечения равномерного распределения компонентов в композицию(и) предпочтительно включают суспендирующий агент, например поливинилпирролидон.

В соответствии с настоящим изобретением введение может быть осуществлено с применением различных методов доставки, включая инкапсуляцию микрочастиц, доставку с использованием вирусной системы или аэрозольное распыление при высоком давлении.

Описание чертежей

Фиг. 1 - изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) в геле, содержащем катионные конструкции;

Фиг. 2 - процент расщепления SNAP-25 в нейронах спинного мозга крысиных эмбрионов (eSCN) под действием Cat5v2 (K1064H/N954K) (A), Cat5v2 (K1064H/N886K) (B) и Cat5v2 (K1064H/N1025K) (C), и суммарная доза pEC50 для nBoNT/A1. (A, B, C).

Нейроны спинного мозга крысиных эмбрионов культивировали в течение трех недель, обрабатывали Cat5v4 в течение 24 ч, а затем осуществляли вестерн-блоттинг с использованием SNAP-25-специфического антитела. Данные представлены как среднее \pm ср. кв. ош. для трех независимых экспериментов, проводимых с тремя повторностями. (D) Относительная активность Cat5v2 (K1064H/N886K), Cat5v2 (K1064H/N954K) и Cat5v2 (K1064H/N1025K) по отношению к nBoNT/A1 (List Biological Laboratories) в анализе на активность расщепления SNAP-25 в крысиных eSCN. Каждая точка соответствует отдельной партии и означает среднее для 3 независимых определений pEC50 по кривой зависимости "концентрация - ответ" (CRC), построенной по 8 точкам. Каждая концентрация на CRC была оценена с тремя повторностями. Данные сравнения активности представлены как среднее для партий, входящих в список, совокупные данные, n=24. Данные представлены как среднее \pm ср. кв. ош. для n=3 партий на Cat5v4.

Фиг. 3 - Активность (t_{50}) nBoNT/A1 и Cat5v4 в анализе, проводимом для правого или левого купола мышинового диафрагмального нерва (mPNHD).

Ткань правого или левого купола мышинового диафрагмального нерва инкубировали с Cat5v4 или с нативным BoNT/A1, как указано на фигуре. Сократительную способность диафрагмы регистрировали до тех пор, пока сокращения больше не детектировались, или по прошествии 140 мин. Каждая точка соответствует независимым определениям. Величина t_{50} означает время, необходимое для ингибирования сократительной способности правого или левого купола мышинового диафрагмы на 50%.

Последовательности

SEQ ID NO: 1. Последовательность нуклеиновой кислоты
BoNT/A1.

ATGCCATTTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTTCGACATCGCA
TACATCAAGATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAGATCCACAACAAGA
TTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAGAAGGCGATCTGAACCCGCCACC
GGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCAGCTACTACGATTCGACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAA
GATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTTCAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTCGCA
TGCTGCTGACTAGCATTGTTTCGCGGTATCCCGTTCGGGGTGGTAGCACGATTGACACCGAACT
GAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTTATCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAG
CTGAATCTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATCCAATTCGAGTGAAGAGCTTTGGTC
ACGAGGTTCTGAATCTGACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTCGTTTTTCGCCGGA
TTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCGGGCAAA
TTCGCTACCGATCCGGCTGTACGCTGGCCATGAACTGATCCACGCAGGCCACCGCCTGTACG
GCATTGCCATCAACCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATGAGCGG
CCTGGAAGTCAGCTTCGAAGAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACAGC
TTGCAAGAGAATGAGTTCGGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGA
ACAAGGCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTAAAGA
GAAGTACCTGCTGTCCGAGGATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAAA
CTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGACAACCTTGTGAAATCTTCAAAGTGTGA
ATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTTTTCAAGATTAACATCGTCCGAAGGTGAA
CTACACCATCTATGACGGTTTTAACCTGCGTAACACCAACCTGGCGGCGAACTTTAACGGTCAG
AATACGGAATCAACAACATGAATTTACGAAGTTGAAGAAGTTACGGGCTCTGTTGAGTCTT
ATAAGCTGCTGTGCGTGGCGGTATCATCACCAGCAAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAA
CAAGGGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAACAATTTGGATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAA
GATAATTTTACCAACGACCTGAACAAGGTTGAAGAAATCACCAGCGATACGAATATTGAAGCAG
CGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCTGACCTTTAACTTCGACAATGA
ACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATTATCGGTCAGCTGGAACCTGATGCCG
AATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCATTACC
TGCGTGACAGGAGTTTGAACACGGTAAAAGCCGATTCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGC
CCTGCTGAACCCGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAA
GCCACTGAGGCCGCGATGTTCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGAGA
CGAGCGAAGTGAGCACTACCGACAAAATTTGCTGATATTACCATCATATCCCGTATATTGGTCC
GGCACTGAACATTTGGCAACATGCTGTACAAAGACGATTTTGTGGGTGCCCTGATCTTCTCCGGT
GCCGTGATTCTGCTGGAGTTCATTCGGAGATTGCGATCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTGG
TGTCTTACATCGCAATAAGGTTCTGACGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCGAAACGTAA
TGAAAAATGGGACGAGGTTTACAAATACATTGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAG
ATCGACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAA

TTATCAACTACCAATACAACCAGTACACCGAAGAAGAGAATAACATTAACCTCAATATCGA
 TGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTG
 AATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATGATCCGTATGGCGTCAAACGCTCTGGAGG
 ACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGACAATCGTGGTACGCTGAT
 TGGCCAAGTTGACCGCTTGAAGACAAAGTTAACAATACCCTGAGCACCAGCATCCCATTTCAA
 CTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGCTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCA
 TCAATACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTATGC
 AAGCAAGATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTG
 TTTAATCTGGAATCGAGCAAAAATTGAGGTTATCCTGAAAAACGCCATTGTCTACAACCCATGT
 ACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTGCGATCCCGAAATACTTCAACAGCATTAGCCTGAA
 CAACAGGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTAT
 GGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGACACCCAAGAGATCAAGCAGCGCGTCTGTTCAAGTACT
 CTCAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCG
 TCTGAATAACAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTG
 GGTAAATATCCACGCAAGCAACAACATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCATCGTT
 ATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAAGTGAATGAGAAGGAGATCAAGATTT
 GTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGGGGCGATTATCTGCAATACGAT
 AAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAATATGTGGATGTCAATAATGTGGGTA
 TTCGTGGTTACATGATTTGAAGGGTCCCGGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTGAA
 CTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAAC
 ATTGTGCGTAATAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGTGAAGAATAAAGAGTACCGTCTGG
 CGACCAACGCTTCGCAGGCGGGTGTGAGAAAATCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTCGG
 TAATCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACCAGGGTATCACTAACAAGTGCAAG
 ATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTTATGTTTCCACCAGTTCACAATA
 TTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGCCGTACTTTGGG
 CTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGATGATGGTTGGGGCGAACGTCGCTG

SEQ ID NO:2. Последовательность нуклеиновой кислоты ВоНТ/А1.

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGMQPVKAFKIHNKIWIVIPERDTFTNPEEGDLNPPPE
 AKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPIFWGGSTIDTELK
 VIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIGPSADIIQFECKSFGEVLNLRNGYGSTQYIRFSPDF
 TFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIIHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGL
 EVSFEELRTFGGHDAKFIIDSLQENEFRLYYNKFKDIASLTKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEK
 YLLSEDTSGKFSVDKLFKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNY
 TIYDGFNLRNLTNLAANFNGQNTENINMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNK
 ALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEP

ENIS IENLSSDIIGQLELMPNIEFNPNGKKEYELDKYTMFHYLRAQEFHKGKSRIALTNSVNEAL
 LNPSRVYTFSSDYVKKVKNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTFDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPA
 LNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTQVIDNALSKRNE
 KWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDD
 LSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIG
 QVDRCLKDKVNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLRYAS
 KINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNN
 EYTIINCMENNSGWKVS LNYGEI IWTLQDTQEIKQRVVKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRL
 NNSKIYINGRLIDQKPI SNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLY
 DNQNSGILKDFWGDYLYQDKPYMLNLYDPNKYVDVNNVGI RGYMYLKGPRGSVMTNIYLS
 SLYRGTKFI IKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGN
 LSQVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNAKLVASNWNRYNRQIERSRRTLGC
 SWEFIPVDDGGERPL

**SEQ ID NO: 3. Сконструированная последовательность
 нуклеиновой кислоты BoNT/A1 «Cat-A».**

ATGCCATTTCGTC AACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCA
 TACATCAAGATTCGGAACCGCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAGATCCACAACAAGA
 TTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAGAAGCGGATCTGAACCCGCCACC
 GGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTACGTA CTACGATTCGACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAA
 GATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTTCAAGCTATCTACAGCACGGATCTGGGTCGCA
 TGCTGCTGACTAGCATTGTTCCGGGTATCCCGTTCTGGGGTGGTAGCAGATTGACACCGAACT
 GAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAG
 CTGAATCTGGTCATCATTGGCCCGAGCGACAGACATTATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTTTGGTC
 ACGAGGTTCTGAATCTGACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTCGTTTTTCGCCGGA
 TTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCGGGCAAA
 TTCGCTACCGATCCGGCTGTACGCTGGCCATGAAC TGATCCACGCAGGCCACCGCTGTACG
 GCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGTCAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATGAGCGG
 CCTGGAAGTCAGCTTCGAAGAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACAGC
 TTGCAAGAGAATGAGTTCGCTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGA
 ACAAGGCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTAAAGA
 GAAGTACCTGCTGCTCCGAGGATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAAA
 CTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGACAACTTTGTGAAATCTTCAAAGTGTTGA
 ATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTTTCAAGATTAACATCGTGCCGAAGGTGAA
 CTACACCATCTATGACGGTTTTAACCTGCGTAACACCAACCTGGCGGCGAAGCTTTAACGGTCA
 AATACGGAAATCAACAACATGAATTTACGAAGTTGAAGAATTCACGGGTCGTTCGAGTTCT
 ATAAGCTGCTGTGCGTGC GCGGTATCATCACCAGCAAACCAAAGCCTGGACAAAGGCTACAA

CAAGGCGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATTGGGATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAA
GATAATTTTACCAACGACCTGAACAAGGGTGAAGAAATCACCAGCGATACGAATATTGAAGCAG
CGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCTGACCTTTAACTTCGACAATGA
ACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATTATCGGTGAGCTGGAAGTATGATGCCG
AATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCATTACC
TGCGTGACACAGGAGTTTGAACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGC
CCTGTGAACCCGAGCCGTGTCTATACCTTCTTACGAGCGACTATGTTAAGAAAAGTGAACAAA
GCCACTGAGGCCGCGATGTTCCGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGAGA
CGAGCGAAGTGAAGTACTACCGAAAAATGCTGATATTACCATCATTATCCCGTATATTGGTCC
GGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGACGATTTTGTGGGTGCCCTGATCTTCCCGGT
GCCGTGATTTCTGTGGAGTTCATTCCGGGAGATTGCGATCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTGG
TGTCTTACATCGCGAATAAGGTTCTGACGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTGCGAAACGTAA
TGAAAAATGGGACGAGGTTTACAAATACATGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAG
ATCGACCTGATCCGTAAGAAAAATGAAAGAGCGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCCAAAAGCAA
TTATCAACTACCAATACAACAGTACACGGAAGAAGAGAAGAATAACATTAACCTTCAATATCGA
TGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTTG
AATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATGATTCGGTATGGCGTCAAACGCTCGGAGG
ACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGACAACTCGTGGTACCGTGTG
TGGCCAAGTTGACCGCTTGAAGACAAAGTTAACAATACCCTGAGCACCAGATCCCAATTTCAA
CTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGCTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCA
TCAATACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAAGCATCTGATTGATCTGAGCCGTATGCG
TAGCAAGATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTG
TTAATCTGGAATCGAGCAAAAATGAGGTTATCCTGAAAAAGGCCATTGCTTACAACCTCCATGT
ACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTGCGATCCCGAAATACCTCAACAAGATTAGCCTGAA
CAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTAT
GGTGAGATCATTGGACCTTGCAGGACACCAAGAGATCAAGCAGCGCGTCTGTTCAAGTACT
CTCAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCG
TCTGAATAAGAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTG
GGTAATATCCACGCAAGCAACAAGATTATGTTCAAATGGACGGTTGCCCGGATACCCATCGTT
ATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGATCAAAGATTT
GTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGGGCGGATATCTGCAATACGAT
AAGCCGACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAATATGTGGATGTCAATAATGTGGGTA
TTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTGAA
CTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAGATAAC
ATTGTGCGTAATAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCTGGAAGAATAAAGAGTACCGTCTGG
CGACCAACGCTTCGCAGCGGGTGTGAGAAAAATCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTCCG

TAATCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACAAGGGTATCACTAACCAAGTGCAAG
 ATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTTATTGGTTCCACCAGTTCAACAATA
 TTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGCCTACTTTGGG
 CTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGTTCGATGATGGTTGGGGCGAACGTCCTCGCTG

**SEQ ID NO:4. Сконструированная последовательность
 нуклеиновой кислоты ВоNT/A1 «Cat-A».**

MPFVVKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGMQPVKAFKIHNKIWVPERDTFTNPEEGDLN
 PPPEAKQVPVSYDYDSTYLSTDNEKDNLYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPIFWGGSTID
 TELKVIDTNCINVIQPDGYSRSEELNLVIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLRNGYGSTQYIRF
 SPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIIHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYE
 MSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNV
 FKEKYLLEDSTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDAVFKINIVP
 KVNYYIYDGFNLRNNTLANFNGQNTENNMNFTKLNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDK
 GYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNEAAEENISLDLIQQYYLTFNF
 DNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIEFPNGKKEYELDKYTMFHYLRAQEFHKGSRIALTNSV
 NEALLNPSRVYTFSSDYVKVKNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPY
 IGFALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTDNALS
 KRNEKWDEVYKIVTNWLAKVNTQIDLIRKMKKEALENQAEATKAIINYQNYTEEEKNNINF
 NIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLNMNMPYGVKRLDFDASLKDALLKYIYDNRG
 TLIGQVDRDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESKHLIDL
 RYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKKAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNKI
 SLNNEYTIINCMENNSGWKVS LN YGEI IWTLQDTKEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTIT
 NNRLNKSIIYINGRLIDQKPI SNLGN I HASNKIMFKLDGCRDTHRYIWI KYFNLFDKELNEKEI
 KDLYDNQSN S GILKDFWGDY LQYDKPY YMLNLYDPNKYVDVNNVGI RGYMYLKGPRGSVMTTNI
 YLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNDRVYINVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIP
 DVGNLSQVVMKSKNDKGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNI AKLVASN WYNRQIERSR
 TLGCSWEFIPVDDGWGERPL

**SEQ ID NO:5. Сконструированная последовательность
 нуклеиновой кислоты ВоNT/A1 «Cat-B».**

ATGCCATTCTGTCACAAGCAATTCAACTACAAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCA
 TACATCAAGATCCGAACCGCGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTAAGATCCACAACAAGA
 TTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACCTCACGAACCCGGAAGAAGGCGATCTGAACCCGCCACC
 GGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCTAGCTACTACGATTCGACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAA
 GATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTCGAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTCGCA
 TGCTGTGACTAGCATTGTTCCGCGTATCCCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACCGAACT
 GAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAG

CTGAATCTGGTCATCATTGGCCCCGAGCGCAGACATTATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTTTGGTC
ACGAGGTTCTGAATCTGACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTGTTTTTCGCCGGA
TTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCGGGCAA
TTGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCATGAACTGATCCACGCAGGCCACCGCCTGTACG
GCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATGAGCGG
CCTGGAAGTCAGCTTCGAAGAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACAGC
TTGCAAGAGAATGAGTTCGGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGA
ACAAGGCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTTTAAAGA
GAAGTACCTGCTGTCGAGGATACTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAAA
CTGTACaAGATGCTGACCAGATTTACACCGAGGACAACTTTGTGAAATTCCTCAAAGTGTGA
ATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTTTTCAAGATTAACATCGTGCCGAAGGTGAA
CTACACCATCTATGACGGTTTTAACCTGCGTAACACCAACCTGGCGGCGAACTTTAACGGTCAG
AATACGGAAATCAACAACATGAATTTACGAAGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTCGAGTTCT
ATAAGCTGCTGTGCGTGGCGGTATCATCACCAGCAAACCAAAGCCTGGACAAAGGCTACAA
CAAGGCGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATGGGATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAA
GATAATTTTACCAACGACCTGAACAAGGTTGAAGAAATCACCAGCGATACGAATATTGAAGCAG
CGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCTGACCTTTAACTTCGACAATGA
ACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATTATCGGTGAGCTGGAAGTATGACCG
AATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCATTACC
TGCGTGCACAGGAGTTTGAACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGC
CCTGCTGAACCCGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAA
GCCACTGAGGCCGCGATGTTCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGAGA
CGAGCGAAGTGAAGCACTACCGACAAAATGCTGATATTACCATCATTATCCCGTATATTGGTCC
GGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGACGATTTTGTGGGTGCCCTGATCTTCTCCGGT
GCCGTGATCTGCTGGAGTTCATCCGGAGATTGCGATCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTGG
TGTCTACATCGCGAATAAGGTTCTGACGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTGAAACGTAA
TGAAAAATGGGACGAGGTTTACAAATACATGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAG
ATCGACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAA
TTATCAACTACCAATACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAGAATAACATTAACCTCAATATCGA
TGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTG
AATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATGATTCCGTATGGCGTCAAACGCTCTGGAGG
ACTTCGAGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGACAaTCGTGGTACGCTGAT
TGGCCAAGTTGACCGCTTGAAGACAAAGTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCATTTCAA
CTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCA
TCAATACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGC
TAGCAAGATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTG

TTTAATCTGGAATCGAGCAAAATGAGGTTATCCTGAAAAAGCCATTGTCTACAACCTCCATGT
 ACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTTCGCATCCCAGAAATACTTCAAGAAGATTAGCCTGAA
 CAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACATAT
 GGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGACACCAAAGAGATCAAGCAGCGCGTGTCTCAAGTACT
 CTCAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCG
 TCTGAATAAGAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTG
 GGTAATATCCACGCAAGCAACAAGATTATGTTCAAATGGACGGTTGCCGCGATACCCATCGTT
 ATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTGATAAAGAAGTGAATGAGAAGGAGATCAAAGATTT
 GTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGGGGCGATTATCTGCAATACGAT
 AAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAATATGTGGATGTCAATAATGTGGGTA
 TTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTGAA
 CTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAAC
 ATGTGCGTAATAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTGTGGAAGATAAAGAGTACCGTCTGG
 CGACCAACGCTTCGCAGGCGGGTGTGAGAAAATCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTCTGG
 TAATCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACAAGGGTATCACTAACAAGTGAAG
 ATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTTATTGGTTTCCACCAGTCAACAATA
 TTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGCCGTACTTTGGG
 CTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGATGATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

**SEQ ID NO: 6. Сконструированная последовательность
 нуклеиновой кислоты BoNT/A1 «Cat-B».**

MPFVNKQFNYPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWI PERDTFTNPEEGDLN
 PPPEAKQVPVSYDYDSTYLSTDNEKDNLYKGVTKL FERIYSTDLGRMLLTSIVRGI PFWGGSTID
 TELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVI IGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYSTQYIRF
 SPDFTFGFEESELDVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIIHAGHRLYGI AINPNRVFKVNTNAYYE
 MSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIAS TLNKAKSIVGTTASLQYMKNV
 FKEKYLSEDTSGKFSVDKLFKLYKMLTEIYTEDNFVKFKVLRKTYLNFDKAVFKINIVP
 KVNYYTYDGFNLRNTNLAANFNGQNT EINNMFNFKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIIITSKTKSLDK
 GYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNI EAAEENISLDLIQQYYLTFNF
 DNEPENIS IENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFHKGSRIALTNSV
 NEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETVSEVSTTDKIADITIIIPY
 IGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTDNALS
 KRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQA EATKAIINYQYNYTEEEKNNINF
 NIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRL EDFDASLKDALLKYIYDNRG
 TLLIGQVDRKDKVNNLTSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLS
 RYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKKAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFKKI
 SLNNEYTIINCMENNSGWKVS LNYGEI IWTLQDTKEIKQRVVFYKYSQMINISDYINRWIFVTIT

NNRLNLSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNKIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEI
 KDLYDNQSNISGILKDFWGDYLYDKPYMLNLYDPNKYVDVNNVQIRGYMYLKGRGSMVTNII
 YLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIP
 DVGNLQVVMKSKNDKGITNKCKMNLQDNNNGNDIGFIFGHQFNNAIKLVASNWYNRQIERSR
 TLGCSWEFIPVDDGWERPL

**SEQ ID NO: 7. Сконструированная последовательность
 нуклеиновой кислоты ВоNT/A1 «Cat-C».**

ATGCCATTTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCA
 TACATCAAGATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAGATCCACAACAAGA
 TTTGGGTATCCCGGAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAAGAAGGGATCTGAACCCGCCACC
 GGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTGAGCTACTACGATTCGACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAA
 GATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTGCAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTGCGA
 TGCTGCTGACTAGCATTGTTCCGCGGTATCCCGTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACCGAACT
 GAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAG
 CTGAATCTGGTCATCATTGGCCCCGAGCGCAGACATTATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTTTGGTC
 ACGAGGTTCTGAATCTGACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTCGTTTTTCGCCGGA
 TTTTACCTTCGCTTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCGGGCAAA
 TTCGCTACCGATCCGGCTGTGACGCTGGCCATGAACGATCCACGCAGGCCACCGCCTGTACG
 GCATTCGCATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATGAGCGG
 CCTGGAAGTCAGCTTCGAAGAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACAGC
 TTGCAAGAGAATGAGTTCGCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGA
 ACAAGGCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTTAAAGA
 GAAGTACCTGCTGTCCGAGGATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAAA
 CTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGACAACCTTTGTGAAATCTTCAAAGTGTGTA
 ATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAAGCGGTTTTCAAGATTAACATCGTGCCGAAGGTGAA
 CTACACCATCTATGACGGTTTTAACCTGCGTAACACCAACCTGGCGGCGAACCTTAACGGTCAG
 AATACGGAAATCAACAACATGAATTTACGAAGTTGAAGAATTCACGGGTCTGTTGAGTTCCT
 ATAAGCTGCTGTGCGTGCAGGATCATCACCAGCAAAACCAAAAGCCTGGACAAAAGGCTACAA
 CAAGGCGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAACAATGGGATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAA
 GATAATTTTACCAACGACCTGAACAAGGTTGAAGAAATCACCGGATACGAATATTGAAGCAG
 CGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCTGACCTTTAACTTCGACAATGA
 ACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATTATCGGTGACGCTGGAACCTGATGCCG
 AATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCATTACC
 TGCGTGCACAGGAGTTTGAACACGGTAAAAGCCGATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGC
 CCTGCTGAACCCGAGCGGTGCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAA
 GCCACTGAGGCCCGCATGTTCCCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGAGA

CGAGCGAAGTGAGCACTACCGACAAAATTGCTGATATTACCATCATTATCCCGTATATTGGTCC
GGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGACGATTTTGTGGGTGCCCTGATCTTCTCCGGT
GCCGTGATTCTGCTGGAGTTCATTCCGGAGATTGCGATCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTGG
TGTCCCTACATCGCGAATAAGGTTCTGACGGTTCAGACCATCGATAACCGCTGTGCGAAACGTAA
TGAAAAATGGGACGAGGTTTACAAATACATTGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAG
ATCGACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAAGCAA
TTATCAACTACCAATACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAGAATAACATTAACTTCAATATCGA
TGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTTG
AATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATGATTCCGTATGGCGTCAAACGTCTGGAGG
ACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGACAATCGTGGTACGCTGAT
TGGCCAAAGTTGACCGCTTGAAAGACAAAGTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCATTTCAA
CTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAAATCA
TCAACTAGCATCTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGC
TAGCAAGATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTG
TTAATCTGGAATCGAGCAAAAATTGAGGTTATCCTGAAAAAGGCCATTGTTCTACAACCTCATGT
ACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTTCGCATCCCGAAATACTTCAACAAGATTAGCCTGAA
CAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTAT
GGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGACACCAAAGAGATCAAGCAGCGCTGTTCTCAAGTACT
CTCAAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCG
TCTGAAGAAGAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTG
GGTAATATCCACGCAAGCAACAAGATTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCATCGTT
ATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAAGTGAATGAGAAGGAGATCAAAGATTT
GTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGGGGCGATTATCTGCAATACGAT
AAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAATATGTGGATGTCAATAATGTGGGTA
TTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTGAA
CTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAAC
ATTGTGCGTAATAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCGTGAAGAATAAAGAGTACCGTCTGG
CGACCAACGCTTCGCAGGCGGGTGTGAGAAAATCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTCCG
TAATCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACAAGGGTATCACTAACAAGTGCAAG
ATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTTATTGGTTTCCACCAGTTCAACAATA
TTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGCCGACTTTGGG
CTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGTTCGATGATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

**SEQ ID NO: 8. Сконструированная аминокислотная
последовательность BoNT/A1 «Cat-C».**

MPFVNKQFNYPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWVPERDFTNP EEGDLN
PPPEAKQVPVSYDSTYLS TDNEKDNYLKGVTKL FERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTID

TELKVIDTNCINVIQPDGYSRSEELNLVIGPSADIIQFECKSGHEVLNLRNGYGSTQYIRF
 SPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYE
 MSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNV
 FKEKYLLEDSTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVP
 KVNYYTYDGFNLRNTNLAANFNGQNTENNMNFTKLNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDK
 GYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNEAAEENISLDLIQQYYLTFNF
 DNEPENISLENLSSDIIGQLELMPNIEFPPNGKKEYELDKYTMFHYLRAQEFHEHGKSRIALTNSV
 NEALLNPSRVYTFSSDYVKVKNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPY
 IGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTI DNALS
 KRNEKWDEVYKIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINP
 NIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLDFDASLKDALLKYIDNDRG
 TLIGQVDRLLKDKVNNLSTDIPIFQLSKYVDNQRLSFTFEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDL
 RYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKKAIVYNSMYENFSTSFWRIRPKYFNKI
 SLNNEYTIINCMENNSGWKVS LN YGEIITWTLQDTKEIKQRVVKYSQMINISDYINRWIFVTTT
 NNRLKKSKEYINGRLIDQKPI SNLGNIHASNKIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEI
 KDLYDNQSNGLKDFWGDYLYDKPYMLNLYDPNKYVDVNNVVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNI
 YLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIP
 DVGNSQVVMKSKNDKGI TNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNAKLVASNWYNRQIERSSR
 TLGCSWEFIPVDDGWGERPL

**SEQ ID NO: 9. Сконструированная последовательность
 нуклеиновой кислоты BoNT/A1 «Cat-D».**

ATGCCATTTCGTCACAAGCAATTCAACTACAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCA
 TACATCAAGATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTAAGATCCACAACAAGA
 TTTGGGTATCCCGGAGCGTGACACCTCACGAACCCGGAAGAAGGCGATCTGAACCCGCCACC
 GGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTGACGTACTACGATTCGACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAA
 GATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTGCAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTCCGA
 TGCTGCTGACTAGCATTGTTGCGCGGTATCCCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTCACCCGAACT
 GAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAG
 CTGAATCTGGTCATCATTGGCCGAGCGCAGACATTATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTTTGGTC
 ACGAGGTTCTGAATCTGACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTCGTTTTTCGCCGGA
 TTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCGGGCAA
 TTCGCTACCGATCCGGCTGTACGCTGGCCATGAACTGATCCACGCAGGCCACCGCCTGTACG
 GCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATGAGCGG
 CCTgGAAGTCAGCTTCGAAGAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACAGC
 TTGCAAGAGAATGAGTTCGGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTCGAAGCACGTTGA
 ACAAGGCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTTCGTTGAGTATATGAAGAATGTGTTAAAGA

GAAGTACCTGCTGTCCGAGGATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAAA
CTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGACAACCTTTGTGAAATCTTCAAaGTGTTGA
ATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTTTTCaAGATTAACATCGTGCCGAAGGTGAA
CTACACCATCTATGACGGTTTTAACCTGCGTAACACCAACCTGGCGGCGAACTTTAACGGTCAG
AATACGGAAATCAACAACATGAATTTACGAAGTTGAAGAACTTACGGGTCTGTTTCGAGTTCT
ATAAGCTGCTGTGCGTGCGGGTATCATCACCAGCAAAACAAAAGCCTGGACAAAAGGTACAA
CAAGGCGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATTGGGATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAA
GATAATTTTACCAACGACCTGAACAAGGGTGAAGAAATCACCAGCGATACGAATATTGAAGCAG
CGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCTGACCTTTAACTTCGACAATGA
ACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATTATCGGTGAGCTGGAAGTGTGCGG
AATATCGAACGTTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCATTACC
TGCGTGACAGGAGTTTGAACCGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGC
CCTGCTGAACCCGAGCCGTGTCTATACCTTCTTACGACGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAA
GCCACTGAGGCCGCGATGTTCTGGGCTGGGTGGAAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGAGA
CGAGCGAAGTGAGCACTACCGACAAAaTTGCTGATaTTACCATCATTATCCCGTATATTGGTCC
GGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGACGATTTTGTGGGTGCCCTGATCTTCTCCGGT
GCCGTGATTCTGCTGGAGTTTATCCGGAGATTGCGATCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTGG
TGCTCTACATCGGAATAAGGTTTCTGACGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCGAAACGTAA
TGAAAATGGGACGAGGTTTACAAATACATTGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCaATACCCAG
ATCGACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGGGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAGCAA
TTATCAACTACCAATACAACAGTACACGGAAGAAGAGAAGAATAACATTAACTTCAATATCGA
TGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTTG
AATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATGATTCGATGGCGTCAAACGTCTGGAGG
ACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGACAATCGTGGTACGCTGAT
TGGCCAAGTTGACCGCTTGAAGACAAAAGTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCATTTCAA
CTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGCTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCA
TCAATACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATtGATCTGAGCCGTTATGC
AAGCAAGATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTG
TTTAATCTGGAATCGAGCAAAATTGAGGTATCCTGAAAACGCCATTGCTTACAACCTCCATGT
ACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTGCGATCCCGAAAATACTTCAACAGCATTAGCCTGAA
CAACGAGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACTAT
GGTGAGATCATTTGGACCTTGACAGACACCCAAGAGATCAAGCAGCGCGTGTGTTCAAGTACT
CTCAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCG
TCTGAATAACAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTG
GGTAATATCCACGCAAGCAACAACATTTATGTTCAAATTGGACGGTTGCCGCGATACCCATCGTT
ATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAAGTGAATGAGAAGGAGATCAAAGATTT

GTATGACAACCAATCTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTCTGGGGCGATTATCTGCAATACGAT
 AAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAATATGTGGATGTCAATAATGTGGGTA
 TTCGTGGTTACATGTATTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTGAA
 CTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAAC
 ATTTGTGCGTAATAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCTGTAAGCGTAAAGAGTACCGTCTGG
 CGACCAACGCTTCGCAGCGGGTGTGAGAAAATCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTCGTGTCCG
 TCGTCTGAGCCAAGTCTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACCAGGGTATCACTAACAAAGTGAAG
 ATGAACCTGCAAGACCGTCTGGTAACGACATCGGCTTTATGGTTCCACCAGTCAACAATA
 TTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCGTAGCCGCTGTTGGG
 CTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGTCTGATGATGGTTGGGGCGAACGTCCTCGCTG

SEQ ID NO:10. Сконструированная аминокислотная
 последовательность BoNT/A1 «Cat-D».

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMFPVKAFKIHNKIWIWIPERDFTFNPEEGDLN
 PPPEAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNLYKGVTKLFEIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTID
 TELKVIDTNCINVIQPDGYSRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGEVNLNLRNGYSTQYIRF
 SPDFTFGFEESLEVDNPLLGAGKFDPAVTLAHELIIHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYE
 MSCLEVVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIASTLNKAKSIVCTTAGLQYMKNV
 FKEKYLSEDTSGKFSVDKLFKLYKMLTEIYTEDNFVFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVP
 KVNVTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTENNMNFTKLNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDK
 GYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEETSDTNEAAEENISLDLIQQYYLTFNF
 DNEPENIS IENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKEYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSV
 NEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPY
 IGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALS
 KRNEKWDEVYKIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINF
 NIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLDFDASLKDALLKYIYDNRG
 TLIGQVDRLLKDKVNNLSTDIQFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDL
 RYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSI
 SLNNEYTIINC MENNSGWKVS LNYGEI IWTLQDTQEIKQRVVFYKYSQMINISDYINRWIFVTIT
 NNRLNNSKIYINGRLIDQKPI SNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEI
 KDLYDNQNSGILKDFWGDYLYDKPYMLNLYDPNKYVDVNNVGI RGYMYLKGPRGSMVTNI
 YLNSSLYRGTKFI IKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKRKEYRLATNASQAGVEKILSALEIP
 RVRRLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDRRGNDIGFIGFHQFNNAKLVASNWNRYQIERRSR
 RLGCSWEFIPVDDGGERPL

Примеры

Нижеследующие примеры приводятся в целях иллюстрации конкретных вариантов осуществления изобретения и не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения, заявленного в формуле изобретения.

Пример 1.

Было получено три различных варианта сконструированной молекулы BoNT/A1 в соответствии с настоящим изобретением.

Аминокислоты для модификации (в сайтах мутации) были выбраны с учетом ряда различных критериев.

Замены остатков были осуществлены по следующим критериям:

1. Тип остатка;
2. Степень доступности остатка на поверхности;
3. Локализация во вторичной/третичной структуре;
4. Локализация известных функциональных доменов BoNT;
5. Степень консервативности последовательностей для подтипов BoNT/A или BoNT/E;
6. Возможность введения дополнительного сайта убихитинизации.

В этом примере для мутации были выбраны аспарагин (Asn, N) и глутамин (Gln, Q), поскольку они являются полярными, имеют размер, аналогичный размеру Lys, образуют только слабые дипольные связи с другими остатками и составляют 14% от всех остатков в молекуле.

Остатки Asn и Gln, которые визуальным образом обнаруживаются на поверхности молекулы, были идентифицированы по кристаллической структуре BoNT/A1 (PDB ID: 3BTA). Это означает, что все замененные остатки имеют внешний заряд. Из этого списка можно исключить те остатки, которые являются наименее подходящими для замены в соответствии с пп.3-5 вышеуказанных критериев отбора (операция повторной итерации).

Неконсервативные остатки в BoNT/A1 были идентифицированы посредством их выравнивания с остатками в BoNT/A других подтипов и функционально аналогичных серотипов BoNT/E. Остатки, выяв-

ленные как основные остатки в других последовательностях, были выбраны как наилучшие кандидаты для замены.

После проведения последовательных раундов итерации в соответствии с критериями отбора, указанными в разделах, приведенных выше, был идентифицирован конечный список остатков-кандидатов. Эти остатки были скринированы на возможное присутствие дополнительных консенсусных последовательностей убихитинизации (с использованием сервера CKSAAP_UbSite). Несколько идентифицированных остатков лизина были удалены путем их замены на аргинин.

Конечные репрезентативные синтезированные катионные конструкции, имеющие последовательности VoNT/A1, перечислены ниже и обозначены Cat-A, Cat-B и Cat-C. Каждая конструкция имеет молекулярную массу 149637 Дальтон.

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

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

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

Пример 2.

Аминокислотные последовательности VoNT/B, F и E были оценены на остатки-кандидаты, которые могут быть заменены остатками Lys или Arg. Такая предварительная оценка позволяет идентифицировать остатки, которые могут быть заменены с получением белка VoNT/B, E или F, имеющего более высокую pI.

Была проанализирована первичная последовательность VoNT/B (Ac: P10844), VoNT/E (Ac: Q00496) и VoNT/F (Ac: P30996), и аминокислотный состав этой последовательности систематизирован в нижеприведенной таблице:

Таблица 3

Серотип	Теоретический	Суммарный заряд	No. Asn и	No. Asp и
	pI	при pH 7,4	Gln	Glu
VoNT/B	5,3	-23	179	156
VoNT/E	6,2	-7	160	132
VoNT/F	5,4	-22	169	161

Как видно из таблицы, указанные аминокислотные последовательности имеют такое же большое число полярных остатков Asn/Gln, как это наблюдается в VoNT/A1. В этих последовательностях также присутствует относительно большое число кислотных (Asp/Glu) остатков, которые могут быть заменены либо соответствующими нейтральными остатками (Asn/Gln), либо основными остатками (Lys или Arg).

Пример 3. Идентификация предпочтительных для модификации аминокислот токсина клостридий

Для последовательностей VoNT/A, VoNT/B и VoNT/E имеются данные об их полноразмерной структуре, однако для остальных четырех серотипов, исходя из информации о последовательностях и их структурной гомологии, была построена теоретическая модель с помощью компьютерной программы LOORP.

Каждая структура была проанализирована с помощью программы AreaMol (входящей в пакет программ CCP4), и доступные остатки были идентифицированы как остатки, имеющие суммарное число более, чем 40. Из этого списка были выбраны остатки с полярными боковыми цепями, и было отдано предпочтение остаткам, которые являются либо кислотными (Asp и Glu), либо имеют акцепторную боковую цепь с H-связью (Asn и Gln). Конечная стадия компьютерного анализа включает отбор остатков, находящихся между α -спиралями и β -цепями, по данным анализа, проводимого на сервере Stride. Структура каждой молекулы была визуально оценена для идентификации остатков, находящихся в пограничных областях, и эти остатки отбрасывали.

Для VoNT/A1 список предпочтительных остатков был дополнен функционально неконсервативными остатками, составляющими по меньшей мере 90% от всех остатков сопоставляемых последовательностей [остатки с крупными неполярными боковыми цепями (Met, Pro, Phe, Trp) рассматривались как эквивалентные; остатки с небольшими неполярными боковыми цепями (Gly, Ala, Val, Leu, Ile) рассматривались как эквивалентные; остатки с кислотными боковыми цепями (Asp, Glu) рассматривались как эквивалентные; и остатки с основными боковыми цепями (Arg, Lys) рассматривались как эквивалентные]. Более конкретно, эти неконсервативные остатки, которые были идентифицированы как основные остатки, составляющие по меньшей мере 10% от всех остатков в последовательностях, и неконсервативные остатки Asn, Gln, Asp или Glu, присутствующие в исходной последовательности, были выбраны в качестве кандидатов.

Для оставшихся серотипов было проведено выравнивание множества последовательностей различных подтипов в целях выявления функционально неконсервативных остатков, которые были идентифицированы как основные остатки, составляющие по меньшей мере 10% от всех остатков в последовательностях.

Ниже представлены предпочтительные для модификации аминокислоты токсина клостридий:

039105

BoNT/A:

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

BoNT/B:

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

BoNT/C₁:

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

BoNT/D:

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

BoNT/E:

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

BoNT/F:

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

BoNT/G:

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

TeNT:

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

Используемые последовательности: Идентификационные номера:

BoNT/A: P10845
BoNT/B : P10844
BoNT/C₁ P18640
BoNT/D: P19321
BoNT/E: Q00496
BoNT/F: YP_001390123
BoNT/G: Q60393
TeNT: P04958

Источник получения структурных данных

Кристаллические структуры BoNT/A (3BTA.pdb), BoNT/B (1EPW) и BoNT/E (3FFZ.pdb) были получены от RCSB.

Моделирование гомологии BoNT/C₁, BoNT/D, BoNT/F, BoNT/G и TeNT осуществляли с использованием программы LOOPP и следующих последовательностей соответственно: P18640, P19321, YP_001390123, Q60393 и P04958.

Структурный анализ

Доступные остатки определяли с использованием программы AreaIMol, входящей в пакет программ CCP4.

Присваивание вторичной структуры осуществляли с использованием программы Stride.

Пограничные остатки определяли путем визуальной оценки с использованием программы RasMol.

Анализ последовательностей

Полноразмерные последовательности VoNT были получены от NCBI.

Выравнивание проводили с использованием компьютерной программы ClustalX.

Пример 4. Клонирование, экспрессия и очистка

ДНК-конструкции, кодирующие сконструированные молекулы VoNT/A, описанные в примере 1, синтезировали, клонировали в экспрессионный вектор pJ401, а затем переносили в BL21 (DE3) E. coli. В результате была достигнута сверхэкспрессия растворимых рекомбинантных белков Cat-A, Cat-B и Cat-C в BL21(DE3) E.coli.

Рекомбинантно сконструированные VoNT очищали из лизатов E.coli классическими методами хроматографии. Сначала осуществляли стадию очистки с использованием катионообменной смолы, а затем осуществляли стадию промежуточной очистки с использованием гидрофобной смолы. После этого, рекомбинантный одноцепочечный сконструированный VoNT расщепляли посредством протеолиза, в результате чего получали активированный двухцепочечный VoNT. Затем проводили конечную стадию очистки для удаления остальных примесей.

Пример 5. Характеризация очищенных сконструированных VoNT

Сконструированные VoNT, описанные выше в примере 1, характеризовали экспериментально способом, описанным ниже.

Измерение pI показало, что сконструированные VoNT имели более высокое значение изоэлектрической точки, чем немодифицированный (нативный) VoNT/A1 - см. фиг. 1 и таблицу, представленную ниже.

Таблица 4

Молекула VoNT/A1	pI (вычисленная)	pI (наблюдаемая)
Сконструированная «Cat-A» [Cat5v2 (K1064H/N886K)]	6,9	~ 8,0
Сконструированная «Cat-B» [Cat5v2 (K1064H/N954K)]	6,9	~ 8,0
Сконструированная «Cat-C» [Cat5v2 (K1064H/N1025K)]	6,9	7,8-8,0
Нативная VoNT/A1 [nVoNT/A1]	6,05	~ 7,4

Способность сконструированных VoNT проникать в нейроны и расщеплять SNAP-25 (мишень для VoNT/A1) оценивали с использованием нейронов спинного мозга крысиных эмбрионов (eSCN). На фиг. 2 показано, что сконструированные VoNT сохраняли такую же способность проникать в нейрон и расщеплять SNAP-25, как и нативный VoNT/A1.

Активность сконструированных VoNT дополнительно оценивали с помощью анализа, проводимого с использованием правого или левого купола мышинового диафрагмального нерва (mPNHD). На фиг. 3 показано, что сконструированные VoNT сохраняли такую же способность ингибировать сокращение правого или левого купола мышины диафрагмы, как и нативный VoNT/A1.

Был проведен *in vivo* анализ методом оценки абдукции пальцев задних конечностей (DAS) для определения активности, а также коэффициента безопасности сконструированного VoNT по сравнению с активностью и коэффициентом безопасности нативного VoNT/A1. Обе эти молекулы имели более высокий коэффициент безопасности, чем нативный VoNT/A1, и были несколько более активными. Полученные данные представлены ниже (табл. 4).

Таблица 4

Молекула	DAS ED ₅₀ (пг/мышь)	Доза DAS 4 (пг/мышь)	Доза для -10% ΔBW (пг/мышь)	Коэффициент безопасности
Нативная BoNT/A1 (n=5)	2	10-20	9, 9-14, 5	7
Сконструированная «Cat-A»	1, 16	10-20	27, 4	24
Сконструированная «Cat-B»	1, 79	25	47, 6	27

DAS ED₅₀: Вычисленная доза, индуцирующая DAS 2

Доза DAS 4: Экспериментальная доза, индуцирующая DAS 4

BW: Масса тела

Доза для - 10% ΔBW: Вычисленная доза, вызывающая 10% снижение BW по сравнению с BW на день 0

Коэффициент безопасности: Доза для - 10% ΔBW/DAS ED₅₀

Коэффициент безопасности представляет собой показатель негативного эффекта после введения BoNT (потеря массы) по отношению к активности BoNT (полумаксимальная оценка абдукции пальцев задних конечностей (DAS)). Этот коэффициент был вычислен как отношение - 10% массы тела (BW) к DAS ED₅₀, где - 10% BW означает количество BoNT (пг/животное), необходимое для 10% снижения массы тела, а ED₅₀ означает количество BoNT (пг/животное), достаточное для достижения DAS=2.

Анализ DAS осуществляли путем инъекции 20 мкл сконструированного токсина клостридий, приготовленного в желатин-фосфатном буфере, в икроножную мышцу/солнечное сплетение мыши, с последующей оценкой абдукции пальцев задних конечностей, проводимой как описано ранее в публикации Aoki (Aoki KR, Toxicon 39: 1815-1820; 2001).

Пример 6.

Другой сконструированный токсин клостридий согласно изобретению получали в соответствии с критериями, указанными выше в примере 1.

Эта катионная конструкция также происходила от BoNT/A1 и имела вычисленную pI=7,4 и молекулярную массу 149859. Данную конструкцию обозначали Cat-D. Конструкции Cat-A, Cat-B и Cat-C содержали остатки, замененные лизином, а Cat-D содержал остатки, замененные аргинином.

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

Пример 7. Лечение пациентки, страдающей шейной дистонией

50-летняя женщина, страдающая спастической кривошеей, находилась на стационарном лечении в клинике, где она проходила курс лечения путем введения в шейную мышцу терапевтически эффективного количества стандартного препарата BoNT/A, однако у этой пациентки наблюдалась дисфагия, вызванная распространением токсина в область ротоглотки. Этой пациентке в шейные мышцы вводили инъекцию приблизительно 1,5 нг (или более) сконструированного BoNT/A согласно изобретению. Через 3-7 дней, степень кривошеи у пациентки значительно снижалась, при этом какой-либо дисфагии не наблюдалось, и пациентка могла держать голову и плечи в нормальном положении по меньшей мере в течение пяти месяцев. Так как сконструированная молекула BoNT/A ударживалась в ткани в течение более длительного периода времени и почти не проникала в другие органы, то лечащий врач может назначить введение большего количества лекарственного продукта без какого-либо опасения возникновения побочных эффектов, и такое увеличение дозы будет обеспечивать более длительное действие препарата.

Пример 8. Лечение пациента, страдающего блефароспазмом

47-летний мужчина, страдающий блефароспазмом, находился в клинике на стационарном лечении. Этому пациенту было назначено лечение путем инъекции 5-25 пг сконструированного BoNT/A согласно изобретению в латеральную мышцу предплюсневой кружка верхнего века и в латеральную мышцу предплюсневой кружка нижнего века. Приблизительно через неделю у этого пациента наблюдалось ослабление симптомов, а по меньшей мере через пять месяцев симптомы данного заболевания полностью исчезали, при этом блефароптоза не наблюдалось. Высокий уровень безопасности полипептида согласно изобретению позволял лечащему врачу повышать дозу этого полипептида и, тем самым, увеличивать продолжительность его клинического эффекта.

Пример 9.

27-летний мужчина, страдающий церебральным параличом, при котором наблюдались такие симптомы, как деформированная "конская стопа" и затруднение при ходьбе, находился в клинике на стационарном лечении. Этот пациент проходил лечение терапевтически эффективным BoNT/A, в результате чего наблюдалось улучшение его походки, но это улучшение сопровождалось мышечной слабостью и болями в конечностях. Данному пациенту было назначено лечение путем инъекции приблизительно 20

пг/кг сконструированного ВоNT/A согласно изобретению в каждый из двух участков медиального и латерального купола икроножной мышцы пораженной(ых) нижней(их) конечности(ей). Через неделю походка у пациента улучшалась, и при этом не наблюдалось каких-либо явных побочных эффектов, а по меньшей мере через четыре месяца симптомы этого заболевания полностью исчезали. Возможность увеличения дозы этого лекарственного средства позволяла продолжать лечение и, тем самым, увеличивать продолжительность его действия.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сконструированный терапевтический нейротоксин клостридий, содержащий от 1 до 80 аминокислотных модификаций, расположенных в N_{CN} -домене токсина клостридий, где указанные от 1 до 80 аминокислотных модификаций увеличивают изоэлектрическую точку (pI) сконструированного нейротоксина до величины, которая по меньшей мере на 0,2 единицы выше, чем pI какого-либо другого аналогичного токсина клостридий, не содержащего по меньшей мере от одной до 80 аминокислотных модификаций,

где указанный сконструированный токсин представляет собой сконструированный ботулинический нейротоксин А (ВоNT/A) и от 1 до 80 аминокислотных модификаций содержат модификацию по меньшей мере одной расположенной на поверхности

кислой аминокислоты, выбранной из GLU 920, GLU 992, ASP 1058, GLU 1081, GLU 1083 и ASP 1086; и/или

незаряженной аминокислоты, выбранной из ASN 886, ASN 905, GLN 915, ASN 918, ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, GLN 995, ASN 1006, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1032, ASN 1043, ASN 1046, ASN 1052, HIS 1064 и ASN 1080,

где указанный сконструированный нейротоксин имеет изоэлектрическую точку (pI) по меньшей мере 6,6,

при этом указанные от 1 до 80 аминокислотных модификаций содержат замену кислотного аминокислотного остатка основным аминокислотным остатком, выбранным из лизина и аргинина; замену кислотного аминокислотного остатка незаряженным аминокислотным остатком, выбранным из гистидина, аспарагина, глутамина, серина, треонина, тирозина, метионина, триптофана, цистеина, аланина, глицина, валина, лейцина, изолейцина, пролина и фенилаланина; и замену незаряженного аминокислотного остатка основным аминокислотным остатком, выбранным из лизина и аргинина,

где сконструированный нейротоксин имеет коэффициент безопасности, равный по меньшей мере 8, где коэффициент безопасности вычисляют как дозу токсина, необходимую для -10% изменения массы тела (пг/мышь) и деленную на ED_{50} (пг/мышь) по DAS, где ED_{50} равна дозе, необходимой для получения оценки по DAS, равной 2, и

где указанный сконструированный нейротоксин, кодируемый нуклеотидной последовательностью, имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 3, 5 и 7, или

где указанный сконструированный нейротоксин содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 4, 6 и 8.

2. Сконструированный нейротоксин по п.1, где указанные от 1 до 80 аминокислотных модификаций увеличивают pI сконструированного нейротоксина до величины, которая по меньшей мере на 0,5 единицы выше, чем pI какого-либо другого аналогичного нейротоксина клостридий, не содержащего указанные от 1 до 80 аминокислотных модификаций.

3. Сконструированный нейротоксин по п.1 или 2, где указанные от 1 до 80 аминокислотных модификаций увеличивают pI сконструированного нейротоксина до величины, которая по меньшей мере на одну единицу выше, чем pI какого-либо другого аналогичного нейротоксина клостридий, не содержащего указанные от 1 до 80 аминокислотных модификаций.

4. Сконструированный нейротоксин по любому из предшествующих пунктов, где указанные от 1 до 80 аминокислотных модификаций увеличивают pI сконструированного нейротоксина до величины, которая по меньшей мере на две единицы выше, чем pI какого-либо другого аналогичного нейротоксина клостридий, не содержащего указанные от 1 до 80 аминокислотных модификаций.

5. Сконструированный нейротоксин по любому из предшествующих пунктов, где указанные от 1 до 80 аминокислотных модификаций увеличивают pI сконструированного нейротоксина до величины, которая по меньшей мере на 2-5 единиц выше, чем pI какого-либо другого аналогичного нейротоксина, не содержащего указанные аминокислотные модификации.

6. Сконструированный нейротоксин по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что имеет pI от 7 до 9.

7. Сконструированный нейротоксин по п.6, отличающийся тем, что имеет pI от 8 до 9.

8. Сконструированный нейротоксин по любому из предшествующих пунктов, где от 1 до 80 аминокислотных модификаций содержат замену остатком лизина или остатком аргинина.

9. Сконструированный нейротоксин по любому из предшествующих пунктов, где сконструированный нейротоксин содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию, расположенную в H_{CN}-домене токсина клостридий.

10. Сконструированный нейротоксин по любому из предшествующих пунктов, где сконструированный нейротоксин содержит модификацию следующих семи аминокислот: ASN 886, ASN 930, SER 955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052 и GLN 1229, где указанная модификация содержит замену аминокислот остатком лизина или остатком аргинина.

11. Сконструированный нейротоксин по любому из пп.1-9, где сконструированный нейротоксин содержит модификацию следующих семи аминокислот: ASN 930, ASN 954, SER 955, GLN 991, ASN 1026, ASN 1052 и GLN 1229, где указанная модификация содержит замену аминокислот остатком лизина или остатком аргинина.

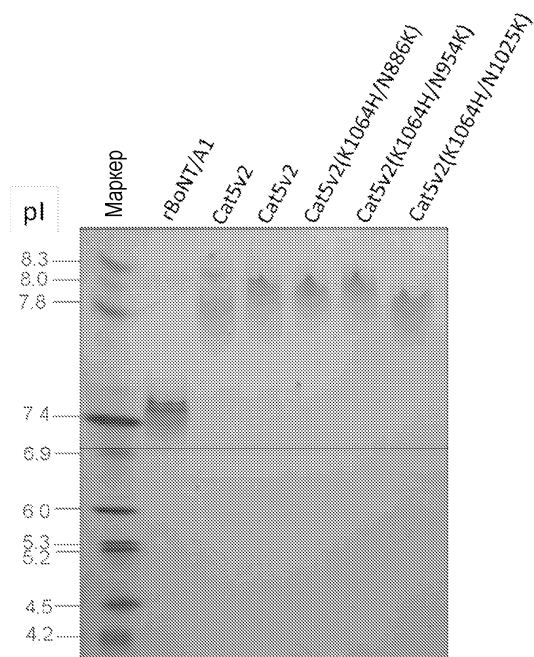
12. Сконструированный нейротоксин по любому из пп.1-9, где сконструированный нейротоксин содержит модификацию следующих семи аминокислот: ASN 930, SER 955, GLN 991, ASN 1025, ASN 1026, ASN 1052 и GLN 1229, где указанная модификация содержит замену аминокислот остатком лизина или остатком аргинина.

13. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую сконструированный терапевтический нейротоксин клостридий по любому из пп.1-12.

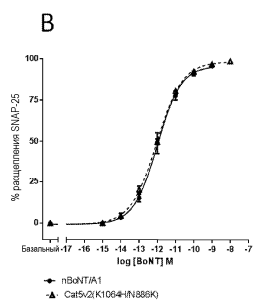
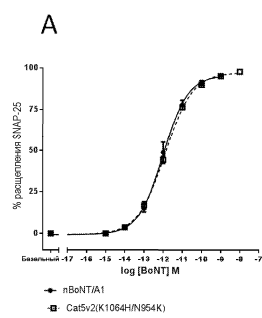
14. Способ получения одноцепочечного полипептида сконструированного терапевтического нейротоксина клостридий, имеющего легкую цепь и тяжелую цепь, включающий экспрессию нуклеиновой кислоты по п.13 в подходящей клетке-хозяине; лизис клетки-хозяина с получением гомогената клетки-хозяина, содержащего одноцепочечный полипептид сконструированного нейротоксина; и выделение указанного одноцепочечного полипептида сконструированного нейротоксина.

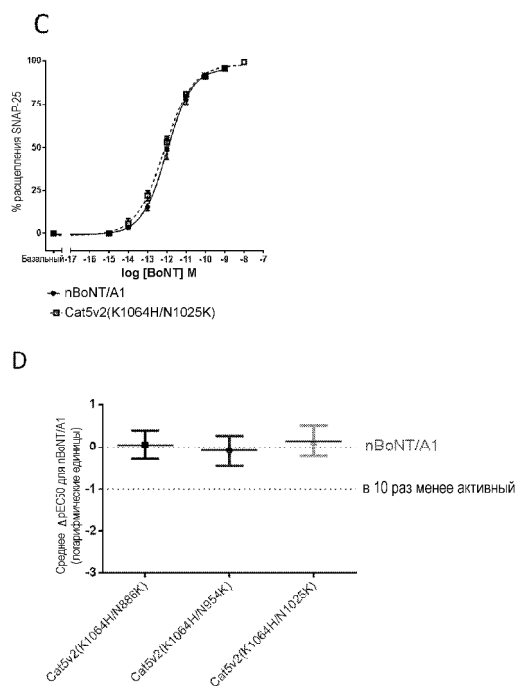
15. Способ активации сконструированного терапевтического нейротоксина клостридий, включающий получение одноцепочечного полипептида сконструированного нейротоксина способом по п.14; контактирование полипептида с протеазой, расщепляющей полипептид в сайте распознавания (сайте расщепления), расположенном между легкой цепью и тяжелой цепью; и превращение полипептида в двухцепочечный полипептид, в котором легкая цепь и тяжелая цепь связаны друг с другом дисульфидной связью.

16. Применение сконструированного терапевтического нейротоксина клостридий по любому из пп.1-12 для предупреждения или лечения заболевания или состояния, выбранного из косоглазия; блефароспазма; гетеротропии; дистонии (например, спастической дистонии; нижнечелюстной дистонии; очаговой дистонии; поздней дистонии; дистонии ротоглотки; дистонии конечностей; шейной дистонии); кривошеи (например, спастической кривошеи); снижения клеточной/мышечной активности (посредством ингибирования или инактивации SNARE), которое может быть предотвращено методами, применяемыми в косметологии (с использованием косметических средств); нервномышечного заболевания или нарушения моторики глазного яблока (например, сопутствующего косоглазия, вертикального косоглазия, паралича расположенной сбоку прямой мышцы глаза, нистагма, дистиреоидной миопатии); писчего спазма; бруксизма; болезни Вильсона; тремора; тиков; сегментарного синдрома "пляшущих глаз"; спазмов; спастичности, вызываемой хроническим рассеянным склерозом; спастичности, приводящей к нарушению функции мочевого пузыря; анимуса; спазмов в области спины; судорог икроножной мышцы ("болезни всадников"); головной боли напряжения; синдрома поднимающей мышцы таза; синдрома расщепленного позвоночника; поздней дискинезии; болезни Паркинсона; тугоподвижности; спазмов в гемифациальной области; поражения век; церебрального паралича; фокальной спастичности; спастического колита; нейрогенной дисфункции мочевого пузыря; анизма; спастичности конечностей; трещин в анальной области; ахалазии; дисфагии; слезливости; гипергидроза; избыточного слюноотделения; избыточной секреции желудочного сока; боли в мышцах (например, боли, вызываемой мышечными спазмами); головной боли (например, головной боли напряжения); глубоких морщин в области бровей; морщин на коже, рака; заболеваний матки; расстройств мочеполовых путей; мочеполовых-нервных расстройств; хронического нейрогенного воспаления и расстройств гладких мышц.

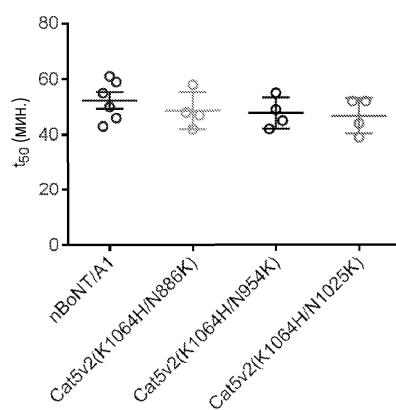


Фиг. 1





Фиг. 2



SXN/партия	t_{50} (среднее, мин. \pm ср. кв. ош.)
nBoNT/A1	52 \pm 3
Cat5v2(K1064H/N886K)	49 \pm 3
Cat5v2(K1064H/N954K)	48 \pm 3
Cat5v2(K1064H/N1025K)	47 \pm 3

Фиг. 3

