

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202190889** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2021.11.10**

(51) Int. Cl. *A61K 38/48* (2006.01)  
*C12N 15/62* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2019.09.27**

**(54) КЛОСТРИДИАЛЬНЫЕ НЕЙРОТОКСИНЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ЭКЗОГЕННУЮ ПЕТЛЮ АКТИВАЦИИ**

(31) **1815817.0**

(72) Изобретатель:

(32) **2018.09.28**

**Купински Адам, Лоувелок Лаура (GB)**

(33) **GB**

(86) **PCT/GB2019/052732**

(74) Представитель:

(87) **WO 2020/065336 2020.04.02**

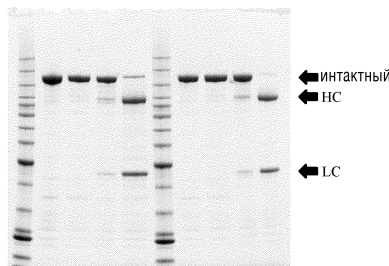
**Медведев В.Н. (RU)**

(71) Заявитель:

**ИПСЕН БИОФАРМ ЛИМИТЕД (GB)**

(57) Изобретение относится к способу протеолитического процессинга одноцепочечного клостридиального нейротоксина в соответствующий двухцепочечный клостридиальный нейротоксин, причем способ включает предоставление одноцепочечного клостридиального нейротоксина; и приведение одноцепочечного клостридиального нейротоксина в контакт с энтерокиназой или фактором Ха; где одноцепочечный клостридиальный нейротоксин имеет петлю активации, содержащую полипептидную последовательность Cys-(Xaa)<sub>a</sub>-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)<sub>b</sub>-Cys (SEQ ID NO: 1), где a=1-10 и b=4-15; и где энтерокиназа или фактор Ха гидролизует пептидную связь петли активации, тем самым продуцируя двухцепочечный клостридиальный нейротоксин. Изобретение также относится к сконструированным клостридиальным нейротоксинам и способам их изготовления, а также к родственным фармацевтическим композициям, нуклеотидным последовательностям и терапевтическим применениям.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



**A1**

**202190889**

**202190889**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 567636EA/042

### КЛОСТРИДАЛЬНЫЕ НЕЙРОТОКСИНЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ЭКЗОГЕННУЮ ПЕТЛЮ АКТИВАЦИИ

Настоящее изобретение относится к клостридиальным нейротоксинам и к способам их активации и применения.

Бактерии рода *Clostridia* продуцируют в высокой степени сильнодействующие и специфические белковые токсины, которые могут отравлять нейроны и другие клетки, к которым они доставляются. Примеры таких клостридиальных нейротоксинов включают нейротоксины, продуцируемые *C. tetani* (TeNT) и *C. botulinum* (BoNT) серотипов A-G и X (см. WO 2018/009903 A2), а также нейротоксины, продуцируемые *C. baratii* и *C. butyricum*.

К клостридиальным нейротоксинам принадлежат некоторые из наиболее известных сильнодействующих токсинов. В качестве примера, ботулиновые нейротоксины имеют величины срединной летальной дозы ( $LD_{50}$ ) для мышей в диапазоне от 0,5 до 5 нг/кг, в зависимости от серотипа. Как столбнячные, так и ботулиновые токсины действуют посредством ингибирования функции пораженных нейронов, в частности, высвобождения нейротрансмиттеров. В то время как ботулиновый токсин действует на нейромышечные соединения и ингибирует холинэргическую передачу в периферической нервной системе, столбнячный токсин действует в центральной нервной системе.

Клостридиальные нейротоксины экспрессируются в *Clostridium* в качестве одноцепочечных полипептидов. Каждый клостридиальный нейротоксин имеет каталитическую легкую цепь, отделенную от тяжелой цепи (охватывающую N-концевой домен транслокации и C-концевой рецептор-связывающий домен) находящейся на поверхности областью, называемой петлей активации. В ходе созревания белка протеолитическое расщепление петли активации разделяет легкую и тяжелую цепи клостридиального нейротоксина, которые удерживаются вместе дисульфидным мостиком, с образованием полностью активного двухцепочечного токсина. Этот процесс должен быть воспроизведен в ходе рекомбинантного продуцирования токсина.

Экзогенные протеазы, такие как трипсин или Lys-C, используют для протеолитической активации одноцепочечных клостридиальных нейротоксинов. Однако для некоторых клостридиальных нейротоксинов инкубация с Lys-C или трипсином приводит к частичному или ненадлежащему расщеплению одноцепочечного полипептида, что приводит к продуцированию контаминирующих одноцепочечных и/или неактивных продуктов расщепления/деградации (например, в случае BoNT/E), что делает необходимой очистку полноразмерного двухцепочечного полипептида. Таким образом, в настоящее время не существует универсальной экзогенной протеазы для активации клостридиальных нейротоксинов. Это является особенно проблематичным при идентификации нового клостридиального нейротоксина или продуцировании модифицированного (например, химерного или гибридного) нейротоксина, которые требуют скрининга множества протеаз для определения надлежащей активации.

Недавно был идентифицирован ботулиновый нейротоксин серотипа X (BoNT/X) (WO 2018/009903 A2). Было обнаружено, что BoNT/X особенно проблематично активировать, и расщепление трипсином или Lys-C приводит к полной деградации полипептида.

Настоящее изобретение решает одну или несколько из упомянутых выше проблем.

Протеаза энтерокиназа демонстрирует значительно более высокую специфичность к субстрату по сравнению с традиционно используемым трипсином и Lys-C. Эта протеаза распознает и сразу расщепляет С-конец до пептидной последовательности DDDDK (SEQ ID NO: 72). Примечательно, эта последовательность отсутствует во всех из петель активации кластридиального нейротоксина (см. фиг.1), таким образом, энтерокиназа ранее была исключена в качестве протеазы для применения для активации кластридиальных нейротоксинов.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что энтерокиназа распознает и сразу расщепляет С-конец до последовательности IDGR, присутствующей в петле активации BoNT/C1 (см. фиг.1). Преимущественно, эта последовательность также может распознаваться и расщепляться фактором Ха - другой протеазой, демонстрирующей высокую субстратную специфичность (например, по сравнению с трипсином и Lys-C). Более того, петля активации BoNT/C1 также имеет остатки лизина и аргинина, позволяя расщепление либо лизином, либо трипсином. Таким образом, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что петля BoNT/C1 представляет собой универсальную петлю активации для кластридиальных нейротоксинов, таким образом, обеспечивая универсальность в виде применения четырех различных протеаз.

В одном аспекте изобретение относится к способу протеолитического процессинга одноцепочечного кластридиального нейротоксина (например, сконструированного кластридиального нейротоксина, описанного в настоящем описании) в соответствующий двухцепочечный кластридиальный нейротоксин, причем способ включает:

- a. предоставление одноцепочечного кластридиального нейротоксина; и
- b. приведение одноцепочечного кластридиального нейротоксина в контакт с энтерокиназой;

где одноцепочечный кластридиальный нейротоксин имеет петлю активации, содержащую полипептидную последовательность Cys-(Xaa)<sub>a</sub>-Pе-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)<sub>b</sub>-Cys (SEQ ID NO: 1); и

где энтерокиназа гидролизует пептидную связь петли активации, тем самым продуцируя двухцепочечный кластридиальный нейротоксин (например, сконструированный двухцепочечный кластридиальный нейротоксин, описанный в настоящем описании).

В родственном аспекте изобретение относится к способу протеолитического процессинга одноцепочечного кластридиального нейротоксина (например, сконструированного кластридиального нейротоксина, описанного в настоящем описании) в соответствующий двухцепочечный кластридиальный нейротоксин, причем способ

включает:

- a. предоставление одноцепочечного клостридиального нейротоксина; и
- b. приведение одноцепочечного клостридиального нейротоксина в контакт с фактором Ха;

где одноцепочечный клостридиальный нейротоксин имеет петлю активации, содержащую полипептидную последовательность Cys-(Xaa)<sub>a</sub>-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)<sub>b</sub>-Cys (SEQ ID NO: 1); и

где фактор Ха гидролизует пептидную связь петли активации, тем самым продуцируя двухцепочечный клостридиальный нейротоксин (например, сконструированный двухцепочечный клостридиальный нейротоксин, описанный в настоящем описании).

Одноцепочечный клостридиальный нейротоксин предпочтительно представляет собой сконструированный одноцепочечный клостридиальный нейротоксин по настоящему изобретению, где петля активации представляет собой экзогенную петлю активации. Преимущественно, авторы настоящего изобретения обнаружили, что замена эндогенной петли активации клостридиального нейротоксина на экзогенную петлю активации, указанную в качестве SEQ ID NO: 1 (которая содержит участок расщепления протеазой в ее естественном контексте) решает проблемы, ассоциированные с модификацией эндогенной петли активации для встраивания участка расщепления протеазой (например, участок расщепления фактором Ха, такой как Ile-Asp-Gly-Arg [SEQ ID NO: 18] или Ile-Glu-Gly-Arg [SEQ ID NO: 19]). В частности, модификация эндогенной петли активации для встраивания участка расщепления протеазой может приводить к конформационным изменениям, которые в свою очередь могут иметь негативный эффект на эффективность расщепления (см. пример 7 настоящего описания).

В особенно предпочтительном варианте осуществления способы по настоящему изобретению включают применение энтерокиназы.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению энтерокиназы для гидролиза пептидной связи полипептида (например, клостридиальный нейротоксин), содержащего последовательность, указанную в качестве SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19 (предпочтительно SEQ ID NO: 18). Предпочтительно энтерокиназа гидролизует пептидную связь, являющуюся непосредственно С-концевой для SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19 (более предпочтительно SEQ ID NO: 18), содержащейся в полипептидной последовательности. В одном варианте осуществления полипептид содержит полипептидную последовательность, указанную в качестве SEQ ID NO: 1, или полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

Настоящее изобретение также относится к способу получения сконструированного клостридиального нейротоксина, причем способ включает:

- a. идентификацию эндогенной петли активации клостридиального нейротоксина, где клостридиальный нейротоксин отличается тем, что пептидная связь снаружи



эндогенной петли активации кластридиального нейротоксина гидролизуется трипсином или Lys-C; и

b. замену эндогенной петли активации экзогенной петлей активации, тем самым получая сконструированный кластридиальный нейротоксин, где экзогенная петля активации содержит полипептидную последовательность Cys-(Xaa)<sub>a</sub>-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)<sub>b</sub>-Cys (SEQ ID NO: 1).

Настоящее изобретение также относится к способу получения сконструированного кластридиального нейротоксина, причем способ включает:

a. идентификацию эндогенной петли активации кластридиального нейротоксина, где кластридиальный нейротоксин отличается тем, что эндогенная петля активации неэффективно протеолитически процессируется трипсином или Lys-C; и

b. замену эндогенной петли активации экзогенной петлей активации, тем самым получая сконструированный кластридиальный нейротоксин, где экзогенная петля активации содержит полипептидную последовательность Cys-(Xaa)<sub>a</sub>-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)<sub>b</sub>-Cys (SEQ ID NO: 1).

В одном варианте осуществления кластридиальный нейротоксин характеризуется тем, что пептидная связь вне эндогенной петли активации кластридиального нейротоксина гидролизуется трипсином или Lys-C, и эндогенная петля активации неэффективно протеолитически процессируется трипсином или Lys-C.

В вариантах осуществления, где эндогенная петля активации неэффективно протеолитически процессируется трипсином (и предпочтительно пептидная связь вне эндогенной петли активации кластридиального нейротоксина не гидролизуется трипсином), способ может дополнительно включать приведение сконструированного кластридиального нейротоксина в контакт с трипсином, который способен гидролизовать пептидную связь в экзогенной петле активации сконструированного кластридиального нейротоксина. Аналогично, в вариантах осуществления, где эндогенная петля активации неэффективно протеолитически процессируется посредством Lys-C (и предпочтительно пептидная связь вне эндогенной петли активации кластридиального нейротоксина не гидролизуется Lys-C), способ может дополнительно включать приведение сконструированного кластридиального нейротоксина в контакт с Lys-C, который способен гидролизовать пептидную связь в экзогенной петле активации сконструированного кластридиального нейротоксина.

В одном варианте осуществления способ включает стадию скрининга кластридиального нейротоксина в отношении пригодности для применения в способе по изобретению. Стадия скрининга может включать определение того, гидролизуется ли пептидная связь вне эндогенной петли активации кластридиального нейротоксина трипсином или Lys-C. Альтернативно или дополнительно, стадия скрининга может включать определение того, является ли неэффективным протеолитический процессинг эндогенной петли активации кластридиального нейротоксина посредством трипсина или Lys-C.

В противоположность кластридиальному нейротоксину (до модификации способами инженерии) в одном варианте осуществления сконструированный кластридиальный нейротоксин по изобретению не является неэффективно протеолитически процессируемым энтерокиназой или фактором Ха, и/или пептидная связь вне экзогенной петли активации сконструированного кластридиального нейротоксина не гидролизуется энтерокиназой или фактором Ха. Таким образом, кластридиальный нейротоксин (до модификации способами инженерии) предпочтительно является резистентным к протеолитическому процессингу энтерокиназой и/или фактором Ха.

Кластридиальный нейротоксин можно идентифицировать в качестве пригодного для модификации способами инженерии в способе по изобретению посредством анализа, включающего приведение в контакт 1 мг кластридиального нейротоксина по меньшей мере с 0,25 мкг трипсина,  $\geq 3350$  единиц/мг, или Lys-C,  $\geq 200$  единиц/мг, в 50 mM реакционном буфере Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, в течение по меньшей мере 5 часов при по меньшей мере 4°C.

В одном варианте осуществления анализ включает приведение в контакт 1 мг кластридиального нейротоксина с 0,25 мкг трипсина,  $\geq 3350$  единиц/мг (молярное соотношение кластридиального нейротоксина и трипсина  $\sim 1:611$ ) или Lys-C,  $\geq 200$  единиц/мг (молярное соотношение кластридиального нейротоксина и Lys-C  $\sim 1:734$ ) в 50 mM реакционном буфере Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, в течение 18 часов при 4°C.

В другом варианте осуществления анализ включает приведение в контакт 1 мг кластридиального нейротоксина с 0,40 мкг трипсина,  $\geq 3350$  единиц/мг (молярное соотношение кластридиального нейротоксина и трипсина  $\sim 1:978$ ) или Lys-C,  $\geq 200$  единиц/мг (молярное соотношение кластридиального нейротоксина и Lys-C  $\sim 1:1174$ ) в 50 mM реакционном буфере Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, в течение 5 часов при 20°C.

Используемый трипсин предпочтительно представляет собой коммерчески доступный TrypZean (Sigma# T3568). Трипсин может иметь полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 47. В одном варианте осуществления трипсин может иметь полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 47. Предпочтительно трипсин может иметь полипептидную последовательность, указанную в качестве SEQ ID NO: 47. Одну единицу указанного трипсина (Trypzean) определяют как количество фермента, которое вызывает изменение поглощения при 253 нм, составляющее 0,003 в мин, при pH 7,6 при 25°C с использованием 0,23 mM раствора этилового эфира Na-бензоил-L-аргинина (BAEE) в качестве субстрата в объеме реакции 3,2 мл.

Используемый Lys-C предпочтительно представляет собой коммерчески доступный Lys-C (Sigma# 000000011047825001). Lys-C может иметь полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 48. В одном варианте осуществления Lys-C может

иметь полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 48. Предпочтительно Lys-C может иметь полипептидную последовательность, указанную в качестве SEQ ID NO: 48. Одну единицу указанного Lys-C определяют как количество фермента, которое гидролизует 1,0 мкмоль Tos-Gly-Pro-Lys-pNA в мин при 25°C, pH 7.

Если посредством SDS-PAGE наблюдают один или несколько продуктов расщепления, дополнительных к продуктам расщепления N-цепи и L-цепи клостридиального нейротоксина (предпочтительно при окрашивании кумасси или красителем с эквивалентной чувствительностью), тогда подтверждается, что пептидная связь вне эндогенной петли активации клостридиального нейротоксина гидролизуется трипсином или Lys-C. Предпочтительно если посредством SDS-PAGE наблюдают по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 продуктов расщепления, дополнительных к продуктам расщепления N-цепи и L-цепи клостридиального нейротоксина после проведения анализа, описанного выше, тогда подтверждается, что пептидная связь вне эндогенной петли активации клостридиального нейротоксина гидролизуется посредством трипсина или Lys-C.

Дополнительно или альтернативно, если менее 70% эндогенной петли активации протеолитически процессируются трипсином или Lys-C с образованием двухцепочечного клостридиального нейротоксина (при оценке посредством SDS-PAGE, предпочтительно с окрашиванием кумасси или красителем с эквивалентной чувствительностью, после проведения анализа, описанного выше), тогда подтверждается, что эндогенная петля активации неэффективно протеолитически расщепляется трипсином или Lys-C. Предпочтительно если менее 60%, 50%, 40%, 30%, 10% или 5% эндогенной петли активации протеолитически процессируются трипсином или Lys-C (при оценке посредством SDS-PAGE после проведения анализа, описанного выше), тогда клостридиальный нейротоксин может характеризоваться тем, что эндогенная петля активации неэффективно протеолитически расщепляется трипсином или Lys-C. Более предпочтительно если менее 30% эндогенной петли активации протеолитически процессируются трипсином или Lys-C (при оценке посредством SDS-PAGE после проведения анализа, описанного выше) тогда клостридиальный нейротоксин может характеризоваться тем, что эндогенная петля активации неэффективно протеолитически расщепляется трипсином или Lys-C.

Клостридиальный нейротоксин (до модификации способами инженерии) предпочтительно представляет собой нейротоксин, в котором пептидная связь (либо внутри, либо вне петли активации) не гидролизуется или по существу не гидролизуется энтерокиназой или фактором Ха. Термин "по существу не гидролизуется" означает, что менее 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% клостридиального нейротоксина, присутствующего в реакции, содержит пептидную связь, которая гидролизуется энтерокиназой или фактором Ха, в способе по изобретению.

В одном варианте осуществления способ по изобретению дополнительно включает

приведение в контакт сконструированного клостридиального нейротоксина с энтерокиназой или фактором Ха (более предпочтительно энтерокиназой), тем самым получая соответствующий двухцепочечный сконструированный клостридиальный нейротоксин.

В одном аспекте изобретение относится к сконструированному клостридиальному нейротоксину (например, получаемому способом по изобретению), где эндогенная петля активации клостридиального нейротоксина заменена экзогенной петлей активации, тем самым получая сконструированный клостридиальный нейротоксин,

где экзогенная петля активации содержит полипептидную последовательность Cys-(Xaa)<sub>a</sub>-Ple-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)<sub>b</sub>-Cys (SEQ ID NO: 1).

В одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин (до модификации способами инженерии) характеризуется тем, что: пептидная связь вне эндогенной петли активации клостридиального нейротоксина гидролизуется трипсином или Lys-C. В одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин (до модификации способами инженерии) характеризуется тем, что: эндогенная петля активации неэффективно протеолитически процессируется трипсином или Lys-C. В другом варианте осуществления клостридиальный нейротоксин (до модификации способами инженерии) характеризуется тем, что: пептидная связь вне эндогенной петли активации клостридиального нейротоксина гидролизуется трипсином или Lys-C; и эндогенная петля активации неэффективно протеолитически процессируется трипсином или Lys-C. Подтверждение этих признаков клостридиального нейротоксина (до модификации способами инженерии) предпочтительно проводится посредством вышеупомянутого способа анализа.

Изобретение может включать замену эндогенной петли активации любого клостридиального нейротоксина экзогенной петлей активации, описанной в настоящем описании. Предпочтительно клостридиальный нейротоксин не является VoNT/C1. Клостридиальный нейротоксин может представлять собой ботулиновый токсин или столбнячный нейротоксин. Предпочтительно клостридиальный нейротоксин представляет собой ботулиновый нейротоксин (VoNT), такой как VoNT/A, VoNT/B, VoNT/D, VoNT/E, VoNT/F, VoNT/G или VoNT/X.

В одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин для применения в рамках настоящего изобретения представляет собой VoNT/X, VoNT/E или гибрид VoNT/A1C1. Предпочтительно клостридиальный нейротоксин представляет собой VoNT/X или VoNT/E, оба из которых характеризуются тем, что трипсин и/или Lys-C гидролизует пептидную связь вне его эндогенной петли активации, и/или тем, что оба клостридиальных нейротоксина содержат эндогенную петлю активации, которая неэффективно протеолитически процессируется трипсином и/или Lys-C. Наиболее предпочтительно клостридиальный нейротоксин для применения в рамках настоящего изобретения представляет собой VoNT/X.

Термин "эндогенная петля активации", как используют в рамках изобретения,

означает петлю активации, присутствующую в рассматриваемом клостридиальном нейротоксине, например, рассматриваемом клостридиальном нейротоксине указанного серотипа. Например, BoNT/A1 включает тяжелую цепь и легкую цепь BoNT/A1, таким образом, эндогенная петля активации BoNT/A1 представляет собой петлю активации A1. Для химер или гибридов клостридиального нейротоксина специалист в данной области может идентифицировать "эндогенную петлю активации", например, посредством определения серотипа(ов), из которого происходит L-цепь и H<sub>N</sub>-домен. В некоторых вариантах осуществления химерный или гибридный клостридиальный нейротоксин может иметь эндогенную петлю активации, которая представляет собой слитую конструкцию петель активации из двух различных серотипов. В качестве примера, химерный клостридиальный нейротоксин, такой как BoNT/A1C1, имеет легкую цепь и домен транслокации BoNT/A1, таким образом, эндогенная петля активации BoNT/A1C1 представляет собой петлю активации A1. Примеры петель активации приведены на фиг. 1.

Предпочтительно "эндогенная петля активации" представляет собой любую петлю активации, которая не является SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления "эндогенная петля активации" представляет собой любую петлю активации, которая не является SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3.

Напротив, "экзогенная петля активации", как используют в рамках изобретения, означает петлю активации, которая отличается от эндогенной петли активации, присутствующей в рассматриваемом клостридиальном нейротоксине, например, рассматриваемом клостридиальном нейротоксине указанного серотипа. Например, петля активации BoNT/C1 имеет полипептидную последовательность, отличную от петли активации BoNT/A1 дикого типа, таким образом, петля активации BoNT/C1 является экзогенной для BoNT/A1. Для химер или гибридов клостридиального нейротоксина, специалист в данной области может определить, является ли петля активации "экзогенной петлей активации", например, посредством определения серотипа(ов), из которого происходят L-цепь и H<sub>N</sub>-домен. Когда L-цепь представляет собой L-цепь BoNT/B и H<sub>N</sub>-домен происходит из BoNT/D, эндогенная петля активации может иметь часть последовательности BoNT/B и часть последовательности BoNT/D, и, если петля активации (например, петля активации C1) отличается от нее, ее считают "экзогенной петлей активации".

Определение того, является ли петля активации "экзогенной петлей активации", можно проводить путем выравнивания последовательности рассматриваемого клостридиального нейротоксина с петлей активации и выявления, присутствует ли петля активации в рассматриваемой последовательности клостридиального нейротоксина. Если она отсутствует, тогда петля активации может быть идентифицирована как экзогенная петля активации.

Предпочтительно вся эндогенная петля активации заменена экзогенной петлей активации, описанной в настоящем описании. Однако в некоторых вариантах осуществления часть эндогенной петли активации заменена, как например, по меньшей

мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 аминокислотных остатков эндогенной петли активации заменены.

Замену эндогенной петли активации можно проводить любым способом, известным в данной области. Например, замену можно проводить посредством модификации аминокислот. В одном варианте осуществления эндогенная петля активации может быть заменена путем делеции одного или нескольких аминокислотных остатков эндогенной петли активации. Эндогенная петля активации может быть заменена путем замены одного или нескольких аминокислотных остатков эндогенной петли активации на аминокислотные остатки экзогенной петли активации. В некоторых вариантах осуществления эндогенная петля активации (или ее часть) может быть удалена и экзогенная петля активации встроена, предпочтительно в положении, которое прежде занимала эндогенная петля активации. Альтернативно эндогенная петля активации может сохраняться в сконструированном клостридиальном нейротоксине по изобретению и предпочтительно инактивирована (например, посредством мутации). Предпочтительно чтобы эндогенная петля активации (или ее часть, более предпочтительно вся эндогенная петля активации) не присутствовала в сконструированном клостридиальном нейротоксине по изобретению. Предпочтительно чтобы экзогенная петля активации занимала положение в клостридиальном нейротоксине, которое ранее занимала эндогенная петля активации.

Способы модификации белков путем замены, вставки или делеции аминокислотных остатков известны в данной области и могут использоваться при применении настоящего изобретения на практике. В качестве примера, аминокислотные модификации можно вносить путем модификации последовательности ДНК, кодирующей клостридиальный нейротоксин. Этого можно достигать с использованием стандартных способов молекулярного клонирования, например, посредством сайт-направленного мутагенеза, где короткие цепи ДНК (олигонуклеотидов), кодирующие желаемую аминокислоту(ы), используют для замены исходной кодирующей последовательности с использованием фермента полимеразы, или посредством вставки/делеции частей гена с использованием различных ферментов (например, лигазы и эндонуклеазы рестрикции). Альтернативно, модифицированная последовательность гена может быть химически синтезирована.

В одном варианте осуществления эндогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере 80% или 90%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 71. В одном варианте осуществления эндогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью

последовательности с SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 71. Предпочтительно эндогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, представленную в качестве SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 71.

В одном варианте осуществления эндогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере 80% или 90%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 или SEQ ID NO: 69. В одном варианте осуществления эндогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 или SEQ ID NO: 69. Предпочтительно эндогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, указанную в качестве SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 или SEQ ID NO: 69.

В одном варианте осуществления эндогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере 80% или 90%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 24. В одном варианте осуществления эндогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 24. Предпочтительно эндогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, указанную в качестве SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 24.

Предпочтительно эндогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере 80% или 90%) идентичностью последовательности SEQ ID NO: 20. В одном варианте осуществления эндогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 20. Более предпочтительно эндогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, указанную в качестве SEQ ID NO: 20.

Предпочтительно эндогенная петля активации содержит полипептидную

последовательность, обладающую по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере 80% или 90%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 21. В одном варианте осуществления эндогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 21. Более предпочтительно эндогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, указанную в качестве SEQ ID NO: 21.

Предпочтительно эндогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере 80% или 90%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 24. В одном варианте осуществления эндогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 24. Более предпочтительно эндогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, указанную в качестве SEQ ID NO: 24.

Настоящее изобретение охватывает способы и кластридиальные нейротоксины, в которых эндогенная петля активации заменена экзогенной петлей активации, такой как экзогенная петля активации, содержащая полипептид, указываемый как Cys-(Хаа)<sub>a</sub>-Phe-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)<sub>b</sub>-Cys (SEQ ID NO: 1). Хаа или Yaa может представлять собой любую аминокислоту. Количество аминокислот в положении Хаа и Yaa указано буквами "a" и "b", соответственно. В одном варианте осуществления "a" и "b" могут представлять собой любое целое число, которое позволяет протеолитическое расщепление петли активации и обеспечивает активный двухцепочечный кластридиальный нейротоксин. В одном варианте осуществления "a" составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В одном варианте осуществления "b" составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15. В одном варианте осуществления "a" составляет ≤12, ≤11, ≤10, ≤9, ≤8, ≤7, ≤6, ≤5 или ≤4. В одном варианте осуществления "b" составляет ≤20, ≤19, ≤18, ≤17, ≤16, ≤15, ≤14, ≤13, ≤12, ≤11, ≤10 или ≤9.

В одном варианте осуществления "a" составляет 1-12, например, 1-10. Предпочтительно "a" составляет 1-7, как например, 2-4. Более предпочтительно "a" составляет 3. В одном варианте осуществления "b" составляет 1-20, например, 4-15. Предпочтительно "b" составляет 6-10. Более предпочтительно "b" составляет 8.

Подразумевается, что Хаа или Yaa ограничиваются только одним типом аминокислот. Таким образом, один или несколько остатков, присутствующих в положении Хаа, могут быть независимо выбраны из стандартных аминокислот: аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аргинин, лизин, гистидин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, метионин, триптофан, цистеин, аланин, глицин, валин, лейцин, изолейцин, пролин и фенилаланин. Один или несколько остатков, присутствующих в положении Yaa, могут быть независимо выбраны из стандартных аминокислот: аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аргинин, лизин, гистидин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, метионин, триптофан, цистеин, аланин, глицин, валин, лейцин, изолейцин, пролин и фенилаланин. Предпочтительно



аминокислота в положении Yaa (более предпочтительно непосредственно с С-концевой стороны от остатка Arg в SEQ ID NO: 1) не является пролином.

Альтернативно/дополнительно, один или несколько остатков, присутствующих в положении Xaa или Yaa, могут быть независимо выбраны из нестандартной аминокислоты (аминокислота, которая является частью стандартного набора из 20, описанных выше). В качестве примера, нестандартные аминокислоты могут включать 4-гидроксипролин, 6-N-метиллизин, 2-аминоизомаляновую кислоту, изовалин,  $\alpha$ -метилсерин, транс-3-метилпролин, 2,4-метанопролин, цис-4-гидроксипролин, транс-4-гидроксипролин, N-метилглицин, аллотреонин, метилтреонин, гидроксиэтилцистеин, гидроксиэтилгомоцистеин, нитроглутамин, гомоглутамин, пипеколиновую кислоту, трет-лейцин, норвалин, 2-азафенилаланин, 3-азафенилаланин, 4-азафенилаланин, L-орнитин, L-2-амино-3-гуанидинопропионовую кислоту, или D-изомеры лизина, аргинина и/или орнитина, и 4-фторфенилаланин. Способы внесения нестандартных аминокислот в белки известны в данной области и включают синтез рекомбинантных белков с использованием ауксотрофных экспрессирующих хозяев *E. coli*.

Свойства стандартных аминокислот указаны в таблице ниже:

| <b>АМИНОКИСЛОТА</b>   |     |   | <b>БОКОВАЯ ЦЕПЬ</b>        |
|-----------------------|-----|---|----------------------------|
| Аспарагиновая кислота | Asp | D | Заряженная (кислотная)     |
| Глутаминовая кислота  | Glu | E | Заряженная (кислотная)     |
| Аргинин               | Arg | R | Заряженная (основная)      |
| Лизин                 | Lys | K | Заряженная (основная)      |
| Гистидин              | His | H | Незаряженная (полярная)    |
| Аспарагин             | Asn | N | Незаряженная (полярная)    |
| Глутамин              | Gln | Q | Незаряженная (полярная)    |
| Серин                 | Ser | S | Незаряженная (полярная)    |
| 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) |
|-------------|-----|---|----------------------------|

Следующие аминокислоты считаются заряженными аминокислотами: аспарагиновая кислота (отрицательно), глутаминовая кислота (отрицательно), аргинин (положительно) и лизин (положительно).

Последовательность Ile-Asp/Glu-Gly-Arg, содержащаяся в SEQ ID NO: 1, относится к участку, который, как неожиданно было обнаружено авторами настоящего изобретения, распознается энтерокиназой (а также фактором Ха). Предпочтительно последовательность представляет собой Ile-Asp-Gly-Arg, например, Cys-(Xaa)<sub>a</sub>-Ile-Asp-Gly-Arg-(Yaa)<sub>b</sub>-Cys. Полагают, что энтерокиназа и фактор Ха гидролизуют пептидную связь непосредственно с С-концевой стороны от Arg в SEQ ID NO: 1 (т.е. пептидная связь между Arg и Yaa).

В одном варианте осуществления аминокислотный остаток Xaa непосредственно с N-концевой стороны от Ile в SEQ ID NO: 1 представляет собой незаряженную гидрофобную аминокислоту, предпочтительно аланин. В некоторых вариантах осуществления "а" составляет по меньшей мере 2, и Xaa содержит по меньшей мере С-концевую незаряженную полярную аминокислоту и заряженную основную аминокислоту непосредственно с N-концевой стороны от нее. Предпочтительно заряженная основная аминокислота представляет собой лизин. Таким образом в вариантах осуществления, где "а" составляет по меньшей мере 2, Xaa может содержать по меньшей мере Lys-Ala, где Ala находится непосредственно с N-концевой стороны от Ile в SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления Xaa содержит или состоит из последовательности НКА.

В одном варианте осуществления аминокислотный остаток Yaa непосредственно с С-концевой стороны от Arg в SEQ ID NO: 1 представляет собой незаряженную полярную аминокислоту, предпочтительно серин. В некоторых вариантах осуществления "b" составляет по меньшей мере 2, и Yaa содержит по меньшей мере N-концевую незаряженную полярную аминокислоту и незаряженную гидрофобную аминокислоту непосредственно с С-концевой стороны от нее. Предпочтительно незаряженная гидрофобная аминокислота представляет собой лейцин. Таким образом в вариантах осуществления, где "b" составляет по меньшей мере 2, Yaa может содержать по меньшей мере Ser-Leu, где Ser находится непосредственно с С-концевой стороны от Arg в SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления Yaa содержит или состоит из последовательности SLYNKTLDC.

В некоторых вариантах осуществления экзогенная петля активации обладает по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления экзогенная петля активации обладает по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно экзогенная петля активации обладает по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2. Более предпочтительно экзогенная петля активации обладает по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2.

В особенно предпочтительном варианте осуществления экзогенная петля содержит SEQ ID NO: 2. Более предпочтительно экзогенная петля состоит из SEQ ID NO: 2.

Экзогенная петля также может представлять собой вариант SEQ ID NO: 2, такой как SEQ ID NO:3, или последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью с ними. SEQ ID NO: 3 представляет собой вариант SEQ ID NO: 2, в котором в участок распознавания энтерокиназой IDGR внесена мутация на IEGR. В одном варианте осуществления экзогенная петля активации обладает по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно экзогенная петля активации обладает по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3. Более предпочтительно экзогенная петля активации обладает по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3.

В особенно предпочтительном варианте осуществления экзогенная петля содержит SEQ ID NO: 3. Более предпочтительно экзогенная петля состоит из SEQ ID NO: 3.

Клостридиальный нейротоксин по настоящему изобретению (например, сконструированный клостридиальный нейротоксин) может кодироваться нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12. В одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин по настоящему изобретению может кодироваться нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 80% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12. Предпочтительно клостридиальный нейротоксин по настоящему изобретению может кодироваться нуклеотидной последовательностью, содержащей (более предпочтительно состоящей из) SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12.

Клостридиальный нейротоксин по настоящему изобретению (например, сконструированный клостридиальный нейротоксин) может содержать полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13. В одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин по настоящему изобретению может содержать полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13. Предпочтительно клостридиальный нейротоксин по настоящему изобретению может содержать (более предпочтительно состоять из) полипептидную последовательность, указанную в качестве SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13.

Клостридиальный нейротоксин по настоящему изобретению (например, сконструированный клостридиальный нейротоксин) предпочтительно представляет собой VoNT/X, где клостридиальный нейротоксин кодируется нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 70% идентичностью

последовательности с SEQ ID NO: 4. В одном варианте осуществления кластридиальный нейротоксин кодируется нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 80% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно кластридиальный нейротоксин кодируется нуклеотидной последовательностью, содержащей (или состоящей из) SEQ ID NO: 4. Кластридиальный нейротоксин по настоящему изобретению предпочтительно представляет собой VoNT/X, где кластридиальный нейротоксин содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 5. В одном варианте осуществления кластридиальный нейротоксин содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно кластридиальный нейротоксин содержит (или состоит из) полипептидной последовательности, указанной в качестве SEQ ID NO: 5.

Кластридиальный нейротоксин по настоящему изобретению (например, сконструированный кластридиальный нейротоксин) предпочтительно представляет собой VoNT/E, где кластридиальный нейротоксин кодируется нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 10. В одном варианте осуществления кластридиальный нейротоксин кодируется нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 80% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно кластридиальный нейротоксин кодируется нуклеотидной последовательностью, содержащей (или состоящей из) SEQ ID NO: 10. Кластридиальный нейротоксин по настоящему изобретению предпочтительно представляет собой VoNT/E, где кластридиальный нейротоксин содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 11. В одном варианте осуществления кластридиальный нейротоксин содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно кластридиальный нейротоксин содержит (или состоит из) полипептидную последовательность, указанную в качестве SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления полипептидные последовательности по изобретению (или нуклеотидные последовательности, кодирующие их) могут включать метку для очистки, такую как His-метка. Подразумевается, что настоящее изобретение также охватывает полипептидные последовательности (и нуклеотидные последовательности, кодирующие их) где метка для очистки удалена.

Настоящее изобретение охватывает приведение в контакт одноцепочечного кластридиального нейротоксина (например, сконструированный кластридиальный нейротоксин по изобретению) с протеазой, способной гидролизовать пептидную связь в петле активации одноцепочечного кластридиального нейротоксина, тем самым получая двухцепочечный кластридиальный нейротоксин. Протеаза может представлять собой

эндопептидазу. Протеаза может представлять собой энтерокиназу, фактор Ха, Lys-C или трипсин. Предпочтительно протеаза представляет собой энтерокиназу или фактор Ха, более предпочтительно энтерокиназу.

Термин "энтерокиназа" или "ЕК" охватывает энтерокиназы, описанные в настоящем описании, а также любую протеазу, обладающую структурным и/или функциональным сходством (предпочтительно структурным и функциональным сходством), которая способна гидролизовать пептидную связь SEQ ID NO: 1. Подходящая энтерокиназа представляет собой легкую цепь энтерокиназы, которая является коммерчески доступной от NEB (#P8070). Одна единица может быть определена как количество фермента, требуемого для расщепления 25 мкг субстрата MBP-ЕК-парамиозин- $\Delta$ Sal до завершения на 95% в течение 16 часов при 25°C в общем объеме реакции 25 мкл (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 8,0 при 25°C)).

В одном варианте осуществления энтерокиназа содержит последовательность полипептида, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления энтерокиназа содержит последовательность полипептида, обладающую по меньшей мере 80% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 49. Предпочтительно энтерокиназа содержит (более предпочтительно состоит из) SEQ ID NO: 49.

В некоторых вариантах осуществления энтерокиназа может дополнительно содержать тяжелую цепь, где тяжелая и легкая цепи соединены дисульфидным мостиком. Такие энтерокиназы являются коммерчески доступными (например, от R&D Systems).

Термин "фактор Ха" охватывает фактор Ха, описанный в настоящем описании, а также любую протеазу, обладающую структурным и/или функциональным сходством (предпочтительно структурным и функциональным сходством), которая способна гидролизовать пептидную связь SEQ ID NO: 1. Подходящий фактор Ха является коммерчески доступным от NEB (#P8010). Одна единица может быть определена как количество фактора Ха, требуемое для расщепления 50 мкг тестируемого субстрата в виде слитого белка MBP, MBP- $\Delta$ Sal (субстрат MBP- $\Delta$ Sal представляет собой связывающий мальтозу белок, слитый с укороченной формой парамиозина, с аминокислотами Ile-Glu-Gly-Arg в точке слияния) до завершения на 95% в течение 6 часов или менее при 23°C в объеме реакции 50 мкл (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 8,0)).

В одном варианте осуществления фактор Ха содержит полипептидную последовательность, обладающую тяжелой цепью по меньшей мере с 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 50 и легкой цепью по меньшей мере с 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 51, где тяжелая и легкая цепи соединены дисульфидным мостиком. В некоторых вариантах осуществления фактор Ха содержит полипептидную последовательность, обладающую тяжелой цепью по меньшей мере с 80% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 50 и легкой цепью по меньшей мере с 80% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 51, где тяжелая и легкая цепи соединены дисульфидным мостиком. Предпочтительно фактор

Ха содержит (более предпочтительно состоит из) SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51, где тяжелая и легкая цепь соединены дисульфидным мостиком.

Приведение в контакт может происходить в любых подходящих условиях, которые приводят к продуцированию более 30%, 40%, 50% или 60% (предпочтительно более 70%) одноцепочечного клостридиального нейротоксина, протеолитически процессируемого в соответствующий двухцепочечный клостридиальный нейротоксин без гидролиза или без существенного гидролиза пептидной связи вне петли активации указанного клостридиального нейротоксина. "Без существенного гидролиза" может означать, что менее 5%, 4%, 3%, 2% или 1% контактирующих клостридиальных нейротоксинов содержат пептидную связь вне петли активации, которая гидролизуется протеазой в способе по изобретению.

Специалист в данной области может выбрать подходящее время реакции, температуру, буферы и молярное соотношение протеазы и одноцепочечного клостридиального нейротоксина для достижения вышеуказанного. Оптимизация таких условий может быть определена эмпирически с использованием стандартных способов, таких как визуальный анализ SDS-PAGE (например, при окрашивании кумасси или красителем со сходной чувствительностью) продуктов реакции после указанного приведения в контакт или спектрометрические способы (например, масс-спектрометрия).

При оценке посредством SDS-PAGE (например, при окрашивании кумасси или красителем со сходной чувствительностью) способ по изобретению предпочтительно приводит к продуцированию только L-цепи и N-цепи клостридиального нейротоксина.

В одном варианте осуществления протеолитический процессинг посредством протеазы в способе по изобретению приводит к продуцированию менее 5 продуктов деградации L-цепи или N-цепи клостридиального нейротоксина, более предпочтительно менее 4, 3, 2 или 1 продуктов деградации. Предпочтительно L-цепь и N-цепь, продуцируемые способом по изобретению, представляют собой полноразмерные L-цепь и N-цепь.

Таким образом, в особенно предпочтительном варианте осуществления протеаза, используемая в способе по изобретению (например энтерокиназа или фактор Ха) гидролизует только пептидную связь SEQ ID NO: 1, более предпочтительно только пептидную связь между Arg и Yaa в SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления приведение в контакт происходит в течение по меньшей мере 1 часа, например по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20 часов.

В одном варианте осуществления приведение в контакт происходит при температуре по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40°C.

В одном варианте осуществления приведение в контакт происходит при температуре от 1 до 10°C (предпочтительно приблизительно 4°C). Предпочтительно приведение в контакт происходит при температуре от 1 до 10°C (более предпочтительно приблизительно 4°C) в течение 10-25 часов (предпочтительно 15-20 часов).

В одном варианте осуществления приведение в контакт происходит при температуре 15-25°C (предпочтительно приблизительно 20°C). Предпочтительно приведение в контакт происходит при температуре 15-25°C (более предпочтительно приблизительно 20°C) в течение 10-25 часов (предпочтительно 15-20 часов).

В одном варианте осуществления приведение в контакт происходит при температуре 20-30°C (предпочтительно приблизительно 25°C). Предпочтительно приведение в контакт происходит при температуре 20-30°C (более предпочтительно приблизительно 25°C) в течение 10-25 часов (предпочтительно 15-20 часов).

Стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование по меньшей мере 1 мкг протеазы на мг клостридиального нейротоксина. В одном варианте осуществления стадия приведения в контакт способа по изобретению включает использование по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 мкг протеазы на мг клостридиального нейротоксина. Предпочтительно стадия приведения в контакт способа по изобретению включает использование по меньшей мере 2 мкг (более предпочтительно по меньшей мере 4 мкг) протеазы на мг клостридиального нейротоксина.

В одном варианте осуществления стадия приведения в контакт способа по изобретению включает использование  $\leq 20$  мкг протеазы на мг клостридиального нейротоксина. В одном варианте осуществления стадия приведения в контакт способа по изобретению включает использование  $\leq 15$  мкг протеазы на мг клостридиального нейротоксина. Предпочтительно стадия приведения в контакт способа по изобретению включает использование  $\leq 10$  мкг протеазы на мг клостридиального нейротоксина. Более предпочтительно стадия приведения в контакт способа по изобретению включает использование  $\leq 7$  мкг протеазы на мг клостридиального нейротоксина.

Стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование 0,1-20 мкг протеазы на мг клостридиального нейротоксина. В одном варианте осуществления способ по изобретению может включать использование 1-10 мкг протеазы на мг клостридиального нейротоксина, предпочтительно 4-7 мкг протеазы на мг клостридиального нейротоксина.

Стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60 или 70 единиц энтерокиназы на мг клостридиального нейротоксина. Предпочтительно, стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование по меньшей мере 60 единиц энтерокиназы (более предпочтительно по меньшей мере 70 единиц) на мг клостридиального нейротоксина. В некоторых вариантах осуществления стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование  $\leq 150$ ,  $\leq 140$ ,  $\leq 130$ ,  $\leq 120$ ,  $\leq 110$ ,  $\leq 100$ ,  $\leq 90$  единиц энтерокиназы на мг клостридиального нейротоксина. Предпочтительно, стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование  $\leq 100$  единиц энтерокиназы (более предпочтительно  $\leq 90$  единиц) на мг клостридиального нейротоксина. Стадия приведения в контакт способа по изобретению

может включать использование 50-110 единиц энтерокиназы на мг клостридиального нейротоксина. В одном варианте осуществления способ по изобретению может включать использование 70-90 единиц энтерокиназы на мг клостридиального нейротоксина, например, приблизительно 80 единиц энтерокиназы на мг клостридиального нейротоксина.

Стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование по меньшей мере 0,5, 1, 2, 3, 4 или 5 единиц фактора Ха на мг клостридиального нейротоксина. Предпочтительно, стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование по меньшей мере 3 единицы фактора Ха (более предпочтительно по меньшей мере 4 единицы) на мг клостридиального нейротоксина. В некоторых вариантах осуществления стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование  $\leq 15$ ,  $\leq 14$ ,  $\leq 13$ ,  $\leq 12$ ,  $\leq 11$ ,  $\leq 10$ ,  $\leq 9$ ,  $\leq 8$  или  $\leq 7$  единиц фактора Ха на мг клостридиального нейротоксина. Предпочтительно стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование  $\leq 8$  единиц фактора Ха (более предпочтительно  $\leq 7$  единиц) на мг клостридиального нейротоксина. Стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование 0,5-15 единиц фактора Ха на мг клостридиального нейротоксина. В одном варианте осуществления способ по изобретению может включать использование 1-10 единиц (предпочтительно 4-7 единиц) фактора Ха на мг клостридиального нейротоксина, например, приблизительно 5 или 6 единиц фактора Ха на мг клостридиального нейротоксина.

Стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование по меньшей мере 0,02, 0,04, 0,06 или 0,08 единиц Lys-C на мг клостридиального нейротоксина. Предпочтительно, стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование по меньшей мере 0,04 единиц Lys-C на мг клостридиального нейротоксина. В некоторых вариантах осуществления стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование  $\leq 0,5$ ,  $\leq 0,4$  или  $\leq 0,2$  единицы Lys-C на мг клостридиального нейротоксина. Предпочтительно, стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование  $\leq 0,2$  единицы Lys-C на мг клостридиального нейротоксина. Стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование 0,02-0,5 единицы Lys-C на мг клостридиального нейротоксина. Предпочтительно, способ по изобретению может включать использование 0,04-0,2 единицы Lys-C на мг клостридиального нейротоксина.

Стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,3 или 0,4 единицы трипсина на мг клостридиального нейротоксина. Предпочтительно, стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование по меньшей мере 0,4 единицы трипсина на мг клостридиального нейротоксина. В некоторых вариантах осуществления стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование  $\leq 2,5$ ,  $\leq 2,3$ ,  $\leq 2,1$ ,  $\leq 1,9$  единицы трипсина на мг клостридиального нейротоксина. Предпочтительно,



стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование  $\leq 1,8$  единицы трипсина на мг клостридиального нейротоксина. Стадия приведения в контакт способа по изобретению может включать использование 0,1-2,5 единицы трипсина на мг клостридиального нейротоксина. Предпочтительно, способ по изобретению может включать использование 0,3-2 единиц (более предпочтительно 0,4-1,8 единицы) трипсина на мг клостридиального нейротоксина.

В одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин (например, до модификации способами инженерии) может представлять собой VoNT/X. Эталонная последовательность VoNT/X указана в качестве SEQ ID NO: 33. Меченная гистицином версия VoNT/X указана в качестве SEQ ID NO: 34. Эталонная нуклеотидная последовательность, кодирующая VoNT/X, указана в качестве SEQ ID NO: 32.

В одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин (например, до модификации способами инженерии) может представлять собой VoNT/A. Эталонная последовательность VoNT/A указана в качестве SEQ ID NO: 35.

В другом варианте осуществления клостридиальный нейротоксин (например, до модификации способами инженерии) может представлять собой VoNT/B. Эталонная последовательность VoNT/B указана в качестве SEQ ID NO: 36.

В другом варианте осуществления клостридиальный нейротоксин (например, до модификации способами инженерии) может представлять собой VoNT/C. Эталонная последовательность VoNT/C<sub>1</sub> указана в качестве SEQ ID NO: 37.

В другом варианте осуществления клостридиальный нейротоксин (например, до модификации способами инженерии) может представлять собой VoNT/D. Эталонная последовательность VoNT/D указана в качестве SEQ ID NO: 38.

В другом варианте осуществления клостридиальный нейротоксин (например, до модификации способами инженерии) может представлять собой VoNT/E. Эталонная последовательность VoNT/E указана в качестве SEQ ID NO: 39.

В другом варианте осуществления клостридиальный нейротоксин (например, до модификации способами инженерии) может представлять собой VoNT/F. Эталонная последовательность VoNT/F указана в качестве SEQ ID NO: 40.

В другом варианте осуществления клостридиальный нейротоксин (например, до модификации способами инженерии) может представлять собой VoNT/G. Эталонная последовательность VoNT/G указана в качестве SEQ ID NO: 41.

В другом варианте осуществления клостридиальный нейротоксин (например, до модификации способами инженерии) может представлять собой TeNT. Эталонная последовательность TeNT указана в качестве SEQ ID NO: 42.

Как описано выше, клостридиальные нейротоксины образованы из двух полипептидных цепей: тяжелой цепи (H-цепь), которая имеет молекулярную массу приблизительно 100 кДа, и легкой цепи (L-цепь), которая имеет молекулярную массу приблизительно 50 кДа. H-цепь содержит C-концевой нацеливающий компонент (связывающий рецептор домен или H<sub>C</sub>-домен) и N-концевой компонент транслокации

(H<sub>N</sub>-домен).

Примеры эталонных последовательностей легкой цепи включают:

Ботулинический нейротоксин типа А: аминокислотные остатки 1-448

Ботулинический нейротоксин типа В: аминокислотные остатки 1-440

Ботулинический нейротоксин типа С1: аминокислотные остатки 1-441

Ботулинический нейротоксин типа D: аминокислотные остатки 1-445

Ботулинический нейротоксин типа E: аминокислотные остатки 1-422

Ботулинический нейротоксин типа F: аминокислотные остатки 1-439

Ботулинический нейротоксин типа G: аминокислотные остатки 1-441

Столбнячный нейротоксин: аминокислотные остатки 1-457.

Сообщалось, что для недавно идентифицированного BoNT/X, L-цепь соответствует его аминокислотам 1-439, причем границы L-цепи потенциально отличаются приблизительно на 25 аминокислот (например, 1-414 или 1-464).

Идентифицированные выше эталонные последовательности следует считать основными, поскольку может существовать небольшое варьирование в зависимости от подсеротипов. В качестве примера, в US 2007/0166332 (включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме) цитированы несколько различающиеся кластридиальные последовательности:

Ботулинический нейротоксин типа А: аминокислотные остатки M1-K448

Ботулинический нейротоксин типа В: аминокислотные остатки M1-K441

Ботулинический нейротоксин типа С1: аминокислотные остатки M1-K449

Ботулинический нейротоксин типа D: аминокислотные остатки M1-R445

Ботулинический нейротоксин типа 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.

Домен транслокации представляет собой молекулу, которая позволяет транслокацию протеазы в клетку-мишень, так что в цитозоле клетки-мишени происходит функциональное проявление активности протеазы. Наличие у какой-либо молекулы (например, белка или пептида) требуемой функции транслокации по настоящему изобретению может быть подтверждено посредством одного из ряда общепринятых способов анализа.

Например, Shone C. (1987) описывает анализ *in vitro* с использованием липосом, нагруженных тестируемой молекулой. Присутствие требуемой функции транслокации подтверждается высвобождением из липосом K<sup>+</sup> и/ или меченого NAD, мониторинг которого можно проводить без труда [см. Shone C. (1987) *Eur. J. Biochem*; vol. 167(1): pp. 175-180].

Следующий пример предоставлен Blaustein R. (1987), где описан простой анализ *in vitro* с использованием плоских фосфолипидных двухслойных мембран. Мембраны нагружают тестируемой молекулой и необходимую функцию транслокации

подтверждают повышением проводимости через указанные мембраны [см. Blaustein (1987) FEBS Letts; vol. 226, no. 1: pp. 115-120].

Дополнительная методология, позволяющая оценку слияния мембран и, таким образом, идентификацию доменов транслокации, пригодных для применения в рамках настоящего изобретения, приведена в *Methods in Enzymology Vol 220 and 221, Membrane Fusion Techniques, Parts A and B, Academic Press 1993*.

Настоящее изобретение также охватывает варианты доменов транслокации при условии, что варианты доменов все еще демонстрируют требуемую активность транслокации. В качестве примера, вариант может обладать по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% гомологией аминокислотной последовательности с эталонным доменом транслокации. Термин фрагмент, когда его используют применительно к домену транслокации, означает пептид, имеющий по меньшей мере 20, предпочтительно по меньшей мере 40, более предпочтительно по меньшей мере 80, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 100 аминокислотных остатков эталонного домена транслокации. В случае кластридиального домена транслокации фрагмент предпочтительно имеет по меньшей мере 100, предпочтительно по меньшей мере 150, более предпочтительно по меньшей мере 200, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 250 аминокислотных остатков эталонного домена транслокации (например,  $H_N$ -домен). "Фрагменты" доменов транслокации по настоящему изобретению охватывают фрагменты вариантов доменов транслокации на основе эталонных последовательностей.

Домен транслокации предпочтительно способен образовывать проницаемые для ионов поры в липидных мембранах в условиях низких значений pH. Предпочтительно было обнаружено, что можно использовать только те части белковой молекулы, которые способны к образованию пор в эндосомальной мембране.

Домен транслокации может быть получен из источника микробного белка, в частности, из источника бактериального или вирусного белка. Таким образом, в одном варианте осуществления домен транслокации представляет собой домен транслокации фермента, такого как бактериальный токсин или вирусный белок.

Документально подтверждено, что определенные домены, бактериальных молекул токсинов способны образовывать такие поры. Также известно, что определенные домены транслокации, экспрессируемых вирусами мембранных слитых белков, способны образовывать такие поры. Такие домены можно использовать в рамках настоящего изобретения.

Домен транслокации может происходить из кластридий, такой как  $H_N$ -домен (или его функциональный компонент).  $H_N$  означает часть или фрагмент N-цепи кластридиального нейротоксина, приблизительно эквивалентную N-концевой половине N-цепи, или домен, соответствующий этому фрагменту интактной N-цепи. В одном варианте осуществления функция  $H_C$  N-цепи может быть устранена путем удаления

аминокислотной последовательности Н<sub>С</sub> (либо на уровне синтеза ДНК, или на уровне после синтеза посредством обработки нуклеазой или протеазой). Альтернативно функция Н<sub>С</sub> может быть инактивирована посредством химической или биологической обработки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления Н-цепь может быть неспособна связываться с участком связывания на клетке-мишени, с которым связывается нативный клостридиальный нейротоксин (т.е. голотоксин).

Примеры подходящих (эталонных) доменов транслокации включают:

Ботулинический нейротоксин типа А - аминокислотные остатки (449-871)

Ботулинический нейротоксин типа В - аминокислотные остатки (441-858)

Ботулинический нейротоксин типа С - аминокислотные остатки (442-866)

Ботулинический нейротоксин типа D - аминокислотные остатки (446-862)

Ботулинический нейротоксин типа Е - аминокислотные остатки (423-845)

Ботулинический нейротоксин типа F - аминокислотные остатки (440-864)

Ботулинический нейротоксин типа G - аминокислотные остатки (442-863)

Столбнячный нейротоксин - аминокислотные остатки (458-879).

Идентифицированную выше эталонную последовательность следует считать основной, поскольку может существовать небольшое варьирование в зависимости от подсеротипов. В качестве примера, в US 2007/0166332 (включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме) цитированы несколько различающиеся клостридиальные последовательности:

Ботулинический нейротоксин типа А - аминокислотные остатки (A449-K871)

Ботулинический нейротоксин типа В - аминокислотные остатки (A442-S858)

Ботулинический нейротоксин типа С - аминокислотные остатки (T450-N866)

Ботулинический нейротоксин типа D - аминокислотные остатки (D446-N862)

Ботулинический нейротоксин типа Е - аминокислотные остатки (K423-K845)

Ботулинический нейротоксин типа F - аминокислотные остатки (A440-K864)

Ботулинический нейротоксин типа G - аминокислотные остатки (S447-S863)

Столбнячный нейротоксин - аминокислотные остатки (S458-V879).

В контексте настоящего изобретения различные области Н<sub>N</sub> клостридиального нейротоксина, содержащие домен транслокации, могут быть пригодными в аспектах настоящего изобретения при условии, что эти активные фрагменты могут облегчать высвобождение нецитотоксической протеазы (например, клостридиальная L-цепь) из внутриклеточных везикул в цитоплазму клетки-мишени и, таким образом, участвовать в исполнении клеточного механизма в целом, где клостридиальный нейротоксин протеолитически расщепляет субстрат. Области Н<sub>N</sub> из тяжелых цепей клостридиальных нейротоксинов имеют длину приблизительно 410-430 аминокислот и содержат домен транслокации. Исследование показало, что полная длина области Н<sub>N</sub> из тяжелой цепи клостридиального нейротоксина не является необходимой для активности транслокации домена транслокации. Таким образом, аспекты этого варианта осуществления могут включать области Н<sub>N</sub> клостридиального нейротоксина, содержащие домен транслокации,

имеющий длину, например, по меньшей мере 350 аминокислот, по меньшей мере 375 аминокислот, по меньшей мере 400 аминокислот и по меньшей мере 425 аминокислот. Другие аспекты этого варианта осуществления могут включать области H<sub>N</sub> кластридиального нейротоксина, содержащие домен транслокации, имеющий длину, например, не более 350 аминокислот, не более 375 аминокислот, не более 400 аминокислот и не более 425 аминокислот.

Для дальнейших деталей, касающихся генетической основы продуцирования токсинов в *Clostridium botulinum* и *C. tetani*, см. Henderson et al (1997), *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis*, Academic press.

Термин H<sub>N</sub> охватывает природные части нейротоксина H<sub>N</sub> и модифицированные части H<sub>N</sub>, имеющие аминокислотные последовательности, которые не встречаются в природе и/или синтетические аминокислотные остатки, при условии, что модифицированные части H<sub>N</sub> все еще демонстрируют вышеупомянутую функцию транслокации.

Альтернативно домен транслокации может иметь некластридиальное происхождение. Примеры некластридиальных (эталонных) источников доменов транслокации включают, но не ограничиваются ими, домен транслокации дифтерийного токсина [O'Keefe et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89, 6202-6206; Silverman et al., *J. Biol. Chem.* (1993) 269, 22524-22532; и London, E. (1992) *Biochem. Biophys. Acta.*, 1112, pp.25-51], домен транслокации экзотоксина типа A *Pseudomonas* [Prior et al. *Biochemistry* (1992) 31, 3555-3559], домены транслокации токсина сибирской язвы [Blanke et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996) 93, 8437-8442], различные фузогенные или гидрофобные пептиды с функцией транслокации [Plank et al. *J. Biol. Chem.* (1994) 269, 12918-12924; и Wagner et al (1992) *PNAS*, 89, pp.7934-7938], и амфифильные пептиды [Murata et al (1992) *Biochem.*, 31, pp.1986-1992]. Домен транслокации может представлять собой домен транслокации, присутствующий во встречающемся в природе белке, или может включать изменения аминокислот при условии, что изменения не нарушают способность домена транслокации к транслокации.

Конкретные примеры вирусных (эталонных) доменов транслокации, пригодные для применения в рамках настоящего изобретения, включают определенные домены транслокации экспрессируемых вирусом мембранных слитых белков. Например, Wagner et al. (1992) и Murata et al. (1992) описывают функцию транслокации (т.е. слияние мембран и везикуляция) ряда фузогенных и амфифильных пептидов, происходящих из N-концевой области гемагглютинин вируса гриппа. Другие экспрессируемые вирусом мембранные слитые белки, известные тем, что они обладают желаемой активностью транслокации, представляют собой домен транслокации фузогенного пептида вируса леса Семлики (SFV), домен транслокации гликопротеина G вируса везикулярного стоматита (VSV), домен транслокации белка F вируса SER и домен транслокации гликопротеина оболочки пенящих вирусов. Кодированные вирусами белки Aspике имеют конкретное применение в контексте настоящего изобретения, например, белок E1 SFV и белок G

VSV.

Использование (эталонных) доменов транслокации, перечисленных в таблице (ниже), включает использование их последовательностей их вариантов. Вариант может содержать одну или более консервативных нуклеотидных замен и/или нуклеотидных делеций или вставок при условии, что вариант обладает необходимой функцией транслокации. Вариант может также содержать одну или более аминокислотных замен и/или аминокислотных делеций или вставок при условии, что вариант обладает необходимой функцией транслокации.

| <b>Источник домена транслокации</b>           | <b>Аминокислотные остатки</b>                           | <b>Ссылки</b>  |
|---|---|--|
| Дифтерийный токсин                            | 194-380   | <b>Silverman et al.</b> , 1994, J. Biol. Chem. 269, 22524-22532<br><b>London E.</b> , 1992, Biochem. Biophys. Acta., 1113, 25-51   |
| Домен II экзотоксина pseudomonas              | 405-613   | <b>Prior et al.</b> , 1992, Biochemistry 31, 3555-3559<br><b>Kihara &amp; Pastan</b> , 1994, Bioconj Chem. 5, 532-538  |
| Гемагглютинин вируса гриппа                   | GLFGAIAGFIENGWEG MIDGWYG (SEQ ID NO: 73), и ее варианты | <b>Plank et al.</b> , 1994, J. Biol. Chem. 269, 12918-12924<br><b>Wagner et al.</b> , 1992, PNAS, 89, 7934-7938<br><b>Murata et al.</b> , 1992, Biochemistry 31, 1986-1992 |
| Фузогенный белок вируса леса Семлики          | Домен транслокации                                      | <b>Kielian et al.</b> , 1996, J Cell Biol. 134(4), 863-872   |
| Гликопротеин G вируса везикулярного стоматита | 118-139   | <b>Yao et al.</b> , 2003, Virology 310(2), 319-332   |
| F-белок вируса SER                            | Домен транслокации                                      | <b>Seth et al.</b> , 2003, J Virol 77(11) 6520-6527  |
| Гликопротеин оболочки пенящего вируса         | Домен транслокации                                      | <b>Picard-Maureau et al.</b> , 2003, J Virol. 77(8), 4722-4730   |

Примеры эталонных последовательностей H<sub>C</sub>-домена кластридиального

нейротоксина включают:

BoNT/A - N872-L1296

BoNT/B - E859-E1291

BoNT/C1 - N867-E1291

BoNT/D - S863-E1276

BoNT/E - R846-K1252

BoNT/F - K865-E1274

BoNT/G - N864-E1297

TeNT - I880-D1315

Для недавно идентифицированного BoNT/X, H<sub>C</sub>-домен был описан как соответствующий его аминокислотам 893-1306, причем границы домена потенциально варьируются приблизительно на 25 аминокислот (например, 868-1306 или 918-1306).

Клостридиальные нейротоксины, описанные в настоящем описании, кроме того, могут содержать домен, облегчающий транслокацию. Указанный домен облегчает доставку нецитотоксической протеазы в цитозоль клетки-мишени и описан, например, в WO 08/008803 и WO 08/008805, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки.

В качестве примера, подходящие домены, облегчающие транслокацию, включают фузогенный пептидный домен оболочечного вируса, например, подходящие фузогенные пептидные домены включают фузогенный пептидный домен вируса гриппа (например, фузогенный пептидный домен из 23 аминокислот вируса гриппа А), фузогенный пептидный домен альфавируса (например, фузогенный пептидный домен вируса леса Семлики из 26 аминокислот), фузогенный пептидный домен везикуловируса (например, фузогенный пептидный домен вируса везикулярного стоматита из 21 аминокислоты), фузогенный пептидный домен респировируса (например, фузогенный пептидный домен вируса Сендай из 25 аминокислот), фузогенный пептидный домен вируса кори (например, фузогенный пептидный домен вируса собачьей чумы из 25 аминокислот), фузогенный пептидный домен авулаввируса (например, фузогенный пептидный домен вируса болезни Ньюкасла из 25 аминокислот), фузогенный пептидный домен хенипавируса (например, фузогенный пептидный домен вируса Хендра из 25 аминокислот), фузогенный пептидный домен метапневмовируса (например, фузогенный пептидный домен метапневмовируса человека из 25 аминокислот) или фузогенный пептидный домен спумавируса, такой как фузогенный пептидный домен пенящего вируса обезьян; или их фрагменты или варианты.

В качестве следующего примера облегчающий транслокацию домен может содержать H<sub>CN</sub>-домен клостридиального нейротоксина или его фрагмент или вариант. Более детально, облегчающий транслокацию домен H<sub>CN</sub> клостридиального нейротоксина может иметь длину по меньшей мере 200 аминокислот, по меньшей мере 225 аминокислоты, по меньшей мере 250 аминокислоты, по меньшей мере 275 аминокислоты. В этом отношении, облегчающий транслокацию домен клостридиального нейротоксина H<sub>CN</sub> предпочтительно имеет длину не более 200 аминокислот, не более 225 аминокислот,

не более 250 аминокислот или не более 275 аминокислот. Конкретные (эталонные) примеры включают:

- Ботулинический нейротоксин типа А - аминокислотные остатки (872-1110)
- Ботулинический нейротоксин типа В - аминокислотные остатки (859-1097)
- Ботулинический нейротоксин типа С - аминокислотные остатки (867-1111)
- Ботулинический нейротоксин типа D - аминокислотные остатки (863-1098)
- Ботулинический нейротоксин типа Е - 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)

Указанные выше положения в последовательности могут несколько варьироваться в зависимости от серотипа/подтипа, и следующие примеры подходящих (эталонных) доменов H<sub>CN</sub> клостридиального нейротоксина включают:

- Ботулинический нейротоксин типа А - аминокислотные остатки (874-1110)
- Ботулинический нейротоксин типа В - аминокислотные остатки (861-1097)
- Ботулинический нейротоксин типа С - аминокислотные остатки (869-1111)
- Ботулинический нейротоксин типа D - аминокислотные остатки (865-1098)
- Ботулинический нейротоксин типа Е - 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).

Любой из описанных выше облегчающих доменов можно комбинировать с любым из описанных выше пептидов доменов транслокации, которые являются пригодными для применения в рамках настоящего изобретения. Таким образом, в качестве примера, неклостридиальный облегчающий домен можно комбинировать с неклостридиальным доменом транслокации или с клостридиальным пептидом домена транслокации. Альтернативно, домен облегчения транслокации H<sub>CN</sub> клостридиального нейротоксина можно комбинировать с неклостридиальным пептидом домена транслокации. Альтернативно облегчающий домен H<sub>CN</sub> клостридиального нейротоксина можно комбинировать с клостридиальным пептидом домена транслокации, примеры которого включают:

- Ботулинический нейротоксин типа А - аминокислотные остатки (449-1110)
- Ботулинический нейротоксин типа В - аминокислотные остатки (442-1097)
- Ботулинический нейротоксин типа С - аминокислотные остатки (450-1111)
- Ботулинический нейротоксин типа D - аминокислотные остатки (446-1098)
- Ботулинический нейротоксин типа Е - аминокислотные остатки (423-1085)
- Ботулинический нейротоксин типа F - аминокислотные остатки (440-1105)
- Ботулинический нейротоксин типа G - аминокислотные остатки (447-1105)
- Столбнячный нейротоксин - аминокислотные остатки (458-1127)

В некоторых вариантах осуществления клостридиальные нейротоксины по



настоящему изобретению могут быть лишены функционального H<sub>C</sub>-домена клостридиального нейротоксина. Таким образом, указанные клостридиальные нейротоксины не способны связывать синапсомальные мембраны крысы (через клостридиальный компонент H<sub>C</sub>) в анализах связывания, как описано в Shone et al. (1985) *Eur. J. Biochem.* 151, 75-82. В одном варианте осуществления клостридиальные нейротоксины предпочтительно лишены последних 50 С-концевых аминокислот клостридиального нейротоксина голотоксина. В другом варианте осуществления клостридиальные нейротоксины предпочтительно лишены последних 100, предпочтительно последних 150, более предпочтительно последних 200, особенно предпочтительно последних 250, и наиболее предпочтительно последних 300 С-концевых аминокислотных остатков клостридиального нейротоксина голотоксина. Альтернативно активность связывания H<sub>C</sub> может быть устранена/ снижена посредством мутагенеза - в качестве примера, см. BoNT/A для удобства, модификация одного или двух аминокислотных остатков (W1266 на L и Y1267 на F) в ганглиозид-связывающем кармане вызывает утрату областью H<sub>C</sub> ее функции связывания рецептора. Аналогичные мутации можно вносить в клостридиальные пептидные компоненты не серотипа А, например, конструкцию на основе ботулинического токсина В с мутациями (W1262 на L и Y1263 на F) или ботулинического токсина Е (W1224 на L и Y1225 на F). Другие мутации активного центра достигают того же устранения активности связывания рецептора H<sub>C</sub>, например, Y1267S в ботулиническом токсине типа А и соответствующий высококонсервативный остаток в других клостридиальных нейротоксинах. Подробное описание этой и других мутаций приведено в Rummel et al (2004) (*Molecular Microbiol.* 51:631-634), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Пептид H<sub>C</sub> нативного клостридиального нейротоксина содержит приблизительно 400-440 аминокислотных остатков и состоит из двух функционально обособленных домена размером приблизительно 25 кДа каждый, а именно, N-концевой области (часто называемой пептидом или доменом H<sub>CN</sub>) и С-концевой области (часто называемой пептидом или доменом H<sub>CC</sub>). Этот факт подтверждается следующими публикациями, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме: Umland TC (1997) *Nat. Struct. Biol.* 4: 788-792; Herreros J (2000) *Biochem. J.* 347: 199-204; Halpern J (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 15, pp. 11188-11192; Rummel A (2007) *PNAS* 104: 359-364; Lacey DB (1998) *Nat. Struct. Biol.* 5: 898-902; Knapp (1998) *Am. Cryst. Assoc. Abstract Papers* 25: 90; Swaminathan and Eswaramoorthy (2000) *Nat. Struct. Biol.* 7: 1751-1759; и Rummel A (2004) *Mol. Microbiol.* 51(3), 631-643. Более того, было документально подтверждено, что С-концевая область (H<sub>CC</sub>), которая составляет С-концевые 160-200 аминокислотных остатков, ответственна за связывание клостридиального нейротоксина с его естественными клеточными рецепторами, а именно, с нервными окончаниями в нервно-мышечном соединении - этот факт также подтверждается описанными выше публикациями. Таким образом, указание на протяжении настоящего описания на клостридиальную тяжелую цепь, лишенную функционального пептида H<sub>C</sub> (или домена)

тяжелой цепи, так что тяжелая цепь неспособна связываться с рецепторами клеточной поверхности, с которыми связывается нативный клостридиальный нейротоксин, означает, что клостридиальная тяжелая цепь просто лишена функционального пептида  $H_{CC}$ . Иными словами, область пептида  $H_{CC}$  может быть либо частично, либо полностью удалена или иным образом модифицирована (например, посредством общепринятой химической или протеолитической обработки) для инактивации ее нативной способности связываться с нервными окончаниями в нервно-мышечном соединении.

Таким образом, в одном варианте осуществления пептид  $H_N$  клостридиального нейротоксина по настоящему изобретению лишен части С-концевой пептидной части ( $H_{CC}$ ) клостридиального нейротоксина и, таким образом, лишен функции связывания  $H_C$  нативного клостридиального нейротоксина. В качестве примера, в одном варианте осуществления удлиненный на С-конце клостридиальный пептид  $H_N$  лишен 40 С-концевых аминокислотных остатков, или 60 С-концевых аминокислотных остатков, или 80 С-концевых аминокислотных остатков, или 100 С-концевых аминокислотных остатков, или 120 С-концевых аминокислотных остатков, или 140 С-концевых аминокислотных остатков, или 150 С-концевых аминокислотных остатков, или 160 С-концевых аминокислотных остатков тяжелой цепи клостридиального нейротоксина. В другом варианте осуществления клостридиальный пептид  $H_N$  по настоящему изобретению лишен всей С-концевой пептидной части ( $H_{CC}$ ) клостридиального нейротоксина и, таким образом, лишен функции связывания  $H_C$  нативного клостридиального нейротоксина. В качестве примера, в одном варианте осуществления клостридиальный пептид  $H_N$  лишен 165 С-концевых аминокислотных остатков или 170 С-концевых аминокислотных остатков, или 175 С-концевых аминокислотных остатков, или 180 С-концевых аминокислотных остатков, или 185 С-концевых аминокислотных остатков, или 190 С-концевых аминокислотных остатков, или 195 С-концевых аминокислотных остатков тяжелой цепи клостридиального нейротоксина. В качестве следующего примера клостридиальный пептид  $H_N$  по настоящему изобретению лишен эталонной последовательности клостридиального  $H_{CC}$ , выбранной из группы, состоящей из:

- Ботулинического нейротоксина типа А - аминокислотные остатки (Y1111-L1296)
- Ботулинического нейротоксина типа В - аминокислотные остатки (Y1098-E1291)
- Ботулинического нейротоксина типа С - аминокислотные остатки (Y1112-E1291)
- Ботулинического нейротоксина типа D - аминокислотные остатки (Y1099-E1276)
- Ботулинического нейротоксина типа Е - аминокислотные остатки (Y1086-K1252)
- Ботулинического нейротоксина типа F - аминокислотные остатки (Y1106-E1274)
- Ботулинического нейротоксина типа G - аминокислотные остатки (Y1106-E1297)
- Столбнячного нейротоксина - аминокислотные остатки (Y1128-D1315).

Идентифицированные выше эталонные последовательности следует считать основными, поскольку может существовать небольшое варьирование в зависимости от подсеротипов.

Настоящее изобретение является пригодным для применения для многих

различных типов клостридиального нейротоксина. Таким образом, в контексте настоящего изобретения, термин "кlostридиальный нейротоксин" охватывает токсины, продуцируемые *C. botulinum* (ботулинический нейротоксин серотипов А, В, С1, D, E, F, G, H и X), *C. tetani* (столбнячный нейротоксин), *C. butyricum* (ботулинический нейротоксин серотипа E), и *C. baratii* (ботулинический нейротоксин серотипа F), а также модифицированные клостридиальные нейротоксины или производные, происходящие из любого из вышеуказанных. Термин "кlostридиальный нейротоксин" также охватывает ботулинический нейротоксин серотипа H. Предпочтительно клостридиальный нейротоксин не является BoNT/C1.

Ботулинический нейротоксин (BoNT) продуцируется *C. botulinum* в форме крупного белкового комплекса, состоящего из самого BoNT в комплексе с рядом вспомогательных белков. В настоящее время существует девять различных классов ботулинического нейротоксина, а именно: серотипы ботулинического нейротоксина А, В, С1, D, E, F, G, H и X, все из которых обладают сходными структурами и способами действия. Различные серотипы BoNT могут различаться на основе инактивации посредством специфической нейтрализующей антисыворотки, причем такая классификация по серотипам коррелирует с процентной идентичностью последовательностей на уровне аминокислот. Белки BoNT данного серотипа далее подразделяют на различные серотипы на основе процентной идентичности аминокислотных последовательностей.

BoNT всасываются в желудочно-кишечном тракте и после проникновения в общий кровоток связывается с пресинаптической мембраной холинэргических нервных окончаний и препятствует высвобождению их нейротрансмиттера ацетилхолина. BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F и BoNT/G расщепляют синаптобrevин/ассоциированный с везикулами белок (VAMP); BoNT/C1, BoNT/A и BoNT/E расщепляют ассоциированный с синаптосомами белок размером 25 кДа (SNAP-25); и BoNT/C1 расщепляет синтаксин. Было обнаружено, что BoNT/X расщепляет SNAP-25, VAMP1, VAMP2, VAMP3, VAMP4, VAMP5, Ykt6 и синтаксин 1.

Столбнячный токсин продуцируется в форме одного серотипа *C. tetani*. *C. butyricum* продуцируют BoNT/E, в то время как *C. baratii* продуцируют BoNT/F.

Также подразумевается, что термин "кlostридиальный нейротоксин" охватывает модифицированные клостридиальные нейротоксины и их производные, включая, но не ограничиваясь ими, нейротоксины, описанные ниже. Модифицированный клостридиальный нейротоксин или производное может содержать одну или несколько аминокислот, которые модифицированы по сравнению с нативной (немодифицированной) формой клостридиального нейротоксина, или может содержать одну или несколько встроенных аминокислот, которые не присутствуют в нативной (немодифицированной) форме клостридиального нейротоксина. В качестве примера, модифицированный клостридиальный нейротоксин может иметь модифицированные аминокислотные последовательности в одном или нескольких доменах относительно нативной

(немодифицированной) последовательности клостридиального нейротоксина. Такие модификации могут модифицировать функциональные аспекты токсина, например биологическую активность или стабильность. Таким образом, в одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению представляет собой сконструированный модифицированный клостридиальный нейротоксин или сконструированное модифицированное производное клостридиального нейротоксина, или сконструированное производное клостридиального нейротоксина.

Модифицированный клостридиальный нейротоксин может иметь одну или несколько модификаций в аминокислотной последовательности тяжелой цепи (такой как модифицированный домен Н<sub>С</sub>), где указанная модифицированная тяжелая цепь связывается с нервными клетками, являющимися мишенями, с более высокой или более низкой аффинностью, чем нативный (немодифицированный) клостридиальный нейротоксин. Такие модификации в Н<sub>С</sub>-доме могут включать модификацию остатков в ганглиозид-связывающем участке Н<sub>С</sub>-домена или в связывающем белок (SV2 или синаптоагмин) участке, которая изменяет связывание с рецептором ганглиозида и/или рецептором белка нервной клетки, являющейся мишенью. Примеры таких модифицированных клостридиальных нейротоксинов описаны в WO 2006/027207 и WO 2006/114308, обе из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

Модифицированный клостридиальный нейротоксин может иметь одну или несколько модификаций в аминокислотной последовательности легкой цепи, например, модификации в связывающем субстрат или каталитическом домене, которые могут изменять или модифицировать специфичность модифицированной L-цепи в отношении белка SNARE. Примеры таких модифицированных клостридиальных нейротоксинов описаны в WO 2010/120766 и US 2011/0318385, обе из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

Модифицированный клостридиальный нейротоксин может содержать одну или несколько модификаций, которые повышают или снижают биологическую активность и/или биологическую стабильность модифицированного клостридиального нейротоксина. Например, модифицированный клостридиальный нейротоксин может содержать мотив на основе лейцина или тирозина, где указанный мотив повышает или снижает биологическую активность и/или биологическую стабильность модифицированного клостридиального нейротоксина. Подходящие мотивы на основе лейцина включают xDxxxLL (SEQ ID NO: 74), xExxxLL (SEQ ID NO: 75), xExxxIL (SEQ ID NO: 76) и xExxxLM (SEQ ID NO: 77) (где x представляет собой любую аминокислоту). Подходящие мотивы на основе тирозина включают Y-x-x-Hy (SEQ ID NO: 78) (где Hy представляет собой гидрофобную аминокислоту). Примеры модифицированных клостридиальных нейротоксинов, содержащих мотивы на основе лейцина и тирозина, описаны в WO 2002/08268, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Подразумевается, что термин "клостридиальный нейротоксин" охватывает

гибридные и химерные клостридиальные нейротоксины. Гибридный клостридиальный нейротоксин содержит по меньшей мере часть легкой цепи из одного клостридиального нейротоксина или его подтипа, и по меньшей мере часть тяжелой цепи из другого клостридиального нейротоксина или подтипа клостридиального нейротоксина. В одном варианте осуществления гибридный клостридиальный нейротоксин может содержать всю легкую цепь из одного подтипа клостридиального нейротоксина и тяжелую цепь из другого подтипа клостридиального нейротоксина. В другом варианте осуществления химерный клостридиальный нейротоксин может содержать часть (например, связывающий домен) тяжелой цепи одного подтипа клостридиального нейротоксина, причем другая часть тяжелой цепи происходит из другого подтипа клостридиального нейротоксина. Аналогично или альтернативно, терапевтический элемент может содержать части легких цепей из различных клостридиальных нейротоксинов. Такие гибридные или химерные клостридиальные нейротоксины являются пригодными, например, в качестве средств для обеспечения терапевтической пользы таких клостридиальных нейротоксинов у пациентов, которые являются иммунологически резистентными к данному подтипу клостридиального нейротоксина, у пациентов, которые могут иметь более низкую чем средняя концентрация рецепторов к данному связывающему тяжелую цепь клостридиального нейротоксина домена, или у пациентов, которые могут иметь резистентный к протеазам вариант мембранного или везикулярного субстрата токсина (например, SNAP-25, VAMP и синтаксин). Гибридные и химерные клостридиальные нейротоксины описаны в US 8071110, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Таким образом, в одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению представляет собой сконструированный гибридный клостридиальный нейротоксин или сконструированный химерный клостридиальный нейротоксин.

В особенно предпочтительном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин представляет собой ВоNT/X, содержащий по меньшей мере один домен из клостридиального нейротоксина, не являющегося ВоNT/X (например, гибрида или химера ВоNT/X).

Например, в одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин по изобретению (содержащий экзогенную петлю активации) может содержать:

- i. L-цепь ВоNT/X и домен  $H_N$  и  $H_C$  не ВоNT/X;
- ii. Домен  $H_N$  ВоNT/X и L-цепь и домен  $H_C$  не ВоNT/X;
- iii. Домен  $H_C$  ВоNT/X и L-цепь и  $H_N$ -домен не ВоNT/X;
- iv. L-цепь и  $H_N$ -домен ВоNT/X и  $H_C$ -домен не ВоNT/X;
- v. L-цепь и  $H_C$ -домен ВоNT/X и  $H_N$ -домен не ВоNT/X; или
- vi.  $H_N$ -домен и  $H_C$ -домен ВоNT/X и L-цепь не ВоNT/X.

В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению содержит L-цепь и  $H_N$ -домен ВоNT/X и  $H_C$ -домен ВоNT/A. В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по



сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению, содержащий L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/X и  $H_C$ -домен VoNT/A, содержит (более предпочтительно состоит из) полипептидную последовательность, указанную в качестве SEQ ID NO: 9.

В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению содержит L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/X и  $H_C$ -домен VoNT/C. В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению содержит L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/X и  $H_C$ -домен VoNT/D. В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению содержит L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/X и  $H_C$ -домен VoNT/E. В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению содержит L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/X и  $H_C$ -домен VoNT/F. В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению содержит L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/X и  $H_C$ -домен VoNT/G. В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению содержит L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/X и  $H_C$ -домен TeNT.

В одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин представляет собой VoNT/A, содержащий по меньшей мере один домен из клостридиального нейротоксина не VoNT/A.

Например, в одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин по изобретению (содержащий экзогенную петлю активации) может содержать:

- i. L-цепь VoNT/A и  $H_N$ - и  $H_C$ -домен не VoNT/A;
- ii.  $H_N$ -домен VoNT/A и L-цепь и  $H_C$ -домен не VoNT/A;
- iii.  $H_C$ -домен VoNT/A и L-цепь и  $H_N$ -домен не VoNT/A;
- iv. L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/A и  $H_C$ -домен не VoNT/A;
- v. L-цепь и  $H_C$ -домен VoNT/A и  $H_N$ -домен не VoNT/A; или
- vi.  $H_N$ -домен и  $H_C$ -домен VoNT/A и L-цепь не VoNT/A.

В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению содержит L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/A и  $H_C$ -домен VoNT/C1. В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению, содержащий L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/A и  $H_C$ -домен VoNT/C1, кодируется нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 12. В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению, содержащий L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/A и  $H_C$ -домен VoNT/C1, кодируется нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 80% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению, содержащий L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/A и  $H_C$ -домен VoNT/C1, кодируется нуклеотидной последовательностью, содержащей (более предпочтительно состоящий из) SEQ ID NO: 12. В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению, содержащий L-цепь

и  $H_N$  домен VoNT/A и  $H_C$ -домен VoNT/C1, содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 13. В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению, содержащий L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/A и  $H_C$ -домен VoNT/C1, содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 13. Предпочтительно сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению, содержащий L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/A и  $H_C$ -домен VoNT/C1, содержит (более предпочтительно состоит из) полипептидную последовательность, указанную в качестве SEQ ID NO: 13.

В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению содержит L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/A и  $H_C$ -домен VoNT/B. В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению содержит L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/A и  $H_C$ -домен VoNT/D. В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению содержит L-цепь и  $H_N$  домен VoNT/A и  $H_C$ -домен VoNT/E. В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению содержит L-цепь и  $H_N$  домен VoNT/A и  $H_C$ -домен VoNT/F. В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению содержит L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/A и  $H_C$ -домен VoNT/G. В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению содержит L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/A и  $H_C$ -домен VoNT/X. В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению содержит L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/A и  $H_C$ -домен TeNT.

Например, в одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин по изобретению (содержащий экзогенную петлю активации) может содержать:

- i. L-цепь VoNT/B и  $H_N$ - и  $H_C$ -домен не VoNT/B;
- ii.  $H_N$ -домен VoNT/B и L-цепь и  $H_C$ -домен не VoNT/B;
- iii.  $H_C$ -домен VoNT/B и L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/B;
- iv. L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/B и  $H_C$ -домен не VoNT/B;
- v. L-цепь и  $H_C$ -домен VoNT/B и  $H_N$ -домен не VoNT/B; или
- vi.  $H_N$ -домен и  $H_C$ -домен VoNT/B и L-цепь не VoNT/B.

Например, в одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин по изобретению (содержащий экзогенную петлю активации), может содержать:

- i. L-цепь VoNT/D и  $H_N$ - и  $H_C$ -домен не VoNT/XD;
- ii.  $H_N$ -домен VoNT/D и L-цепь и  $H_C$ -домен не VoNT/D;
- iii.  $H_C$ -домен VoNT/D и L-цепь и  $H_N$ -домен не VoNT/D;
- iv. L-цепь и  $H_N$ -домен VoNT/D и  $H_C$ -домен не VoNT/D;
- v. L-цепь и  $H_C$ -домен VoNT/D и  $H_N$ -домен не VoNT/D; или
- vi.  $H_N$ -домен и  $H_C$ -домен VoNT/D и L-цепь не VoNT/D.

Например, в одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин по



изобретению (содержащий экзогенную петлю активации) может содержать:

- i. L-цепь BoNT/E и H<sub>N</sub>- и H<sub>C</sub>-домен не BoNT/E;
- ii. H<sub>N</sub>-домен BoNT/E и L-цепь и H<sub>C</sub>-домен не BoNT/E;
- iii. H<sub>C</sub>-домен BoNT/E и L-цепь и H<sub>N</sub>-домен не BoNT/E;
- iv. L-цепь и H<sub>N</sub>-домен BoNT/E и H<sub>C</sub>-домен не BoNT/E;
- v. L-цепь и H<sub>C</sub>-домен BoNT/E и H<sub>N</sub>-домен не BoNT/E; или
- vi. H<sub>N</sub>-домен и H<sub>C</sub>-домен BoNT/E и L-цепь не BoNT/E.

Например, в одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин по изобретению (содержащий экзогенную петлю активации) может содержать:

- i. L-цепь BoNT/F и H<sub>N</sub> и H<sub>C</sub>-домен не BoNT/F;
- ii. H<sub>N</sub>-домен BoNT/F и L-цепь и H<sub>C</sub>-домен не BoNT/F;
- iii. H<sub>C</sub>-домен BoNT/F и L-цепь и H<sub>N</sub>-домен не BoNT/F;
- iv. L-цепь и H<sub>N</sub>-домен BoNT/F и H<sub>C</sub>-домен не BoNT/F;
- v. L-цепь и H<sub>C</sub>-домен BoNT/F и H<sub>N</sub>-домен не BoNT/F; или
- vi. H<sub>N</sub>-домен и H<sub>C</sub>-домен BoNT/F и L-цепь не BoNT/F.

Например, в одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин по изобретению (содержащий экзогенную петлю активации) может содержать:

- i. L-цепь BoNT/G и H<sub>N</sub>- и H<sub>C</sub>-домен не BoNT/G;
- ii. H<sub>N</sub>-домен BoNT/G и L-цепь и H<sub>C</sub>-домен не BoNT/G;
- iii. H<sub>C</sub>-домен BoNT/G и L-цепь и H<sub>N</sub>-домен не BoNT/G;
- iv. L-цепь и H<sub>N</sub>-домен BoNT/G и H<sub>C</sub>-домен не BoNT/G;
- v. L-цепь и H<sub>C</sub>-домен BoNT/G и H<sub>N</sub>-домен не BoNT/G; или
- vi. H<sub>N</sub>-домен и H<sub>C</sub>-домен BoNT/G и L-цепь не BoNT/G.

Например, в одном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин по изобретению (содержащий экзогенную петлю активации) может содержать:

- i. L-цепь TeNT и H<sub>N</sub>- и H<sub>C</sub>-домен не TeNT;
- ii. H<sub>N</sub>-домен TeNT и L-цепь и H<sub>C</sub>-домен не TeNT;
- iii. H<sub>C</sub>-домен TeNT и L-цепь и H<sub>N</sub>-домен не TeNT;
- iv. L-цепь и H<sub>N</sub>-домен TeNT и H<sub>C</sub>-домен не TeNT;
- v. L-цепь и H<sub>C</sub>-домен TeNT и H<sub>N</sub>-домен не TeNT; или
- vi. H<sub>N</sub>-домен и H<sub>C</sub>-домен TeNT и L-цепь не TeNT.

Термин "клостридиальный нейротоксин" также может охватывать вновь открытые представителе белкового семейства ботулинических нейротоксинов, экспрессируемые неклостридиальными микроорганизмами, такие как кодируемый *Enterococcus* токсин, который обладает наиболее высокую идентичность последовательности с BoNT/X, кодируемый *Weissella oryzae* токсин, называемый BoNT/Wo (NCBI Ref Seq: WP\_027699549.1), который расщепляет VAMP2 в W89-W90, кодируемый *Enterococcus faecium* токсин (GenBank: OTO22244.1), который расщепляет VAMP2 и SNAP25, и кодируемый *Chryseobacterium ripero* токсин (NCBI Ref.Seq: WP\_034687872.1).

Подразумевается, что термин "клостридиальный нейротоксин" охватывает

перенацеленные клостридиальные нейротоксины. В случае перенацеленного клостридиального нейротоксина, клостридиальный нейротоксин модифицируют включением экзогенного лиганда, известного как нацеливающая часть (ТМ). ТМ выбирают так, чтобы она обеспечивала специфичность связывания в отношении желаемой клетки-мишени и в качестве части процесса перенацеливания нативная связывающая часть клостридиального нейротоксина (например, Н<sub>С</sub>-домен или Н<sub>СС</sub>-домен) может быть удалена. Технология перенацеливания описаны, например, в: EP-B-0689459; WO 1994/021300; EP-B-0939818; US 6,461,617; US 7,192,596; WO 1998/007864; EP-B-0826051; US 5,989,545; US 6,395,513; US 6,962,703; WO 1996/033273; EP-B-0996468; US 7,052,702; WO 1999/017806; EP-B-1107794; US 6,632,440; 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; все из которых включены в качестве ссылок в полном объеме. Таким образом, в одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению представляет собой сконструированный перенацеленный клостридиальный нейротоксин. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по настоящему изобретению может быть лишен функционального Н<sub>С</sub>-домена клостридиального нейротоксина и также лишен какой-либо функционально эквивалентной ТМ. Таким образом, указанные полипептиды лишены естественной связывающей функции, которой обладает клостридиальный нейротоксин, и не способны связывать синапсомальные мембраны крысы (через клостридиальный компонент Н<sub>С</sub> или через какой-либо функционально эквивалентный ТМ) в анализах связывания, как описано в Shone et al. (1985) Eur. J. Biochem. 151, 75-82. В одном варианте осуществления ТМ предпочтительно не является пептидом агглютинина зародышей пшеницы (WGA).

В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по изобретению может включать сконструированный полипептид LH<sub>N</sub>, описанный в настоящем описании.

В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин может содержать сконструированный полипептид LH<sub>N</sub>, описанный в настоящем описании, и нацеливающую часть (ТМ).

Эталонные последовательности сконструированного полипептида LH<sub>N</sub> представлены в настоящем описании в качестве SEQ ID NO: 53-60, однако последовательность сконструированного полипептида LH<sub>N</sub> может обладать по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 53-60. В одном варианте осуществления последовательность сконструированного полипептида LH<sub>N</sub> может обладать по меньшей мере 80% или 90% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 53-60. Предпочтительно последовательность сконструированного полипептида LH<sub>N</sub> содержит (более предпочтительно состоит из) любой из SEQ ID NO: 53-60.

В одном варианте осуществления ТМ может содержать защитный антиген (РА) токсина сибирской язвы или его фрагмент. Эталонная последовательность РА указана в

качестве SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления РА содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 52, или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления РА содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 52 или ее фрагментом. В других вариантах осуществления РА содержит (или состоит из) полипептидную последовательность, представленную в качестве SEQ ID NO: 52, или ее фрагмента.

Таким образом, в одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин по настоящему изобретению может содержать: нецитотоксиический домен протеазы клостридиального нейротоксина, домен транслокации клостридиального нейротоксина (например,  $LH_N$  клостридиального нейротоксина), и ТМ, содержащую РА или ее фрагмент. Указанный сконструированный клостридиальный нейротоксин содержит экзогенную петлю активации, содержащую полипептидную последовательность  $Cys-(Xaa)_a-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cys$  (SEQ ID NO: 1).

Таким образом, в одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин содержит РА или его фрагмент и  $LH_N/A$ ,  $LH_N/B$ ,  $LH_N/D$ ,  $LH_N/E$ ,  $LH_N/F$ ,  $LH_N/G$ ,  $LH_N/X$  или  $LH_N/TeNT$ , где эндогенная петля активации клостридиального нейротоксина заменена экзогенной петлей активации, содержащей полипептидную последовательность  $Cys-(Xaa)_a-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cys$  (SEQ ID NO: 1).

Lys-C не является пригодным для применения с общепринятыми клостридиальными нейротоксинами, содержащими  $LH_N$  и ТМ в виде РА, поскольку Lys-C гидролизует одну или несколько пептидных связей вне эндогенной петли активации указанного клостридиального нейротоксина, например, было обнаружено, что Lys-C гидролизует одну или несколько пептидных связей в ТМ в виде РА.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин содержит РА (или его фрагмент) и:

- i. Аминокислотные остатки 1-871 SEQ ID NO: 35;
- ii. Аминокислотные остатки 1-858 SEQ ID NO: 36;
- iii. Аминокислотные остатки 1-862 SEQ ID NO: 38;
- iv. Аминокислотные остатки 1-845 SEQ ID NO: 39;
- v. Аминокислотные остатки 1-864 SEQ ID NO: 40;
- vi. Аминокислотные остатки 1-863 SEQ ID NO: 41;
- vii. Аминокислотные остатки 1-879 SEQ ID NO: 42; или
- viii. Аминокислотные остатки 1-924 SEQ ID NO: 33;

где петля активации эндогенного клостридиального нейротоксина заменена экзогенной петлей активации, содержащей полипептидную последовательность  $Cys-(Xaa)_a-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)_b-Cys$  (SEQ ID NO: 1).

В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин имеет полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с полипептидом, содержащим:

a. SEQ ID NO: 52; и

b. SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60.

В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин имеет полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% или 90% идентичностью последовательности с полипептидом, содержащим:

a. SEQ ID NO: 52; и

b. SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60.

Предпочтительно сконструированный клостридиальный нейротоксин имеет полипептидную последовательность, содержащую:

a. SEQ ID NO: 52; и

b. SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60.

В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин имеет полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с полипептидом, содержащим:

a. фрагмент SEQ ID NO: 52; и

b. SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60.

В одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин имеет полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% или 90% идентичностью последовательности с полипептидом, содержащим:

a. фрагмент SEQ ID NO: 52; и

b. SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60.

Предпочтительно сконструированный клостридиальный нейротоксин имеет полипептидную последовательность, содержащую:

a. фрагмент SEQ ID NO: 52; и

b. SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60.

В одном варианте осуществления фрагмент PA может представлять собой PAd1, который находится в положении остатков 1-258 SEQ ID NO: 52. В одном варианте осуществления фрагмент PA может представлять собой PAd2, который находится в положении остатков 259-487 SEQ ID NO: 52. В одном варианте осуществления фрагмент PA может представлять собой PAd3, который находится в положении остатков 488-594 SEQ ID NO: 52. В одном варианте осуществления фрагмент PA может представлять собой

PAd4, который находится в положении остатков 595-735 SEQ ID NO: 52. В других вариантах осуществления фрагмент PA может содержать любую комбинацию PAd1, PAd2, PAd3 или PAd4.

Полноразмерный PA размером 83 кДа (PA83) может протеолитически процессироваться фурином или другой фурин-подобной протеазой, в результате чего происходит удаление N-концевого фрагмента (PA20). Процессированная форма массой 63 кДа, известная как PA63, представляет собой олигомеризующую форму PA.

В одном варианте осуществления фрагмент PA может содержать (или состоять из) один или несколько PA63, PAd3-d4, PAd2-d4 и PAd4.

В одном варианте осуществления фрагмент PA может представлять собой связывающий C-концевой рецептор домен PA или его фрагмент PA (или его вариант), который сохраняет активность связывания с ANTXR2 или связывающим ноцирецептор нейронов белком.

Настоящее изобретение также охватывает клостридиальные нейротоксины, которые имеют ненативный участок расщепления протеазой. В таких клостридиальных нейротоксинах нативный участок расщепления протеазой (также известный как участок активации, как описано выше) модифицирован или заменен участком расщепления протеазой, который не является нативным для данного клостридиального нейротоксина (т.е. экзогенный участок расщепления). Такой участок требует экзогенной протеазы для расщепления, которая позволяет улучшение контроля времени и места событий расщепления. Ненативные участки расщепления протеазой, которые могут использоваться в клостридиальных нейротоксинах, включают:

TEV (вирус гравировки табака) (ENLYFQ↓G) (SEQ ID NO: 79)

Тромбин (LVPR↓GS) (SEQ ID NO: 80)

PreScission (LEVLFG↓GP) (SEQ ID NO: 81).

Дополнительные участки расщепления протеазой включают последовательности распознавания, которые расщепляются нецитотоксической протеазой, например, легкой цепью клостридиального нейротоксина. Они включают белковые последовательности распознавания SNARE (например, SNAP-25, синтаксин, VAMP), которые расщепляются нецитотоксическими протеазами, такими как легкая цепь клостридиального нейротоксина. Клостридиальные нейротоксины, содержащие ненативные участки расщепления, описаны в US 7132259, EP 1206554-B2 и US 2007/0166332, все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. Также термин "протеаза" охватывает участок расщепления, представляющий собой интеин, который является саморасщепляющейся последовательностью. Реакция самосплайсинга контролируется, например, посредством варьирования концентрации присутствующего восстановителя.

Настоящее изобретение также охватывает клостридиальные нейротоксины, содержащие "деструктивный участок расщепления". В указанных клостридиальных нейротоксинах ненативный участок расщепления протеазой включен в клостридиальный нейротоксин в выбранном положении, так что расщепление в указанном участке снижает

активность или инактивирует клостридиальный нейротоксин. Деструктивный участок расщепления протеазой может быть чувствительным к расщеплению местной протеазой в случае, когда клостридиальный нейротоксин после введения мигрирует в область, не являющуюся мишенью. Подходящие ненативные участки расщепления протеазой включают участки, описанные выше. Клостридиальные нейротоксины, содержащие деструктивный участок расщепления, описаны в WO 2010/094905 и WO 2002/044199, обе из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

Сконструированные клостридиальные нейротоксины по настоящему изобретению, особенно их легкий компонент, могут быть пегилированными - это может помочь увеличить стабильность, например, длительность действия компонента легкой цепи. Пегилирование является особенно предпочтительным, когда легкая цепь содержит протеазу BoNT/A, B или C1. Пегилирование предпочтительно включает добавление ПЭГ к N-конце компонента легкой цепи. В качестве примера N-конец легкой цепи может быть удлинен на один или несколько аминокислотных остатков (например цистеин), которые могут быть одинаковыми или могут различаться. Один или несколько из указанных аминокислотных остатков могут иметь их собственную присоединенную (например, ковалентно связанную) к ним молекулу ПЭГ. Пример этой технологии описан в WO2007/104567, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Сконструированные клостридиальные нейротоксины по настоящему изобретению могут быть свободны от комплексообразующих белков, которые присутствуют во встречающемся в природе комплексе клостридиальных нейротоксинов.

Сконструированные клостридиальные нейротоксины по настоящему изобретению можно получать с использованием рекомбинантных технологий нуклеиновых кислот. Таким образом, в одном варианте осуществления сконструированный клостридиальный нейротоксин (как описано выше) представляет собой рекомбинантный сконструированный клостридиальный нейротоксин.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте (например, ДНК), содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированный клостридиальный нейротоксин, как описано выше. В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты получают в качестве части ДНК-вектора, содержащего промотор и терминатор.

В предпочтительном варианте осуществления вектор имеет промотор, выбранный из:

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

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

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

Молекулы нуклеиновых кислот по изобретению можно получать с использованием любого подходящего процесса, известного в данной области. Таким образом, молекулы нуклеиновых кислот можно получать с использованием способов химического синтеза. Альтернативно молекулы нуклеиновых кислот молекулы по изобретению можно получать с использованием способов молекулярной биологии.

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

Вышеупомянутую последовательность нуклеиновой кислоты необязательно модифицируют для использования кодонов в соответствии с предпочтением конечной экспрессирующей системы клетки-хозяина (например, *E. coli*), которую намереваются использовать.

В одном аспекте настоящее изобретение относится нуклеотидной последовательности, кодирующей сконструированный клостридиальный нейротоксин по настоящему изобретению. Нуклеотидная последовательность содержит последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12. В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность содержит последовательность, обладающую по меньшей мере 80% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12. Предпочтительно нуклеотидная последовательность содержит (более предпочтительно состоит из) SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12.

Нуклеотидная последовательность по изобретению кодирует полипептид, содержащий SEQ ID NO: 1.

Термины "нуклеотидная последовательность" и "нуклеиновая кислота" используют в настоящем описании в качестве синонимов. Предпочтительно нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность ДНК.

Изобретение относится к способу продуцирования белка одноцепочечного (сконструированного) клостридиального нейротоксина, имеющего легкую цепь и тяжелую цепь, причем способ включает экспрессию нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем описании, в подходящей клетке-хозяине, лизис клетки-хозяина с получением

гомогената клеток-хозяев, содержащего белок одноцепочечного (сконструированного) клостридиального нейротоксина, и выделения белка одноцепочечного (сконструированного) клостридиального нейротоксина. В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу протеолитического процессинга (сконструированного) клостридиального нейротоксина по настоящему изобретению в соответствующий двухцепочечный клостридиальный нейротоксин, причем способ включает приведение (сконструированного) клостридиального нейротоксина в контакт с протеазой (предпочтительно эндопептидаза, такая как энтерокиназа или фактор Ха), тем самым получая двухцепочечный клостридиальный нейротоксин (например, где легкая цепь и тяжелая цепь соединены вместе дисульфидной связью).

Таким образом, настоящее изобретение относится к двухцепочечному клостридиальному нейротоксину, получаемый способом по изобретению.

Термин "получаемый", как используют в рамках изобретения, также охватывает термин "полученный". В одном варианте осуществления термин "получаемый" означает полученный.

Клостридиальный нейротоксин по настоящему изобретению стабильно применим в медицине или в косметике. При применении клостридиальный нейротоксин предпочтительно имеет двухцепочечную форму.

(Сконструированные) клостридиальные нейротоксины по изобретению можно использовать для предупреждения или лечения определенных медицинских или косметических заболеваний и состояний. Таким образом, в следующем аспекте настоящее изобретение относится к (сконструированному) клостридиальному нейротоксину, как описано выше, для применения в медицине.

В родственном аспекте настоящее изобретение относится к (сконструированному) клостридиальному нейротоксину, как описано выше, для применения для предупреждения заболевания или состояния, выбранного из: состояния, ассоциированного с нежелательной иммунной секретией, страбизмом, блефароспазмом, косоглазием, дистонией (например, спастическая дистония, оромандибулярная дистония, очаговая дистония, поздняя дистония, ларингеальная дистония, дистония конечностей, цервикальная дистония), кривошеей (например, спастическая кривошея), применением в косметологии (косметике), при котором представляют интерес нарушения работоспособности клеток/мышц (посредством подавления или инактивации SNARE), нервно-мышечного нарушения или состояния подвижности глаз (например, сопутствующий страбизм, вертикальный страбизм, паралич латеральной прямой мышцы, нистагм, дистироидная миопатия), графоспазмом, блефароспазмом, бруксизмом, болезнью Вильсона, тремором, тиками, сегментным миоклонусом, спазмами, спастичностью вследствие хронического рассеянного склероза, спастичностью, приводящей к нарушению контроля мочевого пузыря, враждебностью, спазмом в спине, ушибом или разрывом мышц, тензионными головными болями, синдромом поднимающей мышцы таза, расщепленным позвоночником, поздней дискинезией, болезнью Паркинсона, заиканием,



гемифациальным спазмом, нарушением глазного яблока, церебральным параличом, очаговой спастичностью, спастическим колитом, нейрогенным мочевым пузырем, анизмусом, спастичностью конечностей, тиками, тремором, бруксизмом, анальными трещинами, ахалазией, дисфагией, слезоотделением, гипергидрозом, чрезмерным слюноотделением, чрезмерной желудочно-кишечной секрецией, мышечной болью (например, боль в результате мышечных спазмов), головной болью (например, тензионная головная боль), межбровными складками, морщинами кожи, злокачественной опухолью, нарушениями матки, урогенитальными нарушениями, урогенитально-неврологическими нарушениями, хроническим нейрогенным воспалением и нарушением гладких мышц.

Где (сконструированный) клостридиальный нейротоксин по изобретению содержит последовательность VoNT/X (или ее часть), причем указанный клостридиальный нейротоксин может быть способен к нацеливанию на другие типы секреторных клеток, отличные от нейронов, вследствие его способности расщеплять VAMP4, VAMP5 и/или Ykt6. В некоторых вариантах осуществления секреторная клетка, на которую осуществляют нацеливание, представляет собой секреторную иммунную клетку. "Секреторная иммунная клетка", как используют в рамках изобретения, относится к иммунным клеткам, которые секретируют цитокины, хемокины или антитела. Такие секреторные иммунные клетки могут представлять собой клетки врожденного иммунитета, включающие, но не ограничивающиеся ими, натуральные киллеры, тучные клетки, эозинофилы, базофилы, макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки. Также посредством клостридиальных нейротоксинов по настоящему изобретению можно осуществлять нацеливание на секреторные иммунные клетки, которые секретируют антитела (например, лейкоциты). Неограничивающие примеры секретирующих антитела клеток включают, но не ограничиваются ими, плазматические В-клетки, плазмоциты, плазмациты и эффекторные В-клетки. В некоторых вариантах осуществления клостридиальный нейротоксин может модулировать иммунный ответ. Таким образом, кроме того, в рамках настоящего изобретения предусматривается терапевтическое применение клостридиального нейротоксина по изобретению для лечения состояния, ассоциированного с нежелательной секрецией, предпочтительно с нежелательной иммунной секрецией. Состояния, ассоциированные с нежелательной иммунной секрецией, включают, но не ограничиваются ими: воспаление, псориаз, аллергию, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз и алкогольное заболевание поджелудочной железы.

В одном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей (сконструированный) клостридиальный нейротоксин или двухцепочечный клостридиальный нейротоксин по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент, адъювант, пропеллент и/или соль.

(Сконструированные) клостридиальные нейротоксины по настоящему изобретению могут быть составлены для перорального, парентерального введения, непрерывной инфузии, ингаляции или местного применения. Композиции, пригодные для

инъекции, могут иметь форму растворов, суспензий или эмульсий, или сухих порошков, которые растворяют или суспендируют в подходящем носителе перед применением.

В случае (сконструированного) клостридиального нейротоксина, который доставляют локально, (сконструированный) клостридиальный нейротоксин может быть составлен в качестве крема (например, для местного применения) или для подкожной инъекции.

Средства локальной доставки могут включать аэрозоль или другой спрей (например, небулайзер). В этом отношении, аэрозольный состав (сконструированного) клостридиального нейротоксина позволяет доставку в легкие и/или другие носовые и/или бронхиальные, или дыхательные пути.

(Сконструированные) клостридиальные нейротоксины по изобретению можно вводить пациенту посредством интратекальной или эпидуральной инъекции в позвоночный столб на уровне сегмента позвоночника, вовлеченного в иннервацию пораженного органа.

Предпочтительным путем введения является лапароскопический путь и/или локализованная, в частности внутримышечная, инъекция.

Диапазоны дозировок для введения (сконструированных) клостридиальных нейротоксинов по настоящему изобретению представляют собой диапазоны, которые вызывают желаемый терапевтический эффект. Будет понятно, что требуемый диапазон дозировок зависит от точной природы (сконструированного) клостридиального нейротоксина или композиции, пути введения, природы состава, возраста пациента, природы, степени или тяжести состояния пациента, противопоказаний, при их наличии, и мнения лечащего врача. Эти дозировки могут варьироваться с использованием стандартных эмпирических способов оптимизации.

Подходящие суточные дозировки (на кг массы тела пациента) находятся в диапазоне 0,0001-1 нг/кг, предпочтительно 0,0001-0,5 нг/кг, более предпочтительно 0,002-0,5 нг/кг, и особенно предпочтительно 0,004-0,5 нг/кг. Единичная дозировка может варьироваться от менее 1 пикограмма до 30 нг, однако, как правило, она находится в диапазоне от 0,01 до 1 нг на дозу, которую можно вводить каждые сутки или предпочтительно менее часто, например, раз в неделю или раз в шесть месяцев.

Особенно предпочтительный режим дозирования основан на 0,05 нг (сконструированного) клостридиального нейротоксина в качестве 1X дозы. В этом отношении, предпочтительные дозировки находятся в диапазоне 1X-100X (т.е. 0,05-5 нг).

Жидкие дозированные формы, как правило, получают с использованием (сконструированного) клостридиального нейротоксина и свободного от пирогенов стерильного носителя. (Сконструированный) клостридиальный нейротоксин, в зависимости от используемого носителя и концентрации, может быть либо растворен, либо суспендирован в носителе. При получении растворов (сконструированный) клостридиальный нейротоксин можно растворять в носителе, раствор при необходимости можно преобразовывать в изотонический посредством добавления хлорида натрия и

стерилизовать фильтрацией через стерильный фильтр с использованием асептических способов перед заполнением стерильных флаконов или ампул и герметизации. Альтернативно, если стабильность раствора является достаточной, раствор в его закрытых контейнерах можно стерилизовать автоклавированием. Преимущественно, добавки, такие как буферные вещества, солубилизирующие вещества, стабилизирующие вещества, консерванты или бактерицидные средства, суспендирующие средства или эмульгаторы, и/или местные анестетики могут быть растворены в носителе.

Сухие порошки, которые растворяют или суспендируют в подходящем носителе перед применением можно получать путем заполнения предварительно стерилизованными ингредиентами стерильного контейнера с использованием асептического способа в стерильной зоне. Альтернативно ингредиенты могут быть растворены в подходящих контейнерах с использованием асептического способа в стерильной зоне. Затем продукт лиофилизируют и контейнеры запечатывают в асептических условиях.

Парентеральные суспензии, пригодные для внутримышечной, подкожной или внутривенной инъекции, приготавливают по существу одним и тем же способом, за исключением того, что стерильные компоненты суспендируют в стерильном носителе вместо растворения, и стерилизация не может быть осуществлена посредством фильтрации. Компоненты можно выделять в стерильном состоянии или альтернативно они могут быть стерилизованы после выделения, например, посредством облучения гамма-излучением.

Преимущественно, в композицию(и) включают суспендирующее вещество, например, поливинилпирролидон, для облегчения однородного распределения компонентов.

Для введения в соответствии с настоящим изобретением может использоваться множество технологий доставки, включая инкапсулирование в микрочастицы, вирусные системы доставки или включение в аэрозоль под высоким давлением.

Предполагается, что варианты осуществления, связанные с различными способами по изобретению, могут применяться в равной степени к другим способам, клостридиальным нейротоксинам, например, сконструированным клостридиальным нейротоксинам (как в одноцепочечной, так и в двухцепочечной форме), применениям или фармацевтическим композициям, и наоборот.

### ГОМОЛОГИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Для определения процентной идентичности можно использовать любой из различных способов выравнивания, включая, но не ограничиваясь ими, глобальные способы, локальные способы и гибридные способы, например, такие как способы сегментного подхода. Протоколы для определения процентной идентичности являются стандартными методиками, входящим в объем способностей специалиста в данной области. Глобальные способы выравнивают последовательности сначала до конца молекулы и определяют наилучшее выравнивание путем суммирования показателей

индивидуальных пар остатков и путем применения штрафов за пропуски. Неограничивающие способы включают, например, CLUSTAL W, см., например, Julie D. Thompson et al., CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22(22) *Nucleic Acids Research* 4673-4680 (1994); и итеративное уточнение, см., например, Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) *J. Mol. Biol.* 823-838 (1996). Локальные способы выравнивают последовательности посредством идентификации одного или нескольких консервативных мотивов, общих для всех из входных последовательностей. Неограничивающие способы включают, например, Match-box, см., например, Eric Depiereux and Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) *CABIOS* 501-509 (1992); Gibbs sampling, см., например, C. E. Lawrence et al., Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262 (5131) *Science* 208-214 (1993); Align-M, см., например, Ivo Van Waile et al., Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9) *Bioinformatics*:1428-1435 (2004).

Таким образом, процентную идентичность последовательностей определяют общепринятыми способами. См., например, Altschul et al., *Bull. Math. Bio.* 48: 603-16, 1986 и Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-19, 1992. В кратком изложении, две аминокислотных последовательности выравнивают для оптимизации показателей выравнивания с использованием штрафа за внесение делеции 10, штрафа за продолжение делеции 1 и оценочной матрицы "blosum 62", Henikoff and Henikoff (там же), как показано ниже (аминокислоты указаны посредством стандартного однобуквенного кода).

"Процентная идентичность последовательностей" между двумя или более последовательностями нуклеиновых кислот или аминокислот является функцией количества идентичных положений между последовательностями. Таким образом, % идентичность можно вычислять как количество идентичных нуклеотидов/аминокислот на общее количество нуклеотидов/аминокислот, умноженное на 100. В вычислении % идентичности последовательностей также учитывается количество пропусков и длина каждого пропуска, который необходимо вносить для оптимизации выравнивания двух или более последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности между двумя или более последовательностями можно проводить с использованием специальных математических алгоритмов, таких как BLAST, которые известны специалисту в данной области.

### **ПОКАЗАТЕЛИ ВЫРВАНЕНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИДЕНТИЧНОСТИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

A R N D C Q E G H I L K M F P S T W Y V

A 4

R -1 5

N -2 0 6

D -2 -2 1 6

C 0 -3 -3 -3 9

Q -1 1 0 0 -3 5

E -1 0 0 2 -4 2 5

G 0 -2 0 -1 -3 -2 -2 6

H -2 0 1 -1 -3 0 0 -2 8

I -1 -3 -3 -3 -1 -3 -3 -4 -3 4

L -1 -2 -3 -4 -1 -2 -3 -4 -3 2 4

K -1 2 0 -1 -3 1 1 -2 -1 -3 -2 5

M -1 -1 -2 -3 -1 0 -2 -3 -2 1 2 -1 5

F -2 -3 -3 -3 -2 -3 -3 -3 -1 0 0 -3 0 6

P -1 -2 -2 -1 -3 -1 -1 -2 -2 -3 -3 -1 -2 -4 7

S 1 -1 1 0 -1 0 0 0 -1 -2 -2 0 -1 -2 -1 4

T 0 -1 0 -1 -1 -1 -1 -2 -2 -1 -1 -1 -1 -2 -1 1 5

W -3 -3 -4 -4 -2 -2 -3 -2 -2 -3 -2 -3 -1 1 -4 -3 -2 11

Y -2 -2 -2 -3 -2 -1 -2 -3 2 -1 -1 -2 -1 3 -3 -2 -2 2 7

V 0 -3 -3 -3 -1 -2 -2 -3 -3 3 1 -2 1 -1 -2 -2 0 -3 -1 4

Затем процентную идентичность вычисляют следующим образом:

Общее количество идентичных совпадений

× 100

[длина наиболее длинной последовательности плюс количество пропусков, внесенное в более длинную последовательность, для выравнивания двух последовательностей]

По существу гомологичные полипептиды характеризуются наличием одной или нескольких аминокислотных замен, делеций или вставок. Эти изменения предпочтительно являются незначительными, т.е. представляют собой консервативные аминокислотные замены (см. ниже) и другие замены, которые не оказывают значительного влияния на сворачивание и активность полипептида; небольшие делеции, как правило, от одной до приблизительно 30 аминокислот; и небольшие N- или C-концевые удлинения, такие как

N-концевой остаток метионина, небольшой линкерный пептид из вплоть до приблизительно 20-25 остатков, или аффинную метку.

#### КОНСЕРВАТИВНЫЕ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ

Основные: аргинин, лизин, гистидин

Кислотные: глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота

Полярные: глутамин, аспарагин

Гидрофобные: лейцин, изолейцин, валин

Ароматические: фенилаланин, триптофан, тирозин

Небольшие: глицин, аланин, серин, треонин, метионин

В дополнение к 20 стандартным аминокислотам, нестандартными аминокислотами (такими как 4-гидроксипролин, 6-N-метиллизин, 2-аминоизомасляная кислота, изовалин и  $\alpha$ -метилсерин) можно заменять аминокислотные остатки полипептидов по настоящему изобретению. Аминокислотные остатки полипептида можно заменять ограниченным количеством неконсервативных аминокислот, аминокислот, которые не кодируются генетическим кодом и неприродных аминокислот. Полипептиды по настоящему изобретению также могут содержать не встречающиеся в природе аминокислотные остатки.

Не встречающиеся в природе аминокислоты включают, но не ограничиваются ими, транс-3-метилпролин, 2,4-метанопролин, цис-4-гидроксипролин, транс-4-гидроксипролин, N-метилглицин, аллотреонин, метилтреонин, гидроксиэтилцистеин, гидроксиэтилгомоцистеин, нитроглутамин, гомоглутамин, пипеколиновую кислоту, трет-лейцин, норвалин, 2-азафенилаланин, 3-азафенилаланин, 4-азафенилаланин и 4-фторфенилаланин. В данной области известно несколько способов включения не встречающихся в природе аминокислотных остатков в белки. Например, можно использовать систему *in vitro*, где нонсенс-мутации подавляются с использованием химически аминоацелированных супрессорных тРНК. Способы синтеза аминокислот и аминоацелирования тРНК известны в данной области. Транскрипцию и трансляцию плазмид, содержащих нонсенс-мутации, проводят в бесклеточной системе, содержащей экстракт *E. coli* S30 и коммерчески доступные ферменты и другие реагенты. Белки очищают посредством хроматографии. См., например, Robertson et al., *J. Am. Chem. Soc.* 113:2722, 1991; Ellman et al., *Methods Enzymol.* 202:301, 1991; Chung et al., *Science* 259:806-9, 1993; и Chung et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10145-9, 1993). Во втором способе трансляцию проводят в ооцитах *Xenopus* посредством микроинъекции мутантной мРНК и химически аминоацелированных супрессорных тРНК (Turcatti et al., *J. Biol. Chem.* 271:19991-8, 1996). В третьем способе клетки *E. coli* культивируют в отсутствие природной аминокислоты, подлежащей замене (например, фенилаланин) и в присутствии желаемой не встречающейся в природе аминокислоты(аминокислот) (например, 2-азафенилаланин, 3-азафенилаланин, 4-азафенилаланин или 4-фторфенилаланин). Не встречающуюся в природе аминокислоту включают в полипептид вместо ее природного аналога. См., Koide et al., *Biochem.* 33:7470-6, 1994. Встречающиеся в природе

аминокислотные остатки можно конвертировать в не встречающиеся в природе формы посредством химической модификации *in vitro*. Химическую модификацию можно комбинировать с сайт-направленным мутагенезом для дальнейшего расширения диапазона замен (Wynn and Richards, *Proteins Sci.* 2:395-403, 1993).

Аминокислотные остатки полипептидов по настоящему изобретению могут быть замещены неконсервативными аминокислотами, аминокислотами, которые не кодируются генетическим кодом, не встречающимися в природе аминокислотами, и неприродными аминокислотами.

Незаменимые аминокислоты в полипептидах по настоящему изобретению можно идентифицировать с помощью методик, известных в данной области, таких как сайт-направленный мутагенез или аланин-сканирующий мутагенез (Cunningham and Wells, *Science* 244: 1081-5, 1989). Участки биологического взаимодействия также могут быть определены посредством физического анализа структуры, при определены такими способами, как ядерный магнитный резонанс, кристаллография, электрогистография или фотоаффинное мечение, совместно с мутацией предполагаемых аминокислот участков контакта. См., например, de Vos et al., *Science* 255:306-12, 1992; Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224:899-904, 1992; Wlodaver et al., *FEBS Lett.* 309:59-64, 1992. Тип незаменимых аминокислот также может быть установлен посредством анализа гомологов с родственными компонентами (например, компоненты транслокации или протеазные компоненты) полипептидов по настоящему изобретению.

Множество аминокислотных замен можно вносить и тестировать с использованием известных способов мутагенеза и скрининга, таких как способы, описанные Reidhaar-Olson and Sauer (*Science* 241:53-7, 1988) или Bowie and Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2152-6, 1989). В кратком изложении, эти авторы описывают способы одновременной рандомизации двух или более положений в полипептиде, селекции функционального полипептида, а затем секвенирования подвергнутых мутагенезу полипептидов для определения спектра допустимых замен в каждом положении. Другие способы, которые можно использовать, включают фаговый дисплей (например, Lowman et al., *Biochem.* 30:10832-7, 1991; Ladner et al., патент США № 5223409; Huse, публикация WIPO WO 92/06204) и мутагенез, целенаправленно воздействующий на область (Derbyshire et al., *Gene* 46:145, 1986; Ner et al., *DNA* 7:127, 1988).

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, обладают тем же значением, которое обычно подразумевают специалистом в области, к которой относится настоящее изобретение. В Singleton, et al., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994), и Hale & Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY*, Harper Perennial, NY (1991) предоставлен специалисту в данной области общий словарь многих из терминов, используемых в настоящем описании.

Настоящее изобретение не ограничивается иллюстративными способами и материалами, описанными в настоящем описании, и любые способы и материалы,

сходные или эквивалентные способам, описанным в настоящем описании, можно использовать для применения на практике или тестирования вариантов осуществления изобретения. Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если нет иных указаний, любые последовательности нуклеиновых кислот написаны слева направо в ориентации от 5' к 3'; аминокислотные последовательности написаны слева направо в ориентации от N к C, соответственно.

Заголовки, приведенные в настоящем описании, не являются ограничениями различных аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения.

Аминокислоты указывают в настоящем описании с использованием названия аминокислот, трехбуквенного сокращенного обозначения или однобуквенного сокращенного обозначения. Термин "белок", как используют в рамках изобретения, включает белки, полипептиды и пептиды. Как используют в рамках изобретения, термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "полипептид" и/или термина "белок". В некоторых случаях термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "пептид". В некоторых случаях термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "фермент". Термины "белок" и "полипептид" используют в настоящем описании взаимозаменяемо. В настоящем описании и формуле изобретения можно использовать общепринятые однобуквенные и трехбуквенные коды аминокислотных остатков. 3-буквенный код аминокислот при определении в соответствии с Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) IUPACIUB. Также понятно, что полипептид может кодироваться более чем одной нуклеотидной последовательностью вследствие вырожденности генетического кода.

На протяжении настоящего описания могут быть приведены другие определения. Перед более подробным описанием иллюстративных вариантов осуществления, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными вариантами осуществления, и они по существу могут варьироваться. Также понятно, что терминология, используемая в настоящем описании, приведена только для цели описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения.

Когда предусматривается диапазон величин, понятно, что также конкретно предусматривается каждая входящая в этот диапазон величина до десятой доли единицы, если контекст не предусматривает иное, между верхним и нижним пределами этого диапазона. Изобретение охватывает каждый меньший диапазон между какой-либо указанной величиной или входящей в него величиной в указанном диапазоне и любой другой указанной или входящей в него величиной в этом указанном диапазоне. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены или исключены из диапазона, и изобретение охватывает каждый диапазон, где любой, ни один или оба из этих пределов включены в меньшие диапазоны при условии какого-либо конкретного исключенного предела в указанном диапазоне. Когда указанный диапазон включает один или оба из пределов, также изобретение включает любой или оба из этих



включенных пределов.

Необходимо отметить, что, как используют в рамках изобретения и в прилагаемой формуле изобретения, форма единственного числа включает множественное число, если контекст явно не указывает на иное. Таким образом, например, указание на "клостридиальный нейротоксин" включает множество таких средств-кандидатов и указание на "клостридиальный нейротоксин" включает указание на один или несколько клостридиальных нейротоксинов и их эквивалентов, известных специалистам в данной области, и т.д.

Публикации, описанные в настоящем описании, предоставлены только для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в настоящем описании не следует истолковывать как допущение того, что такие публикации составляют уровень техники для прилагаемой формулы изобретения.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

Варианты осуществления изобретения описаны далее только в качестве примеров с помощью прилагаемых чертежей и примеров.

На **фиг.1** представлено сравнение белковой последовательности петли активации для всех серотипов VoNT и столбнячного токсина с двумя фланкирующими остатками цистеина, образующими дисульфидный мостик, соединяющий легкую и тяжелую цепи молекулы токсина. Участок расщепления фактора Ха (IDGR) в VoNT/C1 и VoNT/CD подчеркнут.

На **фиг.2** показано, что все четыре протестированных протеазы: трипсин (TrypZean), Lys-C, фактор Ха (FXa) и энтерокиназа (ЕК), обладают способностью расщеплять петлю активации VoNT/C1 и образовывать двухцепочечную молекулу по сравнению с контролем без обработки протеазой С. (**A, B**) VoNT/C1(0) (SEQ ID NO: 15), обработанный фактором Ха (FXa), энтерокиназой (ЕК) и трипсином (за период 1-16 часов), как указано, при тестировании посредством SDS-PAGE в не восстанавливающих (**A**) и восстанавливающих условиях (**B**). Аналогично, протеолитическое расщепление Lys-C создает двухцепочечные молекулы VoNT/C1 (**C**). Как трипсин, так и Lys-C, демонстрируют неспецифическое расщепление тяжелой цепи VoNT/C1. 1-маркер молекулярной массы (5 мкл); 2-контрольный образец (-LysC) - DTT; 3-контрольный образец (-LysC) +DTT; 4-активированный - DTT; 5-активированный +DTT.

На **фиг.3 (A)** представлено расщепление VoNT/X посредством Lys-C. Образцы тестировали в условиях без восстановления и восстановлением (+DTT). 1-маркер молекулярной массы (5 мкл); 2-контроль без протеазы; 3-LysC, 0,125 мкг/мл; 4-LysC, 0,25 мкг/мл; 5-LysC, 0,5 мкг/мл; 6-LysC, 1 мкг/мл; 7-LysC, 2 мкг/мл; 8-LysC, 4 мкг/мл; 9-контроль без протеазы +DTT; 10-LysC, 0,125 мкг/мл +DTT; 11-LysC, 0,25 мкг/мл +DTT; 12-LysC, 0,5 мкг/мл +DTT; 13-LysC, 1 мкг/мл +DTT; 14-LysC, 2 мкг/мл +DTT; 15-LysC, 4 мкг/мл +DTT; и 16-маркер молекулярной массы (5 мкл). На (**B**) представлено расщепление VoNT/X посредством трипсина (TrypZean), фактор Ха и энтерокиназы. Образцы тестировали в условиях без восстановления и с восстановлением (+DTT). 1-маркер

молекулярной массы (5 мкл); 2-контроль без протеазы; 3-TrypZean, 0,125 мкг/мл; 4-TrypZean, 0,25 мкг/мл; 5-контроль без протеазы; 6-TrypZean, 1 мкг/мл; 7-TrypZean, 2 мкг/мл; 8-TrypZean, 4 мкг/мл; 9-фактор Ха, 5 мкг/мл; 10-энтерокиназа 0,01 мкг/мл; 11-контроль без протеазы +DTT; 12-TrypZean, 0,125 мкг/мл +DTT; 13-TrypZean, 0,25 мкг/мл +DTT; 14-контроль без протеазы +DTT; 15-TrypZean, 1 мкг/мл +DTT; 16-TrypZean, 2 мкг/мл +DTT; 17-TrypZean, 4 мкг/мл +DTT; 18-фактор Ха, 5 мкг/мл; 19-энтерокиназа, 0,01 мкг/мл; и 20-маркер молекулярной массы (5 мкл).

На **фиг.4** представлен сконструированный VoNT/X (SEQ ID NO: 5), обработанный указанными протеазами, и успешное образование двухцепочечного VoNT, о чем свидетельствует сравнение между условиями без восстановления (-DTT) и с восстановлением (+DTT). На дорожках 4-7 представлены образцы при обработке. На дорожках 8-11 представлены конечные образцы после последней стадии очистки. 1-изображение нагрузки HisHP; 2-контроль -DTT -протеаза; 3-контроль +DTT - протеаза; 4-с активацией-DTT +ЕК; 5-с активацией+DTT +ЕК; 6-с активацией -DTT +FXa; 7-с активацией +DTT +FXa; 8-конечные - DTT ЕК активная; 9-конечные +DTT ЕК активная; 10-конечные -DTT FXa активный; 11-конечные +DTT FXa активный.

На **фиг.5 (А)** представлен VoNT/E, протестированный с 10 мкг/мл эндопротеазы Lys-C из *Lysobacter enzymogenes* ("Lys-C") и *Pseudomonas aeruginosa* ("rLys-C") в течение 2 ч при 37°. Образцы тестировали в условиях без восстановления и с восстановлением (+TSEP). На **(В)** представлен VoNT/E, обработанный указанными количествами трипсина в течение 7 ч при 20°C. **(С)** - образец, хранившийся при -20°C. **(Т)** - контроль без протеазы при 20°C. Образцы тестировали в условиях с восстановлением (+DTT).

На **фиг.6** представлен сконструированный VoNT/E (SEQ ID NO: 11), обработанный указанными протеазами, и успешное образование двухцепочечного VoNT, о чем свидетельствует сравнение между условиями без восстановления (-DTT) и с восстановлением (+DTT). 1-маркер молекулярной массы (5 мкл); 2-контрольный образец (- ЕК) - DTT; 3-контрольный образец (- ЕК) +DTT; 4-с активацией (+ ЕК) - DTT; 5-с активацией (+ ЕК) +DTT; 11-маркер молекулярной массы (5 мкл); 6-контрольный образец (- FXa) - DTT; 7-контрольный образец (- FXa) +DTT; 8-с активацией (+ FXa) - DTT; 9-с активацией (+ FXa) +DTT.

На **фиг.7 (А)** представлен сконструированный VoNT/A1C1 (SEQ ID NO: 13), обработанный протеазой фактором Ха, и последовательное образование двухцепочечного VoNT, о чем свидетельствует сравнение между условиями без восстановления (-DTT) и с восстановлением (+DTT). 1-маркер молекулярной массы; 2-контроль (-FXa -DTT); 3-контроль (-FXa +DTT); 4-с активацией (+FXa -DTT); 5-с активацией (+FXa +DTT). На **(В)** представлено расщепление VoNT/A1 посредством FXa или ЕК через 2 часа по сравнению с положительным контролем (двухцепочечный VoNT/A1).

На **фиг.8** представлено зависимое от дозы VoNT/A1C1 и VoNT/C1 ингибирование высвобождения глутамата из первичных нейронов крысы.

На **фиг.9** представлен интактный анализ массы не восстановленного

сконструированного VoNT/E (SEQ ID NO: 11), активированного энтерокиназой с указанной массой 143853 Да.

На **фиг.10** представлен анализ массы исходного вещества восстановленного сконструированного VoNT/E (SEQ ID NO: 11), активированного энтерокиназой с указанной массой 47518 Да и 96338 Да.

На **фиг.11** представлен анализ массы исходного вещества не восстановленного сконструированного VoNT/E (SEQ ID NO: 11), активированного фактором Ха с указанной массой 143850 Да.

На **фиг.12** представлен анализ массы исходного вещества восстановленного сконструированного VoNT/E (SEQ ID NO: 11), активированного фактором Ха с указанной массой 47518 Да и 96335 Да.

На **фиг.13** представлен контактирующий с L<sub>H<sub>N</sub></sub>/A1 участок расщепления ЕК, встроенный в петлю активации (SEQ ID NO: 44) и обработанный ЕК по сравнению с нативной петлей A1 (SEQ ID NO: 46) при обработке Lys-C. 1-маркер молекулярной массы (5 мкл); 2-пустой; 3-SEQ ID NO: 44 +ЕК -DTT; 4-SEQ ID NO: 44 +ЕК +DTT; 5-SEQ ID NO: 44 -ЕК -DTT; 6-SEQ ID NO: 44 -ЕК +DTT; 7-маркер молекулярной массы; 8-SEQ ID NO: 46 -LysC -DTT; 9-SEQ ID NO: 46 -LysC -DTT; 10-SEQ ID NO: 46 +LysC -DTT; 11-SEQ ID NO: 46 -LysC +DTT; 12-SEQ ID NO: 46 -LysC +DTT и 13-SEQ ID NO: 46 +LysC +DTT.

На **фиг.14** представлена активация сконструированная VoNT/XA (SEQ ID NO: 7) с FXa. На **фиг.14** представлена активация сконструированная VoNT/XA (SEQ ID NO: 7) с FXa.

На **фиг.15** представлена активация сконструированного VoNT/XB (SEQ ID NO: 9) посредством FXa.

### **СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

Где первоначальный аминокислотный остаток Met или соответствующий первоначальный кодон указан в любой из приведенных ниже SEQ ID NO, причем указанный остаток/кодон является необязательным.

#### SEQ ID NO: 1 (консенсусная последовательность петли активации C1)

Cys-(Xaa)<sub>a</sub>-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)<sub>b</sub>-Cys

#### SEQ ID NO: 2 (петля активации C1)

CHKAIDGRSLYNKTLDC

#### SEQ ID NO: 3 (вариант петли активации C1)

CHKAIEGRSLYNKTLDC

#### SEQ ID NO: 4 (нуклеотидная последовательность VoNT/X с петлей активации C1)

ATGAAACTGGAAATCAACAAATTCAACTACAACGATCCGATCGATGGCATT  
ATGTTATTACCATGCGTCCGCCTCGTCATAGCGATAAAATCAATAAAGGTAAAGGTC  
CGTTCAAAGCSTTTTCAGGTGATTAAAAACATTTGGATTGTGCCGGAACGCTACAAC  
TTACCAATAATACCAACGATCTGAACATTCGAGCGAACCGATTATGGAAGCAGAT  
GCCATTTATAACCCGAACSTATCTGAATACCCCGAGCGAAAAAGATGAATTTCTGCAG  
GGTGTATTCAAAGTGCTGGAACGCATTAAAAGCAAACCGGAAGGTGAAAACTGCT

GGAAGTATTAGCAGCAGCATTCCGCTGCCGCTGGTTAGCAATGGTGCCTGACCCT  
GAGCGATAATGAAACCATTGCATATCAAGAGAACAACAACATTGTGAGCAATCTGC  
AGGCAAACCTGGTTATTTATGGTCCGGGTCCTGATATTGCAAATAATGCAACCTATG  
GTCTGTATAGCACCCCGATTAGTAATGGTGAAGGTACACTGAGCGAAGTTAGCTTTA  
GCCCCTTTTATCTGAAACCGTTTGATGAAAGCTATGGCAATTATCGTAGCCTGGTGA  
ATATCGTGAACAAATTCGTGAAACGTGAATTTGCACCTGATCCGGCAAGCACCCCTGA  
TGCATGAACTGGTTCATGTTACCCATAATCTGTATGGTATTAGCAACCGCAACTTCT  
ACTATAACTTTGACACCCGGCAAAATTGAAACCAGCCGTCAGCAGAATAGCCTGATTT  
TTGAAGAACTGCTGACCTTTGGTGGCATTGATAGCAAAGCAATTAGCAGCCTGATCA  
TCAAGAAAATTATCGAAACCGCCAAGAACAACCTATAACCACGCTGATTAGCGAACGC  
CTGAATACCGTTACCGTTGAAAATGATCTGCTGAAATATATCAAAAACAAAATCCCCG  
GTTACAGGGTCGTCTGGGTAACCTTTAAACTGGATACCGCAGAATTCGAGAAAAAGCT  
GAATACCATTCTGTTTGTGCTGAACGAAAGCAATCTGGCACAGCGTTTTAGCATTCT  
GGTTCGTAAACATTACCTGAAAGAACGTCCGATTGATCCGATTTATGTGAACATTCT  
GGATGACAATAGCTACAGCACCCCTGGAAGGTTTTAACATTAGCAGTCAGGGTAGCA  
ATGATTTCCAAGGTCAGCTGCTGGAAAGCAGCTATTTTGAAAAATTGAAAGCAAT  
GCCCTGCGTGCCTTTATCAAAATTTGTCATAAAGCCATTGATGGTTCGAGCCTGTAT  
AACAAAACCCTGGATTGTATTGAGGTGGAAAACAAAGACCTGTTTCTGATTAGCAA  
CAAAGATAGCCTGAACGATATTAACCTGAGCGAAGAAAAAATCAAACCGGAAACC  
ACCGTGTCTTCAAAGATAAACTGCCTCCGCAGGATATTACGCTGAGCAATTATGAT  
TTTACCGAAGCCAATAGCATTCCGAGCATTAGCCAGCAGAACATTCTGGAACGTAAT  
GAAGAACTGTATGAACCGATTTCGCAATAGCCTGTTTGAAATCAAACCATCTATGTG  
GATAAGCTGACCACCTTTTCAATTTTCTGGAAGCCCAGAATATTGATGAGAGCATTGAT  
AGCAGCAAAATTCGTGTTGAACTGACCGATAGCGTTGATGAAGCACTGAGCAATCC  
GAATAAAGTTTATAGCCCGTTCAAGAACATGAGCAACACCATTAATAGCATTGAAA  
CCGGTATTACCAGCACCTACATCTTTTATCAGTGGCTGCGTAGCATCGTGAAAGATT  
TTAGTGATGAAACCGGCAAAATCGACGTGATTGATAAAAGCAGCGATACCCTGGCA  
ATTGTTCCGTATATTGGTCCGCTGCTGAATATTGGTAATGATATTCGTATGGCGATT  
TTGTGGGTGCAATTGAACTGGCAGGCATTACCGCACTGCTGGAATATGTTCCGGAAT  
TTACCATTCCGATTCTGGTTGGTCTGGAAGTTATTGGTGGCGAACTGGCACGTGAAC  
AGGTTGAAGCAATTGTTAATAATGCCCTGGATAAACGCGATCAGAAATGGGCAGAA  
GTTTACAATATTACCAAAGCACAGTGGTGGGGCACCATTCAATTAACAGATTAATACC  
CGTCTGGCCCATACCTATAAAGCCCTGAGCCGTCAGGCAAATGCCATTAATAATGAAT  
ATGGAATTTAGCTGGCCAACTACAAAGGCAACATTGATGATAAAGCCAAGATCAA  
AAACGCCATCAGCGAAACCGAAATTCTGCTGAACAAAAGCGTTGAACAGGCCATGA  
AAAACACCGAGAAATTCATGATTAACTGAGCAACAGCTACCTGACCAAAGAAATG  
ATTCCGAAAGTTCAGGACAACCTGAAAAACTTTGATCTGGAAACCAAAAAGACCCT  
GGACAAGTTCATCAAAGAGAAAGAAGATATCCTGGGCACCAATCTGAGCAGCAGCC  
TGCGTCGTAAAGTTAGCATTTCGTCTGAATAAAAACATTGCCTTCGACATCAACGATA  
TCCCGTTTAGCGAATTTGATGATCTGATCAACCAGTACAAAACGAGATCGAAGATT

ATGAAGTGCTGAATCTGGGTGCAGAAGATGGCAAAATCAAAGATCTGAGCGGTACA  
 ACCAGCGATATCAATATTGGTTCAGATATCGAACTGGCCGATGGTCGTGAAAATAA  
 AGCGATTAAGATTAAGGCAGCGAGAACAGCACCATCAA AATTGCAATGAACAAAT  
 ATCTGCGTTTTAGCGCGACCGATAACTTTAGCATTAGCTTTTGGATCAAACATCCGA  
 AACCGACCAATCTGCTTAATAACGGTATTGAATATACCCTGGTCGAGA ACTTTAATC  
 AGCGTGGTTGGAAAATTAGCATCCAGGATAGCAA ACTGATTTGGTATCTGCGCGATC  
 ACAATAACAGCATCAA AATCGTTACACCGGATTATATTGCGTTTAATGGCTGGAACC  
 TGATTACCATTACAAACAATCGTAGCAAAGGCAGCATCGTGTATGTTAACGGTAGC  
 AAAATTGAAGAGAAGGACATTAGCAGCATTTGGAATACCGAAGTGGATGATCCGAT  
 TATCTTCCGCCTGAAAAATAACCGTGATACCCAGGCATTTACCCTGCTGGATCAGTT  
 TAGCATTTATCGCAAAGA ACTGAACCAGAACGAAGTGGTGA AACTGTATAACTACT  
 ACTTCAACAGCAACTACATTCGCGATATTTGGGGTAATCCGCTGCAGTACAACAAAA  
 AATACTATCTGCAGACCCAGGACAAACCTGGTAAAGGTCTGATCCGCGAATATTGG  
 AGCAGCTTTGGTTATGATTATGTGATTCTGAGCGATAGCAAGACCATTACCTTTCCG  
 AATAATATCCGTTATGGTGCCCTGTATAATGGTAGCAAAGTGCTGATCAAGAACAGC  
 AAAAACTGGATGGTCTGGTGCGCAATAAAGATTTCAATTCAGCTGGAAATCGATGG  
 CTATAATATGGGTATTAGCGCAGATCGCTTTAACGAGGATACCAACTATATTGGCAC  
 CACCTATGGTACAACCCATGATCTGACCACCGATTTTGA AATTATTCAGCGCCAAGA  
 GAAATACCGCAATTATTGTCAGCTGAAAACCCCGTATAACATCTTTCATAAAAGCGG  
 TCTGATGAGCACCGAAACCAGCAAACCGACCTTCATGATTATCGCGATTGGGTTTA  
 TAGCAGCGCATGGTATTTTCAGAACTATGAAAATCTGAACCTGCGCAAACATACCA  
 AAACCAACTGGTATTTTATCCCGAAAGATGAAGGTTGGGATGAAGATCTGGAAGTG  
 CTGTTTCAGGGTCCGCATCATCACCACCATCACCATCATCACTGA

SEQ ID NO: 5 (полипептидная последовательность BoNT/X с петлей активации C1)

MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIKNIWIVPERYNF  
 TNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPSEKDEF LQGVKVLERIKSKPEGEKLELISSSI  
 PLPLVSN GALTLSDNETIAYQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEG  
 TLSEVSFS PFYLPKFDES YGNYSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHEL VHVTHNLYGIS  
 N RN FYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGIDSKA ISSLIKKI IETAKNNYTT LISERLNT  
 VT V EN DLLKYIKNKIPVQGR LGNFKLDTA EF EK KLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKHYL  
 KERPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISSQGSNDFQGLLESSYFEKIESNALRAFIKICHKAI  
 DGRSLYNKTLDCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKDKLPPQDITLSNY  
 DFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRV  
 ELTDSVDEALSNPNKVYSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDET GKIDVID  
 KSSDTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPILVGLVIGGELAR  
 EQVEAIVNNALDKRDQKWA EVYNITKAQWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA I KM  
 NMEFQLANYKGNIDDKAKIKNAISET EILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLT KEMIPK  
 VQDNLKNFDLET KKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNIAFDINDIPFSEFDDL  
 INQYKNEIEDYEVLNLGAEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIELADGRENKAIKIKGSENSTIKI  
 AMNKYLRFSATDNFSISFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLR

DHNSIKIVTPDYIAFNGWNLITITNNRSKGSIVYVNGSKIEEKDISSIWNTEVDDPIIFRLK  
 NNRDTQAFTLLDQFSIYRKELNQNEVVKLYNYFYNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQ  
 DKPGKGLIREYWSSFGYDYVILSDSKTITFPNNIRYGALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNK  
 DFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTTHDLTTDFEIIQRQEKYRNYCQLKTPYNI  
 FHKSGLMSTETSKPTFHDYRDWVYSSAWYFQNYENLNLRKHTKTNWYFIPKDEGWDE  
 DLEVLFGPHHHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 6 (нуклеотидная последовательность BoNT/XA [LH<sub>N</sub>X-H<sub>C</sub>A] с петлей активации C1)

ATGAAACTGGAAATCAACAAATTCAACTACAACGATCCGATCGATGGCATT  
 ATGTTATTACCATGCGTCCGCCTCGTCATAGCGATAAAATCAATAAAGGTAAAGGTC  
 CGTTCAAAGCCTTTCAGGTGATTA AAAACATTTGGATTGTGCCGGAACGCTACAAC  
 TTACCAATAATAACCAACGATCTGAACATTCCGAGCGAACCGATTATGGAAGCAGAT  
 GCCATTTATAACCCGAACTATCTGAATACCCCGAGCGAAAAAGATGAATTTCTGCAG  
 GGTGTTATCAAAGTGCTGGAACGCATTA AAAAGCAAACCGGAAGGTGAAAAACTGCT  
 GGAACCTGATTAGCAGCAGCATTCCGCTGCCGCTGGTTAGCAATGGTGCCTGACCT  
 GAGCGATAATGAAACCATTCATATCAAGAGAACAACAACATTGTGAGCAATCTGC  
 AGGCAAACCTGGTTATTTATGGTCCGGGTCCTGATATTGCAAATAATGCAACCTATG  
 GTCTGTATAGCACCCCGATTAGTAATGGTGAAGGTACACTGAGCGAAGTTAGCTTTA  
 GCCCGTTTTATCTGAAACCGTTTTGATGAAAGCTATGGCAATTATCGTAGCCTGGTGA  
 ATATCGTGAACAAATTCGTGAAACGTGAATTTGCACCTGATCCGGCAAGCACCTGA  
 TGCATGAACTGGTTCATGTTACCCATAATCTGTATGGTATTAGCAACCGCAACTTCT  
 ACTATAACTTTGACACCCGGCAAAATTGAAACCAGCCGTCAGCAGAATAGCCTGATTT  
 TTGAAGAACTGCTGACCTTTGGTGGCATTGATAGCAAAGCAATTAGCAGCCTGATCA  
 TCAAGAAAATTATCGAAACCGCCAAGAACAACCTATAACCACGCTGATTAGCGAACGC  
 CTGAATACCGTTACCGTTGAAAATGATCTGCTGAAATATATCAAAAACAAAATCCCG  
 GTTCAGGGTCGTCTGGGTAACCTTTAAACTGGATACCGCAGAATTCGAGAAAAAGCT  
 GAATACCATTCTGTTTGTGCTGAACGAAAGCAATCTGGCACAGCGTTTTAGCATTCT  
 GGTTTCGTAAACATTACCTGAAAGAACGTCCGATTGATCCGATTTATGTGAACATTCT  
 GGATGACAATAGCTACAGCACCTGGAAGGTTTTAACATTAGCAGTCAGGGTAGCA  
 ATGATTTTCAGGGCCAGCTGCTGGAAAGCAGCTATTTTGAAAAAATTGAATCCAATG  
 CGCTGCGTGCCTTTATCAAAAATTTGTCATAAAGCCATTGATGGTTCGCAGCCTGTATA  
 ACAAACCTGGATTGTATTGAAGTGGAACAAGACCTGTTCCCTGATTAGCAAT  
 AAAGATAGCCTGAACGATATCAACCTGAGCGAAGAAAAAATCAAACCGGAAACCA  
 CCGTGTTCTTCAAAGATAAACTGCCTCCGCAGGATATTACCCTGAGCAATTATGATT  
 TTACCGAAGCCAATAGCATTCCGAGCATTAGCCAGCAGAACATTCTGGAACGTAAT  
 GAAGAACTGTATGAACCGATTTCGCAATAGCCTGTTTGAAATCAAACCATCTATGTG  
 GATAAGCTGACCACCTTTCAATTTCTGGAAGCCCAGAATATTGATGAGAGCATTGAT  
 AGCAGCAAAAATTCGTGTTGAACTGACCGATAGCGTTGATGAAGCACTGAGCAATCC  
 GAATAAAGTTTATAGCCCGTTCAAGAACATGAGCAACACCATTAATAGCATTGAAA  
 CCGGTATTACCAGCACCTACATCTTTTATCAGTGGCTGCGTAGCATCGTGAAAGATT

TTAGTGATGAAACCGGCAAAATCGACGTGATTGATAAAAGCAGCGATACCCTGGCC  
ATTGTTCCGTATATTGGTCCGCTGCTGAATATTGGTAATGATATTCGTTCATGGCGATT  
TTGTGGGTGCAATTGAACTGGCAGGCATTACCGCACTGCTGGAATATGTTCCGGAAT  
TTACCATTCCGATTCTGGTTGGTCTGGAAGTTATTGGTGGCGAACTGGCACGTGAAC  
AGGTTGAAGCAATTGTTAATAATGCCCTGGATAAACGCGATCAGAAATGGGCAGAA  
GTTTACAATATTACCAAAGCACAGTGGTGGGGCACCATTCATTTACAGATTAATACC  
CGTCTGGCCCATACCTATAAAGCCCTGAGCCGTCAGGCAAATGCCATTAATAATGAAT  
ATGGAATTCAGCTGGCCAACTACAAAGGCAACATTGATGATAAAGCCAAGATCAA  
AAACGCCATCAGCGAAACCGAAATTCTGCTGAACAAAAGCGTTGAACAGGCCATGA  
AAAACACCGAGAAATTCATGATTAAACTGAGCAACAGCTACCTGACCAAAGAAATG  
ATTCCGAAAGTTCAGGACAACCTGAAAAACTTTGATCTGGAAACCAAAAAGACCCT  
GGACAAGTTCATCAAAGAGAAAGAAGATATCCTGGGCACCAATCTGAGCAGCAGCC  
TGCGTCGTAAAGTTAGCATTTCGTCTGAATAAAAACATTGCCTTCGACATCAACGATA  
TCCCGTTTAGCGAATTTGATGATCTGATCAACCAGTACAAAAACGAGATCGAAGATT  
ATGAAGTGCTGAATCTGGGTGCAGAAGATGGCAAATCAAAGATCTGAGCGGTACA  
ACCAGCGATATTAACATTGGTAGCGATATCGAAATCATCAACACCAGCATTCTGAAT  
CTGCGCTATGAAAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCGTCCAAAATCAAT  
ATTGGCAGCAAAGTGAATTTGACCCGATCGATAAAAATCAGATCCAGCTGTTTAAT  
CTGGAAGCTCCAAAATTGAGGTGATTCTGAAAAACGCGATTGTGTACAATAGCAT  
GTATGAGAATTTCTCAACCAGCTTCTGGATTCGCATTCCGAAATACTTTAACAGCAT  
CAGCCTGAACAACGAGTATAACCATTATCAACTGCATGGAAAACAATAGCGGTTGGA  
AAGTGAGCCTGAATTATGGTGAAATTATCTGGACCCTGCAGGATACCCAAGAAATC  
AAACAGCGTGTGTGTTCAAATACAGCCAGATGATTAACATCAGCGATTACATTAAC  
CGCTGGATCTTTGTTACCATTACCAACAATCGCCTGAATAACAGCAAGATCTATATT  
AACGGTCGTCTGATTGACCAGAAACCGATTAGTAATCTGGGTAATATTCATGCCAGC  
AACAACATCATGTTCAAACCTGGATGGTTGTCGTGATACCCATCGTTATATTTGGATC  
AAGTATTTTAACCTGTTTGATAAAGAAGTGAACGAAAAAGAAATTAAGGATCTGTA  
TGATAACCAGTCCAATAGCGGCATCCTGAAGGATTTTTGGGGTGATTATCTGCAGTA  
TGACAAACCGTATTATATGCTGAACCTGTACGATCCGAACAAATATGTGGATGTGAA  
TAATGTGGGTATCCGTGGCTATATGTATCTGAAAGGTCCGCGTGGTAGCGTTATGAC  
CACCAACATTTATCTGAATAGCAGCCTGTATCGTGGCACCAAATTCATCATCAAAAA  
ATACGCCAGCGGCAACAAAGATAATATTGTGCGTAATAATGACCGCGTGTATATCA  
ATGTGGTGGTGAAGAATAAAGAATATCGTCTGGCAACCAATGCAAGCCAGGCAGGC  
GTTGAAAAAATTCTGAGCGCACTGGAAATCCCGGATGTGGGTAATCTGAGCCAGGT  
TGTTGTTATGAAAAGCAAAAATGATCAGGGCATCACCAACAAGTGCAAAAATGAATC  
TGCAGGACAATAACGGCAACGACATTGGTTTTATTGGCTTTCACCAGTTTAACAACA  
TTGCCAAACTGGTTGCGAGCAATTGGTATAATCGTCAGATTGAACGTAGCAGTCGTA  
CCCTGGGTTGTAGCTGGGAATTTATTCCGGTTGATGATGGTTGGGGTGAACGTCCGC  
TGCATCATCACCACCATCACCATCACCACCATTAA

SEQ ID NO: 7 (полипептидная последовательность BoNT/XA [LH<sub>N</sub>X-H<sub>C</sub>A] с петлей

активации C1)

MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIKNIWIVPERYNF  
 TNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTNPSEKDEFQGVKVLERIKSKPEGEKLELISSSI  
 PLPLVSNAGALTLSNETIAYQENNNIVSNLQANLVIYGGPDIANNATYGLYSTPISNGEG  
 TLSEVSFSFPFYLKPFDES YGNYSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHELHVHVNLYGIS  
 NRNFYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGIDSKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNT  
 VTVENDLLKYIKNKIPVQGR LGNFKLDTAEFKKNLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKHYL  
 KERPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISSQGSNDFQGLLESSYFEKIESNALRAFIKICHKAI  
 DGRSLYNKTLDCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKDKLPPQDITLSNY  
 DFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRV  
 ELTDSVDEALSNPNKVYSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDET GKIDVID  
 KSSDTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPILVGLEVIGGELAR  
 EQVEAIVNNALDKRDQKWA E VYNITKAQWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKM  
 NMEFQLANYKGNIDDKAKIKNAISET EILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLT KEMIPK  
 VQDNLKNFDLET KKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNIAFDINDIPFSEFDDL  
 INQYKNEIEDYEVLNLGAEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIEIINTSILNLRYESNHLIDLSRYA  
 SKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISL  
 NNEYTIINCMENNSGWK VSLNYGEIHWTLQDTQEIKQRV VFKYSQMINISDYINRWIFVTI  
 TNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELN  
 EKEIKDLYDNQSN S GILKDFWGDYLYDKPYYMLNLYDPNKYVDVNNV GIRGYMYLK  
 GPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATN  
 ASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQF  
 NNIAKLVASNWYNRQIERSSRTLGC S WEFIPVDDGWGERPLHHHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 8 (нуклеотидная последовательность ВоNT/ХВ [LH<sub>N</sub>X-Н<sub>C</sub>B] с петлей активации C1)

ATGAAACTGGAAATCAACAAATTCAACTACAACGATCCGATCGATGGCATT  
 ATGTTATTACCATGCGTCCGCCTCGTCATAGCGATAAAATCAATAAAGGTAAAGGTC  
 CGTTCAAAGCCTTTCAGGTGATTA AAAACATTTGGATTGTGCCGGAACGCTACAAC  
 TTACCAATAATAACCAACGATCTGAACATTCGAGCGAACCGATTATGGAAGCAGAT  
 GCCATTTATAACCCGAACTATCTGAATACCCCGAGCGAAAAAGATGAATTTCTGCAG  
 GGTGTTATCAAAGTGCTGGAACGCATTA AAAAGCAAACCGGAAGGTGAAAAACTGCT  
 GGAAC TGATTAGCAGCAGCATTCCGCTGCCGCTGGTTAGCAATGGTGCACTGACCCT  
 GAGCGATAATGAAACCATTGCATATCAAGAGAACAACAACATTGTGAGCAATCTGC  
 AGGCAAACCTGGTTATTTATGGTCCGGGTCCTGATATTGCAAATAATGCAACCTATG  
 GTCTGTATAGCACCCCGATTAGTAATGGTGAAGGTACACTGAGCGAAGTTAGCTTTA  
 GCCCGTTTTATCTGAAACCGTTTGATGAAAGCTATGGCAATTATCGTAGCCTGGTGA  
 ATATCGTGAACAAATTCGTGAAACGTGAATTTGCACCTGATCCGGCAAGCACCCCTGA  
 TGCATGAACTGGTTCATGTTACCCATAATCTGTATGGTATTAGCAACCGCAACTTCT  
 ACTATAACTTTGACACCCGCAAAATTGAAACCAGCCGTCAGCAGAATAGCCTGATTT  
 TTGAAGAACTGCTGACCTTTGGTGGCATTGATAGCAAAGCAATTAGCAGCCTGATCA



TCAAGAAAATTATCGAAACCGCCAAGAACAACCTATAACCACGCTGATTAGCGAACGC  
CTGAATACCGTTACCGTTGAAAATGATCTGCTGAAATATATCAAAAACAAAATCCCCG  
GTTCAGGGTCGTCTGGGTAACCTTAAACTGGATACCGCAGAATTCGAGAAAAAGCT  
GAATACCATTCTGTTTGTGCTGAACGAAAGCAATCTGGCACAGCGTTTTAGCATTCT  
GGTTCGTAAACATTACCTGAAAGAACGTCCGATTGATCCGATTTATGTGAACATTCT  
GGATGACAATAGCTACAGCACCCCTGGAAGGTTTTAACATTAGCAGTCAGGGTAGCA  
ATGATTTTCAGGGCCAGCTGCTGGAAAGCAGCTATTTTGAAAAAATTGAATCCAATG  
CGCTGCGTGCCTTTATCAAAATTTGTCATAAAGCCATTGATGGTCGCAGCCTGTATA  
ACAAAACCCCTGGATTGTATTGAAGTGGAAAACAAAGACCTGTTCCCTGATTAGCAAT  
AAAGATAGCCTGAACGATATCAACCTGAGCGAAGAAAAAATCAAACCGGAAACCA  
CCGTGTTCTTCAAAGATAAACTGCCTCCGCAGGATATTACCCTGAGCAATTATGATT  
TTACCGAAGCCAATAGCATTCCGAGCATTAGCCAGCAGAACATTCTGGAACGTAAT  
GAAGAACTGTATGAACCGATTTCGCAATAGCCTGTTTGAAATCAAACCATCTATGTG  
GATAAGCTGACCACCTTTCATTTTCTGGAAGCCCAGAATATTGATGAGAGCATTGAT  
AGCAGCAAAATTCGTGTTGAACTGACCGATAGCGTTGATGAAGCACTGAGCAATCC  
GAATAAAGTTTATAGCCCGTTCAAGAACATGAGCAACACCATTAATAGCATTGAAA  
CCGGTATTACCAGCACCTACATCTTTTATCAGTGGCTGCGTAGCATCGTGAAAGATT  
TTAGTGATGAAACCGGCAAAATCGACGTGATTGATAAAAGCAGCGATACCCTGGCC  
ATTGTTCCGTATATTGGTCCGCTGCTGAATATTGGTAATGATATTCGTATGGCGATT  
TTGTGGGTGCAATTGAACTGGCAGGCATTACCGCACTGCTGGAATATGTTCCGGAAT  
TTACCATTCCGATTCTGGTTGGTCTGGAAGTTATTGGTGGCGAACTGGCACGTGAAC  
AGGTTGAAGCAATTGTTAATAATGCCCTGGATAAACGCGATCAGAAATGGGCAGAA  
GTTTACAATATTACCAAAGCACAGTGGTGGGGCACCATTCAATTAACAGATTAATACC  
CGTCTGGCCCATACTATAAAGCCCTGAGCCGTCAGGCAAATGCCATTAATAATGAAT  
ATGGAATTTAGCTGGCCAACTACAAAGGCAACATTGATGATAAAGCCAAGATCAA  
AAACGCCATCAGCGAAACCGAAATTCTGCTGAACAAAAGCGTTGAACAGGCCATGA  
AAAACACCGAGAAATTCATGATTAAACTGAGCAACAGCTACCTGACCAAAGAAATG  
ATTCCGAAAGTTCAGGACAACCTGAAAAACTTTGATCTGGAAACCAAAAAGACCCT  
GGACAAGTTCATCAAAGAGAAAGAAGATATCCTGGGCACCAATCTGAGCAGCAGCC  
TGCGTCGTAAAGTTAGCATTTCGTCTGAATAAAAACATTGCCTTCGACATCAACGATA  
TCCCGTTTAGCGAATTTGATGATCTGATCAACCAGTACAAAAACGAGATCGAAGATT  
ATGAAGTGCTGAATCTGGGTGCAGAAGATGGCAAAATCAAAGATCTGAGCGGTACA  
ACCAGCGATATTAACATTGGTAGCGATATCGAAATCCTGAACAACATTATTCTGAAC  
CTGCGCTATAAAGATAACAACCTGATTGATCTGAGTGGCTATGGTGCAAAAAGTTGA  
AGTTTATGATGGTGTGGAACCTGAACGACAAAAACCAGTTCAAACTGACCAGCAGCG  
CAAATTCAAAAATTCGCGTTACCCAGAACCAGAACATCATTTTTAACAGCGTGTTTC  
TGGATTTAGCGTGAGCTTTTGGATTTCGTATTCCGAAATATAAGAACGACGGCATCC  
AGAACTATATCCACAATGAATATAACCATCATCAACTGCATGAAGAATAACAGCGGT  
TGGAATAATTAGCATCCGTGGCAATCGTATTATTTGGACCCTGATCGATATTAATGGC  
AAAACCAAGAGCGTGTTTTTCGAGTATAACATCCGTGAAGATATCAGCGAATACAT

CAACCGTTGGTTTTTTGTGACCATTACCAACAATCTGAACAACGCCAAAATCTACAT  
 TAACGGCAAACCTGGAAAGCAACACCGATATCAAAGATATTCGTGAAGTGATTGCCA  
 ACGGCGAGATTATCTTTAAACTGGATGGTGATATTGATCGCACCCAGTTTATTTGGA  
 TGAAATACTTCAGCATCTTCAACACCGAACTGAGCCAGAGCAATATTGAAGAACGC  
 TATAAAATCCAGAGCTACAGCGAGTATCTGAAAGACTTTTGGGGTAATCCGCTGATG  
 TACAACAAAGAATACTACATGTTTAATGCCGGTAACAAAAACAGCTATATCAAACCT  
 GAAAAAGGATAGTCCGGTGGGTGAAATTCTGACCCGTAGCAAATATAACCAGAATA  
 GCAAGTATATCAACTATCGCGATCTGTACATCGGCGAGAAATTTATCATTTCGTCGTA  
 AAAGCAACTCCCAGAGCATTAAACGATGATATTGTGCGCAAAGAGGATTACATCTAC  
 CTGGATTTTTTCAACCTGAATCAAGAGTGGCGTGTGTACACCTATAAGTACTTCAAAA  
 AAAGAAGAAATGAAACTGTTTCTGGCACCGATCTATGATAGCGACGAATTTTACAA  
 TACCATTAGATTAAAGAATATGATGAACAGCCGACCTATAGCTGTCAGCTGCTGTT  
 TAAAAAGGATGAAGAAAGCACGGATGAAATTGGCCTGATTGGTATCCATCGTTTTT  
 ATGAAAGCGGCATCGTGTTTGAAGAGTACAAAGATTATTTCTGCATCAGCAAATGG  
 TATCTTAAAGAGGTGAAACGCAAACCGTATAATCTGAAACTGGGTTGCAATTGGCA  
 GTTCATCCCGAAAGATGAAGGTTGGACCGAACATCATCACCACCATCACCATCATCA  
 TCACTGA

SEQ ID NO: 9 (полипептидная последовательность BoNT/XB [LH<sub>N</sub>X-H<sub>C</sub>B] с петлей активации C1)

MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIKNIWIVPERYNF  
 TNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTNPSEKDEFQGVKVLERIKSKPEGEKLELISSSI  
 PLPLVSNALTLSDNETIAYQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEG  
 TLSEVSFSPFYLPFDES YGNYSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHELHVHVNLYGIS  
 NRNFYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGIDSKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNT  
 VTVENDLLKYIKNKIPVQGR LGNFKLDTAEFKKNLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKHYL  
 KERPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISSQGSNDFQQLLESSYFEKIESNALRAFIKICHKAI  
 DGRSLYNKTLDCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKDKLPPQDITLSNY  
 DFTEANSIPSISQQNILERNEEL YEPINSLFEIKTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRV  
 ELTDSVDEALSNPNKVYSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDET GKIDVID  
 KSSDTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPILV GLEVIGGELAR  
 EQVEAIVNNALDKRDQKWA E VYNITKAQWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKM  
 NMEFQLANYKGNIDDKAKIKNAISET EILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLT KEMIPK  
 VQDNLKNFDLET KKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNIAFDINDIPFSEFDDL  
 INQYKNEIEDYEVLNLGAEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIEILNNIILNLR YKDNNLIDLSGY  
 GAKVEVYDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDG  
 IQNYIHNEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWLIDINGKTKSVFFEYNIREDISEYINRWF  
 VTITNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELS  
 QSNIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSK  
 YNQNSKYINYRDL YIGEKFIIRKSNSSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWRYTYKYF  
 KKEEMKLFLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGI

VFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTEHHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 10 (нуклеотидная последовательность ВоNT/E с петлей активации C1)

atgccgaaaatacaactctttcaactacaacgaccgggtaacgaccgtaccatcctgtatatacaaacgggtgggtgccaggagtt  
ctacaaatctttcaacatcatgaaaaacatctggatcatcccggaacgtaacgttatcgggtaccaccccgaggactccaccgccgacctc  
tctgaaaaacgggtactcttctactacgaccgaactacctccagctctgacgaagaaaaagaccgttctgaaaaatcgttacaaaaatcttc  
aacctgtatcaacaacaacctgtctgggtatcctgtctggaagaactgtctaaagctaaccgtaacctgggtaacgacaacaccccgaca  
accagttccacatcgggtgacgcttctgctgttgaaatcaaattcttaacgggtctcaggacatcctgctgccgaacgttatcatcatgggtgt  
gaaccggacctgttcgaaaccaactcttcaacatctctctgctgtaacaactacatgccgttaaccacgggttcgggtctatcgtatcgttacc  
ttctctccggaataactctttccgttcaacgacaacagcatgaacgagttcatccaggaccggctctgacctgatgaccaactgatctattc  
tctgcacggctctgtacgggtctaaagggtatcaccacaaatacaccatcaccagaaacagaaccggctgatcaccacatccgtgtgacc  
aacatcgaagagttcctgaccttcgggtgtaaccgacctgaacatcatcacctctgctcagcttaacgacatctacaccaacctgctgggtgac  
tacaacaaaaatcgttctaaactgtctaaagttcagggttctaaaccgctgctgaaccgtaacaaagacgttttcgaagctaaatcgggtctgga  
caaagacgcttctgggtatctactctgttaacatcaacaaattcaacgacatctcaaaaaactgtactctttcaccgagttcgacctggcgacca  
aattccaggttaaatgccgtcagacctacatcgggtcagtaacaaactcaaaactgtctaacctgctgaacgactctatctacaacatctctgaa  
gggtacaacatcaacaacctgaaagtaactccgtgggtcagaacgtaacctgaaccggctatcaccacccgatcaccggctcgtgtgtct  
gggtaaaaaatcatccgtttcTGCCACAAAGCGATTGATGGCCGCTCTCTCTATAACAAAACGCT  
GGATTGCatcgaatcaacaacgggtgaactgttctcgttctctgaaaactcttacaacgacgacaacatcaacaccccgaaagaa  
atcgaacgacaccgttaccttaacaacaactacgaaaacgacctggaccaggttatcctgaactcaactctgaatctgctccgggtctgtct  
gacgaaaaactgaacctgacctccagaacgacgcttacatcccgaatacgaactaacgggtacctctgacatcgaacagcagcagcgtta  
acgaactgaacgttttctctacctggacgctcagaaagttccggaaggtgaaaacaacgttaacctgacctctctatcgacaccgctctgct  
ggaacagccgaaaaatctacaccttctctctctctgagttcatcaacaacgttaacaaaccgggtcaggctgctctgttcgtttctggattcagca  
gggtctggttgacttaccaccgaagctaacccagaatctaccgttgacaaaatcgtctgacatctctatcgttctccgtacatcgggtctggtc  
tgaacatcggtaacgaagctcagaaagtaactcaaaagcctctggaactgctgggtgctgggtatcctgctggagttcgaaccggaact  
gctgatcccagaccatcctgggttaccatcaaatcttctcgggttctctgacaacaaaaacaaagttatcaaaagctatcaacaacgctctga  
aagaacgtgacgaaaaatggaagaagttactcttcatcgtttctaaactggatgacaaaatcaacaccagttcaacaacgtaagaac  
agatgtaccaggctctccagaaccaggttaacgctatcaaaaccatcatcgaatctaaatacaactcttacacctggaagaaaaaacgaa  
ctgaccaacaaatacgaatcaaacagatcgaaaaacgaactgaaccagaaagttctatcgtatgaacaacatcgaccgttctgaccga  
atctctatctctacctgatgaaactcatcaacgaagttaaaatcaacaactgcgtgaatacgaacgaaacgttaaacctacctgctgaact  
acatcatccagcaggttctatcctgggtgaatctcagcaggaactgaactctatggtaccgacacctgaacaactctatcccgttcaact  
gtctcttacaccgacgacaaaatcctGATCTCTTACTTCAACAAATTCTTTAAAcgcATTAAGAGTTC  
ATCGGTTctgaatATGCGGTACAAAATGATAAAatGTGCGATACTTCTGGATATgatAGCA  
ATATCAACATTAACGGCGACGTGTATAAATATccgACAAATAAAAACCAGTTTGGGA  
TATATAACGACAAGctgTCGGAGGTCAATattTCTCAAACGACTatATCattTACGATAATa  
aaTATAAAAACCTTTAGCATTAGTttTGGGTTcgtATACCTAATtatGACAATaaaattGTAAAT  
GTGAATAACGAGTATAACCATTATAAAGTGTATGcgcGACAATAACAGTGGTTGGAAG  
GTATCGctgAACCATTAATGAGATTATCTGGACCctgcagGATAATgcaGGTATAAACCAGA  
AACTGGCTTTTAACTATGGAAACGCAAATGGGATCTCAGATTACATTaataaaTGGattttt  
GTTaccATTACGAACGATcgcTTAGGCGACTCAAAAACCTTTATATTAATggcAATctgATAG  
ATCAGAAATCAATCTTAAATTTGGGCAATATTCATGTCTCTgatAACATCTTGTTCAG  
ATCGTTAATTGCAGTTACACTcgtTATATTGGCATTCTGTTACTTTAATATCTTcgataaaG

AActgGACGAGACGGAAATCcagACTCTGTATTCAAACGAGCCCAATACTAATATATTG  
 AAAGATTTTTGGGGTAACTATCTTTTATATGATAAAGAATACTATCTCCTGaatGTATT  
 GAAGCCAAACAATTTTCATAGATAGACGCAAGGATAGCACATTAAGTATCAACAATA  
 TCAGATCTACTATActgtaGCAAATCGCCTcTACTCCggtATTAAAGTGAAGATTcagCGG  
 GTTAATAACTCCAGTACCAATGATAATCTGGTCCGTAAGAACGATCAGGTATACATC  
 aatTTCGTCGCGAGCAAAACTcatCTCTTCCCCTTTACGCCgatACAGCTACGACAAACA  
 AGGAAAAAACCATAAAAAATTTCCAGCTCCGGAAACAGATTCAATCAAGTAGTTGTA  
 ATGAACTCTGTGGGTaatAATTGTACGATGAACTTTaagAATAACAATGGGAACAATatt  
 GGACTTTTGGGCTTcAAAGCCGACACAGTGGTGGCGTCCACCTGGTATTACACGcacA  
 TGcggGACCATACGAATTCGAACGGTTGCTTCTGGAACCTTATCTCGGAaAgaCACGGG  
 TGGCAAGAAAAA

SEQ ID NO: 11 (полипептидная последовательность BoNT/E с петлей активации

C1)

MPKINSFNYNPVDNRITILYIKPGGCQEFYKSFNIMKNIWIIPERNVIGTTPQDFHP  
 PLSLKNGDSSYYDPNYLQSDEEKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANPYLGND  
 NTPDNQFHIGDASAVEIKFSNGSQDILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISLRNNYMPSNHGF  
 GSIAIVTFSPEYSFRFNDNSMNEFIQDPALTMHQLIYSLHGLYGAKGITTKYTITQKQNP  
 LITNIRGTNIEEFLTFGGTDLNIITSAQSNDIYTNLLADYKKIASKLSKVQVSNPLLNPYKD  
 VFEAKYGLDKDASGIYSVNINKFNDIFKKLYSFEFDLATKFQVKCRQTYIGQYKYFKLS  
 NLLNDSIYNISEGYNINNLKVNFRGQANLNPRIITPITGRGLVKKIIRFCHKAIDGRSLYN  
KTLDCEINNGELFFVASENSYNDDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLDQVILNFNSEAPG  
 LSDEKLNLTIQNDAYIPKYDSNGTSDIEQHVDNELNVFFYLDAQKVPEGENNVNLTSSID  
 TALLEQPKIYTFSSSEFINNVNKPVQAALFVSWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIADISIVV  
 PYIGLALNIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFEPELLIPTILVFTIKSFLGSSDNKNKVIK  
 AINNALKERDEKWKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNAIKTHIESKY  
 NSYTL EEKNELTNKYDIKQIENELNQKVSIAMNNIDRFLTESSISYLMKLINEVKINKLRE  
 YDENVKTYLLNYIIQHGSILGESQQELNSMVTDTLNN SIPFKLSSYTDDKILISYFNKFFK  
 RIKSSSVLNMRYKNDKYVDTSGYDSNININGDVYKYPTNKNQFGIYNDKLSEVNISQND  
 YIIYDNKYKNFSISFWVRIPNYDNKIVNVNNEYTIINCMRDNNNGWKVSLNHNEIHWTLQ  
 DNAGINQKLA FN YGNANGISDYINKWIFVTITNDRLGDSKLYINGNLIDQKSILNLGNH  
 VSDNILFKIVNCSYTRYIGIRYFNIFDKELDETEIQTLYSNEPNTNILKDFWGNLYLLYDKE  
 YYLLNVLPNNFIDRRKDESTLSINNIRSTILLANRLYSGIKVKIQRVNSSTNDNLVRKND  
 QVYINFAASKTHLFLPLYADTATTNKEKTIKISSGNRFNQVVVMNSVGNNCTMNFKNN  
 NGNNIGLLGFKADTVVASTWYYTHMRDHTNSNGCFWNFISEEHGWQEK

SEQ ID NO: 12 (нуклеотидная последовательность BoNT/A1C1 с петлей активации

C1)

ATGCCATTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTTCG  
 ACATCGCATAACATCAAGATTCCGAACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTA  
 AGATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACCTTCACGAACCCGGAA  
 GAAGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCAGCTACTACGA

TTCGACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCA  
AGCTGTTTCGAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTG  
TTCGCGGTATCCCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACCGAACTGAAGGTTATCG  
ACACTAACTGCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGA  
ATCTGGTCATCATTGGCCCGAGCGCAGACATTATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTTTG  
GTCACGAGGTTCTGAATCTGACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTCGTT  
TTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAATCCGT  
TGCTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATgAACTGA  
TCcACGCAGGCCACCGCCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGG  
TTAATACGAATGCATACTACGAGATGAGCGGCCTGGAAGTCAGCTTCGAAGAACTG  
CGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACAGCTTGCAAGAGAATGAGTTC  
CGTCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACAAGGCCAA  
AAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTTTAAAGAGAA  
GTACCTGCTGTCCGAGGATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGA  
CAAAGTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGACAACCTTTGTGAAATTCTT  
CAAAGTGTGAAATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTTTTCAAGATTAA  
CATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAACCTGCGTAACACCAA  
CCTGGCGGCGAACTTTAACGGTCAGAATACGGAAATCAACAACATGAATTTACGA  
AGTTGAAGAACTTCACGGGTCTGTTTCGAGTTCTATAAGCTGCTGTGCCACAAAGCGA  
TTGATGGCCGCTCTCTCTATAACAAAACGCTGGATTGCATTAAGGTAAACAATTGGG  
ATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAAGATAATTTTACCAACGACCTGAACAAGGGTGAAG  
AAATCACCAGCGATACGAATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTG  
ATCCAGCAGTACTATCTGACCTTTAACTTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATT  
GAGAATCTGAGCAGCGACATTATCGGTCAGCTGGAAGTATGCCGAATATCGAACG  
TTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCATTACCTGCG  
TGCACAGGAGTTTGAACACGGTAAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACG  
AGGCCCTGCTGAACCCGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGA  
AAGTGAACAAAGCCACTGAGGCCGCGATGTTCCCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTA  
TATGACTTCACGGACGAGACGAGCGAAGTGAGCACTACCGACAAAATTGCTGATAT  
TACCATCATTATCCCGTATATTGGTCCGGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAA  
AGACGATTTTGTGGGTGCCCTGATCTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTCATT  
CCGGAGATTGCGATCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCTACATCGCGAAT  
AAGGTTCTGACGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTGCAAACGTAATGAAAAATG  
GGACGAGGTTTACAAATACATTGTTACGAATTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAGA  
TCGACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACC  
AAAGCAATTATCAACTACCAATACAACCAGTACACGGAAGAAGAGAAGAATAACAT  
TAACTTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAATCTATCAACAAAGCGAT  
GATCAATATCAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTTCGTACCTGATGAATAGCAT  
GATTCGGTATGGCGTCAAACGTCTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTT  
GCTGAAATACATTTACGACAATCGTGGTACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAA

AGACAAAGTTAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCATTTCAACTGAGCAAGTATG  
 TTGATAATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATTAATGACA  
 GCAAATTCTGAGCCTGCAGAATCGTAAGAATACGCTGGTAGATAACCAGTGGATAT  
 AATGCGGAAGTCTCAGAAGAGGGTGATGTACAGCTGAACCCGATCTTCCGTTCTGA  
 CTTTAAACTGGGGTCTAGTGGTGAAGATCGCGGTAAAGTGATCGTTACCCAAAACG  
 AGAACATTGTGTATAACAGCATGTACGAGAGTTTCTCAATTTCTTTCTGGATTCTGCA  
 TCAATAAATGGGTTTCTAATTTGCCTGGCTATACCATCATTGATAGCGTCAAAAACA  
 ACTCGGGCTGGTCGATTGGCATTATTAGCAACTTTCTGGTGTTTACCCTGAAACAGA  
 ATGAGGATTCGGAACAGAGCATTAACTTCTCCTACGACATCAGCAACAATGCACCA  
 GGGTATAACAAATGGTTCTTCGTAACGGTGACGAACAATATGATGGGCAATATGAA  
 AATCTACATTAACGGGAAACTTATCGACACCATTAAGTGAAAGAGCTTACTGGGA  
 TCAATTTTAGTAAAACCATTACCTTTGAGATCAACAAAATTCCGGACACGGGTCTGA  
 TTACCTCCGATTCGGATAATATCAATATGTGGATTTCGCGACTTTTATATCTTCGCCAA  
 AGAACTTGATGGCAAAGATATCAACATTTTGTTTAATTCCTGCAGTATAACCAATGT  
 CGTTAAGGACTATTGGGGCAATGATCTCCGCTACAATAAAGAATACTACATGGTTAA  
 CATCGACTATCTCAATCGCTACATGTATGCTAACTCGCGTCAAATTGTGTTTAAACAC  
 ACGTCGTAACAACAACGATTTTAAACGAAGGTTATAAAATCATTATCAAACGGATCC  
 GCGGCAATACGAACGATACTCGTGTTTCGTGGCGGTGACATTCTGTATTTTCGACATGA  
 CGATTAATAATAAAGCGTACAATCTGTTTCATGAAGAACGAAACCATGTACGCCGAT  
 AACCATTCCACTGAAGATATCTACGCAATCGGACTTCGCGAACAGACCAAAGACAT  
 TAACGACAACATCATCTTTCAGATTCAACCGATGAATAATACCTACTACTATGCCTC  
 CCAGATCTTCAAAGTAATTTCAACGGCGAAAACATTTACGGCATTGCTCAATCGG  
 CACTTATCGGTTCCGGTTAGGTGGTGATTGGTATCGTCACAACCTACCTTGTTCACCA  
 GTGAAACAAGGCAACTATGCATCGCTCTTAGAAAGCACATCTACGCATTGGGGTTTT  
 GTGCCAGTCAGTGAATAA

SEQ ID NO: 13 (полипептидная последовательность BoNT/A1C1 с петлей активации C1)

MPFVNKQFNKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMGPVKAFKIHNKIWWIPERDTFTNPE  
 EGDLPNPPPEAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNLYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGI  
 PFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFSGHEVLNLTR  
 NGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGGAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGIAIN  
 PNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIASL  
 NKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKEYLLEDTSKGKFSVDKLFKFDKLYKMLTEIYTEDNFV  
 KFFKVLNRKTYLNFDAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTNINMNFT  
 KLKNFTGLFEFYKLLCHKAIDGRSLYNKTLDCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEIT  
 SDTNIEAAEENISLDLIQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYEL  
 DKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVKNKATEAAMF  
 LGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILL  
 EFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQI  
 DLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININ

KFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNN  
 TLSTDIPFQLSKYVDNQRLSSTFTEYIKNINDSKILSLQNRKNTLVDTSGYNAEVSEEGDV  
 QLNPIFPDFKLGSSGEDRGKVIIVTQENENIVYNSMYEFSISFWIRINKWVSNLPGYTIIDS  
 VKNNSGWSIGIISNFLVFTLKQNEDESEQSINFSYDISNAPGYNKWFFVTVTNNMMGNM  
 KIYINGKLIDTIKVKELTGINFSKTITFEINKIPDTGLITSDSDNINMWIRDFYIFAKELD GK  
 DINILFNSLQYTNVVKDYWGNDLRYNKEYYMVNIDYLNRYMYANSRQIVFNTRRNNN  
 DFNEG YKIIKRI RGNTNDTRV RGGDILYFDMTINNKAYNLFMKNETMYADNHSTEDIY  
 AIGLREQTKDINDNIIFQIQPMNNTYYYYASQIFKSNFNGENISGICSIGTYRFRLGGDWYR  
 HNYLVPTVKQGNYSALLESTSTHWGFVPVSE

SEQ ID NO: 14 (нуклеотидная последовательность ВоNT/C1(0) (эндогенативная))

ATGCCGATCACGATTAATAATTTCAACTATAGCGATCCGGTGGACAATAAGA  
 ATATTCTGTATCTGGATACTCATCTGAATACGCTGGCTAACGAACCGGAGAAAGCGT  
 TCCGCATCACAGGCAACATCTGGGTTATCCCGATCGCTTTTCACGCAACAGCAACC  
 CTAATCTGAACAAACCTCCTCGTGTCAACCAGTCCTAAATCCGGTTATTACGACCCAA  
 ACTATCTGAGTACGGATAGCGATAAAGATCCCTTTCTGAAAGAGATCATTAAGCTGT  
 TCAAACGCATTA ACTCTCGCGAAATTGGGGAAGAGCTGATCTATCGGCTTTCGACAG  
 ATATCCCGTTCCAGGTAACAATAATACCCCGATTAATACTTTGACTTTGATGTTG  
 ATTTCAATTCTGTGGATGTGAAAACGCGTCAAGGCAATAATTGGGTGAAA ACTGGT  
 AGCATTAAACCGAGTGTAATTATCACAGGTCCCGTGAGAACATCATCGACCCGGA  
 AACCTCTACCTTCAAGCTGACGAACAACACGTTTGCTGCACAGGAAGGGTTTGGTGC  
 CCTGTCAATCATTTCATCTCACCGCGTTTCATGTAACTACTCCAATGCCACAAAT  
 GATGTTGGCGAAGGACGTTTTAGCAAATCAGAATTTTGCATGGACCCAATTCTCATT  
 CTGATGggCacGCTGAACaATGCGATGCACA ACTTGTATGGCATTGCTATTCCAAACG  
 ATCAAACCATTAGCTCCGTTACCAGTAATATCTTCTATAGCCAGTATAATGTCAAAT  
 TGGAGTATGCCGAAATTTACGCCTTTGGAGGCCCGACCATTGACCTGATTCCGAAAT  
 CTGCACGCAAATACTTCGAAGAAAAGGCGTTAGATTACTATCGCAGCATCGCGAAA  
 CGCCTGAACTCGATTACCACGGCCAATCCGTCGTCGTTCAACAATAACATTGGTGAA  
 TATAAACAGAACTGATTTCGCAAATATCGGTTTGTCGTAGAAAGCTCTGGTGAAGTG  
 ACTGTAAACCGCAACAAATTTGTCGAACTCTACAACGAGTTGACCCAAATCTTTACC  
 GAGTTTAACTACGCAAAGATCTATAACGTACAGAACCGCAAGATTTATCTTAGCAAT  
 GTATACACACCGGTTACTGCGAACATCTTAGACGACAATGTGTATGATATTCAGAAT  
 GGCTTTAACATCCCGAAATCAAATCTGAACGTTCTGTTTATGGGCCAGAACCTGAGT  
 CGTAATCCAGCACTGCGTAAAGTGAACCCGGAAAATATGCTCTACTTGTTTACCCAAA  
 TTTTGCCACAAAGCGATTGATGGCCGCTCTCTCTATAACAAAACGCTGGATTGTCGT  
 GAGTACTTGTGAAGAACTGATTTACCGTTCATTGGGGATATCTCCGACGTGAAA  
 ACCGATATCTTCCTGCGCAAAGACATTAATGAAGAAACGGAAGTCATCTATTACCCC  
 GACAATGTGAGCGTTGATCAGGTCATTTTATCGAAGAACACCTCCGAACATGGTCAG  
 TTGGATTTGCTGTACCCTAGCATTGACTCGGAGAGTGAAATCCTTCCGGGCGAAAAT  
 CAAGTGTTTTACGACAACCGTACCCAAAATGTTGATTATTTGAATTCTTATTACTACC  
 TGGAATCTCAGAAATTGAGCGACAATGTGGAAGATTTACGTTACACGCTCCATTG

AGGAAGCGCTGGATAATAGCGCGAAAGTGTATACGTATTTCCCTACCTTGGCGAAT  
AAAGTAAATGCTGGTGTCCAGGGAGGCTTATTTCTGATGTGGGCGAATGATGTGGTA  
GAAGATTTTACGACCAATATTTTGCGTAAGGACACCTTAGATAAAAATTAGCGATGTT  
AGCGCCATCATCCCCTATATTGGCCCAGCACTGAATATCTCGAACTCTGTGCGTCGC  
GGAAACTTCACCGAAGCATTGCGGGTGACCGGGGTTACTATTCTGTTGGAAGCCTTT  
CCGGAGTTTACTATTCCGGCGCTGGGTGCGTTTGTGATTTATTCGAAAGTACAAGAA  
CGCAATGAAATTATCAAAACCATCGATAATTGCCTGGAACAACGCATTAAACGCTG  
GAAGGATTCTTATGAATGGATGATGGGCACCTGGTTATCCCGTATTATCACACAGTT  
TAACAACATCTCGTATCAGATGTACGATTCACTGAACTACCAAGCAGGGGCGATCA  
AAGCCAAGATCGACTTAGAATACAAGAAATATTCAGGTAGCGATAAAGAGAATATT  
AAAAGCCAGGTTGAAAACCTGAAGAACTCTCTGGATGTCAAAATTTTCAGAGGCTAT  
GAACAACATTAACAAATTTATCCGCGAATGTAGCGTCACGTATCTGTTTAAAAACAT  
GCTCCCGAAAGTGATTGATGAGCTCAACGAGTTTGATCGCAACACAAAGGCCAAAC  
TGATTAACCTGATTGATAGTCACAATATTATTTTAGTCGGTGAAGTTGACAAGCTGA  
AGGCTAAGGTCAATAACAGCTTTCAGAACACTATTCCGTTTAATATTTTCTCCTATAC  
GAACAATAGTCTGCTGAAAGACATTATCAACGAATACTTCAACAATATTAATGACA  
GCAAAATTCTGAGCCTGCAGAATCGTAAGAATACGCTGGTAGATACCAGTGGATAT  
AATGCGGAAGTCTCAGAAGAGGGTGATGTACAGCTGAACCCGATCTTTCCGTTCGA  
CTTTAAACTGGGGTCTAGTGGTGAAGATCGCGGTAAAGTGATCGTTACCCAAAACG  
AGAACATTGTGTATAACAGCATGTACGAGAGTTTCTCAATTTCTTTCTGGATTCGCA  
TCAATAAATGGGTTTCTAATTTGCCTGGCTATACCATCATTGATAGCGTCAAAAACA  
ACTCGGGCTGGTCGATTGGCATTATTAGCAACTTTCTGGTGTTTACCCTGAAACAGA  
ATGAGGATTCGGAACAGAGCATTAACTTCTCCTACGACATCAGCAACAATGCACCA  
GGGTATAACAAATGGTTCTTCGTAACGGTGACGAACAATATGATGGGCAATATGAA  
AATCTACATTAACGGGAAACTTATCGACACCATTAAAGTGAAAGAGCTTACTGGGA  
TCAATTTTAGTAAAACCATTACCTTTGAGATCAACAAAATTCCGGACACGGGTCTGA  
TTACCTCCGATTCGGATAATATCAATATGTGGATTTCGCGACTTTTATATCTTCGCCAA  
AGAACTTGATGGCAAAGATATCAACATTTTGTTTAATTCCTGCAGTATACCAATGT  
CGTTAAGGACTATTGGGGCAATGATCTCCGCTACAATAAAGAATACTACATGGTTAA  
CATCGACTATCTCAATCGCTACATGTATGCTAACTCGCGTCAAATTGTGTTTAAACAC  
ACGTCGTAACAACAACGATTTTAAACGAAGGTTATAAAATCATTATCAAACGGATCC  
GCGGCAATACGAACGATACTCGTGTTTCGTGGCGGTGACATTCTGTATTTTCGACATGA  
CGATTAATAATAAAGCGTACAATCTGTTCATGAAGAACGAAACCATGTACGCCGAT  
AACCATTCCACTGAAGATATCTACGCAATCGGACTTCGCGAACAGACCAAAGACAT  
TAACGACAACATCATCTTTCAGATTCAACCGATGAATAATACCTACTACTATGCCTC  
CCAGATCTTCAAAAGTAATTTCAACGGCGAAAACATTTTCAGGCATTTGCTCAATCGG  
CACTTATCGGTTCCGGTTAGGTGGTGATTGGTATCGTCACAACACTACCTTGTTCACCA  
GTGAAACAAGGCAACTATGCATCGCTCTTAGAAAGCACATCTACGCATTGGGGTTTT  
GTGCCAGTCAGTGAAtaatg

SEQ ID NO: 15 (полипептидная последовательность BoNT/C1(0) (эндогенативная))



MPITINNFNYSDPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNP  
 NLNKPPRVTS PKSGYYDPNYLSTDSKDPFLKEI IKLFKRINSREIGEELIYRLSTDIPFPGN  
 NNTPI NTFDFD VDFNSVDVKTRQGNWVKTGSINPSVIITGPRENIIDPETSTFKLTNNTF  
 AAQEGFGALSIIISPRFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILILMGT LNNAMHNL YGI  
 AIPNDQTISSVTSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKALDYR SI AKR  
 LNSITTANPSSFNKYIGEYKQKLIRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVELYNELTQIFTEFNYA  
 KIYNVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDNVYDIQNGFNIPKSNLNVLFMGQNL SRNPALRK  
 VNPENMLYLFTKFCHKAIDGRSLYNKTLDCRELLVKNTDL PFIGDISDVKTDIFLRKDIN  
 EETEVIYYPDNVSDQVILSKNTSEHGQLDLLYPSIDSESEILPGENQVFYDNRTQNV DY  
 LNSYYYLESQLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFPTLANKVNAGVQGGLFLMW  
 ANDVVEDFTTNILRKDTLDKISDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFTEAFAVTGVTILLEAF  
 PEFTIPALGAFVIYSKVQERNEI IKTIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGTWLSRIITQFNNIS  
 YQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNNINKFI  
 RECSVTYL FKNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNIILVGEVDK LKAKVNNSFQNT  
 IPFNIFS YTNNSLLKDIINEYFNNINDSKILSLQNRKNTLVDTSGYNAEVSEEGDVQLNPIF  
 PFDKLGSSGEDRGKVIVTQ NENIVYNSMYESFSISFWIRINKWVSNLPGYTIIDSVKNNS  
 GWSIGIISNFLVFTLKQNEDESEQSINFSYDISN NAPGYNKWFFVTVTNNMMGMNKIYING  
 KLIDTIKVKELTGINF SKTITFEINKIPDTGLITSDSDNINMWIRDFYIFAKELDGKDINILFN  
 SLQYTNVVKDYWGNDLRYNKEYYMVNIDYLNRYMYANSRQIVFNTRRNNDFNEGY  
 KIIKRIRGNTNDTRVRGGDILYFDMTINNKAYNLFMKNETMYADNHSTEDIYAIGLREQ  
 TKDINDNIIFQIQPMNNTY YYYASQIFKSNFNGENISGICSIGTYRFRLGGDWYRHNYLVPT  
 VKQGN YASLLESTSTHWGFVPVSE

SEQ ID NO: 16 (нуклеотидная последовательность BoNT/C1)

GTGGACAATAAGAATATTCTGTATCTGGATACTCATCTGAATACGCTGGCTA  
 ACGAACCGGAGAAAGCGTTCCGCATCACAGGCAACATCTGGGTTATTCCCGATCGC  
 TTTTCACGCAACAGCAACCCTAATCTGAACAAACCTCCTCGTGTCACCAGTCCTAAA  
 TCCGGTTATTACGACCCAAACTATCTGAGTACGGATAGCGATAAAGATCCCTTTCTG  
 AAAGAGATCATTAAAGCTGTTCAAACGCATTA ACTCTCGCGAAATTGGGGAAGAGCT  
 GATCTATCGGCTTTTCGACAGATATCCCGTTCCAGGTAACAATAATACCCCGATTAA  
 TACTTTGACTTTGATGTTGATTTCAATTCTGTGGATGTGAAAACGCGTCAAGGCAA  
 TAATTGGGTGAAAACCTGGTAGCATTAAACCCGAGTGTAATTATCACAGGTCCCGTGA  
 GAACATCATCGACCCGGAACCTCTACCTTCAAGCTGACGAACAACACGTTTGCTGC  
 ACAGGAAGGGTTTGGTGCCCTGTCAATCATTTCCATCTCACCGCGTTTCATGTTAAC  
 CTA CTCCAATGCCACAAATGATGTTGGCGAAGGACGTTTTAGCAAATCAGAATTTTG  
 CATGGACCCAATTCTCATTCTGATGCACGAGCTGAACCATGCGATGCACA ACTTGTA  
 TGGCATTGCTATTCCAAACGATCAAACCATTAGCTCCGTTACCAGTAATATCTTCTAT  
 AGCCAGTATAATGTCAAATTGGAGTATGCCGAAATTTACGCCTTTGGAGGCCCGACC  
 ATTGACCTGATTCCGAAATCTGCACGCAAATACTTCGAAGAAAAGGCGTTAGATTAC  
 TATCGCAGCATCGCGAAACGCCTGAACTCGATTACCACGGCCAATCCGTCGTCGTT C  
 AACAAATACATTGGTGAATATAAACAGAAACTGATTCGCAAATATCGGTTTGTCGTA

GAAAGCTCTGGTGAAGTGACTGTAAACCGCAACAAATTTGTCGAACTCTACAACGA  
GTTGACCCAAATCTTTACCGAGTTTAACTACGCAAAGATCTATAACGTACAGAACCG  
CAAGATTTATCTTAGCAATGTATACACACCGGTTACTGCGAACATCTTAGACGACAA  
TGTGTATGATATTCAGAATGGCTTTAACATCCCGAAATCAAATCTGAACGTTCTGTT  
TATGGGCCAGAACCTGAGTCGTAATCCAGCACTGCGTAAAGTGAACCCGGAAAATA  
TGCTCTACTTGTTTACCAAATTTTGCCACAAAGCGATTGATGGCCGCTCTCTCTATAA  
CAAAACGCTGGATTGTCGTGAGTACTTGTGAAGAACTGATTTACCGTTCATTGG  
GGATATCTCCGACGTGAAAACCGATATCTTCCTGCGCAAAGACATTAATGAAGAAA  
CGGAAGTCATCTATTACCCCGACAATGTGAGCGTTGATCAGGTCATTTTATCGAAGA  
ACACCTCCGAACATGGTCAGTTGGATTTGCTGTACCCTAGCATTGACTCGGAGAGTG  
AAATCCTTCCGGGCGAAAATCAAGTGTTTTACGACAACCGTACCCAAAATGTTGATT  
ATTTGAATTCTTATTACTACCTGGAATCTCAGAAATTGAGCGACAATGTGGAAGATT  
TCACGTTACACGCTCCATTGAGGAAGCGCTGGATAATAGCGCGAAAGTGTATACG  
TATTTCCCTACCTTGCGAATAAAGTAAATGCTGGTGTCCAGGGAGGCTTATTTCTG  
ATGTGGGCGAATGATGTGGTAGAAGATTTTACGACCAATATTTTTCGTAAGGACACC  
TTAGATAAAATTAGCGATGTTAGCGCCATCATCCCCTATATTGGCCAGCACTGAAT  
ATCTCGAACTCTGTGCGTCGCGGAACTTCACCGAAGCATTTCGCGGTGACCGGGGTT  
ACTATTCTGTTGGAAGCCTTCCGGAGTTTACTATTCCGGCGCTGGGTGCGTTTGTGA  
TTTATTCGAAAGTACAAGAACGCAATGAAATTATCAAACCATCGATAATTGCCTGG  
AACAACGCATTAAACGCTGGAAGGATTCTTATGAATGGATGATGGGCACCTGGTTA  
TCCCGTATTATCACACAGTTTAAACAACATCTCGTATCAGATGTACGATTCACTGAAC  
TACCAAGCAGGGGCGATCAAAGCCAAGATCGACTTAGAATAACAAGAAATATTCAGG  
TAGCGATAAAGAGAATATTA AAAAGCCAGGTTGAAAACCTGAAGA ACTCTCTGGATG  
TCAA AATTT CAGAGGCTATGAACAACATTAACAAATTTATCCGCGAATGTAGCGTCA  
CGTATCTGTTTTAAAACATGCTCCCGAAAGTGATTGATGAGCTCAACGAGTTTGATC  
GCAACACAAAGGCCAAACTGATTAACCTGATTGATAGTCACAATATTATTTTAGTCG  
GTGAAGTTGACAAGCTGAAGGCTAAGGTCAATAACAGCTTTCAGAACACTATTCCG  
TTTAATATTTTCTCCTATACGAACAATAGTCTGCTGAAAGACATTATCAACGAATAC  
TTCAACAATATTAATGACAGCAAAATTCTGAGCCTGCAGAATCGTAAGAATACGCT  
GGTAGATACCAGTGGATATAATGCGGAAGTCTCAGAAGAGGGTGATGTACAGCTGA  
ACCCGATCTTTCCGTTTCGACTTTAAACTGGGGTCTAGTGGTGAAGATCGCGGTAAAG  
TGATCGTTACCCAAAACGAGAACATTGTGTATAACAGCATGTACGAGAGTTTCTCAA  
TTTCTTTCTGGATTCGCATCAATAAATGGGTTTCTAATTTGCCTGGCTATACCATCAT  
TGATAGCGTCAAAAACA ACTCGGGCTGGTCGATTGGCATTATTAGCAACTTTCTGGT  
GTTTACCCTGAAACAGAATGAGGATTCGGAACAGAGCATTAACTTCTCCTACGACAT  
CAGCAACAATGCACCAGGGTATAACAAATGGTTCTTCGTAACGGTGACGAACAATA  
TGATGGGCAATATGAAAATCTACATTAACGGGAACTTATCGACACCATTAAAGTG  
AAAGAGCTTACTGGGATCAATTTTAGTAAAACCATTACCTTTGAGATCAACAAAATT  
CCGGACACGGGTCTGATTACCTCCGATTCGGATAATATCAATATGTGGATTCGCGAC  
TTTTATATCTTCGCCAAAGAACTTGATGGCAAAGATATCAACATTTTGTTTAATTCCC

TGCAGTATACCAATGTCGTTAAGGACTATTGGGGCAATGATCTCCGCTACAATAAAG  
 AATACTACATGGTTAACATCGACTATCTCAATCGCTACATGTATGCTAACTCGCGTC  
 AAATTGTGTTTAAACACACGTCGTAACAACAACGATTTTAAACGAAGGTTATAAAATCA  
 TTATCAAACGGATCCGCGGCAATACGAACGATACTCGTGTTTCGTGGCGGTGACATTC  
 TGTATTTTCGACATGACGATTAATAATAAAGCGTACAATCTGTTCATGAAGAACGAAA  
 CCATGTACGCCGATAACCATTCCACTGAAGATATCTACGCAATCGGACTTCGCGAAC  
 AGACCAAAGACATTAACGACAACATCATCTTTCAGATTCAACCGATGAATAATACCT  
 ACTACTATGCCTCCCAGATCTTCAAAAGTAATTTCAACGGCGAAAACATTTTCAGGCA  
 TTTGCTCAATCGGCACTTATCGGTTCCGGTTAGGTGGTGATTGGTATCGTCACAAC  
 ACCTTGTTCCACAGTGAAACAAGGCAACTATGCATCGCTCTTAGAAAGCACATCTA  
 CGCATTGGGGTTTTGTGCCAGTCAGTGAAtaa

SEQ ID NO: 17 (полипептидная последовательность BoNT/C1)

MPITINNFNYSDPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNP  
 NLNKPPRVTSFKSGYYDPNYLSTDSKDPFLKEIKLFRINSREIGEELIYRLSTDIPFPGN  
 NNTPIINTDFDFVDFNSVDVKTRQGNWVKTGSINPSVIITGPRENIIDPETSTFKLTNNTF  
 AAQEGFGALSIIISPRFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILILMHELNHAMHNLGYI  
 AIPNDQTISSVTSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKALDYRYSIAKR  
 LNSITTANPSSFNKYIGEYKQKLIRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVELYNELTQIFTEFNYA  
 KIYNVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDNVYDIQNGFNIPKSNLNVLFMGQNLNRPALRK  
 VNPENMLYLFTKFCHKAIDGRSLYNKTLDCRELLVKNTDLPFIGDISDVKTDIFLRKDIN  
 EETEVIYYPDNVSDQVILSKNTSEHGQLDLLYPSIDSESEILPGENQVFYDNRTQNVYD  
 LNSYYYLESQLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFPTLANKVNAGVQGGLFLMW  
 ANDVVEDFTTNILRKDTLDKISDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFTEAFAVTGVILLEAF  
 PEFTIPALGAFVIYSKVQERNEIIKTIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGTWLSRIITQFNIS  
 YQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNNINKFI  
 RECSVTYLFFKNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNIILVGEVDKLLKAVNNSFQNT  
 IPFNIFSYTNNLLKDIINEYFNNINDSKILSLQNRKNTLVDTSGYNAEVSEEGDVQLNPIF  
 PFDKLGSSGEDRGKVIVTQENENIVYNSMYESFISFWIRINKWVSNLPGYTIIDSVKNNS  
 GWSIGIISNFLVFTLKQNEDESEQSINFSYDISNAPGYNKWFFVTVTNNMMGNMKIYING  
 KLIDTIKVKELTGINFSKTITFEINKIPDTGLITSDSDNINMWIRDFYIFAKELDGKDINILFN  
 SLQYTNVVKDYWGNDLRYNKEYYMNIDYLNRYMYANSRQIVFNTRRNNDFNEGY  
 KIIKRIKRGNTNDTRVRGGDILYFDMTINNKAYNLFMKNETMYADNHSTEDIYAIGLREQ  
 TKDINDNIIFQIQPMNNTYYSQIFKSNFNGENISGICSIGTYRFRLGGDWYRHNYLVPT  
 VKQGNYSALLESTSTHWGFVPVSE

SEQ ID NO: 18 (участок расщепления энтерокиназой и фактором Xa)

IDGR

SEQ ID NO: 19 (вариант участка расщепления энтерокиназой и фактором Xa)

IEGR

SEQ ID NO: 20 (петля активации BoNT/X)

CPRNGLLYNAIYRNSKNYLNIDLEDKKTTSKTNVSYPCSLNGC

SEQ ID NO: 21 (петля активации VoNT/A1 и A6)

CVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLC

SEQ ID NO: 22 (VoNT/B2, петля активации B3 и B6)

CKSVRAPGIC

SEQ ID NO: 23 (петля активации VoNT/D)

CLRLTKNSRDDSTC

SEQ ID NO: 24 (петля активации VoNT/E1-E5, E9 и E12)

CKNIVSVKGIRKSIC

SEQ ID NO: 25 (петля активации VoNT/F1 и F6)

CKSVIPRKGTKAPPRLC

SEQ ID NO: 26 (петля активации VoNT/F2 и F3)

CKSIIPRKGTKQSPSLC

SEQ ID NO: 27 (петля активации VoNT/F4)

CKSIIPRKGTKAPPRLC

SEQ ID NO: 28 (петля активации VoNT/F5)

CLNSSFKKNTKKPLC

SEQ ID NO: 29 (петля активации VoNT/F7)

CKSIVSKKGTKNSLC

SEQ ID NO: 30 (петля активации TeNT)

CKKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLGGELC

SEQ ID NO: 31 (петля активации VoNT/G)

CKPVMYKNTGKSEQC

SEQ ID NO: 32 (нуклеотидная последовательность VoNT/X-10HT дикого типа)

ATGAAACTGGAAATCAACAAATTCAACTACAACGATCCGATCGATGGCATTAA  
 ATGTTATTACCATGCGTCCGCCTCGTCATAGCGATAAAATCAATAAAGGTAAAGGTC  
 CGTTCAAAGCSTTTTCAGGTGATTA AAAACATTTGGATTGTGCCGGAACGCTACAAC  
 TTACCAATAATACCAACGATCTGAACATTCGAGCGAACCGATTATGGAAGCAGAT  
 GCCATTTATAACCCGAACSTATCTGAATACCCCGAGCGAAAAAGATGAATTTCTGCAG  
 GGTGTTATCAAAGTGCTGGAACGCATTA AAAAGCAAACCGGAAGGTGAAAAACTGCT  
 GGAAC TGATTAGCAGCAGCATTCGCTGCCGCTGGTTAGCAATGGTGCACTGACCCT  
 GAGCGATAATGAAACCATTCGATATCAAGAGAACAACAACATTGTGAGCAATCTGC  
 AGGCAAACCTGGTTATTTATGGTCCGGGTCCTGATATTGCAAATAATGCAACSTATG  
 GTCTGTATAGCACCCCGATTAGTAATGGTGAAGGTACACTGAGCGAAGTTAGCTTTA  
 GCCCGTTTTATCTGAAACCGTTTTGATGAAAGCTATGGCAATTATCGTAGCCTGGTGA  
 ATATCGTGAACAAATTCGTGAAACGTGAATTTGCACCTGATCCGGCAAGCACCCCTGA  
 TGCATGAACTGGTTCATGTTACCCATAATCTGTATGGTATTAGCAACCGCAACTTCT  
 ACTATAACTTTGACACCCGGCAAAATTGAAACCGCCGTCAGCAGAATAGCCTGATTT  
 TTGAAGAACTGCTGACSTTTGGTGGCATTGATAGCAAAGCAATTAGCAGCCTGATCA  
 TCAAGAAAATTATCGAAACCGCCAAGAACAACCTATAACCACGCTGATTAGCGAACGC  
 CTGAATACCGTTACCGTTGAAAATGATCTGCTGAAATATATCAAAAACAAAATCCCG

GTTCAGGGTCGTCTGGGTAACCTTTAAACTGGATACCGCAGAATTCGAGAAAAAGCT  
GAATACCATTCTGTTTGTGCTGAACGAAAGCAATCTGGCACAGCGTTTTAGCATTCT  
GGTTCGTAAACATTACCTGAAAGAACGTCCGATTGATCCGATTTATGTGAACATTCT  
GGATGACAATAGCTACAGCACCCCTGGAAGGTTTTAACATTAGCAGTCAGGGTAGCA  
ATGATTTCCAAGGTCAGCTGCTGGAAAGCAGCTATTTTGAAAAAATTGAAAGCAAT  
GCCCTGCGTGCCTTCATTA AAAATCTGTCCGCGTAATGGTCTGCTGTATAATGCCATTT  
ATCGCAACAGCAAAA ACTACCTGAACAACATTGATCTGGAAGATAAAAAGACCACG  
AGCAAAACCAATGTTAGCTATCCGTGTAGCCTGCTGAATGGTTGTATTGAAGTTGAA  
AACAAAGACCTGTTCCCTGATTAGCAACAAAGATAGCCTGAACGATATTAACCTGAG  
CGAAGAAAAAATCAAACCGGAAACCACCGTGTTCTTCAAAGATAAACTGCCTCCGC  
AGGATATTACGCTGAGCAATTATGATTTTACCGAAGCCAATAGCATTCCGAGCATT  
GCCAGCAGAACATTCTGGAACGTAATGAAGAACTGTATGAACCGATTTCGCAATAGC  
CTGTTTGAAATCAA AACCATCTATGTGGATAAGCTGACCACCTTTCATTTTCTGGAA  
GCCCAGAATATTGATGAGAGCATTGATAGCAGCAAAATTCGTGTTGAACTGACCGA  
TAGCGTTGATGAAGCACTGAGCAATCCGAATAAAGTTTATAGCCCGTTCAAGAACA  
TGAGCAACACCATTAATAGCATTGAAACCGGTATTACCAGCACCTACATCTTTTATC  
AGTGGCTGCGTAGCATCGTGAAAGATTTTAGTGATGAAACCGGCAAAATCGACGTG  
ATTGATAAAAGCAGCGATACCCTGGCAATTGTTCCGTATATTGGTCCGCTGCTGAAT  
ATTGGTAATGATATTCGTCATGGCGATTTTGTGGGTGCAATTGAACTGGCAGGCATT  
ACCGCACTGCTGGAATATGTTCCGGAATTTACCATTCCGATTCTGGTTGGTCTGGAA  
GTTATTGGTGGCGAACTGGCACGTGAACAGGTTGAAGCAATTGTTAATAATGCCCTG  
GATAAACGCGATCAGAAATGGGCAGAAGTTTACAATATTACCAAAGCACAGTGGTG  
GGGCACCATTCA TTTACAGATTAATACCCGTCTGGCCATACTATAAAGCCCTGAG  
CCGTCAGGCAAATGCCATTA AAAATGAATATGGAATTTAGCTGGCCAACTACAAAG  
GCAACATCGATGATAAAGCCAAAATCAAAAACGCCATCAGCGAAACCGAAATCCTG  
CTGAACAAAAGCGTTGAACAGGCAATGAAAAACACCGAGAAATTCATGATCAA ACT  
GAGCAACAGCTATCTGACCAAAGAAATGATTCCGAAAGTGCAGGATAACCTGAAAA  
ATTTGATCTGGAAACCAAGAAAACCCTGGACAAATTTATCAAAGAGAAAGAGGAC  
ATTCTGGGCACCAATCTGAGCAGCAGCCTGCGTTCGTAAAGTTAGCATTCTGTCTGAAT  
AAAAACATTGCCTTCGACATCAACGATATCCCGTTTAGCGAATTTGATGATCTGATC  
AACCAGTACAAAACGAGATCGAAGATTATGAAGTGCTGAATCTGGGTGCAGAAGA  
TGGGAAAATCAAAGATCTGAGCGGTACAACCAGCGATATCAATATTGGTTCAGATA  
TCGAACTGGCCGATGGTTCGTGAAAATAAAGCCATTAAGATTAAGGCAGCGAGAAC  
AGCACCATCAA AATTGCAATGAACAAATATCTGCGTTTTAGCGCGACCGATAACTTT  
AGCATTAGCTTTTTGGATCAAACATCCGAAACCGACCAATCTGCTTAATAACGGTATT  
GAATATAACCCTGGTTCGAGAACTTTAATCAGCGTGGTTGGAAAATTAGCATCCAGGAT  
AGCAA ACTGATTTGGTATCTGCGCGATCACAATAACAGCATCAA AATCGTTACACCG  
GATTATATTGCGTTTAATGGCTGGAACCTGATTACCATTACAAACAATCGTAGCAAA  
GGCAGCATTGTGTATGTGAACGGTAGCAAAATTGAAGAGAAGGATATTAGCAGCAT  
CTGGAATACCGAAGTGGATGATCCGATTATCTTTCGCCTGAAAAACAATCGCGATAC

CCAGGCGTTTACCCTGCTGGATCAGTTTAGCATTTATCGGAAAGAACTGAACCAGAA  
 CGAAGTGGTGAAACTGTATAACTACTACTTCAACAGCAACTACATTCGCGATATTTG  
 GGGTAATCCGCTGCAGTACAACAAAAATACTATCTGCAGACCCAGGACAAACCTG  
 GTAAAGGTCTGATCCGCGAATATTGGAGCAGCTTTGGTTATGATTATGTGATTCTGA  
 GCGATAGCAAGACGATTACCTTTCCGAATAATATCCGTTATGGTGCCCTGTATAACG  
 GCAGCAAAGTTCTGATCAAAAATAGCAAAAAACTGGATGGTCTGGTGCGCAATAAA  
 GATTCATTCAGCTGGAAATCGATGGCTATAATATGGGTATTAGCGCAGATCGCTTT  
 AACGAGGATACCAACTATATTGGCACCACCTATGGTACAACCCATGATCTGACCACC  
 GATTTTCAAATTATTCAGCGCCAAGAGAAATACCGCAATTATTGTCAGCTGAAAACC  
 CCGTATAACATCTTTTCATAAAAGCGGTCTGATGAGCACCGAAACCAGCAAACCGAC  
 CTTTCATGATTATCGTGACTGGGTTTATAGCAGCGCATGGTATTTTCAGAACTATGA  
 AAATCTGAACCTGCGCAAACATAACAAAACCAACTGGTATTTTATCCCGAAAGATG  
 AAGGTTGGGATGAAGATCTTGAAGTTCTGTTTCAGGGTCCGCATCATCACCACCATC  
 ACCATCATCATCAC

SEQ ID NO: 33 (полипептидная последовательность BoNT/X)

MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIKNIWIVPERYNF  
 TNNT  
 NDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPEKDEFLQGVKVLERIKSKPEGEKLELISS  
 IP  
 LPLVSNLALTLSDNETIAYQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPIS  
 NNEG  
 TLSEVSFSPFYLPFDES YGNYSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHELVHVTHN  
 LYGIS  
 NRNFYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGIDSKAISSLIKKIETAKNNYTTLIS  
 E  
 RLNTVTVENDLLKYIKNKIPVQGR LGNFKLDTAEFKKNLNTILFVLNESNLAQRF  
 SILVR  
 KHYLKERPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISSQGSNDFQGQLLESSYFEKIESNALR  
 AFI  
 KICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNIDLEDKKTTSKTNVSYPCSLNNGCIEVENKDL  
 FLISN  
 KDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEE  
 LY  
 EPIRNSLFEIKTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYS  
 PF  
 KNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVIDKSSDTLAIVPYIGPLL  
 NI  
 GNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPILVGLEVIGGELAREQVEAIVNNALD  
 KRD  
 QKWAEVYNITKAQWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYK

GNIDDKAK

IKNAISETEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMIPKVQDNLKNFDLET  
KTLDK

FIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIEDYEVL  
NL

GAEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIELADGRENKAIKIKGSENSTIKIAMNKYLRFSA  
DNF

SISFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLRDHNN  
SIKIVTP  
DYI

AFNGWNLITITNNRSKGSIVYVNGSKIEEKDISSIWNTTEVDDPIIFRLKNNRDTQAF  
TLL

DQFSIYRKELNQNEVVKLYNYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKG  
LIREYWS

SFGYDYVILSDSKTITFPNNIRYGALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNKDFIQLEIDG  
YNMG

ISADRFNEDTNYIGTTYGTTHDLTTDFEIIQRQEKYRNYCQLKTPYNIFHKSG  
LMS  
TETS

KPTFHDIRDWVYSSAWYFQNYENLNRKHTKTNWYFIPKDEGWDED

SEQ ID NO: 34 (полипептидная последовательность BoNT/X-10HT дикого типа)

MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIKNIWIVPERY  
NF  
TNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPSEKDEFQGVKVLERIKSKPEGEKLELI  
SSSI  
PLPLVSNALTLSDNETIAYQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPIS  
NGEG  
TLSEVSFSPFYLPFDESYGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHELHVHVT  
HNL  
YGIS  
NRNFYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGIDSKAISSLIKKIETAKNNYTT  
LISERLNT  
VTVENDLLKYIKNKIPVQGRGKLDTAEFKKNLNTILFVLNESNLAQRFSILVR  
KH  
YL  
KERPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGLLESSYFEKIESNALRAFI  
KIC  
PRNG  
LLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVSYPCSLNCGIEVENKDLFLISNKD  
SLNDIN  
LSEEKIKPETTVFFKDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPI  
RNS  
LFEIKT  
IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNNPKVYSPFKNMSNT  
INSI  
ETGI  
TSTYIFYQWLRISVKDFSDETGKIDVIDKSSDTLAIVPYIGPLLNIGNDIRHGDF  
VGA  
IELA  
GITALLEYVPEFTIPILVGLVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWAEVYNITKA  
QWW  
GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANAIAKMNMEFQLANYKGNIDDKAKIKNAISETE  
ILLNKS  
VEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMIPKVQDNLKNFDLETKTLDKFIKEKEDILGT  
NLSS  
SLRRKVSIRLNKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIEDYEVLNLGAEDGKIKDLS  
GTTSDI  
NIGSDIELADGRENKAIKIKGSENSTIKIAMNKYLRFSA  
TDNFSISFWIKHPKPTNLLNNGI  
EYTLVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLRDHNN  
SIKIVTPDYIAFNGWNLITITNNRSKGSIV  
YVNGSKIEEKDISSIWNTTEVDDPIIFRLKNNRDTQAF  
TLLDQFSIYRKELNQNEVVKLYNYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGK  
GLIREYWS  
SFGYDYVILSDSKTITFPNNIRYGALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNKDFIQLEIDG  
YNMG  
ISADRFNEDTNYIGTTYGTTHDLTTDFEIIQRQEKYRNYCQLKTPYNIFHKSG  
LMSTETS  
KPTFHDIRDWVYSSAWYF

QNYENLNRKHTKTNWYFIPKDEGWDEDLEVLFGPHHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 35 (BoNT/A - UniProt P10845)

MPFVNKQFNKDPVNGVDIAYIKIPNVGQMOPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPE  
 EGDLN  
 PPPEAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIP  
 FWGG  
 STIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRN  
 GY  
 GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGIA  
 INPN  
 RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIAS  
 TLNKA  
 KSIVGTTASLQYMKNVFKEKEYLLSEDTSGKFSVDKLLKFDKLYKMLTEIYTEDNF  
 VKFFKV  
 LNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTTEINNMNFT  
 KLKNFT  
 GLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDL  
 NKGEE  
 ITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPN  
 G  
 KKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKV  
 NKATEA  
 AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGAL  
 IFSG  
 AVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTQVQIDNALSQRNEKWDEVYKYIVTN  
 WLAK  
 VNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNE  
 SINKA  
 MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVD  
 RLKDK  
 VNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKI  
 NI  
 GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISL  
 NN  
 EYTIINCMENNSGWKVSLSNYGEIHWTLQDTQEIKQRVVKYSQMINISDYINRWIF  
 VTIT  
 NNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLF  
 KELN  
 EKEIKDLYDNQSNLQDFWGDYLDKPYMLNLYDPNKYVDVNNVVGIRGY  
 MYLKGPR



GSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIKKYASGNKDNIVRNDRVYINVVVKNKEYRLA  
 TNASQA  
 GVEKILSALEIPDVGNSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQ  
 FNNAIK  
 LVASNWYNRQIERSRSLGCSWEFIPVDDGWERPL  
SEQ ID NO: 36 (BoNT/B - UniProt P10844)  
 MPVTINNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGRYYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKP  
 EDFN  
 KSSGIFNRDVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLLMIINGIP  
 YLG  
 DRRVPLEEFNTNIASVTVNKLISNPGEVERKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQ  
 NH  
 FASREGFGGIMQMKFCPEYVSVFNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALILMHELIHV  
 LHGLY  
 GIKVDDLPIVPNEKKFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNR  
 GIV  
 DRLNKVLVCISDPNININIKKFKDKYKFVEDSEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGF  
 TETN  
 IAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIEEGFNISDKDMEKEYRGQNKAIN  
 KQA  
 YEEISKEHLAVYKIQMCKSVKAPGICIDVDNEDLFFIADKNSFSDDLKNERIEYN  
 TQSN  
 YIENDFPINELILDIDLISKIELPSENTESLTDFNVDVPVYEKQPAIKKIFTDENTIFQ  
 Y  
 LYSQTFPLDIRDISLTSSFDDALLFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVK  
 QIVND  
 FVIEANKSNTMDKIADISLIVPYIGLALNVGNETAAGNFENAFEIAGASILLEFIPEL  
 LI  
 PVVGAFLESYIDNKNKIIKTIDNALTKRNEKWSDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTI  
 KEGMY  
 KALNYQAQALEEIIKYRYNIYSEKEKSNINIDFNDINSKLNENINQAIDNINNFING  
 CSV  
 SYLMKKMIPLAVEKLLDFDNTLKNLLNYIDENKLYLIGSAEYKSKVNKYLKTI  
 MPFDL  
 SIYTNDTILIEFMFNKYNSEILNNIILNRLRYKDNLLIDLSGYGAKVEVYDGVELNDK  
 NQFK  
 LTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMK  
 NNS  
 GWKISIRGNRIIWTLLIDINGKTKSVFFEYNIREDISEYINRFFFVTITNNLNNAKIYI  
 NG

KLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIEERYKIQ  
 SY  
 SEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYI  
 NYRDLY  
 IGEKFIIRRKSNSSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWVYTYKYFKKEEEKLFLA  
 PISD  
 SDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYF  
 CIS  
 KWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE  
SEQ ID NO: 37 (BoNT/C - UniProt P18640)  
 MPITINNFNYS DPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNP  
 NLNK  
 PPRVTSPKSGYYDPNYLSTDSKDPFLKEIKLFRKINSREIGEELIYRLSTDIPFPG  
 NN  
 NTPINTFDFDVFNSVDVKTRQGNNWVKTGSINPSVIITGPRENIIDPETSTFKLTN  
 NTF  
 AAQEGFGALSIIISPRFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILILMHELNHAMH  
 NLYG  
 IAIPNDQTISSVTSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKALDYY  
 RSI  
 AKRLNSITTANPSSFNKEYIGEYKQKLIRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVELYNELT  
 QIFTE  
 FNYAKIYNVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDNVYDIQNGFNIPKSNLNVLFMGQNL  
 SRNPA  
 LRKVN PENMLYLFTKFCHKAIDGRSLYNKTLDCRELLVKNTDLPFIGDISDVKTD  
 IFLRK  
 DINEETEVIYYPDNVSVDQVILSKNTSEHGQLDLLYPSIDSESEILPGENQVFYDNR  
 TQN  
 VDYLNSYYYLESQKLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFPTLANKVNAGVQ  
 GGLFLM  
 WANDVVEDFTTNILRKDTLKDSDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFTEAFAVTGV  
 TILL  
 EAFPEFTIPALGAFVIYSKVQERNEIHKTIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGTWLSRI  
 ITQF  
 NNISYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEA  
 MNNIN  
 KFIRESV TYL FKNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHN IILVGEVDK LKAKV  
 NNSF  
 QNTIPFNIFS YTNNSLLKDIINEYFNNINDSKILSLQNRKNTLVDTSGYNAEVSEEG  
 DVQ

LNPIFPDFDKLGSSGEDRGKVIVTQENENIVYNSMYESFSISFWIRINKWVSNLPGYT  
 IID  
 SVKNNSGWSIGIISNFLVFTLKQNEDESEQSINFSYDISNAPGYNKWFFVTVTNN  
 MMGNM  
 KIYINGKLIDTIKVKELTGINFSKTITFEINKIPDTGLITSDSDNINMWIRDFYIFAKE  
 L  
 DGKDINILFNSLQYTNVVKDYWGNDLRYNKEYYMVNIDYLNRYMYANSRQIVF  
 NTRRNNN  
 DFNEGKIIKIRIRGNTNDTRVRRGGDILYFDMTINNKAYNLFMKNETMYADNHS  
 TEDIYA  
 IGLREQTKDINDNIIFQIQPMNNTYYYASQIFKSNFNGENISGICSIGTYRFRLGGD  
 WYR  
 HNYLVPTVKQGNYSALLESTSTHWGFVPVSE  
SEQ ID NO: 38 (BoNT/D - UniProt P19321)  
 MTWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRIQNKLITTPVKAFMITQNIWVIPERFSSDTNP  
 SLSK  
 PPRPTSKYQSYDPSYLSSTDEQKDTFLKGIKLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFM  
 GDS  
 STPEDTFDFTRHTTNIAVEKFENGSWKVTNIITPSVLIFGPLPNILDYASLTLQGG  
 QSN  
 PSFEGFGTLSILKVAPEFLTFSDVTSNQSSAVLGKSIFCMDPVIALMHETHSLHQ  
 LYG  
 INIPSDKRIRPQVSEGGFSQDGPVNVQFEELYTFGGLDVEIIPQIERSQLREKALGHY  
 KDI  
 AKRLNNINKTIPSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKDNTGNFVVNIDKFNSLYSDLTN  
 VMSE  
 VVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIRDGFNLTNKGFNIE NSGQNI  
 RNPA  
 LQKLSSSEVVDLFTKVCLRLTKNSRDDSTCIKVKNRRLPYVADKDSISQEIFENKII  
 TDE  
 TNVQNYSDKFSLDESILDGQVPINPEIVDPLLPNVNMEPLNLPGEEIVFYDDITKY  
 VDYL  
 NSYYYLESQKLSNNVENITLTTSVEEALGYSNKIYTFLPSLAEKVNKGVQAGLFL  
 Nwane  
 VVEDFTTNIMKKDTLTKISDVSVIIPYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFL  
 EGFP  
 EFTIPALGVFTFYSSIQEREKIIKTIENCLEQRVKRWKDSYQWMVSNWLSRITTQF  
 NHIN  
 YQMYDSL SYQADAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNN  
 INKFIR

ECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNIIIVGEVDRLKAKVNESF  
 ENTM  
 PFNIFSYTNNSSLKDIINEYFNSINDSKILSLQNKKNALVDTSGYNAEVRVGDNVQ  
 LNTI  
 YTNDFKLSSSGDKIIVNLNNILYSAIYENSSVSFWIKISKDLTNSHNEYTIINSIEQ  
 NS  
 GWKLCIRNGNIEWILQDVNRKYKSLIFDYSELSHTGYTNKWWFFVTITNNIMGYM  
 KLYIN  
 GELKQSQKIEDLDEVKLDKTIVFGIDENIDENQMLWIRDFNIFSKELSNEDINIVYE  
 GQI  
 LRNVIKDYWGNPLKFDTEYYIINDNYIDRYIAPESNVLVLVQYPDRSKLYTGNPIT  
 IKS  
 SDKNPYSRILNGDNIILHMLYNSRKYMIIRDTDTIYATQGGECSSQNCVYALKLQS  
 NLGNY  
 GIGIFSIKNIVSKNKYCSQIFSSFRENTMLLADIYKPWRFSFKNAYTPVAVTNYET  
 KLLS  
 TSSFWKFISRDPGWVE  
SEQ ID NO: 39 (BoNT/E - UniProt Q00496)  
 MPKINSFNYPVNDRTILYIKPGGCQEFYKSFNIMKNIWIIPERNVIGTTPQDFHP  
 PTS  
 LKNGDSSYYDPNYLQSDEEKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANPYLGN  
 DNTP  
 DNQFHIGDASAVEIKFSNGSQDILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISLRNNYMPSNH  
 RFGS  
 IAIVTFSPEYSFRFNDNCMNEFIQDPALTMHELHSLHGLYGAKGITTKYTITQK  
 QNPL  
 ITNIRGTNIEEFLTFGGTDLNIITSAQSNDIYTNULLADYKKIASKLSKVQVSNPLLNP  
 YK  
 DVFEAKYGLDKDASGIYSVNINKFNDIFKKLYSFTEFDLRTKFQVKCRQTYIGQY  
 KYFKL  
 SNLLNDSIYNISEGYNINNLKVNFRGQANLNPRIITPITGRGLVKKIIRFCKNIVSV  
 KG  
 IRKSICIEINNGELFFVASENSYNDDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLDQVILNFNS  
 ESA  
 PGLSDEKLNLTIQNDAYIPKYDSNGTSDIEQHVDNELNVFFYLDAQKVPEGENNV  
 NLTSS  
 IDTALLEQPKIYTFSSSEFINNVNKPVQAALFVSWIQQVLVDFTEANQKSTVDKI  
 ADIS  
 IVVPYIGLALNIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFEPELLIPTILVFTIKSFLGSSD  
 NK

NKVIKAINNALKERDEKWKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVN  
 AIKTIIE  
 SKYNSYTL EEKNELTNKYDIKQIENELNQKVSIAMNNIDRFLTESSISYLMKIINEV  
 KIN  
 KLREYDENVKTYLLNYIIQHGSILGESQQELNSMVTDTLNN SIPFKLSSYTDDKILI  
 SYF  
 NKFFKRIKSSSVLNMRYKNDKYVDTSGYDSNININGDVYKYPTNKNQFGIYNDK  
 LSEVNI  
 SQNDYIIYDNKYKNFSISFWVRIPNYDNKIVNVNNEYTIINCMRDNNSGWKVS LN  
 HNEII  
 WTFEDNRGINQKLA FN YGNANGISDYINKWIFVTITNDR LGDSKLYINGNLIDQK  
 SILNL  
 GNIHVSDNILFKIVNCSYTRYIGIRYFNIFDKELDETEIQTLYSNEPNTNILKDFWG  
 NYL  
 LYDKEYYLLNVLKPNNFIDRRKDSTLSINNIRSTILLANRLYSGIKVKIQRVNSST  
 NDN  
 LVRKNDQVYIN FVASKTHLFLYADTATTNKEKTIKISSSGNRFNQVVVMNSVG  
 NCTMNF  
 KNNNGNIGLLGFKADTVVASTWYYTHMRDHTNSNGCFWNFISEEHGWQEK  
SEQ ID NO: 40 (BoNT/F - UniProt A7GBG3)  
 MPVVINSFN YNDPVNDDTILYMQIPYEEKSKKYYKA FEIMRNVWIIPERTIGTDP  
 SDFD  
 PPASLENGSSAYYDPNYLTTDAEKDRYLKTTIKLFRINSNPAGEVLLQEISYAKP  
 YLGN  
 EHTPINEFHPVTRTTSVNIKSSTNVKSSIILNLLVLGAGPDIFENSSYPVRKLMDSG  
 GVV  
 DPSNDGFGSINIVTFSPEYEYTFNDISGGYNSSTESFIADPAISLAHELIHALHGLYG  
 AR  
 GVTYKETIKVKQAPLMIAEKPIRLEEFLTFGGQDLNIITSAMKEKIYNNLLANYEK  
 IATR  
 LSRVNSAPPEYDINEYKDYFQWKYGLDKNADGSYTVNENKFN EIYKKLYSFTEI  
 DLANKF  
 KVKCRNTYFIKYGFLKVPNLLDDDIYTVSEGFNIGNLAVNNRGQNIKLNPKIIDS I  
 PDKG  
 LVEKIVKFCKSVIPRKGTKAPRLCIRVNNRELFVASESSYNENDINTPK EIDDTT  
 NLN  
 NNYRNNLDEVILDYNSETIPQISNQT LNTLVQDDSYVPRYDSNGTSEIEEHNVD  
 LNVFF  
 YLHAQKVPEGETNISLTSSIDTAL SEESQVYTFFSSEFINTINKPVHAALFISWINQV  
 IR

DFTTEATQKSTFDKIADISLVVPYVGLALNIGNEVQKENFKEAFELLGAGILLEFV  
 PELL  
 IPTILVFTIKSFIGSSENKNKIIKAINNSLMERETKWKEIYSWIVSNWLTRINTQFNK  
 RK  
 EQMYQALQNQVDAIKTVIEYKYNNYTSDERNRLESEYNINNIREELNKKVSLAM  
 ENIERF  
 ITESSIFYLMKLINEAKVSKLREYDEGVKEYLLDYISEHRSILGNSVQELNDLVTST  
 LNN  
 SIPFELSSYTNDKILILYFNKLYKKIKDNSILDMRYENNKFIDISGYGSNISINGDVY  
 IY  
 STNRNQFGIYSSKPSEVNIAQNNDIYNGRYQNFSISFWVRIPKYFNKVNLNNEYTI  
 IDC  
 IRNNNSGWKISLNYNKIIWTLQDTAGNNQKLVFNQYTMISISDYINKWIFVTITNN  
 RLGN  
 SRIYINGNLIDEKISISNLGDIHVSDNILFKIVGCNDTRYVGIRYFKVFDTELGKTEIE  
 TL  
 YSDEPDPSILKDFWGNLYLLYNKRYLLNLLRTDKSITQNSNFLNINQQRGVYQKP  
 NIFSN  
 TRLYTGVEVIIRKNGSTDISNTDNFVRKNDLAYINVVDRDVEYRLYADISIAKPEK  
 IIKL  
 IRTSNSNNSLGQIIVMDSIGNNCTMNFQNNNGGNIGLLGFHSNNLVASSWYYNNI  
 RKNTS  
 SNGCFWSFISKEHGWQEN  
SEQ ID NO: 41 (BoNT/G - UniProt Q60393)  
 MPVNIKXFNYNDPINDDIIMMEPFNDPGPGTYKAFRIIDRIWIVPERFTYGFQP  
 DQFN  
 ASTGVFSKDVYEYYDPTYLKTDAEKDKFLKTMIKLFNRINSKPSGQRLLDMIVD  
 AIPYLG  
 NASTPPDKFAANVANVSINKKIIQPGAEDQIKGLMTNLIIFGPGPVLSDNFTDSMI  
 MNGH  
 SPISEGFGARMMIRFCPSCLNVFNQENKDTSIFSRRAYFADPALTLMHელიHVL  
 HGLY  
 GIKISNLPITPNTKEFFMQHSDPVQAEELYTFGGHDPSVISPSTDMNIYNKALQNF  
 QDIA  
 NRLNIVSSAQGSGIDISLYKQIYKNKYDFVEDPNGKYSVDKDKFDKLYKALMFG  
 FTETNL  
 AGEYGIKTRYSYFSEYLPPIKTEKLLDNTIYTQNEGFNIASKNLKTEFNQNKAVN  
 KEAY  
 EEISLEHLVIYRIAMCKPVMYKNTGKSEQCIIVNNEDLFFIANKDSFSKDLAKAETI  
 AYN

TQNNTIENNFSIDQLILDNDLSSGIDLPNENTEPFTNFDDIDIPVYIKQSALKKIFVD  
 GD  
 SLFEYLHAQTFPSNIENLQLTNSLNDALRNNNKVYTFSTNLVEKANTVVGASLF  
 VNWVK  
 GVIDDFTSESTQKSTIDKVSVDVSIIPYIGPALNVGNETAKENFKNAFEIGGAAILM  
 EFI  
 PELIVPIVGFFTLESYVGNKGHIIMTISNALKKRDQKWTDMYGLIVSQWLSTVNT  
 QFYTI  
 KERMYNALNNQSQAIKIIEDQYNRYSEEDKMNINIDFNDIDFKLNQSINLAINNI  
 DDFI  
 NQCSISYLMNRMIPLA VKKLDKDFDDNLKRDLLEYIDTNELYLLDEVNILKSKVNR  
 HLKDS  
 IPFDLSLYTKDTILIQVFNNYISNISSNAILSLSYRGGRLIDSSGYGATMNVGSDVIF  
 ND  
 IGNGQFKLNSENSENITAHQSKFVVYDSMFDNFSINFWVRTPKYNNNDIQTYLQ  
 NEYTH  
 SCIKNDSGWKVSIIKGNRIIWTLIDVNAKSKSIFFEYSIKDNISDYINKWFSITITNDR  
 LG  
 NANIYINGSLKKSEKILNLDNRINSSNDIDFKLINCTDITKFWWIKDFNIFGRELNAT  
 EVS  
 SLYWIQSSTNTLKDFWGNPLRYDTQYYLNFQGMQNIYIKYFSKASMGETAPRTN  
 FNNAAI  
 NYQNLYLGLRFIIKKASNSRNINNDNIVREGDYIYLNIDNISDESRYVYVLVNSKEI  
 QTQ  
 LFLAPINDDPTFYDVLQIKKYEKTTCYNCQILCEKDTKTFGLFGIGKFKDYGYV  
 WDTYD  
 NYFCISQWYLRRISENINKLRLGCNWQFIPVDEGWTE  
SEQ ID NO: 42 (TeNT - UniProt P04958)  
 MPITINNFRYSDPVNNDTIIMMEPPYCKGLDIYYKAFKITDRIWIVPERYEFGTKPE  
 DFN  
 PPSSLIEGASEYYDPNYLRTDSDKDRFLQTMVKLFNRIKNNVAGEALLDKIINAIP  
 YLGN  
 SYSLLDKFDTNSNSVSFNLLEQDPSGATTKSAMLTNLIIFGPGPVLNKNEVRGIVL  
 RVDN  
 KNYFPCRDGFGSIMQMAFCPEYVPTFDNVIENTISLTIGKSKYFQDPALLMHელი  
 HVLH  
 GLYGMQVSSHEIIPSKQEIYMQHTYPISAEELFTFGGQDANLISIDIKNDLYEKTNL  
 DYK  
 AIANKLSQVTSCNDPNIDIDSYKQIYQQKYQFDKDSNGQYIVNEDKFQILYNSIM  
 YGFTE

IELGKKFNIKTRLSYFSMNHDPVKIPNLLDDTIYNDTEGFNIESKDLKSEYKGQNM  
 RVNT  
 NAFRNVDGSGLVSKLIGLCKKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLGGELCIKIKNEDLTF  
 IAE  
 KNSFSEEPFQDEIVSYNTKNKPLNFNYSLDKIIVDYNLQSKITLPNDRTPVTKGIP  
 YAP  
 EYKSNAASTIEIHNIDDNTIYQYLYAQKSPTTLQRITMTNSVDDALINSTKIYSYFP  
 SVI  
 SKVNQGAQGILFLQWVRDIIDDFTNESSQKTTIDKISDVSTIVPYIGPALNIVKQGY  
 EGN  
 FIGALETTGVVLLLEYIPEITLPVIAALSIAESSTQKEKIIKTIDNFLEKRYEKWIEVY  
 K  
 LVKAKWLGTVNTQFQKRSYQMYRSLEYQVDAIKKIIDYEYKIYSGPDKEQIADEI  
 >NNLKN  
 KLEEKANKAMININIFMRESSRSFLVNQMINEAKKQLLEFDTQSKNILMQYIKAN  
 SKFIG  
 ITELKKLESKINKVFSTPIPFYSKNLDCWVDNEEDIDVILKKSTILNLDINNDIISDI  
 S  
 GFNSSVITYPDAQLVPGINGKAIHLVNSESSEVIVHKAMDIEYNDMFNNFTVSWF  
 LRVPK  
 VSASHLEQYGTNEYSIISSMKKHSLSIGSGWSVSLKGNNLIWTLKDSAGEVRQITF  
 RDLF  
 DKFNAYLANKWVFITITNDRSSANLYINGVLMGSAEITGLGAIREDDNNITLKL  
 RCNNN  
 NQYVSIDKFRIFCKALNPKEIEKLYTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYLIPVASS  
 KDV  
 QLKNITDYMYLTNAPSYTNGKLNIIYRRLYNGLKFIKRYTPNNEIDSFVKSGDFI  
 KLYV  
 SYNNEHIVGYPKDGNFNNLDRILRVGYNAPGIPLYKKMEAVKLRDLKTYSVQ  
 LKLYDD  
 KNASLGLVGTHNGQIGNDPNRDILIASNWFNHLKDKILGCDWYFVPTDEGWT  
 ND

SEQ ID NO: 43 (нуклеотидная последовательность LH<sub>N</sub>/A1 с участком расщепления EK)

ATGGAGTTCGTTAACAACAGTTCAACTATAAAGACCCAGTTAACGGTGTG  
 ACATTGCTTACATCAAAAATCCCGAACGCTGGCCAGATGCAGCCGGTAAAGGCATC  
 AAAATCCACAACAAAATCTGGGTATCCCGAACGTGATACCTTTACTAACCCGGA  
 AGAAGGTGACCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAACAGGTGCCGGTATCTTACTATG  
 ACTCCACCTACCTGTCTACCGATAACGAAAAGGACAACCTACCTGAAAGGTGTTACTA  
 AACTGTTTCGAGCGTATTTACTCCACCGACCTGGGCCGTATGCTGCTGACTAGCATCG



TTCGCGGTATCCCGTTCTGGGGCGGTTCTACCATCGATACCGAACTGAAAGTAATCG  
 AACTAACTGCATCAACGTTATTCAGCCGGACGGTTCCTATCGTTCCGAAGAACTGA  
 ACCTGGTGATCATCGGCCCGTCTGCTGATATCATCCAGTTCGAGTGTAAGAGCTTTG  
 GTCACGAAGTTCTGAACCTCACCCGTAACGGCTACGGTTCCTACTCAGTACATCCGTT  
 TCTCTCCGGACTTCACCTTCGGTTTTGAAGAATCCCTGGAAGTAGACACGAACCCAC  
 TGCTGGGGCGCTGGTAAATTCGCAACTGATCCTGCGGTTACCCTGGCTCACGAACTGA  
 TTCATGCAGGCCACCGCCTGTACGGTATCGCCATCAATCCGAACCGTGTCTTCAAAG  
 TTAACACCAACGCGTATTACGAGATGTCCGGTCTGGAAGTTAGCTTCGAAGAACTGC  
 GTACTTTTGGCGGTCACGACGCTAAATTCATCGACTCTCTGCAAGAAAACGAGTTCC  
 GTCTGTACTACTATAACAAGTTCAAAGATATCGCATCCACCCTGAACAAAGCGAAAT  
 CCATCGTGGGTACCACTGCTTCTCTCCAGTACATGAAGAACGTTTTTAAAGAAAAAT  
 ACCTGCTCAGCGAAGACACCTCCGGCAAATTCTCTGTAGACAAGTTGAAATTCGATA  
 AACTTTACAAAATGCTGACTGAAATTTACACCGAAGACAACCTTCGTTAAGTTCTTTA  
 AAGTTCTGAACCGCAAAACCTATCTGAACTTCGACAAGGCAGTATTCAAATCAAC  
 ATCGTGCCGAAAGTAACTACACTATCTACGATGGTTTCAACCTGCGTAACACCAAC  
 CTGGCTGCTAATTTTAAACGGCCAGAACACGGAAATCAACAACATGAACTTCACAAA  
 ACTGAAAAACTTCACTGGTCTGTTTCGAGTTTTACAAGCTGCTGTGCgtcgacggcatcattacct  
 ccaaaactaaatctgacgatgacgataaaaacaaagcgctgaacctgcagTGTATCAAGGTTAACA  
 ACTGGGATT  
 TATTCTTCAGCCCGAGTGAAGACAACCTTCACCAACGACCTGAACAAAGGTGAAGAA  
 ATCACCTCAGATACTAACATCGAAGCAGCCGAAGAAAACATCTCGCTGGACCTGAT  
 CCAGCAGTACTACCTGACCTTTAATTTTCGACAACGAGCCGGAAAACATTTCTATCGA  
 AAACCTGAGCTCTGATATCATCGGCCAGCTGGAACCTGATGCCGAACATCGAACGTTT  
 CCCAAACGGTAAAAAGTACGAGCTGGACAAATATAACCATGTTCCACTACCTGCGCG  
 CGCAGGAATTTGAACACGGCAAATCCCGTATCGCACTGACTAACTCCGTTAACGAA  
 GCTCTGCTCAACCCGTCCCGTGTATACACCTTCTTCTCTAGCGACTACGTGAAAAAG  
 GTCAACAAAGCGACTGAAGCTGCAATGTTCTTGGGTTGGGTTGAACAGCTTGTTTAT  
 GATTTTACCGACGAGACGTCCGAAGTATCTACTACCGACAAAATTGCGGATATCACT  
 ATCATCATCCCGTACATCGGTCCGGCTCTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGAC  
 GACTTCGTTGGCGCACTGATCTTCTCCGGTGCGGTGATCCTGCTGGAGTTCATCCCG  
 GAAATCGCCATCCCGGTACTGGGCACCTTTGCTCTGGTTTCTTACATTGCAAACAAG  
 GTTCTGACTGTACAAACCATCGACAACGCGCTGAGCAAACGTAACGAAAAATGGGA  
 TGAAGTTTACAAATATATCGTGACCAACTGGCTGGCTAAGGTTAATACTCAGATCGA  
 CCTCATCCGCAAAAAAATGAAAGAAGCACTGGAAAACCAGGCGGAAGCTACCAAG  
 GCAATCATTAACTACCAGTACAACCAGTACACCGAGGAAGAAAAAACAACATCAA  
 CTTCAACATCGACGATCTGTCTCTAAACTGAACGAATCCATCAACAAAGCTATGAT  
 CAACATCAACAAGTTCCTGAACCAGTGCTCTGTAAGCTATCTGATGAACTCCATGAT  
 CCCGTACGGTGTTAAACGTCTGGAGGACTTCGATGCGTCTCTGAAAGACGCCCTGCT  
 GAAATACATTTACGACAACCGTGGCACTCTGATCGGTCAGGTTGATCGTCTGAAGGA  
 CAAAGTGAACAATACCTTATCGACCGACATCCCTTTTCAGCTCAGTAAATATGTCGA  
 TAACCAACGCCTTTTGTCCACTCTAGAAGCAcaccatcatcacCACCATCACCATCACCAT

SEQ ID NO: 44 (полипептидная последовательность LH<sub>N</sub>/A1 с участком расщепления ЕК)

MEFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWWIPERDTFTNPE  
EGDLNPPPEAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFEIYSTDLGRMLLTSIVRGI  
PFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTR  
NGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAIN  
PNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASL  
NKAKSIVGTTASLQYMKNVFKKEYLLSEDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFV  
KFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTTEINNMNFT  
KLKNFTGLFEFYKLLCVDGIITSKTKSDDDDKNKALNLQCIKVNNWDLFFSPSEDNFTN  
DLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERF  
PNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVN  
KATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDDFVGA  
LIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALS KRNEKWDEVYKYIVTN  
WLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLN  
SINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQV  
DRLKDKVNNLSTLDIPFQLSKYVDNQRLSTLEAHHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 45 (нуклеотидная последовательность ВоNT с нативной петлей A1)

ATGAAACTGGAAATCAACAAATTCAACTACAACGATCCGATCGATGGCATT  
ATGTTATTACCATGCGTCCGCCTCGTCATAGCGATAAAATCAATAAAGGTAAAGGTC  
CGTTCAAAGCCTTTCAGGTGATTA AAAACATTTGGATTGTGCCGGAACGCTACAAC  
TTACCAATAATACCAACGATCTGAACATTCCGAGCGAACCGATTATGGAAGCAGAT  
GCCATTTATAACCCGAACTATCTGAATACCCCGAGCGAAAAAGATGAATTTCTGCAG  
GGTGTATCAAAGTGCTGGAACGCATTA AAAAGCAAACCGGAAGGTGAAAACTGCT  
GGAACCTGATTAGCAGCAGCATTCCGCTGCCGCTGGTTAGCAATGGTGCACCTGACCT  
GAGCGATAATGAAACCATTCATATCAAGAGAACAACAACATTGTGAGCAATCTGC  
AGGCAAACCTGGTTATTTATGGTCCGGGTCCTGATATTGCAAATAATGCAACCTATG  
GTCTGTATAGCACCCCGATTAGTAATGGTGAAGGTACACTGAGCGAAGTTAGCTTTA  
GCCCCTTTTATCTGAAACCGTTTGATGAAAGCTATGGCAATTATCGTAGCCTGGTGA  
ATATCGTGAACAAATTCGTGAAACGTGAATTTGCACCTGATCCGGCAAGCACCTGA  
TGCATGAACTGGTTCATGTTACCCATAATCTGTATGGTATTAGCAACCGCAACTTCT  
ACTATAACTTTGACACCCGGCAAAATTGAAACCAGCCGTCAGCAGAATAGCCTGATTT  
TTGAAGAACTGCTGACCTTTGGTGGCATTGATAGCAAAGCAATTAGCAGCCTGATCA  
TCAAGAAAATTATCGAAACCGCCAAGAACAACCTATAACCACGCTGATTAGCGAACGC  
CTGAATACCGTTACCGTTGAAAATGATCTGCTGAAATATATCAAAAACAAAATCCCG  
GTTCAAGGTCGTCTGGGTAACCTTAAACTGGATACCGCAGAATTCGAGAAAAAGCT  
GAATACCATTCTGTTTGTGCTGAACGAAAGCAATCTGGCACAGCGTTTTAGCATTCT  
GGTTCGTAAACATTACCTGAAAGAACGTCCGATTGATCCGATTTATGTGAACATTCT  
GGATGACAATAGCTACAGCACCCCTGGAAGGTTTTAACATTAGCAGTCAGGGTAGCA  
ATGATTTCCAAGGTCAGCTGCTGGAAAGCAGCTATTTTGAAAAAATTGAAAGCAAT

GCCCTGCGTGCCTTCATTA AAAATCTGTCCGCGTAATGGTCTGCTGTATAATGCCATTT  
ATCGCAACAGCAAAAATCTGGAAGTTCTGTTTCAGGGTCCGCATCATCACCACCATC  
ACCATCATCATCACCTGGAAGTGTTATTTTCAGGGACCGTATCTGAATAACATTGATC  
TGGAAGATAAAAAGACCACGAGCAAAAACCAATGTTAGCTATCCGTGTAGCCTGCTG  
AATGGTTGTATTGAAGTTGAAAACAAAGACCTGTTCCCTGATTAGCAACAAAGATAG  
CCTGAACGATATTAACCTGAGCGAAGAAAAAATCAAACCGGAAACCACCGTGTTCT  
TCAAAGATAAACTGCCTCCGCAGGATATTACGCTGAGCAATTATGATTTTACCGAAG  
CCAATAGCATTCCGAGCATTAGCCAGCAGAACATTCTGGAACGTAATGAAGA ACTG  
TATGAACCGATTGCAATAGCCTGTTTGAAATCAAACCATCTATGTGGATAAGCTG  
ACCACCTTTCATTTTCTGGAAGCCCAGAATATTGATGAGAGCATTGATAGCAGCAAA  
ATTCGTGTTGAACTGACCGATAGCGTTGATGAAGCACTGAGCAATCCGAATAAAGTT  
TATAGCCCGTTCAAGAACATGAGCAACACCATTAATAGCATTGAAACCGGTATTACC  
AGCACCTACATCTTTTATCAGTGGCTGCGTAGCATCGTGAAAGATTTTAGTGATGAA  
ACCGGCAAAATCGACGTGATTGATAAAAGCAGCGATACCCTGGCAATTGTTCCGTA  
TATTGGTCCGCTGCTGAATATTGGTAATGATATTCGTCATGGCGATTTTGTGGGTGC  
AATTGAACTGGCAGGCATTACCGCACTGCTGGAATATGTTCCGGAATTTACCATTCC  
GATTCTGGTTGGTCTGGAAGTGATTGGTGGCGAACTGGCACGTGAACAGGTTGAAG  
CAATTGTTAATAATGCCCTGGATAAACGCGATCAGAAATGGGCAGAAGTTTACAAT  
ATTACCAAAGCACAGTGGTGGGGCACCATTCATTTACAGATTAATACCCGTCTGGCC  
CATACTATAAAGCCCTGAGCCGTCAGGCAAATGCCATTA AAAATGAATATGGAATTT  
CAGCTGGCCAACTACAAAGGCAACATTGATGATAAAGCCAAGATCAAAAACGCCAT  
CAGCGAAACCGAAATTCTGCTGAACAAAAGCGTTGAACAGGCCATGAAAAACACCG  
AGAAATTCATGATTA AACTGAGCAACAGCTACCTGACCAAAGAAATGATTCCGAAA  
GTT CAGGACAACCTGAAAACTTTGACCTGGAAACCAAAAAAACCCTGGACAAGTT  
CATCAAAGAGAAAGAAGATATCCTGGGCACCAATCTGAGCAGCAGCCTGCGTCGTA  
AAGTTAGCATTTCGTCTGAATAAAAACATTGCCTTCGACATCAACGATATCCCGTTTA  
GCGAATTTGATGATCTGATCAACCAGTACAAAAACGAGATCGAAGATTATGAAGTG  
CTGAATCTGGGTGCAGAAGATGGCAAAATCAAAGATCTGAGCGGTACAACCAGCGA  
TATCAATATTGGTTCAGATATCGAACTGGCCGATGGTTCGTGAAAATAAAGCCATTAA  
GATTA AAGGCAGCGAGAACAGCACCATCAA AATTGCAATGAACAAATATCTGCGTT  
TTAGCGCCACCGATAACTTTAGCATTAGCTTTTGGATCAAACATCCGAAACCGACCA  
ATCTGCTTAATAACGGTATTGAATATACCCTGGTCGAGA ACTTTAATCAGCGTGGTT  
GGAAAATTAGCATCCAGGATAGCAA ACTGATTTGGTATCTGCGCGATCACAATAAC  
AGCATCAA AATCGTTACACCGGATTATATTGCGTTTAATGGCTGGAACCTGATCACC  
ATTACGAATAATCGTAGCAAAGGCAGCATCGTGTATGTGAATGGTAGCAA AATTGA  
AGAGAAGGACATTAGCAGCATT TGG AATACCGAAGTGGATGATCCGATTATCTTCC  
GCCTGAAAAATAACCGTGATACCCAGGCATTTACCCTGCTGGATCAGTTTAGCATTT  
ATCGGAAAGAACTGAACCAGAACGAAGTGGTGA AACTGTATAACTACTACTTCAAC  
AGCAACTACATTCGCGATATTTGGGGTAATCCGCTGCAGTACAACAAAAAATACTAT  
CTGCAGACCCAGGACAAACCTGGTAAAGGTCTGATCCGCGAATATTGGAGCAGCTT

TGGTTATGATTATGTGATTCTGAGCGATAGCAAGACGATTACCTTTCCGAACAATAT  
 CCGTTATGGTGCCCTGTATAACGGTAGCAAAGTTCTGATCAAGAACAGCAAGAAAT  
 TAGATGGTCTGGTGCGCAATAAAGATTTTCATTCAGCTGGAAATCGATGGCTATAATA  
 TGGGTATTAGCGCAGATCGCTTTAACGAGGATACCAACTATATTGGCACCACCTATG  
 GTACAACCCATGATCTGACCACCGATTTTGAAATTATTCAGCGCCAAGAGAAATACC  
 GCAATTATTGTCAGCTGAAAACCCCGTATAACATCTTTCATAAAAGCGGTCTGATGA  
 GCACCGAAACCAGCAAACCGACCTTCCATGATTATCGCGATTGGGTTTATAGCAGCG  
 CATGGTATTTTCAGAACTATGAAAATCTGAACCTGCGCAAACATACCAAAAACCAACT  
 GGTATTTTATCCCGAAAGATGAAGGTTGGGACGAAGAT

SEQ ID NO: 46 (полипептидная последовательность BoNT с нативной петлей A1)

MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIKNIWIVPERYNF  
 TNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPSEKDEFLLQGVKVLERIKSKPEGEKLELISSSI  
 PLPLVSNAGALTLSDNETIAYQENNNIVSNLQANLVIYGPGPDIANNATYGLYSTPISNGEG  
 TLSEVSFSFPYLKPFDESYGNYSRLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHELHVHVTNLYGIS  
 NRNFYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGIDSKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNT  
 VTVENDLLKYIKNKIPVQGR LGNFKLDTAEFKKNLTLFVLNESNLAQRFSILVRKHYL  
 KERPIDIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGLLESSYFEKIESNALRAFIKICPRNG  
 LLYNAIYRNSKNLEVLFGPHHHHHHHHHHLEVLFGPYLNNIDLEDKKTTSKTNVSYF  
 CSLLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKDKLPPQDITLSNYDFTEAN  
 SIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSV  
 DEALSNPNKVYSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDET GKIDVIDKSSDTL  
 AIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPILVGLEVIGGELAREQVEAI  
 VNNALDKRDQKWA EVYNITKAQWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQL  
 ANYKGNIDDKAKIKNAISETTEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLT KEMIPKVQDNL  
 KNFDLET KKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYK  
 NEIEDYEVNLGAEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIELADGRENKAIKIKGSENSTIKIAMNK  
 YLRFSATDNFSISFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLRDHNN  
 SIKIVTPDYIAFNGWNLITITNRSKGSIVYVNGSKIEEKDISSIWNTTEVDDPIIFRLKNNRD  
 TQAFTLLDQFSIYRKELNQNEVVKLYNYFFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPG  
 KGLIREYWSSFGYDYVILSDSKTITFPNNIRYGALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNKDFIQ  
 LEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTTHDLTTDFEIIQRQEKYRNYCQLKTPYNIFHK  
 SGLMSTETSKPTFHDYRDWVYSSAWYFQNYENLNLRKHTKTNWYFIPKDEGWDED

SEQ ID NO: 47 (полипептидная последовательность трипсина)

MHPLLILAFVGA AVAFPSDDDDKIVGGYTCAENSVPYQVSLNAGYHFCGGSLIN  
 DQWVVVSAAHCYQYHIQVRLGEYNIDVLEGGEQFIDASKIIRHPKYSSWTLDNDILLIKLS  
 TPAVINARVSTLALPSACASGSTECLISGWGNTLSSGVNYPDLLQCLEAPLLSHADCEAS  
 YPGEITNNMICAGFLEGGKDCSQGDSGGPVACNGQLQGIVSWGYGCAQKKGKPGVYTK  
 VCNYVDWIQETIAANS

SEQ ID NO: 48 (полипептидная последовательность Lys-C)

G V S G S C N I D V V C P E G N G H R D V I R S V A A Y S K Q G T M W C T G S

LVNNSANDKKMYFLTANHCGMTTAAIASSMVVYWNYQNSTC  
 RAPGSSSSGANGDGSLAQSQTGAVVRATNAASDFTLLELNTAA  
 NPAYNLFWAGWDRRDQNFAGATAIHHPNVAEKRISHSTVATE  
 ISGYNGATGTSHLHVFWQASGGVTEPGSSSGSPIYSPEKRVLGQ  
 LH211GGPSSCSATGADRSDYYGRVFTSWTGGGTSATRLSDWL  
 DAAGTGAQFIDGLDSTGTPPV

SEQ ID NO: 49 (полипептидная последовательность легкой цепи энтерокиназы)

IVGGSDSREGAWPWVVALYFDDQQVCGASLVSRDWLVSAAHCVYGRNMEPSK  
 WKAVLGLH

MASNLTSPIETRLIDQIVINRHYNKRRKNNDIAMMHLEMKVNYTDYIQICLPE  
 ENQVF

PPGRICSIAGWGALIQGSTADVLQEADVPLLSNEKCQQQMPEYNITENMVCAG  
 YDAGGV

DSCQGDSSGGLMCQENNRWLLAGVTSFGYQCALPNRPGVYARVPRFTEWIQSF  
 LH

SEQ ID NO: 50 (полипептидная последовательность тяжелой цепи фактора Ха)

IVGGRDCAEGECPWQALLVNEENEGFCGGTILNEFYVLTAACHLHQAQRFTVRV  
 GDRNTEQEEGNEMAHEVEMTVKHSRFVKETYDFDIAVLRKTPIRFRNVAPACLPEKD  
 WAEATLMTQKTGIVSGFGRTHEKGRLSSTLKMLEVYVDRSTCKLSSSFTITPNMFCAG  
 YDTQPEDACQGDSGGPHVTRFKDTYFVTGIVSWGEGCARKGKFGVYTKVSNFLKWIDK  
 IMKARAGAAGSRGHSEAPATWTVPPPLPL

SEQ ID NO: 51 (полипептидная последовательность легкой цепи фактора Ха)

ANSFLEEVKQGNLERECLEEACSLEEAREVFEDAEQTDEFWSKYKDGQCEGHP  
 CLNQGHCKDGIGDYTCTCAEGFEGKNCEFSTREICSLDNGGCDQFCREERSEVRCSCAH  
 GYVLGDDSKSCVSTERFPCGKFTQGRS

SEQ ID NO: 52 (полипептидная последовательность защитного антигена токсина  
 сибирской язвы - NCBI Ref Seq: NP\_052806)

1 mkrkvlip1 malstilvss tgnleviqae vkqenrllne sesssqgllg yyfsdlmfqa  
 61 pmvvtsttg dlsipsele nipsenqyfq saiwsgfikv kksdeytfat sadnhvtmwv  
 121 ddgevinkas nsnkirlekq rlyqikiqq renptekglf fklywtasqn kkevisssnl  
 181 qlpelkqkss nsrkrstsa gptvpdrnd gipdsleveg ytvdvknkrt flspwisnih  
 241 ekkgltkyks spekwstasd pysdfekvtg ridknvspea rhplvaaypi vhdmenii  
 301 sknedqstqn tdsqtrtisk ntstsrhts evhgnaevha sffdiggsvs agfsnsnst  
 361 vaidhsisla gertwaetmg lntadtarl n aniryvntgt apiynvlptt slvlgknqtl  
 421 atikakenql sqilapnny psknlapial naqddfsstp itmynqfle lektkqlrld  
 481 tdqvygniat ynfengrvrv dtgsnwsevl pqigettari ifngkdlnlv erriaavnps  
 541 dplettkpdm tlkealkiaf gfnepngnlq yqgkditefd fnfdqqtstqn iknqlaelna  
 601 tniyvtldki klnakmnil rdkrfhydrn niavgadesv vkeahrevin ssteglllni  
 661 dkdirkilsg yiveiedteg lkevindryd mlnisslrqd gktfidfkky nklplyisn  
 721 pnykvnvyav tkentiinps engdtstngi kkilifskkg yeig

SEQ ID NO: 53 (LH<sub>N</sub>/A с петлей активации C1)

MPFVNKQFNYPVNGVDIAIYKIPNVGQMOPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPE  
 EGDNLN

PPPEAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIP

FWGG

STIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFSGHEVLNLTRN

GY

GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGIA

INPN

RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIAS

TLNKA

KSIVGTTASLQYMKNVFKKEYLLSEDTSGKFSVDKLFKLYKMLTEIYTEDNF

VKFFKV

LNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTTEINNMNFT

KLKNFT

GLFEFYKLLCHKA**IDGR**SLYNKTLDCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEE

ITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIERFPN

G

KKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTTFFSSDYVKKV

NKATEA

AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGAL

IFSG

AVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTQVQIDNALSQRNEKWDEVYKYIVTN

WLAK

VNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLE

SINKA

MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVD

RLKDK

VNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIK

SEQ ID NO: 54 (LH<sub>N</sub>/B с петлей активации C1)

MPVTINNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGRYYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKP

EDFN

KSSGIFNRDVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLEMIINGIP

YLG

DRRVPLEEFNTNIASVTVNKLISNPGEVERKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQ

NH

FASREGFGGIMQMKFCPEYVSVFNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALILMHელიHV

LHGLY

GIKVDLPIVPNEKKFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNFR

GIV

DRLNKVLVCISDPNININIIYKNKFKDKYKFVEDSEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGF

TETN

IAENYKIKTRASYPFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIEEGFNISDKDMEKEYRGQNKAIN

KQA

YEEISKEHLAVYKIQMCHKA**IDGR**SLYNKTLDCIDVDNEDLFFIADKNSFSDDL  
 KNERIEYNTQSNYIENDFPINELILDITDLISKIELPSENTESLTDNFVDVPVYEKQPAIKKIF  
 TDENTIFQY

LYSQTFFPLDIRDISLTSSFDDALLFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVK  
 QIVND

FVIEANKSNTMDKIADISLIVPYIGLALNVGNETAAGNFENAFEIAGASILLEFIPEL  
 LI

PVVGAFLLSYIDNKNKIIKTIDNALTZRNEKWSDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTI  
 KEGMY

KALNYQAQALEEIIKYRYNIYSEKEKSNINIDFNDINSKLNENINQAINNINFING  
 CSV

SYLMKKMIPLAVEKLLDFDNTLKKNLLNYIDENKLYLIGSAEYEKSKVNKYLKTI  
 MPFDL

SIYTNDTILIEFMFNKYN

SEQ ID NO: 55 (LH<sub>N</sub>/D с петлей активации C1)

MTWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRIQNKLITTPVKAFMITQNIWVIPERFSSDTNP  
 SLSK

PPRPTSKYQSYDPSYLSSTDEQKDTFLKGIKLFKRINERDIGKKLINYLTVGSPFM  
 GDS

STPEDTFDFTRHTTNIAVEKFENGSWKVTNIITPSVLIFGPLNILDYASLTLQGG  
 QSN

PSFEGFGTSLKVAPEFLTFSDVTSNQSSAVLGKSIFCMDPVIALMHETHSLHQ  
 LYG

INIPSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLDVEIIPQIERSQLREKALGHY  
 KDI

AKRLNNINKTIPSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKDNTGNFVVNIDKFNSLYSDLTN  
 VMSE

VVYSSQYNVKNRTHYFSRHYPVFANILDDNIYTIRDGFNLTKGFNIENSGQNE  
 RNPA

LQKLSSSESVVDLFTKVCHKA**IDGR**SLYNKTLDCIKVKNNRLLPYVADKDSISQEIF  
 ENKIITDE

TNVQNYSDKFSLDESILDGQVPINPEIVDPLLPNVNMEPLNLPGEEIVFYDDITKY  
 VDYL

NSYYYLESQKLSNNVENITLTTSVEEALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKGVQAGLFL  
 Nwane

VVEDFTTNIMKKDTLTKISDVSVIIPYIGPALNIGNSALRGNFNQAFAATAGVAFL  
 EGFP

EFTIPALGVFTFYSSIQEREKIIKTIENCLEQRVKRWKDSYQWMVSNWLSRITTQF  
 NHIN

YQMYDSLQYQADAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNN

INKFIR

ECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNIIILVGEVDRLKAKVNESF

ENTM

PFNIFS YTNNSLLKDIINEYFN

SEQ ID NO: 56 (LH<sub>N</sub>/E с петлей активации C1)

MPKINSFNYNNDPVNDRITILYIKPGGCQEFYKSFNIMKNIWIIPERNVIGTTPQDFHP

PTS

LKNGDSSY YDPNYLQSDEEKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANPYLGN

DNTP

DNQFHIGDASAVEIKFSNGSQDILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISLRNNYMPSNH

RFGS

IAIVTFSPEYSFRFNDNCMNEFIQDPALTMHELHSLHGLYGAKGITTKYTITQK

QNPL

ITNIRGTNIEEFLTFFGGTDLNIITSAQSNDIYTNLLADYKKIASKLSKVQVSNPLLNP

YK

DVFEAKYGLDKDASGIYSVNINKFNDIFKKLYSFTEFDLRTKFQVKCRQTYIGQY

KYFKL

SNLLNDSIYNISEGYNINNLKVNFRGQANLNPRIITPITGRGLVKKIIRF

CHKA**IDGR**SLYNKTLDCIEINNGELFFVASSENSYNDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLD

QVILNFNSESAPGLSDEKLNLTIQNDAYIPKYDSNGTSDIEQHVDNELNVFFYLDAQKVP

EGENNVNLTSS

IDTALLEQPKIYTFSSSEFINNVNKPVQAALFVSWIQQVLVDFTEANQKSTVDKI

ADIS

IVVPYIGLALNIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFEPELLIPTILVFTIKSFLGSSD

NK

NKVIKAINNALKERDEKWKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVN

AIKTIE

SKYNSYTL EEKNELTNKYDIKQIENELNQKVSIAMNNIDRFLTESSISYLMKIINEV

KIN

KLREYDENVKTYLLNYIIQHGSILGESQQELNSMVTDTLNN SIPFKLSSYTDDKILI

SYF

NKFFK

SEQ ID NO: 57 (LH<sub>N</sub>/F с петлей активации C1)

MPVVINSFNYNNDPVNDDTILYMQIPYEEKSKKYYKAFEIMRNVWIIPERN TIGTDP

SDFD

PPASLENGSSAYYDPNYLTDAEKDRYLKTTIKLFRINSNPAGEVLLQEISYAKP

YLG N

EHTPINEFHPVTRTTSVNIKSSTNVKSSIILNLLVLGAGPDIFENSSYPVRKLMDSG

GVY

DPSNDGFGSINIVTFSPEYEYTFNDISGGYNSSTESFIADPAISLAHELIHALHGLYG



AR

GVTYKETIKVKQAPLMIAEKPIRLEEFLTFGGQDLNIITSAMKEKIYNNLLANYEK

IATR

LSRVNSAPPEYDINEYKDYFQWKYGLDKNADGSYTVNENKFNEIYKKLYSFTEI

DLANKF

KVKCRNTYFIKYGFLKVPNLLDDDIYTVSEGFNIGNLAVNNRGQNIKLNPKIIDS

PDKG

LVEKIVKFCHKA**IDGR**SLYNKTLDCIRVNNRELFFVASESSYNENDINTPKEIDDT

TNLN

NNYRNNLDEVILDYNSETIPQISNQTNLTLVQDDSYVPRYDSNGTSEIEEHNVD

LNVFF

YLHAQKVPEGETNISLTSSIDTALSEESQVYTFSSSEFINTINKPVHAALFISWINQV

IR

DFTTEATQKSTFDKIADISLVVPYVGLALNIGNEVQKENFKEAFELLGAGILLEFV

PELL

IPTILVFTIKSFIGSSENKNKIIKAINNSLMERETKWKEIYSWIVSNWLTRINTQFNK

RK

EQMYQALQNQVDAIKTVIEYKYNNYTSDERNRLESEYNINNIREELNKKVSLAM

ENIERF

ITESSIFYLMKLINEAKVSKLREYDEGVKEYLLDYISEHRSILGNSVQELNDLVTST

LNN

SIPFELSSYTNDKILILYFNKLYK

SEQ ID NO: 58 (LH<sub>N</sub>/G с петлей активации C1)

MPVNIKXFNYNDPINNDDIIMMEPFNDPGPGTYKAFRIIDRIWIVPERFTYGFQP

DQFN

ASTGVFSKDVYEYYDPTYLKTDAEKDKFLKTMIKLFNRINSKPSGQRLLDMIVD

AIPYLG

NASTPPDKFAANVANVSINKKIIQPGAEDQIKGLMTNLIIFGPGPVLSDNFTDSMI

MNGH

SPISEGFGARMMIRFCPSCLNVFNQENKDTSFRRAYFADPALTMHELIVL

HGLY

GIKISNLPITPNTKEFFMQHSDPVQAEELYTFGGHDPSVISPSTDMNIYNKALQNF

QDIA

NRLNIVSSAQGSGIDISLYKQIYKNKYDFVEDPNGKYSVDKDKFDKLYKALMFG

FTETNL

AGEYGIKTRYSYFSEYLPPIKTEKLLDNTIYTQNEGFNIASKNLKTEFNGQNKAVN

KEAY

EEISLEHLVIYRIAMCHKA**IDGR**SLYNKTLDCIIVNNEDLFFIANKDSFSKDLAKA

ETIAYN

TQNNTIENNFSIDQLILDNDLSSGIDLPNENTEPFTNFDDIDIPVYIKQSALKKIFVD

GD

SLFEYLHAQTFPSNIENLQLTNSLNDALRNNNKVYTFSTNLVEKANTVVGASLF

VNWVK

GVIDDFTSESTQKSTIDKVSIVSIIIPYIGPALNVGNETAKENFKNAFEIGGAAILM

EFI

PELIVPIVGFFTLESYVGNKGHIIMTISNALKKRDQKWTDMYGLIVSQWLSTVNT

QFYTI

KERMYNALNNQSQAIEKIIDQYNRYSEEDKMNINIDFNDIDFKLNQSINLAINNI

DDFI

NQCSISYLMNRMIPLA VKKLKDFDDNLKRDLEIDTNELYLLDEVNILKSKVNR

HLKDS

IPFDLSLYTKDTILIQVFNNYIS

SEQ ID NO: 59 (LH<sub>N</sub>/TeNT с петлей активации C1)

MPITINNFYSDPVNNDTIIMMEPPYCKGLDIYYKAFKITDRIWIVPERYEFGTKPE

DFN

PPSSLIEGASEYYDPNYLRTDSDKDRFLQTMVKLFNRIKNNVAGEALLDKIINAIP

YLGN

SYSLLDKFDTNSNSVSFNLEQDPSGATTKSAMLTNLIIFGPGPVLNKNEVRGIVL

RVDN

KNYFPCRDGFGSIMQMAFCPEYVPTFDNVIENTISLTIGKSKYFQDPALLMHელი

HVLH

GLYGMQVSSHEIIPSKQEIYMQHTYPISAEELFTFGGQDANLISIDIKNDLYEKT LN

DYK

AIANKLSQVTSCNDPNIDIDSYKQIYQQKYQFDKDSNGQYIVNEDKFQILYNSIM

YGFTE

IELGKKFNKTRLSYFSMNHDPVKIPNLLDDTIYNDTEGFNIESKDLKSEYKGQNM

RVNT

NAFRNVDGSGLVSKLIGLCHKA **IDGRS**LYNKTLDCIKIKNEDLTFIAE

KNSFSEEPFQDEIVSYNTKNKPLNFNYSLDKIIVDYNLQSKITLPNDRTPVTKGIP

YAP

EYKSNAASTIEIHNIDDNTIYQYLYAQKSPTTLQRITMTNSVDDALINSTKIYSYFP

SVI

SKVNQGAQGILFLQWVRDIIDDFTNESSQKTTIDKISDVSTIVPYIGPALNIVKQGY

EGN

FIGALETTGVVLLLEYIPEITLPVIAALSIAESSTQKEKIIKTIDNFLEKRYEKWIEVY

K

LVKAKWLGTVNTQFQKRSYQMYRSLEYQVDAIKKIIDYEYKIYSGPDKEQIADEI

NNLKN

KLEEKANKAMININIFMRESSRSFLVNQMINEAKKQLLEFDTQSKNILMQYIKAN

SKFIG

ITELKKLESKINKVFSTPIPFYSKLNDCWVDNEEDIDV

SEQ ID NO: 60 (LH<sub>N</sub>/X с петлей активации C1)

MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIKNIWIVPERYNFTNNT  
 NDLNIPSEPI MEADAIYNPNYLNTPEKDEF LQGVKVLERIKSKPEGEKLELISSSIP  
 LPLVSN GALTLS DNETIAYQENNNIVSNLQANLVIYGP GPDIANNATYGLYSTPISNGEG  
 TLSEVSFS PFY LKPFDES YGNYSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHEL VHVTHNLYGIS  
 N RN FYYNFDTGKIETS RQQNSLIFEELLTFGGIDSKA ISSLIKKIETAKNNYTTLISE  
 RLNTVTVENDLLKYIKNKIPVQGR LGNFKLDTA EF EK LNTILFVLNESNLAQRFSILVR  
 KH YLKERPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISSQGSNDFQGQLLESSYFEKIESNALRAFI  
 KICHKA **IDGR**SLYNKTLDCIEVENKDLFLISN  
 KD SLNDINLSEEKIKPETTVFFKDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELY  
 EPIRNSLF EIKTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALS NPNKVYSPF  
 KNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSD ETGKIDVIDKSSDTLAIVPYIGPLNI  
 GNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPILVGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRD  
 QKWAEVYNITKAQWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGNIDD  
 КАК  
 IKNAISET EILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKE MIPKVQDNLKNFDLET KKTLDK  
 FIK EKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNIAFDINDIPSEFDDLINQYKNEIEDYEVLNL  
 GAEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIE

### ПРИМЕРЫ

### МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

#### Материалы

- 5 мл HiTrap Butyl HP (GE#: 28411005)
- 5 мл HiTrap Q HP (GE#: 17-1154-01)
- 5-мл колонка HiTrap Phenyl HP (GE# 17-5195-01)
- колонка СНТ типа II (Biorad# 7324756)
- TrypZean (Sigma# T3568)
- Lys-C (Sigma# 000000011047825001)
- Энтерокиназа, легкая цепь (NEB#P8070)
- Фактор Ха (NEB#P8010)
- колонка ACQUITY UPLC Protein BEH C4 (Waters# 186004495)

#### Очистка белка

Для экспрессии белков использовали BL21 (DE3) или NiCo (DE3) (NEB) E. coli. Как правило, бактерии культивировали при 37°C до индукции, температуру снижали до 16°C и экспрессию индуцировали 1 mM IPTG в течение ночи.

#### BoNT/AC с петлей C1 (SEQ ID NO: 13)

Бактериальный осадок ресуспендировали в лизирующем буфере (50 mM Tris-HCl pH=8) посредством обработки ультразвуком и очищали центрифугированием. Концентрацию сульфата аммония доводили до 1,3 M и белок-мишень иммобилизовывали с использованием смолы Butyl HP (GE). Фракции, содержавшие белок-мишень,

обессоливали и наносили на смолу Q HP (GE). Очищенный белок активировали в течение ночи при 4°C посредством 6 мкг/1 мг фактора Ха ВоNT (NEB) с последующей очисткой с использованием смолы Phenyl HP (GE).

#### **ВоNT/E с петлей C1 (SEQ ID NO: 11)**

Бактериальные осадки разрушали в лизирующем буфере (100 мМ фосфат натрия pH=7,8; 100 мМ NaCl) посредством обработки ультразвуком и очищали центрифугированием. Концентрацию сульфата аммония доводили до 1,25 М и белок-мишень иммобилизовывали с использованием смолы Butyl HP (GE). Фракции, содержавшие белок-мишень, обессоливали и наносили на смолу Q HP (GE). Очищенный белок активировали в течение ночи при 4°C посредством либо 5 мкг/1 мг фактора Ха (NEB) ВоNT или 80 Е/мл энтерокиназы (NEB), с последующей очисткой с использованием смолы СНТ типа II (Biorad).

#### **ВоNT/X (SEQ ID NO: 5)**

Бактериальные осадки разрушали лизирующим буфером (50 мМ Tris-HCl pH=8, 500 мМ NaCl) посредством обработки ультразвуком и очищали центрифугированием. Белок-мишень улавливали с использованием колонки HisTrap HP (GE). Фракции, содержавшие белок-мишень, обессоливали и наносили на смолу Q HP (GE). Очищенный белок активировали в течение ночи при 4°C посредством либо 5 мкг/1 мг фактора Ха (NEB) ВоNT, либо 80 Е/1 мг энтерокиназы (NEB) ВоNT, с последующей очисткой с использованием 1-мл колонки HisTrap (GE).

#### **LC/MS**

В образцах проводили замену буфера на 50 мМ бикарбонат аммония перед анализом. Образцы представляли собой либо интактный белок, либо восстановленный посредством инкубации с 10 мМ DTT в течение 30 минут при 37°C. Образцы тестировали с использованием системы Waters Acquity H-Class UPLC System в комбинации с масс-спектрометром Waters Xevo G2-XS QToF.

- Подвижная фаза А 0,1% муравьиная кислота в воде
- Подвижная фаза В 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле
- Колонка: ACQUITY UPLC Protein BEH C4 (Waters)

#### **ПРИМЕР 1**

##### **Петля активации ВоNT/C1 может расщепляться множеством протеаз**

Неактивный ВоNT/C1 (0) (SEQ ID NO: 15) инкубировали с набором протеаз: трипсин, Lys-C, энтерокиназа и фактор Ха. Все протеазы продемонстрировали расщепление в петле активации. ВоNT/C1 (0) (SEQ ID NO: 15) расщепляли энтерокиназой (ЕК) или фактором Ха (FXa) в течение ночи при 4°C и 25°C. Кроме того, ВоNT/C1 (0) расщепляли трипсином в течение 16 ч при 20°C (фиг.2 А, В). Все три протеазы могут расщеплять петлю активации ВоNT/C1 и образовывать двухцепочечную молекулу по сравнению с контролем без обработки протеазой. Однако дополнительные продукты расщепления были заметны после расщеплением трипсином и Lys-C.

#### **ПРИМЕР 2**

### Охарактеризация и улучшение протеолитической активации VoNT/X

Частично очищенный VoNT/X-10NT дикого типа (SEQ ID NO: 34) инкубировали в течение ночи при 4°C с возрастающими количествами трипсина (TrypZean) и Lys-C, а также фактора Ха (FXa) и энтерокиназы (ЕК).

На фиг.3 показано, что VoNT/X дикого типа деградировался посредством как Lys-C (фиг.3А), так и трипсина (фиг.3В, дорожки 12-13 и 15-17). Примечательно, что FXa и ЕК были неспособны активировать белок в двухцепочечной форме (фиг.3В, дорожки 18 и 19, соответственно).

В попытках улучшить активацию VoNT/X, петлю активации VoNT/X заменяли петлей активации VoNT/C1 (SEQ ID NO: 2) с получением сконструированного белка VoNT SEQ ID NO: 5. Сконструированный VoNT очищали с использованием нескольких стадий хроматографии и обрабатывали энтерокиназой (ЕК) или фактором Ха (FXa) для подтверждения того, что присутствие петли VoNT/C позволяло продуцирование двухцепочечной молекулы. Неожиданно, на фиг.4 показано, что ЕК и FXa специфически расщепляют сконструированным VoNT/X в двухцепочечной форме.

#### ПРИМЕР 3

### Охарактеризация и улучшение протеолитической активации VoNT/E

VoNT/E дикого типа расщепляли Lys-C и трипсином (TrypZean). На фиг.5А показано, что Lys-C неточно расщепляет/деградирует VoNT/E. Обработка трипсином приводила к укорочению VoNT/E, что означает, что требовалась дополнительная стадия очистки для отделения полноразмерного белка от продукта укорочения (фиг.5В).

В попытках улучшить активацию VoNT/E петлю активации VoNT/E заменяли на петлю активации VoNT/C1 (SEQ ID NO: 2) с получением сконструированного белка VoNT SEQ ID NO: 11. Сконструированный VoNT очищали с использованием нескольких стадий хроматографии и обрабатывали энтерокиназой (ЕК) или фактором Ха (FXa) для подтверждения того, что присутствие петли VoNT/C позволяло продуцирование двухцепочечной молекулы. На фиг.6 показано, что ЕК и FXa неожиданно специфически расщепляют сконструированный VoNT/E на двухцепочечную форму.

#### ПРИМЕР 4

### Протеолитическая активация химеры VoNT/A1C1

Петлю VoNT/C вносили в химеру VoNT/A1C1 (LH<sub>N</sub>/A1 с H<sub>C</sub>-доменом C1) для облегчения протеолитической активации белка. Петлю активации VoNT/A1 VoNT/A1C1 заменяли петлей VoNT/C1 с получением сконструированного белка VoNT SEQ ID NO: 13. Сконструированный VoNT очищали с использованием нескольких стадий хроматографии и обрабатывали фактором Ха (FXa) для подтверждения того, что присутствие петли VoNT/C позволяло продуцирование двухцепочечной молекулы. На фиг.7А показано, что FXa специфически расщепляет сконструированный VoNT/A1C1 на двухцепочечную форму. Для целей сравнения Met VoNT/A1 дикого типа (коммерчески доступный от Metabionics A1080116), содержащий петлю активации A1, инкубировали с FXa и ЕК. На фиг.7В показано, что FXa не расщепляет петлю активации A1, в то время как ЕК

расщепляет только с минимальной активностью, и как FXa, так и ЕК приводит к образованию дополнительных ненадлежащих продуктов расщепления (продуктов деградации).

#### ПРИМЕР 5

##### VoNT, содержащие петлю C1, сохраняют активность расщепления SNARE

Первичные кортикальные нейроны крысы обрабатывали в течение 24 ч посредством VoNT/A1C1 (SEQ ID NO: 13) согласно примеру 4, содержащего петлю активации VoNT/C1 и очищенный рекомбинантный VoNT/C1 (SEQ ID NO: 17). SNARE-зависимое высвобождение глутамата из клеток, стимулированных хлоридом калия, измеряли после инкубации (фиг.8). Эти данные подтверждают активность кластридиальных нейротоксинов, модифицированных включением петли активации VoNT/C1.

#### ПРИМЕР 6

##### Фактор Ха и энтерокиназа расщепляют петлю активации VoNT/C в том же участке IDGR↓SL

Очищенный VoNT/E, содержащий петлю VoNT/C1 (SEQ ID NO: 11) активировали протеазами либо энтерокиназой, либо фактором Ха, и инкубировали с 10 mM DTT для восстановления дисульфидных мостиков и разделения легкой и тяжелой цепей. Анализ посредством жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии массы интактного белка проводили на образцах сконструированного VoNT/E с восстановлением и без восстановления (SEQ ID NO: 11) для картирования участков расщепления обеих протеаз. Обе протеазы расщепляли VoNT/E с образованием легкой и тяжелой цепей одного размера, что указывает на то, что как энтерокиназа, так и фактор Ха осуществляет расщепление в одном и том же участке (таблица 1).

**Таблица 1.** Сравнение спрогнозированных и измеренных масс сконструированного VoNT/E (SEQ ID NO: 11) после расщепления участка IDGR↓SL в С-петле. Масса тяжелой цепи указывает на расщепление в заданном участке как посредством, так и фактора Ха.

|                           | <b>Спрогнозированная теоретическая масса [Да]</b> | <b>Наблюдаемая масса после расщепления ЕК [Да]</b> | <b>Наблюдаемая масса после расщепления FXa [Да]</b> |
|---------------------------|---|--|---|
| <b>интактная молекула</b> | 143952  | 143853 (фиг.9)                                     | 143850 (фиг.11)                                     |
| <b>Легкая цепь</b>        | 47633   | 47518 (фиг.10)                                     | 47518 (фиг.12)                                      |
| <b>Тяжелая цепь</b>       | 96337   | 96338 (фиг.10)                                     | 96335 (фиг.12)                                      |

#### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ПРИМЕР 7

##### Вставка участка распознавания протеазой в эндогенную петлю

Петля активации VoNT/C1 является единственной петлей активации VoNT, которая содержит встречающийся в природе участок расщепления для специфической протеазы

FXa (и неожиданно EK) (см. фиг.1). Все другие петли расщепляют неспецифическими протеазами, такими как трипсин или Lys-C. Расщепление посредством Lys-C и трипсина часто приводит к нежелательному укорочению белка, поскольку участок расщепления определяется доступностью протеазы, а не конкретной последовательностью распознавания.

Природные петли активации из различных серотипов эволюционировали, чтобы обеспечить доступность для протеазы и процессировать токсин в двухцепочечную форму посредством Clostridium. Без связи с теорией полагают, что мутация этих петель с образованием участка распознавания протеазой может приводить к конформационным изменениям, которые могут негативно влиять на эффективность расщепления.

Для тестирования этой гипотезы полипептид, имеющий легкую цепь и домен транслокации VoNT/A1 (LH<sub>N</sub>/A1), модифицировали включением последовательности распознавания протеазой EK DDDDK (SEQ ID NO: 44). Эффективность протеолитического расщепления модифицированного LH<sub>N</sub>/A1 посредством EK оценивали и сравнивали с расщеплением петли активации A1 дикого типа посредством Lys-C (следует отметить, что благодаря отсутствию участков распознавания EK в петле дикого типа не является возможным прямое сравнение с использованием EK). На фиг.13 показано, что расщепление модифицированной петли является значительно менее эффективным, чем расщепление петли дикого типа.

#### ПРИМЕР 8

##### Протеолитическая активация химеры VoNT/XA

Получали химеру VoNT/XA, содержащую легкую цепь и домен транслокации VoNT/X, связывающий домен VoNT/A1, и петлю активации VoNT/C1 (SEQ ID NO: 7). На фиг.14 показано, что после активации посредством FXa продуцировалась двухцепочечная сконструированная химера VoNT/XA.

#### ПРИМЕР 9

##### Протеолитическая активация химеры VoNT/XB

Получали химеру VoNT/XB, содержащую легкую цепь и домен транслокации VoNT/X, связывающий домен VoNT/B, и петлю активации VoNT/C1 (SEQ ID NO: 9). На фиг.15 показано, что после активации FXa продуцировалась двухцепочечная форма сконструированной химеры VoNT/XB.

Все публикации, упомянутые в приведенном выше описании, включены в настоящее описание в качестве ссылки. Различные модификации и изменения описанных способов и систем по настоящему изобретению станут очевидными специалистам в данной области без отклонения от объема и сущности настоящего изобретения. Хотя настоящее изобретение описано применительно к конкретным предпочтительным вариантам осуществления, следует понимать, что заявленное изобретение не должно чрезмерно ограничиваться такими конкретными вариантами осуществления. Действительно, подразумевается, что различные модификации описанных способов осуществления изобретения, которые являются очевидными в области биохимии и

биотехнологии или родственных областях, входят в объем прилагаемой ниже формулы изобретения.



## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ протеолитического процессинга одноцепочечного клостридиального нейротоксина в соответствующий двухцепочечный клостридиальный нейротоксин, причем способ включает:

а. предоставление одноцепочечного клостридиального нейротоксина; и

б. приведение одноцепочечного клостридиального нейротоксина в контакт с энтерокиназой или фактором Ха;

где одноцепочечный клостридиальный нейротоксин имеет петлю активации, содержащую полипептидную последовательность Cys-(Xaa)<sub>a</sub>-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)<sub>b</sub>-Cys (SEQ ID NO: 1), где a=1-10 и b=4-15; и

где энтерокиназа или фактор Ха гидролизует пептидную связь петли активации, тем самым получая двухцепочечный клостридиальный нейротоксин.

2. Способ по п.1, где a=2-4.

3. Способ по п.1 или 2, где a=3.

4. Способ по любому из предшествующих пп., где b=6-10.

5. Способ по любому из предшествующих пп., где b=8.

6. Способ по любому из предшествующих пп., где петля активации содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

7. Способ по любому из предшествующих пп., где петля активации содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

8. Способ по любому из предшествующих пп., где петля активации содержит полипептидную последовательность, имеющую SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

9. Способ по любому из предшествующих пп., где петля активации содержит SEQ ID NO: 2.

10. Способ по любому из предшествующих пп., где петля активации состоит из SEQ ID NO: 2.

11. Способ по любому из предшествующих пп., где одноцепочечный клостридиальный нейротоксин приводят в контакт с энтерокиназой.

12. Способ по любому из предшествующих пп., где клостридиальный нейротоксин лишен функционального Н<sub>С</sub>-домена клостридиального нейротоксина.

13. Способ по любому из предшествующих пп., где клостридиальный нейротоксин представляет собой перенацеленный клостридиальный нейротоксин, содержащий неклостридиальную нацеливающую часть (ТМ).

14. Способ по любому из предшествующих пп., где клостридиальный нейротоксин представляет собой перенацеленный клостридиальный нейротоксин, содержащий ТМ, где ТМ включает защитный антиген токсина сибирской язвы (РА) или его фрагмент.

15. Способ по п.14, где клостридиальный нейротоксин имеет полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью

последовательности с полипептидом, содержащим:

a. SEQ ID NO: 52 или его фрагмент; и

b. SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60.

16. Способ по любому из предшествующих пп., где клостридиальный нейротоксин не является BoNT/C1.

17. Способ по любому из предшествующих пп., где клостридиальный нейротоксин выбран из: BoNT/A, BoNT/B, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G, BoNT/X и TeNT.

18. Способ по любому из предшествующих пп., где клостридиальный нейротоксин представляет собой BoNT/X, BoNT/E, химерный BoNT или гибридный BoNT.

19. Способ по любому из предшествующих пп., где одноцепочечный клостридиальный нейротоксин:

a. кодируется нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12; или

b. содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13.

20. Способ получения сконструированного клостридиального нейротоксина, причем способ включает:

a. идентификацию эндогенной петли активации клостридиального нейротоксина, где клостридиальный нейротоксин отличается тем, что:

i. пептидная связь вне эндогенной петли активации клостридиального нейротоксина гидролизуется посредством трипсина или Lys-C; и/или

ii. эндогенная петля активации неэффективно протеолитически процессируется трипсином или Lys-C; и

b. замену эндогенной петли активации экзогенной петлей активаций, тем самым получая сконструированный клостридиальный нейротоксин, где экзогенная петля активации содержит полипептидную последовательность Cys-(Xaa)<sub>a</sub>-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)<sub>b</sub>-Cys (SEQ ID NO: 1), где a=1-10 и b=4-15.

21. Способ по п.20, где эндогенная петля активации представляет собой одну или несколько, выбранных из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 71.

22. Способ по п.20 или 21, где клостридиальный нейротоксин идентифицирован как являющийся пригодным для применения в способе посредством приведения клостридиального нейротоксина в контакт с трипсином или Lys-C и подтверждения гидролиза пептидной связи вне эндогенной петли активации клостридиального

нейротоксина.

23. Способ по любому из пп.20-22, дополнительно включающий приведение сконструированного клостридиального нейротоксина в контакт с энтерокиназой или фактором Ха, тем самым получая соответствующий двухцепочечный сконструированный клостридиальный нейротоксин.

24. Способ по любому из пп. 20-23, где  $a=2-4$ .

25. Способ по любому из пп. 20-24, где  $a=3$ .

26. Способ по любому из пп. 20-25, где  $b=6-10$ .

27. Способ по любому из пп. 20-26, где  $b=8$ .

28. Способ по любому из пп. 20-27, где экзогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

29. Способ по любому из пп. 20-28, где экзогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

30. Способ по любому из пп.20-29, где экзогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, имеющую SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

31. Способ по любому из пп. 20-30, где экзогенная петля активации содержит SEQ ID NO: 2.

32. Способ по любому из пп. 20-31, где экзогенная петля активации состоит из SEQ ID NO: 2.

33. Способ по любому из пп.23-32, где сконструированный клостридиальный нейротоксин приводят в контакт с энтерокиназой.

34. Способ по любому из пп.20-33, где клостридиальный нейротоксин лишен функционального  $H_C$ -домена клостридиального нейротоксина.

35. Способ по любому из пп.20-34, где клостридиальный нейротоксин представляет собой перенацеленный клостридиальный нейротоксин, содержащий неклостридиальную нацеливающую часть (ТМ).

36. Способ по любому из пп.20-35, где клостридиальный нейротоксин представляет собой перенацеленный клостридиальный нейротоксин, содержащий ТМ, где ТМ содержит защитный антиген (РА) токсина сибирской язвы или его фрагмент.

37. Способ по п.36, где клостридиальный нейротоксин имеет полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с полипептидом, содержащим:

а. SEQ ID NO: 52 или ее фрагмент; и

б. SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60.

38. Способ по любому из пп.20-37, где клостридиальный нейротоксин не является BoNT/C1.

39. Способ по любому из пп.20-38, где клостридиальный нейротоксин выбран из:

BoNT/A, BoNT/B, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G, BoNT/X и TeNT.

40. Способ по любому из пп.20-39, где клостридиальный нейротоксин представляет собой BoNT/X, BoNT/E, химерный BoNT или гибридный BoNT.

41. Способ по любому из пп.20-40, где сконструированный клостридиальный нейротоксин:

а. кодируется нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12; или

б. содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13.

42. Сконструированный клостридиальный нейротоксин (например, получаемый способом по любому из пп.20-41), где эндогенная петля активации клостридиального нейротоксина заменена экзогенной петлей активации с получением тем самым сконструированного клостридиального нейротоксина,

где экзогенная петля активации содержит полипептидную последовательность Cys-(Xaa)<sub>a</sub>-Ile-Asp/Glu-Gly-Arg-(Yaa)<sub>b</sub>-Cys (SEQ ID NO: 1), где a=1-10 и b=4-15, и

где клостридиальный нейротоксин характеризуется тем, что: пептидная связь вне эндогенной петли активации клостридиального нейротоксина гидролизована трипсином или Lys-C; и/или эндогенная петля активации неэффективно протеолитически процессируется трипсином или Lys-C.

43. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по п.42, где эндогенная петля активации представляет собой одну или несколько, выбранных из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 71.

44. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по п.42 или 43, где a=2-4.

45. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по любому из пп.42-44, где a=3.

46. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по любому из пп.42-45, где b=6-10.

47. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по любому из пп.42-46, где b=8.

48. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по любому из пп.42-47, где экзогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

49. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по любому из пп.42-48, где

экзогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% или 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

50. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по любому из пп.42-49, где экзогенная петля активации содержит полипептидную последовательность, имеющую SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

51. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по любому из пп.42-50, где экзогенная петля активации содержит SEQ ID NO: 2.

52. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по любому из пп.42-51, где экзогенная петля активации состоит из SEQ ID NO: 2.

53. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по любому из пп.42-52, где клостридиальный нейротоксин лишен функционального H<sub>C</sub>-домена клостридиального нейротоксина.

54. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по любому из пп.42-53, где клостридиальный нейротоксин представляет собой перенацеленный клостридиальный нейротоксин, содержащий неклостридиальную нацеливающую часть (ТМ).

55. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по любому из пп.42-54, где клостридиальный нейротоксин не является VoNT/C1.

56. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по любому из пп.42-55, где клостридиальный нейротоксин выбран из: VoNT/A, VoNT/B, VoNT/D, VoNT/E, VoNT/F, VoNT/G, VoNT/X и TeNT.

57. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по любому из пп.42-56, где клостридиальный нейротоксин представляет собой VoNT/X, VoNT/E, химерный VoNT или гибридный VoNT.

58. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по любому из пп.42-57, где одноцепочечный клостридиальный нейротоксин:

а. кодируется нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12; или

б. содержит полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13.

59. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по любому из пп.42-58, где сконструированный клостридиальный нейротоксин представляет собой перенацеленный клостридиальный нейротоксин, содержащий нацеливающую часть (ТМ), где ТМ содержит защитный антиген (РА) токсина сибирской язвы или его фрагмент.

60. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по п.59, где сконструированный клостридиальный нейротоксин имеет полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с полипептидом, содержащим:

a. SEQ ID NO: 52 или ее фрагмент; и

b. SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60.

61. Способ протеолитического процессинга сконструированного клостридиального нейротоксина по любому из пп.42-60 в соответствующий двухцепочечный клостридиальный нейротоксин, причем способ включает приведение сконструированного клостридиального нейротоксина в контакт с энтерокиназой или фактором Ха, тем самым получая двухцепочечный клостридиальный нейротоксин.

62. Двухцепочечный клостридиальный нейротоксин, получаемый способом по любому из пп.1-19, 23-41 или 61.

63. Фармацевтическая композиция, содержащая сконструированный клостридиальный нейротоксин по любому из пп.42-60 или двухцепочечный клостридиальный нейротоксин по п.62, и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент, адъювант, пропеллент и/или соль.

64. Сконструированный клостридиальный нейротоксин по любому из пп.42-60, двухцепочечный клостридиальный нейротоксин по п.62 или фармацевтическая композиция по п.63 для применения для лечения одного или нескольких из: состояния, ассоциированного с нежелательной иммунной секрецией, страбизмом, блефароспазмом, косоглазием, дистонией (например, спастическая дистония, оромандибулярная дистония, очаговая дистония, поздняя дистония, ларингеальная дистония, дистония конечностей, цервикальная дистония), кривошеей (например, спастическая кривошея), применением в косметологии (косметике), при котором представляют интерес нарушения работоспособности клеток/мышц (посредством подавления или инактивации SNARE), нервно-мышечного нарушения или состояния подвижности глаз (например, сопутствующий страбизм, вертикальный страбизм, паралич латеральной прямой мышцы, нистагм, дистироидная миопатия), графоспазмом, блефароспазмом, бруксизмом, болезнью Вильсона, тремором, тиками, сегментным миоклонусом, спазмами, спастичностью вследствие хронического рассеянного склероза, спастичностью, приводящей к нарушению контроля мочевого пузыря, враждебностью, спазмом в спине, ушибом или разрывом мышц, тензионными головными болями, синдромом поднимающей мышцы таза, расщепленным позвоночником, поздней дискинезией, болезнью Паркинсона, заиканием, гемифациальным спазмом, нарушением глазного яблока, церебральным параличом, очаговой спастичностью, спастическим колитом, нейрогенным мочевым пузырем, анизмусом, спастичностью конечностей, тиками, тремором, бруксизмом, анальными трещинами, ахалазией, дисфагией, слезоотделением, гипергидрозом, чрезмерным слюноотделением, чрезмерной желудочно-кишечной секрецией, мышечной болью (например, боль в результате мышечных спазмов), головной болью (например, тензионная головная боль), межбровными складками, морщинами кожи, злокачественной опухолью, нарушениями матки, урогенитальными нарушениями, урогенитально-неврологическими нарушениями, хроническим нейрогенным воспалением и нарушением

гладких мышц.

65. Применение энтерокиназы для гидролиза пептидной связи полипептида, содержащего полипептидную последовательность, представленную в качестве SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19.

66. Нуклеотидная последовательность, кодирующая сконструированный клостридиальный нейротоксин, содержащий последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12.

## ФИГ.1

| ID белка     | Начальн.<br>а.к. | Последовательность            | Конечная<br>а.к. | SEQ ID<br>NO: |
|--------------|------------------|-------------------------------|------------------|---------------|
| D_AB012112   | 437              | CLRLTKNSRDDSTC                | 450              | 23            |
| DC_AB745660  | 437              | CLRLTRNSRDDSTC                | 450              | 61            |
| C1_X62389    | 437              | CHKAIDGRSLYNKTLDC             | 453              | 2             |
| CD_AB200360  | 437              | CHKAIDGRSLYNKTLDC             | 453              |               |
| A4_EU341307  | 430              | CVRGIITSKTKSLDEGYNKALNELC     | 454              | 62            |
| A7_JQ954969  | 430              | CVRGIITSKTKSLDEGYNKALNDLC     | 454              | 63            |
| A6_FJ981696  | 430              | CVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLC     | 454              | 21            |
| A1_AF488749  | 430              | CVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLC     | 454              |               |
| A5_EU679004  | 430              | CVRGIITSKTKSLDEGYNKALNDLC     | 454              | 63            |
| A3_DQ185900  | 426              | CVRGIIPFKTKSLDEGYNKALNYLC     | 450              | 64            |
| A2_X73423    | 430              | CVRGIIPFKTKSLDEGYNKALNDLC     | 454              | 65            |
| A8_KM233166  | 430              | CVRGIIPFKTKSLDEGYNKALNDLC     | 454              |               |
| H_KGO15617   | 428              | CSNSNTKNSLC                   | 438              | 66            |
| E9_JX424534  | 414              | CKNIVSVKGIRKSIC               | 429              | 24            |
| E12_KM370319 | 414              | CKNIVSVKGIRKSIC               | 429              |               |
| E11_KF861875 | 411              | CTNIFSPKGIRKSIC               | 426              | 67            |
| E10_KF861917 | 411              | CKNIVFSKGITKSIC               | 426              | 68            |
| E7_JN695729  | 411              | CKNIVFSKGITKSIC               | 426              |               |
| E8_JN695730  | 411              | CKNIVFSKGITKSIC               | 426              |               |
| E5_AB037711  | 411              | CKNIVSVKGIRKSIC               | 426              |               |
| E6_AM695759  | 411              | CKNIVFSKGIRKSIC               | 426              | 69            |
| E4_AB088207  | 411              | CKNIVSVKGIRKSIC               | 426              | 24            |
| E3_EF028403  | 411              | CKNIVSVKGIRKSIC               | 426              |               |
| E1_GQ244314  | 411              | CKNIVSVKGIRKSIC               | 426              |               |
| E2_EF028404  | 411              | CKNIVSVKGIRKSIC               | 426              |               |
| F7_GU213233  | 420              | CKSIVSKKGTKNSLC               | 434              | 29            |
| F5_GU213211  | 428              | CLNSSFKKNTKKPLC               | 442              | 28            |
| F1_GU213203  | 429              | CKSVIPRKGTKAPPRC              | 445              | 25            |
| F4_GU213214  | 429              | CKSIIPRKGTKAPPRC              | 445              | 27            |
| F2_GU213209  | 429              | CKSIIPRKGTKQSPSLC             | 445              | 26            |
| F3_GU213227  | 429              | CKSIIPRKGTKQSPSLC             | 445              |               |
| F6_M92906    | 429              | CKSVIPRKGTKAPPRC              | 445              | 25            |
| T_P04958     | 439              | CKKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLGGELC | 467              | 30            |
| G_X74162     | 436              | CKPVMYKNTGKSEQC               | 450              | 31            |
| B4_EF051570  | 437              | CKSVKVPKVIC                   | 446              | 70            |
| B8_JQ964806  | 437              | CKSVRAPKVIC                   | 446              | 22            |
| B7_JQ354985  | 437              | CKSVKAPKVIC                   | 446              | 71            |
| B6_AB302852  | 437              | CKSVRAPKVIC                   | 446              | 22            |
| B2_AB084152  | 437              | CKSVRAPKVIC                   | 446              |               |
| B3_EF028400  | 437              | CKSVRAPKVIC                   | 446              |               |

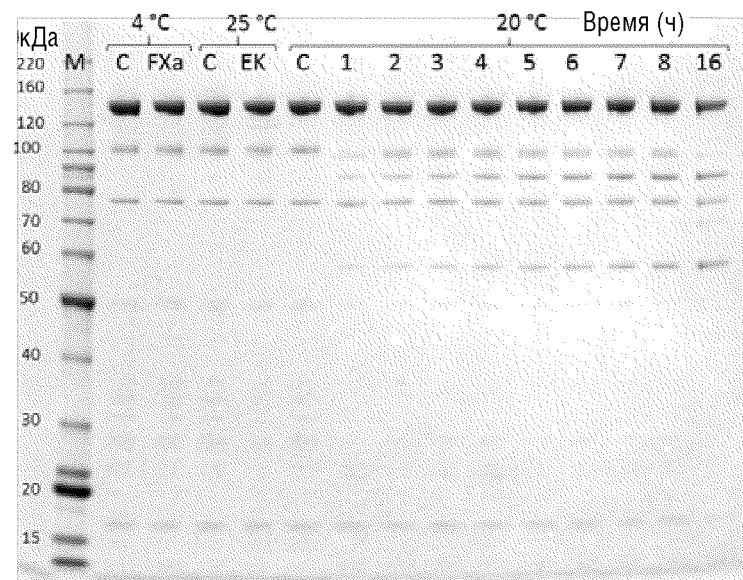


## ФИГ.1 (продолжение)

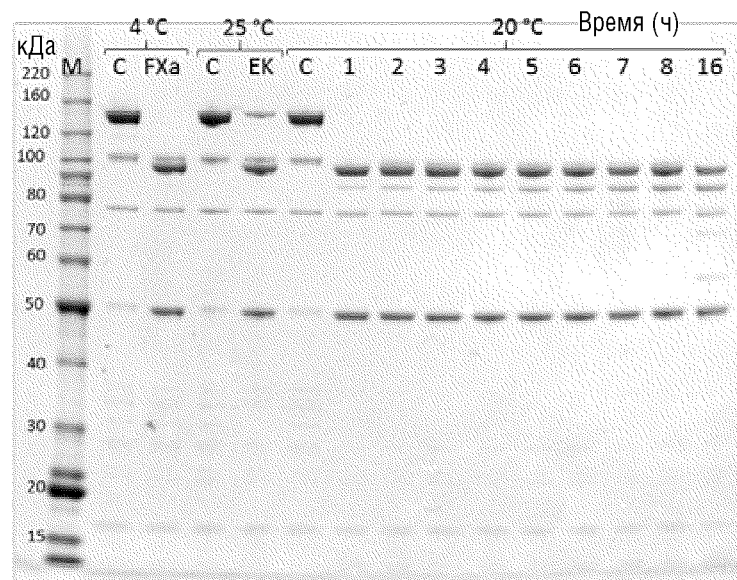
| ID белка           | начальн.<br>а.к. | Последовательность                                | конечная<br>а.к. | SEQ ID<br>NO: |
|--------------------|------------------|---|------------------|---------------|
| <b>B1_AB232927</b> | 437              | CKSVKAPGIC  | 446              | 71            |
| <b>B5_EF033130</b> | 437              | CKSVKAPGIC  | 446              |               |
| <b>X_BAQ12790</b>  | 423              | CPRNGLLYNAIYRNSKKNYLNNIDLEDKK<br>TTSKTNVSYPCSLNGC | 467              | 20            |

# ФИГ.2

А



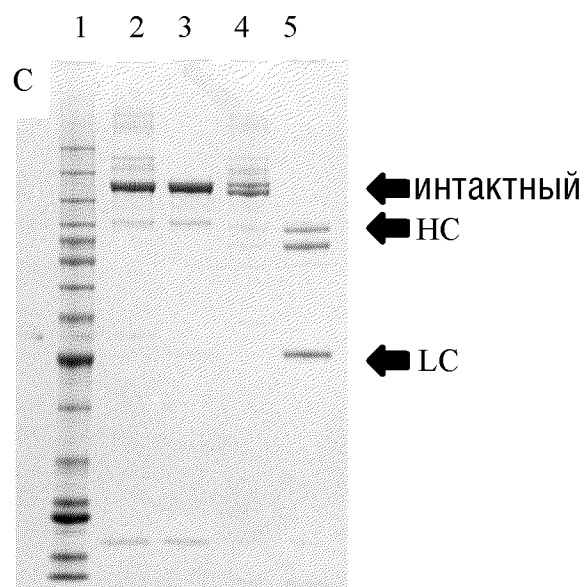
В



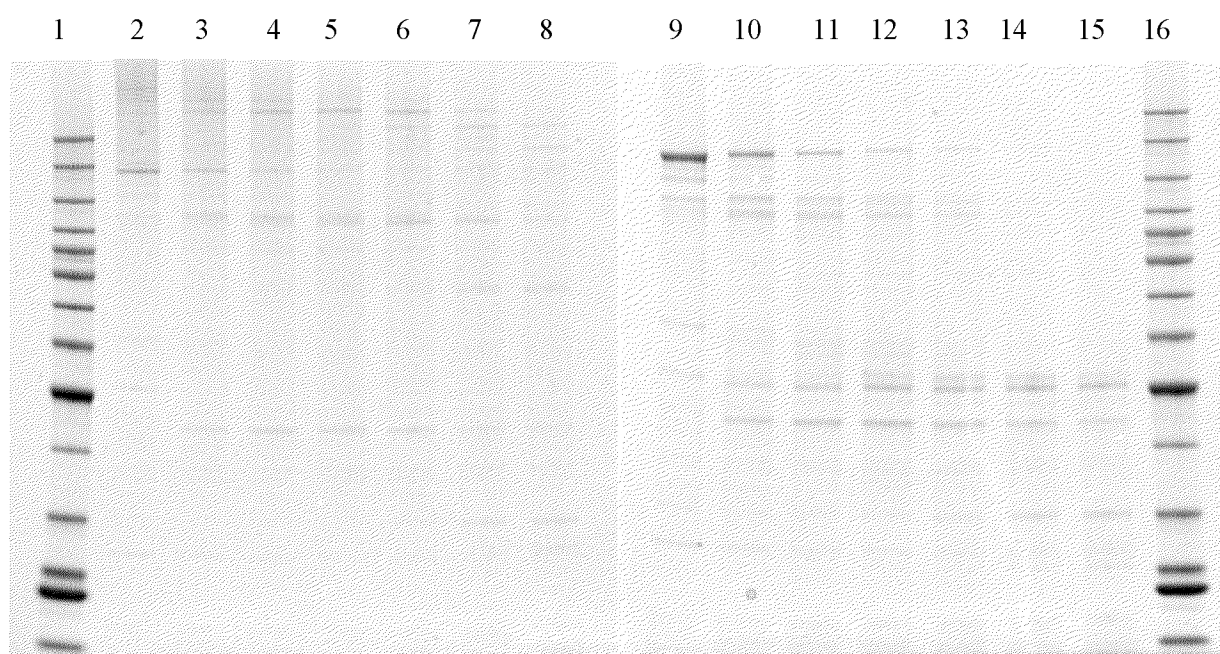
← интактный  
← HC  
← LC

3/17

## ФИГ.2 (продолжение)

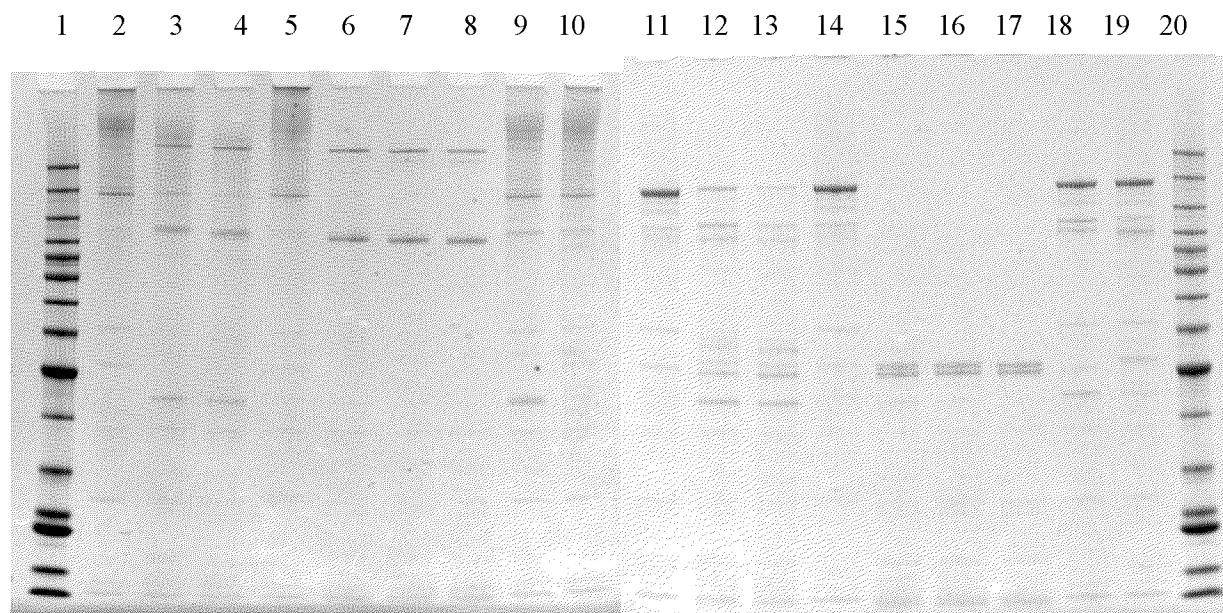


## ФИГ.3



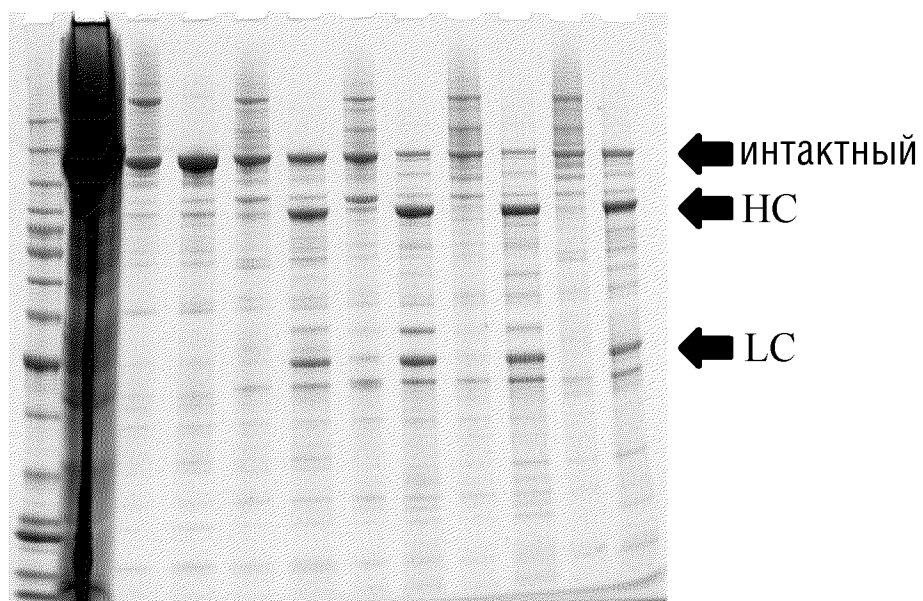
## ФИГ.3 (продолжение)

В



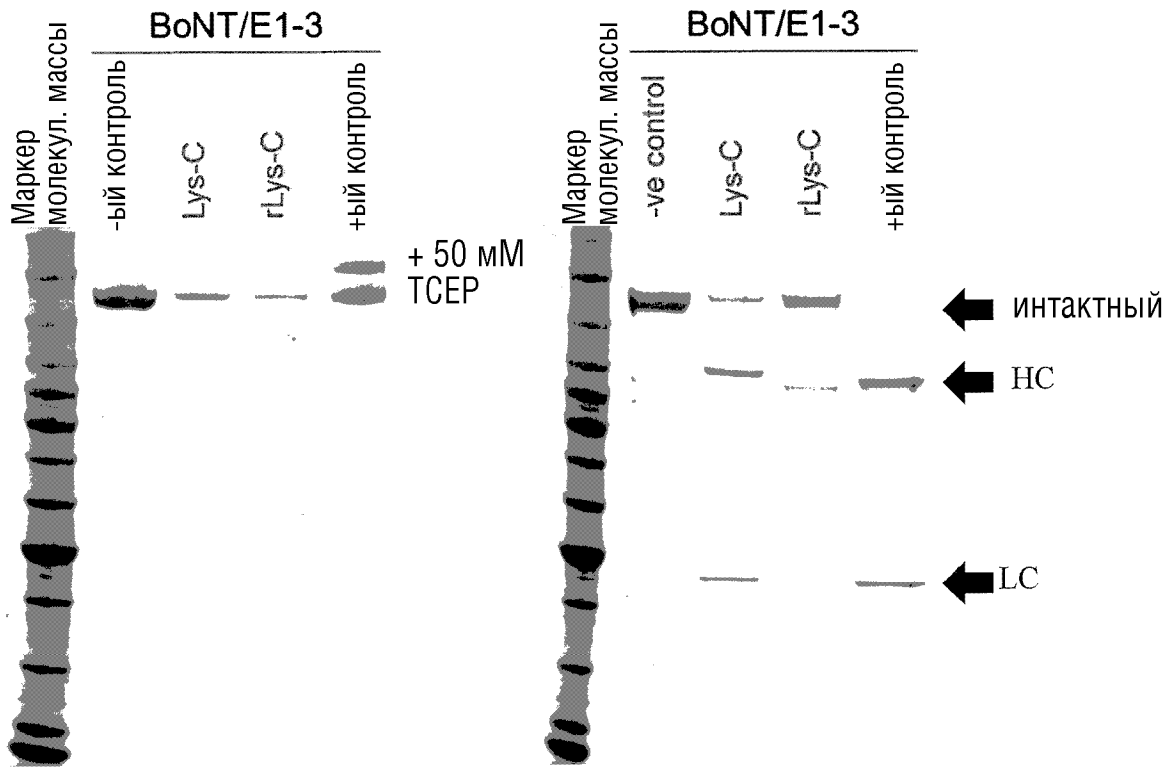
## ФИГ.4

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

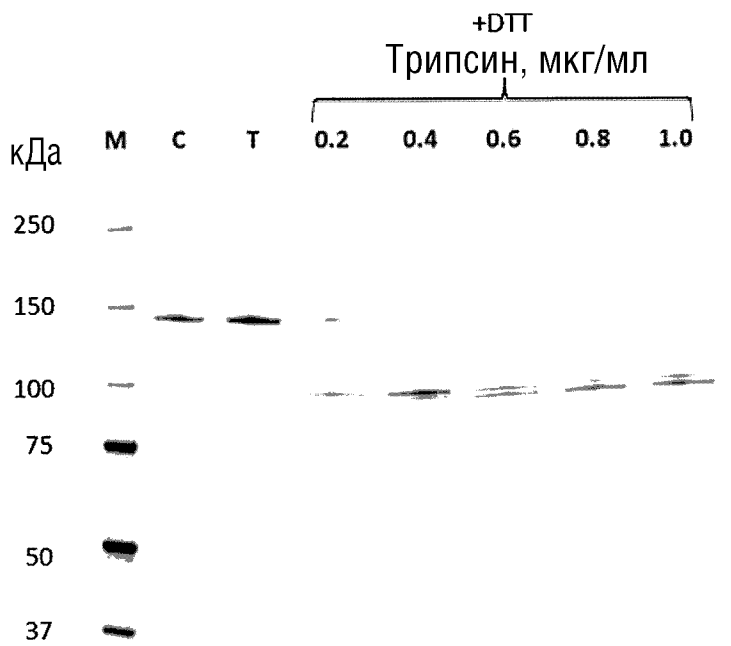


ФИГ.5

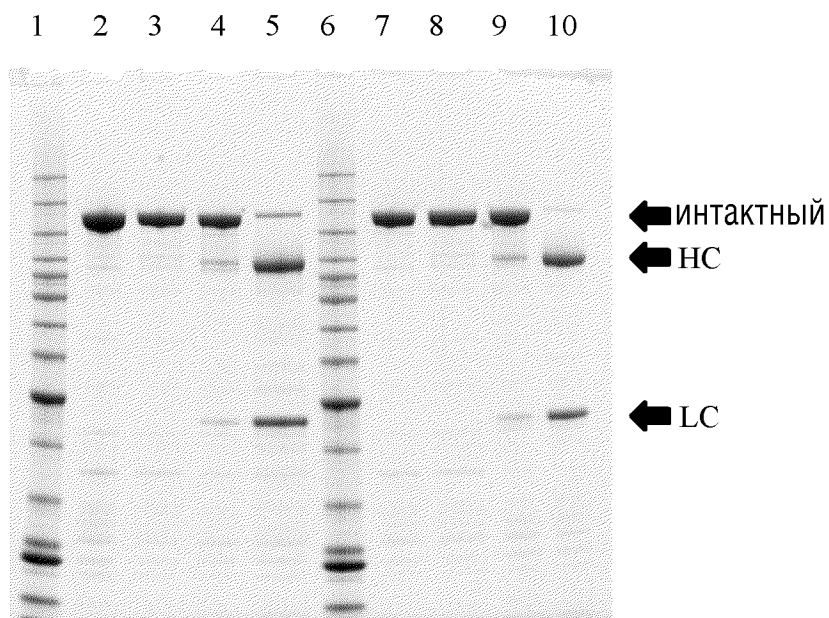
А



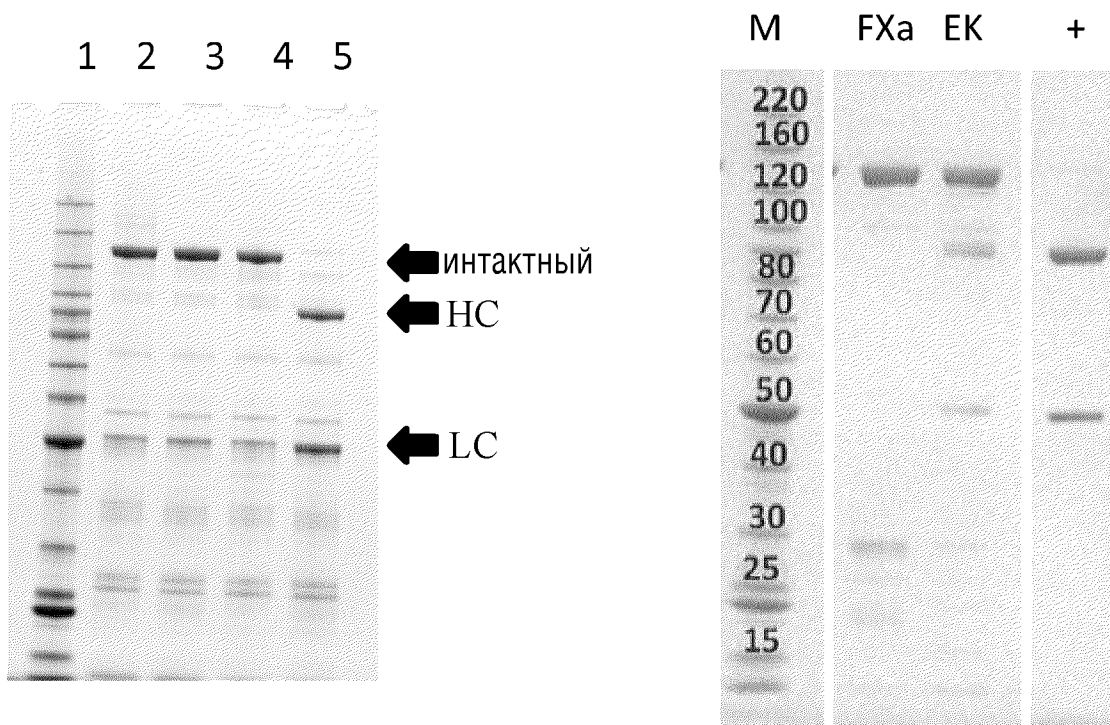
В



ФИГ.6

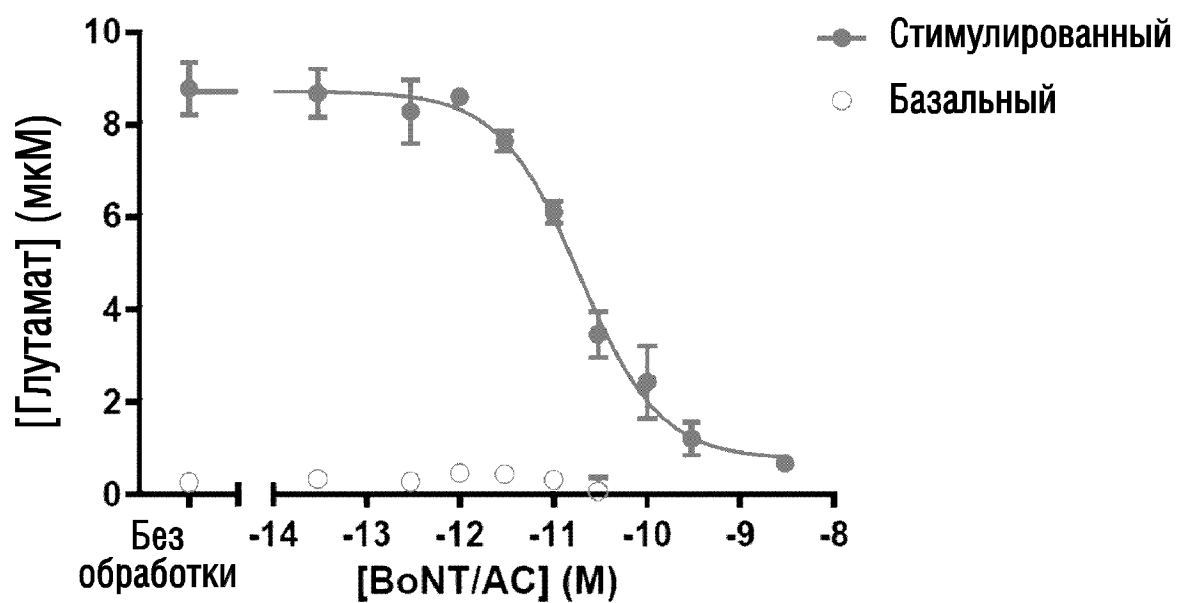


ФИГ.7

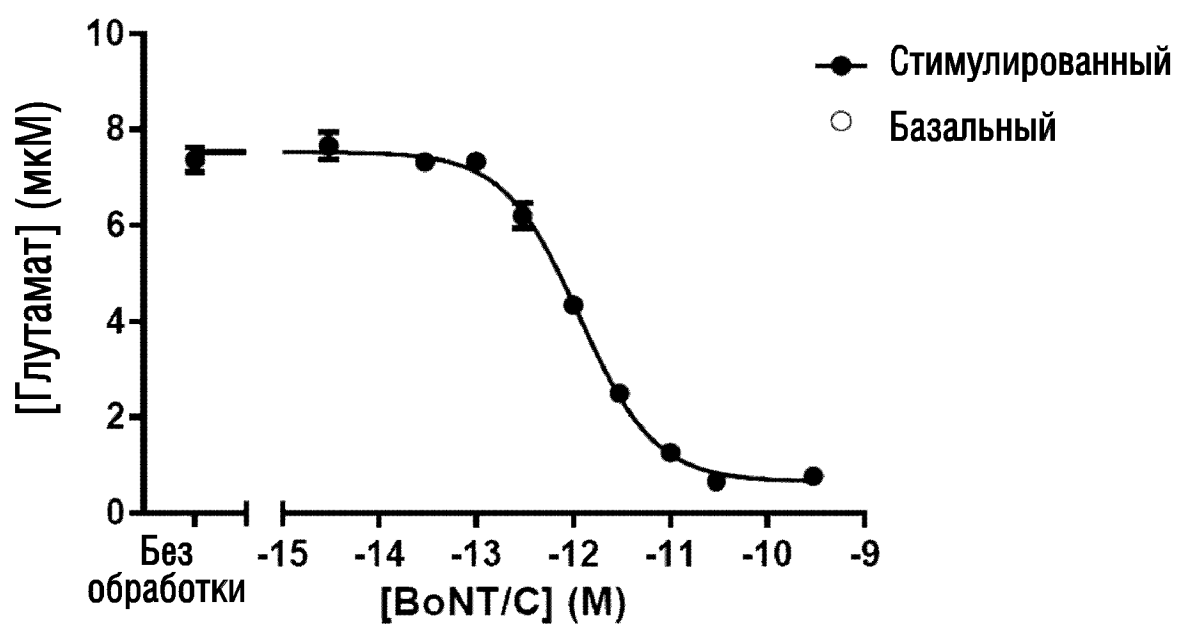


## ФИГ.8

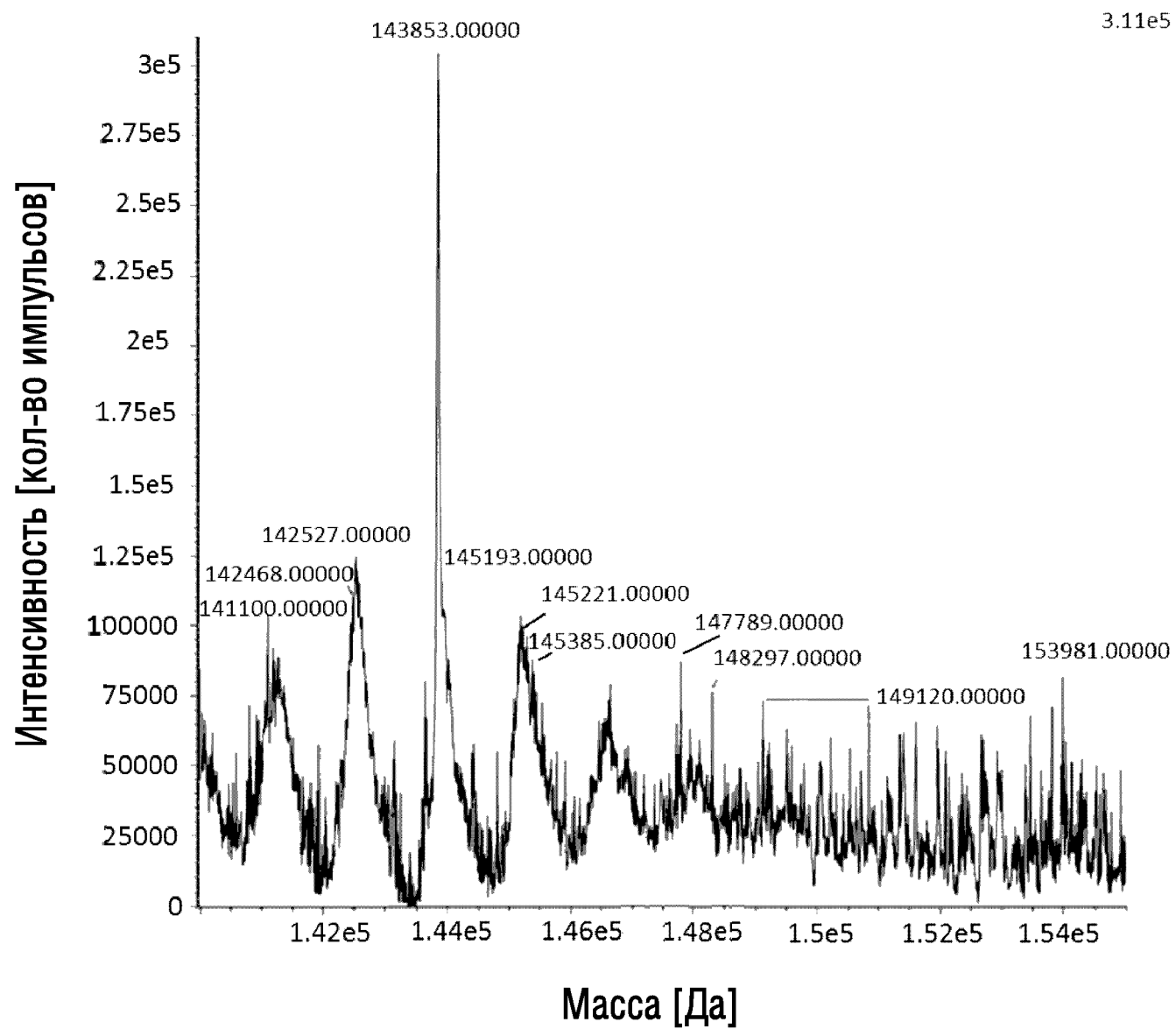
А



В



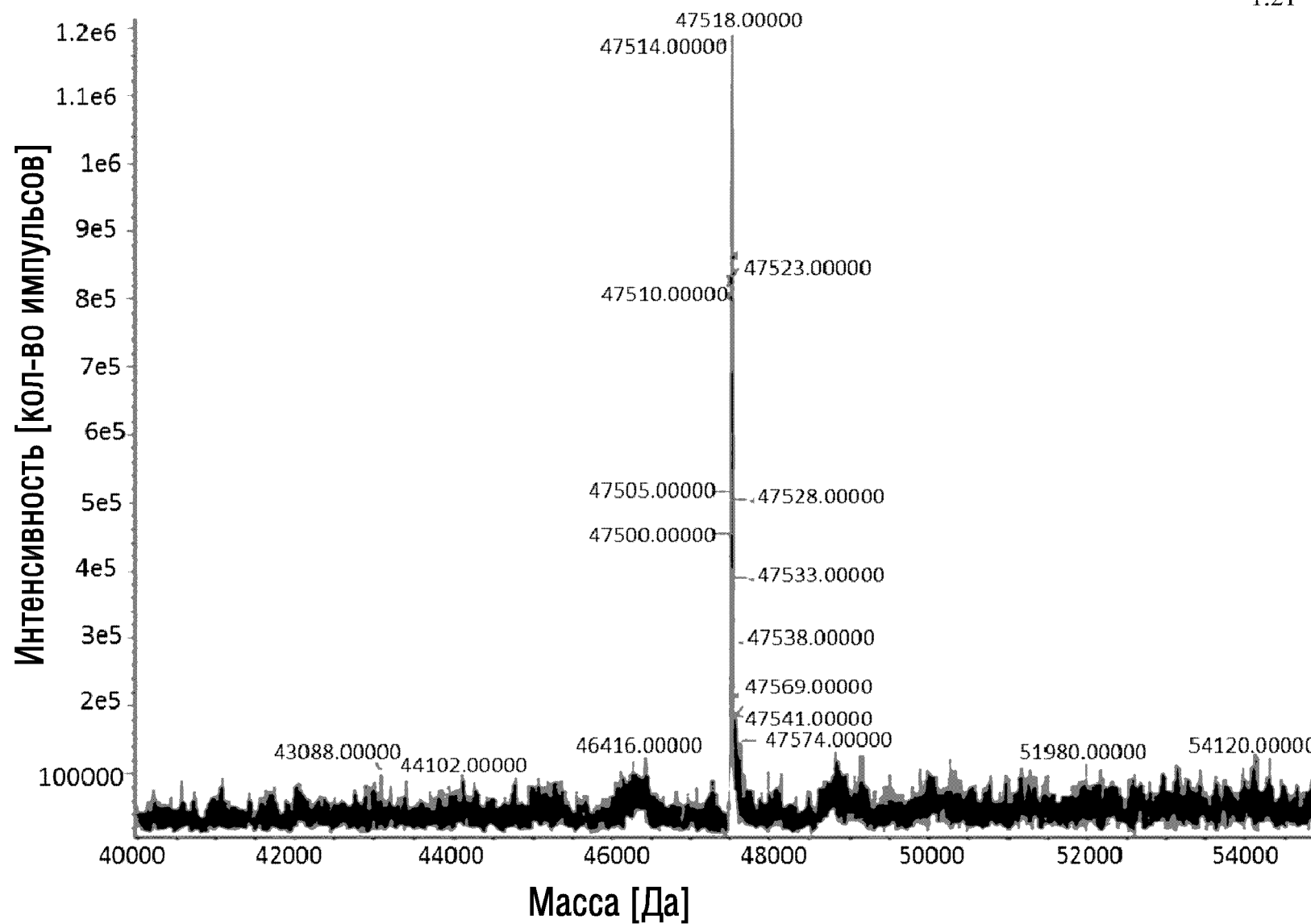
ФИГ.9





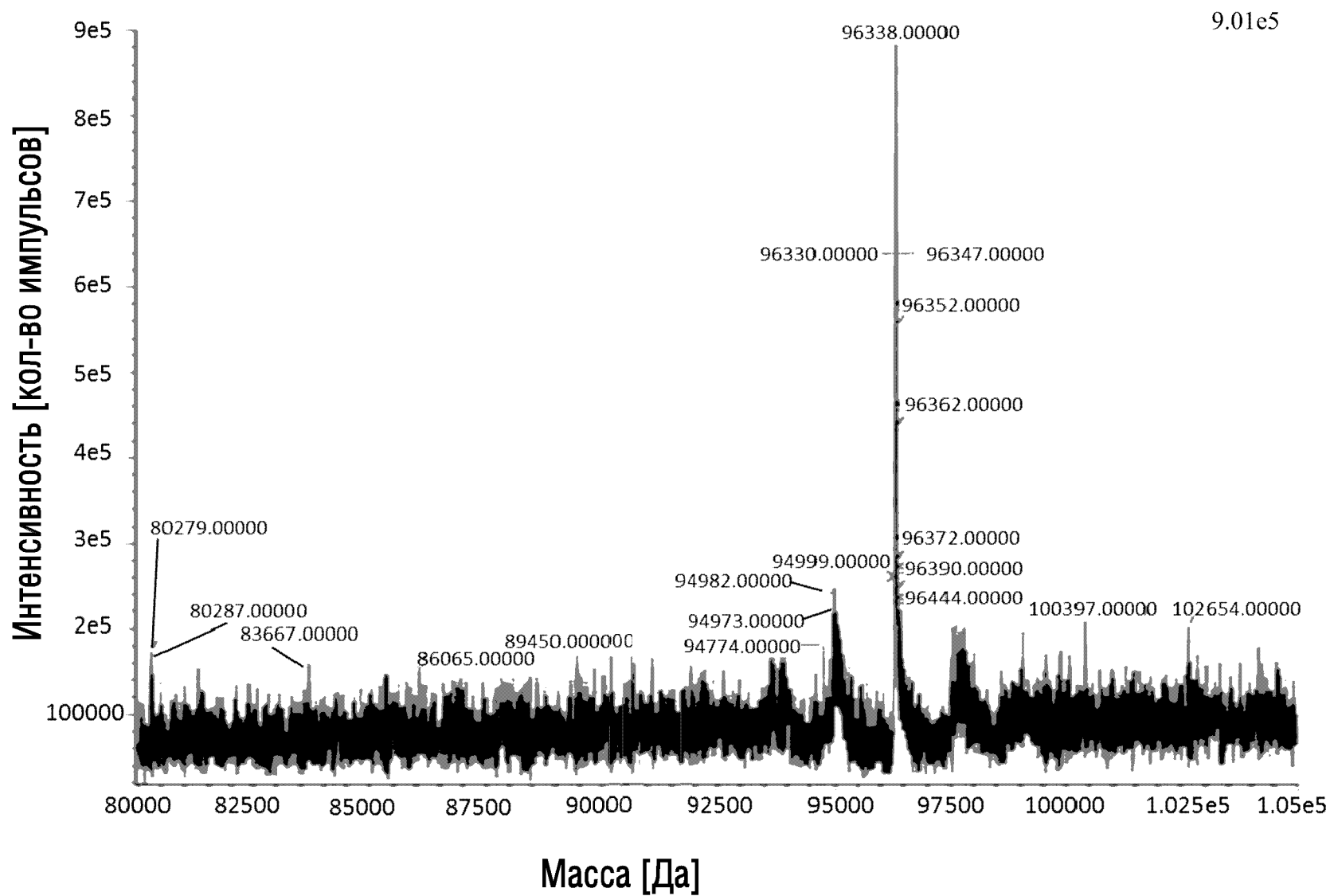
ФИГ.10

1.21



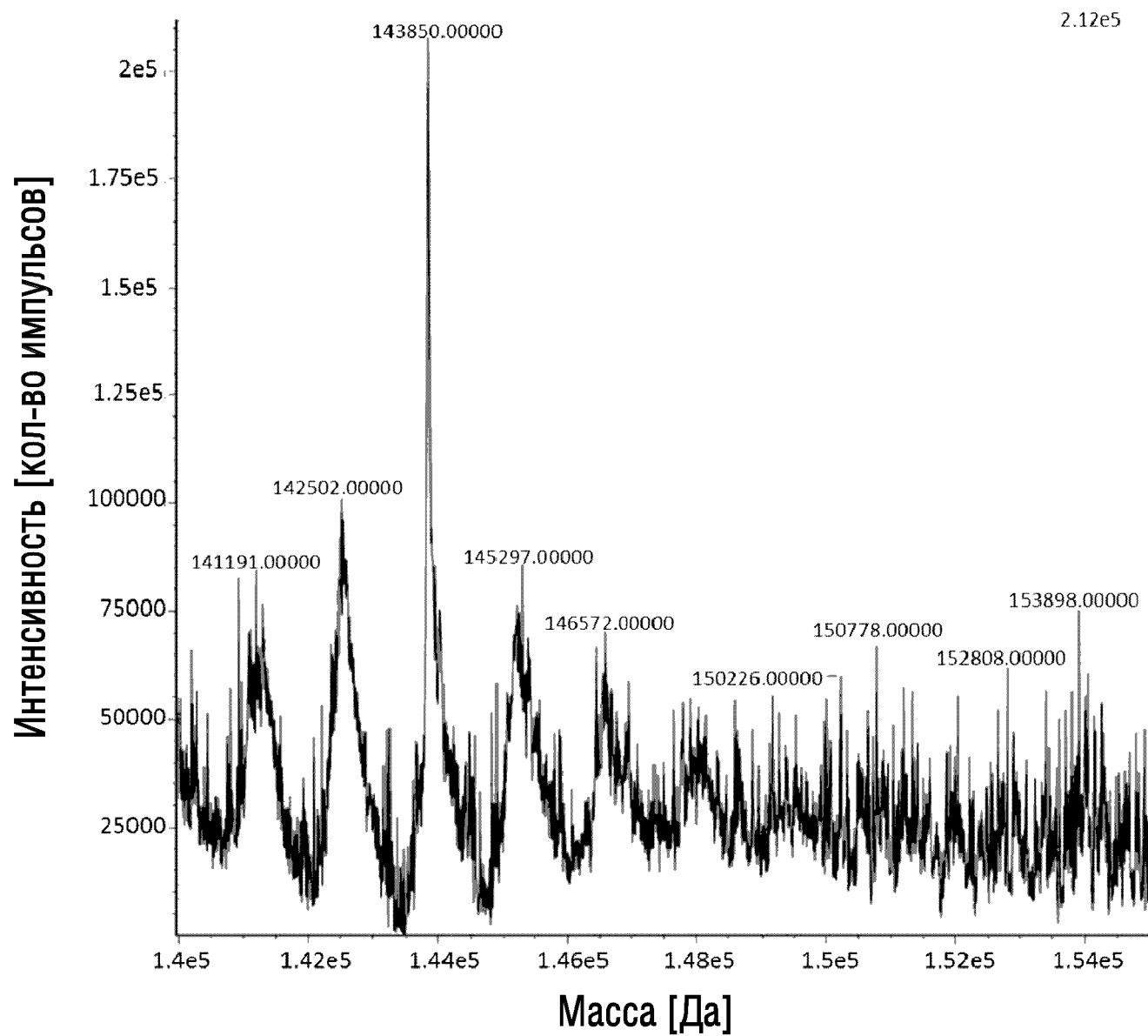
10/17

ФИГ.10 (продолжение)

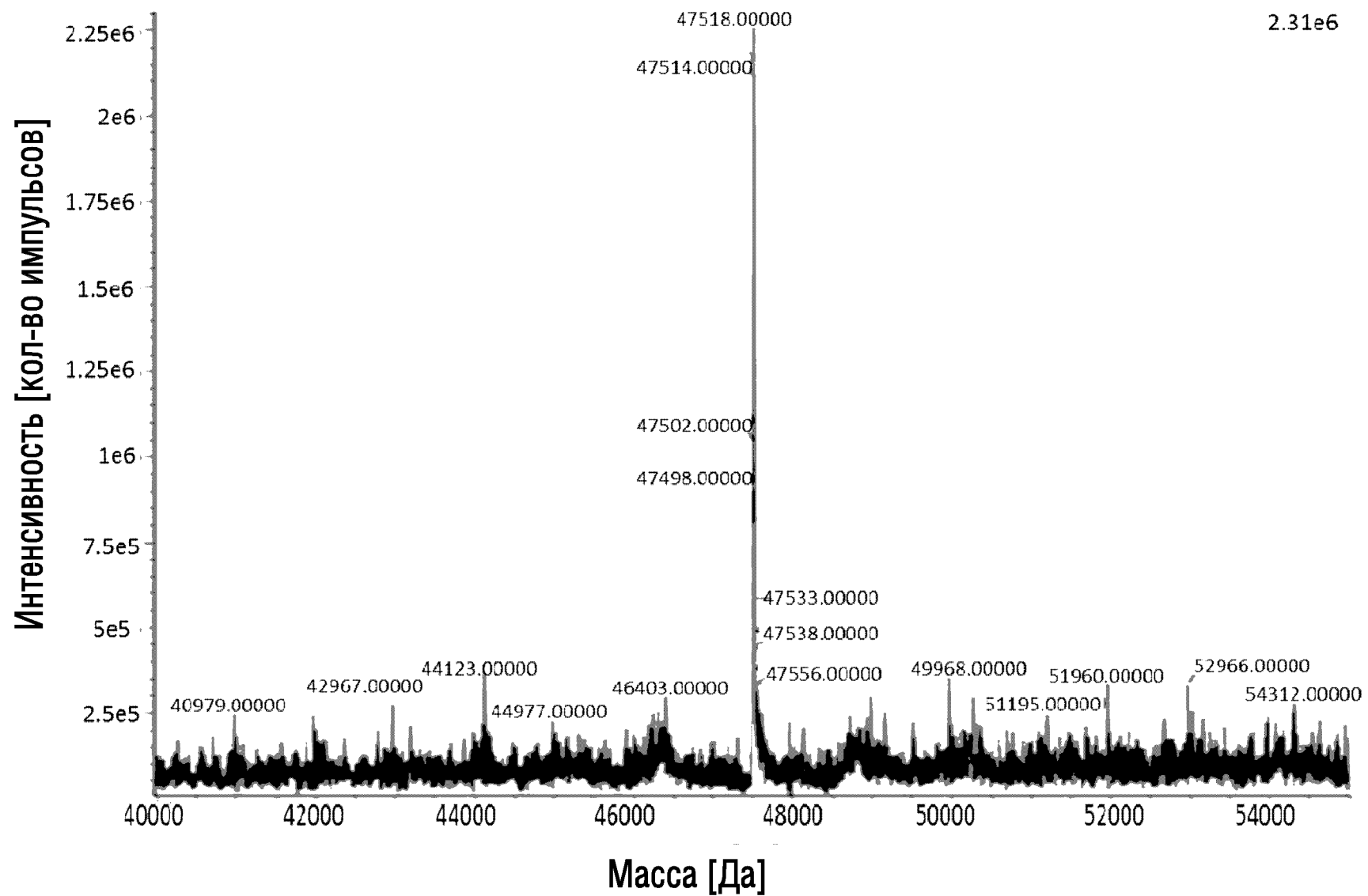


11/17

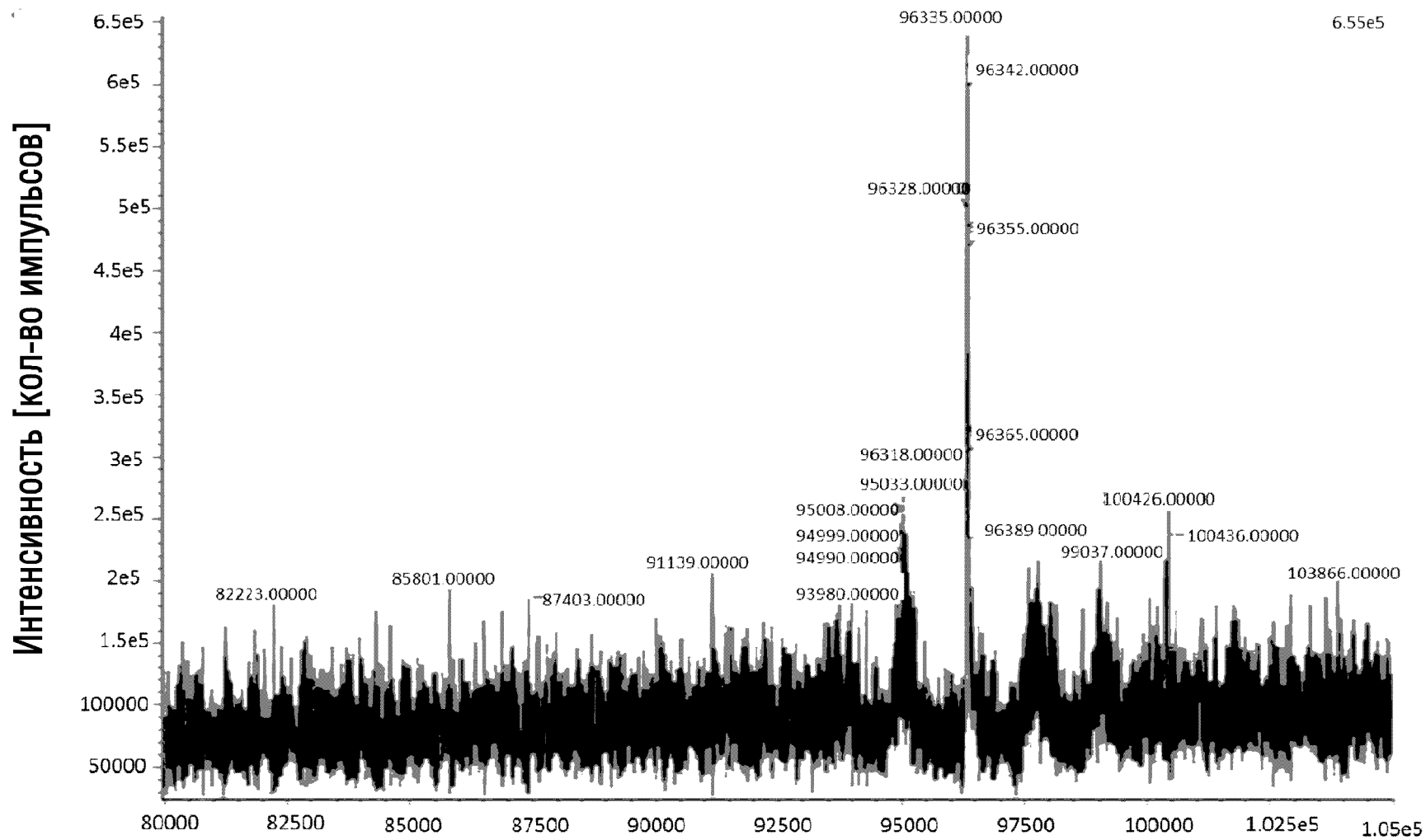
ФИГ.11



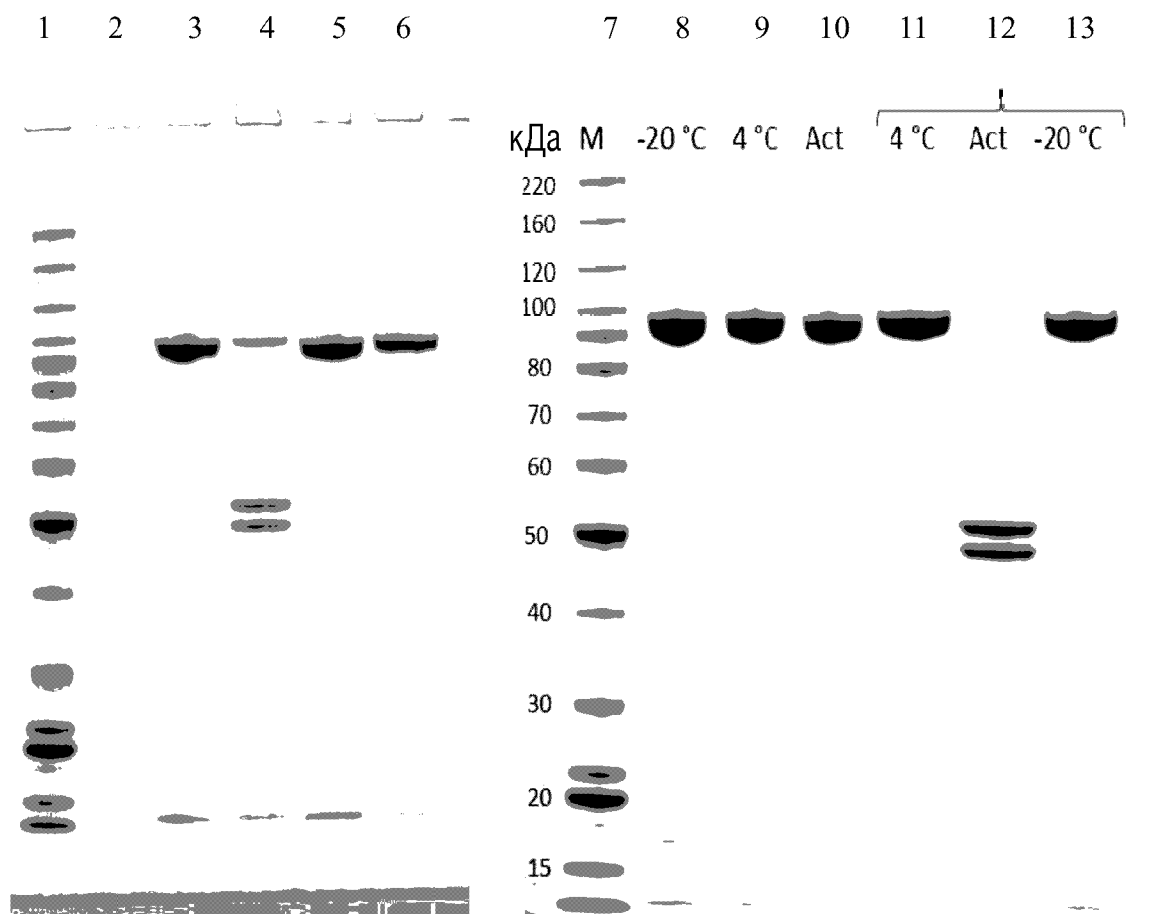
ФИГ.12



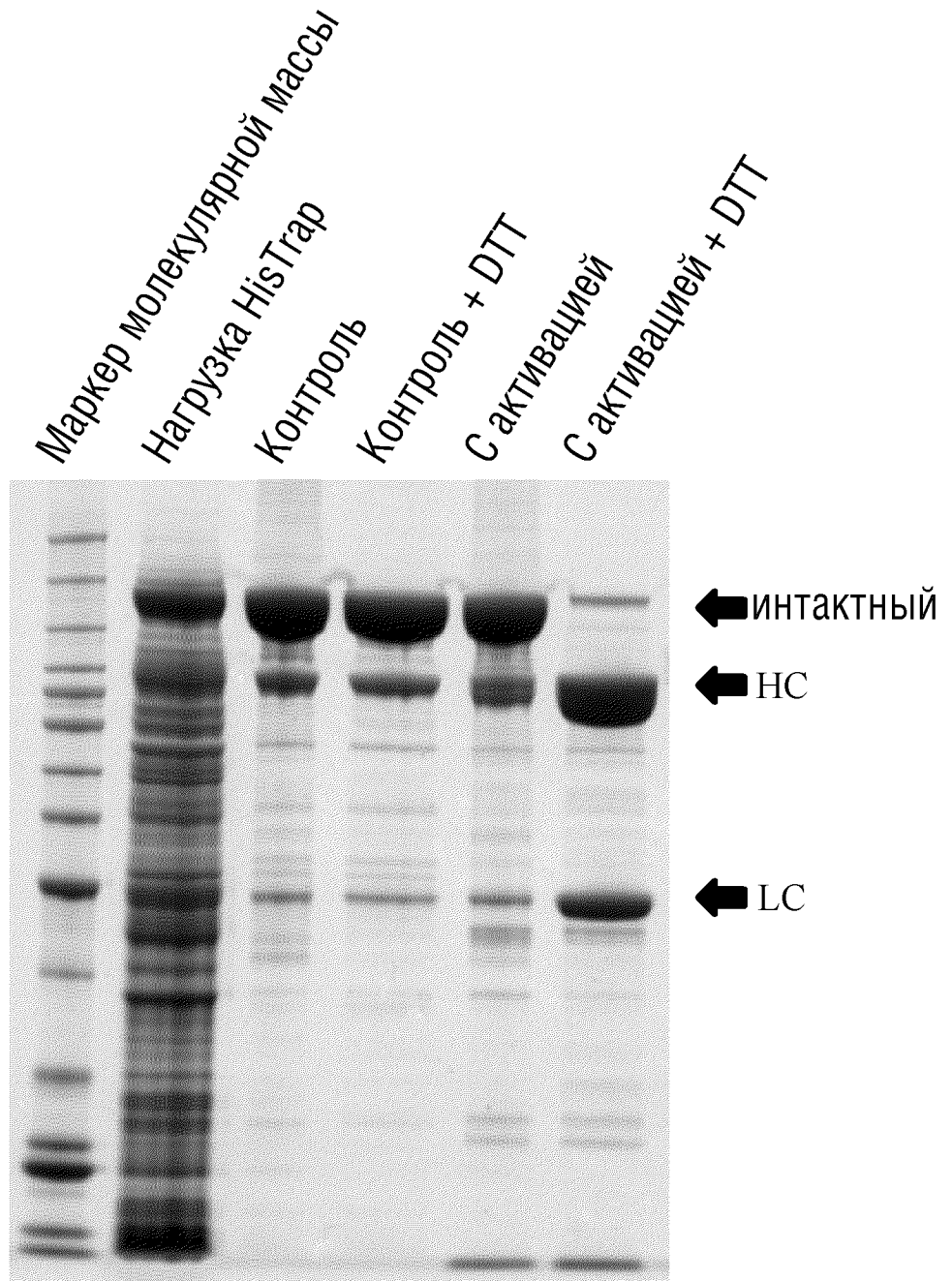
ФИГ.12 (продолжение)



ФИГ.13



ФИГ.14



ФИГ.15

