

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **041568**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.11.07**

(21) Номер заявки  
**201990229**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.07.07**

(51) Int. Cl. **C07K 14/33** (2006.01)  
**A61K 38/48** (2006.01)  
**C12N 5/00** (2006.01)

---

(54) **НОВЫЙ БОТУЛИНИЧЕСКИЙ НЕЙРОТОКСИН И ЕГО ПРОИЗВОДНЫЕ**

---

(31) **62/360,239**

(32) **2016.07.08**

(33) **US**

(43) **2019.06.28**

(86) **PCT/US2017/041255**

(87) **WO 2018/009903 2018.01.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**СТЕНМАРК ПОЛ (SE); ЧИЛДРЕН'З  
МЕДИКАЛ СЕНТЕР КОРПОРЕЙШН  
(US)**

(72) Изобретатель:

**Стенмарк Пол (SE), Дун Минь, Чжан  
Сыцай (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(56) **WO-A2-2012041761  
WO-A1-2013180799  
WO-A1-2009014854**

---

(57) В настоящем документе представлены пептиды нейротоксина Clostridial botulinum (BoNT) нового серотипа (BoNT/X), а также способы получения и применения полипептидов BoNT, например, в терапевтических целях.

**B1**

**041568**

**041568**

**B1**

### Ссылка на родственные заявки

По заявке на данное изобретение в соответствии с 35 U.S.C. § 119(e) испрашивается приоритет согласно заявке на выдачу патента США с серийным № 62/360239, поданной 8 июля 2016 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### Правительственная поддержка

Настоящее изобретение выполнено при правительственной поддержке в соответствии с R01NS080833, присужденным национальными институтами здоровья. Правительство обладает определенными правами на настоящее изобретение.

### Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Нейротоксины Clostridial botulinum (BoNT) относятся к наиболее опасным потенциальным биотеррористическим средствам, а также используются клинически для лечения увеличивающегося перечня медицинских состояний. Существует семь серотипов BoNT (BoNT/A-G), известных на данный момент. В последние годы BoNT широко использовали для лечения увеличивающегося перечня медицинских состояний: локальные инъекции незначительного количества токсинов могут аттенуировать нейрональную активность на намеченных участках, что может быть полезным для многих медицинских состояний, а также для косметических целей. По мере расширения применения BoNT сообщается об ограничениях и побочных эффектах. Основным ограничением является выработка нейтрализующих антител у пациентов, что делает дальнейшее лечение неэффективным. Прекращение использования BoNT часто оставляет пациентов без других эффективных способов лечения/облегчения их нарушений. Побочные эффекты, связанные с использованием BoNT, варьируют от кратковременных нетяжелых явлений, таких как птоз и диплопия, до угрожающих жизни явлений, даже смерти. Ограничения и побочные эффекты BoNT в значительной степени связаны с дозой. Существует значительный интерес к разработке новых типов BoNT в качестве терапевтических токсинов. За последние 45 лет новые типы BoNT не были выявлены.

### Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее раскрытие основано, по меньшей мере частично, на идентификации нового серотипа BoNT - BoNT/X - путем поиска в геномной базе данных штаммов Clostridium Botulinum. BoNT/X обладает наименьшей идентичностью последовательностей по отношению к другим BoNT и не распознается антисывороткой, вырабатываемой против известных типов BoNT. BoNT/X расщепляет белки SNARE подобно другим BoNT. Однако BoNT/X также расщепляет некоторые белки SNARE, которые другие BoNT расщеплять не могут, например VAMP4, VAMP5 и Ykt6. Представлены композиции и способы лечения заболеваний с использованием BoNT/X. Также в настоящем документе представлены способы получения BoNT/X.

Следовательно, в некоторых аспектах настоящего раскрытия представлены выделенные полипептиды нейротоксина Clostridial botulinum (BoNT), содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1.

В некоторых аспектах настоящего раскрытия представлены выделенные полипептиды BoNT, содержащие аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью по отношению к SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный полипептид BoNT состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1.

В некоторых аспектах настоящего раскрытия представлены выделенные полипептиды BoNT, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2. В некоторых аспектах настоящего раскрытия представлены выделенные полипептиды BoNT, аминокислотная последовательность которых характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью по отношению к SEQ ID NO: 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный полипептид BoNT состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2.

В некоторых аспектах настоящего раскрытия представлены выделенные полипептиды BoNT, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах настоящего раскрытия представлены выделенные полипептиды

BoNT, аминокислотная последовательность которых характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью по отношению к SEQ ID NO: 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный полипептид

BoNT состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

В некоторых аспектах настоящего раскрытия представлены модифицированные полипептиды BoNT, состоящие из одной или нескольких мутаций по типу замены в положении, соответствующем C461, C467 и C1240 в SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления мутация(и) по типу замены соответствует C461S, C461A, C467S, C467A, C1240S, C1240A, C461S/C1240S, C416S/C1240A, C461A/C1240S, C461A/C1240A, C467S/C1240S, C461S/C1240A, C467A/C1240S или C467A/C1240A в SEQ ID NO: 1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид BoNT содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO ID NO: 4-17. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид BoNT содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 4-17, при этом полипептид не имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид BoNT состоит из аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 4-17.

В некоторых аспектах настоящего раскрытия представлены модифицированные полипептиды BoNT, имеющие однократную мутацию по типу замены в положении, соответствующем C461 или C467 в SEQ ID NO: 2.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления мутация по типу замены соответствует C461S, C461A, C467S, C467A, C1240S, C1240A, C461S/C1240S, C416S/C1240A, C461A/C1240S, C461A/C1240A, C467S/C1240S, C461S/C1240A, C467A/C1240S или C467A/C1240A в SEQ ID NO: 2.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид BoNT содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 18-21. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид BoNT содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 18-21, при этом полипептид не имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид BoNT состоит из аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 18-21.

В некоторых аспектах настоящего раскрытия представлены химерные полипептиды BoNT, содержащие аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 22-24. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный полипептид BoNT содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 22-24, при этом полипептид не имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный полипептид BoNT состоит из аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 22-24.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный полипептид BoNT дополнительно содержит однократную мутацию по типу замены в положении, соответствующем C461 или C467 в SEQ ID NO: 2.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный полипептид BoNT содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 25-30. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный полипептид BoNT содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 25-30. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный полипептид BoNT состоит из аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 25-30.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT проникает в клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT расщепляет белок SNARE в клетке. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок SNARE выбран из группы, со-

стоящей из SNAP-25, VAMP1, VAMP2, VAMP3, VAMP4, VAMP5, Ykt6 и синтаксина 1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок SNARE представляет собой VAMP1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления BoNT расщепляет между аминокислотными остатками, соответствующими R66 и A67 из SEQ ID NO: 39.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок SNARE представляет собой VAMP2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления BoNT расщепляет между аминокислотными остатками, соответствующими R66 и A67 из SEQ ID NO: 40.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок SNARE представляет собой VAMP3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления BoNT расщепляет между аминокислотными остатками, соответствующими R66 и A67 из SEQ ID NO:41.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок SNARE представляет собой VAMP4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления BoNT расщепляет между аминокислотными остатками, соответствующими K87 и S88 из SEQ ID NO: 42.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок SNARE представляет собой VAMP5. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления BoNT расщепляет между аминокислотными остатками, соответствующими R40 и S41 из SEQ ID NO:43.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок SNARE представляет собой Ykt6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления BoNT расщепляет между аминокислотными остатками, соответствующими K173 и S174 из SEQ ID NO:44.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT обладает повышенной стабильностью по сравнению с соответствующим ему полипептидом BoNT дикого типа.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка представляет собой секреторную клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка представляет собой нейрональную клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка представляет собой иммунную клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT подавляет нейрональную активность. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT индуцирует атрофический паралич. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка представляет собой культивируемую клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка находится *in vivo*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка получена из млекопитающего. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления млекопитающее представляет собой человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления млекопитающим является грызун. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления грызун является мышью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления грызун является крысой.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT не реагирует перекрестно с антителом против серотипа A, B, C, D, E, F или GBoNT.

В других аспектах настоящего раскрытия представлены молекулы нуклеиновой кислоты, состоящие из полинуклеотида, кодирующего полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью по отношению к полипептиду BoNT, описываемому в настоящем документе. Представлены векторы нуклеиновой кислоты, состоящие из таких молекул нуклеиновой кислоты. Представлены клетки, включающие в себя молекулы нуклеиновой кислоты или векторы нуклеиновой кислоты, описываемые в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие клетки экспрессируют полипептид BoNT, описываемый в настоящем документе.

Представлены способы получения полипептида BoNT в соответствии с настоящим раскрытием. Такие способы предусматривают стадии культивирования клетки, экспрессирующей полипептиды BoNT, в условиях, при которых продуцируется указанный полипептид BoNT. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способы дополнительно предусматривают извлечение полипептида BoNT из культуры.

В других аспектах настоящего раскрытия представлены модифицированные полипептиды BoNT, состоящие из (a) протеазного домена; (b) модифицированного линкерного участка и (c) домена транслокации; при этом (a), (b) и (c) принадлежат серотипу X BoNT, и при этом модифицированный линкерный участок содержит одну однократную мутацию по типу замены в положении, соответствующем C461 или C467 из SEQ ID NO: 1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид BoNT дополнительно содержит (d) домен связывания с рецептором.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный линкерный участок содержит мутацию по типу замены, соответствующую C461S или C461A в SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный линкерный участок содержит мутацию по

типу замены, соответствующую C467S или C467A в SEQ ID NO: 1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления домен связывания с рецептором является рецептором из BoNT/X. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления домен связывания с рецептором является модифицированным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления домен связывания с рецептором содержит мутацию по типу замены, соответствующую C1240S или C1240A в SEQ ID NO: 1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления домен связывания с рецептором является рецептором серотипа, выбранного из группы, состоящей из A, B, C, D, E, F и G.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид BoNT проникает в клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид BoNT расщепляет белки SNARE в клетке. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок SNARE выбран из группы, состоящей из SNAP-25, VAMP1, VAMP2, VAMP3, VAMP4, VAMP5, Ykt6 и синтаксина 1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок SNARE представляет собой VAMP1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления BoNT расщепляет между аминокислотными остатками, соответствующими R66 и A67 из SEQ ID NO: 39.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок SNARE представляет собой VAMP2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления BoNT расщепляет между аминокислотными остатками, соответствующими R66 и A67 из SEQ ID NO: 40.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок SNARE представляет собой VAMP3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления BoNT расщепляет между аминокислотными остатками, соответствующими R66 и A67 из SEQ ID NO: 41.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок SNARE представляет собой VAMP4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления BoNT расщепляет между аминокислотными остатками, соответствующими K87 и S88 из SEQ ID NO: 42.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок SNARE представляет собой VAMP5. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления BoNT расщепляет между аминокислотными остатками, соответствующими R40 и S41 из SEQ ID NO: 43.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок SNARE представляет собой Ykt6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления BoNT расщепляет между аминокислотными остатками, соответствующими K173 и S174 из SEQ ID NO: 44.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT обладает повышенной стабильностью по сравнению с соответствующим ему полипептидом BoNT дикого типа.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка представляет собой секреторную клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка представляет собой нейрональную клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка представляет собой иммунную клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT подавляет нейрональную активность. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT индуцирует атрофический паралич. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка представляет собой культивируемую клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка находится *in vivo*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка получена из млекопитающего. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления млекопитающее представляет собой человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления млекопитающее представляет собой грызуна. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления грызун является мышью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления грызун является крысой.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT не реагирует перекрестно с антителом против серотипа A, B, C, D, E, F или G BoNT.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный линкерный участок содержит искусственный линкер. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления искусственный линкер содержит сайт расщепления протеазой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления протеаза выбрана из группы, состоящей из тромбина, TEV, PreScission (3C протеазы), фактора Ха, MMP-12, MMP-13, MMP-17, MMP-20, гранзима-B и энтерокиназы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 50-60).

В других аспектах настоящего раскрытия представлены молекулы нуклеиновой кислоты, состоящие из полинуклеотида, кодирующего полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью по отношению к полипептиду BoNT, описываемому в настоящем документе. Представлены векторы нуклеиновой кислоты, состоящие из таких молекул нук-

леиновой кислоты. Представлены клетки, включающие в себя молекулы нуклеиновой кислоты или векторы нуклеиновой кислоты, описываемые в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие клетки экспрессируют полипептид VoNT, описываемый в настоящем документе.

Представлены способы получения полипептида VoNT в соответствии с настоящим раскрытием. Такие способы предусматривают стадии культивирования клетки, экспрессирующей полипептиды VoNT, в условиях, при которых продуцируется указанный полипептид VoNT. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способы дополнительно предусматривают извлечение полипептида VoNT из культуры.

В других аспектах настоящего раскрытия представлены модифицированные полипептиды VoNT, состоящие из одной или нескольких мутаций по типу замены в положениях, соответствующих R360, Y363, H227, E228 или H231 в SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одна или несколько мутаций по типу замены соответствуют R360A/Y363F, H227Y, E228Q или H231Y в SEQ ID NO: 1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид VoNT содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 31-38. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид VoNT содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 31-38, при этом полипептид не имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид VoNT состоит из аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 31-38.

В других аспектах настоящего раскрытия представлен модифицированный полипептид VoNT/X, состоящий из а) неактивного протеазного домена; б) линкерного участка и с) домена транслокации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный VoNT/X дополнительно содержит домен связывания с рецептором.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления неактивный протеазный домен содержит одну или несколько мутаций по типу замены в положениях, соответствующих R360, Y363, H227, E228 или H231 из SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одна или несколько мутаций по типу замены соответствуют R360A/Y363F, H227Y, E228Q или H231Y из SEQ ID NO: 1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид VoNT проникает в клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид VoNT не расщепляет белок SNARE.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид VoNT/X дополнительно содержит модификацию в линкерном участке (b). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модификация в линкерном участке содержит одну однократную мутацию по типу замены в положении, соответствующем C461 или C467 из SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления однократная мутация по типу замены соответствует C461A, C461S, C467A или C467S из SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид VoNT/X дополнительно содержит модификацию в домене связывания с рецептором (d).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модификация в домене связывания с рецептором содержит мутацию по типу замены в положении, соответствующем C1240 из SEQ ID NO: 1.

В других аспектах настоящего раскрытия представлены молекулы нуклеиновой кислоты, состоящие из полинуклеотида, кодирующего полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5 или 100% идентичностью по отношению к полипептиду VoNT, описываемому в настоящем документе. Представлены векторы нуклеиновой кислоты, состоящие из таких молекул нуклеиновой кислоты. Представлены клетки, включающие в себя молекулы нуклеиновой кислоты или векторы нуклеиновой кислоты, описываемые в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие клетки экспрессируют полипептид VoNT, описываемый в настоящем документе.

Представлены способы получения полипептида VoNT в соответствии с настоящим раскрытием. Такие способы предусматривают стадии культивирования клетки, экспрессирующей полипептиды VoNT, в условиях, при которых продуцируется указанный полипептид VoNT. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способы дополнительно предусматривают извлечение полипептида VoNT из

культуры.

Кроме того, в настоящем документе представлено применение модифицированного полипептида BoNT, описываемого в настоящем документе, в качестве средства доставки для доставки терапевтических средств в нейроны.

В некоторых аспектах настоящего раскрытия представлены химерные молекулы, состоящие из первой части, связанной со второй частью, при этом первая часть представляет собой модифицированный полипептид BoNT, описываемый в настоящем документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первая часть и вторая часть связываются ковалентно. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первая часть и вторая часть не связываются ковалентно.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вторая часть выбрана из группы, состоящей из малой молекулы, нуклеиновой кислоты, короткого полипептида и белка. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вторая часть представляет собой биоактивную молекулу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вторая часть представляет собой отличное от полипептида лекарственное средство. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вторая часть представляет собой терапевтический полипептид.

В других аспектах настоящего раскрытия представлены молекулы нуклеиновой кислоты, состоящие из полинуклеотида, кодирующего полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5 или 100% идентичностью по отношению к химерному полипептиду BoNT, описываемому в настоящем документе. Представлены векторы нуклеиновой кислоты, состоящие из таких молекул нуклеиновой кислоты. Представлены клетки, включающие в себя молекулы нуклеиновой кислоты или векторы нуклеиновой кислоты, описываемые в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие клетки экспрессируют химерный полипептид BoNT, описываемый в настоящем документе.

Представлены способы получения химерного полипептида BoNT в соответствии с настоящим раскрытием. Такие способы предусматривают стадии культивирования клетки, экспрессирующей химерные полипептиды BoNT, в условиях, при которых продуцируется химерный полипептид BoNT. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способы дополнительно предусматривают извлечение химерного полипептида BoNT из культуры.

В других аспектах настоящего раскрытия представлены фармацевтические композиции, состоящие из полипептидов BoNT, описываемых в настоящем документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

Также представлен набор, состоящий из таких фармацевтических композиций и указания по терапевтическому введению фармацевтической композиции.

В некоторых аспектах настоящего раскрытия представлены способы лечения состояния, предусматривающие введение терапевтически эффективного количества полипептида BoNT, химерной молекулы или фармацевтической композиции, описываемых в настоящем документе, субъекту для лечения состояния.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления состояние связано с надактивными нейронами или железами. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления состояние выбрано из группы, состоящей из спастической дисфонии, спастической кривошеи, дистонии мышц гортани, ороромандибулярной дистонии, язычной дистонии, цервикальной дистонии, фокальной дистонии руки, блефароспазма, страбизма, гемифациального спазма, нарушения века, церебрального паралича, фокальной спастичности и других нарушений голоса, спастического колита, нейрогенного мочевого пузыря, анимуса, спастичности конечностей, тиков, треморов, бруксизма, трещины заднего прохода, ахалазии, дисфагии и других нарушений мышечного тонуса, а также других нарушений, характеризующихся произвольными движениями групп мышц, лакримацией, гипергидрозом, повышенным слюноотделением, избыточными желудочно-кишечными секретами, секреторными нарушениями, болью из-за мышечных спазмов, головной болью, дерматологическими или эстетическими/косметическими состояниями и ожирением/снижением аппетита.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления состояние не связано с нежелательной нейрональной активностью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления состояние выбрано из группы, состоящей из псориаза, аллергии, гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза и алкогольных заболеваний поджелудочной железы.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение осуществляют путем инъекции в участок, где присутствует нежелательная нейрональная активность.

В следующих аспектах настоящего раскрытия представлены способы получения полипептида ней-

ротоксина Clostridial botulinum (BoNT), при этом способ предусматривает:

(i) получение первого фрагмента BoNT, состоящего из легкой цепи (LC) и N-терминального домена тяжелой цепи (H<sub>N</sub>), при этом первый фрагмент BoNT содержит C-терминальный мотив LPXTGG (SEQ ID NO: 60);

(ii) получение второго фрагмента BoNT, состоящего из C-терминального домена тяжелой цепи (H<sub>C</sub>); при этом второй фрагмент BoNT содержит специфический сайт расщепления протеазой на своем N-конце;

(iii) расщепление второго фрагмента BoNT специфической протеазой, при этом расщепление приводит к получению свободного глицинового остатка на N-конце; и

(iv) введение в контакт первого фрагмента BoNT и второго фрагмента BoNT в присутствии транс-пептидазы, что тем самым лигирует первый фрагмент BoNT и второй фрагмент BoNT с образованием лигированного BoNT.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый фрагмент BoNT дополнительно содержит аффинную метку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аффинная метка сливается с первым фрагментом BoNT на N-конце. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аффинная метка сливается с первым фрагментом BoNT на C-конце. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аффинная метка выбрана из группы, состоящей из His6, GST, Avi, Strep, S, MBP, Sumo, FLAG, HA, Мус, SBP, E, калмодулина, Softag 1, Softag 3, TC, V5, VSV, Xpress, Halo и Fc.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления второй фрагмент BoNT дополнительно содержит аффинную метку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аффинная метка сливается с первым фрагментом BoNT на N-конце. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аффинная метка сливается со вторым фрагментом BoNT на C-конце. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аффинная метка выбрана из группы, состоящей из His6, GST, Avi, Strep, S, MBP, Sumo, FLAG, HA, Мус, SBP, E, калмодулина, Softag 1, Softag 3, TC, V5, VSV, Xpress, Halo и Fc.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления протеаза выбрана из группы, состоящей из тромбина, TEV, PreScission, MMP-12, MMP-13, MMP-17, MMP-20, гранзима-B, энтерокиназы и протеазы SUMO. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления когнатная протеаза представляет собой тромбин.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый фрагмент BoNT происходит из серотипа A, B, C, D, E, F, G или X BoNT. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый фрагмент BoNT происходит из BoNT/X. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления второй фрагмент BoNT происходит из серотипа A, B, C, D, E, F, G или X BoNT. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления второй фрагмент BoNT происходит из BoNT/A. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления второй фрагмент BoNT является фрагментом BoNT/B. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления второй фрагмент BoNT является фрагментом BoNT/C. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления второй фрагмент BoNT является фрагментом BoNT/X.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления транспептидаза представляет собой сортазу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сортаза является сортазой Staphylococcus aureus (SrtA).

Эти и другие аспекты настоящего раскрытия, а также различные преимущества и применения станут понятными при обращении к подробному раскрытию настоящего изобретения. Как станет понятно, каждый аспект настоящего раскрытия может охватывать различные варианты осуществления.

Все документы, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

#### **Краткое описание графических материалов**

Следующие графические материалы составляют часть настоящего описания и включены для дальнейшей демонстрации некоторых аспектов настоящего раскрытия, которые можно будет легче понять при обращении к одному или нескольким из данных графических материалов в комбинации с подробным описанием специфических вариантов осуществления, представленных в настоящем документе. Файл патента или заявки содержит как минимум один рисунок, выполненный в цвете. Копии публикации настоящего патента или заявки на выдачу патента с цветным графическим(и) материалом(ами) будут предоставлены Ведомством при запросе и оплате необходимой пошлины.

На фиг. 1A-1E показана идентификация BoNT/X как нового BoNT.

На фиг. 1A показано филогенетическое дерево выравнивания белковых последовательностей для BoNT/A-G, BoNT/F5, TeNT и BoNT/X, анализируемых способом ClustalW. Проценты идентичности последовательностей каждого токсина и BoNT/X обозначены после каждого токсина. Также отмечены проценты идентичности последовательностей BoNT/E и BoNT/F, а также BoNT/B и BoNT/G.

На фиг. 1B, верхняя панель, показано схематическое изображение трех доменов BoNT/X с отмеченными консервативным протеазным мотивом в LC и мотивом связывания с ганглиозидом в H<sub>C</sub>.

На фиг. 1B, нижняя панель, показано скользящее окно сравнения последовательностей, демонстрирующее, что BoNT/X характеризуется подобием низкой степени, равномерно распределенным по его

последовательности, по отношению ко всем другим семи VoNT и TeNT.

На фиг. 1C показано схематическое изображение кластера генов *orf*, который включает в себя ген VoNT/X (верхняя панель), обладающий двумя уникальными признаками по сравнению с двумя известными вариантами кластера *orfX* (средняя и нижняя панели): (1) имеется дополнительный белок *orfX2* (обозначенный как *orfX2b*), расположенный рядом с геном VoNT/X; (2) рамка считывания генов *orfX* имеет то же направление, что и ген VoNT/X.

На фиг. 1D схематически иллюстрируется уникальная направленность гена и дополнительный ген *OrfX2*, обнаруженный в VoNT/X.

На фиг. 1E показана предварительная структура легкой цепи VoNT/X. Темная точка представляет собой активный сайт цинка. Структура показана с разрешением 1,9 Å.

На фиг. 2A-2J показано, что LC из VoNT/X (X-LC) расщепляет VAMP по уникальному сайту.

На фиг. 2A показан X-LC, с предварительной обработкой EDTA и без таковой, инкубируемый с экстрактами в поверхностно-активном веществе головного мозга крысы (BDE). Выполняли анализ иммуноблоттинга для выявления синтаксина 1, SNAP-25 и VAMP2. Также выявляли синаптофизин (Syn) в качестве контроля загрузки. LC из VoNT/A (A-LC) и VoNT/B (B-LC) анализировали параллельно. Расщепление VAMP2 с помощью B-LC приводит к потере сигналов иммуноблоттинга, тогда как расщепление SNAP-25 с помощью A-LC генерирует меньший фрагмент SNAP-25, который все еще может быть выявлен иммуноблоттингом (отмечен звездочкой). Инкубация с X-LC приводит к потере сигналов иммуноблоттинга VAMP2, что свидетельствует о том, что X-LC расщепил VAMP2. EDTA блокировала активность X-, A- и B-LC.

На фиг. 2B показан VAMP2 (остатки 1-96), очищенный в виде His6-меченого рекомбинантного белка и инкубированный с X-LC. Образцы анализировали с помощью SDS-PAGE и окрашивания кумасси синим. X-LC превращал VAMP2 (1-96) в два меньших фрагмента, что указывает на то, что X-LC расщепил VAMP2.

На фиг. 2C-2E показан VAMP2 (1-96), инкубированный с X-LC. Образцы цельного белка затем анализировали с помощью масс-спектрометрии (LC-MS/MS) для определения точной молекулярной массы расщепленных фрагментов. Пиковые значения элюированного пептида из колонки HPLC наносили на график на фиг. 2C за время выполнения (RT, ось X).

Данные масс-спектрометрии для двух продуктов расщепления показаны на фиг. 2D и 2E соответственно с отношением массы к заряду (масса/заряд), отмеченным для каждого сигнала. Молекулярную массу выводили путем умножения *m* на *z* с последующим вычитанием *z*. Белковые последовательности для двух продуктов расщепления соответствуют SEQ ID NO: 61 и 62 сверху вниз и показаны на фиг. 2C.

На фиг. 2F показано выравнивание последовательности между VAMP 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, Sec22b и Ykt6, с подчеркнутыми сайтами расщепления для VoNT/B, D, F, G и X и двумя мотивами SNARE, взятыми в рамку. Последовательности соответствуют SEQ ID NO: 63-71 сверху вниз.

На фиг. 2G показан HA-меченые VAMP1, 3, 7 и 8, а также тус-меченые Sec22b и Ykt6, экспрессированные в клетках HEK293 посредством временной трансфекции. Клеточные лизаты инкубировали с X-LC и подвергали анализу иммуноблоттинга, выявляющему метку HA или Мус. Актин служил контролем загрузки. X-LC расщеплял VAMP1, 3 и Ykt6, но не VAMP7, 8 и Sec22.

На фиг. 2H показан GST-меченый Ykt6, инкубируемый с X-LC (100 нМ) в течение указанного времени. Образцы анализировали с помощью SDS-PAGE и окрашивания кумасси синим. X-LC расщеплял Ykt6.

На фиг. 2I показанный GST-меченные цитоплазматические домены из VAMP2 (33-86), VAMP4 (1-115) и VAMP5 (1-70), инкубируемые с X-LC в течение указанного времени. Образцы анализировали с помощью SDS-PAGE и окрашивания кумасси синим. X-LC расщеплял VAMP4, и VAMP5. Более длительное время инкубации (360 мин) требуется для расщепления большинства VAMP5. Следует учитывать, что белок VAMP5 содержит дополнительную полосу, которая является либо продуктом разложения, либо бактериальной белковой примесью, которая почти равна (но не идентична) таковой продукта расщепления при SDS-PAGE.

На фиг. 2J показаны эксперименты, проводимые, как описано на фиг. 2A, за исключением того, что были выявлены VAMP4 и Sec22b. Синаптотагмин I (Syn I) выявляли в качестве контроля загрузки. X-LC расщеплял нативный VAMP4 в BDE.

На фиг. 3A-3E показана активация VoNT/X с помощью протеолитического расщепления линкерного участка между LC и H<sub>N</sub>.

На фиг. 3A показано выравнивание последовательностей линкерных участков между LC и H<sub>N</sub> семи VoNT и VoNT/X. Последовательности соответствовали SEQ ID NO: 72-79 сверху вниз. VoNT/X имеет самый длинный линкерный участок среди всех VoNT, который содержит дополнительный цистеин в дополнение к двум консервативным цистеинам в LC и в H<sub>N</sub>. Сайт рестрикции Lys-C при ограниченном протеолизе идентифицировали с помощью масс-спектрометрического подхода.

На фиг. 3B показаны культивируемые кортикальные нейроны крысы, подвергавшиеся воздействию указанных концентраций X-LC-H<sub>N</sub> в среде в течение 12 ч. Клеточные лизаты собирали и выполняли анализ иммуноблоттинга для изучения синтаксина 1, SNAP-25 и VAMP2 в нейронах. Актин служил в каче-

стве контроля загрузки. Активированные трипсином LC-H<sub>N</sub> из BoNT/A (A-LC-H<sub>N</sub>) и BoNT/B (B-LC-H<sub>N</sub>) анализировали параллельно в качестве контролей. X-LC-H<sub>N</sub> проникал в нейроны и расщеплял VAMP2, что подтверждалось потерей сигналов иммуноблоттинга VAMP2. X-LC-H<sub>N</sub>, активированный Lys-C, показывал значительно более высокую эффективность, чем неактивированный X-LC-H<sub>N</sub>. X-LC-H<sub>N</sub> является более эффективным, чем активированные трипсином B-LC-H<sub>N</sub> и A-LC-H<sub>N</sub>, которые не показывали какого-либо обнаруживаемого расщепления их субстратов SNARE в нейронах при тех же концентрациях анализа.

На фиг. 3C показаны мутанты X-LC-H<sub>N</sub> с указанным мутированным цистеином, а также WT X-LC-H<sub>N</sub>, активированный ограниченным протеолизом и анализируемые с помощью SDS-PAGE и окрашивания кумасси синим, с DTT или без такового. Мутация C423S давала в результате два 50-кДа фрагмента, с DTT или без такового. Мутанты, имеющие C461S или C467S, показывали одну полосу при 100 кДа при отсутствии DTT, и она разделялась на две ~50 кДа полосы в присутствии DTT, демонстрируя, что и C461, и C467 в H<sub>N</sub> могут формировать межцепочечную дисульфидную связь с C423 в LC. Часть X-LC-H<sub>N</sub> WT формировала агрегаты в верхней части геля SDS-PAGE. Эти агрегаты обусловлены образованием межмолекулярной дисульфидной связи, так как они исчезали в присутствии DTT. Мутация любого из трех цистеинов уничтожает агрегаты, указывая на то, что образование межмолекулярной дисульфидной связи обусловлено наличием дополнительного цистеина в линкерном участке. Большая часть активированного X-LC-H<sub>N</sub> WT также разделялась на две полосы по ~50 кДа в геле SDS-PAGE без DTT. Это связано с перестановкой дисульфидной связи, описанной на фиг. 3D.

На фиг. 3D показан X-LC-H<sub>N</sub> WT, активированный ограниченным протеолизом с последующей повторной инкубацией с указанными концентрациями NEM для блокирования перестановки дисульфидной связи. Затем образцы анализировали с помощью SDS-PAGE и окрашивания кумасси синим в присутствии DTT или без такового. Большая часть X-LC-H<sub>N</sub> WT существует в виде одной полосы при 100 кДа без DTT после обработки NEM, что указывает на то, что X-LC-H<sub>N</sub> WT в основном содержит межцепочечную дисульфидную связь.

На фиг. 3E показаны эксперименты, проведенные, как описано на фиг. 3B, за исключением того, что нейроны подвергали воздействию либо WT, либо указанных мутантов X-LC-H<sub>N</sub>. Мутирование цистеина в LC (C423) устраняет активность X-LC-H<sub>N</sub>, в то время как мутирование одного из двух цистеинов в H<sub>N</sub> (C461 или C467) не влияет на активность X-LC-H<sub>N</sub> в нейронах. Эти результаты подтверждают, что образование межцепочечной дисульфидной связи является существенным для активности X-LC-H<sub>N</sub>.

На фиг. 4A-4F показано, что BoNT/X полной длины является активным в культивируемых нейронах и *in vivo* у мышей. Последовательности являются следующими: LVPR-GS (SEQ ID NO: 80), LPETGG-His6 (SEQ ID NO: 81), GG-His6 (SEQ ID NO: 82) и LPETGS (SEQ ID NO: 59).

На фиг. 4A показан схематический чертеж, иллюстрирующий синтез BoNT/X полной длины с использованием способа опосредованного сортазой лигирования.

На фиг. 4B показано, что реакционную смесь для опосредованного сортазой лигирования и указанные контрольные компоненты анализировали с помощью SDS-PAGE и окрашивания кумасси синим. Звездочкой отмечены агрегаты белков, обусловленные межмолекулярной дисульфидной связью, поскольку эти агрегаты исчезали в присутствии DTT. Маркер молекулярной массы находится на дорожке 1 (начиная с левой стороны). BoNT/X полной длины (X-FL) появился только в смеси для опосредованного сортазой лигирования (дорожка 7 и дорожка 14).

На фиг. 4C показано, что нейроны подвергались воздействию одинакового количества (5 мкл) смеси для опосредованного сортазой лигирования или указанных контрольных компонентов в течение 12 ч в среде. Клеточные лизаты анализировали с помощью иммуноблоттинга. X-LC-H<sub>N</sub> отдельно расщеплял некоторое количество VAMP2 из-за его высокой концентрации в реакционной смеси. Контрольная смесь, содержащая как X-LC-H<sub>N</sub>, так и X-H<sub>C</sub>, но не сортазу, несколько усиливала расщепление VAMP2 по сравнению с X-LC-H<sub>N</sub> отдельно, вероятно потому, что X-H<sub>C</sub> связывается с X-LC-H<sub>N</sub> посредством нековалентных взаимодействий. Лигирование X-LC-H<sub>N</sub> и X-H<sub>C</sub> с помощью сортазы усиливало расщепление VAMP2 в смеси X-LC-H<sub>N</sub> и X-H<sub>C</sub> без сортазы, демонстрируя, что лигированный X-FL является функциональным в нейронах.

На фиг. 4D показано, что реакционная смесь сортазы, полученная, как описано на панели b (дорожка 7), активна *in vivo*, как анализировали с использованием анализа DAS на мышах. В инъекционной конечности развивался атрофический паралич, и пальцы ног не могли разгибаться в течение 12 ч. Левая конечность, в которую не вводили токсины, служила контролем.

На фиг. 4E показано, что BoNT/A-G, мозаичный токсин BoNT/DC и BoNT/X подвергали дот-блот-анализу (0,2 мкг на токсин, нанесенный на нитроцеллюлозные мембраны) с использованием четырех лошадиных антисывороток (трехвалентного антитела против BoNT/A, B и E, антитела против BoNT/C, антитела против BoNT/DC и антитела против BoNT/F), а также двух козьих антисывороток (антитела против BoNT/G и антитела против BoNT/D). BoNT/X состоит из очищенного X-LC-H<sub>N</sub> и X-H<sub>C</sub> при отношении 1:1. Эти антисыворотки распознавали соответствующие им целевые токсины, но ни одна из них не распознавала BoNT/X.

На фиг. 4F показано, что неактивную форму полной длины BoNT/X (BoNT/XRY) очищали как

His6-меченый рекомбинантный белок в *E. coli* и анализировали с помощью SDS-PAGE и окрашивания кумасси синим, с DTT или без такового.

На фиг. 5 представлено филогенетическое дерево, демонстрирующее распределение и взаимосвязь кластридальных нейротоксинов. Дерево представляет взаимосвязи различных BoNT и последовательностей TeNT из поиска JackHMMER. BoNT/X отмечен окружностью.

На фиг. 6 показан анализ масс-спектрометрии интактного VAMP2 (1-96). His6-меченый VAMP2 (1-96) анализировали с помощью масс-спектрометрии LC-MS/MS. Профиль HPLC приведен на левой панели вместе с белковой последовательностью. Данные масс-спектрометрии для VAMP2 полной длины (1-96) показаны на правой панели и соответствуют SEQ ID NO: 83 со значением масса/заряд, отмеченным для каждого сигнала.

На фиг. 7A-7F показана идентификация сайта расщепления в GST-VAMP2 (33-86) с помощью X-LC.

На фиг. 7A показан GST-меченый VAMP2 (33-86), инкубируемый с X-LC или без такового. Образцы анализировали с помощью SDS-PAGE и окрашивания кумасси синим.

На фиг. 7B, 7C показан интактный GST-меченый VAMP2 (33-86), анализируемый с помощью масс-спектрометрии LC-MS/MS. Профиль HPLC показан на фиг. 7B. Данные масс-спектрометрии показаны на фиг. 7C, при этом белковая последовательность (SEQ ID NO: 84) отмечена на фиг. 7C. Отмечены VAMP2 (33-66) и VAMP2 (67-86).

На фиг. 7D, 7E показан GST-меченый VAMP2 (33-86), инкубируемый с X-LC. Затем образцы анализировали с помощью масс-спектрометрии LC-MS/MS. Профиль HPLC показан на фиг. 7D. Данные масс-спектрометрии для С-терминального фрагмента (SEQ ID NO: 85), образуемого с помощью X-LC, показаны на фиг. 7E.

Данные масс-спектрометрии для N-терминального фрагмента (SEQ ID NO: 86) показаны на фиг. 7F.

Белковые последовательности С- и N-терминальных фрагментов указаны на фиг. 7E, 7F и соответствуют SEQ ID NO: 85 и 86 соответственно.

На фиг. 8A, 8B показано, что химерный токсин ХА является активным в нейронах.

На фиг. 8A показан химерный токсин ХА, образованный путем лигирования X-LC-H<sub>N</sub> с А-Н<sub>C</sub> с помощью сортазы подобно образованию X-FL, как описывается на фиг. 4A. Смесь для опосредованного сортазой лигирования и указанные контрольные компоненты анализировали с помощью SDS-PAGE и окрашивания кумасси синим. Лигирование является эффективным, поскольку большая часть X-LC-H<sub>N</sub> была лигирована в химерный токсин ХА.

На фиг. 8B показаны кортикальные нейроны крысы, подвергнутые указанным контрольным компонентам или лигированной сортазой смеси ХА (5 мкм) в течение 12 ч в среде. Клеточные лизаты анализировали с помощью иммуноблоттинга. X-LC-H<sub>N</sub> отдельно расщеплял некоторое количество VAMP2 из-за его высокой концентрации в реакционной смеси. Лигированный ХА расщеплял VAMP2 в нейронах.

На фиг. 9 показано, что мутирование дополнительного цистеина в Н<sub>N</sub> и цистеина в Н<sub>C</sub> не влияет на активность BoNT/X. Х-Н<sub>C</sub> (C1240S) лигировался с WT X-LC-H<sub>N</sub>, X-LC-H<sub>N</sub> (C461S) или X-LC-H<sub>N</sub> (C467S) путем опосредованного сортазой лигирования. Нейроны подвергали смеси для опосредованного сортазой лигирования или контрольным компонентам (5 мкл) в течение 12 ч в среде. Клеточные лизаты анализировали с помощью иммуноблоттинга. Мутирование C1240 и одного из цистеинов в Н<sub>N</sub> (C461 или C467) не влияет на активность BoNT/X, поскольку лигированные мутантные токсины способны проникать в нейроны и расщеплять VAMP2.

На фиг. 10 показана антисыворотка, вырабатываемая против семи серотипов BoNT, нейтрализующая свои целевые BoNT в нейронах. Культивируемые кортикальные нейроны крысы подвергали указанным BoNT, с или без повторной инкубации с указанной антисывороткой. Клеточные лизаты собирали через 12 ч и подвергали анализу иммуноблоттинга. Вся антисыворотка специфически нейтрализовала свои целевые BoNT без влияния на активность другого серотипа BoNT, что подтверждало, таким образом, специфичность и эффективность этой антисыворотки. Концентрации BoNT составляли: BoNT/A (50 пМ), BoNT/B (2 нМ), BoNT/C (1,5 нМ), BoNT/D (100 пМ), BoNT/E (0,5 нМ), BoNT/F (0,5 нМ), BoNT/G (5 нМ). Антисыворотку против BoNT/A/B/E использовали при 20 мкл на лунку. Остальные антисыворотки применяли при 10 мкл на лунку. BoNT предварительно инкубировали с указанной антисывороткой в течение 30 мин при 37°C перед добавлением в культуральную среду.

На фиг. 11A-11C показано, что BoNT/X<sub>RY</sub> не активен в нейронах.

На фиг. 11A показаны культивируемые кортикальные нейроны крысы, подвергаемые BoNT/X<sub>RY</sub> при указанных концентрациях. Клеточные лизаты анализировали с помощью иммуноблоттинга. VAMP2 не расщеплялся, что указывает на то, что BoNT/X<sub>RY</sub> не активен в нейронах.

На фиг. 11B показан анализ SDS-PAGE экспрессии BoNT/X<sub>RY</sub> в клеточном лизате и надосадочной жидкости (S/N) (4-12% BisTris, MOPS буфер). Полоса при 150 кДа, соответствующая BoNT/X, отчетливо видна и в лизате, и в растворимой фракции.

На фиг. 11C показан анализ SDS-PAGE конечного образца высокоочищенного BoNT/X<sub>RY</sub> (4-12% BisTris, MOPS буфер). Одна полоса при 150 кДа, что соответствует BoNT/X, отчетливо видна и показывает ~90% чистоту.

На фиг. 12A-12F показано, что BoNT/X связывается со всеми четырьмя ганглиозидами головного мозга.

На фиг. 12A-12D показан BoNT/X (квадратики) и A-H<sub>C</sub> (кружочки), связывающиеся с GD1a (фиг. 12A), GT1b (фиг. 12B), GD1b (фиг. 12C) и GM1 (фиг. 12D) соответственно. Кривые соответствовали среднему анализу ELISA в трех повторностях и были построены с помощью Prism7 (программного обеспечения GraphPad).

На фиг. 12E представлено краткое описание BoNT/X, связывающегося со всеми четырьмя ганглиозидами, в сравнении с полным связыванием BoNT/A на фиг. 12F.

На фиг. 13A-13D показана идентификация сайтов расщепления X-LC в Ykt6 с помощью анализа масс-спектрометрии.

На фиг. 13A-13D показано, что 10 мкг GST-меченого Ykt6 (1-192) с предварительной инкубацией или без таковой с X-LC разделяли на SDS-PAGE (фиг. 13A). Белковые полосы вырезали, как указано, и разлагали химотрипсином. Разложенные пептиды обессоливали и анализировали обращенно-фазовой HPLC через колонку C18, объединенную с ESI-MS. Профили HPLC GST-Ykt6 без предварительной обработки с X-LC показаны на фиг. 13B, а образец, предварительно обработанный с X-LC, показан на фиг. 13C. Установили, что интенсивность одного пептида была в ~100 раз выше в образцах, предварительно обработанных с X-LC, чем в образцах, которые не подвергали X-LC (отмечено звездочкой). Этот пептид элюировали через 37 мин при комнатной температуре с масса/заряд = 611 (фиг. 13D), что могло соответствовать только пептидной последовательности ESLLERGEKLDLVSQ (SEQ ID NO: 87) в Ykt6, что указывает на то, что это пептид, расположенный на N-терминальной стороне сайта расщепления для X-LC. Поэтому сайтом расщепления является K173-S174 в Ykt6.

На фиг. 14A-14E показана идентификация сайтов расщепления X-LC в VAMP4 и VAMP5 с помощью анализа масс-спектрометрии. На фиг. 14A-14E показаны эксперименты, выполняемые, как описано на фиг. 13, за исключением того, что анализировали VAMP4 (фиг. 14B, 14C) и VAMP5 (фиг. 14D, 14E).

На фиг. 14B показан пептид, который метит N-терминальный сайт сайта расщепления в VAMP4. Последовательность пептида DELQDK соответствует SEQ ID NO: 88.

На фиг. 14C показан пептид, который метит C-терминальный сайт сайта расщепления в VAMP4. Последовательность пептида SESLSDNATAF соответствует SEQ ID NO: 89.

На фиг. 14D показан пептид, который метит N-терминальный сайт сайта расщепления в VAMP5. Последовательность пептида AELQQR соответствует SEQ ID NO: 90.

На фиг. 14E показан пептид, который метит C-терминальный сайт сайта расщепления в VAMP5. Последовательность пептида SDQLLDMSSTF соответствует SEQ ID NO: 91. Таким образом, сайты расщепления определяли как K87-S88 в VAMP4 и R40-S41 в VAMP5.

#### Подробное раскрытие настоящего изобретения

Нейротоксины Clostridium botulinum (BoNT) представляют собой семейство бактериальных токсинов, продуцируемых бактерией Clostridium, с семью установленными серотипами (BoNT/A-G)<sup>1-3</sup>. Они представляют собой одно из наиболее опасных потенциальных биотеррористических средств, классифицируемых Центром по контролю за заболеваниями (CDC) Соединенных Штатов Америки как особо опасное средство "категории А"<sup>4</sup>. Эти токсины продуцируются в виде одного полипептида и могут быть разделены бактериальными протеазами или протеазами хозяина на легкую цепь (LC, ~50 кДа) и тяжелую цепь (H<sub>C</sub>, ~100 кДа). Две цепи остаются связанными межцепочечной дисульфидной связью. H<sub>C</sub> содержит два субдомена: N-терминальный домен H<sub>N</sub>, который опосредует транслокацию LC через эндосомальные мембраны, и C-терминальный домен H<sub>C</sub>, который опосредует связывание с рецепторами в нейронах. Межцепочечная дисульфидная связь восстанавливается при транслокации LC в цитозоль<sup>5, 6</sup>. Высвобожденная LC действует как протеаза со специфическим расщеплением ряда нейрональных белков: BoNT/A, C и E расщепляют по разным сайтам в белке, известном как SNAP-25; BoNT/B, D, F и G расщепляют по разным сайтам в везикулярном белке VAMP; и BoNT/C также расщепляет трансмембранный белок синтаксин 1<sup>1-3</sup>. Эти три белка образуют комплекс, известный как комплекс SNARE, который необходим для высвобождения нейротрансмиттеров<sup>7, 8</sup>. Расщепление любого из этих трех белков SNARE блокирует высвобождение нейротрансмиттеров из нейронов, тем самым парализуя мышцы.

BoNT являются наиболее мощными из известных токсинов и вызывают заболевания людей и животных, известные как ботулизм<sup>3</sup>. Основная форма ботулизма вызывается употреблением пищи, загрязненной BoNT (пищевой ботулизм). Существуют и другие формы, такие как детский ботулизм, который обусловлен колонизацией кишечника продуцирующими токсин бактериями у детей. BoNT всегда вырабатываются вместе с другим белком 150 кДа, известным как NTNHA (нетоксичным, не геммагглютининовым белком), который образует pH-зависимый комплекс с BoNT и защищает BoNT от протеаз в желудочно-кишечном тракте<sup>9</sup>. Обнаружены гены, кодирующие BoNT и NTNHA, в двух типах генных кластеров: (1) кластер HA, содержащий гены для трех консервативных белков HA17, HA33 и HA70, которые образуют комплекс с BoNT/NTNHA и способствуют абсорбции токсинов через эпителиальный барьер кишечника<sup>10-12</sup>; (2) кластер OrfX, который кодирует консервативные белки OrfX1, OrfX2, OrfX3 и P47 с неизвестными функциями<sup>13</sup>.

Поскольку локальные инъекции незначительных количеств токсинов могут аттенуировать нейро-

нальную активность в намеченных участках, BoNT применяли для лечения увеличивающегося перечня медицинских состояний<sup>14-16</sup>, в том числе мышечных спазмов, хронической боли, проблем надактивного мочевого пузыря, а также для косметических целей. Рынок BoNT уже превысил 1,5 миллиарда долларов в 2011 году и, по прогнозам, достигнет 2,9 миллиарда к 2018 году.

BoNT традиционно описывали с помощью анализов нейтрализации на мышцах путем инъекции культуральной надосадочной жидкости бактерий *Clostridium* мышам с антисывороткой против известных BoNT или без таковой. Первые выделенные серотипы, BoNT/A и BoNT/B, были установлены в 1919 году Georgina Burke<sup>18</sup>. Последний из семи типов, BoNT/G, определили в 1969 году из образцов почвы в Аргентине<sup>19</sup>. С 1970 года новые серотипы BoNT не обнаруживали. Эта классификация сохранялась после определения белковых последовательностей для каждого BoNT в 1990-х гг. Идентичность последовательностей между любыми двумя парами среди семи варьирует от 32 до 65,3%. Все семь BoNT были идентифицированы и охарактеризованы до эры их медицинского применения. Следовательно, не существует патента ни на один из этих токсинов. Любая компания может свободно производить и продавать любой из этих семи BoNT. Среди семи типов BoNT/A и BoNT/B являются двумя токсинами, которые в настоящее время одобрены FDA для применения у людей<sup>14,16</sup>. BoNT/A является доминирующим типом, используемым как в медицинских, так и в косметических целях, продаваемым как Botox от Allergan Inc., Dysport от IPSEN Inc. и Xeomin от Merz Inc. BoNT/B продается как Myobloc компанией USWorld Med. Существует значительный интерес к разработке других типов BoNT в качестве терапевтических токсинов по двум основным причинам.

(1) Основным ограничением в лечении является образование нейтрализующего антитела против BoNT/A или BoNT/B у пациентов, что делает неэффективным в будущем лечение тем же токсином<sup>20</sup>. В этом случае пациентам необходимо будет лечиться другим типом BoNT. Вот почему BoNT/B часто используется для лечения пациентов, у которых выработались нейтрализующие антитела против BoNT/A во время лечения, но существует потребность в альтернативных токсинах для пациентов, у которых выработались антитела как против BoNT/A, так и против BoNT/B.

(2) Хотя все BoNT имеют одинаковую структуру и функцию, между ними также имеются значительные различия. Например, BoNT/A расщепляет SNAP-25 и использует белок SV2 в качестве своего рецептора, тогда как BoNT/B расщепляет VAMP и использует белок синаптоагмин (Syt) в качестве своего рецептора<sup>21-27</sup>. Эти функциональные вариации могут приводить к потенциальным различиям в терапевтической эффективности, направленной на разные типы нейронов. Кроме того, стабильность и продолжительность лечения могут также отличаться среди семи типов токсинов. Следовательно, другой тип токсина может иметь свои преимущества перед BoNT/A и BoNT/B.

Быстрый прогресс в геномном секвенировании в последние годы выявил удивительное разнообразие BoNT<sup>28,29</sup>. Во-первых, существует несколько подтипов, которые могут распознаваться одной и той же антисывороткой, но содержат значительные уровни вариаций белковых последовательностей (различия 2,6-31,6%)<sup>28, 30</sup>. Например, BoNT/A содержит восемь известных подтипов, обозначаемых как BoNT/A1-A8<sup>13</sup>. Кроме того, существует множество мозаичных токсинов, вероятно, происходящих из-за рекомбинации генов токсина. Например, "тип H" был зарегистрирован в 2013 году, но позднее он был признан химерным токсином, поскольку его LC характеризуется ~80% идентичностью с LC подтипа BoNT/F, BoNT/F5 и его H<sub>C</sub> характеризуется ~84% идентичностью с H<sub>C</sub> BoNT/A1<sup>31-34</sup>. Соответственно, этот токсин может быть распознан и нейтрализован доступной антисывороткой против BoNT/A<sup>33</sup>.

Генный кластер, кодирующий BoNT, может находиться на плаزمиде, бактериальных фагах или хромосомах, что указывает на то, что гены токсинов подвижны и подвержены горизонтальному переносу генов<sup>13</sup>. Также существуют случаи, когда штамм бактерий *Clostridium* содержит два или даже три разных гена токсина<sup>32, 35, 36</sup>. В этих случаях один токсин обычно экспрессируется на более высоких уровнях (обозначен заглавной буквой), чем другой токсин (обозначен строчной буквой). Например, штаммы, которые экспрессируют высокие уровни BoNT/B и низкие уровни BoNT/F, известны как штаммы BoNT/Bf. Встречаются также случаи, когда один токсин экспрессируется, а другой токсин не экспрессируется, что известно как молчаливый токсин (обычно помеченный в скобках). Например, исследование случаев ботулизма у детей в Калифорнии показало, что 8% штаммов представляли собой BoNT/A(B), это означает, что эти штаммы содержат гены как для BoNT/A, так и для BoNT B, но экспрессируют на выявляемых уровнях только BoNT/A<sup>37-39</sup>.

Как показано в графических материалах и примерах настоящего раскрытия, проводили поиск в опубликованных базах данных геномных последовательностей бактерий *Clostridium* и идентифицировали новый ген BoNT (далее обозначаемый как "BoNT/X"), кодируемый в хромосоме штамма 111 *Clostridium botulinum*. Штамм 111 был впервые выделен в Японии у пациента детского возраста с ботулизмом в 1996 году<sup>40</sup>. Показали, что токсичность штамма 111 у мышей может быть нейтрализована антисывороткой против BoNT/B<sup>40</sup>. Позднее подтвердили, что этот штамм экспрессирует подтип BoNT/B, BoNT/B2, кодируемый в плазмиде<sup>41, 42</sup>. Последовательность BoNT/X депонировали в базу данных PubMed в феврале 2015 года как часть геномной последовательности штамма 111. BoNT/X ранее не был охарактеризован. Остается неизвестным, экспрессируется ли он в штамме 111 и является ли он функциональным токсином.

Также в настоящем документе представлена характеристика BoNT/X на функциональных уровнях. Его LC, как выяснили, расщепляет VAMP по сайту, отличному от известных целевых сайтов всех других BoNT. Обнаружили, что токсин полной длины, образуемый ковалентным связыванием нетоксичных фрагментов сортазой, проникает в культивируемые нейроны и расщепляет VAMP в нейронах, вызывая атрофический паралич у мышей. Наконец, обнаружили, что токсин не распознается антисывороткой, вырабатываемой против всех семи известных BoNT, что говорит о BoNT/X как о новом серотипе BoNT. Его идентификация представляет срочную задачу для разработки эффективных констрмер. Он также может быть превращен в новый терапевтический токсин и может быть использован для создания химерных токсинов с потенциально различными фармакологическими свойствами.

Используемый в настоящем документе термин "полипептид нейротоксина Clostridial botulinum (BoNT)" охватывает любой полипептид или фрагмент из ботулинического нейротоксина, описываемого в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления термин BoNT относится к BoNT полной длины. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления термин BoNT относится к фрагменту BoNT, который может осуществлять весь клеточный механизм, посредством которого BoNT проникает в нейрон и ингибирует высвобождение нейротрансмиттеров. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления термин BoNT просто относится к фрагменту BoNT, что не требует наличия у фрагмента какой-либо специфической функции или активности. Например, полипептид BoNT может относиться к легкой цепи (LC) BoNT, например BoNT/X. Другими терминами, которые могут быть использованы по всему настоящему раскрытию для "нейротоксинов Clostridial botulinum", могут быть BoNT, ботулинические токсины или токсины *C. botulinum*. Следует учитывать, что данные термины используются взаимозаменяемо. Термин "BoNT/X" относится к новому серотипу BoNT, описываемому и характеризующему в настоящем раскрытии. Также представлена белковая последовательность BoNT/X (No. в GenBank BAQ12790,1; четыре цистеина подчеркнуты и выделены жирным шрифтом):

```

MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGFPAQVVIKNIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEA
DAIYNPNYLNTPEKDEFQGVKVLRIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNALTLSDNETIAYQENNNIVSN
LQANLVIIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTLSEVSFSPFYLPFDESYGNYRSLVNIIVKFKREFADPD
ASTLMHVELVHVTNLYGISNRNFYFNFTGKIETSRQONSLIFEELLTFGGIDSKAIISSLIKKIETAKNNYT
TLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPVQGRNGFNKLDTAEFKELNLTILFVLNESNLAQRFSILVRKHLYKERPI
DPIYVNLDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGGQLESSEYFEKIESNALRAFIKIPRNGLLYNAIYRNSKNYLN
IDLEDKKTTSKTNVSYPCSLNNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKDKLPPQDITLSNYD
FTEANSIPSISQONILNERNEELYEPINSLFEIKTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNP
NKVYSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLRISIVKDFSDETGKIDVIDKSSDTLAIVPYIGPLLNIGNDIRHGD
FVGAIELAGITALLEYVPEFTIPILVGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWAEVYNTKAQWWGTIHL
QINTRLAHTYKALSRQANAIAKMNMEFQLANYKGNIDDKAKIKNAISETTEILLNKSVEQAMKNTKFMIKLS
NSYLTKEMIPKVDNLKNFDLETKKTLDFIKEDIKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNIAFDINDIPFSEFDDLI
NQYKNEIEDYEVNLGAEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIELADGRENKAIAKIKGSENSTIKIAMNKYLRFSATD
NFSISFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLRDHNNSIKIVTPDYIAFNGWNLITITN
NRSKGSIVYVNGSKIEEKDISSIWNTTEVDDPIIFRLKNNRDTQAFTLLDQFSIYRKELNQNEVVKLYNYFYNS
NYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREYWSSFGYDYVILSDSKTITFPNNIRYALYNGSKVLKNS
KKLDGLVRNKDFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTTHDLTDFEIIQRQEKYRNYCQLKTPYNIF
HKSGLMSTETSKPTFHDIRDWDVYSSAWYFQNYENLNRKHTKTNYFIPKDEGWDED (SEQ ID NO:

```

1).

Термин "модифицированный нейротоксин Clostridial botulinum (BoNT)" охватывает BoNT, содержащий любые модификации в аминокислотной последовательности, например усечение, добавление, аминокислотную замену и любую их комбинацию. Например, BoNT/X, содержащий аминокислотные мутации по типу замены в C461 или C467, является модифицированным BoNT. В другом примере фрагмент или домен BoNT полной длины (например, протеазный домен или LC) считают модифицированным BoNT. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления домен BoNT также может содержать аминокислотные мутации по типу замены, например протеазный домен, содержащий мутации по типу замены в положениях C461 или C467 BoNT/X.

Термин "проникает в клетку" при использовании для описания действия BoNT в соответствии с настоящим раскрытием охватывает связывание BoNT с рецепторным комплексом с низкой или высокой аффинностью, связывание BoNT с ганглиозидом, интернализацию токсина, транслокацию легкой цепи токсина в цитоплазму и ферментативную модификацию субстрата BoNT.

Используемый в настоящем документе термин "протеазный домен нейротоксина Clostridial botulinum (BoNT)" является синонимичным термину "легкая цепь (LC)". Протеазный домен BoNT располагается в легкой цепи BoNT и, таким образом, также называется LC. Термин означает домен BoNT, ко-

торый может осуществлять стадию ферментативной целевой модификации в процессе интоксикации. Если упоминается LC из определенного серотипа BoNT, используют термин "серотип-LC". Например, термин "X-LC" означает полипептид LC из BoNT/X. Протеазный домен BoNT специфически нацеливается на субстрат токсина *C. botulinum* и осуществляет протеолитическое расщепление субстрата токсина *C. botulinum*, такого как, например, белки SNARE, такие как субстрат SNAP-25, субстрат VAMP и субстрат синтаксина, в BoNT (например, BoNT/X, BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C и т.д.). Считают, что протеазный домен или LC соответствуют приблизительно аминокислотам 1-439 в BoNT/X. Граница домена может варьировать в пределах до приблизительно 25 аминокислот. Например, протеазный домен может соответствовать аминокислотам 1-414 или 1-464 в BoNT/X. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления протеазный домен может соответствовать аминокислотам 1-438, 1-437, 1-436, 1-435, 1-434, 1-433, 1-432, 1-431, 1-430, 1-429, 1-439, 1-440, 1-441, 1-442, 1-443, 1-444, 1-445, 1-446, 1-447, 1-448 или 1-449 в BoNT/X.

Используемый в настоящем документе термин "домен транслокации нейротоксина *Clostridium botulinum* (BoNT)" является синонимичным термину "домен H<sub>N</sub>" и означает домен BoNT, который может осуществлять стадию транслокации процесса интоксикации, который опосредует транслокацию легкой цепи BoNT. Таким образом, H<sub>N</sub> облегчает перемещение легкой цепи BoNT через мембрану в цитоплазму клетки. Неограничивающие примеры H<sub>N</sub> включают в себя H<sub>N</sub> BoNT/A, H<sub>N</sub> BoNT/B, H<sub>N</sub> BoNT/C1, H<sub>N</sub> BoNT/D, H<sub>N</sub> BoNT/E, H<sub>N</sub> BoNT/F, H<sub>N</sub> BoNT/G и H<sub>N</sub> BoNT/X. Домен транслокации располагается на N-конце тяжелой цепи (H<sub>C</sub>) и, таким образом, также называется H<sub>N</sub>. Следует учитывать, что данные термины используются в настоящем документе взаимозаменяемо.

Используемый в настоящем документе термин "линкерный участок" относится к аминокислотной последовательности между протеазным доменом и доменом транслокации BoNT. Линкер содержит два цистеина в положениях 461 и 467, один из которых образует межмолекулярную дисульфидную связь с цистеином в протеазном домене C423 (дисульфидную связь C461-C423 или дисульфидную связь C467-C423). Образование данной дисульфидной связи необходимо для активности BoNT/X.

Используемый в настоящем документе термин "LC-H<sub>N</sub>" относится к полипептиду BoNT, содержащему протеазный домен, линкерный участок и домен транслокации. Если упоминают LC-H<sub>N</sub> из определенного серотипа BoNT, то используют термин "серотип-LC-H<sub>N</sub>". Например, термин "X-LC-H<sub>N</sub>" означает полипептид LC-H<sub>N</sub> из BoNT/X. Считают, что полипептид LC-H<sub>N</sub> соответствует приблизительно аминокислотам 1-892 из BoNT/X. Граница домена может варьировать в пределах до приблизительно 25 аминокислот. Например, полипептид LC-H<sub>N</sub> может соответствовать приблизительно аминокислотам 1-917 или 1-867 в BoNT/X. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид LC-H<sub>N</sub> может соответствовать аминокислотам 1-893, 1-894, 1-895, 1-896, 1-897, 1-898, 1-899, 1-900, 1-901, 1-902, 1-892, 1-891, 1-890, 1-889, 1-888, 1-887, 1-886, 1-885, 1-884 или 1-883 в BoNT/X.

Используемый в настоящем документе термин "связывающий рецептор домен нейротоксина *Clostridium botulinum* (BoNT)" является синонимичным термину "домен H<sub>C</sub>" и означает любой домен связывания с рецептором встречающегося в природе BoNT, который может осуществлять стадию связывания с клеткой в процессе интоксикации, в том числе, например, связывание BoNT с BoNT-специфической рецепторной системой, расположенной на поверхности плазматической мембраны целевой клетки. Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к доменам связывания с рецептором модифицированного BoNT из серотипа X (BoNT/X). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "домен связывания с рецептором модифицированного BoNT/X" содержит аминокислотные замены в положении, соответствующем C1240 в BoNT/X (SEQ ID NO: 1). Считают, что домен связывания с рецептором или H<sub>C</sub> соответствует приблизительно аминокислотам 893-1306 из BoNT/X. Граница домена может варьировать в пределах до приблизительно 25 аминокислот. Например, домен связывания с рецептором или H<sub>C</sub> может соответствовать аминокислотам 868-1306 или 918-1306. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления домен связывания с рецептором или H<sub>C</sub> может соответствовать аминокислотам 893-1306, 894-1306, 895-1306, 896-1306, 897-1306, 898-1306, 899-1306, 900-1306, 901-1306, 902-1306, 892-1306, 891-1306, 890-1306, 889-1306, 888-1306, 887-1306, 886-1306, 885-1306, 884-1306 или 883-1306 в BoNT/X.

Термин "выделенный" означает материал, который не содержит в варьирующей степени компоненты, обычно сопровождающие его в его нативном состоянии. Термин "выделять" означает степень выделения из оригинального источника или окружения, например из клетки, или из фланкирующей ДНК, или из природного источника ДНК. Термин "очищенный" применяют в отношении вещества, такого как полипептид, которое является "практически чистым" в отношении других компонентов препарата (например, других полипептидов). Он может относиться к полипептиду, который является по меньшей мере приблизительно на 50, 60, 70 или 75%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 85%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на приблизительно 95% чистым в отношении других компонентов. Термины "практически чистый" или "по сути чистый", в отношении полипептида, относятся к препарату, который содержит меньше чем приблизительно 20%, более предпочтительно меньше чем приблизительно 15, 10, 8, 7%, наиболее предпочтительно меньше чем приблизительно 5, 4, 3, 2, 1 или менее чем 1% одного или нескольких других

компонентов (например, других полипептидов или клеточных компонентов).

Термин "мутация по типу замены", без упоминания конкретной аминокислоты, может включать в себя любую аминокислоту, отличную от остатка дикого типа, обычно встречающегося в этом положении. Такие замены могут быть заменены неполярными (гидрофобными) аминокислотами, такими как глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, триптофан и пролин. Замены могут быть заменены полярными (гидрофильными) аминокислотами, такими как серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин. Замены могут быть заменены электрически заряженными аминокислотами, например отрицательно электрически заряженными аминокислотами, такими как аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота, и положительно электрически заряженными аминокислотами, такими как лизин, аргинин и гистидин.

Мутации по типу замены, описываемые в настоящем документе, как правило, будут заменены другим встречающимся в природе аминокислотным остатком, но в некоторых случаях не встречающиеся в природе аминокислотные остатки также могут быть заменены. Неприродные аминокислоты в качестве используемого в настоящем документе термина представляют собой непротеиногенные (т.е. не кодирующие белок) аминокислоты, которые либо имеют природное происхождение, либо синтезированы химическим путем. Примеры включают в себя, без ограничения,  $\beta$ -аминокислоты ( $\beta 3$  и  $\beta 2$ ), гомоаминокислоты, производные пролина и пировиноградной кислоты, производные 3-замещенного аланина, производные глицина, производные замещенного по кольцу фенилаланина и тирозина, аминокислоты с линейным ядром, диаминокислоты, D-аминокислоты и N-метиламинокислоты. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аминокислота может быть замещенной или незамещенной. Замещенная аминокислота или заместитель могут быть галогенированной ароматической или алифатической аминокислотой, галогенированной алифатической или ароматической модификацией в гидрофобной боковой цепи или алифатической или ароматической модификацией.

Термин "процент идентичности" двух аминокислотных последовательностей определяют с использованием алгоритма Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-68, 1990, модифицированного, как в Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-77, 1993. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST (версии 2.0) Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Поиски белков BLAST могут быть выполнены с программой XBLAST, балл = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных представляющим интерес белковым молекулам. Если имеются гэпы между двумя последовательностями, может быть использована Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST могут быть использованы параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

Следовательно, в некоторых аспектах настоящего раскрытия представлены выделенные полипептиды BoNT. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный полипептид BoNT является полипептидом BoNT/X полной длины. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный полипептид BoNT содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный полипептид BoNT/X содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью по отношению к SEQ ID NO: 1. Например, выделенный полипептид BoNT может содержать аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью по отношению к SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный полипептид BoNT содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 100% идентичностью по отношению к SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный полипептид BoNT состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный полипептид BoNT представляет собой полипептид X-LC-H<sub>N</sub>. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный полипептид BoNT содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный полипептид BoNT содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью по отношению к SEQ ID NO: 2. Например, выделенный полипептид BoNT может содержать аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью по отношению к SEQ ID NO: 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный полипептид BoNT содержит аминокислотную последователь-

ность, которая характеризуется 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 100% идентичностью по отношению к SEQ ID NO: 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный полипептид BoNT состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный полипептид BoNT представляет собой полипептид X-LC. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный полипептид BoNT содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный полипептид BoNT содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью по отношению к SEQ ID NO: 3. Например, выделенный полипептид BoNT может содержать аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью по отношению к SEQ ID NO: 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный полипептид BoNT содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 100% идентичностью по отношению к SEQ ID NO: 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный полипептид BoNT состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

Полипептид X-LC может быть введен отдельно в клетки, где желательно расщепление субстрата BoNT (например, белка SNARE) для исследовательской или терапевтической цели, любыми известными в уровне техники методиками экспрессии экзогенного белка, например трансфекцией кодирующей LC последовательности непосредственно в клетки, с помощью лентивирусных векторов, с помощью AAV векторов или слияния X-LC с проникающими в клетку пептидами.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептиды BoNT в соответствии с настоящим раскрытием представляют собой BoNT/X полной длины, содержащий протеазный домен (LC), линкерный участок, домен транслокации ( $H_N$ ) и домен связывания с рецептором ( $H_C$ ), при этом линкерный участок располагается между протеазным доменом и доменом транслокации. Подобно другим BoNT BoNT/X изначально продуцируется как один полипептид и активируется путем расщепления линкерного участка между LC и  $H_N$  либо бактериальными протеазами, либо протеазами хозяина. Этот процесс известен как "активация" и необходим для активности BoNT/X после расщепления, при этом LC и  $H_N$  остаются соединенными межцепочечной дисульфидной связью до транслокации LC в цитозоль клеток, где дисульфидная связь восстанавливается для высвобождения LC в цитозоль. BoNT/X содержит два цистеина, которые являются консервативными по сравнению с другими BoNT, C423 и C467. Интересно, что BoNT/X также содержит дополнительный цистеин (C461), который является уникальным для BoNT/X. Образование межцепочечной дисульфидной связи (C423-C461 или C423-C467) необходимо для активности BoNT/X.

В дополнение к цистеинам в линкерном участке домен связывания с рецептором BoNT содержит другой цистеин, C1240, который также может формировать межмолекулярные дисульфидные связи с другими цистеинами в BoNT/X. Эти межмолекулярные дисульфидные связи вызывают агрегацию BoNT/X и дестабилизируют белок (фиг. 4B). Замещение цистеинов, которые не являются необходимыми для активности BoNT/X, могут давать полипептиды BoNT/X с повышенной стабильностью.

Следовательно, в некоторых аспектах настоящего раскрытия представлен модифицированный полипептид BoNT/X, содержащий одну или несколько мутаций по типу замены в C461, C467 или C1240, который является более стабильным, чем BoNT/X дикого типа, и обладает сопоставимыми активностями. Цистеины могут быть заменены любыми аминокислотами, которые аннулируют формирование дисульфидных связей. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления цистеины заменяют серином (S) или аланином (A). Возможными комбинациями мутаций по типу замены, которые могут присутствовать в модифицированных BoNT в соответствии с настоящим раскрытием, являются, без ограничения, C461S, C461A, C467S, C467A, C1240S, C1240A, C461S/C1240S, C461A/C1240S, C461S/C1240A, C467A/C1240A, C467S/C1240S, C467A/C1240S, C467S/C1240A и C467A/C1240A. Знак "/" указывает на двойные мутации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид BoNT/X в соответствии с настоящим раскрытием содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 4-17. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид BoNT/X содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 4-17, и не имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1. Например, модифицированный полипептид BoNT/X может содержать аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 4-17, и не имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1. В

соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид BoNT/X содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 100% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 4-17, и не имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид BoNT/X состоит из аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO:4-17.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид BoNT в соответствии с настоящим раскрытием представляет собой модифицированный полипептид BoNT/X-LC-H<sub>N</sub>, содержащий мутации по типу замены, описываемые в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный BoNT/X-LC-H<sub>N</sub> содержит одну однократную мутацию по типу замены в положении, соответствующем C461 или C467 в SEQ ID NO: 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный BoNT/X-LC-H<sub>N</sub> содержит одну однократную мутацию по типу замены, соответствующую C461A, C461S, C467A или C467S в SEQ ID NO: 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид BoNT/X в соответствии с настоящим раскрытием содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 18-21. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид BoNT/X-LC-H<sub>N</sub> содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 18-21, и не имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2. Например, модифицированный полипептид BoNT/X-LC-H<sub>N</sub> может содержать аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 18-21, и не имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид BoNT/X-LC-H<sub>N</sub> содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 100% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 18-21, и не имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный полипептид BoNT/X-LC-H<sub>N</sub> состоит из аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 18-21.

Модифицированный полипептид BoNT, содержащий одну или несколько мутаций по типу замены (например, в C461, C467 или C1240), описываемый в настоящем документе, не формирует межмолекулярные дисульфидные связи, которые вызывают агрегацию белка, и поэтому является более стабильным, чем соответствующие ему белки дикого типа. Активность полипептидов BoNT не нарушается мутациями по типу замены в цистеинах. Таким образом, модифицированный BoNT/X может быть более подходящим для терапевтического применения, чем BoNT/X дикого типа, благодаря его повышенной стабильности.

В других аспектах настоящего раскрытия представлены химерные BoNT, содержащие BoNT/X-LC-H<sub>N</sub>, описываемые в настоящем документе, и домен связывания с рецептором (H<sub>C</sub>) из другого BoNT. Например, домен связывания с рецептором может быть из любого из BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/E, BoNT/F и BoNT/G. Таким образом, химерные BoNT, описываемые в настоящем документе, включают в себя BoNT/X-LC-H<sub>N</sub>-A-H<sub>C</sub>, BoNT/X-LC-H<sub>N</sub>-B-H<sub>C</sub>, BoNT/X-LC-H<sub>N</sub>-C-H<sub>C</sub>, BoNT/X-LC-H<sub>N</sub>-D-H<sub>C</sub>, BoNT/X-LC-H<sub>N</sub>-E-H<sub>C</sub>, BoNT/X-LC-H<sub>N</sub>-F-H<sub>C</sub> и BoNT/X-LC-H<sub>N</sub>-G-H<sub>C</sub>. Следует учитывать, что домен H<sub>C</sub> любых подтипов семи известных серотипов (например, A, B, C, D, E, F или G) является подходящим для химерного токсина. Упоминание BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F или BoNT/G охватывает все подтипы. Например, BoNT/A имеет восемь подтипов, BoNT/A1, BoNT/A2, BoNT/A3, BoNT/A4, BoNT/A5, BoNT/A6, BoNT/A7 или BoNT8, а H<sub>C</sub> любого из этих подтипов BoNT/A является подходящим для применения в химерном BoNT в соответствии с настоящим раскрытием. Подобным образом, H<sub>C</sub> любого из восьми подтипов BoNT/B, т.е. BoNT/B1, BoNT/B2, BoNT/B3, BoNT/B4, BoNT/B5, BoNT/B6, BoNT/B7 или BoNT/B8, является подходящим для применения в химерном BoNT в соответствии с настоящим раскрытием.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представлены BoNT/X-LC-H<sub>N</sub>-A1-H<sub>C</sub> (SEQ ID NO: 22), BoNT/X-LC-H<sub>N</sub>-B1-H<sub>C</sub> (SEQ ID NO: 23) и BoNT/X-LC-H<sub>N</sub>-C1-H<sub>C</sub> (SEQ ID NO: 24). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный полипептид BoNT содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 22-24. Например, химерный полипептид BoNT может содержать аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью по отношению

к любой под SEQ ID NO: 22-24. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный полипептид BoNT содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 100% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 22-24. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный полипептид BoNT состоит из аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 22-24.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный BoNT в соответствии с настоящим раскрытием включает в себя модифицированный BoNT/X-LC-H<sub>N</sub>, содержащий мутацию по типу замены в линкерном участке, например, в положении, соответствующем C461 или C467 из SEQ ID NO: 2. Например, BoNT/X-LC-H<sub>N</sub> в химерном BoNT может содержать мутацию по типу замены, соответствующую C461A, C467A, C461S или C467S в SEQ ID NO: 2. Например, химерный полипептид BoNT в соответствии с настоящим раскрытием может содержать аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 25-30. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный полипептид BoNT содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 25-30. Например, химерный полипептид BoNT может содержать аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 25-30. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный полипептид BoNT содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 100% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 25-30. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный полипептид BoNT состоит из аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 25-30.

Для создания химерных токсинов, например токсина BoNT/X-LC-H<sub>N</sub>-A1-H<sub>C</sub>, фрагмент X-LC-H<sub>N</sub>, содержащий аминокислоту приблизительно 1-892 (SEQ ID NO: 2), сливают с доменом связывания с рецептором любого из BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F и BoNT/G. Домены связывания с рецептором других BoNT соответствовали аминокислотам приблизительно 860-1291 в BoNT/B1. Следует учитывать, что граница фрагмента X-LC-H<sub>N</sub> и/или доменов связывания с рецептором может варьировать на 1-25 аминокислот. Например, фрагмент X-LC-H<sub>N</sub>, который может быть использован для химерного токсина, может содержать аминокислоты 1-917 или 1-867 BoNT/X. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фрагмент X-LC-H<sub>N</sub>, который может быть использован для химерного токсина, может содержать аминокислоты 1-893, 1-894, 1-895, 1-896, 1-897, 1-898, 1-899, 1-900, 1-901, 1-902, 1-892, 1-891, 1-890, 1-889, 1-888, 1-887, 1-886, 1-885, 1-884 или 1-883 BoNT/X. Подобным образом, домен связывания с рецептором, который может быть использован для химерного токсина, может содержать аминокислоту, соответствующую 885-1291 или 835-1291 BoNT/X. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления домен связывания с рецептором, который может быть использован для химерного токсина, может содержать аминокислоту, соответствующую 860-1291, 861-1291, 862-1291, 863-1291, 864-1291, 865-1291, 866-1291, 867-1291, 868-1291, 869-1291, 870-1291, 860-1291, 859-1291, 858-1291, 857-1291, 856-1291, 855-1291, 854-1291, 853-1291, 852-1291 или 851-1291 BoNT/B. Специалист в данной области сможет идентифицировать домены, которые могут быть использованы для химерного токсина в соответствии с настоящим раскрытием, на основании своих знаний в области гомологии белков, с помощью программного обеспечения выравнивания последовательностей или без такового. Способы слияния фрагментов являются стандартными рекомбинантными методиками, которые хорошо известны специалисту в данной области.

Далее в настоящем документе описываются модифицированные полипептиды BoNT/X, содержащие модифицированный линкерный участок, при этом линкерный участок содержит специфический сайт расщепления протеазой. Используемый в настоящем документе термин "специфический сайт расщепления протеазой" относится к сайту распознавания и расщепления для специфической протеазы, в отличие от последовательности, которая распознается и расщепляется более чем одной неспецифической протеазой. Такие специфические протеазы включают в себя без ограничения тромбин, TEV, PreScission, фактор Ха, MMP-12, MMP-13, MMP-17, MMP-20, гранзим-В и энтерокиназу. Сайт расщепления специфических протеаз может быть добавлен в линкерный участок полипептида BoNT/X путем вставки или замены имеющихся аминокислот в линкерном участке (например, замены аминокислот 424-460 в полипептиде BoNT/X). Также представлены последовательности специфических сайтов расщепления протеазой: LVPR|GS (тромбин, SEQ ID NO: 50), ENLYFQ|G (TEV, SEQ ID NO: 51), LEVLFQ|GP (PreScission, SEQ ID NO: 52), IEGR| или IDGR| (фактор Ха, SEQ ID NO: 53 или 54), DDDDK| (энтерокиназа, SEQ ID NO: 55) и AHREQIGG| (протеаза SUMO, SEQ ID NO: 56). Знак "|" указывает, где происходит расщепление.

В других аспектах настоящего раскрытия представлена функциональная характеристика полипептидов BoNT/X. Полипептиды BoNT/X, модифицированные полипептиды BoNT/X и химерные полипептиды BoNT в соответствии с настоящим раскрытием могут связываться с целевыми клетками и прони-

кату в них, например в нейроны, и расщеплять свои субстратные белки, например белки SNARE. Используемый в настоящем документе термин "белки SNARE" относится к рецепторам SNAP (растворимого связанного с NSF белка), которые представляют собой крупное надсемейство белков, состоящих более чем из 60 представителей в клетках дрожжей и млекопитающих. Главная роль белков SNARE заключается в опосредовании слияния везикул, т.е. слияния везикул с их связанными с целевой мембраной компартаментами (такими как лизосома). Наиболее изученными белками SNARE являются те, которые обеспечивают стыковку синаптических везикул с пресинаптической мембраной в нейронах, например SNAP-25, VAMP1, VAMP2, VAMP3, VAMP4, VAMP5, VAMP7, VAMP8, синтаксин 1 и Ykt6. Некоторые из этих белков SNARE являются субстратами BoNT. Например, показали, что VAMP1, VAMP2, VAMP3, SNAP-25 и синтаксин 1 расщепляются известными BoNT, например BoNT/A и BoNT/B.

В настоящем документе представлены данные, демонстрирующие, что BoNT/X расщепляет белки SNARE, которые являются известными субстратами BoNT. Одним удивительным открытием настоящего изобретения является то, что BoNT/X способен расщеплять некоторые белки SNARE, которые другие BoNT расщеплять не способны, например VAMP4, VAMP5 и Ykt6. VAMP4 широко экспрессируется и, как известно, опосредует везикулярное слияние между сетью транс-Гольджи (TGN) и эндосомами, а также гомотипичное слияние эндосом. Традиционно известно, что BoNT ограничены целевыми SNARE, которые опосредуют экзоцитоз везикул на плазматических мембранах. BoNT/X - это первый BoNT, способный расщеплять SNARE, опосредующий события слияния других типов внутри клеток, в которых отсутствует плазматическая мембрана по определению. VAMP4 также может вносить вклад в асинхронный экзоцитоз синаптических везикул, экзоцитоз ростосом и зависимый от активности объемный эндоцитоз (ADBE) в нейронах. Кроме того, VAMP4 участвует в высвобождении гранул в иммунных клетках. Таким образом, BoNT/X может обладать уникальным потенциалом среди всех BoNT для модуляции воспалительной секреции в иммунных клетках, которая может использоваться терапевтически. VAMP5 в основном экспрессируется в мышцах, и его функция еще не установлена. BoNT/X станет уникальным инструментом для исследования функции VAMP4 и VAMP5. Ykt6 функционирует в эндоплазматическом ретикулуме для транспорта Гольджи. Он также функционирует в ранней/рециклинговой эндосоме в транспорте TGN. Идентификация Ykt6 в качестве субстрата полипептидов BoNT, описываемых в настоящем документе, является важной, поскольку она открывает новое терапевтическое применение для блокирования секреции в широком диапазоне клеток с помощью BoNT.

Другое неожиданное открытие настоящего изобретения заключается в том, что BoNT/X расщепляет белки SNARE по новому сайту, который ранее не был описан. Как показано в примерах и графических материалах настоящего изобретения, BoNT/X расщепляет между аминокислотами R66-S67 в VAMP1, VAMP2 и VAMP3. R66-A67 является новым сайтом расщепления, отличным от установленных целевых сайтов для всех других BoNT (фиг. 2F). Это также единственный сайт расщепления BoNT, расположенный в области, ранее известной как мотив SNARE (фиг. 2F).

Следовательно, полипептиды BoNT в соответствии с настоящим раскрытием имеют расширенный профиль целевых клеток и субстратов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT расщепляет белок SNARE в клетке. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT расщепляет белок SNARE, выбранный из группы, состоящей из SNAP-25, VAMP1, VAMP2, VAMP3, VAMP4, VAMP5, Ykt6 и синтаксина 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT расщепляет VAMP1 (SEQ ID NO: 39). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT расщепляет VAMP1 между аминокислотными остатками, соответствующими R66 и A67 в SEQ ID NO: 39. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT расщепляет VAMP2 (SEQ ID NO: 40). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT расщепляет VAMP2 между аминокислотными остатками, соответствующими R66 и A67 в SEQ ID NO: 40. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT расщепляет VAMP3 (SEQ ID NO: 31). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT расщепляет VAMP3 между аминокислотными остатками, соответствующими R66 и A67 в SEQ ID NO: 41. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT расщепляет VAMP4 (SEQ ID NO: 42). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT расщепляет VAMP4 между аминокислотными остатками, соответствующими K87 и S88 в SEQ ID NO: 42. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT расщепляет VAMP5 (SEQ ID NO: 43). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT расщепляет VAMP5 между аминокислотными остатками, соответствующими R40 и S41 в SEQ ID NO: 43. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT расщепляет Ykt6 (SEQ ID NO: 44). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT расщепляет Ykt6 между аминокислотными остатками, соответствующими K173 и S174 в SEQ ID NO: 44.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT в соответствии с настоящим раскрытием расщепляет белок SNARE в целевой клетке. Используемый в настоящем документе термин "целевая клетка" означает клетку, которая является встречающейся в природе клеткой, в которую BoNT может проникать или которую может интоксигировать. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целевая клетка представляет собой секреторную клетку, например, нейрон или секретор-

ную иммунную клетку. Примеры нейронов, которые могут быть BoNT целевыми клетками, включают в себя, без ограничения, двигательные нейроны; сенсорные нейроны; автономные нейроны; такие как, например, симпатические нейроны и парасимпатические нейроны; непептидергические нейроны, такие как, например, холинергические нейроны, адренергические нейроны, норадренергические нейроны, серотонергические нейроны, ГАВА-эргические нейроны и пептидергические нейроны, такие как, например, нейроны субстанции P, нейроны генетически родственного кальцитонину пептида, нейроны вазоактивного пептида кишечника, нейроны нейропептида Y, нейроны холецистокинина.

Полипептид BoNT в соответствии с настоящим раскрытием, например BoNT/X или модифицированный полипептид BoNT/X, способен нацеливаться на другие типы секреторных клеток, отличных от нейронов, благодаря своей способности расщеплять VAMP4 или Ykt6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления секреторной клеткой, на которую нацеливается полипептид BoNT, является секреторная иммунная клетка. Используемый в настоящем документе термин "секреторная иммунная клетка" относится к иммунным клеткам, которые секретируют цитокины, хемокины или антитела. Такие секреторные иммунные клетки могут быть врожденными иммунными клетками, в том числе, без ограничения, натуральными клетками-киллерами, тучными клетками, эозинофилами, базофилами, макрофагами, нейтрофилами и дендритными клетками. На секреторные иммунные клетки, которые секретируют антитела (например, белые клетки крови), также могут нацеливаться полипептиды BoNT в соответствии с настоящим раскрытием. Неограничивающие примеры секретирующих антитела клеток включают в себя, без ограничения, В-клетки плазмы, плазмциты, плазмациты и эффекторные В-клетки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целевая клетка представляет собой культивируемую клетку, например культивируемый нейрон или культивируемую секреторную иммунную клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целевая клетка находится *in vivo*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целевая клетка является клеткой млекопитающего. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления млекопитающее представляет собой человека. В соответствии с вариантами осуществления млекопитающее представляет собой грызуна, например мышь или крысу.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT подавляет нейрональную активность. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT модулирует иммунный ответ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT индуцирует атрофический паралич. Термин "атрофический паралич" относится к клиническому проявлению, характеризующемуся слабостью или параличом и пониженным мышечным тонусом без другой очевидной причины (например, травмы).

В других аспектах настоящего раскрытия представлены модифицированные полипептиды BoNT/X, содержащие неактивный протеазный домен. Такие полипептиды BoNT/X (также называемые в настоящем документе "неактивными BoNT/X") могут проникать в целевые клетки, но не могут расщеплять субстратные белки (например, белок SNARE) из-за неактивности протеазного домена. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления неактивный BoNT/X представляет собой фрагмент X-LC-N<sub>N</sub>, содержащий а) неактивный протеазный домен; б) линкерный участок и с) домен транслокации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления неактивный BoNT/X представляет собой полипептид BoNT/X полной длины, содержащий а) неактивный протеазный домен; б) линкерный участок; с) домен транслокации и д) домен связывания с рецептором. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления неактивный протеазный домен содержит одну или несколько мутаций по типу замены в положении, соответствующем R360, Y363, H227, E228 или H231 в SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одна или несколько мутаций по типу замены соответствуют R360A/Y363F, H227Y, E228Q или H231Y в SEQ ID NO: 1. Следует учитывать, что неактивный полипептид BoNT/X может содержать любую мутацию(и), которая инактивирует протеазный домен.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления неактивный полипептид BoNT/X содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 31-38. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления неактивный полипептид BoNT/X содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 31-38. Например, неактивный полипептид BoNT/X может содержать аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 31-38. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления неактивный полипептид BoNT/X содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 100% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 31-38. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления неактивный полипептид BoNT/X состоит из аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 31-38.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления неактивный BoNT/X (например, неактив-

ный X-LC-H<sub>N</sub> или неактивный VoNT/X полной длины) дополнительно содержит мутации в линкерном участке. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модификация в линкерном участке содержит одну однократную мутацию по типу замены в положении, соответствующем C461 или C467 из SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления однократная мутация по типу замены соответствует C461A, C461S, C467A или C467S в SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления неактивный VoNT/X (например, неактивный VoNT/X полной длины) дополнительно содержит модификацию в домене связывания с рецептором. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модификация в домене связывания с рецептором содержит мутацию по типу замены в положении, соответствующем C1240 в SEQ ID NO: 1.

Также предполагается, что модифицированный полипептид VoNT/X, содержащий неактивный протеазный домен, описываемый в настоящем документе, может быть использован в качестве инструмента доставки в целевые клетки (например, нейроны) у людей. Например, модифицированный VoNT/X может быть связан с другими терапевтическими средствами, ковалентно или нековалентно, и действует как нацеливающаяся среда-носитель для доставки терапевтических средств в целевые клетки у людей.

Таким образом, другой аспект настоящего раскрытия относится к химерной молекуле полипептида, содержащей первую часть, которая представляет собой неактивный VoNT/X, содержащий одну или несколько мутаций по типу замены, которые инактивируют протеазный домен, связанный со второй частью. Вторая часть молекулы может быть биоактивной молекулой, такой как терапевтическое средство (например, полипептид или отличное от полипептида лекарственное средство). Связывание первой и второй частей молекулы может быть ковалентным (например, в форме белка слияния) или нековалентным. Способы такого связывания известны в уровне техники и могут быть без труда применены специалистом в данной области. Если вторая часть химерной молекулы является полипептидом и химерная молекула имеет форму белка, то обеспечиваются нуклеиновые кислоты и векторы нуклеиновой кислоты, кодирующие такие химерные молекулы.

Также представлены клетки, содержащие нуклеиновые кислоты или векторы нуклеиновой кислоты, и клетки, экспрессирующие такие химерные молекулы. Химерные молекулы в форме белка слияния могут быть экспрессированы и выделены с использованием способов, раскрываемых в настоящем документе.

Модифицированные полипептиды VoNT/X, химерные полипептиды VoNT или химерные молекулы, содержащие вторую часть, которая является полипептидом в соответствии с настоящим раскрытием (например, без ограничения, полипептидами, содержащими аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-38), как правило, будут продуцироваться путем экспрессии рекомбинантных нуклеиновых кислот в соответствующих клетках (например, в *E. coli* или клетках насекомых) и выделяться. Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, описываемые в настоящем документе, могут быть получены, и нуклеотидная последовательность нуклеиновых кислот может быть определена любым способом, известным в уровне техники.

Кроме того, в настоящем документе представлены выделенные и/или рекомбинантные нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из полипептидов VoNT, раскрываемых в настоящем документе. Нуклеиновые кислоты, кодирующие выделенные полипептидные фрагменты в соответствии с настоящим раскрытием, могут представлять собой ДНК или РНК, двуниевую или из одной нити. Согласно некоторым аспектам рассматриваемые нуклеиновые кислоты, кодирующие выделенные полипептидные фрагменты, как далее будет понятно, включают в себя нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, которые являются вариантами любого из модифицированных полипептидов VoNT, описываемых в настоящем документе.

Вариантные нуклеотидные последовательности включают в себя последовательности, которые отличаются одной или несколькими нуклеотидными заменами, добавлениями или делециями, такие как аллельные варианты. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим раскрытием содержат полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 1-38. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим раскрытием содержат полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая характеризуется 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью по отношению к любой под SEQ ID NO: 1-38.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуклеиновая кислота содержится в векторе, таком как вектор экспрессии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор содержит промотор, функционально связанный с нуклеиновой кислотой.

Ряд промоторов может быть использован для экспрессии полипептидов, описываемых в настоящем

документе, в том числе без ограничения, промежуточный ранний промотор цитомегаловируса (CMV), вирусный LTR, такой как LTR вируса саркомы Рауса, HIV-LTR, LTR HTLV-1, ранний промотор вируса обезьяны 40 (SV40), промотор *E. coli lac UV5* и промотор вируса простого герпеса tk. Также могут быть использованы регулируемые промоторы. Такие регулируемые промоторы включают в себя промоторы, использующие репрессор *lac* из *E. coli* в качестве модулятора транскрипции для регуляции транскрипции из промоторов несущих оператор *lac* клеток млекопитающих [Brown, M. et al., *Cell*, 49:603-612 (1987)], промоторы, использующие тетрациклиновый репрессор (*tetR*) [Gossen, M., and Bujard, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551 (1992); Yao, F. et al., *Human Gene Therapy*, 9:1939-1950 (1998); Shockelt, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:6522-6526 (1995)].

Другие системы включают в себя FK506 димер, VP16 или p65, использующий астрадиол, RU486, дифенолмурислерон или рапамицин. Индуцибельные системы доступны от Invitrogen, Clontech и Ariad. Могут быть использованы индуцибельные промоторы, которые включают в себя репрессор с опероном. Согласно одному варианту осуществления репрессор *lac* из *Escherichia coli* может функционировать как транскрипционный модулятор для регулирования транскрипции из промоторов несущих оператор *lac* клеток млекопитающих [M. Brown et al., *Cell*, 49:603-612 (1987)]; Gossen и Bujard (1992) [M. Gossen et al., *Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992)] объединили тетрациклиновый репрессор (*tetR*) с активатором транскрипции (VP 16) для создания белка слияния *tetR*-активатора транскрипции клеток млекопитающих, tTa (*tetR*-VP 16), с несущим *tetO* минимальным промотором, полученным из главного немедленно-раннего промотора цитомегаловируса человека (HCMV), с созданием операторной системы *tetR*-*tet* для контроля экспрессии генов в клетках млекопитающих. Согласно одному варианту осуществления применяют тетрациклин-индуцибельный переключатель (Yao et al., *Human Gene Therapy*; Gossen et al., *Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992); Shockett et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:6522-6526 (1995)).

Кроме того, вектор может содержать, например, некоторое или все из следующего: селективируемый маркерный ген, такой как ген неомидина для отбора стабильных или транзитных трансфектантов в клетках млекопитающих; энхансерные/промоторные последовательности из немедленно-раннего гена CMV человека для высоких уровней транскрипции; терминация транскрипции и сигналы процессинга РНК из SV40 для стабильности mRNA; начала репликации полиомы SV40 и ColE1 для надлежащей эпизомальной репликации; внутренние сайты связывания с рибосомой (IRES), изменчивые сайты множественного клонирования; а также промоторы T7 и SP6 РНК для *in vitro* транскрипции смысловой и антисмысловой РНК. Подходящие векторы и способы получения векторов, содержащих трансгены, хорошо известны и доступны в уровне техники.

Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, может быть перенесен в клетку-хозяина традиционными методиками (например, электропорацией, липосомальной трансфекцией и осаждением фосфатом кальция), а затем трансфицированные клетки культивируют традиционными методиками для получения полипептидов, описываемых в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления экспрессия полипептидов, описываемых в настоящем документе, регулируется конститутивным, индуцибельным или тканеспецифическим промотором.

Клетками-хозяевами, применяемыми для экспрессии выделенных полипептидов, описываемых в настоящем документе, могут быть либо бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или предпочтительно эукариотические клетки. В частности, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как элемент главного промотора немедленно-раннего гена из цитомегаловируса человека, является эффективной экспрессионной системой для иммуноглобулинов (Foecking et al. (1986), "Powerful And Versatile Enhancer-Promoter Unit For Mammalian Expression Vectors", *Gene*, 45:101-106; Cockett et al. (1990), "High Level Expression Of Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases In Chinese Hamster Ovary Cells Using Glutamine Synthetase Gene Amplification", *Biotechnology*, 8:662-667). Ряд систем-хозяев векторов экспрессии может быть использован для экспрессии выделенных полипептидов, описываемых в настоящем документе. Такие экспрессионные системы-хозяева представляют среды-носители, с помощью которых кодирующие последовательности выделенных полипептидов, описываемых в настоящем документе, могут быть получены, а затем очищены, а также представляют клетки, которые при трансформации или трансфекции подходящими нуклеотидными кодирующими последовательностями могут экспрессировать выделенные полипептиды, описываемые в настоящем документе *in situ*. Они включают в себя, без ограничения, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные векторами экспрессии рекомбинантной бактериофаговой ДНК, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими кодирующие последовательности для выделенных полипептидов, описываемых в настоящем документе; дрожжи (например, *Saccharomyces pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми векторами экспрессии, содержащими последовательности, кодирующие выделенные полипептиды, описываемые в настоящем документе; системы клеток насекомых, инфицированных рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирными), содержащими последовательности, кодирующие выделенные полипептиды, описываемые в настоящем документе; системы растительных клеток, инфицированных рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вируса мозаики цветной капусты (CaMV) и вируса табачной мозаики (TMV) или трансформированные рекомбинантными плазмидными

векторами экспрессии (например, Ti плазмидными), содержащими последовательности, кодирующие выделенные полипептиды, описываемые в настоящем документе; или системы клеток млекопитающих (например, клетки COS, CHO, ВНК, 293, 293Т, 3Т3, лимфатические клетки (см. патент США № 5807715), клетки Per C.6 (клетки сетчатки человека, разработанные Cuscell), содержащие рекомбинантные экспрессионные конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, металлотионеиновый промотор) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор 7.5K вируса осповакцины).

В бактериальных системах ряд векторов экспрессии может быть успешно подобран в зависимости от применения, предназначенного для полипептидов, подлежащих экспрессии. Например, если требуется получение большого количества такого белка, то для создания фармацевтических композиций полипептидов, описываемых в настоящем документе, могут быть желательны векторы, которые направлены на экспрессию высоких уровней продуктов белков слияния, которые легко очищаются. Такие векторы включают в себя, без ограничения, вектор экспрессии pUR278 *E. coli* (Rüther et al. (1983), "Easy Identification Of cDNA Clones", *EMBO J.* 2:1791-1794), в котором кодирующая последовательность может быть лигирована индивидуально в вектор в рамке с кодирующей областью *lac Z* так, что получается белок слияния; векторы pIN (Inouye et al. (1985), "Up-Promoter Mutations In The *lpp* Gene Of *Escherichia Coli*", *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3110; Van Heeke et al. (1989), "Expression Of Human Asparagine Synthetase In *Escherichia Coli*", *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509) и т.п. Векторы pGEX также могут быть использованы для экспрессии чужеродных полипептидов в качестве белков слияния с глутатино-S-трансферазой (GST). Как правило, такие белки слияния являются растворимыми и могут быть легко очищены из лизированных клеток путем адсорбции и связывания с матричными глутатион-агарозными гранулами с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона.

Векторы pGEX разработаны с включением сайтов расщепления протеазой тромбином или фактором Ха так, что продукт клонированного целевого гена может быть высвобожден из фрагмента GST. В системе насекомых используют вирус множественного ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV) в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Вирус растет в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодирующая последовательность может быть клонирована индивидуально во второстепенные области (например, ген полигедрина) вируса и помещена под контроль промотора AcNPV (например, полигедринового промотора).

В клетках-хозяевах млекопитающих может быть использован ряд основанных на вирусе экспрессионных систем. В случаях применения аденовируса в качестве вектора экспрессии представляющая интерес кодирующая последовательность может быть лигирована в комплекс контроля транскрипции/трансляции аденовируса, например поздний промотор и трехкомпонентная лидерная последовательность. Этот химерный ген затем может быть вставлен в геном аденовируса с помощью *in vitro* или *in vivo* рекомбинации. Вставка во второстепенную область вирусного генома (например, область E1 или E3) даст в результате рекомбинантный вирус, который является жизнеспособным и способным экспрессировать молекулу иммуноглобулина в инфицированных хозяевах (см., например, Logan et al. (1984), "Adenovirus Tripartite Leader Sequence Enhances Translation Of mRNAs Late After Infection", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3655-3659). Специфические сигналы инициации также могут быть необходимы для эффективной трансляции вставленных кодирующих антитела последовательностей. Эти сигналы включают в себя ATG иницирующий кодон и соседние последовательности. Кроме того, иницирующий кодон должен быть в фазе с рамкой считывания желательной кодирующей последовательности для обеспечения трансляции всей вставки. Эти экзогенные сигналы трансляционного контроля и иницирующие кодоны могут быть разного происхождения, как природными, так и синтетическими.

Эффективность экспрессии может быть усилена путем включения подходящих транскрипционных энхансерных элементов, терминаторов транскрипции и т.п. (см. Bitter et al. (1987), "Expression And Secretion Vectors For Yeast", *Methods in Enzymol.* 153:516-544). Кроме того, может быть выбран штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию вставленных последовательностей или модифицирует и процессирует генный продукт определенным желаемым образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессирование (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важны для функции белка. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептиды, описываемые в настоящем документе, могут быть экспрессированы как один генный продукт (например, как одна полипептидная цепь, т.е. как полипротеиновый предшественник), требующий протеолитического расщепления нативными или рекомбинантными клеточными механизмами для формирования отдельных полипептидов, описываемых в настоящем документе.

Настоящее раскрытие, таким образом, охватывает конструирование последовательности нуклеиновой кислоты для кодирования молекулы полипротеинового предшественника, содержащей полипептиды, описываемые в настоящем документе, которая включает в себя кодирующие последовательности, способные управлять посттрансляционным расщеплением указанного полипротеинового предшественника. Посттрансляционное расщепление полипротеинового предшественника дает в результате полипептиды, описываемые в настоящем документе. Посттрансляционное расщепление молекулы предшественника, содержащей полипептиды, описываемые в настоящем документе, может происходить *in vivo* (т.е. в клет-

ке-хозяине с помощью нативных или рекомбинантных клеточных систем/механизмов, например, фуриновое расщепление по соответствующему сайту) или может происходить *in vitro* (например, инкубация указанной полипептидной цепи в композиции, содержащей протеазы или пептидазы известной активности, и/или в композиции, содержащей условия или реагенты, которые, как известно, способствуют желаемому протеолитическому действию).

Очистка и модификация рекомбинантных белков хорошо известны в уровне техники, так что разработка полипротеинового предшественника может предусматривать ряд вариантов осуществления, без труда определяемых специалистом-практиком. Любые известные протеазы или пептидазы, известные в уровне техники, могут быть использованы для описанных модификаций молекулы предшественника, например тромбин или фактор Ха (Nagai et al. (1985), "Oxygen Binding Properties Of Human Mutant Hemoglobins Synthesized In Escherichia Coli", Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82:7252-7255, and reviewed in Jenny et al. (2003), "A Critical Review Of The Methods For Cleavage Of Fusion Proteins With Thrombin And Factor Ха", Protein Expr. Purif. 31:1-11, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте)), энтерокиназа (Collins-Racie et al. (1995), "Production Of Recombinant Bovine Enterokinase Catalytic Subunit In Escherichia Coli Using The Novel Secretory Fusion Partner DsbA", Biotechnology, 13:982-987, тем самым включенная в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте)), фурин и AcTEV (Parks et al. (1994), "Release Of Proteins And Peptides From Fusion Proteins Using A Recombinant Plant Virus Proteinase", Anal. Biochem. 216:413-417, тем самым включенная в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте)), а также протеаза С3 вируса ящура.

Разные клетки-хозяева обладают характерными и специфическими механизмами для посттрансляционного процессирования и модификации белков и генных продуктов. Подходящие клеточные линии или системы хозяев могут быть выбраны для обеспечения корректной модификации и процессирования экспрессируемого чужеродного белка. С этой целью могут быть использованы эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным механизмом для правильного процессирования первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают в себя без ограничения CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, CRL7030 и Hs578Bst.

Для длительного продуцирования с высоким выходом рекомбинантных белков предпочтительна стабильная экспрессия. Например, могут быть сконструированы клеточные линии, которые стабильно экспрессируют полипептиды, описываемые в настоящем документе. Вместо использования векторов экспрессии, которые содержат вирусные начала репликации, клетки-хозяева могут быть трансформированы ДНК, контролируемой соответствующими элементами контроля экспрессии (например, промотором, энхансером, последовательностями, терминаторами транскрипции, сайтами полиаденилирования и т.д.), и селективируемым маркером. После введения чужеродной ДНК можно обеспечить рост сконструированных клеток в течение 1-2 суток в обогащенной среде, а затем переключить на селективную среду. Селективируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость к отбору и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в свои хромосомы и расти с образованием очагов, которые, в свою очередь, могут быть клонированы и размножены в клеточные линии. Этот способ может преимущественно использоваться для конструирования клеточных линий, которые экспрессируют полипептиды, описываемые в настоящем документе. Такие сконструированные клеточные линии могут быть особенно полезны при скрининге и оценке полипептидов, которые прямо или косвенно взаимодействуют с полипептидами, описываемыми в настоящем документе.

Может быть использован ряд систем отбора, в том числе, без ограничения, гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler et al. (1977), "Transfer Of Purified Herpes Virus Thymidine Kinase Gene To Cultured Mouse Cells", Cell, 11:223-232), гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (Szybalska et al. (1992), "Use Of The HPRT Gene And The HAT Selection Technique In DNA-Mediated Transformation Of Mammalian Cells First Steps Toward Developing Hybridoma Techniques And Gene Therapy", Bioessays, 14:495-500) и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy et al. (1980), "Isolation Of Transforming DNA: Cloning The Hamster aprt Gene", Cell, 22:817-823) могут быть использованы в клетках tk<sup>-</sup>, hgprt<sup>-</sup> или aprt<sup>-</sup> соответственно, также может быть использована устойчивость к антиметаболитам в качестве основы отбора для следующих генов: dhfr, который обеспечивает устойчивость к метотрексату (Wigler et al. (1980), "Transformation Of Mammalian Cells With An Amplifiable Dominant-Acting Gene", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:3567-3570; O'Hare et al. (1981), "Transformation Of Mouse Fibroblasts To Methotrexate Resistance By A Recombinant Plasmid Expressing A Prokaryotic Dihydrofolate Reductase", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527-1531); gpt, который обеспечивает устойчивость к микофенольной кислоте (Mulligan et al. (1981), "Selection For Animal Cells That Express The Escherichia coli Gene Coding For Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072-2076); neo, который обеспечивает устойчивость к аминогликозидазе G-418 (Tolstoshev (1993), "Gene Therapy, Concepts, Current Trials And Future Directions", Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan (1993), "The Basic Science Of Gene Therapy", Science, 260:926-932; и Morgan et al. (1993), "Human Gene Therapy", Ann. Rev. Biochem. 62:191-217), и hygro, который обеспечивает устойчивость к гигромицину (Santerre et al. (1984) "Expression Of Prokaryotic Genes For Hygromycin B And G418 Resistance As Dominant-Selection Markers In Mouse L

Cells", *Gene* 30:147-156). Способы, общеизвестные в области технологии рекомбинантной ДНК и которые могут быть использованы, описаны в Ausubel et al. (eds.), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; Krieglger, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY; и в Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin et al. (1981), "A New Dominant Hybrid Selective Marker For Higher Eukaryotic Cells", *J. Mol. Biol.* 150:1-14.

Уровни экспрессии полипептидов, описываемых в настоящем документе, могут быть повышены с помощью амплификации вектора (для обзора см. Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987). Если маркер в векторной системе, экспрессирующей полипептид, описываемый в настоящем документе, является амплифицируемым, то повышение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина, будет повышать число копий маркерного гена. Поскольку амплифицируемая область ассоциирована с нуклеотидной последовательностью полипептида, описываемого в настоящем документе, или с полипептидом, описываемым в настоящем документе, то продуцирование полипептида также повысится (Crouse et al. (1983), "Expression And Amplification Of Engineered Mouse Dihydrofolate Reductase Minigenes", *Mol. Cell. Biol.* 3:257-266).

После того как полипептид, описываемый в настоящем документе, был рекомбинантно экспрессирован, его можно очистить любым способом, известным в уровне техники для очистки полипептидов, полипротеинов или антител (например, аналогично схемам очистки антител на основе антигенной селективности), например, с помощью хроматографии (например, ионообменной, аффинной, особенно с помощью аффинности в отношении специфического антигена (необязательно после отбора белка А, если полипептид содержит Fc домен (или его часть)) и колоночной хроматографии с распределением по размерам), центрифугирования, дифференциальной растворимости или с помощью любой другой стандартной методики для очистки полипептидов или антител. Другие аспекты настоящего раскрытия относятся к клетке, содержащей нуклеиновую кислоту, описываемую в настоящем документе, или вектор, описываемый в настоящем документе.

Клетка может быть прокариотической или эукариотической клеткой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка является клеткой млекопитающего. В настоящем документе описываются типичные виды клеток. Другие аспекты настоящего раскрытия относятся к клетке, экспрессирующей модифицированные полипептиды BoNT, описываемые в настоящем документе. Клетка может быть прокариотической или эукариотической клеткой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка является клеткой млекопитающего. В настоящем документе описываются типичные виды клеток. Клетка может служить для размножения нуклеиновой кислоты или для экспрессии нуклеиновой кислоты, или как для того, так и для другого. Такие клетки включают в себя, без ограничения, прокариотические клетки, в том числе, без ограничения, штаммы аэробных, микроаэрофильных, капнофильных, факультативных, анаэробных, грамотрицательных и грамположительных бактериальных клеток, таких как клетки, что pochodят от, например, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridia perfringens*, *Clostridia difficile*, *Caulobacter crescentus*, *Lactococcus lactis*, *Methylobacterium extorquens*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas fluorescens* и *Salmonella typhimurium*; и эукариотические клетки, в том числе, без ограничения, штаммы дрожжей, такие как, например, те, что происходят от *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia angusta*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Yarrowia lipolytica*; клетки насекомых и клеточные линии, что происходят от насекомых, такие как, например, те, что происходят от *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*, *Drosophila melanogaster* и *Manduca sexta*; и клетки млекопитающих и клеточные линии, что происходят от клеток млекопитающих, такие как, например, те, что происходят от мыши, крысы, хомячка, свиньи, крупного рогатого скота, лошади, примата и человека. Клеточные линии могут быть получены из Американской коллекции типовых культур, Европейской коллекции клеточных культур и Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур. Неограничивающие примеры специальных протоколов для отбора, создания и использования соответствующей клеточной линии описаны, например, в *INSECT CELL CULTURE ENGINEERING* (Mattheus F.A. Goosen et al. eds., Marcel Dekker, 1993); *INSECT CELL CULTURES: FUNDAMENTAL AND APPLIED ASPECTS* (J.M. Vlcek et al. eds., Kluwer Academic Publishers, 1996); Maureen A. Harrison & Ian F. Rae, *GENERAL TECHNIQUES OF CELL CULTURE* (Cambridge University Press, 1997); *CELL AND TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES* (Alan Doyle et al eds., John Wiley and Sons, 1998); R. Ian Freshney, *CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE* (Wiley-Liss, 4.sup.th ed. 2000); *ANIMAL CELL CULTURE: A PRACTICAL APPROACH* (John R.W. Masters ed., Oxford University Press, 3.sup.rd ed. 2000); *MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL*, supra, (2001); *BASIC CELL CULTURE: A PRACTICAL APPROACH* (John M. Davis, Oxford Press, 2.sup.nd ed. 2002); и *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, supra, (2004).

Эти протоколы являются рутинными процедурами в пределах объема знаний специалиста в данной области и из приведенного в настоящем документе описания. Другие аспекты настоящего раскрытия относятся к способу получения полипептида, описываемого в настоящем документе, при этом способ

предусматривает получение клетки, описываемой в настоящем документе, и экспрессию нуклеиновой кислоты, описываемой в настоящем документе, в указанной клетке. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ дополнительно предусматривает выделение и очистку полипептида, описываемого в настоящем документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ботулинический нейротоксин может быть получен путем создания и выращивания культур *Clostridium botulinum* в ферментаторе, а затем сбора и очистки ферментируемой смеси в соответствии с известными процедурами. Все серотипы ботулинического токсина изначально синтезируют в виде неактивных одноцепочечных белков, которые должны быть расщеплены или разорваны протеазами, чтобы стать нейроактивными.

Штаммы бактерий, которые производят серотипы А и G ботулинического токсина, обладают эндогенными протеазами, и поэтому серотипы А и G могут быть извлечены из бактериальных культур преимущественно в их активной форме. Напротив, серотипы С, D и E ботулинического токсина синтезируются непротеолитическими штаммами и поэтому обычно неактивны при извлечении из культуры. Серотипы В и F продуцируются как протеолитическими, так и непротеолитическими штаммами и поэтому могут быть извлечены в активной или неактивной форме. Протеолитические штаммы, которые продуцируют, например, серотип ботулинического токсина типа В, могут расщеплять только часть продуцируемого токсина. В настоящем документе описывается получение полипептидов BoNT/X с использованием этих штаммов.

Точное отношение разорванных и неразорванных молекул зависит от продолжительности инкубации и температуры культуры. Поэтому определенный процент препарата, например ботулинического токсина типа В, может быть неактивным. Согласно одному варианту осуществления нейротоксин в соответствии с настоящим раскрытием находится в активном состоянии. Согласно одному варианту осуществления нейротоксин находится в неактивном состоянии. Согласно одному варианту осуществления предполагается комбинация активного и неактивного нейротоксина.

Один аспект настоящего раскрытия относится к новым способам получения BoNT с помощью *in vitro* реакции транспептидазы, которая лигирует два нетоксичных фрагмента BoNT. Такие способы предусматривают стадии:

(i) получение первого фрагмента BoNT, содержащего легкую цепь (LC) и N-терминальный домен тяжелой цепи ( $H_N$ ), при этом первый фрагмент BoNT содержит C-терминальный мотив LPXTGG (SEQ ID NO: 60);

(ii) получение второго фрагмента BoNT, содержащего C-терминальный домен тяжелой цепи ( $H_C$ ); при этом второй фрагмент BoNT содержит специфический сайт расщепления протеазой на своем N-конце;

(iii) расщепление второго фрагмента BoNT специфической протеазой, при этом расщепление приводит к получению свободного глицинового остатка на N-конце; и

(iv) введение в контакт первого фрагмента BoNT и второго фрагмента BoNT в присутствии транспептидазы, что тем самым лигирует первый фрагмент BoNT и второй фрагмент BoNT с образованием лигированного BoNT.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый фрагмент BoNT содержит полипептид X-LC- $H_N$ , описываемый в настоящем документе, слитый с C-терминальным мотивом LPXTGG (SEQ ID NO: 60) (например, SEQ ID NO: 45), или любые его варианты. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления второй фрагмент BoNT содержит полипептид  $H_C$ , описываемый в настоящем документе, или любые его варианты (например, SEQ ID NO: 46). Следует учитывать, что любые фрагменты BoNT или домены могут быть лигированы с использованием способов, описываемых в настоящем документе.

Способы, описываемые в настоящем документе, также могут быть применены для создания химерных BoNT. Например, первый фрагмент BoNT может быть из серотипа А, В, С, D, E, F, G или X BoNT. Подобным образом, второй фрагмент BoNT может быть из серотипа А, В, С, D, E, F, G или X BoNT. Специалист в данной области сможет определить комбинации, которые могут быть сделаны. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерные полипептиды BoNT, описываемые в настоящем документе (например, BoNT/X-LC- $H_N$ -A1- $H_C$ , BoNT/X-LC- $H_N$ -B1- $H_C$  или BoNT/X-LC- $H_N$ -C1- $H_C$ ) получают с использованием данного способа.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления транспептидаза представляет собой сортазу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сортаза происходит из *Staphylococcus aureus* (SrtA).

Другие системы пептидного лигирования, доступные в уровне техники, также могут быть применены для лигирования двух нетоксичных фрагментов BoNT. Например, опосредованная интенином реакция лигирования белков обеспечивает лигирование синтетического пептида или белка с N-терминальным цистеиновым остатком с C-концом бактериально экспрессируемого белка посредством нативной пептидной связи (Evans et al, (1998), Protein Sci. 7, 2256-2264, Dawson et al., (1994), Science, 266, 776-779; Tam et al., (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 12485-12489, Muir et al., (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 6705-6710; Severinov and Muir (1998), J. Biol. Chem. 273, 16205-16209, полные содержания кото-

рых включены в настоящий документ посредством ссылки). Наборы являются коммерчески доступными (например, от New England Biolabs) для опосредованных интенином реакций лигирования белков.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый фрагмент VoNT дополнительно содержит аффинную метку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аффинная метка сливается с первым фрагментом VoNT на N-конце. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аффинная метка сливается с первым фрагментом VoNT на C-конце. В случае, когда аффинная метка сливается с C-концом первого фрагмента VoNT, транспептидаза расщепляет между T и G в мотиве LPXTGG (SEQ ID NO: 60) и удаляет аффинную метку перед лигированием первого фрагмента VoNT и второго фрагмента VoNT.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления второй фрагмент VoNT дополнительно содержит аффинную метку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аффинная метка сливается с первым фрагментом VoNT на N-конце. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аффинная метка сливается со вторым фрагментом VoNT на C-конце. В случае, когда аффинная метка сливается с N-концом первого фрагмента VoNT, транспептидаза расщепляет по специфическому сайту расщепления протеазой и удаляет аффинную метку перед лигированием первого фрагмента VoNT и второго фрагмента VoNT транспептидазой.

Используемый в настоящем документе термин "аффинная метка" относится к полипептидной последовательности, которая может специфически связываться с веществом или фрагментом, например, метка, состоящая из шести гистидинов, специфически связывается с  $Ni^{2+}$ . Аффинные метки могут быть добавлены к белкам для облегчения их выделения. Аффинные метки, как правило, сливаются с белками с помощью методик рекомбинантной ДНК, известных специалистам в данной области. Применение аффинных меток для облегчения выделения белков также хорошо известно в уровне техники. Подходящие аффинные метки, которые могут быть использованы в соответствии с настоящим раскрытием, включают в себя, без ограничения, His6, GST, Avi, Strep, S, MBP, Sumo, FLAG, HA, Мус, SBP, E, калмодулин, Softag 1, Softag 3, TC, V5, VSV, Xpress, Halo и Fc.

Второй фрагмент VoNT подвергается расщеплению специфической протеазой на N-конце. Расщепление сайта специфической протеазой дает в результате свободный глициновый остаток на N-конце второго фрагмента VoNT. Подходящая специфическая протеаза, которая может быть использована в соответствии с настоящим раскрытием, включает в себя без ограничения тромбин, TEV, PreScission, энтерокиназу и протеазу SUMO. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления специфическая протеаза представляет собой тромбин, а сайтом расщепления является LVPR|GS (SEQ ID NO: 50).

Полипептиды VoNT/X, описываемые в настоящем документе, обладают потенциалом для терапевтического применения. Например, VoNT/X может быть более эффективным по сравнению с другими серотипами VoNT. VoNT/X является более изменчивым и может быть более эффективным в широком диапазоне клеток благодаря его способности расщеплять больше субстратов, чем другие серотипы VoNT.

Таким образом, настоящее раскрытие также охватывает фармацевтические композиции, содержащие полипептиды VoNT/X или химерные молекулы в соответствии с настоящим раскрытием. Как также станет очевидно далее из настоящего раскрытия, фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим раскрытием может дополнительно содержать другие терапевтические средства, подходящие для конкретного заболевания, для лечения которого предназначена такая композиция. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим раскрытием дополнительно содержит фармацевтически приемлемые носители.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или среду-носитель, такие как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное средство, технологическая добавка (например, смазка, тальк, стеарат магния, кальция или цинка, или стеариновая кислота) или материал для инкапсулирования растворителя, участвующие в переносе или транспортировке полипептида от одного участка (например, участка доставки) организма в другой участок (например, орган, ткань или часть организма).

Фармацевтически приемлемый носитель является "приемлемым" в смысле совместимости с другими ингредиентами состава и безвредности для ткани субъекта (например, физиологически совместимый, стерильный, физиологический pH и т.д.). Некоторые примеры материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают в себя (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) смазочные средства, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк; (8) вспомогательные средства, такие как масло какао и суппозиторные воски; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) многоатомные спирты, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль (PEG); (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апирогенную

воду; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) pH буферные растворы; (21) сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; (22) объемобразующие средства, такие как полипептиды и аминокислоты; (23) сывороточный компонент, такой как сывороточный альбумин, HDL и LDL; (22) C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> спирты, такие как этанол; и (23) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах. Увлажняющие средства, красители, средства высвобождения, покрытия, подсластители, ароматизаторы, отдушки, консервант и антиоксиданты также могут присутствовать в составе. Термины, такие как "вспомогательное средство", "носитель", "фармацевтически приемлемый носитель" или подобные, используются в настоящем документе взаимозаменяемо. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT в соответствии с настоящим раскрытием в композиции вводят путем инъекции, посредством катетера, посредством суппозитория или посредством имплантата, при этом имплантат является пористым, непористым или гелеобразным материалом, в том числе мембраной, такой как силиконовая (sialastic) мембрана, или волокном.

Как правило, при введении композиции применяют материалы, которые не абсорбируют полипептид в соответствии с настоящим раскрытием. В соответствии с другими вариантами осуществления полипептиды BoNT в соответствии с настоящим раскрытием доставляют в системе контролируемого высвобождения. Такие композиции и способы введения представлены в публикации патентного документа США № 2007/0020295, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Согласно одному варианту осуществления может быть использован насос (см., например, Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Sefton, 1989, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88:507; Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). В соответствии с другим вариантом осуществления могут быть использованы полимерные материалы (см., например *Medical Applications of Controlled Release* (Langer and Wise eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance* (Smolen and Ball eds., Wiley, New York, 1984); Ranger and Peppas, 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61. See also Levy et al., 1985, *Science?* 228:190; During et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71:105). Другие системы контролируемого высвобождения обсуждаются, например, у Langer, *supra*.

Полипептиды BoNT в соответствии с настоящим раскрытием могут вводиться как фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество связывающего средства и один или несколько фармацевтически совместимых ингредиентов. В соответствии с типичными вариантами осуществления фармацевтическую композицию составляют согласно рутинным процедурам в виде фармацевтической композиции, приспособленной для внутривенного или подкожного введения субъекту, например человеку.

Как правило, композиции для введения инъекцией представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости фармацевтическая композиция также может включать в себя солюбилизирующее средство и местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли на участке инъекции. Как правило, ингредиенты обеспечивают либо отдельно, либо смешанными вместе в единичной лекарственной форме, например в виде сухого лиофилизованного порошка или безводного концентрата, в герметично закупоренном контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного средства. Если фармацевтическая композиция подлежит введению инфузией, то она может быть распределена из инфузионной бутылки, содержащей стерильные воду или солевой раствор фармацевтического качества. При введении фармацевтической композиции инъекцией может быть предоставлена ампула со стерильными водой для инъекции или солевым раствором так, что ингредиенты могут быть смешаны до введения. Фармацевтическая композиция для системного введения может быть жидкостью, например стерильным солевым раствором, раствором Рингера с лактатом или раствором Хэнка. Кроме того, фармацевтическая композиция может иметь твердые формы и повторно растворяться или суспендироваться непосредственно перед применением. Также предусматриваются лиофилизованные формы. Фармацевтическая композиция может быть содержаться в липидной частице или везикуле, такой как липосома или микрокристалл, которая также подходит для парентерального введения. Частицы могут иметь любую подходящую структуру, такую как однослойная или многослойная, при условии, что в них содержится композиция.

Полипептиды в соответствии с настоящим раскрытием могут быть захвачены в "стабилизированные плазмид-липидные частицы (SPLP)", содержащие фузогенный липид диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE), низкие содержания (5-10 мол.%) катионного липида и стабилизированные полиэтиленгликолем (PEG) покрытием (Zhang Y.P. et al., *Gene Ther.* 1999, 6:1438-47). Положительно заряженные липиды, такие как N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметил-амонийметилсульфат или "DOTAP", являются особенно предпочтительными для таких частиц и везикул. Получение таких липидных частиц хорошо известно. См., например, патенты США № 4880635; 4906477; 4911928; 4917951; 4920016 и 4921757. Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим раскрытием могут быть введены или упакованы в виде единичной дозы, например.

Термин "единичная доза" при использовании в отношении фармацевтической композиции в соответствии с настоящим раскрытием относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичной дозировки для субъекта, при этом каждая единица содержит предварительно определенное

количество активного материала, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в ассоциации с необходимым разбавителем; т.е. носителем или средой-носителем. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептиды VoNT/X, описываемые в настоящем документе, могут быть конъюгированы с терапевтическим фрагментом, например антибиотиком. Методики для конъюгации таких терапевтических фрагментов с полипептидами, в том числе, например, Fc доменами, хорошо известны; см., например, Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), 1985, p. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery (2<sup>nd</sup> Ed.)*, Robinson et al. (eds.), 1987, p. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), 1985, p. 475-506); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), 1985, p. 303-16, Academic Press; и Thorpe et al. (1982), "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-158. Кроме того, фармацевтическая композиция может быть представлена в виде фармацевтического набора, содержащего (a) контейнер, содержащий полипептид в соответствии с настоящим раскрытием в лиофилизированной форме и (b) второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый разбавитель (например, стерильную воду) для инъекции. Фармацевтически приемлемый разбавитель может быть использован для восстановления или разбавления лиофилизированного полипептида в соответствии с настоящим раскрытием. Необязательно вместе с таким контейнером(ами) может быть примечание в форме, предписанной государственным органом, регулирующим изготовление, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, при этом примечание отражает одобрение органом изготовления, применения или продажи для введения человеку. В другом аспекте представлено изделие, содержащее материалы, применимые для лечения заболеваний, описываемых выше. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изделие содержит контейнер и ярылок.

Подходящие контейнеры включают в себя, например, бутылки, флаконы, шприцы и пробирки для тестов. Контейнеры могут быть сформованы из ряда материалов, таких как стекло или пластик. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления контейнер содержит композицию, которая является эффективной для лечения заболевания, описываемого в настоящем документе, и может иметь стерильный доступ. Например, контейнер может быть пакетом внутривенного раствора или флаконом, имеющим пробку, прокальваемую гиподермической инъекционной иглой. Активное средство в композиции представляет собой выделенный полипептид в соответствии с настоящим раскрытием. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ярылок на контейнере или вместе с контейнером указывает, что композицию применяют для лечения выбранного заболевания. Изделие дополнительно может содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как забуференный фосфатом солевой раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы. Он дополнительно может включать в себя другие материалы, желательные с коммерческой и пользовательской точки зрения, в том числе другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по применению.

Полипептиды VoNT (например, полипептид VoNT/X), химерные молекулы и фармацевтические композиции в соответствии с настоящим раскрытием могут быть использованы для лечения состояний, связанных с нежелательными нейрональными активностями. Таким образом, дополнительно в настоящем документе представлены способы лечения состояния, связанного с нежелательной нейрональной активностью, при этом способ предусматривает введение терапевтически эффективного количества полипептида VoNT, химерной молекулы или фармацевтической композиции, описываемых в настоящем документе, с лечением тем самым состоянием. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептиды VoNT, химерные молекулы и фармацевтические композиции в соответствии с настоящим раскрытием контактируют с одним или несколькими нейронами, проявляющими нежелательную нейрональную активность.

Состояния, которые, как правило, лечат нейротоксином (например, состояния скелетной мускулатуры, состояние гладкой мускулатуры, железистые состояния, нейромышечное нарушение, автономное нарушение, боль или эстетическое/косметическое состояние), связаны с нежелательной нейрональной активностью, как определяется специалистами. Введение осуществляют путем, при котором приводят в контакт эффективное количество композиции с нейронами, проявляющими нежелательную активность. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления состояние может быть связано с надактивными нейронами или железами. Конкретные состояния, предполагаемые для лечения способами, обсуждаемыми в настоящем документе, включают в себя, без ограничения, спастическую дисфонию, спастическую кривошею, дистонию мышц гортани, оромандибулярную дистонию, язычную дистонию, цервикальную дистонию, фокальную дистонию руки, блефароспазм, страбизм, гемифациальный спазм, нарушение века, церебральный паралич, фокальную спастичность и другие нарушения голоса, спастический колит, нейрогенный мочевого пузыря, анизмус, спастичность конечностей, тики, треморы, бруксизм, трещину заднего прохода, ахалазию, дисфагию и другие нарушения мышечного тонуса, а также другие нарушения, характеризующиеся произвольными движениями групп мышц, лакримацией, гипергидрозом, повы-

шенным слюноотделением, избыточными желудочно-кишечными секретами, а также другими секреторными нарушениями, болью из-за мышечных спазмов, головной болью. Кроме того, настоящее раскрытие может быть использовано для лечения дерматологических или эстетических/косметических состояний, например для уменьшения межбровной складки, уменьшения морщин кожи.

Одной уникальной особенностью полипептидов BoNT/X в соответствии с настоящим раскрытием является их способность расщеплять VAMP4, VAMP5 и Ykt6. Таким образом, далее в настоящем документе описывается терапевтическое применение полипептидов BoNT/X при состояниях, связанных с нежелательной секрецией активностей в широком диапазоне клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нежелательной секрецией является иммунная секреция. Состояния, связанные с нежелательной иммунной секрецией, включают в себя, без ограничения, воспаление, псориаз, аллергию, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз и алкогольное заболевание поджелудочной железы.

Настоящее раскрытие также может быть применено в лечении спортивных травм. Borodic в патенте США № 5053005 раскрывает способы лечения ювенильного искривления позвоночника, т.е. сколиоза, с использованием ботулина типа А. Раскрытие Borodic включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Согласно одному варианту осуществления с использованием способов, практически подобных раскрываемому у Borodic, полипептид BoNT может быть введен млекопитающему, предпочтительно человеку, для лечения искривления позвоночника. В соответствии с подходящим вариантом осуществления вводят полипептид BoNT, содержащий ботулин типа Е, слитый с мотивом на основе лейцина. Еще более предпочтительно вводят полипептид BoNT, содержащий ботулин типа А-Е с мотивом на основе лейцина, слитый с карбоксильным концом его легкой цепи, млекопитающему, предпочтительно человеку, для лечения искривления позвоночника.

Кроме того, полипептиды BoNT могут быть введены для лечения нейромышечных нарушений с использованием хорошо известных методик, которые обычно выполняют с ботулином типа А. Например, настоящее раскрытие может быть использовано для лечения боли, например головной боли, боли из-за мышечных спазмов и различных форм воспалительной боли. Например, Aoki в патенте США № 5721215 и Aoki в патенте США № 6113915 раскрывает способы применения ботулинического токсина типа А для лечения боли. Раскрытия этих двух патентов включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Нарушения автономной нервной системы также можно лечить модифицированным нейротоксином. Например, нарушение работы желез является нарушением автономной нервной системы. Нарушение работы желез включает в себя избыточное потовыделение и повышенное слюноотделение. Нарушение респираторной функции является другим примером нарушения автономной нервной системы. Нарушение респираторной функции включает в себя хроническое обструктивное заболевание легких и АСТМУ. Sanders et al. раскрывают способы лечения автономной нервной системы; например лечение нарушений автономной нервной системы, таких как избыточное потовыделение, повышенное слюноотделение, астма и т.д., с использованием встречающихся в природе ботулинических токсинов. Раскрытие Sander et al. включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Согласно одному варианту осуществления могут быть использованы способы, практически подобные способу Sanders et al., но с использованием полипептида BoNT, для лечения нарушений автономной нервной системы, таких как обсуждаемые выше. Например, полипептид BoNT может быть локально введен в назальную полость млекопитающего в количестве, достаточном для образования холинергических нейронов автономной нервной системы, которые контролируют секрецию слизи в назальной полости. Боль, которую можно лечить модифицированным нейротоксином, включает в себя боль, вызванную напряжением мышцы или спазмом, или боль, которая не связана с мышечным спазмом. Например, Binder в патенте США № 5714468 раскрывает, что головную боль, вызванную сосудистым нарушением, напряжением мышцы, невралгией и нейропатией, можно лечить встречающимся в природе ботулиническим токсином, например ботулином типа А. Раскрытие Binder включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Согласно одному варианту осуществления могут быть использованы способы, практически подобные способу Binder, но с использованием полипептида BoNT, описываемого в настоящем документе, для лечения головной боли, особенно вызванной сосудистым нарушением, напряжением мышцы, невралгией и нейропатией. Боль, вызванную мышечным спазмом, также можно лечить введением полипептида BoNT, описываемого в настоящем документе. Например, ботулин типа Е, слитый с мотивом на основе лейцина, предпочтительно на карбоксильном конце легкой цепи ботулина типа Е, может быть введен внутримышечно в место расположения боли/спазма для облегчения боли. Кроме того, модифицированный нейротоксин может быть введен млекопитающему для лечения боли, которая не связана с мышечным нарушением, таким как спазм.

В соответствии с одним широким вариантом осуществления способы в соответствии с настоящим раскрытием лечения не связанной со спазмом боли включают в себя центральное введение или периферическое введение полипептида BoNT. Например, Foster et al. в патенте США № 5989545 раскрывают, что ботулинический токсин, конъюгированный с нацеливающимся фрагментом, может быть введен центрально (интратекально) для облегчения боли. Раскрытие Foster et al. включено в настоящий документ

посредством ссылки во всей своей полноте.

Согласно одному варианту осуществления могут быть использованы способы, практически подобные способу Foster et al., но с использованием композиций, описываемых в настоящем документе, для лечения боли. Болью, подлежащей лечению, может быть острая боль или хроническая боль. Острая или хроническая боль, которая не связана с мышечным спазмом, также может быть облегчена локальным, периферическим введением модифицированного нейротоксина в место расположения фактической или мнимой боли у млекопитающего.

Согласно одному варианту осуществления полипептид BoNT вводят подкожно в место расположения боли или рядом с ним, например в порез или рядом с ним. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный нейротоксин вводят внутримышечно в место расположения боли или рядом с ним, например в место расположения гематомы или рядом с ним, у млекопитающего. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид BoNT вводят инъекцией непосредственно в сустав млекопитающего для лечения или облегчения боли, вызванной артритными состояниями. Также часто повторяющаяся инъекция или инфузия модифицированного нейротоксина в место расположения периферической боли попадает в объем настоящего раскрытия. Пути введения для таких способов известны в уровне техники, и специалист в данной области сможет легко адаптировать их для способов, описываемых в настоящем документе (см., например, Harrison's Principles of Internal Medicine (1998), edited by Anthony Fauci et al., 14.sup.th edition, published by McGraw Hill).

В качестве неограничивающего примера лечение нейромышечного нарушения может предусматривать стадию локального введения эффективного количества молекулы в мышцу или группу мышц, лечение автономного нарушения может предусматривать стадию локального введения эффективного количества молекулы в железу или железы, а лечение боли может предусматривать стадию введения эффективного количества молекулы в участок боли. Кроме того, лечение боли может предусматривать стадию введения эффективного количества модифицированного нейротоксина в спинной мозг.

Используемый в настоящем документе термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству каждого терапевтического средства в соответствии с настоящим раскрытием, необходимому для обеспечения терапевтического эффекта у субъекта, либо отдельно, либо в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими средствами. Эффективные количества, как понятно специалистам в данной области, варьируют в зависимости от конкретного состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния, индивидуальных параметров субъекта, в том числе от возраста, физического состояния, размера, пола и массы, длительности лечения, природы параллельной терапии (если имеется), конкретного пути введения и подобных факторов в пределах знаний и опыта специалиста здравоохранения. Данные факторы хорошо известны специалистам в данной области и могут быть установлены не более чем рутинным экспериментом. Как правило, предпочтительно, чтобы использовалась максимальная доза отдельных компонентов или их комбинаций, т.е. самая высокая безопасная доза в соответствии с обоснованным медицинским заключением. Специалистам в данной области должно быть понятно, однако, что субъект может требовать более низкую дозу или переносимую дозу по медицинским причинам, психологическим причинам или по практически любым другим причинам. Эмпирические соображения, такие как период полужизни, как правило, будут способствовать определению дозировки. Например, терапевтические средства, которые совместимы с иммунной системой человека, такие как полипептиды, содержащие области из гуманизованных антител или полностью человеческих антител, могут использоваться для продления периода полужизни полипептида и для предотвращения атаки иммунной системы хозяина на полипептид.

Частота введения может быть определена и подобрана в ходе курса терапии и, как правило, но не обязательно, основана на лечении, и/или подавлении, и/или ослаблении, и/или задержке заболевания. В качестве альтернативы могут быть подходящими составы с замедленным непрерывным высвобождением полипептида. В уровне техники известны различные составы и устройства для достижения замедленного высвобождения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение дозы осуществляют ежесуточно, через сутки, каждые трое суток, каждые четверо суток, каждые пять суток или каждые шесть суток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления частота введения дозы составляет один раз в неделю, каждые 2 недели, каждые 4 недели, каждые 5 недель, каждые 6 недель, каждые 7 недель, каждые 8 недель, каждые 9 недель или каждые 10 недель или один раз в месяц, каждые 2 месяца, или каждые 3 месяца, или реже. Прогресс данной терапии легко контролируется традиционными методами и анализами.

Режим введения дозы (в том числе применяемого полипептида) может варьировать со временем. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления для взрослого субъекта с нормальной массой могут быть введены дозы, варьирующие от приблизительно 0,01 до 1000 мг/кг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления доза составляет от 1 до 200 мг. Конкретный режим введения дозы, т.е. доза, время и повторяемость, будет зависеть от конкретного субъекта и истории болезни этого субъекта, а также от свойств полипептида (таких как период полужизни полипептида и другие факторы, хорошо известные в уровне техники).

Для целей настоящего раскрытия соответствующая дозировка терапевтического средства, описы-

ваемого в настоящем документе, будет зависеть от конкретного используемого средства (или его композиций), состава и пути введения, типа и тяжести заболевания, введения полипептида для превентивных или терапевтических целей, предшествующей терапии, истории болезни субъекта и ответа на антагонист, а также от мнения лечащего врача. Как правило, обычно врач будет вводить полипептид до тех пор, пока не будет достигнута дозировка, которая обеспечит желаемый результат.

Введение одного или нескольких полипептидов может быть непрерывным или прерывистым в зависимости, например, от физиологического состояния реципиента, терапевтической или профилактической цели введения, а также от других факторов, известных специалистам в данной области. Введение полипептида может быть, по сути, непрерывным на протяжении предварительно выбранного периода времени или может осуществляться сериями разделенной дозы, например, либо до, в ходе, либо после развития заболевания. Используемый в настоящем документе термин "лечение" относится к применению или введению полипептида или композиции, включающей в себя полипептид, субъекту при необходимости этого.

Термин "субъект при необходимости этого" относится к индивидууму, который имеет заболевание, симптом заболевания или предрасположенность к заболеванию, требующий лечения, исцеления, облегчения, ослабления, изменения, излечения, устранения, улучшения или влияния на ход заболевания, симптома заболевания или предрасположенности к заболеванию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект имеет CDI. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект имеет рак. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект представляет собой отличного от человека примата. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект представляет собой человека. Облегчение заболевания включает в себя задержку развития или прогрессирования заболевания или уменьшение тяжести заболевания. Облегчение заболевания не требует обязательных результатов лечения.

Используемый в настоящем документе термин "задержка" развития заболевания означает отсрочивание, торможение, замедление, откладывание, стабилизацию и/или отдаление прогрессирования заболевания. Такая задержка может иметь различную продолжительность по времени в зависимости от истории заболевания и/или индивидуумов, подлежащих лечению. Способ, который "замедляет" или облегчает развитие заболевания или замедляет проявление заболевания, представляет собой способ, который снижает вероятность развития одного или нескольких симптомов заболевания в данной временной рамке и/или снижает степень симптомов в данной временной рамке по сравнению с ситуацией без использования способа. Такие сравнения обычно основаны на клинических исследованиях с использованием количества субъектов, достаточных для получения статистически значимого результата.

Термин "развитие" или "прогрессирование" заболевания означает начальные проявления и/или последующее прогрессирование заболевания. Развитие заболевания может быть выявлено и оценено с использованием стандартных клинических методик, хорошо известных в уровне техники. Однако развитие также относится к прогрессированию, которое может быть невыявляемым. Для целей настоящего раскрытия развитие или прогрессирование относится к биологическому курсу симптомов. Термин "развитие" включает в себя возникновение, рецидив и начало.

Используемый в настоящем документе термин "начало" или "возникновение" заболевания включает в себя изначальное начало и/или рецидив. Традиционные способы, известные специалистам в области медицины, могут быть использованы для введения выделенного полипептида или фармацевтической композиции субъекту в зависимости от типа заболевания, подлежащего лечению, или участка заболевания. Данная композиция также может быть введена другими традиционными путями, например введена перорально, парентерально, ингаляционным распылением, местно, ректально, назально, буккально, вагинально или с помощью имплантируемого резервуара.

Используемый в настоящем документе термин "парентеральный" включает в себя методики подкожной, внутрисуставной, внутримышечной, внутривенной, внутрисуставной, внутриартериальной, внутрисиновиальной, интрастеральной, интратекальной, внутриочаговой и интракраниальной инъекции или инфузии. Кроме того, это может предусматривать введение субъекту с помощью путей инъекционного депо, например, с использованием 1-, 3- или 6-месячного инъекционного депо или биоразлагаемых материалов и способов.

Используемый в настоящем документе термин "субъект" относится к человеку или животному. Обычно животное представляет собой беспозвоночное животное, такое как примат, грызун, домашнее животное или животное-компаньон. Приматы включают в себя шимпанзе, яванских макаков, обезьян-пауков и макаков, например резус. Грызуны включают в себя мышей, крыс, сурков, хорьков, кроликов и хомяков. Домашние и животные-компаньоны включают в себя коров, лошадей, свиней, оленей, бизона, буйвола, виды кошек, например домашнюю кошку, виды собак, например собаку, лису, волка, виды птиц, например цыпленка, эму, страуса, и рыбу, например форель, сома и лосося. Пациент или субъект включает в себя любую подгруппу вышеупомянутых, например всех из упомянутых выше, за исключением одной или нескольких групп или одного или нескольких видов, таких как люди, приматы или грызуны. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аспектов, описываемых в настоящем

документе, субъектом является млекопитающее, например примат, например человек.

Термины "пациент" и "субъект" используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Субъект может быть мужского пола или женского пола. Субъект может быть полностью развитым субъектом (например, взрослым) или субъектом, находящимся в процессе развития (например, ребенком, младенцем или зародышем). Предпочтительно субъект является млекопитающим. Млекопитающее может представлять собой человека, отличного от человека примата, мышшь, крысу, собаку, кошку, лошадь или корову, без ограничения данными примерами. Млекопитающие, отличные от людей, могут успешно использоваться в качестве субъектов, которые представляют животные модели нарушений, связанных с нежелательной нейрональной активностью. Кроме того, способы и композиции, описываемые в настоящем документе, могут быть использованы для лечения домашних животных и/или животных-компаньонов.

Следующие примеры предназначены для иллюстрации некоторых вариантов осуществления, но не для ограничения. Полное содержание всех упомянутых документов (в том числе литературных ссылок, выданных патентов, опубликованных заявок на выдачу патентов и находящихся на рассмотрении заявок на выдачу патентов), цитированных в настоящем описании, тем самым включено в настоящий документ посредством ссылки.

### Примеры

Таблица 1

#### Последовательности полипептидов BoNT

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
1	BoNT/X WT	MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPEKDEF LQGVIVLERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNALTLSDNETIA YQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTSL EVSFSPFYLPFDES YGNYSLSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHE LVHVTHNLYGISNRNFYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID SKAISSLIKKIIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV QGRGNFKLDTAEFKKNLTLFVLNENLAQRFSILVRKHLYLKE RPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGLLESSYFEKIES NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS YPCSLNNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKD KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNNPKVYS PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLRISIVKDFSDETGKIDVIDKSS DTLAIVPYIGPLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWADEVYNITKAQWW GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA KMNMEFQLANYKGNIDDK AKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMIPKV QDNLKNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI AFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIEDYEVNLGAEDGKIKDLSGTTT DINIGSDIELADGRENKAIKIKGSENSTIKIAMNKYLRFSATDNFSI SFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQD SKLIWYLRD HNNSIKIVTPDYIAFNWNLITITNNRSKGSIVYVNGSKIEEKDISS IWNTEVDDPIIFRLKNNRDTQAFLLDQFSIYRKELNQNEVVKLY

		<p>           NYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREYWSSF            GYDYVILSDSKTITFPNNIRYGALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNK            DFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTTDHLTTDFEIIQRQ            EKYRNYCQLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTFHDIRDWVYSSAW            YFQNYENLNLKHTKTNWYFIPKDEGWDED         </p>
2	<p>           BoNT/X            WT            LC-H<sub>N</sub> </p>	<p>           MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK            NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPEKDEF            LQGVIVLERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNALTLSDNETIA            YQENNNIVSNLQANLVIYGPGPDIANNATYGLYSTPISNGEGTLS            EVSFSPFYLPFDESIGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHE            LVHVTHNLYGISNRNFYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID            SKAISLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV            QGR LGNFKLDTAEFKLNILFVLNESNLAQRFSILVRKHYLE            RPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGQLESSEYFEKIES            NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS            YPCSLNNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIPETTVFFKD            KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT            IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYS            PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLRISIVKDFDETGKIDVIDKSS            DTLAIVPYIGPLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL            VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWADEVYNTKAQWW            GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANAIKMMEFQLANYKGNIDDK            AKIKNAISETEILLNK SVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMIPKV            QDNLKNFDLETKKTLDFIKIEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI            AFDINDIPSEFDDLINQYKNEI         </p>
3	<p>           BoNT/X            WT            LC         </p>	<p>           MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK            NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPEKDEF            LQGVIVLERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNALTLSDNETIA            YQENNNIVSNLQANLVIYGPGPDIANNATYGLYSTPISNGEGTLS            EVSFSPFYLPFDESIGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHE            LVHVTHNLYGISNRNFYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID            SKAISLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV            QGR LGNFKLDTAEFKLNILFVLNESNLAQRFSILVRKHYLE            RPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGQLESSEYFEKIES            NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKN         </p>
4	BoNT/X	<p>           MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK         </p>

	WT C461S	<p>NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPSEKDEF  LQGVKVLERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNLALTLSDNETIA  YQENNNIVSNLQANLVIIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTSL  EVSFSPFYLPFDESIGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHE  LVHVTHNLYGISNRNFYFNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID  SKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV  QGRNGFNKLDTAEFKLNLTILFVLESNLAQRFSILVRKHLYKE  RPIDPIYVNLDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGLLESSYFEKIES  NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS  YPSLLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKD  KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQNILERNEELYEPINSLFEIKT  IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNNPKVYS  PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLSIVKDFSDETGKIDVIDKSS  DTLAIVPYIGPLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL  VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWADEVYNITKAQWW  GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANAIKMNMEFQLANYKGNIDDK  AKIKNAISETEILLNKSVQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMIPKV  QDNLKNFDLETKKTLDFIKKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI  AFDINDIPSEFDDLINQYKNEIEDYEVNLGAEDGKIKDLSGTTS  DINIGSDIELADGRENKAIKIKGSENSTIKIAMNKYLRFSATDNFSI  SFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDskLIWYLRD  HNNSIKIVTPDYIAFNGWNLITITNRSKGSIVYVNGSKIEEKDSS  IWNTevDDPIIFRLKNNRDTQAFLLDQFSIYRKELNQNEVVKLY  NYFYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREYWSSF  GYDYVILSDSKTITFPNNIRYGALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNK  DFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTTHDLTTDFEIIQRQ  EKYRNYCQLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTFHDIRDWVYSSAW  YFQNYENLNRKHTKTNWYFIPKDEGWDED</p>
5	BoNT/X WT C461A	<p>MKLEINKFNNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK  NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPSEKDEF  LQGVKVLERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNLALTLSDNETIA  YQENNNIVSNLQANLVIIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTSL  EVSFSPFYLPFDESIGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHE  LVHVTHNLYGISNRNFYFNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID  SKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV  QGRNGFNKLDTAEFKLNLTILFVLESNLAQRFSILVRKHLYKE</p>

		<p>RPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISSQGSNDFQGQLESSYFEKIES          NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS          YP<u>A</u>LLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKD          KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT          IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYS          PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVIDKSS          DTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL          VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWADEVYNITKAQWW          GTIHLQINTRLAHTYKALSQRANA IKMNMFLANYKGNIDDK          AKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMIPKV          QDNLKNFDLETKKTLDFIKEDIKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI          AFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIEDYEVNLGAEDGKIKDLSGTTT          DINIGSDIELADGRENKA IKIKGSENSTIKIAMNKYLRF SATDNFSI          SFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLRD          HNNSIKIVTPDYIAFNGWNLITITNRSKGSIVYVNGSKIEEKDISS          IWNTTEVDDPIIFRLKNNRDTQAFLLDQFSIYRKELNQNEVVKLY          NYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREYWSSF          GYDYVILSDSKTITFPNNIRY GALYNGSKVLIKNSKCLDGLVRNK          DFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTTHDLTTDFEIIQRQ          EKYRNYCQLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTFH YDRDWVYSSAW          YFQNYENLNRKHTKTNWYFIPKDEGWDED</p>
6	BoNT/X WT C467S	<p>MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIK          NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPI MEADAIYNPNYLNTPEKDEF          LQGVIKVLERIKSKPEGEKLELISISSIPLPLVSN GALTLSDNETIA          YQENNNIVSNLQANLVIYGPGDIANNATYGLYSTPISNGEGTLS          EVSFSPFYLPFDES YGNYSLVNIVNKFKREFAPDPASTLMHE          LVHVTHNLYGISNRNFYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID          SKAISSLIKKIIE TAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV          QGRLGNFKLDTAEFEKKNLTLFV LNESNLAQRFSILVRKHYLKE          RPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISSQGSNDFQGQLESSYFEKIES          NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS          YPC<u>S</u>LLNGSIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKD          KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT          IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYS          PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVIDKSS          DTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL</p>

		<p>VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWAEVYNITKAQWW  GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGNIDDK  AKIKNAISETEILLNK SVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMIPKV  QDNLKNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI  AFDINDIPSEFDDLINQYKNEIEDYEVLNLGAEDGKIKDLSGTTT  DINIGSDIELADGRENKAIKIKGSENSTIKIAMNKYLRF SATDNFSI  SFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLRD  HNNSIKIVTPDYIAFNGWNLITITNNR SKGSIVYVNGSKIEEKDSS  IWNTTEVDDPIIFRLKNNRDTQAFLLDQFSIYRKELNQNEVVKLY  NYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREYWSF  GYDYVILSDSKTITFPNNIRY GALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNK  DFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTHDLTTDFEIIQRQ  EKYRNYCQLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTFHDIRDWVYSSAW  YFQNYENLNL RKHTKTNWYFIPKDEGWDED</p>
7	BoNT/X WT C467A	<p>MKLEINKFNYPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIK  NIWIVPERYNTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPEKDEF  LQGVIVLERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSN GALTLSDNETIA  YQENNNIVSNLQANLVIIYGPDIANNATYGLYSTPISNGEGTLS  EVSFSPFYLPFDES YGNYSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHE  LVHVTHNLYGISNRNFYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID  SKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV  QGRLGNFKLDTAEFEKLNLTILFVLNESNLAQRFSILVRKHLYKE  RPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGQLESSYFEKIES  NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS  YPCSLNNGAIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIPETTVFFKD  KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQNILERNEELYEPINSLFEIKT  IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYS  PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVIDKSS  DTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL  VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWAEVYNITKAQWW  GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGNIDDK  AKIKNAISETEILLNK SVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMIPKV  QDNLKNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI  AFDINDIPSEFDDLINQYKNEIEDYEVLNLGAEDGKIKDLSGTTT  DINIGSDIELADGRENKAIKIKGSENSTIKIAMNKYLRF SATDNFSI  SFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLRD</p>

		HNNSIKIVTPDYIAFNGWNLITITNRRSKGSIVYVNGSKIEEKDISS IWNTEVDDPIIFRLKNNRDTQAFLLDQFSIYRKELNQNEVVKLY NYYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREYWSSF GYDYVILSDSKTITFPNNIRYGALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNK DFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTTHDLTTDFEIIQRQ EKYRNYCQLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTFHDIRDWVYSSAW YFQNYENLNLRKHTKTNWYFIPKDEGWDED
8	BoNT/X WT C1240S	MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIK NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPEKDEF LQGVKIVLERIKSKPEGEKLELISSIPPLVSNALTLSDNETIA YQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTSL EVSFSFPYLYKPFDESYGNYSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHE LVHVTHNLYGISNRNFYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID SKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV QGRGNFKLDTAEFKKNLTLFVLNESNLAQRFSILVRKHLYKE RPIDPIYVNIIDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGLLESSYFEKIES NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS YPCSLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIPETTFFFKD KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPKVYS PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLRISIVKDFSDETGKIDVIDKSS DTLAIVPYIGPLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWADEVYNITKAQWW GTIHLQINRLAHTYKALSRQANAIAKMNMEFQLANYKGNIDDK AKIKNAISETEILLNKSVQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMIPKV QDNLKNFDLETKKTLDFIKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI AFDINDIPSEFDDLINQYKNEIEDYEVNLGAEDGKIKDLSGTTT DINIGSDIELADGRENKAIKIGSENSTIKIAMNKYLRFSATDNFSI SFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLRD HNNSIKIVTPDYIAFNGWNLITITNRRSKGSIVYVNGSKIEEKDISS IWNTEVDDPIIFRLKNNRDTQAFLLDQFSIYRKELNQNEVVKLY NYYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREYWSSF GYDYVILSDSKTITFPNNIRYGALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNK DFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTTHDLTTDFEIIQRQ EKYRNYCQLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTFHDIRDWVYSSAW YFQNYENLNLRKHTKTNWYFIPKDEGWDED

<p>9</p> <p>BoNT/X WT C1240S</p>	<p>MKLEINKFNYNPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPEKDEF LQGVIVLERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNLALTLSDNETIA YQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTSL EVSFSFPYLKPFDESYGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHE LVHVTHNLYGISNRNFYFNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID SKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV QGR LGNFKLDTAEFKLNLTILFVLNESNLAQRFSILVRKHYLE RPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGQLESSEYFEKIES NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS YPCSLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIPETT VFFKD KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYS PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVIDKSS DTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWA EYVYNITKAQWW GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGNIDDK AKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKE MIPKV QDNLKNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI AFDINDIPSEFDDLINQYKNEIEDYEVLNLGAEDGKIKDLSGTT S DINIGSDIELADGRENKAIKIKGSENSTIKIAMNKYLRF SATDNFSI SFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLRD HNNSIKIVTPDYIAFNGWNLITITNRSKGSIVYVNGSKIEEKDISS IWNTEVDDPIIFRLKNNRDTQAFLLDQFSIYRKELNQNEVVKLY NYYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREYWSSF GYDYVILSDSKTITFPNNIRY GALYNGSKVLIKNSKLDGLVRNK DFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTT HDLTTDFEIIQRQ EKYRNYAQLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTFH DYRDWVYSSAW YFQNYENLNLRKHTKTNWFIPKDEGWDED</p>
<p>10</p> <p>BoNT/X WT C461S/C1 240A</p>	<p>MKLEINKFNYNPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPEKDEF LQGVIVLERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNLALTLSDNETIA YQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTSL EVSFSFPYLKPFDESYGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHE LVHVTHNLYGISNRNFYFNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID SKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV</p>

		<p>QGR LGNFKLDTAEF EKKLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKHLYLKE  RPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGQLLESSYFEKIES  NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS  YPSSLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKD  KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT  IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYS  PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVIDKSS  DTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL  VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWAEVYNITKAQWW  GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGNIDDK  AKIKNAISETEILLNK SVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKE MIPKV  QDNLKNFDLETKKTLDFIK EKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI  AFDINDIPSEFDDLINQYKNEIEDYEVLNLGAEDGKIKDLSGTT S  DINIGSDIELADGRENKAIKIKGSENSTIKIAMNKYLRF SATDNFSI  SFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQD SKLIWYLRD  HNNSIKIVTPDYIAFNGWNLITITNRSKGSIVYVNGSKIEEKDISS  IWNTEVDDPIIFRLKNNRDTQAF TLLDQFSIYRKELNQNEVVKLY  NYYFN SNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREY WSSF  GYDYVILSDSKTITFPNNIRY GALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNK  DFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTTHDLTTDFEIIQRQ  EKYRNYAQLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTFH DYRDWVYSSAW  YFQNYENLNL RKHTKTNWYFIPKDEGWDED</p>
11	BoNT/X WT C461S/C1 240S	<p>MKLEINKFNYNPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAQVIK  NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPI MEADAIYNPNYLNTPSEKDEF  LQGVIVLERIKSKPEGEKLEL ISSIPLPLVSN GALTLSDNETIA  YQENNNIVSNLQANLVIYGP GPDIAN NATYGLYSTPISNGEGTLS  EVSFS PFYLPFDES YGNYSLVNIVNK FVKREFAPDPASTLMHE  LVHVTHNLYGISNRNFYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID  SKAISSLIKKI IETAKNNYTT LISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV  QGR LGNFKLDTAEF EKKLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKHLYLKE  RPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGQLLESSYFEKIES  NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS  YPSSLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKD  KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT  IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYS  PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVIDKSS</p>

		<p>DTLAIVPYIGPLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL  VGLVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWAEVYNITKAQWW  GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANAIAIKMNMEFQLANYKGNIDDK  AKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMIPKV  QDNLKNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI  AFDINDIPSEFDDLINQYKNEIEDYEVLNLGAEDGKIKDLSGTT  DINIGSDIELADGRENKAIIKIGSENSTIKIAMNKYLRFSATDNFSI  SFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDskLIWYLRD  HNNSIKIVTPDYIAFNGWNLITITNRSKGSIVYVNGSKIEEKDISS  IWNTEVDDPIIFRLKNNRDTQAFLLDQFSIYRKELNQNEVVKLY  NYYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREYWSSF  GYDYVILSDSKTITFPNNIRYGALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNK  DFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTTHDLTTDFEIIQRQ  EKYRNYSQLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTFHDYRDWVYSSAW  YFQNYENLNRKHTKTNWYFIPKDEGWDED</p>
<p>12</p>	<p>BoNT/X  WT  C461A/C1  240S</p>	<p>MKLEINKFNYNPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIK  NIWIVPERYNTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPEKDEF  LQGVIVLERIKSKPEGEKLELISISSIPLPLVSNALTLSDNETIA  YQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTSL  EVSFSFPFLKPFDESYGNYSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHE  LVHVTHNLYGISNRNFYYNFDTGKIETSRQONS LIFEELLTFGGID  SKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV  QGR LGNFKLDTAEFKKNLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKHLYKE  RPIDPIYVNI DDNSYSTLEGFNISSQGSNDFQGQLESSEYFEKIES  NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS  YPA<sup>A</sup>SLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKD  KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT  IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYS  PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVIDKSS  DTLAIVPYIGPLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL  VGLVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWAEVYNITKAQWW  GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANAIAIKMNMEFQLANYKGNIDDK  AKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMIPKV  QDNLKNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI  AFDINDIPSEFDDLINQYKNEIEDYEVLNLGAEDGKIKDLSGTT  DINIGSDIELADGRENKAIIKIGSENSTIKIAMNKYLRFSATDNFSI</p>

		SFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLRD HNNSIKIVTPDYIAFNGWNLITITNRSKGSIVYVNGSKIEEKDISS IWNTTEVDDPIIFRLKNNRDTQAFLLDQFSIYRKELNQNEVVKLY NYYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREYWSSF GYDYVILSDSKTITFPNNIRYGALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNK DFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTTTHDLTTDFEIIQRQ EKYRNY <u>Q</u> QLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTFHDIRDWVYSSAW YFQNYENLNLRKHTKTNWYFIPKDEGWDED
13	BoNT/X WT C461A/C1 240A	MKLEINKFNYNPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIK NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPSEKDEF LQGVIVLERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNGALTLSDNETIA YQENNNIVSNLQANLVIYGPGPIANNATYGLYSTPISNGEGTLS EVSFSPFYLPFDESIGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHE LVHVTHNLYGISNRNFYFNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID SKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV QGRLGNFKLDTAEFKKNLTLFVLNESLAQRFSILVRKHYLE RPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQQLLESSYFEKIES NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS YPA <u>S</u> LLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIPETTVFFKD KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYS PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLRISVKDFSDETGKIDVIDKSS DTLAIVPYIGPLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWADEVNITKAQWW GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANAIAKMNMEFQLANYKGNIDDK AKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMIPKV QDNLKNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI AFDINDIPFSEDDLINQYKNEIEDYEVNLGAEDGKIKDLSGTTT DINIGSDIELADGRENKAIAIKGSENSTIKIAMNKYLRFSATDNFSI SFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLRD HNNSIKIVTPDYIAFNGWNLITITNRSKGSIVYVNGSKIEEKDISS IWNTTEVDDPIIFRLKNNRDTQAFLLDQFSIYRKELNQNEVVKLY NYYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREYWSSF GYDYVILSDSKTITFPNNIRYGALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNK DFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTTTHDLTTDFEIIQRQ EKYRNY <u>A</u> QLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTFHDIRDWVYSSAW

		YFQNYENLNLRKHTKTNWYFIPKDEGWDED
14	BoNT/X WT C467S/C1 240A	<p>MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK  NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPSEKDEF  LQGVIVLERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNALTLSDNETIA  YQENNNIVSNLQANLVIIYGPDIANNATYGLYSTPISNGEGTLS  EVSFSPLYLKFDESIGNYRSLVNIIVNKFVKREFAPDPASTLMHE  LVHVTHNLYGISNRNFYFNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID  SKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV  QGRLGNFKLDTAEFKLNLTILFVLNESNLAQRFSILVRKHLYKE  RPIDPIYVNLDDNSYSTLEGFNISSQGSNDFQGGQLESSEYFEKIES  NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS  YPCSLNNGSIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIPETTVFFKD  KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQONILERNEELYEPIRNSLFEIKT  IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNNPKVYS  PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLRISIVKDFSDETGKIDVIDKSS  DTLAIVPYIGPLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL  VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWADEVYNTKAQWW  GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANAIAKMNMEFQLANYKGNIDDK  AKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMIPKV  QDNLKNFDLETKKTLDFIKEDIKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI  AFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIEDYEVNLGAEDGKIKDLSGTTT  DINIGSDIELADGRENKAIKIKGSENSTIKIAMNKYLRFSATDNFSI  SFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLRD  HNNSIKIVTPDYIAFNGWNLITITNNRSKGSIVYVNGSKIEEKDISS  IWNTTEVDDPIIFRLKNNRDTQAFLLDQFSIYRKELNQNEVVKLY  NYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREYSSWF  GYDYVILSDSKTITFPNNIRYALYNGSKVLIKNSKLDGLVRNK  DFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTTHDLTTDFEIIQRQ  EKYRNYAQLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTFHDIRDWVYSSAW  YFQNYENLNLRKHTKTNWYFIPKDEGWDED</p>
15	BoNT/X WT C467S/C1 240S	<p>MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK  NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPSEKDEF  LQGVIVLERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNALTLSDNETIA  YQENNNIVSNLQANLVIIYGPDIANNATYGLYSTPISNGEGTLS  EVSFSPLYLKFDESIGNYRSLVNIIVNKFVKREFAPDPASTLMHE  LVHVTHNLYGISNRNFYFNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID</p>

		<p>SKAISSLIKKIIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV  QGR LGNFKLDTAEF EKKLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKHYLKE  RPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGQLLESSYFEKIES  NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS  YPCSLNNGSIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKD  KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT  IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYS  PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSD ETGKIDVIDKSS  DTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL  VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWA EYVNITKAQWW  GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGNIDDK  AKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKE MIPKV  QDNLKNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI  AFDINDIPFSEDDLINQYKNEIEDYEV LNLGAEDGKIKDLSGTT S  DINIGSDIELADGRENKA I KIKGSENSTIKIAMNKYLRFSATDNFSI  SFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLRD  HNNSIKIVTPDYIAFNGWNLITITN NR SKGSIVYVNGSKIEEKDISS  IWNT EVD D P IIFRLKNNRDTQAFTLLDQFSIYRKELNQNEVVKLY  NYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREYWSSF  GYDYVILSDSKTITFPNNIRY GALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNK  DFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTTHDLTTDFEIIQRQ  EKYRNYSQLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTFH DYRDWVYSSAW  YFQNYENLNL RKHTKTNWYFIPKDEGWDED</p>
16	BoNT/X WT C467A/C1 240S	<p>MKLEINKFNYPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK  NIWIVPERYNTNNTNDLNIPSEPI MEADAIYNP NYLNTPSEKDEF  LQGVIKVLERIKSKPEGEKLEL ISSIPLPLVSN GALTLS DNETIA  YQENNNIVSNLQANLV IYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTLS  EVSFSPFY LKPFDES YGNYSRLVNIVNK FVKREFAPDPASTLMHE  LVHVTHNLYGISNRNFYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID  SKAISSLIKKIIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV  QGR LGNFKLDTAEF EKKLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKHYLKE  RPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGQLLESSYFEKIES  NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS  YPCSLNNGAIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKD  KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT  IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYS</p>

		<p>PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSD ETGKIDVIDKSS  DTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL  VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWA EVYNITKAQWW  GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGNIDDK  AKIKNAISETEILLNK SVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMIPKV  QDNLKNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI  AFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIEDYEVLNLGAEDGKIKDLSGTT S  DINIGSDIELADGRENKA I KIKGSENSTIKIAMNKYLRF SATDNFSI  SFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQD SKLIWYLRD  HNNSIKIVTPDYIAFNGWNLITITNNR SKGSIVYVNGSKIEEKDISS  IWNTTEVDDPIIFRLKNNRDTQAF TLLDQFSIYRKELNQNEVVKLY  NYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREYWSSF  GYDYVILSDSKTITFPNNIRY GALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNK  DFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTTHDLTTDFEIIQRQ  EKYRNYSQLKTPYNIFHK SGLMSTETSKPTFH DYRDWVYSSAW  YFQNYENLNL RKHTKTNWYFIPKDEGWDED</p>
17	<p>BoNT/X  WT  C467A/C1  240A</p>	<p>MKLEINKFNYNPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK  NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSE PIMEADAIYNPNYLNTPSEKDEF  LQGVIKVLERIKSKPEGEKLEL ISSIPLPLVSN GALTLSDNETIA  YQENNNIVSNLQANLVIYGP GPDIANATYGLYSTPISNGEGTLS  EVSFSPFYLPFDES YGNYSRLVNIVNK FVKREFAPDPASTLMHE  LVHVTHNLYGISNRNFY YNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID  SKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV  QGR LGNFKLDTAEF EKKLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKH YLKE  RPIDPIYVNILDDNSYS TLEGFNISSQGSNDFQGQLLESSYFEKIES  NALRAFIKICPRNGLL YNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS  YPCSLNNGAIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKD  KLPPQDITLSNYDFTEANS IPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT  IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYS  PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSD ETGKIDVIDKSS  DTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL  VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWA EVYNITKAQWW  GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGNIDDK  AKIKNAISETEILLNK SVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMIPKV  QDNLKNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI  AFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIEDYEVLNLGAEDGKIKDLSGTT S</p>

		DINIGSDIELADGRENKAIKIKGSENSTIKIAMNKYLRFSATDNFSI SFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLRD HNNSIKIVTPDYIAFNGWNLITITNNRSKGSIVYVNGSKIEEKDISS IWNTEVDDPIIFRLKNRDTQAFLLDQFSIYRKELNQNEVVKLY NYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREYWSSF GYDYVILSDSKTITFPNNIRY GALYNGSKVLIKNSKKLDGLVRNK DFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTTHDLTTDFEIIQRQ EKYRNY <u>A</u> QLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTFHDIRDWVYSSAW YFQNYENLNLKHTKTNWYFIPKDEGWDED
18	BoNT/X WT LC-H <sub>N</sub> C461A	MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIK NIWIVPERYNTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPEKDEF LQGVIVLERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNALTLSDNETIA YQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTSL EVSFSFPYLPFDES YGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHE LVHVTHNLYGISNRNFYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID SKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV QGRLGNFKLDTAEFEKLNLTILFVLNESNLAQRFSILVRKHLYKE RPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISSQGSNDFQGQLESSYFEKIES NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS Y <u>P</u> ASLLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIPETTVFFKD KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPINSLFEIKT IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPKNVYS PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLSIVKDFDETGKIDVIDKSS DTLAIVPYIGPLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWADEVYNTKAQWW GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA KMNMEFQLANYKGNIDDK AKIKNAISETEILLNK SVEQAMKNTKFMIKLSNSYLTKEMIPKV QDNLKNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI AFDINDIPSEFDDLINQYKNEI
19	BoNT/X WT LC-H <sub>N</sub> C461S	MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIK NIWIVPERYNTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPEKDEF LQGVIVLERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNALTLSDNETIA YQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTSL EVSFSFPYLPFDES YGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHE LVHVTHNLYGISNRNFYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID SKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV

		<p>QGR LGNFKLDTAEF EKKLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKHYLKE  RPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGQLLESSYFEKIES  NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS  YPSLLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKD  KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT  IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYS  PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVIDKSS  DTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL  VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWA EVYNITKAQWW  GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGNIDDK  AKIKNAISETEILLNK SVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLT KEMIPKV  QDNLKNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI  AFDINDIPSEFDDLINQYKNEI</p>
20	BoNT/X WT LC-H <sub>N</sub> C467A	<p>MKLEINKFNYNPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK  NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPI MEADAIYNPNYLNTPSEKDEF  LQGVIVLERIKSKPEGEKLEL ISSIPLPLVSN GALTLSDNETIA  YQENNNIVSNLQANLVIYGPGDIANNATYGLYSTPISNGEGTLS  EVSFSPFY LKPFDES YGNYSRLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHE  LVHVTHNLYGISNRNFYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID  SKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV  QGR LGNFKLDTAEF EKKLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKHYLKE  RPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGQLLESSYFEKIES  NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS  YPCSLNNGAIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKD  KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT  IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYS  PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVIDKSS  DTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL  VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWA EVYNITKAQWW  GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGNIDDK  AKIKNAISETEILLNK SVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLT KEMIPKV  QDNLKNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI  AFDINDIPSEFDDLINQYKNEI</p>
21	BoNT/X WT LC-H <sub>N</sub>	<p>MKLEINKFNYNPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK  NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPI MEADAIYNPNYLNTPSEKDEF  LQGVIVLERIKSKPEGEKLEL ISSIPLPLVSN GALTLSDNETIA</p>

	C467S	<p>YQENNNIVSNLQANLVIYGPGPDIANNATYGLYSTPISNGEGTLS  EVSFSFPFYLKPFDESYGNYSRLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHE  LVHVTHNLYGISNRNFYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID  SKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV  QGR LGNFKLDTAEF EKKLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKHLYLKE  RPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGQLESSYFEKIES  NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS  YPCSLNGSIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKD  KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT  IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNNPKVYS  PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDF SDET GKIDVIDKSS  DTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL  VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWA EVYNITKAQWW  GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGNIDDK  AKIKNAISETEILLNK SVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKE MIPKV  QDNLKNFDLET KKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI  AFDINDIPFSEFDDLINQYKNEI</p>
22	BoNT/X- LC-H <sub>N</sub> - A1-Hc	<p>MKLEINKFNYNPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFFKAFQVIK  NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPSEKDEF  LQGVIVLERIKSKPEGEKLELISSIPPLVSN GALTLSDNETIA  YQENNNIVSNLQANLVIYGPGPDIANNATYGLYSTPISNGEGTLS  EVSFSFPFYLKPFDESYGNYSRLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHE  LVHVTHNLYGISNRNFYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID  SKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV  QGR LGNFKLDTAEF EKKLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKHLYLKE  RPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGQLESSYFEKIES  NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS  YPCSLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKD  KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT  IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNNPKVYS  PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDF SDET GKIDVIDKSS  DTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL  VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWA EVYNITKAQWW  GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGNIDDK  AKIKNAISETEILLNK SVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKE MIPKV  QDNLKNFDLET KKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI</p>

		<p>AFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIIINTSILNLRYESNHLIDL SRYASK          INIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTS          FWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWKVS LNYGEI IWTLQDT          QEIKQRVVFKY SQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLI          DQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNE          KEIKDLYDNQSN SGI LKDFWGDYLYQDKPYYMLNLYDPNKYV          DVNNVGIRGYMYLK GPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYAS          GNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEI          PDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQ          FNNIAKLVASNWYNRQIERSRTLGC SWEFIPVDDGWGERPL</p>
23	BoNT/X- LC-H <sub>N</sub> - B1-Hc	<p>MKLEINKFNYNPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK          NIWIVPERYNTNNTNDLNIPSEPI MEADAIYNP NYLNT PSEKDEF          LQGVIKVLERIKSKPEGEKLELIS SSIPLPLV SNGAL T L S DNETIA          YQENNNIVSNLQANLVIYGP GPDIANNA TYGLYSTPISNGEGTLS          EVSFS PFY LKPFDES YGNYS L V NIVNK FVKREF APDPASTLMHE          LVHVTHNLYGISNRNFYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID          SKAISLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV          QGRLGNFKLDTAEFEKLN TILFVLNESNLAQRFSILVRKHYLKE          RPIDPIYVNI LDDNSYSTLEGFNIS SQSND FQGQLLESSYFEKIES          NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS          YPCSLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKD          KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPINSLFEIKT          IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYS          PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDF SDET GKIDVIDKSS          DTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL          VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWA EVYNITKAQWW          GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA I KM NMEFQLANYKGNIDDK          AKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLT KEMIPKV          QDNLKNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI          AFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIILNNIILNLR YKDNNLIDLSGYGA          KVEVYDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSV          SFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIWT          LIDINGKTKSVFFEYNIRE DISEYINRWFFVTITNNLNNAKIYINGK          LESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQ          SNIERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIK          LKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYINYRDLYIGEKFIIRRKNSQSIN</p>

		DDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWVRVYTYKYFKKEEEKLFLAPISDS DEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGI VFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE
24	BoNT/X- LC-H <sub>N</sub> - C1-Hc	MKLEINKFNYNNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPSEKDEF LQGVIVLERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNALTLSDNETIA YQENNNIVSNLQANLVIYGPGPDIANNATYGLYSTPISNGEGTLS EVSFSPFYLPFDESYGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHE LVHVTHNLYGISNRNFYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID SKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV QGRGNFKLDTAEFEKLNILFVLNESNLAQRFSILVRKHLYKE RPIDPIYVNLDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGGLESSEYFEKIES NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS YPCSLNNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKD KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYS PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLRISVKDFSDETGKIDVIDKSS DTLAIVPYIGPLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWAEVYNITKAQWW GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANAIAKMNMEFQLANYKGNIDDK AKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMIPKV QDNLKNFDLETKKTLDFIKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI AFDINDIPFSEDDLINQYKNEIINDSKILSLQNRKNTLVDTSQYN AEVSEEGDVQLNPIPFDFKLGSSGEDRGKVIVTQENINIVNSMY ESFSISFWIRINKWVSNLPGYTIIDSVKNNSGWSIGIISNLFVFTLK QNEDEQSINFSYDISNAPGYNKWFFVTVTNNMMGMNKIYIN GKLIDTIKVKELTGINFSKTITFEINKIPDTGLITSDSDNINMWIRD FYIFAKELDGKDINILFNSLQYTNVVKDYWGNDLRYNKEYYMV NIDYLNRYMYANSRQIVFNTRNNNDNFNEGYKIIIRIRGNTNDT RVRGGDILYFDMTINNKAYNLFMKNETMYADNHSTEDIYAIGL REQTKDINDNIIFQIQPMNNTYYYASQIFKSNFNGENISGICSIGTY RFRLGGDWYRHNLYVPTVKQGNYSALLESTSTHWGFVPVSE
25	BoNT/X- LC-H <sub>N</sub> - A1-Hc C461S	MKLEINKFNYNNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPSEKDEF LQGVIVLERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNALTLSDNETIA YQENNNIVSNLQANLVIYGPGPDIANNATYGLYSTPISNGEGTLS

		<p> EVSFSFPFYLKPFDESYGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHE  LVHVTHNLYGISNRNFYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID  SKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV  QGRLGNFKLDTAEFEKKLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKHYLE  RPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGQLESSYFEKIES  NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS  YPSLLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKD  KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT  IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYS  PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLRISIVKDFSDETGKIDVIDKSS  DTLAIVPYIGPLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPL  VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWADEVYNITKAQWW  GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANAIAKMNMEFQLANYKGNIDDK  AKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTKFMIKLSNSYLTKEMIPKV  QDNLKNFDLETKKTLDFIKEDIKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI  AFDINDIPSEFDDLINQYKNEIINTSILNLRYESNHLIDLRYASK  INIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTS  FWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWKVSLSNYGEIWTLQDT  QEIKQRVVFYKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLI  DQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIWYFNLFDKELNE  KEIKDLYDNQSNLILKDFWGDYLYQDKPYMYMLNLYDPNKYV  DVNNVGIKGYMYLKGRGSMVMTTNIYLNSSLYRGTKFIKKYAS  GNKDNIVRNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEI  PDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQ  FNNIAKLVASNWYNRQIERSRTLGCSEWEIFVDDGWGERPL </p>
26	BoNT/X- LC-H <sub>N</sub> - B1-Hc C461S	<p> MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIK  NIWIVPERYNTNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPSEKDEF  LQGVIVLERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNLALTLSDNETIA  YQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTLS  EVSFSFPFYLKPFDESYGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMHE  LVHVTHNLYGISNRNFYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGID  SKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIPV  QGRLGNFKLDTAEFEKKLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKHYLE  RPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGQLESSYFEKIES  NALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVS  YPSLLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKD </p>

		<p>KLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEIKT          IYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKVYS          PFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLRISIVKDFSDETGKIDVIDKSS          DTLAIVPYIGPLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPIL          VGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWADEVYNITKAQWW          GTIHLQINTRLAHTYKALSRQANAIAKMNMEFQLANYKGNIDDK          AKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMIPKV          QDNLNKFDLETKKTLDFKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNI          AFDINDIPFSEFDDLINQYKNEILNINILNRYKDNNDLIDLSGYGA          KVEVYDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSV          SFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWT          LIDINGKTKSVFFEYNIREDISYINRWFFVTITNLLNAKIYINGK          LESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFIFNTELSQ          SNIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIK          LKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYINRDLYIGEKFIIIRKNSNSQSIN          DDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWVYTYKYFKKEEEKLFLAPISDS          DEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGI          VFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE</p>
27	BoNT/X- LC-H <sub>N</sub> -C1- Hc C461S	<p>MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIK          NIWIVPERYFTNNTNDLNIPSEPIEADAIYNPNYLNTPSEKDE          FLQGVKIVLERIKSKPEGEKLELISISSIPLPLVSNAGLTLSDNETI          AYQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTL          SEVSFSPFYLKPFDESIGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMH          ELVHVTHNLYGISNRNFYFNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGI          DSKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIP          VQGRGLGNFKLDTAEFEKKNLTLFVLNESLAQRFSILVRKHYL          KERPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGLLESSYFEKI          ESNALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTN          VSYPSSLLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFF          KDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEI          KTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKV          YSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLRISIVKDFSDETGKIDVID          KSSDTLAIVPYIGPLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEF          TIPILVGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWADEVYNITKA          QWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANAIAKMNMEFQLANYKGN          DDKAKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMI</p>

		<p>PKVQDNLKNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRL          NKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIINDSKILSLQNRKNTLVDS          GYNAEVSEEGDVQLNPIPFDFKLGSSGEDRGKVIVTQENENIVY          NSMYESFSISFWIRINKWVSNLPGYTIIDSVKNNSGWSIGIISNFL          VFTLKQNEDESEQSINFSDISNAPGYNKWFFVTVTNNMMGMN          KIYINGKLIDTIKVKELTGINFSTITFEINKIPDTGLITSDSDNINM          WIRDFYIFAKELDGKDINILFNSLQYTNVVKDYWGNDLRYNKE          YYMVNIDYLNRYMYANSRQIVFNTRRNNDFNEGYKIIIRIG          NTNDTRVRGGDILYFDMTINNKAYNLFMKNETMYADNHSTEDI          YAIGLREQTKDINDNIIFQIQPMNNTYYYASQIFKSNFNGENISGI          CSIGTYRFRLGGDWYRHNYLVPTVKQGNYSALLESTSTHWGFV          PVSE</p>
28	BoNT/X- LC-H <sub>N</sub> -A1- Hc C467S	<p>MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIK          NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIEADAIYNPNYLNTPEKDE          FLQGVKVLERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNALTLSDNETI          AYQENNNIVSNLQANLVIYGPGDIANNATYGLYSTPISNGEGL          SEVSFSPFYLPKPFDESYGNYSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMH          ELVHVTHNLYGISNRNFYFNFDTGKIETSRQONSIFEELLTFGGI          DSKAISSLIKKIETAKNNYTLISERLNTVTVENDLLKYKKNIP          VQGRLGNFKLDTAEFEKKNLTLFVLNESNLAQRFSILVRKHYL          KERPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISSQGSNDFQGGLESSEYFEKI          ESNALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKTTSTKTN          VSYPCSLNNGSIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFF          KDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEI          KTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNNPKV          YSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLSIVKDFSDETGKIDVID          KSSDTLAIVPYIGPLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEF          TIPILVGLLEVIGGELAREQVEAIVNNAALDKRDQKWAEVYNITKA          QWWGTIHLQINRLAHTYKALSRQANAIAKMNMEFQLANYKGN          DDKAKIKNAISETTEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMI          PKVQDNLKNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRL          NKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIINTSILNLRYESNHLIDLSR          YASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYE          NFSTSFWIRIPKYFNISLNEEYTIINCMENNSGWKVSLSNYGEIHW          TLQDTQEIKQRVVFYKYSQMINISDYINRWIFVTITNRLNNSKIYI          NGRLLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLF</p>

		<p>KELNEKEIKDLYDNQSNQSGILKDFWGDYDLYDKPYYMLNLYDP          NKYVDVNNVVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIK          KYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKIL          SALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGF          IGFHQFNNAKLVASNWYNRQIERSRRTLGCSEWEPVDDGWGE          RPL</p>
29	BoNT/X- LC-H <sub>N</sub> -B1- Hc C467S	<p>MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK          NIWIVPERYNTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPSEKDE          FLQGVIVLVERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNALTLSDNETI          AYQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTL          SEVSFSPFYLKPFDES YGNYSRLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMH          ELVHVTHNLYGISNRNFYNFDTGKIE TSRQQNSLIFEELLTFGGI          DSKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIP          VQGR LGNFKLDTAEFKKNLTLFVLNESLAQRFSILVRKHYL          KERPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGQLESSYFEKI          ESNALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTN          VSYPCSLNNGSIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFF          KDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEI          KTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKV          YSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVID          KSSDTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEF          TIPILVGLVIGGELAREQVEAIVNNA LDKRDQKWA EYVNTKA          QWWGTIHLQINRLAHTYKALSRQANA IKMNM EFLANYKGN I          DDKAKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLT KEMI          PKVQDNLKNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRL          NKNIAFDINDIPSEFDDLINQYKNEIILNNIILNRYKDNNLIDLS          GYGAKVEVYDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVF          LDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNNSGWKISIRG          NRIIWTLIDINGKTKSVFFEYNIREDI SEYINRWFFVTITNNLNNA          KIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSI          FNTELSQSNIERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAG          NKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYIN YRDLYIGEKFIIRR          KSNSQSINDDIVRKEDIYIYLDFFNLNQEW RVYTYKYFKKEEKL          FLAPISDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGI          HRFYESGIVFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIP</p>

		KDEGWTE
30	BoNT/X- LC-H <sub>N</sub> -C1- Hc C467S	MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPSEKDE FLQGVIKVLERIKSKPEGEKLELELISSIPLPLVSNGALTLSDNETI AYQENNNIVSNLQANLVIYGPGPIANNATYGLYSTPISNGEGTL SEVSFSPFYLKPFDESYGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMH ELVHVTHNLYGISNRNFYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGI DSKAISSLIIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIP VQGR LGNFKLDTAEFKELNTILFVLNESLAQRFSILVRKHYL KERPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISSQGSNDFQGQLESSYFEKI ESNALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTN VSYPCSLNNGSIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFF KDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQONILERNEELYEPINSLFEI KTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNNKV YSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVID KSSDTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEF TIPILVGLVIGGELAREQVEAIVNNA LDKRDQKWA EYVNITKA QWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGN DDKAKIKNAISETEILLNK SVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMI PKVQDNLNK NFDLETKKTLDKFIKEKEDILG TNLSSSLRRKVSIRL NKNIAFDINDIPSEFDDLINQYKNEIINDSKILSLQNRKNTLV DTS GYNAEVSEEGDVQLNPIFPDFKLGSSGEDRGK VIVTQENIVY NSMYESFSISFWIRINKWVSNLPGYTIIDSVKNNSGWSIGIISNFL VFTLKQNEDEQSINF SYDISNAPGYNK WFFVTVTNNMMGMN KIYINGKLIDTIKVKELTGINF SKTITFEINKIPDTGLITSDSDNINM WIRDFYIFAKELDGKDINILFNSLQYTNVVKDYWGNDLRYNKE YYMVNIDYLNRYMYANSRQIVFNTRRNNNDNFEGYKIIKRIRG NTNDTRVRGGDILYFDMTINNKAYNLFMKNETMYADNHSTEDI YAIGLREQTKDINDNIIFQIQPMNNTYYYASQIFKSNFNGENISGI CSIGTYRFR LGGDWYRHNYLVPTVKQGN YASLLESTSTHWGFV PVSE
31	BoNT/X R360A/Y36 3F	MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPSEKDE FLQGVIKVLERIKSKPEGEKLELELISSIPLPLVSNGALTLSDNETI AYQENNNIVSNLQANLVIYGPGPIANNATYGLYSTPISNGEGTL SEVSFSPFYLKPFDESYGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMH

		<p>ELVHVTHNLYGISNRNFYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGI  DSKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIP  VQGR LGNFKLDTAEF EKKLNTILFVLNESLAQRFSILVAKHFL  KERPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGQLESSYFEKI  ESNALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTN  VSYPCSLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFF  KDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEI  KTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKV  YSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVID  KSSDTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEF  TIPILVGLVIGGELAREQVEAIVNNA LDKRDQKWA EYVNITKA  QWWGTIHLQINTRAHTYKALS RQANA IKMNMEFQLANYKGN I  DDKAKIKNAISETEILLNKSVEQAMK NTEKFMIKLSNSYLTKEMI  PKVQDNLKNFDLET KKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRL  NKNIAFDINDIPSEFDDLINQYKNEIEDYEVLNLGAEDGKIKDLS  GTTSDINIGSDIELADGRENKA I KIKGSENSTIKIAMNKYLRF SAT  DNFSISFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQD SKLI  WYLRDHNN SIKIVTPDYIAFNGWNLITITNRSKGSIVYVNGSKI  EEKDISSIWNT EVDDPIIFRLKNNRDTQAF TLLDQFSIYRKELNQ N  EVVKLYNYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIR  EYWSSFGYDYVILSDSKTITFPNNIRY GALYNGSKVLIKNSKKLD  GLVRNKDFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTT HDLTT  DFEIIQRQEKYRNYCQLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTFH DYRD  WVYSSAWYFQNYENLNRKHTKTNWYFIPKDEGWDED</p>
32	BoNT/X H227Y	<p>MKLEINKFNYPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK  NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPI MEADAIYNPNYLNTPEKDE  FLQGVIKVLERIKSKPEGEKLEL ISSIPLPLV SNGALTLSDNETI  AYQENNNIVSNLQANLVIYGP GPDIANNATYGLYSTPISNGEGTL  SEVSFSPFYLKPFDES YGNYRSLVNIVNK FVKREFAPDPASTLMY  ELVHVTHNLYGISNRNFYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGI  DSKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIP  VQGR LGNFKLDTAEF EKKLNTILFVLNESLAQRFSILVRKHYL  KERPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQGQLESSYFEKI  ESNALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTN  VSYPCSLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFF  KDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEI</p>

		<p>KTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKV          YSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVID          KSSDTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEF          TIPILVGLLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWA EYVNITKA          QWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGN I          DDKAKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLT KEMI          PKVQDNLKNFDLET KKTLDKFIKEKEDILG TNLSSSLRRKVSIRL          NKNIAFDINDIPSEFDDLINQYKNEIEDYEVLNLGAEDGKIKDLS          GTTSDINIGSDIELADGRENKA I KIKGSENSTIKIAMNKYLRF SAT          DNFSISFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQD SKLI          WYLRDHNN SIKIVTPDYIAFNGWNLITITNNRSKGSIVYVNGSKI          EEKDISSIW NTEVDDPIIFRLKNNRDTQAFTLLDQFSIYRKELNQN          EVVKLYNYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIR          EYWSSFGYDYVILSDSKTITFPNNIRY GALYNGSKVLIKNSK KLD          GLVRNKDFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTT HDLTT          DFEIQRQEKYRNYCQLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTFH DYRD          WVYSSAWYFQNYENLNRKHTKTNWYFIPKDEGWDED</p>
33	BoNT/X E228Q	<p>MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIK          NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPI MEADAIYNP NYLNTPEKDE          FLQGVIKVLERIKSKPEGEKLEL ISSIPLPLV SNGALTLSDNETI          AYQENNNIVSNLQANLVIYGP GPDIANNATYGLYSTPISNGEGTL          SEVSFSPFY LKPFDES YGNYSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMH          QLVHVTHNLYGISNRNFY YNFDTGKIETS RQQNSLIFEELLTFGG          IDSKAISSLIKKI IETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNIP          VQGR LGNFKLDTAEF EKKLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKH YL          KERPIDIYVNILDDNSYSTLEGFNISSQGSNDFQGGQLESSYFEKI          ESNALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTN          VSYPCSLN GCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIPETT VFF          KDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEI          KTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKV          YSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVID          KSSDTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEF          TIPILVGLLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWA EYVNITKA          QWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGN I          DDKAKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLT KEMI          PKVQDNLKNFDLET KKTLDKFIKEKEDILG TNLSSSLRRKVSIRL</p>

		<p>NKNIAFDINDIPSEFDDLINQYKNEIEDYEVLNLGAEDGKIKDLS  GTTSDINIGSDIELADGRENKAIKIKGSENSTIKIAMNKYLRFSAT  DNFSISFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLI  WYLRDHNNSIKIVTPDYIAFNGWNLITITNNRSKGSIVYVNGSKI  EEKDISSIWNTEVDDPIIFRLKNNRDTQAFLLDQFSIYRKELNQN  EYVVKLYNYFYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIR  EYWSSFGYDYVILSDSKTITFPNNIRYGALYNGSKVLIKNSKKLD  GLVRNKDFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTHDLTT  DFEIIQRQEKYRNYCQLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTFHIDYRD  WVYSSAWYFQNYENLNRKHTKTNWYFIPKDEGWDED</p>
34	BoNT/X H231Y	<p>MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAQVIK  NIWIVPERYNTNNTNDLNIPSEPIEADAIYNPYLNTPSEKDE  FLQGVIVLERIKSKPEGEKLELLEISSIPLPLVSNALTLSDNETI  AYQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTL  SEVSFSPFYLPFDESYGNYRSLVNIIVNKFVKREFAPDPASTLMH  ELVYVTHNLYGISNRNFYFNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGI  DSKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIP  VQGR LGNFKLDTAEFKKNLTLFVLNESLAQRFSILVRKHYL  KERPIDPIYVNI DDNSYSTLEGFNISSQGSNDFQGQLESSYFEKI  ESNALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTN  VSYPCSLNNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFF  KDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEI  KTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKV  YSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVID  KSSDTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEF  TIPILVGLEVIGGELAREQVEAIVNNA LDKRDQKWA EYVNITKA  QWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGN I  DDKAKIKNAISETTEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMI  PKVQDNLKNFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTLNSSLRRKVSIRL  NKNIAFDINDIPSEFDDLINQYKNEIEDYEVLNLGAEDGKIKDLS  GTTSDINIGSDIELADGRENKAIKIKGSENSTIKIAMNKYLRFSAT  DNFSISFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQDSKLI  WYLRDHNNSIKIVTPDYIAFNGWNLITITNNRSKGSIVYVNGSKI  EEKDISSIWNTEVDDPIIFRLKNNRDTQAFLLDQFSIYRKELNQN  EYVVKLYNYFYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIR  EYWSSFGYDYVILSDSKTITFPNNIRYGALYNGSKVLIKNSKKLD</p>

		GLVRNKDFIQLEIDGYNMGISADRFNEDTNYIGTTYGTTHTDLTT DFEIIQRQEKYRNYCQLKTPYNIFHKSGLMSTETSKPTFHDIRD WVYSSAWYFQNYENLNRKHTKTWYFIPKDEGWDED
35	BoNT/X- LC-H <sub>N</sub> R360A/Y36 3F	MKLEINKFNYNPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPSEKDE FLQGVIVLERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNLALTLSDNETI AYQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTL SEVSFSPFYLPFDES YGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMH ELVHVTHNLYGISNRNFYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGI DSKAISSELIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIP VQGR LGNFKLDTAEFEKLNILFVLNESLAQRFSILVAKHFL KERPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQQLLESSYFEKI ESNALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTN VSYPCSLNCGIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFF KDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEI KTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKV YSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVID KSSDTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEF TIPILVGLVIGGELAREQVEAIVNNAIDKRDQKWAEVYNITKA QWWGTIHLQINRLAHTYKALSQRANAIKMNMEFQLANYKGN DDKAKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMI PKVQDNLNKFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTLNSSLRRKVSIRL NKNI AFDINDIPSEFDDLINQYKNEI
36	BoNT/X- LC-H <sub>N</sub> H227Y	MKLEINKFNYNPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPSEKDE FLQGVIVLERIKSKPEGEKLELISSEIPLPLVSNLALTLSDNETI AYQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGTL SEVSFSPFYLPFDES YGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMY ELVHVTHNLYGISNRNFYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGI DSKAISSELIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIP VQGR LGNFKLDTAEFEKLNILFVLNESLAQRFSILVRKHYL KERPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISQGSNDFQQLLESSYFEKI ESNALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTN VSYPCSLNCGIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFF KDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEI KTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKV

		<p>YSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVID  KSSDTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEF  TIPILVGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWA EYVNITKA  QWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGN I  DDKAKIKNAISETEILLNK SVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLT KEMI  PKVQDNLKNFDLET KKTLDKFIKEKEDILG TNLSSSLRRKVSIRL  NKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEI</p>
37	BoNT/X- LC-H <sub>N</sub> E228Q	<p>MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK  NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNP NYLNTPSEKDE  FLQGVIKVLERIKSKPEGEKLELELISS IPLPLV SNGALTLSDNETI  AYQENNNIVSNLQANLVIYGPGDIANNATYGLYSTPISNGEGTL  SEVSFSPFYLPFDES YGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMH  QLVHVTHNLYGISNRNFY NFDTGKIETS RQQNSLIFEELLTFGG  IDSKAISSLIKKI IETAKNNYTTLISERLNTVT VENDLLKYIKNKIP  VQGR LGNFKLDTA EF EK KLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKH YL  KERPIDPIYVNILDDNS YSTLEGFNIS SQS NDFQ GQLESS YFEKI  ESNALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLN NIDLEDKKTTSKT N  VSYPCSLNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFF  KDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEEL YEPINSLFEI  KTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALS NP NKV  YSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVID  KSSDTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEF  TIPILVGLEVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWA EYVNITKA  QWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGN I  DDKAKIKNAISETEILLNK SVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLT KEMI  PKVQDNLKNFDLET KKTLDKFIKEKEDILG TNLSSSLRRKVSIRL  NKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEI</p>
38	BoNT/X- LC-H <sub>N</sub> H231Y	<p>MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFKAFQVIK  NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNP NYLNTPSEKDE  FLQGVIKVLERIKSKPEGEKLELELISS IPLPLV SNGALTLSDNETI  AYQENNNIVSNLQANLVIYGPGDIANNATYGLYSTPISNGEGTL  SEVSFSPFYLPFDES YGNYRSLVNIVNKFVKREFAPDPASTLMH  ELVYVTHNLYGISNRNFY NFDTGKIETS RQQNSLIFEELLTFGGI  DSKAISSLIKKI IETAKNNYTTLISERLNTVT VENDLLKYIKNKIP  VQGR LGNFKLDTA EF EK KLNTILFVLNESNLAQRFSILVRKH YL  KERPIDPIYVNILDDNS YSTLEGFNIS SQS NDFQ GQLESS YFEKI</p>

		ESNALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTN VSYPCSLNNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFF KDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQNILERNEELYEPINSLFEI KTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKV YSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLRISIVKDFSDETGKIDVID KSSDTLAIVPYIGPLLNIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEF TIPILVGLVIGGELAREQVEAIVNNALDKRDQKWADEVYNITKA QWWGTIHLQINTRLAHTYKALSQRQANAIAIKMNMEFQLANYKGN DDKAKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMI PKVQDNLNKFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTNLSSSLRRKVSIRL NKNIAFDINDIPSEFDDLINQYKNEI
39	VAMP1	MSAPAQPPAEGTEGTAPGGGPPGPPNMTSNRRLQQTQAQVEE VVDIIRVNVDKVLERDQKLELDDRADALQAGASQFESSAAKL KRKYWWKNCKMMIMLGAICAIIVVVIVYFFT
40	VAMP2	MSATAATAPPAAPAGEGGPPAPPNLTSNRRLQQTQAQVDEVV DIMRVNVDKVLERDQKLELDDRADALQAGASQFETSAAKLKR KYWWKNLKMIMLGVICAILIIIVYFSS
41	VAMP3	MSTGVPSGSSAATGSNRRLQQTQNVDEVV DIMRVNVDK VLE RDQKLELDDRADALQAGASQFETSAAKLKRKYWWKNCKMW AIGISVLVIIIIIVWCVS
42	VAMP4	MPPKFKRHLNDDVDTGSVKSERNNLEDDSDDEEDFFLRGSPG RFGPRNDKIKHVQNQVDEVIDVMQENITKVIERGERLDELQDKS ESLSDNATAFSNRSKQLRRQMWWRGCKIKAIMALVAAILLVIII LIVMKYRT
43	VAMP5	MAGIELERCQQQANEVTEIMRNNFGKVLERGKLAELQQRSDQ LLDMSSTFNKTTQNLAQKKCWENIRYRICVGLVVVGVLIIILVL LVVFLPQSSDSSAPRTQDAGIASGPGN
44	Ykt6	MKLYSLSVLYKGEAKVVLLKAAVDVSSFSFFQRSSVQEFMTFTS QLIVERSKGRASVKEQDYLVCHVYVRNDSLAVVIADNEYPSR VAFTLLEKVLDEFKQVDRIDWPVGPATIHYPALDGHLRYQN PREADPMTKVQAELETKIILHNTMESLLERGEKLLDVLVSKSEV LGTQSKAFYKTARKQNSCCAI
45	BoNT/X- LC-H <sub>N</sub> - LPETGG	MKLEINKFNYNDPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIK NIWIVPERYNFTNNTNDLNIPSEPIMEADAIYNPNYLNTPEKDE FLQGVIKVLERIKSKPEGEKLELIISSIPLPLVSNALTLSDNETI AYQENNNIVSNLQANLVIIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEGL

		SEVSFSPFYLKPFDES YGNYRSLVNIIVNKFKREFAPDPASTLMH ELVHVTHNLYGISNRNFYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGI DSKAISSLIKKIETAKNNYTTLISERLNTVTVENDLLKYIKNKIP VQGR LGNFKLDTAEF EKKLNTILFVLNESLAQRFSILVRKHYL KERPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNISSQGSNDFQGGQLESSEYFEKI ESNALRAFIKICPRNGLLYNAIYRNSKKNYLNNIDLEDKKTTSKTN VSYPCSLNNGCIEVENKDLFLISNKDSLNDINLSEEKIKPETTVFF KDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELYEPIRNSLFEI KTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALSNPNKV YSPFKNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSDETGKIDVID KSSDTLAIVPYIGPLL NIGNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEF TIPILVGLEVIGGELAREQVEAIVNNA LDKRDQKWA EYVNITKA QWWWGTHLQINTRLAHTYKALSRQANA IKMNMEFQLANYKGN DDKAKIKNAISETEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMI PKVQDNLNK NFDLETKKTLDKFIKEKEDILGTLNLSSSLRRKVSIRL NKNI AFDINDIPSEFDDLINQYKNEILPETGG
46	G-BoNT/X- Hc	GEDYEVLNLGAEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIELADGRENKAIKI KGSENSTIKIAMNKYLRF SATDNFSISFWIKHPKPTNLLNNGIEYT LVENFNQRGWKISIQDSKLIWYLRDHNN SIKIVTPDYIAFNGWN LITITNRRSKGSIVYVNGSKIEEKDISSIWNTEVDDPIIFRLKNNRD TQAF TLLDQFSIYRKELNQNEVVKLYNY YFNSNYIRDIWGNPLQ YNKKYYLQTQDKPGKGLIREYWSSFGYDYVILSDSKTITFPNNIR YGALYNGSKVLIKNSKLDGLVRNKDFIQLEIDGYNMGISADRF NEDTNYIGTTYGTT HDLTTDFEIIQRQEKYRNYCQLKTPYNIFHK SGLMSTETSKPTFHDYRDWVYSSAWYFQNYENLNRKHTKTN WYFIPKDEGWDED
47	BoNT/A1- Hc	IINTSILNLRYESNHLIDL SRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNL ESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFN S ISLNNEYTIIN CMENNSGWK VSLNYGEIHWTLQDTQEIKQRV VFKYSQMINISDY INRWIFVTITNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFK LDGCRDTHR YIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSN S GILKDF WGDYLYQYDKPYMLNLYDPNKYVDVNNV GIRGYMYLKGPRG SVMTTNIYLNSSLYRGT KFIKKYASGNKDNIVRNDRVYINVV VKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKND QGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFN NIAKLVASNWYNRQI ERSRRTLGC SWEFIPVDDGWGERPL

48	BoNT/B1- Hc	ILNNIILNLRKDNLDLIDLSGYGAKVEVYDGVELNDKNQFKLTS SANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNE YTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLIDINGKTKSVFFEYNIREDIS EYINRWFFVTITNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFK LDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIERYKIQSYSEYLKDFW GNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNS KYINYRDLYIGEKFIIRKSNSSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQE WRVYTYKYFKKEEEKLFLAPISDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQ LLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCISKWYLKEVK RKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE
49	BoNT/C1- Hc	INDSKILSLQNRKNTLVDTSGYNAEVSEEGDVQLNPIFPDFKLG SSGEDRGKVIVTQENIVYNSMYESFSISFWIRINKWVSNLPGYT IIDSVKNNSGWSIGIISNFLVFTLKQNEDEQSINFSYDISNNAPGY NKWFFVTVTNNMMGMNKIYINGKLIDTIKVKELTGINFSKTITFE INKIPDTGLITSDSDNINMWIRDFYIFAKELDGKDINILFNSLQYT NVVKDYWGNDLRYNKEYYMNIDYLNRYMYANSRQIVFNTR RNNNDFNEGYKIIKIRIGNTNDTRVRGGDILYFDMTINNKAYN LFMKNETMYADNHSTEDIYAIGLREQTKDINDNIIFQIQPMNNTY YYASQIFKSNFNGENISGICISIGTYRFLGGDWYRHNYLVPTVK QGNYSALLESTSTHWGFVPVSE
50	Сайт расщеплен ия тромбином	LVPR GS
51	TEV	ENLYFQ G
52	Сайт расщеплен ия PreScission	LEVLFQ GP
53	Сайт расщеплен ия фактором Ха	IEGR
54	Сайт расщеплен	IDGR

	ия фактором Ха	
55	Сайт расщеплен ия энтерокина зой	DDDDK
56	Сайт расщеплен ия протеазой SUMO	AHREQIGG

\* Мутации указаны подчеркиванием.

Новый ботулинический нейротоксин и его производные.

Ботулинические нейротоксины (BoNT) относятся к наиболее опасным потенциальным биотеррористическим средствам, а также используются клинически для лечения увеличивающегося перечня медицинских состояний. Существует семь серотипов BoNT (BoNT/A-G), известных на данный момент, но за последние 45 лет новые типы не были выявлены. Поиск в геномной базе данных штаммов *Clostridium botulinum* выявил новый тип BoNT, названный BoNT/X. Этот токсин демонстрировал самую низкую идентичность последовательностей по отношению к другим BoNT и не распознавался антисывороткой, вырабатываемой против известных типов BoNT. Он расщепляет связанный с везикулами мембранный белок (VAMP) в нейронах, который также является целью для BoNT/B/D/F/G, но BoNT/X расщепляет по сайту (между Arg66-Ala67 в VAMP2), уникальному для данного токсина. Для подтверждения активности BoNT/X ограниченное количество BoNT/X полной длины собирали путем ковалентного связывания двух нетоксичных фрагментов BoNT/X с использованием транспептидазы (сортазы). Собранный BoNT/X проникал в культивируемые нейроны, расщеплял VAMP2 и вызывал атрофический паралич у мышей, что измеряли с помощью анализа показателя отведения пальца. Совместно эти данные установили BoNT/X как новый тип BoNT. Его идентификация представляет срочную задачу для разработки эффективных контрмер, а также представляет новый инструмент для потенциального терапевтического применения.

Поиск в геномных базах данных выявил новый ген BoNT.

В попытке исследовать эволюционный ландшафт BoNT выполняли итеративные поиски по модели Hidden Markov в базе данных последовательностей PubMed с использованием последовательностей семи BoNT в качестве зондов. Поиск успешно идентифицировал основные серотипы, подтипы и мозаичные токсины BoNT, а также родственный нейротоксин столбняка (TeNT) (фиг. 5). Неожиданно также выявили новый ген BoNT (GenBank № BAQ12790.1) из недавно сообщенной геномной последовательности штамма 111 *Clostridium botulinum*. Этот ген токсина в настоящем документе обозначен как BoNT/X.

Филогенетический анализ выявил, что BoNT/X четко отличается от всех других BoNT и TeNT (фиг. 1A). Он имеет наименьшую идентичность белковой последовательности (<31%) из любых других BoNT среди парных сравнений в семействе BoNT/TeNT (фиг. 1A). Например, BoNT/A и BoNT/B обладают 39% идентичностью последовательностей, а BoNT/B и BoNT/G обладают 58% идентичностью последовательностей. Кроме того, скользящее окно сравнения последовательностей продемонстрировало, что подобие низкой степени равномерно распределено по последовательности BoNT/X по сравнению с другими семью BoNT и TeNT (фиг. 1B), что указывает на то, что это не мозаичный токсин.

Несмотря на низкую идентичность последовательностей, общее расположение доменов и некоторые ключевые признаки BoNT, по-видимому, являются консервативными в BoNT/X (фиг. 1B), в том числе: (1) консервативный цинк-зависимый мотив протеазы HExxH (остатки 227-231, HELVH (SEQ ID NO: 92)) находится в предполагаемой LC; (2) на границе между предполагаемым LC и HC находятся два консервативных цистеина, которые могут образовывать важную межпечечную дисульфидную связь; (3) консервативный мотив связывания рецептора SxWY существует в предполагаемой HC (остатки 1274-1277, SAWY (SEQ ID NO: 93)), который распознает липидные корцепторные ганглиозиды<sup>43, 44</sup>.

Как и предполагали, гену BoNT/X предшествует предполагаемый ген NTNHA (фиг. 1C). Они расположены в кластере генов OrfX. Однако кластер генов OrfX в BoNT/X имеет две уникальные особенности по сравнению с двумя другими известными кластерами OrfX (фиг. 1C): (1) имеется дополнительный белок OrfX2 (обозначенный как OrfX2b), расположенный рядом с геном BoNT/X, о котором не сообщалось для каких-либо других кластеров OrfX; (2) рамка считывания генов OrfX имеет то же направление,

что и ген VoNT/X, в то время как они обычно противоположны направлению гена VoNT в других кластерах OrfX (фиг. 1C). Вместе эти особенности указывают на то, что VoNT/X может составлять уникальную эволюционную ветвь семейства VoNT.

LC VoNT/X расщепляет VAMP2 по новому сайту.

Далее проверяли, является ли VoNT/X функциональным токсином. Сначала исследовали LC VoNT/X (X-LC). Границу LC (остатки 1-439) определяли путем выравнивания последовательностей с другими VoNT. Синтезировали cDNA, кодирующую LC и получали LC как His6-меченный рекомбинантный белок в *E. coli*. X-LC инкубировали с экстрактами в поверхностно-активном веществе головного мозга крысы (BDE) и анализ иммуноблоттинга использовали для исследования расщепления трех доминантных белков SNARE в головном мозге - SNAP-25, VAMP2 и синтаксина 1. LC VoNT/A (A-LC) и VoNT/B (B-LC) анализировали параллельно в качестве контролей. Расщепление SNAP-25 с помощью VoNT/A создает меньший фрагмент, который все еще может распознаваться при иммуноблоттинге, в то время как расщепление VAMP2 с помощью VoNT/B аннулирует сигнал VAMP2 при иммуноблоттинге (фиг. 2A). Синаптофизин (Syn), синаптический везикулярный белок, также выявляли в качестве внутреннего контроля загрузки. Инкубация X-LC с DTE головного мозга крысы не влияла на синтаксин 1 или SNAP-25, но аннулировала сигналы VAMP2 (фиг. 2A). LC VoNT являются цинк-зависимыми протеазами<sup>25</sup>. Как предполагали, EDTA предотвращала расщепление белков SNARE с помощью X-, A- и B-LC (фиг. 2A). Для дальнейшего подтверждения того, что X-LC расщепляет VAMP2, очищали цитозольный домен VAMP2 (остатки 1-96) в виде His6-меченого белка. Инкубация VAMP2 (1-96) с X-LC превращала полосу VAMP2 в две полосы с более низкой молекулярной массой в геле SDS-PAGE (фиг. 2B), подтверждая, что X-LC расщепляет VAMP2.

Чтобы идентифицировать сайт расщепления в VAMP2, белок VAMP2 (1-96) анализировали с предварительной инкубацией или без таковой с X-LC с помощью жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS, фиг. 2C-2E, подробности см. ниже). Одиночный пик доминантного пептида появился после инкубации с X-LC (фиг. 2C, 2E и 6). Его молекулярную массу определяли как 3081,7, что соответствует только пептидной последовательности остатков A67-L96 VAMP2 (фиг. 2C, 2E). Соответственно, также выявляли другой фрагмент от начала His6-метки до остатка R66 VAMP2 (фиг. 2D). Чтобы дополнительно подтвердить этот результат, анализ повторяли с другим фрагментом VAMP2 - GST-меченым рекомбинантным VAMP2 (33-86) (фиг. 7). Инкубация с X-LC давала один доминантный пик с молекулярной массой 2063,1, который соответствует только пептидной последовательности остатков A67-R86 VAMP2 (фиг. 7D, 7E). Как и ожидалось, также выявляли другой фрагмент от начала GST-метки до остатка R66 VAMP2 (фиг. 7F). Вместе эти результаты продемонстрировали, что X-LC имеет единственный сайт расщепления в VAMP2 между R66 и A67.

R66-A67 является новым сайтом расщепления, отличным от установленных целевых сайтов для всех других VoNT (фиг. 2F). Это также единственный сайт расщепления VoNT, расположенный в области, ранее известной как мотив SNARE (фиг. 2F, заштрихованные области)<sup>45</sup>. Семейство белков VAMP включает в себя VAMP1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, а также родственные Sec22b и Ykt6. R66-A67 является консервативным в VAMP1 и VAMP3, которые являются высокоомологичными по отношению к VAMP2, но не в других гомологах VAMP, таких как VAMP7 и VAMP8. Для подтверждения специфичности X-LC HA-меченый VAMP1, 3, 7, 8 полной длины и мус-меченый Sec22b и Ykt6 экспрессировали в клетках HEK293 путем транзientной трансфекции. Клеточные лизаты инкубировали с X-LC (фиг. 2G). VAMP1 и 3 расщепляли с помощью X-LC, о чем свидетельствует смещение сигнала иммуноблоттинга к более низкой молекулярной массе, в то время как VAMP7, VAMP8 и Sec22b были устойчивы к X-LC (фиг. 2G).

Неожиданно Ykt6 расщепляли с помощью X-LC (фиг. 2G). Этот результат подтверждали с использованием очищенного GST-меченого фрагмента Ykt6, который после инкубации с X-LC сместился к полоске более низкой молекулярной массы (фиг. 2H). Сайт расщепления определяли как K173-S174 с помощью анализа масс-спектрометрии интактного Ykt6 по сравнению с Ykt6, расщепленным с помощью X-LC (фиг. 13A). Это гомологичный сайт по отношению к сайту расщепления в VAMP2 (фиг. 2F), что указывает на то, что местоположение сайта расщепления сохраняется в разных VAMP. Среди представителей VAMP VAMP4 содержит ту же пару остатков (K87-S88) на этом сайте, что и Ykt6. Обнаружили, что GST-меченый цитоплазматический домен VAMP4 эффективно расщеплялся с помощью X-LC (фиг. 2I). Соответственно, X-LC расщеплял нативный VAMP4 в BDE (фиг. 4J). В качестве контроля Sec22b не расщеплялся с помощью X-LC в BDE. Кроме того, GST-меченый цитоплазматический домен VAMP5 также расщеплялся, хотя и с более медленной скоростью, чем VAMP2 и VAMP4 (фиг. 2I). Сайты расщепления подтверждали как K87-S88 в VAMP4 и R40-S41 в VAMP5 с помощью анализа масс-спектрометрии (фиг. 14). Оба являются гомологичными сайтами по отношению к сайту расщепления в VAMP2 (фиг. 2F). Способность X-LC расщеплять VAMP4, VAMP5 и Ykt6 весьма необычна, так как их последовательности существенно отличаются от VAMP 1/2/3. VoNT/X является первым VoNT, способным расщеплять VAMP вне канонических целей VAMP1/2/3<sup>66</sup>. X-LC также расщеплял VAMP4 в BDE, и расщепление блокировалось с помощью EDTA (фиг. 2J).

Примечательной особенностью VoNT/X является его уникальная способность расщеплять VAMP4 и Ykt6. VAMP4 широко экспрессируется и, как известно, опосредует слияние везикул между сетью

транс-Гольджи (TGN) и эндосомами, а также гомотипическое слияние эндосом<sup>59, 60</sup>. Ykt6 представляет собой атипичный SNARE без трансмембранного домена<sup>67-70</sup>. Он заякоривается в мембранах посредством липидирования, что позволяет динамически регулировать его мембранную ассоциацию. Ykt6 является незаменимым белком в дрожжах, участвуя во множественных событиях слияния мембран, в том числе ER-Гольджи, внутри Гольджи, эндосома-Гольджи-вакуолярное и аутофагосомное образование. Его функция в клетках млекопитающих еще не установлена. Традиционно известно, что VoNT ограничиваются целями SNARE, которые опосредуют везикулярный экзоцитоз на плазматических мембранах. VoNT/X является первым VoNT, который способен расщеплять SNARE, опосредуя различные события внутриклеточной мембранной миграции.

Интересно, что и VAMP4, и Ykt6 имеют повышенное содержание в нейронах. Недавние исследования показали, что VAMP4 также может вносить вклад в асинхронный синаптический везикулярный экзоцитоз, экзоцитоз ростосом и зависимый от активности объемный эндоцитоз (ADBE) в нейронах<sup>61-63</sup>. Роль Ykt6 в нейронах еще предстоит установить, но показали, что он подавляет токсичность  $\alpha$ -синуклеина в моделях болезни Паркинсона<sup>71, 72</sup>. Другой субстрат VoNT/X, VAMP5, в основном экспрессируется в мышечных клетках, и его функция еще не установлена<sup>64</sup>. VoNT/X будет мощным инструментом для исследования функций VAMP4, Ykt6 и VAMP5, а также связанных с ними событий мембранной миграции. Кроме того, VAMP4 участвует в высвобождении гранул в иммунных клетках<sup>65</sup>, таким образом, VoNT/X может обладать уникальным потенциалом среди всех VoNT для модулирования воспалительной секреции в иммунных клетках.

#### Протеолитическая активация VoNT/X.

VoNT изначально продуцируется как один полипептид. Линкерный участок между LC и H<sub>N</sub> должен быть расщеплен либо бактериальными, либо хозяйскими протеазами в процессе, известном как "активация", что важно для активности VoNT. LC и H<sub>N</sub> в VoNT остаются соединенными межцепочечной дисульфидной связью до транслокации LC в цитозоль клеток, где дисульфидная связь восстанавливается для высвобождения LC в цитозоль. Выравнивание последовательностей показало, что VoNT/X содержит самый длинный линкерный участок между двумя консервативными цистеинами по сравнению со всеми другими VoNT (C423-C467, фиг. 3A). Кроме того, линкерный участок VoNT/X содержит дополнительный цистеин (C461), который является уникальным для VoNT/X.

Для проверки того, является ли линкерный участок между LC и H<sub>N</sub> в VoNT/X восприимчивым к протеолитическому расщеплению, получали рекомбинантный фрагмент X-LC-H<sub>N</sub> (остатки 1-891) в *E. coli* и подвергали ограниченному протеолизу с помощью эндопротеиназы Lys-C, которая разрезает по С-терминальной стороне лизиновых остатков. Для идентификации восприимчивого сайта расщепления при условиях ограниченного протеолиза X-LC-H<sub>N</sub> анализировали с использованием мечения Tandem Mass Tag (TMT) и подхода тандемной масс-спектрометрии. Метки TMT не имеют N-конец (и лизины). Ограниченный протеолиз с помощью Lys-C дает дополнительные свободные N-концы, которые не могут существовать в интактном образце X-LC-H<sub>N</sub> (подробности см. ниже). Вкратце, интактные образцы X-LC-H<sub>N</sub> метили легкой TMT и равное количество образцов X-LC-H<sub>N</sub> подвергали Lys-C, а затем метили тяжелой TMT. Затем оба образца расщепляли химотрипсином, объединяли вместе и подвергали количественному анализу масс-спектрометрии. Перечень идентифицированных пептидов показан в табл. 2. Отношение легкая TMT:тяжелая TMT обычно было в 2 раза больше друг относительно друга для каждого пептида, за исключением пяти пептидов, начиная с N439, которые не показали сигнала для мечения легкой TMT, что указывает на то, что это новый N-конец создается за счет разрезания Lys-C (фиг. 3A, табл. 2). Таким образом, Lys-C предпочтительно разрезает K438-N439 в ограниченных протеолитических условиях, демонстрируя, что линкерный участок является чувствительным к протеазам (фиг. 3A).

Далее проверяли важность этой протеолитической активации для функции VoNT/X. Ранее показали, что инкубация высоких концентраций LC-H<sub>N</sub> VoNT с культивируемыми нейронами приводила к проникновению LC-H<sub>N</sub> в нейронах, вероятно из-за неспецифического поглощения в нейронах<sup>46, 47</sup>. С использованием данного подхода сравнивали эффективность интактного и активированного X-LC-H<sub>N</sub> в культивируемых кортикальных нейронах крысы. Нейроны подвергали X-LC-H<sub>N</sub> в среде в течение 12 ч. Клеточные лизаты собирали и выполняли анализ иммуноблоттинга для изучения расщепления белков SNARE. Как показано на фиг. 3B, X-LC-H<sub>N</sub> проникал в нейроны и расщеплял VAMP2 в зависимости от концентрации. X-LC-H<sub>N</sub>, активированный Lys-C, демонстрировал значительно более высокую эффективность, чем интактный X-LC-H<sub>N</sub>: 10 нМ активированного X-LC-H<sub>N</sub> расщепляли подобные уровни VAMP2 как 150 нМ интактного X-LC-H<sub>N</sub> (фиг. 3B). Следует отметить, что интактный X-LC-H<sub>N</sub>, вероятно, чувствителен к протеолитическому расщеплению протеазами клеточной поверхности, поэтому он все еще активен в нейронах при высоких концентрациях. Интересно, что активированный X-LC-H<sub>N</sub>, по-видимому, является более мощным, чем активированный LC-H<sub>N</sub> VoNT/A (A-LC-H<sub>N</sub>) и VoNT/B (B-LC-H<sub>N</sub>), который не показал какого-либо выявляемого расщепления их субстратов SNARE в нейронах в тех же условиях анализа (фиг. 3B).

Пептидные фрагменты X-LC-H<sub>N</sub> при ограниченном протеолизе анализировали с помощью мечения TMT количественной масс-спектрометрии (табл. 2).

His6-меченый рекомбинантный X-LC-H<sub>N</sub> метили легкой TMT. Равное количество образцов

X-LC-H<sub>N</sub> подвергали Lys-C, а затем метили тяжелой TMT. Затем оба образца расщепляли химотрипсином, объединяли вместе и подвергали количественному анализу масс-спектрометрии. Представлен перечень идентифицированных пептидов. Отношение легкая TMT:тяжелая TMT в 2 раза больше друг относительно друга для всех пептидов, за исключением пяти пептидов (подчеркнутых), начиная с N439. Эти пять пептидов не показали сигнала для мечения легкой TMT, что указывает на то, что N439 является новым N-концом, созданным за счет разрезания Lys-C. Пептидные последовательности в табл. 2 соответствуют, сверху вниз, SEQ ID NO: 94-226.

Таблица 2

ScanF	Z	Теор. масса/заряд	PPM	X Corr	Δ Corr	Этал.	Пептид	Стартовое полож.	Конечное полож.	Макс. тяж.	Макс. легк.	Отношение тяж./легк.
16633	2	611,384	1,46	1,751	0,651	xLcH <sub>N</sub>	K.LJEINK#F.N	3	8	4,03E+04	2,92E+04	1,38
16638	2	606,3736	0,95	1,71	0,654	xLcH <sub>N</sub>	K.LEINKF.N	3	8	4,03E+04	2,92E+04	1,38
15946	2	912,456	2,74	4,083	0,877	xLcH <sub>N</sub>	F.NJYNDPIDGINV ITM*.R	9	22	4,34E+05	9,26E+05	0,47
15942	2	909,9508	2,28	4,546	0,661	xLcH <sub>N</sub>	F.NYNDPIDGINVI TM*.R	9	22	4,34E+05	9,26E+05	0,47
17201	2	785,9092	1,26	2,455	0,273	xLcH <sub>N</sub>	F.NYNDPIDGINVI T	9	20	1,14E+06	1,94E+06	0,59
11082	2	679,833	1,17	1,74	0,754	xLcH <sub>N</sub>	F.NYNDPIDGIN.V	9	18	8,01E+05	1,20E+06	0,67
11083	2	682,3382	0,96	2,6	0,742	xLcH <sub>N</sub>	F.NJYNDPIDGIN.V	9	18	8,01E+05	1,20E+06	0,67
19628	2	535,3264	0,97	1,391	0,701	xLcH <sub>N</sub>	D.PIDGINVLT	13	20	6,55E+04	1,23E+05	0,53
19626	2	532,8211	0,68	1,474	0,608	xLcH <sub>N</sub>	D.PIDGINVLT	13	20	6,55E+04	1,23E+05	0,53
20815	4	802,2073	2,19	2,962	0,582	xLcH <sub>N</sub>	Y.NJPNYLNTPSE K#DEFLQGVK#V L.E	78	99	4,57E+04	1,21E+05	0,38
20463	4	802,2073	1,96	2,726	0,385	xLcH <sub>N</sub>	Y.NJPNYLNTPSE K#DEFLQGVK#V L.E	78	99	2,96E+04	8,18E+04	0,36
20799	4	798,4495	1,91	3,647	0,659	xLcH <sub>N</sub>	Y.NPNYLNTPSEK DEFLQGVKVL.E	78	99	4,57E+04	1,21E+05	0,38
20568	4	798,4495	1,63	2,639	0,419	xLcH <sub>N</sub>	Y.NPNYLNTPSEK DEFLQGVKVL.E	78	99	2,96E+04	8,18E+04	0,36
22720	2	753,4631	1,96	2,339	0,222	xLcH <sub>N</sub>	L.LELISSSIPLPL.V	112	123	1,40E+04	2,80E+04	0,50
21170	2	696,9211	1,9	1,781	0,326	xLcH <sub>N</sub>	L.ELISSSIPLPL.V	113	123	2,75E+04	4,15E+04	0,66
21281	2	696,9211	1,86	2,099	0,282	xLcH <sub>N</sub>	L.ELISSSIPLPL.V	113	123	2,75E+04	4,15E+04	0,66
21378	2	696,9211	1,83	1,593	0,149	xLcH <sub>N</sub>	L.ELISSSIPLPL.V	113	123	2,75E+04	4,15E+04	0,66

041568

19246	2	578,363	1,18	1,443	0,27	xLcH <sub>N</sub>	L.IJSSSIPLPL.V	115	123	1,61E+04	4,12E+04	0,39
19365	2	578,363	1,08	1,624	0,135	xLcH <sub>N</sub>	L.IJSSSIPLPL.V	115	123	1,61E+04	4,12E+04	0,39
19241	2	575,8577	1	1,484	0,209	xLcH <sub>N</sub>	L.ISSSIPLPL.V	115	123	1,61E+04	4,12E+04	0,39
19360	2	575,8577	0,91	1,673	0,298	xLcH <sub>N</sub>	L.ISSSIPLPL.V	115	123	1,61E+04	4,12E+04	0,39
13952	2	948,9912	2,47	2,562	0,54	xLcH <sub>N</sub>	L.VJSGALTLSD NETIAY.Q	124	139	2,51E+05	3,67E+05	0,68
13949	2	946,486	2,42	1,729	0,599	xLcH <sub>N</sub>	L.VSNGALTLSDN ETIAY.Q	124	139	2,51E+05	3,67E+05	0,68
6712	2	392,7318	0,19	1,523	0,206	xLcH <sub>N</sub>	L.VSNGAL.T	124	129	1,18E+05	2,03E+05	0,58
10243	2	678,3482	0,73	1,499	0,616	xLcH <sub>N</sub>	L.TJLSDNETIAY.Q	130	139	2,14E+05	3,67E+05	0,58
10242	2	675,843	0,69	1,594	0,842	xLcH <sub>N</sub>	L.TLSDNETIAY.Q	130	139	2,14E+05	3,67E+05	0,58
15890	2	1110,579	2,74	2,243	0,6	xLcH <sub>N</sub>	L.QJANLVIYGP DIANNATY.G	150	168	5,20E+04	9,82E+04	0,53
15881	2	1108,073	1,86	2,121	0,673	xLcH <sub>N</sub>	L.QANLVIYGP DIANNATY.G	150	168	5,20E+04	9,82E+04	0,53
11142	2	727,3879	1,39	1,945	0,635	xLcH <sub>N</sub>	L.VIYGPDIAN N.A	154	165	1,91E+04	3,90E+04	0,49
12879	2	894,962	1,24	2,673	0,731	xLcH <sub>N</sub>	L.VIYGPDIAN NATY.G	154	168	6,62E+05	1,25E+06	0,53
10964	2	707,3541	2,8	1,39	0,466	xLcH <sub>N</sub>	Y.GPDIANNAT Y.G	157	168	1,42E+04	2,24E+04	0,63
11091	2	456,2473	0,78	1,352	0,765	xLcH <sub>N</sub>	N.ATYGLY.S	166	171	3,55E+04	8,08E+04	0,44
17435	2	1094,055	2,53	3,418	0,69	xLcH <sub>N</sub>	Y.GJLYSTPISN GTLSEVSF.S	169	187	1,55E+05	2,27E+05	0,68
17410	2	1091,549	2,48	3,748	0,738	xLcH <sub>N</sub>	Y.GJLYSTPISN GTLSEVSF.S	169	187	1,55E+05	2,27E+05	0,68
19830	2	1259,631	2,15	2,885	0,676	xLcH <sub>N</sub>	Y.GJLYSTPISN GTLSEVSFSF.Y	169	190	1,98E+04	2,46E+04	0,81
20131	3	838,4197	2,08	2,781	0,742	xLcH <sub>N</sub>	Y.GJLYSTPISN GTLSEVSFSF.Y	169	190	4,60E+05	5,32E+05	0,86
12546	2	862,9488	1,9	1,817	0,401	xLcH <sub>N</sub>	Y.GJLYSTPISN GTLS.E	169	183	7,95E+04	7,83E+04	1,02
12571	2	860,4436	1,84	1,528	0,588	xLcH <sub>N</sub>	Y.GJLYSTPISN GTLS.E	169	183	7,95E+04	7,83E+04	1,02
19819	3	838,4197	1,61	2,655	0,662	xLcH <sub>N</sub>	Y.GJLYSTPISN GTLSEVSFSF.Y	169	190	4,13E+04	4,59E+04	0,90
9948	2	851,4307	2,54	2,044	0,765	xLcH <sub>N</sub>	Y.STPISNGE EV.S.F	172	186	1,92E+04	2,39E+04	0,81
18409	2	1090,541	2,45	4,434	0,844	xLcH <sub>N</sub>	Y.STPISNGE EV.SF.SF.Y	172	190	8,21E+05	9,22E+05	0,89
18417	2	1090,541	2,39	3,307	0,82	xLcH <sub>N</sub>	Y.STPISNGE EV.SF.SF.Y	172	190	8,21E+05	9,22E+05	0,89
18418	2	1093,047	2,39	2,983	0,845	xLcH <sub>N</sub>	Y.SJTPISNGE SEVSFSF.Y	172	190	8,21E+05	9,22E+05	0,89
18876	2	1093,047	1,97	1,841	0,679	xLcH <sub>N</sub>	Y.SJTPISNGE SEVSFSF.Y	172	190	8,21E+05	9,22E+05	0,89
14591	2	927,4701	1,96	3,362	0,646	xLcH <sub>N</sub>	Y.SJTPISNGE SEVSF.S	172	187	2,09E+05	1,42E+05	1,48
14803	2	924,9649	1,88	1,934	0,462	xLcH <sub>N</sub>	Y.STPISNGE GTL.S	172	187	2,96E+05	4,65E+05	0,64



## 041568

20825	2	825,4247	2,17	2,958	0,881	xLcH <sub>N</sub>	D.PIYVNILDDNS Y.S	371	382	7,80E+04	8,16E+04	0,96
12614	2	685,3561	1,34	1,843	0,609	xLcH <sub>N</sub>	N.IJLDDNSYSTL.E	376	385	1,01E+05	2,57E+05	0,39
11272	2	441,7421	1,48	1,795	0,903	xLcH <sub>N</sub>	Y.SJTLEGF.N	383	388	4,45E+04	1,36E+05	0,33
11261	2	439,2369	1,08	1,536	0,514	xLcH <sub>N</sub>	Y.STLEGF.N	383	388	4,45E+04	1,36E+05	0,33
14260	2	441,7421	0,49	1,462	0,848	xLcH <sub>N</sub>	Y.SJTLEGF.N	383	388	5,41E+04	1,32E+05	0,41
14246	2	439,2369	0,38	1,46	0,844	xLcH <sub>N</sub>	Y.STLEGF.N	383	388	5,41E+04	1,32E+05	0,41
13808	2	916,4629	2,48	2,036	0,498	xLcH <sub>N</sub>	F.NISSQGSNDFQ GQLL.E	389	403	2,86E+04	6,39E+04	0,45
17314	3	815,7238	2,05	2,149	0,621	xLcH <sub>N</sub>	F.NISSQGSNDFQ GQLLESSYF.E	389	408	1,26E+05	2,71E+05	0,47
6340	2	803,3788	0,75	2,554	0,721	xLcH <sub>N</sub>	F.NISSQGSNDFQ GQ.L	389	401	1,03E+04	2,21E+04	0,47
11696	2	493,2814	0,67	1,62	0,518	xLcH <sub>N</sub>	L.LJYNAIY.R	429	434	1,19E+05	1,87E+05	0,63
11692	2	490,7762	0,6	1,57	0,118	xLcH <sub>N</sub>	L.LYNAIY.R	429	434	1,19E+05	1,87E+05	0,63
14021	3	756,4332	2,14	2,305	0,363	xLcH <sub>N</sub>	K.NJYLNNIDLED K#K#T.T	439	451	6,85E+05	5,12E+03	133, 95
12997	3	1009,909	1,93	3,044	0,553	xLcH <sub>N</sub>	K.NJYLNNIDLED K#K#TTSK#TN.V	439	456	4,24E+05	0,00E+00	#DI V/O!
12932	3	1009,909	1,92	4,251	0,695	xLcH <sub>N</sub>	K.NJYLNNIDLED K#K#TTSK#TN.V	439	456	4,24E+05	0,00E+00	#DI V/O!
14003	3	790,1157	1,59	2,894	0,542	xLcH <sub>N</sub>	K.NJYLNNIDLED K#K#T.T.S	439	452	4,40E+06	1,13E+04	389, 24
13105	4	729,173	1	3	0,599	xLcH <sub>N</sub>	K.NJYLNNIDLED K#K#TTSK#T.N	439	455	3,39E+06	3,14E+03	1078 97
11567	3	747,091	1,33	2,711	0,518	xLcH <sub>N</sub>	N.YLNNIDLEDKK T.T.S	440	452	1,22E+04	9,52E+04	0,13
11515	3	747,091	1,33	2,729	0,496	xLcH <sub>N</sub>	N.YLNNIDLEDKK T.T.S	440	452	1,22E+04	9,52E+04	0,13
17001	2	857,9579	1,99	1,967	0,713	xLcH <sub>N</sub>	G.CIEVENKDLF.L	467	476	3,29E+04	1,64E+05	0,20
16337	4	941,793	1,76	2,419	0,135	xLcH <sub>N</sub>	F.LJISNK#DSLNDI NLSEEK#IK#PETT VF.F	477	501	1,27E+06	1,06E+06	1,19
16394	4	941,793	1,72	2,19	0,391	xLcH <sub>N</sub>	F.LJISNK#DSLNDI NLSEEK#IK#PETT VF.F	477	501	1,27E+06	1,06E+06	1,19
17983	3	993,888	2,4	3,193	0,657	xLcH <sub>N</sub>	K.DJSLNDINLSEE K#IK#PETTVF.F	482	501	3,27E+04	2,59E+03	12,6 4
18031	3	955,5456	2,06	3,607	0,764	xLcH <sub>N</sub>	D.SJLNDINLSEEK #IK#PETTVF.F	483	501	4,90E+04	4,12E+04	1,19
11720	2	834,8912	2,14	1,689	0,726	xLcH <sub>N</sub>	L.SNYDFTEANSIP S.I	514	526	2,91E+04	2,50E+04	1,17
13409	2	1065,513	2,12	4,742	0,769	xLcH <sub>N</sub>	L.SJNYDFTEANSI PSISQQ.N	514	530	7,05E+04	7,52E+04	0,94
8896	2	642,7908	1,42	1,851	0,708	xLcH <sub>N</sub>	L.SNYDFTEAN.S	514	522	2,12E+05	2,27E+05	0,94
8883	2	645,296	1,39	2,362	0,879	xLcH <sub>N</sub>	L.SJNYDFTEAN.S	514	522	2,12E+05	2,27E+05	0,94
17774	2	1051,044	2,7	1,967	0,9	xLcH <sub>N</sub>	Y.DFTEANSIPSIS QQNILE	517	533	3,52E+04	3,28E+04	1,07

## 041568

17438	2	1051,044	2,55	1,944	0,665	xLcH <sub>N</sub>	Y.DFTEANSIPSIS QQNILE	517	533	9,04E+04	8,08E+04	1,12
12784	2	880,9387	1,87	2,537	0,778	xLcH <sub>N</sub>	Y.DFTEANSIPSIS QQ.N	517	530	4,72E+05	5,06E+05	0,93
12779	2	883,4439	1,73	3,423	0,797	xLcH <sub>N</sub>	Y.DJFTEANSIPSIS QQ.N	517	530	4,72E+05	5,06E+05	0,93
16126	4	911,7114	1,6	3,934	0,579	xLcH <sub>N</sub>	Y.DFTEANSIPSIS QQNILERNEELYE PIRN.S	517	545	5,41E+05	2,02E+05	2,67
12449	2	937,9602	1,56	3,012	0,73	xLcH <sub>N</sub>	Y.DFTEANSIPSIS QQN.I	517	531	5,16E+05	5,72E+05	0,90
12151	2	940,4654	1,47	1,476	0,458	xLcH <sub>N</sub>	Y.DJFTEANSIPSIS QQN.I	517	531	4,65E+05	4,96E+05	0,94
20080	3	1106,923	2,52	3,592	0,677	xLcH <sub>N</sub>	N.SJIPSISQQNILE RNEELYEPIRNSL F.E	523	548	1,86E+04	1,52E+04	1,23
11314	3	700,7002	1,59	2,563	0,763	xLcH <sub>N</sub>	L.TDSVDEALSNP NKVY.S	583	597	1,74E+05	1,84E+05	0,95
11315	3	704,0405	1,56	2,444	0,262	xLcH <sub>N</sub>	L.TJDSVDEALSNP NK#VY.S	583	597	1,74E+05	1,84E+05	0,95
11916	3	700,7002	1,52	2,049	0,508	xLcH <sub>N</sub>	L.TDSVDEALSNP NKVY.S	583	597	2,27E+05	2,78E+05	0,82
7902	2	635,3637	0,25	1,478	0,567	xLcH <sub>N</sub>	L.SNPNKVY.S	591	597	6,79E+05	8,90E+05	0,76
7903	2	640,3742	0,25	1,485	0,282	xLcH <sub>N</sub>	L.SJNPNK#VY.S	591	597	6,79E+05	8,90E+05	0,76
14536	3	927,1457	1,59	2,027	0,553	xLcH <sub>N</sub>	Y.SJPFK#NM*SNT INSIETGITSTY.I	598	618	1,47E+05	8,07E+04	1,83
14487	3	923,8054	1,54	2,35	0,708	xLcH <sub>N</sub>	Y.SPFKNM*SNTI NSIETGITSTY.I	598	618	1,47E+05	8,07E+04	1,83
13108	3	813,421	2,03	2,046	0,548	xLcH <sub>N</sub>	F.KNM*SNTINSIE TGITSTY.I	601	618	2,41E+06	2,42E+06	1,00
12962	3	813,421	1,98	2,378	0,482	xLcH <sub>N</sub>	F.KNM*SNTINSIE TGITSTY.I	601	618	2,41E+06	2,42E+06	1,00
13079	3	813,421	1,98	2,245	0,617	xLcH <sub>N</sub>	F.KNM*SNTINSIE TGITSTY.I	601	618	2,41E+06	2,42E+06	1,00
13194	2	915,4701	2,12	1,504	0,654	xLcH <sub>N</sub>	M.SJNTINSIETGIT STY.I	604	618	1,74E+05	3,22E+05	0,54
13170	2	912,9649	1,99	1,791	0,699	xLcH <sub>N</sub>	M.SNTINSIETGIT STY.I	604	618	1,74E+05	3,22E+05	0,54
12405	2	812,4274	2,38	1,349	0,781	xLcH <sub>N</sub>	N.TINSIETGITSTY .I	606	618	2,94E+04	3,41E+04	0,86
14318	3	837,465	1,53	2,439	0,647	xLcH <sub>N</sub>	F.SJDETGK#IDVI DK#SSDTL.A	632	648	2,23E+04	1,55E+04	1,44
19535	2	586,368	0,52	1,753	0,731	xLcH <sub>N</sub>	L.AJIVPYIGPLL	649	657	7,93E+05	1,16E+06	0,69
19564	2	442,268	0,43	1,498	0,892	xLcH <sub>N</sub>	V.PYIGPLL	652	657	1,30E+04	2,64E+04	0,49
9998	2	715,396	1,76	2,148	0,33	xLcH <sub>N</sub>	V.IJGGELAREQVE .A	699	709	8,53E+04	1,32E+04	6,44
5372	3	494,9536	0,34	2,943	0,626	xLcH <sub>N</sub>	L.SRQANAIKM*.N	754	762	2,50E+05	1,57E+04	15,9 7
5363	3	494,9536	0,32	3,357	0,734	xLcH <sub>N</sub>	L.SRQANAIKM*.N	754	762	2,50E+05	1,57E+04	15,9 7
17794	2	734,3537	1,89	2,212	0,79	xLcH <sub>N</sub>	F.SEFDDLINQY.K	879	888	3,00E+05	4,05E+05	0,74

14171	4	757,641	0,97	2,289	0,421	xLcH <sub>N</sub>	F.DDLINQYKNEG SILPETGGLEHH.H	882	904	1,02E+04	3,96E+04	0,26
7676	4	679,3532	1,49	2,624	0,624	xLcH <sub>N</sub>	Y.KNEGSILPETG GLEHHHHHHH.-	889	908	3,63E+04	3,74E+04	0,97
13193	3	588,3365	1,18	2,307	0,629	xLcH <sub>N</sub>	Y.KNEGSILPETG GLE	889	901	2,81E+05	3,08E+05	0,91
10362	3	677,037	1,15	2,582	0,615	xLcH <sub>N</sub>	Y.KNEGSILPETG GLEH.H	889	903	8,01E+05	1,17E+06	0,68
9325	4	542,2943	1,06	2,617	0,58	xLcH <sub>N</sub>	Y.KNEGSILPETG GLEHH.H	889	904	2,17E+05	2,96E+05	0,73

Уникальная особенность дисульфидной связи в VoNT/X.

Линкерный участок VoNT/X содержит дополнительный цистеин (C461), который является уникальным для VoNT/X. Для определения того, какой цистеин формирует дисульфидную связь, соединяющую LC и H<sub>N</sub>, создавали трех мутантов X-LC-H<sub>N</sub> с каждым из трех мутантных цистеиновых остатков (C423S, C461S и C467S). Эти три цистеиновых мутанта, а также X-LC-H<sub>N</sub> дикого типа (WT) подвергали ограниченному протеолизу, а затем анализировали путем SDS-PAGE и окрашивания кумасси синим с восстанавливающим средством DTT или без такового (фиг. 3С). Выявили, что мутирующий цистеин в LC (C423S) давал в результате белок, который разделялся на две полосы ~ 50 кДа с DTT или без такового, что указывает на то, что C423S аннулировал межцепочечную дисульфидную связь. Напротив, мутанты, содержащие либо C461S, либо C467S, демонстрировали одну полосу при 100 кДа при отсутствии DTT, которые разделялись на две полосы ~50 кДа в присутствии DTT, подтверждая, что и C461, и C467 в H<sub>N</sub> могут формировать межцепочечную дисульфидную связь с C423 в LC. Также мутант X-LC-H<sub>N</sub> (C423S), по-видимому, более восприимчив к Lys-C, чем мутанты как C461S, так и C467S, что приводило к дальнейшему расщеплению белка (фиг. 3С). Этот результат говорит о том, что потеря межцепочечной дисульфидной связи может увеличить свободу LC и H<sub>N</sub>, обнажая тем самым больше площадей поверхности. Кроме того, часть X-LC-H<sub>N</sub> WT образовала агрегаты в верхней части геля SDS-PAGE (фиг. 3С). Эти агрегаты обусловлены образованием межмолекулярной дисульфидной связи, поскольку они исчезали в присутствии DTT (фиг. 3С, + DTT). C423, C461 и C467 являются единственными тремя цистеинами в X-LC-H<sub>N</sub>. Мутирование любого из трех цистеинов уничтожило агрегаты X-LC-H<sub>N</sub> (фиг. 2С, - DTT), что указывает на то, что образование межмолекулярной дисульфидной связи обусловлено наличием дополнительного цистеина в линкерном участке.

Большая часть активированного X-LC-H<sub>N</sub> WT также разделялась на две полосы ~50 кДа в геле SDS-PAGE без DTT (фиг. 3С). С другой стороны, X-LC-H<sub>N</sub> WT так же устойчив к Lys-C, как мутанты C461S и C467S, и он не демонстрировал дальнейшего разложения, как это сделал мутант C423S (фиг. 3С, + DTT), что подтверждает, что X-LC-H<sub>N</sub> WT отличается от мутанта C423S. Одним из возможных объяснений является перетасовка дисульфидной связи из-за наличия двух цистеинов, близких к каждому в H<sub>N</sub> (C461 и C467), которые могут перегруппировать дисульфидную связь из межцепочечных C423-C467 или C423-C467 во внутрицепочечные C461-C467 в денатурированных условиях<sup>48, 49</sup>. Чтобы проверить эту гипотезу, использовали алкилирующий реагент, N-этилmaleимид (NEM), который реагирует с сульфгидрилами свободного цистеина и постоянно блокирует любые свободные цистеины. Как показано на фиг. 3D, X-LC-H<sub>N</sub> WT, предварительно обработанный NEM, демонстрировал в основном одну полосу при 100 кДа при отсутствии DTT и разделялся на две полосы ~50 кДа в присутствии DTT. Эти результаты подтвердили, что нативный X-LC-H<sub>N</sub> WT содержит в основном межцепочечную дисульфидную связь, которая подвержена перетасовке дисульфидной связи из-за наличия третьего цистеина в линкерном участке.

Наконец, исследовали активность трех цистеиновых мутантов X-LC-H<sub>N</sub> в культивируемых нейронах. Как показано на фиг. 3Е, мутирование цистеина в LC (C423S) аннулировало активность X-LC-H<sub>N</sub>, о чем свидетельствует отсутствие расщепления VAMP2 в нейронах. Мутация одного из двух цистеинов в H<sub>N</sub> (C461 или C467) не оказывала значительного влияния на активность X-LC-H<sub>N</sub> по сравнению с X-LC-H<sub>N</sub> дикого типа (WT) (фиг. 3Е). Эти результаты подтвердили, что межцепочечная дисульфидная связь важна для активности VoNT/X, и продемонстрировали, что функциональная межцепочечная дисульфидная связь может быть образована либо через C423-C461, либо через C423-C467.

Создание VoNT/X полной длины путем опосредованного сортазой лигирования.

Для оценивания того, что VoNT/X является функциональным токсином, было необходимо создать и протестировать VoNT/X полной длины. Однако VoNT являются одними из наиболее опасных потенциальных биотеррористических средств. Поэтому были приняты необходимые меры предосторожности, и ген активного токсина полной длины не создавали. Вместо этого разрабатывали подход для создания ограниченных количеств VoNT полной длины в тестовых пробирках в контролируемых условиях путем ферментативного лигирования двух нетоксичных фрагментов VoNT. В этом способе используется транспептидаза, известная как сортаза, которая распознает специфические пептидные мотивы и ковалентно связывает два пептида вместе, образуя нативную пептидную связь (фиг. 4А). Этот подход ранее использовался для создания химерных токсинов и других белков слияния<sup>50, 51</sup>.

Создавали сконструированную сортазу А, известную как SrtA\*, из *Staphylococcus aureus*<sup>51</sup>. SrtA\* распознает пептидный мотив LPXTG (SEQ ID NO: 57), расщепляет между Т-G и одновременно формирует новую пептидную связь между белком, содержащим LPXTG (SEQ ID NO: 57), с другими белками/пептидами, содержащими один или несколько N-концевых глицинов (фиг. 4А). Получали два нетоксичных фрагмента VoNT/X: (1) LC-H<sub>N</sub> с мотивом LPETGG (SEQ ID NO: 58) и His6-меткой, слитой с С-концом; (2) H<sub>C</sub> VoNT/X (X-H<sub>C</sub>) с меткой GST и сайтом расщепления тромбином на своем N-конце. Разрезание тромбином высвобождает X-H<sub>C</sub> со свободным глицином на N-конце. Инкубация этих двух фрагментов с SrtA\* создавала ограниченное количество ~150-кДа VoNT/X полной длины, содержащего короткий линкер (LPETGS, SEQ ID NO: 59) между LC-H<sub>N</sub> и H<sub>C</sub> (фиг. 4А, 4В).

Наблюдали, что X-H<sub>C</sub> демонстрировал сильную тенденцию к агрегации в растворе по неизвестным причинам при разрезании его от метки GST, что может быть причиной низкой эффективности лигирования для VoNT/X (фиг. 4В). Напротив, лигирование X-LC-H<sub>N</sub> с H<sub>C</sub> VoNT/A (A-H<sub>C</sub>) с использованием того же подхода достигало гораздо более высокой эффективности, при этом большинство X-LC-H<sub>N</sub> лигировали в химерный токсин ХА полной длины (фиг. 8А).

VoNT/X является активным в культивируемых нейронах.

Для анализа активности VoNT/X полной длины применяли культивируемые кортикальные нейроны крысы в качестве модельной системы. Нейроны подвергали смеси для опосредованного сортазой лигирования и различным контрольным смесям в среде. Клеточные лизаты собирали через 12 ч и выполняли анализ иммуноблоттинга для проверки расщепления белков SNARE. Как показано на фиг. 4С, X-LC-H<sub>N</sub> отдельно расщеплял некоторое количество VAMP2 благодаря его высокой концентрации в реакционной смеси. Контрольная смесь, содержащая X-LC-H<sub>N</sub> и X-H<sub>C</sub>, а не сортазу, слегка усиливала расщепление VAMP2 по сравнению с X-LC-H<sub>N</sub> отдельно. Этот результат подтверждает, что X-H<sub>C</sub> может быть связан с X-LC-H<sub>N</sub> путем нековалентных взаимодействий. Это взаимодействие, по-видимому, является специфическим, поскольку контрольная смесь, содержащая X-LC-H<sub>N</sub> и А-Нс, показывала тот же уровень расщепления VAMP2, что и X-LC-H<sub>N</sub> отдельно (фиг. 8В). Лигирование X-LC-H<sub>N</sub> и X-H<sub>C</sub> сортазой усиливало расщепление VAMP2 по смеси X-LC-H<sub>N</sub> и X-H<sub>C</sub> без сортазы (фиг. 4С), демонстрируя, что лигированный VoNT/X полной длины может проникать в нейроны и расщеплять VAMP2. Подобным образом, лигированный химерный токсин ХА полной длины также проникал в нейроны и расщеплял VAMP2 (фиг. 8В).

Смешивание X-H<sub>C</sub> с X-LC-H<sub>N</sub> увеличивало количество агрегатов в верхней части геля SDS-PAGE по сравнению с X-LC-H<sub>N</sub> отдельно. Эти агрегаты исчезали в присутствии DTT, что позволяет предположить, что часть X-H<sub>C</sub> формировала межмолекулярную дисульфидную связь с X-LC-H<sub>N</sub>. Присутствие DTT также увеличивало количество лигированного VoNT/X полной длины, что указывает на то, что часть VoNT/X агрегировала через межмолекулярную дисульфидную связь (фиг. 4В). Образование этих агрегатов может значительно снизить эффективные концентрации мономера токсина в растворе. Это может быть присущим недостатком последовательности VoNT/X. X-H<sub>C</sub> содержит один цистеин (С1240), и мутирование этого цистеина не влияло на активность лигированного VoNT/X (фиг. 9). Кроме того, мутант С1240S может быть объединен с мутациями С461S или С467S в X-LC-H<sub>N</sub> с созданием модифицированного VoNT/X без свободных цистеинов (фиг. 9). Эти мутантные токсины поддерживали те же уровни активности, что и VoNT/X WT, но являются более стабильными в растворе как мономеры, чем VoNT/X WT.

VoNT/X индуцировал атрофический паралич *in vivo* у мышей *In vivo* активность VoNT/X проверяли с использованием хорошо установленного нелетального анализа на мышцах, известного как показатель отведения пальца (DAS). С помощью данного анализа измеряют локальный мышечный паралич после инъекции VoNT в мышцы задней конечности мыши<sup>52, 53</sup>. VoNT вызывает атрофический паралич мышц конечности, который может быть выявлен по неспособности растопырить пальцы при стартл-рефлексе. Активированную сортазой реакционную смесь (фиг. 4В, дорожка 7) вводили инъекцией в икроножные мышцы правой задней конечности у мышей. В пределах 12 ч в правой конечности развивался типичный атрофический паралич, и пальцы не могли растопыриваться (фиг. 4D). Эти результаты подтверждают, что VoNT/X способен вызывать атрофический паралич *in vivo*, как и другие VoNT.

VoNT/X не распознавался антисывороткой, вырабатываемой против всех известных VoNT.

Для дополнительного подтверждения того, что VoNT/X является серологически уникальным VoNT, выполняли дот-блот-анализы с использованием антисыворотки, вырабатываемой против известных VoNT, в том числе всех семи серотипов, а также одного мозаичного токсина (VoNT/DC). Использовали четыре лошадиные антисыворотки (трехвалентное антитело против VoNT/A, В и Е, антитело против VoNT/C, антитело против VoNT/DC и антитело против VoNT/F), а также две антисыворотки козы (антитело против VoNT/G и антитело против VoNT/D). Все эти антисыворотки были способны нейтрализовать соответствующие им целевые VoNT и предотвращали расщепление белков SNARE в нейронах (фиг. 10), что тем самым подтверждало их специфичность и эффективность. Как показано на фиг. 4Е, данные антисыворотки распознавали соответствующие им целевые токсины, но ни одна из них не распознавала VoNT/X. Следует отметить, что антисыворотки, вырабатываемые против VoNT/DC и VoNT/C, перекрестно реагировали друг с другом, поскольку они обладают высокой степенью подобия в их H<sub>C</sub>. Данный результат доказывал то, что VoNT/X является новым серологическим типом VoNT.

Неактивный VoNT/X полной длины.

Наконец, исследовали возможность получения VoNT/X в виде растворимого белка. Чтобы обеспечить требование биобезопасности, вводили мутации в LC VoNT/X, которые инактивируют его токсичность. Показали, что мутации по двум остаткам R362A/Y365F в VoNT/A инактивируют протеазную активность LC *in vitro* и устраняют токсичность VoNT/A полной длины у мышей *in vivo*<sup>54-56</sup>. Эти два остатка являются консервативными во всех VoNT, в том числе в VoNT/X. Поэтому вводили соответствующие мутации в эти два сайта (R360A/Y363F в VoNT/X). Как показано на фиг. 4F, эту полноразмерную инактивированную форму VoNT/X (VoNT/XRY) получали и очищали как His6-меченый белок в *E. coli* рекомбинантно. Он не обладает какой-либо активностью в отношении нейронов, поскольку VAMP2 не расщепляется в нейронах (фиг. 11).

Существенная часть VoNT/XRY формировала агрегаты в верхней части геля SDS-PAGE (фиг. 4F). Вероятно, это объясняется формированием межмолекулярной дисульфидной связи из дополнительного цистеина в линкерном участке и цистеина в HC, поскольку добавлением DTT превращало агрегаты в мономерный VoNT/XRY (фиг. 4F). Мутирование этих цистеинов не влияет на активность VoNT/X (фиг. 9) и полезно тем, что предотвращает образование межмолекулярной дисульфидной связи и агрегацию VoNT/X.

Неактивная форма VoNT/X может использоваться в качестве среды-носителя для доставки терапевтических средств в нейроны. Инактивация может быть достигнута мутациями в любом из следующих остатков или в их комбинациях: R360, Y363, H227, E228 или H231, причем последние три остатка образуют консервативный мотив протеазы.

Очистка неактивного VoNT/X полной длины в промышленном масштабе.

Исследовали возможность очистки VoNT/X полной длины до высокой степени чистоты и с хорошим выходом, что будет важно для промышленного получения VoNT/X (или его производных) в качестве терапевтического токсина. Тестировали некоторые параметры клеточного роста и экспрессии, такие как температура, время индуцирования и концентрации IPTG. Оптимальными параметрами, выбранными для экспрессии белка, были культивирование клеток при 37°C до тех пор, пока они не достигали экспоненциального роста, на этой стадии температуру снижали до 18°C, а экспрессию индуцировали добавлением 1 mM IPTG в среду. Затем клетки культивировали в течение 16-18 ч до сбора. Присутствие VoNT/X подтверждали с помощью SDS-PAGE и показывали высокий уровень надэкспрессии в растворимой фракции (фиг. 11B).

Для оптимизации процесса получения выполняли несколько испытаний очистки в лабораторных масштабах. Механический клеточный лизис с использованием Emulsiflex-C3 (Avestin, Mannheim, Germany) был предпочтительным способом для экстракции внутриклеточного белка и оказался более эффективным, чем обработка ультразвуком. Различные буферные условия также подлежали оценке для оптимального извлечения VoNT/X. Восстановитель был включен в процесс очистки и значительно уменьшил склонность к нежелательной агрегации. Кроме того, глицерин был использован в качестве добавки на ранней стадии процесса очистки и улучшал стабильность белка.

Конструкция VoNT/X была экспрессирована с His6-меткой, которую можно использовать для аффинной хроматографии в качестве первой стадии очистки. Для испытания лабораторного масштаба использовали 5-мл колонку HisTrapFF (GE Healthcare, Danderyd, Sweden). Для достижения максимальной чистоты исходной хроматографии тестировали различные концентрации имидазола. VoNT/X элюировали из концентрации 100 mM имидазола; однако основная примесь легко очищалась совместно с токсином. Эта примесь, по-видимому, неспецифически взаимодействует с VoNT/X и была идентифицирована с помощью масс-спектрометрии как белок-хозяин *E. coli* (бифункциональный белок полимиксиновой устойчивости ArnA). Присутствие этой примеси резко снижалось при введении высокой концентрации соли (500 mM NaCl) и при проведении дополнительной стадии промывания при 100 mM имидазола во время очистки. Это позволило элюировать более чистую фракцию VoNT/X при 250 mM имидазола. Эта более поздняя фракция может быть затем обработана эксклюзионной хроматографией.

После этого этот протокол расширяли в масштабе путем пересчета на 12 л среды с условиями, описанными выше. Кроме того, получали матрицу более высокоаффинной хроматографии, состоящую из 15 мл Protino® Ni-NTA агарозы (Macherey-Nagel, Düren, Germany) для повышения выхода извлеченного VoNT/X. Стадию конечной очистки выполняли эксклюзионной хроматографией с использованием колонки Superdex200-16/60 (GE Healthcare, Danderyd, Sweden). С использованием этого способа достигали чистоты от 85 до 90% (фиг. 11C). Белок мог быть концентрирован (с использованием концентратора Vivaspin с порогом 100 кДа; GE Healthcare, Danderyd, Sweden) и казался стабильным до 10 мг/мл. Полные подробности процесса получения описаны ниже. Выход полученного VoNT/X составлял приблизительно 3 мг на 1 л клеточной культуры. Вместе эти результаты продемонстрировали, что VoNT/X может быть очищен в промышленном масштабе до высокой степени чистоты.

Следует отметить, что очистку выполняли в присутствии восстановителя, который мог восстанавливать дисульфидную связь между LC и HC так, что очищенный токсин не мог быть активным. Однако сконструированное производное VoNT/X, содержащее мутации по цистеиновым сайтам (одну мутацию в

C461 или C467, объединенную с мутацией в C1240), могло быть очищено без восстановителей. Следует отметить, что неактивная форма BoNT/X (и его производное с цистеиновыми мутациями) может быть использована как среда-носитель для доставки терапевтических средств в нейроны. Инактивация может быть достигнута путем мутаций по любому из следующих остатков или их комбинаций: R360, Y363, H227, E228 или H231 (последние три остатка из консервативного протеазного мотива).

Идентификация ганглиозидов в качестве рецепторов для BoNT/X.

Ганглиозиды являются хорошо установленными липидными корцепторами для всех BoNT, и мотив связывания ганглиозида является достаточно консервативным в BoNT/X (фиг. 1C). Использовали высокоочищенный неактивный BoNT/X полной длины для изучения связывания BoNT/X с нейрональными клетками через ганглиозиды. Разрабатывали *in vitro* анализ ELISA для тестирования взаимодействия с четырьмя основными ганглиозидами головного мозга: GD1a, GD1b, GT1b и GM1. A-LC применяли в качестве отрицательного контроля для оценивания неспецифического связывания. Выполняли прямое сравнение с доменом связывания с рецептором BoNT/A (A-NC). Связывание белков выявляли с использованием антитела против His6-метки. Выяснили, что BoNT/X демонстрировал зависимость от дозы связывание со всеми четырьмя ганглиозидами на уровне неспецифического связывания A-LC (фиг. 12), что подтверждало тот факт, что BoNT/X способен использовать все четыре ганглиозида головного мозга в качестве корцепторов. В соответствии с предыдущими сообщениями BoNT/A отдавал равное предпочтение GD1a и GT1b (фиг. 12F) и их терминальному фрагменту NAcGal-Gal-NAcNeu (с очевидными значениями  $EC_{50}$  0,7 и 1,0 мкМ соответственно при использовании сигмоидальной модели доза-ответ). Напротив, BoNT/X показывал более высокую аффинность для GD1b и GM1 по сравнению с GD1a и GT1b (фиг. 12E). Это позволяет предположить, что BoNT/X характеризуется предпочтительным паттерном распознавания сиаловой кислоты, также наблюдаемым в BoNT/B и TeNT. BoNT/X обладает консервативным мотивом SxWY в гомологичном местоположении с одним из других токсинов. Тот факт, что может распознавать все четыре ганглиозида, хотя и с низкой аффинностью, может свидетельствовать о множественных сайтах связывания углеводов.

Обсуждение.

Было идентифицировано восемь серотипов BoNT за 45 лет после идентификации последнего основного серотипа BoNT. BoNT/X обладает наименьшей идентичностью белковых последовательностей по отношению к любым другим BoNT и TeNT из данного семейства токсинов, и такой низкий уровень идентичности равномерно распределен по последовательности токсина. Как и предполагали, BoNT/X не распознавался никакой антисывороткой, вырабатываемой против известных BoNT. Он явно представляет уникальную и отличную эволюционную ветвь семейства токсинов.

BoNT/X был выявлен путем поиска геномных последовательностей штаммов *Clostridium botulinum* и представляет первый основной тип токсина, идентифицированный с помощью геномного секвенирования и биоинформационного подхода. Штамм 111, который содержит ген BoNT/X, изначально идентифицировали у больного ботулизмом пациента-младенца в 1990-х гг. Предварительные характеристики с использованием классического анализа нейтрализации установили, что BoNT/B2 является основным токсином этого штамма. Вероятно, что BoNT/X является молчащим геном токсина или он не экспрессировался при выявляемых уровнях токсичности в условиях культивирования в лаборатории. Следовательно, его можно идентифицировать только путем секвенирования штамма 111. Это иллюстрирует важность геномного секвенирования и подходов биоинформатики для понимания микробных вирулентных факторов.

Молчащие гены BoNT часто идентифицировали в различных штаммах *Clostridium botulinum*. Не ясно, почему эти бактерии содержат молчащий ген токсина. Это может быть эволюционно вырожденный ген. Это явно тот случай, когда молчащие гены токсина содержат мутации преждевременного стоп-кода. Однако имеются также случаи, когда молчащий ген кодирует BoNT полной длины. Вопрос о том, могут ли эти молчащие BoNT полной длины экспрессироваться и проявлять токсичность при определенных условиях окружающей среды, остается интригующим вопросом.

Общие трехдоменные структуры и функции BoNT хорошо сохраняются в BoNT/X, но у него также есть несколько уникальных характеристик: (1) он использует VAMP в качестве своей цели в нейронах, как и BoNT/B, D, F и G, но он разрезает VAMP по новому сайту (R66-A67 в VAMP2), который является уникальным для этого токсина. Это еще больше расширяет репертуар токсинов, которые можно использовать для удаления VAMP в разных участках. (2) Межцепочечная дисульфидная связь, соединяющая LC и H<sub>N</sub>, сохраняется в BoNT/X, но она также содержит уникальный дополнительный цистеин в линкерном участке, который может привести к перетасовке дисульфидной связи. Дополнительный цистеин на H<sub>N</sub> не является существенным для активности LC-H<sub>N</sub> (фиг. 3D), и его мутирование имеет преимущество в предотвращении образования межмолекулярной дисульфидной связи (фиг. 3D, 4B).

His6-меченый фрагмент X-LC-H<sub>N</sub> стабилен в буферах в качестве рекомбинантных белков. Он показал более высокий уровень активности на нейронах, чем A-LC-H<sub>N</sub> и B-LC-H<sub>N</sub> (фиг. 3B), что подтверждает, что его мембранная транслокационная и/или протеазная активность может быть более эффективной, чем у соответствующих фрагментов в BoNT/A и BoNT/B. X-LC-H<sub>N</sub> может быть полезным реагентом для нацеливания на VAMP1/2/3 в широком диапазоне типов клеток и тканей, поскольку его проникновение

может не ограничиваться нейронами. Например, он потенциально может быть использован для уменьшения боли в локальной области путем воздействия как на сенсорные нейроны, так и на другие клетки, которые секретируют воспалительные сигналы. Его также можно использовать для получения химерных токсинов, таких как X<sub>A</sub> (фиг. 8).

X-H<sub>C</sub> является функциональным, так как его присутствие усиливает расщепление VAMP2 в нейронах по сравнению с LC-H<sub>N</sub> отдельно (фиг. 4C). Однако X-H<sub>C</sub> может иметь некоторые неблагоприятные характеристики, которые еще предстоит оценить. Например, достаточные уровни растворимого X-H<sub>C</sub> были получены только тогда, когда он был слит с GST, который, как известно, облегчает сворачивание/растворимость белка, но не с His6-меткой. После освобождения от метки GST X-H<sub>C</sub> склоняется к агрегации. Кроме того, цистеин в X-H<sub>C</sub> также может образовывать межмолекулярную дисульфидную связь (фиг. 4B). Неактивный BoNT/X полной длины может быть очищен и может существовать в виде растворимого белка, что позволяет предположить, что проблема растворимости с X-H<sub>C</sub> может, по меньшей мере частично, объясняться отделением этого домена от X-LC-H<sub>N</sub>. Например, X-LC-H<sub>N</sub> может взаимодействовать с X-H<sub>C</sub> и покрывать его потенциальные гидрофобные сегменты в контексте полной длины, что не является чем-то необычным для многодоменного белка.

Ганглиозиды уже давно установлены как нейрональные рецепторы для всех подтипов BoNT. Показали, что BoNT/X может связываться со всеми четырьмя наиболее распространенными ганглиозидами: GD1a, GD1b, GT1b и GM1. Кроме того, он характеризуется заметной разницей в аффинности и специфичности по сравнению с BoNT/A. Это интригующее свойство, так как другие BoNT, по-видимому, имеют различные степени предпочтения по отношению к подгруппе ганглиозидов. Например, BoNT/A, E, F и G предпочитают GD1a и GT1b. BoNT/X может потенциально распознавать более широкий спектр типов нейронов по сравнению с другими BoNT.

Возможно, что BoNT/X обладает низкой токсичностью *in vivo*, что может объяснить тот факт, почему активность BoNT/X не была выявлена в первоначальном исследовании штамма 111. Если это так, то пониженная токсичность, вероятно, обусловлена его доменом H<sub>C</sub>, поскольку X-LC-H<sub>N</sub> представляется более активным, чем A-LC-H<sub>N</sub> и B-LC-H<sub>N</sub>. Образование межмолекулярной дисульфидной связи может также снизить эффективную концентрацию токсина. Для определения его активности *in vivo* необходимо будет получить нативный BoNT/X полной длины, но будет важно создать нейтрализующую антисыворотку с использованием нетоксичных фрагментов BoNT/X до продуцирования токсина полной длины.

Введение гена активного токсина полной длины в любые системы/организмы экспрессии всегда является серьезной проблемой в области биобезопасности, и это стало серьезным препятствием для исследования структурных функций биологических токсинов. Это особенно важно для BoNT, так как они являются одним из шести потенциальных биотеррористических средств категории A<sup>4</sup>. В соответствии с настоящим изобретением разрабатывали способ биохимической сборки ограниченного количества токсина полной длины из двух комплементарных и нетоксичных фрагментов. Каждый фрагмент экспрессируется и очищается индивидуально, а затем лигируется вместе с помощью сортазы в тестовых пробирках. Другие способы лигирования белков, такие как интеиновые системы расщепления, которые сливают два фрагмента белка посредством транс-сплайсинга белка, также могут быть использованы<sup>57</sup>. Контролируя количество фрагментов-предшественников в реакции, можно строго контролировать количество лигированного токсина полной длины. Такой "полусинтетический" подход может быть использован для получения мультидоменных биологических токсинов и других токсичных белков в контролируемых условиях. Он также предоставляет универсальную платформу для создания слитых и химерных токсинов, таких как замещение H<sub>C</sub> двух BoNT, замена H<sub>C</sub> BoNT другими целевыми белками или присоединение дополнительного груза к токсинам. Поскольку никогда не образуется cDNA токсина полной длины, и экспрессия токсинов в бактериях или любых других живых организмах отсутствует, этот подход значительно смягчает проблемы биобезопасности, связанные с продуцированием токсинов дикого типа и мутантных токсинов, и будет значительно облегчать исследования структурных функций биологических токсинов и токсичных белков.

#### Материалы и способы/

Материалы: Моноклональные антитела мыши против синтаксина 1 (HPC-1), SNAP-25 (C171.2) и VAMP2 (C169.1) были любезно предоставлены E. Chapman (Madison, WI) и доступны от Synaptic Systems (Goettingen, Germany). Моноклональное антитело мыши против актина приобретали в Sigma (AC-15). Лошадиную поликлональную антисыворотку против BoNT/A/B/E, BoNT/C, BoNT/DC, BoNT/F и козью поликлональную антисыворотку против BoNT/G получали от FDA. Козье поликлональное антитело против BoNT/D приобретали в Fisher Scientific (NB10062469). BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C, BoNT/DC, BoNT/E, BoNT/F и BoNT/G приобретали в Metabionics (Madison, WI). BoNT/D был любезно предоставлен E. Johnson (Madison, WI).

cDNA и конструкции: Синтезировали cDNA, кодирующие X-LC (остатки 1-439) и X-H<sub>C</sub> (остатки 893-1306). cDNA, кодирующую X-H<sub>N</sub>, получали в собственной лаборатории с использованием способа сборки Gibson. cDNA, кодирующие A-LC (остатки 1-425, M30196) и B-LC (остатки 1-439, AB232927), синтезировали с помощью GenScript (New Brunswick, NJ). Эти LC клонировали в векторы pET28 для экспрессии в виде His6-меченых белков. X-H<sub>C</sub> клонировали в pGEX4T для экспрессии в виде

GST-меченого белка. X-LC-H<sub>N</sub>, A-LC-H<sub>N</sub> и B-LC-H<sub>N</sub> субклонировали в вектор pET28, при этом пептидная последовательность LPETGG (SEQ ID NO: 58) сливалась с их С-концами, и очищали как His6-меченые белки. Неактивную форму BoNT/X полной длины собирали в собственной лаборатории из мутантного X-LC (R360A/Y363F), X-H<sub>N</sub> и X-H<sub>C</sub>. Ее клонировали в вектор pET28, при этом His6-метка сливалась с С-концом BoNT/X. cDNA, кодирующая VAMP2 крысы, была любезно предоставлена E. Charman (Madison, WI). VAMP2 (1-96) был клонирован в вектор pET28 и экспрессирован как His6-меченый белок. VAMP2 (33-86) был клонирован в вектор pGEX4T и экспрессирован как GST-меченый белок. cDNA, кодирующая мышинный VAMP1, VAMP3, крысиный VAMP7 и VAMP8, была любезно предоставлена С. Hu (Louisville, KY). Их клонировали в модифицированные векторы pCDNA3.1, при этом метка HA слита с их С-концами. Конструкция, кодирующая His6-меченую сортазу (SrtA\*), была любезно предоставлена В. Pentelute (Boston, MA) и была описана ранее<sup>51</sup>.

Биоинформатика: Выполняли поиск по базе данных Uniprot с JackHMMER на веб-сервере HMMER с использованием последовательности BoNT типа А (номер доступа в Uniprot A5HZZ9) до конвергенции. Возвращенные последовательности выравнивали с Clustal Omega и филогенетической сетью NeighborNet, оцениваемой с SplitsTree4.

Очистка белка: E. coli BL21 (DE3) использовали для экспрессии белка. Индуцирование экспрессии выполняли с 0,1 мМ IPTG при 22°C на протяжении ночи. Бактериальные осадки разрушали в буфере для лизиса (50 мМ Tris, pH 7,5, 150 мМ NaCl) с помощью обработки ультразвуком и надосадочные жидкости собирали после центрифугирования при 20000 g в течение 30 мин при 4°C. Очистку белка выполняли с использованием системы АКТА Prime FPLC (GE) и очищенные белки далее обессоливали с колонкой PD-10 (GE, 17-0851-01). В частности, неактивный BoNT/X полной длины (BoNT/XRY) клонировали в вектор pET22b. Соответствующую плазмиду трансформировали в компетентные клетки E. coli BL21 (DE3). Полученные в результате колонии применяли для инокуляции 100 мл культивируемых на протяжении ночи культур в среде ТВ, содержащей 100 мкг/мл карбенициллина, в 250-мл встряхиваемой колбе и выращивали при 37°C. Культуры для экспрессии сначала выращивали с использованием LEX Bioreactor (Epiphyte3, Ontario, Canada) при 37°C в 1,5 л среды ТВ до достижения OD<sub>600</sub> 0,8. Затем температуру снижали до 18°C для индуцирования экспрессии с 1 мМ IPTG и выращивали в течение 16-17 ч. Клетки собирали и повторно суспендировали на льду в 50 мМ HEPES, pH 7,2, 500 мМ NaCl, 25 мМ имидазола, 5% глицерина, 2 мМ ТСЕР для обеспечения лизиса клеток с Emulsiflex-C3 (Avestin, Mannheim, German) при 20000 фунтов/кв. дюйм. Лизат ультрацентрифугировали при 200000 g в течение 45 мин при 4°C. Надосадочную жидкость загружали в колонку с 15 мл агарозы Protino® Ni-NTA (Macherey-Nagen, Düren, Germany), которую затем промывали 50 мМ HEPES, pH 7,2, 500 мМ NaCl, 100 мМ имидазола, 5% глицерина, 1 мМ ТСЕР. Элюирование выполняли с 50 мМ HEPES, pH 7,2, 500 мМ NaCl, 250 мМ имидазола, 5% глицерина, 1 мМ ТСЕР. Элюат диализовали на протяжении ночи в 50 мМ HEPES, pH 7,2, 500 мМ NaCl, 5% глицерина, 0,5 мМ ТСЕР при 4°C. Диализат концентрировали с использованием концентратора Vivaspin (порог отсечения 100 кДа, GE Healthcare, Danderyd, Sweden) перед загрузкой в колонку Superdex200-16/60 (GE Healthcare, Danderyd, Sweden), предварительно уравновешенную тем же буфером, что использовали для диализа. Пик элюирования, соответствующий BoNT/X, собирали и концентрировали так, что конечный образец имел концентрацию 10 мг/мл. Образец аликвотировали и молниеносно замораживали в жидком азоте для хранения при -80°C.

Анализ связывания ганглиозида: Очищенные ганглиозиды GD1a, GD1b, GT1b и GM1 (Carbosynth, Compton, UK) растворяли в DMSO и разбавляли метанолом до достижения конечной концентрации 2,5 мкг/мл; 100 мкл вносили в каждую лунку 96-луночного PVC аналитического планшета (№ по каталогу 2595, Corning; Corning, NY). После выпаривания растворителя при 21°C лунки промывали 200 мкл PBS/0,1% (мас./об.) BSA. Сайты неспецифического связывания блокировали путем инкубации в течение 2,5 ч при 4°C в 200 мкл PBS/2% (мас./об.) BSA. Анализы связывания выполняли в 100 мкл PBS/0,1% (мас./об.) BSA на лунку в течение 1 ч при 4°C с содержанием образцов (в трех повторностях) при концентрациях, варьирующих от 6 до 0,05 мкМ (в серийном 2-кратном разведении). После инкубации лунки промывали три раза с помощью PBS/0,1% (мас./об.) BSA и инкубировали с HRP-конъюгированным моноклональным антителом против 6xHis (1:2000, ThermoFisher) в течение 1 ч при 4°C. После трех стадий промывания с PBS/0,1% (мас./об.) BSA связанные образцы выявляли с использованием Ultra-TMB (100 мкл/лунка, ThermoFisher) в качестве субстрата. Реакцию останавливали после 15 мин путем добавления 100 мкл 0,2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и измеряли поглощение при 450 нм с использованием устройства для считывания планшетов Infinite M200PRO (Tecan, Männedorf, Switzerland). Данные анализировали с Prism7 (программное обеспечение GraphPad).

Расщепление белков SNARE в экстрактах в поверхностно-активном веществе головного мозга крысы (BDE): BDE крысы получали из свежесеченного головного мозга взрослых крыс, как описано ранее<sup>58</sup>. Вкратце, головной мозг крысы гомогенизировали в 15 мл 320 мМ сахарозного буфера, а затем центрифугировали при 5000 об/мин в течение 2 мин при 4°C. Надосадочные жидкости собирали и центрифугировали при 11000 об/мин в течение 12 мин. Осадок собирали и солибилизировали в течение 30 мин в 15 мл Tris-буферного солевого раствора (TBS: 20 мМ Tris, 150 мМ NaCl) плюс 2% Triton X-100 и кок-

тейль ингибиторов протеазы (Roche, CA). Затем образцы центрифугировали при 17000 об/мин в течение 20 мин для удаления нерастворимых материалов. Конечная концентрация BDE составляет ~2 мг/мл белков. BDE (60 мкл) инкубировали с X-LC (0,5 мкМ), A-LC (1 мкМ) или B-LC (1 мкМ) соответственно в течение 1 ч при 37°C, а затем анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием способа усиленной хемиллюминесценции (ECL) (Pierce). В качестве контролей LC предварительно инкубировали с 20 мМ EDTA в течение 20 мин при комнатной температуре (RT) для деактивации их активности перед добавлением в BDE.

Расщепление рекомбинантного VAMP с помощью X-LC: VAMP2 (1-96) экспрессировали и очищали как His6-меченый белок, а VAMP2 (33-86) экспрессировали и очищали как GST-меченый белок. Эти белки (0,6 мг/мл) инкубировали с 0,1 мкМ X-LC в буфере TBS в течение 1 ч при 37°C. Образцы либо анализировали с помощью геля SDS-PAGE и окрашивания кумасси синим, либо подвергали анализу масс-спектрометрии.

Расщепление VAMP в клеточных лизатах: HA-меченые VAMP1, 3, 7 и 8 полной длины трансфицировали в клетки HEK293 с использованием реагентов трансфекции PolyJet (SigmaGen, MD) согласно инструкции изготовителя. Клеточные лизаты собирали через 48 ч в буфер RIPA (50 мМ Tris, 1% NP40, 150 мМ NaCl, 0,5% дезоксихолата натрия, 0,1% SDS, 400 мкл на 10-см чашку) плюс коктейль ингибиторов протеазы (Sigma-Aldrich). Клеточные лизаты (250 мкл) инкубировали с X-LC (0,5 мкМ) в течение 1 ч при 37°C. Затем образцы анализировали с помощью иммуноблоттинга.

Анализ цельного белка с помощью LC-MS/MS: Образцы анализировали в профильном центре биологической масс-спектрометрии Taplin в Медицинской школе Harvard. Вкратце, образцы цельного белка загружали в колонку с 100-мкм внутренним диаметром C18 для обращенно-фазовой HPLC, упакованную 3 см гранул в автономном режиме с использованием ячейки давления. Колонку повторно присоединяли к насосу Accela 600 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Использовали быстрый градиент повышающегося ацетонитрила для элюирования белка/пептида из колонки HPLC. По мере элюирования пептидов их подвергали ионизации электрораспылением, а затем вводили в масс-спектрометр LTQ Orbitrap Velos Pro с ионной ловушкой (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) для осуществления FTMS-сканирования с высоким разрешением при разрешении 60000, второго сканирования с низким разрешением в ионной ловушке и окончательного сканирования для выполнения зависимой от данных MS/MS. "Конверты" в заряженном состоянии извлекали вручную, чтобы получить моноизотопные массы, когда это возможно, или средние массы для белков. Идентичность пептидов и белков определяли путем сопоставления баз данных белков с полученным паттерном фрагментации с помощью программного обеспечения Sequest (Thermo Fisher Scientific). Все базы данных содержат обратную версию всех последовательностей, и данные были отфильтрованы до уровня ложноположительных результатов обнаружения пептида от 1 до 2%.

Идентификация сайта расщепления протеазой между LC и Hn: His6-меченый рекомбинантный фрагмент X-LC-H<sub>N</sub> (остатки 1-891) очищали в *E. coli* и подвергали ограниченному протеолизу с помощью эндопротеиназы Lys-C (Sigma P2289, молярное отношение 100:1 (токсин: Lys-C), 25 мин при комнатной температуре). Сайт расщепления определяли путем мечения Tandem Mass Tag (TMT) и подхода тандемной масс-спектрометрии. Вкратце, интактные образцы X-LC-H<sub>N</sub> метили легкой TMT и равное количество образцов X-LC-H<sub>N</sub> подвергали Lys-C, а затем метили тяжелой TMT. И те, и другие образцы затем расщепляли химотрипсином, объединяли вместе и подвергали количественному анализу масс-спектрометрии.

Алкилирование цистеина с помощью NEM: Lys-C активированный фрагмент X-LC-H<sub>N</sub> разбавляли в натрийфосфатном буфере (10 мМ, pH 6,5) при конечной концентрации 0,3 мг/мл, с NEM или без такового при указанных концентрациях (20, 10 и 5 мМ) и инкубировали в течение 10 мин при RT. NEM получали свежим в натрийфосфатном буфере. Образцы смешивали с 3× нейтральным Loading Dye (200 мМ Tris, pH 6,8, 30% глицерина, 6% додецилсульфата лития, 10 мМ NEM и 0,06% BPB). Для образцов без NEM использовали тот же 3× SDS Loading Dye без NEM. Образцы далее инкубировали с Loading Dye при RT в течение 10 мин, нагревали в течение 10 мин при 55°C, а затем анализировали с помощью SDS-PAGE и окрашивания кумасси синим.

Культура нейронов и анализ иммуноблоттинга: Первичные кортикальные нейроны крысы получали из зародышей E18-19 с использованием набора диссоциации папаином (Worthington Biochemical, NJ), как авторы настоящего изобретения описывали ранее<sup>58</sup>. Эксперименты выполняли в DIV 14-16. Нейроны подвергали фрагментам BoNT/X или смеси для опосредованного сортазой лигирования в среде в течение 12 ч. Затем клетки промывали и лизировали буфером RIPA (50 мМ Tris, 1% NP40, 150 мМ NaCl, 0,5% дезоксихолата натрия, 0,1% SDS) плюс коктейль ингибиторов протеазы (Sigma-Aldrich). Лизаты центрифугировали в течение 10 мин при максимальной скорости с использованием микроцентрифуги при 4°C. Надосадочные жидкости подвергали SDS-PAGE и анализу иммуноблоттинга.

Дот-блот: BoNT (0,2 мкг в 1 мкл) пятнами наносили на нитроцеллюлозные мембраны и сушили (10 мин при комнатной температуре). Мембраны блокировали 5% молоком в TBST (TBS плюс 0,05% Tween20) в течение 30 мин, а затем инкубировали с указанной антисывороткой (разведение 1:500) в течение 30 мин. Затем мембраны промывали три раза TBST и инкубировали с конъюгированными с HRP

(пероксидазой хрена) вторичными антителами в течение 30 мин, промывали еще три раза с помощью TBST и анализировали способом ECL (Pierce). Следует отметить, что образец VoNT/X состоял из очищенного X-LC-H<sub>N</sub> и X-H<sub>C</sub> при отношении 1:1.

Опосредованное сортазой лигирование: GST-X-HC расщепляли на протяжении ночи при 4°C с помощью тромбина перед добавлением в смесь белков. Реакцию лигирования осуществляли в 50 мкл буфера TBS с добавлением X-LC-H<sub>N</sub> (8 мкМ), расщепленного тромбином GST-X-HC (25 мкМ), Ca<sup>2+</sup> (10 мМ) и сортазы (10 мкМ) в течение 40 мин при RT. На фиг. 4C нейроны подвергали 5 мкл смеси в среде в течение 12 ч. В анализе DAS, описанном на фиг. 4D, 25 мкл смеси вводили мышам инъекцией в заднюю конечность.

Анализ DAS: Смесь для опосредованного сортазой лигирования сначала активировали ограниченным протеолизом с использованием трипсина (молярное отношение 60:1 (общее количество белков: трипсин), 30 мин при RT). Выбирали трипсин вместо Lys-C, поскольку могли остановить протеолиз путем добавления ингибитора трипсина (соевого ингибитора трипсина, отношение 1:10 (трипсин: ингибитор трипсина). Мышей (штамма CD-1, 21-25 г, n=6) анестезировали изофлураном (3-4%) и вводили инъекцией смесь для опосредованного сортазой лигирования с использованием иглы 30 калибра, присоединенной к стерильным шприцам Hamilton, в икроножные мышцы правой задней конечности. VoNT приводили к параличу задней лапы в отношении стартл-рефлекса. Мышечный паралич наблюдали в пределах 12 ч после инъекции, как описано ранее<sup>52, 53</sup>.

## Ссылки

1. Schiavo, G., Matteoli, M. & Montecucco, C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev* **80**, 717-766 (2000).
2. Montal, M. Botulinum neurotoxin: a marvel of protein design. *Annu Rev Biochem* **79**, 591-617 (2010).
3. Rossetto, O., Pirazzini, M. & Montecucco, C. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* **12**, 535-549 (2014).
4. Arnon, S.S., *et al.* Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *Jama* **285**, 1059-1070 (2001).
5. Pirazzini, M., *et al.* Thioredoxin and its reductase are present on synaptic vesicles, and their inhibition prevents the paralysis induced by botulinum neurotoxins. *Cell Rep* **8**, 1870-1878 (2014).
6. Pirazzini, M., *et al.* The thioredoxin reductase--Thioredoxin redox system cleaves the interchain disulphide bond of botulinum neurotoxins on the cytosolic surface of synaptic vesicles. *Toxicon* **107**, 32-36 (2015).
7. JaHN, R. & Scheller, R.H. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 631-643 (2006).
8. Sudhof, T.C. & Rothman, J.E. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* **323**, 474-477 (2009).
9. Gu, S., *et al.* Botulinum neurotoxin is shielded by NTNHA in an interlocked complex. *Science* **335**, 977-981 (2012).
10. Lee, K., *et al.* Molecular basis for disruption of E-cadherin adhesion by botulinum neurotoxin A complex. *Science* **344**, 1405-1410 (2014).
11. Lee, K., *et al.* Structure of a bimodular botulinum neurotoxin complex provides insights into its oral toxicity. *PLoS Pathog* **9**, e1003690 (2013).
12. Sugawara, Y., *et al.* Botulinum hemagglutinin disrupts the intercellular epithelial barrier by directly binding E-cadherin. *J Cell Biol* **189**, 691-700 (2010).
13. Hill, K.K., Xie, G., Foley, B.T. & Smith, T.J. Genetic diversity within the botulinum neurotoxin-producing bacteria and their neurotoxins. *Toxicon* **107**, 2-8 (2015).
14. Johnson, E.A. Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits of nature's most toxic proteins. *Annu Rev Microbiol* **53**, 551-575 (1999).
15. Aoki, K.R. Botulinum toxin: a successful therapeutic protein. *Curr Med Chem* **11**, 3085-3092 (2004).
16. Montecucco, C. & Molgo, J. Botulinum neurotoxins: revival of an old killer. *Curr Opin Pharmacol* **5**, 274-279 (2005).
17. Dolly, J.O., Lawrence, G.W., Meng, J. & Wang, J. Neuro-exocytosis: botulinum toxins as inhibitory probes and versatile therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* **9**, 326-335 (2009).

18. Burke, G.S. Notes on *Bacillus botulinus*. *J Bacteriol* **4**, 555-570 551 (1919).
19. Gimenez, D.F. & Ciccarelli, A.S. Another type of *Clostridium botulinum*. *Zentralbl Bakteriolog Orig* **215**, 221-224 (1970).
20. Lange, O., *et al.* Neutralizing antibodies and secondary therapy failure after treatment with botulinum toxin type A: much ado about nothing? *Clin Neuropharmacol* **32**, 213-218 (2009).
21. Dong, M., *et al.* SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science* **312**, 592-596 (2006).
22. Dong, M., *et al.* Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J Cell Biol* **162**, 1293-1303 (2003).
23. Mahrhold, S., Rummel, A., Bigalke, H., Davletov, B. & Binz, T. The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett* **580**, 2011-2014 (2006).
24. Nishiki, T., *et al.* Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* **269**, 10498-10503 (1994).
25. Schiavo, G., *et al.* Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* **359**, 832-835 (1992).
26. Schiavo, G., *et al.* Botulinum neurotoxins serotypes A and E cleave SNAP-25 at distinct COOH-terminal peptide bonds. *FEBS Lett* **335**, 99-103 (1993).
27. Blasi, J., *et al.* Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* **365**, 160-163 (1993).
28. Smith, T.J., *et al.* Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization. *Infect Immun* **73**, 5450-5457 (2005).
29. Hill, K.K., *et al.* Genetic diversity among Botulinum Neurotoxin-producing clostridial strains. *J Bacteriol* **189**, 818-832 (2007).
30. Montecucco, C. & Rasotto, M.B. On botulinum neurotoxin variability. *MBio* **6**(2015).
31. Dover, N., Barash, J.R., Hill, K.K., Xie, G. & Arnon, S.S. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. *J Infect Dis* **209**, 192-202 (2014).
32. Barash, J.R. & Arnon, S.S. A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. *J Infect Dis* **209**, 183-191 (2014).
33. Maslanka, S.E., *et al.* A Novel Botulinum Neurotoxin, Previously Reported as Serotype H, Has a Hybrid-Like Structure With Regions of Similarity to the Structures of Serotypes A and F and Is Neutralized With Serotype A Antitoxin. *J Infect Dis* (2015).
34. Kalb, S.R., *et al.* Functional characterization of botulinum neurotoxin serotype H as a hybrid of known serotypes F and A (BoNT F/A). *Anal Chem* **87**, 3911-3917 (2015).

35. Luquez, C., Raphael, B.H. & Maslanka, S.E. Neurotoxin gene clusters in *Clostridium botulinum* type Ab strains. *Appl Environ Microbiol* **75**, 6094-6101 (2009).
36. Dover, N., *et al.* *Clostridium botulinum* strain Af84 contains three neurotoxin gene clusters: bont/A2, bont/F4 and bont/F5. *PLoS One* **8**, e61205 (2013).
37. Dabritz, H.A., *et al.* Molecular epidemiology of infant botulism in California and elsewhere, 1976-2010. *J Infect Dis* **210**, 1711-1722 (2014).
38. Franciosa, G., Ferreira, J.L. & Hatheway, C.L. Detection of type A, B, and E botulism neurotoxin genes in *Clostridium botulinum* and other *Clostridium* species by PCR: evidence of unexpressed type B toxin genes in type A toxigenic organisms. *J Clin Microbiol* **32**, 1911-1917 (1994).
39. Hutson, R.A., *et al.* Genetic characterization of *Clostridium botulinum* type A containing silent type B neurotoxin gene sequences. *J Biol Chem* **271**, 10786-10792 (1996).
40. Kakinuma, H., Maruyama, H., Takahashi, H., Yamakawa, K. & Nakamura, S. The first case of type B infant botulism in Japan. *Acta Paediatr Jpn* **38**, 541-543 (1996).
41. Kozaki, S., *et al.* Characterization of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin associated with infant botulism in Japan. *Infect Immun* **66**, 4811-4816 (1998).
42. Ihara, H., *et al.* Sequence of the gene for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin associated with infant botulism, expression of the C-terminal half of heavy chain and its binding activity. *Biochim Biophys Acta* **1625**, 19-26 (2003).
43. Rummel, A., Bade, S., Alves, J., Bigalke, H. & Binz, T. Two carbohydrate binding sites in the H(CC)-domain of tetanus neurotoxin are required for toxicity. *J Mol Biol* **326**, 835-847 (2003).
44. Rummel, A., Mahrhold, S., Bigalke, H. & Binz, T. The HCC-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction. *Mol Microbiol* **51**, 631-643 (2004).
45. Rossetto, O., *et al.* SNARE motif and neurotoxins. *Nature* **372**, 415-416 (1994).
46. Masuyer, G., Beard, M., Cadd, V.A., Chaddock, J.A. & Acharya, K.R. Structure and activity of a functional derivative of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *J Struct Biol* **174**, 52-57 (2011).
47. Chaddock, J.A., *et al.* Expression and purification of catalytically active, non-toxic endopeptidase derivatives of *Clostridium botulinum* toxin type A. *Protein Expr Purif* **25**, 219-228 (2002).
48. Ewbank, J.J. & Creighton, T.E. The molten globule protein conformation probed by disulphide bonds. *Nature* **350**, 518-520 (1991).

49. Nagy, P. Kinetics and mechanisms of thiol-disulfide exchange covering direct substitution and thiol oxidation-mediated pathways. *Antioxid Redox Signal* **18**, 1623-1641 (2013).
50. Popp, M.W., Antos, J.M., Grotenbreg, G.M., Spooner, E. & Ploegh, H.L. Sortagging: a versatile method for protein labeling. *Nat Chem Biol* **3**, 707-708 (2007).
51. McCluskey, A.J. & Collier, R.J. Receptor-directed chimeric toxins created by sortase-mediated protein fusion. *Mol Cancer Ther* **12**, 2273-2281 (2013).
52. Broide, R.S., *et al.* The rat Digit Abduction Score (DAS) assay: a physiological model for assessing botulinum neurotoxin-induced skeletal muscle paralysis. *Toxicon* **71**, 18-24 (2013).
53. Aoki, K.R. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. *Toxicon* **39**, 1815-1820 (2001).
54. Binz, T., Bade, S., Rummel, A., Kollwe, A. & Alves, J. Arg(362) and Tyr(365) of the botulinum neurotoxin type a light chain are involved in transition state stabilization. *Biochemistry* **41**, 1717-1723 (2002).
55. Fu, Z., *et al.* Light chain of botulinum neurotoxin serotype A: structural resolution of a catalytic intermediate. *Biochemistry* **45**, 8903-8911 (2006).
56. Pier, C.L., *et al.* Recombinant holotoxoid vaccine against botulism. *Infect Immun* **76**, 437-442 (2008).
57. Mootz, H.D. Split inteins as versatile tools for protein semisynthesis. *ChemBiochem* **10**, 2579-2589 (2009).
58. Peng, L., Tepp, W.H., Johnson, E.A. & Dong, M. Botulinum neurotoxin D uses synaptic vesicle protein SV2 and gangliosides as receptors. *PLoS Pathog* **7**, e1002008 (2011).
59. Steegmaier, M., Klumperman, J., Foletti, D.L., Yoo, J.S. & Scheller, R.H. Vesicle-associated membrane protein 4 is implicated in trans-Golgi network vesicle trafficking. *Mol Biol Cell* **10**, 1957-1972 (1999).
60. Brandhorst, D., *et al.* Homotypic fusion of early endosomes: SNAREs do not determine fusion specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2701-2706 (2006).
61. Raingo, J., *et al.* VAMP4 directs synaptic vesicles to a pool that selectively maintains asynchronous neurotransmission. *Nat Neurosci* **15**, 738-745 (2012).
62. Cocucci, E., Racchetti, G., Rupnik, M. & Meldolesi, J. The regulated exocytosis of enlargosomes is mediated by a SNARE machinery that includes VAMP4. *J Cell Sci* **121**, 2983-2991 (2008).
63. Nicholson-Fish, J.C., Kokotos, A.C., Gillingwater, T.H., Smillie, K.J. & Cousin, M.A. VAMP4 Is an Essential Cargo Molecule for Activity-Dependent Bulk Endocytosis. *Neuron* **88**, 973-984 (2015).

64. Zeng, Q., *et al.* A novel synaptobrevin/VAMP homologous protein (VAMP5) is increased during *in vitro* myogenesis and present in the plasma membrane. *Mol Biol Cell* **9**, 2423-2437 (1998).
65. Krzewski, K., Gil-Krzewska, A., Watts, J., Stern, J.N. & Strominger, J.L. VAMP4- and VAMP7-expressing vesicles are both required for cytotoxic granule exocytosis in NK cells. *Eur J Immunol* **41**, 3323-3329 (2011).
66. Yamamoto, H., *et al.* Specificity of botulinum protease for human VAMP family proteins. *Microbiol Immunol* **56**, 245-253 (2012).
67. McNew, J.A., *et al.* Ykt6p, a prenylated SNARE essential for endoplasmic reticulum-Golgi transport. *J Biol Chem* **272**, 17776-17783 (1997).
68. Kweon, Y., Rothe, A., Conibear, E. & Stevens, T.H. Ykt6p is a multifunctional yeast R-SNARE that is required for multiple membrane transport pathways to the vacuole. *Mol Biol Cell* **14**, 1868-1881 (2003).
69. Hasegawa, H., *et al.* Mammalian ykt6 is a neuronal SNARE targeted to a specialized compartment by its profilin-like amino terminal domain. *Mol Biol Cell* **14**, 698-720 (2003).
70. Daste, F., Galli, T. & Tareste, D. Structure and function of longin SNAREs. *J Cell Sci* **128**, 4263-4272 (2015).
71. Cooper, A.A., *et al.* Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* **313**, 324-328 (2006).
72. Thayanidhi, N., *et al.* Alpha-synuclein delays endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport in mammalian cells by antagonizing ER/Golgi SNAREs. *Mol Biol Cell* **21**, 1850-1863 (2010).

#### Другие варианты осуществления

Все признаки, раскрываемые в настоящем описании, могут быть объединены в любой комбинации. Каждый признак, раскрытый в настоящем описании, может быть заменен альтернативным признаком, который служит той же эквивалентной или подобной цели. Таким образом, если прямо не указано иное, каждый раскрытый признак является лишь примером общей серии эквивалентных или сходных признаков.

Из приведенного выше описания специалист в данной области сможет легко установить основные характеристики настоящего раскрытия и, не отступая от его сущности и объема, сможет внести различные изменения и модификации в настоящее раскрытие, чтобы адаптировать его к различным применениям и условиям. Таким образом, другие варианты осуществления также попадают в объем формулы изобретения.

#### Эквиваленты и объем

В то время как в настоящем документе описаны и проиллюстрированы некоторые варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области будет очевиден ряд других средств и/или структур для осуществления функции и/или получения результатов и/или одного или нескольких из преимуществ, описываемых в настоящем документе, и каждая из таких вариаций и/или модификаций попадает в объем вариантов осуществления настоящего изобретения, описываемых в настоящем документе. В целом, специалисты в данной области легко определяют, что все параметры, измерения, материалы и конфигурации, описываемые в настоящем документе, являются типичными, и что фактические параметры, измерения, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или применений, для которых используют идеи настоящего изобретения. Специалисты в данной области смогут распознать или установить, используя не более чем рутинные эксперименты, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описываемых в настоящем документе. Следовательно, следует понимать, что вышеизложенные варианты осуществления представлены исключительно в качестве примера и что в пределах объема прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов варианты осуществления настоящего изобретения могут применяться на практике иначе, чем конкретно описано и заявлено. Варианты осуществления настоящего изобретения направлены на каждые отдельные признак, систему, изделие, материал, набор и/или способ, описываемые в настоящем документе. Кроме того, любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов, наборов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы, наборы и/или способы не являются взаимно несовместимыми, включена в объем изобретения в соответствии с настоящим раскрытием.

Следует понимать, что все определения, определяемые и применяемые в настоящем документе, контролируют словарные определения, определения в документах, включенных посредством ссылки, и/или обычные значения определяемых терминов.

Все ссылки, патенты и заявки на выдачу патентов, раскрываемые в настоящем документе, включены посредством ссылки в отношении заявляемого предмета, для которого каждая из них цитируется, при этом в некоторых случаях ссылка может охватывать документ полностью.

Использование в настоящем документе объектов в единственном числе в описании и формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать как "по меньшей мере один".

Фразу "и/или", используемую в настоящем документе в описании и формуле изобретения, следует понимать как "один или оба" из элементов, соединенных таким образом, т.е. элементов, которые в одном случае присутствуют совместно, а в других случаях отдельно. Несколько элементов, перечисленных с помощью "и/или", должны толковаться одинаково, т.е. "один или несколько" элементов, соединенных таким образом. Необязательно могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, специально указанных условием "и/или", независимо от того, связаны они или не связаны с теми элементами, которые конкретно определены. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на "А и/или В", когда используется вместе в открытой фразе, такой как "содержащий", может ссылаться в одном варианте осуществления только на А (необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления только к В (необязательно включая элементы, отличные от А); в одном варианте осуществления и к А, и к В (необязательно включая другие элементы); и т.п.

Используемый в настоящем документе в описании и в формуле изобретения союз "или" следует понимать как имеющий то же значение, что и союз "и/или", определяемый выше. Например, при разделении элементов в перечне союз "или" или "и/или" должен интерпретироваться как включающий, т.е. включение по меньшей мере одного, но также включение более одного из ряда или перечня элементов и необязательно дополнительных не перечисленных элементов. Только термины, четко обозначенные как противоположные, такие как "только один из" или "исключительно один из", или при применении в формуле изобретения, "состоящий из", будет относиться к включению ровно одного элемента из ряда или перечня элементов. Как правило, термин "или", используемый в настоящем документе, должен толковаться только как указывающий на исключительные альтернативы (т.е. "один или другой, но не оба"), когда ему предшествуют термины исключительности, такие как "либо", "один из", "только один из" или "исключительно один из". Термин "состоящий по сути из", используемый в формуле изобретения, имеет свое обычное значение, используемое в области патентного права.

Используемую в настоящем документе в описании и формуле изобретения фразу "по меньшей мере один" в отношении перечня одного или нескольких элементов следует понимать как означающую по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или нескольких элементов в перечне элементов, но необязательно включает в себя по меньшей мере один из каждого элемента, конкретно указанного в перечне элементов, и не исключает какие-либо комбинации элементов в перечне элементов. Это определение также допускает, что необязательно могут присутствовать элементы, отличные от элементов, конкретно определенных в перечне элементов, к которым относится фраза "по меньшей мере один", независимо от того, связаны они или не связаны с теми элементами, которые конкретно определены. Таким образом, в качестве неограничивающего примера "по меньшей мере один из А и В" (или, что эквивалентно, "по меньшей мере один из А или В", или что эквивалентно, "по меньшей мере один из А и/или В") может относиться согласно одному варианту осуществления по меньшей мере к одному, необязательно в том числе более чем одному, А, без присутствия В (и необязательно включая элементы, отличные от В); согласно другому варианту осуществления по меньшей мере к одному, необязательно в том числе более чем одному В, без присутствия А (и необязательно включая элементы, отличные от А); согласно другому варианту осуществления по меньшей мере к одному, необязательно в том числе более чем одному А и по меньшей мере одному, необязательно в том числе более чем одному В (и необязательно включая другие элементы); и т.п.

Следует также учитывать, что, если явно не указано обратное, в любых способах, заявляемых в настоящем документе, которые предусматривают более чем одну стадию или действие, порядок стадий или действий способа необязательно ограничен порядком, в котором стадии или действия способа изложены.

В формуле изобретения, а также в приведенном выше описании все переходные фразы, такие как "содержащий", "включающий в себя", "несущий", "имеющий", "включающий", "состоящий из" и подобные, следует понимать как открытые, т.е. означающие "в том числе без ограничения". Только переходные фразы "состоящий из" и "состоящий по сути из" являются закрытыми или полузакрытыми переходными фразами соответственно, как указано в руководстве по процедурам патентной экспертизы Патентного ведомства США, раздел 2111.03.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный полипептид нейротоксина Clostridial botulinum (BoNT), содержащий аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по

меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью по отношению к любой из SEQ ID NO: 1-3.

2. Выделенный полипептид BoNT по п.1, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-3.

3. Выделенный полипептид BoNT по п.1, содержащий одну или несколько мутаций по типу замены в положении, соответствующем С461, С467 или С1240 в SEQ ID NO: 1.

4. Выделенный полипептид BoNT по п.1, содержащий однократную мутацию по типу замены в положении, соответствующем С461 или С467 из SEQ ID NO: 2.

5. Выделенный полипептид BoNT по п.1, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 22-24, где указанный полипептид представляет собой химерный пептид BoNT.

6. Выделенный полипептид BoNT по п.1, содержащий:

(a) протеазный домен;

(b) модифицированный линкерный участок;

(c) домен транслокации,

при этом (a), (b) и (c) происходят из серотипа X BoNT, и при этом модифицированный линкерный участок содержит одну однократную мутацию по типу замены в положении, соответствующем С461 или С467 из SEQ ID NO: 1.

7. Выделенный полипептид BoNT по п.6, дополнительно содержащий (d) домен связывания с рецептором.

8. Выделенный полипептид BoNT по п.7, при этом домен связывания с рецептором происходит из BoNT/X.

9. Выделенный полипептид BoNT по п.8, при этом домен связывания с рецептором содержит мутацию по типу замены, соответствующую С1240S или С1240A в SEQ ID NO: 1.

10. Выделенный полипептид BoNT по п.7, при этом домен связывания с рецептором происходит из серотипа, выбранного из группы, состоящей из A, B, C, D, E, F и G.

11. Выделенный полипептид BoNT по п.6, при этом модифицированный линкерный участок содержит искусственный линкер.

12. Выделенный полипептид BoNT по п.11, при этом искусственный линкер содержит сайт расщепления протеазой.

13. Выделенный полипептид BoNT по п.1, содержащий одну или несколько мутаций по типу замены в положении, соответствующем R360, Y363, H227, E228 или H231 в SEQ ID NO: 1.

14. Выделенный полипептид BoNT по п.13, содержащий мутацию в положении, соответствующем R360 и Y363 из SEQ ID NO: 1.

15. Выделенный полипептид BoNT по п.13, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31-38.

16. Выделенный полипептид BoNT по п.1, где аминокислотная последовательность не является на 100% идентичной SEQ ID NO: 1-3.

17. Химерная молекула, содержащая первую часть, связанную со второй частью, при этом первая часть представляет собой выделенный полипептид BoNT по п.13.

18. Способ лечения состояния, при этом способ предусматривает введение терапевтически эффективного количества выделенного полипептида BoNT по любому из пп.1-16, или химерной молекулы по п.17 субъекту для лечения состояния, при этом состояние связано с надактивными нейронами или железами.

19. Способ получения полипептида BoNT, где способ предусматривает:

(i) получение первого фрагмента BoNT, состоящего из легкой цепи (LC) и N-терминального домена тяжелой цепи (H<sub>N</sub>), при этом первый фрагмент BoNT содержит C-терминальный мотив LPXTGG (SEQ ID NO: 60);

(ii) получение второго фрагмента BoNT, состоящего из C-терминального домена тяжелой цепи (H<sub>C</sub>), при этом второй фрагмент BoNT содержит специфический сайт расщепления протеазой на своем N-конце;

(iii) расщепление второго фрагмента BoNT специфической протеазой, при этом расщепление приводит к получению свободного глицинового остатка на N-конце; и

(iv) введение в контакт первого фрагмента BoNT и второго фрагмента BoNT в присутствии транс-пептидазы, таким образом лигируя первый фрагмент BoNT и второй фрагмент BoNT с образованием лигированного BoNT.

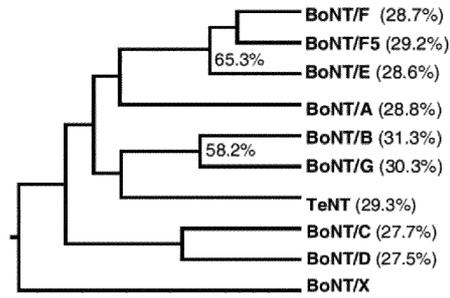
20. Выделенный полипептид нейротоксина Clostridial botulinum серотипа X (BoNT/X), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь,

где L<sub>C</sub> содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;

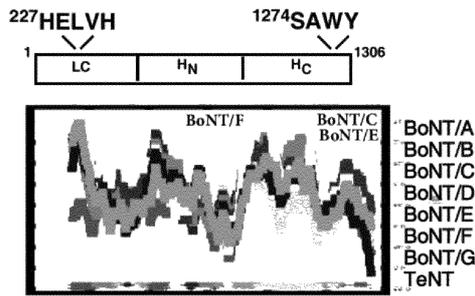
где тяжёлая цепь содержит аминокислотную последовательность, изложенную в виде аминокислот

468-1306 последовательности SEQ ID NO: 1;

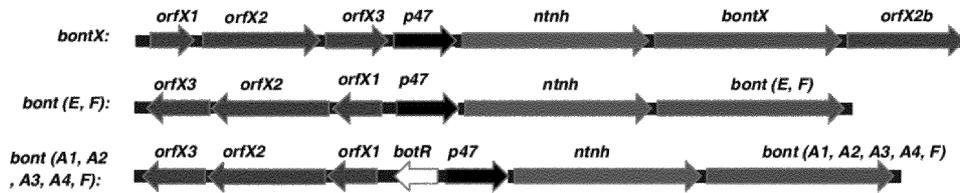
где легкая цепь и тяжелая цепь связаны межцепочечной дисульфидной связью.



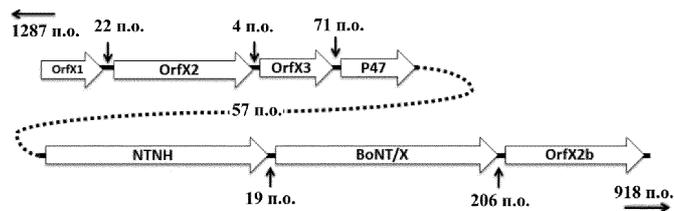
Фиг. 1А



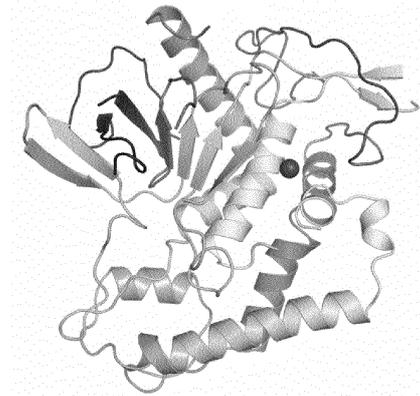
Фиг. 1В



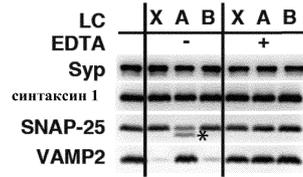
Фиг. 1С



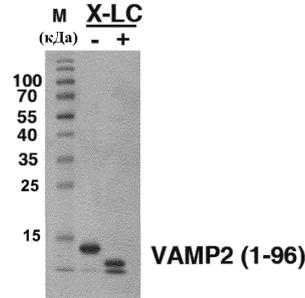
Фиг. 1D



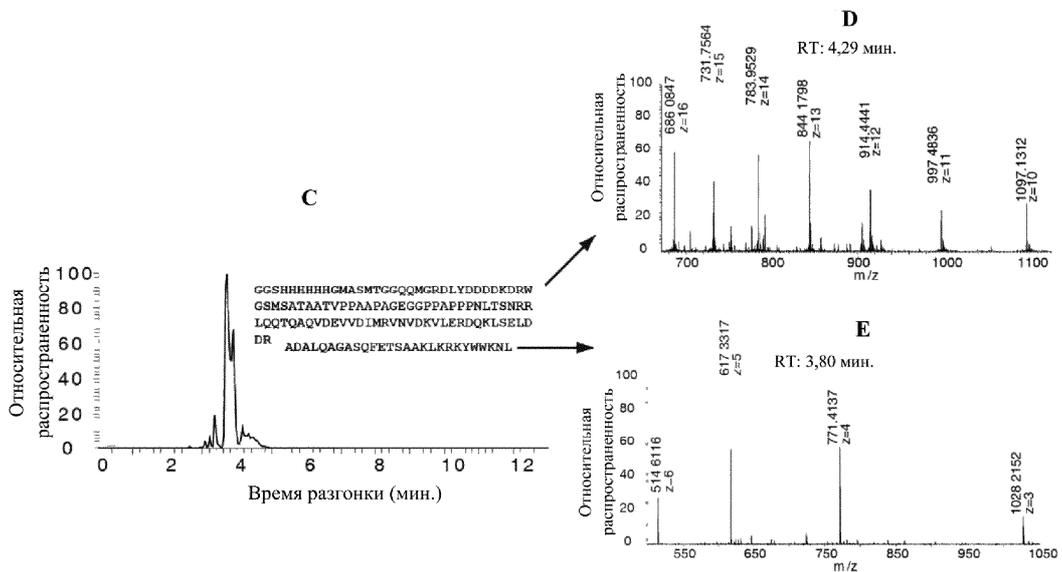
Фиг. 1Е



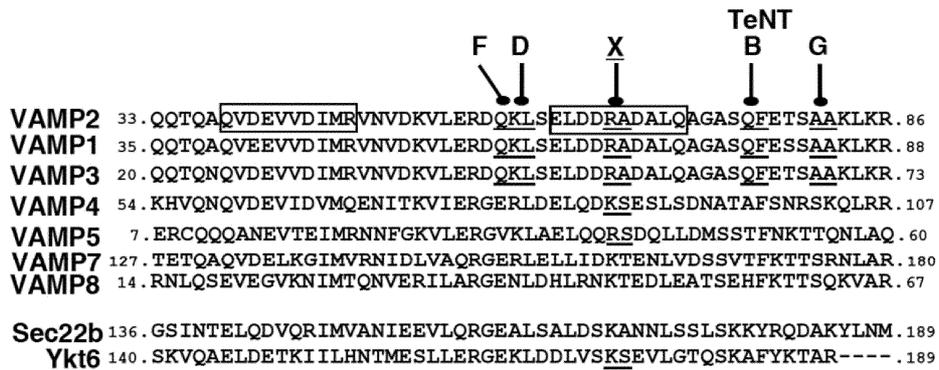
Фиг. 2А



Фиг. 2В

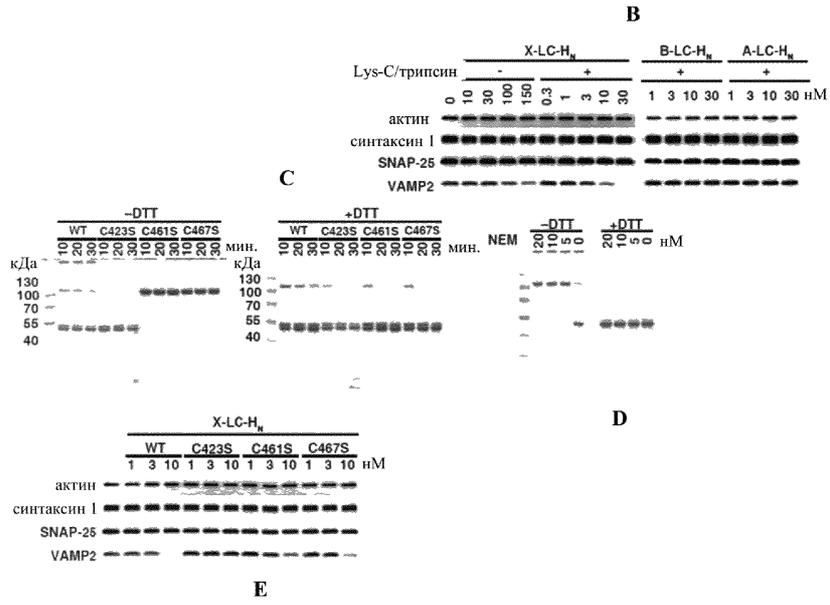


Фиг. 2С-Е

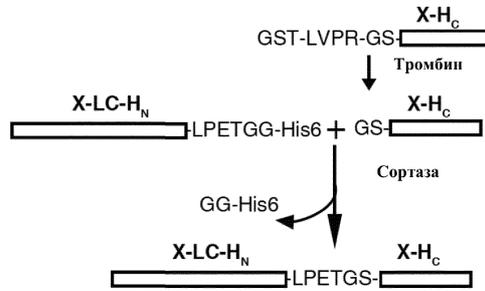


Фиг. 2F

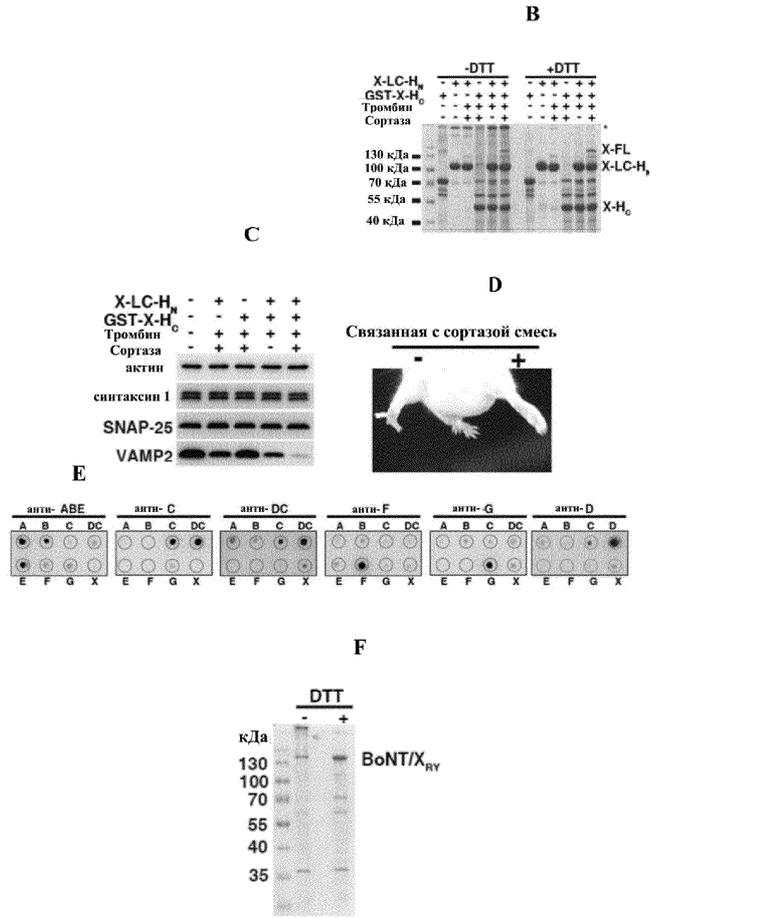




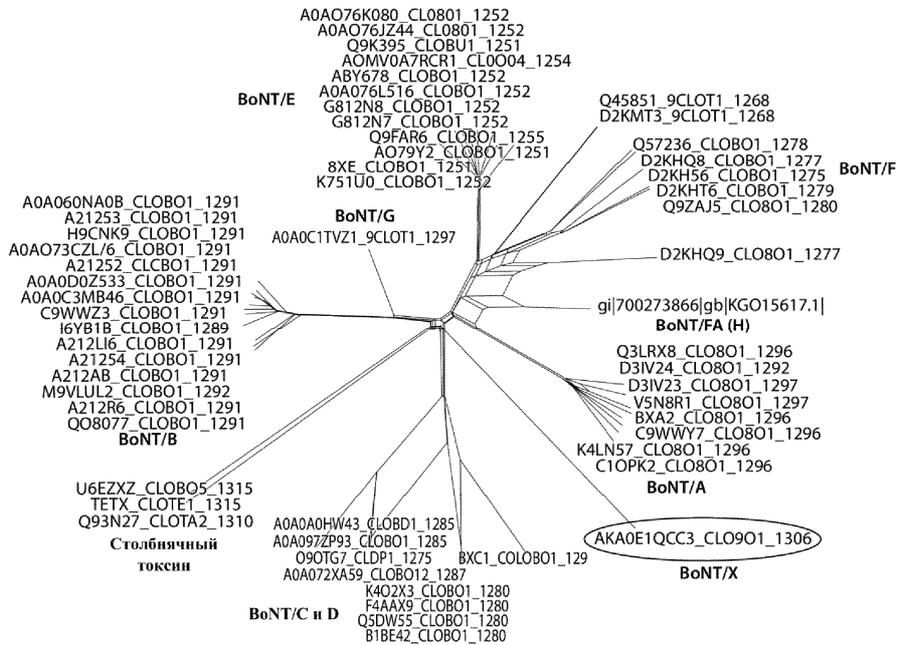
Фиг. 3В-Е



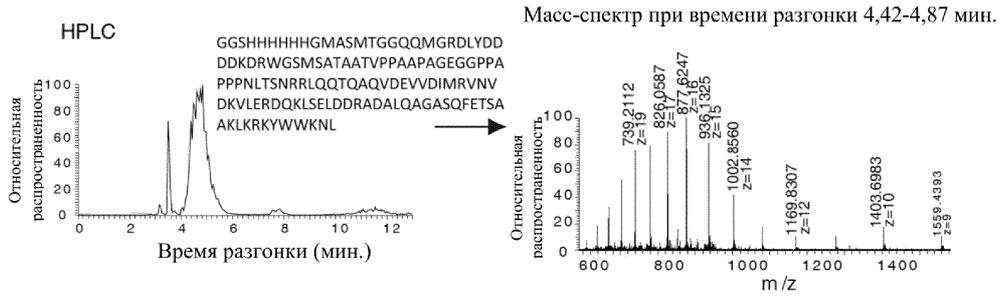
Фиг. 4А



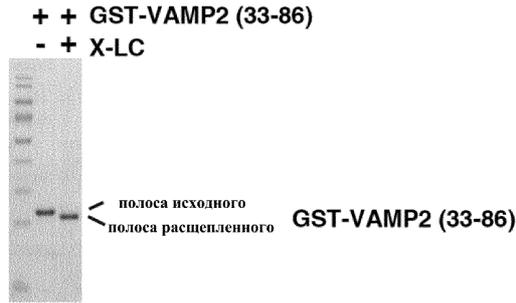
Фиг. 4В-Ф



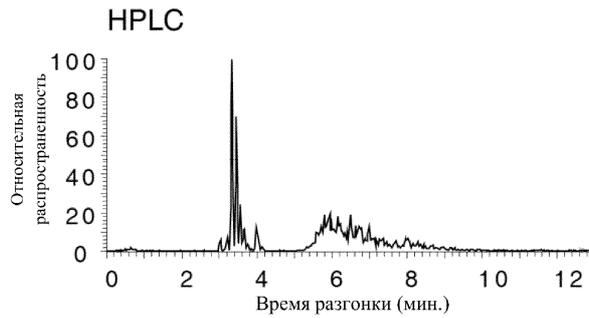
Фиг. 5



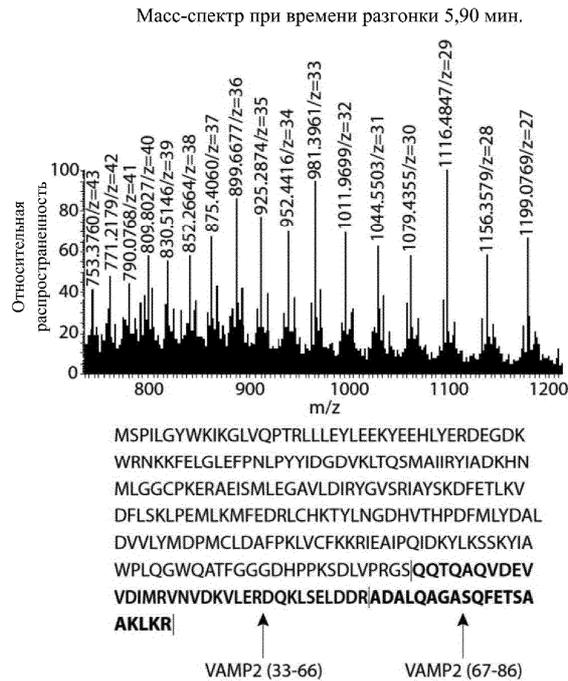
Фиг. 6



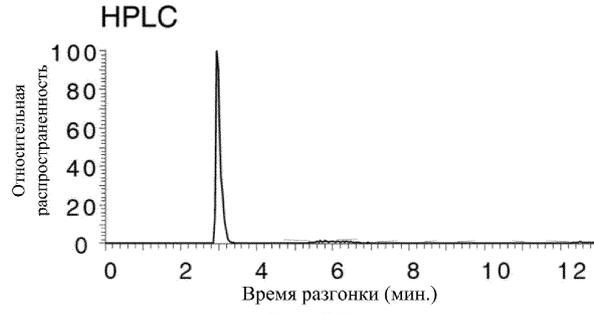
Фиг. 7А



Фиг. 7В

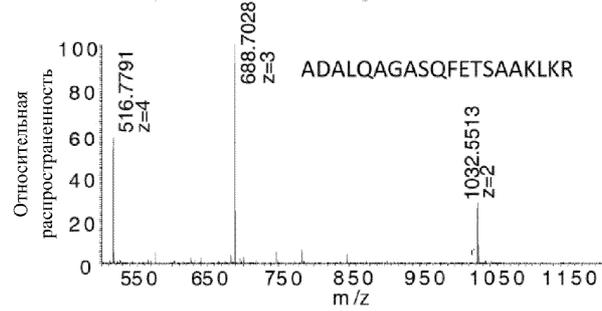


Фиг. 7С



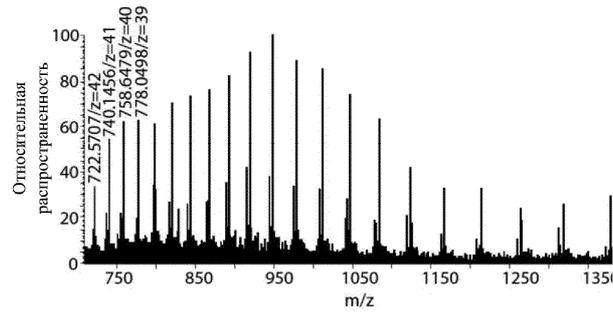
Фиг. 7D

Масс-спектр при времени разгонки 3,02 мин.



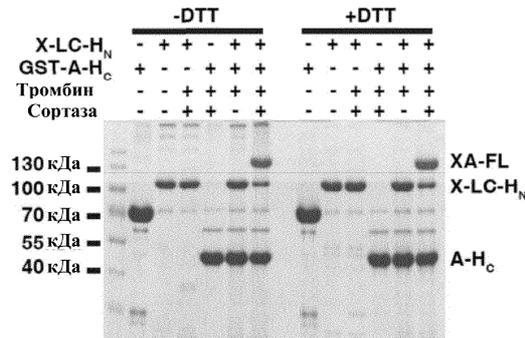
Фиг. 7E

Масс-спектр при времени разгонки 5,90 мин.

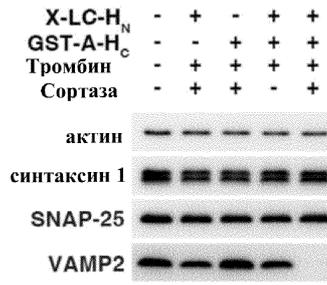


MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEELHYRDEGDK  
 WRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKTQSMIIIRYIADKHN  
 MLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSRVIAYSKDFETLKV  
 DFLSKLPMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDAL  
 DVVLYMDPMCLDAFPLKVCFKKRIEAIPIQIDKYLKSSKYIA  
 WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGQQTQAQVDEV  
 VDIMRVNVDKVLERDQKLELDDR

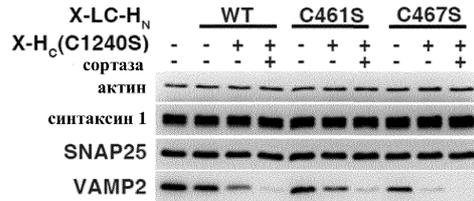
Фиг. 7F



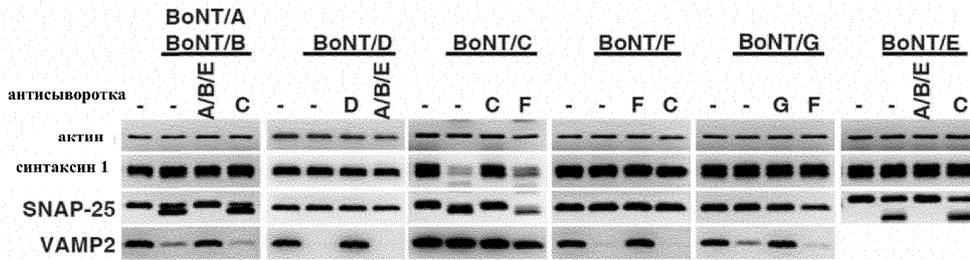
Фиг. 8A



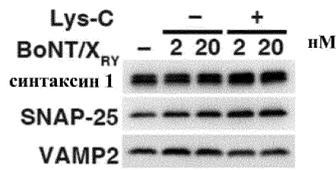
Фиг. 8В



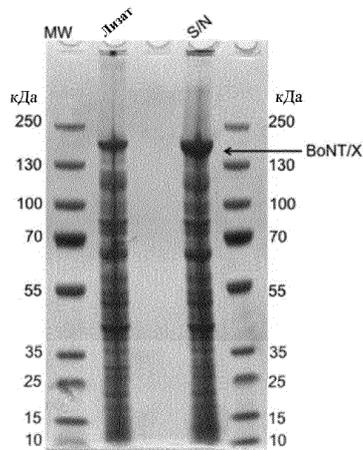
Фиг. 9



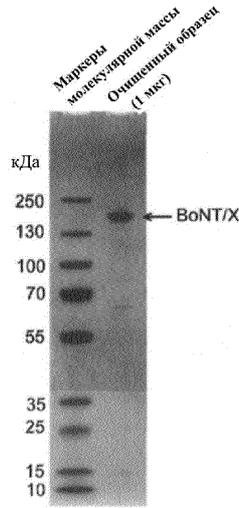
Фиг. 10



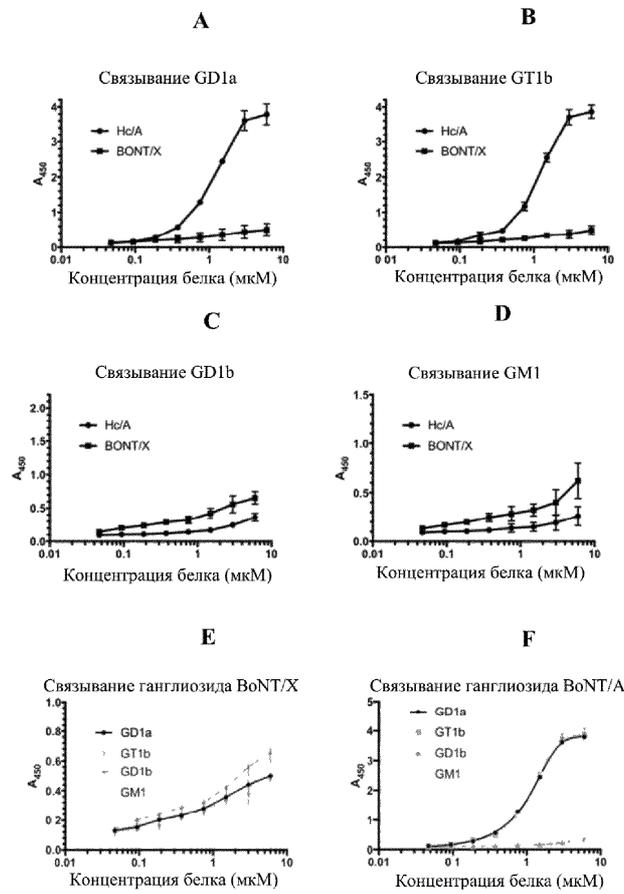
Фиг. 11А



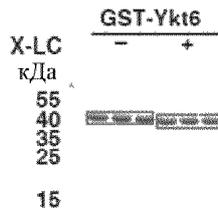
Фиг. 11В



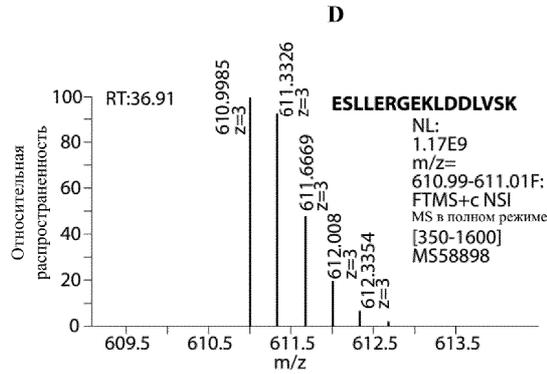
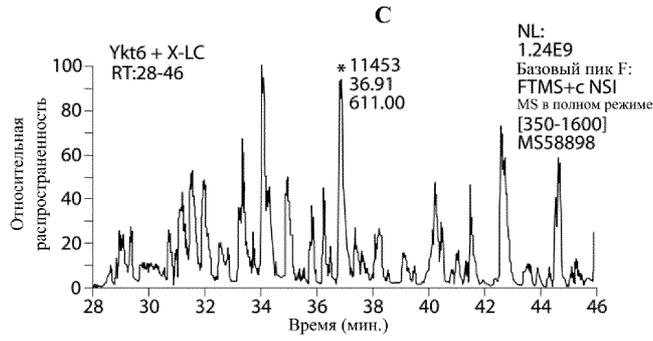
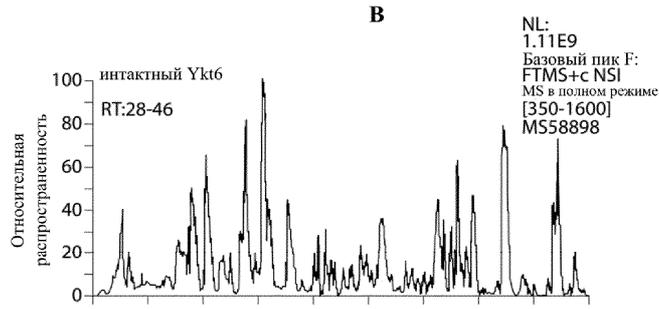
Фиг. 11С



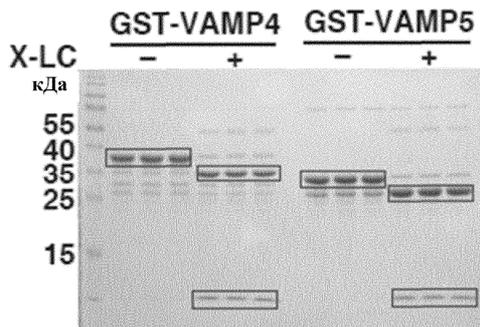
Фиг. 12



Фиг. 13А

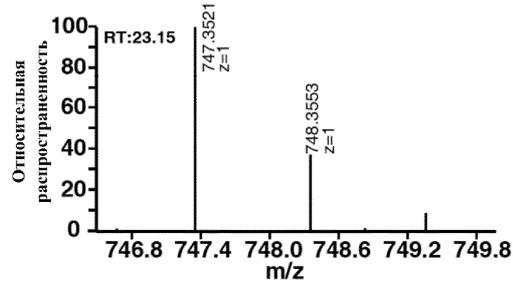
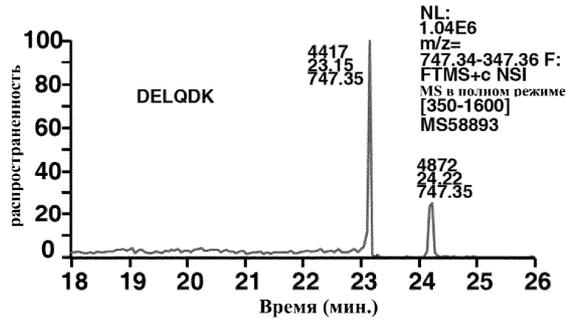


Фиг. 13B-D

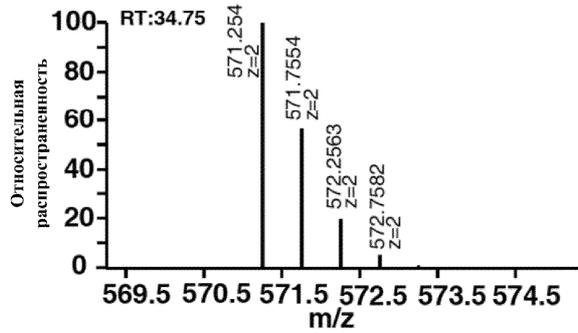
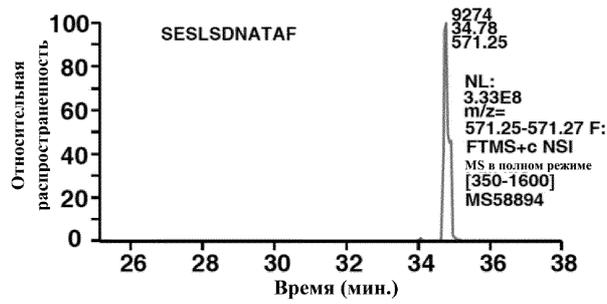


Фиг. 14А

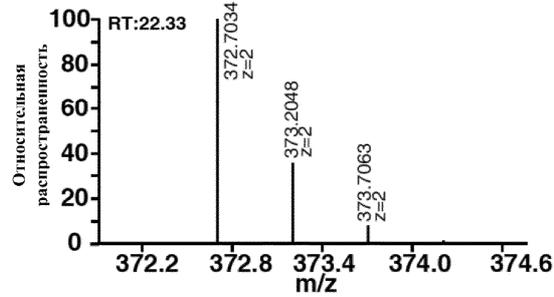
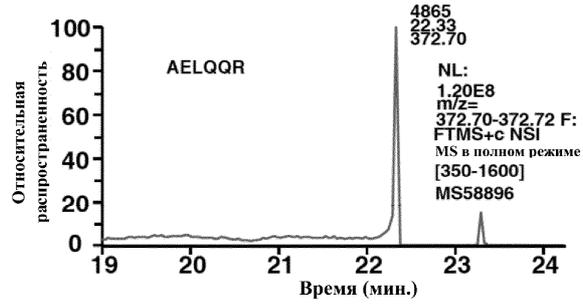
041568



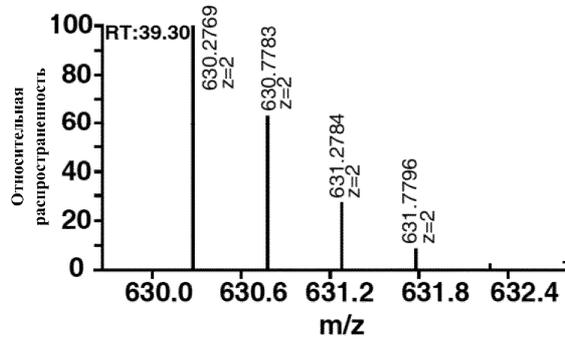
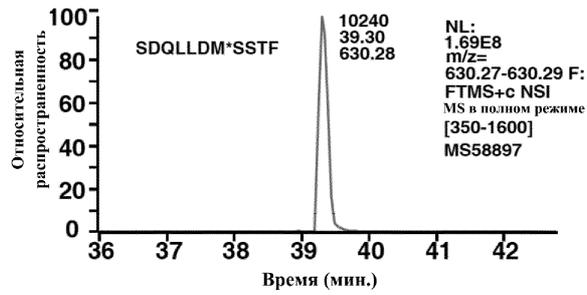
Фиг. 14В



Фиг. 14С



Фиг. 14D



Фиг. 14E

