

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390364** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.07.26

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

(22) Дата подачи заявки
2017.05.05

(54) **ХИМЕРНЫЕ НЕЙРОТОКСИНЫ**

(31) 1607901.4

(32) 2016.05.05

(33) GB

(62) 201892386; 2017.05.05

(71) Заявитель:

ИПСЕН БИОФАРМ ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:

Лю Сай Ман (GB)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к химерным нейротоксинам с улучшенными свойствами и к их применению в терапии.

A1

202390364

202390364

A1

ХИМЕРНЫЕ НЕЙРОТОКСИНЫ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к химерным нейротоксинам с улучшенными свойствами и к их применению в терапии.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ДЛЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Бактерии рода *Clostridia* продуцируют высоко активные и специфические белковые токсины, которые могут отравлять нейроны и другие клетки, к которым их доставляют. Примеры таких токсинов клостридий включают в себя нейротоксины, продуцируемые *C. tetani* (TeNT) и *C. botulinum* (BoNT) серотипов А-Г, а также продуцируемые *C. baratii* и *C. butyricum*.

Среди нейротоксинов клостридий присутствуют некоторые из наиболее активных известных токсинов. В качестве примера, ботулинические нейротоксины имеют медианные значения летальной дозы (LD50) для мышей в диапазоне от 0,5 до 5 нг/кг, в зависимости от серотипа. Как столбнячный, так и ботулинический токсины действуют посредством ингибирования функции пораженных нейронов, конкретно, высвобождения нейротрансмиттеров. В то время как ботулинический токсин действует на нервно-мышечное соединение и ингибирует холинэргический перенос в периферической нервной системе, столбнячный токсин действует в центральной нервной системе.

В природе, нейротоксины клостридий синтезируются в форме одноцепочечного полипептида, который модифицируется пост-трансляционно посредством события протеолитического расщепления с формированием двух полипептидных цепей, соединенных вместе дисульфидной связью. Расщепление происходит в специфическом участке расщепления, часто обозначаемом как участок активации, который локализован между остатками цистеина, обеспечивающими межцепьевую дисульфидную связь. Эта двухцепочечная форма представляет собой активную форму токсина. Две цепи называют тяжелой цепью (Н-цепью), имеющей молекулярную массу приблизительно 100 кДа, и легкой цепью (L-цепью), имеющей молекулярную массу приблизительно 50 кДа. Н-цепь содержит N-концевой компонент для транслокации (домен N_N) и C-концевой

компонент для нацеливания (домен Н_C). Участок расщепления локализован между L-цепью и компонентами домена для транслокации. После связывания домена Н_C с его нейроном-мишенью и интернализации связанного токсина в клетку посредством эндосомы, домен Н_N транслоцирует L-цепь через эндосомальную мембрану и в цитозоль, и L-цепь обеспечивает функцию протеазы (также известной как нецитотоксическая протеаза).

Нецитотоксические протеазы действуют посредством протеолитического расщепления белков внутриклеточного транспорта, известных как белки SNARE (например, SNAP-25, VAMP или синтаксин) -см. Gerald K (2002) «Cell and Molecular Biology» (4th edition) John Wiley & Sons, Inc. Акроним SNARE происходит от термина растворимый рецептор присоединения NSF (Soluble NSF Attachment Receпtor), где NSF обозначает чувствительный к N-этилмалеинимиду фактор (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor). Белки SNARE являются составной частью слияния с внутриклеточной везикулой, и таким образом, секреции молекул посредством транспорта везикул из клетки. Протеазная функция представляет собой активность зависимой от цинка эндопептидазы и имеет высокую субстратную специфичность для белков SNARE. Соответственно, после доставки к желательной клетке-мишени, нецитотоксическая протеаза является способной ингибировать клеточную секрецию из клетки-мишени. Протеазы L-цепи токсинов клостридий представляют собой нецитотоксические протеазы, расщепляющие белки SNARE.

Принимая во внимание повсеместный характер белков SNARE, нейротоксины клостридий, такие как ботулинический токсин, успешно применяли в широком ряде способов терапии.

В качестве примера, авторы настоящего изобретения ссылаются на William J. Lipham, Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin (Slack, Inc., 2004), где описано применение нейротоксинов клостридий, таких как ботулинические нейротоксины (BoNT), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F и BoNT/G, и столбнячный нейротоксин (TeNT), для ингибирования нейронной трансмиссии в ряде терапевтических и косметических или эстетических применений - например, поставляемые на рынок

продукты ботулинического токсина в настоящее время одобрены в качестве лекарственных средств при показаниях, включающих очаговую спастичность, спастичность верхних конечностей, спастичность нижних конечностей, дистонию мышц шеи, блефароспазм, гемифациальный спазм, гипергидроз подмышечных областей, хроническую мигрень, нейрогенную сверхактивность мышцы-сжимателя, межбровные морщины и выраженные морщины в углах глаз. Кроме того, описаны виды терапии нейротоксином клостридий для лечения нейромышечных нарушений (см. US 6872397); для лечения нарушений матки (см. US 2004/0175399); для лечения язв и желудочно-пищеводного рефлюкса (см. US 2004/0086531); для лечения дистонии (см. US 6319505); для лечения повреждений глаз (см. US 2004/0234532); для лечения блефароспазма (см. US 2004/0151740); для лечения страбизма (см. US 2004/0126396); для лечения боли (см. US 6869610, US 6641820, US 6464986 и US 6113915); для лечения фибромиалгии (см. US 6623742, US 2004/0062776); для лечения боли в пояснице (см. US 2004/0037852); для лечения травм мышц (см. US 6423319); для лечения синусовой головной боли (см. US 6838434); для лечения головной боли напряжения (см. US 6776992); для лечения головной боли (см. US 6458365); для уменьшения головной боли при мигрени (см. US 5714469); для лечения сердечно-сосудистых заболеваний (см. US 6767544); для лечения неврологических нарушений, таких как болезнь Паркинсона (см. US 6620415, US 6306403); для лечения нейропсихиатрических нарушений (см. US 2004/0180061, US 2003/0211121); для лечения эндокринных нарушений (см. US 6827931); для лечения нарушений щитовидной железы (см. US 6740321); для лечения нарушения работы потовых желез под влиянием холинэргических веществ (см. US 6683049); для лечения диабета (см. US 6337075, US 6416765); для лечения нарушений поджелудочной железы (см. US 6261572, US 6143306); для лечения злокачественных опухолей, таких как опухоли костной ткани (см. US 6565870, US 6368605, US 6139845, US 2005/0031648); для лечения нарушений уха (см. US 6358926, US 6265379); для лечения вегетативных нарушений, таких как нарушения мышц желудочно-кишечного тракта и дисфункция других гладких мышц (см. US

5437291); для лечения повреждений кожи, ассоциированных с нарушениями пролиферации клеток кожи (см. US 5670484); для контроля нейrogenных воспалительных нарушений (см. US 6063768); для уменьшения потери волос и стимуляции роста волос (см. US 6299893); для лечения опускания углов рта (см. US 6358917); для уменьшения аппетита (см. US 2004/40253274); для стоматологической терапии и процедур (см. US 2004/0115139); для лечения нейромышечных нарушений и состояний (см. US 2002/0010138); для лечения различных нарушений и состояний, и ассоциированной боли (см. US 2004/0013692); для лечения состояний, возникающих в результате повышенной секреции слизи, таких как астма и COPD (см. WO 00/10598); и для лечения не относящихся к нейрональным состояний, таких как воспаление, эндокринные состояния, экзокринные состояния, иммунологические состояния, сердечно-сосудистые состояния, состояния костной ткани (см. WO 01/21213). Полное содержание всех из вышеуказанных публикаций, таким образом, приведено в качестве ссылки.

Предполагают, что использование нецитотоксических протеаз, таких как нейротоксины клостридий (например, BoNTs и TeNT), в терапевтическом и косметическом лечении человека и других млекопитающих распространяется на постоянно расширяющийся диапазон заболеваний и недомоганий, при которых можно получать преимущество от свойств этих токсинов.

В настоящее время все одобренные лекарственные средства/косметические препараты, содержащие BoNT, содержат природные нейротоксины, очищенный из штаммов клостридий (BoNT/A в случае DYSPORT®, BOTOX® или XEOMIN®, и BoNT/B в случае MYOBLOC®).

Рекомбинантная технология обеспечивает возможность изменения или оптимизации свойств нейротоксинов посредством введения модификации в их последовательность и/или структуру. В частности, получены химерные нейротоксины, в которых домен N_c или субдомен N_{cc} заменен на домен N_c или субдомен N_{cc} из другого нейротоксина.

Rummel et al, 2011 (Exchange of the H_{CC} domain mediating double receptor recognition improves the pharmacodynamic properties of botulinum neurotoxin. FEBS Journal, 278(23), 4506-4515) получили различные активные полноразмерные гибридные нейротоксины, включая химеры AABV, AACС и BVAA (буквы обозначают источник серотипа для каждого из четырех доменов: L, H_N, H_{СN}, H_{CC}). Обнаружено, что химера AABV была более активной, чем BoNT/A в гемидиафрагмальном анализе диафрагмального нерва мышцы, в то время как AACС сохраняла только 10% активности BoNT/A. Химера BVAA сохраняла 85% активности BoNT/A и имела равную активность с BoNT/B.

Wang et al, 2008 (Novel chimeras of botulinum neurotoxins A and E unveil contributions from the binding, translocation, and protease domains to their functional characteristics. Journal of Biological Chemistry, 283(25), 16993-17002) получили химерные нейротоксины AE (LH_N из BoNT/A и H_C из BoNT/E) и EA (LH_N из BoNT/E и H_C из BoNT/A), добавляя линкер в случае химеры AE между доменами LH_N и H_C для увеличения гибкости. Оба являлись способными вызывать паралич в гемидиафрагмальном анализе диафрагмального нерва мышцы, так же как *in vivo*.

Wang et al., 2012a (Longer-acting and highly potent chimaeric inhibitors of excessive exocytosis created with domains from botulinum neurotoxin A and B. Biochemical Journal, 444(1), 59-67) получили химерные нейротоксины AV (LH_N из BoNT/A и H_C из BoNT/B, с линкером для улучшения сворачивания), и VA (LH_N из BoNT/B и H_C из BoNT/A). Химера AV индуцировала у мышей более продолжительный нервномышечный паралич, чем BoNT/A. Химера VA являлась способной уменьшать экзоцитоз из не относящихся к нейрональным клеткам.

Wang et al, 2012b (Novel chimeras of botulinum and tetanus neurotoxins yield insights into their distinct sites of neuroparalysis. The FASEB Journal, 26(12), 5035-5048) получили химеры ATx (LH_N из BoNT/A и H_C из TeNT), TxA (LH_N из TeNT и H_C из BoNT/A), ETx (LH_N из BoNT/E и H_C из TeNT) и TxE (LH_N из TeNT и H_C из BoNT/E). Информация, представленная применительно к белковой

последовательности этих химерных нейротоксинов из предшествующей области техники, обобщена в таблице 1 ниже:

Таблица 1 - Домены L_N и H_C химерных нейротоксинов из предшествующей области техники

| | Химера | L_N | H_C |
|---------------|---------------|------------------------------|----------------------|
| Rummel, 2011 | AABV | A | B: 871-1304 |
| | AACC | A | C: 871-1296 |
| | BVAA | B | A: 858-1283 |
| Wang, 2008 | AE | A: 1-874 (+линкер ELGGGGSEL) | E: 845-1252 |
| | EA | E: 1-844 (+линкер DI) | A: 871-1296 |
| Wang, 2012(a) | AB | A: 1-874 (+линкер ELGGGGSEL) | B: 858-1283 |
| | BA | B: 1-861 (+линкер DI) | A: 871-1296 |
| Wang, 2012(b) | ATx | A: 1-877 | Tx: 879-1315 |
| | TxA | Tx: 1-882 (+линкер DI) | A: 871-1296 |
| | ETx | E: 1-844 (+линкер DI) | Tx: 879-1315 |
| | TxE | Tx: 1-882 (+линкер EL) | E: 845-1252 |

Однако, все еще существует необходимость оптимизированного дизайна химерных нейротоксинов, обеспечивающих улучшенные терапевтические свойства.

Настоящее изобретение решает вышеуказанную проблему посредством предоставления химерных нейротоксинов, как указано в формуле изобретения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте изобретение относится к химерному нейротоксину, содержащему домен L_N из первого нейротоксина, ковалентно связанный с доменом H_C из второго нейротоксина, где первый и второй нейротоксины являются различными, где С-концевой аминокислотный остаток домена L_N соответствует первому аминокислотному остатку спирали Z₁₀, разделяющей домены L_N и H_C в первом нейротоксине, и где N-концевой аминокислотный остаток домена H_C соответствует второму аминокислотному остатку спирали Z₁₀, разделяющей домены L_N и H_C во втором нейротоксине.

Во втором аспекте, изобретение относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный нейротоксин по изобретению.

В третьем аспекте, изобретение относится к вектору, содержащему нуклеотидную последовательность по изобретению.

В четвертом аспекте, изобретение относится к клетке, содержащей нуклеотидную последовательность или вектор по изобретению.

В пятом аспекте, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей химерный нейротоксин по изобретению.

В шестом аспекте, изобретение относится к химерному нейротоксину по изобретению для использования в терапии.

В седьмом аспекте, изобретение относится к не терапевтическому использованию химерного нейротоксина по изобретению для лечения эстетического или косметического состояния.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В одном аспекте изобретение относится к химерному нейротоксину, содержащему домен LN_N из первого нейротоксина, ковалентно связанный с доменом N_C домен из второго нейротоксина, где первый и второй нейротоксины являются различными,

где С-концевой аминокислотный остаток домена LN_N соответствует первому аминокислотному остатку спирали Z₁₀, разделяющей домены LN_N и N_C в первом нейротоксине, и

где N-концевой аминокислотный остаток домена N_C соответствует первому аминокислотному остатку спирали Z₁₀, разделяющей домены LN_N и N_C во втором нейротоксине.

Как применяют в настоящем описании, неконкретизированные термины и конкретизированные термины единственного числа могут обозначать один или несколько.

Термин «нейротоксин», как применяют в настоящем описании, обозначает любой полипептид, который проникает в нейрон и ингибирует высвобождение нейротрансмиттеров. Этот процесс включает связывание нейротоксина с низкоаффинным или с высокоаффинным рецептором, интернализацию нейротоксина, транслокацию эндопептидазной части нейротоксина в цитоплазму и ферментную модификацию субстрата нейротоксина. Более конкретно, термин «нейротоксин» включает любой полипептид, продуцируемый бактериями *Clostridium* (нейротоксины клостридий), который

проникает в нейрон и ингибирует высвобождение нейротрансмиттеров, и такие полипептиды, полученные посредством рекомбинантных технологий или химических способов. Двухцепочечная форма является активной формой токсина. Две цепи названы тяжелой цепью (H-цепью), имеющей молекулярную массу приблизительно 100 кДа, и легкой цепью (L-цепью), имеющей молекулярную массу приблизительно 50 кДа. Предпочтительно, первый и второй нейротоксины представляют собой нейротоксины клостридий.

Один пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/A представлен как SEQ ID NO: 1 (номер доступа в UniProt A5HZZ9). Один пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/B представлен как SEQ ID NO: 2 (номер доступа в UniProt B1INP5). Один пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/C представлен как SEQ ID NO: 3 (номер доступа в UniProt P18640). Один пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/D представлен как SEQ ID NO: 4 (номер доступа в UniProt P19321). Один пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/E представлен как SEQ ID NO: 5 (номер доступа в UniProt Q00496). Один пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/F представлен как SEQ ID NO: 6 (номер доступа в UniProt Q57236). Один пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/G представлен как SEQ ID NO: 7 (номер доступа в UniProt Q60393). Один пример аминокислотной последовательности нейротоксина TeNT представлен как SEQ ID NO: 8 (номер доступа в UniProt P04958). Аминокислотные последовательности указанных нейротоксинов показаны в выравнивании из фигуры 1 ниже, вместе с последовательностями других нейротоксинов (т.е. SEQ ID NO:58-91).

Термин «химерный нейротоксин», как применяют в настоящем описании, обозначает нейротоксин, содержащий домен L_N, происходящий из первого нейротоксина, и домен H_c, происходящий из второго нейротоксина, или состоящий из них.

Термин «домен H_c», как применяют в настоящем описании, обозначает функционально отдельную область тяжелой цепи нейротоксина с молекулярной массой приблизительно 50 кДа,

которая обеспечивает связывание нейротоксина с рецептором, локализованным на поверхности клетки-мишени. Домен H_c состоит из двух структурно отдельных субдоменов, «субдомена H_{cN} » (N-концевой части домена H_c) и «субдомена H_{cC} » (C-концевой части домена H_c), каждый из которых имеет молекулярную массу приблизительно 25 кДа.

Термин «домен LH_N », как применяют в настоящем описании, обозначает нейротоксин, который лишен домена H_c и состоит из домена эндопептидазы («L» или «легкой цепи») и домена, ответственного за транслокацию эндопептидазы в цитоплазму (домена H_N тяжелой цепи).

Ссылка в настоящем описании на «первый аминокислотный остаток спирали Z_{10} , разделяющей домены LH_N и H_c в первом нейротоксине», обозначает N-концевой остаток спирали Z_{10} , разделяющей домены LH_N и H_c .

Ссылка в настоящем описании на «второй аминокислотный остаток спирали Z_{10} , разделяющей домены LH_N и H_c во втором нейротоксине», обозначает аминокислотный остаток, следующий за N-концевым остатком спирали Z_{10} , разделяющей домены LH_N и H_c .

«Спираль Z_{10} » представляет собой тип вторичной структуры, обнаруженной в белках и полипептидах, вместе с α -спиралями, β -листами и обратными витками. Аминокислоты в спирали Z_{10} аранжированы в правовращающую спиральную структуру, где каждый полный оборот состоит из трех остатков и десяти атомов, разделяющих внутримолекулярную водородную связь между ними. Каждая аминокислота соответствует повороту спирали на 120° (т.е., спираль имеет три остатка на виток), и продвижению на $2,0 \text{ \AA}$ (= $0,2 \text{ нм}$) по винтовой оси, и имеет 10 атомов в кольце, сформированном посредством образования водородной связи. Наиболее важно, что группа N-H аминокислоты формирует водородную связь с группой C=O аминокислоты, расположенной раньше на три остатка; это повторяющееся водородное связывание $i+3 \rightarrow i$ определяет спираль Z_{10} . Спираль A Z_{10} является стандартной концепцией в молекулярной биологии, с которой знаком специалист в данной области.

Эта спираль Z_{10} соответствует четырем остаткам, которые формируют фактическую спираль, и двум кэпирующим (или временным) остаткам, по одному на каждом конце этих четырех остатков. Термин «спираль Z_{10} , разделяющая домены LH_N и H_C », как применяют в настоящем описании, состоит из этих 6 остатков.

В ходе проведения структурных анализов и выравниваний последовательности, авторы изобретения идентифицировали спираль Z_{10} , разделяющую домены LH_N и H_C в столбнячном и ботулиническом нейротоксинах. Эта спираль Z_{10} окружена α -спиралью на N-конце (т.е. на C-концевой части домена LH_N) и β -тяжем на C-конце (т.е. на N-концевой части домена H_C). Первый (N-концевой) остаток (кэпирующий или временный остаток) спирали Z_{10} также соответствует C-концевому остатку этой α -спирали.

Спираль Z_{10} , разделяющую домены LH_N и H_C , можно, например, определять по множеству доступных кристаллических структур ботулинических нейротоксинов, например, 3BTA (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3BTA>) и 1EPW (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1EPW>) для ботулинических нейротоксинов A1 и B1, соответственно.

Инструменты для моделирования и выравнивания *in silico*, которые доступны публично, также можно использовать для определения локализации спирали Z_{10} , разделяющей домены LH_N и H_C в других нейротоксинах, например, серверы для моделирования гомологии LOOPP (Learning, Observing and Outputting Protein Patterns, <http://loopp.org>), PHYRE (Protein Homology/analogy Recognition Engine, <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) и Rosetta (<https://www.rosettacommons.org/>), сервер для наложения белков SuperPose (<http://wishart.biology.ualberta.ca/superpose/>), программа для выравнивания Clustal Omega (<http://www.clustal.org/omega/>), и ряд других инструментов/сервисов, перечисленных в интернет-ресурсах для молекулярных и клеточных биологов (<http://molbiol-tools.ca/>). Авторы изобретения обнаружили, в частности, что область около стыка « H_N/H_{CN} » является структурно высоко

консервативной, что делает ее идеальной областью для наложения различных серотипов.

Например, авторы изобретения использовали следующие способы для определения последовательности этой спирали Z_{10} в других нейротоксинах:

1. Инструмент для моделирования структурной гомологии LOOP (<http://loop.org>) использовали для получения прогнозируемой структуры всех серотипов VoNT и TeNT на основании кристаллической структуры VoNT/A1 (3VTA.pdb);

2. Полученные таким образом файлы структуры (pdb) редактировали для включения только N-конца домена H_{CN} и приблизительно 80 остатков до него (составляющие часть домена H_N), таким образом, сохраняя область « H_N/H_{CN} », которая является структурно высоко консервативной;

3. Сервер для наложения белков SuperPose (<http://wishart.biology.ualberta.ca/superpose/>) использовали для наложения каждого серотипа на структуру 3VTA.pdb;

4. Наложённые файлы pdb проверяли для локализации спирали Z_{10} в начале домена H_C VoNT/A1, и затем идентифицировали соответствующие остатки в другом серотипе.

5. Все последовательности серотипа VoNT выравнивали с использованием Clustal Omega для проверки того, что соответствующие остатки были правильными.

Примеры доменов LH_N , H_C и спирали Z_{10} , определенных этим способом, представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Домены LH_N , H_C и спирали Z_{10}

| Нейротокс ин | Номер доступа | LH_N | H_C | Спираль Z_{10} | SEQ ID NO (спираль Z_{10}) |
|-----------------|---------------|--------|----------|--------------------------------------|----------------------------------|
| VoNT/A1 | A5HZZ9 | 1-872 | 873-1296 | ⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷ | 14 |
| VoNT/A2 | X73423 | 1-872 | 873-1296 | ⁸⁷² NIVNTS ⁸⁷⁷ | 15 |
| VoNT/A3 | DQ185900 | 1-872 | 873-1292 | ⁸⁷² NIVNTS ⁸⁷⁷ | 16 |
| VoNT/A4 | EU341307 | 1-872 | 873-1296 | ⁸⁷² NITNAS ⁸⁷⁷ | 17 |
| VoNT/A5 | EU679004 | 1-872 | 873-1296 | ⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷ | 18 |
| VoNT/A6 | FJ981696 | 1-872 | 873-1296 | ⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷ | 19 |
| VoNT/A7 | JQ954969 | 1-872 | 873-1296 | ⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷ | 20 |
| VoNT/A8 | KM233166 | 1-872 | 873-1297 | ⁸⁷² NITNTS ⁸⁷⁷ | 21 |

| Нейротокс ин | Номер доступа | LH _N | H _C | Спираль Z ₁₀ | SEQ ID NO (спираль Z ₁₀) |
|-----------------|---------------|-----------------|----------------|--------------------------------------|---|
| BoNT/B1 | B1INP5 | 1-859 | 860-1291 | ⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴ | 22 |
| BoNT/B2 | AB084152 | 1-859 | 860-1291 | ⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴ | 23 |
| BoNT/B3 | EF028400 | 1-859 | 860-1291 | ⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴ | 24 |
| BoNT/B4 | EF051570 | 1-859 | 860-1291 | ⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴ | 25 |
| BoNT/B5 | EF033130 | 1-859 | 860-1291 | ⁸⁵⁹ DILNNI ⁸⁶⁴ | 26 |
| BoNT/B6 | AB302852 | 1-859 | 860-1291 | ⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴ | 27 |
| BoNT/B7 | JQ354985 | 1-859 | 860-1291 | ⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴ | 28 |
| BoNT/B8 | JQ964806 | 1-859 | 860-1292 | ⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴ | 29 |
| BoNT/C1 | P18640 | 1-867 | 868-1291 | ⁸⁶⁷ NINDSK ⁸⁷² | 30 |
| BoNT/CD | AB200360 | 1-867 | 868-1280 | ⁸⁶⁷ SINDSK ⁸⁷² | 31 |
| BoNT/DC | AB745660 | 1-863 | 864-1276 | ⁸⁶³ SINDSK ⁸⁶⁸ | 32 |
| BoNT/D | P19321 | 1-863 | 864-1276 | ⁸⁶³ SINDSK ⁸⁶⁸ | 33 |
| BoNT/E1 | Q00496 | 1-846 | 847-1252 | ⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹ | 34 |
| BoNT/E2 | EF028404 | 1-846 | 847-1252 | ⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹ | 35 |
| BoNT/E3 | EF028403 | 1-846 | 847-1252 | ⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹ | 36 |
| BoNT/E4 | AB088207 | 1-846 | 847-1252 | ⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹ | 37 |
| BoNT/E5 | AB037711 | 1-846 | 847-1251 | ⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹ | 38 |
| BoNT/E6 | AM695759 | 1-846 | 847-1252 | ⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹ | 39 |
| BoNT/E7 | JN695729 | 1-846 | 847-1252 | ⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹ | 40 |
| BoNT/E8 | JN695730 | 1-846 | 847-1252 | ⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹ | 41 |
| BoNT/E9 | JX424534 | 1-846 | 847-1251 | ⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹ | 42 |
| BoNT/E10 | KF861917 | 1-846 | 847-1252 | ⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹ | 43 |
| BoNT/E11 | KF861875 | 1-846 | 847-1252 | ⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹ | 44 |
| BoNT/E12 | KM370319 | 1-846 | 847-1254 | ⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹ | 45 |
| BoNT/F1 | Q57236 | 1-865 | 866-1278 | ⁸⁶⁵ KIKDNS ⁸⁷⁰ | 46 |
| BoNT/F2 | GU213209 | 1-865 | 866-1280 | ⁸⁶⁵ KIKDSS ⁸⁷⁰ | 47 |
| BoNT/F3 | GU213227 | 1-865 | 866-1279 | ⁸⁶⁵ KIKDSS ⁸⁷⁰ | 48 |
| BoNT/F4 | GU213214 | 1-865 | 866-1277 | ⁸⁶⁵ KIKDNC ⁸⁷⁰ | 49 |
| BoNT/F5 | GU213211 | 1-862 | 863-1277 | ⁸⁶² KIKDSS ⁸⁶⁷ | 50 |
| BoNT/F6 | M92906 | 1-864 | 865-1274 | ⁸⁶⁴ KIKDSS ⁸⁶⁹ | 51 |
| BoNT/F7 | GU213233 | 1-856 | 857-1268 | ⁸⁵⁶ KIKDSS ⁸⁶¹ | 52 |
| BoNT/G | Q60393 | 1-864 | 865-1297 | ⁸⁶⁴ NISSNA ⁸⁶⁹ | 53 |
| BoNT/H | KGO15617 | 1-860 | 861-1288 | ⁸⁶⁰ ELKYNC ⁸⁶⁵ | 54 |
| TeNT | P04958 | 1-880 | 881-1315 | ⁸⁸⁰ ILKKST ⁸⁸⁵ | 55 |

С использованием структурного анализа и выравнивания последовательностей, авторы изобретения обнаружили, что β-тяж

после спирали Z_{10} , разделяющей домены LH_N и H_C , является консервативной структурой во всех ботулинических и столбнячных нейротоксинах и начинается на 8^{-м} остатке, когда начинается с первого остатка спирали Z_{10} , разделяющей домены LH_N и H_C (например, на остатке 879 для BoNT/A1).

В соответствии с альтернативным определением, первый аспект изобретения относится к химерному нейротоксину, содержащему домен LH_N из первого нейротоксина, ковалентно связанный с доменом H_C из второго нейротоксина, где первый и второй нейротоксины являются различными,

где С-концевой аминокислотный остаток домена LH_N соответствует восьмому аминокислотному остатку на N-конце от β -тяжа, локализованной в начале (на N-конце) домена H_C в первом нейротоксине, и

где N-концевой аминокислотный остаток домена H_C соответствует седьмому аминокислотному остатку на N-конце от β -тяжа, локализованной в начале (на N-конце) домена H_C второго нейротоксина.

В соответствии с другим определением, первый аспект изобретения относится к химерному нейротоксину, содержащему домен LH_N из первого нейротоксина, ковалентно связанный с доменом H_C из второго нейротоксина, где первый и второй нейротоксины являются различными,

где С-концевой аминокислотный остаток домена LH_N соответствует С-концевому аминокислотному остатку α -спирали, локализованному на конце (на С-конце) домена LH_N в первом нейротоксине, и

где N-концевой аминокислотный остаток домена H_C соответствует аминокислотному остатку непосредственно на С-конце от С-концевого аминокислотного остатка α -спирали, локализованного на конце (на С-конце) домена LH_N во втором нейротоксине.

Обоснованием для способа дизайна химерных нейротоксинов по изобретению являлась попытка убедиться в том, что вторичная структура не является нарушенной, и таким образом,

минимизировать любые изменения в третичной структуре и функции каждого домена.

В некоторых химерных нейротоксинах из предшествующей области техники, необходим линкер между доменами L_N и N_C (см. таблицу 1), предположительно, для обеспечения приемлемых экспрессии и очистки.

Без намерения быть связанными теорией, выдвинули гипотезу, что придание структуры химерным нейротоксинам в форме белков, имеющих третичную структуру, близко имитирующую третичную структуру природных нейротоксинов, может способствовать их растворимости.

Без намерения быть связанными теорией, кроме того, выдвинули гипотезу, что факт отсутствия нарушения четырех центральных аминокислотных остатков из спирали Z₁₀ в химерном нейротоксине обеспечивает оптимальную конформацию химерного нейротоксина, таким образом, позволяя химерному нейротоксину проявлять свои функции в полной мере.

Фактически, авторы изобретения неожиданно обнаружили, что сохранение только первого аминокислотного остатка из спирали Z₁₀ первого нейротоксина и второго аминокислотного остатка из спирали Z₁₀ спереди от второго нейротоксина не только позволяет получение растворимых и функциональных химерных нейротоксинов, но кроме того, приводит к улучшенным свойствам по сравнению с другими химерными нейротоксинами, в частности, к увеличенной активности, увеличенному коэффициенту безопасности и/или более длительной продолжительности действия.

Нежелательные эффекты нейротоксина (вызванные диффузией нейротоксина из участка введения) можно оценивать экспериментально посредством измерения процента потери массы тела в соответствующей модели на животных (например, на мышах, где потерю массы тела детектируют в пределах семи суток после введения). И наоборот, желательные целевые эффекты нейротоксина можно оценивать экспериментально посредством анализа индекса степени отведения пальца (DAS), показателя паралича мышц. Анализ DAS можно проводить посредством инъекции 20 мкл нейротоксина, составленного в желатиновом фосфатном буфере, в

икроножный/камбаловидный комплекс мыши, с последующей оценкой индекса степени отведения пальца с использованием способа Aoki (Aoki KR, Toxicon 39: 1815-1820; 2001). В анализе DAS, мышей кратковременно подвешивают за хвост для вызова характерного ответа испуга, при котором мышь вытягивает свои задние конечности и отводит пальцы задней конечности. После инъекции нейротоксина, различные степени отведения пальца оценивают в баллах по пятибалльной шкале (от 0=норма до 4=максимальное уменьшение отведения пальца и вытягивания задней конечности).

Затем можно выразить коэффициент безопасности нейротоксина как соотношение между количеством нейротоксина, необходимым для падения массы тела мыши на 10% (измеренного как наивысший эффект в пределах первых семи суток после дозирования у мыши), и количеством нейротоксина, необходимым для показателя DAS 2. Таким образом, высокий коэффициент безопасности является желательным и указывает на нейротоксин, который является способным эффективно парализовать намеченную мышцу с небольшими нежелательными неспецифическими эффектами.

Высокий коэффициент безопасности является особенно преимущественным в терапии, поскольку он представляет увеличение терапевтического индекса. Иными словами, это означает, что можно использовать уменьшенные дозы по сравнению с известными лекарственными средствами на основе токсина клостридий, и/или что можно использовать увеличенные дозы без дополнительных эффектов. Возможность использовать более высокие дозы нейротоксина без дополнительных эффектов является особенно преимущественной, поскольку более высокие дозы обычно приводят к более длительной продолжительности действия нейротоксина.

Активность нейротоксина можно выразить как минимальную дозу нейротоксина, которая приводит к данному показателю DAS при введении в икроножный/камбаловидный комплекс мыши, например, к показателю DAS 2 (доза ED₅₀) или к показателю DAS 4. Активность нейротоксина можно также выразить как дозу EC₅₀ в клеточном анализе, измеряющем расщепление SNARE посредством нейротоксина, например, дозу EC₅₀ в клеточном анализе, измеряющем расщепление SNAP-25 посредством химерного нейротоксина BoNT/AB.

Продолжительность действия нейротоксина можно выразить как время, необходимое для восстановления показателя DAS 0 после введения данной дозы нейротоксина, например, минимальной дозы нейротоксина, приводящей к показателю DAS 4, в икроножный/камбаловидный комплекс мышцы.

В одном варианте осуществления, первый нейротоксин представляет собой ботулинический нейротоксин (BoNT) серотипа А, серотипа В, серотипа С, серотипа D, серотипа Е, серотипа F или серотипа G, или столбнячный нейротоксин (TeNT), и второй нейротоксин представляет собой ботулинический нейротоксин (BoNT) серотипа А, серотипа В, серотипа С, серотипа D, серотипа Е, серотипа F или серотипа G, или столбнячный нейротоксин (TeNT). В предпочтительном варианте осуществления, первый нейротоксин представляет собой ботулинический нейротоксин (BoNT) серотипа А, серотипа В или серотипа С, и второй нейротоксин представляет собой ботулинический нейротоксин (BoNT) серотипа А, серотипа В или серотипа С.

Различные серотипы BoNT можно различать на основании инактивации посредством специфической нейтрализующей антисыворотки, где такая классификация по серотипу коррелирует с процентом идентичности последовательности на уровне аминокислот. Белки BoNT данного серотипа далее разделяют на различные подтипы на основании процента идентичности аминокислотной последовательности.

Предпочтительно, первый и второй нейротоксины представляют собой ботулинические нейротоксины из различных серотипов. В другом варианте осуществления, либо первый, либо второй нейротоксин представляет собой ботулинический нейротоксин, и другой нейротоксин представляет собой столбнячный нейротоксин.

При использовании представления «XY», в соответствии с которым X представляет собой домен L_N, и Y представляет собой домен N_c, следующие химерные нейротоксины представляют собой варианты осуществления настоящего изобретения:

AB, AC, AD, AE, AF, AG, AT_x,
 BA, BC, BD, BE, BF, BG, BT_x,
 CA, CB, CD, CE, CF, CG, CT_x,

DA, DB, DC, DE, DF, DG, DTx,
EA, EB, EC, ED, EF, EG, ETx,
FA, FB, FC, FD, FE, FG, FTx,
GA, GB, GC, GD, GE, GF, FTx,
TxA, TxB, TxC, TxD, TxE, TxF, TxG,

где А, В, С, D, E, F, G и Tx представляют собой, соответственно, ботулинический нейротоксин (BoNT) серотипа А, серотипа В, серотипа С, серотипа D, серотипа E, серотипа F, серотипа G, и столбнячный нейротоксин (TeNT).

Кроме того, при использовании такого же представления «XY», как описано выше, следующие химерные нейротоксины представляют собой предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения:

AB, AC,
BA, BC,
CA, CB,

где А, В, С представляют собой, соответственно, ботулинический нейротоксин (BoNT) серотипа А, серотипа В и серотипа С.

В одном варианте осуществления, домен LN_n из первого нейротоксина соответствует:

- аминокислотным остаткам 1-872 из SEQ ID NO: 1, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 1-859 из SEQ ID NO: 2, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 1-867 из SEQ ID NO: 3, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 1-863 из SEQ ID NO: 4, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 1-846 из SEQ ID NO: 5, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 1-865 из SEQ ID NO: 6, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 1-864 из SEQ ID NO: 7, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними, или

- аминокислотным остаткам 1-880 из SEQ ID NO: 8, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними.

и домен N_c из второго нейротоксина соответствует:

- аминокислотным остаткам 873-1296 из SEQ ID NO: 1, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 860-1291 из SEQ ID NO: 2, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 868-1291 из SEQ ID NO: 3, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 864-1276 из SEQ ID NO: 4, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 847-1251 из SEQ ID NO: 5, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 866-1275 из SEQ ID NO: 6, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 865-1297 из SEQ ID NO: 7, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними, или

- аминокислотным остаткам 881-1315 из SEQ ID NO: 8, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними.

«Процент идентичности последовательностей» между двумя или более последовательностями нуклеиновой кислоты или

аминокислотными последовательностями является функцией количества нуклеотидов/аминокислот в идентичных положениях, разделяемых выровненными последовательностями. Таким образом, % идентичности можно рассчитывать как количество идентичных нуклеотидов/аминокислот в каждом положении, деленное на общее количество нуклеотидов/аминокислот в выровненной последовательности, умноженное на 100. При расчетах % идентичности последовательности можно также принимать во внимание количество пропусков, и длину каждого пропуска, которые необходимо вводить для оптимизации выравнивания двух или более последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя или более последовательностями можно проводить с использованием специфических математических алгоритмов, в частности, математического алгоритма глобального выравнивания (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48(3), 443-453, 1972), такого как BLAST, известного специалисту в данной области.

Первый или второй нейротоксин может представлять собой мозаичный нейротоксин. Термин «мозаичный нейротоксин», как используют в этом контексте, относится к природному нейротоксину клостридий, который содержит по меньшей мере один функциональный домен из другого типа нейротоксинов клостридий (например, нейротоксина клостридий другого серотипа), где указанный нейротоксин клостридий обычно не содержит указанный по меньшей мере один функциональный домен. Примерами мозаичных нейротоксинов являются природные BoNT/DC и BoNT/CD. BoNT/DC содержит L-цепь и домен N_D серотипа D и домен N_C серотипа C, в то время как BoNT/CD состоит из L-цепи и домена N_D серотипа C и домена N_C серотипа D.

Первый и второй нейротоксины могут представлять собой модифицированные нейротоксины и их производные, включая, но без ограничения, нейротоксины, описанные ниже. Модифицированный нейротоксин или его производное может содержать одну или несколько аминокислот, модифицированных по сравнению с нативной (немодифицированной) формой нейротоксина, или может содержать один или несколько вставленных аминокислот, которые не

присутствуют в нативной (unмодифицированной) формой токсина. В качестве примера, модифицированный нейротоксин клостридий может иметь модифицированные аминокислотные последовательности в одном или нескольких доменах относительно нативной (немодифицированной) последовательностью нейротоксина клостридий. Такие модификации могут модифицировать функциональные аспекты нейротоксина, например, биологическую активность или персистенцию. Таким образом, в одном варианте осуществления, первый нейротоксин и/или второй нейротоксин представляет собой модифицированный нейротоксин, или модифицированное производное нейротоксина.

Модифицированный нейротоксин сохраняет по меньшей мере одну из функций нейротоксина, выбранных из способности связываться с низкоаффинным или высокоаффинным рецептором нейротоксина на клетке-мишени, транслоцировать эндопептидазную часть нейротоксина (легкую цепь) в цитоплазму клетки и расщеплять белок SNARE. Предпочтительно, модифицированный нейротоксин сохраняет по меньшей мере две из этих функций. Более предпочтительно, модифицированный нейротоксин сохраняет три эти функции.

Модифицированный нейротоксин может иметь одну или несколько модификаций в аминокислотной последовательности тяжелой цепи (такой как модифицированный домен N_c), где указанная модифицированная тяжелая цепь связывается с клетками нервов-мишеней с более высокой или более низкой аффинностью, чем нативный (немодифицированный) нейротоксин. Такие модификации в домене N_c могут включать модификацию остатков в участке связывания ганглиозида домена N_c или в участке связывания белка (SV2 или синаптотатмина), которые изменяют связывание с рецептором ганглиозида и/или рецептором белка в клетке нерва-мишени. Примеры таких модифицированных нейротоксинов описаны в WO 2006/027207 и WO 2006/114308, полное содержание обоих из которых, таким образом, приведено в качестве ссылки.

Модифицированный нейротоксин может иметь одну или несколько модификаций в аминокислотной последовательности легкой цепи, например, модификации в связывающем субстрат или каталитическом

доме, которые могут изменять или модифицировать специфичность для белка SNARE модифицированной LC. Примеры таких модифицированных нейротоксинов описаны в WO 2010/120766 и US 2011/0318385, полное содержание обоих из которых, таким образом, приведено в качестве ссылки.

Модифицированный нейротоксин может содержать одну или несколько модификаций, которые увеличивают или уменьшают биологическую активность и/или биологическую персистенцию модифицированного нейротоксина. Например, модифицированный нейротоксин может содержать мотив на основе лейцина или тирозина, где указанный мотив увеличивает или уменьшает биологическую активность и/или биологическую персистенцию модифицированного нейротоксина. Пригодные мотивы на основе лейцина включают xDxxxLL, xExxxLL, xExxxIL и xExxxLM (где x представляет собой любую аминокислоту). Пригодные мотивы на основе тирозина включают Y-x-x-Hy (где Hy представляет собой гидрофобную аминокислоту). Примеры модифицированных нейротоксинов, включающих мотивы на основе лейцина и тирозина, описаны в WO 2002/08268, полное содержание которого, таким образом, приведено в качестве ссылки.

В одном варианте осуществления, первый или второй нейротоксин представляет собой модифицированный BoNT/A, который имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления, первый или второй нейротоксин представляет собой модифицированный BoNT/B, который имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2.

В одном варианте осуществления, первый или второй нейротоксин представляет собой модифицированный BoNT/C, который имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3.

В одном варианте осуществления, первый или второй нейротоксин представляет собой модифицированный VoNT/D, который имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления, первый или второй нейротоксин представляет собой модифицированный VoNT/E, который имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5.

В одном варианте осуществления, первый или второй нейротоксин представляет собой модифицированный VoNT/F, который имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6.

В одном варианте осуществления, первый или второй нейротоксин представляет собой модифицированный VoNT/G, который имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7.

В одном варианте осуществления, первый или второй нейротоксин представляет собой модифицированный TeNT, который имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8.

В одном варианте осуществления, второй нейротоксин представляет собой VoNT/B. Такой химерный нейротоксин обозначен в настоящем описании как «нейротоксин VoNT/XB».

В предпочтительном варианте осуществления, первый нейротоксин представляет собой VoNT/A, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/B. Такой химерный нейротоксин обозначен в настоящем описании как «нейротоксин VoNT/AB». Более предпочтительно, первый нейротоксин представляет собой VoNT/A1, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/B1. Еще более предпочтительно, домен L_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-872 из VoNT/A1, и домен H_c из второго

нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 860-1291 из VoNT/B1. В одном предпочтительном варианте осуществления, домен LN_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-872 из SEQ ID NO: 1, и домен N_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 860-1291 из SEQ ID NO: 2. Иными словами, предпочтительный химерный нейротоксин по изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13 или состоит из нее.

По сравнению с серотипом VoNT/A, природный VoNT/B является намного менее активным, несмотря на сравнительно большую распространенность его рецептора на синаптических везикулах. Это обусловлено уникальной аминокислотной заменой внутри участка связывания токсина в синаптотагмине II человека (Syt II) по сравнению с Syt II грызунов (крысы/мыши) (Peng, L., et al., J Cell Sci, 125(Pt 13):3233-42 (2012); Rummel, A. et al, FEBS J 278:4506-4515 (2011).13,22. В результате замены этого остатка, Syt II человека имеет сильно уменьшенное связывание с природным VoNT/B, так же как с природным VoNT/D-C и /G. Эти обнаружения обеспечивают объяснение для клинических наблюдений, что намного более высокая доза VoNT/B, чем VoNT/A (который связывает другой рецептор) необходима для достижения таких же уровней терапевтических эффектов у пациентов. В предпочтительном варианте осуществления нейротоксина VoNT/XB или VoNT/AB по изобретению, домен N_C из нейротоксина VoNT/B содержит замену, добавление или делецию по меньшей мере одного аминокислотного остатка в субдомene N_{CC}, которые оказывают эффект увеличения аффинности связывания нейротоксина VoNT/B для Syt II человека по сравнению с последовательностью природного VoNT/B.

Пригодные замена, добавление или делеция аминокислотного остатка в субдомene N_{CC} VoNT/B описаны в WO2013/180799 и в PCT/US2016/024211, которая еще не опубликована (содержание обоих приведено в настоящем описании в качестве ссылки).

Пригодные замена, добавление или делеция аминокислотного остатка в субдомene N_{CC} VoNT/B включают мутации замены, выбранные из группы, состоящей из: V1118M; Y1183M; E1191M; E1191I; E1191Q; E1191T; S1199Y; S1199F; S1199L; S1201V; E1191C, E1191V, E1191L,

E1191Y, S1199W, S1199E, S1199H, W1178Y, W1178Q, W1178A, W1178S, Y1183C, Y1183P и их комбинаций.

Пригодные замена, добавление или делеция аминокислотного остатка в субдомене H_{CC} VoNT/V дополнительно включают комбинации из двух мутаций замены, выбранные из группы, состоящей из: E1191M и S1199L, E1191M и S1199Y, E1191M и S1199F, E1191Q и S1199L, E1191Q и S1199Y, E1191Q и S1199F, E1191M и S1199W, E1191M и W1178Q, E1191C и S1199W, E1191C и S1199Y, E1191C и W1178Q, E1191Q и S1199W, E1191V и S1199W, E1191V и S1199Y, или E1191V и W1178Q.

Пригодные замена, добавление или делеция аминокислотного остатка в субдомене H_{CC} VoNT/V также включают комбинацию из трех мутаций, представляющих собой E1191M, S1199W и W1178Q.

В предпочтительном варианте осуществления, пригодные замена, добавление или делеция аминокислотного остатка в субдомене H_{CC} VoNT/V включают комбинацию из двух мутаций, представляющих собой E1191M и S1199Y. Иными словами, предпочтительный химерный нейротоксин по изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12, или состоит из нее.

В другом предпочтительном варианте осуществления, первый нейротоксин представляет собой VoNT/C, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/V. Такой химерный нейротоксин обозначен в настоящем описании как «нейротоксин VoNT/CB». Более предпочтительно, первый нейротоксин представляет собой VoNT/C1, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/V1. Еще более предпочтительно, домен LH_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-867 из VoNT/C1, и домен H_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 860-1291 из VoNT/V1. В одном предпочтительном варианте осуществления, домен LH_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-867 из SEQ ID NO: 3, и домен H_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 860-1291 из SEQ ID NO: 2. В предпочтительном варианте осуществления, домен H_C из нейротоксина VoNT/V содержит замену, добавление или делецию по меньшей мере одного аминокислотного остатка в субдомене H_{CC} ,

которые оказывают эффект увеличения аффинности связывания нейротоксина VoNT/B для Syt II человека по сравнению с последовательностью природного VoNT/B. Пригодные замена, добавление или делеция аминокислотного остатка в субдомене H_{CC} VoNT/B являются такими, как описано выше.

В предпочтительном варианте осуществления нейротоксина VoNT/XDC (химерного нейротоксина, в котором второй нейротоксин представляет собой мозаичный VoNT/DC) по изобретению, домен H_C из мозаичного нейротоксина VoNT/DC содержит замену, добавление или делецию по меньшей мере одного аминокислотного остатка в субдомене H_{CC}, которые оказывают эффект увеличения аффинности связывания мозаичного нейротоксина VoNT/DC для Syt II человека по сравнению с последовательностью природного мозаичного VoNT/DC.

В предпочтительном варианте осуществления нейротоксина VoNT/XG по изобретению, домен H_C из нейротоксина VoNT/G содержит замену, добавление или делецию по меньшей мере одного аминокислотного остатка в субдомене H_{CC}, которые оказывают эффект увеличения аффинности связывания нейротоксина VoNT/G для Syt II человека по сравнению с последовательностью природного VoNT/G.

Другие предпочтительные нейротоксины по изобретению являются следующими.

В предпочтительном варианте осуществления, первый нейротоксин представляет собой VoNT/A, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/C. Такой химерный нейротоксин обозначен в настоящем описании как «нейротоксин VoNT/AC». Более предпочтительно, первый нейротоксин представляет собой VoNT/A1, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/C1. Еще более предпочтительно, домен L_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-872 из VoNT/A1, и домен H_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 868-1291 из VoNT/C1. В одном предпочтительном варианте осуществления, домен L_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-872 из SEQ ID NO: 1, и домен H_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 868-1291 из SEQ ID NO: 3.

В другом предпочтительном варианте осуществления, первый нейротоксин представляет собой VoNT/B, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/A. Такой химерный нейротоксин обозначен в настоящем описании как «нейротоксин VoNT/BA». Более предпочтительно, первый нейротоксин представляет собой VoNT/B1, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/A1. Еще более предпочтительно, домен LH_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-859 из VoNT/B1, и домен H_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 873-1296 из VoNT/A1. В одном предпочтительном варианте осуществления, домен LH_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-859 из SEQ ID NO: 2, и домен H_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 873-1293 из SEQ ID NO: 1.

В другом предпочтительном варианте осуществления, первый нейротоксин представляет собой VoNT/B, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/C. Такой химерный нейротоксин обозначен в настоящем описании как «нейротоксин VoNT/BC». Более предпочтительно, первый нейротоксин представляет собой VoNT/B1, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/C1. Еще более предпочтительно, домен LH_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-859 из VoNT/B1, и домен H_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 868-1291 из VoNT/C1. В одном предпочтительном варианте осуществления, домен LH_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-859 из SEQ ID NO: 2, и домен H_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 868-1291 из SEQ ID NO: 3. Иными словами, предпочтительный химерный нейротоксин по изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 или состоит из нее.

В другом предпочтительном варианте осуществления, первый нейротоксин представляет собой VoNT/C, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/A. Такой химерный нейротоксин обозначен в настоящем описании как «нейротоксин VoNT/CA». Более предпочтительно, первый нейротоксин представляет собой VoNT/C1, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/A1. Еще более предпочтительно, домен LH_N из первого нейротоксина соответствует

аминокислотным остаткам 1-867 из BoNT/C1, и домен Нс из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 873-1296 из BoNT/A1. В одном предпочтительном варианте осуществления, домен LН_Н из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-867 из SEQ ID NO: 3, и домен Нс из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 873-1296 из SEQ ID NO: 1.

Химерные нейротоксины по настоящему изобретению можно получать с использованием рекомбинантных способов. Таким образом, в одном варианте осуществления, химерный нейротоксин по изобретению представляет собой рекомбинантный химерный нейротоксин. Хорошо понятно, что, в соответствии с этим предпочтительным вариантом осуществления, нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный химерный нейротоксин по изобретению, вектор, содержащий указанную нуклеотидную последовательность, и клетку, содержащую указанный вектор, как дополнительно описано ниже, можно, с учетом соответствующих изменений, обозначать как рекомбинантные.

В другом аспекте изобретение относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный нейротоксин по изобретению, например, последовательности ДНК или РНК. В предпочтительном варианте осуществления, нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность ДНК.

Молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению можно получать с использованием любого пригодного способа, известного в данной области. Таким образом, молекулы нуклеиновой кислоты можно получать с использованием способов химического синтеза. Альтернативно, молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению можно получать с использованием способов молекулярной биологии.

Последовательность ДНК по настоящему изобретению, предпочтительно, разрабатывают *in silico*, и затем синтезируют посредством общепринятых способов синтеза ДНК.

Вышеупомянутую информацию о последовательности нуклеиновой кислоты, необязательно, модифицируют для сдвига кодонного состава в соответствии с конечной системой экспрессии в клетке-хозяине (например, *E. coli*), подлежащей использованию.

В другом аспекте изобретение относится к вектору, содержащему нуклеотидную последовательность по изобретению. В одном варианте осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты получают в качестве части ДНК-вектора, содержащего промотор и терминатор. В предпочтительном варианте осуществления, вектор имеет промотор, выбранный из Tac, AraBAD, T7-Lac или T5-Lac.

Вектор может являться пригодным для экспрессии *in vitro* и/или *in vivo* вышеупомянутой последовательности нуклеиновой кислоты. Вектор может представлять собой вектор для временной и/или стабильной экспрессии гена. Вектор может, кроме того, содержать регуляторные элементы и/или селективные маркеры. Указанный вектор может иметь вирусное происхождение, фаговое происхождение или бактериальное происхождение. Например, указанный экспрессирующий вектор может представлять собой вектор pET, pJ401, pGEX или его производное.

В другом аспекте изобретение относится к клетке, содержащей нуклеотидную последовательность или вектор по изобретению. Термин «клетка» в настоящем описании можно использовать взаимозаменяемо с термином «клетка-хозяин» или «линия клеток». Пригодный тип клеток включает прокариотические клетки, например, *E. coli*, и эукариотические клетки, такие как клетки дрожжи, клетки млекопитающих, клетки насекомых и т.д. Предпочтительно, клетка представляет собой *E. coli*.

В другом аспекте изобретение относится к способу получения химерного нейротоксина по изобретению, включающему стадию культивирования клетки, как описано выше, в условиях, в которых продуцируется химерный нейротоксин. Указанные условия хорошо известны специалисту-практику в данной области, и таким образом, нет необходимости дополнительно подробно объяснять их в настоящем описании. Предпочтительно, указанный способ дополнительно включает стадию выделения химерного нейротоксина из культуры.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей химерный нейротоксин по изобретению. Предпочтительно, фармацевтическая композиция содержит химерный

нейротоксин вместе по меньшей мере с одним компонентом, выбранным из фармацевтически приемлемых носителя, наполнителя, адъюванта, пропеллента и/или соли.

В другом аспекте изобретение относится к химерному нейротоксину или фармацевтической композиции по изобретению для использования в терапии. Более точно, изобретение относится к использованию химерного нейротоксина или фармацевтической композиции, как описано в настоящем описании, для изготовления лекарственного средства. Иными словами, изобретение относится к способу для лечения нуждающегося в этом субъекта, включающему стадию введения эффективного количества химерного нейротоксина или фармацевтической композиции, как описано в настоящем описании, указанному субъекту. Под «эффективным количеством» понимают, что химерный нейротоксин или фармацевтическую композицию вводят в количестве, достаточном для обеспечения эффекта, для которой она предназначена. Как применяют в настоящем описании, термин «субъект» предпочтительно относится к человеку или животному, более предпочтительно, к человеку.

Химерный нейротоксин по изобретению, предпочтительно, является пригодным для использования в лечении состояния, ассоциированного с нежелательной нейрональной активностью, у нуждающегося в этом субъекта, например, состояния, выбранного из группы, состоящей из спастической дисфонии, спастической кривошеи, дистонии мышц гортани, оромандибулярной дисфонии, лингвальной дистонии, цервикальной дистонии, фокальной дистонии рук, блефароспазма, страбизма, гемифациального спазма, нарушения века, церебрального паралича, фокальной спастичности и других нарушений голоса, спастического колита, нейрогенного мочевого пузыря, анизмуса, спастичности конечностей, тиков, треморов, бруксизма, анальной трещины, ахалазии, дисфагии и других нарушений мышечного тонуса, и других нарушений, характеризующихся произвольными движениями групп мышц, слезотечения, гипергидроза, повышенного слюноотделения, избыточной секреции в желудочно-кишечном тракте, нарушений секреции, боли из-за мышечных спазмов, головной боли, мигрени и дерматологических состояний. Более точно, изобретение относится

к использованию химерного нейротоксина или фармацевтической композиции, как описано в настоящем описании, для изготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения состояния, ассоциированного с нежелательной нейрональной активностью, как описано выше. Иными словами, изобретение относится к способу лечения состояния, ассоциированного с нежелательной нейрональной активностью, как описано выше, у нуждающегося в этом субъекта, где указанный способ содержит стадию введения эффективного количества химерного нейротоксина или фармацевтической композиции, как описано в настоящем описании, указанному субъекту.

В другом аспекте изобретение относится к нетерапевтическому использованию химерного нейротоксина по изобретению для лечения эстетического или косметического состояния, у нуждающегося в этом субъекта. Иными словами, изобретение относится к способу лечения эстетического или косметического состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающему стадию введения эффективного количества химерного нейротоксина или фармацевтической композиции, как описано в настоящем описании, указанному субъекту. В соответствии с этим аспектом изобретения, субъект, подлежащий лечению, предпочтительно, не страдает от состояния, ассоциированного с нежелательной нейрональной активностью, как описано выше. Более предпочтительно, указанный субъект представляет собой здорового субъекта, т.е. субъекта, не страдающего никаким заболеванием.

В другом аспекте изобретение относится к набору для использования в терапевтическом или нетерапевтическом (косметическом или эстетическом) способе, или для терапевтического или нетерапевтического (косметического или эстетического) применения, как описано выше, где указанный набор содержит фармацевтическую композицию по изобретению и инструкции для осуществления указанного способа или применения. Более точно, изобретение относится к набору, содержащему фармацевтическую композицию по изобретению и инструкции для терапевтического или косметического введения указанной композиции нуждающемуся в этом субъекту. Как применяют в

настоящем описании, термин «инструкции» относится к публикации, записи, диаграмме, или любой другой среде выражения, которую можно использовать для разъяснения того, как осуществлять способ или применение по изобретению, такие как терапевтическое или косметическое введение указанной композиции нуждающемуся в этом субъекту. Указанные инструкции могут, например, быть прикреплены к контейнеру, содержащему указанную композицию или указанный набор.

Сконструированные химерные нейротоксины по настоящему изобретению можно составлять для перорального, парентерального введения, непрерывной инфузии, ингаляции или местного введения. Композиции, пригодные для инъекции, могут находиться в форме растворов, суспензий или эмульсий, или сухих порошков, которые растворяют или суспендируют в пригодном носителе перед использованием.

В случае химерного нейротоксина, подлежащего местной доставке, химерный нейротоксин можно составлять в форме крема (например, для местного введения), или для подкожной инъекции.

Средства для местной доставки могут включать аэрозоль или другой спрей (например, распылитель). В этом отношении, аэрозольный состав химерного нейротоксина позволяет доставку в легкие и/или другие носовые, и/или бронхиальные, или воздушные пути.

Химерные нейротоксины по изобретению можно вводить пациенту посредством интратекальной или эпидуральной инъекции в позвоночный столб на уровне участка спинного мозга, вовлеченного в иннервацию пораженного органа.

Предпочтительным способом введения является введение посредством лапароскопической и/или локализованной, в частности, внутримышечной, инъекции.

Диапазоны доз для введения химерных нейротоксинов по настоящему изобретению являются такими, чтобы оказывать желательный терапевтический эффект. Следует понимать, что этот необходимый диапазон доз зависит от конкретного типа химерного нейротоксина или композиции, способа введения, типа состава, возраста пациента, характера, степени или тяжести состояния

пациента, противопоказаний, если они существуют, и суждения лечащего врача. Изменения этих уровней дозирования можно уточнять с использованием стандартных эмпирических способов оптимизации.

Жидкие лекарственные формы, как правило, получают с использованием химерного нейротоксина и апирогенного стерильного носителя. Сконструированный токсин клостридий, в зависимости от используемых носителя и концентрации, можно либо растворять, либо суспендировать в носителе. При получении растворов химерный нейротоксин можно растворять в носителе, где раствор делают изотоническим, при необходимости, посредством добавления хлорида натрия и стерилизуют посредством фильтрации через стерильный фильтр с использованием асептических способов перед заполнением и герметичным закрытием подходящих стерильных флаконов или ампул. Альтернативно, если стабильность раствора является соответствующей, раствор в герметично закрытых контейнерах можно стерилизовать посредством автоклавирования. Обеспечивающие преимущество добавки, такие как забуферивающие, солюбилизующие, стабилизирующие средства, консерванты или бактерицидные, суспендирующие или эмульгирующие средства, и/или местные анестетики, можно растворять в носителе.

Сухие порошки, которые растворяют или суспендируют в подходящем носителе перед использованием, можно получать посредством заполнения предварительно простерилизованными ингредиентами стерильного контейнера с использованием асептического способа в стерильном пространстве. Альтернативно, ингредиенты можно растворять в подходящих контейнерах с использованием асептического способа в стерильном пространстве. Затем продукт лиофилизируют, и контейнеры асептически герметизируют.

Парентеральные суспензии, подходящие для внутримышечной, подкожной или внутрикожной инъекции, получают по существу таким же способом, за исключением того, что стерильные компоненты суспендируют в стерильном носителе, вместо растворения, и стерилизацию невозможно осуществлять посредством фильтрации. Компоненты можно изолировать в стерильном состоянии или,

альтернативно, их можно стерилизовать после изоляции, например, посредством гамма-излучения.

При введении в соответствии с настоящим изобретением можно получать преимущество множества способов доставки, включая инкапсуляцию в микрочастицы, вирусные системы доставки или воздействие аэрозоля под высоким давлением.

Это описание не является ограниченным иллюстративными способами и материалами, описанными в настоящем описании, и любые способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в настоящем описании, можно использовать для практического осуществления или тестирования вариантов осуществления этого описания. Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иначе, любые последовательности нуклеиновой кислоты записаны слева направо в ориентации от 5' до 3'; аминокислотные последовательности кислоты записаны слева направо в ориентации от амино-конца до карбокси-конца, соответственно.

Когда представлен диапазон значений, понятно, что каждое промежуточное значение, до десятых единицы нижнего предела, если контекст явно не требует иного, между верхним и нижним пределами этого диапазона, также конкретно описано. Каждый меньший диапазон между любым указанным значением или промежуточным значением в указанном диапазоне и любое другое указанное или промежуточное значение в этом указанном диапазоне включены в это описание. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов можно независимо включать или исключать из диапазона, и каждый диапазон, в котором любой, никакой или оба предела включены в меньшие диапазоны, также включены в это описание, с учетом любого конкретно исключенного предела в указанном диапазоне. Когда указанный диапазон включает один или оба из пределов, диапазоны, исключающие любой один или оба из этих включенных пределов, также включены в это описание.

Следует отметить что, как применяют в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения, неконкретизированные и конкретизированные формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не требует иного. Таким

образом, например, ссылка на «нейротоксин клостридий» включает множество таких средств-кандидатов, и ссылка на «нейротоксин клостридий» включает ссылку на один или несколько нейротоксинов клостридий и их эквивалентов, известных специалистам в данной области, и т.д.

Изобретение в настоящее время описано, только в качестве примера, применительно к следующим фигурам и примерам.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1 - Выравнивание последовательностей VoNT/A1-8, /B1-8, /C, /D, /E1-12, /F1-7, /G, /«H» и TeNT с использованием инструмента для выравнивания множества последовательностей CLUSTAL Omega (1.2.1). Локализация предположительной спирали Z_{10} , разделяющей домены LH_N и H_C , показана жирным и подчеркнутым шрифтом.

Фигура 2 - SDS PAGE очищенных рекомбинантных химер 1, 2 и 3A VoNT/AB (SEQ ID NO: 9, 10 и 11, соответственно). Дорожки помечены «Маркер» (маркер молекулярной массы), «-DTT» (окисленный образец химеры VoNT/AB) и «+DTT» (восстановленный образец химеры VoNT/AB).

Фигура 3 - Расщепление SNAP-25 в нейронах спинного мозга крысы посредством рекомбинантных химер 1, 2 и 3A VoNT/AB (SEQ ID NO: 9, 10 и 11, соответственно). Культивированные первичные нейроны спинного мозга крысы (SCN) подвергали воздействию различных концентраций рекомбинантных химер 1, 2 или 3A VoNT/AB в течение 24 часов, при 37°C в увлажненной атмосфере с 10% CO₂. Затем клетки лизировали с использованием буфера 1x NuPAGE, дополненного DTT и бензоназой. Образцы переносили в пробирки для микроцентрифугирования, нагревали в течение 5 мин при 90°C в термоблоке и хранили при -20°C до анализа расщепления SNAP-25 посредством вестерн-блоттинга. SNAP-25 детектировали с использованием поликлональных антител, которые детектируют как полноразмерную, так и расщепленные формы SNAP-25 (Sigma #S9684). Антитело против антител кролика с HRP (Sigma #A6154) использовали в качестве вторичного антитела.

Фигура 4 - Анализ индекса степени отведения пальца у мышей. Мышам вводили инъекцию, в комплекс икроножной-камбаловидной мышц одной задней конечности, под кратковременной общей анестезией; ослабление мышц измеряли по шкале 0-4 с использованием индекса степени отведения пальца (DAS). Максимальные значения DAS определяли для каждой дозы и наносили на график в зависимости от дозы, и данные приводили в соответствие с 4-параметрическим логистическим уравнением, определяли значения ED50 и дозы, приводящие к DAS 4 (доза для DAS 4).

Фигура 5 - SDS PAGE очищенных рекомбинантных химер 3В и 3С ВоNT/AB (SEQ ID NO: 12 и 13, соответственно). Дорожки помечены «Маркер» (маркер молекулярной массы), «-DTT» (окисленный образец химеры ВоNT/AB) и «+DTT» (восстановленный образец химеры ВоNT/AB).

Фигура 6 - Расщепление SNAP-25 посредством рекомбинантных химер 3В и 3С ВоNT/A и ВоNT/AB (SEQ ID NO: 1, 12 и 13, соответственно) в периферических нейронах, происходящих из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (PERI.4U - AxioGenesis, Germany). Клетки PERI.4U подвергали воздействию различных концентраций рекомбинантного ВоNT/A, или химер 3В или 3С ВоNT/AB в течение 24 часов, при 37°C в атмосфере увлажненного CO₂, содержащей 5% CO₂. Затем клетки лизировали с использованием буфера 1x NuPAGE, дополненного DTT и бензоназой. Образцы переносили в пробирки для микроцентрифугирования, нагревали в течение 5 мин при 90°C в термоблоке и хранили при -20°C, до анализа расщепления SNAP-25 посредством вестерн-блоттинга. SNAP-25 детектировали с использованием поликлональных антител, которые детектируют как полноразмерную, так и расщепленные формы SNAP-25 (Sigma #S9684). Антитело против антител кролика с HRP (Sigma #A6154) использовали в качестве вторичного антитела.

Фигура 7 - Длительность ослабления мышц с течением времени в анализе индекса степени отведения пальца у мышей. Мышам вводили инъекцию, в комплекс икроножной-камбаловидной мышц одной задней конечности, под кратковременной общей анестезией; ослабление мышц измеряли по шкале 0-4 с использованием индекса

степени отведения пальца (DAS). Животных из группы, подвергнутой инъекции самой низкой дозы, которая индуцировала в течение первых четырех суток после инъекции DAS 4, мониторировали до полного восстановления ослабления мышц до DAS 0 (отсутствие наблюдаемого ослабления мышц).

Фигура 8 - SDS PAGE очищенного рекомбинантного VoNT/BC (SEQ ID NO: 56). Дорожки помечены «Маркер» (маркер молекулярной массы), «-DTT» (окисленный образец химеры VoNT/BC) и «+DTT» (восстановленный образец химеры VoNT/BC).

Фигура 9 - Расщепление VAMP-2 посредством нативных химер VoNT/B, VoNT/BC и неактивного рекомбинантного VoNT/B (SEQ ID NO: 2, 56 и 57, соответственно) в кортикальных нейронах крысы. Клетки подвергали воздействию различных концентраций VoNT в течение 24 часов, при 37°C в атмосфере увлажненного CO₂, содержащей 5% CO₂. Клетки лизировали с использованием буфера 1x NuPAGE, дополненного DTT и бензоназой, и нагревали в течение 5 мин при 90°C перед хранением при -20°C. Образцы анализировали по расщеплению VAMP-2 посредством вестерн-блоттинга с использованием первичного антитела - поликлональных антител кролика против VAMP-2 (Abscam ab3347, 1:1000), и конъюгированного с HRP вторичного антитела против антител кролика (Sigma #A6154).

Фигура 10 - Расщепление пептидного репортера VAMP-2 посредством нативных химер VoNT/B и VoNT/BC (SEQ ID NO: 2 и 56, соответственно) с использованием набора VoTest® (BioSentinel). Различные концентрации VoNT инкубировали при 30°C в течение 18 часов с пептидом VAMP-2 с парой CFP-YFP для FRET в качестве репортера, и соотношение нерасщепленного:расщепленного репортерного субстрата измеряли как потерю интенсивности флуоресценции YFP при 528 нм и прибавление флуоресценции CFP при 485 нм после возбуждения при 440 нм.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры служат для иллюстрации конкретных вариантов осуществления изобретения и не ограничивают объем изобретения, определенный в формуле изобретения, никаким образом.

Пример 1 - Картирование спирали Z₁₀ в нейротоксинах клостридий

Аминокислотные последовательности всех серотипов VoNT и TeNT получали из публичной базы данных (например, www.uniprot.org или <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и затем строили модели в известной кристаллической структуре VoNT/A1 (3VTA.pdb) с использованием www.loopp.org. Это привело к получению прогнозируемой белковой структуры, которую редактировали для сохранения только N-концевой части домена H_{CN} и ~80 остатков перед ней (С-концевой части домена H_N) -этот домен («H_N/H_{CN}») является структурно высоко консервативным, что, таким образом, делает его наилучшей областью для наложения различных серотипов. Каждую отредактированную структуру затем накладывали на 3VTA.pdb с использованием <http://wishart.biology.ualberta.ca/superpose/>, и затем идентифицировали остатки, соответствующие явной спирали Z₁₀ в начале H_C из VoNT/A1 (⁸⁷²NIINTS⁸⁷⁶), и соответствующие остатки в другом серотипе. Это подвергали перекрестной проверке с использованием выравнивания последовательностей всех серотипов VoNT с использованием Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) (Фигура 1).

Посредством идентификации этой области эквивалентности структуры между различными нейротоксинами, стало возможным идентифицировать специфическую точку, в которой С-концевая половина одного нейротоксина может переходить в N-концевую половину другого нейротоксина без прерывания вторичной структуры общей молекулы. Эту точку выбрали в качестве старта спирали Z₁₀.

Результаты представлены в таблице 2 выше.

Пример 2 - Клонирование, экспрессия и очистка химер VoNT/AB

Химерные конструкции VoNT/AB 1, 2, 3A, 3B и 3C (SEQ ID NO: 9-13) конструировали из ДНК, кодирующей молекулу исходного серотипа, и соответствующих олигонуклеотидов с использованием стандартных способов молекулярной биологии. Затем их клонировали в экспрессирующий вектор pJ401 в присутствии или в отсутствие С-концевой His₁₀-метки и трансформировали в клетки *E. coli* BLR

(DE3) для сверхэкспрессии. Эти клетки выращивали при 37°C и встряхивании при 225 об./мин в 2 л конических колбах с отражателями, содержащих 1 л модифицированной среды Terrific Broth (mTB), дополненной соответствующим антибиотиком. Когда A₆₀₀ достигала >0,5, температуру в инкубаторе уменьшали до 16°C, и затем проводили индукцию с использованием 1 mM IPTG через один час в течение 20 час при встряхивании при 225 об./мин, для экспрессии рекомбинантной конструкции VoNT/AB.

Собранные клетки лизировали посредством обработки ультразвуком и осветляли посредством центрифугирования при 4500 об./мин в течение 1 час при 4°C. Затем рекомбинантные химерные молекулы VoNT/AB выделяли в сульфате аммония и очищали стандартными способами быстрой жидкостной хроматографии белка (FPLC). Они включали использование смолы для гидрофобного взаимодействия для связывания и анионообменной смолы для стадии промежуточной очистки. Затем частично очищенные молекулы протеолитически расщепляли эндопротеазой Lys-C для получения активной двухцепочечной формы. Ее дополнительно очищали с использованием второй смолы для гидрофобного взаимодействия для получения конечной химеры VoNT/AB.

Для химерных молекул VoNT/AB с декагистиридиновой меткой (H₁₀) (химеры 1, 2, 3A), стадия связывания включала использование смолы с иммобилизованным никелем вместо смолы для гидрофобного взаимодействия.

Последовательность каждой химеры представлена в таблице 3.

Таблица 3 - химерные конструкции VoNT/AB

| Молекула | SEQ ID NO | Последовательность |
|-----------|-----------|--|
| Химера 1 | 9 | A1:1-871+B1:858-1291 (E1191M/S1199Y)+His ₁₀ -метка |
| Химера 2 | 10 | A1:1-874+ELGGGGSEL+B1:858-1291 (E1191M/S1199Y)+His ₁₀ -метка |
| Химера 3A | 11 | A1:1-872+B1: 860-1291 (E1191M/S1199Y)+His ₁₀ -метка |

| Молекула | SEQ ID NO | Последовательность |
|-----------|-----------|---------------------------------------|
| Химера 3В | 12 | A1:1-872+B1: 860-1291 (E1191M/S1199Y) |
| Химера 3С | 13 | A1:1-872+B1: 860-1291 |

Пример 3 - Сравнение химер ВоNT/AB 1, 2 и 3А

Химеры ВоNT/AB 1, 2 и 3А, имеющие С-концевую His₁₀-метку и двойную мутацию E1191M/S1199Y, очищали, как описано в примере 1 (фиг. 2) и тестировали по функциональной активности.

АНАЛИЗ РАСЩЕПЛЕНИЯ SNAP-25 В НЕЙРОНАХ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ

Первичные культуры нейронов спинного мозга крысы (SCN) получали и выращивали в течение 3 недель, в 96-луночных культуральных планшетах (как описано в: Masuyer *et al.*, 2011, J. Struct. Biol. Structure and activity of a functional derivative of Clostridium botulinum neurotoxin B; и в: Chaddock *et al.*, 2002, Protein Expr. Purif. Expression and purification of catalytically active, non-toxic endopeptidase derivatives of Clostridium botulinum toxin type A). Серийные разведения ВоNT/AB получали в питательной среде SCN. Среду для выращивания из лунок, подлежащих обработке, собирали и фильтровали (фильтр 0,2 мкм). 125 мкл фильтрованной среды добавляли обратно в каждую тестируемую лунку. Затем 125 мкл разведенного токсина добавляли в планшет (в трех повторах лунок). Обработанные клетки инкубировали при 37°C, 10% CO₂, в течение 24±1 час).

Анализ активности ВоNT с использованием анализа расщепления SNAP-25

После обработки, ВоNT удаляли, и клетки промывали один раз PBS (Gibco, UK). Клетки лизировали в 1x буфере NuPAGE для лизиса (Life Technologies), дополненном 0,1 М дитиотреитола (DTT) и 250 единиц/мл бензоназы (Sigma). Лизат белков разделяли посредством SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозные мембраны. Мембраны анализировали с использованием в качестве зонда первичного антитела, специфического для SNAP-25 (Sigma #S9684), которое узнает нерасщепленный SNAP-25, так же как SNAP-25, расщепленный эндопептидазой ВоNT/A. Использованное вторичное антитело представляло собой конъюгированное с HRP антитело против IgG кролика (Sigma #A6154). Полосы детектировали с использованием

усиленной хемилюминесценции и визуализировали с использованием pXi6 Access (Synoptics, UK). Интенсивность полос определяли с использованием программного обеспечения GeneTools (Syngene, Cambridge, UK), и рассчитывали процент SNAP-25, расщепленного при каждой концентрации BoNT. Данные приводили в соответствие с 4-параметрическим логистическим уравнением, и pEC_{50} рассчитывали с использованием GraphPad Prism версии 6 (GraphPad).

В таблице 4 ниже представлены значения pEC_{50} , определенные для химер 1, 2 и 3А в анализе расщепления SNAP-25 в SCN крысы. Эти результаты показывают, что эти три химеры BoNT/AB сохраняли способность проникать в нейроны спинного мозга крысы и расщеплять свой субстрат-мишень. Однако, химера 3А являлась более активной, чем химеры 1 и 2, в этом анализе (см. также фигуру 3).

Таблица 4

| | $pEC_{50} \pm SEM$ |
|-----------|--------------------|
| Химера 1 | 12,42 \pm 0,04 |
| Химера 2 | 12,57 \pm 0,01 |
| Химера 3А | 12,89 \pm 0,04 |

АНАЛИЗ ИНДЕКСА СТЕПЕНИ ОТВЕДЕНИЯ ПАЛЬЦА (DAS)

Способ измерения активности химер 1, 2 и 3А BoNT/AB в анализе DAS основан на распространяющемся на пальцы задней конечности рефлексе ответа на испуг мышей, при кратковременном подвешивании за хвост. Этот рефлекс оценивают в баллах как индекс степени отведения пальца (DAS) и подавляют после введения BoNT в икроножную-камбаловидную мышцы задней лапы. Мышей кратковременно подвешивают за хвост для вызова характерного ответа испуга, при котором животное вытягивает свои задние конечности и отводит пальцы задней конечности. (Aoki et al. 1999, Eur. J. Neurol.; 6 (suppl. 4) S3-S10)

На сутки инъекции, мышей подвергали анестезии в индукционной камере, в которую вводили 3% изофлуран в кислороде. Каждой мыши вводили внутримышечную инъекцию химеры BoNT/AB или

носителя (фосфатного буфера, содержащего 0,2% желатин) в икроножную-камбаловидную мышцу правой задней лапы.

После инъекции нейротоксина, различные степени отведения пальца оценивали в баллах по шкале от нуля до четырех, где 0=норма, и 4=максимальное уменьшение отведения пальца и вытягивания задней конечности. ED50 определяли посредством нелинейного корректирующего анализа с использованием среднего для максимального эффекта при каждой дозе. Используемая математическая модель представляла собой 4-параметрическую логистическую модель.

DAS проводили каждые 2 часа в течение первых суток после дозирования; затем его проводили 3 раза в сутки в течение 4 суток.

На фигуре 4 показаны подобранные кривые для химер 1, 2 и 3А (SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно). Кривая для химеры 3А сдвинута влево, что означает, что при более низких дозах химеры 3А достигали сходного ответа DAS по сравнению с химерами 1 и 2, таким образом, показывая, что химера 3А является более активной, чем другие, в анализе DAS у мышей; см. также таблицу ниже (таблицу 5), в которой представлены значения для рассчитанных ED50 и дозы, приводящей к DAS 4 (наивысшему баллу), для каждой химеры.

В таблице 5 ниже представлены ED₅₀ и дозы для DAS 4, определенные для рекомбинантного BoNT/A1 (rBoNT/A1) и химер 1, 2 и 3А в анализе DAS у мышей. Эти результаты показывают, что из этих трех химер, химера 3А имеет наивысшую активность *in vivo* в индукции мышечной слабости. Исследования, показанные на фигуре 4 и в таблице 5, проводили на мышах, полученных из Charles River laboratories.

Таблица 5

| | ED ₅₀ (пг/мышь) | Доза для DAS 4 (пг/мышь) |
|-----------|----------------------------|-----------------------------|
| rBoNT/A1 | 1 | 5 |
| Химера 1 | 23 | 200 |
| Химера 2 | 89 | >300 |
| Химера 3А | 18 | 133 |

Пример 4 - Сравнение химер 3В, 3С BoNT/AB и BoNT/A1

Не содержащие метки химеры 3В и 3С VoNT/AB, соответственно, в присутствии и в отсутствие двойной мутации E1191M/S1199Y (SEQ ID NO: 12 и 13) очищали, как описано в примере 1 (фиг. 5), и тестировали по функциональной активности с использованием рекомбинантного VoNT/A1 (SEQ ID NO: 1) в качестве эталона.

АНАЛИЗ РАСЩЕПЛЕНИЯ SNAP-25 В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Криоконсервированные клетки PERI.4U закупили из AxioGenesis (Cologne, Germany). Размораживание и посев клеток проводили, как рекомендовано производителем. Кратко, криоампулы, содержащие клетки, размораживали в водяной бане при 37°C в течение 2 минут. После осторожного ресуспендирования клетки переносили в 50 мл пробирку. Криоампулы промывали с использованием 1 мл среды для размораживания Peri.4U®, поставляемой производителем, и среду переносили по каплям в суспензию клеток в 50 мл пробирке, перед добавлением дополнительных 2 мл среды для размораживания Peri.4U® по каплям в 50 мл пробирку. Затем клетки подсчитывали с использованием гемоцитометра. После этого, дополнительные 6 мл среды для размораживания Peri.4U® добавляли в суспензию клеток. Осадок клеток получали посредством центрифугирования при 260 x g (например, 1100 об./мин) в течение 6 минут при комнатной температуре. Затем клетки ресуспендировали в полной культуральной среде Peri.4U®, поставляемой производителем. Клетки рассеивали с плотностью 50000–150000 клеток на см² в культуральные планшеты, покрытые поли-L-орнитином и ламинином. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере увлажненного CO₂, и среду полностью меняли каждые 2–3 суток в ходе культивирования.

Для обработки токсином, получали серийные разведения VoNTs в культуральной среде Peri.4U®. Среду из лунок, подлежащих обработке, собирали и фильтровали (0,2 мкм фильтр). 125 мкл фильтрованной среды добавляли обратно в каждую лунку. Затем в планшет добавляли 125 мкл разведенного токсина (в трех повторах лунок). Обработанные клетки инкубировали при 37°C, 10% CO₂, в течение 48±1 час).

Анализ активности VoNT с использованием анализа расщепления SNAP-25

После обработки, VoNT удаляли, и клетки промывали один раз PBS (Gibco, UK). Клетки лизировали в 1x буфере NuPAGE для лизиса (Life Technologies), дополненном 0,1 М дитиотреитола (DTT) и 250 единиц/мл бензоназы (Sigma). Лизат белков разделяли посредством SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозные мембраны. Мембраны анализировали с использованием в качестве зонда первичного антитела, специфического для SNAP-25 (Sigma #S9684), которое узнает нерасщепленный SNAP-25, так же как SNAP-25, расщепленный эндопептидазой VoNT/A. Использованное вторичное антитело представляло собой конъюгированное с HRP антитело против IgG кролика (Sigma #A6154). Полосы детектировали с использованием усиленной хемилюминесценции и визуализировали с использованием pXi6 Access (Synoptics, UK). Интенсивность полос определяли с использованием программного обеспечения GeneTools (Syngene, Cambridge, UK), и рассчитывали процент SNAP-25, расщепленного при каждой концентрации VoNT. Данные приводили в соответствие с 4-параметрическим логистическим уравнением, и pEC_{50} рассчитывали с использованием GraphPad Prism версии 6 (GraphPad).

На фигуре 6 показано, что химеры 3В и 3С имеют более высокую активность, чем rVoNT/A1, в расщеплении SNAP-25 в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека, однако, для первой из них это значимо больше. Это можно объяснить двойной мутацией, которая увеличивает аффинность химеры 3В для рецептора белка синаптотатмина II человека, присутствующего на этих клетках (фиг. 6, таблица 6).

Таблица 6

| | $pEC_{50} \pm SEM$ |
|-----------|--------------------|
| rVoNT/A1 | 10,21±0,05 |
| Химера 3В | 12,38±0,06 |
| Химера 3С | 10,72±0,08 |

Способ измерения активности VoNT в анализе DAS основан на распространяющемся на пальцы задней конечности рефлексе ответа на испуг мышей, при кратковременном подвешивании за хвост. Этот рефлекс оценивают в баллах как индекс степени отведения пальца (DAS) и подавляют после введения VoNT в икроножную-камбаловидную мышцы задней лапы. Мышей кратковременно подвешивают за хвост для вызова характерного ответа испуга, при котором животное вытягивает свои задние конечности и отводит пальцы задней конечности. (Aoki et al. 1999, Eur. J. Neurol.; 6 (suppl. 4) S3-S10)

На сутки инъекции, мышей подвергали анестезии в индукционной камере, в которую вводили 3% изофлуран в кислороде. Каждой мышце вводили внутримышечную инъекцию химеры VoNT или носителя (фосфатного буфера, содержащего 0,2% желатин) в икроножную-камбаловидную мышцы правой задней лапы.

После инъекции нейротоксина, различные степени отведения пальца оценивали в баллах по шкале от нуля до четырех, где 0=норма, и 4=максимальное уменьшение отведения пальца и вытягивания задней конечности. ED50 определяли посредством нелинейного корректирующего анализа с использованием среднего для максимального эффекта при каждой дозе. Используемая математическая модель представляла собой 4-параметрическую логистическую модель.

DAS проводили каждые 2 часа в течение первых суток после дозирования; затем его проводили 3 раза в сутки в течение 4 суток для всех доз. Животных из групп, подвергнутых инъекции носителя и самой низкой дозы, которая индуцировала в течение первых четырех суток после инъекции DAS 4, мониторировали затем до полного восстановления ослабления мышц до DAS 0 (отсутствие наблюдаемого ослабления мышц).

Для расчета коэффициента безопасности всех животных взвешивали за сутки до инъекции токсина (D0) и затем один раз в сутки на протяжении исследования. Среднюю массу тела, ее стандартное отклонение и стандартную ошибку среднего рассчитывали ежесуточно для каждой группы дозирования. Для

получения коэффициента безопасности для VoNT ($-10\% \Delta BW / ED_{50}$), дозу, при которой в любое время на протяжении исследования средняя масса тела в группе дозирования была ниже на 10%, чем средняя массы тела на D0 для той же самой группы дозирования, делили на ED_{50} для исследованного VoNT. Летальную дозу определяли как дозу, при которой одно или несколько животных в этой группе дозирования умирали.

На фигуре 7 показана длительность ослабления мышц с течением времени в анализе индекса степени отведения пальца у мышей для rVoNT/A1, химеры 3B и химеры 3C (SEQ ID NO: 1, 12 и 13), показывающая, что химера имеет более продолжительную длительность действия.

В таблице 7 ниже представлены дозы ED_{50} и DAS 4, определенные для rVoNT/A1 и химер 3B и 3C в анализе DAS у мышей. В таблице представлена также общая длительность действия дозы DAS 4 до полного восстановления ослабления мышц до DAS 0 (отсутствие наблюдаемого ослабления мышц). Кроме того, в таблице показана летальная доза и коэффициент безопасности ($-10\% \Delta BW / ED_{50}$) для мышей, как определено в тексте выше. По сравнению с rVoNT/A1, химеры 3B и 3C имеют более продолжительную длительность действия, лучший коэффициент безопасности и более высокую летальную дозу. Исследования, показанные на фигуре 7 и в таблице 7, проводили на мышах, полученных из Janvier laboratories.

Таблица 7

| | Доза ED_{50} (DAS 2) (пг/мышь) | Доза DAS 4 (пг/мышь) | Общая длительность действия (сутки) для самой низкой дозы DAS 4 | Летальная доза для мышей (пг) | Коэффициент безопасности ($-10\% \Delta BW / ED_{50}$) |
|-----------|-------------------------------------|-------------------------|---|--|--|
| rVoNT/A1 | 0,9 | 2,3 | 29 | 18 | 4,5 |
| Химера 3B | 8,0 | 89 | 42 | 200 | 14,1 |
| Химера 3C | 5,0 | 26 | 42 | 8,9 | 7,4 |

Пример 5 - Экспрессия и очистка химеры VoNT/BC и подтверждение функциональной активности

Химеру 4 VoNT/BC (SEQ ID NO: 56) клонировали, экспрессировали и очищали, как описано в примере 2, за исключением использования другого штамма клеток (BL21) для экспрессии и протеолитического расщепления с использованием трипсина вместо эндопротеазы Lys-C (Фигура 8).

Таблица 8 - химерная конструкция VoNT/BC

| Молекула | SEQ ID NO | Последовательность |
|----------|-----------|----------------------|
| Химера 4 | 56 | B1:1-859+C1:868-1291 |

Эту химеру тестировали по функциональной активности в анализе расщепления VAMP-2.

АНАЛИЗ РАСЩЕПЛЕНИЯ VAMP-2 В КОРТИКАЛЬНЫХ НЕЙРОНАХ КРЫС

Кортикальные нейроны крыс получали и поддерживали в покрытых поли-L-орнитинном (PLO) 96-луночных планшетах при плотности 20000 клеток/лунку в 125 мкл среды Neurobasal, содержащей 2% добавку B27, 0,5 mM GlutaMAX, 1% фетальную бычью сыворотку (FBS) и 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина, при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Дополнительные 125 мкл среды Neurobasal, содержащей 2% B27, 0,5 mM GlutaMAX, добавляли на DIV 4. Клетки поддерживали посредством замены половины среды каждые 3-4 суток. На DIV 11, 1,5 мкМ цитозин-β-D-арабинофуранозид (AraC) добавляли в среду для предотвращения пролиферации не относящихся к нейрональным клеток. Кортикальные нейроны на DIV 19-21 обрабатывали с использованием диапазона концентраций VoNT (30 фМ - 3 нМ) в течение 24 часов при 37°C.

Анализ активности VoNT с использованием анализа расщепления VAMP-2

Клетки быстро промывали средой для анализа (Neurobasal без фенола красного, 2% B27, 0,5 mM GlutaMAX, 10 мкМ TFB-TBOA ((3S)-3-[[3-[[4-(трифторметил)бензоил]амино]фенил]метокси]-L-аспарагиновая кислота), до лизиса в 100 мкл буфера для лизиса (буфер для образцов NuPage LDS, 1mM DTT и 1:500 бензоназы) и нагревали при 90°C в течение 5 минут. 15 мкл лизатов разделяли в 12% Bis-Tris гелях при 200 В в течение 50 минут с использованием буфера MES. Белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны

посредством Transblot Turbo (Biorad) с использованием программы для низкой MW. Мембраны блокировали с использованием 5% обезжиренного молока в PBST и затем анализировали с использованием в качестве зонда первичного антитела кролика против VAMP-2 (Abcam ab3347, 1:1000), и затем конъюгированного с HRP вторичного антитела против IgG кролика HRP (Sigma #A6154). Мембраны проявляли с использованием хемилюминесцентного субстрата SuperSignal West Dura и визуализировали с использованием системы Syngene Pxi. Денситометрию полос анализировали с использованием программного обеспечения GeneTools (Syngene), и определяли процент VAMP-2, расщепленного при каждой концентрации VoNT, относительно контрольных лунок. Данные приводили в соответствие с 4-параметрическим логистическим уравнением, и pEC_{50} рассчитывали с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad).

На фигуре 9 показано, что химера 4 является способной связываться с нейронами спинного мозга крысы, осуществлять транслокацию в цитоплазму и специфически расщеплять свой субстрат VAMP-2. В качестве отправной точки, эта химера является явно функциональной по сравнению с неактивной рекомбинантной молекулой VoNT/B1 (имеющей двойную мутацию в E231Q и H234Y, а также обозначенной в настоящем описании как VoNT/B1(0)) (SEQ ID NO: 57) и является почти настолько же активной, как нативная молекула VoNT/B1 (SEQ ID NO: 2) (Таблица 9). Это можно объяснить высокой аффинностью связывания VoNT/B с синаптотагмином и различными ганглиозидами, присутствующими на поверхности клеток крысы, в то время как для связывающего домена С в химере 4 известно только связывание с более низкой аффинностью с ганглиозидами. Это поддерживают данные анализа протеазной активности легкой цепи, как показано далее ниже.

Таблица 9

| | $pEC_{50} \pm SEM$ (анализ расщепления VAMP-2 в кортикальных клетках крысы) |
|------------------|---|
| нативный VoNT/B1 | 10,60 \pm 0,06 |
| Химера 4 | 9,36 \pm 0,15 |

| ВоNT/B1 (0) | неактивный |
|---|--|
| <u>АНАЛИЗ ПРОТЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕГКОЙ ЦЕПИ</u> | |
| Активность легкой цепи | серотипа В оценивали с использованием бесклеточного анализа VoTest® (BioSentinel A1009) в соответствии с инструкциями производителя. Например, ВоNT разводили до 1,39 нМ в реакционном буфере VoTest (50 мМ HEPES-NaOH, 5 мМ NaCl, 10 мкМ ZnCl ₂ , 0,1% Tween-20, 0,1 мг/мл BSA, pH 7,1) и восстанавливали с использованием 5 мМ DTT в течение 30 минут при комнатной температуре. Пептидный репортер VAMP-2 (CFP-VAMP-2 (33-94)-YFP в 50 мМ HEPES-NaOH, 10 мМ NaCl, 15% глицерине) в конечной концентрации 200 нМ комбинируют с диапазоном концентраций ВоNT (500 фМ - 1,25 нМ, конечная) в черных планшетах Maxisorp (Nunc) в конечном объеме смеси для анализа 100 мкл/лунку. Планшеты герметично закрывали и инкубировали при 30°C в течение 18 часов вдали от света. Потерю флуоресценции при FRET от CFP до YFP при 528 нм и прибавление флуоресценции GFP при 485 нм после возбуждения при 440 нм измеряли с использованием считывателя для планшетов BioTek Synergy HT. Соотношение излучения флуоресценции для нерасщепленного:расщепленного репортерного субстрата при каждой концентрации ВоNT приводили в соответствие с 4-параметрическим логистическим уравнением, и pEC ₅₀ рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. |

Анализ протеазной активности легкой цепи подтверждает, что легкая цепь химеры 4 является настолько же активной, как легкая цепь нативного ВоNT/B1 (см. фигуру 10 и таблицу 10), и таким образом, что, как объяснено выше, результаты анализа расщепления VAMP-2 можно объяснить тем фактом, что ВоNT/В имеет более высокую аффинность к синаптотатмину и различным ганглиозидам, присутствующим на поверхности клеток крысы, по сравнению со связывающим доменом С в химере 4, который связывается только с ганглиозидами.

Таблица 10

pEC₅₀±SEM

(анализ расщепления пептида VAMP-2 *in*

vitro)

| | |
|------------------|------------|
| нативный ВоNT/B1 | 10,62±0,01 |
| Химера 4 | 10,46±0,01 |
| ВоNT/B1 (0) | NA |

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный нейротоксин, содержащий домен L_N из первого нейротоксина, ковалентно связанный с доменом H_c из второго нейротоксина,

где С-концевой аминокислотный остаток указанного домена L_N соответствует С-концевому аминокислотному остатку α-спирали, расположенному на С-конце домена L_N в указанном первом нейротоксине, и

где N-концевой аминокислотный остаток указанного домена H_c соответствует аминокислотному остатку непосредственно на С-конце от С-концевого аминокислотного остатка α-спирали, расположенного на С-конце домена L_N в указанном втором нейротоксине,

где указанные первый и второй нейротоксины являются разными, и (i) указанный первый нейротоксин представляет собой ботулинический нейротоксин (BoNT) серотипа А, серотипа В, серотипа С, серотипа D, серотипа Е, серотипа F или серотипа G или столбнячный нейротоксин (TeNT); и (ii) указанный второй нейротоксин представляет собой BoNT серотипа А, серотипа В, серотипа С, серотипа D, серотипа Е, серотипа F или серотипа G или TeNT.

2. Химерный нейротоксин по п.1,

где указанный первый нейротоксин представляет собой:

BoNT/A, последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1;

серотип BoNT/B, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 2;

серотип BoNT/C1, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 3;

серотип BoNT/D, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 4;

серотип BoNT/E, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 5;

серотип BoNT/F, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 6;

серотип BoNT/G, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 7; или

TeNT, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 8;

и, где

указанный второй нейротоксин представляет собой:

VoNT/A, последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1;

серотип VoNT/B, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 2;

серотип VoNT/C1, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 3;

серотип VoNT/D, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 4;

серотип VoNT/E, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 5;

серотип VoNT/F, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 6;

серотип VoNT/G, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 7; или

TeNT, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 8.

3. Химерный нейротоксин по п.1 или 2, где указанный домен LN_N первого нейротоксина соответствует:

- аминокислотным остаткам 1-872 из VoNT/A серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 1;

- аминокислотным остаткам 1-859 из VoNT/B серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 2;

- аминокислотным остаткам 1-867 из VoNT/C1 серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 3;

- аминокислотным остаткам 1-863 из VoNT/D серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 4;

- аминокислотным остаткам 1-846 из VoNT/E серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 5;

- аминокислотным остаткам 1-865 из VoNT/F серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 6;

- аминокислотным остаткам 1-864 из VoNT/G серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 7; или

- аминокислотным остаткам 1-880 из TeNT который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 8;

и, где указанный домен H_c второго нейротоксина соответствует:

- аминокислотным остаткам 873-1296 из VoNT/A серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 1;

- аминокислотным остаткам 860-1291 из VoNT/B серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 2;

- аминокислотным остаткам 868-1291 из VoNT/C1 серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 3;

- аминокислотным остаткам 864-1276 из VoNT/D серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 4;

- аминокислотным остаткам 847-1252 из VoNT/E серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 5;

- аминокислотным остаткам 866-1287 из VoNT/F серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 6;

- аминокислотным остаткам 865-1297 из VoNT/G серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 7; или

- аминокислотным остаткам 881-1315 из TeNT, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 8.

4. Химерный нейротоксин по любому из п.п.1-3, где указанный домен LH_N из первого нейротоксина соответствует:

- аминокислотным остаткам 1-872 из VoNT/A1 последовательности SEQ ID NO: 1,

- аминокислотным остаткам 1-859 из VoNT/B1 последовательности SEQ ID NO:2,

- аминокислотным остаткам 1-867 из VoNT/C1 последовательности SEQ ID NO:3,

- аминокислотным остаткам 1-863 из VoNT/D последовательности SEQ ID NO:4,

- аминокислотным остаткам 1-846 из VoNT/E1 последовательности SEQ ID NO:5,

- аминокислотным остаткам 1-865 из VoNT/F1 последовательности SEQ ID NO:6,

- аминокислотным остаткам 1-864 из VoNT/G последовательности SEQ ID NO:7, или

- аминокислотным остаткам 1-880 из TeNT последовательности SEQ ID NO:8,

и где указанный домен H_c из второго нейротоксина соответствует:

- аминокислотным остаткам 873-1296 из BoNT/A1 последовательности SEQ ID NO:1,

- аминокислотным остаткам 860-1291 из BoNT/B1 последовательности SEQ ID NO:2,

- аминокислотным остаткам 868-1291 из BoNT/C1 последовательности SEQ ID NO:3,

- аминокислотным остаткам 864-1276 из BoNT/D последовательности SEQ ID NO:4,

- аминокислотным остаткам 847-1251 из BoNT/E1 последовательности SEQ ID NO:5,

- аминокислотным остаткам 866-1275 из BoNT/F1 последовательности SEQ ID NO:6,

- аминокислотным остаткам 865-1297 из BoNT/G последовательности SEQ ID NO:7, или

- аминокислотным остаткам 881-1315 из TeNT последовательности SEQ ID NO:8.

5. Химерный нейротоксин по любому из п.п.1-4, где указанный первый нейротоксин представляет собой BoNT/A, который имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO:1, и где указанный второй нейротоксин представляет собой BoNT/B который имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO:2.

6. Химерный нейротоксин по п.5, где указанный первый нейротоксин представляет собой BoNT/A1, который имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO:1 и, где указанный второй нейротоксин представляет собой BoNT/B1, который имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO:2.

7. Химерный нейротоксин по п.6, где указанный домен LH_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-872 из BoNT/A1 последовательности SEQ ID NO:1 и, где указанный домен

H_c из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 860–1291 из VoNT/B1 последовательности SEQ ID NO:2.

8. Химерный нейротоксин по п.5, 6 или 7, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13.

9. Химерный нейротоксин по п.5, 6, 7 или 8, где указанный домен H_c из нейротоксина VoNT/B, который имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO:2 содержит замену, добавление или делецию по меньшей мере одного аминокислотного остатка в субдомene H_{cc}, которые оказывают эффект увеличения аффинности связывания нейротоксина VoNT/B для рецептора S_{yt} II человека по сравнению с последовательностью природного VoNT/B.

10. Химерный нейротоксин по п.9, где указанные замена, добавление или делеция по меньшей мере одного аминокислотного остатка в субдомene H_{cc} включают мутацию замены, выбранную из группы, состоящей из: V1118M; Y1183M; E1191M; E1191I; E1191Q; E1191T; S1199Y; S1199F; S1199L; S1201V; E1191C, E1191V, E1191L, E1191Y, S1199W, S1199E, S1199H, W1178Y, W1178Q, W1178A, W1178S, Y1183C, Y1183P и их комбинаций.

11. Химерная молекула по п.9, где указанные замена, добавление или делеция по меньшей мере одного аминокислотного остатка в субдомene H_{cc} включают две мутации замены, выбранные из группы, состоящей из: E1191M и S1199L, E1191M и S1199Y, E1191M и S1199F, E1191Q и S1199L, E1191Q и S1199Y, E1191Q и S1199F, E1191M и S1199W, E1191M и W1178Q, E1191C и S1199W, E1191C и S1199Y, E1191C и W1178Q, E1191Q и S1199W, E1191V и S1199W, E1191V и S1199Y, или E1191V и W1178Q.

12. Химерный нейротоксин по п.11, где указанные две мутации замены представляют собой E1191M и S1199Y.

13. Химерная молекула по п.9, где указанные замена, добавление или делеция по меньшей мере одного аминокислотного остатка в субдомene H_{cc} включают три мутации замены, представляющие собой E1191M, S1199W и W1178Q.

14. Химерный нейротоксин по пп.9, 10, 11 или 12, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11 или 12.

15. Химерный нейротоксин по любому из п.п.1-4, где указанный первый нейротоксин представляет собой VoNT/B, который имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO:2, и где указанный второй нейротоксин представляет собой VoNT/C, который имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO:3.

16. Химерный нейротоксин по п.15, где указанный первый нейротоксин представляет собой VoNT/B1, который имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO:2, и где указанный второй нейротоксин представляет собой VoNT/C1, который имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO:3.

17. Химерный нейротоксин по п.16, где указанный домен LH_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-859 из VoNT/B1 последовательности SEQ ID NO:2, и где указанный домен H_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 868-1291 из VoNT/C1 последовательности SEQ ID NO:3.

18. Химерный нейротоксин по пп.15, 16 или 17, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 56.

19. Нуклеотидная последовательность, кодирующая химерный нейротоксин по любому из пп. 1-18.

20. Вектор для получения химерного нейротоксина или для лечения состояния, связанного с нежелательной нейронной активностью, содержащий нуклеотидную последовательность по п.19.

21. Клетка для получения химерного нейротоксина, содержащая нуклеотидную последовательность по п.19 или вектор по п.20.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая химерный нейротоксин по любому из пп. 1-18.

23. Набор для лечения состояния, связанного с нежелательной нейронной активностью, содержащий фармацевтическую композицию по п.22 и инструкции для терапевтического или косметического введения указанной композиции нуждающемуся в этом субъекту.

24. Способ получения химерного нейротоксина по любому из пп.1-18, включающий стадию культивирования клетки по п.21, в

условиях, в которых продуцируется указанный химерный нейротоксин.

25. Применение химерного нейротоксина по любому из пп. 1-18 в терапии.

26. Применение химерного нейротоксина по п.25, для лечения состояния, ассоциированного с нежелательной нейрональной активностью.

27. Применение химерного нейротоксина по п.26, для лечения состояния, выбранного из группы, состоящей из спастической дисфонии, спастической кривошеи, дистонии мышц гортани, оромандибулярной дисфонии, лингвальной дистонии, цервикальной дистонии, фокальной дистонии рук, блефароспазма, страбизма, гемифациального спазма, нарушения века, церебрального паралича, фокальной спастичности и других нарушений голоса, спастического колита, нейрогенного мочевого пузыря, анизмуса, спастичности конечностей, тиков, треморов, бруксизма, анальной трещины, ахалазии, дисфагии и других нарушений мышечного тонуса, и других нарушений, характеризующихся непроизвольными движениями групп мышц, слезотечения, гипергидроза, повышенного слюноотделения, избыточной секреции в желудочно-кишечном тракте, нарушений секреции, боли из-за мышечных спазмов, головной боли, мигрени и дерматологических состояний.

28. Применение фармацевтической композиции по п.22 в терапии.

29. Применение фармацевтической композиции по п.28, для лечения состояния, ассоциированного с нежелательной нейрональной активностью.

30. Применение фармацевтической композиции по п.29, для лечения состояния, выбранного из группы, состоящей из спастической дисфонии, спастической кривошеи, дистонии мышц гортани, оромандибулярной дисфонии, лингвальной дистонии, цервикальной дистонии, фокальной дистонии рук, блефароспазма, страбизма, гемифациального спазма, нарушения века, церебрального паралича, фокальной спастичности и других нарушений голоса, спастического колита, нейрогенного мочевого пузыря, анизмуса, спастичности конечностей, тиков, треморов, бруксизма, анальной

трещины, ахалазии, дисфагии и других нарушений мышечного тонуса, и других нарушений, характеризующихся непроизвольными движениями групп мышц, слезотечения, гипергидроза, повышенного слюноотделения, избыточной секреции в желудочно-кишечном тракте, нарушений секреции, боли из-за мышечных спазмов, головной боли, мигрени и дерматологических состояний.

31. Нетерапевтическое применение химерного нейротоксина по любому из пп. 1-18 для лечения эстетического или косметического состояния.

32. Нетерапевтическое применение фармацевтической композиции по п.22, для лечения эстетического или косметического состояния.

По доверенности

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/EP2017/060821 |
|---|

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K38/00 C07K14/33 ADD. | | |
|--|--|-----------------------|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | JIAFU WANG ET AL: "Longer-acting and highly potent chimaeric inhibitors of excessive exocytosis created with domains from botulinum neurotoxin A and B", BIOCHEMICAL JOURNAL, PORTLAND PRESS LTD, GB, vol. 444, no. Part 1, 15 May 2012 (2012-05-15), pages 59-67, XP002690949, ISSN: 0264-6021, DOI: 10.1042/BJ20120100 cited in the application | 1 |
| A | figure 1 ----- -/-- | 2-23 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents : | | |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | |
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report | |
| 25 July 2017 | 01/08/2017 | |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Schmitz, Till | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/060821

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | <p>J. WANG ET AL: "Novel chimeras of botulinum and tetanus neurotoxins yield insights into their distinct sites of neuroparalysis", THE FASEB JOURNAL, vol. 26, no. 12, 1 December 2012 (2012-12-01), pages 5035-5048, XP055175043, ISSN: 0892-6638, DOI: 10.1096/fj.12-210112 cited in the application figure 1</p> | 1-23 |
| A | <p>----- US 2014/147429 A1 (CHADDOCK JOHN [GB] ET AL) 29 May 2014 (2014-05-29) the whole document</p> | 1-23 |
| A | <p>----- WO 2015/097087 A1 (UNIV DUBLIN CITY [IE]) 2 July 2015 (2015-07-02) figure 1 -----</p> | 1-23 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

| |
|---|
| International application No PCT/EP2017/060821 |
|---|

| Patent document cited in search report | | Publication date | | Patent family member(s) | Publication date |
|---|----|---------------------|----|----------------------------|---------------------|
| US 2014147429 | A1 | 29-05-2014 | AU | 2012257578 A1 | 28-11-2013 |
| | | | BR | 112013029525 A2 | 24-01-2017 |
| | | | CA | 2835285 A1 | 22-11-2012 |
| | | | CN | 103649317 A | 19-03-2014 |
| | | | EP | 2710129 A1 | 26-03-2014 |
| | | | ES | 2562425 T3 | 04-03-2016 |
| | | | HK | 1192587 A1 | 14-10-2016 |
| | | | JP | 6050330 B2 | 21-12-2016 |
| | | | JP | 2014516526 A | 17-07-2014 |
| | | | KR | 20140036239 A | 25-03-2014 |
| | | | RU | 2013155594 A | 27-06-2015 |
| | | | UA | 112985 C2 | 25-11-2016 |
| | | | US | 2014147429 A1 | 29-05-2014 |
| | | | WO | 2012156743 A1 | 22-11-2012 |
| ----- | | | | | |
| WO 2015097087 | A1 | 02-07-2015 | AU | 2014372689 A1 | 21-07-2016 |
| | | | CA | 2934986 A1 | 02-07-2015 |
| | | | CN | 105916875 A | 31-08-2016 |
| | | | EP | 3087089 A1 | 02-11-2016 |
| | | | JP | 2017501715 A | 19-01-2017 |
| | | | KR | 20160096201 A | 12-08-2016 |
| | | | US | 2015174217 A1 | 25-06-2015 |
| | | | US | 2016230159 A1 | 11-08-2016 |
| | | | WO | 2015097087 A1 | 02-07-2015 |
| ----- | | | | | |