



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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.10.24**

**(21)** Номер заявки  
**202190892**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.09.27**

**(51)** Int. Cl. **C12Q 1/37** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**G01N 33/542** (2006.01)  
**G01N 33/569** (2006.01)

**(54) КЛЕТОЧНЫЕ АНАЛИЗЫ КЛОСТРИДАЛЬНЫХ НЕЙРОТОКСИНОВ**

**(31)** **1815870.9**

**(32)** **2018.09.28**

**(33)** **GB**

**(43)** **2021.07.05**

**(86)** **PCT/GB2019/052734**

**(87)** **WO 2020/065338 2020.04.02**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ИПСЕН БИОФАРМ ЛИМИТЕД (GB);  
ИНСТИТЮТ ОФ МОЛЕКЪЮЛАР  
ЭНД СЕЛЛ БАЙОЛОДЖИ,  
БАЙОМЕДИКАЛ САЙЕНСИЗ  
ИНСТИТЮТС (SG)**

**(72)** Изобретатель:  
**Фостер Кейт, Биэрд Мэттью (GB),  
Йео Джереми Чанной, Бард Фредерик  
Андре Жан, Тай Пэй Лин Фелиция  
(SG)**

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

**(56)** WO-A1-2016079310  
UMA BASAVANNA ET AL.: "Development of a Cell-Based Functional Assay for the Detection of Clostridium botulinum Neurotoxin Types A and E", INTERNATIONAL JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 2013, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 1-7, XP55440310, ISSN: 1687-918X, DOI: 10.1155/2013/593219, the whole document, figure 1d  
WO-A2-2004029576  
MIN DONG ET AL.: "Using fluorescent sensors to detect botulinum neurotoxin activity in vitro and in living cells", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 101, no. 41, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 14701-14706, XP008156528, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0404107101, abstract, page 14701, right-hand column, page 14702, left-hand column; figure 1

WO-A2-2012047325

RAMIN MOLLAAGHABABA HAKAMI ET AL.: "Gaining ground: assays for therapeutics against botulinum neurotoxin", TRENDS IN MICROBIOLOGY, vol. 18, no. 4, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 164-172, XP55241136, GB, ISSN: 0966-842X, DOI: 10.1016/j.tim.2010.02.001, page 168, left-hand column, page 169, left-hand column

MARCO TERENCE ET AL.: "siRNA screen of ES cell-derived motor neurons identifies novel regulators of tetanus toxin and neurotrophin receptor trafficking", FRONTIERS IN CELLULAR NEUROSCIENCE, vol. 8, 20 May 2014 (2014-05-20), page 140, XP55638515, DOI: 10.3389/fncel.2014.00140, the whole document

JEREMY YEO ET AL.: "Genome-wide siRNA screen identification of genes in regulation of BoNT/A trafficking in a sensitized human neuronal stem cell line", TOXICON, vol. 156, no. Supplement 1, 1 December 2018 (2018-12-01), pages S118-S119, XP055644808, US, ISSN: 0041-0101, DOI: doi:10.1016/j.toxicon.2018.11.283, the whole document

ERKAN KIRIS ET AL.: "Embryonic stem cell-derived motoneurons provide a highly sensitive cell culture model for botulinum neurotoxin studies, with implications for high-throughput drug discovery", STEM CELL RESEARCH, ELSEVIER, NL, vol. 6, no. 3, 1 May 2011 (2011-05-01), pages 195-205, XP003030979, ISSN: 1873-5061, DOI: 10.1016/J.SCR.2011.01.002, Retrieved from the Internet: URL:http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873506111000031 [retrieved on 2011-05-01] the whole document

ALEXEY G. ZDANOVSKY ET AL.: "Peptide Phage Display Library as Source for Inhibitors of Clostridial Neurotoxins", JOURNAL OF PROTEIN CHEMISTRY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 20, no. 1, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 73-80, XP019284136, ISSN: 1573-4943, the whole document

DONATO ROBERTA ET AL.: "Differential development of neuronal physiological responsiveness in two human neural stem cell lines", BMC NEUROSCIENCE, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 8, no. 1, 25 May 2007 (2007-05-25), page 36, XP021028253, ISSN: 1471-2202, DOI: 10.1186/1471-2202-8-36, the whole document

**(57)** Изобретение относится к способу идентификации гена, который регулирует активность клостридиального нейротоксина, где способ включает: а) предоставление образца нейронных клеток человека, экспрессирующих полипептид, который содержит С-концевую обнаруживаемую метку, где полипептид может расщепляться клостридиальным нейротоксином; б) изменение экспрессии гена-мишени клеток; с) контактирование клеток с клостридиальным нейротоксином;

d) измерение количества детектируемой С-концевой метки, посредством чего количественно определяют активность клостридиального нейротоксина; и е) идентификацию гена-мишени как регулятора активности клостридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность клостридиального нейротоксина отличается от количественно определенной активности клостридиального нейротоксина в случае, когда экспрессия гена-мишени не изменена; или f) идентификацию того, что ген-мишень не является регулятором активности клостридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность клостридиального нейротоксина эквивалентна количественно определенной активности клостридиального нейротоксина в случае, когда экспрессия гена-мишени не изменена. Также предоставлены родственные способы для идентификации агента, который регулирует активность клостридиального нейротоксина, а также человеческие нейронные клетки, нуклеотиды, векторы, полипептиды, наборы и композиции, подходящие для применения в способах по изобретению.

048091 B1

048091 B1

---

Изобретение относится к клеточным анализам клостридиальных нейротоксинов.

Бактерии рода *Clostridia* продуцируют высокоэффективные и специфичные белковые токсины, которые могут отравлять нейроны и другие клетки, в которые они попадают. Примеры таких клостридиальных нейротоксинов включают нейротоксины, продуцируемые *C. Tetani* (TeNT) и *C. Botulinum* (BoNT) серотипов AG и X (см. WO 2018/009903 A2), а также продуцируемые *C. Baratii* и *C. butyricum*.

Среди клостридиальных нейротоксинов присутствуют одни из самых сильных известных токсинов. Например, ботулинические нейротоксины имеют значения средней летальной дозы ( $LD_{50}$ ) для мышей в диапазоне от 0,5 до 5 нг/кг, в зависимости от серотипа. И столбнячный, и ботулинический токсины действуют посредством подавления функции пораженных нейронов, в частности, высвобождения нейромедиаторов. Ботулинический токсин действует в нервно-мышечном соединении и подавляет холинергическую передачу в периферической нервной системе; столбнячный токсин действует в центральной нервной системе.

В природе клостридиальные нейротоксины синтезируются как одноцепочечный полипептид, который подвергается посттрансляционной модификации в результате протеолитического расщепления с образованием двух полипептидных цепей, соединенных дисульфидной связью. Расщепление происходит в определенном сайте расщепления, часто называемом сайтом активации, который расположен между остатками цистеина, обеспечивающими межцепочечную дисульфидную связь. Именно эта двухцепочечная форма является активной формой токсина. Две цепи называются тяжелой цепью (H-цепью), которая имеет молекулярную массу приблизительно 100 кДа, и легкой цепью (L-цепью), которая имеет молекулярную массу приблизительно 50 кДа. H-цепь содержит N-концевой компонент транслокации (домен  $H_N$ ) и C-концевой компонент нацеливания (домен  $H_C$ ). Сайт расщепления располагается между L-цепью и компонентами домена транслокации. После связывания домена  $H_C$  с его нейроном-мишенью и интернализации связанного токсина в клетку через эндосому домен  $H_N$  перемещает L-цепь через эндосомную мембрану в цитозоль, а L-цепь обеспечивает функцию протеазы (также известную как нецитотоксическая протеаза).

Нецитотоксические протеазы действуют путем протеолитического расщепления внутриклеточных транспортных белков, известных как SNARE-белки (например, SNAP-25, VAMP или синтаксин) - см. Gerald K. (2002) "Cell and Molecular Biology" (4th edition) John Wiley & Sons, Inc. Сокращение SNARE происходит от термина (Soluble NSF Attachment Receptor (рецептор связывания растворимых NSF), где NSF означает чувствительный к N-этилмалеимиду фактор. SNARE-белки являются неотъемлемым элементом слияния внутриклеточных везикул, и, таким образом, секреции молекул посредством везикулярного транспорта из клетки. Функция протеазы представляет собой цинк-зависимую эндопептидазную активность и демонстрирует высокую субстратную специфичность для белков SNARE. Соответственно, после доставки в желаемую клетку-мишень нецитотоксическая протеаза способна ингибировать клеточную секрецию из клетки-мишени. Протеазы L-цепи клостридиальных нейротоксинов являются нецитотоксическими протеазами, которые расщепляют SNARE-белки.

Анализ  $LD_{50}$  для мышей в настоящее время является единственным тестом, одобренным FDA для высвобождения ботулотоксинов. Анализ одновременно проверяет действие всех трех доменов ботулинического нейротоксина (т.е. связывания, транслокации и протеазного). Более подробно, он определяет среднюю летальную внутрибрюшинную дозу токсина в определенный момент времени, обычно через 2-4 дня после введения дозы (активность выражается в единицах  $LD_{50}$  для мышей). Однако, к сожалению, в анализах  $LD_{50}$  используется большое количество животных. Более того, единицы  $LD_{50}$  не являются абсолютными измерениями, потому что они не являются биологическими константами - таким образом, они сильно зависят от условий анализа. В частности, ошибки, связанные с этим анализом, могут достигать 60% между различными испытательными центрами (Sesardic и соавт. 2003; *Biologicals* 31 (4): 265-276).

Тест на периферический паралич мышей, который также известен как "анализ абдоминального птоза мышей", соотносит активность ботулинического токсина со степенью вздутия живота, наблюдаемого после подкожной инъекции токсина в левую пахово-грудную область мышцы - величина паралича зависит от дозы. Этот подход был предложен в качестве усовершенствования теста  $LD_{50}$  для мышей, поскольку он основан на гуманной конечной точке. Этот анализ примерно в 10 раз более чувствителен, чем анализ  $LD_{50}$ , использует сублетальную дозу токсина и является более быстрым, чем тест  $LD_{50}$ , поскольку дает результаты в течение 24-48 ч, по сравнению с 72-96 ч для типового анализа  $LD_{50}$ . Результаты этого анализа демонстрируют превосходное соответствие со значениями  $LD_{50}$  (Sesardic и соавт., 1996; *Pharmacol Toxicol*, 78 (5): 283-8). Хотя в этом анализе используется 20% от числа животных, использованных в анализе  $LD_{50}$ , использование животных все еще является необходимым.

Анализы, такие как гемидиафрагмальный анализ диафрагмального нерва мыши/крысы (который основан на использовании нервных/мышечных препаратов *ex vivo*), сопоставляют активность ботулинического нейротоксина с уменьшением амплитуды конвульсивного ответа на препарат после его нанесения в поддерживающую среду. Обычной конечной точкой анализа является время, необходимое для наблюдения 50%-ного уменьшения амплитуды. Однако, к сожалению, гемидиафрагмальный анализ (как и анализ  $LD_{50}$ ) приводит к использованию большого количества животных. Кроме того, для проведения

анализа требуется высококвалифицированный персонал, обученный использованию сложного и дорогостоящего оборудования.

Все вышеперечисленные анализы имеют определенные недостатки, особенно проблемы с благополучием животных. Более того, ни один из вышеупомянутых анализов не подходит для высокопроизводительного тестирования, например, для обнаружения генетических или химических регуляторов кластридиального нейротоксина. Таким образом, в данной области техники существует потребность в альтернативных и/или улучшенных анализах кластридиального нейротоксина.

Настоящее изобретение решает одну или более из вышеупомянутых проблем.

В одном из аспектов изобретение предоставляет способ идентификации гена, который регулирует активность кластридиального нейротоксина, включающий:

a) получение образца нейронных клеток человека, экспрессирующих полипептид, который содержит С-концевую обнаруживаемую метку, при этом полипептид может расщепляться кластридиальным нейротоксином;

b) изменение экспрессии гена-мишени клеток;

c) контактирование клеток с кластридиальным нейротоксином;

d) измерение количества детектируемой С-концевой метки, посредством чего количественно определяют активность кластридиального нейротоксина; и

e) идентификацию гена-мишени как регулятора активности кластридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность кластридиального нейротоксина отличается от количественно определенной активности кластридиального нейротоксина для случая, когда экспрессия гена-мишени не изменяется.

Альтернативно, способ может включать определение того, что ген-мишень не является регулятором активности кластридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность кластридиального нейротоксина эквивалентна количественно определенной активности кластридиального нейротоксина в случае, когда экспрессия гена-мишени не изменяется.

В одном из вариантов осуществления клетки могут контактировать с кластридиальным нейротоксином до изменения экспрессии гена-мишени.

В родственном аспекте изобретение предоставляет способ идентификации агента, регулирующего активность кластридиального нейротоксина, включающий:

a) получение образца нейронных клеток человека, экспрессирующих полипептид, который содержит С-концевую обнаруживаемую метку, при этом полипептид расщепляется кластридиальным нейротоксином;

b) контактирование клеток с кластридиальным нейротоксином и агентом, при этом контактирование является последовательным или одновременным;

c) измерение количества детектируемой С-концевой метки, посредством чего количественно определяют активность кластридиального нейротоксина; и

d) идентификацию агента как регулятора активности кластридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность кластридиального нейротоксина отличается от количественно определенной активности кластридиального нейротоксина в отсутствие агента.

Альтернативно, способ может включать идентификацию того, что агент не является регулятором активности кластридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность кластридиального нейротоксина эквивалентна количественно определенной активности кластридиального нейротоксина в отсутствие агента.

Агент может быть идентифицирован как отрицательный регулятор активности кластридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность кластридиального нейротоксина ниже, чем количественно определенная активность кластридиального нейротоксина в отсутствие агента. Альтернативно, агент может быть идентифицирован как положительный регулятор активности кластридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность кластридиального нейротоксина выше, чем количественно определенная активность кластридиального нейротоксина в отсутствие агента.

В настоящем изобретении применяются нейронные клетки человека, и это связано с рядом преимуществ, отсутствующих в обычных клеточных анализах, таких как анализы с использованием мышечных клеток. Человеческие нейронные клетки позволяют использовать библиотеки сайленсинга человеческих генов (например, библиотеки человеческих siRNA) или библиотеки агентов (например, библиотеки человеческих лекарственных соединений). Таким образом, настоящее изобретение имеет более высокие прогностические возможности, чем обычные клеточные анализы, и имеет повышенную терапевтическую значимость для человека.

Таким образом, в одном из аспектов изобретение предоставляет нейронную клетку человека, экспрессирующую полипептид, который может расщепляться кластридиальным нейротоксином и содержит С-концевую обнаруживаемую метку. Клетка, предпочтительно, представляет собой стабильную клеточную линию, содержащую нуклеотидную последовательность или вектор по изобретению.

Нейронная клетка человека по изобретению, предпочтительно, не является раковой клеткой. Предпочтительно, нейронная клетка человека по изобретению представляет собой иммортализованную клет-

ку-предшественник нейронов человека или клетку, эквивалентную ей (например, функционально эквивалентную ей). Например, клетка может являться клеткой-предшественником нейронов человека ReN-cell® (коммерчески доступной от Sigma-Aldrich), экспрессирующей полипептид по изобретению. Предпочтительно, нераковые клетки являются генетически более близкими к природным нейронам человека по сравнению с линиями раковых клеток (например, клетками нейробластомы) и, таким образом, представляют собой улучшенную модель нейронных клеток для применения в анализах, описанных в настоящем описании.

Клетку-предшественник нейронов человека, предпочтительно, дифференцируют перед применением в способе по настоящему изобретению. Таким образом, в одном из вариантов осуществления нейронная клетка человека по изобретению или для применения в способе по изобретению (например, нейрон человека или его предшественник) происходит из клетки-предшественника нейронов человека. Более предпочтительно, человеческая нейронная клетка по изобретению или для применения в способе по изобретению представляет собой человеческий нейрон или клетку, эквивалентную ему (например, функционально эквивалентную ему).

Полипептид, экспрессируемый нейронной клеткой человека, описанной в настоящем описании, может содержать обнаруживаемую метку как на N-конце, так и на C-конце. В одном из вариантов осуществления обнаруживаемые метки N-конца и C-конца различаются.

Обнаруживаемая метка, предпочтительно, является флуоресцентной меткой. В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению не содержит дополнительной нефлуоресцентной метки.

В одном из вариантов осуществления N-концевая или C-концевая обнаруживаемая метка представляет собой красный флуоресцентный белок (RFP). Более предпочтительно, один конец белка имеет обнаруживаемую метку RFP, а другой конец белка имеет обнаруживаемую метку, выбранную из: зеленого флуоресцентного белка (GFP), голубого флуоресцентного белка (CFP) и желтого флуоресцентного белка (YFP). Предпочтительно, RFP антигенно отличается от GFP, CFP и YFP, поэтому способы по настоящему изобретению позволяют применять (вторичные/подтверждающие) методики иммуногенного обнаружения, такие как вестерн-блоттинг. Полипептиды, в которых обе метки выбраны из GFP, CFP и YFP, обычно не подходят для применения с такими методиками иммуногенного обнаружения ввиду перекрестной реактивности антител. Предпочтительно, полипептид, описанный в настоящем описании, содержит N-концевую обнаруживаемую метку RFP и C-концевую обнаруживаемую метку GFP.

Предпочтительно, чтобы полипептид по изобретению не содержал метку для иммобилизации и/или очистки; поскольку анализ основан на клетках, в таких метках нет необходимости. В одном из вариантов осуществления полипептид по изобретению может не содержать His-метку (например, полигистидиновую метку, такую как 6-His-метку), FLAG-метку, метку белка A, метку связывающего мальтозу белка и/или Мус-метку.

Следовательно, в одном из аспектов изобретение относится к полипептиду, который расщепляется кластридиальным нейротоксином и содержит N-концевую обнаруживаемую метку RFP и C-концевую обнаруживаемую метку GFP. В родственном аспекте изобретение предоставляет нуклеотидную последовательность, кодирующую указанный полипептид, а также вектор (например, плазмиду), содержащий нуклеотидную последовательность по изобретению, функционально связанную с промотором. Можно использовать любой промотор, подходящий для экспрессии в нейронной клетке человека, такой как промотор CMV.

Полипептид содержит субстрат кластридиального нейротоксина или его часть. Субстрат (или его часть) выбирают соответствующим образом на основе анализируемого кластридиального нейротоксина.

В одном из вариантов осуществления полипептид содержит субстрат ботулинического нейротоксина (или его часть), такой как SNARE-белок. Таким образом, полипептид может содержать субстрат (или его часть) BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G или BoNT/X. Предпочтительно, полипептид содержит субстрат (или его часть) BoNT/A.

Полипептид по изобретению может содержать синаптосомальный белок 25 кДа (SNAP-25), синаптотревин/ассоциированный с везикулами мембранный белок (VAMP, например, VAMP1, VAMP2, VAMP3, VAMP4 или VAMP5), синтаксин (например, синтаксин 1, синтаксин 2 или синтаксин 3), Ykt6, или часть указанного.

Предпочтительно, полипептид по изобретению содержит SNAP-25 или его часть, более предпочтительно, полноразмерный SNAP-25.

BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F и BoNT/G расщепляют синаптотревин/ассоциированный с везикулами мембранный белок (VAMP); BoNT/C1, BoNT/A и BoNT/E расщепляют синаптосомальный белок 25 кДа (SNAP-25); и BoNT/C1 расщепляет синтаксин 1, синтаксин 2 и синтаксин 3. Было обнаружено, что BoNT/X расщепляет SNAP-25, VAMP1, VAMP2, VAMP3, VAMP4, VAMP5, Ykt6 и синтаксин 1.

Термин "часть указанного" в отношении субстрата кластридиального нейротоксина включает сайт, в котором расщепляется кластридиальный нейротоксин, и может дополнительно включать ряд аминокислотных остатков, окружающих указанный сайт, например, если указанные дополнительные аминокислотные остатки являются необходимыми для расщепления субстрата посредством расщепления кло-

стридиальным нейротоксином. Например, фрагмент может содержать  $\leq 50$ ,  $\leq 25$  или  $\leq 15$  аминокислот субстрата кластридиального нейротоксина.

Полипептид по изобретению может содержать один или более полипептидов, имеющих по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10 и/или 12. В одном из вариантов осуществления полипептид по изобретению содержит один или более полипептидов, имеющих по меньшей мере 80% или 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10 и/или 12. Предпочтительно, полипептид по изобретению содержит один или более полипептидов, показанных как SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10 и/или 12.

Полипептид по изобретению может содержать полипептиды, имеющие по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12. В одном из вариантов полипептид по изобретению содержит полипептиды, имеющие по меньшей мере 80% или 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12. Предпочтительно, полипептид по изобретению содержит полипептиды, показанные как SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12.

Полипептид по изобретению может содержать полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. В одном из вариантов осуществления полипептид по изобретению содержит полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% или 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, полипептид по изобретению содержит (более предпочтительно, состоит из) полипептидную последовательность, показанную как SEQ ID NO: 2.

Нуклеотидная последовательность по изобретению (например, которая кодирует полипептидную последовательность по изобретению) может содержать одну или более нуклеотидных последовательностей, имеющих по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9 и/или 11. В одном из вариантов осуществления нуклеотидная последовательность по изобретению содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, имеющих по меньшей мере 80% или 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9 и/или 11. Предпочтительно, нуклеотидная последовательность по изобретению содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, показанных как SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9 и/или 11.

Нуклеотидная последовательность по изобретению может содержать одну или более нуклеотидных последовательностей, имеющих по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, 9 и/или 11. В одном из вариантов нуклеотидная последовательность по изобретению содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, имеющих по меньшей мере 80% или 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, 9 и/или 11. Предпочтительно, нуклеотидная последовательность по изобретению содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, показанных как SEQ ID NO: 3, 9 и/или 11.

Нуклеотидная последовательность по изобретению может содержать нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. В одном из вариантов осуществления нуклеотидная последовательность по изобретению содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% или 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно, нуклеотидная последовательность по изобретению содержит (более предпочтительно, состоит из) нуклеотидную последовательность, показанную как SEQ ID NO: 1.

Как упоминалось выше, изобретение предоставляет способы идентификации регулятора (например, гена или агента) активности кластридиального нейротоксина. Регуляция активности кластридиального нейротоксина может являться повышающей/положительной регуляцией (например, повышенная активность кластридиального нейротоксина) или понижающей/отрицательной регуляцией активности кластридиального нейротоксина (например, пониженной активностью кластридиального нейротоксина). Например, регуляция активности кластридиального нейротоксина может являться прямой регуляцией на уровне:

- i) связывания кластридиального нейротоксина с клеткой;
- ii) интернализации кластридиального нейротоксина;
- iii) транслокации L-цепи кластридиального нейротоксина из эндосомы (включая уменьшение дисульфидной связи между L-цепью и H-цепью);
- iv) катализа (например, ингибирования или активации расщепления SNARE); или
- v) продолжительности эффекта (например, сохранения активности L-цепи в цитоплазме клетки).

В других вариантах осуществления регуляция активности кластридиального нейротоксина может являться косвенной регуляцией. Косвенная регуляция может включать регуляцию пути, необходимого для активности кластридиального нейротоксина. Примером косвенной регуляции является регуляция клеточного переноса рецептора кластридиального нейротоксина, такого как гликопротеин 2A синаптических везикул (SV2).

Предпочтительно, регуляция активности кластридиального нейротоксина является прямой регуляцией.

Сведения о косвенных регуляторах можно использовать для дальнейшей проверки любых генов или агентов, идентифицированных с помощью способа по изобретению. В одном из вариантов осуществ-

вления рецептор кластридиального нейротоксина (предпочтительно, SV2) может быть применен для определения того, регулирует ли ген или агент миграцию рецептора кластридиального нейротоксина косвенно, или напрямую регулирует активность кластридиального нейротоксина (например, посредством миграции кластридиального нейротоксина).

Таким образом, в одном из вариантов осуществления способы по изобретению включают дальнейшую проверку гена или агента, идентифицированного в способе по изобретению, при этом проверка дополнительно включает обнаружение присутствия или отсутствия рецептора кластридиального нейротоксина в клетке, когда экспрессия гена-мишени была изменена в клетке, или когда клетка контактировала с агентом. Подходящий способ проверки представлен в примере 5 настоящего описания.

Обнаруженное количество рецептора кластридиального нейротоксина можно сравнить с отрицательным контролем, в котором экспрессия гена-мишени не была изменена или в котором клетка не контактировала с агентом. Альтернативно или дополнительно, отрицательный контроль может включать клетки, которые не контактировали с кластридиальным нейротоксином. Когда клетка не контактировала с кластридиальным нейротоксином, происходит интернализация и последующая рециркуляция рецептора кластридиального нейротоксина на поверхность клетки. Напротив, когда клетка контактировала с кластридиальным нейротоксином, расщепление белков SNARE посредством указанного кластридиального нейротоксина предотвращает эффективную рециркуляцию рецептора на поверхность клетки.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления количество детектируемого рецептора кластридиального нейротоксина меньше количества, детектируемого на поверхности клетки, которая не контактировала с кластридиальным нейротоксином.

В одном из вариантов осуществления обнаружение пониженного количества рецептора кластридиального нейротоксина на поверхности клетки: а) в которой была изменена экспрессия гена-мишени; и б) которая контактировала с кластридиальным нейротоксином, может указывать на то, что ген-мишень косвенно регулирует активность кластридиального нейротоксина.

Упомянутое выше понижение может иметь место по сравнению с эквивалентной клеткой, в которой экспрессия гена-мишени не изменяется.

Путем дальнейшего использования известного прямого ингибитора активности кластридиального нейротоксина можно подтвердить, что ген-мишень косвенно регулирует активность кластридиального нейротоксина на уровне миграции рецептора кластридиального нейротоксина. Например, косвенная регуляция может быть подтверждена, если количество рецептора на поверхности клетки, обнаруженного в присутствии ингибитора, меньше количества рецептора, обнаруженного в эквивалентной клетке (в которой экспрессия гена-мишени не изменена), которая также контактировала с кластридиальным нейротоксином и ингибитором (и наоборот).

В одном из вариантов осуществления обнаружение эквивалентного или большего количества рецептора кластридиального нейротоксина на поверхности клетки: а) в которой была изменена экспрессия гена-мишени, и б) которая контактировала с кластридиальным нейротоксином, может указывать на то, что ген-мишень не регулирует косвенно активность кластридиальных нейротоксинов.

Эквивалентное или большее количество, упомянутое выше, может иметь место по сравнению с эквивалентной клеткой, в которой экспрессия гена-мишени не изменена.

Аналогичным образом, в одном из вариантов осуществления обнаружение пониженного количества рецептора кластридиального нейротоксина в клетке, контактирующей с: а) кластридиальным нейротоксином и б) агентом, может указывать на то, что агент косвенно регулирует активность кластридиального нейротоксина.

Пониженное количество, упомянутое выше, может иметь место по сравнению с эквивалентной клеткой в отсутствие агента.

Путем дальнейшего использования известного прямого ингибитора активности кластридиального нейротоксина можно подтвердить, что агент косвенно регулирует активность кластридиального нейротоксина на уровне миграции рецептора кластридиального нейротоксина. Например, косвенная регуляция может быть подтверждена, если количество рецептора, обнаруженного в присутствии ингибитора, меньше количества рецептора, обнаруженного в эквивалентной клетке, которая также контактировала с кластридиальным нейротоксином и ингибитором, но не контактировала с агентом (и наоборот).

В одном из вариантов осуществления обнаружение эквивалентного или большего количества рецептора кластридиального нейротоксина на поверхности клетки, контактирующей с: а) кластридиальным нейротоксином и б) агентом, может указывать на то, что агент не регулирует косвенно активность кластридиального нейротоксина.

Эквивалентное или большее количество, упомянутое выше, может иметь место по сравнению с эквивалентной клеткой в отсутствие агента.

Предпочтительно, рецептором кластридиального нейротоксина является SV2.

Настоящее изобретение преодолевает ограничение предшествующих анализов, заключающееся в том, что во многих типах клеток нормальные уровни SV2 на клеточной поверхности являются низкими и их трудно обнаружить, и поэтому невозможно/трудно определить, изменяются ли эти уровни, когда экспрессия гена-мишени изменена или в присутствии агента.

В одном из вариантов осуществления известным прямым ингибитором активности кластридиального нейротоксина является миРНК или кшРНК, которая подавляет экспрессию тиоредоксинредуктазы.

Способы по настоящему изобретению являются особенно подходящими для высокопроизводительного скрининга. В этом отношении способы могут включать использование множества образцов клеток, предпочтительно, при этом экспрессия разных генов-мишеней изменяется в каждом из образцов клеток. Библиотеки РНКи (или эквивалентные библиотеки сайленсинга генов) особенно хорошо подходят для применения в таких высокопроизводительных методах, как библиотеки лекарственных препаратов.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления способ по изобретению включает:

а) предоставление множества образцов нейронных клеток человека, экспрессирующих полипептид, который содержит С-концевую обнаруживаемую метку, при этом полипептид может расщепляться кластридиальным нейротоксином;

б) изменение экспрессии разных генов-мишеней в каждом из множества образцов, при этом ген-мишень отличается в каждом образце клеток;

с) контактирование клеток с кластридиальным нейротоксином;

д) измерение количества С-концевой обнаруживаемой метки, посредством чего количественно определяют активность кластридиального нейротоксина; и

е) идентификацию одного или более генов-мишеней в качестве регуляторов активности кластридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность кластридиального нейротоксина отличается от количественно определенной активности кластридиального нейротоксина для случая, когда экспрессия одного или более генов-мишеней не изменена; или

ф) идентификацию того, что один или более генов-мишеней не являются регуляторами активности кластридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность кластридиального нейротоксина эквивалентна количественно определенной активности кластридиального нейротоксина в случае, когда экспрессия одного или более генов-мишеней не изменена.

В другом варианте осуществления способ включает:

а) предоставление множества образцов нейронных клеток человека, экспрессирующих полипептид, который содержит С-концевую обнаруживаемую метку, при этом полипептид может расщепляться кластридиальным нейротоксином;

б) контактирование клеток с кластридиальным нейротоксином и агентом, при этом контактирование является последовательным или одновременным, и при этом каждый из образцов контактирует с разным агентом;

с) измерение количества С-концевой обнаруживаемой метки, посредством чего количественно определяют активность кластридиального нейротоксина; и

д) идентификацию одного или более агентов в качестве регуляторов активности кластридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность кластридиального нейротоксина отличается от количественно определенной активности кластридиального нейротоксина в отсутствие одного или более агентов; или

е) идентификацию того, что один или более агентов не являются регуляторами активности кластридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность кластридиального нейротоксина эквивалентна количественно определенной активности кластридиального нейротоксина в отсутствие одного или более агентов.

Используемый в настоящем описании термин "множество" означает два или более. Предпочтительно, термин "множество" означает более двух, например,  $\geq 50$ ,  $\geq 100$ ,  $\geq 150$ ,  $\geq 200$ ,  $\geq 250$  или  $\geq 300$ .

Способ может включать использование многолуночного планшета, в котором каждая лунка содержит один из множества образцов. Чувствительность и высокое отношение сигнал/шум способов по настоящему изобретению позволяют использовать многолуночные планшеты, содержащие  $\geq 150$  лунок (предпочтительно,  $\geq 300$  лунок, например, 384-луночный планшет). Предпочтительно, это позволяет повысить производительность по сравнению со способами, в которых используются планшеты с количеством лунок  $\leq 150$  (например, 96-луночные планшеты).

Количественное определение активности кластридиального нейротоксина путем измерения количества обнаруживаемой С-концевой метки в соответствии со способами по настоящему изобретению особенно хорошо подходит для простого и быстрого получения изображений и количественной оценки с применением автоматизированных и/или высокопроизводительных средств (например, микроскопия в сочетании с программным обеспечением для автоматического анализа). Более того, нейронные клетки человека по настоящему изобретению являются высокочувствительными к кластридиальным нейротоксинам, что позволяет сократить время воздействия для генерирования сигнала, достаточного для обнаружения. Это особенно подходит для применения в автоматическом скрининге с меньшими форматами многолуночных планшетов, например, содержащими  $\geq 150$  лунок (например, 384-луночные планшеты), поскольку более короткое время инкубации делает логистику планирования автоматизированных этапов в способе менее сложной. Снижается сложность узких мест при продвижении группы планшетов (в процессе скрининга) от одной стадии к другой, когда некоторые стадии завершаются за минуты, а другие -

за часы или дни; требуется меньшее количество и более короткие этапы удержания, и оборудование занято меньше времени.

Способы идентификации гена, который регулирует активность кластридиального нейротоксина, включают изменение экспрессии гена-мишени. Изменение может представлять собой повышающую или понижающую регуляцию экспрессии (по сравнению с уровнем экспрессии в эквивалентной клетке, в которой экспрессия не была изменена, т.е., в которой экспрессия гена-мишени "не изменена"). Изменение экспрессии гена-мишени может быть достигнуто с применением любого способа, известного в данной области техники, например, путем редактирования гена, сверхэкспрессии или сайленсинга гена.

В одном из вариантов осуществления экспрессия изменяется посредством понижающей регуляции экспрессии гена-мишени (например, посредством сайленсинга гена). Предпочтительным способом понижающей регуляции экспрессии гена-мишени является РНК-интерференция (РНКи), например, с использованием коротких интерферирующих или коротких шпилечных РНК (миРНК или кшРНК).

В вариантах осуществления, в которых экспрессию изменяют посредством понижающей регуляции экспрессии гена-мишени, ген-мишень может быть идентифицирован как положительный регулятор активности кластридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность кластридиального нейротоксина ниже, чем количественно определенная активность кластридиального нейротоксина в случае, когда экспрессия гена-мишени не изменена. Альтернативно, ген-мишень может быть идентифицирован как отрицательный регулятор активности кластридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность кластридиального нейротоксина выше, чем количественно определенная активность кластридиального нейротоксина в случае, когда экспрессия гена-мишени не изменена.

Напротив, в вариантах осуществления, в которых экспрессию изменяют посредством повышающей регуляции экспрессии гена-мишени, ген-мишень может быть идентифицирован как отрицательный регулятор активности кластридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность кластридиального нейротоксина ниже, чем количественно определенная активность кластридиального нейротоксина в случае, когда экспрессия гена-мишени не изменена. Альтернативно, ген-мишень может быть идентифицирован как положительный регулятор активности кластридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность кластридиального нейротоксина выше, чем количественно определенная активность кластридиального нейротоксина в случае, когда экспрессия гена-мишени не изменена.

Способы идентификации агента, который регулирует активность кластридиального нейротоксина, включают контактирование клеток с кластридиальным нейротоксином и агентом, при этом контактирование является последовательным (например, контактирование с кластридиальным нейротоксином, а затем с агентом, или контакт с агентом, а затем с кластридиальным нейротоксином) или одновременным. Предпочтительно, контактирование является последовательным.

В одном из вариантов осуществления клетки контактируют с агентом перед контактом с кластридиальным нейротоксином. Такие способы являются особенно подходящими для идентификации агентов, способных предотвратить интоксикацию кластридиальным нейротоксином. Агенты, способные предотвратить интоксикацию, могут являться подходящими для применения в терапии в качестве профилактических средств.

Альтернативно, клетки могут контактировать с агентом после контакта с кластридиальным нейротоксином. Такие способы являются особенно подходящими для идентификации агентов, способных ингибировать активность кластридиального нейротоксина после интоксикации, и могут являться подходящими для применения в терапии после интоксикации в качестве терапевтических средств.

Агент, идентифицированный как положительный регулятор активности кластридиального нейротоксина, может представлять собой агент, являющийся сенсibiliзирующим в отношении кластридиального нейротоксина. Такие агенты могут применяться в терапии в сочетании с кластридиальным нейротоксином для модуляции местной активности кластридиальных нейротоксинов (например, в целях снижения дозировки и сведения к минимуму распространения на другие ткани).

Активность кластридиального нейротоксина может быть определена количественно путем измерения количества обнаруживаемой С-концевой метки. Предпочтительно, активность кластридиального нейротоксина может быть определена количественно путем измерения количества детектируемой С-концевой метки и детектируемой N-концевой метки.

Количество С-концевой обнаруживаемой метки после контакта клеток с кластридиальным нейротоксином можно сравнивать с количеством С-концевой обнаруживаемой метки, измеренным в отсутствие кластридиального нейротоксина. Например, количество детектируемой С-концевой метки можно измерять в образце одних и тех же клеток до и после контакта с кластридиальным нейротоксином. В качестве альтернативы, количество С-концевой обнаруживаемой метки можно измерять после контакта с кластридиальным нейротоксином и сравнивать с количеством С-концевой обнаруживаемой метки, присутствующей в эквивалентном образце клеток в эквивалентных условиях, которые не контактировали с кластридиальным нейротоксином.

В одном из вариантов осуществления потеря С-концевой обнаруживаемой метки (например, с течением времени) по сравнению с эквивалентной клеткой, которая не контактировала с кластридиальным

нейротоксином, или по сравнению с той же клеткой до контакта с клостридиальным нейротоксином, указывает на наличие активности клостридиального нейротоксина. В качестве альтернативы, в одном из вариантов осуществления отсутствие потери (или обнаружение эквивалентного количества) С-концевой обнаруживаемой метки (например, с течением времени) по сравнению с эквивалентной клеткой, которая не контактировала с клостридиальным нейротоксином, или по сравнению с той же клеткой до контакта с клостридиальным нейротоксином, указывает на отсутствие активности клостридиального нейротоксина. В одном из вариантов осуществления частичная потеря С-концевой обнаруживаемой метки (например, с течением времени) по сравнению с эквивалентной клеткой, которая не контактировала с клостридиальным нейротоксином, или по сравнению с той же клеткой до контакта с клостридиальным нейротоксином, может указывать на наличие пониженной активности клостридиального нейротоксина (и наоборот).

Способ может дополнительно включать измерение количества N-концевой обнаруживаемой метки. Аналогично С-концевой метке, количество N-концевой обнаруживаемой метки после контактирования клеток с клостридиальным нейротоксином можно сравнивать с количеством N-концевой обнаруживаемой метки, измеренным в отсутствие клостридиального нейротоксина. Например, количество N-концевой обнаруживаемой метки можно измерять в образце одних и тех же клеток до и после контакта с клостридиальным нейротоксином. В качестве альтернативы, количество N-концевой обнаруживаемой метки можно измерять после контактирования с клостридиальным нейротоксином и сравнивать с количеством N-концевой обнаруживаемой метки, присутствующей в эквивалентном образце клеток в эквивалентных условиях, которые не контактировали с клостридиальным нейротоксином.

Предпочтительно, активность клостридиального нейротоксина определяют путем сравнения количества N-концевой метки и С-концевой метки. Большее количество N-концевой метки по отношению к С-концевой метке, предпочтительно, указывает на то, что полипептид был расщеплен клостридиальным нейротоксином.

Обнаруживаемую метку по изобретению могут измерять в один или более моментов времени после контактирования клеток с клостридиальным нейротоксином. Посредством этого можно рассчитать уровень активности клостридиального нейротоксина.

В одном из вариантов осуществления обнаруживаемую метку могут измерять после контактирования клеток с клостридиальным нейротоксином в течение, по меньшей мере, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 или 70 ч. В других вариантах осуществления обнаруживаемую метку могут измерять после контактирования клеток с клостридиальным нейротоксином в течение менее 100, 80, 70, 60 или 50 ч. Предпочтительно, обнаруживаемую метку могут измерять после контактирования клеток с клостридиальным нейротоксином в течение менее 72 ч, более предпочтительно менее 50 ч. Таким образом, обнаруживаемую метку могут измерять после контактирования клеток с клостридиальным нейротоксином в течение 20-60 ч, предпочтительно, 40-55 ч (например, около 48 ч). Клетки могут быть зафиксированы до измерения количества обнаруживаемой метки.

При сравнении клеток по способу изобретения с контролем (например, эквивалентной клеткой, в которой экспрессия гена-мишени не изменена или которая не контактировала с агентом по изобретению, или другим контролем, упомянутым выше), предполагается, что измерения выполняют одним и тем же способом (например, в один и тот же момент времени после контактирования клеток с клостридиальным нейротоксином). Это позволяет сравнивать количественно определенную активность клостридиального нейротоксина клеток по способу и контролю, с тем чтобы идентифицировать наличие или отсутствие различия в активности клостридиального нейротоксина.

Этап измерения или обнаружения по изобретению может быть выполнен с применением любых подходящих средств, известных специалисту. В одном из вариантов осуществления флуоресцентную метку, присутствующую на полипептиде (или присутствующую на антителе, связывающемся с рецептором клостридиального нейротоксина), возбуждают светом подходящей длины волны и детектируют результирующую флуоресценцию. Таким образом, в изобретении можно применять флуоресцентную микроскопию. В предпочтительном варианте осуществления этап измерения или обнаружения включает применение высокопроизводительной системы скрининга. Примером подходящей системы является система скрининга Opera Phenix™ High-Content, которая коммерчески доступна от PerkinElmer, и/или применение подходящего программного обеспечения для обработки изображений, такого как программное обеспечение Columbus™ (коммерчески доступно от PerkinElmer). В некоторых вариантах осуществления этап измерения или обнаружения изобретения автоматизирован и может включать применение робототехники.

В способе по изобретению, предпочтительно, не используется электронная связь между обнаруживаемыми метками, описанными в настоящем описании. В частности, является предпочтительным, чтобы метки не располагались таким образом, чтобы донорная метка (например, N-концевая метка) могла передавать энергию акцепторной метке (например, С-концевой метке), например, с помощью механизма диполь-дипольного связывания. Предпочтительно, изобретение не предполагает использование резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET).

Способы по изобретению могут включать этап проверки, на котором количественно определенную активность клостридиального нейротоксина, обнаруженную в способе, сравнивают с положительным

контролем. Положительная проверка может иметь место, когда количественно определенная активность кластридиального нейротоксина эквивалентна активности положительного контроля.

Способ по изобретению может включать дополнительную проверку того, что регулятор действительно является положительным регулятором. В одном из вариантов осуществления способ включает контактирование клеток с известным отрицательным регулятором активности кластридиального нейротоксина и демонстрацию того, что влияние на активность кластридиального нейротоксина является обратимым. В одном из вариантов осуществления способ включает повышающую регуляцию экспрессии известного отрицательного регулятора активности кластридиального нейротоксина и демонстрацию того, что влияние на активность кластридиального нейротоксина является обратимым. Предпочтительно, способ включает понижающую регуляцию экспрессии известного положительного регулятора активности кластридиального нейротоксина и демонстрацию того, что влияние на активность кластридиального нейротоксина является обратимым.

Способ по изобретению может включать дополнительную проверку того, что регулятор действительно является отрицательным регулятором. В одном из вариантов осуществления способ включает контактирование клеток с известным положительным регулятором активности кластридиального нейротоксина и демонстрацию того, что влияние на активность кластридиального нейротоксина является обратимым. В одном из вариантов осуществления способ включает понижающую регуляцию экспрессии известного отрицательного регулятора активности кластридиального нейротоксина и демонстрацию того, что влияние на активность кластридиального нейротоксина является обратимым. В одном из вариантов осуществления способ включает повышающую регуляцию экспрессии известного положительного регулятора активности кластридиального нейротоксина и демонстрацию того, что влияние на активность кластридиального нейротоксина является обратимым.

Известным (положительным) регулятором активности кластридиальных нейротоксинов является тиоредоксинредуктаза. В одном из вариантов осуществления экспрессия тиоредоксинредуктазы подвергается повышающей регуляции. Предпочтительно, экспрессия тиоредоксинредуктазы подвергается понижающей регуляции.

Используемый в настоящем описании термин "эквивалент" может означать, что два или более сравниваемых значения не отличаются на статистически значимом уровне. Используемый в настоящем описании термин "эквивалент", предпочтительно, означает, что два или более значений идентичны. Точно так же, термин "не изменена", используемый в настоящем описании, может означать, что два или более сравниваемых значения не отличаются на статистически значимом уровне. Предпочтительно, термин "не изменена", используемый в настоящем описании, означает, что два или более значений идентичны.

Упомянутое в настоящем описании различие или изменение (например, повышение или понижение) предпочтительно, означает статистически значимое различие или изменение (например, статистически значимое повышение или понижение). Таким образом, различие в количественно определенной активности кластридиального нейротоксина, предпочтительно, является статистически значимым различием в количественно определенной активности кластридиального нейротоксина. В одном из вариантов осуществления различие в количественно определенной активности кластридиального нейротоксина составляет, по меньшей мере, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% или 50% по сравнению с количественно определенной активностью кластридиального нейротоксина для отрицательного контроля (например, эквивалентная клетка, в которой экспрессия гена-мишени не изменена или которая не контактировала с агентом по изобретению или другим контролем, упомянутым выше).

Способы по настоящему изобретению представляют собой способы *in vitro*.

В одном из вариантов осуществления способы по изобретению представляют собой способы с использованием живых клеток, и, необязательно, в этих способах применяется мониторинг активности кластридиального нейротоксина в реальном времени, когда изменяется экспрессия гена-мишени и/или когда клетки контактируют с агентом.

Предпочтительно, термин "контактирование клетки с кластридиальным нейротоксином" означает, что поверхность клетки контактирует с кластридиальным нейротоксином. Соответственно, кластридиальный нейротоксин может быть добавлен в среду, в которой присутствует клетка, например, в среду для культивирования клеток. Термин "контактирование клетки с кластридиальным нейротоксином", предпочтительно, исключает контактирование посредством экспрессии кластридиального нейротоксина в клетке, поскольку эта методика не дает информации относительно связывания, интернализации и/или транслокации кластридиального нейротоксина.

Способ по изобретению обычно включает контактирование клеток с кластридиальным нейротоксином в концентрации менее 1500 нМ. В одном из вариантов осуществления клетки контактируют с кластридиальным нейротоксином в концентрации менее чем 1000 нМ, например, менее чем 500 нМ, 250 нМ или 100 нМ.

Способ по изобретению может включать контактирование клеток с кластридиальным нейротоксином в концентрации, по меньшей мере, 1 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 20 нМ или 50 нМ.

В одном из вариантов осуществления способ по изобретению может включать контактирование клеток с кластридиальным нейротоксином в концентрации 1-1000 нМ, например, с кластридиальным нейротоксином в концентрации 1-500 нМ или 1-200 нМ.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что посредством контактирования клеток с буфером, содержащим GDNF и проницаемый для клеток cAMP (и, необязательно, дополнительно содержащим CaCl<sub>2</sub> и KCl), можно повысить чувствительность способов по настоящему изобретению. В присутствии буфера клетки становятся высокочувствительными к кластридиальному нейротоксину при концентрации менее 100 нМ, предпочтительно, менее 50 нМ, более предпочтительно, 5-15 нМ (например, ~10 нМ).

Буфер может содержать GDNF, d-cAMP, CaCl<sub>2</sub> и KCl. GDNF может присутствовать в количестве 1-100 нг/мл, предпочтительно, 10 нг/мл. d-cAMP может присутствовать в концентрации 0,1-5 мМ, предпочтительно, 1 мМ. CaCl<sub>2</sub> может присутствовать в концентрации 0,1-7 мМ, предпочтительно, 2 мМ. KCl может присутствовать в количестве 1-100 мМ, предпочтительно, 56 мМ.

Буфер может являться компонентом набора по настоящему изобретению.

Таким образом, в одном из аспектов изобретение предоставляет композицию, содержащую:

- a) кластридиальный нейротоксин и
- b) буфер, содержащий GDNF, проницаемый для клеток циклический аденозинмонофосфат (сAMP), CaCl<sub>2</sub> и KCl.

В одном из вариантов осуществления композиция содержит GDNF, присутствующий в концентрации 1-100 нг/мл, d-cAMP, присутствующий в концентрации 0,1-5 мМ, CaCl<sub>2</sub>, присутствующий в концентрации 0,1-7 мМ, и KCl, присутствующий в концентрации 1-100 мМ. Предпочтительно, буфер содержит GDNF в концентрации 10 нг/мл, d-cAMP в концентрации 1 мМ, CaCl<sub>2</sub> в концентрации 2 мМ и KCl в концентрации 56 мМ.

Ссылка в настоящем описании на "сAMP", предпочтительно, является взаимозаменяемой с d-cAMP.

Композиция может содержать менее 1500 нМ кластридиального нейротоксина. В одном из вариантов осуществления композиция содержит менее 1000 нМ, например, менее 500, 250 или 100 нМ кластридиального нейротоксина. В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать, по меньшей мере 1 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 20 нМ или 50 нМ кластридиального нейротоксина. В одном из вариантов осуществления композиция содержит 1-1000 нМ кластридиального нейротоксина, например, 1-500 нМ или 1-200 нМ кластридиального нейротоксина. Предпочтительно, композиция содержит кластридиальный нейротоксин в концентрации менее 100 нМ, предпочтительно, менее 50 нМ, более предпочтительно, 5-15 нМ (например, ~10 нМ).

В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит клетки, такие как нейронные клетки человека, описанные в настоящем описании.

Клетки можно инкубировать с кластридиальным нейротоксином в течение любого подходящего времени. В одном из вариантов осуществления клетки можно инкубировать с кластридиальным нейротоксином в течение, по меньшей мере, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 или 70 ч. В других вариантах осуществления клетки можно инкубировать с кластридиальным нейротоксином в течение менее 100, 80, 70, 60 или 50 ч. Предпочтительно, клетки инкубируют с кластридиальным нейротоксином менее 72 ч, более предпочтительно, менее 50 ч. Таким образом, клетки можно инкубировать с кластридиальным нейротоксином в течение 20-60 ч, предпочтительно, 40-55 ч (например, около 48 ч). Предпочтительно, нейронные клетки человека по настоящему изобретению являются высокочувствительными к кластридиальному нейротоксину, что обеспечивает короткие периоды инкубации с кластридиальным нейротоксином, составляющие менее 72 ч (~48 ч), и, таким образом, сокращает время, необходимое для проведения анализа.

Клетки можно инкубировать с кластридиальным нейротоксином при любой подходящей температуре. В одном из вариантов осуществления клетки инкубируют с кластридиальным нейротоксином при 30-40°C, предпочтительно 37°C.

Ген-мишень или агент, идентифицированный посредством способа по настоящему изобретению, можно использовать в способе лечения расстройства. Таким образом, в одном из аспектов изобретение предоставляет способ лечения расстройства, включающий введение субъекту агента, идентифицированного посредством способа по изобретению. В другом аспекте изобретение предоставляет способ лечения расстройства, включающий изменение экспрессии гена у субъекта, при этом ген был идентифицирован посредством способа по изобретению.

В одном из аспектов изобретение предоставляет набор, содержащий: клетку согласно изобретению; и, необязательно, инструкции по ее применению (например, в способе, описанном в настоящем описании). В родственном аспекте изобретение предоставляет набор, содержащий нуклеотидную последовательность согласно изобретению; и, необязательно, инструкции по ее применению (например, в способе, описанном в настоящем описании). В родственном аспекте изобретение предоставляет набор, содержащий вектор согласно изобретению; и, необязательно, инструкции по его применению (например, в способе, описанном в настоящем описании). В одном из вариантов осуществления набор содержит клетку (предпочтительно, клетку, идентичную типу клеток по настоящему изобретению, но не содержащую нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению и не экспрессирующую полипептид по настоящему изобретению), нуклеотидную последовательность или вектор по настоящему изобретению и, необязательно, инструкции по их применению (например, в способе, описанном в настоящем описании). Указанные наборы могут содержать один или более отдельных контейнеров, каждый из которых содержит указанный компонент набора.

Настоящее изобретение является подходящими для применения ко многим различным разновидностям клостридиального нейротоксина. Таким образом, в контексте настоящего изобретения термин "кlostридиальный нейротоксин" охватывает токсины, продуцируемые *C. Botulinum* (серотипы ботулинического нейротоксина А, В, СI, D, E, F, G, H и X), *C. Tetani* (столбнячный нейротоксин), *C. Butyricum* (ботулинический нейротоксин серотипа E) и *C. Varatii* (ботулинический нейротоксин серотипа F), а также модифицированные клостридиальные нейротоксины или производные, полученные из любого из вышеперечисленных нейротоксинов. Термин "кlostридиальный нейротоксин" также охватывает ботулинический нейротоксин серотипа H.

Ботулинический нейротоксин (BoNT) продуцируется *C. Botulinum* в форме большого белкового комплекса, состоящего из самого BoNT, соединенного с рядом дополнительных белков. В настоящее время существует девять различных классов ботулинических нейротоксинов, а именно: серотипы ботулинического нейротоксина А, В, СI, D, E, F, G, H и X, которые имеют схожие структуры и механизмы действия. Различные серотипы BoNT можно различить на основе инактивации специфическими нейтрализующими антисыворотками, при этом такая классификация по серотипу коррелирует с процентной идентичностью последовательностей на аминокислотном уровне. Белки BoNT заданного серотипа далее разделяют на разные подтипы на основе процента идентичности аминокислотных последовательностей.

BoNT абсорбируются в желудочно-кишечном тракте и, попадая в общий кровоток, связываются с пресинаптической мембраной холинергических нервных окончаний и предотвращают высвобождение их нейромедиатора ацетилхолина.

Столбнячный токсин продуцируется в единственном серотипе *C. tetani*. *C. Butyricum* продуцирует BoNT/E, а *C. Varatii* продуцирует BoNT/F.

Термин "кlostридиальный нейротоксин" также предназначен для охвата модифицированных клостридиальных нейротоксинов и их производных, включая, но не ограничиваясь ими, описанные ниже. Модифицированный клостридиальный нейротоксин или его производная может содержать одну или более аминокислот, которые были модифицированы по сравнению с нативной (немодифицированной) формой клостридиального нейротоксина, или могут содержать одну или более вставленных аминокислот, которые отсутствуют в нативной (немодифицированной) форме клостридиального нейротоксина. Например, модифицированный клостридиальный нейротоксин может иметь модифицированные аминокислотные последовательности в одном или более доменах относительно нативной (немодифицированной) последовательности клостридиального нейротоксина. Такие модификации могут изменять функциональные аспекты токсина, например, биологическую активность или персистенцию. Таким образом, в одном из вариантов осуществления клостридиальный нейротоксин по изобретению представляет собой модифицированный клостридиальный нейротоксин, или модифицированную производную клостридиального нейротоксина, или производную клостридиального нейротоксина.

Модифицированный клостридиальный нейротоксин может иметь одну или более модификаций в аминокислотной последовательности тяжелой цепи (например, модифицированный домен H<sub>C</sub>), при этом указанная модифицированная тяжелая цепь связывается с нервными клетками-мишенями с более высокой или более низкой аффинностью, чем нативный (немодифицированный) клостридиальный нейротоксин. Такие модификации в домене H<sub>C</sub> могут включать модифицирующие остатки в сайте связывания ганглиозидов домена H<sub>C</sub> или в сайте связывания белка (SV2 или синаптоагмин), которые изменяют связывание с рецептором ганглиозида и/или рецептором белка нервной клетки-мишени. Примеры таких модифицированных клостридиальных нейротоксинов описаны в WO 2006/027207 и WO 2006/114308, которые включены в настоящее описание во всей их полноте посредством ссылки.

Модифицированный клостридиальный нейротоксин может иметь одну или более модификаций в аминокислотной последовательности легкой цепи, например, модификации в связывающем субстрате или каталитическом домене, которые могут изменять или модифицировать специфичность SNARE-белка модифицированной L-цепи. Примеры таких модифицированных клостридиальных нейротоксинов описаны в WO 2010/120766 и US 2011/0318385, которые включены в настоящее описание во всей их полноте посредством ссылки.

Модифицированный клостридиальный нейротоксин может содержать одну или более модификаций, которые повышают или понижают биологическую активность и/или биологическую персистенцию модифицированного клостридиального нейротоксина. Например, модифицированный клостридиальный нейротоксин может содержать мотив на основе лейцина или тирозина, при этом указанный мотив повышает или понижает биологическую активность и/или биологическую персистенцию модифицированного клостридиального нейротоксина. Подходящие мотивы на основе лейцина включают xDxxxLL (SEQ ID NO: 22), xExxxLL (SEQ ID NO: 23), xExxxIL (SEQ ID NO: 24) и xExxxLM (SEQ ID NO: 25) (где x представляет собой произвольную аминокислоту). Подходящие мотивы на основе тирозина включают Yxx-Hu (SEQ ID NO: 26) (где Hu представляет собой гидрофобную аминокислоту). Примеры модифицированных клостридиальных нейротоксинов, содержащих мотивы на основе лейцина и тирозина, описаны в WO 2002/08268, которая включена в настоящее описание во всей ее полноте посредством ссылки.

Термин "кlostридиальный нейротоксин" охватывает гибридные и химерные клостридиальные нейротоксины. Гибридный клостридиальный нейротоксин содержит, по меньшей мере, часть легкой цепи

одного клостридиального нейротоксина или его подтипа и, по меньшей мере, часть тяжелой цепи другого клостридиального нейротоксина или клостридиального нейротоксина другого подтипа. В одном из вариантов гибридный клостридиальный нейротоксин может содержать всю легкую цепь легкой цепи одного подтипа клостридиального нейротоксина и тяжелую цепь другого подтипа клостридиального нейротоксина. В другом варианте осуществления химерный клостридиальный нейротоксин может содержать часть (например, связывающий домен) тяжелой цепи одного подтипа клостридиального нейротоксина, при этом другая часть тяжелой цепи принадлежит другому подтипу клостридиального нейротоксина. Аналогично или альтернативно, терапевтический элемент может содержать части легкой цепи из различных клостридиальных нейротоксинов. Такие гибридные или химерные клостридиальные нейротоксины являются полезными, например, в качестве средства доставки терапевтических преимуществ таких клостридиальных нейротоксинов пациентам, которые являются иммунологически устойчивыми к данному подтипу клостридиальных нейротоксинов, пациентам, которые могут иметь концентрацию рецепторов к заданному домену связывания тяжелой цепи клостридиального нейротоксина ниже среднего уровня, или пациентам, которые могут иметь устойчивый к протеазе вариант мембранного или везикулярного токсинного субстрата (например, SNAP-25, VAMP и синтаксин). Гибридные и химерные клостридиальные нейротоксины описаны в патенте США 8071110, публикация которого включена в настоящий документ посредством ссылки во всей ее полноте. Таким образом, в одном из вариантов осуществления клостридиальный нейротоксин по изобретению представляет собой гибридный клостридиальный нейротоксин или химерный клостридиальный нейротоксин.

Термин "клостридиальный нейротоксин" может также охватывать недавно обнаруженные члены семейства белков ботулинического нейротоксина, экспрессируемые неклостридиальными микроорганизмами, такие как кодируемый энтерококком токсин, который имеет наибольшую идентичность последовательности с BoNT/X, кодируемый *Weissella oryzae* токсин, называемый BoNT/Wo (NCBI Ref Seq: WP\_027699549.1), который расщепляет VAMP2 на W89-W90, кодируемый *Enterococcus faecium* токсин (GenBank: OT022244.1), который расщепляет VAMP2 и SNAP-25, кодируемый *Chryseobacterium pipego* токсин (NCBI Ref Seq: WP\_034687872.1).

В предпочтительном варианте осуществления клостридиальный нейротоксин представляет собой ботулинический нейротоксин, более предпочтительно, BoNT/A.

В одном из вариантов осуществления клостридиальный нейротоксин может представлять собой BoNT/A. Референсная последовательность BoNT/A представлена как SEQ ID NO: 13.

В другом варианте осуществления клостридиальный нейротоксин может представлять собой BoNT/B. Референсная последовательность BoNT/B представлена как SEQ ID NO: 14.

В другом варианте осуществления клостридиальный нейротоксин может представлять собой BoNT/C. Референсная последовательность BoNT/C представлена как SEQ ID NO: 15.

В другом варианте осуществления клостридиальный нейротоксин может представлять собой BoNT/D. Референсная последовательность BoNT/D представлена как SEQ ID NO: 16.

В другом варианте осуществления клостридиальный нейротоксин может представлять собой BoNT/E. Референсная последовательность BoNT/E представлена как SEQ ID NO: 17.

В другом варианте осуществления клостридиальный нейротоксин может представлять собой BoNT/F. Референсная последовательность BoNT/F представлена как SEQ ID NO: 18.

В другом варианте осуществления клостридиальный нейротоксин может представлять собой BoNT/G. Референсная последовательность BoNT/G представлена как SEQ ID NO: 19.

В одном из вариантов осуществления клостридиальный нейротоксин может представлять собой BoNT/X. Референсная последовательность BoNT/X представлена как SEQ ID NO: 20.

В другом варианте осуществления клостридиальный нейротоксин может представлять собой TeNT. Референсная последовательность TeNT представлена как SEQ ID NO: 21.

Варианты осуществления, относящиеся к различным способам изобретения, в равной степени предназначены для применения к другим способам, клеткам, полипептидам, нуклеотидным последовательностям, наборам и композициям согласно изобретению, и наоборот.

#### **Гомология последовательности**

Для определения процента идентичности можно применить любой из множества методов выравнивания последовательностей, включая, без ограничения, методы глобального выравнивания, методы локального выравнивания и гибридные методы, такие как, например, методы сегментного подхода. Протоколы для определения процента идентичности являются обычными процедурами в пределах компетенции специалиста в данной области техники. Методы глобального выравнивания выравнивают последовательности от начала до конца молекулы и определяют наилучшее выравнивание посредством сложения оценок отдельных пар остатков и применения штрафов за пропуски. Неограничивающие методы включают, например, Clustal W., см., например, Julie D. Thompson и соавт., Clustal W.: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22(22) Nucleic Acids Research 4673-4680 (1994); и итеративное уточнение, см., например, Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein. Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) J. Mol. Biol. 823-838 (1996). Методы локального выравнивания выравнивают последовательности посредством

идентификации одного или более консервативных мотивов, являющихся общими для всех входных последовательностей. Неограничивающие методы включают, например, Match-box, см., например, Eric Depiereux and Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) CABIOS 501-509 (1992); выборка Гиббса, см., например, C.E. Lawrence и соавт., Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262 (5131) Science 208-214 (1993); Align-M., см., например, Ivo Van Walle и соавт., Align-M. - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9) Bioinformatics: 1428-1435 (2004).

Таким образом, процент идентичности последовательностей определяется обычными методами; см., например, Altschul и соавт., Bull. Math. Bio. 48: 603-16, 1986 и Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-19, 1992. Вкратце, две аминокислотные последовательности выравниваются для оптимизации оценок выравнивания с применением штрафа за открытие пропуска, равного 10, штрафа за удлинение пропуска, равного 1, и матрицы замен "blosum 62" Хеникофф и Хеникофф (там же), как показано ниже (аминокислоты обозначены стандартными однобуквенными кодами).

"Процент идентичности последовательностей" между двумя или более последовательностями нуклеиновых кислот или аминокислот является функцией количества идентичных позиций, общих для последовательностей. Таким образом, % идентичности можно рассчитать как количество идентичных нуклеотидов/аминокислот, деленное на общее количество нуклеотидов/аминокислот, и затем умноженное на 100. При расчете % идентичности последовательности также можно учитывать количество пропусков и длину каждого пропуска, которые необходимо ввести для оптимизации выравнивания двух или более последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя или более последовательностями можно проводить с использованием определенных математических алгоритмов, таких как BLAST, которые будут знакомы специалисту в данной области техники.

#### Оценки выравнивания для определения идентичности последовательностей

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

Затем процент идентичности рассчитывают как:  

$$\frac{\text{Общее количество совпадающих символов}}{\text{длина более длинной последовательности} + \text{плюс количество пропусков, внесенных в более длинную последовательность для выравнивания двух последовательностей}} \times 100$$

По существу гомологичные полипептиды характеризуются наличием одной или более аминокислотных замен, делеций или вставок. Эти изменения, предпочтительно, носят незначительный характер, то есть, являются консервативными аминокислотными заменами (см. ниже) и другими заменами, которые существенно не влияют на сворачивание или активность полипептида; небольшие делеции, обычно от одной до около 30 аминокислот; и небольшие удлинения на амино- или карбоксильном конце, такие как аминоконцевой остаток метионина, небольшой линкерный пептид длиной вплоть до около 20-25 остатков, или аффинная метка.

### Консервативные аминокислотные замены

Основные:

аргинин,  
лизин,  
гистидин.

Кислотные:

глутаминовая кислота,  
аспарагиновая кислота.

Полярные:

глутамин,  
аспарагин.

Гидрофобные:

лейцин,  
изолейцин,  
валин.

Ароматические:

фенилаланин,  
триптофан,  
тирозин.

Малые:

глицин,  
аланин,  
серин,  
треонин,  
метионин.

Помимо 20 стандартных аминокислот, нестандартные аминокислоты (такие как 4-гидроксипролин, 6-N-метиллизин, 2-аминоизомаляновая кислота, изовалин и  $\alpha$ -метилсерин) могут заменять аминокислотные остатки в полипептидах по настоящему изобретению. Ограниченное количество неконсервативных аминокислот, аминокислот, которые не кодируются генетическим кодом, и неприродных аминокислот могут замещать аминокислотные остатки полипептида. Полипептиды по настоящему изобретению могут также содержать не встречающиеся в природе аминокислотные остатки.

Не встречающиеся в природе аминокислоты включают, без ограничения, транс-3-метилпролин, 2,4-метанопролин, цис-4-гидроксипролин, транс-4-гидроксипролин, N-метилглицин, аллотреонин, метилтреонин, гидроксипролин, гидроксипролин, N-метилглицин, аллотреонин, метилтреонин, гидроксипролин, гидроксипролин, нитроглутамин, гомоглутамин, пипеколин, пипеколин, трет-лейцин, норвалин, 2-азафенилаланин, 3-азафенилаланин, 4-азафенилаланин и 4-фторфенилаланин. В данной области техники известно несколько способов включения не встречающихся в природе аминокислотных остатков в белки. Например, можно использовать систему *in vitro*, в которой нонсенс-мутации подавляются с использованием химически аминокислотированных супрессорных тРНК. Способы синтеза аминокислот и аминокислотирования тРНК известны в данной области техники. Транскрипция и трансляция плазмид, содержащих нонсенс-мутации, осуществляется в бесклеточной системе, содержащей экстракт *E. coli* S30 и коммерчески доступные ферменты, и другие реагенты. Белки очищают посредством хроматографии; см., например, Robertson и соавт., *J. Am. Chem. Soc.* 113: 2722, 1991; Ellman и соавт., *Methods Enzymol.* 202: 301, 1991; Chung и соавт., *Science* 259: 806-9, 1993 и Chung и соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10145-9, 1993). Во втором способе трансляция осуществляется в ооцитах *Xenopus* путем микроинъекции мутированной мРНК и химически аминокислотированных супрессорных тРНК (Turcatti и соавт., *J. Biol. Chem.* 271: 19991-8, 1996). В рамках третьего способа клетки *E. coli* культивируют в отсутствие естественной аминокислоты, которую необходимо заменить (например, фенилаланин), и в присутствии желаемой не встречающейся в природе аминокислоты (аминокислот) (например, 2-азафенилаланин, 3-азафенилаланин, 4-азафенилаланин или 4-фторфенилаланин). Не встречающаяся в природе аминокислота встраивается в полипептид вместо своего природного аналога; см. Koide и соавт., *Biochem.* 33: 7470-6, 1994. Встречающиеся в природе аминокислотные остатки могут быть преобразованы в не встречающиеся в природе виды путем химической модификации *in vitro*. Химическая модификация может быть объединена с сайт-направленным мутагенезом для дальнейшего расширения диапазона замен (Wynn and Richards, *Protein Sci.* 2: 395-403, 1993).

Ограниченное количество неконсервативных аминокислот, аминокислот, которые не кодируются генетическим кодом, не встречающихся в природе аминокислот и неприродных аминокислот, могут заменять собой аминокислотные остатки полипептидов по настоящему изобретению.

Незаменимые аминокислоты в полипептидах по настоящему изобретению можно идентифицировать в соответствии с процедурами, известными в данной области техники, такими как сайт-направленный мутагенез или мутагенез с аланиновым сканированием (Cunningham and Wells, *Science* 244: 1081-5, 1989). Сайты биологического взаимодействия также могут быть определены с помощью физического анализа структуры, в соответствии с определенным посредством таких методик, как ядерный

магнитный резонанс, кристаллография, электронная дифракция или фотоаффинное мечение, в сочетании с мутацией предполагаемых аминокислот сайта контакта; см., например, de Vos и соавт., *Science* 255: 306-12, 1992; Smith и соавт., *J. Mol. Биол.* 224: 899-904, 1992; Wlodaver и соавт., *FEBS Lett.* 309: 59-64, 1992. Идентичность незаменимых аминокислот также может быть выведена из анализа гомологий с родственными компонентами (например, транслокационными или протеазными компонентами) полипептидов по настоящему изобретению.

Множественные аминокислотные замены могут быть произведены и протестированы с применением известных способов мутагенеза и скрининга, таких как раскрытые Reidhaar-Olson и Sauer (*Science* 241: 53-7, 1988) или Bowie и Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-6, 1989). Вкратце, эти авторы раскрывают способы одновременной рандомизации двух или более положений в полипептиде, отбора функционального полипептида и последующего секвенирования мутагенизированных полипептидов для определения спектра допустимых замен в каждом положении. Другие способы, которые можно применять, включают фаговый дисплей (например, Lowman и соавт., *Biochem.* 30: 10832-7, 1991; Ladner и соавт., патент США № 5223409; Huse, публикация WIPO WO 92/06204) и регион-направленный мутагенез (Derbyshire и соавт., *Gene* 46: 145, 1986; Neg и соавт., *DNA* 7: 127, 1988).

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее раскрытие. Синглтон и соавт., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994), and Hale & Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY*, Harper Perennial, NY (1991), предоставляют общий словарь многих терминов, используемых в данном раскрытии, для квалифицированных специалистов.

Настоящее раскрытие не ограничивается типовыми способами и материалами, раскрытыми в настоящем описании, и любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем описании, могут применяться на практике или при тестировании вариантов осуществления настоящего раскрытия. Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, любые последовательности нуклеиновых кислот записываются слева направо в ориентации от 5' к 3'; аминокислотные последовательности написаны слева направо в ориентации от amino к карбокси, соответственно.

Заголовки, представленные в настоящем описании, не являются ограничениями различных аспектов или вариантов осуществления настоящего раскрытия.

В настоящем описании аминокислоты указываются с использованием названия аминокислоты, трехбуквенного сокращения или однобуквенного сокращения. Используемый в настоящем описании термин "белок" включает белки, полипептиды и пептиды. Используемый в настоящем описании термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "полипептид" и/или термина "белок". В некоторых случаях, термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "пептид". В некоторых случаях термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "фермент". Термины "белок" и "полипептид" используются в настоящем описании взаимозаменяемо. В настоящем раскрытии и формуле изобретения могут использоваться обычные однобуквенные и трехбуквенные коды для аминокислотных остатков. Трехбуквенный код для аминокислот определен в соответствии с Совместной комиссией IUPACIUB по биохимической номенклатуре (JCBN). Также следует понимать, что полипептид может кодироваться более чем одной нуклеотидной последовательностью вследствие вырожденности генетического кода.

В описании могут встречаться и другие определения терминов. Прежде чем типовые варианты осуществления будут описаны более подробно, следует понимать, что настоящее раскрытие не ограничивается конкретными описанными вариантами осуществления, и, следовательно, может варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем описании терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего раскрытия будет определяться только прилагаемой формулой изобретения.

Если предоставляется диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение, вплоть до одной десятой единицы нижнего предела, если контекст явно не диктует иное, между верхним и нижним пределами этого диапазона также конкретно раскрывается. Каждый меньший по размеру диапазон между любым заявленным значением или промежуточным значением в указанном диапазоне и любым другим заявленным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне охвачен настоящим раскрытием. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут независимо включаться или исключаться из диапазона, и каждый диапазон, в котором любой, ни один, либо оба предела включены в меньшие диапазоны, также охватывается настоящим раскрытием, с учетом любого специально исключенного предела в заявленном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включены в настоящее раскрытие.

Следует отметить, что используемые в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не диктует иное. Таким образом, например, ссылка на "некоторый кластридальный нейротоксин" включает множе-

ство таких кандидатов-агентов, а ссылка на "указанный клостридиальный нейротоксин" включает ссылку на один или более клостридиальных нейротоксинов и их эквивалентов, известных специалистам в данной области техники, и так далее.

Обсуждаемые в настоящем описании публикации предназначены исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в настоящем описании не должно толковаться как признание того, что такие публикации составляют предшествующий уровень техники по отношению к прилагаемой формуле изобретения.

### Краткое описание чертежей

Варианты осуществления изобретения теперь будут описаны только в качестве примера со ссылкой на следующие фигуры и примеры.

На фиг. 1 показан способ создания ReNcell VM, стабильно эспрессирующей TagRFPT-SNAP25-TagGFP. Изображения (внизу) показывают красную флуоресценцию (справа) и зеленую флуоресценцию (справа).

На фиг. 2 показан BoNT/A-индуцированный распад C-концевого фрагмента конструкции. Клетки ReD SNAPR дифференцировались в течение 14 дней без факторов роста, затем к клеткам добавляли 100 нМ BoNT/A и подвергали интоксикации в течение 48 ч. (A) Клетки были визуализированы с использованием флуоресцентной микроскопии, и соответствующие объединенные каналы GFP, RFP и GFP/RFP показаны на фигуре. (B) Лизаты подвергали SDS-PAGE для вестерн-блоттинга. Для вестерн-блоттинга использовали кроличьи антитела против tagRFPT и tagGFP.

На фиг. 3 показана диаграмма, обобщающая распад конструкции под действием BoNT/A.

На фиг. 4 показано, что буфер повышенной дифференцировки и стимуляции сенсibilизировал клетки ReD SNAPR к BoNT/A. (A) Клетки ReD SNAPR подвергались воздействию среды для дифференцировки ReNcell с добавлением и без GDNF и d-cAMP во время дифференцировки и буфера с высоким содержанием калия во время интоксикации. Полученная в результате модифицированная среда известна как среда ReDS (усиленная дифференцировка и стимуляция ReNcell). Потеря флуоресценции tagGFP при расщеплении конструкции SNAP25 с двойной меткой наблюдалась в зависимости от дозы. Клетки ReD SNAPR в среде ReDS проявляли повышенную чувствительность к BoNT/A по сравнению с нормальной средой ReNcell, что обнаружено с помощью конфокальной микроскопии. (B) Количественная оценка BoNT/A-опосредованного расщепления при обоих условиях показала, что EC<sub>50</sub> улучшилось с 43 до 6 нМ в ReD SNAPR, подвергнутых воздействию среды ReDS. (C) Вестерн-блоттинг обнаружил BoNT/A-опосредованное расщепление конструкции SNAP25 в клетках ReD SNAPR в нормальной среде и среде ReDS. Верхний блот показывает клеточные лизаты, зондированные антителом tRFP, а нижний блот - зондированные антителом tGFP.

На фиг. 5 показана siRNA против TrxR, предотвращающая BoNT/A-опосредованное расщепление конструкции. Показаны графики уровней нокдауна TrxR1 и расщепления конструкции. Верхняя панель (ReD SNAPR) показывает зеленую и красную флуоресценцию (siNT3, -BoNT/A), только красную флуоресценцию (siNR3, + BoNT/A), зеленую и красную флуоресценцию (siTrxR, -BoNT/A), а также зеленую и красную флуоресценцию (siTrxR, +BoNT/A). На нижней панели показано окрашивание на TrxR1 в присутствии siNT3 (для условий как -BoNT/A, так и +BoNT/A) и отсутствии окрашивания на TrxR1 в присутствии siTrxR (для условий как -BoNT/A, так и для +BoNT/A).

На фиг. 6 показано, что интоксикация BoNT/A предотвращает перенос SV2 на поверхность клетки. (A) Клетки ReNcell VM обрабатывали siNT3, siVAMP2 и siTrxR1 в течение 72 ч перед добавлением BoNT/A. Клетки фиксировали и окрашивали первичным антителом против SV2A (без пермеабиллизации). Против первичного антитела использовали вторичное антитело Alexa-488. (B) Иллюстрация BoNT/A-опосредованного снижения доставки SV2 на поверхность клетки.

На фиг. 7 представлена схема проведения полногеномного скрининга мiPHK с применением клеточной линии по настоящему изобретению.

### Список последовательностей

Если исходный аминокислотный остаток Met или соответствующий начальный кодон указан в любой из следующих SEQ ID NO, то указанный остаток/кодон может являться необязательным.

SEQ ID NO: 1 (нуклеотидная последовательность конструкции TagRFPT-SNAP25-

TagGFP)

```
ATGGTGTCTAAGGGCGAAGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGT
ACATGGAGGGCACCGTGAACAACCACCACCTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGC
AAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCATGAGAATCAAGGTGGTTCGAGGGCGGCCCTCT
CCCCCTCGCCTTCGACATCCTGGCTACCAGCTTCATGTACGGCAGCAGAACCTTCAT
CAACCACACCCAGGGCATCCCCGACTTCTTAAAGCAGTCTTCCCTGAGGGCTTCAC
ATGGGAGAGAGTCAACACATACGAAGACGGGGCGTGTGACCGCTACCCAGGACA
CCAGCCTCCAGGACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAACCTC
CCATCCAACGGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACTCGGCTGGGAGGCCAACCCGA
GATGCTGTACCCGCTGACGGCGCCCTGGAAGGCAGAACCACATGGCCCTGAAGC
```

TCGTGGGCGGGGGCCACCTGATCTGCAACTTCAAGACCACATACAGATCCAAGAAA  
 CCCGCTAAGAACCTCAAGATGCCCGGCGTCTACTATGTGGACCACAGACTGGAAAG  
 AATCAAGGAGGCCGACAAAGAGACCTACGTCGAGCAGCAGAGGTGGCTGTGGCC  
 AGATACTGCGACCTCCCTAGCAAACCTGGGGCACAACTTAATGGCATGGACGAGCT  
 GTACAAGGGCTCGGGCTCGGGCTCGGGCGTGGCCGAAGACGCAGACATGCGCAATG  
 AGCTGGAGGAGATGCAGCGAAGGGCTGACCAGTTGGCTGATGAGTCGCTGGAAAGC  
 ACCCGTCGTATGCTGCAACTGTTGAAGAGAGTAAAGATGCTGGTATCAGGACTTTG  
 GTTATGTTGGATGAACAAGGAGAACAACCTCGATCGTGTGGAAGAAGGCATGAACCA  
 TATCAACCAAGACATGAAGGAGGCTGAGAAAAATTTAAAAGATTTAGGGAAATGCT  
 GTGGCCTTTTCATATGTCCTTGTAAACAAGCTTAAATCAAGTGATGCTTACAAAAAAG  
 CCTGGGGCAATAATCAGGACGGAGTGGTGGCCAGCCAGCCTGCTCGTGTAGTGGAC  
 GAACGGGAGCAGATGGCCATCAGTGGCGGCTTCATCCGCAGGGTAACAAATGATGC  
 CCGAGAAAATGAAATGGATGAAAACCTAGAGCAGGTGAGCGGCATCATCGGGAAC  
 CTCCGTACATGGCCCTGGATATGGGCAATGAGATCGATACACAGAATCGCCAGAT  
 CGACAGGATCATGGAGAAGGCTGATTCCAACAAAACCAGAATTGATGAGGCCAACC  
 AACGTGCAACAAAGATGCTGGGAAGTGGTTACGGCGGCTCGGGCTCGGGCGTGAGC  
 GGGGGCGAGGAGCTGTTCCGCCGCATCGTGCCCGTGTGATCGAGCTGGACGGCGA  
 CGTGCACGGCCACAAGTTCAGCGTGCAGCGGCGAGGGCGAGGGCGACGCCACTACG  
 GCAAGCTGGAGATCAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCC  
 ACCCTGGTGACCACCCTCTGCTACGGCATCCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGAGCAC  
 ATGAAGATGAACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCGAGGGCTACATCCAGGAGCG  
 CACCATCCAGTTCAGGACGACGGCAAGTACAAGACCCGCGGCGAGGTGAAGTTCC  
 AGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCAAGGACTTCAAGGAGGA  
 CGGCAACATCCTGGGCCACAAGCTGGAGTACAGCTTCAACAGCCACAACGTGTACA  
 TCCGCCCGACAAGGCCAACAACGGCCTGGAGGCTAACTTCAAGACCCGCCACAAC  
 ATCGAGGGCGGCGGCTGCAGCTGGCCGACCACTACCAGACCAACGTGCCCTGGG  
 CGACGGCCCCGTGTGATCCCCATCAACCACTACCTGAGCACTCAGACCAAGATCA  
 GCAAGGACCGCAACGAGGCCGCGACCACATGGTGCTCCTGGAGTCCTTCAGCGCC  
 TGCTGCCACACCCACGGCATGGACGAGCTGTACAGGTAA

SEQ ID NO: 2 (полипептидная последовательность конструкции TagRFPT-SNAP25-  
 TagGFP)

MVSKGEELIKENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVVEG  
 GPLPFAFDILATSFMYGSRTFINHTQGIPDFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTS  
 LQDGLIYNVKIRGVNFPSPNGPVMQKKTGLWEANTEMLYPADGGLEGRDMLKLVG  
 GGHLICNFKTTYRSKKPAKNLKMPPGVVYVDHRLRIKEADKETYVEQHEVA VARYCDL  
 PSKLGHLKLNMDELYKGS GSGVAEDADM RNELEEMQRRADQLADESLESTRMLQ  
 LVEESKDAGIRTLVMLDEQGEQLDRVEEGMNHINQDMKEAEKNLKD LGKCCGLFICPC  
 NKLKSSDAYKKA WGNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRV TNDARENEMDEN  
 LEQVSGIIGNLRH MALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANQRATKMLGSGYG  
 GSGSGVSGEELFAGIVPVLIELDGDVHGHKFSVRGEGEGDADY G KLEIKFICTTGKLPV

PWPTLVTTLCYGIQCFARYPEHMKMNDFFKSAMPEGYIQERTIQFQDDGKYKTRGEVK  
 FEGDTLVNRIELKGGKDFKEDGNILGHKLEYSFNHSHNVYIRPDKANNGLANFKTRHNIE  
 GGGVQLADHYQTNVPLGDGPVLIPINHLYLSTQTKISKDRNEARDHMLLESFSACCHTH  
 GMDELYR\*

SEQ ID NO: 3 (нуклеотидная последовательность TagRFPT)

ATGGTGTCTAAGGGCGAAGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGT  
 ACATGGAGGGCACCGTGAACAACCACCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGC  
 AAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCATGAGAATCAAGGTGGTCGAGGGCGGCCCTCT  
 CCCCTTCGCCTTCGACATCCTGGCTACCAGCTTCATGTACGGCAGCAGAACCTTCAT  
 CAACCACACCCAGGGCATCCCCGACTTCTTTAAGCAGTCCTCCCTGAGGGCTTCAC  
 ATGGGAGAGAGTCAACCACATACGAAGACGGGGCGTGTGACCGCTACCCAGGACA  
 CCAGCCTCCAGGACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAAGTTC  
 CCATCCAACGGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACTCGGCTGGGAGGCCAACCCGA  
 GATGCTGTACCCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGAACCGACATGGCCCTGAAGC  
 TCGTGGGCGGGGGCCACCTGATCTGCAACTTCAAGACCACATACAGATCCAAGAAA  
 CCCGCTAAGAACCTCAAGATGCCGGCGTCTACTATGTGGACCACAGACTGGAAAG  
 AATCAAGGAGGCCGACAAAGAGACCTACGTCGAGCAGCACGAGGTGGCTGTGGCC  
 AGATACTGCGACCTCCCTAGCAAACCTGGGGCACAACTTAATGGCATGGACGAGCT  
 GTACAAG

SEQ ID NO: 4 (полипептидная последовательность TagRFPT)

MVSKGEELIKENMHMKLYMEGTVNNHNFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVVEG  
 GPLPFAFDILATSFMYGSRTFINHTQGIPDFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTS  
 LQDGCLIYVVKIRGVNFPNGPVMQKKTGLWEANTEMLYPADGGLEGRTDMALKLVG  
 GGHLICNFKTTYRSKKPAKNLKMPGVYYVDHRLRIKEADKETYVEQHEVA VARYCDL  
 PSKLGHKLNGMDELYK

SEQ ID NO: 5 (нуклеотидная последовательность Glycine-Serine rich linker 1)

GGCTCGGGCTCGGGCTCGGGC

SEQ ID NO: 6 (полипептидная последовательность глицин-серин богатого линкера

1)

GSGSGSG

SEQ ID NO: 7 (нуклеотидная последовательность глицин-серин богатого линкера

2)

GGCGGCTCGGGCTCGGGC

SEQ ID NO: 8 (полипептидная последовательность глицин-серин богатого линкера

2)

GSGSGSG

SEQ ID NO: 9 (нуклеотидная последовательность SNAP25)

GTGGCCGAAGACGCAGACATGCGCAATGAGCTGGAGGAGATGCAGCGAAGG  
 GCTGACCAGTTGGCTGATGAGTCGCTGGAAAGCACCCGTCGTATGCTGCAACTGGTT  
 GAAGAGAGTAAAGATGCTGGTATCAGGACTTTGGTTATGTTGGATGAACAAGGAGA

ACAACTCGATCGTGTGCGAAGAAGGCATGAACCATATCAACCAAGACATGAAGGAGG  
 CTGAGAAAAATTTAAAAAGATTTAGGGAAATGCTGTGGCCTTTTCATATGTCTTGTA  
 ACAAGCTTAAATCAAGTGATGCTTACAAAAAGCCTGGGGCAATAATCAGGACGGA  
 GTGGTGGCCAGCCAGCCTGCTCGTGTAGTGGACGAACGGGAGCAGATGGCCATCAG  
 TGGCGGCTTCATCCGCAGGGTAACAAATGATGCCCGAGAAAATGAAATGGATGAAA  
 ACCTAGAGCAGGTGAGCGGCATCATCGGGAACCTCCGTCACATGGCCCTGGATATG  
 GGCAATGAGATCGATACACAGAATCGCCAGATCGACAGGATCATGGAGAAGGCTGA  
 TTCCAACAAAACCAGAATTGATGAGGCCAACCAACGTGCAACAAAGATGCTGGGAA  
 GTGGTTAC

SEQ ID NO: 10 (полипептидная последовательность SNAP25)

VAEDADMNRNELEEMQRRADQLADESLESTRRMLQLVEESKDAGIRTLVMLDEQ  
 GEQLDRVEEGMNHINQDMKEAEKNLKDGLKCCGLFICPCNKLKSSDAYKKAWGNNDQ  
 GVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTDARENEMDENLEQVSGIIGNLRHMALDMG  
 NEIDTQNRQIDRIMEKADSNTKTRIDEANQRATKMLGSGY

SEQ ID NO: 11 (нуклеотидная последовательность TagGFP)

GTGAGCGGGGGCGAGGAGCTGTTCGCCGGCATCGTCCCCGTGCTGATCGAGC  
 TGGACGGCGACGTGCACGGCCACAAGTTCAGCGTGCAGCGGGGAGGGCGAGGGCGA  
 CGCCGACTACGGCAAGCTGGAGATCAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCG  
 TGCCCTGGCCACCCTGGTGACCACCTCTGCTACGGCATCCAGTGCTTCGCCCGCT  
 ACCCCGAGCACATGAAGATGAACGACTTCTCAAGAGCGCCATGCCCGAGGGCTAC  
 ATCCAGGAGCGCACCATCCAGTTCAGGACGACGGCAAGTACAAGACCCGCGGCGA  
 GGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCAAGGACT  
 TCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGCCACAAGCTGGAGTACAGCTTCAACAGCCAC  
 AACGTGTACATCCGCCCGACAAGGCCAACAACGGCCTGGAGGCTAACTTCAAGAC  
 CCGCCACAACATCGAGGGCGGGCGGCGTGCAGCTGGCCGACCACTACCAGACCAACG  
 TGCCCTGGGCGACGGCCCCGTGCTGATCCCATCAACCACTACCTGAGCACTCAGA  
 CCAAGATCAGCAAGGACCGCAACGAGGCCCGCGACCACATGGTGTCTCCTGGAGTCC  
 TTCAGCGCCTGCTGCCACACCCACGGCATGGACGAGCTGTACAGGTAA

SEQ ID NO: 12 (полипептидная последовательность TagGFP)

VSGEELFAGIVPVLIELDGDVHGHKFSVRGEGEGDADYKLEIKFICTTGKLPV  
 PWPTLVTTLCYGIQCFARYPEHMKMNDFFKSAMPEGYIQUERTIQFQDDGKYKTRGEVK  
 FEGDTLVNRIELKKGDFKEDGNILGHKLEYSFNHNVYIRPDKANNGLANFKTRHNIE  
 GGGVQLADHYQTNVPLGDGPVLIPINHLYLSTQTKISKDRNEARDHMLLESFSACCHTH  
 GMDELYR\*

SEQ ID NO: 13 (BoNT/A - UniProt P10845)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIA YIKIPNVGQMOPVKAFAKIHNKIWWIPERDTFTNPEEGDL  
 N  
 PPPEAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNLYKGVTKLFEIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGG  
 STIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGY  
 GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAINPN

RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASLTNK  
 A  
 KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFK  
 V  
 LNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTTEINNMNFTKLNK  
 T  
 GLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEE  
 ITSDTNEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIERFPNG  
 KKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKVKNKAT  
 EA  
 AMFLGWVEQLVYDFDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSG  
 AVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVTQIDNALSQRNEKWDEVYKYIVTNWLAK  
 VNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKA  
 MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKD  
 K  
 VNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINI  
 GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNN  
 EYTIINCMENNSGWKVSLSNYGEIITWTLQDTQEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTIT  
 NNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIWIKYFNLFDKELN  
 EKEIKDLYDNQNSGILKDFWGDYLYDKPYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLK  
 GPR  
 GSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQ  
 A  
 GVEKILSALEIPDVGNSLQVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNIA  
 K  
 LVASNWYNRQIERSRRTLGCSEWEIFVDDGGERPL  
SEQ ID NO: 14 (BoNT/B - UniProt P10844)  
 MPVTINNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGGRYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKPEDFN  
 KSSGIFNRDVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLEMIINGIPYLG  
 DRRVPLEEFNTNIASVTVNKLISNPGEVERKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQNH  
 FASREGFGGIMQMKFCPEYVSFNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALILMHელიHVLHGL  
 Y  
 GIKVDDLPIVPNEKFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNFRGIV  
 DRLNKVLVCISDPNININIKNFKDKYKFVEDSEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGFTETN  
 IAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIEEGFNISDKDMEKEYRGQNKAINKQA  
 YEEISKEHLAVYKIQMCKSVKAPGICIDVDNEDLFFIADKNSFSDDLKNERIEYNTQSN  
 YIENDFPINELILDIDLISKIELPSENTESLTDFNVDPVYEQPAIKKIFTDENTIFQY  
 LYSQTFPLDIRDISLTSSFDDALLFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVND  
 FVIEANKSNTMDKIADISLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFEIAGASILLEFIPELLI  
 PVVGAFLESYIDNKNKIIKTIDNALTKRNEKWSDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGM

Y  
 KALNYQAQALEEIIKYRYNIYSEKEKSNINIDFNDINSKLNEGINQAIDNINNFINGCSV  
 SYLMKKMIPLAVEKLLDFDNTLLKKNLLNYIDENKLYLIGSAEYEKSKVNKYLKTIMPFD  
 L  
 SIYTNDTILIEFMFNKYNSEILNINILNRLRYKDNLLIDLSGYGAKVEVYDGVELNDKNQFK  
 LTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNNS  
 GWKISIRGNRIIWTLDINGKTKSVFFEYNIREISEYINRWFFVTITNNLNNAKIYING  
 KLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIERYKIQSY  
 SEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKSNIYKLLKDSVGEILTRSKYNQNSKYINYRD  
 LY  
 IGEKFIHRRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWVYTYKYFKKEEEKLFLAPISD  
 SDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFFKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCIS  
 KWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE  
SEQ ID NO: 15 (BoNT/C - UniProt P18640)  
 MPITINNFNYSVPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNPNLNK  
 PPRVTSKPGSYDPNYLSTDSKDPFLKEIKLFRINSREIGEELIYRLSTDIPFPGNN  
 NTPINTDFDFVDFNSVDVKTRQGNNWVKTGSINPSVIITGPRENIIDPETSTFKLTNNTF  
 AAQEGFGALSIIISPRFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILILMHELNHAMHNLG  
 IAIPNDQTISSVTSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKALDYYSI  
 AKRLNSITTANPSSFNKYIGEYKQKLIRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVELYNELTQIFTE  
 FNYAKIYNVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDNVYDIQNGFNIPKSNLNLVFMGQNLNRNP  
 A  
 LRKVNPNMMLYLFTKFKCHKAIDGRSLYNKTLDCRELLVKNTDLFIGDISDVKTDFLRK  
 DINEETEVIYYPDNVSDVQVILSKNTSEHGQLDLLYPSIDSESEILPGENQVFYDNRTQN  
 VDYLNSYYLESQKLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFPTLANKVNAGVQGGFLF  
 M  
 WANDVVEDFTTNILRKDTLDKISDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFTEAFAVTGVTILL  
 EAFPEFTIPALGAFVIYSKVQERNEIITIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGTWLSRIITQF  
 NNISYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNNI  
 N  
 KFIRESVTYLFFKNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNILLVGEVDKLLKAVNNSF  
 QNTIPFNIFSYTNNLLKDIINEYFNNINDSKILSLQNRKNTLVDTSGYNAEVSEEGDVQ  
 LNPIFPDFKLGSSGEDRGKVVIVTQENENIVYNSMYESFSISFWIRINKWVSNLPGYTIID  
 SVKNNSGWSIGIISNFLVFTLKQNEDEQSINFSYDISNAPGYNKWFFVTVTNNMMGN  
 M  
 KIYINGKLIDTIKVKELTGINFSKTITFEINKIPDTGLITSDSDNINMWIRDFYIFAKEL  
 DGKDINILFNSLQYTNVVKDYWGNDLRYNKEYYMVNIDYLNRYMYANSRQIVFNTRR  
 NNN  
 DFNEGYKIIKIRIGNTNDTRVRGGDILYFDMTINNKAYNLFMKNETMYADNHSTEDIY  
 A

IGLREQTKDINDNIIFQIQPMNNTYYYYASQIFKSNFNGENISGICSIGTYRFRLLGGDWYR  
 HNYLVPTVKQGNYSALLESTSTHWGFVPVSE

SEQ ID NO: 16 (BoNT/D - UniProt P19321)

MTWVPVKDFNYSDPVNDNDILYLRIPQNKLIITTPVKAFMITQNIWVIPERFSSDTNPSLSK  
 PPRPTSKYQSYDPSYSLSTDEQKDTFLKGIKLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDS  
 STPEDTFDFRHTTNI AVEKFENGSWKVTNIITPSVLIFGPLPNILDY TASLTLQGQQSN  
 PSFEGFGTLSILKVAPEFLLTFSDVTSNQSSAVLGKSIFCMDPVIALMHETHSLHQLYG  
 INIPSDKRIRPQVSEGFFSQDGPVQFEELYTFGGLDVEIIPQIERSQLREKALGHYKDI  
 AKRLNINIKTIPSSWISNIDKYKIFSEKYNFDKDNTGNFVFNIDKFNSLYSDLTNVMSE  
 VVYSSQYNVKNRTHYFSRHYPVFANILDDNIYTIRDGFNLTKGFNIENSGQNIERNPA  
 LQKLSSESVDLFTKVCLRLTKNSRDDSTCIKVKNNRPLPYVADKDSISQEIFENKIITDE  
 TNVQNYSDKFSLDESILDGQVPINPEIVDPLLPNVNMEPLNLPGEEIVFYDDITKYVDYL  
 NSYYYLESQKLSNNVENITLTSVEEALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKGVQAGLFLNWAN  
 E  
 VVEDFTTINIMKKTLDKISDVSVIIPYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLLEGFP  
 EFTIPALGVFTFYSSIQEREKIITIENTCLEQRVKRWKDSYQWMVSNWLSRITTQFNHIN  
 YQMYDSLQYQADAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNNINKFI  
 R  
 ECSVTYLFKNMPLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNIIIVGEVDRLKAKVNESFENTM  
 PFNIFSYTNNLLKDIINEYFNSINDSKILSLQNKKNALVDTSGYNAEVRVGDVNLQNTI  
 YTNDFKLSSSGDKIIVNLNNNILYSAIYENSSVFWIKISKDLTNSHNEYTIINSIEQNS  
 GWKLCIRNGNIEWILQDVNRKYKSLIFDYSELSHTGYTNKWFFVTITNNIMGYMKLYI  
 N  
 GELKQSQKIEDLDEVKLDKTIVFGIDENIDENQMLWIRDFNIFSKELSNEDINIVYEGQI  
 LRNVIKDYWGNPLKFDTEYYIINDNYIDRYIAPESNVLVLVQYPDRSKLYTGNPITIKSV  
 SDKNPYSRILNGDNIIHMLYNSRKYMIIRDTDIYATQGGECQNCVYALKLQSNLGN  
 YGIGIFSINKIVSKNKYCSQIFSSFRENTMLLADIYKPWRFSFKNAYTPVAVTNYETKLLS  
 TSSFWKFISRDPGWVE

SEQ ID NO: 17 (BoNT/E - UniProt Q00496)

MPKINSFNYPVNDRTILYIKPGGCQEFYKSFNIMKNIWIIPERNVIGTTPQDFHPPTS  
 LKNGDSSYYDPNYLQSDDEKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANPYLGNNDTP  
 DNQFHIGDASA VEIKFNSGSDILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISLRNNYMPNHRFGS  
 IAIVTFSPEYSFRFNDNCMNEFIQDPALTMHELIIHSLHGLYGAKGITTKYTITQKQNPL  
 ITNIRGTNIEEFLTFGGTDLNIITSAQSNDIYTLLADYKKIASKLSKVQVSNPLNPKYK  
 DVFEAKYGLDKDASGIYSVNINKFNDIFKLYSFTEFDLRTKFQVKCRQTYIGQYKYFKL  
 SNLLNDSIYNISEGYNINNLKVNFRGQANLNPRITPITGRGLVKKIIRFCNIVSVKG  
 IRKSICIEINNGELFFVASENSYNDDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLDQVILNFNSES  
 A PGLSDEKLNLTIQNDAYIPKYDSNGTSDIEQHVDVNELNVFFYLDAQKVPGENNVNLTSS  
 IDTALLEQPKIYTFSSSEFINNVNKPVQAALFVSWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIADIS  
 IVVPYIGLALNIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFEPELLIPTILVFTIKSFLGSSDNK

NKVIKAINNALKERDEKWKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNAIKTII  
E

SKYNSYTLLEKNELTNKYDIKQIENELNQKVSIAMNNIDRFLTESSISYLMKIINEVKIN  
KLREYDENVKTYLLNYIIQHGSILGESQQELNSMVTDTLNN SIPFKLSSYTDDKILISYF  
NKFFKRIKSSSVLNMRYKNDKYVDTSGYDSNININGDVYKYPTNKNQFGIYNDKLESEVN  
I

SQNDYIIYDNKYKNFSISFWVRIPNYDNKIVNVNNEYTIINC MRDNNSGWK VSLNHNEII  
WTFEDNRGINQKLA FN YGNANGISDYINKWIFVTITNDRLGDSKLYINGNLIDQKSILNL  
GNIHVSDNILFKIVNCSYTRYIGIRYFNIFDKELDETEIQTLYSNEPNTNILKDFWGNYL  
LYDKEYYLLNVLKPNNFIDRRKDSTLSINNIRSTILLANRLYSGIKVKIQRVNNSS TNDN  
LVRKNDQVYINFVASKTHLFLPLYADTATTNKEKTIKISSSGNRFNQVVMNSVGNCTM  
NF

KNNNGNIGLLGFKADTVVASTWYYTHMRDHTNSNGCFWNFISEEHGWQEK

SEQ ID NO: 18 (BoNT/F - UniProt A7GBG3)

MPVVINSFNNDPVNDDTILYMQIPYEEKSKKYYKAFEIMRNVWIIPERNITIGTDPDFD  
PPASLENGSSAYYDPNYLTDAEKDRYLKTTIKLFRINSNPAGEVLLQEISYAKPYLGN  
EHTPINEFHPVTRTTSVNIKSS TNV KSS IILNLLVLGAGPDIFENSSYPVRKLMDSGGVY  
DPSNDGFGSINIVTFSPEYEYTFNDISGGYNSSTESFIADPAISLAHELIALHGLYGAR  
GVTYKETIKVKQAPLMIAEKPIRLEEFLTFGGQDLNIITSAMKEKIYNNLLANYEKIATR  
LSRVNSAPPEYDINEYKDYFQWKYGLDKNADGSYTVNENKFNEIYKLYSFTEIDLANK  
F

KVKCRNTYFIKYGFLKVPNLLDDDIYTVSEGFNIGNLAVNNRGQNIKLNPKIIDSIPDKG  
LVEKIVKFKSVIPRKGTKAPRRLCIRVNNRELFVASESSYNENDINTPKIEDDTTNLN  
NNYRNNLDEVILDYNSETIPQISNQTNLTLVQDDSYPVRYDSNGTSEIEEHNVDLNVFF  
YLHAQKVPEGETNISLTSSIDTALSEESQVYTFSSSEFINTINKPVHAALFISWINQVIR  
DFTTEATQKSTFDKIADISLVVPYVGLALNIGNEVQKENFKEAFELLGAGILLEFVPELL  
IPTILVFTIKSFIGSSENKNKIIKAINNSLMERETKWKEIYSWIVSNWLTRINTQFNKRK  
EQMYQALQNQVDAIKTVIEYKYNNTSDERNRLESEYNINNIREELNKKVSLAMENIER  
F

ITESSIFYLMKLINEAKVSKLREYDEGVKEYLLDYISEHRSILGNSVQELNDLVTSTLNN  
SIPFELSSYTNDKILILYFNKLYKKIKDNSILDMRYENNKFIDISGYGSNISINGDVYIY  
STNRNQFGIYSSKPSEVNIAQNNDIYNGRYQNFSISFWVRIPKYFNKVNLNNEYTIIDC  
IRNNNSGWKISLNYNKIIWTLQDTAGNNQKLVFNQYTMISISDYINKWIFVTITNNRLGN  
SRIYINGNLIDEKSISNLGDIHVSDNILFKIVGCNDTRYVGIRYFKVFDTELGKTEIETL  
YSDEPDPSILKDFWGNLYLLYNKRYLLNLLRTDKSITQNSNFLNINQQRGVYQKPNIFSN  
TRLYTGVEVIIRKNGSTDISNTDNFVRKNDLAYINVVDRDVEYRLYADISIAKPEKIIKL  
IRTSNNSNLGQIIVMDSIGNNCTMNFQNNNGGNIIGLLGFHSNNLVASSWYYNNIRKNTS  
SNGCFWSFISKEHWQEN

SEQ ID NO: 19 (BoNT/G - UniProt Q60393)

MPVNIKXFNYNDPINNDDIIMMEPFNDPGPGTYKAFRIIDRIWIVPERFITYGFQPDQFN

ASTGVFSKDVY EYDPTYLKTD AEKDKFLKTMIKLFNRINSKPSGQRLLDMIVDAIPYL  
 G  
 NASTPPDKFAANVANVSINKKIIQPGAEDQIKGLMTNLIIFGPGPVLSDNFTDSMIMNGH  
 SPISEFGARM MIRFCPSCLNVFN NVQENKDT SIFSRRA YFADPAL TMHELIVLHGLY  
 GIKISNLPITPNTKEFFMQHSDPVQAEELYTFGGHDP SVISPSTDMNIYNKALQNFQDIA  
 NRLNIVSSAQSGIDISLYKQIYKNKYDFVEDPNGKYSVDKDKFDKLYKALMFGFTETN  
 L  
 AGEYGIKTRYSYFSEYLPPIKTEKLLDNTIYTQNEGFNIASKNLKTEFNGQNKAVNKEAY  
 EEISLEHLVIYRIAMCKPVMYKNTGKSEQCIIVNNE DLFFIANKDSFSKDLAKAETIAYN  
 TQNNTIENNFSIDQLILDNDLSSGIDL PNENTEPFTNFDDIDIPVYIKQSALKKIFVDGD  
 SLFEYLHAQTFPSNIENLQLTNSLNDALRNNNKVYTFSTNLVEKANTVV GASLFVNWW  
 K  
 GVIDDFTSESTQKSTIDKVS DVSIIPYIGPALNVGNETAKENFKNAFEIGGAAILMEFI  
 PELIVPIVGFFTLESYVGNGGHIIMTISNALKKRDQKWTD MYGLIVSQWLSTVNTQFYTI  
 KERMYNALNNQSQAI EKIIDQYNR YSEEDKMNINIDFNDIDFKLNQ SINLAINNIDDFI  
 NQCSISYLMNRMIPLAVK KLDKDFDDNLKRD LLEYIDTNELYLLDEVNILKSKVNRHLKD  
 S  
 IPFDLSLYTKDTILIQVFNNYISNISSNAILSLSYRGGRLIDSSGYGATMNVGSDVIFND  
 IGNQKFLNSENSENITAHQSKFVVYDSMFDNFSINFWVRTPKYNNNDIQTYLQNEYTII  
 SCIKNDSGWKVSIKGNRIIWLIDVNAKSKSIFFEYSIKDNISDYINKWFSITITNDRLG  
 NANIYINGSLK KSEKILNDRINSSNDIDFKLINCTD TTKFVWIKDFNIFGRELNATEVS  
 SLYWIQSSTNTLKDFWGNPLRYDTQYYLFNQGMQNIYIKYFSKASMGETAPRTNFNNA  
 AI  
 NYQNLYLGLRFIIKKASNSRNINNDNIVREGDYIYLNIDNISDES YRVYVLVNSKEIQTQ  
 LFLAPINDDPTFYDVLQIKKYEKTTYNCQILCEKDTKTFGLFGIGKFKDYGYVWDTY  
 D  
 NYFCISQWYLRRISENINKLRLG CNWQFIPVDEGWTE

SEQ ID NO: 20 (полипептидная последовательность BoNT/X)

MKLEINKFNYPIDGINVITMRPPRHSDKINKGKGPFAFQVIKNIWIVPERYNFTNNT  
 NDLNIPSEPIEADAIYNP NYLNTPEKDEF LQGVIKVLERIKSKPEGEKLELISSSIP  
 LPLVSN GALTLSDN ETIAYQENNNIVSNLQANLVIYGPDPDIANNATYGLYSTPISNGEG  
 TLSEVSFSPFY LKPFDES YGNYSLVNIVNK FVKREFAPDPASTLMHEL VHVTHNLYGIS  
 NRN FYYNFDTGKIETSRQQNSLIFEELLTFGGIDSKAISSLIKKIETAKNNYTTLISE  
 RLNTVTVENDLLKYIKNKIPVQGR LGNFKLDTAEF EKLN TILFVLNESNLAQRFSILVR  
 KHYLKERPIDPIYVNILDDNSYSTLEGFNIS SQSND FQGQLESSYFEKIESNALRAFI  
 KICPRNGLLYNAIYRNSKNYLNNIDLEDKKTTSKTNVSYPCSLNGCIEVENKDLFLISN  
 KDSLNDINLSEEKIKPETTVFFKDKLPPQDITLSNYDFTEANSIPSISQQNILERNEELY  
 EPIRNSLFEIKTIYVDKLTTFHFLEAQNIDESIDSSKIRVELTDSVDEALS NPNKVYSPF  
 KNMSNTINSIETGITSTYIFYQWLR SIVKDFSEDTGKIDVIDKSSDTLAIVPYIGPLNI  
 GNDIRHGDFVGAIELAGITALLEYVPEFTIPILVGLEVIGGELAREQVEAIVNNA LDKRD

QKWADEVYNITKAQWWGTIHLQINTRLAHTYKALSRQANAIAIKMNMEFQLANYKGNIDD  
 KAK  
 IKNAISETTEILLNKSVEQAMKNTEKFMIKLSNSYLTKEMIPKVQDNLKNFDLETKKTLDK  
 FIKKEDILGTNLSSSLRRKVSIRLNKNIAFDINDIPFSEFDDLINQYKNEIEDYEVLNL  
 GAEDGKIKDLSGTTSDINIGSDIELADGRENKAIKIGSENSTIKIAMNKYLRFSATDNF  
 SISFWIKHPKPTNLLNNGIEYTLVENFNQRGWKISIQD SKLIWYLRDHNNISIKIVTPDYI  
 AFNGWNLITITNRSKGSIVYVNGSKIEEKDISSIWNTTEVDDPIIFRLKNNRDTQAFTLL  
 DQFSIYRKELNQNEVVKLYNYFNSNYIRDIWGNPLQYNKKYYLQTQDKPGKGLIREY  
 WS  
 SFGYDYVILSDSKTITFPNNIRYGALYNGSKVLKNSKKLDGLVRNKDFIQLEIDGYNMG  
 ISADRFNEDTNYIGTTYGTHDLTTDFEIIQRQEYRNYCQLKTPYNIFHKSGLMSTETS  
 KPTFHIDYRDWVYSSAWYFQNYENLNRKHTKTNWYFIPKDEGWDED  
SEQ ID NO: 21 (TeNT - UniProt P04958)  
 MPITINFRYSDFVNNDTIIMMEPPYCKGLDIYYKAFKITDRIWIVPERYEFGTKPEDFN  
 PPSLLIEGASEYYDPNYLRTDSDKDRFLQTMVKLFNRKNNVAGEALLDKIINAIPYLG  
 SYSLLDKFDTSNSNSVSFNLEEQDPSGATTKSAMLTNLIIFGPGPVLNKNEVRGIVLRVDN  
 KNYFPCRDGFGSIMQMAFCPEYVPTFDNVIENTSLTIGKSKYFQDPALLMHLEIHLVH  
 GLYGMQVSSHEIIPSKQEIYMQHTYPISEELFTFGGQDANLISIDIKNDLYEKTLDYK  
 AIANKLSQVTSCNDPNIDISYKQIYQQKYQFDKDSNGQYIVNEDKFQILYNSIMYGFE  
 IELGKFKNIKTRLSYFSMNHDPVKIPNLLDDTIYNDTEGFNIESKDLKSEYKQNMVRNT  
 NAFRNVDSGLVSKLIGLCKKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLGGELCIKIKNEDLTFIAE  
 KNSFSEEPFQDEIVSYNTKNKPLNFNYSLDKIIDVYNLQSKITLPNDRTPVTKGIPYAP  
 EYKSNAASTIEIHNIDDNTIYQYLYAQKSPTTLQRITMNSVDDALINSTKIYSYFPSVI  
 SKVNQGAQGILFLQWVRDIHDDFTNESSQKTTIDKISDVSTIVPYIGPALNIVKQGYEGN  
 FIGALETTGVVLLLEYIPEITLPIVIAALSIAESSTQKEKIKTIDNFLEKRYEKWIEVYK  
 LVKAKWLGTVNTQFQKRSYQMYRSLEYQVDAIKKIIDYEYKIYSGPDKEQIADEINNLK  
 N  
 KLEEKANKAMININIFMRESSRSFLVNQMINEAKKQLEFDTQSKNILMQYIKANSKFIG  
 ITELKLESKINKVVFSTPIPFYSKNLDCWVDNEEDIDVILKSTILNLDINNDIISDIS  
 GFNSSVITYPDAQLVPGINGKAIHLVNNESSEVIVHKAMDIEYNDMFNNFTVSFWLRVP  
 K  
 VSASHLEQYGTNEYSIISSMKKHLSIGSGWSVSLKGNNLIWTLKDSAGEVRQITFRDLP  
 DKFNAYLANKWVFITITNDRSSANLYINGVLMGSAEITGLGAIREDNITLKLDRCN  
 NQYVSDKFRIFCKALNPKEIEKLYTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYLIPVASSKDV  
 QLKNITDYMYLTNAPS YTNGLKNIYYRRLYNGLKFIKRYTPNNEIDSFVKSGDFIKLYV  
 SYNNEHIVGYPKDGNAFNNLDRILRVGYNAPGIPLYKKMEAVKLRDLKTYSVQLKLY  
 DD  
 KNASLGLVGTHTNGQIGNDPNRDLIASNWFNHLKDKILGCDWYFVPTDEGWTND

### Примеры

Пример 1. Создание стабильной клеточной линии.

Синтез генов и субклонирование.

Нуклеотидные последовательности tagRFPT и tagGFP были получены от Evrogen и синтезированы GeneArt (Thermo Fisher Scientific). Продукт гена, tRFPT-SNAP25-tGFP, фланкировали последовательностями attB для клонирования Gateway®. Затем синтезированный генный продукт субклонировали в лентивирусный вектор pLenti6.3/V5-dest с использованием набора ферментов BP clonase (Thermo Fisher) в соответствии с протоколом производителя. Полученный вектор pLenti6.3-tRFPT-SNAP25-tGFP трансформировали в клетки E.coli BL21 и отбирали с использованием антибиотика ампициллина. Положительные клоны бактерий были предварительно обработаны с использованием набора Machery-Nagel Maxiprep, не содержащего эндотоксинов, в соответствии с протоколом производителя.

Генерация лентивируса из клеток HEK293FT.

Для подготовки к генерации лентивируса клетки HEK293FT культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла с высоким содержанием глюкозы с 4500 мг/л глюкозы с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (Gibco), затем высевали в колбу T75 см<sup>2</sup> при 80% степени смачивания и инкубировали в течение ночи при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. Затем клетки котрансфицировали плазмидой pLenti6.3-tRFPT-SNAP25-tGFP и смесью для упаковки лентивирусов ViraPower (Invitrogen Cat No. K497000) с использованием реагента Lipofactamine 3000 (Invitrogen) в соответствии с руководством, предоставленным поставщиком, и инкубировали в колбе в течение 6 ч при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. Через 6 ч после трансфекции среду, содержащую комплексы липид-ДНК, осторожно удаляли и выгружали из колбы и

заменяли 10 мл предварительно нагретой среды. Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. 10 мл клеточного супернатанта (первая партия вируса) собирали через 24 ч после трансфекции и хранили в конических пробирках на 15 мл при 4°C. Собранную среду заменяли 10 мл предварительно нагретой среды, и колбу инкубировали в течение ночи при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. Вторую партию вируса собирали через 48 ч после трансфекции. Обе партии супернатанта центрифугировали на 2000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре для удаления продуктов клеточного распада. Осветленный лентивирусный супернатант собирали после центрифугирования и фильтровали с использованием фильтра с размером пор 0,45 мкм для удаления любых оставшихся продуктов клеточного распада. Вирус разделяли на аликвоты по 1 мл и хранили при -80°C.

Измерение титра лентивирусов посредством GFP-селекции.

Клетки HEK293FT высевали в 96-луночный планшет (Nunc) при плотности 10000 клеток/лунку в 100 мкл культуральной среды. Серийные разведения вируса от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-4</sup> были сделаны с использованием свежей культуральной среды с 8 мг/мл (конечная концентрация) реагента Polybrene (каталожный номер Sigma H9268). Клетки трансдуцировали путем удаления существующей среды и заменяли на 100 мкл приготовленных разведений в соответствующую лунку. Планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день культуральную среду меняли на свежую без полибрена. Клетки инкубировали в течение дополнительных 3 дней перед вычислением титра вируса. Соответствующий фактор разведения использовали для расчета титра в единицах трансдукции (TU) на мл на основе процента GFP-положительных клеток. Желаемый диапазон трансдукции составлял 1-20%. Следовательно, титр вируса определяли по следующей формуле: Титр = (FXC/V) XD, где F=частота GFP-положительных клеток (процент GFP-положительных клеток/100), C=количество клеток на лунку в момент трансдукции, V=объем посевного материала в мл (0,1 мл) и D=коэффициент разведения лентивируса.

Генерация стабильной клеточной линии ReNcell VM из лентивирусов.

Клетки ReNcell VM (Millipore) высевали в 24 лунки, покрытые ламином (конечная концентрация 20 мкг/мл) при 80% степени смыкания, и инкубировали в течение ночи при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. Среду удаляли и добавляли 500 мкл лентивируса на лунку с реагентом Polybrene до конечной концентрации 8 мг/мл. Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день среду заменяли свежей средой без полибрена. Трансдуцированные клетки были размножены и отсортированы по FACS с использованием длины волны GFP.

Результаты.

Конструкцию для анализа, состоящую из полноразмерного SNAP25, фланкированного tagRFPT и tagGFP, клонировали в остов лентивирусного вектора. Создание стабильной клеточной линии было достигнуто с использованием модифицированного протокола генерации лентивируса, состоящего из липофекции конструкции с упаковкой лентивирусных плазмид в клеточную линию HEK293T. Полученный лентивирус был очищен и добавлен к клеткам ReNcell VM, которые в конечном итоге были отсортированы с использованием FACS (см. фигуру 1), и было подтверждено создание стабильной клеточной линии. Эту иммортализованную клеточную линию v-тус получают из клеток-предшественников нейронов (NPC) человека, которые являются генетически более близкими к природным нейронам человека по сравнению с линиями раковых клеток и, следовательно, являются лучшей моделью нейронных клеток для использования в анализах, описанных в настоящем описании.

Пример 2. Конструкция является чувствительной к расщеплению BoNT/A.

Материалы и методы.

Планшеты для визуализации Perkin Elmer CellCarrier 384 Ultra™ и 24-луночные чашки для культур тканей Nunc инкубировали с 20 мкг/мл ламинина (Invitrogen) в течение ночи при 4°C.

Визуализация.

Стабильная клеточная линия по изобретению (называемая клеточной линией ReD SNAPR) была дифференцирована в соответствии с протоколом производителя клеток ReNcell VM. Вкратце, клетки высевали на планшеты для визуализации Perkin Elmer CellCarrier 384 Ultra™ с предварительно нанесенным покрытием из расчета 3000 клеток на лунку. Клетки поддерживали в поддерживающей среде ReNcell NSC без факторов роста (EGF и FGF2) (среда для дифференцировки) в течение 14 дней, со сменой среды каждые 3 дня. Клетки инкубировали со 100 нМ BoNT/A в среде для дифференцировки в течение 48 ч. Клетки фиксировали фиксатором (4% параформальдегида и 2% сахарозы). Фиксированные клетки были визуализированы с помощью Opera™ Phenix.

Вестерн-блоттинг.

Клетки ReD SNAPR дифференцировали согласно протоколу производителя клеток ReNcell VM. Вкратце, клетки высевали на 24-луночную чашку для культуры ткани Nunc по 30000 клеток на лунку. Клетки поддерживали в поддерживающей среде ReNcell NSC без факторов роста (EGF и FGF2) (среда для дифференцировки) в течение 14 дней, со сменой среды каждые 3 дня. Клетки инкубировали со 100 нМ BoNT/A в среде для дифференцировки в течение 48 ч. Среду аспирировали и клетки лизировали лизисным буфером NP-40 (150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Трис-Cl, pH 8,0). Для того, чтобы подготовить образцы для загрузки в гель SDS-PAGE, к образцам добавляли 10% DTT и 6X загрузочный буфер (Bio-

Rad) и кипятили в течение 5 минут. 20 мкл образцов добавляли в каждую дорожку геля NuPAGE Bis-tris 4-12% (Thermo Fisher) и прогоняли при 120 В до тех пор, пока не кончился фронт красителя. Гель переносили на нитроцеллюлозную мембрану и зондировали анти-tRFP и анти-tag (CGY) FP (Evrogen) в течение ночи.

Результаты.

На фиг. 2 продемонстрировано, что конструкция для анализа является чувствительной к распаду под действием BoNT/A. Обычные клеточные анализы фокусируются на взаимодействиях FRET или прямом вестерн-блоттинге расщепленного SNAP25 в клеточном лизате, что не подходит для приложений высокопроизводительного скрининга (HTS). В нормальных условиях С-концевой фрагмент полноразмерного SNAP25, расщепленный BoNT/A, трудно обнаружить из-за малой молекулярной массы, поэтому его судьба обычно неизвестна. Это ранее не отмеченное наблюдение показывает, что С-концевой фрагмент разрушается вместе с флуорофором, который присоединяется к нему. Относительная простота этой методологии хорошо подходит для ряда приложений с низкой и высокой пропускной способностью.

На фиг. 3 представлена схема, показывающая опосредованный BoNT/A распад С-конца конструкции SNAP25. После интернализации BoNT/A в клетках ReD SNAPR легкая цепь BoNT/A проникает в цитоплазму и расщепляет tagRFPT-SNAP25-tagGFP (стабильно экспрессируется в клетках ReD SNAPR). Это приводит к распаду С-концевого фрагмента при сохранении N-концевой конструкции. Распад можно обнаружить с помощью флуоресцентной микроскопии и вестерн-блоттинга.

Пример 3. Повышение чувствительности клеток ReD SNAPR к BoNT/A.

Клетки ReD SNAPR высевали на 384-луночные планшеты, как описано выше. Для усиленной дифференцировки клетки ReD SNAPR культивировали в нормальной среде ReNcell с 10 нг/мл GDNF и 1 мМ d-cAMP (проницаемой для клеток cAMP). Различные концентрации (0-1 мкМ) BoNT/A добавляли к нормальной среде и среде ReDS, где среда ReDS содержала 10 нг/мл GDNF, 1 мМ d-cAMP, 2 мМ CaCl<sub>2</sub> и 56 мМ KCl.

Дифференцированные клетки ReD SNAPR подвергали интоксикации посредством среды, содержащей BoNT/A, фиксировали и визуализировали, как описано выше.

Результаты.

На фиг. 4 показано, что добавление GDNF и d-cAMP во время дифференцировки и условия с высоким содержанием калия во время интоксикации повышали чувствительность клеточной линии к BoNT/A. Были определены кривые зависимости ответа от дозы и значения EC<sub>50</sub> для BoNT/A в анализе (см. фигуру 4b) с низкими значениями нМ, когда клетки подвергались воздействию среды ReDS.

Пример 4. Тиоредоксинредуктаза (TrxR1) в качестве контроля анализа.

Клетки ReD SNAPR высевали на 384-луночные планшеты и дифференцировали, как описано выше. Дифференцированные клетки обрабатывали 25 нмоль либо нецелевого контроля миРНК, NT3, либо миРНК против TrxR1 с использованием Lipofectamine RNAiMax в соответствии с протоколом производителя и оставляли на клетках на 72 ч. Среда ReDS, содержащую 10 нМ BoNT/A, добавляли к клеткам на 48 ч, а затем фиксировали и визуализировали, как описано выше. Вкратце, клетки фиксировали и использовали антитело против TrxR1 для обнаружения TrxR1 и визуализации флуоресценции с помощью Opera Phenix. Были зафиксированы и измерены средние уровни интенсивности флуоресценции каналов GFP, RFP и дальнего красного.

Результаты.

На фиг. 5 показано, что обработанные siTrxR клетки являются более устойчивыми к BoNT/A-опосредованному расщеплению по сравнению с контролем. Таким образом, TrxR1 можно использовать в качестве подходящего положительного контроля для идентификации генов, участвующих во внутриклеточном перемещении BoNT/A. В частности, нокдаун TrxR1 может применяться, чтобы показать, что интоксикация BoNT/A может быть устранена, посредством чего дополнительно подтверждаются гены, идентифицированные в анализе.

Пример 5. Использование рецептора BoNT SV2.

Клетки ReNcell VM высевали на 384-луночные планшеты и дифференцировали, как описано ранее. Дифференцированные клетки обрабатывали 25 нмоль siNT3, siVAMP2 или siTrxR с использованием Lipofectamine RNAiMax в соответствии с протоколом производителя и оставляли на клетках на 72 ч. Среда ReDS, содержащую 10 нМ BoNT/A, добавляли к клеткам на 48 ч и затем фиксировали. Для иммуноокрашивания клетки блокировали 0,5% BSA/PBS в течение 1 ч, к клеткам добавляли антитело против SV2A (Cell Signaling, #66724) и инкубировали в течение по меньшей мере 1 ч. Вторичное антитело, конъюгированное с Alexa-488, добавляли в клетки на 1 ч и визуализировали клетки с помощью Opera Phenix. Затем клетки были визуализированы с помощью Opera Phenix с показанными каналами GFP и DAPI.

Результаты.

Хотя SV2 является основным рецептором BoNT/A, он ранее не изучался на предмет его постинтоксикационного пути в клетке. На фиг. 6 показано, что интоксикация BoNT/A приводит к снижению SV2 на поверхности клетки, что может быть типичным следствием опосредованного BoNT/A дефектного переноса на поверхность клетки. В этом случае возврат SV2 обратно на поверхность клетки блокируется. Следовательно, SV2 может использоваться в качестве индикатора интоксикации BoNT/A.

Многие гены могут регулировать активность VoNT/A в клетке. Примером косвенной регуляции может быть уровень миграции рецептора VoNT SV2 (вместо модуляции самой активности токсина). Для того, чтобы отсеять кандидатов, вовлеченных в трафик SV2, окрашивание поверхности SV2 может быть идеальным критерием отбора. Пример, показанный в настоящем описании, представляет собой клетки, обедненные VAMP2, которые после интоксикации VoNT/A приводили к снижению окрашивания поверхности SV2. Это может быть связано с синергическим действием блокирования экзоцитоза везикул на поверхности клетки за счет снижения интоксикации VAMP2 и VoNT/A.

Поверхностный SV2 может быть восстановлен за счет истощения TtxR, что показывает, что сам TtxR не влияет на экзоцитоз SV2 на поверхности клетки, но напрямую модулирует активность VoNT/A посредством высвобождения его легкой цепи (LC). Это непреднамеренно приводит к восстановлению поверхности SV2 из-за снижения VoNT/A LC в цитоплазме.

Таким образом, SV2 является полезным в анализе по изобретению, поскольку его можно использовать для отделения генов-кандидатов, непосредственно участвующих в передаче VoNT/A, от тех, которые модулируют передачу рецептора VoNT/A SV2.

Пример 6. Полногеномный скрининг миРНК.

На фиг. 7 представлена схема, показывающая способ проведения полногеномного скрининга миРНК с клеточной линией по изобретению. Клетки ReD SNAPR высевают и дифференцируют, как описано выше. Библиотеку миРНК готовят и объединяют с Lipofectamine™ RNAiMAX с использованием стандартных протоколов, и клетки ReD SNAPR трансфецируют миРНК. VoNT/A в буфере для стимуляции добавляется к клеткам перед фиксацией и визуализацией с использованием Opera™ Phenix и количественной оценкой с помощью программного обеспечения Columbus™.

Положительные результаты могут быть подвергнуты дальнейшей проверке путем оценки восстановления в присутствии siRNA против TtxR1. Подтверждение того, что гены непосредственно регулируют активность VoNT, подтверждают путем окрашивания поверхности клеток SV2, как описано выше.

Пример 7. Определение профилактических терапевтических средств против ботулизма.

Клетки ReD SNAPR высевают и дифференцируют, как описано выше, и подвергают воздействию агента (например, низкомолекулярного лекарственного средства). VoNT/A в буфере для стимуляции добавляют к клеткам перед фиксацией и визуализацией с использованием Opera™ Phenix и количественной оценкой с помощью программного обеспечения Columbus™.

Агент идентифицируют как профилактическое средство против ботулизма, если расщепление конструкции ингибируется.

Пример 8. Определение терапевтических средств против ботулизма после интоксикации.

Клетки ReD SNAPR высевают и дифференцируют, как описано выше, и к клеткам добавляют VoNT/A в буфере для стимуляции и наблюдают расщепление конструкции (потерю GFP). Затем клетки подвергаются воздействию агента (например, низкомолекулярного лекарственного средства). Наконец, клетки фиксируют и визуализируют с помощью Opera™ Phenix и подвергают количественному анализу с помощью программного обеспечения Columbus™.

Агент идентифицируют как средство против ботулизма после интоксикации, если наблюдается восстановление GFP.

Пример 9. Идентификация агентов, повышающих чувствительность к VoNT.

Клетки ReD SNAPR высевают и дифференцируют, как описано выше, и подвергают воздействию агента (например, низкомолекулярного лекарственного средства). VoNT/A в буфере для стимуляции добавляют к клеткам перед фиксацией и визуализацией с использованием Opera™ Phenix и количественной оценкой с помощью программного обеспечения Columbus™.

Агент идентифицируют как агент, повышающий чувствительность к VoNT, если расщепление конструкции улучшается (например, происходит быстрее или очевидно большее расщепление). Сенсибилизирующий агент предлагается для дальнейшего изучения на предмет его применения в качестве сопутствующего продукта для модуляции локальной активности клостридиальных нейротоксинов (например, в целях обеспечения возможности снижения дозировки и минимизации распространения на другие ткани).

Все публикации, упомянутые в приведенном выше описании, включены в настоящее описание посредством ссылки. Различные модификации и вариации описанных способов и системы по настоящему изобретению без отклонения от объема и формы настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники. Хотя настоящее изобретение было описано в связи с конкретными предпочтительными вариантами осуществления, следует понимать, что заявляемое изобретение не должно чрезмерно ограничиваться такими конкретными вариантами осуществления. Действительно, предполагается, что различные модификации описанных способов осуществления изобретения, которые будут очевидны для специалистов в области биохимии и биотехнологии или в смежных областях, входят в объем приведенной ниже формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ для идентификации гена, который регулирует активность кластридиального нейротоксина, включающий:

- a) получение образца нейронных клеток человека, модифицированных для экспрессии полипептида, который содержит С-концевую обнаруживаемую метку, где полипептид может расщепляться кластридиальным нейротоксином;
- b) изменение экспрессии гена-мишени клеток;
- c) контактирование клеток с кластридиальным нейротоксином;
- d) измерение количества С-концевой обнаруживаемой метки, посредством чего количественно определяют активность кластридиального нейротоксина; и
- e) идентификацию гена-мишени как регулятора активности кластридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность кластридиального нейротоксина отличается от количественно определенной активности кластридиального нейротоксина в случае, когда экспрессия гена-мишени не изменена; или
- f) идентификацию того, что ген-мишень не является регулятором активности кластридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность кластридиального нейротоксина эквивалентна количественно определенной активности кластридиального нейротоксина в случае, когда экспрессия гена-мишени не изменена.

2. Способ по п.1, где экспрессию изменяют путем подавления экспрессии гена-мишени.

3. Способ по п.2, где ген-мишень идентифицируют как положительный регулятор активности кластридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность кластридиального нейротоксина ниже, чем количественно определенная активность кластридиального нейротоксина в случае, когда экспрессия гена-мишени не изменена.

4. Способ по п.2 или 3, где ген-мишень идентифицируют как отрицательный регулятор активности кластридиального нейротоксина, когда количественно определенная активность кластридиального нейротоксина выше, чем количественно определенная активность кластридиального нейротоксина в случае, когда экспрессия гена-мишени не изменена.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, где предоставляется множество образцов нейронных клеток человека и в каждом из образцов нейронных клеток человека изменена экспрессия отличающегося гена-мишени.

6. Способ по п.5, где экспрессия отличающегося гена-мишени изменена в каждом из образцов с использованием библиотеки РНКи человека.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий определение того, является ли ген-мишень прямым регулятором активности кластридиального нейротоксина или косвенным регулятором активности кластридиального нейротоксина,

где: (i) прямой регулятор регулирует активность кластридиального нейротоксина на уровне:

- 1) связывания кластридиального нейротоксина с клеткой;
- 2) интернализации кластридиального нейротоксина;
- 3) транслокации L-цепи кластридиального нейротоксина из эндосомы;
- 4) катализа и/или
- 5) сохранения активности L-цепи в цитоплазме клетки; и/или

(ii) косвенный регулятор регулирует процесс клеточной миграции рецептора кластридиального нейротоксина.

8. Способ по п.7, где определение включает обнаружение присутствия или отсутствия рецептора кластридиального нейротоксина в клетке, когда экспрессия гена-мишени была изменена.

9. Способ по п.7 или 8, где обнаружение меньшего количества рецептора кластридиального нейротоксина на поверхности клетки, когда экспрессия гена-мишени изменена (предпочтительно снижена) по сравнению с эквивалентной клеткой, контактирующей с кластридиальным нейротоксином, в которой экспрессия гена-мишени не изменена, указывает на то, что ген-мишень косвенно регулирует активность кластридиального нейротоксина; или обнаружение эквивалентного или большего (предпочтительно большего) количества рецептора кластридиального нейротоксина на поверхности клетки, когда экспрессия гена-мишени была изменена (предпочтительно имела понижающую регуляцию) по сравнению с эквивалентной клеткой, контактирующей с кластридиальным нейротоксином, в которой экспрессия гена-мишени не изменена, указывает на то, что ген-мишень напрямую регулирует активность кластридиального нейротоксина.

10. Способ по любому из пп.7-9, где рецептор кластридиального нейротоксина представляет собой гликопротеин 2А синаптических везикул (SV2).

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, где нейронная клетка человека является неравковой клеткой.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, где нейронная клетка человека представляет собой иммортализованную клетку-предшественник нейронов человека или предпочтительно нейронная клетка человека была получена (например, дифференцирована) из иммортализованной клетки-

предшественника нейронов человека.

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, где полипептид дополнительно содержит N-концевую обнаруживаемую метку и N-концевая обнаруживаемая метка отличается от C-концевой обнаруживаемой метки.

14. Способ по п.13, где одна из обнаруживаемых меток представляет собой красный флуоресцентный белок (RFP), и одну из обнаруживаемых меток выбирают из зеленого флуоресцентного белка (GFP), голубого флуоресцентного белка (CFP) и желтого флуоресцентного белка (YFP).

15. Способ по любому из предшествующих пунктов, где полипептид содержит N-концевой RFP и C-концевой GFP.

16. Способ по любому из предшествующих пунктов, где полипептид:

а) кодируется нуклеотидной последовательностью, содержащей:

i) нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3;

ii) нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9; и/или

iii) нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11; или

б) кодируется нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1; или

с) содержит полипептидную последовательность, содержащую:

i) полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4;

ii) полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10; и/или

iii) полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12; или

д) содержит полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2.

17. Способ по любому из предшествующих пунктов, где полипептид:

а) кодируется нуклеотидной последовательностью, содержащей:

i) нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3;

ii) нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9; и/или

iii) нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11; или

б) кодируется нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1; или

с) содержит полипептидную последовательность, содержащую:

i) полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4;

ii) полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10; и/или

iii) полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12; или

д) содержит полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2.

18. Способ по любому из предшествующих пунктов, где полипептид:

а) кодируется нуклеотидной последовательностью, содержащей:

i) нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3;

ii) нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9; и/или

iii) нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11; или

б) кодируется нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1; или

с) содержит полипептидную последовательность, содержащую:

i) полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4;

ii) полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10; и/или

iii) полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12; или

тельности с SEQ ID NO: 12; или

d) содержит полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2.

19. Способ по любому из предшествующих пунктов, где полипептид:

a) кодируется нуклеотидной последовательностью, содержащей:

i) SEQ ID NO: 3;

ii) SEQ ID NO: 9 и

iii) SEQ ID NO: 11; или

b) кодируется нуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 1; или

c) содержит:

i) SEQ ID NO: 4;

ii) SEQ ID NO: 10 и

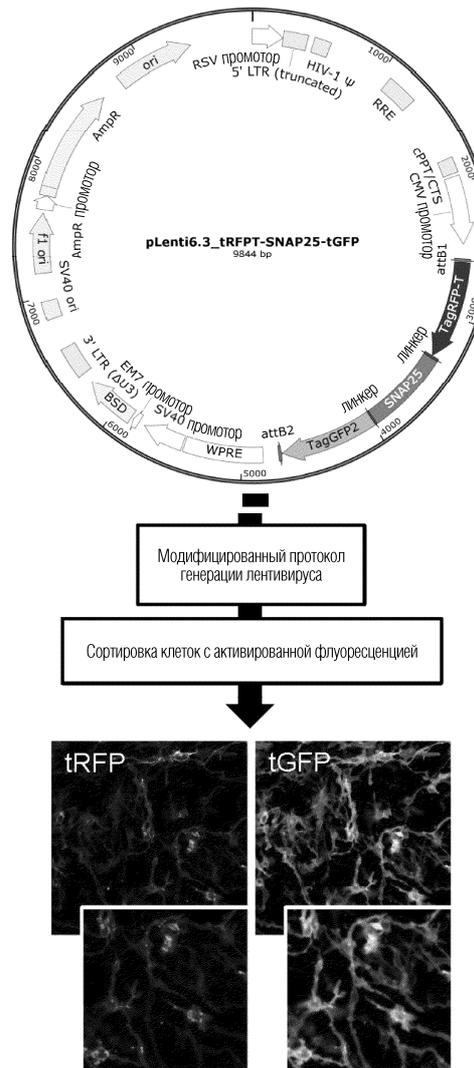
iii) SEQ ID NO: 12; или

d) содержит SEQ ID NO: 2.

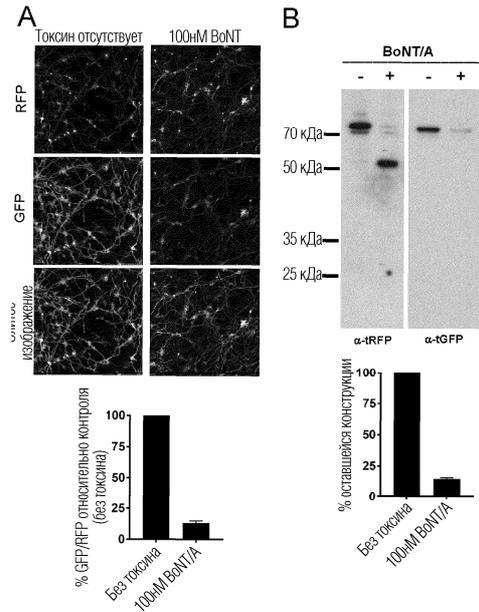
20. Способ по любому из предшествующих пунктов, где полипептидная последовательность состоит из SEQ ID NO: 2.

21. Способ по любому из предшествующих пунктов, где способ включает приведение клеток в контакт с нейротрофическим фактором глиальных клеток (GDNF), проницаемым для клеток циклическим аденозинмонофосфатом (сAMP),  $\text{CaCl}_2$  и KCl.

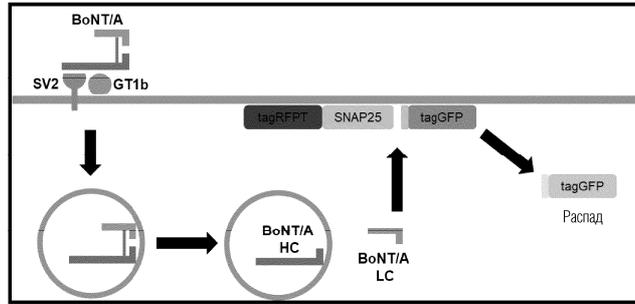
22. Способ по п.21, где GDNF присутствует в концентрации 1-100 нг/мл, сAMP присутствует в концентрации 0,1-5 мМ,  $\text{CaCl}_2$  присутствует в концентрации 0,1-7 мМ и/или KCl присутствует в концентрации 1-100 мМ.



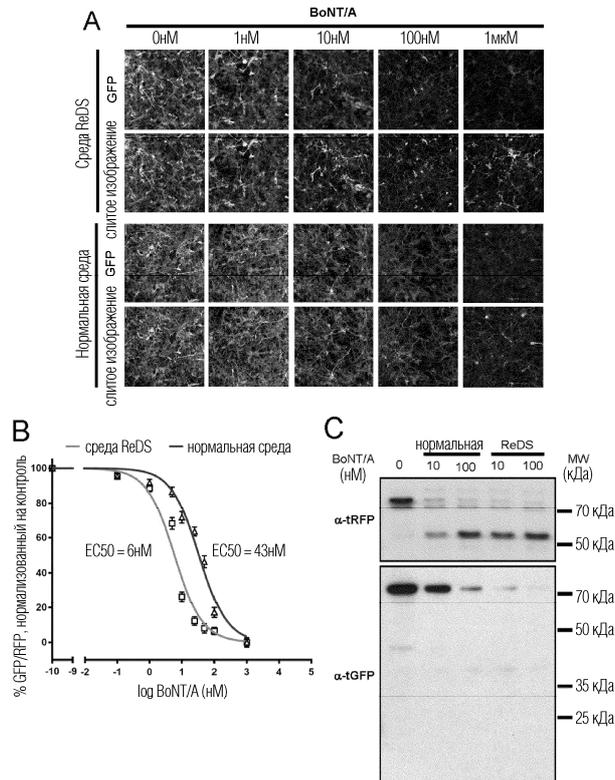
Фиг. 1



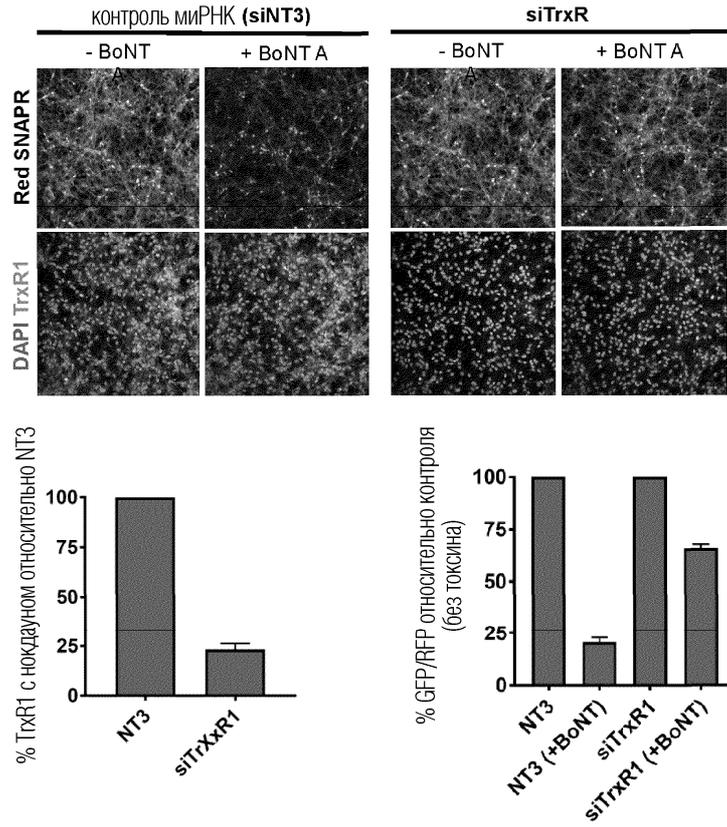
Фиг. 2



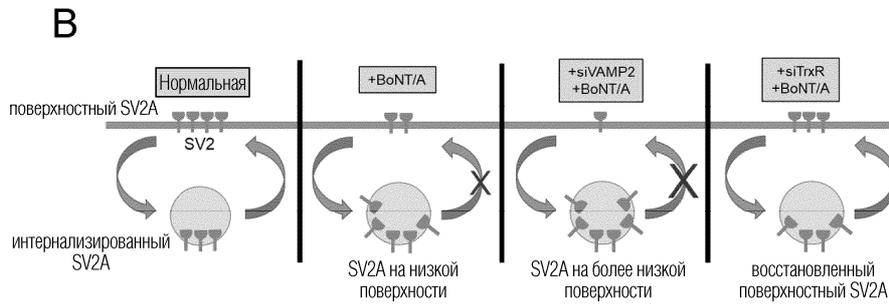
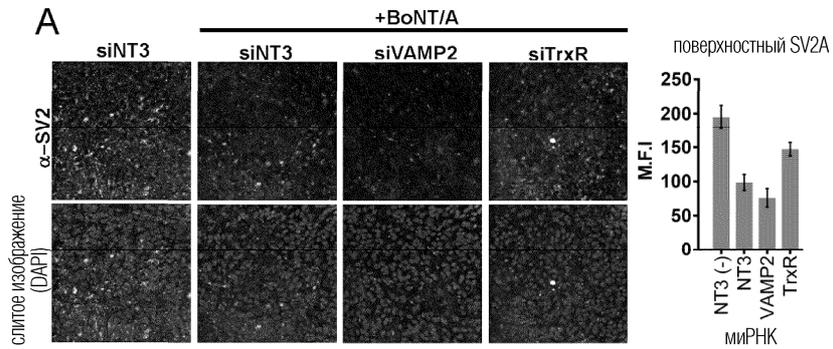
Фиг. 3



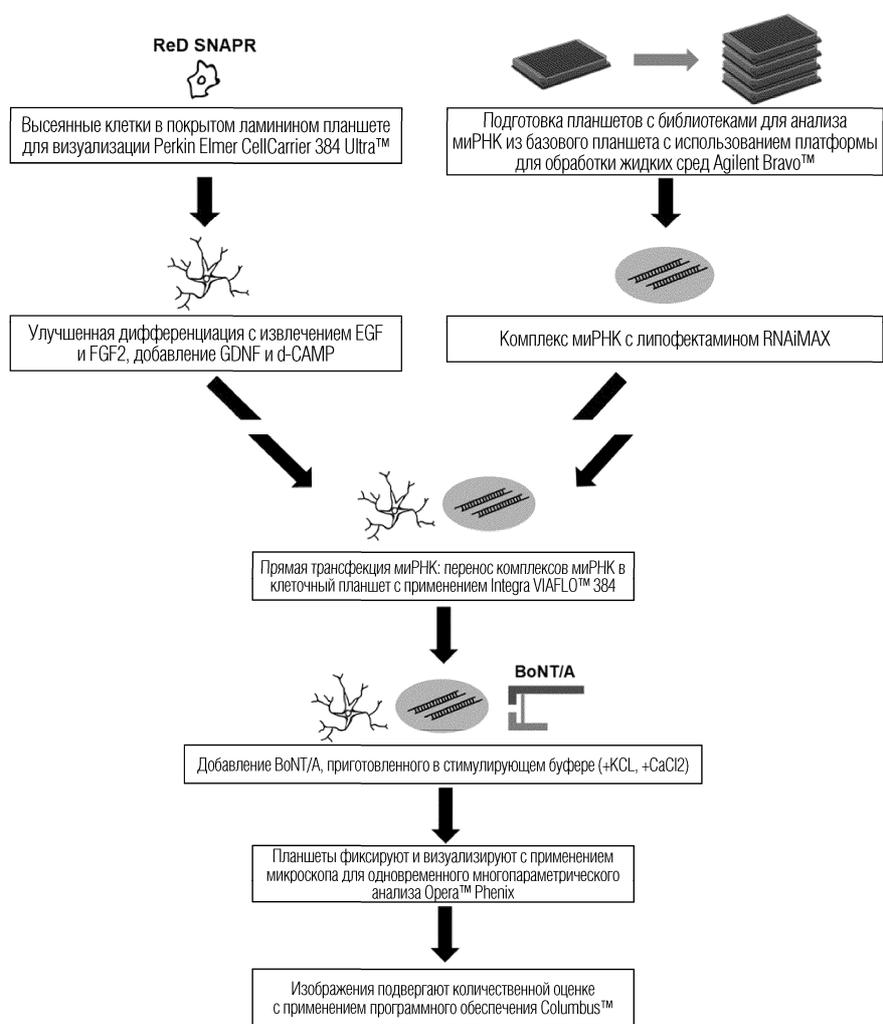
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

