

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392577** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2024.04.27**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.01.29**

(51) Int. Cl. *C07K 14/33* (2006.01)  
*A61K 39/08* (2006.01)  
*A61K 38/48* (2006.01)  
*C12N 9/52* (2006.01)

---

(54) **РАСЩЕПЛЯЮЩИЕ НЕНЕЙРОННЫЙ SNARE БОТУЛИНИЧЕСКИЕ  
НЕЙРОТОКСИНЫ**

---

(31) **18153941.2**

(32) **2018.01.29**

(33) **EP**

(62) **202091296; 2019.01.29**

(71) Заявитель:

**ИПСЕН БИОФАРМ ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:

**Бинц Томас, Сикорра Стефан (GB)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к модифицированной протеазе L-цепи ботулинического нейротоксина А (BoNT/A), которая демонстрирует повышенное расщепление человеческого SNAP-23 (hSNAP-23) по сравнению с немодифицированной протеазой L-цепи BoNT/A дикого типа, а также к ее применению для расщепления hSNAP-23.

**A1**

**202392577**

**202392577**

**A1**

## РАСЩЕПЛЯЮЩИЕ НЕНЕЙРОННЫЙ SNARE БОТУЛИНИЧЕСКИЕ НЕЙРОТОКСИНЫ

### Введение

Настоящее изобретение относится к модифицированной протеазе ботулинического нейротоксина, обладающей способностью расщеплять ненейронный белок SNARE, и к ее применению для подавления нежелательной секреции из клетки млекопитающего путем расщепления указанного ненейронного белка SNARE в указанной клетке млекопитающего.

Токсины обычно подразделяются на один из двух классов, а именно цитотоксические токсины (например, растительный токсин, такой как рицин), которые убивают их естественные клетки-мишени, и нецитотоксические токсины (например, ботулинические нейротоксины), которые не убивают их естественные клетки-мишени. Нечитотоксические токсины оказывают свое воздействие на клетку-мишень, ингибируя клеточный процесс, отличный от синтеза белка.

Протеазы ботулинического нейротоксина действуют путем протеолитического расщепления внутриклеточных транспортных белков, известных как белки SNARE (например, SNAP-25, VAMP или синтаксин). Сокращение SNARE происходит от термина «растворимый рецептор белка присоединения NSF», где NSF означает чувствительный к N-этилмалеимиду фактор. Белки SNARE - это большое суперсемейство белков. Важной функцией белков SNARE является опосредование экзоцитоза молекул нейромедиаторов к постсинаптическому соединению. Поэтому белки SNARE являются неотъемлемой частью секреции молекул посредством везикулярного транспорта из клетки.

*Clostridium botulinum* продуцирует семь (от А до G) различных нейротоксинов (BoNT), которые дифференцированы серологически по отсутствию антисывороточной перекрестной нейтрализации серотипа. BoNT вызывают нейрон-специфичный атонический паралич путем воздействия на нейроны и расщепления нейрон-специфичных белков SNARE.

BoNT имеют полипептидную цепь 150 кДа, содержащую тяжелую цепь 100 кДа и легкую цепь 50 кДа, связанные дисульфидной связью. BoNT организованы в три функциональных домена: N-концевая протеолитическая легкая цепь (L-цепь); и C-концевая тяжелая цепь (H-цепь), последняя состоит из транслокационного домена (H<sub>N</sub>) и C-концевого нейрон-связывающего домена (H<sub>C</sub>). Токсический эффект BoNT (нервная интоксикация) осуществляется по трехэтапному механизму действия. Сначала, часть H<sub>C</sub> связывается с холинергической нервной клеткой и интернализируется путем опосредованного рецептором эндоцитоза. Затем, часть H<sub>N</sub> транслоцирует L-цепь через эндосомальную мембрану в цитозоль нервной клетки. И наконец, L-цепь связывается и расщепляет нейронный белок SNARE в цитозоле, тем самым подавляя высвобождение нейромедиатора из нервной клетки и приводя к интоксикации нервной клетки.

Семь серотипов BoNT расщепляют специфичные остатки в одном из трех белков

## SNARE:

серотипы В, D, F и G расщепляют VAMP-2;  
 серотипы А и Е расщепляют SNAP-25; и  
 серотип С расщепляет SNAP-25 и синтаксин Ia.

В то время как нативные BoNT способны нацеливаться и расщеплять нейронные изоформы SNARE, такие как VAMP-2, SNAP-25 и синтаксин-1a, указанные протеазы оказывают незначительное или вовсе не оказывают расщепляющего действия на большинство ненейронных белков SNARE. Эта субстратная специфичность в отношении нейронных SNARE согласуется и понимается как отражение природной специфичности связывания нервных клеток, демонстрируемой BoNT. Например, BoNT/A расщепляет человеческий SNAP-25, но не его человеческие ненейронные изоформы.

Еще в 1989 году Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов (FDA США) одобрило BoNT/A для лечения косоглазия, блефароспазма и гемифациального спазма, а затем для лечения шейной дистонии, косметического применения, для устранения глabellaрных морщин лица и подмышечного гипергидроза. Эффективность BoNT/A при дистонии и других расстройствах, связанных с непроизвольной активностью скелетных мышц, в сочетании с удовлетворительным профилем безопасности, подтолкнула медиков к его эмпирическому/не по назначению применению при разнообразных выделениях, а также при болях и косметических расстройствах.

Клиническое применение BoNT сфокусировано на расстройствах, связанных с нервно-мышечной активностью. Совсем недавно пионерное исследование, проведенное компанией Syntaxin Ltd, позволило разработать перенаправленные BoNT, которые связываются с уникальной группой нейронов (например, ноцицептивными афферентами - см. Международную патентную заявку WO96/33273, содержание которой полностью включено в настоящее изобретение) и/или с клетками, которые не являются нейронами, (например, клетками эпителия дыхательных путей - см. Международную патентную заявку WO00/10598, содержание которой полностью включено в настоящее изобретение). Эта технология, известная как технология направленного ингибирования секреции (TSI), включает в себя замену нативного связывающего домена BoNT другим нацеливающим фрагментом (например, фактором роста или другой сигнальной молекулой), и она открыла двери для новых основанных на использовании BoNT методов лечения и видов терапии.

Однако избирательное расщепление нейрон-специфичных белков SNARE с помощью BoNT ограничило разработку новых методов лечения в этих ненейронных системах. Считается, что нейронные и ненейронные белки SNARE одинаково важны для процесса слияния внутриклеточных везикул и, следовательно, для секреции молекул посредством транспорта везикул из клетки. Соответственно, применение традиционных терапевтических средств на основе BoNT для инактивации секреции, управляемой нейронным белком SNARE, не будет направлено на какую-либо соответствующую

клеточную секрецию, управляемую ненейронными SNARE.

Соответственно, существует потребность в сконструированной протеазе L-цепи BoNT, которая эффективно расщепляет ненейронный белок SNARE.

Настоящее изобретение решает одну или более из вышеуказанных проблем путем создания сконструированной протеазы L-цепи BoNT/A, которая расщепляет изоформу белка SNARE, которая в основном экспрессируется в клетках, не являющихся нейронами, а именно в SNAP-23 человека (hSNAP-23). Настоящее изобретение, таким образом, относится к новому классу нецитотоксичного терапевтического агента.

### **Подробное описание изобретения**

Если здесь не указано иное, то научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, должны иметь значения, которые обычно понимают специалисты в данной области техники. Кроме того, если из контекста не следует иное то, используемые здесь номенклатуры и методики культивирования клеток и тканей являются хорошо известными и широко используемыми в данной области техники.

Тем не менее, что касается использования различных терминов в настоящем описании, то более конкретно применимы следующие определения.

Термины, употребленные в единственном числе, включают в себя значение множественного числа, такое как «один или более» или «по меньшей мере, один», если контекст не требует иного.

Используемый здесь термин «протеаза» означает фермент, который способен гидролитически расщеплять белки и/или пептиды. В контексте настоящего изобретения указанная протеаза, в частности, представляет собой протеазу легкой цепи (L-цепь) ботулинического нейротоксина (BoNT), то есть протеазу (также называемую протеолитическим доменом), полученную из ботулинического нейротоксина, в частности из ботулинического нейротоксина А (BoNT/A). Как хорошо известно специалисту в данной области техники, легкая цепь ботулинического нейротоксина обладает функцией протеазы (также известной как нецитотоксическая функция протеазы) и обычно имеет молекулярную массу примерно 50 кДа. Такие нецитотоксические протеазы обычно действуют путем протеолитического расщепления внутриклеточных транспортных белков, известных как белки SNARE (например, SNAP-25, VAMP или синтаксин) - см. Gerald K (2002) «Cell and Molecular Biology» (4th edition) John Wiley & Sons, Inc. Встречающаяся в природе (т.е. дикого типа) L-цепь BoNT/A в частности способна эффективно расщеплять SNAP-25, но только в незначительной степени способна расщеплять hSNAP-23, как дополнительно объяснено ниже. В противоположность этому, протеаза L-цепи BoNT/A настоящего изобретения, как более подробно описано ниже, отличается от встречающейся в природе L-цепи BoNT/A тем, что она обладает улучшенной способностью расщеплять hSNAP-23 и упоминается здесь как «модифицированная L-цепь BoNT/A, которая расщепляет hSNAP-23».

Способность расщеплять hSNAP23 может быть подтверждена с помощью обычного анализа, такого как анализ, описанный в Примере 2 ниже. Используемый здесь

термин «расщепление hSNAP-23» более конкретно означает, что модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения демонстрирует улучшенное расщепление hSNAP-23 по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1). Для этой цели может быть использован любой простой сравнительный анализ, такой как анализ hSNAP-23, описанный в Примере 2. L-цепь VoNT/A дикого типа способна только в незначительной степени (т.е. на уровне фона) расщеплять hSNAP-23.

Таким образом, модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения обладает одним или более (предпочтительно двумя) из следующих свойств:

а) более 0,2% (например, более 0,5%, предпочтительно, более 1%, более предпочтительно, более 5%) расщепления hSNAP-23 в бесклеточном анализе (1 мкмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубируют при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. Пример 2, Фигура 1; и/или

б) Km менее чем 225 (например, менее чем 200, предпочтительно менее чем 150) мкмоль в бесклеточном анализе (1 мкмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубируют при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. Пример 2, Фигура 1; и/или

с) Kcat (1/мин) менее 0,2 (например, менее 0,18, предпочтительно менее 0,1) в бесклеточном анализе (1 мкмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубируют при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. Пример 2, Фигура 1.

Модифицированная протеаза L-цепи VoNT/A настоящего изобретения может необязательно расщеплять не только hSNAP-23, но также SNAP-25. Расщепление SNAP-25 может быть подтверждено с помощью обычного анализа, такого как анализ, описанный в Примере 3 ниже. В соответствии с этим необязательным вариантом осуществления изобретения используемый здесь термин «расщепление SNAP-25» означает, что модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения предпочтительно демонстрирует, по меньшей мере, 0,5%, по меньшей мере, 1%, по меньшей мере, 2%, предпочтительно, по меньшей мере, 3%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 10% расщепления SNAP-25 по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1). Для этой цели может быть использован любой простой сравнительный анализ, такой как анализ SNAP-25, описанный в Примере 3.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения модифицированная протеаза L-цепи VoNT/A настоящего изобретения расщепляет hSNAP-23, но не расщепляет SNAP-25, такой как hSNAP-25.

Используемый здесь термин «SNAP-23» (ассоциированный с синаптосомами белок 23) обозначает белок SNARE, который способен связываться с различными другими белками SNARE и с высокой аффинностью образовывать с этими белками комплекс в клетке, предпочтительно в нервной клетке, тем самым регулируя слияние внутриклеточной мембраны в указанной клетке. Термин «hSNAP-23» более конкретно

относится к человеческому SNAP-23 и предпочтительно к белку, имеющему последовательность SEQ ID NO: 2.

Используемый здесь термин «SNAP-25» (ассоциированный с синапсосомами белок 25) обозначает белок SNARE, который способен связываться с различными другими белками SNARE и с высокой аффинностью образовывать с этими белками комплекс в клетке, предпочтительно в нервной клетке, тем самым регулируя слияние внутриклеточной мембраны в указанной клетке. Термин «hSNAP-25» более конкретно относится к человеческому SNAP-25 и предпочтительно к белку, имеющему последовательность SEQ ID NO: 3.

Термины «модификация», «замена» или «мутация» могут использоваться здесь взаимозаменяемо и относятся к изменению в аминокислотной последовательности по сравнению с последовательностью эталонного белка, то есть в настоящем изобретении по сравнению с последовательностью L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1). Аминокислотная последовательность, показанная здесь как SEQ ID NO: 1, имеет длину 438 аминокислотных остатков и заканчивается K438. Понятно, что K438 является первым аминокислотным остатком лизина в петле активации и наиболее вероятно представляет C-концевой конец L-цепи после протеолитического расщепления петли активации. Таким образом, SEQ ID NO: 1 представляет собой (естественно) активированную форму L-цепи VoNT/A дикого типа. В связи с этим до протеолитической активации L-цепь VoNT/A дикого типа обычно имеет длину ~448 аминокислотных остатков, и включает в себя короткое C-концевое удлинение аминокислотных остатков петли активации.

Как дополнительно объясняется ниже, настоящее изобретение раскрывает идентификацию критических аминокислотных положений в L-цепи VoNT/A дикого типа, которые требуют рациональной замены другим аминокислотным остатком, чтобы сделать L-цепь VoNT/A способной к расщеплению hSNAP-23. В этой связи, введение аминокислотной замены (то есть мутации) может быть осуществлено посредством вставки, делеции или замены аминокислоты и предпочтительно путем замены аминокислоты. Способы, позволяющие вводить такую мутацию, известны специалисту в данной области техники. Например, возможно ввести мутацию путем случайного или направленного мутагенеза, с помощью ПЦР с использованием вырожденных праймеров, например, в нуклеотидной последовательности, кодирующей эталонный белок. Указанные методы, в частности, описаны в Sambrook et al. «Molecular Cloning: A laboratory Manual», 4th edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2012, и обновления 2014), и в Ausubel et al. «Current Protocols in Molecular Biology», John Wiley & Sons (2012).

Аминокислотная замена происходит в одном или более «связывающих карманах» L-цепи относительно L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1). Используемый здесь термин «связывающий карман» означает область L-цепи VoNT/A, которая содержит одну или более аминокислот, которые являются точками контакта (например, через водородную связь, солевой мостик и/или гидрофобный контакт) для связывания с соответствующим сайтом связывания hSNAP-23, и/или которые обеспечивают

пространство для размещения других аминокислотных остатков субстрата (например, путем модификации, такой как замещение), способных связывать hSNAP-23. Используемый здесь термин «связывание с» означает «подходящий для связывания» и составляет часть научного обоснования заявителя для настоящего изобретения - указанное обоснование не является существенным техническим признаком настоящего изобретения. Например, связывающий карман протеазы L-цепи BoNT/A, определяемый аминокислотными остатками E148, T307, A308 и Y312 SEQ ID NO: 1, относится к области протеазы L-цепи BoNT/A, содержащей аминокислоты E148, T307, A308 и/или Y312, и/или их мутанты, как описано в настоящем изобретении, которые, как полагает заявитель, участвуют в связывании с предсказанным сайтом связывания на hSNAP-23 (например, с сайтом связывания P182/D178 hSNAP-23).

Используемый здесь термин «сайт связывания» относится к области hSNAP-23, которая содержит одну или более аминокислот, которые могут быть связаны соответствующим связывающим карманом L-цепи BoNT/A. Например, сайт связывания «P182/D178» hSNAP-23 содержит аминокислоты P182 и/или D178 hSNAP-23. Используемый здесь термин «сайт связывания» просто означает «гипотетический сайт связывания» (как теоретически предсказано Заявителем) и является частью научного обоснования заявителя для настоящего изобретения - указанное обоснование не является существенным техническим признаком настоящего изобретения.

«Идентичность по последовательности» между аминокислотными или нуклеотидными последовательностями может быть определена путем сравнения положения в каждой из последовательностей, которые могут быть выровнены для целей сравнения. Когда положение в сравниваемых последовательностях занято одним и тем же нуклеотидом или аминокислотой, тогда последовательности в этом положении идентичны. Степень идентичности между аминокислотными последовательностями является функцией количества идентичных аминокислотных последовательностей, которые являются общими для этих последовательностей. Степень идентичности по последовательности между нуклеиновыми кислотами является функцией количества идентичных нуклеотидов в положениях, общих для этих последовательностей.

Чтобы определить «процент идентичности по последовательности» между двумя аминокислотными последовательностями или двумя последовательностями нуклеиновых кислот, последовательности выравнивают для оптимального сравнения. Например, пробелы могут быть введены в последовательность первой аминокислотной последовательности или первой нуклеотидной последовательности для оптимального выравнивания со второй аминокислотной последовательностью или второй нуклеотидной последовательностью. Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих аминокислотных положениях или нуклеотидных положениях. Когда положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, молекулы в этой позиции считаются идентичными.

Процент(%) идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей. Следовательно, процент идентичности может быть рассчитан путем умножения количества идентичных положений на 100 и деления на длину выровненной области (перекрывающиеся положения), включая промежутки (только внутренние промежутки, а не промежутки на концах последовательности).

В этом сравнении последовательности могут быть одинаковой длины или могут иметь разную длину. Оценка идентичности учитывает только идеальные совпадения и не учитывает степень сходства аминокислот друг с другом.

В соответствии с настоящим изобретением оптимальное выравнивание последовательностей предпочтительно может проводиться с помощью алгоритма глобального выравнивания гомологии, если выравнивание выполняется с использованием последовательностей одинаковой или сходной длины, например, алгоритмом, описанным в Needleman and Wunsch (*Journal of Molecular Biology*; 1970, 48 (3): 443-53), с помощью компьютерных реализаций этого алгоритма (например, с использованием программного обеспечения DNASTAR® Lasergene) или путем визуального осмотра. Альтернативно, если выравнивание выполняется с использованием последовательностей различной длины (например, аминокислотная последовательность легкой цепи настоящего изобретения сравнивается с полной аминокислотной последовательностью встречающегося в природе ботулинического нейротоксина), то в этом случае оптимальное выравнивание последовательностей может предпочтительно проводиться с помощью алгоритма локального выравнивания гомологии, такого как алгоритм, описанный в Smith and Waterman (*Journal of Molecular Biology*; 1981, 147: 195-197), с помощью компьютерных реализаций этого алгоритма (например, с использованием программного обеспечения DNASTAR® Lasergene) или путем визуального осмотра. Выбирается наилучшее выравнивание (т. е. приводящее к наибольшему проценту идентичности между сравниваемыми последовательностями), генерируемое различными методами. Примеры алгоритмов выравнивания на основе глобальной и локальной гомологии хорошо известны специалисту в данной области техники и включают в себя, без ограничения, ClustalV (глобальное выравнивание), ClustalW (локальное выравнивание) и BLAST (локальное выравнивание).

Специалист в данной области техники также легко поймет, что настоящее изобретение включает в себя модифицированные L-цепи BoNT/A, которые в значительной степени гомологичны и которые сохраняют способность расщеплять hSNAP-23, то есть функциональные варианты или гомологи. Эти функциональные варианты или гомологи могут быть охарактеризованы как имеющие одну или более аминокислотных мутаций (таких как делеция, добавление и/или замена аминокислот), отличных от раскрытых здесь в связи с расщеплением hSNAP-23, и которые незначительно влияют на укладку или протеазную активность, в частности расщепление hSNAP-23. Например, такие мутации включают в себя без ограничений консервативные



замены, небольшие делеции (обычно от 1 до 30 аминокислот), небольшие amino- или карбокси-концевые удлинения (такие как amino-концевой остаток метионина), добавление небольшого линкерного пептида до примерно 20-25 остатков или аффинной метки.

Функциональные варианты или гомологи в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержат мутации минорной природы, такие как консервативные аминокислотные замены. Консервативные аминокислотные замены хорошо известны специалисту в данной области техники и включают в себя без ограничения:

Основные: аргинин, лизин, гистидин

Кислотные: глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота

Полярные: глутамин, аспарагин

Гидрофобные: лейцин, изолейцин, валин, метионин

Ароматические: фенилаланин, триптофан, тирозин

Малые: глицин, аланин, серин, треонин.

В дополнение к 20 стандартным аминокислотам нестандартные аминокислоты (такие как 4-гидроксипролин, 6-N-метиллизин, 2-аминоизомаасляная кислота, изовалин и  $\alpha$ -метилсерин) могут заменять аминокислотные остатки полипептидов настоящего изобретения. Ограниченное количество неконсервативных аминокислот, аминокислот, которые не кодируются генетическим кодом, и неприродных аминокислот могут быть заменены аминокислотными остатками кластридиального полипептида. Полипептиды настоящего изобретения также могут содержать неприродные аминокислотные остатки.

Не встречающиеся в природе аминокислоты включают в себя без ограничений транс-3-метилпролин, 2,4-метанолпролин, цис-4-гидроксипролин, транс-4-гидроксипролин, N-метилглицин, алло-треонин, метил-треонин, гидроксиэтилцистеин, гидроксиэтилгомоцистеин, нитроглутамин, гомоглутамин, пипеколиновую кислоту, 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.

Замена аминокислоты может включать в себя замену аминокислоты, имеющей определенное физико-химическое свойство (например, гидрофобность), на аминокислоту, имеющую сходное или альтернативное свойство. Примеры таких замен приведены ниже:

Кислая аминокислота, замещенная нейтральной полярной аминокислотой;

Полярная аминокислота, замещенная неполярной аминокислотой;

Неполярная аминокислота, замещенная неполярной аминокислотой;

Неполярная аминокислота, замещенная полярной аминокислотой;

Полярная аминокислота, замещенная основной аминокислотой;

Неполярная аминокислота, замещенная кислой аминокислотой;

Неполярная аминокислота, замещенная полярной аминокислотой.

Соответственно, настоящее изобретение включает в себя L-цепь всех подтипов

BoNT/A, такую как любая из L-цепей BoNT/A1-BoNT/A8, которая содержат одну или более мутаций, как описано здесь, для расщепления hSNAP-23. Указанная L-цепь BoNT/A может дополнительно содержать дополнительные мутации для создания ненативного сайта активации расщепления, такого как сайт расщепления энтерокиназы (SEQ ID NO: 10), протеазы PreScission, фактора Ха, тромбина, протеазы TEV и т.д.

Дополнительные определения приведены в описании.

Настоящее изобретение может быть описано следующим образом.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к модифицированной протеазе L-цепи ботулинического нейротоксина А (BoNT/A), которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23), имеющей модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая содержит:

а) по меньшей мере, одну замену аминокислотного остатка, расположенного в первом связывающем кармане протеазы L-цепи BoNT/A для связывания с сайтом связывания P182/D178 hSNAP-23;

б) где указанный первый связывающий карман протеазы L-цепи BoNT/A, определяется аминокислотными остатками E148, T307, A308 и Y312 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная, по меньшей мере, одна замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аспарагина и тирозина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку E148 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из фенилаланина, изолейцина и лейцина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку T307 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

iii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из пролина, аспарагина, треонина и изолейцина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку A308 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

iv. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из лизина, валина, метионина и лейцина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Y312 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

Не ограничивая себя какой-либо теорией, заявитель полагает, что определенный выше связывающий карман L-цепи BoNT/A влияет на важную фермент-субстратную связь с последовательностью узнавания hSNAP-23.

Таким образом, настоящее изобретение основано на неожиданном открытии

(например, неожиданном техническом эффекте), что целевые аминокислотные замены, как заявлено, позволяют получать L-цепь(и) BoNT/A с повышенной эффективностью расщепления hSNAP-23 (по сравнению с L-цепью BoNT дикого типа). Авторы настоящего изобретения не только успешно идентифицировали подходящие аминокислотные положения L-цепи BoNT/A, которые могут быть изменены (например, замещены) для увеличения эффективности расщепления hSNAP-23, но также идентифицировали точные аминокислотные замены, которые обеспечивают этот эффект.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к модифицированной протеазе L-цепи ботулинического нейротоксина А (BoNT/A), которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23), имеющей модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая содержит:

а) по меньшей мере, одну замену аминокислотного остатка, расположенного в первом связывающем кармане протеазы L-цепи BoNT/A, для связывания с сайтом связывания P182/D178 hSNAP-23;

б) где указанный первый связывающий карман протеазы L-цепи BoNT/A, определяется аминокислотным остатком E148 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная, по меньшей мере, одна замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аспарагина и тирозина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку E148 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к модифицированной протеазе L-цепи ботулинического нейротоксина А (BoNT/A), которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23), имеющей модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью BoNT/A дикого типа. (SEQ ID NO: 1), которая содержит:

а) по меньшей мере, одну замену аминокислотного остатка, расположенного в первом связывающем кармане протеазы L-цепи BoNT/A, для связывания с сайтом связывания P182/D178 hSNAP-23;

б) где указанный первый связывающий карман протеазы L-цепи BoNT/A, определяется аминокислотными остатками E148, T307, A308 и Y312 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная, по меньшей мере, одна замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из фенилаланина, изолейцина и лейцина в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку

T307 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из пролина, аспарагина, треонина и изолейцина в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку A308 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

iii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из лизина, валина, метионина и лейцина в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Y312 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

Модифицированная L-цепь VoNT/A может содержать одну аминокислотную замену (по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1 дикого типа). Модифицированная L-цепь VoNT/A может содержать две аминокислотные замены (по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1 дикого типа). Модифицированная L-цепь VoNT/A может содержать три аминокислотные замены (по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1 дикого типа). Модифицированная L-цепь VoNT/A может содержать четыре аминокислотные замены (по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1 дикого типа).

Модифицированные L-цепи VoNT/A настоящего изобретения, содержащие мутацию связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, обычно демонстрируют, по меньшей мере, в 1,15 раза повышенную эффективность расщепления hSNAP-23 (по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа) - см. 1-й столбец данных на Фигуре 1А. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y или E148N;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену T307I, A308P и Y312V;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену T307F, A308N и Y312L;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148N, T307I и A308P, Y312V;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, T307F, A308N и Y312L;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, T307I, A308P и Y312V;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, T307L, A308T и Y312M;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, T307L, A308I и Y312M.

В одном варианте осуществления модифицированные L-цепи VoNT/A настоящего изобретения, содержащие мутацию связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, обычно демонстрируют, по меньшей мере, в 1,35 раза повышенную

эффективность расщепление hSNAP-23 (по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа) - см. 1-й столбец данных на Фигуре 1А. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначааемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y или E148N;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену T307I, A308P и Y312V;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену T307F, A308N и Y312L;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148N, T307I, A308P и Y312V;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, T307F, A308N и Y312L;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, T307I, A308P и Y312V;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, T307L, A308T и Y312M;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, T307L, A308I и Y312M.

В другом варианте осуществления модифицированные L-цепи VoNT/A настоящего изобретения, содержащие мутацию связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, обычно демонстрируют, по меньшей мере, в 1,7 раза повышенную эффективность расщепления hSNAP-23 (по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа) - см. 1-й столбец данных на Фигуре 1А. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначааемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену T307F;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену T307I;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену Y312K;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену Y312K, E148Y;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену T307I, A308P и Y312V;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148N, T307I, A308P и Y312V;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, T307F, A308N и Y312L;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, T307L, A308T и Y312M.

В дополнительном варианте осуществления модифицированные L-цепи VoNT/A настоящего изобретения, содержащие мутацию связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, могут демонстрировать, по меньшей мере, 2,0-кратное увеличение эффективности расщепления hSNAP-23 (по сравнению с L-цепью VoNT/A

дикого типа) - см. 1-й столбец данных на Фигуре 1А. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148N, T307I, A308P и Y312V;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, T307F, A308N и Y312L;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, T307L, A308T и Y312M.

В дополнительном варианте осуществления модифицированные L-цепи VoNT/A настоящего изобретения, содержащие мутацию связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, могут демонстрировать, по меньшей мере, 4,0-кратное увеличение эффективности расщепления hSNAP-23 (по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа) - см. 1-й столбец данных на Фигуре 1А. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148N, T307I, A308P и Y312V;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, T307F, A308N и Y312L;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, T307L, A308T и Y312M.

В другом варианте осуществления модифицированные L-цепи VoNT/A настоящего изобретения, содержащие мутацию связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, демонстрируют, по меньшей мере, 6,0, предпочтительно, по меньшей мере, 7,0, более предпочтительно, по меньшей мере, 8-кратное увеличение эффективности расщепления hSNAP-23 (по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа) - см. 1-й столбец данных на Фигуре 1А. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y.

Модифицированные L-цепи VoNT/A настоящего изобретения, содержащие мутацию связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, обычно демонстрируют более 1,5% расщепления hSNAP-23 (% при 1 мкмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных на Фигуре 1А. Для справки: L-цепь VoNT/A дикого типа (например, SEQ ID NO: 1) демонстрирует менее чем 0,5% расщепления hSNAP-23 (% при 1 мкмоль

модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа). Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену T307F;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену T307I;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену Y312K;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену Y312K и E148Y.

В одном варианте осуществления модифицированные L-цепи VoNT/A настоящего изобретения, содержащие мутацию связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, обычно демонстрируют более чем 2% расщепления hSNAP-23 (% при 1 мкмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных на Фигуре 1А. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену T307I;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену Y312K.

В еще одном варианте осуществления модифицированные L-цепи VoNT/A настоящего изобретения, содержащие мутацию связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, демонстрируют, по меньшей мере, повышенные 9% расщепления hSNAP-23 (% при 1 мкмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных на Фигуре 1А. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y.

Дополнительные примеры модифицированных мутантов L-цепи VoNT/A, имеющих мутацию связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену A308L;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену A308V;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену A308I;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену A308P;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену A308N;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену A308T;  
модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену Y312V;  
модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену Y312M;  
модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену Y312L.

Модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, может содержать одну или более замен аминокислотных остатков по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа, как определено здесь ранее. В качестве иллюстрации, модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения может иметь одну мутацию аминокислотного остатка (в пределах связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, как определено выше), например, мутацию, соответствующую аминокислотному остатку E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1). Аналогично, модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения может содержать более одной мутации аминокислотного остатка (в пределах связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, как определено выше), например мутации, соответствующие аминокислотным остаткам T307, A308 и Y312 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

В предпочтительном варианте осуществления модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения, имеющая одну или более мутаций связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, дополнительно содержит одну или более мутаций в одном или более различных связывающих карманах L-цепи VoNT/A для hSNAP-23, как дополнительно описано ниже.

Указанные один или более различных связывающих кармана L-цепи VoNT/A для hSNAP-23 включают в себя второй связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A для связывания с сайтом связывания D189/D192 hSNAP-23; третий связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A для связывания с сайтом связывания I198 hSNAP-23; четвертый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A для связывания с сайтом связывания K185 hSNAP-23; пятый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A для связывания с сайтом связывания R186 hSNAP-23; шестой связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A для связывания с сайтом связывания K206 hSNAP-23; седьмой связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A для связывания с сайтом связывания D210 hSNAP-23; восьмой связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A для связывания с сайтом связывания D168 hSNAP-23.

Альтернативно, согласно различным техническим признакам настоящего изобретения, модифицированная L-цепь VoNT/A может содержать одну или более мутаций внутри одного или более связывающих карманов L-цепи VoNT/A, отличных от связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP23, как определено выше.

Указанные связывающие карманы L-цепи VoNT/A для hSNAP-23 и соответствующие представляющие интерес мутации дополнительно описаны ниже.

Соответственно, в качестве дополнительного технического признака или в качестве



альтернативного технического признака настоящее изобретение включает в себя мутанты L-цепи VoNT/A, содержащие одну или более мутаций в определенном здесь кармане L-цепи VoNT/A. В качестве примера, модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения, которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23), имеет модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO : 1) которая включает в себя:

а) замену аминокислотного остатка, расположенного в пятом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A для связывания с сайтом связывания R186 hSNAP-23;

б) где указанный пятый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A, определяется аминокислотным остатком S143 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамина, глутамата и аспартата в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку S143 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

Не ограничивая себя какой-либо теорией, заявитель полагает, что определенный выше связывающий карман L-цепи VoNT/A обеспечивает стабилизирующий солевой мостик между остатками R186 на hSNAP-23 и S143 на VoNT/A.

Модифицированные L-цепи VoNT/A настоящего изобретения, содержащие мутацию связывающего кармана для сайта связывания R186 hSNAP-23, как правило, имеют  $K_M$  для hSNAP-23 менее чем 100 мкмоль, например, менее чем 95 мкмоль - 3-й столбец данных на Фигуре 1А. Для справки: L-цепь VoNT/A дикого типа (например, SEQ ID NO: 1) имеет  $K_M$  для hSNAP-23 больше 150 мкмоль, например, больше 200 мкмоль. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену V304D;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену V304E;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену G305D;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену G305E;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену S143D;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену S143E;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену S143Q;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену K166F.

В предпочтительном варианте осуществления модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания R186 hSNAP-23, может дополнительно содержать одну или более мутаций в пределах одного или более различных связывающих карманов L-цепи VoNT/A, как описано здесь (например, в связывающем кармане для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, как

определено выше). Такие мутанты обычно демонстрируют, по меньшей мере, 0,5-кратное снижение эффективности расщепления hSNAP-23 (по сравнению с E148Y-модифицированной L-цепью VoNT/A) или, другими словами увеличенное, по меньшей мере, в 4,0 раза расщепление hSNAP-23 (по сравнению с L-цепью VoNT дикого типа) - см. 1-й столбец данных для многокарманных мутантов на Фигуре 1B; или, по меньшей мере, 5% расщепления hSNAP-23 (% при 1 мкмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных на Фигуре 1B. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y и S143E;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y и S143D;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащая замену E148Y и S143Q.

Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к модифицированной протеазе L-цепи VoNT/A, которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23) и имеет модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая содержит:

a) замену аминокислотного остатка, расположенного в первом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A для связывания с сайтом связывания P182/D178 hSNAP-23; где указанный первый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

b) замену аминокислотного остатка, расположенного в пятом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A для связывания с сайтом связывания R186 hSNAP-23; где указанный пятый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком S143 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

c) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из тирозина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку S143 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к модифицированной протеазе L-цепи VoNT/A, которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23) и имеет модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая содержит:

а) замену аминокислотного остатка, расположенного в первом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A для связывания с сайтом связывания P182/D178 hSNAP-23; где указанный первый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A, определяется аминокислотным остатком E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

б) замену аминокислотного остатка, расположенного в пятом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A для связывания с сайтом связывания R186 hSNAP-23; где указанный пятый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком S143 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из тирозина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку S143 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления модифицированная L-цепь VoNT настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания R186 hSNAP-23, дополнительно содержит одну или более мутаций в одном или более различных связывающих карманах L-цепи VoNT/A, как описано здесь (например, в пределах связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, как определено выше). Такие мутанты обычно демонстрируют, по меньшей мере, 2,0-кратное увеличение эффективности расщепления hSNAP-23 (по сравнению с модифицированной E148Y L-цепью VoNT/A) - см. 1-й столбец данных для многокарманных мутантов на Фигуре 1B. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, имеющую замену E148Y и S143E;

модифицированную L-цепь VoNT/A, имеющую замену E148Y и S143D.

В другом варианте осуществления модифицированная L-цепь VoNT настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания R186 hSNAP-23, дополнительно содержит одну или более мутаций в одном или более различных связывающих карманах L-цепи VoNT/A, как описано здесь (например, в пределах связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, как определено выше). Такие мутанты обычно демонстрируют как минимум 3,0-кратное увеличение эффективности расщепления hSNAP-23 (в процентах по сравнению с модифицированной E148Y L-цепью VoNT/A) - см. 1-й столбец данных для многокарманных мутантов на Фигуре 1B. Примеры таких модифицированных L-цепей

VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, S143D.

В качестве дополнительного технического признака или альтернативного технического признака настоящее изобретение включает в себя мутанты L-цепи VoNT/A, содержащие одну или более мутаций в определенном здесь кармане L-цепи VoNT/A. Например, модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения, которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23), имеет модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), который содержит:

а) по меньшей мере, одну замену аминокислотного остатка, расположенного в четвертом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A для связывания с сайтом связывания K185 hSNAP-23;

б) где указанный четвертый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотными остатками V304 и G305 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная, по меньшей мере, одна замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамата и аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку V304 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамата и аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку G305 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

Не ограничивая себя какой-либо теорией, заявитель полагает, что определенный выше связывающий карман L-цепи VoNT/A обеспечивает стабилизирующий солевой мостик между остатком K185 на hSNAP-23 и VoNT/A.

Модифицированные L-цепи VoNT/A настоящего изобретения, содержащие мутацию связывающего карманного для сайта связывания K185 hSNAP-23, обычно имеют  $K_M$  для hSNAP-23 менее 100 мкмоль · см. 3-й столбец данных на Фигуре 1А. Для справки: L-цепь VoNT/A дикого типа (например, SEQ ID NO: 1) имеет  $K_M$  для hSNAP-23 больше 150 мкмоль, например, больше 200 мкмоль. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену V304D;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену V304E;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену G305D;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену G305E.

Модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания K185 hSNAP-23, содержит одну или более замен аминокислотных остатков по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа, как определено здесь ранее. В качестве иллюстрации, модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения может иметь одну мутацию аминокислотного остатка (в пределах связывающего кармана для сайта связывания K185 hSNAP-23, как определено выше), например, мутант, соответствующий аминокислотному остатку G305 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1). Аналогично, модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения может содержать более одной мутации (в пределах связывающего кармана для сайта связывания K185 hSNAP-23, как определено выше), например, соответствующую аминокислотным остаткам V304 и G305 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

В предпочтительном варианте осуществления модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания K185 hSNAP-23, может дополнительно содержать одну или более мутаций в пределах одного или более различных связывающих карманов L-цепи VoNT/A для hSNAP-23, как описано здесь (например, в пределах связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, как определено выше). Такие мутанты обычно демонстрируют, по меньшей мере, 2,0-кратное, предпочтительно, по меньшей мере, 2,5-кратное увеличение эффективности расщепления hSNAP-23 (по сравнению с E148Y-модифицированной L-цепью VoNT/A) - см. 1-й столбец данных для многокарманных мутантов на Фигуре 1B. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, имеющую замену E148Y и G305D.

Таким образом, в другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к модифицированной протеазе L-цепи VoNT/A, которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23) и имеет модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая включает в себя:

а) замену аминокислотного остатка, расположенного в первом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания P182/D178 hSNAP-23; где указанный первый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A, определяется аминокислотным остатком E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

б) замену аминокислотного остатка, расположенного в четвертом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания K185 hSNAP-23; где указанный четвертый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A, определяется аминокислотным остатком G305 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из тирозина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку G305 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

Также, в качестве дополнительного технического признака или в качестве альтернативного технического признака настоящее изобретение включает в себя мутанты L-цепи VoNT/A, содержащие одну или более мутаций в определенном здесь кармане L-цепи VoNT/A. В качестве примера, модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения, которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23), имеет модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO : 1), которая включает в себя:

a) замену аминокислотного остатка, расположенного во втором связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания D189/D192 hSNAP-23;

b) где указанный второй связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A, определяется аминокислотным остатком Q29 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

c) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток аланина в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Q29 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

Не ограничивая себя какой-либо теорией, заявитель полагает, что определенный выше связывающий карман L-цепи VoNT/A обеспечивает стабилизирующее взаимодействие между D189/D192 на hSNAP-23 и аминокислотой 29 VoNT/A или соседними аминокислотами.

Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, имеющую замену Q29A.

В предпочтительном варианте осуществления модифицированная L-цепь VoNT настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания D189/D192 hSNAP-23, дополнительно содержит одну или более мутаций в одном или более различных связывающих карманах L-цепи VoNT/A как описано здесь (например, внутри связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, как определено выше). Такие мутанты обычно демонстрируют увеличение эффективности расщепления hSNAP-23, по меньшей мере, в 1,50 раза (по сравнению с E148Y-модифицированной L-цепью VoNT/A) - см. 1-й столбец данных, представленный для

многокарманных мутантов на Фигуре 1В. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, имеющую замену E148Y, Q29A.

Таким образом, в другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к модифицированной протеазе L-цепи VoNT/A, которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23) и имеет модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая включает в себя:

а) замену аминокислотного остатка, расположенного в первом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания P182/D178 hSNAP-23; где указанный первый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

б) замену аминокислотного остатка, расположенного во втором связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания D189/D192 hSNAP-23; где указанный второй связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком Q29 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из тирозина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Q29 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления модифицированная L-цепь VoNT настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания D189/D192 hSNAP-23, может дополнительно содержать одну или более мутаций в, по меньшей мере, двух разных связывающих карманах L-цепи VoNT/A, как описано здесь (например, внутри связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23 и внутри связывающего кармана для сайта связывания R186 hSNAP-23, как определено выше). Такие мутанты обычно демонстрируют как минимум 2,5-кратное увеличение эффективности расщепления hSNAP-23 (по сравнению с E148Y-модифицированной L-цепью VoNT/A - см. 1-й столбец данных, представленный на Фигуре 1В. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, Q29A и S143D.

Таким образом, в другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к модифицированной протеазе L-цепи VoNT/A, которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23) и имеет модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая включает в себя:

а) замену аминокислотного остатка, расположенного в первом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания P182/D178 hSNAP-23; где указанный первый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

б) замену аминокислотного остатка, расположенного во втором связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания D189/D192 hSNAP-23; где указанный второй связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A, определяется аминокислотным остатком Q29 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

с) замену аминокислотного остатка, расположенного в пятом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания R186 hSNAP-23; где указанный пятый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком S143 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

д) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из тирозина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Q29 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

iii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку S143 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления модифицированная L-цепь VoNT настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания D189/D192 на hSNAP-23, может дополнительно содержать одну или более мутаций в, по меньшей мере, двух разных связывающих карманах L-цепи VoNT/A (например, внутри связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23 и внутри связывающего кармана для сайта связывания K185 hSNAP-23, как определено выше). Такие мутанты обычно демонстрируют, по меньшей мере, 3,0-кратное, предпочтительно, по меньшей мере, 3,4-кратное увеличение эффективности расщепления hSNAP-23 (по



сравнению с E148Y-модифицированной L-цепью VoNT/A) - см. 1-й столбец данных, представленный для многокарманных мутантов на Фигуре 1B. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замены E148Y, Q29A и G305D.

Таким образом, в другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к модифицированной протеазе L-цепи VoNT/A, которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23) и имеет модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая включает в себя:

а) замену аминокислотного остатка, расположенного в первом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания P182/D178 hSNAP-23; где указанный первый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

б) замену аминокислотного остатка, расположенного во втором связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания D189/D192 hSNAP-23; где указанный второй связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком Q29 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

с) замену аминокислотного остатка, расположенного в четвертом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания K185 hSNAP-23; где указанный четвертый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком G305 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

д) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из тирозина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Q29 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

iii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку G305 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

В качестве дополнительного технического признака или альтернативного технического признака настоящее изобретение включает в себя мутанты L-цепи VoNT/A,

содержащие одну или более мутаций в определенном здесь кармане L-цепи VoNT/A. В качестве примера, модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения, которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23), имеет модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO : 1), которая включает в себя:

а) по меньшей мере, одну замену аминокислотного остатка, расположенного в шестом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания K206 hSNAP-23;

б) где указанный шестой связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотными остатками Y251, L256, V258, L367 и F369 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная, по меньшей мере, одна замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамата и аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Y251 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамата, аспартата, глутамина, глицина, аланина и аргинина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку L256 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

iii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из серина, аланина, пролина, лейцина и глутамата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку V258 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

iv. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина и глицина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку L367 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

v. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, серина и лейцина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку F369 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

В качестве дополнительного технического признака или альтернативного технического признака настоящее изобретение включает в себя мутанты L-цепи VoNT/A, содержащие одну или более мутаций в определенном здесь кармане L-цепи VoNT A. В качестве примера, модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения, которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23), имеет модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая включает в себя:

а) по меньшей мере, одну замену аминокислотного остатка, расположенного в шестом связывающем кармане протеазы L-цепи BoNT/A, для связывания с сайтом связывания K206 hSNAP-23;

б) где указанный шестой связывающий карман протеазы L-цепи BoNT/A определяется аминокислотными остатками Y251, L256, V258, L367 и F369 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная, по меньшей мере, одна замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамата и аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Y251 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамина и аргинина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку L256 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

iii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из серина, лейцина и глутамата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку V258 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

iv. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина и глицина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку L367 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

v. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, серина и лейцина в положении в аминокислотной последовательности модифицированной протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку F369 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

Не ограничивая себя какой-либо теорией, заявитель полагает, что определенный выше связывающий карман L-цепи BoNT/A влияет на важную фермент-субстратную связь с положением (S3') последовательности узнавания hSNAP-23.

В качестве дополнительного технического признака или альтернативного технического признака настоящее изобретение включает в себя мутанты L-цепи BoNT/A, содержащие одну или более мутаций в определенном здесь кармане L-цепи BoNT/A. В качестве примера, модифицированная L-цепь BoNT/A настоящего изобретения, которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23), имеет модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая включает в себя:

а) по меньшей мере, одну замену аминокислотного остатка, расположенного в шестом связывающем кармане протеазы L-цепи BoNT/A, для связывания с сайтом

связывания K206 hSNAP-23;

b) где указанный шестой связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотными остатками Y251, L256, V258, L367 и F369 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

c) и где указанная, по меньшей мере, одна замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамата и аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Y251 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамина и аргинина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку L256 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

iii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из серина, лейцина и глутамата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку V258 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

iv. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина и глицина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку L367 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

v. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, серина и лейцина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку F369 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

Модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания K206 hSNAP-23, может содержать одну или более замен аминокислотных остатков по сравнению с L-цепями VoNT/A дикого типа, описанными здесь ранее. В качестве иллюстрации, модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения может иметь одну мутацию аминокислотного остатка (в пределах связывающего кармана для сайта связывания K206 hSNAP-23), например, мутант, соответствующий аминокислотному остатку Y251 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1). Аналогично, модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения может содержать более одной мутации (в пределах связывающего кармана для сайта связывания K206 hSNAP-23), например, мутанты, соответствующие аминокислотным остаткам Y251 и L256 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

Модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретению, содержащая мутацию связывающего карманного для сайта связывания K206 hSNAP-23, обычно демонстрирует более 1,5% расщепления hSNAP-23 (% при 1 мкмоль модифицированной

L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных на Фигуре 1А. Для справки: L-цепь VoNT/A дикого типа (например, SEQ ID NO: 1) демонстрирует менее чем 0,5% расщепления hSNAP-23 (% при 1 мкмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных, представленный на Фигуре 1А. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену Y251D;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену Y251E;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену L256D.

В одном варианте осуществления модифицированные L-цепи VoNT/A настоящего изобретения демонстрируют по меньшей мере 3% расщепления hSNAP-23 (% при 1 мкмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных, представленный на Фигуре 1А. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену Y251E.

Дополнительные примеры модифицированных мутантов L-цепи VoNT/A, имеющих мутацию связывающего кармана для K206 hSNAP-23 (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену V245D;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену L256E;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену L256G;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену L256Q;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену L256A;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену V258A;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену V258P;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену V258L;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену L256E и V258P;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену L256Q и V258P;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену L256A и V258L;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену L256G и V258L.

В предпочтительном варианте осуществления модифицированная L-цепь VoNT настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания K206 hSNAP-23, может дополнительно содержать одну или более мутаций в одном или более различных связывающих карманах L-цепи VoNT/A, как описано здесь (например,

внутри связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, как определено выше). Такие мутанты обычно демонстрируют, по меньшей мере, 0,5-кратное снижение эффективности расщепления hSNAP-23 (по сравнению с E148Y-модифицированной L-цепью VoNT/A) или, другими словами, по меньшей мере, в 4,0-кратное увеличение эффективности расщепления hSNAP23 (по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа) - см. 1-й столбец данных, представленный для многокарманных мутантов на Фигуре 1B, или, по меньшей мере, 5% расщепления hSNAP-23 (% при 1 мкмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных на Фигуре 1B. Предпочтительные примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замены E148Y и Y251D;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замены E148Y и L256D;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замены E148Y и Y251E.

Таким образом, в другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к модифицированной протеазы L-цепи VoNT/A, которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23) и имеет модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая включает в себя:

а) замену аминокислотного остатка, расположенного в первом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания P182/D178 hSNAP-23; где указанный первый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

б) замену аминокислотного остатка, расположенного в пятом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания K206 hSNAP-23; где указанный пятый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком Y251 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из тирозина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Y251 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления модифицированная L-цепь VoNT настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания K206

hSNAP-23, может дополнительно содержать одну или более мутаций в, по меньшей мере, трех различных связывающих карманах L-цепи VoNT/A, как описано здесь (например, в связывающем кармане для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, в связывающем кармане для сайта связывания R186 hSNAP-23 и в связывающем кармане для сайта связывания D189/D192, как определено выше). Такие мутанты, как правило, демонстрируют как минимум 1,3-кратное увеличение эффективности расщепления hSNAP-23 (по сравнению с E148Y-модифицированной L-цепью VoNT/A) - см. 1-й столбец данных, представленный для многокарманных мутантов на Фигуре 1B. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замены E148Y, S143D, Q29A и Y251E.

Таким образом, в другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к модифицированной протеазе L-цепи VoNT/A, которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23) и имеет модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая включает в себя:

a) замену аминокислотного остатка, расположенного в первом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания P182/D178 hSNAP-23; где указанный первый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A, определяется аминокислотным остатком E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

b) замену аминокислотного остатка, расположенного в пятом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания R186 hSNAP-23; где указанный пятый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком S143 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

c) замену аминокислотного остатка, расположенного во втором связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания D189/D192 hSNAP-23; где указанный второй связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A, определяется аминокислотным остатком Q29A L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

d) замену аминокислотного остатка, расположенного в шестом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания K206 hSNAP-23; где указанный шестой связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком Y251 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

e) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из тирозина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ

ID NO: 1); и

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку S143 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

iii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Q29 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

iv. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Y251 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

В качестве дополнительного технического признака или альтернативного технического признака настоящее изобретение включает в себя мутанты L-цепи VoNT/A, содержащие одну или более мутаций в определенном здесь кармане L-цепи VoNT/A. В качестве примера, модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения, которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23), имеет модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая включает в себя:

a) замену аминокислотного остатка, расположенного в третьем связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания I198 hSNAP-23;

b) где указанный третий связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком K166 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

c) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из валина, фенилаланина, лейцина и изолейцина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку K166 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

Не ограничивая себя какой-либо теорией, заявитель полагает, что определенный выше связывающий карман L-цепи VoNT/A может обеспечить стабилизирующее гидрофобное взаимодействие между I198 в hSNAP-23 и аминокислотой 166 VoNT/A.

Модифицированные L-цепи VoNT/A настоящего изобретения, содержащие мутацию связывающего кармана для сайта связывания I198 hSNAP-23, обычно демонстрируют более 9% расщепления hSNAP-23 (% при 1 мкмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных, представленный на Фигуре 1A. Для справки: L-цепь VoNT/A дикого типа (например, SEQ ID NO: 1) демонстрирует менее чем 0,5% расщепления hSNAP-23 (% при 1 мкмоль



модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных, представленный на Фигуре 1А. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену K166V;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену K166F;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену K166L;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену K166I.

В одном варианте осуществления модифицированные L-цепи VoNT/A настоящего изобретения, содержащие мутацию связывающего карманного для сайта связывания I198 hSNAP-23, обычно демонстрируют более 40% расщепления hSNAP-23 (% при 1 мкмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных, представленный на Фигуре 1А. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену K166F;
- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену K166L.

В дополнительном варианте осуществления модифицированные L-цепи VoNT/A настоящего изобретения, содержащие мутацию связывающего карманного для сайта связывания I198 hSNAP-23, обычно демонстрируют более 60% расщепления hSNAP-23 (% при 1 мкмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных, представленный на Фигуре 1А. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

- модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену K166F.

В предпочтительном варианте осуществления модифицированная L-цепь VoNT настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания I198 hSNAP-23, может дополнительно содержать одну или более мутаций в одном или более различных связывающих карманах L-цепи VoNT/A, как описано здесь (например, в, по меньшей мере, двух различных связывающих карманах L-цепи VoNT/A, таких как связывающий карман для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23 и связывающий карман для сайта связывания K185 или R186 hSNAP-23). Такие мутанты обычно демонстрируют, по меньшей мере, 40% расщепления hSNAP-23 (% при 1 мкмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных, представленный на Фигуре 1В. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по

аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замены E148Y, K166F и G305D;  
модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замены E148Y, K166V и G305D;  
модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замены E148Y, S143D и K166F.

Таким образом, в другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к модифицированной протеазе L-цепи VoNT/A, которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23) и имеет модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая включает в себя:

а) замену аминокислотного остатка, расположенного в первом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания P182/D178 hSNAP-23; где указанный первый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

б) замену аминокислотного остатка, расположенного в третьем связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания I198 hSNAP-23; где указанный третий связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком K166 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

с) замену аминокислотного остатка, расположенного в четвертом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания K185 hSNAP-23; где указанный четвертый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A, определяется аминокислотным остатком G305 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

д) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из тирозина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из валина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку K166 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

iii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку G305 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления модифицированная L-цепь VoNT настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания I198 hSNAP-23, может дополнительно содержать одну или более мутаций в, по меньшей мере, двух разных связывающих карманах L-цепи VoNT/A (например, внутри связывающего

кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23 и внутри связывающего кармана для сайта связывания K185 или R186 hSNAP-23). Такие мутанты обычно демонстрируют, по меньшей мере, 15% расщепления hSNAP-23 (% при 10 нмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных\*\*, представленный на Фигуре 1B. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, K166F и G305D;  
модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, S143D и K166F.

В одном варианте осуществления модифицированная L-цепь VoNT настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания I198 hSNAP-23, может дополнительно содержать одну или более мутаций в, по меньшей мере, трех разных связывающих карманах L-цепи VoNT/A (например, в связывающем кармане для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, в связывающем кармане для сайта связывания D189/D192 hSNAP23 и в связывающем кармане для сайта связывания K185 hSNAP-23, как определено выше). Такие мутанты обычно демонстрируют по меньшей мере 60% расщепления hSNAP-23 (% при 1 мкмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных, представленный на Фигуре 1B. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замены E148Y, Q29A, K166V и G305D;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замены E148Y, Q29A, K166F и G305D.

Таким образом, в другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к модифицированной протеазе L-цепи VoNT/A, которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23) и имеет модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ) ID NO: 1), которая включает в себя:

а) замену аминокислотного остатка, расположенного в первом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания P182/D178 hSNAP-23; где указанный первый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A, определяется аминокислотным остатком E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

б) замену аминокислотного остатка, расположенного в третьем связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания I198 hSNAP-23; где указанный третий связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется

аминокислотным остатком K166 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

с) замену аминокислотного остатка, расположенного во втором связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания D189/D192 hSNAP-23; где указанный второй связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком Q29A L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

d) замену аминокислотного остатка, расположенного в четвертом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A для связывания с сайтом связывания K185 hSNAP-23; где указанный четвертый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A, определяется аминокислотным остатком G305 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

e) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из тирозина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку E148 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из валина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку K166 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

iii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Q29 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и

iv. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку G305 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления модифицированная L-цепь VoNT настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания I198 на hSNAP-23, может дополнительно содержать одну или более мутаций в, по меньшей мере, трех разных связывающих карманах L-цепи VoNT/A (например, внутри связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, внутри связывающего кармана для сайта связывания D189/D192 hSNAP23 и внутри связывающего кармана для сайта связывания K185 hSNAP-23). Такие мутанты обычно демонстрируют, по меньшей мере, 10% расщепления hSNAP-23 (% при 10 нмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных\*\*, представленный на Фигуре 1B. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, Q29A, K166F и G305D.

Дополнительные примеры модифицированных мутантов L-цепи VoNT/A, имеющих мутацию связывающего кармана для I198 hSNAP-23, (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, Q29A, K166F, Y251E и G305D.

В одном варианте осуществления модифицированная L-цепь VoNT настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания I198 hSNAP-23, может дополнительно содержать одну или более мутаций в одном или более различных связывающих карманах L-цепи VoNT/A (например, внутри связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23 или внутри связывающего кармана для сайта связывания K185 hSNAP-23, как определено выше). Такие мутанты обычно демонстрируют, по меньшей мере, 3% расщепления hSNAP-23 (% при 10 нмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных\*\*, представленный на Фигуре 1B. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y и K166F;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену G305D и K166F.

В другом варианте осуществления модифицированная L-цепь VoNT настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания I198 hSNAP-23, может дополнительно содержать одну или более мутаций в одном или более различных связывающих карманах L-цепи VoNT/A (например, внутри связывающего кармана для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23 или внутри связывающего кармана для сайта связывания K185 hSNAP-23). Такие мутанты обычно демонстрируют, по меньшей мере, 5% расщепления hSNAP-23 (% при 10 нмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных\*\*, представленный на Фигуре 1B. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y и K166F.

В качестве дополнительного технического признака или альтернативного технического признака настоящее изобретение включает в себя мутанты L-цепи VoNT/A, содержащие одну или более мутаций в определенном здесь кармане L-цепи VoNT/A. В качестве примера, модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения, которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23), имеет модифицированную

аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая включает в себя:

a) замену аминокислотного остатка, расположенного в седьмом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания D210 hSNAP-23;

b) где указанный седьмой связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком S254 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

c) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. например, аминокислотный остаток аланина в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку S254 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

Не ограничивая себя какой-либо теорией, заявитель полагает, что определенный выше связывающий карман L-цепи VoNT/A может обеспечивать водородную связь с сайтом связывания D210 hSNAP-23. Кроме того, заявитель полагает, что модификация указанного связывающего кармана (как определено здесь) исключает образование водородной связи между D210 hSNAP-23 и аминокислотой 254 VoNT/A. Считается, что это, в свою очередь, генерирует C-концевой продукт расщепления hSNAP-23 в форме лучше «уходящей» группы и, таким образом, повышается скорость расщепления hSNAP-23.

Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену S254A.

В одном варианте осуществления модифицированная L-цепь VoNT настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания D210 hSNAP-23, может дополнительно содержать одну или более мутаций в одном или более различных связывающих карманах L-цепи VoNT/A, как описано здесь (например, внутри, по меньшей мере, двух или трех различных связывающих карманов L-цепи VoNT/A, таких как связывающий карман для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23 и связывающий карман для сайта связывания I198 hSNAP-23 и, необязательно, связывающий карман для сайта связывания K185 hSNAP23). Такие мутанты обычно демонстрируют, по меньшей мере, 10% расщепления hSNAP-23 (% при 10 нмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных\*\*, представленный на Фигуре 1B. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, K166F и S254A;

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, K166F, S254A и G305D.

В предпочтительном варианте осуществления модифицированная L-цепь VoNT настоящего изобретения, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания

D210 hSNAP-23, может дополнительно содержать одну или более мутаций в одном или более различных связывающих карманах L-цепи VoNT/A, как описано здесь (например, внутри, по меньшей мере, трех различных связывающих карманов L-цепи VoNT/A, таких как связывающий карман для сайта связывания P182/D178 hSNAP-23, связывающий карман для сайта связывания I198 hSNAP-23, и связывающий карман для сайта связывания K185 hSNAP23). Такие мутанты обычно демонстрируют, по меньшей мере, 25% расщепления hSNAP-23 (% при 10 нмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных\*\*, представленный на Фигуре 1B. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y, K166F, S254A и G305D.

В качестве дополнительного технического признака или альтернативного технического признака настоящее изобретение включает в себя мутанты L-цепи VoNT/A, содержащие одну или более мутаций в определенном здесь кармане L-цепи VoNT/A. В качестве примера, модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения, которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23), имеет модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая включает в себя:

a) замену аминокислотного остатка, расположенного в восьмом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания D168 hSNAP-23;

b) где указанный восьмой связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком K340 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

c) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. например, аминокислотный остаток гистидина в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку K340 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

Не ограничивая себя какой-либо теорией, заявитель полагает, что определенный выше связывающий карман L-цепи VoNT/A может обеспечить солевой мостик между D168 hSNAP-23 и аминокислотой 340 VoNT/A.

Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену K340H.

В одном варианте осуществления модифицированная L-цепь VoNT настоящего изобретению, имеющая мутацию связывающего кармана для сайта связывания P182/D178

hSNAP-23, может дополнительно содержать одну или более мутаций в связывающем кармане L-цепи VoNT/A сайта связывания D168 hSNAP-23. Такие мутанты обычно демонстрируют, по меньшей мере, 3% расщепления hSNAP-23 (% при 1 мкмоль модифицированной L-цепи VoNT/A; 20 мкмоль hSNAP-23; предпочтительно инкубированных при температуре примерно 37°C в течение примерно 1 часа) - см. 2-й столбец данных, представленный на Фигуре 1B. Примеры таких модифицированных L-цепей VoNT/A (обозначаемых по аминокислотной замене(ам) по сравнению с соответствующей L-цепью VoNT/A дикого типа SEQ ID NO: 1) включают в себя:

модифицированную L-цепь VoNT/A, содержащую замену E148Y и K340H.

Модифицированная протеаза L-цепи VoNT/A, как описано выше, может содержать аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, например, по меньшей мере, 80%, или, по меньшей мере, 85%, или, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 95%, или, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99%, идентичности по последовательности с L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1). Модифицированная аминокислотная последовательность L-цепи VoNT/A имеет менее 100% идентичности по последовательности с L-цепью VoNT/A дикого типа (например, SEQ ID NO: 1). Как указывалось ранее, упоминание в этом описании модифицированной протеазы L-цепи VoNT/A включает в себя ее функциональные фрагменты, то есть фрагменты указанной протеазы, которые расщепляют hSNAP-23. Например, модифицированная протеаза L-цепи VoNT/A настоящего изобретения содержит, по меньшей мере, 300 (например, по меньшей мере, 350, или, по меньшей мере, 400 или, по меньшей мере, 410) аминокислот. Например, восемь N-концевых аминокислот и/или карбоксильный конец (например, последние 32 аминокислоты) протеазы L-цепи ботулинического нейротоксина не являются необходимыми для протеолитической активности.

Модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения может быть пегилирована для увеличения стабильности, например, продолжительности действия протеазного компонента. Пегилирование предпочтительно включает в себя добавление ПЭГ к N-концу L-цепи. В качестве примера, N-конец L-цепи может быть удлинен одним или более аминокислотными (например, цистеиновыми) остатками. Один или более из указанных аминокислотных остатков могут иметь свою собственную молекулу ПЭГ, присоединенную (например, ковалентно связанную) к ней. Пример этой технологии описан в Международной патентной заявке WO2007/104567, содержание которой полностью включено в настоящее изобретение путем ссылки.

Модифицированная L-цепь VoNT/A настоящего изобретения может включать в себя добавление (или удаление) «вторичных сайтов модификации» - см. патентные документы WO2002/040506, US7223577 и WO2005/068494, каждый из которых полностью включен в настоящее изобретение путем ссылки. Дополнительное присутствие или отсутствие (по сравнению с L-цепью VoNT дикого типа) таких сайтов изменяет биологическую стойкость (например, биологическое время полужизни)



модифицированной L-цепи настоящего изобретения.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, включающей в себя или состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует модифицированную L-цепь VoNT/A, как описано здесь. Указанная последовательность нуклеиновой кислоты может предпочтительно кодировать средство доставки TSI, как дополнительно описано ниже. Конструкция нуклеиновой кислоты настоящего изобретения может включать в себя обычные регуляторные элементы, такие как промотор и/или терминатор.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты в форме бактериальной плазмиды или вирусного вектора. Указанная конструкция нуклеиновой кислоты необязательно может быть оптимизированной по кодонам для оптимизации экспрессии (например, рекомбинантной экспрессии) в желаемой клетке-хозяине (например, *E.coli*).

В одном варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая модифицированную L-цепь VoNT/A, как описано здесь, может быть использована для введения в представляющую интерес клетку-мишень, например, с терапевтической или косметической целью. С этой целью указанную конструкцию нуклеиновой кислоты можно, как правило, оптимизировать с помощью общепринятой методологии для доставки в (с последующей экспрессией внутри) клетку-мишень, предпочтительно клетку человека. Клетка-мишень предпочтительно представляет собой клетку, не являющуюся нейроном.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к средству доставки для модифицированной L-цепи VoNT/A, тем самым облегчая прохождение модифицированной L-цепи VoNT/A в представляющую интерес клетку-мишень. В соответствии с этим аспектом настоящее изобретение в частности относится к средству доставки, содержащему:

а) модифицированную протеазу L-цепи VoNT/A настоящего изобретения или конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую в себя или состоящую из последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей модифицированную L-цепь VoNT/A настоящего изобретения; и

б) средство для доставки указанной модифицированной протеазы L-цепи VoNT/A или указанной конструкции нуклеиновой кислоты в клетку-мишень.

Предпочтительные средства для такой доставки включают в себя любое общепринятое средство доставки, известное в данной области техники, такое как липосомы, биолистические частицы, проникающие в клетки пептиды, векторы для переноса генов и т.д.

Одним из особенно предпочтительных способов доставки, который наиболее подходит для использования с настоящим изобретением, является разработанная заявителем технология нацеленной секреции ингибиторов (TSI). Основные способы, используемые для создания TSI, хорошо документированы и в настоящее время

считаются традиционными (см., например, Международные патентные заявки WO98/07864, WO2006/059113, WO2009/150469, WO2010/020811, WO2009/150470, WO2010/094905, WO2012/156743, каждая из которых полностью включена в настоящее изобретение путем ссылки). Технология TSI основана на механизме доставки, который имитирует те же основные этапы, которые использует кластридиальный нейротоксин, когда он интоксицирует клетку-хозяина (т.е. связывание с клеткой-мишенью, образование эндосом, транслокация L-цепи в цитозоль, протеолитическое расщепление белка SNARE при помощи L-цепи). Средства доставки TSI основаны на простой структуре кластридиального нейротоксина, имеющей три основных компонента:

1) L-цепь кластридиального нейротоксина;

2) Нацеливающий фрагмент (НФ), чтобы направлять средство доставки к выбранной клетке-мишени. Как правило, нативный связывающий домен кластридиального нейротоксина (НСС), может быть заменен лигандом для обеспечения избирательного связывания средства доставки с желаемой клеткой-мишенью, отличной от нативной клетки-мишени указанного НСС. В предпочтительном варианте осуществления изобретения можно использовать более одного НФ (необязательно включая связывающий домен кластридиального нейротоксина);

3) транслокационный пептид (например, домен транслокации  $H_N$  кластридиального нейротоксина) для обеспечения доставки L-цепи кластридиального нейротоксина в клетку-мишень, где она может затем проявить свое протеолитическое действие (то есть расщепление белка SNARE).

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления изобретения средство б) средства доставки настоящего изобретения может содержать:

- i) Нацеливающий фрагмент (НФ), который связывает средство доставки с клеткой-мишенью. Указанный нацеливающий фрагмент может представлять собой или нативный связывающий домен кластридиального нейротоксина (НСС), или, более предпочтительно, лиганд, обеспечивающий связывание с клеткой-мишенью, отличной от нативной клетки-мишени указанного НСС; и

ii) транслокационный пептид, который транслоцирует модифицированную протеазу L-цепи ВоNT/A настоящего изобретения в клетку-мишень, предпочтительно в цитозоль указанной клетки.

Средство доставки настоящего изобретения, как правило, включает в себя один или более Нацеливающий фрагмент (НФ). Упоминание НФ включает в себя любую структуру (обычно пептид), которая функционально взаимодействует с сайтом (например, рецептором или акцептором), вызывая физическую ассоциацию между модифицированной протеазой L-цепи ВоNT/A настоящего изобретения и поверхностью клетки-мишени млекопитающего (например, клетки человека). Сайт предпочтительно представляет собой сайт, способный к интернализации (например, образованию эндосом), также называемой рецептор-опосредованным эндоцитозом. НФ может обладать функцией транслокации эндосомальной мембраны, и в этом случае не нужно использовать

отдельные компоненты НФ и домен транслокации.

НФ настоящего изобретения связывается (например, специфично связывается) с выбранной клеткой-мишенью. Термин «специфично связывается» предпочтительно означает, что данный НФ связывается с клеткой-мишенью с аффинностью связывания ( $K_a$ )  $10^6 \text{ M}^{-1}$  или более, например,  $10^7 \text{ M}^{-1}$  или более,  $10^8 \text{ M}^{-1}$  или более или  $10^9 \text{ M}^{-1}$  или более.

То, что НФ связывается с выбранной клеткой-мишенью, подтверждается стандартным образом. Например, может быть использован простой эксперимент по радиоактивному смещению, в котором ткань или клетки, представляющие интересующую клетку-мишень, подвергаются воздействию меченого (например, тритированного) НФ в присутствии избытка немеченого НФ. В таком эксперименте могут быть оценены относительные пропорции неспецифического и специфического связывания, что позволяет подтвердить, что НФ связывается с клеткой-мишенью. Необязательно, анализ может включать в себя один или более антагонистов связывания, и анализ может дополнительно включать в себя наблюдение потери связывания НФ. Примеры экспериментов такого типа можно найти в Hulme, E.C. (1990), *Receptor-binding studies, a brief outline*, pp. 303-311, In *Receptor biochemistry, A Practical Approach*, Ed. E.C. Hulme, Oxford University Press.

НФ настоящего изобретения предпочтительно связывается с ненеуронной клеткой-мишенью (например, тучной клеткой и/или эпителиальной клеткой - см., например, Международные патентные заявки WO00/10598 и WO01/21213, каждая из которых полностью включена в настоящее изобретение путем ссылки). При этом указанный НФ способен направлять средство доставки к выбранной ненеуронной клетке-мишени, которая экспрессирует нежелательный фенотип hSNAP-23 (и, необязательно, нежелательный фенотип SNAP-25). Параллельно НФ настоящего изобретения может отдельно связываться (например, через тот же НФ или через второй НФ) со второй выбранной клеткой-мишенью, например со второй ненеуронной клеткой-мишенью или с нейронной клеткой-мишенью, экспрессирующей нежелательный фенотип hSNAP-23 и/или SNAP-25.

Подходящие НФ включают в себя: лиганды к сайтам связывания рецепторов клеток млекопитающих, такие как цитокины, факторы роста, нейропептиды, лектины и антитела - этот термин включает в себя моноклональные антитела, одноцепочечные антитела и фрагменты антител, такие как Fab, F(ab)'2, Fv, ScFv и т.д.

В качестве дополнительного примера, НФ включают в себя пептид лептин, рецептор грелина, пептид соматостатин, пептид инсулинового фактора роста, пептид EgrB (например, EGF), пептид VIP-глюкагон-GRF-секретин (например, пептид PACAP), пептид интерлейкин (например, пептид IL-1, IL-2, IL-6 или IL-10), пептид NGF, пептид VEGF, пептид бомбезин, пептид уротензин, пептид меланин-концентрирующий гормон, пептид пролактолиберин, пептид KiSS-1, пептид CRF, пептид GHRH, пептид вещества P, пептид бета-2-адренорецептор, гастрин-высвобождающий пептид, пептид, связанный с геном кальцитонина, пептид фактора роста тромбоцитов, пептид фактора роста кератиноцитов,

пептид фактора роста гепатоцитов, пептид ФНО-альфа, пептид ФНО-бета, предсердный натрийуретический пептид и пептид интегрин.

Средство доставки настоящего изобретения обычно не имеет (функционального) связывающего домена клостридиального нейротоксина (в качестве НФ).

Альтернативно, средство доставки настоящего изобретения может включать в себя (функциональный) связывающий домен клостридиального нейротоксина (в качестве НФ). Упоминание связывающего домена клостридиального нейротоксина включает в себя часть Н<sub>С</sub> (точнее, Н<sub>СС</sub>) клостридиального нейротоксина, а также ее мутанты, которые сохраняют связывающую способность домена Н<sub>С</sub> (например, способность связывать синапсомальные мембраны крыс в обычных анализах связывания, таких как описано в Shone et al. (1985) Eur. J. Biochem. 151, 75-82.

Связывающий домен/пептид Н<sub>С</sub> нативного клостридиального нейротоксина содержит приблизительно 400-440 аминокислотных остатков и состоит из двух функционально отличных доменов приблизительно по 25 кДа каждый, а именно N-концевой области (обычно называемой пептидом или доменом Н<sub>СН</sub>) и С-концевой области (обычно называемой пептидом или доменом Н<sub>СС</sub>). Именно С-концевая область (Н<sub>СС</sub>), которая образована С-концевыми аминокислотными остатками 160-200, отвечает за связывание клостридиального нейротоксина с нервными окончаниями в нервно-мышечном соединении. Типичные пептиды Н<sub>СС</sub> включают в себя:

Ботулинический нейротоксин типа А - аминокислотные остатки (Y1111-L1296)

Ботулинический нейротоксин типа В - аминокислотные остатки (Y1098-E1291)

Ботулинический нейротоксин типа С - аминокислотные остатки (Y1112-E1291)

Ботулинический нейротоксин типа D - аминокислотные остатки (Y1099-E1276)

Ботулинический нейротоксин типа E - аминокислотные остатки (Y1086-K1252)

Ботулинический нейротоксин типа F - аминокислотные остатки (Y1106-E1274)

Ботулинический нейротоксин типа G - аминокислотные остатки (Y1106-E1297)

Столбнячный нейротоксин - аминокислотные остатки (Y1128-D1315).

Вышеуказанные эталонные последовательности следует рассматривать как примерные данные, так как могут иметь место небольшие вариации в зависимости от субсеротипа.

Средство доставки настоящего изобретения обычно включает в себя транслокационный пептид, который обеспечивает транслокацию модифицированной L-цепи в цитозоль мишени. Обладает ли пептид необходимой транслокационной функцией в соответствии с настоящим изобретением, может быть подтверждено любым из нескольких общепринятых анализов. Например, Shone C. (1987) описывает анализ *in vitro* с использованием липосом, которые нагружают тестируемой молекулой. Наличие необходимой транслокационной функции подтверждается высвобождением из липосом К<sup>+</sup> и/или меченого НАД, которые можно легко контролировать [см. Shone C. (1987) Eur. J. Biochem; vol. 167(1): pp. 175-180]. Еще один пример можно найти в Blaustein R. (1987), где описан простой анализ *in vitro* с использованием плоских фосфолипидных двухслойных

мембран. Мембраны нагружают тестируемой молекулой, и необходимую транслокационную функцию подтверждают увеличением проводимости через указанные мембраны [см. Blaustein (1987) FEBS Letts; vol. 226, no. 1: pp. 115-120]. Дополнительная методика, позволяющая оценить слияние мембран и, таким образом, идентифицировать транслокационные домены, подходящие для использования в настоящем изобретении, описана в Methods in Enzymology Vol 220 and 221, Membrane Fusion Techniques, Parts A and B, Academic Press 1993.

Транслокационный домен может иметь клостридиальное происхождение, такое как домен/часть  $H_N$  нейротоксина. Термин «домен  $H_N$ » означает фрагмент N-цепи клостридиального нейротоксина, приблизительно эквивалентный аминоконцевой половине N-цепи. Домен  $H_N$  клостридиального нейротоксина лишен естественной функции связывания компонента  $H_C$  N-цепи. Таким образом, домен  $H_N$  не способен связываться с сайтом связывания на клетке-мишени, с которой связывается нативный клостридиальный нейротоксин (то есть холотоксин).

Примеры подходящих (эталонных) транслокационных доменов включают в себя:

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

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

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

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

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

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

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

Столбнячный нейротоксин - аминокислотные остатки (458-879)

Исследования показали, что полная длина части  $H_N$  тяжелой цепи клостридиального нейротоксина не является необходимой для транслокационной активности. Таким образом, аспекты этого варианта осуществления изобретения могут включать в себя области  $H_N$  клостридиального токсина, содержащие домен транслокации, имеющий длину, например, по меньшей мере, 350 аминокислот, по меньшей мере, 375 аминокислот, по меньшей мере, 400 аминокислот и, по меньшей мере, 425 аминокислот. Для получения более подробной информации о генетических основах получения токсинов в *Clostridium botulinum* и *C. tetani*, см. Henderson et al (1997) in The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis, Academic press.

Термин « $H_N$ » включает в себя встречающиеся в природе части  $H_N$  нейротоксина, а также варианты  $H_N$ , имеющие аминокислотные последовательности, которые не встречаются в природе, при условии, что эти варианты  $H_N$  сохраняют вышеупомянутую функцию транслокации. Например, часть  $H_N$  клостридиального нейротоксина включает в себя различные аминокислотные последовательности, обладающие, по меньшей мере, 70% (например, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85% или, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% или, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99%) идентичности по последовательности с частью  $H_N$

кlostридиального нейротоксина дикого типа, хотя при условии, что они сохраняют функцию транслокации.

Альтернативно, транслокационный пептид может иметь некlostридиальное происхождение, например он может представлять собой транслокационный домен дифтерийного токсина [O.Keefe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89, 6202-6206; Silverman et al., J. Biol. Chem. (1993) 269, 22524-22532; и London, E. (1992) Biochem. Biophys. Acta., 1112, pp.25-51], транслокационный домен экзотоксина типа А синегнойной палочки [Prior et al. Biochemistry (1992) 31, 3555-3559], транслокационные домены токсина сибирской язвы [Blanke et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93, 8437-8442], разнообразные фузогенные или гидрофобные пептиды с функцией транслокации [Plank et al. J. Biol. Chem. (1994) 269, 12918-12924; и Wagner et al (1992) PNAS, 89, pp.7934-7938] и амфифильные пептиды [Murata et al (1992) Biochem., 31, pp.1986-1992].

Упоминание транслокационных пептидов некlostридиального нейротоксина включает в себя фрагменты и варианты аминокислотных последовательностей, имеющих, по меньшей мере, 70% (например, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85% или, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% или, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99%) идентичности по последовательности с соответствующей некlostридиальной транслокационной пептидной последовательностью дикого типа, хотя при условии, что этот вариант сохраняет функцию транслокации.

<b>Источник транслокационного домена</b>	<b>Аминокислотные остатки</b>	<b>Ссылки</b>
Дифтерийный токсин	194-380	<b>Silverman et al.</b> , 1994, J. Biol. Chem. 269, 22524-22532 <b>London E.</b> , 1992, Biochem. Biophys. Acta., 1113, 25-51
Домен II экзотоксина синегнойной палочки	405-613	<b>Prior et al.</b> , 1992, Biochemistry 31, 3555-3559 <b>Kihara &amp; Pastan</b> , 1994, Bioconj Chem. 5, 532-538
Гемагглютинин вируса гриппа	GLFGAIAGFIENGWEGMIDG WYG, и его варианты	<b>Plank et al.</b> , 1994, J. Biol. Chem. 269, 12918-12924 <b>Wagner et al.</b> , 1992, PNAS, 89, 7934-7938 <b>Murata et al.</b> , 1992, Biochemistry 31, 1986-1992

Фузогенный белок вируса леса Семлики	Транслокационный домен	<b>Kielian et al.</b> , 1996, J Cell Biol. 134(4), 863-872
Гликопротеин G вируса везикулярного стоматита	118-139	<b>Yao et al.</b> , 2003, Virology 310(2), 319-332
Белок F SER вируса	Транслокационный домен	<b>Seth et al.</b> , 2003, J Virol 77(11) 6520-6527
Гликопротеин оболочки вируса пенистости	Транслокационный домен	<b>Picard-Maureau et al.</b> , 2003, J Virol. 77(8), 4722-4730

Полипептиды настоящего изобретения могут дополнительно содержать домен, облегчающий транслокацию. Указанный домен облегчает доставку нецитотоксической протеазы в цитозоль клетки-мишени и описан, например, в Международных патентных заявках WO08/008803 и WO08/008805, каждая из которых включена в настоящее изобретение путем ссылки.

Например, подходящие облегчающие транслокацию домены включают в себя домен фузогенного пептида оболочки вируса, например, подходящие домены фузогенного пептида включают в себя домен фузогенного пептида вируса гриппа (например, домен фузогенного пептида вируса гриппа А из 23 аминокислот), домен фузогенного пептида альфавируса (например, домен фузогенного пептида вируса леса Семлики из 26 аминокислот), домен фузогенного пептида везикуловируса (например, домен фузогенного пептида вируса везикулярного стоматита из 21 аминокислоты), домен фузогенного пептида респираторного вируса (например, домен фузогенного пептида вируса Сендай из 25 аминокислот), домен фузогенного пептида морбилливируса (например, домен фузогенного пептида вируса чумки собак из 25 аминокислот), домен фузогенного пептида авулавируса (например, домен фузогенного пептида вируса ньюкаслской болезни из 25 аминокислот), домен фузогенного пептида хенипавируса (например, домен фузогенного пептида вируса Хендра из 25 аминокислот), домен фузогенного пептида метапневмовируса (например, домен фузогенного пептида метапневмовируса человека из 25 аминокислот) или домен фузогенного пептида спумавируса, такой как домен фузогенного пептида вируса пенистости обезьян; или их фрагменты или варианты.

В качестве дополнительного примера, облегчающий транслокацию домен может включать в себя домен N<sub>СN</sub> клостридиального нейротоксина или его фрагмент или вариант (имеющий по меньшей мере 70% идентичности по последовательности с соответствующей последовательностью дикого типа), хотя при условии, что он сохраняет улучшенную функцию транслокации. Более подробно, облегчающий транслокацию домен N<sub>СN</sub> клостридиального токсина, может иметь длину, по меньшей мере, 200 аминокислот, по меньшей мере, 225 аминокислот, по меньшей мере, 250 аминокислот, по меньшей мере, 275 аминокислот. В этом отношении, облегчающий транслокацию домен N<sub>СN</sub>

кlostридиального токсина, предпочтительно имеет длину не более 200 аминокислот, не более 225 аминокислот, не более 250 аминокислот или не более 275 аминокислот. Конкретные (эталонные) примеры включают в себя:

Ботулинический нейротоксин типа А - аминокислотные остатки (872-1110)

Ботулинический нейротоксин типа В - аминокислотные остатки (859-1097)

Ботулинический нейротоксин типа С - аминокислотные остатки (867-1111)

Ботулинический нейротоксин типа D - аминокислотные остатки (863-1098)

Ботулинический нейротоксин типа E - аминокислотные остатки (846-1085)

Ботулинический нейротоксин типа F - аминокислотные остатки (865-1105)

Ботулинический нейротоксин типа G - аминокислотные остатки (864-1105)

Столбнячный нейротоксин - аминокислотные остатки (880-1127).

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к способу расщепления hSNAP-23, где указанный способ включает в себя приведение hSNAP-23 в контакт с модифицированной протеазой L-цепи BoNT/A, или с конструкцией нуклеиновой кислоты, или со средством доставки, как описано здесь, тем самым позволяя модифицированной L-цепи BoNT/A связаться с указанным hSNAP-23 с последующим протеолитическим расщеплением hSNAP-23 модифицированной протеазой L-цепи BoNT/A. В одном варианте осуществления изобретения указанный способ выполняется *in vitro*.

В одном варианте осуществления изобретения указанный способ расщепления hSNAP-23 включает в себя предварительные этапы:

1) связывание средства доставки с клеткой-мишенью при помощи его нацеливающего фрагмента (НФ); и

2) транслокация модифицированной L-цепи BoNT/A в клетку-мишень, предпочтительно в цитозоль указанной клетки-мишени, при помощи транслокационного пептида средства доставки.

Предпочтительно НФ связывается с сайтом на клетке-мишени (например, с молекулой белка, сахара и/или липида), причем указанный сайт способен к опосредованному рецептором эндоцитозу, и средство доставки затем интернализируется клеткой-мишенью через образование эндосомы. После этого транслокационный пептид средства доставки может перемещать модифицированную L-цепь BoNT/A через эндосомальную мембрану и в цитозоль клетки-мишени.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к модифицированной протеазе L-цепи (BoNT/A), или к конструкции нуклеиновой кислоты, или к средству доставки, как описано здесь, для применения в способе расщепления hSNAP23, как описано выше.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к описанной здесь модифицированной протеазе L-цепи (BoNT/A) для применения в способе лечения, предпочтительно способе лечения секреторного расстройства.

Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к описанной здесь протеазе L-цепи BoNT/A, или описанной здесь конструкции нуклеиновой кислоты, или описанному здесь средству доставки для применения в качестве лекарственного



средства.

В таких аспектах указанная модифицированная протеаза L-цепи ВоNT/A предпочтительно содержится в ВоNT, дополнительно включающем в себя тяжелую цепь, то есть в полноразмерном ВоNT. Такие полноразмерные ВоNT обычно имеют полипептидную цепь массой 150 кДа, содержащую тяжелую цепь массой 100 кДа и легкую цепь массой 50 кДа, связанные дисульфидной связью, и организованы в три функциональных домена: N-концевую протеолитическую легкую цепь (L-цепь); и C-концевую тяжелую цепь (H-цепь), последняя состоит из транслокационного домена (H<sub>N</sub>) и C-концевого нейрон-связывающего домена (H<sub>C</sub>).

Предпочтительные секреторные расстройства включают в себя спастичность мышц/гиперактивное движение мышц (включая спастичность после инсульта, спастичность после повреждения спинного мозга, спазмы головы и шеи, века, влагалища, конечностей, челюстей и голосовых связок), косоглазие, гипергидроз и тяжелые первичный подмышечный гипергидроз.

Настоящее изобретение будет лучше понято в свете следующих подробных примеров. Тем не менее, специалисту в данной области техники понятно, что это подробное описание не является ограничивающим, и что могут быть сделаны различные модификации, замены, отступления и изменения, которые при этом не выходят за пределы объема изобретения.

### **Описание чертежей**

**Фигура 1** - Данные по расщеплению hSNAP-23 и hSNAP25 для модифицированных протеаз L-цепи ВоNT/A настоящего изобретения. (A) данные для протеазы L-цепи ВоNT/A, имеющей мутации в одном связывающем кармане, (B) данные для протеазы L-цепи ВоNT/A, имеющей мутации в нескольких связывающих карманах.

**Фигура 2** - Тонированное 3D-изображение взаимодействия протеазы L-цепи ВоNT/A (контур) с сайтами связывания SNAP-25/23 (линия визуализации).

### **Аминокислотные последовательности**

SEQ ID NO: 1 - Легкая цепь ВоNT/A дикого типа (аминокислотные остатки 1-438 Uniprot A5HZZ9)

MPFVNKQFNKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMGPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPE  
EGDLNPPPEAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGI  
PFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTR  
NGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGIAN  
PNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNFKDIASTL  
NKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKEYLLSEDTSGKFSVDKLFKFDKLYKMLTEIYTEDNFV  
KFFKVLNRKTYLNFDAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTEINNMNFT  
KLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSK

SEQ ID NO: 2 - человеческий SNAP23

MDNLSSEEIQQRANQITDESLESTRRILGLAIESQDAGIKTITMLDEQKEQLNRIEE  
GLDQINKDMRETEKTLTELNKCCGLCVCPNRTKNFESGKAYKTTWGDGGENSPCNVV

SKQPGPVTNGQLQQPTTGAASGGYIKRITNDAREDEMEENLTQVGSILGNLKDMLNIG  
NEIDAQNPQIKRITDKADTNRDRIDIANARAKKLIDS

SEQ ID NO: 3 - SNAP25 человека и грызуна

MAEDADMRNELEEMQRRADQLADESLESTRMLQLVEESKDAGIRTLVMLDEQ  
GEQLERIEEGMDQINKDMKEAEKNLTDLGKFCGLCVPCNKLKSSDAYKKAWGNNQD  
GVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTDARENEMDENLEQVSGIIGNLRHMALDMG  
NEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANQRATKMLGSG

SEQ ID NO: 4 - Сайт IgA-протеазы His6 метка (искусственная)

PPTPGHHHHHH

SEQ ID NO: 5 - метка Twin Strep Tag (искусственная)

MASWSHPQFEKGGGSGGGSGGGWSHPQFEKGAGS

SEQ ID NO: 6 - His6 метка (искусственная)

GHHHHHH

SEQ ID NO: 7 - Сайт V-IgA-протеазы His6 метка (искусственная)

VPPTPGHHHHHH

SEQ ID NO: 8 - BoNT/A1 дикого типа

MPFVNKQFNKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPE  
EGDLNPPPEAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNLYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGI  
PFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTR  
NGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAIN  
PNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAAKFDISLQENEFRLYYYNKFKDIASL  
NKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLFKLYKMLTEIYTEDNFV  
KFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTNINMNF  
KLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTND  
LNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIEFP  
NGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNK  
ATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITHIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALI  
FSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTQVQIDNALSQRNEKWDEVYKYIVTNWL  
AKVNTQIDLIRKKMKEALENQAATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESIN  
KAMININKFLNQC SVSYLMNSMIPYGVKRLDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRL  
KDKVNNLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINI  
GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEY  
TIINCMENNSGWKVSLSNYGEIHWTLQDTQEIKQRVVFKY SQMINISDYINRWIFVTITNRR  
LNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEI  
KDLYDNQSN SGILKDFWGDYLYQYDKPYMLNLYDPNKYVDVNNV GIRGYMYLKGPR  
GSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQ  
AGVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNNGNDIGFIGFHQFNNI  
AKLVASNWYNRQIERSSRTLGCSEWEIFVDDGWGERPL

SEQ ID NO: 9 - линкер LH<sub>N</sub> (искусственная)

VRGIITSKTKSLDKGYNKALNDL

SEQ ID NO: 10 - сайт активации энтерокиназы

DDDDK

SEQ ID NO: 11 - петля активации BoNT/A1

VDGПТСКТКСDDDDKНКALNLQ

### Примеры

#### **Пример 1 - Получение модифицированных L-цепей BoNT/A (LC BoNT/A) настоящего изобретения**

Плазмиду pBN3, кодирующую L-цепь BoNT/A дикого типа (аминокислоты 1-448, SEQ ID NO: 1), получали при помощи ПЦР и подходящих олигонуклеотидных праймеров с использованием бактериальной ДНК штамма 62A в качестве матрицы. ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность PPTPGHHHHHH (SEQ ID NO: 4), встраивали после кодона для аминокислоты Ala-449. Штамм *E.coli* M15pREP4 (Qiagen, Hilden, Германия) трансфицировали плазмидой pBN3, содержащей LC BoNT/A дикого типа, или ее мутанты, то есть мутанты протеазы SEQ ID NO: 1, как описано в настоящей заявке. Для каждого трансфицированного штамма *E.coli* одну бактериальную колонию, выращенную в течение ночи в 5 мл среды 2YT, использовали для инокуляции 500 мл среды 2YT.

После того как культура достигла ОП 0,7 при длине волны 600 нм, L-цепи BoNT/A получали в течение 15 ч индукции с использованием 0,2 мМ IPTG при температуре 21°C. Бактерии собирали центрифугированием и замораживали при температуре -20°C в течение ночи. Бактерии ресуспендировали в лизирующем буфере (300 мМ NaCl, 50 мМ фосфат, pH 8,0) с добавлением бензамидина, пепстатина А и PMSF в конечных концентрациях 5 мМ, 1 мкг/мл и 0,5 мМ соответственно, лизировали ультразвуком, лизат очищают центрифугированием в течение 30 минут при 29000 g, и L-цепь BoNT/A связывали с гранулами Ni<sup>2+</sup>-нитрилотриуксусной кислоты и агарозы. Гранулы промывали 20 объемами слоя лизирующего буфера, содержащего 10 мМ имидазола, и элюировали L-цепь BoNT/A лизирующим буфером, содержащим 100 мМ имидазола. Фракции, содержащие желаемый белок, подвергали диализу против буфера для анализа токсина (150 мМ глутамат калия, 10 мМ Hepes-KOH, pH 7,2) и на последнем этапе очищенную L-цепь, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C.

#### **Пример 2 - Бесклеточный анализ расщепления hSNAP-23**

Получали плазмиду hSNAP-23 (SEQ ID NO: 2) для экспрессии в *E.coli* и транскрипции/трансляции *in vitro*, pS3-hSNAP-23His6.

Она кодирует N-концевую слитую метку Twin Strep Tag (MASWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSSWSHPQFEKGAGS, SEQ ID NO: 5) и C-концевую слитую метку His6 (GHHHHHH, SEQ ID NO: 6) после кодона карбокси-концевого серина 211.

Для получения и очистки белка штамм *E.coli* BL21-DE3 (Stratagene Europe, Ebsdorfergrund, Германия) трансфицировали плазмидой pS3-hSNAP-23His6 по тому же протокол, который подробно описан для протеазы L-цепи BoNT/A в Примере 1. Однако

белок, элюированный из гранул Ni<sup>2+</sup>-нитрилотриуксусной кислоты и агарозы, дополнительно очищали на гранулах стреп-тактин-агарозы (IBA Lifesciences, Геттинген, Германия) путем промывания 20 объемами слоя 0,1 М Трис, pH 8,0 и элюирования 10 мМ дестхиобиотином в 0,1 М Трис, pH 8,0. Кроме того, во все буферы, используемые для очистки hSNAP-23, добавляли 10 мМ β-меркаптоэтанол.

Затем радиоактивно меченый hSNAP-23 получали путем транскрипции/трансляции *in vitro* с использованием pS3-hSNAP-23His6, системы лизата ретикулоцитов TNT, связанной с T7 (Promega) и [<sup>35</sup>S] метионина (370 кБк/мкл, >37 ТБк/ммоль; Hartmann Analytic, Брауншвейг, Германия) согласно инструкции производителя.

Бесклеточный анализ расщепления hSNAP-23 включал в себя рекомбинантный hSNAP-23 в конечной концентрации 20 мкмоль плюс 1 мкл смеси для транскрипции/трансляции, состоящей из меченого [<sup>35</sup>S] метионином hSNAP-23 и каждой модифицированной или дикого типа L-цепи VoNT/A, в конечных концентрациях 1 мкмоль или 10 нмоль, которые инкубировали в течение 60 мин при температуре 37°C в общем объеме 10 мкл буфера для анализа токсинов. Реакции останавливали добавлением равного объема двукратного буфера для образца [120 мМ Трис-HCl (pH 6,75), 10% (об./об.) β-меркаптоэтанол, 4% (об./об.) ДСН, 20% (мас./об.) глицерин и 0,014% (мас./об.) бромфеноловый синий]. После инкубации в течение 30 минут при температуре 37°C каждый образец анализировали с помощью ДСН-ПААГ с использованием 15% трис-глициновых гелей (соотношение акриламид/бис-акриламид: 73,5:1).

Гели высушивали и визуализировали радиоактивно меченный белок с использованием фосфоимиджера FLA-9000 (Fuji Photo Film, Co., Ltd., Токио, Япония). Количественное определение радиоактивно меченого белка и продуктов его расщепления проводили с помощью программного обеспечения Multigauge 3.2 (Fuji Photo Film). Для определения кинетических параметров фермента L-цепи VoNT/A дикого типа и ее мутантов концентрацию субстрата варьировали от 5 до 100 мкМ с использованием hSNAP-23, продуцируемого в *E.coli*. К каждой из различных концентраций субстрата добавляли 1 мкл радиоактивно меченого hSNAP-23, полученного путем транскрипции/трансляции *in vitro*. Инкубацию проводили в конечном объеме 25 мкл буфера для анализа токсинов. После 2 и 4 мин инкубации при температуре 37°C отбирали аликвоты по 10 мкл и ферментативную реакцию останавливали, смешивая с 10 мкл предварительно охлажденного двукратного буфера для образцов ДСН-ПААГ. Процент расщепления определяли по превращению радиоактивно меченого субстрата, как подробно описано выше, и использовали для расчета начальной скорости гидролиза субстрата. Значения K<sub>m</sub>, K<sub>cat</sub> и V<sub>max</sub> рассчитывали методом нелинейной регрессией с использованием программы GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software Inc., Сан-Диего, США).

Полученные данные показаны на Фигуре 1.

### **Пример 3 - Бесклеточный анализ расщепления hSNAP-25**

Плазмида pBN10 для экспрессии hSNAP-25 (SEQ ID NO: 3) в *E.coli* была описана в

Binz et al. (J Biol Chem., 1994; 269: 1617-20). После кодона для карбокси-концевого глицина-206 следует ДНК, кодирующая аминокислотную последовательность VPPTPGHNNNNN (SEQ ID NO: 7). Плазмиду для транскрипции/трансляции *in vitro*, pSNAP-25His6, впоследствии получали путем субклонирования фрагмента EcoRI-SalI pBN10 в соответственно расщепленную плазмиду pSP73 (Promega, Mannheim, Германия).

Для получения белка и очистки SNAP-25 штамм *E.coli* M15pREP4 (Qiagen, Hilden, Германия) трансфицировали плазмидой pBN10 по тому же протокол, который подробно описан для протеазы L-цепи BoNT/A в Примере 1.

Радиоактивно меченый SNAP-25 получали путем транскрипции/трансляции *in vitro* с использованием pSNAP-25His6, системы лизата ретикулоцитов TNT, связанной с SP6 (Promega) и [35S] метионина (370 кБк/мкл, >37 ТБк/ммоль; Hartmann Analytic, Брауншвейг, Германия) согласно инструкции производителя.

Анализ расщепления hSNAP25 проводили точно так же, как описано для hSNAP-23 в Примере 2.

Полученные данные показаны на Фигуре 1.

#### **Пример 4 - Получение доменов LH<sub>N</sub>, содержащих модифицированную легкую цепь A (BoNT/A LC) настоящего изобретения**

В этом примере описывается конструирование транслокационных доменов LH<sub>N</sub>, содержащих модифицированную легкую цепь A (BoNT/A LC), проявляющую активность расщепления hSNAP23 в соответствии с настоящим изобретением. Такие домены LH<sub>N</sub> можно использовать для создания семейств средств доставки TSI, добавляя соответствующие нацеливающие фрагменты.

В кратком изложении, для каждого мутанта BoNT/A LC настоящего изобретения сначала конструировали клонирующие векторы путем химического синтеза ДНК (GeneArt, ThermoFisher), которая кодирует указанный мутант BoNT/A LC и которая оптимизирована для экспрессии в *E.coli*, эту ДНК субклонировали в вектор pCR4 (Invitrogen). Параллельно клонирующий вектор для домена H<sub>N</sub> BoNT/A конструировали аналогичным образом путем химического синтеза кодон-оптимизированной ДНК, кодирующей домен H<sub>N</sub>/A (соответствующий аминокислотным остаткам 449-872 SEQ ID NO: 8, регистрационный номер в базе данных UniprotKB A5HZZ9), и субклонировали в стандартный вектор, такой как вектор pCR4 (Invitrogen). Клонированный вектор для линкера LH<sub>N</sub> также конструировали путем химического синтеза кодон-оптимизированной ДНК, кодирующей указанный линкер, и субклонировали в стандартный вектор, такой как вектор pCR4 (Invitrogen). В частности, линкер LH<sub>N</sub> VRGIITSKTKSLDKGYNKALNDL (SEQ ID NO: 9), подходящий для серотипа BoNT/ (это междоменная полипептидная область, которая существует между цистеинами дисульфидного мостика между LC и доменом H<sub>N</sub> BoNT/A) использовали для конструирования линкерного вектора LH<sub>N</sub>. Также могут быть созданы альтернативные линкерные конструкции LH<sub>N</sub>: в действительности, как хорошо известно специалисту в данной области техники, для получения сайта расщепления конкретной протеазы, можно или использовать нативную восприимчивость

к протеолизу протеазой LysC, или вставить сайт активации энтерокиназы (например, DDDDK, SEQ ID NO: 10) в петлю активации для получения последовательности, такой как VDGITSKTKSDDDDKKNKALNLQ (SEQ ID NO: 11), или в эту петлю активации может быть вставлен сайта протеазы для любой другой протеазы, хорошо известной в данной области техники, такой как PreScission, фактор Ха, тромбин, протеаза TEV и т.д.

Затем домены  $LH_N$  собирали путем клонирования в модифицированный экспрессионный вектор pET (Novagen) в 2 основных этапа. ДНК, кодирующую каждую из модифицированных LC ВоNT/A настоящего изобретения, встраивали перед ДНК, кодирующей линкер  $LH_N$ , причем указанный линкер находился далее перед ДНК, кодирующей домен  $H_N/A$ .

**Пример 5 - Получение средств доставки TSI, связывающихся с ненейронной клеткой в соответствии с настоящим изобретением**

В этом примере описывается конструирование средств доставки TSI путем добавления подходящего нацеливающего фрагмента (в данном случае, человеческого GHRP) к каждому С-концевому концу доменов  $LH_N$ , содержащих модифицированную легкую цепь А настоящего изобретения, как описано выше в Примере 2. Для этого между направляющей группой и доменом  $LH_N$  вводили гибкий линкер.

В кратком изложении, клонирующие векторы линкер-hGHRP конструировали путем химического синтеза кодон-оптимизированной ДНК, кодирующей гибкий линкер, слитый в рамке с нацеливающим фрагментом hGHRP, и субклонировали в вектор pCR4 (Invitrogen).

Затем конструкции TSI собирали путем клонирования ДНК, кодирующей линкер-hGHRP, в каждый из экспрессионных векторов pET, содержащих домены  $LH_N$ , описанные в Примере 2, таким образом, чтобы линкер-hGHRP сливался в рамке с С-концевым концом каждого домена  $LH_N$ .

Для экспрессии белка каждого носителя TSI 100 мл модифицированной среды Terrific Broth (TB), содержащей 0,2% глюкозамина и 30 мкг/мл канамицина, инкубировали в колбе на 250 мл с одной бактериальной колонией (*E.coli* BL21 (DE3), трансфицированной TSI. Каждую культуру выращивали при температуре 37°C и 225 об/мин в течение 16 часов с последующим внесением 10 мл ночной культуры в 1 л модифицированной среды TB, содержащей 0,2% глюкозамина и 30 мкг/мл канамицина, в колбе объемом 2 л. Затем полученную культуру выращивали при температуре 37°C до достижения приблизительного значения ОП 0,5 при длине волны 600 нм, после чего температуру снижали до 16°C. Через 1 час каждую культуру индуцировали 1 mM IPTG и дополнительно выращивали при температуре 16°C в течение еще 16 ч. Бактерии собирали центрифугированием и замораживали при температуре -20 °C в течение ночи.

Последующую очистку каждого экспрессированного TSI проводили следующим образом.

Бактерии размораживали и осадок клеток обрабатывали ультразвуком для лизиса клеток. После центрифугирования супернатант загружали в хелатную колонку с 0,1 М

NiSO<sub>4</sub>, уравновешенную 50 mM HEPES, pH 7,2, 200 mM NaCl. Промывку колонки проводили буфером, содержащим 40-100 mM имидазола (ступенчатый градиент), для элюирования несвязанного белка, и буфером, содержащим 200 mM имидазола, для элюирования белка TSI. Фракции, содержащие желаемый белок (TSI), затем подвергали диализу против буфера, содержащего 50 mM HEPES, pH 7,2, 200 mM NaCl. Затем к 1 мг очищенного TSI добавляли протеазу (в данном случае LysC) в соответствующем количестве для его активации (то есть так, чтобы TSI образовывал ди-цепь, способную связываться с GHRP, транслоцировать легкую цепь в цитоплазму и каталитически расщеплять hSNAP23). Затем полученную смесь дополнительно очищали, загружая ее в хелатную колонку с 0,1 M NiSO<sub>4</sub>, уравновешенную 50 mM HEPES, pH 7,2, 200 mM NaCl. Колонку сначала промывали 50 mM HEPES, pH 7,2, 200 mM NaCl, затем буфером, содержащим 40-100 mM имидазола, для элюирования неспецифично связанного белка, и буфером, содержащим 200 mM имидазола, для элюирования активированного TSI. Фракции, содержащие желаемый активированный белок (TSI), впоследствии подвергали диализу против буфера, содержащего 50 mM HEPES, pH 7,2, 150 mM NaCl. Диализированный белок затем концентрировали до примерно 2 мг/мл, аликвотировали и на последнем этапе замораживали при температуре -80°C.

#### **Клаузула**

1. Модифицированная протеаза L-цепи ботулинического нейротоксина A (BoNT/A), которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23), имеющая модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая содержит:

а) по меньшей мере, одну замену аминокислотного остатка, расположенного в первом связывающем кармане протеазы L-цепи BoNT/A для связывания с сайтом связывания P182/D178 hSNAP-23;

б) где указанный первый связывающий карман протеазы L-цепи BoNT/A, определяется аминокислотными остатками E148, T307, A308 и Y312 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная, по меньшей мере, одна замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аспарагина и тирозина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку E148 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из фенилаланина, изолейцина и лейцина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку T307 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

iii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из пролина, аспарагина, треонина и изолейцина, в положении в модифицированной аминокислотной

последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку A308 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

iv. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из лизина, валина, метионина и лейцина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Y312 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

2. Модифицированная протеаза L-цепи VoNT/A по п.1, дополнительно содержащая:

a) замену аминокислотного остатка, расположенного во втором связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A для связывания с сайтом связывания R186 hSNAP-23;

b) где указанный второй связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A, определяется аминокислотным остатком S143 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамата, глутамата и аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку S143 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

3. Модифицированная протеаза L-цепи VoNT/A по п.1 или п.2, дополнительно содержащая:

a) по меньшей мере, одну замену аминокислотного остатка, расположенного в третьем связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A для связывания с сайтом связывания K185 hSNAP-23;

b) где указанный третий связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотными остатками V304 и G305 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная, по меньшей мере, одна замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамата и аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку V304 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамата и аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку G305 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

4. Модифицированная протеаза L-цепи VoNT/A по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая:

a) замену аминокислотного остатка, расположенного в четвертом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания D189/D192



hSNAP-23;

b) где указанный четвертый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком Q29 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

c) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Q29 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

5. Модифицированная протеаза L-цепи VoNT/A по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая:

a) по меньшей мере, одну замену аминокислотного остатка, расположенного в пятом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания K206 hSNAP-23;

b) где указанный пятый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком Y251, L256, V258, L367 и F369 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

c) и где указанная, по меньшей мере, одна замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамата и аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Y251 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамата, аспартата, глутамина, глицина, аланина и аргинина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку L256 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

iii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из серина, аланина, пролина, лейцина и глутамата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку V258 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

iv. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина и глицина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку L367 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

v. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, серина и лейцина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку F369 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

6. Модифицированная протеаза L-цепи VoNT/A по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая:

a) замену аминокислотного остатка, расположенного в шестом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания I198 hSNAP-23;

b) где указанный шестой связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A, определяется аминокислотным остатком K166 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из валина, фенилаланина, лейцина и изолейцина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку K166 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

7. Модифицированная протеаза L-цепи VoNT/A по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая:

a) замену аминокислотного остатка, расположенного в седьмом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания D210 hSNAP-23;

b) где указанный связывающий седьмой карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком S254 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку S254 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

8. Модифицированная протеаза L-цепи VoNT/A по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая:

a) замену аминокислотного остатка, расположенного в восьмом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания D168 hSNAP-23;

b) где указанный восьмой связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком K340 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из гистидина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку K340 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

9. Модифицированная протеаза L-цепи ботулинического нейротоксина А (VoNT/A), которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23), имеющая модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая содержит:

a) замену аминокислотного остатка, расположенного в четвертом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A, для связывания с сайтом связывания D189/D192

hSNAP-23;

b) где указанный четвертый связывающий карман протеазы L-цепи BoNT/A определяется аминокислотным остатком Q29 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

c) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Q29 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

10. Модифицированная протеаза L-цепи ботулинического нейротоксина А (BoNT/A), которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23), имеющая модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая содержит:

a) замену аминокислотного остатка, расположенного в шестом связывающем кармане протеазы L-цепи BoNT/A, для связывания с сайтом связывания I198 hSNAP-23;

b) где указанный шестой связывающий карман протеазы L-цепи BoNT/A определяется аминокислотным остатком K166 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

c) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из валина, фенилаланина, лейцина и изолейцина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку K166 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

11. Модифицированная протеаза L-цепи ботулинического нейротоксина А (BoNT/A), которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23), имеющая модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая содержит:

a) по меньшей мере, одну замену аминокислотного остатка, расположенного в пятом связывающем кармане протеазы L-цепи BoNT/A, для связывания с сайтом связывания K206 hSNAP-23;

b) где указанный пятый связывающий карман протеазы L-цепи BoNT/A определяется аминокислотными остатками Y251, L256, V258, L367 и F369 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

c) и где указанная, по меньшей мере, одна замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамата и аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Y251 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

ii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аспартата, глутамина, глицина, аланина и аргинина, в положении в модифицированной

аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку L256 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

iii. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из серина, аланина, пролина, лейцина и глутамата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку V258 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

iv. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина и глицина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку L367 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1); и/или

v. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, серина и лейцина, в положении в аминокислотной последовательности модифицированной протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку F369 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

12. Модифицированная протеаза L-цепи ботулинического нейротоксина А (BoNT/A), которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23), имеющая модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая содержит:

a) замену аминокислотного остатка, расположенного в седьмом связывающем кармане протеазы L-цепи BoNT/A, для связывания с сайтом связывания D210 hSNAP-23;

b) где указанный седьмой связывающий карман протеазы L-цепи BoNT/A определяется аминокислотным остатком S254 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

c) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку S254 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

13. Модифицированная протеаза L-цепи ботулинического нейротоксина А (BoNT/A), которая расщепляет человеческий SNAP-23 (hSNAP-23), имеющая модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая содержит:

a) замену аминокислотного остатка, расположенного в восьмом связывающем кармане протеазы L-цепи BoNT/A, для связывания с сайтом связывания D168 hSNAP-23;

b) где указанный восьмой связывающий карман протеазы L-цепи BoNT/A определяется аминокислотным остатком K340 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

c) и где указанная замена аминокислотного остатка включает в себя:

i. аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из гистидина, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи,

которое соответствует аминокислотному остатку K340 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

14. Модифицированная протеаза L-цепи ботулинического нейротоксина А (BoNT/A) по любому из п.п. 9-13, дополнительно содержащая, по меньшей мере, одну замену аминокислотного остатка, расположенного в другом связывающем кармане протеазы L-цепи BoNT/A, где указанная замена аминокислотного остатка и указанный другой связывающий карман протеазы L-цепи BoNT/A определяются техническими признаками, перечисленными в любом из п.п. 1-13.

15. Конструкция нуклеиновой кислоты, включающая в себя или состоящая из последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей модифицированную протеазу L-цепи BoNT/A, по любому из предшествующих пунктов.

16. Средство доставки, содержащее:

а) модифицированную протеазу L-цепи BoNT/A, по любому из п.п. 1-14, или конструкцию нуклеиновой кислоты по п. 15; и

б) средство для доставки указанной модифицированной протеазы L-цепи BoNT/A или указанной конструкции нуклеиновой кислоты в клетку-мишень, предпочтительно в клетку-мишень, не являющуюся нейроном.

17. Средство доставки по п.16, где средство б) для доставки указанной модифицированной протеазы L-цепи BoNT/A в клетку-мишень содержит:

i) нацеливающий фрагмент, который связывает средство доставки с клеткой-мишенью; и

ii) транслокационный пептид, который транслоцирует модифицированную протеазу L-цепи BoNT/A или конструкцию нуклеиновой кислоты в клетку-мишень, предпочтительно в клетку-мишень, не являющуюся нейроном.

18. Способ расщепления hSNAP-23, включающий в себя приведение hSNAP-23 в контакт с протеазой L-цепи (BoNT/A) по любому из п.п. 1-14, или с конструкцией нуклеиновой кислоты по п.15. или со средством доставки по п.16 или п.17.

19. Протеаза L-цепи (BoNT/A) по любому из п.п. 1-14, или конструкция нуклеиновой кислоты по п.15, или средство доставки по п.16 или п.17, для применения в способе по п.18.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированная протеаза L-цепи ботулинического нейротоксина А (BoNT/A), которая демонстрирует увеличенную эффективность расщепления человеческого SNAP-23 (hSNAP-23) по сравнению с L-цепью BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), имеющая модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с L-цепью BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая содержит:

а) по меньшей мере одну замену аминокислотного остатка, расположенного в шестом связывающем кармане протеазы L-цепи BoNT/A для связывания с сайтом связывания I198 hSNAP-23;

б) где указанный шестой связывающий карман протеазы L-цепи BoNT/A определяется аминокислотным остатком K166 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная по меньшей мере одна замена аминокислотного остатка включает: аминокислотный остаток фенилаланин в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку K166 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

2. Модифицированная протеаза L-цепи BoNT/A по п. 1, дополнительно содержащая:

а) замену аминокислотного остатка, расположенного во втором связывающем кармане протеазы L-цепи BoNT/A для связывания с сайтом связывания D189/D192 hSNAP-23;

б) где указанный второй связывающий карман протеазы L-цепи BoNT/A определяется аминокислотным остатком Q29 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная замена аминокислотного остатка включает: аминокислотный остаток аланин в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Q29 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

3. Модифицированная протеаза L-цепи BoNT/A по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая:

а) по меньшей мере одну замену аминокислотного остатка, расположенного в четвертом связывающем кармане протеазы L-цепи BoNT/A для связывания с сайтом связывания K185 hSNAP-23;

б) где указанный четвертый связывающий карман протеазы L-цепи BoNT/A определяется аминокислотным остатком G305 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

с) и где указанная по меньшей мере одна замена аминокислотного остатка включает: аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамата и аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку G305 L-цепи BoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

4. Модифицированная протеаза L-цепи BoNT/A по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая:

а) замену аминокислотного остатка, расположенного в пятом связывающем кармане

протеазы L-цепи VoNT/A для связывания с сайтом связывания R186 hSNAP-23;

b) где указанный пятый связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком S143 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

c) и где указанная замена аминокислотного остатка включает:

аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамина, глутамата и аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку S143 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

5. Модифицированная протеаза L-цепи VoNT/A по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая:

a) по меньшей мере одну замену аминокислотного остатка, расположенного в шестом связывающем кармане протеазы L-цепи VoNT/A для связывания с сайтом связывания K206 hSNAP-23;

b) где указанный шестой связывающий карман протеазы L-цепи VoNT/A определяется аминокислотным остатком Y251 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1);

c) и где указанная по меньшей мере одна замена аминокислотного остатка включает:

аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глутамата и аспартата, в положении в модифицированной аминокислотной последовательности протеазы L-цепи, которое соответствует аминокислотному остатку Y251 L-цепи VoNT/A дикого типа (SEQ ID NO: 1).

6. Бактериальная плаزمиды или вирусный вектор, содержащие конструкцию нуклеиновой кислоты, которая содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей модифицированную протеазу L-цепи VoNT/A по любому из предшествующих пунктов.

7. Средство доставки, содержащее:

a) модифицированную протеазу L-цепи VoNT/A по любому из п.п. 1-5, или бактериальную плазмиду или вирусный вектор по п. 6; и

b) средство для доставки указанной модифицированной протеазы L-цепи VoNT/A или указанных бактериальной плазмиды или вирусного вектора в клетку-мишень,

где указанное средство b) для доставки указанной модифицированной протеазы L-цепи VoNT/A в клетку-мишень содержит:

i) нацеливающий фрагмент, который связывает средство доставки с клеткой-мишенью; и

ii) транслокационный пептид, который транслоцирует модифицированную протеазу L-цепи VoNT/A или конструкцию нуклеиновой кислоты в клетку-мишень.

8. Средство доставки по п. 7, где указанная клетка-мишень представляет собой клетку-мишень, не являющуюся нейроном.

9. Способ расщепления hSNAP-23 *in vitro*, включающий приведение hSNAP-23 в контакт с протеазой L-цепи (VoNT/A) по любому из п.п. 1-5 или со средством доставки по п. 7 или 8, где указанное средство доставки содержит модифицированную протеазу L-цепи

ВоNT/A по любому из п.п. 1-5.

10. Применение протеазы L-цепи (ВоNT/A) по любому из п.п. 1-5 или средства доставки по п. 7 или 8, которое содержит модифицированную протеазу L-цепи ВоNT/A по любому из п.п. 1-5, в качестве лекарственного средства.

По доверенности



1/4

## ФИГ. 1А

Сайты связывания hSNAP23	Точечные мутации (в LC/A дикого типа)	Кратность увеличения эффективности расщепления hSNAP23 (по сравнению с LC/A дикого типа)	% расщепления hSNAP23 (при 1 мкМ LC/A, 20 мкМ hSNAP23)	$K_m$ [мкМ]	$k_{cat}$ [1/мин]	% расщепления hSNAP25 (при 0,5 нМ LC/A, 20 мкМ hSNAP25)
-	Отсутствуют (LC/A дикого типа)	1.00	0.2	225±38	0.2	61±10
P182/D178	A308L			79±20	0.09	
P182/D178	E148Y	8.28	9.7	52± 6	0.36	29± 5
P182/D178	E148N	1.18				
P182/D178	T307F		1.6			
P182/D178	T307I		2.4			
P182/D178	Y312K		2.6			26± 2
P182/D178	Y312K, E148Y		1.7			
P182/D178	T307I, A308P, Y312V	1.74				
P182/D178	T307F, A308N, Y312L	1.49				
P182/D178	E148N, T307I, A308P, Y312V	2.73				
P182/D178	E148Y, T307F, A308N, Y312L	2.01				
P182/D178	E148Y, T307I, A308P, Y312V	1.45				
P182/D178	E148Y, T307L, A308T, Y312M	2.23				
P182/D178	E148Y, T307L, A308I, Y312M	1.38				
K185	V304D			56±13	0.14	
K185	V304E			65± 1	0.16	
K185	G305D			52± 6	0.13	46± 3
K185	G305E			61±12	0.12	
R186	S143D			69±14	0.14	51± 3
R186	S143E			57±11	0.13	102 ± 4.1
R186	S143Q			91± 6	0.21	
I198	K166V	1.096				
I198	K166F	1.66	66.1	44± 9	0.9	62± 8
I198	K166L	1.43				91± 6
I198	K166I	1.098				58± 1
K206	L256D		1.7			7± 2
K206	Y251D		2.3			8± 1
K206	Y251E		3.2			2± 1
K206	L256E, V258P			173±42	0.19	

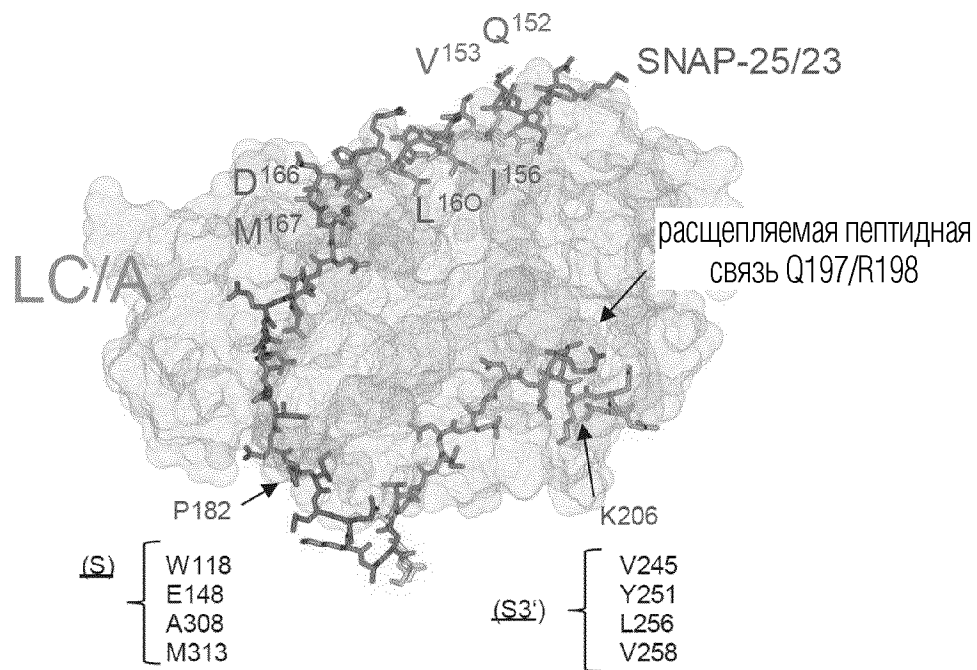
## ФИГ. 1В

Сайты связывания hSNAP23	Точечные мутации (в LC/A дикого типа)	Кратность увеличения эффективности расщепления hSNAP23 (по сравнению с LC/A-E148Y)	% расщепления hSNAP23 (% при 1 мкМ LC/A, 20 мкМ hSNAP23) <sup>***</sup> при 10 нМ LC/A]	$K_M$ [мкМ]	$k_{cat}$ [1/мин]	% расщепления hSNAP25 (при 0,5 нМ LC/A, 20 мкМ hSNAP25)
P182/D178	E148Y	1.00	9.7	52± 6	0.36	29± 5
P182/D178, D189/D192	E148Y, Q29A	1.618	15.7			34± 7
P182/D178, R186	E148Y, S143E	2.13	20.7			17± 3
P182/D178, R186	E148Y, S143D	3.2	31.1			16± 4
P182/D178, K185	E148Y, G305D	2.61	25.4	24	0.29	38± 3
P182/D178, I198	E148Y, K166F		5.6**			28±10
K185, I198	G305D, K166F		3.8**			66±14
P182/D178, K206	E148Y, Y251D	1.298	12.6			
P182/D178, D189/D192, K185	E148Y, Q29A, G305D	3.5	34.0	6.6± 1	0.28	38± 3
P182/D178, D189/D192, R186	E148Y, Q29A, S143D	2.56	24.8	24± 4	17.7	23± 1
P182/D178, I198, K185	E148Y, K166F, G305D		15.2**			60± 4
P182/D178, I198, K185	E148Y, K166V, G305D	4.67	45.3			
P182/D178, R186, K206, D189/D192	E148Y, S143D, Q29A, Y251E	1.36	13.2			2± 1
P182/D178, D189/D192, I198, K185	E148Y, Q29A, K166V, G305D	6.422	62.3			41± 2
P182/D178, D189/D192, I198, K185	E148Y, Q29A, K166F, G305D		10.4**	21± 1	13.4	40±14
P182/D178, K206	E148Y, L256D		5.8			
P182/D178, K206	E148Y, Y251E		9.0			3± 2
P182/D178, R186, I198	E148Y, S143D, K166F		18.2**			11± 1
P182/D178, I198, D210	E148Y, K166F, S254A		13.3**	19± 2	13.8	
P182/D178, K185, I198, D210	E148Y, K166F, S254A, G305D		29.9**	16± 3	27.8	
P182/D178, R186	E148Y, S143Q		5.8			10± 1
P182/D178, D168	E148Y, K340H		3.5			

## ФИГ. 1С

Сайты связывания hSNAP23	Точечные мутации (в LC/A дикого типа)	Кратность увеличения эффективности расщепления hSNAP23 (по сравнению с LC/A дикого типа)	% расщепления hSNAP23 (% при 1 мкМ LC/A, 20 мкМ hSNAP23)[**% при 10 нМ LC/A]	SNAP23 $K_m$ [мкМ]	$k_{cat}$	% расщепления hSNAP25 по сравнению с LC/A дикого типа (при 0,5 нМ LC/A, 20 мкМ hSNAP25)
<i>P182/D178</i>	E148R	1.44				4±2
<i>P182/D178</i>	E148K	0.84				1.7 ±0.5
R186	S143D	2.35		69±14	8±2	72.6 ±4.9
R186	S143Q	2.75		91±6	13±1	
K185	V304D	2.58		56±13	8±1	82.9 ±8.4
K185	V304E	1.46		65±1	9±2	
K206	V258A	0.59				33.1 ±4.7

## ФИГ. 2



**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202392577****А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

МПК:

**C07K 14/33** (2006.01)  
**A61K 39/08** (2006.01)  
**A61K 38/48** (2006.01)  
**C12N 9/52** (2006.01)

СПК:

**C07K 14/33**  
**A61K 39/08**  
**A61K 38/4893**  
**C12N 9/52**

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

A61K 39/08, C12N 9/52, A61K 38/48, C07K 14/33

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)  
 EAPATIS, Espacenet, Embase, PubMed, Яндекс

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 2016025626 A3 (BIOMADISON, INC.) 2016-02-18 реферат, абзацы [0027], [0040]-[0042], Таблица 1, пункты 5-18, 22-27	1-10
A	WO 2012041761 A2 (MERZ PHARMA GMBH & AMP; CO. KGAA И ДР.) 2012-04-05 реферат, абзацы [0001], [0018]-[0021], [0027], [0043], [0047], пункты 1-14	1-10
A	SIKORRA S, et al. Identification and characterization of Botulinum neurotoxin a substrate binding pockets and their re-engineering for human SNAP-23, JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 2015, Vol. 428, No. 2, p. 376-381 doi.org/10.1016/j.jmb.2015.10.024 реферат, Таблицы 1-2, Фигура 4	1-10

 последующие документы указаны в продолжении графы

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

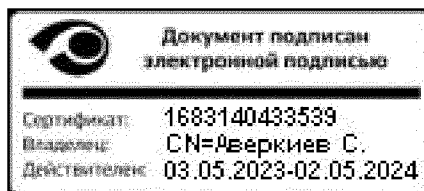
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&amp;» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 26 марта 2024 (26.03.2024)

Уполномоченное лицо:  
 Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев