

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036610**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.30

(51) Int. Cl. **C07K 14/33 (2006.01)**
C12N 9/52 (2006.01)

(21) Номер заявки
201890851

(22) Дата подачи заявки
2016.09.27

(54) **СПОСОБ ОЧИСТКИ НЕЙРОТОКСИНА КЛОСТРИДИЙ**

(31) **1517450.1**

(56) **WO-A1-2013091895**
WO-A1-2011050072
WO-A1-2015004461

(32) **2015.10.02**

(33) **GB**

(43) **2018.08.31**

(86) **PCT/EP2016/072986**

(87) **WO 2017/055274 2017.04.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИПСЕН БИОФАРМ ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
**Хэкетт Стефен Гэвин, Палан Шилпа,
Андерсон Дина Брэди (GB)**

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

(57) Способ очистки нейротоксина клостридий, включающий контактирование катионообменной смолы с композицией, содержащей нейротоксин клостридий, где стадию контактирования проводят по меньшей мере при pH 7,3 и где указанную стадию контактирования катионообменной смолы с композицией, содержащей указанный нейротоксин клостридий, проводят до превращения нейротоксина клостридий из одноцепочечной формы в двухцепочечную форму. Изобретение также относится к применению буфера, имеющего значение pH, которое составляет -1 или выше, чем вычисленная pI нейротоксина клостридий; к промежуточным продуктам очистки и нейротоксинам клостридий, получаемым в соответствии с изобретением, где нейротоксин клостридий присутствует в одноцепочечной форме.

B1

036610

036610
B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способу очистки нейротоксинов клостридий, к применению буфера, к промежуточным продуктам очистки и к нейротоксинам клостридий, полученным описанным здесь способами, и к их применению.

Предпосылки создания изобретения

Бактерии рода *Clostridia* продуцируют в высокой степени активные и специфичные белки-токсины, которые могут поражать нейроны и другие клетки, в которые они проникают. Примерами таких токсинов клостридий является нейротоксин, продуцируемые серотипами A-G *C. tetani* (TeNT) и *C. botulinum* (BoNT), а также бактериями *C. baratii* и *C. butyricum*.

Известно, что из нейротоксинов клостридий некоторые обладают наиболее высокой активностью. Так, например, ботулинические нейротоксины имеют величины медианных летальных доз (LD₅₀) для мышей, составляющие в пределах от 0,5 до 5 нг/кг, в зависимости от серотипа. Столбнячные и ботулинические токсины действуют посредством ингибирования функции поврежденных нейронов, а в частности, высвобождают нейромедиаторы. Ботулинический токсин действует в нейромышечном синапсе и ингибирует передачу холинергических рецепторов в периферическую нервную систему, а столбнячный токсин действует на центральную нервную систему.

В природе, нейротоксины клостридий синтезируются как одноцепочечный полипептид, который посттрансляционно модифицируется посредством протеолитического расщепления с образованием двух полипептидных цепей, связанных друг с другом дисульфидной связью. Расщепление происходит в специфическом сайте расщепления, который часто называется активным центром, расположенным между цистеиновыми остатками, образующими межцепьевую дисульфидную связь. В результате образуется двухцепочечная форма, которая представляет собой активную форму токсина. Две цепи называются тяжелой цепью (H-цепью), которая имеет молекулярную массу приблизительно 100 кДа, и легкой цепью (L-цепью), которая имеет молекулярную массу приблизительно 50 кДа. H-цепь содержит N-концевой компонент транслокации (H_N-домен) и C-концевой нацеливающий компонент (H_C-домен). Сайт расщепления расположен между L-цепью и компонентами домена транслокации. После связывания H_C-домена с его нейроном-мишенью и интернализации связанного токсина в клетку посредством эндосомы, H_N-домен переносит L-цепь через эндосомную мембрану в цитозоль, и L-цепь приобретает протеазную функцию (также известную как не-цитотоксическая протеаза).

Нецитотоксические протеазы действуют посредством 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. Акроним SNARE происходит от термина "растворимый рецептор, связанный с NSF" (Soluble NSF Attachment Receptor), где NSF означает фактор, восприимчивый к N-этилмалеимиду (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor). Белки SNARE представляют собой интегральные белки, связывающиеся с внутриклеточными везикулами и таким образом секретирующие молекулы посредством везикулярного транспорта из клеток. Протеазная функция представляет собой цинк-зависимую эндопептидазную активность и обладает высокой специфичностью к субстрату для белков SNARE. В соответствии с этим не-цитотоксическая протеаза, после ее проникновения в нужную клетку-мишень, приобретает способность ингибировать клеточную секрецию из клетки-мишени. L-цепьевые протеазы нейротоксинов клостридий представляют собой не-цитотоксические протеазы, которые расщепляют белки SNARE.

Благодаря повсеместной распространенности белков SNARE, нейротоксины клостридий, такие как ботулинический токсин, успешно применяются в терапии широкого ряда.

Так, например, авторы ссылаются на публикацию William J. Lipham, *Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin* (Slack, Inc., 2004), в которой описано использование нейротоксинов клостридий, таких как ботулинические нейротоксины (BoNTs), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C₁, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F и BoNT/G и столбнячный нейротоксин (TeNT), для ингибирования нейротрансмиссии при их применении в терапии, косметике или в медицине по уходу за кожей; так, например, в настоящее время, коммерчески доступные продукты на основе ботулинического токсина разрешены для лечения заболеваний, включая очаговые спазмы, спазмы верхних конечностей, спазмы нижних конечностей, шейную дистонию, блефароспазм, гемифациальные спазмы, гипергидроз подмышечной области, хроническую мигрень, нейрогенную гиперактивность детрузора, спазмы в глабеллярных линиях и тяжелые расстройства латеральных областей глазных щелей. Кроме того, описано применение терапии на основе нейротоксинов клостридий для лечения нервно-мышечных расстройств (см. US 6872397); для лечения расстройств матки (см. US 2004/0175399); для лечения язв и гастроэзофагеального рефлюкса (см. US 2004/0086531); для лечения дистонии (см. US 6319505); для лечения глазных заболеваний (см. US 2004/0234532); для лечения блефароспазма (см. US 2004/0151740); для лечения косоглазия (см. US 2004/0126396); для устранения боли (см. US 6869610, US 6641, 820, US 6464986 и US 6113915); для лечения фибромиалгии (см. US 6623742 US 2004/0062776); для устранения боли в пояснице (см. US 2004/0037852); для лечения мышечных травм (см. US 6423319); для устранения головной боли в синусной области (см. US 6838434); для устранения головной боли напряжения (см. US 6776992); для устранения головной боли (см. US 6458365); для ослабления боли при мигрени (см. US 5714469); для лече-

ния сердечно-сосудистых заболеваний (см. US 6767544); для лечения нервных расстройств, таких как болезнь Паркинсона (см. US 6620415, US 6306403); для лечения психоневрологических расстройств (см. US 2004/0180061, US 2003/0211121); для лечения расстройств эндокринной системы (см. US 6827931); для лечения расстройств щитовидной железы (см. US 6740321); для лечения холинергических расстройств потовых желез (см. US 6683049); для лечения диабета (см. US 6337075, US 6416765); для лечения расстройств поджелудочной железы (см. US 6261572, US 6143306); для лечения рака, такого как опухоли костей (см. US 6565870, US 6368605, US 6139845, US 2005/0031648); для лечения ушных заболеваний (см. US 6358926, US 6265379); для лечения вегетативных расстройств, таких как расстройства желудочно-кишечных мышц и других дисфункций гладких мышц (см. US 5437291); для лечения кожных поражений, ассоциированных с кожными клеточно-пролиферативными расстройствами (см. US 5670484); для лечения нейрогенных воспалительных расстройств (см. US 6063768); для снижения выпадения волос и для стимуляции роста волос (см. US 6299893); для лечения косоротия (см. US 6358917); для снижения аппетита (см. US 2004/40253274); для лечения заболеваний зубов и проведения стоматологических процедур (см. US 2004/0115139); для лечения нервно-мышечных расстройств и состояний (см. US 2002/0010138); для лечения различных заболеваний и состояний и устранения связанных с ними болей (см. US 2004/0013692); для лечения состояний, вызываемых гиперсекрецией слизи, таких как астма и ХОБЛ (см. WO 00/10598); и для лечения не-нейронных заболеваний, таких как воспаление, эндокринные расстройства, экзокринные расстройства, иммунологические расстройства, сердечно-сосудистые расстройства и заболевания костей (см. WO 01/21213). Все вышеупомянутые публикации во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

Считается, что использование не-цитотоксических протеаз, таких как нейротоксины клостридий (например, BoNT и TeNT) в медицине и в косметике, а также для лечения других млекопитающих, распространяется на более широкий ряд заболеваний и расстройств, которые могут поддаваться лечению исходя из свойств этих токсинов.

Во избежание возникновения системных неврологических эффектов, многие методы лечения с использованием нейротоксинов клостридий включают прямое введение терапевтического нейротоксина клостридий в нужную область-мишень (такую как ткань-мишень). При проведении терапии на основе нейротоксинов клостридий таким способом возникает проблема, связанная с распространением токсина за пределы области введения и в окружающую ткань или в системный кровоток. Предполагается, что диффузия токсина за пределы ткани-мишени может вызывать нежелательные побочные эффекты, которые, в исключительных случаях, могут представлять угрозу для жизни. Это особенно проблематично при использовании терапевтических нейротоксинов клостридий (таких как терапевтические BoNT) в высоких дозах, концентрациях и объемах инъекций. Побочными эффектами, связанными с этой проблемой, о которой сообщалось при описании коммерчески доступных терапевтических BoNT/A, являются астения, генерализованная мышечная слабость, диплопия, птоз, дисфагия, дисфония, дизартрия, недержание мочи и затруднение дыхания. Нарушения глотания и затруднение дыхания могут представлять угрозу для жизни, и были зарегистрированы случаи летальных исходов, вызванных распространением токсических эффектов. Эти проблемы были поставлены и решены в заявке WO 2015/004461 A1 (которая вводится в настоящее описание посредством ссылки), относящейся к сконструированным нейротоксинам клостридий, содержащим по меньшей мере одну аминокислотную модификацию, которая увеличивает изоэлектрическую точку (pI) сконструированного нейротоксина клостридий.

В литературе описаны методы очистки нейротоксинов клостридий. В заявке WO 2006/096163 A1 (которая вводится в настоящее описание посредством ссылки) описаны хроматографические способы и системы для очистки ботулинического нейротоксина типа А, образующего комплекс со стабилизирующими нетоксическими белками. В WO 2006/096163 A1 описано множество хроматографических способов, включая использование катионообменной колонки в качестве конечной колонки (т.е. колонки, используемой в том случае, когда комплекс ботулинического нейротоксина типа А уже был подвергнут обработке на одной или более колонках, и является, по существу, чистым). В WO 2006/096163 A1 было описано использование очень низких значений pH (например, pH 4,0) при связывании с комплексом ботулинического нейротоксина типа А и при проведении катионообменной хроматографии с этим комплексом.

Тем не менее, все еще существует потребность в разработке оптимизированных и улучшенных методов очистки нейротоксинов клостридий (в частности, нейротоксинов клостридий, не образующих комплексов), которые позволяли бы усовершенствовать этот способ и/или повысить его выходы, а предпочтительно, облегчить очистку нейротоксинов клостридий путем проведения меньшего числа стадий (и/или, возможно, более эффективных стадий).

Сущность изобретения

В соответствии со своим первым аспектом настоящее изобретение относится к способу очистки нейротоксина клостридий, включающему контактирование катионообменной смолы с композицией, содержащей нейротоксин клостридий, где стадию контактирования проводят по меньшей мере при рН 7,3 и где указанную стадию контактирования катионообменной смолы с композицией, содержащей указанный нейротоксин клостридий, проводят до превращения указанного нейротоксина клостридий из одноцепочечной формы в двухцепочечную форму.

Во втором своем аспекте настоящее изобретение относится к промежуточному продукту очистки, содержащему нейротоксин клостридий, связанный с катионообменной смолой, где промежуточный продукт очистки имеет значение рН по меньшей мере 7,3 и где указанный нейротоксин клостридий присутствует в одноцепочечной форме.

В своем третьем аспекте настоящее изобретение относится к нейротоксину клостридий, который был отделен от катионообменной смолы, где промежуточный продукт очистки имеет значение рН по меньшей мере 7,3 и где указанный нейротоксин клостридий присутствует в одноцепочечной форме.

В своем четвертом аспекте настоящее изобретение относится к применению буфера, имеющего значение рН, которое составляет -1 или превышает вычисленную рI нейротоксина клостридий, в целях контактирования композиции, содержащей нейротоксин клостридий с катионообменной смолой, для повышения уровня связывания и/или увеличения выхода нейротоксина клостридий, по сравнению с применением буфера, рН которого более, чем на -1 единицу ниже, чем вычисленная рI указанного нейротоксина клостридий в одинаковых условиях, и где указанный нейротоксин клостридий присутствует в одноцепочечной форме.

В своем пятом аспекте настоящее изобретение относится к нейротоксину клостридий, полученному в соответствии со способом или применением по любому из предшествующих пунктов и/или выделенному из промежуточного продукта очистки согласно изобретению.

Краткое описание чертежей

Описанные здесь варианты приводятся лишь в качестве примеров со ссылкой на нижеследующие чертежи.

На фиг. 1 показан захват гBoNT/A1 на катионообменных смолах при различных рН. E. coli-лизаты эндонегативного гBoNT/A1 подвергали буферному обмену до рН 6,0 (панели А и В), рН 7,5 (панели С и D), или рН 8,0 (панели Е и F). Лизаты загружали на Hi-Trap SP-HP, промывали и элюировали в градиенте рН (панель А) или NaCl (панели В-F). Фракции F5-F16 анализировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, где BoNT/A показан звездочкой (*) на каждой панели.

На фиг. 2 показан захват катионного гBoNT/A1 на катионообменных смолах при различных рН. E. coli-лизаты эндонегативного катионного гBoNT/A1 подвергали буферному обмену до рН 6,0 (панели А и В), рН 7,5 (панели С и D), или рН 8,0 (панели Е и F). Лизаты загружали на Hi-Trap SP-HP, промывали и элюировали в градиенте рН (панель А) или NaCl (панели В-F). Соответствующие фракции анализировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, где BoNT/A показан звездочкой (*) на каждой панели.

На фиг. 3 представлена нуклеотидная последовательность катионного BoNT/A1 (например, BoNT/A1, имеющего более высокую изоэлектрическую точку, чем нативный BoNT/A1) (SEQ ID NO: 1).

На фиг. 4 представлена полипептидная последовательность катионного гBoNT/A1 (SEQ ID NO: 2).

На фиг. 5 представлена нуклеотидная последовательность гBoNT/A1 (SEQ ID NO: 3).

На фиг. 6 представлена полипептидная последовательность гBoNT/A1 (SEQ ID NO: 4).

На фиг. 7 представлена нуклеотидная последовательность катионного BoNT/A, "CatH_N_v1" (SEQ ID NO: 5).

На фиг. 8 представлена полипептидная последовательность катионного BoNT/A, "CatH_N_v1" (SEQ ID NO: 6).

На фиг. 9 представлена нуклеотидная последовательность катионного BoNT/A, "CatH_N_v2" (SEQ ID NO: 7).

На фиг. 10 представлена полипептидная последовательность катионного BoNT/A, "CatH_N_v2" (SEQ ID NO: 8).

На фиг. 11 представлена нуклеотидная последовательность катионного BoNT/A, "CatH_N_v3" (SEQ ID NO: 9).

На фиг. 12 представлена полипептидная последовательность катионного BoNT/A, "CatH_N_v3" (SEQ ID NO: 10).

На фиг. 13 представлена нуклеотидная последовательность легкой цепи катионного BoNT/E, "CatLC" (SEQ ID NO: 11).

На фиг. 14 представлена полипептидная последовательность легкой цепи катионного BoNT/E, "CatLC" (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 15 представлена нуклеотидная последовательность BoNT/A1 (SEQ ID NO: 13).

На фиг. 16 представлена полипептидная последовательность BoNT/A1 (SEQ ID NO: 14).

На фиг. 17 представлена нуклеотидная последовательность катионного BoNT/A1, "Cat-A" (SEQ ID NO: 15).

На фиг. 18 представлена полипептидная последовательность катионного BoNT/A1, "Cat-A" (SEQ ID NO: 16).

На фиг. 19 представлена нуклеотидная последовательность катионного BoNT/A1, "Cat-B" (SEQ ID NO: 17).

На фиг. 20 представлена полипептидная последовательность катионного BoNT/A1, "Cat-B" (SEQ ID NO: 18).

На фиг. 21 представлена нуклеотидная последовательность катионного BoNT/A1, "Cat-C" (SEQ ID NO: 19).

На фиг. 22 представлена полипептидная последовательность катионного BoNT/A1, "Cat-C" (SEQ ID NO: 20).

На фиг. 23 представлена нуклеотидная последовательность катионного BoNT/A1, "Cat-D" (SEQ ID NO: 21).

На фиг. 24 представлена полипептидная последовательность катионного BoNT/A1, "Cat-D" (SEQ ID NO: 22).

Подробное описание изобретения

Основополагающими результатами, полученными авторами настоящего изобретения, является то, что нейротоксины клостридий связываются с катионообменными остатками по меньшей мере при pH 7,3. Этот результат оказался весьма неожиданным и противоречит распространенному мнению специалистов, считающих, что в процессе катионообменной хроматографии необходимо использовать значения pH, которые значительно ниже pI очищенного белка.

Авторами настоящего изобретения было также неожиданно обнаружено, что применение буфера, имеющего значение pH -1 или выше вычисленной изоэлектрической точки (pI) указанного нейротоксинов клостридий, приводило к повышению уровня связывания и/или к увеличению выхода по сравнению с аналогичным применением в различных условиях pH.

Поэтому, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу очистки нейротоксина клостридий, включающему контактирование катионообменной смолы с композицией, содержащей нейротоксин клостридий, где стадию контактирования проводят по меньшей мере при pH 7,3, и где указанную стадию контактирования катионообменной смолы с композицией, содержащей указанный нейротоксин клостридий, проводят до превращения указанного нейротоксина клостридий из одноцепочечной формы в двухцепочечную форму.

В одном из вариантов осуществления изобретения стадия контактирования может быть осуществлена по меньшей мере приблизительно при pH 7,3. В соответствии с этим стадия контактирования может быть осуществлена по меньшей мере приблизительно при pH 7,4 или по меньшей мере при pH 7,5.

В соответствии с этим стадия контактирования может быть осуществлена по меньшей мере приблизительно при pH 7,6 или по меньшей мере приблизительно при pH 7,7.

В соответствии с этим стадия контактирования может быть осуществлена по меньшей мере приблизительно при pH 7,8 или по меньшей мере приблизительно при pH 7,9.

В соответствии с этим стадия контактирования может быть осуществлена по меньшей мере приблизительно при pH 8,0.

В другом варианте осуществления изобретения стадия контактирования может быть осуществлена по меньшей мере приблизительно pH 7,3-9,5. В соответствии с этим стадия контактирования может быть осуществлена при pH приблизительно от 7,5 до 9,0 или приблизительно при pH от 7,5 до 8,5.

В соответствии с этим стадия контактирования может быть осуществлена приблизительно при pH 7,5.

В соответствии с этим стадия контактирования может быть осуществлена приблизительно при pH 8,0.

Используемый здесь термин "очистка" означает удаление одной или более примесей, не являющихся нейротоксином клостридий, которые могут присутствовать в композиции, содержащей нейротоксин клостридий, предпочтительно в целях получения нейротоксина клостридий, который не содержит указанных примесей, не являющихся нейротоксином клостридий. Другими словами, термин "очистка" означает некоторую степень очистки, но не абсолютную очистку, если это не оговорено особо. Поэтому термин "очистка" может означать удаление по меньшей мере 5% (предпочтительно по меньшей мере 10% или 20%) примесей, не являющихся нейротоксином клостридий. В соответствии с этим термин "очистка" может означать удаление по меньшей мере 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 95% примесей.

В другом своем варианте настоящее изобретение относится к применению буфера, имеющего значение pH, которое составляет -1 или выше вычисленной pI нейротоксина клостридий, в целях контактирования композиции, содержащей нейротоксин клостридий, с катионообменной смолой, для повышения уровня связывания и/или увеличения выхода нейротоксина клостридий, по сравнению с применением буфера, pH которого более чем на -1 единицу pH ниже, чем вычисленная pI указанного нейротоксина клостридий, в одинаковых условиях, и где указанный нейротоксин клостридий присутствует в одноцепочечной форме.

Используемый здесь термин "более чем -1 единица рН или выше, чем вычисленная рI нейротоксина кластридий" означает, что значение рН выше чем -1 и ниже, чем вычисленная рI нейротоксина кластридий. Так, например, этот термин будет охватывать значения рН -0,5, +0,5, +1 и т.п. В качестве примера, если нейротоксин кластридий имеет рI 8,0, то значение рН, которое составляет более чем -1 или выше, означает рН более чем рН 7,0, например, рН 8,0, рН 9,0 и т.д.

Используемый здесь термин "рН более чем -1 и ниже, чем вычисленная рI указанного нейротоксина кластридий" означает, что рН составляет менее чем -1 и ниже, чем вычисленная рI нейротоксина кластридий. Так, например, этот термин будет охватывать рН -2 и т.п. Так, например, если нейротоксин кластридий имеет рI 8,0, то значение рН, которое составляет более чем на -1 ниже, означает, что рН составляет менее чем рН 7,0, например, рН 6,0, рН 5,0 и т.д.

Катионообменной смолой, используемой в настоящем изобретении, может быть катионообменная смола любого вида, способная связываться с нейротоксином кластридий. В одном из вариантов осуществления изобретения катионообменной смолой может быть сильная катионообменная смола, слабая катионообменная смола или их комбинации.

В соответствии с этим катионообменной смолой может быть сильная катионообменная смола.

Неограничивающими примерами сильных катионообменников являются SP-сефароза HP, SP-сефароза FF (обе поставляются от GE Healthcare, UK), Mustang S, S Ceramic, HyperD® F, Acrodisc с Mustang S, AcroPrep с Mustang S и/или AcroSep с S Ceramic HyperD® F (все катионообменники (если это не оговорено особо) являются коммерчески доступными и поставляются Pall Corporation, 25 Harbor Park Drive, Port Washington, NY 11050, USA).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения катионообменной смолой может быть сильная катионообменная смола, содержащая сульфоновую кислоту.

В одном из вариантов осуществления изобретения катионообменной смолой может быть SP-сефарозная смола HP и/или SP-сефарозная смола FF (все эти катионообменники являются коммерчески доступными и поставляются от GE Healthcare, UK).

Неограничивающими примерами слабых катионообменников являются CM Ceramic HyperD® F, AcroSep с CM Ceramic и/или HyperD® F (все эти катионообменники являются коммерчески доступными и поставляются от Pall Corporation, 25 Harbor Park Drive, Port Washington, NY 11050, USA).

В одном из вариантов осуществления изобретения слабой катионообменной смолой может быть смола, содержащая карбоксиметил.

В одном из вариантов осуществления изобретения может быть использована смола смешанного типа. Смолы смешанного типа могут использовать заряженные лиганды, которые реагируют с белком-мишенью посредством ионных взаимодействий, и могут быть усилены под действием одной или более функциональных групп (например, в результате взаимодействий с водородными связями, гидрофобных взаимодействий и ван-дер-ваальсовых взаимодействий). Поэтому в одном из вариантов осуществления изобретения смола смешанного типа может функционировать как ионообменная смола и гидрофобная смола. В соответствии с этим смола смешанного типа может функционировать как катионообменная смола (соответственно, слабая катионообменная смола) и гидрофобная смола.

Неограничивающими примерами смол смешанных типов являются хроматографические колонки мультимодального диапазона Carbo (коммерчески доступные и поставляемые от GE Healthcare, UK).

В природе нейротоксины кластридий синтезируются в виде одноцепочечного полипептида, который был посттрансляционно модифицирован посредством протеолитического расщепления с образованием двух полипептидных цепей, связанных друг с другом дисульфидной связью. Расщепление происходит в специфическом сайте расщепления, который часто называется активным центром, расположенным между цистеиновыми остатками, образующими межцепевую дисульфидную связь. В результате образуется двухцепочечная форма, которая представляет собой активную форму токсина. Две цепи называются тяжелой цепью (H-цепью), которая имеет молекулярную массу приблизительно 100 кДа, и легкой цепью (L-цепью), которая имеет молекулярную массу приблизительно 50 кДа. H-цепь содержит N-концевой компонент транслокации (N_N-домен) и C-концевой нацеливающий компонент (N_C-домен). Сайт расщепления расположен между L-цепью и компонентами домена транслокации. После связывания N_C-домена с его нейроном-мишенью и интернализации связанного токсина в клетку посредством эндосомы, N_N-домен переносит L-цепь через эндосомную мембрану в цитозоль, и L-цепь приобретает протеазную функцию (также известную как не-цитотоксическая протеаза).

В настоящем изобретении могут быть использованы нейротоксины кластридий многих различных типов. Таким образом, в контексте настоящего изобретения, термин "нейротоксин кластридий" охватывает токсины, продуцируемые бактерией *C. botulinum* (ботулинический нейротоксин серотипов A, B, D, E, F и G), *C. tetani* (столбнячный нейротоксин), *C. butyricum* (ботулинический нейротоксин серотипа E) и *C. baratii* (ботулинический нейротоксин серотипа F), а также модифицированные нейротоксины кластридий или производные, происходящие от любых указанных выше нейротоксинов. Термин "нейротоксин кластридий" может также охватывать природные гибриды, мозаики и химеры ботулинических нейротоксинов.

Термин "мозаика", используемый в данном контексте, относится к природному нейротоксину клостридий, который содержит по меньшей мере один функциональный домен от нейротоксинов клостридий другого типа (например, нейротоксин клостридий другого серотипа), где указанный нейротоксин клостридий обычно не содержит по меньшей мере один указанный функциональный домен.

Поэтому в одном из вариантов осуществления изобретения, нейротоксин клостридий согласно изобретению или нейротоксин клостридий, используемый в настоящем изобретении, может быть получен из одной или более клостридий, выбранных из группы, состоящей из *Clostridia botulinum*, *Clostridia tetani*, *Clostridia baratii* и *C. butyricum*.

Ботулинический нейротоксин (BoNT) продуцируется бактерией *C. botulinum* в виде крупного белкового комплекса, состоящего из самого BoNT вместе с рядом вспомогательных белков. В настоящее время существует восемь различных классов ботулинических нейротоксинов, а именно, ботулинические нейротоксины серотипов А, В, С, D, Е, F, G и H, которые имеют аналогичные структуры и механизмы действия. Различные серотипы BoNT могут отличаться по их инактивации специфическими нейтрализующими антисыворотками, причем, такая классификация серотипов коррелирует с процентом идентичности последовательности на аминокислотном уровне. Белки BoNT данного серотипа, кроме того, подразделяются на различные подтипы исходя из процента идентичности аминокислотных последовательностей.

BoNT всасываются в желудочно-кишечном тракте и после поступления в общий кровоток связываются с пресинаптической мембраной холинергических нервных окончаний и предотвращают высвобождение ацетилхолина, являющегося нейромедиатором. BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F и BoNT/G расщепляют мембранный белок, связанный с синаптобrevином/везикулами (VAMP); BoNT/C₁, BoNT/A и BoNT/E расщепляют белок, связанный с синаптосомами и имеющий размер 25 кДа (SNAP-25); а BoNT/C₁ расщепляет синтаксин.

Столбнячный токсин продуцируется бактерией *C. tetani* в виде одного серотипа. *C. butyricum* продуцирует BoNT/E, а *C. baratii* продуцирует BoNT/F.

В одном из вариантов осуществления изобретения, нейротоксином клостридий может быть TeNT. Эталонная последовательность TeNT имеет обозначение UniProtKB с регистрационным номером P04958.

В соответствии с этим нейротоксин клостридий согласно изобретению или нейротоксин клостридий, используемый в настоящем изобретении, может представлять собой ботулинический нейротоксин (BoNT), а предпочтительно, один или более BoNT, выбранных из группы, состоящей из BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C₁, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F и BoNT/G.

В одном из вариантов осуществления изобретения, нейротоксином клостридий может быть BoNT/A. Эталонная последовательность BoNT/A имеет обозначение UniProtKB с регистрационным номером P10845.

В другом варианте осуществления изобретения нейротоксином клостридий может быть BoNT/B. Эталонная последовательность BoNT/B имеет обозначение UniProtKB с регистрационным номером P10844.

В другом варианте осуществления изобретения нейротоксином клостридий может быть BoNT/C. Эталонная последовательность BoNT/C₁ имеет обозначение UniProtKB с регистрационным номером P18640.

В другом варианте осуществления изобретения нейротоксином клостридий может быть BoNT/D. Эталонная последовательность BoNT/D имеет обозначение UniProtKB с регистрационным номером P19321.

В другом варианте осуществления изобретения нейротоксином клостридий может быть BoNT/E. Эталонная последовательность BoNT/E имеет обозначение UniProtKB с регистрационным номером Q00496.

В другом варианте осуществления изобретения нейротоксином клостридий может быть BoNT/F. Эталонная последовательность BoNT/F имеет обозначение UniProtKB с регистрационным номером YP_001390123.

В другом варианте осуществления изобретения нейротоксином клостридий может быть BoNT/G. Эталонная последовательность BoNT/G имеет обозначение UniProtKB с регистрационным номером Q60393.

Термин "нейротоксин клостридий" также охватывает модифицированные нейротоксины клостридий и их производные, включая, но не ограничиваясь ими, нейротоксины клостридий, описанные ниже. Модифицированный нейротоксин клостридий или его производное может содержать одну или более аминокислот, которые были модифицированы по сравнению с нативной (немодифицированной) формой нейротоксина клостридий, или они могут содержать одну или более встроенных аминокислот, которые не присутствуют в нативной (немодифицированной) форме нейротоксина клостридий или могут иметь одну или более аминокислотных делеций по сравнению с нативной (немодифицированной) формой нейротоксина клостридий. Так, например, модифицированный нейротоксин клостридий может иметь модифицированные аминокислотные последовательности в одном или более доменах по сравнению с нативной (немодифицированной) последовательностью нейротоксина клостридий. Такие модификации могут

изменять функциональные свойства нейротоксина, например, биологическую активность или персистентность.

Модифицированный нейротоксин кластридий может представлять собой модифицированный нейротоксин кластридий, описанный в WO 2015/004461 A1 (например, катионный BoNT).

В другом варианте осуществления изобретения нейротоксином кластридий согласно изобретению или нейротоксином кластридий, используемым в настоящем изобретении, может быть катионный BoNT/A.

В другом варианте осуществления изобретения нейротоксином кластридий согласно изобретению или нейротоксином кластридий, используемым в настоящем изобретении, может быть катионный BoNT/B.

В другом варианте осуществления изобретения нейротоксином кластридий согласно изобретению или нейротоксином кластридий, используемым в настоящем изобретении, может быть катионный BoNT/C.

В другом варианте осуществления изобретения нейротоксином кластридий согласно изобретению или нейротоксином кластридий, используемым в настоящем изобретении, может быть катионный BoNT/D.

В другом варианте осуществления изобретения нейротоксином кластридий согласно изобретению или нейротоксином кластридий, используемым в настоящем изобретении, может быть катионный BoNT/E.

В другом варианте осуществления изобретения нейротоксином кластридий согласно изобретению или нейротоксином кластридий, используемым в настоящем изобретении, может быть катионный BoNT/F.

В другом варианте осуществления изобретения нейротоксином кластридий согласно изобретению или нейротоксином кластридий, используемым в настоящем изобретении, может быть катионный BoNT/G.

Катионным BoNT является BoNT, который имеет изоэлектрическую точку, превышающую изоэлектрическую точку нативного аналога BoNT.

Модифицированные нейротоксины кластридий могут иметь одну или более модификаций в аминокислотной последовательности тяжелой цепи (например, модифицированный H_C-домен), где указанная модифицированная тяжелая цепь связывается с нервными клетками-мишенями с более высокой или более низкой аффинностью, чем нативный (немодифицированный) нейротоксин кластридий. Такие модификации в H_C-домене могут включать модифицирующие остатки в ганглиозид-связывающем сайте H_C-домена или в сайте, связывающемся с белком (SV2 или синаптоагмином), которые модифицируют связывание с ганглиозидным рецептором и/или с рецептором белка нервных клеток-мишеней. Примеры таких модифицированных нейротоксинов кластридий описаны в заявках WO 2006/027207 и WO 2006/114308, которые во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

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

Модифицированный нейротоксин кластридий может содержать одну или более модификаций, которые повышают или снижают биологическую активность и/или биологическую персистентность модифицированного нейротоксина кластридий. Так, например, модифицированный нейротоксин кластридий может содержать мотив на основе лейцина или тирозина, где указанный мотив повышает или снижает биологическую активность и/или биологическую персистентность модифицированного нейротоксина кластридий. Подходящими мотивами на основе лейцина являются xDxxxLL, xExxxLL, xExxxIL и xExxxLM (где x представляет собой любую аминокислоту). Подходящими мотивами на основе тирозина являются Y-x-x-Hu (где Hu представляет собой гидрофобную аминокислоту). Примеры модифицированных нейротоксинов кластридий, содержащих мотивы на основе лейцина и тирозина, описаны в заявке WO 2002/08268, которая вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Термин "нейротоксин кластридий" охватывает гибридные и химерные нейротоксины кластридий. Гибридный или химерный нейротоксин кластридий содержит по меньшей мере часть легкой цепи от одного нейротоксина кластридий или его подтипа, и по меньшей мере часть тяжелой цепи от другого нейротоксина кластридий или другого подтипа нейротоксина кластридий.

В одном варианте осуществления изобретения, гибридный или химерный нейротоксин кластридий может содержать всю легкую цепь от нейротоксина кластридий одного подтипа и тяжелую цепь от нейротоксина кластридий другого подтипа. В другом варианте осуществления изобретения химерный нейротоксин кластридий может содержать часть (например, связывающий домен) тяжелой цепи нейротоксина кластридий одного подтипа вместе с другой частью тяжелой цепи нейротоксина кластридий другого подтипа. Аналогично или альтернативно, терапевтический элемент может содержать части легких

цепей от различных нейротоксинов клостридий. Такие гибридные или химерные нейротоксины клостридий могут быть использованы, например, в качестве средств, обеспечивающих терапевтический эффект таких нейротоксинов клостридий у пациентов, которые являются иммунологически резистентными к нейротоксину клостридий данного подтипа; у пациентов, которые могут иметь рецепторы для данного домена, связывающегося с тяжелой цепью нейротоксина клостридий в концентрации ниже средней; или у пациентов, которые могут иметь резистентный к протеазе вариант мембранного или везикулярного субстрата токсина (например, SNAP-25, VAMP и синтаксин). Гибридные и химерные нейротоксины клостридий описаны в патенте США 8071110 и в GB1607901.4 (который еще не был опубликован), и указанные публикации во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения, нейротоксин клостридий для очистки в соответствии со способом или применением согласно изобретению может представлять собой сконструированный нейротоксин клостридий и, соответственно, сконструированный гибридный нейротоксин клостридий или сконструированный химерный нейротоксин клостридий.

Термин "нейротоксин клостридий" охватывает ретаргетированные нейротоксины клостридий. В ретаргетированном нейротоксине клостридий, этот нейротоксин клостридий имеет модификацию, т.е. включает экзогенный лиганд, известный как таргетирующая молекула (ТМ). ТМ выбирают, так чтобы обеспечивалась специфичность связывания с нужной клеткой-мишенью, и в процессе ретаргетирования, нативная связывающая часть нейротоксина клостридий (например, Н_С-домен или Н_{СС}-домен) могла быть удалена. Технология ретаргетирования описана, например, в EP-B-0689459; WO 1994/021300; EP-B-0939818; US 6461617; US 7192596; WO 1998/007864; EP-B-0826051; US 5989545; US 6395513; US 6962703; WO 1996/033273; EP-B-0996468; US 7052702; WO 1999/017806; EP-B-1107794; US 6632440; WO 2000/010598; WO 2001/21213; WO 2006/059093; WO 2000/62814; WO 2000/04926; WO 1993/15766; WO 2000/61192 и WO 1999/58571; которые во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения, сконструированным нейротоксином клостридий, используемым в настоящем изобретении, может быть сконструированный ретаргетированный нейротоксин клостридий.

Настоящее изобретение также охватывает нейротоксины клостридий (или их применение), которые имеют не-нативный сайт расщепления протеазой. В таких нейротоксинах клостридий, нативный сайт расщепления протеазой (также известный как сайт активации, описанный выше) был модифицирован или заменен сайтом расщепления протеазой, который не является нативным для этого нейротоксина клостридий (т.е. экзогенным сайтом расщепления). Такому сайту для расщепления требуется экзогенная протеаза, которая позволяет повысить контроль за временем и локализацией событий расщепления. Не-нативными сайтами расщепления протеазой, которые могут присутствовать в нейротоксинах клостридий, являются:

Энтерокиназа: (DDDDK↓).

Фактор Ха: (IEGR↓/IDGR↓).

TEV (вирус гравировки табака): (ENLYFQ↓G).

Тромбин: (LVPR↓GS).

PreScission: (LEVLFFQ↓GP).

Дополнительные сайты расщепления протеазой включают последовательности распознавания, которые расщепляются нецитотоксической протеазой, например, легкие цепи нейротоксина клостридий. Такими последовательностями являются последовательности распознавания белка SNARE (например, SNAP-25, синтаксин, VAMP), которые расщепляются не-цитотоксическими протеазами, такие как легкая цепь нейротоксина клостридий. Нейротоксины клостридий, содержащие ненативные сайты расщепления протеазой, описаны в US 7132259, EP 1206554-B2 и US 2007/0166332, которые во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки. Термин "сайт расщепления протеазой" также охватывает интеин, который представляет собой саморасщепляющуюся последовательность. Реакция аутосплайсинга является контролируемой, например, путем изменения концентрации присутствующего восстановителя.

Настоящее изобретение также охватывает применение нейротоксинов клостридий, содержащих "деструктивный сайт расщепления". В указанных нейротоксинах клостридий, не-нативный сайт расщепления протеазой вводят в нейротоксин клостридий, в положение, выбранное так, чтобы расщепление в указанном сайте снижало активность нейротоксина клостридий или инактивировало его. Деструктивный сайт расщепления протеазой может быть чувствительным к расщеплению локальной протеазой, в том случае, если нейротоксин клостридий, после его введения, мигрирует в участок, не являющийся мишенью. Подходящими не-нативными сайтами расщепления протеазой являются сайты, описанные выше. Нейротоксины клостридий, содержащие деструктивный сайт расщепления, описаны в заявках WO 2010/094905 и WO 2002/044199, которые во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

Нейротоксины клостридий согласно изобретению или нейротоксины клостридий, используемые в настоящем изобретении, могут быть пэгилированными, что может способствовать повышению стабиль-

ности, например, продолжительности д компонента легкой цепи. Пэггилирование является особенно предпочтительным, если легкая цепь содержит протеазу для BoNT/A, B или C₁. Пэггилирование предпочтительно включает присоединение ПЭГ к N-концу компонента легкой цепи. Так, например, N-конец легкой цепи может быть удлинён за счёт одного или более аминокислотных остатков (например, цистеина), которые могут быть одинаковыми или различными. Один или более из указанных аминокислотных остатков может иметь свою собственную молекулу ПЭГ, присоединённую (например, ковалентно присоединённую) к этому остатку. Пример такой технологии описан в заявке WO2007/104567, которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, нейротоксин клостридий согласно изобретению или нейротоксин клостридий, используемый в настоящем изобретении, может не содержать комплексообразующих белков, которые присутствуют в природном комплексе нейротоксина клостридий.

Нейротоксин клостридий согласно изобретению или нейротоксин клостридий, используемый в настоящем изобретении, может быть получен посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, или нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность, которая по меньшей мере на 65 или 70% идентична этой последовательности.

В соответствии с этим нейротоксин клостридий согласно изобретению или нейротоксин клостридий, используемый в настоящем изобретении, может быть получен посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, или нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность, которая по меньшей мере на 75 или 80% идентична этой последовательности.

В соответствии с этим нейротоксин клостридий согласно изобретению или нейротоксин клостридий, используемый в настоящем изобретении, может быть получен посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, или нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность, которая по меньшей мере на 85 или 90% идентична этой последовательности.

В соответствии с этим нейротоксин клостридий согласно изобретению или нейротоксин клостридий, используемый в настоящем изобретении, может быть получен посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, или нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность, которая по меньшей мере на 95 или 99% идентична этой последовательности.

В одном из вариантов осуществления изобретения, нейротоксин клостридий согласно изобретению или нейротоксин клостридий, используемый в настоящем изобретении, может содержать полипептидную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, или полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 65 или 70% идентична этой последовательности.

В соответствии с этим нейротоксин клостридий согласно изобретению или нейротоксин клостридий, используемый в настоящем изобретении, может содержать полипептидную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, или полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 75 или 80% идентична этой последовательности.

В соответствии с этим нейротоксин клостридий согласно изобретению или нейротоксин клостридий, используемый в настоящем изобретении, может содержать полипептидную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, или полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85 или 90% идентична этой последовательности.

В соответствии с этим нейротоксин клостридий согласно изобретению или нейротоксин клостридий, используемый в настоящем изобретении, может содержать полипептидную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, или полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 95 или 99% идентична этой последовательности.

В одном из вариантов осуществления изобретения, нейротоксин клостридий согласно изобретению или нейротоксин клостридий, используемый в настоящем изобретении, может быть получен посред-

В соответствии с этим нейротоксин кластридий согласно изобретению или нейротоксин кластридий, используемый в настоящем изобретении, может представлять собой катионный нейротоксин кластридий, содержащий полипептидную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, или нуклеиновую кислоту, которая по меньшей мере на 75 или 80% идентична этой последовательности.

В соответствии с этим нейротоксин кластридий согласно изобретению или нейротоксин кластридий, используемый в настоящем изобретении, может представлять собой катионный нейротоксин кластридий, содержащий полипептидную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, или нуклеиновую кислоту, которая по меньшей мере на 85 или 90% идентична этой последовательности.

В соответствии с этим нейротоксин кластридий согласно изобретению или нейротоксин кластридий, используемый в настоящем изобретении, может представлять собой катионный нейротоксин кластридий, содержащий полипептидную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, или нуклеиновую кислоту, которая по меньшей мере на 95 или 99% идентична этой последовательности.

"Процент идентичности последовательностей" между двумя или более последовательностями нуклеиновой кислоты или аминокислотными последовательностями зависит от числа идентичных положений для этих последовательностей. Таким образом, % идентичности может быть вычислен как число идентичных нуклеотидов/аминокислот, деленное на общее число нуклеотидов/аминокислот и умноженное на 100. Вычисление % идентичности последовательностей может быть также осуществлено с учетом числа пробелов и длины каждого пробела, который должен быть введен для оптимизации выравнивания двух или более последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя или более последовательностями может быть осуществлено с использованием определенных математических алгоритмов, таких как BLAST, которые известны специалистам в данной области.

Термин "композиция, содержащая нейротоксин кластридий" относится к любой такой композиции на любой стадии ее получения.

В одном варианте осуществления изобретения, композиция, содержащая нейротоксин кластридий, может иметь значение рН, которое по меньшей мере приблизительно равно 7,3. В соответствии с этим композиция, содержащая нейротоксин кластридий, может иметь значение рН, которое по меньшей мере приблизительно равно 7,4 или 7,5.

В соответствии с этим композиция, содержащая нейротоксин кластридий, может иметь значение рН, которое по меньшей мере приблизительно равно 7,6 или по меньшей мере приблизительно равно 7,7.

В соответствии с этим композиция, содержащая нейротоксин кластридий, может иметь значение рН, которое по меньшей мере приблизительно равно 7,8 или по меньшей мере приблизительно равно 7,9.

В соответствии с этим композиция, содержащая нейротоксин кластридий, может иметь значение рН, которое по меньшей мере приблизительно равно 8,0.

В другом варианте осуществления изобретения композиция, содержащая нейротоксин кластридий, может иметь значение рН приблизительно от 7,3 до 9,5. В соответствии с этим композиция, содержащая нейротоксин кластридий, может иметь значение рН приблизительно от 7,5 до 9,0 или приблизительно от 7,5 до 8,5.

В соответствии с этим композиция, содержащая нейротоксин кластридий, может иметь значение рН, которое приблизительно равно 7,5.

В соответствии с этим композиция, содержащая нейротоксин кластридий, может иметь значение рН, которое приблизительно равно 8,0.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, содержащая нейротоксина кластридий, может иметь значение рН, которое равно -1 или выше, чем вычисленная изоэлектрическая точка нейротоксина кластридий, содержащихся в этой композиции.

В соответствии с этим композиция, содержащая нейротоксин кластридий, может иметь значение рН, которое составляет -0,5 или выше, чем вычисленная изоэлектрическая точка нейротоксина кластридий, содержащегося в этой композиции.

В соответствии с этим композиция, содержащая нейротоксин кластридий, может иметь значение рН, которое по меньшей мере соответствует вычисленной изоэлектрической точке нейротоксина кластридий, содержащегося в этой композиции.

В соответствии с этим композиция, содержащая нейротоксин кластридий может иметь значение рН, которое составляет по меньшей мере приблизительно 0,2 единицы рI или по меньшей мере приблизительно на 0,5 единиц рН выше вычисленной изоэлектрической точки нейротоксина кластридий, содержащегося в этой композиции.

В одном варианте осуществления изобретения, композиция, содержащая нейротоксин клостридий, может иметь значение рН, которое составляет в пределах приблизительно от величины, которая на -1 единицу рН ниже вычисленной изоэлектрической точки нейротоксина клостридий, содержащегося в этой композиции, и до величины, которая приблизительно на 2 единицы рН выше вычисленной изоэлектрической точки.

В соответствии с этим композиция, содержащая нейротоксин клостридий, может иметь значение рН, которое составляет в пределах от величины приблизительно на -0,5 единиц рН ниже вычисленной изоэлектрической точки нейротоксина клостридий, содержащегося в этой композиции, и до величины приблизительно на 1,5 единиц рН выше вычисленной изоэлектрической точки.

В соответствии с этим композиция, содержащая нейротоксин клостридий, может иметь значение рН, которое составляет в пределах от величины, приблизительно соответствующей вычисленной изоэлектрической точке нейротоксина клостридий, содержащегося в этой композиции, и до величины, приблизительно на 2 единицы рН выше вычисленной изоэлектрической точки.

В соответствии с этим композиция, содержащая нейротоксин клостридий, может иметь значение рН, которое составляет в пределах от величины приблизительно на 0,2 единицы рН выше вычисленной изоэлектрической точки нейротоксина клостридий, содержащегося в этой композиции, и до величины приблизительно на 1,5 единиц рН выше вычисленной изоэлектрической точки.

Предпочтительно композиция, содержащая нейротоксин клостридий, может иметь значение рН, которое составляет в пределах от величины приблизительно на 0,5 единицы рН выше вычисленной изоэлектрической точки нейротоксина клостридий, содержащегося в этой композиции, и до величины приблизительно на 1,5 единиц рН выше вычисленной изоэлектрической точки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения "композиция, содержащая нейротоксин клостридий" может представлять собой бесклеточный экстракт и/или клеточный лизат. Термин "бесклеточный экстракт" означает, что экстракт содержит менее чем приблизительно 5% клеток, более предпочтительно менее чем приблизительно 1 или 0,1% клеток по общему объему экстракта.

Бесклеточный экстракт и/или клеточный лизат могут быть получены из клетки-хозяина, экспрессирующей нуклеотидную последовательность, кодирующую нейротоксин клостридий, например, одну или более описанных здесь нуклеотидных последовательностей. В одном из вариантов осуществления изобретения, клеткой-хозяином может быть клетка-хозяин *Escherichia coli*.

Клеточный лизат может быть получен после лизиса клеточной пасты. Клеточная паста может быть подвергнута лизису любым методом, известным специалисту. Так, например, клеточный лизис может быть достигнут путем обработки ультразвуком предпочтительно в присутствии по меньшей мере одной нуклеазы (например, коммерчески доступной Бензоназы®, поставляемой Sigma-Aldrich).

После получения клеточного лизата указанный клеточный лизат может быть подвергнут буферному обмену. Это может быть осуществлено с применением любой подходящей методики, известной специалисту в данной области. Так, например, это может быть осуществлено с использованием обессоливающей колонки или диализа посредством соответствующей мембраны и буфера для диализа. Примером подходящей обессоливающей колонки может быть обессоливающая колонка Econo-Pac 10DG (поставляемая Bio-Rad).

В других вариантах осуществления изобретения "композиция, содержащая нейротоксин клостридий" может представлять собой композицию, получаемую (например, полученную) путем проведения одной или более предварительных стадий очистки (т.е. стадии очистки, проводимой до получения композиции). Предварительной стадией очистки может быть любая стадия очистки, известная специалисту, а предпочтительно, стадия очистки, которая, как известно, является подходящей для очистки нейротоксина клостридий. Предварительной стадией очистки может быть одна или более стадий, выбранных из группы, состоящей из хроматографической стадии очистки, стадии очистки на основе преципитации (например, преципитации сульфатом аммония) и стадии очистки путем кристаллизации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ и/или применение согласно изобретению могут включать первую стадию очистки (например, первую хроматографическую стадию) путем контактирования катионообменной смолы с композицией, содержащей нейротоксин клостридий.

В других вариантах осуществления изобретения способ и/или применение могут включать одну или более стадий очистки. Одна или более стадий очистки могут быть проведены до или после контактирования катионообменного остатка с композицией, содержащей нейротоксин клостридий. В соответствии с этим одна или более стадий очистки могут быть проведены после контактирования катионообменного остатка с композицией, содержащей нейротоксин клостридий.

Одна или более стадий очистки могут быть выбраны из группы, состоящей из: хроматографической стадии очистки и стадии очистки на основе преципитации (например, преципитации сульфатом аммония).

Используемый здесь термин "хроматографическая стадия очистки" может означать одну или более стадий, выбранных из группы, состоящей из: гидрофобной хроматографии, ионообменной хроматографии (например, катионообменной или анионообменной хроматографии), хроматографии смешанного типа, гидрофобной хроматографии с индукцией заряда, гель-фильтрации и аффинной хроматографии.

В одном варианте осуществления изобретения хроматографическая стадия очистки может включать проведение хроматографии смешанного типа, предпочтительно, с использованием гидроксипатитной смолы. В соответствии с этим гидроксипатитной смолой может быть гидроксипатитная смола I и/или гидроксипатитная смола II. Такие смолы являются коммерчески доступными (например, поставляются GE Healthcare, UK).

В другом варианте осуществления изобретения хроматографической стадией очистки может быть катионообменная хроматография. Катионообменная хроматография может включать использование сильной катионообменной смолы и/или слабой катионообменной смолы.

В соответствии с этим сильной катионообменной смолой может быть смола, содержащая сульфоновую кислоту.

В соответствии с этим слабой катионообменной смолой может быть смола, содержащая карбоксиметил.

В другом варианте осуществления изобретения хроматографической стадией очистки может быть анионообменная хроматография. Анионообменная хроматография может включать использование сильной анионообменной смолы и/или слабой анионообменной смолы.

Примерами сильных анионообменных смол являются смолы, содержащие четвертичный аммоний, такой как Mustang® Q, Q Ceramic HyperD® F, Acrodisc® с Mustang Q, AcroPrep™ с Mustang Q, AcroSep™ с Q Ceramic HyperD® F, Q и S HyperCel и/или HyperCel STAR AX (все эти смолы являются коммерчески доступными и поставляются от Pall Corporation, 25 Harbor Park Drive, Port Washington, NY 11050, USA).

Примерами слабых анионообменных смол являются смолы, содержащие карбоксиметил, такие как CM Ceramic HyperD® F, AcroSep with CM Ceramic и/или HyperD® F (все эти смолы являются коммерчески доступными и поставляются от Pall Corporation, 25 Harbor Park Drive, Port Washington, NY 11050, USA).

В тех вариантах, где хроматографическая стадия очистки представляет собой стадию гелефильтрации, соответственно, смолой может быть смола Superdex 200 (коммерчески доступная смола, поставляемая GE Healthcare UK).

В тех вариантах, где хроматографическая стадия очистки представляет собой стадию гидрофобного взаимодействия, соответственно, смолой может быть фениловая смола FF, октиловая смола FF и/или бутиловая смола FF (коммерчески доступная смола, поставляемая GE Healthcare UK).

В тех вариантах, где хроматографическая стадия очистки представляет собой стадию аффинной хроматографии, соответственно, смола может быть выбрана из: глутатионовой смолы, стрептавидиновой смолы, биотиновой смолы, смолы, образующей хелатный комплекс с металлом, декстрин-сефарозной смолы и IgG-смолы (коммерчески доступной смолы, поставляемой GE Healthcare UK).

В некоторых вариантах осуществления изобретения хроматографическая стадия очистки может представлять собой стадию аффинной хроматографии с антителом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ или применение могут включать стадию превращения ботулинического токсина из одноцепочечной формы в двухцепочечную форму (стадия активации). Активацию нейротоксина клостридий желателно проводить после контактирования нейротоксина клостридий с катионообменной смолой. Более предпочтительно стадия активации может быть проведена после отделения нейротоксина клостридий от катионообменной смолы.

Нейротоксин клостридий может быть активирован путем контактирования (и, необязательно, инкубирования) нейротоксина клостридий с подходящей протеазой в условиях, при которых подходящая протеаза может расщеплять полипептидную последовательность нейротоксина клостридий.

В одном из вариантов осуществления изобретения подходящей протеазой может быть эндопротеаза, способная расщеплять полипептидную последовательность нейротоксина клостридий с образованием активированной формы.

В одном варианте осуществления изобретения эндопротеазой, используемой в соответствии с настоящим изобретением, может быть Lys-C-протеаза. Подходящая Lys-C-протеаза может представлять собой протеазу, описанную в WO 2014/079495 или WO 2014/080206, которые вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

Lys-C-протеаза может быть получена из любого подходящего источника и поставляется Life Technologies Ltd, UK.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения способ и/или применение согласно изобретению может альтернативно и/или дополнительно включать гидрофобную хроматографию.

Поэтому в своем предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к способу и/или применению согласно изобретению, которые дополнительно включают (или также состоят из нее) активацию нейротоксина клостридий с использованием Lys-C и гидрофобной хроматографии.

Предпочтительно гидрофобная хроматография может включать использование одной или более смол, выбранных из группы, состоящей из бутилсефарозной смолы, фенилсефарозной смолы и октилсефарозной смолы.

Настоящее изобретение включает контактирование катионообменной смолы с композицией, содержащей нейротоксин клостридий.

Термин "контактирование", если он относится к стадии контактирования катионообменной смолы с композицией, содержащей нейротоксин клостридий, охватывает любой известный метод облегчения связывания катионообменной смолы с нейротоксином клостридий. Так, например, стадия контактирования может быть осуществлена путем инкубирования катионообменной смолы с композицией, содержащей нейротоксин клостридий, в подходящих условиях в течение подходящего периода времени. Подходящие условия инкубирования могут включать перемешивание или соответствующую температуру, выбранную для повышения стабильности белка и/или сохранения его активности.

В одном варианте осуществления изобретения стадия контактирования может быть осуществлена путем нанесения композиции, содержащей нейротоксин клостридий, на колонку, содержащую катионообменную смолу. В соответствии с этим контактирование может быть осуществлено автоматизированным или полуавтоматизированным способом, например, с помощью системы, сконструированной для проведения автоматизированной жидкостной хроматографии (например, жидкостной экспресс-хроматографии белков).

В другом варианте осуществления изобретения композиция, содержащая нейротоксин клостридий, может быть смешана с катионообменной смолой. В соответствии с этим указанная смесь может быть инкубирована при соответствующей температуре и/или в течение определенного периода времени для облегчения связывания. В некоторых вариантах осуществления изобретения, смесь может быть перемешана. В других вариантах осуществления изобретения, колонка для очистки может быть приготовлена вместе со смесью и подвергнута жидкостной хроматографии стандартными методами (например, включая промывку и/или элюирование).

В одном варианте осуществления изобретения, "связывание" может соответственно означать взаимодействие или ассоциацию на основе заряда. В соответствии с этим "связывание" может представлять собой взаимодействие, способное поддерживать реакцию катионообменной смолы, связанной с нейротоксином клостридий, в одном или более промывочных буферах. Термин "промывочный буфер" относится к одному или более буферам, полученным специалистом в данной области для блокирования связывания нежелательных примесных белков (соответствующих белков, которые не являются нейротоксинами клостридий) с катионообменной смолой. Обычно, промывочный буфер получают так, чтобы он в достаточно жестких условиях блокировал связывание нежелательных примесных белков (соответствующих белков, которые не являются нейротоксинами клостридий) с катионообменной смолой без какого-либо явного нарушения связывания нейротоксина клостридий с катионообменной смолой.

Буфер, имеющий рН по меньшей мере приблизительно рН 7,3, может быть использован в настоящем изобретении. В соответствии с этим буфер, имеющий рН по меньшей мере приблизительно рН 7,5, может быть использован в настоящем изобретении.

Растворы со скорректированным рН известны специалисту в данной области и могут быть получены с использованием любого подходящего буфера. В одном варианте осуществления изобретения буфер может содержать бис-трис (пропан), бис-трис (метан), Трис, НЕРЕС, цитрат или фосфат. В соответствии с этим буфер может содержать бис-трис (пропан). Специалист в данной области может выбрать любую подходящую молярность буфера. В соответствии с этим молярность может составлять приблизительно 50 мМ.

В одном варианте осуществления изобретения, буфер для использования в настоящем изобретении может иметь значение рН, которое по меньшей мере приблизительно составляет 7,3 (соответственно, по меньшей мере приблизительно рН 7,4 или рН 7,5).

В соответствии с этим буфер для использования в настоящем изобретении может иметь значение рН, которое по меньшей мере приблизительно составляет рН 7,6 или по меньшей мере приблизительно рН 7,7.

В соответствии с этим буфер для использования в настоящем изобретении может иметь значение рН, которое по меньшей мере приблизительно составляет рН 7,8 или по меньшей мере приблизительно рН 7,9.

В соответствии с этим буфер для использования в настоящем изобретении может иметь значение рН, которое по меньшей мере приблизительно составляет рН 8,0.

В другом варианте осуществления изобретения буфер для использования в настоящем изобретении может иметь рН приблизительно от 7,3 до приблизительно 9,5. В соответствии с этим буфер для использования в настоящем изобретении может иметь рН приблизительно от 7,5 до приблизительно 9,0 или приблизительно от 7,5 до приблизительно 8,5.

В соответствии с этим буфер для использования в настоящем изобретении может иметь значение рН приблизительно 7,5.

В соответствии с этим буфер для использования в настоящем изобретении может иметь значение рН приблизительно 8,0.

Применение согласно изобретению включает использование буфера, имеющего значение рН, которое составляет -1 или выше вычисленной изоэлектрической точки нейротоксина клостридий (например,

нейротоксина клостридий, к которому относится указанное применение).

Значение рН может означать величину рН, измеренную при контактировании катионообменной смолы с композицией, содержащей нейротоксин клостридий, например, значение рН раствора, содержащего смесь катионообменника и композиции, содержащей нейротоксин клостридий.

Настоящее изобретение может включать использование буфера, имеющего значение рН, которое составляет -1 или выше вычисленной рI нейротоксина клостридий.

Растворы со скорректированным рН известны специалисту в данной области и могут быть получены с использованием любого подходящего буфера. В одном варианте осуществления изобретения, буфер может содержать: бис-трис (пропан), бис-трис (метан), Трис, HEPES, цитрат или фосфат. В соответствии с этим буфер может содержать бис-трис (пропан). Специалист в данной области может выбрать любую подходящую молярность буфера. В соответствии с этим молярность может составлять приблизительно 50 мМ.

В соответствии с этим значение рН, используемое в настоящем изобретении, может означать значение рН, которое составляет -0,5 или выше вычисленной изоэлектрической точки нейротоксина клостридий.

В одном из вариантов осуществления изобретения, значение рН, используемое в настоящем изобретении, может по меньшей мере соответствовать вычисленной изоэлектрической точке нейротоксина клостридий.

В соответствии с этим значение рН может составлять по меньшей мере приблизительно 0,2 единицы рI или по меньшей мере приблизительно на 0,5 единиц рН выше, чем вычисленная изоэлектрическая точка нейротоксина клостридий.

В одном варианте осуществления изобретения, величина рН, может составлять в пределах от величины приблизительно на -1 единицу рН ниже вычисленной изоэлектрической точки нейротоксина клостридий и до величины приблизительно на 2 единицы рН выше вычисленной изоэлектрической точки.

В соответствии с этим величина рН может составлять в пределах от величины приблизительно на -0,5 единиц рН ниже вычисленной изоэлектрической точки нейротоксина клостридий и до величины приблизительно на 1,5 единиц рН выше вычисленной изоэлектрической точки.

В соответствии с этим величина рН может составлять в пределах от величины, соответствующей вычисленной изоэлектрической точке нейротоксина клостридий, и до величины приблизительно на 2 единицы рН выше вычисленной изоэлектрической точки.

В соответствии с этим величина рН может составлять в пределах от величины приблизительно на 0,2 единицы рН выше вычисленной изоэлектрической точки нейротоксина клостридий и до величины приблизительно на 1,5 единицы рН выше вычисленной изоэлектрической точки.

Предпочтительно, величина рН может составлять в пределах от величины приблизительно на 0,5 единицы рН выше вычисленной изоэлектрической точки нейротоксина клостридий и до величины приблизительно на 1,5 единицы рН выше вычисленной изоэлектрической точки.

В одном варианте осуществления изобретения, буфер для использования в настоящем изобретении, может иметь значение рН по меньшей мере приблизительно рН 5,0, а предпочтительно по меньшей мере приблизительно рН 6,0.

В другом варианте осуществления изобретения буфер для использования в настоящем изобретении может иметь значение рН по меньшей мере приблизительно рН 6,5, по меньшей мере приблизительно рН 7,0 или по меньшей мере приблизительно рН 7,5.

Предпочтительно, буфер для использования в настоящем изобретении может иметь значение рН по меньшей мере приблизительно рН 8,0.

В одном варианте осуществления изобретения, буфер для использования в настоящем изобретении может иметь значение рН приблизительно от рН 5,0 до приблизительно рН 9,5, а предпочтительно приблизительно от рН 6,0 до приблизительно рН 9,5.

В соответствии с этим буфер для использования в настоящем изобретении может иметь значение рН приблизительно от рН 5,0 до приблизительно рН 9,0, а предпочтительно приблизительно от рН 6,0 до приблизительно рН 9,0.

В другом варианте осуществления изобретения буфер для использования в настоящем изобретении может иметь значение рН приблизительно от рН 6,5 до приблизительно рН 8,5, а предпочтительно приблизительно от рН 7,0 до приблизительно рН 8,0.

В одном варианте осуществления изобретения, буфер для использования в настоящем изобретении может иметь значение рН приблизительно рН 6,0, предпочтительно приблизительно рН 6,5 или приблизительно рН 7,0.

В другом варианте осуществления изобретения буфер для использования в настоящем изобретении может иметь значение рН приблизительно рН 7,5.

Предпочтительно, буфер для использования в настоящем изобретении может иметь значение рН приблизительно рН 8,0.

Изоэлектрическая точка (рI) является специфическим свойством данного белка. Как хорошо известно специалистам в данной области техники, белки состоят из определенной последовательности

аминокислот (также называемых аминокислотными остатками, если они входят в состав белка). Аминокислоты, входящие в стандартный набор из двадцати аминокислот, имеют различные боковые цепи (или R-группы), и это означает, что каждый аминокислотный остаток в белке характеризуется конкретными химическими свойствами, такими как заряд и гидрофобность. На эти свойства может влиять окружающая химическая среда, такая как температура и pH. Общие химические характеристики белка зависят от суммы этих различных факторов.

Некоторые аминокислотные остатки (подробно описанные ниже) имеют ионизируемые боковые цепи, которые могут нести соответствующий электрический заряд в зависимости от pH среды. Имеет ли такая боковая цепь заряд или нет при данном pH зависит от pKa соответствующей ионизируемой группы, где pKa представляет собой отрицательный логарифм константы диссоциации кислоты (Ka) для определенного протона из сопряженного основания.

Так, например, кислотные остатки, такие как аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота, имеют группы боковых цепей карбоновой кислоты с величинами pKa приблизительно 4,1 (точные значения pKa могут зависеть от температуры, ионной силы и микроокружения ионизируемой группы). Таким образом, эти боковые цепи имеют отрицательный заряд при pH 7,4 (часто называемым "физиологическим pH"). При низких значениях pH эти боковые цепи становятся протонированными и теряют свой заряд.

С другой стороны, основные остатки, такие как лизин и аргинин, имеют азотсодержащие группы боковой цепи с величинами pKa приблизительно 10-12. Таким образом, эти боковые цепи имеют положительный заряд при pH 7,4. Эти боковые цепи становятся депротонированными и теряют свой заряд при высоких значениях pH.

Следовательно, общий (суммарный) заряд белковой молекулы зависит от количества кислотных и основных остатков, присутствующих в белке (и степени их воздействия на поверхность), а также от pH окружающей среды. Изменение pH окружающей среды приводит к изменению общего заряда на белке. В соответствии с этим для каждого белка существует конкретный pH, при котором число положительных и отрицательных зарядов равно, и такой белок не имеет общего суммарного заряда. Это состояние известно как изоэлектрическая точка (pI). Изоэлектрическая точка представляет собой стандартный параметр, известный специалистам в области биохимии белков.

Таким образом, изоэлектрическая точка (pI) определяется как значение pH, при котором белок имеет суммарный заряд, равный нулю. Увеличение pI означает повышение величины pH, необходимое для того, чтобы белок имел суммарный заряд, равный нулю. Таким образом, увеличение pI означает повышение величины суммарного положительного заряда белка при данном значении pH. И наоборот, уменьшение pI означает снижение величины pH, необходимое для того, чтобы белок имел суммарный заряд, равный нулю. Таким образом, уменьшение pI означает снижение величины суммарного положительного заряда белка при данном значении pH.

Методы определения pI белка являются известными и будут понятны специалистам в данной области. В качестве примера pI белка может быть вычислена исходя из средних значений pKa для каждой аминокислоты, присутствующей в белке ("вычисленная pI"). Такие вычисления могут быть осуществлены с использованием компьютерных программ, известных специалистам; причем предпочтительными примерами компьютерных программ для вычисления величин pI являются Protein Calculator от Scripps Research Institute и Compute pI/MW Tool от ExPASy. Сравнение значений pI для различных молекул должно быть осуществлено с применением того же самого метода/той же самой программы вычисления.

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения, "вычисленная pI" может означать pI, вычисленную с использованием Scripps Protein Calculator v3.4, которая представляет собой пакет программ онлайн, имеющийся на сайте www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc (содержание которого вводится в настоящее описание посредством ссылки).

Там, где это необходимо, вычисленная pI белка может быть подтверждена экспериментально методом изоэлектрического фокусирования ("наблюдаемая pI"). В этом методе используется электрофорез для разделения белков по их pI. Изоэлектрическое фокусирование обычно проводят с использованием геля, который имеет устойчивый градиент pH. При приложении электрического поля, белок мигрирует по градиенту pH до тех пор, пока pH не достигнет суммарного нулевого заряда, и эта точка представляет собой pI белка. Результаты, полученные методом изоэлектрического фокусирования, по своей природе, обычно имеют относительно низкую разрешающую способность, и, таким образом, авторы настоящего изобретения предполагают, что результаты, полученные для вычисленной pI (как описано выше), являются более подходящими для применения.

В настоящем описании "pI" означает "вычисленная pI", если это не оговорено особо.

pI белка может быть увеличена или уменьшена путем изменения числа основных и/или кислотных групп, находящихся на его поверхности. Это может быть достигнуто путем модификации одной или более аминокислот белка. Так, например, увеличение pI может быть осуществлено за счет уменьшения числа кислотных остатков или увеличения числа основных остатков. Такие аминокислотные модификации более подробно обсуждаются ниже.

В качестве примера вычисленная pI BoNT/A (SEQ ID NO: 14) составляет 6,4. Вычисленная pI также представлена для катионных BoNT: Cat-A, Cat-B и Cat-C, которые описаны в WO 2015/004461; а также

для Cat H_N_v1, Cat H_N_v2 и Cat H_N_v3.

Определение рН для использования в настоящем изобретении осуществляют в зависимости от рI очищенного токсина клостридий. Так, например, если целью очистки является катионный rBoNT/A (SEQ ID NO: 2), который имеет вычисленную рI 7,4, то значение рН для использования в настоящем изобретении составляет рН 6,4 или выше. Аналогичным образом, если "Cat-A" (SEQ ID NO: 16) имеет рI 7,3, то значение рН для использования в настоящем изобретении составляет приблизительно рН 6,3 или выше.

Таблица 1
Вычисленные величины рI для ряда нейротоксинов клостридий

Нейротоксин клостридий	Вычисленная рI
Катионный rBoNT/A (SEQ ID No. 2)	7,4
rBoNT/A (эндогенативный BoNT/A) (SEQ ID No. 4)	6,5
Cat H _N _v1 (SEQ ID No. 6)	7,4
Cat H _N _v2 (SEQ ID No. 8)	7,3
Cat H _N _v3 (SEQ ID No. 10)	7,1
Сконструированный «Cat-A» [Cat5v2 (K1064H/N886K)] (SEQ ID No. 16)	7,3
Сконструированный «Cat-B» [Cat5v2 (K1064/N954K)] (SEQ ID No. 18)	7,3
Сконструированный «Cat-C» [Cat5v2 (K1064H/N1025K)] (SEQ ID No. 20)	7,3

20 стандартных аминокислот, присутствующих в белках, представлены в табл. 2.

Таблица 2

Аминокислоты

Аминокислота			Боковая цепь
Аспарагиновая кислота	Asp	D	Заряженная (кислая)
Глутаминовая кислота	Glu	E	Заряженная (кислая)
Аргинин	Arg	R	Заряженная (основная)
Лизин	Lys	K	Заряженная (основная)
Гистидин	His	H	Незаряженная (полярная)
Аспарагин	Asn	N	Незаряженная (полярная)
Глютамин	Gln	Q	Незаряженная (полярная)
Серин	Ser	S	Незаряженная (полярная)
Треонин	Thr	T	Незаряженная (полярная)
Тирозин	Tyr	Y	Незаряженная (полярная)
Метионин	Met	M	Незаряженная (полярная)
Триптофан	Trp	W	Незаряженная (полярная)
Цистеин	Cys	C	Незаряженная (полярная)
Аланин	Ala	A	Незаряженная (гидрофобная)
Глицин	Gly	G	Незаряженная (гидрофобная)
Валин	Val	V	Незаряженная (гидрофобная)
Лейцин	Leu	L	Незаряженная (гидрофобная)
Изолейцин	Ile	I	Незаряженная (гидрофобная)
Пролин	Pro	P	Незаряженная (гидрофобная)
Фенилаланин	Phe	F	Незаряженная (гидрофобная)

Заряженными аминокислотами считаются следующие аминокислоты: аспарагиновая кислота (отрицательная), глутаминовая кислота (отрицательная), аргинин (положительный) и лизин (положительный).

При рН 7,4, боковые цепи аспарагиновой кислоты (рКа 3,1) и глутаминовой кислоты (рКа 4,1) имеют отрицательный заряд, а боковые цепи аргинина (рКа 12,5) и лизина (рКа 10,8) имеют положительный заряд. Аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота считаются кислотными аминокислотными остатками. Аргинин и лизин считаются основными аминокислотными остатками.

Незаряженными полярными аминокислотами (это означает, что они могут участвовать в образовании водородной связи) считаются следующие аминокислоты: аспарагин, глутамин, гистидин, серин, треонин, тирозин, цистеин, метионин и триптофан.

Незаряженными гидрофобными аминокислотами считаются следующие аминокислоты: аланин, валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, пролин и глицин.

Способ и/или применение согласно изобретению предпочтительно направлены на увеличение связывания и/или выхода нейротоксина клостридий. В соответствии с этим "повышение связывания и/или выхода" может быть определено путем сравнения связывания и/или выхода, полученного способом и/или с применением согласно изобретению, со связыванием и/или выходом, полученными таким же способом и/или при таком же применении, но при других значениях pH.

Термин "связывание", используемый в контексте описания настоящего изобретения, относится к связыванию нейротоксина клостридий с катионообменной смолой. Концентрация связанного нейротоксина клостридий может быть определена путем сравнения концентрации нейротоксина клостридий в исходной композиции, до контактирования с катионообменной смолой, и концентрации (если таковая имеется) нейротоксина клостридий, оставшихся в растворе, который был подвергнут контактированию с катионообменной смолой. В некоторых вариантах осуществления изобретения, концентрацию нейротоксина клостридий в исходной композиции можно сравнить с концентрацией нейротоксина клостридий в проточной фракции, которая соответствует белкам в композиции, не связанной с катионообменной смолой.

Способы и/или применения согласно изобретению могут быть осуществлены путем связывания по меньшей мере приблизительно 50% от общего количества нейротоксина клостридий, содержащегося в композиции. В соответствии с этим способ и/или применение могут быть осуществлены путем связывания по меньшей мере приблизительно 60 или 70% от общего количества нейротоксина клостридий, содержащегося в композиции.

В соответствии с этим способ и/или применение могут быть осуществлены путем связывания по меньшей мере приблизительно 80 или 90% от общего количества нейротоксина клостридий, содержащегося в композиции. Предпочтительно связывание составляет по меньшей мере приблизительно 95, 97 или 99%.

Используемый здесь термин "выход" означает количество (например, концентрацию) нейротоксина клостридий, полученного после осуществления способа и/или применения согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения, "выход" может быть вычислен путем сравнения количества (например, концентрации) нейротоксина клостридий в исходной композиции с количеством (например, концентрацией) нейротоксина клостридий, присутствующего во фракции, элюируемой из катионообменной смолы.

Способ и/или применение согласно изобретению могут также включать отделение нейротоксина клостридий от катионообменной смолы. Такое разделение может называться здесь "элюированием". Разделение может быть достигнуто с использованием соответствующего элюирующего буфера. Обычно для ионообменной хроматографии (например, катионообменной хроматографии), буфер приготавливают так, чтобы он содержал подходящую концентрацию соответствующей соли, которая вытесняет связанный белок из ионообменной смолы (например, катионообменной смолы).

В некоторых вариантах осуществления изобретения нейротоксин клостридий, связанный с катионообменной смолой, может быть обработан элюирующим буфером. В соответствии с этим любой раствор может быть затем отделен от катионообменной смолы. Так, например, при использовании колонки могут быть собраны одна или более фракций.

Поэтому в одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к нейротоксину клостридий, содержащемуся в буфере для элюирования.

В другом своем варианте настоящее изобретение относится к промежуточному продукту очистки, содержащемуся в буфере для элюирования.

В еще одном своем варианте настоящее изобретение относится к нейротоксину клостридий, получаемому способом и/или с применением согласно изобретению, и содержащемуся в буфере для элюирования.

В одном варианте осуществления изобретения концентрация градиента элюирующего буфера может быть нанесена на катионообменную смолу, связанную с нейротоксином клостридий. Градиент может быть получен путем смешивания элюирующего буфера, имеющего нужную концентрацию соли (например, концентрацию соли, превышающую концентрацию, при которой нейротоксин клостридий элюируется из катионообменной смолы), с одним или более дополнительными буферами, имеющими другую (например, более низкую) концентрацию соли.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нейротоксин клостридий, отделенный от катионообменной смолы, может быть по существу чистым.

Используемый здесь термин "чистый" относится к состоянию, при котором нейротоксин клостридий не содержит примесей, не относящихся к нейротоксину клостридий (например, примесных белков).

Используемый здесь термин "по существу чистый", означает, что в данной композиции, нейротоксин кластридий, в основном, не содержит примесей, не относящихся к нейротоксину кластридий (например, примесных белков) и составляет по меньшей мере приблизительно 85, 90 или 95% от общей концентрации белка. В соответствии с этим нейротоксин кластридий может составлять по меньшей мере приблизительно 97, 99 или 99,9% от общей концентрации белка.

Таким образом, настоящее изобретение относится к нейротоксину кластридий, получаемому (например, полученному) способом или с применением согласно изобретению. В соответствии с этим нейротоксином кластридий может быть по существу чистым нейротоксином кластридий.

В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к промежуточному продукту очистки, содержащему нейротоксин кластридий, связанный с катионообменной смолой, где промежуточный продукт очистки имеет значение pH по меньшей мере pH 7,3.

В другом своем варианте настоящее изобретение относится к промежуточному продукту очистки, содержащему нейротоксин кластридий, который был отделен от катионообменной смолы, где промежуточный продукт очистки имеет значение pH по меньшей мере pH 7,3.

В одном из вариантов осуществления изобретения промежуточный продукт очистки может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере приблизительно pH 7,3 (предпочтительно по меньшей мере pH 7,4 или pH 7,5).

В соответствии с этим промежуточный продукт очистки может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере приблизительно pH 7,6 или по меньшей мере приблизительно pH 7,7.

В соответствии с этим промежуточный продукт очистки может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере приблизительно pH 7,8 или по меньшей мере приблизительно pH 7,9.

В соответствии с этим промежуточный продукт очистки может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере приблизительно pH 8,0.

В другом варианте осуществления изобретения промежуточный продукт очистки может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере приблизительно от 7,5 до приблизительно pH 9,5. В соответствии с этим промежуточный продукт очистки может иметь значение pH, которое составляет приблизительно от pH 7,5 до pH 9,0, или приблизительно от pH 7,5 до pH 8,5.

В соответствии с этим промежуточный продукт очистки может иметь значение pH приблизительно pH 7,5.

В соответствии с этим промежуточный продукт очистки может иметь значение pH приблизительно pH 8,0.

Используемый здесь термин "промежуточный продукт очистки", относится к нейротоксину кластридий, который был подвергнут или находится в процессе по меньшей мере одной стадии очистки, но который не был подвергнут всем стадиям очистки, проводимым квалифицированным специалистом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, промежуточный продукт очистки может быть по существу чистым.

В одном из вариантов осуществления изобретения, нейротоксин кластридий может быть получен (например, уже получен) из промежуточного продукта очистки согласно изобретению. В соответствии с этим нейротоксин кластридий может быть по существу чистым.

Промежуточный продукт очистки и/или нейротоксин кластридий согласно изобретению может отличаться от промежуточного продукта очистки и/или нейротоксина кластридий, полученных альтернативным способом, по меньшей мере по величине pH буфера, в котором присутствует указанный промежуточный продукт очистки и/или нейротоксин кластридий.

Другими словами, буфер, в котором промежуточный продукт очистки и/или нейротоксин кластридий согласно изобретению могут иметь значение pH по меньшей мере приблизительно pH 7,3. В соответствии с этим буфер может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере pH 7,3, а также содержать соль в концентрации, соответствующей концентрации катионообменного элюирующего буфера.

Элюирующий буфер может содержать один или более из NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂ и (NH₄)₂SO₄.

В одном из вариантов осуществления изобретения такой буфер может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере приблизительно pH 7,3 и может содержать по меньшей мере приблизительно 50 mM NaCl, или по меньшей мере приблизительно 100 mM NaCl.

В другом варианте изобретения такой буфер может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере приблизительно pH 7,3 и может содержать по меньшей мере приблизительно 200 mM NaCl или по меньшей мере приблизительно 300 mM NaCl (соответственно по меньшей мере приблизительно 400 mM NaCl или по меньшей мере приблизительно 500 mM NaCl).

В одном из вариантов осуществления изобретения такой буфер может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере приблизительно pH 7,3 и может содержать по меньшей мере приблизительно 50 mM KCl или по меньшей мере приблизительно 100 mM KCl.

В другом варианте осуществления изобретения такой буфер может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере приблизительно pH 7,3 и может содержать по меньшей мере приблизительно 200 mM KCl или по меньшей мере приблизительно 300 mM KCl (соответственно по меньшей мере приблизительно 400 mM KCl или по меньшей мере приблизительно 500 mM KCl).

В одном из вариантов осуществления изобретения, такой буфер может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере приблизительно pH 7,3 и может содержать по меньшей мере приблизительно 50 mM CaCl₂ или по меньшей мере приблизительно 100 mM CaCl₂.

В другом варианте осуществления изобретения такой буфер может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере приблизительно pH 7,3 и может содержать по меньшей мере приблизительно 200 mM CaCl₂ или по меньшей мере приблизительно 300 mM CaCl₂ (соответственно по меньшей мере приблизительно 400 mM CaCl₂ или по меньшей мере приблизительно 500 mM CaCl₂).

В одном из вариантов осуществления изобретения такой буфер может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере приблизительно pH 7,3 и может содержать по меньшей мере приблизительно 50 mM MgCl₂ или по меньшей мере приблизительно 100 mM MgCl₂.

В другом варианте осуществления изобретения такой буфер может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере приблизительно pH 7,3 и может содержать по меньшей мере приблизительно 200 mM MgCl₂ или по меньшей мере приблизительно 300 mM MgCl₂ (соответственно по меньшей мере приблизительно 400 mM MgCl₂ или по меньшей мере приблизительно 500 mM MgCl₂).

В одном из вариантов осуществления изобретения такой буфер может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере приблизительно pH 7,3 и может содержать по меньшей мере приблизительно 50 mM (NH₄)₂SO₄ или по меньшей мере приблизительно 100 mM (NH₄)₂SO₄.

В другом варианте осуществления изобретения такой буфер может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере приблизительно pH 7,3 и может содержать по меньшей мере приблизительно 200 mM (NH₄)₂SO₄ или по меньшей мере приблизительно 300 mM (NH₄)₂SO₄ (предпочтительно по меньшей мере приблизительно 400 mM (NH₄)₂SO₄ или по меньшей мере приблизительно 500 mM (NH₄)₂SO₄).

Буфер для использования в настоящем изобретении предпочтительно может также содержать 50 mM бис-трис-пропана, pH 8,0.

При элюировании из катионообменного остатка в соответствии с настоящим изобретением, буфер, содержащий 50 mM бис-трис-пропана при pH 8,0, может быть использован в комбинации с градиентом элюирования приблизительно от 0 до 500 mM соли. В соответствии с этим соль может быть выбрана из группы, состоящей из: NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂ и (NH₄)₂SO₄ (предпочтительно NaCl).

Буфер, имеющий значение pH, которое составляет -1 единицу pH или превышает вычисленную pI нейротоксина клостридий для использования в настоящем изобретении, может представлять собой элюирующий буфер. Элюирующий буфер может содержать один или более из: NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂ и (NH₄)₂SO₄.

В одном из вариантов осуществления изобретения, такой буфер может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере -1 единицу pH или превышает вычисленную pI нейротоксина клостридий, и может содержать по меньшей мере приблизительно 50 mM NaCl или по меньшей мере приблизительно 100 mM NaCl.

В другом варианте осуществления изобретения такой буфер может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере -1 единицу pH или превышает вычисленную pI нейротоксина клостридий, и может содержать по меньшей мере приблизительно 200 mM NaCl или по меньшей мере приблизительно 300 mM NaCl (соответственно по меньшей мере приблизительно 400 mM NaCl или по меньшей мере приблизительно 500 mM NaCl).

В одном из вариантов осуществления изобретения, такой буфер может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере -1 единицу pH или превышает вычисленную pI нейротоксина клостридий, и может содержать по меньшей мере приблизительно 50 mM KCl или по меньшей мере приблизительно 100 mM KCl.

В другом варианте осуществления изобретения такой буфер может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере -1 единицу pH или превышает вычисленную pI нейротоксина клостридий, и может содержать по меньшей мере приблизительно 200 mM KCl или по меньшей мере приблизительно 300 mM KCl (соответственно по меньшей мере приблизительно 400 mM KCl или по меньшей мере приблизительно 500 mM KCl).

В одном из вариантов осуществления изобретения такой буфер может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере -1 единицу pH или превышает вычисленную pI нейротоксина клостридий, и может содержать по меньшей мере приблизительно 50 mM CaCl₂ или по меньшей мере приблизительно 100 mM CaCl₂.

В другом варианте осуществления изобретения такой буфер может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере -1 единицу pH или превышает вычисленную pI нейротоксина клостридий, и может содержать по меньшей мере приблизительно 200 mM CaCl₂ или по меньшей мере приблизительно 300 mM CaCl₂ (соответственно по меньшей мере приблизительно 400 mM CaCl₂ или по меньшей мере приблизительно 500 mM CaCl₂).

В одном из вариантов осуществления изобретения такой буфер может иметь значение pH, которое составляет по меньшей мере -1 единицу pH или превышает вычисленную pI нейротоксина клостридий, и может содержать по меньшей мере приблизительно 50 mM MgCl₂ или по меньшей мере приблизительно 100 mM MgCl₂.

В другом варианте осуществления изобретения такой буфер может иметь значение рН, которое составляет по меньшей мере -1 единицу рН или превышает вычисленную рI нейротоксина клостридий, и может содержать по меньшей мере приблизительно 200 мМ MgCl₂ или по меньшей мере приблизительно 300 мМ MgCl₂ (соответственно по меньшей мере приблизительно 400 мМ MgCl₂ или по меньшей мере приблизительно 500 мМ MgCl₂).

В одном из вариантов осуществления изобретения, такой буфер может иметь значение рН, которое составляет по меньшей мере -1 единицу рН или превышает вычисленную рI нейротоксина клостридий, и может содержать по меньшей мере приблизительно 50 мМ (NH₄)₂SO₄ или по меньшей мере приблизительно 100 мМ (NH₄)₂SO₄.

В другом варианте осуществления изобретения такой буфер может иметь значение рН, которое составляет по меньшей мере -1 единицу рН или превышает вычисленную рI нейротоксина клостридий, и может содержать по меньшей мере приблизительно 200 мМ (NH₄)₂SO₄ или по меньшей мере приблизительно 300 мМ (NH₄)₂SO₄ (соответственно по меньшей мере приблизительно 400 мМ (NH₄)₂SO₄ или по меньшей мере приблизительно 500 мМ (NH₄)₂SO₄).

Буфер для использования в настоящем изобретении может также предпочтительно содержать 50 мМ бис-трис-пропана, рН 8,0.

При элюировании из катионообменного остатка в соответствии с настоящим изобретением, буфер, содержащий 50 мМ бис-трис-пропана, рН 8,0, может быть использован в комбинации с градиентом элюирования приблизительно от 0 до приблизительно 500 мМ соли. В соответствии с этим соль может быть выбрана из группы, состоящей из NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂ и (NH₄)₂SO₄ (предпочтительно NaCl).

Гомология последовательностей

Для определения процента идентичности может быть применен любой из ряда методов выравнивания последовательностей, включая, но не ограничиваясь ими, общие методы, локальные методы и гибридные методы, такие как, например, методы на основе сегментов. Протоколы определения процента идентичности представляют собой рутинные процедуры в пределах компетенции специалиста в данной области. Общие методы позволяют выравнивать последовательности по всей молекуле и определять наилучшее соответствие путем сложения баллов отдельных пар остатков и наложения штрафов на пробелы. Неограничивающие методы включают, например, CLUSTAL W, см., например, Julie D. Thompson et al., CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22(22), Nucleic Acids Research, 4673-4680 (1994); и итеративные уточнения, см., например, Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4), J. Mol. Biol. 823-838 (1996). Локальные методы позволяют выравнивать последовательности путем идентификации одного или более консервативных мотивов, которые являются общими для всех исходных последовательностей. Неограничивающие методы включают, например, алгоритм Match-box, см., например, Eric Depiereux and Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5), CABIOS 501-509 (1992); метод выборки по Гиббсу, см., например,

C.E. Lawrence et al., Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262(5131) Science 208-214 (1993); Align-M, см., например, Ivo Van Walle et al., Align-M-A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9) Bioinformatics:1428-1435 (2004).

Таким образом, процент идентичности последовательностей определяют стандартными методами. См., например, Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48:603-16, 1986 и Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19, 1992. Вкратце, две аминокислотные последовательности выравнивают для оптимизации оценки сопоставления с использованием "штрафа на пробел-пропуск" = 10, "штрафа на пробел-удлинение" = 1 и оценочной матрицы "blosum 62" Henikoff & Henikoff (ibid.), как показано ниже (аминокислоты указаны стандартными однобуквенными кодами).

Оценки выравнивания для определения идентичности последовательностей.

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

A 4

R -1 5

N -2 0 6

D -2 -2 1 6

C 0 -3 -3 -3 9

Q -1 1 0 0 -3 5

E -1 0 0 2 -4 2 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Затем вычисляют процент идентичности по формуле

Общее число идентичных совпадений

— × 100

[Длина более длинной последовательности+число пробелов,
введенных в более длинную последовательность для
выравнивания
двух последовательностей]

По существу гомологичные полипептиды характеризуются как полипептиды, имеющие одну или более аминокислотных замен, делеций или добавлений. Эти модификации, предпочтительно, являются незначительными, т.е. представляют собой консервативные аминокислотные замены (см. ниже) и другие замены, которые не оказывают существенного влияния на укладку или активность полипептида; небольшие делеции, обычно от одной до приблизительно 30 аминокислот; и небольшие амино- или карбокси-концевые удлинения, такие как амино-концевой метиониновый остаток, небольшой линкерный пептид, имеющий приблизительно до 20-25 остатков, или аффинная метка.

Консервативные аминокислотные замены.

Основные :	аргинин
	лизин
	гистидин
Кислотные :	глутаминовая кислота
	аспарагиновая кислота
Полярные :	глутамин
	аспарагин
Гидрофобные :	лейцин
	изолейцин
	валин
Ароматические :	фенилаланин
	триптофан
	тирозин
Небольшие :	глицин
	аланин
	серин
	треонин
	метионин

Помимо 20 стандартных аминокислот, аминокислотные остатки полипептидов согласно изобретению могут быть заменены нестандартными аминокислотами (такими как 4-гидроксипролин, 6-N-метиллизин, 2-аминоизомаляновая кислота, изовалин и альфа-метилсерин). Аминокислотные остатки полипептида клостридий могут быть заменены ограниченным числом неконсервативных аминокислот; аминокислот, которые не кодируются генетическим кодом; и не природных аминокислот. Полипептиды согласно изобретению могут также содержать не природных аминокислотные остатки.

Не природными аминокислотами являются, но не ограничиваются ими, транс-3-метилпролин, 2,4-метанпролин, цис-4-гидроксипролин, транс-4-гидроксипролин, N-метилглицин, аллотреонин, метилтреонин, гидроксизетилцистеин, гидроксизетилгомоцистеин, нитроглютамин, гомоглютамин, пипеколиновая кислота, трет-лейцин, норвалин, 2-азафенилаланин, 3-азафенилаланин, 4-азафенилаланин и 4-фторфенилаланин. Известно несколько способов включения не природных аминокислотных остатков в белки. Так, например, может быть использована система *in vitro*, где нонсенс-мутации подавляются с использованием химически аминоацелированных супрессоров тРНК. Способы синтеза аминокислот и аминоацелирования тРНК известны специалистам в данной области. Транскрипцию и трансляцию плазмид, содержащих нонсенс-мутации, осуществляют в бесклеточной системе, содержащей экстракт *E. Coli* S30, коммерчески доступные ферменты и другие реагенты. Белки очищают с помощью хроматографии. См., например, Robertson et al., *J. Am. Chem. Soc.* 113:2722, 1991; Ellman et al., *Methods Enzymol.* 202:301, 1991; Chung et al., *Science* 259:806-9, 1993; и Chung et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10145-9, 1993). Во втором способе, трансляцию осуществляют в ооцитах *Xenopus* путем микроинъекции мутированной мРНК и химически аминоацелированных супрессоров тРНК (Turcatti et al., *J. Biol. Chem.* 271:19991-8, 1996). В третьем способе, клетки *E. coli* культивируют в отсутствие природной аминокислоты, которая должна быть заменена (например, фенилаланина), и в присутствии нужной(ых) не природной(ых) аминокислоты (аминокислот) (например, 2-азафенилаланина, 3-азафенилаланина, 4-азафенилаланина или 4-фторфенилаланина). Не природную аминокислоту вводят в полипептид вместо его природного аналога. См., Koide et al., *Biochem.* 33:7470-6, 1994. Природные аминокислотные остатки могут быть превращены в не природных молекулы путем химической модификации *in vitro*. Химическая модификация может быть объединена с сайт-направленным мутагенезом для дополнительного расширения пределов замен (Wynn and Richards, *Protein Sci.* 2:395-403, 1993).

Аминокислотные остатки полипептидов согласно изобретению могут быть заменены ограниченным числом неконсервативных аминокислот; аминокислот, которые не кодируются генетическим кодом; не встречающихся в природе аминокислот и не природных аминокислот.

Незаменимые аминокислоты в полипептидах согласно изобретению могут быть идентифицированы в соответствии с процедурами, известными специалистам в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез или аланин-сканирующий мутагенез (Cunningham & Wells, *Science*, 244:1081-5, 1989). Сайты биологического взаимодействия могут быть также определены с помощью физического анализа структуры, например, такими методами, как ядерный магнитный резонанс, кристаллография, дифракция электронов или фотоаффинное мечение, в комбинации с мутацией предполагаемого сайта контактирования аминокислот. См., например, de Vos et al., *Science* 255:306-12, 1992; Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224:899-904, 1992; Wlodaver et al., *FEBS Lett.* 309:59-64, 1992. Идентичность незаменимых аминокислот может быть также определена в анализе на гомологию с родственными компонентами (например, с компонентами транслокации или протеазными компонентами) полипептидов согласно изобретению.

Множественные аминокислотные замены могут быть введены и протестированы известными методами мутагенеза и скрининга, такими как методы, описанные Reidhaar-Olson and Sauer (*Science* 241:53-7, 1988) или Bowie and Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2152-6, 1989). Вкратце, авторы этих публикаций описывают методы одновременной рандомизации двух или более положений в полипептиде, отбора на функциональный полипептид, а затем секвенирования мутагенезированных полипептидов для определения спектра допустимых замен в каждом положении. Другие методы, которые могут быть применены, включают фаговое представление (например, Lowman et al., *Biochem.* 30:10832-7, 1991; Ladner et al., патент США No. 5223409; Huse, публикацию WIPO WO 92/06204) и сайт-направленный мутагенез (Derbyshire et al., *Gene* 46:145, 1986; Ner et al., *DNA* 7:127, 1988).

Множественные аминокислотные замены могут быть введены и протестированы известными методами мутагенеза и скрининга, такими как методы, описанные Reidhaar-Olson and Sauer (*Science* 241:53-7, 1988) или Bowie and Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2152-6, 1989). Вкратце, авторы этих публикаций описывают методы одновременной рандомизации двух или более положений в полипептиде, отбора на функциональный полипептид, а затем секвенирования мутагенезированных полипептидов для определения спектра допустимых замен в каждом положении. Другие методы, которые могут быть применены, включают фаговое представление (например, Lowman et al., *Biochem.* 30:10832-7, 1991; Ladner et al., патент США No. 5223409; Huse, публикацию WIPO WO 92/06204) и сайт-направленный мутагенез (Derbyshire et al., *Gene* 46:145, 1986; Ner et al., *DNA* 7:127, 1988).

Преимущества

В соответствии с вышеуказанными вариантами осуществления изобретения основополагающими результатами, полученными авторами настоящего изобретения, является то, что нейротоксин клостридий способен взаимодействовать с катионообменной смолой по меньшей мере при рН 7,3. Этот результат оказался весьма неожиданным, и, не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что нейротоксин клостридий имеет величину рН, превышающую вычисленную рI, и общий отрицательный заряд. Таким образом, весьма удивительно, что такой нейротоксин способен взаимодействовать (особенно с такой высокой эффективностью связывания) с катионообменной смолой, которая, как известно, ассоциируется с положительно заряженными белками.

Еще одним преимуществом настоящего изобретения является то, что один и тот же рН может поддерживаться в течение всего процесса очистки. Другими словами, необходимость в трудоемких заменах буферов (в аналогичных способах, где используется значение рН менее, чем 7,3) снижается или вообще отсутствует, что способствует повышению эффективности и/или пропускной способности. Дополнительно или альтернативно, сохранение одного и того же рН в течение всего процесса очистки, преимущественно означает, что физическая обработка композиции, содержащей нейротоксин клостридий, и/или промежуточного продукта очистки и/или нейротоксина клостридий упрощается.

Применение, включающее контактирование катионообменной смолы с композицией, содержащей нейротоксин клостридий, где такое контактирование происходит при рН, равном -1 или выше вычисленной изоэлектрической точки указанного нейротоксина клостридий, способствует улучшению ряда свойств. Так, например, такое применение способствует повышению уровня связывания и/или выхода нейротоксина клостридий по сравнению с подобным применением, когда контактирование не происходит при значении рН -1 или выше вычисленной изоэлектрической точки указанного нейротоксина клостридий.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что при контактировании нейротоксина клостридий и катионообменной колонки в указанных условиях рН, такое повышение уровня связывания нейротоксина клостридий с катионообменной колонкой способствует удалению примесей (например, белковых примесей), присутствующих в композиции, которая связывается и, тем самым, совместно элюируется с токсином клостридий.

Повышенное связывание нейротоксина клостридий с катионообменной смолой, также способствует повышению эффективности очистки, что приводит к увеличению выхода и/или снижению стоимости, затрачиваемой на каждую очистку. Другими словами, такой способ очистки является более безотходным и/или более экономичным.

Способы и/или применения согласно изобретению преимущественно заключаются в том, что для получения нейротоксина клостридий со степенью очистки, подходящей для его применения в терапии и/или в медицине, требуется проведение меньшего числа стадий очистки.

Если это не оговорено особо, то все используемые здесь технические и научные термины имеют общепринятое значение, известное специалистам в области, к которой относится настоящее изобретение. В публикации Singleton, et al., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994), и Hale & Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY*, Harper Perennial, NY (1991) приводится общее описание многих терминов, используемых в настоящем документе.

Настоящее изобретение не ограничивается описанными в нем репрезентативными способами и материалами, и в объем настоящего описания могут входить любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным здесь, способам и материалам, применяемым для осуществления или анализа вариантов осуществления изобретения. Численные интервалы включают числа, определяющие данный интервал. Если это не оговорено особо, то любые последовательности нуклеиновых кислот записываются слева направо в направлении от 5' до 3'; а аминокислотные последовательности записываются слева направо в направлении от amino-конца до карбокси-конца, соответственно.

Представленные здесь заголовки не должны рассматриваться как ограничения различных аспектов или вариантов осуществления настоящего изобретения, которые могут быть введены в настоящее описание посредством ссылки как единое целое. В соответствии с этим термины, определенные непосредственно ниже, более полно описаны со ссылкой на описание изобретения как единое целое.

Используемые здесь аминокислоты представлены либо их названиями, либо обозначены трехбуквенным или однобуквенным кодом.

Используемый здесь термин "белок" включает белки, полипептиды и пептиды.

Используемый здесь термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "полипептид" и/или термина "белок". В некоторых случаях термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "пептид". В некоторых случаях термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "фермент".

Используемые здесь термины "белок" и "полипептид" являются синонимами. В настоящем описании и в формуле изобретения аминокислотные остатки могут обозначаться стандартными однобуквенными и трехбуквенными кодами. 3-буквенный код для аминокислот был определен специалистами Обь-

единой комиссии по биохимической номенклатуре IUPACIUB (JCBN). Следует также отметить, что полипептид может кодироваться более чем одной нуклеотидной последовательностью из-за вырожденности генетического кода.

Во всем описании изобретения могут встречаться и другие определения терминов. Перед более подробным описанием репрезентативных вариантов, следует отметить, что такое описание не ограничивается конкретными вариантами его осуществления, и очевидно, что такие варианты могут варьироваться. Кроме того, следует отметить, что терминология, используемая здесь в целях описания конкретных вариантов осуществления изобретения, не должна рассматриваться как ограничение объема изобретения, поскольку объем изобретения ограничен лишь прилагаемой формулой изобретения.

В случае, если указываются интервалы величин, это означает, что в него входит каждая промежуточная величина до десятой единицы нижнего предела между верхним и нижним пределом этого интервала, если из контекста явно не следует иное. В объем настоящего изобретения входит каждый более узкий интервал между любой заданной величиной или промежуточной величиной в указанном интервале и любой другой указанной величиной или промежуточной величиной в этом интервале. Верхние и нижние пределы этих более узких интервалов могут быть независимо включены в этот интервал или исключены из этого интервала, и каждый интервал, где любой предел или оба предела входят в эти более узкие интервалы или исключены из этого более узкого интервала, также входят в объем настоящего изобретения, при этом, допускается исключение любого конкретного предела. Если указанный интервал включает один или оба предела, то интервалы, исключающие любой или оба из этих включенных пределов, также входят в объем настоящего изобретения.

Следует отметить, что употребляемые в описании и в прилагаемой формуле изобретения существительные в единственном числе могут употребляться и во множественном числе, если из контекста описания явно не следует иное. Так, например, ссылка на "a, clostridial neurotoxin" ("нейротоксин клостридий") включает множество таких агентов-кандидатов, а ссылка на "the clostridial neurotoxin" ("нейротоксин клостридий") включает один или более нейротоксинов клостридий и их эквивалентов, известных специалистам в данной области, и т.п.

Обсуждаемые здесь публикации приведены исключительно для их раскрытия до даты подачи заявки на данное изобретение. Ничто здесь не должно быть истолковано как признание того, что такие публикации представляют предшествующий уровень техники в прилагаемой формуле изобретения.

Настоящее изобретение описано ниже лишь в иллюстративных целях со ссылкой на прилагаемые чертежи и примеры.

Примеры

Пример 1. Культивирование хозяина и экспрессия растворимых белков gBoNT/A.

Одну колонию из клеток BL21 (DE3), трансформированных экспрессионным вектором, содержащим последовательность ДНК gBoNT/A (SEQ ID NO: 1 или 3), использовали для инокуляции 100 мл модифицированного бульона Terrific (mTB), в который было добавлено 30 мкг/мл канамицина. Этот метод будет в равной степени применим при использовании сфер Microbank™ или глицеринового маточного раствора (10-100 мкл) для инокуляции колбы. Культуру инкубировали в течение 16 ч при 37°C со встряхиванием при 250 об/мин.

После инкубирования всего 10 мл из 100 мл культуры использовали для инокуляции 1 л mTB, в который было добавлено 0,2% глюкозамина и 30 мкг/мл канамицина. Культуру инкубировали при 37°C с перемешиванием при 250 об/мин до тех пор, пока OD₆₀₀ не достигала 0,5. В это время температуру инкубирования снижали до 16°C. Через 1 ч экспрессию белка-мишени индуцировали 1 mM IPTG с последующим инкубированием при 16°C в течение 20 ч со встряхиванием при 225 об/мин. После инкубирования клетки собирали центрифугированием при 4000×g в течение 20 мин при 4°C, а затем хранили при -20°C.

Пример 2. Экстракция белков gBoNT/A из клеток-хозяев.

Клеточные пасты оттаивали при комнатной температуре и ресуспендировали в 3 мл 50 mM бис-трис, pH 6,0, 50 mM NaCl-буфера на грамм клеток, а затем к клеточной суспензии добавляли 10 мкл нуклеазы Benzonase®. Клетки подвергали лизису при 0-4°C путем обработки ультразвуком при 100 Вт (10 циклов, 30 с во включенном состоянии и 45 с в выключенном состоянии). Лизаты центрифугировали при 4000×g в течение 1 часа при 4°C с получением растворимого gBoNT/A (SEQ ID NO: 2 или 4) в осветленном супернатанте.

Пример 3. Захват белка-мишени gBoNT/A.

Свойства белков gBoNT/A были определены по первичной последовательности белка с помощью компьютерной программы Scripps Protein Calculator v3.4 от Scripps Research Institute (табл. 3).

Таблица 3

Предсказанные свойства rBoNT/A

Нейротоксин клостридий	Вычисленная pI
rBoNT/A (эндогенативный BoNT/A) (SEQ ID No. 4)	6,5
Катионный rBoNT/A (SEQ ID No. 2)	7,4

На основе вычисленных величин pI было предсказано, что rBoNT/A (SEQ ID NO: 4) и катионный rBoNT/A (SEQ ID NO: 2) будут связываться с катионообменной смолой (СЕХ) в буфере с рН <6,5 и <7,4 соответственно.

Пример 4. Обессоливание осветленного лизата в тест-буферах.

Осветленные лизаты, содержащие растворимый rBoNT/A (SEQ ID NO: 2 и 4), были разделены на равные части, и буфер был заменен на загрузочные буферы, перечисленные в табл. 4, с использованием обессоливающей колонки Esopo-Pac 10DG.

Таблица 4

Загрузочные буферы, используемые для поиска буфера для СЕХ

Условие #	Загрузочный буфер
1	Цитратно-фосфатный буфер, рН 6,0
2	50 мМ бис-трис-метан, рН 6,0
3	50 мМ HEPES, рН 7,5
4	50 мМ бис-трис рН 7,5
5	50 мМ трис, рН 8,0
6	50 мМ бис-трис-пропан, рН 8,0

После замены буфера осветленные лизаты хранили при 4°C, а затем загружали на колонку HiTrap SP HP.

Пример 5. Скрининг буфера для проведения стадии хроматографического захвата СЕХ на rBoNT/A (SEQ ID NO: 4) с использованием жидкостной экспресс-хроматографии белков (ЖЭХБ).

Лизаты, для которых были заменены буферы и которые содержали растворимый rBoNT/A (SEQ ID NO: 4), были загружены на колонку HiTrap SP HP. % Связывания и % чистоты элюированного белка-мишени определяли с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ и денситометрии. Элюирование связанного белка достигалось благодаря линейному градиенту рН или NaCl (табл. 5).

Таблица 5

Загрузочные буферы и градиент элюирования, используемые для поиска буфера для СЕХ

Условие #	Загрузочный буфер	Градиент элюирования
1	Цитратно-фосфатный буфер, рН 6,0	рН 6,0-7,5
2	50 мМ бис-трис-метана, рН 6,0	0-1М NaCl
3	50 мМ HEPES, рН 7,5	0-1М NaCl
4	50 мМ бис-трис-метана, рН 7,5	0-1М NaCl
5	50 мМ трис, рН 8,0	0-1М NaCl
6	50 мМ бис-трис-пропана, рН 8,0	0-1М NaCl

На фиг. 1 (панели А-Е) показаны профили элюирования rBoNT/A (SEQ ID NO: 4) на окрашенных кумасси ПААГ-ДСН после связывания с SP-сефарозной смолой HP и элюирования из этой смолы в условиях, представленных в табл. 5. Анализ ПААГ-ДСН позволяет вычислить % чистоты элюированного белка-мишени (табл. 6).

Таблица 6

Анализ связывания гBoNT/A (SEQ ID NO: 4)
с SP-сефарозной смолой HP

Условие #	Загрузочный буфер	% чистоты элюированного белка-мишени
1	Цитратно-фосфатный буфер, pH 6,0	н.о.
2	50 mM бис-трис-метана, pH 6,0	70%
3	50 mM HEPES, pH 7,5	35%
4	50 mM бис-трис-метана, pH 7,5	25%
5	50 mM трис, pH 8,0	60%
6	50 mM бис-трис-пропана, pH 8,0	40%

† Денситометрический анализ гелей ПААГ-ДСН.

Визуальная оценка гелей ПААГ-ДСН (фиг. 1) показала более высокий выход белка-мишени после элюирования в условиях 3-6, что свидетельствует о более высоком уровне первоначального связывания белка-мишени со смолой.

Пример 6. Скрининг буфера для проведения стадии хроматографического захвата СЕХ на катионном гBoNT/A (SEQ ID NO: 2) с использованием жидкостной экспресс-хроматографии белков (ЖЭХБ).

Лизаты, для которых были заменены буферы и которые содержали растворимый катионный гBoNT/A (SEQ ID NO: 2), были загружены на колонку HiTrap SP HP. % Связывания и % чистоты элюированного белка-мишени определяли с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ. Элюирование связанного белка достигалось благодаря линейному градиенту pH или NaCl (табл. 5).

На фиг. 2 (панели А-F) показаны профили элюирования катионного гBoNT/A (SEQ ID NO: 2) на окрашенных кумасси ПААГ-ДСН после связывания с SP-сефарозной смолой HP и элюирования из этой смолы в условиях, представленных в табл. 5. Анализ ПААГ-ДСН позволяет вычислить % чистоты и % связывания белка-мишени с SP-сефарозной смолой HP (табл. 7).

Таблица 7

Анализ на связывание катионного гBoNT/A (SEQ ID NO: 2)
с SP-сефарозной смолой HP

Буфер	Загрузочный буфер	% Связывания с SP-сефарозной смолой HP*	% Чистоты элюированного белка-мишени†
1	Цитратно-фосфатный буфер, pH 6,0	Очень плохое <10%	50%
2	50 mM бис-трис-метана, pH 6,0	Нормальное ~30%	10%
3	50 mM HEPES, pH 7,5	Хорошее ~60%	35%
4	50 mM бис-трис-метана pH 7,5	Хорошее ~60%	40%
5	50 mM трис, pH 8,0	Хорошее ~60%	25%
6	50 mM бис-трис-пропана, pH 8,0	Хорошее ~60%	35%

* Визуальная оценка и вычисление % связывания.

† Денситометрический анализ гелей ПААГ-ДСН.

Оценка гелей ПААГ-ДСН (фиг. 2) показала более высокий % связывания и аналогичный % чистоты белка-мишени при pH 7,5-8,0 по сравнению с оценкой при pH 6,0. Это соответствует общему увеличению выхода белка-мишени.

Все упомянутые выше публикации вводятся в настоящее описание посредством ссылки. Различные модификации и варианты описанных способов и систем согласно изобретению будут очевидны для специалиста в данной области и не выходят за рамки существа и объема изобретения. Хотя настоящее изобретение описано на конкретных предпочтительных вариантах его осуществления, однако, следует отметить, что заявленное изобретение не должно быть чрезмерно ограничено такими конкретными вариантами его осуществления. Действительно, различные модификации описанных способов осуществления изобретения, которые будут очевидны для специалистов в области биохимии и биотехнологии или в смежных областях, входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки ботулинического нейротоксина серотипа А (BoNT/A), включающий:
 - (a) контактирование катионообменной смолы с композицией, содержащей BoNT/A, где стадию контактирования проводят в загрузочном буфере с рН более чем на -1 единицу ниже, чем вычисленная рI BoNT/A, где указанную стадию контактирования катионообменной смолы с композицией, содержащей указанный BoNT/A, проводят до превращения указанного BoNT/A из одноцепочечной формы в двухцепочечную форму;
 - (b) отделение BoNT/A от катионообменной смолы с использованием элюирующего буфера;
 - (c) выделение одноцепочечного BoNT/A по существу в чистом состоянии.
2. Способ по п.1, где значение рН составляет:
 - (a) по меньшей мере приблизительно рН 7,5 (предпочтительно приблизительно рН 7,6, предпочтительно по меньшей мере приблизительно рН 7,7, а более предпочтительно по меньшей мере приблизительно рН 7,8);
 - (b) приблизительно от рН 7,3 до рН 9,5 или
 - (c) приблизительно от рН 7,3 до рН 8,0.
3. Способ по п.1 или 2, где выделенный BoNT/A находится по существу в чистом состоянии, где необязательно:
 - (a) выделенный BoNT/A составляет по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,9% от общей концентрации белка и/или
 - (b) по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% примесей удаляют из BoNT/A.
4. Способ по любому из пп.1-3, где:
 - (a) катионообменная смола представляет собой (i) сильную катионообменную смолу, необязательно содержащую сульфоновую кислоту; (ii) слабую катионообменную смолу, необязательно содержащую карбоксиметил; (iii) комбинацию сильных и слабых катионообменных смол или (iv) смолу смешанного типа, которая действует как катионообменная смола, предпочтительно слабая катионообменная смола; и/или
 - (b) буфер содержит один или более из NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂ и (NH₄)₂SO₄; и/или
 - (c) композиция, содержащая BoNT/A, представляет собой бесклеточный экстракт и/или клеточный лизат.
5. Промежуточный продукт очистки, содержащий BoNT/A, связанный с катионообменной смолой, где промежуточный продукт очистки имеет рН по меньшей мере 6,5, более предпочтительно по меньшей мере рН 7,3, где катионообменная смола контактирует с указанным BoNT/A до превращения указанного BoNT/A из одноцепочечной формы в двухцепочечную форму и где необязательно BoNT/A является BoNT/A, содержащим аминокислотную последовательность UniProtKB с регистрационным номером P10845 или его модифицированную форму.
6. Промежуточный продукт очистки, содержащий BoNT/A, который был отделен от катионообменной смолы, где промежуточный продукт очистки имеет рН по меньшей мере 6,5, более предпочтительно по меньшей мере рН 7,3, где катионообменная смола контактирует с указанным BoNT/A до превращения указанного BoNT/A из одноцепочечной формы в двухцепочечную форму и где необязательно BoNT/A является BoNT/A, содержащим аминокислотную последовательность UniProtKB с регистрационным номером P10845 или его модифицированную форму.
7. Промежуточный продукт очистки по п.5 или 6, где:
 - (a) BoNT содержит последовательность смежных аминокислот, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18, 20 или 22; и/или
 - (b) катионообменная смола представляет собой (i) сильную катионообменную смолу, необязательно содержащую сульфоновую кислоту; (ii) слабую катионообменную смолу, необязательно содержащую карбоксиметил; (iii) комбинацию сильных и слабых катионообменных смол или (iv) смолу смешанного типа, которая действует как катионообменная смола, предпочтительно слабая катионообменная смола.
8. Промежуточный продукт очистки по любому из пп.5-7, где BoNT/A представляет собой катионный BoNT/A.
9. Промежуточный продукт очистки по любому из пп.5-8, где значение рН составляет:
 - (a) по меньшей мере приблизительно рН 7,5 (предпочтительно приблизительно рН 7, 6, предпочтительно по меньшей мере приблизительно рН 7,7, а более предпочтительно по меньшей мере приблизительно рН 7,8);
 - (b) приблизительно от рН 7,3 до рН 9,5 или
 - (c) приблизительно от рН 7,3 до рН 8,0.
10. Применение загрузочного буфера, имеющего значение рН, которое составляет -1 или выше, чем вычисленная рI одноцепочечного BoNT/A, в целях контактирования композиции, содержащей BoNT/A, с катионообменной смолой до превращения указанной одноцепочечной формы в двухцепочечную форму,

для повышения уровня связывания и/или увеличения выхода одноцепочечного VoNT/A по сравнению с применением pH, значение которого составляет более чем на -1 единицу pH ниже, чем вычисленная pI указанного VoNT/A в одинаковых условиях, где буфер содержит бис-трис (пропан), бис-трис (метан), Трис, HEPES, цитрат или фосфат.

11. Применение по п.10, где значение pH составляет:

(a) по меньшей мере 6,5;

(b) по меньшей мере равно (предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 0,2 единицы pH выше, а более предпочтительно по меньшей мере на 0,5 единицы pH выше) вычисленной pI указанного VoNT/A;

(c) приблизительно на 0,2-1,5 единиц pH выше вычисленной pI указанного VoNT/A;

(d) приблизительно на 0,2-1,0 единиц pH выше вычисленной pI указанного VoNT/A.

12. Способ или применение по любому из пп.1-4 или 10, 11, где контактирование катионообменной смолы с композицией, содержащей VoNT/A, представляет собой первую стадию очистки (например, первую стадию хроматографической очистки).

13. Способ или применение по любому из пп.1-4 или 10-12, где очистка включает одну или более дополнительных стадий.

14. Способ или применение по п.13, где одна или более дополнительных стадий включают контактирование композиции, содержащей VoNT/A, с одной или более дополнительными смолами и где необязательно:

(a) контактирование с одной или более дополнительными смолами осуществляют после стадии контактирования катионообменной смолы с композицией, содержащей VoNT/A; и/или

(b) одну и/или более дополнительных стадий выбирают из группы, состоящей из анионообменной хроматографии, катионообменной хроматографии, гидрофобной хроматографии, хроматографии смешанного типа, гидрофобной хроматографии с индукцией заряда, гель-фильтрации и аффинной хроматографии;

где предпочтительно способ включает дополнительную стадию анионообменной хроматографии после стадии контактирования катионообменной смолы с композицией, содержащей VoNT/A.

15. Способ или применение по п.13 или 14, где одна или более дополнительных стадий включают превращение VoNT/A из одноцепочечной формы в двухцепочечную форму с последующим выделением одноцепочечного VoNT/A.

16. Способ или применение по любому из пп.1-4 или 10-15, где по меньшей мере 35% (предпочтительно по меньшей мере 40, 50 60, 70 или 80%) всего VoNT/A, содержащегося в композиции, связаны с катионообменной смолой.

17. Способ или применение по любому из пп.1-4 или 10-16, где:

(a) VoNT/A представляет собой VoNT/A, содержащий аминокислотную последовательность UniProtKB P10845 или его модифицированную форму; и/или

(b) VoNT/A содержит последовательность смежных аминокислот, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18, 20 или 22.

18. Способ или применение по любому из пп.1-4 или 10-17, где VoNT/A представляет собой катионный VoNT/A.

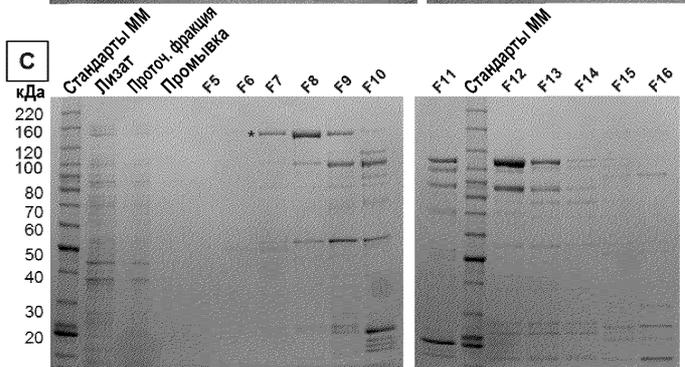
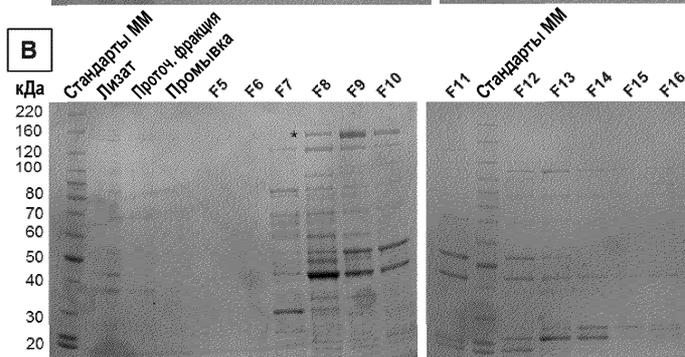
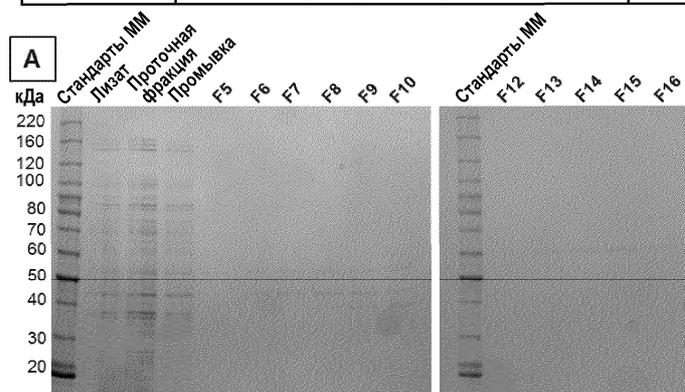
19. VoNT/A, получаемый способом или с применением по любому из пп.1-4 или 10-18 и/или выделенный из промежуточного продукта очистки по любому из п.п.5-9, где VoNT/A имеет аминокислотную последовательность, как определено в любом из пп.4-6.

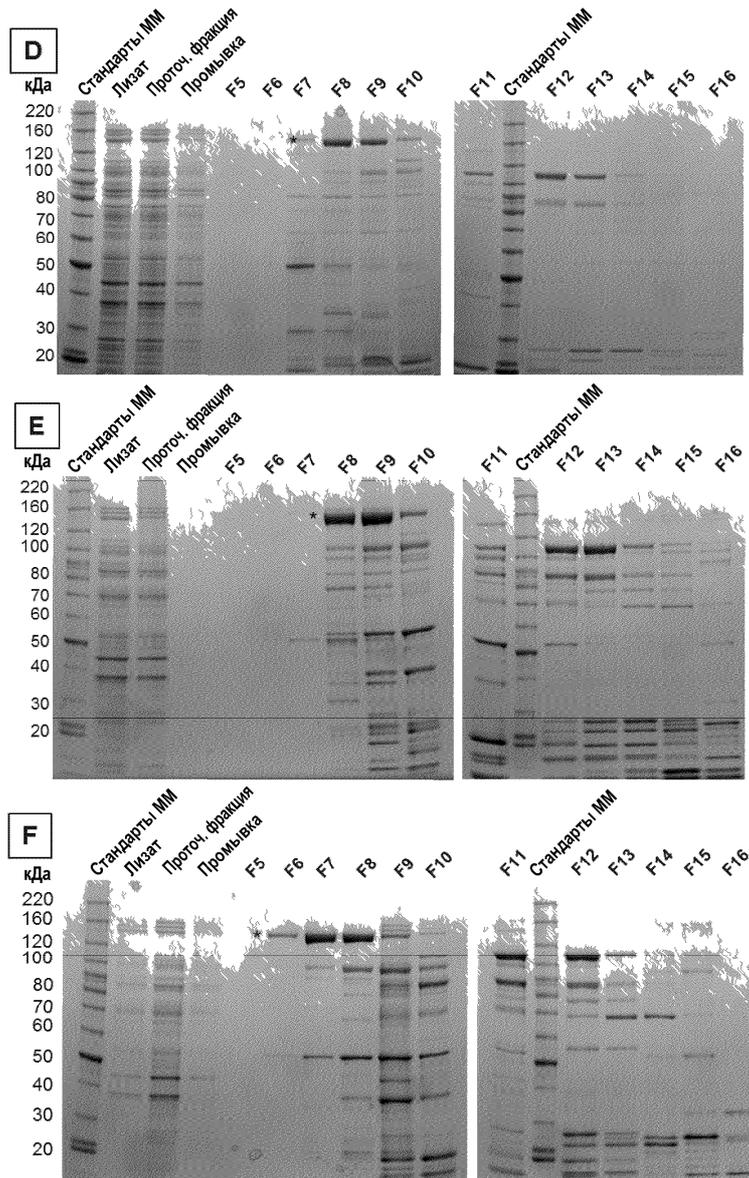
20. VoNT/A по п.19, где:

(a) указанный VoNT/A находится по существу в чистом состоянии и/или

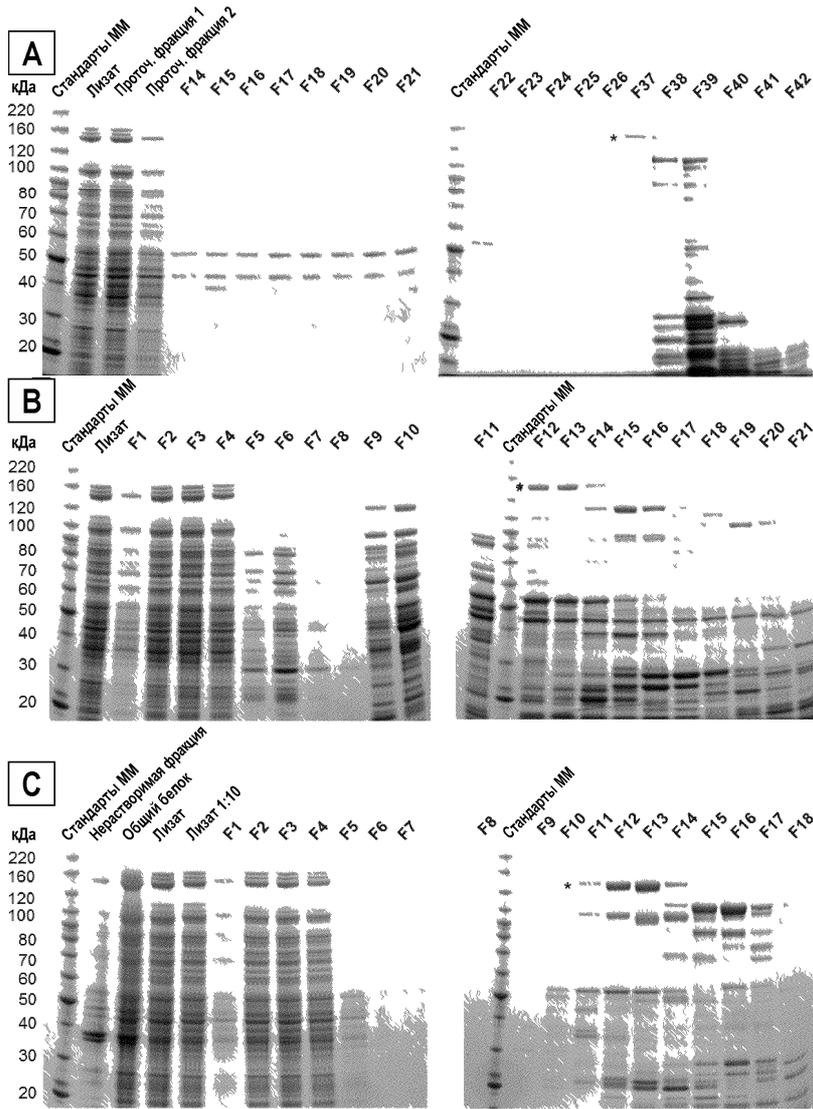
(b) выделенный VoNT/A составляет по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,9% от общей концентрации белка.

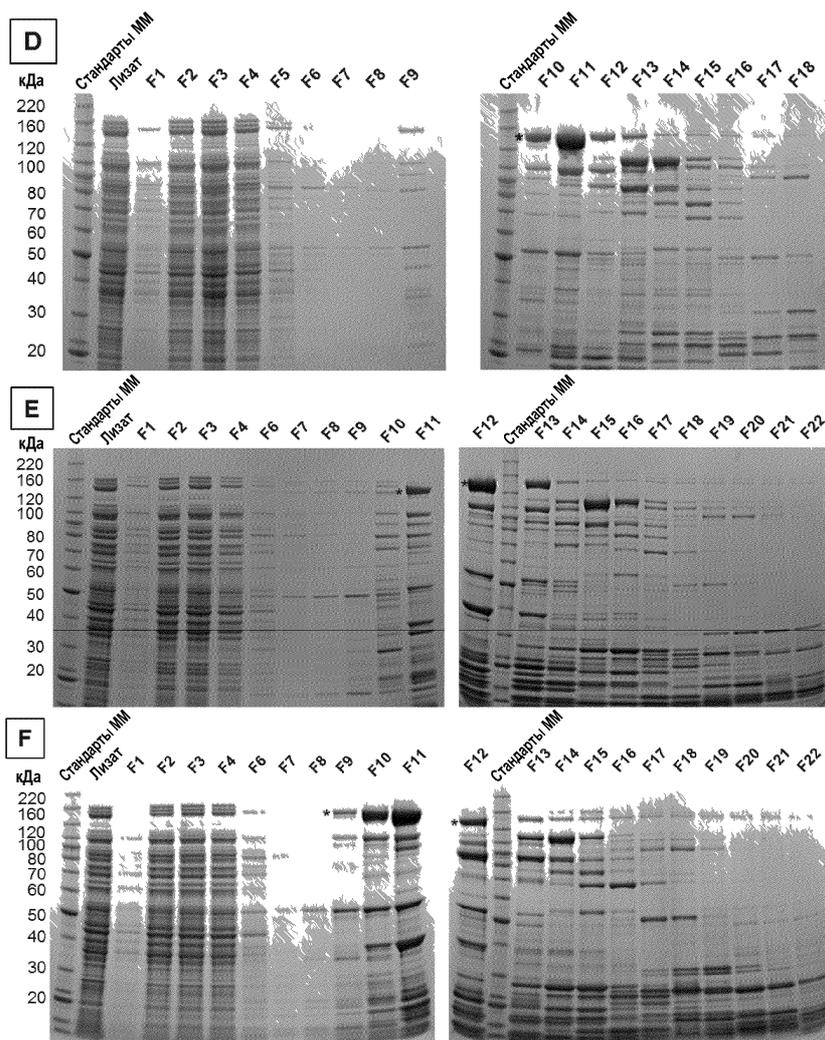
Панель	Загрузочный буфер	Градиент элюирования
A	Цитратно-фосфатный буфер, pH 6,0	pH 6,0-7,5
B	50 mM бис-трис-метана, pH 6,0	0-1M NaCl
C	50 mM HEPES, pH 7,5	0-1M NaCl
D	50 mM бис-трис-метана, pH 7,5	0-1M NaCl
E	Трис, pH 8,0	0-1M NaCl
F	50 mM бис-трис-пропана, pH 8,0	0-1M NaCl





Фиг. 1





Фиг. 2

(SEQ ID No. 1)

ATGCCATTCGTCACCAAGCAATTCAACTACAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATACATCAAGATTCGG
AACGCCGGTCAAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTAAGATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACC
TTACCGAACCCCGGAGGAGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTGACGTACTACGATTCG
ACGTAACTGAGCAGGATAACGAAAAAGATAAATACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTCCAGCATTCTACAGC
ACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGTTCCGGGTATCCCGTCTGGGGTGGTAGCAGATTCACACC
GAACTGAAGGTTATCGACACTAATGCATTAACTGTTATCAACCCGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAAT
CTGGTCATCATTGGCCGAGCCGACAGACATTAATCCAAATTCGAGTGCAAGAGCTTTGGTCACGAGGTTCTGAATCTG
ACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCAGTACATTCGTTTTCCGCCGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTG
GAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCGGGCAAATTCGTTACCGATCCGGCTGTACGCTGGCCCATCAACTG
ATCTACGCAGGCCACCGCCTGTACGGCATTCGCATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATAC
TACGAGATGAGCGCCCTGGAAAGTCAAGTTCGAAGAACTGCCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGAC
AGCTTGCAAGAGAATGAGTTCCTGTACTACTATAACAATTCAAAGACATTGCAAGCAGTTGAACAAGGCC
AAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTAAAAGAGAAGTACCTGCTGCCGAG
GATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAACTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACC
GAGGACAACCTTTGAAATCTTCAAAGTGTGAACTGTAACCACTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTTTTCAAG
ATTAACATCGTCCCGAAGGTGAATACACCATCTATGACGGTTTTAACCTGCGTAAACCAACCTGGCCGGCAAC
TTAAACCGTCAGAAATACCGAAATCAACAACATCAATTCACCAACTTGAAGCACTTACACCGCTCTTCCACATTC
TATAAGCTGCTGTGCGTGGCGGTATCATACCAGCAAAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAACAAGCGCTG
AATGACCTGTGCATTAAAGTAAACAATTTGGGATCTGTTCTTTCCGCCATCCGAAGATAATTTTACCAACGACCTG
AACCAAGGGTGAAGAATACCCAGCGATACGAATTTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCTGGATCTGATCCAG
CAGTACTATCTGACCTTTAACTTCGACAAATGAACCCGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATATC
GGTCAGCTGGAAGTATGCCGAATATCGAACGTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATG
TTCCATTACCTGCGTGCACAGAGTTTGAACACGGTAAAAGCCGATTCGCCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGCG
CTGCTGAACCCGAGCGCTGTCTATACCTTCTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAGCCACTGAGCC
GCCATGTTCTGGGCTGGTGGAAACAGTGGTATATGACTTCACGGACGAGCAGCGAAGTGAAGCCTACCGAC
AAAATTTGCTGATATTACCATCAATTCCTGATATTTGGTCCGGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAGAC
GATTTTTGGGGTCCCTGATCTTCCCGGTGATTCTGCTGGAGTTCATTCCGGAGATTGCCGATCCCGGTG
TTGGGTACCTTCGCGCTGGTCCCTACATCCGGAATAAGGTTCTGACGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTG
AAACGTAATGAAAAATGGACGAGGTTTACAATACATGTTTACGAATGGCTGGCAGAACTCAATACCCAGATC
GACCTGATCCGTAAAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGGCGAGGCCACCAAGCAATTAACACTACCAA
TACAACCACTACACGGGAAGAGAGAATAAATTAACCTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAA
TCTAATCAGTAAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTAACCTGATGAATGCAATG
ATTCCGATGCGCTCAAACGCTCGGAGGACTTCGACGGCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGAC
AATCGTGGTACGCTGATTTGGCAGGTTGACCGCTTGAAGACAAAAGTTAACAATACCTGAGCAGCAGACATCCCA
TTTCAACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGCTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATCA
ACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAAGCATCTGATGATCTGAGCCGTTATGCTAGCAAGATCAACATC
GGTAGCAAGGTCATTTTACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTGTTAATCTGGAATCGAGCAAAAATGAG
GTTATCCTGAAAAGGCCATTGCTACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTCGCATCCCG
AAATACCTCAACAAGATTAGCCTGAACAACAGATATACTATCACTCACTGATGGAGAAACAACAGCGGTTGGAAG
GTGCTCTGAACATGTTGAGATCAATTTGGACCTTGCAGGACACCAAGAGATCAAGCAGCGCGTGTGTTCAAG
TACTCTCAAAATGATCAACATTTCCGATTAATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTAACGAATAACCGCTGAA
AAGAGCAAGATTACATCAATGGTCCGTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCACGCAAGC
AACAAGATTATGTTCAAATTTGGACGGTTGCCCGGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTT
GATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGATCAAAAGATTTGATGACAACCAATTAACAGCGCGGATTTGAAAGGACTTC
TGGGGCGATTATCTGCAATACGATAAGCCGTAATATGCTGACCTGATGATCGCAACAATATGTGGATGTC
AATAATGTGGGTTATCTGCTGGTTACATGATTTGAAGGTCCTGGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTG
AACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAGATAACATTTGCGGT
AATAACGATCGTGTCTACATCAACGTTGCTGTTGAAGAATAAAGAGTACCGCTTGGCGACCAACGCTTCCGAGCGC
GGTGTGAGAAAATCTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTCGGTAATCTGAGCAAGTCTGAGCAAGTCTGTTGTT
AAGAACGACAAGGTTACTAACAAGTCAAGATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTTAT
GGTTTCCACAGTTCAACAATATTGCTAACTGGTAGCGAGCAATGGTACAATCTGATGAGCGCAGCAGC
CGTACTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGTTCGATGATGTTGGGGCAACGTCCTG

Фиг. 3

(SEQ ID No. 2)

MPFVNKQFNKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMPVKAFKIHNKIWI PERDFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYDYS
TYLSTDNEDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGI PFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGYSRSEELN
LVIIGPSADI IQFECKSFGEHVLNLRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDNPLLGAGKFATDPAVTLAHQL
IYAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYEEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFI DLSQENEFRLYYNKFKDIASTLNKA
KSI VGTASLQYMKNVFKKYLLEDTS GKF SVDKLFKFDLYKMLTEIYTEDNFVVKFKVLRKTYLNFDKAVFK
INIVPKVNYIYDGFNLRNTNLAANFNGQNT EINNMF TKLKNFTGLFEPYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKAL
NDLICKVNWDLFFSPSEDNFTNDLNGEEITSDTNI EAAEENI SLDLIQYYLTFNFDNEPENISIEINLSDII
GQLELMPNIERFPNGKYEYLDKYMFLYLAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVKNKATEA
AMFLGWVQLVYDFTDETSVSTPDKIADIT IIPYI GPALNIGNMLYKDDDFV GALIFSGAVLLEFIP EIAIPV
LGT FALVSIANKVLT VQTDI NALS KRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALBNQAEATKAIINYQ
YNQYTEEEKNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQC SVSYLMNSMI PYGVKRL EDFDASLKDALLKYIYD
NRGTLIGQVDRLEKDKVNNTLSTDI PFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESKHLIDLRSRYAKINI
GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKKAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNKISLNNEYIINCMENNSGWK
VSLNYGEI IWTLDQTK EIKQRVVFYKYSQMINISDYINRWIFVTITNRLNKSKIYINGRLIDQKPI SNLGNHAS
NKIMPKLDGCRDTHRYIWI KYFNLFDKELNEKEIKLDYDNQSN SGLKDFWGDYLYQYDKPYMLNLYDPNKYVDV
NNVGI RGYMYLKGPRGSMVTNI YLNSL YRGT KFI I KKYASGNKDNIVRNDRVYINVVKNKE YRLATNASQA
GVEKILSALEIPDVGNLSQVVMKSKNDKGTINCKMNLQDNNNDIGFIFGHQFNNAKLVASNWNRYRIERS
RTLGC SWEFIPVDDGWGERPL

Фиг. 4

(SEQ ID No. 3)

ATGCCATTTCGTCACCAAGCAATTCAACTACAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATACATCAAGATTCGG
AACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTAAGATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACC
TTCACGAACCCGGGAAGAGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTGAGTACTACGATTTCG
ACGTACTGAGCAGGATAACGAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTGCAACGATCTACAGC
ACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGTTTCGCGGTATCCCGTCTGGGGTGGTAGCAGGATTGACACC
GAATCGAAGGTTATCGACACTAATGCATTAACGTTATCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAAT
CTGGTCAATATTGGCCGAGCCGACGACATTATCCAAATTCGAGTCAAGAGCTTTGGTCACGAGGTTCTGAATCTG
ACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCAGTACATTCGTTTTTCGCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTG
GAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCCGGCAAATTCGTTACCGATCCGGCTGTCCAGCTGGCCCATCAACTG
ATCACGCGAGCCACCAGCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTTCAGGTTAAATACGAATGCATAC
TAGGATGAGCGGCCGGAAGTCAAGTTCGAAAGAACTGCCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGAC
AGCTTCAAGAGAAATGAGTTCGCTGTACTACTATAACAATTCAAAGACATTCGAAGCAGCTTGAACAAGCCG
AAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAATATGAAAGATGTGTTTAAAGAGAAAGTACCTGCTGCTCCGAG
GATACCTCCGGCAAGTTTACGCTGTAAAGCTGAAGTTTGACAACTGTACAAAGATGCTGACCGGAGATTACACC
GAGGCAACTTTGTGAAATCTTCAAAGTGTGAACTGTAACCACTATCTGAATTTGACAAAAGCGGTTTTCAAG
ATTAACATCGTGCAGAGGTGAACTACACCATCTATGACGTTTTAACCTGCGTAAACCAACCTGGCCGCGAAC
TTTAAACGGTCAGAAATACGAAATCAACAACATGAATTTACAGAAAGTTGAAGAACTTACGGGCTGTTTCGAGTTC
TATAAGCTGCTGTGCGTGCAGGATCATCACAGCAAAAACCAAAAAGCTGGACAAAGGCTACAACAAGCGGCTG
AATGACCTGTGCATTAAGGTAACAATTTGGATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAAGATAATTTTACCAACGACCTG
AACAAAGGTTGAAGAAATCACAGCGATACGAATTTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCTGGATCTGATCCAG
CAGTACTATCTGACCTTAACTTCGACAAATGAACCCGAGAACATAGCAATGAGAATCTGAGCAGGACATATC
GGTCAGCTGGAAGTATGACCAATATCGAACGTTTTCCGAAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATG
TTCCATTACCTGCGTGACAGGAGTTTGAACACGGTAAAAGCCGATTCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGGAGCC
CTGCTGAACCCGAGCGGTGTCTATACCTTCTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCCATGACGCC
GCCATGTTCTGGGCTGGGTGGAACAGTGTATATGACTTCACGGACGAGACGAGCGAAGTGAAGCACTACCGAC
AAAATGCTGATATTACATCATTATCCCGTATATTTGGTCCGGCACTGAACATTTGGCAACATGCTGTACAAAGC
GATTTTGTGGTGCCTGATCTTCCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTTACCTCCGAGATTGCGATCCCGGTG
TTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCTACATCGCGAATAAGGTTCTGACGGTTGAGACCATCGATAACCGCTGTCG
AAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTTTACAAATACATTTGTTACGAATTTGGCTGGCGAAGTCAATACCCGATC
GACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGCGCTGGAGAATCAGCGGAGGCCACCAAGCAATTTTCAACTACCAA
TACAACCGATACCGGAAGAGAGAAATTAACATTAACCTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGTGAATGAA
TCTATCAACAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTAACCTGATGATGAGCATG
ATTCCGTATGCCGTAACAGCTCTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTGTGCTGAAATACATTTACGAC
AATCGTGGTACGCTGATTTGGCCAAAGTTGACCGCTTGAAGACAAAGTTTAAACAATCCCTGAGCAGCGACATCCCA
TTTCAACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGCTGTTGAGCACTTTACCGAGTATATCAAAAACATCAACTAAT
ACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCGCTTATGCAAGCAAGTCAACATC
GGTAGCAAGGTCATTTTACCCGATCGATAAAGAACAGATCCAGCTGTTTAACTCTGGAATCGAGCAAAAATGAG
GTTATCTGAAAAACCGCTTGTCTACAACCTGATGACGAGAAATTTCTCCACAGCTTCTGGATTCGCATCCCG
AAATACCTCAACAGCATAGCCTGAACAAACAGTATACATCATCAACTGATGGAGAACCAACAGCGGTTGGAAG
GTCTCTGAACTATGTTGAGATCATTTGGACCTTCGAGGACACCCAAAGAGATCAAGCAGCGCTGCTGTCTCAAG
TACTCTCAAATGATCAACATTTCCGATTAATTAATCGTTGGATCTTCTGACCATACGAATAACCGCTCTGAAT
AACAGCAAGATTTACATCAATGGTCCGTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCACGCAAGC
AACAACTATGTTCAAATTTGACGCTTGGCGGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAAACCTGTT
GATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGATCAAGATTTGATGACAACCAATCTAACAGCGGCTTTTGAAGGACTTC
TGGGGCGGATATCTGCAATACGATAAGCCGTAATATGCTGAACCTGATGATCCGAACAAATATGTTGGATCTG
AATAAATGTTGGGTTATCTGTTGTTACATGATTTGAAGGCTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTC
AATCTAGCCTGATCCGTTGTTACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAAATGTTGCGGT
AATAACGATCGTGTACATCAACGTTGTTGGAAGATAAAGAGTACCCTGCTGGCAGCAACGCTTCCGAGCGG
GGTGTGAGAAAATCTGAGCGCGTTGAGATCCCTGATGTCGTAATCTGAGCCAAAGTCTGGTATGAGAGAGC
AAGAACGACCCAGGTTACTAACAAGTGAAGATGAACCTGCAAGCAACAATGTTAACGACATCCGGCTTTATT
GGTTCCACCAGTTCAACAATATGCTAACTGGTAGCGGACAAATGGTAGCAATCTGACAGTTGAGCCGACGAGC
CGTACTTTGGGCTGAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGATGATGGTTGGGCGAACCTCCGCTG

Фиг. 5

(SEQ ID No. 4)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIHWIIPERDFTFNPEEGLNPPPEAKQVPSYYS
TYLSTDNEKDNYLKGVTKLFFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPIFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGYSRSEELN
LVIIGPSADIQFECKSFGEVNLNLRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDNPLLGAGKFPATDPAVTLAHLQ
IYAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYEEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNFKFKDIASLTNKA
KSIVGTFTASLQYMKNVFKEKYLSEDTSGKFSVDKLPDKLYKMLTEIYTEDNFVFKFKVLRNRTYLNFDKAVFK
INIVPKVNYTIDYDFNLNRLNLAANFNQNTIEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKAL
NDLCIKVNNWDLFFSPEDNFTNDLNKGEETSDTNI EAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENIS IENLSSDI I
GQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNVNEALLNPSRVYTFSSDYVKVKNKATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIIPALNIGNMLYKDDFVGLIFSGAVILLEFIPETAIIPV
LGTFAVLSYIANKVLTVQTDINALSKRNEKWDEVYKIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQ
YNOYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKREDFDASLKDALLKYID
NRGTLIGQVDRLLKDKVNNLSTDIIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINI
GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWK
VSLNYGEI IWTLDQTEIKQRVVFYKYSQMINISDYINRWI FVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPI SNLGNIHAS
NNIMFKLDGCRDTHRYIWKYFNLFDKELNEKEIKLDYDQNSNGILKDFWGDYLYDKPYYMLNLYDPNKYVDV
NNVIRGYMYLKGPRGSMVTNIYLNSSLYRGTFFIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVKNKEYRLATNNSQA
GVEKILSALEIPDVGNLSQVVMKSKNDQGITNKKMMLQDNNNGDIFGIFGHQFNNAKLVASNWNRYQIERSS
RTLCCSWEFIPVDDGWGERPL

Фиг. 6

(SEQ ID No. 5)

ATGCCATTTCGTCACAGCAATTCACACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATAACATCAAGATTCGG
AACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAAGATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACC
TTACGAAACCCGGAAGAAGCGGATCTGAACCCGCCACCCGGAAGCAAGTCCCTGTCAGTACTACTGATTCG
ACGTACCTGACACGGATAACGAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTCCGACGATCTACAGC
ACGGATCTGGGTCCGATGCTGCTGACTAGCATTGTTCCGGGTATCCCGTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACC
GAACTGAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTATTCACCCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAAT
CTGGTCATCATTGGCCCAGCGCAGACATTAATCCAATTCGAGTCAAGAGCTTTGGTCACGAGGTTCTGAATCTG
ACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCAGTACATTCGTTTTCCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCCTG
GAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCGGGCAAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTACCGTGGCCCATGAATG
ATCCACGCGAGCCACCGCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATCAAGATGCATAC
TACGAGATGAGCGCCCTGGAAGTCACTTCAAGAACTGCGCACCTTCGGTGGCCATGACCTAAATTCATTTGAC
AGCTTGAAGAGAATGAGTTCGGTCTGTACTACTATAACAATTCAAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACAAGGCC
AAAAGCATCGTTGGTACTACCGCTGCTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTAAAGAGAAGTACCTGCTGTCGAG
GATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAACCTGTACAAGTGTGACCGAGATTTACACC
GAGGACAACCTTTGTGAAATCTTCAAAGTGTGAACTGTAACCTATCTGAATTTTGACAAGCGGTTTTCAAG
ATTAACATCGTCCGGAAGGTGAATACACCATCTATGACGGTTTTAACCTGCTAAACCAACCTGGCGCGAACA
TTTAACGGTCAGAAATACGGAATCAACAACATGAATTTACGAAAGTTGAAGAACTTCACGGGCTGTTCGAGTTT
TATAAGCTGCTGCGGTGCGCGTATCATCACCAGCAAAACCAAAGCCTGGCAAAAGGCTACACAAGGCGCTG
AATGACCTGTGCATTAAGGTAAACAATTTGGGATCTGTTCTTTTCGCGCATCCGAAGATAATTTTACCAGACCTG
AACAAAGGTGAAGAATCACCAGCGATACGAATATGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAG
CAGTACTATCTGACCTTTAATCTGACCAATGAACCGGAGAACATAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATTTATC
GGTCAGCTGGAATGATGCCGAATATCGAACGTTTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATG
TTCATTTACCTGCGTGCACAGGAGTTTGAACACGGTAAAcgtCGTATCCGGCTGACCAACAGCGTTTAAACGAGCC
CTGCTGAACCCGAGCGGTGTCTATACCTTCTTACGACGACTACTGTTAAGAAAGTGAACAAGCCACTGAGGCC
CGCATGTTCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGACGAGCGAAGTGAAGCCTACCGAC
AAAATTTGCTGATATTAACCATTAATCCCGTATATTTGGTCCGGCAGTGAACATTGGCAACATGCGTTTACAAAcgt
cgTTTTGTTGGGTGCCCTGATCTTCCGGTGCCGTGATTTCTGCTGGAGTTTATTCCGGAGATTGCGATCCCGGTG
TTGGTACCTTCGCGTGGTGTCTACATCCGCAATAAGGTTCTGACGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCC
AAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTTTACAAAATACATTTTACGAATTTGGCTGGCGAAAAGTCAATACCCAGATC
GACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGGTGGAGAATCAGCGGAGGCCACCAAGCAATTAACAATACCAA
TACAACCAAGTACACGGAAGAAGAGAATAACATTAACCTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGTGAATGAA
TCTATCAACAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATG
ATTCGCTATGGCGTCAAACGCTTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGAC
AATCGTGGTACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAAGACAAAAGTTAACAATACCTGAGCcgTGAACgTCCA
TTTTCACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGCTGTTGAGCACCTTCCAGGATATATCAAAAACATCATCAAT
ACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCGGTTATGCAAGCAAGATCAACATC
GGTAGCAAGGTCAATTTTGAACCCGATCGATAAGAACCCAGATCCAGCTGTTTAACTGGAATCGAGCAAAATGAG
GTTATCTGAAAACCGCCATTGTCTACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTCCGATCCCG
AAATACTTCAACAGCATTAGCCTGAACAACGAGTATACTATCATCACTGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAG
GTGCTCTGAACTATGGTGAGATCATTTGGACCTTGCAGGACACCCAAAGAGATCAAGCAGCGCGCTGTTCAAG
TACTCTCAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAATCGTTGGATCTTCTGACCATACGAAATACCGCTGAT
AACGCAAGATTTACATCAATGGTTCGTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCACGCAAGC
AACACATTAATGTTCAAATTTGACGGTTGGCCGCGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTT
GATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGATCAAGATTTGATGACAACCAATTAACAGCGGCAACAAAGATAAATTTGCGCT
TGCGGCGATTATCTGCAATACGATAAGCCGTTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAATATGTTGATGTC
AATAATGTTGGTATTCGTTGAAATTTGAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTGTTT
AATCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAAATTTGCGCT
AATAACGATCGTGTCTACATCAACGTTGCTGTAAGAAATAAGAGTACCGTTCGGCGACCAACGCTTCGACGGCG
GGTGTGAGAAAATTTGAGCGGTTGGAGATCCCTGATGTCGGTAATCTGAGCCAAGTCTGGTTATGAAAGAGC
AAGAACGACAGGATCACTAAACAAGTGCAGATGAACCTGCAAGCAACAATGGTAACGACATCCGGTTTTATT
GGTTCCACAGTTCAACAATTTGCTAACTGGTAGCGAGCAATTTGGTACAATCGTCAAGTATGAGCGCAGCAGC
CGTACTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGATGATGGTTGGGCGAACGTCGCTG

Фиг. 7

(SEQ ID No. 6)

MPFVNKQFNKYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWIWIPERDFTNPEBGLNPPPEAKQVPVSYDS
TYLSTDNEKDNYLKGVTKLPERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPIFFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGYSRSEELN
LVIIGPSADIIQFECKSPGHEVLNLRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESELEVDNPLLGAGKFATDPAVTLAHEL
IHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYEMSGLEVSFEELRTPGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNFKFDIATSLNKA
KSIIVGTASLQYMKNVFKEKYLLEDSTSGKFSVDLKFDPKLYKMLTEIYTEDNFVFKFVLRNRYLNFDPKAVFK
INIVPKVNYTIYDGFNLNNTNLAANFNQNTIEINMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIIITSKTKSLDKGYNKAL
NDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEIITSDTNI EAABENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISINLSSDI
GQLELMPNIERFPNGKKEYLDKYTMFHYLRAQEFHGRRIALNTNSVNEALLNPSRVYTFPSSDYVKKVNKATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSVSTDDKIADITIIIPYIGPALNIGNMRYKRRFVGLIFSGAVILLEFIPPIAIPV
LGTALVSYIANKVLTQVTDI DNALSKRNEKWDVYKYIVTNWLAQVNTQIDILIRKKMKEALENQAETKAIINQY
YNYQYTBEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKNFLNQC SVSYLNMNMIPIYGVKREDFDASLKDALIKYIYD
NRGTLIGQVDRLLKDKVNNLTLRDRPFQLSKYVDNRLLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLRYASKINI
GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSILNNEYTIINCMENNSGWK
VSLNYGEIITWLLQDTQEIQRVVPKYSQMINISDYINRWIFVTTNNRNLNNSKIYINGRLIDQKPIINLGNIHAS
NNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLVDNQSNISGILKDFWGDYLYQYDKPYMNLNLDPNKYVDV
NNVGI RGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNLSLYRGTKFIKKYASGNKDNIVRNRDRVYINVVKNKEYRLATNASQA
GVEKILSALEIPDVGNLSQVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGIFGFHFNNIAKLVASNWNRYRIERSR
RTLGCSEWFIPIVDDGWGERPL

Фиг. 8

(SEQ ID No. 7)

ATGCCATTTCGTCACAAGCAATTCAACTACAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATACATCAAGATTCCG AACCCCGGTCAAATCGACCGGTTAAGGCTTTAAGATCCACAACAAGATTGGGTTATCCCGGAGCTGACACC TTCACGAAACCCGGAAGAAGCGGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTAGCTACTACGATTTCG ACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTGCAACGATCTACAGC ACGGATCTGGGTGCGATGCTGCTGACTAGCATTGTTGCGGGTATCCGTTCTGGGGTGGTAGCAGGATTGACACC GAACGAAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTATTCAACCCGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAAT CTGGTCATCATTGGCCGAGCGCAGACATTAATCCAATTCGAGTGAAGAGCTTTGGTCCAGAGTTCTGAATCTG ACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTCGTTTTTCGCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTG GAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATGAACG ATCCACGAGCGCCACCGCTGATCGGCATTCGCAATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATAC TACGAGATGAGCGGCTGGAAGTCACTTCGAAGAAGTGGCACCCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATGTAC AGCTTGAAGAAGATGAGTCCGCTGTACTACTATAACAATTCAAAGACATTGCAAGCAGCTGAAACAAGGCC AAAAGCATCGTTGGTACTACCGGCTGTTGACGATATGAAGAATGTTTAAAGAGAAGTACCTGCTGTCGAG GATACTCCCGCAAGTTTACGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAACTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACC GAGGACAACCTTTGTAAATTCCTCAAAGTGTGAATCGTAAAACCTATCTGAAATTTGACAAAGCGGTTTTCAAG ATTAACATCGTCCGAAAGGTGAACATACACCATCTATGACGGTTTTAACCTGCGTAACCAACCTGGCGGCGAAC TTTAACCGTCAGAATACGGAATCAACAACATGAATTTACGAAAGTTGAAGAAGTTCAGGGTCTGTTCAAGTTT TATAAGCTGCTGTCGTCGCGGATCATCACAGCAAAAACCAAAGCCTGGCAAAAGGCTACAAACAGGCGCTG AATGACCTGTGCATTAAGGTAACAATTTGGGATCTGTTCTTTCCGCATCCGAAGATAATTTTACCAACGACCTG AAgAAGGTTGAAGAATCACCAGGATACGAATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAG CAGTACTATCTGACCTTTAATTCGACAAATGAACCGGAGAACATAGCATTGAGAATCTGAGCAGGACATATTC GGTCAAGCTGGAACATGATGCGCAATTCGAACGTTTTCCGAAACGCAAAAGTACGAGCTGGCAAGTACTATG TTCCATTACCTCGGTGCACAGGATTTGAACACGGTAAAAGCCGATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCC CTGCTGAACCCGAGCGGCTGCTATACCTTCTCAGCAGCGACTATGTTAAAGAAAGTGAACAAAGCCACTAAGGCC GCGATGTTCCCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGATATGACTTCAGGACGAGCAGGAGCGAAGTGGCAGCTACCGCA AAAATGCTGATATTACCATCATTATCCCGTATATTTGGTCCGGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAGAC GATTTTGGGGTGCCTGATCTTCCCGGTGCCGTTGATTCTGCTGGAGTTTATCCCGGAGATTGCGATCCCGGTTG TTGGTACCTTCGCGCTGGTGTCTTACATCAGCAAGAAAGGTTCTGACGGTTGAGCAGCATCGATAACGCGCTGTCG AAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTTTACAATACATTTGTTACGAATGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAGATC GACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAGCAATTTATCAACTACCAA TACAACCGATACAGGAAGAGAGAATAAAGATTAAGTTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAA TCTATCAACAAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTGATCAGTGTAGCGTTTCTACCTGATGAATAGCATG ATTCGCTATGGCGTCAAACGCTCGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGAC AATCGTGGTACGCTGAAGGCCAAGTTGACCGCTTGAAGACAAAGTTAAACAATACCTGAGCAGCCGACATCCCA TTTCAACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGCTGTTGAGCAGCTTCCACCGAGTATATCAAAAACATCATCAAT ACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCAAGCAAGTCAACATC GGTAGCAAGGTTCAATTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTGTTTAACTCGAATCGAGCAAAATTTAG GTATCCCTGAAAACCGCCATTGCTACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACAGCTTCTGGATTGCGATCCCG AAATACTTCAACAGCATTAGCCTGAACAACAGGATATACTATCACTCACTGATGGAGAACAAACAGCGGTTGGAAG GTGCTCTGAACATGGTGGATCATTGGACCTTGCAGGACACCCAAAGATCAAGCAGCGCGTCTGTTCAAG TACTCTCAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTTGACCATACGAATAACCGCTGAA TAAACGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCACGCAAGC AACAAATATGTTCAAATTTGAGCGGTTGCCGCGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAAACCTGTT GATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGATCAAGATTTGATGACAAACCAATTAACAGCGGCAATTTGAAAGGACTTC TGGGCGATTAATCTGCAATACGATAAGCCGTAATATGCTGAACCTGATGATCCGAACAAATATGTTGATGTC AATAATGTTGGTATTCGTTGATGATTTGAAAGGTCGCGGTTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTG AACTCTAGCCTGACCGTGGTACGAAATTCATATTAAGAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATTTGCGT AATAACGATCTGCTGATACATCAACGCTGGTCTGGAAGAATAAAGAGTACCGCTTGGCAGCAACGCTTCCGAGGCG GGTGTTGAGAAAATTTCTGAGCGGTTGGAGATCCCTGATGTCGGTAACTGAGCCAGTCTGGTTATGAAGAC AAGAACGACAGGGTATCACTAACAGTGAAGATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTTATT GGTTCACCAAGTTCAACAATATTGCTAACTGGTAGCAGCAATGGTAACTCGATGATTGAGCGCAGCAGC CGTACTTTGGGCTGATGCTGGGATTTATCCCGGCTGATGATGTTGGGCGAACGCTCCGCTG

Фиг. 9

(SEQ ID No. 8)

MPFVNKQFNKYDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWIVIPERDFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYDYS TYLSTDNEKDNYLKGVTKLFEIRIYSTDLGRMLLTSIVRGIPIFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSRSEELN LVIIGPSADIIQFECKSPGHEVLNLRNRYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDNPLLGAGKFPDPAVTLAHEL IHAGHRLYGIANPNRVFKVNTNAYEYMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFI DLSQENEFRLYYNKFKDIASLTNKA KSVIGTTASLQYMKNVFKEKYLLEDTSKGFVSKLFDKLYKMLTELYTEDNFVFFKVLNRRTYLNFDAKVFK INIVPKVNYTIYDGFNLNRNTLNAANFNQNTBEINNMNFTKLNFTGLFEFYKLLCVRGITSKTKSLDKYGNKAL NDLCIKVNNWDLFFSPEDNFTNLLKKEGEEITSDTNEAAEENISLDLIQYYLTFNFDNEPENISLENSSDI I GQLELMPNIERFPNGKYEYLDKYMFMHYLRAQEFPHGKSRIALTNVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVKNKATKA AMFLGWVQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIPIYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPETAI PV LGTFALVSYIAKKVLTQVTIDNALSKRNEKWEDEVYKIVTNWLAQVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINQY YNQYTEEEKNKIKFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLDFDASLKDALLKYIYD NRGTLLKGGVDRKDKVNNTLSTDIFFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSTRYASKINI GSKVNFDPIDKNQILQFNLESSKIEVILKNAIVVNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWK VSLNYGEI IWTLDQTEIKQRVVPKYSQMINISDIINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPI SNLGNIHAS NNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKLDYDNQSNIGLDFWGDYLDKPYMLNLDYDNKYVDV NNVGIRGYMYLKGPRGSMVTNIIYLNSSLYRGTKFI IKKYASGNKDNIVRNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQA GVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNNGNDIGFICGHQFNNAIKLVASNWNRYRIERS RTLGCSEWEIFVDDGWERPL

Фиг. 10

(SEQ ID No. 9)

ATGCCATTCTCAACAAGCAATTCACACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATACATCAAGATTCCG
AACGCCGGTCAAATGACGACCGGTTAAGGCTTTAAGATCCCAACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGGTGACACC
TTCAACGAACCCGGAAGAAGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAAGCAAGTCCCTGTCAGCTACTACGATTCG
ACGTACTGAGCAGCGATAACGAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTCAACGATATCTACAGC
ACGGATCTGGGTGCGATGCTGCTGACTAGCATTGTTCCGGGTATCCCGTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACC
GAACCTGAAGGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTATTCACCCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAAT
CTGGTCATCATTGGCCCGAGCCGACATATTCGAATTCGAGTGCAGAGGCTTTGGTCCAGGAGTTCTGAATCTG
ACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCAGTACATTCGTTTTTCGCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCCTG
GAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGTGCGGGCAAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATGAACCTG
ATCCACGCGAGCCACCGCTGTACGGCATTCGCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATAC
TACGAGATGAGCGGCTGGAAGTCACTTCGAAGAAGTCCGCGACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGAC
AGCTTCAAGAGAAATGAGTCCGCTGTACTACTATAACAATTCAAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACAAGGCC
AAAAGAGCTGTTGGTACTACCCGCTGTTGACGATATGAAGAAATGTTTAAAGAGAAAGTACCTGCTGTCAGAG
GATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTTGACAACTGTACAAGATGCTGACCGAGATTTACACC
GAGGACAACCTTTGAAATCTTCAAAGTGTGAATCGTAAACCTATCTGAATTTTGAACAAGCGGTTTTCAAG
ATTAACATCGTCCGCAAGGTGAACCTACACCATCTATGACGGTTTTTAACTGCGTAAACCCAACTGGCCGCGAAC
TTTAAACGGTTCAGAAATACGGAATCAACAACATGAATTTACGGAAGTTGAAGAAGTTCACGGGCTGTTCCGATTC
TATAAGCTGCTGTGCTGCGCGGTATCATCACCAGCAAAACAAAAGCTGGACAAAAGCTTACAACAAGGCGCTG
AATGACCTGTGCATTAAAGTAAACAAATTTGGATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAGGATAAATTTACCAACGACCTG
AACAAAGGGTGAAGAAATCACAGCGATACGAATATGAAGCAGCGGAAGAGAAATATCAGCCTGGATCTGATCCAG
CACTACTATCTGACCTTTAATCTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATTTGAGAATCTGAGCAGCCGACATATC
GGTCAGCTGGAACTGATGCCAAATATCGAACGTTTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATG
TTCCATTACCTGCGTGCACAGGAGTTTGAACACCGTAAAGCCGATTCGCGCTGACCAACAGCGTTTGAACAAGGC
CTGCTGAAACCGAGCGGTGTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAGCCACTGAGGGCC
CGGATGTTCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTACGGCAGGACGAGCGAAGTGAGCACTACCCGAC
AAAATGCTGATATACCATCATTTACCCGATATTTGGTCCGGCTGAAACATGGCAACATGCTGTACAAAAGAC
GATTTTGGGGTGGCTGATCTTCTCCGCTGCGGTGATTTCTGCTGGAGTTTCCCGGAGATTGCGATCCCGAaG
TTGGGTACCTTCGGCTGGTTCCTACAAGCGAATAAGGTTCTGACGGTTCAGACCATCGATAACCGCGCTGTCG
AAACGTAATGAAAATGGGACGAGGTTTACAATATACATTTGACGAATTTGGTGGCGAAAAGTCAATACCCAGATC
GACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGCGCTGGAGAATCAGCGGAGGCCACCAAGCAATTTAACAATACCAA
TACAACCGTACAAAGGAAAGAGAGAATAACATTAACCTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGATGAA
TCTATCAACAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTTCTGACCTGATGAATAGCATG
ATTCGCTATGGCGTCAACCGTCTGGAGGACTTCGACGCGCAGCTGAAAGATGCGTTGCTGAAAATACATTTACGAC
AATCGTGGTACCGTATTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTGTTTAACTGGAATTCGAGCAAAATTTGAG
GTTATCTGAAAACGCCATTGCTACAACCTCCATGACGAGAAATTTCCACCAGCTTCTGGATTCCGATCCCG
AAATACTTCAACAGCATAGCCTGAACAACGAGTATACATCATCAACTGTATGGAGAACAAACAGCGGTTGGAAG
GTCTCTGAACTATGGTGAATCATTTGGACCTTGCAGGACACCCAAGAGATCAAGCAGCGCTGTTGTTCAAG
TACTCTCAATGATCAACATTTCCGATACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGCTGGAAT
AACAGCAAGATTTACATCAATGGTGGCTTGCATGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCACCGCAAGC
AACAAACATATGTTCAAATTTGACCGGTTGCGCGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTT
GATAAAGACTGAAATGAGAAGGAGATCAAGATTTGATGACAACCAATCAACAGCGGCTTTTGAAGGACTTC
TGCGGCGATTATCTGCAATACGATAAGCCGCTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAAACAAATATGTTGGATTC
AATAATGTTGGTATCTGGTTACATGATTTTGAAGGTTCCGCTGGCAGCTTATGACGACCAACATTTACCTG
AACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCGAGCGGCAACAAAGATAACATTTGCGCT
AATAACGATCTGCTACATCAACGTTGGTGGTGAAGAATAAAGAGTACCGCTGGCGACCAACCGCTTCGAGGGC
GGTGTGAGAAAATTTGAGCGGCTGGAGATCCCTGATGTCGGTAATCTGAGCAAGTCTGGGTTATGAAGAGC
AAGAACGACCGGGTATCACTAACAGTCAAGATGAACCTGCAAGCAACAATGGTAACGACATCGGCTTTATTT
GGTTCCACAGTTCAACAATTTGCTAACTGGTAGCGAGCAATTTGGTACAATCTCAGATTTGAGCGCAGCAGC
CGTACTTTGGGCTGATGCTGGAGTTTTTCCCGGTCGATGATGGTGGGGCGAACGCTCCGCTG

Фиг. 11

(SEQ ID No. 10)

MPFVNKQFNKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNNKIWIIPERDFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYDYS
TYLSTDNEKDNLYKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPIFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGYSRSEELN
LVIIGPSADIIQFECKSPFGEVHLNLRNGYGSTQYIRFSPDFTGFEEBLEVDNPLLGAGKGFATDPAVTLAHEL
IHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYEYMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIIDSLQENEFRLYYNKFKDIASLTNKA
KSIVGTASLQYMKNVFKKYLLESDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFKVNLNRKTYLNFDRKAVFK
INIVPKVNYTIDYDFNLNRNTNLAANFNQNTIEINNMNFTKLNFTGLFEPYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKAL
NDLCLIKVNNWDLFFSPEDNFTNDLNKGEIITSDTNI EAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISLENLSSDI
GQLELMPNIEFPNGKYELEDKTYTMFHYLRAQEFEBHKSRIALTNVNEALLKPSRVYTFPSSDYVKKVNAETEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIPIYIGPALNIGNMLYKDDFVVALIFSGAVILLEFIPETAI
LGTALVSYKANKVLTVQTDNALSKRNEKWEVYKIVTNWLAKVNTQIDILIRKKMKEALENQAETKAIINQY
YNQYKEKEKNINIFNIDDLSSKLNESINKAMININIKFLNQCSVSYLNMNMTPIYGVKRLDFDASLKDALLKYIYD
NRGTLIGQVDRDKDKVNNLSTDIIPQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLRYASKINI
GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTTIINCMMNSGWK
VSLNYGEIITWLDQDTQEIQRVVFYKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPIISNLGNIHAS
NNIMFKLDGCRDTHRYIWIYFNFLDKELNEKIKDLYDNQSNISGILKDFWGDYLYQDKPYMLNLYDNPKYVDV
NNVGIIRGYMYLKGPRGSMVTNIIYLNLSLYRGTFFIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQA
GVEKILSALEIPDVGNLSQVVMKSKNDQGITNCKMNLQDNNNGNDIGFIGFHQFNNAIKLVASNNWYNRQIERSS
RTLGCSEWEPFVDDGWGERPL

Фиг. 12

(SEQ ID No. 11)

ATGAAAATCGAAGAAGGTAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCTATAACGGTCTCGCTGAAAGTCCGGT
AAGAAATTCGAGAAAGATACCCGAATTAAGTCAACCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAAAATCCCCACAG
GTTGCGGCAACTGGCGATGGCCCTGACATTAATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGC
CTGTGGCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTCCAGGACAAAGCTGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTAC
AACGGCAAGCTGATGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAAGATCTGGTGGCGAAC
CCGCCAAAACCTGGGAAGAGATCCCGCGCTGGATAAAGAACTGAAAGCGAAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTTT
AACCTGCAAGAACCGTACTTACCTGGCCGCTGATGCTGCTGACGGGGTTATGCTTCAAGTATGAAAACGGC
AATACGACATTAAGACGTTGGCGTGGATAACGCTGGCGGAAAGCGGGTCTGACCTTCTGGTTGACCTGATT
AAAAACAAACACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCCGAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATG
ACCATCAACGGCCCGTGGGCATGGTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGAATTAATGGTGTACCGTACTGCCGACC
TTCAAGGGTCAACCATCAAACCGTTCGTTGGCGTGTGAGCGCAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAAGAG
CTGGCAAAAAGAGTTCCTCGAAAACATCTGCTGACTGATGAAGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTG
GGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGCGAAAAGATCCACGTATTGCCGCCACTATGGAAAACGCC
CAGAAAAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCGCTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAAC
GCCGCCAGCGGTGCTCAGACTGTCGATGAAGCCCTGAAAGACGGCGACAGCTAATTCGAGCTCGAACAAACAAAC
AATAACAATAACAACAACCTCGGGATCGAGGGAAGGATTTGAGAATTCGGATCCATGCCAAAATCAACAGCTTT
AATTACAATGACCCCTGAAACGATCGTACCATCCCTATACATAAAGCCGGGTGGGTGTCACAGATTTACAAAATCT
TTCAATATTAAGAAATATATGGATTAATCACTGAGCGTAACGTTATTGGTACGACACCCGCAAGATTTTCATCCA
CCTACTTCTGTTGAAGAACCGTGACTCTTCTTATTACGACCCCAATTAATCTCCAGTCCGATGAAGAGAGACAGA
TTCCCTTAAAATAGTAACAAAATCTTTAACAGGATTAATAACAATCTATCCGGAGGTATTTTGCTTGAAGAGCTT
AGTAAAGCTAATCCTTACCTAGGTAAACGATAATACACAGACAAAGTTTCAATATAGGGGATGCATCCGCCCTG
GAAATCAATTTAGCAAGGATCACAGCATATTTCTTGGCCACGTTATTATAATGGGGCGGAACAGATTTA
TTTGAACAATTCGAGTAAATATTAGCCTGAGAAATAACTATATGCCGTCAAACCATGGGTTCCGGTAGCATAGCG
ATCGTTACTTTTCTCCCGAATACAGTTTTCGCTTCAATGATAATAGTATAAATGAGTTTATCCAAGACCCCGCA
CTCACGCTTATGCACGAACCTCATACACTCTTACACGGCCTGATGGCGCTAAGGGGATAACCACTACGTGTATC
ATTAATCAGCAAAAGAACCCATTGATAACGAACAGGAAGGGCATTAAACATCGAGGAATTTCTTACATTTGGAGGC
AACGATCTGAACATTATAACTGTCGCACAGTACAATGACATCTATACCAACTTACTAAATGATTATAGAAAAATC
GCTTCTAAGTTATCCAAGGTTCAAGTCTCAAACCTCAACTGAATCCGTATAAGGACATATTTCCAAGAGAAATAT
GGATTAGACAAAGACCGCTCAGGAATCTATTCGGTAAACATTAACAAATTCGACGATATTTGAAAGAACTTTAC
AGCTTCACGGAGTTCGACTTGGCCACCAAATTCAGGTCAAATGCCGAGACATACATCGGACAGTATAAGTAT
TTCAAGCTGTGCAATCTCCTGAATGATCCATATACAACATTAAGTGGGGTTACAATATAAATAACCTAAAGGTG
AATTTCCGAGGCCAAAACGCCAACCTAAATCCGCGCATCATTAACCCATCACAGGACGGGGTTAGTGAAGAAA
ATAATCCGGTTTCCGGTCGACAAGCTTGGCGCCGCACTGAGCACCACCACCACCAC

Фиг. 13

(SEQ ID No. 12)

MKIEEGKLVIIWINGDKYNGLAIEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEFQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQS
LLAEITPDKAFQDKLYPFTWDVAVRNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPKTWEEIIPALDKELKAKGKSALMF
NLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENKDYDIKDVGVNDNAGAKAGLTFVLVDLIKXKHMNADTDYSIAEAAAFNKGETAM
TINGPWAWSNIDTSKVNNGVTVLPFTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPL
GAVALKSYEEELAKDPRIAAATMENAQKGEIMPNIPOMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSSNNNN
NNNNNLGIEGRISEFGSMPKINSFNNDPVNDRTILYIKPGGCQEFYKSNIMKNIWIIPERNVIGTTPQDFHP
PTSLKNGDSSYYDPNYLQSDIEKDRFLKIVTKIFNRIINNLSGGILLLEELSKANPYLGNNDTPDNKPHIGDASAV
EIKFSKGSQHILLPNVIIMGAEPDLFETNSNINSLRNNYMPNSNHGFGSIAIVTFSPEYSFRFDNSINEFIQDPA
LTMHELIIHSLHGLYGARGITTTCTIITQQNPLITNRKINIEEFLTFGGNDLNIITVAQYNDIYTNLLNDYRKI
ASKLSKVQVSNPQLNPKYDIFQEKYGLDKDASGIYSVNINKFDDILLKLYSFTFEDLATKFQVKCRETYIGQYKY
FKLSNLLNDSIYINISEGYNINNLKVNFRQNANLNPRIKPKITGRGLVKKIIIRFAVDKLAALAEHHHHHH

Фиг. 14

(SEQ ID No. 13)

ATGCCATTTCGTCACCAAGCAATTCAACTACAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATACATCAAGATTCCG
AACGCCGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTAAGATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACC
TTCACGAACCCGGGAAGAGCGGATCTGAACCCGCCAGCGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTACGCTACTACGATTCG
ACGTACTCTGAGCAGCGATAACGAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTGAAAGCTATCTACAGC
ACGGATCTGGTTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGTTCCGGGTATCCCGTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACC
GAACCTGAAGTTATCGACACTAACTGCATTAACGTTATCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAAT
CTGGTCATCATTGCCCGAGCGCAGACATTAATCCAATTCGAGTGAAGAGCTTTGGTACAGAGGTTCTGAATCTG
ACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTCGTTTTCCGGGATTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTG
GAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCGGGCAAAATTCGTACCCGATCCGGCTGTCACGCTGGCCCATGAAC
ATCCACGCGAGCCACCGCTGTACCGCATTCACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAAATGCATAC
TACGAGATGAGCGCCCTGGAAGTCAGCTTCGAAGAAGTGGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGAC
AGCTTGCAAGAGAATGAGTTCGCTGTACTACTATAACAATTCAAAGACATTCGAAGCAGCTTGAACAGGGCC
AAAAGCATCGTTGGTACTACCGCTGCTGACGATATGAAGAAATGTTTAAAGAGAAGTACCTGCTGTCGAG
GATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAAACTGTACAAGATGCTGACCCGAGATTTACACC
GAGGACAACCTTTGAAATCTTCAAAGTGTGAATCGTAAACCTATCTGAATTTGACAAAGCGGTTTTCAAG
ATTAACATCGTCCGAGGTAACACCATCTATGACGTTTTAACTCGCTAACACCACTGGCCGGCAAC
TTAACGGTCAAGATACGGAATCAACACATGAATTTACGAAAGTTGAAGAACTTACGGGCTGTCTCGAGTT
TATAAGCTGCTGTGCGTGGCGGTATCTACACAGCAAAACCAAAGCTGGACAAGGCTACAACAAGCGCTG
AATGACCTGTGCATTAAGGTAACAATTTGGATCTGTTCTTTCCGCATCCGAAGATAATTTTACCAACGACCTG
AACAAAGGGTGAAGAAATCACCGGATACGAATATTGAAGCAGCGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAG
CAGTACTATCTGACCTTTAATTCGACATGAACCGGAGAACATTAGCATTTGAGAATCTGAGCAGCGACATTATC
GGTCAGCTGGAATGATGCCAATATCGAACGTTTTCCGAAACGGCAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATG
TTCATTAACCTGCTGTCACAGGAGTTTGAACACCGTAAAGCCGTTACCGCTGACCAACAGCTTAAACGAGCC
CTGCTGAACCCGAGCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAGCCACTGAGGCC
CGGATGTTCCCTGGCTGGTGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGAGACGAGCAAGTGAACACTACCGAC
AAAATTCGTGATATTACCATTATCCGTTATTTGGTCCGGCATGAAACATGGCAACATGCTGTACAAGAGAC
GATTTTGTGGGTGCCTGATCTTCCCGTGGCGTATTCTGCTGGAGTTTACCTCCGGAGATTGCGATCCCGGTT
TTGGGTACCTTCGCGTGGTGTCTTACATCGCGAATAAGGTTCTGACGGTTCAGACCATCGATAACCGCTGTG
AAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTTTACAATACATTTGTTACGAATTTGGTGGCAAGTCAATACCCAGATC
GACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGCGCTGGAGAATCAGCGGAGGCCACCAAGCAATTTCAACTACCAA
TACAACCGATACACGGAAGAGAAGATAACATTAACCTTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAA
TCTATACAACAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTTCTGACCTGATGAATAGCATG
ATTCCGATGGCGTCAAACGCTTGGAGGACTTCGACGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGAC
AATCGTGGTACGCTGATTTGGCCAAAGTTGACCGCTTGAAGACAAAGTTAAACAATACCCTGAGCACCACATCCCA
TTCAACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGCTGTTGAGCACTTTACCAGGATATATCAAAAACATCATCAAT
ACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCAAGCAAGTCAACATC
GGTAGCAAGGTCATTTTACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTGTTTAACTCGAATCGAGCAAAATTTGAG
GTTATCCTGAAAACGCCATTGCTTACAACCTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTGCGATCCCG
AAACTCTCAACAGCATTAGCCTGAACAACGAGTATACATCATCAACTGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAG
GTGCTCTGAACATATGGTGAAGATCATTTTGGACCTTTCAGGACACCCAAAGAGATCAAGCAGCGCTGTGTTCAAG
TACTCTCAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAATCGTTGGATCTTCTGACCATACGAAATACCGCTGAAT
AACGCAAGATTTACATCAATGGTGCCTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCAGCGAAGC
AACACGATATGTTCAAATTTGACCGGTTGCCGCGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAAACGTTT
GATAAAGAAGTGAATGAGAAGGAGATCAAGATTTGATGACAAACCAATCTAACAGCGGCTTTTGAAGGACTTC
TGGGGCGATTACTCGCAATACGATAAGCCGCTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAAACAAATGTGGATGTC
AATAATGTTGGTATTCTGTTGATGATTTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTG
AACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATTTGCGCT
AATAACGATCGTGTCTACATCAACGTTGGTCTGGAAGAATAAAGAGTACCCTGCTGGCGACCAACCGTTGCGAGCG
GGTGTGAGAAAATCTGAGCGGTTGGAGATCCCTGATGTCGGTAATCTGAGCCAGTCTGGTTATGAGAGC
AAGAAGCAGCCAGGGTATCACTAACAGTGAAGATGAACCTGCAAGACAAACAAATGGTAACGACATCGGCTTTATT
GGTTCCACAGTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGGAGCAATTTGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGC
CGTACTTTGGCTGTAGCTGGGATTTATCCCGGTCGATGATGGTGGGGCGAACGCTCCGCTG

Фиг. 15

(SEQ ID No. 14)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWVPERDFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYDYS
TYLSTDNKDNYLKGVTKLFBRIYSTDLGRMLLTSIVRGIFFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSGYRSEELN
LVIIGPSADIIQFECKSFGEVHLNLRNRYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDNPLLGAGKFPATDPAVTLAHEL
IHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYEMSGLEVSFEELRTPGGHDAKFI DLSQENEFRLYYNKFKDIASTLNKA
KSI VGTASLQYMKNVFKEKYLLESDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFK
INIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNQNTBINNMNFTKLNFTGLFEPYKLLCVRGIITSKTKSLDRKYNKAL
NDLCIKVNNWDLFFSPEDNFTNDLNKGBEITSDTNI EAAEENI SLDLIQYYLTFNFDNEPENIS IENLSSDI
GQLELMPNIE RFPNGKYE LDKYTMFHYLRAQEF EHGKSR IALTNVNEALLNPSRVYTFSSDYVKVKNKATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIPIYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIP EIAIPV
LGFALVSYIANKVLTVQTDINALSKRNEKWDEVYKIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQ
YNYQTEEBEKNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMSMI PYGVKRL EDFDASLKDALLKYIYD
NRGTLIGQVDRKDKVNNLSTDI PFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDL SRYASKINI
GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTINC MENNSGWK
VSLNYGEI IWTQDTEI KQRVVFYKYSQMINISDYINRWI FVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPI SNLGNIHAS
NNIMFKLDGCRDTHRYIWKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNSGILKDFWGDYLYDKPYMLNLYDPNKYVDV
NNVDIRGYMYLKGPRGSMVTNIYLNSSLYRGTKEFKKYASGNKDNIVRNDRVYINVVKNKE YRLATNASQA
GVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIPGHQFNNAKLVASNNWYNRQIERS
RTIGCSWEFIPVDDGWGERPL

Фиг. 16

(SEQ ID No. 17)

ATGCCATTTCGTCACCAAGCAATTCACACTACAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATACATCAAGATTCGG
AACGGCCGTTCAAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAAGTCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACC
TTCACGAACCCGGAAGAAGGGGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTACGCTACTACGATTCG
ACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTGGAACGTATCTACAGC
ACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGTTCCGGGTATCCCGTCTGGGGTGGTAGCACCATTGACACC
GAACTGAAGGTTATCGACACTAAGTGCATTAACGTTATTCACCCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAAT
CTGGTCATCATTGGCCGAGCGCAGACATTATCCAATTCGAGTCAAGAGCTTTGGTCCAGGAGTTCTGAATCTG
ACCCGCAATGGCTATGTTAGCACCAGTACATTCGTTTTTCGGCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCGCTG
GAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTACGCTGGCCATGAACTG
ATCCACGCGAGGCCACCGCTGTACGGCATTCGCATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATAC
TACGAGATGAGCGGCCGGAAGTCAAGTTCGAAGAAGTGGCAGCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGAC
AGCTTGAAGAGAATGAGTTCGCTGTACTACTATAACAATTCAAAGACATTGCAAGCAGCTTGAACAAGGCC
AAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGCTGTGAGTATATGAAGAATGTGTTTAAAGAGAAGTACCTGCTGTCCGAG
GATACCTCCGGCAAGTTTACGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAACTGTACaAGATGCTGACCGAGATTTACACC
GAGGACAACCTTTGTAAATTCCTCAAAGTGTGAACTGTAAAACCTATCTGAATTTTGAACAAGCGGTTTTCAAG
ATTAACATCGTCCGAAAGGTGAACATACACCTATATGACGGTTTTAACCTGCGTAAACCAACCTGGCCGCGAAC
TTTAAACCGTCAAGAAATACGGAATCAACAACATGAATTCACGAAGTTGAAGAACTTACCGGCTGTCTCGAGTTC
TATAAGCTGCTGTGCGTGGCGGTATCATCACAGCAAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGTTACAACAAGCGCTG
AATGACCTGTGCATTAAGGTAACAATTTGGGATCTGTTCTTTCCGCATCCGAAGATAATTTTACCAACGACCTG
AACAAAGGTGAAGAATCACCAGCATACCAATTTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATGATCCAG
CAGTACTATCTGACCTTAACTTCGACAAATGAACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATTTATC
GGTCAGCTGGAATGATGCCAATATCGAAGCTTTCCGAAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATG
TTCATTTACCTCGGTGCACAGGAGTTTGAACACGGTAAAAGCCGATTCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCC
CTGCTGAAACCGAGCGGTGTCTATACCTTCTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAGGCCACTGAGGCC
CGGATGTTCCCTGGGCTGGTGGAAAGCTGTTATGACTTACGGAGCAGACGAGCGAAGTGAACGCTGAGCAGC
AAAATGCTGATATTACCATCATTATCCCGTATATTTGGTCCGGCACTGAACATTGGCAACATGCTGTACAAGAC
GATTTTGTGGTGCCTGATCTTCCCGGTGCCGTGATTTGCTGGAGTTCATTCCGGGATTCGATGATCCCGCTG
TTGGTACCTTCGCGTGTGCTTACATCGCAATAAGGTTCTGACGGTTCAGACCATCGATAACCGCTGTGCG
AAACGTAATGAAAAATGGACGAGGTTTACAATACATTTGTTACGAATGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAGATC
GACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGCGCTGGAGAATCAGCGGAGGCCACCAAGCAATATCAACTACCAA
TACAACCGATACCGAAGAAGAGAAGAAATAACATTAACCTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAA
TCTATCAACAAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTGATCAGTGTAGCGTTTCGTAACCTGATGAATAGCATG
ATTCGCTATGGCGTCAAACGCTCGGAGGACTTCGACCGCCAGCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGAC
AaTCGTGTTACGCTGATTGGCCAAAGTTGACCGCTTGAAGAGCAAAGTTAACAATACCCTGAGCAGCGACATCCCA
TTTCAACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGCTGTTGAGCAGCTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATCAAT
ACTAGCATTCTGAACCTCGCTTACGAGAGCAATCATCTGATGATCTGAGCCGTTATGCTAGCAAGATCAACATC
GGTAGCAAGGTTCAATTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTGTTTAACTGGAATCGAGCAAAAATTTAG
GTTATCCTGAAAAGGCCATTGTCTACAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTCCGATCCCG
AAATACTTCAAGAAAGATTAGCCTGAACAACCGATATACTATCAACTGATGGAGAAACAACAGCGGTTGGAAG
GTGCTCTGAACTATGGTGAATCATTGACCTTGCAGGACACCAAGAGATCAAGCAGCGCTGCTGTTCAAG
TACTCTAAATGATCAACATTTCCGATTAATATCGTTGGATCTTCGTTGACATTACGAATAACCGCTGAAAT
AAGAGCAAGATTACATCAATGGTCCGTTGATCGATCAGAACCAGATTAGCAACCTGGGTAATATCCACCGAAGC
AACAAGATTATGTTCAAATGGACGGTTGCCGCGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTT
GATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGATCAAGATTTGTATGACAACCAATTAACAGCGGCAATTTGAAGGACTTC
TGGGCGATTAATCTGAATACGATAAGCCGTAATATGCTGAACCTGATGATCCGAAACAATATGATGATGCTC
AATAATGTTGGTATTCTGGTACATGATTTGAAGGTTCCGCTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTG
AACTTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAGATAACATTTGTCGGT
AATAACGATCGTGTCTACATCAACCTGGTCCGTGAAGAATAAAGAGTACCGCTTGGCGACCAACCGCTGAGC
GGTGTGAGAAAATTTCTGAGCGGTTGGAGATCCCTGATGTCGGTAATCTGAGCCAAGTCTGGTATGAAAGAC
AAGAACGACAAGGTTACTAACAAGTGAAGATGAACCTGCAAGACAACAATGGAACGACATCGGCTTTATT
GCTTCCACAGTTCAACAATATTGCTAAACTGTTAGCAGCAATTTGTTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGC
CGTACTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGCTGATGATGGTTGGGGCAACGCTCCGCTG

Фиг. 19

(SEQ ID No. 18)

MPPFVNKQFNKDPVNGVDIAIYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIHWIIPERDFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYDYS
TYLSTDNEKNYKGVTKLPERIYSTDLGRMLLTSIVRGI PFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQDPDGSYRSEELN
LVIIGPSADI IQFECKSFGHEVLNLTNRNGYSTQYIRFSPDFTPGFEESLEVDNPNLLGAGKFATDPVTLAHEL
IHAGHRLYGIATPNRNVFKVNTNAYEYMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFI DLSQENEFRLYYNFKFDIASTLNKA
KSI VGTASLQYMKNVFKEKYLSEDTSGKFSVDKLFKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDPKAVFK
INIVPKVNYTYDGFNLNRNTLNAANFNGQNT EINNMF TKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDRGYNKAL
NDLICIKVNNWDLFFSPEDNFTNDLNKGEIITSDTNI EAAEENI SLDLIQYYLTFNFDNEPENIS IENLSSDI
GQLELMPNIERFPNGKYEYLDKTYMFIHLRAQEFHGRSRIALTSNVNEALLNPSRVYTFSSDYKVKVNKATEA
AMPLGWVEQLVYDFDTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAPV
LGT FALVSYIANKVLTVQTDNALS KRNEKWDDEVYKIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAI NYQ
YNYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQC SVSYLMSMIPYGVKRLDFDASLKDALLKYIYD
NRGT LIGQVDR LKDKVNNLTSDI PFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINI
GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKKAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFKKISLNNEYTINC MENSSGWK
VSLNYGEBI IWTLDQTK EIKQRVVFKYSQMINISDYINRWI PVTITNNRLNKS KIIYINGRLIDQKPI SNLGNIHAS
NKIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQNSGILKDFWGDYLYQYDKPYMLNLYDPNKYVDV
NNVGIRGYMYLKGPRGSMVTNI YLNSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQA
GVEKILSALEIPDVGNLSQVVMKSKNDKGITNKCKMNLQDNNNGNDIGFIFGHQFNIIAKLVASNNWYNRQIERSS
RTLGSWEFIPVDDGWGERPL

Фиг. 20

(SEQ ID No. 19)

ATGCCATTTCGTAACAAGCAATTCACACTACAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATACATCAAGATTCCG
AACCGCGGTCAAAATCGACCCGGTTAAGGCTTTAAGATCCACAACAAGATTGGGTTATCCCGGAGCGGTGACACC
TTCACGAAACCCGGAAGAAGCGCATGTGAACCCGCCACCGGAAGCGGAAGCAAGTCCCTGTACAGTACTACGATTCG
ACGTACCTGAGCACGGATAACGAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTCGAACGTATCTACACC
ACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGTTCCGGGTATCCCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACC
GAACCTGAAGGTTATCGACACTAAGTGCATTAACTGTTTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGCTGAAAT
CTGGTCATCATTGGCCGAGCGACAGCATTTCCAAATTCGAGTGCAGAGGCTTTGGTCCAGGAGTTCTGAATCTG
ACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCAGTACATTCGTTTTCCCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCCTG
GAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGGTGCGGGCAAAATTCGCTACCGATCCCGCTGTCACGCTGGCCATGAACTG
ATCCACGCGAGCCACCGCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATAC
TAGCAGATGAGCGGCTGGAAAGTACGCTTCGAAGAATTCGCGACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGAC
AGCTTGCAGAAGATGAGTTCCTGCTGTACTACTATAACAATTCAAAGACATTGCAAGCAGCTTGAACAAGGCC
AAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCTGCTGACGATATGAAGAATGTGTTTAAAGAGAAGTACCTGCTGTCGAG
GATACCTCCGGCAAGTTTACGTTGATAAGCTGAAGTTTGAACAATTCGCAAAATGTACAAGTGTGACCCGAGATTTACACC
GAGGACAACCTTGTGAAATTCCTCAAAGTGTGAATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGAACAAGCGGTTTTCAAG
ATTAACATCGTCCGAAAGGTGAACACTACACCATCTATGACGTTTTTAACTTCGCTAACCCAACTGGCGGGCAAC
TTTAAACGGTCAGAAATACGGAATCAACAACATGAATTTACGAGGTTGAAGAACTTCACGGGCTGCTGATTCGAGTTC
TATAAGCTGCTGTCGCTGCGCGGTATCATCACCAGCAAAACCAAAGCTGGCAAAAGGCTACAACAAGCGGCTG
AATGACCTGTGCATTAAGGTAACAATTTGGGATCTGTTCTTTCCGCTCCGGAAGATAATTTTACCACGACCTG
AACAAAGGTGAAGAATACACGCGATACGAATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAG
CAGTACTATCTGACCTTAACTTCGCAATGAACCGGAGAACATTAGCATTTGAGAATCTGAGCAGCGACATTATC
GGTCAGCTGGAATGATGCCAATATCGAACGTTTTCCCGAACCGCAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACTACTATG
TTCATTTACCTGCTGTCACAGGAGTTTGAACACCGTAAAAGCCGATTCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCC
CTGCTGAACCCGAGCGGTGCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAGCCACTGAGGCC
CGGATGTTCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGAGACGAGCGAAGTGAAGTACTACCGAC
AAAATGCTGATTAACCATCAATTTACCGGATATTTGGTCCGGCATGAACATTGGCAACATGCTGTACAAGAAGC
GATTTTGTGGTGCCTGATCTTCCCGGTGCGGTGATTTCTGCTGGAGTTCATTCGGGAGATTGCGATCCCGGTTG
TTGGTACTTTCGCGCTGGTTCCTACATCGCAATAAGGTTCTGACGGTTCAGACCATCGATAACCGCTGCTCG
AAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTTTACAATAACATTTGTTACGAATTTGGTGGCAAAAGTCAATACCCAGATC
GACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGCGCTGGAGAATCAGCGGGAGGCCACCAAGCAATTTAACAACCAAA
TACAACCGATACCGGAAGAGAAGAATAACATTAACCTTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAA
TCTATCAACAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTTCTGACCTGATGAATAGCATG
ATTCGATGGCGTCAAACGCTTCGGAGGACTTCGACCGCCAGCTGAAAGATGCGTGTGCTGAAATACATTTACGAC
AATCTGGTACCTGATTTGGCAAGTTGACCGCTTGAAGAGCAAGTTAAACAATACCCTGAGCACCAGATCCCA
TTTTCAACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGCTGTGTGAGCATTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATCAAT
ACTAGCATCTGAACTCGCTTACGAGAGCAATCATCTGATTTGATCTGAGCCGTTATGCTAGCAAGTAAACATC
GGTAGCAAGGTTCAATTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTGTTTAACTCGGAATCGAGCAAAATTTGAG
GTTATCCTGAAAAAGCCATTGCTACAACCTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTCCGATCCCG
AAACTACTCAACAAGATTAGCCTGAACAACAGGATATACTATCAACTGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAG
GTGCTCTGAACTATGGTGAAGATCAATTTGGACCTTCGAGGACACCAAGAGATCAAGCAGCGCGCTGCTGTTCAA
TACTCTCAAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAATCGTTGGATCTTCTGACCATACGAAATACCGCTGGAAG
AAGAGCAAGATTACATCAATGGTGCCTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCACGCAAGC
AACAGATATGTTCAAATTTGAGCGGTTGCGCGGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTT
GATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGATCAAAGATTTGATGACAACCAATTAACAGCGGCATTTTGAAGGACTTC
TGGGGCGATTATCTGCAATACGATAAGCCGCTACTATATGCTGAACTGTATGATCCGAACAATATGTTGGATGTC
AATAATGTTGGGTTATTCGTTGTTACATGATTTTGAAGGCTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTG
AACTCTAGCCTGACCGGTGACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAGATAACATTTGTCGCT
AATAACGATCGTGTCTACATCAACCTGGTGGTGAAGAATAAAGAGTACCGTTCGGCGACCAACGCTTCGACGGC
GGTGTGAGAAAATTTGAGCGCGTTGGAGATCCCTGATGTCGGTAACTGAGCCAAGTCTGGTTATGAAGAGC
AAGAACGCAAGGGTATCACTAACAGTGAAGATGAACCTGCAAGCAACAATGGTAACGACATCCGCTTTATTT
GGTTCCACAGTTCACAATATTTGCTAACTGGTAGCGGCAATTTGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGC
CGTACTTTGGGCTGAGCTGGGAGTTTATCCCGGTCGATGATGTTGGGGCAACGCTCCGCTG

Фиг. 21

(SEQ ID No. 20)

MPPVFNKQFNKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMFPVKAFKIHNKIWVI PERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYDYS
TYLSTDNEKDNLYLKVTKLPERIYSTDLGRMLLTSIVRGI PFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGYSRSEBLN
LVIIGSPADIIQFECKSPFGEVNLNLRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEEBLEVDNPLLGAGKATDPAVTLAHL
IHAGHRLYGLAINPNRVFKVNTNAYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFI DSQLQENEFRLYYNPKFKDIASLTKA
KSI VGTASLQYMKNVFKEKYLSEDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFVLRNRTYLNFDKAVFK
INIVPKVNYTIYDGFNLRNNTLANFNGQNTENINMNFTKLKNFTGLFEPYKLLCVRGITTSKTKSLDKGYNKAL
NDLCIKVNNWDLFFSPEDNFTNDLNKGEIITSDTNEAAEENISLDLIQYYLTNFDNEPENISINENLSSDI
GQLELMFNIERFPNGKYEYLDKTYTMFHYLRAQEFHKGSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVVKVKNKATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSVSTTKIADITIIIPYIGPALNINMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPPIAIPV
LGTFAVLSYIANKVLTVQTDINALSKRNEKWEDEVYKIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQ
YNQYEEKEKNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKREDFDASLKDALLKYIYD
NRGTLIGQVDRDKDKVNNLTSTDI PFLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLRSYASKINI
GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKKAIVNSMYENFSTSFWIRIPKYFNKISLNNEYTIINCMENNSGWK
VSLNYGEI IWTLQDTEIKQRVVFYKYSQMINISDYINRWIVFTITNNRLKSKIIYINGRLIDQKPI SNLGNIHAS
NKIMFKLDGCRDTHRYIWI KYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNIGLKFWDYQYDKFYMLNLYDPNKYVDV
NNVIGRYMYLKGPRGSMVTNIYLNSSLYRGTKFIKIKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVKNKEYRLATNASQA
GVEKILSALPIPDVGNLSQVVMKSKNDKIGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGPHQFNIAKLVASNWNRYQIERS
RTLGCSEWEPVDDGWGERPL

Фиг. 22

(SEQ ID No. 21)

ATGCCATTGTCACCAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATACATCAAGATTCCG AACCCGGTCAATGACGACCGGTTAAGGCTTTAAGATCCCAACAAAGATTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACC TTACGAACCCCGGAAGAGCGGATCTGAACCCGACCCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTGACGACTACGATTCG ACGTACTGAGCAGGATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTTGACCAAGCTGTTGCAACGATATCTACAGC ACGGATCTGGGTCGCATGCTGCTGACTAGCATTGTTCCGGGTATCCCGTTCGGGGTGGTAGCAGGATTGACACC GAACGAAAGGTTATCGACACTAATGTCATTAACGTTATTCACCCGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAAT CTGGTCACTATGGCCCGAGCCGACATATCCCAATTGAGTGAAGAGCTTTGGTACCAGGTTCTGAATCTG ACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCAGTACATTCGTTTTCCGCCGATTTTACCCTCGGCTTTGAAGAGAGCCTG GAGGTTGATACCAATCCGTTGCTGGTGGCGGCAAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTACGCTGGCCCATGAACTG ATCCACGCGAGCCACCGCTGTACGGCATTCGCAATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATAC TACGAGATGAGCGCCCTGGAAGTCAGCTTCGAAGAATGCGCACCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGAC AGCTTGAAGAGAATGAGTTCGGCTGTACTACTATAACAAATTCAAAGACATTGCAAGCACGTTGAACAAGGCC AAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAAATGTTTAAAGAGAAGTACCTGCTGTCCGAG GATACCTCCGGCAAGTTAGCGTTGATAAGCTGAAAGTTGACAAACTGTACAAGATGCTGACCCGAAATTTACACC GAGGACAACCTTTGTGAAATCTTCAAaGTGTTGAATCGTAAAACCTATCTGAATTTTGACAAAAGCGGTTTTCaAG ATTAACATCGTCCGAGGTTGAACACTACCATCTATGACGGTTTTAACTGCGTAAACCCAACTGGCGGCGAACT TTTAACGGTCAAGATAACGAAATCAACAACATGAATTTACGAAAGTTGAAGAATTCACGGGCTGTGTTGCGATTC TATAAGCTGCTGTCGTCGCGGTATCATCACAGCAAAACCAAAAGCTGGACAAAGGCTACAACAAGGCGCTG AATGACCTGTGCATTAAAGTAAACAAATGGGATCTGTTCTTTTCGCCATCCGGAAGATAATTTTACCAACGACCTG AACAAAGGTTGAAGAAATCACCGGATACGAATATGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAG CAGTACTATCTGACCTTTAACTTCGCAATGAACCGGAGAACATTAGCATTTGAGAATCTGAGCAGCGACATTTATC GGTCAGCTGGAAGTATGACCAATATCGAACGTTTTCCCGAACCGGCAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATG TTCATTACCTGCGTGCACAGGATTTGAACACCGGTAAGAGCCGATTCGGCTGACCAACCGCTTAAACGAGGCC CTGCTGAAACCCGAGCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCCACTGAGGCC CGGATGTTCTGGGTCGGTGGACAGCTGGTATATGACTTCACGGCAGAGCAGCGAAGTGAAGTACACTACCGAC AAAaTTGCTGATaTTACCATTATCCGCTATATTGGTCCGGCACTGAAACATTGGCAACATGCTGTCAAAAGAC GATTTTGGGTTGCCCTGATCTTCTCCGGTCCCGTATCTGCTGGAGTTTCACTCCGAGATTGCGATCCCGGTTG TTGGTACCTTCGGCTGGTGTCTACATCGCGAATAAGGTTCTGACGGTTGACACCATCGATAACGCGCTGTGCG AAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTTTACAATAACATTTGTTACGAATTTGGTGGGCAAGTcaATACCCAGATC GACCTGATCCGTAAGAAAATGAAAGAGCGCTGGAGAATCAGCGGAGGCCACCAAGCAATTTATCAACTACCAA TACAACAGTACACGGAAGAGAAGATAACATTAACCTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGAATGAA TCTATCAACAAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTGAAATCAGTGTAGCGTTTTGCTACCTGATGAATAGCATG ATTCGATGAGCGTCAACCGTCTGGAGGACTTCGACCGCCAGCCTGAAAGATGCGTTGCTGAAAATACATTTACGAC AATCGTGGTACCGTGTATGGCCAAAGTTGACCGCTTGAAGACAAAAGTTAAACAATACCTGAGCAGCCGACATCCCA TTTCAACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATCAAT ACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATtGATCTGAGCCGTTATGCAAGCAAGTCAACATC GGTAGCAAGGTCaATTTTGAACCGATCGATAAGAACAGATCCAGCTGTTTAACTCGGAATCGAGCAAAAATGAG GTTATCCTGAAAACGCCATTTCTCAAACTCCATGTACGAGAATTTCTCCACAGCTTCTGGATTCCGATCCCG AAATACTTCAACAGCATTAGCCTGAACAACGAGTATACATCATCAACTGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAG GTGCTCTGAACATATGGTGAAGTCAATTTGGACCTTCGAGGACACCCAAAGAGATCAAGCAGCGCGCTGTTGTTCAAG TACTCTCAATGATCAACATTTCCGATTAATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTCAGAAATACCGCTGTAAT AACAGCAAGATTTACATCAATGGTCCGTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCACCGCAAG AACAAACATATGTTCAAAATTTGACCGGATCCGCGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACGTTGTT GATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGTCAAAAGATTTGATGACAAACCAATCTAACAGCGGCAATTTGAAAGGACTTC TGGGGCGATTATCTGCAATACGATAAGCCGTAATATGCTGAAACCTGTATGATCCGAACAAATATGTTGATGTC AATAATGTTGGTATTCGTTGTTATGATATTTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTG AACCTTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAAGATAACATTTGTCGCT AATAACGATCTGCTCATACATCAACGTTGGTGGTGAAGCGTAAAGAGTACCGCTGCGGACCAACCGCTTCGAGGGG GGTGTTGAGAAAATTTGAGCGGCTGGAGATCCCTCGTGTCCGTCGTGAGCCAACTGCTGGTTATGAAAGGC AAGAAGCAGCCAGGTTACTAACAAGTCAAGATGAACTGCAAGACCGCTGTTGTAACGACATCCGCTTTATTT GGTTTCCACGTTCAACAATATGCTAACTGGTAGCGGCAATTTGGTACAATCGTCAGATTTGAGCGCCGATGAG CCGCTTTGGGCTGAGCTGGAGTTTTATCCCGGTCGATGATGGTGGGCGAACGCTCCGCTG

Фиг. 23

(SEQ ID No. 22)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMVPVKAFKIHNKIWIIPERDFTFNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYDS TYLSTDNEKDNLYKGVTKLPERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPIFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGYSRSEELN LVIIGPSADI IQFECKSPGHEVLNLRNRYGSTQYIRFSPDFTFGFBESELEVDTNPLLGAGKFPATDPAVTLAHEL IHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKPIDSLQENEFRLYYNKFKDIASITLKA KSIVGTTASLQYMKNVFKKYLLESDTSGKFSVDKLPDKLYKMLTEIYTEDNFVFKFKVILNRKTYLNFDAVFK INIVPKVNYTIDYDFNLNNTNLAANFNQNTENINNMNFTKLKNFTGLPEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGNKAL NDLCIKVNNWDLFFSPEDNFTNDLNKGEIITSDTNI EAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENIS IENLSSDI I GQLELMPNIERFPNGKYELDKYTMFHYLRAQEFHEGKSRIALTNVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNRKATEA AMFLGWVEQLVYDFTDDETSEVSTTDKIADITIIPIYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFPEIAIPV LGTFALVSYIANKVLTVQTI DNALSKRNEKWEDEVKYIVTNWLAKVNTQIDILIRKMKKEALENQAEATKAIINQY YNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMINIKFLNQCSVSYLNMNMIPIYGVKRLIEDFDASLKDALLKYID NRGTLIGQVDRLLKDVNNTLSTDI PFQLSKYVDNQRLLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLRYASKINI GSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWK VSLNYGEI IWTLQDTQEIQRVVFYKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPI SNLGNIHAS NNIMPKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNSGILKDFWGDYLYQYDKPYMNLNLYDPNKYVVDV NNVGIRGYMYLKGPRGSMVTNIIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNRDRVYINVVVKKREYRLATNASQA GVEKILSALEIIPRVRRLSQVVVMKSKNDQGITNKKCMNLQDRRNGDIFIGFHQFNNAKILVASNWYNRQTERRS RRLGCSWEFIPVDDGWGERPL

Фиг. 24