

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040938**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.19

(51) Int. Cl. **C12P 21/06** (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)

(21) Номер заявки
201692188

(22) Дата подачи заявки
2015.04.29

(54) ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ НЕЙРОТОКСИНОВ CLOSTRIDIUM BOTULINUM

(31) **1407525.3**

(32) **2014.04.29**

(33) **GB**

(43) **2017.03.31**

(86) **PCT/GB2015/051250**

(87) **WO 2015/166242 2015.11.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИПСЕН БАЙОИННОВЕЙШН
ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:
**Палан Шилпа, Лю Сай Ман, Хакетт
Гэйвин Стефен (GB)**

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

(56) EP-A1-2524963

YAO ZHAO ET AL.: "Peg Precipitation Coupled with Chromatography is a New and Sufficient Method for the Purification of Botulinum Neurotoxin Type B", PLOS ONE, vol. 7, no. 6, 28 June 2012 (2012-06-28), page e39670, XP055199984, DOI: 10.1371/journal.pone.0039670 page 2, right-hand column, paragraph 3 page 3, right-hand column, paragraph 7 - page 4, left-hand column, paragraph 1 US-A1-2006228780

ANDY PICKETT ET AL.: "Towards New Uses of Botulinum Toxin as a Novel Therapeutic Tool", TOXINS, vol. 3, no. 12, 12 January 2011 (2011-01-12), pages 63-81, XP055199954, DOI: 10.3390/toxins3010063 the whole document page 64, lines 9-13

MALIZIO C. ET AL.: "Purification of Clostridium botulinum Type A Neurotoxin", METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, HUMANA PRESS, INC, US, vol. 145, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 27-39, XP008123242, ISSN: 1064-3745, DOI:10.1385/1-59259-052-7:27 [retrieved on 2008-02-05] the whole document WO-A1-2014080206

CLIFFORD C. SHONE ET AL.: "Inactivation of Clostridium botulinum type A neurotoxin by trypsin and purification of two tryptic fragments. Proteolytic action near the COOH-terminus of the heavy subunit destroys toxin-binding activity", EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 151, no. 1, 1 August 1985 (1985-08-01), pages 75-82, XP055199874, ISSN: 0014-2956, DOI:10.1111/j.1432-1033.1985.tb09070.x page 76, left-hand column, paragraph 3 page 76, right-hand column, paragraph 2

(57) Изобретение предоставляет способы получения растворимого бипептидного белка BoNT/A.

B1**040938****040938 B1**

Область изобретения

Представленное изобретение относится к способам получения рекомбинантных нейротоксинов серотипа А (BoNT/A) *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*).

Уровень техники изобретения

Ботулиновый нейротоксин (BoNT) продуцируется *C. botulinum* в форме большого белкового комплекса, состоящего из самого BoNT, образующего комплекс с рядом аксессуарных белков. В настоящее время имеется по меньшей мере семь различных классов ботулинового нейротоксина, а именно ботулиновый нейротоксин серотипов А, В, С₁, D, Е, F и G, которые все имеют сходную структуру и механизмы действия. Недавно появились сообщения о возможном девятом серотипе, Н, но последовательность еще не опубликована. Различные серотипы BoNT можно различать, основываясь на инактивации специфической нейтрализующей антисывороткой, причем подобная классификация по серотипу коррелирует с процентом идентичности последовательности на уровне аминокислот. Белки BoNT данного серотипа дополнительно подразделяются на различные подтипы на основании процента идентичности аминокислотной последовательности.

BoNT являются наиболее сильнодействующими известными токсинами, со значениями средней летальной дозы (LD₅₀) для мышей, варьирующими от 0,5 до 5 нг/кг в зависимости от серотипа. BoNT всасываются в желудочно-кишечном тракте и после поступления в общий кровоток связываются с пресинаптической мембраной холинергических нервных окончаний и препятствуют высвобождению нейротрансмиттера ацетилхолина. BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F и BoNT/G расщепляют синаптобревин/везикуло-ассоциированный мембранный белок (VAMP); BoNT/C, BoNT/A и BoNT/E расщепляют синаптосомально-ассоциированный белок 25 кДа (SNAP-25); а BoNT/C расщепляет синтаксин.

В природе клостридиальные нейротоксины синтезируются в виде одноцепочечного полипептида, который посттрансляционно модифицируется посредством явления протеолитического расщепления с образованием двух полипептидных цепей, соединенных друг с другом посредством дисульфидного мостика. Расщепление происходит в специфическом сайте расщепления, часто именуемом сайтом активации, который расположен между цистеиновыми остатками, которые обеспечивают межцепочечный дисульфидный мостик. Именно данная бицепная форма является активной формой токсина. Две цепи называются тяжелой цепью (Н-цепь), которая имеет молекулярную массу, составляющую приблизительно 100 кДа, и легкой цепью (L-цепь, или LC), которая имеет молекулярную массу, составляющую приблизительно 50 кДа. Н-цепь содержит С-концевой направляющий компонент (Н_С домен) и N-концевой компонент транслокации (Н_Н домен). Сайт расщепления расположен между L-цепью и компонентами транслокации в области подвергаемой воздействию петли (см. табл. 1). После связывания Н_С домена со своим нейроном-мишенью и интернализации связанного токсина в клетку посредством эндосомы Н_Н домен транслоцирует L-цепь через эндосомальную мембрану в цитозоль, и L-цепь обеспечивает протеазную функцию (также известную, как нецитотоксическая протеаза).

Нецитотоксические протеазы действуют посредством протеолитически расщепляющих внутриклеточных транспортных белков, известных как SNARE белки (например, SNAP-25, VAMP или Синтаксин), см. Gerald K. (2002) "Cell and Molecular Biology" (4th edition) John Wiley & Sons, Inc. Сокращение SNARE происходит от термина "растворимый NSF рецептор связывания", где NSF обозначает чувствительный к N-этилмалеимиду фактор. SNARE белки являются неотъемлемой частью внутриклеточного слияния везикул и, таким образом, секреции молекул посредством транспорта везикул из клетки. Протеазная функция представляет собой цинк-зависимую эндопептидазную активность и демонстрирует высокую субстратную специфичность для SNARE белков. Соответственно, после доставки в нужную клетку-мишень нецитотоксическая протеаза сразу является способной ингибировать клеточную секрецию из клетки-мишени. Протеазы L-цепей клостридиальных нейротоксинов представляют собой нецитотоксические протеазы, которые расщепляют SNARE белки.

Ботулиновые нейротоксины являются хорошо известными из-за их способности вызывать вялый мышечный паралич. Указанные миорелаксирующие свойства привели к тому, что ботулиновые нейротоксины (такие как BoNT/A) задействуют в ряде медицинских и косметических процедур, включая лечение межбровных морщин или гиперкинетических морщин лица, головной боли, гемифациального спазма, гиперактивного мочевого пузыря, гипергидроза, носогубных морщин, шейной дистонии, блефароспазма и спастичности.

Традиционно, получение BoNT осуществляли с помощью культуры бактерий *C. botulinum*, с последующим выделением и очисткой комплекса ботулинового нейротоксина. Однако получение BoNT данным способом малопродуктивно и обеспечивает малый выход белка. В дополнение *C. botulinum* являются спорообразующими бактериями и поэтому требуют специализированного оборудования и оснащения для культивирования, которые не требуются для культивирования таких бактерий, как *Escherichia coli* (*E. coli*). Увеличивающееся применение BoNT привело к развитию альтернативных способов получения и очистки BoNT. В частности, были разработаны способы получения BoNT с применением *E. coli*.

Очистка CNT от ферментационного раствора (будь-то с применением *C. botulinum* или *E. coli*) является особой задачей, поскольку нейротоксины содержатся в нем в виде смеси необработанных, частично обработанных и полностью обработанных полипептидов, которые все имеют очень похожие биохимиче-

ские и физические свойства. Обычно получают частично обработанные нейротоксины, если эндопротеолитическая активность гидролизует пептидную связь между легкой цепью и петлей, тогда как пептидная связь между петлей и N-концом тяжелой цепи еще не затронута. Более того, частично обработанный нейротоксин также можно получить, если эндопротеолитическая активность высвободила петлевой пептид из тяжелой цепи, тогда как пептидная связь между петлевым пептидом и C-концом легкой цепи еще не была гидролизирована. В зависимости от условий ферментации и типа нейротоксина, полностью обработанный полипептид, который лишен петлевого пептида, может быть значительно загрязнен содержанием от 5 до 90% частично обработанного или необработанного полипептида. В некоторых случаях нейротоксин в основном является необработанным и перед терапевтическим применением нуждается в обработке эндопептидазой с целью стать биологически активным.

Предыдущий уровень техники описывает разнообразные попытки обработки клостридиальных нейротоксинов гетерологическими протеазами с целью снизить количество необработанного или частично обработанного белка-предшественника. Протеаза трипсин, наиболее широко применяемая для активации клостридиальных нейротоксинов, являясь пригодной для активизации клостридиальных нейротоксинов серотипов В (BoNT/B) и Е (BoNT/E), по-видимому, производит вторичные продукты, предположительно, посредством протеолитического действия вблизи C-конца тяжелой субъединицы BoNT/A и, таким образом, по-видимому, разрушает токсин, связывающийся со своим клеточным рецептором. Более конкретные продукты расщепления теоретически ожидаются от эндогенных протеаз, выделенных из природного хозяина, такого как *C. botulinum*, продуцирующего BoNT/A.

Авторы представленного изобретения предварительно идентифицировали различные протеазы, такие как эндогенные протеазы из *C. Botulinum*, и экзогенные протеазы, включая протеазу эндопротеиназы Lys-C (Lys-C) (которая является коммерчески доступной и может быть выделена из *Lysobacter enzymogenes*). Однако хотя расщепление рекомбинантного BoNT/A посредством данной эндопротеиназы более точно отображает природное расщепление, применение Lys-C рождает новые практические умозаключения. В частности, после расщепления рекомбинантного BoNT/A Lys-C может оставаться активной в реакционной смеси на протяжении дней. Поэтому средства и способы для уменьшения количества Lys-C в конечном продукте и тем самым улучшающие качество препаратов нейротоксина являются весьма желательными, но все еще недоступными.

Таким образом, техническая задача, лежащая в основе представленного изобретения, может рассматриваться как предоставление средств и способов улучшения производства полипептидов нейротоксина посредством удовлетворения вышеупомянутых потребностей. Конкретно, в данной области техники существует потребность в улучшенных способах получения рекомбинантного BoNT, в частности активированного бипептного рекомбинантного BoNT/A.

Техническая задача решается с помощью вариантов осуществления, охарактеризованных в формуле изобретения и в настоящем документе ниже.

Сущность изобретения

Получения подсеротипов рекомбинантного BoNT/A можно достичь посредством экспрессии в *Escherichia coli* в виде отдельного полипептида, в данном документе именуемого как одноцепочечные BoNT/A белки. В результате выделения данного одноцепочечного белка посредством жидкостной экспресс-хроматографии белков (FPLC), одноцепочечный белок должен быть расщеплен с образованием активного токсина, который представляет собой бипептный белок, связанный воедино посредством простой дисульфидной связи.

Авторы представленного изобретения предварительно обнаружили, что подсеротипы рекомбинантного одноцепочечного BoNT/A можно расщеплять, используя протеазу эндопротеиназу Lys-C (Lys-C) для получения активного бипептного белкового нейротоксина BoNT/A, т.е. гетеродимера легких и тяжелых цепей BoNT/A. Посредством N-концевого секвенирования и масс-спектрометрии было определено, что сайт расщепления Lys-C является идентичным эндогенному белку. Таким образом, получение активного бипептного белка BoNT/A с применением Lys-C является предпочтительным, поскольку это приводит к получению аутентичного активного бипептного BoNT/A, а именно бипептного BoNT/A, который является фактически идентичным природному активному бипептному BoNT/A. В противоположность, трипсин, другая распространенная протеаза, применяемая для получения активных бипептных белков BoNT, расщепляет по меньшей мере один дополнительный сайт в пределах одноцепочечной последовательности BoNT/A. Данное дополнительное расщепление уменьшает активность продуцируемого активного бипептного белка BoNT/A.

После того как Lys-C расщепляет одноцепочечный белок BoNT/A, с целью получения готового чистого продукта требуется очистка активного бипептного белка BoNT/A для удаления каких-либо оставшихся белков клеток хозяина и протеазы Lys-C.

В частности, из исследований расщепления эндопротеиназы Lys-C авторы изобретения обнаружили, что Lys-C расщепляет рекомбинантный BoNT/A1 (rBoNT/A1) при очень низких концентрациях и остается активной в течение дней. Следовательно, важно разработать способ, который мог бы очищать данную протеазу от активированного токсина.

Авторы представленного изобретения разработали эффективный способ удаления активированной

протеазы Lys-C и белков клеток хозяев из BoNT/A после активации посредством применения хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC). Авторы представленного изобретения неожиданно обнаружили, что HIC максимально увеличивает не только количество активного бицепного BoNT/A, извлекаемого при очистке, но также значительно улучшает отделение Lys-C, т.е. удаление протеазы Lys-C. Предпочтительные свойства HIC являются неожиданными с учетом биофизических характеристик Lys-C и gBoNT/A; на основании изоэлектрической точки (pI) и суммарного заряда BoNT/A и Lys-C, было спрогнозировано, что расщепить два белка могла бы не HIC, а ионообменная хроматография (IEX).

Представленное изобретение решает одну или более вышеуказанных проблем посредством предоставления способов в соответствии с формулой изобретения.

Соответственно, представленное изобретение предоставляет способ получения растворимого бицепного белка BoNT/A, при этом указанный способ включает:

- a) предоставление растворимого одноцепочечного белка BoNT/A;
- b) приведение в контакт указанного белка BoNT/A с эндопротеиназой Lys-C (Lys-C) в растворе и
- c) отделение растворимого белка BoNT/A от Lys-C посредством приведения в контакт раствора, содержащего растворимый белок BoNT/A и Lys-C, с гидрофобной поверхностью, при этом растворимый белок BoNT/A предпочтительно связывается с гидрофобной поверхностью.

Растворимый одноцепочечный белок BoNT/A может быть получен в клетке-хозяине посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный одноцепочечный белок BoNT/A в экспрессирующей системе, при этом необязательно экспрессирующая система представляет собой бактериальную экспрессирующую систему, при этом предпочтительно, чтобы бактериальной экспрессирующей системой была экспрессирующая система *E. coli*, а клеткой-хозяином была клетка *E. coli*. Указанный растворимый одноцепочечный белок BoNT/A может экспрессироваться в цитоплазме указанной клетки-хозяина или в бесклеточной системе. Растворимый одноцепочечный белок BoNT/A может экспрессироваться на уровне, составляющем по меньшей мере 5 мг/л культуры. Указанный способ может включать лизис клетки-хозяина для предоставления гомогената клетки-хозяина, содержащего указанный растворимый одноцепочечный белок BoNT/A (предпочтительно растворимый одноцепочечный BoNT/A присутствует в концентрации, составляющей по меньшей мере 5 мг/л гомогената клетки-хозяина).

Гидрофобная поверхность, применяемая в способе представленного изобретения, может представлять собой инертную матрицу, к которой прикрепляется лиганд, состоящий из арильных или алкильных групп, при этом необязательно лиганд выбирают из группы, состоящей из бутильных, фенильных или октильных лигандов. В одном варианте осуществления применяют высокоэффективную гидрофобную поверхность.

Изобретение также предоставляет активный бицепный белок BoNT/A, получаемый посредством способа изобретения.

Изобретение дополнительно предоставляет композицию, содержащую активный бицепный белок BoNT/A изобретения; при этом указанная композиция, по существу, не содержит эндопротеиназу Lys-C. Предпочтительно указанная композиция содержит менее 400 пг эндопротеиназы Lys-C (Lys-C) на 100 нг белка BoNT/A, или менее 300 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 200 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 100 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 50 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A. Данные композиции являются подходящими для применения в терапевтических и косметических видах лечения.

Изобретение также предоставляет жидкую фармацевтическую композицию, содержащую активный бицепный белок BoNT/A изобретения; небелковый стабилизирующий агент, который представляет собой поверхностно-активное вещество; и воду; при этом указанная жидкая фармацевтическая композиция не содержит белковый стабилизирующий агент; и при этом указанная жидкая фармацевтическая композиция, по существу, не содержит эндопротеиназу Lys-C (Lys-C). Предпочтительно указанная жидкая фармацевтическая композиция содержит менее 400 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 300 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 200 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 100 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 50 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A. Указанная жидкая фармацевтическая композиция может дополнительно содержать хлорид натрия, буферный раствор для поддержания pH между 5,5 и 7,5 и дисахарид; при этом водой является стерильная вода.

Изобретение также предоставляет активный бицепный белок BoNT/A, композицию или жидкую фармацевтическую композицию изобретения для применения в терапии.

Изобретение дополнительно предоставляет применение активного бицепного белка BoNT/A, композиции или жидкой фармацевтической композиции изобретения при получении лекарственного средства.

Изобретение также предоставляет способ лечения, включающий введение активного бицепного белка BoNT/A, композиции или жидкой фармацевтической композиции изобретения нуждающемуся в этом пациенту.

Подробное описание изобретения

Ботулиновый токсин серотипа А (BoNT/A).

Термин "BoNT" обозначает ботулиновый нейротоксин и относится к нейротоксину, получаемому из

С. Botulinum, такому как BoNT серотипа А, В, С₁, D, E, F или G. Также термином "CNT" и "BoNT" охватываются рекомбинантный и модифицированный нейротоксин, содержащий одну или более модификаций, включая химическую модификацию или генетическую модификацию. Термин "генетическая модификация" обозначает делецию, замещение или добавление одного или более нуклеиновых кислотных остатков, приводящих к делеции, замещению или добавлению одного или более аминокислотных оснований, или делеции, замещению или добавлению указанного одного или более аминокислотных остатков.

Серотип BoNT/A подразделяется по меньшей мере на восемь подсеротипов (также известных как подтипы), от BoNT/A1 до BoNT/A8, которые имеют по меньшей мере 84%, вплоть до 98%, общей идентичности аминокислотной последовательности; белки BoNT/A в пределах данного подтипа имеют более высокий общий процент идентичности аминокислотной последовательности. Табл. 1 (ниже) показывает предшественник, природный бицепной нейротоксин подтипов BoNT/A и идентифицирует подвергавшуюся воздействию петлю (петлю активации), включающую аминокислотную последовательность, расщепленную посредством Lys-C.

Таблица 1

ТОКСИН	ПОДВЕРГАЕМАЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ (АКТИВАЦИИ) ПЕТЛЯ	LC	H _N	H _{CN}	H _{CC}
BoNT/A1 (P10845)	SEQ ID NO: 2	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A2 (A2I2R5)	SEQ ID NO: 3	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A2 (A2I2R5)	SEQ ID NO: 4	M1-K434	A445-N868	I869-S1088	N1089-L1292
BoNT/A3 (B1L2G5)	SEQ ID NO: 3	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A3 (B1L2G5)	SEQ ID NO: 4	M1-K434	A445-N868	I869-S1088	N1089-L1292
BoNT/A3 (Q3LRX9)	SEQ ID NO: 5	M1-K434	A445-N868	I869-S1088	N1089-L1292
BoNT/A4 (Q3LRX8)	SEQ ID NO: 6	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A5 (C7BEA8)	SEQ ID NO: 7	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A6 (C9WWY7)	SEQ ID NO: 2	M1-K438	A449-N872	I873-S1093	N1094-L1297
BoNT/A7 (K4LN57)	SEQ ID NO: 13	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A8 (A0A0A7PDB7)	SEQ ID NO: 14	M1-K438	A449-N872	I873-S1093	N1094-Q1297

Ссылаясь на табл. 1, аминокислотные позиции (остатки), указанные для LC, H_N, H_{CN} и H_{CC} областей, соответствуют аминокислотным позициям для указанных областей в последовательности полноразмерного белка BoNT/A. Учетные номера UniProt, приведенные в табл. 1, представляют собой примеры подсеротипов различных BoNT/A. Таким образом, в одном варианте осуществления аминокислотные позиции LC, H_N, H_{CN} и H_{CC} областей, указанные в табл. 1, соответствуют аминокислотным позициям в последовательностях полноразмерного белка BoNT/A, идентифицируемым посредством Учетного номера.

С применением способов представленного изобретения теперь является возможным получение бицепных композиций BoNT/A со значительно меньшим загрязнением необработанным или частично обработанным BoNT/A, поскольку данные загрязнители эффективно перерабатываются в бицепную

BoNT/A. Способы представленного изобретения также делают возможным эффективное удаление фермента Lys-C, применяемого для переработки одноцепочечного белка BoNT/A в активную бицепь. В одном аспекте бицепь BoNT/A представляет собой природный бицепной нейротоксин, при этом С-конец легкой цепи и N-конец тяжелой цепи являются идентичными соответствующему полностью переработанному бицепному BoNT/A, выделенному из клостридий дикого типа.

В соответствии с представленным изобретением активная бицепь BoNT/A, включая рекомбинантную бицепь BoNT/A, может быть получена в виде одноцепочечного полипептида, который расщепляется с образованием активной бицепной формы белка.

Представленные способы можно использовать для получения бицепи любого подтипа BoNT/A или его гомолога или производного, включая, например, полипептид SEQ ID NO: 1 и его производные. Термин "производное", как используется в отношении данного и других аспектов изобретения, включает мутации аминокислот, такие как добавление, замещение, делеция или процессинг одного или более аминокислотных остатков.

Одноцепочечный белок BoNT/A может содержать полипептидную последовательность, как показано в GenBank NO: CBZ04958,1, YP_002805603,1, ZP_02994746,1, YP_001788403,1, YP_001782718,1, ZP_02616437,1, ZP_02614241,1, YP_001392361,1, YP_001255575,1. Одноцепочечный белок BoNT/A может содержать полипептидную последовательность, как показано в

подсеротипе A1: UniParc Дополнение № UPI0000ED909E (UniProt Дополнение № P10845, Версия 159), UniParc Дополнение № UPI0000EF85BD (UniProt Дополнение № S8B1U4, Версия 3, или UniProt Дополнение № A2I2R4, версия 41), UniParc Дополнение № UPI0001A954C8 (UniProt Дополнение № C6K838, Версия 11), UniParc Дополнение № UPI0000001386 (UniProt Дополнение № A5HZZ9, Версия 57), UniParc Дополнение № UPI000003409D (UniProt Дополнение № A2I2U2, Версия 36), UniParc Дополнение № UPI00016529B7 (UniProt Дополнение № B1A2D5, Версия 21), UniParc Дополнение № UPI00027EE164 (UniProt Дополнение № J7FGZ9, Версия 6);

подсеротипе A2: UniParc Дополнение № UPI0000EF84BD (UniProt Дополнение № A2I2R5, Версия 28), UniParc Дополнение № UPI0001C0B376 (UniProt Дополнение № D2KCK3, Версия 15), UniParc Дополнение № UPI0001C32E84 (UniProt Дополнение № D3IV23, Версия 10), UniParc Дополнение № UPI0001F3B30D (UniProt Дополнение № E5F1I1, Версия 11), UniParc Дополнение № UPI000016EA88 (UniProt Дополнение № Q45894, Версия 116 или UniProt Дополнение № Q58GH1, Версия 51), UniParc Дополнение № UPI000067C53E (UniProt Дополнение № Q2PPK6, Версия 33), UniParc Дополнение № UPI000290BEB1 (UniProt Дополнение № K4GGE0, Версия 6);

подсеротипе A3: UniParc Дополнение № UPI00005B712C (UniProt Дополнение № Q3LRX9, Версия 38), UniParc Дополнение № UPI00016DBC11 (UniProt Дополнение № B1L2G5, Версия 38 или UniProt Дополнение № D3IV24, Версия 11), UniParc Дополнение № UPI000290C3D0 (UniProt Дополнение № K4G3L3, Версия 7);

подсеротипе A4: UniParc Дополнение № UPI00005B712D (UniProt Дополнение № Q3LRX8, Версия 35), UniParc Дополнение № UPI00019DB885 (UniProt Дополнение № C3KS13, Версия 29);

подсеротипе A5: UniParc Дополнение № UPI0001AE7D6A (UniProt Дополнение № C7BEA8, Версия 14), UniParc Дополнение № UPI000198BDAE (UniProt Дополнение № E8ZMW0, Версия 18 или UniProt Дополнение № C1IPK2, Версия 20);

подсеротипе A6: UniParc Дополнение № UPI0001B7D251 (UniProt Дополнение № C9WWY7, Версия 13),

подсеротипе A7: UniParc Дополнение № UPI000290B995 (UniProt Дополнение № K4LN57),

подсеротипе A8: UniParc Дополнение № UPI000559A469 (UniProt Дополнение № A0A0A7PDB7); UniParc Дополнение № UPI0003C9D2A1 (UniProt Дополнение № V5N8R1).

Одноцепочечный белок BoNT/A может содержать полипептидную последовательность, которая является гомологом или производным, имеющим по меньшей мере 50% идентичность последовательности с одной из вышеуказанных полипептидных последовательностей BoNT/A.

В одном аспекте полипептидная цепь указанного одноцепочечного белка BoNT/A содержит последовательность, выбранную из любой одной из SEQ ID NO: от 2 до 7, или 13, или 14. В более конкретном аспекте полипептидная цепь указанного одноцепочечного белка BoNT/A содержит последовательность, выбранную из любой одной из SEQ ID NO: от 2 до 7, или 13, или 14, и при этом второй полипептид представляет собой расщепленный С-конец до основного аминокислотного остатка в пределах указанной последовательности любого одного из SEQ ID NO: от 2 до 7, или 13, или 14. Указанные последовательности представляют аминокислотные последовательности известных субстратов одноцепочечного белка BoNT/A представленного изобретения.

Одноцепочечные белки BoNT/A представляют собой расщепленный С-конец до основного аминокислотного остатка, содержащегося в последовательности, сравнить колонки LC и H_N табл. 1. В предпочтительном аспекте указанный одноцепочечный белок BoNT/A содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: от 2 до 7 и 13-14 (например, серотип BoNT/A1, SEQ ID NO: 2).

Одноцепочечный белок BoNT/A может содержать производное любого одного из SEQ ID NO: от 2 до 7, или 13, или 14, или SEQ ID NO: 1, или одну из полипептидных последовательностей, соответст-

вующих учетным номерам, идентифицированным в данном документе, при этом указанное производное имеет одну или более точечную мутацию и/или один или более дополнительных аминокислотных остатков. В другом аспекте указанное производное имеет вплоть до 1, вплоть до 2, вплоть до 3, вплоть до 4, вплоть до 5, вплоть до 6, вплоть до 7, вплоть до 8, вплоть до 9, вплоть до 10, вплоть до 15 точечных мутаций. За счет применения анализа активности для определения активности протеазы, как описано в данном документе, квалифицированный специалист может определить, обработано ли данное производное посредством Lys-C.

Производное может содержать точечную мутацию, изменяющую основной аминокислотный остаток в неосновной аминокислотный остаток. Производное может иметь по меньшей мере 50% идентичность последовательности с любой одной из SEQ ID NO: от 2 до 7, или 13, или 14, SEQ ID NO: 1, или одной из полипептидных последовательностей, соответствующих учетным номерам, идентифицированным в данном документе. Указанное производное или полипептид, содержащий производное, может являться субстратом Lys-C и протеолитически расщепляться посредством Lys-C. Типичным примером является производное SEQ ID NO: 1, содержащее, например, одну или более точечных мутаций в легкой или тяжелой цепи.

Указанный одноцепочечный белок BoNT/A может содержать (а) полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 30% идентичность последовательности, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более с последовательностью SEQ ID NO: 1 (BoNT/A ATCC 3502, Genbank доп. AAA23262), или с одной из полипептидных последовательностей, соответствующих учетным номерам, идентифицированных в данном документе. Одноцепочечный белок BoNT/A может содержать полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, или полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 30% идентичность последовательности, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более с последовательностью SEQ ID NO: 15.

Термин "идентичность последовательности", как используется в данном документе, относится к определению идентичности между эталонной аминокислотной последовательностью и искомой последовательностью, при этом последовательности выравнены так, чтобы было получено совпадение наивысшего порядка, которое можно вычислить с применением опубликованных методик или способов, закодированных в компьютерных программах, таких как, например, BLASTP, BLASTN, FASTA (Altschul 1990, J. Mol. Biol. 215: 403). Значения процента идентичности можно вычислить по всей аминокислотной последовательности или по области аминокислотной последовательности. Например, для одноцепочечного белка BoNT/A идентичность последовательности можно вычислить по длине последовательности, составляющей вплоть до 50 аминокислотных (aa) остатков, вплоть до 100 aa, вплоть до 150 aa, вплоть до 250 aa, 300 aa, 350 aa, 400 aa, 450 aa, 500 aa, 550 aa, 600 aa, 650 aa, 700 aa, 750 aa, 800 aa, 850 aa, 900 aa, 950 aa, 1000 aa, 1050 aa, 1100 aa, 1150 aa, 1200 aa, 1250 aa или более остатков, вплоть до последовательности полноразмерного одноцепочечного белка BoNT/A. Идентичность последовательности можно вычислить по меньшей мере по 50 aa остаткам, по меньшей мере 100 aa, по меньшей мере 150 aa или по меньшей мере 250 aa остаткам.

Для сравнения различных последовательностей квалифицированному работнику доступен ряд программ, основанных на различных алгоритмах. В данном контексте особенно достоверные результаты дают алгоритмы Needleman и Wunsch или Smith и Waterman. Для выполнения выравнивания последовательностей и вычисления значений идентичности последовательности, перечисленных в данном документе, коммерчески доступную программу DNASTAR Lasergene MegAlign версия 7,1.0, основанную на алгоритме Clustal W, применяли по всей области последовательности со следующими настройками: параметры попарного выравнивания: штраф за пропуск: 10.00, штраф за длину пропуска: 0,10, матрица сравнения аминокислот по Gonnet 250, которые, если не указано иное, всегда будут использоваться в качестве стандартных параметров для выравнивания последовательностей.

По меньшей мере 30% обозначает по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более, вплоть до 100%. Идентичность последовательности указанного одноцепочечного белка BoNT/A, имеющего по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1, можно определить, основываясь на позиции аминокислот от 420 до 466 SEQ ID NO: 1, или указанную идентичность последовательности можно определить, основываясь на любой одной из SEQ ID NO: от 2 до 7, или 13, или 14. Другими словами, одноцепочечный белок BoNT/A может содержать полипептидную последовательность, которая имеет, например, по меньшей мере 30% идентичность последовательности с полипептидной последовательностью, обнаруженной между позициями аминокислот от 420 до 466 одноцепочечного белка BoNT/A, или по меньшей мере 30% идентичность последовательности с полипептидной последовательностью любого одного из одноцепочечного белка BoNT/A, включая любую одну из полипептидных по-

следовательностей, соответствующих учетным номерам, идентифицированным в данном документе. В соответствии с данным определением полипептид, например, получают из *C. botulinum*, *C. tetani* или *C. sporogenes*. Указанный одноцепочечный белок BoNT/A может представлять собой, например, нейротоксин природного происхождения или его производное, включающее одну или более аминокислотных мутаций, таких как добавление, замещение, делецию или процессинг одного или более аминокислотных остатков. Например, включены производные, не имеющие, например, H_C домена природного нейротоксина или его частей, или производные с другими аминокислотными остатками, замещающими H_C домен нейротоксина, а также производные с дополнительной легкой цепью или другая белковоподобная грузовая молекула, соединенная на N-конце с легкой цепью BoNT.

Одноцепочечный белок BoNT/A может содержать дополнительные аминокислотные остатки на N-или C-конце или во внутренней позиции. Дополнительные аминокислотные остатки могут быть окружены сайтами расщепления одной или более протеаз. Дополнительная аминокислотная последовательность может функционировать в качестве обнаруживаемой метки и/или обеспечивает возможность связывания с твердой подложкой. Примером является His-метка или GST-метка. Другим примером является аминокислотная последовательность VPPTGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 12), содержащая Streptag, предпочтительно присоединенная к C-концу.

В другом аспекте биологическую активность указанного BoNT/A одноцепочечного белка можно модулировать посредством протеолитического расщепления. Квалифицированному специалисту хорошо известно, что функцию многих полипептидов можно модулировать посредством протеолитической обработки.

"Модулированная", как используется в данном документе, обозначает повышенную или пониженную, активированную или инактивированную. Например, биологическую активность многих клостридиальных нейротоксинов повышают или запускают посредством протеолитической переработки одноцепочечного нейротоксина в бицепной нейротоксин, при этом бицепной нейротоксин составлен из легкой и тяжелой полипептидных цепей, которые являются ковалентно связанными через дисульфидный мостик. Биологическая активность нейротоксина охватывает по меньшей мере три отдельных действия: первое действие представляет собой "протеолитическую активность", присущую легкой цепи нейротоксина, и является ответственным за гидролиз пептидной связи одного или более полипептидов, задействованных в регуляции слияния клеточных мембран. Второе действие представляет собой "транслокационную активность", присущую N-терминальному концу тяжелой цепи обрабатываемого нейротоксина, и задействовано в транспорте легкой цепи через лизосомальную мембрану в цитоплазму. Третье действие представляет собой "рецептор-связывающую активность", присущую C-терминальному концу тяжелой цепи обрабатываемого нейротоксина, и задействовано в связывании и поглощении нейротоксина в клетку-мишень. В предпочтительном аспекте термин биологическая активность, как используется в данном документе, обозначает протеолитическую активность. В более предпочтительном аспекте термин обозначает повышенную протеолитическую активность.

Биологическая активность клостридиального нейротоксина можно измерить посредством различных анализов, которые все известны квалифицированному специалисту в данной области. Данные анализы делают возможным определение одного или более видов активности, указанных выше. Например, анализ мышинной LD₅₀ или анализ ex vivo купола диафрагмы диафрагмального нерва мышей (MPN), как описано Pearce et al., 1994 (Pearce L.B., Borodic G.E., First E.R., MacCallum R.D. (1994), Toksecologecol Appl. Pharmacol. 128: 69-77) и Habermann et al., 1980 (Habermann E., Dreyer F., Bigalke H. (1980), Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 311:33-40) позволяет определить токсическое действие препарата данного нейротоксина на живой организм или выделенный нервномышечный препарат. Для установления токсического действия в анализе LD₅₀ нейротоксин должен быть биологически активным в каждом из указанных трех действий, упомянутых выше. Более того, доступными являются различные другие анализы, позволяющие, например, определить, является ли нейротоксин или легкая цепь нейротоксина протеолитически активным. Данные анализы, например, основываются на приведении в контакт BoNT/A со SNAP-25. В качестве альтернативы можно использовать пептид, представляющий сайт расщепления SNAP-25, при этом пептид может быть меченым для легкого определения. В предпочтительном аспекте биологическую активность определяют посредством применения анализа MPN, описанного выше в данном документе.

Молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный одноцепочечный белок BoNT/A, можно использовать в соответствии с представленным изобретением. Указанная молекула нуклеиновой кислоты может необязательно включать регулирующие элементы. Термин "регулирующие элементы", как используется в данном документе, относится к регулирующим элементам экспрессии генов, включая транскрипцию и трансляцию, и включает такие элементы, как TATA-бокс, промотор, энхансер, сайт связывания рибосом, последовательность Шайна-Дальгарно, IRES-участок, сигнал полиаденилирования, концевую кэпнинг-структуру и т.п. Указанный регулирующий элемент может включать в себя один или более гетерологичных регулирующих элементов или один или более гомологичных регулирующих элементов. "Гомологичный регулирующий элемент" представляет собой регулирующий элемент клетки дикого типа, из которой происходит молекула нуклеиновой кислоты, которая задействована в регуляции экспрес-

сии генов молекулы нуклеиновой кислоты или полипептида в указанной клетке дикого типа. "Гетерологический регулирующий элемент" представляет собой регулирующий элемент, который не задействован в регуляции экспрессии генов молекулы нуклеиновой кислоты или полипептида в указанной клетке дикого типа. Также можно использовать регулирующие элементы для индуцируемой экспрессии, такие как индуцируемые промоторы.

Молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой, например, гетерогенную ядерную РНК, матричную РНК, РНК, ДНК, пептидную нуклеиновую кислоту, запертую нуклеиновую кислоту и/или модифицированные молекулы нуклеиновых кислот. Молекула нуклеиновой кислоты может быть кольцевой, линейной, интегрированной в геном или эписомной. Также включены конкатемеры, кодирующие белки слияния, содержащие три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять полипептидов. Более того, молекула нуклеиновой кислоты может содержать последовательности, кодирующие сигнальные последовательности для внутриклеточного транспорта, такие как сигналы для транспорта во внутриклеточное пространство или для транспорта через клеточную мембрану.

В соответствии с изобретением молекула нуклеиновой кислоты, кодирующей BoNT/A, может быть разработана преимущественно для предоставления высоких уровней экспрессии в клетках-хозяевах, в частности в бактериальных клетках-хозяевах, предпочтительно в клетках *E. coli*. Способы разработки молекул нуклеиновых кислот для увеличения экспрессии белка в клетках-хозяевах, в частности в бактериальных клетках-хозяевах, предпочтительно в клетках *E. coli*, являются известными в данной области и включают уменьшение частоты (числа появлений) "медленных кодонов" в последовательности кодирующей нуклеиновой кислоты.

В одном аспекте одноцепочечный белок BoNT/A получают с применением экспрессионного вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный одноцепочечный белок BoNT/A. Вектор может быть подходящим для экспрессии указанного одноцепочечного белка BoNT/A *in vitro* и/или *in vivo*. Вектор может представлять собой вектор для кратковременной и/или стабильной экспрессии генов. Вектор может дополнительно содержать регулирующие элементы и/или селективные маркеры. Указанный вектор может быть вирусного происхождения, фагового происхождения или бактериального происхождения. Например, указанный экспрессионный вектор может представлять собой вектор pET-26b(+).

Молекула нуклеиновой кислоты или экспрессионный вектор, кодирующие одноцепочечный белок BoNT/A, может содержаться в клетке-хозяине, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты или вектор представленного изобретения. Термин "клетка-хозяин", как используется в данном документе, охватывает прокариотические и/или эукариотические клетки, пригодные для транслирования указанной молекулы нуклеиновой кислоты или указанного вектора и, в частности, одноцепочечного белка BoNT/A. Указанная клетка-хозяин может являться клеткой-хозяином, не экспрессирующей одноцепочечный белок BoNT/A или его гомолог. Термин "гомолог", как используется в данном документе, относится к полипептиду, содержащему полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичность последовательности с последовательностью BoNT/A, например последовательностью BoNT/A SEQ ID NO: 1. Однако, также включены клетки-хозяева, такие как клетки дикого типа, экспрессирующие одноцепочечный белок BoNT/A или его гомолог. Например, клетка-хозяин может быть выбрана из *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. baratii* и *C. tetani*, например *C. botulinum* серотипа A, B или F. Клетка-хозяин может представлять собой Hall штамм (ATCC 3502) *C. botulinum*; BoNT/A, продуцирующий штамм ATCC 19397, также известный как NCTC 4587 и NCTC 7272 *C. botulinum*; BoNT/A, продуцирующий штамм NCTC 2916 *C. botulinum*; BoNT/A2, продуцирующий штамм Kyoto-F или Mauritius/NCTC 9837 *C. botulinum*; BoNT/A3, продуцирующий штамм A254 Loch Maree/NCTC 2012 *C. botulinum*; BoNT/A4 и B, продуцирующие штамм CDC657 *C. botulinum*; BoNT/A5 и B3', продуцирующие штамм H04402 065 *C. botulinum*; BoNT/B1, продуцирующий штамм Okra/NCTC 7273 *C. botulinum*; BoNT/B и F, продуцирующие штамм CDC4013/NCTC 12265 *C. botulinum*; или BoNT/F1, продуцирующий штамм Langeland/NCTC 10281 *C. botulinum*. Указанной клеткой-хозяином могут быть *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium acetobutylicum*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. thermoproteolyticus*, *B. anthracis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. coli* или дрожжевая клетка. Предпочтительно клеткой-хозяином является клетка-хозяин *E. coli*, в частности клетка *E. coli* BL21 (DE3) или BLR(DE3).

В одном аспекте одноцепочечный белок BoNT/A модифицирован внутри клетки-хозяина (т.е. гликозилирован, фосфорилирован, обработан протеазами и т.д.). Модификация также включает добавление небелковоподобных кофакторов, включая ионы металлов. Клетка-хозяин может включать в себя индуктор экспрессии одноцепочечного белка BoNT/A. Данный индуктор экспрессии может представлять собой молекулу нуклеиновой кислоты или полипептида или химический структурный элемент, включая небольшой химический структурный элемент, обладающий эффектом повышения количества одноцепочечного белка BoNT/A в культурах клеток-хозяев или их лизатах. Индуктор экспрессии может, например, увеличивать транскрипцию или трансляцию молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей одноцепочечный белок BoNT/A. Индуктор может, например, экспрессироваться рекомбинантными средствами,

известными квалифицированному специалисту в данной области. В качестве альтернативы индуктор может быть выделен из клетки, например клостридиальной клетки.

Одноцепочечный белок BoNT/A может быть получен посредством способа, включающего введение экспрессионного вектора, как описано в данном документе, и экспрессию указанного одноцепочечного белка BoNT/A в указанной клетке-хозяине. Одноцепочечный белок BoNT/A может быть получен посредством предоставления клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный одноцепочечный белок BoNT/A, и экспрессии указанного одноцепочечного белка BoNT/A в указанной клетке-хозяине. Как правило, клеткой-хозяином является бактериальная клетка, предпочтительно клетка *E. coli*. Клеткой-хозяином *E. coli* может являться клетка *E. coli* BL21 (DE3) или BLR (DE3).

Предпочтительно одноцепочечный белок BoNT/A транслируется в клетке. Клеткой может быть прокариотическая или эукариотическая клетка. В одном аспекте клетку выбирают из *E. coli*, *B. subtilis* или дрожжей; *E. coli* является высокопредпочтительной клеткой-хозяином. Также представленное изобретение охватывает трансляцию одноцепочечного белка BoNT/A в клетке дикого типа, т.е. клетке, выделенной в природе, такой как любой известный изолят *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium baratii* и *Clostridium tetani*. В соответствии с представленным изобретением можно использовать любую пригодную клетку-хозяина, как описано в данном документе.

Квалифицированному специалисту в данной области доступны различные стандартные средства и методы для введения молекулы нуклеиновой кислоты или вектора в клетку-хозяина и экспрессии одноцепочечного белка BoNT/A в качестве рекомбинантного белка в клетке. Более того, квалифицированный специалист в данной области знает много стандартных методик для извлечения белков и полипептидов из клеток или клеточных лизатов (например, *Recombinant DNA Principles and Methodologies*, J. Green, Marcel Dekker Inc., 1998; *The Condensed Protocols: From Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 2006; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 2000). Любой из данных средств и способов можно использовать в способах представленного изобретения.

Обычные способы извлечения белков из клеток-хозяев или лизата клеток-хозяев включают центрифугирование (отделение взвешенных частиц) клеточного лизата, осаждение белков сульфатом аммония, ресуспендирование белков, центрифугирование ресуспендированных белков, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, хроматографию с гидрофобным взаимодействием и т.п. Некоторые комбинации данных этапов в различном порядке могут быть подходящими в соответствии с представленным изобретением для очистки одноцепочечного белка BoNT/A.

Как описано более подробно ниже, одноцепочечный белок BoNT/A можно привести в контакт с Lys-C для получения активной бицепи BoNT/A. Теперь авторы изобретения разработали предпочтительный способ очистки бицепи BoNT/A от реакционной смеси BoNT/A и Lys-C.

Эндопротеиназа Lys-C.

Как описано в данном документе, одноцепочечный белок BoNT/A расщепляют с образованием активной бицепной формы белка BoNT/A с применением эндопротеиназы Lys-C (Lys-C). Термин "Lys-C" относится к 33 кДа сериновой эндопротеиназе Lys-C из *Lysobacter enzymogenes* (лизил-эндопептидаза, LeK, Genbank доп. Q7M135), которая специфично расщепляет пептидные связи на С-конце до лизина или его гомолога, имеющего по меньшей мере 50% идентичность последовательности. В одном варианте осуществления его гомолог, имеющий по меньшей мере 50% идентичность последовательности к Lys-C, сохраняет функциональность (т.е. протеолитическую активность) Lys-C.

В соответствии с представленным изобретением фермент Lys-C представляет собой протеолитически активный полипептид, который может содержать или состоять из полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 8. В одном аспекте фермент Lys-C, применяемый в соответствии с представленным изобретением, представляет собой протеолитически активный полипептид, состоящий из полипептидной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 8.

Как правило, гомологи Lys-C способны гидролизировать одноцепочечный ботулиновый нейротоксин (например, серотип A (BoNT/A)) для получения бицепного ботулинового нейротоксина (например, серотипа A (BoNT/A)). В одном варианте осуществления термин "Lys-C" также охватывает функционально эквивалентные протеазы, например, такие как протеазы, которые распознают такую же последовательность расщепления, как у Lys-C, и гидролизуются на карбоксильной стороне Lys. Также термин охватывает гомологи указанной протеазы, имеющие по меньшей мере 60% идентичность последовательности.

Термин "протеолитически активный полипептид", как используется в данном документе, относится к каталитической функции полипептида и означает, что полипептид способен гидролизировать пептидную связь. В одном аспекте "протеолитически активный полипептид" относится к полипептиду, который способен гидролизировать полипептид, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из любой одной из SEQ ID NO: от 1 до 7.

Термин "протеолитически неактивный полипептид", как используется в данном документе, относится к каталитической функции полипептида и означает, что полипептид неспособен гидролизировать

пептидную связь.

Квалифицированный специалист в данной области может определить, является ли полипептид Lys-C в соответствии с определением последовательности, указанной в данном документе, полипептидом для применения в соответствии с представленным изобретением, посредством исследования протеолитической активности указанного полипептида. Система анализа или тестирования для определения протеолитической активности включает приведение в контакт полипептида Lys-C, который включает полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 8, с тестовым субстратом.

Тестовым субстратом обычно является полипептид, который, как известно, расщепляется Lys-C. Предпочтительно тестовым субстратом является клостридиальный нейротоксин (CNT), такой как BoNT или его фрагмент. Тестовым субстратом может быть, например, нерасщепленный/необработанный BoNT, обозначенный в данном документе, как одноцепочечный BoNT (scBoNT), и он, например, может относиться к серотипу A, B, C₁, D, E, F или G (например, scBoNT/A, scBoNT/B и т.д.) или тестовым субстратом может быть столбнячный нейротоксин (TNT). В качестве альтернативы тестовым субстратом может быть фрагмент клостридиального нейротоксина, при этом указанный фрагмент содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой одной из SEQ ID NO: от 1 до 7. Фрагментом может быть полипептид из 50 или более аминокислотных остатков или пептид из вплоть до 49 аминокислотных остатков. Как используется по всему представленному описанию, термин "полипептид" относится к молекулам с 50 или более аминокислотными остатками, тогда как термин "пептид" относится к молекулам с 2-49 аминокислотными остатками.

Тестовым субстратом может быть растворимый фрагмент нейротоксина, называемый L_N, содержащий полипептид легкой цепи, область пептида с подвергаемой воздействию петель и N-концевую половину полипептида тяжелой цепи, транслокационный домен H_N. Тестовый субстрат может представлять собой или содержать пептид, выбранный из любой одной из SEQ ID NO: от 2 до 8 (см. табл. 1). Тестовым субстратом может быть химерный нейротоксин, содержащий аминокислотные остатки, полученные от двух или более серотипов.

Анализ для определения протеолитической активности фермента Lys-C, его гомолога или производного, как правило, включает стадию определения степени превращения тестового субстрата в продукт (продукты) его расщепления. Наблюдение за одним или более продуктом (продуктами) расщепления, образующимся после приведения в контакт полипептида с тестовым субстратом, или наблюдение увеличения количества продукта (продуктов) расщепления свидетельствует о протеолитической активности полипептида. Указанная стадия определения может включать сравнение субстрата и продукта (продуктов) расщепления. Указанное сравнение может включать определение количества субстрата и/или количества одного продукта или более продуктов расщепления и может также включать подсчет соотношения субстрата и продукта (продуктов) расщепления. В дополнение анализ определения протеолитической активности может включать стадию сравнения тестового образца с эталонным образцом, при этом эталонный образец, как правило, содержит (а) полипептид, который содержит полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 8, и который, как известно, является протеолитически активным, и (b) тестовый субстрат, о котором известно, что он расщепляется полипептидом (а).

Анализ определения протеолитической активности может включать разделение субстрата (например, одноцепочечного белка BoNT/A) и продукта (продуктов) расщепления (например, активной бицепи BoNT/A) посредством электрофореза или посредством колоночной хроматографии и, необязательно, спектрометрического анализа. Может быть удобно метить тестовым субстрат одной или более метками с целью более легкого определения уменьшения тестового субстрата и/или увеличения продукта (продуктов). Термин "метка", как используется в данном документе, обозначает определяемый маркер и включает, например, радиоактивную метку, антитело и/или флуоресцентную метку. Количество тестового субстрата и/или продукта расщепления можно определить, например, посредством способов ауторадиографии или спектрометрии, включая способы, основанные на резонансном переносе энергии между по меньшей мере двумя метками. В качестве альтернативы для обнаружения можно использовать иммунологические способы, такие как вестерн-блоттинг или ELISA.

В предпочтительном аспекте полипептид является протеолитически активным, если более чем 20%, предпочтительно более чем 95% тестового субстрата превращается в продукты расщепления, такие как легкая цепь и тяжелая цепь, за 120 мин при 37°C с применением буферного раствора, выбранного из 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, или PBS (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7,4). Такие же условия применяются, если тестовый субстрат является не полноразмерным BoNT/A, но вместо этого, например, фрагментом полноразмерного BoNT/A или производным BoNT/A. Очевидно, что продукты расщепления в данном случае будут отличаться. Однако квалифицированный специалист может количественно определить соответствующие продукты расщепления.

Как правило, в анализе применяют 100 нг протеолитически активного полипептида Lys-C и молярное соотношение 1:100 по отношению к субстрату.

Образец можно брать с интервалами, чтобы отследить каталитическую активность с течением вре-

мени.

Анализ можно модифицировать, например, посредством применения кратных количеств протеолитически активного полипептида Lys-C.

SEQ ID NO: 9 показывает полипептидную последовательность протеолитически неактивного полипептида, полученного от штамма ATCC 3502 *Clostridium botulinum*, GenBank дополнение № CAL82988,1, имеющего аминокислотную протяженность из 581 остатка. SEQ ID NO: 8 показывает протеолитически активное производное SEQ ID NO: 9 с отсутствием от 1 до 248 аминокислотных остатков SEQ ID NO: 9.

Термин "полипептид, который содержит полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 8" относится к полипептиду, который имеет по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 8. В дополнение термин относится к полипептиду, который содержит полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 8. Указанный полипептид может иметь дополнительные аминокислоты, например, во внутренней позиции или на N- или C-конце, к последовательности, показанной в SEQ ID NO: 8, или во внутренней позиции или на N- или C-конце к аминокислотной последовательности, которая является по меньшей мере на 50% идентичной с последовательностью SEQ ID NO: 8, при этом на N-конце полипептида может присутствовать метионин. В дополнение термин относится к полипептиду с недостающим одним или более аминокислотными остатками, например, во внутренней позиции или на N- или C-конце последовательности, показанной в SEQ ID NO: 8, или во внутренней позиции или на N- или C-конце последовательности, которая является по меньшей мере на 50% идентична по последовательности с SEQ ID NO: 8. Термин "идентичность последовательности" и средства расчета идентичности последовательностей определены в данном документе по отношению к BoNT/A, и такие же определения и средства также используются при рассмотрении Lys-C.

Как правило, идентичность последовательности фермента Lys-C определяют по всей длине SEQ ID NO: 8 или 9, т.е. по длине, составляющей 333 aa или 581 aa соответственно. Термин "по меньшей мере 50% идентичность последовательности", как используется в данном документе, обозначает по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичность последовательности.

Протеолитически активный полипептид Lys-C может иметь такое же количество аминокислот, как и последовательность эталонного полипептида, как показано в SEQ ID NO: 8. В качестве альтернативы полипептид может иметь дополнительные аминокислотные остатки или меньшее количество аминокислотных остатков. Например, протеолитически активный полипептид представленного изобретения может состоять или содержит процессинговый мутант SEQ ID NO: 8 или 9 или полипептид, имеющий по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 8 или 9. Процессинговому мутанту SEQ ID NO: 9, может, например, не хватать одного или более аминокислотных остатков на N-конце к позиции аминокислоты 249. Процессинговый мутант может представлять собой N- или C-концевой процессинговый мутант и/или внутренний процессинговый мутант, который является протеолитически активным.

Процессинговому мутанту SEQ ID NO: 9 может не хватать позиций аминокислот с 1 до 248 SEQ ID NO: 9. В качестве альтернативы процессинговый мутант SEQ ID NO: 9 может представлять собой C-концевой процессинговый мутант. Процессинговому мутанту может не хватать вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 50, 100, 150 или вплоть до 170 следующих друг за другом аминокислотных остатков. Протеолитически активный полипептид может иметь аминокислотную протяженность, составляющую по меньшей мере 200 аминокислотных (aa) остатков, по меньшей мере 250 aa остатков, по меньшей мере 300 aa остатков или по меньшей мере 333 aa остатка. В качестве альтернативы протеолитически активный полипептид может иметь вплоть до 333 aa остатков, вплоть до 350 aa остатков, вплоть до 573 остатков, вплоть до 581 aa остатка, вплоть до 592 aa остатков, вплоть до 600 aa или вплоть до 617 aa остатков.

Протеолитически активный полипептид может включать полипептид, включающий дополнительные аминокислотные остатки на N- или C-конце и/или во внутренней позиции полипептидной цепи SEQ ID NO: 8 или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 8. Данные дополнительные аминокислотные остатки могут включать в себя вплоть до 5, вплоть до 10 или даже вплоть до 200, 300 или вплоть до 400 следующих друг за другом аминокислотных остатков.

Дополнительные аминокислотные остатки могут функционировать в качестве ингибитора протеолитической активности. Данные дополнительные аминокислотные остатки могут удаляться протеазой. В качестве альтернативы исключены дополнительные остатки, ингибирующие протеолитическую активность полипептида. Дополнительные аминокислотные остатки могут быть окружены одним или более сайтами расщепления протеазы. В другом аспекте дополнительная аминокислотная последовательность функционирует в качестве определяемой метки и/или делает возможным связывание с твердой подложкой.

В другом аспекте полипептидная цепь SEQ ID NO: 8 или полипептидной последовательности, име-

ющей по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 8, модифицирована посредством обмена одного или более аминокислотных остатков. Термин "обмен", как используется в данном документе, обозначает замещение аминокислоты другой аминокислотой. Например, в пределах полипептидной последовательности может быть заменено вплоть до 1 аминокислоты (aa), 2 aa, 3 aa, 4 aa, 5 aa, 6 aa, 7 aa, 8 aa, 9 aa, 10 aa, 15 aa, 20 aa или вплоть до 50 aa. Обмены могут затрагивать консервативные или неконсервативные замены аминокислот, направленные, например, на увеличение или уменьшение субстрата связывания или протеолитической активности полипептида.

Как правило, протеолитически активный полипептид включает в себя полипептид, который способен гидролизировать субстрат (например, одноцепочечный белок BoNT/A) на два или более природных продукта (продуктов) расщепления. Полипептид представленного изобретения может гидролизировать субстрат на два или более продукта расщепления, которые являются такими же или отличаются от природных продуктов расщепления. Предпочтительно продукты расщепления являются такими же, как природные продукты расщепления.

Термин "природные продукты расщепления" или "природные продукты", как используется в данном документе, относится к продуктам, которые являются идентичными по аминокислотной последовательности при сравнении с продуктами, происходящими из одного и того же субстрата в культурах клеток дикого типа, из которых происходит субстрат. В предпочтительном варианте осуществления продукт расщепления представляет собой бицепной нейротоксин ботулинового нейротоксина или столбнячного нейротоксина. В более предпочтительном варианте осуществления бицепной нейротоксин представляет собой нейротоксин, выделенный из *C. botulinum* серотипа A, B, C₁, D, E, F или G. В другом аспекте указанный бицепной нейротоксин представляет собой природный бицепной нейротоксин BoNT/A.

Должно быть понятно, что определение и объяснение терминов, сделанные выше и ниже, если не указано иное, применяются с учетом необходимых изменений для всех аспектов, описанных в данном описании.

Способы получения BoNT.

Представленное изобретение относится к применению Lys-C в способе протеолитической переработки полипептида, конкретно одноцепочечного белка BoNT/A, и к средству очистки активной бицепи BoNT/A, полученной из Lys-C с применением хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC). В одном аспекте представленное изобретение относится к способу получения активной бицепи BoNT/A, включающему стадию приведения в контакт: (a) Lys-C с (b) одноцепочечным белком BoNT/A, при этом указанный одноцепочечный белок BoNT/A подвергается протеолизу посредством Lys-C, при этом указанное приведение в контакт приводит к протеолитической переработке указанного одноцепочечного белка BoNT/A по меньшей мере на два продукта расщепления, предпочтительно включая активную бицепь BoNT/A, и очистки указанной активной бицепи с применением HIC.

Способ изобретения можно использовать для получения протеолитически обработанного клостридиального нейротоксина (CNT) или ботулинового нейротоксина (BoNT), конкретно протеолитически обработанного BoNT/A, т.е. активной бицепи BoNT/A, как описано в данном документе. С применением способа представленного изобретения теперь является возможным получить композиции активной бицепи BoNT/A со значительно меньшим загрязнением необработанным или частично обработанным BoNT/A, поскольку данные загрязнители эффективно перерабатываются в бицепь BoNT/A. Способы представленного изобретения также делают возможным эффективное удаление фермента Lys-C, применяемого для переработки одноцепочечного белка BoNT/A в активную бицепь, т.е. улучшенную очистку активной бицепи BoNT/A.

Таким образом, представленное изобретение относится к очистке (расщеплению) бицепи BoNT/A от Lys-C, включая разделение посредством хроматографии с гидрофобным взаимодействием. Соответственно, изобретение предоставляет способ получения бицепного белка BoNT/A, включая предоставление одноцепочечного белка BoNT/A, приведение в контакт указанного белка BoNT/A с эндопротеиназой Lys-C в растворе и отделение белка BoNT/A от Lys-C посредством приведения в контакт раствора, содержащего белок BoNT/A и Lys-C, с гидрофобной поверхностью, при этом белок BoNT/A предпочтительно связывается с гидрофобной поверхностью. Как правило, приведение в контакт одноцепочечного белка BoNT/A с Lys-C приводит к расщеплению одноцепочечного белка BoNT/A на растворимую бицепную форму. Предпочтительно продукт расщепления одноцепочечного белка BoNT/A посредством Lys-C является таким же, как и природный продукт расщепления BoNT/A. Как правило, как одноцепочечная, так и бицепная формы BoNT/A являются растворимыми.

Одну или более фракций, собранных при колоночной хроматографии, можно концентрировать, например, посредством преципитации или ультрафильтрации.

В одном варианте осуществления, в котором изобретение предоставляет способ (как описано выше) получения растворимого бицепного белка BoNT/A, растворимый одноцепочечный белок BoNT/A предоставляется посредством способа, как описано выше, для получения растворимого одноцепочечного белка BoNT/A в клетке-хозяине, предпочтительно бактериальной клетке-хозяине, наиболее предпочтительно клетке-хозяине *E. coli*.

Для получения растворимого одноцепочечного белка BoNT/A можно использовать любую пригод-

ную экспрессирующую систему. В соответствии с представленным изобретением экспрессирующая система может представлять собой экспрессирующую систему *in vivo* или *in vitro* (бесклеточную). Примеры пригодных экспрессирующих систем *in vivo* и *in vitro* являются известными в данной области. Как определено в данном документе, экспрессирующая система может включать пригодную клетку-хозяина и/или пригодный экспрессионный вектор для применения в указанной клетке-хозяине. Например, пригодная экспрессирующая система может включать в себя бактериальную клетку-хозяина и/или экспрессионный вектор, пригодный для экспрессии растворимого одноцепочечного белка BoNT/A в указанной бактериальной клетке-хозяине.

Одноцепочечный белок BoNT/A можно получать в любой пригодной клетке-хозяине, как описано в данном документе, такой как бактериальная клетка. Как правило, применяют клетку-хозяина *Escherichia coli* (*E. coli*). Одноцепочечный белок BoNT/A можно получать посредством способа, включающего экспрессию нуклеиновокислотной последовательности в экспрессирующей системе клетки-хозяина (например, клетки *E. coli*). Такая экспрессия может включать введение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный одноцепочечный белок BoNT/A, в указанную клетку-хозяина, и трансляцию указанной молекулы нуклеиновой кислоты для получения одноцепочечного белка BoNT/A. Способы и методики, применяемые для экспрессии гетерологических белков в экспрессирующих системах, включая экспрессирующие системы *E. coli*, являются хорошо известными в данной области.

Как правило, указанный растворимый одноцепочечный белок BoNT/A экспрессируется в цитоплазме указанной клетки-хозяина *E. coli*.

Растворимый одноцепочечный белок BoNT/A может экспрессироваться на уровне (концентрации), составляющем по меньшей мере 5 мг/л (например, по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 или 500 мг/л, 1 мг/мл, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100 мг/мл или более). Как правило, уровень экспрессии одноцепочечного белка BoNT/A относится к уровню одноцепочечного BoNT/A в клеточной культуре. В одном варианте осуществления указанный уровень экспрессии относится к необработанному гомогенату клетки-хозяина (например, бактериальной клетки-хозяина), т.е. необработанному гомогенату клеток-хозяев (например, бактериальных клеток-хозяев), применяемых для экспрессии одноцепочечного белка BoNT/A. Таким образом, в одном варианте осуществления уровень экспрессии одноцепочечного белка BoNT/A в необработанном гомогенате клетки-хозяина, например необработанном гомогенате бактериальной клетки-хозяина, составляет по меньшей мере 5 мг/л (как определено в данном документе).

Способ получения растворимого одноцепочечного белка BoNT/A, как описано выше, может включать лизис клетки-хозяина, предпочтительно бактериальной клетки-хозяина, наиболее предпочтительно клетки-хозяина *E. coli*, для предоставления гомогената клетки-хозяина, более предпочтительно гомогената бактериальной клетки-хозяина, наиболее предпочтительно гомогената клетки-хозяина *E. coli*, содержащего указанный растворимый одноцепочечный белок BoNT/A. Способы и методики, применяемые для лизиса клеток-хозяев, таких как бактериальные клетки, в частности клетки-хозяева *E. coli*, являются известными в данной области. Примеры включают ультразвуковую обработку или применение пресс Френча.

Очистку *C. botulinum* или *E. coli*, экспрессирующих одноцепочечный белок BoNT/A, можно делать, например, как фактически описано в предыдущем уровне техники (DasGupta 1984, *Toxicon* 22, 415; Sathyaamoorthy 1985, *J. Biol. Chemistry* 260, 10461). В частности, очистка нейротоксина может включать один или более этапов преципитации и экстрагирования, один или более этапов концентрации и дополнительные отдельные хроматографические стадии. Рекомбинантный одноцепочечный BoNT/A и его очистка описаны в предшествующем уровне техники (Rummel et al., 2004, *Mol. Microbiol.* 51:631-43).

Бактериальной клеткой-хозяином, применяемой для получения одноцепочечного белка BoNT/A или его производного, может быть *C. botulinum* или *E. coli*. Для ферментации можно использовать процесс, описанный DasGupta B.R. et al., в *Toxicon*, vol. 22, № 3, p. 414-424, 1984. Вследствие этого 0,5% экстракт дрожжей и 0,6% автоклавированную дрожжевую пасту добавляют к 2% среде N-Z-амин типа А, и pH 7,2 будет достигнута с помощью 4М NaOH, и среда, приготовленная таким образом, будет после этого автоклавирована. К данной среде можно добавить отдельно автоклавированную глюкозу (20% по массе на объем), чтобы достичь в среде итоговой концентрации глюкозы, составляющей 0,5%. Инкубирование может происходить, например, при 37°C без встряхивания, при этом ферментацию прерывают, например, после 96 ч. Можно использовать периодическую ферментацию, полупериодическую ферментацию, повторную периодическую ферментацию или непрерывную ферментацию.

После фактической ферментации и отделения ферментационной среды от клеток ферментационную среду можно подвергнуть первой преципитации с целью удаления крупных белков. Преципитация представляет собой предпочтительно кислотную преципитацию. Условия реакции для данной кислотной преципитации являются известными квалифицированному специалисту в данной области. Как правило, для закисления супернатанта до pH 3,5 можно использовать 1,5М H₂SO₄. Центрифугирование обычно происходит в течение 20 мин при 2400×g при 4°C. Осадок, полученный посредством центрифугирования, можно промыть водой, предпочтительно повторно. В дальнейшем осадок можно экстрагировать буферным раствором 0,1М лимонной кислоты-тринатрия цитрата, pH 5,5, например, в течение часа. В даль-

нейшем можно выполнить этап дополнительного центрифугирования, например, при 9800×g в течение 20 мин при 4°C. Полученный таким образом осадок затем необязательно можно вновь экстрагировать, как описано ранее. Супернатант экстрагирования и оба супернатанта в случае повтора экстрагирования затем можно подвергнуть осаждению протамина сульфатом. Преципитация может продолжаться в течение ночи, например, при 8°C. В дальнейшем преципитат можно центрифугировать, например, в течение 20 мин при 4°C и при 1200×g. Супернатант центрифугирования можно подвергнуть осаждению, такому как осаждение сульфатом аммония, тем самым можно удалить другие более крупные белки. После этапа осаждения сульфатом аммония можно добавить этап еще одного центрифугирования, и в дальнейшем полученный таким образом осадок можно растворить повторно и, необязательно, подвергнуть диализу. Экстракт, который предпочтительно диализован и вновь центрифугирован, можно подвергнуть последовательным этапам хроматографии с целью очистки нейротоксина. Каждый из этапов хроматографии служит для удаления загрязнителей, таких как протамина сульфат, оставшейся ДНК, частей более мелких белков и белков средней величины, а также гемагглютининов белкового комплекса ботулинового нейротоксина. С этой целью в предпочтительном варианте осуществления можно применить один или более этапов хроматографии. Необязательно, элюат, например, последнего этапа хроматографии, можно профильтровать с целью удаления микроорганизмов. Необязательно элюат можно разбавить перед фильтрованием и можно добавить подходящие вспомогательные вещества. Во время дополнительных этапов после добавления вспомогательных веществ может быть выполнено другое стерилизующее фильтрование. В одном аспекте фильтрование проводят в реакционных емкостях, которые затем можно подвергнуть этапу лиофилизации.

Одноцепочечный белок BoNT/A может быть введен в контакт с Lys-C после того, как он был выделен из клетки-хозяина или лизата клетки-хозяина, а затем подвергнут способу представленного изобретения.

Когда одноцепочечный белок BoNT/A изобретения вводят в контакт с Lys-C, протеолитическое действие Lys-C расщепляет одноцепочечный белок на участке между L-цепью компонента протеазы и компонентом транслокации для получения бицепного белка, в котором две цепи связаны посредством дисульфидного мостика. Например, две цепи, образованные после расщепления одноцепочечного BoNT/A1, A2 и A4-A6 в сайте активации, являются первой цепью аминокислотных остатков 1-438 и второй цепью аминокислотных остатков 449-1296 (кроме A6, в котором вторая цепь имеет аминокислотные остатки 449-1297), при этом остатки 439-447 удаляют посредством явления расщепления. Две цепи, образованные после расщепления одноцепочечного BoNT/A3 в сайте активации, являются первой цепью аминокислотных остатков 1-434 и второй цепью аминокислотных остатков 445-1292, при этом остатки 435-444 удаляют посредством явления расщепления. Таким образом, Lys-C можно использовать для активации одноцепочечного полипептида посредством его превращения в активную бицепную форму. Преимущественно поэтому применение Lys-C означает, что нет необходимости встраивать в BoNT/A экзогенный (неприродный) сайт расщепления, а также делает возможным получение природной бицепи BoNT/A.

В одном варианте осуществления ссылка на Lys-C охватывает Lys-C-подобные и варианты ферменты, которые расщепляют в таком же сайте расщепления протеазы, как и Lys-C, как описано в данном документе.

Термин "введение в контакт", как используется в данном документе, относится к приведению по меньшей мере двух различных соединений в физическую близость так, чтобы сделать возможным физическое и/или химическое взаимодействие указанных соединений. В соответствии со способом данного изобретения указанные два различных соединения представляют собой одноцепочечный белок BoNT/A и Lys-C, которые включены в раствор. Приведение в контакт производят в условиях и в течение времени, достаточном, чтобы сделать возможным взаимодействие одноцепочечного белка BoNT/A и Lys-C.

Термин "подверженный протеолизу" относится к признаку или критерию одноцепочечного белка BoNT/A и применяется в данном документе, означая, что указанный одноцепочечный белок BoNT/A протеолитически расщепляется посредством Lys-C. Другими словами, термин "подверженный протеолизу" означает, что одноцепочечный белок BoNT/A включает сайт распознавания и расщепления протеазы, позволяющий ему функционировать в качестве субстрата Lys-C. Как описано в данном документе, одноцепочечный белок BoNT/A является субстратом Lys-C и протеолитически перерабатывается в два или более продукта расщепления (предпочтительно именно два пептида - L-цепь или его фрагмент и H-цепь или его фрагмент, соединенные друг с другом через дисульфидный мостик). С применением анализа, описанного в данном документе выше, квалифицированный специалист может тестировать, является ли данный одноцепочечный белок BoNT/A субстратом первого полипептида и, таким образом, "второго полипептида" в соответствии с определением представленного изобретения. Термин "по меньшей мере два продукта расщепления" включает, например, вплоть до двух, трех, четырех, пяти и вплоть до шести продуктов расщепления.

Данный способ можно использовать, например, для приготовления фармацевтической композиции, содержащей бицепь BoNT/A, или для создания полипептидных фрагментов, применяемых в способе

масс-спектрометрии. Lys-C и одноцепочечный белок BoNT/A могут контактировать на различных этапах процесса получения бицепса BoNT/A. Например, этап приведения в контакт Lys-C и одноцепочечного белка BoNT/A может происходить в пределах клетки, например, посредством экспрессии Lys-C и одноцепочечного белка BoNT/A в указанной клетке.

В качестве альтернативы указанный этап приведения в контакт происходит в клеточном лизате или в очищенном клеточном лизате. Он включает в себя добавление Lys-C к лизату или очищенному лизату. Lys-C можно добавлять на различных этапах во время очистки одноцепочечного белка BoNT/A от клеточного лизата. Например, Lys-C можно добавить перед или после: осаждения белка, ионообменной хроматографии, хроматографии с гидрофобным взаимодействием и/или эксклюзионной хроматографии.

Этап приведения в контакт требует инкубирования в условиях и в течение времени, достаточном, чтобы Lys-C расщепил одноцепочечный белок BoNT/A. Иллюстративные условия могут включать добавление буферного раствора, выбранного из группы, состоящей из 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 или PBS (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7,4). Предпочтительные буферные условия включают 100 mM Tris-HCl, pH 8,0. "Время, достаточное для расщепления" можно определить с применением анализа, описанного в данном документе выше. В одном аспекте указанное "время, достаточное для расщепления" зависит от степени расщепления, которую должен иметь протеолитически обработанный полипептид или содержащая его композиция. В одном аспекте способ включает стадию инкубирования Lys-C и одноцепочечного белка BoNT/A в течение по меньшей мере 30 мин, 60 мин, 120 мин или по меньшей мере 240 мин. В другом аспекте Lys-C и одноцепочечный белок BoNT/A инкубируют в течение вплоть до 30 мин, 60 мин, 120 мин, 240 мин, 480 мин или вплоть до 600 мин. В другом аспекте способ включает стадию инкубирования Lys-C и одноцепочечного белка BoNT/A при 4°C или при 37°C. В другом аспекте способ включает стадию инкубирования в течение вплоть до 1 ч, вплоть до 2 ч, 4 ч, 6 ч, 10 ч или вплоть до 16 ч.

В одном варианте осуществления, в котором изобретение предоставляет способ (как описано выше) получения растворимого бицепсного белка BoNT/A, способ включает отделение растворимого белка BoNT/A от Lys-C посредством приведения в контакт раствора, содержащего растворимый белок BoNT/A и Lys-C с гидрофобной поверхностью, при этом растворимый белок BoNT/Lys-C предпочтительно связывается с гидрофобной поверхностью.

Авторы представленного изобретения обнаружили, что большой выход активированного бицепсного белка BoNT/A можно получить посредством применения процесса гидрофобной очистки, чтобы отделить активированный бицепсной полипептид от Lys-C. Неожиданно, данный процесс обеспечивает превосходную очистку по сравнению со стандартной очисткой с применением ионообменной хроматографии, которая, как обнаружили авторы представленного изобретения, является менее эффективной для отделения активированного бицепсного полипептида от Lys-C. В дополнение процесс преимущественно предоставляет активированный бицепсной белок BoNT/A, который не содержит активированную протеазу и, таким образом, пригоден для применения в терапии в виде части общего процесса очистки.

Как описано в данном документе, получение активного рекомбинантного BoNT/A требует протеолитического этапа, который расщепляет молекулу до активной бицепсной формы. Данного расщепления можно достичь посредством этапа активации *in vitro* с применением эндопротеиназы Lys-C. После этапа активации важно удалить Lys-C из конечного продукта, что также предотвращает любое дополнительное неспецифическое расщепление BoNT/A.

Как показано в табл. 2 ниже, расчетные изоэлектрические точки (pI) Lys-C и BoNT/A составляют 6,70 и 6,05 соответственно, что указывает, что разделения двух белков можно было бы достичь посредством ионообменной (IEX) хроматографии, использующей разницу зарядов между двумя молекулами. Суммарный заряд белка подвергается влиянию pH окружающей его среды и будет более положительно или отрицательно заряжен в зависимости от того, получит ли он или потеряет протоны, pI представляет собой значение pH, при котором молекула не несет электрического заряда и поэтому не будет взаимодействовать с заряженной средой IEX. Это означает, что если белок находится в pH выше его pI, то он будет нести чистый отрицательный заряд и будет связываться с положительно заряженной средой, такой как анионообменник. Аналогичным образом, если pH буферного раствора ниже pI, то белок будет нести чистый положительный заряд и не будет связываться с анионообменником.

Более того, как проиллюстрировано в табл. 2, BoNT/A и Lys-C имеют сходную среднюю гидропатичность, но большую разность заряда при pH 4,5 и 8,0. Основываясь на данном принципе, следовало бы ожидать, что ионообменную хроматографию (IEX) можно использовать для расщепления (разделения) BoNT/A и Lys-C. IEX является простым и недорогим способом хроматографии, так что она не требует, чтобы белок, загружаемый в колонку, находился в высокосолеовом буферном растворе, что могло бы приводить к потере белка посредством осаждения.

Авторы представленного изобретения протестировали множество анионообменных колонок с применением как сильных, так и слабых функциональных групп, прикрепленных к перекрестно-сшитым агарозным гранулам, при pH 8. При сравнении с элюированием BoNT/A было обнаружено, что неожиданно Lys-C элюирует с аналогичной ионной силой (табл. 3; фиг. 7-10), показывая, что Lys-C не был отделен, как прогнозировали, и будет присутствовать в итоговом очищенном продукте BoNT/A с дополнительной возможностью добавочной дегидратации BoNT/A.

Авторы представленного изобретения решили вышеуказанную проблему. Более подробно, авторы изобретения неожиданно определили, что оптимальное отделение Lys-C-BoNT/A достигается посредством применения гидрофобной поверхности раздела (например, посредством хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC), которая отделяет белки в соответствии с различием в гидрофобности их поверхностей посредством использования обратимого взаимодействия между данными белками и гидрофобной поверхностью HIC матрицы/смолы).

Как правило, активная бицепь BoNT/A преимущественно связывается с гидрофобной поверхностью HIC смолы/матрицы (данные термины применяют взаимозаменяемо в данном документе) по сравнению с Lys-C, связывающимся с гидрофобной поверхностью. "Преимущественное" связывание можно определить как повышенное или улучшенное связывание активной бицепи BoNT/A с гидрофобной поверхностью по сравнению со связыванием Lys-C с гидрофобной поверхностью. Например, активная бицепь BoNT/A может связываться с гидрофобной поверхностью, по меньшей мере, с двухкратной, трехкратной, четырехкратной, пятикратной, шестикратной, семикратной, восьмикратной, девятикратной, десятикратной, 15-кратной, 20-кратной, 25-кратной, 30-кратной, 40-кратной, 50-кратной, 100-кратной или более аффинностью Lys-C к гидрофобной поверхности. В предпочтительном варианте осуществления активная бицепь BoNT/A связывается с гидрофобной поверхностью, по меньшей мере, с пятикратной, или, по меньшей мере, с десятикратной аффинностью Lys-C к гидрофобной поверхности.

В одном варианте осуществления гидрофобная поверхность представляет собой инертную матрицу/смолу, к которой прикрепляется лиганд, включающий или состоящий из арильных или алкильных групп.

Термин "арильная" относится к ароматическим группам, например фенильной, нафтильной, тиенильной и индолильной.

Термин "алкильная" относится к алифатическим группам, включая прямоцепочечные, с разветвленной цепью, циклическим группам и их комбинациям. Алкильная группа может иметь от 1 до 12 атомов углерода. Примеры алкильных групп включают, но без ограничения, такие группы, как метильная, этильная, пропильная (например, n-пропильная, изопропильная), бутильная (например, n-бутильная, изобутильная, втор-бутильная, t-бутильная), пентильная, гексильная, гептильная и октильная.

В одном варианте осуществления гидрофобная поверхность содержит один или более лигандов, выбранных из группы, состоящей из бутильного, фенильного или октильного лигандов.

В одном варианте осуществления гидрофобная поверхность содержит бутильные лиганды. В одном варианте осуществления гидрофобная поверхность содержит фенильные лиганды. В одном варианте осуществления гидрофобная поверхность содержит октильные лиганды.

Гидрофобная поверхность может содержать любую пригодную инертную матрицу/смолу с соответствующим прикрепленным гидрофобным лигандом. Например, инертная матрица/смола может быть выбрана из диоксида кремния, поперечно-сшитого декстрана, поперечно-сшитого полиакриламида или поперечно-сшитой агарозы и т.п. Также в отдельных полипептидах содержится стекло, полистирол, полипропилен, полиэтилен, полиэтиленгликоль (PEG), декстран, нейлон, амилазы, натуральные и модифицированные целлюлозы, полиакриламиды, габбро и магнетит. Инертной матрицей, например, является полисахаридная матрица, выбранная из группы, состоящей из сефарозы, сефадекса, агарозы, цефцели, микроцеллюлозы и альгинатовых шариков. В другом аспекте указанная инертная матрица/смола может состоять из стеклянных шариков и/или полипептидных матриц.

Инертная матрица/смола может иметь любую пригодную структурную конфигурацию или компоновку. Например, матрица/смола может быть сферической, как в шарике, или цилиндрической, как на внутренней поверхности пробирки, или на наружной поверхности стержня. В качестве альтернативы матрица может быть неправильной или плоской, такой как лист или тестовая полоска.

Авторы представленного изобретения открыли, что особенно предпочтительные результаты отделения Lys-C от BoNT/A получаются с HIC с применением хроматографических матриц/смол, содержащих алкильные или арильные группы, например бутильный, фенильный и октильный лиганды, соединенные с инертной матрицей/смолой, такие как поперечно-сшитая агароза или полистирольные шарики (табл. 4; фиг. 1-3).

Применение HIC обеспечивает улучшенное отделение Lys-C от активной бицепи BoNT/A по сравнению с ионообменной хроматографией (IEX).

В соответствии с представленным изобретением для HIC хроматографии можно использовать "Fast flow" смолы/матрицы. "Fast flow" смола/матрица может быть определена как смола/матрица с более однородным средним размером частиц, чем стандартная HIC смола/матрица, и будет использовать более маленькие частицы. Конкретно, "Fast flow" смола/матрица будет иметь более узкий диапазон размеров более маленьких частиц. Размер частиц может быть количественно определен любым соответствующим способом, известным в данной области, например в показателях среднего диаметра частиц. Как правило, "Fast flow" смола/матрица будет содержать частицы (например, шарики) среднего диаметра менее 100 мкм, менее 95 мкм, менее 90 мкм или менее. В предпочтительном варианте осуществления средний диаметр "Fast flow" смолы/матрицы составляет менее 90 мкм. Как правило, распределение средних частиц "Fast flow" смолы/матрицы будет от приблизительно 20 до приблизительно 180 мкм, от приблизительно

30 до приблизительно 170 мкм, от приблизительно 40 до приблизительно 170 мкм, от приблизительно 40 до приблизительно 165 мкм. В предпочтительном варианте осуществления распределение средних частиц "Fast flow" смолы/матрицы составляет от приблизительно 44 до приблизительно 165 мкм.

В предпочтительном варианте осуществления используют высокоэффективные НИС смолы, такие как фенильные высокоэффективные (PhHP) или бутильные высокоэффективные (BuHP) смолы. Подобные высокоэффективные НИС матриц/смолы, как правило, обеспечивают улучшенное отделение Lys-C от активной бицепи BoNT/A по сравнению с ионообменной хроматографией (IEX), даже когда используют высокоэффективные IEX матрицы/смолы, такие как четвертично-аминовые высокоэффективные (QHP) матрицы/смолы. Как обсуждалось в данном документе, основное различие между высокоэффективными смолами/матрицами и другими состоит в том, что средний размер частиц (снова он может быть количественно определен любым соответствующим способом, известным в данной области, например, средний диаметр частиц) является более маленьким (34 мкм против 90 мкм) и более однородным (24-44 мкм против 44-165 мкм), результатом чего является улучшенное разделение.

Как правило, высокоэффективная НИС смола/матрица имеет более однородный средний размер частиц, чем стандартная НИС смола/матрица или даже "Fast flow" смола/матрица, как определено в данном документе, и будет использовать более маленькие частицы. Конкретно, высокоэффективная НИС смола/матрица будет иметь более узкий диапазон более маленьких размеров частиц, чем стандартная НИС смола/матрица или даже "Fast flow" смола/матрица, как определено в данном документе.

Таким образом, изобретение обеспечивает применение высокоэффективных НИС смол/матриц. Как правило, высокоэффективная НИС смола/матрица имеет средний диаметр частиц менее 70 мкм, менее 60 мкм, менее 50 мкм, менее 40 мкм, менее 30 мкм или меньше. В предпочтительном варианте осуществления высокоэффективная НИС смола/матрица имеет средний диаметр частиц менее 40 мкм, более предпочтительные менее 35 мкм, например 34 мкм.

Как правило, распределение средних частиц высокоэффективной НИС смолы/матрицы будет от приблизительно 10 до приблизительно 60 мкм, от приблизительно 10 до приблизительно 50 мкм, от приблизительно 20 до приблизительно 50 мкм, от приблизительно 20 до приблизительно 44 мкм. В предпочтительном варианте осуществления распределение средних частиц высокоэффективной НИС смолы/матрицы составляет от приблизительно 22 до приблизительно 44 мкм.

Как правило, процесс гидрофобной очистки для отделения активированного бицепного белка BoNT/A от Lys-C уменьшает концентрацию Lys-C по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 35 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 45 раз или по меньшей мере в 50 раз. В предпочтительном варианте осуществления процесс гидрофобной очистки для отделения активированного бицепного белка BoNT/A от Lys-C уменьшает концентрацию Lys-C по меньшей мере в 10 раз.

Способность гидрофобной очистки отделять активированную бицепь BoNT/A от Lys-C также может быть количественно определен в показателях процентного содержания Lys-C, содержащейся в первоначальном растворе, содержащем активированную бицепь BoNT/A и Lys-C, которое остается после стадии гидрофобной очистки. Как правило, при получении бицепи BoNT/A после стадии гидрофобной очистки остается менее 80, 70, менее 60, менее 50, менее 45, менее 40, менее 35, менее 30, менее 25, менее 20, менее 19, менее 18, менее 17, менее 16, менее 15, менее 14, менее 13, менее 12, менее 11, менее 10, менее 9, менее 8, менее 7, менее 6, менее 5, менее 4, менее 3, менее 2, менее 1% или меньше, включая 0% Lys-C. Предпочтительно при получении бицепи BoNT/A после стадии гидрофобной очистки остается менее 50%, более предпочтительно менее 25%, даже более предпочтительно менее 10% Lys-C.

В родственном аспекте изобретение предоставляет активный бицепной белок BoNT/A, получаемый посредством способа (как описано выше) получения растворимого бицепного белка BoNT/A.

В одном аспекте изобретение предоставляет композицию, содержащую активный бицепной белок BoNT/A (как описано выше), при этом указанная композиция, по существу, не содержит Lys-C.

Таким образом, композиция преимущественно, по существу, не содержит протеазу Lys-C (используемую для активации одноцепочечного полипептида посредством его преобразования в активную бицепную форму), предотвращая таким образом нежелательное неспецифическое расщепление белка BoNT/A.

При этом композиция (как описано выше), по существу, не содержит Lys-C, при этом композиция, как правило, содержит менее 400 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A; например, менее 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 5, 4, 3, 2, 1 пг или менее Lys-C на 100 нг белка BoNT/A. В одном варианте осуществления композиция (как описано выше) содержит менее 400 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 350 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 300 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 250 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 200 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 150 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 100 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 50 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 40 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 30 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 20 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 15 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 14 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 13 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 12 пг Lys-C на 100

нг белка BoNT/A, менее 11 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 10 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 9 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 8 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 7 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 6 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 5 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A или меньше. В предпочтительном варианте осуществления композиция (как описано выше) содержит менее 100 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A или менее 50 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 20 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 15 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A или менее 10 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A.

Способы определения концентрации Lys-C в композиции являются известными в данной области. В качестве примера концентрация Lys-C в композиции изобретения может быть определена с применением сэндвич-ELISA (фермент-связанного иммуносорбентного исследования) или калориметрического анализа, как описано в данном документе.

Фармацевтические композиции и клинические показания.

Представленное изобретение также относится к композиции, получаемой посредством способа представленного изобретения, для получения бицепси BoNT/A. В одном аспекте указанная композиция содержит смесь обработанного (бицепсного) и необработанного (одноцепочечного) BoNT/A, при этом указанная смесь может содержать менее 5, 4, 3, 2 или менее 1% необработанного (одноцепочечного) BoNT/A. В аспекте указанной композиции ссылки на BoNT/A охватывают ее производное, как определено в данном документе. Композиция может представлять собой, например, жидкую или твердую композицию и может содержать один или более носителей, вспомогательных веществ и/или эксципиентов.

В другом аспекте представленное изобретение также относится к способу получения лекарственного средства, т.е. фармацевтической композиции, включающему стадии упомянутого выше способа и дополнительную стадию приготовления готовой формы очищенной бицепси BoNT/A в качестве лекарственного средства. Как правило, указанное лекарственное средство содержит смесь обработанного (бицепсного) и необработанного (одноцепочечного) BoNT/A, при этом указанная смесь содержит менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5% или меньше необработанного (одноцепочечного) BoNT/A. В предпочтительном варианте осуществления смесь содержит менее 5% необработанного (одноцепочечного) BoNT/A, например менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1% необработанного (одноцепочечного) BoNT/A.

Представленное изобретение также относится к различным медицинским и эстетическим (косметическим) способам применения соединений и композиций, раскрытых в данном документе. Соответственно, представленное изобретение относится к активной бицепси BoNT/A или композиции, содержащей активную бицепсь BoNT/A в соответствии с представленным изобретением, для применения в качестве лекарственного средства или в фармацевтической композиции. Представленное изобретение также относится к применению активной бицепси BoNT/A или композиции, содержащей активную бицепсь BoNT/A представленного изобретения, при изготовлении лекарственных средств. Представленное изобретение также относится к активной бицепси BoNT/A или композиции, содержащей активную бицепсь BoNT/A представленного изобретения, для применения в способе лечения организма человека или животного посредством терапии. Представленное изобретение также относится к способу лечения, включающему введение активной бицепси BoNT/A или композиции, содержащей активную бицепсь BoNT/A представленного изобретения, нуждающемуся в этом пациенту.

Термин "композиция", как используется в данном документе, относится к любой композиции, готовая форма которой приготовлена в твердом, жидком, аэрозольном (или газообразном) виде и т.п. Указанная композиция содержит, например, терапевтически активное соединение изобретения необязательно вместе с подходящими вспомогательными соединениями, такими как разбавители или носители или дополнительные ингредиенты. В одном аспекте терапевтически активным соединением является активная бицепсь BoNT/A представленного изобретения. Композиции, в частности фармацевтические композиции изобретения, как правило, по существу, не содержат Lys-C, как определено в данном документе.

Таким образом, представленное изобретение предоставляет твердую или жидкую фармацевтическую композицию, содержащую:

- (a) активный бицепсный белок BoNT/A, как описано выше, и
- (b) стабилизирующий агент.

В одном варианте осуществления композиция (как описано выше), по существу, не содержит Lys-C. Например, композиция (как описано выше) может содержать менее 400 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 300 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 200 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 100 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 50 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 20 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 15 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A или менее 10 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A.

Стабилизирующие агенты, которые можно использовать в композиции в соответствии с изобретением, включают белковые стабилизаторы, такие как альбумин, в частности альбумин человеческой сыворотки (HSA), и небелковые стабилизаторы.

Небелковые стабилизирующие агенты, которые можно использовать в композиции в соответствии с изобретением, включают поверхностно-активные вещества, в частности неионные поверхностно-

активные вещества. Примеры неионных поверхностно-активных веществ включают полисорбаты, такие как полисорбат 20 или полисорбат 80, и блок-сополимеры, такие как полоксамеры (т.е. сополимеры полиэтилена и пропиленгликоля).

В отдельном варианте осуществления композиция не содержит белок в качестве стабилизирующего агента.

В соответствии с отдельным вариантом осуществления изобретения фармацевтической композицией является жидкая фармацевтическая композиция, содержащая:

- (a) активный бицепной белок BoNT/A, как описано выше;
- (b) небелковый стабилизирующий агент, которым является поверхностно-активное вещество; и
- (c) воду;

при этом указанная жидкая фармацевтическая композиция не содержит белковый стабилизирующий агент; и

при этом указанная жидкая фармацевтическая композиция, по существу, не содержит Lys-C, при этом "по существу не содержит Lys-C" имеет смысл, который определен в данном документе (например, указанная жидкая фармацевтическая композиция содержит менее 400 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 300 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 200 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 100 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 50 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 20 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 15 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A или менее 10 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A).

В одном варианте осуществления активный бицепной белок BoNT/A присутствует в композиции (как описано выше) в концентрации, составляющей 1-1000 нг/мл или более. Таким образом, активный бицепной белок BoNT/A может присутствовать в композиции (как описано выше) в концентрации, составляющей приблизительно 1-500 нг/мл, например, приблизительно 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 нг/мл или более. В предпочтительном варианте осуществления активный бицепной белок BoNT/A присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 100 нг/мл, 200 нг/мл, 300 нг/мл, 400 нг/мл, 500 нг/мл, 600 нг/мл или 700 нг/мл.

В одном варианте осуществления поверхностно-активным веществом (как описано выше) является полисорбат, например полисорбат, имеющий среднюю степень полимеризации, варьирующую от 20 до 100 мономерных звеньев, и может, например, представлять собой полисорбат 80. В предпочтительном варианте осуществления полисорбат имеет растительное происхождение. Концентрация поверхностно-активного вещества предпочтительно ниже чем 1% о/о, например, в случае полисорбата 80 от приблизительно 0,005 до 0,02% о/о.

Фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением также может содержать кристаллический агент.

Под кристаллическим агентом подразумевают агент, который между прочим сохраняет механически прочную спрессованную структуру лиофилизированного комплекса ботулинового нейротоксина (тип A, B, C₁, D, E, F или G) или ботулиновый нейротоксин высокой чистоты (тип A, B, C₁, D, E, F или G). При включении в твердые готовые формы кристаллические агенты также обладают эффектом увеличения объема. В особенности кристаллические агенты содержат хлорид натрия. Концентрация кристаллического агента может составлять, например, от 0,1 до 0,5М, предпочтительно от 0,1 до 0,4М, особенно приблизительно от 0,15 до 0,3М.

Фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением также может содержать буферный раствор для поддержания уровня pH, находящегося между 5,5 и 7,5 или между 6,0 и 7,0. Буферным раствором может быть любой буферный раствор, способный поддерживать адекватный pH. Например, буферный раствор для композиции в соответствии с изобретением можно выбрать из группы, состоящей из сукцината, динатрия фосфата/лимонной кислоты и аминокислоты, такой как гистидин. Концентрация буферного раствора может составлять, например, от 1 до 50 мМ, предпочтительно от 5 до 20 мМ, предпочтительно приблизительно 10 мМ.

Фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением также может содержать дисахарид.

Дисахарид, используемый в композиции в соответствии с изобретением, можно выбрать из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, маннитола и лактозы. В конкретном варианте осуществления дисахаридом является сахароза. Концентрация дисахарида может составлять, например, от 5 до 50 мМ, предпочтительно от 5 до 25 мМ, более предпочтительно от 10 до 20 мМ, а наиболее предпочтительно приблизительно 11,7 мМ.

В отдельном варианте осуществления фармацевтической композицией является жидкая фармацевтическая композиция, содержащая:

- (a) активный бицепной белок BoNT/A, как описано выше;
- (b) небелковый стабилизирующий агент, которым является поверхностно-активное вещество;
- (c) хлорид натрия,
- (d) буферный раствор для поддержания pH между 5,5 и 7,5;
- (e) дисахарид и

(f) стерильную воду, при этом указанная жидкая фармацевтическая композиция не содержит белковый стабилизирующий агент; и

при этом указанная жидкая фармацевтическая композиция, по существу, не содержит Lys-C, при этом "по существу не содержит Lys-C" имеет смысл, который определен в данном документе (например, указанная жидкая фармацевтическая композиция содержит менее 400 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 300 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 200 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 100 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 50 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 20 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, менее 15 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A или менее 10 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A).

В соответствии с конкретным вариантом осуществления фармацевтическую композицию в соответствии с изобретением в жидкой форме закупоривают во флаконе или в готовом для использования устройстве, таком как шприц, без жидкой/газообразной поверхности раздела, и она является стабильной по меньшей мере в течение трех месяцев или по меньшей мере в течение шести месяцев при 23-27°C и в течение по меньшей мере двенадцати месяцев при 2-8°C. Иллюстративные фармацевтические композиции изобретения описаны в примерах.

Ежемесячные скорости распада фармацевтических композиций или готовых форм изобретения могут быть ниже 5% в месяц в течение 12 недель, что означает, что протеазная функция бицепси BoNT композиций или готовых форм остается стабильной при 25°C по меньшей мере в течение 12 недель.

Фармацевтические композиции представленного изобретения можно хранить в лиофилизированной форме вакуумной сушки в контейнерах при вакуумметрическом давлении или в виде стабильных жидкостей. Перед лиофилизацией активный бицепсный белок BoNT/A можно комбинировать с фармацевтически приемлемыми эксципиентами, стабилизаторами и/или носителями, такими как альбумин. Для создания раствора или композиции, содержащей активный бицепсный белок BoNT/A, подлежащий введению пациенту, лиофилизированный материал можно восстанавливать с помощью солевого раствора или воды.

В данном контексте для представленного изобретения следует проводить различие между вспомогательными соединениями, т.е. соединениями, которые не вносят вклад в результаты, вызываемые соединением представленного изобретения в результате применения композиции для ее требуемой цели, и дополнительными ингредиентами, т.е. соединениями, которые вносят вклад в дополнительный эффект или модулированный эффект соединения представленного изобретения. Подходящие разбавители и/или носители зависят от цели, с которой должна использоваться композиция, и других ингредиентов. Квалифицированный специалист в данной области техники может определить подобные подходящие разбавители и/или носители без дополнительных трудностей.

Носитель (носители) должен быть приемлемым в том смысле, что он должен быть совместим с другими ингредиентами готовой формы и быть безвредным для его получателя. Используемый фармацевтический носитель может представлять собой твердое вещество, гель или жидкость. Иллюстративным примером твердых носителей являются лактоза, каолин, сахароза, тальк, желатин, агар, пектин, камедь, стеарат магния, стеариновая кислота и т.п. Иллюстративным примером жидких носителей являются фосфатно-солевой буферный раствор, очищенная патока, масло, вода, эмульсии, различные типы смачивающих агентов и т.п. Аналогичным образом, носитель или разбавитель может содержать материал временной задержки, хорошо известный в данной области, такой как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат отдельно или с воском. Указанные подходящие носители включают носители, указанные выше и другие, хорошо известные в данной области, см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

Разбавитель (разбавители) выбирают таким образом, чтобы не оказывать влияния на биологическую активность комбинации. Примерами подобных разбавителей являются дистиллированная вода, физиологический солевой раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и раствор Хэнкса, в дополнение фармацевтическая композиция или готовая форма также может содержать другие носители, адъюванты или нетоксические, нетерапевтические, неиммуногенные стабилизаторы и т.п.

В одном аспекте фармацевтическая композиция, как используется в данном документе, содержит биологически активный нейротоксин, полученный посредством способа представленного изобретения (т.е. активную бицепс BoNT/A), необязательно, один или более фармацевтически приемлемый носитель. Активный нейротоксин может присутствовать в жидкой или лиофилизированной форме. В аспекте указанное соединение может присутствовать вместе с глицерином, белковыми стабилизаторами (например, альбумином человеческой сыворотки (HSA)) или с небелковоподобными стабилизаторами, такими как поливинилпирролидон или гиалуроновая кислота. В одном аспекте фармацевтическую композицию вводят местно. Общепринято используемым введением лекарственного препарата является внутримышечное или подкожное (как правило, около сальных желез) введение. Однако в зависимости от природы и механизма действия соединения фармацевтическую композицию также можно вводить другими путями. Бицепсный нейротоксиновый полипептид является активным ингредиентом композиции, и в одном аспекте вводится в общепринятых лекарственных формах, приготовленных за счет комбинирования лекарст-

венного вещества со стандартными фармацевтическими носителями в соответствии с общепринятой процедурой. Данные процедуры могут включать перемешивание, гранулирование и прессование или растворение ингредиентов в зависимости от обстоятельств для необходимого препарата. Следует иметь в виду, что форма и характер фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя определяется количеством активного ингредиента, с которым его нужно скомбинировать, путем введения и другими хорошо известными переменными.

Терапевтически эффективная доза относится к количеству соединения, нейротоксина, подлежащего применению в фармацевтической композиции представленного изобретения, которая предотвращает, облегчает или лечит симптомы, сопровождающие заболевание или патологическое состояние, упоминаемое в данном описании. Терапевтическая эффективность и токсичность соединения может определяться стандартными фармацевтическими процедурами в клеточных культурах или с экспериментальными животными, например ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная в 50% популяции) и LD₅₀ (доза, летальная для 50% популяции). Соотношение доз между терапевтическим и токсическим результатами является терапевтическим индексом, и его можно выразить, как соотношение, LD₅₀/ED₅₀.

Схема приема лекарственного средства будет определяться штатным врачом больницы и другими клиническими факторами. Как хорошо известно в медицинской области, дозировки для любого пациента зависят от множества факторов, включая размеры пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное соединение, подлежащее введению, пол, время и путь введения, общее здоровье и другие одновременно вводимые лекарственные вещества, успехи можно отслеживать с помощью периодических оценок. Фармацевтические композиции и готовые формы, упоминаемые в данном документе, вводят по меньшей мере один раз с целью лечения или ослабления или предотвращения заболевания или патологического состояния, перечисленных в данном описании. Однако указанные фармацевтические композиции можно вводить более чем один раз.

Как описано в данном документе, для лечения можно использовать активные бицепные белки BoNT/A изобретения и композиции и их жидкие фармацевтические композиции. Подходящие виды лечения могут включать косметические виды лечения и способы медицинского лечения.

В дополнительном аспекте изобретения упомянутой выше композицией является лекарственная или косметическая композиция. В одном аспекте указанное лекарственное средство, содержащее биологически активный нейротоксин (т.е. активную бицепь BoNT/A), можно использовать для предотвращения и/или лечения по меньшей мере одного из следующих заболеваний и расстройств: сопротивление попеременно-полосатых мышц, фокальная дистония, включая цервикальную, краниальную дистонию и доброкачественный идиопатический блефароспазм, гемифациальный спазм и фокальную спастичность, желудочно-кишечные расстройства, гипергидроз и коррекция косметических морщин, в дополнительном аспекте также блефароспазм, оромандибулярная дистония открытотелюстного типа, закрытотелюстного типа, бруксизм, синдром Мейгса, лингвальная дистония, апраксия века, открытая цервикальная дистония, антеколлиз, ретроколлиз, латероколлиз, кривошея, фарингеальная дистония, ларингеальная дистония, аддукторная спастическая дисфония, абдукторная спастическая дисфония, спастическое диспноэ, дистония конечностей, дистония верхних конечностей, дистония при выполнении специфических задач, писчий спазм, судороги музыканта, спазм игрока в гольф, дистония нижней конечности, приведение бедра, отведение бедра, коленное сгибание, коленное разгибание, сгибание ноги в голеностопном суставе, разгибание ноги в голеностопном суставе, эквиноварусная деформация стопы, деформация вследствие дистонии стопы, стриарный палец ноги, сгибание пальца стопы, разгибание пальца стопы, осевая дистония, синдром Пизанской башни, дистония исполнителя танца живота, сегментарная дистония, гемидистония, генерализованная дистония, дистония при синдроме Lubag, дистония при кортикобазальной дегенерации, дистония при синдроме Lubag, остаточная дистония, дистония при спинальном атрофическом синдроме, дистония при болезни Паркинсона, дистония при болезни Хантингтона, дистония при болезни Галлервордена-Шпатца, допа-индуцированные дискинезии/допа-индуцированная дистония, остаточные дискинезии/остаточная дистония, пароксизмальные дискинезии/дистонии, кинезиогенные, некинезиогенные, вызванные действием, небный миоклонус, миокимический миоклонус, ригидность, доброкачественные мышечные судороги, наследственное дрожание подбородка, парадоксальная активность жевательных мышц, спазмы жевательных мышц одной половины лица, гипертрофическая бронхиальная миопатия, гипертрофия жевательной мышцы, гипертрофия передней большеберцовой мышцы, нистагм, осциллопия, надъядерный паралич зрения, эпилепсия парциальная постоянная, планируемая операция при спастической кривошее, паралич отводящей мышцы голосовой складки, устойчивая мутационная дисфония, дисфункция верхнего сфинктера глотки, гранулема голосовой складки, заикание, синдром Туретта, миоклонус среднего уха, защитное смыкание голосовой щели, постларингэтомическое нарушение речи, защитный птоз, заворот век, дисфункция сфинктера Одди, псевдоахалазия, неахалазийное эзофагальное расстройство моторики, вагинизм, послеоперационный тремор при неподвижности, дисфункция мочевого пузыря, детрузорно-сфинктерная диссинергия, спазм сфинктера мочевого пузыря, гемифациальный спазм, реиннервационные дискинезии, косметическое применение при "гусиных лапках", асимметрия лица вследствие нахмуривания, ямки подбородка, синдром скованного человека, столбняк, гиперплазия простаты, лечение ожирения, детский церебральный паралич, косоглазие, смешанное, паралитическое,

содружественное, после операции при отслойке сетчатки, после операции удаления катаракты, при афакции, миозитное косоглазие, миопатическое косоглазие, диссоциированное вертикальное отклонение, как дополнение к хирургии косоглазия, сходящееся косоглазие, расходящееся косоглазие, ахалазия, анальные трещины, гиперфункция экзокринных желез, синдром Фрей, синдром крокодилий слез, гипергидроз подмышечный, ладонный, подошвенный, ринорея, относительная гиперсаливация при инсульте, при болезни Паркинсона, при спастических состояниях при боковом амиотрофическом склерозе, при процессах аутоиммунного энцефалита и миелита, рассеянный склероз, поперечный миелит, болезнь Девика, вирусные инфекции бактериальные инфекции паразитарные инфекции, грибковые инфекции, при наследственном спастическом парапарезе, постапоплектический синдром, инфаркт полушария, инфаркт ствола мозга, инфаркт спинного мозга, мигрень, при травме центральной нервной системы, поражения полушарий, поражение спинного мозга, повреждение ствола мозга, при кровоизлиянии центральной нервной системы, внутримозговое кровоизлияние, субарахноидальное кровоизлияние, субдуральное кровоизлияние, кровоизлияние в спинной мозг, при неоплазиях, опухоли полушарий, опухоли ствола головного мозга, опухоли спинного мозга, храпе (WO 2000/033863). Для подробностей и симптомов см., например, Jost 2007, Drugs 67(5), 669 или Dressier 2000 в Botulinum Toxin Therapy, Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

В другом аспекте изобретения композицией является косметическая композиция, готовая форма которой может быть приготовлена, как описано для фармацевтической композиции выше. Более того, для косметической композиции предусматривается, что соединение представленного изобретения находится в аспекте с использованием, по существу, в чистом виде. В дополнительном аспекте косметические композиции должны применяться внутримышечно. В еще одном дополнительном аспекте изобретения косметические композиции, содержащие нейротоксин, можно приготовить в виде раствора против морщин.

Все ссылки, перечисленные в данном описании, включены настоящим посредством ссылки в отношении содержания их полного раскрытия и содержания раскрытия, конкретно упомянутого в данном описании.

Ключ к SEQ ID NO.

SEQ ID NO: 1 BoNT/A ATCC 3502, Genbank доп. "AAA23262".

SEQ ID NO: 2 Петля активации BoNT/A1.

SEQ ID NO: 3 Петля активации BoNT/A2/A6.

SEQ ID NO: 4 Петля активации BoNT/A3.

SEQ ID NO: 5 Петля активации BoNT/A3.

SEQ ID NO: 6 Петля активации BoNT/A4.

SEQ ID NO: 7 Петля активации BoNT/A5.

SEQ ID NO: 8 Протеолитически активный полипептид, полученный из штамма ATCC 3502 Clostridium botulinum, GenBank дополнение № "CAL82988.1", недостающие 248 N-концевые аминокислотные остатки.

SEQ ID NO: 9 Протеолитически неактивный полипептид, полученный из штамма ATCC 3502 Clostridium botulinum, GenBank дополнение № "CAL82988.1".

SEQ ID NO: 10 Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 8.

SEQ ID NO: 11 Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 9.

SEQ ID NO: 12 Аминокислотная последовательность "Streptag".

SEQ ID NO: 13 Петля активации BoNT/A7.

SEQ ID NO: 14 Петля активации BoNT/A8.

SEQ ID NO: 15 Аминокислотная последовательность одноцепочечного, рекомбинантного, катионного производного ботулинового нейротоксина подсеротипа A1 (mrBoNT/A1).

Список фигур

Фиг. 1 - профили элюирования из фенильной высокоэффективной (PhHP) колонки, на которой оценивали отделение Lys-C (A₄₀₅ - столбцы) от BoNT/A (A₂₈₀ - пунктирная линия).

Фиг. 2 - профили элюирования из фенильной колонки сильного замещения Fast Flow (PhFF-Hi), на которой оценивали отделение Lys-C (A₄₀₅ - столбцы) от BoNT/A (A₂₈₀ - пунктирная линия).

Фиг. 3 - профили элюирования из бутильной высокоэффективной (BuHP) колонки, на которой оценивали отделение Lys-C (A₄₀₅ - столбцы) от BoNT/A (A₂₈₀ - пунктирная линия).

Фиг. 4 - профили элюирования из сульфопропильной высокоэффективной (SPHP) колонки, на которой оценивали отделение Lys-C (A₄₀₅ - столбцы) от BoNT/A (A₂₈₀ - пунктирная линия).

Фиг. 5 - профили элюирования из сульфопропильной колонки Fast Flow (SPFF), на которой оценивали отделение Lys-C (A₄₀₅ - столбцы) от BoNT/A (A₂₈₀ - пунктирная линия).

Фиг. 6 - профили элюирования из карбоксилметильной колонки Fast Flow (CMFF), на которой оценивали отделение Lys-C (A₄₀₅ - столбцы) от BoNT/A (A₂₈₀ - пунктирная линия).

Фиг. 7 - профили элюирования из четвертичноаминовой высокоэффективной (QHP) колонки, на которой оценивали отделение Lys-C (A₄₀₅ - столбцы) от BoNT/A (A₂₈₀ - пунктирная линия).

Фиг. 8 - профили элюирования из четвертичноаминовой колонки Fast Flow (QFF), на которой оценивали отделение Lys-C (A₄₀₅ - столбцы) от BoNT/A (A₂₈₀ - пунктирная линия).

Фиг. 9 - профили элюирования из диэтиламинопропиловой (DEAP, "ANX") колонки, на которой оценивали отделение Lys-C (A_{405} - столбцы) от BoNT/A (A_{280} - пунктирная линия).

Фиг. 10 - профили элюирования из диэтиламиноэтиловой (DEAE) колонки, на которой оценивали отделение Lys-C (A_{405} - столбцы) от BoNT/A (A_{280} - пунктирная линия).

Фиг. 11 - удаление Lys-C из rBoNT/A1 посредством фенильной HP HIC. Фракции, взятые со стадии очистки PhHP HIC, анализировали с помощью SDS-PAGE (вверху). Рекомбинантный BoNT/A1 имеет молекулярную массу, равную ~149 кДа, и маркеры молекулярной массы (Benchmark) метили в кДа. Образцы одних и тех же фракций также тестировали в калориметрическом анализе Lys-C (снизу), где расщепление субстрата высвобождает желтый хромофор (в черной рамке).

Фиг. 12 - удаление Lys-C из rBoNT/A2(0) посредством фенильной HP HIC. Фракции, взятые со стадии очистки фенильной HP HIC, анализировали с помощью SDS-PAGE (вверху). Рекомбинантный BoNT/A1 имеет молекулярную массу, равную ~149 кДа, и маркеры молекулярной массы (Benchmark) метили в кДа. Образцы одних и тех же фракций также тестировали в калориметрическом анализе Lys-C (внизу), где расщепление субстрата высвобождает желтый хромофор (в черной рамке).

Фиг. 13 - удаление Lys-C из rBoNT/A5(0) посредством фенильной HP HIC. Фракции, взятые со стадии очистки фенильной HP HIC, анализировали с помощью SDS-PAGE (вверху). Рекомбинантный BoNT/A5(0) имеет молекулярную массу, равную ~149 кДа, и маркеры молекулярной массы (Benchmark) метили в кДа. Образцы одних и тех же фракций также тестировали в калориметрическом анализе Lys-C (внизу), где расщепление субстрата высвобождает желтый хромофор (в черной рамке).

Фиг. 14 - удаление Lys-C из rBoNT/A6(0) посредством фенильной HP HIC. Фракции, взятые со стадии очистки фенильной HP HIC, анализировали с помощью SDS-PAGE (вверху). Рекомбинантный BoNT/A6(0) имеет молекулярную массу, равную ~149 кДа, и маркеры молекулярной массы (Benchmark) метили в кДа. Образцы одних и тех же фракций также тестировали в калориметрическом анализе Lys-C (внизу), где расщепление субстрата высвобождает желтый хромофор (в черной рамке).

Фиг. 15 - удаление Lys-C из mrBoNT/A1 посредством бутильной HP HIC. Фракции, взятые со стадии очистки бутильной HP HIC, анализировали с помощью SDS-PAGE (вверху). Рекомбинантный mrBoNT/A1 имеет молекулярную массу, равную ~149 кДа, и маркеры молекулярной массы (Benchmark) метили в кДа. Образцы одних и тех же фракций также тестировали в калориметрическом анализе Lys-C (внизу), где расщепление субстрата высвобождает желтый хромофор (в черной рамке).

Примеры

Пример 1. Культивирование хозяина и экспрессия растворимого белка rBoNT/A.

Единственную колонию BoNT/A, трансформируемого в клетках BLR (DE3), используют для инокулирования 250 мл конической колбы, содержащей 100 мл модифицированной среды Terrific Broth (mTB), дополненной 0,2% глюкозамином и 30 мкг/мл канамицина.

Данный способ будет одинаково применим при использовании шарика Microbank или глицеринового материала (10-100 мкл) для инокулирования колбы.

Колбу инокулируют в течение 16 ч при 37°C со встряхиванием при 250 об/мин. 10 мл данной стартовой культуры используют для инокулирования 2 л конических колб, каждая из которых содержит 1 л, дополненный 0,2% глюкозамином и 30 мкг/мл канамицина. Клетки выращивают при 37°C в течение 2 ч при 225 об/мин до достижения OD_{600} , равного 0,5. В данный момент температуру культивирования понижают до 16°C. Спустя 1 ч клетки побуждают экспрессировать BoNT/A за счет добавления 1 mM IPTG в течение 20 ч. Клетки собирают посредством центрифугирования в течение 20 мин при 4°C, взвешивают, а затем хранят при -20°C.

Пример 2. Экстрагирование белка BoNT/A из хозяина и анализ уровня экспрессии.

Пасты экспрессирующих клеток rBoNT/A размораживают при комнатной температуре и ресуспендируют, капая пипеткой в 3 мл на 1 г клеток буферного раствора Tris-NaCl для ресуспендирования, дополненного 10 мкл бензолазы. Клетки лизируют посредством разрушения ультразвуком при 100 Вт - 10×30 с включено+45 с выключено. Лизат центрифугируют при 4000×g в течение 1 ч при 4°C для получения растворимого rBoNT/A в супернатанте.

Анализ Бредфорда для определения общей концентрации белка полученных лизатов.

Образец (50 мкл) каждого из разбавленного лизата rBoNT/A или стандарта BSA добавляют в 1 мл одноразовые кюветы. В каждую кювету добавляют 450 мкл реагента Кумасси для анализа Бредфорда и обеспечивают возможность инкубирования при комнатной температуре в течение 10 мин перед считыванием A_{600} . Значения, полученные для стандартов BSA, используют для определения количества белка в образцах лизатов.

Полуколичественный анализ Вестерн-блоттинг.

Для создания SDS-PAGE стандартов используют коммерческий образец белка BoNT/A, продаваемый Metabio. Затем из образцов лизата из культур экспрессирующих клеток получают SDS-PAGE образцы с известной общей концентрацией белка. Данные образцы наносят на полиакриламидный гель и обрабатывают при 200 В в течение 50 мин. Полосы белка переносятся электрофорезом на нитроцеллюлозную мембрану в не содержащем метанол буферном растворе для блоттинга при 0,4 мА в течение 1 ч.

Мембраны блокируют в течение 1 ч с 0,5% BSA в PBS-0,1% Tween 20, а затем исследуют с помощью антитела к BoNT/A в течение 1 ч. Пятна дополнительно исследуют с помощью HRP конъюгированных вторичных антител, сформированных в субстрате SuperSignal DuraWest, и визуализируют с применением устройства отображения Syngene.

Пример 3. Активация ботулинового нейротоксина А (BoNT/A) посредством Lys-C.

Одноцепочечный рекомбинантный BoNT/A1 (0,5 мг/мл), растворенный в буферном растворе (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 125 mM NaCl) протеолитически активировали с помощью Lys-C (при соотношении фермент:субстрат от 1:500 до 1:2500) при 37°C или 4°C, на протяжении периода, составляющего 2-20 ч, перед реакцией ингибировали 0,4 мкМ AEBSF (4-(2-аминоэтил)бензолсульфонил вторид гидрохлорид), специфическим ингибитором серинпротеазы. Это дает созревшую бицепную форму BoNT/A1, где тяжелая цепь связана с легкой цепью единственным дисульфидным мостиком (данные не показаны).

С помощью N-концевого секвенирования и масс-спектрометрии было определено, что сайт расщепления является идентичным эндогенному белку, подтверждая, что Lys-C является активирующим ферментом выбора (данные не показаны).

Тесты расщепления эндопротеиназы Lys-C продемонстрировали, что Lys-C расщеплял rBoNT/A1 при очень низких концентрациях и оставался активным в течение дней (данные не показаны).

Пример 4. Очистка белка-мишени BoNT/A, не содержащего активирующей протеазы.

Используя первичную последовательность белка BoNT/A, исследовали свойства BoNT/A и Lys-C (см. табл. 2).

Прогнозируемые свойства, предполагавшие, что как Lys-C, так и BoNT/A обладают аналогичной средней гидропатичностью (значением GRAVY), но большой разницей заряда при pH 4,5 и 8 (см. табл. 2).

Таблица 2

Прогнозируемые свойства Lys-C и BoNT/A		
Свойство (расчетное)	Lys-C	BoNT/A
pI	6,70	6,05
% заряженных остатков (DEKR)	13	25
Общее Средне Гидропатичности (GRAVY) *	-0,30	-0,37
Заряд при pH 8,0	-5	-12
Заряд при pH 4,5	+13	+72

(* GRAVY=средняя гидропатичность на остаток молекулы (положительное значение указывает на гидрофобную молекулу)).

Только на основе данной информации спрогнозировали, что ионообменная (IEX) хроматография должна отделять Lys-C от BoNT/A. Поэтому исследовали различные хроматографические значения очистки, включая IEX хроматографию (см. ниже).

Пример 5. Скрининг колонок для жидкостной экспресс-хроматографии белков (FPLC) для отделения Lys-C от BoNT/A.

FPLC очистка.

После активации BoNT/A1 с Lys-C ряд FPLC колонок тестировали на очистку и удаление Lys-C: три колонки для хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC): фенильная высокоэффективная (PhHP), фенильная Fast Flow сильного замещения (PhFF-Hi) и бутильная HP (BuHP) тестировали с Tris pH 8; три колонки для катионообменной хроматографии (CEC): сульфопропильная высокоэффективная (SPHP), сульфопропильная Fast Flow (SPFF) и карбоксилметильная Fast Flow (CMFF) were тестировали с ацетатом натрия pH 4,5; и четыре колонки для анионообменной хроматографии (AEC): четвертичноаминовая высокоэффективная (QHP), четвертичноаминовая Fast Flow (QFF), диэтиламинопропильная (DEAP, "ANX") и диэтиламиноэтильная (DEAE)) тестировали с Tris pH 8.

После того как образец загружали в колонку, колонку промывали буферным раствором для удаления всяких неспецифично связанных молекул перед применением элюирования в линейном градиенте увеличения или уменьшения концентрации соли (HIC и CEC/AEC соответственно).

Реакционные условия и прогоны очистки варьируют между колонками различных типов (см. табл. 3 ниже).

Таблица 3

Скрининговые условия для всех колонок, протестированных для отделения Lys-C

Колонка	Загруженный BoNT/A1 (мг)	Загруженный Lys-C (мкг)	Буферный раствор	Градиент элюирования
PhHP	1,9	1,5	Высокосолёный, Tris pH 8	1-0 М, 15 CV
BuHP	1,9	1,5	Высокосолёный, Tris pH 8	1-0 М, 15 CV
PhFF-Hi	1,5	1,2	Высокосолёный, Tris pH 8	1-0 М, 15 CV
SPHP	3,4	3,0	Низкосолёный, NaOAc pH 4,5	0-0,5 М, 30 CV
SPFF	3,4	3,0	Низкосолёный, NaOAc pH 4,5	0-0,5 М, 30 CV
CMFF	3,4	3,0	Низкосолёный, NaOAc pH 4,5	0-0,5 М, 30 CV
QHP	2,7	2,0	Низкосолёный, Tris pH 8	0-0,5 М, 30 CV
QFF	2,7	2,0	Низкосолёный, Tris pH 8	0-0,5 М, 30 CV
ANX	2,7	2,0	Низкосолёный, Tris pH 8	0-0,5 М, 30 CV
DEAE	2,7	2,0	Низкосолёный, Tris pH 8	0-0,5 М, 30 CV

Фиг. 1-10 показывают профили элюирования (A_{280}) белка BoNT/A1 из различных хроматографических колонок (пунктирные линии). Различные реакционные условия и прогоны очистки, используемые для различных колонок, объясняют различные используемые масштабы.

Для оценки активности Lys-C фракции, собранные во время градиента элюирования, анализировали с помощью калориметрического анализа.

Калориметрический анализ активности Lys-C.

Данный анализ включал расщепление бесцветного субстрата для получения желтого хромофора, который может быть обнаружен фотометрически за счет поглощения 405 нм света (A_{405}). Таким образом, данный анализ обеспечивал простой способ определения в каждой фракции, присутствовал ли Lys-C.

Каждую фракцию элюирования анализировали с применением указанного калориметрического анализа активности Lys-C и измеряли A_{405} нм.

Количество (измеренное в показателях A_{405}) Lys-C в каждой фракции элюирования показано в виде столбцов на фиг. 1-10.

Результаты.

За счет сравнения данных A_{405} и A_{280} (на графиках фиг. 1-10) было возможно сделать вывод, какая колонка/колонки обеспечивают наилучшее отделение Lys-C от BoNT/A.

Различные алкильные/арильные группы (Bu и Ph) из трех использованных ИС колонок предоставляют различные лиганды, с которыми могут взаимодействовать различные белки за счет гидрофобного эффекта. На данное взаимодействие дополнительно влияет плотность (степень замещения (Hi/Lo) и размер шариков (FF/HP)) данных гидрофобных групп. Для СЕС колонок pH образца регулируют ниже pH белка-мишени pI, так что он получает весь суммарный положительный заряд и, таким образом, имеет возможность связываться с колонкой. Различные лиганды, присутствующие в каждом типе колонки, обеспечивают различные плотности заряда, а на взаимодействие с различными белками также влияет плотность лиганда. Данные переменные аналогичным образом применимы к АЕС колонкам, где различные химические группы отображают различные плотности зарядов. В данном случае pH образца регулируют выше pH белка-мишени pI, так что он получает весь суммарный отрицательный заряд.

Графические данные с фиг. 1-10 качественно суммированы в табл. 4.

Таблица 4

Сущность качественного Lys-C/BoNT расщепления данных			
Хроматография		Отделение Lys-C*	
Гидрофобное взаимодействие ^a		PhHP	✓✓✓✓
		BuHP	✓✓✓✓
		PhFF-Hi	✓✓✓
Ионнообменное ^b	катионное	SPHP	✓
		SPFF	✓
		CMFF	✓
	анионное	QHP	✓✓✓
		QFF	✓
		ANX	✓
		DEAE	✓

* очевидное отделение Lys-C относительно rBoNT/A1:

✓✓✓✓=хорошее,

✓✓✓=OK,

✓=слабое,

^a фенильная высокоэффективная (PhHP), фенильная Fast Flow сильного замещения (PhFF-Hi), бутильная HP (BuHP),

^b сульфопропильная высокоэффективная (SPHP), сульфопропильная Fast Flow (SPFF), карбоксиметильная Fast Flow (CMFF), четвертичноаминовая высокоэффективная (QHP), четвертичноаминовая Fast Flow (QFF), диэтиламинопропильная (DEAP, "ANX") и диэтиламиноэтильная (DEAE).

Процент извлечения Lys-C и очистки после элюирования из колонки каждого типа.

Общий сигнал Lys-C в каждой фракции был нормирован до среднего значения A_{405} из 5 последних фракций хроматографической стадии. Из этого рассчитывали процентную долю Lys-C, присутствующей в пиковых фракциях белка, чтобы показать степень отделения Lys-C от белка на основе фракций элюирования (табл. 5, % LysC в пиковых фракциях белка (нормированную)).

Что касается белка-мишени, предполагается, что все молекулы BoNT/A элюируют под главным пиком (т.е. 100% извлечение); поэтому степень очистки может быть выражена, как процентная доля общего загруженного белка, который не извлечен в главном пике (табл. 5, % очистки).

Хорошим отделением Lys-C от BoNT/A было бы отделение, при котором было видно низкое значение процентной доли LysC в пиковой фракции белка. Отсюда похоже, что СЕС не способна отделять Lys-C от BoNT/A1. Высокоэффективная АЕС колонка, QHP, показала некоторую способность отделения Lys-C от BoNT/A1. Однако она была значительно менее эффективна, чем две высокоэффективные ИС колонки. Поэтому результаты демонстрируют, что сопоставимо сравнивая (т.е. стандартную эффективность со стандартной эффективностью, а высокую эффективность с высокой эффективностью), ИС колонки показали улучшенное отделение Lys-C от BoNT/A1, чем либо СЕС, либо АЕС колонки.

Два наиболее перспективных кандидата включают ИС - PhHP и BuHP. Интересно, что в обеих данных колонках используются высокоэффективные шарики.

Главное различие между высокоэффективными средами и другими состоит в том, что средний размер частиц является более маленьким (34 мкм против 90 мкм) и более однородным (24-44 мкм против 44-165 мкм). Это согласуется с заявленными улучшениями эффективности с аналитическими колонками, в которых используются шарики более маленьких размеров (средние размеры между 3-30 мкм) (GE Healthcare handbooks 11-0004-21 & 11-0012-69 и data files 18-1172-87 AE & 18-1172-88 AD).

Таблица 5

Краткое изложение эффективности колонок

Колонка	% LysC в пиковых фракциях белка (нормированный)	% Очистки
PhHP	5	11
BuHP	7	11
PhFF-Hi	43	22
SPHP	85	20
SPFF	82	11
CMFF	81	10
QHP	26	9
QFF	51	6
ANX	70	7
DEAE	74	9

PhHP HIC выбрали в качестве итоговой стадии очистки для отделения Lys-C от BoNT/A (см. пример 6 ниже).

Пример 6. Активация и итоговая очистка рекомбинантного ботулинового нейротоксина подсеротипа A1 (rBoNT/A1).

Одноцепочечный rBoNT/A1 очищали с помощью жидкостной экспресс-хроматографии белков (FPLC) с применением высокоэффективной бутильной сефарозной хроматографии с гидрофобным взаимодействием (бутильная HP HIC) для улавливания с последующим промежуточным этапом очистки с помощью высокоэффективной четвертичноаммониевой сефарозной анионообменной хроматографии (Q HP AEC). Данную молекулу затем инкубировали с 0,4 мкг/мл Lys-C при 37°C в течение 2 ч для получения активной бицепи.

Lys-C отделяли от активированного rBoNT/A1 с применением высокоэффективной фенильной сефарозной хроматографии с гидрофобным взаимодействием (PhHP HIC). Она включала регулирование реакционной смеси высокосолёным Tris буферным раствором перед загрузкой в PhHP колонку с последующим высокосолёным промыванием и последующим элюированием белка в линейном градиенте в низкосолёном Tris буферном растворе. Элюирование фракций анализировали с помощью электрофореза в денатурирующем геле (SDS PAGE - фиг. 11 вверху) и калориметрического анализа активности Lys-C (фиг. 11 внизу). Было продемонстрировано раннее элюирование Lys-C в градиенте (F16-F21, выделено в черной рамке) перед активированием молекулы BoNT (F21-F29). Таким образом, это показывает хорошее отделение Lys-C от rBoNT/A1. Максимальная эффективность фракций, по-видимому, аналогична 30 нг/мл Lys-C, предполагая, что любой остаточный Lys-C, присутствующий во фракциях rBoNT/A1, будет меньше данной концентрации.

Пример 7. Активации и итоговая очистка рекомбинантного эндопептидазо-отрицательного ботулинового нейротоксина подсеротипа A2 (rBoNT/A2(0)).

Одноцепочечный rBoNT/A2(0) очищали с помощью жидкостной экспресс-хроматографии белков (FPLC) с применением высокоэффективной бутильной сефарозной хроматографии с гидрофобным взаимодействием (бутильная HP HIC) для улавливания с последующим промежуточным этапом очистки с помощью высокоэффективной четвертичноаммониевой сефарозной анионообменной хроматографии (Q HP AEC). Данную молекулу затем инкубировали с 4 мкг/мл Lys-C при 37°C в течение 2 ч для получения активной бицепи.

Lys-C отделяли от активированного rBoNT/A2(0) с применением высокоэффективной фенильной сефарозной хроматографии с гидрофобным взаимодействием (PhHP HIC). Она включала регулирование реакционной смеси высокосолёным Tris буферным раствором перед загрузкой в фенильную HP колонку с последующим высокосолёным промыванием и последующим элюированием белка в линейном градиенте в низкосолёном Tris-буферном растворе. Элюирование фракций анализировали с помощью электрофореза в денатурирующем геле (SDS PAGE) и калориметрического анализа активности Lys-C (фиг. 12), она показала, что Lys-C рано элюировал в градиенте (F5-F11) непосредственно перед активированной молекулы BoNT (F12-F15). Таким образом, данная колонка показывает хорошее отделение Lys-C от rBoNT/A2(0).

Пример 8. Активация и итоговая очистка рекомбинантного эндопептидазо-отрицательного ботулинового нейротоксина подсеротипа A5 (rBoNT/A5(0)).

Одноцепочечный rBoNT/A5(0) очищали с помощью жидкостной экспресс-хроматографии белков (FPLC) с применением высокоэффективной бутильной сефарозной хроматографии с гидрофобным взаимодействием (бутильная HP HIC) для улавливания с последующим промежуточным этапом очистки с помощью высокоэффективной четвертичноаммониевой сефарозной анионообменной хроматографии (Q

НР АЕС). Данную молекулу затем инкубировали с 2,5 мкг/мл Lys-C при 37°C в течение 2 ч для получения активной бицепи. Lys-C отделяли от активированного rBoNT/A5(0) с применением высокоэффективной фенильной сефарозной хроматографии с гидрофобным взаимодействием (фенильная HP НИС). Она включала регулирование реакционной смеси высокосольным Tris-буферным раствором перед загрузкой в фенильную HP колонку, с последующим высокосольным промыванием и последующим элюированием белка в линейном градиенте в низкосольном Tris-буферном растворе. Элюирование фракций анализировали с помощью электрофореза в денатурирующем геле (SDS PAGE) и калориметрического анализа активности Lys-C (фиг. 13), она показала, что Lys-C рано элюировал в градиенте (F10-F39) перед активированной молекулой BoNT (F51-F65). Таким образом, данная колонка показывает хорошее отделение Lys-C от rBoNT/A5(0).

Пример 9. Активация и итоговая очистка рекомбинантного эндопептидазо-отрицательного ботулинового нейротоксина подсеротипа A6 (rBoNT/A6(0)).

Одноцепочечный rBoNT/A6(0) сперва очищали посредством преципитации сульфатом натрия и повторной солубелизации в ацетат натрия перед улавливанием с помощью жидкостной экспресс-хроматографии белков (FPLC) с применением высокоэффективной сульфопропильной сефарозной катионообменной хроматографии (SP HP CEC) с последующей заменой буферного раствора на Tris-буферный раствор при pH 8. Данную молекулу затем инкубировали с 0,3 мкг/мл Lys-C при 37°C в течение 2 ч для получения активной бицепи. Lys-C отделяли от активированного rBoNT/A6(0) с применением высокоэффективной фенильной сефарозной хроматографии с гидрофобным взаимодействием (фенильная HP НИС). Она включала регулирование реакционной смеси высокосольным Tris-буферным раствором перед загрузкой в фенильную HP колонку, с последующим высокосольным промыванием и последующим элюированием белка в линейном градиенте в низкосольном Tris-буферном растворе. Элюирование фракций анализировали с помощью электрофореза в денатурирующем геле (SDS PAGE) и калориметрического анализа активности Lys-C (фиг. 14), она показала, что Lys-C рано элюировал в градиенте (F6-F13) перед активированной молекулой BoNT (F16-F27). Это показывает превосходное отделение Lys-C от rBoNT/A6(0).

Пример 10. Очистка производного одноцепочечного, рекомбинантного, катионного, ботулинового нейротоксина подсеротипа A1 (mrBoNT/A1).

Одноцепочечный mrBoNT/A1 (SEQ ID NO: 15) очищали с помощью жидкостной экспресс-хроматографии белков (FPLC) с применением высокоэффективной сульфопропильной сефарозной катионообменной хроматографии (SPHP CEX) для улавливания. Промежуточный этап очистки с применением высокоэффективной бутильной сефарозной хроматографии с гидрофобным взаимодействием (BuHP НИС) использовали для дополнительного удаления белков клеток хозяев. BuHP элюирование фракций анализировали с помощью SDS-PAGE, и фракции, содержащие одноцепочечный mrBoNT/A1 собирали в качестве очищенного, одноцепочечного mrBoNT/A1.

Пример 11. Активация и итоговая очистка производного рекомбинантного, катионного, ботулинового нейротоксина подсеротипа A1 (mrBoNT/A1).

Одноцепочечный mrBoNT/A1 (SEQ ID NO: 15) инкубировали с 0,4 мкг/мл Lys-C при 37°C в течение 2 ч для получения активной бицепи. Lys-C отделяли от активированного mrBoNT/A1 с применением высокоэффективной бутильной сефарозной хроматографии с гидрофобным взаимодействием (BuHP НИС). Она включала регулирование реакционной смеси высокосольным Bis-Tris буферным раствором перед загрузкой в колонку BuHP, с последующим высокосольным промыванием и последующим элюированием белка в линейном градиенте в низкосольном Bis-Tris-буферном растворе. Элюирование фракций анализировали с помощью SDS-PAGE (фиг. 15 сверху) и калориметрического анализа активности Lys-C (фиг. 15 внизу). Lys-C рано и насквозь элюировал в потоке колонки в градиенте элюирования (F1-6, выделено в черной рамке, фиг. 15 внизу) перед активированной молекулой BoNT (F10-F12). Таким образом, это показывает хорошее отделение Lys-C от mrBoNT/A1.

Пример 12. Готовая форма, содержащая активную бицепь BoNT/A, по существу, не содержит Lys-C.

Приготовили следующие шесть жидких композиций, содержащих активную бицепь BoNT/A (табл. 6).

Таблица 6

Иллюстративные готовые формы BoNT/A

	1	2	3	4	5	6
Полисорбат 80	0,10 мг/мл	0,10 мг/мл	0,10 мг/мл	0,10 мг/мл	–	–
Полоксамер	–	–	–	–	0,04 мг/мл	0,04 мг/мл
Сахароза	4,0 мг/мл	–	4,0 мг/мл	–	4,0 мг/мл	–
Маннитол	–	4,0 мг/мл	–	4,0 мг/мл	–	4,0 мг/мл
Хлорид натрия	8,76 мг/мл	8,76 мг/мл	8,76 мг/мл	8,76 мг/мл	8,76 мг/мл	8,76 мг/мл
pH	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
Буферный раствор	L-Гистидин/ Соляная кислота	L-Гистидин/ Соляная кислота	Динатрийфосфат/ безводная Лимонная кислота	Динатрийфосфат/ безводная Лимонной кислоты	L-Гистидин/ Соляная кислота	L-Гистидин/ Соляная кислота
Бицель BoNT/A	20 нг/мл	20 нг/мл	20 нг/мл	20 нг/мл	20 нг/мл	20 нг/мл
MilliQ воду	сколько потребуется до 1 мл	сколько потребуется до 1 мл	сколько потребуется до 1 мл	сколько потребуется до 1 мл	сколько потребуется до 1 мл	сколько потребуется до 1 мл

Все шесть композиций хранили при 25°C в течение 12 недель. Стабильность бицели протеазной функции BoNT/A оценивали во время этого периода с применением бесклеточного эндопептидазного анализа.

Пример 13. Высокочувствительный анализ активности Lys-C.

Количественное определение итоговой концентрации Lys-C в очищенных образцах BoNT/A проводили посредством расщепления флуоресцентного пептидного субстрата. Флуоресцентный субстрат (Tos-GPK-7-амино-4-трифторацетатная соль, также называемая Tos-GPK-AMC) восстанавливали в DMSO для предоставления запаса 20 мг/мл (32,7 мМ). Его дополнительно разбавляли до 10 мМ водой, и аликвоты готовили и хранили при -20°C. В день анализа брали соответствующее количество субстрата и дополнительно разбавляли 25 мМ Tris pH 8, 125 мМ NaCl для предоставления 0,5 мМ рабочего раствора Lys-C; затем готовили стандарты Lys-C (известных концентраций) посредством разбавления рабочего раствора в буферном растворе для анализа (25 мМ Tris, 125 мМ NaCl, 0,1 мг/мл BSA, pH 8). Стандарты, заготовки (только буферный раствор для анализа) и тестовые образцы (партии очищенного rBoNT/A) распределяли на черные планшеты OptiPlate, в трех повторениях (180 мкл на лунку) и уравнивали до 37°C в течение 10-15 мин. Далее добавляли 20 мкл субстрата, и планшет немедленно переносили в планшет-ридер, где проводили кинетическое считывание. Планшет считывали с применением фильтров возбуждения/эмиссии 360/40 и 485/20 при 37°C, каждые 20 мин в течение 5 ч. Данные наносили на график в виде времени в минутах (ось x) против поглощения/флуоресценции (ось y). Значения наклона для каждой концентрации Lys-C использовали для создания стандартной кривой для концентрации Lys-C. Образцы очищенного rBoNT/A обрабатывали таким же образом, и из стандартной кривой интерполировали концентрацию Lys-C в каждом образце rBoNT/A. На основе анализа четырех независимых партий или rBoNT/A, измеренная средняя концентрация Lys-C в итоговом материале составляла 7,3±1,5 пг Lys-C на 100 нг/BoNT/A.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- Способ получения активного растворимого двухцепочечного белка BoNT/A, включающий:
 - предоставление растворимого одноцепочечного белка BoNT/A, содержащего аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% SEQ ID NO: 1;
 - приведение указанного растворимого одноцепочечного белка BoNT/A в контакт с эндопротеиназой Lys-C в растворе с получением растворимого двухцепочечного белка BoNT/A; и
 - отделение указанного растворимого двухцепочечного белка BoNT/A от Lys-C путем приведения в контакт раствора, содержащего растворимый двухцепочечный белок BoNT/A и Lys-C, с гидрофобной поверхностью, с которой связывается указанный растворимый двухцепочечный белок BoNT/A, где указанный растворимый двухцепочечный белок BoNT/A включает первую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% аминокислотным остаткам 1-438 SEQ ID NO: 1; и вторую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% аминокислотным остаткам 449-1296 SEQ ID NO: 1; где первая и вторая цепи соединены дисульфидным мостиком.
- Способ по п.1, в котором растворимый одноцепочечный белок BoNT/A получен посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный одноцепочечный белок BoNT/A в клетке-хозяине или в экспрессирующей системе in vitro.
- Способ по п.2, в котором клеткой-хозяином является бактериальная клетка-хозяин.
- Способ по п.3, в котором клеткой-хозяином является клетка E. coli.
- Способ по любому из пп.2-4, в котором указанный растворимый одноцепочечный белок BoNT/A экспрессируется в цитоплазме указанной клетки-хозяина.

6. Способ по любому из пп.2-5, в котором указанный растворимый одноцепочечный белок BoNT/A экспрессируется на уровне, составляющем по меньшей мере 5 мг/л.

7. Способ по любому из пп.3-6, включающий лизис бактериальной клетки-хозяина или клетки-хозяина *E. coli* для обеспечения гомогената бактериальной клетки-хозяина или клетки-хозяина *E. coli*, содержащего указанный растворимый одноцепочечный белок BoNT/A.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором гидрофобная поверхность представляет собой инертную матрицу, к которой прикреплен лиганд, состоящий из арильных или алкильных групп.

9. Способ по п.8, в котором лиганд представляет собой бутильный, фенильный или октильный лиганд.

10. Миорелаксантная композиция, содержащая:

(i) активный растворимый двухцепочечный белок BoNT/A, полученный способом по любому из пп.1-9;

(ii) менее 2% одноцепочечного белка BoNT/A и

(iii) Lys-C, где Lys-C присутствует в концентрации менее 400 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A; где активная протеазная функция двухцепочечного BoNT/A остается стабильной при 25°C в течение по меньшей мере 12 недель.

11. Композиция по п.10, содержащая менее 1% одноцепочечного белка BoNT/A.

12. Композиция по п.10 или 11, содержащая эндопротеиназу Lys-C в концентрации менее 300 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 200 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 100 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 50 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 20 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 15 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 10 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A.

13. Жидкая миорелаксантная фармацевтическая композиция, содержащая:

a) активный растворимый двухцепочечный белок BoNT/A, полученный способом по любому из пп.1-9;

b) небелковый стабилизирующий агент, который представляет собой поверхностно-активное вещество; и

c) воду;

при этом указанная жидкая фармацевтическая композиция не содержит белковый стабилизирующий агент; и

содержит (i) менее 2% одноцепочечного белка BoNT/A и (ii) и (iii) Lys-C, где Lys-C присутствует в концентрации менее 400 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A;

где активная протеазная функция двухцепочечного BoNT/A остается стабильной при 25°C в течение по меньшей мере 12 недель.

14. Жидкая фармацевтическая композиция по п.13, содержащая эндопротеиназу Lys-C в концентрации менее 300 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 200 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 100 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 50 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 20 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 15 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 10 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A.

15. Жидкая фармацевтическая композиция по п.13 или 14, дополнительно содержащая хлорид натрия,

буферный раствор для поддержания pH между 5,5 и 7,5 и дисахарид;

при этом водой является стерильная вода.

16. Композиция по любому из пп.10-12 для лечения заболевания или расстройства, выбранного из следующих: сопротивление поперечно-полосатых мышц, фокальная дистония, включая цервикальную, краниальную дистонию и доброкачественный идиопатический блефароспазм, гемифациальный спазм и фокальную спастичность, желудочно-кишечные расстройства, гипергидроз, коррекция косметических морщин, блефароспазм, оромандибулярная дистония (открыточелюстного типа, закрыточелюстного типа), бруксизм, синдром Мейгса, лингвальная дистония, апраксия века, открытая цервикальная дистония, антеколлис, ретроколлис, латероколлис, кривошея, фарингеальная дистония, ларингеальная дистония, аддукторная спастическая дисфония, абдукторная спастическая дисфония, спастическое диспноэ, дистония конечностей, дистония верхних конечностей, дистония при выполнении специфических задач, писчий спазм, судороги музыканта, спазм игрока в гольф, дистония нижней конечности, приведение бедра, отведение бедра, коленное сгибание, коленное разгибание, сгибание ноги в голеностопном суставе, разгибание ноги в голеностопном суставе, эквиноварусная деформация стопы, деформация вследствие дистонии стопы, стриарный палец ноги, сгибание пальца стопы, разгибание пальца стопы, осевая дистония, синдром Пизанской башни, дистония исполнителя танца живота, сегментарная дистония, гемидистония, генерализованная дистония, дистония при синдроме Lubag, дистония при кортикобазальной дегенерации, дистония при синдроме Lubag, остаточная дистония, дистония при спинальном жереховой атаксии, дистония при болезни Паркинсона, дистония при болезни Хантингтона, дистония при болезни Галлервордена-Шпатца, допа-индуцированные дискинезии/допа-индуцированная дистония, остаточные дискине-

зии/остаточная дистония, пароксизмальные дискинезии/дистонии, кинезиогенные, некинезиогенные, вызванные действием, небный миоклонус, миокимический миоклонус, ригидность, доброкачественные мышечные судороги, наследственное дрожание подбородка, парадоксальная активность жевательных мышц, спазмы жевательных мышц одной половины лица, гипертрофическая бронхиальная миопатия, гипертрофия жевательной мышцы, гипертрофия передней большеберцовой мышцы, нистагм, осциллопсия, надъядерный паралич взора, эпилепсия парциальная постоянная, планируемая операция при спастической кривошее, паралич отводящей мышцы голосовой складки, устойчивая мутационная дисфония, дисфункция верхнего сфинктера глотки, гранулема голосовой складки, заикание, синдром Туретта, миоклонус среднего уха, защитное смыкание голосовой щели, постларингэктомическое нарушение речи, защитный птоз, заворот век, дисфункция сфинктера Одди, псевдоахалазия, неахалазийное эзофагиальное расстройство моторики, вагинизм, послеоперационный тремор при неподвижности, дисфункция мочевого пузыря, детрузорно-сфинктерная диссинергия, спазм сфинктера мочевого пузыря, гемифациальный спазм, реиннервационные дискинезии, косметическое применение при "гусиных лапках", асимметрия лица вследствие нахмуривания, ямки подбородка, синдром скованного человека, столбняк, гиперплазия простаты, лечение ожирения, детский церебральный паралич, косоглазие, смешанное, паралитическое, содружественное, после операции при отслойке сетчатки, после операции удаления катаракты, при афакии, миозитное косоглазие, миопатическое косоглазие, диссоциированное вертикальное отклонение, как дополнение к хирургии косоглазия, сходящееся косоглазие, расходящееся косоглазие, ахалазия, анальные трещины, гиперфункция экзокринных желез, синдром Фрей, синдром крокодилий слез, гипергидроз подмышечный, ладонный, подошвенный, ринорея, относительная гиперсаливация при инсульте, при болезни Паркинсона, при спастических состояниях при боковом амиотрофическом склерозе, при процессах аутоиммунного энцефалита и миелита, рассеянный склероз, поперечный миелит, болезнь Девика, вирусные инфекции, бактериальные инфекции, паразитарные инфекции, грибковые инфекции, при наследственном спастическом парапарезе, постапоплектический синдром, инфаркт полушария, инфаркт ствола мозга, инфаркт спинного мозга, мигрень, при травме центральной нервной системы, поражения полушарий, поражение спинного мозга, повреждение ствола мозга, при кровоизлиянии центральной нервной системы, внутримозговое кровоизлияние, субарахноидальное кровоизлияние, субдуральное кровоизлияние, кровоизлияние в спинной мозг, при неоплазиях, опухоли полушарий, опухоли ствола головного мозга, опухоли спинного мозга и храп.

17. Жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.13-15 для лечения заболевания или расстройства, выбранного из следующих: сопротивление поперечно-полосатых мышц, фокальная дистония, включая цервикальную, краниальную дистонию и доброкачественный идиопатический блефароспазм, гемифациальный спазм и фокальную спастичность, желудочно-кишечные расстройства, гипергидроз, коррекция косметических морщин, блефароспазм, оромандибулярная дистония (открыточелюстного типа, закрыточелюстного типа), бруксизм, синдром Мейгса, лингвальная дистония, апраксия века, открытая цервикальная дистония, антеколлиз, ретроколлиз, латероколлиз, кривошея, фарингеальная дистония, ларингеальная дистония, аддукторная спастическая дисфония, абдукторная спастическая дисфония, спастическое диспноэ, дистония конечностей, дистония верхних конечностей, дистония при выполнении специфических задач, писчий спазм, судороги музыканта, спазм игрока в гольф, дистония нижней конечности, приведение бедра, отведение бедра, коленное сгибание, коленное разгибание, сгибание ноги в голеностопном суставе, разгибание ноги в голеностопном суставе, эквиноварусная деформация стопы, деформация вследствие дистонии стопы, стриарный палец ноги, сгибание пальца стопы, разгибание пальца стопы, осевая дистония, синдром Пизанской башни, дистония исполнителя танца живота, сегментарная дистония, гемидистония, генерализованная дистония, дистония при синдроме Lubag, дистония при кортикобазальной дегенерации, дистония при синдроме Lubag, остаточная дистония, дистония при спинальном жерчковой атаксии, дистония при болезни Паркинсона, дистония при болезни Хантингтона, дистония при болезни Галлервордена-Шпатца, допа-индуцированные дискинезии/допа-индуцированная дистония, остаточные дискинезии/остаточная дистония, пароксизмальные дискинезии/дистонии, кинезиогенные, некинезиогенные, вызванные действием, небный миоклонус, миокимический миоклонус, ригидность, доброкачественные мышечные судороги, наследственное дрожание подбородка, парадоксальная активность жевательных мышц, спазмы жевательных мышц одной половины лица, гипертрофическая бронхиальная миопатия, гипертрофия жевательной мышцы, гипертрофия передней большеберцовой мышцы, нистагм, осциллопсия, надъядерный паралич взора, эпилепсия парциальная постоянная, планируемая операция при спастической кривошее, паралич отводящей мышцы голосовой складки, устойчивая мутационная дисфония, дисфункция верхнего сфинктера глотки, гранулема голосовой складки, заикание, синдром Туретта, миоклонус среднего уха, защитное смыкание голосовой щели, постларингэктомическое нарушение речи, защитный птоз, заворот век, дисфункция сфинктера Одди, псевдоахалазия, неахалазийное эзофагиальное расстройство моторики, вагинизм, послеоперационный тремор при неподвижности, дисфункция мочевого пузыря, детрузорно-сфинктерная диссинергия, спазм сфинктера мочевого пузыря, гемифациальный спазм, реиннервационные дискинезии, косметическое применение при "гусиных лапках", асимметрия лица вследствие нахмуривания, ямки подбородка, синдром скованного человека, столбняк, гиперплазия простаты, лечение ожирения, детский церебральный паралич, косогла-

зие, смешанное, паралитическое, содружественное, после операции при отслойке сетчатки, после операции удаления катаракты, при афакии, миозитное косоглазие, миопатическое косоглазие, диссоциированное вертикальное отклонение, как дополнение к хирургии косоглазия, сходящееся косоглазие, расходящееся косоглазие, ахалазия, анальные трещины, гиперфункция экзокринных желез, синдром Фрей, синдром крокодилий слез, гипергидроз подмышечный, ладонный, подошвенный, ринорея, относительная гиперсаливация при инсульте, при болезни Паркинсона, при спастических состояниях при боковом амиотрофическом склерозе, при процессах аутоиммунного энцефалита и миелита, рассеянный склероз, поперечный миелит, болезнь Девика, вирусные инфекции, бактериальные инфекции, паразитарные инфекции, грибковые инфекции, при наследственном спастическом парапарезе, постапоплектический синдром, инфаркт полушария, инфаркт ствола мозга, инфаркт спинного мозга, мигрень, при травме центральной нервной системы, поражения полушарий, поражение спинного мозга, повреждение ствола мозга, при кровоизлиянии центральной нервной системы, внутримозговое кровоизлияние, субарахноидальное кровоизлияние, субдуральное кровоизлияние, кровоизлияние в спинной мозг, при неоплазиях, опухоли полушарий, опухоли ствола головного мозга, опухоли спинного мозга и храп.

18. Применение композиции по любому из пп.10-12, или жидкой фармацевтической композиции по любому из пп.13-15 при изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, выбранного из следующих: сопротивление поперечнополосатых мышц, фокальная дистония, включая цервикальную, краниальную дистонию и доброкачественный идиопатический блефароспазм, гемифациальный спазм и фокальную спастичность, желудочно-кишечные расстройства, гипергидроз, коррекция косметических морщин, блефароспазм, оромандибулярная дистония (открыточелюстного типа, закрыточелюстного типа), бруксизм, синдром Мейгса, лингвальная дистония, апраксия века, открытая цервикальная дистония, антеколлиз, ретроколлиз, латероколлиз, кривошея, фарингеальная дистония, ларингеальная дистония, аддукторная спастическая дисфония, абдукторная спастическая дисфония, спастическое диспноэ, дистония конечностей, дистония верхних конечностей, дистония при выполнении специфических задач, писчий спазм, судороги музыканта, спазм игрока в гольф, дистония нижней конечности, приведение бедра, отведение бедра, коленное сгибание, коленное разгибание, сгибание ноги в голеностопном суставе, разгибание ноги в голеностопном суставе, эквиноварусная деформация стопы, деформация вследствие дистонии стопы, стриарный палец ноги, сгибание пальца стопы, разгибание пальца стопы, осевая дистония, синдром Пизанской башни, дистония исполнителя танца живота, сегментарная дистония, гемидистония, генерализованная дистония, дистония при синдроме Lubag, дистония при кортикобазальной дегенерации, дистония при синдроме Lubag, остаточная дистония, дистония при спино-мозжечковой атаксии, дистония при болезни Паркинсона, дистония при болезни Хантингтона, дистония при болезни Галлервордена-Шпатца, допа-индуцированные дискинезии/допа-индуцированная дистония, остаточные дискинезии/остаточная дистония, пароксизмальные дискинезии/дистонии, кинезиогенные, некинезиогенные, вызванные действием, небный миоклонус, миокимический миоклонус, ригидность, доброкачественные мышечные судороги, наследственное дрожание подбородка, парадоксальная активность жевательных мышц, спазмы жевательных мышц одной половины лица, гипертрофическая бронхиальная миопатия, гипертрофия жевательной мышцы, гипертрофия передней большеберцовой мышцы, нистагм, осциллопия, надъядерный паралич зрения, эпилепсия парциальная постоянная, планируемая операция при спастической кривошее, паралич отводящей мышцы голосовой складки, устойчивая мутационная дисфония, дисфункция верхнего сфинктера глотки, гранулема голосовой складки, заикание, синдром Туретта, миоклонус среднего уха, защитное смыкание голосовой щели, постларингэтомическое нарушение речи, защитный птоз, заворот век, дисфункция сфинктера Одди, псевдоахалазия, неахалазийное эзофагиальное расстройство моторики, вагинизм, послеоперационный тремор при неподвижности, дисфункция мочевого пузыря, детрузорно-сфинктерная диссинергия, спазм сфинктера мочевого пузыря, гемифациальный спазм, реиннервационные дискинезии, косметическое применение при "гусиных лапках", асимметрия лица вследствие нахмуривания, ямки подбородка, синдром скованного человека, столбняк, гиперплазия простаты, лечение ожирения, детский церебральный паралич, косоглазие, смешанное, паралитическое, содружественное, после операции при отслойке сетчатки, после операции удаления катаракты, при афакии, миозитное косоглазие, миопатическое косоглазие, диссоциированное вертикальное отклонение, как дополнение к хирургии косоглазия, сходящееся косоглазие, расходящееся косоглазие, ахалазия, анальные трещины, гиперфункция экзокринных желез, синдром Фрей, синдром крокодилий слез, гипергидроз подмышечный, ладонный, подошвенный, ринорея, относительная гиперсаливация при инсульте, при болезни Паркинсона, при спастических состояниях при боковом амиотрофическом склерозе, при процессах аутоиммунного энцефалита и миелита, рассеянный склероз, поперечный миелит, болезнь Девика, вирусные инфекции, бактериальные инфекции, паразитарные инфекции, грибковые инфекции, при наследственном спастическом парапарезе, постапоплектический синдром, инфаркт полушария, инфаркт ствола мозга, инфаркт спинного мозга, мигрень, при травме центральной нервной системы, поражения полушарий, поражение спинного мозга, повреждение ствола мозга, при кровоизлиянии центральной нервной системы, внутримозговое кровоизлияние, субарахноидальное кровоизлияние, субдуральное кровоизлияние, кровоизлияние в спинной мозг, при неоплазиях, опухоли полушарий, опухоли ствола головного мозга, опухоли спинного мозга и храп.

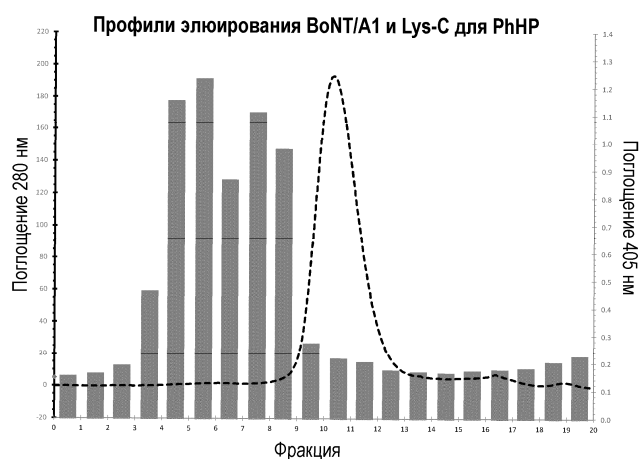
19. Применение жидкой фармацевтической композиции по любому из пп.13-15 при изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, выбранного из следующих: сопротивление поперечно-полосатых мышц, фокальная дистония, включая цервикальную, краниальную дистонию и доброкачественный идиопатический блефароспазм, гемифациальный спазм и фокальную спастичность, желудочно-кишечные расстройства, гипергидроз, коррекция косметических морщин, блефароспазм, оромандибулярная дистония (открыточелюстного типа, закрыточелюстного типа), бруксизм, синдром Мейгса, лингвальная дистония, апраксия века, открытая цервикальная дистония, антеколлиз, ретроколлиз, латероколлиз, кривошея, фарингеальная дистония, ларингеальная дистония, аддукторная спастическая дисфония, абдукторная спастическая дисфония, спастическое диспноэ, дистония конечностей, дистония верхних конечностей, дистония при выполнении специфических задач, писчий спазм, судороги музыканта, спазм игрока в гольф, дистония нижней конечности, приведение бедра, отведение бедра, коленное сгибание, коленное разгибание, сгибание ноги в голеностопном суставе, разгибание ноги в голеностопном суставе, эквиноварусная деформация стопы, деформация вследствие дистонии стопы, стриарный палец ноги, сгибание пальца стопы, разгибание пальца стопы, осевая дистония, синдром Пизанской башни, дистония исполнителя танца живота, сегментарная дистония, гемидистония, генерализованная дистония, дистония при синдроме Lubag, дистония при кортикобазальной дегенерации, дистония при синдроме Lubag, остаточная дистония, дистония при спиноомозжечковой атаксии, дистония при болезни Паркинсона, дистония при болезни Хантингтона, дистония при болезни Галлервордена-Шпатца, допа-индуцированные дискинезии/допа-индуцированная дистония, остаточные дискинезии/остаточная дистония, пароксизмальные дискинезии/дистонии, кинезиогенные, некинезиогенные, вызванные действием, небный миоклонус, миокимический миоклонус, ригидность, доброкачественные мышечные судороги, наследственное дрожание подбородка, парадоксальная активность жевательных мышц, спазмы жевательных мышц одной половины лица, гипертрофическая бронхиальная миопатия, гипертрофия жевательной мышцы, гипертрофия передней большеберцовой мышцы, нистагм, осциллопия, надъядерный паралич взора, эпилепсия парциальная постоянная, планируемая операция при спастической кривошее, паралич отводящей мышцы голосовой складки, устойчивая мутационная дисфония, дисфункция верхнего сфинктера глотки, гранулема голосовой складки, заикание, синдром Туретта, миоклонус среднего уха, защитное смыкание голосовой щели, постларингэктомическое нарушение речи, защитный птоз, заворот век, дисфункция сфинктера Одди, псевдоахалазия, неахалазийное эзофагиальное расстройство моторики, вагинизм, послеоперационный тремор при неподвижности, дисфункция мочевого пузыря, детрузорно-сфинктерная диссинергия, спазм сфинктера мочевого пузыря, гемифациальный спазм, реиннервационные дискинезии, косметическое применение при "гусиных лапках", асимметрия лица вследствие нахмуривания, ямки подбородка, синдром скованного человека, столбняк, гиперплазия простаты, лечение ожирения, детский церебральный паралич, косоглазие, смешанное, паралитическое, содружественное, после операции при отслойке сетчатки, после операции удаления катаракты, при афакии, миозитное косоглазие, миопатическое косоглазие, диссоциированное вертикальное отклонение, как дополнение к хирургии косоглазия, сходящееся косоглазие, расходящееся косоглазие, ахалазия, анальные трещины, гиперфункция экзокринных желез, синдром Фрей, синдром крокодильих слез, гипергидроз подмышечный, ладонный, подошвенный, ринорея, относительная гиперсаливация при инсульте, при болезни Паркинсона, при спастических состояниях при боковом амиотрофическом склерозе, при процессах аутоиммунного энцефалита и миелита, рассеянный склероз, поперечный миелит, болезнь Девика, вирусные инфекции, бактериальные инфекции, паразитарные инфекции, грибковые инфекции, при наследственном спастическом парапарезе, постапоплектический синдром, инфаркт полушария, инфаркт ствола мозга, инфаркт спинного мозга, мигрень, при травме центральной нервной системы, поражения полушарий, поражение спинного мозга, повреждение ствола мозга, при кровоизлиянии центральной нервной системы, внутримозговое кровоизлияние, субарахноидальное кровоизлияние, субдуральное кровоизлияние, кровоизлияние в спинной мозг, при неоплазиях, опухоли полушарий, опухоли ствола головного мозга, опухоли спинного мозга и хrap.

20. Способ лечения заболевания или расстройства, выбранного из следующих: сопротивление поперечно-полосатых мышц, фокальная дистония, включая цервикальную, краниальную дистонию и доброкачественный идиопатический блефароспазм, гемифациальный спазм и фокальную спастичность, желудочно-кишечные расстройства, гипергидроз, коррекция косметических морщин, блефароспазм, оромандибулярная дистония (открыточелюстного типа, закрыточелюстного типа), бруксизм, синдром Мейгса, лингвальная дистония, апраксия века, открытая цервикальная дистония, антеколлиз, ретроколлиз, латероколлиз, кривошея, фарингеальная дистония, ларингеальная дистония, аддукторная спастическая дисфония, абдукторная спастическая дисфония, спастическое диспноэ, дистония конечностей, дистония верхних конечностей, дистония при выполнении специфических задач, писчий спазм, судороги музыканта, спазм игрока в гольф, дистония нижней конечности, приведение бедра, отведение бедра, коленное сгибание, коленное разгибание, сгибание ноги в голеностопном суставе, разгибание ноги в голеностопном суставе, эквиноварусная деформация стопы, деформация вследствие дистонии стопы, стриарный палец ноги, сгибание пальца стопы, разгибание пальца стопы, осевая дистония, синдром Пизанской башни, дистония исполнителя танца живота, сегментарная дистония, гемидистония, генерализованная дис-

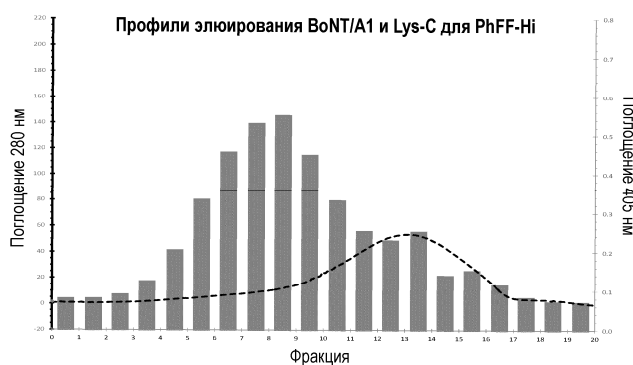
тония, дистония при синдроме Lubag, дистония при кортикобазальной дегенерации, дистония при синдроме Lubag, остаточная дистония, дистония при спинальном мозжечковом атаксии, дистония при болезни Паркинсона, дистония при болезни Хантингтона, дистония при болезни Галлервордена-Шпатца, допа-индуцированные дискинезии/допа-индуцированная дистония, остаточные дискинезии/остаточная дистония, пароксизмальные дискинезии/дистонии, кинезиогенные, некинезиогенные, вызванные действием, небный миоклонус, миокимический миоклонус, ригидность, доброкачественные мышечные судороги, наследственное дрожание подбородка, парадоксальная активность жевательных мышц, спазмы жевательных мышц одной половины лица, гипертрофическая бранхиальная миопатия, гипертрофия жевательной мышцы, гипертрофия передней большеберцовой мышцы, нистагм, осциллопия, надъядерный паралич зрения, эпилепсия парциальная постоянная, планируемая операция при спастической кривошее, паралич отводящей мышцы голосовой складки, устойчивая мутационная дисфония, дисфункция верхнего сфинктера глотки, гранулема голосовой складки, заикание, синдром Туретта, миоклонус среднего уха, защитное смыкание голосовой щели, постларингэктомическое нарушение речи, защитный птоз, заворот век, дисфункция сфинктера Одди, псевдоахалазия, неахалазийное эзофагиальное расстройство моторики, вагинизм, послеоперационный тремор при неподвижности, дисфункция мочевого пузыря, детрузорно-сфинктерная диссинергия, спазм сфинктера мочевого пузыря, гемифациальный спазм, реиннервационные дискинезии, косметическое применение при "гусиных лапках", асимметрия лица вследствие нахмуривания, ямки подбородка, синдром скованного человека, столбняк, гиперплазия простаты, лечение ожирения, детский церебральный паралич, косоглазие, смешанное, паралитическое, содружественное, после операции при отслойке сетчатки, после операции удаления катаракты, при афакии, миозитное косоглазие, миопатическое косоглазие, диссоциированное вертикальное отклонение, как дополнение к хирургии косоглазия, сходящееся косоглазие, расходящееся косоглазие, ахалазия, анальные трещины, гиперфункция экзокринных желез, синдром Фрей, синдром крокодилий слез, гипергидроз подмышечный, ладонный, подошвенный, ринорея, относительная гиперсаливация при инсульте, при болезни Паркинсона, при спастических состояниях при боковом амиотрофическом склерозе, при процессах аутоиммунного энцефалита и миелита, рассеянный склероз, поперечный миелит, болезнь Девика, вирусные инфекции, бактериальные инфекции, паразитарные инфекции, грибковые инфекции, при наследственном спастическом парапарезе, постапплектический синдром, инфаркт полушария, инфаркт ствола мозга, инфаркт спинного мозга, мигрень, при травме центральной нервной системы, поражения полушарий, поражение спинного мозга, повреждение ствола мозга, при кровоизлиянии центральной нервной системы, внутри-мозговое кровоизлияние, субарахноидальное кровоизлияние, субдуральное кровоизлияние, кровоизлияние в спинной мозг, при неоплазиях, опухоли полушарий, опухоли ствола головного мозга, опухоли спинного мозга и храп, где указанный способ включает введение композиции по любому из пп.10-12 нуждающемуся в этом пациенту.

21. Способ лечения заболевания или расстройства, выбранного из следующих: сопротивление поперечно-полосатых мышц, фокальная дистония, включая цервикальную, краниальную дистонию и доброкачественный идиопатический блефароспазм, гемифациальный спазм и фокальную спастичность, желудочно-кишечные расстройства, гипергидроз, коррекция косметических морщин, блефароспазм, оромандибулярная дистония (открыточелюстного типа, закрыточелюстного типа), бруксизм, синдром Мейгса, лингвальная дистония, апраксия века, открытая цервикальная дистония, антеколлиз, ретроколлиз, латероколлиз, кривошея, фарингеальная дистония, ларингеальная дистония, аддукторная спастическая дисфония, абдукторная спастическая дисфония, спастическое диспноэ, дистония конечностей, дистония верхних конечностей, дистония при выполнении специфических задач, писчий спазм, судороги музыканта, спазм игрока в гольф, дистония нижней конечности, приведение бедра, отведение бедра, коленное сгибание, коленное разгибание, сгибание ноги в голеностопном суставе, разгибание ноги в голеностопном суставе, эквиноварусная деформация стопы, деформация вследствие дистонии стопы, стриарный палец ноги, сгибание пальца стопы, разгибание пальца стопы, осевая дистония, синдром Пизанской башни, дистония исполнителя танца живота, сегментарная дистония, гемидистония, генерализованная дистония, дистония при синдроме Lubag, дистония при кортикобазальной дегенерации, дистония при синдроме Lubag, остаточная дистония, дистония при спинальном мозжечковом атаксии, дистония при болезни Паркинсона, дистония при болезни Хантингтона, дистония при болезни Галлервордена-Шпатца, допа-индуцированные дискинезии/допа-индуцированная дистония, остаточные дискинезии/остаточная дистония, пароксизмальные дискинезии/дистонии, кинезиогенные, некинезиогенные, вызванные действием, небный миоклонус, миокимический миоклонус, ригидность, доброкачественные мышечные судороги, наследственное дрожание подбородка, парадоксальная активность жевательных мышц, спазмы жевательных мышц одной половины лица, гипертрофическая бранхиальная миопатия, гипертрофия жевательной мышцы, гипертрофия передней большеберцовой мышцы, нистагм, осциллопия, надъядерный паралич зрения, эпилепсия парциальная постоянная, планируемая операция при спастической кривошее, паралич отводящей мышцы голосовой складки, устойчивая мутационная дисфония, дисфункция верхнего сфинктера глотки, гранулема голосовой складки, заикание, синдром Туретта, миоклонус среднего уха, защитное смыкание голосовой щели, постларингэктомическое нарушение речи, защитный птоз, заворот век, дисфункция сфинктера Одди, псевдоахалазия, неахалазийное эзофагиальное расстройство моторики,

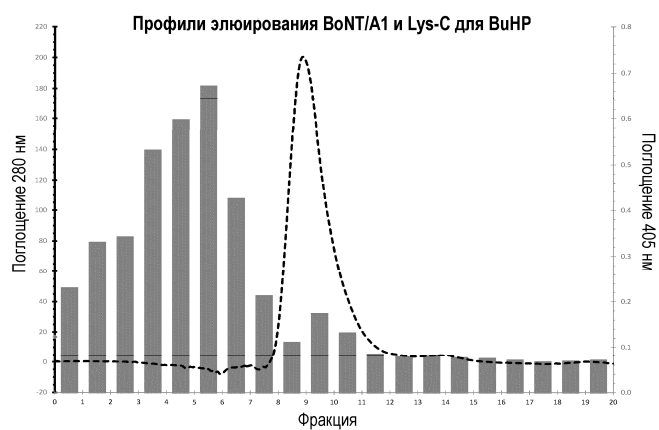
вагинизм, послеоперационный тремор при неподвижности, дисфункция мочевого пузыря, детрузорно-сфинктерная диссинергия, спазм сфинктера мочевого пузыря, гемифациальный спазм, реиннервационные дискинезии, косметическое применение при "гусиных лапках", асимметрия лица вследствие нахмуривания, ямки подбородка, синдром скованного человека, столбняк, гиперплазия простаты, лечение ожирения, детский церебральный паралич, косоглазие, смешанное, паралитическое, содружественное, после операции при отслойке сетчатки, после операции удаления катаракты, при афакии, миозитное косоглазие, миопатическое косоглазие, диссоциированное вертикальное отклонение, как дополнение к хирургии косоглазия, сходящееся косоглазие, расходящееся косоглазие, ахалазия, анальные трещины, гиперфункция экзокринных желез, синдром Фрей, синдром крокодилий слез, гипергидроз подмышечный, ладонный, подошвенный, ринорея, относительная гиперсаливация при инсульте, при болезни Паркинсона, при спастических состояниях при боковом амиотрофическом склерозе, при процессах аутоиммунного энцефалита и миелита, рассеянный склероз, поперечный миелит, болезнь Девика, вирусные инфекции, бактериальные инфекции, паразитарные инфекции, грибковые инфекции, при наследственном спастическом парапарезе, постапоплектический синдром, инфаркт полушария, инфаркт ствола мозга, инфаркт спинного мозга, мигрень, при травме центральной нервной системы, поражения полушарий, поражение спинного мозга, повреждение ствола мозга, при кровоизлиянии центральной нервной системы, внутримозговое кровоизлияние, субарахноидальное кровоизлияние, субдуральное кровоизлияние, кровоизлияние в спинной мозг, при неоплазиях, опухоли полушарий, опухоли ствола головного мозга, опухоли спинного мозга и храп, где указанный способ включает введение жидкой фармацевтической композиции по любому из пп.13-15, нуждающемуся в этом пациенту.



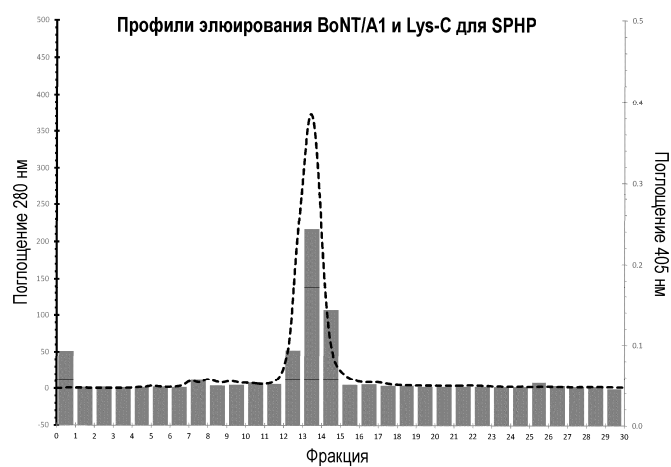
Фиг. 1



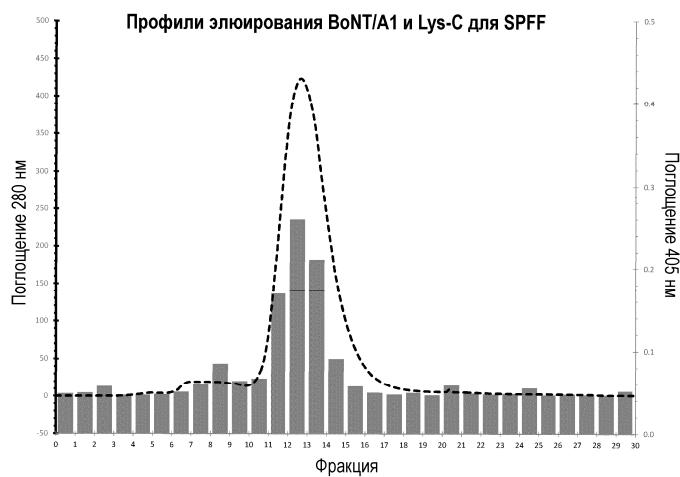
Фиг. 2



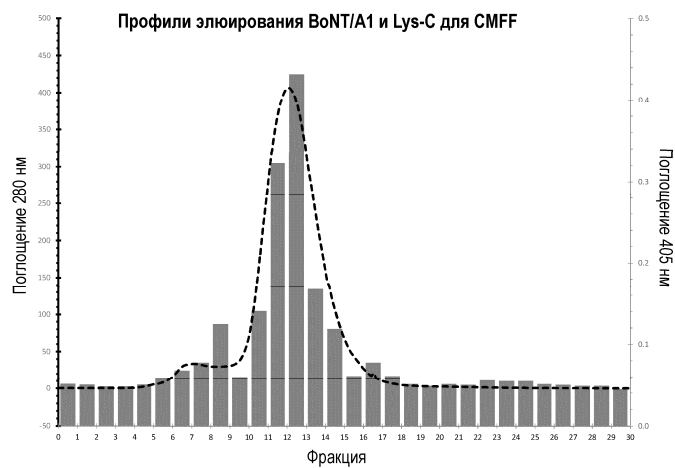
Фиг. 3



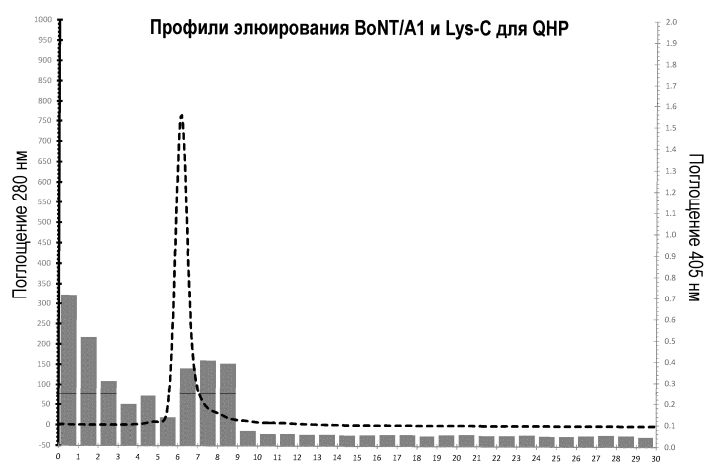
Фиг. 4



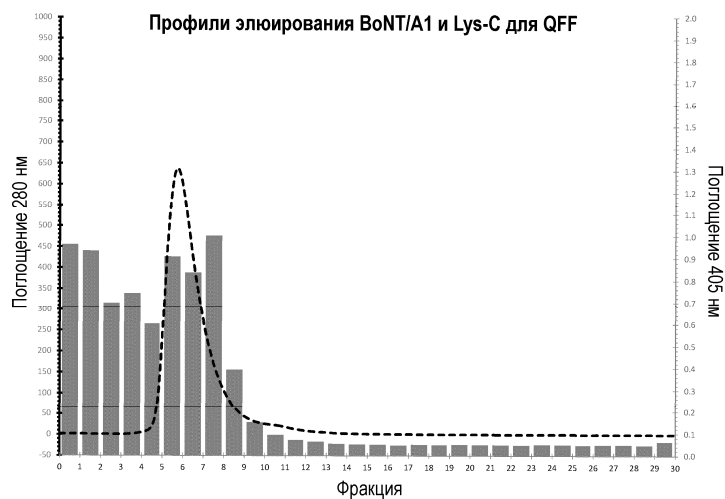
Фиг. 5



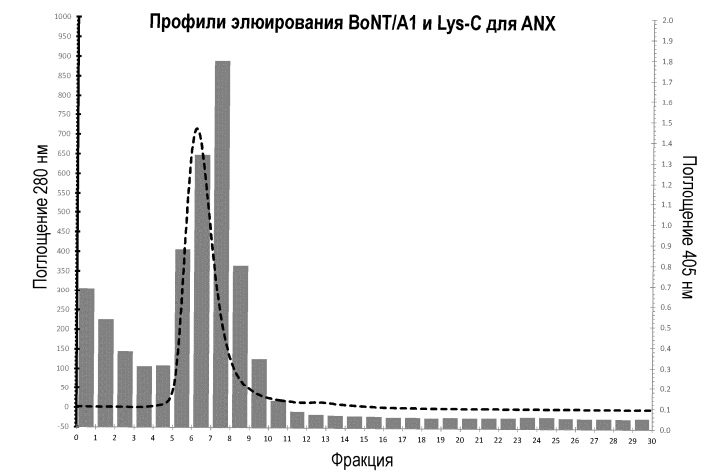
Фиг. 6



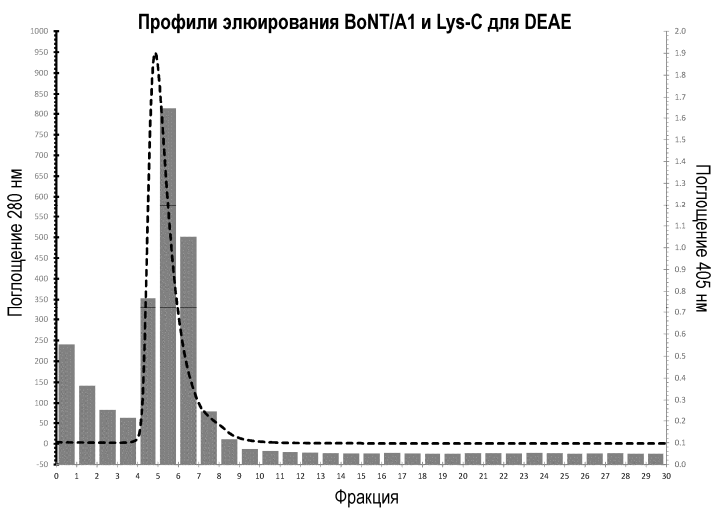
Фиг. 7



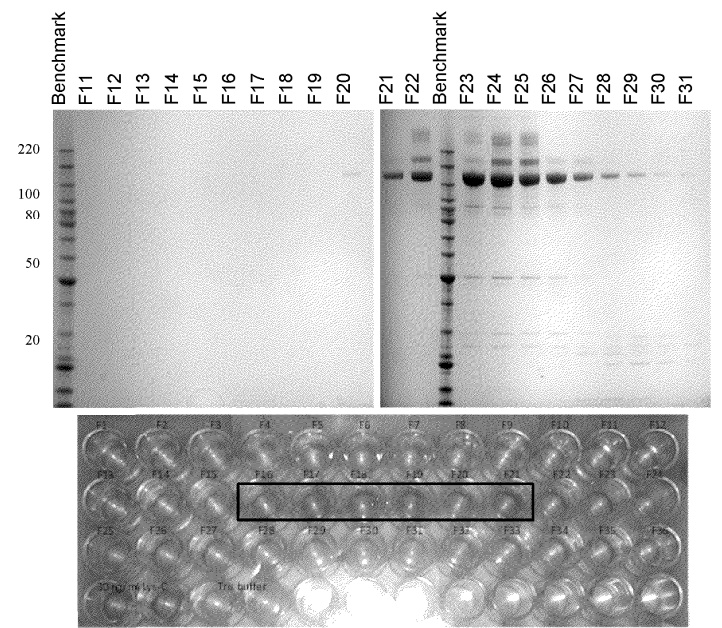
Фиг. 8



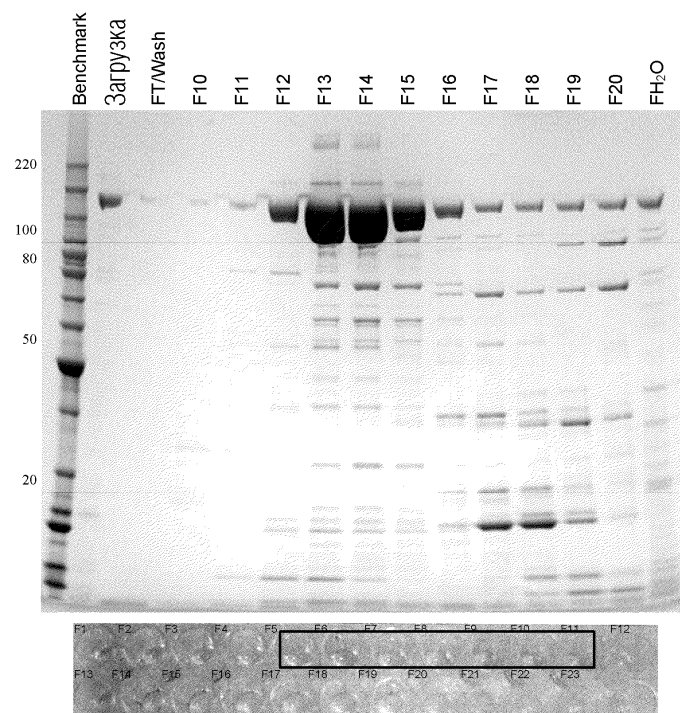
Фиг. 9



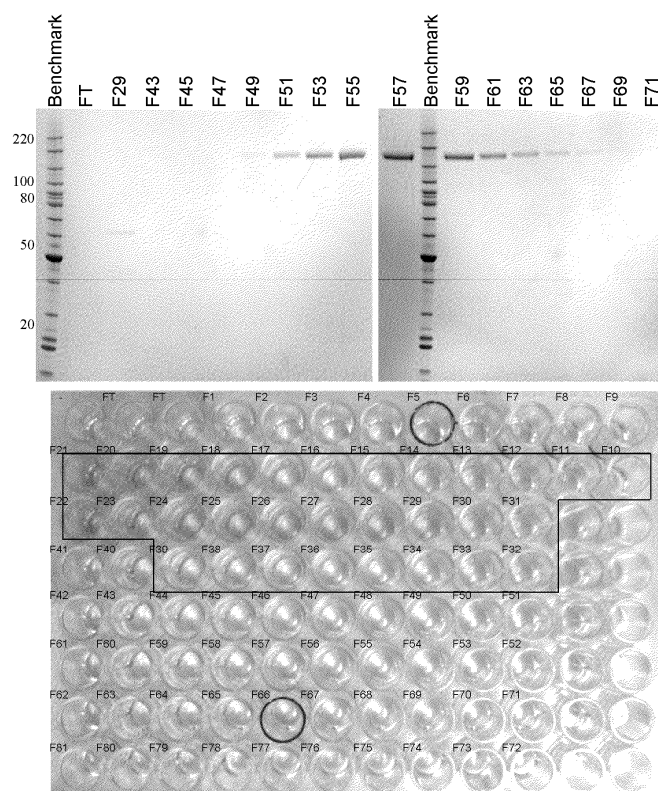
Фиг. 10



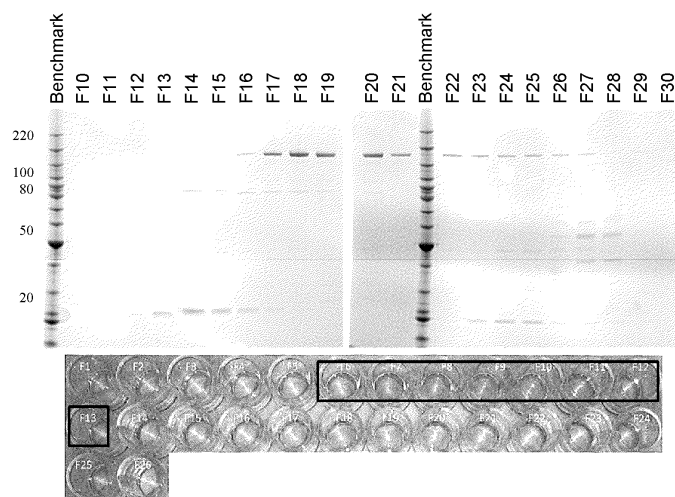
Фиг. 11



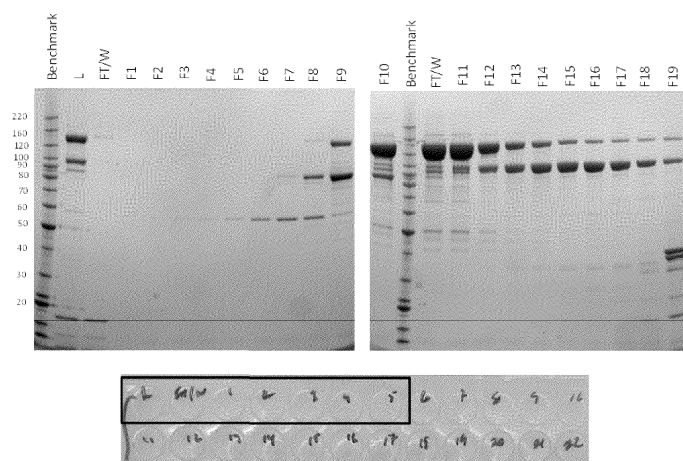
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2