(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 041060 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.09.05

(21) Номер заявки
201892643

(22) Дата подачи заявки
2017.05.16

(51) Int. Cl. ***C07K 14/33*** (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)
C12N 9/52 (2006.01)

(54) СПОСОБ ОЧИСТКИ И АКТИВАЦИИ БОТУЛИНИЧЕСКОГО НЕЙРОТОКСИНА

(31) **62/336,958**
(32) **2016.05.16**
(33) **US**
(43) **2019.06.28**
(86) **PCT/US2017/032985**
(87) **WO 2017/201105 2017.11.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПРЕЗИДЕНТ ЭНД ФЕЛЛОУЗ ОФ ГАРВАРД КОЛЛЕДЖ (US)

(72) Изобретатель:
Дун Минь, Барко Сулиман, Тао Лян (US)

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

(56) JP-A-2010037253

MIYATA K ET AL: "Expression and stability of the nontoxic component of the botulinum toxin complex", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 384, no. 1, 19 June 2009 (2009-06-19), pages 126-130, XP026115687, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2009.04.095 [retrieved on 2009-04-24] abstract page 127, right-hand column, paragraph 2 page 128, right-hand column, paragraph 1 page 130, left-hand column, paragraph 2

KEITA MIYATA ET AL: "Purification and Characterization of Nontoxic Protein Complex from Serotype D 4947 Botulinum Toxin Complex", JOURNAL OF PROTEIN CHEMISTRY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 31, no. 5, 8 May 2012 (2012-05-08), pages 387-392, XP035074599, ISSN: 1573-4943, DOI: 10.1007/S10930-012-9413-X abstract page 388, right-hand column, paragraph 2 - paragraph 3 page 389, left-hand column, paragraph 2

S. GU ET AL: "Botulinum Neurotoxin Is Shielded by NTNHA in an Interlocked Complex", SCIENCE, vol. 335, no. 6071, 24 February 2012 (2012-02-24), pages 977-981, XP055390753, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1214270 cited in the application the whole document

(57) В данном изобретении раскрыты способы выделения и очистки белка ботулинического нейротоксина (BoNT), или полипептида, содержащего рецептор-связывающий домен BoNT, из раствора. Указанный способ включает в себя приведение в контакт раствора, содержащего белок или полипептид, с матриксом, который имеет прикрепленный к нему нетоксичный негемагглютинин (NTNHA), в условиях, подходящих для связывания, промывку матрикса, чтобы тем самым удалить не связавшиеся материалы, и элюирование белка или полипептида с помощью раствора, который диссоциирует связанный белок от NTNHA. Условия, необходимые для связывания, представляют собой pH меньше чем 7,5 (например, 6). Условия, подходящие для диссоциации, представляют собой pH, превышающий или равный 7,5 (например, 8). Также раскрыты композиции, специфичные для данных способов.

041060 B1

041060 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/336958, поданной 16 мая 2016 года, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Перечень последовательностей

Данная спецификация ссылается на Перечень последовательностей (подан в электронном виде как.txt-файл с названием "0342941-0584_SL.TXT" 16 мая 2017 года). Файл.txt был создан 16 мая 2017 года, и имеет размер 96153 байта. Все содержание Перечня последовательностей тем самым включено посредством ссылки.

Область изобретения

Данное изобретение относится к области терапевтического применения нейротоксинов.

Уровень техники

Ботулинические нейротоксины (BoNT) являются наиболее токсичными веществами, которые известны человеку. Было идентифицировано семь серотипов BoNT (A-G); со многими подтипами в каждом серотипе. BoNT - это белки примерно 150 кДа, продуцируемые различными штаммами бактерии Clostridium botulinum (Montal 2 010). Данные токсины вызывают ботулизм у животных - тяжелое неврологическое заболевание, проявляющееся в виде крайне вялого паралича и возможной смерти. Молекулярная основа этой токсичности заключается в способности BoNT связываться с и проникать в моторные нейроны, и высвобождать свой ферментативный домен в цитозоль, который расщепляет клеточную машинерию, ответственную за слияние синаптических пузырьков в нервно-мышечных соединениях (НМС), и ингибирует нейротрансмиссию, блокируя выделение ацетилхолина.

Нейро-ингибирующая функция BoNT была исследована в качестве стратегии лечения многих мышечных нарушений, начиная от косоглазия и заканчивая контролем множества дистоний (Masuyer et al., 2014), не говоря уже о резком увеличении косметических применений BoNT (A) для индукции вялого паралича в лицевых мышцах, чтобы разгладить морщины. Рынок BoNT приближается к 2 миллиардам долларов и продолжает расти быстрыми темпами.

В данное время существует несколько проблем в производстве BoNT. BoNT необходимо продуцировать в бактериях и выделять из бактериальных лизатов. Существующие терапевтические BoNT все еще продуцируют и выделяют с использованием старых методик, подобных тем, которые имели место более 50 лет назад, когда была описана первая партия приготовленного в лаборатории BoNT/A (Bonventre & Kempe 1959; Pickett 2014). Данные способы обычно включают в себя длительную инкубацию/ферментацию природных бактериальных штаммов, которые продуцируют данные токсины (спорообразующие штаммы клостридий), и многие последующие трудоемкие этапы хроматографии. Помимо технических проблем и проблем сдерживания, данные процессы могут также снижать конечный выход, эффективность и воспроизводимость препаратов BoNT.

В последние годы было исследовано экспрессирование BoNT рекомбинантно в общепринятых системах хозяев, применяемых для производства белка в промышленности, таких E. coli и клетки насекомых. Аффинный тэг, такой как His-6 (SEQ ID NO: 1) или GST, обычно соединяют с BoNT для облегчения очистки посредством аффинной очистки. Хотя выделение рекомбинантного BoNT с помощью аффинных тэгов упрощает этапы очистки, оно приводит к новым проблемам. Тэг может отрицательно влиять на биологическую активность токсина и/или иметь нежелательную антигенность. В результате тэг должен быть удален после очистки, что связано с дополнительными стадиями ферментативной обработки и очистки. Кроме того, часто остаются дополнительные остатки, прикрепленные к токсину, оставшиеся от отщепленного тэга, что создает неродные N- или C-концы, которые могут влиять на активность или приводить к иммунологическим последствиям у пациента.

Выделение природных форм BoNT является намного более предпочтительным, но остается трудоемким и занимающим много времени процессом.

Очищенные BoNT должны быть дополнительно активированы посредством ограниченного протеолиза перед применением. Рекомбинантные BoNT обычно активируют после очистки путем инкубации с эндопротеиназой, такой как трипсин. Такая активация может вызывать неспецифическую деградацию и требует дополнительной стадии очистки для удаления активирующей эндопротеиназы, и то и другое снижает активность токсина и выход.

Сущность изобретения

Как будет очевидно специалистам в данной области техники при прочтении данного раскрытия изобретения, данное изобретение охватывает осознание проблемы касательно композиций и способов продуцирования, очистки и/или активации ботулинических нейротоксинов (BoNT), или их частей, или их фрагментов. Среди прочего, данное изобретение обозначает трудности предоставления материалов и процедур, которые облегчают продуцирование, очистку и/или активацию BoNT с желаемыми характеристиками (например, относительно неизмененная биологическая активность; ограниченное внесение нежелательной антигенности; ограничение по загрязняющим веществам, таким как нежелательные эндопротеиназы и/или продукты разложения; и также высокое качество, эффективность и/или воспроизводимость желаемого BoNT), одновременно уменьшая ограничения предыдущих подходов (например, ограниченная эффективность продуцирования, времязатратные и/или трудоемкие шаги и/или жесткие условия).

Один аспект изобретения относится к молекуле, содержащей полипептид нетоксичного негемагглютинина (NTNHA), ковалентно связанный с гетерологичным аффинным фрагментом. В одном варианте осуществления, NTNHA и аффинный фрагмент экспрессируются в виде слитого белка. В одном варианте осуществления раскрытых в данном документе композиций, аффинный фрагмент расположен в позиции, выбранной из группы, состоящей из: N-конца аминокислотной последовательности NTNHA, C-конца аминокислотной последовательности NTNHA, и внутри по отношению к аминокислотной последовательности NTNHA. В одном варианте осуществления раскрытых в данном документе композиций, аффинный фрагмент эффективно связывает мишень связывания в условиях от около pH 6 до около pH 8. В одном варианте осуществления раскрытых в данном документе композиций, аффинный фрагмент выбирают из группы, состоящей из: глутатион-S-трансферазы (GST), тэга C-myc, связывающего хитин домена, связывающего стрептавидин белка (SBP), связывающего целлюлозу домена, связывающего кальмодулин пептида, S-тэга, Strep-тэга II, FLA, белка A, белка G, гистидинового аффинного тэга (HAT), поли-His и связывающего мальтозу белка (MBP). В одном варианте осуществления раскрытых в данном документе композиций, NTNHA происходит из серотипа A, B, C1, D, E, F или G. В одном варианте осуществления раскрытых в данном документе композиций, NTNHA происходит из серотипа B. В одном варианте осуществления раскрытых в данном документе композиций, молекула находится в комплексе с совместимым ботулиническим нейротоксином (BoNT) или полипептидом, содержащим его рецептор-связывающий домен. В одном варианте осуществления раскрытых в данном документе композиций, BoNT или полипептид содержит модифицированный рецептор-связывающий домен Clostridial botulinum серотипа B (B-H_c). В одном варианте осуществления раскрытых в данном документе композиций, молекула дополнительно связана с мишенью связывания через аффинный фрагмент. В одном варианте осуществления раскрытых в данном документе композиций, мишень связывания стабильно прикреплена к матриксу.

Другой аспект изобретения относится к водному раствору, содержащему одну из описанных в данном документе молекул.

Другой аспект изобретения относится к нуклеиновой кислоте, которая кодирует слитый белок одного из функциональных NTNHA и аффинного фрагмента, описанных в данном документе.

Другой аспект изобретения относится к вектору экспрессии, содержащему нуклеиновую кислоту, которая кодирует слитый белок одного из функциональных NTNHA и аффинного фрагмента, описанных в данном документе.

Другой аспект изобретения относится к клетке-хозяину, которая содержит и экспрессирует нуклеиновую кислоту, которая кодирует слитый белок одного из функциональных NTNHA и аффинного фрагмента, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления, клетка-хозяин дополнительно экспрессирует совместимый ботулинический нейротоксин (BoNT). В одном варианте осуществления описанных в данном документе клеток-хозяев, BoNT содержит модифицированный рецептор-связывающий домен Clostridial botulinum серотипа B (B-H_c). В одном варианте осуществления описанных в данном документе клеток-хозяев, клетка-хозяин является прокариотической или эукариотической.

В одном варианте осуществления описанных в данном документе клеток-хозяев, клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку, дрожжевую клетку, клетку млекопитающего, клетку насекомого, растительную клетку или клетку земноводного.

Другой аспект изобретения относится к способу очистки ботулинического нейротоксина (BoNT), включающему контактирование BoNT с совместимым нетоксичным негемагглютинином (NTNHA) в условиях, подходящих для связывания NTNHA с BoNT для того, чтобы сформировать комплекс NTNHA-BoNT. В одном варианте осуществления, BoNT находится в растворе, и NTNHA прикрепляют к матриксу, при этом раствор приводят в контакт с матриксом, чтобы таким образом соединить BoNT с NTNHA. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, способ дополнительно включает в себя промывку матрикса, чтобы тем самым удалить не связавшиеся материалы, и элюирование BoNT из матрикса путем контактирования матрикса с водным раствором, который диссоциирует BoNT из комплекса NTNHA-BoNT. В одном альтернативном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, после контактирования раствора BoNT с матриксом NTNHA, способ дополнительно включает в себя: промывку матрикса, чтобы тем самым удалить не связавшиеся материалы, приведение в контакт матрикса с протеазой в условиях, которые сохраняют комплекс NTNHA-BoNT и подходят для расщепления BoNT в комплексе NTNHA-BoNT, промывку матрикса, чтобы тем самым удалить протеазу и несвязанные материалы, и элюирование BoNT из матрикса путем контактирования матрикса с водным раствором, который диссоциирует BoNT из комплекса NTNHA-BoNT. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, NTNHA ковалентно связан с аффинным тэгом, матрикс связан с мишенью связывания аффинного тэга, а NTNHA нековалентно связан с матриксом посредством взаимодействий аффиного фрагмента и мишени связывания. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, NTNHA ковалентно связан с матриксом. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, BoNT содержит модифицированный рецептор-связывающий домен Clostridial botulinum серотипа B (B-H_c). В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, водный раствор, который диссоциирует BoNT из комплекса

NTNHA-BoNT, имеет pH≥7,5. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, раствор, содержащий BoNT, представляет собой очищенный клеточный экстракт из экспрессирующих BoNT клеток. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, очищенный клеточный экстракт дополнительно содержит 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF). В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, условия, подходящие для связывания, включают в себя контактирование BoNT в составе связывающего буфера, который имеет физиологическую ионную силу и pH<7,5. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, промывку проводят промывочным буфером, который имеет физиологическую ионную силу с pH<7,5. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, буфер связывания и/или промывочный буфер содержит между 100-200 мМ KCl или NaCl. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, буфер связывания и/или промывочный буфер имеет pH около 6. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, буфер связывания и/или промывочный буфер содержит 50 мМ MES, 150 мМ NaCl, pH 6. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, водный раствор, который диссоциирует BoNT из комплекса NTNHA-BoNT, представляет собой буфер для элюирования около 50 мМ Трис, 150 мМ NaCl. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, водный раствор представляет собой буфер для элюирования с pH около 8. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, аффинный фрагмент выбирают из группы, состоящей из: глутатион-S-трансферазы (GST), тэга C-myc, связывающего хитин домена, связывающего стрептавидин белка (SBP), связывающего целлюлозу домена, связывающего кальмодулин пептида, S-тэга, Strep-тэга II, FLA, белка A, белка G, гистидинового аффинного тэга (HAT), поли-His и связывающего мальтозу белка (MBP).

В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, аффинный фрагмент представляет собой GST, а мишенью связывания является глутатион.

В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, NTNHA присутствует в молярном соотношении между около 1:1 и около 10:1 к BoNT, например около 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1 к BoNT. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, BoNT и NTNHA коэкспрессируются в одной и той же клетке-хозяине, например E. coli. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, BoNT и NTNHA экспрессируются в разных клетках-хозяевах. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, BoNT продуцируют рекомбинантным способом в гетерологичной клетке-хозяине, такой как E. coli. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, BoNT продуцируют в его нативной клостридиальной клетке. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, NTNHA продуцируют рекомбинантным способом в гетерологичной клетке-хозяине, такой как E. coli. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, NTNHA продуцируют в его нативной Clostridial клетке.

В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, протеаза выбрана из трипсина, пепсина, эндопротеиназы Lys-C, эндопротеиназы Lys-N, аргинильной эндопептидазы, плазмина, омптина и клостридиальной протеазы, как описано в EP2524963. В предпочтительном варианте осуществления, протеаза представляет собой трипсин или эндопротеиназу Lys-C. В одном варианте осуществления, протеаза представляет собой протеазу, которая расщепляет не-нативныи (то есть экзогенный) сайт расщепления BoNT. В таких клостридиальных токсинах нативный сайт расщепления протеазою (также известный как сайт активации) модифицируют или заменяют сайтом расщепления протеазой, который не является нативным для данного клостридиального токсина. Не-нативные протеазы, которые могут быть применены, включают в себя ентерокиназу (DDDDK↓ (SEQ ID NO: 2)), фактор Xa (IEGR↓ (SEQ ID NO: 3)/ IDGR↓ (SEQ ID NO: 4)), TEV (Tobacco Etch virus) (ENLYFQ↓G (SEQ ID NO: 5)), тромбин (LVPR↓GS (SEQ ID NO: 6)) и PreScission (LEVLFQ↓GP (SEQ ID NO: 7)).

В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, протеазу добавляют в молярном соотношении от около 1:2 до около 1:1000 к NTNHA, предпочтительно от около 1:5 до около 1:100 к NTNHA, например около 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 или 1:50. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, протеазу добавляют в молярном соотношении от около 1:2 до около 1:1000 к BoNT, предпочтительно от около 1:5 до около 1:100 к BoNT, например около 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 или 1:50. Подходящие условия для конкретной применяемой протеазы будут определены специалистом в данной области техники. Продолжительность воздействия протеазы также будет варьировать в зависимости от протеазы, применяемой концентрации, и температуры. В одном варианте осуществления методов описанных в данном изобретении протеазу приводят в контакт с матриксом при температуре от около 2 до около 40°C, предпочтительно от около 4 до около 37°C, например 4, 16, 20 или 37°C. В одном варианте осуществления методов описанных в данном изобретении протеазу приводят в контакт с матриксом при при комнатной температуре (около 20-22°C). В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, протеазу приводят в контакт с матриксом в течение от около 10 мин до около 18 ч, предпочтительно от около 30 мин до около 5 ч, например около 30 мин, 1, 2, 3, 4 или 5 ч. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, протеазу приводят в контакт с

матриксом при pH от около 5,5 до около 8,5, предпочтительно от около 6 до 8, например при pH около 6, 7 или 8. В одном варианте осуществления, протеазу выбирают из протеаз: трипсин и эндопротеиназа Lys-C, и приводят в контакт с матриксом при комнатной температуре в течение около от 30 мин до 2 ч, при pH от 6 до 7.

В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, протеазу добавляют в молярном соотношении около 1:10 к NTNHA. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, протеазу приводят в контакт с матриксом при комнатной температуре. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, протеазу приводят в контакт с матриксом в течение около от 30 мин до 12 ч.

Другой аспект изобретения относится к способу очистки ботулинического нейротоксина (BoNT), включающему в себя: приведение в контакт очищенного клеточного экстракта, содержащего BoNT, с матриксом, покрытой глутатионом, который имеет прикрепленный к нему совместимый нетоксичный негемагглютинин (NTNHA), слитый с глутатионо-S-трансферазой, в буфере для связывания с pH около 6, чтобы тем самым сформировать комплекс NTNHA-BoNT; промывку матрикса промывочным буфером с pH около 6, чтобы таким образом удалить несвязанный материал; приведение в контакт матрикса с протеазой в буфере с pH около 6, чтобы тем самым расщепить BoNT в комплексе NTNHA-BoNT; промывку матрикса промывочным буфером с pH около 6, чтобы таким образом удалить протеазу и не связавшийся материал; и элюирование BoNT из матрикса, путем приведение в контакт матрикса с элюирующим буфером, который имеет pH≥7,5, чтобы таким образом диссоциирует BoNT из комплекса NTNHA-BoNT. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, BoNT содержит модифицированный рецептор-связывающий домен Clostridial botulinum серотипа B (B-H_c). В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, буфер связывания и/или промывочный буфер содержит 50 мМ MES, 150 мМ NaCl. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, буфер связывания дополнительно содержит 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF). В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, элюирующий буфер содержит 50 мМ Трис, 150 мМ NaCl, и имеет pH около 8. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, матрикс, покрытый глутатионом, представляет собой связанные с глутатином агарозные шарики. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, матрикс, покрытый глутатионом, представляет собой колонку. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, матрикс, покрытый глутатионом, имеет около 5 мг/мл связанного NTNHA. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, протеаза представляет собой трипсин или эндопротеиназу Lys-C.

Другой аспект изобретения относится к способу очистки полипептида, содержащего рецептор-связывающий домен (Hc-полипептид) ботулинического нейротоксина, включающему стадии: приведение в контакт раствора, содержащего полипептид Hc, с матриксом, которая имеет прикрепленный к ней совместимый нетоксичный негемагглютинин (NTNHA), в условиях, подходящих для связывания NTNHA с полипептидом Hc, чтобы таким образом сформировать полипептидный комплекс NTNHA-Hc; промывку матрикса, чтобы тем самым удалить не связавшиеся материалы; и элюирование полипептида Hc из матрикса путем приведения в контакт матрикса с водным раствором, который диссоциирует Hc-полипептид из полипептидного комплекса NTNHA-Hc. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, рецептор-связывающий домен полипептида Hc представляет собой модифицированный рецептор-связывающий домен Clostridial botulinum серотипа B (B-H_c). В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, полипептид Hc представляет собой полипептид ботулинического нейротоксина (BoNT). В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, полипептид Hc представляет собой химерный полипептид ботулинического нейротоксина (BoNT).

Другой аспект изобретения относится к применению описанной в данном документе молекулы в способе очистки полипептида ботулинического нейротоксина (BoNT).

Краткое описание графических материалов

Данный патент или файл заявки содержит по меньшей мере один графический материал, выполненный в цвете. Копии данного патента или публикации патентной заявки с цветными графическими материалами будут предоставлены Управлением по запросу и с оплатой необходимой пошлины.

Фиг. 1A и 1B - иллюстрация варианта осуществления принципа очистки и протокола для BoNT, как описано в данном документе. Фиг. 1A - схематическая иллюстрация pH-зависимого бимолекулярного комплексообразования BoNT и NTNHA. ЛЦ: легкая цепь, HN: домен транслокации, HCN, HCC: N-концевая и C-концевая части рецептор-связывающего домена, соответственно. NTNHA имеет такое же доменное содержание, как и BoNT, показано как слитый с GST белок (глутатион-S-трансфераза) иммобилизован на глутатион-агарозной смоле. Фиг. 1B - блок-схема, описывающая полный протокол очистки, активации и элюирования BoNT с применением их естественного партнера по связыванию NTNHA.

Фиг. 2A и 2B - изображения гель-фракционированных белков. Экспериментальные результаты указывают на успешную очистку BoNT/B с применением NTNHA/B в качестве модельного комплекса для BoNT. Фиг. 2A - применяется моноклональное антитело к BoNT/B для контроля наличия BoNT/B на ка-

ждой стадии очистки, которые показаны на фиг. 1B (за исключением того, что образцы здесь не обрабатывались трипсином). Фиг. 2B - гель ДСН-ПААГ электрофореза выбранных образцов, окрашенных кумасси, показывает чистоту очищенного BoNT/B, как показано на панели A. Основная полоса (около 150 кДа), соответствующая BoNT/B, наблюдается в элюированной фракции.

Фиг. 3A и 3B - изображения двух наборов гель-фракционированных белков. Экспериментальные результаты показывают, что BoNT/B эффективно активируется в комплексах NTNHA/B·BoNT/B. Фиг. 3A - иллюстративный иммуноблот NTNHA-связанного BoNT/B, активированного трипсином, который разделяет BoNT/B на два фрагмента (100 кДа и 50 кДа соответственно). Два фрагмента BoNT/B остаются связанными друг с другом одной дисульфидной связью. Они отделяются друг от друга при добавлении ДТТ, для разрушения дисульфидной связи. Фиг. 3B - окрашенная кумасси элюированная фракция показывает полосы токсинов, соответствующие фрагментам расщепленного токсина (на 100 и 50 кДа, соответственно). Полоса 150 кДа представляет собой часть полноразмерного токсина, который еще должен быть расщеплен.

Фиг. 4 представляет собой изображение гель-фракционированных белков. Экспериментальные результаты подтверждают успешную очистку химерного токсина BoNT/A1B с применением NTNHA/B. Поликлональное антитело к BoNT/A применяли для наблюдения за стадиями очистки химерного токсина BoNT/A1B, который был составлен из легкой цепи и транслокационной области BoNT/A1, и рецептор-связывающего домена из BoNT/B. Полноразмерный BoNT/A1B (полоса 150 кДа в элюированной фракции) был успешно очищен и элюирован с применением NTNHA/B. Отметим, что четкая полоса на 100 кДа является продуктом разрушения данного химерного токсина, вероятно, расщепляемого эндогенными протеазами в E. coll.

Фиг. 5A-5I (SEQ ID NO: 22-30) представляют собой список аминокислотных последовательностей различных серотипов NTNHA и их вариантов.

Фиг. 6A-6C представляют собой иллюстрацию варианта осуществления принципа очистки и протокола для BoNT, как описано в данном документе. Фиг. 6A - схематическая иллюстрация pH-зависимого бимолекулярного комплексообразования BoNT и NTNHA. ЛЦ: легкая цепь, H_N: домен транслокации, H_{CN}, H_{CC}: N-концевая и C-концевая части рецептор-связывающего домена, соответственно. NTNHA имеет такое же доменное содержание, как и BoNT, и показано как слитый с GST белок (глутатион-s-трансфераза) может быть иммобилизован на глутатион-агарозной смоле. Взаимодействие между BoNT и NTNHA в слабокислых условиях (например, около pH 6) может быть нарушено путем изменений буферных условий в сторону нейтрально-щелочного pH. Фиг. 6B - протокол выделения и активации BoNT. Блок-схема, описывающая стратегию очистки, активации и элюирования тэгированных и нетэгированных BoNT из сырых лизатов с применением NTNHA. Фиг. 6C - ДСН-ПААГ электрофорез анализ типичного выделения неактивного BoNT ($BoNT/B_{\{RY\}}$) из фильтрованного лизата E. coli, с применением GST-NTNHA/B, иммобилизованного на глутатион-агарозных шариках. Стадии связывания и промывки проводили при pH 6 и элюировали путем замены буфера до pH 8.

Фиг. 7A и 7B показывают, что BoNT/B, выделенный с применением иммобилизованного NTNHA, является чистым и связывает его канонический нейронный рецептор. Фиг. 7A - анализ ДСН-ПААГ электрофорез (слева) показывает три элюированные фракции, которые объединяют и концентрируют (лунка 5). Моноклональное антитело к BoNT/B для обнаружения токсина на всех стадиях (ВБ, справа). Элюированные фракции содержат неактивированный BoNT/B в качестве основной полосы на около 150 кДа, соответствующей одноцепочечному токсину $BoNT/B_{\{RY\}}$. Фиг. 7B - связывание, обнаруженное с помощью анизотропии: элюированный полноразмерный токсин показывает сходную аффиность к FITC-меченому фрагменту его каноничного рецептора синапротогамина 1 синаптической везикулы (Syt 1) с его рекомбинантным доменом H_C; BoNT/A H_C не связывает Syt. Планки погрешности представляют собой среднее значение +COC 3 образцов.

Фиг. 8A-8C показывают, что BoNT в комплексе эффективно активируется, и в то же время защищен от неспецифического расщепления. Фиг. 8A - трипсин-опосредованная активация (расщепление) $BoNT/B_{\{RY\}}$ визуализирована с помощью 8% ДСН-ПААГ электрофореза. Расщепление со временем одноцепочечного (SC) токсина приводит к появлению двух фрагментов: тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC), соединенных одной дисульфидной связью. Фиг. 8B - анализ ВБ показывает, что активация BoNT/B в комплексе с NTNHA/B защищает его от неспецифической трипсинизации, позволяя эффективно промывать и удалять эндопротеиназу. Фиг. 8C - эндопротеиназа Lys-C также может быть применена в качестве специфического активатора для продуцирования активных, двухцепочечных токсинов, применяя данный способ.

Фиг. 9 показывает выделение химерного токсина BoNT/A1B1 с применением NTNHA/B. Поликлональное антитело к BoNT/A применяют для наблюдения за очисткой химерного токсина, составленного из BoNT/A ($LC_{\{RY\}}$, H_N), слитого с доменом BoNT/B H_C. Элюированные фракции содержат неактивированный белок BoNT/A1B1 на около 150 кДа. Явная полоса на около 70 кДа, вероятно, является фрагментом NTNHA/B, который распознается поликлональным антителом.

Подробное описание некоторых вариантов осуществления изобретения

Ботулинические нейротоксины (BoNT) представляют собой сильнодействующие белковые токси-

ны, продуцируемые спорообразующей Clostridium botulinum. В последние несколько десятилетий данные смертельные агенты были признаны полезными при лечении многочисленных нервно-мышечных нарушений и в эстетических применениях, блокируя высвобождение нейротрансмиттера в инъецированных мышцах. В настоящее время признанные как терапевтические агенты, BoNT широко производятся в больших масштабах несколькими производителями по всему миру. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что производственные процедуры основаны на способах многолетней давности, в которых применяются спорообразующие штаммы, а выделение токсинов производят с помощью многочисленных трудоемких и неэффективных стадий массовой очистки. Необходим усовершенствованный способ прямой очистки и активации терапевтических BoNT.

Ботулинические нейротоксины (BoNT) являются наиболее токсичными веществами, которые известны человеку. Семь серотипов белков BoNT (A-G) были идентифицированы как около 150 кДа продукты разных штаммов бактерии Clostridium botulinum (Montal 2010). Данные токсины вызывают ботулизм у животных - тяжелое нервно-мышечное заболевание, проявляющееся в виде крайне вялого паралича. Молекулярная основа данной токсичности заключается в способности токсинов эффективно связываться с рецепторами на моторных нейронах в нервно-мышечном соединении (НМС), поглощаться посредством эндоцитоза, и проходить эндосомную мембрану, высвобождая свою ферментативную цепь в цитозоль. Затем высвобожденная протеаза расщепляет клеточную машинерию (белки SNARE), ответственную за слияние синаптических пузырьков в НМС, тем самым ингибируя нейропередачу, блокируя выделение ацетилхолина (Blasi et al. 1993; Borden Lacy et al. 1998; Rossetto et al. 2014).

Ботулинические нейротоксины (BoNT) также могут быть применены в качестве инструментов для локального контроля мышечных функций, особенно неконтролируемых действий или нарушений вследствие мышечной спастичности (Masuyer et al., 2014). Эта нейро-ингибирующая функция BoNT была изучена в качестве стратегии лечения многих мышечных нарушений, включая косоглазие, и для контроля множества дистоний и дисфункций нижних мочевых путей (LUTD) (Jankovic & Brin 1991; Truong & Jost 2006; Visco et al. 2012; Jiang et al. 2015). В качестве терапевтического и/или косметического агента BoNT могут применять для парализации лицевых мышц с целью разглаживания морщин (Hexsel et al., 2011). Дополнительные применения токсинов направлены на облегчение депрессии и профилактическое лечение мигрени (Finzi & Rosenthal 2014; Jackson et al., 2012). Клинические применения токсина вызывают большой общественный интерес (Sifferlin 2017).

Ботулинические нейротоксины (BoNT) могут быть выделены из культуры спорообразующего штамма клостридий и затем очищены до конечного продукта (Pickett 2014). Имеющиеся данные о производственных процессах и выделении BoNT позволяют предположить, что производители применяют способы условий культивирования и выращивания нативных штаммов, которые аналогичны тем, что имели место быть десятилетия назад (Pickett & Perrow 2009; Snipe & Sommer 1928; Duff, Wright, et al. 1957; Duff, Klerer, et al. 1957; Bonventre & Kempe 1959; Schantz & Johnson 1992; Pickett 2014). Такие способы ограничены по эффективности, при которых нативный штамм клостридий может продуцировать токсин, и обычно включают в себя длительные периоды ферментации природного источника токсина (спорообразующих штаммов клостридий), после чего следуют трудоемкие процедуры выделения токсинов, часто в жестких условиях с несколькими кислотными/спиртовыми осаждениями, кристаллизациями и/или многочисленными стадиями хроматографии (DasGupta & Boroff 1967; Tse et al. 1982; Schantz & Johnson 1992; Malizio et al. 2000).

Производство тэгированных BoNT рекомбинантно возможно с включением аффинного тэга (например, His_{6X} или GST-встройки) для облегчения очистки токсинов применяя аффинные хроматографии. Однако такие подходы имеют недостатки, например, при применении BoNT в качестве терапевтических биологических препаратов. Например, аффинные тэги могут отрицательно влиять на биологическую активность токсина и/или иметь нежелательную антигенность. Удаление тэга после очистки также требует дополнительных стадий ферментации и очистки, в итоге получая не-нативные N- или C-концы в конечном продукте. Дополнительно, рекомбинантные BoNT необходимо активировать с помощью эндопротеиназы после очистки, для получения функциональных и эффективных двуцепочечных токсинов. Дания протеолитическая стадия приводит к неспецифическому разрушению, что делает неободимыми дополнительные стадии очистки для удаления эндопротеиназ и/или продуктов разрушения. Помимо инженерных проблем и проблем безопасности производства токсинов из спорообразующих штаммов, и последующих очисток (Malizio et al., 2000; Pickett 2014), данные рекомбинантные подходы могут нарушить большинство свойств конечного продукта, начиная от качества и активности до эффективной воспроизводимости. Новая стратегия безопасного и эффективного выделения активных терапевтических BoNT будет полезна для крупномасштабного производства и легкого выделения BoNT.

Исследования биохимических свойств и клеточных механизмов, с помощью которых клостридиальные нейротоксины проникают в цитозоль нейронов, обеспечили некоторое понимание структурных, молекулярных и механистических функций клостридиальных нейротоксинов (Blasi et al. 1993; Borden Lacy et al. 1998; Dong et al. 2006; Rossetto et al. 2014). Ботулизмы, связанные с пищевыми продуктами, требуют прохождения интактных токсинов и других продуктов бактерий через желудочно-кишечный тракт хозяина. Молекулярная и структурная основа данной способности избегать разрушения оставалась

загадкой до недавнего времени, когда более крупные комплексы, называемые "комплексы предшественников токсинов" (КПТ), были охарактеризованы как составляющие весь токсический агент, с которым сталкивается организм-мишень. В дополнение к протеолитически активному токсину, данные мультибелковые комплексы обычно состоят из серотип-специфического белка нетоксичного негемагглютинина (NTNHA) и трех гемагглютининовых белков (HA) (Lee et al., 2014). Ранее рассматриваемые как способствующие функциям токсина (Schantz & Johnson 1992), КПТ теперь, как известно, физически заслоняют и защищают BoNT от суровой желудочно-кишечной среды для безопасного достижения его мишеней: сначала эпителиальных барьеров, а затем НМС, где он может быть поглощен в цитозоль через механизмы рециркуляции синаптических везикул. В структурном исследовании (Gu et al., 2012) Gu и коллеги указали на атомные элементы минимально эффективного PTC (m-PTC) в нековалентном комплексе BoNT/A:NTNHA/A. Ко-кристаллическая структура комплекса токсин:NTNHA показала pH-зависимое формирование комплекса. Сообщалось, что BoNT/A и NTNHA/A могут образовывать плотный комплекс с аффинностью наномолярного уровня в слегка кислых условиях (около pH 6). Однако такое формирование комплекса, как было сказано, не происходит при нейтрально-щелочном pH.

В данном документе раскрыты композиции и способы, относящиеся к очистке BoNT, которые используют природную аффинность молекулы BoNT к белку нетоксичного негемагглютинина (NTNHA). BoNT естественным образом формирует димерный комплекс с белком шапероном NTNHA и защищен от протеазы и кислотного разрушения в желудочно-кишечном тракте. Связывание является обратимым и зависит от pH, связываясь при pH больше 7, и диссоциируя при pH меньше 7,4. Белок NTNHA добавляют к смеси, содержащей BoNT, при pH, который способствует связыванию. Комплекс BoNT:NTNHA выделяют из других компонентов смеси путем иммобилизации NTNHA в комплексе. После промывки BoNT высвобождают из комплекса путем повышения pH для способствования диссоциации. Могут быть очищены немеченные формы токсина, поскольку данный способ не зависит от аффинной модификации BoNT.

Описанные в данном документе способы очистки также позволяют активировать BoNT в комплексе BoNT:NTNHA. После активации BoNT может быть высвобожден из комплекса, тем самым получая очищенную активированную форму токсина.

Аспекты изобретения относятся к способу очистки BoNT. Обычно BoNT находится в составе водного раствора, содержащего загрязняющие компоненты, таком как клеточный экстракт. Способ включает в себя объединение раствора с молекулой NTNHA в условиях, подходящих для связывания BoNT с NTNHA. Фактически это может включать объединение молекулы NTNHA с водным раствором (например, клеточным экстрактом или очищенным клеточным экстрактом). BoNT может быть выделен посредством молекулы NTNHA. В целом, как правило, это достигается путем иммобилизации NTNHA на матриксу. Несвязанные материалы удаляют из комплекса, например, путем промывки матрикса (например, применяя количество промывочного буфера в виде 3-4 объемов матрикса). После промывки BoNT высвобождают из комплекса, например, путем элюирования из матрикса связанного NTNHA для получения очищенного полипептида.

BoNT может быть активирован до высвобождения из комплекса путем расщепления протеазой. Это может быть достигнуто путем приведения в контакт связанного с матриксом комплекса с протеазой в условиях, подходящих для расщепления BoNT, которые в остальном не разрушают комплекс (например, сохраняют требуемый pH). Протеазу удаляют вместе с другими несвязавшимися материалами путем промывки матрикса (например, промывочным буфером). Затем активированный очищенный BoNT может быть элюирован путем приведения в контакт матрикса с водным раствором, который диссоциирует BoNT из комплекса NTNHA (например, с помощью буфера для элюирования). В некоторых вариантах осуществления, активация полипептида не требуется или не желательна.

NTNHA, применяемый в способе, должен быть совместим с BoNT. Термин "совместимый" при использовании в отношении NTNHA и BoNT относится к молекулам, способным формировать плотный и стабильный комплекс друг с другом. В одном варианте осуществления, BoNT и NTNHA являются компонентами одного и того же встречающегося в природе белкового комплекса серотипа BoNT. Это происходит, когда последовательности, кодирующие BoNT и NTNHA, из одного и того же оперона. Поскольку термин "серотип" применяется в данном документе для описания молекулы NTNHA, быть "из серотипа" относится к молекуле NTNHA, полученной из оперона, который кодирует определенный серотип BoNT. Совместимость может также относиться к BoNT или химерному полипептиду, имеющему область (например, область Hc), которая совместима с NTNHA. В одном варианте осуществления, NTNHA и область Hc BoNT получены из одного и того же природного комплекса серотипа BoNT.

Иммобилизация NTNHA на матриксу может происходить до или после связывания BoNT. В одном варианте осуществления, NTNHA прикрепляют к матриксу, и к матриксу добавляют раствор, содержащий BoNT, чтобы таким образом привести в контакт полипептид Hc с NTNHA, и обеспечить формирование комплекса. В одном варианте осуществления, NTNHA и BoNT находятся в комплексе до присоединения NTNHA к матриксу.

В одном варианте осуществления, аффинный фрагмент вносят в белок NTNHA (например, путем экспрессии в виде слитого белка), и тэгированный белок применяют для связывания и выделения BoNT в

условиях, которые обеспечивают связывание BoNT:NTNHA. Комплекс BoNT:NTNHA выделяют путем аффинной очистки NTNHA в комплексе.

Буферы для связывания, буферы для инкубации, буферы для промывки и буферы для расщепления протеазой будут обеспечивать условия, подходящие для формирования и сохранения комплекса Hc-NTNHA. Это включает, без ограничения, наличие pH, который обеспечивает формирование комплексов. Обычно pH будет меньше чем 7,5, например меньше чем 6. В одном варианте осуществления, pH буфера составляет от 2 до 8. В одном варианте осуществления, pH буфера составляет от 5 до 7. В одном варианте осуществления, pH составляет около 5, около 6 или около 7. Буферы для связывания, буферы для инкубации, буферы для промывки могут быть очень похожими или одинаковыми. Буферы могут дополнительно содержать дополнительные компоненты, отличные от указанных в данном документе. В одном варианте осуществления, буфер дополнительно содержит стабилизирующий агент полипептида BoNT (например, сывороточный альбумин, полисахарид, трегалозу или поверхностно-активное вещество). pH буферов может быть оптимизирован для различных компонентов в пределах указанных диапазонов. Специалисту в данной области техники будет понятно, что pH буфера должен сохранять общую структуру белка, избегая pH, который приближается к PI (изоэлектрическая точка) белка, который может осаждать белок.

Буферы предпочтительно будут иметь физиологическую ионную силу (например, в пределах 100-200 мМ KCl или NaCl). Для создания требуемой ионной силы доступны различные соли. Слишком высокие концентрации соли могут нарушить взаимодействие, вследствие полярных/ионных воздействий. В одном варианте осуществления концентрация соли составляет 400 мМ или меньше. Ожидается, что условия низкой концентрации соли также будут адекватными. В одном варианте осуществления, концентрация соли составляет 150 мМ. В одном варианте осуществления, буфер содержит 50 мМ MES, 150 мМ NaCl и имеет pH 6. В одном варианте осуществления, буфер, в котором происходит связывание (буфер для связывания), дополнительно содержит один или большее количество ингибиторов протеаз (например, фенилметилсульфонилфторид (PMSF)). В одном варианте осуществления, буфер для связывания содержит PMSF в концентрации от около 0,1 до 1 мМ. В одном варианте осуществления, PMFS составляет около 1 мМ.

Промывка может быть выполнена, например, применяя промывочный буфер. Типичным количеством для промывки является 3-4 объема матрикса.

Молекула BoNT содержит несколько доменов и связывается с молекулой NTNHA через свой рецептор-связывающий домен (иначе называемый домен Hc). Таким образом, описанные в данном документе способы применимы к очистке любого полипептида, содержащего рецептор-связывающий домен (полипептид Hc) ботулинического нейротоксина (например, полноразмерный BoNT или его фрагмент, содержащий полипептид Hc, или химерный полипептид, содержащий домен Hc).

В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, NTNHA присутствует в молярном соотношении между около 1:1 и около 10:1 к BoNT или его рецептор-связывающему домену, например около 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1 к BoNT или его рецептор-связывающему домену.

Активация связанного BoNT или его фрагмента достигается путем приведения в контакт комплекса BoNT:NTNHA (например, связанного с матриксом) с соответствующей протеазой. В одном варианте осуществления, протеаза расщепляет белок после остатка лизина. В одном варианте осуществления, протеаза представляет собой, без ограничения: трипсин, пепсин, эндопротеазу Lys-C, эндопротеиназу Lys-N, аргинильную эндопептидазу, плазмин, омптин или клостридиальную протеазу, как описано в EP 2524963. Предпочтительные условия не приведут к существенному разрушению NTNHA, любых ассоциированных аффинных фрагментов или их мишени-связывания. Условия, подходящие для расщепления, включают в себя соответствующую концентрацию протеазы и подходящие условия для активности протеазы (например, температуру, время инкубации, буферные компоненты и т.д.). Такие условия могут быть достигнуты, применяя подходящий буфер для расщепления протеазой. Количество применяемой протеазы может быть определено количеством молекулы NTNHA или количеством молекулы BoNT. В одном варианте осуществления, протеаза присутствует в молярном соотношении от около 1:2 до около 1:1000 к молекуле NTNHA. В одном варианте осуществления, протеаза присутствует в молярном соотношении от около 1:5 до около 1:100 к молекуле NTNHA, например около 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 или 1:50. В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, протеазу добавляют в молярном соотношении от около 1:2 до около 1:1000 к BoNT (например, от около 1:5 до около 1:100 к BoNT) или около 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 или 1:50.

Подходящие условия для конкретной применяемой протеазы будут определены специалистом в данной области техники. Продолжительность воздействия протеазы также будет варьировать в зависимости от протеазы, применяемой концентрации, и температуры. В одном варианте осуществления, протеазу приводят в контакт при температуре между 2 и 40°C, предпочтительно между 4 и 37°C, например 4, 16, 20, или 37°C). В одном варианте осуществления, протеазу приводят в контакт при комнатной температуре (около 20-22°C).

В одном варианте осуществления, протеазу приводят в контакт в течение от около 10 мин до около 18 ч, предпочтительно от 30 мин до 5 ч (например, около 30 мин, 1, 2, 3, 4 или 5 ч). В одном варианте

осуществления, протеазу приводят в контакт в течение около 4 ч. В одном варианте осуществления, протеаза представляет собой эндопротеазу Lys-C, а время инкубации составляет около 30 мин.

В одном варианте осуществления, протеазу приводят в контакт с матриксом при pH от около 5,5 до около 8,5. В одном варианте осуществления, протеазу приводят в контакт с матриксом при pH от около 6 до около 8 (например, около 6, 7 или 8).

В одном варианте осуществления, протеазу выбирают из протеаз трипсин и эндопротеиназа Lys-C, и приводят в контакт с матриксом при комнатной температуре в течение около от 30 мин до 2 ч при pH между 6 и 7.

Элюирование BoNT из комплекса BoNT-NTNHA осуществляют, применяя водный раствор с pH, который способствует диссоциации комплекса (называемый в данном документе буфером для элюирования). Предпочтительно буфер для элюирования разрушает комплекс BoNT-NTNHA тем что имеет подходящий pH, в то время как в остальном, по существу, сохраняет целостность полипептида Hc и, по существу, сохраняет иммобилизацию NTNHA (например, сохраняет связывание NTNHA с матриксом). Буфер для элюирования дополнительно предпочтительно будет иметь физиологическую ионную силу. Для применения подходят различные доступные буферы (например, Трис, MOPS, HEPES, фосфатный буфер и т.д.). В одном варианте осуществления, буфер для элюирования является таким же, как и буфер для связывания и/или промывки, отличающийся только pH. В одном варианте осуществления, буфер для элюирования представляет собой около 50 мМ Трис, 150 мМ NaCl с соответствующим pH, обсуждаемым в данном документе (например, pH 8).

Применяемый буфер для элюирования (например, описанный в данном документе), может иметь pH от около 7 до около 11. В одном варианте осуществления, pH составляет 7,5 или больше. В одном варианте осуществления, pH составляет около 8. Буфер для элюирования может дополнительно содержать дополнительные компоненты, отличные от указанных в данном документе. pH буфера для элюирования может быть оптимизирован для различных компонентов в нем.

Обычно BoNT очищают из клеточного экстракта. В одном варианте осуществления, клеточный экстракт представляет собой очищенный клеточный экстракт. Термин "очищенный клеточный экстракт" относится к тому, что экстракт, по существу, не содержит ни одного вещества в виде частиц, так как их удаляют путем центрифугирования и/или фильтрации.

BoNT и NTNHA могут быть ко-экспрессированы в одной и той же клетке-хозяине, например E. coli. Способ может использовать NTNHA экспрессированный в ней с BoNT. Альтернативно, BoNT и NTNHA могут быть экспрессированы в разных клетках-хозяевах. Соответствующие клеточные экстракты могут быть применены для получения/выделения соответствующих белков. BoNT может быть продуцирован рекомбинантным способом в гетерологичной клетке-хозяине, такой как E. coli, или продуцирован в его нативной клостридиальной клетке. NTNHA может быть продуцирован рекомбинантным способом в гетерологичной клетке-хозяине, такой как E. coli, или продуцирован в его нативной клостридиальной клетке.

Термин "очистка" или "очищенный", как применяется в данном документе, относится к BoNT или его фрагменту, который является "по существу чистым" по отношению к другим компонентам препарата (например, к другим полипептидам). Он может относиться к BoNT или фрагменту, который по меньшей мере на около 50, 60, 70 или 75%, предпочтительно по меньшей мере на около 85%, более предпочтительно по меньшей мере на около 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на около 95% чист, по отношению к другим компонентам. Повторно, термины "по существу чистый" или "по существу очищенный" в отношении BoNT или фрагмента относятся к препарату, который содержит меньше чем около 20%, более предпочтительно меньше чем около 15, 10, 8, 7%, наиболее предпочтительно меньше чем около 5, 4, 3, 2, 1%, или меньше чем 1%, одного или большего количества других компонентов (например, других полипептидов или клеточных компонентов).

Другие аспекты изобретения относятся к компонентам, применяемым в описанных в данном документе способах. Один аспект изобретения относится к полипептиду NTNHA, применяемому для связывания BoNT. Полипептид NTNHA может представлять собой полноразмерный NTNHA или его функциональный фрагмент. Предполагается, что функциональный фрагмент NTNHA сохраняет свойство связывания с совместимым доменом Hc BoNT и защищает BoNT от разрушения, делая возможной активацию. Полипептид NTNHA может дополнительно содержать дополнительные гетерологичные аминокислоты. Как термин применяется в данном документе, гетерологичный относится к молекуле другого происхождения. Например, гетерологичный аффинный фрагмент отличается от любых внутренних аффинных фрагментов, естественно присутствующих в молекуле NTNHA.

Гетерологичные последовательности могут быть ковалентно связаны с NTNHA (например, путем экспрессии в виде слитого белка или путем посттрансляционной модификации молекулы NTNHA). В одном варианте осуществления, дополнительные гетерологичные аминокислотные последовательности представляют собой гетерологичный аффинный фрагмент.

Гетерологичные аминокислотные последовательности могут присутствовать на N-конце, C-конце или внутри. Такие последовательности, когда представлены, должны быть сконструированы таким образом, чтобы сохранить взаимодействие NTNHA с доменом Hc BoNT. В одном варианте осуществления,

гетерологичная последовательность представляет собой аффинный фрагмент, и между аффинным фрагментом и последовательностью NTNHA нет встроеной последовательности. В одном варианте осуществления, гетерологичные аминокислоты расположены на N-конце NTNHA.

В одном варианте осуществления, гетерологичные аминокислоты не имеют функционального белкового сайта расщепления, такого как те, которые обычно применяют для удаления аффинного тэга из слитого белка. В одном варианте осуществления, изобретение исключает полипептид NTNHA, содержащий myc-тэг, слитую с N-концом, например NTNHA-A1 (Gu et al., Science 335:977-981 (2012)).

В одном аспекте изобретения, полипептид NTNHA стабильно прикреплен к матриксу. Стабильное присоединение относится к прикреплению, которое не нарушается условиями различных буферов, описанных в данном документе. Присоединение к матриксу может осуществляться через ковалентные или нековалентные взаимодействия. В одном варианте осуществления, присоединение к матриксу осуществляется посредством взаимодействия гетерологичного аффинного фрагмента на полипептиде NTNHA с соответствующим связывающим фрагментом на матриксу (например, аффинного фрагмента GST на NTNHA с глютатионом на матриксу).

В одном варианте осуществления, полипептид NTNHA в различных формах, описанных в данном документе (например, связанный с аффинным фрагментом и/или стабильно прикрепленный к матриксу), дополнительно находится в комплексе с совместимым BoNT или полипептидом, содержащим его рецептор-связывающий домен (Hc). В одном варианте осуществления, BoNT или Hc является нативным белком. В одном варианте осуществления, BoNT или Hc является генетически модифицированным рецептор-связывающим доменом (например, с повышенным связыванием к конкретному рецептору).

В одном варианте осуществления, полипептид NTNHA, содержащий аффинный фрагмент, дополнительно связывается с мишенью связывания посредством связывания аффинным фрагментом. Мишень связывания может дополнительно быть стабильно прикреплена к матриксу.

Другой аспект изобретения относится к водному раствору, который содержит описанный в данном документе полипептид NTNHA. Полипептид NTNHA в растворе может быть любой формы, описанной в данном документе, такой как соединенный с аффинным фрагментом, стабильно прикрепленным к матриксу и/или связанным с мишенью связывания через аффинный фрагмент, любая из которых может быть дополнительно соединена с совместимым BoNT.

Нуклеотидные последовательности, которые кодируют слитый белок NTNHA и аффинного фрагмента, описанные в данном документе, также охватываются изобретением. Нуклеотидные последовательности, кодирующие белки, могут быть оптимизированы для экспрессии в E. coli. В одном варианте осуществления, нуклеотидные последовательности представлены в контексте вектора (например, вектора экспрессии). Векторы должны быть совместимы с клетками-хозяевами, в которых как предполагается нуклеиновые кислоты будут размножены и/или экспрессированы.

NTNHA.

NTNHA представляет собой белок 140 кДа, синтезированный Clostridium botulinum. Гены NTNHA встречаются в пределах оперонов, которые кодируют белок BoNT конкретного серотипа. BoNT и NTNHA, полученные из одного и того же оперона, являются компонентами одного и того же природного белкового комплекса BoNT и формируют тесный, стабильный комплекс друг с другом. NTNHA связывает BoNT с $K_д$ примерно 30,8 нМ при стехиометрии 1:1 (Shenyan et al., Science 335: 977-981 (2012)). Предпочтительно NTNHA получают из того же штамма Clostridium botulinum, который продуцирует тот серотип (и подтип) BoNT или фрагмент Hc, который будут очищать (A, A1, A2, A3, A4-A, A4-B, типы B, C, Cl, D, E, F или G). Можно ожидать некоторое совпадение связывания между серотипами. Квалифицированному специалисту доступны аминокислотные последовательности различных белков NTNHA, как и кодирующие нуклеотидные последовательности, например белков NTNHA, полученных из оперонов, кодирующих серотипы BoNT: Al (YP_001253341.1), A2 (WP_012704905), B (WP_003404192.1), C1 (YP_398515.1), D (BAA75083.1), E (WP_003409842), F (YP_001390122.1) и G (CAA61228.1). В одном варианте осуществления, изобретение исключает применение молекулы NTNHA/A (NTNHA/A1) и кодирующих ее нуклеиновых кислот.

BoNT.

В данной области техники известны различные серотипы ботулинических нейротоксинов - (A-G), и также существует много подтипов (A1, A2, A3, A4-A, A4-B). Способы, описанные в данном документе, могут быть применены для очистки нативного BoNT (продуцируемого клостридиальными бактериями) или рекомбинантного белка. Рекомбинантный BoNT может быть продуцирован в любом другом типе хозяина, таком как другие прокариотические клетки, эукариотические клетки, ткани или организмы.

Могут также быть выделены мутированные варианты BoNT (например, в результате аминокислотных замен, вставок или делеций). В одном варианте осуществления, вариант имеет повышенную токсичность (например, путем увеличения связывания с клеточными рецепторами). Такие мутированные варианты могут содержать "модифицированный рецептор-связывающий домен" или "модифицированный H_C". Модифицированный Hc, как данный термин применяется в данном документе, имеет одну или большее количество не встречающихся в природе мутаций-замен, которые усиливают связывание молекулы нейротоксина C. botulinum, в которую она включена, к рецептору нейротоксина C. botulinum, рас-

положенного на поверхности клетки-мишени. Такую молекулу обычно создают с помощью технологии генетической рекомбинации. Модифицированный H_C имеет связывающую активность к рецептору нейротоксина C. botulinum, которая сильнее, чем у его аналога дикого типа. Примеры модифицированных рецептор-связывающих доменов раскрыты в заявке на патент США 2015/166972, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Изобретение дополнительно пригодно для выделения любой молекулы, обладающей или сохраняющей биологическую активность ботулинического нейротоксина, такой как слитый (или химерный) белок, усеченный белок, фрагмент белка, или мутированный вариант ботулинического нейротоксина, такой как белок, имеющий один или большее количество добавленных, удаленных или замещенных аминокислот.

В одном варианте осуществления, BoNT, выделенный способами, описанными в данном документе, обладает активностью токсина. Активность BoNT может быть определена путем измерения протеолитической активности на соответствующем субстрате. A и E типы ботулинического нейротоксина расщепляют белок SNAP-25. B, D, F и G типы ботулинического нейротоксина расщепляют связанный с везикулами мембранный белок (VAMP, называемый синаптобревином). Ботулинический нейротоксин типа C1 расщепляет как SNAP25, так и белок синтаксин. Анализы, которые могут быть применены для определения данной активности, известны в данной области техники, например, как описано в WO 95/33850, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.

Аффинные фрагменты.

NTNHA может быть присоединен к аффинному фрагменту. Аффинный фрагмент специфически связывает мишень связывания в условиях способов, описанных в данном документе (например, от около pH 6 до около pH 8). Различные аффинные фрагменты известны в данной области техники и доступны для применения в изобретении. Аффинный фрагмент может быть членом специфической пары связывания, таким как эпитоп, который специфически распознается антителом. Когда эпитоп применяют в качестве аффинного фрагмента, антитело применяют в качестве мишени связывания. Такие многочисленные комбинации аффинный фрагмент:антитело известны в данной области техники и коммерчески доступны. Примеры включают в себя, без ограничений, c-myc (Roth et al, (1991) J. Cell Biol. 115:587-596), myc (EQKLISEEDL (SEQ ID NO: 8); Evan G I, et al. (1985) Mol. Cell Biol. 5:3610-3616; Munro S. and Pelham H R B, (1987) Cell 48:899-907; Borjigin J. and Nathans J., (1994) 269:14715-14727; Smith D J, (1997) BioTechniques 23:116-120), FLAG.RTM. (патенты США № 4703004; 4851341 и 5011912), HA, полученный из белка гемагглютина вируса гриппа (Wilson I A, et al., (1984) Cell, 37:767; Field J. et al. Mol. Cell Biol. (1988) 8:2159-2165; Xu Y, et al. (2000) Mol Cell Biol. 20:2138-2146), IRS (RYIRS (SEQ ID NO: 9); Liang T C et al. (1996) 329:208-214; Luo W et. al. (1996) Arch. Biochem. Biophys. 329:215-220), AU1 и AU5 ((DTYRYI (SEQ ID NO: 10) TDFLYK (SEQ ID NO: 11)); Lim P S et al. (1990) J. Infect. Dis. 162:1263-1269; Goldstein D J et al. (1992) 190:889-893; Koralnik I J et al. (1993) J. Virol. 67:2360-2366), glu-glu (9 аминокислотный эпитоп из среднего антигена T полиомавируса (EEEEYMPME (SEQ ID NO: 12)); Grussenmeyer, T. et al. (1985) PNAS. USA 82:7952-7954; Rubinfeld. B. et al. (1991) Cell 65:1033-1042), KT3 (11 аминокислотный эпитоп из большого T-антигена SV40 (KPPTPPPEPET (SEQ ID NO: 13)); MacArthur H. and Walter G. (1984) J, Virol. 52:483-491; Martin G A et al. (1990) 63:843-849; Di Paolo G et al. (1997) 272:5175-5182), T7 (11 аминокислотный лидерный пептид из большого капсидного белка T7 (MASMTGGQQMG (SEQ ID NO: 14))), S-TAG, HSV (11 аминокислотный пептид из гликопротеина D вируса просто герпеса (QPELAPEDPEDC (SEQ ID NO: 15))), VSV-G (11 аминокислотный эпитоп из карбоксильного конца гликопротеина вируса везикулярного стоматита, (YTDIEMNRLGK (SEQ ID NO: 16)); Kreis T. (1986) EMBO J. 5:931-941; Turner J R et al (1996) 271:7738-7744), Anti-Xpress (8 аминокислотный эпитоп, (DLYDDDK (SEQ ID NO: 17))), и VS (14 аминокислотный эпитоп из парамоксивируса SV5, (GKPIPNPLLGLDST (SEQ ID NO: 18))).

Другой эпитоп, обычно применяемый в качестве аффинного фрагмента, представляет собой FLAG.RTM. Данная последовательность обычно состоит из DYKDDDDK (SEQ ID NO: 19), но любая комбинация из 3-6 остатков аспарагиновой или глутаминовой кислоты также считается последовательностью FLAG.RTM. Аффинный тэг FLAG.RTM. эффективно применялась в различных системах экспрессии для очистки рекомбинантных слитых белков (Brizzard et al. (1994) BioTechniques 16:730-735; Lee et al. (1994) Nature 372:739-746; Xu et al. (1993) Development 117:1223-1237; Dent et al. (1995) Mol. Cell Biol. 15:4125-4135; Ritchie et al. (1999) BioChem Journal 338:305-10.).

Существует также много аффинных фрагментов, которые не основаны на эпитопе, и они также могут быть применены в изобретении. GST (глутатион-S-трансфераза) представляет собой аффинный фрагмент, предусмотренный для применения в данном изобретении (патенты США № 5654176; 6303128 и 6013462). Полигистидиновый афинный фрагмент представляет собой неприродную последовательность подряд аминокислотных остатков гистидина, включая любые соответствующие пептиды, раскрытые в патентах США № 5284933 и 5310663. Обычно такие последовательности содержат от четырех до десяти остатков гистидина (SEQ ID NO: 20).

В одном варианте осуществления, аффинный фрагмент представляет собой: глутатион-S-трансферазу (GST), тэг C-myc, связывающий хитин домен, связывающий стрептавидин белок (SBP), связывающий целлюлозу домену, связывающий кальмодулин пептид, S-тэг, Strep-тэг II, FLA, белок A, бе-

лок G, гистидиновый аффинный тэг (HAT), поли-His и связывающий мальтозу белок (MBP). В одном варианте осуществления, аффинный фрагмент не представляет собой: GST, тэг C-myc, связывающий хитин домен, SBP, связывающий целлюлозу домену, связывающий кальмодулин пептид, S-тэг, Strep-тэг II, FLA, белок A, белок G, HAT, поли-His и MBP. В одном варианте осуществления, аффинный фрагмент представляет собой AviTag™, V5, Myc, T7, FLAG, HSV, VSV-G, поли His (обычно His_6 (SEQ ID NO: 1)), биотин, или STREP (WSHPQFEK (SEQ ID NO: 21)). В одном варианте осуществления, аффинный фрагмент не представляет собой AviTag™, V5, Myc, T7, FLAG, HSV, VSV-G, поли His, биотин, или STREP.

Члены пары связывания, которые взаимодействуют с или обнаружены природно в организме млекопитающего (человека), такие как антитела, которые природно связываются с NTNHA, или молекулы, распознаваемые транспортерами в печени и/или почках, исключены из композиций, описанных в данном документе.

Мишени связывания для аффинных фрагментов.

Мишени связывания применяют для иммобилизации полипептида NTNHA через связывание аффинного фрагмента. Мишень связывания обычно будет специфичной для данного аффинного фрагмента. Мишени связывания прикреплены к матриксу таким образом, что сохраняется их аффинность связывания к аффинному фрагменту. Например, мишень связывания для эпитопного тэга представляет собой антитело, которое специфически связывает эпитопный тэг. Мишенью связывания для GST является глутатион. Мишенью связывания для биотина является авидин или стрептавидин. Мишенью связывания для STREP является Strep-tactin. Мишенью связывания для поли-His является бивалентный ион никеля или кобальта. Мишенью связывания для белка G является Fc-часть IgG. Мишенью связывания для белка A является Fc-часть иммуноглобулина различных видов.

Матрикс.

В качестве матрикса в изобретении могут применятся различные инертные вещества, обычно применяемые для иммобилизации молекулы посредством физического прикрепления. Матрикс, иначе называемый субстратом, может быть изготовлен из широкого спектра материалов и может принимать различные формы. Материалы включают в себя, без ограничения, металл, металлический сплав, полимер, пластик, бумагу, стекло, ткань, упаковочный материал, биологический материал, такой как клетки, ткани, гидрогели, белки, пептиды, нуклеиновые кислоты и любые их комбинации. Формы, которые может принимать матрикс, включают в себя, без ограничения, гранулы (включая полимерные микрогранулы, магнитные микрогранулы и т.п.), фильтры, волокна, сетки, ячейку, трубки, полые волокна, каркасы, плашки, каналы и любую их комбинацию. Другие примеры субстратов матриксов, известные в данной области техники, включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: каркасы нуклеиновых кислот, белковый каркасы, липидные каркасы, дендримеры, микрочастицы или микрошарики, нанотрубки и микротитровальные плашки. В одном варианте осуществления, матриксные компоненты имеют форму колонки.

В одном варианте осуществления, полипептид NTNHA присоединен к матриксу путем связывания аффинного фрагмента, присутствующего на NTNHA, с мишенью связывания, присутствующей на поверхности матрикса. Для применения доступны различные аффинные фрагменты и мишени связывания, пример которых обсуждается в данном документе. В одном варианте осуществления, матрикс покрыт глутатионом в качестве мишени связывания (например, с глутатион-агарозные шарики). В одном варианте осуществления, покрытая глутатионом матрикс имеет форму колонки.

В одном варианте осуществления, полипептид NTNHA конъюгируют непосредственно с поверхностью матрикса посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия. Это может происходить через N-конец, C-конец или внутреннюю часть молекулы. Дополнительно может быть полезно включить линкер в полипептид NTNHA, чтобы облегчить прикрепление к субстрату.

Конъюгирование с субстратом может быть осуществлено применяя различные способы в данной области техники. Примеры ковалентного приклепления включают в себя, без ограничений, силановую связь (Weetall, 15 Adv. Mol. Cell Bio. 161 (2008); Weetall, 44 Meths. Enzymol. 134 (1976)), и применение реакции NHS или агента конъюгации. Нековалентное прикрепление может быть основано на ионных взаимодействиях, ван-дер-ваальсовых взаимодействиях, диполь-дипольных взаимодействиях, водородных связях, электростатических взаимодействиях и/или взаимодействиях по типу распознавания формы. Без ограничений конъюгация может включать в себя либо стабильную, либо лабильную связь, либо агент конъюгации. Иллюстративные соединения включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: ковалентную связь, амидную связь, добавления к углерод-углеродным кратным связям, азид-алкиновое циклоприсоединение, реакцию Дильса-Альдера, дисульфидную связь, сложноэфирную связь, добавления Майкла, силановую связь, уретан, реакции раскрытия нуклеофильного кольца: эпоксиды, безальдольные карбонильные химические соединения, реакции циклоприсоединения: 1,3-дипольное циклоприсоединение, чувствительную к температуре, чувствительную к излучению (ИИ (инфракрасное излучение), ближнее ИИ, УФ) связь или агент конъюгации, pH-чувствительную связь или агент конъюгации, нековалентные связи (например, формирование комплекса ионных зарядов, водородная связь, пи-пи- взаимодействия, циклодекстрин/ жесткое взаимодействие типа гость-хозяин) и тому подобное. Как применяется в

данном документе, термин "агент конъюгации" обозначает органический фрагмент, который соединяет две части соединения. Линкеры обычно содержат прямую связь или атом, такой как кислород или серу, группу, такую как NR1, C(O), C(O)NH, SO, SO_2, SO_2NH или цепочку атомов, где один или большее количество метиленов могут прерываться или заканчиваться O, S, S(O), SO_2, NH, $C(O)N(R1)_2$, C(O), расщепляемой линкерной группой, замещенным или незамещенным арилом, замещенным или незамещенным гетероарилом, замещенным или незамещенным гетероциклом; где R1 представляет собой водород, ацил, алифатическое или замещенное алифатическое соединение.

Различные химические соединения для конъюгации доступны для конъюгирования двух молекул вместе и могут быть применены для соединения полипептида NTNHA с матриксом. Иллюстративные соединяющие молекулы и/или функциональные группы для конъюгирования по меньшей мере одной сконструированной микроб-нацеленной молекулы с субстратом включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: полиэтиленгликоль (ПЭГ, NH2-PEGX-COOH, который может иметь ПЭГ-спейсер различной длины X, где 1<X<100, например ПЭГ-2К, ПЭГ-5К, ПЭГ-10К, ПЭГ-12К, ПЭГ-15К, ПЭГ-20К, ПЭГ-40К и т.п.), агент конъюгирования малеимид, PASилирование, HESилирование, агент конъюгирования бис(сульфосукцинимидил) суберат (suberate), ДНК агент конъюгирования, пептидный агент конъюгирования, агент конъюгирования силан, полисахаридный агент конъюгирования, гидролизуемый агент конъюгирования, и любые их комбинации.

Количество NTNHA, связанное с матриксом, может быть определено и оптимизировано специалистом-практиком. В одном варианте осуществления, матрикс имеет около 20 мг/мл полипептида NTNHA. В одном варианте осуществления, матрикс имеет около 5 мг/мл полипептида или около 2 мг/мл полипептида.

Протеазы.

Любая протеаза, которая будет расщеплять BoNT, может быть применена в описанных в данном документе способах. Такие протеазы включают в себя без ограничения: трипсин, пепсин, эндопротеиназу Lys-C, эндопротеиназу Lys-N, аргинильную эндопептидазу, плазмин, омптин и клостридиальную протеазу, как описано в EP 2524963. В одном варианте осуществления, протеаза представляет собой трипсин или эндопротеиназу Lys-C. В одном варианте осуществления, протеаза представляет собой протеазу, которая расщепляет не-нативный (то есть экзогенный) сайт расщепления BoNT. В таких клостридиальных токсинах нативный сайт расщепления протеазою (также известный как сайт активации) модифицируют или заменяют сайтом расщепления протеазой, который не является нативным для данного клостридиального токсина. Ненативные протеазы, которые могут быть применены, включают в себя энтерокиназу (DDDDK↓ (SEQ ID NO: 2)), фактор Xa (IEGR↓ (SEQ ID NO: 3)/ IDGR↓ (SEQ ID NO: 4)), TEV (вирус гравировки табака) (ENLYFQ↓G (SEQ ID NO: 5)), тромбин (LVPR↓GS (SEQ ID NO: 6)) и PreScission (LEVLFQ↓GP (SEQ ID NO: 7)), (↓ обозначает сайт расщепления).

Нуклеотидные векторы.

Другой аспект изобретения относится к нуклеотидному вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую описанный в данном документе полипептид NTNHA. Вектор может быть вектором исключительно для увеличения количества копий нуклеотидной последовательности в организме или клетке, или может также быть для экспрессии нуклеотидной последовательности в виде полипептида в данном организме или клетке.

В одном варианте осуществления, вектор представляет собой вектор экспрессии. Такой вектор экспрессии упоминается в данном документе как конструкция экспрессии и содержит молекулу нуклеиновой кислоты, раскрытую в данном документе, функционально связанную с вектором экспрессии, полезную для экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты в клетке или бесклеточном экстракте. Для экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей описанный в данном документе полипептид NTNHA, можно применять широкий спектр векторов экспрессии, включающих в себя, без ограничения: вирусный вектор экспрессии (например, ретровирусы, вирус осповакцины, адено-ассоциированный вирус, вирусы герпеса или вирус папилломы крупного рогатого скота), прокариотический вектор экспрессии, эукариотический вектор экспрессии, такой как, например, вектор экспрессии в дрожжах, вектор экспрессии в насекомых, вектор экспрессии в млекопитающих и вектор экспрессии в бесклеточном экстракте. В одном варианте осуществления, вектор экспрессии представляет собой бакуловирусный вектор экспрессии. Подходящие векторы экспрессии включают в себя, без ограничения, вектор экспрессии кДНК Окаяма-Берг pcDV1 (Pharmacia), pBluescript (Stratagene), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen) или pSPORT1 (Invitrogen) или вектор, полученный из бакуловируса. Векторы экспрессии, полученные из вирусов, могут быть использованы для доставки нуклеиновых кислот по изобретению в популяцию клеток-мишеней. Ряд векторов экспрессии для получения слитых белков с аффинными фрагментами, такими как описанные в данном документе, доступны в данной области техники. Выбор, создание и применение соответствующего вектора экспрессии являются рутинными процедурами, проводимые опытным специалистом.

Клетки-хозяева.

Другой аспект изобретения относится к клетке, в которой увеличивается количество копий и/или

экспрессируется одна или большее количество описанных в данном документе молекул (например, полипептид NTNHA и/или полипептид BoNT). Такая клетка называется клеткой-хозяином. Клетки-хозяева могут быть генетически модифицированы для экспрессии описанных в данном документе молекул, например, путем трансфекции вектором, кодирующим белки, и/или могут экспрессировать одну или большее количество молекул (например, BoNT) естественным образом. В одном варианте осуществления, клетка-хозяин содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид NTNHA (например, в составе вектора). В одном варианте осуществления, клетка-хозяин экспрессирует нуклеиновую кислоту (например, из вектора экспрессии). В некоторых вариантах осуществления, клетки, применяемые согласно данному изобретению, включают в себя прокариотические клетки и эукариотические клетки. Неограничивающие примеры прокариотической клетки представляют собой клетки Escherichia coli, клетки Clostridium botulinum, клетки Clostridium tetani, клетки Clostridium beratti, клетки Clostridium butyricum, или клетки Clostridium perfringens. Неограничивающими примерами эукариотических клеток являются клетки насекомых, дрожжевые клетки, клетки амфибий, клетка млекопитающего, растительные клетки. Неограничивающие примеры клеток насекомых представляют собой клетки Spodoptera frugiperda, клетки Aedes albopictus, клетки Trichoplusia ni, клетки Estigmene acrea, клетки Bombyx mori cells и клетки Drosophila melanogaster. Неограничивающие примеры дрожжевых клеток представляют собой клетки Saccharomyces cerevisiae, клетки Schizosaccharomyces pombe, клетки Pichia pastoris, клетки Hansenula polymorpha, клетки Kluyveromyces lactis и клетки Yarrowia lipolytica.

Если не указано иное в данном документе, научные и технические термины, применяемые в связи с данной заявкой, должны иметь значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области техники. Дополнительно, если иное не требуется по контексту, термины существительных в единственном числе должны включать их множественное число, а существительные в множественном числе должны включать их единственное число.

Следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами и реагентами и т.д., описанными в данном документе и, как таковые, может варьироваться. Терминология, применяемая в данном документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема данного изобретения, который определяется исключительно формулой изобретения.

За исключением случаев, когда в рабочих примерах или где-нибудь еще указано иначе, все числа, выражающие количества ингредиентов или условия реакции, применяемые в данном документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином "около". Термин "около" при применении в описании данного изобретения, применительно к процентам, может означать ±1, или ±5, или ±10%.

В одном отношении, данное изобретение относится к описанным в данном документе композициям, способам и их соответствующему компоненту(ам), которые являются существенными для изобретения, но открытыми для включения неуказанных элементов, существенных или нет ("содержащий"). В некоторых вариантах осуществления, другие элементы, которые должны быть включены в описание композиции, способа или их соответствующего компонента, ограничены теми, которые не оказывают существенного влияния на основной и новый признак(ки) изобретения ("состоящей в основном из"). Это в равной степени относится к стадиям описанного способа, а также к композициям и компонентам в таковом. В других вариантах осуществления, изобретения, композиции, способы и их соответствующие компоненты, описанные в данном документе, предназначены исключать любой элемент, который не считается существенным элементом для компонента, композиции или способа ("состоящий из").

Все патенты, заявки на патент и указанные публикации прямо включены в данный документ посредством ссылки для целей описания и раскрытия, например методологий, описанных в таких публикациях, которые могут быть применены в связи с данным изобретением. Данные публикации предоставляются исключительно для их раскрытия до даты подачи данной заявки. Ничто в этом отношении не должно толковаться как признание того, что изобретатели не имеют права претендовать на более раннюю дату такого раскрытия изобретения в силу предшествующего изобретения или по любой другой причине. Все заявления о дате или представлении в отношении содержания данных документов основаны на информации, доступной для заявителей, и не составляют допущения о правильности дат или содержания данных документов.

Изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые не следует истолковывать как дополнительное ограничение.

Примеры

Пример 1.

Новый способ очистки и активации BoNT.

В данном документе предлагается новый способ очистки и активации природных форм BoNT без тэгов посредством простых стадий аффинной очистки. Данный способ основан на уникальной особенности BoNT: данные токсины естественным образом формируют димерный комплекс с их белком-шапероном, известным как NTNHA. Биологическая цель данного димера заключается в защите токсинов от протеаз и жесткой кислотной среды в желудочно-кишечном тракте (GI). Взаимодействия между BoNT и NTNHA зависят от pH: они связываются при pH меньше чем 7, и отделяются друг от друга при pH

больше чем 7,4. Поэтому внесение аффинного тэга в NTNHA может быть применено для выделения природных форм BoNT в растворах с pH больше чем 7. Связанные BoNT могут затем быть высвобождены путем простого повышения pH раствора до pH больше чем 7,4. Другими словами, вместо того, чтобы помещать аффинный тэг на BoNT, может быть тэгирован его партнер по связыванию. Это позволяет получать природные формы BoNT путем удобного способа аффинной очистки.

В дополнение к очистке, BoNT необходимо активировать ограниченным протеолизом. Рекомбинантные BoNT обычно активируют после очистки с помощью эндопротеиназы (такой как трипсин). Данный способ имеет несколько недостатков: 1) есть вероятность неспецифического разрезания эндопротеиназой, что ставит под угрозу активность токсина и выход; 2) эндопротеиназа должна быть удалена после завершения реакции, что требует дополнительной стадии разделения, которая ставит под угрозу выход и активность токсинов.

Сайт активации BoNT по-прежнему экспонирован на поверхности комплекса BoNT-NTNHA, тогда как другие восприимчивые сайты BoNT часто защищены в комплексе. Это предоставляет возможность обрабатывать токсины эндопротеиназой, тогда как токсин все еще находится в комплексе с NTNHA. Данный подход решает обе проблемы в предыдущих способах: 1) NTNHA защитит токсины от неспецифического разрезания эндопротеиназой; 2) эндопротеиназа может быть легко удалена на одной стадии промывки вместе со всеми другими нетоксичными белками, которые не связываются с NTNHA.

Результаты.

У каждого природного BoNT есть свой, природно встречающийся партнер NTNHA. BoNT/B и NTNHA/B применялись в качестве прототипов для определения осуществимости нашего подхода. Если кратко, то NTNHA/B экспрессировали в виде слитого белка с обычно применяемым тэгом GST (глутатион-S-трансфераза). GST-NTNHA/B очищали, иммобилизировали на шариках глутатиона и затем уравновешивали буфером для связывания с токсином (pH 6). Затем данную смолу добавляли к лизату клеток E. coli, содержащему рекомбинантно экспрессированный BoNT/B, и инкубировали в течение 1 ч при 4°C, чтобы обеспечить формирование комплексов в условиях pH 6. Затем связанный с шариками комплекс был промыт буфером для связывания для удаления неспецифических загрязнителей и несвязанных белков. Связанный BoNT/B либо элюировали из шариков, применяя буфер для элюирования pH 8, либо подвергали воздействию трипсина для активации.

Принцип и стадии очистки схематически проиллюстрированы на фиг. 1A и 1B. Результаты показали, что BoNT/B может быть эффективно очищен от сырых бактериальных лизатов применяя данный способ (фиг. 2A) с высоким выходом и чистотой конечного белка (фиг. 2B). Часть смолы, содержащей комплекс NTNHA/B:BoNT/B, подвергали трипсин-опосредованному расщеплению. Результаты, показанные на фиг. 3A и 3B, указывают, что BoNT могут быть эффективно активированы в течение нескольких часов на шариках в комплексе и впоследствии элюированы из шариков для получения нативного, активного токсина.

В частности, исследовали рецептор-связывающий домен для того, чтобы выяснить можно ли применять NTNHA, специфичный к одному серотипу, для очистки химерных токсинов, содержащих часть данного токсина. Рецептор-связывающий домен опосредует большинство взаимодействий между NTNHA и BoNT. Результаты, показанные на фиг. 4, указывают на успешное применение NTNHA/B для очистки слитого токсина (BoNT/A1B), содержащего рецептор-связывающий домен BoNT/B.

Данные экспериментальные результаты служат доказательством концепции способа, который может быть применен для очистки широко используемого терапевтического токсина: BoNT/A (с помощью NTNHA/A) и BoNT/B (с помощью NTNHA/B), очистки других серотипов BoNT (с помощью подходящего NTNHA), очистки рекомбинантных BoNT, содержащих мутации, очистки химерных BoNT (с помощью NTNHA, который связывается с рецептор-связывающим доменом или специфически разработанными химерными белками NTNHA). Преимуществами данного способа являются: 1) способность очищать BoNT с помощью природных N- и C-концов, которые экспрессируются рекомбинантно, удобной аффинной очисткой, 2) мягкие буфферные условия (pH 6-8) минимизируют возможное повреждение токсинов, 3) специфическое pH-зависимое связывание и элюирование позволяют получить очень чистые токсины, что уменьшает необходимость в дальнейшей очистке, 4) защита NTNHA снижает неспецифическое расщепление активирующей протеазой во время стадии активации, и 5) активация протеазой до элюирования токсинов устраняет необходимость отдельно удалять протеазу.

Материалы и способы.

Экспрессия и очистка белка.

NTNHA/B экспрессировали в E. coli в виде слитого белка глутатион-S-трансферазы (GST-NTNHA/B), с GST, слитой с N-концом белка NTNHA/B; BoNT/B экспрессировали в E. coli с C-концевой His_6-тэгом (SEQ ID NO: 1). Бактериальные культуры (1 л) выращивали при 37°, а экспрессию белка индуцировали добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (IPTG) (250 мкМ), когда оптическая плотность культуры при 600 нм (OD_{600}) достигала около 0,6 AU. Культуры затем переносили в встряхивающий инкубатор с 20° для экспрессии в течение ночи (около 16 ч). Бактерии собирали центрифугированием при 5500×g и полученные осадки замораживали до очистки.

Осадки BoNT/B оттаивали и солюбилизировали в буфере для связывания (50 мМ MES, 150 мМ NaCl, pH 6) с 5 мл/г сухого бактериального осадка; осадки NTNHA/B оттаивали и солюбилизировали в другом буфере для связывания (50 мМ Трис, 150 мМ NaCl, pH 8). 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF) добавляли перед лизисом ультразвуком на льду (Branson Sonifier 250) в течение 15 мин (3×5 мин, 50% мощности). Неочищенный лизат затем очищали центрифугированием (30000×g, 15 мин) и супернатант фильтровали с использованием 0,45 мкм шприцевых фильтров (Nalgene).

Очистка GST-NTNHA/B.

600 мкл глутатион-агарозных шариков Pierce (50% суспензия, Thermo), уравновешенных буфером для связывания, добавляли к около 20 мл супернатанта GST-NTNHA/B и оставляли для связывания в течение 1 ч при 4°. Шарики извлекали центрифугированием (700×g) и дважды промывали 3 объемами смолистых шариков буфера для связывания (50 мМ Трис, 150 мМ NaCl, pH 8). Оцененная концентрация очищенного GST-NTNHA/B составляла около 0,6 мг/мл (анализ BCA и анализ ДСН-ПААГ электрофорез).

pH-зависимое комплексообразование; активация протеазой; и элюирование очищенного BoNT.

Агарозные шарики, содержащие GST-NTNHA/B, добавляли к около 5 мл очищенного BoNT/B лизата E. coli для массового связывания в течение 2 ч при 4° в качающейся конической колбе. Гранулы собирали (700×g) и дважды промывали 3 объемами смолистых шариков буфера для связывания (50 мМ MES, 150 мМ NaCl, pH 6).

Трипсин или эндопротеиназу Lys-C (Sigma-Aldrich) добавляли в молярном соотношении 1:10 при pH 6 (на шариках) для активации NTNHA-связанного токсина в конечном объеме 500 мкл. Реакцию продолжали на качающей платформе при комнатной температуре и контролировали в течение 4 ч путем отбора небольших аликвот для последующего анализа. Смолу дважды промывали связывающим буфером для удаления протеаз и несвязанных примесей. Очищенный и активированный BoNT элюировали двумя объемами смолы буфера с высоким pH (50 мМ Трис, 150 мМ NaCl, pH 8).

Анализ ДСН-ПААГ электрофорез и Вестерн-блоттинг.

10 мкл всех образцов (с или без восстанавливающего агента ДТТ) наносили на 9% гели ДСН-ПААГ электрофореза. После разделения гель окрашивали красителем Кумасси или подвергали стандартному анализу иммуноблоттингом. Для обнаружения BoNT/B применяли человеческое моноклональное антитело, и для обнаружения BoNT/A1B химерного токсина применяли поликлональное антитело кролика.

Пример 2.

Легкое, прямое выделение рекомбинантных BoNT из неочищенных бактериальных лизатов.

Объединение между BoNT и NTNHA облегчается многочисленными сенсорами pH на двух молекулах, которые образуют специфическую поверхность распознавания (Gu et al., 2012). Данный взаимно связывающийся комплекс защищает активный токсин от жесткой кислотной среды, через которую он должен пройти, чтобы достичь своих мест назначений в клетке.

Данный пример подтверждает возможность выделения рекомбинантного полноразмерного BoNT (неактивного BoNT/B, далее называемого BoNT/$B_{\{RY\}}$), который экспрессируется в E. coli, как описано в данном документе. Партнер по комплексу, который облегчает выделение токсинов, является GST-меченным совместимым серотипом его рекомбинантного партнера по комплексу - NTNHA/B. Молекулу GST-меченного NTNHA-B с BoNT/$B_{\{RY\}}$ экспрессировали отдельно в хозяевах E. coli, а производства белка добивались применяя стандартные способы автоиндукции (Studier, 2005). Для выделения GST-NTNHA-B проводили одностадийную массовую очистку глутатион-агарозными гранулами, как описано в способах. Иммобилизованный GST-NTNHA-B был стабильным при коротком-среднесрочном хранении при 4° в течение примерно одной недели, хотя более длительное хранение приводило к возможному спонтанному появлению разрывов, как сообщалось ранее (Sagane et al., 2002; Gu et al., 2012). Затем данный реагент был использован для выделения BoNT/$B_{\{RY\}}$ и химерного BoNT/A1$_{\{RY\}}$B1 в простом технологическом потоке (фиг. 6B), где агарозные гранулы были ловушкой для поимки рекомбинантных токсинов из неочищенных лизатов в благоприятных условиях (например, pH 6,0, 150 мМ NaCl). Анализ ДНС-ПААГ электрофореза соответствующих фракций из схемы очистки показан на фиг. 6C. Выделенный GST-NTNHA/B после элюирования можно легко применять в другом цикле очистки для выделения более совместимых токсинов из свежих или альтернативных экстрактов. Элюированный полноразмерный токсин селективно высвобождают из комплекса при буферном обмене на шариках, и может быть визуализирован на ДНС-ПААГ или анализом вестерн-блоттинг (ВБ) (фиг. 7A). Более того, такие мягкие условия для выделения полноразмерных (FL) токсинов с большей вероятностью сохраняют его протеазную активность и функциональные роли в связывании его клеточных целей. Как показано, канонический нейронный рецептор для BoNT/B, тэгированный пептид, полученный из синаптогамина, взаимодействует с выделенным полноразмерным токсином в in vitro флуоресцентном анизотропном анализе связывания (фиг. 7B).

Токсин в комплексе эффективно активируется экзогенными протеазами.

Как двуцепочечные (AB) токсины, BoNT экспрессируются в виде одной полипептидной цепи, которая подвергается активации с образованием функциональной молекулы, соединенной дисульфидным

мостиком между тяжелой и легкой цепями. "Никирование" экзогенными или эндогенными протеазами, которые расщепляют полипептидную цепь между двумя консервативными цистеинами, которые поддерживают ковалентный мостик между LC и HC, могут повышать активность, и могут требоваться для максимальной активности (фиг. 6A). В данном Примере описано, что добавление таких протеаз (например, в частности, экзогенной протеазы) может быть включено в технологические процессы протокола очистки, как описано в данном документе, и в некоторых вариантах осуществления может помочь максимизировать выделение активных токсинов. Например, GST-NTNHA/B:BoNT/$B_{\{RY\}}$ в комплексе может быть расщеплен каталитическими количествами трипсина или эндопротеиназы Lys-C в мягких условиях при комнатной температуре, а никированный токсин может быть селективно высвобожден в буфер с более высоким pH. Фиг. 8A-8C показывают временные точки активации сформированного в комплекс одноцепочечного BoNT//$B_{\{RY\}}$ для высвобождения протеазного домена (LC) около 50 кД и HC около 100 кДа в образцах, содержащих дитиотреитол (ДТТ). Условия связывания с более низким pH и более низкая активность протеаз (Kasserra & Laidler, 1969; Jekel et al., 1983) играют защитную роль от неспецифического/чрезмерного разрушения токсина и/или NTNHA (фиг. 8B). Чистота и степень никирования токсина могут быть визуализированы либо на геле ДНС-ПААГ электрофореза, либо детектированы с помощью анализа Вестрен-блоттинга (фиг. 8A и 8C).

Химерные рекомбинантные токсины могут быть выделены применяя общий серотип NTNHA.

Данный пример подтверждает, что химерный рекомбинантный ботулинический нейротоксин может быть очищен применяя протокол очистки на основе комплексообразования, как описано в данном документе, с применением различных мишеней, которые могут служить в качестве терапевтических основ для будущих биологических препаратов. Рецептор-связывающий домен BoNT опосредует большинство полярных контактов с NTNHA (Gu et al., 2012). Данный Пример подтверждает, что рекомбинантный ботулотксин может быть очищен путем формирования комплексов с NTNHA. Химерный рекомбинантный белок (BoNT/$A1_{\{RY\}}$B1), который сконструирован из неактивных BoNT/A LC, BoNT/A H_N, и BoNT/B H_C, был применен как доказательство концепции. Применяя тот же самый рекомбинантный GST-NTNHA/B, комплексообразование и обогащение химерного токсина на шариках NTNHA можно было обнаружить несмотря на низкие уровни экспрессии токсина (фиг. 9). Очищенный лизат для химерного токсина содержал продукты разложения и большие примеси, которые часто препятствуют эффективному комплексообразованию с иммобилизованным NTNHA. Следовательно BoNT/$A1_{\{RY\}}$B1 лизат пропускали один раз и элюировали из смолы Ni-NTA до экспонирования иммобилизованному NTNHA на агарозной смоле. Последующие профили активации с данным химерным токсином могут быть похожими на профили активации BoNT/$B_{\{RY\}}$, возможно с различающейся эффективностью.

Обсуждение.

Данный пример демонстрирует выделение рекомбинантно экспрессированных BoNT применяя NTNHA/B в качестве нековалентного партнера-предшественника по комплексу. Оба BoNT/$B_{\{RY\}}$ и NTNHA/B были сверхэкспрессированы отдельно в хозяевах E.coli. NTNHA/B экспрессировали в виде слитого белка с тэгом GST, присоединенной к его N-концу в качестве аффинного фрагмента к твердой глутатион-агарозной смоле. BoNT/$B_{\{RY\}}$ (и химерный BoNT/$A1_{\{RY\}}$B1) были экспрессированы в виде последовательностей дикого типа, за исключением инактивирующей мутаций и C-концевого тэга His_{6X}. Лизис бактерий в буфере с низким pH высвобождал данные токсины в лизат, который инкубировали с агарозными шариками, несущими на себе GST-NTNHA/B. После формирования комплекса твердая среда интенсивно промывается для удаления загрязняющих веществ; после чего токсины могут быть элюированы путем обмена с буфером с высоким pH, или активированы посредством дополнительной стадии, в которой экзогенная эндопротеаза применяется к связанному с смолой комплексу.

Как подтверждено результатами, описанными в данном Примере, данное раскрытие изобретение предоставляет решение для эффективного выделения активных терапевтических BoNT из различных источников в мягких условиях. Усовершенствованная методика выделения, активации и элюирования очищенных BoNT может быть чрезвычайно полезна, например, при крупномасштабном производстве терапевтических BoNT. Потенциальные преимущества включают следующее: 1) эффективное выделение рекомбинантных BoNT из неочищенных лизатов в мягких условиях, в отличие от тех, которые применяются в современной практике (Malizio et al., 2000; Donovan 2007); 2) активированные токсины высокой чистоты могут быть получены применяя единственную схемы очистки, так как это позволяет проводить более интенсивную промывку и избегать нескольких этапов хроматографии; 3) иммобилизованный NTNHA может надлежащим образом защитить от неспецифического расщепления токсина на стадии активации, которая может быть легко включена в протокол очистки (в отличие от обычной активации после очистки). Это может увеличить конечные выходы и однородность конечного активированного токсина; и 4) иммобилизованный GST-NTNHA может использоваться в течение нескольких последовательных очисток, поскольку он возобновляется в конце каждого цикла с небольшими потерями; и 5) такая методология может быть расширена до выделения химерных терапевтических токсинов с совместимыми рецептор-связывающими доменами.

Материалы и способы.

Экспрессия и очистка белка.

NTNHA/B был экспрессирован в виде слитого белка глутатион-S-трансферазы (GST-NTNHA/B) в векторе pGEX; BoNT/$B_{\{RY\}}$ и BoNT/$A1_{\{RY\}}$B1 были экспрессированы С-концевым тэгом (His_{6x}) в векторе pET32-a в E.coli (BL21DE3). Клеточные культуры (обычно 300 мл) выращивали в аутоиндуцируемых средах (Formedium™, UK) в баффлд (baffled) 2 л колбах при 37°C интенсивном перемешивании (>250 об/мин). Когда культуры достигали OD около 0,6, культуры клеток переносили в перемешивающий инкубатор с 20°C для экспрессии в течение ночи (около 16 ч). Клетки собирали центрифугированием при 5500×g и полученные осадки замораживали при -20°C до очистки.

BoNT/$B_{\{RY\}}$ клеточные осадки оттаивали и солюбилизировали в буфере для связывания (50 мМ MES, 150 мМ NaCl, pH 6) с 5 мл/грамм сухого клеточного осадка. GST-NTNHA/B клетки оттаивали и солюбилизировали в TBS буфере для связывания (50 мМ Трис, 150 мМ NaCl, pH 8). Фенилметилсульфонилфторид (PMSF) добавляли к солюбилизированным клеткам при конечной концентрации 0,1 мМ до лизиса путем обработки ультразвуком на льду (Branson Sonifier 250) в течение 15 мин (3×5 мин); 30% мощности. Неочищенный лизат затем очищали центрифугированием (30000×g, 15 мин) и супернатант фильтровали с использованием 0,45 мкм шприцевых фильтров (Nalgene).

Очистка GST-NTNHA/B.

600 мкл глутатион-агарозных шариков Pierce (50% суспензия, Thermo), уравновешивали буфером для связывания, добавляли к около 20 мл супернатанта GST-NTNHA/B и оставляли для массового связывания в течение 1 ч при 4°C на плавно перемешивающей платформе. Шарики извлекали центрифугированием (700×g) и дважды промывали 3 объемами смолистых шариков буфера для связывания (1X TBS). Оцененная концентрация очищенного GST-NTNHA/B обычно составляла около 0,5 мг/мл (анализ BCA и анализ ДНС-ПААГ электрофорез).

Связывание, активация и элюирование очищенных BoNT.

Агарозные шарики, несущие GST-NTNHA/B, добавляли к 10-25 мл BoNT/$B_{\{RY\}}$ или BoNT/$A1_{\{RY\}}$B1 очищенных лизатов (в MES, pH 6) буфера и позволяли массовое связывание в течение 2 ч при 4°C в 50 мл конической колбе на перемешивающей платформе. Гранулы собирали (700×g) и дважды промывали 3 объемами смолистых шариков буфера для связывания (MES, pH 6). Если активация не требуется, связанные очищенные токсины могут быть элюированы на этом этапе, как описано ниже.

Трипсин или эндопротеиназу Lys-C (Sigma-Aldrich) добавляли в молярном соотношении 1:10 эндопротеиназа:GST-NTNHA/B при pH 6 (на шариках) для активации связанного токсина в конечном объеме 500-1000 мкл. Реакция протекала на вращающейся платформе при комнатной температуре и контролировалась (либо в течение 2-4 ч, как на фиг. 8A и фиг. 8C, либо в течение ночи при 4°C, как на фиг. 8B) путем отбора небольших аликвот для последующего анализа. Смолу дважды промывали буфером для связывания, для удаления протеаз и несвязанных загрязняющих веществ. Очищенный и активированный BoNT/$B_{\{RY\}}$ элюировали двумя объемами смолы буфера с высоким pH (TBS: 50 mM Трис, 150 mM NaCl, pH 8).

Анализ ДСН-ПААГ электрофорез и Вестерн-блоттинг.

10 мкл всех образцов (с или без восстановителей ДТТ или βME) были применены к 8-12% гелям ДНС-ПААГ электрофореза. После разделения гели окрашивали красителем Кумасси или подвергали стандартной процедуре Вестерн-блоттинга. Для обнаружения BoNT/$B_{\{RY\}}$ применяли моноклональное антитело кролика (1:5000), а для обнаружения BoNT/$A1_{\{RY\}}$B1 применяли поликлональное антитело кролика (1:2000), полученное против BoNT/A.

Анизотропия флуоресценции.

Пептид (АА 33-53), производный от синаптотагамина 1 (Syt 1) человека синтезировали с N-концевой меткой FITC (GenScript, Пискатуэй Нью-Джерси) и использовали в качестве рецептора в эксперименте связывания в количестве 50-100 нМ. Элюированные полноразмерные токсины были сконцентрированы на фильтровальных установках Vivaspin 6 (10K MWCO, GE). Эксперименты по связыванию (50 мкл) измеряли в черной 96-луночной плашке (Corning) применяя считыватель плашек на основе фильтров (возбуждение/излучение 485/520 нм). BoNT/A и BoNT/B Hc отдельно экспрессировали и очищали, и применяли в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно.

Список литературы

Blasi, J. et al., 1993. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25.

Nature, 365(6442), pp.160-163.

Bonventre, P.F. & Kempe, L.L., 1959. Physiology of toxin production by Clostridium botulinum types A and B. III. Effect of pH and temperature during incubation on growth, autolysis. and toxin production. Applied microbiology, 7, pp.374-377.

Borden Lacy, D. et al., 1998. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications

for toxicity. *Nature structural & molecular biology*, 5(10), pp.898-902.

DasGupta, B.R. & Boroff, D.A., 1967. Chromatographic isolation of hemagglutinin-free neurotoxin from crystalline toxin of Clostridium botulinum type A. *Biochimica et biophysica acta*, 147(3), pp.603-605.

Dong, M. et al., 2006. SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science*, 312(5773), pp.592-596.

Donovan, S., 2007. Botulinum toxin production method. *US Patent*. Available at: https://www.google.com/patents/US7189541 [Accessed March 10, 2017].

Duff, J.T., Wright, G.G., et al., 1957. Studies on immunity to toxins of Clostridium botulinum. I. A simplified procedure for isolation of type A toxin. *Journal of bacteriology*, 73(1), pp.42-47.

Duff, J.T., Klerer, J., et al., 1957. Studies on immunity to toxins of Clostridium botulinum. II. Production and purification of type B toxin for toxoid. *Journal of bacteriology*, 73(5), pp.597-601.

Finzi, E. & Rosenthal, N.E., 2014. Treatment of depression with onabotulinumtoxinA: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Journal of psychiatric research*, 52, pp.1-6.

Gu, S. et al., 2012. Botulinum neurotoxin is shielded by NTNHA in an interlocked complex. Science, 335(6071), pp.977-981.

Hexsel, C. et al., 2011. Botulinum toxin type A for aging face and aesthetic uses. *Dermatologic therapy*, 24(1), pp.54-61.

Jackson, J.L., Kuriyama, A. & Hayashino, Y., 2012. Botulinum toxin A for prophylactic treatment of migraine and tension headaches in adults: a meta-analysis. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 307(16), pp.1736-1745.

Jankovic, J. & Brin, M.F., 1991. Therapeutic uses of botulinum toxin. *The New England journal of medicine*, 324(17), pp.1186-1194.

Jekel, P.A., Weijer, W.J. & Beintema, J.J., 1983. Use of endoproteinase Lys-C from Lysobacter enzymogenes in protein sequence analysis. *Analytical biochemistry*, 134(2), pp.347-354.

Jiang, Y.-H., Liao, C.-H. & Kuo, H.-C., 2015. Current and potential urological applications of botulinum toxin A. *Nature reviews. Urology*, 12(9), pp.519-533.

Kasserra, H.P. & Laidler, K.J., 1969. pH Effects in trypsin catalysis. *Canadian journal of chemistry*, 47(21), pp.4021-4029.

Lee, K. et al., 2014. Molecular basis for disruption of E-cadherin adhesion by botulinum neurotoxin A complex. *Science*, 344(6190), pp.1405-1410.

Malizio, C.J., Goodnough, M.C. & Johnson, E.A., 2000. Purification of Clostridium botulinum type A neurotoxin. *Methods in molecular biology*, 145, pp.27-39.

Masuyer, G. et al., 2014. Engineered botulinum neurotoxins as new therapeutics. Annual review of pharmacology and toxicology, 54, pp.27-51.

Montal, M., 2010. Botulinum neurotoxin: a marvel of protein design. Annual review of biochemistry, 79, pp.591-617.

Pickett, A., 2014. Botulinum Toxin as a Clinical Product: Manufacture and Pharmacology. In Clinical Applications of Botulinum Neurotoxin. Current Topics in Neurotoxicity. Springer New York, pp. 7-49.

Pickett, A. & Perrow, K., 2009. Composition and Molecular Size of Clostridium botulinum Type A Toxin-Hemagglutinin Complex. *The protein journal*, 28(5), pp.248-249.

Rossetto, O., Pirazzini, M. & Montecucco, C., 2014. Botulinum neurotoxins: genetic, structural

and mechanistic insights. *Nature reviews. Microbiology*, 12(8), pp.535-549.

Sagane, Y. et al., 2002. Spontaneous Nicking in the Nontoxic-Nonhemagglutinin Component of the Clostridium botulinum

Toxin Complex. *Biochemical and biophysical research communications*, 292(2), pp.434-440.

Schantz, E.J. & Johnson, E.A., 1992. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiological reviews*, 56(1), pp.80-99.

Sifferlin, A., 2017. Botox: The Drug That's Treating Everything. *Time*. Available at: http://time.com/4623409/botox-drug-treating-everything/ [Accessed March 10, 2017].

Snipe, P.T. & Sommer, H., 1928. Studies on botulinus toxin 3. Acid precipitation of botulinus toxin. *The Journal of infectious diseases*, 43(2), pp.152-160.

Studier, F.W., 2005. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein expression and purification*, 41(1), pp.207-234.

Truong, D.D. & Jost, W.H., 2006. Botulinum toxin: clinical use. *Parkinsonism & related disorders*, 12(6), pp.331-355.

Tse, C.K. et al., 1982. Preparation and characterisation of homogeneous neurotoxin type A from Clostridium botulinum. Its inhibitory action on neuronal release of acetylcholine in the absence and presence of beta-bungarotoxin. *European journal of biochemistry/FEBS*, 122(3), pp.493-500.

Visco, A.G. et al., 2012. Anticholinergic therapy vs. onabotulinumtoxina for urgency urinary incontinence. *The New England journal of medicine*, 367(19), pp.1803-1813.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула для выделения и очистки белка ботулинического нейротоксина (BoNT) или полипептида, включающего рецептор-связывающий домен BoNT, из раствора, содержащая полипептид нетоксичного негемагглютинина (NTNHA), ковалентно связанный с гетерологичным аффинным фрагментом, где:

i) молекула дополнительно связана с мишенью связывания через аффинный фрагмент; или

ii) молекула дополнительно связана с мишенью связывания через аффинный фрагмент, и где мишень связывания стабильно прикреплена к матриксу; и где

полипептид NTNHA находится в комплексе с совместимым ботулиническим нейротоксином (BoNT) или полипептидом, содержащим его рецептор-связывающий домен.

2. Молекула по п.1, отличающаяся тем, что NTNHA и аффинный фрагмент экспрессируются в виде слитого белка.

3. Молекула по любому из пп.1-2, отличающаяся тем, что аффинный фрагмент расположен в позиции, выбранной из группы, состоящей из: N-конца аминокислотной последовательности NTNHA, C-конца аминокислотной последовательности NTNHA, и внутри аминокислотной последовательности NTNHA.

4. Молекула по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что аффинный фрагмент эффективно связывает мишень связывания в условиях от pH 6 до 8.

5. Молекула по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что аффинный фрагмент выбирают из группы, состоящей из: глутатион-S-трансферазы (GST), тега C-myc, связывающего хитин домена, связывающего стрептавидин белка (SBP), связывающего целлюлозу домена, связывающего кальмодулин пептида, S-тэга, Strep-тэга II, FLA, белка A, белка G, гистидинового аффинного тэга (HAT), поли-His и связывающего мальтозу белка (MBP).

6. Молекула по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что NTNHA происходит из серотипа B, A, Cl, D, E, F или G.

7. Молекула по любому из пп.1-6, отличающаяся тем, что NTNHA происходит из серотипа B.

8. Молекула по любому из пп.1-7, отличающаяся тем, что молекула находится в комплексе с совместимым ботулиническим нейротоксином (BoNT) или полипептидом, содержащим его рецептор-связывающий домен.

9. Молекула по п.8, отличающаяся тем, что BoNT или полипептид содержит модифицированный рецептор-связывающий домен из Clostridial botulinum серотипа B (B-H_c).

10. Водный раствор для выделения и очистки белка ботулинического нейротоксина (BoNT), содержащий молекулу по любому из пп.1-9.

11. Нуклеиновая кислота, которая кодирует слитый белок из NTNHA и аффинного фрагмента, описанный в любом из пп.2-7.

12. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.11.

13. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.11 или вектор экспрессии по п.12.

14. Клетка-хозяин по п.13, которая дополнительно продуцирует совместимый ботулинический нейротоксин (BoNT).

15. Клетка-хозяин по п.14, отличающаяся тем, что BoNT содержит модифицированный рецептор-связывающий домен из Clostridial botulinum серотипа B (B-H_c).

16. Клетка-хозяин по любому из пп.13-14, которая является прокариотической.

17. Клетка-хозяин по любому из пп.13-14, которая является эукариотической.

18. Клетка-хозяин по любому из пп.13-14, которая представляет собой бактериальную клетку.

19. Клетка-хозяин по любому из пп.13-14, которая представляет собой дрожжевую клетку.

20. Клетка-хозяин по любому из пп.13-14, которая представляет собой клетку млекопитающего.

21. Клетка-хозяин по любому из пп.13-14, которая представляет собой клетку насекомого.

22. Клетка-хозяин по любому из пп.13-14, которая представляет собой растительную клетку.

23. Клетка-хозяин по любому из пп.13-14, которая представляет собой клетку земноводного.

24. Способ очистки ботулинического нейротоксина (BoNT), включающий в себя стадии:

a) приведение в контакт BoNT с молекулой по любому из пп.1-9 при pH<7,5 для связывания NTNHA с BoNT для того, чтобы сформировать комплекс NTNHA-BoNT;

b) промывку матрикса, чтобы тем самым удалить несвязавшиеся материалы;

c) элюирование BoNT из матрикса путем приведения в контакт матрикса с водным раствором, который диссоциирует BoNT из комплекса NTNHA-BoNT; или

b) промывку матрикса, чтобы тем самым удалить несвязавшиеся материалы;

c) приведение в контакт матрикса с протеазой при pH<7,5, что сохраняют комплекс NTNHA-BoNT и подходят для отщепления BoNT в пределах комплекса NTNHA-BoNT;

d) промывку матрикса, чтобы тем самым удалить протеазу и несвязавшиеся материалы; и

e) элюирование отщепленного BoNT из матрикса путем приведения в контакт матрикса с водным раствором, который диссоциирует отщепленный BoNT из комплекса NTNHA-BoNT.

25. Способ по п.24, отличающийся тем, что матрикс соединен с мишенью связывания аффинного фрагмента, и молекула нековалентно связана с матриксом посредством взаимодействий аффинного фрагмента и мишени связывания.

26. Способ по п.24 или 25, отличающийся тем, что BoNT содержит модифицированный рецептор-связывающий домен Clostridial botulinum серотипа B ($B\text{-}H_c$).

27. Способ по п.24, отличающийся тем, что водный раствор имеет pH≥7,5.

28. Способ по любому из пп.24-27, отличающийся тем, что раствор, содержащий BoNT, представляет собой очищенный клеточный экстракт из экспрессирующих BoNT клеток; необязательно, отличающийся тем, что очищенный клеточный экстракт дополнительно содержит 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF).

29. Способ по любому из пп.24-28, отличающийся тем, что условия, подходящие для связывания, включают в себя приведение в контакт BoNT в контексте буфера для связывания, который имеет физиологическую ионную силу и pH<7,5.

30. Способ по любому из пп.24-29, отличающийся тем, что по меньшей мере одну стадию промывки проводят промывочным буфером, который имеет физиологическую ионную силу с pH<7,5.

31. Способ по п.29 или 30, отличающийся тем, что буфер для связывания и/или промывочный буфер находится (имеет концентрацию) между 100-200 мМ KCl или NaCl; и, необязательно, буфер для связывания и/или промывочный буфер имеет pH около 6; и, необязательно, буфер для связывания и/или промывочный буфер содержит 50 мМ MES, 150 мМ NaCl, pH 6.

32. Способ по любому из пп.29-31, отличающийся тем, что водный раствор представляет собой элюирующий буфер, содержащий около 50 мМ Трис, 150 мМ NaCl; и, необязательно, водный раствор представляет собой элюирующий буфер с pH около 8.

33. Способ по любому из пп.25-32, отличающийся тем, что аффинный фрагмент выбирают из группы, состоящей из: глутатион-S-трансферазы (GST), тэга C-myc, связывающего хитин домена, связывающего стрептавидин белка (SBP), связывающего целлюлозу домена, связывающего кальмодулин пептида, S-тэга, Strep-тэга II, FLA, белка A, белка G, гистидинового аффинного тэга (HAT), поли-His и связывающего мальтозу белка (MBP); предпочтительно, отличающийся тем, что аффинный фрагмент представляет собой GST, а мишень связывания представляет собой глутатион.

34. Способ по любому из пп.25-32, отличающийся тем, что протеаза представляет собой:

(i) трипсин или эндопротеиназу Lys-C; необязательно

(ii) добавленную в молярном соотношении от около 1:2 до около 1:1000 к NTNHA; необязательно

(iii) приведенную в контакт с матриксом при комнатной температуре; необязательно

(iv) приведенную в контакт с матриксом в течение от около 10 мин до 18 ч.

35. Способ по п.24, в котором:

молекулу прикрепляют к матриксу, покрытому глутатионом; и

стадия a) приведения в контакт включает приведение в контакт очищенного клеточного экстракта, содержащего BoNT, с матриксом в буфере для связывания с pH около 6, чтобы тем самым сформировать комплекс NTNHA-BoNT; и, дополнительно, где

стадия b) промывки включает промывочный буфер с pH около 6, чтобы таким образом удалить несвязавшиеся материалы; и

стадия e) элюирования включает элюирующий буфер, который имеет pH≥7,5, чтобы таким образом диссоциировать BoNT из комплекса NTNHA-BoNT.

36. Способ по п.24, в котором:

молекулу прикрепляют к матриксу, покрытому глутатионом; и

стадия a) приведения в контакт включает приведение в контакт очищенного клеточного экстракта, содержащего BoNT, с матриксом в буфере для связывания с pH около 6, чтобы тем самым сформировать комплекс NTNHA-BoNT; и, дополнительно, где

стадия b) промывки включает промывочный буфер с pH около 6, чтобы таким образом удалить несвязавшиеся материалы; и

стадия c) приведения в контакт включает приведение в контакт матрикса с протеазой в буфере с pH около 6, чтобы таким образом отщепить BoNT в пределах комплекса NTNHA-BoNT;

стадия d) промывки включает промывочный буфер с pH около 6, чтобы таким образом удалить протеазу и несвязавшиеся материалы; и

стадия e) элюирования включает элюирующий буфер, который имеет pH≥7,5, чтобы таким образом диссоциировать BoNT из комплекса NTNHA-BoNT.

37. Способ по любому из пп.35 или 36, отличающийся тем, что BoNT содержит модифицированный рецептор-связывающий домен Clostridial botulinum серотипа B (B-H_c) и/или отличающийся тем, что буфер для связывания и/или промывочный буфер содержит 50 мМ MES, 150 мМ NaCl; необязательно, отличающийся тем, что буфер для связывания дополнительно содержит 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF).

38. Способ по любому из пп.35-37, отличающийся тем, что элюирующий буфер содержит 50 мМ Трис, 150 мМ NaCl, и имеет pH около 8.

39. Способ по любому из пп.35-38, отличающийся тем, что матрикс, покрытый глутатионом, представляет собой соединенные с глутатионом агарозные гранулы; или колонку.

40. Способ по пп.35-39, отличающийся тем, что матрикс, покрытый глутатионом, имеет около 5 мг/мл связанного NTNHA.

41. Способ по любому из пп.36-40, отличающийся тем, что протеаза представляет собой трипсин или эндопротеиназу Lys-C.

42. Способ очистки полипептида, содержащего рецептор-связывающий домен (полипептид Hc) ботулинического нейротоксина, включающий следующие стадии:

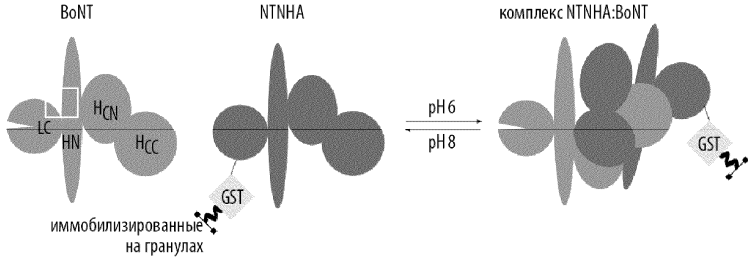
a) приведение в контакт раствора, содержащего полипептид Hc с матриксом, который имеет прикрепленную к нему совместимую молекулу по любому из пп.1-9 при pH<7,5 для связывания NTNHA с полипептидом Hc, чтобы тем самым сформировать комплекс NTNHA-полипептид Hc.

b) промывку матрикса, чтобы тем самым удалить несвязавшиеся материалы;

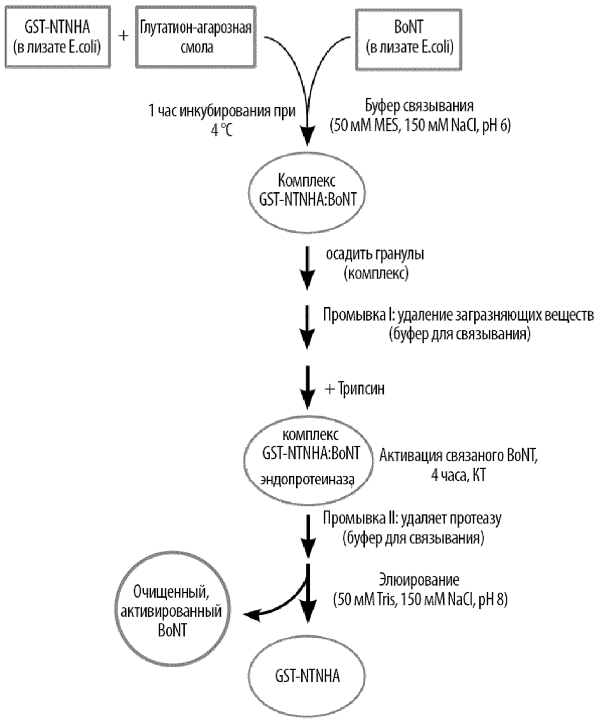
c) элюирование полипептида Hc из матрикса путем приведения в контакт матрикса с водным раствором, который диссоциирует полипептид Hc из комплекса NTNHA-полипептид Hc, и, необязательно, отличающийся тем, что рецептор-связывающий домен полипептида Hc представляет собой модифицированный рецептор-связывающий домен Clostridial botulinum серотипа B (B-H_c).

43. Способ по п.42, отличающийся тем, что полипептид Hc представляет собой полипептид ботулинического нейротоксина (BoNT), и/или полипептид Hc представляет собой химерный полипептид ботулинического нейротоксина (BoNT).

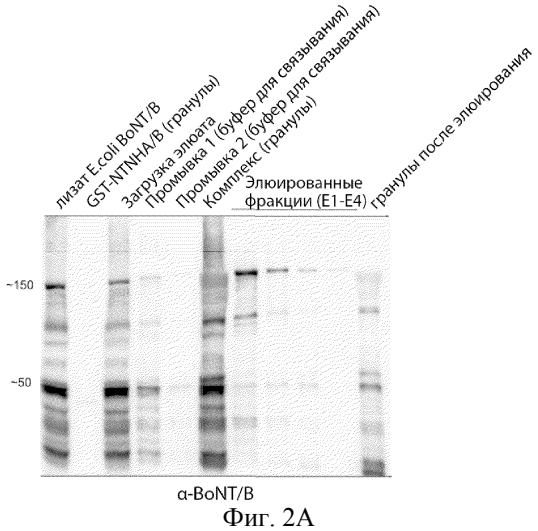
44. Применение молекулы по любому из пп.1-9 в способе очистки полипептида ботулинического нейротоксина (BoNT).



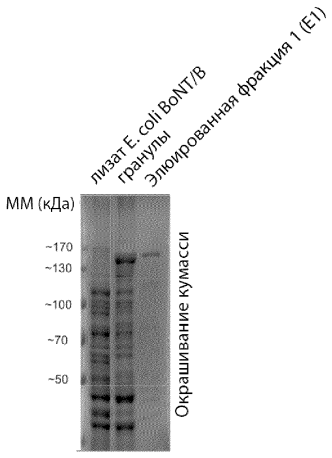
Фиг. 1A



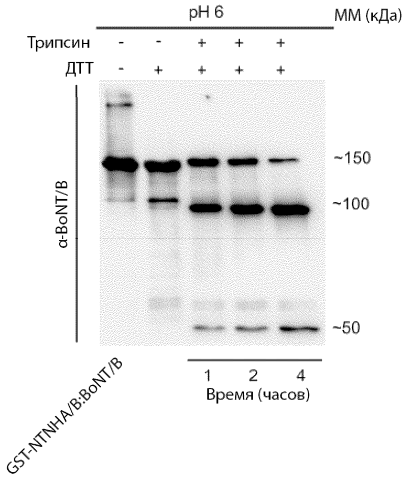
Фиг. 1B



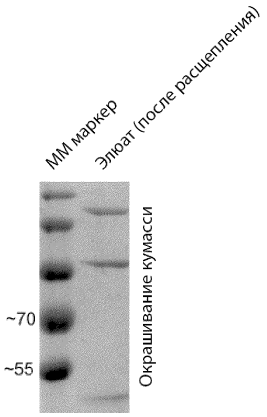
Фиг. 2A



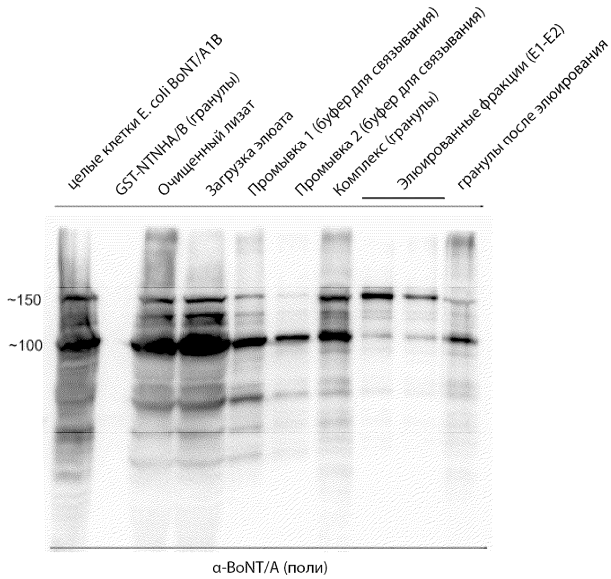
Фиг. 2B



Фиг. 3А



Фиг. 3В



Фиг. 4

NTNHA A1: Clostridium botulinum A штамм ATCC 350. (YP_001253341.1) (SEQ ID NO: 22)

```
   1 mnindnlsin spvdnknvvv vrarktdtvf kafkvapniw vaperyyges lsideeykvd
  61 ggiydsnfls qdsekdkflq aiitllkrin stnageklls listaipfpy gyigggyyap
 121 nmitfgsapk snkklnslis stipfpyagy retnylssed nksfyasniv ifgpganive
 181 nntvfykked aengmgtmte iwfqpfltyk ydefyidpai elikcliksl yflygikpsd
 241 dlvipyrlrs elenieysql nivdllvsgg idpkfintdp ywftdnyfsn akkvfedhrn
 301 iyeteiegnn aigndiklrl kqkfrinind iwelnlnyfs kefsimmpdr fnnalkhfyr
 361 kqyykidype nysingfvng qinaqlslsd rnqdiinkpe eiinllngnn vslmrsniyg
 421 dglkstvddf ysnykipynr ayeyhfnnsn dssldnvnig vidnipeiid vnpykencdk
 481 fspvqkitst reintnipwp inylqaqntn nekfslssdf vevvsskdks lvysflsnvm
 541 fyldsikdns pidtdkkyyl wlreifrnys fditatqein tncginkvvt wfgkalniln
 601 tsdsfveefq nlgaislink kenlsmpiie syeipndmlg lplndlnekl fniyskntay
 661 fkkiyynfld qwwtqyysqy fdlicmakrs vlaqetlikr iiqkklsyli gnsnissdnl
 721 almnltttnt lrdisnesqi amnnvdsfln naaicvfesn iypkfisfme qcinninikt
 781 kefiqkctni nedeklqlin qnvfnsldfe flniqnmksl fssetallik eetwpyelvl
 841 yafkepgnnv igdasgknts ieyskdiglv yginsdalyl ngsnqsisfs ndffengltn
 901 sfsiyfwlrn lgkdtikskl igskedncgw eiyfqdtglv fnmidsngne kniylsdvsn
 961 nswhyitisv drlkeqllif iddnlvanes ikeilniyss niisllsenn psyiegltil
1021 nkpttsqevl snyfevlnns yirdsneerl eynktyqlyn yvfsdkpice vkqnnniylt
1081 inntnnlnlq askfkllsin pnkqyvqkld eviisvldnm ekyidisedn rlqlidnknn
1141 akkmiisndi fisncltlsy ngkyiclsmk denhnwmicn ndmskylylw sfk
```

Фиг. 5A

NTNHA A2: Clostridium botulinum A2 штамм Kyoto (WP 012704905) (SEQ ID NO: 23)

```
   1 mkinnnfnid slidnrdvai vrgrktdtff kvfqvapniw iaperyyges lninedqksd
  61 ggiydsnfls tndekdeflq atvkilqrin nnvigaklls listaipfpy eykpgdyrqt
 121 nylvskdnqh yytanlvifg pgtnivenna iyykkedsen gmgtmseiwf qpfltykygq
 181 fyvdpaleli kcliklyyyl ygikpsddls ipyrlrseln sfeyseldmi dflisggtey
 241 klldtnpywf tdnyfidapk nfekykndye tkiknnndia nsiklyleqk fktnaqdiwe
 301 lnlsyfstef eimmpeifnn alnhyyrkey yvidyfknyn ingfingqik tilplskynk
 361 niinkpelvv nlinenntvl mksnvygdgl kgtmdnfyaa ykipynigde yhinysylnn
 421 vnveeinnip pindadiypy rknsdpfipv ynitetkein tttplsvnyl qaqvtnsndi
 481 slssdfskvi sskdrslvys fldntidyld sikydepidt dkkyylwlke ifrnysfdmt
 541 etqevntpcg inkvvpwlgk alnilntgns fieefkslgp islinkkeni tmpkieidei
 601 pnsmlnlsfk dlsenlfnrf sknnsyfeki yydfldqwwt qyysqyfdli cmakksilaq
 661 etlikkiiqk klsylignsn issdnlalmn ltttntlrdi snesqiamnn vdsflnsaai
 721 cvfegniysk fisfmeqcin ninkntrefi qkctnitene klqlinqnif ssldfdflni
 781 enlkslfsse tallikeets pyelvlyafq epdnnaigda sakntsieys kdidlvygin
 841 sdalylngsn qsisfsndff engltnsfsi yfwlrnlgkd tikskligsk edncgweiyf
 901 qdtglvfnmi dsngnekniy lsdvsnnswh yitisvdrlk eqllifiddn lvanesikei
 961 lniyssniis llsennpsyi egltilnkpt tsqevlnnyf kvlnnsyird sneerleynk
1021 tyqlynyvfs dkpicevkqn nniyltinnt nnlnlqpskf kllsinsnkq yvqkfdevii
1081 silgnmekyi disednrlql idnkngakkm iisndmfisn cltlscggky iclsmkdenh
1141 nwmicnndms kylylwsfk
```

Фиг. 5B

NTNHA B: Clostridium botulinum B1 str. Okra (WP 003404192.1) (SEQ ID NO: 24)

```
   1 mnindnlsin spvdnknvvv vrarktdtvf kafkvapniw vaperyyges lsideeykvd
  61 ggiydsnfls qdsekdkflq aiitllkrin stnageklls listaipfpy gyigggyyap
 121 nmitfgsapk snkklnslis stipfpyagy retnylssed nksfyasniv ifgpganive
 181 nntvfykked aengmgtmte iwfqpfltyk ydefyidpai elikcliksl yflygikpsd
 241 dlvipyrlrs elenieysql nivdllvsgg idpkfintdp ywftdnyfsn akkvfedhrn
 301 iyetqiegnn aigndiklrl kqkfrinind iwelnlnyfs kefsimmpdr fnnalkhfyr
 361 kqyykidype nysingfvng qinvqlslsd rnqdiinkpe eiinllngnn vslmrsniyg
 421 dglkstvddf ysnykipynr ayeyhfnnsn dssldnvnig vidnipeiid vnpykencdk
 481 fspvqkitst reintnipwp inylqaqntn nekfslssdf vevvsskdks lvysflsnvm
 541 fyldsikdns pidtdkkyyl wlreifrnys fditatqein tdcginkvvt wfgkalniln
 601 tsdsfveefq nlgpislink kenlsmpiie iygipndmlg lplndlnekl fniylknily
 661 fkkvyfnfld qwwteyysqy fdlicmakqs ilaqeklikq iiqnklqdlf kadismdkln
 721 lmnlatektf idlsnesqia innindflnk saicvfdtni ypkfisfmeq cinsvnsnvt
 781 afiqkctnit edeklqlikl ntfmnidfef fdiqsikdli tsetdlikee kesdynlflf
 841 tlqednnkvi edisgkntlv kysdsislvy gvngdalylk epdesvsfsn kafengltns
 901 fsicfwlrnl gediitskli enkadncgwe iyfennglvf sivdcngnee niylsdvisk
 961 nwyyisisid rlrnqllifi ndklianqsi eqilniyssn tislvnennp iyieglsiln
1021 rsitseevvn nyfsylnnsy irdisgerle ynktyelyny vfpenslyev tennniylsi
1081 kdtnnlniqg akfklinida nkqyvqkwde gvvcllgdee kyvdissenn riqlvnskdt
1141 akriifnndi fmpncltfay nnkylslslr drnynwmicn nndnipkaah lwalkgi
```

Фиг. 5C

NTNHA C1: Clostridium botulinum C1 (YP 398515.1) (SEQ ID NO: 25)

MDINDDLNIN SPVDNKNVVI VRARKTNTFF KAFKVAPNIW VAPERYYGEP LDIAEEYKLD
GGIYDSNFLS QDSERENFLQ AIIILLKRIN NTISGKQLLS LISTAIPFPY GYIGGGYSSP
NIFTFGKTPK SNKKLNSLVT STIPFPFGGY RETNYIESQN NKNFYASNII IFGPGSNIVE
NNVIYYKKND AENGMGTMAE IVFQPLLTYK YNKFYIDPAM ELTKCLIKSL YFLYGIKPSD
NLVVPYRLRT ELDNKQFSQL NIIDLLISGG VDLEFINTNP YWFTNSYFPN SIKMFEKYKN
IYKTEIEGNN AIGNDIKLRL KQKFQINVQD IWNLNLNYFC QSFNSIIPDR FSNALKHFYR
KQYYTMDYTD NYNINGFVNG QINTKLPLSN KNTNIISKPE KVVNLVNENN ISLMKSNIYG
DGLKGTTEDF YSTYKIPYNE EYEYRFNDSD NFPLNNISIE EVDSIPEIID INPYKDNSDN
LVFTQITSMT EEVTTHTALS INYLQAQITN NENFTLSSDF SKVVSSKDKS LVYSFLDNLM
SYLETIKNDG PIDTDKKYYL WLKEVFKNYS FDINLTQEID SMCGINEVVL WFGKALNILN
TSNSFVEEYQ DSGAISLISK KDNLREPNIE IDDISDSLLG LSFKDLNNKL YEIYSKNIVY
FKKIYFSFLD QWWTEYYSQY FELICMAKQS ILAQESLVKQ IVQNKFTDLS KASIPPDTLK
LIRETTEKTF IDLSNESQIS MNRVDNFLNK ASICVFVEDI YPKFISYMEK YINNINIKTR
EFIQRCTNIN DNEKSILINS YTFKTIDFKF LDIQSIKNFF NSQVEQVMKE ILSPYQLLLF
ASKGPNSNII EDISGKNTLI QYTESIELVY GVNGESLYLK SPNETIKFSN KFFTNGLTNN
FTICFWLRFT GKNDDKTRLI GNKVNNCGWE IYFEDNGLVF EIIDSNGNQE SVYLSNIIND
NWYYISISVD RLKDQLLIFI NDKNVANVSI DQILSIYSTN IISLVNKNNS IYVEELSVLD
NPITSEEVIR NYFSYLDNSY IRDSSKSLLE YNKNYQLYNY VFPETSLYEV NDNNKSYLSL
KNTDGINISS VKFKLINIDE SKVYVQKWDE CIICVLDGTE KYLDISPENN RIQLVSSKDN
AKKITVNTDL FRPDCITFSY NDKYFSLSLR DGDYNWMICN DNNKVPKGAH LWILES

Фиг. 5D

NTNHA D: Clostridium botulinum D (BAA75083.1) (SEQ ID NO: 26)

```
   1 mdinddlnin spvdnknvvi vrarktntff kafkvapniw vaperyygep ldiaeeykld
  61 ggiydsnfls qdserenflq aiiillkrin ntisgkqlls listaipfpy gyigggyssp
 121 niftfgktpk snkklnslvt stipfpfggy retnyiesqn nknfyasniv ifgpgsnive
 181 nnviyykknd aengmgtmae ivfqplltyk ynkfyidpam eltkcliksl yflygikpsd
 241 nlvvpyrlrt eldnkqfsql niidllisgg vdlefintnp ywftnsyfpn sikmfekykn
 301 iykteiegnn aigndiklrl kqkfqinvqd iwnlnlnyfc qsfnsiipdr fsnalkhfyr
 361 kqyytmdytd nyningfvng qintklplsn kntniiskpe kvvnlvnenn islmksniyg
 421 dglkgstedf ystykipyne eyeyrfndsd nfplnnisie evdsipeiid inpykdnsdn
 481 lvftqitsmt eevtthtals inylqaqitn nenftlssdf skvvsskdks lvysfldnlm
 541 syletikndg pidtdkkyyl wlkevfknys fdinltqeid smcginevvl wfgkalniln
 601 tsnsfveeyq dsgaislisk kdnlrepnie iddisdsllg lsfkdlnnkl yeiysknivy
 661 fkkiyfsfld qwwteyysqy felicmakqs ilaqeslvkq ivqnkftdls kasippdtlk
 721 lirettektf idlsnesqis mnrvdnflnk asicvfvedi ypkfisymek yinniniktr
 781 efiqrctnin dneksilins ytfktidfkf ldiqsiknff nsqveqvmke ilspyqlllf
 841 askgpnsnii edisgkntli qytesielvy gvngeslylk spnetikfsn kfftngltnn
 901 fticfwlrft gknddktrli gnkvnncgwe iyfednglvf eiidsngnqe svylsniind
 961 nwyyisisvd rlkdqllifi ndknvanvsi dqilsiystn iislvnknns iyveelsvld
1021 npitseevir nyfsyldnsy irdsskslle ynknyqlyny vfpetslyev ndnnksylsl
1081 kntdginiss vkfklinide skgyvqkwde ciicvldgte kyldispenn riqlvsskdn
1141 akkitvntdl frpdcitfsy ndkyfslslr dgdynwmicn dnnkvpkgah lwiles
```

Фиг. 5E

NTNHA E: Clostridium botulinum тип E (WP_003409842) вариант (SEQ ID NO: 27)

```
   1 mkingnlnid spvdnknvai vrsrksdvff kafqvapniw iaperyyges lkinedqksd
  61 ggiydsnfls tnnekdeflq atikllqrin nnvvgaklls listaipfpy enntedyrqt
 121 nylssknneh yytanlvifg pgsniiknnv iyykkeyaen gmgtmleiwf qpflthkyde
 181 fyvdpaleli kcliklyyyl ygikpndnln ipyrlrnefn sleyseldmi dflisggidy
 241 kllntnpywf idkyfidtsk nfekykndye ikiknnnyia nsiklyleqk fkinvkdiwe
 301 lnlsyfskef qimmperynn alnhyyrkey yvidyfknyn ingfkngqik tklplskynk
 361 eiinkpeliv nlinqnntvl mksniygdgl kgtvdnfysn yiipynlnye hsinysyldn
 421 vnieeiekip pindediypy rknadtfipv ynitkakein tttplpvnyl qaqmidsndi
 481 nlssdflkvi sskgslvysf lnntmdylef ikydkpidtd kkyykwlkai frnysldite
 541 tqeisnqfgd tkiipwigra lnilntnnsf veefknlgpi slinkkenit ipkikideip
 601 ssmlnfsfkd lsenlfniyc knnfylkkiy ynfldqwwtq yysqyfdlic masksvlaqe
 661 klikkliqkq lrylmensni sstnlilinl tttntlrdis nqsqiainni dkffnnaamc
 721 vfenniypkf tsfmeqcikn inkstkefil kctninetek shlimqnsfs nldfdfldiq
 781 nmkklfnsyt ellikeqtsp yelslyafqe qdnnvigdts gkntlveypk diglvyginn
 841 naihltganq nikftndyfe ngltnnfsiy fwlrnlnqnt ikskligske dncgweiyfe
 901 nnglvfniid sngnekniyl snisnkswhy ivisinrlkd qllifidnil vanedikeil
 961 niyssdiisl lsdnnnvyie glsvlnktin sneiltdyfs dlnnsyirnf deeilqynrt
1021 yelfnyvfpe iainkieqnn niylsnnnen slnfkplkfk llntnpnkqy vqkwdevifs
1081 vldgtekyld isidnnriql vdnknnaktf iinndifisn cltltynnvn vylsiknqdy
1141 nwvicdlnhd ipkksylwil kni
```

Фиг. 5F

NTNHA F: Clostridium botulinum тип F (YP_001390122.1) (SEQ ID NO: 28)

```
   1 M K I N D D L N I N S P V D N K N V V I V R A R K T N I F F
  31 K A F Q V A P N I W V A P E R Y Y G E P L N I S D Q E K S D
  61 G G I Y D E N F L K E N S E K E E F L Q A I I L L L K R I N
  91 N N I I G Q K L L S L M C T S I P F L H E Y K Q G D Y R Q S
 121 N Y L G S K N S E Y L Y S A N I V I F G P G S N I V K N N T
 151 I Y Y K K N F A E N G M G T M A E I L F Q P F L T Y K Y N Q
 181 F Y A D P A L E L I K C L I K A I Y F L Y G I K P N D N L N
 211 I P Y R L R N E F S N V E Y S E L N I I D F L I S G G I D Y
 241 K F I N T N P Y W F I D N Y F I D V P K V F E K H K N D Y E
 271 I N I K N N S E I G T S I K L Y L E Q K F K T N V Q D I W E
 301 L N L S Y F S K E F Q I M M P E K H N N A L K H Y Y R K E Y
 331 Y K I N Y S K Q Y D I N G F V N G Q I A T K L L L S E K N Q
 361 Y I I N K P Q L I I N L I N K S N N S L L M K S N I Y G D G
 391 L N G T T D N F Y R N Y K I P D N I A Y Q Y H P N N T Y L D
 421 N V N I E E I N N I P Q I T D A D I Y P Y T N N C D T F I P
 451 I Y N I T Q S R E I N T T V P Y S I N Y L Q S Q I M N S D D
 481 I T L S S D F W E V V C S N D K S L V Y S Y L D N V I N Y L
 511 D S I K N N T P I N T D K K Y Y L W L K E I F R N Y S F D I
 541 T A T E E I T T E C G I N K I V S W F G K A F N I L N T D N
 571 S F K I E F Q N S G A I A L I N K K D N I I I P K I E I D E
 601 M P N S M L N L S F E D L N E Q L Y S I Y S K N I T Y F K K
 631 I Y Y N F L D Q W W T E Y Y S Q Y F D L I C M A K K S I L A
 661 Q E N L I K K I I Q K K I S Y L I G A S N I P D D I L A V M
 691 R L T T T N T L R D I S V E S Q I A M N N L N N F L N K A A
 721 M C V F Q S N I Y P K F I S F M E Q C I K H I N K S T K E F
 751 I Q K C T N I N E T E K L Q L I M Q N S F S N L D F D F L D
 781 I Q N M K N L F N S Y T E L L I K E Q T S P Y E L S L Y A F
 811 E E Q D N N V I G D A S G K N T L V E Y P K G I E L V Y G I
 841 N N S A L Y L N G S N Q S I I F T N D Y F E N G L T N S F S
 871 I Y F W L R N L G Q D T I K S K L I G S K E Y N C G W E I Y
 901 F Q E I G H V F N M I D S N G N E K N I Y L S D V S N N S W
 931 H Y I T I S V D R L K E Q L L I F I D D N L V V N E S I K D
 961 I L N I Y S S N I I S L L S D N K A S Y I E G L T I L N K P
 991 T T G E E V L R N Y F K N L N N S Y V R D S N D E R L E Y N
1021 K T Y Q L Y D Y V F P D N P I C E V K Q D N N I Y L T I N N
1051 I N N L N M K P C K F K L L S I N S N K Q Y V Q K W D E V I
1081 I S V L Y D T E K Y V C I S N E N N R V K I I D N K I M Q V
1111 K F I I S N D I F I S N C L T H A H N N K Y I C L S M K D E
1141 N Y N W M I C N N E S N I P K K A Y L W I L K E V
```

Фиг. 5G

NTNHA G: clostridium botulinum (Clostridium argentinense) тип G ATCC 27322 (CAA61228.1) (SEQ ID NO: 29)

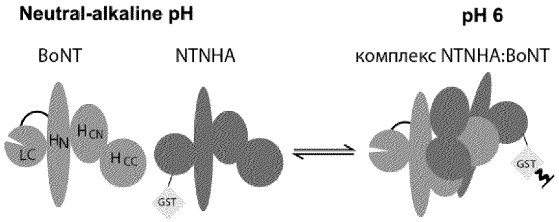
```
   1 mkinsnltin spidnknvvi vraretskff kafkvapniw vaperyyges lsieeskkvn
  61 ggvydsnfls qnnekdkflq aiitllkrin sniageklls lvstaipfpy gyigggyycp
 121 nivtfgstik ynkkinslis ttipfpyggy retnylsskd tenfyaaniv ifgpganive
 181 nntvfykked aengmgtmae icfqpfltyk ydqfyvdpal elmecliksl yflygikpnn
 241 nltvpyrlrn elsniefsql sivdllisgg idskfintdp ywfidsyfsn akttfeehks
 301 iyeteikgnn aigndiklrl kqkfqttvhd iwqlnldyfs kefqimmpyr fnnalkyyyr
 361 keyykidype kysiagfvdg qlntqlslsd knqyiinkpe livnlisenn islmrsniyg
 421 dglkyttdnf ystykipynr ayeyhfnnss tsslenvnve eisnipeiid inpyrensdi
 481 fspveniiet kevntktpwp inylqaqipn neeftlssdf sqvvsyktqs lvysflsnvi
 541 syldsvkdtn pidtdekyyl wlreifrnys fditaieein tscginkvvs wfgkalniln
 601 tsnsfvkefk nlgpislink kenlsmpiie vneipndmlg lslkdlnekl fniylknily
 661 fkkvyfsfld qwwteyysqy fglicmakqs ilaqenlikk ivqkklsdls kqsnisnekl
 721 nlmnlttekt fidlsnqsqi amnninnfln kaaicvfesn iypkfisfme qyinninikt
 781 tafirkctni tekeklqlin qntfnnldfe ffdiqtienl ltsetnliik ektspydlll
 841 fslqeadrkv ikdisgkdtl vqysdtidls ygvngdalyl kepnqsvnfs nnifengltn
 901 sfsicfwlrn lgqdnlssnl ignivnncgw qiyfennglv fsmvdcngne kniylsdvls
 961 kywyyisvsv drlrnkllif indklivnes ieqilniyss niislvnenn picieelsil
1021 nkaltseevl nsyftnlnns yirdsygarl eynknyelyn yvfpenslye viennnmyls
1081 iknikntnil gakfklintd eskqyvqkwd eviicvlgdt ekyadiqagn nriqlvnskd
1141 narkiivnnn ifrpncvlfs ynnkylslsl rnrnynwmic ndnsfipkha hlwilkki
```

Фиг. 5H

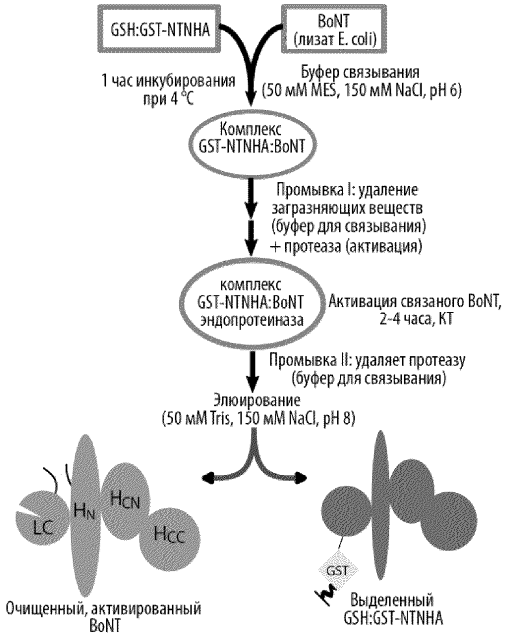
NTNHA E: Clostridium botulinum тип E (WP_012450714.1) (SEQ ID NO: 30)

```
   1 mkingnlnid spvdnknvai vrsrksdvff kafqvapniw ivperyyges lkinedqkfd
  61 ggiydsnfls tnnekddflq atikllqrin nnvvgaklls listaipfpy ennтedyrqt
 121 nylssknneh yytanlvifg pgsniiknnv iyykkeyaes gmgtmleiwf qpflthkyde
 181 fyvdpaleli kcliklyyl ygikpndnln ipyrlrnefn sleyseldmi dflisggidy
 241 kllntnpywf idkyfidtsk nfekykndye ikiknnnyia nsiklyleqk fkinvkdiwe
 301 lnlsyfskef qimmperynn alnhyyrkey yvidyfknyn ingfkngqik tklplskynk
 361 eiinkpeliv nlinqnntvl mksniygdgl kgtvdnfysn yiipynlnye hsinysyldn
 421 vnieeiekip pindediypy rknadtfipv ynitkakein tttplpvnyl qaqmidsndi
 481 nlssdflkvi sskgslvysf lnntmdylef ikydkpidtd kkyykwlkai frnysldite
 541 tqeisnqfgd tkiipwigra lnilntnnsf veefknlgpi slinkkenit ipkikideip
 601 ssmlnfsfkd lsenlfniyc knnfylkkiy ynfldqwwtq yysqyfdlic masksvlaqe
 661 klikkliqkq lrylmensni sstnlilinl tttntlrdis nqsqiainni dkffnnaamc
 721 vfenniypkf tsfmeqcikn inkstkefil kctninetek shlimqnsfs nldfdfldiq
 781 nmknlfnsyt ellikeqtsp yelslyafqe qdnnvigdts gkntlveypk diglvyginn
 841 naihltganq nikftndyfe ngltnnfsiy fwlrnlkqnt ikskligske dncgweiyfe
 901 ndglvfniid sngnekniyl snisnnswhy ivisinrlkd qllifidnil vanedikeil
 961 niyssdiisl lsdnnnvyie glsvlnktin sneiltdyfs dlnnsyirnf deeilqynrt
1021 yelfnyvfpe iainkieqnn niylsinnen nlnfkplkfk llntnpnkqy vqkwdevifs
1081 vldgtekyld isttnnriql vdnknnaqif iinndifisn cltltynnvn vylsiknqdy
1141 nwvicdlnhd ipkksylwil kni
```

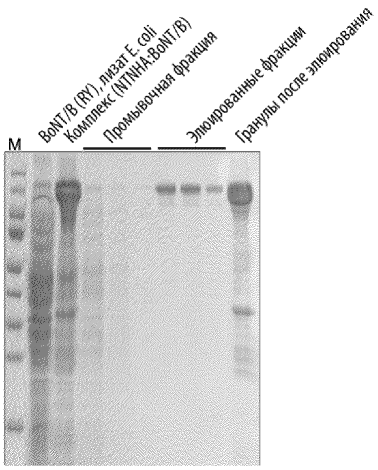
Фиг. 5I



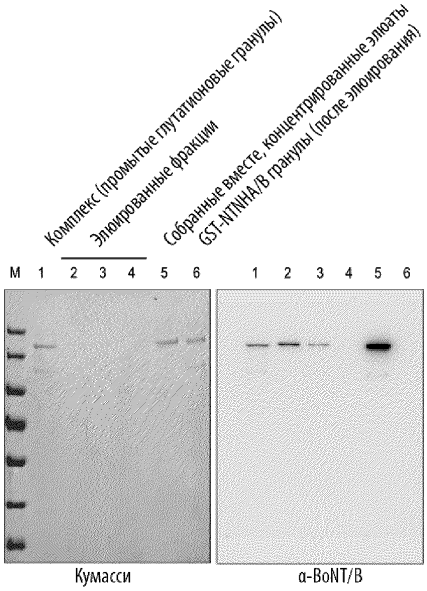
Фиг. 6A



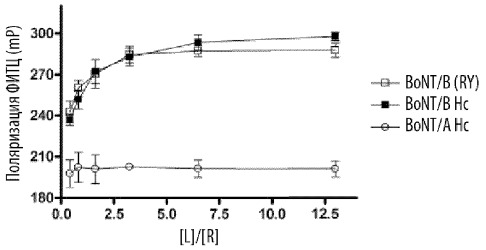
Фиг. 6B



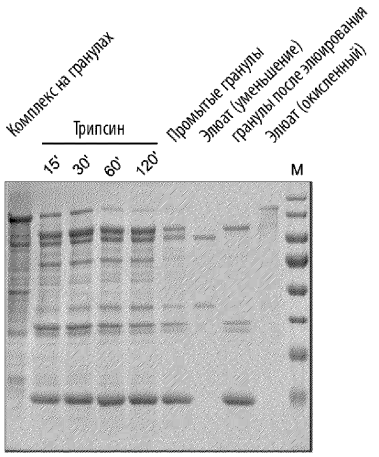
Фиг. 6C



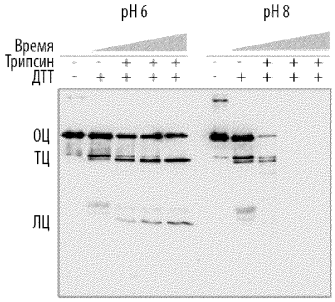
Фиг. 7A



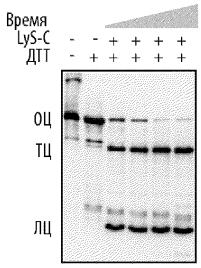
Фиг. 7B



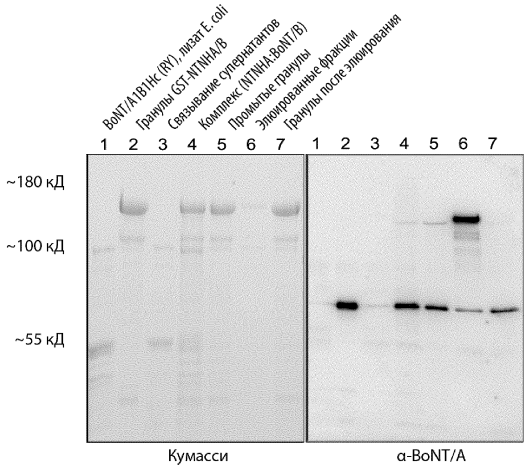
Фиг. 8A



Фиг. 8B



Фиг. 8C



Фиг. 9