

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202291497** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2022.12.30**

(22) Дата подачи заявки  
**2015.04.29**

(51) Int. Cl. *A61K 38/16* (2006.01)  
*A61P 21/02* (2006.01)  
*A61K 9/00* (2006.01)  
*C12R 1/145* (2006.01)  
*C12N 9/52* (2006.01)

---

(54) **ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ НЕЙРОТОКСИНОВ CLOSTRIDIUM  
BOTULINUM**

---

(31) **1407525.3**

(32) **2014.04.29**

(33) **GB**

(62) **201692188; 2015.04.29**

(71) Заявитель:  
**ИПСЕН БАЙОИННОВЕЙШН  
ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Изобретение представляет способы получения растворимого бицепного белка BoNT/A.

**202291497**  
**A1**

**202291497**

**A1**

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ НЕЙРОТОКСИНОВ CLOSTRIDIUM BOTULINUM**

## Описание

**Область Изобретения**

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

**Уровень Техники Изобретения**

Ботулиновый нейротоксин (BoNT) продуцируется *C. botulinum* в форме большого белкового комплекса, состоящего из самого BoNT, образующего комплекс с рядом акцессорных белков. В настоящее время имеется по меньшей мере семь различных классов ботулинового нейротоксина, а именно: ботулиновый нейротоксин серотипов А, В, С<sub>1</sub>, D, Е, F и G, которые все имеют сходную структуру и механизмы действия. Недавно появились сообщения о возможном девятом серотипе, H, но последовательность еще не опубликована. Различные серотипы BoNT можно различать, основываясь на инактивации специфической нейтрализующей антисывороткой, причем подобная классификация по серотипу коррелирует с процентом идентичности последовательности на уровне аминокислот. Белки BoNT данного серотипа дополнительно подразделяются на различные подтипы на основании процента идентичности аминокислотной последовательности.

BoNT являются наиболее сильнодействующими известными токсинами, со значениями средней летальной дозы (LD<sub>50</sub>) для мышей, варьирующими от 0,5 до 5 нг/кг в зависимости от серотипа. BoNT всасываются в желудочно-кишечном тракте и, после поступления в общий кровоток, связываются с пресинаптической мембраной холинергических нервных окончаний и препятствуют высвобождению нейротрансмиттера ацетилхолина. BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F и BoNT/G расщепляют синаптобrevин/везикуло-ассоциированный мембранный белок (VAMP); BoNT/C, BoNT/A и BoNT/E расщепляют синаптосомально-ассоциированный белок 25 кДа (SNAP-25); а BoNT/C расщепляет синтаксин.

В природе клостридиальные нейротоксины синтезируются в виде одноцепочечного полипептида, который посттрансляционно

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

Нецитотоксические протеазы действуют посредством протеолитически расщепляющих внутриклеточных транспортных белков, известных как SNARE белки (напр., SNAP-25, VAMP или Синтаксин) -см. Gerald K (2002) «Cell и Молекулярную Biology» (4th edition) *John Wiley & Sons, Inc.* Сокращение SNARE происходит от термина Растворимый NSF Рецептор Связывания, где NSF обозначает чувствительный к N-этилмалеимиду фактор. SNARE белки являются неотъемлемой частью внутриклеточного слияния везикул и, таким образом, секреции молекул посредством транспорта везикул из клетки. Протеазная функция представляет собой цинк-зависимую эндопептидазную активность и демонстрирует высокую субстратную специфичность для SNARE белков. Соответственно, после доставке в нужную клетку-мишень нецитотоксическая протеаза сразу является способной ингибировать клеточную секрецию из клетки-мишени. Протеазы L-

цепей клостридиальных нейротоксинов представляют собой нецитотоксические протеазы, которые расщепляют SNARE белки.

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

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

Очистка CNT от ферментационного раствора (будь то с применением *C. botulinum* или *E. coli*) является особой задачей, поскольку нейротоксины содержатся в нем в виде смеси необработанных, частично обработанных и полностью обработанных полипептидов, которые все имеют очень похожие биохимические и физические свойства. Обычно получают частично обработанные нейротоксины, если эндопротеолитическая активность гидролизует пептидную связь между легкой цепью и петлей, тогда как пептидная связь между петлей и N-концом тяжелой цепи еще не затронута. Более того, частично обработанный нейротоксин также можно получить, если эндопротеолитическая активность высвободила петлевой пептид из тяжелой цепи, тогда как пептидная связь между петлевым пептидом и C-концом легкой цепи

еще не была гидролизирована. В зависимости от условий ферментации и типа нейротоксина, полностью обработанный полипептид, который лишен петлевого пептида, может быть значительно загрязнен содержанием от 5% до 90% частично обработанного или необработанного полипептида. В некоторых случаях нейротоксин в основном является необработанным и перед терапевтическим применением нуждается в обработке эндопептидазой с целью стать биологически активным.

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

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

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

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

### **Сущность изобретения**

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

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

дополнительный сайт в пределах одноцепочечной последовательности VoNT/A. Данное дополнительное расщепление уменьшает активность продуцируемого активного бицепного белка VoNT/A.

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

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

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

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

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

- a) предоставление растворимого одноцепочечного белка VoNT/A;
- b) приведение в контакт указанного белка VoNT/A с

эндопротеиназой Lys-C (Lys-C) в растворе; и

с) отделение растворимого белка VoNT/A от Lys-C посредством приведения в контакт раствора, содержащего растворимый белок VoNT/A и Lys-C, с гидрофобной поверхностью, при этом растворимый белок VoNT/A предпочтительно связывается с гидрофобной поверхностью.

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

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

Изобретение также предоставляет активный бицепной белок VoNT/A, получаемый посредством способа изобретения.

Изобретение дополнительно предоставляет композицию, содержащую активный бицепной белок VoNT/A изобретения; при этом указанная композиция по существу не содержит эндопротеиназу

Lys-C. Предпочтительно указанная композиция содержит менее 400 пг эндопротеиназы Lys-C (Lys-C) на 100 нг белка BoNT/A, или менее 300 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 200 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 100 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A, или менее 50 пг Lys-C на 100 нг белка BoNT/A. Данные композиции являются подходящими для применения в терапевтических и косметических видах лечения.

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

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

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

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

#### **Подробное описание изобретения**

Ботулиновый Токсин Серотипа А (BoNT/A)

Термин «BoNT» обозначает ботулиновый нейротоксин и относится к нейротоксину, получаемому из *C. Botulinum*, такому как BoNT серотипа А, В, С1, D, Е, F или G. Также термином «CNT» и «BoNT» охватываются рекомбинантный и модифицированный нейротоксин, содержащий одну или более модификаций, включая химическую модификацию или генетическую модификацию. Термин «генетическая модификация» обозначает делецию, замещение или добавление одного или более нуклеиновокислотных остатков, приводящих к делеции, замещению или добавлению одного или более аминокислотных оснований, или делеции, замещению или добавлению указанного одной или более аминокислотных остатков.

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

Таблица 1

ТОКСИН	ПОДВЕРГАЕМАЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ (АКТИВАЦИИ) ПЕТЛЯ	LC	H <sub>N</sub>	H <sub>CN</sub>	H <sub>CC</sub>
BoNT/A1 (P10845)	SEQ ID NO: 2	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A2 (A2I2R5)	SEQ ID NO: 3	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A2 (A2I2R5)	SEQ ID NO: 4	M1-K434	A445-N868	I869-S1088	N1089-L1292
BoNT/A3 (B1L2G5)	SEQ ID NO: 3	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296

BoNT/A3 (B1L2G5)	SEQ ID NO: 4	M1-K434	A445-N868	I869-S1088	N1089-L1292
BoNT/A3 (Q3LRX9)	SEQ ID NO: 5	M1-K434	A445-N868	I869-S1088	N1089-L1292
BoNT/A4 (Q3LRX8)	SEQ ID NO: 6	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A5 (C7BEA8)	SEQ ID NO: 7	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A6 (C9WWY7)	SEQ ID NO: 2	M1-K438	A449-N872	I873-S1093	N1094-L1297
BoNT/A7 (K4LN57)	SEQ ID NO: 13	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A8 (A0A0A7PDB7)	SEQ ID NO: 14	M1-K438	A449-N872	I873-S1093	N1094-Q1297

Ссылаясь на Таблицу 1, аминокислотные позиции (остатки), указанные для LC, H<sub>N</sub>, H<sub>CN</sub> и H<sub>CC</sub> областей, соответствуют аминокислотным позициям для указанных областей в последовательности полноразмерного белка BoNT/A. Учетные номера UniProt, приведенные в Таблице 1, представляют собой примеры подсеротипов различных BoNT/A. Таким образом, в одном варианте осуществления, аминокислотные позиции LC, H<sub>N</sub>, H<sub>CN</sub> и H<sub>CC</sub> областей, указанные в Таблице 1, соответствуют аминокислотным позициям в последовательностях полноразмерного белка BoNT/A, идентифицируемым посредством Учетного номера.

С применением способов представленного изобретения теперь является возможным получение бицепсных композиций BoNT/A со значительно меньшим загрязнением необработанным или частично обработанным BoNT/A, поскольку данные загрязнители эффективно перерабатываются в бицепную BoNT/A. Способы представленного изобретения также делают возможным эффективное удаление фермента Lys-C, применяемого для переработки одноцепочечного белка BoNT/A в активную бицепь. В одном аспекте бицепь BoNT/A представляет собой природный бицепной нейротоксин, при этом С-конец легкой цепи и N-конец тяжелой цепи являются идентичными

соответствующему полностью переработанному бицепному VoNT/A, выделенному из клостридий дикого типа.

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

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

Одноцепочечный белок VoNT/A может содержать полипептидную последовательность, как показано в GenBank NO: CBZ04958,1, YP\_002805603,1, ZP\_02994746,1, YP\_001788403,1, YP\_001782718,1, ZP\_02616437,1, ZP\_02614241,1, YP\_001392361,1, YP\_001255575,1. Одноцепочечный белок VoNT/A может содержать полипептидную последовательность, как показано в:

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

Подсеротип A2: UniParc Дополнение № UPI0000EF84BD (UniProt Дополнение № A2I2R5, Версия 28), UniParc Дополнение № UPI0001C0B376 (UniProt Дополнение № D2KCK3, Версия 15), UniParc Дополнение № UPI0001C32E84 (UniProt Дополнение № D3IV23, Версия 10), UniParc Дополнение № UPI0001F3B30D (UniProt Дополнение № E5F1I1, Версия 11), UniParc Дополнение № UPI000016EA88 (UniProt Дополнение № Q45894, Версия 116 или UniProt Дополнение №

Q58GH1, Версия 51), UniParc Дополнение № UPI000067C53E (UniProt Дополнение № Q2PPK6, Версия 33), UniParc Дополнение № UPI000290VEB1 (UniProt Дополнение № K4GGE0, Версия 6);

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

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

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

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

Подсеротип A7: UniParc Дополнение № UPI000290B995 (UniProt Дополнение № K4LN57).

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

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

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

или 14. Указанные последовательности представляют аминокислотные последовательности известных субстратов одноцепочечного белка VoNT/A представленного изобретения.

Одноцепочечные белки VoNT/A представляют собой расщепленный С-конец до основного аминокислотного остатка, содержащегося в последовательности, сравнить колонки LC и H<sub>N</sub> Таблицы 1. В предпочтительном аспекте указанный одноцепочечный белок VoNT/A содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: от 2 до 7 и 13-14 (напр., серотип VoNT/A1, SEQ ID NO: 2).

Одноцепочечный белок VoNT/A может содержать производное любого одного из SEQ ID NO: от 2 до 7 или 13 или 14, или SEQ ID NO: 1, или одну из полипептидных последовательностей, соответствующих учетным номерам, идентифицированным в данном документе, при этом указанное производное имеет одну или более точечную мутацию и/или один или более дополнительных аминокислотных остатков. В другом аспекте указанное производное имеет вплоть до 1, вплоть до 2, вплоть до 3, вплоть до 4, вплоть до 5, вплоть до 6, вплоть до 7, вплоть до 8, вплоть до 9, вплоть до 10, вплоть до 15 точечных мутаций. За счет применения анализа активности для определения активности протеазы, как описано в данном документе, квалифицированный специалист может определить, обработано ли данное производное посредством Lys-C.

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

Указанный одноцепочечный белок VoNT/A может содержать (a)

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

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

можно вычислить по меньшей мере по 50 аа остаткам, по меньшей мере 100 аа, по меньшей мере 150 аа или по меньшей мере 250 аа остаткам.

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

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

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

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

В другом аспекте биологическую активность указанного BoNT/A одноцепочечного белка можно модулировать посредством протеолитического расщепления. Квалифицированному специалисту хорошо известно, что функцию многих полипептидов можно модулировать посредством протеолитической обработки. «Модулированная», как используется в данном документе, обозначает повышенную или пониженную, активированную или инактивированную. Например, биологическую активность многих клостридиальных нейротоксинов повышают или запускают посредством протеолитической переработки одноцепочечного

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

Биологическая активность клостридиального нейротоксина можно измерить посредством различных анализов, которые все известны квалифицированному специалисту в данной области. Данные анализы делают возможным определение одного или более видов активности, указанных выше. Например, анализ мышью LD<sub>50</sub> или анализ *ex vivo* купола диафрагмы диафрагмального нерва мышей (MPN), как описано Pearce *et al.*, 1994 (Pearce LB, Borodic GE, First ER, MacCallum RD (1994), *Toxicologicol Appl Pharmacol* 128: 69-77) и Habermann *et al.*, 1980 (Habermann E, Dreyer F, Bigalke H. (1980), *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 311:33-40) позволяет определить токсическое действие препарата данного нейротоксина на живой организм или выделенный нервномышечный препарат. Для установления токсического действия в анализе LD<sub>50</sub> нейротоксин должен быть биологически активным в каждом из указанных трех действий, упомянутых выше. Более того, доступными являются различные другие анализы, позволяющие,

напр., определить, является ли нейротоксин или легкая цепь нейротоксина протеолитически активным. Данные анализы, напр., основываются на приведении в контакт VoNT/A со SNAP-25. В качестве альтернативы, можно использовать пептид, представляющий сайт расщепления SNAP-25, при этом пептид может быть меченным для легкого определения. В предпочтительном аспекте биологическую активность определяют посредством применения анализа MPN, описанного выше в данном документе.

Молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный одноцепочечный белок VoNT/A, можно использовать в соответствии с представленным изобретением. Указанная молекула нуклеиновой кислоты может необязательно включать регулирующие элементы. Термин «регулирующие элементы», как используется в данном документе, относится к регулирующим элементам экспрессии генов, включая транскрипцию и трансляцию, и включает такие элементы, как ТАТА-бокс, промотор, энхансер, сайт связывания рибосом, последовательность Шайна-Дальгарно, IRES-участок, сигнал полиаденилирования, концевую кэпинг-структуру и тому подобное. Указанный регулирующий элемент может включать в себя один или более гетерологичных регулирующих элементов или один или более гомологичных регулирующих элементов. *«Гомологичный регулирующий элемент»* представляет собой регулирующий элемент клетки дикого типа, из которой происходит молекула нуклеиновой кислоты, которая задействована в регуляции экспрессии генов молекулы нуклеиновой кислоты или полипептида в указанной клетке дикого типа. *«Гетерологический регулирующий элемент»* представляет собой регулирующий элемент, который не задействован в регуляции экспрессии генов молекулы нуклеиновой кислоты или полипептида в указанной клетке дикого типа. Также можно использовать регулирующие элементы для индуцируемой экспрессии, такие как индуцируемые промоторы.

Молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой, например, гетерогенную ядерную РНК, матричную РНК, РНК, ДНК, пептидную нуклеиновую кислоту, запертую нуклеиновую кислоту и/или модифицированные молекулы нуклеиновых кислот. Молекула нуклеиновой кислоты может быть кольцевой, линейной,

интегрированной в геном или эписомной. Также включены конкатемеры, кодирующие белки слияния, содержащие три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять полипептидов. Более того, молекула нуклеиновой кислоты может содержать последовательности, кодирующие сигнальные последовательности для внутриклеточного транспорта, такие как сигналы для транспорта во внутриклеточное пространство или для транспорта через клеточную мембрану.

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

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

Молекула нуклеиновой кислоты или экспрессионный вектор, кодирующие одноцепочечный белок VoNT/A, может содержаться в клетке-хозяине, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты или вектор представленного изобретения. Термин «клетка-хозяин», как используется в данном документе, охватывает прокариотические

и/или эукариотические клетки, пригодные для транслирования указанной молекулы нуклеиновой кислоты или указанного вектора и в частности одноцепочечного белка ВоNT/A. Указанная клетка-хозяин может являться клеткой-хозяином, не экспрессирующей одноцепочечный белок ВоNT/A или его гомолог. Термин «гомолог», как используется в данном документе, относится к полипептиду, содержащему полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичность последовательности с последовательностью ВоNT/A, например последовательностью ВоNT/A SEQ ID NO: 1. Однако, также включены клетки-хозяева, такие как клетки дикого типа, экспрессирующие одноцепочечный белок ВоNT/A или его гомолог. Например, клетка-хозяин может быть выбрана из *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. baratii* и *C. tetani*, например, *C. botulinum* серотипа А, В или F. Клетка-хозяин может представлять собой Hall штамм (ATCC 3502) *C. botulinum*; ВоNT/A, продуцирующий штамм ATCC 19397, также известный как NCTC 4587 и NCTC 7272 *C. botulinum*; ВоNT/A, продуцирующий штамм NCTC 2916 *C. botulinum*; ВоNT/A2, продуцирующий штамм Kyoto-F или Mauritius/NCTC 9837 *C. botulinum*; ВоNT/A3, продуцирующий штамм A254 Loch Maree/NCTC 2012 *C. botulinum*; ВоNT/A4 и В, продуцирующие штамм CDC657 *C. botulinum*; ВоNT/A5 и В3', продуцирующие штамм H04402 065 *C. botulinum*; ВоNT/B1, продуцирующий штамм Okra/NCTC 7273 *C. botulinum*; ВоNT/В и F, продуцирующие штамм CDC4013/NCTC 12265 *C. botulinum*; или ВоNT/F1, продуцирующий штамм Langeland/NCTC 10281 *C. botulinum*. Указанной клеткой-хозяином могут быть *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium acetobutylicum*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoidis*, *B. thermoproteolyticus*, *B. anthracis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. coli* или дрожжевая клетка. Предпочтительно клеткой-хозяином является клетка-хозяин *E. coli*, в частности клетка *E. coli* BL21 (DE3) или BLR(DE3).

В одном аспекте одноцепочечный белок ВоNT/A модифицирован внутри клетки-хозяина (т.е. гликозилирован, фосфорилирован,

обработан протеазами, и т.д.). Модификация также включает добавление небелковоподобных кофакторов, включая ионы металлов. Клетка-хозяин может включать в себя индуктор экспрессии одноцепочечного белка VoNT/A. Данный индуктор экспрессии может представлять собой молекулу нуклеиновой кислоты или полипептида или химический структурный элемент, включая небольшой химический структурный элемент, обладающий эффектом повышения количества одноцепочечного белка VoNT/A в культурах клеток-хозяев или их лизатах. Индуктор экспрессии может, напр., увеличивать транскрипцию или трансляцию молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей одноцепочечный белок VoNT/A. Индуктор может, например, экспрессироваться рекомбинантными средствами, известными квалифицированному специалисту в данной области. В качестве альтернативы, индуктор может быть выделен из клетки, напр., клостридиальной клетки.

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

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

любую пригодную клетку-хозяина, как описано в данном документе.

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

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

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

#### **Эндопротеиназа Lys-C**

Как описано в данном документе, одноцепочечный белок VoNT/A расщепляют с образованием активной бицепной формы белка VoNT/A с применением эндопротеиназы Lys-C (Lys-C). Термин «Lys-C» относится к 33 кДа сериновой эндопротеиназе Lys-C из *Lysobacter enzymogenes* (лизил-эндопептидаза, LeK, Genbank доп.

Q7M135), которая специфично расщепляет пептидные связи на С-конце до лизина или его гомолога, имеющего по меньшей мере 50% идентичность последовательности. В одном варианте осуществления его гомолог, имеющий по меньшей мере 50% идентичность последовательности к Lys-C, сохраняет функциональность (т.е. Протеолитическую активность) Lys-C.

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

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

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

Термин «*протеолитически неактивный полипептид*», как используется в данном документе, относится к каталитической функции полипептида и означает, что полипептид неспособен

гидролизировать пептидную связь.

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

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

Тестовым субстратом может быть растворимый фрагмент нейротоксина, называемый LN<sub>N</sub>, содержащий полипептид легкой цепи, область пептида с подвергаемой воздействию петель и N-концевую половину полипептида тяжелой цепи, транслокационный домен H<sub>N</sub>. Тестовый субстрат может представлять собой или

содержать пептид, выбранный из любой одной из SEQ ID NO: от 2 до 8 (см. Таблицу 1). Тестовым субстратом может быть химерный нейротоксин, содержащий аминокислотные остатки, полученные от двух или более серотипов.

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

Анализ определения протеолитической активности может включать разделение субстрата (напр., одноцепочечного белка VoNT/A) и продукта (продуктов) расщепления (напр., активной бицепи VoNT/A) посредством электрофореза или посредством колоночной хроматографии и, необязательно, спектрометрического анализа. Может быть удобно метить тестовым субстрат одной или более метками с целью более легкого определения уменьшения тестового субстрата и/или увеличения продукта (продуктов). Термин «метка», как используется в данном документе, обозначает определяемый маркер и включает, напр., радиоактивную метку,

антитело и/или флуоресцентную метку. Количество тестового субстрата и/или продукта расщепления можно определить, напр., посредством способов ауторадиографии или спектрометрии, включая способы, основанные на резонансном переносе энергии между по меньшей мере двумя метками. В качестве альтернативы, для обнаружения можно использовать иммунологические способы, такие как вестерн-блоттинг или ELISA.

В предпочтительном аспекте полипептид является протеолитически активным, если более чем 20%, предпочтительно более чем 95% тестового субстрата превращается в продукты расщепления, такие как легкая цепь и тяжелая цепь, за 120 мин при 37°C с применением буферного раствора, выбранного из 100 мМ Tris-HCl, pH 8,0, или PBS (50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 мМ NaCl, pH 7,4). Такие же условия применяются, если тестовый субстрат является не полноразмерным BoNT/A, но вместо этого, напр., фрагментом полноразмерного BoNT/A или производным BoNT/A. Очевидно, что продукты расщепления в данном случае будут отличаться. Однако квалифицированный специалист может количественно определить соответствующие продукты расщепления.

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

Образец можно брать с интервалами, чтобы отследить каталитическую активность с течением времени.

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

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

Термин «полипептид, который содержит полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 50% идентичность

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

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

Протеолитически активный полипептид Lys-C может иметь такое же количество аминокислот, как и последовательность эталонного полипептида, как показано в SEQ ID NO: 8. В качестве альтернативы, полипептид может иметь дополнительные

аминокислотные остатки или меньшее количество аминокислотных остатков. Например, протеолитически активный полипептид представленного изобретения может состоять или содержит процессинговый мутант SEQ ID NO: 8 или 9 или полипептид, имеющий по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 8 или 9. Процессинговому мутанту SEQ ID NO: 9, может, например, не хватать одного или более аминокислотных остатков на N-конце к позиции аминокислоты 249. Процессинговый мутант может представлять собой N- или C-концевой процессинговый мутант и/или внутренний процессинговый мутант, который является протеолитически активным. Процессинговому мутанту SEQ ID NO: 9 может не хватать позиций аминокислот с 1 до 248 SEQ ID NO: 9. В качестве альтернативы, процессинговый мутант SEQ ID NO: 9 может представлять собой C-концевой процессинговый мутант. Процессинговому мутанту может не хватать вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 50, 100, 150 или вплоть до 170 следующих друг за другом аминокислотных остатков. Протеолитически активный полипептид может иметь аминокислотную протяженность, составляющую по меньшей мере 200 аминокислотных (aa) остатков, по меньшей мере 250 aa остатков, по меньшей мере 300 aa остатков или по меньшей мере 333 aa остатка. В качестве альтернативы, протеолитически активный полипептид может иметь вплоть до 333 aa остатков, вплоть до 350 aa остатков, вплоть до 573 остатков, вплоть до 581 aa остатка, вплоть до 592 aa остатков, вплоть до 600 aa или вплоть до 617 aa остатков.

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

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

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

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

Термин «природные продукты расщепления» или «природные продукты», как используется в данном документе, относится к продуктам, которые являются идентичными по аминокислотной последовательности при сравнении с продуктами, происходящими из одного и того же субстрата в культурах клеток дикого типа, из

которых происходит субстрат. В предпочтительном варианте осуществления продукт расщепления представляет собой бицепной нейротоксин ботулинового нейротоксина или столбнячного нейротоксина. В более предпочтительном варианте осуществления бицепной нейротоксин представляет собой нейротоксин, выделенный из *C. botulinum* серотипа А, В, С1, D, Е, F или G. В другом аспекте указанный бицепной нейротоксин представляет собой природный бицепной нейротоксин ВоNT/A.

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

#### Способы Получения ВоNT

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

Способ изобретения можно использовать для получения протеолитически обработанного клостридиального нейротоксина (CNT) или ботулинового нейротоксина (ВоNT), конкретно протеолитически обработанного ВоNT/A, т.е. активной бицепи ВоNT/A, как описано в данном документе. С применением способа представленного изобретения теперь является возможным получить композиции активной бицепи ВоNT/A со значительно меньшим загрязнением необработанным или частично обработанным ВоNT/A, поскольку данные загрязнители эффективно перерабатываются в

бицепь VoNT/A. Способы представленного изобретения также делают возможным эффективное удаление фермента Lys-C, применяемого для переработки одноцепочечного белка VoNT/A в активную бицепь, т.е. Улучшенную очистку активной бицепи VoNT/A.

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

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

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

Для получения растворимого одноцепочечного белка VoNT/A можно использовать любую пригодную экспрессирующую систему. В соответствии с представленным изобретением экспрессирующая система может представлять собой экспрессирующую систему *in vivo* или *in vitro* (бесклеточную). Примеры пригодных

экспрессирующих систем *in vivo* и *in vitro* являются известными в данной области. Как определено в данном документе, экспрессирующая система может включать пригодную клетку-хозяина и/или пригодный экспрессионный вектор для применения в указанной клетке-хозяине. Например, пригодная экспрессирующая система может включать в себя бактериальную клетку-хозяина и/или экспрессионный вектор, пригодный для экспрессии растворимого одноцепочечного белка VoNT/A в указанной бактериальной клетке-хозяине.

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

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

Растворимый одноцепочечный белок VoNT/A может экспрессироваться на уровне (концентрации), составляющем по меньшей мере 5 мг/л (например, по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 25, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 или 500 мг/л, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 7 мг/мл, 8 мг/мл, 9 мг/мл, 10 мг/мл, 15 мг/мл, 20 мг/мл, 25 мг/мл, 50 мг/мл, 100 мг/мл или более). Как правило, уровень экспрессии одноцепочечного белка VoNT/A относится к уровню одноцепочечного VoNT/A в клеточной культуре. В одном варианте осуществления указанный уровень экспрессии

относится к необработанному гомогенату клетки-хозяина (напр., бактериальной клетки-хозяина), т.е. Необработанному гомогенату клеток-хозяев (напр., бактериальных клеток-хозяев), применяемых для экспрессии одноцепочечного белка VoNT/A. Таким образом, в одном варианте осуществления уровень экспрессии одноцепочечного белка VoNT/A в необработанном гомогенате клетки-хозяина, например, необработанном гомогенате бактериальной клетки-хозяина, составляет по меньшей мере 5 мг/л (как определено в данном документе).

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

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

Бактериальной клеткой-хозяином, применяемой для получения одноцепочечного белка VoNT/A или его производного, может быть *C. botulinum* или *E. coli*. Для ферментации можно использовать процесс, описанный DasGupta B. R. et al. в Toxicon, vol. 22, №3, p. 414-424, 1984. Вследствие этого 0,5% экстракт дрожжей и

0,6% автоклавированную дрожжевую пасту добавляют к 2% среде N-Z-амин типа А, и рН 7,2 будет достигнута с помощью 4 М NaOH, и среда, приготовленная таким образом, будет после этого автоклавирована. К данной среде можно добавить отдельно автоклавированную глюкозу (20% по массе на объем), чтобы достичь в среде итоговой концентрации глюкозы, составляющей 0,5%. Инкубирование может происходить, напр., при 37°C без встряхивания, при этом ферментацию прерывают, напр., после 96 часов. Можно использовать периодическую ферментацию, полупериодическую ферментацию, повторную периодическую ферментацию или непрерывную ферментацию.

После фактической ферментации и отделения ферментационной среды от клеток ферментационную среду можно подвергнуть первой преципитации с целью удаления крупных белков. Преципитация представляет собой предпочтительно кислотную преципитацию. Условия реакции для данной кислотной преципитации являются известными квалифицированному специалисту в данной области. Как правило, для закисления супернатанта до рН 3,5 можно использовать 1,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Центрифугирование обычно происходит в течение 20 минут при 2400x g при 4°C. Осадок, полученный посредством центрифугирования, можно промыть водой, предпочтительно повторно. В дальнейшем осадок можно экстрагировать буферным раствором 0,1 М лимонной кислоты-тринатрия цитрата, рН 5,5, напр., в течение часа. В дальнейшем можно выполнить этап дополнительного центрифугирования, напр., при 9800x g в течение 20 минут при 4°C. Полученный таким образом осадок затем необязательно можно вновь экстрагировать, как описано ранее. Супернатант экстрагирования, и оба супернатанта в случае повтора экстрагирования, затем можно подвергнуть осаждению протамина сульфатом. Преципитация может продолжаться в течение ночи, напр., при 8°C. В дальнейшем преципитат можно центрифугировать, напр., в течение 20 минут при 4°C и при 12000x g. Супернатант центрифугирования можно подвергнуть осаждению, такому как осаждение сульфатом аммония, тем самым можно удалить другие более крупные белки. После этапа

осаждения сульфатом аммония можно добавить этап еще одного центрифугирования и в дальнейшем полученный таким образом осадок можно растворить повторно и, необязательно, подвергнуть диализу. Экстракт, который предпочтительно диализирован и вновь центрифугирован, можно подвергнуть последовательным этапам хроматографии с целью очистки нейротоксина. Каждый из этапов хроматографии служит для удаления загрязнителей, таких как протамина сульфат, оставшейся ДНК, частей более мелких белков и белков средней величины, а также гемагглютининов белкового комплекса ботулинового нейротоксина. С этой целью в предпочтительном варианте осуществления можно применить один или более этапов хроматографии. Необязательно, элюат, напр., последнего этапа хроматографии, можно профильтровать с целью удаждения микроорганизмов. Необязательно элюат можно разбавить перед фильтрованием и можно добавить подходящие вспомогательные вещества. Во время дополнительных этапов после добавления вспомогательных веществ может быть выполнено другое стерилизующее фильтрование. В одном аспекте фильтрование проводят в реакционных емкостях, которые затем можно подвергнуть этапу лиофилизации.

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

Когда одноцепочечный белок BoNT/A изобретения вводят в контакт с Lys-C, протеолитическое действие Lys-C расщепляет одноцепочечный белок на участке между L-цепью компонента протеазы и компонентом транслокации для получения бицепного белка, в котором две цепи связаны посредством дисульфидного мостика. Например, две цепи, образованные после расщепления одноцепочечного BoNT/A1, A2 и A4-A6 в сайте активации, являются первой цепью аминокислотных остатков 1-438 и второй цепью аминокислотных остатков 449-1296 (кроме A6, в котором вторая цепь имеет аминокислотные остатки 449-1297), при этом остатки 439-447 удаляют посредством явления расщепления. Две цепи, образованные после расщепления одноцепочечного BoNT/A3 в сайте

активации, являются первой цепью аминокислотных остатков 1-434 и второй цепью аминокислотных остатков 445-1292, при этом остатки 435-444 удаляют посредством явления расщепления. Таким образом, Lys-C можно использовать для активации одноцепочечного полипептида посредством его превращения в активную бицепную форму. Преимущественно поэтому применение Lys-C означает, что нет необходимости встраивать в VoNT/A экзогенный (неприродный) сайт расщепления, а также делает возможным получение природной бицепи VoNT/A.

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

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

Термин «*подверженный протеолизу*» относится к признаку или критерию одноцепочечного белка VoNT/A и применяется в данном документе, означая, что указанный одноцепочечный белок VoNT/A протеолитически расщепляется посредством Lys-C. Другими словами, термин «*подверженный протеолизу*» означает, что одноцепочечный белок VoNT/A включает сайт распознавания и расщепления протеазы, позволяющий ему функционировать в качестве субстрата Lys-C. Как описано в данном документе, одноцепочечный белок VoNT/A является субстратом Lys-C и протеолитически перерабатывается в два или более продукта расщепления (предпочтительно именно два пептида - L-цепь или его фрагмент и H-цепь или его фрагмент, соединенные друг с другом через дисульфидный мостик). С применением анализа,

описанного в данном документе выше, квалифицированный специалист может тестировать, является ли данный одноцепочечный белок VoNT/A субстратом первого полипептида и, таким образом, «второго полипептида» в соответствии с определением представленного изобретения. Термин «по меньшей мере два продукта расщепления» включает, например, вплоть до двух, трех, четырех, пяти и вплоть до шести продуктов расщепления.

Данный способ можно использовать, например, для приготовления фармацевтической композиции, содержащей бицепь VoNT/A, или для создания полипептидных фрагментов, применяемых в способе масс-спектрометрии. Lys-C и одноцепочечный белок VoNT/A могут контактировать на различных этапах процесса получения бицепи VoNT/A. Например, этап приведения в контакт Lys-C и одноцепочечного белка VoNT/A может происходить в пределах клетки, например, посредством экспрессии Lys-C и одноцепочечного белка VoNT/A в указанной клетке.

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

Этап приведения в контакт требует инкубирования в условиях и в течение времени, достаточном, чтобы Lys-C расщепил одноцепочечный белок VoNT/A. Иллюстративные условия могут включать добавление буферного раствора, выбранного из группы, состоящей из 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 или PBS (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,4). Предпочтительные буферные условия включают 100 mM Tris-HCl, pH 8,0. «Время, достаточное для расщепления» можно определить с применением анализа, описанного в данном документе выше. В одном аспекте указанное «время, достаточное для расщепления» зависит от степени расщепления, которую должен иметь протеолитически обработанный полипептид или содержащая его композиция. В одном аспекте способ включает стадию

инкубирования Lys-C и одноцепочечного белка VoNT/A в течение по меньшей мере 30 мин, 60 мин, 120 мин или по меньшей мере 240 мин. В другом аспекте Lys-C и одноцепочечный белок VoNT/A инкубируют в течение вплоть до 30 мин, 60 мин, 120 мин, 240 мин, 480 мин или вплоть до 600 мин. В другом аспекте способ включает стадию инкубирования Lys-C и одноцепочечного белка VoNT/A при 4°C или при 37°C. В другом аспекте способ включает стадию инкубирования в течение вплоть до 1 ч, вплоть до 2 ч, 4 ч, 6 ч, 10 ч или вплоть до 16 ч.

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

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

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

любое дополнительное неспецифическое расщепление VoNT/A.

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

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

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

Авторы представленного изобретения решили вышеуказанную

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

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

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

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

Термин «алкильная» относится к алифатическим группам, включая прямоцепочечные, с разветвленной цепью, циклическим группам и их комбинациям. Алкильная группа может иметь от 1 до 12 атомов углерода. Примеры алкильных групп включают, но без ограничения такие группы, как метильная, этильная, пропильная

(напр., n-пропильная, изопропильная), бутильная (напр., n-бутильная, изобутильная, втор-бутильная, t-бутильная), пентильная, гексильная, гептильная и октильная.

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

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

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

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

Авторы представленного изобретения открыли, что особенно предпочтительные результаты отделения Lys-C от VoNT/A получаются с HIC с применением хроматографических матриц/смола, содержащих алкильные или арильные группы, например бутильный,

фенильный и октильный лиганды, соединенные с инертной матрицей/смолой, такие как поперечносшитая агароза или полистирольные шарики (Таблица 4; Фигуры 1-3).

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

В соответствии с представленным изобретением для НИС хроматографии можно использовать «Fast flow» смолы/матрицы. «Fast flow» смола/матрица может быть определена, как смола/матрица с более однородным средним размером частиц, чем стандартная НИС смола/матрица, и будет использовать более маленькие частицы. Конкретно, «Fast flow» смола/матрица будет иметь более узкий диапазон размеров более маленьких частиц. Размер частиц может быть количественно определен любым соответствующим способом, известным в данной области, например, в показателях среднего диаметра частиц. Как правило, «Fast flow» смола/матрица будет содержать частицы (напр., шарики) среднего диаметра менее 100 мкм, менее 95 мкм, менее 90 мкм или менее. В предпочтительном варианте осуществления средний диаметр «Fast flow» смолы/матрицы составляет менее 90 мкм. Как правило, распределение средних частиц «Fast flow» смолы/матрицы будет от приблизительно 20 до приблизительно 180 мкм, от приблизительно 30 до приблизительно 170 мкм, от приблизительно 40 до приблизительно 170 мкм, от приблизительно 40 до приблизительно 165 мкм. В предпочтительном варианте осуществления распределение средних частиц «Fast flow» смолы/матрицы составляет от приблизительно 44 до приблизительно 165 мкм.

В предпочтительном варианте осуществления используют высокоэффективные НИС смолы, такие как Фенильные Высокоэффективные (PhHP) или Бутильные Высокоэффективные (BuHP) смолы. Подобные высокоэффективные НИС матриц/смолы, как правило, обеспечивают улучшенное отделение Lys-C от активной бицепи VoNT/A по сравнению с ионообменной хроматографией (IEX), даже когда используют высокоэффективные IEX матрицы/смолы, такие как Четвертичноаминовые Высокоэффективные (QHP)

матрицы/смолы. Как обсуждалось в данном документе, основное различие между высокоэффективными смолами/матрицами и другими состоит в том, что средний размер частиц (снова он может быть количественно определен любым соответствующим способом, известным в данной области, например, средний диаметр частиц) является более маленьким (34 мкм против 90 мкм) и более однородным (24-44 мкм против 44-165 мкм), результатом чего является улучшенное разделение.

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

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

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

Как правило, процесс гидрофобной очистки для отделения активированного бипептидного белка BoNT/A от Lys-C уменьшает концентрацию Lys-C по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 15 раз, по

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

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

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

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

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

При этом композиция (как описано выше) по существу не содержит Lys-C, при этом композиция, как правило, содержит менее 400 пикограмм (пг) Lys-C на 100 нг белка VoNT/A; например, менее 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70,

60, 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 5, 4, 3, 2, 1 пг или менее Lys-C на 100 нг белка VoNT/A. В одном варианте осуществления композиция (как описано выше) содержит менее 400 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 350 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 300 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 250 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 200 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 150 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 100 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 50 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 40 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 30 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 20 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 15 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 14 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 13 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 12 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 11 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 10 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 9 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 8 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 7 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 6 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 5 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A или меньше. В предпочтительном варианте осуществления композиция (как описано выше) содержит менее 100 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A или менее 50 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 20 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A, менее 15 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A или менее 10 пг Lys-C на 100 нг белка VoNT/A.

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

#### Фармацевтические Композиции и Клинические показания

Представленное изобретение также относится к композиции, получаемой посредством способа представленного изобретения, для получения бицепси VoNT/A. В одном аспекте указанная композиция содержит смесь обработанного (бицепсного) и необработанного (одноцепочечного) VoNT/A, при этом указанная смесь может содержать менее 5%, 4%, 3%, 2% или менее 1% необработанного

(одноцепочечного) VoNT/A. В аспекте указанной композиции ссылки на VoNT/A охватывают ее производное, как определено в данном документе. Композиция может представлять собой, напр., жидкую или твердую композицию и может содержать один или более носителей, вспомогательных веществ и/или эксципиентов.

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

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

представленного изобретения, нуждающемуся в этом пациенту.

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

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

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

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

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

Небелковые стабилизирующие агенты, которые можно использовать в композиции в соответствии с изобретением, включают поверхностно-активные вещества, в частности неионные поверхностно-активные вещества. Примеры неионных поверхностно-активных веществ включают полисорбаты, такие как полисорбат 20 или полисорбат 80, и блок-сополимеры, такие как полуксамеры

(т.е. Сополимеры полиэтилена и пропиленгликоля).

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

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

(a) активный бицепной белок VoNT/A, как описано выше;

(b) небелковый стабилизирующий агент, которым является поверхностно-активное вещество; и

(c) воду;

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

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

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

В одном варианте осуществления поверхностно-активным веществом (как описано выше) является полисорбат, например,

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

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

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

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

Фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением также может содержать дисахарид.

Дисахарид, используемый в композиции в соответствии с изобретением, можно выбрать из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, маннитола и лактозы. В конкретном варианте

осуществления дисахаридом является сахароза. Концентрация дисахарида может составлять, например, от 5 до 50 мМ, предпочтительно от 5 до 25 мМ, более предпочтительно от 10 до 20 мМ, а наиболее предпочтительно приблизительно 11,7 мМ.

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

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

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

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

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

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

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

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

Носитель (носители) должен быть приемлемым в том смысле, что он должен быть совместим с другими ингредиентами готовой формы и быть безвредным для его получателя. Используемый фармацевтический носитель может представлять собой твердое вещество, гель или жидкость. Иллюстративным примером твердых носителей являются лактоза, каолин, сахароза, тальк, желатин, агар, пектин, камедь, стеарат магния, стеариновая кислота и тому подобное. Иллюстративным примером жидких носителей

являются фосфатно-солевой буферный раствор, очищенная патока, масло, вода, эмульсии, различные типы смачивающих агентов и тому подобное. Аналогичным образом, носитель или разбавитель может содержать материал временной задержки, хорошо известный в данной области, такой как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат отдельно или с воском. Указанные подходящие носители включают носители, указанные выше и другие, хорошо известные в данной области, см., напр., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

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

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

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

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

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

более чем один раз.

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

В дополнительном аспекте изобретения упомянутой выше композицией является лекарственная или косметическая композиция. В одном аспекте указанное лекарственное средство, содержащее биологически активный нейротоксин (т.е. активную бицепь BoNT/A), можно использовать для предотвращения и/или лечения по меньшей мере одного из следующих заболеваний и расстройств: сопротивление поперечно-полосатых мышц, фокальная дистония, включая цервикальную, краниальную дистонию и доброкачественный идиопатический блефароспазм, гемифациальный спазм и фокальную спастичность, желудочно-кишечные расстройства, гипергидроз и коррекция косметических морщин, в дополнительном аспекте также блефароспазм, оромандибулярная дистония открыточелюстного типа, закрыточелюстного типа, бруксизм, синдром Мейгса, лингвальная дистония, апраксия века, открытая цервикальная дистония, антеколлис, ретроколлис, латероколлис, кривошея, фарингеальная дистония, ларингеальная дистония, аддукторная спастическая дисфония, абдукторная спастическая дисфония, спастическое диспноэ, дистония конечностей, дистония верхних конечностей, дистония при выполнении специфических задач, писчий спазм, судороги музыканта, спазм игрока в гольф, дистония нижней конечности, приведение бедра, отведение бедра, коленное сгибание, коленное разгибание, сгибание ноги в голеностопном суставе, разгибание ноги в голеностопном суставе, эквиноварусная деформация стопы, деформация вследствие дистонии стопы, стриарный палец ноги, сгибание пальца стопы, разгибание пальца стопы, осевая дистония, синдром Пизанской башни, дистония исполнителя танца живота, сегментарная дистония, гемидистония, генерализованная дистония, дистония при синдроме Lubbag, дистония при кортикобазальной дегенерации, дистония при синдроме Lubbag,

остаточная дистония, дистония при спинальном мозжечковом атаксии, дистония при болезни Паркинсона, дистония при болезни Хантингтона, дистония при болезни Галлервордена-Шпатца, допа-индуцированные дискинезии/допа-индуцированная дистония, остаточные дискинезии/остаточная дистония, пароксизмальные дискинезии/дистонии, кинезиогенные, некинезиогенные, вызванные действием, небный миоклонус, миокимический миоклонус, ригидность, доброкачественные мышечные судороги, наследственное дрожание подбородка, парадоксальная активность жевательных мышц, спазмы жевательных мышц одной половины лица, гипертрофическая бронхиальная миопатия, гипертрофия жевательной мышцы, гипертрофия передней большеберцовой мышцы, нистагм, осциллопсия, надъядерный паралич взора, эпилепсия парциальная постоянная, планируемая операция при спастической кривошее, паралич отводящей мышцы голосовой складки, устойчивая мутационная дисфония, дисфункция верхнего сфинктера глотки, гранулема голосовой складки, заикание, синдром Туретта, миоклонус среднего уха, защитное смыкание голосовой щели, постларингэктомическое нарушение речи, защитный птоз, заворот век, дисфункция сфинктера Одди, псевдоахалазия, неахалазийное эзофагиальное расстройство моторики, вагинизм, послеоперационный тремор при неподвижности, дисфункция мочевого пузыря, детрузорно-сфинктерная диссинергия, спазм сфинктера мочевого пузыря, гемифациальный спазм, реиннервационные дискинезии, косметическое применение при «гусиных лапках», асимметрия лица вследствие нахмуривания, ямки подбородка, синдром скованного человека, столбняк, гиперплазия простаты, лечение ожирения, детский церебральный паралич, косоглазие, смешанное, паралитическое, содружественное, после операции при отслойке сетчатки, после операции удаления катаракты, при афакии, миозитное косоглазие, миопатическое косоглазие, диссоциированное вертикальное отклонение, как дополнение к хирургии косоглазия, сходящееся косоглазие, расходящееся косоглазие, ахалазия, анальные трещины, гиперфункция экзокринных желез, синдром Фрей, синдром крокодильих слез, гипергидроз подмышечный, ладонный, подошвенный, ринорея,

относительная гиперсаливация при инсульте, при болезни Паркинсона, при спастических состояниях при боковом амиотрофическом склерозе, при процессах аутоиммунного энцефалита и миелита, рассеянный склероз, поперечный миелит, болезнь Девика, вирусные инфекции бактериальные инфекции паразитарные инфекции, грибковые инфекции, при наследственном спастическом парапарезе, постапоплектический синдром, инфаркт полушария, инфаркт ствола мозга, инфаркт спинного мозга, мигрень, при травме центральной нервной системы, поражения полушарий, поражение спинного мозга, повреждение ствола мозга, при кровоизлиянии центральной нервной системы, внутримозговое кровоизлияние, субарахноидальное кровоизлияние, субдуральное кровоизлияние, кровоизлияние в спинной мозг, при неоплазиях, опухоли полушарий, опухоли ствола головного мозга, опухоли спинного мозга, храпе (WO 2000/033863). Для подробностей и симптомов см., напр., Jost 2007, Drugs 67(5), 669 или Dressler 2000 в Botulinum Toxin Therapy, Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

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

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

**Ключ к SEQ ID NO**

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

SEQ ID NO: 2 Петля активации BoNT/A1

- SEQ ID NO: 3 Петля активации VoNT/A2/A6
- SEQ ID NO: 4 Петля активации VoNT/A3
- SEQ ID NO: 5 Петля активации VoNT/A3
- SEQ ID NO: 6 Петля активации VoNT/A4
- SEQ ID NO: 7 Петля активации VoNT/A5
- SEQ ID NO: 8 Протеолитически активный полипептид, полученный из штамма ATCC 3502 Clostridium botulinum, GenBank дополнение № «CAL82988.1», недостающие 248 N-концевые аминокислотные остатки
- SEQ ID NO: 9 Протеолитически неактивный полипептид, полученный из штамма ATCC 3502 Clostridium botulinum, GenBank дополнение № «CAL82988.1»
- SEQ ID NO: 10 Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 8
- SEQ ID NO: 11 Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 9
- SEQ ID NO: 12 аминокислотная последовательность «Streptag»
- SEQ ID NO: 13 Петля активации VoNT/A7
- SEQ ID NO: 14 Петля активации VoNT/A8
- SEQ ID NO: 15 Аминокислотная последовательность одноцепочечного, рекомбинантного, катионного производного ботулинового нейротоксина подсеротипа A1 (mrVoNT/A1)

### Список Фигур

**Фигура 1:** Профили элюирования из Фенильной Высокоэффективной (PhHP) колонки, на которой оценивали отделение Lys-C (A<sub>405</sub> - столбцы) от VoNT/A (A<sub>280</sub> - пунктирная линия).

**Фигура 2:** Профили элюирования из Фенильной колонки сильного замещения Fast Flow (PhFF-Hi), на которой оценивали отделение Lys-C (A<sub>405</sub> - столбцы) от VoNT/A (A<sub>280</sub> - пунктирная линия).

**Фигура 3:** Профили элюирования из Бутильной Высокоэффективной (BuHP) колонки, на которой оценивали

отделение Lys-C (A<sub>405</sub> - столбцы) от VoNT/A (A<sub>280</sub> - пунктирная линия).

**Фигура 4:** Профили элюирования из Сульфопропильной Высокоэффективной (SPHP) колонки, на которой оценивали отделение Lys-C (A<sub>405</sub> - столбцы) от VoNT/A (A<sub>280</sub> - пунктирная линия).

**Фигура 5:** Профили элюирования из Сульфопропильной колонки Fast Flow (SPFF), на которой оценивали отделение Lys-C (A<sub>405</sub> - столбцы) от VoNT/A (A<sub>280</sub> - пунктирная линия).

**Фигура 6:** Профили элюирования из Карбоксилметильной колонки Fast Flow (CMFF), на которой оценивали отделение Lys-C (A<sub>405</sub> - столбцы) от VoNT/A (A<sub>280</sub> - пунктирная линия).

**Фигура 7:** Профили элюирования из Четвертичноаминовой Высокоэффективной (QHP) колонки, на которой оценивали отделение Lys-C (A<sub>405</sub> - столбцы) от VoNT/A (A<sub>280</sub> - пунктирная линия).

**Фигура 8:** Профили элюирования из Четвертичноаминовой колонки Fast Flow (QFF), на которой оценивали отделение Lys-C (A<sub>405</sub> - столбцы) от VoNT/A (A<sub>280</sub> - пунктирная линия).

**Фигура 9:** Профили элюирования из диэтиламинопропильной (DEAP, «ANX») колонки, на которой оценивали отделение Lys-C (A<sub>405</sub> - столбцы) от VoNT/A (A<sub>280</sub> - пунктирная линия).

**Фигура 10:** Профили элюирования из диэтиламиноэтильной (DEAE) колонки, на которой оценивали отделение Lys-C (A<sub>405</sub> - столбцы) от VoNT/A (A<sub>280</sub> - пунктирная линия).

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

**Фигура 12:** Удаление Lys-C из rVoNT/A2(0) посредством Фенильной HP HIC. Фракции, взятые со стадии очистки Фенильной HP HIC, анализировали с помощью SDS-PAGE (вверху). Рекомбинантный VoNT/A1 имеет молекулярную массу, равную ~149

кДа, и маркеры молекулярной массы (Benchmark) метили в кДа. Образцы одних и тех же фракций также тестировали в калориметрическом анализе Lys-C (внизу), где расщепление субстрата высвобождает желтый хромофор (в черной рамке).

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

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

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

#### Примеры

#### **ПРИМЕР 1 - Культивирование хозяина и экспрессия растворимого белка rBoNT/A**

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

Microbank или глицеринового материала (10-100 мкл) для инокулирования колбы.

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

#### **ПРИМЕР 2 - Экстрагирование белка VoNT/A из хозяина и анализ уровня экспрессии**

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

#### Анализ Бредфорда для Определения Общей Концентрации Белка Полученных Лизатов

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

#### Полуколичественный Анализ Вестерн-блоттинг

Для создания SDS-PAGE стандартов используют коммерческий образец белка VoNT/A, продаваемый Metabionics. Затем из

образцов лизата из культур экспрессирующих клеток получают SDS-PAGE образцы с известной общей концентрацией белка. Данные образцы наносят на полиакриламидный гель и обрабатывают при 200 В в течение 50 минут. Полосы белка переносятся электрофорезом на нитроцеллюлозную мембрану в не содержащем метанол буферном растворе для блоттинга при 0,4 мА в течение 1 часа. Мембраны блокируют в течение 1 часа с 0,5% BSA в PBS-0,1% Tween 20, а затем исследуют с помощью антитела к BoNT/A в течение 1 часа. Пятна дополнительно исследуют с помощью HRP конъюгированных вторичных антител, сформированных в субстрате SuperSignal DuraWest, и визуализируют с применением устройства отображения Syngene.

**ПРИМЕР 3 - Активация ботулинового нейротоксина А (BoNT/A) посредством Lys-C**

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

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

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

**ПРИМЕР 4 - Очистка белка-мишени BoNT/A, не содержащего активирующей протеазы**

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

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

Таблица 2

Прогнозируемые свойства Lys-C и BoNT/A

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

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

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

#### **ПРИМЕР 5 - Скрининг колонок для жидкостной экспресс-хроматографии белков (FPLC) для отделение Lys-C от BoNT/A**

##### *FPLC Очистка*

После активации BoNT/A1 с Lys-C, ряд FPLC колонок тестировали на очистку и удаление Lys-C:

- три колонки для хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC): Фенильная Высокоэффективная (PhHP), Фенильная Fast Flow сильного замещения (PhFF-Hi) и Бутильная HP (BuHP) тестировали с Tris pH 8;

- три колонки для катионообменной хроматографии (CEC): Сульфопропильная Высокоэффективная (SPHP), Сульфопропильная Fast Flow (SPFF) и Карбоксилметильная Fast Flow (CMFF) were тестировали с ацетатом натрия pH 4,5; и

- четыре колонки для анионообменной хроматографии (AEC): Четвертичноаминовая Высокоэффективная (QHP), Четвертичноаминовая Fast Flow (QFF), диэтиламинопропильная (DEAP, «ANX»), и диэтиламиноэтильная (DEAE)) тестировали с Tris

pH 8.

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

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

Таблица 3

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

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

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

Для оценки активности Lys-C, фракции, собранные во время

градиента элюирования, анализировали с помощью калориметрического анализа.

#### Калориметрический Анализ Активности Lys-C

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

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

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

#### Результаты

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

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

Графические данные с Фигур 1-10 качественно суммированы в Таблице 4.

Сущность of qualitative Lys-C/BoNT расщепление данные

Хроматография		Отделение Lys-C*	
Гидрофобное взаимодействие <sup>a</sup>		PhHP	✓✓✓
		BuHP	✓✓✓
		PhFF-Hi	✓✓
Ионнообменное <sup>b</sup>	катионное	SPHP	✓
		SPFF	✓
		CMFF	✓
	анионное	QHP	✓✓
		QFF	✓
		ANX	✓
		DEAE	✓

\*Очевидное отделение Lys-C относительно rBoNT/A1. ✓✓✓ =хорошее, ✓✓ =ОК, ✓ =слабое

<sup>a</sup>Фенильная Высокоэффективная (PhHP), Фенильная Fast Flow сильного замещения (PhFF-Hi), Бутильная HP (BuHP)

<sup>b</sup>Сульфопропильная Высокоэффективная (SPHP), Сульфопропильная Fast Flow (SPFF), Карбоксилметильная Fast Flow (CMFF), Четвертичноаминовая Высокоэффективная (QHP), Четвертичноаминовая Fast Flow (QFF), Диэтиламинопропильная (DEAP, «ANX») и Диэтиламиноэтильная (DEAE)

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

Общий сигнал Lys-C в каждой фракции был нормирован до среднего значения A<sub>405</sub> из 5 последних фракций хроматографической стадии. Из этого рассчитывали процентную долю Lys-C, присутствующей в пиковых фракциях белка, чтобы показать степень отделения Lys-C от белка на основеа фракций элюирования (Таблица 5, % LysC в пиковых фракциях белка (нормированную)).

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

Хорошим отделением Lys-C от BoNT/A было бы отделение, при котором было видно низкое значение процентной доли LysC в

пиковой фракции белка. Отсюда похоже, что СЕС не способна отделять Lys-C от BoNT/A1. Высокоэффективная АЕС колонка, QHP, показала некоторую способность отделения Lys-C от BoNT/A1. Однако, она была значительно менее эффективна, чем две высокоэффективные НИС колонки. Поэтому, результаты демонстрируют, что сопоставимо сравнивая (т.е. Стандартную эффективность со стандартной эффективностью, а высокую эффективность с высокой эффективностью), НИС колонки показали улучшенное отделение Lys-C от BoNT/A1, чем либо СЕС, либо АЕС колонки.

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

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

Таблица 5

Краткое изложение эффективности колонок

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

PhHP НИС выбрали в качестве итоговой стадии очистки для

отделения Lys-C от BoNT/A (см. Пример 6 ниже).

**ПРИМЕР 6 - Активация и итоговая очистка рекомбинантного ботулинового нейротоксина подсеротипа A1 (rBoNT/A1)**

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

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

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

Одноцепочечный rBoNT/A2 (0) очищали с помощью жидкостной экспресс-хроматографии белков (FPLC) с применением высокоэффективной бутильной сефарозной хроматографии с

гидрофобным взаимодействием (Бутильная HP HIC) для улавливания с последующим промежуточным этапом очистки с помощью высокоэффективной четвертично аммониевой сефарозной анионообменной хроматографии (Q HP AEC). Данную молекулу затем инкубировали с 4 мкг/мл Lys-C при 37°C в течение 2 ч для получения активной бицепи.

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

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

Одноцепочечный rBoNT/A5(0) очищали с помощью жидкостной экспресс-хроматографии белков (FPLC) с применением высокоэффективной бутильной сефарозной хроматографии с гидрофобным взаимодействием (Бутильная HP HIC) для улавливания с последующим промежуточным этапом очистки с помощью высокоэффективной четвертично аммониевой сефарозной анионообменной хроматографии (Q HP AEC). Данную молекулу затем инкубировали с 2,5 мкг/мл Lys-C при 37°C в течение 2 ч для получения активной бицепи. Lys-C отделяли от активированного rBoNT/A5(0) с применением высокоэффективной фенильной сефарозной хроматографии с гидрофобным взаимодействием (Фенильная HP HIC). Она включала регулирование реакционной

смеси высокосолёным Tris буферным раствором перед загрузкой в Фенильную HP колонку, с последующим высокосолёным промыванием и последующим элюированием белка в линейном градиенте в низкосолёном Tris буферном растворе. Элюирование фракций анализировали с помощью электрофореза в денатурирующем геле (SDS PAGE) и калориметрического анализа активности Lys-C (Фигура 13) -она показала, что Lys-C рано элюировал в градиенте (F10-F39) перед активированной молекулой BoNT (F51-F65). Таким образом, данная колонка показывает хорошее отделение Lys-C от rBoNT/A5(0).

**ПРИМЕР 9 - Активация и итоговая очистка рекомбинантного эндопептидазо-отрицательного ботулинового нейротоксина подсеротипа А6 (rBoNT/A6(0))**

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

**ПРИМЕР 10 - Очистка производного одноцепочечного,**

**рекомбинантного, катионного, ботулинового нейротоксина подсеротипа A1 (mrBoNT/A1)**

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

**ПРИМЕР 11 - Активация и итоговая очистка производного рекомбинантного, катионного, ботулинового нейротоксина подсеротипа A1 (mrBoNT/A1)**

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

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

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

Таблица 6

## Иллюстративные готовые формы ВоNT/A

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

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

### **ПРИМЕР 13 - Высокочувствительный анализ активности Lys-C**

Количественное определение итоговой концентрации Lys-C в очищенных образцах VoNT/A проводили посредством расщепления флуоресцентного пептидного субстрата. Флуоресцентный субстрат (Tos-GPK-7-амино-4-трифторацетатная соль, также называемая Tos-GPK-AMC) восстанавливали в DMSO для предоставления запаса 20 мг/мл (32,7 мМ). Его дополнительно разбавляли до 10 мМ водой, и аликвоты готовили и хранили при -20°C. В день анализа брали соответствующее количество субстрата и дополнительно разбавляли 25 мМ Tris pH8, 125 мМ NaCl для предоставления 0,5 мМ рабочего раствора Lys-C; затем готовили стандарты Lys-C (известных концентраций) посредством разбавления рабочего раствора в буферном растворе для анализа (25 мМ Tris, 125 мМ NaCl, 0,1 мг/мл BSA, pH8). Стандарты, заготовки (только буферный раствор для анализа) и тестовые образцы (партии очищенного rVoNT/A) распределяли на черные планшеты OptiPlate, в трех повторениях (180 мкл на лунку) и уравнивали до 37°C в течение 10-15 мин. Далее добавляли 20 мкл субстрата, и планшет немедленно переносили в планшет-ридер, где проводили кинетическое считывание. Планшет считывали с применением фильтров возбуждения/эмиссии- 360/40 и 485/20 при 37°C, каждые 20 мин в течение 5 ч. Данные наносили на график в виде времени в минутах (ось x) против поглощения/флуоресценции (ось y). Значения наклона для каждой концентрации Lys-C использовали для создания стандартной кривой для концентрации Lys-C. Образцы очищенного rVoNT/A обрабатывали таким же образом, и из стандартной кривой интерполировали концентрацию Lys-C в каждом образце rVoNT/A. На основе анализа четырех независимых партий или rVoNT/A, измеренная средняя концентрация Lys-C в итоговом материале составляла  $7,3 \pm 1,5$  пг Lys-C на 100 нг/VoNT/A.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Миорелаксирующая твердая фармацевтическая композиция, содержащая:

а) активный бицепсный белок VoNT/A, получаемый способом, включающим:

(i) получение растворимого одноцепочечного белка VoNT/A, содержащего полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1 или 15;

(ii) приведение в контакт указанного белка VoNT/A с эндопротеиназой Lys-C (Lys-C) в растворе; и

(iii) отделение растворимого белка VoNT/A от Lys-C посредством приведения в контакт раствора, содержащего растворимый бицепсный белок VoNT/A и Lys-C, с гидрофобной поверхностью, которая связывается с растворимым бицепсным VoNT/A; и

б) стабилизирующий агент;

и, где:

(i) указанный растворимый бицепсный белок VoNT/A содержит первую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотным остаткам 1-438 SEQ ID NO: 1, и вторую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотным остаткам 449-1296 SEQ ID NO: 1 или 15, где указанные первая и вторая цепи связаны дисульфидным мостиком;

(ii) указанная твердая фармацевтическая композиция содержит менее 2% одноцепочечных VoNT/A;

(iii) указанная твердая фармацевтическая композиция содержит Lys-C, где Lys-C присутствует в концентрации менее 400 мкг Lys-C на 100 мг белка VoNT/A.

2. Твердая фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что представлена в лиофилизированной форме.

3. Твердая фармацевтическая композиция по п.2, восстановленная водой или физиологическим раствором.

4. Твердая фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что:

а) указанный стабилизирующий агент представляет собой небелковый стабилизирующий агент, предпочтительно поверхностно-активное вещество, еще более предпочтительно неионогенное поверхностно-активное вещество; и/или

б) указанная твердая фармацевтическая композиция не содержит белковый стабилизирующий агент.

5. Твердая фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что указанная композиция дополнительно содержит буферный раствор для поддержания pH в диапазоне от 5,5 до 7,5.

6. Миорелаксирующая жидкая фармацевтическая композиция, содержащая:

а) активный бицепный белок VoNT/A, получаемый способом, включающим:

получение растворимого одноцепочечного белка VoNT/A, содержащего полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1 или 15;

(ii) приведение в контакт указанного белка VoNT/A с эндопротеиназой Lys-C (Lys-C) в растворе; и

(iii) отделение растворимого белка VoNT/A от Lys-C посредством приведения в контакт раствора, содержащего растворимый бицепный белок VoNT/A и Lys-C, с гидрофобной поверхностью, которая связывается с растворимым бицепным VoNT/A;

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

с) воду;

где:

- указанный растворимый бицепный белок VoNT/A содержит первую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотным остаткам 1-438 SEQ ID NO: 1, и вторую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотным остаткам 449-1296 SEQ ID NO: 1 или 15, где указанные первая и вторая цепи связаны дисульфидным мостиком; и

- указанная жидкая фармацевтическая композиция:

(i) не содержит белковый стабилизирующий агент;

(ii) содержит менее 2% одноцепочечных ВоNT/A; и

(iii) содержит Lys-C, где Lys-C присутствует в концентрации менее 400 мкг Lys-C на 100 нг белка ВоNT/A.

7. Твердая фармацевтическая композиция по любому из пп.1-5 или жидкая фармацевтическая композиция по п.6, которые содержат неионогенное поверхностно-активное вещество, выбранное из полисорбата или полуксамера.

8. Твердая фармацевтическая композиция по п.7 или жидкая фармацевтическая композиция по п.7, где указанное неионогенное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

9. Твердая фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-5, 7 или 8 или жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп. 6-8, где:

a) указанное поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации менее 1% о/о; или

b) указанное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80 в концентрации от 0,005% до 0,02% о/о.

10. Твердая фармацевтическая композиция по любому из пп.1-5 или 7-9 или жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.6-9, которая дополнительно содержит дисахарид.

11. Твердая фармацевтическая композиция по п.10 или жидкая фармацевтическая композиция по п.10, где дисахарид выбран из сахарозы, трегалозы, маннита и лактозы.

12. Жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.6-11, отличающаяся тем, что указанная жидкая фармацевтическая композиция дополнительно содержит:

хлорид натрия,

буферный раствор для поддержания pH от 5,5 до 7,5, и

дисахарид, выбранный из группы, состоящей из: сахарозы, трегалозы, маннита и лактозы;

где вода является стерильной водой.

13. Твердая фармацевтическая композиция по п.10 или 11 или жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.10-12, где

указанный дисахарид представляет собой сахарозу.

14. Твердая фармацевтическая композиция по любому из пп.10-13 или жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.10-13, где концентрация указанного дисахарида составляет от 5 до 50 мМ.

15. Твердая фармацевтическая композиция по п.5 или жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.12-14, где указанный буфер выбран из группы, состоящей из: сукцината, динатрия фосфата/лимонной кислоты и аминокислоты, такой как гистидин.

16. Твердая фармацевтическая композиция по п.5 или 15 или жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.12-15, где концентрация указанного буферного раствора составляет от 1 до 50 мМ, предпочтительно от 5 до 20 мМ.

17. Твердая фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-5, 7-11 или 13-16 или жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп. 6-16, где указанная композиция содержит менее 1% одноцепочечных ВоNT/A.

18. Твердая фармацевтическая композиция по любому из пп.1-5, 7-11 или 13-17 или жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.6-17, где указанная фармацевтическая композиция содержит Lys-C в концентрации менее 300 пг Lys-C на 100 нг белка ВоNT/A, менее 200 пг Lys-C на 100 нг белка ВоNT/A, менее 100 пг Lys-C на 100 нг белка ВоNT/A, менее 50 пг Lys-C на 100 нг белка ВоNT/A, менее 20 пг Lys-C на 100 нг белка ВоNT/A, менее 15 пг Lys-C на 100 нг белка ВоNT/A или менее 10 пг Lys-C на 100 нг белка ВоNT/A.

19. Твердая фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-5, 7-11 или 13-18 или жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп. 6-18, отличающаяся тем, что протеазная функция активного бицепного белка ВоNT/A остается стабильной при 25°C в течение не менее 12 недель.

20. Твердая композиция по любому из пп.1-5, 7-11 или 13-19 для лечения заболевания или расстройства, выбранного из следующего: сопротивление поперечно-полосатых мышц, фокальная дистония, включая цервикальную, краниальную дистонию и

доброкачественный идиопатический блефароспазм, гемифациальный спазм и фокальную спастичность, желудочно-кишечные расстройства, гипергидроз и коррекция косметических морщин, блефароспазм, оромандибулярная дистония (открыточелюстного типа, закрыточелюстного типа), бруксизм, синдром Мейгса, лингвальная дистония, апраксия века, открытая цервикальная дистония, антеколлис, ретроколлис, латероколлис, кривошея, фарингеальная дистония, ларингеальная дистония, аддукторная спастическая дисфония/абдукторная спастическая дисфония, спастическое диспноэ, дистония конечностей, дистония верхних конечностей, дистония при выполнении специфических задач, писчий спазм, судороги музыканта, спазм игрока в гольф, дистония нижней конечности, приведение бедра, отведение бедра, коленное сгибание, коленное разгибание, сгибание ноги в голеностопном суставе, разгибание ноги в голеностопном суставе, эквиноварусная деформация стопы, деформация вследствие дистонии стопы, стриарный палец ноги, сгибание пальца стопы, разгибание пальца стопы, осевая дистония, синдром Пизанской башни, дистония исполнителя танца живота, сегментарная дистония, гемидистония, генерализованная дистония, дистония при синдроме Lubaq, дистония при кортикобазальной дегенерации, дистония при синдроме Lubaq, остаточная дистония, дистония при спинальном атоническом параличе, дистония при болезни Паркинсона, дистония при болезни Хантингтона, дистония при болезни Галлервордена-Шпатца, допа-индуцированные дискинезии/допа-индуцированная дистония, остаточные дискинезии/остаточная дистония, пароксизмальные дискинезии/дистонии, кинезиогенные, некинезиогенные, вызванные действием, небный миоклонус, миокимический миоклонус, ригидность, доброкачественные мышечные судороги, наследственное дрожание подбородка, парадоксальная активность жевательных мышц, спазмы жевательных мышц одной половины лица, гипертрофическая бронхиальная миопатия, гипертрофия жевательной мышцы, гипертрофия передней большеберцовой мышцы, нистагм, осциллопсия, надъядерный паралич взора, эпилепсия парциальная постоянная, планируемая операция при спастической кривошее, паралич отводящей мышцы голосовой

складки, устойчивая мутационная дисфония, дисфункция верхнего сфинктера глотки, гранулема голосовой складки, заикание, синдром Туретта, миоклонус среднего уха, защитное смыкание голосовой щели, постларингэктомическое нарушение речи, защитный птоз, заворот век, дисфункция сфинктера Одди, псевдоахалазия, неахалазийное эзофагиальное расстройство моторики, вагинизм, послеоперационный тремор при неподвижности, дисфункция мочевого пузыря, детрузорно-сфинктерная диссинергия, спазм сфинктера мочевого пузыря, гемифациальный спазм, реиннервационные дискинезии, косметическое применение при «гусиных лапках», асимметрия лица вследствие нахмуривания, ямки подбородка, синдром скованного человека, столбняк, гиперплазия простаты, лечение ожирения, детский церебральный паралич, косоглазие, смешанное, паралитическое, содружественное, после операции при отслойке сетчатки, после операции удаления катаракты, при афакии, миозитное косоглазие, миопатическое косоглазие, диссоциированное вертикальное отклонение, как дополнение к хирургии косоглазия, сходящееся косоглазие, расходящееся косоглазие, ахалазия, анальные трещины, гиперфункция экзокринных желез, синдром Фрей, синдром крокодильих слез, гипергидроз подмышечный, ладонный, подошвенный, ринорея, относительная гиперсаливация при инсульте, при болезни Паркинсона, при спастических состояниях при боковом амиотрофическом склерозе, при процессах аутоиммунного энцефалита и миелита, рассеянный склероз, поперечный миелит, болезнь Девика, вирусные инфекции бактериальные инфекции паразитарные инфекции, грибковые инфекции, при наследственном спастическом парапарезе, постапоплектический синдром, инфаркт полушария, инфаркт ствола мозга, инфаркт спинного мозга, мигрень, при травме центральной нервной системы, поражения полушарий, поражение спинного мозга, повреждение ствола мозга, при кровоизлиянии центральной нервной системы, внутримозговое кровоизлияние, субарахноидальное кровоизлияние, субдуральное кровоизлияние, кровоизлияние в спинной мозг, при неоплазиях, опухоли полушарий, опухоли ствола головного мозга, опухоли спинного мозга, храпе.

21. Жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп. 6-19 для лечения заболевания или расстройства, выбранного из следующего: сопротивление поперечно-полосатых мышц, фокальная дистония, включая цервикальную, краниальную дистонию и доброкачественный идиопатический блефароспазм, гемифациальный спазм и фокальную спастичность, желудочно-кишечные расстройства, гипергидроз и коррекция косметических морщин, блефароспазм, оромандибулярная дистония (открыточелюстного типа, закрыточелюстного типа), бруксизм, синдром Мейтса, лингвальная дистония, апраксия века, открытая цервикальная дистония, антеколлис, ретроколлис, латероколлис, кривошея, фарингеальная дистония, ларингеальная дистония, аддукторная спастическая дисфония/абдукторная спастическая дисфония, спастическое диспноэ, дистония конечностей, дистония верхних конечностей, дистония при выполнении специфических задач, писчий спазм, судороги музыканта, спазм игрока в гольф, дистония нижней конечности, приведение бедра, отведение бедра, коленное сгибание, коленное разгибание, сгибание ноги в голеностопном суставе, разгибание ноги в голеностопном суставе, эквиноварусная деформация стопы, деформация вследствие дистонии стопы, стриарный палец ноги, сгибание пальца стопы, разгибание пальца стопы, осевая дистония, синдром Пизанской башни, дистония исполнителя танца живота, сегментарная дистония, гемидистония, генерализованная дистония, дистония при синдроме Lubbag, дистония при кортикобазальной дегенерации, дистония при синдроме Lubbag, остаточная дистония, дистония при спинозжечковой атаксии, дистония при болезни Паркинсона, дистония при болезни Хантингтона, дистония при болезни Галлервордена-Шпатца, допа-индуцированные дискинезии/допа-индуцированная дистония, остаточные дискинезии/остаточная дистония, пароксизмальные дискинезии/дистонии, кинезиогенные, некинезиогенные, вызванные действием, небный миоклонус, миохимический миоклонус, ригидность, доброкачественные мышечные судороги, наследственное дрожание подбородка, парадоксальная активность жевательных мышц, спазмы жевательных мышц одной половины лица, гипертрофическая бронхиальная миопатия,

гипертрофия жевательной мышцы, гипертрофия передней большеберцовой мышцы, нистагм, осциллопсия, надъядерный паралич взора, эпилепсия парциальная постоянная, планируемая операция при спастической кривошее, паралич отводящей мышцы голосовой складки, устойчивая мутационная дисфония, дисфункция верхнего сфинктера глотки, гранулема голосовой складки, заикание, синдром Туретта, миоклонус среднего уха, защитное смыкание голосовой щели, постларингэктомическое нарушение речи, защитный птоз, заворот век, дисфункция сфинктера Одди, псевдоахалазия, неахалазийное эзофагиальное расстройство моторики, вагинизм, послеоперационный тремор при неподвижности, дисфункция мочевого пузыря, детрузорно-сфинктерная диссинергия, спазм сфинктера мочевого пузыря, гемифациальный спазм, реиннервационные дискинезии, косметическое применение при «гусиных лапках», асимметрия лица вследствие нахмуривания, ямки подбородка, синдром скованного человека, столбняк, гиперплазия простаты, лечение ожирения, детский церебральный паралич, косоглазие, смешанное, паралитическое, содружественное, после операции при отслойке сетчатки, после операции удаления катаракты, при афакии, миозитное косоглазие, миопатическое косоглазие, диссоциированное вертикальное отклонение, как дополнение к хирургии косоглазия, сходящееся косоглазие, расходящееся косоглазие, ахалазия, анальные трещины, гиперфункция экзокринных желез, синдром Фрей, синдром крокодильих слез, гипергидроз подмышечный, ладонный, подошвенный, ринорея, относительная гиперсаливация при инсульте, при болезни Паркинсона, при спастических состояниях при боковом амиотрофическом склерозе, при процессах аутоиммунного энцефалита и миелита, рассеянный склероз, поперечный миелит, болезнь Девика, вирусные инфекции бактериальные инфекции паразитарные инфекции, грибковые инфекции, при наследственном спастическом парапарезе, постапоплектический синдром, инфаркт полушария, инфаркт ствола мозга, инфаркт спинного мозга, мигрень, при травме центральной нервной системы, поражения полушарий, поражение спинного мозга, повреждение ствола мозга, при кровоизлиянии центральной нервной системы, внутримозговое

кровоизлияние, субарахноидальное кровоизлияние, субдуральное кровоизлияние, кровоизлияние в спинной мозг, при неоплазиях, опухоли полушарий, опухоли ствола головного мозга, опухоли спинного мозга, храпе.

22. Применение твердой композиции по любому из пп.1-5, 7-11 или 13-19 в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, выбранного из следующего: сопротивление поперечно-полосатых мышц, фокальная дистония, включая цервикальную, краниальную дистонию и доброкачественный идиопатический блефароспазм, гемифациальный спазм и фокальную спастичность, желудочно-кишечные расстройства, гипергидроз и коррекция косметических морщин, блефароспазм, оромандибулярная дистония (открыточелюстного типа, закрыточелюстного типа), бруксизм, синдром Мейгса, лингвальная дистония, апраксия века, открытая цервикальная дистония, антеколлис, ретроколлис, латероколлис, кривошея, фарингеальная дистония, ларингеальная дистония, аддукторная спастическая дисфония/абдукторная спастическая дисфония, спастическое диспноэ, дистония конечностей, дистония верхних конечностей, дистония при выполнении специфических задач, писчий спазм, судороги музыканта, спазм игрока в гольф, дистония нижней конечности, приведение бедра, отведение бедра, коленное сгибание, коленное разгибание, сгибание ноги в голеностопном суставе, разгибание ноги в голеностопном суставе, эквиноварусная деформация стопы, деформация вследствие дистонии стопы, стриарный палец ноги, сгибание пальца стопы, разгибание пальца стопы, осевая дистония, синдром Пизанской башни, дистония исполнителя танца живота, сегментарная дистония, гемидистония, генерализованная дистония, дистония при синдроме Lubbag, дистония при кортикобазальной дегенерации, дистония при синдроме Lubbag, остаточная дистония, дистония при спино мозжечковой атаксии, дистония при болезни Паркинсона, дистония при болезни Хантингтона, дистония при болезни Галлервордена-Шпатца, допа-индуцированные дискинезии/допа-индуцированная дистония, остаточные дискинезии/остаточная дистония, пароксизмальные дискинезии/дистонии, кинезиогенные, некинезиогенные, вызванные

действием, небный миоклонус, миокимический миоклонус, ригидность, доброкачественные мышечные судороги, наследственное дрожание подбородка, парадоксальная активность жевательных мышц, спазмы жевательных мышц одной половины лица, гипертрофическая бронхиальная миопатия, гипертрофия жевательной мышцы, гипертрофия передней большеберцовой мышцы, нистагм, осциллопсия, надъядерный паралич взора, эпилепсия парциальная постоянная, планируемая операция при спастической кривошее, паралич отводящей мышцы голосовой складки, устойчивая мутационная дисфония, дисфункция верхнего сфинктера глотки, гранулема голосовой складки, заикание, синдром Туретта, миоклонус среднего уха, защитное смыкание голосовой щели, постларингэктомическое нарушение речи, защитный птоз, заворот век, дисфункция сфинктера Одди, псевдоахалазия, неахалазийное эзофагиальное расстройство моторики, вагинизм, послеоперационный тремор при неподвижности, дисфункция мочевого пузыря, детрузорно-сфинктерная диссинергия, спазм сфинктера мочевого пузыря, гемифациальный спазм, реиннервационные дискинезии, косметическое применение при «гусиных лапках», асимметрия лица вследствие нахмуривания, ямки подбородка, синдром скованного человека, столбняк, гиперплазия простаты, лечение ожирения, детский церебральный паралич, косоглазие, смешанное, паралитическое, содружественное, после операции при отслойке сетчатки, после операции удаления катаракты, при афакии, миозитное косоглазие, миопатическое косоглазие, диссоциированное вертикальное отклонение, как дополнение к хирургии косоглазия, сходящееся косоглазие, расходящееся косоглазие, ахалазия, анальные трещины, гиперфункция экзокринных желез, синдром Фрей, синдром крокодильих слез, гипергидроз подмышечный, ладонный, подошвенный, ринорея, относительная гиперсаливация при инсульте, при болезни Паркинсона, при спастических состояниях при боковом амиотрофическом склерозе, при процессах аутоиммунного энцефалита и миелита, рассеянный склероз, поперечный миелит, болезнь Девика, вирусные инфекции бактериальные инфекции паразитарные инфекции, грибковые инфекции, при наследственном

спастическом парапарезе, постапоплектический синдром, инфаркт полушария, инфаркт ствола мозга, инфаркт спинного мозга, мигрень, при травме центральной нервной системы, поражения полушарий, поражение спинного мозга, повреждение ствола мозга, при кровоизлиянии центральной нервной системы, внутримозговое кровоизлияние, субарахноидальное кровоизлияние, субдуральное кровоизлияние, кровоизлияние в спинной мозг, при неоплазиях, опухоли полушарий, опухоли ствола головного мозга, опухоли спинного мозга, храпе.

23. Применение жидкой фармацевтической композиции по любому из пп.6-19 в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, выбранного из следующего: сопротивление поперечно-полосатых мышц, фокальная дистония, включая цервикальную, краниальную дистонию и доброкачественный идиопатический блефароспазм, гемифациальный спазм и фокальную спастичность, желудочно-кишечные расстройства, гипергидроз и коррекция косметических морщин, блефароспазм, оромандибулярная дистония (открыточелюстного типа, закрыточелюстного типа), бруксизм, синдром Мейгса, лингвальная дистония, апраксия века, открытая цервикальная дистония, антеколлис, ретроколлис, латероколлис, кривошея, фарингеальная дистония, ларингеальная дистония, аддукторная спастическая дисфония/абдукторная спастическая дисфония, спастическое диспноэ, дистония конечностей, дистония верхних конечностей, дистония при выполнении специфических задач, писчий спазм, судороги музыканта, спазм игрока в гольф, дистония нижней конечности, приведение бедра, отведение бедра, коленное сгибание, коленное разгибание, сгибание ноги в голеностопном суставе, разгибание ноги в голеностопном суставе, эквиноварусная деформация стопы, деформация вследствие дистонии стопы, стриарный палец ноги, сгибание пальца стопы, разгибание пальца стопы, осевая дистония, синдром Пизанской башни, дистония исполнителя танца живота, сегментарная дистония, гемидистония, генерализованная дистония, дистония при синдроме Lubbag, дистония при кортикобазальной дегенерации, дистония при синдроме Lubbag, остаточная дистония, дистония при спинозжечковой атаксии,

дистония при болезни Паркинсона, дистония при болезни Хантингтона, дистония при болезни Галлервордена-Шпатца, допа-индуцированные дискинезии/допа-индуцированная дистония, остаточные дискинезии/остаточная дистония, пароксизмальные дискинезии/дистонии, кинезиогенные, некинезиогенные, вызванные действием, небный миоклонус, миокимический миоклонус, ригидность, доброкачественные мышечные судороги, наследственное дрожание подбородка, парадоксальная активность жевательных мышц, спазмы жевательных мышц одной половины лица, гипертрофическая бронхиальная миопатия, гипертрофия жевательной мышцы, гипертрофия передней большеберцовой мышцы, нистагм, осциллопсия, надъядерный паралич взора, эпилепсия парциальная постоянная, планируемая операция при спастической кривошее, паралич отводящей мышцы голосовой складки, устойчивая мутационная дисфония, дисфункция верхнего сфинктера глотки, гранулема голосовой складки, заикание, синдром Туретта, миоклонус среднего уха, защитное смыкание голосовой щели, постларингэктомическое нарушение речи, защитный ртоз, заворот век, дисфункция сфинктера Одди, псевдоахалазия, неахалазийное эзофагиальное расстройство моторики, вагинизм, послеоперационный тремор при неподвижности, дисфункция мочевого пузыря, детрузорно-сфинктерная диссинергия, спазм сфинктера мочевого пузыря, гемифациальный спазм, реиннервационные дискинезии, косметическое применение при «гусиных лапках», асимметрия лица вследствие нахмуривания, ямки подбородка, синдром скованного человека, столбняк, гиперплазия простаты, лечение ожирения, детский церебральный паралич, косоглазие, смешанное, паралитическое, содружественное, после операции при отслойке сетчатки, после операции удаления катаракты, при афакии, миозитное косоглазие, миопатическое косоглазие, диссоциированное вертикальное отклонение, как дополнение к хирургии косоглазия, сходящееся косоглазие, расходящееся косоглазие, ахалазия, анальные трещины, гиперфункция экзокринных желез, синдром Фрей, синдром крокодильих слез, гипергидроз подмышечный, ладонный, подошвенный, ринорея, относительная гиперсаливация при инсульте, при болезни

Паркинсона, при спастических состояниях при боковом амиотрофическом склерозе, при процессах аутоиммунного энцефалита и миелита, рассеянный склероз, поперечный миелит, болезнь Девика, вирусные инфекции бактериальные инфекции паразитарные инфекции, грибковые инфекции, при наследственном спастическом парапарезе, постапоплектический синдром, инфаркт полушария, инфаркт ствола мозга, инфаркт спинного мозга, мигрень, при травме центральной нервной системы, поражения полушарий, поражение спинного мозга, повреждение ствола мозга, при кровоизлиянии центральной нервной системы, внутримозговое кровоизлияние, субарахноидальное кровоизлияние, субдуральное кровоизлияние, кровоизлияние в спинной мозг, при неоплазиях, опухоли полушарий, опухоли ствола головного мозга, опухоли спинного мозга, храпе.

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

гемидистония, генерализованная дистония, дистония при синдроме Lubaq, дистония при кортикобазальной дегенерации, дистония при синдроме Lubaq, остаточная дистония, дистония при спинальном атаксии, дистония при болезни Паркинсона, дистония при болезни Хантингтона, дистония при болезни Галлервордена-Шпатца, допа-индуцированные дискинезии/допа-индуцированная дистония, остаточные дискинезии/остаточная дистония, пароксизмальные дискинезии/дистонии, кинезиогенные, некинезиогенные, вызванные действием, небный миоклонус, миохимический миоклонус, ригидность, доброкачественные мышечные судороги, наследственное дрожание подбородка, парадоксальная активность жевательных мышц, спазмы жевательных мышц одной половины лица, гипертрофическая бронхиальная миопатия, гипертрофия жевательной мышцы, гипертрофия передней большеберцовой мышцы, нистагм, осциллопсия, надъядерный паралич зрения, эпилепсия парциальная постоянная, планируемая операция при спастической кривошее, паралич отводящей мышцы голосовой складки, устойчивая мутационная дисфония, дисфункция верхнего сфинктера глотки, гранулема голосовой складки, заикание, синдром Туретта, миоклонус среднего уха, защитное смыкание голосовой щели, постларингэктомическое нарушение речи, защитный птоз, заворот век, дисфункция сфинктера Одди, псевдоахалазия, неахалазийное эзофагиальное расстройство моторики, вагинизм, послеоперационный тремор при неподвижности, дисфункция мочевого пузыря, детрузорно-сфинктерная диссинергия, спазм сфинктера мочевого пузыря, гемифациальный спазм, реиннервационные дискинезии, косметическое применение при «гусиных лапках», асимметрия лица вследствие нахмуривания, ямки подбородка, синдром скованного человека, столбняк, гиперплазия простаты, лечение ожирения, детский церебральный паралич, косоглазие, смешанное, паралитическое, содружественное, после операции при отслойке сетчатки, после операции удаления катаракты, при афакии, миозитное косоглазие, миопатическое косоглазие, диссоциированное вертикальное отклонение, как дополнение к хирургии косоглазия, сходящееся косоглазие, расходящееся косоглазие, ахалазия, анальные трещины, гиперфункция

экзокринных желез, синдром Фрей, синдром крокодильих слез, гипергидроз подмышечный, ладонный, подошвенный, ринорея, относительная гиперсаливация при инсульте, при болезни Паркинсона, при спастических состояниях при боковом амиотрофическом склерозе, при процессах аутоиммунного энцефалита и миелита, рассеянный склероз, поперечный миелит, болезнь Девика, вирусные инфекции бактериальные инфекции паразитарные инфекции, грибковые инфекции, при наследственном спастическом парапарезе, постапоплектический синдром, инфаркт полушария, инфаркт ствола мозга, инфаркт спинного мозга, мигрень, при травме центральной нервной системы, поражения полушарий, поражение спинного мозга, повреждение ствола мозга, при кровоизлиянии центральной нервной системы, внутримозговое кровоизлияние, субарахноидальное кровоизлияние, субдуральное кровоизлияние, кровоизлияние в спинной мозг, при неоплазиях, опухоли полушарий, опухоли ствола головного мозга, опухоли спинного мозга, храпе, где указанный способ включает введение твердой композиции по любому из пп. 1-5, 7-11 или 13-19 нуждающемуся в этом пациенту.

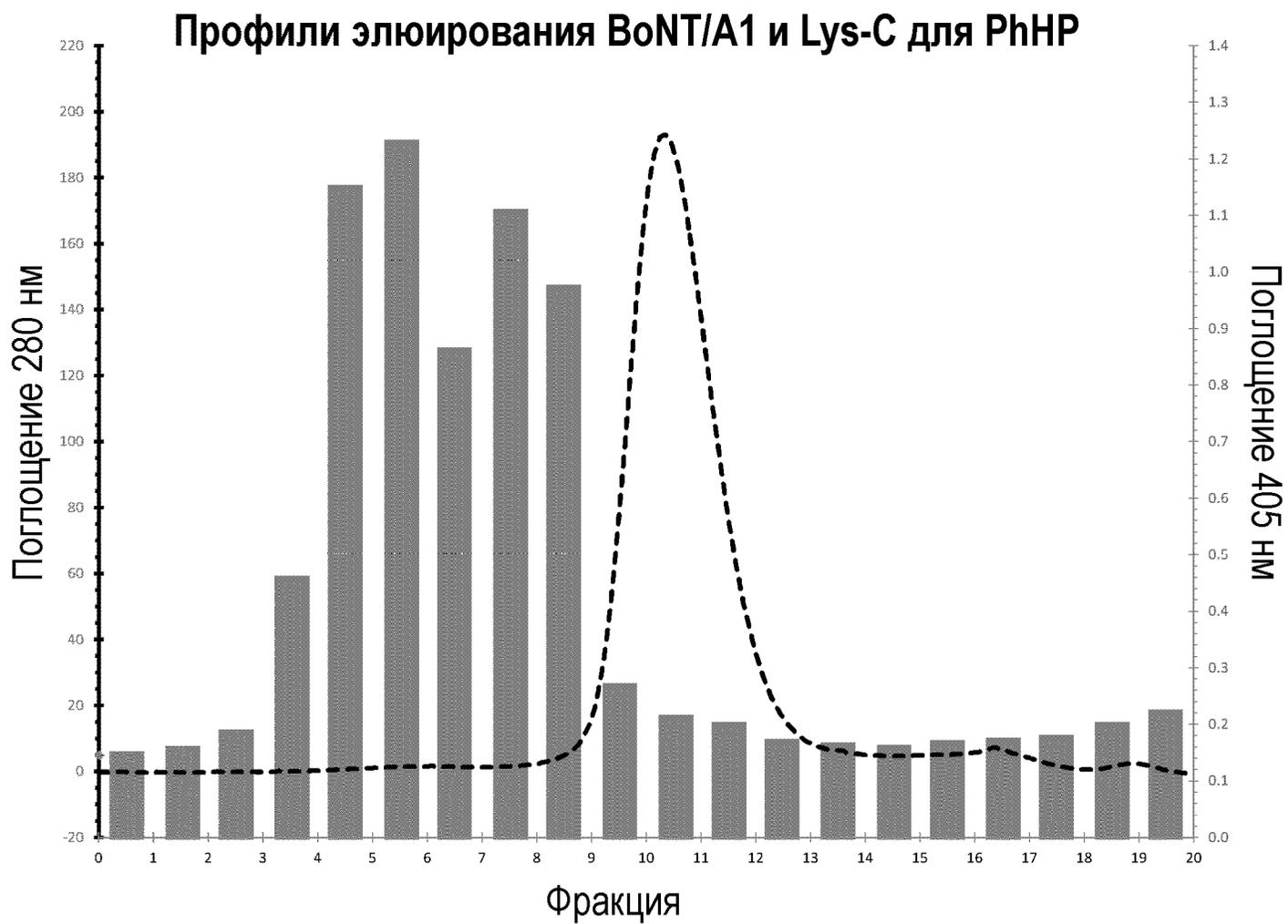
25. Способ лечения заболевания или расстройства, выбранного из следующего: сопротивление поперечно-полосатых мышц, фокальная дистония, включая цервикальную, краниальную дистонию и доброкачественный идиопатический блефароспазм, гемифациальный спазм и фокальную спастичность, желудочно-кишечные расстройства, гипергидроз и коррекция косметических морщин, блефароспазм, оромандибулярная дистония (открыточелюстного типа, закрыточелюстного типа), бруксизм, синдром Мейгса, лингвальная дистония, апраксия века, открытая цервикальная дистония, антеколлис, ретроколлис, латероколлис, кривошея, фарингеальная дистония, ларингеальная дистония, аддукторная спастическая дисфония/абдукторная спастическая дисфония, спастическое диспноэ, дистония конечностей, дистония верхних конечностей, дистония при выполнении специфических задач, писчий спазм, судороги музыканта, спазм игрока в гольф, дистония нижней конечности, приведение бедра, отведение бедра, коленное сгибание, коленное разгибание, сгибание ноги в

голеностопном суставе, разгибание ноги в голеностопном суставе, эквиноварусная деформация стопы, деформация вследствие дистонии стопы,стриарный палец ноги, сгибание пальца стопы, разгибание пальца стопы, осевая дистония, синдром Пизанской башни, дистония исполнителя танца живота, сегментарная дистония, гемидистония, генерализованная дистония, дистония при синдроме Lubag, дистония при кортикобазальной дегенерации, дистония при синдроме Lubag, остаточная дистония, дистония при спинальном мозжечковом атаксии, дистония при болезни Паркинсона, дистония при болезни Хантингтона, дистония при болезни Галлервордена-Шпатца, допа-индуцированные дискинезии/допа-индуцированная дистония, остаточные дискинезии/остаточная дистония, пароксизмальные дискинезии/дистонии, кинезиогенные, некинезиогенные, вызванные действием, небный миоклонус, миохимический миоклонус, ригидность, доброкачественные мышечные судороги, наследственное дрожание подбородка, парадоксальная активность жевательных мышц, спазмы жевательных мышц одной половины лица, гипертрофическая бронхиальная миопатия, гипертрофия жевательной мышцы, гипертрофия передней большеберцовой мышцы, нистагм, осциллопсия, надъядерный паралич взора, эпилепсия парциальная постоянная, планируемая операция при спастической кривошее, паралич отводящей мышцы голосовой складки, устойчивая мутационная дисфония, дисфункция верхнего сфинктера глотки, гранулема голосовой складки, заикание, синдром Туретта, миоклонус среднего уха, защитное смыкание голосовой щели, постларингэктомическое нарушение речи, защитный птоз, заворот век, дисфункция сфинктера Одди, псевдоахалазия, неахалазийное эзофагиальное расстройство моторики, вагинизм, послеоперационный тремор при неподвижности, дисфункция мочевого пузыря, детрузорно-сфинктерная диссинергия, спазм сфинктера мочевого пузыря, гемифациальный спазм, реиннервационные дискинезии, косметическое применение при «гусиных лапках», асимметрия лица вследствие нахмуривания, ямки подбородка, синдром скованного человека, столбняк, гиперплазия простаты, лечение ожирения, детский церебральный паралич, косоглазие, смешанное, паралитическое, содружественное, после операции при

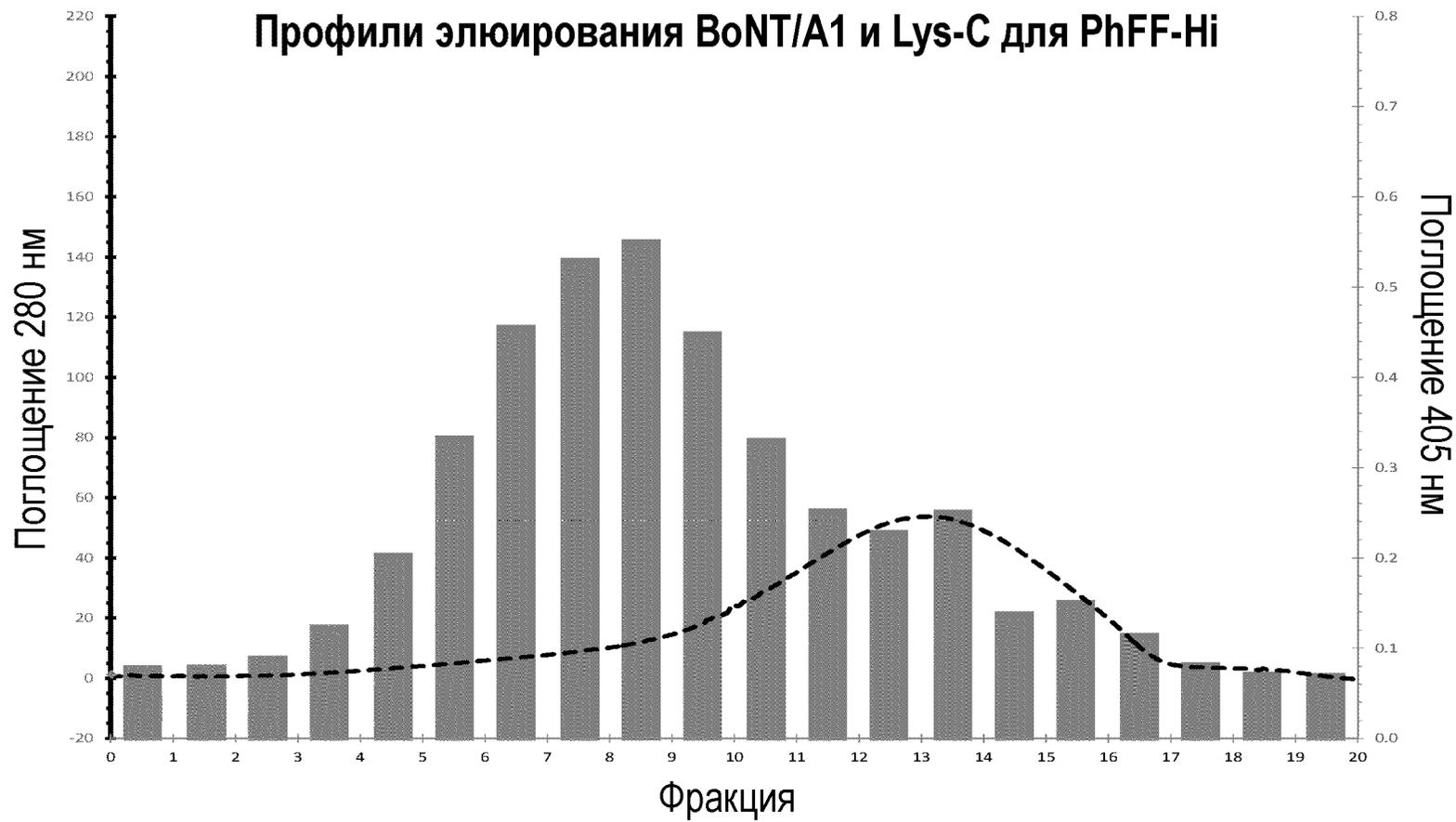
отслойке сетчатки, после операции удаления катаракты, при афакии, миозитное косоглазие, миопатическое косоглазие, диссоциированное вертикальное отклонение, как дополнение к хирургии косоглазия, сходящееся косоглазие, расходящееся косоглазие, ахалазия, анальные трещины, гиперфункция экзокринных желез, синдром Фрей, синдром крокодильих слез, гипергидроз подмышечный, ладонный, подошвенный, ринорея, относительная гиперсаливация при инсульте, при болезни Паркинсона, при спастических состояниях при боковом амиотрофическом склерозе, при процессах аутоиммунного энцефалита и миелита, рассеянный склероз, поперечный миелит, болезнь Девика, вирусные инфекции бактериальные инфекции паразитарные инфекции, грибковые инфекции, при наследственном спастическом парапарезе, постапоплектический синдром, инфаркт полушария, инфаркт ствола мозга, инфаркт спинного мозга, мигрень, при травме центральной нервной системы, поражения полушарий, поражение спинного мозга, повреждение ствола мозга, при кровоизлиянии центральной нервной системы, внутримозговое кровоизлияние, субарахноидальное кровоизлияние, субдуральное кровоизлияние, кровоизлияние в спинной мозг, при неоплазиях, опухоли полушарий, опухоли ствола головного мозга, опухоли спинного мозга, храпе, где указанный способ включает введение жидкой фармацевтической композиции по любому из пп. 6-19 нуждающемуся в этом пациенту.

По доверенности

ФИГ. 1

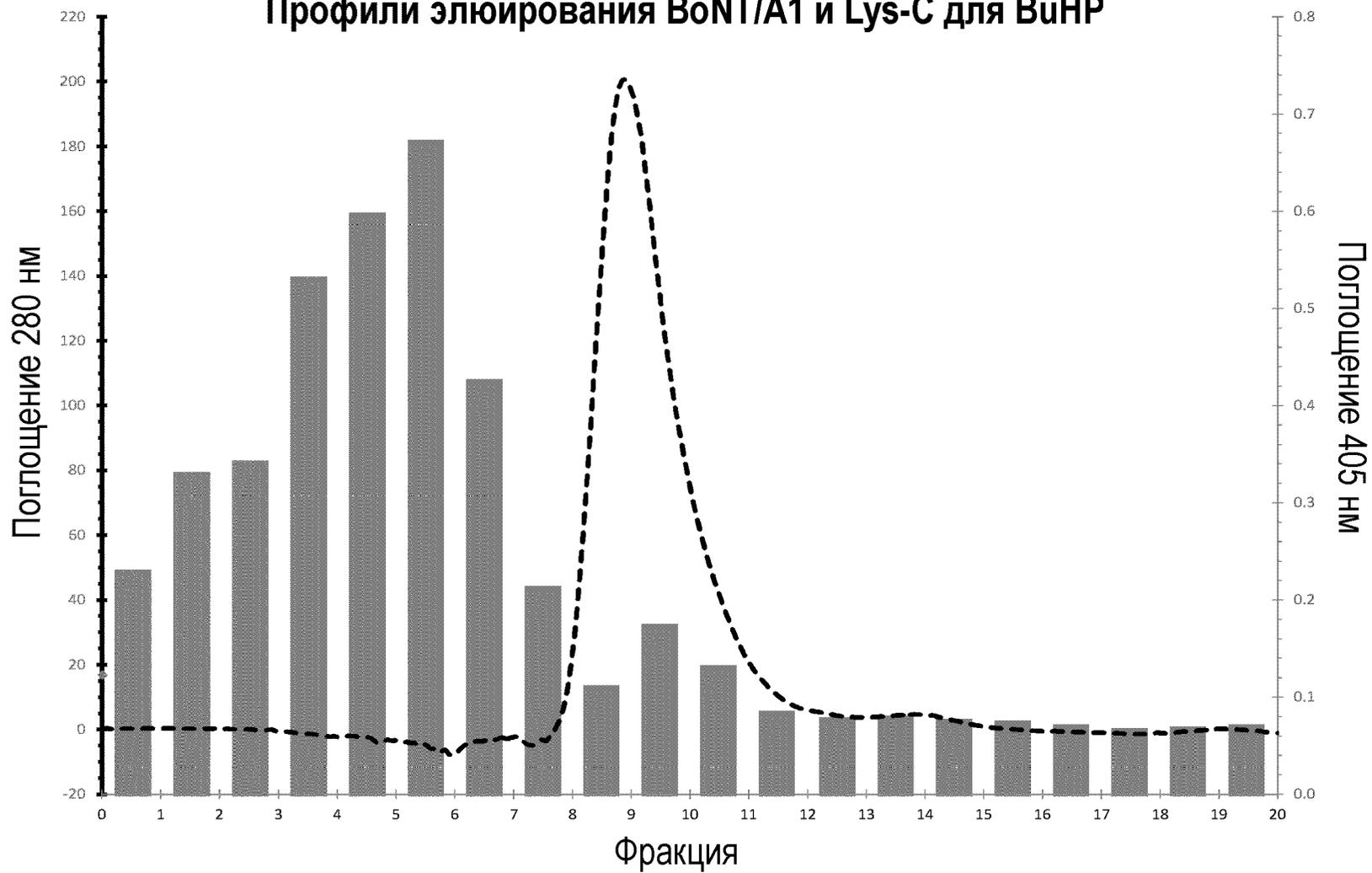


ФИГ. 2

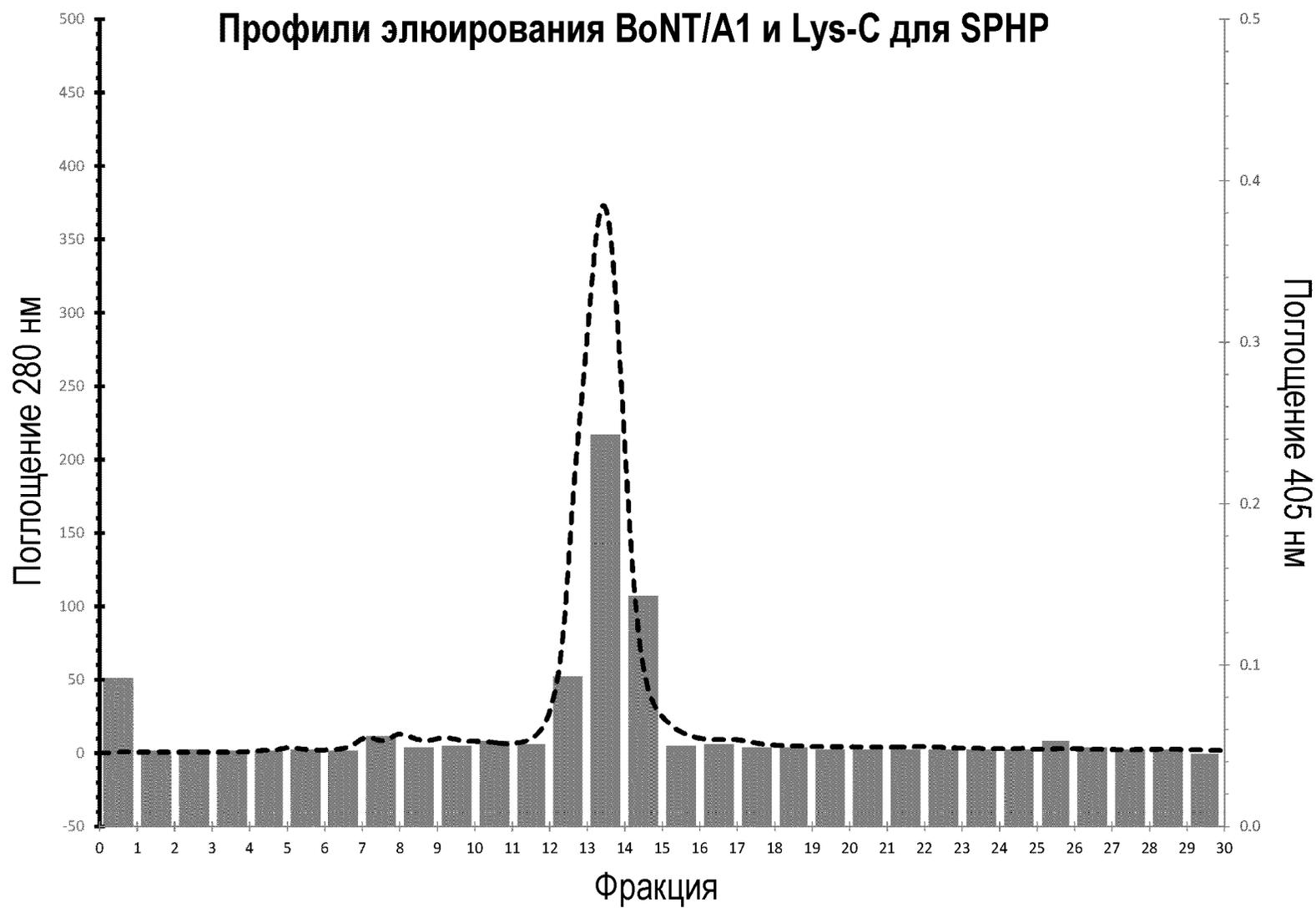


ФИГ. 3

Профили элюирования VoNT/A1 и Lys-C для ВиНР

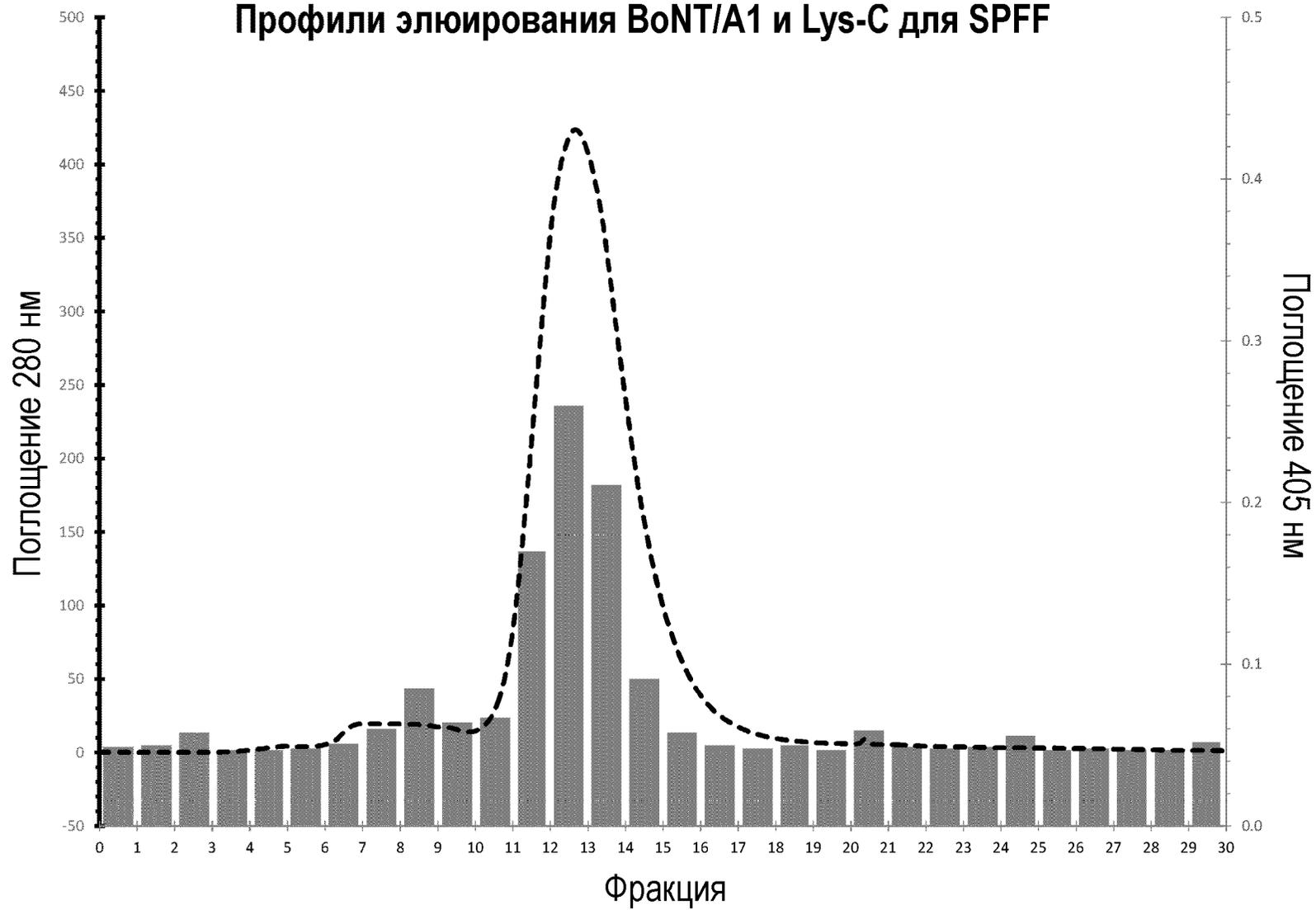


ФИГ. 4



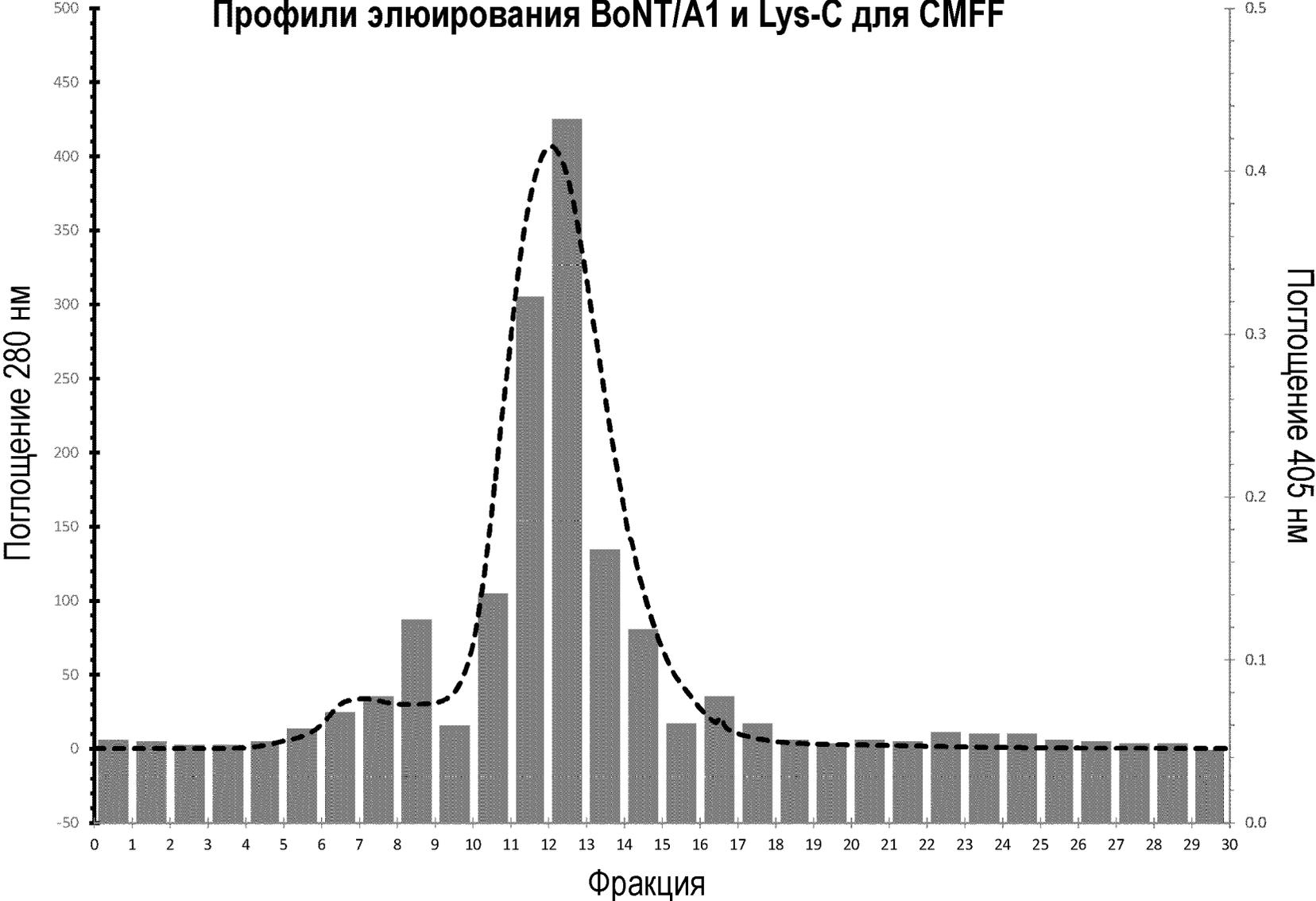
ФИГ. 5

Профили элюирования VoNT/A1 и Lys-C для SPFF

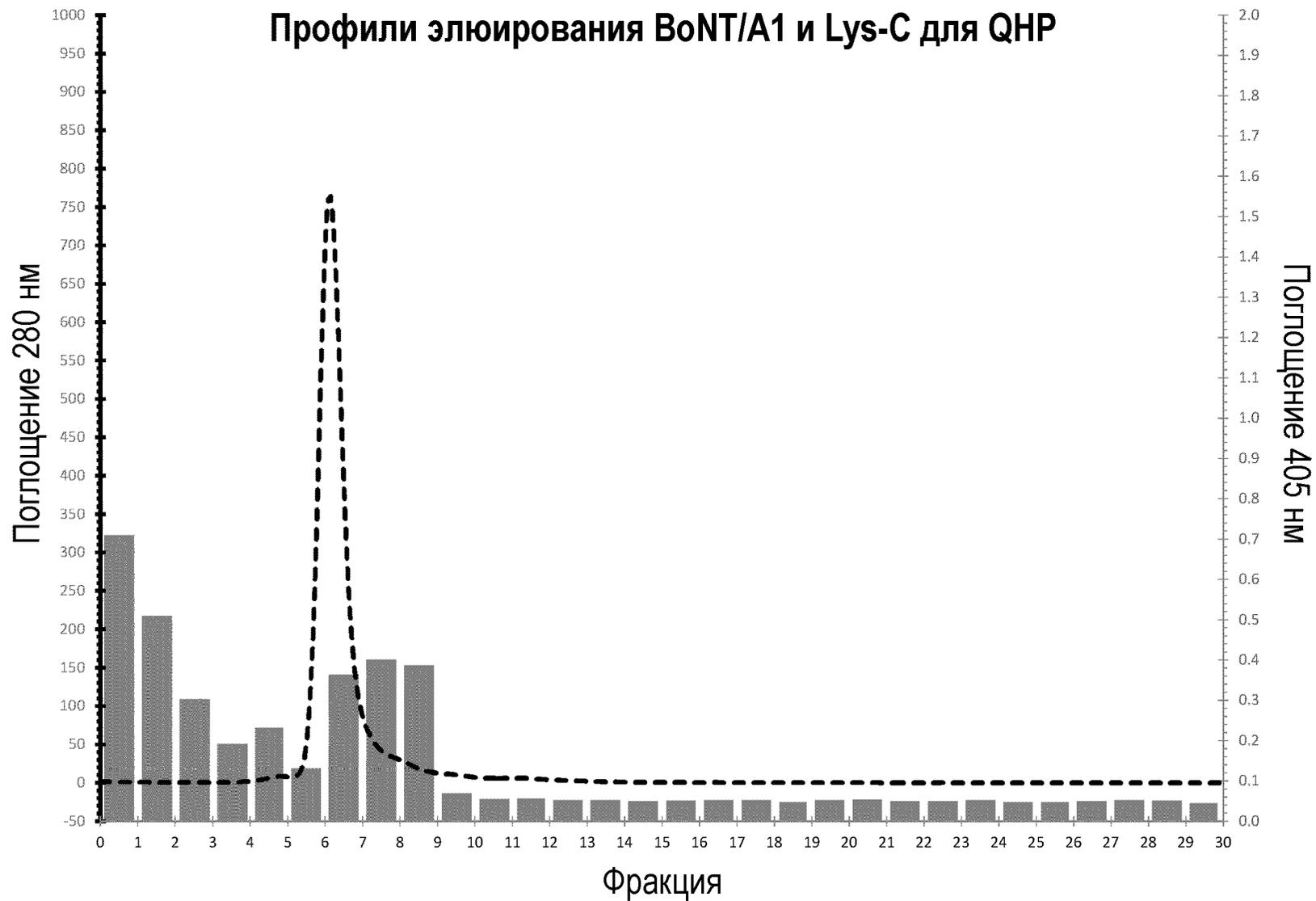


ФИГ. 6

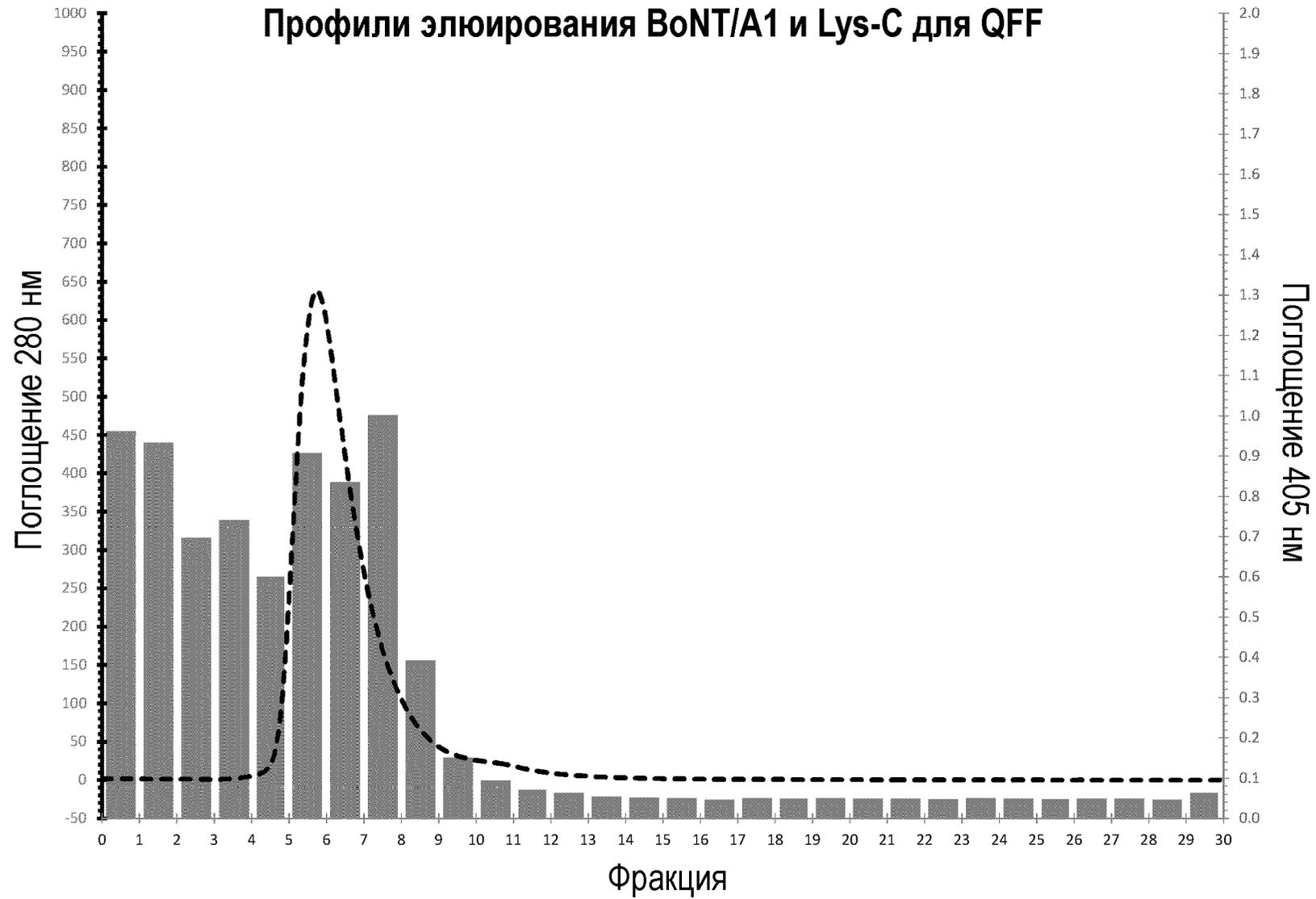
Профили элюирования VoNT/A1 и Lys-C для CMFF



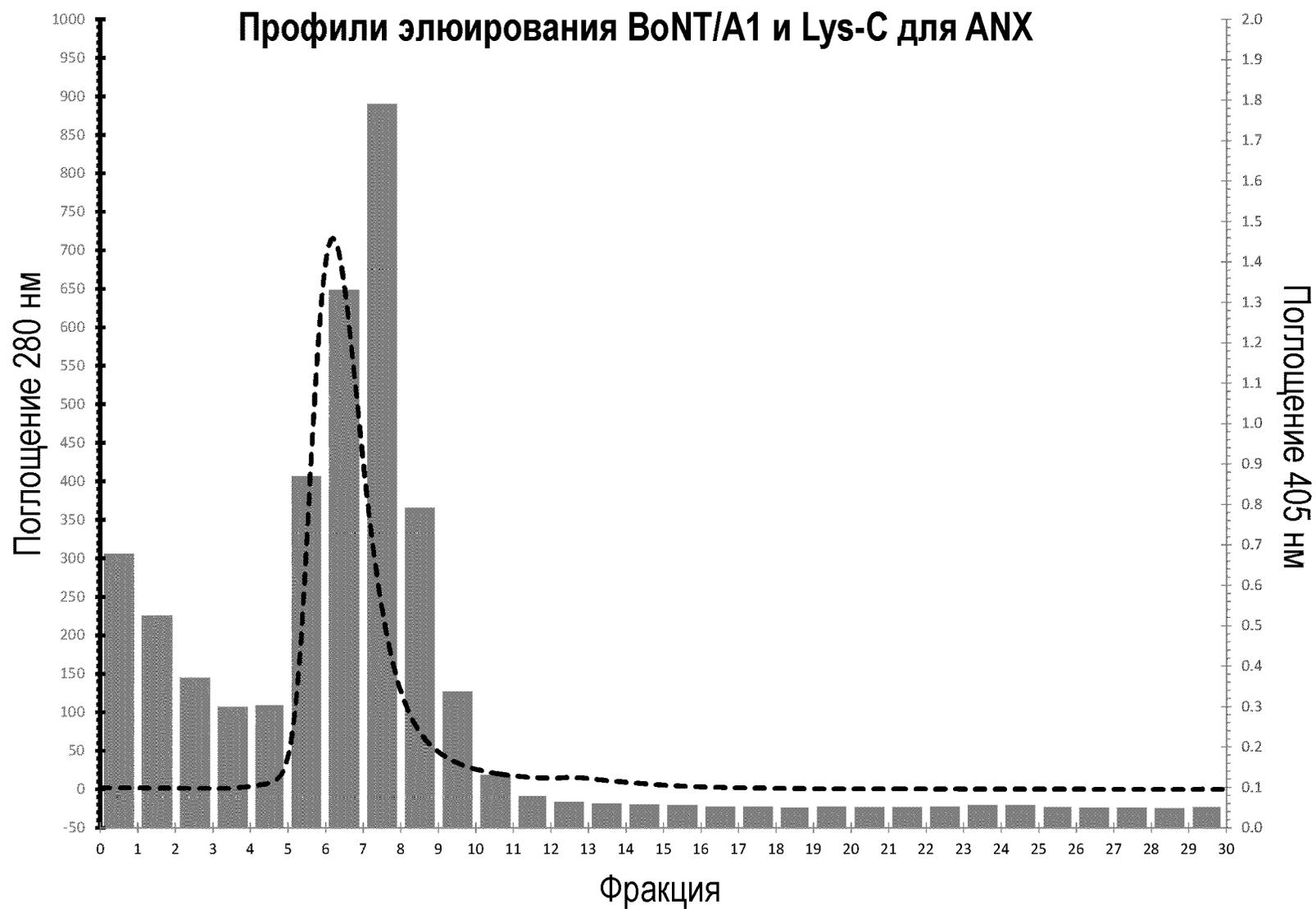
ФИГ. 7



ФИГ. 8

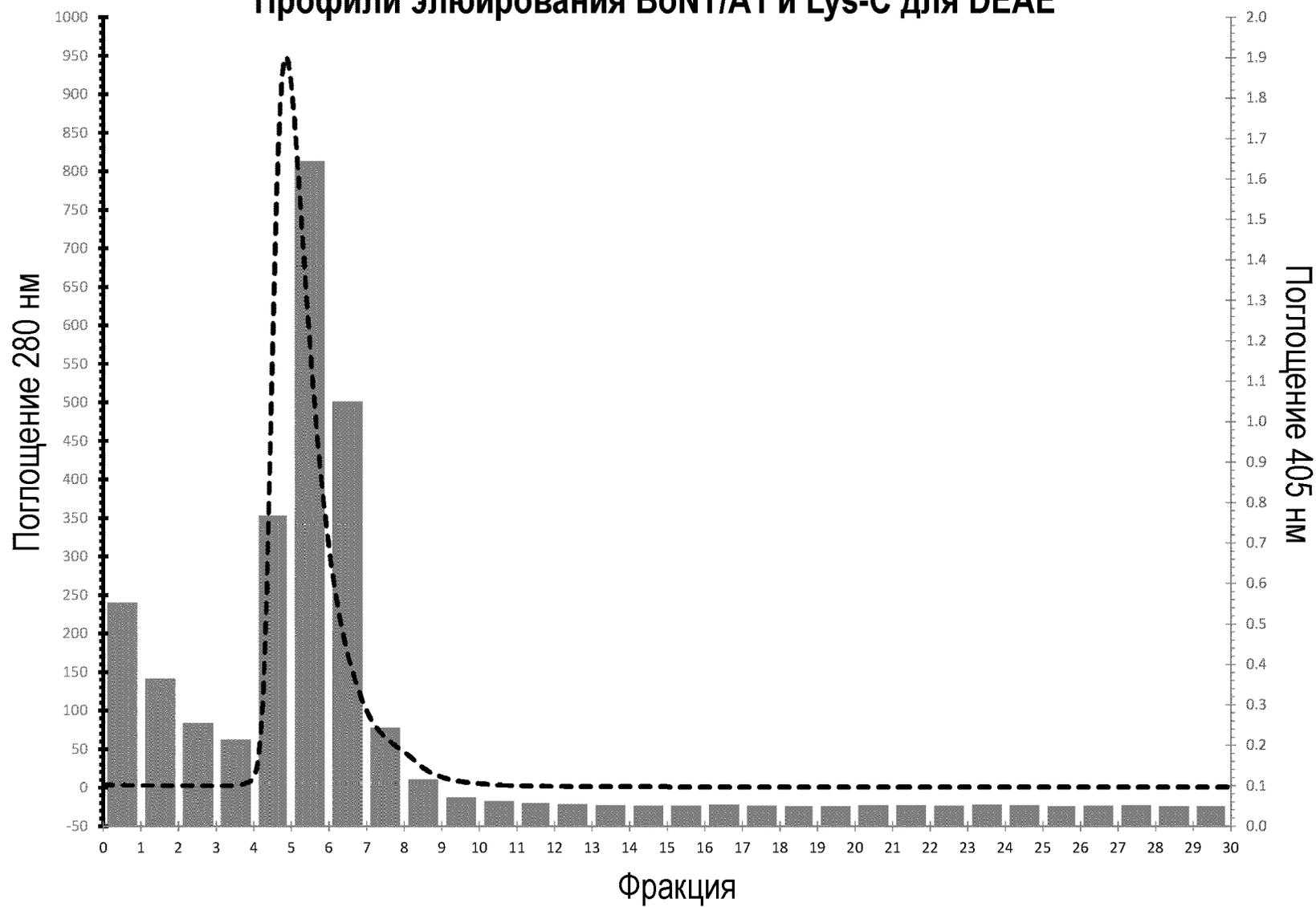


ФИГ. 9

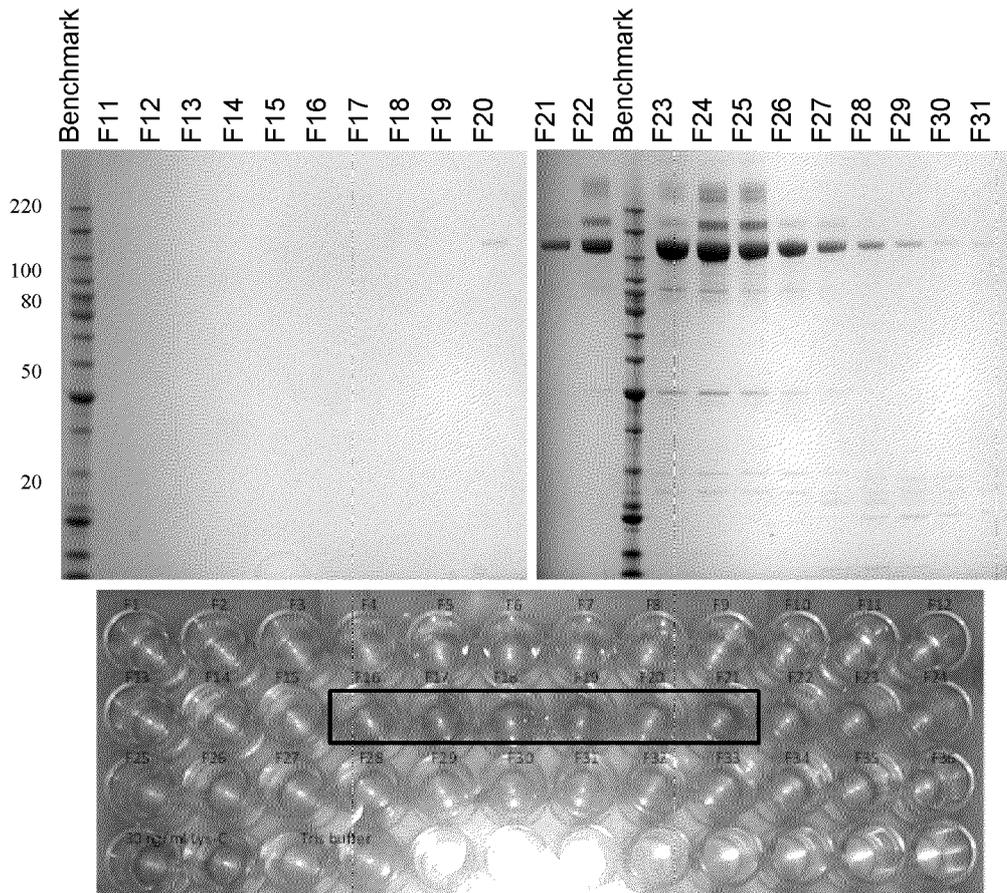


ФИГ. 10

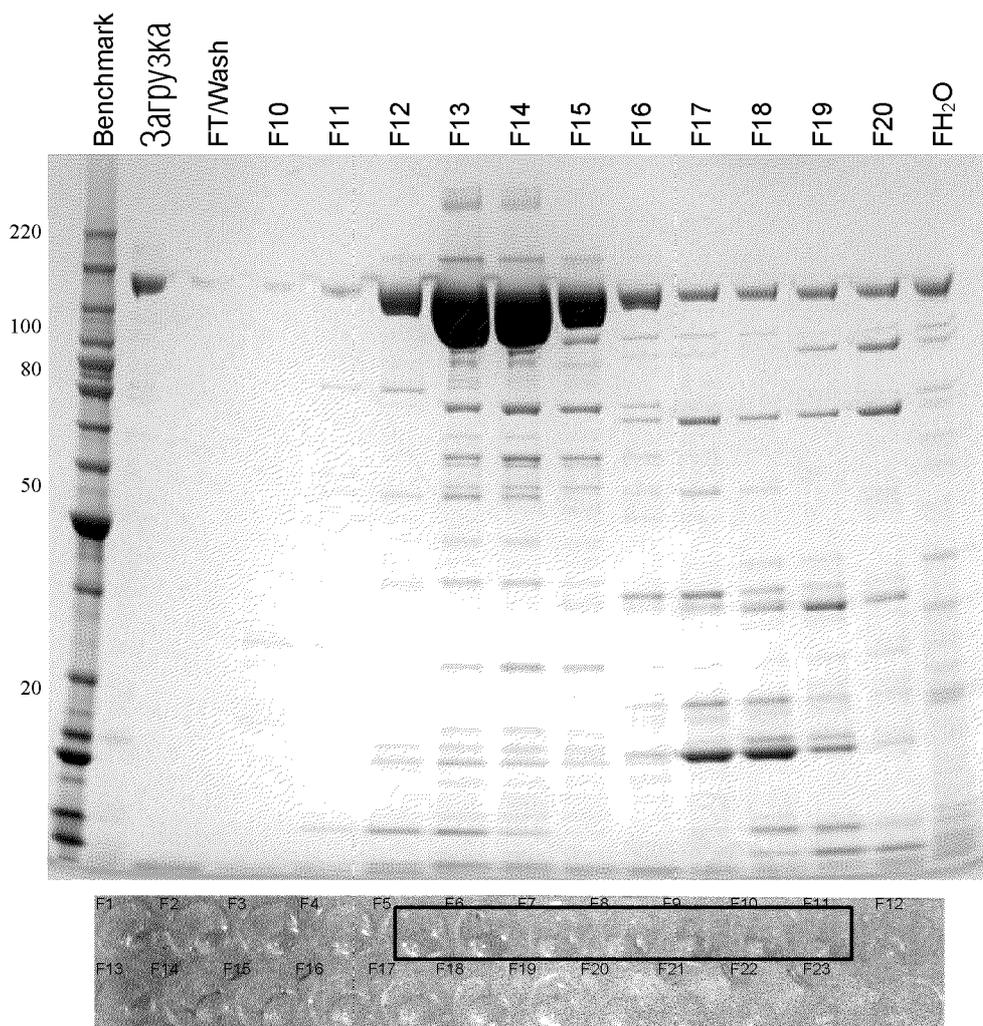
Профили элюирования VoNT/A1 и Lys-C для DEAE



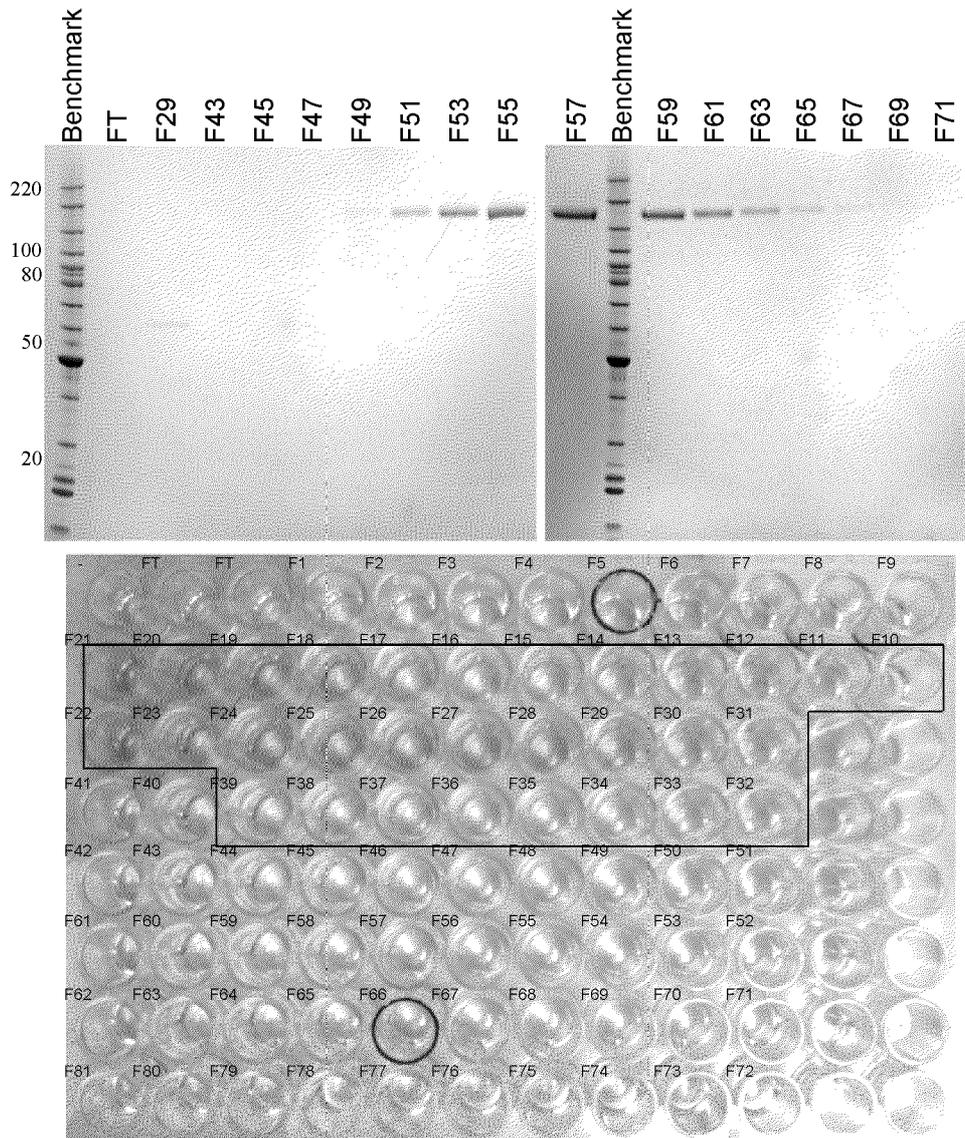
ΦΙΓ. 11



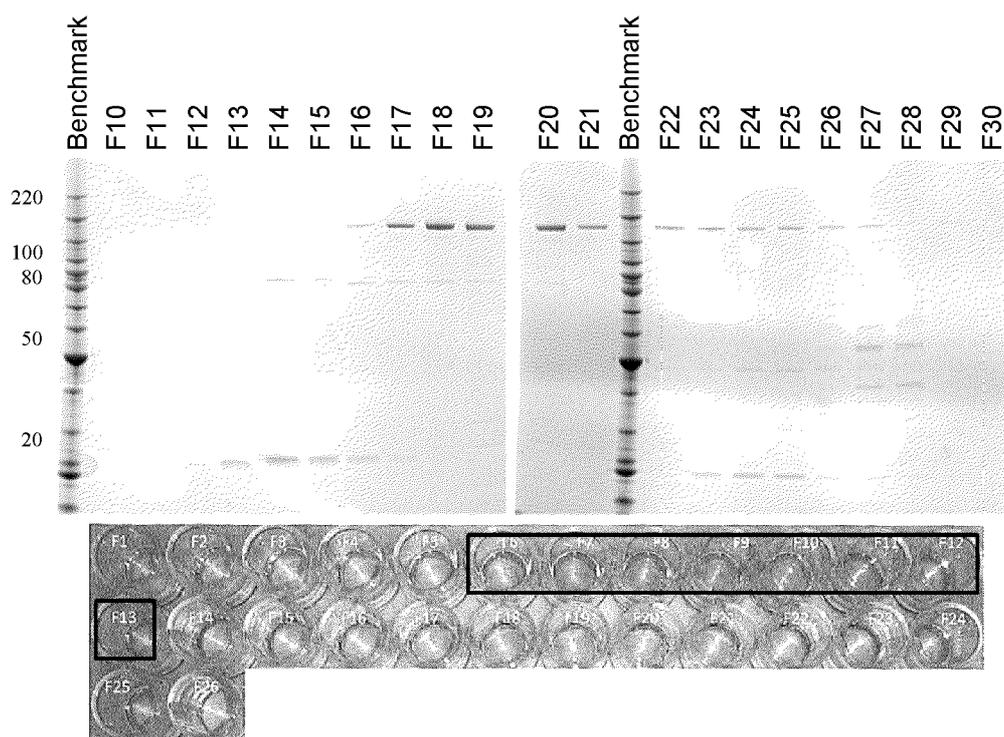
ФИГ. 12



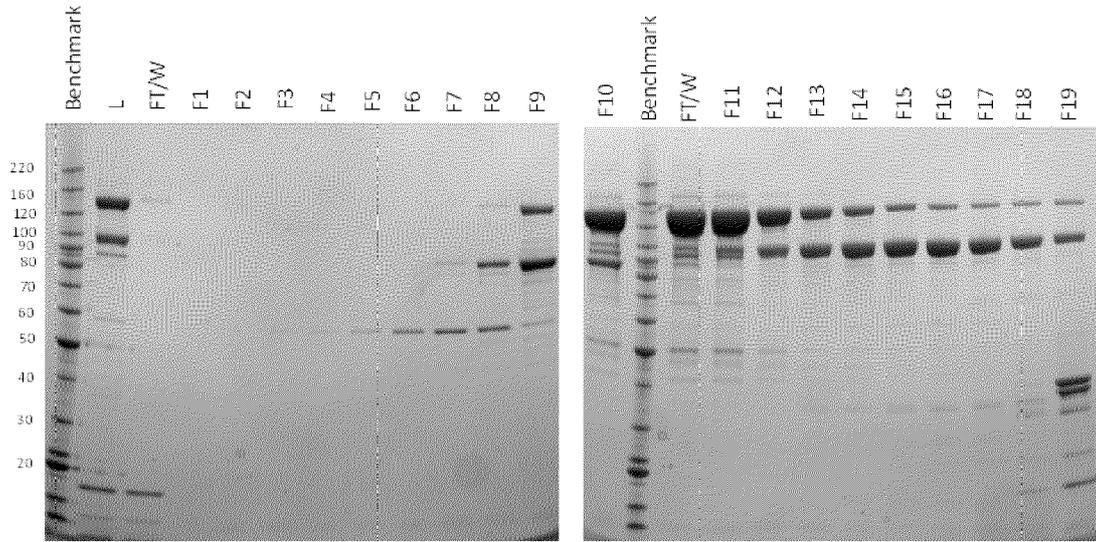
ФИГ. 13



ФИГ. 14



# ФИГ. 15



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:  
**202291497**

**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**  
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)  
A61K 9/00, 38/00, 38/16, A61P 21/00, 21/02, C12R 1/145, C12N 9/52

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)  
Espacenet, ЕАПАТИС, ЕРОQUE Net, Reaxys, Google

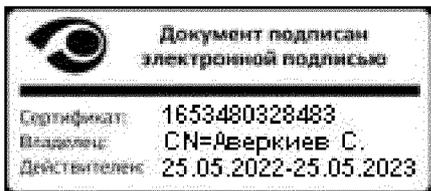
**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	EP 1322324 B1 (ALLERGAN, INC) 18.08.2010, параграфы [0001], [0011]-[0012], [0019]-[0021], [0029]-[0034], [0050]-[0062], примеры, формула	1-25
A	US 2009/0028906 A1 (MERZ PHARMA GMBH & CO. KGAA) 29.01.2009, параграфы [0001], [0014]-[0015], [0026], [0028], [0032]-[0038], формула	1-21
A	WO 2009/055351 A1 (ALLERGAN INC. et al.) 30.04.2009 формула	20-25
A	AKAIKE Norio et al. Transsynaptic inhibition of spinal transmission by A2 botulinum toxin. J Physiol 591.4, 2013, pp 1031-1043, реферат	1-25
A, P	WO 2014/080206 A1 (SYNTAXIN LIMITED) 30.05.2014 примеры, формула	1-25

последующие документы указаны в продолжении

<p>* Особые категории ссылочных документов: «А» - документ, определяющий общий уровень техники «D» - документ, приведенный в евразийской заявке «Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее «О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д. "P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"</p>	<p>«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения «Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности «У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории «&amp;» - документ, являющийся патентом-аналогом «L» - документ, приведенный в других целях</p>
--	--

Дата проведения патентного поиска: 09 ноября 2022 (09.11.2022)

<p>Уполномоченное лицо: Начальник Управления экспертизы</p>	 <p>Документ подписан электронной подписью</p> <p>Сертификат: 1653480328483 Владелец: С.Н.Аверкиев С. Действителен: 25.05.2022-25.05.2023</p>	<p>С.Е. Аверкиев</p>
---	---	----------------------

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
**(дополнительный лист)**

Номер евразийской заявки:

**202291497**

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

A61K 38/16 (2006.01)  
A61P 21/02 (2006.01)  
A61K 9/00 (2006.01)  
C12R 1/145 (2006.01)  
C12N 9/52 (2006.01)