



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118837** (13) **C2**  
(51) МПК (2019.01)  
**A61K 38/48** (2006.01)  
**C07K 14/33** (2006.01)  
A61P 43/00

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2015 02159</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Коссінс Еймі (GB), Бірд Меттью (GB), Маркс Філіп (GB)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>31.10.2013</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.03.2019</b>	
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>1219602.8</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ІПСЕН БІОІННОВЕЙШН ЛІМІТЕД,</b> Units 4-10 The Quadrant, Barton Lane, Abingdon, Oxfordshire OX14 3YS, United Kingdom (GB), <b>ІПСЕН БІОФАРМ ЛІМІТЕД,</b> 190 Bath Road, Slough Berkshire SL1 3XE, United Kingdom (GB)
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>31.10.2012</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>GB</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Михайлюк Ганна Валентинівна, реєстр. №184</b>
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>25.06.2015, Бюл.№ 12</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2006011966 A1, 02.02.2006 WO 2009014854 A1, 29.01.2009 Gilmore M A et al: "Fully active recombinant Bont/E purified from E. coli in high yield", Toxicon, Elmsford, NY, US, vol. 51, 01.06.2008, P. 11-12 Evelina Angov: "Codon usage: Nature's roadmap to expression and folding of proteins", Biotechnology journal, vol. 6, no. 6, 12.05.2011, P. 650-659 WO 2008008805 A2, 17.01.2008 A. Fischer ET AL: "Molecular Architecture of Botulinum Neurotoxin E Revealed by Single Particle Electron Microscopy", Journal of Biological Chemistry, vol. 283, no. 7, 15.02.2008, P. 3997-4003
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.03.2019, Бюл.№ 6</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>РСТ/GB2013/052845, 31.10.2013</b>	

**(54) РЕКОМБІНАНТНИЙ НЕЙРОТОКСИН CLOSTRIDIUM BOTULINUM****(57) Реферат:**

Винахід належить до способу одержання розчинного дволанцюгового білка BoNT/E1, причому зазначений спосіб включає забезпечення розчинного одноланцюгового білка BoNT/E1, що містить послідовність суміжних амінокислот, де зазначена послідовність суміжних амінокислот характеризується щонайменше 95 % ідентичністю послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 2, приведення зазначеного білка BoNT/E1 у контакт із трипсином у розчині та відділення розчинного білка BoNT/E1 від трипсину шляхом приведення розчину, що містить розчинний білок BoNT/E1 та трипсин, у контакт із гідрофобною поверхнею, де розчинний білок BoNT/E1 зв'язується з гідрофобною поверхнею Також винахід стосується

**UA 118837 C2**

активного дволанцюгового білка BoNT/E1 та його застосування в композиції, в тому числі й фармацевтичній композиції для терапевтичних цілей.

Дана патентна заявка заявляє пріоритет заявки GB 1219602.8, поданої 31 жовтня 2012 року, яка тим самим включена за посиланням у своїй повноті.

Даний винахід відноситься до послідовностей нуклеїнової кислоти, що кодують нейротоксини серотипу E (BoNT/E) *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*), та до способів одержання рекомбінантного BoNT/E. Даний винахід також відноситься до відповідних медичних застосувань рекомбінантного BoNT/E.

Ботулінічний нейротоксин продукується *C. botulinum* у вигляді великого білкового комплексу, що складається з самого BoNT у комплексі з рядом акцесорних білків. Наразі існують сім різних класів ботулінічного нейротоксину, а саме: серотипи A, B, C<sub>1</sub>, D, E, F та G ботулінічного нейротоксину, усі з яких мають подібні структури та способи дії. Різні серотипи BoNT можна розрізняти за інактивацією конкретними нейтралізуючими антисироватками, причому така класифікація за серотипом співвідноситься з відсотком ідентичності послідовності на амінокислотному рівні. Білки BoNT даного серотипу додатково ділять на різні підтипи на основі відсотка ідентичності амінокислотної послідовності.

BoNT є найбільш сильнодіючими токсинами з відомих, причому значення середньої летальної дози (LD50) для мишей знаходяться в діапазоні від 0,5 до 5 нг/кг залежно від серотипу. BoNT поглинаються у шлунково-кишковому тракті та після попадання у загальний кровоток зв'язуються із пресинаптичною мембраною холінергічних нервових закінчень та перешкоджають вивільненню з них нейромедіатора ацетилхоліну. BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F та BoNT/G розщеплюють синаптобrevін/везикуло-асоційований мембранний білок (VAMP); BoNT/C, BoNT/A та BoNT/E розщеплюють синаптосомально-асоційований білок розміром 25 кДа (SNAP-25); та BoNT/C розщеплює синтаксин.

У природі клостридіальні нейротоксини синтезуються у вигляді одноланцюгового поліпептиду, який піддається посттрансляційній модифікації за допомогою явища протеолітичного розщеплення з утворенням двох поліпептидних ланцюгів, з'єднаних разом дисульфідним зв'язком. Розщеплення відбувається у конкретному сайті розщеплення, який часто називають сайтом активації, який знаходиться між цистеїновими залишками, які забезпечують міжланцюговий дисульфідний зв'язок. Саме ця дволанцюгова форма є активною формою токсину. Два ланцюги називають важким ланцюгом (H-ланцюгом), який має молекулярну масу приблизно 100 кДа, і легким ланцюгом (L-ланцюгом), який має молекулярну масу приблизно 50 кДа. H-ланцюг містить C-кінцевий націлювальний компонент (домен H<sub>C</sub>) та N-кінцевий транслокаційний компонент (домен H<sub>N</sub>). Сайт розщеплення знаходиться між L-ланцюгом та транслокаційними компонентами. Після зв'язування домену H<sub>C</sub> з його нейроном-мішенню та інтерналізації зв'язаного токсину у клітину через ендосому домен H<sub>N</sub> переміщує L-ланцюг через ендосомальну мембрану та у цитозоль, та L-ланцюг забезпечує протеазну функцію (також відомий як нецитотоксична протеаза).

Нецитотоксичні протеази діють шляхом протеолітичного розщеплення внутрішньоклітинних транспортних білків, відомих як білки SNARE (наприклад, SNAP-25, VAMP або синтаксин), див. Gerald K (2002) "Cell and Molecular Biology" (4th edition) John Wiley & Sons, Inc. Аббревіатура SNARE походить від виразу розчинний рецептор приєднання NSF (Soluble NSF Attachment Receptor), де NSF означає фактор, чутливий до N-етилмалеїміду (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor). Білки SNARE є важливими для злиття внутрішньоклітинних везикул і, отже, для секреції молекул шляхом транспорту везикул із клітини. Протеазна функція являє собою цинк-залежну ендопептидазну активність та проявляє високу субстратну специфічність щодо білків SNARE. Відповідно, після доставки у потрібну клітину-мішень нецитотоксична протеаза здатна інгібувати клітинну секрецію із клітини-мішені. L-ланцюгові протеази клостридіальних нейротоксинів являють собою нецитотоксичні протеази, які розщеплюють білки SNARE.

Ботулінічні нейротоксини добре відомі своєю здатністю викликати периферичний параліч м'язів. Зазначені властивості як міорелаксанта привели до використання ботулінічних нейротоксинів (таких як BoNT/A) у ряді медичних та косметичних процедур, включаючи обробку глабеллярних зморшок або гіперкінетичних зморшок на обличчі, лікування головного болю, геміфаціального спазму, гіперактивності сечового міхура, гіпергідрозу, обробку носогубних зморшок, лікування шийної дистонії, блефароспазму та спастичності.

Традиційно, одержання BoNT здійснюють шляхом культивування бактерій *C. botulinum* з наступним виділенням та очищенням комплексу ботулінічного нейротоксину. Проте одержання BoNT таким чином є неефективним та забезпечує низькі виходи білка. Окрім того, *C. botulinum* є бактеріями, що утворюють спори, та, таким чином, вимагають спеціалізованого обладнання та установок для культивування, які не потрібні для такої культури бактерій, як *Escherichia coli* (*E. coli*). Зростаюче застосування BoNT привело, таким чином, до потреби у альтернативних та/або вдосконалених способах одержання та очищення BoNT.

У патентному документі US 20080103098 описується спосіб одержання рекомбінантних білків BoNT у дволанцюговій формі, що включає експресію конструкції рекомбінантної нуклеїнової кислоти у клітині-хазяїні *E. coli*. Проте зазначений спосіб вимагає введення конкретної ненативної (тобто неклостридіальної) пентапептидної послідовності у петльовий домен нейротоксину. Уведена пентапептидна послідовність утворює сайт активації розщеплення, який розщеплюється ендогенною протеазою *E. coli* при лізисі клітини. Спосіб з патентного документа US 20080103098, таким чином, повідомляє про те, що для досягнення оптимальної експресії BoNT послідовність BoNT має бути модифікована шляхом вставки ненативного сайту розщеплення.

У патентному документі US 7132259 описані молекули рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодують білки BoNT. Проте молекули нуклеїнової кислоти з патентного документа US 7132259 модифікують із заміною нативного сайту розщеплення ненативним сайтом розщеплення. Отже, спосіб з патентного документа US 7132259 також повідомляє, що введення ненативного сайту розщеплення необхідне для оптимальної експресії BoNT.

У патентному документі US 6495143 описуються молекули рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодують фрагменти важкого ланцюга ( $H_c$ ) BoNT, для застосування в індукції імунних реакцій (як наприклад, при вакцинації). Проте молекули нуклеїнової кислоти не кодують послідовності BoNT повної довжини. Експресія в *E. coli* та очищення окремих Н- та L-ланцюгів правцевого токсину та BoNT є досяжними; ці виділені ланцюги самі по собі є нетоксичними. Після окремого одержання цих пептидних ланцюгів та у суворо контрольованих умовах Н- та L-субодиниці можна об'єднати за допомогою утвореного завдяки окисненню дисульфідного містка з утворенням активних дволанцюгових форм. На жаль, ця стратегія має декілька недоліків. По-перше, експресія та виділення великих кількостей окремих ланцюгів не є можливим на практиці; зокрема, за відсутності Н-ланцюга виділений L-ланцюг є майже нерозчинним у водному розчині та дуже чутливий до протеолітичного руйнування. По-друге, окиснення *in vitro* окремо експресованих та очищених Н- та L-ланцюгів з одержанням активної дволанцюгової форми є вкрай неефективним та приводить до низьких виходів активного токсину та утворення великої кількості неактивних неправильно згорнутих або окиснених форм. Очищення токсину, що містить правильно згорнуті та окиснені Н- та L-ланцюг, є важким, як і його відокремлення від цих неактивних форм та окремих Н- та L-ланцюгів, які не прореагували. Отже, спосіб з патентного документа US 6495143 пов'язаний зі значними недоліками.

Таким чином, в даній галузі техніки існує потреба в удосконалених способах одержання рекомбінантних BoNT, зокрема, активованих дволанцюгових BoNT з рекомбінантних BoNT/E.

Даний винахід розв'язує одну або декілька з вищезазначених проблем, забезпечуючи послідовності нуклеїнової кислоти та способи, які визначені у формулі винаходу.

В одному аспекті даний винахід передбачає послідовність нуклеїнової кислоти, що містить послідовність суміжних нуклеотидів, де зазначена послідовність суміжних нуклеотидів характеризується щонайменше 80 % (наприклад, щонайменше 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 або 100 %) ідентичністю послідовності з послідовністю нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 1, та де зазначена послідовність суміжних нуклеотидів кодує одноланцюговий білок BoNT/E1.

Серотип BoNT/E ділять на вісім підтипів, від BoNT/E1 до BoNT/E8, які характеризуються щонайменше 90 % ідентичністю амінокислотної послідовності; білки BoNT/E в межах заданого підтипу характеризуються вищим відсотком ідентичності амінокислотної послідовності (наприклад, щонайменше 95 % або вищою). Як описано вище, послідовності нуклеїнової кислоти за даним винаходом кодують білок BoNT/E1. Прикладом білка BoNT/E1 є білок, який кодується амінокислотною послідовністю UPI000016EA7F з UniParc. Іншим прикладом білка BoNT/E1 є білок, який кодується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 2.

Послідовності нуклеїнової кислоти за даним винаходом було сконструйовано для того, щоб переважно забезпечувати високі рівні експресії у клітинах *E. coli*.

Ряд факторів впливає на рівні експресії даного білка. Одним таким фактором є швидкість, з якою транскрибується послідовність мРНК, що кодує цей білок. Цей фактор сам знаходиться під впливом того, які конкретні кодони мРНК використовуються для визначення кожної амінокислоти у білку. Деякі кодони транскрибуються швидше, ніж інші. Вибір кодону для кожної амінокислоти може змінюватись, оскільки кодони мРНК є виродженими за своєю природою. Усі декілька різних кодонів можуть визначати однакову амінокислоту; таким чином, декілька різних послідовностей мРНК можуть кодувати один і той самий білок. Різні кодони, які визначають одну й ту саму амінокислоту, називають синонімічними кодонами. Точна суміш синонімічних кодонів у конкретній мРНК впливає на швидкість трансляції кодованого білка.

Існує ряд різних причин, які обумовлюють те, що деякі кодони транслюються швидше, ніж інші. Кожний кодон визначає амінокислоту шляхом залучення молекули тРНК, прикріпленої до даної амінокислоти. На швидкість трансляції впливає відносно поширення різноманітних молекул різних тРНК, афінність, з якою кожна конкретна молекула тРНК зв'язується з кодоном, що її залучає, а також інші фактори, як наприклад, якою мірою пара кодон-молекула тРНК взаємодіє з іншими елементами механізму трансляції. Приблизні швидкості трансляції кодону можна оцінити за допомогою визначення частоти, з якою різні кодони виявляються у генах з високим рівнем експресії. Проте не всі кодони, що часто зустрічаються, приводять у результаті до оптимальної експресії.

Не вдаючись до будь-якої конкретної теорії, автори даного винаходу вважають, що оптимальна експресія послідовностей нуклеїнової кислоти BoNT/E1 досягається шляхом зниження частоти (тобто числа випадків появи у послідовності) певних кодонів, які нижче у даному документі вважають "повільними кодонами" та які наведені нижче. У зв'язку з цим автори даного винаходу вважають, що зазначені повільні кодони пов'язані зі зниженими швидкостями трансляції.

Амінокислота	Повільний кодон (РНК)	Повільний кодон (еквівалент у ДНК)
Фенілаланін	UUU	TTT
Тирозин	UAU	TAT
Цистеїн	UGU	TGT
Гістидин	CAU	CAT
Глутамін	CAA	CAA
Пролін	CCA та/або CCG	CCA та/або CCG
Серин	UCA та/або UCG	TCA та/або TCG
Аргінін	CGG	CGG
Лейцин	UUA та/або CUA	TTA та/або CTA

Автори даного винаходу використали спосіб раціонального конструювання послідовності для одержання послідовностей нуклеїнової кислоти за даним винаходом. Один шлях, за допомогою якого послідовності нуклеїнової кислоти за даним винаходом забезпечують високі рівні експресії кодованих білків BoNT/E1, полягає в тому, що вони характеризуються оптимізованим числом повільних кодонів (наприклад, зниженням частоти, з якою повільні кодони з'являються у послідовності).

В одному варіанті здійснення послідовність нуклеїнової кислоти містить максимум 160 повільних кодонів (наприклад, максимум 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88 або 87 повільних кодонів).

Отже, в одному варіанті здійснення послідовність нуклеїнової кислоти містить від 0 до 160 повільних кодонів (наприклад, 0-160, 0-150, 0-140, 0-130, 0-120, 0-110, 0-100, 0-90, 0-95, 0-94, 0-93, 0-92, 0-91, 0-90, 0-89, 0-88 або 0-87 повільних кодонів).

В одному варіанті здійснення послідовність нуклеїнової кислоти містить 60-160 повільних кодонів (наприклад, 60-160, 60-150, 60-140, 70-150, 70-140, 70-130, 70-120, 70-110, 70-100, 70-90, 80-130, 80-120, 80-110, 80-100 або 80-90 повільних кодонів).

В одному варіанті здійснення, необов'язково у комбінації з будь-яким одним або декількома з вищенаведених варіантів здійснення, у перших 50 % послідовності нуклеїнової кислоти присутня менша кількість повільних кодонів, ніж у других 50 % послідовності нуклеїнової кислоти. Перші 50 % послідовності нуклеїнової кислоти визначені відносно положення нуклеотиду номер 1 як відправної точки та, таким чином, містять сайт ініціації трансляції; другі 50 % послідовності нуклеїнової кислоти містять сайт термінації трансляції. У якості прикладу, що стосується SEQ ID NO: 1 (яка має загальну довжину 3759 нуклеотидів), перша половина зазначеної послідовності може бути представлена положеннями нуклеотидів 1-1881 (що включають 627 нуклеотидних триплетів), та друга половина зазначеної послідовності може бути представлена положеннями 1882-3759 (що включають 626 нуклеотидних триплетів); в якості альтернативи, перша половина зазначеної послідовності може бути представлена положеннями нуклеотидів 1-1878 (що включають 626 нуклеотидних триплетів), та друга половина зазначеної послідовності може бути представлена положеннями 1879-3759 (що включає 627 нуклеотидних триплетів).

В одному варіанті здійснення, необов'язково у комбінації з будь-яким одним або декількома з вищенаведених варіантів здійснення, послідовність нуклеїнової кислоти (яка описана вище) містить максимум 30 (наприклад, 30, 25, 20, 15 або 10) фенілаланінових повільних кодонів



пролінових повільних кодонів), послідовність нуклеїнової кислоти (яка описана вище) містить максимум 2 цистеїнові повільні кодони (РНК=UGU; ДНК=TGT).

В одному варіанті здійснення, необов'язково у комбінації з будь-яким одним або декількома з вищенаведених варіантів здійснення (включаючи раніше описані варіанти здійснення, що стосуються фенілаланінових, тирозинових, лейцинових, глутамінових, серинових, пролінових та/або цистеїнових повільних кодонів), послідовність нуклеїнової кислоти (яка описана вище) містить максимум 5 (наприклад, 5 або 4) гістидинових повільних кодонів (РНК=CAU; ДНК=CAT). В одному варіанті здійснення, необов'язково у комбінації з будь-яким одним або декількома з вищенаведених варіантів здійснення (включаючи раніше описані варіанти здійснення, що стосуються фенілаланінових, тирозинових, лейцинових, глутамінових, серинових, пролінових та/або цистеїнових повільних кодонів), послідовність нуклеїнової кислоти (яка описана вище) містить максимум 4 гістидинові повільні кодони (РНК=CAU; ДНК=CAT).

В одному варіанті здійснення, необов'язково у комбінації з будь-яким одним або декількома з вищенаведених варіантів здійснення (включаючи раніше описані варіанти здійснення, що стосуються фенілаланінових, тирозинових, лейцинових, глутамінових, серинових, пролінових, цистеїнових та/або гістидинових повільних кодонів), послідовність нуклеїнової кислоти (яка описана вище) містить від 5 до 10 (наприклад, 5, 6, 7, 8, 9 або 10) аргінінових повільних кодонів (РНК=CGG; ДНК=CGG). В одному варіанті здійснення, необов'язково у комбінації з будь-яким одним або декількома з вищенаведених варіантів здійснення (включаючи раніше описані варіанти здійснення, що стосуються фенілаланінових, тирозинових, лейцинових, глутамінових, серинових, пролінових, цистеїнових та/або гістидинових повільних кодонів), послідовність нуклеїнової кислоти (яка описана вище) містить 10 аргінінових повільних кодонів (РНК=CGG; ДНК=CGG).

В одному варіанті здійснення, необов'язково у комбінації з будь-яким одним або декількома з вищенаведених варіантів здійснення, послідовність нуклеїнової кислоти (яка описана вище) містить максимум 30 (наприклад, 30, 25, 20, 15 або 10; переважно 10) фенілаланінових повільних кодонів (РНК=UUU; ДНК=TTT) та максимум 30 (наприклад, 30, 25, 20, 19 або 18; переважно 18) тирозинових повільних кодонів (РНК=UAU; ДНК=TAT).

В одному варіанті здійснення, необов'язково у комбінації з будь-яким одним або декількома з вищенаведених варіантів здійснення, послідовність нуклеїнової кислоти (яка описана вище) містить максимум 30 (наприклад, 30, 25, 20, 15 або 10; переважно 10) фенілаланінових повільних кодонів (РНК=UUU; ДНК=TTT), максимум 30 (наприклад, 30, 25, 20, 19 або 18; переважно 18) тирозинових повільних кодонів (РНК=UAU; ДНК=TAT) та максимум 19 (наприклад, 19, 18, 17, 16, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6 або 5; переважно 5) лейцинових повільних кодонів (РНК=UUA та/або CUA; ДНК=TTA та/або CTA).

В одному варіанті здійснення, необов'язково у комбінації з будь-яким одним або декількома з вищенаведених варіантів здійснення, послідовність нуклеїнової кислоти (яка описана вище) містить максимум 30 (наприклад, 30, 25, 20, 15 або 10; переважно 10) фенілаланінових повільних кодонів (РНК=UUU; ДНК=TTT), максимум 30 (наприклад, 30, 25, 20, 19 або 18; переважно 18) тирозинових повільних кодонів (РНК=UAU; ДНК=TAT), максимум 19 (наприклад, 19, 18, 17, 16, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6 або 5; переважно 5) лейцинових повільних кодонів (РНК=UUA та/або CUA; ДНК=TTA та/або CTA) та максимум 14 (наприклад, 14, 12, 10, 8, 6, 5, 4 або 3; переважно 3) глутамінових повільних кодонів (РНК=CAA; ДНК=CAA).

В одному варіанті здійснення, необов'язково у комбінації з будь-яким одним або декількома з вищенаведених варіантів здійснення, послідовність нуклеїнової кислоти (яка описана вище) містить:

- максимум 10 фенілаланінових повільних кодонів;
- максимум 18 тирозинових повільних кодонів;
- максимум 2 цистеїнові повільні кодони;
- максимум 4 гістидинові повільні кодони;
- максимум 3 глутамінові повільні кодони;
- максимум 19 пролінових повільних кодонів;
- максимум 16 серинових повільних кодонів та
- максимум 5 лейцинових повільних кодонів.

В одному варіанті здійснення, необов'язково у комбінації з будь-яким одним або декількома з вищенаведених варіантів здійснення, послідовність нуклеїнової кислоти (яка описана вище) містить:

- максимум 10 фенілаланінових повільних кодонів;
- максимум 18 тирозинових повільних кодонів;
- максимум 2 цистеїнові повільні кодони;

максимум 4 гістидинові повільні кодони;  
 максимум 3 глутамінові повільні кодони;  
 максимум 19 пролінових повільних кодонів;  
 максимум 16 серинових повільних кодонів;

5 максимум 5 лейцинових повільних кодонів та  
 максимум 10 аргінінових повільних кодонів.

В одному варіанті здійснення, де послідовність нуклеїнової кислоти являє собою послідовність нуклеїнової кислоти, яка описана вище, зазначений одноланцюговий білок BoNT/E1 містить послідовність суміжних амінокислот, та де зазначена послідовність суміжних амінокислот характеризується щонайменше 95 % (наприклад, щонайменше 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 або 100 %) ідентичністю послідовності з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO: 2.

15 В одному варіанті здійснення, де послідовність нуклеїнової кислоти являє собою послідовність нуклеїнової кислоти, яка описана вище, зазначений одноланцюговий білок BoNT/E1 містить нативний сайт активації, який представлений амінокислотою послідовністю, вибраною з KGIRK, VKGIRKS, SVKGIKRSI, VSVKGIKRSI, IVSVKGIKRSI, NIVSVKGIKRSI, KNIVSVKGIKRSI, CKNIVSVKGIKRSI, KNIVSVKGIKRSIC та CKNIVSVKGIKRSIC.

20 В одному варіанті здійснення послідовність нуклеїнової кислоти являє собою послідовність нуклеїнової кислоти, яка описана вище, за умови, що одноланцюговий BoNT/E1, який описаний вище, або послідовність суміжних амінокислот, яка описана вище, містить одну або декілька (наприклад, одну або декілька, дві або більше, три або більше, чотири або більше, п'ять або більше, шість або більше, сім або більше або вісім) з наступних амінокислот (де нумерація амінокислотних положень починається з N-кінцевого амінокислотного залишку та закінчується C-кінцевим амінокислотним залишком у білку BoNT/E1):

25 гліцин у положенні 177; серин у положенні 198; аланін у положенні 340; лейцин у положенні 773; лейцин у положенні 963; глутамін у положенні 964; аланін у положенні 967; аспарагін у положенні 1195.

30 В одному варіанті здійснення зазначені одна або декілька амінокислот містять (або включають) гліцин у положенні 177; серин у положенні 198; аланін у положенні 340; лейцин у положенні 773; лейцин у положенні 963; глутамін у положенні 964; аланін у положенні 967 та аспарагін у положенні 1195.

35 В одному варіанті здійснення зазначені одна або декілька амінокислот містять (або включають) гліцин у положенні 177; аланін у положенні 340; лейцин у положенні 773; лейцин у положенні 963; глутамін у положенні 964; аланін у положенні 967 та аспарагін у положенні 1195.

40 В одному варіанті здійснення зазначені одна або декілька амінокислот містять (або включають) гліцин у положенні 177 та один або декілька (наприклад, один або декілька, два або більше, три або більше, чотири або більше, п'ять або більше, шість або більше або сім) з серину у положенні 198; аланіну у положенні 340; лейцину у положенні 773; лейцину у положенні 963; глутаміну у положенні 964; аланіну у положенні 967; аспарагіну у положенні 1195.

45 В одному варіанті здійснення зазначені одна або декілька амінокислот містять (або включають) серин у положенні 198 та один або декілька (наприклад, один або декілька, два або більше, три або більше, чотири або більше, п'ять або більше, шість або більше або сім) з гліцину у положенні 177; аланіну у положенні 340; лейцину у положенні 773; лейцину у положенні 963; глутаміну у положенні 964; аланіну у положенні 967 та аспарагіну у положенні 1195.

50 В одному варіанті здійснення зазначені одна або декілька амінокислот містять (або включають) аланін у положенні 340 та один або декілька (наприклад, один або декілька, два або більше, три або більше, чотири або більше, п'ять або більше, шість або більше або сім) з гліцину у положенні 177; серину у положенні 198; лейцину у положенні 773; лейцину у положенні 963; глутаміну у положенні 964; аланіну у положенні 967; аспарагіну у положенні 1195.

55 В одному варіанті здійснення зазначені одна або декілька амінокислот містять (або включають) лейцин у положенні 773 та один або декілька (наприклад, один або декілька, два або більше, три або більше, чотири або більше, п'ять або більше, шість або більше або сім) з гліцину у положенні 177; серину у положенні 198; аланіну у положенні 340; лейцину у положенні 963; глутаміну у положенні 964; аланіну у положенні 967; аспарагіну у положенні 1195.

60 В одному варіанті здійснення зазначені одна або декілька амінокислот містять (або включають) лейцин у положенні 963 та один або декілька (наприклад, один або декілька, два або більше, три або більше, чотири або більше, п'ять або більше, шість або більше або сім) з



гліцину у положенні 177; серину у положенні 198; аланіну у положенні 340; лейцину у положенні 773; глутаміну у положенні 964; аланіну у положенні 967; аспарагіну у положенні 1195.

В одному варіанті здійснення зазначені одна або декілька амінокислот містять (або включають) глутамін у положенні 964 та один або декілька (наприклад, один або декілька, два або більше, три або більше, чотири або більше, п'ять або більше, шість або більше або сім) з гліцину у положенні 177; серину у положенні 198; аланіну у положенні 340; лейцину у положенні 773; лейцину у положенні 963; аланіну у положенні 967; аспарагіну у положенні 1195.

В одному варіанті здійснення зазначені одна або декілька амінокислот містять (або включають) аланін у положенні 967 та один або декілька (наприклад, один або декілька, два або більше, три або більше, чотири або більше, п'ять або більше, шість або більше або сім) з гліцину у положенні 177; серину у положенні 198; аланіну у положенні 340; лейцину у положенні 773; лейцину у положенні 963; глутаміну у положенні 964; аспарагіну у положенні 1195.

В одному варіанті здійснення зазначені одна або декілька амінокислот містять (або включають) аспарагін у положенні 1195 та один або декілька (наприклад, один або декілька, два або більше, три або більше, чотири або більше, п'ять або більше, шість або більше або сім) з гліцину у положенні 177; серину у положенні 198; аланіну у положенні 340; лейцину у положенні 773; лейцину у положенні 963; глутаміну у положенні 964; аланіну у положенні 967.

В одному варіанті здійснення присутність зазначених однієї або декількох амінокислот, які описані вище, забезпечує BoNT/E1, що характеризується покращеною розчинністю порівняно із білком BoNT/E1, що не містить зазначених амінокислот. Зазначена покращена розчинність підвищує вихід білка у гетерологічній (*E. coli*) системі експресії.

В одному варіанті здійснення, де послідовність нуклеїнової кислоти являє собою послідовність нуклеїнової кислоти, яка описана вище, послідовність суміжних нуклеотидів характеризується щонайменше 770 (наприклад, щонайменше 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870 або 880) синонімічними кодонами порівняно з послідовністю нуклеїнової кислоти BoNT/E1 дикого типу (SEQ ID NO: 3). Отже, в одному варіанті здійснення послідовність нуклеїнової кислоти містить щонайменше 770 кодонів, які відрізняються від відповідного кодону у послідовності нуклеїнової кислоти BoNT/E1 дикого типу (SEQ ID NO: 3), але кодують таку саму амінокислоту, що й він.

В одному варіанті здійснення послідовність нуклеїнової кислоти (яка описана вище) характеризується вмістом G-C щонайменше 41 % (наприклад, щонайменше 41 або 42 %). В одному варіанті здійснення послідовність нуклеїнової кислоти (яка описана вище) характеризується вмістом G-C 42 %. Поняття вмісту G-C у нуклеїновій кислоті (також відоме як вміст GC або вміст G+C) відноситься до співвідношення нуклеотидів у заданій послідовності нуклеїнової кислоти, які являють собою або G (гуанін), або C (цитозин). Отже, в одному варіанті здійснення вміст G-C у послідовності нуклеїнової кислоти за даним винаходом є змінним (наприклад, шляхом заміни на синонімічні кодони) для того, щоб краще відповідати вмісту G-C у нуклеїнових кислотах, що переважно експресуються у клітинах-хазяїнах *E. coli*, тим самим покращуючи експресію послідовності та забезпечуючи підвищені виходи білка.

В одному аспекті даний винахід передбачає вектор експресії, що кодує послідовність нуклеїнової кислоти, яка описана вище. В одному варіанті здійснення вектор експресії являє собою вектор pET-26b(+).

В одному аспекті даний винахід передбачає клітину-хазяїна, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка описана вище, або вектор експресії, який описаний вище. В одному варіанті здійснення клітина-хазяїн являє собою клітину *E. coli*. В одному варіанті здійснення клітина-хазяїн *E. coli* являє собою клітину *E. coli* BLR (DE3).

В одному аспекті даний винахід передбачає спосіб одержання розчинного одноланцюгового білка BoNT/E1 у клітині-хазяїні *E. coli*, причому зазначений спосіб включає експресію послідовності нуклеїнової кислоти (яка описана вище) у системі експресії *E. coli*.

Способи та методики, які застосовують для експресії гетерологічних білків у системах експресії *E. coli* (*Escherichia coli*) є добре відомими у рівні техніки.

В одному варіанті здійснення зазначений розчинний одноланцюговий білок BoNT/E1 експресується у цитоплазмі зазначеної клітини-хазяїна *E. coli*.

В одному варіанті здійснення зазначений розчинний одноланцюговий білок BoNT/E1 експресується на рівні щонайменше 3 мг/л (наприклад, щонайменше 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 або 50 мг/л).

В одному варіанті здійснення спосіб одержання розчинного одноланцюгового білка BoNT/E1, який описаний вище, включає лізис клітини-хазяїна *E. coli* з забезпеченням гомогенату клітини-хазяїна *E. coli*, що містить зазначений розчинний одноланцюговий білок BoNT/E1. Способи та методики, які застосовують для лізису клітин-хазяїнів, таких як клітини-хазяїни *E. coli*, є

відомими у рівні техніки. Приклади включають обробку ультразвуком та застосування французького преса.

В одному аспекті даний винахід передбачає спосіб одержання розчинного дволанцюгового білка BoNT/E1, причому зазначений спосіб включає забезпечення розчинного одностанцювого білка BoNT/E1, що містить послідовність суміжних амінокислот, та де зазначена послідовність суміжних амінокислот характеризується щонайменше 95 % (наприклад, щонайменше 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 або 100 %) ідентичністю послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 2, та приведення зазначеного білка BoNT/E1 у контакт із трипсином у розчині.

Коли одностанцюговий білок BoNT/E1 за даним винаходом приводять у контакт із трипсином, протеолітична дія трипсину розщеплює одностанцюговий білок у сайті між L-ланцюговим протеазним компонентом та транслокаційним компонентом з одержанням дволанцюгового білка, в якому два ланцюги зв'язані дисульфідним містком (детальніше, два ланцюги, утворені після розщеплення одностанцюгового BoNT/E1 в сайті активації, являють собою перший ланцюг з амінокислотними залишками 1-419 та другий ланцюг з амінокислотними залишками 423-1252, причому залишки 420, 421 та 422 видаляються у процесі розщеплення). Отже, трипсин можна застосовувати для активації одностанцюгового поліпептиду шляхом його перетворення на активну дволанцюгову форму. Таким чином, переважно застосування трипсину означає, що конструювання екзогенного (ненативного) сайту розщеплення у BoNT/E1 за даним винаходом не є необхідним.

В одному варіанті здійснення посилання на трипсин охоплює трипсиноподібні ферменти, які розщеплюють у тому ж сайті розщеплення протеазою, що й трипсин.

Трипсин розщеплює послідовності білків, у яких конкретні амінокислоти знаходяться у певних положеннях на будь-якому боці від розщепленого пептидного зв'язку. Такі послідовності можуть бути представлені списком P4-P3-P2-P1-розщеплений зв'язок-P'1-P'2-P'3-P'4; у якому P1-P4 позначають амінокислоти, розташовані у положеннях 1-4 відносно розщепленого пептидного зв'язку у бік N-кінця, відповідно, та P'1-P'4 позначають положення 1-4 відносно розщепленого пептидного зв'язку у бік C-кінця.

Найбільш важливо, трипсин розщеплює послідовності білків, у яких або амінокислоти Arg, або Lys займають положення P1. Коли Lys знаходиться у положенні P1, існують три головні типи послідовності, не чутливі до трипсину:

(1) Pro у положенні P'1 звичайно зменшує чутливість до розщеплення трипсином (але не у випадку, коли Trp знаходиться у положенні P2);

(2) або Cys, або Asp у положенні P2 разом із Asp у положенні P'1 зменшує чутливість до розщеплення трипсином;

(3) Cys у положенні P2 разом з одним із His або Trp у положенні P'1 знижує чутливість до розщеплення трипсином.

Коли Arg знаходиться у положенні P1, існують три основні типи послідовності, які не є чутливими до трипсину:

(1) Pro у положенні P'1 звичайно зменшує чутливість до розщеплення трипсином (але не у випадку, коли або Met, або можливо Glu знаходиться у положенні P2);

(2) Cys у положенні P2 разом із Lys у положенні P'1 зменшує чутливість до розщеплення трипсином;

(3) Arg у положенні P2 разом з одним із His або Arg у положенні P'1 зменшує чутливість до розщеплення трипсином.

В одному варіанті здійснення даний винахід передбачає спосіб (який описаний вище) одержання розчинного дволанцюгового білка BoNT/E1 за умови, що зазначена послідовність суміжних амінокислот містить одну або декілька (наприклад, одну або декілька, дві або більше, три або більше, чотири або більше, п'ять або більше, шість або більше або сім) із наступних амінокислот (де нумерація амінокислотних положень починається з N-кінцевого амінокислотного залишку та закінчується C-кінцевим амінокислотним залишком у білку BoNT/E1): гліцину у положенні 177; серину у положенні 198; аланіну у положенні 340; лейцину у положенні 773; лейцину у положенні 963; глутаміну у положенні 964; аланіну у положенні 967; аспарагіну у положенні 1195.

В одному варіанті здійснення присутність зазначених однієї або декількох амінокислот, які описані вище (та з урахуванням багатьох перестановок зазначених однієї або декількох амінокислот, які описані вище), забезпечує білок BoNT/E1, що характеризується покращеною розчинністю порівняно із білком BoNT/E1, що не містить зазначених амінокислот. Зазначена покращена розчинність може підвищувати вихід білка у гетерологічній системі експресії.

В одному варіанті здійснення, у якому даний винахід передбачає спосіб (який описаний вище) одержання розчинного дволанцюгового білка BoNT/E1, розчинний одностанцюговий білок BoNT/E1 забезпечують за допомогою описаного вище способу одержання розчинного одностанцюгового білка BoNT/E1 у клітині-хазяїні *E. coli*.

5 В одному варіанті здійснення, у якому даний винахід передбачає спосіб (який описаний вище) одержання розчинного дволанцюгового білка BoNT/E1, причому спосіб включає відділення розчинного білка BoNT/E1 від трипсину шляхом приведення розчину, що містить розчинний білок BoNT/E1 та трипсин, у контакт із гідрофобною поверхнею, де розчинний білок BoNT/E1 переважно зв'язується з гідрофобною поверхнею.

10 Автори даного винаходу виявили, що високі виходи активованого дволанцюгового білка BoNT/E1 можна одержати при застосуванні способу гідрофобного очищення для відділення активованого дволанцюгового поліпептиду від трипсину. Несподівано, даний спосіб забезпечує краще очищення, ніж стандартне очищення із застосуванням іонообмінної хроматографії, яка, як виявили автори даного винаходу, є неефективною для відділення активованого  
15 дволанцюгового поліпептиду від трипсину. Окрім того, спосіб переважно забезпечує активований дволанцюговий білок BoNT/E1, який не містить активаційну протеазу як частину способу загального очищення.

Одержання активного рекомбінантного BoNT/E1 вимагає стадії протеолізу, на якій молекула розщеплюється з утворенням активної дволанцюгової форми. Цього розщеплення можна досягти  
20 за допомогою стадії активації *in vitro* із застосуванням протеази, трипсину. Після стадії активації важливим є видалення протеази з кінцевого продукту, що також попереджає будь-яке подальше неспецифічне розщеплення BoNT/E1.

Ізоелектричні точки (pI) трипсину та BoNT/E1 становлять 9,32 та 6,2, відповідно, що вказує на те, що розділення цих двох білків буде досягатися за допомогою іонообмінної (ІЕХ)  
25 хроматографії, яка використовує різницю у заряді між двома молекулами. На сумарний заряд білка впливає рН його навколишнього середовища, та заряд буде ставати більш позитивним або негативним залежно від того, чи одержує або втрачає протони білок. pI являє собою значення рН, при якому молекула не несе електричного заряду та, отже, не буде взаємодіяти з зарядженим ІЕХ середовищем. Це означає, що якщо білок знаходиться при рН, що перевищує  
30 його pI, то він буде нести сумарний негативний заряд та буде зв'язуватися з позитивно зарядженим середовищем, таким як аніонообмінна смола. Аналогічно, якщо рН буфера є нижчим pI, то білок буде нести сумарний позитивний заряд та не буде зв'язуватися з аніонообмінною смолою.

Виходячи з цього принципу, при рН 8 можна очікувати, що BoNT/E (pI якого становить 6,2)  
35 буде зв'язуватися з аніонообмінною колонкою, у той час як трипсин з pI 9,32 не буде, що забезпечує можливість розділення двох білків. ІЕХ є простим та недорогим способом хроматографії, оскільки він не вимагає, щоб білок, який завантажують на колонку, знаходився у буфері з високим вмістом солі, що може приводити до втрат білка внаслідок осадження.

Автори даного винаходу випробували ряд аніонообмінних колонок із застосуванням як  
40 сильних, так і слабких функціональних груп, прикріплених до бусин на основі зшитого агарози, при рН 8. У кожному випадку виявляли, що велика частка трипсину не зв'язувалася з колонкою, як передбачалося, а була присутня в елюаті. Проте, коли колонки елюювали при лінійному градієнті зі зростанням іонної сили, трипсин елюювався з колонки, що вказувало на те, що частина трипсину була здатна до зв'язування з колонками. При порівнянні з елюванням  
45 BoNT/E1 було неочікувано виявлено, що трипсин елюється при подібній іонній силі (таблиця 1; фігура 1), що вказує на те, що трипсин не відділявся, як передбачалося, та був присутній у кінцевому очищеному продукті BoNT/E1 з додатковою можливістю подальшого руйнування BoNT/E1.

Таблиця 1

Елюйовані фракції з аніонообмінних колонок,  
на яких оцінювали відділення трипсину від BoNT/E1. Піки виражені у кількості  
об'ємів колонки (CV). F/T: елюат із колонки; FF: смола для хроматографії у швидкому потоці

Колонка	Трипсин		BoNT/E1	
	Головний пік	Міnorний пік	Головний пік	Міnorний пік
ANX	F/T	8,8, 11,3, 12,3	10,7	17,3
QHP	F/T	9,0, 10,6	-	-
DEAE	F/T	10,5	9,8	13,2
Q FF	F/T	9,2, 10,9	16,1	10,7

Автори даного винаходу розв'язали описану вище проблему. Детальніше, автори даного  
5 винаходу несподівано виявили, що оптимального розділення трипсин-BoNT/E1 досягають при  
застосуванні гідрофобної поверхні для розділення (наприклад, за допомогою хроматографії  
гідрофобних взаємодій (HIC), яка розділяє білки за відмінностями у їхній поверхневій  
гідрофобності, використовуючи оборотну взаємодію між цими білками та гідрофобною  
поверхнею HIC середовища).

10 В одному варіанті здійснення гідрофобна поверхня являє собою інертну матрицю, до якої  
прикріплений ліганд, що включає арильні або алкільні групи.

Вираз "арил" стосується ароматичних груп, наприклад, фенілу, нафтилу, тієнілу та індолілу.

15 Вираз "алкіл" стосується аліфатичних груп, у тому числі лінійних, розгалужених, циклічних  
груп та їх комбінацій. Алкільна група може містити 1-12 атомів вуглецю. Приклади алкільних  
груп включають без обмеження такі групи, як метил, етил, пропіл (наприклад, н-пропіл,  
ізопропіл), бутіл (наприклад, н-бутіл, ізобутіл, втор-бутіл, трет-бутіл), пентил, гексил, гептил  
та октил.

В одному варіанті здійснення гідрофобна поверхня вибрана з групи, що включає бутильні,  
фенільні або октильні ліганди.

20 В одному варіанті здійснення гідрофобна поверхня містить бутильні ліганди. В одному  
варіанті здійснення гідрофобна поверхня містить фенільні ліганди. В одному варіанті здійснення  
гідрофобна поверхня містить октильні ліганди.

25 Автори даного винаходу встановили, що особливо переважні результати для відділення  
трипсину від BoNT/E одержують з HIC при застосуванні хроматографічних смол, що містять  
алкільні або арильні групи, наприклад, бутильні, фенільні та октильні ліганди, приєднані до  
інертної матриці, такої як бусини на основі зшитої агарози або полістиролу (таблиця 2;  
фігура 2).

Таблиця 2

Елюйовані фракції з комерційних колонок для хроматографії гідрофобних взаємодій, на яких оцінювали відділення трипсину від BoNT/E. Піки виражені у кількості об'ємів колонки (CV). F/T: елюат із колонки; FF: смола хроматографії у швидкому потоці; HP: смола для високоефективної хроматографії, (LS): низький ступінь заміщення гідрофобних груп; (HS): високий ступінь заміщення гідрофобних груп

Колонка	Трипсин		BoNT/E	
	Головний пік	Міnorний пік	Головний пік	Міnorний пік
Феніл (HS) FF	23,3	-	32,2	-
Феніл (LS) FF	F/T	-	21,4	-
Феніл HP	F/T	16,1	24,4	-
Бутил FF	F/T	16,8	23,7	-
Бутил HP	18	Розмитий	27,6	-
Октил FF	F/T	-	27,1	-

В одному варіанті здійснення спосіб гідрофобного очищення для відділення активованого дволанцюгового білка BoNT/E1 від трипсину знижує концентрацію трипсину щонайменше у 100 разів, щонайменше у 150 разів, щонайменше у 200 разів, щонайменше у 250 разів, щонайменше у 300 разів, щонайменше у 350 разів, щонайменше у 400 разів, щонайменше у 450 разів або щонайменше у 500 разів. У переважному варіанті здійснення спосіб гідрофобного очищення для відділення активованого дволанцюгового білка BoNT/E1 від трипсину знижує концентрацію трипсину щонайменше у 350 разів.

В іншому аспекті даний винахід передбачає активний дволанцюговий білок BoNT/E1, де перший ланцюг містить послідовність суміжних амінокислот, та де зазначена послідовність суміжних амінокислот характеризується щонайменше 95 % (наприклад, щонайменше 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 або 100 %) ідентичністю послідовності з амінокислотною послідовністю у положеннях 1-419 у SEQ ID NO: 2; де другий ланцюг містить послідовність суміжних амінокислот, та де зазначена послідовність суміжних амінокислот характеризується щонайменше 95 % (наприклад, щонайменше 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 або 100 %) ідентичністю послідовності з амінокислотною послідовністю у положеннях 423-1252 у SEQ ID NO: 2; де перший та другий ланцюги з'єднані разом дисульфідним зв'язком між цистеїном 412 у першому ланцюзі та цистеїном 426 у другому ланцюзі; за умови, що зазначена послідовність суміжних амінокислот містить одну або декілька (наприклад, дві або більше, три або більше, чотири або більше, п'ять або більше, шість або більше, сім або більше або вісім) з наступних амінокислот (де нумерація амінокислотних положень починається з N-кінцевого амінокислотного залишку та закінчується C-кінцевим амінокислотним залишком у білку BoNT/E1): гліцин у положенні 177; серин у положенні 198; аланін у положенні 340; лейцин у положенні 773; лейцин у положенні 963; глутамін у положенні 964; аланін у положенні 967; аспарагін у положенні 1195.

У пов'язаному аспекті даний винахід передбачає активний дволанцюговий білок BoNT/E1, який можна одержати за допомогою способу (який описаний вище) одержання розчинного дволанцюгового білка BoNT/E1.

В одному аспекті даний винахід передбачає композицію, що містить активний дволанцюговий білок BoNT/E1 (який описаний вище), де зазначена композиція практично не містить трипсину.

Отже, композиція переважно практично не містить трипсинової протеази (яку використовують для активації одноланцюгового поліпептиду шляхом його перетворення на активну дволанцюгову форму), тим самим попереджаючи небажане неспецифічне розщеплення білка BoNT/E1.

В одному варіанті здійснення, у якому композиція (яка описана вище) практично не містить трипсину, композиція містить менш ніж 100 пікограмів (пг) трипсину на 100 нанограмів (нг) білка BoNT/E1; наприклад, менш ніж 50, 20, 10, 9, 8, 7, 6 або 5 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1. В

одному варіанті здійснення композиція (яка описана вище) містить менш ніж 10 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1, або менш ніж 7 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1, або менш ніж 5 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1. У переважному варіанті здійснення композиція (яка описана вище) містить менш ніж 10 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1 або менш ніж 7 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1.

Отже, в одному варіанті здійснення фраза "практично не містить трипсину" означає менш ніж 100 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1; наприклад, менш ніж 50, 20, 10, 9, 8, 7, 6 або 5 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1, переважно менш ніж 10 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1 або менш ніж 7 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1.

Способи визначення концентрації трипсину у композиції відомі у рівні техніки. У якості прикладу, концентрацію трипсину у композиції за даним винаходом можна визначити за допомогою сендвіч ELISA (твердофазного імуноферментного аналізу).

У додатковому аспекті даний винахід передбачає тверду або рідку фармацевтичну композицію, що містить:

(a) активний дволанцюговий білок BoNT/E1, який описаний вище, та

(b) стабілізуювальний засіб.

В одному варіанті здійснення композиція (яка описана вище) практично не містить трипсину. В одному варіанті здійснення композиція містить менш ніж 100 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1, наприклад, менш ніж 50, 20, 10, 9, 8, 7, 6 або 5 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1. В одному варіанті здійснення композиція містить менш ніж 10 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1 або менш ніж 7 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1.

Стабілізуювальні засоби, які можна застосовувати в композиціях згідно з даним винаходом, включають білкові стабілізатори, такі як альбумін, зокрема, сироватковий альбумін людини (HSA), та небілкові стабілізатори.

Небілкові стабілізуювальні засоби, які можна застосовувати в композиціях згідно з даним винаходом, включають поверхнево-активні речовини, зокрема, неіоногенні поверхнево-активні речовини. Приклади неіоногенних поверхнево-активних речовин включають полісорбати, такі як полісорбат 20 або полісорбат 80, та блок-співполімери, такі як поллоксамери (тобто співполімери поліетилену та пропіленгліколю).

У конкретному варіанті здійснення композиція не містить білок як стабілізуювальний засіб.

Згідно з конкретним варіантом здійснення даного винаходу фармацевтична композиція являє собою рідку фармацевтичну композицію, яка містить:

(a) активний дволанцюговий білок BoNT/E1, який описаний вище;

(b) небілковий стабілізуювальний засіб, що являє собою поверхнево-активну речовину; та

(c) воду;

де зазначена рідка фармацевтична композиція не містить білкового стабілізуювального засобу; та

де зазначена рідка фармацевтична композиція практично не містить трипсину (наприклад, зазначена рідка фармацевтична композиція містить менш ніж 100 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1, або менш ніж 10 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1, або менш ніж 7 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1, або менш ніж 5 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1; переважно де зазначена рідка фармацевтична композиція містить менш ніж 10 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1 або менш ніж 7 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1).

В одному варіанті здійснення активний дволанцюговий білок BoNT/E1 присутній у композиції (яка описана вище) у концентрації 1-100 нг/мл. В одному варіанті здійснення активний дволанцюговий білок BoNT/E1 присутній у композиції (яка описана вище) у концентрації 5-50 нг/мл, наприклад, приблизно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 або 50 нг/мл. У переважному варіанті здійснення активний дволанцюговий білок BoNT/E1 присутній у концентрації приблизно 20 нг/мл.

В одному варіанті здійснення поверхнево-активна речовина (описана вище) являє собою полісорбат, такий як полісорбат, що має середній ступінь полімеризації в діапазоні від 20 до 100 мономерних ланок, і може, наприклад, являти собою полісорбат 80. У переважному варіанті здійснення полісорбат має рослинне походження. Концентрація поверхнево-активної речовини переважно становить менше 1 % об'єм/ об'єм, наприклад, становить від 0,005 % до 0,02 % об'єм/об'єм у випадку полісорбату 80.

Фармацевтична композиція згідно з даним винаходом також може містити кристалічний засіб.

Під кристалічним засобом мають на увазі засіб, який, серед іншого, забезпечує підтримання структури механічно міцного слою осаду клітин у ліофілізованому комплексі ботулінічного нейротоксину (типу A, B, C, D, E, F або G) або ботулінічному нейротоксині високого ступеня

чистоти (типу А, В, С, D, Е, F або G). У випадку включення в тверді склади кристалічні засоби також мають ефект збільшення об'єму. Кристалічні засоби включають, зокрема, хлорид натрію. Концентрація кристалічного засобу може становити, наприклад, від 0,1 до 0,5 М, переважно від 0,1 до 0,4 М, зокрема, від приблизно 0,15 до 0,3 М.

5 Фармацевтична композиція згідно з даним винаходом також може містити буфер для підтримання рівня рН у діапазоні від 5,5 до 7,5 або від 6,0 до 7,0. Буфер може являти собою будь-який буфер, здатний підтримувати рН на належному рівні. Наприклад, буфер для композицій згідно з даним винаходом можна вибрати з групи, яка включає сукцинат, фосфат динатрію/лимонну кислоту та амінокислоту, таку як гістидин. Концентрація буферу може становити, наприклад, від 1 до 50 мМ, переважно від 5 до 20 мМ, переважно приблизно 10 мМ.

10 Фармацевтична композиція згідно з даним винаходом також може містити дисахарид.

Дисахарид, застосовуваний у композиціях згідно з даним винаходом, можна вибрати з групи, яка включає сахарозу, трегалозу, маніт та лактозу. У конкретному варіанті здійснення дисахарид являє собою сахарозу. Концентрація дисахариду може становити, наприклад, від 5 до 50 мМ, переважно від 5 до 25 мМ, більш переважно від 10 до 20 мМ і найбільш переважно приблизно 11,7 мМ.

15 У конкретному варіанті здійснення фармацевтична композиція являє собою рідку фармацевтичну композицію, яка містить:

- (а) активний дволанцюговий білок BoNT/E1, який описаний вище;
- 20 (b) небілковий стабілізуювальний засіб, що являє собою поверхнево-активну речовину;
- (с) хлорид натрію;
- (с) буфер для підтримання рН від 5,5 до 7,5;
- (е) дисахарид та
- (f) стерильну воду;

25 де зазначена рідка фармацевтична композиція не містить білкового стабілізуювального засобу; та

де зазначена рідка фармацевтична композиція практично не містить трипсину (наприклад, зазначена рідка фармацевтична композиція містить менш ніж 100 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1, або менш ніж 10 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1, або менш ніж 7 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1, або менш ніж 5 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1; переважно де зазначена рідка фармацевтична композиція містить менш ніж 10 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1 або менш ніж 7 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1).

30 Згідно з конкретним варіантом здійснення фармацевтична композиція згідно з даним винаходом у рідкій формі міститься в герметичному флаконі або готовому до використання пристрої, такому як шприц, без межі поділу рідина/газ та є стабільною протягом щонайменше трьох місяців або щонайменше шести місяців при 23-27 °С та протягом щонайменше дванадцяти місяців при 2-8 °С.

В одному аспекті даний винахід передбачає активний дволанцюговий білок BoNT/E1, який описаний вище, або активний дволанцюговий білок BoNT/E1, який можна одержати шляхом протеолітичного розщеплення одноланцюгового білка BoNT/E1, який описано вище, або композицію, яка описана вище, або рідку фармацевтичну композицію, яка описана вище, для застосування у терапії.

40 Автори даного винаходу виявили, що активні дволанцюгові білки BoNT/E1 за даним винаходом, та композиції, та рідкі фармацевтичні композиції з ними можна застосовувати у терапії. Придатні види терапії можуть включати косметичні обробки та способи медичного лікування.

Пояснення до SEQ ID NO

SEQ ID NO: 1 Оптимізована послідовність нуклеїнової кислоти BoNT/E1

SEQ ID NO: 2 Амінокислотна послідовність BoNT/E1

50 SEQ ID NO: 3 Послідовність нуклеїнової кислоти BoNT/E1 дикого типу

SEQ ID NO: 1 Оптимізована послідовність нуклеїнової кислоти BoNT/E1

ATGCCGAAAATCAACTCTTTCAACTACAACGACCCGGTTAACGACCGTACCATCCTGTAT  
ATCAAACCGGGTGGTTGCCAGGAGTTCTACAAATCTTTCAACATCATGAAAAACATCTGG  
ATCATCCCGGAACGTAACGTTATCGGTACCAACCCCGCAGGACTTCCACCCGCCGACCTCT  
55 CTGAAAAACGGTGACTCTTCTTACTACGACCCGAACCTACCTCCAGTCTGACGAAGAAAAA  
GACCGTTTCTCTGAAAATCGTTACCAAAATCTTCAACCGTATCAACAACAACCTGTCTGGT  
GGTATCCTGCTGGAAGAACTGTCTAAAGCTAACCCGTACCTGGGTAACGACAACACCCCG  
GACAACAGTTCACATCGGTGACGCTTCTGCTGTTGAAATCAAATTCTCTAACGGTTCT  
CAGGACATCCTGCTGCCGAACGTTATCATCATGGGTGCTGAACCGGACCTGTTCCGAAACC  
60 AACTCTTCTAACATCTCTCTGCGTAACAACCTACATGCCGTCTAACCAACGGTTTCGGTTCT

ATCGCTATCGTTACCTTCTCTCCGGAATACTCTTTCCGTTTCAACGACAACAGCATGAAC  
 GAGTTCATCCAGGACCCGGCTCTGACCCTGATGCACGAACCTGATCCACTCTCTGCACGGT  
 CTGTACGGTGCTAAAGGTATCACCACCAAATACACCATCACCCAGAAACAGAACCCGCTG  
 5 ATCACCACATCCGTGGTACCAACATCGAAGAGTTCCTGACCTTCGGTGGTACCGACCTG  
 AACATCATCACCTCTGCTCAGTCTAACGACATCTACACCAACCTGCTGGCTGACTACAAA  
 AAAATCGCTTCTAAACTGTCTAAAGTTTCAGGTTTCTAACCCGCTGCTGAACCCGTACAAA  
 GACGTTTTTCGAAGCTAAATACGGTCTGGACAAAGACGCTTCTGGTATCTACTCTGTAAAC  
 ATCAACAAATTCAACGACATCTTCAAAAACTGTACTCTTTCACCGAGTTCGACCTGGCG  
 10 ACCAAATTCCAGGTAAATGCCGTCAGACCTACATCGGTCAAGTACAATACTTCAAACCTG  
 TCTAACCTGCTGAACGACTCTATCTACAACATCTCTGAAGGTTACAACATCAACAACCTG  
 AAAGTTAACTTCGGTGGTCAGAACGCTAACCTGAACCCGCGTATCATCACCCCGATCACC  
 GGTGCTGGTCTGGTTAAAAAATCATCCGTTTTCTGCAAGAATATTGTAAGCGTTAAAGGA  
 ATAAGAAAAAGTATCTGCATCGAAATCAACAACGGTGAACCTGTTCTTCTGTTGCTTGAA  
 AACTCTTACAACGACGACAACATCAACACCCCGAAAGAAATCGACGACACCGTTACCTCT  
 15 AACAACAACCTACGAAAACGACCTGGACCAGGTTATCCTGAACCTTCAACTCTGAATCTGCT  
 CCGGGTCTGCTGACGAAAAACTGAACCTGACCATCCAGAACGACGTTACATCCCGAAA  
 TACGACTCTAACGGTACCTCTGACATCGAACAGCAGCAGCTTAACGAACCTGAACGTTTTCT  
 TTCTACCTGGACGCTCAGAAAGTTCCGGAAGGTGAAAACAACGTTAACCTGACCTCTTCT  
 ATCGACACCGCTCTGCTGGAACAGCCGAAAATCTACACCTTCTTCTTCTGAGTTCATC  
 20 AACAACGTTAACAAACCGGTTTCAGGCTGCTCTGTTCTGTTTCTTGGATTGAGCAGGTTCTG  
 GTTGACTTCACCACCGAAGCTAACCGAAATCTACCGTTGACAAAATCGCTGACATCTCT  
 ATCGTTGTTCCGTACATCGGTCTGGCTCTGAACATCGGTAACGAAGCTCAGAAAGGTAAC  
 TTCAAAGACGCTCTGGAACCTGCTGGGTGCTGGTATCCTGCTGGAGTTCGAACCGGAACTG  
 CTGATCCCGACCATCCTGGTTTTCCACCATCAAATCTTTCCTGGGTTCTTCTGACAACAAA  
 25 AACAAAGTTATCAAAGCTATCAACAACGCTCTGAAAGAACGTGACGAAAAATGGAAGAA  
 GTTTACTCTTTCATCGTTTTCTAACTGGATGACCAAAATCAACACCCAGTTCAACAAACGT  
 AAAGAACAGATGTACCAGGCTCTCCAGAACCAGGTTAACGCTATCAAAACCATCATCGAA  
 TCTAAATACAACCTTTACACCCTGGAAGAAAAAACGAACCTGACCAACAAATACGACATC  
 AAACAGATCGAAAACGAACCTGAACCAGAAAGTTTCTATCGCTATGAACAACATCGACCGT  
 30 TTCCTGACCGAATCTTCTATCTCTTACCTGATGAAACTCATCAACGAAGTTAAAATCAAC  
 AAAGTGCCTGAATACGACGAAAACGTTAAACCTACCTGCTGAACCTACATCATCCAGCAC  
 GGTCTATCCTGGGTGAATCTCAGCAGGAACCTGAACCTATGGTTACCGACACCCTGAAC  
 AACTCTATCCCGTTCAAACCTGTCTTCTTACACCGACGACAAAAATCCTGATCTCTTACTTC  
 AACAAATTCTTTAAACGCATTAAGAGTTCATCGGTTCTGAATATGCGGTACAAAAATGAT  
 35 AAATATGTCGATACTTCTGGATATGATAGCAATATCAACATTAACGGCGACGTGTATAAA  
 TATCCGACAAATAAAACCAAGTTTGGGATATAACGACAAAGCTGTGCGGAGTCAATATT  
 TCTCAAAACGACTATATCATTTACGATAATAAATAAAAACTTTAGCATTAGTTTTTGG  
 GTTCGTATACCTAATTATGACAATAAAATTGTAATGTGAATAACGAGTATACCATTATA  
 AACTGTATGCGCGACAATAACAGTGGTTGGAAGGTATCGCTGAACCATAATGAGATTATC  
 40 TGGACCCTGCAGGATAATGCAGGTATAAACCAGAACTGGCTTTTAACTATGGAACGCA  
 AATGGGATCTCAGATTACATTAATAAATGGATTTTTGTTACCATTACGAACGATCGCTTA  
 GGCGACTCAAACTTTATATTAATGGCAATCTGATAGATCAGAAATCAATCTTAAATTTG  
 GGCAATATTCTGCTCTGATAACATCTTGTTCAGATCGTTAATTGCAGTTACACTCGT  
 TATATTGGCATTCTGTTACTTTAATATCTTCGATAAAGAACTGGACGAGACGGAAATCCAG  
 45 ACTCTGTATTCAAACGAGCCCAATACTAATATATTGAAAGATTTTTGGGGTAACTATCTT  
 TTATATGATAAAGAATACTATCTCCTGAATGTATTGAAGCCAAACAATTTATAGATAGA  
 CGCAAGGATAGCACATTAAGTATCAACAATATCAGATCTACTATACTGTTAGCAAATCGC  
 CTCTACTCCGGTATTAAAGTGAAGATTCAGCGGGTTAATAACTCCAGTACCAATGATAAT  
 CTGGTCCGTAAGAACGATCAGGTATACATCAATTTCTGTCGCGAGCAAAACTCATCTCTTC  
 50 CCGCTTTACGCCGATACAGCTACGACAAACAAGGAAAAAACATAAAAAATTTCCAGCTCC  
 GGAAACAGATTCAATCAAGTAGTTGTAATGAACCTCTGTGGGTAAATAATTGTACGATGAAC  
 TTTAAGAATAACAATGGGAACAATATTGGACTTTTGGGCTTCAAAGCCGACACAGTGGTG  
 GCGTCCACCTGGTATTACACGCACATGCGGGACCATAACGAATTCGAACGGTTGCTTCTG  
 AACTTTATCTCGGAAGAACACGGGTGGCAAGAAAAATAA  
 55 SEQ ID NO: 2 Амінокислотна послідовність BoNT/E1  
 MPKINSFNNDPVNDRTILYIKPGGCQEFYKSFNIMKNIWIIPERNVIGTTPQDFHPPTS  
 LKNGDSSYYDPNYLQSDDEEKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANPYLGNDNTP  
 DNQFHIGDASAVEIKFSNGSQDILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISLRNNMPSNHGFGS  
 IAIVTFPEYSFRFNDNSMNEFIQDPALTMHELIHSLHGLYGAKGITTKYITITQKQNPL  
 60 ITNIRGTNIEEFLTFGGTDLNIITSAQSNDIYTNLLADYKKIASKLSKVQVSNPLLPYK



DVFEAKYGLDKDASGIYSVNINKFNDIFKKLYSFTEFDLATKFQVKCRQTYIGQYKYFKL  
 SNLLNDSIYNISEGYNNLNKVNFRGQANLNPNRIITPITGRGLVKKIIRFCKNIVSVKG  
 IRKSICIEINNGELFFVASSENSYNDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLDQVILNFNSES  
 PGLSDEKLNLTIQNDAYIPKYDSNGTSDIEQHDVNELNVFFYLDAQKVPGEENNVNLTSS  
 5 IDTALLEQPKIYTFSSSEFINNVNKPVQAALFVSWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIADIS  
 IVVPYIGLALNIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFEPELLIPTILVFTIKSFLGSSDNK  
 NKVIKAINNALKERDEKWKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNAIKTIE  
 SKYNSYTL EEKNELTNKYDIQIENELNQKVSIAMNNIDRFLTESSISYLMKLINEVKIN  
 KLREYDENVKTYLLNYIIQHGSILGESQQELNSMVTDTLNN SIPFKLSSYTDDKILISYF  
 10 NKFFKRIKSSSVLNMRYKNDKYVDTSGYDSNININGDVYKYPTNKNQFGIYNDKLSEVNI  
 SQNDYIIYDNKYKNFSISFWVRIPNYDNKIVNVNNEYTIINCMRDNNSGWKVS LNHN EII  
 WTLQDNAGINQKLA FN YGNANGISDYINKWIFVTITNDRLGDSKLYINGNLIDQKSILNL  
 GNIHVSDNILFKIVNCSYTRYIGIRYFNIFDKELDETEIQTLYSNEPNTN ILKDFWGNYL  
 LYDKEYYLLNVLPNNFIDRRK DSTLSINNIRSTILLANRLYSGIKVKIQRVNNSSTNDN  
 15 LVRKNDQVYIN FVASKTHLFLYADTATTNKEKTIKISSSGNRFNQVVMNSVGN NCTMN  
 FKNNNGNNIGLLGFKADTVVASTWYYTHMRDHTNSNGCFWNFISEEHGWQEK  
 SEQ ID NO: 3 Послідовність нуклеїнової кислоти BoNT/E1 дикого типу  
 ATGCCAAAAATTAATAGTTTTAATTATAATGATCCTGTTAATGATAGAACAATTTTATAT  
 ATTAACCAGGCGGTTGTCAAGAATTTTATAAATCATTTAATATTATGAAAAATATTTGG  
 20 ATAATTCCAGAGAGAAATGTAATTGGTACAACCCCCCAAGATTTTCATCCGCCTACTTCA  
 TTA AAAAATGGAGATAGTAGTTATTATGACCCTAATTATTTACAAAGTGATGAAGAAAAG  
 GATAGATTTTTAAAAATAGTCACAAAAATATTTAATAGAATAAATAAATCTTTCAGGA  
 GGGATTTTATTAGAAGAACTGTCAAAAGCTAATCCATATTTAGGGAATGATAACTCCA  
 GATAATCAATTCATATTGGTGATGCATCAGCAGTTGAGATTAAATTCTCAAATGGTAGC  
 25 CAAGACATACTATTACCTAATGTTATTATAATGGGAGCAGAGCCTGATTTATTTGAAACT  
 AACAGTTCCAATATTTCTCTAAGAAATAATTATATGCCAAGCAATCACGGTTTTTGATCA  
 ATAGCTATAGTAACATTCTCACCTGAATATTCTTTTAGATTTAATGATAATAGTATGAAT  
 GAATTTATTCAAGATCCTGCTCTTACATTAATGCATGAATTAATACATTCATTACATGGA  
 CTATATGGGGCTAAAGGGATTACTACAAAGTATACTATAACACAAAAACAAAATCCCCTA  
 30 ATAACAAATATAAGAGGTACAAATATTGAAGAATTCTTAACTTTTGGAGGTACTGATTTA  
 AACATTATTACTAGTGCTCAGTCCAATGATATCTATACTAATCTTCTAGCTGATTATAAA  
 AAAATAGCGTCTAACTTAGCAAAGTACAAGTATCTAATCCACTACTTAATCCTTATAAA  
 GATGTTTTTGAAGCAAAGTATGGATTAGATAAAGATGCTAGCGGAATTTATTCGGTAAAT  
 ATAAACAAATTTAATGATATTTTTAAAAAATTATACAGCTTTACGGAATTTGATTTAGCA  
 35 ACTAAATTTCAAGTTAAATGTAGGCAAACTTATATTGGACAGTATAAACTCTTCAAACCT  
 TCAAACCTTGTTAAATGATTCTATTATATAATATATCAGAAGGCTATAAATAAATTTA  
 AAGGTAAATTTTAGAGGACAGAATGCAAATTTAAATCCTAGAAATTATTACACCAATTACA  
 GGTAGAGGACTAGTAAAAAAATCATTAGATTTTGTAAAAATATTGTTTCTGTAAAAGGC  
 ATAAGGAAATCAATATGTATCGAAATAAATAATGGTGAGTTATTTTTGTGGCTTCCGAG  
 40 AATAGTTATAATGATGATAATATAAATACTCCTAAAGAAATTGACGATACAGTAACTTCA  
 AATAATAATTATGAAAATGATTTAGATCAGGTTATTTTAAATTTTAAATAGTGAATCAGCA  
 CCTGGACTTTCAGATGAAAAATTAATTTAACTATCCAAAATGATGCTTATATACCAAAA  
 TATGATTCTAATGGAACAAGTGATATAGAACAACATGATGTTAATGAACCTAATGTATTT  
 TTCTATTTAGATGCACAGAAAGTGCCCGAAGGTGAAAATAATGTCAATCTCACCTCTTCA  
 45 ATTGATACAGCATTATTAGAACAACCTAAAATATATACATTTTTTTTCATCAGAATTTATT  
 AATAATGTCAATAAACCTGTGCAAGCAGCATTATTTGTAAGCTGGATACAACAAGTGTTA  
 GTAGATTTTACTACTGAAGCTAACCAAAAAAGTACTGTTGATAAAATTGCAGATATTTCT  
 ATAGTTGTTCCATATATAGGTCTTGCTTTAAATATAGGAAATGAAGCACAAAAAGGAAAT  
 TTAAAGATGCACTTGAATTATTAGGAGCAGGTATTTTATTAGAATTTGAACCCGAGCTT  
 50 TTAATTCCTACAATTTTAGTATTCACGATAAAATCTTTTTTAGGTTCTATCTGATAATAAA  
 AATAAAGTTATTAAAGCAATAAATAATGCATTGAAAGAAAGAGATGAAAAATGGAAAGAA  
 GTATATAGTTTTATAGTATCGAATTGGATGACTAAAATTAATACACAATTTAATAAAGA  
 AAAGAACAAATGTATCAAGCTTTACAAAATCAAGTAAATGCAATTAACAATAATAGAA  
 TCTAAGTATAATAGTTATACTTTAGAGGAAAAAAATGAGCTTACAAATAAATATGATATT  
 55 AAGCAAATAGAAAATGAACCTAATCAAAAGGTTTCTATAGCAATGAATAATATAGACAGG  
 TTCTTAACTGAAAGTTCTATATCCTATTTAATGAAATTAATAAATGAAGTAAAAATTAAT  
 AAATTAAGAGAATATGATGAGAATGTCAAAACGTATTTATTGAATTATATTATACAACAT  
 GGATCAATCTTGGGAGAGAGTCAGCAAGAACTAAATCTATGGTAACTGATACCTAAAT  
 AATAGATTCCTTTTAAGCTTTCTTCTTATACAGATGATAAAATTTTAATTTTCAATTTT  
 60 AATAAATCTTTAAGAGAATTAAGAGTAGTTTCAAGTTTAAATATGAGATATAAAATGAT

AAATACGTAGATACTTCAGGATATGATTCAAATATAAATATTAATGGAGATGTATATAAA  
TATCCAACATAAAAAATCAATTTGGAATATATAATGATAAACTTAGTGAAGTTAATATA  
TCTCAAAATGATTACATTATATATGATAATAAATATAAAAAATTTTAGTATTAGTTTTGG  
5 GTAAGAATTCCTAACTATGATAATAAGATAGTAAATGTTAATAATGAATACACTATAATA  
AATTGTATGAGAGATAATAATTCAGGATGGAAAGTATCTCTTAATCATAATGAAATAATT  
TGGACATTGCAAGATAATGCAGGAATTAATCAAAAATTAGCATTAACTATGGTAACGCA  
AATGGTATTTCTGATTATATAAATAAGTGGATTTTTGTAACATAACTAATGATAGATTA  
GGAGATTCTAACTTTATATTAATGGAAATTTAATAGATCAAAAATCAATTTTAAATTTA  
10 GGTAAATATTCATGTTAGTGACAATATATTATTTAAAAATAGTTAATTGTAGTTATACAAGA  
TATATTGGTATTAGATATTTTAATATTTTGTATAAGAATTAGATGAAACAGAAATTCAA  
ACTTTATATAGCAATGAACCTAATACAAATATTTTGAAGGATTTTTGGGGAAATTATTTG  
CTTTATGACAAAGAATACTATTTATTAATGTGTTAAACCAAATAACTTTATTGATAGG  
AGAAAAGATTCTACTTTAAGCATTAAATAATAAGAAGCACTATTCTTTTAGCTAATAGA  
TTATATAGTGGAATAAAAAGTTAAAAATACAAAGAGTTAATAATAGTAGTACTAACGATAAT  
15 CTTGTTAGAAAGAATGATCAGGTATATATTAATTTTGTAGCCAGCAAAACTCACTTATTT  
CCATTATATGCTGATACAGCTACCACAAATAAAGAGAAAACAATAAAAAATATCATCATCT  
GGCAATAGATTTAATCAAGTAGTAGTTATGAATTCAGTAGGAAATAATTGTACAATGAAT  
TTAAAAATAATAATGGAAATAATATTGGGTTGTTAGGTTTCAAGGCAGATACTGTAGTT  
GCTAGTACTTGGTATTATACACATATGAGAGATCATACAAACAGCAATGGATGTTTTTGG  
20 AACTTTATTTCTGAAGAACATGGATGGCAAGAAAAATAA

Короткий опис фігур

Фігура 1

Елюйовані фракції з аніонообмінних колонок, на яких оцінювали відділення трипсину від BoNT/E1. Позначені пік для трипсину, BoNT/E1 та градієнт солі. Фіг. 1A: Q-сефароза HP; фіг. 1B: DEAE сефароза.

Фігура 2

Елюйовані фракції з колонок для хроматографії гідрофобних взаємодій, на яких оцінювали відділення трипсину від BoNT/E1. Позначені пік для трипсину, BoNT/E1 та градієнт солі. Фіг. 2A: фенол-сефароза HP; фіг. 2B: бутил-сефароза HP; фіг. 2C: октил-сефароза FF.

Фігура 3

Рівень експресії розчинного rBoNT/E1 у культурі, визначений за допомогою Вестерн-блотингу, порівняно із комерційним BoNT/E1.

Фігура 4

SDS-PAGE (електрофорез у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію) rBoNT/E1 при відновних та невідновних умовах, що підтверджує утворення дволанцюгової структури.

Приклади

ПРИКЛАД 1

Конструювання оптимізованої послідовності нуклеїнової кислоти BoNT/E1

Послідовність ДНК спочатку конструювали за допомогою зворотної трансляції амінокислотної послідовності BoNT/E1 (SEQ ID NO: 2). Послідовність рестрикції (PstI) додавали до N-кінця та стоп-кодон і додаткові послідовності рестрикції XbaI-стоп-кодон-HindIII додавали до C-кінця. Послідовність ДНК потім оптимізували для експресії з урахуванням кількості та положення повільних кодонів (які визначені вище).

Послідовність оптимізували для добору проти повільних кодонів. Оптимізацію застосовували особливо на початку послідовності для одержання гарної ініціації та початку трансляції. У випадку, коли повільні кодони включали (для забезпечення можливості використання у відповідності з переважним використанням певних кодонів у хазяїна експресії), їх направляли у бік кінця послідовності (де початок послідовності визначається як точка, де відбувається ініціація трансляції).

Після конструювання послідовності оптимізовану послідовність ДНК синтезували у вигляді двох частин із застосуванням унікального/нативного сайту PstI для подальшого збирання у ген токсину повної довжини. Послідовність першого гена включала сайт NdeI на аміно-кінці та сайт PstI на карбоксильному кінці. Ця частина гена мала довжину 2895 п. о., кодує LC BoNT/E1 та аміно-частину HC. Послідовність другого гена включала сайт PstI на N-кінці та сайт HindIII на карбоксильному кінці, мала довжину 882 п.о. та кодувала карбоксильну частину HC BoNT/E1.

ПРИКЛАД 2

Конструювання вектора експресії послідовності нуклеїнової кислоти BoNT/E1

Використовували вектор експресії на основі вектора pET-26b(+) (Novagen), який включає сайти рестрикції для клонування NdeI та HindIII, розташовані на початку та на кінці ДНК, що кодує ORF BoNT/E1. Вектор pET-26b(+) був дефектним за здатністю до мобілізації, але міг бути

мобілізований, якщо знаходився разом з іншими здатними до мобілізації плазмідами. Вектор рЕТ-26b (+) модифікували, щоб видалити гени з високою мобільністю та щоб зробити його нездатним до мобілізації.

Вектор експресії розщеплювали NdeI та PstI та очищений кістяк вектора лігували з першим фрагментом ДНК BoNT/E1, який розщеплювали такими самими рестрикційними ферментами з одержанням проміжного продукту. На другій стадії клонування ДНК BoNT/E1 з другого фрагмента, який був розщеплений PstI та HindIII, лігували у проміжний продукт із першої стадії (який також був розщеплений такими самими рестрикційними ферментами). Це приводило до утворення кінцевого продукту ДНК BoNT/E1 у векторі експресії.

#### ПРИКЛАД 3

Уведення вектору експресії BoNT/E1 у хазяїна

Цей приклад оснований на застосуванні клітин E. coli BLR (DE3), хоча процедури та способи в однаковій мірі застосовні до будь якого іншого штаму E. coli, що здатний до експресії. Компетентні клітини E. coli BLR (DE3) зберігали при температурі нижче -70 °C до потреби. Трансформацію клітин виконували із застосуванням адаптації протоколу виробника. Клітини розморожували на льоду та готували субаліквоти по 10 мкл. Аліквоту трансформували з використанням теплового шоку при температурі 42 °C протягом 80 секунд з 1 мкл плазмідної ДНК. Після відновлення на льоду протягом 5 хвилин 90 мкл бульйону SOC, що не містив компонентів тваринного походження, додавали до середовищ трансформації, які потім переносили до інкубаторів зі струшуванням та інкубували протягом 1 години при 37 °C та 250 об./хв. Після інкубування 90 мкл кожного середовища трансформації переносили та розподіляли на плашках LB агару, що не містив компонентів тваринного походження, доповненого 50 мкг/мл канаміцину. Плашки інкубували при 37 °C протягом 16 годин.

#### ПРИКЛАД 4

Культивування хазяїна та експресія розчинного білка rBoNT/E1

Одну колонію з трансформованим BoNT/E1 у BLR(DE3) клітинах використовували для інокуляції 250 мл конічної колби, що містила 100 мл модифікованого високопоживного бульйону (Terrific Broth) (mTB), доповненого 0,2% глюкозаміну та 30 мкг/мл канаміцину. Цей спосіб буде в однаковій мірі застосовний при використанні бусин Microbank або гліцеринового маточного розчину (10-100 мкл) для інокуляції колби.

Колбу інкубували протягом 16 годин при 37 °C при струшуванні з 250 об./хв. 10 мл цієї стартової культури використовували для інокуляції 2 л конічних колб, кожна з яких містила 1 л, доповнений 0,2 % глюкозаміну та 30 мкг/мл канаміцину. Клітини вирощували при 37 °C протягом ~2 годин при 225 об./хв. до досягнення значення OD600 0,5. У цей момент температуру культури знижували до 16 °C. Після 1 години клітини індукували до експресії BoNT/E1 шляхом додавання 1 mM IPTG протягом 20 годин. Клітини збирали шляхом центрифугування протягом 20 хв. при 4 °C, зважували та потім зберігали при -20 °C.

#### ПРИКЛАД 5

Екстракція білка BoNT/E1 з хазяїна та аналіз рівня експресії

Пасти з клітин, що експресують rBoNT/E1, розморожували при кімнатній температурі та ресуспендували шляхом піпетування у 3 мл ресуспендувального буфера Tris-NaCl на грам клітин, доповненого 10 мкл бензонази. Клітини піддавали лізису шляхом обробки ультразвуком з амплітудою 4 мкм - 10 x 30 с в увімкненому стані + >45 с у вимкненому стані. Лізат центрифугували при 4000 g протягом 1 години при 4 °C з одержанням розчинного rBoNT/E1 у супернатанті.

Аналіз методом Бредфорда для визначення концентрації загального білка у одержаних лізатах

Зразок (50 мкл), або розведеного лізату з rBoNT/E1, або стандарту BSA додавали у 1 мл пластикові кювети. Додавали 450 мкл реактиву кумасі для аналізу методом Бредфорда до кожної кювети та забезпечували можливість інкубування при кімнатній температурі протягом 10 хвилин до зчитування OD600. Значення, одержані для стандартів BSA використовували для визначення кількості білка у зразках лізатів.

Приготування зразків лізатів для напівкількісного аналізу Вестерн-блотинг

Комерційний зразок білка BoNT/E1, придбаного у Metabionics, використовували для приготування стандартів для SDS-PAGE. Зразки для SDS-PAGE потім приготували зі зразків лізатів з культур клітин, що експресували, з відомою концентрацією загального білка.

Вестерн-блотинг

Гелі завантажували та розганяли при напрузі 200 В протягом 55 хвилин та переносили при 0,4 mA протягом 1 години на нітроцелюлозну мембрану у буфері для блотингу, що не містив метанолу. Блоти на нітроцелюлозі блокували протягом 1 години 0,5% BSA у PBS-0,1% Tween

20 та потім мітили антитілом до BoNT/E1 протягом 1 години. Блоти детектували з використанням вторинного антитіла, кон'югованого з HRP, яке проявляли за допомогою субстрату SuperSignal DuraWest. Проявлені блоти візуалізували з використанням інструменту для візуалізації Syngene Imaging Instrument (фігура 3).

#### 5 ПРИКЛАД 6

Початкове очищення та активація цільового білка BoNT/E1 з одержанням дволанцюгової форми

Даний приклад оснований на одній комбінації стадій захоплення та колонкової хроматографії проміжного продукту, хоча комбінацію можна змінювати або проводити у зворотному порядку з використанням тих же самих властивостей у різному порядку. Освітлений супернатант доводили до високої концентрації солі та завантажували на гідрофобну колонку для захоплення (бутил-сефарозну). Зв'язаний rBoNT/E1 елюювали з колонки з використанням градієнту Tris-буфер з низьким вмістом солі. Елюований білок додатково очищали з використанням іонообмінної колонки, такої як Q-сефарозна, при елюванні з градієнтом Tris-буфер з високим вмістом солі. Трипсин потім додавали до зразка елюованого rBoNT/E1 у кінцевій концентрації 2,5 мкг/мл та інкубували при 37 °C протягом 40 хв. Це розрізало активаційну петлю BoNT/E1 та утворювало кінцеву дволанцюгову структуру BoNT/E1, яку підтверджували SDS-PAGE у відновних умовах (фігура 4).

#### ПРИКЛАД 7

20 Кінцеве очищення цільового білка BoNT/E1, що не містив активаційну протеазу

Зразок активованого rBoNT/E1 негайно завантажували у буфері з високим вмістом солі на гідрофобну колонку (бутил-сефарозну). Колонку промивали буфером із високим вмістом солі для видалення слабко зв'язаного трипсину до того, як застосовували градієнт Tris-буфер з низьким вмістом солі для додаткового видалення трипсину з колонки та зв'язування білка rBoNT/E1. Білок rBoNT/E1 потім елюювали у кінці градієнту, на відстані від трипсину.

Аналіз для визначення рівнів трипсину

Аналіз ELISA на трипсин розробили для визначення рівнів, присутніх у фракціях з колонки та у кінцевому зразку BoNT/E1. Імобілізоване антитіло до трипсину наносили у вигляді покриття на мікротитрувальні планшети на 1 годину при 37 °C. Стандарти трипсину та тестові зразки додавали на планшет (100 мкл/лунка) та інкубували протягом 1 години при 37 °C до виявлення з використанням другого антитіла до трипсину. Кількість трипсину у кожному зразку/фракції з колонки потім одержували на основі стандартів та накладали на хроматограму очищення для підтвердження відділення трипсину від BoNT/E1 (фігура 2B).

#### ПРИКЛАД 8

35 Склад, що містить активний дволанцюговий BoNT/E1, практично не містить трипсину

Готували наступні шість рідких композицій, що містили активний дволанцюговий BoNT/E1 (таблиця 3).

Таблиця 3

	1	2	3	4	5	6
Полісорбат 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	-
Маніт	-	4,0 мг/мл	-	4,0 мг/мл	-	4,0 мг/мл
Хлорид натрію	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
Буфер	L-гістидин/Соляна кислота	L-гістидин/Соляна кислота	Фосфат динатрію/Безводна лимонна кислота	Фосфат динатрію/Безводна лимонна кислота	L-гістидин/Соляна кислота	L-гістидин/Соляна кислота
дволанцюговий BoNT/E1	20 нг/мл	20 нг/мл	20 нг/мл	20 нг/мл	20 нг/мл	20 нг/мл
Вода, очищена за допомогою MilliQ	у достатній кількості до 1 мл	у достатній кількості до 1 мл	у достатній кількості до 1 мл	у достатній кількості до 1 мл	у достатній кількості до 1 мл	у достатній кількості до 1 мл

40 Усі шість композицій зберігали при 25 °C протягом 12 тижнів. Стабільність протеазної функції дволанцюгового BoNT/E1 оцінювали впродовж цього періоду із застосуванням ендопептидазного аналізу в безклітинній системі. Щомісяця значення швидкості розпаду для

шести складів становили менше 5 % за місяць протягом періоду 12 тижнів, це показує, що протеазна функція дволанцюгового BoNT/E1 у шести композиціях залишається стабільною при 25 °C протягом щонайменше 12 тижнів.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> СИНТАКСИН ЛІМІТЕД

ІПСЕН БІОФАРМ ЛІМІТЕД

<120> Рекомбінантні нейротоксини Clostridium botulinum

<130> P39711WO

<150> GB 1219602.8

<151> 2012-10-31

<160> 3

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 3759

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Оптимізована послідовність нуклеїнової кислоти BONT/E1

<400> 1

atgccgaaaa tcaactcttt caactacaac gaccgggta acgaccgtac catcctgtat

60

atcaaaccgg gtggttgcca ggagttctac aaatctttca acatcatgaa aaacatctgg	120
atcatcccgg aacgtaacgt tatcgggtacc accccgcagg atttccaccc gccgacctct	180
ctgaaaaacg gtgactcttc ttactacgac ccgaactacc tccagtctga cgaagaaaaa	240
gaccgtttcc tgaaaatcgt taccaaaatc ttcaaccgta tcaacaacaa cctgtctggg	300
ggatcctgc tggaagaact gtctaaagct aaccgcgtacc tgggtaacga caacaccccg	360
gacaaccagt tccacatcgg tgacgcttct gctgttgaaa tcaaattctc taacggttct	420
caggacatcc tgctgccgaa cgttatcatc atgggtgctg aaccggacct gttcgaaacc	480
aactcttcta acatctctct gcgtaacaac tacatgccgt ctaaccacgg tttcggttct	540
atcgtatcgt ttaccttctc tccggaatac tctttccgtt tcaacgacaa cagcatgaac	600
gagttcatcc aggacccggc tctgaccctg atgcacgaac tgatccactc tctgcacggg	660
ctgtacgggtg ctaaagggtat caccacaaa tacacatca ccagaaaca gaaccgctg	720
atcaccaaca tccgtggtac caacatcgaa gagttcctga ctttcgggtg taccgacctg	780
aacatcatca cctctgtca gtctaacgac atctacacca acctgctggc tgactacaaa	840

aaaatcgctt ctaaactgtc taaagttcag gtttctaacc cgctgctgaa cccgtacaaa	900
gacgttttcg aagctaaata cggctctggac aaagacgctt ctggtatcta ctctgttaac	960
atcaacaaat tcaacgacat cttcaaaaaa ctgtactctt tcaccgagtt cgacctggcg	1020
accaaattcc aggttaaatg ccgtcagacc tacatcggtc agtacaaata cttcaaactg	1080
tctaacctgc tgaacgactc tatctacaac atctctgaag gttacaacat caacaacctg	1140
aaagttaact tccgtgggtca gaacgctaac ctgaaccgc gtatcatcac cccgatcacc	1200
ggtcgtggtc tggtaaaaaa aatcatccgt ttctgcaaga atattgtaag cgtaaagga	1260
ataagaaaaa gtatctgcat cgaaatcaac aacggtgaac tgttcttcgt tgcttctgaa	1320
aactcttaca acgacgacaa catcaacacc ccgaaagaaa tcgacgacac cgttacctct	1380
aacaacaact acgaaaacga cctggaccag gttatcctga acttcaactc tgaatctgct	1440
ccgggtctgt ctgacgaaaa actgaacctg accatccaga acgacgtta catcccga	1500
tacgactcta acggtacctc tgacatcgaa cagcacgacg ttaacgaact gaacgttttc	1560
ttctacctgg acgctcagaa agttccggaa ggtgaaaaca acgttaacct gacctcttct	1620



atcgacaccg ctctgctgga acagccgaaa atctacacct tcttctcttc tgagttcatc	1680
aacaacgtta acaaaccggt tcaggctgct ctgttcgttt cttggattca gcaggttctg	1740
gttgacttca ccaccgaagc taaccagaaa tctaccgttg aaaaaatcgc tgacatctct	1800
atcgttggtc cgtacatcgg tctggctctg aacatcggta acgaagctca gaaaggtaac	1860
ttcaaagacg ctctggaact gctgggtgct ggtatcctgc tggagttcga accggaactg	1920
ctgatcccga ccacctctggt tttcaccatc aaatctttcc tgggttcttc tgacaacaaa	1980
aacaaagtta tcaaagctat caacaacgct ctgaaagaac gtgacgaaaa atggaaagaa	2040
gtttactctt tcatcgtttc taactggatg accaaaatca acaccagtt caacaaacgt	2100
aaagaacaga tgtaccaggc tctccagaac caggttaacg ctatcaaaac catcatcgaa	2160
tctaaataca actcttacac cctggaagaa aaaaacgaac tgaccaacaa atacgacatc	2220
aaacagatcg aaaacgaact gaaccagaaa gtttctatcg ctatgaacaa catcgaccgt	2280
ttcctgaccg aatcttctat ctcttacctg atgaaactca tcaacgaagt taaaatcaac	2340
aaactgcgtg aatacgacga aaacgttaaa acctacctgc tgaactacat catccagcac	2400

ggttctatcc tgggtgaatc tcagcaggaa ctgaactcta tggttaccga caccctgaac	2460
aactctatcc cgttcaaact gtcttcttac accgacgaca aaatcctgat ctcttacttc	2520
aacaaattct ttaaacgcat taagagttca tcggttctga atatgcggtg caaaaatgat	2580
aaatatgtcg atacttctgg atatgatagc aatatcaaca ttaacggcga cgtgtataaa	2640
tatccgacaa ataaaaacca gtttgggata tataacgaca agctgtcgga ggtcaatatt	2700
tctcaaaacg actatatcat ttacgataat aaatataaaa actttagcat tagtttttgg	2760
gttcgtatac ctaattatga caataaaatt gtaaatgtga ataacgagta taccattata	2820
aactgtatgc gcgacaataa cagtgggttg aaggatcgc tgaaccataa tgagattatc	2880
tggaccctgc aggataatgc aggtataaac cagaaactgg cttttaacta tggaaacgca	2940
aatgggatct cagattacat taataaatgg atttttgtta ccattacgaa cgatcgctta	3000
ggcgactcaa aactttatat taatggcaat ctgatagatc agaaatcaat cttaaatttg	3060
ggcaatattc atgtctctga taacatcttg ttcaagatcg ttaattgcag ttacactcgt	3120
tatatggca ttcgttactt taatatcttc gataaagaac tggacgagac ggaaatccag	3180

actctgtatt caaacgagcc caatactaata atattgaaag atttttgggg taactatctt 3240

ttatatgata aagaatacta tctcctgaat gtattgaagc caaacaattt catagataga 3300

cgcaaggata gcacattaag tatcaacaat atcagatcta ctatactgtt agcaaatcgc 3360

ctctactccg gtattaaagt gaagattcag cgggttaata actccagtac caatgataat 3420

ctggtccgta agaacgatca ggtatacatc aatttcgtcg cgagcaaaac tcattctctt 3480

ccgctttacg ccgatacagc tacgacaaac aaggaaaaaa ccataaaaat ttccagctcc 3540

ggaaacagat tcaatcaagt agttgtaatg aactctgtgg gtaataattg tacgatgaac 3600

tttaagaata acaatgggaa caatattgga cttttgggct tcaaagccga cacagtgggtg 3660

gcgtccacct ggtattacac gcacatgcgg gaccatacga attcgaacgg ttgcttctgg 3720

aactttatct cggaagaaca cgggtggcaa gaaaaataa 3759

<210> 2

<211> 1252

<212> Білок

<213> Clostridium botulinum

<400> 2

Met Pro Lys Ile Asn Ser Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Val Asn Asp Arg

1 5 10 15

Thr Ile Leu Tyr Ile Lys Pro Gly Gly Cys Gln Glu Phe Tyr Lys Ser

20 25 30

Phe Asn Ile Met Lys Asn Ile Trp Ile Ile Pro Glu Arg Asn Val Ile

35 40 45

Gly Thr Thr Pro Gln Asp Phe His Pro Pro Thr Ser Leu Lys Asn Gly

50 55 60

Asp Ser Ser Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Gln Ser Asp Glu Glu Lys

65 70 75 80

Asp Arg Phe Leu Lys Ile Val Thr Lys Ile Phe Asn Arg Ile Asn Asn

85 90 95

Asn Leu Ser Gly Gly Ile Leu Leu Glu Glu Leu Ser Lys Ala Asn Pro

100

105

110

Tyr Leu Gly Asn Asp Asn Thr Pro Asp Asn Gln Phe His Ile Gly Asp

115

120

125

Ala Ser Ala Val Glu Ile Lys Phe Ser Asn Gly Ser Gln Asp Ile Leu

130

135

140

Leu Pro Asn Val Ile Ile Met Gly Ala Glu Pro Asp Leu Phe Glu Thr

145

150

155

160

Asn Ser Ser Asn Ile Ser Leu Arg Asn Asn Tyr Met Pro Ser Asn His

165

170

175

Gly Phe Gly Ser Ile Ala Ile Val Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Ser Phe

180

185

190

Arg Phe Asn Asp Asn Ser Met Asn Glu Phe Ile Gln Asp Pro Ala Leu

195

200

205

Thr Leu Met His Glu Leu Ile His Ser Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala  
210 215 220

Lys Gly Ile Thr Thr Lys Tyr Thr Ile Thr Gln Lys Gln Asn Pro Leu  
225 230 235 240

Ile Thr Asn Ile Arg Gly Thr Asn Ile Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly  
245 250 255

Gly Thr Asp Leu Asn Ile Ile Thr Ser Ala Gln Ser Asn Asp Ile Tyr  
260 265 270

Thr Asn Leu Leu Ala Asp Tyr Lys Lys Ile Ala Ser Lys Leu Ser Lys  
275 280 285

Val Gln Val Ser Asn Pro Leu Leu Asn Pro Tyr Lys Asp Val Phe Glu  
290 295 300

Ala Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asp Ala Ser Gly Ile Tyr Ser Val Asn  
305 310 315 320

Ile Asn Lys Phe Asn Asp Ile Phe Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr Glu  
325 330 335

Phe Asp Leu Ala Thr Lys Phe Gln Val Lys Cys Arg Gln Thr Tyr Ile  
340 345 350

Gly Gln Tyr Lys Tyr Phe Lys Leu Ser Asn Leu Leu Asn Asp Ser Ile  
355 360 365

Tyr Asn Ile Ser Glu Gly Tyr Asn Ile Asn Asn Leu Lys Val Asn Phe  
370 375 380

Arg Gly Gln Asn Ala Asn Leu Asn Pro Arg Ile Ile Thr Pro Ile Thr  
385 390 395 400

Gly Arg Gly Leu Val Lys Lys Ile Ile Arg Phe Cys Lys Asn Ile Val  
405 410 415

Ser Val Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys Ile Glu Ile Asn Asn Gly

420

425

430

Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Asn Ser Tyr Asn Asp Asp Asn Ile

435

440

445

Asn Thr Pro Lys Glu Ile Asp Asp Thr Val Thr Ser Asn Asn Asn Tyr

450

455

460

Glu Asn Asp Leu Asp Gln Val Ile Leu Asn Phe Asn Ser Glu Ser Ala

465

470

475

480

Pro Gly Leu Ser Asp Glu Lys Leu Asn Leu Thr Ile Gln Asn Asp Ala

485

490

495

Tyr Ile Pro Lys Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Ser Asp Ile Glu Gln His

500

505

510



Asp Val Asn Glu Leu Asn Val Phe Phe Tyr Leu Asp Ala Gln Lys Val

515

520

525

Pro Glu Gly Glu Asn Asn Val Asn Leu Thr Ser Ser Ile Asp Thr Ala

530

535

540

Leu Leu Glu Gln Pro Lys Ile Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Glu Phe Ile

545

550

555

560

Asn Asn Val Asn Lys Pro Val Gln Ala Ala Leu Phe Val Ser Trp Ile

565

570

575

Gln Gln Val Leu Val Asp Phe Thr Thr Glu Ala Asn Gln Lys Ser Thr

580

585

590

Val Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Ile Val Val Pro Tyr Ile Gly Leu

595

600

605

Ala Leu Asn Ile Gly Asn Glu Ala Gln Lys Gly Asn Phe Lys Asp Ala

610

615

620

Leu Glu Leu Leu Gly Ala Gly Ile Leu Leu Glu Phe Glu Pro Glu Leu  
625 630 635 640

Leu Ile Pro Thr Ile Leu Val Phe Thr Ile Lys Ser Phe Leu Gly Ser  
645 650 655

Ser Asp Asn Lys Asn Lys Val Ile Lys Ala Ile Asn Asn Ala Leu Lys  
660 665 670

Glu Arg Asp Glu Lys Trp Lys Glu Val Tyr Ser Phe Ile Val Ser Asn  
675 680 685

Trp Met Thr Lys Ile Asn Thr Gln Phe Asn Lys Arg Lys Glu Gln Met  
690 695 700

Tyr Gln Ala Leu Gln Asn Gln Val Asn Ala Ile Lys Thr Ile Ile Glu  
705 710 715 720

Ser Lys Tyr Asn Ser Tyr Thr Leu Glu Glu Lys Asn Glu Leu Thr Asn  
725 730 735

Lys Tyr Asp Ile Lys Gln Ile Glu Asn Glu Leu Asn Gln Lys Val Ser  
740 745 750

Ile Ala Met Asn Asn Ile Asp Arg Phe Leu Thr Glu Ser Ser Ile Ser  
755 760 765

Tyr Leu Met Lys Leu Ile Asn Glu Val Lys Ile Asn Lys Leu Arg Glu  
770 775 780

Tyr Asp Glu Asn Val Lys Thr Tyr Leu Leu Asn Tyr Ile Ile Gln His  
785 790 795 800

Gly Ser Ile Leu Gly Glu Ser Gln Gln Glu Leu Asn Ser Met Val Thr  
805 810 815

Asp Thr Leu Asn Asn Ser Ile Pro Phe Lys Leu Ser Ser Tyr Thr Asp  
820 825 830

Asp Lys Ile Leu Ile Ser Tyr Phe Asn Lys Phe Phe Lys Arg Ile Lys

835

840

845

Ser Ser Ser Val Leu Asn Met Arg Tyr Lys Asn Asp Lys Tyr Val Asp

850

855

860

Thr Ser Gly Tyr Asp Ser Asn Ile Asn Ile Asn Gly Asp Val Tyr Lys

865

870

875

880

Tyr Pro Thr Asn Lys Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Asn Asp Lys Leu Ser

885

890

895

Glu Val Asn Ile Ser Gln Asn Asp Tyr Ile Ile Tyr Asp Asn Lys Tyr

900

905

910

Lys Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg Ile Pro Asn Tyr Asp Asn

915

920

925

Lys Ile Val Asn Val Asn Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Arg  
 930 935 940

Asp Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu Asn His Asn Glu Ile Ile  
 945 950 955 960

Trp Thr Leu Gln Asp Asn Ala Gly Ile Asn Gln Lys Leu Ala Phe Asn  
 965 970 975

Tyr Gly Asn Ala Asn Gly Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys Trp Ile Phe  
 980 985 990

Val Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Gly Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Asn  
 995 1000 1005

Gly Asn Leu Ile Asp Gln Lys Ser Ile Leu Asn Leu Gly Asn Ile  
 1010 1015 1020

His Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys Ile Val Asn Cys Ser Tyr  
 1025 1030 1035

Thr Arg Tyr Ile Gly Ile Arg Tyr Phe Asn Ile Phe Asp Lys Glu  
1040 1045 1050

Leu Asp Glu Thr Glu Ile Gln Thr Leu Tyr Ser Asn Glu Pro Asn  
1055 1060 1065

Thr Asn Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr Leu Leu Tyr Asp  
1070 1075 1080

Lys Glu Tyr Tyr Leu Leu Asn Val Leu Lys Pro Asn Asn Phe Ile  
1085 1090 1095

Asp Arg Arg Lys Asp Ser Thr Leu Ser Ile Asn Asn Ile Arg Ser  
1100 1105 1110

Thr Ile Leu Leu Ala Asn Arg Leu Tyr Ser Gly Ile Lys Val Lys  
1115 1120 1125

Ile Gln Arg Val Asn Asn Ser Ser Thr Asn Asp Asn Leu Val Arg

1130

1135

1140

Lys Asn Asp Gln Val Tyr Ile Asn Phe Val Ala Ser Lys Thr His

1145

1150

1155

Leu Phe Pro Leu Tyr Ala Asp Thr Ala Thr Thr Asn Lys Glu Lys

1160

1165

1170

Thr Ile Lys Ile Ser Ser Ser Gly Asn Arg Phe Asn Gln Val Val

1175

1180

1185

Val Met Asn Ser Val Gly Asn Asn Cys Thr Met Asn Phe Lys Asn

1190

1195

1200

Asn Asn Gly Asn Asn Ile Gly Leu Leu Gly Phe Lys Ala Asp Thr

1205

1210

1215

Val Val Ala Ser Thr Trp Tyr Tyr Thr His Met Arg Asp His Thr

1220

1225

1230

Asn Ser Asn Gly Cys Phe Trp Asn Phe Ile Ser Glu Glu His Gly  
 1235 1240 1245

Trp Gln Glu Lys  
 1250

<210> 3

<211> 3759

<212> ДНК

<213> Clostridium botulinum

<400> 3

atgccaaaa ttaatagttt taattataat gatcctgtta atgatagaac aattttatat 60

attaaaccag gcggttgtca agaattttat aaatcattta atattatgaa aaatatttgg 120

ataattccag agagaaatgt aattggtaca accccccaag attttcatcc gcctacttca 180

ttaaaaaatg gagatagtag ttattatgac cctaattatt taaaaagtga tgaagaaaag 240

gatagatttt taaaaatagt cacaaaaata tttaatagaa taaataataa tctttcagga 300



gggattttat tagaagaact gtcaaaagct aatccatatt tagggaatga taatactcca	360
gataatcaat tccatattgg tgatgcatca gcagttgaga ttaaattctc aaatggtagc	420
caagacatac tattacctaa tgttattata atgggagcag agcctgattt atttgaaact	480
aacagttcca atatttctct aagaaataat tatatgccaa gcaatcacgg ttttgatca	540
atagctatag taacattctc acctgaatat tcttttagat ttaatgataa tagtatgaat	600
gaatttattc aagatcctgc tcttacatta atgcatgaat taatacattc attacatgga	660
ctatatgggg ctaaagggat tactacaaag tatactataa cacaaaaaca aaatccccta	720
ataacaaata taagaggtag aaatattgaa gaattcttaa cttttggagg tactgattta	780
aacattatta ctagtgtca gtccaatgat atctatacta atcttctagc tgattataaa	840
aaaatagcgt ctaaacttag caaagtacaa gtatctaata cactacttaa tccttataaa	900
gatgtttttg aagcaaagta tggattagat aaagatgcta gcggaattta ttcggtaaat	960
ataaacaat ttaatgatat ttttaaaaaa ttatacagct ttacggaatt tgatttagca	1020
actaaatttc aagttaaag taggcaaact tatattggac agtataaata cttcaaactt	1080

tcaaaacttgt taaatgattc tatttataat atatcagaag gctataatat aaataattta	1140
aaggtaaatt ttagaggaca gaatgcaaat ttaaactcta gaattattac accaattaca	1200
ggtagaggac tagtaaaaaa aatcattaga ttttgtaaaa atattgtttc tgtaaaaggc	1260
ataaggaaat caatatgtat cgaaataaat aatggtgagt tattttttgt ggcttccgag	1320
aatagttata atgatgataa tataaatact cctaaagaaa ttgacgatac agtaacttca	1380
aataataatt atgaaatga tttagatcag gttattttta attttaatag tgaatcagca	1440
cctggacttt cagatgaaaa attaaattta actatccaaa atgatgctta tataccaaaa	1500
tatgattcta atggaacaag tgatatagaa caacatgatg ttaatgaact taatgtattt	1560
ttctatttag atgcacagaa agtgcccga ggtgaaaata atgtcaatct cacctcttca	1620
attgatacag cattattaga acaacctaaa atatatacat ttttttcac agaatttatt	1680
aataatgtca ataaacctgt gcaagcagca ttatttgtaa gctggataca acaagtgtta	1740
gtagatttta ctactgaagc taaccaaaaa agtactgttg ataaaattgc agatatttct	1800
atagttgttc catatatagg tcttgcttta aatataggaa atgaagcaca aaaaggaaat	1860

tttaaagatg cacttgaatt attaggagca ggtatTTTTat tagaatttga acccgagctt	1920
ttaattccta caatttttagt attcacgata aaatctTTTT taggttcac tcgataataaa	1980
aataaagtta ttaaagcaat aaataatgca ttgaaagaaa gagatgaaaa atggaaagaa	2040
gtatatagtt ttatagtatc gaattggatg actaaaatta atacacaatt taataaaaga	2100
aaagaacaaa tgtatcaagc ttacaaaaat caagtaaagc caattaaaaac aataatagaa	2160
tctaagtata atagttatac tttagaggaa aaaaatgagc ttacaaataa atatgatatt	2220
aagcaaatag aaaatgaact taatcaaaag gtttctatag caatgaataa tatagacagg	2280
ttcttaactg aaagttctat atcctattta atgaaattaa taaatgaagt aaaaattaat	2340
aaattaagag aatatgatga gaatgtcaaa acgtatttat tgaattatat tataacaacat	2400
ggatcaatct tgggagagag tcagcaagaa ctaaattcta tggtaactga taccctaaat	2460
aatagtattc cttttaagct ttcttcttat acagatgata aaattttaat ttcatatttt	2520
aataaattct ttaagagaat taaaagtagt tcagttttta atatgagata taaaatgat	2580
aaatacgtag atacttcagg atatgattca aatataaata ttaatggaga tgtatataaa	2640

tatccaacta ataaaaatca atttggaata tataatgata aacttagtga agttaatata	2700
tctcaaatg attacattat atatgataat aaatataaaa attttagtat tagtttttgg	2760
gtaagaattc ctaactatga taataagata gtaaatgtta ataatagaata cactataata	2820
aattgtatga gagataataa ttcaggatgg aaagtatctc ttaatcataa tgaaataatt	2880
tggacattgc aagataatgc aggaattaat caaaaattag catttaacta tggtaacgca	2940
aatggtatct ctgattatat aaataagtgg atttttgtaa ctataactaa tgatagatta	3000
ggagattcta aactttatat taatggaaat ttaatagatc aaaaatcaat tttaaattta	3060
ggtaatatcc atgttagtga caatatatta tttaaaatag ttaattgtag ttatacaaga	3120
tatattggta ttagatatct taatatctct gataaagaat tagatgaaac agaaattcaa	3180
actttatata gcaatgaacc taatacaaat attttgaagg atttttgggg aaattatttg	3240
ctttatgaca agaataacta ttattataat gtgttaaaac caataactt tattgatagg	3300
agaaaagatt ctactttaag cattaataat ataagaagca ctattctttt agctaataka	3360
ttatatagtg gaataaaagt taaaatacaa agagttaata atagtagtac taacgataat	3420

```

cttgtagaa agaatgatca ggtatatatt aattttgtag ccagcaaaac tcacttattt 3480

ccattatatg ctgatacagc taccacaaat aaagagaaaa caataaaaat atcatcatct 3540

ggcaatagat ttaatcaagt agtagttatg aattcagtag gaaataattg tacaatgaat 3600

tttaaaaaata ataatggaaa taatatggg ttgttaggtt tcaaggcaga tactgtagtt 3660

gctagtactt ggtattatac acatatgaga gatcatacaa acagcaatgg atgtttttgg 3720

aactttattt ctgaagaaca tggatggcaa gaaaaataa 3759

```

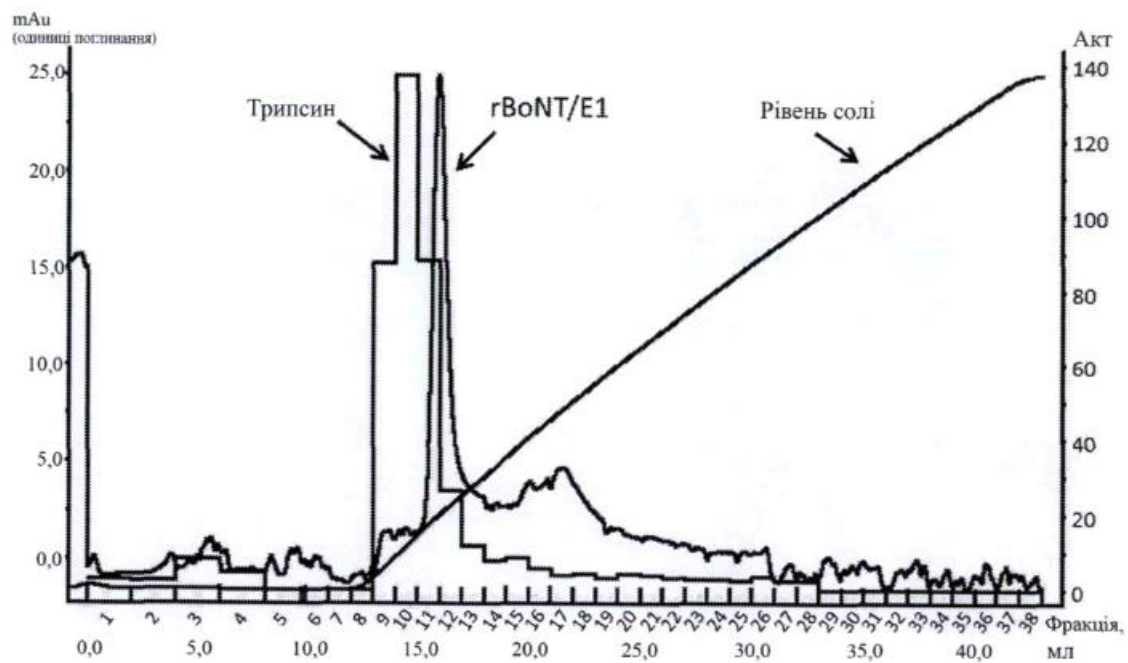
5

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

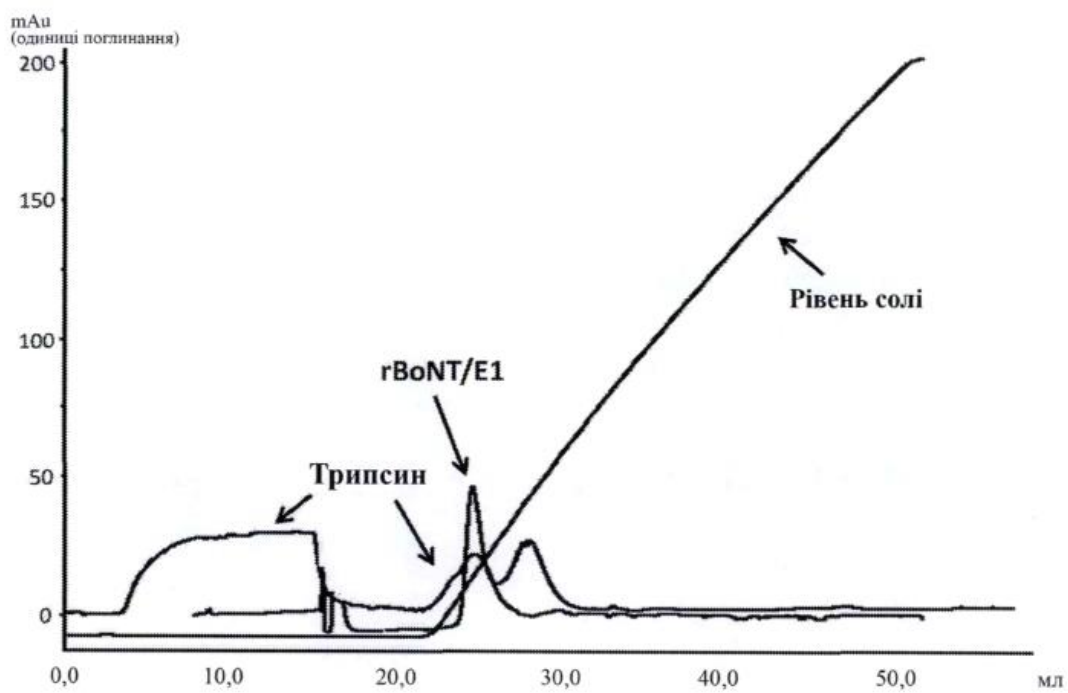
1. Спосіб одержання розчинного дволанцюгового білка BoNT/E1, причому зазначений спосіб включає
- 10 забезпечення розчинного одноланцюгового білка BoNT/E1, що містить послідовність суміжних амінокислот, де зазначена послідовність суміжних амінокислот характеризується щонайменше 95% ідентичністю послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 2,
- приведення зазначеного білка BoNT/E1 у контакт із трипсином у розчині та
- відділення розчинного білка BoNT/E1 від трипсину шляхом приведення розчину, що містить розчинний білок BoNT/E1 та трипсин, у контакт із гідрофобною поверхнею, де розчинний білок
- 15 BoNT/E1 зв'язується з гідрофобною поверхнею.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що зазначена послідовність суміжних амінокислот містить одну або декілька з наступних амінокислот і де нумерація амінокислотних положень починається з N-кінцевого амінокислотного залишку та закінчується C-кінцевим амінокислотним залишком у білку BoNT/E1:
- 20 гліцин у положенні 177;
- серин у положенні 198;
- аланін у положенні 340;
- лейцин у положенні 773;
- лейцин у положенні 963;
- 25 глутамін у положенні 964;
- аланін у положенні 967;
- аспарагін у положенні 1195.
3. Спосіб за п. 1 або п. 2, де розчинний одноланцюговий білок BoNT/E1 забезпечують шляхом експресії у системі експресії E. coli послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить послідовність
- 30 суміжних нуклеотидів, де зазначена послідовність суміжних нуклеотидів характеризується щонайменше 90 % ідентичністю послідовності з послідовністю нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 1,
- та де зазначена послідовність суміжних нуклеотидів кодує одноланцюговий білок BoNT/E1.
4. Спосіб за п. 3, де нуклеїнова кислота містить максимум 160 повільних кодонів, вибраних з
- 35 TTT, TAT, TGT, CAT, CAA, CCA, CCG, TCA, TCG, CGG, TTA та CTA.
5. Спосіб за п. 3 або п. 4, де зазначений одноланцюговий білок BoNT/E1 містить послідовність суміжних амінокислот та де зазначена послідовність суміжних амінокислот характеризується щонайменше 95 % ідентичністю послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 2.

6. Спосіб за будь-яким з пп. 3-5, де зазначена послідовність суміжних нуклеотидів характеризується щонайменше 785 синонімічними кодонами порівняно з послідовністю нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 3 BoNT/E1 дикого типу.
7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, де гідрофобна поверхня являє собою інертну матрицю, до якої
- 5 прикріплений ліганд, що включає арильні або алкільні групи.
8. Спосіб за п. 7, де гідрофобна поверхня вибрана із групи, що включає бутильні, фенільні або октильні ліганди.
9. Активний дволанцюговий білок BoNT/E1,
- 10 де перший ланцюг містить послідовність суміжних амінокислот, та де зазначена послідовність суміжних амінокислот характеризується щонайменше 95% ідентичністю послідовності з амінокислотною послідовністю у положеннях 1-419 SEQ ID NO: 2;
- де другий ланцюг містить послідовність суміжних амінокислот, та де зазначена послідовність суміжних амінокислот характеризується щонайменше 95% ідентичністю послідовності з амінокислотною послідовністю у положеннях 423-1252 SEQ ID NO: 2;
- 15 де перший та другий ланцюги з'єднані разом дисульфідним зв'язком між цистеїном 412 у першому ланцюзі та цистеїном 426 у другому ланцюзі;
- який відрізняється тим, що зазначена послідовність суміжних амінокислот містить одну або декілька з наступних амінокислот і де нумерація амінокислотних положень починається з N-кінцевого амінокислотного залишку та закінчується C-кінцевим амінокислотним залишком у
- 20 білку BoNT/E1:
- гліцин у положенні 177;
- серин у положенні 198;
- аланін у положенні 340;
- лейцин у положенні 773;
- 25 лейцин у положенні 963;
- глутамін у положенні 964;
- аланін у положенні 967;
- аспарагін у положенні 1195;
- та де зазначена послідовність суміжних амінокислот не містить залишки 420, 421 та 422 SEQ ID
- 30 NO: 2.
10. Активний дволанцюговий білок BoNT/E1, який можна одержати за допомогою способу за будь-яким з пп. 1-8.
11. Композиція, яка містить активний дволанцюговий білок BoNT/E1 за п. 9 або п. 10, де зазначена композиція містить менш ніж 10 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1 або менш ніж 7
- 35 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1, або менш ніж 5 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1.
12. Рідка фармацевтична композиція, яка містить:
- активний дволанцюговий білок BoNT/E1 за п. 9 або п. 10;
- небілковий стабілізуючий засіб, що являє собою поверхнево-активну речовину; та
- воду;
- 40 де зазначена рідка фармацевтична композиція не містить білкового стабілізуючого засобу; та де зазначена рідка фармацевтична композиція містить менш ніж 10 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1 або менш ніж 7 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1, або менш ніж 5 пг трипсину на 100 нг білка BoNT/E1.
13. Рідка фармацевтична композиція за п. 12, де зазначена рідка фармацевтична композиція
- 45 додатково містить:
- хлорид натрію,
- буфер для підтримання pH від 5,5 до 7,5 та
- дисахарид;
- де вода являє собою стерильну воду.
- 50 14. Активний дволанцюговий білок BoNT/E1 за п. 9 або п. 10 або композиція за п. 11, або рідка фармацевтична композиція за п. 12 або п. 13 для застосування у терапії.

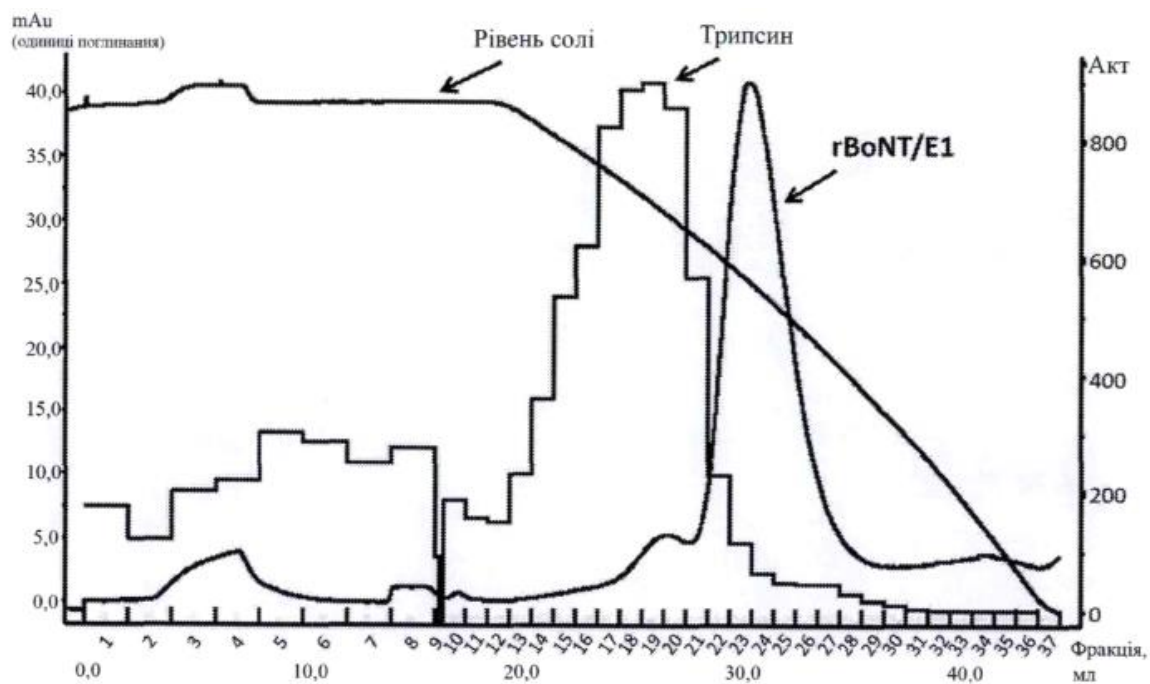




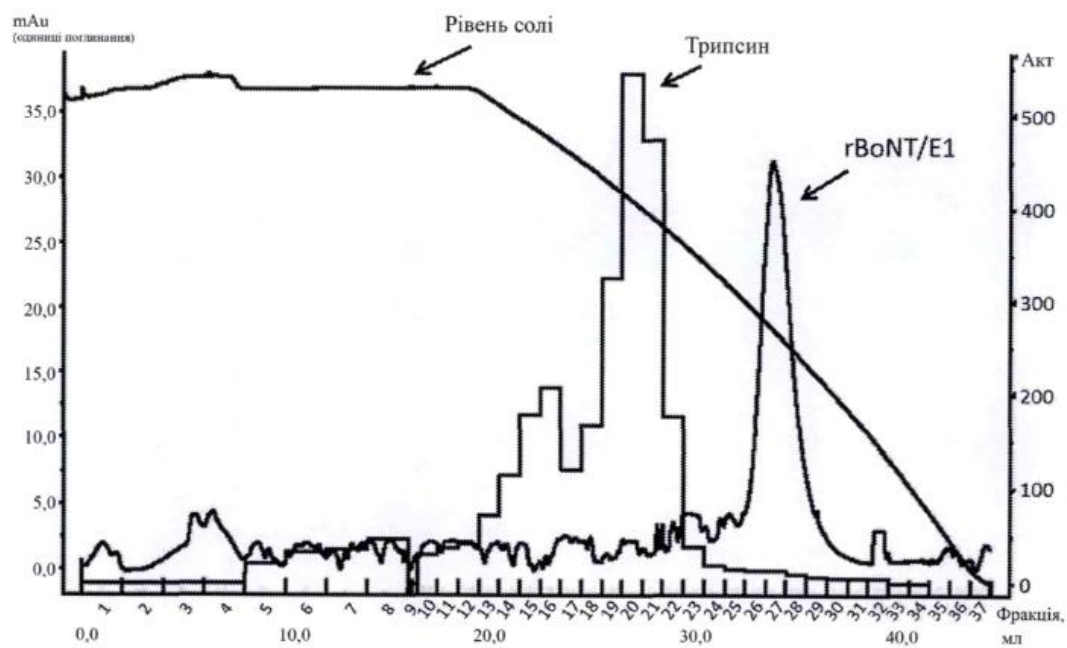
Фіг. 1А



Фіг. 1В

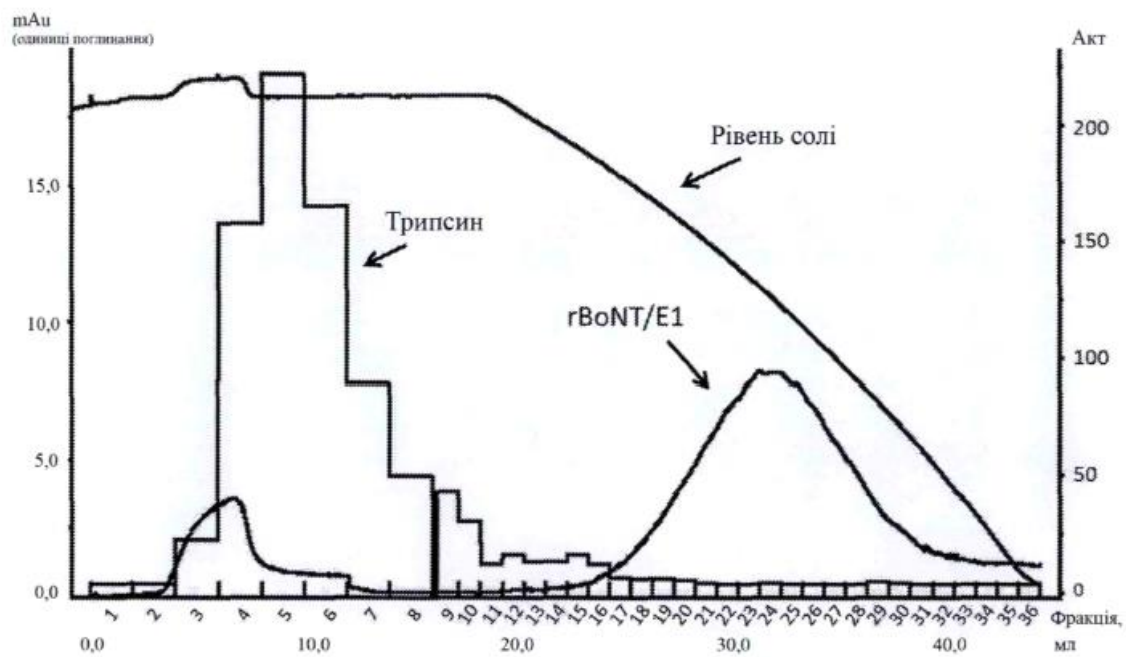


Фіг. 2А

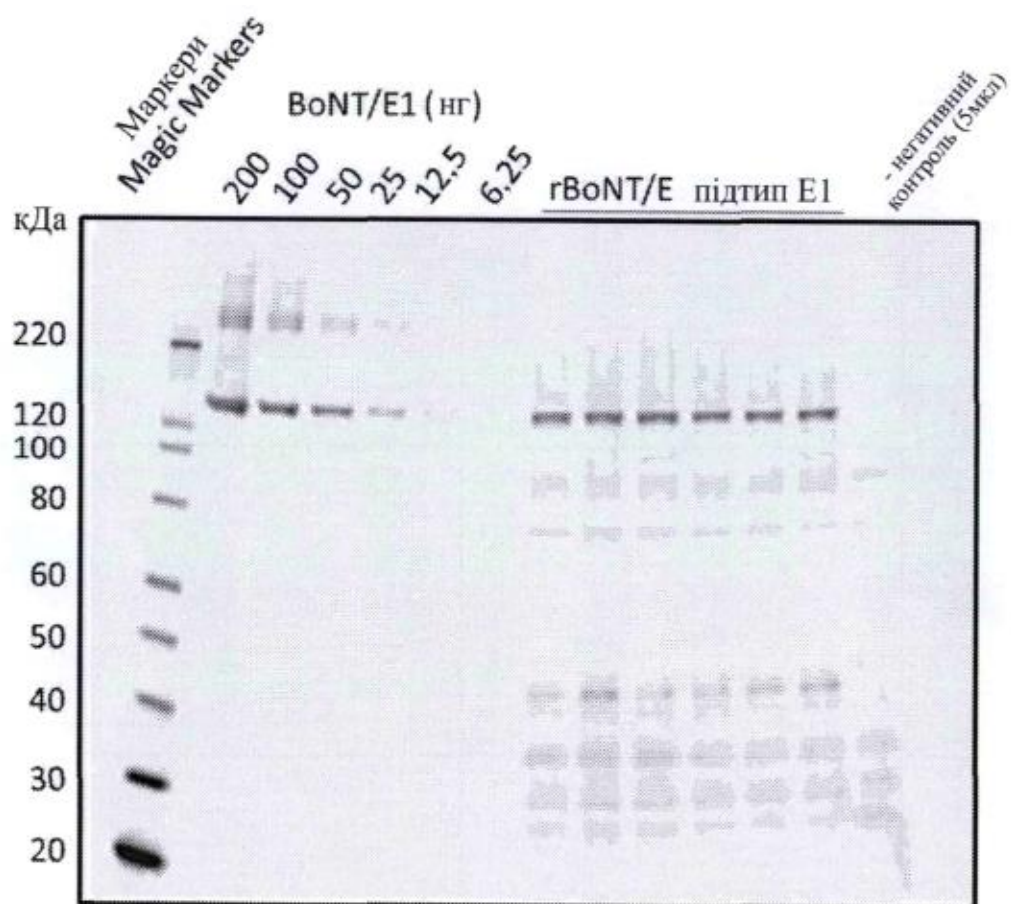


Фіг. 2В

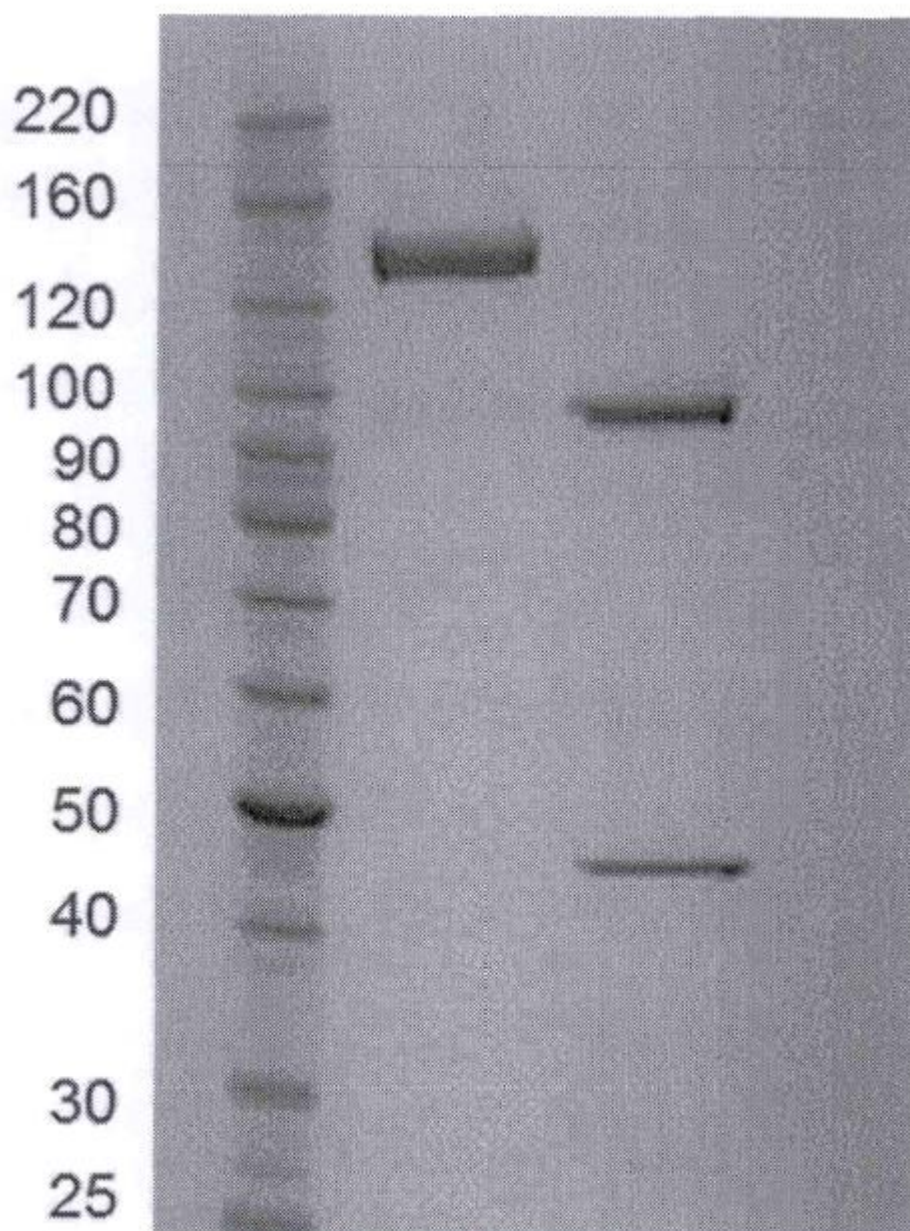




Фіг. 2С



Фіг. 3



Фіг. 4

5

10

---

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601