

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 047362

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2024.07.10

(21) Номер заявки  
202291517

(22) Дата подачи заявки  
2020.12.19

(51) Int. Cl. C12P 21/02 (2006.01)  
C12N 1/20 (2006.01)  
C12R 1/145 (2006.01)

---

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БОТУЛИНИЧЕСКОГО ТОКСИНА

---

(31) 62/951,549

(32) 2019.12.20

(33) US

(43) 2022.08.15

(86) PCT/IB2020/062252

(87) WO 2021/124296 2021.06.24

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ГАЛЬДЕРМА ХОЛДИНГ СА (CH);  
ИПСЕН БИОФАРМ ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:

Столь Ульф, Франк Петер, Ярстад  
Андерс, Пикетт Эндрю (SE)

(74) Представитель:

Хмара М.В. (RU)

(56) WO-A1-2016175565  
US-A1-2011008843  
WO-A1-2018200991  
WO-A2-2005035749  
US-A1-2004235139  
WO-A2-2006042542

---

(57) Изобретение в целом относится к области получения ботулинического токсина. Более конкретно, изобретение относится к способу получения ботулинического токсина в культуральной среде, не содержащей или по существу не содержащей продукта животного происхождения. Изобретение также относится к культуральной среде для получения ботулинического токсина, которая не содержит или по существу не содержит продукта животного происхождения.

---

B1

047362

047362

B1

### Перекрестные ссылки на родственные заявки

Данная заявка претендует на приоритет и эффект изобретения согласно § 119(е) Раздела 35 Свода законов США в соответствии с предварительной заявкой на патент США с регистрационным номером 62/951,549, поданной 20 декабря 2019 г., содержание которой полностью включено в данную публикацию посредством ссылки.

### Область техники

Изобретение в целом относится к области получения ботулинического токсина (ботулотоксина). Более конкретно, изобретение относится к способу получения ботулинического токсина в культуральной среде, не содержащей или практически не содержащей продукта животного происхождения. Изобретение также относится к культуральной среде для получения ботулинического токсина, которая не содержит или практически не содержит продукта животного происхождения.

### Предшествующий уровень техники

Приведенное ниже описание предшествующего уровня техники для предлагаемой технологии представлено исключительно в качестве помощи для понимания предлагаемой технологии, и не допускается его использование для описания предлагаемой технологии или включение в предлагаемую технологию.

Описано семь по существу иммунологически различных ботулинических нейротоксинов - серотипы А, В, С, D, Е, F и G ботулинического нейротоксина, которые различают по нейтрализации типоспецифическими антителами. Например, BOTOX® - это товарный знак очищенного нейротоксинового комплекса ботулинического токсина типа А, коммерчески поставляемого компанией Allergan, Inc., Ирвайн, Калифорния. Ботокс является популярной инъекционной косметической процедурой, которая временно визуально уменьшает тонкие линии и морщины. Одна единица (U; от англ.: unit) ботулинического токсина определена как LD<sub>50</sub> после внутрибрюшинной инъекции самкам мышей Swiss Webster массой от 18 г до 20 г. Другими словами, одна единица ботулинического токсина - это такое количество ботулинического токсина, которое убивает 50% группы самок мышей Swiss Webster. Описано семь по существу иммунологически различных ботулинических нейротоксинов, соответственно являющихся серотипами А, В, С, D, Е, F и G ботулинического нейротоксина, которые различают по нейтрализации типоспецифическими антителами. Различные серотипы ботулинического токсина отличаются по видам животных, которых они поражают, и по степени тяжести и длительности вызываемого ими паралича. Например, по результатам измерения степени тяжести паралича, вызываемого у крыс, было установлено, что ботулинический токсин типа А в 500 раз сильнее ботулинического токсина типа В. Кроме того, определено, что ботулинический токсин типа В не является токсичным для приматов в дозе, равной 480 U/кг, что примерно в 12 раз больше LD<sub>50</sub> для приматов ботулинического токсина типа А. Известно, что ботулинические токсины также можно использовать для лечения различных заболеваний. Примеры включают патент US 5714468 (мигрень), выданный 3 февраля 1998 г.; опубликованная заявка на патент US 2005019132 (головная боль), регистрационный номер 11/039,506, поданная 18 января 2005 г.; опубликованная заявка на патент US 20050191320 (головная боль, вызванная чрезмерным использованием лекарственных средств), заявка с регистрационным номером 10/789,180, поданная 26 февраля 2006 г.; и патент US7811587 (нервно-психиатрическое расстройство), выданный 12 октября 2010 г.; содержание всех этих публикаций полностью включено в данную работу посредством ссылки.

Ботулинический токсин обычно получают способом культивирования и ферментации, в котором используют один или более продуктов животного происхождения (таких как культуральная среда на мясном бульоне и фракция крови или вспомогательное вещество, являющееся производным крови). Введение пациенту фармацевтической композиции, в которой активный биологический ингредиент получен способом, в котором использованы продукты животного происхождения, может подвергнуть пациента потенциальному риску получения различных патогенных микроорганизмов или инфекционных агентов. Например, в фармацевтической композиции могут присутствовать прионы. Прион - это белковая инфекционная частица, которая предположительно образуется как аномальная конформационная изоформа из той же последовательности нуклеиновой кислоты, которая дает нормальный белок. Также высказано предположение, что инфекционность основана на «реакции рекрутинга» нормальной изоформы белка к изоформе белка приона на посттрансляционном уровне. По-видимому, индуцируется неправильное сворачивание нормального эндогенного клеточного белка в патогенную прионную конформацию.

Существует потребность в разработке способа получения ботулинического токсина с использованием культуральной среды, не содержащей или практически не содержащей продукта животного происхождения, что минимизирует риски и проблемы, связанные с нежелательными загрязняющими веществами животного происхождения.

### Сущность изобретения

В данной работе предложены способы получения ботулинического токсина, включающие стадии (a) получения рабочего банка клеток (WCB; от англ.: working cell bank), содержащего бактерию *Clostridium botulinum*; (b) добавления рабочего банка клеток в первый контейнер, содержащий растительную среду для получения токсина (VTPM; от англ.: vegetable toxin production medium), и культивирование бактерий *Clostridium botulinum* в VTPM в условиях, которые обеспечивают размножение *Clostridium bot-*

ulimum, с получением прекультуры; (с) добавления прекультуры во второй контейнер, содержащий ВТРМ, и культивирование бактерии Clostridium botulinum в ВТРМ в условиях, которые обеспечивают продуцирование ботулинического токсина, и (d) выделения ботулинического токсина, причем ВТРМ практически не содержит или вообще не содержит продукта животного происхождения и содержит белок растительного происхождения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ботулинический токсин является ботулиническим нейротоксином типа А (BoNT/A; от англ.: botulinum neurotoxin type A).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения контейнер, используемый на стадиях (b) и (с), является ферментационным мешком.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения условия во время стадий (b) и (с) включают анаэробную среду. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анаэробная среда имеет концентрацию растворенного кислорода (DO; от англ.: dissolved oxygen) менее 2%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анаэробная среда имеет концентрацию растворенного кислорода (DO) менее 1%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анаэробная среда имеет концентрацию растворенного кислорода (DO) менее 0,5%.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения условие во время стадии (b) включает температуру в диапазоне от примерно 35°C до примерно 39°C или в диапазоне от примерно 36°C до примерно 38°C (или имеет промежуточное значение). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения условие во время стадии (b) включает температуру, равную примерно 35,0°C, примерно 35,5°C, примерно 36,0°C, примерно 36,5°C, примерно 37,0°C, примерно 37,5°C, примерно 38,0°C, примерно 38,5°C или примерно 39,0°C. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения условие во время стадии (b) включает температуру, равную примерно 37±1°C. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения условие во время стадии (b) включает температуру, равную примерно 37±0,5°C. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения условие во время стадии (b) включает температуру, равную примерно 37±0,2°C.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения условие во время стадии (с) включает температуру в диапазоне от примерно 30°C до примерно 37°C, от примерно 31°C до примерно 36°C, от примерно 32°C до примерно 35°C или от примерно 32°C до примерно 34°C (или имеет промежуточное значение). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения условие во время стадии (с) включает температуру, равную примерно 33±1°C. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения условие во время стадии (с) включает температуру, равную примерно 33±0,5°C. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения условие во время стадии (с) включает температуру, равную примерно 33±0,2°C.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения объемное отношение WCB к ВТРМ на стадии (b) не превышает примерно 2,0%, не превышает примерно 1,9%, не превышает примерно 1,8%, не превышает примерно 1,7%, не превышает примерно 1,6%, не превышает примерно 1,5%, не превышает примерно 1,4%, не превышает примерно 1,3%, не превышает примерно 1,2%, не превышает примерно 1,1%, не превышает примерно 1,0%, не превышает примерно 0,9%, не превышает примерно 0,8%, не превышает примерно 0,7%, не превышает примерно 0,6%, не превышает примерно 0,5%, не превышает примерно 0,4%, не превышает примерно 0,3%, не превышает примерно 0,2%, не превышает примерно 0,1%, не превышает примерно 0,09%, не превышает примерно 0,08%, не превышает примерно 0,07%, не превышает примерно 0,06%, не превышает примерно 0,05%, не превышает примерно 0,04%, не превышает примерно 0,03%, не превышает примерно 0,02% или не превышает примерно 0,01% (или имеет промежуточное значение).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения объемное отношение WCB к ВТРМ на стадии (b) равно примерно 0,01%, примерно 0,02%, примерно 0,03%, примерно 0,04%, примерно 0,05%, примерно 0,06%, примерно 0,07%, примерно 0,08%, примерно 0,09%, примерно 0,10%, примерно 0,15%, примерно 0,20%, примерно 0,25%, примерно 0,30%, примерно 0,35%, примерно 0,40%, примерно 0,45%, примерно 0,50%, примерно 0,55%, примерно 0,60%, примерно 0,65%, примерно 0,70%, примерно 0,75%, примерно 0,80%, примерно 0,85%, примерно 0,90%, примерно 0,95%, примерно 1,0%, примерно 1,1%, примерно 1,2%, примерно 1,3%, примерно 1,4%, примерно 1,5%, примерно 1,6%, примерно 1,7%, примерно 1,8%, примерно 1,9% или примерно 2,0%.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения объемное отношение прекультуры к ВТРМ на стадии (с) составляет от примерно 1:2 до примерно 1:50, от примерно 1:3 до примерно 1:45, от примерно 1:4 до примерно 1:40, от примерно 1:5 до примерно 1:35, от примерно 1:6 до примерно 1:30, от примерно 1:7 до примерно 1:25, от примерно 1:8 до примерно 1:20 или от примерно 1:8 до примерно 1:10 (или имеет промежуточное значение). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения объемное отношение прекультуры к ВТРМ на стадии (с) равно примерно 1:2, примерно 1:3, примерно 1:4, примерно 1:5, примерно 1:6, примерно 1:7, примерно 1:8, примерно 1:9, примерно 1:10, примерно 1:15, примерно 1:20, примерно 1:25, примерно 1:30, примерно 1:35, примерно 1:40, примерно 1:45 или примерно 1:50.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стадию (b) проводят до тех пор, пока значение  $OD_{600}$  (оптическая плотность при длине волны 600 нм) не достигнет диапазона от примерно 0,1 до примерно 1,0, от примерно 0,1 до примерно 0,05 или от примерно 0,2 до примерно 0,4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стадию (b) проводят до тех пор, пока  $OD_{600}$  не достигнет значения, равного примерно 0,1, примерно 0,2, примерно 0,3, примерно 0,4, примерно 0,5, примерно 0,6, примерно 0,7, примерно 0,8, примерно 0,9 или примерно 1,0.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стадию (b) проводят в течение промежутка времени в диапазоне от примерно 10 часов до примерно 30 часов, от примерно 15 часов до примерно 25 часов или от примерно 17 часов до примерно 21 часа (или имеющего промежуточное значение). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стадию (b) проводят в течение примерно 10 часов, примерно 11 часов, примерно 12 часов, примерно 13 часов, примерно 14 часов, примерно 15 часов, примерно 16 часов, примерно 17 часов, примерно 18 часов, примерно 19 часов, примерно 20 часов, примерно 21 часа, примерно 22 часов, примерно 23 часов, примерно 24 часов, примерно 25 часов, примерно 26 часов, примерно 27 часов, примерно 28 часов, примерно 29 часов или примерно 30 часов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стадию (b) проводят в течение примерно  $19 \pm 2$  часов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стадию (b) проводят в течение примерно  $19 \pm 1$  часов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стадию (b) проводят в течение примерно  $19 \pm 0,5$  часов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стадию (b) проводят в течение примерно  $19 \pm 0,2$  часов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стадию (b) проводят в течение примерно 19 часов.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стадию (c) проводят в течение промежутка времени в диапазоне от примерно 60 часов до примерно 80 часов, от примерно 65 часов до примерно 75 часов или от примерно 67 часов до примерно 71 часа (или имеющего промежуточное значение). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения процесс ферментации продолжается в течение примерно 60 часов, примерно 65 часов, примерно 66 часов, примерно 67 часов, примерно 68 часов, примерно 69 часов, примерно 70 часов, примерно 71 часа, примерно 72 часов, примерно 73 часов, примерно 74 часов, примерно 75 часов, примерно 76 часов, примерно 77 часов, примерно 78 часов, примерно 79 часов или примерно 80 часов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения процесс ферментации продолжается в течение примерно  $69 \pm 2$  часов, примерно  $69 \pm 1$  часов, примерно  $69 \pm 0,5$  часов или примерно  $69 \pm 0,2$  часов. В варианте осуществления настоящего изобретения стадию (c) проводят в течение примерно 69 часов.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анализ на микробиологическую чистоту в отношении других микроорганизмов, отличающихся от *C. botulinum*, проводят в прекультуре после стадии (b) и перед стадией (c).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анализ на микробиологическую чистоту в отношении других микроорганизмов, отличающихся от *C. botulinum*, проводят в культуре после стадии (c) и перед стадией (d).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения белок растительного происхождения является пшеничным пептоном. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация пшеничного пептона в ВТРМ составляет от примерно 10 граммов на литр до примерно 30 граммов на литр, например, она равна примерно 20 граммам на литр. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация пшеничного пептона в ВТРМ равна примерно 20 граммам на литр. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ВТРМ содержит пшеничный пептон, экстракт дрожжей, D-(+)-глюкозу, L-цистеина гидрохлорида моногидрат, Эмульсию Медицинского Антивспенивателя С ("Medical Antifoam C Emulsion").

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ВТРМ содержит пшеничный пептон, экстракт дрожжей, D-(+)-глюкозу, L-цистеина гидрохлорида моногидрат, Эмульсию Медицинского Антивспенивателя С, дистиллированную воду, NaOH и HCl. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения ВТРМ содержит примерно 20 граммов на литр пшеничного пептона, примерно 20 граммов на литр экстракта дрожжей, примерно 5 граммов на литр D-(+)-глюкозы, примерно 0,20 грамма на литр L-цистеина гидрохлорида моногидрата и примерно 0,24 грамма на литр Эмульсии Медицинского Антивспенивателя С. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения pH ВТРМ составляет от примерно 6,7 до примерно 7,2.

В другом аспекте в данной работе предложены композиции, содержащие *Clostridium botulinum* и культуральную среду для получения ботулинического токсина, причем среда не содержит или практически не содержит продукта животного происхождения и содержит один или более белков растительного происхождения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения один или более белков растительного происхождения являются пшеничным пептоном, пептоном конских бобов, картофельным пептоном, гороховым пептоном, рисовым пептоном или соевым пептоном, или их комбинациями. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения белок растительного происхождения является пшеничным пептоном.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация пшеничного пептона в VTPM равна примерно 20 граммам на литр. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения VTPM содержит пшеничный пептон, экстракт дрожжей, D-(+)-глюкозу, L-цистеина гидрохлорида моногидрат, Эмульсию Медицинского Антивспенивателя С.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения VTPM содержит пшеничный пептон, экстракт дрожжей, D-(+)-глюкозу, L-цистеина гидрохлорида моногидрат, Эмульсию Медицинского Антивспенивателя С, дистиллированную воду, NaOH и HCl. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения VTPM содержит примерно 20 граммов на литр пшеничного пептона, примерно 20 граммов на литр экстракта дрожжей, примерно 5 граммов на литр D-(+)-глюкозы, примерно 0,20 грамма на литр L-цистеина гидрохлорида моногидрата и примерно 0,24 грамма на литр Эмульсии Медицинского Антивспенивателя С.

#### **Краткое описание графических материалов**

Фиг. 1 иллюстрирует процесс ферментации. 400 мкл рабочего банка клеток (WCB) добавили к 500 мл питательной среды в ферментационном мешке объемом 2 л. Перед инокуляцией мешок продули профильтрованным азотом. Ферментацию проводили до тех пор, пока  $OD_{600}$  (оптическая плотность при длине волны 600 нм) не достигла значения в диапазоне от 0,2 до 0,4, при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Затем 4500 мл растительной среды для получения токсина (VTPM) добавили в культивационный мешок объемом 5 л, содержащий 500 мл прекультуры. Перед инокуляцией мешок продули профильтрованным азотом. Ферментацию проводили в течение  $69 \pm 2$  ч при  $33 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Фиг. 2 демонстрирует график оптической плотности при 600 нм для основного культивирования. График основан на взятых и проанализированных образцах из нескольких ферментаций, выполненных так, как указано в примере 2 ниже.

Фиг. 3 демонстрирует график pH для основного культивирования. График основан на взятых и проанализированных образцах из нескольких ферментаций, выполненных так, как указано в примере 2 ниже.

Фиг. 4 демонстрирует вестерн-блот анализ вариантов тяжелой цепи BoNT/A в основном культивировании, выполненном согласно примеру 2. Образцы были взяты в различные моменты времени во время ферментации и проанализированы совместно с контрольными образцами, демонстрирующими только полосу 2 или как полосу 1, так и полосу 2.

Фиг. 5 демонстрирует таблицу с избранными иллюстрациями из вестерн-блот анализа вариантов тяжелой цепи BoNT/A в образцах, полученных при сборе из основных культивирований при различных температурах. В таблице также приведены концентрации BoNT/A в тех же образцах, определенные способом ELISA.

Фиг. 6 демонстрирует содержание токсина, полученного при сборе через 69 часов основных культур, выращенных в VTPM на основе пшеничного пептона или в VTPM на основе соевого пептона.

Фиг. 7 демонстрирует содержание токсина, полученного при сборе через 69 часов основных культур, выращенных в VTPM на основе пептона, полученного из картофеля, конских бобов или пшеницы.

#### **Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения**

Далее варианты осуществления настоящего изобретения будут описаны более подробно. Однако аспекты настоящего изобретения могут быть осуществлены в различных формах, и их не следует считать ограниченными вариантами осуществления, указанными в данной работе. Напротив, эти варианты осуществления представлены для того, чтобы описание настоящего изобретения было подробным и полным и полностью раскрыло объем настоящего изобретения специалистам в данной области техники. Следует понимать, что предложенная технология не ограничена конкретными способами, реагентами, соединениями, композициями или биологическими системами, которые, конечно же, могут варьироваться. Терминология, используемая в данном описании, предназначена исключительно для описания конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, и не является ограничительной.

Если не указано иное, все термины (включая технические и научные термины), использованные в данной работе, имеют стандартное значение, используемое специалистами в той области техники, к которой относится настоящее изобретение. Также следует понимать, что термины, например, определенные в обычно используемых словарях, следует интерпретировать как имеющие значение, соответствующее их значению в контексте данной заявки и соответствующей области техники, и их не следует интерпретировать в идеализированном или чрезмерно формальном смысле, кроме тех случаев, когда такое определение в явной форме приведено в данной работе. Такие термины следует интерпретировать согласно их стандартному значению, кроме тех случаев, когда в явной форме указано иное.

Кроме того, там, где признаки или аспекты настоящего изобретения описаны в терминах групп Маркуша, специалистам в данной области техники будет понятно, что настоящее изобретение также при этом описано в терминах любого отдельного элемента или подгруппы элементов группы Маркуша.

Как будет понятно специалисту в данной области техники, для любых целей, в частности - для обеспечения письменного описания, все диапазоны, указанные в данной работе, также включают все возможные поддиапазоны и комбинации поддиапазонов. Любой указанный диапазон легко можно при-

знать достаточно описывающим и позволяющим разбить этот диапазон на по меньшей мере равные половины, трети, четверти, пятые части, десятые части и т.д. В качестве неограничивающего примера, любой диапазон, обсуждаемый в данной работе легко можно разбить на нижнюю треть, среднюю треть и верхнюю треть, и т.д. Также специалисту в данной области техники будет понятно, что все выражения, такие как "до", "по меньшей мере", "более чем", "менее чем" и т.п., включают указанное число и относятся к диапазонам, которые в дальнейшем можно разбить на поддиапазоны, как обсуждалось выше. Наконец, как будет понятно специалисту в данной области техники, диапазон включает каждый конкретный элемент. Соответственно, например, термин "группа, содержащая от 1 клетки до 3 клеток" относится к группам, содержащим 1 клетку, 2 клетки или 3 клетки. Сходным образом, термин "группа, содержащая от 1 клетки до 5 клеток", относится к группам, содержащим 1 клетку, 2 клетки, 3 клетки, 4 клетки или 5 клеток, и т.д.

Если из контекста не следует иное, то это конкретно означает, что различные признаки технологии, описанной в данной работе, можно использовать в любой комбинации. Более того, настоящее изобретение также предусматривает, что в некоторых вариантах его осуществления можно исключить или удалить любой признак или комбинацию признаков, указанных в данной работе. В качестве иллюстрации, если в описании указано, что комплекс содержит компоненты А, В и С, то это конкретно означает, что любой компонент А, В или С или их комбинацию можно исключить и отказаться от них по отдельности или в любой комбинации.

Если в явной форме не указано иное, то все описанные варианты осуществления, признаки и термины включают как указанный вариант осуществления, признак или термин, так и их биологические эквиваленты.

Все патенты, заявки на патенты, предварительные заявки на патенты и публикации, на которые даны ссылки или которые цитируются в данной работе, полностью включены в данную публикацию посредством ссылок, включая все графические материалы и таблицы, в той мере, в которой они не являются несоответствующими выраженным в явной форме идеям данного описания.

#### Определения

При использовании в контексте настоящего изобретения формы единственного числа обозначают как единственное число, так и множественное число, если в явной форме не указано, что они обозначают только единственное число.

Следует понимать, хотя это не всегда указано в явной форме, что всем числовым значениям предшествует термин "примерно" или "приблизительно". Термины "примерно" или "приблизительно" означают, что подразумеваемое число не ограничено точным числом, указанным в данной работе, а относится к числам, расположенным по существу вокруг указанного числа, если они входят в объем настоящего изобретения. При использовании в контексте настоящего изобретения термины "примерно" или "приблизительно" будут понятными для специалистов в данной области техники и будут варьироваться в определенной степени в зависимости от контекста, в котором они использованы. Если имеются применения терминов, которые не очевидны специалистам в данной области техники, то в зависимости от контекста, в котором они использованы, термины "примерно" или "приблизительно" будут означать указанное число и до плюс-минус 15%, 10%, 5%, 1% или 0,1% от конкретного числа (например, "примерно 10" следует понимать как 10 и диапазон от 8,5 до 11,5).

Также при использовании в контексте настоящего изобретения термин "и/или" относится к любым возможным комбинациям и охватывает любые возможные комбинации одного или более соответствующих указанных элементов, а также отсутствие комбинаций при интерпретации в альтернативной форме ("или").

Также при использовании в контексте настоящего изобретения термины "не содержащий продукта животного происхождения", "по существу не содержащий продукта животного происхождения" или "практически не содержащий продукта животного происхождения" включают, соответственно, термины "не содержащий белка животного происхождения", или "практически не содержащий белка животного происхождения", или "по существу не содержащий белка животного происхождения" и означают отсутствие, по существу отсутствие или практическое отсутствие производных крови, кровяных депо и других продуктов или соединений животного происхождения. Термин "животное" означает млекопитающее (например, человека), птицу, рептилию, рыбу, насекомое, паука или другие виды животных. Термин "животное" не включает микроорганизмы, такие как бактерии. Соответственно, среда или процесс, не содержащие продукта животного происхождения, или среда или процесс, практически не содержащие продукта животного происхождения, в объеме настоящего изобретения могут включать ботулинический токсин или бактерию *Clostridium botulinum*. Например, процесс, не содержащий продукта животного происхождения, или процесс, практически не содержащий продукта животного происхождения, означает процесс, который либо практически не содержит, либо по существу не содержит, либо вообще не содержит белков животного происхождения, таких как иммуноглобулины, мясной гидролизат, мясные субпродукты и молоко или молочные продукты или гидролизаты. Соответственно, примером процесса, не содержащего продукта животного происхождения, является процесс (такой как процесс культивирования бактерий или бактериальной ферментации), в котором исключено использование мясных и молочных

продуктов или мясных или молочных субпродуктов.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин "ботулинический токсин" означает нейротоксин, продуцируемый *Clostridium botulinum*, и ботулинический токсин (или его легкую цепь, или его тяжелую цепь), полученный рекомбинантно с использованием неклостридиальных видов. Термин "ботулинический токсин" при использовании в контексте настоящего изобретения охватывает серотипы А, В, С, D, Е, F и G ботулинического токсина. При использовании в контексте настоящего изобретения термин "ботулинический токсин" также охватывает комплекс ботулинического токсина (то есть комплексы, молекулярная масса которых равна 300 кДа, 600 кДа и 900 кДа), а также очищенный ботулинический токсин (то есть имеющий молекулярную массу, примерно равную 150 кДа). "Очищенный ботулинический токсин" определен как ботулинический токсин, который отделен или практически отделен от других белков, включающих белки, образующие комплекс ботулинического токсина. Очищенный ботулинический токсин может иметь степень чистоты более 95% и предпочтительно - более 99%. Ботулинические цитотоксины С<sub>2</sub> и С<sub>3</sub>, не являющиеся нейротоксинами, исключены из объема настоящего изобретения. При использовании в контексте настоящего изобретения термин "ботулинический токсин" также охватывает термин "модифицированный ботулинический токсин".

Термин "модифицированный ботулинический токсин" означает ботулинический токсин, у которого по меньшей мере одна из его аминокислот удалена, модифицирована или заменена по сравнению с нативным ботулиническим токсином. Кроме того, модифицированный ботулинический токсин может быть рекомбинантно полученным нейротоксином или производным или фрагментом рекомбинантно полученного нейротоксина. Модифицированный ботулинический токсин сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность нативного ботулинического токсина, например - способность связываться с рецептором ботулинического токсина или способность ингибировать выделение нейромедиатора из нейрона. Примером модифицированного ботулинического токсина является ботулинический токсин, который содержит легкую цепь от одного серотипа ботулинического токсина (например, серотипа А) и тяжелую цепь от другого серотипа ботулинического токсина (например, серотипа В). Другим примером модифицированного ботулинического токсина является ботулинический токсин, соединенный с нейромедиатором, таким как субстанция Р.

При использовании в контексте настоящего изобретения термины "среда" или "ферментационная среда" означают любую среду для культивирования бактерий, то есть либо среду для их размножения для получения культуры для посева, используемой для инокуляции производственной среды, либо производственную среду, в которой бактерии размножаются и продуцируют токсин. Примером ферментационной среды по настоящему изобретению является растительная среда для получения токсина (VTRM).

При использовании в контексте настоящего изобретения термин "клостридиальный нейротоксин" означает нейротоксин, продуцируемый клостридиальной бактерией или нативный для клостридиальной бактерии, такой как *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum* или *Clostridium baratii*, а также клостридиальный нейротоксин, полученный рекомбинантно от неклостридиальных видов. Клостридиальные токсины, продуцируемые *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium baratii* и *Clostridium butyricum*, наиболее широко используют в терапевтических и косметических процедурах у людей и других млекопитающих. Штаммы *C. botulinum* продуцируют семь антигенноразличных типов ботулинических токсинов (BoNTs; от англ.: Botulinum toxins), которые выявили при исследовании вспышек ботулизма у людей (BoNT/A, 7В, FE и /F), животных (BoNT/C и /D) или выделили из почвы (BoNT/G). BoNTs имеют примерно 35%-ную идентичность аминокислот друг с другом и имеют одинаковую организацию функционального домена и общую структурную архитектуру. Специалистам в данной области техники известно, что внутри каждого типа клостридиального токсина могут существовать подтипы, которые несколько отличаются по последовательности аминокислот и по нуклеиновым кислотам, кодирующим эти белки. Например, в настоящее время известны пять подтипов BoNT/A - BoNT/A1, BoNT/A2, BoNT/A3, BoNT/A4 и BoNT/A5, причем специфические подтипы демонстрируют примерно 89%-ную идентичность аминокислот при сравнении с другими подтипами BoNT/A. Несмотря на то, что все семь серотипов BoNT имеют сходную структуру и фармакологические свойства, каждый из них также демонстрирует гетерогенные бактериологические характеристики. В противоположность этому, столбнячный токсин (TeNT; от англ.: tetanus toxin) продуцируется однородной группой *C. tetani*. Два других вида *Clostridia* - *C. baratii* и *C. butyricum* - также продуцируют токсины - BaNT и BuNT, соответственно, которые являются сходными с BoNT/F и BoNT/E, соответственно.

Клостридиальные токсины выделяются клостридиальными бактериями в форме комплексов, содержащих клостридиальный токсин с молекулярной массой, равной примерно 150 кДа, и связанные нетоксинные белки (NAPs; от англ.: non-toxin proteins). Идентифицированные NAPs включают белки, обладающие гемагглютинационной активностью, такие, например, как гемагглютинин с массой, примерно равной 17 кДа (HA-17), гемагглютинин с массой, примерно равной 33 кДа (HA-33), и гемагглютинин с массой, примерно равной 70 кДа (HA-70), а также нетоксичный негемагглютинин (NTNH; от англ.: non-toxic non-hemagglutinin) - белок с молекулярной массой, примерно равной 130 кДа; см., например, публикации Eric A. Johnson and Marite Bradshaw, *Clostridial botulinum and its Neurotoxins: A Metabolic and Cellu-*

lar Perspective, 39 Toxicon 1703-1722 (2001); и Stephanie Raffestin et al., Organization and Regulation of the Neurotoxin Genes in Clostridium botulinum and Clostridium tetani, 10 Anaerobe 93-100 (2004). Соответственно, комплекс ботулинического токсина типа А может быть выделен клостридиальной бактерией в виде форм с молекулярной массой, равной 900 кДа, 500 кДа и 300 кДа. Ботулинические токсины типов В и С, по-видимому, продуцируются только в форме с молекулярной массой, равной 500 кДа. Ботулинический токсин типа D продуцируется в форме комплексов с молекулярной массой, равной 300 кДа и 500 кДа. Наконец, ботулинические токсины типов Е и F продуцируются только в форме комплексов с молекулярной массой, равной примерно 300 кДа. Различия в молекулярной массе комплексов обусловлены различными долями NAPs. Комплекс токсина является важным для процесса интоксикации, поскольку он обеспечивает защиту от неблагоприятных условий окружающей среды, устойчивость против расщепления протеазой и, по-видимому, способствует интернализации и активации токсина.

Все клостридиальные токсины транслируются в форме одноцепочечного полипептида, который затем расщепляется посредством протеолитического расщепления внутри дисульфидной петли природной протеазой. Это расщепление происходит внутри дискретной области двухцепочечной петли, возникающей между двумя остатками цистеина, которые образуют дисульфидный мостик. Этот посттрансляционный процессинг дает двухцепочечную молекулу, содержащую легкую цепь (LC; от англ.: light chain) с молекулярной массой, равной примерно 50 кДа, и тяжелую цепь (HC; от англ.: heavy chain) с молекулярной массой, равной примерно 100 кДа, которые удерживаются вместе за счет одной дисульфидной связи и нековалентных взаимодействий между двумя цепями. Природная протеаза, используемая для преобразования одноцепочечной молекулы в двухцепочечную, в настоящее время неизвестна. В случае некоторых серотипов, например, таких как BoNT/A, природная протеаза продуцируется эндогенно бактериальным серотипом, и расщепление осуществляется внутри клетки до высвобождения токсина в окружающую среду. Однако в случае других серотипов, например, таких как BoNT/E, бактериальный штамм, по-видимому, не продуцирует эндогенную протеазу, способную преобразовать одноцепочечную форму токсина в двухцепочечную форму. В этих ситуациях токсин выделяется из клетки в форме одноцепочечного токсина, который в дальнейшем преобразуется в двухцепочечную форму природной протеазой, обнаруживаемой в окружающей среде.

При использовании в контексте настоящего изобретения термины "не содержащий" или "вообще не содержащий" означает, что в пределах диапазона обнаружения используемого прибора или способа вещество невозможно обнаружить или его присутствие невозможно подтвердить.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин "по существу не содержащий" означает, что можно обнаружить только следовые количества вещества. В настоящем изобретении "по существу не содержащий" означает, что вещество присутствует в концентрации, составляющей менее 0,1%, предпочтительно - менее 0,01%, и наиболее предпочтительно - менее от 0,001% от массы всей композиции.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин "практически не содержащий" означает, что вещество содержится в концентрации, составляющей менее 5%, предпочтительно - менее 2%, и наиболее предпочтительно - менее 1% от массы всей композиции.

При использовании в контексте настоящего изобретения термины "среда" или "ферментационная среда" означают любую среду для культивирования бактерий, то есть либо среду для их размножения для получения культуры для посева, используемой для инокуляции производственной среды, либо производственную среду, в которой бактерии размножаются и продуцируют токсин.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин "рабочий банк клеток" или "WCB" означает популяцию по существу гомологичных клеток, происходящих из одного главного банка клеток (MCB; от англ.: master cell bank). WCB обычно необходимы во время разработки и производства терапевтических средств. WCB получают из одного флакона MCB, который был выращен посредством нескольких пассажей и заморожен. Другими словами, клетки для WCB размножают из MCB. В действительности, если линию клеток необходимо использовать во многих производственных циклах, широко рекомендована двухуровневая система банков клеток, состоящая из главного банка клеток (MCB) и рабочего банка клеток (WCB).

При использовании в контексте настоящего изобретения термин "растительная среда для получения токсина" или "VTRM" означает среду для культивирования клеток, которая содержит компонент или компоненты, происходящие от одного или более растений (например, пшеницы, сои, конских бобов, картофеля, гороха и т.п.). Компонент или компоненты, происходящие от одного или более растений, могут включать, но не ограничены этим, растительный гидролизат, пептон или экстракт.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин "пептон" означает гидролизованный белковый материал, образующийся при ферментативном или кислотном расщеплении.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин "растительный экстракт" означает водные экстракты из каких-либо растений, содержащие аминокислоты и низкомолекулярные пептиды, углеводы, витамины и другие факторы роста.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин "растительный пептон" означает белковый материал, происходящий от растений, который был гидролизован с использованием микроб-



ных или растительных ферментов или посредством кислотного гидролиза. Белковым субстратом для образования пептонов может быть любой белковый материал, полученный из растений, или белковый концентрат, выделенный, например, из рисовой, пшеничной или соевой муки. Термин "дрожжевой пептон" означает белковый материал, полученный из дрожжевых клеток, который был гидролизован посредством аутолиза, или с использованием микробных или растительных ферментов, или посредством кислотного гидролиза. Термин "растительный пептон" в контексте настоящего изобретения относится к продукту частичного расщепления белка растительного происхождения, который находится в форме смеси, которая содержит не только отдельные молекулы аминокислот, но и пептиды, состоящие из нескольких штук или нескольких десятков аминокислот, и интактные молекулы белка. В настоящем изобретении растительный пептон предпочтительно является соевым пептоном, пшеничным пептоном, пептоном конских бобов, картофельным пептоном, гороховым пептоном, папайновым гидролизатом соевых бобов или люпиновым пептоном, наиболее предпочтительными являются гороховый пептон и пшеничный пептон.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин "OD<sub>600</sub>" означает оптическую плотность, измеренную при длине волны, равной 600 нм. Специалисту в данной области техники известно, что измерение OD<sub>600</sub> является стандартным способом определения концентрации клеток (в том числе бактерий) в жидкости. Способы определения OD<sub>600</sub> описаны, например, в публикациях S.A. Janke, et al., *Microbiological Turbidity Using Standard Photometers*, 6 Biospektrum 501-02 (1999); K. Harnack, et al. *Turbidity Measurements (OD<sub>600</sub>) with Absorption Spectrometers*, 6 Biospektrum 503-04 (1999).

Растительная среда для получения токсина (VTPM)

Растительные экстракты можно использовать в средах для размножения патогенных бактерий и получения их токсинов. Растительные экстракты - это водные экстракты растений, содержащие аминокислоты и низкомолекулярные пептиды, относительно высокие концентрации углеводов, витамины и другие факторы роста. Согласно настоящему изобретению, белки растительного происхождения, такие как пептоны, полученные из растений, включающих картофель, пшеницу, рис, смесь пшеницы и риса, хлопчатник или горох, могут заменить продукт животного происхождения для поддержания размножения бактерии *Clostridium botulinum*. Пептоны, которые можно использовать для целей описанной VTPM, могут включать, но не ограничены этим, пшеничный пептон CAS № 94350-06-8, пшеничный пептон E1, пшеничный пептон E260, гороховый пептон CAS № 100209-45-8, гороховый пептон A482, гороховый пептон A2501, картофельный пептон CAS № 100209-45-8, картофельный пептон E210, картофельный пептон L8, картофельный пептон A2401, рисовый пептон 19560, пептон хлопчатника 200, соевый пептон CAS № 91079-46-8, соевый пептон A3SC, соевый пептон A2SC и другие растительные или овощные пептоны.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пептон является пшеничным пептоном. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация пшеничного пептона в ферментационной среде составляет от 5 г/л до 50 г/л, предпочтительно - от 10 г/л до 40 г/л, предпочтительно - от 15 г/л до 30 г/л, предпочтительно - от 15 г/л до 25 г/л, и более предпочтительно - она равна примерно 20 г/л ферментационной среды. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация пшеничного пептона в ферментационной среде равна примерно 5 г/л, примерно 10 г/л, примерно 15 г/л, примерно 20 г/л, примерно 25 г/л, примерно 30 г/л, примерно 35 г/л, примерно 40 г/л, примерно 45 г/л или примерно 50 г/л.

Согласно настоящему изобретению ферментационная среда содержит экстракт дрожжей. Экстракты дрожжей обычно получают посредством бессолевого аутолиза первичных дрожжей и последующей тщательной очистки, которая обеспечивает отсутствие в экстракте дрожжей нежелательных компонентов, таких как споры и ДНК.

Согласно настоящему изобретению ферментационная среда дополнительно содержит экстракт дрожжей. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация экстракта дрожжей в ферментационной среде составляет от 5 г/л до 50 г/л, предпочтительно - от 10 г/л до 40 г/л, предпочтительно - от 15 г/л до 30 г/л, предпочтительно - от 15 г/л до 25 г/л, и более предпочтительно - она равна примерно 20 г/л ферментационной среды. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация экстракта дрожжей в ферментационной среде равна примерно 5 г/л, примерно 10 г/л, примерно 15 г/л, примерно 20 г/л, примерно 25 г/л, примерно 30 г/л, примерно 35 г/л, примерно 40 г/л, примерно 45 г/л или примерно 50 г/л.

Для размножения *C. botulinum* использовали различные источники углерода, включая глюкозу и глицерол. Добавление отдельного источника углерода не является абсолютно необходимым, если используют углеродсодержащий источник азота (*C. Botulinum* может ассимилировать углерод из аминокислот), но скорости размножения во время ферментации значительно выше, если имеется дополнительный источник углерода.

Согласно настоящему изобретению ферментационная среда содержит D-(+)-глюкозу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация D-(+)-глюкозы в ферментационной среде составляет от 0,5 г/л до 20 г/л, предпочтительно - от 1,0 г/л до 10 г/л, предпочтительно - от 2,5 г/л до 7,5 г/л, предпочтительно - от 3,5 г/л до 6,5 г/л, и более предпочтительно - она равна примерно 5 г/л ферментационной среды. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация D-(+)-глюкозы в ферментационной среде равна примерно 0,5 г/л, примерно 0,6 г/л, примерно 0,7 г/л,

примерно 0,8 г/л, примерно 0,9 г/л, примерно 1,0 г/л, примерно 1,5 г/л, примерно 2,0 г/л, примерно 2,5 г/л, примерно 3,0 г/л, примерно 3,5 г/л, примерно 4,0 г/л, примерно 4,5 г/л, примерно 5,0 г/л, примерно 5,5 г/л, примерно 6,0 г/л, примерно 6,5 г/л, примерно 7,0 г/л, примерно 7,5 г/л, примерно 8,0 г/л, примерно 8,5 г/л, примерно 9,0 г/л, примерно 9,5 г/л, примерно 10,0 г/л, примерно 11,0 г/л, примерно 12,0 г/л, примерно 13,0 г/л, примерно 14,0 г/л, примерно 15,0 г/л, примерно 16,0 г/л, примерно 17,0 г/л, примерно 18,0 г/л, примерно 19,0 г/л или примерно 20,0 г/л.

Согласно настоящему изобретению ферментационная среда также содержит L-цистеина гидрохлорида моногидрат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация L-цистеина гидрохлорида моногидрата в ферментационной среде составляет от 0,05 г/л до 5 г/л, предпочтительно - от 0,1 г/л до 5 г/л, предпочтительно - от 0,1 г/л до 2,5 г/л, предпочтительно - от 0,15 г/л до 1,5 г/л, и более предпочтительно - она равна примерно 0,2 г/л ферментационной среды. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация L-цистеина гидрохлорида моногидрата в ферментационной среде равна примерно 0,05 г/л, примерно 0,06 г/л, примерно 0,07 г/л, примерно 0,08 г/л, примерно 0,09 г/л, примерно 0,10 г/л, примерно 0,15 г/л, примерно 0,20 г/л, примерно 0,25 г/л, примерно 0,30 г/л, примерно 0,35 г/л, примерно 0,40 г/л, примерно 0,45 г/л, примерно 0,50 г/л, примерно 0,55 г/л, примерно 0,60 г/л, примерно 0,70 г/л, примерно 0,75 г/л, примерно 0,80 г/л, примерно 0,85 г/л, примерно 0,90 г/л, примерно 0,95 г/л, примерно 1,0 г/л, примерно 1,5 г/л, примерно 2,0 г/л, примерно 2,5 г/л, примерно 3,0 г/л, примерно 3,5 г/л, примерно 4,0 г/л, примерно 4,5 г/л или примерно 5,0 г/л.

Согласно настоящему изобретению ферментационная среда может содержать Эмульсию Медицинского Антивспенивателя С ("Medical Antifoam С Emulsion" от компании Dow Corning®). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация Эмульсии Медицинского Антивспенивателя С в ферментационной среде составляет от примерно 0,05 г/л до примерно 0,50 г/л, от примерно 0,10 г/л до примерно 0,40 г/л, от примерно 0,20 г/л до примерно 0,30 г/л или от примерно 0,22 г/л до примерно 0,26 г/л (или имеет промежуточное значение). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация Эмульсии Медицинского Антивспенивателя С в ферментационной среде равна примерно 0,05 г/л, примерно 0,10 г/л, примерно 0,12 г/л, примерно 0,14 г/л, примерно 0,16 г/л, примерно 0,18 г/л, примерно 0,20 г/л, примерно 0,22 г/л, примерно 0,24 г/л, примерно 0,26 г/л, примерно 0,28 г/л, примерно 0,30 г/л, примерно 0,32 г/л, примерно 0,34 г/л, примерно 0,36 г/л, примерно 0,38 г/л, примерно 0,40 г/л, примерно 0,45 г/л или примерно 0,50 г/л (или имеет любое промежуточное значение). В варианте осуществления настоящего изобретения концентрация Эмульсии Медицинского Антивспенивателя С в ферментационной среде равна примерно 0,24 г/л.

Согласно настоящему изобретению VTPM имеет значение pH в диапазоне от 5 до 8, предпочтительно - в диапазоне от 6 до 7,8, например, примерно 6,1, 6,3, 6,5, 6,7, 6,9, 7,0, 7,1, 7,3, 7,5 и 7,7.

#### Условия культивирования

Согласно настоящему изобретению первой стадией получения ботулинического токсина является прекультивирование бактерии *Clostridium botulinum* из рабочего банка клеток (WCB). В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения WCB получают посредством первоначального выделения уникального штамма *C. Botulinum* типа A1 из образца почвы. Затем штамм культивируют до образования спор и замораживают в форме многочисленных (например, 100) аликвот объемом по 0,5 мл каждая в качестве основного банка клеток (МСВ). Отдельную аликвоту МСВ затем культивируют до образования спор, которые замораживают в форме многочисленных (например, примерно 500) аликвот объемом по 0,5 мл каждая в качестве WCB.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения WCB размораживают и добавляют в ферментационный мешок, содержащий растительную среду для получения токсина (VTPM). В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения ферментационный мешок является стерильным, одноразовым, гибким ферментационным мешком, содержащим порты и/или трубки для подачи среды, инокуляции, извлечения образцов, впускное отверстие для газа и выпускное отверстие для газа. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения ферментационный мешок содержит газовый фильтр с размером ячеек, равным 0,2 мкм, на порте и/или трубке для подачи газа для обеспечения стерильной среды. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения VTPM предварительно нагревают до температуры, равной примерно  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , и продувают профильтрованным газообразным азотом для обеспечения анаэробной среды.

Анаэробную среду определяют как среду с концентрацией растворенного кислорода (DO), составляющей менее 2%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация растворенного кислорода (DO) может быть <2,0%, <1,9%, <1,8%, <1,7%, <1,6%, <1,5%, <1,4%, <1,3%, <1,2%, <1,1%, <1,0%, <0,9%, <0,8%, <0,7%, <0,6%, <0,5%, <0,4%, <0,3%, <0,2%, <0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02% или 0,01%. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация растворенного кислорода может быть примерно равной 0. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения WCB размораживают при комнатной температуре в течение пяти минут, затем перемешивают вихревым способом 3 раза по 5 секунд каждый раз перед добавлением 400 мкл WCB в ферментационный мешок, содержащий 500 мл VTPM.

Процесс ферментации продолжают до достижения  $OD_{600}$  приемлемого уровня, например - в диапазоне от примерно 0,1 до примерно 1,0, от примерно 0,1 до примерно 0,5 или предпочтительно - от примерно 0,2 до примерно 0,4 (или между этими значениями), для получения прекультуры. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения  $OD_{600}$  достигает значения, равного примерно 0,1, примерно 0,2, примерно 0,3, примерно 0,4, примерно 0,5, примерно 0,6, примерно 0,7, примерно 0,8, примерно 0,9 или примерно 1,0.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения анализ на микробиологическую чистоту в отношении других микроорганизмов, отличающихся от *C. botulinum*, выполняют на прекультуре в ходе текущего контроля. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения анализ выполняют для обнаружения возможного загрязнения бактериальной культуры во время ферментации. Присутствовать и обнаруживаться должен только *Clostridium botulinum*. Для скрининга на возможное присутствие каких-либо загрязняющих бактерий или грибов в культуре *C. botulinum* анализ проводят в различных средах и в различных условиях окружающей среды. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения для обнаружения анаэробных бактерий 10 мкл культуры наносят штрихами на пластину из агара, содержащего овечью кровь, которую инкубируют при 30-35°C в анаэробных условиях. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения для обнаружения аэробных бактерий 1 мл культуры смешивают с триптиказо-соевым агаром (TSA; от англ.: tryptic soy agar) и инкубируют при 30-35°C. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения для выявления дрожжей и плесеней образец культуры объемом 1 мл смешивают с SAB и инкубируют при 20-25°C. Не должно быть микробного роста на TSA и SAB пластинах, и все колонии, выросшие на пластине с овечьей кровью, должны иметь одинаковую (кlostридиальную) морфологию. Последующее окрашивание по Граму колоний с пластины с кровью должно показать грамположительные палочковидные бактерии и споры. Число жизнеспособных *C. botulinum* анализируют в ходе текущего контроля процесса.

Следующей стадией получения ботулинического токсина является основная культура. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения прекультуру добавляют в ферментационный мешок, содержащий 4500 мл VTPM, предварительно нагретый до  $33 \pm 1^\circ\text{C}$  и продутый профильтрованным газообразным азотом для обеспечения анаэробной среды. Анаэробную среду определяют как среду с содержанием растворенного кислорода (DO) менее 2%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация растворенного кислорода (DO) может быть <1,9%, <1,8%, <1,7%, <1,6%, <1,5%, <1,4%, <1,3%, <1,2%, <1,1%, <1,0%, <0,9%, <0,8%, <0,7%, <0,6%, <0,5%, <0,4%, <0,3%, <0,2%, <0,1%, <0,09%, <0,08%, <0,07%, <0,06%, <0,05%, <0,04%, <0,03%, <0,02% или <0,01% (или между этими значениями). В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация растворенного кислорода может быть равна примерно 0%, примерно 0,01%, примерно 0,02%, примерно 0,03%, примерно 0,04%, примерно 0,05%, примерно 0,06%, примерно 0,07%, примерно 0,08%, примерно 0,09%, примерно 0,1%, примерно 0,2%, примерно 0,3%, примерно 0,4%, примерно 0,5%, примерно 0,6%, примерно 0,7%, примерно 0,8%, примерно 0,9%, примерно 1,0%, примерно 1,1%, примерно 1,2%, примерно 1,3%, примерно 1,4%, примерно 1,5%, примерно 1,6%, примерно 1,7%, примерно 1,8%, примерно 1,9% или примерно 2,0%.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения процесс ферментации продолжается в течение промежутка времени в диапазоне от примерно 60 часов до примерно 80 часов, от примерно 65 часов до примерно 75 часов или от примерно 67 часов до примерно 71 часа (или имеющего промежуточное значение). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения процесс ферментации продолжается в течение примерно 60 часов, примерно 65 часов, примерно 66 часов, примерно 67 часов, примерно 68 часов, примерно 69 часов, примерно 70 часов, примерно 71 часа, примерно 72 часов, примерно 73 часов, примерно 74 часов, примерно 75 часов, примерно 76 часов, примерно 77 часов, примерно 78 часов, примерно 79 часов или примерно 80 часов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения процесс ферментации продолжается в течение примерно  $69 \pm 2$  часов, примерно  $69 \pm 1$  часов, примерно  $69 \pm 0,5$  часов или примерно  $69 \pm 0,2$  часов. В варианте осуществления настоящего изобретения стадию (с) проводят в течение примерно 69 часов.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения анализ на микробиологическую чистоту в отношении других микроорганизмов, отличающихся от *C. botulinum*, выполняют на прекультуре в ходе текущего контроля. Число жизнеспособных *C. botulinum* анализируют в ходе текущего контроля процесса.

### Описание примеров осуществления изобретения

#### Пример 1. Прекультивирование

В ферментационный мешок объемом 2 л добавили 500 мл растительной среды для получения токсина (VTPM), предварительно нагретой до  $37^\circ\text{C}$  и продутой профильтрованным газообразным азотом для обеспечения анаэробной среды. В ходе процесса проводили текущий контроль концентрации растворенного кислорода (DO) до тех пор, пока DO не стала < 2%. Флакон с рабочим банком клеток (WCB) разморозили при комнатной температуре в течение пяти минут, затем перемешали вихревым способом 3 раза по 5 секунд перед добавлением 400 мкл WCB с использованием пипетки во время подачи воздуха

класса А в ферментационный мешок, который затем поместили на биореактор.

Для получения рабочего банка клеток (WCB) использовали патентованный банк клеток. Коротко говоря, ботулинический токсин типа А1 выделили из образца почвы. В случае этого WCB оперон токсина был на 100% идентичен штамму Hall, ATCC 3502 - представителю Группы I (протеолитических) бактерий, продуцирующих ботулинический токсин.

Температура была задана в диапазоне  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , угол завихрения был равен  $12^\circ$ , и частота завихрений была равна  $12 \text{ мин}^{-1}$ . Концентрацию кислорода (DO) и значение pH контролировали в режиме реального времени. Продолжили ферментацию и в ходе процесса проводили текущий контроль  $\text{OD}_{600}$  до тех пор, пока  $\text{OD}_{600}$  не достигла значения в диапазоне от 0,2 до 0,4, через примерно 19 часов.

В конце стадии прекультивирования в качестве текущего контроля прекультуры был выполнен анализ микробиологической чистоты в отношении других микроорганизмов, отличающихся от *C. botulinum*. Число жизнеспособных *C. botulinum* анализировали в ходе текущего контроля во время процесса.

Таблица 1

Состав растительной среды для получения токсина (VTPM)

Сырьевой материал	Количество (на л)
1. Пшеничный пептон (Solabia, A2101)	$20,0 \pm 0,2 \text{ г}$
2. Экстракт дрожжей (BD Biosciences, 212750)	$20,0 \pm 0,2 \text{ г}$
3. D-(+)-глюкоза	$5,0 \pm 0,05 \text{ г}$
4. L-цистеина гидрохлорида моногидрат	$0,20 \pm 0,02 \text{ г}$
5. Эмульсия Медицинского Антивспенивателя С	$0,25 \pm 0,025 \text{ г}$
6. Дистиллированная вода	$970 \pm 10 \text{ мл}$
7. NaOH	Для регулирования pH
8. HCl	Для регулирования pH

#### Пример 2. Основная культура и ферментация

Ферментационный мешок объемом 10 л заполнили 4500 мл VTPM под потоком газообразного азота, предварительно нагрели до  $33 \pm 1^\circ\text{C}$  на биореакторе с углом завихрения, равным  $12^\circ$ , и частотой завихрений, равной  $12 \text{ мин}^{-1}$ . Прекультуру из предыдущей стадии посредством сифонирования добавили в ферментационный мешок. Мешок продули газообразным азотом для обеспечения анаэробной среды и в ходе процесса проводили текущий контроль концентрации растворенного кислорода (DO) до тех пор, пока значение DO не стабилизировалось на уровне ниже 2%.

Ферментацию продолжали в течение  $69 \pm 2 \text{ ч}$  от момента инокуляции основной культуры. Текущий контроль собираемой культуры выполнили посредством анализа микробиологической чистоты в отношении микроорганизмов, отличающихся от *C. botulinum*. Число жизнеспособных *C. botulinum* анализировали в ходе текущего контроля.

Коротко говоря, анализ на микробиологическую чистоту выполняют для обнаружения возможного загрязнения бактериальной культуры во время ферментации. Присутствовать и обнаруживаться должны только бактерии *Clostridium botulinum*. Для скрининга на возможное присутствие каких-либо загрязняющих бактерий или грибов в культуре *C. botulinum* анализ проводят в различных средах и в различных условиях окружающей среды. Для обнаружения анаэробных бактерий 10 мкл культуры наносят штрихами на пластину из агара, содержащего овечью кровь, которую инкубируют при  $30\text{-}35^\circ\text{C}$  в анаэробных условиях. Для обнаружения аэробных бактерий 1 мл культуры смешивают с триптиказо-соевым агаром (TSA) и инкубируют при  $30\text{-}35^\circ\text{C}$ . Для выявления дрожжей и плесеней 1 мл культуры смешивают с агаром, содержащим овечью кровь (SAB; от англ.: sheep blood agar) и инкубируют при  $20\text{-}25^\circ\text{C}$ . Не должно быть микробного роста на TSA и SAB пластинах, и все колонии, выросшие на пластине с овечьей кровью, должны иметь одинаковую (клостридиальную) морфологию. Последующее окрашивание по Граму колоний с пластины с кровью должно показывать грамположительные палочковидные бактерии и споры.

Таблица 2  
 Параметры процесса и диапазоны их значений

Параметр	Предпочтительный диапазон
<i>Прекультивирование</i>	
VTPM	500 ± 10 г
Температура	37 ± 1 °C
Объем инокуляции WCB	400 ± 7,5 мкл
Концентрация растворенного кислорода (DO) на старте	< 2%, предпочтительно < 0,2%
Время ферментации	19 ± 3 ч
OD <sub>600</sub>	0,2 - 0,4 ед. абсорбции
Угол завихрения	12°
Скорость завихрения	12 об/мин
<i>Основное культивирование</i>	
Объем инокуляции из прекультивирования	500 мл
Количество питательной среды VTPM	4500 ± 10 г
Температура	33 ± 1 °C
DO на старте	< 2%, предпочтительно < 0,2%
Время ферментации	69 ± 2 ч
Угол завихрения	12°
Скорость завихрения	12 об/мин

Размножение *S. botulinum* контролируют посредством взятия образцов основной культуры и измерения оптической плотности при длине волны 600 нм (OD<sub>600</sub>). Фиг. 2 демонстрирует график оптической плотности (поглощения света при 600 нм) для основных культивирований *S. botulinum* в VTPM, выполненных согласно примеру 2. Оптическая плотность при длине волны 600 нм обеспечивает кривую размножения основной культуры. Быстрое размножение наблюдается в течение первых 15 часов, когда OD<sub>600</sub> возрастает до примерно 7, после чего происходит столь же быстрое снижение OD<sub>600</sub> до примерно 1 вследствие лизиса бактерий и высвобождения молекул токсина. В остальное время - от примерно 40 часов до сбора через 69±2 часа - значение OD<sub>600</sub> остается относительно стабильным, демонстрируя лишь небольшое повышение.

Фиг. 3 демонстрирует результаты мониторинга "в потоке" значения pH во время ферментации основной культуры. График pH основной культуры обнаруживает типичную форму с начальным снижением от pH 7 до pH, равного примерно 5,7, примерно за 15 часов, что является приблизительно тем же временем, за которое OD<sub>600</sub> достигает пика. После 15 часов происходит медленное, но непрерывное повышение pH до значения 6,3 через 69 часов (то есть к моменту сбора).

Выход токсина в основной культуре во время сбора можно измерить посредством BoNT/A-специфического твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA; от англ.: enzyme-linked immunosorbent assay). Средняя концентрация, генерированная в основных культурах, выращенных согласно примеру 2, равна 4,9 мкг/мл при стандартном отклонении, равном 0,75.

Протокол ELISA является непрямым сэндвич-анализом ELISA, основанным на принципах и общем способе, описанных в Фармакопее США (USP - United States Pharmacopoeia) <1103>, "Immunological Test Methods - Enzyme-linked Immunosorbent Assay". Способ ELISA основан на иммунологическом связывании и обнаружении BoNT/A с использованием двух различных типов BoNT/A-специфических поликлональных антител.

Серию стандартных разведений белков на основе коммерческого BoNT/A токсина приготовили посредством разведения BoNT/A в фосфатном буферном растворе (PBS; от англ.: phosphate-buffered saline) с добавлением Tween (0,05% Твин-20) в диапазоне концентраций от 3 нг/мл до 28 нг/мл. Образец, разведенный в PBS-Tween до диапазона стандартных разведений белков, параллельно добавили в три лунки микропланшета, покрытые поликлональным антителом к BoNT/A. Инкубация приводит к распознаванию антитела и связыванию BoNT/A антигена с лункой. За каждой инкубацией следовала стадия автоматизированной промывки с использованием раствора PBS-Tween.

Первичное обнаружение осуществляют посредством связывания другого типа поликлонального антитела к BoNT/A, что приводит к образованию сэндвич-комплекса. Затем добавляют вторичное антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP; от англ.: horseradish peroxidase). Его связывание с первичным антителом обеспечивает обнаружение BoNT/A внутри сэндвич-комплекса. Затем в лунки с образцом

добавляют субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ; от англ.: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine). HRP преобразует субстрат ТМВ с образованием синего продукта реакции. Затем добавляют стоп-раствор, останавливающий конверсию ТМВ и иницирующий преобразование цвета остаточного ТМВ в желтый. Оптическую плотность в каждой лунке микропланшета определяют при длине волны 450 нм с помощью спектрофотометра для прочтения планшетов, причем измеренная оптическая плотность прямо пропорциональна количеству ВоNT/A в лунке. Значения оптической плотности образца рассчитывают посредством сравнения со стандартной кривой, основанной на значениях оптической плотности в случае стандартных разведений ВоNT/A. Результаты представляют в форме средних значений в мкг/мл.

Во время ферментации основной культуры токсин становится обнаружимым в культуральных средах примерно через 15 часов. При анализе содержания токсина в восстановленных образцах из ферментаций основной культуры посредством вестерн-блот анализа с поликлональным антителом к ВоNT/A обнаружены различные варианты тяжелой цепи токсина. Фиг. 4 демонстрирует пример такого вестерн-блот анализа, который выявил образование полос 1 и 2 тяжелых цепей во время основной ферментации (образцы за период с 20 часов до 77 часов).

Во время ранних фаз ферментации имеются три видимые основные полосы, представляющие нерасщепленный претоксинный полипептид с молекулярной массой, равной 160 кДа, полосу 1 тяжелой цепи с молекулярной массой, примерно равной 100 кДа, и полосу 2 тяжелой цепи, расположенную немного ниже полосы 1 полностью зрелого ВоNT/A. Во время ферментации нерасщепленный претоксинный полипептид и полоса 1 тяжелой цепи постепенно исчезают и преобразуются в полосу 2 изоформы зрелой тяжелой цепи. Во время сбора (через  $69 \pm 2$  часов) в основной культуре присутствует только полоса 2 изоформы зрелой тяжелой цепи.

Созревание белка ВоNT/A с образованием полосы 2 изоформы тяжелой цепи регулируется временем ферментации, но другим важным фактором является температура ферментации. Фиг. 5 демонстрирует таблицу с избранными иллюстрациями (из вестерн-блот анализа) вариантов тяжелой цепи ВоNT/A во время сбора основных культивирований, выполненных при различных температурах. В таблице также представлена концентрация ВоNT/A в тех же образцах (определенная посредством ELISA). При температурах, равных или ниже  $30^\circ\text{C}$ , созревание является неполным после 69 часов ферментации основной культуры. При температуре ферментации, равной или выше  $35^\circ\text{C}$ , созревание до полосы 2 изоформы тяжелой цепи является полным через 69 часов, но концентрация ВоNT/A в культуральной среде ниже. Если обобщить результаты, то данные показали, что оптимальная для основного культивирования температура, которая обеспечивает генерацию полностью зрелого ВоNT/A с высоким выходом токсина, равна примерно  $33^\circ\text{C}$ .

Пример 3. Сравнение с другими растительными пептонами

Кроме пшеничного пептона, VTPM среды могут быть основаны на других растительных пептонах (например, соевом пептоне, картофельном пептоне или пептоне конских бобов) для размножения *S. botulinum* и получения ботулинического токсина.

Фиг. 6 демонстрирует количество ботулинического токсина, полученного в основных культурах *S. botulinum*, выращенных при  $30^\circ\text{C}$  в VTPM на основе соевого пептона (сплошные столбики) или в VTPM на основе пшеничного пептона (заштрихованные столбики), в равных общих объемах. Данные показывают, что пшеничный пептон дает немного более высокий выход токсина, а также обеспечивает более надежный, устойчивый процесс.

Фиг. 7 демонстрирует концентрацию ботулинического токсина, полученного в основных культурах *S. botulinum*, выращенных при  $30^\circ\text{C}$  в VTPM на основе картофельного пептона, пептона конских бобов или пшеничного пептона. Все три VTPM среды обеспечили концентрации токсина при сборе, превышавшие 1 мкг/мл. Однако пшеничный пептон обеспечил существенно большее количество токсина (примерно 4 мкг/мл), чем VTPM на основе картофельного пептона и пептона конских бобов.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения ботулинического токсина, включающий следующие стадии:
  - (a) получение рабочего банка клеток (WCB), содержащего бактерию *Clostridium botulinum*;
  - (b) добавление рабочего банка клеток в первый контейнер, содержащий растительную среду для получения токсина (VTPM), и культивирование бактерии *Clostridium botulinum* в VTPM в условиях, которые обеспечивают размножение *Clostridium botulinum*, с получением прекультуры;
  - (c) добавление прекультуры во второй контейнер, содержащий VTPM, и культивирование бактерии *Clostridium botulinum* в VTPM в условиях, которые обеспечивают продуцирование ботулинического токсина, и
  - (d) выделение ботулинического токсина,причем VTPM практически не содержит или вообще не содержит продукта животного происхождения и содержит пшеничный пептон в концентрации от 15 г/л до 30 г/л.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что стадия (c) включает культивирование бактерии *Clostridium botulinum* при температуре в диапазоне от 30°C до 37°C.
3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что стадию (c) проводят в течение промежутка времени от 60 часов до 80 часов.
4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что ботулинический токсин является ботулиническим нейротоксином типа А (BoNT/A).
5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что контейнер, используемый на стадиях (b) и (c), является ферментационным мешком.
6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что условия на стадиях (b) и (c) включают анаэробную среду.
7. Способ по п.6, отличающийся тем, что анаэробная среда имеет концентрацию растворенного кислорода (DO) менее 2%.
8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что условие на стадии (b) включает температуру в диапазоне от 35°C до 39°C, предпочтительно равную 37±1°C.
9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что культивирование бактерии *Clostridium botulinum* на стадии (c) осуществляют при температуре, составляющей 33±1°C, 33±0,5°C, или 33±0,2°C.
10. Способ по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что:
  - (i) объемное отношение WCB к VTPM на стадии (b) не превышает 2,0%, предпочтительно равно 0,08%;
  - (ii) объемное отношение прекультуры к VTPM на стадии (c) составляет от 1:2 до 1:50, предпочтительно равно 1:9;
  - (iii) стадию (b) проводят до тех пор, пока OD<sub>600</sub> не достигнет значения в диапазоне от 0,1 до 1,0, предпочтительно от 0,2 до 0,4; и/или
  - (iv) стадию (b) проводят в течение промежутка времени в диапазоне от 10 часов до 30 часов, предпочтительно в течение 19 часов.
11. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что стадию (c) проводят в течение 69±2 часов.
12. Способ по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что после стадии (b) и перед стадией (c) в прекультуре проводят анализ на микробиологическую чистоту в отношении других микроорганизмов, отличающихся от *C. botulinum*.
13. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что после стадии (c) и перед стадией (d) в культуре проводят анализ на микробиологическую чистоту в отношении других микроорганизмов, отличающихся от *C. botulinum*.
14. Способ по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что концентрация пшеничного пептона в VTPM составляет от 15 г/л до 25 г/л, предпочтительно 20 г/л (± 15%).
15. Способ по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что VTPM содержит пшеничный пептон, экстракт дрожжей, D-(+)-глюкозу, L-цистеина гидрохлорида моногидрат и Эмульсию Медицинского Анти-вспенивателя С.
16. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что VTPM содержит:
  - от 15 г/л до 25 г/л, предпочтительно 20 г/л (± 15%), пшеничного пептона;
  - от 5 г/л до 50 г/л, предпочтительно 20 г/л, экстракта дрожжей;
  - от 0,05 г/л до 20 г/л, предпочтительно 5 г/л, D-(+)-глюкозы;
  - от 0,05 г/л до 0,50 г/л, предпочтительно 0,20 г/л, L-цистеина гидрохлорида моногидрата; и
  - от 0,05 г/л до 0,50 г/л, предпочтительно 0,24 г/л Эмульсии Медицинского Анти-вспенивателя С.
17. Способ по любому из пп.1-16, отличающийся тем, что pH VTPM составляет от 6,7 до 7,2.
18. Композиция, содержащая *Clostridium botulinum* и культуральную среду, для получения ботулинического токсина, причем среда не содержит или практически не содержит продукта животного происхождения и содержит пшеничный пептон в концентрации от 15 г/л до 30 г/л, экстракт дрожжей, D-(+)-

глюкозу, L-цистеина гидрохлорида моногидрат и Эмульсию Медицинского Антивспенивателя С.

19. Композиция по п.18, отличающаяся тем, что культуральная среда содержит:

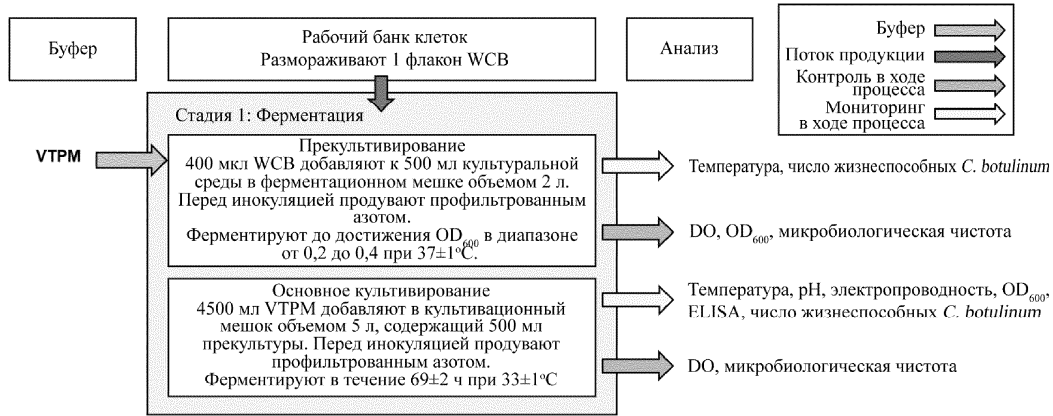
от 15 г/л до 25 г/л, предпочтительно 20 г/л ( $\pm 15\%$ ), пшеничного пептона;

от 5 г/л до 50 г/л, предпочтительно 20 г/л, экстракта дрожжей;

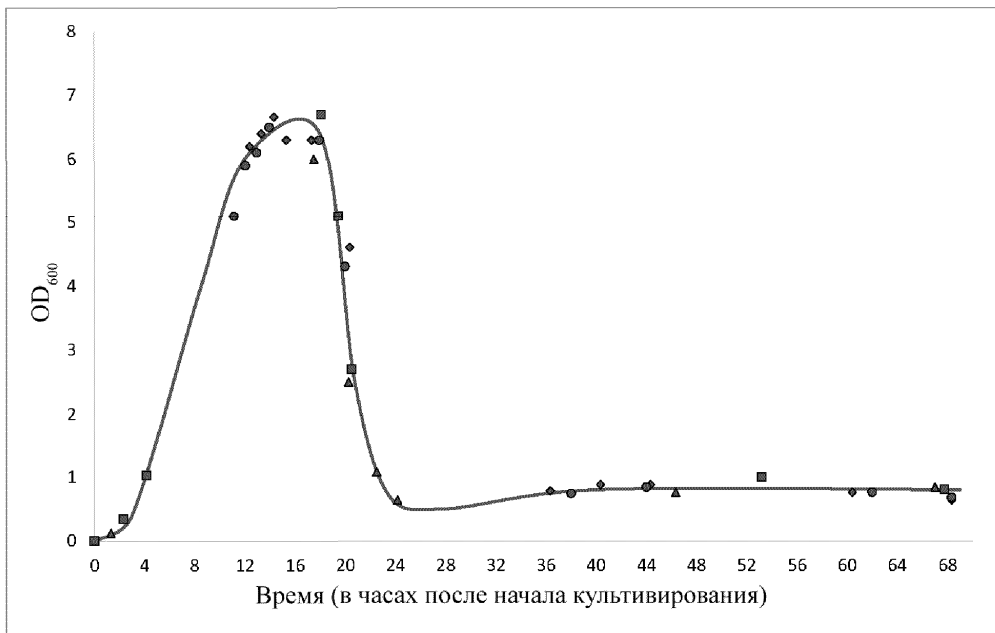
от 1 г/л до 20 г/л, предпочтительно 5 г/л, D-(+)-глюкозы;

от 0,05 г/л до 0,50 г/л, предпочтительно 0,20 г/л, L-цистеина гидрохлорида моногидрата; и

от 0,05 г/л до 0,50 г/л, предпочтительно 0,24 г/л, Эмульсии Медицинского Антивспенивателя С.

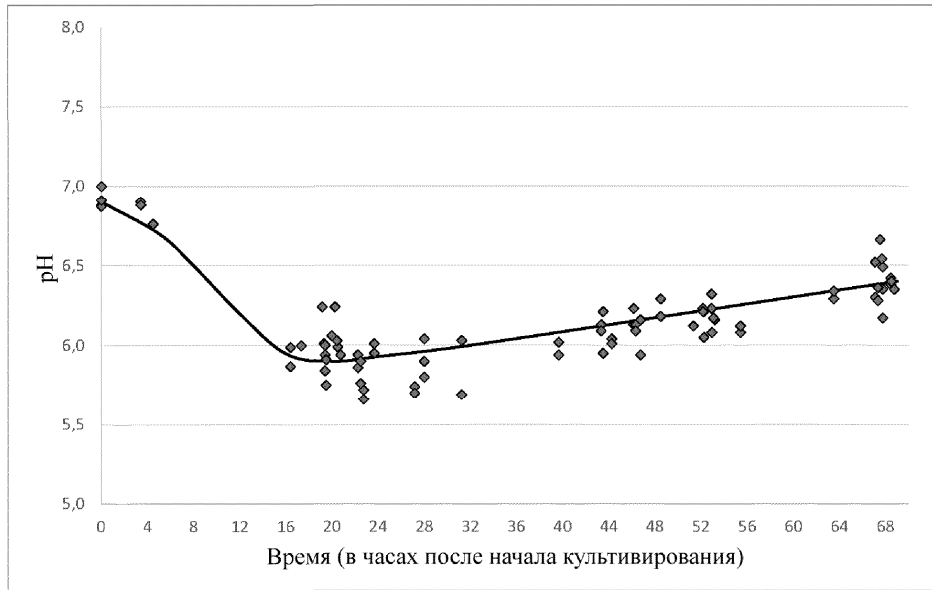


Фиг. 1

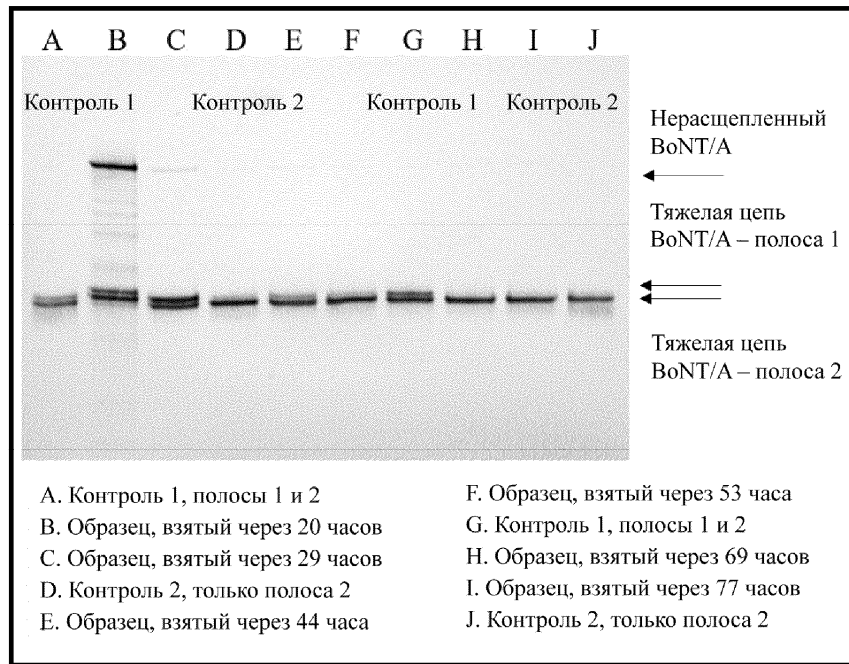


Фиг. 2





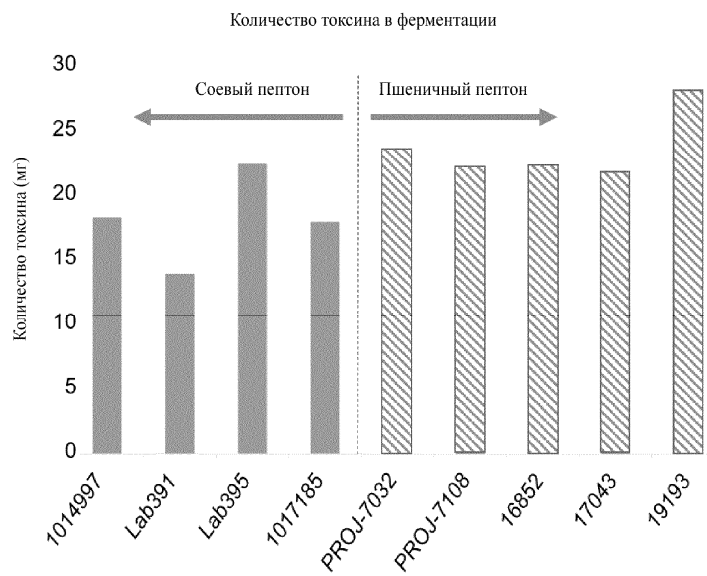
Фиг. 3



Фиг. 4

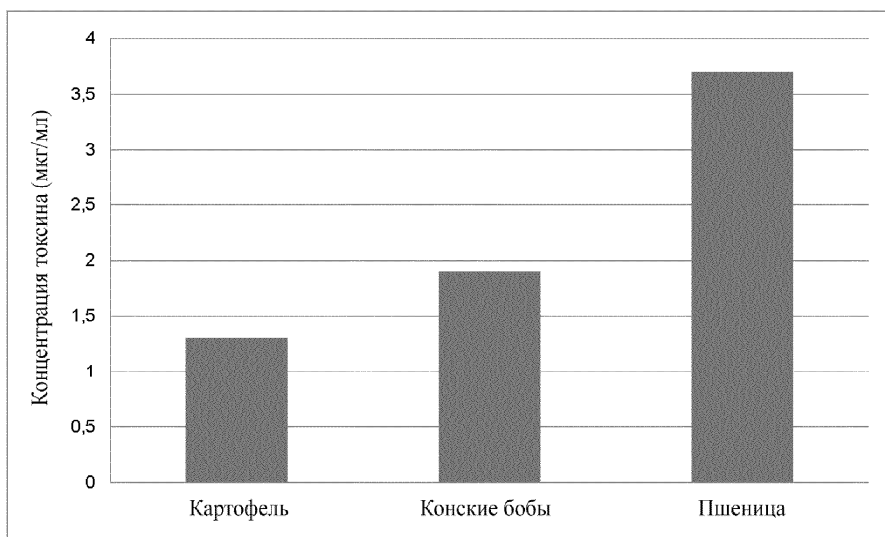
Температура во время основного культивирования (°C)	27		30		33		35	37
KS ~ 69 ч								
Содержание BoNT/A (мкг/мл)	2.9	3.3	4.2	4.8	5.5	5.9	4.6	1.8

Фиг. 5



Образец

Фиг. 6



Фиг. 7

