

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(10) 国际公布号
WO 2024/250799 A1

(43) 国际公布日
2024 年 12 月 12 日 (12.12.2024) **WIPO | PCT**

(51) 国际专利分类号:

C07K 14/33 (2006.01) **C07K 1/14** (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) **A61K 38/16** (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01) **A61P 27/02** (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

道滨海社区高新南十道87、89、91号深圳市软件产业基地2栋C1202, Guangdong 518063 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/083192

(22) 国际申请日: 2024 年 3 月 22 日 (22.03.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202310681461.9 2023年6月8日 (08.06.2023) CN

(72) 发明人: 江志华 (**JIANG, Zhihua**); 中国广东省深圳市南山区粤海街道滨海社区高新南十道87、89、91号深圳市软件产业基地2栋C1202, Guangdong 518063 (CN)。侯曦凡(**HOU, Xifan**); 中国广东省深圳市南山区粤海街道滨海社区高新南十道87、89、91号深圳市软件产业基地2栋C1202, Guangdong 518063 (CN)。王斌(**WANG, Bin**); 中国广东省深圳市南山区粤海街道滨海社区高新南十道87、89、91号深圳市软件产业基地2栋C1202, Guangdong 518063 (CN)。

(71) 申请人: 深圳德进生物科技有限公司 (**SHENZHEN REJUVO BIOTECHNOLOGY CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区粤海街

(74) 代理人: 北京志霖恒远知识产权代理有限公司(**BEIJING ZHILIN HENGYUAN INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.**); 中国北京市东

(54) **Title:** PREPARATION METHOD FOR BOTULINUM TOXIN TYPE A AND USE OF SAME

(54) 发明名称: 一种A型肉毒毒素的制备方法及其应用

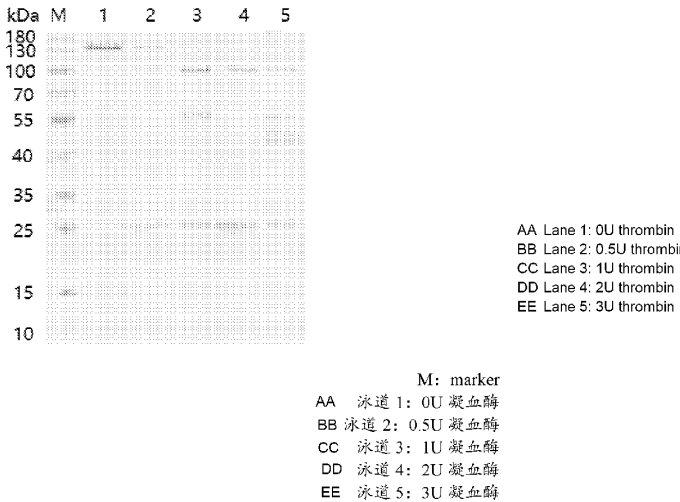


图 10

(57) **Abstract:** Provided is a preparation method for recombinant botulinum toxin type A (BoNT/A), the method comprising: designing a BoNT/A amino acid sequence in a P0DP10 protein database; by using a homologous recombination method, inserting an His tag and an SUMO tag sequence into the N terminal of the BoNT/A amino acid sequence; and then performing cleavage between GG-M by means of a SUMO tag protease. A result shows that no amino acid residue of any tag and the SUMO sequence is present, so that the safety is remarkably improved. Comparative experiments and animal experiments show that the recombinant botulinum toxin type A polypeptide which is prepared, purified and activated on the basis of a bacterium body centrifugal supernatant has higher virulence, so that the effective dose during practical use is reduced, thus remarkably reducing side effects and stimulation and achieving higher safety.

[见续页]

WO 2024/250799 A1

城区北三环东路36号环球贸易中心C座
2001-2007室, Beijing 100013 (CN)。

- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(57) 摘要: 提供了一种重组A型肉毒毒素(BoNT/A)的制备方法, 在P0DP10蛋白数据库设计BoNT/A氨基酸序列, 通过同源重组法将His标签和SUMO标签序列插入BoNT/A氨基酸序列N端, 再通过SUMO标签蛋白酶在GG-M之间进行切割, 结果显示不会有任何标签和SUMO序列的氨基酸残留, 安全性显著提升。通过对比实验和动物实验显示, 上述根据菌体离心上清液制备纯化并激活得到的重组A型肉毒毒素多肽毒力更强, 因此在实际应用中, 有效剂量降低, 因而副作用和刺激也显著降低, 具有更高的安全性。