

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 430**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/33** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**C12N 9/52** (2006.01)  
**C12P 21/02** (2006.01)  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**C12N 9/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2005 E 05759483 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 1853623**

54 Título: **Sistema libre de productos de origen animal y procedimiento de purificación de una toxina botulínica**

30 Prioridad:

**03.03.2005 US 72050**  
**03.03.2005 US 72673**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.08.2013**

73 Titular/es:

**ALLERGAN, INC. (100.0%)**  
**2525 DUPONT DRIVE**  
**IRVINE, CA 92612, US**

72 Inventor/es:

**XIANG, HUI;**  
**LUO, MINGJIANG;**  
**WANG, PING y**  
**DONOVAN, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 420 430 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Sistema libre de productos de origen animal y procedimiento de purificación de una toxina botulínica

**Referencia cruzada**

5 La presente solicitud es una continuación en parte de la solicitud de patente de Estados Unidos con número de serie pendiente, presentada el 3 de marzo de 2005, titulada "Medios para bacteria *Clostridium* y procedimientos para la obtención de una toxina de *Clostridium*" de Ping Wang y Stephen Donovan, que es una continuación en parte de la solicitud de Estados Unidos con número de serie 10/672.876, presentada el 25 de septiembre de 2003.

**Antecedentes**

10 La presente invención se refiere a sistemas y procedimientos de purificación de una toxina de *Clostridium*. En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento cromatográfico de purificación de una neurotoxina botulínica. Una composición farmacéutica adecuada para su administración a un ser humano o un animal con un propósito terapéutico, diagnóstico, de investigación o cosmético, puede comprender un principio activo. La composición farmacéutica también puede incluir uno o más excipientes, tampones, vehículos, estabilizantes, conservantes y/o agentes para aumentar el volumen. El principio activo en una composición farmacéutica puede ser 15 biológico tal como una toxina botulínica. La toxina botulínica como principio activo utilizado para fabricar una composición farmacéutica de toxina botulínica se puede obtener a través de un procedimiento multietapa de cultivo, fermentación y preparación de compuestos que utiliza uno o más productos de origen animal (tales como caldo de carne e ingredientes de caseína en uno o más de los medios de cultivo y fermentación usados para obtener una toxina botulínica a granel, y una fracción de sangre o un excipiente derivado de sangre en la preparación final de la 20 composición farmacéutica de toxina botulínica). La administración a un paciente de una composición farmacéutica en la que el principio activo biológico se obtiene a través de un procedimiento que utiliza productos de origen animal puede someter al paciente al posible riesgo de recibir varios agentes patógenos o infecciosos. Por ejemplo, en una composición farmacéutica pueden estar presentes priones. Un prión es una partícula infecciosa proteica de la que se ha hipotetizado que aparece como una isoforma conformacional anormal a partir de la misma secuencia de ácido nucleico que produce la proteína normal. También se ha propuesto la hipótesis de que la infectividad reside en una "reacción de reclutamiento" de la isoforma normal de la proteína hacia la isoforma priónica de la proteína en un nivel 25 postraducciona. Aparentemente, la proteína normal celular endógena es inducida a plegarse erróneamente en la conformación patogénica priónica.

30 La enfermedad de Creutzfeldt-Jacob es un raro trastorno neurodegenerativo de encefalopatía espongiiforme transmisible humana en la que el agente transmisor es aparentemente una isoforma anormal de una proteína priónica. Un individuo con la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob puede deteriorarse en seis meses de una apariencia perfectamente sana a mutismo acinético. Por tanto, puede existir un riesgo potencial de adquirir una enfermedad mediada por priones, tal como la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, por la administración de una composición farmacéutica que contenga un producto biológico, tal como una toxina botulínica, obtenida, purificada o compuesta 35 utilizando productos de origen animal.

**Toxina botulínica**

40 El género *Clostridium* tiene más de ciento veintisiete especies, agrupadas por su morfología y función. La bacteria anaerobia gram positiva *Clostridium botulinum* produce una potente neurotoxina polipeptídica, la toxina botulínica, que causa una enfermedad neurológica en seres humanos y en animales llamada botulismo. El *Clostridium botulinum* y sus esporas se encuentran comúnmente en el suelo y las bacterias pueden crecer en envases de comida inadecuadamente esterilizados y sellados de conservas de tipo casero, que son la causa de muchos de los casos de botulismo. Los efectos del botulismo aparecen típicamente de 18 a 36 horas después de haber comido los alimentos infectados con un cultivo de *Clostridium botulinum* o sus esporas. La toxina botulínica puede pasar aparentemente sin atenuar a través del revestimiento del intestino y atacar a las neuronas motoras periféricas. Los 45 síntomas de la intoxicación por toxina botulínica pueden progresar desde una dificultad para caminar, tragar, y hablar a una parálisis de los músculos respiratorios y muerte.

50 La toxina botulínica tipo A es el agente biológico natural más letal conocido para el hombre. Aproximadamente 50 picogramos de toxina botulínica (complejo de neurotoxina purificada) tipo A es una DL<sub>50</sub> en ratones. En base molar, la toxina botulínica tipo A es 1,8 mil millones de veces más letal que la difteria, 600 millones de veces más letal que el cianuro sódico, 30 millones de veces más letal que la cobrotoxina y 12 millones de veces más letal que el cólera. Singh, *Critical Aspects of Bacterial Protein Toxins*, páginas 63-84 (capítulo 4) of *Natural Toxins II*, editado por B.R. Singh y col., Plenum Press, New York (1976) (donde la afirmación de que la DL<sub>50</sub> de toxina botulínica tipo A de 0,3 ng equivale a 1 U se corrige por el hecho de que aproximadamente 0,05 ng de BOTOX® es igual a 1 unidad). El BOTOX® es la marca registrada de un complejo de neurotoxina de toxina botulínica tipo A purificada disponible 55 comercialmente en Allergan, Inc., de Irvine, California. Una unidad (U) de toxina botulínica se define como la DL<sub>50</sub> tras la inyección intraperitoneal en ratones hembra Swiss Webster que pesen aproximadamente 18-20 gramos cada uno. En otras palabras, una unidad de toxina botulínica es la cantidad de toxina botulínica que mata el 50% de un grupo de ratones hembra Swiss Webster. Se han caracterizado de manera general siete neurotoxinas botulínicas

- distintas inmunológicamente, estas son respectivamente los serotipos de neurotoxina botulínica A, B, C<sub>1</sub>, D, E, F y G, cada una de las cuales se distingue por neutralización con anticuerpos específicos de tipo. Los diferentes serotipos de toxina botulínica varían en las especies animales a las que afectan y en la gravedad y duración de la parálisis que causan. Por ejemplo, se ha determinado que la toxina botulínica tipo A es 500 veces más potente, cuando se mide por la tasa de parálisis que produce en la rata, que la toxina botulínica tipo B. Además, se ha determinado que la toxina botulínica tipo B no es tóxica para los primates a una dosis de 480 U/kg que es aproximadamente 12 veces la DL<sub>50</sub> en primates para la toxina botulínica tipo A. Las toxinas botulínicas aparentemente se unen con alta afinidad a las neuronas motoras colinérgicas, se translocan a las neuronas y bloquean la liberación presináptica de acetilcolina.
- Las toxinas botulínicas se han utilizado en el contexto clínico para el tratamiento de, por ejemplo, trastornos musculares caracterizados por músculos esqueléticos hiperactivos. La toxina botulínica tipo A se ha aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos para el tratamiento del blefaroespasma esencial, el estrabismo y el espasmo hemifacial en pacientes de más de doce años, para el tratamiento de la distonía cervical y para el tratamiento de las arrugas de la línea glabellar (facial). La FDA ha aprobado también una toxina botulínica del tipo B para el tratamiento de la distonía cervical. Los efectos clínicos de la inyección periférica (es decir, intramuscular o subcutánea) de toxina botulínica tipo A se ven usualmente en la semana posterior a la inyección, y a menudo en pocas horas tras la inyección. La duración típica del alivio sintomático (es decir, de la parálisis muscular flácida) por una sola inyección intramuscular de toxina botulínica tipo A puede ser de aproximadamente tres meses a aproximadamente seis meses.
- Aunque todos los serotipos de toxina botulínica aparentemente inhiben la liberación del neurotransmisor acetilcolina en la unión neuromuscular, lo hacen afectando a distintas proteínas neurosecretoras y/o escindiendo estas proteínas en diferentes sitios. La toxina botulínica A es una endopeptidasa de cinc que puede hidrolizar específicamente un enlace peptídico de la proteína SNAP-25 intracelular, asociada a vesículas. La toxina botulínica tipo E también escinde la proteína asociada al sinaptosoma de 25 kiloDaltons (kDa) (SNAP-25), pero se dirige a diferentes secuencias de aminoácidos en esta proteína, cuando se compara con la toxina botulínica tipo A. Los tipos de toxina botulínica B, D, F y G actúan sobre la proteína asociada a vesículas (VAMP, también llamada sinaptobrevina), y cada serotipo escinde la proteína en un sitio diferente. Finalmente se ha demostrado que la toxina botulínica tipo C<sub>1</sub> escinde tanto la sintaxina como la SNAP-25. Estas diferencias en los mecanismos de acción pueden afectar a la potencia relativa y/o la duración de acción de los distintos serotipos de toxina botulínica.
- Independientemente del serotipo, el mecanismo molecular de la intoxicación por la toxina parece ser similar e implicar al menos tres etapas o estadios. En la primera etapa del procedimiento, la toxina se une a la membrana presináptica de la neurona diana a través de una interacción específica entre la cadena pesada (cadena H) y un receptor celular de superficie; se piensa que el receptor es diferente para cada serotipo de toxina botulínica. El segmento carboxilo terminal de la cadena H, H<sub>C</sub>, parece ser importante para dirigir la toxina a la superficie celular.
- En la segunda etapa, la toxina cruza la membrana plasmática de la célula envenenada. La toxina se envuelve en primer lugar por la célula por endocitosis mediada por receptor, y se forma un endosoma que contiene la toxina. La toxina entonces escapa del endosoma al citoplasma de la célula. Se piensa que esta última etapa está mediada por el segmento amino terminal de la cadena H, H<sub>N</sub>, que provoca un cambio conformacional de la toxina en respuesta a un pH de aproximadamente 5,5 o más bajo. Se sabe que los endosomas poseen una bomba de protones que disminuye el pH intraendosómico. El cambio conformacional expone los restos hidrófobos de la toxina, lo cual permite que la toxina se incruste por sí misma en la membrana endosómica. La toxina se transloca entonces a través de la membrana endosómica al citosol.
- La última etapa del mecanismo de la actividad de la toxina botulínica parece implicar la reducción del enlace disulfuro que une la cadena H y L. Toda la actividad tóxica de *Clostridium botulinum* y de las toxinas botulínicas está contenida en la cadena L de la holotoxina; la cadena L es una endopeptidasa de cinc (Zn<sup>++</sup>) que escinde selectivamente proteínas esenciales para el reconocimiento y acoplamiento de vesículas que contienen neurotransmisores con la superficie citoplasmática de la membrana plasmática, y la fusión de las vesículas con la membrana plasmática. La neurotoxina botulínica, toxinas botulínicas B, D, F, y G, producen la degradación de la sinaptobrevina (también llamada proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP)), una proteína de la membrana sinaptosómica. La mayoría de las VAMP presentes en la superficie citosólica de la vesícula sináptica desaparece como resultado de cualquiera de estos eventos de escisión. Cada toxina escinde específicamente un enlace diferente.
- El peso molecular de la molécula proteica de la toxina botulínica, para los siete serotipos de toxinas botulínicas conocidos, es aproximadamente 150 kDa. Curiosamente, las toxinas botulínicas se liberan por la bacteria *Clostridium* como complejos que comprenden la molécula proteica de toxina botulínica de 150 kDa junto con una o más proteínas asociadas que no son toxinas. Por tanto, el complejo de toxina botulínica tipo A puede producirse por la bacteria *Clostridium* como formas de 900 kDa, 500 kDa y 300 kDa (pesos moleculares aproximados). Las toxinas botulínicas tipos B y C<sub>1</sub> se producen aparentemente como un complejo de 500 kDa solamente. La toxina botulínica tipo D se produce como complejos tanto de 300 kDa como de 500 kDa. Finalmente, las toxinas botulínicas tipos E y F se producen como complejos de aproximadamente 300 kDa solamente. Se cree que los complejos (es decir, de peso molecular mayor que aproximadamente 150 kDa) contienen una proteína hemaglutinina no toxina y una

proteína no hemaglutinina no toxina y no tóxica. Por tanto, un complejo de toxina botulínica puede comprender una molécula de toxina botulínica (el componente neurotóxico) y una o más proteínas hemaglutininas no tóxicas, y/o proteínas no hemaglutininas no toxinas (las últimas pueden denominarse proteínas NTNH). Estos dos tipos de proteínas no toxinas (que junto con la molécula de la toxina botulínica pueden constituir el complejo relevante neurotóxico) pueden actuar proporcionando estabilidad contra la desnaturalización a la molécula de toxina botulínica y protección contra los ácidos digestivos cuando la toxina es ingerida. Adicionalmente, es posible que los complejos más grandes (mayores de un peso molecular de aproximadamente 150 kDa) de toxina botulínica puedan dar como resultado una tasa de difusión más lenta de la toxina botulínica lejos del sitio de la inyección intramuscular de un complejo de toxina botulínica. Los complejos de toxina se pueden disociar en proteína de toxina y proteína hemaglutinina por tratamiento del complejo con glóbulos rojos a pH 7,3 o sometiendo el complejo a un procedimiento de separación tal como cromatografía en columna, en un tampón adecuado a un pH de aproximadamente 7-8. La proteína de toxina botulínica tiene una marcada inestabilidad tras disociarse de la proteína hemaglutinina.

Todos los serotipos de toxina botulínica se sintetizan por la bacteria nativa *Clostridium botulinum* como proteínas inactivas de una cadena única que debe escindirse o cortarse por proteasas para convertirse en neuroactiva. Las cepas bacterianas que producen los serotipos botulínicos A y G poseen proteasas endógenas y, por tanto, los serotipos A y G se pueden recuperar de los cultivos bacterianos predominantemente en su forma activa. Por el contrario, los serotipos de toxina botulínica C<sub>1</sub>, D y E se sintetizan por cepas no proteolíticas y, por tanto, están típicamente inactivadas cuando se recuperan de los cultivos. Los serotipos B y F los producen cepas tanto proteolíticas como no proteolíticas y, por tanto, se pueden recuperar en forma activa o inactiva. Sin embargo, incluso las cepas proteolíticas que producen, por ejemplo, el serotipo B de toxina botulínica solo escinden una porción de la toxina producida. La proporción exacta entre moléculas cortadas y sin cortar depende del periodo de incubación y de la temperatura del cultivo. Por tanto, es probable que un cierto porcentaje de cualquier preparación, por ejemplo, de la toxina botulínica tipo B, sea inactiva, posiblemente contribuyendo, como se sabe, a la potencia significativamente menor conocida de la toxina botulínica tipo B cuando se compara con la toxina botulínica tipo A. La presencia de moléculas de toxina botulínica inactivas en una preparación clínica contribuirá a la carga total de proteínas de la preparación, lo cual se ha asociado a un aumento de la antigenicidad, sin contribuir a su eficacia clínica. Adicionalmente, se sabe que la toxina botulínica tipo B tiene, tras la inyección intramuscular, una duración de actividad más corta y es también menos potente que la toxina botulínica tipo A a la misma dosis.

Los estudios *in vitro* han indicado que la toxina botulínica inhibe la liberación inducida por cationes de potasio de la acetilcolina y la norepinefrina en cultivos celulares primarios de células madre de tejido de tronco encefálico. Adicionalmente, se ha informado que la toxina botulínica inhibe la liberación evocada tanto de glicina como de glutamato en cultivos primarios de neuronas de médula espinal y que en preparaciones de sinaptosoma cerebral la toxina botulínica inhibe la liberación de los neurotransmisores acetilcolina, dopamina, norepinefrina, CGRP y glutamato.

El éxito de la toxina botulínica tipo A para tratar una variedad de afecciones clínicas ha llevado a interesarse en otros serotipos de toxina botulínica. De esta manera, al menos los tipos de toxina botulínica, A, B, E y F se han utilizado clínicamente en seres humanos. Adicionalmente, se ha utilizado toxina botulínica pura (de aproximadamente 150 kDa) para tratar seres humanos. Véase, por ejemplo, Kohl A., y col. Comparison of the effect of botulinum toxin A (Botox®) with the highly-purified neurotoxin (NT 201) in the extensor digitorum brevis muscle test, *Mov Disord* 2000; 15 (Suppl 3): 165. Por consiguiente, se puede preparar una composición farmacéutica de toxina botulínica utilizando toxina botulínica pura (de aproximadamente 150 kDa), en contraposición al uso de un complejo de toxina botulínica.

Se sabe que la toxina botulínica tipo A es soluble en soluciones acuosas diluidas a pH 4-6,8. A un pH por encima de aproximadamente 7 las proteínas no tóxicas estabilizadoras se disocian de la neurotoxina, lo que da como resultado la pérdida gradual de toxicidad, particularmente según suben el pH y la temperatura. Schantz E.J., y col. Preparation and characterization of botulinum toxin type A for human treatment (en particular, páginas 44-45), que es el capítulo 3 de Jankovic, J., y col, *Therapy with Botulinum Toxin*, Marcel Dekker, Inc (1994).

Al igual que ocurre con las enzimas, generalmente, las actividades biológicas de las toxinas botulínicas (que son peptidasas intracelulares), dependen, al menos en parte, de su conformación tridimensional. De esta manera, la toxina botulínica tipo A se detoxica por calor, varios productos químicos que varían la tensión superficial y el secado de la superficie. Adicionalmente, se sabe que la dilución del complejo de toxinas obtenido por el procedimiento conocido de cultivo, fermentación y purificación para conseguir las concentraciones que se usan de toxina, muchísimo más bajas, en la formulación de composiciones farmacéuticas da como resultado la detoxicación rápida de la toxina a menos que esté presente un agente estabilizador adecuado. La dilución de la toxina de cantidades en miligramos a una solución que contiene nanogramos por mililitro presenta dificultades significativas debido a la rápida pérdida de toxicidad específica en esa dilución tan grande. Como es posible que la toxina se use meses o años después de que se haya formulado la composición farmacéutica que contiene la toxina, esta se puede estabilizar con un agente estabilizador tal como la albúmina y la gelatina.

Se ha informado de que una toxina botulínica se ha utilizado en varios contextos clínicos, incluyendo los siguientes:

- (1) aproximadamente 75-125 unidades de BOTOX® por inyección intramuscular (múltiples músculos) para tratar la distonía cervical;

(2) 5-10 unidades de BOTOX® por inyección intramuscular para tratar las líneas glabellares (surcos de la frente) (5 unidades inyectadas por vía intramuscular en el músculo procerus y 10 unidades inyectadas por vía intramuscular en cada músculo corrugador superciliar);

5 (3) aproximadamente 30-80 unidades de BOTOX® para tratar el estreñimiento por inyección intraesfinteriana del músculo puborrectal;

(4) aproximadamente 1-5 unidades por músculo de BOTOX® inyectado por vía intramuscular para tratar el blefaroespasma por inyección en el músculo ocular orbicular pretarsal del párpado superior y el ocular orbicular pretarsal lateral del párpado inferior.

10 (5) para tratar el estrabismo, se han inyectado por vía intramuscular en los músculos extraoculares aproximadamente 1-5 unidades de BOTOX®, variando la cantidad inyectada basándose en el tamaño del músculo a inyectarse y el grado de la parálisis muscular que se desee (es decir la cantidad de dioptrías que se desee corregir).

15 (6) para tratar la espasticidad de miembros superiores como consecuencia de un ictus por inyecciones intramusculares de BOTOX® en 5 músculos flexores diferentes del miembro superior, como se indica a continuación:

(a) flexor digital profundo: 7,5 U a 30 U

(b) flexor digital superficial: 7,5 U a 30 U

(c) flexor carpocubital: 10 U a 40 U

(d) flexor carporradial: 15 U a 60 U

20 (e) bíceps braquial: 50 U a 200 U. Las inyecciones en cada uno de los cinco músculos indicados se realizan en la misma sesión de tratamiento, de manera que el paciente recibe de 90 U a 360 U de BOTOX® en músculos flexores de los miembros superiores por inyección intramuscular en cada sesión de tratamiento.

25 (7) para tratar la migraña, una inyección de 25 U de BOTOX® inyectada pericranealmente (inyectando simétricamente en los músculos glabellar, frontal, y temporal) ha mostrado un beneficio significativo como tratamiento profiláctico de la migraña comparado con un vehículo como se ha valorado por medidas decrecientes de la frecuencia de migrañas, la gravedad máxima, vómitos asociados y el uso de medicación aguda durante el periodo de los tres meses siguientes a la inyección de 25 U.

30 Se sabe que la toxina botulínica tipo A puede tener eficacia durante hasta 12 meses (European J. Neurology 6 (Supp 4): S111-S1150:1999), y en algunas circunstancias durante hasta 27 meses. The Laryngoscope 109:1344-1346: 1999. Sin embargo, la duración normal de una inyección intramuscular de BOTOX® es típicamente de aproximadamente 3 a 4 meses.

35 Una composición farmacéutica que contiene toxina botulínica disponible comercialmente en se vende bajo la marca comercial BOTOX® (disponible en Allergan, Inc. de Irvine, California). El BOTOX® consiste en un complejo de toxina botulínica tipo A purificada, seroalbúmina humana y cloruro sódico, envasado en condiciones estériles y en forma secada al vacío. La toxina botulínica tipo A se obtiene a partir de un cultivo de la cepa Hall de *Clostridium botulinum* cultivada en un medio que contiene caseína N-Z Amine y extracto de levadura. El complejo de toxina botulínica tipo A se purifica de la solución del cultivo por una serie de precipitaciones en ácido o ácido y etanol en un complejo cristalino que consiste en la proteína de la toxina activa de alto peso molecular y una proteína hemaglutinina asociada. El complejo cristalino se redisuelve en una solución que contiene solución salina y albúmina y se filtra en condiciones estériles (0,2 micras) antes del secado al vacío. El BOTOX® se puede reconstituir con solución salina estéril, sin conservantes, antes de la inyección intramuscular. Cada vial de BOTOX® contiene aproximadamente 100 unidades (U) de complejo de toxina de *Clostridium botulinum* tipo A, 0,5 miligramos de seroalbúmina humana y 0,9 miligramos de cloruro sódico en una forma estéril, secada al vacío sin conservantes.

45 Para reconstituir el BOTOX® secado al vacío, se usa una solución salina normal estéril sin conservantes (una inyección al 0,9% de cloruro sódico) poniendo la cantidad adecuada de diluyente en la jeringa de tamaño apropiado. Como el BOTOX® se desnaturaliza por la formación de burbujas o cualquier agitación violenta similar, el diluyente se inyecta en el vial con cuidado. El BOTOX® reconstituido puede almacenarse en un refrigerador (de 2 °C a 8 °C) y es un líquido transparente, incoloro y libre de partículas. Hay informes de BOTOX® reconstituido que conserva su potencia durante un periodo hasta 20 días. Véase, por ejemplo, Guttman C., Botox retains its efficacy for blepharospasm treatment after freezing and storage, New York investigators find, EuroTimes 2000 Nov/Dic; 5(8):16. El producto secado al vacío se almacena en un congelador a , o por debajo de, -5 °C.

50 En general, se reconocen cuatro grupos fisiológicos de *C. botulinum* (I, II, III, IV). Los organismos capaces de producir una toxina distinta serológicamente pueden proceder de más de un grupo fisiológico. Por ejemplo, las toxinas del tipo B y F se pueden producir por cepas del Grupo I o II. Además, se han identificado otras cepas de especies de *Clostridium* que pueden producir neurotoxinas botulínicas (*C. baratii*, tipo F; *C. butyricum*, tipo E; *C. novyi*, tipo C<sub>1</sub> o D).

Los grupos fisiológicos de tipos de *Clostridium botulinum* se enumeran en la Tabla I.

Tabla I. Grupos Fisiológicos de *Clostridium botulinum*

Grupo	Toxina Serotipo	Bioquímica	Digestión de leche	Fermentación de Glucosa	Lipasa	Fagos y Plásmidos	<i>Clostridium</i> Fenotípicamente Relacionado (no toxigénicos)
I	A,B,F	Proteolítico Sacarolítico	+	+	+	+	<i>C. sporogenes</i>
II	B,E,F	No proteolítico Sacarolítico Psicotrópico	-	+	+	+	
III	C,D	No proteolítico Sacarolítico	±	+	+	+	<i>C. novyi</i>
IV	G	Proteolítico No sacarolítico	+	-	-	-	<i>C. subterminale</i>

Estos tipos de toxinas pueden producirse seleccionando el grupo fisiológico apropiado de organismos de *Clostridium botulinum*. A los organismos designados como Grupo I normalmente se les llama proteolíticos y producen toxinas botulínicas de los tipos A, B y F. Los organismos designados como Grupo II son sacarolíticos y producen toxinas botulínicas de los tipos B, E y F. Los organismos designados como Grupo III producen solamente los tipos de toxina botulínica C y D y se distinguen de los organismos del Grupo I y el Grupo II por la producción de cantidades significativas de ácido propiónico. Los organismos del Grupo IV producen solamente neurotoxina del tipo G.

Se sabe obtener una toxina tetánica utilizando un medio específico sustancialmente libre de productos de origen animal. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 6.558.926. Pero en particular, incluso el medio "libre de productos de origen animal" desvelado en esta patente utiliza Bacto-peptona, un producto de digestión de carne. Significativamente, la producción de toxina tetánica por *Clostridium tetani* en contraste con la producción de toxina botulínica por una bacteria *Clostridium botulinum* implica parámetros y consideraciones diferentes de crecimiento, medios y fermentación. Véase, por ejemplo, Johnson, E.A., y col., *Clostridium botulinum* and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective, *Toxicon* 39 (2001), 1703-1722.

Producción de Neurotoxina Botulínica Activa

La toxina botulínica para su uso en una composición farmacéutica se puede obtener por la fermentación anaeróbica de *Clostridium botulinum* utilizando una versión modificada del procedimiento bien conocido de Schantz (véase, por ejemplo, Schantz E.J., y col., *Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine*, *Microbiol Rev* 1992 Mar; 56(1): 80-99; Schantz E.J., y col., *Preparation and characterization of botulinum toxin type A for human treatment*, capítulo 3 en Jankovic J, ed. *Neurological Disease and Therapy. Therapy with botulinum toxin* (1994), New York, Marcel Dekker; 1994, páginas 41-49, y; Schantz E.J., y col., *Use of crystalline type A botulinum toxin in medical research*, en: Lewis GE Jr, ed. *Biomedical Aspects of Botulism* (1981) New York, Academic Press, páginas 143-50.).

Una neurotoxina de *Clostridium botulinum* (como toxina pura o como un complejo de toxina botulínica) también se puede obtener por fermentación aeróbica de una célula huésped recombinante que porte el gen apropiado. Véanse, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.919.665 titulada *Vaccine for Clostridium botulinum neurotoxin*, expedida el 6 de Julio de 1999, de Williams, y la Solicitud de Patente de Estados Unidos 20030215468 titulada *Soluble recombinant botulinum toxin proteins*, de Williams y col., publicada el 20 de noviembre de 2003.

Adicionalmente, las toxinas botulínicas (la molécula de 150 kilodaltons) y los complejos de toxina botulínica (de 300 kDa a 900 kDa) se pueden obtener en, por ejemplo List Biological Laboratories, Inc., Campbell, California; the Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, U.K.; Wako (Osaka, Japan), así como en Sigma Chemicals of St Louis, Missouri. Las composiciones farmacéuticas que contienen la toxina botulínica comercialmente disponibles incluyen BOTOX® (complejo de neurotoxina purificado de toxina botulínica tipo A con seroalbúmina humana y cloruro sódico) disponible en Allergan, Inc., de Irvine, California, en viales de 100 unidades como un polvo liofilizado para reconstituir con cloruro sódico al 0,9% antes de su uso), Dysport® (complejo de hemaglutinina y toxina de *Clostridium botulinum* tipo A con seroalbúmina humana y lactosa en la composición farmacéutica de toxina botulínica), disponible en Ipsen Limited, Berkshire, U.K. como un polvo para reconstituir con cloruro sódico al 0,9% antes de su uso), y MyoBloc® (una solución inyectable que comprende toxina botulínica tipo B, seroalbúmina humana, succinato sódico, y cloruro sódico a un pH de aproximadamente 5,6, disponible en Solstice Neurosciences (anteriormente disponible en Elan Corporation, Dublin, Irlanda) de San Diego, California.

Se requieren varias etapas para fabricar la composición farmacéutica de toxina de *Clostridium* adecuada para su administración a un ser humano o un animal con fines terapéuticos, diagnósticos, de investigación o cosméticos. Estas etapas pueden incluir la obtención de una toxina de *Clostridium* purificada y después la composición de la toxina de *Clostridium* purificada. Una primera etapa puede ser cultivar una bacteria *Clostridium*, típicamente sobre placas de agar, en un entorno que favorezca el crecimiento bacteriano, tal como en una atmósfera anaeróbica templada. La etapa de cultivo permite obtener colonias de *Clostridium* con morfología y otras características deseables. En una segunda etapa, pueden fermentarse en un medio adecuado las colonias de *Clostridium* cultivadas seleccionadas. Después de un cierto periodo de fermentación, las bacterias *Clostridium* típicamente se lisan y liberan toxina de *Clostridium* en el medio. En tercer lugar, el medio de cultivo se puede purificar para obtener una toxina a granel o de partida. Típicamente, la purificación del medio de cultivo para obtener la toxina a granel se lleva a cabo utilizando, entre otros reactivos, enzimas derivadas de animales, tales como DNasa y RNasa, que se usan para degradar y facilitar la retirada de ácidos nucleicos. La toxina a granel resultante puede ser una toxina altamente purificada con una actividad específica alta. Después de la estabilización en un tampón adecuado, la toxina a granel se puede componer con uno o más excipientes para fabricar una composición farmacéutica de toxina de *Clostridium* adecuada para su administración a un ser humano. La composición farmacéutica de toxina de *Clostridium* puede comprender una toxina de *Clostridium* como principio farmacéutico activo. La composición farmacéutica también puede incluir uno o más excipientes, tampones, vehículos, estabilizadores, conservantes y/o agentes para aumentar el volumen.

La etapa de fermentación de la toxina de *Clostridium* puede dar como resultado una solución del cultivo que contiene bacterias *Clostridium* enteras, bacterias lisadas, nutrientes del medio de cultivo y productos residuales de la fermentación. La filtración de esta solución de cultivo con el fin de retirar los elementos gruesos, tales como bacterias enteras o lisadas, proporciona un cultivo clarificado. La solución de cultivo clarificada comprende toxina de *Clostridium* y varias impurezas y se puede procesar para obtener toxina de *Clostridium* concentrada, que se denomina toxina a granel.

Se conocen procedimientos de fermentación y purificación para obtener una toxina de *Clostridium* a granel utilizando uno o más productos de origen animal (tales como la caseína de la digestión de la leche, DNasa y RNasa). Un ejemplo de uno de estos procedimientos no-APF conocidos para obtener un complejo de toxina botulínica es el procedimiento de Schantz. El procedimiento de Schantz (desde el cultivo de células inicial hasta la fermentación y la purificación de la toxina) utiliza varios productos derivados de fuentes animales tales como, por ejemplo, el medio Bacto Cooked Meat de origen animal en el vial de cultivo, placas de Agar Columbia con sangre para el crecimiento y selección de las colonias, y caseína en el medio de fermentación. Adicionalmente, el procedimiento de purificación de la toxina a granel de Schantz utiliza DNasa y RNasa de fuentes bovinas para hidrolizar los ácidos nucleicos presentes en el medio de cultivo fermentado que contiene la toxina.

Se conoce un procedimiento de fermentación para obtener un toxoide tetánico que utiliza cantidades reducidas de productos de origen animal (denominados procedimientos de fermentación libres de proteínas animales o "APF". Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 6.558.926 titulada *Method for production of tetanus toxin using media substantially free of animal products*, expedida a Demain y col., 6 de mayo de 2003. Un procedimiento de fermentación APF para obtener toxina de *Clostridium* tiene la ventaja potencial de reducir la (ya muy baja) posibilidad de contaminación de la toxina a granel resultante con virus, priones u otros elementos indeseables que puedan acompañar a la toxina de *Clostridium* como principio activo farmacéutico cuando se transforme en una composición farmacéutica para su administración a seres humanos.

Se sabe del uso de la cromatografía para purificar la toxina de *Clostridium*. De esta manera:

1. Ozutsumi K., y col., Rapid, simplified method for production and purification of tetanus toxin, *App & Environ Micro*, Apr. 1985, p 939-943, vol. 49, nº 4. (1985) desvela el uso de la filtración en gel en cromatografía líquida a alta presión (HPLC) para purificar la toxina tetánica.

2. Schmidt J.J., y col., Purification of type E botulinum neurotoxin by high-performance ion exchange chromatography, *Anal Biochem* 1986 Jul; 156(1):213-219 desvela el uso de cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía de intercambio iónico para purificar la toxina botulínica tipo E. También se ha desvelado el uso del sulfato de protamina en vez de la ribonucleasa (RNasa).

3. Simpson L.L., y col., Isolation and characterization of the botulinum neurotoxins Simpson LL; Schmidt JJ; Middlebrook JL, en: Harsman S, ed. *Methods in Enzymology*. Vol. 165, *Microbial Toxins: Tools in Enzymology* San Diego, CA: Academic Press; vol. 165: páginas 76-85 (1988) desvela la purificación de neurotoxinas botulínicas utilizando la cromatografía de flujo por gravedad, HPLC, etapas de captura utilizando una resina de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, y cromatografía de intercambio iónico (aniónico y catiónico), incluyendo el uso de dos columnas diferentes de intercambio iónico. Se desvelan varias columnas Sephadex, Sephacel, Trisacryl, S y Q.

4. Zhou L., y col., Expression and purification of the light chain of botulinum neurotoxin A: A single mutation abolishes its cleavage of SNAP-25 and neurotoxicity after reconstitution with the heavy chain, *Biochemistry* 1995; 34(46): 15175-81 (1995) desvela el uso de una columna de afinidad de amilosa para purificar proteínas de fusión de cadena ligera de neurotoxina botulínica.

5. Kannan K., y col., Methods development for the biochemical assessment of Neurobloc (botulinum toxin type B), *Mov Disord* 2000; 15(Suppl 2):20 (2000) desvela el uso de cromatografía de exclusión por tamaño para ensayar

una toxina botulínica tipo B.

6. Wang Y-c, The preparation and quality of botulinum toxin type A for injection (BTXA) and its clinical use, *Dermatol Las Faci Cosm Surg* 2002; 58 (2002) desvela la cromatografía de intercambio iónico para purificar una toxina botulínica tipo A. Esta referencia desvela una combinación de técnicas de cromatografía y precipitación.

7. Johnson S.K., y col., Scale-up of the fermentation and purification of the recombination heavy chain fragment C of botulinum neurotoxin serotype F, expressed in *Pichia pastoris*, *Protein Expr and Purif* 2003; 32:1-9 (2003) desvela el uso de columnas de interacción hidrófoba y de intercambio iónico para purificar un fragmento recombinante de cadena pesada de toxina botulínica tipo F.

8. La solicitud de patente de Estados Unidos publicada 2003 0008367 A1 (Oguma) desvela el uso de columnas de intercambio iónico y de lactosa para purificar una toxina botulínica.

Johnson y col. han informado del medio de crecimiento nutricional para los serotipos de *Clostridium botulinum* A, B, y E (*Applied and Environmental Microbiology*, marzo 1998, páginas 753-759). En el documento WO-A-01/05997 se desveló que la toxina tetánica se puede producir utilizando medios sustancialmente libres de productos de origen animal.

Los procedimientos de purificación resumidos anteriormente generalmente se refieren a procedimientos a escala de investigación o de laboratorio que no pueden aumentarse a la escala de los procedimientos industriales o comerciales. Se sabe bien que las técnicas de cromatografía tales como, por ejemplo la cromatografía de flujo por gravedad y filtración en gel no se pueden utilizar como procedimientos de fabricación de acuerdo con el cGMP (certificado de buenas prácticas de fabricación), validables, a gran escala. Como alternativa o además, el procedimiento de purificación resumido anteriormente se refiere a una purificación a pequeña escala de la toxina pura (es decir, de la molécula neurotóxica de aproximadamente 150 kDa), o un componente específico del complejo neurotóxico, en oposición al complejo completo de toxina botulínica de 900 kDa. Como también es bien conocido, obtener un complejo de toxina botulínica purificado, biológicamente activo es considerablemente más complejo y difícil que si se purifica solamente un componente del complejo. Esto es debido, por ejemplo, al mayor tamaño, la fragilidad, la naturaleza lábil y las conformaciones particulares de las moléculas secundarias, terciarias y cuaternarias y complejas que se necesitan para obtener un complejo de toxina botulínica estable y biológicamente activo.

Además, los procedimientos que existen, incluyendo el procedimiento a escala comercial, para obtener una toxina botulínica adecuada para preparar una composición farmacéutica de toxina botulínica, incluyen típicamente una serie de etapas de precipitación para separar el complejo de toxina de las impurezas que acompañan a la toxina botulínica procedentes del procedimiento de fermentación. Particularmente, las técnicas de precipitación se utilizan ampliamente en la industria biofarmacéutica para la purificación de una toxina botulínica. Por ejemplo, se utilizan la precipitación o el fraccionamiento con alcohol en frío (procedimiento de Cohn) para retirar las proteínas del plasma. Desafortunadamente, las técnicas de precipitación para purificar una toxina botulínica tienen los inconvenientes de la baja resolución, baja productividad, dificultad de operación, dificultad de control y validación y dificultad para aumentar a escala o reducir a escala.

Lo que se necesita, por tanto, es un procedimiento APF para purificar un medio de fermentación de toxina botulínica para obtener una toxina botulínica a granel sin hacer uso de productos de origen animal en el procedimiento de purificación.

## **Sumario**

La invención de los inventores presentes proporciona un procedimiento para producir una toxina botulínica A, B o F purificada. El procedimiento de la presente invención puede aumentarse a escala y cumple las directrices del cGMP. La toxina botulínica es preferentemente un complejo de toxina botulínica tipo A de 900 kDa. La parte de purificación se puede usar como un procedimiento de purificación APF comercial a escala industrial, para purificar la toxina botulínica obtenida a partir de una fermentación APF separada (es decir, con el uso de soja hidrolizada en vez de caseína en el medio de fermentación) de un *Clostridium botulinum*. La presente invención, por tanto, permite reemplazar un procedimiento no APF (por ejemplo con el uso de DNasa y RNasa) para purificar la toxina botulínica.

Por tanto, la parte de purificación de la presente invención se usa junto con (posteriormente a) una fermentación APF para de esta manera eliminar el uso de productos de origen animal en las etapas requeridas para obtener una toxina botulínica a granel.

## **Definiciones**

Como se usa en el presente documento, las palabras o expresiones que se exponen a continuación tienen las siguientes definiciones.

“Aproximadamente” significa que la unidad, el parámetro o término así calificado engloba un intervalo de más o menos un diez por ciento por encima o por debajo del valor de la unidad, el parámetro o término indicado.

“Administración” o “administrar” significa la etapa de dar (es decir, administrar) una composición farmacéutica a un sujeto. Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se “administran localmente” por

ejemplo, por administración intramuscular (i.m.), intradérmica, administración subcutánea, administración intratecal, intracraneal, intraperitoneal (i.p.), tópica (transdérmica) e implantación (es decir por un dispositivo de liberación lenta como un implante polimérico o una bomba miniosmótica).

5 “Libre de productos de origen animal” o “sustancialmente libre de productos de origen animal” engloba, respectivamente, “libre de proteínas animales” o “sustancialmente libre de proteínas animales” y significa la ausencia o ausencia sustancial de derivados sanguíneos, reservas de sangre y otros productos o compuestos de origen animal.

10 “Animal” significa un mamífero (tal como un ser humano), un ave, un reptil, un pez, un insecto, una araña u otras especies animales. “Animal” excluye microorganismos tales como bacterias. Por tanto, un medio o procedimiento libre de productos de origen animal o un medio o procedimiento sustancialmente libre de productos de origen animal dentro del alcance de la presente invención puede incluir una toxina botulínica o una bacteria *Clostridium botulinum*. Por ejemplo, un procedimiento libre de productos de origen animal o un procedimiento sustancialmente libre de productos de origen animal significa un procedimiento que está sustancialmente o esencialmente libre o totalmente libre de proteínas derivadas de animales, tales como inmunoglobulinas, productos de digestión de la carne, subproductos cárnicos y leche o productos lácteos o productos de digestión de la leche. Por tanto, un ejemplo de un procedimiento libre de productos de origen animal es un procedimiento (tal como un cultivo bacteriano o un procedimiento de fermentación bacteriana) que excluye la carne y los productos lácteos o subproductos cárnicos o lácteos.

20 “Toxina botulínica” significa una neurotoxina producida por *Clostridium botulinum*, así como toxinas botulínicas modificadas, recombinantes, híbridas y quiméricas. Una toxina botulínica recombinante puede tener una cadena ligera y/o una cadena pesada que se ha fabricado de manera recombinante por una especie que no es del género *Clostridium*. “Toxina botulínica”, como se usa en el presente documento, engloba los serotipos de toxina botulínica A, B, C, D, E, F y G. “Toxina botulínica”, como se usa en el presente documento, también engloba tanto un complejo de toxina botulínica (es decir, los complejos de 300, 600, y 900 kDa) así como la toxina botulínica pura (es decir, la molécula neurotóxica de aproximadamente 150 kDa), todas ellas útiles en la práctica de la presente invención. “Toxina botulínica purificada” significa una toxina botulínica pura o un complejo de toxina botulínica que se ha aislado, o aislado sustancialmente, de otras proteínas e impurezas que pueden acompañar a la toxina botulínica cuando se obtiene de un cultivo o procedimiento de fermentación. Por tanto, una toxina botulínica purificada puede tener retiradas al menos un 90%, preferentemente más del 95% y, más preferentemente, más del 99% de las proteínas toxinas no botulínicas y las impurezas. Las citotoxinas C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>, al no ser neurotoxinas, se excluyen del alcance de la presente invención.

25 “Neurotoxina de *Clostridium*” significa una neurotoxina producida por, o nativa de, una bacteria *Clostridium*, tales como *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum* o *Clostridium baratti*, así como una neurotoxina de *Clostridium* fabricada de manera recombinante por una especie que no es del género *Clostridium*.

30 “Totalmente libre” (es decir, la terminología “que consiste en”) significa que dentro del intervalo de detección del instrumento o procedimiento que se utiliza, la sustancia no puede detectarse o no se puede confirmar su presencia.

“Esencialmente libre” (o “que consiste esencialmente en”) significa que solo se pueden detectar cantidades muy pequeñas de la sustancia.

40 “Toxina botulínica modificada” significa una toxina botulínica en la que al menos uno de sus aminoácidos se ha deletado, modificado, o remplazado, cuando se compara con una toxina botulínica nativa. Adicionalmente, la toxina botulínica modificada puede ser una neurotoxina producida de manera recombinante, o un derivado o fragmento de una neurotoxina producida de manera recombinante. Una toxina botulínica modificada conserva al menos una actividad biológica de la toxina botulínica nativa, tal como la capacidad para unirse a un receptor de toxina botulínica, o la capacidad para inhibir la liberación de neurotransmisores de una neurona. Un ejemplo de una toxina botulínica modificada es una toxina botulínica que tiene una cadena ligera de un serotipo de toxina botulínica (tal como el serotipo A), y una cadena pesada de un serotipo de toxina botulínica diferente (tal como el serotipo B). Otro ejemplo de una toxina botulínica modificada es una toxina botulínica acoplada a un neurotransmisor, tal como la sustancia P.

45 “Paciente” significa un sujeto humano o no humano que recibe atención médica o veterinaria. En consecuencia, como se desvela en el presente documento, las composiciones pueden usarse para tratar a cualquier animal, tal como los mamíferos.

50 “Composición farmacéutica” significa una formulación en la que un principio activo puede ser una toxina botulínica. La palabra “formulación” significa que hay al menos un ingrediente adicional (tal como una albúmina y/o cloruro sódico) en la composición farmacéutica además del principio activo de neurotoxina. Una composición farmacéutica es por tanto una formulación que es adecuada para la administración diagnóstica, terapéutica o cosmética (es decir, por inyección intramuscular o subcutánea o por inserción de un depósito o implante) a un sujeto, tal como un paciente humano. La composición farmacéutica puede estar: en un estado liofilizado o secado al vacío; en una solución, formada tras la reconstitución de la composición farmacéutica liofilizada o secada al vacío con solución

5 salina o agua, o; como una solución que no necesita reconstituirse. El principio activo puede ser uno de los serotipos de toxina botulínica A, B, C<sub>1</sub>, D, E, F, o G o una toxina botulínica, pudiendo obtenerse todos ellos de forma nativa por bacterias *Clostridium*. Como se ha indicado, una composición farmacéutica puede ser líquida o sólida, por ejemplo secada al vacío. Los ingredientes que constituyen una composición farmacéutica pueden estar incluidos en una sola  
 10 composición (es decir, todos los ingredientes constituyentes, excepto cualquier fluido de reconstitución requerido, están presentes en el momento de la preparación inicial de la composición farmacéutica) o como un sistema de dos componentes, por ejemplo una composición secada al vacío reconstituida con un diluyente tal como solución salina, en la que el diluyente contiene un ingrediente que no está presente en la preparación inicial de la composición farmacéutica. Un sistema de dos componentes proporciona la ventaja de permitir la incorporación de ingredientes  
 15 que no son suficientemente compatibles con el primer componente del sistema de dos componentes para el almacenamiento a largo plazo. Por ejemplo, el vehículo de reconstitución o diluyente puede incluir un conservante que proporcione la suficiente protección contra el crecimiento bacteriano durante el periodo de uso, por ejemplo una semana de almacenamiento en refrigeración, pero no esté presente durante el periodo de almacenamiento en congelador de dos años durante el cual podría degradar la toxina. De esta manera, se pueden incorporar otros ingredientes que pueden no ser compatibles con una toxina de *Clostridium* u otros ingredientes durante periodos de tiempo prolongados; es decir, se pueden añadir en un segundo vehículo (es decir, en el fluido de reconstitución) en un momento próximo a su uso. En la Publicación de Patente de Estados Unidos 2003 0118598 A1 se desvelan procedimientos para formular una composición farmacéutica con principio activo de toxina botulínica.

20 "Sustancialmente libre" significa presente a un nivel de menos del uno por ciento en peso de la composición farmacéutica.

"Formulación terapéutica" significa una formulación que se puede usar para tratar y por tanto aliviar un trastorno o una enfermedad, tal como un trastorno o una enfermedad caracterizada por hiperactividad (es decir, espasticidad) de un músculo periférico.

En el siguiente documento se usan las siguientes abreviaturas:

Cultivo 3:1:1	un medio de cultivo/fermentación de toxina botulínica que contiene un 3% de HySoy, un 1% de HyYeast y un 1% de glucosa. HySoy (Producto Quest nº 5X29022) es una fuente de péptidos obtenida por hidrólisis enzimática de soja. HyYeast (HyYest, producto Quest nº 5Z10102 o 5Z10313) es un extracto de levadura de panadería.
Cultivo 5:1:1	un medio de cultivo/fermentación de toxina botulínica que contiene un 5% de HySoy, un 1% de HyYeast, y un 1% de glucosa.
API	principio activo farmacéutico
APF	libre de productos de origen animal
BCA	ácido bicinconínico
CV	volumen de columna
DF	diafiltración
ELISA	ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. "Hc" en "Hc-ELISA" significa cadena pesada de la toxina botulínica.
MLD50	la cantidad de una toxina botulínica que es letal para el 50% de ratones de 18-23 gramos de raza Swiss-Weber inyectados por vía intraperitoneal
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico
SEC-HPLC	cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño
UF	ultrafiltración
UV	ultravioleta

25 La presente invención es un procedimiento libre de proteínas animales para producir una toxina botulínica purificada A, B o F. El procedimiento comprende las etapas de:

- (a) producir un cultivo de fermentación de *Clostridium botulinum* utilizando un medio de cultivo libre de proteínas de origen animal, comprendiendo el medio soja hidrolizada;
- (b) obtener una muestra del cultivo de fermentación de *Clostridium botulinum*;

(c) poner en contacto la resina de una columna de interacción hidrófoba con la muestra de cultivo para permitir la captura de la toxina botulínica por la columna de interacción hidrófoba.

(d) eluir la toxina botulínica de la columna de interacción hidrófoba;

5 (e) cargar la resina de una columna de intercambio iónico con el eluyente de la columna de interacción hidrófoba; y

(f) eluir la toxina botulínica de la columna de intercambio iónico; obteniendo de esta manera una toxina botulínica purificada A, B o F.

Por "cultivo de fermentación de toxina botulínica" se entiende un medio de fermentación en el que se ha fermentado la bacteria *Clostridium botulinum* de forma que la bacteria ha liberado toxina botulínica en el medio.

10 Un procedimiento para purificar una toxina botulínica dentro del alcance de la presente invención puede también tener la etapa, después de la etapa de contacto (c) y antes de la etapa de elución (d), de retirada por lavado de las impurezas de la columna de interacción hidrófoba. Adicionalmente, un procedimiento para purificar una toxina botulínica dentro del alcance de la presente invención puede también tener la etapa, después de la etapa de carga, de retirada por lavado de las impurezas de la segunda columna.

15 De manera significativa, un procedimiento para purificar una toxina de *Clostridium* dentro del alcance de la presente invención puede proporcionar un rendimiento de complejo de toxina botulínica purificado mayor de aproximadamente 50 mg por lote por cada 10 litros de cultivo de fermentación de toxina botulínica.

20 Un complejo purificado de toxina botulínica que se obtiene por la puesta en práctica de un procedimiento para purificar una toxina botulínica dentro del alcance de la presente invención puede tener las siguientes características: un aspecto de suspensión blanca o blanquecina; una concentración de 2,0-3,6 mg de complejo de toxina botulínica por ml de eluyente; una relación de la absorbancia a 260 nm con respecto a la absorbancia a 278 nm (A260/A278) menor o igual a 0,6; una potencia específica en unidades MLD50/mg de entre  $2,4 \times 10^7$  y  $5,9 \times 10^7$  unidades MLD50 por mg de la toxina botulínica purificada; una identidad inmunológica de complejo de neurotoxina botulínica tipo A; unas características de SDS-PAGE que se ajustan a la referencia; unas características de SEC-HPLC del complejo de toxina de 900 kDa de >95% del pico total, y; el procedimiento utilizado para obtener dicho complejo de toxina botulínica purificada es sólido, puede aumentarse a escala, es validable, y/o cumple el cGMP.

25 Un procedimiento APF para purificar un complejo de toxina botulínica A, B o F dentro del alcance de la presente invención puede tener las etapas de:

30 (a) obtener una muestra de cultivo de fermentación de toxina botulínica producido utilizando un medio libre de proteínas animales que comprende soja hidrolizada;

(b) poner en contacto la resina de una columna de cromatografía de interacción hidrófoba con la muestra de cultivo de forma que permita la captura de una toxina botulínica por la primera columna;

(c) retirar por lavado las impurezas de la columna de cromatografía de interacción hidrófoba;

35 (d) eluir la toxina botulínica de la columna de interacción hidrófoba (la etapa de elución puede ir seguida de la etapa de dilución del eluyente de la columna de cromatografía de interacción hidrófoba para una posterior cromatografía de intercambio iónico);

(e) cargar la resina de una columna de cromatografía en columna de intercambio iónico con el eluyente (tal como el eluyente diluido de la columna de cromatografía de interacción hidrófoba) de la columna de cromatografía de interacción hidrófoba;

40 (f) retirar por lavado las impurezas de la columna de cromatografía de intercambio iónico, y;

(g) eluir la toxina botulínica de la columna de intercambio iónico, obteniendo de esta manera una toxina botulínica purificada A, B o F a través de un procedimiento para purificar una toxina botulínica que es sustancialmente un procedimiento de purificación APF.

45 El procedimiento APF expuesto en el párrafo anterior puede comprender además, después de la etapa de obtención de una muestra de cultivo de fermentación de toxina botulínica y antes de la etapa de puesta en contacto de la resina de la columna de cromatografía de interacción hidrófoba con la muestra de cultivo, la etapa adicional de acondicionamiento del cultivo clarificado para la cromatografía de interacción hidrófoba. Adicionalmente, el procedimiento APF expuesto en el párrafo anterior puede comprender además, después de la etapa de elución de la toxina botulínica de la columna de interacción hidrófoba y antes de la etapa de carga de la resina de la columna de cromatografía de intercambio iónico con el eluyente de la columna de cromatografía de interacción hidrófoba, la etapa de acondicionamiento del eluyente de la columna de interacción hidrófoba para la cromatografía de intercambio iónico.

50 Una realización detallada del procedimiento APF para purificar una toxina botulínica puede comprender las etapas de:

55 (a) obtener una muestra de un cultivo de fermentación de toxina botulínica, en el que el cultivo de fermentación de toxina botulínica se produce utilizando un medio libre de proteínas animales que comprende soja hidrolizada;

(b) acondicionar el cultivo clarificado para la cromatografía de interacción hidrófoba;

(c) poner en contacto la resina de la columna de cromatografía de interacción hidrófoba con la muestra de cultivo

para permitir la captura de una toxina botulínica en la primera columna;

(d) retirar por lavado las impurezas de la columna de cromatografía de interacción hidrófoba;

(e) eluir la toxina botulínica de la columna de interacción hidrófoba;

(f) acondicionar el eluyente de la columna de interacción hidrófoba para la cromatografía de intercambio iónico;

5 (g) cargar la resina de una columna de cromatografía en columna de intercambio iónico con el eluyente acondicionado de la columna de cromatografía de interacción hidrófoba;

(h) retirar por lavado las impurezas de la columna de cromatografía de intercambio iónico, y;

(i) eluir la toxina botulínica de la columna de intercambio iónico, obteniendo de esta manera una toxina botulínica purificada por medio de un procedimiento para purificar una toxina botulínica A, B o F.

## 10 Dibujos

Los aspectos de la invención se explican o ilustran por los siguientes dibujos.

La Figura 1 titulada "% de fuente de N (es decir, HySoy más YE) frente a Potencia y pH" es un gráfico que muestra la actividad de la toxina botulínica determinada: (1) en el lado izquierdo del eje Y la dosis letal 50 para ratones (MLD50) (barras azules), y; (2) en el lado izquierdo del eje Y la actividad de SNAP25 (barras rojas), de varios medios APF a los tiempos de fermentación que se muestran en la parte superior de las barras, para el pH del medio APF que se muestra en el lado derecho del eje Y, para medios APF con la cantidad en % en peso de concentrado de soja hidrolizado y concentrado de extracto de levadura como se muestra en el eje X. Todos los medios de la Figura 1 también contenían un 1% en peso de glucosa.

15 La Figura 2 es un diagrama de flujo resumido que compara un procedimiento no APF para obtener toxina botulínica (en la mitad superior de la Figura 2) con un procedimiento APF para obtener toxina botulínica (la mitad inferior de la Figura 2), a través de las etapas de creación de un banco celular, el cultivo y la fermentación. La figura 2 omite las etapas de recolección y purificación.

20 La Figura 3 es un cromatograma obtenido de la cromatografía de interacción hidrófoba de un cultivo APF clarificado (un cultivo 3.1.1) en una columna de Fast Flow de Butil Sefarosa. El eje X en la Figura 3 representa el volumen en ml de líquido (efluente) que ha pasado a través de la columna. El eje Y representa la absorbancia a 280 nm en mAU.

25 La Figura 4 es un cromatograma obtenido de la cromatografía de intercambio iónico del eluyente de la columna de Butil de la Figura 3 sobre una columna de alta resolución de SP Sefarosa. Los ejes en la Figura 4 son los mismos que los de la Figura 3.

30 La Figura 5A es una imagen de SDS-PAGE reducida de varias fracciones obtenidas de la operación de la columna de Butil de la Figura 3. El lado izquierdo de la Figura 5A está marcado verticalmente con los pesos moleculares descendentes en miles de Daltons (kDa). Los números 1 a 8 a lo largo del borde inferior de la Figura 5A representan las calles en las que se cargaron las fracciones.

35 La Figura 5B es una imagen de SDS-PAGE reducida de varias fracciones obtenidas de la operación de la columna SP de la Figura 4. Los lados izquierdo e inferior de la Figura 5B están marcados como en la Figura 5A.

La Figura 6 es una imagen de SDS-PAGE reducida de varias fracciones obtenidas en las etapas posteriores a las columnas (véase la Figura 7), concretamente las fracciones de la etapa UF/DF, la etapa de filtración estéril, y de la etapa de precipitación en sulfato amónico. Los lados izquierdo e inferior de la Figura 6 están marcados como en la Figura 5A.

40 La Figura 7 es un diagrama de flujo de un procedimiento APF cromatográfico de purificación de toxina botulínica dentro del alcance de la presente invención.

45 La Figura 8 es un gráfico que compara el efecto de una concentración de proteína de soja sobre la producción de un complejo de toxina botulínica tipo A en un procedimiento de fermentación APF, en el que el medio de fermentación contenía un 1% en peso de glucosa y un 1% en peso de un extracto de levadura. En la Figura 8 el eje X representa la concentración en porcentaje en peso en el medio de fermentación de una proteína de soja hidrolizada particular (HySoy), el lado izquierdo del eje Y representa la potencia del complejo de toxina botulínica purificada final y el lado derecho del eje Y representa el porcentaje de lisis celular completo, como se determina por la ecuación:

$$Lisis\ celular(\%) = \frac{DO_{600m\acute{a}x} - DO_{600\ punto\ final}}{DO_{600m\acute{a}x}} \times 100$$

50 Donde  $DO_{600\ m\acute{a}x}$  corresponde a la densidad óptica medida a 600 nm en el momento de máximo crecimiento, y  $DO_{600\ punto\ final}$  es en el momento de la recolección de la fermentación.

## Descripción

La presente invención se refiere a un sistema libre de productos de origen animal y a un procedimiento para purificar una neurotoxina A, B o F de *Clostridium botulinum*. La neurotoxina de *Clostridium botulinum* puede ser un complejo de toxina botulínica tipo A, tal como un complejo de 300 kDa, de 500 kDa o de 900 kDa (pesos moleculares aproximados) o mezclas de los mismos.

55

Significativamente, el procedimiento se puede aumentar a escala, lo que significa que puede usarse para purificar las cantidades de toxina botulínica obtenidas por un procedimiento industrial o comercial, como las usadas en la

producción farmacéutica. Además, el sistema y procedimiento cumplen también el cGMP (certificado de buenas prácticas de fabricación), como se exige por el CFR U.S. (código de regulaciones federales de Estados Unidos), lo que significa que puede cumplir los requisitos reguladores.

5 A través de la experimentación se desarrollaron sistemas y procedimientos APF para purificar una toxina botulínica, tal como un complejo de neurotoxina tipo A de *Clostridium botulinum* (cepa Hall). La toxina botulínica se purifica del medio de fermentación que resulta de un procedimiento de fermentación APF. Significativamente, mientras que en el procedimiento de fermentación APF se pueden reducir o eliminar los productos de origen animal (tales como la caseína y el caldo de carne) como nutrientes del medio utilizado para cultivar y fermentar las bacterias *Clostridium*, los procedimientos de fermentación APF van seguidos típicamente por una o más etapas de purificación que utilizan productos de origen animal, tales como las enzimas DNasa y RNasa. La purificación del medio de fermentación es necesaria para obtener la toxina de *Clostridium* a granel. La toxina de *Clostridium* a granel (toxina pura o complejo de toxina) se puede usar para preparar una composición farmacéutica de toxina de *Clostridium*.

15 El procedimiento de purificación APF se pone en práctica junto con un procedimiento de fermentación APF. La puesta en práctica de la presente invención junto con un procedimiento de fermentación APF proporciona un procedimiento de fermentación APF y un procedimiento de purificación APF combinados. Adicionalmente, el procedimiento de la presente invención está optimizado para operar en un medio de fermentación APF, en oposición a un medio de fermentación basado en caseína u otra proteína animal. La puesta en práctica del procedimiento de purificación APF sobre una fermentación no APF puede dar como resultado un rendimiento más bajo y/o una menor potencia de la toxina botulínica purificada obtenida.

20 Por tanto, aunque los procedimientos de purificación de toxina botulínica de Schantz y APF utilizan productos de origen animal tales como la benzamidina para estabilizar la toxina botulínica y DNasa y RNasa para extraer los ácidos nucleicos presentes con la toxina botulínica en el medio de fermentación (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 6 y 7), la presente invención permite que una toxina botulínica pueda purificarse sin el uso de tales productos de origen animal.

25 La presente invención engloba procedimientos para purificar una toxina botulínica A, B o F. Un sistema para su uso con la presente invención comprende una pluralidad (preferentemente como una serie consecutiva) de etapas cromatográficas. Los parámetros importantes del sistema incluyen las columnas en particular, los tampones y las condiciones de operación utilizadas (el recorrido por la columna).

30 Una primera etapa general de una realización particular de la invención puede ser cargar un cultivo clarificado del medio de fermentación en una columna de interacción hidrófoba (tal como una columna Fast Flow ["FF"] de Butil Sefarosa). Esta primera columna captura la toxina botulínica y permite que las impurezas fluyan a través de la columna. Se descubrió que una columna de interacción hidrófoba proporcionaba una captura eficaz de un complejo de toxina botulínica (una proteína grande con una estructura terciaria y cuaternaria particular) del medio de fermentación, con retención de la actividad biológica del complejo de toxina botulínica, mientras que también separaba (a través del flujo) muchas impurezas presentes junto con la toxina botulínica en el medio de fermentación. Para eluir la toxina de *Clostridium* capturada (unida) por la columna de interacción hidrófoba se utiliza un tampón adecuado.

40 En una segunda etapa general de una realización particular de la presente invención, el eluyente de la primera columna se carga en una segunda columna, la columna para purificar adicionalmente la toxina botulínica. Se descubrió que un mecanismo diferente para la separación de la toxina de las impurezas por la segunda etapa cromatográfica puede proporcionar una etapa de purificación más eficaz. Por tanto, la segunda etapa de cromatografía conlleva el uso de una columna de intercambio iónico.

45 En las etapas posteriores a la cromatografía (columna), el eluyente de la segunda columna se puede procesar más para obtener complejo de toxina botulínica a granel altamente purificada. Estas etapas de procesamiento adicionales pueden incluir el intercambio de tampón por ultrafiltración y diafiltración, filtración estéril y preparación de una suspensión de sulfato amónico del complejo de toxina botulínica purificada.

Nuestra invención engloba un sistema que puede aumentarse a escala y que cumple el cGMP y procedimientos para purificar una toxina botulínica, que pueden dar como resultado la obtención de una toxina botulínica a granel con las características que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de la Neurotoxina Botulínica Purificada

Aspecto	Suspensión blanca o blanquecina
Concentración	2,0 - 3,6 mg/ml
Ácidos Nucleicos (A260/A278)	No más de 0,6
Potencia Específica (unidades MLD50/mg)	2,4 - 5,9 x 10 <sup>4</sup>
Identidad Inmunológica	Pasa
SDS-PAGE	Conforme al patrón
SEC-HPLC	Complejo de toxina de 900 kDa >95% del pico total

50

Una composición farmacéutica que contiene toxina botulínica disponible en el mercado se vende bajo la marca comercial BOTOX® (disponible en Allergan, Inc., de Irvine, California). El BOTOX® tiene las características mostradas en la Tabla 1 anterior. El BOTOX® consiste en un complejo de toxina botulínica tipo A purificada, seroalbúmina humana, y cloruro sódico envasado de forma estéril y secado al vacío. La toxina botulínica tipo A se produce a partir de un cultivo de la cepa Hall de *Clostridium botulinum* que crece en un medio que contiene caseína N-Z Amine y extracto de levadura (es decir, un procedimiento no APF). El complejo de toxina botulínica tipo A se purifica de la solución de cultivo por una serie de etapas de precipitación (incluyendo precipitación ácida) en un complejo cristalino que consiste en la proteína de la toxina de alto peso molecular activa y una proteína hemaglutinina asociada. El complejo cristalino se vuelve a disolver en una solución que contiene solución salina y albúmina y se filtra (0,2 micrómetros) en condiciones estériles antes del secado al vacío. El BOTOX® puede reconstituirse con solución salina estéril, sin conservantes, antes de su inyección intramuscular. Cada vial de BOTOX® contiene aproximadamente 100 unidades (U) de complejo de toxina botulínica tipo A de *Clostridium*, 0,5 miligramos de seroalbúmina humana y 0,9 miligramos de cloruro sódico en forma estéril, secada al vacío sin conservantes.

Para reconstituir el BOTOX® secado al vacío se utiliza una solución salina normal estéril sin conservantes (inyección de cloruro sódico al 0,9%) para extraer la cantidad apropiada de diluyente en una jeringa de tamaño apropiado. Como el BOTOX® se desnaturaliza por burbujeo o una agitación violenta similar, el diluyente se inyecta suavemente en el vial. Se ha notificado que el BOTOX® se ha administrado treinta o más días después de la reconstitución con poca pérdida de potencia. Durante este periodo de tiempo, el BOTOX® reconstituido se guarda en un refrigerador (2° a 8 °C). El BOTOX® reconstituido es transparente, incoloro y está libre de material en forma de partículas. El producto secado al vacío se guarda en un congelador a una temperatura de -5 °C o menor.

La presente invención se basa en el descubrimiento de medios y procedimientos que están libres o sustancialmente libres de un producto animal o un subproducto animal, útiles para el cultivo y la fermentación de un organismo (tal como una bacteria *Clostridium botulinum*) capaz de producir toxina botulínica biológicamente activa. La toxina botulínica obtenida se puede utilizar para producir composiciones farmacéuticas con toxina botulínica como principio activo. Por tanto, el medio de cultivo que se desvela en el presente documento está libre de tales productos de origen animal.

La presente invención engloba el inesperado hallazgo de que en el medio no se necesitan productos basados en animales para el crecimiento de *Clostridium botulinum* y, particularmente, que ciertos productos basados en soja hidrolizada pueden reemplazar los productos de origen animal empleados típicamente en tales medios para el crecimiento de *Clostridium botulinum*.

El medio de crecimiento libre de proteína animal incluye productos derivados de la soja que están hidrolizados. Los productos de origen animal comunes que se pueden sustituir por la soja hidrolizada incluyen infusión de corazón bovino (BHI), productos de peptona de origen animal, tales como Bacto-peptona, caseínas hidrolizadas, y subproductos lácteos tales como leche de animales.

Preferentemente, los medios que contienen productos hidrolizados de soja para el crecimiento de *Clostridium botulinum* son similares a los medios de crecimiento que se usan normalmente que contienen productos de origen animal excepto sustancialmente porque todos los productos de origen animal se han reemplazado por productos derivados de vegetales. Por ejemplo, los medios de fermentación de soja hidrolizada pueden comprender un producto de soja hidrolizada, una fuente de carbono tal como la glucosa, sales tales como el NaCl y KCl, ingredientes que contienen fosfatos tales como Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, cationes divalentes tales como hierro y magnesio, polvo de hierro, y aminoácidos tales como L-cisteína y L-tirosina. Los medios utilizados para hacer crecer el cultivo de *Clostridium botulinum* (es decir, el medio seminal o primero) para la inoculación del medio de fermentación (segundo) contiene soja hidrolizada y preferentemente una fuente de sal tal como NaCl, y una fuente de carbono tal como la glucosa.

La presente invención proporciona un procedimiento para el crecimiento de *Clostridium botulinum* que maximiza la producción de una toxina botulínica, utilizando medios que están sustancialmente libres de productos de origen animal. El crecimiento de *Clostridium botulinum* para la producción de toxina botulínica puede tener lugar por fermentación en medios que contienen soja hidrolizada que reemplaza a los ingredientes derivados de subproductos de origen animal. El inoculante para el medio de fermentación puede derivar de un medio de crecimiento a menor escala (un medio seminal). Dependiendo del tamaño y volumen de la etapa de fermentación, el número de cultivos sucesivos en el medio seminal para incrementar la biomasa del cultivo puede variar. Para cultivar una cantidad adecuada de *Clostridium botulinum* para inocularlo en el medio de fermentación, se pueden llevar a cabo una etapa o múltiples etapas que implican el crecimiento en un medio seminal. Para un procedimiento de cultivo de *Clostridium botulinum* que esté libre de productos de origen animal, es preferible que el cultivo de *Clostridium botulinum* proceda de un cultivo almacenado en medios que no son de origen animal. El cultivo almacenado, preferentemente liofilizado, se produce por el cultivo en medios que contienen proteínas derivadas de la soja y carentes de subproductos de origen animal. El crecimiento del *Clostridium botulinum* en un medio de fermentación puede tener lugar por inoculación directamente desde un cultivo liofilizado almacenado.

En una realización preferida de la presente invención, el crecimiento de *Clostridium botulinum* se produce en dos fases: cultivo seminal y fermentación. Ambas fases se llevan a cabo en entornos anaeróbicos. La fase de cultivo seminal generalmente se usa para "aumentar a escala" la cantidad de microorganismos en un cultivo almacenado. El propósito de la fase de cultivo seminal es incrementar la cantidad de microorganismos disponibles para la fermentación. Además, la fase de cultivo seminal permite a los microbios relativamente dormidos de los cultivos almacenados rejuvenecer y crecer en cultivos que crecen activamente. Además, el volumen y la cantidad de microorganismos viables utilizados para inocular el cultivo de fermentación se puede controlar de manera más precisa a partir de un cultivo de crecimiento activo que a partir de un cultivo almacenado. Por tanto, se prefiere el crecimiento de un cultivo seminal para la inoculación del medio de fermentación. Además, se puede utilizar cualquier número de etapas consecutivas que impliquen el crecimiento en medios seminales para aumentar a escala la cantidad de *Clostridium botulinum* para la inoculación del medio de fermentación. Debe tenerse en cuenta que el crecimiento de *Clostridium botulinum* en la fase de fermentación puede proceder directamente del cultivo almacenado, por inoculación directa.

En la fase de fermentación, se usa una porción del medio seminal o todo el medio seminal que contiene *Clostridium botulinum* del cultivo seminal para inocular un medio de fermentación. Preferentemente, se usa aproximadamente el 2-4% de un medio seminal que contiene *Clostridium botulinum* de la fase de cultivo seminal para inocular el medio de fermentación. La fermentación se usa para producir la máxima cantidad de microbios en un entorno anaeróbico a gran escala (Ljungdahl y col., Manual of industrial microbiology and biotechnology (1986), editado por Demain y col., American Society for Microbiology, Washington, D.C. página 84).

Se puede aislar y purificar una toxina botulínica utilizando procedimientos de purificación de proteínas bien conocidos por expertos habituales en la técnica de purificación de proteínas. Véase, por ejemplo, Coligan y col. Current Protocols in Protein Science, Wiley & Sons; Ozutsumi y col. Appl. Environ. Microbiol. 49; 939-943:1985.

Para la producción de toxina botulínica, pueden hacerse crecer cultivos de *Clostridium botulinum* en un medio seminal para la inoculación del medio de fermentación. El número de etapas sucesivas que implican el crecimiento en un medio seminal puede variar dependiendo de la escala de producción de toxina botulínica en la fase de fermentación. Sin embargo, como se trató previamente, el cultivo en la fase de fermentación puede proceder directamente de la inoculación de un cultivo almacenado. Los medios seminales de origen animal para el cultivo de *Clostridium botulinum* generalmente comprenden BHI, bacto-peptona, NaCl y glucosa. Como se trató previamente, se pueden preparar medios seminales alternativos de acuerdo con la presente invención en los que los componentes de origen animal se sustituyen por componentes no procedentes de animales. La soja hidrolizada puede sustituir a la BHI y la bacto-peptona en el medio seminal para el cultivo de *Clostridium botulinum* y la producción de toxina botulínica.

Preferentemente, la hidrólisis de la soja se lleva a cabo utilizando enzimas no animales. Las fuentes de soja hidrolizada están disponibles en varios vendedores comerciales. Estos incluyen, aunque no están limitados a Hy-Soy (Quest International), Soy peptone (Gibco) Bac-soytone (Difco), AMISOY (Quest), NZ soy (Quest), NZ soy BL4, NZ soy BL7, SE50M (DMV International Nutritionals, Fraser, N.Y.), y SE50MK (DMV). Más preferentemente, la fuente de soja hidrolizada es Hy-Soy o SE50MK. Se conocen otras fuentes potenciales de soja hidrolizada.

Las concentraciones de Hy-Soy en el medio seminal de acuerdo con la presente invención varían entre 25-200 g/l. Preferentemente, la concentración de Hy-Soy en el medio seminal varía entre 50-150 g/l. Más preferentemente, la concentración de Hy-Soy en el medio seminal es aproximadamente de 100 g/l. Además, la concentración de NaCl varía entre 0,1-2,0 g/l. Preferentemente, la concentración de NaCl varía entre 0,2-1,0 g/l. Más preferentemente, la concentración de NaCl en el medio seminal es aproximadamente de 0,5 g/l. La concentración de glucosa varía entre 0,1 g/l y 5,0 g/l. Preferentemente, la concentración de glucosa varía entre 0,5-2,0 g/l. Más preferentemente, la concentración de glucosa en el medio seminal es aproximadamente 1,0 g/l. También se prefiere, aunque no necesariamente para la presente invención, que la glucosa se esterilice en autoclave junto con los otros componentes del medio seminal. El nivel de pH en el medio seminal antes del cultivo puede ser de 7,5-8,5. Por ejemplo, el pH del medio seminal antes del cultivo de *Clostridium botulinum* puede ser aproximadamente de 8,1.

El cultivo de *Clostridium botulinum* en el medio seminal puede realizarse en una o más etapas. Preferentemente, el cultivo en el medio seminal se realiza en dos etapas. En la etapa uno, se suspende un cultivo de *Clostridium botulinum* en una cantidad de medio seminal y se incuba a  $34 \pm 1$  °C durante 24-48 horas en un ambiente anaeróbico. Preferentemente, el cultivo en la etapa uno se realiza durante aproximadamente 48 horas. En la etapa dos, una porción de todo el medio de la etapa uno que contiene *Clostridium botulinum* se usa para inocular un medio seminal de la etapa dos para continuar el cultivo. Tras la inoculación, el medio de la etapa dos se incuba a  $34 \pm 1$  °C durante aproximadamente 1 - 4 días, también en un ambiente anaeróbico. Preferentemente, el cultivo en el medio seminal de la etapa dos continúa durante aproximadamente 3 días. También es preferible que el cultivo en el medio seminal en cualquier etapa no produzca lisis celular antes de la inoculación del medio de fermentación con el cultivo final en medio seminal.

El medio de fermentación de referencia que contiene subproductos de origen animal para el crecimiento de *Clostridium botulinum* puede basarse en la receta de Mueller y Miller (MM; J. Bacteriol. 67:271, 1954). Los ingredientes del medio MM que contiene subproductos de origen animal incluyen BHI y NZ-CaseTT. NZ-CaseTT es

una fuente disponible en el mercado de péptidos y aminoácidos que proceden de la digestión enzimática de caseínas, un grupo de proteínas que se encuentran en la leche de animales. La presente invención demuestra que los productos que no son de origen animal pueden sustituir al BHI y NZ-CaseTT en el medio de fermentación. Por ejemplo pero sin limitación, los productos hidrolizados de soja pueden reemplazar a los componentes de origen animal del medio MM utilizado para la fermentación de *Clostridium botulinum*.

De acuerdo con la presente invención, se puede utilizar cualquier fuente de soja hidrolizada. Preferentemente, la soja hidrolizada se obtiene de Quest International (Sheffield) bajo el nombre comercial Hy-Soy o de DMV International Nutritionals (Fraser, NY) bajo el nombre comercial SE50MK. Los productos de soja solubles también se pueden obtener de una diversidad de fuentes que incluyen, pero sin limitación, Soy peptone (Gibco), Bac-soytone (Difco), AMISOY (Quest), NZ soy (Quest), NZ soy BL4, NZ soy BL7, y SE50MK (DMV International Nutritionals, Fraser, N.Y.).

En otra realización preferida de la presente invención, el medio utilizado para la fermentación de *Clostridium botulinum* está libre de subproductos de origen animal y comprende soja hidrolizada, glucosa, NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, L-cisteína, L-tirosina y hierro en polvo. Como se desvela para el medio seminal, la soja hidrolizada puede reemplazar a los subproductos de origen animal en el medio de fermentación. Estos subproductos de origen animal incluyen BHI y NZ-Case TT (caseína digerida enzimáticamente).

La concentración de Hy-Soy en el medio de fermentación para la producción de toxina botulínica preferentemente varía entre aproximadamente 10-100 g/l. Preferentemente, la concentración de Hy-Soy varía entre aproximadamente 20-60 g/l. Más preferentemente, la concentración de Hy-Soy en el medio de fermentación es aproximadamente 35 g/l. Para una producción máxima de toxina botulínica, las concentraciones particularmente preferidas de componentes en el medio de fermentación son aproximadamente 7,5 g/l de glucosa; 5,0 g/l de NaCl; 0,5 g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 175 mg/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 50 mg/l de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 125 mg/l de L-cisteína; y 125 mg/l de L-tirosina. La cantidad de hierro en polvo utilizado puede variar de 50 mg/l a 2000 mg/l. Preferentemente, la cantidad de hierro en polvo varía entre aproximadamente 100 mg/l y 1000 mg/l. Más preferentemente, la cantidad de hierro en polvo usado en el medio de fermentación varía entre aproximadamente 200 mg/l y 600 mg/l.

Para obtener niveles óptimos de producción de toxina, el pH inicial (antes de la esterilización en autoclave) del medio de fermentación basado en soja varía preferentemente entre aproximadamente 5,0 y 7,1. Los presentes inventores descubrieron que el control del pH mejora la recuperación de la toxina botulínica. Preferentemente, el pH inicial del medio de fermentación es aproximadamente un pH de 7. Como se explica en el ejemplo 7, los presentes inventores han descubierto que se puede obtener un alto rendimiento de toxina botulínica estable si el pH se reduce posteriormente y se mantiene entre 5-5,5. Como se describe para el medio seminal, los componentes del medio de fermentación, incluyendo la glucosa y el hierro, se esterilizan juntos preferentemente en autoclave.

Preferentemente, una parte del medio seminal de la segunda etapa utilizado para el cultivo de *Clostridium botulinum* se utiliza para inocular el medio de fermentación. La fermentación se produce en una cámara anaeróbica a aproximadamente 34 ± 1 °C durante aproximadamente 7 a 9 días. El cultivo bacteriano se puede controlar midiendo la densidad óptica (D.O.) del medio. La fermentación preferentemente se para después de que la lisis celular se haya realizado durante 48 horas como se determina por la medición del crecimiento (por densidad óptica). Cuando se lisan las células, desciende la D.O. del medio.

En una realización preferida de la presente invención, los cultivos de *Clostridium botulinum* utilizados para el almacenamiento a largo plazo de *Clostridium botulinum* y para inocular el medio seminal, se dejan crecer y liofilizan en leche de soja antes del almacenamiento a 4 °C. Los cultivos de *Clostridium botulinum* en leche animal liofilizados para el almacenamiento también se pueden utilizar para la producción de toxina botulínica. Sin embargo, para mantener los medios que están sustancialmente libres de subproductos de origen animal durante la producción de toxina botulínica, se prefiere que el cultivo inicial de *Clostridium botulinum* se conserve en leche de soja y no en leche animal.

## Ejemplos

A menos que se explique de otra manera, en estos Ejemplos "toxina" o "toxina botulínica" significa un complejo de toxina botulínica tipo A con un peso molecular de aproximadamente 900 kDa. La presente invención no está limitada a sistemas y procedimientos para purificar un complejo de toxina botulínica tipo A con un peso molecular de aproximadamente 900 kDa, pudiendo aplicarse también a la purificación de toxinas de 150 kDa, 300 kDa y 500 kDa, así como de toxinas, complejos y serotipos de toxina botulínica de otros pesos moleculares.

### Ejemplo 1

#### Preparación de un medio seminal libre de productos de origen animal para *Clostridium botulinum*

Se puede preparar un medio seminal de control utilizando los siguientes ingredientes para cada litro de medio: NaCl (5 g), Bacto-peptona (10 g), glucosa (10 g), BHI (hasta 1 litro), pH 8,1 (ajustado con NaOH 5 N).

Se puede preparar un medio seminal de ensayo (libre de productos de origen animal) utilizando los siguientes

ingredientes para cada litro de medio: NaCl (5 g), Soy-peptona (10 g), glucosa (10 g), Hy-Soy (35 g/litro, para obtener 1 litro de fluido de medio), pH 8,1 (ajustado con NaOH 5 N).

## Ejemplo 2

### Cultivo de *Clostridium botulinum* en un medio seminal libre de productos de origen animal

5 Se puede suspender un cultivo liofilizado de *Clostridium botulinum* en 1 ml del medio control y del medio seminal de ensayo del Ejemplo 1, dividiendo (cada medio seminal) en dos tubos de los que cada uno puede contener 10 ml de los respectivos medios seminales, y después incubarse a 34 °C durante aproximadamente 24-48 horas. Un ml del cultivo se puede utilizar después para inocular un Matraz de Cultivo DeLong Belco de 125 ml que contiene 40 ml del medio seminal (respectivo). El cultivo inoculado se puede incubar a 33 °C ± 1 °C durante 24 horas en una Cámara Anaeróbica Coy (Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, Mich.).

## Ejemplo 3

### Preparación de medios libres de productos de origen animal para *Clostridium botulinum*

15 Se puede preparar un medio basal de fermentación utilizando los siguientes ingredientes para cada dos litros de medio: glucosa (15 g), NaCl (10 g), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,350 g), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,1 g), cisteína-HC (0,250 g), tirosina-HCl (0,250 g), hierro en polvo (1 g), ZnCl<sub>2</sub> (0,250 g) y MnCl<sub>2</sub> (0,4 g).

Se puede preparar un medio de fermentación de control utilizando los siguientes ingredientes por cada dos litros de medio preparado: BHI (500 ml; que corresponde a aproximadamente 45,5 gramos en peso seco de infusión de corazón bovino), NZ-CaseTT (30 g), y medio basal (hasta 2 litros), pH 6,8.

20 Puede prepararse primero el medio de fermentación basal y ajustarse a un pH de 6,8. Después puede prepararse la infusión de corazón bovino (BHI) y su pH ajustarse a un valor de 8 con NaOH 5 N. Después se puede añadir el BHI al medio basal. Luego se puede preparar NZ-CaseTT. Después se añade NZ-CaseTT al medio basal al que ya se ha añadido la infusión de corazón bovino, y se disuelve añadiendo HCl. El pH entonces se puede ajustar a 6,8 con NaOH 5 N. Este medio se puede separar en porciones de 8 ml en dieciséis tubos de ensayo de 100 mm, seguido de esterilización en autoclave durante 25 minutos a 120 °C.

25 Se puede preparar un medio de fermentación de ensayo (libre de productos de origen animal) por sustitución del BHI presente en el medio de fermentación de control por una la fuente de nitrógeno de ensayo. Las fuentes de nitrógeno adecuadas en el medio de fermentación de ensayo incluyen: Hy-Soy (Quest), AMI-Soy (Quest), NZ-Soy (Quest), NZ-Soy BL4 (Quest), NZ-Soy BL7 (Quest), Sheftone D (Sheffield), SE50M (DMV), SE50 (DMV), SE%MK (DMV), Soy Peptone (Gibco), Bacto-Soyton (Difco), Nutrisoy 2207 (ADM), Bakes Nutrisoy (ADM) harina Nutrisoy, harina Soybean, Extracto Bacto-Yeast (Difco), Extracto de levadura (Gibco), Hy-Yest 412 (Quest), Hy-Yest 441 (Quest), Hy-Yest 444 (Quest), Hy-Yest (455 (Quest) Extracto Bacto-Malt (Difco), extracto soluble de maíz, y Proflo (Traders).

35 El medio de fermentación de ensayo se puede preparar como se ha indicado anteriormente para el medio de fermentación de control excepto porque se excluye el BHI y porque la fuente de nitrógeno relevante se puede ajustar primero a un pH de 6,8 con HCl 3 N o con NaOH 5 N. Los medios pueden repartirse en porciones de 8 ml en dieciséis tubos de ensayo de 100 mm, seguido de esterilización en autoclave durante 20-30 minutos a 120 °C.

## Ejemplo 4

### Cultivo de *Clostridium botulinum* en un medio de fermentación libre de productos de origen animal

40 Se puede utilizar una porción de 40 µl de cultivo en medio seminal de ensayo (libre de productos de origen animal) para inocular cada alícuota de medio de fermentación de control o de ensayo en un tubo de ensayo de 16 x 100 mm de 8 ml de capacidad. Los cultivos después se pueden incubar a 33 ± 1 °C durante 24 horas. Los tubos después se pueden incubar en una cámara anaeróbica para permitir el crecimiento de la bacteria. Cada ensayo del medio puede realizarse por triplicado (es decir, puede implicar tres inoculaciones independientes del mismo medio), y puede también incluir un control no inoculado, que se puede utilizar como el blanco del espectrofotómetro. El crecimiento (como se determina por densidad óptica, D.O.) se puede medir cada 24 horas con un Espectrofotómetro Turner (Modelo 330) a 660 nm. El cultivo debe pararse después hayan transcurrido aproximadamente 48 de lisis celular y entonces se pueda medir la producción de toxina botulínica.

50 Se pueden llevar a cabo experimentos adicionales con un medio de fermentación Hy-Soy que contenga los siguientes ingredientes por cada 500 ml de medio: Hy-Soy (17,5 g); glucosa (3,75 g); NaCl (2,5 g); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,25 g), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,025 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,0875 g), L-cisteína (0,0625 g), L-tirosina (0,0625 g), hierro en polvo (0,25 g), pH 6,8.

**Ejemplo 5****Determinación de la producción de toxina botulínica por el cultivo de *Clostridium botulinum* en un medio de fermentación libre de productos de origen animal**

5 Se pueden centrifugar las células cultivadas del Ejemplo 4 y luego determinarse el pH del sobrenadante. Se pueden medir los niveles de toxina botulínica en una muestra determinada añadiendo una antitoxina de referencia y midiendo el tiempo transcurrido antes de la floculación. Se pueden determinar tanto el Kf (el tiempo que se necesita para que se produzca la floculación) como el Lf (el límite de floculación; equivalente a 1 unidad internacional de antitoxina de referencia, que se establece por floculación). Se pueden tomar 4 ml del caldo de fermentación de cada tubo de fermentación de un cultivo determinado y se pueden combinar juntos de forma que puedan mezclarse un total de 12 ml en un tubo de centrifuga de 15 ml. Los tubos se pueden centrifugar a 5000 rpm (34000 g) durante 30 min a 4 °C. Se pueden añadir alícuotas de 1 ml de sobrenadante a tubos que contienen 0,1-0,6 ml de antisuero de toxina botulínica de referencia y los tubos se pueden agitar cuidadosamente para mezclar su contenido. Los tubos después se pueden poner en un baño de agua a  $45 \pm 1$  °C y puede registrarse el tiempo inicial. Los tubos se pueden comprobar frecuentemente, y el punto de tiempo en el que empieza la floculación se puede registrar como Kf. La concentración de toxina en el tubo en el que la floculación comenzó primero puede denominarse L<sub>FFF</sub>. La concentración de toxina en el tubo en el que la floculación se inicia en segundo lugar puede denominarse L<sub>f</sub>.

10 Pueden realizarse ensayos paralelos de fermentación, cultivo y producción de toxinas para: (a) tanto el medio seminal de control (utilizado para inocular el medio de fermentación de control) como el medio de fermentación de control, y (2) tanto el medio seminal de ensayo (libre de productos de origen animal) (usado para inocular el medio de fermentación de ensayo) como el medio de fermentación de ensayo (libre de productos de origen animal). Significativamente, se puede determinar que la fermentación de *Clostridium botulinum* en medios libres de productos de origen animal e inoculados a partir de cultivos también libres de productos de origen animal (con productos basados en la soja para reemplazar a los productos de origen animal) puede dar lugar a un valor de L<sub>f toxina</sub> de aproximadamente 50 o mayor. Como mínimo, el valor de L<sub>f toxina</sub> es igual aproximadamente a 10. Preferentemente, el valor de L<sub>f toxina</sub> es al menos 20. Más preferentemente, el valor de L<sub>f toxina</sub> es mayor de 50.

15 Adicionalmente, se puede determinar que varios productos de soja mantienen el crecimiento de *Clostridium botulinum* en medios de fermentación carentes de BHI. Por tanto, preparaciones solubles de soja pueden reemplazar al BHI para el cultivo de *Clostridium botulinum*. La mejor concentración puede ser 12,5 o 25 g/l. Hy-Soy (Sheffield) puede producir el mayor crecimiento. Las preparaciones insolubles de soja pueden ser menos eficaces.

20 Además, se pueden obtener resultados que muestran que Hy-Soy de Quest, SE50MK de DMV, y NZ-Soy de Quest pueden ser productos de soja eficaces en términos de su capacidad para reemplazar al BHI para el cultivo de *Clostridium botulinum*. Los resultados pueden revelar que los productos de soja (tales como Hy-Soy de Quest, SE50MK de DMV y NZ-Soy de Quest) que pueden ser óptimos para el crecimiento, pueden ser eficaces en el reemplazo de BHI para la producción de toxinas. El mejor producto de soja para la producción de toxinas puede ser Hy-Soy de Quest a 22,75 g/l. Concentraciones más altas de este producto pueden producir un mayor crecimiento, pero no mejoran la producción de toxina. Se ha sugerido que se pueden obtener resultados similares con SE50MK, para el que una concentración mayor puede generar un incremento del crecimiento, pero no un incremento en la producción de toxina. Por otra parte, a su concentración más alta, NZ-Soy, puede producir mayor crecimiento y mayor producción de toxina.

25 Finalmente, se puede determinar que los productos de soja pueden reemplazar eficazmente a la BHI así como a NZ-CaseTT. La eliminación de NZ-CaseTT de los medios basados en soja puede reducir el crecimiento aproximadamente 2-4 veces. El mejor producto de soja para el crecimiento tanto en presencia como en ausencia de NZ-CaseTT puede ser SE50MK. Hy-Soy puede reemplazar tanto a la BHI como a NZ-CaseTT para la producción de toxina. Sin embargo, puede ser necesario un ciclo de fermentación más largo de 1 o 2 días. Hy-Soy podría reemplazar a la BHI y a NZ-CaseTT en los medios de producción de toxina. Sin embargo, se puede determinar que los extractos de levadura pueden ser inhibidores de la producción de toxina.

30 Se puede determinar que Hy-Soy a 22,75 g/l puede reemplazar completamente tanto a BHI como a HY-CaseTT para la producción de toxina. A diferencia del efecto sobre el crecimiento donde lo mejor puede ser 56,88 g/l de HY-Soy, para la fase de producción de toxina puede ser mejor 34,13 g/l de HY-Soy.

35 De esta manera, sorprendentemente, se ha determinado si Hy-Soy o [Hy-Soy+Hy-Yest] pueden reemplazar a la BHI y a la bacto-peptona en los medios para el cultivo seminal de *Clostridium botulinum*. Además, se pueden diseñar experimentos para determinar las concentraciones óptimas de los componentes en los medios seminales para producir los máximos niveles de producción de toxina botulínica por *Clostridium botulinum*. La producción de toxina por *Clostridium botulinum* cultivado en medio seminal y medio de fermentación que está libre de BHI y NZ-CaseTT puede alcanzar o exceder los niveles conseguidos en medios que contienen BHI y NZ-CaseTT.

40 Se pueden determinar las concentraciones óptimas de Hy-Soy o [Hy-Soy+Hy-Yest] para el cultivo en el medio seminal. Los experimentos pueden confirmar que Hy-Soy puede reemplazar a la BHI y a la Bacto-peptona como fuente de nitrógeno en el medio seminal para el cultivo de *Clostridium botulinum* y para la producción de toxina

botulínica en la posterior fase de fermentación. Además, Hy-Soy como fuente de nitrógeno en el medio seminal, cuando se compara con Hy-Soy más Hy-Yest, puede producir niveles más altos de toxina botulínica en la etapa de fermentación posterior. Las concentraciones de Hy-Soy en el medio seminal que producen los mejores niveles de toxina varían de aproximadamente 62,5 g/l a 100 g/l.

- 5 Se pueden diseñar experimentos adicionales para determinar las concentraciones óptimas de Hy-Soy en el medio seminal para la producción máxima de toxina botulínica por *Clostridium botulinum* mediante fermentación. De esta manera, 30 g, 50 g, 75 g y 100 g de Hy-Soy en el medio seminal pueden dar como resultado la producción de toxina botulínica por fermentación de *Clostridium botulinum* y esta producción es comparable o excede los niveles de toxina botulínica producida en el medio seminal que contiene BHI y Bacto-peptona como fuente de nitrógeno.
- 10 Se puede observar que una concentración de 100 g/l de Hy-Soy en el medio seminal dio como resultado los niveles más altos de producción de toxina en la etapa posterior de fermentación. Además, los datos indican que en la etapa seminal 1 del medio seminal de Hy-Soy se producía mayor crecimiento después de 48 horas que después de 24 horas.

### Ejemplo 6 (Referencia)

#### 15 Procedimiento no APF para obtener una toxina botulínica

Se obtuvo una toxina de *Clostridium* por fermentación de una bacteria *Clostridium botulinum*. De esta manera, se llevó a cabo un procedimiento de Schantz modificado (no APF) para obtener una toxina muy potente y altamente purificada de *Clostridium botulinum* (es decir, toxina a granel) de la manera siguiente. Un procedimiento de Schantz modificado (no APF) puede proporcionar un alto rendimiento de toxina botulínica. Tanto el procedimiento de Schantz como el procedimiento de Schantz modificado utilizan caseína en todos los medios de fermentación.

#### Preparación del cultivo de base

Varias bacterias *Clostridium* están disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Virginia. De manera alternativa, se puede preparar un vial de banco de células *Clostridium botulinum* por aislamiento de *Clostridium botulinum* de varias fuentes, incluyendo el suelo, o por recogida de muestras profundas (en lugares anaeróbicos o casi anaeróbicos) o en cadáveres de animales en putrefacción. Comúnmente, *Clostridium botulinum* se puede obtener de una muestra de un fluido fisiológico (es decir, un exudado de la herida de un paciente con botulismo por herida) de un paciente al que se le ha diagnosticado botulismo. La mitad superior de la Figura 1 resume el procedimiento no APF utilizado para la preparación de un vial de banco celular, y para el cultivo y fermentación de una toxina botulínica.

30 El *Clostridium botulinum* obtenido de una fuente natural o de un paciente se cultiva en placas de agar sangre, y a continuación se inoculan las colonias con un alto crecimiento en el medio del vial del banco celular. El medio del vial del banco celular utilizado para *Clostridium botulinum* era un medio de carne cocida que contenía carne fresca de vacuno picada. Los cultivos que crecieron activamente se mezclaron con glicerol para preparar un vial de banco celular (es decir, un cultivo de base) de la bacteria *Clostridium botulinum* que se congeló para su uso posterior.

#### 35 Cultivos seminales

Un vial de banco celular de *Clostridium botulinum* se descongeló a temperatura ambiente, y a continuación se llevaron a cabo cuatro etapas de cultivo. (1) Para seleccionar colonias con una morfología adecuada, se cultivaron alícuotas del vial de banco celular descongelado aplicando estrías de las bacterias sobre placas agar sangre Columbia pre-reducidas y se incubaron en condiciones anaerobias durante 30-48 horas a  $34\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (2) Se inocularon entonces las colonias seleccionadas en tubos de ensayo que contenían un medio de crecimiento de caseína durante 6-12 horas a  $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El contenido del tubo con crecimiento más rápido y densidad mayor (etapa de selección por crecimiento) se cultivó después a través de incubaciones anaeróbicas en dos etapas: (3) una primera incubación de 12-30 horas a  $34\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un frasco de cultivo seminal de un litro, seguido de (4) un segundo cultivo en un fermentador seminal de 25 litros que contenía un medio de cultivo con caseína durante 6-16 horas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Estos cultivos en dos etapas se llevaron a cabo en un medio nutritivo que contenía un 2% de hidrolizado de caseína (un producto de digestión de la caseína [proteína de la leche]), un 1% de extracto de levadura y un 1% de glucosa (dextrosa) en agua a un pH de 7,3.

#### Fermentación

Los cultivos por etapas continuaron con una incubación más durante 60-96 horas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un fermentador a escala comercial (es decir 115 litros) en un medio que contenía caseína, bajo una atmósfera anaeróbica controlada. El crecimiento de las bacterias se completa normalmente tras 24 a 36 horas, y durante la fermentación de 60-96 horas la mayoría de las células experimentan lisis y liberaron la toxina botulínica. El control del pH del medio de fermentación no es necesario en un procedimiento de Schantz o de Schantz modificado. Se cree que la toxina se libera por la lisis celular y se activa por las proteasas presentes en el caldo de cultivo. Opcionalmente, se puede preparar una filtración de este medio de cultivo utilizando un filtro de una sola capa de profundidad para extraer las impurezas gruesas (es decir, las células enteras y rotas) para obtener una solución transparente que se denomina

cultivo clarificado.

#### Recolección

La recolección de la toxina se puede lograr bajando el pH a 3,5 con ácido sulfúrico para precipitar la toxina de partida a 20 °C. La toxina de partida después se concentró por ultrafiltración seguida de diafiltración.

#### 5 Purificación

La toxina bruta recolectada se transfirió después a un recipiente de digestión y se estabilizó por la adición del inhibidor de proteasas clorhidrato de benzamidina. Se añadieron DNasa y RNasa para digerir los ácidos nucleicos. El material que contenía la toxina se sometió a UF/DF y tres etapas de precipitación (precipitaciones en etanol frío, ácido clorhídrico y sulfato amónico). El complejo de neurotoxina botulínica purificada (toxina a granel) se almacenó como una suspensión en un tampón de fosfato sódico/sulfato amónico a 2-8 grados C.

10

La toxina a granel resultante era un complejo de toxina botulínica tipo A de 900 kDa cristalina de alta calidad producida a partir de la cepa Hall A de *Clostridium botulinum* con una potencia específica de  $\geq 3 \times 10^7$  U/mg, una relación  $A_{260}/A_{278}$  de menos de 0,60 y un patrón característico de bandas en el gel de electroforesis, y era adecuada para su uso para la preparación de una composición farmacéutica de toxina botulínica.

15

La preparación puede englobar la dilución de muchas veces de la toxina a granel, la mezcla con uno o más excipientes (tales como albúmina y cloruro sódico) para formar así una composición de toxina, y la preparación de una forma de la composición de estable durante el almacenamiento y el transporte, tal como mediante liofilización, secado por congelación o secado al vacío de la composición.

20

El complejo de toxina botulínica purificada obtenido por el procedimiento de Schantz o el procedimiento de Schantz modificado puede eluirse de la columna de intercambio iónico en un tampón a pH de 7-8 para disociar las proteínas del complejo que no son toxinas de la molécula de toxina botulínica, proporcionando de esta forma (dependiendo del tipo de bacteria *Clostridium botulinum* fermentada) toxina botulínica tipo A pura con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa y una potencia específica de  $1-2 \times 10^8$  UDL<sub>50</sub>/mg o mayor; o toxina botulínica tipo B purificada de un peso molecular de aproximadamente 156 kDa y una potencia específica de  $1-2 \times 10^8$  UDL<sub>50</sub>/mg o mayor, o una toxina botulínica tipo F purificada con un peso molecular de aproximadamente 155 kDa y una potencia específica de  $1-2 \times 10^7$  UDL<sub>50</sub>/mg o mayor.

25

Como se expuso anteriormente, en un aspecto, la presente invención elimina las etapas de purificación de la recolección expuestas en este Ejemplo 6 realizadas sobre el cultivo clarificado, incluyendo la eliminación del uso de productos de origen animal, tales como RNasa y DNasa.

30

#### Ejemplo 7

##### Medios APF y procedimiento para obtener una toxina botulínica

Este Ejemplo 7 expone un procedimiento APF realizado para obtener una toxina tipo A de *Clostridium botulinum* de alta potencia y altamente purificada (es decir, toxina a granel). El procedimiento se puede utilizar con otros serotipos de toxina botulínica.

35

#### Preparación del Cultivo de base

Como se expone en el Ejemplo 6, *Clostridium botulinum* se puede obtener en la ATCC, de varias fuentes en la naturaleza, o de un paciente con botulismo. La mitad inferior de la Figura 1 resume el procedimiento APF utilizado para la preparación de un vial de banco celular, y para el cultivo y fermentación de una toxina botulínica. Los viales de banco celular APF se prepararon cultivando *Clostridium botulinum* sobre placas de agar vegetal. Las placas de agar vegetal se fabricaron mezclando el derivado de soja Hy-Soy (Quest) con un extracto de levadura y glucosa en una relación 3:1:1 (en porcentaje de peso) con agar y dejando sedimentar. También se consideraron adecuadas otras placas de agar APF disponibles en el mercado o polvo deshidratado para preparar las placas. Las colonias de alto crecimiento seleccionadas después se inocularon en un medio APF en un vial de banco celular. El medio APF del vial de banco celular usado comprendía proteína de soja hidrolizada, extracto de levadura (no se utilizó ningún producto de origen animal ni en el cultivo de la levadura ni en el procedimiento de preparación de la levadura considerado adecuado). Los concentrados de soja hidrolizada y de extracto de levadura que se utilizaron se obtuvieron de Quest International. El cultivo de *Clostridium botulinum* en el medio APF se combinó con glicerol, se prepararon alícuotas en crioviales y se congelaron para su uso posterior. Los medios APF desarrollados se pueden utilizar para almacenar bacterias *Clostridium botulinum* durante un periodo de un año o más sin pérdida de viabilidad. Estas mezclas de cultivo congelado y glicerol en crioviales son los viales de banco celular.

40

45

50

#### Cultivos

Un vial de banco celular APF se descongeló a temperatura ambiente, y a continuación se llevó a cabo una única etapa de cultivo: en un frasco de cultivo seminal de un litro después se inoculó directamente (es decir, sin un cultivo intermedio en agar sangre o etapas intermedias de crecimiento en tubos) el contenido del vial de banco celular APF

utilizando el mismo medio APF (el medio del vial de banco celular APF [almacenamiento] puede ser diferente del medio de fermentación APF [de crecimiento]) y se mantuvo a 35 °C durante 15 a 24 horas, con un pH inicial del medio de 7,0 en una atmósfera anaeróbica (nitrógeno).

#### Fermentación

- 5 A continuación, el cultivo seminal del frasco se transfirió a un fermentador de producción de 10 litros a escala comercial que contenía el medio APF (proteína de soja hidrolizada, extracto de levadura y un 1% de glucosa) y se mantuvo a 35 °C durante 52-72 horas, con un pH inicial del medio de 7,0, en una atmósfera anaeróbica (nitrógeno). A partir de ahí (en 1-2 horas después del comienzo de la fermentación) el pH se redujo y se mantuvo en un intervalo estrecho de pH de 5-5,5. Se observó que era necesario controlar el pH del medio de fermentación APF en un intervalo estrecho con el fin de obtener un rendimiento aceptable de toxina botulínica activa. Por tanto, se observó que este control del pH entre 5-5,5 prevenía sustancialmente la degradación y pérdida de potencia de la toxina botulínica. Se cree que, durante la fermentación, la mayoría de las células experimentan lisis y liberaban la toxina botulínica y que la toxina liberada por la lisis celular se activa por las proteasas presentes en el caldo de cultivo. La filtración de este medio de cultivo utilizando un filtro de una sola capa de profundidad extrae las impurezas gruesas (es decir, las células enteras y rotas), dando como resultado una solución trasparente que se denomina cultivo clarificado.

#### Recolección

La recolección de toxina botulínica puede entonces transcurrir como en el Ejemplo 6 (es decir, precipitación con ácido sulfúrico, seguido de concentración por microfiltración y posterior diafiltración).

#### 20 Purificación

La purificación de la toxina se puede posteriormente realizar como se expone en el Ejemplo 6: es decir, adición de clorhidrato de benzamidina y DNasa y RNasa, precipitación con ácido sulfúrico, precipitación con etanol frío, extracción en tampón fosfato, precipitación con ácido clorhídrico, extracción en tampón fosfato y almacenamiento de la toxina a granel.

- 25 Como alternativa al procedimiento de recolección y purificación del Ejemplo 6, puede realizarse un procedimiento de cromatografía en columna de la presente invención.

- La toxina a granel resultante es un complejo de toxina botulínica tipo A cristalina de 900 kDa de alta calidad producido a partir de la cepa Hall A de *Clostridium botulinum* con una potencia específica de  $\geq 3 \times 10^7$  U/mg, una relación  $A_{260}/A_{278}$  menor de 0,60 y un patrón característico de bandas en el gel de electroforesis, y es adecuada para su uso en la preparación de una composición farmacéutica de toxina botulínica. Por tanto, este procedimiento APF para una toxina botulínica puede generar una toxina de alta calidad.

- 30 El complejo de toxina botulínica purificada obtenido por un procedimiento APF puede pasarse a través y eluirse de una columna de intercambio iónico en un tampón a pH 7-8 para disociar las proteínas del complejo que no son toxinas de la molécula de toxina botulínica, proporcionando de esta manera (dependiendo del serotipo de la bacteria *Clostridium botulinum* fermentada) toxina botulínica con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa y una potencia específica de  $1-2 \times 10^8$  UDL<sub>50</sub>/mg o mayor; o toxina botulínica purificada tipo B con un peso molecular de aproximadamente 156 kDa y una potencia específica de  $1-2 \times 10^8$  UDL<sub>50</sub>/mg o mayor, o toxina botulínica purificada tipo F con un peso molecular de aproximadamente 155 kDa y una potencia específica de  $1-2 \times 10^7$  UDL<sub>50</sub>/mg o mayor. Por ejemplo, mediante el uso del medio APF de la presente invención, los presentes inventores fueron capaces de obtener un complejo de toxina botulínica tipo A con una potencia específica de  $1,02 \times 10^8$  UDL<sub>50</sub>/mg de la toxina botulínica.

- 45 En este Ejemplo 7 se utilizaron medios APF con un 1% en peso o un 2% en peso de glucosa (debe tenerse en cuenta que un 1% de glucosa significa 1 g de glucosa por 100 ml de medio de cultivo y un 2% de glucosa significa que están presentes 2 g de glucosa por cada 100 ml de medio de cultivo) y se determinó que el crecimiento máximo de la bacteria (como se determinó por el pico de densidad óptica [densidad óptica que se midió a 600 nm] del cultivo) se producía después de aproximadamente 20 horas de fermentación en el medio APF con un 1% de glucosa frente a las aproximadamente 40 horas de fermentación en el medio APF con un 2% de glucosa, pero que los picos de densidad óptica no diferían significativamente cuando se variaba el contenido en glucosa del medio. Se creía que la autólisis celular y la liberación de toxina daba como resultado la máxima cantidad de toxina botulínica activa en los medios APF con un 1% de glucosa (como se determinó por el ensayo SNAP-25 para la toxina activa) tras aproximadamente 55 horas de fermentación, pero que con los medios APF con el 2% de glucosa la cantidad de toxina botulínica activa presente en el medio en un tiempo posterior (como se determinó por el ensayo de SNAP-25 para la toxina activa) aún se incrementaba tras 65 horas de fermentación. Por tanto, se producía una liberación más rápida de toxina botulínica con el uso de una cantidad más baja de glucosa (1%) presente en el medio APF, lo que indica que se puede llevar a cabo un procedimiento de producción de toxina más eficaz (es decir, se obtiene una mayor cantidad de toxina por unidad de tiempo) utilizando el medio APF con menos glucosa (1%).

Como se muestra en la Figura 1, se determinó también que los parámetros óptimos para la producción de toxina botulínica en un medio APF eran una combinación de los siguientes parámetros: (1) aproximadamente el 6% en peso de concentrado de soja hidrolizada ("Hy-Soy Conc." en la Figura 1) en el medio de fermentación APF. El 6% de soja significa 6 g de proteína de soja por 100 ml de medio de cultivo; (2) de un 0% a un 3% de concentrado de extracto de levadura ("YE Conc." en la Figura 1) en el medio de fermentación APF; (3) 50-72 horas de fermentación a una temperatura de 33-35 °C en condiciones anaeróbicas (atmósfera de nitrógeno); (4) un pH del medio de fermentación mantenido entre aproximadamente 5,0 y 5,5 a lo largo de todo el periodo de fermentación tras el crecimiento celular inicial, y (5) un 1% en peso de glucosa en el medio de fermentación APF.

Por tanto, como se muestra en la Figura 1, cuanto más proteína está presente en el medio APF (como cantidad total de HySoy y YE), el pH del medio tiende a incrementarse dando como resultado una menor estabilidad de la toxina, y cuando el pH se redujo con el mismo contenido en nutrientes proteicos totales en el medio, el rendimiento de producción de toxina aumentó de forma espectacular. En el procedimiento no APF, el contenido de proteína total es menor por lo que el pH no tiende a aumentar y por tanto no hay un pH elevado que tenga un efecto perjudicial sobre la producción de la toxina. La Figura 1 muestra que había consistentemente más actividad (como se determinó por los ensayos MLD50 y SNAP-25) cuando el pH del medio se controlaba en un intervalo estrecho de aproximadamente 5,3 a 5,5. La Figura 1 también muestra que el rendimiento más alto de la toxina (como se determinó por el ensayo SNAP-25) se obtuvo con un medio que comprendía un 6% de soja hidrolizada y un 1% de extracto de levadura.

El ensayo SNAP-25 utilizado fue un procedimiento basado en ELISA para medir la actividad proteolítica sobre SNAP-25 de la toxina botulínica. SNAP-25 es una abreviatura de proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa de peso molecular. SNAP-25 es una proteína de la membrana plasmática de 206 aminoácidos implicada en la exocitosis neuronal. El ensayo está basado en el procedimiento desvelado en Ekong T., y col., Recombinant SNAP-25 is an effective substrate for *Clostridium botulinum* type A toxin endopeptidase activity *in vitro*, Microbiology (1997), vol. 143, páginas 3337-3347. El ensayo utiliza una proteína SNAP-25 truncada (el péptido de 206 restos de aminoácidos) unida a placas de microtitulación de poliestireno con 96 pocillos y un anticuerpo monoclonal que reconoce el producto escindido (un péptido de 197 restos de aminoácidos) que se produce por hidrólisis enzimática entre los aminoácidos 197 y 198 de SNAP-25 por la toxina botulínica tipo A reducida. El anticuerpo monoclonal unido al producto escindido se detecta entonces con un anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano rusticano [HRP]), que produce un cambio de color en presencia de un sustrato cromogénico (TMB).

El ensayo MLD50 (dosis letal para el 50% de ratones) es un procedimiento para medir la potencia de una toxina botulínica por inyección intraperitoneal de la toxina botulínica en ratones hembra (de aproximadamente cuatro semanas de edad) con un peso de 17-22 gramos cada uno al principio del ensayo. Cada ratón se dispone en posición supina con la cabeza inclinada hacia abajo y se le inyecta por vía intraperitoneal en la parte baja a la derecha del abdomen con un ángulo de aproximadamente 30 grados utilizando una aguja con un calibre de 25 a 27 de 3/8" a 5/8" con una de las varias diluciones seriadas de toxina botulínica en solución salina. Se registran las tasas de mortalidad en las 72 horas siguientes con cada dilución. Las diluciones se preparan de forma que la dilución más concentrada produzca una tasa de mortalidad de al menos el 80% de los ratones inyectados, y la dilución menos concentrada produzca una tasa de mortalidad no mayor del 20% de los ratones inyectados. Debe haber un mínimo de cuatro diluciones que caigan en el intervalo monótono decreciente de las tasas de mortalidad. El intervalo monótono decreciente comienza con una tasa de mortalidad de no menos del 80%. En las cuatro o más tasas monótonas decrecientes, las dos mayores y las dos menores deben ser decrecientes (es decir, no deben ser equivalentes). La dilución a la que el 50% de los ratones mueren en el periodo de observación de los tres días posteriores a la inyección se define como una dilución que comprende una unidad (1 U) de toxina botulínica.

Significativamente, el procedimiento APF de este Ejemplo 7 se diferencia del procedimiento no APF del Ejemplo 6, por al menos: (1) el remplazo del medio con carne cocida por un medio APF en el vial de banco celular; (2) la eliminación de la etapa de selección de colonias en agar sangre; (3) la eliminación de la etapa posterior de crecimiento en el medio en tubo basado en caseína, y; (4) el remplazo de los medios de fermentación no APF por medios APF.

La Figura 2 presenta un resumen de las diferencias entre un procedimiento de Schantz (no APF) a escala industrial (Ejemplo 6) y el procedimiento APF a escala industrial del Ejemplo 7, a través de las etapas de creación del banco celular, cultivo y fermentación. La Figura 2 omite las etapas de recolección y purificación.

Los medios APF se pueden utilizar para seleccionar bacterias *Clostridium botulinum*. Así, la práctica concurrente de las etapas iniciales de cultivo de los Ejemplos 6 y 7 permite el aislamiento y el crecimiento de un cultivo de *Clostridium botulinum* con características que conducen al crecimiento y producción de toxinas botulínicas en o sobre un medio APF. La transferencia de bacterias *Clostridium botulinum* de un medio no APF a un medio APF enriquece y selecciona las bacterias que pueden adaptarse al nuevo entorno o a través de la muerte selectiva, elimina las bacterias que no pueden crecer y producir en el nuevo entorno.

**Ejemplo 8**

**Sistemas cromatográficos y procedimientos para purificar una toxina botulínica**

Los productos químicos utilizados en los experimentos expuestos en el Ejemplo 8 y siguientes incluyen:

- 5 NaOH 10 N (Mallinckrodt, VWR N° Cat. MKH38505)
- Ácido Acético, Calidad USP/FCC, 99,5 - 100,5% (J.T.Baker, N° Cat. JT9522-2)
- Sulfato Amónico, Ultrapuro, 99% (ICN, N° Cat. IC808211)
- Ácido Cítrico, Calidad USP/FCC, 99,5 - 100,5% (J.T.Baker, N° Cat. JT0119-1)
- Etanol, anhidro, desnaturalizado (JT Baker, N° Cat. 9299-1)
- 10 Ácido Clorhídrico, Calidad NF/FCC, 36,5 - 38%-Mallinckrodt-MK2612-14
- Ácido Fosfórico, NF/FCC, 85% - 88% (Mallinckrodt, N° Cat. MK278814)
- Acetato Sódico trihidrato, 99% - 101%, USP/FCC (Mallinckrodt, N° Cat. MK735602)
- Cloruro Sódico, Calidad USP/FCC, 99,0 - 101,0 (Mallinckrodt, N° Cat. MK753204)
- Citrato Sódico, Calidad USP/FCC, 99,0 - 100,5% (J.T.Baker, N° Cat. JT3650-1)
- 15 Hidróxido Sódico, Calidad NF/FCC, 95,0 - 100,5%-Mallinckrodt-MK768004
- Fosfato Sódico, dibásico Heptahidrato, USP (Mallinckrodt, N° Cat. MK789604)
- Fosfato Sódico, monobásico monohidrato, USP/FCC (Mallinckrodt, N° Cat. MK786812)

Las resinas de cromatografía utilizadas en los experimentos siguientes incluyen:

- Bakerbond ABx Prepscale (JT Baker, N° Cat. 7269-02)
- Butil Sefarosa FF (Amersham Biosciences, N° Cat. 17-0980-02)
- 20 - Hidroxiapatita Cerámica, Tipo I (Bio-Rad, N° Cat. 158-4000)
- Hidroxiapatita Cerámica, Tipo II (Bio-Rad, N° Cat. 157-4200)
- Kit de selección HiTrap HIC (Amersham Biosciences, N° Cat. 17-1349-01)
- Kit de selección HiTrap IEX (Amersham Biosciences, N° Cat. 17-6002-33)
- MEP Hypercel (Ciphergen, sample)
- 25 - SP Sefarosa HP (Amersham Biosciences, N° Cat. 17-1087-03)

El equipo y los accesorios utilizados en los experimentos siguientes incluyen:

- Purificador AKTA y Sistema de Cromatografía AKTA FPLC (Amersham Biosciences)
- Filtro estéril de vacío Bottle-top de 0,22 µm (Nalgene)
- 30 Sistema Labscale TFF y Pellicon XL50 con membrana Biomax 100 (Millipore) (este es el equipo de ultrafiltración).
- Bomba Masterflex US Modelo N° 77201-62 (Cole-Parmer)
- Pellicon 2 Mini Holder (Millipore)
- Columnas XK y HR (Amersham Biosciences)

Los tampones utilizados en los experimentos de los presentes inventores se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 2. Tampones utilizados en el procedimiento de purificación APF

<b>Etapas de Purificación</b>	<b>Tampones utilizados</b>
Cromatografía de Butil Sefarosa FF	1. NaPi 50 mM, NaCl 4 M, pH 6,0
	2. NaPi 50 mM, NaCl 2 M, pH 6,0
	3. NaPi 50 mM, NaCl 1 M, pH 6,0
	4. NaPi 50 mM, pH 6,0
Cromatografía de SP Sefarosa HP	5. Citrato Na 20 mM, pH 4,0
	6. Citrato Na 20 mM, NaCl 300 mM, pH 4,0
	7. Citrato Na 20 mM, NaCl 400 mM, pH 4,0
	8. Citrato Na 20 mM, NaCl 1 M, pH 4,0
<b>Etapas posteriores a la purificación</b>	<b>Soluciones utilizadas</b>
Procedimientos posteriores a la columna	9. NaAc 50 mM, pH 4,0
	10. sulfato amónico 3,5 M
Diversos	11. NaOH 0,1 N
	12. NaOH 1 N

En la Tabla 2: Los tampones 1 y 2 se utilizaron para retirar las impurezas de la columna por lavado; los tampones 3 y 4 se utilizaron para eluir la toxina unida de la columna; el tampón 5 se utilizó para diluir el eluyente de la columna de Butil; el tampón 6 se utilizó para retirar las impurezas de la columna por lavado; los tampones 7 y 8 se utilizaron para eluir la toxina unida de la columna; el tampón 8 era el tampón de diálisis UF/DF; la solución 9 se utilizó para precipitar la toxina, y las soluciones 10 y 11 se utilizaron para inactivar (limpiar) cualquier toxina que quedara en las columnas después de su uso.

**Ejemplo 9**

**Selección de las columnas de cromatografía preferidas para su uso en un procedimiento APF de purificación de toxina botulínica por cromatografía en columna (Etapa de Captura)**

Este experimento estableció las columnas de cromatografía preferidas y las técnicas para la purificación inicial de un complejo de toxina botulínica tipo A de las impurezas asociadas en un medio de fermentación.

*Materiales de alimentación*

Un cultivo celular filtrado (cultivo clarificado) obtenido por un procedimiento de fermentación APF y un extracto del mismo preparado por precipitación con ácido clorhídrico, se evaluaron como materiales de alimentación para la columna de cromatografía. Se descubrió que la carga directa del cultivo clarificado en la columna prevenía la precipitación de la toxina y que un material de alimentación de cultivo clarificado era mucho más fácil de manipular y de validar. Por otra parte, el uso de un material de alimentación de un extracto de cultivo clarificado preparado por precipitación con ácido retiraba más impurezas y producía la inactivación de virus. Con respecto a las características de solidez del procedimiento, se determinó que un cultivo clarificado era el material de alimentación preferido, al contrario del uso de una preparación de precipitación con ácido clorhídrico como material de alimentación de una resina para la cromatografía de complejo de toxina botulínica a granel.

Los estudios de los presentes inventores mostraron que según se bajaba el pH, las proteínas (es decir el complejo de toxina botulínica) empezaban a precipitar aproximadamente a un pH de 5, que se extraían pequeñas cantidades de toxina (ya que la mayoría habían precipitado) aproximadamente a un pH de 4,0, y que esencialmente toda la toxina había precipitado de la solución a un pH entre 3,5 y 3,8. Por otro lado, los presentes inventores observaron (basándose, por ejemplo, en SDS-PAGE y transferencia de Western) que la mayoría de las impurezas se co-extraían con la toxina botulínica a un pH de 6,8. Por tanto, un pH preferido del líquido de alimentación preferido para llevar a cabo el procedimiento de purificación de la presente invención estaba entre aproximadamente un pH de 5-6,8, siendo un pH más preferido un valor de aproximadamente 5,5 para la extracción, es decir, la separación de la toxina botulínica de las impurezas asociadas.

*Etapa de Captura*

Para la etapa de captura de la toxina botulínica tipo A (cepa Hall), se incubaron filtrados de cultivos celulares con varias resinas de cromatografía (véase más adelante) según las condiciones especificadas por el fabricante para el uso de cada columna en particular.

Después de lavar las columnas, las proteínas ligadas a la columna se eluyeron con los tampones de elución especificados. Todas las fracciones eluidas se recolectaron y se analizaron por SDS-PAGE. Los resultados obtenidos (Tabla 3) se confirmaron por cromatografía utilizando columnas HiTrap o HR5/5 de 1 ml.

Tabla 3: Sumario de los Resultados de la Etapa de Captura

Técnica de Separación	Resina	Toxina en Flujo a través de la columna	Toxina en el Eluido	Separación Observada
Interacción Hidrofoba	Phenyl FF (HS)	-	+	+
	Octyl FF	-	+	+
	Butil FF	-	+	+
Intercambio iónico	Q FF	+	-	+
	SP FF	+	-	-
Modo mixto	HA Tipo I	+	-	-
	HA Tipo II	+	-	-
	Abx	+	-	-
Carga-Inducción Hidrofoba	MEP	-	+	-
Afinidad por ion Metálico Inmovilizado	Quelante FF	+	-	-

Este experimento mostró claramente que la separación deseada de la toxina botulínica de otras sustancias presentes se conseguía mejor utilizando cromatografía en columna de tipo hidrófobo. Por tanto, los presentes inventores observaron que la toxina botulínica se unía a las columnas hidrófobas, pero no se unía a una columna de intercambio iónico, tal como la columna de Q Sefarosa FF.

- 5 Entre las columnas hidrófobas evaluadas, la Butil Sefarosa FF débilmente hidrófoba dio la mejor resolución. Por tanto, tanto la Butil Sefarosa FF en modo de unión o la Q Sefarosa FF en modo de flujo a través de la columna proporcionaron una etapa de captura de la toxina botulínica preferida.

De esta manera, los presentes inventores determinaron que una etapa de captura eficaz se podía llevar a cabo utilizando una columna hidrófoba, tal como la cromatografía en columna de Butil Sefarosa. Presumiblemente, la toxina se une a la columna de Butil por medio de una interacción hidrófoba. Antes de este experimento se desconocía que un complejo de toxina botulínica podía ser la toxina purificada directamente desde el cultivo clarificado utilizando una columna de cromatografía hidrófoba. Los presentes inventores descubrieron que la Fast Flow de Butil Sefarosa tiene una alta capacidad de unión, permite un caudal rápido con baja presión negativa y es por tanto adecuada para la etapa de captura que necesita la rápida retirada de las impurezas.

15 **Ejemplo 10**

**Cuatro sistemas cromatográficos APF en columna y procedimientos para purificar un complejo de toxina botulínica**

*Etapas de purificación intermedia y de pulido*

20 Se llevaron a cabo etapas adicionales (intermedia y de pulido) de purificación de toxinas utilizando las fracciones que contenían toxinas obtenidas de las columnas preferidas Q y Butil del Ejemplo 9.

Tres tipos de columnas de cromatografía se consideraron eficaces para la purificación adicional del complejo de toxina botulínica. Una columna de Hidroxiapatita (HA) tipo I era una columna preferida para su uso por los presentes inventores porque mostraba separación, pero se encontró algo de toxina en el flujo a través de la columna. La filtración en gel con una columna Superdex 200 era una columna más preferida para su uso porque permitía la purificación del complejo de toxina botulínica de 900 kDa de las impurezas, pero aún estaba presente una banda minoritaria de impurezas en el análisis SDS-PAGE.

Una columna más preferida fue una columna SP Sefarosa HP que se descubrió que separaba la toxina botulínica de las impurezas con muy buena resolución. La toxina botulínica era pura después de la cromatografía en SP Sefarosa HP, basándose en el análisis por SDS-PAGE.

Tabla 4: Resumen de las Etapas de Purificación por Cromatografía de Columna

Técnica de Separación	Resina	Resumen
Modo mixto	Hidroxiapatita tipo I	Toxina en modo de flujo a través de la columna, algunas impurezas separadas.
Filtración en Gel	Superdex 200	Toxina parcialmente purificada, dificultad para aumentar a escala, baja productividad.
Intercambio iónico	SP Sefarosa HP	Separación de alta resolución, obtención de toxina pura.

30 Basándose en los resultados de los Ejemplos 8 y 9, y como se muestra en la Tabla 4, se desarrolló el siguiente procedimiento de purificación por cromatografía en cuatro columnas:

1. Uso de una columna de Q Sefarosa FF para la purificación inicial de un cultivo clarificado. En esta etapa las impurezas se unieron a la columna y la toxina fluyó a lo largo de la columna;
- 35 2. El eluyente de la columna de Q Sefarosa FF de la etapa 1 se pasó entonces a través de una columna de Butil Sefarosa FF. La toxina se unió a la columna y se eluyó con un tampón adecuado.
3. El eluyente de la Butil Sefarosa FF se pasó entonces a través de una columna de Hidroxiapatita tipo I. Las impurezas se unieron a la columna y la toxina fluyó a través de la columna;
4. El eluyente de la Hidroxiapatita tipo I se pasó entonces a través de una columna de SP Sefarosa. La toxina se unió a la columna y se eluyó con un tampón adecuado.

40 Este procedimiento de purificación en cuatro columnas de la toxina se puede resumir como:

Cultivo clarificado APF ⇒ Q (flujo a través de la columna) ⇒ Butil (unión) ⇒ HA (flujo a través de la columna) ⇒ SP (unión) ⇒ complejo de toxina purificada

Este procedimiento de cuatro columnas del complejo de toxina botulínica a granel permitía la carga directa del sobrenadante de cultivo filtrado en la columna Q (etapa 1). El flujo a través de la columna se suplementó con sulfato amónico 0,8 M antes de la segunda etapa de carga en la columna de Butil. En la tercera etapa, el eluato de butil se cargó en la columna HA directamente, mientras que el flujo a través de la columna de HA se diluyó 4 veces con agua desionizada y el pH se ajustó a 4,0 antes de cargarlo en la columna SP para la etapa de la cuarta columna. Este procedimiento de cuatro columnas necesitaba un mínimo de manipulación de la muestra en cada etapa, y aseguraba que la toxina se exponía a condiciones tamponantes suaves a lo largo de las cuatro etapas de este procedimiento de purificación.

Se usó un aumento a escala del procedimiento de purificación en cuatro columnas expuesto anteriormente llevado a cabo sobre 680 ml de sobrenadante de cultivo filtrado obtenido a partir de un procedimiento de fermentación APF de toxina botulínica tipo A. Los resultados (véase la Tabla 5) muestran que este procedimiento de cuatro columnas daba como resultado un alto rendimiento y un complejo de toxina botulínica tipo A altamente purificado.

Tabla 5. Resultados de una purificación aumentada a escala utilizando el procedimiento de purificación de cuatro columnas	
<b>Rendimiento de Toxina</b>	-30 mg por l de cultivo basándose en UV y Hc-ELISA.
<b>Pureza de la Toxina</b>	>98%, monodispersa, complejo de 900 kDa basándose en SEC-HPLC y LS. Pura según el análisis de SDS-PAGE, transferencia western conforme a la referencia.
<b>Potencia de la Toxina</b>	3-5 x 10 <sup>7</sup> unidades MLD <sub>50</sub> por mg basándose en los ensayos de toxicidad en ratones.

### Ejemplo 11

#### Procedimientos APF adicionales de cromatografía multicolumna para purificación de un complejo de toxina botulínica

Utilizando los mismos procedimientos expuestos en los Ejemplos 9 y 10 se evaluaron otras combinaciones de columnas adicionales. Se determinó que cada una de las siguientes cuatro combinaciones adicionales de columnas proporcionaba procedimientos APF para obtener complejo de toxina botulínica altamente purificada, como se determina por SDS-PAGE.

1. Q (flujo a través de la columna) ⇒ Butil ⇒ SP
2. Butil ⇒ Q o HA (flujo a través de la columna) ⇒ SP
3. Butil ⇒ SP ⇒ Q o HA (flujo a través de la columna)
4. Butil ⇒ SP

Las toxinas purificadas se analizaron después por SEC-HPLC con dispersión de luz, electroforesis de capilaridad, ensayo de ADN residual, Hc-ELISA, y MLD50. No se encontraron diferencias significativas entre las toxinas de los cuatro diferentes procedimientos expuestos anteriormente. Los resultados se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Resumen de la calidad de las muestras de toxina purificada por diferentes procedimientos APF 1.4. anteriores.

<b>SEC-HPLC/LS</b>	Pureza >99%, más pura que BCC2030, pero menos homogénea que BCC2030.
<b>Electroforesis de capilaridad</b>	Idénticas entre sí, similares a las toxinas APF de calidad de investigación 19P y 20P, pero ligeramente diferentes de BCC2030.
<b>Ensayo de ADN picogreen</b>	2-6 ng/ml, significativamente más bajo que BCC2030.
<b>Ensayo de toxicidad en ratón, Hc-ELISA</b>	Potencia de la toxina 3,1-4,8 x 10 <sup>7</sup> unidades MLD50/mg de toxina (por UV), o 3,8-12 x 10 <sup>7</sup> unidades MLD50/mg de toxina (por Hc-ELISA).
<b>SDS-PAGE con tinción con plata</b>	Idénticas entre sí

### Ejemplo 12

#### Procedimiento APF de cromatografía de dos columnas para la purificación de un complejo de toxina botulínica

En base a los resultados obtenidos en el Ejemplo 11 se seleccionó un procedimiento de cromatografía de dos columnas (Butil ⇒ SP) para desarrollarlo más.

*Optimización de la primera etapa: Captura de toxina por Butil Sefarosa FF*

Alimentación: Alimentación se realiza en el cultivo clarificado cargado en la columna. Como el sulfato amónico puede

- afectar al pH del tampón, se evaluó el uso de NaCl para remplazar al sulfato amónico en la columna de Butil. Los presentes inventores descubrieron que la adición de NaCl para una alimentación suficiente, era de NaCl 2 M, lo que permitía que el complejo de toxina botulínica se uniera a la columna de Butil. Posteriormente, se determinó que la alimentación con NaCl 4 M aumentaba la unión del complejo de toxina botulínica a la columna de Butil, de forma que el rendimiento de toxina de la columna de Butil se incrementó en un 30% a un 50%, cuando se comparó con el uso de NaCl 2 M en la alimentación, como se determinó por Hc-ELISA.
- La adición de NaCl al cultivo clarificado (la alimentación) producía un pequeño desplazamiento del pH. Sin embargo, el pH de alimentación aceptable se estableció entre pH 5 y 6 y el pH final de la alimentación después de la adición de NaCl estaba entre pH 5 y pH 6. Por tanto, la alimentación preferida para su uso en esta primera etapa de un procedimiento de purificación en dos columnas tiene una concentración de NaCl 4 M y un pH de 5-6. Se añadió NaCl sólido directamente al cultivo clarificado para obtener la concentración de NaCl 4 M y esta alimentación se añadió entonces a la columna de Butil. La toxina unida se eluyó de la columna utilizando un tampón de elución de NaCl 1 M.
- Resultó inesperado que la mayoría de las impurezas proteicas pudieran retirarse de la columna por lavado y la mayor parte de la toxina unida a la columna se pudiera eluir con un tampón de NaCl 1 M, porque los procedimientos de purificación en columna típicamente consisten en 3 o más columnas, excepto en el procedimiento de columna de afinidad. Los presentes inventores determinaron que esta columna de Butil es única, ya que tiene la capacidad de retirar muchas impurezas proteicas. Por tanto, tras el uso de esta columna, la pureza del complejo de toxina botulínica fue aproximadamente del 50%.
- Se llevó a cabo entonces una etapa de lavado para retirar las impurezas de una columna. Las impurezas en la columna procedían de la alimentación del cultivo clarificado (que contenía NaCl 4 M) utilizado. Las etapas de lavado optimizadas fueron: 1) Lavado nº 1: 5 CV de NaPi 50 mM, NaCl 4 M, pH 6,0, y 2) Lavado nº 2: 12 CV de NaPi 50 mM, NaCl 2 M, pH 6,0. Cuando se compararon los 12 CV y 5 CV, se observó que 5 CV no es suficiente para eliminar las impurezas cuando el lavado es para eliminar las impurezas tras la carga del cultivo clarificado como ocurre en este caso.
- Elución (para retirar la toxina unida a una columna). Se evaluó la elución de toxinas con NaCl 1,2 M, 1,0 M y 0,8 M. Se escogió eluir la toxina con NaCl 1 M en NaPi 50 mM, a pH 6,0, basándose en la recuperación de toxina y la eliminación de impurezas.
- Lavado de baja salinidad: Tras la elución, la columna se lavó además con NaPi 50 mM, a pH 6,0 para eliminar las impurezas residuales unidas a la columna, para la caracterización del procedimiento de purificación.
- Limpieza: la columna se limpió con 3 CV de NaOH 0,1 N para inactivar cualquier residuo de toxina antes de la eliminación de la resina utilizada.
- Caudal de recorrido: el caudal típico fue de 100 cm/h. El caudal de carga fue entre 90 cm/h y 120 cm/h dependiendo de la presión negativa.
- Capacidad de carga: La capacidad de carga típica era de 12,7 ml de cultivo por ml de lecho, o a escala de producción, 10 l de cultivo por cada 785 ml de lecho de resina (columna BPG 100 a una altura de lecho de 10 cm).
- Altura del lecho: Todas las columnas se rellenaron con una altura de referencia de lecho de 10 cm.
- Optimización de la segunda etapa. Purificación en SP Sefarosa HP*
- Acondicionamiento de la alimentación: El eluato de la columna de Butil se diluyó 5 veces con un tampón de citrato Na 20 mM, pH 4,0, y el pH de alimentación se ajustó a 4,0. La etapa de dilución 5 veces se llevó a cabo para acondicionar el eluyente de la cromatografía de interacción hidrófoba para su uso en una cromatografía de intercambio iónico. Los presentes inventores observaron que el pH de alimentación óptimo para la mejor recuperación de toxina estaba en el intervalo de pH 4,0±0,2.
- Etapa de lavado: Después de la carga, la columna se lavó con 1) 5 CV de citrato Na 20 mM, a pH 4,0, seguido de 2) 5-5 CV de Na citrato 20 mM, NaCl 300 mM, pH 4,0 para eliminar las impurezas antes de la elución de toxina unida.
- Etapa de elución: La toxina se eluyó con citrato Na 20 mM, NaCl 400 mM, y un pH 4,0.
- Etapa de lavado de alta salinidad: Tras la elución, la columna se lavó además con citrato Na 20 mM, NaCl 1 M, y un pH 4,0, para eliminar las impurezas unidas fuertemente.
- Limpieza de la columna: La columna se limpió con ~3 CV de NaOH 1 N para inactivar los residuos de toxina antes de la eliminación de la resina utilizada.
- Caudal: El caudal típico fue de 100 cm/h.
- Carga: El eluato total de la columna de Butil se cargó en la columna SP.

Altura del lecho: Todas las columnas se rellenaron con la altura de referencia del lecho de 10 cm.

A continuación se exponen los procedimientos operativos detallados con respecto al procedimiento de purificación de complejo de toxina botulínica en dos columnas que se expone en este Ejemplo12.

### 1. Columna de Butil de Interacción Hidrófoba

#### 5 *Materiales y Reactivos utilizados*

Sistema de Cromatografía: Purificador AKTA, Amersham Biosciences  
 Tipo de Resina: Butil Sefarosa FF, Amersham Pharmacia  
 Detección: UV (280 nm)  
 Tampón de equilibrado/Tampón de lavado nº 1: NaPi 50 mM, NaCl 4 M, pH 6,0  
 10 Tampón de lavado nº 2: NaPi 50 mM, NaCl 2 M, pH 6,0  
 Tampón de elución: NaPi 50 mM, NaCl 1 M, pH 6,0  
 Tampón de lavado de baja salinidad: NaPi 50 mM, pH 6,0  
 Solución de limpieza: NaOH 0,1 N  
 Tampón de titulación: NaPi 500 mM, pH 7,2

#### 15 *Procedimiento*

Rellenado y Acondicionamiento de la Columna

Equilibrar la columna con al menos 5-10 CV de tampón de equilibrado o hasta que el pH de salida sea equivalente al pH de entrada

Preparación de las muestras

#### 20 Medición del pH del material de partida

Añadir NaCl sólido al cultivo clarificado a una concentración final de NaCl de 4 M. La adición de NaCl 4 M es un ejemplo de como acondicionar el cultivo clarificado para utilizar el cultivo clarificado como líquido de alimentación en la cromatografía de interacción hidrófoba. Ajustar el pH de 5,0 a 6,0 si es necesario, con tampón de titulación.

Carga de la columna

#### 25 Cargar el cultivo clarificado (que contiene NaCl 4 M) y recoger el flujo a través de la fracción para el análisis.

Lavado de columna nº 1 (lavado con NaCl 4 M)

Lavar las proteínas de la columna con 5 CV de tampón de equilibrado para eliminar las impurezas. Recoger la fracción lavada para el análisis y registrar el volumen.

3.5. Lavado de columna nº 2 (lavado con NaCl 2 M)

#### 30 Lavar la columna con 15 CV de tampón de lavado nº 2 para eliminar las impurezas proteicas adicionales. Recoger la fracción lavada para el análisis y registrar el volumen.

Elución (elución del pico de la toxina con NaCl 1 M)

#### 35 Eluir la toxina unida con 5 CV de tampón de elución. Controlar la absorbancia del eluato a 280 nm, empezar la recolección del eluato cuando la absorbancia a 280 nm empiece a aumentar y parar la recolección del pico del eluato cuando la absorbancia a 280 nm alcance el valor basal. Registrar el volumen de la fracción de elución de la toxina.

Lavado a baja salinidad (elución del pico de impurezas con NaCl 0 M)

Lavar la columna con 4 CV de tampón de lavado de baja salinidad para eliminar las impurezas proteicas residuales. Recoger la fracción para el análisis y registrar el volumen.

#### 40 Limpieza de la columna (NaOH 0,1 N)

Limpiar la columna con 3 CV de tampón de limpieza para inactivar la toxina residual antes de eliminar la resina utilizada.

### 2. Columna SP de intercambio iónico (Posterior a la columna de Butil)

#### *Materiales y Reactivos utilizados*

#### 45 Sistema de Cromatografía: Purificador AKTA 100, Amersham Biosciences

Tipo de Resina: SP Sefarosa HP, Amersham Pharmacia  
 Detección: UV (280 nm)  
 Tampón de Dilución, Equilibrado y Tampón de Lavado nº 1: Citrato Na 20 mM, pH 4,0  
 Tampón de Lavado nº 2: Citrato Na 20 mM, NaCl 300 mM, pH 4,0  
 5 Tampón de Elución: Citrato Na 20 mM, NaCl 400 mM, pH 4,0  
 Tampón de Alta Salinidad: Citrato Na 20 mM, NaCl 1 M, pH 4,0  
 Solución de limpieza: NaOH 0,1 N

*Procedimiento*

Rellenado y Acondicionamiento de la columna

- 10 Equilibrar la columna con 5-10 CV de tampón de equilibrado o hasta que el pH de salida sea equivalente al pH de entrada.

Preparación de las muestras

Diluir un volumen de eluato de la columna de Butil con NaCl 1 M con 4 volúmenes de tampón de dilución. Medir la conductividad y pH de la carga. Ajustar el pH a 4,0 se es necesario.

- 15 Carga de la columna

Aplicar el eluato de la columna de Butil diluido anterior a la columna SP y recoger la fracción del flujo a través de la columna.

Lavado de columna nº 1 (lavado con tampón de equilibrado)

- 20 Lavar la columna SP con 5 CV de tampón de equilibrado. Continuar recogiendo el eluato como la fracción de flujo a través de la columna.

Lavado de columna nº 2 (lavado con NaCl 300 mM)

Lavar la columna SP con 4 CV de tampón de lavado nº 2 para eliminar las impurezas proteicas. Registrar el volumen de la fracción de lavado nº 2.

Elución (elución con NaCl 400 mM)

- 25 Eluir la toxina unida con 3 CV de tampón de elución. Controlar la absorbancia a 280 nm del eluato, comenzar la recolección de eluato cuando la absorbancia a 280 nm empiece a aumentar y parar la recolección del pico de eluato cuando la absorbancia a 280 nm alcance el valor basal. Registrar el volumen de la fracción de elución de la toxina.

Elución de alta salinidad (NaCl 1 M)

- 30 Eluir las impurezas proteicas fuertemente unidas con 3 CV de tampón altamente salino. Recoger la fracción para analizar y registrar el volumen.

Limpieza de la columna

Limpiar la columna SP con 3 CV de solución de limpieza para inactivar la toxina residual antes de la eliminación de la resina utilizada.

**Ejemplo 13**

- 35 **Solidez del procedimiento APF de cromatografía en dos columnas para purificar un complejo de toxina botulínica**

La solidez de las dos columnas del procedimiento del Ejemplo 12 se estudió en una serie de experimentos, como se muestra más adelante.

*pH del cultivo*

- 40 Se evaluó el efecto del pH del cultivo sobre la purificación de la toxina. Se llevó a cabo un estudio utilizando cultivos en crecimiento a un pH de 5,5 y un pH de 6,5 como material de partida para la purificación, y se observó que la recuperación del cultivo a pH 6,5 era ligeramente inferior que la del cultivo a pH 5,5, basándose en los resultados de Hc-ELISA.

*Tiempo de Almacenamiento*

- 45 La toxina se purificó a partir de un cultivo que crecía a pH 5,5 el día de la recolección y tras 4 días de almacenamiento del cultivo a 2-8 °C. No se encontró ninguna diferencia, basándose en los resultados de la

recuperación de toxina, cromatogramas de Butil y SP, SDS-PAGE, y Hc-ELISA.

*Capacidad de unión de la columna*

La carga propuesta en la columna de Butil fue de 12,7 ml de cultivo por ml de resina, o 10 l de cultivo para la columna BPG100 (con una altura del lecho de 10 cm). Las columnas de Butil y SP se ensayaron cargando 4 veces más de cultivo. Los resultados de SDS-PAGE y Hc-ELISA indicaron poca toxina en las fracciones de flujo a través de la columna tanto de la columna de Butil como de la columna SP. La capacidad de las columnas de Butil y SP es al menos cuatro veces mayor que la carga habitual. La toxina del eluato de SP era pura según el análisis de SDS-PAGE. La recuperación de la columna de Butil fue del 48% y la recuperación de la columna SP fue del 74%, basándose en Hc-ELISA. El rendimiento total es de 16 mg de toxina por l de cultivo, basándose en el resultado de UV.

*Procedimiento de tiempo de retención*

Tras la recogida, el cultivo se procesó a través de la columna de Butil en el mismo día o tras una noche de almacenamiento. El eluato de Butil se almacenó normalmente una noche antes de cargarse en la columna SP. Un estudio preliminar mostró que el eluato de Butil fue estable durante 4 días, lo que dio patrones idénticos en el cromatograma y SDS-PAGE. La estabilidad del eluato de SP se evaluó por electroforesis capilar (CE) y SEC-HPLC. Los resultados no mostraron diferencias entre las muestras almacenadas durante un periodo de hasta 2 días. También se evaluó en estas muestras la recuperación de la toxina tras la filtración. La recuperación de la toxina disminuyó ligeramente en el día 2 comparada con el día 0, pero no estaba claro si este descenso se debía al almacenamiento o a una variación experimental.

*Densidad celular del cultivo*

Se evaluaron el cultivo concentrado dos veces y el cultivo diluido dos veces por cromatografía en columna de Butil para estudiar el efecto de la densidad celular del cultivo sobre la purificación de la toxina. Los cromatogramas de los dos ensayos parecían idénticos. El perfil de impurezas y toxina de los dos ensayos fueron idénticos según SDS-PAGE. Los resultados del Hc-ELISA (Tabla 7) mostraron que el balance de masa de ambos procedimientos era >90%, mientras que la recuperación del cultivo concentrado dos veces fue significativamente menor que la del cultivo diluido 2 veces. El veintinueve por ciento de toxina se perdió antes de la elución de la toxina para el cultivo concentrado 2 veces, comparado con la pérdida del 4% del cultivo diluido 2 veces.

Tabla 7. Balance de masa de toxina APF analizado por Hc-ELISA

Ensayo	Balance de masa	FT	Lavado 2 M	Elución 1 M	Elución 0 M
Concentrado 2 veces	91%	11%	18%	53%	9%
Diluido 2 veces	97%	0%	4%	74%	19%

*Estudios de biocarga*

La biocarga se controló en diferentes etapas del procedimiento. Se evaluaron las muestras cargadas en la columna de Butil, el eluato de la columna de Butil tras 3 días de almacenamiento, la carga de SP, y el eluato de SP tras una noche de almacenamiento. Se observaron algunos contaminantes (~<1 UFC/ml a 35 UFC/ml). La muestra con el mayor número de contaminantes fue el eluato de Butil. Los contaminantes pueden deberse a un entorno incontrolado en el que se realizó el procedimiento de purificación.

*Efecto del NaCl 4 M*

Con el fin de evaluar el efecto del NaCl 4 M sobre la toxina en el cultivo, el cultivo que contenía NaCl 4 M se mantuvo a 4 °C durante una noche y después se realizaron los procedimientos de las columnas de Butil y SP. El resultado cromatográfico, SDS-PAGE y Hc-ELISA mostraron que no había efecto del NaCl 4 M sobre la toxina en el cultivo tras el almacenamiento durante una noche.

*Medios de cultivo (3:1:1 frente a 5:1:1)*

Se procesaron dos litros y medio de cultivos 5:1:1 y 3:1:1. La toxina recuperada de cada una de las purificaciones analizadas por Hc-ELISA se resume en la Tabla 8. La toxina purificada de ambos cultivos era pura según SDS-PAGE, lo que indica que el procedimiento desarrollado con el cultivo 3:1:1 puede utilizarse para purificar la toxina del cultivo 5:1:1.

Tabla 8. Toxina recuperada basándose en Hc-ELISA

Etap	Cultivo 3:1:1	Cultivo 5:1:1
Butil	46%	43%
SP	63%	44%

*pH de trabajo para la cromatografía en SP Sefarosa HP*

La cromatografía de SP Sefarosa HP se llevó a cabo con diferentes valores de pH: 3,5, 4,2 y 4,5. Se observó que el pH 3,5 producía la precipitación de la toxina en la columna, no se eluyó nada de toxina con NaCl 400 mM y se extrajo muy poca toxina con NaCl 1 M. Con un pH 4,5, la toxina no se unía a la columna SP. Los resultados preliminares obtenidos a pH 4,2 mostraron que la toxina no se unía tan fuertemente como a pH 4,0 y se eluyó como un pico ancho tras el pico de lavado con NaCl 300 mM. Los resultados indican que el pH en esta etapa era crítico y que el intervalo de pH óptimo era estrecho.

**Ejemplo 14****10 Evaluación del procedimiento APF de cromatografía en dos columnas para la purificación de un complejo de toxina botulínica**

Se evaluaron varios eluyentes de cada una de las dos columnas del procedimiento de purificación del Ejemplo 12 como se expone a continuación.

*A. Cromatografía de Butil Sefarosa FF*

15 Se utilizó un cultivo 3:1:1 filtrado como alimentación para este experimento. Antes de cargar la alimentación (cultivo clarificado obtenido por una fermentación de Schantz de un *Clostridium botulinum* tipo A (cepa Hall) en la columna de Butil Sefarosa FF (XK50/10, con un diámetro de columna de 5 cm, altura del lecho de 10 cm, volumen de columna de 196 ml), se añadieron 584,4 g de NaCl a 2500 ml de cultivo con agitación durante 30 min. Atípicamente el pH de la alimentación se ajustó a 5,81 y el caudal de recorrido se fijó a 92 cm/h (el caudal normal es de 100 cm/h). El volumen de carga fue de 2800 ml.

20 Tras la carga, la columna se lavó con 5 CV o 1000 ml de NaPi 50 mM, NaCl 4 M, pH 6,0, seguido de 15 CV o 3000 ml de NaPi 50 mM, NaCl 2 M, pH 6,0. El complejo de toxina botulínica tipo A unido después se eluyó de la columna con 5 CV o 1000 ml de NaPi 50 mM, NaCl 1 M, pH 6,0. Tras la elución del complejo de toxina botulínica, las impurezas unidas fuertemente se retiraron de la columna por lavado con 4 CV u 800 ml de NaPi 50 mM, pH 6,0. Luego, se lavó la columna con 2 CV (400 ml) de NaOH 0,1 N para inactivar la toxina residual antes de la eliminación de la resina utilizada. El cromatograma del eluyente de la toxina se muestra en la Figura 3.

25 La Figura 3 muestra que la columna de Butil utilizada puede proporcionar una buena separación del complejo de toxina botulínica de las impurezas presentes en el líquido de alimentación del cultivo clarificado. Como se midió por UV a 280 nm, la Figura 3 muestra el pico del flujo a través de la columna y los picos de NaCl 2 M, NaCl 1 M, NaCl 0 M y NaOH 0,1 N. Basándose en el tamaño del pico, se determinó que la mayoría de las impurezas se retiraron en la fracción del flujo a través de la columna. También se eliminó una cantidad significativa de impurezas en la fracción de NaCl 2 M antes de la elución de la toxina en la fracción de NaCl 1 M.

30 La Figura 3 es un cromatograma obtenido por el paso de un cultivo clarificado APF (un cultivo 3:1:1) a través de una columna de Butil de interacción hidrófoba. El eje X representa el volumen en ml del líquido (efluente) que ha pasado a través de la columna. El eje Y representa la absorbancia a 280 nm en mAU. Además, se controló la conductividad (línea del gráfico separada) durante la cromatografía.

35 Como se muestra en la Figura 3, muchas impurezas proteicas pasaron a través de la columna en aproximadamente los primeros 3000 ml. Los tampones de lavado NaCl 4 M y 2 M producen picos posteriores, aunque más pequeños, mostrando la eliminación de las impurezas adicionales. El uso del NaCl 1 M (a un volumen de aproximadamente 7000 ml) produjo la elución del complejo de toxina unida de la columna y esta fue la fracción cargada en la segunda columna.

*B. Cromatografía en SP Sefarosa HP*

Los ejes de la Figura 4 son los mismos que los de la Figura 3. Las etapas que se llevaron a cabo para obtener el cromatograma de la Figura 4 fueron las siguientes:

- 45 (1) cien ml del eluato de Butil obtenido del Ejemplo 12 (el eluyente de la columna de Butil resultante de la Figura 3) se diluyó con 400 ml de citrato Na 20 mM a un pH de 4,0 (por tanto, una dilución de 5 veces). El pH de este eluyente de Butil diluido era de 4,1.
- (2) Después se cargaron cuatrocientos sesenta y seis ml de esta alimentación en la columna SP Sefarosa HP (XK26/10, 2,6 cm de diámetro de columna, altura de lecho de 10 cm, volumen de columna: 53 ml).
- 50 (3) tras la carga, la columna se lavó (a aproximadamente el punto de volumen de 450 ml en el eje x de la Figura 4) con 5 CV o 250 ml de citrato Na 20 mM, a pH 4,0.
- (4) La columna se lavó entonces con 4 CV o 200 ml de citrato Na 20 mM, NaCl 300 mM, pH 4,0 (a aproximadamente el punto de volumen de 725 ml en el eje x de la Figura 4).
- (5) El complejo de toxina botulínica unido a la columna se eluyó después con 3 CV o 150 ml de citrato Na 20 mM, NaCl 400 mM, pH 4,0 (a aproximadamente el punto de volumen de 925 ml en el eje x de la Figura 4).
- 55 (6) Después de la elución del complejo de toxina unido a la columna, la columna se lavó además con 3 CV o 150

ml de citrato Na 20 mM, NaCl 1 M, pH 4,0 para eluir las impurezas fuertemente unidas (a aproximadamente el punto de volumen de 1050 ml en el eje x de la Figura 4).

(7) La columna se limpió entonces con 3 CV o 150 ml de NaOH 1 N (justo después del punto de volumen de 1200 ml en el eje x de la Figura 4).

- 5 El cromatograma de la Figura 4 muestra la elución de un complejo de toxina botulínica tipo A (de aproximadamente un peso molecular de 900 kDa) justo antes del punto de volumen de 1000 ml en el eje x de la Figura 4.

La Figura 4 muestra que se puede obtener un complejo de toxina botulínica altamente purificado utilizando la columna de SP Sefarosa posteriormente a la columna de Butil. La Figura 3 muestra que había un pico ancho de flujo a través de la columna, un pico pequeño de lavado con ClNa 300 mM, un pico de elución de la toxina de 400 mM y un pico de limpieza con NaCl 1 M. Como se analizó por SDS-PAGE en la Figura 5B, no había una banda visible de proteína en la fracción de flujo a través de la columna, y había algunas bandas de impureza proteica en la fracción de lavado con NaCl 300 mM y la fracción de limpieza con NaCl 1 M. La toxina se eluyó en la fracción de elución con NaCl 400 mM.

### C. Resultados analíticos:

- 15 SDS-PAGE: Las fracciones de elución de las cromatografías en columna de las columnas de Butil y SP se analizaron por SDS-PAGE y los resultados típicos se muestran en la Figura 5A (columna de Butil) y la Figura 5B (columna SP).

Las Figuras 5 y 6 son registros de electroforesis en gel obtenidos por el uso de SDS-PAGE reducida. La mitad izquierda de los registros de electroforesis en gel de las Figuras 5 y 6 está marcada verticalmente con pesos moleculares ascendentes en miles de Daltons (kDa). Los números 1 a 6, 1 a 7 o 1 a 8 en las Figuras 5 y 6 representan las fracciones cargadas en los geles.

En la Figura 5A: el punto 1 (calle de gel 1) "Marca 12" es el marcador de peso molecular Novex de masas moleculares de referencia; la calle 2 es el líquido de alimentación del cultivo clarificado; la calle 3 es una alícuota del lavado que resulta del uso del flujo a través de la columna ("FT") y el lavado 4 M en la columna de Butil; la calle 4 es una alícuota del uso del lavado 2 M; la calle 5 es una alícuota de la fracción de cola del lavado 2 M; la calle 6 es una alícuota de la fracción de elución 1 M; la calle 7 es una alícuota de la fracción de cola de la elución 1 M, y; la calle 8 es una alícuota del lavado 0 M.

La Figura 5A muestra que la columna de Butil eliminaba muchas impurezas (véanse las columnas 3-5 en la figura 5A) y proporcionaba toxina botulínica inicialmente purificada (véanse las columnas 6-8 en la Figura 5A).

- 30 En la Figura 5B: el punto 1 (columna de gel 1) "Marca 12" es el mismo marcador de peso molecular utilizado en la Figura 5A; la columna 2 es el eluyente diluido de la columna de Butil; la columna 3 es una alícuota del flujo a través de la columna; la columna 4 es una alícuota del lavado de 300 mM; la columna 5 es una alícuota del eluyente de la columna; la columna 6 es una alícuota del lavado 1 M. La Figura 5B muestra que el uso de una columna SP posteriormente al uso de una columna de Butil proporcionaba una toxina botulínica altamente purificada (véase la columna 5 en la Figura 5B).

### Hc-ELISA

La concentración de toxina se analizó por Hc-ELISA, un ensayo ELISA para determinar la concentración de toxina basándose en la concentración de cadena pesada de toxina, y se estimó el balance de masa de la toxina durante la purificación. La Tabla 9 muestra la concentración de la toxina y la recuperación por etapas durante las etapas de columna de Butil y SP de un ensayo típico de purificación. La recuperación total después de las columnas de Butil y SP fue del 28,6%.

### SEC-HPLC

Los resultados de SEC-HPLC mostraron que la recuperación por etapas para la cromatografía SP era del 42,9%, comparado con el 62,5% del ensayo Hc-ELISA. Esto muestra que la recuperación de toxina botulínica tras la etapa de columna SP era aproximadamente del 50%.

### Rendimiento normalizado

El rendimiento de toxina se normalizó como 22,3 mg (por SEC-HPLC) o 23,4 mg (por Hc-ELISA) por litro de cultivo tras la cromatografía en Butil, y 9,6 mg (por SEC-HPLC) u 8,9 mg (por Hc-ELISA) por litro de cultivo tras la cromatografía SP de una ejecución. Por tanto, utilizando el sistema de dos columnas de los presentes inventores y el procedimiento que se expone en el presente documento, se pueden purificar entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 90 mg de complejo de toxina botulínica por cada 10 l de cultivo clarificado de medio de fermentación (obtenido por ejemplo por los procedimientos de fermentación del Ejemplo 6 o el Ejemplo 72).

Tabla 9. Concentración de toxina y balance de masa en las etapas típicas de cromatografía en Butil y SP

Muestras de Butil	Volumen (ml)	Conc (µg/ml)	Toxina Amt (mg)	% de Recuperación
Carga de Butil	2800	45,5	127,4	100
Flujo a través de la columna y Lavado	2634	N/A	N/A	N/A
Pico de lavado con NaCl 2 M	336	32,5	10,9	8,6
Pico de elución con NaCl 1 M	404	144,5	58,4	45,8
Después de la Elución con NaCl 1 M	443	N/A	N/A	N/A
Lavado con NaCl 0 M	369	19	7,0	5,5
Lavado con NaCl 0 M	369	19	7,0	5,5
Muestras de SP	Volumen (ml)	Conc (µg/ml)	Toxina Amt (mg)	% de Recuperación
Carga SP	466	19	8,9	100,0
Flujo a través de la columna	708	N/A	N/A	N/A
Pico de lavado 300 mM	54	N/A	N/A	N/A
Pico de elución	35	168	5,5	62,5
Pico de lavado 1 M	13	N/A	N/A	N/A
Pico de Limpieza	44	N/A	N/A	N/A

**Ejemplo 15****Procedimiento para la Estabilización y Almacenamiento del Complejo de Toxina Después de la Cromatografía de Columna**5 **1. Fundamento del desarrollo**

Después de la cromatografía de columna, se prefiere transferir el complejo de toxina botulínica purificada en un tampón estable con una concentración deseada por una etapa UF/DF, seguida por una filtración estéril para obtener de este modo una toxina adecuada para su uso en la preparación de una composición farmacéutica de toxina botulínica. La toxina botulínica purificada se almacenó en forma soluble en tampón de acetato o como una suspensión en sulfato amónico.

10 **2. Etapa UF/DF**

Se utilizó una membrana de polietersulfona Biomax-10 (NMWCO: 10 kDa, Millipore) en la etapa UF/DF. Se eligió NaAc 50 mM, pH 4,0 como tampón de diafiltración. El eluato de SP se ultrafiltró a ~1 mg/ml, y después se diafiltró con 8 volúmenes de diafiltración (VD) de NaAc 50 mM, a pH 4,0.

15 La ultrafiltración (UF) es un procedimiento para separar partículas extremadamente pequeñas y moléculas disueltas de fluidos. La base primaria para la separación es el tamaño molecular, aunque pueden tener un papel factores secundarios tales como la forma y la carga de la molécula. Los materiales que oscilan en tamaños de 1.000 a 1.000.000 de peso molecular quedan retenidos en las membranas del ultrafiltro, mientras que las sales y el agua pasan a su través. El material coloidal y las partículas pueden también quedar retenidos.

20 La diafiltración (DF) es el procedimiento de fraccionamiento que lava las moléculas más pequeñas a través de una membrana y deja las moléculas más grandes en el material retenido sin cambiar su concentración final. La DF puede utilizarse para retirar sales o tampones de intercambio. La DF también puede retirar etanol u otros pequeños disolventes o aditivos. Hay varias maneras de llevar a cabo la diafiltración. En la diafiltración continua, la solución de diafiltración (agua o tampón) se añade al reservorio de la muestra de alimentación a la misma velocidad a la que se genera el filtrado. De esta manera, el volumen en el reservorio de la muestra permanece constante, pero las moléculas pequeñas (por ejemplo sales) que pueden infiltrarse libremente a través de la membrana se retiran por lavado. Utilizando la retirada de sal como ejemplo, cada volumen de diafiltración (VD) adicional reduce más la concentración de sal. (Un volumen de diafiltración es el volumen de muestra antes de que se añada la solución de diafiltración). Utilizando 5 volúmenes de diafiltración se reducirá la intensidad iónica en ~99% con diafiltración continua. En la diafiltración discontinua, la solución se diluye primero y luego se concentra de nuevo al volumen de partida. Después, este procedimiento se repite hasta que se alcanza la concentración requerida de pequeñas moléculas (por ejemplo, sales) que permanecen en el reservorio. Cada volumen de diafiltración adicional (VD) reduce más la concentración de sal. Un volumen de diafiltración es el volumen de la muestra antes de que se añada la solución de dilución. Utilizando 5 volúmenes de diafiltración se reducirá la intensidad iónica un ~96% con diafiltración discontinua. La diafiltración continua requiere menos volumen de filtrado para alcanzar el mismo grado

de reducción salina que en la diafiltración discontinua.

3. Etapa de filtración con 0,22 µm

Se seleccionó un filtro superior de un frasco de vacío de acetato de celulosa (CA) de 0,22 µm de baja unión a proteínas para la etapa de filtración.

5 4. Etapa de precipitación con sulfato amónico

Después se llevó a cabo la precipitación con sulfato amónico: se añadió sulfato amónico 3,5 M a la solución de toxina filtrada con 0,22 µm con agitación suave hasta la primera aparición de opalescencia. La toxina a granel purificada después se almacenó a 2-8 °C.

5. Resultados de un típico procedimiento posterior a la columna

- 10 El eluato de SP se concentró de 70,5 ml a 18 ml utilizando Pellicon Biomax-10 (área de superficie 50 cm<sup>2</sup>, Millipore) en un sistema LabScale TFF (Millipore) y se diafiltró con 8 VD de NaAc 50 mM, pH 4,0. El material retenido (fracción post-UF/DF) se recogió y se filtró con un filtro Corning 0,22 µm CA (Corning 431154). El sistema UF/DF se aclaró con tampón acetato. Se recogió la fracción de aclarado. Se almacenaron diez ml del post-filtrado 0,22 µm a 2-8 °C para los estudios de estabilidad. Se sometieron ocho ml del post-filtrado 0,22 µm a precipitación con sulfato amónico. Se añadió un total de 2,8 ml de sulfato amónico 3,5 M al filtrado hasta que se volvió opalescente.

La recuperación de la toxina se estimó basándose en la medición UV, que se muestra en la Tabla 10. Los resultados SDS-PAGE se muestran en la Figura 4.

En la figura 6, las calles que se muestran representan:

- 20 La calle 1 es M12, referencias de peso molecular  
 La calle 2 es el eluato de la columna SP  
 La calle 3 es el material retenido de UF/DF; el material retenido de UF/DF tras la UF/DF del eluato de SP, diluido a la misma cantidad de proteína cargada que en la calle 2, para comparación  
 La calle 4 es una solución de aclarado de UF/DF del aclarado de la membrana de UF/DF después de que se haya completado el procedimiento en la membrana de UF/DF  
 25 La calle 5 es el material después de la filtración en 0,22 µm; después del procedimiento de UF/DF y después de que la muestra se filtrara con el filtro de 0,22 µm  
 La calle 6 es una suspensión de sulfato amónico después de la columna; después de la filtración con filtro de 0,22 µm, la muestra se precipitó con sulfato amónico porque el complejo de toxina botulínica es estable en sulfato amónico  
 30 La calle 7 es el material retenido de UF/DF (como en la calle 3), pero sin diluir para mostrar los detalles.

La Figura 6 nos cuenta que las etapas del procedimiento de purificación después de la columna de UF/DF, filtración en 0,22 µm, y precipitación con sulfato amónico no afectan la pureza del complejo de toxina botulínica, como se determina por el análisis de SDS-PAGE. Significativamente, Los resultados de la MLD<sub>50</sub> mostraron que la potencia del complejo de toxina botulínica a granel purificado era 2,9 - 3,7 x 10<sup>7</sup> unidades MLD<sub>50</sub>/mg.

Tabla 10. Recuperación de toxina basándose en la medición UV

Fracción	Conc. de toxina por UV (mg/ml)	Vol. (ml)	Toxina total (mg)	Recuperación (%)
Eluato de SP	0,389	70,5	27,4	100 (definido)
Después de UF/DF	1,260	18,0	22,7	82,8
Aclarado UF/DF	0,220	14,0	3,1	11,3
Después de filtración	1,270	18,0	22,8	83,2
Después de AS ppt*	N/A (~0,94)	~10,8	N/A	N/A

\*de 8 ml de la fracción posterior a la filtración

- 35 La Figura 7 es un diagrama de flujo de un procedimiento cromatográfico preferido de dos columnas, libre de proteínas animales para purificar un complejo de toxina botulínica tipo A. Es un procedimiento sólido, que se puede aumentar a escala y cumple el cGMP para obtener complejo purificado de toxina de *Clostridium botulinum* de 900 kDa. En la Figura 7 se puede resaltar que el eluato de la columna de Butil está condicionado por la cromatografía de intercambio iónico por una dilución de 5 veces con un tampón de citrato sódico a pH 4.

- 40 El procedimiento de la Figura 7 también se puede utilizar para obtener toxina pura (es decir toxina botulínica de 150 kDa libre de las proteínas del complejo que no son toxina) cargando el eluyente de la columna SP en una columna de intercambio iónico en un tampón a pH 8 para disociar las proteínas del complejo que no son toxina de la molécula de toxina botulínica de 150 kDa, proporcionando por tanto (en el flujo que pasa a través de la columna) una toxina

botulínica tipo A (componente neurotóxico) con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa, y una potencia específica de  $1-2 \times 10^8$  DL<sub>50</sub> U/mg o mayor. Este procedimiento también puede utilizarse para obtener otros componentes que no son toxina del complejo de toxina botulínica (es decir, proteínas hemaglutininas no toxinas y/o proteínas no hemaglutininas no toxinas) por disociación del complejo en sus componentes y después purificación de los componentes disociados.

5 El complejo de toxina purificado obtenido por el procedimiento de la presente invención cumple o supera las especificaciones mostradas en la Tabla 1. Adicionalmente, el rendimiento típico fue aproximadamente de 100 mg o 900 kDa de complejo de toxina a partir de 10 l de cultivo celular, que es mayor que el rendimiento obtenido por un procedimiento de Schantz (no APF).

10 Las ventajas de la presente invención incluyen:

1. En el procedimiento no se utiliza ningún componente o sustancia procedente de una fuente animal. Específicamente, se elimina el uso de DNasa o RNasa.

2. Se pueden obtener más de aproximadamente 50 mg de complejo de toxina botulínica tipo A purificado con las características expuestas en la Tabla 1 por cada 10 litros de medio de fermentación.

15 3. La toxina purificada se obtiene por un procedimiento que es sólido, puede aumentarse a escala, es validable y cumple el cGMP. Sólido significa que el procedimiento se puede reproducir incluso con un cambio de aproximadamente  $\pm 10\%$  en uno o más de los parámetros del procedimiento. Validable significa que el procedimiento produce sistemáticamente toxina purificada con las características de la Tabla 1. cGMP significa que el procedimiento se puede convertir fácilmente en un procedimiento de fabricación que cumple los requisitos de la FDA de Buenas Prácticas de Fabricación actuales.

20 4. La potencia del complejo de toxina purificado final cumple o supera la potencia (como se determina por el ensayo MLD50) o de un complejo de toxina botulínica purificado obtenido por un procedimiento de Schantz o de Schantz modificado.

5. Eliminación de cualquier etapa de precipitación para purificar un complejo de toxina botulínica.

25

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento libre de proteínas de origen animal (APF) de producción de una toxina purificada de *Clostridium botulinum* A, B o F que comprende las etapas de:
- 5 (a) producir un cultivo de fermentación de *Clostridium botulinum* utilizando un medio de cultivo libre de proteínas de origen animal, comprendiendo el medio soja hidrolizada;
- (b) obtener una muestra del cultivo de fermentación de *Clostridium botulinum*;
- (c) poner en contacto una resina de columna de interacción hidrófoba con la muestra de cultivo para permitir la captura de una toxina botulínica por la columna de interacción hidrófoba;
- 10 (d) eluir la toxina botulínica de la columna de interacción hidrófoba;
- (e) cargar una resina de columna de intercambio iónico con el eluyente de la columna de interacción hidrófoba; y
- (f) eluir la toxina botulínica de la columna de intercambio iónico, obteniendo de esta manera una toxina botulínica A, B o F purificada.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende, después de la etapa de puesta en contacto (c) y antes de la etapa de elución (d), la etapa de retirada por lavado de impurezas de la columna de interacción hidrófoba.
- 15 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que además comprende, después de la etapa de carga (e) y antes de la etapa de elución (f), la etapa de retirada por lavado de impurezas de la columna de intercambio iónico.
4. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el rendimiento de toxina botulínica purificada es mayor de 50 mg por lote para cada 10 litros de cultivo de fermentación de *Clostridium botulinum*.
- 20 5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:
- (i) las impurezas se retiran por lavado de la columna de interacción hidrófoba antes de la etapa de elución (d); y
- (ii) las impurezas se retiran por lavado de la columna de cromatografía de intercambio iónico antes de la etapa de elución (f).
- 25 6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, que además comprende, después de la etapa de obtención de una muestra de cultivo de fermentación de *Clostridium botulinum* y antes de la etapa de puesta en contacto de la resina de la columna de cromatografía de interacción hidrófoba con la muestra de cultivo, la etapa de acondicionamiento del cultivo para la cromatografía de interacción hidrófoba.
- 30 7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, que además comprende, después de la etapa de elución de la toxina botulínica de la columna de interacción hidrófoba y antes de la etapa de carga de este eluyente en la columna de cromatografía de intercambio iónico en columna, la etapa de acondicionamiento del eluyente de la columna de interacción hidrófoba para la cromatografía de intercambio iónico.



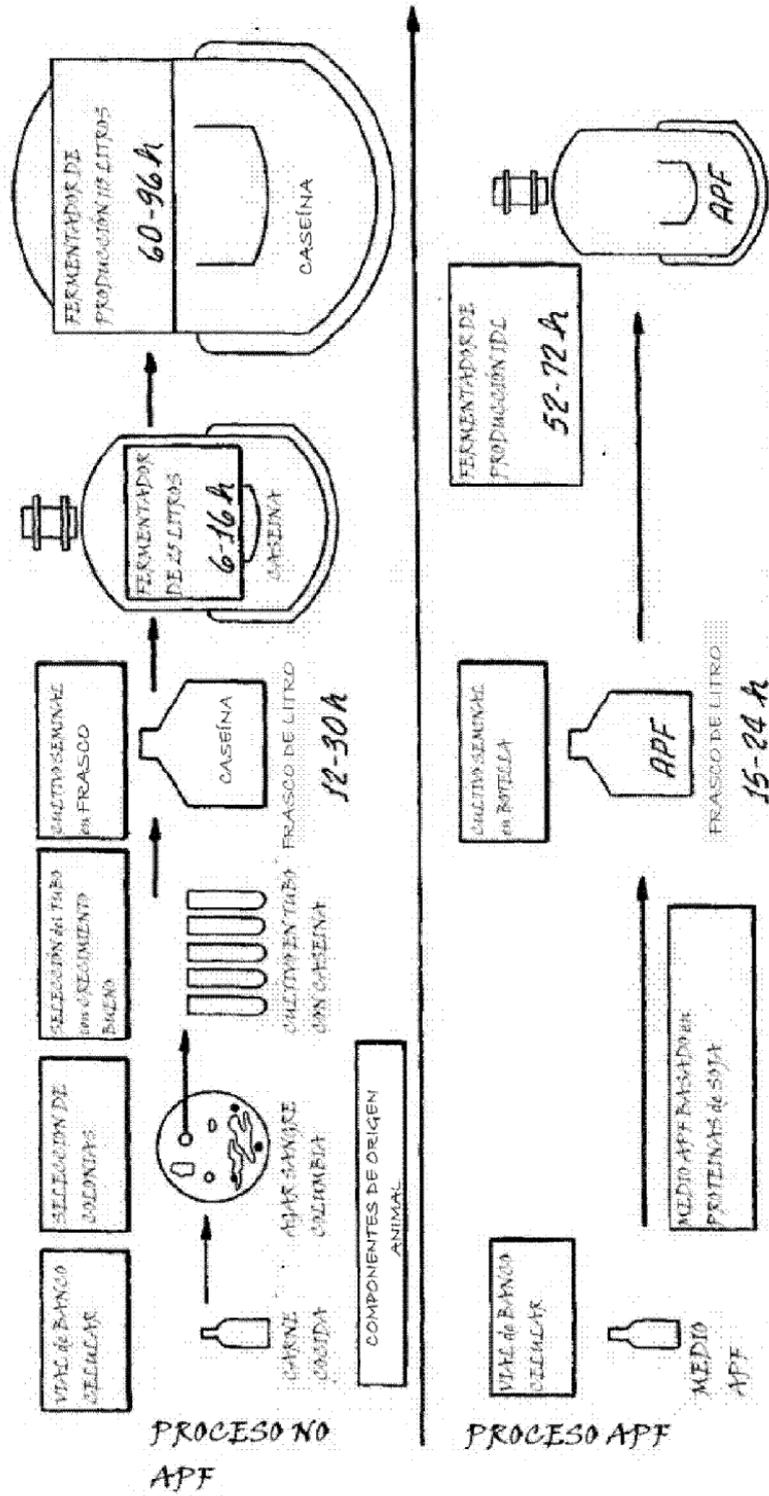
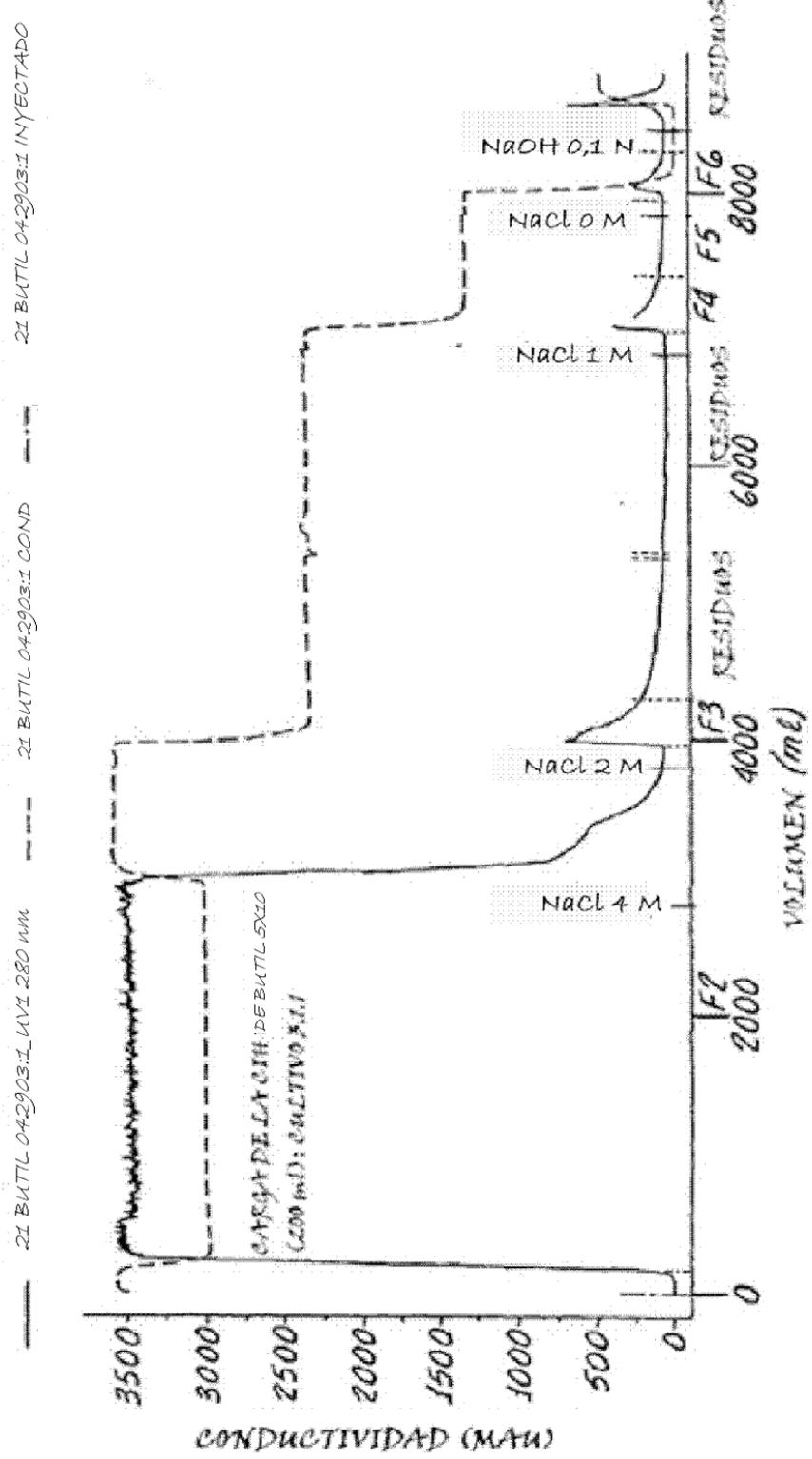
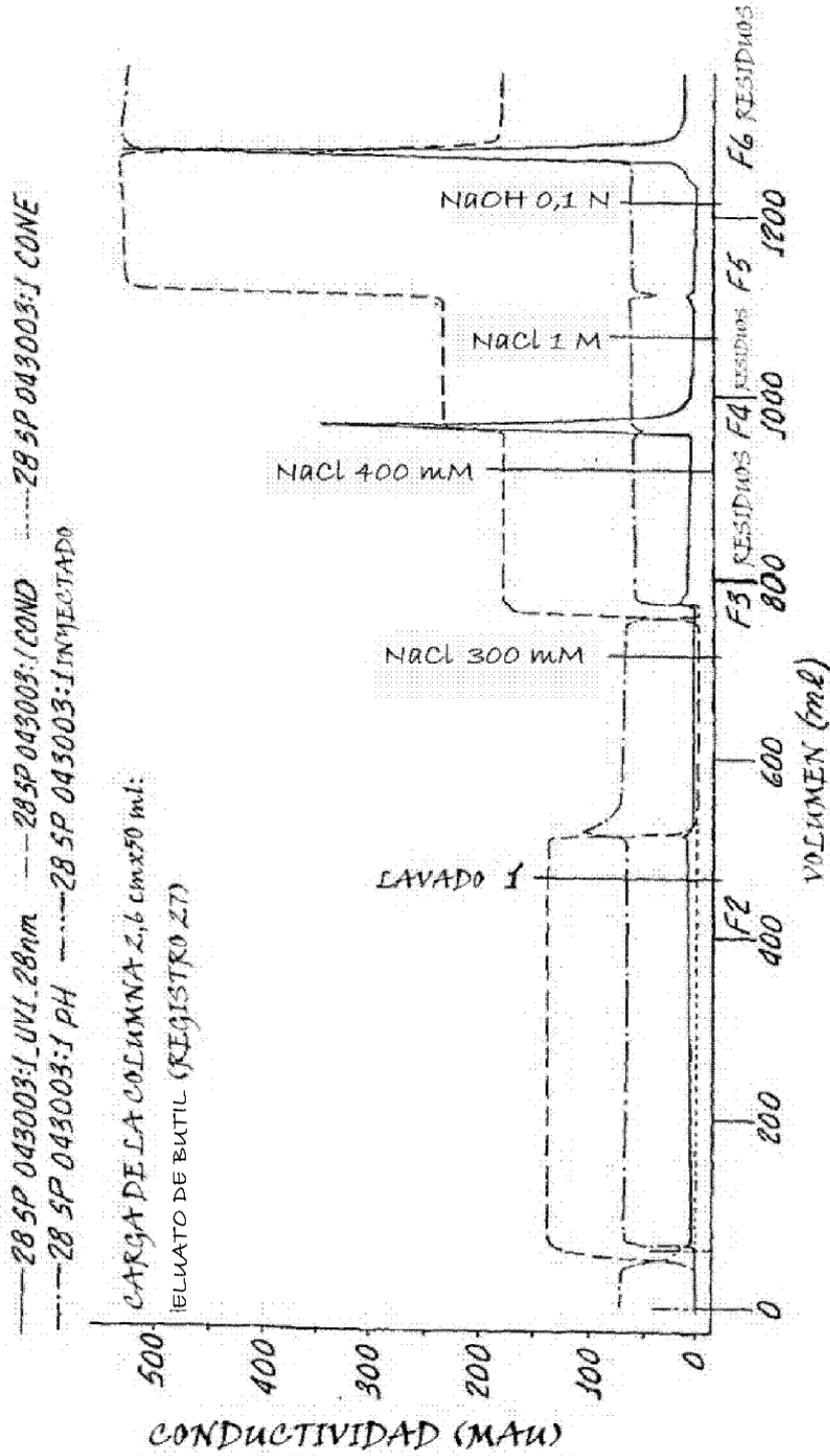


FIG. 2.



CROMATOGRAMA DE CROMATOGRAFÍA DE BUTIL SEFAROSA FF

FIG. 3.



CROMATOGRAMA DE UNA CROMATOGRAFÍA SP SEFAROSA HP

FIG. 4.

COMENTARIOS/ OBSERVACIONES		DESIGNACION	
Nº			
200		1	ACERCA DE
116		2	ACERCA DE
97		3	ACERCA DE
66		4	ACERCA DE
55		5	ACERCA DE
36		6	ACERCA DE
31		7	ACERCA DE
21		8	ACERCA DE
14			

SDS-PAGE DE LAS MUESTRAS DE LA COLUMNA DE BUTIL

FIG. 5A.

COMENTARIOS/ OBSERVACIONES	
Nº	DESCRIPCION
1	MARCA 12
2	CARGA
3	FT
4	LAVADO 300 MM
5	ELUATO
6	LAVADO 1 M

	1	2	3	4	5	6
200						
116						
97						
66						
55						
36						
31						
21						
14						

MUESTRAS DE COLUMNA SP

Fig. 5B.

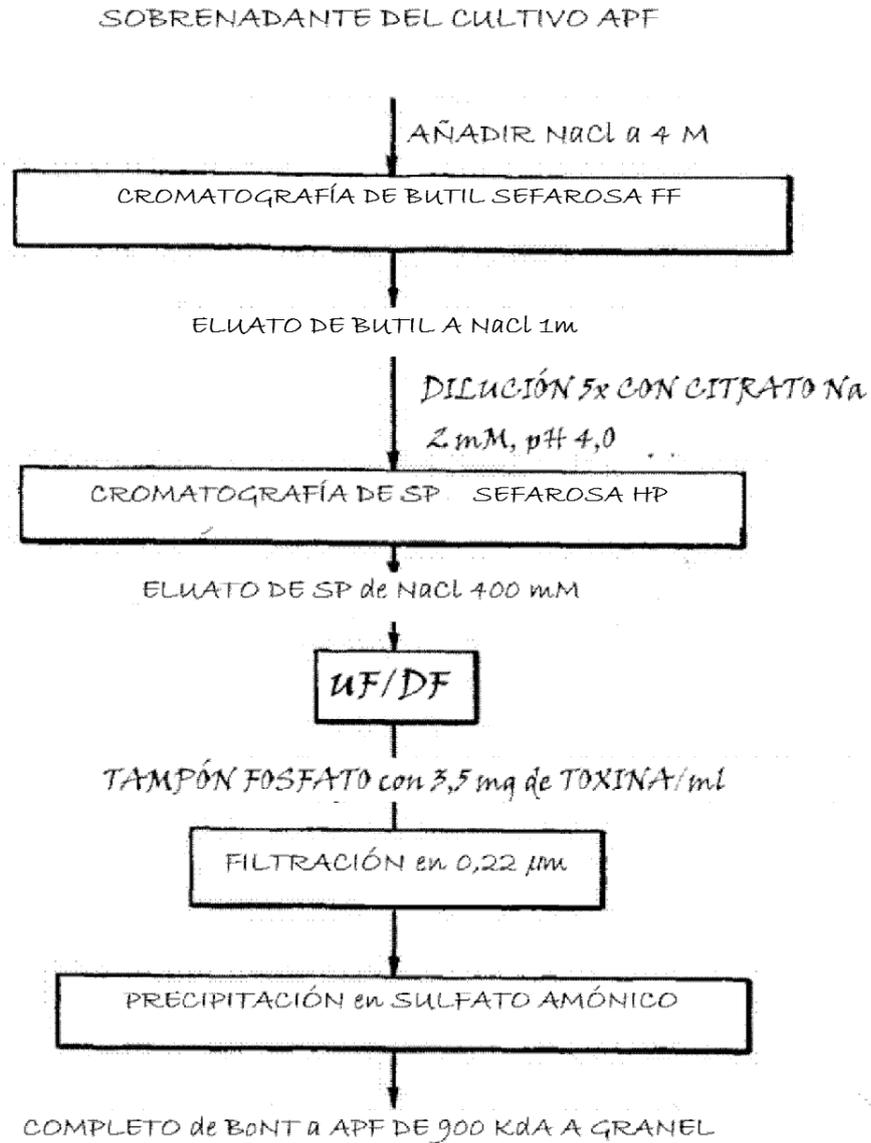
COMENTARIOS/ OBSERVACIONES	
Nº	DESCRIPCION
1	MZ.MWS
2	ELUATO SP
3	RET. UF/DF DILUIDO
4	ACARADA UF/DF
5	POST- FILTRACION 0,2 µm
6	POST. A5 ppt
7	RET. UF/DF NO DILUIDO

200  
116  
97  
66  
55  
36  
31  
21  
14

1 2 3 4 5 6 7

FIG. 6.

RESULTADOS DE SDS-PAGE DE LAS MUESTRAS DE LA ETAPA POSTERIOR A LA COLUMNA



DIGRAMA DE FLUJO RESUMEN DE UN PROCESO CROMATOGRÁFICO APF COMPLETO DE PURIFICACIÓN.

*Fig. 7.*

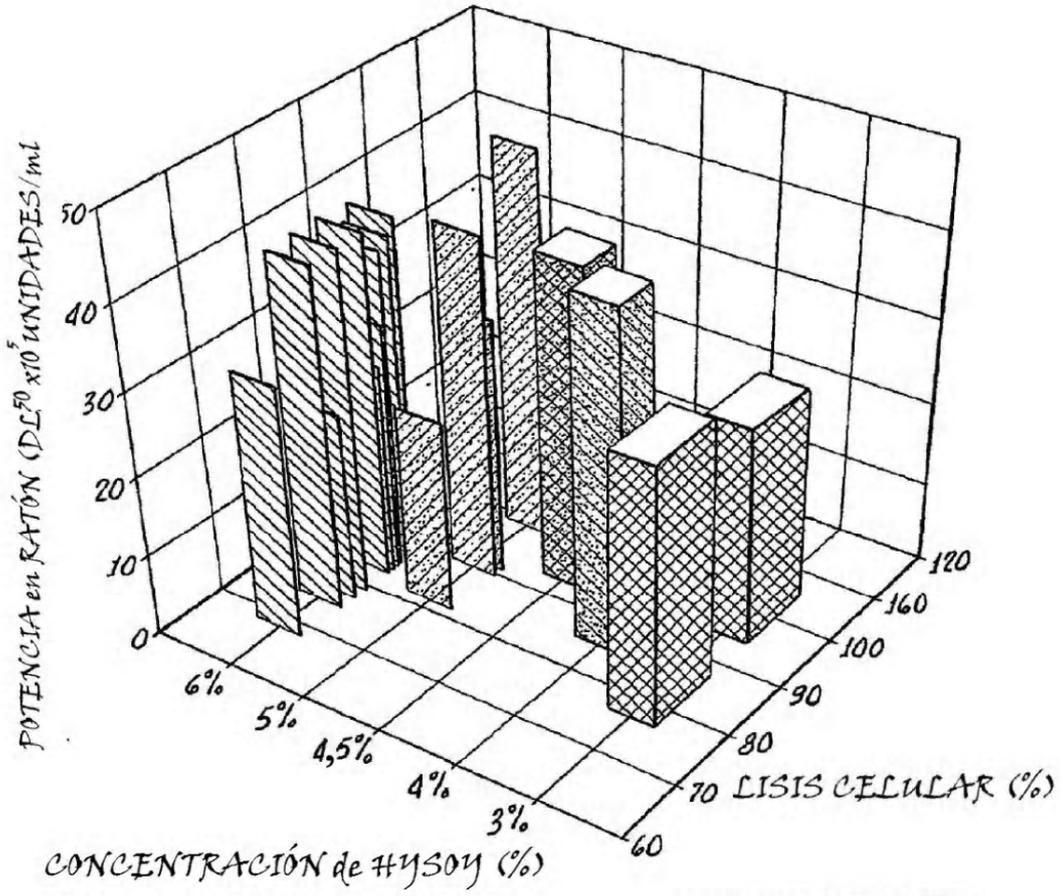


FIG. 8.

